

## SUB/SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRRAFIE PRO ANALÝZU CHIRÁLNÍCH SLOUČENIN

*Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii*

**KVĚTA KALÍKOVÁ, DENISA FOLPRECHTOVÁ  
a ZUZANA KADLECOVÁ**

*Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 128 00 Praha 2  
kalikova@natur.cuni.cz*

Došlo 30.12.21, přijato 10.1.22.

**Klíčová slova:** sub/superkritická fluidní chromatografie, enantiomer, chirální stacionární fáze, enantioselektivita, separace

● <https://doi.org/10.54779/chl20220146>

### Obsah

1. Úvod
2. Sub/superkritická fluidní chromatografie
  - 2.1. Mobilní fáze pro separace chirálních sloučenin
  - 2.2. Chirální stacionární fáze
  - 2.3. Ovlivnění enantioselektivity kombinací chirálních selektorů
  - 2.4. Metody pro chirální screening
3. Závěr

### 1. Úvod

Chiralita je přirozenou vlastností živé hmoty, velká část přírodních sloučenin, včetně těch obsažených v živých organismech, je chirálních<sup>1–4</sup>. Chirální sloučeniny se vyskytují ve formě enantiomerů. Pojmem enantiomery se označují dvojice molekul, které jsou svými zrcadlovými obrazy<sup>5,6</sup>. V chirálním prostředí mohou jednotlivé enantiomery dané sloučeniny vykazovat různé chemické nebo fyzikální vlastnosti v důsledku rozdílného prostorového uspořádání, a tím poskytovat odlišné stereoselektivní interakce<sup>7</sup>. Rozdílné účinky enantiomerů biologicky aktivních látek v živých organismech jsou obecně známé<sup>8</sup>. Velká pozornost je věnována zejména odlišnému chování enantiomerů léčiv, pesticidů, nových psychoaktivních sloučenin (NPS) a jejich metabolitů<sup>9–18</sup>. V literatuře se uvádí, že v současné době je přibližně 60 % syntetických léčiv používaných v klinické praxi chirálních, přičemž 88 % z nich se používá ve formě racemátů<sup>19</sup>. V případě pesticidních přípravků je na trhu 43 % chirálních pesticidů, z toho 47 % se aplikuje jako racemát<sup>20</sup>. Vzhledem k tomu, že se farmakologické a toxické účinky jednotlivých enantiomerů léčiv, NPS a jejich metabolitů mohou výrazně lišit, je nezbytné vyvíjet metody pro jejich separace, které umožní studium účinků jednotlivých forem a kontrolu enantiomerní čistoty<sup>16,18,21,22</sup>. Rovněž toxicita, bioakumulace a rychlost degradace jednotlivých enantiomerů (např. používaných pesticidů) může být v životním prostředí odlišná<sup>23,24</sup>.

Chromatografické metody, konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie s chirálními stacionárními fázemi, patří mezi nejčastěji používané metody pro separace



**Doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.** absolvovala v roce 2005 magisterské studium oboru Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. V rámci diplomové práce, kterou vypracovala na katedře fyzikální a makromolekulární chemie pod vedením prof. Evy Tesařové se začala podrobně zabývat charakterizací enantioselektivních chromatografických systémů, konkrétně v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V roce 2009 dokončila doktorské studium v oboru fyzikální chemie na PŘF UK, Praha. V rámci dizertační práce se, opět pod vedením prof. Evy Tesařové, zabývala podrobnou charakterizací chirálních i achirálních separačních systémů kapalinové chromatografie z teoretického i praktického hlediska. V roce 2014 získala cenu děkana pro mladého vědeckopedagogického pracovníka na PŘF UK, Praha. V současné době působí jako docentka fyzikální chemie a vedoucí chromatografické skupiny na katedře fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK, Praha. Je školitelkou a konzultantkou bakalářských, diplomových a dizertačních prací s chromatografickou tematikou. Hlavní oblasti jejího vědeckého zájmu jsou nadále teoretické i aplikační aspekty chirálních i achirálních chromatografických systémů v uspořádání kapalinové a sub/superkritické fluidní chromatografie. Je autorkou/spoluautorkou 70 publikací v mezinárodních impaktovaných odborných časopisech. Inspiraci pro další vědecké směřování získává aktivním odpočinkem se synem a partnerem v přírodě.

a stanovení enantiomerů, a to v analytickém, semipreparativním i preparativním měřítku, v akademickém prostředí i v průmyslu<sup>9,11</sup>. Nicméně, z důvodu požadavků na vývoj rychlých, účinných a robustních metod s nižší ekologickou zátěží se v tomto směru dostává do popředí sub/supercritická fluidní chromatografie (SFC)<sup>25–27</sup>.

