FAM INFORMATION

Mai 1987/160 W

Eidgenössiche Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld

Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion-Kapillarfluidchromatographie

Teile I - III

W. Gmür, J.O. Bosset und E. Plattner

Teil I: Sonderdruck aus Journal of Chromatography **388**, 143-150 (1987)
Teil II: " " " " 335-349 (1987)
Teil III: Sonderdruck aus Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **78**, 21-35 (1987)

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

BEITRAG ZUR DIREKTEN KOPPLUNG FLUIDEXTRAKTION–KAPILLARFLUIDCHROMATOGRAPHIE

I. THEORETISCHE OPTIMIERUNG EINIGER WICHTIGER APPARATIVER PARAMETER

W. GMUER
Eidgenössische Technische Hochschule, 1015 Lausanne (Schweiz)
J. O. BOSSET*
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld-Bern (Schweiz)
und
E. PLATTNER
Eidgenössische Technische Hochschule, 1015 Lausanne (Schweiz)
(Eingegangen am 28. August 1986; geänderte Fassung eingegangen am 8. Oktober 1986)

SUMMARY

Contribution to direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary supercritical fluid chromatography. I. Theoretical optimization of some important instrumental parameters.

Up until now supercritical fluid extraction (SFE) and supercritical fluid chromatography (SFC) were developed independently. The present work examines for the first time direct coupling of SFE to capillary SFC. This article deals with the theoretical optimization of some important instrumental parameters such as capillary inside diameter, capillary length, pressure drop along the column, linear gas velocity in column and injection volume. For an injection volume of 1 μl, capillaries with 0.15 mm inside diameter represent an optimum for direct coupling SFE to capillary SFC. However they are not yet commercially available.

EINLEITUNG

Hochverdichtete Gase im kritischen Temperaturbereich besitzen gasähnliche Viskositäten und Diffusionskoeffizienten die wesentlich über jenen von Flüssigkeiten liegen, zeigen jedoch wegen ihrer grossen Dichte ähnliche Lösungseigenschaften wie Flüssigkeiten. Diese vorteilhaften physikalischen Eigenschaften führten in den letzten Jahren zur Anwendung überkritischer Gase als Extraktionsmittel in der Lebensmittel- und Aromaindustrie (Fluidextraktion, SFE), sowie als mobile Phase in der Chromatographie (Fluidchromatographie, SFC)[1].

Die SFC erlaubt weit bessere Trennleistungen ($30 \cdot 10^3$–$50 \cdot 10^3$ theoretische Böden pro Säule) als die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC; $5 \cdot 10^3$–10

· 10^3) und ermöglicht im Gegensatz zur Gaschromatographie (GC) auch die Auftrennung von schwer flüchtigen und/oder thermisch labilen Verbindungen[2,3]. Es fehlen jedoch heute noch zum "cold-trapping" der Gaschromatographie analoge Einspritztechniken zur Aufgabe relativ verdünnter Proben.

Hauptvorteile der SFE sind die sehr einfache Regulierung des Lösungsvermögens durch Anpassung des Drucks und/oder der Temperatur sowie die mit geeigneten überkritischen Gasen, insbesondere Kohlendioxid, sehr milden Extraktionsbedingungen[1]. Die Variationsmöglichkeiten der Extraktions- und Abscheidebedingungen (siehe z.B. Kohler[4]) kommen zwar einerseits einem möglichen Anwender sehr zu gute, machen aber andererseits die Optimierung der Verfahrensparameter sehr aufwendig. Herkömmliche Techniken zur Untersuchung der Gasphasenzusammensetzung erfordern die umständliche Entspannung des überkritischen Fluids und das Auffangen der gelösten Verbindungen in einem organischen Lösungsmittel[5]. Die Analyse der so gewonnenen Probe mittels der sehr leistungsfähigen Kapillar-gaschromatographie verlangt die Derivatisierung schwer flüchtiger Komponenten und oft auch die Einengung des Lösungsmittels. Dabei besteht die Gefahr von Verlusten leicht flüchtiger sowie der Zersetzung thermisch labiler Verbindungen. Zudem überlappt der Lösungsmittelpeak mit koeluierenden Substanzen. Die HPLC ermöglicht zwar auch die Analyse von schwer flüchtigen und thermolabilen Stoffen, jedoch sowohl in Bezug auf Trennleistung als auch Nachweisgrenze kann sie nicht mit der GC verglichen werden.

Koppelt man die SFE direkt mit der SFC, so fallen die oben erwähnten, mit der Entspannung des überkritischen Fluids verbundenen Probleme weg, und man gewinnt ein neues, sehr viel versprechendes Analysensystem. Es kombiniert nicht nur die oben erwähnten Vorteile der SFE und der SFC, sondern ermöglicht darüber hinaus die für grosstechnische Anwendungen der SFE sehr nützliche schnelle Optimierung der Extraktionsparameter (Druck, Temperatur). Sie liefert im weiteren eine für die SFC neue Einspritztechnik zur Aufgabe relativ verdünnter Proben[6]. Als einzige berichteten bisher Sugiyama *et al.*[7] sowie Skelton, jr. *et al.*[8] von der direkten Kopplung SFE–SFC. Ihre mit gepackten Säulen und sehr grossen Injektionsvolumina (100–500 μl) erhaltenen Chromatogramme zeigen jedoch eine geringe Auflösung. Falls es gelingt, Injektions- und Detektionsvolumen genügend klein zu halten, wären Kapillar gepackten Säulen eindeutig vorzuziehen: Sie gewährleisten weit bessere trennleistungen und ermöglichen die in der SFC sehr wichtige Druck- und Temperaturprogrammierung, sowie die einfache Kopplung mit den sehr empfindlichen Detektoren der Gaschromatographie[1,9].

Ziel dieser Arbeit war die theoretische Optimierung und der Aufbau einer im Hinblick auf Routineuntersuchungen möglichst einfachen Apparatur zur direkten Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Der erste hier vorliegende Artikel ist der theoretischen Optimierung einiger wichtiger experimenteller Parameter gewidmet. Ein später erscheinender Teil beschreibt den Aufbau eines Prototyps und zeigt einige praktische Anwendungsbeispiele. Ein dritter Abschnitt schliesslich diskutiert die experimentelle Optimierung der Verfahrensparameter im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten.

Im Gegensatz zu den thermodynamisch bestimmten Retentionszeiten der einzelnen Stoffe wird die Breite eines Peaks durch kinetisch kontrollierte Diffusionsvorgänge bestimmt. Die heute sehr verbreitete dynamische Bodentheorie beschreibt die Abhängigkeit der theoretischen Bodenhöhe von der linearen Geschwindigkeit der mobilen Phasen. Sie geht von der Modellvorstellung aus, die Säule bestehe aus aneinandergereihten Verteilungselementen, in denen jeweils eine Einstellung des Verteilungsgleichgewichts der Probenkomponenten zwischen mobiler und stationärer Phase stattfindet. Obwohl in Wirklichkeit die Bandenverbreiterung durch Diffusionsvorgänge verursacht wird, erlaubt die dynamische Bodentheorie die für die Praxis sehr nützliche Abschätzung des Einflusses experimenteller Parameter (Säulendurchmesser, Filmdicke, lineare Strömungsgeschwindigkeit) auf die Bandenverbreiterung.

Die Chromatographie mit Kapillarsäulen folgt der Gleichung von Golay[10]

$$h = \frac{2D_m}{\bar{u}} + \frac{(1 + 6k + 11k^2)d_c^2\,\bar{u}}{96(1 + k)^2 D_m} + \frac{2kd_f^2\,\bar{u}}{3(1 + k)^2 D_s} \qquad (1)$$

In dieser Gleichung entsprechen h der theoretischen Bodenhöhe, D_m dem Diffusionskoeffizienten der Probenkomponente in der mobilen Phase, D_s dem Diffusionskoeffizienten der Probenkomponente in der stationären Phase, $\bar{u}$ der mittleren linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase, k dem Kapazitätsverhältnis, d_c dem Säulendurchmesser und d_f der Filmdicke. Gleichung 1 setzt sich aus drei Haupttermen zusammen und lässt sich vereinfacht folgendermassen ausdrücken

$$h = \frac{B}{\bar{u}} + C_m\bar{u} + C_s\bar{u} \qquad (2)$$

Der B-Term charakterisiert die Bandenverbreiterung durch Molekulardiffusion, die sich hauptsächlich in axialer Richtung auswirkt. Die beiden C-Terme sind auf die in endlicher Zeit ablaufenden Prozesse zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase zurückzuführen und werden auch als Widerstand gegen den Massentransport bezeichnet. Der C_m-Teil wird von den Wegen in der mobilen Phase, der C_s-Anteil durch den Stoffaustausch mit der stationären Phase verursacht. In der Kapillar-Gaschromatographie mit geringen Filmdicken kann der C_s-Term vernachlässigt werden. Wegen den im Vergleich zu Gasen wesentlich kleineren Diffusionskoeffizienten überkritischer Fluide (Faktor 10^2) kann der C_s-Term in erster Näherung auch in der Kapillar-SFC weggelassen werden[9]

$$h = \frac{B}{\bar{u}} + C_m\bar{u} \qquad (3)$$

Durch Ableitung von Gleichung 3 nach $\bar{u}$ und Gleichsetzen mit 0 erhält man die lineare Geschwindigkeit $\bar{u}_{opt}$, die der kleinst möglichen Bodenhöhe entspricht

$$\bar{u}_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C_m}} \qquad (4)$$

und durch Einsetzen von Gleichung 4 in Gleichung 3

$$h_{min} = 2\sqrt{BC_m} \tag{5}$$

Ersetzt man B und C_m durch ihre Werte, ergibt sich

$$\bar{u}_{opt} = \frac{4D_m}{d_c}\sqrt{\frac{12(1 + k)^2}{1 + 6k + 11k^2}} \tag{6}$$

und

$$h_{min} = d_c\sqrt{\frac{1 + 6k + 11k^2}{12(1 + k)^2}} \tag{7}$$

Die Saëlenlänge L berechnet sich aus der Totzeit t_M

$$L = t_M\bar{u}_{opt} \tag{8}$$

und daraus folgt die Anzahl theoretischer Böden n

$$n = \frac{L}{h} \tag{9}$$

Zur Beibehaltung der von der Säule erzielten Auftrennung sollte als Faustregel die Summe von Injektions- und Detektionsvolumen 10% des Volumens eines nicht zurückgehaltenen Peaks nicht überschreiten[9]. Für das Volumen V_p einer nicht zurückgehaltenen Komponente, dessen Peak einer Gauss-Verteilung entspricht, ergibt sich

$$V_p = 4\bar{u}t_M n^{-0.5} \tag{10}$$

und daraus die maximal tolerierbare Summe von Injektions- und Detektionsvolumen $V_{ID(max)}$

$$V_{ID(max)} = \frac{V_p}{10} \tag{11}$$

Als weiterer wichtiger Parameter in der Fluidchromatographie berechnet sich der Druckabfall ΔP_c über der Säule mit der Poiseuille-Gleichung

$$\Delta P_c = \frac{32L\eta\bar{u}}{d_c} \tag{12}$$

wobei η der Viskosität entspricht.

ANNAHMEN UND VORGEHEN

Zur Abschätzung der Säulentrennleistung mit Hilfe obiger Gleichungen wurden für den hier interessierenden Fall (Kohlendioxid, Druckbereich 60–200 bar, Temperaturbereich 35–200°C) folgende Annahmen und Randbedingungen getroffen. (i) Alle Berechnungen wurden für einen k-Wert von 0 durchgeführt (Verbindung wird nicht zurückgehalten). (ii) Mit einem Diffusionskoeffizienten D_m von 10^{-8} m^2 s^{-1} (siehe Lit. 9) und einer Viskosität von $2{,}27 \cdot 10^{-5}$ Pa s (siehe Lit. 11) wählte man zwei charakteristische Werte. (iii) Zur Beibehaltung praktisch vernünftiger Analysenzeiten sollte eine Totzeit von 15 min nicht überschritten werden. Diesen Höchstwert benutzte man direkt in den Berechnungen. (iv) Vorausgehende Löslichkeitsuntersuchungen zeigten, dass zur Aufgabe einer für die SFC ausreichenden Probenmenge das Einspritzvolumen nicht kleiner als 1 μl sein sollte[5]. (v) Wegen der im kritischen Bereich des Kohlendioxids relativ starken Variation des Kapazitätsverhältnisses k mit dem Druck wurde der maximal tolerierbare Druckabfall in der Säule bei 0,5 bar festgelegt[9]. Bei grösseren Druckabfällen besteht wegen dem mit sinkendem Druck abnehmenden Lösungsvermögen überkritischer Gase die Gefahr des Ausfallens von Probensubstanzen. Zudem sind die oben gemachten Annahmen, wie konstanter Diffusionskoeffizient, konstante Viskosität sowie konstante lineare Geschwindigkeit in der Säule, nur für kleine Druckabfälle gültig.

Mit den obenerwähnten Annahmen gestatten Gleichung 6 und 7 die Berechnung von $\bar{u}_{opt}$ und h_{min}. Aus den Gleichungen 8 und 9 folgt die Anzahl theoretischer Böden n und Gleichungen 10 und 11 erlauben die Abschätzung des maximalen Injektions- und Detektionsvolumens. Der Druckabfall über der Trennsäule berechnet sich mit Gleichung 12.

RESULTATE UND DISKUSSION

Arbeitet man bei der optimalen linearen Geschwindigkeit $\bar{u}_{opt}$, das heisst der Geschwindigkeit, die der kleinst möglichen Bodenhöhe entspricht, so erreicht man gemäss Fig. 1 auch mit sehr grossen Säulendurchmessern nicht das geforderte maximale tolerierbare Injektions- und Detektionsvolumen $V_{ID(max)}$ von 1 μl[5].

Zur Erreichung dieses $V_{ID(max)}$ muss nach Gleichung 10 und 11 die lineare Geschwindigkeit $\bar{u}$ der mobilen Phase erhöht werden. Dies führt hingegen zu einer Verminderung der theoretischen Bodenzahl n pro Säulenlänge. Bei Konstanthalten der Totzeit erlauben jedoch höhere lineare Geschwindigkeiten die Verwendung von längeren Säulen. Gemäss Fig. 2. zeigt die theoretische Bodenzahl pro Säule eine hyperbolische Abhängigkeit von der linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase. Ab einer linearen Geschwindigkeit von *ca.* 0,3–0,4 cm/s befindet man sich im asymptotischen Gebiet, wo eine weitere Geschwindigkeitserhöhung nur ein minimales Anwachsen der theoretischen Bodenzahl pro Säule bewirkt.

Kapillarsäulen mit kleinen Innendurchmessern ergeben wesentlich höhere theoretische Bodenzahlen (Fig. 2). Sie erfordern jedoch zur Erreichung des nötigen Injektions- und Detektionsvolumens sehr hohe lineare Geschwindigkeiten und bewirken deshalb sehr grosse Druckabfälle (Gleichung 12). Nach Fig. 3 sollte für einen maximalen Druckabfall von 0,5 bar ein Säulendurchmessr von 0,18 mm nicht unterschritten werden.

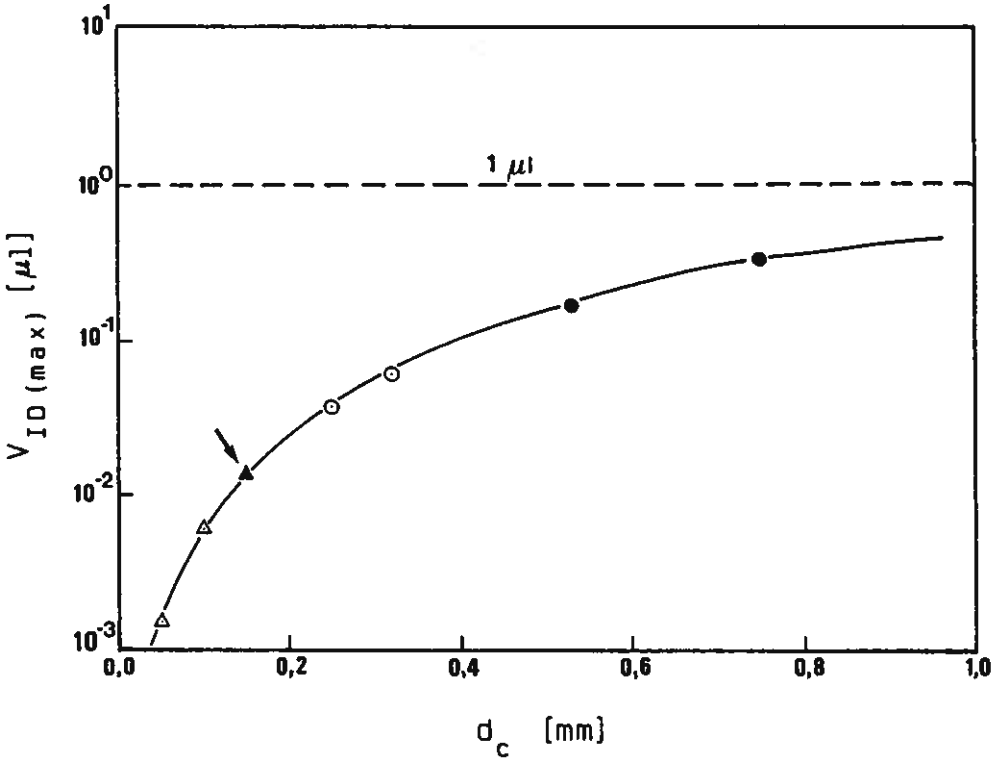

Fig. 1. Maximal tolerierbares Injektions- und Detektionsvolumen $V_{ID(max)}$ in Funktion des Säuleninnendurchmessers d_c bei der optimalen linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase $\bar{u}_{opt}$. Berechnet nach Gleichungen 10 und 11 (Totzeit = 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0). Legende: △ = SFC-Kapillarsäulen, ▲ = Optimale Kapillarsäule zur direkten Kopplung SFE–SFC, c = GC-Kapillarsäulen, ● = "Wide bore" Kapillarsäulen.

