

CHROM. 12,724

TRIMETHYLSILYL-ESTER PFLANZLICHER SÄUREN UND IHRE ANWENDUNG IN DER GASCHROMATOGRAPHIE

DARSTELLUNG, KINETIK DER SILYLIERUNG UND EINFLÜSSE VERSCHIEDENER LÖSUNGSMITTEL AUF AUSBEUTE UND STABILITÄT DER DERIVATE

PETER ENGLMAIER

Institut für Pflanzenphysiologie an der Universität Wien, Dr. Karl Lueger-Ring 1, A-1010 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 27. Februar 1979; geänderte Fassung eingegangen am 1. Februar 1980)

SUMMARY

Trimethylsilyl esters of plant acids and their application in gas-liquid chromatography. Preparation, kinetics of silylation and solvent effects on quantitative reaction and stability of the derivatives.

Gas-liquid chromatographic separation of phosphate and organic acids in plant extracts as trimethylsilyl (TMS) derivatives is usually carried out in relatively high boiling solvents (pyridine, dimethylformamide) using internal standards which undergo no reaction with the silylating agent.

It is shown that acetone is advantageous to conventional solvents concerning boiling point, dissolving of the acids and the fact that extremely anhydrous conditions are not needed. Moreover, the reproducibility of results is essentially better for most compounds than with pyridine.

An internal standard forming TMS derivatives compensates for variable reaction conditions and permits the analysis of samples over an extended period of time, since its derivatives are subjected to a similar decomposition as the substances analysed. Butylmalonate met all these requirements.

The kinetics of the silylation reaction and the decomposition of the derivatives were investigated for phosphate and a lot of biologically interesting plant organic acids.

EINLEITUNG

Für die gaschromatographische (GC) Trennung pflanzlicher organischer Säuren werden vor allem Methyl ester und Trimethylsilyl (TMS)-Ester herangezogen. Nur in wenigen Fällen ist die Flüchtigkeit der Säuren für eine direkte GC-Analyse ausreichend.

Die Methylierung wird entweder durch Gemische aus wasserfreiem Methanol mit HCl bzw. BF₃ oder durch Diazomethan erreicht¹. Störungen durch C=C und

C=O Gruppen können Mehrfachpeaks zur Folge haben². Diese Nebeneffekte können durch Darstellung der TMS-Ester vermieden werden, für deren Bereitung bereits eine Vielzahl Reagenzien von unterschiedlicher TMS-Donorstärke entwickelt wurden. Üblicherweise gelangen für organische Säuren Trimethylchlorosilan (TMCS), Gemische aus TMCS und Hexamethyldisilazan (HMDS)^{3,9} sowie N,O-bis(TMS)-trifluoroacetamid (BSTFA) und N,O-bis(TMS)acetamid (BSA)^{4,6,11} zur Anwendung. Nebenreaktionen, die zu Mehrfachderivatbildung führen, wurden nur bei Vorhandensein enolisierbarer Ketogruppen (z.B. bei α -Ketoglutarat) beobachtet, sie können durch Methoximierung der Carbonyle ausgeschlossen werden^{4,5}.

Die genaueste Methode zur quantitativen Bestimmung der Komponenten ist die Zugabe eines internen Standards (I.S.). Bei der Wahl der Standardsubstanz ist aber darauf Rücksicht zu nehmen, dass nicht nur Fehler durch schwankende Einspritzmengen und Detektorempfindlichkeit ausgeglichen werden, sondern dass auch Unterschiede in den Reaktionsbedingungen und der kontinuierliche Abbau der Derivate über längere Zeiträume mit erfasst werden. Letzteres ist eine essentielle Voraussetzung für den Einsatz in automatischen Probengebern. Dabei wird ja eine grössere Zahl Ansätze zur gleichen Zeit bereitet und anschliessend sequenziell vom Automaten zur Analyse herangezogen.