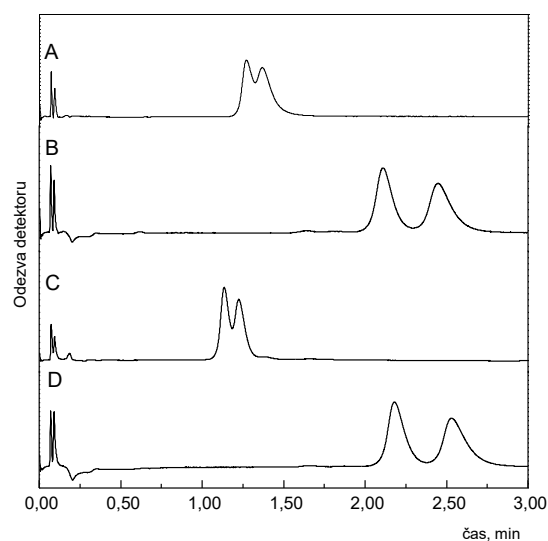
## 2. Sub/supercritická fluidní chromatografie

V klasické superkritické fluidní chromatografii byla jako mobilní fáze používána tekutina v superkritickém stavu, a to především fluorované uhlovodíky, amoniak a oxid uhličitý<sup>28</sup>. Dnes se používá výhradně oxid uhličitý, neboť a) kritických hodnot teploty ( $T_c=304,12$  K) a tlaku ( $p_c=7,38$  MPa)<sup>29</sup> CO<sub>2</sub> lze s dnešní instrumentací snadno dosáhnout, b) je relativně levný (vedlejší produkt v mnoha průmyslových odvětvích) a je možné jej recyklovat – zejména při použití v preparativním měřítku, c) je nehořlavý, nekorozivní a vykazuje nízkou toxicitu, d) je mísitelný s řadou organických rozpouštědel<sup>30–32</sup>. Zatímco v rané fázi vývoje této techniky se jako mobilní fáze používala převážně jedna čistá tekutina v superkritickém stavu, v moderní SFC se většinou používají mobilní fáze složené ze stlačeného oxidu uhličitého a organického modifikátoru, jako je methanol (MeOH), ethanol (EtOH), propan-2-ol (PropOH) apod. Takto tvořené mobilní fáze často nejsou superkritické tekutiny, přestože tlak může být nad kritickým tlakem, teplota je velmi často pod hodnotou kritické teploty<sup>33</sup>. Organické modifikátory se do těchto mobilních fází přidávají za účelem zvýšení rozpouštěcí schopnosti mobilní fáze a změny polarit a tím zvýšení eluční síly mobilní fáze. Pokud hlavní složkou mobilní fáze zůstává stlačený oxid uhličitý, označuje se tato metoda jako sub/supercritická fluidní chromatografie<sup>34,35</sup>. Aplikace subkritických mobilních fází nezpůsobuje žádné významné problémy během chromatografických analýz, protože výhody poskytované superkritickou mobilní fází zůstávají<sup>36,37</sup>, tj. nižší viskozita a vysoká difuzivita mobilní fáze ve srovnání s viskozitou mobilních fází používaných v kapalinové chromatografii, a z toho plynoucí možnost použití vysokých průtoků mobilní fáze<sup>32</sup>. Toto uspořádání tudíž poskytuje rychlé a účinné separace.

### 2.1. Mobilní fáze pro separace chirálních sloučenin

Jak již bylo zmíněno výše, hlavní složkou mobilní fáze v SFC je stlačený oxid uhličitý. Za účelem zvýšení polarit a eluční síly se k oxidu uhličitému přidávají různé organické modifikátory. V SFC se množství organického modifikátoru v mobilní fázi pohybuje mezi 2 a 40 obj.%. Pro počáteční screening mobilních fází se velmi často používá gradientová eluce se zvyšujícím se množstvím organického modifikátoru, zatímco pro následnou optimalizaci a dosažení žádoucího rozlišení enantiomerů je preferována izokratická eluce<sup>27</sup>. Alifatické alkoholy, jako je MeOH, EtOH a PropOH, patří mezi nejběžnější organické modifikátory v chirální SFC<sup>38</sup>. MeOH je z těchto modifikátorů používán nejčastěji<sup>39–42</sup>, protože vykazuje nejvyšší eluční

