

# Einfache Methodenentwicklung für die SFC

## Robuste, zuverlässige Alternative zur konventionellen LC

Brigitte Bollig, Gesa J. Schad

Shimadzu Europa GmbH

Bereits im späten 18. Jahrhundert wurde entdeckt, dass schwere nicht-flüchtige organische Substanzen sich in manchen anorganischen Gasen lösen, und zwar wenn die Gase oberhalb ihres kritischen Punktes, also in superkritischem Zustand vorliegen. 1957 gab es dann die ersten Ideen, diese Gase als mobile Phase in der Chromatographie einzusetzen. In den frühen 90er Jahren zeigte sich, dass durch Zugabe von polaren Lösungsmitteln eine Kontrolle der Retentionszeiten erreicht werden konnte. Somit war die moderne Superkritische Flüssigkeits-Chromatographie (SFC) geboren.

In der überkritischen Flüssigkeits-Chromatographie (SFC) wird sogenanntes „überkritisches“ Kohlenstoffdioxid als mobile Phase verwendet. Überkritisches CO<sub>2</sub> beschreibt einen fluiden Zustand von Kohlenstoffdioxid, wobei es über seiner kritischen Temperatur von 31,1°C und über dem kritischen Druck von 73,8 bar gehalten werden muss. In diesem überkritischen Zustand wird die Dichte des Mediums stark von Änderungen der Temperatur und des Drucks beeinflusst und seine physikalischen und thermischen Eigenschaften liegen zwischen denen der Gas und der Flüssigphase. Kompressibilität und Diffusionskoeffizient des überkritischen Lösungsmittels sind höher, während die Viskosität gegenüber der reinen Flüssigkeit verringert ist.

### Schnelle, effiziente chromatographische Trennung

Durch die Verwendung von „überkritischem“ CO<sub>2</sub> wird die chromatographische Trennung daher schneller, effizienter, günstiger und umweltfreundlicher als bei Benutzung giftiger organischer Lösungsmittel, z.B. Hexan, Heptan oder Chloroform, wie sie in der Normalphasen-HPLC üblich sind. CO<sub>2</sub> im überkritischen Zustand ist unpolare und die Lösemittelstärke wird oft durch Zusatz eines polaren CO-Eluenten erhöht.

Sobald ein zusätzliches organisches Lösungsmittel zugesetzt wird, ist die mobile

Phase nicht wirklich „überkritisch“, wird aber trotzdem zumeist als solche bezeichnet. Viele Lösungsmittel sind mit CO<sub>2</sub> mischbar (z.B. MeOH, EtOH [Wasserstoffbrückenbindungen], ACN [Dipole]) und bieten zusätzliche Wechselwirkungen. Dadurch bewirken sie kontrollierbare Veränderung der Retention und liefern eine wertvolle Möglichkeit, die Selektivität einer Trennung zu beeinflussen.

### Method Scouting für automatisierte Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung mit dem Nexera UC-System wird durch die Method-Scouting-

Option sehr vereinfacht. Sie ermöglicht schnelles Testen von bis zu zwölf Trennsäulen zusammen mit bis zu vier zusätzlichen Lösungsmitteln neben CO<sub>2</sub> (schematische Darstellung Abbildung 1). Die zugehörige Method-Scouting-Solution-Plattform erstellt sämtliche Scouting-Methoden automatisch, entsprechend einiger vordefinierter Methodenparameter (Abbildung 2). Es können hierbei die verschiedenen Kombinationen der Modifier mit unterschiedlichen Säulen und auch mit variablen Gradienten überprüft werden.

