Versuche zur Vereinfachung der Herstellung flüchtiger Derivate für die Gaschromatographie von Aminosäuren

Autor(en): **Uebersax, P. / Bovay, E.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **65 (1974)**

Heft 1

PDF erstellt am: **28.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983685

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **65**, 157—172 (1974)
Eingegangen 29. Oktober 1973. Angenommen 13. November 1973

Versuche zur Vereinfachung der Herstellung flüchtiger Derivate für die Gaschromatographie von Aminosäuren

P. Uebersax
Eidg. Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, Liebefeld-Bern
(Direktor: *E. Bovay*)

1. Einleitung

Ueblicherweise werden zur Veresterung wasserfreie Alkohol-Salzsäurelösungen eingesetzt. Die relativ umständliche Herstellung durch Einleiten von HCl-Gas unter Kühlung und das anschließende Einstellen der gewünschten Konzentration durch Verdünnen entfällt, wenn es gelingt, mit wässerigen Alkohol-Salzsäurelösungen entsprechend der Veresterung-Gleichgewichtsreaktion eine genügende Menge Ester zu erhalten.

Weiter wurde die Frage geprüft, ob wässerige Alkohol-Salzsäurelösungen allenfalls durch Destillation, Zugabe von Phosphorpentoxid oder eines Molekularsiebes wasserfrei erhalten werden können.

Anstelle des teuren Trifluoressigsäureanhydrids wurden Acylierungen mit billigeren Säureanhydriden untersucht.

Versuche zu arbeitstechnischen Vereinfachungen wurden am Beispiel der Silylierung ausgeführt. (Silylieren auf der Trennsäule bzw. auf einer Vorsäule.)

Von den rund 20 interessierenden Aminosäuren mußte eine Auswahl getroffen werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten erscheinen im Gaschromatogramm aller 20 Aminosäuren etwa gleichmäßig verteilt.

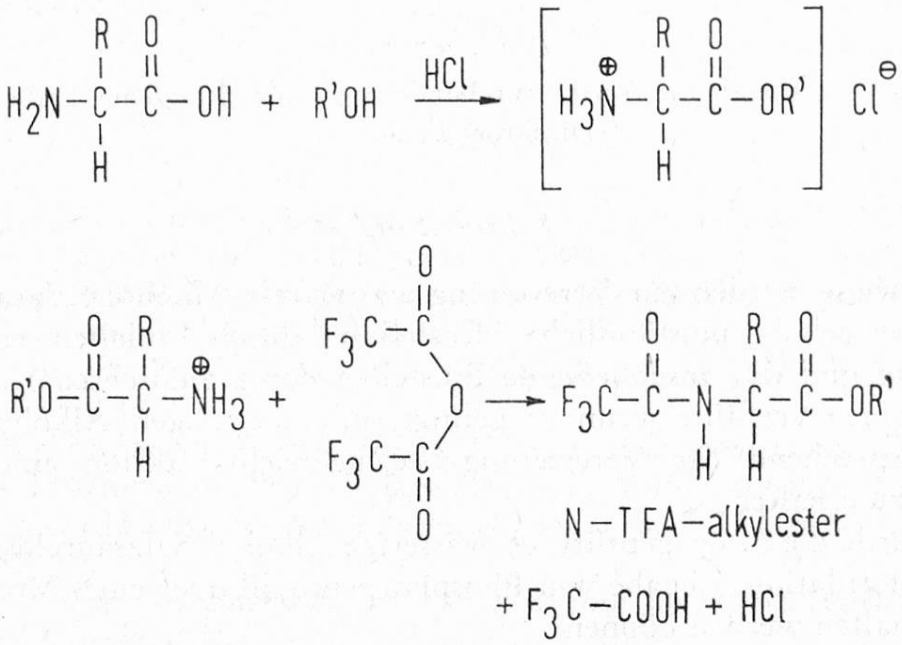
*Abkürzungen**

Ala	Alanin
Pro	Prolin
Met	Methionin
Glu	Glutaminsäure
Lys	Lysin
AS	Aminosäure(n)
TFA	Trifluoressigsäure
TMSDMA	Trimethylsilyldimethylamin

* Die Abkürzungen für Silylierungsreagentien wurden dem «Handbook of Silylation» entnommen. Herausgeber: Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. USA. Zu beziehen durch Kontron AG, Zürich.

TMSDEA	Trimethylsilyldiäthylamin
BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
TMS	Trimethylsilyl
TMSI	Trimethylsilylimidazol

Allgemeines Reaktionsschema



In der Tabelle 1 sind Versuche zur Trennung verschiedener Derivate von Aminosäuren und die Trennsäulen, welche verschiedene Autoren benützten, zusammengestellt. Die Tabelle kann nur ein Ausschnitt darstellen. Dabei wurden Arbeiten vor 1969 nicht berücksichtigt.

2. *Eigene Versuche*

2.1. *Veresterung*

2.1.1. *Wässerige Alkohol-Salzsäurelösungen*

5 ml einer Standardlösung mit je 0,1 mg Ala, Pro, Met, Glu, Lys pro ml wurden am Rotationsverdampfer bei 60 ° C in einem «Sovirel» Schraubglas zur Trockne abgedampft. Zugabe von 5 ml 3 N Salzsäure in Alkohol. Anschließend im verschlossenen Glas 45 Minuten bei 100 ° C im Trockenschrank verestern, dann wieder zur Trockne eindampfen und 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid (TFEA) Chloroform 1 : 1 zugeben. Nach 1 Minute Acylierzeit bei Raumtemperatur 5 µl einspritzen.

