

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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 75 (1984)

Heft: 1

Artikel: HPLC-Bestimmung von Carbonsäuren als p-Nitrobenzylester in Fruchtsäften und Wein = HPLC analysis of carboxylic acids as p-nitrobenzyl esters in fruit juices and wine

Autor: Steiner, W. / Müller, E. / Fröhlich, D.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982691>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

W. Steiner, E. Müller, D. Fröhlich und *R. Battaglia*, Kantonales Laboratorium, Zürich

HPLC-Bestimmung von Carbonsäuren als p-Nitrobenzylester in Fruchtsäften und Wein

HPLC Analysis of Carboxylic Acids as p-Nitrobenzyl Esters in Fruit Juices and Wine

Einleitung

Die HPLC-Analyse von freien organischen Carbonsäuren in Fruchtsäften und Wein ist von vielen Autoren beschrieben worden (1, 2, 3, 4, 5, 6). Weniger häufig wird das Einführen einer chromophoren Gruppe beschrieben, um die Absorption von UV- oder sichtbarem Licht zu erhöhen bzw. um fluoreszierende Verbindungen zu erzeugen. Letztere werden z. B. mit 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin (7, 8, 9, 10) oder mit 4-Bromomethyl-7-acetoxycoumarin (11) hergestellt. Diese Veresterungen werden mit Hilfe von Kronenethern durchgeführt (Phasentransferkatalyse). Als Nachteil erweist sich bei den Coumarylestern, daß sie je nach mobiler Phase und derivatisierter Säure unterschiedlich stark fluoreszieren (11). Für Gradienten scheinen sie nicht geeignet zu sein (11).

Zur Bildung UV-Licht absorbierender Ester wurden Benzyl-, Naphtacyl-, Phenacyl-, p-Bromphenacyl- (12, 13), p-Nitrobenzyl- (14) oder p-Nitrophenacylbromid, p-Methoxyanilin und p-Nitrobenzyl-N,N'-diisopropylisoharnstoff (PNBDI) als Derivatisierungsreagenzien angewandt (15). Als Katalysatoren für die Bildung von Benzyl- und Phenacylestern dienen tertiäre Amine oder Kronenether. Anilide müssen über die Säurechloride hergestellt werden (16), während PNBDI direkt mit Säuren reagiert (17, 18, 19). Die hohe Reaktivität von PNBDI mit Carbonsäuren ließ dieses Reagenz als besonders geeignet erscheinen, auch in komplexer Matrix noch eine Veresterung mit genügender Ausbeute zu ermöglichen. Der Gewinn an Selektivität und Empfindlichkeit sollte den Nachteil kompensieren, eine Veresterung vor der Analyse durchführen zu müssen.

Material und Methoden

Als Lösungsmittel wurden verwendet: Dichlormethan, Dimethylformamid, Ethylacetat, p. a., Tetrahydrofuran für die Spektroskopie (alle von Merck), Diethylether, Petrolether 40–70 °C (beide von Siegfried) und für die HPLC: Bidestilliertes Wasser, Methanol (J. T. Baker, 8402).

Substanzen: D,L-Äpfelsäure, Ameisensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Essigsäure, Propionsäure, L-Weinsäure (Merck, p. a.), L-Milchsäure (Sigma), Diisopropylcarbodiimid, Kupfer(I)-chlorid, 4-Nitrobenzylalkohol (Fluka, purum), p-Nitrobenzylidiisopropylisoharnstoff (PNBDI, Regis und synthetisiert). Die p-Nitrobenzylester der genannten Säuren wurden synthetisiert. Für die Chromatographie: Aluminiumoxid neutral aktiv (I), Kieselgel 60, 230–400 mesh (Merck), Dowex 50 X8 (Fluka).

Synthese von PNBDI (19)

15,3 g (0,1 Mol) 4-Nitrobenzylalkohol, 12,6 g (0,1 Mol) Diisopropylcarbodiimid, 0,01 g Kupfer(I)-chlorid und 10 ml Dimethylformamid wurden 96 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Lösungsmittel wurde im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, der Rückstand mit Petrolether verdünnt und auf eine Aluminiumoxidsäule (20 x 2 cm) aufgetragen. Mit ca. 0,5 l Petrolether wurde das PNBDI eluiert und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde mit Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 14 g (50%). Smp.: 41–43 °C.

