

ПОЛУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ*



Е.Н. Решетова,
кандидат химических наук,
младший научный сотрудник,
Институт технической химии
УрО РАН

В последние годы наблюдается серьезный прогресс в решении широкого круга задач энантиомерного разделения и анализа разнообразных оптически чистых соединений, в том числе лекарственных форм. В статье рассмотрены вопросы современного состояния исследований в области получения энантиомерно чистых лекарственных препаратов. Основное внимание уделено изучению такого значимого класса противовоспалительных препаратов, как профены. На основании проведенных исследований предложены условия разделения энантиомеров ибупрофена методом препаративной жидкостной хроматографии.

Современные тенденции развития мировой фармацевтической промышленности свидетельствуют о растущей потребности в получении оптически чистых лекарственных форм. Необходимость практического использования хиральных соединений в оптически чистой форме обусловлена различием в химических и биологических свойствах индивидуальных энантиомеров. Из десятков тысяч синтезируемых в мире органических соединений около половины являются хиральными. Так, оптически чистые хиральные соединения лидируют по продажам современных медпрепаратов на Западе (к примеру, объем мировых продаж лишь одного оптически чистого противозачаточного препарата (S)-омепразола в 2003 году превышал \$3,8 млрд., а в 2006 году достиг \$4,1 млрд.) [11]. Требования к оптической

чистоте препаратов постоянно растут. В основных законодательствах США (FDA, 1992 г.) и стран Европейского Сообщества (CPMP, 1993 г.) появились регулирующие акты по энантиомерно чистым препаратам. Согласно основным положениям этих актов фирмы-заявители должны признавать существование препаратов, состоящих из стереоизомеров, пытаться их разделять, изучать их фармакологическую активность и осуществлять рациональный выбор стереоизомера для регистрации. В результате ориентирования фармацевтической промышленности Европы, США, Канады, Японии, а также ряда стран юго-восточной Азии на выпуск энантиомерно чистых препаратов, доля лекарственных препаратов, зарегистрированных во всем мире в виде отдельных энантиомеров, непрерывно растет [14].

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-03-00048-а.

Необходимо отметить, что энантиомерное производство лекарственных форм в России практически отсутствует. Выпускаемые в виде рацемических смесей отечественные синтетические лекарственные препараты уступают по лечебному эффекту аналогичным зарубежным препаратам, в состав которых входят чистые энантиомеры. На сегодняшний день зарубежные производители, несмотря на экономические трудности, по-прежнему аккумулируют значительную часть российского рынка лекарственных средств.

В настоящее время часть энантиомерно чистых лекарств производится с применением микробиологических методов синтеза, однако для получения многих целевых соединений в энантиомерно чистой форме такие методы либо неэффективны, либо вообще невозможны. Весьма эффективным является асимметрический синтез, но и этот метод не дает нужной степени чистоты энантиомерного продукта, так как для многих лекарственных препаратов энантиомерная чистота должна быть не ниже 99,5 %, а для отдельных лекарств и хиральных катализаторов – практически 100 % [2].

Другой способ получения энантиомеров – разделение рацемических смесей. Среди известных методов разделения наиболее эффективным и экономически целесообразным является метод энантиоселективной хроматографии. Для решения проблем селективности разделения изучается связь структуры исследуемых молекул с их удерживанием на сорбентах разной химической природы, разрабатываются многомерные варианты хроматографии, обеспечивающие разделение нескольких тысяч компонентов, развивается теоретическое и компьютерное моделирование хроматограмм.

Несмотря на крупнейший вклад отечественных ученых в мировую хроматографию, положение России в этой области науки и техники оставляет желать лучшего – хроматографическое разделение энантиомеров часто оказывается безуспешным в связи с использованием не очень эффективных методов хроматографии и малоактивных хиральных адсор-

бентов, а отсутствие адекватных моделей для описания энантиоразделения препятствует развитию новых промышленных технологий в разделении и очистке энантиомеров. Но, несмотря на существующие проблемы в этой области, приоритет в прямом разделении сложных смесей и получении высокочистых компонентов надолго останется за хроматографией. К сожалению, в последнее время российские исследования в области распознавания в энантиоселективной хроматографии немногочисленны. В России созданием хиральных колонок для разделения энантиомеров соединений различных классов занимаются два исследовательских коллектива (ИНЭОС РАН и МГУ). Вопросы теории и практики энантиоразделения изучаются в ИТХ УрО РАН.

В настоящее время ИТХ УрО РАН развивает одно из новых для Института направление – изучение хроматографического разделения оптических изомеров лекарственных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хиральных неподвижных фазах (ХНФ). ВЭЖХ на ХНФ является одним из наиболее распространенных и эффективных методов получения и определения энантиомеров. Являясь более универсальной, чем хиральная газовая хроматография, она привлекает значительное внимание благодаря широкому спектру применений в разделении различных классов соединений. ВЭЖХ на ХНФ обеспечивает быстрое и точное разделение хиральных соединений, «on-line» детектирование и количественное определение массы и оптического вращения энантиомеров при использовании соответствующих детектирующих приборов [19].

