

CHROM. 13,276

COMPORTEMENT ET SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE DES ACIDES DICARBOXYLIQUES À COURTE CHAÎNE

M. J. WAECHTER

Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)

et

M. C. PFAFF-DESSALLES et G. MAHUZIER*

Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier Spécialisé de Villejuif, 54 Avenue de la République, 94800 Villejuif (France)

SUMMARY

Behaviour and separation of short-chain dicarboxylic acids by gas chromatography on glass capillary columns

The gas-liquid chromatographic behaviour of 26 dicarboxylic compounds usually found in biological fluids is described. After butylation by BF_3 -butanol 14% (w/v) the esters are separated on a 11.5% Carbowax 20M, WCOT glass capillary column.

The compounds formed are identified by combined gas chromatography-mass spectrometry. Their capacity factors and methylene unit values can be applied to predict their separation.

INTRODUCTION

De nombreux dérivés dicarboxyliques à courte chaîne se rencontrent dans les milieux biologiques¹⁻³. L'augmentation ou l'apparition de certains d'entre eux peuvent traduire des variations physiologiques⁴ ou pathologiques^{5,6}, des désordres métaboliques ou génétiques^{1,7-9} ou être consécutifs à certaines thérapeutiques tout particulièrement en milieu psychiatrique¹⁰⁻¹². Les séparations les plus efficaces de dérivés dicarboxyliques sont actuellement effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire¹³⁻¹⁶ après, le plus souvent, transformation préalable de ces composés en dérivés silylés^{5,7,17}, méthylés^{14,18}, butylés¹⁸⁻²⁰ ou cyclohexylés²¹.

La plupart de ces études ayant trait aux dérivés monocarboxyliques, le comportement chromatographique sur colonne capillaire des butylesters de 26 dérivés dicarboxyliques (C_2 - C_{10}) les plus souvent rencontrés dans les milieux biologiques est ici envisagé.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Produits de référence

Les dérivés dicarboxyliques étudiés sont les suivants: acide oxalique, succinique, glutarique, adipique, méthyl-3-maléique, maléique, fumarique, maléique (Pro-labo, Paris, France); acide pimélique, subérique, azélaïque, méthylmalonique, éthylmalonique, méthyl-3-glutarique, tartronique, hydroxy-2-méthyl malonique, hydroxy-2-succinique, hydroxy-3-méthyl-3-glutarique, oxomalonique, oxaloacétique, oxo-2-glutarique, oxo-3-glutarique (Fluka, Buchs, Suisse), acide malonique (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J., U.S.A.), acide α -cétoadipique (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.), hydroxy-2-glutarate disodique, citromalate dipotassique (Fluka). Le bibutyl adipate provient de Merck (Munich, Allemagne) et les carbures saturés de référence C₁₆ à C₁₈ d'Applied Sciences Labs. (State College, PA, U.S.A.).

Les solutions de ces acides sont préparées par dissolution directe dans le butanol (1 mg ml⁻¹).

Lorsque les dérivés dicarboxyliques sont commercialisés sous forme de sel alcalin, des solutions de ces sels à 2 mg ml⁻¹ sont effectuées dans l'eau; les acides sont ensuite extraits par le butanol après acidification par l'acide chlorhydrique.

Réactifs et solvants

Le réactif de butylation BF₃-butanol 14% (w/v) provient d'Interchim (Montluçon, France), le chloroforme et le butanol de Prolabo normapur (Paris, France).

Appareillage

Chromatographie en phase gazeuse. L'appareil utilisé est un chromatographe Girdel 300 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur-diviseur Girdel en verre pour colonne capillaire. La colonne capillaire (WCOT) de 50 m de long et 0.26 mm de diamètre interne est imprégnée d'un film de Carbowax 20M (11.5%) de 0.2 μ m d'épaisseur. Le nombre de plateaux est de 30,000.

La température de l'injecteur est de 280°C, celle du détecteur 300°C. Les échantillons ont été chromatographiés soit en isotherme à 120 ou 150°C selon les cas, soit en programmation de température de 100 à 200°C (5°C min⁻¹). Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec une pression d'entrée de 0.3 bar. La fuite est réglée pour obtenir un rapport de division d'environ 1/100ème.