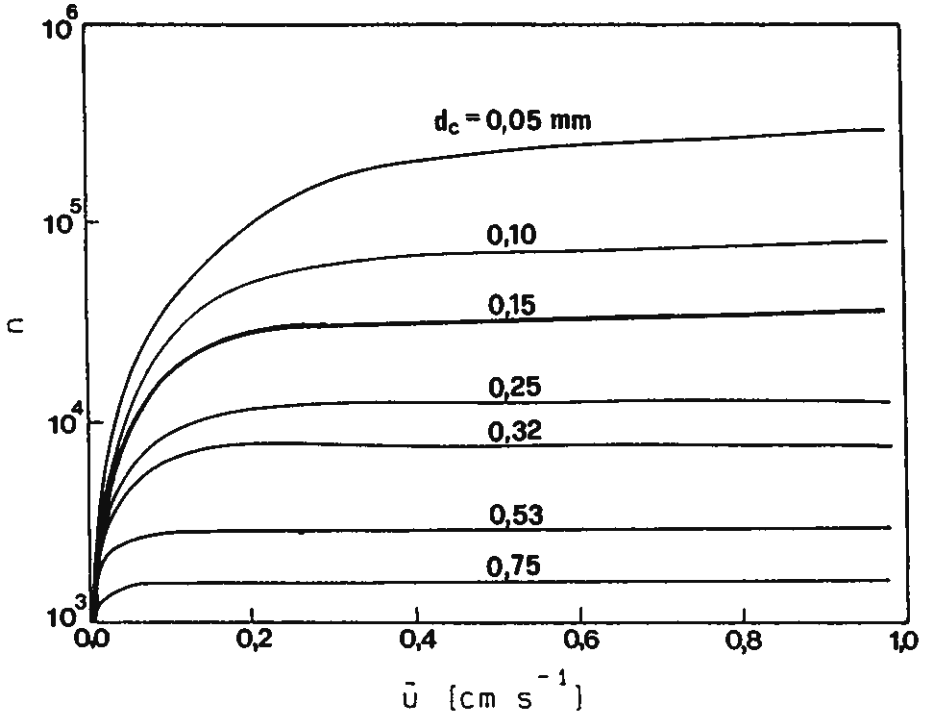

Fig. 2. Theoretische Bodenzahl n pro Säule in Funktion der linearen Geschwindigkeit $\bar{u}$ der mobilen Phase für kommerziell erhältliche Kapillarsäuleninnendurchmesser d_c. Berechnet nach Gleichung 3 (Totzeit = 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0).

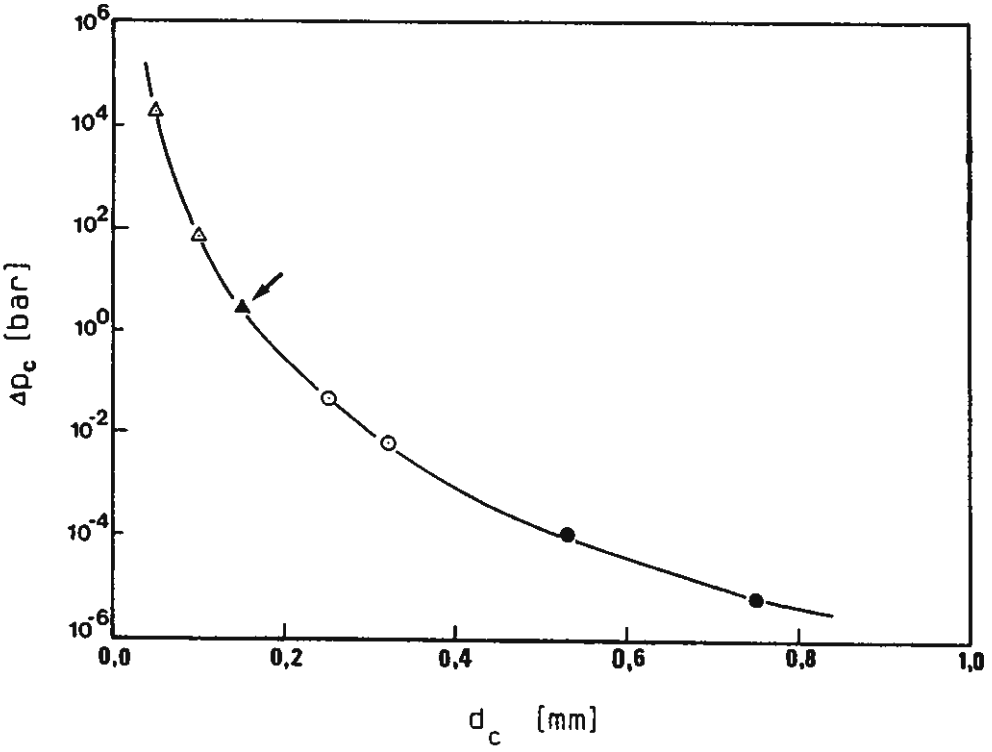

Fig. 3. Druckabfall ΔP_c über der Trennsäule in Funktion des Säuleninnendurchmessers d_c. Berechnet nach Gleichung 12. Symbole siehe. Fig. 1. ($V_{ID(max)}$ = 1 µl, Totzeit 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0).

TABELLE I

BERECHNETE SÄULENPARAMETER FÜR KOMMERZIELL ERHÄLTLICHE KAPILLARSÄULEN MIT INNENDURCHMESSERN VON 0,05, 0,10, 0,15*, 0,25, 0,32, 0,53 UND 0,75 mm (k = 0)

d_c = Säuleninnendurchmesser, t_M = Totzeit (aus praktischen Gründen bei 15 min festgesetzt), $V_{ID(max)}$ = Max. tolerierbares Injektions- und Detektionsvolumen[5], n = Theoretische Bodenzahl pro Säule (Gleichungen 3, 8 und 9), h = Theoretische Bodenhöhe (Gleichung 3), L = Säulenlänge (Gleichung 8), ΔP_c = Druckabfall über Säule (Gleichung 12), $\bar{u}$ = Mittlere lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase.

Symbol in Fig. 1, 3	d_c *(mm)*	t_M *(min)*	$V_{ID(max)}$ *(µl)*	n	h *(mm)*	L *(m)*	ΔP_c *(bar)*	$\bar{u}$ *(cm s^{-1})*
△	0,05	15	1	345 600	6,86	2369	$2 \cdot 10^4$	263,3
△	0,10	15	1	86 399	3,42	296	$7 \cdot 10^1$	32,8
▲	*0,15*	*15*	*1*	*38 397*	*2,27*	*87*	*2,7*	*9,7*
○	0,25	15	1	13 814	1,37	18	$5 \cdot 10^{-2}$	2,1
○	0,32	15	1	8 421	1,06	9	$6 \cdot 10^{-3}$	1,0
●	0,53	15	1	3 033	0,65	2	$1 \cdot 10^{-4}$	0,2
●	0,75	15	1	1 450	0,47	0,7	$1 \cdot 10^{-5}$	0,08

* Wird gemäss einer persönlichen Mitteilung von Prof. W. Jennings demnächst kommerziell erhältlich sein.

SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Die oben angestellten Überlegungen zeigen, dass je nachdem ob man n oder ΔP_c betrachtet, abweichende Einschränkungen zur Wahl des Kapillarsäuleninnendurchmessers bestehen. Vom theoretischen Standpunkt her würden Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 0,15 mm einen günstigen Kompromiss für die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC darstellen. Sie liefern vergleichsweise hohe theoretische Bodenzahlen (38 000 theoretische Böden pro Säule (Tabelle I)) bei akzeptablen Druckabfällen ($<2{,}7$ bar). Leider sind solche Säulen noch nicht kommerziell erhältlich. Die speziell für die SFC entwickelten Kapillarsäulen mit Innendurchmessern von 0,05 und 0,10 mm (J & W Scientific, Rancho Cordova, CA, U.S.A.) gewährleisten zwar sehr hohe theoretische Bodenzahlen (Tabelle I), erfordern jedoch zu kleine Injektions- und Detektionsvolumina ($<0{,}1$ μl).

Die oben erhaltenen Resultate dienten als Basis bei dem im zweiten Teil dieser Veröffentlichung beschriebenen Aufbau eines Prototyps zur direkten Kopplung SFE–Kapillar-SFC.

ZUSAMMENFASSUNG

Fluidextraktion (SFE) und Fluidchromatographie (SFC) entwickelten sich bis anhin unabhängig voneinander. Die vorliegende Arbeit untersucht zum erstenmal die direkte Kopplung der SFE mit der Kapillar-SFC. Dieser erste Teil ist der theoretischen Optimierung einiger wichtiger experimenteller Parameter wie Kapillarsäuleninnendurchmesser, Säulenlänge, Druckverlust, lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase und Einspritzvolumen gewidmet. Die leider noch nicht kommerziell erhältlichen Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 0,15 mm stellen für ein Einspritzvolumen von 1 μl ein Optimum für die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC dar.

LITERATUR

1 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, im Druck.
2 E. Klesper, A. H. Corwin und P. A. Turner, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 700–701.
3 M. Novotny, in M. Novotny und D. Ishii (Herausgeber), *Microcolumn Separations Journal of Chromatography Library*, Band 30, 1985, S. 105–120.
4 W. D. Koller, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 19 (1986) 56–58.
5 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, im Druck.
6 S. R. Springston, *Ph. D. Thesis*, Indiana University, 1984.
7 U. Sugiyama, M. Saito, T. Hondo und M. Senda, *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 107–116
8 R. J. Skelton, Jr., C. C. Johnson und L. T. Taylor, *Chromatographia*, 21(1) (1986) 3–8
9 S. R. Springston und M. Novotny, *Chromatographia*, 14(12) (1981) 679–684.
10 M. J. E. Golay, in D. H. Desty (Herausgeber), *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1959, p. 36.
11 L'Air Liquide, *Gas Encyclopedia*, Elsevier, Amsterdam, 1976, p. 357.

CHROM. 19 188

BEITRAG ZUR DIREKTEN KOPPLUNG FLUIDEXTRAKTION–KAPILLARFLUIDCHROMATOGRAPHIE

II*. AUFBAU EINES PROTOTYPS UND ANWENDUNGSBEISPIELE

W. GMUER
Eidgenössische Technische Hochschule, 1015 Lausanne (Schweiz)
J. O. BOSSET*
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld-Bern (Schweiz)
und
E. PLATTNER
Eidgenössische Technische Hochschule, 1015 Lausanne (Schweiz)
(Eingegangen am 2. Oktober 1986)

SUMMARY

Direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary supercritical fluid chromatography. II. Construction of a prototype and examples of application

The second part of this work describes the construction of a prototype for direct coupling of supercritical fluid extraction (SFE) and capillary supercritical fluid chromatography (SFC). The analyses of some natural products such as cheese, butter, coffee, tobacco and camomile were performed to evaluate the power of this new technique and to improve the existing prototype. It was shown that the direct coupling of SFE to capillary SFC represents a very promising new analytical tool. However, the developed apparatus can and must be simplified and improved.

EINLEITUNG

Der erste Teil dieser Veröffentlichung behandelte die theoretische Optimierung einiger wichtiger apparativer Parameter wie Kapillarsäuleninnendurchmesser, Säulenlänge, Druckverlust und Einspritzvolumen[1]. Der vorliegende zweite Teil beschreibt den Aufbau einer im Hinblick auf Routineuntersuchungen möglichst einfachen Apparatur zur direkten Kopplung der Fluidextraktion (SFE) mit der Kapillarfluidchromatographie (SFC). An Hand der Analyse einiger Naturprodukte überprüfte man die vorgängig durchgeführte theoretische Optimierung. Ein dritter Teil[2] ist der experimentellen Optimierung der Trennbedingungen im Hinblick auf die

* Für Teil I siehe Lit. 1.

Analyse von Milchprodukten gewidmet. Die Anwendungsbeispiele dienten im weiteren der Abschätzung der Leistungsfähigkeit dieser neuen Analysentechnik sowie der Verbesserung des bestehenden Prototyps.

EXPERIMENTELLER TEIL

Proben

Synthetische Proben. Ein erstes synthetisches Gemisch mit Reinsubstanzen, die als Aromastoffe in Lebensmittel vorkommen können, setzte sich aus je 0.5 g folgender Methylketone und freier Fettsäuren dispergiert in 50 ml Wasser zusammen. Methylketone (puriss p.a., puriss., purum oder pract.; alles von Fluka): Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Hexanon, 2-Heptanon, 2-Octanon, 2-Nonanon, 2-Decanon, 2-Undecanon. Freie Fettsäuren (puriss. p.a., puriss. oder techn.; alles von Fluka): Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, *n*-Valeriansäure, Capronsäure, Önanthsäure, Caprylsäure, Pelargonsäure, Caprinsäure, Undecansäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Pentadecansäure, Palmitinsäure, Heptadecansäure, Stearinsäure.

Ein zweites synthetisches Gemisch aus vier freien C_{18} Fettsäuren (puriss. oder pract.; alles von Fluka) mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen setzte sich wie folgt zusammen: 1 g Stearinsäure, 1.5 g Ölsäure, 2 g Linolsäure, und 0.8 g Linolensäure in 50 ml Wasser.

Natürliche Proben. Folgende Lebensmittel wurden paarweise verglichen: frische mit drei Tage der Sonne ausgesetzter Butter; raffiniertes mit rohem Rinderfett (Morgia Produits, Morges, Schweiz); raffiniertes mit rohem Rapsöl (E. Vogel, Zürich, Schweiz); fein gemahlener Kaffee mit und ohne Coffein (Nestlé, Hag). Im weiteren wurden folgende pflanzliche Produkte untersucht: der Tabak einer leichten und einer starken Zigarette (Select, Gauloise); getrocknete unbehandelte Kamillenblüten.

Apparatur

Fig. 1 zeigt die zur direkten Kopplung der SFE mit der SFC entwickelte Apparatur (Prototyp) bestehend aus: (1) Gaszylinder mit Kohlendioxid bei 55 bar, Reinheit >99.9%, Klasse 2 (Carbagas, Lausanne, Schweiz); (2) Gasreinigungspatrone, Edelstahlrohr (300 × 15 mm) je zur Hälfte gefüllt mit Molekularsieb (Union Carbide Typ 3A, Fluka 69832) und Aktivkohle (gekörnt 4–8 mm, puriss. p.a., Fluka) (Eigenherstellung École Polytechnique Fédérale de Lausanne); (3) Gasfilter, Stahlfritte mit einer Porengrösse von 4 μm, Typ 520.5332 (Nova-Swiss, Effretikon, Schweiz); (4) Membrankompressor, Maximaldruck 1000 bar, Typ 554.2121 (Nova-Swiss, Effretikon, Schweiz); (5) Gasvorratszylinder aus Edelstahl VEW A 305, Maximaldruck 1000 bar, versehen mit 3 Gasanschlüssen (1 unten, 2 im Deckel) und einem Einführungsrohr für die Temperatursonde. Innenmasse: Durchmesser 70 mm, Höhe 240 mm, Volumen 900 ml. Doppelmantel zur Thermostatisierung aus Polypropylen (Eigenherstellung École Polytechnique Fédérale de Lausanne); (6) Extraktionsautoklav, Innenmasse: Durchmesser 70 mm, Höhe 110 mm, Volumen 400 ml. Weitere Charakteristika wie (5); (7) SFE–SFC Kapillarkopplung*, desaktivierte unbeschichtete Kapillarsäule (300 × 0.32 mm) (Supelco SA, Gland, Schweiz); (8) Druckprogrammierzylinder*, Edelstahlrohr (300 × 10 mm) gefüllt wie (2) und umwickelt mit einem

* Siehe weitere Angaben unter "Diskussion des Prototyps".

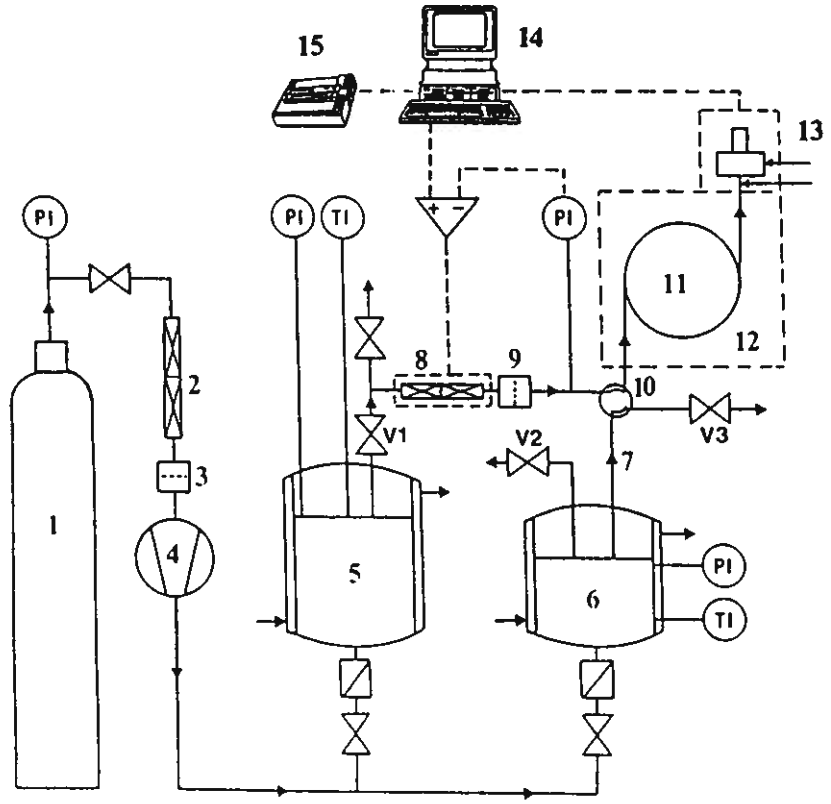

Fig. 1. Apparatur zur direkten Kopplung Fluidextraktion–Kapillarfluidchromatographie. 1 = Gaszylinder; 2 = Gasreinigungspatrone; 3 = Gasfilter; 4 = Membrankompressor; 5 = Gasvorratszylinder; 6 = Extraktionsautoklav; 7 = Kapillarkopplung; 8 = Druckprogrammierzylinder; 9 = Gasfilter; 10 = Probenaufgeber; 11 = GC-Kapillarsäule; 12 = Programmierbarer Heizofen: 13 = Flammenionisationsdetektor; 14 = Rechner und Steuereinheit; 15 = Drucker; V1–V3 = Sperrventile. Funktion: 1–5, Gasaufbereitung; 6, SFE[3]; 7, SFE-SFC Kopplung; 8–15, SFC. (PI = Druckanzeige; TI = Temperaturanzeige.)

