

CHROM. 4884

Die Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie bei der Identifizierung aliphatischer Hydroxy- und Dicarbonsäuren

Chromatographisch vorgetrennte Substanzen werden häufig durch anschließende IR-Spektroskopie identifiziert¹. In der qualitativen Analyse von Fettsäuren lässt sich zu ihrer Identifizierung vorteilhaft die Dünnschicht- mit der Gaschromatographie kombinieren^{2,3}. Die Dünnschichtchromatographie auf Cellulose wurde zur Abtrennung der Milchsäure von den aus Muskelgewebe mitextrahierten Säuren eingesetzt⁴. Die sich anschließende Bestimmung der Milchsäure erfolgte nach ihrer Elution mit Wasser mittels chemischer Methoden⁴. Eine Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie erschien bei der Identifizierung von aliphatischen, nicht zur Fettsäurereihe gehörigen Carbonsäuren, von Vorteil.

Methode

Die zu untersuchenden Lösungen und Extrakte von Hydroxy- und Dicarbonsäuren wurden auf Schichten, die zu gleichen Teilen aus Kieselgur und Kieselgel G bestanden, aufgetragen und mit dem Laufmittel: Benzol-Äthanol-NH₄OH (25%) (10:20:5) dünnschichtchromatographiert⁵. Sichtbar gemacht wurden die Säuren vor dem Auskratzen mit Bromkresolgrün. Die abgeschabten Säurebanden blieben zur Elution mehrere Stunden (oder über Nacht) mit Methanol im Überschuss stehen. Die methanolische Lösung der Säuren konnte durch Abfiltrieren mittels Porzellantiegel vom silikathaltigen Trägermaterial abgetrennt werden. Die am Rotavapor eingengten Lösungen wurden nun zum Methylieren mit 0.15–0.3 ml Methanol-BF₃ aufgenommen. Die bei Zimmertemperatur über Nacht gebildeten Methylester konnten ohne weitere Vorarbeiten, in Mengen von 1–4 μ l direkt in den Gaschromatographen injiziert werden. Das miteluierte Bromkresolgrün störte die Gaschromatographie nicht. Die Trennung der Säuremethylester erfolgte auf Reoplex (400) (10% auf Chromosorb W)⁶ mit einem Perkin-Elmer-Gerät F₂₀, mit FID-Detektor ausgestattet. Wie hierzu früher beschrieben⁷, war es vorteilhaft mit Temperaturprogrammierung zwischen 60° und 170° und einer Anstiegsrate von 3°/min zu arbeiten. Die Durchflussgeschwindigkeit des Trägergases Stickstoff betrug 65 ml/min. Der Wasserstoffverbrauch wurde auf eine Strömungsgeschwindigkeit von 33 ml/min und synthetische Luft auf 350 ml/min eingestellt.

Ergebnisse

(a) Untersuchung eines Reinsubstanzgemisches

Aus einer Säurelösung, die jeweils 0.2%ig an Bernsteinsäure und Fumarsäure und 0.4%ig jeweils an Glykolsäure und β -Hydroxybuttersäure sowie 0.4%ig an Na-Lactat war, wurden pro Platte 100–250 μ l strichförmig aufgetragen. Unter den in der Methodik beschriebenen Bedingungen konnten folgende R_F -Werte ermittelt werden: Bernstein-, 0.17; Fumar-, 0.32; Glykol-, 0.42; Milch-, 0.55; und β -Hydroxybuttersäure, 0.65 (Hauptbande). Zusammengehörige Fraktionen von mehreren Platten wurden zum Teil gemeinsam eluiert und zur Gaschromatographie vorbereitet. Jede individuelle Bande der Dünnschichtplatte enthielt nach dem Methylieren im Gas-

