

CHROM. 19 188

## BEITRAG ZUR DIREKTEN KOPPLUNG FLUIDEXTRAKTION-KAPIL- LARFLUIDCHROMATOGRAPHIE

### 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<sup>1</sup>. 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<sup>2</sup> ist der experimentellen Optimierung der Trennbedingungen im Hinblick auf die

---

\* Für Teil I siehe Lit. 1.

Analyse von Milchprodukten gewidmet. Die Anwendungsbeispiele dienen im weiteren der Abschätzung der Leistungsfähigkeit dieser neuen Analysetechnik 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<sub>18</sub> 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".

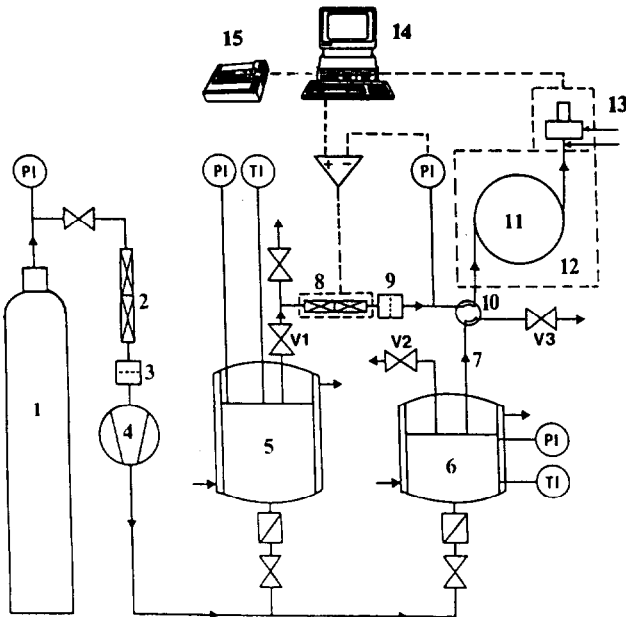


Fig. 1. Apparatur zur direkten Kopplung Fluidextraktion–Kapillarfluidchromatographie. 1 = Gaszylinder; 2 = Gasreinigungspatrone; 3 = Gasfilter; 4 = Membrankompressor; 5 = Gasvorratszylinder; 6 = Extraktionsautoklav; 7 = Kapillarkopplung; 8 = Druckprogrammierzylinder; 9 = Gasfilter; 10 = Probenaufgeber; 11 = GC-Kapillarsäule; 12 = Programmierbarer Heizofen; 13 = Flammenionisationsdetektor; 14 = Rechner und Steuereinheit; 15 = Drucker; V1–V3 = Sperrventile. Funktion: 1–5, Gasaufbereitung; 6, SFE<sup>3</sup>; 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, Stahlritze 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<sup>+</sup> 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<sup>3</sup>). Zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen Gas- und Probephase wartete man ca. 14 h über Nacht<sup>3</sup>. 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 flüchtigem Kohlendioxid gespült.

#### DISKUSSION DES PROTOTYPS

##### *Apparatur für die SFE*

Sowohl die Gasaufbereitung als auch die Extraktionsapparatur wurden an andernorts bereits ausführlich beschrieben<sup>3</sup>.

##### *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 Chromatographen befestigter Probenaufgeber mit einer internen Einspritzschleife 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<sup>1</sup>, 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

