

Ультравысокоэффективная хроматография со сверхкритическими флюидами — эффективный метод разделения структурно близких соединений

Основным направлением развития аналитической хроматографии в последние годы является совершенствование приборов и хроматографических колонок, позволяющих сокращать время анализа и добиваться большей разрешающей способности в разделениях сложных смесей. Недаром рубрика «Аналитический контроль» в нынешнем номере журнала берет в фокус жидкостную хроматографию именно в этом ракурсе — UHPLC-системы и колонки

О.И. Покровский,
ЗАО «ШАГ»

Этот подход безусловно оправдан, поскольку он способствовал осуществлению значительного прорыва в аналитической химии вообще и фармацевтическом анализе в частности. Разделение смесей, ранее недостижимое ввиду своей сложности и структурного сходства компонентов, сейчас осуществляется рутинно, как правило, без трудоемкой оптимизации хроматографических условий благодаря высокому качеству используемого оборудования и сорбентов. Однако вследствие такого сосредоточения на совершенствовании приборной базы из поля зрения практикующих хроматографистов нередко ускользают новейшие достижения методологического характера. Речь идет о различных способах повышения скорости и эффективности хроматографического анализа за счет управления свойствами подвижной фазы при прочих равных условиях. В данной статье речь пойдет об одном из таких достижений — аналитической сверхкритической флюидной хроматографии. Далее мы кратко напомним читателям журнала «Фармацевтическая отрасль», что такое сверхкритический флюид, дадим общее описание сверхкритической

флюидной хроматографии, рассмотрим несколько наиболее типичных областей применения этого хроматографического метода и в заключение представим новейшую разработку компании Waters Corp в данном направлении — первый в мире хроматограф класса УВЭЖХ (UHPLC), созданный специально для работы со сверхкритическими флюидами.

Сверхкритический флюид — особое состояние вещества, которое с учетом его свойств условно можно рассматривать как промежуточное между жидкостью и газом. В это состояние вещество переходит при сжатии его до определенного давления и нагреве до определенной температуры, которые являются индивидуальными для каждого химического вещества. Если поместить любое устойчивое химическое вещество в герметичный сосуд, нагреть и одновременно сжать так, что плотности его газообразной и жидкой фаз сравняются, то оно перейдет в сверхкритическое флюидное состояние. В нем уже невозможно расслоение на две фазы, а плотность и другие физико-химические характеристики среды могут изменяться от жидкоподобных до газоподобных не скачкообразно, а непрерывно и плавно, например, путем варьирования давления или тем-

пературы. С одной стороны, сверхкритический флюид, подобно газу, обладает высокой проникающей способностью, низкой вязкостью, легкой сжимаемостью и пренебрежимо малым межфазным натяжением, а с другой, подобно жидкости — сравнительно высокой плотностью и наличием растворяющей способности. Такое необычное сочетание свойств делает сверхкритические флюиды наиболее оптимальной средой для осуществления разнообразных транспортных химических процессов, в том числе сепарационных.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) — метод, родственная высокоэффективной жидкостной хроматографии, в котором в качестве подвижной фазы вместо жидкости используется смесь веществ, находящаяся в сверх- или субкритическом состоянии. В современной СФХ в качестве основного компонента подвижной фазы чаще всего используют сверхкритический диоксид углерода (СК-CO_2). Это негорючее, нетоксичное, химически устойчивое вещество с низкими критическими параметрами ($P_{\text{крит}} = 73$ атм, $T_{\text{крит}} = 31$ °C). СК-CO_2 является неполярным растворителем, его растворяющую способность условно можно сопоставить с таковой гексана и бензола [1]. В нормальных условиях это газ, поэтому после проведения разделения и сброса давления большая часть подвижной фазы сверхкритической флюидной хроматографии испаряется автоматически. Это обстоятельство значительно снижает остроту проблемы выделения очищенных аналитов из подвижной фазы в препаративном варианте СФХ.

