

Von Egon Stahl, Winfried Schilz, Erwin Schütz und Eberhard Willing^[*]

Durch eine neuartige Mikroextraktion mit überkritischen Gasen in direkter Kopplung mit der Dünnschicht-Chromatographie gelingt es, das Löslichkeitsverhalten zahlreicher Naturstoffe im Druckgradient bis 400 bar zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Faustregeln zusammengefaßt, die eine Vorhersage über die Extrahierbarkeit aufgrund der chemischen Struktur ermöglichen. Es sind vorzugsweise lipophile Stoffe, die sich im überkritischen Kohlendioxid und Distickstoffoxid gut extrahieren lassen. Bei Alkaloiden wurde das Extraktionsvermögen beider Gase verglichen. Für polare Verbindungen wie Zucker und Aminosäuren ist die Löslichkeit auch bei Drücken von 2500 bar so gering (unter 10 µg/Nl), daß eine praktische Anwendung nicht in Betracht kommt. Quantitative Untersuchungen des Löslichkeitsverhaltens von Modellsubstanzen in überkritischen Gasen geben Anhaltspunkte für die technische Anwendung des Verfahrens.

1. Einleitung

Für die „lösungsmittelfreie“ Mikroextraktion und den direkten Transfer von Naturstoffen zur Dünnschicht-Chromatographie (DC) interessierten neue Abtrennverfahren. Das früher von uns beschriebene TAS-Verfahren^[1] und die Thermofraktographie^[2] ermöglichen zwar einen lösungsmittelfreien Direkttransfer, allerdings unter Wärmeeinwirkung. Die zur Extraktion notwendigen Temperaturen liegen zwischen 100 und 250°C, so daß die thermische Belastung der Substanzen der in der Gaschromatographie üblichen entspricht. Der Transport wird durch ein Trägergas unterstützt, so daß das Verfahren als Trägergasdestillation im Mikromaßstab angesehen werden kann. Für die Extraktion von nichtflüchtigen sowie thermolabilen Naturstoffen suchten wir nach einem schonenderen lösungsmittelfreien Verfahren.

Einen Denkanstoß gab die Fluid-Chromatographie (siehe S. 785); dort nutzt man die Tatsache, daß in überkritischen Gasen bei relativ niedriger Temperatur zahlreiche Substanzen transportiert werden können, die unter den üblichen Bedingungen der Gaschromatographie trotz hoher Temperatur infolge zu geringen Dampfdruckes nicht chromatographierbar sind. So stellte sich uns die Aufgabe, eine Extraktion mit überkritischen Gasen im Mikromaßstab durchzuführen und als „Detektor“ die bewährte DC zu verwenden.

Tabelle 1. Physikalische Daten einiger zur Extraktion benutzbarer Gase.

Gas	bei 1 bar Kp [°C]	T _c [°C]	P _c [bar]	ρ _c [g/ml]	DK bei 1 bar, 0°C (ε - 1)
Kohlendioxid	- 78 (subl.)	31.3	73	0.448	0.0011
Distickstoffoxid	- 89	36.5	71	0.457	0.00113
Ethylen	- 103.7	9.5	50	0.20	0.0018
Chlortrifluormethan	- 81.4	28.8	39	0.58	0.0015
Trifluormethan	- 82.2	25.9	46.9	0.516	—

[*] Prof. Dr. E. Stahl, Dipl.-Chem. W. Schilz, Dipl.-Chem. E. Schütz, Dipl.-Chem. E. Willing
Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität
D-6600 Saarbrücken

[**] Nach einem Vortrag beim Symposium „Extraktion mit überkritischen Gasen“, am 5. Juni 1978 in Essen.

Als Extraktionsgase kommen aufgrund ihrer relativ günstigen kritischen Daten vorzugsweise Kohlendioxid, Distickstoffoxid, Ethylen und spezielle Frigene in Betracht (Tabelle 1).

Am interessantesten ist davon das gut zu handhabende, umweltfreundliche und kostengünstige Kohlendioxid. Aus Abbildung 1 erkennt man, daß die Dichte und DK-Werte zwischen 70 und 200 bar sprunghaft ansteigen und flüssigkeitsähnliche Werte erreichen. Dies wiederum macht es verständlich, daß mehrere überkritische Gase ab einem bestimmten Druck ein beachtliches Lösungsvermögen aufweisen und somit anstelle der üblichen Lösungsmittel verwendet werden können.

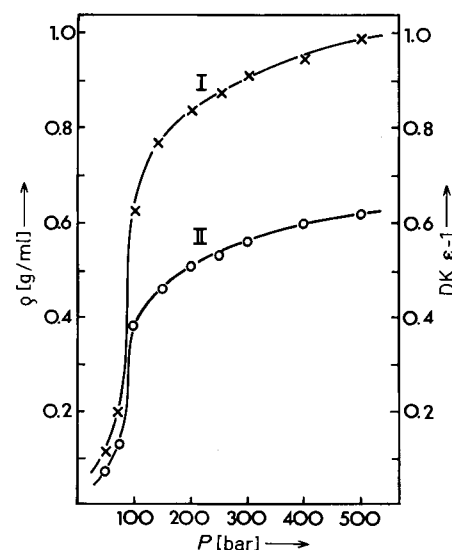


Abb. 1. Abhängigkeit der Dichte ρ (I) und der Dielektrizitätskonstante (DK) des Kohlendioxids bei 40°C vom Druck.

Die zu erzielenden Ergebnisse sind daher von allgemeinem Interesse. Da das bisherige Erfahrungsmaterial über die Extrahierbarkeit mit überkritischen Gasen zum Teil schwer zugänglich und vorzugsweise in Patentanmeldungen oder Patentschriften niedergelegt ist^[3,4], sind Grundlagenforschungen wichtig. Hierzu war es notwendig, eine Anlage für den Mikromaßstab aufzubauen, um in rationeller Weise eine größere Zahl reiner Substanzen und komplexer Proben untersuchen zu können.

2. Apparatur und Funktion der Mikroextraktions-DC-Kopplung

Das Gas wird einer handelsüblichen Druckflasche entnommen und der Druck auf den gewünschten Vordruck von 40 bis 60 bar reduziert (Abb. 2).