Heizband (Heraeus, Carouge, Schweiz) und einer mit Wasser gespeisenen Kühlschlange (600 × 3 mm) (Eigenherstellung École Polytechnique Fédérale de Lausanne); (9) Gasfilter, Stahlfritte mit einer Porengrösse von 2 μm, Typ ZUFR1 (Valco Europ, Schenkon, Schweiz); (10) Probenaufgeber*, Typ CI4W, Probevolumen 1 μl (Valco Europ, Schenkon, Schweiz); (11) Gaschromatographische (GC)-Kapillarsäule*, Innendurchmesser 0.25 mm, Filmdicke 0.25 μm, Länge 14 m. Lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase 2 cm/s. Stationäre Phase: Supelcowax 10 (Supelco, Gland, Schweiz); (12) programmierbarer Heizofen*, umgebauter Gaschromatograph, Perkin-Elmer F30; (13) Flammenionisationsdetektor* von obenerwähntem GC; (14) Rechner und Steuereinheit*. Apple-Computer II$^+$ mit AD/DA-Wandler (Adalab, Interactive Microware, State College, PA, U.S.A.) sowie zugehöriges Softwarepaket (Chromatochart); (15) Drucker (Epson MX-80). Die Hochdruckleitungen aus Edelstahl wurden so kurz wie möglich gehalten. Aussendurchmesser: 1/4 in.; Innendurchmesser: 3/32 in. (Nova-Swiss, Effretikon, Schweiz).

Arbeitsvorschrift. Nach Einfüllen von 50-g Probe in den Extraktionsautoklaven (6) wurden der Extraktionsdruck und die Extraktionstemperatur willkürlich bei 100 bar und 40°C fixiert (Optimum für Käsearomastoffe[3]). Zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen Gas- und Probephase wartete man *ca.* 14 h über Nacht[3]. Danach

* Siehe weitere Angaben unter "Diskussion des Prototyps".

wurde der Druckprogrammierzylinder (8) mit Hilfe des Membrankompressors (4) und des Gasvorratszylinders (5) bis zum SFC Anfangsdruck aufgefüllt. Man schloss Hahn V1 und gab in der Steuereinheit (14) das gewünschte Druckprogramm ein. Das SFC-Temperaturprogramm wurde wie üblich vom Prozessor des umgebauten Gaschromatographen (12) geregelt. Die SFE-SFC-Kapillarkopplung (7) spülte man durch leichtes Öffnen von Hahn V3 4–5 Mal durch und gab gleich danach die Probe auf. Gleichzeitig wurde das Druck- und Temperaturprogramm sowie die Datenerfassung in Gang gesetzt. Nach Beendigung des Chromatogramms entleerte man den Extraktionsautoklaven (7) durch Öffnen von Hahn V2, entnahm den Probenrückstand und säuberte den Autoklaven nacheinander durch Spülen mit Wasser, Aceton und Diethylether. Die Kapillarsäule (11) wurde zur Reinigung über Nacht mit flüssigem Kohlendioxid gespült.

DISKUSSION DES PROTOTYPS

Apparatur für die SFE

Sowohl die Gasaufbereitung als auch die Extraktionsapparatur wurden andernorts bereits ausführlich beschrieben[3].

Apparatur für die SFC und ihre Kopplung mit der SFE

SFE–SFC Kopplung. Zur Kopplung der SFE mit der SFC wurde eine desaktivierte unbeschichtete Fused-Silica-Kapillare benutzt (7). Sie wurde im Autoklaven mit einer Swagelok-Hochdruckverschraubung, im Probenaufgeber mit der zugehörigen Befestigungsschraube fixiert. In beiden Fällen ersetzte man den Metallklemmring durch ein Graphitferrule. Sowohl die Verbindungskapillare als auch der im folgenden beschriebene Probenaufgeber befanden sich bei Raumtemperatur. Das erhöhte Lösungsvermögen des bei 20°C und 100 bar flüssigen Kohlendioxids verhindert das Ausfallen von Probenkomponenten.

Probenaufgeber. Zuerst verwendete man zur Probenaufgabe das interne Totvolumen eines 6-Weghahns (Typ 6W, Valco Europ, Schenkon, Schweiz). Die Reproduzierbarkeit erwies sich jedoch als ungenügend. Besser bewährte sich ein direkt an der Aussenwand des Chromatographs befestigter Probenaufgeber mit einer internen Einspritzschlaufe von 1 μl (10). Die Kapillarsäule fixierte man auf dieselbe Weise wie die SFE–SFC Kopplung. Die gut reproduzierbare (Variation 2.5%) und splitlose Probenaufgabe erlaubte selbst quantitative Bestimmungen.

Kapillarsäule. Wie die theoretische Optimierung zeigte[1], würden Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von *ca.* 0.15 mm ein günstiges Optimum zur direkten Kopplung SFE–SFC darstellen. Da aber solche Säulen noch nicht kommerziell erhältlich sind, musste auf die für die Gaschromatographie entwickelten Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 0.25 mm zurückgegriffen werden (11). Diese erwiesen sich als druckfest bis mindestens 300 bar. Wegen des erhöhten Lösungsvermögens überkritischer Fluide kommen in der SFC nur chemisch gebundene stationäre Phasen in Frage. Dem Carbowax (Polyethylenglykol) ähnliche stationäre Phasen eignen sich am besten zur Analyse von polaren Aromastoffen. Es zeigte sich hingegen, dass bei Druckprogrammierung das "Bluten" solcher Säulen leicht zunahm. Dies störte vor allem bei sehr verdünnten, das heisst eine hohe Detektorempfindlichkeit erfordernden Proben und begrenzte die Druckprogrammierung. Trotzdem konnten

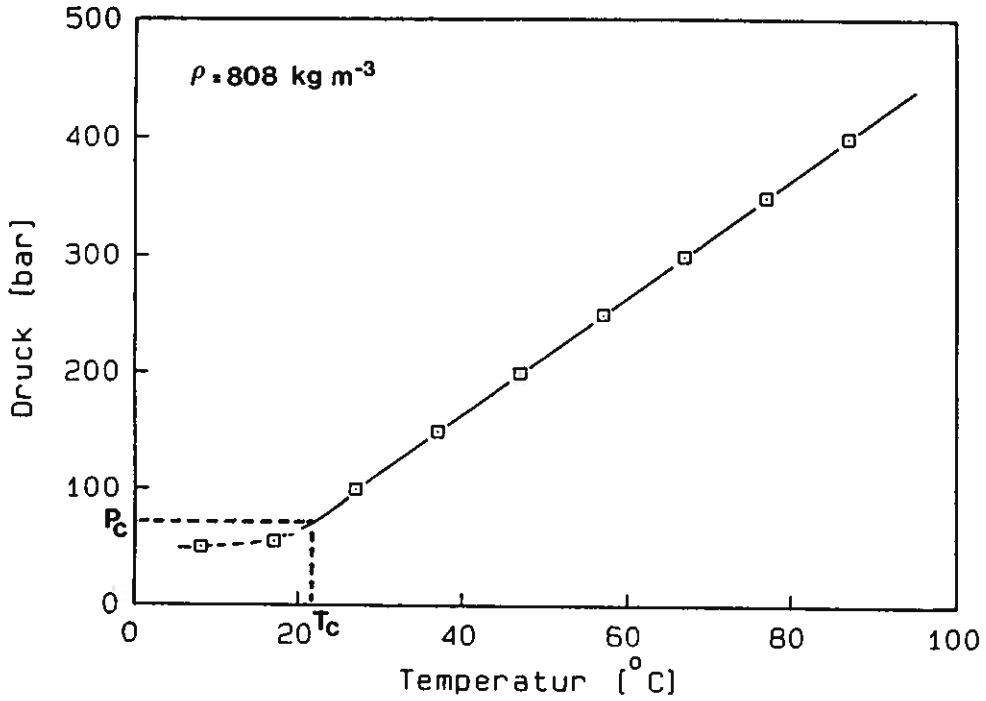

Fig. 2. Variation des Drucks in Funktion der Temperatur für Kohlendioxid bei konstanter Dichte[4].

die hier verwendeten Kapillarsäulen (11) während mehrerer Monate ohne bemerkenswerten Verlust an Trennleistung benutzt werden und ergaben experimentell 730 theoretische Böden pro Meter ($k = 0$). Apolare stationäre Phasen (z.B. Siliconöle) lassen sich zwar wesentlich besser binden, eignen sich jedoch weniger gut zur Trennung von polaren Aromastoffen.

Temperatur- und Druckprogrammierung. Die Temperaturprogrammierung erfolgte durch das Steuerelement und den Heizofen eines Gaschromatographs (12). Der Druckprogrammierung kommt in der SFC eine ähnliche Rolle zu wie der Temperaturprogrammierung in der GC und der Programmierung von Lösungsmittelgradienten in der Flüssigchromatographie. Kapillarsäulen erfordern einen absolut pulsfreien Fluss und verunmöglichen aus diesem Grunde die Druckprogrammierung mittels des Membrankompressors (4). Wie Fig. 2 zeigt, führen für Kohlendioxid schon geringe Temperaturerhöhungen auf niedrigem Niveau zu einem starken Druckanstieg. In der hier beschriebenen Apparatur diente der je zur Hälfte mit Molekularsieb und Aktivkohle gefüllte beheizbare Druckprogrammierzylinder (8) sowohl der zusätzlichen Trägergasreinigung als auch, wie es sein Name andeutet, der Druckprogrammierung. Der gemessene Druck wurde in einem Komparator ständig mit einem von der Steuereinheit (14) gegebenen Sollwert verglichen und der Druckprogrammierzylinder (8) mit einem Heizband (Temperaturschwankung ± 1°C) entsprechend erwärmt. Diese sehr einfache und billige Technik erlaubte eine praktisch pulsfreie Druckprogrammierung bis etwa 200 bar.

Detektor. Die Wahl des Detektors erwies sich beim Bau des Fluidchromatographs als Kernproblem. Die Empfindlichkeit eines speziell konstruierten druckfesten Photoionisationsdetektors nahm mit Kohlendioxid als mobiler Phase bei Druckerhöhung stark ab[5]. Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Flammenionisationsdetektor beobachtet[6].

Eigene Vorversuche mit einem Massenspektrometer (mit Elektronenstossio-

nisation, Typ 5992B, Hewlett-Packard) zeigten, dass dieses Gerät eine für den die Säule verlassenden Gasfluss zu geringe Pumpenkapazität aufwies. Ein selbst gebautes totvolumenfreies Splitsystem ergab nur unbefriedigende Resultate. Einerseits erschwerten die geringen in das Massenspektrometer einströmenden Probemengen die Detektion, andererseits beobachtete man mit der zur Entspannung benutzten, an ihren Enden abgeflachten Platin–Iridium Kapillare[7] schon nach kurzer Zeit Verstopfungserscheinungen.

Der Flammenionisationsdetektor (13) verlangt zwar wie das Massenspektrometer die Entspannung des Trägermediums, gestattet indes weit grössere volumetrische Flussraten (bis zu 30 ml/min bei Normalbedingungen). Man benutzte direkt den zum Chromatographen gehörenden Flammenionisationsdetektor (13). Schwierigkeiten bot jedoch die Wahl der Restriktion: An ihren Enden abgeflachte Platin–Iridium-Kapillaren (150 × 0.15 mm) zeigten wiederum Verstopfungserscheinungen. Wesentlich besser bewährten sich in einer Flamme ausgezogene unbeschichtete Fused-Silica-Kapillaren (Masse der unbehandelten Kapillare 150 × 0.1 mm)[8]. Ihre Herstellung erforderte zwar jeweils einige Sorgfalt und Erfahrung, sie konnten dann aber mehrere Monate problemlos verwendet werden. Man führte die Restriktion direkt durch die Brennerdüse ein und koppelte sie mittels einer totvolumenfreien Verschraubung (Typ 2-3796, Supelco, Gland, Schweiz) mit der Trennsäule. Das Ende des Restriktors mit einem Innendurchmesser von etwa 15 μm befand sich auf Höhe der Brennerdüse und der gesamte Detektorblock wurde ständig auf 350°C geheizt. Bei Druckprogrammierung über 130 bar überschritt man mit der hier verwendeten

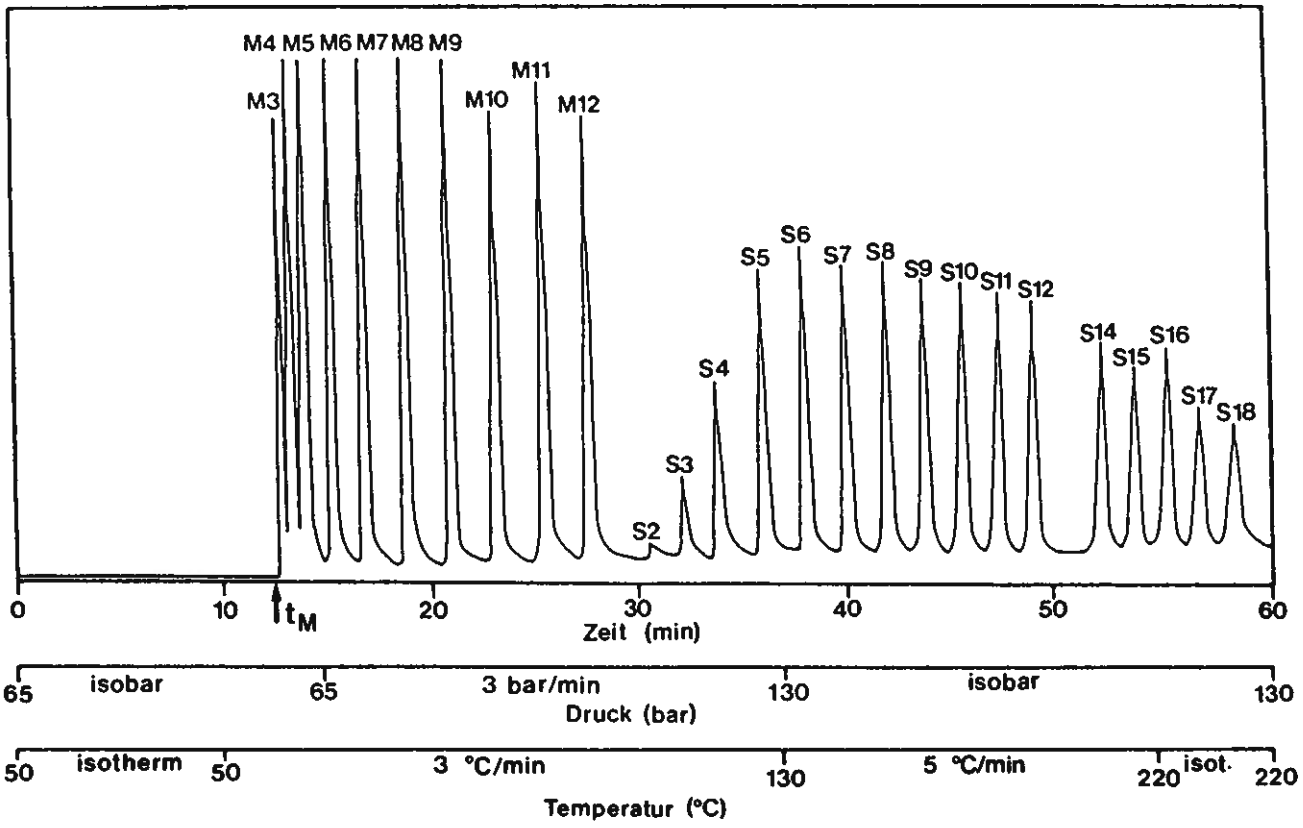

Fig. 3. Trennung eines Gemisches von C_3–C_{12} Methylketonen (M3–M12) und freien C_2–C_{18} Fettsäuren (S2–S18) durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 256. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

Kapillarsäule (11) die maximal tolerierbare volumetrische Flussrate des Flammenionisationsdetektors (30 ml/min bei Normalbedingungen) und seine Empfindlichkeit nahm deshalb stark ab.

Datenverarbeitung und Steuereinheit. Der verwendete Rechner (14) diente der Datenverarbeitung und der Druckprogrammierung. Das benutzte Softwarepaket (Chromatochart) ermöglichte die automatische Datenerfassung, Druckprogrammierung, Integration sowie den Vergleich mit einem Standardfile.