В подавляющем большинстве случаев растворяющей способности чистого CO_2 недостаточно для проведения эффективного элюирования активных фармацевтических ингредиентов в СФХ, поэтому для целей фармации в СФХ используются смеси CO_2 с полярными растворителями, прежде всего низшими спиртами – метанолом, этанолом и изопропанолом, в несколько меньшей степени – с апротонными органическими растворителями. Сочетание низкой вязкости, высокой проникающей способности сверхкритического флюида и высоких коэффициентов диффузии растворенных в нем веществ приводит к тому, что многие разделения в СФХ удается проводить со скоростью в 3 – 5 раз большей, чем в ВЭЖХ на таких же сорбентах при умеренном перепаде давления через колонки. При этом эффективность разделения в СФХ часто выше, чем в аналогичных по селективности разделениях, проводимых с помощью ВЭЖХ. На рис. 1 приведено сопоставление кривых Ван-Деемтера, характерных для ВЭЖХ и СФХ. Поскольку коэффициенты диффузии аналитов в растворах сверхкритических флюидов выше, чем в жидкостях, то минимумы ВЭТТ (высота, эквивалентная теоретической тарел-

ке) в СФХ соответствуют большим линейным скоростям потока ($V \sim D_m$), а снижение эффективности при превышении скорости над оптимальным значением происходит гораздо более полого ($C \sim 1/D_m$) [2]. Это обуславливает целесообразность использования более высоких скоростей потока подвижной фазы в данном методе. Например, типичное значение объемной скорости потока в СФХ при использовании колонок длиной 100 мм, внутренним диаметром 3 мм, заполненных сорбентом с размером частиц 1,7 мкм, составляет 2,5 мл/мин. В ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии на таких же сорбентах редко используют скорости выше 0,6 мл/мин.

Развитие сверхкритической флюидной хроматографии происходило достаточно неравномерно. Первая работа по использованию сверхкритического флюида как подвижной фазы в хроматографии была опубликована в 1962 г. [3]. После первого взлета интереса в 60 – 70-е годы XX века произошло некоторое замедление развития СФХ, не в последнюю очередь связанное с неоправданно завышенными ожиданиями вариативности полярности сверхкритического диоксида углерода. На ранних этапах становления метода предполагалось, что при достаточно высоком давлении растворяющая способность SC-CO_2 будет сравнима с таковой для изопропанола [4], и когда эти надежды не оправдались, наступило некоторое разочарование. Затем, на волне наступления «хиральной эры» в фармации и появления необходимости проводить энантиомерные разделения многих сотен кандидатов в фармпрепараты, интерес к сверхкритической хроматографии возродился. На том этапе он был преимущественно связан с препаративным вариантом данной техники как более быстрой и более экономически привлекательной альтернативой хиральной преп-ВЭЖХ. Препаративные хиральные разделения – очень трудоемкая задача, и преимущества СФХ перед ВЭЖХ в скорости и производительности в этой области оказываются особенно актуальными. Аналитическая сверхкритическая хроматография при этом развивалась слабо, в основном ввиду отсутствия оборудования, которое бы соответствовало современным запро-



Рис. 2. Acuity UPC² – первая аналитическая сверхкритическая хроматографическая система класса UPLC

лось, что при достаточно высоком давлении растворяющая способность SC-CO_2 будет сравнима с таковой для изопропанола [4], и когда эти надежды не оправдались, наступило некоторое разочарование. Затем, на волне наступления «хиральной эры» в фармации и появления необходимости проводить энантиомерные разделения многих сотен кандидатов в фармпрепараты, интерес к сверхкритической хроматографии возродился. На том этапе он был преимущественно связан с препаративным вариантом данной техники как более быстрой и более экономически привлекательной альтернативой хиральной преп-ВЭЖХ. Препаративные хиральные разделения – очень трудоемкая задача, и преимущества СФХ перед ВЭЖХ в скорости и производительности в этой области оказываются особенно актуальными. Аналитическая сверхкритическая хроматография при этом развивалась слабо, в основном ввиду отсутствия оборудования, которое бы соответствовало современным запро-