Als Standardsubstanzen werden in der Literatur fast ausschliesslich aromatische Verbindungen ohne funktionelle Gruppen vorgeschlagen, so etwa Diphenyl^{5,16}. Sie können den vorhin erläuterten Anforderungen nicht genügen, da sie nicht silyliert werden und damit Schwankungen in den Reaktionsbedingungen und dem langsamen Abbau der TMS-Ester bei längeren Wartezeiten zwischen Bereitung und Analyse des Reaktionsgemisches nicht unterworfen sind wie die zu analysierenden Substanzen. Ausserdem muss darauf geachtet werden, dass eine vollständige Trennung der Standardsubstanz von den Komponenten der Analysenlösung erzielt wird.

Die Silylierung wird entweder lösungsmittelfrei¹³, in Pyridin^{8,11} oder Dimethylformamid¹² durchgeführt. Da die verwendeten Lösungsmittel aber relativ hohe Siedepunkte aufweisen (Pyridin: 116 °C, Dimethylformamid: 153 °C bei 1 bar) und Säuren nur sehr langsam lösen, wurde nach einem leichter flüchtigen und besser lösenden Solvens gesucht.

Die lösungsmittelfreie Silylierung befriedigt nicht, da die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Auflösung der Festsubstanzen bestimmt wird und damit ziemlich gering ist¹⁴.

Zur GC-Trennung der TMS-organischen Säuren ist eine stationäre Phase geringer Polarität ausreichend. Die erforderliche thermische Stabilität weisen Silikone auf, etwa die Präparate SE-30 und SE-52^{9,11}. Wegen seiner hohen thermischen Belastbarkeit wurde hier Dexil 300 verwendet.

EXPERIMENTELLES

Die in natürlichen Proben häufig auftretenden Komponenten Glykolsäure, Oxalsäure, Malonsäure, Äpfelsäure, Citronensäure sowie anorganisches Phosphat* wurden als repräsentativ für den Flüchtigkeitsbereich der TMS-Ester pflanzlicher Säuren für die Untersuchung ausgewählt.

* Zur Bestimmung von anorg. Phosphat als TMS-Derivat siehe Hashizume und Sasaki¹⁵.

Als I.S. diente Butylmalonsäure (p.A., 1.6 mg/ml in Aceton p.A.; Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Die organischen Komponenten (p.A.) wurden zu je 1.6 mg/ml in Aceton (p.A.) gelöst. Phosphat lag als wässrige Orthophosphorsäure (85% H_3PO_4 p.A.; Merck) 1:250 verdünnt. Der genaue PO_4 -Gehalt ist durch elektrochemische Titration leicht zu ermitteln.

In 2-ml Probefläschchen (Hewlett-Packard HP 62311-S29) wurden 0.1 ml Phosphatlösung im Vakuum bei Zimmertemperatur (20 °C) abgetrocknet, danach 0.5 ml Aceton-Lösung der organischen Säuren zugesetzt. Nach neuerlichem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 0.5 ml I.S.-Lösung zugesetzt, einige Sekunden leicht geschüttelt und 0.3 ml BSA (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) zugesetzt. Für die Untersuchungen mit anderen Lösungsmitteln wurde eine I.S.-Lösung gleicher Konzentration mit dem betreffenden Lösungsmittel an Stelle der I.S.-Lösung in Aceton eingesetzt. Die volumetrischen Operationen wurden mit Hamilton-Spritzen 725 N, 1001 LTN und Eppendorf-Pipetten 0.1 ml durchgeführt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung in 0.07-ml Portionen auf 0.2-ml fassende Glaseinsätze aus 5×0.5 mm Glasrohren, passend in die HP 62311-S29 Probefläschchen aufgeteilt⁸ und die Fläschchen mit PTFE-Gummi Bördekkappen verschlossen. Die Ansätze wurden sodann bei Zimmertemperatur (20 °C) bis zur Analyse aufbewahrt. So konnten zehn identische, in ihrer Zusammensetzung nicht von Pipettierungsfehlern behaftete Reaktionsansätze im automatischen Probengeber eingesetzt werden.

Die Analyse wurde anschliessend mit einem Gaschromatograph Hewlett-Packard HP 5835A mit automatischer Einspritzeinheit 7671A (Spritze Hamelton 701 RN) durchgeführt.

