

Warum nun auch noch SFC ?

Gründe und Grundlagen zum Einstieg in die SFC

Stefan Bieber, Thomas Letzel

Analytische Forschungsgruppe (AFG) am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München

Vorwort:

Im vorhergehenden Artikel vom 08.01.2015 haben wir versucht, die wechselvolle Geschichte der Superkritischen Fluid Chromatographie (SFC) zu beleuchten und aufzuzeigen, warum sich diese Technik bisher nur schwer durchsetzen konnte. Nun möchten wir erläutern, weshalb man die SFC neben den gut etablierten Techniken GC und HPLC überhaupt noch benötigt und wollen dann auch gleich etwas tiefer in die Grundlagen dieser Technik eintauchen. Wie wir sehen werden, gibt es extrem gute Gründe, die SFC zukünftig mehr zu berücksichtigen.

Trennung mit der SFC:

Die SFC stammt technologisch ursprünglich von der Gaschromatographie ab, da anfänglich Kapillarsäulen zur Trennung verwendet wurden (cSFC).¹ Diverse Chemikalien wurden dabei auf ihre Eignung als mobile Phase hin untersucht, darunter auch kurzkettige Kohlenwasserstoffe, N₂O und Ammoniak.²⁻⁴ Da die meisten dieser Substanzen umwelt- und / oder gesundheitsschädlich sind, setzte sich ausschließlich Kohlenstoffdioxid (CO₂) als mobile Phase durch. Zusätzlich ist der kritische Punkt mit 73,8 bar und 31°C technisch relativ einfach erreichbar. Das Interesse an cSFC hielt jedoch nicht lange an, da die Einsatzmöglichkeiten und die Reproduzierbarkeit der Systeme stark begrenzt waren.⁵ Parallel zur cSFC hatte sich die SFC mit gepackten Säulen (pSFC) Mitte der 1980er Jahre entwickelt. Das erste kommerziell verfügbare Gerät von Hewlett-Packard (1983) baute somit auch auf einer klassischen LC auf. Obwohl die pSFC technisch nahe bei der LC lag, schaffte sie auch hier den Durchbruch nicht. 1985 wurde dann allerdings der Grundstein für den späteren Siegeszug der SFC gelegt, nämlich im Feld der chiralen Trennungen. Mourier et al. zeigten, dass es möglich ist, Enantiomere unter Nutzung der SFC und chiraler Säulenmaterialien zu trennen.⁶ Zur Unterstützung der Analytelution wurde dem superkritischen

Fluid ein Modifizier beigemischt. Im präparativen Maßstab der Pharmaindustrie hat die SFC für die Aufreinigung von Arzneistoffen die HPLC bereits abgehängt. Nun stellt sich die Frage, warum die SFC gerade im präparativen Maßstab den Durchbruch schaffte. Um dies zu verstehen, beschäftigen wir uns nun zunächst mit den technischen und thermodynamischen Grundlagen zur SFC.

CO₂ als mobile Phase:

Kohlenstoffdioxid liegt bei Raumtemperatur gasförmig vor. Würde man es so zur Chromatographie nutzen, wäre man im Bereich der Gaschromatographie. Viel Freude hätte man so allerdings nicht, da CO₂ im Gegensatz zu den herkömmlichen GC-Trägergasen nicht inert ist. Um CO₂ für Trennungen verwenden zu können, muss man es folglich in einen „nützlicheren“ Zustand bringen. Durch Kompression und Temperaturerhöhung kann man das Gas verflüssigen und schließlich in den superkritischen Zustand, den Arbeitsbereich der SFC überführen. Oberhalb des kritischen Punkts erhält man ein Fluid, dessen Dichte flüssigkeitsähnlich ist, aber eine gasähnliche Viskosität besitzt. Dies bedeutet,

