

CHROM. 12,627

Note

Modifizierte Darstellung von Fettsäure-2-naphtacylestern und ihre Fluoreszenz-Detektion in der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

W. DISTLER

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

(Eingegangen am 14. Dezember 1979)

In den letzten Jahren sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung und Trennung von Carbonsäuren mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ausgearbeitet worden. Wegen der geringen UV-Absorption der Carbonsäuren ist bei geringen Mengen eine Derivatisierung unerlässlich. In Standardwerken wie Lawrence und Frei¹ und Blau und King² wird eine Übersicht über geeignete Derivate zur UV-Detektion bzw. Fluoreszenzdetektion gegeben. Diese Entwicklung wird weitergeführt durch Synthese neuer UV-absorbierender Derivate wie z.B. N-Chlor-methylphthalimide³ und fluoreszierender Derivate wie Ester des 4-Bromomethyl-7-Methoxycumarin^{4–6}.

Die chromatographische Trennung derartiger Derivate lässt sich am einfachsten mit Hilfe der Gradienten-Elution an nicht polaren stationären Phasen vom reversed-phase Typ durchführen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Eignung der schon länger bekannten 2-Naphtacylester⁸ für die Fluoreszenzdetektion und ein modifiziertes Verfahren für die Veresterung von Natrium-Salzen kurzkettiger Carbonsäuren aus biologischem Material beschrieben.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien und Chemikalien

Alle organischen Lösungsmittel waren handelsüblich (Merck, Darmstadt, B.R.D.) p.a. Qualität, Acetonitril für die HPLC war frisch destilliert, trockenes Acetonitril wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid gekocht und unter Wasserausschluss destilliert, trockenes Dimethylformamid wurde im Vakuum destilliert. 2-Bromacetonaphton (Aldrich, Milwaukee, Wisc., U.S.A.) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Kryptofix 221 (4,7,13,16,21-penta-oxa-1,10-diazabicyclo(8,8,5)-tricosan) (Merck) war unter Stickstoff in wasserfreien Acetonitril gelöst. Alle verwendeten Säuren bzw. Natrium-Salze waren handelsüblich p.a. (Merck).

Apparatur

Benutzt wurde ein Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatograph HP 1080 A (Hewlett-Packard). Als Detektoren wurden verwendet ein Zweistrahlenspektrometer

HP 1030 B (baugleich mit Schöffel SF 770) der gleichen Firma und ein Spektralfluorometer SFM23LC (Kontron) mit getrennt abstimmbarem Excitations- und Emissionsmonochromatoren. Als Trennsäule diente eine 250×3 mm I.D., $10 \mu\text{m}$ C_{18} LiChrosorb Fertigsäule (Merck).

Derivatisierung

Das aus Stoffwechseluntersuchungen mit Hilfe der Warburg-Methode erhaltene Säuregemisch (20 nMol–80 μMol) wurde mit 0.01 M Natriumhydroxyd gegen Phenolphthalein neutralisiert und nach Abtrennung der Bakterien gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Rückstände, die neben Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat und verschiedenen Mono- und Polysacchariden die Natriumsalze der Carbonsäuren enthielten, wurden unter striktem Wasserausschluss mit 8 ml einer 0.01 M Lösung von 2-Bromacetonaphthon (80 μMol) in trockenem Acetonitril 60 min im Ultraschallbad sehr fein suspendiert. Nach der Ultraschallbehandlung wurden 20 μl einer 0.2 M Lösung von Kryptofix 221 in trockenem Acetonitril und 2 ml trockenes Dimethylformamid zugegeben. Die Veresterungsansätze wurden unter Wasserausschluss 60 min unter Rückfluss gekocht, abfiltriert und unter Auswaschen des Filters mit Acetonitril auf 20 ml aufgefüllt. Eine Verdünnung 1:2 dieser Proben kann direkt am Chromatographen injiziert werden. Sind in der Probe Naphtacyl-ester von Dicarbonsäuren wie z.B. Bernsteinsäure vorhanden, empfiehlt es sich wegen der Schwerlöslichkeit dieser Ester die Proben auf 60 ml aufzufüllen und den Rückstand (Natriumchlorid, Natriumbromid) auszukochen.