Synthese der p-Nitrobenzylester

Die Säuren (0,5–2 mMol) wurden mit 10–20% Überschuß an PNBDI in 10 ml Tetrahydrofuran in einem Reagenzglas mit Sovirelverschluß 2 h bei 80 °C gehalten. Die Reaktionslösungen wurden während 12–15 h in einen Kühlschrank gestellt, anschließend der ausgefallene Diisopropylharnstoff abfiltriert und die Filtrate eingedampft. Von Äpfel-, Bernstein-, Citronen- und Weinsäurenitrobenzylester wurden durch Umkristallisation des Rückstandes in Diethylether Kristalle erhalten. Die Ester von Ameisen-, Essig-, Milch- und Propionsäure wurden in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit demselben Lösungsmittel über einer Kieselgelsäule (25 x 2 cm) gereinigt. Die esterhaltigen Fraktionen wurden zusammengespült, eingedampft und in Diethylether umkristallisiert.

Probenaufbereitung

3–5 ml Probe werden ohne Zwischenfiltration dreimal mit je 0,3–0,5 g stark saurem Kationenaustauscher ca. 30 s kräftig geschüttelt. Eine frische Lösung von 10 mg PNBDI in 450 µl Tetrahydrofuran wird in einem 10-ml-Reagenzglas mit Sovirelverschluß vorbereitet und 50 µl der mit Ionenaustauscher behandelten Probe

dazugegeben. Analog werden 2mal 50 μl Standardlösung zu je einer Lösung von 10 mg PNBDI in 450 μl Tetrahydrofuran zugesetzt. Die Standardlösung enthält Äpfel-, Ameisen-, Bernstein-, Citronen-, Essig-, Milch-, Propion- und Weinsäure in einer Konzentration von 1 g/l Wasser. Die Reagenzgläser werden in Aluminiumfolien verpackt und die Reaktionslösungen 1 h bei 80 °C gerührt.

Die abgekühlten Lösungen werden mit 8 ml Dichlormethan verdünnt und mit Hilfe von Kieselgel-Sep-Pak-Kartuschen gereinigt. Mit weiteren 8 ml Dichlormethan werden die Kartuschen gespült, die vereinigten Eluate im Wasserstrahlvakuum bei 40 °C eingedampft und die Rückstände je in 1 ml Tetrahydrofuran/Ethylacetat (1 + 1, v/v) aufgenommen. 5 μl dieser Lösungen werden zur HPLC-Analyse verwendet.

HPLC-Analyse

Glassäule: 100 x 5 mm
 Stationäre Phase: H-5-ODS (Shandon)
 Fluß: 1 ml/min
 Wellenlänge: 265 nm
 – Mobile Phase: Stufengradient mit Methanol in Wasser

Zeit (min)	% Methanol in Wasser
0–13	29
13–26	50
26–32	60
32–38	65
38–42	100
42–50	29

Orlita Membranpumpe

Injektor: Waters U6K
 Detektor: Spektrophotometer LC 55 (Perkin-Elmer)
 Steuergerät mit 8-Wegventil für Stufengradient: Labtime, Mod. 1788 (Portmann Inst. AG)
 – Mobile Phase: Kombination mit linearem Gradient und Stufengradient

Zeit (min)	% Methanol in Wasser
0–20	15–25
20–30	35–45
30–40	45–49
40–55	49–70
55–58	100
58–65	15

Kontron LC Pumpen 414 mit Mischkammer
Injektor: Rheodyne RE 71-25
Detektor: Spectroflow 773 (Kratos)
Steuergerät für Gradient: Anacomp 220 (Kontron)

Massenspektren

Alle Spektren der p-Nitrobenzylester wurden durch Direkteinlaß auf einem Finnigan-4000-Gerät bei 70 eV und 200 μ A erhalten.