sílu, s čímž souvisí i vyšší účinnost daná počtem teoretických pater, a zároveň nízkou viskozitou<sup>43,44</sup>. Také polarita MeOH je výhodou zejména pro analýzy polárnějších sloučenin, kdy MeOH zvyšuje jejich rozpustnost v mobilní fázi. Změna organického modifikátoru v mobilní fázi může vést až ke změně elučního pořadí jednotlivých enantiomerů. Tento jev byl popsán na polysacharidových chirálních stacionárních fázích<sup>45,46</sup>. Acetonitril, jako aprotické rozpouštědlo, se používá v malém množství pro ovlivnění enantioselektivity, nejčastěji ve směsi s MeOH nebo také s PropOH (cit.<sup>47,48</sup>). Skupina prof. Armstronga ukázala výhody použití azeotropní směsi EtOH a vody jako organického modifikátoru v porovnání s čistým MeOH a EtOH při použití polárních chirálních stacionárních fází (CSF)<sup>49</sup>. Kromě CO<sub>2</sub> a polárních rozpouštědel se do mobilní fáze přidávají kyselá (např. mravenčí, octová nebo trifluoroctová (TFA) kyselina), bazická (např. triethylamin, diethylamin (DEA), isopropylamin, ethanolamin) nebo směsná (kombinace kyselých a bazických aditiv) aditiva. Tato aditiva ovlivňují nejen polaritu mobilní fáze, ale i disociaci či protonizaci ionizovatelných chirálních analytů a funkčních skupin CSF, a tím výrazně zlepšují separační účinnost, rozlišení enantiomerů a symetrii pík<sup>21,50</sup>. Vliv typu aditiva a jeho množství v mobilní fázi na separaci enantiomerů  $\beta$ -blokátoru propranololu na NicoShell koloně je ukázán na obr. 1. Směsná aditiva se, v rámci úspory času, velmi často využívají pro screeningové účely<sup>22,44</sup>. Další



Obr. 1. Znárodnění vlivu typu a množství aditiv v mobilní fázi na separaci enantiomerů propranololu. Chromatografické podmínky: kolona NicoShell s povrchově porézními částicemi (50×2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu$ m), mobilní fáze: A: CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA 90/10/0,1 (v/v/v), B: CO<sub>2</sub>/MeOH/DEA 90/10/0,1 (v/v/v), C: CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA/DEA 90/10/0,05/0,05 (v/v/v/v), D: CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA/DEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v), průtoková rychlost 2 ml min<sup>-1</sup>, teplota kolony 40 °C, regulátor zpětného tlaku 2000 psi, UV detekce 254 nm. Kalíková a spol. nepublikovaná data.

možností je využití vody jako aditiva, což se ukázalo výhodné zejména při separaci chirálních polárních analytů na hydrofilních CSF z hlediska zvýšení účinnosti a snížení doby analýzy<sup>51–53</sup>.

## 2.2. Chirální stacionární fáze

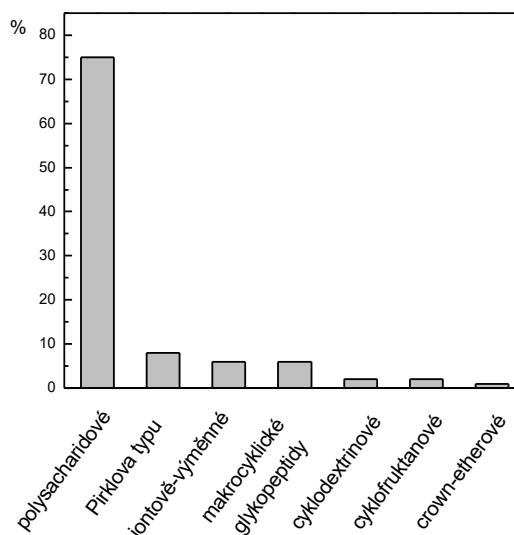
Výběr vhodné CSF je klíčovým parametrem pro úspěšnou separaci enantiomerů nejen v SFC. Většinu chirálních kolon vyvinutých pro kapalinovou chromatografii je možné použít i v SFC. V současné době jsou na trhu dostupné chirální kolony určené pro použití jak v obou chromatografických technikách, tak i přímo určené pro použití v SFC (cit.<sup>45,54</sup>). Protože neexistuje žádný univerzální chirální selektor, který by byl schopen separovat enantiomery všech chirálních látek, vývoj nových CSF stále probíhá v akademické i komerční sféře. Chirální stacionární fáze na bázi derivatizovaných polysacharidů, konkrétně derivatizované celulosy a amylosy<sup>25,27,48,50,55</sup>, patří mezi nejčastěji používané pro jejich enantioselektivitu pro široké spektrum strukturně odlišných chirálních sloučenin<sup>56</sup>. O vývoji, typech, vlastnostech a také mechanismu enantiodiskriminace těchto typů chirálních selektorů pojednává několik přehledových článků<sup>56–59</sup>. Mezi další chirální fáze, které našly uplatnění v SFC, patří CSF Pirklova typu, iontově-výměnné zahrnující CSF na bázi chininu a dalších chinolinových alkaloidů<sup>60,61</sup>, a CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů<sup>42</sup>, tj. vankomycinu, teikoplaninu, teikoplanin-aglykonu a derivatizovaného glykopeptidu (chirální kolona NicoShell). První SFC separace enantiomerů, konkrétně pěti chirálních fosfin oxidů, byla úspěšně provedena v roce 1985 na chirální stacionární fázi Pirklova typu<sup>27,37</sup>. Zřídka používané jsou cykloextrinové, cyklofruktanové a crown-etherové CSF. Tento trend v posledních pěti letech je zdokumentován na obr. 2.