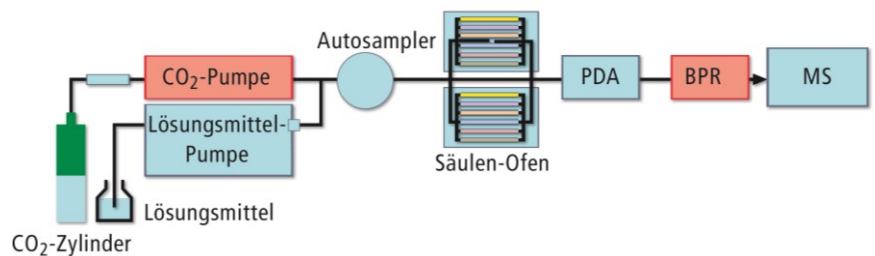


Abb. 1: Schematische Darstellung des Nexera UC Method-Scouting-Systems

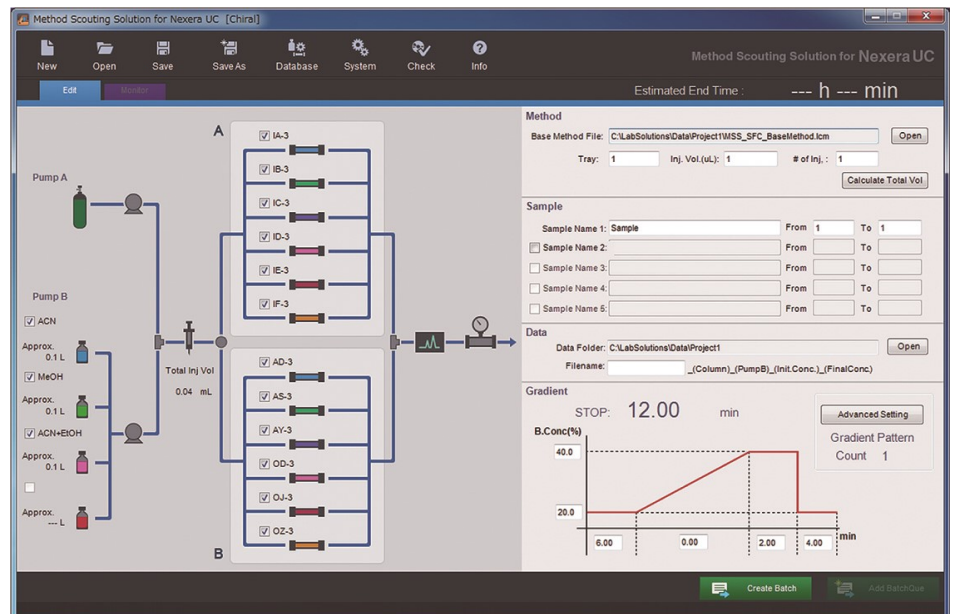


Abb. 2: GUI der Method Scouting Solution für die Nexera UC

## Trennung chiraler Komponenten

Eine sehr gute Anwendung hierfür ist eine Trennung von chiralen Komponenten, welche häufig die besten Trennungen mit der SFC zeigen. Für zwei neu entwickelte Substanzen (PS 101 und PS 132) mit jeweils einem Stereozentrum ist mit Hilfe des Nexera UC Method-Scouting-Systems sehr schnell und einfach eine gute Trennung erhalten worden.

Hierfür wurden zunächst der Modifizierer Methanol und Methanol mit 0,1% Ameisensäure bei jeweils 40°C Säulentemperatur, einer Flussrate von 2,0 ml/min und einem angelegten Druck von 150 bar nach der Säule sowie dem Detektor für verschiedene Säulen ausprobiert.

Es wurden sechs verschiedene chirale Trennsäulen getestet: Lux Amylose-1 und -2, Lux Cellulose-1 bis -4, alle in den Dimensionen 250x4,6 mm mit der Partikelgröße 5 µm. Die einzelnen Chromatogramme zur Probe PS 101 sind in Abbildung 3 zu sehen, hierbei zeigt die Säule Lux Cellulose-3 mit großem Abstand die deutlichste Trennung der beiden Enantiomere.

Ein sehr ähnliches Ergebnis in Bezug auf die beste Trennung auf der Säule Lux Cellulose-3, zeigt auch die Probe 132 in Abbildung 4. Hierbei ist bei beiden Trennungen die einfachste und beste Variante eine isokratische Lösungsmittelzusammensetzung über den gesamten Lauf mit 30% MeOH + 0,1% Ameisensäure. Die Detektion hierbei kann über einen Photodiodenarray-Detektor (PDA/DAD) sowie mit einem Massenspektrometer (LC-MS) erfolgen.

## Fazit

Eine sehr schnelle und einfache Methode zum Screening und zur Trennung von chiralen Komponenten auf verschiedenen Säulen ist in kurzer Zeit entwickelt worden. Dazu wird ein System benutzt, welches das Testen von bis zu zwölf Säulen zusammen mit vier Modifiern als Zusatz zu CO<sub>2</sub> erlaubt. Die Methode ist hinsichtlich Trennung und Empfindlichkeit optimiert.

Auch das simultane Aufnehmen eines UV- oder PDA-Signals mit einem Massensignal über einen LC-MS-Detektor ist in einem Lauf

möglich. Eine Selektivität von > 1,5 mit einer RSD < 2% für die Retentionszeit ist für alle gezeigten Komponenten erzielt worden.

