

Superkritische Fluidchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (SFC-MS): Simultane Untersuchungsmethode für polare und unpolare organische Moleküle in Wasserproben

Stefan Bieber (s.bieber@tum.de), Thomas Letzel (t.letzel@tum.de)

Zusammenfassung

Die seit jüngster Zeit robust einsetzbare Trenntechnik „Superkritische Fluidchromatographie“ (SFC) mit alten Wurzeln (Letzel und Bieber, 2015) wurde in unserer Arbeitsgruppe (Letzel, 2012) nun erstmals auf seine Eignung hin untersucht, organische Spurenstoffe unterschiedlicher Polarität in Gewässern nachzuweisen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass mit dieser Technik problemlos polare und unpolare Spurenstoffe simultan trennbar sind. Die Kopplung an ein Elektrospray-Ionisations-Time-of-Flight Massenspektrometer ermöglichte hierbei die hochaufgelöste und akkurate Detektion (und somit die Bestimmung von Summenformeln). Die Analysenmethode wurde exemplarisch zum Nachweis sechs ausgewählter Zielsubstanzen eingesetzt. Die Retentionszeiten und akkuraten Massen der Referenzmaterialien dieser Zielmoleküle wurden zur Bestätigung in einer Realprobe verwendet. In der Anwendung wurde der Ablauf einer Kläranlage mittels polarer bzw. unpolar Festphasenextraktion angereichert und anschließend analysiert. Zusätzlich zu dem halben Dutzend Pharmaka und Metaboliten wurden in der Realprobe etwa 2500 weitere Substanzen erfasst. Letztlich ist die Handhabung der Technik mit einer Umkehrphasen-Flüssigchromatographie komplementär aber auch vergleichbar; allerdings sind die molekularen Wechselwirkungen in der SFC weitreichender und bisher noch nicht abschließend geklärt. Zu guter Letzt verleiht die Verwendung von Kohlenstoffdioxid als Hauptkomponente dieser Technik einen grünen Charakter was zusätzlich einen verstärkten Einsatz in der Screening-Analytik erwarten lässt.

Einleitung

Bei organischen Spurenstoffen handelt es sich um Substanzen, die in Gewässern im ng/L bis µg/L Bereich detektiert werden können. Diese Stoffe gelangen teilweise durch Kläranlagen oder diffuse Einträge in Oberflächen- und Grundwasser. Es gibt verschiedene Kategorisierungsansätze für organische Spurenstoffe, aber allein ihre Herkunft macht die Umweltrelevanz vieler Substanzen deutlich. Es handelt sich um Pestizide, Pharmazeutika, Haushalts- und Industriechemikalien sowie weitere anthropogen eingebrachte Substanzen. Durch die Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union wurden alle Mitgliedsstaaten dazu verpflichtet, den biologischen und chemischen Zustand aller Gewässerkörper zu bestimmen und die Konzentrationen von prioritären Stoffen regelmäßig zu überwachen (European Commission, 2000). Dies hat zur Folge, dass das Monitoring von organischen Spurenstoffen in Gewässern eine wachsende Bedeutung er-