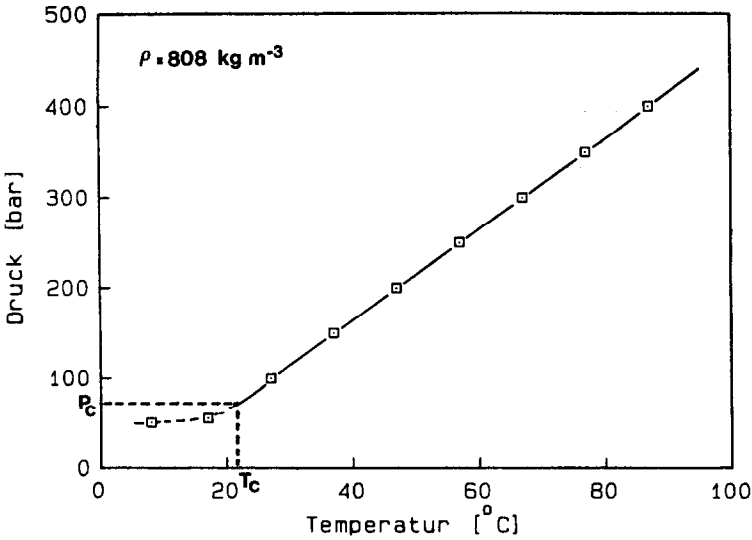


Fig. 2. Variation des Drucks in Funktion der Temperatur für Kohlendioxid bei konstanter Dichte<sup>4</sup>.

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 puls-freien 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  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) entsprechend erwärmt. Diese sehr einfache und billige Technik erlaubte eine praktisch puls-freie 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<sup>5</sup>. Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Flammenionisationsdetektor beobachtet<sup>6</sup>.

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<sup>7</sup> 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)<sup>8</sup>. 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  $\mu\text{m}$  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

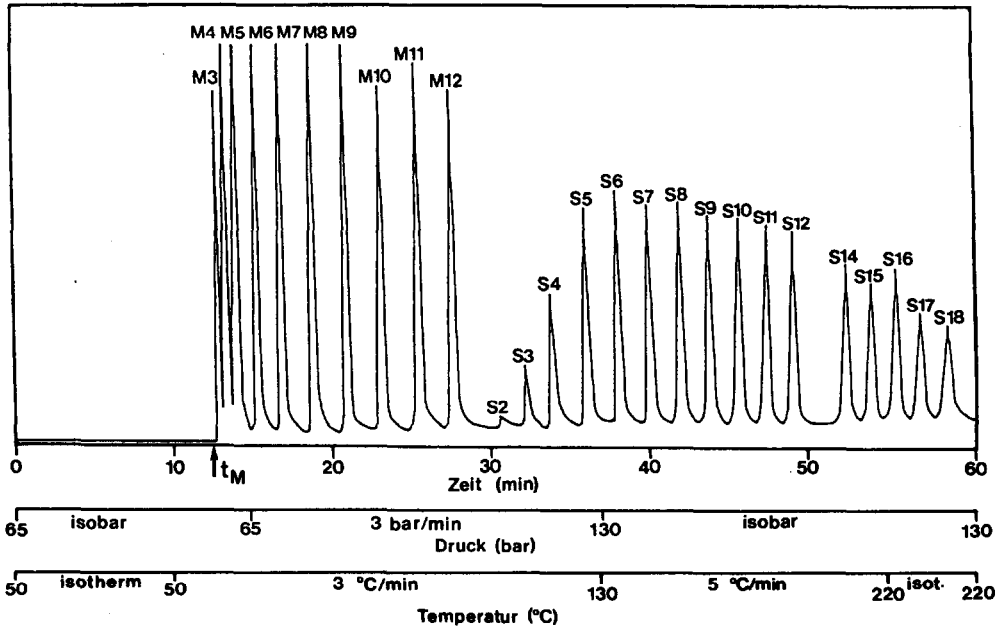


Fig. 3. Trennung eines Gemisches von  $\text{C}_3$ - $\text{C}_{12}$  Methylketonen (M3-M12) und freien  $\text{C}_2$ - $\text{C}_{18}$  Fettsäuren (S2-S18) durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 256$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

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<sup>9</sup>. Herkömmliche Analysemethoden 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

