

CHROM. 7986

GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER AMEISENSÄURE ALS BENZYLESTER UNTER VERWENDUNG VON PHENYLDIAZOMETHAN ALS BENZYLIERUNGSMITTEL

ERWIN K. DOMS

Chemisches Untersuchungslaboratorium der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, Bundesallee 50, D-33 Braunschweig (B.R.D.)

(Eingegangen am 17. Juli 1974; geänderte Fassung eingegangen am 30. September 1974)

SUMMARY

Gas chromatographic determination of formic acid after conversion into its benzyl ester by phenyldiazomethane

A simple gas chromatographic method is described for the determination of formic acid. Formic acid is converted into its benzyl ester by means of phenyldiazomethane. As a result of its low volatility this derivative (b.p. 202°/747 mm) can be easily separated from the solvent without previous concentration of the sample solution. As stationary phases SE-30, FFAP and OV-17 are used.

EINLEITUNG

Die meisten Arbeiten, welche sich mit der gaschromatographischen Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (FFS) befassen, lassen die Ameisensäure unberücksichtigt. Der Grund ist darin zu suchen, dass die Ameisensäure als Anfangsglied der homologen Reihe der Fettsäuren im Vergleich zu den anderen Homologen Besonderheiten aufweist, welche auch ihre gaschromatographischen Eigenschaften beeinflussen. So wird sie vom Flammenionisationsdetektor (FID) im Gegensatz zu den anderen FFS nicht angezeigt. Nun werden aber für gewöhnlich die FFS von der Essigsäure ab in wässriger Lösung mit Hilfe des FID bestimmt¹⁻¹¹, wobei Ameisensäure zur Vermeidung des Memory-Effektes zugesetzt wird. Bei Einbeziehung der Ameisensäure in die Bestimmung muss demnach auf die Anwendung des hochempfindlichen FID und natürlich auf den Ameisensäurezusatz zur Unterdrückung des "ghosting" verzichtet werden. Der weniger empfindliche Wärmeleitfähigkeitsdetektor spricht zwar auf Ameisensäure an, aber im Gegensatz zum FID auch auf Wasser, wobei die Trennung des Ameisensäurepeaks vom Wasserpeak Schwierigkeiten bereitet. Ist Essigsäure zugegen, so wirft auch deren Trennung von der Ameisensäure Probleme auf. Versuche, durch Verwendung verschiedenen Säulenfüllmaterials^{1,4,6-11}, besonderer Detektoren², durch Einsatz "nasser" Trägergase^{3,5} oder spezieller Lösungsmittel¹⁰ die Probleme zu lösen, brachten Fortschritte, jedoch gingen diese meist an

Kosten der methodischen oder apparativen Einfachheit. Von den Derivaten der Ameisensäure erwies sich der Methylester (Kp. 31.8°) wegen seiner Leichtflüchtigkeit und der damit verbundenen schwierigen Trennbarkeit seines Peaks vom Lösungsmittelpeak als wenig geeignet für die gaschromatographische Ameisensäurebestimmung^{12,13,14}, wenn auf den Gebrauch von Kapillarkolonnen verzichtet werden soll¹³. Bessere Trenneigenschaften besitzt der Butylester (Kp. 106.8°)¹⁵. Auch das Anilid wurde zur Bestimmung herangezogen^{16,17}. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Ameisensäuregehalt von Silagen wurde nun ein Verfahren zur Bestimmung der Ameisensäure in Form ihres schwerflüchtigen Benzylesters (Kp. 202–203°/747 Torr) ausgearbeitet, wobei die Veresterung in einfacher Weise mit Phenyldiazomethan (PDM) vorgenommen wurde.

EXPERIMENTELLES

Darstellung von p-Tosylbenzylamid

Diese Verbindung wurde nach dem Verfahren von Holmes und Ingold¹⁸ aus *p*-Tosylchlorid und Benzylamin dargestellt. Ausbeute: 94 %, Fp. 114°.