К настоящему времени разработано около 1300 ХНФ для ВЭЖХ, 200 из которых являются коммерчески доступными [9]. В то же время не существует единственной универсальной ХНФ для разделения всех классов хиральных соединений. Выбор правильной хиральной неподвижной фазы для энантиоразделения – сложная задача, требующая знания всех свойств многокомпонентной гетерогенной системы. К сожалению, в хиральной

ВЭЖХ пока нет достаточно удовлетворительной теории, при помощи которой можно было бы заранее оценить возможность и количественные характеристики разделения произвольной пары энантиомеров на какой-либо хиральной фазе; при этом никакая схема подбора правильной ХНФ не дает гарантии успешного разделения энантиомеров.

При необходимости разделить на энантиомеры новую рацемическую смесь обычно вначале испытывают наиболее универсальные фазы из имеющихся. Затем, в случае неудачи, переходят к менее универсальным или же пытаются достичь разделения за счет варьирования условий хроматографирования: скорости подачи элюента, состава подвижной фазы и температуры.

конкретной проблемы [9].

Лекарственные хиральные соединения, проблема разделения которых вызывает повышенный интерес, – профены (производные 2-арилпропановой кислоты) – являются основным объектом исследования в ИТХ УрО РАН. Вещества этой группы оказывают противовоспалительное, жаропонижающее и анальгетическое действие, также применяются при ревматизме, скелетно-мышечных нарушениях и общих недомоганиях. К профеновым кислотам относятся такие, как ибупрофен, флурбипрофен, напроксен, кетопрофен (рис. 1), а также фенопрофен, карпрофен, альбутерол, ацебутолол, пропafenон, бетаксоллол, метилфенидат и гоматропин и др. Противовоспалительная ак-

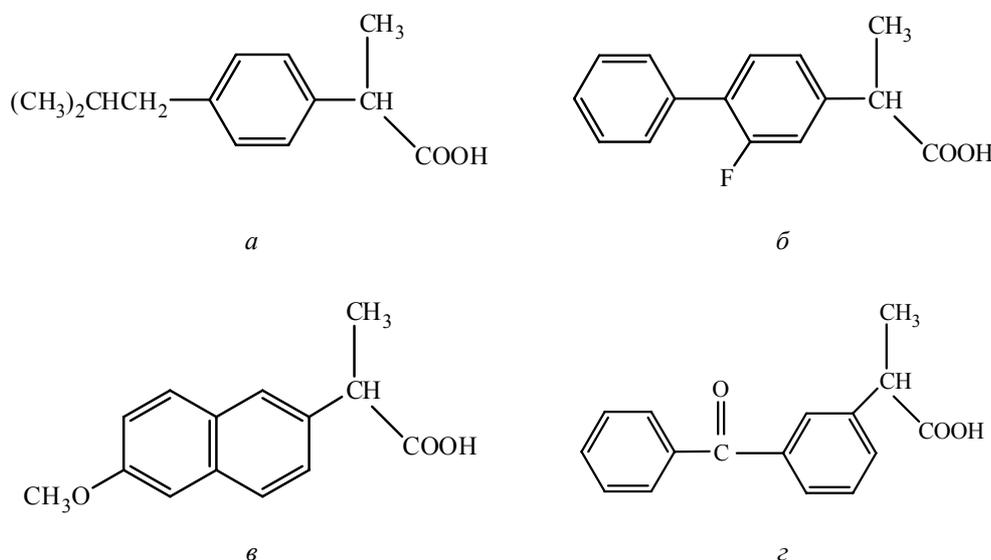


Рис. 1. Профеновые кислоты: а – ибупрофен, б – флурбипрофен, в – напроксен, z – кетопрофен

Также при разработке метода хирального разделения рассматривается взаимодействие трех компонентов: аналита, ХНФ и подвижной фазы. При этом многое зависит от интуиции и практического опыта исследователя. Следовательно, ключом к успешному энантиоразделению какого-либо класса рацематов на соответствующей ХНФ является знание закономерностей хроматографического поведения энантиомеров и понимание возможных механизмов взаимодействия их с хиральным селектором. Поэтому понимание и классификация различных ХНФ важны для выбора наиболее подходящей ХНФ при решении

тивность профенов связана с (*S*)-(+)-изомером [16], тогда как активность (*R*)-(-)-формы либо существенно ниже, либо отсутствует; в некоторых случаях (*R*)-изомер проявляет нежелательные побочные эффекты [20].