dass man ein dichtes aber sehr dünnflüssiges Fluid mit hohem Diffusionsvermögen vorliegen hat. Was passiert nun, wenn ein solches Fluid durch eine, mit porösen Partikeln gepackte, Chromatographiesäule befördert wird? Die niedrige Viskosität sorgt dafür, dass sich die Moleküle des Fluids leichter zwischen den Partikeln hindurch bewegen können. Das hohe Diffusionsvermögen sorgt aber auch dafür, dass die Moleküle der mobilen Phase zügig die Poren der stationären Phase durchdringen. Praktisch bedeutet dies, dass die Äquilibrierung der Säule sehr kurz sein kann (ca. 20 Säulenvolumina) und sehr hohe Flussraten (5 mL/min in analytischen Systemen) gefahren werden können. Zur Veranschaulichung haben wir kurzerhand einige Systemeinstellungen an unserer Anlage (eine Agilent 1260 Analytical SFC) variiert: Bei einem Fluss von 1,5 mL/min reinem CO₂ durch eine 150 x 2 mm Säule (5 µm, 100 Å) beträgt die Druckdifferenz von Säulenbeginn zu Säulenende gerade einmal 35 bar. Erhöht man den Fluss auf 3,0 mL/min, bei sonst gleichen Bedingungen, liegt der Druckabfall entlang der Säule bei lediglich 100 bar (Abb. 1). Die Druckver-

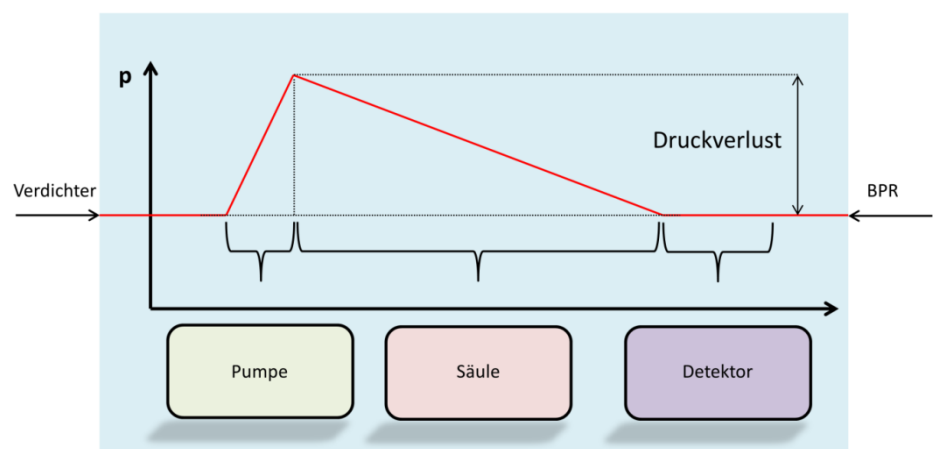


Abb. 1: Druckverlaufdiagramm einer SFC Trennung. Der CO₂ – Verdichter baut einen voreingestellten Druck am Eingang der binären Pumpe auf (oberhalb des kritischen Punkts möglich). Hinter der chromatographischen Säule baut der Backpressure Regulator den gleichen Druck auf. Um nun das Fluid durch die Säule fördern zu können, muss die Pumpe einen entsprechenden Überdruck aufbauen (Druckverlust).

luste in einer HPLC-Säule bei ähnlichen Bedingungen würden wesentlich höher ausfallen.

Fazit 1:

Die Eigenschaften von superkritischen Fluiden ermöglichen schnelle Trennungen und kurze Äquilibrationszeiten.

„Modifier“ in der mobilen Phase:

Versucht man nun Substanzen mittels SFC über eine Säule zu trennen, zeigt sich schnell ein Problem: CO₂ ist sehr unpolar und besitzt ein geringes Lösungsvermögen. Für die Trennung und Elution von Analyten ist es damit meistens notwendig, die mobile Phase durch eine polare Komponente zu erweitern und so die Elutionskraft zu erhöhen. Zu Beginn der SFC-Entwicklung war noch fälschlicherweise davon ausgegangen worden, dass sich die Polarität von CO₂ durch Druck beeinflussen lässt. Mit der Einführung der pSFC wurden erstmals auch sogenannte Modifier eingesetzt. Die Aufgabe des Modifiers war und ist es die Eigenschaften der mobilen Phase zu „modifizieren“, d.h. sie polarer zu machen und somit die Löslichkeit der Analyten in der mobilen Phase zu erhöhen.⁷ Am häufigsten kommen hierfür Methanol, Ethanol und Isopropanol zum Einsatz.