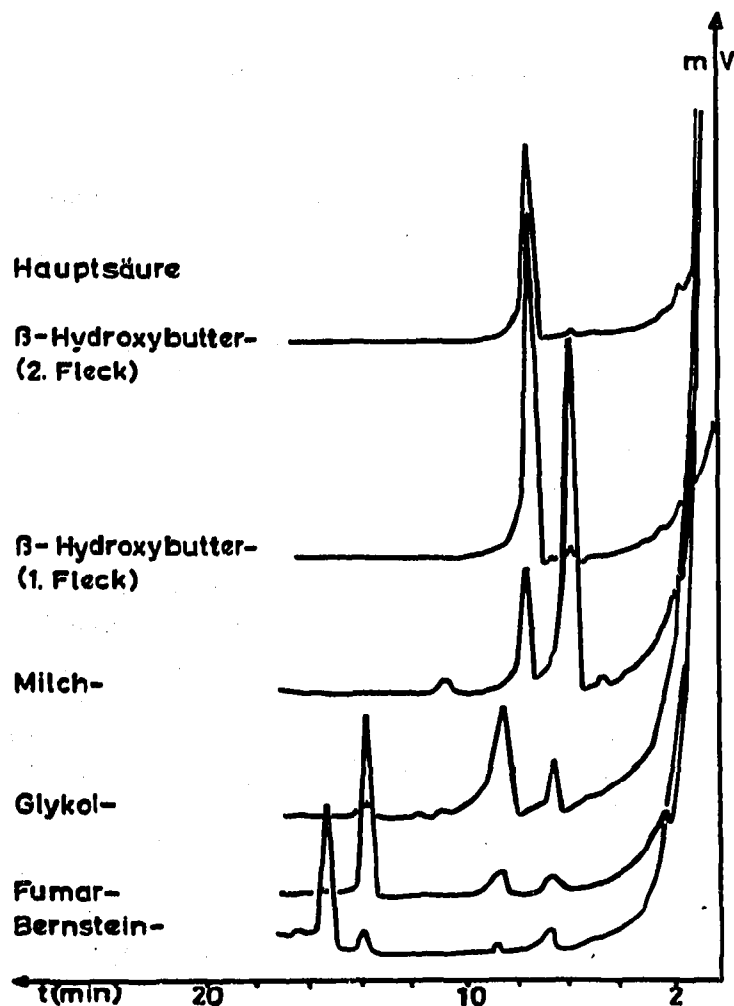


Fig. 1. Gaschromatographie der Methylester der aus Silikatplatten eluierten Säuren eines Reinstanzgemisches, auf Reoplex (400). (Anordnung der Gaschromatogramme entsprechend zunehmender R_F -Werte im Dünnschichtchromatogramm.)

chromatogramm, wie Fig. 1 zeigt, eine Hauptfraktion und geringe Mengen der übrigen Lösungsmittelpartner. β -Hydroxybuttersäure ergab mehrere Banden, von welchen in Fig. 1 nur die ersten beiden aufgezeigt wurden.

(b) *Chromatographie einzelner Hydroxysäuren*

Sowohl β -Hydroxybuttersäure, wie auch 3-Hydroxybuttersäure ergaben bei der Dünnschichtchromatographie neben einer Hauptfraktion, mehrere darüber liegende Nebenfraktionen (vgl. Tabelle I). Nach Elution und Methylieren der letzteren konnte im Gaschromatogramm jedoch für alle nur ein, jeweils an der Stelle der Hauptbande liegender Peak, beobachtet werden.

Es wurde deshalb vermutet, dass es sich bei diesen Nebenfraktionen um kettenförmige Polymere der entsprechenden monomeren Hydroxysäuren handeln könnte. Aus den Estoliden dürften sich beim Eluieren, bzw. Methylieren, die zu Grunde liegenden monomeren Hydroxysäuren zurückgebildet haben.

TABELLE I

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON HYDROXYBUTTERSÄUREN

Laufmittel: benzol-äthanol-NH₄OH (10:20:5); Schicht: Kieselgur-Kieselgel (1:1).

	<i>R_F</i> -Wert	Mengen- verhältnis der Frak- tionen zu- einander ^a
<i>3-Hydroxybuttersäure</i>		
Hauptfraktion	0.55	1.00
Nebenfraktion	0.65	0.39
Nebenfraktion	0.72	0.21
<i>β-Hydroxybuttersäure</i> ^b		
Hauptfraktion	0.55	1.00
Nebenfraktion	0.64	0.15
Nebenfraktion	0.70	0.12
Nebenfraktion (sehr schwach)	0.79	—

^a Nach Elution der Banden gaschromatographisch ermittelt. Innerer Standard: Maleinsäuredimethylester.

^b Zur besseren Ermittlung der Nebenbanden wurden höhere Konzentrationen als im Reinsubstanzgemisch aufgetragen. Dadurch wurden die *R_F*-Werte erniedrigt.

Diese Annahme wird vor allem dadurch gestützt, dass beim Lösen und Methylieren des ringförmigen Lactids, der Milchsäure, im Gaschromatogramm ebenfalls nur ein einzelner Peak an der Stelle des entsprechenden Methylesters beobachtet wird. Bei der Dünnschichtchromatographie des in Wasser gelösten Lactids konnte jedoch auch Lactylmilchsäure, das Zwischenprodukt der hydrolytischen Spaltung, nachgewiesen werden.