Im Spurenbereich (<50 nMol) ist es empfehlenswert, die Gesamtlösungsmittelmenge des Veresterungsansatzes auf 4 ml zu beschränken und entsprechend konzentrierte Reagenzienlösungen einzusetzen. Der Überschuss an Derivatisierungsreagenz sollte nicht mehr als 10% betragen.

Präparative Darstellung von Standardsubstanzen

Um geeignete Standardsubstanzen zu gewinnen, wurden die Naphtacyl-ester von Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure und Valeriansäure analog zu üblichen Verfahren der Darstellung von Phenacylestern⁹ im 20 mMol Masstab synthetisiert. Nach Umkristallisieren und chromatographischer Prüfung auf Reinheit wurden sie massenspektrometrisch charakterisiert.

Bernsteinsäure-bis-naphtacyl-ester lässt sich nur in Anlehnung an die analytische Derivatisierung im wasserfreiem Medium mit Kryptofix als Katalysator in guten Ausbeuten herstellen, wie auch schon Durst *et al.*¹⁰ mit Kronenverbindungen als Katalysatoren zeigen konnten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Derivatisierung

Die Ausbeuten der Derivatisierungsreaktion wurden chromatographisch mit Hilfe externer Standardisierung bestimmt. Beim Einsatz reiner Natriumsalze von Carbonsäuren werden im Bereich zwischen 10 μMol und 100 μMol Ausbeuten über 98% erhalten. Die Reaktionsdauer bis zur vollständigen Veresterung betrug ca. 45 min, sie wurde chromatographisch verfolgt. Bei Proben biologischer Herkunft wurde die Wiederfindungsrate durch Zugabe von Buttersäure als interner Standard

bestimmt. Die Wiederfindungsraten schwankten zwischen 65% und 94%. Ein möglicher Grund für diese deutlich verschlechterten Wiederfindungsraten dürfte der hohe Anteil von Fremdstoffen wie Monosaccharide, Polysaccharide und anorganischen Salzen in den Proben biologischer Herkunft sein, die den Ablauf der heterogenen Reaktion stören.

Die Katalyse der Veresterungsreaktion durch Poly-oxa-diaza-makro bicyclen (Warenzeichen Kryptofix) erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei den von Durst *et al.*¹¹ eingeführten Kronenäthern. Die gebildeten Kryptatverbindungen werden im Vergleich zu monocyclischen Polyäthern wie z.B. 18-Krone-6 als stabiler und selektiver¹² in der Bildung beschrieben. Durch die Komplexbindung des Na⁺ im Hohlraum des bicyclischen Diamins kommt es zur Ausbildung eines getrennten Ionenpaares, wobei das Anion, also der Säurerest, eine gesteigerte Nucleophilie erlangt. Dadurch wird die nucleophile Substitution des Bromatoms im Bromacetonaphthon durch einen Säurerest wesentlich erleichtert. Bei Versuchen, die Derivatisierung analog zu Durst *et al.*^{10,11} zu katalysieren, wurden bei Proben biologischer Herkunft etwas schlechtere Wiederfindungsraten gefunden.

Störend macht sich bemerkbar, dass durch die Ausbildung eines Natrium-Kryptats alle vorliegenden Anionen der im Derivatisierungsansatz befindlichen Natriumsalze grössere nucleophile Kraft gewinnen. Dies gilt vor allem für Natriumchlorid, das aus biochemischen Untersuchungen in die Proben gelangt.

Gemäss Gleichung 1



tritt eine Umhalogenisierung des Derivatisierungsreagenze in starkem Masse auf. In gleicher Weise bewirken Spuren von Wasser, vor allem wässrige Alkalien, den Austausch des Bromatoms gegen eine Hydroxyl-Gruppe. Im Falle des α -Brom-2-acetonaphthons konnten sowohl das entsprechende α -Chlor-2-acetonaphthon als auch das α -Hydroxy-2-acetonaphthon isoliert und massenspektrometrisch charakterisiert werden. Daneben entstehen, allerdings in weit geringerer Menge, weitere Nebenprodukte deren Struktur nicht aufgeklärt wurde. Die Neigung zu derartigen Nebenprodukten nimmt mit gesteigerter Labilität des Bromatoms von 2-Naphtacylbromid über Phenacylbromid, *p*-Bromphenacylbromid bis *p*-Nitrophenacylbromid zu.

Spektroskopische Eigenschaften

Das UV-Spektrum von Milchsäurenaphthacylester zeigt das Hauptmaximum bei 246 nm mit Nebenmaxima bei 280.5 nm mit einer Schulter bei 290 nm und einem weiteren flachen Maximum bei 335 nm. Sowohl bei 246 nm als auch bei 280.5 nm lässt sich Fluoreszenz anregen mit einem Emissionsmaximum bei 450 nm. Das Anregungsmaximum liegt bei 290 nm, der Wellenlänge der ausgeprägten Schulter der ersten Nebenmaxima des UV-Spektrums. UV- und Fluoreszenzspektrum von Milchsäurenaphthacylester sind in Fig. 1 dargestellt. Bromacetonaphthon, Chloracetonaphthon und Hydroxyacetonaphthon zeigen keine Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität der homologen Carbonsäurenaphthacylester nimmt mit steigender C-Zahl ab. Durch diese Ergebnisse ist eine Fluoreszenzdetektion von 2-Naphtacylestern möglich und gleichzeitig die Störung durch Nebenprodukte beseitigt. Die Fluoreszenzintensität der Naphtacylester ist um etwa den Faktor $5 \cdot 10^{-2}$ geringer als die der von

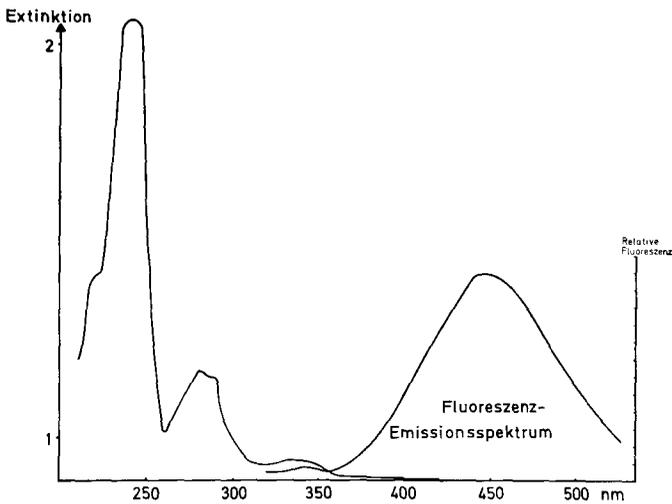


Fig. 1. UV- und Fluoreszenzemissionsspektrum von Milchsäurenaphthacylester. Lösungsmittel 40% Acetonitril in Wasser.

Dünges beschriebenen 4-Methylen-7-methoxycumarinester⁴ (BMC-Ester). Die Nachweisempfindlichkeit für Milchsäurenaphthacylester beträgt 1 ng/10 μ l Injektionsvolumen, für Valeriansäurenaphthacylester liegt sie bei 20 ng/10 μ l.

Chromatographische Trennung

Trennungen von Phenacyl- und Naphthacylestern sind in der Literatur beschrieben. Die meisten Trennungen erfolgten auf reversed-phase Material^{7,8,10,13}, eine neuere Arbeit¹⁴ beschreibt die Trennung auf Kieselgel. Die wohl am besten geeignete Trenntechnik ist das Arbeiten auf reversed-phase Säulen unter Einsatz eines Wasser-Acetonitrilgradienten. Fig. 2 zeigt das Chromatogramm einer Eichmischung, wie sie zur externen Standardisierung benutzt wurde.