„Additive“ in der mobilen Phase:

Sollten Trennung oder Peakform durch Modifizierzusatz noch nicht ausreichend gut sein, besteht die Möglichkeit Additive zuzusetzen. Dies sind Salze, Säuren oder Basen, die die Interaktionen von Analyt und stationärer bzw. mobiler Phase beeinflussen können.

Dank Modifier und Additiven ist es nun also möglich sehr polare Substanzen mittels SFC zu trennen. Die als Modifier verwendeten Alkohole lösen sich generell gut in CO₂, dieses Gemisch besitzt dann aber veränderte physikalische Eigenschaften. Dies resultiert in einer drastischen Verschiebung des kritischen Punktes. 10,7% Methanol in CO₂ verschiebt den kritischen Punkt von den ursprünglich 73,8 bar und 31°C nach 130 bar und 74°C.⁷ Bei Gradientenelutionen kann es folglich passieren, dass eine SFC Trennung im superkritischen Bereich beginnt (geringer Modifieranteil), aber im Verlauf des Gradienten die mobile Phase „sub“-kritisch wird. Wird der Modifieranteil wieder verringert, stellt sich direkt wieder ein superkritischer Zustand ein. Ob eine Trennung im super- oder „sub“-kritischen Bereich stattfindet, ist für die Effizienz meist nicht erheblich und auch dem Chromatogramm nicht anzusehen.⁸

Fazit 2:

Modifier und Additive ermöglichen und optimieren die Trennung unterschiedlichster Substanzen mit der SFC. Die Erhöhung des Modifieranteils kann dazu führen, dass das Fluid nicht mehr superkritisch vorliegt, was sich jedoch nicht zwingend auf die Trenneffizienz auswirkt.

Mobile Phase und Detektoren:

Die Trenneffizienz ist meist nicht beeinflusst, allerdings können die „sub“-kritischen Phasen Probleme in der anschließenden UV- oder ELSD-Detektion verursachen. Diese Probleme resultieren dann von einer Phasentrennung des superkritischen CO₂ und dem flüssigen Modifier.⁷ Der eingangs erwähnte Druckabfall entlang der Chromatographiesäule, kann ebenfalls dafür sorgen, dass der kritische Punkt bereits in der Säule unterschritten wird. Um dies zu verhindern ist heutzutage ein sogenannter Back Pressure Regulator (BPR) hinter Säule und Detektor installiert. Durch den BPR wird am Ende des Systems ein definierter, konstanter Druck (optimalerweise > p_{krit}) aufgebaut. Da das ganze System somit unter Druck steht, müssen alle im System befindlichen Bauteile darauf ausgelegt sein. Bei Pumpen und Säulen stellt dies kein Problem dar, wohl aber beim Detektor hinter der Säule. Flusszellen, wie sie in HPLC eingesetzt werden, halten allgemein Drücken zwischen 50 und 120 bar stand, die in SFC Detektoren bis zu 400 bar. Hier kommen heute meist UV/Vis-(DAD)-Detektoren zum Einsatz. Für diese Messungen ist es notwendig eine homogene mobile Phase vorliegen zu haben. Im schlimmsten Fall könnten sich nämlich Gasblasen in der Flusszelle des Detektors bilden, was eine genaue Messung der Analyten aussichtslos macht. Es muss im Detektor also ein definierter Fluidzustand herrschen. Da dies durch Druck und Temperatur geregelt wird, ist die Flusszelle normalerweise beheizbar und der Detektor vor dem BPR im System verbaut. Ein eventuell im Anschluss daran befindliches Massenspektrometer könnte allerdings wieder ohne Probleme gekoppelt werden, da aufgrund der Dr-

ckentlastung in der Ionenquelle das gasförmige CO₂ verschwindet und der zurückbleibende Modifier nur kleine bis keine Tröpfchen bildet und somit (unterstützend durch Erhitzen) eine extrem effiziente Ionisation gewährleistet ist. Auch der seit kurzem koppelbare Flammenionisationsdetektor und der Streulichtdetektor können in dieser Art problemlos mit der SFC betrieben werden.

Fazit 3:

SFC Trennungen erfordern etwas mehr apparativen Aufwand und Vorsichtsmaßnahmen als HPLC-Trennungen. Besonders die benötigten Maßnahmen für die Einstellung eines erhöhten Rückdrucks zur Trennung sind entscheidend für die optische Detektion der Analyten und erfordern erhöhte Aufmerksamkeit. Gasphasenbasierte Detektoren hingegen sind unproblematisch koppelbar.