Wie aus Tabelle I entnommen werden kann, lassen sich die beiden isomeren Hydroxybuttersäuren dünnschichtchromatographisch unter angegebenen Bedingungen nur schwer von einander trennen. Eine gaschromatographische Differenzierung ihrer Methylester ist jedoch auf Reoplex (400) ohne Schwierigkeiten möglich, da der Methylester von 3-Hydroxybuttersäure wesentlich später, als derjenige von β-Hydroxybuttersäure, aus der Säule austritt (vgl. Fig. 2).

Die Methylester von Glykol- und β-Hydroxybuttersäure liegen dagegen in ihren Retentionsvolumen auf Reoplex (400) so nahe zusammen (vgl. Fig. 2), dass sich bei ihnen für den qualitativen Nachweis, die Dünnschichtchromatographie anbietet (vgl. *R_F*-Werte, Abschnitt a).

(c) Säureuntersuchungen an Lebensmitteln

Leber. Aus Rinderleber wurden, wie früher für Muskelgewebe und Fleischerzeugnisse⁷ beschrieben, die Säuren extrahiert. Der Säureextrakt konnte dünnschichtchromatographisch in die Fraktionen A–G aufgetrennt werden (vgl. Fig. 3). Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende *R_F*-Werte ermittelt: Frakt. B, 0.09; Frakt. C, 0.19; Frakt. D, 0.41; Frakt. E, 0.56; Frakt. F, 0.68; und Frakt. G, 0.75. Bei den Fraktionen B, C, D und F reichte die Konzentration auf dem Dünnschichtchromatogramm für eine anschließende Gaschromatographie aus (vgl. Fig. 4). Übereinstimmend mit

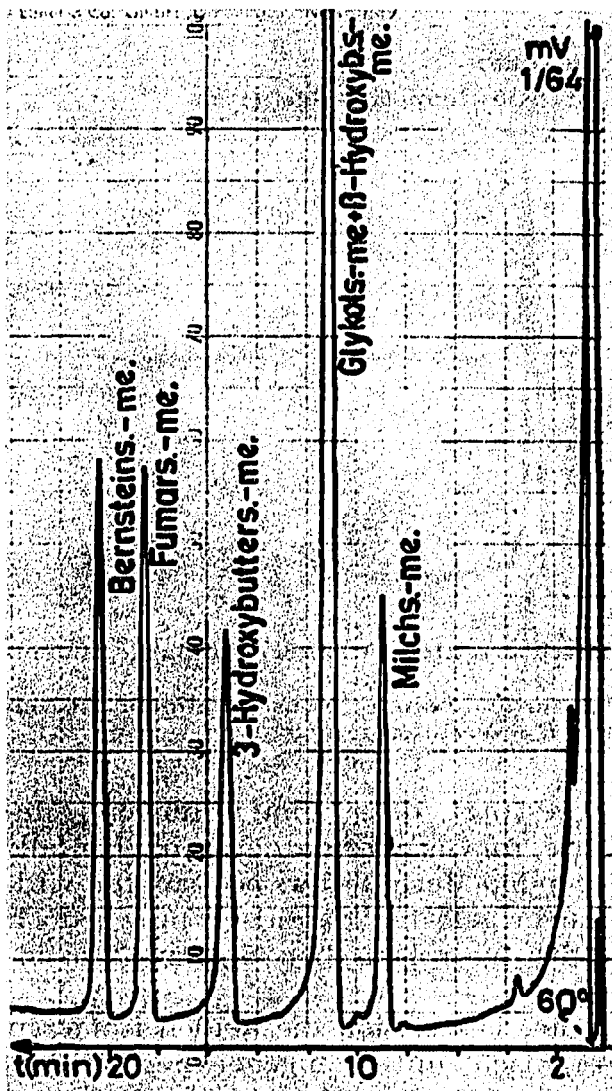


Fig. 2. Gaschromatographie der Methylester eines Reinsubstanzgemisches auf Reoplex (400), temperaturprogrammiert ab 60°, 3°/min. Empfindlichkeit 1/64 der maximalen Geräteempfindlichkeit. Abkürzung: me. = Methylester.