Narůstající požadavky na rutinní využití rychlých a účinných metod nejen pro separace chirálních sloučenin vedly k vývoji vysokotlakých chromatografických systémů a jejich následnému uvedení na trh<sup>62</sup>. S vývojem robustních přístrojů pro ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografii (UHPSFC) úzce souvisí i výzkum v oblasti vhodných CSF, pro zajištění co nejvyšší účinnosti a rychlosti analýz.

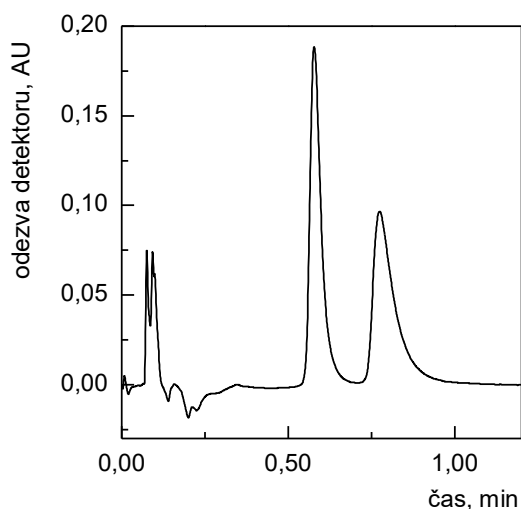
Jednou z možností je využití plně porézních částic o průměru menším než 2  $\mu\text{m}$  (cit.<sup>63</sup>). Zatímco achirální stacionární fáze s takovými částicemi byly dostupné před více než deseti lety a dnes jsou již dobře zavedené, v případě CSF je vývoj v tomto směru komplikovanější<sup>1</sup>. Důležitým posunem v oblasti chirálních kolon byl vývoj (a následné uvedení na trh v roce 2014) CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů s částicemi o průměru 2,5  $\mu\text{m}$  firmou Waters<sup>1</sup>. Do té doby nebyly polysacharidové CSF s plně porézními částicemi menšími než 3  $\mu\text{m}$  dostupné<sup>1,64</sup>. Později byly uvedeny na trh polysacharidové CSF s částicemi o průměru 1,6  $\mu\text{m}$ , jejichž použití v SFC bylo publikováno až v roce 2017 (cit.<sup>65</sup>). Komerčně dostupnou CSF s částicemi o průměru 1,8  $\mu\text{m}$  testovanou v SFC je také fáze Pirklova typu, konkrétně kolona WhelkOI (cit.<sup>66</sup>).

Přestože existují komerční chirální kolony s plně porézními částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  a vnitřním průměrem 2,1 mm, jejich aktuální využití v SFC, resp. v UHPSFC je podstatně menší než v technice ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Na komerčně dostupných SFC přístrojích zatím není možné plně využít potenciál těchto vysoce účinných kolon s malým vnitřním rozměrem z důvodu významných mimokolonových příspěvků k rozšiřování piků, a tudíž nižší separační účinnosti<sup>53,65–67</sup>. V literatuře jsou popsány různé laboratorní úpravy komerčních přístrojů (např. použití kratších a užších kapilár, menší cely detektoru apod.), které jsou lépe kompatibilní s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$  (cit.<sup>53</sup>).

