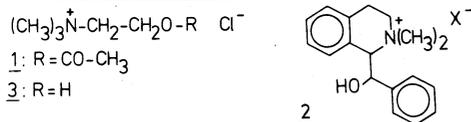


Gaschromatographische Ameisensäurebestimmung in wäßrigen Lösungen

Von Margit Vilbig, Ernst Eibler und Wolfgang Wiegrebe*
Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

Ameisensäure kann neben Essigsäure in wäßrigen Lösungen als n-Propylformiat gc in einer Grenzkonzentration von 2,4 ppm [w/v] bei einer Standardabweichung von 3,8% auf PAeG 4000/Chromosorb G bestimmt werden. Große Mengen anorganischer Ionen (SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , J^-) stören nicht.

O-Acetylcholin [1] wird als Ester eines N-quartären β -Aminoalkohols nach Pharm. Helv. VI (1) durch Erhitzen mit Lauge, d. h. unter den Bedingungen eines Hofmann-Abbaues N-quartärer Ammoniumsalze identifiziert. Der Hofmann-Abbau N-quartärer β -Aminoalkohole vom Typ 2 wurde in früheren Publikationen untersucht (2), so daß uns ein Vergleich zwischen [2], [1] und dem freien Cholin [3] interessierte.



Unter den Reaktionsprodukten der Laugenbehandlung und der nachfolgenden Hypojoditreaktion von [1] – darüber wird gesondert berichtet – finden sich Spuren von Ameisensäure, die quantitativ bestimmt werden mußten.

Kleine Mengen Ameisensäure lassen sich photometrisch nach Reduktion zu Formaldehyd durch Umsetzung mit Chromotropsäure (3) bzw. enzymatisch (4) bestimmen. Das photometrische Verfahren ist nach unseren Erfahrungen zeitraubend, umständlich und störanfällig. Bei der enzymatischen Methode stört anorganisches Material (J^- ; SO_3^{2-}) in nicht a priori überblickbarer Weise, so daß eine in diesen Punkten nicht störanfällige Methode erarbeitet werden mußte.

Die GC-Bestimmung freier Ameisensäure in wäßriger Lösung bringt erhebliche Schwierigkeiten (Zusammenstellung der diesbezüglichen Literatur bei Czerwiński [5]): So können durch Zersetzung der Ameisensäure zu CO und H_2O bei höherer Temperatur unter dem katalytischen Einfluß von Schwermetallspuren vor allem bei der Verwendung von Stahlsäulen erheblich zu niedrige Werte gefunden werden. Da Ameisensäure weiterhin nur etwa 26% Kohlenstoff enthält, wird verständlich, daß der Flammenionisationsdetektor auf diese Substanz nicht ausreichend anspricht. Schließlich muß mit beachtlichen Adsorptionserscheinungen (Tailing) auf den in Frage kommenden Säulen gerechnet werden, was nur durch Konditionieren mit Essigsäure einigermaßen befriedigend zu vermeiden ist. Daher beschäftigen sich eine Reihe von Untersuchungen mit der GC von Ameisensäure nach Derivatisierung. Hier ergeben sich prinzipiell zwei Möglichkeiten: die Umsetzungen zu Säureamiden bzw. zu Estern.

Die Umsetzung mit Anilin bzw. Toluidin beschreibt Umeh (6). Eine Methode zur Herstellung des Piperidids findet sich bei Berbalk (7). Unsere Versuche, sie für Ameisensäuremengen im Bereich um 10 ppm zu optimieren, waren erfolglos.

Zur Veresterung wird z. B. Phenyl diazomethan herangezogen (8) oder mit Schwefelsäure als Kondensationsmittel (9) zur Herstellung des Ethylesters gearbeitet. Die Umsetzung mit Phenyl diazome-

than (8) schließt die Notwendigkeit einer Extraktion aus der wäßrigen Lösung und damit verbundene Verluste ein. – Bei der Veresterung mit Schwefelsäure muß die Headspacetechnik angewendet werden, die für die quantitative Analytik Probleme aufwirft: So gibt Sestakova (9) einen vergleichsweise großen Variationskoeffizienten von 6,74% an, obwohl die untere Grenze ihrer Messungen laut Eichkurve bei etwa 35 ppm Ameisensäure liegt.