L'appareil est relié à un enregistreur Servotrace 1 cm min⁻¹.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le chromatographe est un appareil Girdel couplé à un spectromètre de masse Nermag GC-MS R10-10B (Rueil-Malmaison, France). La colonne capillaire de 21 m de long et 0.21 mm de diamètre interne est imprégnée d'un film d'Ucon 75 H 90,000 de 0.147 μ m d'épaisseur. Le gaz vecteur est de l'hélium dont la pression d'entrée dans la colonne est de 1.2 bar.

Technique de butylation

La butylation est effectuée selon la méthode proposée par Lambert et Moss²⁰ par action directe du réactif BF₃-butanol sur les solutions butanoliques des diacides.

Dans des tubes de 5 ml bouchés émeri, 100 μ l de la solution butanolique de

diacide à 1 mg ml⁻¹ sont mis en contact avec 100 µl de réactif BF₃-butanol et portés à 100°C pendant 10 min.

Après refroidissement l'ester formé est agité au Vortex pendant 1 min avec 100 µl de chloroforme. Après 10 min de repos à la température du laboratoire, l'excès de BF₃ est éliminé par lavage rapide à l'aide de 200 µl d'eau distillée. La phase aqueuse est ensuite éliminée et la phase chloroformique séchée sur sulfate de sodium.

0.25 à 1 µl de la solution chloroformique sont injectés directement.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Afin de déterminer les meilleures conditions de séparation, le comportement des dibutylesters a été étudié à différentes températures. Les facteurs de capacité, *k'*, ont été calculés en température isotherme et les indices de méthylène en programmation de température. Ce calcul des indices utilisé avec profit pour l'étude du comportement des stéroïdes²², des alcools à longues chaînes²³ et des sucres²⁴, a été effectué à l'aide d'une série de carbures saturés à nombre pair d'atomes de carbone compris entre l'hexadécane et l'octacosane.

Ces différents résultats sont regroupés dans les Tableaux I et II; le Tableau I concerne les diacides linéaires, ramifiés ou insaturés ne portant pas d'autres groupements fonctionnels, le Tableau II les diacides porteurs d'un groupement hydroxylé ou cétonique.

Dans chaque série un ou plusieurs dérivés ont été analysés en spectrométrie de masse.

Dérivés linéaires, ramifiés, saturés ou insaturés: Tableau I

Les dibutylesters formés ne donnent qu'un seul pic sur les chromatogrammes. Leur identité a été confirmée par spectrométrie de masse. A titre d'exemple le spectre

TABLEAU I

FACTEUR DE CAPACITÉ *k'* ET INDICE DE MÉTHYLÈNE DES BUTYLESTERS DE DIACIDES SATURÉS LINÉAIRES, RAMIFIÉS ET INSATURÉS

Nombre de C	Acides	<i>k'</i>	Température (°C)	Indice de méthylène
2	Oxalique	0.333	150	16.442
3	Malonique	0.611	150	17.594
4	Succinique	1.037	150	19.066
5	Glutarique	1.924	150	20.000
6	Adipique	1.877	160	21.166
7	Pimélique	1.821	170	22.187
8	Subérique	2.581	170	23.235
9	Azélaïque	1.757	190	24.125
10	Sébacique	3	190	25.133
4	Méthylmalonique	0.444	150	16.781
5	Éthylmalonique	0.611	150	17.594
6	Méthylglutarique	1.653	150	19.733
4	Maléique (<i>cis</i>)	1.423	150	19.366
	Fumarique (<i>trans</i>)	0.892	150	18.666
5	Méthylmaléique ou citraconique	0.620	150	19.500

TABLEAU II

FACTEUR DE CAPACITÉ DES BUTYLESTERS DE DIACIDES HYDROXYLÉS ET CÉTONIQUES

Nombre de C	Acides	k'	Température (°C)
3	Tartronique	*	
4	Malique	*	
5	Hydroxy-2-glutarique	1.076	150
4	Hydroxy-2 méthyl-2-malonique	0.551	150
5	Hydroxy-2 méthyl-2-succinique (citramalique)	0.616	150
6	Hydroxy-3-méthyl-3-glutarique	1.596	150
3	Oxomalonique	0.388	120
4	Oxaloacétique	0.666	120
5	Oxo-2-glutarique	1.70	120
—	Oxo-3-glutarique	0.750	120
6	Oxo-2-adipique	2.6	120

* Ininterprétable.

du bidutylester formé avec l'acide adipique a été comparé avec celui du dibutyl-adipate commercialisé.