Stationäre Phasen in der SFC:

Die SFC ist –wie erwähnt– aus der GC hervorgegangen, aber durch den Einsatz gepackter Säulen näher an die LC gerückt. Zuordnen kann man sie leider zu keiner der beiden Techniken. Auch beim Diffusions- und Lösungsvermögen der mobilen Phase, steht die SFC zwischen LC und GC (Abb. 2). Wie auch in der LC bietet die SFC eine große Auswahl an stationären Phasen, denn sämtliche aus der Flüssigchromatographie bekannte Materialien, können auch für SFC Trennungen eingesetzt werden. In der LC ist die C18 Phase momentan der Goldstandard und wird fast immer eingesetzt. Für SFC Trennungen gibt es derzeit keine Standardphase, die verbreitet Einsatz findet. Die Retentionsmechanismen die in stationären LC Phasen auftreten, müssen nicht identisch sein oder im selben Umfang in SFC Trennungen vorliegen. Eine Vorhersage, wie sich ein Analyt auf einer stationären Phase in der SFC verhält, ist deshalb bisher noch selten möglich. Aus diesem Grund werden meist mehrere unterschiedliche stationäre Phasen auf ihre Eignung für die Lösung einer chromatographischen Problemstellung hin untersucht.

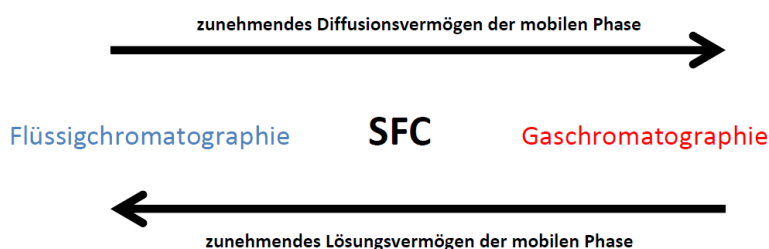


Abb. 2: Einordnung der SFC zwischen LC und GC, auf Grund von speziellen Eigenschaften der mobilen Phase.

Fazit 4:

Stationäre Phasen in der SFC werden bisher noch jedes Mal für jeden einzelnen Satz Analyten getestet, da die Trennmechanismen noch nicht geklärt sind.

Wieso dann auch noch die SFC nutzen?

Wie man bereits aus der Zusammensetzung der mobilen Phase erkennen kann, ist die SFC teilweise mit Normalphasentrennungen (NPLC) in der Flüssigchromatographie vergleichbar. Ein wichtiger Unterschied ist hierbei aber, dass NPLC große Mengen an organischem Lösungsmittel benötigt, welches teuer in Anschaffung und Entsorgung ist sowie ein Risiko für Umwelt und Gesundheit darstellt. SFC benötigt lediglich CO₂ -welches relativ günstig zu beziehen ist- und geringe Anteile Methanol. Da die mobile Phase nach der Trennung zum Großteil durch Expansion in die Gasphase übergeht, muss prinzipiell nichts entsorgt werden. Der Ausgang von HPLCs hängt meist an einem Lösungsmittel-abfallkanister, eine SFC benötigt lediglich einen Abluftanschluss. Dieser Unterschied trägt derzeit auch maßgeblich zum Erfolg der SFC bei.

In vielen Bereichen wird Chromatographie zur Aufreinigung von chemisch produzierten Molekülen genutzt. Ein wichtiger Sektor dabei ist die Pharmaindustrie. Arzneiwirkstoffe werden heute häufig im präparativen Maßstab per SFC aufgereinigt. Die Gründe für die SFC liegen wie beschrieben auf der Hand. Sie besticht in zwei entscheidenden Bereichen: Zeit und Kosten. Durch die niedrige Viskosität können die Flussraten in SFC sehr viel höher eingestellt sein als in HPLC Systemen. Dies führt zu deutlich schnelleren Trennungen bei vergleichbarer Effizienz. Wird die Zielkomponente anschließend aufgefangen, geht ein Großteil der mobilen Phase (CO₂) selbstständig in die Gasphase über. Zurück bleibt nur der Modifier, welcher aber nur einen geringen Anteil der mobilen Phase darstellt. Dies verringert die Kosten zur Evaporation des Lösungsmittels deutlich. Dadurch, dass CO₂ ein Abfallprodukt der Industrie ist, kann es günstig in hoher Reinheit genutzt werden, muss nicht gesondert entsorgt werden, und kann als klimaneutral betrachtet werden (und ist damit wesentlich ‚grüner‘ als andere Lösungsmittel).

