

# Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion-Kapillarfluidchromatographie. Teil III, Experimentelle Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms in der Fluidchromatographie im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten = Contribution to

Autor(en): Gmür, W. / Bosset, J.O. / Plattner, E.  
**direct coupl...**

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **78 (1987)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982975>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

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 Analysemethoden 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 rezent (viertelfetter) mit mildem (vollfetter) 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<sub>2</sub> 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.



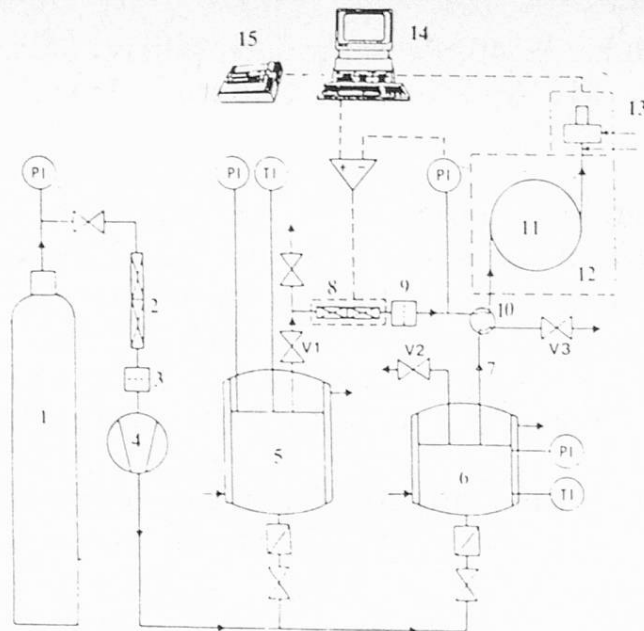


Abb. 1. Apparatur zur direkten Kopplung Fluidextraktion-Kapillarfluidchromatographie

Pos.-Nr.	Bauelement	Funktion
1	Gaszylinder	} Gasaufbereitung
2	Gasreinigungspatrone	
3	Gasfilter	
4	Membrankompressor	
5	Gasvorratszylinder	} SFE (2)
6	Extraktionsautoklav	
7	Kapillarkopplung	} SFE-SFC-Kopplung
8	Druckprogrammierzylinder	
9	Gasfilter	} SFC
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 Produktgruppen 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 Kapazitätsverhältnisses 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  $\alpha$  zwischen zwei Komponenten ist folgendermassen definiert:

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

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

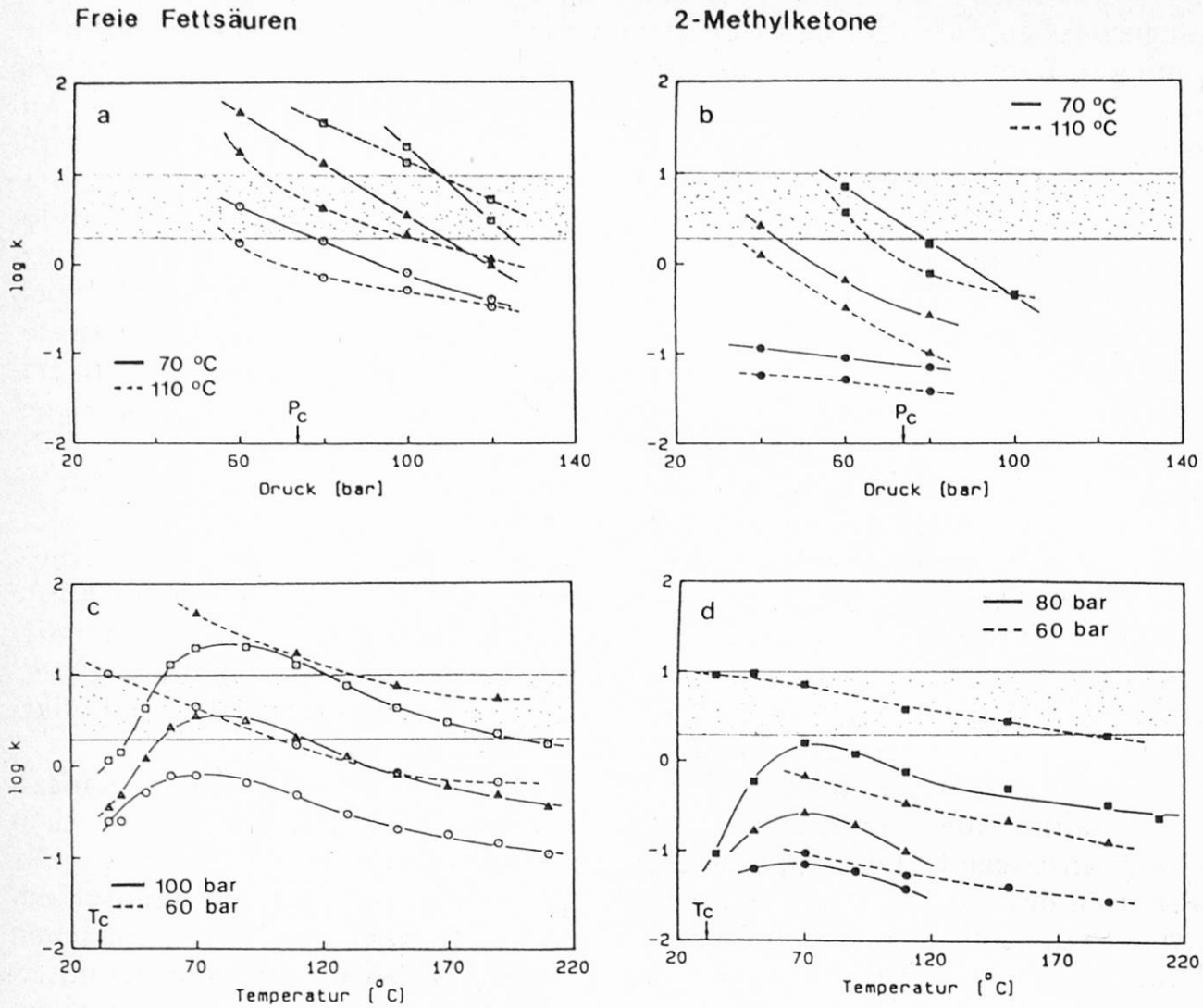


Abb. 2. Variation des Logarithmus des Kapazitätsverhältnisses  $k'$  von 3 freien Fettsäuren (a, c) und 3 Methylketonen (b, d) in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d) des als mobile Phase dienenden  $\text{CO}_2$ . Weitere Trennbedingungen siehe Text. (Der schraffierte Bereich entspricht dem optimalen Auflösungsgebiet.)

Legende:

- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| ○ Propionsäure  | ● Aceton       |
| △ Caprylsäure   | ▲ 2-Octanon    |
| □ Myristinsäure | ■ 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  $\alpha$  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