Anwendungsbeispiele

Freie Fettsäuren und Methylketone. Freie Fettsäuren bilden sich in pflanzlichen und tierischen Fetten durch Hydrolyse und/oder Oxidation der Triglyceride. Langkettige freie Fettsäuren neigen stark zur Oxidation und führen zu Aromafehlern (ranzig, fischig, metallisch). Gleichzeitig bilden sich auch Methylketone[9]. Herkömmliche Analysenmethoden erfordern vor der chromatographischen Trennung die aufwendige Ablösung der freien Fettsäuren von der Fettmatrix (Wasserdampfdestillation, Flüssigextraktion), wobei die Gefahr von Verlusten leicht flüchtiger sowie der Zersetzung thermolabiler Komponenten besteht. Für die GC müssen die langkettigen Fettsäuren wegen ihrer kleinen Flüchtigkeit meistens verestert werden. Fig. 3 zeigt

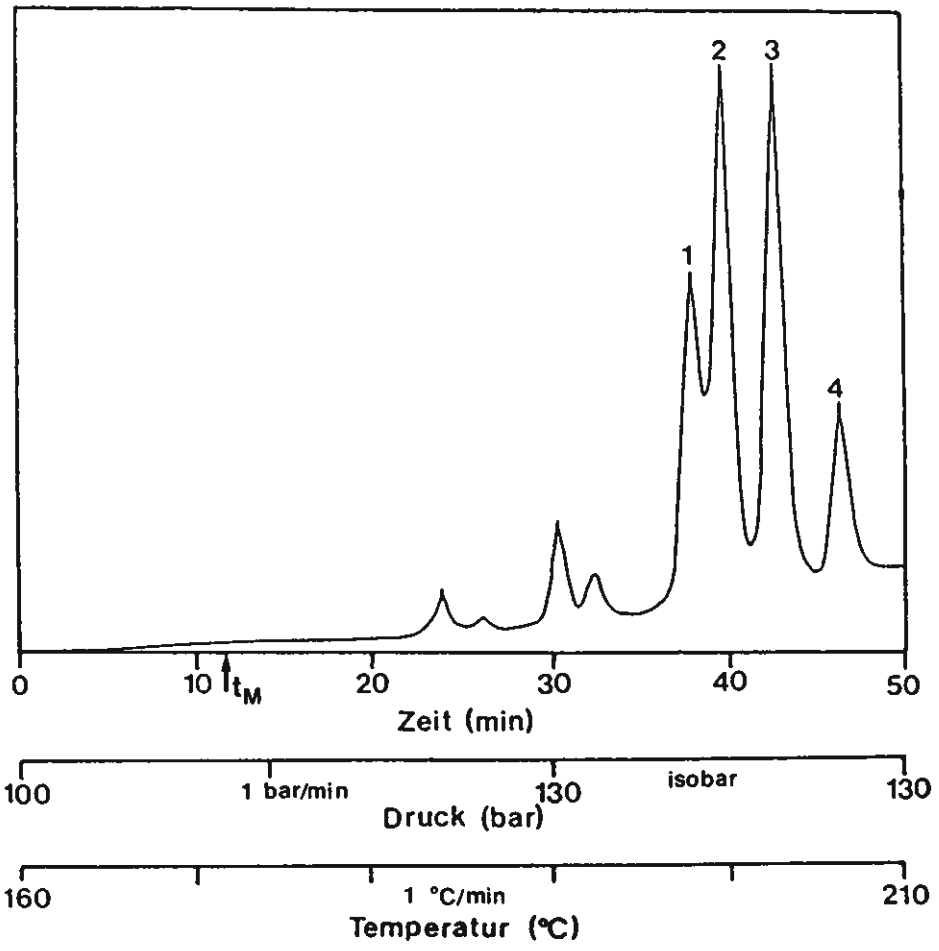

Fig. 4. Trennung eines Gemisches von vier freien C_{18} Fettsäuren mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen durch direkte Kopplung SFE–SFC. 1 = Stearinsäure, 2 = Ölsäure, 3 = Linolsäure, 4 = Linolensäure. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 256. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

die Trennung des ersten synthetischen Gemisches von Methylketonen (C_3–C_{12}) und freien Fettsäuren (C_2–C_{18}) mittels direkter Kopplung SFE–SFC. Durch parallele Druck- und Temperaturprogrammierung gelang sowohl die Auftrennung der leicht flüchtigen Methylketone (C_3–C_6) als auch der schwer flüchtigen freien Fettsäuren (C_{12}–C_{18}).

Die oben beschriebene Apparatur ermöglichte ebenfalls die Auftrennung des zweiten synthetischen Gemisches von vier freien C_{18} Fettsäuren mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen (Fig. 4).

Wie oben erwähnt, gelten Methylketone und freie Fettsäuren als typische Produkte des enzymatischen und/oder oxidativen Milchfettabbaus. Fig. 5 zeigt die Chromatogramme von frischer und drei Tage der Sonne ausgezetzter Butter. Man

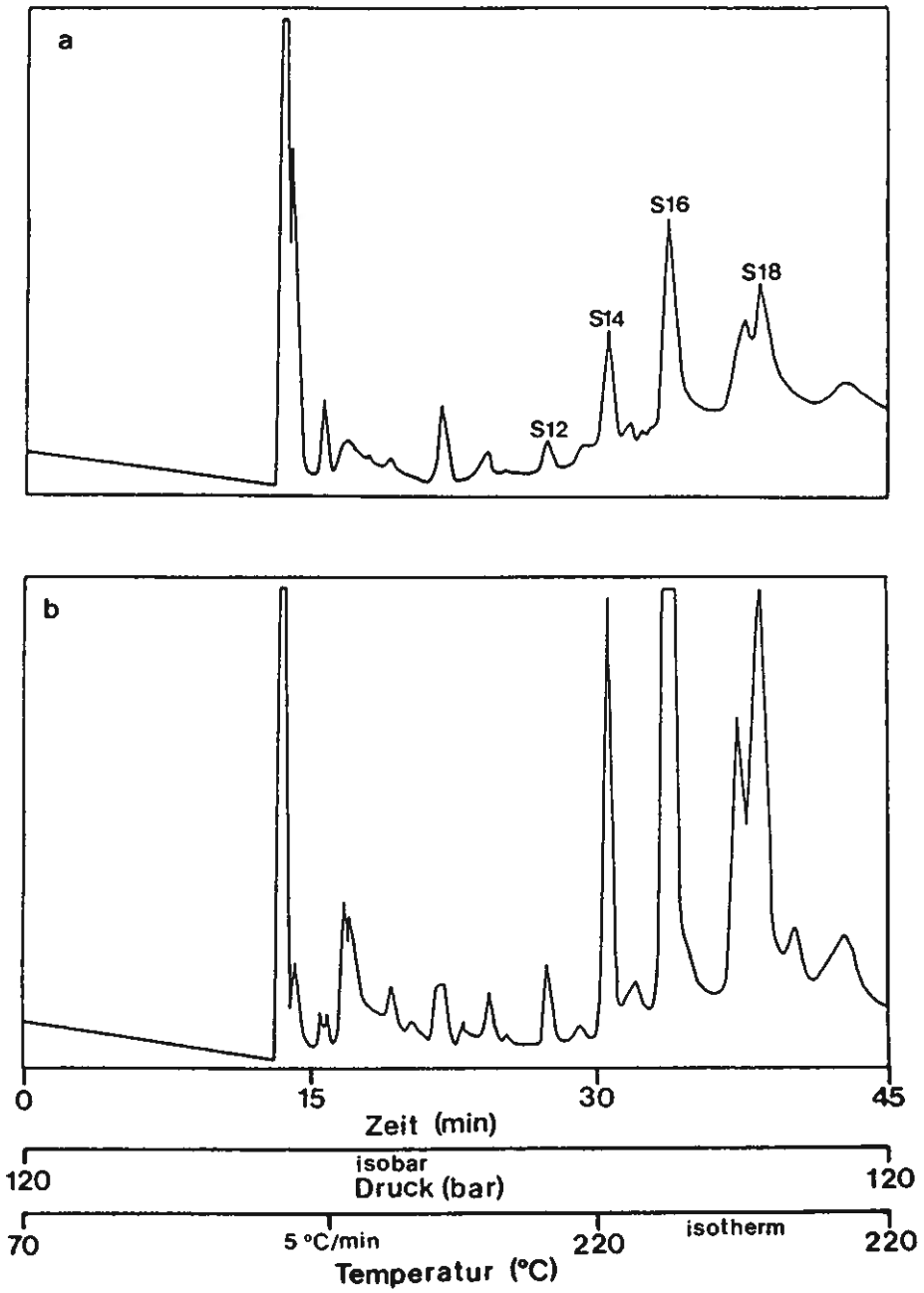

Fig. 5. Analyse von frischer (a) und drei Tage der Sonne ausgesetzter Butter (b) durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

erkennt unter anderem die starke Zunahme verschiedener langkettiger, freier Fettsäuren. Die Methylketone sind zwar verstärkt, aber unvollständig getrennt.

Im Gegensatz zur Butter, wo Oxidation zu freien Fettsäuren und damit zu Ranzigkeit führen kann, sind die niedermolekularen freien Fettsäuren bei der Käsereifung natürliche Reifungsprodukte[10]. Fig. 6 vergleicht die Chromatogramme eines guten (a) und eines ranzigen (b) Raclettekäses. Wiederum erkennt man beim ranzigen Käse die starke Zunahme an freien Fettsäuren und Methylketonen.

Da bei der für diese Analysen nötigen hohen Detektorempfindlichkeit die Basislinie stark ansteigt, wurde auf die Druckprogrammierung verzichtet. Die Temperaturprogrammierung allein führte zu relativ guten Auftrennungen. Eine elektro-

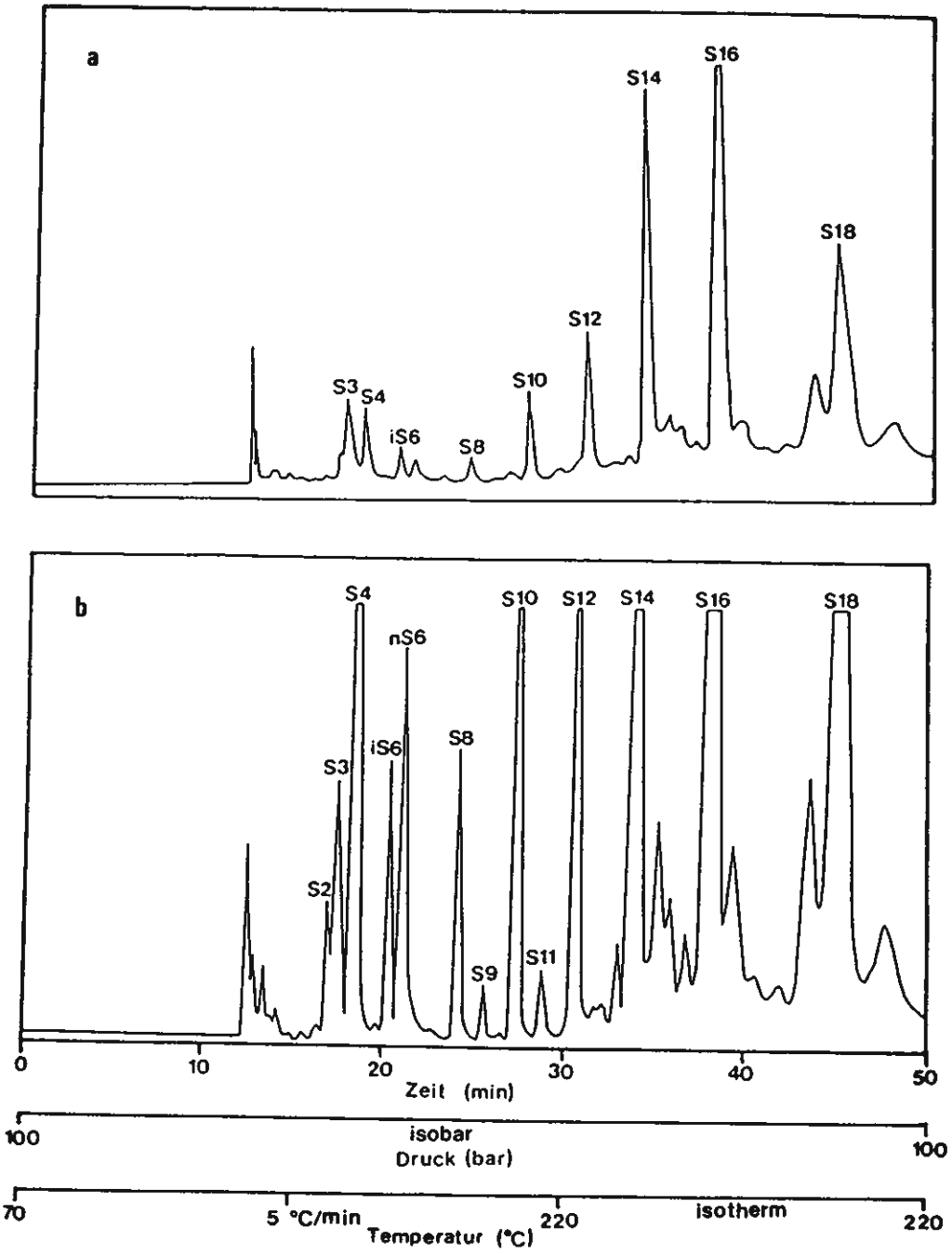

Fig. 6. Analyse von erstklassigem (a) und ranzigem (b) Raclettekäse durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

nische Grundlinienkompensation ist in Bearbeitung und sollte bei paralleler Druckprogrammierung die Auflösung noch wesentlich verbessern (Fig. 3).

Pflanzliche Fette und Öle bestehen hauptsächlich aus Glyceriden, Glycerin, freien Fettsäuren und den Fettbegleitstoffen (Phosphatide, Schleimstoffe, Farbstoffe, geruchs- und geschmacksaktive Stoffe, Terpene, Vitamine)[11]. Ihre Verwertung als Nahrungsmittel erfordert die vorhergehende Abtrennung der freien Fettsäuren sowie einiger weiterer unerwünschter Begleitstoffe (Entsäuern, Desodorisieren). Figs. 7 und 8 vergleichen rohes mit raffiniertem Rinderfett, beziehungsweise rohes mit raffiniertem Rapsöl. In beiden Fällen wurden bei der Raffination die freien langkettigen Fettsäuren praktisch vollständig entfernt.

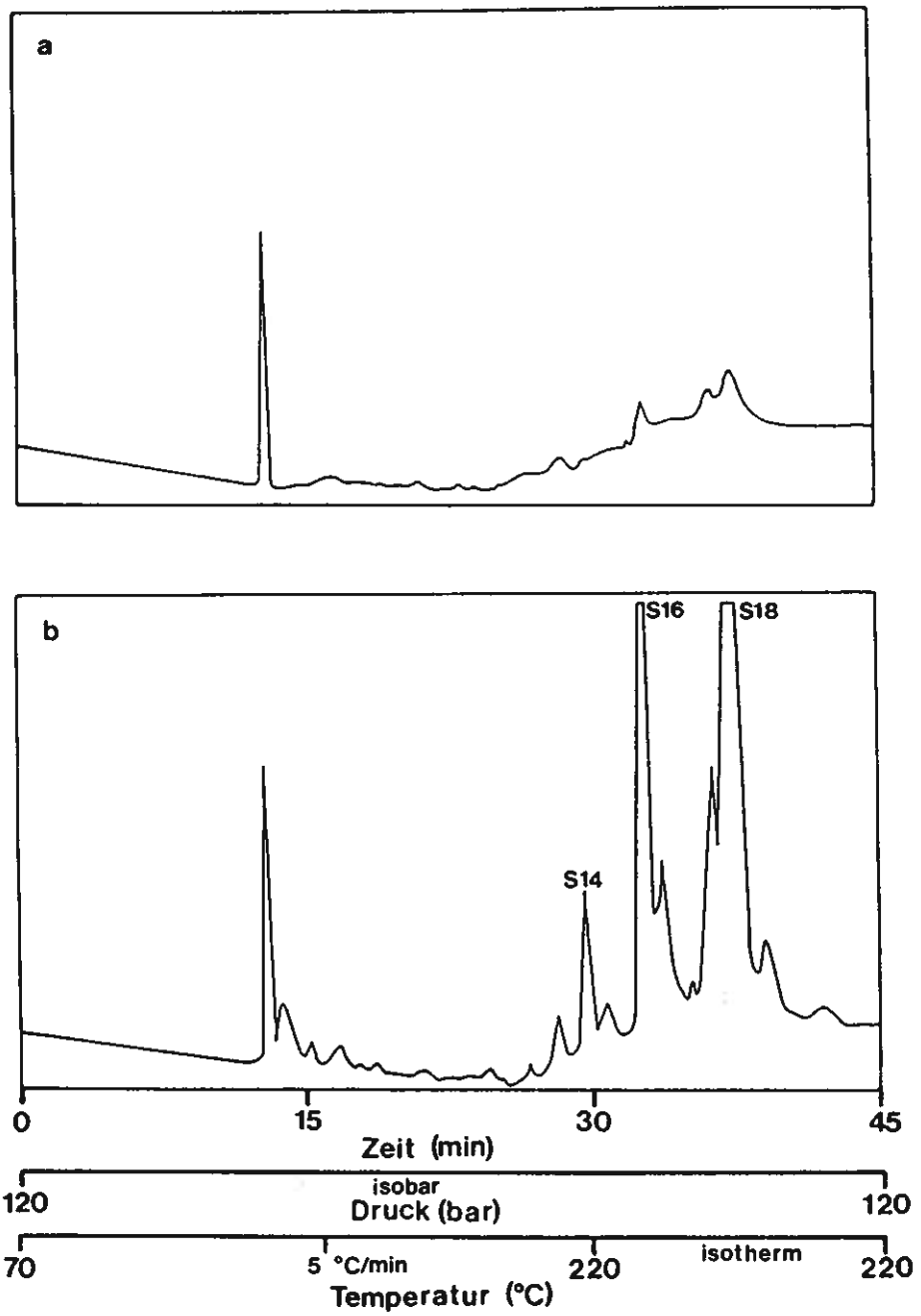

Fig. 7. Analyse von raffiniertem (a) und rohem (b) Rinderfett durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

Kaffee. Die Entcoffeinierung gilt als erste grosstechnische Anwendung der Fluidextraktion. Nach diesem Verfahren soll sich coffeinfreier Kaffee im Gegensatz zu herkömmlichen Entcoffeinierungsmethoden auch aus Röstkaffee herstellen lassen[11]. Fig. 9 zeigt jedoch, dass bei der Extraktion von geröstetem Kaffee mit überkritischem Kohlendioxid beträchtliche Mengen an leicht flüchtigen Aromakomponenten mitgeschleppt werden. Wegen des grossen Anteils an leicht flüchtigen Verbindungen wurde die SFC bei einem relativ tiefen Druck (80 bar) durchgeführt. Wiederum verzichtete man wegen der hohen benötigten Detektorempfindlichkeit auf die Druckprogrammierung. Das hier mit einer Kapillarsäule erhaltene Chromatogramm zeigt im Vergleich zu jenem mit einer gepackten Säule[12,13] eine wesentlich bessere Auflösung.