Dalším významným směrem v oblasti vývoje CSF je využití povrchově porézních částic (SPP – „superficially porous particles“, označované velmi často také jako „core-shell“ částice, tj. částice s pevným jádrem a pórovitou vnější vrstvou). Výhody těchto částic oproti plně porézním sorbentům jsou diskutovány v mnoha odborných publikacích, např. cit.<sup>42,68</sup>. Avšak i v případě použití chirálních kolon s povrchově porézními částicemi s malými rozměry dochází k negativnímu vlivu mimokolonových příspěvků na tvar piků, jak již bylo popsáno u CSF s plně porézními částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . V současné době jsou komerčně dostupné chirální kolony na bázi makrocyclických glykopeptidů, cyklofruktanu, cykloextrinu a chininu využívající SPP sorbenty o velikosti 2,7  $\mu\text{m}$ . Příklad separace enantiomerů diuretika chlortalidonu během jedné minuty na teikoplaninové CSF s povrchově porézními částicemi o velikosti 2,7  $\mu\text{m}$  (TeicoShell kolona) je ukázán na obr. 3.



Obr. 2. Procentuální zastoupení různých typů chirálních stacionárních fází v SFC v odborných člancích publikovaných v letech 2017–2021. Vyhledávání na Web of Science, v grafu je zahrnuto 189 aplikací zmiňovaných v 164 člancích.



Obr. 3. Chromatogram směsi enantiomerů chlortalidonu na teikoplaninové chirální stacionární fázi. Chromatografické podmínky: kolona TeicoShell s povrchově porézními částicemi (50×2,1 mm, velikost částic 2,7 μm), mobilní fáze: CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA/DEA 75/25/0,05/0,05 (v/v/v/v), průtoková rychlost 2 ml min<sup>-1</sup>, teplota kolony 40 °C, regulátor zpětného tlaku 2000 psi, UV detekce 220 nm. Kalíková a spol. nepublikovaná data.

### 2.3. Ovlivnění enantioselektivity kombinací chirálních selektorů

Jak již bylo zmíněno výše, neexistuje žádný univerzální chirální selektor, který by vykazoval enantioselektivitu pro všechny chirální sloučeniny. Jednou z možností, jak rozšířit enantioselektivitu a ovlivnit separační potenciál v SFC, je sériové zapojení dvou, případně více chirálních kolon<sup>1,69,70</sup>. Tento postup je možné využít při použití SFC mobilních fází, které vykazují nízkou viskozitu a nedochází tak k vysokému nárůstu tlaku v systému v porovnání s kapalinovou chromatografií<sup>71</sup>. V případě UHPLC není takové spojení kolon doporučeno z důvodu nutnosti výrazného snížení průtoku mobilní fáze, které vede ke snížení separační účinnosti a prodloužení doby analýzy. Vhodná kombinace různých typů CSF může zlepšit rozlišení jednotlivých enantiomerů, avšak sériově zapojené kolony musí být vzájemně komplementární, tzn. vykazovat odlišnou, ale komplementární (doplňkovou) enantioselektivitu. V případě, že daná CSF za daných chromatografických podmínek neposkytuje požadované rozlišení enantiomerů, použití komplementární CSF vede k požadovanému rozlišení enantiomerů za stejných chromatografických podmínek. Pokud tuto vlastnost nevykazují, může po zapojení takových kolon docházet k úplné ztrátě rozlišení enantiomerů<sup>72</sup>. Důležitým parametrem pro zvýšení enantioselektivity a rozlišení jednotlivých enantiomerů je také pořadí chirálních kolon zapojených v sérii<sup>73</sup>. Při sériovém zapojení dvou chirálních kolon s různými chirálními selektory zaujímá hlavní roli pro separaci enantiomerů druhá kolona

zapojená v sérii<sup>69</sup>. První kolona zapojená v sérii pracuje při vyšším tlaku, tedy vyšší hustotě mobilní fáze, a tím tato kolona vykazuje nižší příspěvek k celkové enantioselektivě systému. Využívá se tedy takové zapojení, kdy druhá kolona v sérii poskytuje za daných separačních podmínek vyšší rozlišení enantiomerů. Publikované práce zabývající se touto problematikou jsou zaměřené zejména na sériové zapojení různých CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů<sup>70–74</sup>, u kterých je známá jejich komplementární enantioselektivita, ale uvedený přístup byl studován i naší skupinou pro CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů<sup>69</sup>.