Sehr gut bewährt hat sich auch ein bis 200 ° C stufenlos heizbarer Aluminiumblock mit 36 Bohrungen für die Schraubgläser. (Hersteller: Gebr. Liebisch, D-Brackenweide. Lieferant: Planta-Jenny & Co., CH-8267 Berlingen.) Zum

Tabelle 1. Literaturübersicht

Anzahl getrennte Amino-säuren	Derivate	Säulen	Spezielles, Bemerkungen	Autor
22	N-TFA-Methylester	Mischphase 2,5 % KE-60 zu 46 % 2,5 % QF-1 zu 27 % 2,5 % MS-200 zu 27 %		1
3	TMSDMA, TMSDEA, BSA, Tri-Sil, TMSI, BSTFA, N-Methyl-N-TMS-Acetamid	3 % OV-1	RMR-Werte mit 6 verschiedenen Silylierungsmitteln	2
15	N-TFA-n-Butylester	65 % EGA	AS in Früchten und Fruchtsäften, RMR-Werte	3
17	N-TFA-n-Butylester	EGA	RMR-Werte beim Einfluß von 20 anorganischen Salzen beim Derivatisieren	4
2	TMS	10 % OV-11	Einfluß von 11 verschiedenen Lösungsmitteln	5
7	N,O-diisopropylester	1 % PZ-103 2 % PZ-101 3 % OV-17 1 % OV-17	Einstufenderivatisierung	6
16	N-TFA-methylester N-TFA-n-butylester	0,325 % EGA	AS in biologischen Flüssigkeiten Optimierungsprobleme	7
19	N-TFA-n-butylester	EGA OV-17 OV-22	RMR-Werte	8

Anzahl getrennte Amino-säuren	Derivate	Säulen	Spezielles, Bemerkungen	Autor
20	(N-HF-butyryl-n propylester) N-HFB-n-propylester	3 % OV-1		9
20	N-TFA-n-butylester	Mischphase 2 % OV- 17 1 % OV-210	Optimierungsproblem	10
21	TMS	SE 30, OV-7, OV-11, OV-17 Mischphase OV-7/ OV-22 2:1	Relative Retentionszeiten für die 5 je mit 10 % Phase belegten Säulen	11
17	N-TFA-n-butylester	3 % OV-101 3 % OV- 17	Nanogramm- bis Picogramm-Mengen	12
19	Saure Hydrolyse TMS	0,65 % EGA 10 % OV-11	Biologisches Material, RMR-Werte Variation der Hydrolysenzeit	13
20	TMS N-TFA-n-butylester	0,2 % OV-7	Einfluß von Lösungsmitteln	14
23	Isopropylester	5 % Carbowax 20 M	Kombination GC-MS	15
38	TMS	3 % OV- 1 3 % OV-17	Retentionsdaten als Methyleinheiten	16
38	N-TFA-n-butylester	EGA	18 Nichtprotein-AS in Gegenwart von 20 Protein-AS	17

Abdampfen der Stammlösungen wurde mit Kapillaren Luft in die Schraubgläser geblasen.

Apparatives

Gaschromatograph Perkin-Elmer, Modell 881 mit FID. 2m Glassäulen mit 1 % OV-1 auf Chromosorb. Programmiert 50—240 ° C mit 6 ° pro Minute.

Oder: 2m Glassäulen mit 1 % OV-17 auf Chromosorb. Programmiert 60—205 ° C mit 4 ° C pro Minute. Mit diesen Säulen werden auch die N-TFA-n-butylester von Glu und Lys sauber getrennt.

Ergebnis

Methanol	Glu-Peak fehlt.
Aethanol	Alle Peaks vorhanden, aber sehr klein.
n-Propanol	Alle Peaks vorhanden, sehr gut.
i-Propanol	Alle Peaks vorhanden, aber sehr klein.
n-Butanol	Alle Peaks vorhanden. Glu und Lys nahe beieinander. Wenig tiefere Peaks als bei n-Propanol.
i-Butanol	Alle vorhanden. Ergibt die höchsten Peaks.
2-Butanol	Alle Peaks vorhanden, aber wesentlich kleiner als bei i-Butanol.
t-Butanol	Nur 1 Peak.

Reduzieren der Normalität

Entsprechend den Resultaten aus 2.1.1. wurden die Alkohole Aethanol, 2-Butanol und t-Butanol für alle weiteren Versuche weggelassen.

2.1.2. Wasserfreie Alkohol-Salzsäurelösungen

Herstellung durch Einleiten von trockenem HCl-Gas unter Kühlung bis die Lösungen 3 N an HCl sind, Derivatisierung und Apparateparameter wie vorher.

Ergebnis

Abbildung 1. Aufgetragen sind die absoluten Peakhöhen in mm gegen die Säurekonzentration.

Diskussion

n-Propanol: Beim Einsatz von wasserfreien Alkoholen entstehen durchwegs höhere Peaks. Es zeigt sich aber, daß auch wässerige Lösungen durchaus brauchbar sind, besonders die Konzentration 0,25 N.

n-Butanol: Bei tiefer Säurekonzentration ist der Einsatz wässeriger Lösungen eindeutig günstiger. n-Butanol hat allerdings den Nachteil des hohen Siedepunktes von 118 ° C: Das Abdampfen aus dem Sovirel-Schraubglas wird etwas schwierig wegen Siedeverzügen und der langen Dauer, wenn eine Badtemperatur von 60 ° C nicht überschritten werden soll.