Bei der Umsetzung der Ameisensäure mit methanolischer Salzsäure nach Czerwiński (5) ergaben sich folgende Schwierigkeiten: Käufliches Methanol p. A. enthält Ameisensäure bzw. deren Methylester in Größenordnungen, die im Bereich der zu bestimmenden Ameisensäuremenge liegen. Außerdem gelangen bei der von Czerwiński (5) angegebenen Temperatur bereits HCl-Spuren auf die Carbowax-Säule und schädigen sie zumindest so weit, daß die dadurch bedingten Untergrundsignale Messungen im unteren Empfindlichkeitsbereich nicht zulassen.

Das Methanolproblem haben wir durch Umsetzung der Ameisensäure mit n-Propanol gelöst. Der Propylester hat darüber hinaus den Vorteil des höheren Siedepunktes und damit einer längeren Retentionszeit. Um einen Kontakt der Säule mit Säurespuren zu verhindern, haben wir den Injektionsbereich mit unbelegtem Material gefüllt und Salzsäure durch Phosphorsäure bzw. ein $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_4\text{O}_{10}$ -Gemisch ersetzt. Dadurch konnten auch das vergleichsweise umständliche Einleiten von HCl in den Alkohol und die damit verbundene Gefahr des Einschleppens von Fremdstoffen aus den Schlauchverbindungen vermieden werden.

Von einem chemisch ähnlichen Prinzip (Toluolsulfonsäure als Katalysator, Direkteinspritzung) gehen Sizova et al. (10) aus. Aus der Menge des internen Standards ist zu schließen (die bestimmten Säuremengen können wir der Publikation nicht entnehmen), daß die Autoren mit Konzentrationen arbeiten, die etwa 100fach über dem uns interessierenden Bereich liegen.

Bei der Veresterungsreaktion nahmen wir eine unvollständige Umsetzung bei nur 65 °C in Kauf, um ohne Druckgefäße arbeiten zu können. Wegen des o. a. anorganischen Materials mußte mit einem großen Reagensüberschuß gearbeitet werden, das hier gleichzeitig die Funktion eines Lösungsmittels für die anorganischen Salze übernimmt. Dementsprechend kann die o. a. Grenzkonzentration allein durch Verminderung der Reagenszugabe gesenkt werden, wenn bei analogen Fragestellungen nur wenig anorganische Substanz vorliegt.

Experimenteller Teil

Substanzen

n-Propanol p. A. Merck Nr. 997
Ameisensäure 98–100% p. A. Merck Nr. 264 (Gehalt 98,37% acidimetrisch nach DAB 7)
Cyclohexanon p. A. Merck Nr. 9666
Diphosphorpentoxid p. A. Merck Nr. 570
Phosphorsäure 85% p. A. Merck Nr. 573
Natriumacetat p. A. Merck Nr. 6268

* Prof. Dr. Dr. h. c. E. Bamann, München, zum 80. Geburtstag freundlich gewidmet

Ameisensäurepropylester (Kp 81,5°) wurde nach Adickes (11) hergestellt und zweimal destilliert. Die Substanz wurde durch IR-Spektrum charakterisiert, die Reinheit gc geprüft (> 99,5%).

Reagenzlösung

18,75 g H₃PO₄ werden mit 7,5 g P₄O₁₀ verrührt und unter Eiskühlung portionsweise in n-Propanol, das zwei Tage über Molekularsieb 3 Å getrocknet worden war, gelöst. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird die Mischung mit 10,0 mg Cyclohexan als internem Standard versetzt und auf 250,0 ml mit getrocknetem n-Propanol aufgefüllt. Zu starkes Erwärmen der Lösung führt zu zusätzlichen Peaks im Chromatogramm, die möglicherweise von einer Reaktion des Propanols mit der Phosphorsäure herrühren. Es ist zweckmäßig, das Reagens vor Durchführung der Bestimmung gc zu überprüfen. Dicht verschlossen ist es im Kühlschrank zwei bis drei Wochen haltbar.