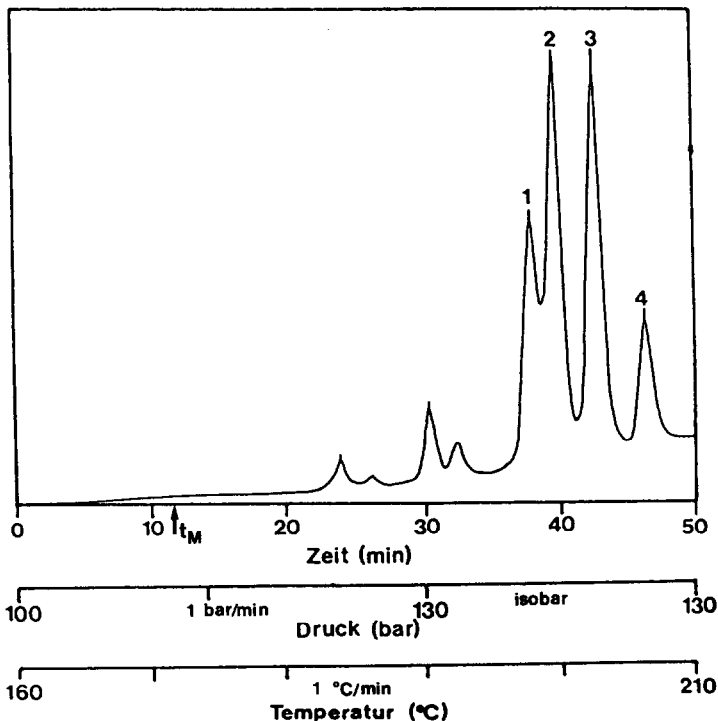


Fig. 4. Trennung eines Gemisches von vier freien C<sub>18</sub> Fettsäuren mit unterschiedlicher Anzahl Doppelbindungen durch direkte Kopplung SFE-SFC. 1 = Stearinsäure, 2 = Ölsäure, 3 = Linolsäure, 4 = Linolensäure. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors × 256. Extraktions- und Trennbedingungen 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 ausgesetzter Butter. Man

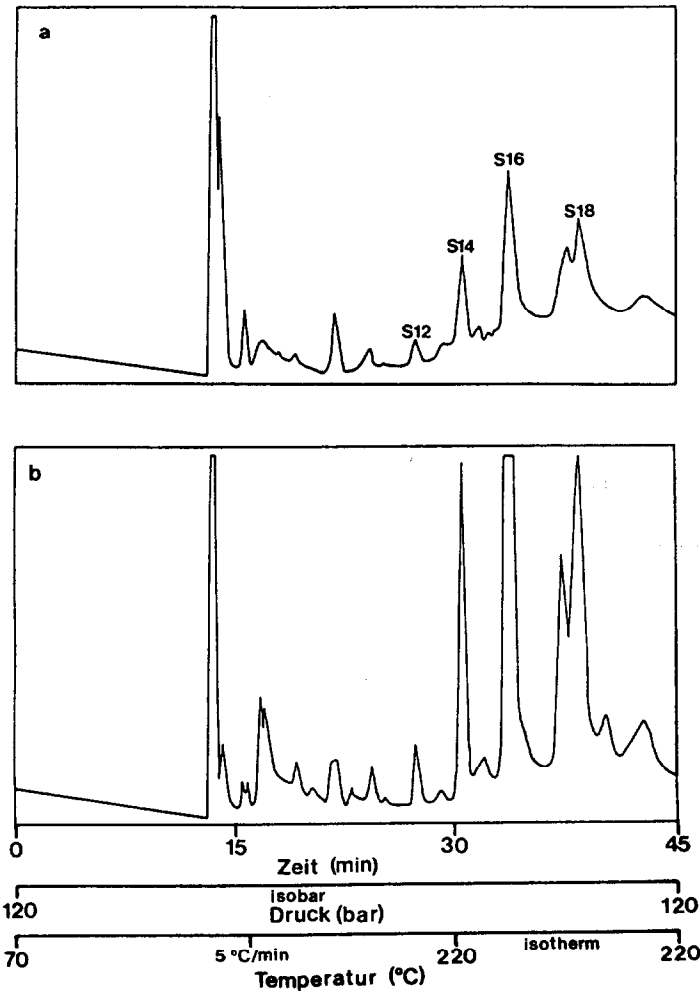


Fig. 5. Analyse von frischer (a) und drei Tage der Sonne ausgesetzter Butter (b) durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 2$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.



