

CHROM. 11,388

GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON FREIEN FETT-SÄUREN UND IHREN SALZEN ALS SUCCINIMIDOMETHYL-ESTER

W. LINDNER und W. TRUGER

Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Graz, Graz (Austria)

(Eingegangen am 4. Juli 1978)

SUMMARY

Gas chromatographic determination of free fatty acids and their salts as succinimido-methyl esters

The reagent N-chloromethylsuccinimide (CMSI) possesses a very mobile halide, which reacts with salts of CH-, NH- and OH-acidic compounds in aprotic solvents.

Kinetic studies of the reaction demonstrate that at 60°, when using crown ether as phase transfer catalyst and acetonitrile or dimethylformamide as solvent, the triethylammonium salts as well as the potassium salts of fatty acids react within 120 min quantitatively with CMSI yielding the corresponding succinimidomethyl ester.

The flame ionization detector response factors of C₁-C₂₀ fatty acid succinimido-methyl esters are given. They have been determined experimentally and calculated using the relative molar response and then re-checked. A method for the quantitative preparation, derivatisation and gas chromatographic determination of aqueous solutions of fatty acid salts is given.

EINLEITUNG

Üblicherweise werden Carbonsäuren als Methylester oder Trimethylsilyl-ester quantitativ gas-chromatographisch bestimmt¹.

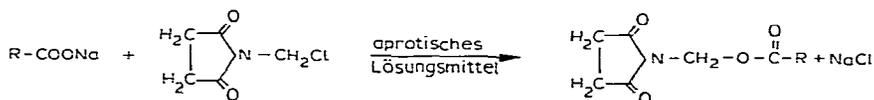
Die Veresterungsreaktion mit Diazomethan bzw. einem Silylierungsmittel verläuft rasch und quantitativ. Schwierigkeiten ergeben sich bei der quantitativen Bestimmung niederer flüchtiger Carbonsäuren (C₁-C₆) über ihre Methyl- bzw. Silylester, da diese einen sehr tiefen Siedepunkt haben und Aufarbeitungsverluste entstehen. Um dies zu umgehen, wurde vor kurzem von Doms² die Herstellung von Benzylestern mit Hilfe von Phenyl Diazomethan der C₁-C₅ Säuren beschrieben. Die flüchtigen Carbonsäuren lassen sich auch direkt gas-chromatographieren, doch treten auch hier Schwierigkeiten bei der quantitativen Probenaufarbeitung (Extraktion) auf.

Salze von Carbonsäuren reagieren mit Diazomethan nicht, und auch über die Quantifizierung der Silylierungsreaktion mit Carbonsäuresalzen scheint wenig bekannt zu sein. Ebenso reagieren Alkylhalogenide, allerdings recht langsam, mit

Silbersalzen von Carbonsäuren zu Estern; die analytische Anwendung dieser Reaktion wurde von Gehrke und Goerlitz³ sowie von Gloor und Leidner⁴ beschrieben. Darüber hinaus gibt es noch weitere qualitative Identifizierungsreaktionen von Carbonsäuren, wie die Bildung von Amidin, Aniliden, Phenacylestern etc., die allerdings kaum Anwendung in der Gaschromatographie (GC) finden⁵.

Mit N-Chlormethylisatin wurde von Knotz⁶ und Wendelin und Knotz⁷ ein neuer Verbindungstyp zur Identifizierung von Fettsäuren eingeführt, welcher mit Salzen von Carbonsäuren zu Isatinylmethylester reagiert. Diese Ester zersetzen sich in der Hitze und sind dadurch für die GC ungeeignet, jedoch gab dieses Derivatisierungsreagens Anstoss zur Suche nach einer ähnlichen, reaktiven Verbindung mit tieferem Siedepunkt.

Im Folgenden soll nun die Brauchbarkeit von N-Chlormethylsuccinimid (CMSI) als Derivatisierungsreagens für Carbonsäuren, sowie deren Salze und die quantitative gas-chromatographische Bestimmung der Succinimidomethyl-ester (SIM-ester) untersucht werden (Formel 1).



Formel 1.