hält. Bislang erfolgt die Trennung von organischen Spurenstoffen überwiegend durch die Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RPLC) und der Nachweis über die gekoppelte massenspektrometrische Detektion (MS). Die RPLC ist wohl die bestetablierte Flüssigchromatographietechnik und eignet sich hervorragend zur Trennung von mittel- bis unpolaren Substanzen auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase (Horváth et al., 1976). Aber gerade im Feld der Gewässerüberwachung ist man mit polaren und stark hydrophilen organischen Spurenstoffen konfrontiert, die oft nur unzureichend oder gar nicht mittels RPLC retardiert bzw. getrennt werden können. Somit stellt sich die Herausforderung neue Ansätze zu entwickeln, die einen parallelen Nachweis von polaren und unpolaren Spurenstoffen erlauben. Eine Möglichkeit stellt die serielle Kopplung von Umkehrphasen- und Hydrophiler Interaktions-Flüssigchromatographie (HILIC) dar (Greco et al., 2013). Hierbei werden eine C₁₈ RPLC und eine zwitterionische HILIC Säule in Reihe geschaltet und die zurückgehaltenen Moleküle in umgekehrter Reihenfolge eluiert. Dies ermöglicht die aufeinanderfolgende Trennung von polaren sowie unpolaren Substanzen und macht auch eine Kopplung mit Massenspektrometern problemlos möglich. Ein wesentlicher Nachteil von HILIC ist jedoch die Verwendung von großen Mengen an teurem und gesundheitsgefährdendem organischem Lösungsmittel, meist Acetonitril. Die Suche nach einer weiteren Möglichkeit zur Trennung von polaren und unpolaren Substanzen führt in das Feld der superkritischen Fluidchromatographie (SFC). Das Grundkonzept dieser Chromatographieart ist es, superkritische Fluide als mobile Phase zu nutzen. Dazu müssen Temperatur und Druck des verwendeten Gases über den kritischen Punkt hin erhöht werden. An diesem Punkt nähern sich die thermodynamischen Eigenschaften von Gas und Flüssigkeit soweit an, dass ein Zustand mit einem Gas-ähnlichen Diffusionsvermögen bei hoher Dichte und niedriger Viskosität resultiert. Das Konzept der SFC wurde bereits 1962 von Ernst Klesper et al. beschrieben, konnte sich aber lange nicht als wettbewerbsfähige Technik gegen die Flüssigchromatographie durchsetzen (Berger, 2014; Klesper et al., 1962). Nur langsam gelang es, alte Vorurteile über die SFC zu widerlegen und das Potential dieser Technik wurde allmählich offensichtlich (Berger und Wilson, 1993; Berger, 1995). Der Durchbruch erfolgte schließlich für die Trennung von chiralen Substanzen im präparativen Maßstab in der Pharmaindustrie. Hier hat die SFC mittlerweile die RPLC als Routinetechnik abgelöst (Miller, 2012). Als Fließmittel hat sich Kohlenstoffdioxid (CO₂) etabliert, dessen

Elutionsstärke durch organische Modifizier wie Methanol oder Isopropanol variiert werden kann. Der kritische Punkt von CO₂ liegt bei 31,0°C und 73,8 bar, was gerätetechnisch einfach zu erreichen ist. Seit 2009 sind robuste SFC-Anlagen im analytischen Maßstab kommerziell erhältlich und das Interesse an dieser Technik wächst zusehends (Berger, 2014), da auch die effiziente Kopplung mit Detektoren, wie UV, FID, ELSD und MS möglich ist.

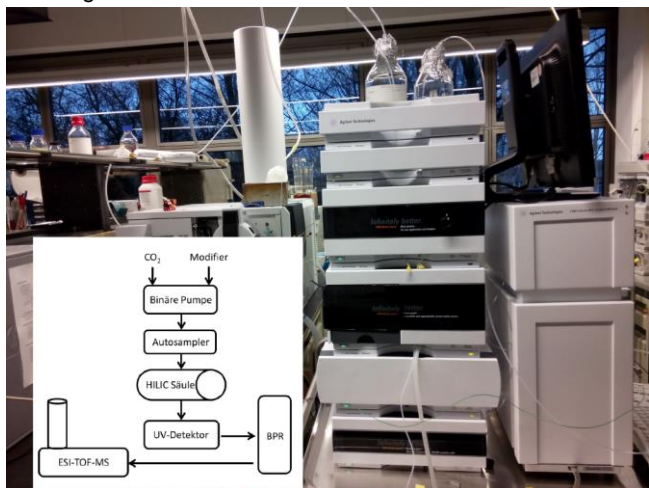


Abb. 1: Bild der SFC-TOF-MS Kopplung im Labor der AFG und vereinfachte schematische Darstellung des SFC-Systems. Über die binäre Pumpe werden CO₂ und Modifizier (Methanol) gefördert. Die Probe wird auf die HILIC Säule aufgebracht und anschließend über einen CO₂/Methanol Gradienten eluiert. Der Back Pressure Regulator (BPR) baut einen vorgegebenen Druck hinter der Säule auf, um zu gewährleisten, dass sich der thermodynamische Zustand des Fließmittels durch den Druckabfall entlang der Säule nicht verändert. Der Ausgang des SFC-Systems ist an ein Time-of-Flight Massenspektrometer mit ‚Hochfluss‘-Elektrospray-Ionisation angeschlossen.