Leurs facteurs de capacité ou leurs indices de méthylène montrent que ces différents composés peuvent être aisément séparés sur ce type de colonne et dans les conditions mentionnées (Fig. 1). Les temps de rétention augmentent avec le nombre d'atomes de carbone et sont influencés par la structure des dérivés : les composés ramifiés ont des temps de rétention nettement inférieurs à leurs isomères linéaires; l'ester de l'acide fumarique dérivé *trans*, insaturé est moins retenu que son homologue saturé le dibutyl succinate à la différence de son isomère *cis*, insaturé le dibutyl maléate. Contrairement à ce qui a été observé sur d'autres colonnes (OV-101, OV-17, EGS, NPGA⁸, l'acide méthylmalonique se sépare des acides malonique ou éthyl malonique, ces deux derniers dérivés ayant par contre ici le même comportement.

Spectre de masse du dibutyladipate (Fig. 2a). Le spectre de masse du dibutyl-adipate formé par action du BF₃-butanol dans les conditions décrites et celui d'un dibutyladipate de référence, sont identiques.

On peut noter l'absence d'ion moléculaire ce qui est observé également dans tous les dérivés étudiés.

Le pic de base à m/e 129 est obtenu par rupture de la molécule en son milieu. Par élimination d'une molécule d'eau cet ion donne naissance à l'ion m/e 111. La rupture du radical (C₄H₉O⁺) entraîne la formation d'un autre ion abondant m/e 189, (M-73) comme dans le cas des esters butyliques d'acides monocarboxyliques linéaires et ramifiés étudiés par Choudhary et Moss¹⁹, sans toutefois être le plus abondant. En accord également avec les résultats de Choudhary et Moss les ions m/e 56 (C₄H₈⁺) et m/e 41 (C₃H₅⁺) provenant de la rupture d'ions butyl sont observés.

La perte d'un groupement butoxycarbonyl (C₄H₉OCO⁺) entraîne la formation de l'ion m/e 101.

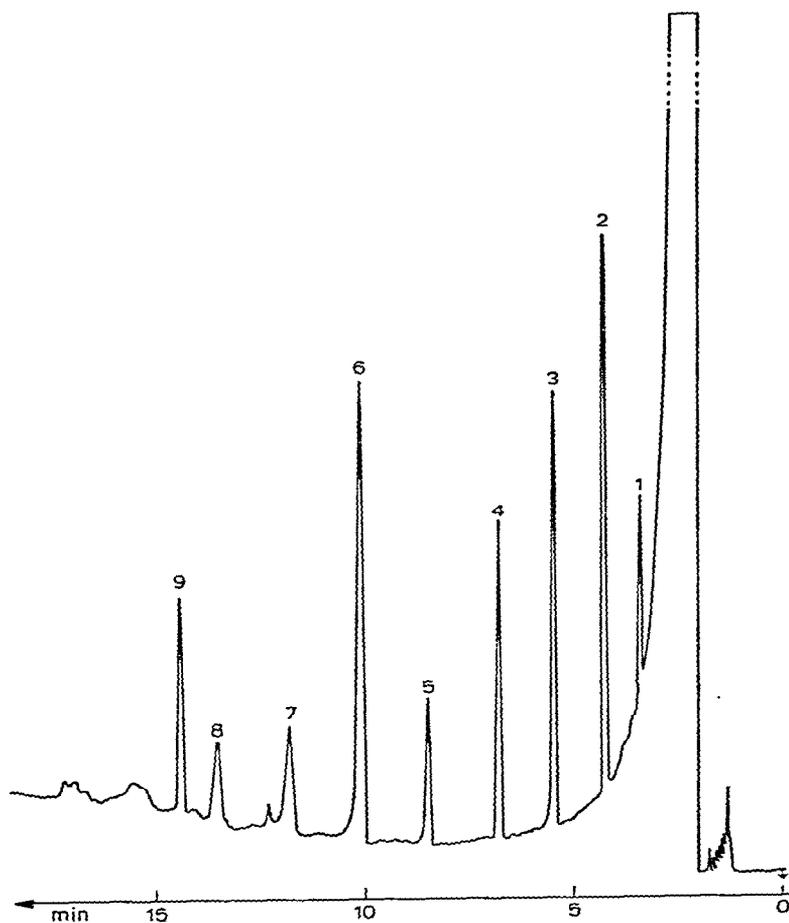


Fig. 1. Chromatogramme des dibutylesters des diacides saturés. 1 = Oxalique; 2 = malonique; 3 = succinique; 4 = glutarique; 5 = adipique; 6 = pimélique; 7 = subérique; 8 = azélaïque; 9 = sébacique.

