

The use of cysteic acid as an internal standard in amino acid analysis

Norleucine is commonly used as an internal standard in automated amino acid analysis since it emerges separate from other compounds found in normal plasma or urine and has a good color yield, similar to that of other leucines¹. Use of norleucine does have several disadvantages. First, it emerges rather late from the column and, if only the early emerging substances are of interest, time is wasted in waiting for the appearance of the standard; especially with urine, another internal standard is difficult to find that does not emerge coincident with a component, either normal or pathological². Second, if the ninhydrin reagent has lost some reactivity, it may not be obvious until the standard emerges. Finally, we have noticed that on several occasions when urine was being chromatographed a dip before or an actual split of the norleucine peak occurs which makes the standard useless. The reason for this is not known but it would appear to reflect the almost simultaneous emergence of a ninhydrin-negative compound. The above mentioned problems are obviated by the use of cysteic acid as standard. The cysteic acid to be used as standard is applied to the column before the introduction of the sample and is eluted for 15 min with the equilibrating buffer. The sample to be analyzed is then introduced and the procedure completed as usual. The standard emerges at one void volume, about 5 min before the front of the applied sample; therefore, there is no possibility of interference of sample and standard. The color yield of cysteic acid is equivalent to that of leucine (or norleucine)¹.

This investigation was supported by research grants from the National Institutes of Health.

Departments of Biochemistry and Urology,
Bowman Gray School of Medicine,
Winston-Salem, N.C. (U.S.A.)

A. WAINER
J. S. KING, JR.

1 P. B. HAMILTON AND R. A. ANDERSON, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1504.
2 J. S. KING, *Clin. Chim. Acta*, 9 (1964) 441.

Received March 15th, 1965

J. Chromatog., 20 (1965) 143

Verhalten einiger 2,4-Dinitro-6-sek.-butylphenylcarbonate bei der Gaschromatographie

In den letzten Jahren wurden einige Derivate der 2,4-Dinitro-6-alkylphenylcarbonate¹⁻⁴ infolge deren akariziden und fungiziden Eigenschaften als wirksame Bestandteile einiger pestizider Präparate herangezogen (Dinobuton, Dinoceton, Dinoteron)⁵.

Grundlage für die Ausarbeitung einer selektiven analytischen Methode der Bestimmung von Derivaten der 2,4-Dinitro-6-sek.-butylphenylcarbonate wurde das

J. Chromatog., 20 (1965) 143-146

Studium des Verhaltens der einzelnen Verbindungen bei der Gaschromatographie auf verschiedenartigen Säulen.

Unter den Nitroverbindungen wurde die Gaschromatographie bei Chlornitrobenzolen⁶, Nitrobenzol und Nitrotoluolen⁷, Nitrophenolen⁸, Methylnitrobenzoaten⁹, 2,4-Dinitrophenylhydrazonen¹⁰, und Alkylpolynitrat¹¹ benutzt.

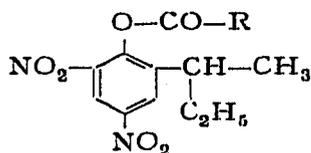
Experimenteller Teil

Die 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenylcarbonate wurden durch die Reaktion der entsprechenden Chlorkohlensäureester mit 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenol in Gegenwart eines salzsäurebindenden Reagens hergestellt. Die Konstanten der hergestellten Verbindungen wurden mit den in der Literatur angegebenen verglichen und die Reinheit der Standardproben chromatographisch nachgeprüft.

Die chromatographischen Arbeiten wurden auf dem Gerät Fractovap C (Carlo Erba, Milano) durchgeführt, das mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet war. Als Trägergas gelangte Stickstoff zur Anwendung. Sämtliche Säulen waren aus