Entwicklungshistorisch ist die SFC vom Aufbau und der Anwendung heraus der Gaschromatographie hervorgegangen, aber mittlerweile nahe an die LC gerückt. Heutige Geräte basieren oft auf einer klassischen HPLC (binäre Pumpe, Autosampler, Säulenofen und UV-Detektor), die durch entsprechende Module (Backpressure Regulator, BPR) und Modifikationen zur SFC erweitert wurde (Abbildung 1). Der BPR dient zur Konditionierung von CO₂ vor und nach der Chromatographiesäule, um einen vergleichbaren thermodynamischen Zustand des Fließmittels zu gewährleisten. Durch die niedrige Viskosität des Fließmittels können Flussraten bis 5 mL/min erreicht werden. Auch wenn die Geräte mittlerweile robust sind und reproduzierbare Ergebnisse produzieren, ist vieles an dieser Technik nicht vollständig verstanden. Schon der Name SFC impliziert, dass die mobile Phase immer superkritisch sein muss. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es keinen erkennbaren Unterschied macht, ob ein Fluid während der Trennung super- oder subkritisch ist (Tarafer et al., 2014). Letztlich ausschlaggebend für die Eigenschaften der SFC ist die Verwendung von CO₂ und nicht dessen thermodynamischer Zustand. Eine weitere Tatsache der ungeklärten Trenntechnik zeigt sich, wenn man die

Trennungsmechanismen in verschiedenen stationären Phasen betrachtet. Wenngleich die Mechanismen aus der LC bekannt sind, bedeutet dies nicht, dass man die Retention von Substanzen in der SFC damit erklären kann. Aber es zeigt sich dennoch, dass alle stationären Phasen der LC auch in der SFC eingesetzt werden können. Gängige Praxis ist derzeit das Testen von mehreren verschiedenen stationären Phasen um die beste Säule für die jeweilige Aufgabe zu finden (Lesellier und West, 2015; Poole, 2012). Die Trennung von unterschiedlichen Pharmazeutika und Pestiziden mittels SFC wurde bereits beschrieben, teils auch gekoppelt mit der Massenspektrometrie (Berger, 1995; Grand-Guillaume Perrenoud et al., 2014).

Das tatsächliche Potential der SFC konnte bislang nur abgeschätzt werden. Es zeigt sich jedoch immer mehr, dass die SFC vergleichbar zur RPLC einsetzbar ist, allerdings Moleküle aus einem breiteren Polaritätsbereich wie bei der RPLC-HILIC-Kopplung trennen kann. Um dies für die Anwendung zu etablieren, wurde diese Technik erstmals exemplarisch auch zum Nachweis von Pharmaka und deren Metabolite in einer Realprobe eingesetzt.

Methodik

Der Ablauf einer Kläranlage nahe München wurde beprobt und über eine 2-stufige Festphasen-Extraktion (d.h. über C18 und HILIC Kartuschen, Strata C18-E, Fa. Phenomenex bzw. ZIC-HILIC SPE, Fa. di2chrom) angereichert. 150 mL Realprobe wurden auf 0,5 mL eingengt, was einer Anreicherung um den Faktor 300 entspricht. Als Blankprobe wurde die Aufreinigung parallel mit voll entsalztem Wasser (Fa. MilliQ) durchgeführt. Die Trennung der Proben erfolgte mittels SFC (Fa. Agilent Technologies) über eine zwitterionische HILIC Säule (EUROSPHERE II 150 x 2,0 mm, 5 µm, Fa. Knauer). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von CO₂ (Reinheit 4.5, Fa. Linde) und 20 mM Ammoniumacetat in Methanol als Modifizier (LC-MS grade, Fa. VWR). Die Gesamtdauer einer Messung war 25 Minuten inklusive Reäquilierungsphase und der Gradient verlief von 5 auf 40% Modifizier. Der Ausgang des SFC-Systems war angeschlossen an ein Time-of-Flight Massenspektrometer mit Jet-Stream Elektrospray-Ionisierungs-Quelle (ESI) (Fa. Agilent Technologies). Zur Identifikation einzelner Substanzen in der Realprobe wurde zuvor dreimal ein Set von Zielsubstanzen mittels SFC getrennt und im positiven ESI-Modus detektiert. Bei den Substanzen handelte es sich um Pharmaka und Metabolite (Tabelle 1), über deren Auftreten in der Umwelt bereits berichtet wurde. Die gewählten Substanzen decken einen breiten Polaritätsbereich ab, welcher durch den pH abhängigen logarithmischen Oktanol-Wasser Distributions-Koeffizienten (log D) veranschaulicht wird. Die aus diesem Experiment erhaltenen akkuraten Massen und Retentionszeiten wurden anschließend zum Nachweis dieser Zielsubstanzen in der Realprobe benutzt.