Angaben zur GC:

Gerät: Varian 1440 mit FID
 Säule: V2A Stahl, Länge 6 m, Durchmesser 1/8"
 Füllung: 2,5% PAeG 4000 auf Chromosorb G (80/100 mesh); der Injektorbereich wird mit unbelegtem Chromosorb W HP (80 mesh) gefüllt.
 Gasfluß: N₂ 30 ml/min, Luft 300 ml/min, H₂ 30 ml/min
 Temperaturen: Injektor 100°; Detektor 150° (stärkeres Aufheizen des Injektorbereichs führt zu Störungen durch Desorptionserscheinungen); Säule a) Zur Bestimmung von Ameisensäure 67° (isotherm); b) zur Bestimmung von Ameisensäure neben Essigsäure 52° (isotherm)
 Verstärkung: Range 10⁻¹¹ Cb/mV; Abschwächung 8x-64x

Retentionszeiten: [min]	52°	67°
Cyclohexan	3,3	3,1
Ameisensäurepropylester	9	6,2
Essigsäurepropylester	13,1	
n-Propanol	16,5	11,8

Chromatogrammbeispiele sind in Abbildung 1 gegeben.

Methode

Ausführung

100,0 ml Prüflösung (Gehalt mindestens 0,240 mg Ameisensäure bzw. 0,250 mg Essigsäure) werden mit 0,1 g NaHCO₃ (wasserfrei) versetzt und im Vakuum zur Trockne eingengt (Rotationsverdampfer). Hierbei wird die Lösung quantitativ in 25-ml-Rundkölbchen NS 14,5 überführt. Beim Einengen ist darauf zu achten, daß

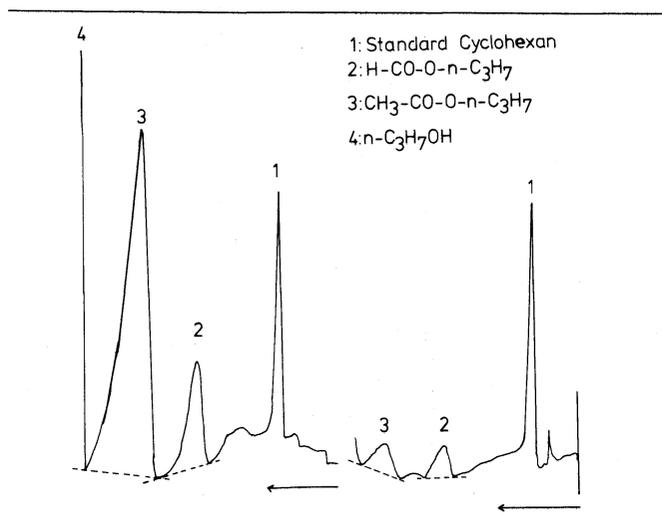


Abb. 1: GC des Ameisen- bzw. Essigsäure-n-propyl-Ester

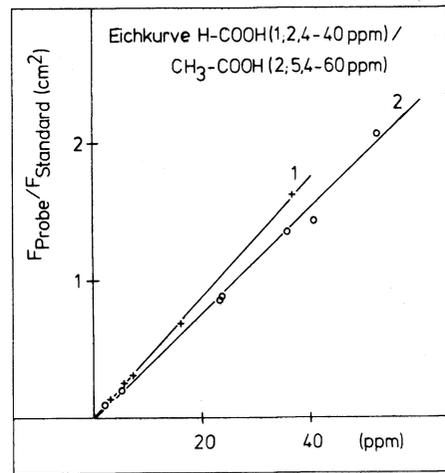


Abb. 2: Eichkurve H-COOH 1; 2,4-40 ppm/CH₃-COOH (2; 5,4-60 ppm)

sich die Festsubstanz möglichst im unteren Teil des Kölbchens abscheidet. Anschließend wird eine Stunde bei 105° getrocknet (bei hygroskopischen Begleitstoffen, wie im Fall des Cholins, wird über Nacht getrocknet). Nach Erkalten im Exsikkator wird Reagens (10,00 ml) zugegeben und die Mischung zunächst bei Raumtemperatur zwei Minuten (schwache CO₂-Entwicklung), dann nach Verschließen mit Schlipfstopfen und Klammer weitere drei Stunden im Wasserbad von 65° (± 1°) mit Magnetrührer gerührt. Der Flüssigkeitsspiegel im Kolben soll sich etwa 1 cm unter dem des Wasserbades befinden. Man läßt abkühlen, wobei sich die Feststoffe absetzen, und verwendet 5 µl des klaren Überstandes für die GC.

Eichlösung

Ameisensäure:

100 mg Ameisensäure werden genau gewogen und zu 100,0 g in Wasser gelöst. 0,2 bis 10 g dieser Lösung werden wie oben beschrieben mit NaHCO₃ eingengt, getrocknet und zum Propylester umgesetzt. Zur Chromatographie werden 5 µl verwendet (Abb. 2 bzw. Abb. 3).