Dérivés hydroxyles: Tableau II

L'acide hydroxy-2-glutarique et les acides en C₄, C₅ et C₆ hydroxylés et substitués par des groupements méthyles donnent chacun, sur les chromatogrammes, un pic bien isolé, identifié par spectrométrie comme étant un dibutylester, la butylation n'affectant pas les groupements hydroxylés.

Les dérivés méthylés et hydroxylés sortent au voisinage de leurs homologues non hydroxylés et par conséquent plus rapidement également que les dérivés linéaires correspondant.

Par contre, dans le cas des acides tartronique et malique plusieurs pics apparaissent et seules de très faibles quantités de butylester sont identifiées, les autres pics étant constitués par des produits de dégradation.

Spectres de masse des dérivés hydroxyles linéaires (Fig. 2b). Les spectres de masse des esters butyliques des acides tartronique, malique, hydroxy-2-glutarique ont été étudiés.

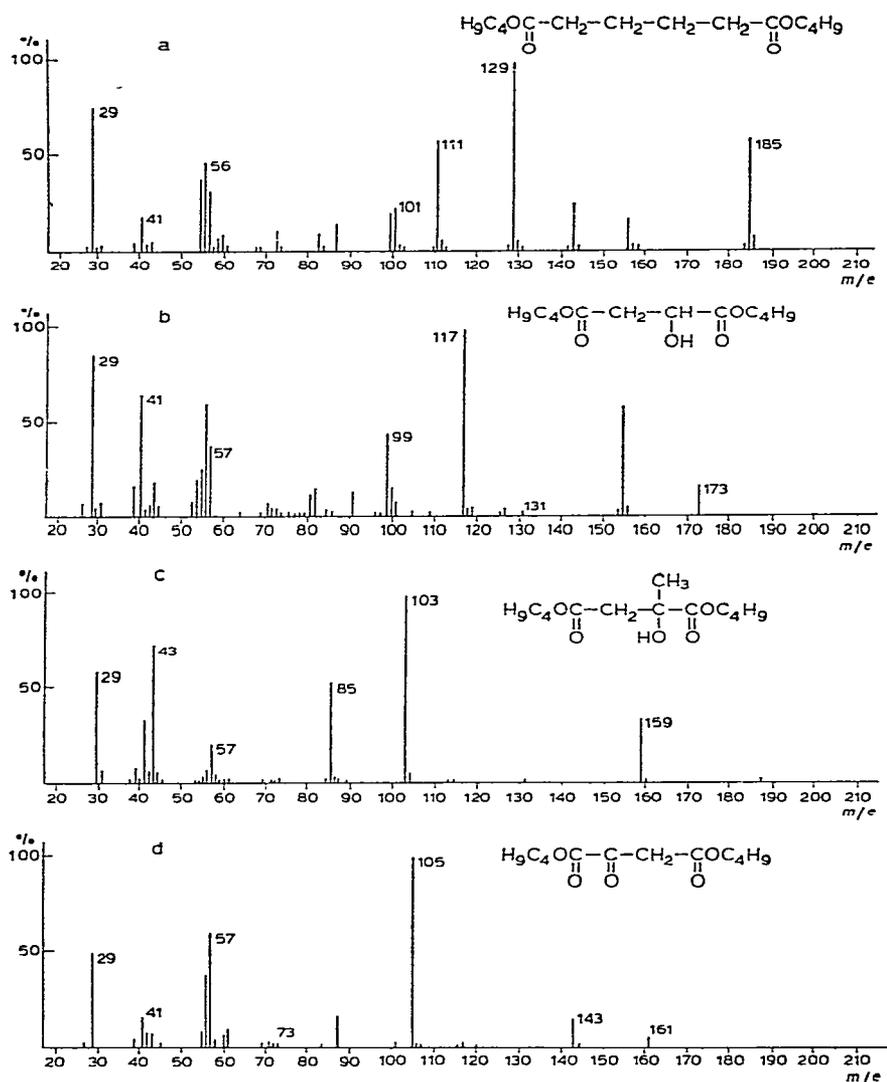


Fig. 2. Spectre de masse du dibutylester de l'acide adipique (a), malique (b), citramalique (c) et oxaloacétique (d).