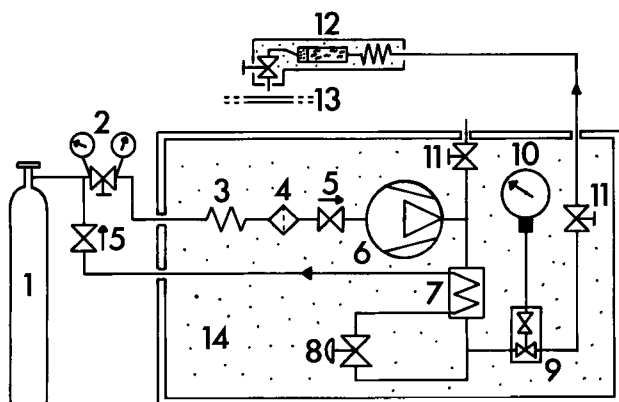


Abb. 2. Schematischer Aufbau der Apparatur zur direkten Kopplung der Fluid-Extraktion mit der Dünnschicht-Chromatographie: 1 Druckflasche, 2 Druckminderer, 3 Vorwärmssäule, 4 Filter, 5 Rückschlagventil, 6 Membrankompressor, 7 Wärmetauscher, 8 Druckhalteventil, 9 Dämpfungsglieder, 10 Feinmeßmanometer, 11 Absperrventil, 12 Mikroextraktionsautoklav, 13 DC-Schicht, 14 thermostatisierter Raum.

Dann wird es mit einem elektrisch angetriebenen Membrankompressor auf den gewünschten Druck (70–400 bar) komprimiert. Ein Druckhalteventil mit einer Regelgenauigkeit von etwa 1 bar ermöglicht die genaue Druckeinstellung; diese wird mit einem Feinmeßmanometer kontrolliert. Die Kompressorstation und der Mikroautoklav sind thermostatisiert, z. B. auf 40°C. Das überkritische Gas strömt in den Mikroautoklaven, der ein Volumen von 2 ml aufweist und der die zu extrahierenden Proben aufnimmt. Der Ausgang des Autoklaven wird durch ein Miniaturabsperrentil verschlossen. Nach Öffnen des Ventils strömt das mit Substanz beladene überkritische Gas durch eine sehr enge Kapillare (50 µm Innendurchmesser) aus und entspannt sich hierbei. Der austretende Gasstrahl trifft auf eine im Abstand von 1–5 mm waagrecht angebrachte DC-Schicht. Diese Schicht wird hin und her bewegt und fängt die ausfallenden, extrahierten Substanzen als Startband auf. In der Regel beginnen wir die Extraktion einer Probe bei

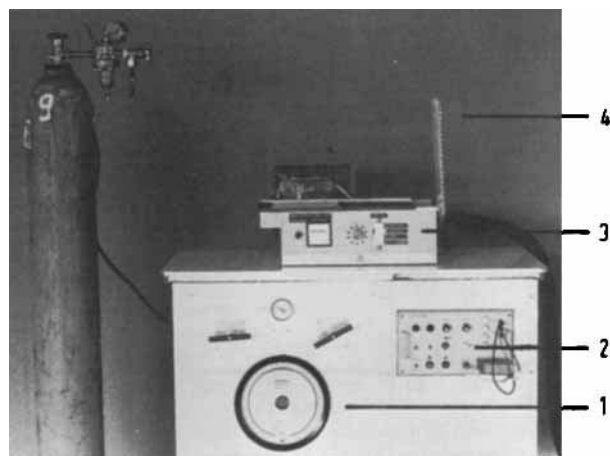


Abb. 3. Frontansicht der Apparatur zur direkten Kopplung der Fluid-Extraktion mit der DC (FE-DC): 1 Kompressorstation, 2 Druckregleinheit, 3 Mikroautoklav mit Auffangvorrichtung, 4 Seifenblasen-Strömungsmesser.

70 bar und lassen 1 NI (Normalliter) Gas durchströmen. Dann wird der Druck stufenweise zumeist um 10 oder 20 bar erhöht, die DC-Platte entsprechend verschoben und die Probe erneut mit 1 NI Gas extrahiert usw. Abbildung 3 zeigt die Apparatur zur direkten Kopplung der Fluid-Extraktion mit der DC (FE-DC); in Abbildung 4 sind der Mikroautoklav mit der auf einem Transportschlitten gehaltenen DC-Schicht, die Kontrolleinheit und die Gasabsaugvorrichtung dargestellt.



Abb. 4. Mikroautoklav mit DC-Auffangvorrichtung: 1 Steuerschaltungen, 2 Transportschlitten mit DC-Platte, 3 Mikroautoklav mit Absperrventil, 4 Plexiglashaube mit Absaugvorrichtung.

Nach der Entwicklung des Chromatogramms erkennt man, bei welchem Druck eine Substanz extrahiert wird. Aus der unterschiedlichen Intensität der Zonen kann ferner beurteilt werden, ob die extrahierte Substanzmenge bei Erhöhung des Druckes zu- oder abnimmt.

Die in den Abbildungen 2–4 vorgestellte Anordnung^[5,6] ist bis maximal 400 bar verwendbar. Bei höheren Drücken versagt sie, da der austretende Gasstrahl die Schicht verletzt und außerdem der Rückpralleffekt so stark wird, daß nur ein geringer Teil der extrahierten Substanzen auf der DC-Schicht aufgefangen wird. Deshalb wurde eine weitere Anordnung entwickelt, die es erlaubt, sowohl im niedrigen als auch im höheren Druckbereich (bis über 2000 bar) die Substanzen quantitativ aufzufangen. Die Apparatur ist im Prinzip gleichartig aufgebaut, nur ist anstelle der DC-Platte ein mit Quarzwolle gefüllter Auffangtrichter an die Kapillare angeschlossen. In diesem Auffangtrichter schlagen sich die Substanzen nach der Entspannung nieder, werden anschließend mit einem Lösungsmittel extrahiert und entweder direkt quantitativ bestimmt oder auf eine DC-Schicht aufgetragen und in bekannter Weise chromatographiert und quantitativ erfaßt.

3. Extraktion schwerflüchtiger Substanzen mit überkritischen Gasen

3.1. Untersuchung mit Modellsubstanzen im Druckbereich bis 400 bar

Da bislang keine Angaben vorlagen, welche Voraussetzungen eine Substanz haben muß, um mit überkritischem Kohlendioxid extrahierbar zu sein, wurden zunächst Reinsubstanzen aus mehreren Naturstoffgruppen untersucht^[6] (Tabelle 2).

Die ausgewählten Verbindungen unterscheiden sich sowohl im Hinblick auf ihre Molekülmasse als auch durch die Anzahl und Beschaffenheit ihrer funktionellen Gruppen. Die Spanne reicht von unpolaren Kohlenwasserstoffen bis zu stark polaren

Tabelle 2. Modellsubstanzen, direkt von Quarzwolle mit überkritischem Kohlendioxid bei 40°C extrahiert.