Ameisensäure neben Essigsäure:

Es wird wie bei Ameisensäure verfahren, jedoch werden zu 100,0 ml Ameisensäurelösung 0,2 bis 10,0 g einer wäßrigen Natriumacetatlösung (100,0 mg Natriumacetat [wasserfrei] zu 100,0 g gelöst) gegeben. Die mengenmäßige Zusammensetzung der Eichgemische wird so gewählt, daß die Bedingungen des sog. „Kreuzverfahrens“ (12) (viel Ameisensäure, wenig Essigsäure bis wenig Ameisensäure, viel Essigsäure) erfüllt sind.

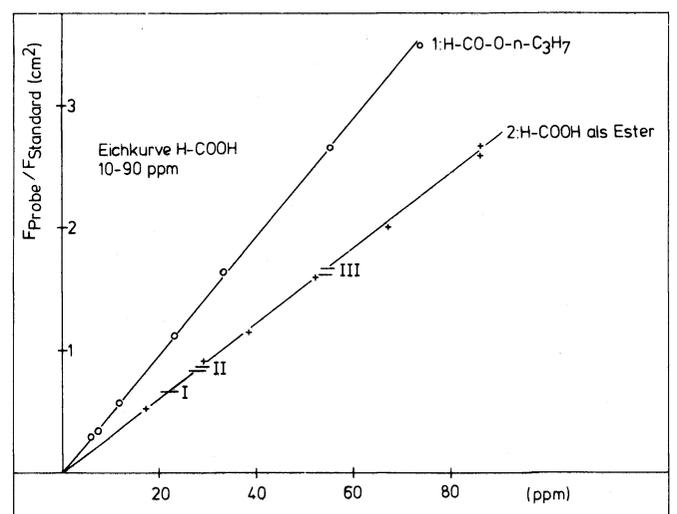


Abb. 3: Eichkurve H-COOH (10-90 ppm)

Auswertung

Die Peakflächen wurden durch Messen der Höhe und Breite in halber Höhe ermittelt. Ausgewertet wurde nach der Methode des internen Standards graphisch (Abb. 2, 3) und rechnerisch (Tab. 1, 2) durch Bestimmung der Auswertfaktoren nach

$$f = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Stand.}} \cdot \text{Konz.}_{\text{Probe}}}{\text{Konz.}_{\text{Stand.}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Probe}}}$$

Prüfung der Ergebnisse

Die Qualität der Bestimmung wurde durch Berechnung der Standardabweichung der Auswertfaktoren geprüft (nach Kaiser [13] werden hierdurch alle zufälligen Fehler in ihrer Gesamtheit erfaßt). Ameisensäurebestimmung (5,0–100 ppm): $s = 3,8\%$.

Ameisensäurebestimmung (2,4–25 ppm) neben Essigsäure (2,4–75 ppm): $s_{\text{Ameisensäure}} = 3,8\%$; $s_{\text{Essigsäure}} = 9,8\%$.

Die Richtigkeit der Methode wurde durch die Analysen von Testmengen in der Größenordnung 3 bis 60 ppm Ameisensäure überprüft, die nicht im gleichen Arbeitsgang wie die Bestimmung der Eichwerte ausgeführt wurden (Abb. 3).

Einwaage (ppm)	56,32 gefunden	56,34	100,0%	III
		54,84	97,4	
	28,27	28,14	99,5	II
		29,46	104,2	
	22,67	22,77	100,5	I
	3,68	3,57	97,0	

Tab. 1: Bestimmung der Auswertfaktoren für 5 bis 90 ppm Ameisensäure

Einwaage Ameisensäure (ppm)	Fläche _{Probe}		Auswertfaktor (f)
	Fläche _{Standard}		
5,83	0,259		8,390
17,37	0,471		8,980
29,08	0,906		8,028
38,28	1,134		8,436
52,20	1,639		7,961
66,69	1,911		8,723
86,52	2,654		8,780

\bar{f} = Mittelwert aus 18 Best. = 8,480

Tab. 2: Bestimmung der Auswertfaktoren für 2,4–40 ppm Ameisensäure neben 5,4–60 ppm Essigsäure