Fig. 3 zeigt das Chromatogramm der gleichen Eichmischung, aber über den hinter den UV-Detektor angeschlossenen Fluoreszenzdetektor detektiert. Die geringe Zeitverschiebung der Peaks ergibt sich aus der Länge der Verbindungskapillare. Im Fluoreszenzchromatogramm fehlt der Peak des Bromacetonaphtons. Die Chromatogramme eines Blindwertes, der unter peinlichem Ausschluss von Wasser und Natriumchlorid hergestellt wurde und des Parallelansatzes, der mit 20 μ l Wasser versetzt wurde und Natriumchlorid aus isotonischer Natriumchlorid-Lösung enthielt, sind in Fig. 4 übereinander gezeichnet. Man erkennt deutlich das Auftreten der Nebenprodukte. α -Hydroxy-2-acetonaphton erscheint bei einer Retentionszeit (RT) von 2.14 min, α -Chlor-2-acetonaphton bei RT = 7.12 min, ein Wert, der mit dem Retentionswert für Propionsäurenaphthacylester interferiert. Eine Trennung ist bei isokratischer Arbeitsweise und Zusatz von 10% Dimethylformamid, allerdings auf Kosten der Trennzeit zu erreichen, wie in Fig. 5 dargestellt ist. Die Chromatogramme einer typischen Probe aus biologischen Material, nämlich aus 8 mg (Nassgewicht) Zahnplaque, sind in Fig. 6 wiedergegeben. Milchsäure ist dominierend, daneben werden Ameisen-, Essig- und Propionsäure gefunden. Bei UV-Detektion wird das im Peak mit RT = 6.93 min mit enthaltene α -Chloracetonaphton mit erfasst und täuscht zu

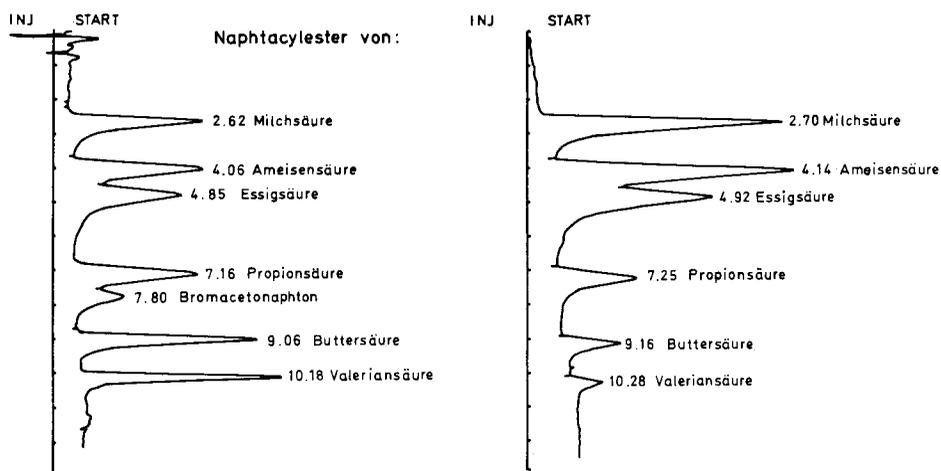


Fig. 2. Trennung von Fettsäurenaphthacylestern. Säule, 250×3 mm I.D., C_{18} LiChrosorb $10 \mu\text{m}$; Temperatur, 35° ; mobile Phase: Wasser-Acetonitril; konvexer Gradient von 38% Acetonitril auf 75% Acetonitril; Flussrate, 2 ml/min; Injektionsvolumen $20 \mu\text{l} \approx$ je 200 ng Fettsäurenaphthacyl-ester; UV-Detektor 245 nm.