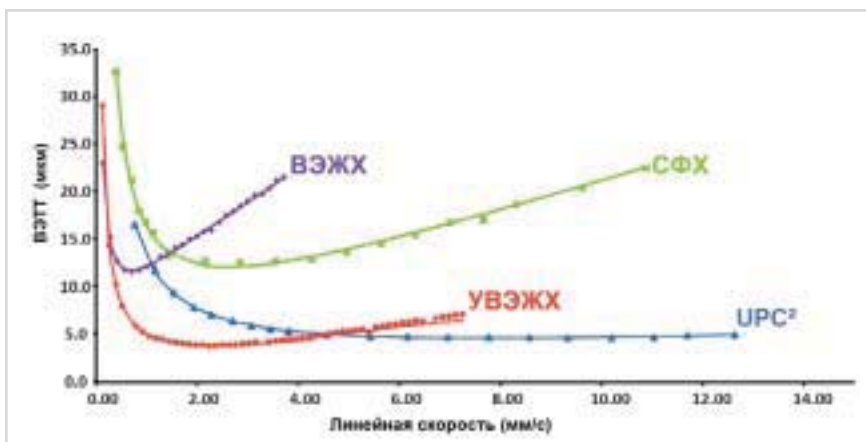


Рис. 1. Сопоставление кривых Ван-Деемтера (зависимостей высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока подвижной фазы) для ВЭЖХ и СФХ. Опыты для ВЭЖХ и СФХ проводились на сорбентах с зернением 5 мкм, для УВЭЖХ и УСФХ (UPC²) – на сорбентах с зернением 1,7 мкм

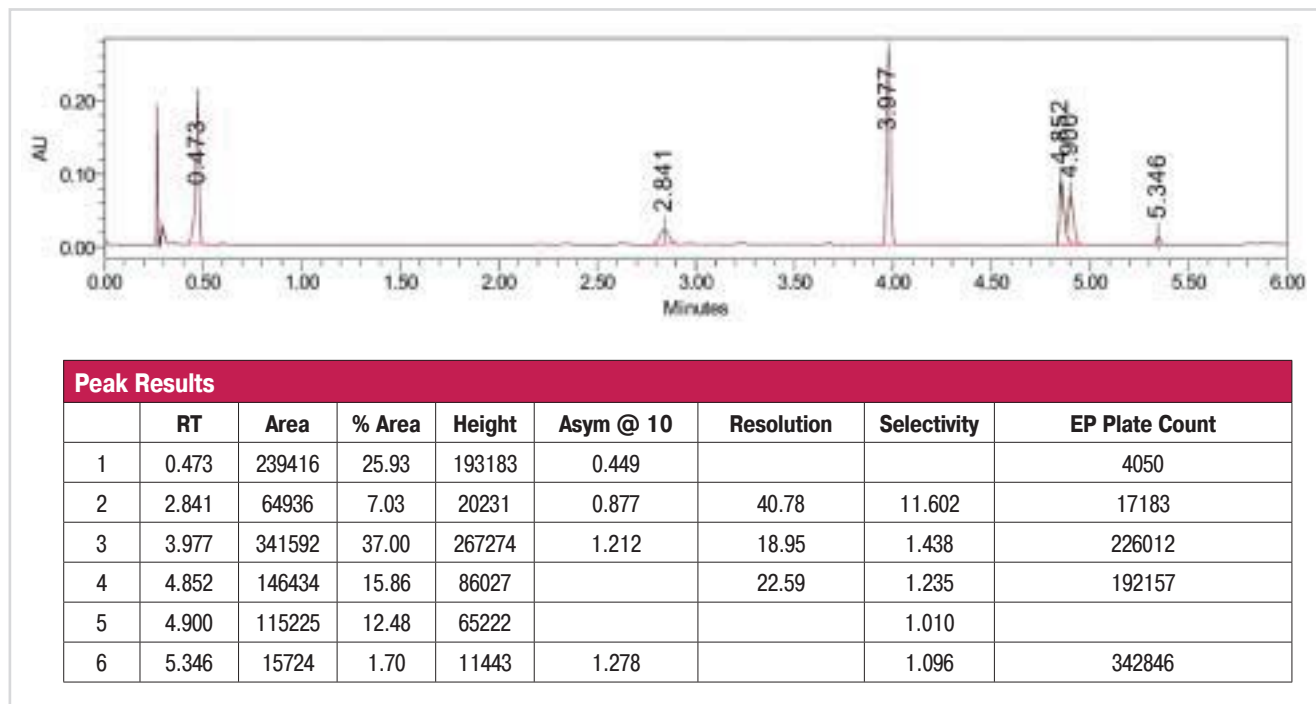


Рис. 3. Эффективность разделения в аналитической СФХ с Acquity UPC². Данные ЗАО «ШАГ»