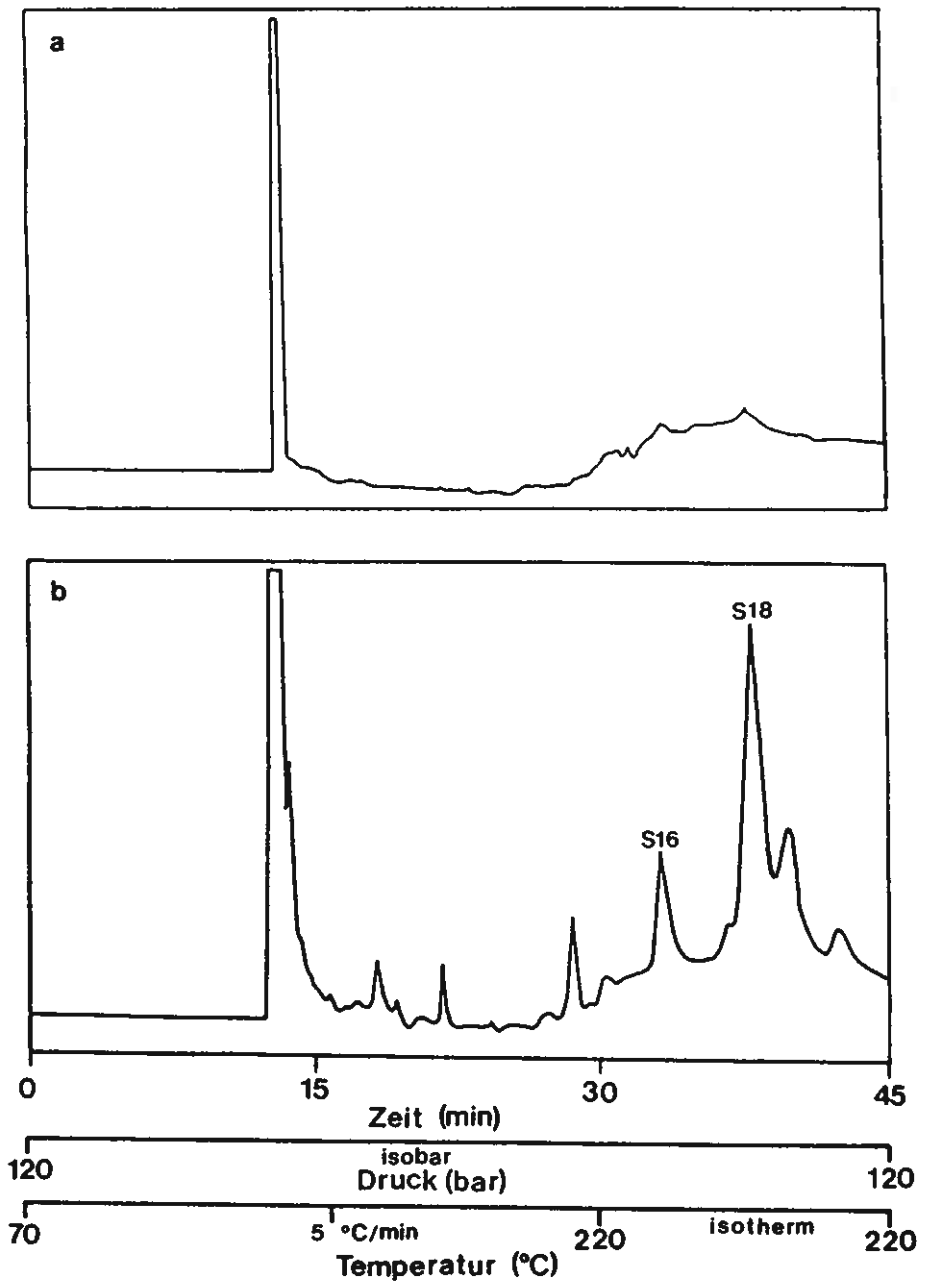

Fig. 8. Analyse von rohem (a) und raffiniertem (b) Rapsöl durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

Pflanzliche Produkte. Fig. 10a und b vergleichen den Tabak einer leichten und einer starken Zigarette. Die beiden Chromatogramme unterscheiden sich vor allem im rechten, den schwer flüchtigen Komponenten entsprechenden Teil. Als weitere Anwendungsmöglichkeit der SFE wurde in der Literatur[14] die Extraktion von Kamillenblüten beschrieben (Fig. 10c). Die Chromatogramme in Fig. 10 zeigen zwar eine eindeutige Extraktion, aber leider auch eine völlig ungenügende chromatographische Auflösung.

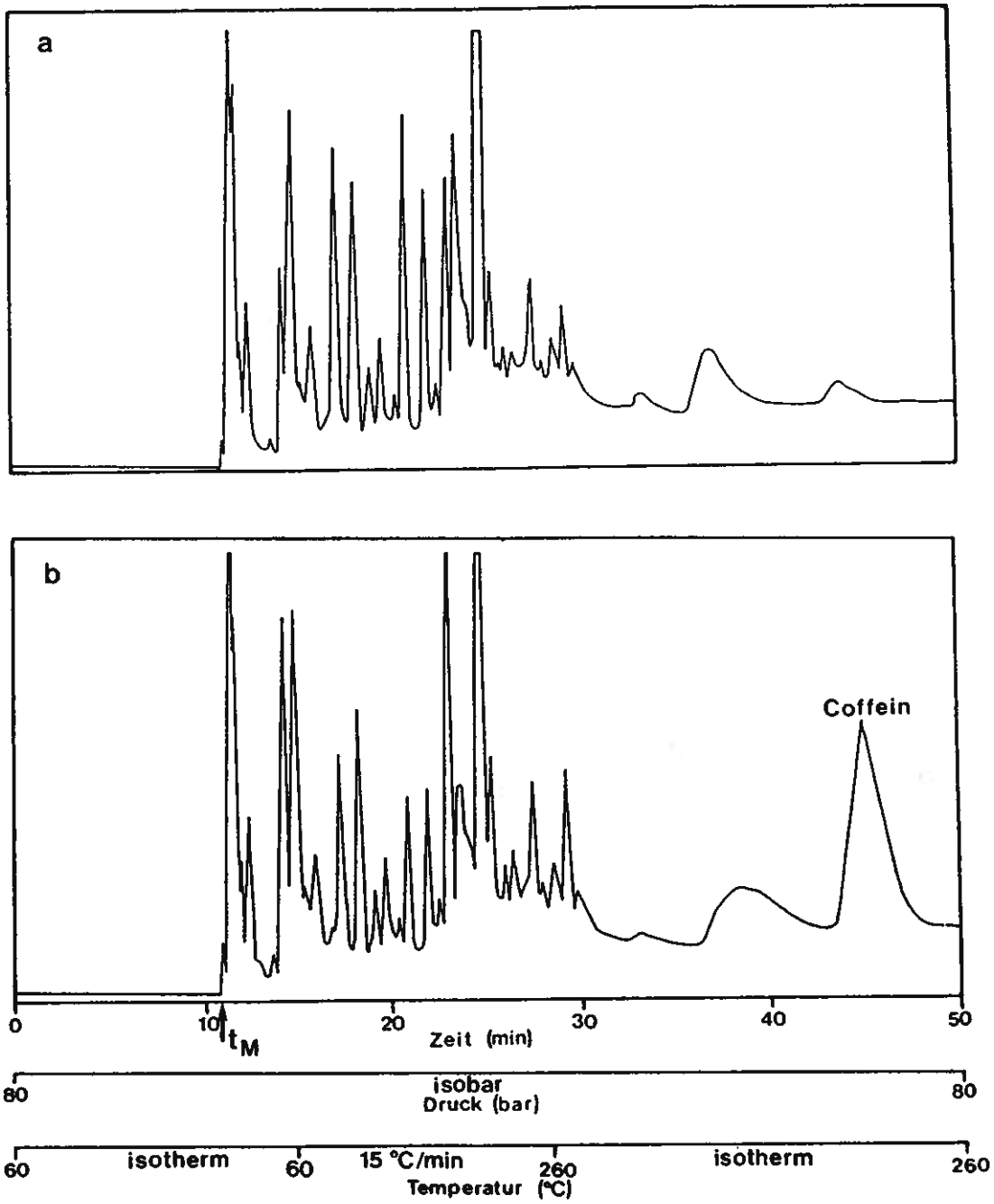

Fig. 9. Analyse von entcoffeiniertem (a) und normalem (b) Kaffee durch direkte Kopplung SFE–SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 16. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

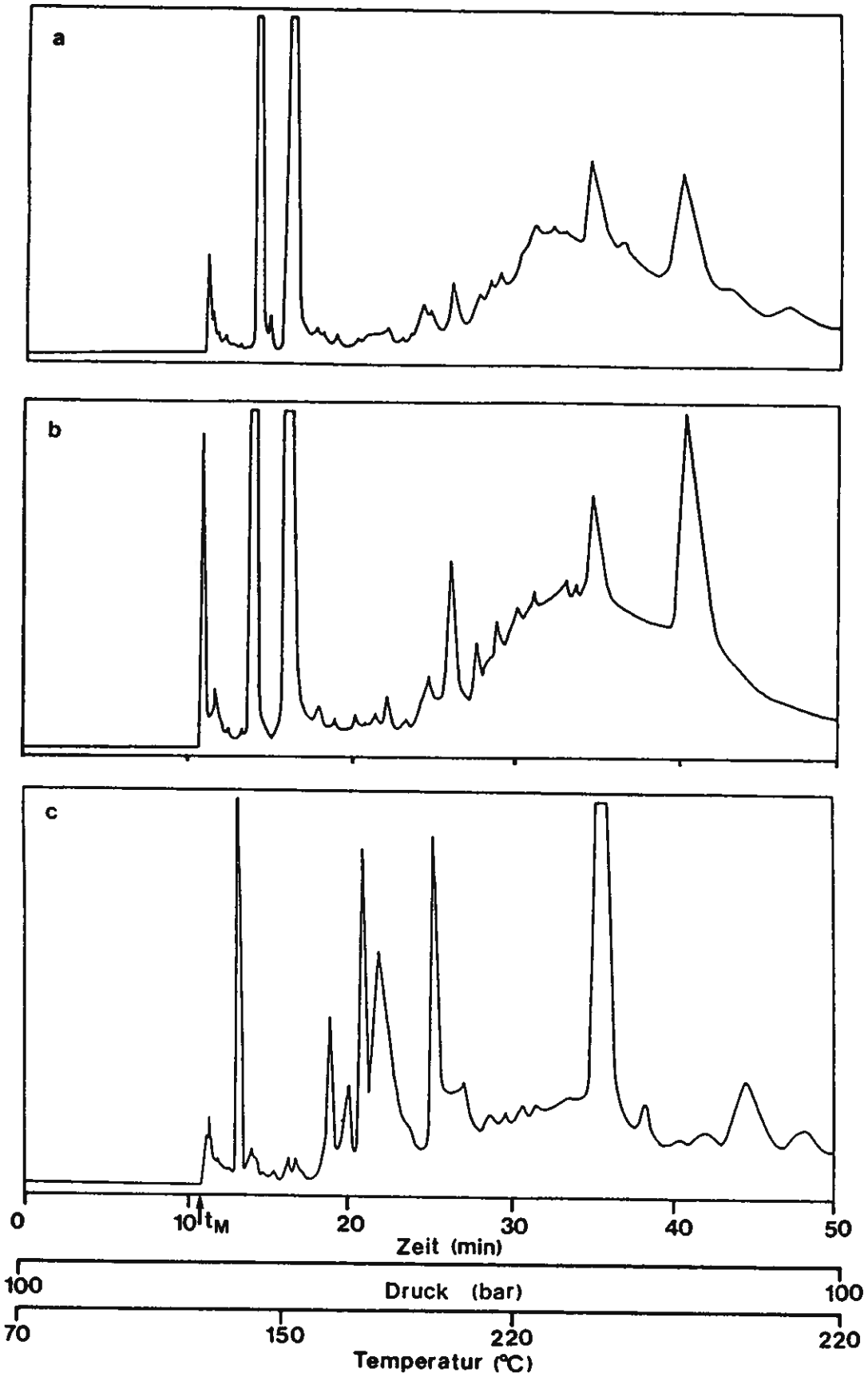

Fig. 10. Analyse pflanzlicher Produkte durch direkte Kopplung SFE–SFC. Tabak einer leichten (a) und einer starken (b) Zigarette, Kamillenblüten (c). Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 8. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

Die hier präsentierte Arbeit zeigte, dass die direkte Kopplung SFE–SFC ein neues vielversprechendes Analysensystem darstellt. Der entwickelte Prototyp kann und muss jedoch noch wesentlich vereinfacht und verbessert werden. Die direkte Kopplung SFE–SFC kombiniert die Vorteile, aber auch die Nachteile der GC und der Hochleistung-Flüssigkeitschromatographie. Sie ersetzt hingegen nicht diese beiden etablierten Techniken, sondern ergänzt sie auf sehr nützliche Art und Weise.

Diese neue Analysenmethode erlaubt die schonende Extraktion und Chromatographie von thermolabilen, schwer flüchtigen und relativ polaren Verbindungen, ermöglicht für grosstechnische Anwendungen der SFE die schnelle Optimierung der Extraktionsparameter (Druck, Temperatur) und liefert eine für die SFC neue Injizierungstechnik zur Aufgabe relativ verdünnter Proben. Das zusätzliche Wegfallen jeder Probenvorbereitung bedeutet einerseits eine grosse Zeitersparnis und lässt andererseits auch quantitative Bestimmungen zu. Da die Kopplung mit Kapillarsäulen jedoch relativ kleine Einspritzvolumen (1 μl) erfordert, ist diese Technik zum Nachweis von Spurenkomponenten ungeeignet.

Die Vorversuche zeigten die oben aufgeführten Stärken und Schwächen dieser Methode sowie im besonderen die wichtigen Vereinfachungen und Verbesserungen die am Prototyp vorzunehmen sind. Die Kopplung der unter hohem Druck stehenden Kapillarsäule mit einem bei Atmosphärendruck arbeitenden Flammenionisationsdetektor erwies sich als realisierbar. Das vorgeschlagene Drucksteuersystem ergab auf sehr einfache und billige Weise einen praktisch pulsfreien Gasfluss. Die Druckprogrammierung erfordert jedoch bei hoher Detektorempfindlichkeit eine elektronische Basislinienkompensation. Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 0.15 mm (leider noch nicht kommerziell erhältlich) sollten die chromatographische Auflösung wesentlich verbessern, die Druckprogrammierung bis zu höheren Drucken gestatten, den Gasverbrauch senken sowie die Kopplung mit einem Massenspektrometer vereinfachen. Eine Miniaturisierung des Extraktionsautoklaven erlaubt nicht nur dessen Kosten zu senken und Extraktionsgas zu sparen, sondern erleichtert zudem dessen Handhabung im Hinblick auf Routineuntersuchungen. Die Vergoldung der Innenwände sowie eine leicht demontier- und auswechselbare Konstruktionsweise würden zusätzlich deren Reinigung wesentlich verbessern. Als letztes lässt sich die analytische Leistungsfähigkeit dieser neuen Technik durch eine sorgfältige Optimierung von Extraktionsdruck und -temperatur einerseits, Chromatographiedruck und -temperatur andererseits noch wesentlich steigern. Der nächste Teil dieser Arbeit ist aus diesem Grunde der detaillierten experimentellen Optimierung der Trennbedingungen im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten gewidmet[2].

VERDANKUNGEN

Die Autoren möchten Herrn Dr. M. Rüegg (Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern, Schweiz) für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts ihren Dank aussprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der vorliegende zweite Teil dieser Arbeit beschreibt den Aufbau eines Prototyps zur direkten Kopplung der Fluidextraktion (SFE) mit der Kapillarfluidchromatographie (SFC). Die Analyse einiger Naturprodukte wie Käse, Butter, Kaffee, Tabak und Kamillenblüten diente der Abschätzung der Leistungsfähigkeit dieser neuen Technik sowie der Verbesserung des bestehenden Prototyps. Es zeigte sich, dass die direkte Kopplung SFE–SFC ein neues vielversprechendes Analysensystem darstellt. Die entwickelte Apparatur kann und muss jedoch noch wesentlich vereinfacht und verbessert werden.