NMR-Spektren

Von Citronensäure- und Weinsäurenitrobenzylester wurden 360 MHz-, von Äpfel-, Ameisen-, Bernstein-, Essig-, Milch- und Propionsäurenitrobenzylester 400 MHz NMR-Spektren in Deuteriochloroform aufgenommen.

Resultate

Zur Analyse von Säuren als p-Nitrobenzylester wurden die Ester von Äpfel-, Ameisen-, Bernstein-, Citronen-, Essig-, Milch-, Propion- und Weinsäure synthetisch dargestellt. Die Identität der p-Nitrobenzylester wurde mit Massenspektrometrie und NMR überprüft. In Tabelle 1 und 2 sind die entsprechenden Daten wiedergegeben.

Die HPLC-Chromatogramme in Abbildung 1 zeigen diese Reinsubstanzen, aufgetrennt mit einem Stufengradienten (a) und einer Kombination von linearem Gradient und Stufengradient (b). Das Chromatogramm b wurde mit derselben Säule, aber mit einem anderen HPLC-System erhalten (vgl. Material und Methoden). Auf diesem System war eine Auftrennung mit dem Stufengradienten, der das Chromatogramm a ergab, nicht möglich. Die Ausbeuten der Veresterungen wurden in einem Gemisch der reinen Säuren ermittelt (6fach-Bestimmung). Das Ausmaß der Derivatisierung wurde durch Vergleich der Detektorsignale von Proben und Referenzlösung der synthetisch dargestellten p-Nitrobenzylester (100 mg/l Essigsäureethylester) bestimmt. Wie Tabelle 3 zeigt, verestern die Hydroxysäuren mit Ausnahme der Milchsäure weniger gut als die rein aliphatischen Carbonsäuren. Weinsäure ergab die geringste Ausbeute (58%), alle Carbonsäuren ohne Hydroxylgruppe zeigten einen Veresterungsgrad von über 90%.

Eine längere Reaktionsdauer bewirkte keine bessere Ausbeute wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist. Chromatogramme von Reaktionslösungen, mit welchen die Veresterung bei 100 °C durchgeführt wurde, enthielten Störsignale, die vermutlich auf Zersetzung von PNBDI zurückzuführen sind.

In 13 Fruchtsäften und 21 Weinproben wurden Carbonsäuren als p-Nitrobenzylester bestimmt. Abbildung 3 zeigt typische Chromatogramme eines Schaum-