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 Käse- reifung natürliche Reifungsprodukte<sup>10</sup>. 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-

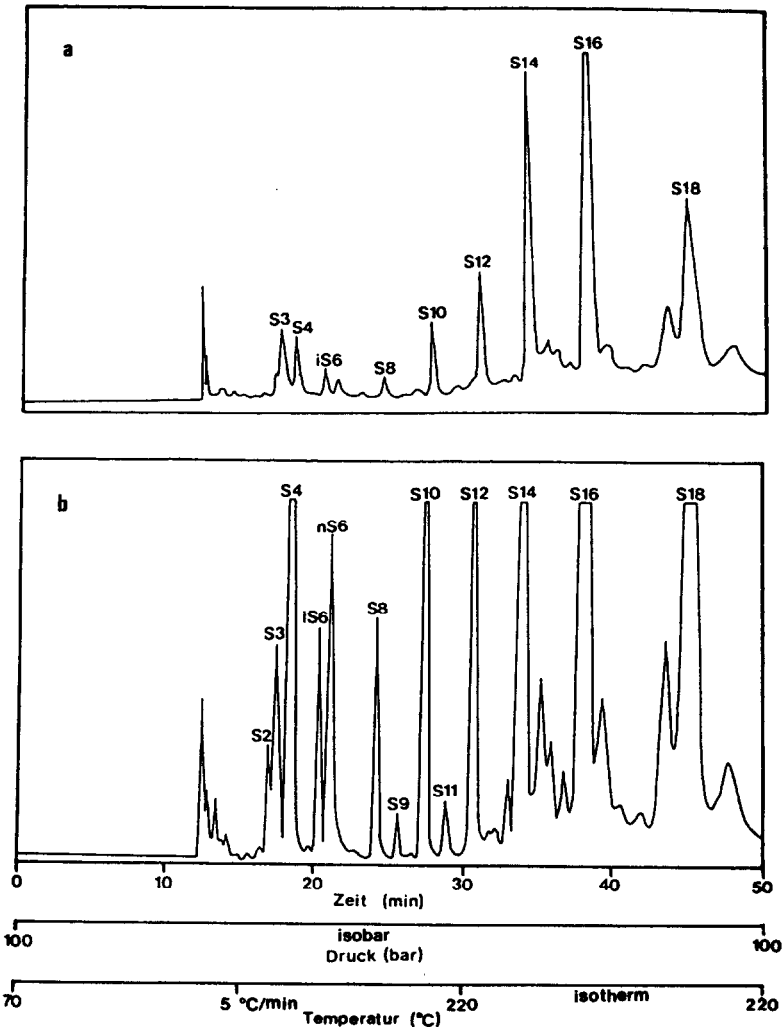


Fig. 6. Analyse von erstklassigem (a) und ranzigem (b) Raclettekäse durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 4$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

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)<sup>11</sup>. 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 Refinement die freien langkettigen Fettsäuren praktisch vollständig entfernt.