Im Rahmen dieser Studien wurden im Zusammenhang mit der Reaktionskinetik der Einfluss des Reaktionsmediums und die Wirksamkeit von Kronenäther als Katalysator betrachtet. Die quantitative GC-Bestimmung der Fettsäure-SIM-ester machte auch die Bestimmung ihrer Flammenionisationsdetektor (FID) Anzeigefaktoren bzw. Relativer Molarer Respons (RMR)-Werte notwendig.

EXPERIMENTELLES

Sämtliche gas-chromatographischen Bestimmungen wurden auf einem GC Modell 900 und einem Integrator D 26 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Das Reagens CMSI wurde durch Chlorierung von N-Hydroxymethylsuccinimid, welches nach der Methode von Cherbuliez und Sulzer⁸ synthetisiert wurde, mit überschüssigem SOCl₂ in trockenem Benzol hergestellt⁹. Die Aufarbeitung dieses Reaktionsgemisches erfolgte wiederum nach der Vorschrift von Cherbuliez und Sulzer⁸. Fp. 58–59°, Kp. (12 mm) 158–160°.

Acetonitril, Dimethylformamid (DMF) und Triäthylamin (TEA) sowie sämtliche Carbonsäuren wurden von der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen und hatten p.a. Qualität. Der Kronenäther (18-Crown-6) stammte von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) und hatte purum Qualität.

Synthese von C₆- bzw. C₁₂- bzw. C₁₆-Succinimidomethyl-ester

0.05 Mol CMSN wird in 50 ml Acetonitril mit 0.1 Mol Fettsäure und 0.1 Mol TEA versetzt und 2 h bei 60° gehalten, in 500 ml Na₂CO₃-haltiges Wasser gegossen, das anfallende Öl mit Benzol extrahiert, getrocknet und das Benzol abgedampft. Der ölige Rückstand wurde bald kristallin und aus Cyclohexan umkristallisiert. Der

Capronsäure-SIM-ester konnte nur durch Destillation gereinigt werden. Capronsäure-SIM-ester: Kp. (20 mm) 195–200°; Laurinsäure-SIM-ester: Fp. 57–58°; Palmitinsäure-SIM-ester: Fp. 76–77°. Ausbeuten *ca.* 90% der Theorie.

Derivatisierungsreaktion

Methode A. Anzuwenden für freie Carbonsäuren bei einer totalen Säurekonzentration von 0.001–0.5 mM. Die Proben nicht flüchtiger, organischer Säuren werden in verschliessbare Reaktionsgefässe von 1 ml Inhalt gebracht, mit einem mindest dreifachen Überschuss an CMSI (bis 0.2 g) und TEA in 0.5–1 ml Acetonitril oder DMF aufgenommen und 2 h bei 60° zur Reaktion gebracht. Nach Abkühlung kann die Lösung direkt am Gaschromatographen vermessen werden; eventuelle ausgefallene farblose Nadeln sind Triäthylammonium-hydrochlorid und stören die Bestimmung nicht.

Methode B. Anzuwenden für wässrige Lösungen von Carbonsäuresalzen bei einer totalen Säurekonzentration von 0.001–0.5 mM. Etwa 1 ml wässrige Salzlösung wird in einem fest verschliessbaren Derivatisierungsgefäss von 1 ml Inhalt vorsichtig zur Trockene eingedampft. Dem Rückstand wird *ca.* 1 mg Innerer Standard (z.B. Laurinsäure-succinimidomethyl-ester), 2 mg Kronenäther (18-Crown-6) als Katalysator und überschüssiges CMSI (bis 0.2 g) in 0.5–1.0 ml Acetonitril oder DMF zugegeben, fest verschlossen und 90 min bei 60° zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung kann direkt quantitativ gas-chromatographisch bestimmt werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

FID-Anzeigefaktoren der Fettsäure-succinimidomethyl-ester

Die unterschiedliche Anzeigeempfindlichkeit von organischen Verbindungen im FID erfordert die experimentelle Bestimmung der jeweiligen Korrekturfaktoren der einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches um quantitative Analysen durchzuführen. Grundlagen zur Vorausberechnung solcher Faktoren schuf Ackman¹⁰ durch Einführung des Begriffes "Relativer Molarer Response" (*RMR*), welcher sich additiv aus Gruppeninkrementen zusammensetzt. Das Gruppeninkrement $-\text{CH}_2-$ in *n*-Heptan hat definitionsgemäss den Wert 100 und *n*-Heptan ein Gesamt-*RMR* von 700.

Ist das C-Inkrement mit einem Heteroatom, wie etwa O, N, S, Halogen verknüpft, erleidet dieses Inkrement einen Anzeigeverlust und demgemäss auch das Gesamtmolekül. Aus der Kenntnis dieser Anzeigeverluste der einzelnen Gruppeninkremente lässt sich der Gesamt-*RMR* einer Verbindung errechnen und zum Gesamt-*RMR* des korrespondierenden *n*-Kohlenwasserstoffes (KW) in Beziehung setzen. In Tabelle I sind die *RMR*-Werte einiger definierter Inkremente zusammengefasst.

Unter Anwendung der Additivität der *RMR* für Gruppeninkremente zur Erstellung eines Gesamt-*RMR* ergibt sich für die Succinimidomethyl-ester (Formel 1) ein Anzeigeverlust von drei Carbonyl-Kohlenstoffen ($RMR = -300$) und dem unbekanntem Anzeigeverlust der mittleren Imidomethylgruppe, die esterartig an eine Carboxylgruppe verknüpft ist. Mit Hilfe unserer experimentell bestimmten Faktoren (*f*) mit Heptan als Basis für die C₆-, C₁₂- und C₁₆-ester errechneten wir unter Anwendung von Gleichung 2 einen *RMR*-Verlust für diese Imidomethylgruppe von -67 .

TABELLE I
RMR EINIGER GRUPPENINKREMENTE

Inkrement	RMR	RMR-Verlust gegenüber voll angezeigtem $-CH_2-$	Literatur
$-CH_2-$	100	—	10
$-CH_2OH$	55	-45	10
$\begin{array}{c} \\ C=O \\ \vdots \end{array}$	—	-100	10
$\begin{array}{c} O \\ \vdots \\ -C \\ \\ O-CH_2- \end{array}$	55	-145	10
$-CH_2-NH_2$	88	-12	11
$-O-CH_2-N=$	33	-67	

Der Gesamt-RMR-Verlust eines Succinimidomethylesters beträgt somit 367 bzw. 3.67 nicht angezeigte C-Atome gegenüber dem vergleichbaren KW.

$$f_{\text{Bezugssubstanz}}^{\text{Substanz}} = \frac{7 \times \text{MG}_{\text{Substanz}}}{\text{RMR}_{\text{Bezugssubstanz}}^{\text{Substanz}}} \quad (2)$$

$$f = \frac{\text{MG}}{n \cdot 14.29} \quad (3)$$

$$f = \frac{\text{MG}}{n \cdot 14} \quad (3a)$$

Bezugssubstanz = Heptan, MG = Molekulargewicht der angezeigten Substanz, und n = Anzahl der angezeigten (ionisierbaren) C-Atome.

Gleichung 3 entspricht der von Binder und Lindner¹² eingeführten Gleichung 3a mit Erweiterung der Dezimalstellen.

In Tabelle II sind nun die mit Hilfe der Gleichung 3 berechneten Anzeigefaktoren (bei einem angenommenen Anzeigeverlust von 3.67 C-Atomen) zusammen-

TABELLE II

BERECHNETE FID-ANZEIGEFAKTOREN DER SUCCINIMIDOMETHYL-ESTER VON GESÄTTIGTEN FETTSÄUREN MIT HEPTAN $f = 1.000$ ALS BASIS

C-Anzahl der Säure	MG des Esters	$f_{\text{theor.}}$	C-Anzahl der Säure	MG des Esters	$f_{\text{theor.}}$
C ₁	157.127	4.719	C ₁₁	297.397	1.688
C ₂	171.154	3.597	C ₁₂	311.424	1.635
C ₃	185.181	2.993	C ₁₃	325.451	1.589
C ₄	199.208	2.615	C ₁₄	339.478	1.550
C ₅	213.235	2.357	3 ₁₅	353.505	1.515
C ₆	227.262	2.170	C ₁₆	367.532	1.484
C ₇	241.289	2.027	C ₁₇	381.559	1.457
C ₈	255.316	1.915	C ₁₈	395.586	1.432
C ₉	269.343	1.825	C ₁₉	409.613	1.410
C ₁₀	283.370	1.750	C ₂₀	423.640	1.390

gefasst. Diese berechneten Faktoren wurden mittels Analyse von Säuregemischen bekannten Gehaltes überprüft und decken sich weitgehend mit den experimentellen Werten.

Untersuchungen des Reaktionsverlaufes

Das Halogen (Chlor) des Verbindungstyps N-Halogenmethylimid ist sehr beweglich und reaktiv. Diese Substanzklasse geht mit Salzen CH-, OH- und NH-acider Verbindungen in aprotischen Lösungsmitteln Reaktionen ein, welche von Knotz und Co-Autoren^{6,7,13}, sowie Böhme und Co-Autoren^{14,15} näher untersucht wurden. Dieser Reaktionstyp wurde auch von Lindner *et al.*¹⁶ hinsichtlich Verwendbarkeit als UV-sensible Derivatisierungsreagenzien für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie überprüft.

Da die Chlormethyl-imide nur mit Salzen reagieren, muss der Reaktand immer in dieser Form vorliegen, wobei es vorerst gleichgültig scheint ob es sich um Alkali- oder z.B. Triäthylammoniumsalze handelt. Den reaktionskinetischen Verlauf der Umsetzung, wobei die Säure als TEA-Salz vorliegt, zeigt Fig. 1. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist relativ stark abhängig vom Reagenzüberschuss und vom TEA-Überschuss was seine Erklärung in der Tatsache findet, dass TEA ebenfalls mit CMSI zum Ammoniumsalz reagiert. Diese Konkurrenzreaktion verläuft langsamer als die Veresterungsreaktion.

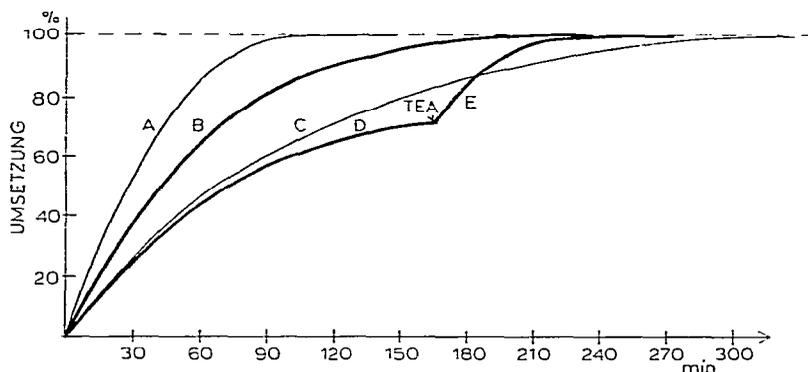


Fig. 1. Umsetzung von Valeriansäure mit CMSI in Acetonitril bei 60° und den Molverhältnissen: (A) Säure-Reagens (1:5), Säure-TEA (1:5); (B) Säure-Reagens (1:2), Säure-TEA (1:5); (C) Säure-Reagens (1:2), Säure-TEA (1:2); (D) Säure-Reagens (1:5), Säure-TEA (1:2); (E) neuerliche Zugabe von 2 Mol TEA zu D.

Liegen TEA und die Säure äquimolar vor (Ammoniumsalz), reagieren nun beide Reaktanden, und zwar kann von der Säure nur so viel umgesetzt werden, solange sie als Ammoniumsalz vorliegt, was zur Folge hat, dass die Veresterungsreaktion wegen der Konkurrenzreaktion unter diesen Bedingungen nicht quantitativ verläuft (Kurve D). Erst nach neuerlicher Zugabe von TEA (Kurve E) wird vollständige Veresterung erreicht.