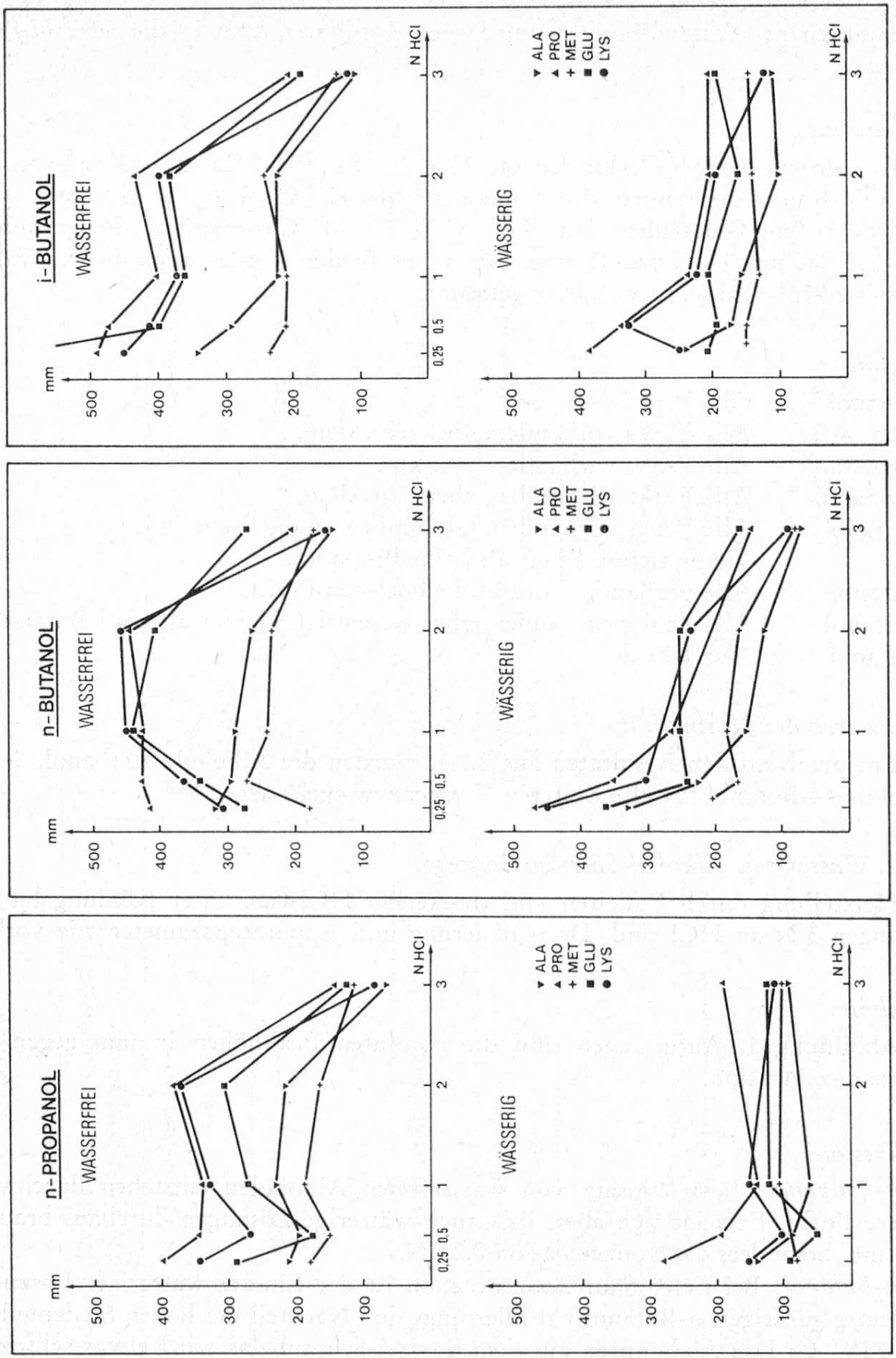


Abb. 1. Vergleich der Peakhöhen nach dem Derivatisieren mit 3 Alkoholen, wässerig und wasserfrei.

i-Butanol: Mit sinkender Säurekonzentration bei wässerigem und wasserfreiem Alkohol wurden die Peaks deutlich höher. Auch hier sind wässerige Lösungen mit der Säurekonzentration 1 N absolut brauchbar.

Falls die Empfindlichkeit des Gaschromatographen nicht vollständig ausgeschöpft werden muß, erscheint die Verwendung von wässerigen Alkohol-Säurelösungen für die Veresterung gut geeignet, auch wenn die Derivate allgemein nur geringere Peakhöhen als beim Einsatz wasserfreier Lösungen zeigen.

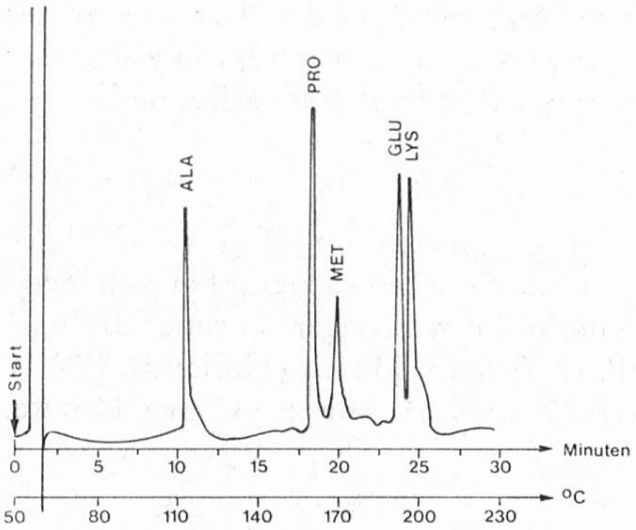


Abb. 2. N-TFA-n-Butylester. Veresterung mit 0,5 N HCl in n-BuOH, wasserfrei.

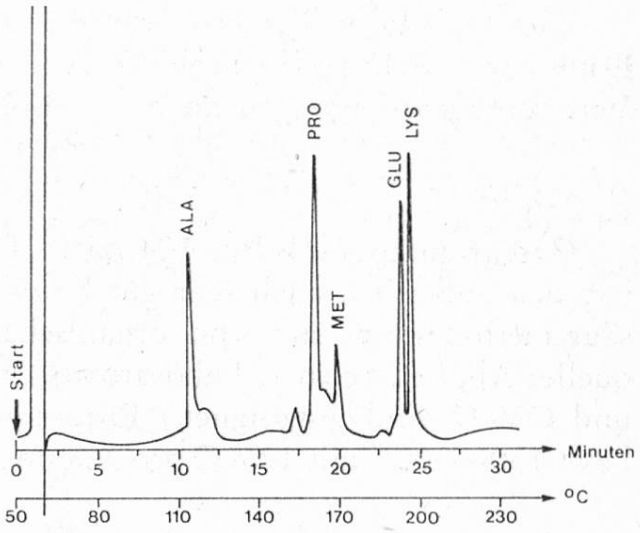


Abb. 3. N-TFA-n-Butylester. Veresterung mit 0,5 N HCl in n-BuOH, wässerig.

2.1.3. Verestern mit BF_3/Methanol bzw. BF_3/n-Propanol

5 ml Standardlösungen abdampfen. 5 ml BF_3/Methanol zugeben und 45 Minuten bei 100 ° C verestern. Möglichst vollständig abdampfen und 1 ml TFEA/CH_2Cl_2 1 : 1 zugeben. Es bildeten sich zwei Phasen, die getrennt chromatographiert wurden. Dabei traten jeweils zwei Peaks auf, die aber nicht identifiziert werden konnten. Das gleiche Resultat lieferte auch die Veresterung mit BF_3/n-Propanol.