TABELLE I

RELATIVE ELUTIONSVOLUMINA VON DERIVATEN DER VERBINDUNG



R	5% APL 205°	5% SE 301 200°	5% PEGA 1% H ₃ PO ₄ 200°	5% PEG 1500 1% H ₃ PO ₄ 190°
-OCH ₃	0.39	0.43	0.63	0.67
-OC ₂ H ₅	0.48	0.53	0.65	0.67
-OC ₃ H _{7-i}	0.53	0.58	0.58	0.60
-OC ₃ H ₇	0.69	0.75	0.78	0.78
-OC ₄ H _{9-i}	0.80	0.85	0.80	0.80
-OC ₄ H ₉	1.00	1.00	1.00	1.00
-OC ₅ H _{11-i}	1.22	1.20	1.11	1.12
-OC ₅ H ₁₁	1.57	1.43	1.32	1.32
-OC ₆ H ₁₃	2.21	1.98	1.77	1.78
-OC ₇ H ₁₅	3.51	2.82	2.37	2.40
-OC ₈ H ₁₇	5.02	4.08	3.17	3.26
-OCH ₂ -C≡CH	0.64	0.67	1.81	2.12
-OCH ₂ -CH=CH ₂	0.64	0.52	0.94	0.96
-OCH / CH ₃ \ C ₂ H ₅	0.77	0.76	0.74	0.76
-OC ₂ H ₄ Cl	1.20	1.09	2.89	3.50
-SC ₂ H ₅	0.99	0.89	1.14	1.16
2,4-Dinitro-6- <i>sek.</i> - butylphenol	—	—	0.17	0.26

Glas, und der Injektionsraum würde gleichfalls mit einem Röhrchen aus Borsilicatglas versehen.

Als stationäre Phase wurde Apiezon L (APL), Silikonfett E 301 (SE 301), Polyäthylenglykoladipat (PEGA), und Polyäthylenglykol 1500 (PEG 1500) benutzt. Die Säulenfüllung wurde durch Imprägnieren des Trägerstoffs mit einer Lösung der aufgezogenen Phase in einem geeigneten Lösungsmittel und durch Vakuumabdampfen des Lösungsmittels unter Mischen hergestellt. Bei nichtpolaren stationären Phasen wurde als Trägerstoff silanisierter Chromosorb W verwendet. Beim Polyäthylenglykoladipat und Polyäthylenglykol 1500 wurde zur stationären Phase Phosphorsäure hinzugefügt und Celite 545 als Trägerstoff verwendet.

Es wurden 0.2–0.4 μ l einer 1–2 %igen ätherischen Lösung der Probe mittels einer Hamiltonspritze dosiert.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle I werden die relativen Elutionsvolumina der untersuchten Derivate, die sich auf 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-*n*-butylcarbonat ($V_R = 1.0$) auf Säulen mit verschiedener Polarität beziehen, angeführt. Auf allen geprüften Säulen wurden bei den 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-*n*-alkyl- und -isoalkylcarbonaten symmetrische Elutionskurven erhalten. Phosphorsäure wurde zu dem Zweck hinzugefügt, um auch beim 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenol, das oft in technischen Produkten auftritt, eine symmetrische Elutionskurve zu erhalten.

Die Abhängigkeit des Logarithmus des spezifischen Elutionsvolumens von der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylgruppe ist auf einer nichtpolaren Säule mit Apiezon L, beginnend mit dem Methylderivat, linear (Fig. 1). Auf den übrigen Säulen

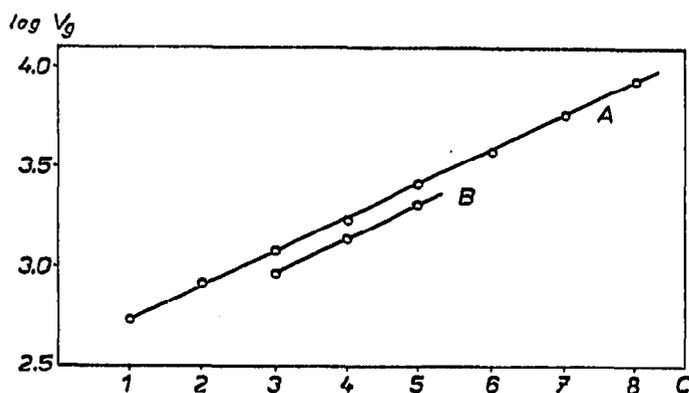


Fig. 1. Abhängigkeit des Logarithmus des spezifischen Elutionsvolumens (V_g) von der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette der 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-*n*-alkyl- (A) und -isoalkylcarbonate (B). Säule: 5% Apiezon L auf silanisiertem Chromosorb W bei 205°.

kommt mit ansteigender Polarität allmählich auch die Ausnahmestellung des ersten Gliedes der homologen Reihe zum Ausdruck, so dass auf der sehr polaren Polyäthylenglykolsäule bereits die Methyl- und Äthyl-derivate gleichzeitig eluiert werden. Wahrscheinlich kann dies durch die Äusserung der Wasserstoffbindung mit der stationären Phase, die beim Methylderivat die stärkste ist, gedeutet werden. Unter den übrigen geprüften Derivaten verläuft die Änderung der Elutionsreihenfolge auf polaren Säulen (Tabelle I) in Übereinstimmung mit deren polarerem Charakter.

