

CHROM. 7385

Note

Gaschromatographische Bestimmung von Oxalsäure, Malonsäure und Bernsteinsäure aus biologischem Material

HUBERTUS VON NICOLAI und FRITZ ZILLIKEN

Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn, Nussallee 11, D-5300 Bonn (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. Januar 1974)

Über die gaschromatographische Bestimmung von Oxalsäure und ihren Homologen ist in den letzten Jahren mehrfach berichtet worden^{1–6}. Als flüchtige Derivate wurden dabei fast ausschliesslich Dimethylester eingesetzt. Besonders der Dimethylester der Oxalsäure besitzt jedoch wegen seines niedrigen Siedepunktes und seiner grossen Flüchtigkeit auf allen getesteten Säulen auch bei niedrigen Säulentemperaturen sehr kurze Retentionszeiten, so dass er praktisch immer als “Aufsetzer-peak” im Tailing des Lösungsmittels erscheint. Auch ist die Methylierung sowohl mit Diazomethan als auch mit methanolischer Salzsäure relativ umständlich und verläuft nicht immer quantitativ.

Eine schnelle und einfache Methode ist die Umsetzung der Oxalsäure und ihrer Homologen mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) zu Trimethylsilyl (TMS)-Derivaten. Die Bis-TMS-ester bilden sich bei kurzzeitigem Erwärmen des Reaktionsgemisches spontan und haben genügend lange Retentionszeiten, so dass sie vom Lösungsmittel sicher getrennt werden (Fig. 1).

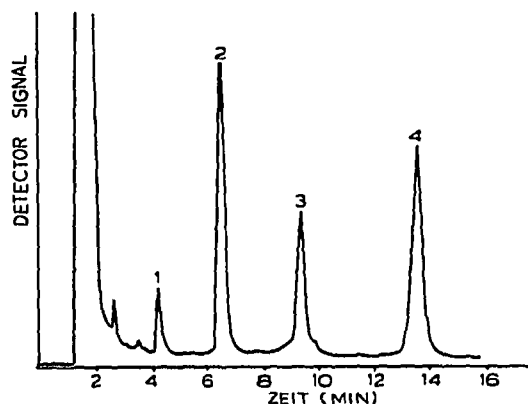


Fig. 1. Gaschromatogramm der Trimethylsilylderivate von Dicarbonsäuren. 1 = *n*-Decan (interner Standard); 2 = Oxalsäure; 3 = Malonsäure; 4 = Bernsteinsäure. Gaschromatograph Perkin-Elmer 900, Doppelsäule V4A (kompensiert), 3.6 m × 1/8 in. I.D., belegt mit 5% Silicon SE-30 auf Chromosorb G AW-DMCS, 60–80 mesh. Trägergas (Stickstoff), 30 ml/min; Einspritzblocktemperatur, 250°; Säulentemperatur, 8 min 140° isotherm, 12 min programmiert 140–160°, 4°/min; Detektorblocktemperatur, 250°; FID; Abschwächung Verstärkereingang, × 100; Abschwächung Verstärkerausgang × 16.

MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Reagenzien waren analysenrein und stammten von den Firmen Merck (Darmstadt, B.R.D.) und Serva (Heidelberg, B.R.D.).

10 ml der zu untersuchenden Lösung wurden auf eine kleine Amberlite IR-120 Kationenaustauschersäule (5×1 cm, 20–50 mesh, H^+ -Form) aufgebracht und mit Wasser eluiert. Das saure Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und mehrere Stunden über P_2O_5 getrocknet. Der Rückstand wurde mit 100 μ l eines Gemisches aus Pyridin–BSTFA–Trimethylchlorsilan (5:3:0.1) versetzt und im gut verschlossenen Schliffkölbchen auf dem Wasserbad bei 80° ca. 2 min erwärmt, bis alles gelöst war. Dann wurden genau 1.0 μ l (0.73 mg) *n*-Decan als innerer Standard hinzugefügt und die Probe (1 μ l) injiziert.

Zur Analyse wurde ein Perkin-Elmer 900 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., U.S.A.). Die Trennung erfolgte an einer Stahlsäule (3.6 m \times $1/8$ in. I.D.), belegt mit 5% Silicon SE-30 auf Chromosorb G. Die Säulentemperatur betrug 140° , die Injektor- und Detektortemperatur 250° . Um die Retentionszeiten zu verkürzen und schärfere Peaks zu erhalten, wurden die höheren Homologen temperaturprogrammiert mit $4^\circ/\text{min}$ bis 160° aufgetrennt. Als Trägergas diente Stickstoff (30 ml/min), die Verstärkerabschwächung war 16×100 .

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden aliquote Mengen authentischer Oxalsäurelösung (1 mg/ml) entsprechend 0.2 bis 2.0 mg Oxalsäure wie beschrieben vorbereitet und chromatographiert (Fig. 2). Die quantitative Auswertung erfolgte durch Ausmessen der Peakhöhen, bzw. unter Verwendung eines elektronischen Integrators Kent Chromalog 2 anhand der Impulsraten. Zur Eliminierung von Dosierfehlern wurden die Quotienten aus den Peakhöhen bzw. Integratorimpulsen von Oxalsäure und dem inneren Standard *n*-Decan gebildet und gegen die injizierten Mengen Oxalsäure aufgetragen (Fig. 3). Die Erstellung der Eichkurven für Malonsäure und Bernsteinsäure erfolgte sinngemäss unter Verwendung von *n*-Dodecan bzw. *n*-Tetradecan als interne Standards.