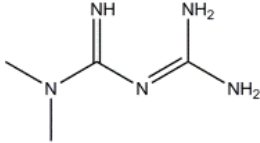
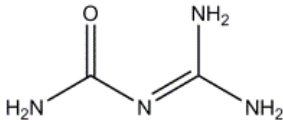
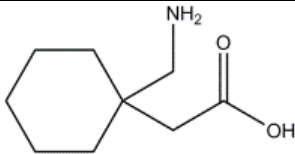
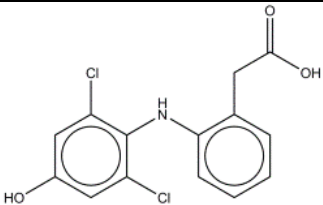
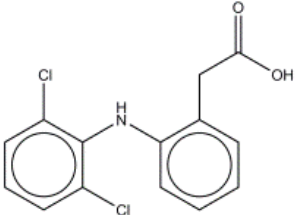
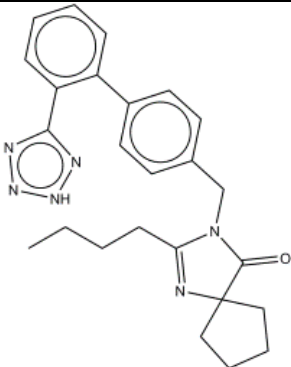
Substanzname	Eigenschaft	Monoisotopische Masse [Da]	log D (pH 7)	Strukturformel
Metformin	Pharmakon	129,1014	- 5,69	
Guanylurea	Metabolit von Metformin	102,0562	- 2,64	
Gabapentin	Pharmakon	171,1259	- 1,26	
4-Hydroxy-Diclofenac	Metabolit von Diclofenac	311,0116	+ 0,89	
Diclofenac	Pharmakon	295,0167	+ 1,37	
Irbesartan	Pharmakon	428,2324	+ 5,35	

Tabelle 1: Für das Screening ausgewählte Zielsubstanzen.

Ergebnisse und Diskussion

In der Bundesrepublik Deutschland wird derzeit eine Vielzahl an Studien durchgeführt, die Effekte von weitergehender zentraler und dezentraler Abwasserreinigung auf den Eintrag von Spurenstoffen in Gewässer untersuchen. Neben Technologien, die auf der Basis von Adsorption arbeiten (Pulveraktivkohle, etc.) wird zur Spurenstoffentfernung auch das Potential von Ozonierung und erweiterter Oxidation (Advanced Oxidation Processes) ermittelt. Bei letzteren beiden Techniken werden Spurenstoffe auf unterschiedliche Weise oxidiert und dadurch transformiert. Das entstehende Produkt ist somit jeweils polarer als die Ausgangssubstanz (Boxall et al., 2004) und dadurch oft schwer analysierbar. Allerdings ist auch über die Toxizität dieser Substanzen

häufig nur wenig bekannt. Ebenso sind humane und mikrobiologische Metabolite polarer Natur und werden in aktuellen umweltrelevanten Diskussionen immer mehr berücksichtigt. Umso mehr zeigt sich hier die Notwendigkeit Nachweismethoden zu entwickeln, die neben den unpolaren (eher bekannten) Substanzen parallel auch sehr polare (und bisher weitgehend unbekannte) Stoffe trennen und detektieren können.

Von zentraler Bedeutung für den parallelen analytischen Nachweis polarer und unpolare Substanzen ist eine entsprechende polaritätserweiterte Probenvorbereitung. Da Spurenstoffkonzentrationen in Gewässerproben gering sind, muss die Probe oftmals konzentriert oder extrahiert werden. Verwendet man hierfür lediglich eine Festphasenextraktion

mit Umkehrphasenmaterial (z.B. C18 SPE), so werden polare Moleküle nicht angereichert und gehen verloren. Konsequenterweise muss die Extraktion durch einen zusätzlichen Anreicherungs-schritt über eine HILIC SPE erweitert werden. Die entsprechend vorbereitete Probe eines Kläranlagenablaufs und einer Blankprobe wurden anschließend mittels SFC-ESI-TOF-MS analysiert. Signale, die in der Blindprobe detektiert wurden, stammten aus der Anreicherungsprozedur sowie der weiteren Analytik und waren nicht von Interesse, weshalb diese bei der Auswertung der Realprobe ausgeschlossen wurden. Insgesamt konnten in der angereicherten Realprobe ca. 2500 Substanzmassen mit zugehöriger Retentionszeit detektiert werden (Abbildung 2). Die Vielzahl der nachweisbaren Moleküle macht es nötig, neue Strategien bzw. Auswertungspfade zu finden um die Komplexität der Probe informativ zu nutzen. Neben den Ansätzen der sogenannten ‚Suspected-Target‘ und ‚Non-Target‘ Screening Auswerte-