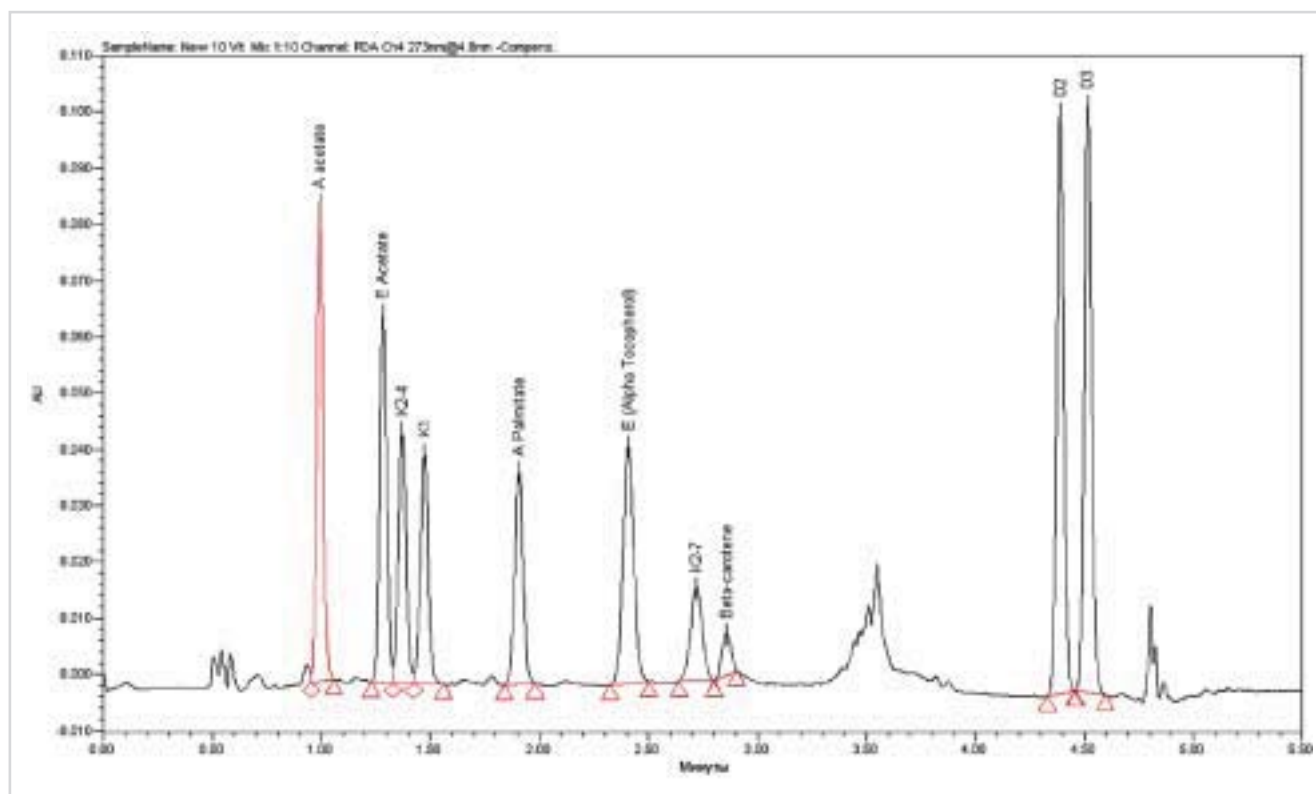


Рис. 4. Анализ жирорастворимых витаминов с помощью Acquity UPC². Данные Waters Corp.

сам хроматографистов-аналитиков. И лишь недавно, с приходом в эту сферу гигантов индустрии хроматографического

оборудования, наступил перелом данной тенденции.

В 2012 г. корпорация Waters выпустила на рынок новый при-

бор семейства Acquity – UPC² (Ultraperformance Convergence Chromatography) (рис. 2). Это единственная в мире аналити-