LITERATUR

1 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *J. Chromatogr.*, 388 (1987) 143.
2 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 78 (1) (1987), im Druck.
3 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *Lebensm. Wiss. Technol.*, im Druck.
4 IUPAC, *International Thermodynamic Tables of the Fluid State, Volume 3, Carbon Dioxide*, Pergamon, Oxford, 1976.
5 W. Gmür, J. O. Bosset und E. Plattner, *Chromatographia*, im Druck.
6 G. Blu, F. Lazarre und G. Guiochon, *Anal. Chem.* 45(8) (1973) 1375–1380.
7 K. Grob, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 6 (1983) 178–184.
8 T. L. Chester, *J. Chromatogr..*, 299 (1984) 424–431.
9 J. P. Dumont und J. Adda, in D. G. Land und H. E. Nursten (Editors), *Progress in Flavour Research*, Applied Science publishers, London, 1979, Ch. 21, pp. 245–262.
10 I. Hanspach, *Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Giessen, 1981.
11 H. D. Belitz und W. Grosch, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer, 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985, p. 724.
12 K. Sugiyama, M, Saito, T. Hondo und M. Senda, *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 107–116.
13 R. J. Skelton, Jr., C. C. Johnson und L. T. Taylor, *Chromatographia*, 21(1) (1986) 3–8.
14 E. Stahl und E. Schuetz, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 311 (1978) 992–1001.

*W. Gmür, J. O. Bosset** und *E. Plattner,* Eidg. Technische Hochschule, Lausanne, und *Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld

Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion–Kapillarfluidchromatographie

III. Experimentelle Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms in der Fluidchromatographie im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten

Contribution to Direct Coupling of Supercritical Fluid Extraction to Capillary Supercritical Fluid Chromatography

III. Experimental Optimization of the Pressure and Temperature Programming Rates in Supercritical Fluid Chromatography Applied to the Analysis of Dairy Products

Einleitung

Der erste Teil dieser Arbeit behandelte die theoretische Optimierung einiger wichtiger Parameter der Fluidchromatographie (1). Es wurde gezeigt, dass Kapillarsäulen mit Innendurchmessern von ca. 0,15 mm ein Optimum für die direkte Kopplung der Fluidextraktion (SFE) mit der Kapillarfluidchromatographie (Kapillar-SFC) darstellen. Der zweite Teil beschrieb den Aufbau eines Prototyps und zeigte einige Anwendungsbeispiele (2). Dabei stellte sich die Analyse von Milchprodukten als für die Praxis besonders interessant heraus (freie Fettsäuren, Ranzigkeit).

Bei der Alterung und Reifung von Milchprodukten bilden sich u. a. durch Proteolyse und Lipolyse mittel- bis schwerflüchtige Zersetzungsprodukte (3). Die bei der Oxidation und/oder Hydrolyse entstehenden freien Fettsäuren und Methylketone können zu als ranzig, fischig oder metallisch bezeichneten Aromafehlern führen. Herkömmliche Analysenmethoden erfordern die zeitraubende Trennung dieser Verbindungen von der Fett- und Proteinmatrix (Wasserdampf-

destillation, Flüssigextraktion). Dabei besteht die Gefahr von Verlusten leichtflüchtiger Verbindungen, der Zersetzung thermolabiler Komponenten sowie der Kontamination mit Fremdstoffen. Die Analyse mittels der sehr leistungsfähigen Kapillargaschromatographie verlangt meistens die Derivatisierung schwerflüchtiger Stoffe. Quantitative Bestimmungen sind zudem nur beschränkt möglich. Demgegenüber bietet die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC wesentliche Vorteile. Mit ihr fällt nicht nur jede Probenvorbereitung weg, sondern sie ermöglicht darüber hinaus auch die Analyse von schwerflüchtigen und/oder thermolabilen Verbindungen.

Der vorliegende dritte Teil dieser Arbeit ist der Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms für die SFC im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten gewidmet. Extraktionsdruck und -temperatur werden bereits früher optimiert (4). Im weiteren werden anhand der Analyse einiger Milchprodukte praktische Anwendungen der direkten Kopplung SFE–Kapillar-SFC aufgezeigt.

Experimenteller Teil

Proben

Synthetische Proben

Die Totzeit wurde mit Propan (Reinheit >99,95%, Carbagas, CH-1000 Lausanne) bestimmt.

Die beiden folgenden Modellgemische benutzte man zur Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms für die SFC:

1. Modellgemisch mit freien Fettsäuren: Je 0,5 g Propionsäure (puriss. p.a., Fluka 81910), Caprylsäure (puriss., Fluka 21639) und Myristinsäure (puriss., Fluka 70079) dispergiert in 50 ml Wasser.

2. Modellgemisch mit Methylketonen: Je 0,5 g Aceton (puriss. p.a., Fluka 00570), 2-Octanon (purum, Fluka 53220) und 2-Tridecanon (pract., Fluka 69620) dispergiert in 50 ml Wasser.

Ein 3. Modellgemisch wurde mit folgenden 2-Methylketonen und freien Fettsäuren (je 0,5 g dispergiert in 50 ml Wasser) hergestellt:

Als 2-Methylketone: Aceton, puriss. p.a., Fluka 00570; 2-Butanon, puriss. p.a., Fluka 04380; 2-Pentanon, purum, Fluka 68950; 2-Hexanon, puriss., Fluka 20260; 2-Heptanon, purum, Fluka 68592; 2-Octanon, purum, Fluka 53220; 2-Nonanon, purum, Fluka 52000; 2-Decanon, pract., Fluka 68230; 2-Undecanon, purum, Fluka 68160; 2-Dodecanon, pract., Fluka 30720.

Als freie Fettsäuren: Essigsäure, puriss. p.a., Fluka 45731; Propionsäure, puriss. p.a., Fluka 81910; Buttersäure, puriss. p.a., Fluka 19210; n-Valeriansäure, puriss., Fluka 94530; Capronsäure, puriss., Fluka 21529; Oenanthsäure, puriss., Fluka 75190; Caprylsäure, puriss., Fluka 21639; Pelargonsäure, techn., Fluka 76343; Caprinsäure, puriss., Fluka 21409; Undecansäure, puriss., Fluka 94089; Laurinsäure, puriss., Fluka 61609; Myristinsäure, puriss., Fluka 70079; Pentade-

cansäure, puriss., Fluka 76540; Palmitinsäure, puriss., Fluka 76119; Heptadecansäure, puriss., Fluka 51610; Stearinsäure, puriss., Fluka 85679.

Natürliche Proben

Folgende Milchprodukte wurden paarweise verglichen:

a) Fein geriebener erstklassiger Emmentaler- mit Greyerzerkäse.
b) Fein geriebener rezenter (viertelfetter) mit mildem (vollfettem) Appenzellerkäse.
c) Fein geriebener ranziger mit erstklassigem Raclettekäse.
d) Fein geriebener 5 Tage alter mit 40 Tage altem Ziegenkäse (Crottin de Chavignol).
e) Frische mit talgiger und mit drei Tage der Sonne ausgesetzter Butter.
f) Joghurt nature mit Fruchtjoghurt (Erdbeer).

Apparatur

Abbildung 1 zeigt den zur direkten Kopplung der SFE mit der Kapillar-SFC entwickelten Prototyp. Eine detaillierte Beschreibung wurde im zweiten Teil dieser Veröffentlichung gegeben (2). Zur Optimierung des SFC-Druck- und Temperaturprogramms wurde die 14 m durch eine 1 m lange Kapillarsäule (Pos. 11) ersetzt. Zudem wurde das zur Datenverarbeitung benutzte Softwarepaket (Pos. 14) mit einer selbstprogrammierten Routine zur automatischen Basislinienkorrektur mit vorgespeicherter Basislinie erweitert.

Arbeitsvorschrift

Nach Einfüllen von 50 g Probe in den Extraktionsautoklaven (Pos. 6) wurden Extraktionsdruck und Extraktionstemperatur bei den früher ermittelten, optimalen Werten von 100 bar und 40 °C fixiert (4). Zur Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Gas- und Probephase wartete man ca. 14 Stunden (über Nacht). Danach wurde der Druckprogrammierzylinder (Pos. 8) mit Hilfe des Membrankompressors (Pos. 4) und des Gasvorratszylinders (Pos. 5) bis zum SFC-Anfangsdruck mit CO_2 aufgefüllt. Man schloss Hahn V1 und gab in der Steuereinheit (Pos. 14) das gewünschte Druckprogramm ein. Das SFC-Temperaturprogramm wurde wie üblich vom Prozessor des umgebauten GC (Pos. 12) geregelt. Die SFE–SFC-Kapillarkopplung (Pos. 7) spülte man 4- bis 5mal durch leichtes Öffnen von Hahn V3 durch und gab gleich danach die Probe auf. Gleichzeitig wurde das Druck- und Temperaturprogramm sowie die Datenerfassung in Gang gesetzt. Nach Beendigung des Chromatogramms entleerte man den Extraktionsautoklaven (Pos. 7) durch Öffnen von Hahn V2, entnahm den Probenrückstand und säuberte den Autoklaven nacheinander durch Spülen mit Wasser, Aceton und Diethylether. Die Kapillarsäule (Pos. 11) wurde zur Reinigung über Nacht mit flüssigem Kohlendioxid gespült.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Arbeitsvorschrift führte man die Versuche zur Optimierung des SFC-Druck- und -Temperaturprogramms bei isobaren und isothermen Bedingungen durch. Zudem wurden die beiden Modellgemische für die gesamte Versuchsreihe im Extraktionsautoklaven belassen.

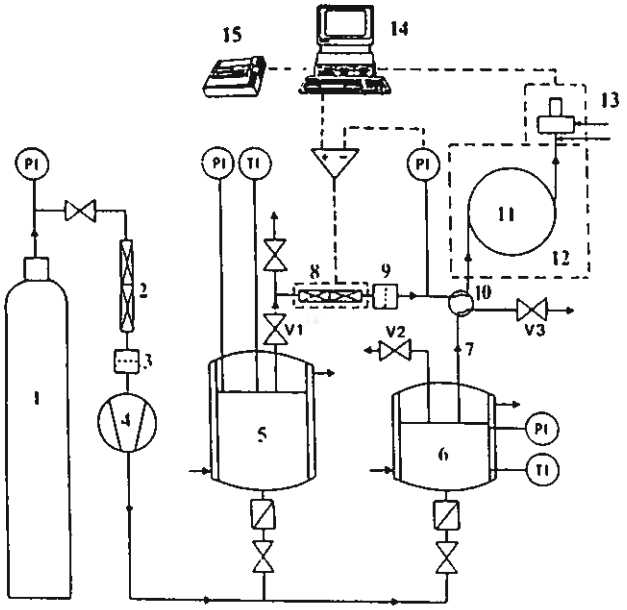

Abb. 1. Apparatur zur direkten Kopplung Fluidextraktion–Kapillarfluidchromatographie

Pos.-Nr.	*Bauelement*	*Funktion*
1	Gaszylinder	Gasaufbereitung
2	Gasreinigungspatrone	
3	Gasfilter	
4	Membrankompressor	
5	Gasvorratszylinder	
6	Extraktionsautoklav	SFE (2)
7	Kapillarkopplung	SFE–SFC-Kopplung
8	Druckprogrammierzylinder	SFC
9	Gasfilter	
10	Probenaufgeber	
11	GC-Kapillarsäule	
12	Programmierbarer Heizofen	
13	Flammenionisationsdetektor (FID)	
14	Rechner und Steuereinheit	
15	Drucker	
V1-V3	Sperrventile	

Resultate und Diskussion

Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms in der SFC

Die Retention in der Chromatographie wird üblicherweise mit dem Kapazitätsverhältnis k' gemessen:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

wobei t_R der Retentionszeit einer bestimmten Reinsubstanz und t_M der Totzeit, die zur Elution einer Inertkomponente notwendig ist, entspricht. Die Auflö-

sung zwischen zwei Verbindungen hängt einerseits von der thermodynamisch bestimmten Retention, andererseits von der kinetisch kontrollierten Verbreiterung eines Peaks ab. Sowohl zu wenig als auch zu stark zurückgehaltene Stoffe zeigen im allgemeinen eine schlechte Auflösung. Dies ist im ersteren Falle ($k'<2$) auf die ungenügende Retention, im letzteren Falle ($k'>10$) auf die mit der Retentionszeit zunehmende Bandenverbreiterung zurückzuführen. Die optimale Auflösungszone befindet sich für die meisten Trennungen zwischen diesen beiden Extremen ($2<k'<10$). Um während einer chromatographischen Trennung im Bereich solcher Kapazitätsverhältnisse zu bleiben, verwendet man in der Gaschromatographie Temperaturprogramme, in der Flüssigchromatographie Lösungsmittelgradienten. Die SFC bietet mit dem Druck einen zusätzlichen Verfahrensparameter zur Optimierung der Auflösung.

Die vorausgehende Bestimmung der Löslichkeit einiger Käseinhaltsstoffe in überkritischem Kohlendioxid (4) zeigte, dass sich die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC im besonderen zur Analyse von freien Fettsäuren und 2-Methylketonen eignet. Die Optimierung des SFC-Druckes und der SFC-Temperatur führte man deshalb bezüglich je einer kurz-, mittel- und langkettigen Komponente dieser beiden Produktegruppen durch. Abbildung 2 zeigt die Variation des Logarithmus des Kapazitätsverhältnisses k' von drei freien Fettsäuren und drei Methylketonen in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d).

Wie zu erwarten, nimmt bei Erhöhung des Druckes (Abb. 2a, b) das Kapazitätsverhältnis aller untersuchten Verbindungen ab. Dies ist auf das mit dem Druck ansteigende Lösungsvermögen des Kohlendioxids zurückzuführen. Die Variation des Kapazitätsverhältnissses mit der Temperatur zeigt ein unterschiedliches Verhalten, je nachdem ob man sich bei unterkritischen oder überkritischen Drucken befindet. Wie aus der Gaschromatographie bekannt, nimmt bei unterkritischen Drucken (hier 60 bar) der Logarithmus des Kapazitätsverhältnisses monoton mit steigender Temperatur ab. Im Gegensatz dazu durchläuft k' bei überkritischen Drucken ein Maximum. Das Gebiet des Anstiegs kann als LC-ähnlich, jenes der Abnahme als GC-ähnlich bezeichnet werden. Im LC-ähnlichen Gebiet führt eine Zunahme der Temperatur wegen der damit verbundenen Abnahme der Dichte des Kohlendioxids zu einem Anwachsen des Kapazitätsverhältnisses. Bei weiterer Temperaturerhöhung bewirkt jedoch der ansteigende Dampfdruck der Verbindungen wiederum ein Abfallen von k'. Ein analoges Verhalten wurde von *Chester* und *Innis* auch für n-Alkane beobachtet (5). Abbildung 2 zeigt im weiteren, dass weder für die freien Fettsäuren noch für die Methylketone ein einzelner Druck besteht, bei dem alle untersuchten Komponenten im optimalen Auflösungsvermögen von $2<k'<10$ (schraffierte Zone) liegen.

Das Retentionsverhältnis α zwischen zwei Komponenten ist folgendermassen definiert:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad k'_2 > k'_1$$

Obwohl das Retentionsverhältnis der Bandenverbreiterung nicht Rechnung trägt, darf es als sehr praktisches Mass für die Trennung zweier Peaks angeschaut

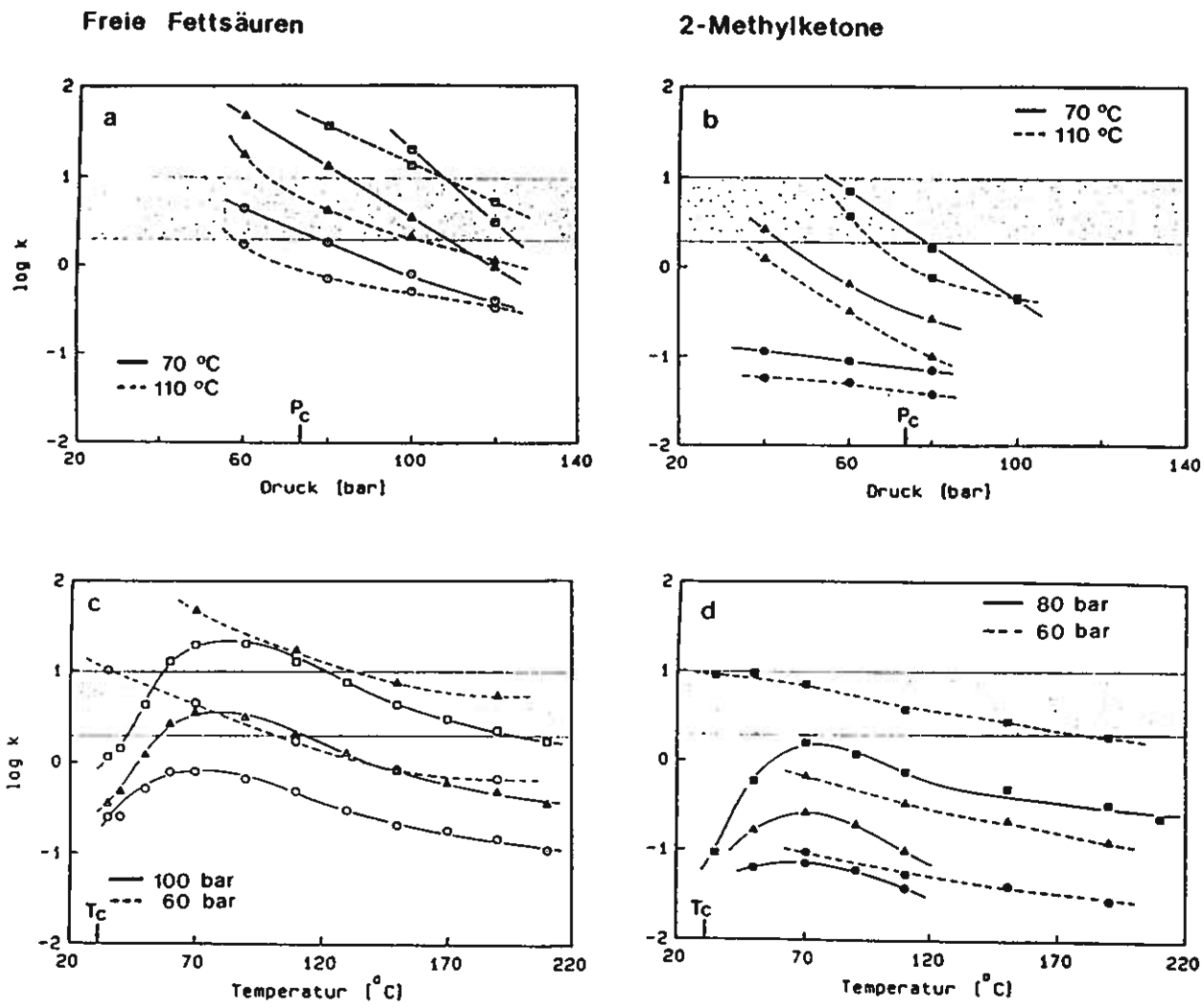

Abb. 2. Variation des Logarithmus des Kapazitätsverhältnisses *k'* von 3 freien Fettsäuren (a, c) und 3 Methylketonen (b, d) in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d) des als mobile Phase dienenden CO_2. Weitere Trennbedingungen siehe Text. (Der schraffierte Bereich entspricht dem optimalen Auflösungsgebiet.)