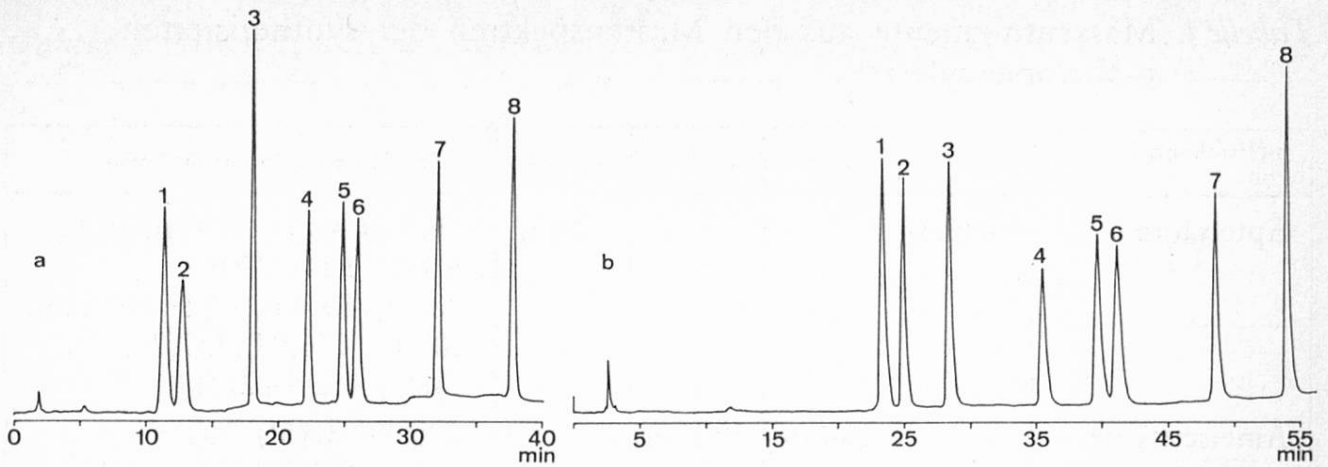


Abb. 1. HPLC-Chromatogramme von synthetisierten p-Nitrobenzylestern
 1 = Ameisen-, 2 = Milch-, 3 = Essig-, 4 = Propion-, 5 = Wein-, 6 = Äpfel-,
 7 = Bernstein-, 8 = Citronensäure nitrobenzylester
 Konzentrationen: 0,09–0,11 mg/ml
 Injektionsmenge: 5 μ l (entspr. 450–550 ng), 0,1 AUFS
 a = Trennung mit einem Stufengradienten
 b = Trennung mit einer Kombination von linearem Gradient und Stufengradient

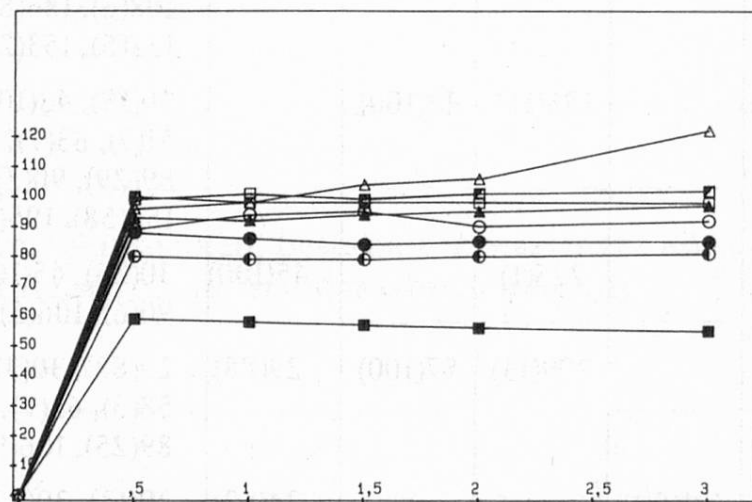


Abb. 2. Ausbeutebestimmung der Veresterung verschiedener Carbonsäuren mit PNBDI. Durch Vergleich der Detektorsignale von derivatisierten Proben und synthetisch dargestellten p-Nitrobenzylestern wurde der Veresterungsgrad ermittelt (X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: % Veresterungsausbeute). Die einzelnen Punkte stellen das Mittel von 2 (3 h), 3 (2 h), 4 (0,5 h und 1,5 h) und 6 (1 h) Bestimmungen dar
 Δ Ameisen-, \square Milch-, \circ Essig-, \blacktriangle Propion-, \blacksquare Wein-, \bullet Äpfel-, \blacksquare Bernstein-, \bullet Citronensäurenitrobenzylester

Table 1. Massenfragmente aus den Massenspektren der synthetisierten p-Nitrobenzylester

p-Nitrobenzylester von	M ⁺ + 1*	M ⁺ *	M ⁺ -152*	M ⁺ -180*	m/e >29 (% rel. Intensität >5%)
Äpfelsäure	405(0,3)			224(9)	30(100), 43(16), 44(14), 51(9), 63(9), 71(14), 77(10), 78(38), 89(40), 90(29), 106(25), 107(10), 136(94), 137(79), 138(7), 152(9), 224(9)
Ameisensäure		181(5)	29(100)		29(100), 30(51), 31(14), 38(8), 39(23), 50(23), 51(33), 52(10), 63(27), 64(8), 77(34), 78(25), 79(12), 89(62), 90(11), 106(5), 107(16), 136(8), 181(5)
Bernsteinsäure			236(1)		39(8), 55(20), 56(14), 63(11), 73(11), 77(10), 78(51), 89(43), 90(39), 101(67), 106(19), 107(18), 136(38), 137(100), 138(6), 152(8)
Citronensäure				417(3)	30(62), 31(10), 39(20), 40(7), 41(8), 42(12), 43(76), 44(100), 50(14), 51(27), 52(8), 53(6), 59(5), 63(13), 64(6), 77(39), 78(31), 79(9), 89(35), 90(17), 91(7), 105(7), 106(27), 107(14), 108(6), 136(82), 137(39), 152(5), 153(28), 264(8)
Essigsäure		195(16)	43(100)		30(19), 43(100), 44(5), 50(5), 51(7), 63(7), 77(7), 78(9), 89(29), 90(5), 106(7), 136(11), 153(58), 195(16)
Milchsäure		225(1)		45(100)	30(26), 45(100), 77(13), 89(13), 90(6), 106(5), 136(14), 137(7)
Propionsäure		209(13)	57(100)	29(88)	29(88), 30(31), 39(6), 57(100), 58(5), 63(7), 77(5), 78(13), 89(25), 106(9), 136(17), 209(13)
Weinsäure	421(0,1)			240(2)	29(13), 30(82), 31(7), 39(8), 43(10), 44(16), 51(9), 60(7), 63(7), 77(12), 78(29), 89(22), 90(22), 106(22), 107(8), 120(5), 136(100), 137(58), 138(5), 152(5)