strategien (Letzel, 2013) können natürlich auch klassische Strategien genutzt werden. ‚Target‘ Screening Techniken beispielsweise nutzen Referenzmaterialien zur qualitativen und quantitativen Bestimmung bekannter Moleküle. Der hier vorgestellte gezielte Nachweis einzelner Substanzen kann auf mehreren Wegen stattfinden. Neben den Eigenschaften deuterierter Referenzmaterialien können zunächst auch spezifische Fragmentierungsmuster aus MS/MS-Analysen der Zielsubstanz (als Referenzsubstanz) zur Identifizierung genutzt werden. Typischerweise besteht die routinemäßige Erfassung der Zielsubstanzen aber in der Bestimmung der Retentionszeiten und der akkuraten Masse. Diese werden später genutzt, um die Zielsubstanzen entsprechend in der Realprobe zu identifizieren und unter Zuhilfenahme der Wiederfindung (bestimmt über die deuterierten Standards) zu quantifizieren.

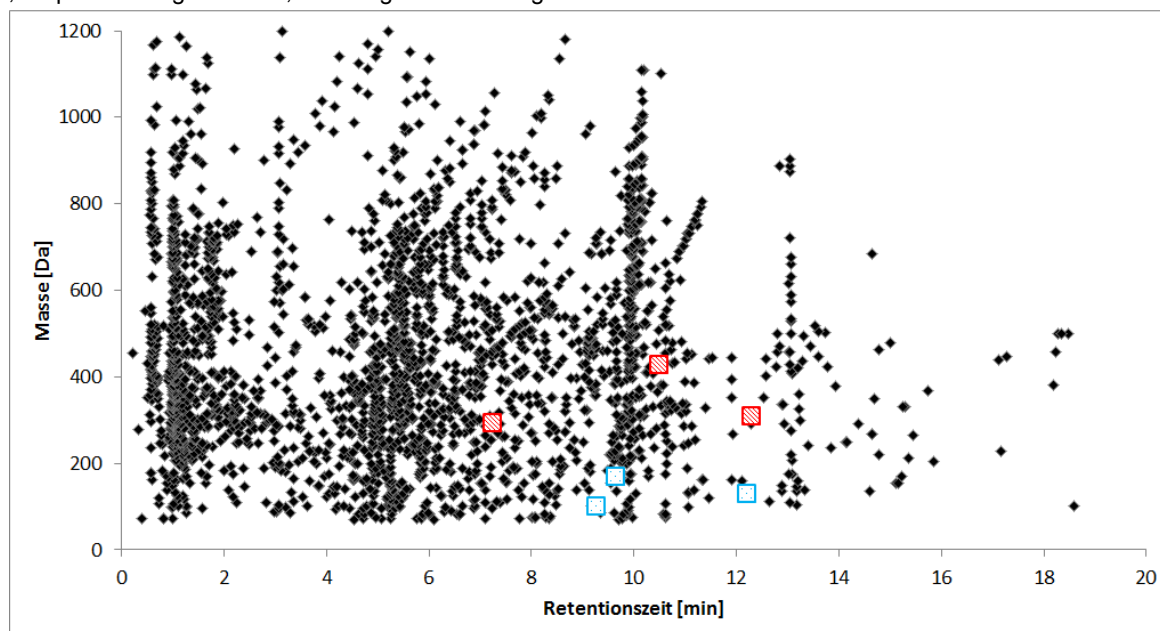


Abb. 2: Retentionszeit - Massenplot einer angereicherten Realprobe. Insgesamt wurden ca. 2500 Signale mittels SFC-ESI-TOF-MS detektiert. Die nachgewiesenen Zielsubstanzen sind entsprechend ihrer Polarität farbig markiert. Die blaue Markierung entspricht den polaren Molekülen (d.h. $\log D < 0$), rot-gestrichelt den unpolaren (d.h. $\log D > 0$).