Substanz	rel. Molekül- masse	Anzahl C-Atome	funktionelle Gruppen	Fp [°C]	Kp [°C]	extrahierbar ab [bar]
1. Polyarene						
Naphthalin	128	10		80	218	70 stark
Phenanthren	178	14		101	340	80
Pyren	202	16		156	393	90
Chrysen	228	18		255	448	100 schwach
Tetracen	228	18		357	subl.	300 schwach
2. Phenole						
Phenol	94	6	1 —OH	43	181	70 stark
Brenzcatechin	110	6	2 —OH (1, 2)	105	245	80
Pyrogallol	126	6	3 —OH (1, 2, 3)	133	309	85
Hydrochinon	110	6	2 —OH (1, 4)	173	285	100
Phloroglucin	126	6	3 —OH (1, 3, 5)	218	subl.	120 schwach
3. Aromatische Carbonsäuren						
Benzoessäure	122	7	1 —COOH	122	249	80
Salicylsäure	138	7	1 —COOH, 1 —OH (1, 2)	159	subl.	85
p-Hydroxybenzoessäure	138	7	1 —COOH, 1 —OH (1, 4)	215	—	120
Gentisinsäure	154	7	1 —COOH, 2 —OH (1, 2, 5)	205	—	120
Gallussäure	170	7	1 —COOH, 3 —OH (1, 3, 4, 5)	255	—	nicht extrahierbar
4. Pyrone						
Cumarin	146	9	1 —O—, 1 Keto-Gr.	71	301	70 stark
Umbelliferon	162	9	1 —OH, 1 —O—, 1 Keto-Gr.	230	subl.	100
Aesculetin	178	9	2 —OH, 1 —O—, 1 Keto-Gr.	276	subl.	nicht extrahierbar
5. Lipide						
Myristylalkohol	214	14	1 —OH	39	263	70
Cholesterin	386	27	1 —OH	148	360	85
Triolein	885	57	3 —COOR	—	235	90

Verbindungen. Die Auswertung der Resultate ergab, daß überraschend viele verschiedenartige Substanzen bereits im unteren Druckbereich mit Kohlendioxid extrahierbar sind. Aufschlußreich ist die Betrachtung einzelner Stoffgruppen, z. B. der aromatischen Kohlenwasserstoffe, der Phenole, der aromatischen Carbonsäuren, der Pyrone und der Lipide (Tabelle 2). Man erkennt deutlich, daß mit steigender Anzahl C-Atome und insbesondere mit der Einführung polarer funktioneller Gruppen die Extrahierbarkeit im Druckbereich bis 400 bar stark abnimmt. Hier zeichnen sich die Möglichkeiten einer fraktionierenden Extraktion komplexer Proben im Druckgradient ab.

Die bisherigen Erfahrungen mit Modellsubstanzen lassen sich in folgenden *Faustregeln* zusammenfassen:

- Kohlenwasserstoffe und weitere typisch lipophile organische Verbindungen, deren Polarität relativ gering ist, z. B. Ester, Ether, Lactone und Epoxide, lassen sich bereits im unteren Druckbereich, d. h. von 70 bis 100 bar, extrahieren.
- Die Einführung stark polarer funktioneller Gruppen (z. B. —OH, —COOH) erschwert die Extrahierbarkeit. In der Reihe der Benzolderivate sind Substanzen mit drei phenolischen Hydroxygruppen gerade noch extrahierbar, desgleichen Verbindungen mit einer Carboxy- und zwei Hydroxygruppen. Nicht extrahierbar sind in dieser Reihe Verbindungen mit einer Carboxy- und drei oder mehr Hydroxygruppen.
- Stärker polare Substanzen, z. B. Zucker und Aminosäuren, sind im Bereich bis 400 bar nicht extrahierbar.
- Eine Fraktionierung im Druckgradient tritt ein, wenn stärkere Unterschiede im Siede- oder Sublimationsbeginn, d. h. der Flüchtigkeit, und/oder starke Unterschiede der Polarität der Substanzen (DK-Wert) vorliegen. Die Fraktionierungseffekte sind im Bereich des starken Anstiegs der Dichte sowie

der DK-Werte des fluiden Kohlendioxids (Abb. 1) am deutlichsten.

Mit diesen Faustregeln ist es nun möglich, die Extrahierbarkeit der verschiedenen Substanzen abzuschätzen.

3.2. Untersuchung komplexer Gemische im Druckbereich bis 400 bar

3.2.1. Extraktion von lipophilen, nicht basischen Substanzen

Im Anschluß an diese grundlegenden Versuche wurden eine Reihe komplexer Gemische mit überkritischen Gasen extrahiert. Die erhaltenen Fluidextraktion-Dünnschicht-Chromatogramme (FE-DC) ergeben auf einen Blick wertvolle Informationen über die Extrahierbarkeit in den jeweiligen Druckberei-

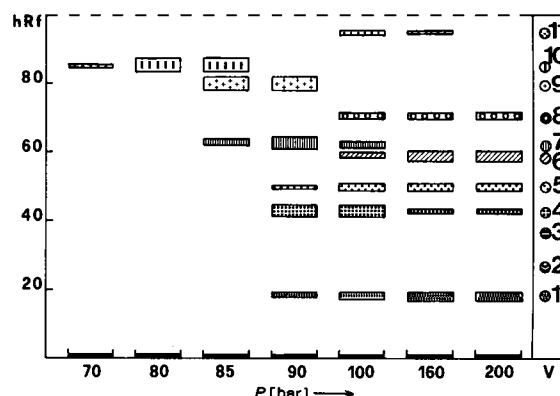


Abb. 5. FE-DC eines Elf-Farbstoff-Gemisches, extrahiert mit Kohlendioxid bei 40°C: 1 Fettorange, 2 Indophenol, 3 Cereschwarz, 4 Sudanrot, 5 Sudanblau, 6 Ceresrot, 7 Ceresorange, 8 Ceresgrün, 9 Sudangelb G, 10 Sudangelb flüssig, 11 Sudanorange. Man beachte den Fraktionierungseffekt anhand der Zonenstärke. Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄, Dichlormethan, 1 × 15 cm, K.S. Nachweis: Tageslichtbetrachtung.

chen. Sie zeigen die Zu- und Abnahme der Menge und die erzielbaren Fraktionierungseffekte. So ist in Abbildung 5, dem FE-DC eines Elf-Farbstoff-Gemisches, eine Fraktionierung einzelner Farbstoffe im Druckbereich von 70 bis 100 bar deutlich zu erkennen.

Die Extraktion von Inhaltsstoffen aus pflanzlichen Drogen bestätigte grundsätzlich die mit den Modellsubstanzen gewonnenen Resultate, wenngleich es nachteilig für die Extraktion ist, daß die Inhaltsstoffe in den Drogen als Salze oder durch Wasserstoffbrücken gebunden vorliegen oder auch mikrokapselt sind. Aus Abbildung 6 kann man erkennen, daß aus Kamillenblüten die Terpenkohlenwasserstoffe bereits im Bereich von 70 bar ebenso extrahiert werden wie der Sesquiterpenalkohol Bisabolol und das Cumarin Herniarin.

