

CHROM. 19 140

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

· 10³) 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 Extraktionsbedingungen¹. Die Variationsmöglichkeiten der Extraktions- und Abscheidebedingungen (siehe z.B. Kohler⁴) 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 Lösungsmittel⁵. Die Analyse der so gewonnenen Probe mittels der sehr leistungsfähigen Kapillargaschromatographie 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 Lösungsmittelpic mit koeluiierenden 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 Proben⁶. 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 μ l) 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.

THEORETISCHE GRUNDLAGEN

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 Golay¹⁰

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

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

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

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 werden⁹

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

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

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

und durch Einsetzen von Gleichung 4 in Gleichung 3

$$h_{\min} = 2\sqrt{BC_m} \quad (5)$$

Ersetzt man B und C_m durch ihre Werte, ergibt sich

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

und

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

Die Säulenlänge L berechnet sich aus der Totzeit t_M

$$L = t_M \bar{u}_{\text{opt}} \quad (8)$$

und daraus folgt die Anzahl theoretischer Böden n

$$n = \frac{L}{h} \quad (9)$$

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 überschreiten⁹. Für das Volumen V_p einer nicht zurückgehaltenen Komponente, dessen Peak einer Gauss-Verteilung entspricht, ergibt sich

$$V_p = 4\bar{u}t_M n^{-0.5} \quad (10)$$

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

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

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

$$\Delta P_c = \frac{32L\eta\bar{u}}{d_c} \quad (12)$$

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 $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (siehe Lit. 9) und einer Viskosität von $2,27 \cdot 10^{-5} \text{ Pa s}$ (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 $1 \mu\text{l}$ sein sollte⁵. (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 festgelegt⁹. 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 oben erwähnten 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 $V_{\text{ID(max)}}$ von $1 \mu\text{l}$ ⁵.

Zur Erreichung dieses $V_{\text{ID(max)}}$ 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 Säulenhöhe. 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 Säulendurchmesser von 0,18 mm nicht unterschritten werden.

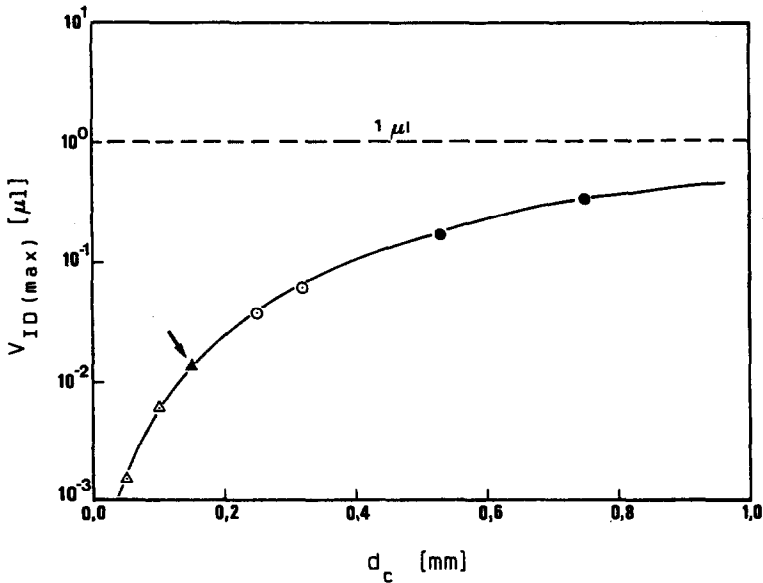


Fig. 1. Maximal tolerierbares Injektions- und Detektionsvolumen $V_{ID(max)}$ in Funktion des Säuleninnendurchmessers d_c bei der optimalen linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase \bar{u}_{opt} . Berechnet nach Gleichungen 10 und 11 (Totzeit = 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0). Legende: Δ = SFC-Kapillarsäulen,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