Fünffacher molarer Überschuss von TEA und Reagens erbringen die günstigsten reaktionskinetischen Werte und die Umsetzung verläuft quantitativ (Kurve A).

Der CMSI-Überschuss stört die GC-Trennung der Fettsäureester nicht, da CMSI vor den Estern eluiert wird.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Veresterungsreaktion nimmt mit der C-Zahl der Säure etwas ab, wie aus Fig. 2 zu entnehmen ist, zudem erkennt man beim Vergleich von Fig. 1 und 2 den Einfluss des Reaktionsmediums; in DMF verläuft die Reaktion deutlich rascher als in Acetonitril. Dieses erzeugt allerdings eine wesentlich schmalere Lösungsmittelfront in der GC und ist dadurch dem DMF meist vorzuziehen.

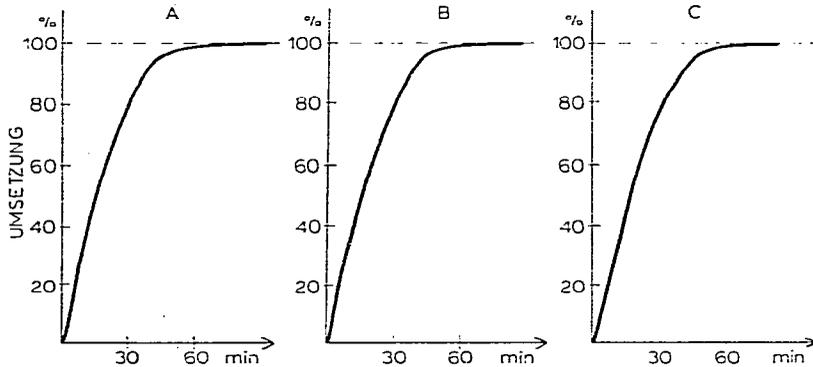


Fig. 2. Umsetzung von Essigsäure (A), Valeriansäure (B) und Palmitinsäure (C) mit CMSI in DMF bei 60° und den Molverhältnissen Säure-Reagens-TEA (1:5:5).

Bei der Veresterungsreaktion der Kaliumsalze scheint der reaktionsbestimmende Schritt die Schwerlöslichkeit der Salze im Reaktionsmedium zu sein. (Die TEA-Salze lösen sich leichter in DMF bzw. Acetonitril.)

Durch Einführung eines Kronenäthers als Phasentransfer-Katalysator, wie er auch schon von Durst und Co-Autoren^{17,18} beschrieben wurde, kann die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich erhöht werden, wie es aus Fig. 3 zu entnehmen ist. Reak-

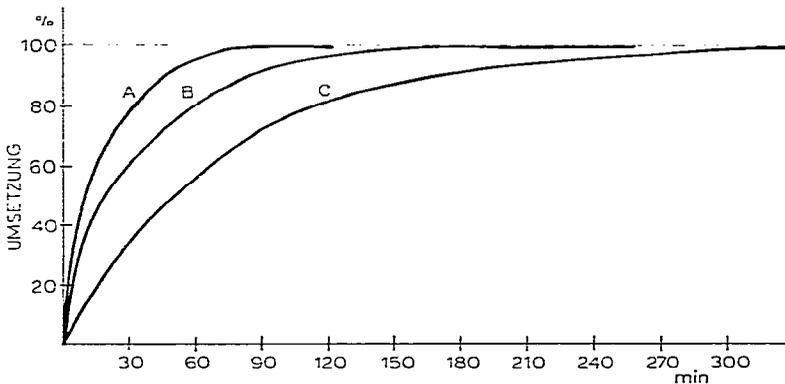


Fig. 3. Umsetzung von Kaliumacetat mit CMSI und Katalyse durch Kronenäther in DMF bei 60° und den Molverhältnissen: (A) Salz-Reagens (1:3); (B) Salz-Reagens (1:1.5); (C) Salz-Reagens (1:1.5) ohne Katalysator.

tionsbedingungen wie bei Kurve A erbringen quantitative Umsetzung des Kalium-Acetates innerhalb von 80 min; ebenso rasch reagiert Kalium-Palmitat.

Diese reaktionskinetischen Studien zeigen, dass die Veresterung von Fettsäuren und Fettsäuresalzen mit CMSI in vertretbarer Reaktionszeit quantitativ verläuft und die SIM-Ester durchwegs gute gas-chromatographische Eigenschaften besitzen (Fig. 4).

Besonders günstig erscheint uns diese Derivatisierungsmethode für Salze niederer Carbonsäuren (Fig. 5), da die Probenaufarbeitung gut reproduzierbar ist. Kleinere Mengen Wasser im Reaktionsmedium stören die Veresterungsreaktion nicht, da es mit CMSI nur langsam zum N-Hydroxymethylsuccinimid reagiert, welches am GC noch vor dem CMSI eluiert wird. Unter Anwendung der eingangs besprochenen FID-Anzeigefaktoren für die Succinimidomethyl-ester ist eine quantitative Fettsäurebestimmung gut durchführbar; dies wurde durch eine Vergleichsanalyse über die korrespondierenden Methylester überprüft und führte zu identen Ergebnissen. Ebenso

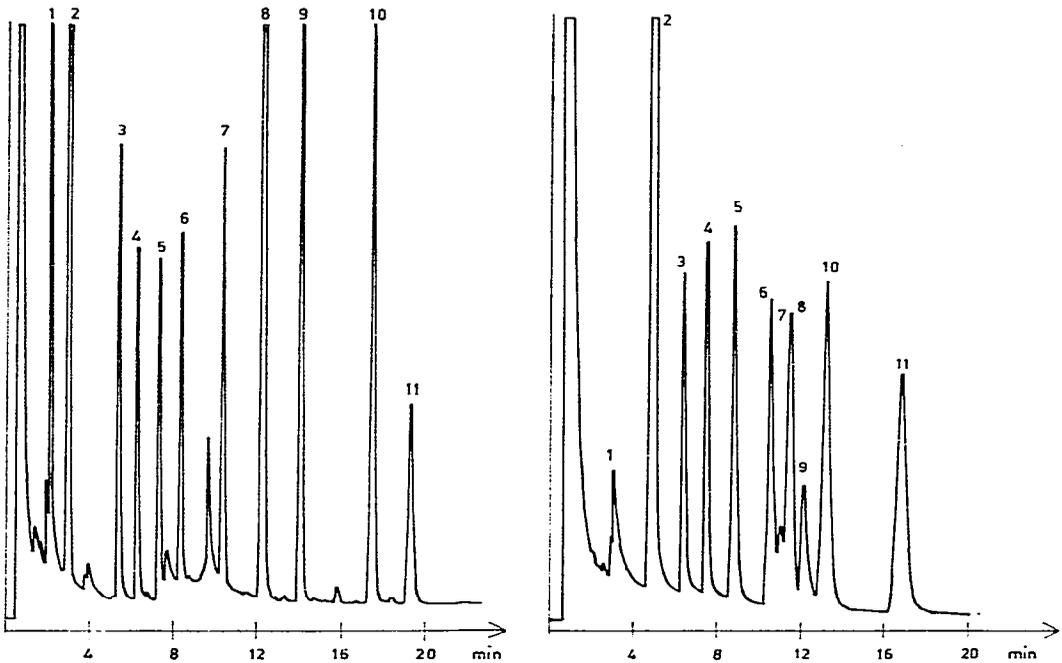


Fig. 4. GC-Trennung von Fettsäure-SIM-Estern. Säule: Glas (2 m × 3 mm I.D.) gepackt mit 3% OV-17 auf Chromosorb W AW DMCS (80-100 mesh); Temp. Programm 140-250°, 8°/min; Flammenionisationsdetektor, 260°. Peakbezeichnung: 1 = N-Hydroxymethylsuccinimid; 2 = CMSI; 3 = Propionsäure-ester; 4 = *n*-Buttersäure-ester; 5 = *n*-Valeriansäure-ester; 6 = Capronsäure-ester; 7 = Caprylsäure-ester; 8 = Caprinsäure-ester; 9 = Laurinsäure-ester; 10 = Palmitinsäure-ester; 11 = Stearinsäure-ester.