Таким образом, в лекарственных формах предпочтительно использование чистого (*S*)-энантиомера, в связи с чем внимание исследователей долгое время было сосредоточено на разработке методов получения (*S*)-изомеров. Из группы (*R*)-изомеров коммерчески доступными, по данным каталогов крупнейших поставщиков (Sigma-Aldrich, Lancaster), являются толь-

ко (*R*)-напроксен и (*R*)-флюрбипрофен, причем по ценам существенно более высоким, чем их широко используемые оптические антиподы. В то же время предполагаемая противораковая активность (*R*)-профенов [17] ставит проблему их получения в количестве, достаточном для лабораторных и доклинических испытаний.

Для разделения энантиомеров профенов в хиральной хроматографии с водными буферными растворами, применяемыми в качестве элюентов, используют ХНФ, основанные на протеиновых и циклодекстриновых [8] хиральных селекторах, а также сорбенты с иммобилизованными макроциклическими антибиотиками [6]. В условиях нормально-фазовой жидкостной хроматографии для разделения энантиомеров профенов в качестве ХНФ используют производные полисахаридов, адсорбированные на макропористом силикагеле (Chiralcel OD, Chiralcel OJ, Chiralpak AD) [13].

Исследования по изучению энантиоразделения профенов в ИТХ УрО РАН проводятся на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» с диодно-матричным детектором, оснащенный термостатом колонок, автоматическим дозатором и насосом с задатчиком градиента низкого давления (рис. 2).

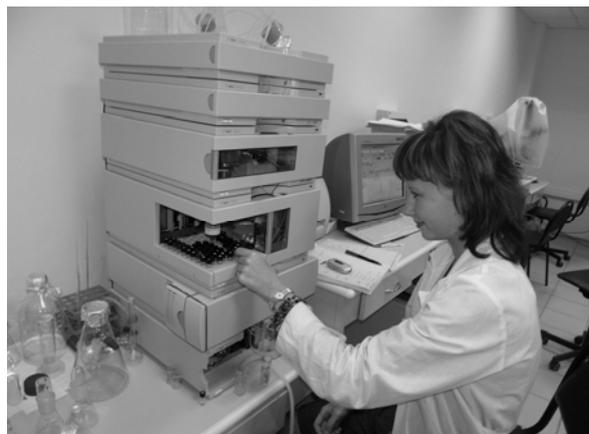


Рис. 2. Научный сотрудник лаборатории окислительного катализа в расплавленных электролитах ИТХ УрО РАН Е.Н. Решетова осуществляет разделение энантиомеров ибупрофена в условиях препаративной жидкостной хроматографии

Эксперименты проводятся в условиях аналитической и препаративной жидкостной хроматографии. Препаративным раз-

делением обычно называют анализы, в которых величина пробы составляет от 10 мг до нескольких граммов. Такие разделения можно проводить на обычных, приспособленных для аналитических разделений приборах. Для многих современных методов исследований достаточно 10–100 мг вещества.

Аналитическое и препаративное разделения существенно отличаются по своим целям даже в том случае, когда они выполняются в одном и том же масштабе. Рассматриваемой задаче должны соответствовать не только выбор методологии и приборов, но и позиции исследователя. Обычно аналитическую ЖХ используют для получения качественной и количественной информации о данном образце: определяют количество присутствующих компонентов; получают сведения о присутствии или отсутствии какого-либо компонента, его количестве, относительных концентрациях интересующих компонентов.

В противоположность этому препаративная ЖХ ориентирована на выделение, обогащение или очистку одного или большего числа компонентов данного образца, которые собирают для дальнейшего использования, например, для продолжения синтеза, применения в качестве стандартных образцов, образцов для анализа или для испытания с помощью физических, химических или биологических методов, в качестве коммерческих продуктов для продажи. При помощи детекторов в этом случае, следя за процессом разделения, делают заключение о том, как фракционировать поток элюента или собирать интересующие компоненты в отдельные фракции. Часто в крупномасштабных разделениях детектирование осуществляется на небольшой части образца, который отбирается от основного потока (он-лайн), или берется для контроля из различных фракций (офф-лайн). Очевидно, что разделение должно быть адекватно целям выделения, т.е. получению материалов с желаемой степенью чистоты [5].

Препаративное разделение можно проводить, только если получено хоро-

шее аналитическое разделение при такой величине пробы, которая соответствует линейной области, т.е. при максимальной нагрузке 10^{-4} – 10^{-3} г пробы на грамм неподвижной фазы. На обычных аналитических колонках (внутренний диаметр 3–4 мм и длина 30 см) можно легко разделить пробу примерно в 1 мг. Для многих дорогостоящих природных веществ это уже «препаративное» количество. При аналитическом разделении (когда величина пробы соответствует линейной области), меняя условия разделения, можно оптимизировать разделение таким образом, что расстояние между пиками станет большим. Если пики удалены друг от друга достаточно далеко, то пробу можно увеличить (рис. 3). Хотя пики при этом станут шире, перекрытия зон веществ, тем не менее, не произойдет из-за лучшего разрешения. Таким образом на аналитических хроматографических колонках можно разделять «препаративные» количества веществ от 5 до 100 мг.