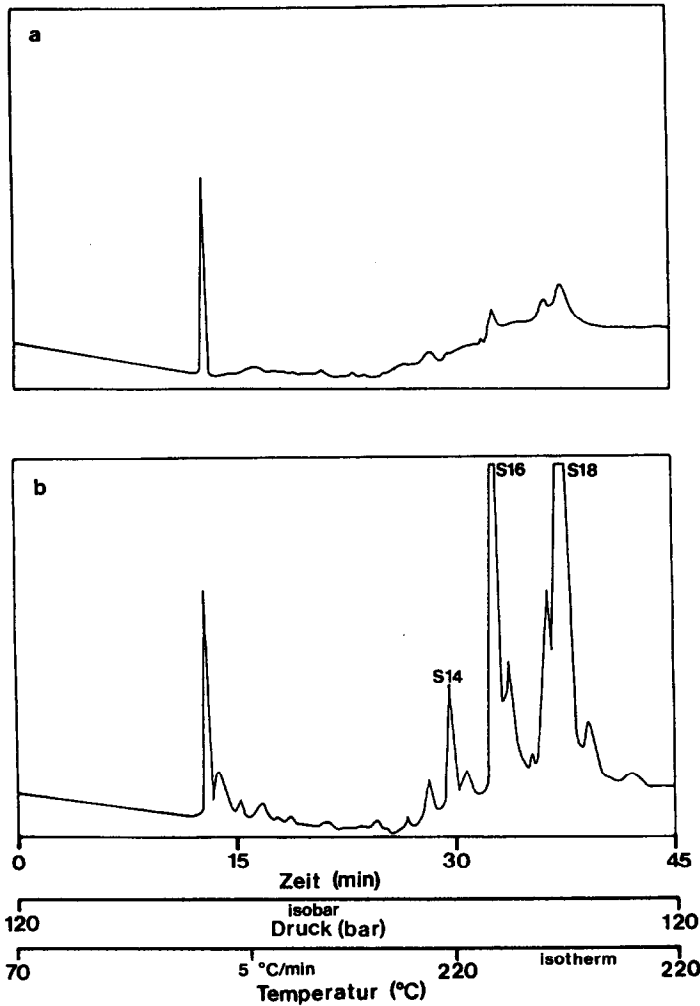


Fig. 7. Analyse von raffiniertem (a) und rohem (b) Rinderfett durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 2$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

*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<sup>11</sup>. 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<sup>12,13</sup> eine wesentlich bessere Auflösung.

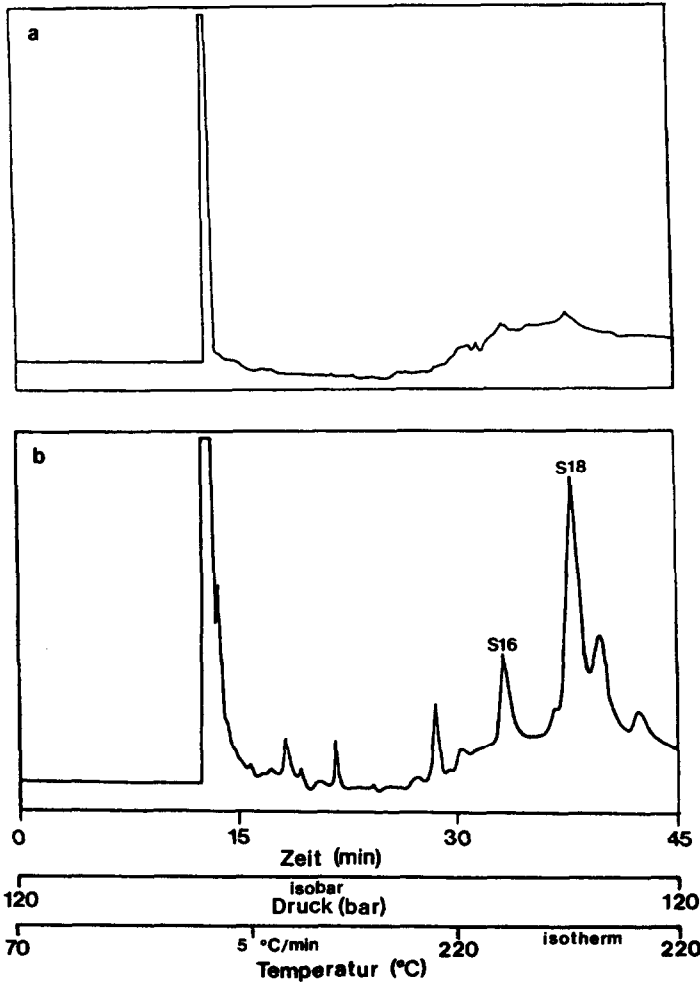


Fig. 8. Analyse von rohem (a) und raffiniertem (b) Rapsöl durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 2$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen.