Finales Fazit:

Die SFC kann mit ähnlichem Aufwand betrieben werden wie eine HPLC. Die Anforderungen an die Hardware einer SFC sind zwar etwas höher als an eine HPLC, andererseits können die neuen SFC-Systeme aber auch als HPLC betrieben werden. Von einigen Herstellern gibt es bereits Optionen während eines Laufs zwischen SFC- und UHPLC-Modus zu wechseln. Die physikalischen und thermodynamischen Grundlagen der SFC sind etwas komplexer als man es von der HPLC gewohnt ist, dennoch ist die Technik gut beherrschbar und reproduzierbar.⁹ Das breite Spektrum an stationären Phasen ermöglicht letztendlich auch einen breiten Einsatz der SFC. Die Vorteile der SFC verglichen mit der HPLC liegen ganz klar im Feld der Wirtschaftlichkeit (sowie der Schnelligkeit), der veränderten Selektivität, und der Möglichkeit nachhaltig Ressourcen zu schonen (und somit der ‚grünen‘ Analytik näher zu kommen).

Weitere Informationen und anschauliche Beispiele zum Einsatz der SFC in der Pharmaindustrie finden sich auf der Homepage der [Green Chemistry Group](#). Unter „Past Conferences“ können dort Folien von vielen Vorträgen aus den vergangenen Jahren angesehen geladen werden. Für das weitere Studium über den derzeitigen Wissensstand zu SFC-Grundlagen seien einige sehr informative Review-Artikel empfohlen.^{7,10-15}

Danksagung:

Wir danken dem Lehrfonds der TUM für die finanzielle Unterstützung unseres Lehrkonzeptes 'Analytik+' in dessen Rahmen unter Anderem diese Serie entsteht.

**Referenzen:**

- (1) Novotny, M.; Springston, S. R.; Peadar, P. A.; Fjeldsted, J. C.; Lee, M. L. *Anal. Chem.* 1981, 53, 407A – 414A.
- (2) Jackson, W. P.; Markides, K. E.; Lee, M. L. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1986, 9, 213–217.
- (3) Huetz, A.; Klesper, E. *J. Chromatogr. A* 1992, 607, 79–89.
- (4) Lauer, H. H.; McManigill, D.; Board, R. D. *Anal. Chem.* 1983, 55, 1370–1375.
- (5) Fekete, S.; Perrenoud, A. G.; Guillaume, D. *Curr. Chromatogr.* 2014, 1, 15–40.
- (6) Mourier, P. a; Eliot, E.; Caude, M. H.; Rosset, R. H.; Cedex, P.; Tambute, A. G.; Bouchet, L. *Anal. Chem.* 1985, 2819–2823.
- (7) Lesellier, E.; West, C. *J. Chromatogr. A* 2015, 1382, 2–46.
- (8) Tarafder, A.; Hill, J. F.; Baynham, M. *Chromatogr. Today* 2014, 7, 34–36.
- (9) Bieber, S.; Letzel, T. *Gesellschaft Dtsch. Chem. Mitteilungen der Fachgr. Umweltchemie und Ökotoxikologie* 2015, 01, 11–16.
- (10) Tarafder, A.; Iraneta, P.; Guiochon, G.; Kaczmarzki, K.; Poe, D. P. *J. Chromatogr. A* 2014, 1366, 126–135.
- (11) Guiochon, G.; Tarafder, A. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1037–1114.
- (12) Tarafder, A.; Kaczmarzki, K.; Poe, D. P.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* 2012, 1258, 136–151.
- (13) Kaczmarzki, K.; Poe, D. P.; Tarafder, A.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* 2012, 1250, 115–123.
- (14) Poe, D. P.; Veit, D.; Ranger, M.; Kaczmarzki, K.; Tarafder, A.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* 2012, 1250, 105–114.
- (15) West, C. *Curr. Anal. Chem.* 2014, 10, 99–120.