Säule: Dexil 300 GC (Applied Science Labs., State College, PA, U.S.A.) 3%ig auf Chromosorb W HP, 80–100 mesh (Pierce Eurochemie, Rotterdam, Niederlande); Säulendimension 6 ft. \times 2 mm; on-column injection; einsäuliger Betrieb.

GC-Konditionen: Initialtemperatur 105 °C; Rate 3 °C von 0–10 min (105–135 °C), 5 °C von 10–23 min (135–200 °C); Endtemperatur 200 °C; Einspritzeinheit 220 °C; Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID) 300 °C; Signalabschwächung 2⁸; Die Abgase wurden durch Absaugen mittels Wasserstrahlvakuum unschädlich gemacht; Gesamtlaufzeit 25.0 min; Zyklusdauer (von Einspritzung zu Einspritzung) 30.0 min; Trägergas N_2 p.A. wasserfrei, Durchfluss 20 ml/min; Einspritzvolumen 1.6 μ l.

ERGEBNISSE

Vergleich der Lösungsmittel

Für diese Untersuchungen wurden 3 Lösungsmittel gewählt: (a) Dichlormethan p.A. wasserfrei, Siedepunkt 41 °C bei 1 bar; (b) Aceton p.A., Wassergehalt max. 0.3%, Siedepunkt 56 °C; (c) Pyridin p.A. wasserfrei, Siedepunkt 116 °C.

Die Auswahl von a und b wurde nach dem Gesichtspunkt vorgenommen, möglichst niedrig siedende Lösungsmittel, die keine Nebenreaktionen mit dem TMS-Donor eingehen können, zu finden. Pyridin (c) ist das für Silylierungen gebräuchlichste Lösungsmittel, während etwa Aceton kaum verwendet wird*.

* Collier und Grimes¹³ zeigen die Verwendung von Aceton als Lösungsmittel für den internen Standard, dieser wird aber erst nach der (lösungsmittelfreien) Silylierungsreaktion zugesetzt.

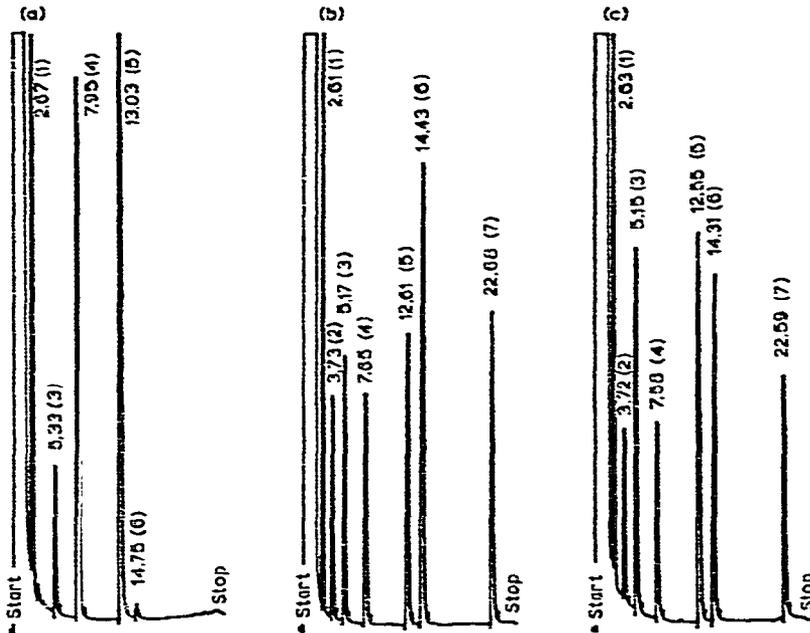


Fig. 1. Gaschromatogramme der TMS-Ester der untersuchten Substanzen in den Lösungsmitteln Aceton (a), Pyridin (b), Dichlormethan (c). Konzentrationen und Derivatisierungsprozess sind im Abschnitt Experimentelles angeführt. Die in der Mischung enthaltenen Komponenten sind: Glykolat (1), Oxalat (2), Malonat (3), Orthophosphat (4), I.S. Butylmalonat (5), Malat (6), Citrat (7). Zu jedem peak erscheint ferner die Retentionszeit in Minuten.