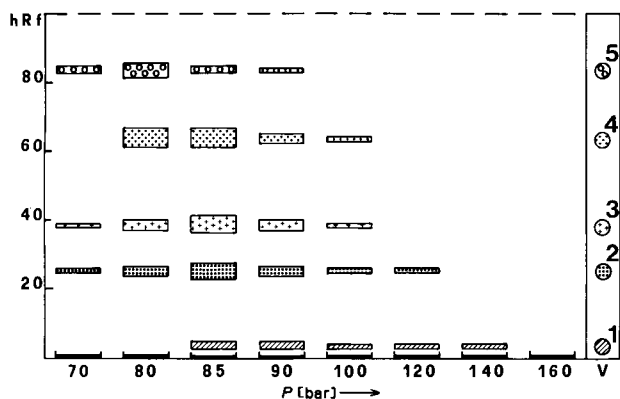


Abb. 6. FE-DC von 50 mg Kamillenblüten, extrahiert mit Kohlendioxid bei 40°C. 1 Matricin, 2 Herniarin, 3 Bisabolol, 4 „En-In-Dicycloether“, 5 Terpenkohlenwasserstoffe. Schicht: Kieselgel F₂₅₄, Chloroform-Benzol (75+25), 2 x 12 cm, KS. Nachweis: a) UV₃₆₅ (Herniarin, blaue Fluoreszenz); b) EP-Reagens [7], 10 min 110°C (Matricin, grün-blau).

Ab 80 bar beginnt die Extraktion der „En-In-Dicycloether“, etwa ab 85 bar wird das Proazulen Matricin extrahiert.

Ein Beispiel für die Extraktion einer fette Öle enthaltenden Droge mit überkritischem Kohlendioxid ist das FE-DC von

Sonnenblumensamen, der mit 0.5 % Squalen imprägniert wurde (Abb. 7). Ab 80 bar beginnt die Extraktion von Squalen. Bei 85 bar ist die Squalen-Zone bereits stark ausgebildet, und es zeigt sich auch erstmals eine schwache Sterolzone.

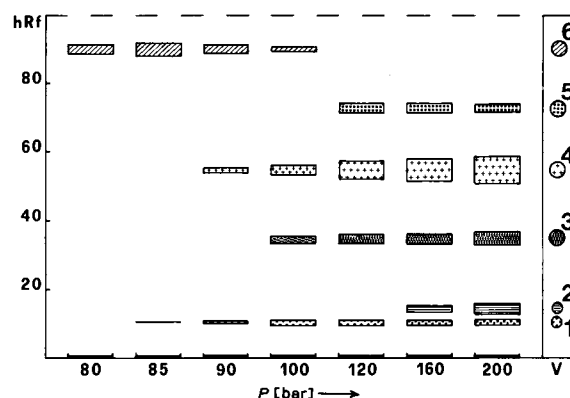


Abb. 7. FE-DC von 80 mg Sonnenblumensamen mit Zusatz von 0.5 % Squalen, extrahiert mit Kohlendioxid bei 40°C. 1 Sterole, 2 Diglyceride, 3 Triglyceride mit Epoxysäuren, 4 Triglyceride, 5 Sterylester, 6 Squalen. Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄, Petrolether (K_p = 40–60°C) – Diethylether – Essigsäure (70+30+1), 1 x 10 cm, KS. Nachweis: Acetanhydrid-Schwefelsäure-Reagens [7], 10 min erhitzen, danach UV₃₆₅ (Fluoreszenz).

Die Triglyceride als Hauptinhaltsstoffe erscheinen ab 90 bar; die Triglyceridzone vergrößert sich ständig mit zunehmendem Druck. Die Extraktion der Sterylester beginnt bei 120 bar, und ab 160 bar sind die Diglyceride auf dem FE-DC sichtbar. Eine Abtrennung der Triglyceride von anderen Inhaltsstoffen wäre praktisch nur unterhalb von 90 bar möglich; dies geht auch aus anderen Beispielen von Drogenextraktionen hervor (Tabelle 3).

3.2.2. Extraktion von Alkaloiden

Besondere Beachtung wurde weiterhin den Alkaloiden und den entsprechenden Drogen geschenkt. Von der rel. Molekülmasse und der Polarität her gesehen handelt es sich um eine

Tabelle 3. Mikroextraktionen von Drogen mit der neuen FE-DC-Kopplungsmethode.

Droge, lufttrocken	Hauptinhaltsstoffe mit DC nachgewiesen	rel. Molekülmasse	Summenformel	Fp [°C]	Kp [°C]	extrahierbar ab [bar]
Kümmelfrüchte	Limonen	136	C ₁₀ H ₁₆	–74	178	70
	Carvon	150	C ₁₀ H ₁₄ O	—	231	70
	Triglyceride	> 600	—	—	—	90
Pfefferminzblätter	Menthol	158	C ₁₀ H ₂₀ O	44	216	70
	Menthon	156	C ₁₀ H ₁₈ O	—	209	70
Kamillenblüten	Herniarin	176	C ₁₀ H ₈ O ₃	117	—	70
	α-Bisabolol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	—	155	70
	„En-In-Dicycloether“ [a]	200	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	—	—	80
	Matricin	306	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	—	—	85
Rohkaffee	Coffein	194	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	178 subl.	—	80
	Triglyceride	> 600	—	—	—	90
Haschisch	Cannabidiol	314	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	66	—	85
	Cannabinol	310	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	76	—	90
	Tetrahydrocannabinol	315	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	76	—	90
Sonnenblumensamen	Squalen	410	C ₃₀ H ₅₀	–20	280	80
	Cholesterin	366	C ₂₇ H ₂₆ O	148	360	85
	Triglyceride	600	—	—	—	90
Sesamsamen	Sesamin	354	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	123	—	85
	Triglyceride	> 600	—	—	—	90

[a] Die „En-In-Dicycloether“ sind ein Gemisch von *cis*- und *trans*-Spiroethern.

recht heterogene Naturstoffklasse. Auch bei den Alkaloiden konnten deutliche Zusammenhänge zwischen Extrahierbarkeit und Konstitution festgestellt werden. In diese Untersuchungen wurde, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, neben Kohlendioxid auch Distickstoffoxid einbezogen. Für Alkaloide mit relativ polaren funktionellen Gruppen, wie etwa Hydroxygruppen, ist überkritisches Kohlendioxid ein schlechtes, überkritisches Distickstoffoxid dagegen ein besseres Extraktionsgas.

re Extraktionsgas. Neben der Polarität der Alkaloide beeinflußt auch die Höhe der Schmelz- und Siedepunkte die Extrahierbarkeit. Diese Zusammenhänge werden auch aus Tabelle 5 deutlich, die die Fluid-Extraktion von einigen Alkaloiden aus Drogen behandelt.