Darstellung von p-Tosyl-N-nitroso-benzylamid

Unter Abänderung der Methode B von White¹⁹ wurden 26.1 g (0.1 M) *p*-Tosylbenzylamid in einem Gemisch von 200 ml Essigsäureanhydrid und 300 ml Eisessig gelöst, auf etwa 5° abgekühlt und im Laufe von 3 h unter Schütteln portionsweise mit 25 g Natriumnitrit versetzt. Das grün gefärbte Reaktionsgemisch wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und dann in 1 l kaltes Wasser gegossen. Der farblose, watteartige, kristalline Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausbeute: 97 %, Fp. 87–89°.

Darstellung von PDM

14.5 g (0.05 M) *p*-Tosyl-N-nitroso-benzylamid wurden in 100 ml Äther suspendiert und nach dem Kühlen in Eiswasser mit einer Lösung von 2.25 g KOH in 30 ml Methanol versetzt. Die anfängliche Gelbfärbung ging langsam unter vorübergehendem schwachem Schäumen des Reaktionsgemisches in Rot über. Nach 5 min war die Hauptreaktion beendet. Man liess das Ganze noch eine halbe Stunde im Kühlschrank stehen, schüttelte die bordeauxrote ätherische Lösung fünfmal mit kaltem destilliertem Wasser aus, trocknete mit wasserfreiem Natriumsulfat und saugte durch eine mit Natriumsulfat bedeckte Fritte ab. Die PDM-Lösung wurde schliesslich in einem Messkolben mit trockenem Äther auf 100 ml aufgefüllt. Ausbeute: 38 %.

Modellösungen

Durch Entnahme aliquoter Volumina aus einer ätherischen Stammlösung von 1 g Ameisensäure pro 100 ml Lösung wurden Modellösungen hergestellt, welche 10–200 mg Ameisensäure pro 100 ml enthielten und damit Probelösungen von Silagen mit einem Gehalt von 0.1–2.0% Ameisensäure entsprachen²⁰. Bei der Injektion von jeweils 5 µl Modellösung in den Gaschromatographen betrug dementsprechend die Eingabe 0.5–10.0 µg Ameisensäure.

Benzylierung mit PDM

Den Modellösungen wurden aliquote Volumina entnommen (je 10 ml) und in Kölbchen mit überschüssiger PDM-Lösung versetzt (je 2 ml). Die Kölbchen wurden verschlossen und 2 h stehen gelassen. Den noch deutlich rotgefärbten Lösungen wurde dann zur Beseitigung des PDM-Überschusses Propionsäure zugesetzt (je 0.2 ml). Die wieder verschlossenen Kölbchen blieben stehen, bis nach einigen Minuten die Entfärbung der Lösungen anzeigte, dass kein PDM mehr vorhanden war. Dann wurden die Lösungen der gaschromatographischen Bestimmung zugeführt.