Fig. 1a zeigt, dass Dichlormethan einige Komponenten nicht löst und daher nicht verwendet werden kann.

Aceton und Pyridin als Solventien (Fig. 1b und c) zeigen, abgesehen von einem bei Pyridin etwas stärkeren "tailing" des Lösungsmittelpeaks, der die Bestimmung von Glykolat stört (siehe Tabelle I), im detector response und damit in der Ausbeute an

TABELLE I

VERGLEICH DER REPRODUZIERBARKEIT DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG MIT UNTERSCHIEDLICHEN LÖSUNGSMITTELN

n = Anzahl der Bestimmungen, \bar{Q} = Mittelwert der Quotienten $\text{area}_x/\text{area}_{1.s.}$, s_Q = Standardabweichung, $s_Q(\%)$ = Standardabweichung in % des Mittelwertes.

	Lösungsmittel							
	Aceton				Pyridin			
	n	\bar{Q}	s_Q	$s_Q(\%)$	n	\bar{Q}	s_Q	$s_Q(\%)$
Glykolat	76	0.9946	0.0183	1.83	76	0.9587	0.1642	17.12
Oxalat	76	1.0045	0.0478	4.78	76	1.1183	0.0916	7.74
Malonat	76	0.9709	0.0226	2.33	76	0.9816	0.0154	1.57
Orthophosphat	76	1.0027	0.0145	1.45	76	0.9866	0.0308	3.12
Malat	76	1.0104	0.0133	1.31	76	1.0071	0.0064	0.64
Citrat	76	1.0324	0.0393	3.80	76	1.0167	0.0457	4.49

TMS-Ester der untersuchten Substanzen nur sehr geringfügige Differenzen. Deutliche Unterschiede treten jedoch im Fall der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hervor, diese ist bei Anwendung von Aceton in 3 Fällen (Glykolat, Oxalat und Citrat) wesentlich besser (siehe Tabelle II). Die Werte von Malonat, Phosphat und Malat unterscheiden sich nur geringfügig.

TABELLE II

DETECTOR-RESPONSE-VERGLEICH BEI VERWENDUNG VERSCHIEDENER LÖSUNGSMITTEL

Die Analysenbedingungen sind im Abschnitt Experimentelles angegeben. Die Analyse erfolgte 60 min nach Bereiten des Ansatzes. Es wurden die Quotienten $Q = \text{area}_x/\text{area}_{1.5}$ und die Standardabweichungen aus jeweils 4 Bestimmungen errechnet und auf $Q = 1.000$ bezogen. n = Zahl der Bestimmungen; s_Q = Standardabweichung, auf $Q = 1.000$ bezogen.

Substanz	Lösungsmittel			
	Aceton		Pyridin	
	n	s_Q	n	s_Q
Glykolat	4	0.0022	4	0.0147
Oxalat	4	0.0065	4	0.0453
Malonat	4	0.0041	4	0.0054
Orthophosphat	4	0.0007	4	0.0008
Malat	4	0.0017	4	0.0031
Citrat	4	0.0040	4	0.0215

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der mit diesen beiden Lösungsmitteln gewonnenen Ergebnisse bei längerer Aufbewahrung der Reaktionsansätze wurden die Quotienten $Q = \text{area}_x/\text{area}_{1.5}$ bezogen auf $Q = 1000$ bei $t = 60$ min für Zeiten von 60 bis 600 min nach Bereiten der Ansätze in 30-min Intervallen ermittelt. Die Konzentration der Testsubstanzen und die Derivatisierungsprozedur sind im Abschnitt Experimentelles angeführt. Jeder Ansatz wurde $4 \times$ wiederholt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. Es zeigt sich bei Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel deutlich schlechtere Reproduzierbarkeit der Resultate bei den Komponenten Glykolat, Oxalat, Phosphat und Citrat, bei Malonat und Malat ist sie geringfügig besser. Das schlechte Ergebnis bei Glykolat hängt mit der langsamen Eluierung von Pyridin von der Säule und dem dadurch verursachten Zusammenhängen des Lösungsmittelpeaks mit dem TMS-Glykolatpeak zusammen.