Hier erschweren allerdings die Salzbildungen, die Wasserstoffbrückenbindungen und die zur Extraktion notwendigen Diffusionsvorgänge die Extraktion.

Tabelle 4. Alkaloid-Modellsbstanz, direkt von Quarzwolle mit überkritischem Kohlendioxid oder Distickstoffoxid bei 40°C extrahiert. Die Polarität der Alkaloide nimmt innerhalb einer Gruppe von oben nach unten zu.

Alkaloid	rel. Molekülmasse	funktionelle Gruppe	Fp [°C]	FE-Beginn [bar]	
				CO ₂	N ₂ O
1. Colchicin	399	4 —OCH ₃ , 1 NHAc, 1 Keto-Gr.	155–157	100	80
2. <i>Ipecacuanha</i> -Alkaloide					
O-Methyl-psychotrin	478	4 —OCH ₃	123–124	80	80 stark
Emetin	480	4 —OCH ₃ , 1 —NH	74	200	80 gut
Cephaelin	466	1 —OH, 3 —OCH ₃ , 1 —NH	120–130	—	80
Psychotrin	464	1 —OH, 3 —OCH ₃	122	—	150
3. Nicotin	162	1 —NCH ₃	–79	80 sehr stark	80 sehr stark
4. <i>Opium</i> -Alkaloide					
Papaverin	339	4 —OCH ₃	147	90	80 stark
Narcotin	353	3 —OCH ₃ , 3 —O—, 1 Keto-Gr.	176	90	80 stark
Thebain	311	2 —OCH ₃ , 1 —O—	193	90	80 gut
Codein	299	1 —OH, 1 —OCH ₃ , 1 —O—	155	90	80
Morphin	285	2 —OH, 1 —O—	254–256	—	200 sehr schwach
5. <i>Rauwolfia</i> -Alkaloide					
Reserpin	608	5 —OCH ₃ , 1 —CO ₂ CH ₃ , 1 —OCO	262–263	80	80
Yohimbin	354	1 —OH, 1 —CO ₂ CH ₃	240–241	90	80
Ajmalin	326	2 —OH	205–207	—	80
6. <i>Tropa</i> -Alkaloide					
Scopolamin	305	1 —CH ₂ OH, 1 Ester, 1 Epoxid-Gr.	36–37	80	80 gut
Atropin	289	1 —CH ₂ OH, 1 Ester	118	90 gut	80 stark
Tropanol	141	1 —OH	64	90 gut	80 gut
7. <i>Vinca</i> -Alkaloide					
Vincamin	354	1 —OH, 1 —CO ₂ CH ₃	232–233	90	80
Vinblastin	810	2 —OH, 1 —CH ₃	210–211	80	120
Vincristin	824	2 —OH, 1 —CHO	218–220	80	150

Je weniger polar ein Alkaloid ist, desto niedriger ist der anzuwendende Druck für den Beginn der Extraktion. Dabei erweist das fluide Distickstoffoxid sich im Vergleich zu Kohlendioxid auch bei relativ wenig polaren Alkaloiden als das besse-

Das bessere Extraktionsvermögen von fluidem Distickstoffoxid für Alkaloide, vor allem im unteren Druckbereich, beruht wohl darauf, daß Distickstoffoxid dort eine höhere Dichte als Kohlendioxid hat (Abb. 8).

Tabelle 5. Fluid-Extraktion von Alkaloid-Drogen mit überkritischem Kohlendioxid oder Distickstoffoxid bei 40°C.

Droge	mit DC nachgewiesene Alkaloide	FE-Beginn [bar]	
		CO ₂	N ₂ O
1. <i>Nicotianae Folium</i>	Nicotin	90	80
2. <i>Ipecacuanhae Radix</i>	O-Methyl-psychotrin	—	120
	Emetin	200	80 gut
	Cephaelin	—	90
	Psychotrin	—	120
3. <i>Opium crudum</i>	Papaverin	100	80 stark
	Narcotin	120	80 stark
	Thebain	120	80 gut
	Codein	200	80
	Morphin	—	200 sehr schwach
4. <i>Rauwolfiae Radix</i>	Reserpin	80	80
	Ajmalin	—	80

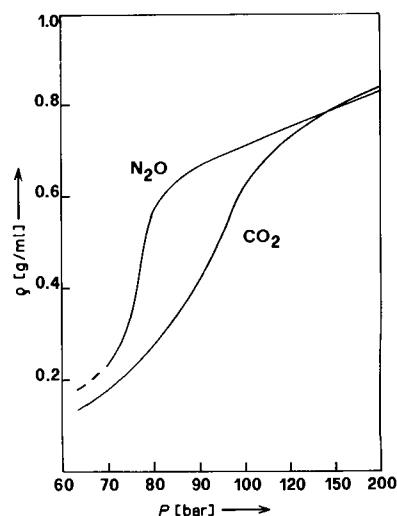


Abb. 8. Unterschiedliche Druckabhängigkeit der Dichten von überkritischem Kohlendioxid und Distickstoffoxid bei 40°C.

Im Vergleich zu fluidem Kohlendioxid ist es eher imstande, die Alkaloide beim Vorgang der Fluid-Extraktion zu solvatisieren. Zudem hat Kohlendioxid, im Gegensatz zu Distickstoffoxid, bekanntlich kein Dipolmoment, und eine Wechselwirkung mit polaren Gruppen der Alkaloide kann folglich nicht eintreten. Die Basizität der Alkaloide scheint auf die Extrahierbarkeit mit fluidem Kohlendioxid und Distickstoffoxid keinen großen Einfluß auszuüben. Alkaloide mit etwa der gleichen Basizität, wie z. B. Morphin und Codein, werden aufgrund der unterschiedlichen Polarität verschieden stark extrahiert. Auch das Verhalten des neutral reagierenden Colchicins zeigt, daß die Basizität hier von untergeordneter Bedeutung für die Extraktion ist.

Ein anschauliches Beispiel für die Möglichkeiten der Fluid-Extraktion gibt das FE-DC von Opium. Hier wurde die Droge mit überkritischem Distickstoffoxid bei 40°C extrahiert. Man erkennt an der Ausdehnung der einzelnen Zonen in Abbildung 9, daß die Alkaloide Papaverin und Narcotin besonders leicht extrahiert werden. Dann folgt Thebain, das bereits bei etwa 120 bar eine gute Extrahierbarkeit aufweist. Weniger gut wird Codein und am schlechtesten Morphin extrahiert. Im Hinblick auf die neuen Tendenzen der Thebaingewinnung aus *Papaver bracteatum* sind die Ergebnisse der Fluid-Extraktion von besonderem Interesse.