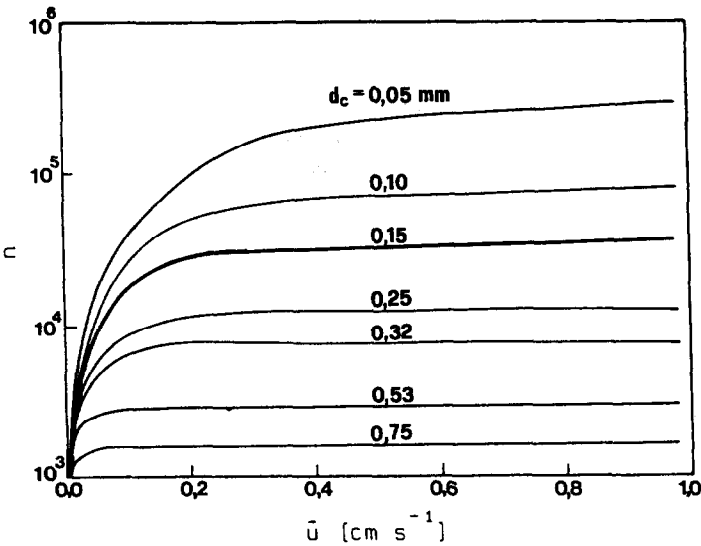


Fig. 2. Theoretische Bodenzahl n pro Säule in Funktion der linearen Geschwindigkeit \bar{u} der mobilen Phase für kommerziell erhältliche Kapillarsäuleninnendurchmesser d_c . Berechnet nach Gleichung 3 (Totzeit = 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0).

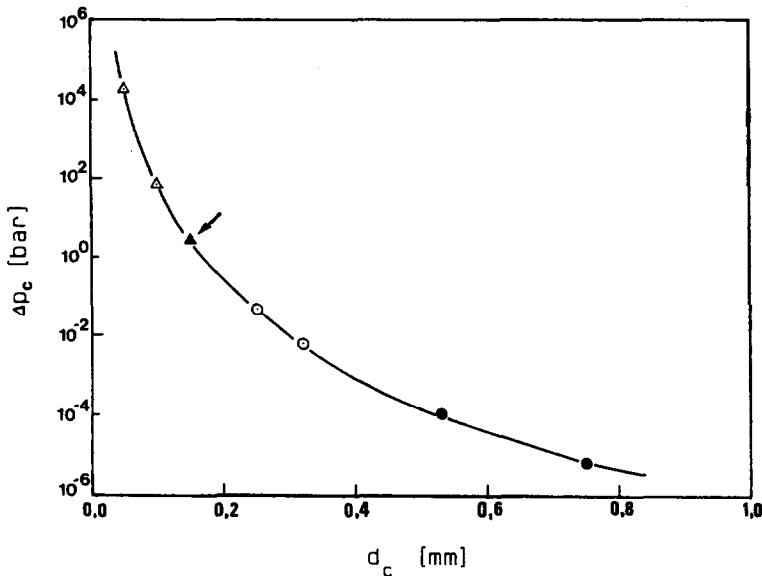


Fig. 3. Druckabfall ΔP_c über der Trennsäule in Funktion des Säulennendurchmessers d_c . Berechnet nach Gleichung 12. Symbole siehe. Fig. 1. ($V_{ID(max)} = 1 \mu l$, Totzeit 15 min, Kapazitätsverhältnis = 0).

TABELLE I

BERECHNETE SÄULENPARAMETER FÜR KOMMERZIELL ERHÄLTICHE KAPILLAR-SÄULEN MIT INNENDURCHMESSERN VON 0,05, 0,10, 0,15*, 0,25, 0,32, 0,53 UND 0,75 mm ($k = 0$)

d_c = Säulennendurchmesser, t_M = Totzeit (aus praktischen Gründen bei 15 min festgesetzt), $V_{ID(max)}$ = Max. tolerierbares Injektions- und Detektionsvolumen⁵, 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} ($cm s^{-1}$)
\triangle	0,05	15	1	345 600	6,86	2369	$2 \cdot 10^4$	263,3
\triangle	0,10	15	1	86 399	3,42	296	$7 \cdot 10^1$	32,8
\blacktriangle	0,15	15	1	38 397	2,27	87	2,7	9,7
\circ	0,25	15	1	13 814	1,37	18	$5 \cdot 10^{-2}$	2,1
\circ	0,32	15	1	8 421	1,06	9	$6 \cdot 10^{-3}$	1,0
\bullet	0,53	15	1	3 033	0,65	2	$1 \cdot 10^{-4}$	0,2
\bullet	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 Kapillarsäulendurchmessers 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 ($< 0,1 \mu\text{l}$).

Die oben erhaltenen Resultate dienen 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 Kapillarsäulendurchmesser, 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 $1 \mu\text{l}$ 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.