Gaschromatographie

Mit einer 10- μ l-Hamiltonspritze wurden je 5 μ l der Benzylierungslösungen in einen Gaschromatographen des Modelles GC-4 der Fa. Beckman injiziert. Gearbeitet wurde mit einem Doppel-FID und mit Helium als Trägergas (60 ml/min). Von den untersuchten Trennsäulen erwiesen sich folgende als besonders gut geeignet: (a) 10% SE-30 auf Chromosorb G AW DMCS mit 60–80 mesh, Stahlsäule (1.80 m \times 0.25 Zoll I.D.); (b) 10% FFAP auf Chromosorb W AW mit 80–100 mesh, Glassäule (2.00 m \times 0.3 cm I.D.); (c) 10% OV-17 auf Chromosorb W mit 60–80 mesh, Glassäule (2.00 m \times 0.3 cm I.D.). Die Säulentemperatur betrug für (a) 150°, (b) 130° und (c) 130°, die Temperaturen für Probengeber und Detektor wurden konstant auf 200° bzw. 250° gehalten, die Abschwächung war auf 1×10^4 oder 5×10^3 eingestellt, der Papiervorschub des Schreibers auf 0.5 Zoll pro Minute.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Arbeit bezweckte, die Ameisensäure durch Reaktion mit PDM in ihren schwerflüchtigen und daher auch in geringen Konzentrationen gut vom Lösungsmittel trennbaren Benzylester umzuwandeln und in dieser Form quantitativ gaschromatographisch zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass sich PDM ausgezeichnet zum Benzylieren von Ameisensäure eignet. Die Reaktion vollzog sich fast augenblicklich, was am Verschwinden der bordeauxroten Färbung des PDM erkennbar war. Der für die quantitative Umsetzung notwendige Überschuss an PDM wurde durch Zugabe von Propionsäure beseitigt, um Störungen durch dessen Artefakte im Gaschromatogramm zu vermeiden. An Stelle von Propionsäure kann, wie Versuche ergaben, jede andere homologe Säure verwendet werden, doch nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Kettenlänge ab. Die Bestimmung ist nur wenig abhängig von der Benzylierungsdauer sowie von der zur Beseitigung des PDM-Überschusses angewandten Säuremenge, jedoch in starkem Masse von der zum Benzylieren zugesetzten Menge an PDM. Die Veresterung ist daher unter möglichst konstanten Bedingungen auszuführen. Wegen der Zersetzlichkeit des PDM wurde auf dessen Reindarstellung durch Destillation verzichtet und die Benzylierung mit der wie beschrieben erhaltenen ätherischen PDM-Lösung ausgeführt. Dabei wurde die Anwesenheit von Nebenprodukten der PDM-Darstellung bewusst in Kauf genommen, da deren Peaks im Gaschromatogramm die Ameisensäurebestimmung nicht stören (Fig. 1–6). PDM lässt sich in ätherischer Lösung monatelang bei -20° im Gefrierschrank einsatzbereit aufbewahren. Auch *p*-Tosyl-N-nitroso-benzylamid, die Ausgangssubstanz zur Darstellung des PDM, sollte kühl gelagert werden, weil sie sich —wie es der Autor er-

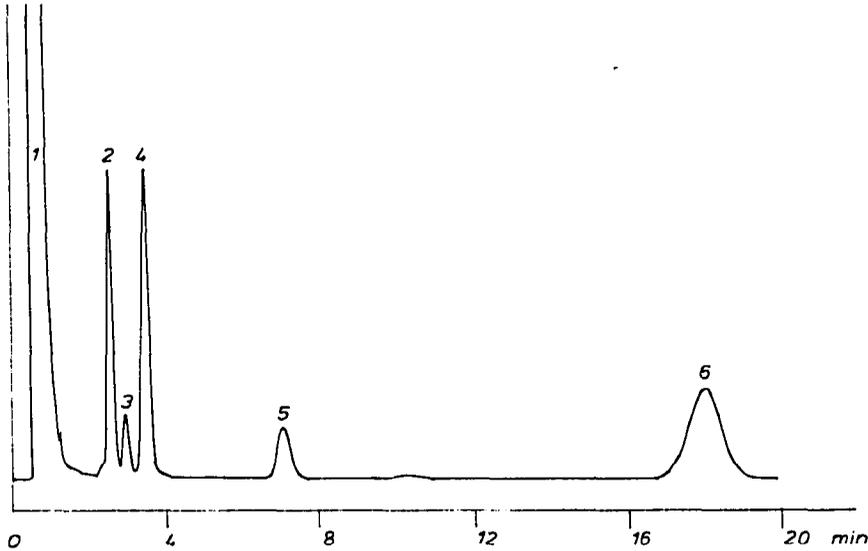


Fig. 1. Chromatogramm einer Lösung von Ameisensäurebenzylester in Äther. Die Ameisensäure wurde mit PDM benzyliert und der Überschuss an PDM mit Propionsäure beseitigt. 1 = Äther; 4 = Ameisensäurebenzylester; 5 = Propionsäurebenzylester; 2,3,6 = Nebenprodukte der PDM-Darstellung. Der Propionsäurepeak wird vom Ätherpeak überlagert. Trennsäule: 10% SE-30.

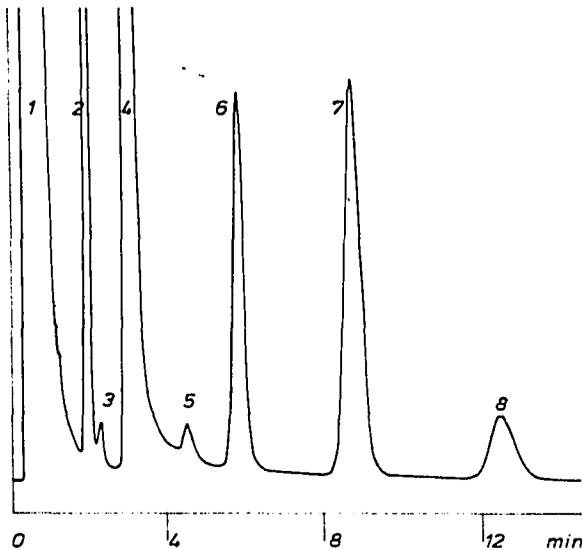


Fig. 2. Chromatogramm einer Lösung von Ameisensäurebenzylester in Äther. Die Ameisensäure wurde mit PDM benzyliert und der PDM-Überschuss mit Propionsäure beseitigt. 1 = Äther; 6 = Ameisensäurebenzylester; 7 = Propionsäurebenzylester; 4 = Propionsäure; 2,3,5,8 = Nebenprodukte der PDM-Darstellung. Trennsäule: 10% FFAP; 10% OV-17 gibt ein ähnliches Chromatogramm.

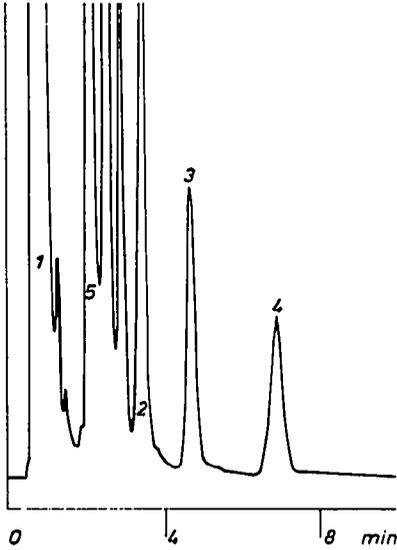


Fig. 3. Chromatogramm einer Lösung von Ameisensäure-, Essigsäure- und Propionsäurebenzylester in Äther. Die Ameisen-, Essig- und Propionsäure wurden mit PDM benzyliert. Der PDM-Überschuss wurde mit Capronsäure beseitigt. 1 = Äther; 2 = Ameisensäurebenzylester; 3 = Essigsäurebenzylester; 4 = Propionsäurebenzylester; 5 = Capronsäure. Die übrigen Peaks stammen von Nebenprodukten der PDM-Darstellung. Trennsäule: 10% SE-30.

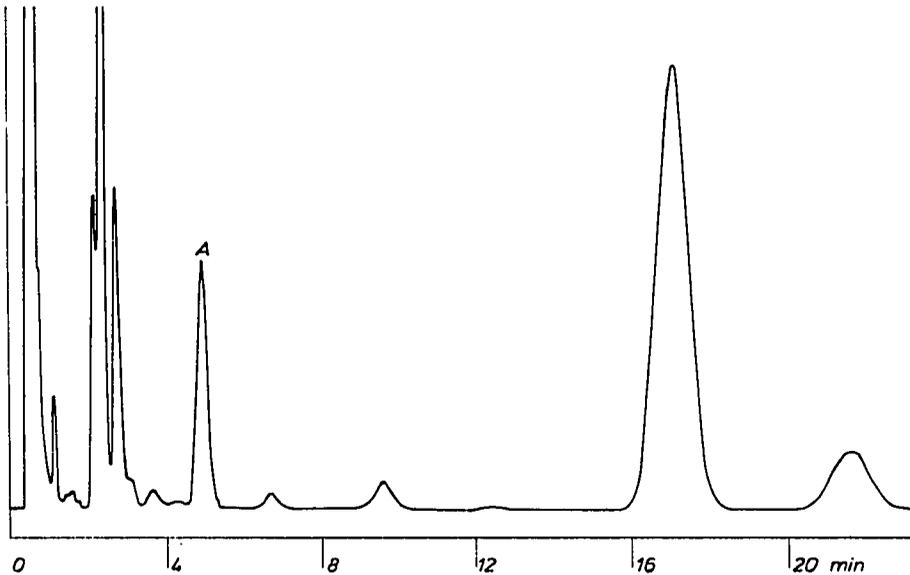


Fig. 4. Chromatogramm einer ätherischen Lösung von PDM. Peak A verschwindet bei der Veresterung niederer Fettsäuren mit PDM. Trennsäule: 10% SE-30 bei 150°.

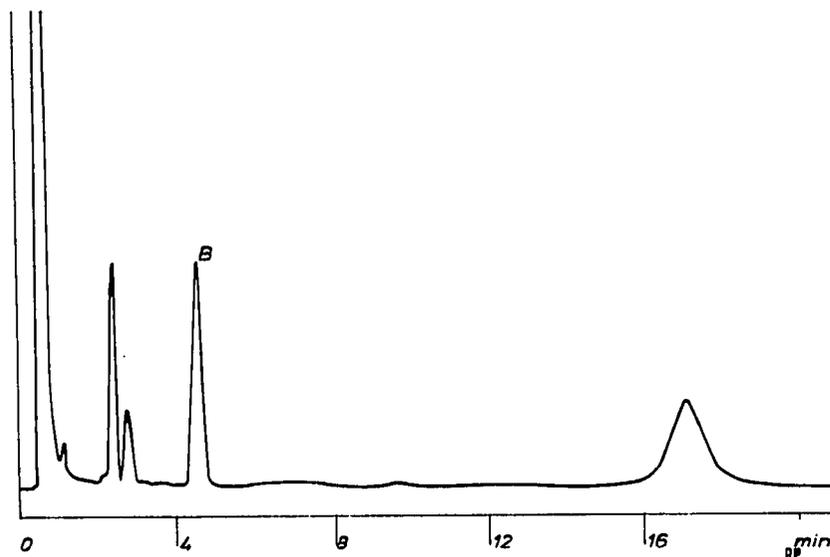


Fig. 5. Chromatogramm einer Lösung von Essigsäurebenzylester in Äther. Eine PDM-Lösung in Äther wurde mit Essigsäure im Überschuss versetzt. B = Essigsäurebenzylester. Der Essigsäurepeak wird vom Ätherpeak überlagert. Trennsäule: 10% SE-30 bei 150°.

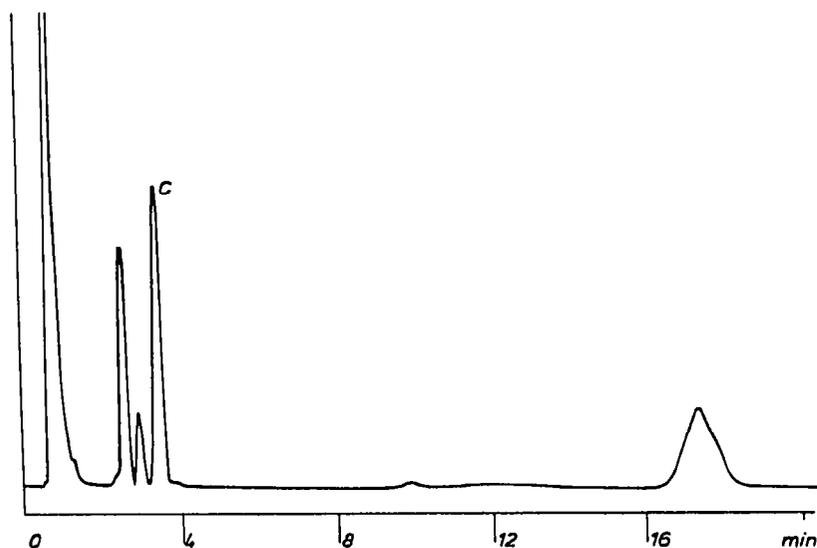


Fig. 6. Chromatogramm einer Lösung von Ameisensäurebenzylester in Äther. Eine PDM-Lösung in Äther wurde mit Ameisensäure im Überschuss versetzt. C = Ameisensäurebenzylester. Der Ameisensäurepeak wird vom FID nicht angezeigt. Trennsäule: 10% SE-30 bei 150°.