beiden Verfahren wurde damit im Vergleich mit Reinsubstanzchromatogrammen Fraktion B als Bernsteinsäure, Frakt. C als Fumarsäure und Frakt. D als Milchsäure identifiziert. In Fraktion F wurde mittels Gaschromatographie Milchsäure nachgewiesen. Entsprechend den vorhergehenden Ausführungen dürfte es sich hierbei um die Bande von Lactylmilchsäure handeln (vgl. Abschnitt b). In Fraktion G waren höhere Fettsäuren angereichert. Die hier eingesetzten Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie eigneten sich jedoch nicht für eine vollständige Abtrennung der Fettsäuren von den übrigen Fraktionen. Die Gaschromatographie (in Fig. 4) wurde deshalb nach Erscheinen der Methylester der aliphatischen Nichtfettsäuren abgebrochen. Bei Fraktion E dürfte es sich, wie Vergleichsuntersuchungen an Hähnchenmuskulatur mit entsprechend höheren Säurekonzentrationen zeigten, um 3-Hydroxybuttersäure handeln. Bei Leber reichte die Konzentration dieser Fraktion nicht zur Aufarbeitung für ein Gaschromatogramm aus.

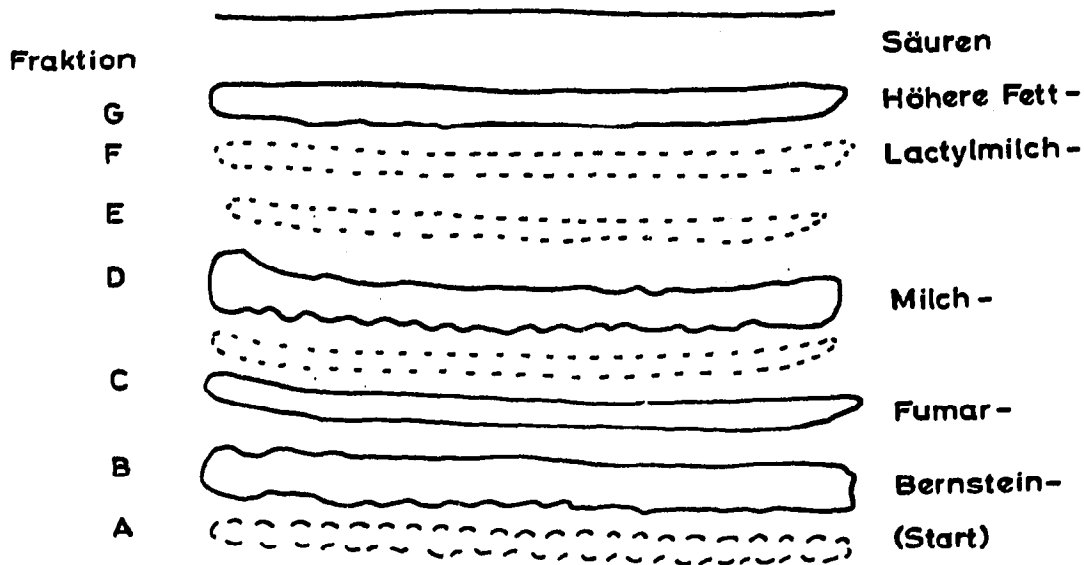


Fig. 3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der aus Leber extrahierbaren Säuren in Fraktionen. Schicht: Kieselgur-Kieselgel (1:1). Laufmittel: Benzol-Äthanol-NH₄OH (10:20:5).