Legende:

○ Propionsäure
△ Caprylsäure
□ Myristinsäure
● Aceton
▲ 2-Octanon
■ 2-Tridecanon

werden. Es lässt sich, im Gegensatz zur Auflösung, auch für relativ schlecht getrennte Komponenten auf sehr einfache Weise bestimmen. In Abbildung 3 wurde das Retentionsverhältnis zwischen Caprylsäure/Propionsäure und 2-Octanon/Aceton in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d) aufgezeichnet.

Gemäss Abbildung 3a, b nimmt α bei Erhöhung des Druckes ab. Diese Abnahme ist für die leichter flüchtigen 2-Methylketone (Abb. 3b) wesentlich stärker als für die schwerer flüchtigen freien Fettsäuren (Abb. 3a). Demzufolge

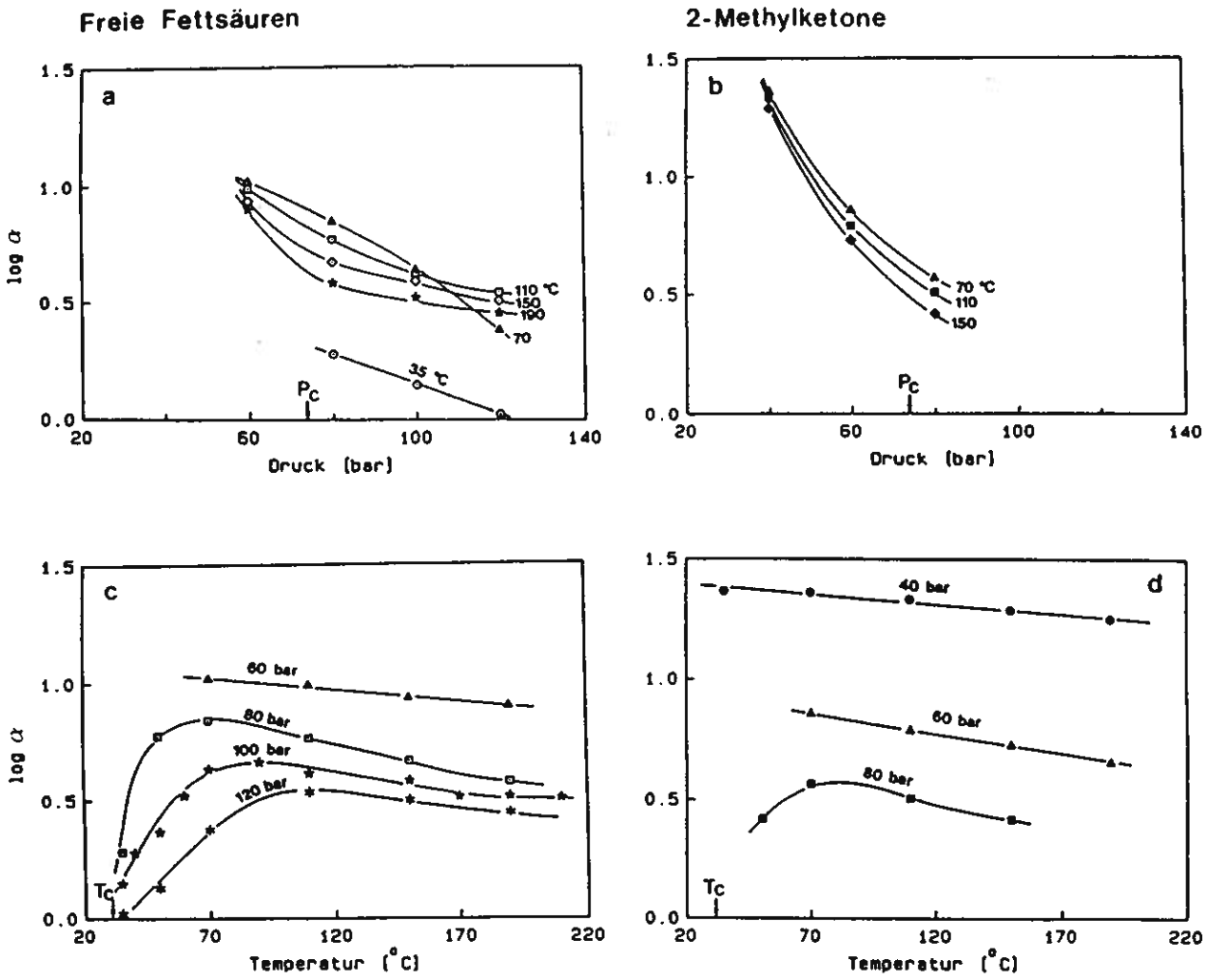

Abb. 3. Variation des Logarithmus des Retentionsverhältnisses α zwischen Caprylsäure/Propionsäure (a, c) und 2-Octanon/Aceton (b, d) in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d) der mobilen Phase. Analysenbedingungen siehe Text

sollte für eine gute Auftrennung der Methylketone mit der Druckprogrammierung bei relativ tiefen Werten begonnen werden.

Im Gegensatz zur Abhängigkeit des Retentionsverhältnisses vom Druck durchläuft α mit der Temperatur bei überkritischen Drucken ein Maximum (Abb. 3c, d). Abbildung 3c zeigt, dass sich für freie Fettsäuren bei nur leicht überkritischen Temperaturen sehr kleine Retentionsverhältnisse und damit sehr schlechte Auftrennungen ergeben. Im weiteren verschiebt sich das Optimum von α bei höheren Drucken zu höheren Temperaturen (Abb. 4).

Es folgt daraus, dass bei Druckprogrammierung zur Beibehaltung einer möglichst guten Auftrennung parallel auch die Temperatur erhöht werden muss. Ein solches Vorgehen wurde ebenfalls von *Fields* und *Lee* (6) vorgeschlagen und scheint gemäss den von *Chester* und *Innis* (5) präsentierten Resultaten auch für n-Alkane gültig zu sein.

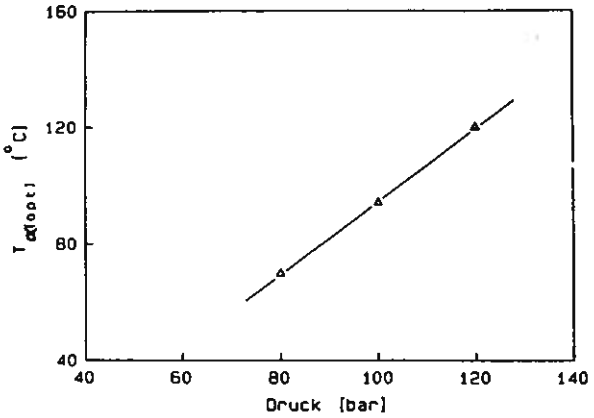

Abb. 4. Variation der Temperatur des Retentionsverhältnisoptimums zwischen Caprylsäure/Propionsäure in Funktion des Druckes der mobilen Phase. Analysenbedingungen siehe Text

Abbildung 5 zeigt die Auftrennung des dritten synthetischen Modellgemisches von 2-Methylketonen (M3-M12) und freien Fettsäuren (S2-S18) durch parallele Druck- und Temperaturprogrammierung. Die maximal tolerierbare Flussrate des FID verunmöglichte eine Druckprogrammierung über 130 bar. Zur Elution der schwer flüchtigen Fettsäuren steigerte man die Temperatur deshalb bis auf 220 °C. Für thermolabile Verbindungen wäre jedoch eine weitere Druckerhöhung vorzuziehen. Dies erforderte aber Kapillarsäulen mit kleineren Innendurchmessern (siehe (1)).

Analyse von Milchprodukten

Alle im folgenden aufgeführten Analysen wurden bei den früher ermittelten, optimalen Extraktionsbedingungen von 100 bar und 40 °C durchgeführt (4).

Abbildung 6 vergleicht das Chromatogramm von Emmentaler- (a) mit jenem von Greyerzerkäse (b). Man erkennt beim Emmentalerkäse einerseits den sehr grossen Anteil an Propionsäure, andererseits die gute Extraktion und Auftrennung der langkettigen freien Fettsäuren.

Abbildung 7 zeigt die Analyse von rezentem (a) und mildem (b) Appenzellerkäse. Der wesentlich rezentere viertelfette Appenzellerkäse unterscheidet sich hauptsächlich durch seinen wesentlich höheren Anteil an freien Fettsäuren.

Gemäss Abbildung 8 nimmt bei der Alterung von Ziegenkäse einerseits sein Gehalt an freien Fettsäuren zu, andererseits geht ein Teil der leicht flüchtigen Methylketone verloren.

Auch ranziger unterscheidet sich von erstklassigem Raclettekäse erwartungsgemäss durch seinen wesentlich grösseren Anteil an freien Fettsäuren (Abb. 9).

Die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC scheint hingegen für die sehr leicht flüchtigen Aromakomponenten von Joghurt ungeeignet zu sein (Abb. 10), da sie von der Kapillarsäule nur ungenügend zurückgehalten werden.

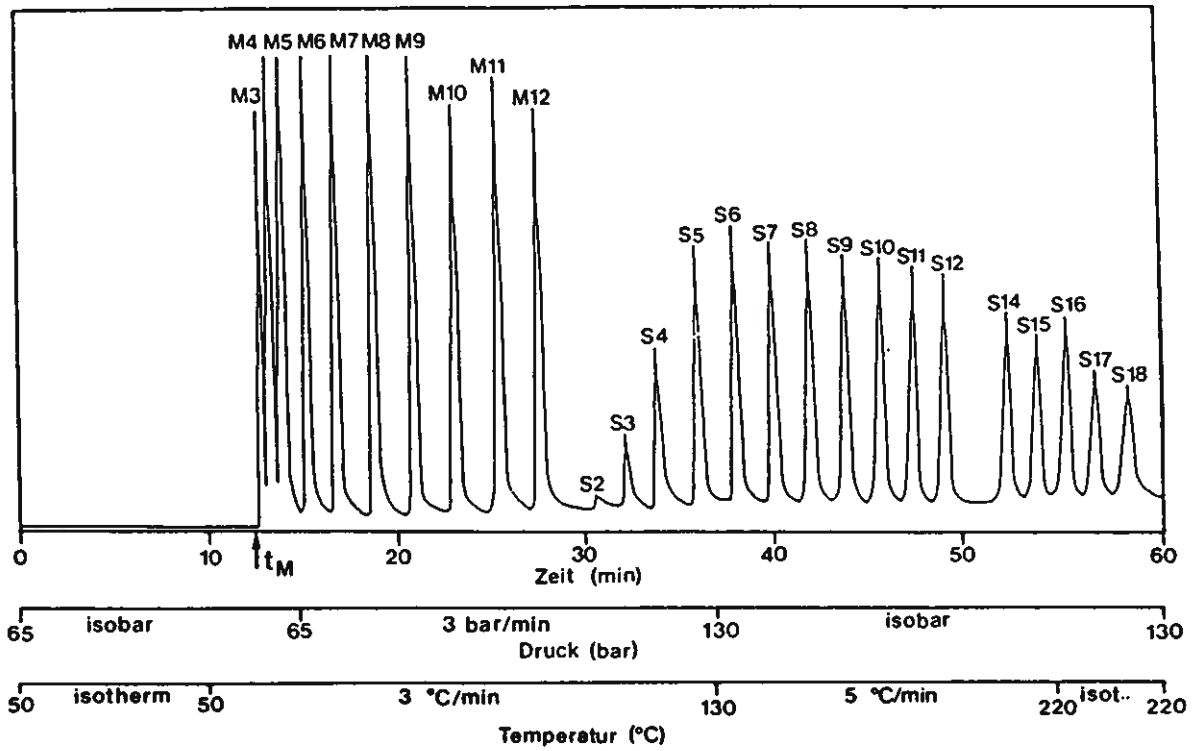

Abb. 5. Trennung eines Gemisches von C_3-C_{12} 2-Methylketonen (M3-M12) und freien C_2-C_{18} Fettsäuren (S2-S18) durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 256. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 11, dass diese Technik zur Charakterisierung von Butter herangezogen werden könnte. Die untersuchten Butter unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Anteil an langkettigen freien Fettsäuren.

Bedeutung des Verteilungskoeffizienten

In Abbildung 12 wurde der Verteilungskoeffizient (Konzentration in der Gas- zur Konzentration in der Probephase) für die in Abbildung 5 gezeigte Trennung eines Modellgemisches von 2-Methylketonen und freien Fettsäuren in Funktion der Anzahl Kohlenstoffatome aufgetragen.

Man erkennt, dass der Verteilungskoeffizient sowohl für die freien Fettsäuren als auch die Methylketone ein Maximum durchläuft. Dies kann mit der bei anwachsender Kettenlänge entgegengesetzten Wirkung auf die Löslichkeit der abnehmenden Polarität und der gleichzeitigen Verminderung des Dampfdruckes erklärt werden. Bei den freien Fettsäuren unterscheiden sich zudem die Verteilungskoeffizienten von Molekülen mit geradzahliger von jenen mit ungeradzahliger Anzahl Kohlenstoffatomen. Dies erstaunt insofern nicht, als dies auch für andere physikalische Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Siedetemperatur usw. der Fall ist. Die Kenntnis des Verteilungskoeffizienten gestattet aufgrund der Analyse der Gasphasenzusammensetzung die Berechnung der Konzentration eines be-

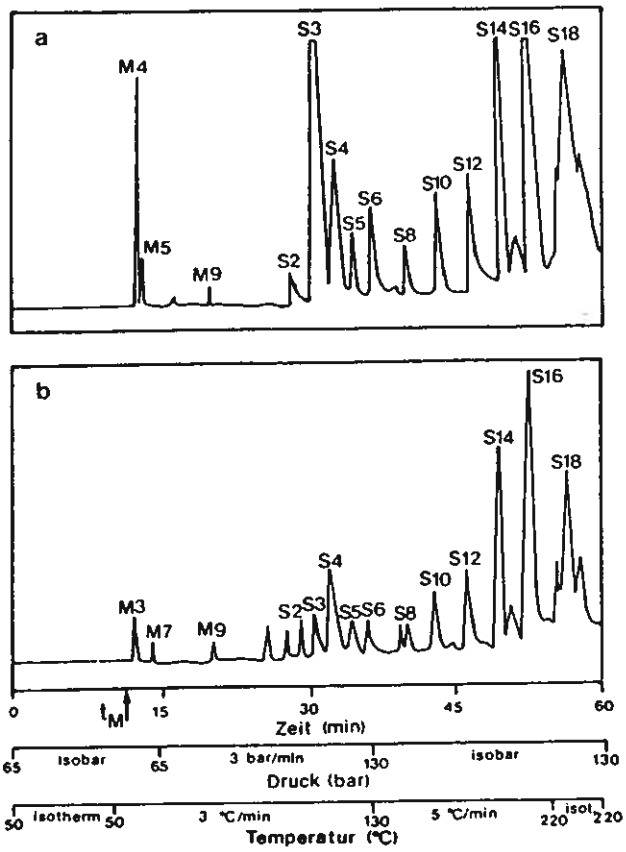

Abb. 6. Analyse von Emmentaler- (a) und Greyerzerkäse (b) durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

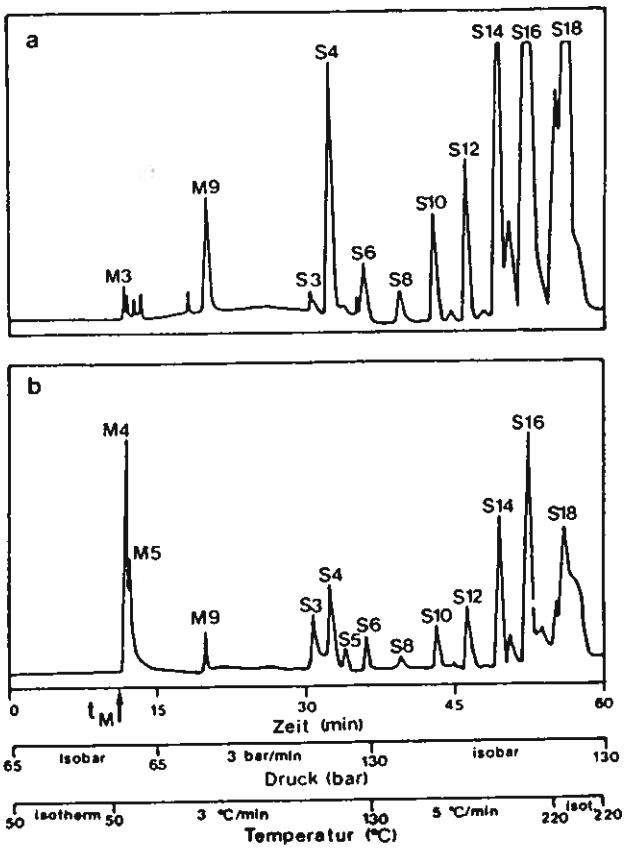

Abb. 7. Analyse von rezentem (a) und mildem (b) Appenzellerkäse durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

stimmten Stoffes in der Probenphase. Die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC könnte auf diese Weise zu quantitativen Bestimmungen ohne internen Standard benutzt werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Analysen der Milchprodukte zeigten, dass die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC ein neues, vielversprechendes Analysensystem darstellt. Für Routineuntersuchungen kann und muss der bestehende Prototyp jedoch noch wesentlich vereinfacht und miniaturisiert werden.