lebte— bei Zimmertemperatur ohne ersichtlichen Grund plötzlich unter Schwarzfärbung zersetzen kann (“Verpuffung”), wobei marzipanartiger Geruch auftritt.

Das Gaschromatogramm des PDM (Fig. 4) besteht aus mehreren Peaks, von denen ein Teil bei Zugabe eines Überschusses an Essigsäure oder Ameisensäure zur

PDM-Lösung verschwindet (z.B. Peak A in Fig. 4) und daher dem PDM selbst oder dessen Artefakten zugeordnet werden muss, während ein anderer Teil erhalten bleibt und offenbar von Nebenprodukten der PDM-Darstellung stammt, so dass sich also das neuerhaltene Chromatogramm aus den Peaks der betreffenden Ester (B in Fig. 5 bzw. C in Fig. 6), des Lösungsmittels Äther, der im Überschuss zugesetzten Säure sowie der erwähnten Nebenprodukte zusammensetzt (Fig. 5 und 6). Da der Ameisensäurebenzylesterpeak von keinem der übrigen Peaks überlagert wird, stört deren Anwesenheit die Bestimmung nicht. Zum Vergleich diene das beigefügte Chromatogramm einer ätherischen Lösung der bei der Fa. Fluka käuflichen Benzylester von Ameisen-, Essig- und Buttersäure (Fig. 7).

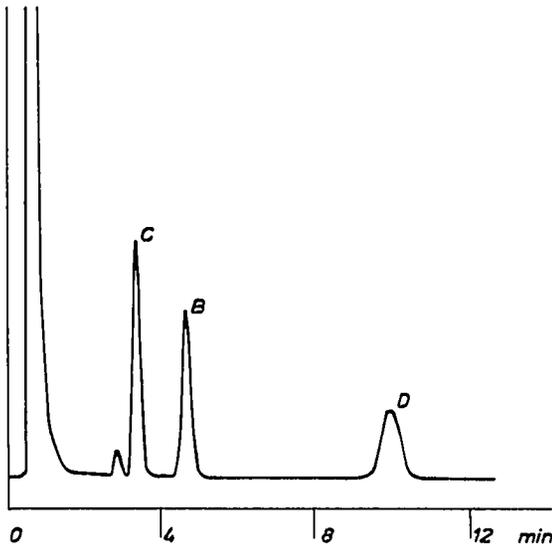


Fig. 7. Chromatogramm einer ätherischen Lösung im Handel erhältlicher Benzylester. B = Essigsäurebenzylester; C = Ameisensäurebenzylester; D = Buttersäurebenzylester. Trennsäule: 10% SE-30 bei 150°.

Die angewandten Arbeitsbedingungen ermöglichten eine scharfe Trennung des Ameisensäurebenzylesterpeaks sowohl vom Lösungsmittel- als auch vom benachbarten Essigsäurebenzylesterpeak ohne vorherige Konzentrierung der Lösung (Fig. 1-3). Die Anzeige des Ameisensäurebenzylesters erfolgt mit grösserer Empfindlichkeit als die der Benzylester homologer Säuren. Aus Tabelle I sind die Retentionszeiten

TABELLE I

RETENTIONSZEITEN DER BENZYLESTER DER AMEISEN-, ESSIG- UND PROPION-SÄURE BEI DEN DREI VERSCHIEDENEN STATIONÄREN PHASEN (min)

	10% SE-30	10% FFAP	10% OV-17
Ameisensäurebenzylester	3.4	5.8	5.4
Essigsäurebenzylester	4.6	6.9	6.3
Propionsäurebenzylester	6.8	8.8	8.2

