

CHROM. 10,661

Note

Trennung von Milch-, Glyoxyl-, Ameisen-, Essig- und Propionsäure mit Hilfe der Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie

WERNER DISTLER

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Biochemisches Labor, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, Glückstrasse 11, D-8520 Erlangen (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. Oktober 1977; geänderte Fassung eingegangen am 21. Oktober 1977)



Zur Trennung von Carbonsäuren wurden bisher Gas-, Flüssigkeits-, Papier- und Dünnschicht-Chromatographie eingesetzt, jedoch ist keine der verwendeten Methoden voll zufriedenstellend. Bei der Gaschromatographie ist in der Regel eine Extraktion und eine Derivatisierung, wie z.B. Veresterung notwendig, was zu Verlusten führen kann. In der Papier- und Dünnschichtchromatographie sind quantitative Aussagen nur mit hohem Aufwand zu machen. Bei Trennungen von aliphatischen Carbonsäuren mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) was bisher die Frage der Detektion das grösste Problem. Die geringe UV-Absorption der aliphatischen Carbonsäuren bei der Messwellenlänge von 254 nm der üblichen Festwellenlängendetektoren zwang zur Derivatisierung, um die Nachweisempfindlichkeit zu verbessern. Dabei wurden zwei Wege beschritten, nämlich erstens die Derivatisierung im Ausgangsmaterial mit anschliessender Trennung der UV-absorbierenden Derivate auf einer reversed-phase-Säule^{1,2} und zweitens die Trennung der freien Säuren entweder auf stark basischen Anionenaustauschersäulen³ oder auf Kieselgel⁴ mit anschliessender Derivatisierung mit einem nach der Säule zudosierten Derivatisierungsreagenz, das eine geeignete UV-Detektion ermöglicht. Die bei allen Substanzen mögliche Detektion durch Refraktometer wurde auch bei der Trennung freier aliphatischer Carbonsäuren angewandt⁵, diese Methode ist jedoch durch die geringe Nachweisempfindlichkeit und die Nichtanwendbarkeit von Gradienten in der Praxis nur beschränkt anwendbar. In einem Übersichtsartikel von Cooper und Anders⁶ werden die bisherigen HPLC-Trennungen von Fettsäuren zusammengefasst und die Detektionsprobleme diskutiert.

Im Zuge unserer Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel von Bakterien aus Zahnbelägen (Plaques) wurde eine Methode benötigt, die eine schnelle und leicht quantifizierbare Trennung kurzkettiger Carbonsäuren, wie sie nach dem Embden-Meyerhof'schen Glykolyse-schema gebildet werden, erlaubt. Im folgenden wird eine direkte Trennung nichtderivatisierter kurzkettiger Carbonsäuren mit einem reversed-phase-System beschrieben.

EXPERIMENTELLES

Benutzt wurde ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph hp 1080 A der Firma

Hewlett-Packard. Als Detektor wurde ein Zweistrahlenspektrometer hp 1030 B (baugleich mit Schöffel SF 770) der selben Firma verwendet. Der Detektor wurde mit einer Messwellenlänge von 210 nm betrieben. Als Trennsäule diente eine Nucleosil-10 C₁₈-Fertigsäule 250 mm Länge 4 mm I.D. der Firma Macherey, Nagel & Co. (Düren, B.R.D.). Diese Säule ist mit kugelförmigem, durch und durch porösem Kieselgel (10 ± 1.5 µm) mit einer chemisch gebundenen Octadecylphase gefüllt. Mit dem halb-automatischen Dosierungssystem wurden jeweils 10 µl des Säuregemisches eingespritzt.

Verwendete Chemikalien

Alle Säuren waren handelsüblich reinst; Milchsäure Merck (Darmstadt, B.R.D.) reinst, etwa 90%; Wasser war frisch bidestilliert; Äthanol p.a. wurde noch einmal destilliert.

Verfahren

Alle Trennungen wurden bei einer Säulentemperatur von 30° durchgeführt. Als Testgemisch diente ein Gemisch von je 300 µl einer jeweils 1%igen Säurelösung in bidestilliertem Wasser. In 10 µl Gemisch sind also 20 µg jeder Komponente enthalten. Als mobile Phase wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das mit H₂SO₄ p.a. auf pH 2.73, 3.06, 3.53 eingestellt war. Detektoreinstellung A 0.04; Abschwächung 2⁹ (512 · 10⁻⁴ cm⁻¹ a.u.). Der eingestellte Fluss war 1 ml/min., der Säulendruck 75 bar.