Die Ursache der Bildung von 2 Phasen liegt in der Unmöglichkeit, das Lösungsmittel von den Estern am Wasserstrahlvakuum auch bei 100 ° C vollständig abzudampfen. Das Problem wurde nicht mehr weiter studiert.

2.1.4. Versuche mit Aluminiumtrichlorid und Schwefelsäure als Katalysatoren

5 ml Standardlösung abdampfen. Zugabe von 100 mg wasserfreiem Aluminiumtrichlorid, entsprechend der Chloridkonzentration des 0,5 N Salzsäurezusatzes. Nach Zugabe von 5 ml Alkohol wieder 45 Minuten bei 100 ° C verestern. Abdampfen und mit TFEA derivatisieren.

Ergebnis: Wenn überhaupt, erscheinen wenige, nicht charakteristische und nicht identifizierbare Peaks. Aehnliche Verhältnisse beim Zusatz von Schwefelsäure anstelle von Salzsäure.

Ursache: Durch Aluminiumtrichlorid wird das TFEA schon nach 15 Minuten bei Raumtemperatur vollständig zerstört, wie sich gaschromatographisch leicht nachweisen läßt. Ein Schwefelsäurezusatz greift in derselben Zeit bei gleicher Temperatur TFEA zwar nicht an, letzteres wird aber schon nach 30 Minuten bei 100 ° C ebenfalls vollständig zerstört. Es müßte geprüft werden, ob sich Aluminiumtrichlorid eignet, falls nur die Ester chromatographiert werden sollen.

2.1.5. Gaschromatographie des Ester

Diese Versuche dienten der Beantwortung der Frage, ob die Flüchtigkeit der Ester zur Gaschromatographie bereits ausreichend ist und zur Optimierung der Veresterungsbedingungen an den Beispielen mit i-Propanol und n-Butanol.

Apparatives

Gaschromatograph Pye 104 mit FID. 1,5 m Glassäulen mit «Tenax». «Tenax» hat sich außerdem auch sehr gut bewährt für die Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern und von organischen Säuren in wässeriger Lösung. Bezugsquelle: Applied Science, Laboratoires, Inc. P. O. Box 25, Maarn (Holland). (OV-1 und OV-17 sind ungeeignet.) Programmiert 60—350 ° C mit 6 ° C pro Minute, bzw. 150—300 ° mit 12 ° C pro Minute.

Ergebnisse

Die i-Propyl- und n-Butylester von Ala, Pro, Met, Glu und Lys lassen sich gut gaschromatographieren. Met und Lys allerdings sind nicht vollständig getrennt. Die Reihenfolge im GC ändert gegenüber derjenigen im Abschnitt 2.1.1. und lautet: Ala, Pro, Met, Lys, Glu. Die entsprechenden Ester von Tyr, Cys und His lassen sich nicht mehr gaschromatographieren.

Peakhöhen in mm bei verschiedenen Veresterungszeiten

0,25 N HCl in i-PrOH							
	Wasserfrei				Wässerig		
Verweilzeit bei 150 ° C Stunden	Pro	Lys	Glu	?	Pro	Lys	Glu
0,5	140	11	32	3	155	11	31
1,0	190	9	42	5	186	12	38
1,5	176	6	51	6	200	12	45
2,0	190	0	55	6	180	13	54
4,5	200	0	62	7	205	14	62
8,5	188	0	78	0	312	0	96

Der nicht identifizierte Peak (?) in obiger Tabelle scheint ein Artefakt des Lysins zu sein. Am günstigsten also 4,5 Stunden bei 150 ° C mit 0,25 N HCl in i-PrOH verestern.

2. 1. 6. *Versuche zum Wasserfreimachen wässeriger Alkohol-Salzsäurelösungen*

Destillation

Das Destillationsverhalten ternärer Gemische Alkohol-Salzsäure-Wasser ist theoretisch schwer zu beschreiben. Das Problem ist recht komplex, da die Systeme Salzsäure-Wasser und Alkohol-Wasser Azeotrope bilden. Von 5 Alkoholen verfolgten wir die Veränderung der Säurekonzentration im Destillat mit der Siedezeit bei Atmosphärendruck durch Titration, ausgehend von 3 N HCl-Lösungen mit dem Ziel, wasserfreie Salzsäure Alkohollösungen zu erhalten (Abb. 4).

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, sind die Verhältnisse bei i-Propanol (i-PrOH), 1-Butanol (1-BuOH) und 2-Butanol (2-BuOH) nicht günstig, da die Säurekonzentration zunimmt bzw. gleich bleibt. Am günstigsten verhält sich beim Sieden n-Butanol: Hier nimmt die Säurekonzentration ab. Deshalb wurde für diesen Fall durch Verfolgen der Dichteabnahme festgestellt, daß sich n-Butanol praktisch absolut erhalten läßt (Abb. 5). Das Ergebnis ließ sich gaschromatographisch leicht bestätigen.

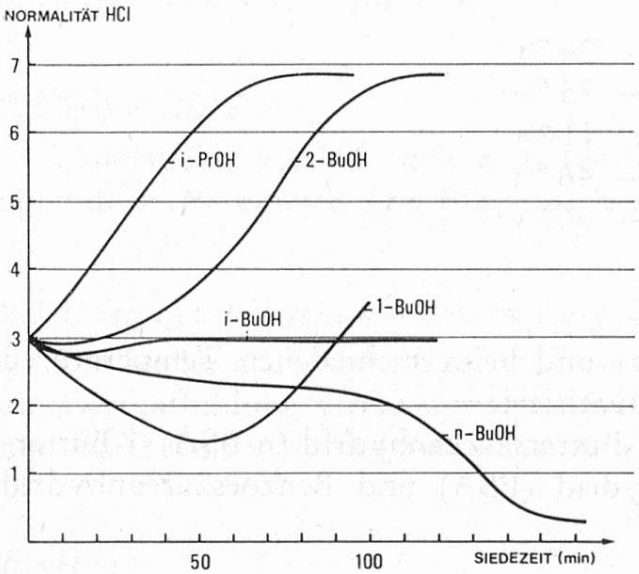


Abb. 4. Veränderung der Säurekonzentration mit der Siedezeit.