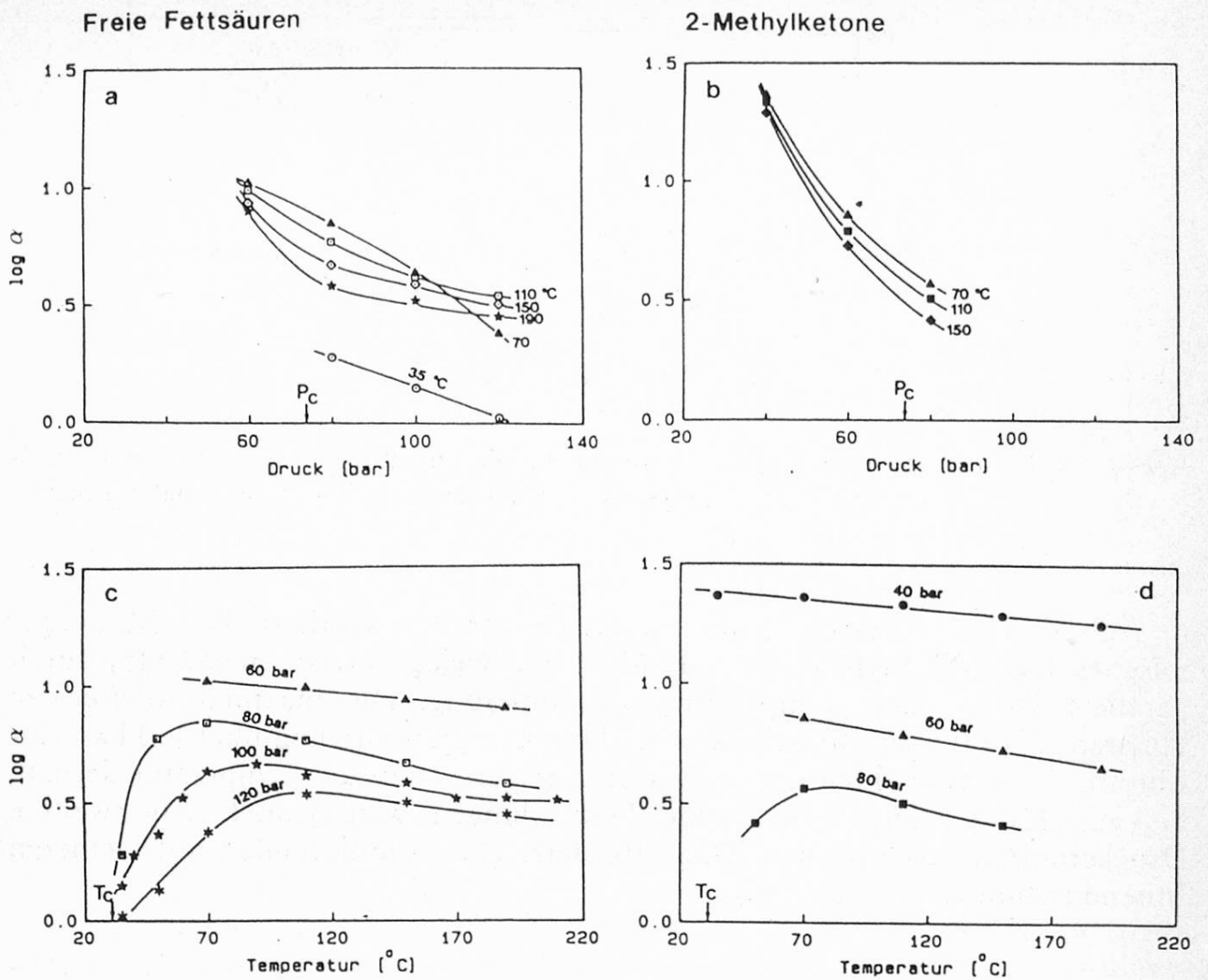


Abb. 3. Variation des Logarithmus des Retentionsverhältnisses  $\alpha$  zwischen Caprylsäure/Propionsäure (a, c) und 2-Octanon/Aceton (b, d) in Funktion des Druckes (a, b) und der Temperatur (c, d) der mobilen Phase. Analysenbedingungen siehe Text

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  $\alpha$  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  $\alpha$  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.