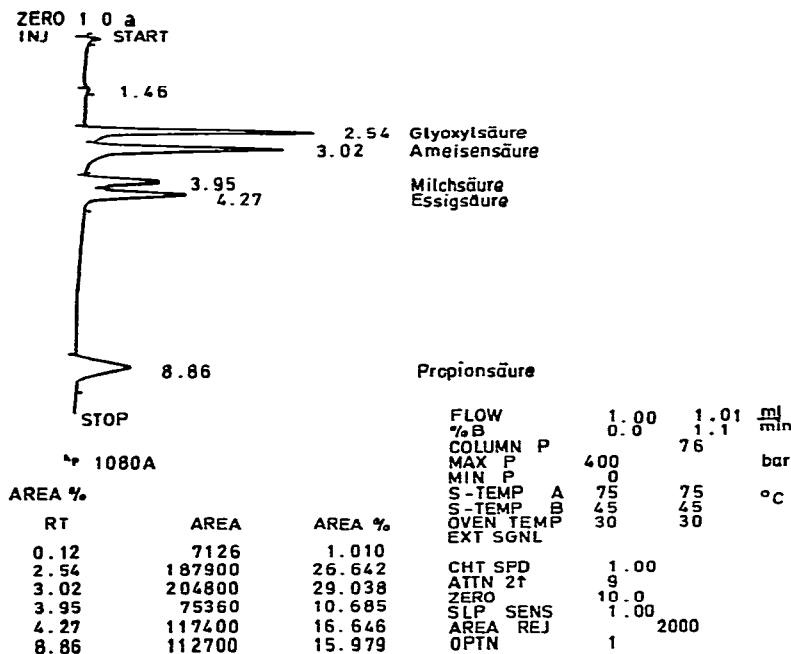


Fig. 1. Trennung kurzkettiger Carbonsäuren. Injektionsvolumen 10 µl, Substanzmenge je 20 µg Säure. Säule: Nucleosil-10 C₁₈; Länge 0.25 m, I.D. 4 mm, Edelstahl. Eluent: bidestilliertes Wasser, pH 3.53. Detektor: Zweistrahlenspektrometer hp 1030 B, 210 nm.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Methode erlaubt eine gute und schnelle Trennung der uns interessierenden kurz-kettigen aliphatischen Carbonsäuren (Fig. 1). Voraussetzung für die Trennung ist, dass die mobile Phase auf einen pH-Wert zwischen 2.5 und 3.5 eingestellt ist, um ein Vorliegen der undissoziierten Säuren sicherzustellen.

Zur Erzielung guter Chromatogramme ist es notwendig, die Säule vor den Analysen etwa eine Stunde lang zu äquilibrieren. In dem gegebenen pH-Bereich ist die Abhängigkeit der Retentionszeiten vom pH-Wert gering. Die ab einer Kettenlänge von C₄ ziemlich gross werdenden Retentionszeiten können durch Einsatz eines Wasser-Äthanol-Gradienten bis etwa 15% Äthanol zu praktikablen Werten verkürzt werden. Die Methode lässt sich ohne Mühe nach den gebräuchlichen Verfahren (externer oder interner Standard) eichen und erlaubt damit quantitative Aussagen. So wurden in unserem Labor die bei Warburg-Versuchen mit isolierten Stämmen von *Streptococcus mutans* gebildeten Säuren qualitativ und quantitativ ohne jede Voreinreinigung oder Vortrennung untersucht. Nachteilig ist die durch die geringe UV-Absorption der Carbonsäuren bedingte geringe Nachweisempfindlichkeit. Eine Abschätzung ergibt eine Nachweisempfindlichkeit von etwa 250 ng, eine Empfindlichkeit, die sich jedoch bei Einsatz eines Differentialrefraktometers nur mit hohem Aufwand realisieren lässt.

DANK

Die Untersuchung wurde mit einer Sachbeihilfe der deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Dr. M. Riedmann, Hewlett Packard GmbH, Karlsruhe, schulde ich Dank für wertvolle Anregungen und Diskussionen. Besonders danken möchte ich Prof. Dr. A. Kröncke, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Erlangen, für sein stetes Interesse und seine ständige wohlwollende Hilfsbereitschaft.

LITERATUR

- 1 H. D. Durst, M. Milano, E. J. Kikta, S. A. Connelly und E. Grushka, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1797.
- 2 E. Grushka, H. D. Durst und E. J. Kikta, Jr., *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 673.
- 3 M. Nakajima, Y. Ozawa, T. Tanimura und Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 129.
- 4 K. W. Stahl, G. Schafer und W. Lamprecht, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 95.
- 5 U. J. Kaiser, *Chromatographia*, 6 (1973) 387.
- 6 M. J. Cooper und M. W. Anders, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 407.