

Potential der SFC : Von analytischer, präparativer, chiraler und achiraler Trennung

Stefan Bieber und Thomas Letzel

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

Vorwort

In den beiden bereits von uns veröffentlichten Artikeln wurde die 'Superkritische Fluid Chromatographie', die SFC, als neue „alte“ Trenntechnik beschrieben. Seit der Einführung der neuesten Gerätegeneration ist die SFC sehr gut beherrschbar und erobert sich langsam aber sicher ihren Platz zwischen Gas- und Flüssigphasenchromatographie.

In diesem Artikel werden nun die Möglichkeiten der analytischen und präparativen SFC erläutert, sowie die klassischen (chiralen) und neu aufkommenden (achiralen) Einsatzgebiete der SFC vorgestellt. In diesem Rahmen gibt es auch einen kurzen Marktüberblick über die derzeit gängigsten Geräte und Hersteller.

Die SFC kann grundsätzlich sowohl zur Charakterisierung von Analyten, wie auch zu deren Aufreinigung und Isolierung verwendet werden. Dementsprechend werden die Anwendungen auch in 'Analytisch' und 'Präparativ' eingeteilt. Das Unterscheidungsmerkmal ist hier die Dimensionierung der Geräte.

Analytische SFC:

Im analytischen Maßstab arbeitet man typischerweise mit Flussraten bis maximal 5 oder 10 mL/min und Säulen bis ca. 4,6 mm Innendurchmesser. Neben den bereits etablierten SFC-Geräteherstellern wie Agilent, Jasco oder Waters, bieten mittlerweile auch andere HPLC Hersteller SFC-Geräte an. Shimadzu präsentierte vor kurzem auf der Pittcon in New Orleans eine SFE-SFC Koppelung, die es ermöglicht Proben zunächst mit superkritischem CO₂ zu extrahieren (SFE) und anschließend über SFC zu trennen. Auch die Firma Jasco stellte eine ganze Serie neuer SFC Geräte vor (SF-4000 Se-

ries).¹ Die Firma PIC Solutions hingegen, ist seit mehr als 10 Jahren fast ausschließlich auf die Herstellung von SFC-Systeme spezialisiert und bietet diese somit schon länger als die Anderen an. Eine Übersicht aller Hersteller von analytischen SFCs ist in Tabelle 1 dargestellt. Verglichen mit Ultra-High-Performance Flüssigchromatographie (UHPLC) Systemen mit bis zu 1000 bar, sind die maximal zulässigen Drücke im SFC-System mit 400 bis 600 bar zwar eher niedrig, dennoch können problemlos Säulen mit sub-2 µm Partikeln verwendet werden. Grund hierfür ist die geringere Viskosität der mobilen Phase in der SFC, die zu einem deutlich niedrigeren Vorsäulendruck führt.

Das analytische Segment ist wohl der Bereich in dem die SFC derzeit auf das größte Interesse stößt. In einigen (wenigen) Anwendungsbereichen ist die SFC auch bereits lange etabliert. In vielen anderen Feldern dagegen wird die SFC erst auf ihre Eignung hin getestet.

Präparative SFC:

Der wohl aufwändigste Bereich der Medikamentenherstellung ist die Aufreinigung von Arzneistoffen. Wirkstoffe müssen im 'Downstreaming'-Prozeß schnell, mit hoher Wiederfindungsrate sowie in höchster Reinheit von anderen Substanzen getrennt bzw. isoliert werden. Durch die großen Probenmengen sollten die Trennsysteme auch entsprechend hohe Flussraten aufweisen. Für LC-Trennungen bedeutet dies auch einen