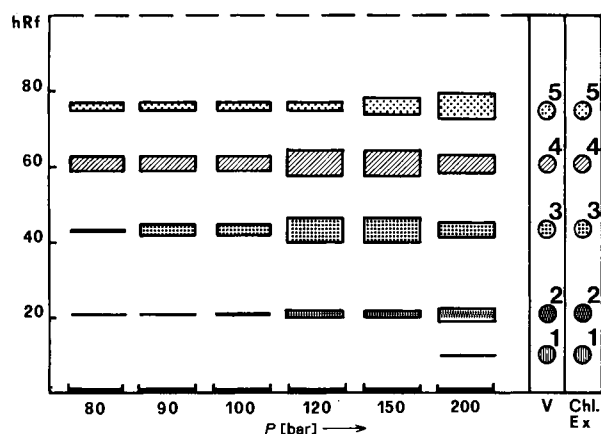


Abb. 9. FE-DC von 100 mg Rohopium, extrahiert mit Distickstoffoxid bei 40°C. 1 Morphin, 2 Codein, 3 Thebain, 4 Papaverin, 5 Narcotin. Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄, Toluol – Aceton – Ethanol – 2,5proz. Ammoniaklösung (45+45+7+3), 1 × 10 cm, KS. Nachweis: Dragendorff-Reagens, modifiziert nach Puech [8], dunkelbraune Zonen.

Mit überkritischem Kohlendioxid werden Codein und Morphin dagegen bis gut 200 bar überhaupt nicht extrahiert. Auch die drei anderen Alkaloide sind deutlich weniger löslich. Weitere Einzelheiten über die Extrahierbarkeit der Alkaloide von *Areca*, *China*, *Colchicum*, *Conium*, *Ephedra*, *Ipecacuanha*, *Nicotiana*, *Rauwolfia*, *Tropa* und *Vinca* sind in der Originalarbeit^[9] enthalten.

4. Quantitative Untersuchung des Löslichkeitsverhaltens von Modellsubstanzen in überkritischen Gasen

Die genaue Bestimmung der Löslichkeit ausgewählter Substanzen in Abhängigkeit vor allem vom Druck ist zur Weiterentwicklung der nach qualitativen Untersuchungen aufgestellten Faustregeln wichtig. Außerdem werden Ausbeuteberechnungen bei Drogenextraktionen mit überkritischen Gasen erst

durch die Kenntnis des Löslichkeitsverhaltens der zu extrahierenden Inhaltsstoffe ermöglicht.

Abbildung 10 zeigt dazu die Druckabhängigkeit der Löslichkeit von drei aromatischen Carbonsäuren und von 1,8-Dihydroxyanthrachinon zwischen 80 und 200 bar. Benzoesäure, von diesen Verbindungen am stärksten lipophil, läßt sich qualitativ bereits unterhalb von 70 bar nachweisen.

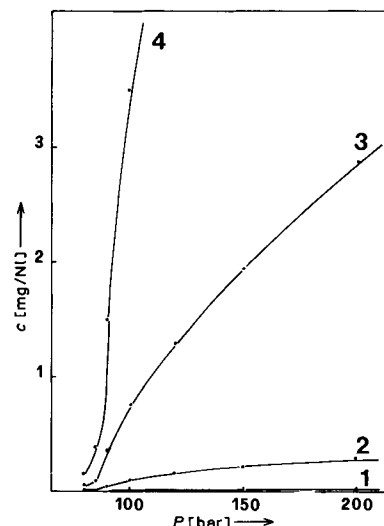


Abb. 10. Abhängigkeit des Löslichkeitsverhaltens einiger Feststoffe in überkritischem Kohlendioxid bei 40°C vom Druck. 1 *p*-Hydroxybenzoesäure, 2 1,8-Dihydroxyanthrachinon, 3 Salicylsäure, 4 Benzoesäure.

Erst ab 85 bar steigt die Konzentration im Gas sehr stark an; bei 100 bar beträgt sie etwa 3,5 mg/Nl, während sich bei 150 bar bereits etwa 9 mg/Nl lösen. Das bedeutet eine 10⁴- bis 10⁵-fache Steigerung gegenüber der Menge, die allein durch den nach der idealen Gasgleichung berechneten Dampfdruck zu erwarten ist.

Die Steigerung der Löslichkeitskurve nimmt zwischen 90 und 100 bar mit zunehmendem Druck wieder ab. Die durch eine OH-Gruppe in *ortho*-Stellung zur Carboxygruppe etwas stärker polare Carbonsäure, die Salicylsäure, zeigt eine geringere Löslichkeit. Ihre Konzentration im Gas beträgt bei 150 bar 2 mg/Nl. Steht dagegen die Hydroxygruppe in *para*-Stellung zur Carboxygruppe, wie bei der *p*-Hydroxybenzoesäure, resultiert eine starke Verringerung der Löslichkeit, bei 150 bar z. B. auf nur etwa 10 µg/Nl.

5. Extraktionsverhalten polarer Naturstoffe im Bereich bis 2500 bar

Giddings et al. gelang es mit überkritischem Kohlendioxid bei höheren Drücken, d. h. hier bei über 1000 bar, unter anderem auch Zucker und Aminosäuren zu lösen und zu chromatographieren^[10]. Modellrechnungen mit dem modifizierten Hildebrand'schen Löslichkeitsparameter ließen ihn auf ein vergleichbares Lösungsvermögen von überkritischem Kohlendioxid und Isopropanol bei vergleichbarer Dichte schließen. Um das Extraktionsverhalten polarer Naturstoffe bis über 2000 bar zu erfassen, führten wir quantitative Löslichkeitsuntersuchungen in diesem Druckbereich mit überkritischem Kohlendioxid und Distickstoffoxid durch^[11]. Für Aminosäuren, Zucker und andere polare Naturstoffe ergaben sich Löslichkeiten von unter 10 µg/Nl, d. h. < 1 : 200000 im überkriti-

schen Kohlendioxid bei über 2000 bar. Diese Stoffe sind in Isopropanol mindestens um den Faktor 500 besser löslich.

Das druckabhängige Löslichkeitsverhalten einiger Substanzen in überkritischen Gasen bei 40°C ist in Abbildung 11 zu sehen. Das Anthrachinonglykosid Frangulin A wurde mit überkritischem Kohlendioxid und überkritischem Distickstoffoxid extrahiert, das entsprechende Aglykon Emodin mit überkritischem Kohlendioxid.

