

CHROM. 554I

Zur gaschromatographischen Bestimmung von Di- und Tricarbonsäuren

Im intermediären Stoffwechsel treten verschiedene Di- und Tricarbonsäuren auf, deren quantitative Erfassung bisher Schwierigkeiten bereitet hat. Zur Lösung dieses Problems bietet sich die gaschromatographische Trennung und Bestimmung als besonders geeignet an. Allerdings sind die genannten Säuren für eine direkte gaschromatographische Analyse zu wenig flüchtig. Man muss sie deshalb in flüchtige Derivate, wie Ester kurzkettiger Alkohole, überführen. Von den hierzu gebräuchlichen Methoden (HCl-Methanol¹⁻³, Bortrifluorid-Methanol³⁻⁵, Diazomethan⁶) ist die Veresterung mit HCl-Methanol bzw. HCl-Äthanol vorzuziehen³.

Die quantitative Erfassung der Säuren erfolgte bisher über eine Eichkurve. Hierbei wurde ein Signal des Detektors (Peakhöhe, Peakfläche) in Beziehung zur Probenmenge gesetzt^{2,4,5}. Die Ergebnisse dieser Methode waren aber nur schlecht reproduzierbar.

Aus diesem Grunde wurde die von GEHRKE UND STALLING⁷ für die Bestimmung von Aminosäuren ausgearbeitete Methode der "Relative Molar Response" (RMR) auf ihre Anwendbarkeit für die quantitative gaschromatographische Analyse von Di- und Tricarbonsäuren geprüft.

Arbeitsbedingungen

Als Testsubstanzen wurden die Diäthyl- bzw. Triäthylester der Malon-, Oxal-, Fumar-, Bernstein- und der Citronensäure (p.A.) und als interner Standard Myristinsäureäthylester (puriss.) verwendet. Die Säuren, Oxal-, Fumar-, Malon-, Bernstein- und Citronensäure (p.A.), wurden im geschlossenen Gefäß mit HCl-Äthanol (1:9 w/w; wasserfrei) bei Raumtemperatur während 24 Std. verestert. Eine definierte Menge des internen Standards wurde der Mischung gleichzeitig zugesetzt. Zur Bindung des Wassers wurde dem Reaktionsgemisch Natriumsulfat sicc. beigefügt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit veränderte die Ausbeute nicht.

Nach der Veresterung wurde das Gemisch direkt in den Gaschromatographen eingespritzt. Chromatographiert wurde unter folgenden Arbeitsbedingungen:

| | |
|----------------------|---|
| Gaschromatograph: | Beckman GC-4 |
| Trennsäulen: | DEGS auf Celite 545, 80/120 mesh, 10% |
| Säulendimensionen: | 200 cm × 1/8 Zoll i.D., rostfreier Stahl |
| Arbeitstemperaturen: | Einspritzstelle 220°; Säule 10 min 160° isotherm, auf 190° mit 3° pro min programmiert; Detektor 250° |
| Trägergas: | N ₂ , 30 ml/min |
| Detektor: | FID; H ₂ , 50 ml/min; Luft, 250 ml/min |
| Integrator: | Infotronics CRS-104 |
| Recorder: | W-W high speed, 1 mV |
| Probengröße: | 5-10 µl |

Ergebnisse

In Analogie zum Vorgehen von GEHRKE UND STALLING⁷ gilt bei der quantitativen Auswertung der Gaschromatogramme folgende Beziehung*

* O.S. = Organische Säure; I.S. = Interner Standard; Mal. = Malonsäure.

$$\text{Mol}_{\text{O.S.}} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{O.S.}}}{\frac{\text{Peakfläche}_{\text{I.S.}}}{\text{Mol}_{\text{I.S.}}} \cdot \text{RMR} \frac{\text{Mal.}}{\text{I.S.}} \cdot \text{RMR} \frac{\text{O.S.}}{\text{Mal.}}}$$

wobei gilt

$$\text{RMR} \frac{\text{Mal.}}{\text{I.S.}} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Mal.}} \cdot \text{Mol}_{\text{I.S.}}}{\text{Mol}_{\text{Mal.}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{I.S.}}} \quad (\text{a})$$

$$\text{RMR} \frac{\text{O.S.}}{\text{Mal.}} = \frac{\text{Molar Response}_{\text{O.S.}}}{\text{Molar Response}_{\text{Mal.}}} \quad (\text{b})$$

$$\text{RMR} \frac{\text{Mal.}}{\text{Mal.}} = 1 \quad (\text{c})$$

Um die verschiedenen Di- und Tricarbonsäuren im Gemisch quantitativ bestimmen zu können, wurden zuerst die unter (a) und (b) aufgeführten *RMR*-Werte ermittelt.