### 2.4. Metody pro chirální screening

Za účelem urychlení vývoje nové metody pro separaci chirálních biologicky aktivních látek a chirálních nečistot vzniklých během syntézy bylo navrženo několik postupů pro tzv. chirální screening<sup>70</sup>. V praxi našly své uplatnění pouze některé z nich, což je dáno tím, že žádný z těchto postupů není univerzální. Enantioselektivita SFC separačního systému závisí na mnoha parametrech, tj. typu chirální stacionární fáze, složení mobilní fáze a hustotě mobilní fáze, která úzce souvisí s teplotou a tlakem<sup>28</sup>. Klíčovými parametry pro separaci chirálních sloučenin jsou výběr vhodné CSF a mobilní fáze, a proto se jejich vhodná kombinace testuje jako první. Případná změna teploty a nastavení regulátoru zpětného tlaku se řeší až při doladění metody. Během chirálního screeningu se systematicky testuje sada stacionárních fází s různými chirálními selektory v několika mobilních fázích<sup>28</sup>. Někteří autoři používají při vývoji těchto metod pouze CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů, což je dáno možností výběru z velkého množství jejich derivátů, a tím zajištění enantioselektivity pro široké spektrum strukturně odlišných chirálních sloučenin<sup>22,44,75</sup>. V několika publikovaných postupech jsou zařazeny kromě CSF založených na derivatizovaných polysacharidech také CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů a Pirklovy fáze<sup>76,77</sup>. Navržené postupy pro chirální screening v posledních 20 letech jsou shrnuty a kriticky zhodnoceny v nedávno publikovaném přehledu<sup>70</sup>.

## 3. Závěr

Sub/superkritická fluidní chromatografie je významným nástrojem pro analýzu chirálních sloučenin v mnoha odvětvích. Tato metoda se dostává do popředí v analýze chirálních sloučenin nejen z důvodu možnosti rychlých a účinných separací enantiomerů, ale také zařazením mezi ekologičtější analytické metody, protože hlavní složku mobilních fází tvoří oxid uhličitý. Při vývoji chirálních metod ve farmaceutickém průmyslu se SFC stává nejpoužívanější metodou, před kapalinovou chromatografií. Zajímavou možností pro rozšíření enantioselektivity a ovlivnění separačního potenciálu v SFC je sériové zapojení chirálních kolon s různými chirálními selektory, které vykazují komplementární enantioselektivitu. Přestože jsou k dispozici chirální kolony pro ultra rychlé analýzy s částí-

cemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ , nelze zatím na komerčních SFC přístrojích plně využít jejich potenciál z důvodu značných mimokolonových příspěvků k rozšiřování piků. Vhodným kompromisem, při současném využití výhod SFC pro rychlé a vysoce účinné separace chirálních analytů, je použití chirálních kolon vhodných rozměrů, ideálně s vnitřním průměrem 3 mm (pro analytické aplikace) naplněných plně porézními částicemi o velikosti 2,5  $\mu\text{m}$ .

*Tuto práci bychom rády věnovaly prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc., která nás zavedla do tajů chirální chromatografie.*

#### Seznam zkratk

CSF	chirální stacionární fáze
DEA	diethylamin
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
NPS	nové psychoaktivní sloučeniny
PropOH	propan-2-ol
SFC	sub/superkritická fluidní chromatografie
SPP	povrchově porézní částice
TFA	trifluoroctová kyselina
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie

#### LITERATURA

- West C.: TrAC, Trends Anal. Chem. 120, 115648 (2019).
- Maier N. M., Franco P., Lindner W.: J. Chromatogr. A 906, 3, (2001).
- Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: Chem. Listy 102, 480 (2008).
- West C., Konjaria M.-L., Shashviashvili N., Lemasson E., Bonnet P., Kakava R., Volonterio A., Chankvetadze B.: J. Chromatogr. A 1499, 174 (2017).
- Yu R. B., Quirino J. P.: TrAC, Trends Anal. Chem. 118, 779 (2019).
- Červinka O.: Chem. Listy 93, 294 (1999).
- Šlechtová T., Kalíková K., Tesařová E.: Chem. Listy 107, 228 (2013).
- Holaň J., Štěpánek F., Ridvan L.: Chem. Listy 108, 46 (2014).
- Chankvetadze B.: TrAC, Trends Anal. Chem. 143, 116332 (2021).
- Švecová P., Petr J.: Talanta 198, 154 (2019).
- Grybinik S., Bosakova Z.: Monatsh. Chem. 152, 1033 (2021).
- García-Cansino L., García M. Á., Marina M. L.: Molecules 26, 5350 (2021).
- Gao Y., Zhao X., Sun X., Wang Z., Zhang J., Li L., Shi H., Wang M.: J. Agric. Food Chem. 69, 3289 (2021).
- Sanganyado E., Lu Z., Fu Q., Schlenk D., Gan J.: Water Res. 124, 527 (2017).
- Barhate C. L., Lopez D. A., Makarov A. A., Bu X., Morris W. J., Lekhal A., Hartman R., Armstrong D. W., Regalado E. L.: J. Chromatogr. A 1539, 87 (2018).
- Schmid M. G., Hägele J. S.: J. Chromatogr. A 1624, 461256 (2020).
- Folprechtová D., Kalíková K., Kadkhodaei K., Reiterer C., Armstrong D. W., Tesařová E., Schmid M. G.: J. Chromatogr. A 1637, 461846 (2021).
- Kolderová N., Jurásek B., Kuchař M., Lindner W., Kohout M.: J. Chromatogr. A 1625, 461286 (2020).
- Luo L., Wen X., Du Y., Jiang Z., Guo X.: Biomed. Chromatogr. 32, e4345 (2018).
- Jeschke P.: Pest. Manage. Sci. 74, 2389 (2018).
- Geryk R., Kalíková K., Schmid M. G., Tesařová E.: Anal. Chim. Acta 932, 98 (2016).
- Nováková L., Douša M.: Anal. Chim. Acta 950, 199 (2017).
- Jing X., Yao G., Liu D., Qu H., Zhou Q., Zhou Z., Wang P.: Ecol. Indic. 75, 126 (2017).
- Wang F., Yi X., Qu H., Chen L., Liu D., Wang P., Zhou Z.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 143, 186 (2017).
- Lemasson E., Bertin S., West C.: J. Sep. Sci. 39, 212 (2016).
- Khater S., Lozac'h M.-A., Adam I., Francotte E., West C.: J. Chromatogr. A 1467, 463 (2016).
- Desfontaine V., Guillarme D., Francotte E., Nováková L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 113, 56 (2015).
- Lesellier E., West C.: J. Chromatogr. A 1382, 2 (2015).
- Guiochon G., Tarafder A.: J. Chromatogr. A 1218, 1037 (2011).
- Kalíková K., Šlechtová T., Vozka J., Tesařová E.: Anal. Chim. Acta 821, 1 (2014).
- Nováková L., Perrenoud A. G.-G., Francois I., West C., Lesellier E., Guillarme D.: Anal. Chim. Acta 824, 18 (2014).
- West C.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 6441 (2018).
- Tarafder A.: TrAC, Trends Anal. Chem. 81, 3 (2016).
- Wolrab D., Frühauf P., Gerner C., Kohout M., Lindner W.: J. Chromatogr. A 1517, 165 (2017).
- Molineau J., Hideux M., West C.: J. Pharm. Biomed. Anal. 193, 113736 (2021).
- Maftouh M., Granier-Loyaux C., Chavana E., Marini J., Pradines A., Heyden Y. V., Picard C.: J. Chromatogr. A 1088, 67 (2005).
- Mourier P. A., Eliot E., Caude M. H., Rosset R. J.: Anal. Chem. 57, 2819 (1985).
- Vaňkátová P., Folprechtová D., Kalíková K., Kubíčková A., Armstrong D. W., Tesařová E.: J. Chromatogr. A 1622, 461138 (2020).
- Felix G., Berthod A., Piras P., Roussel C.: Sep. Purif. Rev. 37, 229 (2008).
- Khater S., West C.: J. Chromatogr. A 1373, 197 (2014).
- Patel D. C., Wahab M. F., Armstrong D. W., Breibach Z. S.: J. Chromatogr. A 1467, 2 (2016).
- Folprechtová D., Kalíková K.: Anal. Sci. Adv. 2, 15 (2021).