hohen Lösungsmittelverbrauch. Die SFC weist in diesem Feld einen deutlich geringeren Lösungsmittelverbrauch auf. Erste apparative Ansätze für präparative SFC Systeme gehen zurück bis in das Jahr 1986, aber wie bereits im **ersten Teil** dieser Serie (vom 08.01.2015) beleuchtet, war die Stabilität der Geräte noch nicht zufriedenstellend.² Mittlerweile haben sich mehrere Unternehmen mit äußerst robusten Geräten auf dem Markt etabliert (Tabelle 2). Im Bereich 20 bis 200 mL/min spricht man von semi-präparativen, darüber hinaus von präparativen Anlagen. Die derzeit höchsten Flussraten liegen im Bereich um 1000 mL/min mit maximalem Systemdrücken im Bereich von 300 bis 500 bar. Flussrate und maximal zulässiger Druck entscheiden auch über die verwendbaren Säulendimensionen. Viele Geräte, vor allem im semi-präparativen Maßstab verfügen über Säulenschaltventile. Diese ermöglichen es gleichzeitig mehrere Säulen mit verschiedenen stationären Phasen im Säulenofen vorzuhalten. Dadurch ist sehr einfach unterschiedliche Phasen auf ihre Trenneigenschaften für verschiedene Analyten hin zu untersuchen. Der Einsatz von SFC für 'simulated moving bed' Anwendungen ist ebenfalls möglich.³ Hierbei werden mehrere gleiche stationäre Phasen in einen Ring geschlossen. Dies ermöglicht eine deutlich effektivere Nutzung der stationären Phase als in herkömmlichen Ansätzen. Eine besondere Herausforderung stellt in der präparativen SFC die Fraktionierung oder Probensammlung dar. Am Ausgang des SFC-Systems

Tabelle 1: Übersicht analytischer SFC Systeme (Stand 06/2015; Gewährleistung für die Vollständigkeit der Systeme wird nicht übernommen)

Hersteller	Modell	Flussraten [mL/min]	max. Säulendurchmesser [mm]	max. Druck [bar]	Website
Agilent	1260 Infinity Analytical SFC System	bis 5 mL/min	4,6	600 bar	www.chem.agilent.com
Jasco	SF-2000 / SF-4000	bis 10 mL/min	10	350 bar	www.jascoinc.com
PIC Solutions	SFC-PICLAB ANALYTIC	bis 20 mL/min	10	350 bar	www.pic-solution.com
Shimadzu	Nexera-UC SFE-SFC	bis 5 mL/min	k.A.	660 bar	www.shimadzu.com
Waters	Acquity UPC ²	bis 4 mL/min	8	400 bar	www.waters.com

liegt die mobile Phase nach der Trennung hauptsächlich gasförmig vor, der Modifier als Aerosol. Um Fraktionen erfolgreich aufzufangen müssen folglich spezielle Verfahren angewandt werden (Zyklon oder Gas-Flüssigkeits-Separatoren). Allerdings bietet die SFC somit auch den Vorteil, dass durch den CO₂-Anteil eben weit weniger mobile Phase, als in der LC verdampft werden muss. Die meisten Anlagen verfügen über ein automatisches Fraktionierungssystem mit sechs bis acht Gefäßen. Das Volumen der Gefäße kann bis zu einem Liter betragen, was es ermöglicht Substanzen im mg/Tag bis kg/Tag Maßstab auf zu reinigen.

Wer sich über die Anwendungsgebiete von SFC informiert, der stößt sehr schnell auf die Unterteilung in chirale und achirale Trennungen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Trennungsarten liegt überwiegend in der jeweils verwendeten Phase. Die gemeinsame Basis von chiralen und achiralen stationären Phasen sind meist Silika-Partikel. An diese können verschiedene chemische Gruppen über Si-O-Brücken gebunden werden. Je nachdem, welche chemischen Eigenschaften ein Gruppe besitzt, weist die Oberfläche der stationären Phase eine spezifische Selektivität auf.

Chirale SFC:

Die Trennung und/oder Isolierung von Enantiomeren aus Racematen ist häufig ein kritischer Schritt in der Arzneimittelentwicklung bzw. der anschließenden Produktion. Sollten von einem Arzneistoff zwei Enantiomere vorliegen, erwarten die Zulassungsbehörden eine getrennte Untersuchung beider Substanzen. Für die Trennung dieser Moleküle werden sogenannte spezielle chirale stationäre Phasen (CSP) verwendet. Derzeit sind mehr als 200 verschiedene CSPs kommerziell verfügbar. Dabei handelt es sich unter anderem um Amylose- oder Cellulose-derivate, makrozyklische Glykopeptide,

Tabelle 2: Übersicht präparativer SFC-Systeme

(Stand 06/2015; Gewährleistung für die Vollständigkeit der Systeme wird nicht übernommen)