Insgesamt gesehen sind die mit Aceton gewonnenen Ergebnisse wesentlich gleichmässiger.

Kinetische Untersuchung der Silylierungsreaktion

Die Aufbauphase der TMS-Ester. Hiefür wurden die Reaktionszeiten unter 60 min betrachtet. Es wurden Analysen identischer Ansätze (Lösungsmittel Aceton) jeweils nach 10, 20, 30 und 60 min durchgeführt und jeder Ansatz $4 \times$ wiederholt. Die so erhaltenen Werte für die Peakflächen wurden auf $C = 1000$ bei $t = 60$ min bezogen und aus den 4 Parallelansätzen Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Daraus wurde die Kurve Konzentrationsverlauf der TMS-Ester/Zeit nach der Formel

$$C = 1 - e^{-kt} \quad (1)$$

errechnet:

<i>Substanz</i>	<i>k</i>
Glykolat	0.321
Oxalat	0.180
Malonat	0.327
Orthophosphat	0.252
Malat	0.238
Citrat	0.158
I.S. (Butylmalonat)	0.238

Die untersuchten Substanzen sind in der Geschwindigkeit ihrer Trimethylsilylierung in homogener Lösung sehr unterschiedlich. Eine äusserst schnelle Reaktion, wie sie Donike¹⁴ für Ephedrinchlorid angibt, konnte hier nicht festgestellt werden. So reagieren die Komponenten Oxalat und Citrat sehr langsam, was die niederen *k*-Werte zeigen. Wesentlich schneller verläuft die Reaktion bei Glykolat und Malonat, während die übrigen Komponenten und der I.S. zwischen diesen beiden Extremen liegen. Trotzdem ist eine Analyse von ausgezeichneter Genauigkeit schon knapp nach Bereiten des Reaktionsansatzes möglich, da der I.S. durch seine mittlere Reaktionsgeschwindigkeit ausgleichend wirkt.

Auch durch den Einsatz anderer, für die Analyse organischer Säuren und ähnlicher Stoffklassen vorgeschlagener TMS-Donorsubstanzen ist keine wesentliche Beschleunigung der Silylierung zu erreichen. Ausserdem erfordert die Anwendung halogenhaltiger Silylierungsmittel (BSTFA, TMCS) spezielle Vorsichtsmassnahmen zur Vermeidung von Korrosion und Gesundheitsschäden beim Bedienungspersonal.

Stabilität der Derivate über längere Zeiträume. Hiefür wurde der Bereich zwischen 60 und 600 min nach Bereiten der Ansätze betrachtet. In dieser Zeit können bei einer Zyklusdauer von 30 min 19 Proben analysiert werden (das entspricht etwa der Kapazität des verwendeten Probengebers).

Wie für den Abschnitt *Die Aufbauphase der TMS-Ester* wurden 4 identische Ansätze (Lösungsmittel Aceton) bereitet und nach einer Wartezeit von 60 min in 30-min Intervallen analysiert. Konzentrationen, Derivatisierungsprozedur und GC-Konditionen sind im Abschnitt Experimentelles erläutert. Die Werte für die Peakflächen wurden auf $C = 1000$ bei $t = 60$ min bezogen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die leichtest zersetzlichen Derivate (TMS-Oxalat und -Malonat) hier den Kulminationspunkt ihrer Konzentration erreichen.

Zur Auswertung wurde die Regressionsgerade berechnet:

<i>Substanz</i>	<i>n</i> *	<i>Gleichung der Regressionsgeraden</i>
Glykolat	76	$C = 0.9847 + 1.825 \cdot 10^{-5} t$
Oxalat	76	$C = 0.9801 - 3.234 \cdot 10^{-5} t$
Malonat	76	$C = 0.9886 - 5.972 \cdot 10^{-5} t$
Orthophosphat	76	$C = 0.9821 + 3.462 \cdot 10^{-5} t$
Malat	76	$C = 0.9815 + 6.645 \cdot 10^{-5} t$
Citrat	76	$C = 0.9817 + 3.827 \cdot 10^{-5} t$
I.S. (Butylmalonat)	76	$C = 0.9831 + 2.807 \cdot 10^{-5} t$

* *n* = Zahl der Bestimmungen.