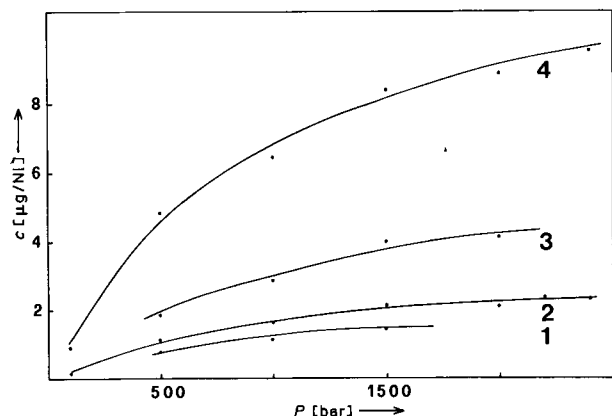


Abb. 11. Abhängigkeit des Löslichkeitsverhaltens einiger Naturstoffe in überkritischen Gasen bei 40°C vom Druck. 1 Frangulin A in Distickstoffoxid, 2 Frangulin A in Kohlendioxid, 3 Aesculetin in Kohlendioxid, 4 Emodin in Kohlendioxid.

Da sich beide Substanzen in der Polarität deutlich unterscheiden, verlaufen ihre Löslichkeitskurven erwartungsgemäß unterschiedlich; das stärker polare Frangulin A ist weniger löslich als Emodin. Beide Löslichkeitskurven haben die gleichen Merkmale, wie sie bei den Zuckern, den Aminosäuren oder auch z. B. der besser löslichen *p*-Hydroxybenzoesäure auftreten; deren Löslichkeit beträgt bei 2000 bar etwa 40 µg/Nl.

Frangulin A zeigt in überkritischem Distickstoffoxid eine um etwa 35 % geringere Löslichkeit als in Kohlendioxid unter gleichen Bedingungen. Die Kurven verlaufen im allgemeinen um so flacher, je höher die Polarität (je geringer die Flüchtigkeit) der Substanzen ist. Mehrere polare Naturstoffe, die mit der Direktkopplung FE-DC mit überkritischem Kohlendioxid bis 400 bar nicht extrahiert und nachgewiesen werden konnten, wurden ebenfalls untersucht. Nur die Löslichkeit von Aesculetin (siehe auch Tabelle 2) konnte quantitativ bestimmt werden (Abb. 11). Gallussäure und 2,6-Dihydroxyanthrachinon z. B. waren dagegen selbst bei 2500 bar so wenig in überkritischem Kohlendioxid löslich, daß die extrahierten Mengen zur quantitativen Bestimmung nicht ausreichten. Die Konzentrationen im komprimierten Kohlendioxid liegen unter 0.1 µg/Nl.

Alle untersuchten festen Naturstoffe zeigen im unteren Druckbereich ab 80 bar die gleiche charakteristische S-förmige Löslichkeitskurve. Der Wendepunkt liegt bei etwa 90 bar; mit zunehmendem Druck wird die Steigung geringer. Dieser Kurvenverlauf setzt sich bei allen untersuchten Substanzen bis über 2000 bar fort. Insgesamt ähneln die Löslichkeitskurven in ihrem druckabhängigen Verhalten der Dichteisotherme bei 40°C (siehe Abb. 1). Diese Abhängigkeit der Löslichkeit von der Gasdichte ist wohl so zu verstehen, daß bei höheren Dichten mehr Teilchen für eine Solvation zur Verfügung stehen. Mit der Zunahme der Dichte nimmt auch die für die Löslichkeit oft zitierte Polarität (DK-Wert) zu. Der Zusammenhang ist nach der Clausius-Mosotti-Gleichung verständ-

lich^[12]. Es besteht allerdings keine lineare Beziehung zwischen der Gasdichte und dem Lösungsvermögen. Die logarithmische Auftragung der Substanzkonzentration für die unterschiedlichsten Stoffe im komprimierten Gas gegen den Logarithmus der Gasdichte zeigt eine direkte Proportionalität in einem Druckbereich zwischen etwa 80 bar und 2000 bar (und höher). Abbildung 12 zeigt einige Beispiele.

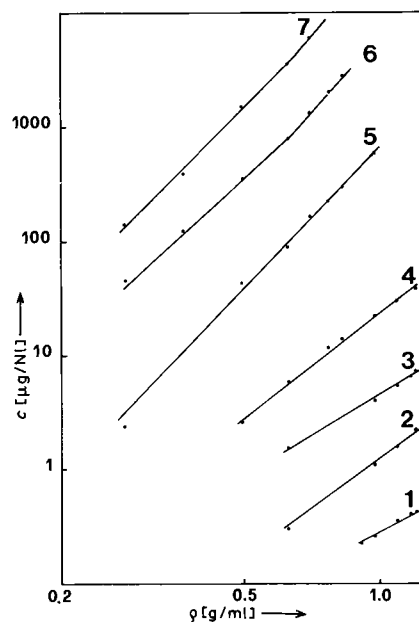


Abb. 12. Abhängigkeit der Löslichkeit einiger Substanzen in Kohlendioxid bei 40°C von der (druckabhängigen) Dichte des Kohlendioxids. 1 Glycin, 2 Frangulin, 3 Emodin, 4 *p*-Hydroxybenzoesäure, 5 1,8-Dihydroxyanthrachinon, 6 Salicylsäure, 7 Benzoesäure.

Die Löslichkeitskurven können durch die einfache Geradengleichung

$$\ln c = m \cdot \ln \rho + \text{const.}$$

beschrieben werden. Die Konstante und der Faktor *m* enthalten Kenngrößen der Subanzeigenschaften. Die Löslichkeit polarer Stoffe im überkritischen Kohlendioxid und Distickstoffoxid hat sich als so gering erwiesen, daß der apparative Aufwand für eine Extraktionsanlage im technischen Maßstab bis 2000 bar und höher nicht zu rechtfertigen ist. Hinzu kommt, daß bei einer Extraktion aus pflanzlichem Material die Verhältnisse noch ungünstiger sind.

6. Besprechung der Ergebnisse und Ausblick

Faßt man die im Mikromaßstab mit unseren Arbeitstechniken gewonnenen Erfahrungen für die Praxis zusammen, so läßt sich sagen, daß die Fluid-Extraktion mit Kohlendioxid vorzugsweise auf lipophile Naturstoffe beschränkt sein wird. Von besonderem Interesse sind die im unteren Druckbereich wenig oberhalb der kritischen Temperatur leicht variierbaren Gasdichten zwischen 0.2 und 0.9 g/ml. Diese einfach zu bewerkstellende vierfache Dichteerhöhung hat eine starke Zunahme des Lösungsvermögens zur Folge und ist in der Nähe der kritischen Temperatur durch relativ geringe Druckerhöhungen zu erreichen. Hinzu kommt, daß man auf umgekehrtem Wege auch eine fraktionierende Abscheidung erreichen kann und so eine weitere Anreicherung bestimmter Stoffe erzielt. Diesen

Effekt haben wir beispielsweise zur Gewinnung matricinreicher Kamillenextrakte ausgenutzt^[13]. Zur Beurteilung von Extraktionsversuchen wird es künftig von besonderer Wichtigkeit sein, die Löslichkeiten quantitativ zu ermitteln. Dies ist ebenfalls mit unserer Methode möglich. Unseres Erachtens sind Löslichkeiten von mindestens 1 : 500 bis 1 : 1000 die Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Fluid-Extraktion im technischen Maßstab.

Ein weiteres Problem, das sich immer wieder stellen wird, ist das Vorliegen des Materials in komplexen Proben. Hier kann bereits mechanisch durch eine Art Mikroverkapselung die Extrahierbarkeit erschwert sein. Es können allerdings auch Salze vorliegen oder starke Wasserstoffbrückenbindungen. Durch geeignete Zusätze zum Extraktionsmaterial wird man einen Teil dieser Hemmnisse beheben können. Wir denken beispielsweise in diesem Zusammenhang an eine Befeuchtung der Droge und gegebenenfalls an Ammoniakzusatz. Weiterhin ist der Einfluß von Schleppern untersuchenswert. Hierunter verstehen wir Substanzen, die zum Extraktionsgas zugemischt eine Erhöhung des Lösungsvermögens, d. h. eine bessere Extra-

hierbarkeit ermöglichen. Auch Konkurrenzphänomenen, wie sie etwa beim Befeuchten der Droge auftreten, wird man künftig größere Beachtung schenken. Mit den uns zur Verfügung stehenden Mikro-Extraktionsmethoden ist es relativ einfach möglich, die Extraktionseigenschaften anderer überkritischer Gase zu untersuchen. Hier werden wohl Ethylen und spezielle Frigene von vorrangigem Interesse sein.

Eingegangen am 1. Juni 1978 [A 233]

- [1] E. Stahl, J. Chromatogr. 37, 99 (1968).
- [2] E. Stahl, Z. Anal. Chem. 261, 11 (1972).
- [3] K. Zosel, DAS 1493190 (1964), Studiengesellschaft Kohle.
- [4] O. Vitzthum, P. Hubert, DAS 2127618 (1971), Studiengesellschaft Kohle.
- [5] E. Stahl, W. Schilz, Z. Anal. Chem. 280, 99 (1976).
- [6] E. Stahl, W. Schilz, Chem.-Ing.-Tech. 48, 773 (1976).
- [7] E. Stahl: Dünnschicht-Chromatographie. 2. Aufl. Springer, Berlin 1967.
- [8] A. Puech, M. Jakob, D. Gaudy, J. Chromatogr. 68, 161 (1972).
- [9] E. Stahl, E. Willing, Planta Med., im Druck (1978).
- [10] J. C. Giddings, M. N. Myers, L. McLaren, R. A. Keller, Science 162, 67 (1968).
- [11] E. Stahl, W. Schilz, Chem.-Ing.-Tech., im Druck (1978).
- [12] G. M. Barrow: Physikalische Chemie. 2. Aufl. Vieweg, Braunschweig 1972.
- [13] E. Stahl, E. Schütz, Arch. Pharm., im Druck (1978).

Chromatographie mit überkritischen fluiden Phasen^[**]

Von Ernst Klesper^[*]

Neue analytische
Methoden (13)

Die Chromatographie mit überkritischen fluiden Phasen vereint in sich Eigenarten sowohl der Gas- als auch der Flüssigkeitschromatographie und weist darüber hinaus eigene spezielle Merkmale auf. Der Diffusionskoeffizient und insbesondere die Viskosität von fluiden Phasen können sich den Werten von Gasen unter niedrigem Druck annähern, während die Lösefähigkeit die von Flüssigkeiten erreichen kann. Darüber hinaus ist es jedoch mit überkritischen fluiden Phasen möglich, die chromatographischen Trennungen sehr wirksam durch Druckprogrammierung zu steuern, da die Löslichkeit mit steigender Dichte ansteigt. Eine Temperaturprogrammierung hingegen kann den entgegengesetzten Effekt wie bei der Gas- oder Flüssigkeitschromatographie haben, denn die Dichte nimmt bei vorgegebenem Druck mit der Temperatur ab. Die Chromatographie mit überkritischen fluiden Phasen dürfte vorzugsweise für Substanzen höheren Molekulargewichtes von Interesse sein. Die Leistungsfähigkeit der Methode wird an mehreren homologen Reihen demonstriert. So ließ sich ein Styrololigomer mit nominal $M_w = 2200$ unter Anwendung eines Druck- und Temperaturprogramms in 40 Spezies zerlegen.

1. Einführung

Substanzen höheren Molekulargewichtes haben keinen ausreichenden Dampfdruck, um mit Niederdruckgasen als mobile Phase chromatographiert werden zu können. Wird der Gasdruck jedoch wesentlich erhöht, etwa in den Bereich des kritischen Druckes, so kann die Lösefähigkeit der mobilen Phase ausreichen, um auch Substanzen sehr hohen Molekulargewichtes durch eine chromatographische Säule zu bewegen. Die Temperatur ist dabei so hoch, daß eine Verflüssigung vermieden wird, d. h. im allgemeinen oberhalb der kritischen Temperatur. Die in der Gaschromatographie häufig verwendeten

permanenten Gase N_2 , He und Ar entwickeln nur geringe Lösefähigkeit bei erhöhten Drücken. Niedrigsiedende Lösungsmittel hingegen, z. B. Pentan und Isopropanol sowie CO_2 , können geeignete Lösungsmittel im fluiden Zustand sein. Die mobile Phase muß jedoch thermisch stabil sein und darf mit Substrat, stationärer Phase und Wandmaterial (Stahl) nicht reagieren.

Die Lösefähigkeit von verdichteten Gasen, insbesondere von Lösungsmitteln oberhalb der kritischen Temperatur, ist schon früh bemerkt worden^[1,2] und wurde später in Übersichtsaufsätzen diskutiert^[3,4]. Es hat jedoch recht lange gedauert, bis verdichtete Gase für chromatographische Trennungen^[5-8] sowie als Extraktionsmittel und Reaktionsmedien verwendet wurden.

Die Chromatographie mit überkritischen fluiden Phasen wurde sowohl mit niedrigsiedenden Lösungsmitteln oberhalb ihrer kritischen Temperatur^[9,10] als auch mit permanenten

[*] Priv.-Doz. Dr. E. Klesper
Institut für Makromolekulare Chemie der Universität
Stefan-Meier-Straße 31, D-7800 Freiburg

[**] Nach einem Vortrag beim Symposium „Extraktion mit überkritischen Gasen“, am 6. Juni 1978 in Essen.