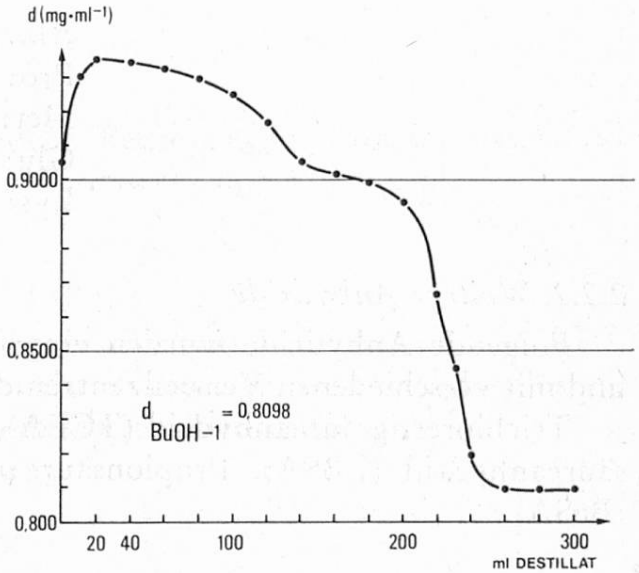


Abb. 5. Dichteabnahme von 3 N HCl-Lösung in n-Butanol bei der Destillation.

Zusatz von Wasserakzeptoren

Zusätze von Molekularsieb 4 Å und Phosphorpentoxid haben sich nicht bewährt. Im Fall Molekularsieb erschienen praktisch keine Peaks, bei Phosphorpentoxid erschienen alle 5 Aminosäuren, aber sehr klein. Auch dieses Problem wurde nicht weiter studiert.

2.2. *Acylierung*

2.2.1. *Ersatz von TFEA durch Essigsäureanhydrid (EA)*

Veresterung mit 0,25 N HCl in i-Butanol wässerig. 45 Minuten bei 100 ° C. Vergleich der absoluten Peakhöhen in mm bei verschiedenen Derivatisierungstemperaturen während 30 Minuten.

Derivationstemperatur	Ala	Pro	Met	Glu + Lys
Raumtemperatur	123	151	125	78
80 ° C	130	150	113	78
100 ° C	165	190	108	65
120 ° C	78	81	140	44
140 ° C	35	158	50	38
160 ° C	35	103	4	35

Daneben erscheinen überall Artefakte und zwar von oben nach unten in Anzahl und Menge zunehmend.

Die Acylierung bei tieferer Temperatur ist eindeutig günstiger. Das trifft auch zu für die Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFEA).

Relative Veränderungen bei der Derivatisierung mit TFEA während 30 Minuten bei 100 ° C gegenüber 30 Minuten bei Raumtemperatur für die n-Butylester:

Ala: — 34 %
Pro: — 75 %
Met: + 11 %
Glu: — 46 %
Lys: — 36 %

2.2.2. Weitere Anhydride

Folgende Anhydride wurden eingesetzt und bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen Verweilzentren derivatisiert:

Trichloressigsäureanhydrid (TCEA), n-Buttersäureanhydrid (n-BSA), i-Buttersäureanhydrid (i-BSA), Propionsäureanhydrid (PSA) und Benzoesäureanhydrid (BeSA).

Ergebnisse

TCEA: In jedem Fall traten nur 4 Peaks auf: Lys und Glu fallen zusammen. TCEA allein ergibt 4 Peaks, die aber im Gaschromatogramm deutlich früher als die AS-Derivate erscheinen.

n-BSA: Alle 5 AS-Derivate erscheinen. Vor ihnen jedoch viele große Peaks. Eine Erhöhung der Derivatisierungstemperatur ist ungünstiger.

i-BSA: Gegenüber n-BSA wesentlich besser, obwohl auch hier am Anfang des Gaschromatogrammes viele große Peaks auftreten.

PSA: Aehnlich wie bei i-BSA. Verbesserung nur insofern, als hier vorab weniger Peaks erscheinen.

BeSA: Viele Peaks. Eine eindeutige Zuordnung ist schwierig. Nicht umgesetztes BeSA erscheint als sehr großer Peak nach den Derivaten am Ende des Chromatogrammes.

2.3. *Silylierungen*

2.3.1. *Mit BSA*

5 ml Standardlösung werden abgedampft. Zugabe von 3 ml 0,25 N HCl in n-Propanol wässerig. Veresterung 15 Minuten bei 150 ° C, dann wieder zur Trockne abdampfen. Zugabe von 1 ml BSA/CH_3CN 1:1 und 90 Minuten im verschlossenen Schraubglas bei 125 ° C silylieren. 5 µl einspritzen und auf OV-17 gaschromatographieren. Programmiert 50—230 ° C mit 4 ° C pro Minute.

Ergebnis

Ungünstig. Es entstehen viele kleine, schwer identifizierbare Peaks. Variation der Silylierungsbedingungen verbessert das Resultat nicht. Nur eine geringe Erhöhung der Peaks ergibt sich, wenn vor dem Derivatisieren Wasserspuren mehrmals mit Benzol azeotrop wegdestilliert werden.

Unbefriedigend verliefen auch Versuche, auf 1 % QF-1 programmiert 60—220 ° C mit 10 ° pro Minute.

2.3.2. *Mit BSTFA*

Untersucht wurden auch hier verschiedene Bedingungen, Lösungsmittel und apparative Parameter. Die Resultate waren durchwegs unbefriedigend.

2.3.3. *Silylieren direkt auf der Trennsäule*

Die Suche nach Vereinfachungen und Zeitersparnis brachte uns auf die Idee, die Derivatbildung direkt auf der Säule durchzuführen. Je 5 ml Standardlösung und BSTFA in verschiedener Reihenfolge aufziehen und einspritzen.