Dabei lassen sich die untersuchten Substanzen in 3 Gruppen einteilen:

(a) Diese Gruppe bildet sehr rasch zersetzliche Derivate (Oxalat, Malonat).

(b) Hier ist die maximale Ausbeute noch nicht erreicht, die Konzentration steigt stetig an (Malat).

(c) Die Komponenten weisen nur noch einen leichten Konzentrationsanstieg auf (Phosphat, Glykolat, Citrat, I.S.).

Die Wahl des Standards wurde auch danach vorgenommen, die unterschiedliche Stabilität der Derivate auszugleichen. Butylmalonat gehört der Gruppe (c) an und erfüllt daher diese Anforderung.

Weitere Tests ergaben, dass die Stabilität der Derivate ausreicht, um auch mit über 50 h alten Reaktionsansätzen noch hinreichend genaue Analysenergebnisse zu erzielen.

Die Reproduzierbarkeit der Analyse mit internem Standard

Hiefür wurden die Ergebnisse der Kurzzeitversuche 10–60 min und der Langzeitstreißen 60–600 min (jeweils in Aceton als Lösungsmittel) als Quotienten $Q = \text{area}_x / \text{area}_{\text{I.S.}}$ dargestellt und auf den Wert $Q = 1000$ bei $t = 60$ min bezogen. Jede Testreihe wurde $4 \times$ wiederholt.

Mittelwerte, Standardabweichung und die Regressionsgeraden wurden für jede Komponente ermittelt und in Tabelle III zusammengestellt. Die graphische Darstellung der Regressionsgeraden zeigt Fig. 2.

TABELLE III

REPRODUZIERBARKEIT DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNGEN BEI ANWENDUNG VON BUTYLMALONAT ALS I.S. (LÖSUNGSMITTEL ACETON)

n = Zahl der Bestimmungen; \bar{Q} = Mittelwert der Quotienten $\text{area}_x / \text{area}_{\text{I.S.}}$; s_Q = Standardabweichung; $s_Q(\%)$ = Standardabweichung in % des Mittelwertes.

Substanz	n	\bar{Q}	s_Q	$s_Q\%$	Gleichung der Regressionsgeraden
<i>Zeitbereich $t = 10-60$ min</i>					
Glykolat	16	1.0304	0.0424	4.11	$C = 1.0419 - 44.00 \cdot 10^{-5} t$
Oxalat	16	0.9714	0.0251	2.58	$C = 0.9597 + 44.53 \cdot 10^{-5} t$
Malonat	16	1.0135	0.0115	1.13	$C = 1.0258 - 46.92 \cdot 10^{-5} t$
Orthophosphat	16	1.0041	0.0096	0.96	$C = 1.0129 - 33.22 \cdot 10^{-5} t$
Malat	16	0.9968	0.0041	0.41	$C = 0.9982 - 5.65 \cdot 10^{-5} t$
Citrat	16	0.9619	0.0186	1.86	$C = 0.9545 + 28.08 \cdot 10^{-5} t$
<i>Zeitbereich $t = 60-600$ min</i>					
Glykolat	76	0.9946	0.0183	1.84	$C = 0.9946 + 0.434 \cdot 10^{-3} t$
Oxalat	76	1.0045	0.0478	4.75	$C = 1.0198 - 4.631 \cdot 10^{-5} t$
Malonat	76	0.9709	0.0226	2.32	$C = 0.9984 - 8.336 \cdot 10^{-5} t$
Orthophosphat	76	1.0027	0.0145	1.44	$C = 1.0010 + 0.485 \cdot 10^{-5} t$
Malat	76	1.0103	0.0133	1.32	$C = 1.0006 + 2.951 \cdot 10^{-5} t$
Citrat	76	1.0323	0.0392	3.80	$C = 1.0280 + 1.207 \cdot 10^{-5} t$

Dabei ist zu ersehen, dass bei Berücksichtigung des Mittelwertes eine durchschnittliche Analysengenauigkeit von $\pm 2.21\%$ im Zeitbereich von 10 bis 600 min nach Bereiten des Reaktionsansatzes erzielt werden kann (wobei die am stärksten schwankende Komponente, Oxalat, über eine Abweichung von $\pm 4.75\%$ nicht