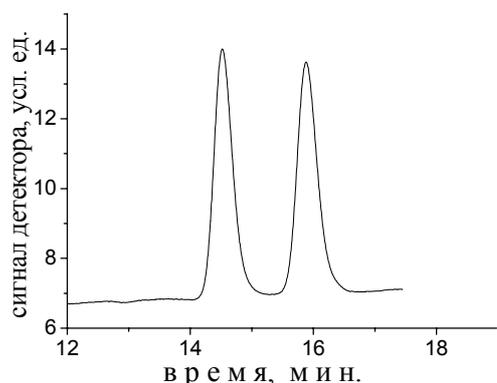


Рис. 3. Хроматограммы ибупрофена. Колонка *Whelk O1* (250×10 мм), подвижная фаза смеси гексан – этанол (2 об. %) + 0,5 об. % CH_3COOH . Температура 30 °С. Объем пробы 1 мкл. Длина волны 280 нм. Концентрация ибупрофена в пробе 12 мг/мл

В большинстве случаев на начальных стадиях разработки методов разделения лекарственных соединений существует небольшой выбор доступных для оптимизации хроматографического метода параметров (величин), таких как производительность, регенерация и чистота. Производительность зависит в основном от двух факторов: времени цикла и загрузки колонки пробой. Загрузка колонки в свою очередь зависит от фактора разделения

(селективности) и емкости насыщения (поглотительной способности). Исходя из хроматографических данных, полученных в аналитических условиях, можно описать время цикла и фактор разделения, а емкость насыщения доступна только при проведении экспериментов в условиях перегрузки колонки или при измерении равновесных изотерм адсорбции [7]. В литературе описано применение комбинированного подхода, а именно выбора аналитических хроматографических данных и проведения экспериментов в условиях перегрузки в лабораторном масштабе [15].

Поскольку разработка эффективных методик энантиоразделения требует знания закономерностей хроматографического поведения энантиомеров, в ИТХ УрО РАН проводятся эксперименты по изучению характеристик удерживания и термодинамики энантиоселективной адсорбции профенов в условиях аналитической жидкостной хроматографии. Измерения осуществляются на полисахаридной ХНФ *Chiralcel OJ-H*, представляющей собой иммобилизованную на силикагеле трис(4-метилбензоил)-целлюлозу [4] и ХНФ с привитым макроциклическим гликопептидным антибиотиком эремомицином *Diaspher-Chiralsel-E* [3].

Вопросы препаративного разделения рацемических (*RS*) профенов (дешевого синтетического сырья для получения индивидуальных энантиомеров) обсуждались в литературе [1, 10, 18], однако сведения о систематических исследованиях, в которых бы одновременно рассматривалось влияние нескольких факторов на производительность разделения и чистоту конечных продуктов, в доступной литературе отсутствуют. В ряду профенов (*RS*)-ибупрофен (2-(4-изобутилфенил)-пропановая кислота) является наиболее трудным объектом для энантиоразделения [12], что объясняет немногочисленность работ, посвященных этому вопросу. S. Perreg с соавторами [18] сообщали о разделении энантиомеров ибупрофена на колонке *Kromasil CHI-TBV* методом сверхкритической флюидной *SMB*-хроматографии, J.H. Won с соавторами. [10]

использовали для этой цели жидкостную SMB-хроматографию. Л.Д. Аснин [1] разделял рацемический ибупрофен методом ВЭЖХ на колонке Chiralcel OJ-H, однако производительность оказалась неприемлемо низкой. Представляло интерес на примере ибупрофена рассмотреть влияние экспериментальных условий на препаративное разделение профенов. В качестве среды для разделения была выбрана хиральная неподвижная фаза (ХНФ) (S,S)-Whelk-O1. Указанный адсорбент, известный высокой энантиоселективностью по отношению к профенам [21], представляет собой силикагель с привитым хиральным селектором 1-(3,5-динитробензамидо)-1,2,3,4-тетрагидрофенантроном.

Исследовано влияние экспериментальных условий (температуры, объема вводимой пробы, концентрации органического растворителя в подвижной фазе) на препаративное разделение профеновых кислот на примере ибупрофена.

Хроматограммы разбавленных проб (RS)-ибупрофена (12 мг/мл, объем пробы 1 мкл) характеризуются полным разделением пиков энантиомеров (см. рис. 2). Величина разрешения возрастает от 0,5 до 1,2 с уменьшением температуры от 50 до 30 °С и доли этанола в подвижной фазе от 10 до 2 об. %.