Ergebnis

Wenige Peaks am Anfang des Chromatogrammes. Unbefriedigend, da die Aminosäuren-Peaks nicht identifiziert werden konnten.

2.3.4. *Silylieren auf einer Vorsäule*

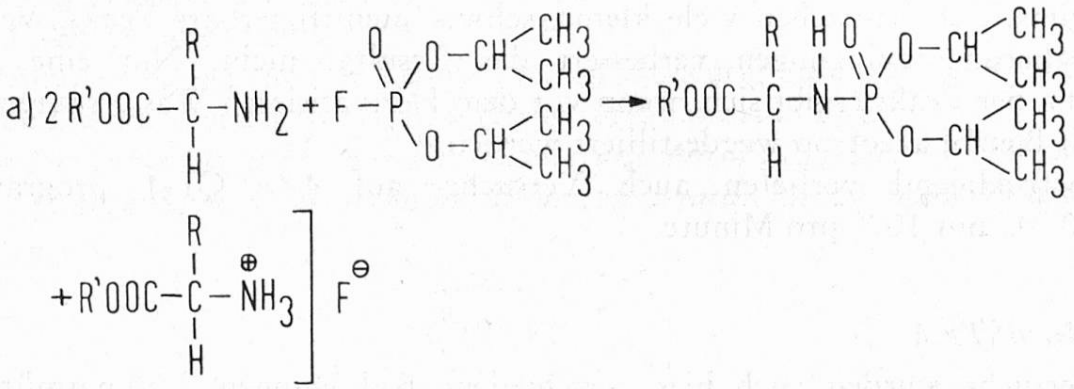
Verwendet wurde die Vorsäulenausrüstung der Perkin-Elmer mit einer 17 cm Metallvorsäule ⌀ 3 mm, und stufenlos regulierbarer Thermostatisierung. Die Vorsäule wurde ohne stationäre Phase mit dem Trägermaterial gefüllt. Orientierende Versuche zum Abtasten der optimalen Betriebsbedingungen verliefen ermutigend. Ein Zusatz von Trimethylchlorsilan als Katalysator scheint dabei vorteilhaft zu sein, da die Reaktionskomponenten doch in relativ kurzer Zeit die Vorsäule passieren und dann auf der Trennsäule bei Anwesenheit von stationärer Phase kaum mehr miteinander reagieren können. Wir werden später über weitere Versuche berichten.

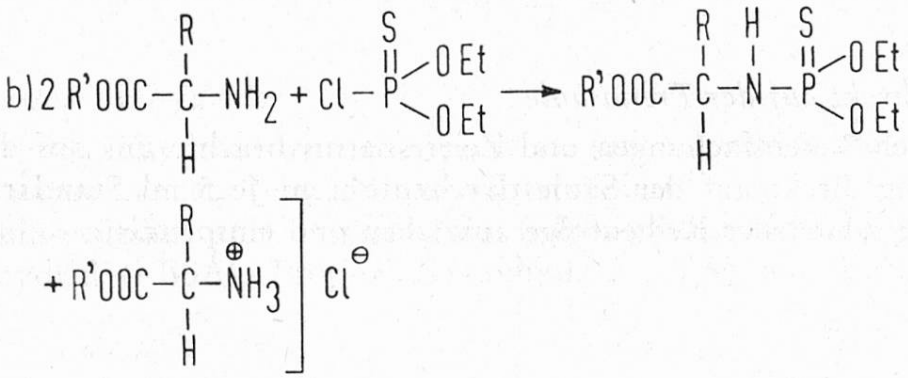
3. *Andere Derivatisierungsmöglichkeiten*

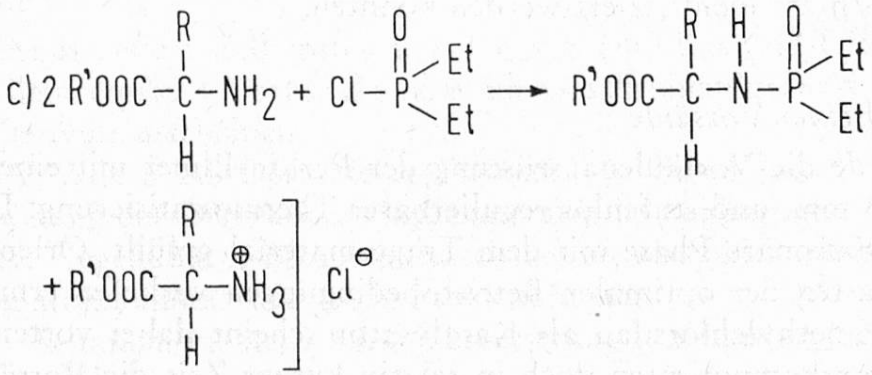
Um die große Empfindlichkeit und Selektivität des thermoionischen Detektors voll ausnützen zu können, wollen wir Aminosäurederivate mit folgenden Verbindungen herzustellen versuchen:

a) Diisopropylfluorphosphat
b) Diäthylchlorthiophosphat
c) Diäthylchlorphosphat

Wir hoffen, daß sich die Derivate auch ohne Veresterung der Carboxylgruppe als für die Gaschromatographie genügend flüchtig erweisen werden.







Für Ratschläge und Diskussionen danke ich Herrn Dr. *K. Hüni* und für die Mithilfe bei praktischen Arbeiten Frau *J. Niederhauser*.

Zusammenfassung

Es wird eine kurze Zusammenstellung der neueren Literatur zur Gaschromatographie der Aminosäuren gegeben.

Eine Standardlösung mit gleichen Konzentrationen an Alanin, Prolin, Methionin und Lysin wurde für das Studium folgender Fragen verwendet:

Veresterung: Können anstelle wasserfreier Alkohol-Salzsäurelösungen auch wässerige verwendet werden? Einfluß der Säurekonzentration. Kann Salzsäure ersetzt werden durch andere Katalysatoren, insbesondere die Komplexe BF_3/Methanol und BF_3/n-Propanol sowie Aluminiumtrichlorid und Schwefelsäure?