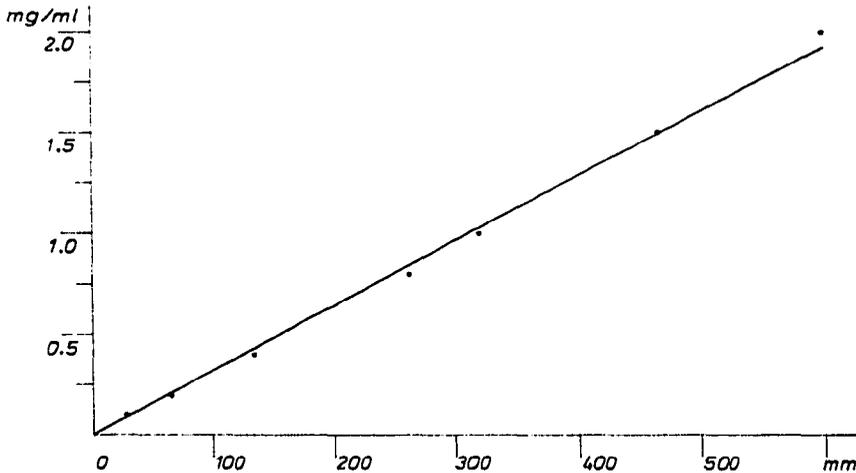


Fig. 8. Peakhöhen des Ameisensäurebenzylesters in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Ameisensäure in den Modellösungen. Trennsäule: 10% SE-30.

der durch Benzylisierung mit PDM erhaltenen Ester von Ameisensäure und Essigsäure bei den drei verschiedenen stationären Phasen zu ersehen. Zur Beseitigung des PDM-Überschusses wurde hier Propionsäure verwendet. Die Retentionszeiten sind relativ kurz, sie betragen nur wenige Minuten. Da aber das durch Peak 6 in Fig. 1 charakterisierte Nebenprodukt der PDM-Darstellung erst nach den interessierenden Benzylestern eluiert wird (Retentionszeit, 17.8 min), ergibt sich für die Gaschromatographie eine entsprechend längere Arbeitszeit. Ein Verfahren, welches die Reindarstellung genügender Mengen von PDM erlaubte, könnte den Nachteil beheben.

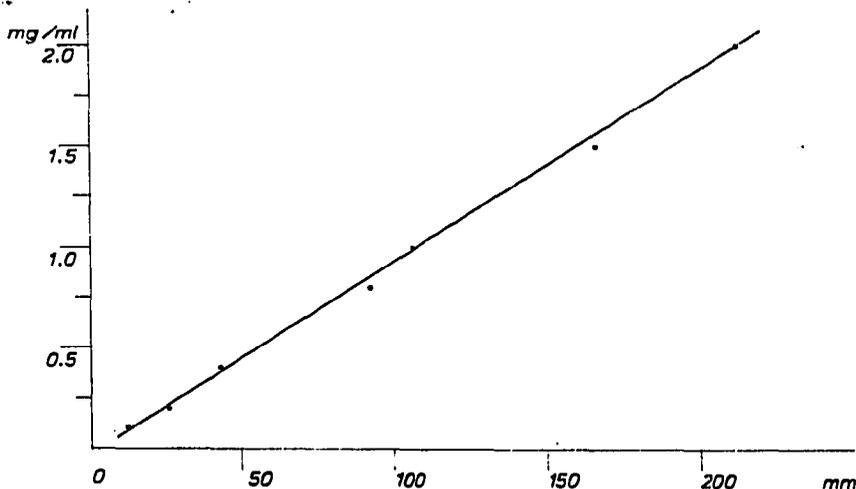


Fig. 9. Peakhöhen des Ameisensäurebenzylesters in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Ameisensäure in den Modellösungen. Trennsäule: 10% OV-17.