(a) Eine bestimmte Menge an Malonsäurediäthylester wurde mit einem genau definierten Anteil des internen Standards gemischt und chromatographiert. Für den *RMR*-Wert ergab sich

$$\text{RMR} \frac{\text{Mal.}}{\text{I.S.}} = 0.280 \text{ (Mittelwert aus Mehrfachbestimmungen)}$$

(b) Je 1 Mol Äthylester der Oxal-, Malon-, Bernstein-, Fumar- und Citronensäure wurden im Gemisch nach den vorliegenden Arbeitsbedingungen chromatographiert. Unter Berücksichtigung der Beziehung

$$\text{RMR} \frac{\text{Mal.}}{\text{Mal.}} = 1.00$$

ergaben sich für die verwendeten Säureestern die in Tabelle I wiedergegebenen *RMR*-Werte.

Zur Überprüfung der ermittelten *RMR*-Werte und der Reproduzierbarkeit der

TABELLE I

DIE *RMR*-WERTE FÜR DIE ÄTHYLESTERN DER OXAL-, FUMAR-, MALON-, BERNSTEIN- UND CITRONENSÄURE

| Äthylester | $\text{RMR} \frac{\text{O.S.}}{\text{Mal.}}$ |
|----------------------------|--|
| Oxalsäurediäthylester | 0.90 |
| Malonsäurediäthylester | 1.00 |
| Fumarsäurediäthylester | 1.31 |
| Bernsteinsäurediäthylester | 1.33 |
| Citronensäuretriäthylester | 1.09 |

TABELLE II

DIE MITTLEREN AUSBEUTEN FÜR DIE EINZELNEN ORGANISCHEN SÄUREN

| Organische Säure | Ausbeute \pm mittlerer Fehler (%) | Schwankungsbereich (%) |
|------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Oxalsäure | 99 \pm 0.75 ^a | 93-104 |
| Malonsäure | 101 \pm 0.56 | 98-105 |
| Fumarsäure | 101 \pm 0.62 | 97-106 |
| Bernsteinsäure | 101 \pm 0.53 | 97-105 |
| Citronensäure | 100 \pm 0.98 | 94-108 |

beschriebenen Methode wurden fünfzehn Gemische, die neben dem internen Standard je 50 mg Oxal-, Fumar-, Malon-, Bernstein- und Citronensäure enthielten, verestert und chromatographiert. Die mit Hilfe der zuvor bestimmten *RMR*-Werte ermittelten Ausbeuten für die verschiedenen Säuren sind in Tabelle II zusammengefasst.

Aus den Werten in Tabelle II ist ersichtlich, dass die organischen Säuren mit grosser Genauigkeit quantitativ erfasst werden konnten. Der mittlere Fehler betrug 0.53% bis 0.98%. Die Ergebnisse sind also gut reproduzierbar.

Agrikulturchemisches Institut,
Institut für Tierernährung,
ETH, Zürich (Schweiz)

P. BALTHASAR
H. VOGTMANN
A. L. PRABUCKI

- 1 T. S. RUMSEY UND C. H. NOLLER, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 325.
- 2 K. SALIMEN UND P. KOIVISTOINEN, *Acta Chim. Scand.*, 21 (1967) 1495.
- 3 D. S. ZAURA UND J. METCOFF, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1781.
- 4 M. A. HARMON UND H. W. DOELLE, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 157.
- 5 E. HAUTALA UND M. L. WEAVER, *Anal. Biochem.*, 30 (1969) 32.
- 6 L. D. QUIN UND M. E. HOBBS, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1400.
- 7 C. W. GEHRKE UND D. L. STALLING, *Sep. Sci.*, 2(1) (1967) 101.

Eingegangen am 24. Mai 1971; geänderte Fassung am 5. Juli 1971

J. Chromatogr., 61 (1971) 343-345