*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<sup>14</sup> 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.

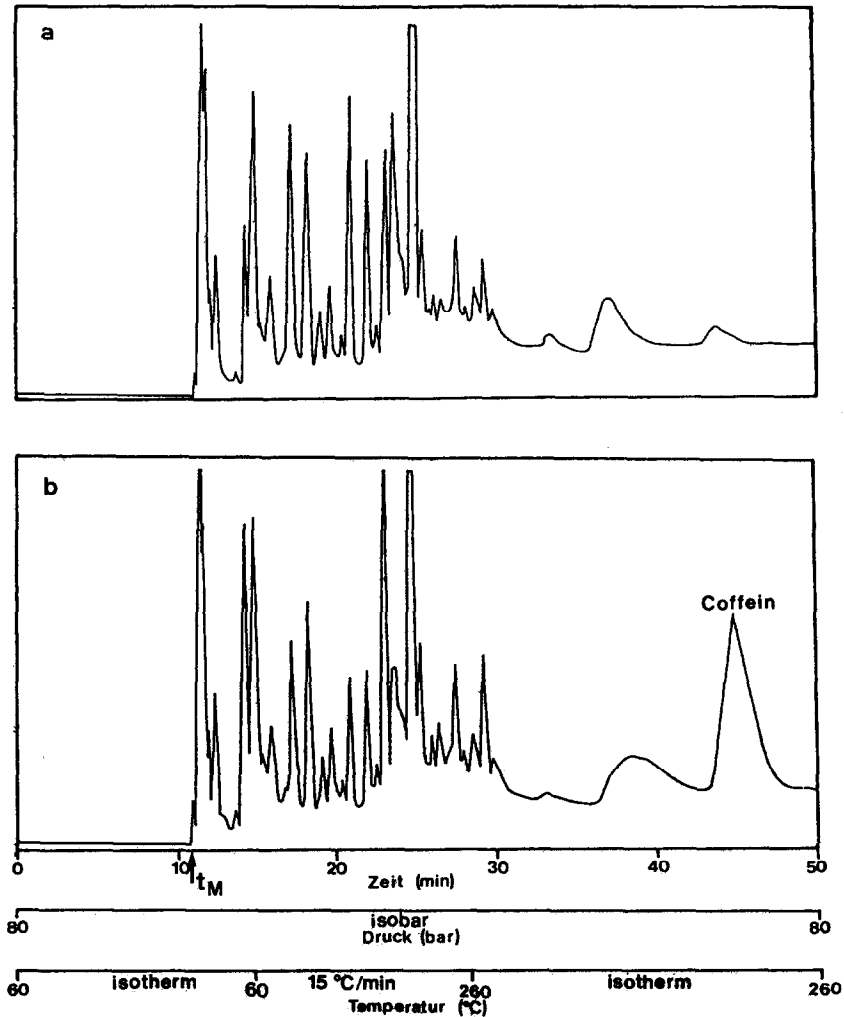


Fig. 9. Analyse von entcaffiniertem (a) und normalem (b) Kaffee durch direkte Kopplung SFE-SFC. Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 16$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

