

Ультрапроизводительная сверхкритическая флюидная хроматография – новое слово в аналитической работе

■ **О.И. Покровский**, руководитель службы технической и методической поддержки проектов отдела химических технологий ЗАО «ШАГ»

Хроматография – один из основных, наиболее развитых и часто используемых инструментов современной аналитической химии. В фармацевтических исследованиях аналитическая хроматография используется для качественного и количественного анализа сложных смесей химических веществ, контроля качества активных фармацевтических субстанций (АФС), исследований фармакокинетики препаратов и многих других задач. Главными требованиями к аналитической хроматографической технике являются воспроизводимость результатов, чувствительность анализа, универсальность, высокая производительность. В последние десятилетия хроматография бурно развивается по многим направлениям, разрабатываются новые техники и приемы, находят новые сферы применения. Уже существующие решения, которые еще недавно были исключительно предметом интереса хроматографистов-исследователей, становятся рутинными и общепринятыми. В этой статье речь пойдет об одной из таких хроматографических техник, приобретающих в последнее время особое значение – сверхкритической флюидной хроматографии.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – ближайший родственник высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), с той разницей, что в ней основным компонентом подвижной фазы является не жидкость, а сверхкритический флюид (СКФ). Свойства вещества в этом состоянии являются как бы промежуточными между свойствами газа и жидкости. С одной стороны, сверхкритические флюиды, подобно жидкостям, обладают растворяющей способностью и сравнительно высокой плотностью. С другой стороны, подобно газам, сверхкритические флюиды обладают низкой вязкостью и, как следствие, низким вязкостным трением. К газоподобным свойствам СКФ относятся также высокие коэффициенты диффузии веществ в них, отсутствие поверхностного натяжения, легкая сжимаемость. Плотностью сверхкритического флюида, а, следовательно, и его растворяющей способностью, легко управлять, контролируя температуру и давление.

Поэтому подавляющее большинство современных приложений сверхкритических флюидных технологий (СКФТ) реализуются с использованием углекислого газа, диоксида углерода (CO₂). Это негорючее, нетоксичное, химически инертное вещество с низкими критическими параметрами (P_{крит} = 74 атм, T_{крит} = 31°C). По сравнению с большинством органических растворителей CO₂ очень дешев и легко доступен, так как является побочным отходом большого числа крупнотоннажных промышленных процессов, от переработки природного газа до получения биотоплива.

На страницах журнала «Фармацевтические технологии и упаковка» неоднократно рассказывалось о различных приложениях сверхкритических флюидных технологий (СКФТ) в фармацевтике и сопряженных областях (Фармацевтические технологии и упаковка, №№ 2, 4, 5, 2010 г.). Одной из сфер приложения, в которых сверхкритические флюиды достигли наибольшего распространения, является сверхкритическая флюидная хроматография. Если в качестве подвижной фазы в хроматографической системе взять сверхкритический флюид вместо жидкости, то благодаря более низким вязкостям и более высоким коэффициентам диффузии разделения сравнимой се-

лективности и эффективности можно достичь за время в 3–5 раз меньшее, чем в ВЭЖХ.

Еще одним важным преимуществом СФХ перед родственными техниками является ее экономическая привлекательность. Как уже упоминалось, CO₂ – очень дешевый растворитель. Для подавляющего большинства приложенных подходов пищевой диоксид углерода (99.8%), средняя стоимость которого – 4–5 руб. за килограмм. К тому же, легкость регенерации и повторного использования позволяет дополнительно снизить расходы на растворители. Но кроме этого, при применении СФХ в препаративной практике резко падает стоимость очистки выделенного препарата от остатков растворителей и различных побочных примесей. В составе подвижной фазы в сверхкритической флюидной хроматографии не используются неорганические соли, отделение которых от продукта представляет наибольшую сложность, основной же компонент растворителя, CO₂, и вовсе испаряется сразу после выделения целевой фракции при сбросе давления.

Приведенные особенности послужили тому, что в настоящее время СФХ сильно потеснила ВЭЖХ в сфере препаративной очистки. Особенно ярко это проявляется в области разделения энантиомеров оптически активных веществ. Подавляющее большинство современных синтетических лекарственных средств хиральны. Известно, что разные энантиомеры одного и того же хирального соединения могут обладать очень разной биологической активностью. Нередко только один из энантиомеров препарата обладает нужной терапевтической активностью, в то время как второй вызывает недопустимые побочные эффекты. Поэтому хиральная очистка фармсубстанций и контроль их энантиомерной чистоты – важная задача современной фармацевтики, и хроматография – основной способ ее решения. Но такие разделения очень трудоемки и дороги. В первую очередь, энантиомеры одного соединения – очень близкие по своим свойствам вещества, получить хроматографическую селективность между которыми сложно. Зачастую этого удается добиться лишь экстенсивными способами, например увеличением числа элюирований одной и той же смеси через колонку (техники типа SMB, SSR и т.п.).