L'ion m/e 131 bien que peu abondant est caractéristique de la série. Il provient de la rupture en α du groupement hydroxyle qui donne naissance à l'ion



Les autres ions caractéristiques $M-73$, $M-129$, $M-147$, s'expliquent par la perte d'un groupement butoxy suivi de celle d'un butyl puis de l'élimination d'une molécule d'eau.

Spectres de masse des dérivés hydroxyles ramifiés (Fig. 2c). Les spectres de

masse des esters butyliques des acides α -isomalique, citramalique, hydroxy-3-méthyl-3-glutarique ont été étudiés.

La rupture en α du C tertiaire est typique de cette série, on obtient ainsi l'ion m/e 145 pour l'ester de l' α -isomalique et l'ion m/e 159 pour ceux des deux autres.

Cette rupture est suivie pour les trois dérivés de la perte d'un groupement butyl pour former les ions m/e 89 pour le dérivé de l'acide α -isomalique et m/e 103 pic de base des dérivés de l'acide citramalique et de l'hydroxy-3-méthyl-3-glutarique.

Enfin, pour ces derniers, l'élimination d'une molécule d'eau explique la présence de l'ion m/e 85.

On peut encore noter l'abondance des ions $C_4H_9^+$ ou $C_3H_5O^+$ (m/e 57), $C_3H_7^+$ (m/e 43) et $C_2H_5^+$ (m/e 29).

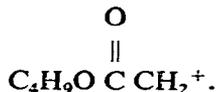
Dérivés cétoniques: Tableau II

Les dibutylesters sont très rapidement élués sur ce type de colonne et il faut descendre à 120°C pour obtenir leur séparation et calculer leur k' .

En programmation de température de 100 à 200°C, on constate la dégradation des acides oxaloacétique et oxomalonique, plusieurs pics précèdent alors les dibutylesters.

Spectres de masse des dérivés cétoniques (Fig. 2d). Les spectres de masse de quatre dérivés oxo-2 et d'un dérivé oxo-3 ont été étudiés: les dibutylesters des acides oxomalonique, oxaloacétique, α -cétoglutarique et α -cétoadipique d'une part, le dibutylester de l'acide oxo-3-glutarique d'autre part.

Dérivés oxo-2. L'ion à m/e M-101 observé dans tous les spectres de ces dérivés sauf dans celui de l'ester de l'acide oxomalonique provient de la rupture d'un groupement butoxycarbonyl en α du groupement cétonique. L'ion m/e 101 résultant de cette coupure constitue le pic de base de l'ester de l'acide α -cétoglutarique. Dans le cas du dérivé de l'acide α -cétoadipique le pic de base m/e 115 correspond à l'ion



L'ion à m/e M-71 observé dans le spectre de l'ester de l'acide oxomalonique peut s'expliquer par le clivage d'un groupement butoxy suivi d'un réarrangement à double hydrogène.

Les ions à m/e M-83 caractéristiques des dérivés de l'acide oxaloacétique et de l'acide α -cétoglutarique semblent pouvoir être expliqués par analogie avec le butylester de l'acide α -cétopropanoïque¹⁹. Ces ions m/e 175 et m/e 161 dans les spectres de l'ester de l'acide α -cétoglutarique et l'acide oxaloacétique respectivement seraient dus au clivage du radical $\text{CO C}_4\text{H}_9^+$ suivi par un réarrangement à double

hydrogène donnant d'une part l'ion $\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{OH} \\ || \qquad | \\ \text{C}_4\text{H}_9 \text{O C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C} = \text{OH}^+ \end{array}$ et d'autre part

l'ion $\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{OH} \\ || \qquad | \\ \text{C}_4\text{H}_9 \text{O C-CH}_2\text{-C} = \text{OH}^+ \end{array}$.

Suite aux clivages donnant les ions M-71 ou M-83 la rupture d'un groupement butyl explique notamment le pic de base m/e 105 de l'ester de l'acide oxaloacétique.

A noter encore dans ce spectre l'importance des ions m/e 57 (pic de base de l'ester de l'acide oxomalonique) m/e 41 et m/e 29.

Dérivé oxo-3. Le pic à m/e M—99, de faible amplitude, est cependant caractéristique du dibutylester de l'acide oxo-3-glutarique. Il provient de la perte d'un groupement butoxycarbonyl suivi d'un réarrangement à double hydrogène. A partir de cet ion nous obtenons les autres ions caractéristiques par perte d'un butyl ou d'une molécule d'eau (m/e 103 et m/e 141) ou des deux à la fois (m/e 85).