Fig. 5. GC-Trennung von C₁ bis C₆ Fettsäure-SIM-estern. Säule wie Fig. 4; Temp. Programm: 150-195°, 6°/min; Flammenionisationsdetektor, 250°. Peakbezeichnung: 1 = N-Hydroxymethylsuccinimid; 2 = CMSI; 3 = Ameisensäure-ester; 4 = Essigsäure-ester; 5 = Propionsäure-ester; 6 = *n*-Buttersäure-ester; 7 = 2-Methyl-buttersäure-ester; 8 = Isovaleriansäure-ester; 9 = Milchsäure-ester; 10 = *n*-Valeriansäure-ester; 11 = Capronsäure-ester.

leicht lassen sich die SIM-Ester der ungesättigten Fettsäuren darstellen. An der GC-Trennung des kritischen Paares C_{18} und C_{18} , wird zur Zeit gearbeitet.

Sämtliche Untersuchungen mit CMSI als GC-Derivatisierungsreagens wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Truger¹⁹ durchgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Reagens N-Chlormethylsuccinimid (CMSI) besitzt ein sehr bewegliches Halogen, welches mit Salzen von CH-, NH- und OH-aciden Verbindungen in aprotischen Lösungsmitteln reagiert.

Reaktionskinetische Studien erbrachten, dass die Triäthylammoniumsalze sowie die Kaliumsalze von Fettsäuren, unter Verwendung von Kronenäther als Phasentransfer-Katalysator, mit CMSI innerhalb von 120 min in Acetonitril oder Dimethylformamid bei 60° quantitativ zu den entsprechenden Succinimidomethyl-estern reagieren.

Die Flammenionisationsdetektor-Anzeigefaktoren der C_1 bis C_{20} Fettsäuresuccinimidomethyl-ester sind zusammengefasst, welche experimentell bestimmt und daraus folgend, unter Anwendung des Relativen Molaren Response, vorausberechnet und überprüft wurden.

Es wird eine Arbeitsvorschrift für die quantitative Aufarbeitung, Derivatisierung und gaschromatographische Bestimmung einer wässrigen Fettsäure-Salz-Lösung angegeben.

LITERATUR

- 1 J. Drozd, *J. Chromatogr.*, 113 (1975) 303.
- 2 E. K. Doms, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 29.
- 3 C. W. Gehrke und D. F. Goerlitz, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 76.
- 4 R. Gloor und H. Leidner, *Chromatographia*, 9 (1976) 618.
- 5 R. L. Shriner, R. C. Fuson und D. Y. Curtin, *The Systematic Identification of Organic Compounds*, Wiley, New York, 1964, S. 227.
- 6 F. Knotz, *Sci. Pharm.*, 38 (1970) 227.
- 7 W. Wendelin und F. Knotz, *Monatsh. Chem.*, 103 (1972) 1632.
- 8 E. Cherbuliez und G. Sulzer, *Helv. Chim. Acta*, 8 (1925) 567.
- 9 T. M. Voronkina, I. T. Strkov und M. F. Schostakovskii, *J. Gen. Chem. USSR*, 32 (1962) 2072.
- 10 R. G. Ackman, *J. Gas Chromatogr.*, 2 (1964) 173.
- 11 W. Lindner, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 331.
- 12 H. Binder und W. Lindner, *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 175.
- 13 W. Wendelin, F. Knotz und H. W. Schramm, *Monatsh. Chem.*, 106 (1975) 159.
- 14 H. Böhme, R. Broese und F. Eiden, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1258.
- 15 H. Böhme und H. H. Otto, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 300 (1967) 922.
- 16 W. Lindner, R. W. Frei und W. Santi, *J. Chromatogr.*, (1978) in Vorbereitung.
- 17 H. D. Durst, M. Milano, E. Kikta, S. Connelly und E. Grushka, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1797.
- 18 E. Grushka, H. D. Durst und E. J. Kikta, Jr., *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 673.
- 19 W. Truger, *Diplomarbeit*, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Graz, Graz, 1978.