43. Brunelli C., Zhao Y., Brown M.-H., Sandra P.: *J. Chromatogr. A* 1185, 263 (2008).
44. De Klerck K., Heyden Y. V., Mangelings D.: *J. Chromatogr. A* 1363, 311 (2014).
45. Vaňkátová P., Kubičková A., Cigl M., Kalíková K.: *J. Supercrit. Fluids* 146, 217 (2019).
46. Jakubec P., Douša M., Nováková L.: *J. Sep. Sci.* 43, 2675 (2020).
47. Folprechtová D., Kozlov O., Armstrong D. W., Schmid M. G., Kalíková K., Tesařová E.: *J. Chromatogr. A* 1612, 460687 (2020).
48. Harps L. C., Joseph J. F., Parr M. K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 162, 47 (2019).
49. Roy D., Wahab M. F., Talebi M., Armstrong D. W.: *Green Chem.* 22, 1249 (2020).
50. Felletti S., Ismail O. H., De Luca C., Costa V., Gasparrini F., Pasti L., Marchetti N., Cavazzini A., Catani M.: *Chromatographia* 82, 65 (2019).
51. Roy D., Wahab M. F., Berger T. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 91, 14672 (2019).
52. Khvalbota L., Roy D., Wahab M. F., Firooz S. K., Machyňáková A., Špánik I., Armstrong D. W.: *Anal. Chim. Acta* 1120, 75 (2020).
53. Broeckhoven K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 146, 116489 (2022).
54. Kozlov O., Kalíková K., Gondová T., Budovská M., Salayová A., Tesařová E.: *J. Chromatogr. A* 1596, 209 (2019).
55. Kučerová G., Kalíková K., Tesařová E.: *Chirality* 29, 239 (2017).
56. Scriba G. K. E.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 120, 115639 (2019).
57. Francotte E. R.: *Chim. Int. J. Chem.* 71, 430 (2017).
58. Padró J. M., Keunchkarin S.: *Microchem. J.* 140, 142 (2018).
59. Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 1269, 26 (2012).
60. Patel D. C., Breitbach Z. S., Yu J., Nguyen K. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chim. Acta* 963, 164 (2017).
61. Ilisz I., Bajtai A., Szatmári I., Fülöp F., Lindner W., Péter A.: *J. Chromatogr. A* 1615, 460771 (2020).
62. Borovcová L., Havlíček V., Lemr K.: *Chem. Listy* 113, 407 (2019).
63. Mazzocanti G., Manetto S., Ciogli A., Villani C., Gasparrini F.: *TrAC, Trends Anal. Chem.*, v tisku. doi: 10.1016/j.trac.2021.116511.
64. Kalíková K., Martínková M., Schmid M. G., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 41, 1471 (2018).
65. Berger T. A.: *J. Chromatogr. A* 1510, 82 (2017).
66. Ismail O. H., Losacco G. L., Mazzocanti G., Ciogli A., Villani C., Catani M., Pasti L., Anderson S., Cavazzini A., Gasparrini F.: *Anal. Chem.* 90, 10828 (2018).
67. Barhate C. L., Wahab M. F., Tognarelli D. J., Berger T. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 88, 8664 (2016).
68. Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H.: *J. Chromatogr. A* 1357, 36 (2014).
69. Folprechtová D., Tesařová E., Kalíková K.: *J. Sep. Sci.* 44, 4048 (2021).
70. Tarafder A., Miller L.: *J. Chromatogr. A* 1638, 461878 (2021).
71. La Z., Charton J., Etienne L., Bourey J., Lipka E.: *J. Chromatogr. A* 1651, 462270 (2021).
72. Akchich A., Charton J., Lipka E.: *J. Chromatogr. A* 1588, 115 (2019).
73. Wang C., Tymiak A. A., Zhang Y.: *Anal. Chem.* 86, 4033 (2014).
74. Welch C. J., Biba M., Gouker J. R., Kath G., Augustine P., Hosek P.: *Chirality* 19, 184 (2007).
75. Lin J., Tsang C., Lieu R., Zhang K.: *J. Chromatogr. A* 1624, 461244 (2020).
76. Barhate C. L., Joyce L. A., Makarov A. A., Zawatzky K., Bernardoni F., Schafer W. A., Armstrong D. W., Welch C. J., Regalado E. L.: *Chem. Commun.* 53, 509 (2017).
77. Michaels P., Neef J., Galyan K., Ginsburg-Moraff C., Zhou X., Dunstan D., Poirier J., Reilly J.: *Chirality* 31, 575 (2019).

**K. Kalíková, D. Folprechtová, and Z. Kadlecová**  
*(Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): Sub/supercritical Fluid Chromatography for Chiral Compounds Analysis*

Chirality is an essential feature of nature as it is common for many biologically active compounds. The different biological effects of individual enantiomers in a chiral environment are generally known. Therefore, there is a need for fast, efficient, and robust methods for their separation, quantification, and purification, too. The easiest way is to use chromatographic methods utilizing chiral stationary phases. Sub/supercritical fluid chromatography has become popular in the field of enantioselective separations in various scopes and, in some cases, has become a method of the first choice.

Therefore, this review article covers actual trends and possibilities of sub/supercritical fluid chromatography in enantioseparations. Ways to influence enantioselectivity of the separation system by column coupling, screening approaches, and processes of methodical development for fast and efficient analyses are discussed.

Sub/supercritical fluid chromatography under suitable experimental conditions provides fast and highly efficient separation of chiral compounds.

**Keywords:** sub/supercritical fluid chromatography, enantiomer, chiral stationary phase, enantioselectivity, separation

- Kalíková K., Folprechtová D., Kadlecová Z.: *Chem. Listy* 116, 146–151 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220146>