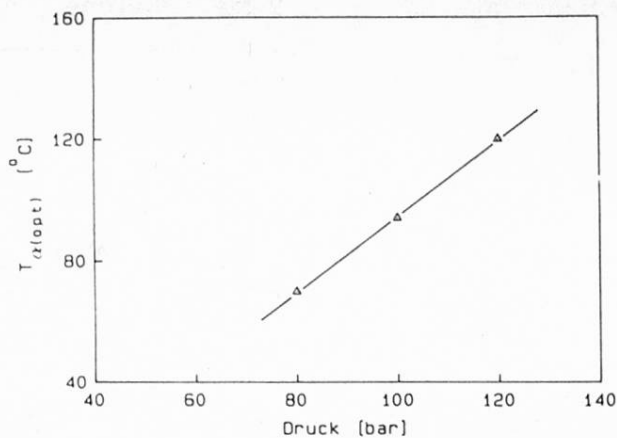


Abb. 4. Variation der Temperatur des Retentionsverhältnisoptimums zwischen Caprylsäure/Propionsäure in Funktion des Druckes der mobilen Phase. Analysenbedingungen siehe Text

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 Greyerzkerkäse (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.

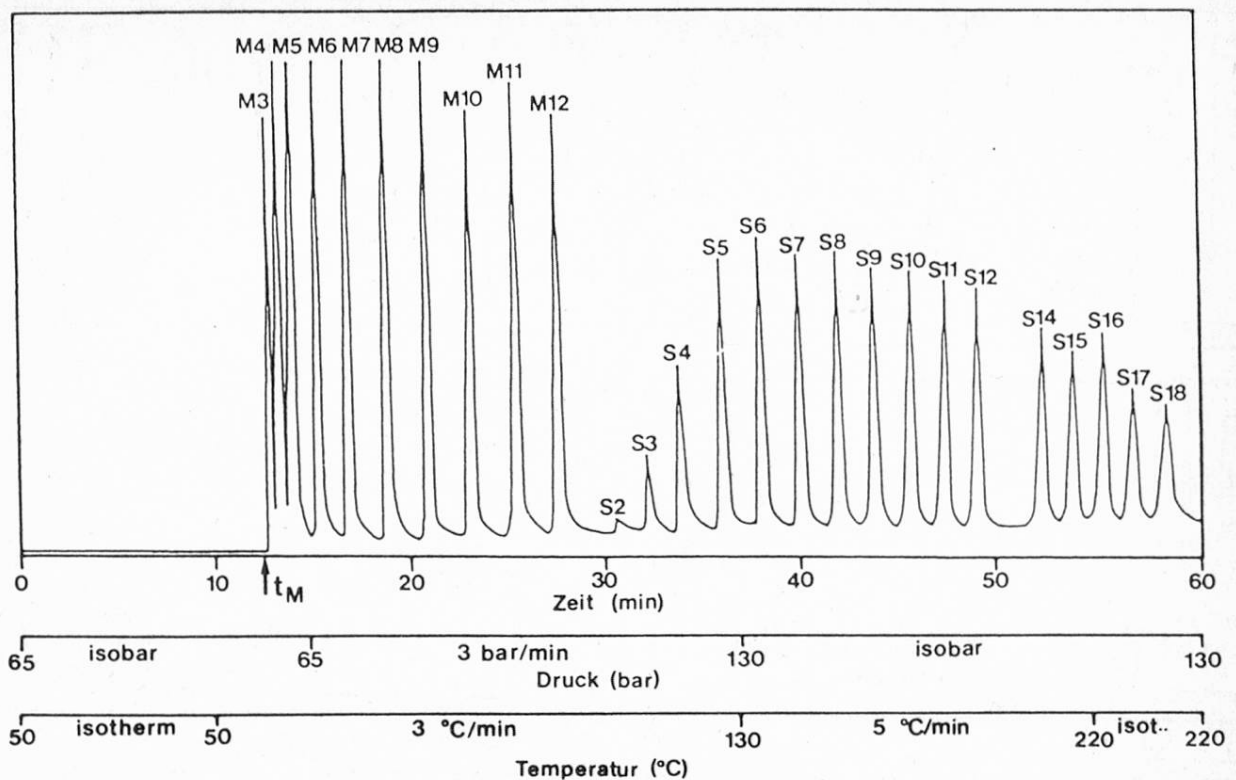


Abb. 5. Trennung eines Gemisches von  $C_3$ - $C_{12}$  2-Methylketonen (M3-M12) und freien  $C_2$ - $C_{18}$  Fettsäuren (S2-S18) durch direkte Kopplung SFE-Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 256. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text