In dieser Studie wurde ein beispielhaftes Set aus sechs Substanzen verwendet und -wie oben beschrieben- qualitativ nachgewiesen. Es handelte dabei sich um vier Pharmaka und zwei Metabolite (Diclofenac \rightarrow 4-Hydroxy-Diclofenac, Metformin \rightarrow Guanylurea) (Bort et al., 1999; Scheurer et al., 2012). Die Substanzen liegen in einem Polaritätsbereich von $\log D$ -5,69 (sehr polar) bis 5,35 (sehr unpolar). Diclofenac wurde vor kurzem von der Europäischen Union auf die Beobachtungsliste für potentiell gefährliche Spurenstoffe gesetzt (European Commission, 2013). Um einen präziseren Eindruck der Belastung von Gewässern mit Spurenstoffen zu erhalten ist es notwendig, neben den Ausgangssubstanzen auch nach Metaboliten oder Transformationsprodukten zu suchen, wie in diesem Fall das 4-Hydroxy-Diclofenac. Das Antidiabetikum Metformin wird nach Einnahme zu ca. 70% unverändert ausgeschieden und kann regelmäßig in hohen Konzentrationen in

Kläranlagenabläufen detektiert werden (Scheurer et al., 2012). Bei Guanylurea handelt es sich um einen bakteriellen Metaboliten von Metformin (Trautwein und Kümmerer, 2011). Die Umweltkonzentrationen beider Substanzen liegen noch weit unterhalb der Wirkungsschwelle, aber auf Grund ihrer starken Polarität können beide Substanzen in Grundwasserkörper eindringen und ein Risiko für die Trinkwassergewinnung darstellen. Gabapentin, ein Antidepressivum, wird zu 100% unverändert ausgeschieden und wurde bereits in Rohtrinkwasserquellen nachgewiesen (Morasch et al., 2010). Bei Irbesartan handelt es sich um eine Substanz zur Behandlung von Bluthochdruck. Sie ist sehr unpolar, äußerst persistent und kann in Kläranlagen nur unzureichend entfernt werden (Howard und Muir, 2011; Huerta-Fontela et al., 2011).

Der Polaritätsbereich unterhalb von $\log D$ -2 ist durch RPLC nur schwer zugänglich und eher durch Normalphasen-

chromatographie oder HILIC greifbar. Somit müssen in der LC zwei stationäre Phasen zur Trennung dieser stark unterschiedlich polaren Moleküle eingesetzt werden. Das SFC-System hingegen ist in der Lage, alle Substanzen mit nur einer stationären Phase erfolgreich zu trennen (Abbildung 3). Der Trennmechanismus ist bislang nicht vollständig geklärt, allerdings Gegenstand derzeitiger Forschungsarbeiten am Hause. Es zeigt sich aber schon jetzt die Tendenz, dass polare Moleküle eher später eluieren als unpolare (Abbildung 3a und b), was einem Normalphasenverhalten entsprechen würde. Auf der anderen Seite eluiert Gabapentin (negativer log D) vor Irbesartan (stark positiver log D) (Abbildung 3 c), was sich nicht direkt mit den bekannten Mechanismen von Normalphase (oder wie hier in zwitterionischen HILIC Säulen) erklären lässt. Neben Adsorption und Verteilung können in geladenen HILIC Phasen auch ionische Wechselwirkungen auftreten (Greco and Letzel, 2013), was zu komplexen Wechselwirkungseigenschaften führt. Durch die generell unpolare Fließmittelzusammensetzung in der SFC ist es möglich dass die einzelnen Trennmechanismen der stationären Phase im Vergleich zur LC unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Des Weiteren benötigen HILIC-Phasen grundsätzlich eine Wasserschicht, um den verstärkten Massentransfer von Analyt an die stationäre Phase zu ermöglichen. In der SFC erfolgt die Trennung jedoch gänzlich ohne Wasser. Es ist somit zu erwarten, dass Methanol, welches wesentlich polarer als CO₂ ist, die Aufgabe des Wassers als Mediator übernimmt, allerdings mit verändertem Verhalten.

Die Zielsubstanzen wurden dreimal mit dem SFC-ESI-TOF-MS Instrument vermessen. Dabei war die relative Standardabweichung der Retentionszeiten in allen Fällen kleiner als 0,5%, was mit der typischen Reproduzierbarkeit von flüssigchromatographischen Systemen vereinbar ist (Greco et al., 2013). Alle sechs Zielsubstanzen konnten, basierend auf deren Retentionszeit und akkurater Masse, anschließend auch in der Realprobe nachgewiesen werden (Abbildung 2). Die Abweichungen der Retentionszeiten zwischen Realprobe und separat analysierten Zielsubstanzen waren grundsätzlich kleiner als 0,2 Minuten (oder 2%), womit gezeigt werden kann, dass die komplexe Probenmatrix in diesem Fall die Elution der Substanzen nicht wesentlich beeinflusst. Das Set an Zielsubstanzen war zwar begrenzt, dennoch zeigt es das Potential der SFC für die Detektion von Substanzen in einem breiten und sonst nur schwer zugänglichen Polaritätsbereich. Gleichzeitig zeigt die Vielzahl detektierter Substanzen in der Realprobe (Abbildung 2), dass diese Technik für komplexe Screeningmethoden bestens geeignet ist und somit weitreichenden Einsatz finden kann. Ein zusätzlicher Vorteil der SFC gegenüber LC Trennungen ist der geringe Einsatz von organischen Lösungsmitteln. Die Hauptkomponente des Fließmittels ist CO₂, welches deutlich günstiger ist als organische Lösungsmittel wie Acetonitril, zudem klimaneutral ist und nicht speziell entsorgt werden muss. Die Kopplung der SFC an (Tandem-)Massenspektrometer ist aufgrund von