Во-вторых, для проведения хиральных разделений необходимо использовать сорбенты с хиральными присадками, стоимость которых в несколько раз выше стоимости обычных хроматографических сорбентов. В таком случае вышеизложенные преимущества СФХ перед иными методами, связанные со скоростью и стоимостью препаративных разделений, становятся решающими. Все лидеры мировой фармацевтической промышленности – Merck, Pfizer, AstraZeneca, Novartis, OSI Pharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, GlaxoSmithKline, Amgen, Hoffmann-LaRoche, Johnson & Johnson и другие – используют препаративную СФХ для проведения хиральной и нехиральной очистки синтезируемых фармсубстанций.

В то же время до недавнего момента применение СФХ в аналитической хроматографии было не очень распространено. Это было обусловлено отсутствием серийно производимого оборудования для СФХ, отвечающего требованиям XXI века к аналитическому хроматографическому инструменту. При проведении клинических исследований, изучении фармакокинетики фармпрепаратов, решении современных протеомических и метаболических задач и т.п. чрезвычайно важны воспроизводимость результатов, чувствительность, универсальность метода анализа, его высокая производительность и по возможности низкая стоимость. И хотя привлекательность СФХ по двум последним пунктам давно стали очевидными, в среде хроматографистов долго оставались предубеждения в отношении широты спектра задач, решаемых с помощью этого метода. Исторически СФХ развивалась лишь как нормально-фазовая техника и применялась для разделения смесей неполярных и слабополярных соединений.

В силу этой искусственной ограниченности производители хроматографического оборудования не стремились вкладывать средства в разработку аналитического оборудования для СФХ, обеспечивающего высокую чувствительность анализа и воспроизводимость результатов. Однако за последние годы для сверхкритической флюидной хроматографии было разработано большое количество различных приемов, в основном связанных с созданием специальных сорбентов либо динамическим модифицированием, которые существенно расширили сферу применимости этого метода. Использование таких режимов элюирования, как HILIC, ион-парный и даже ионообменный позволяет проводить разделение полярных и даже ионогенных органических соединений. Столь многообещающее развитие закономерно привело к формированию интереса к применению СФХ в аналитической практике, для чего необходимо было освоить выпуск соответствующих инструментов.

В 2011 году компания Waters Corp. представила первый в мире прибор, разработанный специально для аналитической сверхкритической флюидной хроматографии – Acquity UPSFC (рис. 1).



Рис. 1. Acquity UPSFC – первый в мире аналитический хроматограф класса UPLC, специально разработанный для сверхкритической флюидной хроматографии

Компания ЗАО «ШАГ» является эксклюзивным дистрибьютером в России и странах СНГ широкого спектра сверхкритического флюидного оборудования, производимого компаниями Waters и Thar Process, Inc. Компания ЗАО «ШАГ» поставляет многофункциональное оборудование от лабораторных установок до пилотных и промышленных систем.

TharProcess

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

КОП
СЕРТИФИЦИРОВАННОЕ
ОБОРУДОВАНИЕ

ЗАО «ШАГ»
119002, г. Москва, Карманинский пер., д. 9
«Арбат Бизнес Центр», офис 501А
т. +7 (495) 956-13-09, ф. +7 (495) 956-13-10

/www.schag.ru/



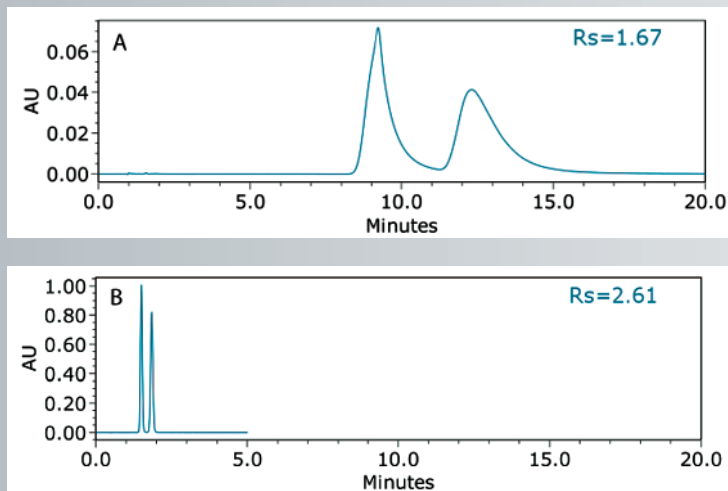


Рис. 2. Разделение энантимеров бинола с помощью: 1) ВЭЖХ, 2) СФХ на Acquity UPSFC

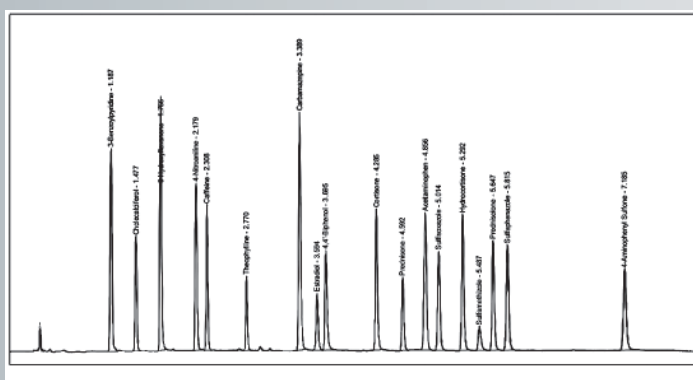


Рис. 3. Воспроизводимость результатов при использовании Acquity UPSFC. Наложение 6 инъекций