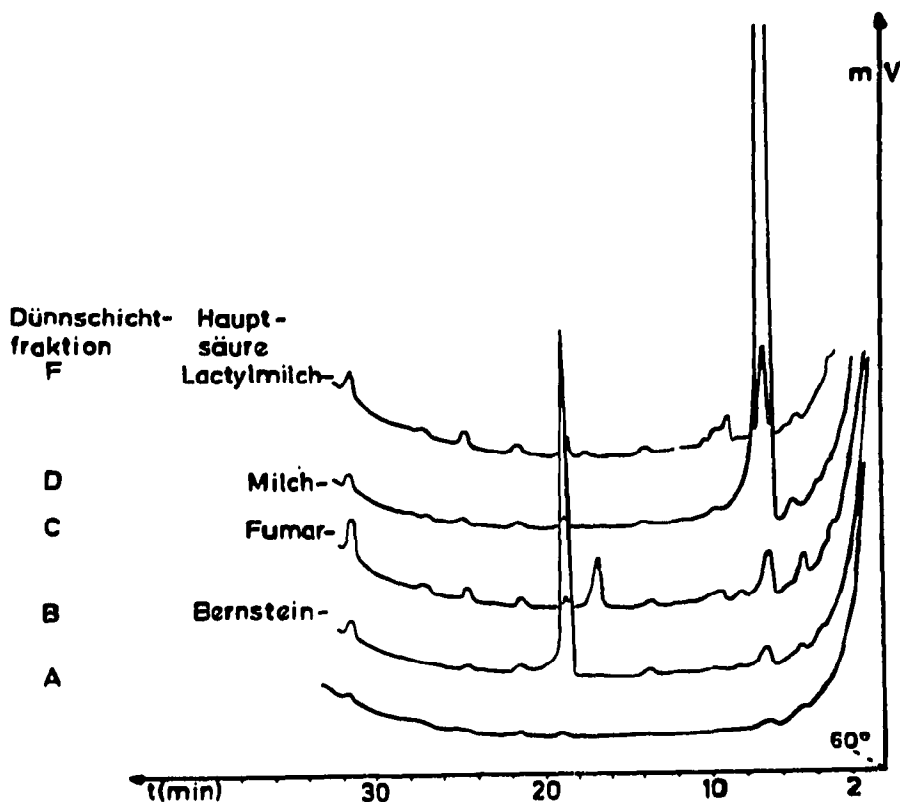


Fig. 4. Gaschromatographie der Methylester von dünnschichtchromatographisch vorgetrennten Säurefraktionen aus Leber. (Anordnung der Gaschromatogramme der einzelnen Banden entsprechend dem Dünnschichtchromatogramm in Fig. 3.)

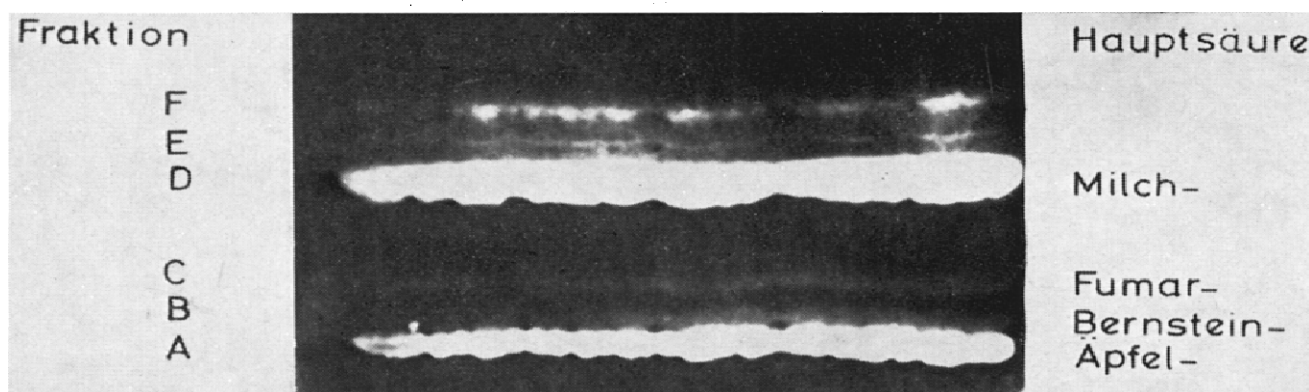


Fig. 5. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der aus Apfelsaft extrahierbaren Säuren in Fraktionen. Schicht: Kieselgur-Kieselgel (1:1). Laufmittel: Benzol-Äthanol-NH₄OH (10:20:5).

Apfelsaft. Entsprechend wie bei Leber, konnte bei der Säureuntersuchung eines käuflichen Apfelsaftes verfahren werden. Die Säuren wurden mit Äther ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch in die Fraktionen A–F aufgetrennt (vgl. Fig. 5). Auf Grund der R_F -Werte in der Dünnschicht und der Retentionszeiten der Methyl-ester auf Reoplex (400), im Vergleich zu Reinsubstanzchromatogrammen, erfolgte die Identifizierung (vgl. Fig. 5 und 6).

In Fraktion A (R_F 0.05) wurde Äpfelsäure und in geringer Menge Citronensäure (in Fig. 6 nicht angezeichnet) nachgewiesen. Fraktion B (R_F 0.12) enthielt Bernsteinsäure; Fraktion C (R_F 0.24) Fumarsäure und Fraktion D (R_F 0.47) die in frischem Kernobst nicht vorhandene Milchsäure. Fraktion E (R_F 0.51) und Fraktion F (R_F 0.60) wurden nicht identifiziert (vgl. Fig. 5).