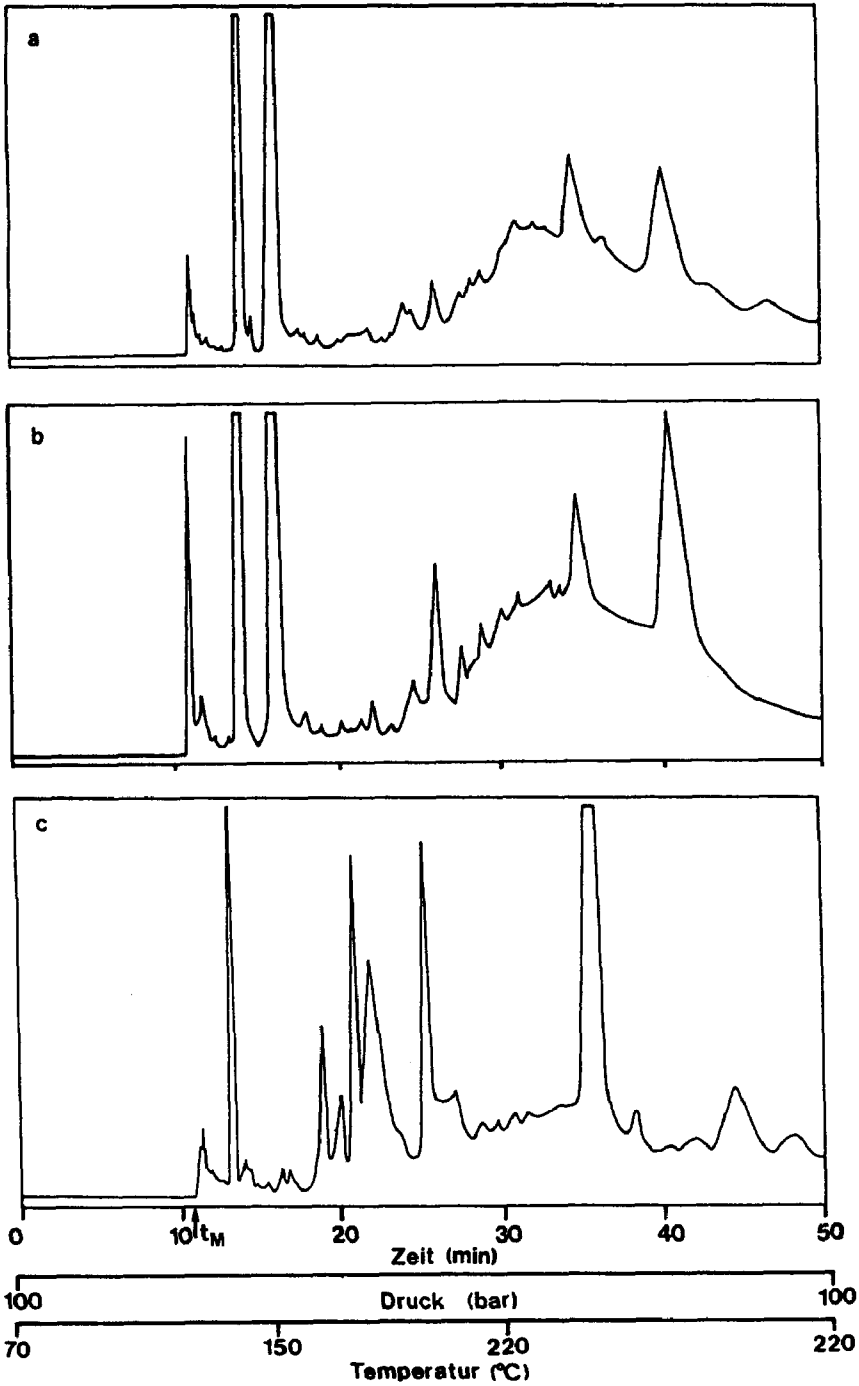


Fig. 10. Analyse pflanzlicher Produkte durch direkte Kopplung SFE-SFC. Tabak einer leichten (a) und einer starken (b) Zigarette, Kamillenblüten (c). Abschwächung des Flammenionisationsdetektors  $\times 8$ . Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text.

## 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 ( $1 \mu\text{l}$ ) 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<sup>2</sup>.

## 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. Lazzarè 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.