Die Chromatogramme einiger Derivate der 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenylcarbonate auf einer Säule mit Polyäthylenglykoladipat werden in Fig. 2 veranschaulicht. Auf dieser Säule wurde die feinste Interaktion (Adsorption oder Retardation) beim Chromatographieren sämtlicher untersuchten Derivate verzeichnet, und diese

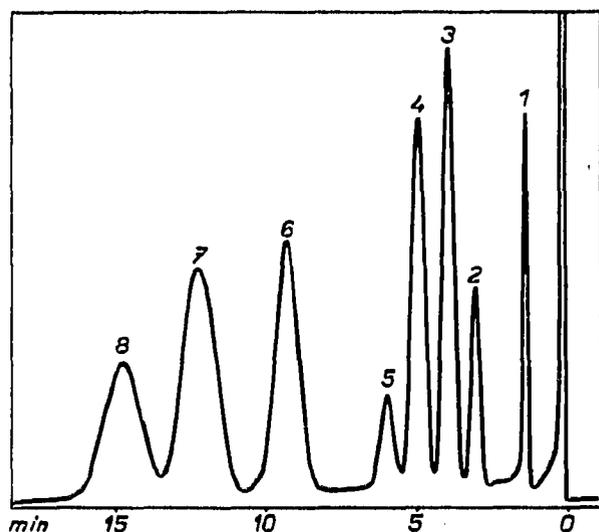


Fig. 2. Chromatogramm einer synthetischen Mischung von 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenylcarbonaten. (1) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenol; (2) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenylisopropylcarbonat; (3) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-*sek.*-butylcarbonat; (4) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenylallylcarbonat; (5) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-äthylthiocarbonat; (6) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-propargylcarbonat; (7) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-*n*-heptylcarbonat; (8) 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenyl-chloräthylcarbonat. Säule: 5 % Polyäthylenglykoladipat und 1 % H_3PO_4 auf Celite 545 bei 205°.

Säule erwies sich für quantitative Zwecke am geeignetsten, wenn eine Bestimmung des 2,4-Dinitro-6-*sek.*-butylphenol notwendig ist.

Die beschriebene Methode wurde für die Nachprüfung der Reinheit von Standardverbindungen und bei der Analyse einiger technischen Produkte benutzt.

Forschungsinstitut für Agrochemische Technologie,
Bratislava-Predmestie (Tschechoslowakei)

JÁN HRIVŇÁK
ZDENĚK ŠŤOTA
JOZEF DOLEŽAL

- 1 Anonym, Fabriek van Chem. Prod. Vondelingenplaat N.V., *Franz. Pat.*, 1,293,748 (1961).
- 2 K. VAN DEN BOOGAART, Fabriek van Chem. Prod. Vondelingenplaat N.V., *Brit. Pat.*, 941,709 (1961).
- 3 Anonym, Murphy Chem. Co. Ltd., *Franz. Pat.*, 1,321,663 (1962).
- 4 R. SMRŽ UND P. WINTERNITZ, *Tschech. Pat.*, 104,563 (1962).
- 5 Anonym, *ISO/TC*, 81 (1964) 200.
- 6 K. J. BOMBAUGH, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 29.
- 7 H. SUHR UND H. ZOLLINGER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 1011.
- 8 J. HRIVŇÁK UND Z. ŠŤOTA, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 30 (1965) 2128.
- 9 B. ALIPRANDI, F. CACACE UND G. CIRANNI, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 2445.
- 10 R. J. SOUKUP, R. J. SCARPELLINO UND E. DANIELCZIK, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 2255.
- 11 E. CAMERA UND D. PRAVISANI, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 2108.

Eingegangen den 22. Februar 1965