Hersteller	Modell	Empfohlene Flussraten [mL/min]	max. Säulendurchmesser [mm]	max. Druck [bar]	Website
Jasco	Semi-Prep SP-2086	1 - 20	bis 10	350 bar	www.jascoinc.com
	Prep PR-2088	bis 180	bis 30	500 bar	
	SF-4000 Serie	bis 120	bis 30	500 bar	
Novasep	Supersep 150	30 - 150	20 - 30	300 bar	www.novasep.com
	Supersep 400	100 - 400	30 - 50	300 bar	
	Supersep 1000	250 - 1000	50 - 80	300 bar	
	Supersep 3000	600 - 3000	80 - 100	300 bar	
PIC Solutions	SFC-PICLAB Hybrid	10 - 150	4,6 - 30	300 bar	www.pic-solution.com
	SFC-PICLAB Prep 150	bis 150	20 - 30	300 bar	
	SFC-PICLAB Prep 350	bis 350	20 - 50	250 bar	
	SFC-PICLAB Prep 600	bis 600	50 - 75	300 bar	
	SFC-PICLAB Prep 1000	bis 1000	75	300 bar	
Sepiatec	Prep SFC 100	bis 150	20 - 30	300 bar	www.sepiatec.com
	Prep SFC 360	bis 360	25 - 50	300 bar	
Waters	Prep 15 SFC Purification System	bis 15	4,6 - 10	345 bar	www.waters.com
	Investigator SFC System	bis 15	4,6 - 10	300 bar	
	Prep 80q	45 - 80	20	380 bar	
	Prep 100q	bis 100	20 - 30	414 bar	
	Prep 200q	100 - 200	23 - 30	380 bar	
	Prep 350	200 - 350	30 - 50	320 bar	

Cyclodextrine und ähnliche Phasen.⁴ CSPs können sowohl in LC- als auch in SFC-Systemen eingesetzt werden. Hier hat die SFC – wie erwähnt – oft den Vorteil schnellere und vor allem günstigere Trennungen, als eine LC zu ermöglichen. Aus diesem Grund ist die chirale SFC in der Pharmaindustrie auch schon seit Jahren sehr gut etabliert.⁴ Beispiele für chirale SFC wären die Trennung von (R)- und (S)-Clenbuterol⁵, aber oder die Trennung von Profen-Enantiomeren⁶.

Achirale SFC:

Für achirale Trennungen können prinzipiell alle, aus der LC bekannten stationären Phasen, eingesetzt werden. Die Bandbreite reicht von Umkehr- bis hin zu Normalphasen und HILIC-Materialien. Häufig ist es schwer vorhersehbar, welche Säule sich für eine Trennung am besten eignet. Die Selektivität einer Phase kann in der SFC komplett anders sein als in der LC. Konsequenterweise ist es bisher üblich die Trennung zunächst an einer Auswahl unterschiedlicher Säulen zu testen, um so geeignete Säulen zu identifizieren. Im Folgenden werden einige Gebiete der achiralen SFC vorgestellt:

- **Pharmaka:** Die SFC wird – neben chiralen – auch für Trennungen von achiralen Pharmaka eingesetzt. Bereits zu Beginn der 1990er Jahre wurde im Pharmabereich versucht achirale Moleküle mittels SFC zu trennen. Beispiele hierfür sind Benzodiazepine und deren Metabolite, oder trizyklische Antidepressiva.⁷ Auch Opiode und Barbiturate können nachgewiesen und getrennt werden.^{7,8} Weiter wurde der quantitative Nachweis mehrerer (Veterinär-) Pharmaka mittels SFC/MS-MS erbracht.⁹ Anwendung – wie die hier genannten – qualifizieren die SFC somit auch für den Einsatz in der Forensik.
- **Petrochemie:** Für die Bestimmung des Gehalts an aromatischen Verbindungen in Dieselmotorkraftstoff wurde die erste Standardmethode für SFC überhaupt zugelassen (ASTM D 5186-91). Die Technik und Methode erwiesen sich als äußerst zuverlässig und reproduzierbar.⁷ Auch zum Nachweis von Verunreinigungen in Biodieselmotorkraftstoffen wurde die SFC bereits erfolgreich eingesetzt.¹⁰
- **Nahrungsmittel:** Die Nahrungsmittelanalytik befasst sich mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Analyten in häufig sehr komplexen Matrices. Die SFC wurde bereits

zur Trennung und zum Nachweis von Lipiden eingesetzt. Hier ist sie im Speziellen für die Trennung von Fettsäuren, Triacylglyceriden, Phospholipiden und Carotinoiden sehr gut geeignet.¹¹