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 geradzahli- von jenen mit ungeradzahli- ger 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-

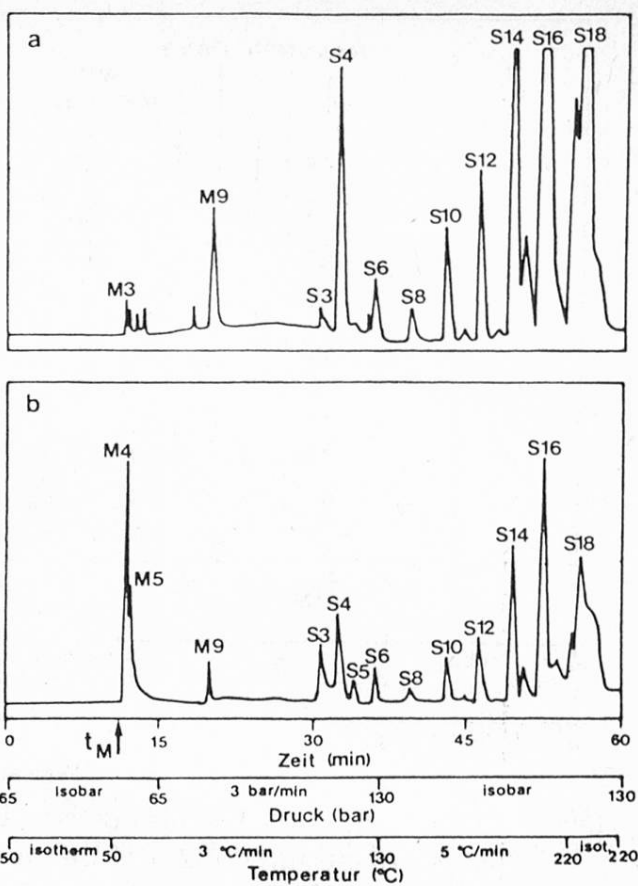
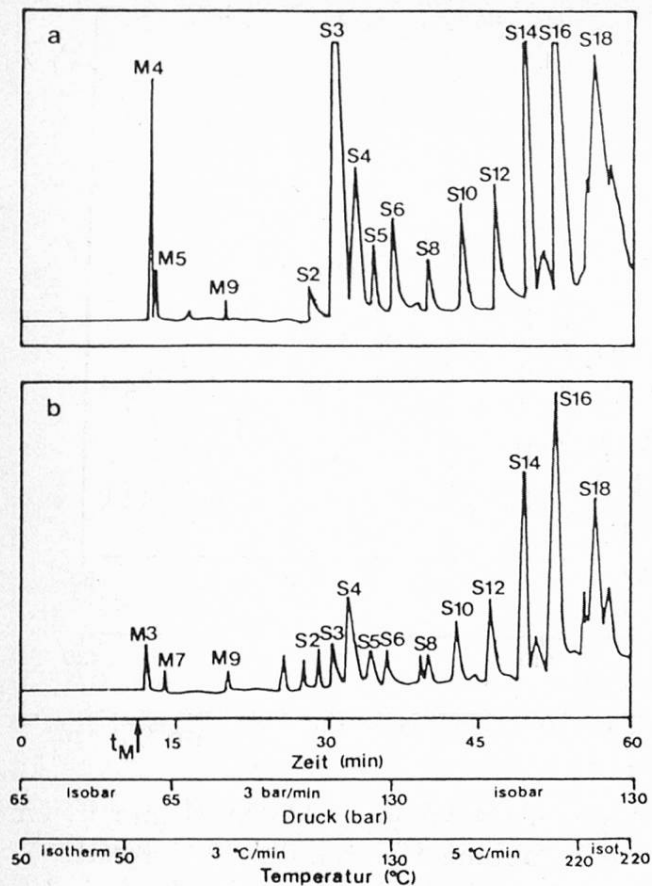


Abb. 6. Analyse von Emmentaler- (a) und Greyerzerkäse (b) durch direkte Kopplung SFE-Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

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.