Gasen als Lösungsmittel auch leicht möglich, da der Trocknungsprozess in der Ionisation weitgehend entfällt.

All diese Faktoren machen die SFC zu einer bislang einzigartigen Technik, deren Möglichkeit noch lange nicht ausgeschöpft ist. Da gezeigt werden konnte, dass die SFC in der Spurenstoffanalytik erfolgreich einsetzbar ist, muss in einem nächsten Schritt die Robustheit der Technik den Beweis zur Routineteuglichkeit erbringen. Allerdings ist die Gerätetechnik mittlerweile so stabil, dass die Hoffnung groß ist, die SFC bald als Standardtechnik (nicht nur) in der Gewässeranalytik etabliert zu sehen.

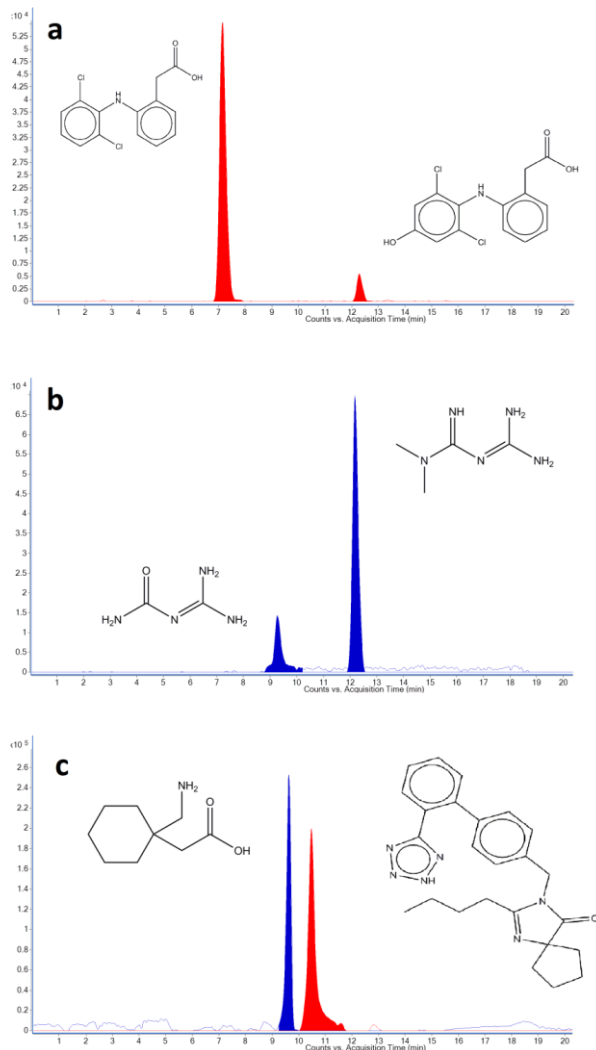


Abb. 3: Extrahierte Ionenchromatogramme und Strukturformeln der Zielsubstanzen. a: Diclofenac (links) und 4-Hydroxy-Diclofenac (rechts); b: Guanylurea (links) und Metformin (rechts); c: Gabapentin (links) und Irbesartan (rechts). Die Farbe der Signale gibt die Substanzpolarität wieder. Polare Substanzen (negativer log D) sind in blau dargestellt, unpolare Substanzen (positiver log D) in rot.