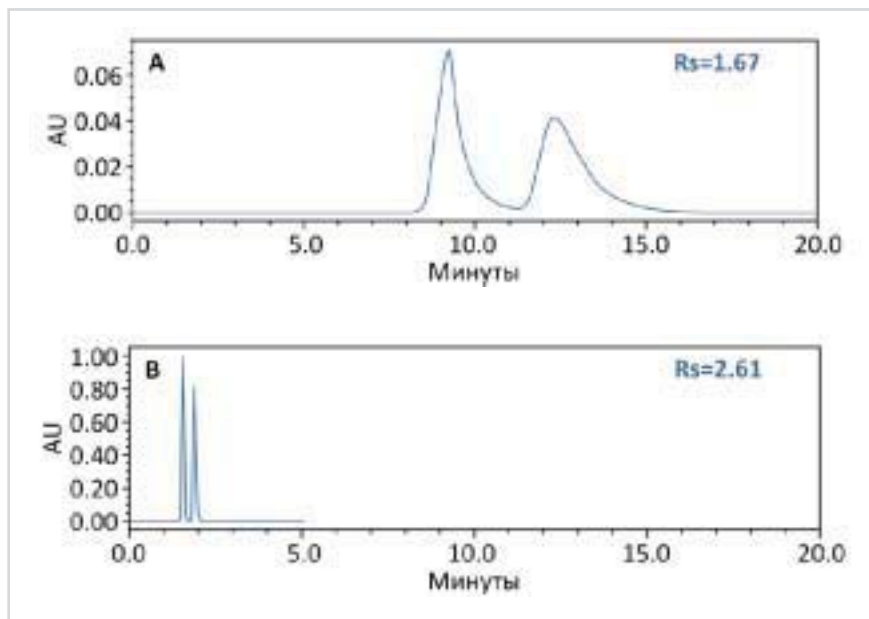


Рис. 5. Разделение энантимеров бинола с помощью А) ВЭЖХ, В) СФХ на Acquity UPC²

ческая хроматографическая система класса UPLC, специально созданная для работы со сверхкритическим диоксидом углерода в качестве основного компонента элюента. В данном приборе воплощены все достоинства оборудования для ультрапроизводительной хроматографии с суб-2-микронными сорбентами и представлены преимущества сверхкритической флюидной хроматографии.

Благодаря сочетанию преимуществ, предоставляемых суб-2-микронными сорбентами, и транспортных свойств сверхкритических флюидов, в СФХ можно добиваться высоких значений эффективности за короткое время удерживания. На рис. 3 приведен пример разделения смеси эпимеров синтетического простагландина мизопростол, в котором для некоторых компонентов смеси за 4 мин достигается эффективность разделения в 220 000 теоретических тарелок.

Благодаря появлению оборудования для СФХ, отвечающего современным требованиям к аналитической хроматографии, в настоящий момент происходит ренессанс нормально-фазовой (НФ) хроматографии в аналитической прак-

тике. В отличие от традиционной НФ-ВЭЖХ, основанной на использовании углеводородных и хлоруглеводородных растворителей, для СФХ не характерны трудности с низкой воспроизводимостью методик и длительностью выхода хроматографической системы на равновесие при смене условий. СФХ успешно применяют для анализа как полярных низкомолекулярных субстанций (например, в фармации), так и липофильных соединений – триглицеридов, терпеноидов, жирорастворимых витаминов и многих других классов химических соединений. На рис. 4 приведен пример анализа смеси жирорастворимых витаминов, позволяющий одновременно определять бета-каротин, витамины групп D, К и пр.

Учитывая возможность использования различных типов сорбентов, обладающих специфической селективностью, а также благодаря управляемой растворяющей способности сверхкритического флюида, СФХ отлично подходит для разделения смесей структурных изомеров, прежде всего энантиомеров, а также позиционных изомеров ароматических соединений, Z/E-изомеров и т.д. Пре-



Рис. 6. Acquity UPC² – золотой призер Pittcon 2012

имущества СФХ, связанные с большими линейными скоростями подвижной фазы, особо актуальны для таких разделений, поскольку близкие по химической структуре вещества обладают сходными сорбционными свойствами, набрать необходимую разницу в удержании между ними сложно, и, как правило, такие разделения занимают много времени. На рис. 5 приведено сравнение разделений энантиомеров бинола на одном и том же сорбенте в СФХ на UPC² и в ВЭЖХ по методике Фармакопеи США.

Все детекторы, используемые в ВЭЖХ, применимы и в сверхкритической хроматографии. Acquity UPC² может быть оснащен оптическим детектором и детектором светорассеяния. Кроме того, данная система совместима со всей линейкой масс-спектрометров компании Waters – от простых квадрупольных детекторов до тандемных масс-спектрометров, в том числе Xevo G2-S QToF и SYNAPT G2-S. Методы ионизации, при-

меняемые в СФХ, включают электроспрей, химическую и фотохимическую ионизацию.