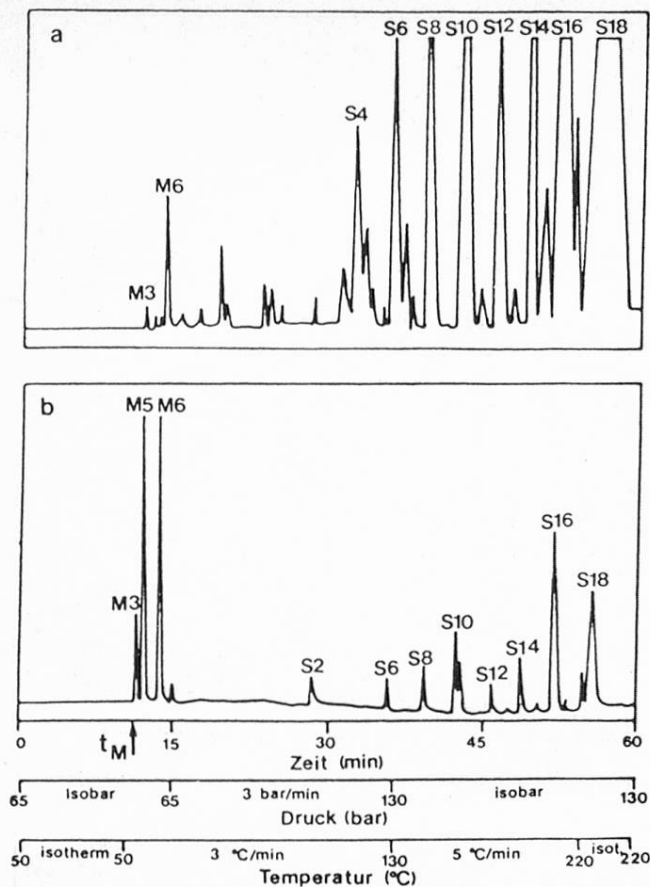


Abb. 8. Analyse von Ziegenkäse mit einem Alter von 40 (a) und 5 (b) Tagen durch direkte Kopplung SFE-Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

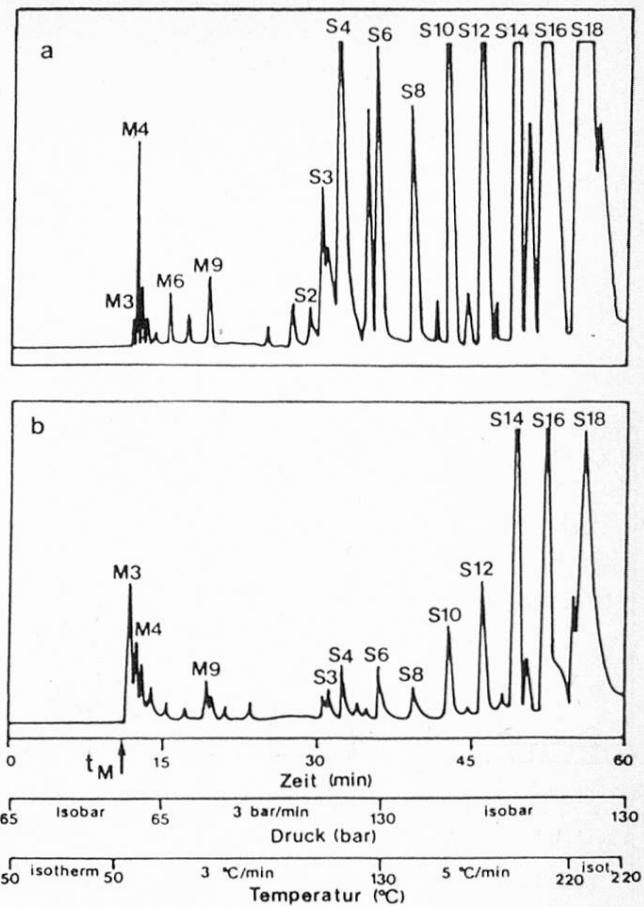


Abb. 9. Analyse von ranzigem (a) und erstklassigem (b) Raclettekäse durch direkte Kopplung SFE-Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 4. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren, M = 2-Methylketone mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

Zur Untersuchung von Milchprodukten weist diese neue Technik im Vergleich zu herkömmlichen Analysemethoden 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 Zeiterparnis und erlaubt andererseits auch quantitative Bestimmungen. Zudem werden nur sehr kleine Probenmengen benötigt. Die durchgeführten Analysen zeigen, 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  $\mu$ l) eignet sich diese Technik indes nicht zur Bestimmung von



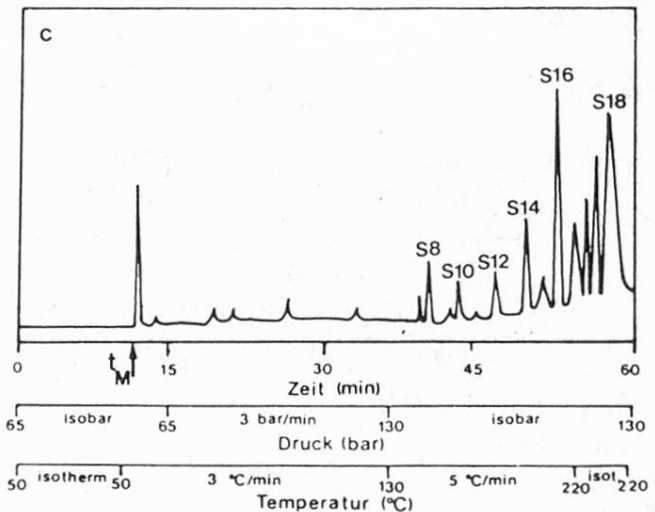
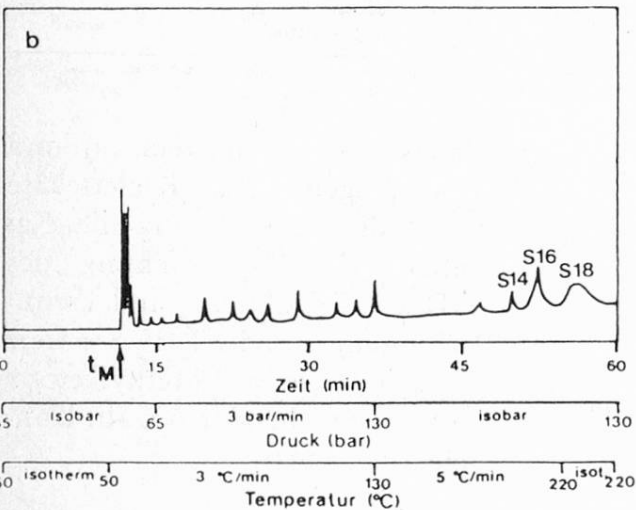
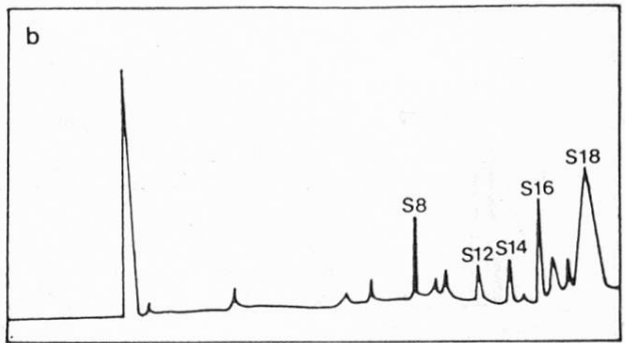
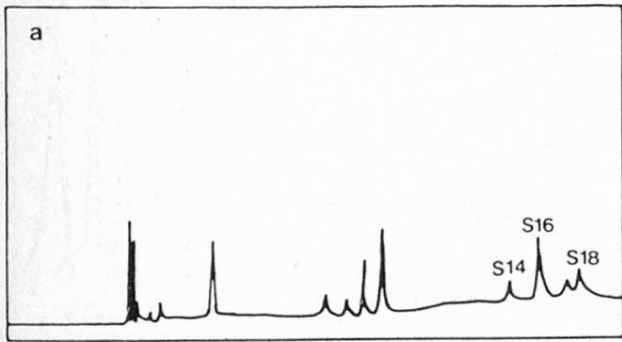
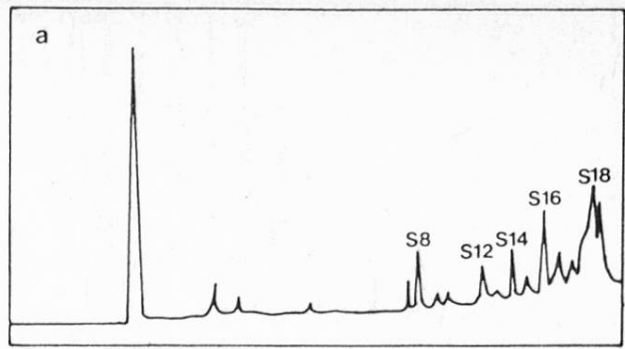