* Werte in Klammern: % relative Intensität

Tabelle 2. NMR-Daten der synthetisierten p-Nitrobenzylester

p-Nitrobenzylester von	ppm/ s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett Ar-H =Aromaten-H, J = Kopplungskonstante
Äpfelsäure	3,0/m (-CH ₂ -), 3,3/d (-OH), 4,6/q (C-H), 5,23/t (-CH ₂ -), 5,33/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Ameisensäure	5,3/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,18/t (-COOH), J = 2Hz, 8,25/m (Ar-H)
Bernsteinsäure	2,8/s (-CH ₂ -), 5,2/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Citronensäure	3,0/q (-CH ₂ -COO), 5,2/t (-CH ₂ -), 5,3/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Essigsäure	2,1/s (CH ₃ -), 5,2/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Milchsäure	1,5/d (CH ₃ -), 2,7/d (-OH), 4,4/m (C-H), 5,3/q (C-H), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Propionsäure	1,2/t (CH ₃ -), 2,4/q (-CH ₂ -), 5,2/s (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)
Weinsäure	3,2/d (-OH), 4,7/d (C-H), 5,4/q (-CH ₂ -), 7,5/m (Ar-H), 8,2/m (Ar-H)

Tabelle 3. Veresterungsausbeuten, bestimmt in wässriger Lösung der reinen Säuren (Mittelwert und Standardabweichungen)

p-Nitrobenzylester von	\bar{x}	\pm (%)	s*
Äpfelsäure	86,2		4,1
Ameisensäure	97,8		3,4
Bernsteinsäure	97,5		3,4
Citronensäure	78,8		3,7
Essigsäure	93,7		4,0
Milchsäure	101,2		4,7
Propionsäure	91,8		3,6
Weinsäure	58,3		3,6