Увеличение размера пробы до препаративных количеств приводит к перекрытию пиков, а при вводе рацемата в количестве 24 мг (объем пробы 200 мкл) разделения не наблюдается (рис. 4).

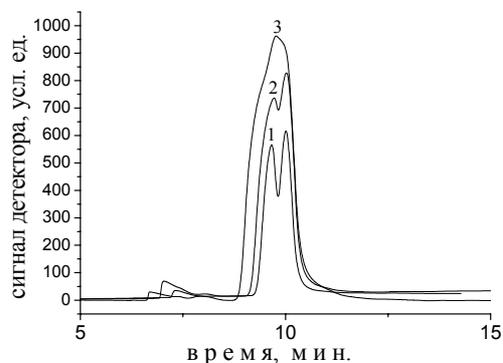


Рис. 4. Хроматограммы ибупрофена. Колонка Whelk O1 (250×10 мм), подвижная фаза гексан – этанол (10 об. %) + 0,5 об. % CH₃COOH. Температура 30 °С. Объем пробы, мкл: 1 – 50, 2 – 100, 3 – 200. Длина волны 280 нм. Концентрация ибупрофена в пробе 120 мг/мл

Влияние объема пробы

В случае первого элюируемого энантиомера (R-ибупрофен) общим правилом является уменьшение оптической чистоты фракции при увеличении объема пробы, при этом не происходит снижения выхода R-ибупрофена (преимущественно при 30 °С) (рис. 5). Для второй фракции (S-ибупрофен) наблюдается обратная картина (рис. 6).

Увеличение выхода разделяемых энантиомеров (90 % и выше) происходит в обоих случаях (для R- и S-форм) при снижении их чистоты даже при малой загрузке колонки (6 мг). В то же время самые низкие выходы получены для S-ибупрофена при вводе в колонку 24 мг рацемата для всех составов подвижной фазы. В случае R-ибупрофена при максимальной загрузке колонки полученные энантиомеры имеют наименьшую чистоту.

Таким образом, получение высоких выходов одновременно с высокой чистотой достигается путем введения небольших объемов проб ибупрофена.

Влияние концентрации органического модификатора

Как следует из экспериментальных данных, время удерживания ибупрофена сокращается с увеличением содержания этанола в подвижной фазе, при этом значения селективности остаются постоянными в пределах погрешности эксперимента (рис. 7).

Наиболее высокие значения селективности наблюдаются для состава подвижной фазы гексан / этанол в соотношении 90:10 при температуре 30 °С, в этих условиях энантиоразделение также характеризуется низким временем удерживания, что является важным для препаративной хроматографии.

Влияние состава подвижной фазы на характеристики препаративного разделения определяется его воздействием на адсорбционное равновесие и размывание хроматографических пиков разделяемых компонентов. Наложение перечисленных эффектов приводит к сложному характеру зависимости состава целевых фракций от содержания полярного модификатора.

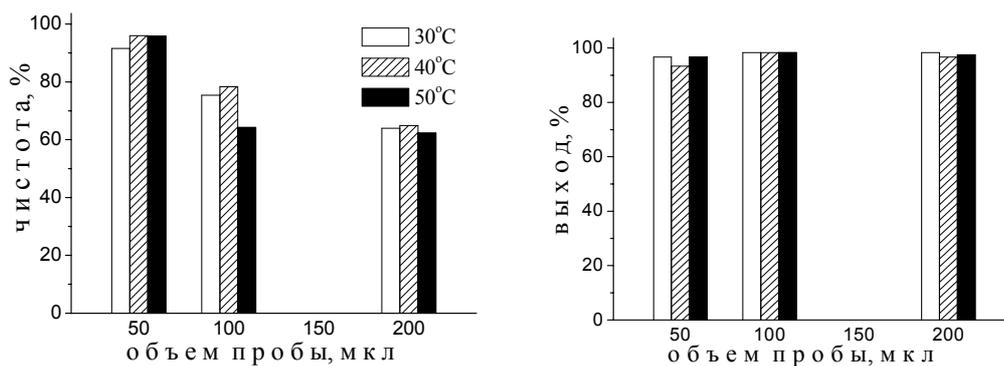


Рис. 5. Влияние объема вводимой пробы на чистоту и выход R-изомера ибупрофена. Концентрация этанола в подвижной фазе 2 об. %