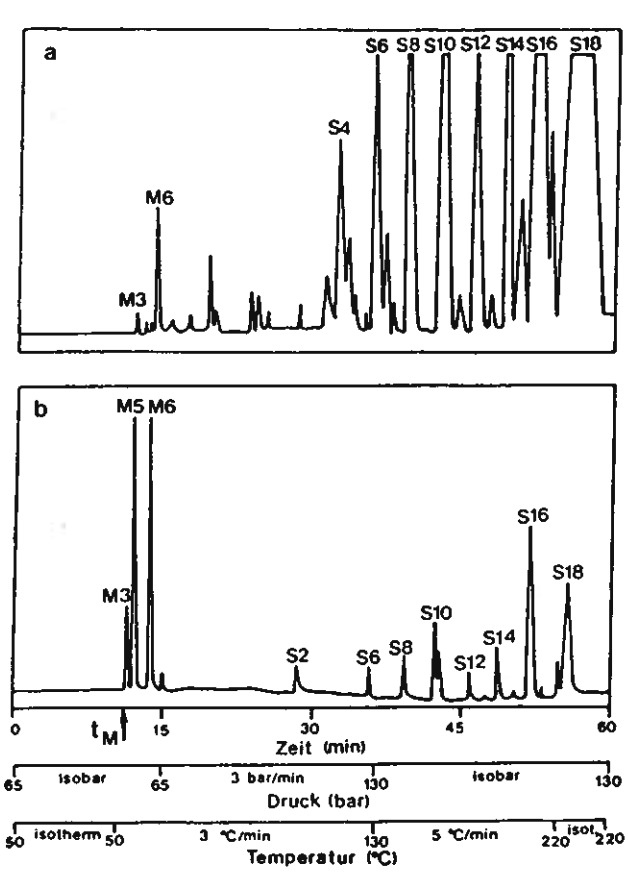

Abb. 8. Analyse von Ziegenkäse mit einem Alter von 40 (a) und 5 (b) Tagen durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

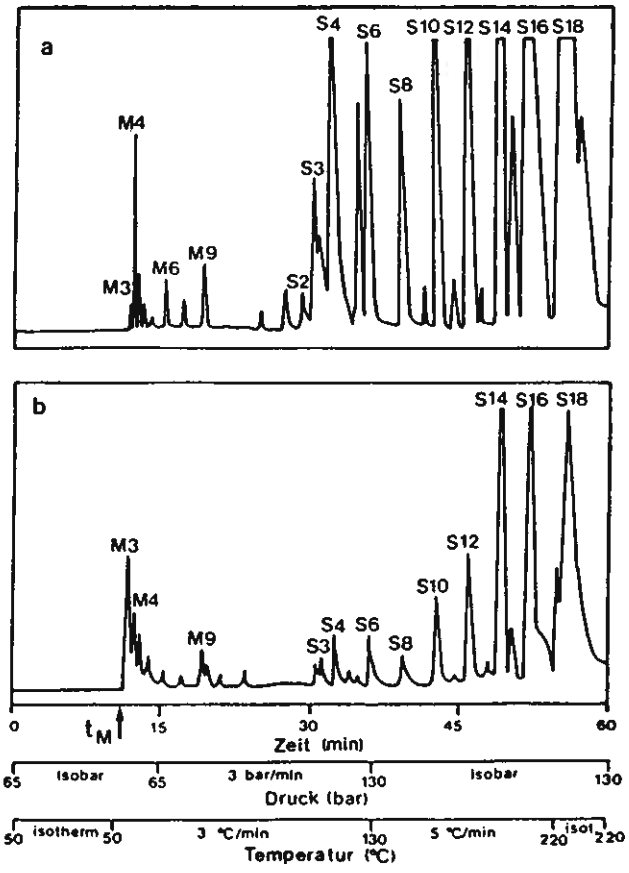

Abb. 9. Analyse von ranzigem (a) und erstklassigem (b) Raclettekäse durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

Zur Untersuchung von Milchprodukten weist diese neue Technik im Vergleich zu herkömmlichen Analysenmethoden wesentliche Vorteile auf. Sie erlaubt bei paralleler Druck- und Temperaturprogrammierung sowohl die Trennung der leicht flüchtigen Methylketone als auch der schwer flüchtigen freien Fettsäuren. Das Wegfallen jeder Probenvorbereitung wie Derivatisierung, Wasserdampfdestillation oder Flüssigextraktion bedeutet einerseits eine grosse Zeitersparnis und erlaubt andererseits auch quantitative Bestimmungen. Zudem werden nur sehr kleine Probenmengen benötigt. Die durchgeführten Analysen zeigten, dass die direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC zur Bestimmung des Reifegrades von Käse, zur Untersuchung der Ranzigkeit von Milchprodukten und anderen Naturstoffen wie Getreidearten, Kekse (7, 8) usw. oder zur Feststellung von Aromafehlern in Butter herangezogen werden könnte. Wegen des geringen Einspritzvolumens (1 μl) eignet sich diese Technik indes nicht zur Bestimmung von

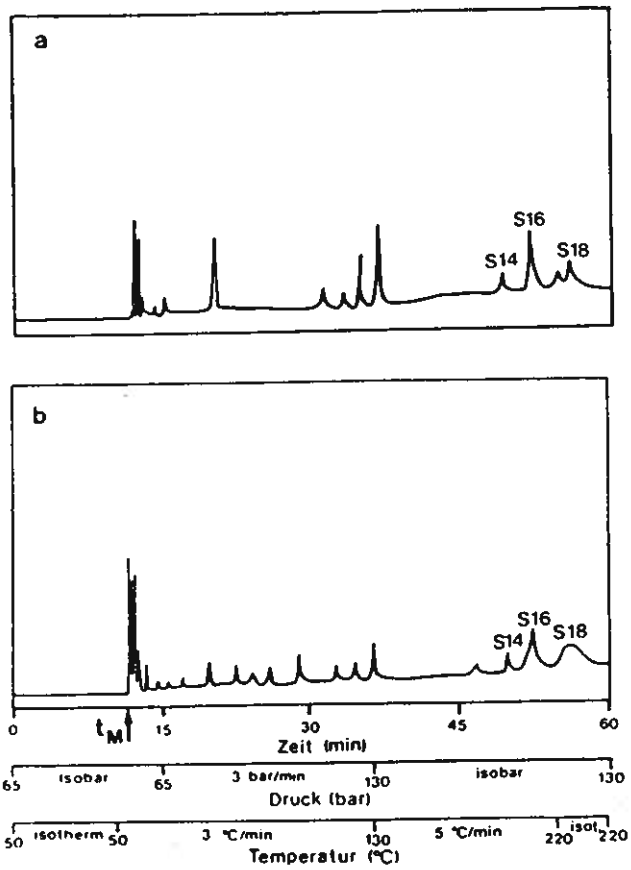

Abb. 10. Analyse von Joghurt nature (a) und Joghurt mit Erdbeeraroma (b) durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

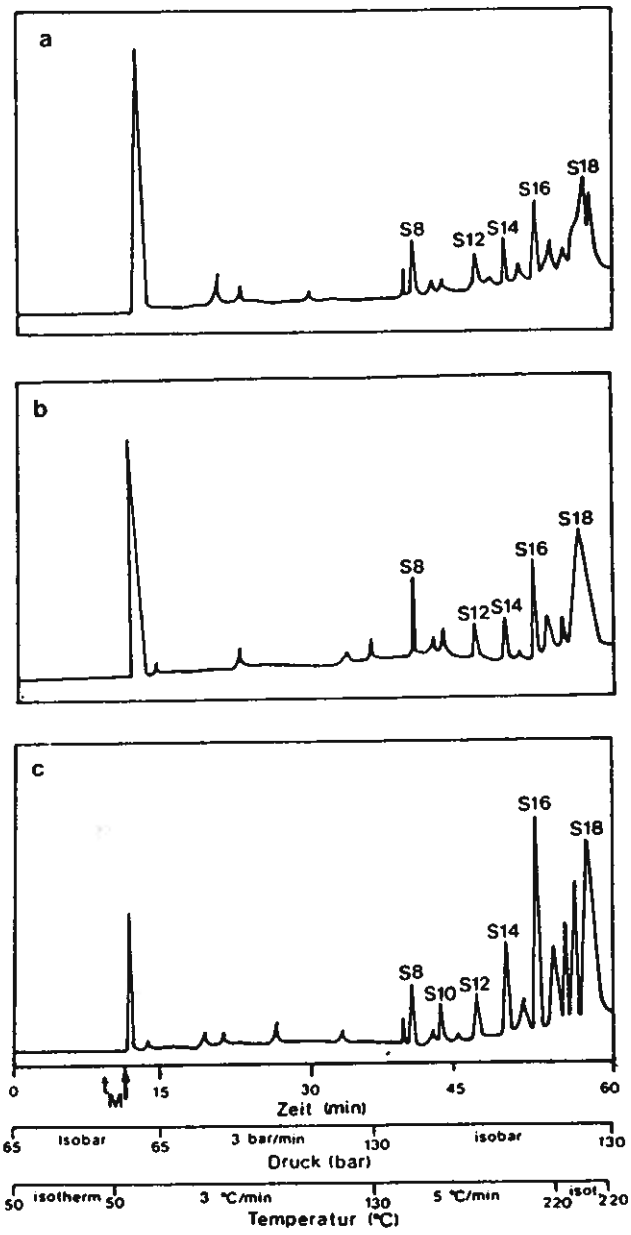

Abb. 11. Analyse von frischer (a), talgiger (b) und drei Tage der Sonne ausgesetzter (c) Butter durch direkte Kopplung SFE–Kapillar-SFC.. Abschwächung des FID x 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

Verbindungen, die in Milchprodukten nur in Spuren vorkommen, wie z. B. Alkohole, Ester und Alkane (9–11). Auch für sehr leicht flüchtige Aromakomponenten, wie man sie zum Beispiel in Joghurt findet, scheint diese Methode ungeeignet zu sein.

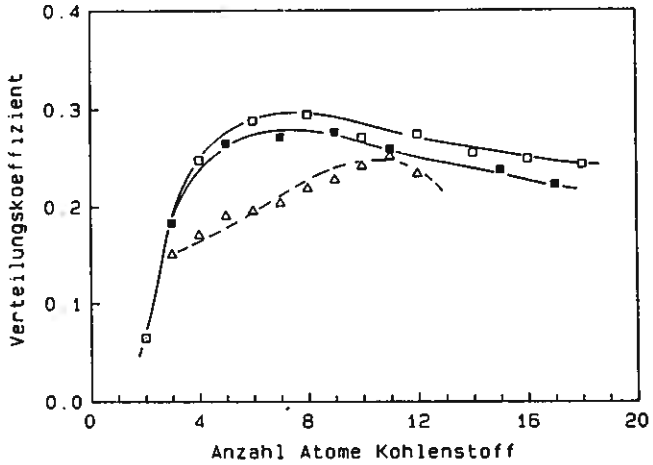

Abb. 12. Verteilungskoeffizient zwischen Gas- und Probephase für freie Fettsäuren mit gerad- (□) und ungeradzahliger (■) Anzahl Atome Kohlenstoff und Methylketone (△) in Funktion der Anzahl Atome Kohlenstoff

Die wichtigsten am Prototyp vorzunehmenden Verbesserungen und Vereinfachungen wurden bereits im zweiten Teil dieser Veröffentlichung (2) aufgezählt. Die für diese Untersuchungen hinzugefügte automatische Basislinienkorrektion ermöglichte die Druckprogrammierung auch bei hohen Detektorempfindlichkeiten und verbesserte damit die chromatographische Auflösung. Zur weiteren Verbesserung wären die leider noch nicht kommerziell erhältlichen Kapillarsäulen mit Innendurchmessern von 0,15 mm sehr wünschenswert. Im Hinblick auf Routineuntersuchungen zeigten die Analysen von Milchprodukten, dass der Miniaturisierung und Vergoldung des Extraktionsautoklaven eine besonders wichtige Rolle zukommt. Der Fluidchromatograph würde so während der langen Gleichgewichtseinstellungszeit zwischen Gas- und Probephase (14 Stunden) nicht blokkiert, und die Entfernung der sich auf Edelstahl festsetzenden freien Fettsäuren würde wesentlich erleichtert.

Dank

Die Autoren möchten Herrn Dr. *M. Rüegg* (Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld) für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes ihren Dank aussprechen.

Zusammenfassung

Der dritte Teil dieser Arbeit ist der Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms für die Fluidchromatographie (SFC) im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten gewidmet. Die besten Trennungen von Methylketonen (C_2-C_{12}) und freien Fettsäuren (C_2-

C_{18}) erreichte man durch simultane Druck- und Temperaturprogrammierung. Die durchgeführten Analysen zeigten, dass die direkte Kopplung Fluidextraktion–Kapillar-SFC zur Bestimmung des Reifegrades von Käse, zur Untersuchung der Ranzigkeit von Milchprodukten sowie zur Feststellung von Aromafehlern in Butter herangezogen werden könnte. Für Routineanalysen kann und muss der bestehende Prototyp jedoch noch wesentlich vereinfacht und miniaturisiert werden.

Résumé

La troisième partie de ce travail traite de l'optimisation des programmes de pression et de température utilisés en chromatographie capillaire en phase surcritique (SFC) en vue de l'application de cette dernière à l'analyse des produits laitiers. Les meilleures séparations de méthylcétones (de C_2 à C_{12}) et d'acides gras libres (de C_2 à C_{18}) sont obtenues avec une programmation simultanée de la pression de 65 à 130 bars et de la température de 50 à 220 °C. Les analyses effectuées montrent que le couplage direct de l'extraction et de la chromatographie surcritiques peut être utilisé pour la détermination du degré de maturation des fromages, pour l'étude de la rancidité des produits laitiers ainsi que pour la mise en évidence de défauts d'arôme de beurres. En outre, le présent travail montre que le prototype utilisé peut et même doit faire l'objet de nombreuses simplifications et améliorations afin d'être utilisable en routine.

Summary

The third part of this work deals with the optimization of the temperature and pressure programming rates for supercritical fluid chromatography (SFC) as applied to dairy product analyses. The best separations of methylketones (C_2-C_{12}) and free fatty acids (C_2-C_{18}) were obtained by simultaneous pressure (65–130 bar) and temperature (50–220 °C) programming. These analyses showed that the direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary SFC can be used for the determination of the degree of maturation of cheese, the study of the rancidity of dairy products as well as the detection of aroma defects in butter. Before the existing prototype can be used for routine analyses, however, it can and must be simplified and miniaturized.

Literatur

1. *Gmür, W., Bosset, J. O.* und *Plattner, E.:* Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion - Kapillarfluidchromatographie. I. Theoretische Optimierung einiger wichtiger apparativer Parameter. J. Chromatogr. **388,** 143–150 (1987).
2. *Gmür, W., Bosset, J. O.* und *Plattner, E.:* Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion–Kapillarfluidchromatographie. II. Aufbau eines Prototyps und Anwendungsbeispiele. J. Chromatogr. **388**, 335–349 (1987).
3. *Dumont, J. P.* and *Adda, J.:* Flavour formation in dairy products. In: Land, D. G. and Nursten, H. E. (ed.), Progress in flavour research, pp. 245–262. Applied Science Publ., London 1979.

4. *Gmür, W., Bosset, J. O.* und *Plattner, E.:* Löslichkeit von einigen Käseinhaltsstoffen in überkritischem Kohlendioxid. Lebensm.-Wiss.-Technol. (im Druck).
5. *Chester, T. L.* and *Innis, D. P.:* Retention in capillary supercritical fluid chromatography. J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Comm. **8**, 561–566 (1985).
6. *Fields, S. M.* and *Lee, L. M.:* Effects of density and temperature on efficiency in capillary supercritical fluid chromatography. J. Chromatogr. **349**, 305–316 (1985).
7. *Allen, J. C.* and *Hamilton, R. J.:* Rancidity in foods. Elsevier Appl. Science Publ., London 1986.
8. *Läubli, M. W.* and *Bruttel, P. A.:* Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between active oxygen method (AOCS Cd 12–57) and the Rancimat method. J. Amer. Oil Chem. Soc. **63**, 792–795 (1986).
9. *Liardon, R., Bosset, J. O.* and *Blanc, B.:* The aroma composition of Swiss Gruyère cheese. I. The alkaline volatile components. Lebensm.-Wiss.-Technol. **15**, 143–147 (1982).
10. *Bosset, J. O.* and *Liardon, R.:* The aroma composition of Swiss Gruyère cheese. II. The neutral volatile components: Lebensm.-Wiss.-Technol. **17**, 359–362 (1984).
11. *Bosset, J. O.* and *Liardon, R.:* The aroma composition of Swiss Gruyère cheese. III. Relative changes in the content of alkaline and neutral volatile components during ripening. Lebensm.-Wiss.-Technol. **18**, 178–185 (1985).

Dr. W. Gmür
Prof. E. Plattner
Eidg. Technische Hochschule
CH-1015 Lausanne

Dr. J. O. Bosset
Eidg. Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld