

## Stationäre Phasen in SFC: Welche Säule passt zu welchen Substanzen?

Stefan Bieber und Thomas Letzel

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

Im letzten [Artikel](#) unserer Serie vom 02.07.2015 haben wir Ihnen die klassischen (chiralen) und neu aufkommenden (achiralen) Einsatzgebiete der SFC vorgestellt. Die chirale SFC ist sowohl im präparativen, wie auch analytischen Maßstab weitgehend etabliert. Grund dafür ist die deutliche Überlegenheit der Technik gegenüber flüssigphasen-basierten Techniken für die Trennung von chiralen Analyten. Die achirale SFC dagegen, ist gerade erst noch dabei, sich einen Platz in der Analytik zu sichern. Wie bereits in dem vorhergehenden [Artikel](#) erwähnt, können stationäre Phasen aus der Flüssigphasenchromatographie (LC) auch in der SFC eingesetzt werden. Zusätzlich kommen auch immer mehr SFC-spezifische stationäre Phasen auf den Markt. Hieraus ergibt sich heute schon eine sehr große Vielfalt an Materialien, die es möglich machen ein breites Spektrum an Analyten zu trennen. Dabei stellt sich aber jedes Mal auch die Frage, welche Säule für welchen Analyten am besten geeignet ist. Hilfreich sind hier vor allem Klassifizierungsschemata, die eine entsprechende Vorhersage erleichtern.

### Das herkömmliche Klassifizierungsschema:

Im klassischen – aus der LC bekannten – Klassifizierungsschema werden stationäre Phasen meistens nach ihren oberflächen-gebundenen Liganden eingeteilt. Die wohl bekanntesten Klassen sind dabei die Normal- und Umkehrphasen.

Normalphasen sind dadurch gekennzeichnet, dass die gebundenen Liganden polar sind und polare Lösungsmittel eine höhere Elutionskraft besitzen als Unpolare. Typische Normalphasen bestehen entweder aus unmodifizierten Silicapartikeln mit Silanoloberflächen, oder die Silanole sind durch polare Gruppen wie Diol-, Amino-, Cyano-, und andere polare Gruppen (eventuell über kurze Kohlenwasserstoffketten gekoppelt) modifiziert. Auf Grund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften, werden in Normalphasen also polare Substanzen stärker zurückgehalten, d.h. retardiert, als unpolare.

Auf den sogenannten Umkehrphasen dagegen, werden unpolare Substanzen stärker zurückgehalten als polare. Grund dafür ist, dass die Phasen generell mit unpolaren Gruppen modifiziert sind, welche sowohl aliphatische, wie auch aromatische Strukturen enthalten können. Unpolare Lösungsmittel weisen hier eine höhere Elutionskraft als polare Lösungsmittel auf. Ausgehend von dieser Klassifizierung ist es in der LC möglich, auf Basis der Polarität der Analyten vorherzusagen, welche stationäre Phase am besten geeignet ist für die Trennung welcher Analyten. Es sei erwähnt, dass weitergehende Chromatographiematerialien, wie ionische Phasen und Phasen zur Affinitätschromatographie in diesem Tipp bewusst nicht berücksichtigt werden.

In der SFC ist solch einfache Vorhersage häufig nicht möglich. Für Normalphasentrennungen in der LC kann beispielsweise Toluol als Initialzeitmarker eingesetzt werden, da es keine Retention aufweist. In SFC-Trennungen jedoch, wird Toluol auf Normalphasen sehr wohl zurückgehalten und kann sogar von anderen hydrophoben Substanzen getrennt werden.<sup>1</sup> Die aus Normal- und Umkehrphase bekannten Trennmechanismen, wie hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkungen reichen somit nicht aus, um die Trennungsvorgänge in der SFC zu erklären. Dies liegt unter anderem daran, dass die mobile Phase in der SFC, im Gegensatz zur LC, kompressibel ist. Das hat zur Folge, dass sich die Änderung der Flussrate, oder die Zugabe von Modifiern in die mobile Phase drastisch auf die Trennung auswirken können.<sup>2</sup> Da das herkömmliche Klassifizierungsschema somit für SFC Anwendungen meistens nicht aussagekräftig ist, müssen Säulen hier anders bewertet werden.

### Alternatives Klassifizierungsschema für SFC-Anwendungen

Durch die bislang unzureichende Kenntnis der Retentionsmechanismen in SFC, fällt es schwer stationäre Phase so zu ordnen, dass Vorhersagen auf die Einsetzbarkeit getroffen werden können. Eric Lesellier und Caroline

West haben stattdessen ein Klassifizierungssystem entwickelt, das sogenannte lineare Solvations-Energie Beziehungen nutzt (linear solvation energy relationships, LSER).<sup>3</sup> Das System verwendet Abrahams-Deskriptoren und die folgende Gleichung stellt den Retentionsfaktor  $k$  mit freien Energiewechselwirkungen in Zusammenhang:<sup>4,5</sup>

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

Die Großbuchstaben stellen dabei jeweils die Stoffdeskriptoren dar, die mit bestimmten Wechselwirkungseigenschaften verbunden sind, die Kleinbuchstaben die jeweiligen Systemkonstanten.  $c$  ist ein vom Phasenverhältnis abhängiger Faktor,  $E$  stellt die Exzess-Molrefraktion dar und gibt die Polarisierbarkeit der Substanz im Vergleich zu  $n$ -Alkanen an.  $S$  entspricht der Polarisierbarkeit und Dipolarität.  $A$  und  $B$  geben die Azidität bzw. Basizität an, oder auch die effektive Gesamtstärke der Wasserstoffbrücken-donoren und -akzeptoren im Molekül an.  $V$  entspricht dem charakteristischen McGowan-Volumen, welches in  $\text{cm}^3/\text{mol}$  das molare Volumen eines Stoffes näherungsweise angibt. Die Systemkonstanten werden durch multilineare Regression von Retentionswerten von Substanzen mit bekannten Deskriptoren berechnet.<sup>5</sup> Für einige Substanzen sind Werte in der Literatur verfügbar.<sup>6</sup> Obige Gleichung eignet sich somit sehr gut, verschiedene stationäre Phasen miteinander zu vergleichen. Allerdings ist es dabei zwingend notwendig, dass die Bedingungen in der mobilen Phase konstant gehalten werden. Veränderungen der Flussrate, des Modifizerteils, und Ähnliches würden sich durch Änderung der Viskosität, Dichte und Diffusionseigenschaften der mobilen Phase direkt auf die Deskriptoren und damit die Trenneffizienz auswirken.

Die Darstellung der Ergebnisse kann auf mehrere Arten erfolgen, tabellarisch, in Einzelgraphen für jede stationäre Phase, oder in sogenannten Spider-Diagrammen. In diesem Diagramm können sämtliche klassifizierten stationären Phasen als Punkte dar-

gestellt und verglichen werden. Die Grundlage des Diagramms sind dabei die fünf betrachteten und zweidimensional dargestellten Wechselwirkungen (Abbildung 1). Zwischen diesen fünf Achsen werden die einzelnen stationären Phasen als Punkte eingetragen. Position und Größe der Punkte spiegeln die Stärke der Wechselwirkungen wider.<sup>5</sup> Polare stationäre Phasen werden nahe der S-, B- und/oder A-Achsen zu finden sein, unpolare nahe der E- und V-Achsen. Mischformen dieser Phasen finden sich entsprechend in den Zwischenbereichen, wie z. B. polare Alkylphasen zwischen A- und V-Achse.

Die Polarität der stationären Phasen im Spider-Diagramm nimmt von links nach rechts zu. Je weiter einzelne stationäre Phasen voneinander entfernt sind, desto unterschiedlicher ist deren Selektivität.<sup>5</sup>

#### Wie nutzt man dieses Klassifizierungsschema?

Zur Entwicklung einer neuen SFC-Methode empfiehlt es sich ungefähr fünf stationäre Phasen auszuwählen, die im Spider-Diagramm möglichst weit voneinander entfernt sind.<sup>5</sup> Dadurch kann ein möglichst breiter Selektivitätsbereich getestet werden. Die stationäre Phase, die in einem ersten Lauf die beste Trennung erbringt, wird im

Anschluss für die weitere Optimierung verwendet. Ist eine vollständige Trennungsoptimierung mit der gewählten stationären Phase nicht möglich, kann man auf weitere Phasen, die nahe im Spider-Diagramm lokalisiert sind, ausweichen. Dies wird eher Änderungen in Peakform und Effizienz zur Folge haben, als in der Selektivität.<sup>5</sup>

In der Praxis bedeutet dies nun, dass ein Säulenscreening in der Methodenentwicklung der erste Schritt sein sollte. Dadurch, dass die Trennungsmechanismen aus der LC nicht in die SFC übertragbar sind, ist es selten möglich vorherzusagen, welche stationäre Phase den gewünschten Trennerfolg bringt. Wird jedoch ein möglichst variables Set an Phasen zu Beginn getestet, kann man meist die potentiell aussichtreichste Phasengruppe identifizieren und mit dieser zügig die weitere Optimierung durchführen.

Eine direkte Vorhersage, welche Säule zu welchem Analyten passt, ist in der SFC aktuell nur selten möglich. Solange die Trennungsmechanismen in Kohlenstoffdioxid nicht vollständig verstanden sind, wird dies vermutlich auch so bleiben. Mit entsprechenden Säulenscreening-Protokollen und einer strukturierten anschließenden Trennungsoptimierung lässt sich aber meist schnell eine geeignete stationäre Phase finden.

#### Danksagung:

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



#### Referenzen:

- (1) Noll-Borchers, M.; Hölsche, T.; Naegele, E.; Becker, M. *Application Note, Agilent Technologies, Inc.*, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem). 2015, pp. 1–8.
- (2) Lesellier, E. J. *Chromatogr. A* **2009**, 1216, 1881–1890.
- (3) West, C.; Lesellier, E. J. *Chromatogr. A* **2006**, 1110, 191–199.
- (4) Abraham, M. H.; Smith, R. E.; Luchtefeld, R.; Boorem, A. J.; Luo, R.; Acree, W. E. J. *Pharm. Sci.* **2010**, 99, 1500–1515.
- (5) Lesellier, E.; West, C. J. *Chromatogr. A* **2015**, 1382, 2–46.
- (6) West, C.; Lesellier, E. J. *Chromatogr. A* **2006**, 1110, 181–190.
- (7) Berger, T. A. *Supercritical Fluid Chromatography - Primer*; Agilent Technologies, Inc., 5991-5509EN, 2015.

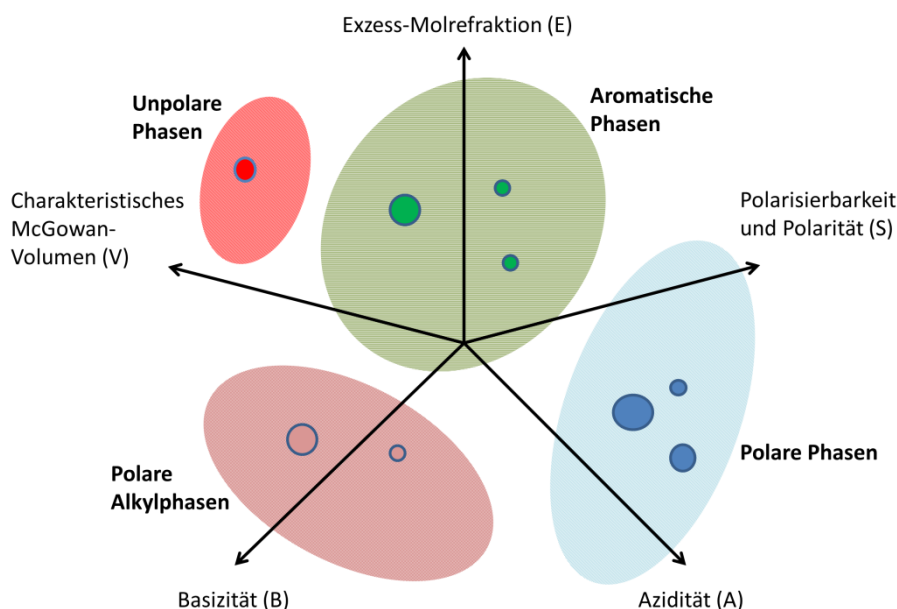


Abb.1: Spider-Diagramm für stationäre Phasen in der SFC. Alle getesteten Phasen lassen sich in dieses Diagramm eintragen und vergleichen. Die hervorgehobenen Bereiche geben an, wo stationäre Phasen der entsprechenden Typen in Diagramm ungefähr lokalisiert sind. Ganz links wären klassische unpolare Phasen (C8, C18) zu finden, ganz rechts polare Phasen (Silica, Diol, etc.). Dazwischen befinden sich polare Alkylphasen (polar endcapped oder embedded, etc.) und aromatische Phasen wie Pentafluorphenyl oder Phenylhexyl und Ähnliches.<sup>5,7</sup>