Einwaage (ppm)		Fläche _{Probe}		Auswertfaktor (f)	
		Fläche _{Standard}			
Ameisensäure	Essigsäure	Ameisensäure	Essigsäure	Ameisensäure	Essigsäure
2,94		0,208		5,481	
5,83		0,412		5,709	
2,48	57,03	0,153	3,030	5,944	6,903
7,39	37,76	0,554	2,803	5,709	5,521
16,29	21,33	1,150	1,588	5,910	5,608
36,85	12,51	2,193	0,623	5,700	6,812
2,43	5,42	0,172	0,314	5,450	6,525

$\bar{f}_{\text{Ameisens.}}$ = Mittelwert aus 12 Best. = 5,677;

$\bar{f}_{\text{Essigs.}}$ = Mittelwert aus 9 Best. = 6,303

Tab. 3: Bestimmung der Richtigkeit mittels Auswertfaktoren

Einwaage Ameisensäure (ppm)	Fläche _{Probe}	
	Fläche _{Standard}	
56,32	1,661	1,617
22,67	0,671	0,671
28,27	0,829	0,868

Einfluß der Arbeitsbedingungen

Temperatur

Je eine Probe mit 50 ppm Ameisensäure wurde nach der oben erwähnten Methode behandelt, die Erwärmungstemperatur jedoch zwischen 60° und 70 °C variiert. Die Umsatzrate wurde durch Vergleich mit der Eichkurve des Ameisensäure-n-propylesters ermittelt (Abb. 3).

Temperatur:	60°	Umsatzrate:	38,8%
	65°		63,3%
	70°		74,2%

Umsetzungsdauer

Eine Probe von 71 ppm Ameisensäure wurde wie oben erwähnt umgesetzt; mit einer Spritze wurden nach bestimmten Zeiten durch eine Serumkappe Proben von etwa 250 µl entnommen. Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion: Danach bringt es keinen Vorteil, die Proben länger als drei Stunden zu erwärmen.

Begleitstoffe

In unserer Analysenlösung befanden sich große Mengen von anorganischen Salzen (Na₂SO₄, NaJ, Na₂SO₃) sowie Cholin und Natriumacetat in mindestens 250facher Menge, bezogen auf Ameisensäure. Wir haben insbesondere den Einfluß des Cholins untersucht, weil dieses u. U. einen Teil der Säuren durch Veresterung der Bestimmung entziehen könnte. Einige Proben wurden deshalb vor dem Einengen mit 250 mg Cholinchlorid versetzt und im Gehalt mit Proben ohne Cholinzusatz verglichen. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied feststellen:

Probe mit Cholin: Einwaage 28,27 ppm, gef. 28,14 ppm = 99,5%
 29,46 ppm, 28,46 ppm = 96,6%
 Probe ohne Cholin: Einwaage 22,67 ppm, gef. 22,77 ppm = 100,4%

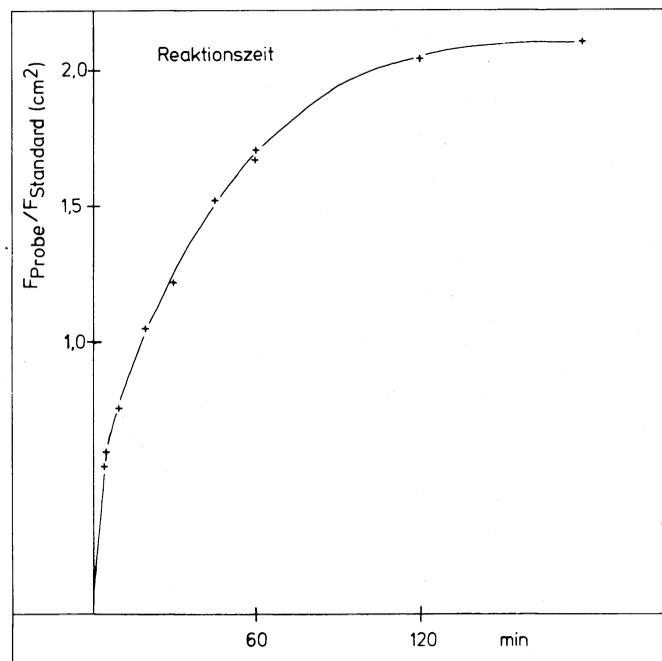


Abb. 4: Reaktionszeit

Bestimmung von Ameisensäure und Essigsäure nebeneinander

Bei einer Säulentemperatur von 52° sind 2,4 bis 60 ppm Essigsäure neben einer größenordnungsmäßig gleichen Menge Ameisensäure quantitativ bestimmbar. In unserem Fall betrug die Standardabweichung 9,8%. Wir konnten 10 ppm Ameisensäure noch einwandfrei von 2500 ppm Essigsäure trennen, doch ist dieses Verfahren für die Bestimmung von Essigsäure nicht konzipiert und dementsprechend nicht optimiert.