Ergebnis: Auch wässerige Alkohol-Salzsäurelösungen sind durchaus brauchbar. Allgemein sind die Peakhöhen kleiner. In der Regel abnehmende Peakhöhen mit steigender Säurekonzentration. BF_3/Methanol BF_3/n-Propanol, $AlCl_3$ und H_2SO_4 befriedigen nicht. Für Pro, Lys und Glu wurden die optimalen Veresterungsbedingungen mit 0,25 N HCl in i-Propanol wässerig gaschromatographisch zu 4,5 Stunden bei 150 ° C ermittelt.

Versuche zur Herstellung wasserfreier Alkohol-Salzsäurelösungen durch Destillation wässeriger Lösungen, Zusatz von Molekularsieb oder Phosphorpentoxid verliefen negativ.

Acylierung: Kann das üblicherweise verwendete Trifluoressigsäureanhydrid (TFEA) durch Essigsäure- (EA), Trichloressigsäure- (TCEA), n-Buttersäure- (n-BSA), i-Buttersäure- (i-BSA), Propionsäure- (PSA) und Benzoesäureanhydrid (BeSA) ersetzt werden?

Ergebnis: Am günstigsten ist der Einsatz von TFEA. Der Glu- und Lys-Peak fallen bei EA und TCEA zusammen. i-BSA, n-BSA sind brauchbar, aber die Gaschromato-, gramme werden wegen vielen anderen Peaks unübersichtlich. Allgemein sind tiefere Temperaturen für die Acylierung günstiger.

Silylierung: BSA und BSTFA wurden als Silylierungsmittel verwendet und Reaktionsbedingungen und Lösungsmitteleinflüsse untersucht. Ueber Versuche zur direkten Silylierung auf der Trennsäule bzw. auf einer Vorsäule wird noch zu berichten sein.

Theoretisch werden drei Derivatisierungsmöglichkeiten zum Einbau eines P-Atoms gezeigt, um damit die große Empfindlichkeit und Selektivität des Thermoionisationsdetektors auszunutzen.

Summary

Tests for Simplification in Preparation of Volatile Derivates of Amino Acids for GC.

A short tabulated summary of the literature published after 1968 for GC of amino acids is given.

For all experiments a standard solution containing Ala, Pro, Met Glu and Lys in identical concentrations was used. The following problems were studied:

Esterification: Replacement of waterfree solutions of alcohol-hydrochloric acid by water containing solutions and influences of the acid concentration. Replacement of hydrochloric acid by other catalysts such as the complexes BF_3/methanol and BF_3/n-propanol respectively. Aluminiumtrichloride and sulfuric acid were tested also.

Result: Aquous solutions of alcohol-hydrochloric acid for the esterification are acceptable. Generally the peaks height is lower and descreases with increasing of the concentration of the acid. BF_3/methanol, BF_3/n-propanol $AlCl_3$ and H_2SO_4 are not successful. Optimal conditions for esterification with 0,25 N NCl in i-propanol were found to 4,5 hours at 150 ° C. Tests for preparation of waterfree solutions of alcohol-hydrochloric acid by distillation, adding of molecular sieves or P_2O_5 were negative.

Acylation: The commonly used trifluoroacetic-acid anhydride (TFEA) was replaced by the anhydrides of acetic, trichloroacetic, n- and i-butyric, propionic and benzoic acid.

The use of TFEA is optimal. The peaks of Glu and Lys are not separated in case of acetic anhydride and trichloroacetic-acid anhydride. i- and n-butyric acid anhydrides are usable but the chromatograms become unreadable because of many other peaks. Generally low temperatures are best for acylation.

Silylation: BSA and BSTFA were used as silylating reagents and different conditions of derivatization were studied. A future paper will show possibilities of silylation directly on the column or on a precolumn.

For the utilisation of the great sensitivity of the thermoionic detector we will try to prepare P containing components of amino acids as shown theoretically.

Résumé

Essais de simplification de la préparation des derivés volatils des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse.

L'auteur donne un résumé des références bibliographiques récentes concernant la détermination des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse.

Une solution-standard contenant des concentrations identiques en Ala, Pro, Met, Glu et Lys a été utilisée pour l'étude des problèmes suivants:

Estérification: Des solutions aqueuses peuvent-elles être utilisées en lieu et place des solutions alcooliques-chlorhydriques?

Influence de la concentration en acide? L'acide chlorhydrique peut-il être remplacé par d'autres catalyseurs, en particulier par les complexes BF_3/méthanol et BF_3/n-propanol, ainsi que par le trichlorure d'aluminium et l'acide sulfurique?

Il résulte des essais effectués que des solutions alcooliques chlorhydriques aqueuses sont tout à fait utilisables. De façon générale, les peaks sont toutefois moins élevés. Leur hauteur diminue avec l'accroissement de la concentration en acide. BF_3/méthanole, BF_3/n-propanol, $AlCl_3$ et H_2SO_4 ne sont pas satisfaisants. Pour Pro, Lys et Glu, les conditions optimales d'estérification s'obtiennent avec une solution chlorhydrique 0,24 N dans l'alcool iso-propylique aqueux pendant 4,5 heures à 150 ° C.

Des essais d'obtention de solutions alcooliques chlorhydriques exemptes d'eau par distillation de solutions acqueuses, adjonction de filtre moléculaire ou de pentoxyde de phosphore demeurèrent infructueux.

Acylation: L'anhydride trifluoracétique habituel peut-il être remplacé par les anhydrides acétique, trichloracétique, n- et i-butyriques, propionique et benzoïque?

L'emploi d'anhydride trifluoracétique s'avère le meilleur. Les peaks pour Glu et Lys sont confondus avec l'anhydride acétique et l'anhydride trichloracétique. Les anhydrides n- et i-butyriques sont utilisables, mais les chromatogrammes deviennent illisibles à cause de la multiplicité d'autres peaks. De façon générale, les températures basses sont favorables à l'acylation.

Silylation: BSA et BSTFA ont été utilisés comme agents de silylation et les conditions de réaction ont été étudiées, de même que l'influence des solvants. Les résultats concernant la silylation directe sur la colonne de séparation, respectivement sur une colonne séparée, seront rapportés ultérieurement.

Trois procédés de dérivation pour l'incorporation d'un atome P sont proposés théoriquement, de façon à utiliser la grande sensibilité du détecteur à thermoionisation.