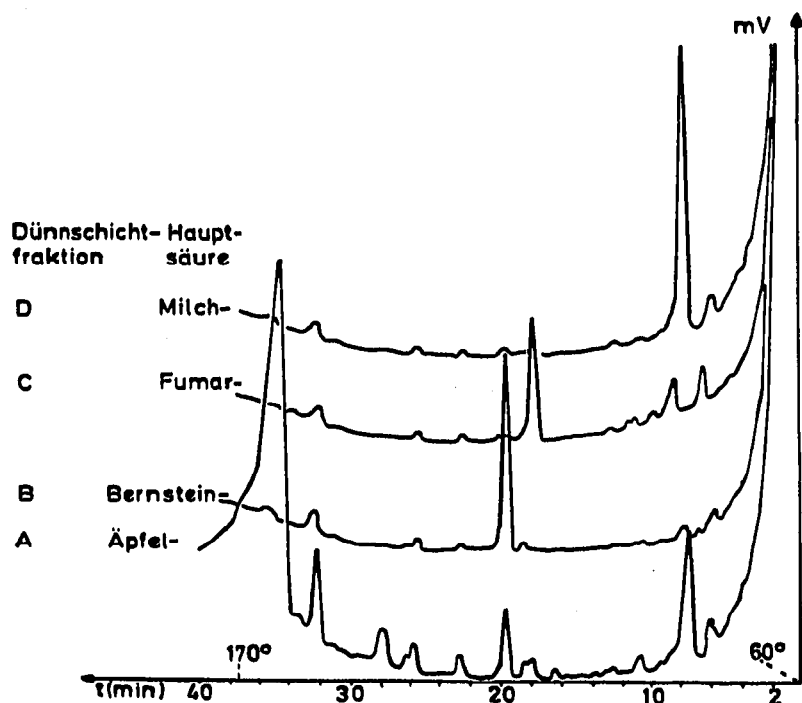


Fig. 6. Gaschromatographie der Methyl-ester von dünnschichtchromatographisch vorgetrennten Säurefraktionen aus Apfelsaft, temperaturprogrammiert 60°–170°, 3°/min. (Anordnung der Gaschromatogramme entsprechend dem Dünnschichtchromatogramm in Fig. 5.)

Schlussfolgerungen

Die Empfindlichkeit des Säurenachweises durch Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie hängt sowohl vom Grad der Eluierbarkeit einer Säure aus dem silikathaltigen Trägermaterial, wie auch von der Intensität des Elektronenstromes beim Ionisieren der Substanz im FID-Detektor ab. Bei Bernstein- und Fumarsäuredimethylester (hiermit vergleichbar ist auch Maleinsäuredimethylester) ist die Empfindlichkeit im FID-Detektor höher, als bei den überprüften Hydroxysäuren. Bei den letztgenannten ist der Nachweis bei Milchsäuremethylester wiederum empfindlicher, als für Glykolsäuremethylester. Die überprüften Dicarbonsäuren lassen sich ausserdem offenbar leichter als die Hydroxysäuren aus dem Silikat-Trägermaterial eluieren.

Um die hochsiedenden Methylester von Äpfelsäure und Citronensäure nachzuweisen, ist es vorteilhafter in der Gaschromatographie bei 170° isotherm zu arbeiten. Citronensäure kann mit der angegebenen Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie schlecht nachgewiesen werden, da ihre Elution aus der Dünnschichtplatte unzureichend ist, und ihr Methylester ausserdem nur eine geringe Flüchtigkeit hat. Durch die Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie konnte neben den monomeren Hydroxysäuren auch der Anteil der gaschromatographisch allein nicht bestimmbareren Estolide für β -Hydroxybutter- und 3-Hydroxybuttersäure abgeschätzt werden.

*Institut für Lebensmittelkunde,
Bischofsholer Damm 15, 3 Hannover (B.R.D.)*

U. STOLL

- 1 *Perkin-Elmer Tips 40UR*, Febr. 1970.
- 2 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1967, S. 390.
- 3 P. MAZLIAK, *Fruits*, 20 (1965) 559.
- 4 A. SCHWEIGER UND H. GÜNTHER, *J. Food Sci.*, 29 (1964) 808.
- 5 E. BANCHER, H. SCHERZ UND V. PREY, *Mikrochim. Acta*, (1963) 713.
- 6 D. T. CANVIN, *Can. J. Biochem.*, 43 (1965) 1281.
- 7 U. STOLL, *J. Chromatog.*, 44 (1969) 537.

Eingegangen am 14. Mai 1970

J. Chromatog., 52 (1970) 145-151