Le pic de base est constitué par l'ion $C_4H_8^+$ m/e 56.

CONCLUSION

Les dégradations observées pour certains dérivés hydroxylés ou α -cétoniques à nombre d'atomes de carbones inférieur à C_5 ont été dans certains cas signalées par d'autres auteurs utilisant cependant une méthodologie différente²⁵. Malgré cette limite, l'estérification par le BF_3 -butanol étant très aisée, cette étude montre qu'il est facile selon les conditions opératoires choisies de séparer la plupart des dérivés dicarboxyliques sous forme de dibutylesters.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Monsieur Dedieu (Société Nermag, Rueil Malmaison, France) de l'aide qu'il leur a apportée.

RÉSUMÉ

Le comportement chromatographique en phase gazeuse de 26 dérivés dicarboxyliques le plus fréquemment rencontrés dans les milieux biologiques, est exposé. Après butylation par le BF_3 -butanol 14% (w/v), les esters sont séparés sur colonne capillaire WCOT Carbowax 20M (11.5%).

L'identification des composés formés est effectuée par couplage avec la spectrométrie de masse.

Leurs facteurs de capacité et leurs indices de méthylène peuvent être employés pour prévoir leur séparation.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. Lindstedt, K. Norberg, G. Steen et E. Wahl, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1330.
- 2 L. Björkman, C. Mc Lean et G. Steen, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 49.
- 3 J. A. Thompson, B. S. Miles et P. V. Fennessey, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 1734.
- 4 R. J. W. Truscott, L. Hick, C. Pullin, B. Halpern, B. Wilxken, H. Griffiths, M. Silink, H. Kilham et F. Grunseit, *Clin. Chim. Acta*, 94 (1979) 31.
- 5 T. Niwa, T. Ohki, K. Maeda, A. Saito et K. Kobayashi, *Clin. Chim. Acta*, 99 (1979) 71.
- 6 J. C. K. Lai, D. B. A. Silk et R. Williams, *Clin. Chim. Acta*, 78 (1977) 305.
- 7 C. Jakobs, E. Solem, J. Ek, K. Halvorsen et E. Jellum, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 31.
- 8 E. Nakamura, L. E. Rosenberg et K. Tanaka, *Clin. Chim. Acta*, 68 (1976) 127.
- 9 M. Duran, D. Ketting, S. K. Wadman, C. Jakobs, R. B. H. Schutgens et H. A. Veder, *Clin. Chim. Acta*, 90 (1978) 187.
- 10 S. E. Hill, F. A. Jenner, C. R. Lee, C. Paschalis, R. J. Pollitt et G. A. Sampson, *Psychopharm.*, 65 (1979) 85.

- 11 R. D. Schmid, *Clin. Chim. Acta*, 74 (1977) 39.
- 12 M. C. Pfaff, G. Mahuzier, N. Preaux et J. L. Pousset, *Drug Interference and Drug Measurement in Clinical Chemistry, Proc. 3ème Int. Coll. Biologie Perspective, Pont à Mousson, 1975*, Karger, Basel, 1976, p. 186.
- 13 E. Jellum, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 427.
- 14 J. Krupščík, J. Hrivňák et J. Janák, *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 4.
- 15 J. Hrivňák, L. Sojak, E. Beška et J. Janák, *J. Chromatogr.*, 68 (1972) 55.
- 16 D. Issakar et J. Yinon, *Biomed. Mass Spectrom.*, 6 (1979) 47.
- 17 R. Kringstad et J. L. F. Bakke, *J. Chromatogr.*, 144 (1977) 209.
- 18 A. J. Sheppard et J. L. Iverson, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 448.
- 19 G. Choudhary et C. W. Moss, *J. Chromatogr.*, 128 (1976) 261.
- 20 M. A. Lambert et C. W. Moss, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 335.
- 21 E. J. Norman, H. K. Berry et M. D. Denton, *Biomed. Mass Spectrom.*, 6 (1979) 546.
- 22 K. B. Eik-Nes et E. C. Horning, dans A. Labhart, T. Jann, L. T. Samuels et J. Zander (Rédacteurs), *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, p. 32.
- 23 W. J. A. VandenHeuvel, W. L. Gardiner et E. C. Horning, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 263.
- 24 A. Doussin, S. Charonnat et M. Guernet, *Ann. Biol. Clin.*, 1 (1977) 19.
- 25 M. A. Harmon et H. W. Doelle, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 157.