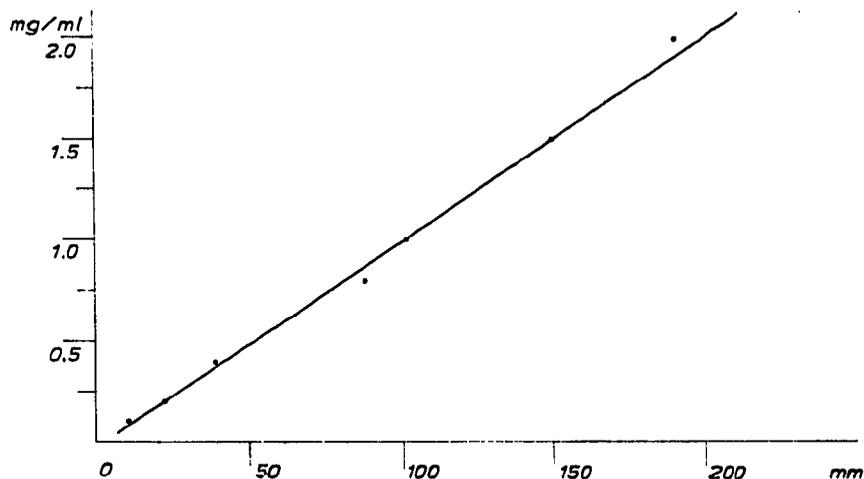


Fig. 10. Peakhöhen des Ameisensäurebenzylesters in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Ameisensäure in den Modellösungen. Trennsäule: 10% FFAP.

Die Auswertung kann nach der Peakflächen- oder Peakhöhenmethode erfolgen, wobei beide Verfahren nahezu gleichwertig sind. Die Werte liegen im Bereich von 0.1 bis 2.0 mg/ml entsprechend einer Konzentration der Ameisensäure von 0.1–2.0% in Silagen (Fig. 8–10) und zeigen gute Linearität. Abgesehen von der Notwendigkeit, die Ameisensäure aus wässrigem Medium in ätherische Lösung zu überführen —was durch Ionenaustausch und Perforation leicht zu erreichen ist²⁰— dürfte sich das hier beschriebene Verfahren wegen seiner Einfachheit empfehlen, besonders wenn *p*-Tosyl-N-nitroso-benzylamid, die Ausgangssubstanz für die PDM-Darstellung, käuflich zu haben sein sollte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein einfaches Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung der Ameisensäure beschrieben. Die Ameisensäure wird mittels Phenyldiazomethan in ihren Benzylester überführt, welcher wegen seiner Schwerflüchtigkeit (Kp. 202°/747 Torr) leicht vom Lösungsmittel getrennt werden kann, ohne dass vorher eine Konzentrierung der Probelösung nötig ist. Als stationäre Phasen wurden SE-30, FFAP und OV-17 verwendet.

LITERATUR

- 1 G. Raupp, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 284.
- 2 R. N. Shelley, H. Salwin und W. Horwitz, *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, 46 (1963) 486.
- 3 G. W. Lanigan und R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 238.
- 4 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 306.
- 5 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 251.
- 6 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 261.
- 7 B. Kaplanová und J. Janák, *Mikrochim. Acta*, (1966) 119.
- 8 W. K. Lee und R. M. Bethea, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 582.

- 9 H. W. Doelle, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 398.
- 10 B. Bartoniček und S. Lukáč, *Chromatographia*, 3 (1970) 108.
- 11 H. L. Goltz und J. B. Moffat, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 546.
- 12 E. T. Oakley, L. Weissbecker und F. E. Resnik, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 380.
- 13 G. R. Allen und M. J. Saxby, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 312.
- 14 D. B. Drucker, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 489.
- 15 J. E. Steinhauer und L. E. Dawson, *J. Food Sci.*, 34 (1969) 359.
- 16 E. O. Umeh, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 139.
- 17 E. O. Umeh, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 147.
- 18 E. L. Holmes und C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.*, 12 (1925) 1800.
- 19 E. H. White, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 (1955) 6008.
- 20 E. Doms, *Landbouwforsch. Völkenrode*, 24 (1974) H. 2.