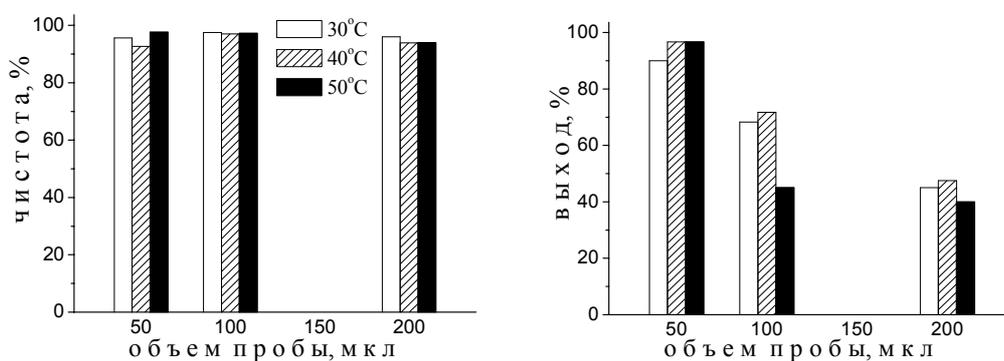


Рис. 6. Влияние объема вводимой пробы на чистоту и выход S-изомера ибупрофена. Концентрация этанола в подвижной фазе 2 об. %

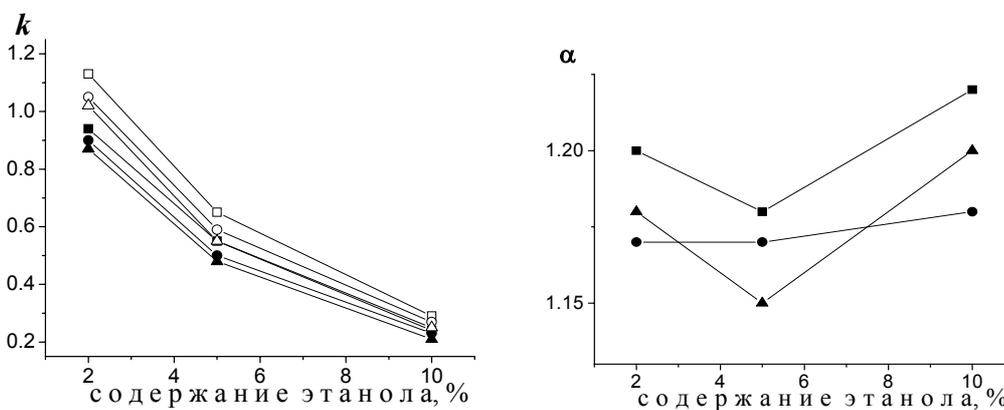


Рис. 7. Зависимость коэффициента удерживания k и селективности α от концентрации этанола в подвижной фазе. $C_{\text{ибупроф.}} = 12 \text{ мг/мл}$, объем пробы 1 мкл. ■, □ – S, R, 30 °C; ●, ○ – S, R, 40 °C; ▲, Δ – S, R, 50 °C

Тем не менее, можно обнаружить общие закономерности в поведении показателей разделения как функции концентрации этанола в подвижной фазе. Так, чистота первого энантиомера (R-ибупрофен), как правило, выше при содержании спирта 10 об. %, чем 2 об. %, хотя эта зависимость может проходить через минимум

или максимум при 5 об. % этанола (рис. 8). Для второй фракции (S-ибупрофен) наблюдается слабая тенденция к уменьшению относительного содержания в ней (R)-ибупрофена с повышением содержания этанола в подвижной фазе, при этом доля S-энантиомера не опускалась ниже 76 %. Выход первого элюируемого