Abb. 10. Analyse von Joghurt nature (a) und Joghurt mit Erdbeearoma (b) durch direkte Kopplung SFE-Kapillar-SFC. Abschwächung des FID x 2. Extraktions- und Trennbedingungen siehe Text. S = freie Fettsäuren mit entsprechender Anzahl Kohlenstoffatomen

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.

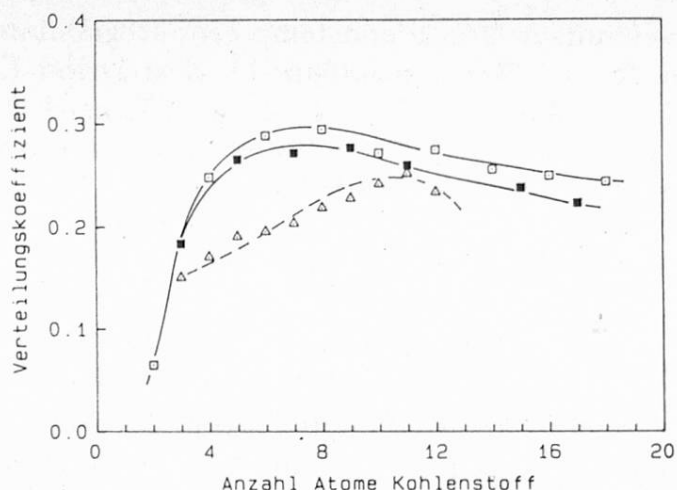


Abb. 12. Verteilungskoeffizient zwischen Gas- und Probephase für freie Fettsäuren mit gerad- (□) und ungeradzahligem (■) Anzahl Atome Kohlenstoff und Methylketone (Δ) in Funktion der Anzahl Atome Kohlenstoff

Die wichtigsten am Prototyp vorzunehmenden Verbesserungen und Vereinfachungen wurden bereits im zweiten Teil dieser Veröffentlichung (2) aufgezählt. Die für diese Untersuchungen hinzugefügte automatische Basislinienkorrektur 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 blockiert, 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<sub>18</sub>) 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<sub>2</sub> à C<sub>12</sub>) et d'acides gras libres (de C<sub>2</sub> à C<sub>18</sub>) 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<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>) and free fatty acids (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>) 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 Käseinhaltstoffen 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