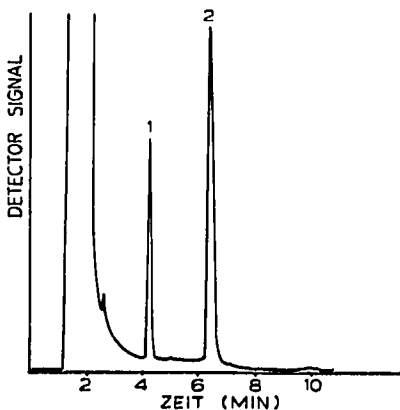


Fig. 2. Gaschromatogramm eines Oxalsäurestandards. 1 = *n*-Decan (interner Standard); 2 = TMS-Oxalsäure (15 μ g). Analysenbedingungen wie Fig. 1.

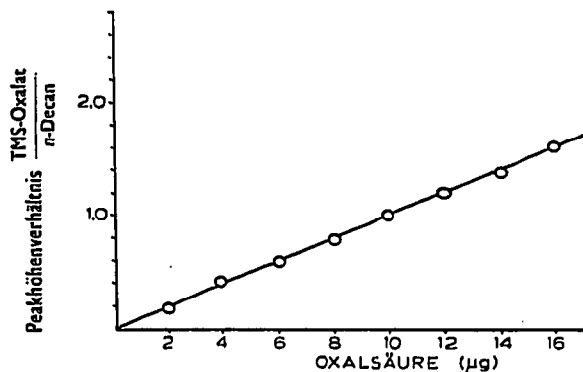


Fig. 3. TMS-Oxalsäure-Eichkurve.

ERGEBNISSE

Nach Protonierung am Kationenaustauscher lassen sich Carbonsäuren mit dem angegebenen Reagens rasch und quantitativ in die Trimethylsilylester überführen. Hierdurch ist es möglich, eine grosse Zahl saurer Metabolite zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen (Fig. 4). Durch die Verwendung interner Standards werden Verdunstungs- und Dosierfehler weitgehend vermieden. Bei *n*-Decan als innerem Standard und einer Säulentemperatur von 140° dauert eine Oxalsäurebestimmung *ca.* 8 min, bei *n*-Dodecan als Standard *ca.* 15 min.

Wegen der hohen Flüchtigkeit von BSTFA und seiner Folgeprodukte ist das Lösungsmitteltailing gering. Die Wiederfindungsrate von zugesetzter Oxalsäure in menschlichem Urin liegt zwischen 92 und 97%. Es ist lediglich darauf zu achten, dass die Proben vor der Silylierung vollkommen trocken sind und dass das Silylierungsreagenz im Überschuss vorhanden ist. Die TMS-Derivate der Dicarbonsäuren bleiben über längere Zeit stabil und die Methode ist genügend empfindlich, so dass auch relativ geringe Mengen Ausgangsmaterial befriedigende Ergebnisse liefern.

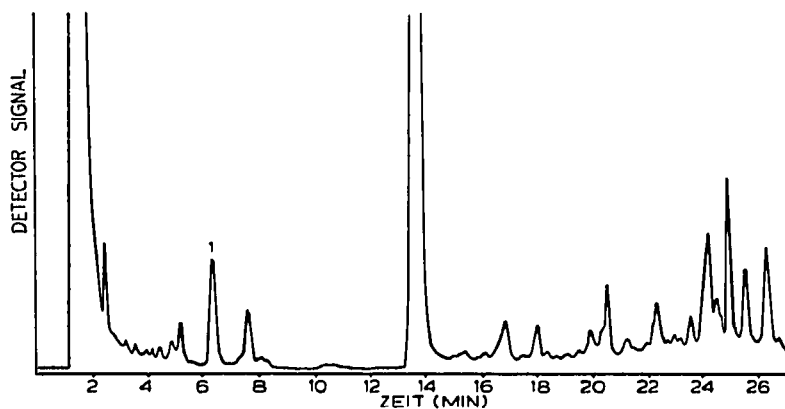


Fig. 4. Gaschromatogramm saurer Metabolite aus menschlichem Urin. 1 = TMS-Oxalsäure. Analysenbedingungen wie Fig. 1. Temperaturprogramm 12 min 140° isotherm, 140–300°, 4°/min.

DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

LITERATUR

- 1 R. G. Ackmann, M. A. Bannermann und F. A. Vandenheuvel, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1209.
- 2 G. Schott und G. Henneberg, *Z. Anorg. Chem.*, 323 (1963) 228.
- 3 T. S. Rumsey und C. H. Noller, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 325
- 4 C. E. Dalglish, E. C. Horning, M. G. Horning, K. L. Knox und K. Yarger, *Biochem. J.*, 101 (1966) 792.
- 5 J. M. L. Mee und R. W. Stanley, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 242.
- 6 M. Rowland und S. Riegelman, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 463.