Исторически в СФХ использовали те же сорбенты, что и в нормально-фазовой ВЭЖХ. В последнее время происходит интенсивное развитие сферы производства специальных сорбентов для сверхкритической хроматографии [5]. Помимо собственно нормально-фазовых в СФХ также возможно осуществление и иных режимов разделения – неводных HILIC-подобных [6], ион-парных [7] и даже ионообменных [8]. Интенсивно развивающаяся область СФХ – использование методов динамического модифицирования для разделения смесей полярных и ионогенных компонентов – позволяет существенно расширить область применимости данной хроматографической техники. Компания Waters выпускает четыре специализированных типа сорбентов для аналитической сверхкритической хроматографии: немодифицированный силикагель, изготавливаемый по технологии ВЕН (Bridged Ethylene Hybrid, гибридный органо-неорганический сорбент на основе силикагеля с этиленовыми мостиками [9]), силикагель с привитыми 2-этилпиридиновыми группами (ВЕН 2ЕР, один из самых популярных сорбентов в СФХ), сорбент на основе технологии СШ (Charged Surface Hybrid, гибридный сорбент на базе технологии ВЕН с дополнительными группами в структуре, несущими электрический заряд) с привитыми перфторфенильными группами (СШ FР) и силикагель особой прочности с привитыми октадецильными группами (HSS C₁₈). Такой набор различных по своей химической структуре сорбентов позволяет использовать большой спектр режимов разделения в СФХ, проводить ортогональные по селективности и порядку элюирования разделения в рамках одного метода, что обеспечивает эффективность начальной оптимизации метода разделения смесей веществ неизвестной природы.

Acquity UPC² – новое слово в аналитической хроматографии,

Литература

1. C. L. Phelps, N. G. Smart, C. M. Wai. Past, present, and possible future applications of supercritical fluid extraction technology. *J. Chem. Edu.*, 1996, 73, 1163.
2. G. Guiochon, A. Tarafder. Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 1037.
3. E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner. High pressure gas chromatography above critical temperatures. *J. Org. Chem.*, 1962, 27, 700.
4. J.C. Giddings, M.N. Myers, L. McLaren, R.A. Keller. High pressure gas chromatography of nonvolatile species. *Science*, 1968, 162, 67.
5. C.F. Poole. Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1250, 157.
6. C. West, S. Khater, E. Lesellier. Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1250, 182.
7. J. Zheng, L.T. Taylor, J.D. Pinkston. Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC. *Chromatographia*, 2006, 63, 267.
8. R. Pell, W. Lindner. Potential of chiral anion-exchangers operated in various subcritical fluid chromatography modes for resolution of chiral acids. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1245, 175.
9. K.D. Wyndham et al. Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6781.

это технология, позволяющая применять методы нормально-фазовой хроматографии на уровне, привычном для современного аналитика. Высочайший уровень данной разработки компании Waters был подтвержден жюри выставки инструментов для химического анализа Pittcon 2012, на которой Acquity UPC² был награжден золотой медалью (рис. 6).

ЗАО «ШАГ», являясь эксклюзивным дистрибьютором сверхкритического флюидного оборудования Waters на территории стран СНГ, осуществляет собственные разработки в сфере различных сверхкритических флюидных технологий, в том числе сверхкритической экстракции, хроматографии, формирования микро- и наноструктур и др. Мы издаем научный журнал о сверхкритических флюидах (<http://scf-tp.ru>), оказываем консультационные услуги по внедрению сверхкритических технологий в лабораторную и производственную практику, поставляем любое необходимое для этого оборудование, прово-

дим разработки методик под конкретные задачи. Если у вас возникли дополнительные вопросы по сверхкритической флюидной хроматографии или есть желание попробовать разделение ваших объектов на UPC², обращайтесь к нам. ■

Приглашаем вас посетить наш стенд на выставке «Аналитика-Экспо», 15 – 18 апреля 2014 г., Россия, Москва, КВЦ «Сокольники», павильон 4, 4.1, стенд В251.



Контактная информация:

ЗАО «ШАГ»
Россия, 119002, г. Москва,
Карманицкий пер., д. 9,
Арбат Бизнес Центр, офис 501А
Тел. +7 (495) 956-13-09
Факс: +7 (495) 956-13-10
irostovshikova@schag.ru
www.schag.ru, www.thar.ru