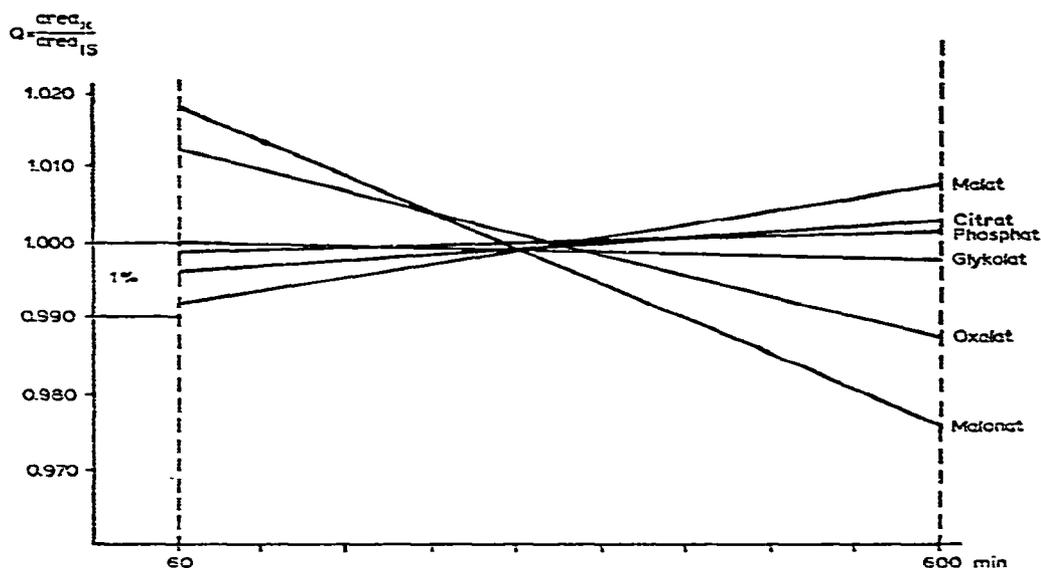


Fig. 2. Regressionsgerade der Quotienten $Q = \text{area}_{1t} / \text{area}_{1s}$, bezogen auf die Mittelwerte \bar{Q} der untersuchten Substanzen (Gleichung der Regressionsgeraden in Tabelle III).

hinausgeht). Dieser Wert kann durch Anwendung der Formel für die Regressionsgerade noch weiter verbessert werden.

DISKUSSION

Für Silylierungsreaktionen werden üblicherweise relativ hoch siedende Lösungsmittel, zumeist Pyridin^{7,11} und wasserfreies Arbeiten vorgeschlagen. Auf der Suche nach einem niedriger siedenden Lösungsmittel wurde unter anderem Aceton erprobt, wobei entscheidend bessere Löslichkeit der untersuchten organischen Säuren beobachtet werden konnte. Der geringe Wassergehalt des benützten Präparates (max. 0.3%) stört die Silylierungsreaktion in keinem Fall, da der molare Überschuss an Silylierungsmittel ausreichend gross ist. Für einen Ansatz wie im Abschnitt Experimentelles beschrieben bedeutet dies: BSA (Molekulargewicht 203.46, Dichte 0.830 g/ml); Testsubstanzen (11.2 mg/ml Gesamtkonzentration, Molekulargewicht durchschnittlich 125, durchschnittlich 2.6 silylierbare Gruppen pro Mol Säure); Aceton (max. Wassergehalt 0.3% = 3 mg Wasser/ml Aceton); Gesamte Silylierungskapazität: 0.300 ml BSA = 2.46 mval TMS-Gruppen; Verbrauch durch die Testsubstanzen: 0.500 ml Lösung = 0.12 mval Säure \triangleq 4.9% der Silylierungskapazität; Verbrauch durch den Wassergehalt: 0.500 ml Aceton \triangleq 0.083 mmol Wasser \triangleq 3.4% der Silylierungskapazität.