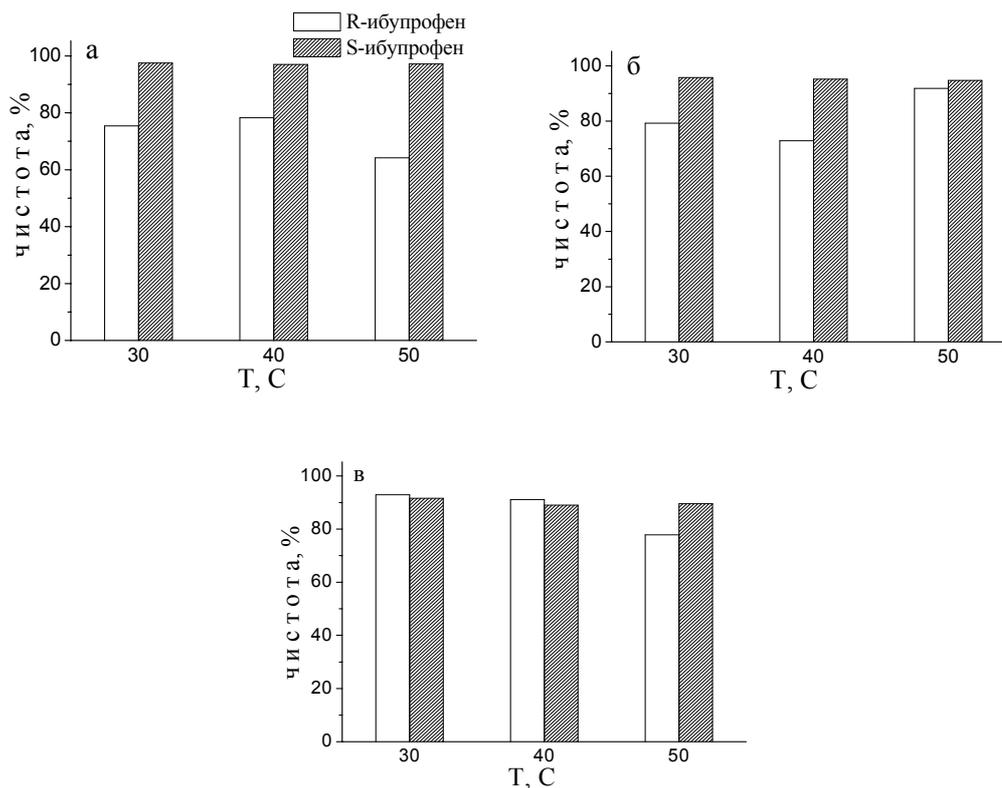


Рис. 8. Влияние концентрации этанола в подвижной фазе на чистоту разделяемых энантимеров. Объем вводимой пробы 100 мкл; содержание этанола в подвижной фазе, об. %: 2 (а), 5 (б), 10 (в)

энантиомера уменьшается с ростом доли спирта в подвижной фазе (рис. 9). Эта зависимость лучше проявляется при более высокой температуре. Выход второго энантиомера сложным образом коррелирует с условиями эксперимента, однако тенденция к увеличению выхода с повышением концентрации этанола может быть зафиксирована с ростом температуры разделения и объема пробы.

Полученные экспериментальные данные позволили сформулировать следующие рекомендации по энантиоразделению ибупрофена в условиях препаративной жидкостной хроматографии:

1. Получение высоких выходов одновременно с высокой чистотой разделяемых продуктов достигается путем введения небольших (50 мкл) объемов проб

ибупрофена.

2. Несмотря на значительное сокращение времени удерживания энантиомеров ибупрофена с повышением температуры, нет преимуществ в использовании более высокой температуры процесса, поскольку это приводит к снижению селективности и чистоты разделяемых энантиомеров.

3. Энантиоразделение, проводимое с подвижной фазой гексан – этанол в соотношении 95:5 с добавкой 0,5 об. % уксусной кислоты при температуре 50 °С и объеме вводимой пробы ≤ 50 мкл (6 мг) является разумным компромиссом между селективностью разделения, временем удерживания, чистотой и выходом выделяемых энантиомеров.