Riassunto

Tentativi atti a semplificare la determinazione degli aminoacidi tramite la cromatografia a gas.

Si espone una breve raccolta di dati bibliografici più recenti sulla cromatografia a gas degli aminoacidi.

È stata utilizzata una soluzione-standard a concentrazioni uguali di alanina, prolina, metionina, glutamina e lisina per lo studio dei seguenti quesiti:

Esterificazione: L'impiego di soluzioni acquose è anche possibile al posto di soluzioni di alcool-acido cloridrico esenti d'acqua? Influenza della concentrazione dell'acido. Può l'acido cloridrico essere sostituito da altri catalizzatori, in specie dai complessi BF_3/MeOH (metanolo) e BF_3/PrOH (propanolo), come pure da tricloruro d'alluminio e acido solforico?

Risultato: Anche soluzioni acquose d'alcool-acido cloridrico sono senz'altro utilizzabili. Generalmente l'altezza degli apici (Peak) è inferiore. Di regola si hanno apici in diminuzione coll'aumentare della concentrazione dell'acido. BF_3/MeOH, BF_3/n-PrOH, $AlCl_3$ e H_2SO_4 non soddisfano. Per prolina, lisina e glutamina le migliori condizioni di esterificazione sono state riscontrate con 0,25 N-HCl in i-PrOH, soluzione acquosa e cromatografia a gas per 4,5 ore a 150 ° C.

Tentativi per la produzione di soluzione alcool-acido cloridrico esenti d'acqua tramite la distillazione di soluzioni acquose, aggiunta di stacci molecolari o pentossido di fosforo ebbero un esito negativo.

Acetilazione: L'anidride dell'acido trifluoroacetico (TFEA) normalmente utilizzata può essere sostituita dalle anidridi degli acidi acetico (EA), tricloroacetico (TCEA), n- e i-butirrico (BA), propionico e benzoico?

Risultato: Più conveniente è l'uso di TFEA. L'apice (Peak) della glutamina e della lisina cade bruscamente con l'uso di EA e di TCEA. Sono utilizzabili n-BA e i-BA, ma i cromatogrammi diventano poco chiari a causa di tanti altri apici contemporanei. In linea generale per l'acetilazione sono da preferire temperature più basse.

Sililazione: Come mezzi di sililazione sono state impiegate BA e l'anidride dell' acido trifluorobutirrico, quindi sono state studiate le condizioni di reazione nonchè le influenze dei solventi. Per ciò che concerne i tentativi inerenti la sililazione diretta sulla colonna di separazione, risp. su una colonna prealabile sarà riferito più in là.

In teoria si dimostrano tre possibilità derivative per l'apporto di un atomo di P, onde potere profittare della grande sensibilità e selettività del detettore a termoionizzazione.

Literatur

1. *Darbre, A.* and *Islam, A.:* Biochem. J. **106**, 923—925 (1968).
2. *Smith, E. D.* and *Shewbart, K. L.:* J. Chromatog. Sci. **7**, 704—707 (1969).
3. *Fernandez, E., Kline, D. A., Johnson, A. R.* and *Leber, B. L.:* JAOAC **53**, 1203—1208 (1970).
4. *Gehrke, Ch. W.* and *Leimer, K.:* J. Chromatog. **53**, 195—200 (1970).
5. *Gehrke, Ch. W.* and *Leimer, K.:* J. Chromatog. **53**, 201—208 (1970).
6. *Pettit, B. C.* and *Stouffer, J. E.:* J. Chromatog. Sci. **8**, 735—737 (1970).
7. *Zumwalt, R. W., Roach, D.* and *Gehrke, Ch. W.:* J. Chromatog. **53**, 171—193 (1970).
8. *Roach, D.* and *Gehrke, Ch. W.:* J. Chromatog. **44**, 269—278 (1969).

9. *Moss, C. W., Lambert, M. A.* and *Diaz, F. J.:* J. Chromatog. **60**, 134—136 (1971).
10. *Gehrke, Ch. W., Kuo, K.* and *Zumwalt, R. W.:* J. Chromatog. **57**, 209—217 (1971).
11. *Gehrke, Ch. W.* and *Leimer, K.:* J. Chromatog. **57**, 219—238 (1971).
12. *Zumwalt, R. W., Kuo, K.* and *Gehrke, Ch. W.:* J. Chromatog. **57**, 193—238 (1971).
13. *Gehrke, Ch. W., Zumwalt, R. W.* and *Kuo, K.:* J. Agr. Food Chem. **19**, 605—618 (1971).
14. *Hardy, J. P.* and *Kerrin, S. L.:* Anal. Chem. **44**, 1497—1499 (1972).
15. *Blessington, B.* and *Fiagabe, N. J. Y.:* J. Chromatog. **68**, 259—261 (1972).
16. *Butts, C. W.:* Anal. Biochem. **46**, 187—199 (1972).

P. Uebersax
Eidg. Forschungsanstalt
für Agrikulturchemie und Umwelthygiene

CH-3097 Liebefeld-Bern

Schweiz. Lebensmittelbuch

5. Auflage, Zweiter Band

Wir möchten darauf hinweisen, daß die 11. Lieferung (1973) erschienen ist. Sie umfaßt die beiden Kapitel

17 «Backhefe»
35 «Kaffee und Kaffee-Ersatz»

Im weiteren sei nochmals auf das revidierte und erweiterte Kapitel 30 «Wein» aufmerksam gemacht. Die neue Ausgabe 1973 kann *separat* bei der Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, 3000 Bern, bezogen werden (Preis Fr. 10.—).

Für die Redaktion: *R. Gerber*

Korrigendum zu der Arbeit:

Ein empfindlicher Gärtest zur Entdeckung kleiner Mengen Konservierungsmittel in Fruchtsäften

von *W. Pilnik* und *Marijke Piek-Faddegon,* Mitt. **63**, 461—467 (1972).

In diesem Artikel wurde auf Seite 466 unter «Ausführungen» ph 3 ± 0,5 genannt, was ein Druckfehler ist. Es handelt sich natürlich um pH 3 ± 0,05, wie auf Seite 462 unter «Arbeitsweise» richtig wiedergegeben.