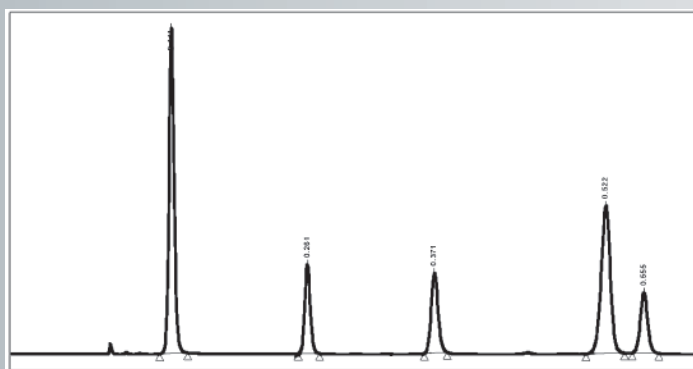


Рис. 4. Сверхбыстрое разделение при использовании СФХ (Acquity UPSFC) и суб-2-микронных сорбентов (Viridis Hybrid 1.7 мкм 50x3 мм). Общее время анализа 5-компонентной смеси – 36 секунд

Acquity UPSFC Manager позволяет осуществлять беспрецедентный по стабильности контроль потока, не дающего практически никакого вклада в уровень шума. Автосамплер и оптические детекторы, традиционно используемые в приборах семейства Acquity, модифицированы таким образом чтобы обеспечивать максимальную чувствительность и воспроизводимость результатов в условиях СФХ. Наиболее универсальным и информативным методом детектирования в современной хроматографии является масс-спектрометрия. **Acquity UPSFC** совместим с различными масс-спектрометрами **Waters** (SQD, TQD, в перспективе – вся линейка масс-спектрометрического оборудования **Waters** вплоть до всего семейства приборов **Zevo**). Эти и ряд иных технических особенностей данного прибора дают хроматографистам возможность реализовывать все преимущества сверхкритической флюидной хроматографии в аналитической работе на уровне, характерном для передовых систем класса **UPLC**. Такая техника получила название ультрапроизводительная сверхкритическая флюидная хроматография (УСФХ, UPSFC).

На рисунке 2 приведено сравнение двух разделений энантимеров бинола, выполненных на одной и той же хиральной колонке с помощью стандартной методики, предписываемой фармакопеей США и с помощью **СФХ** на приборе **Acquity UPSFC**.

Как видно, при переходе с **ВЭЖХ** на **УСФХ** при использовании того же сорбента разделение с большим разрешением достигается за время в 9 раз меньше. Стоимость растворителей, израсходованных на проведение одного такого анализа в случае **ВЭЖХ** равна 85 рублям, в случае **УСФХ** – 3 рублям.

В качестве иллюстрации воспроизводимости результатов, получаемых на **Acquity UPSFC**, на рисунке 3 приведен результат наложения хроматограмм 6 последовательных инъекций одного и того же объекта.

Максимальное среднеквадратичное отклонение времен удерживания равно 0.4% в данном опыте. Следует отметить, что такая воспроизводимость достигается при элюировании в градиентном режиме, с варьированием содержания соразтворителя (метанола) в подвижной фазе с 2% до 16% за 7 минут.

Если преимущества в скорости анализа, обеспечиваемые использованием сверхкритических флюидов, объединяются с преимуществами, связанными с использованием суб-2-микронных сорбентов, то разделение анализируемых смесей зачастую происходит быстрее, чем ввод образца в хроматографический тракт. На рисунке 4 приведен пример такого рода. Полное разделение исследуемой смеси в данном случае достигается всего за 36 секунд.

С появлением такого оборудования в развитии сверхкритической флюидной хроматографии по сути началась новая эпоха. Отныне преимущества этой быстрой, экономически и экологически привлекательной хроматографической техники полностью реализуемы в аналитической работе на самом современном уровне. Подобно тому, как некоторое время назад **СФХ** серьезно потеснила **ВЭЖХ** в сфере препаративной очистки и привела к перерождению нормально-фазовой хроматографии, ныне **УСФХ** занимает свое место в области аналитической хроматографии, постепенно становясь одним из общепринятых высокопроизводительных инструментов химического анализа.

Это новый член хорошо известного семейства приборов **Acquity**, в котором сочетаются все технические достижения технологии **UPLC** и ряд уникальных инженерных решений, обеспечивающих недостижимый ранее контроль за поведением подвижной фазы на основе сверхкритического флюида. Совместная работа системы насосов **BSM**, нагнетающей потока сверхкритического CO_2 и жидкого соразтворителя, и системы контроля давления на всем протяжении хроматографического пути