Bei den hier eingesetzten Mengenverhältnissen werden also durch den Wassergehalt des Lösungsmittels 3.4% der Silylierungskapazität aufgebraucht, eine Menge, die angesichts des 12 fachen Überschusses an TMS-Donor (in jedem Ansatz werden insgesamt 8.3% der Silylierungskapazität verbraucht) die mühevollen Prozedur der Herstellung wasserfreien Acetons nicht rechtfertigt. Ausserdem verbessert der Wassergehalt die Löslichkeit der hydrophilen Säuren.

Die Resultate der Untersuchungen zeigen, dass die Schwankungen in der Ausbeute der Derivate bei Anwendung von Aceton als Lösungsmittel geringer und damit die Analyseergebnisse weit besser sind als im Fall von Pyridin.

Weitere Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren bietet die Anwendung einer silylierbaren Standardsubstanz. Sie ermöglicht eine exakte Analyse im untersuchten Zeitbereich von 10–600 min. Das Einhalten einer bestimmten Reaktionszeit (wie bei der Anwendung nicht silylierbarer Standardsubstanzen) wird dadurch vermieden.

DANK

Die vorliegende Arbeit wurde durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung im Rahmen von Projekt Nr. 3042 unterstützt. Herrn Dr. Georg A. Janauer sei für seine Anregungen und die Unterstützung beim Aufarbeiten der Daten sowie für die kritische Korrektur des Manuskriptes an dieser Stelle bestens gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die zur GC-Trennung von Phosphat und pflanzlichen organischen Säuren als TMS-Derivate bisher vorgeschlagenen Methoden arbeiten mit relativ hoch siedenden Lösungsmitteln (Pyridin, Dimethylformamid) und nicht derivatisierbaren internen Standards.

Es konnte nunmehr gezeigt werden, dass Aceton gegenüber den herkömmlichen Lösungsmitteln entscheidende Vorteile hat (niedrigerer Siedepunkt, besseres Lösungsvermögen für die untersuchten Substanzen, ohne Entfernen von Wasserspuren verwendbar) und ausserdem verglichen mit Pyridin die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse wesentlich besser ist.

Ein silylierbarer interner Standard gleicht nicht nur unterschiedliche Reaktionsbedingungen aus, sondern ermöglicht auch die unterschiedlich lange Aufbewahrung der Reaktionsansätze vom Zeitpunkt der Bereitung bis zur Analyse, da sein TMS-Derivat ebenso wie die der untersuchten Substanzen einem, wenn auch langsamen Zerfall unterliegt. Butylmalonsäure entsprach diesen Anforderungen.

Die Kinetik der Silylierungsreaktion und des Abbaues der Derivate wurde untersucht und das unterschiedliche Verhalten biologisch interessanter pflanzlicher Säuren dokumentiert.

LITERATUR

- 1 A. Sasson, Y. Erner und S. P. Monselise, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976), 652.
- 2 N. W. Alcock, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 335.
- 3 E. Fernandez-Flores, D. A. Kline und A. R. Johnson, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 17.
- 4 M. G. Horning, E. A. Boucher, A. M. Moss und E. C. Horning, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 713.
- 5 D. Nierhaus und H. Kinzel, *Z. Pflanzenphysiol.*, 64 (1971) 107.
- 6 J. F. Klebe, H. Finkbeiner und D. M. White, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88 (1966) 3390.
- 7 A. Pinelli und A. Colombo, *J. Chromatogr.*, 118 (1976) 236.
- 8 G. A. Janauer und P. Englmaier, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 1494.
- 9 Z. Horii, M. Makita und Y. Tamura, *Chem. Ind. London*, 34 (1965) 1494.

- 10 R. B. Clark, *Crop Sci.*, 9 (1969) 341.
- 11 R. D. Phillips und D. H. Jennings, *New Phytologist*, 77 (1976) 333.
- 12 J. R. Baur und R. D. Baker, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 713.
- 13 R. H. Collier und G. S. Grimes, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 781.
- 14 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 85 (1973) 1.
- 15 T. Hashizume und Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, 21 (1967) 316.
- 16 W. W. Fike, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 25.