Fazit

Es konnte der Beweis erbracht werden, dass sich SFC-MS für den Nachweis von organischen Spurenstoffen in Gewässerproben sehr gut eignet. Das Polaritätsspektrum der trenn-

baren Substanzen ist breiter als bei herkömmlichen RPLC-Techniken und ermöglicht den Nachweis von polaren und unpolare Molekülen in nur einem einzigen analytischen Lauf. Ähnliche Ergebnisse könnten nur durch die Kopplung von RPLC und HILIC erreicht werden. Die SFC ist weit umweltschonender als andere Trenntechniken, was einen Vorteil für den Routineeinsatz mit sich bringt. Die Handhabung der SFC unterscheidet sich nur gering von der einer HPLC. Bislang fristete die SFC ein Dasein als Nischentechnologie, aber die neuen robusten Geräte ermöglichen es erstmalig, das volle Potential dieser Technik zu nutzen. Obwohl einige Grundlagen noch nicht vollständig verstanden sind, kann die SFC einfach und zuverlässig im Laboralltag als Screening-technik betrieben werden.

Dankeschön

Wir danken Andrea Boltner, Giorgia Greco, Sylvia Grosse und Jörg E. Drewes für Ihre vielfältigen und unterschiedlichen Beiträge zur Nutzung der SFC, ohne deren Expertise und Diskussion die Technik nicht so schnell mit großer Effizienz und dem jetzigen Verständnis betreibbar wäre. Zusätzlich danken wir Agilent Technologies für die Bereitstellung des SFC-Systems und Knauer Wissenschaftliche Geräte für die kostenlose ZIC-HILIC Säule.

Literatur

- Berger, T.A., 1995. Packed Column SFC. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Berger, T.A., 2014. The past, present, and future of analytical supercritical fluid chromatography. *Chromatogr. Today* 7, 26–29.
- Berger, T.A., Wilson, W.H., 1993. Packed column supercritical fluid chromatography with 220 000 plates. *Anal. Chem.* 65, 1451–1455.
- Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.J., Pfeifer, A., Castell, J., 1999. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human cyp in the minor oxidative pathways. *Biochem. Pharmacol.* 58, 787–796.
- Boxall, B.A., Sinclair, Chris, J., Fenner, K., Kolpin, D.W., Maund, S.J., 2004. When synthetic chemicals degrade in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 368A–375A.
- European Commission, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for the Community Action in the field of water policy. Official Journal of the European Union, L327/1.
- European Commission, 2013. Directive 2013/39/EC of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union, L226/1.
- Grand-Guillaume Perrenoud, A., Veuthey, J.-L., Guillaume, D., 2014. Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: from hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds. *J. Chromatogr. A* 1339, 174–184.
- Greco, G., Grosse, S., Letzel, T., 2013. Serial coupling of reversed-phase and zwitterionic hydrophilic interaction LC/MS for the analysis of polar and nonpolar phenols in wine. *J. Sep. Sci.* 36, 1379–1388.
- Greco, G., Letzel, T., 2013. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *J. Chromatogr. Sci.* 51, 684–693.
- Horváth, C., Melander, W., Molnár, I., 1976. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr. A* 125, 129–156.
- Howard, P.H., Muir, D.C.G., 2011. Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce II: pharmaceuticals. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6938–6946.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* 45, 1432–42.
- Klesper, E., Corwin, A.H., Turner, D.A., 1962. High pressure gas chromatography above critical temperatures. *J. Org. Chem.* 27, 700–701.
- Lesellier, E., West, C., 2015. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *J. Chromatogr. A* 1382, 2–46.
- Letzel, T., 2012. Kurz vorgestellt - Analytische Forschungsgruppe am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München. *Mitt Umweltchem Ökotox - Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie Ökotoxikologie* 18, 75.
- Letzel, T., 2013. Non-Target Screening, Suspected-Target Screening und Target Screening – von Technologien und Philosophien, von Datenbanken und vom Handwerk. *Labor More* 4, 30–35.
- Letzel, T., Bieber, S., 2015. SFC - Superkritische Fluid Chromatographie oder Science Fiction Chromatographie? *Analytik-News* vom 08.01.2015.
- Miller, L., 2012. Preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1250, 250–255.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., De Alencastro, L.F., Perazzolo, C., Chèvre, N., Kohn, T., 2010. Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: Micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1658–1668.
- Poole, C.F., 2012. Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1250, 157–71.
- Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H.-J., Ruck, W., Sacher, F., 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res.* 46, 4790–4802.
- Tarafer, A., Hill, J.F., Baynham, M., 2014. Convergence chromatography versus SFC - What's in a name. *Chromatogr. Today* 7, 34–36.
- Trautwein, C., Kümmerer, K., 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product guanylurea. *Chemosphere* 85, 765–773.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thomas Letzel
Technische Universität München
Analytische Forschungsgruppe am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft
Am Coulombwall 8
85748 Garching