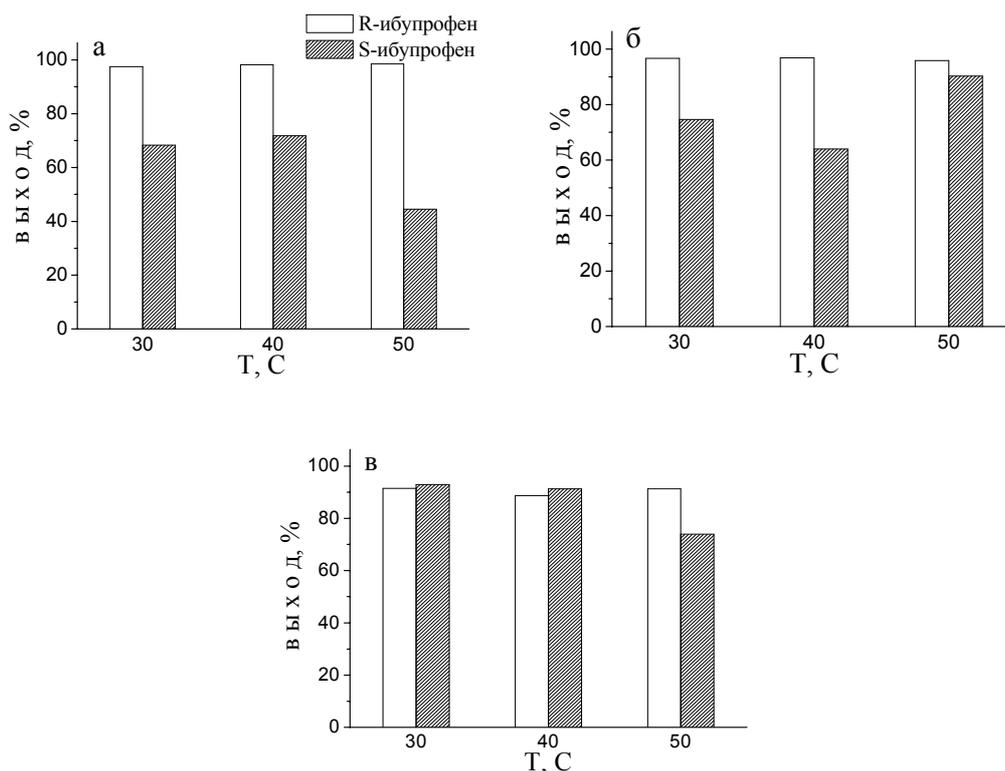


Рис. 9. Влияние концентрации этанола в подвижной фазе на выход разделяемых энантиомеров. Объем вводимой пробы 100 мкл; содержание этанола в подвижной фазе, об. %: 2 (а), 5 (б), 10 (в)

Библиографический список

1. Аснин Л.Д. Хроматография - на благо России. – М.: Граница, 2007. – С. 34–42.
2. Колтунов К.Ю. Энантиоселективный синтез органических соединений: учеб. пособие. – Новосибирск, 2010. – 41 с.
3. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Закономерности хроматографического разделения энантиомеров профенов на эремомидинсодержащей неподвижной фазе // Всерос. симпозиум «Хроматография и хромото-масс-спектрометрия». – М., Клязьма. – 2008. – С. 100.
4. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Термодинамика адсорбции энантиомеров напроксена на химически модифицированной целлюлозе в условиях ВЭЖХ // XI Молодежная конф. по органической химии. – Екатеринбург, 2008. – С. 92.
5. Энгельгардт Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях. – М.: Мир, 1980. – 245 с.
6. Berthod A., He B.L., Beesley T.E. Temperature and enantioselectivity by macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 1060. – P. 205–214.
7. Cox G.B. Packing materials for enantioselective preparative. chromatography // Analysis Mag. – 1998. – Vol. 26. – № 7. – P. M70–M76.
8. Cyclodextrin chiral stationary phases for liquid chromatographic separations of drug stereoisomers / A. Berthod [et al.] // J. Pharm. & Biomed. Anal. – 1990. – Vol. 8. – № 2. – P. 123–130.
9. Enantioselective chromatography in drug discovery / Y. Zhang [et al.] // Drug Discov. Today. – 2005. – Vol. 10. – № 8. – P. 571–577.
10. Enantioselective separation of R, S-ibuprofen using Simulated Moving Bed (SMB) chromatography / J.H. Won [et al.] // Hwahak Konghak. – 2001. – Vol. 39. – № 6. – P. 685–691.
11. Federsel H.-J. Facing chirality in the 21st century: approaching the challenges in the pharmaceutical industry // Chirality. – 2003. – Vol. 15. – № S1. – P. S128–S142.
12. Gyllenhaal O., Stefansson M. Reversal of elution order for profen acid enantiomers in normal phase LC on Chiralpak AD // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – Vol. 46. – № 5. – P. 860–863.
13. Gyoung Won Kang, Joung Ho Ko, Won Jo Cheong. Thermodynamic study of enantioselective separation of arylpropionic acids with a chiralcel OJ-H stationary phase // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2005. – Vol. 28. – № 4. – P. 513–526.
14. Lien Ai Nguyen, Hua He, Chuong Pham-Huy. Chiral Drugs. An Overview // International Journal of Biomedical science. – 2006. – Vol. 2. – № 2. – P. 85–100.

15. *Miller L., Bergeron R.* Analytical and preparative resolution of enantiomers of verapamil and norverapamil using a cellulose-based chiral stationary phase in the reversed-phase // *J. Chromatogr.* – 1993. – Vol. 648. – № 2. – P. 381–388.
16. *Mullangi R., Yao M., Srinivas N.R.* Resolution of enantiomers of ketoprofen by HPLC: a review // *Biomed. Chromatogr.* – 2003. – Vol. 17. – № 7. – P. 423–434.
17. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells / *A. Janssen [et al.]* // *Biochem. Biophys. Research Commun.* – 2008. – Vol. 365. – № 4. – P. 698–703.
18. Separation of ibuprofen enantiomers by supercritical fluid simulated moving bed chromatography / *S. Peper [et al.]* // *Sep. Sci. Technology.* – 2002. – Vol. 37. – № 11. – P. 2545–2566.
19. Spectrophotometric and polarimetric detectors in liquid chromatography for the determination of enantiomer ratios in complex mixtures / *W. Boehme [et al.]* // *Anal. Chem.* – 1982. – Vol. 54. – № 4. – P. 709–711.
20. *Todd P.A., Clissold S.P.* Naproxen: a reappraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states // *Drugs.* – 1990. – Vol. 40. – P. 91–137.
21. *Welch C.J.* Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – Vol. 666. – № 1–2. – P. 3–26.