Ergebnis und Diskussion

Es lassen sich Ameisensäuremengen von 2,5 ppm an aufwärts durch Umsetzung zu n-Propylformiat quantitativ mit einer Standardabweichung von 3,5 bis 3,8% (Auswertung von Hand) bestimmen. Die untere Grenze ergibt sich nicht aus der Methode, sondern aus dem Gehalt an Verunreinigungen des verwendeten n-Propanols. So war die Eichkurve in unserem Fall bei einer Säulentemperatur 67° erst ab 5 ppm linear. Durch eine Senkung der Temperatur auf 52° konnte die untere Grenze auf 2,4 ppm herabgesetzt werden, doch verlängert diese Variante die Analysenzeit. Bei Einhaltung der o. a. Bedingungen, vor allem der Umsetzungstemperatur kann mit externer Eichung gearbeitet werden.

Wir danken Frau Christine Braun herzlich für geschickte experimentelle Mitarbeit.

Summary

GC-Determination of formic acid in aqueous solutions. Formic acid is determined besides acetic acid in aqueous solutions as n-propylformate in a minimum concentration of 2,4 ppm and a standard deviation of 3,8% using a PAeG 4000 column. The procedure is not disturbed by large quantities of inorganic materials (SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , J).

Literatur

- (1) Pharm. Helv. VI, Monographie Acetylcholinium chloratum.
- (2) Wiegrebe, W., B. Rohrbach-Munz, W. Awe und O. Kirk: Helv. Chim. Acta 58, 1825 (1975) und dort zit. Lit.
- (3) Rietbrock, N., und W. D. Hinrichs: Klin. Wochenschr. 42, 981 (1964).
- (4) Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1974, S. 1596.
- (5) Czerwiński, W., und A. Stepien: J. Chromatogr. 148, 219 (1978).
- (6) Umeh, E. O.: J. Chromatogr. 51, 139 (1970).
- (7) Berbalk, H., K. Eichinger und P. Fricke: Monatsh. Chem. 107, 1081 (1976).
- (8) Triebig, G., K. H. Schaller und K. Göbler: Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 114 (1978).
- (9) Sestakova, M.: Krasny Promysl. 24, 149 (1978), ref. C. A. 89, 21357 b.
- (10) Sizova, G. S., E. P. Usova und A. P. Znamenskaya: Z. anal. chim. (USSR) 32, 1034 (1977).
- (11) Adickes, F.: J. prakt. Chem. (neue Folge) 145, 237 (1936).
- (12) Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase, Bd. IV, 2. Aufl. Hochschulverlag, Mannheim, S. 112.
- (13) vgl. (12), s. 114.

Margit Vilbig: Pharmaziestudium 1963–1966 in München und Karlsruhe, 1967–1970 Apothekerin in Karlsruhe, 1971–1976 Lehrtätigkeit an der Lehranstalt für Pharmazeutisch-technische Assistenten in München, seit 1976 Assistentin am Lehrstuhl Pharm. Chem. I der Universität Regensburg.

Dr. Ernst Eibler: Studium der Chemie an der Universität München, Diplom 1968, ab 1970 an der Universität Regensburg als wissenschaftlicher Mitarbeiter, 1974 Promotion bei Prof. Dr. J. Sauer über Nitren-Zwischenstufen, seitdem wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Regensburg.

Dr. Wolfgang Wiegrebe: Pharmaziestudium 1955–1958 Technische Universität Braunschweig, 1961 Promotion (Prof. Dr. W. Awe), Habilitation 1966 für Pharmazeutische Chemie an der Technischen Universität Braunschweig, 1970 wissenschaftlicher Rat und Professor am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt, 1971 o. Prof. für Pharmazeutische Chemie an der Universität Bern, 1975 o. Prof. für Pharmazeutische Chemie an der Universität Regensburg.

Prof. Dr. W. Wiegrebe, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, 8400 Regensburg