Fig. 3. Trennung von Fettsäurenaphthacylestern. Bedingungen wie in Fig. 2. Fluoreszenzdetektor, $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm.

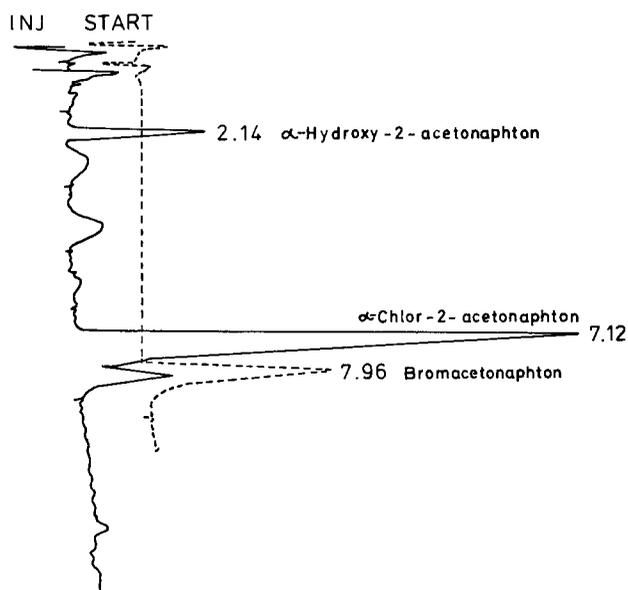


Fig. 4. Chromatogramme von Veresterungsblindwerten. - - - -, unter Ausschluss von Wasser und Natriumchlorid; —, Veresterungsansatz enthielt $20 \mu\text{l}$ Wasser und Natriumchlorid, aus physiologischer Kochsalzlösung. Sonstige Bedingungen wie in Fig. 2.

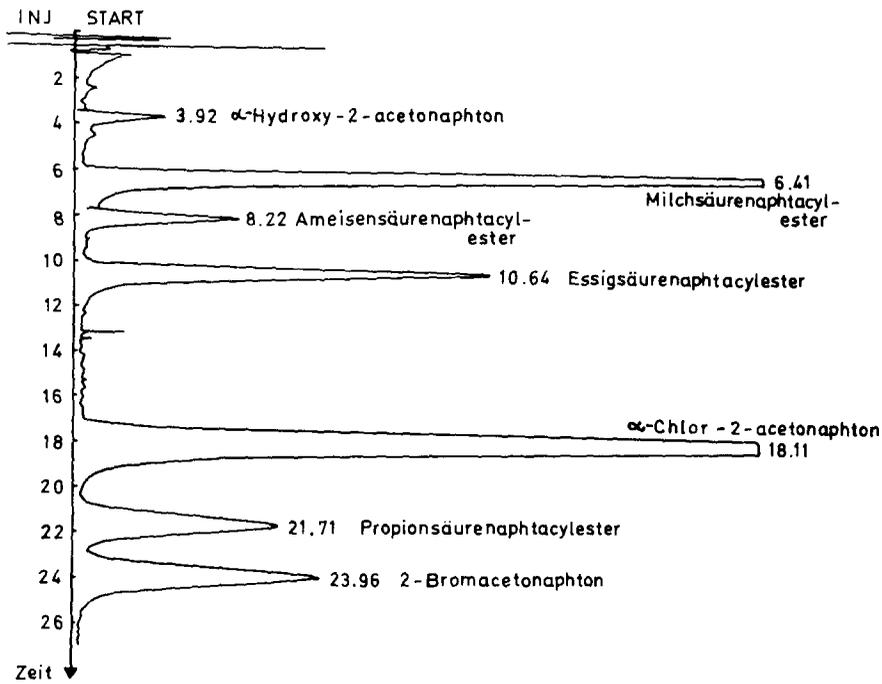


Fig. 5. Isokratische Trennung von Naphtacylestern, α -Hydroxyacetone naphthone und α -Chloracetone naphthone. Mobile Phase, 25% Acetonitril und 10% Dimethylformamid in Wasser. Sonstige Bedingungen wie in Fig. 2.