- **Naturprodukte:** Für die Isolierung und den Nachweis von Substanzen in Naturprodukten kommt sowohl präparative, wie auch analytische SFC zum Einsatz. Je nach Zielsubstanz werden chirale oder achirale Trennungen genutzt. Beispiele aus dem präparativen nicht-chiralen Einsatz sind die Isolierung von Tocopherol aus Palmöl, Antioxidantien aus Rosmarin, oder Spirostanol-Saponinen aus Bockshornklee.¹² Auch der Nachweis von Vitaminen, wie Vitamin A und K oder Coenzym A mittels SFC ist möglich.¹²
- **Life Sciences:** In diesem breiten Feld gibt es bislang noch keine veröffentlichte Standardanwendung für die SFC. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die SFC in der Lage ist Peptide wie Gramicidine zu trennen.¹³ Bei dem momentan steigenden Interesse an der SFC, werden aber sicher zeitnah weitere Anwendungen hinzukommen.
- **Umweltchemikalien:** In Umweltproben trifft man oft auf ein breites Spektrum an Chemikalien aus verschiedenen Quellen. Meist werden diese Substanzen durch menschlichen Einfluss in Böden oder Gewässer eingetragen. Traditionell beinhaltet das Umweltmonitoring überwiegend Pestizide und (andere) unpolare Substanzen. In den letzten Jahren rücken jedoch vor allem Pharmaka und Industriechemikalien in den Fokus der Aufsichtsbehörden. Diese können teilweise deutlich polarer sein, was die herkömmlichen Analysemethoden an ihre Grenzen bringt. Für das Monitoring von Pestiziden und Herbiziden in Gewässerproben sind bereits SFC Methoden zugelassen.⁷ Zur Zeit laufen intensive und erfolgreiche Untersuchungen zum Einsatz der SFC, gekoppelt mit Flugzeit-Massenspektrometrie, zum parallelen Nachweis von polaren und unpolaren Substanzen im Screening von Gewässerproben.¹⁴

Einen tieferen Einblick in das Anwendungsspektrum der SFC bieten u.a. die Internetseiten der Hersteller **Agilent**, **Jasco** und **Waters**.

Die SFC wird weder GC noch LC ersetzen können, aber als Bindeglied zwischen den beiden Techniken wird sie eine zunehmend bedeutende Rolle spielen. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Technik sind äußerst vielfältig. Sowohl im analytischen, wie auch im präparativen Maßstab gibt es Felder, in denen man an der SFC nicht mehr „vorbei kommt“. Dadurch, dass eine ständig wachsende Palette an Geräten verfügbar ist und die Systeme immer weitere Verbreitung finden, werden die Anwendungsbereiche in den kommenden Jahren noch deutlich zunehmen. Das vollständige Potential der SFC ist noch immer nicht absehbar, deshalb wird es spannend, die kommenden Entwicklungen zu verfolgen.

Sollten Sie noch weitere SFC-Hersteller kennen, so würden wir uns sehr freuen, wenn Sie uns diese mitteilen würden, damit wir die Listen aktuell halten können.



Danksagung:

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

Referenzen:

- (1) Dong, M. W. *LCGC Eur.* 2015, 24, 223–231.
- (2) Taylor, L. T. J. *Supercrit. Fluids* 2009, 47, 566–573.
- (3) Taylor, L. T. *Anal. Chem.* 2008, 80, 4285–4294.
- (4) Desfontaine, V.; et al., *Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.007>

- (5) Fountain, K. J.; Wess, C. *Application Highlight, Waters.* 2012, pp. 1–2.
- (6) Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P. *Application Note, Agilent Technologies.* 2011, p. 8.
- (7) Berger, T. A. *Packed Column SFC; Royal Society of Chemistry: Cambridge,* 1995.
- (8) Danaceau, J. P.; Fountain, K. J.; Chambers, E. E. *Application Note, Waters.* 2013, pp. 1-9.
- (9) Naegele, E.; Thiemann, J.; Glauner, T. *Application Note, Agilent Technologies.* 2014, p. 6.
- (10) Ashraf-Khorassani, M.; Yang, J.; Rainville, P.; Jones, M. D.; Fountain, K. J.; Isaac, G.; Taylor, L. T. *J. Chromatogr. B* 2015, 983-984, 94–100.
- (11) Bernal, J. L.; Martín, M. T.; Toribio, L. J. *Chromatogr. A* 2013, 1313, 24–36.
- (12) Hartmann, A.; Ganzer, M. *Planta Med.* 2015.
- (13) McCarthy, S. M.; Aubin, A. J.; Jones, M. D. *Application Note, Waters.* 2012, pp 1-6.
- (14) Bieber, S.; Letzel, T. *Gesellschaft Dtsch. Chem. Mitteilungen der Fachgr. Umweltchemie und Ökotoxikologie* 2015, 01, 11–16.