Die Entwicklung einer SFC-Trennmethode ist mit diesem Geräteaufbau sehr ähnlich im Vergleich zur HPLC-Methodenentwicklung. Wie an diesem Beispiel gezeigt, ist die Technik der Superkritischen Flüssigkeits-Chromatographie eine robuste, zuverlässige und einfache Alternative zur seit vielen Jahrzehnten eingesetzten konventionellen LC.

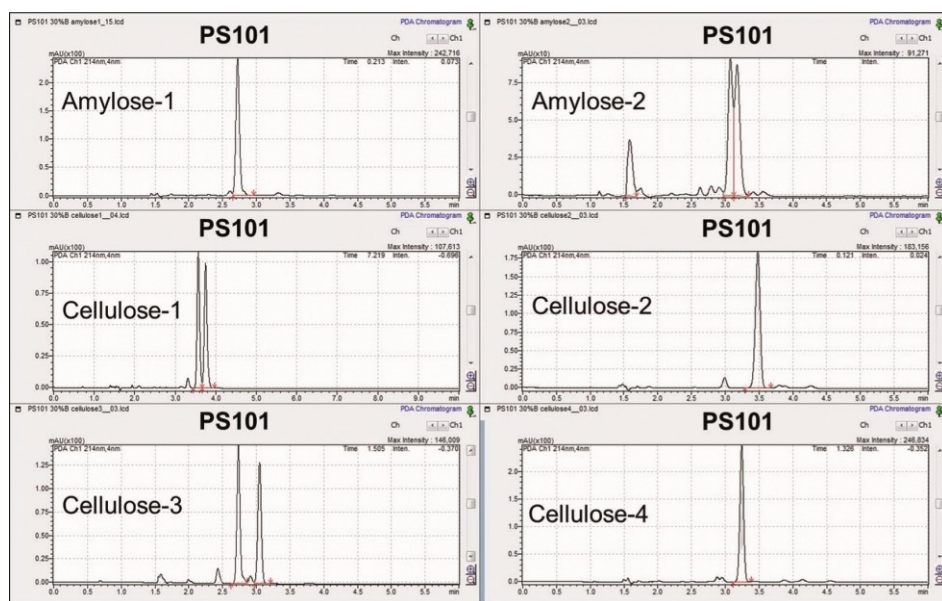


Abb. 3: Chromatogramme von PS 101 auf verschiedenen Säulen

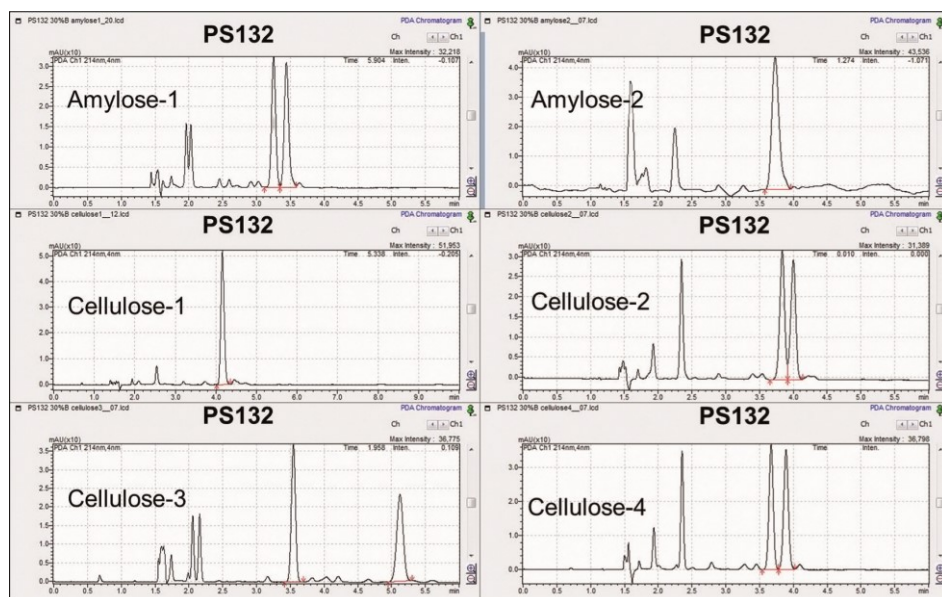


Abb. 4: Chromatogramme von PS 132 auf verschiedenen Säulen