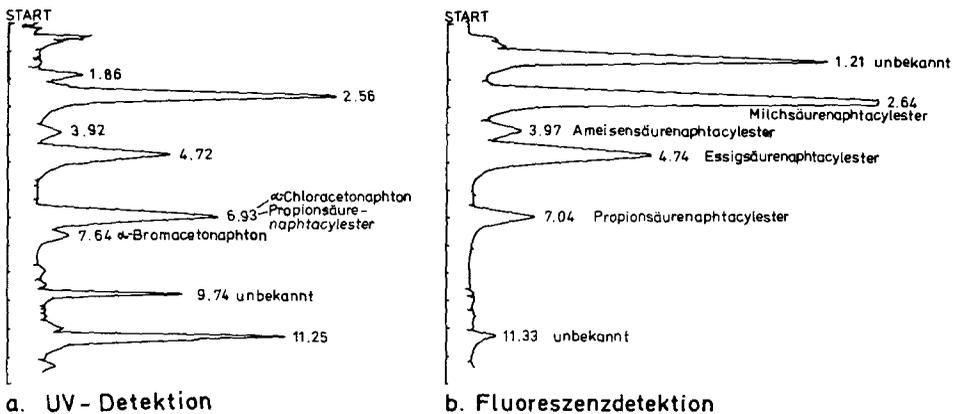


Fig. 6. Naphtacyl-ester aus *in vivo* gebildeten Säuren aus 8 mg (Nassgewicht) Plaque nach Zuckerspülung. Injektionsvolumen 10 μ l. Sonstige Bedingungen wie in Fig. 2.

hohe Werte für Propionsäurenaphthacyl-ester vor. Bei Fluoreszenzdetektion entfällt diese Störung, ebenso die Peaks bei RT = 9.74 min und RT = 1.86 min, dagegen tritt ein neuer Peak einer unbekannt fluoreszierenden Substanz bei RT = 1.21 min auf. Die Substanz bei RT = 11.25 min bzw. 11.33 min ist noch nicht identifiziert, es dürfte sich um eine weitere Säure handeln.

DANK

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe. Frau A. Flach, Frau U. Degiorgio und Frau E. Zitterbart bin ich für ihre zuverlässige experimentelle Mithilfe zu Dank verpflichtet. Besonders danken möchte ich Prof. Dr. A. Kröncke, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Erlangen, der durch sein Interesse und seine wohlwollende Hilfsbereitschaft diese Arbeit ermöglicht hat.

LITERATUR

- 1 J. F. Lawrence und R. W. Frei, *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1976.
- 2 K. Blau und G. S. King, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden & Son, London, 1977.
- 3 W. Lindner und W. Santi, *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 55.
- 4 W. Dünge, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 442.
- 5 W. Dünge und N. Seiler, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 483.
- 6 S. Lam und E. Grushka, *J. Chromatogr.*, 158 (1978) 207.
- 7 H. Engelhard und H. Elgass, *J. Chromatogr.*, 158 (1978) 249.
- 8 M. J. Cooper und M. W. Anders, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1849.
- 9 *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 6. Aufl., 1967, S. 190.
- 10 E. Grushka, H. D. Durst und E. J. Kikta, jr., *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 673.
- 11 H. D. Durst, M. Milano, E. J. Kikta, S. A. Counelly und E. Grushka, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1797.
- 12 J. M. Lehn und J. P. Sauvage, *Chem. Commun.*, (1971) 440.
- 13 H. C. Jordi, *J. Liquid Chromatogr.*, 1 (1978) 215.
- 14 J. Weatherston, L. M. MacDonald, T. Blake, M. H. Benn und Y. Y. Huang, *J. Chromatogr.*, 161 (1978) 347.