* 6fach-Bestimmung bei 80 °C während 1 Stunde

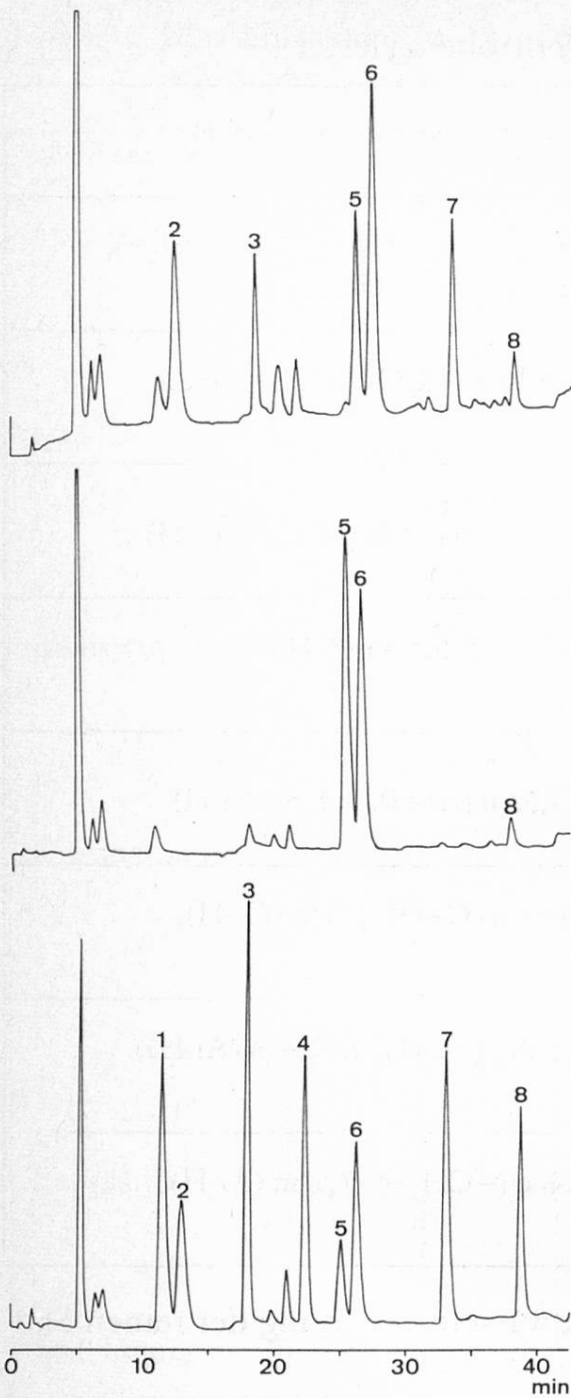


Abb. 3. HPLC-Chromatogramme von veresterten Carbonsäuren (p-Nitrobenzylester) eines Schaumweines (oben), eines Traubensaftes (Mitte) und eines Standardgemisches von je 1 g Säure/l Wasser (unten). Die Auftrennung erfolgte mit einem Stufengradienten. Injektionsmenge: 5 μ l, 0,1 AUFS. Die Reihenfolge der Ester ist in der Legende zu Abbildung 1 angegeben.

weines, eines Traubensaftes und eines gleichzeitig mit der Probe derivatisierten Säurenstandardgemisches. Im Chromatogramm des Weines sind Milch-, Essig-, Wein-, Äpfel-, Bernstein- und Citronensäurenitrobenzylester zu sehen, in jenem des Traubensaftes Essig-, Wein-, Äpfel- und Citronensäurenitrobenzylester.

Für Äpfel-, Citronen-, Essig- und Milchsäure wurde die HPLC-Analyse mit einer enzymatischen Methode (21) verglichen, für Weinsäure wurde das Verfahren von *Rebelein* (22) als Referenz verwendet. Zum Vergleich der Methoden wurden die Resultate des Referenzverfahrens auf der X-Achse und jene der HPLC-Methode auf der Y-Achse aufgetragen. In Abbildung 4 sind die entsprechenden Punkte mit den linearen Regressionsgeraden für Weinsäure, in Abbildung 5 für

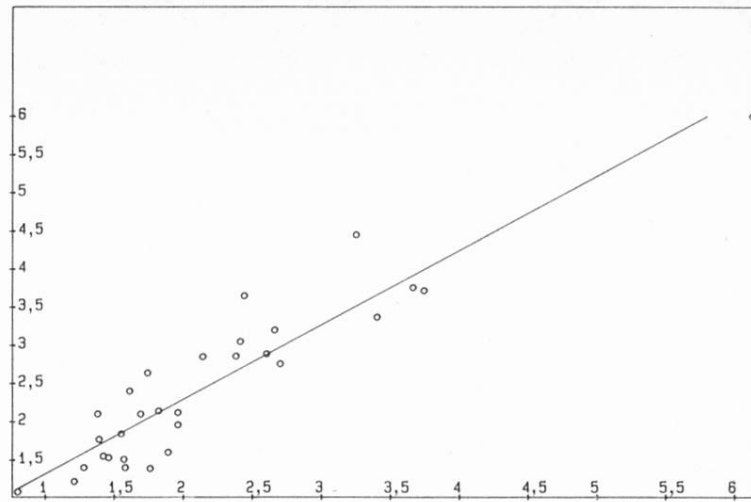


Abb. 4. Vergleich von zwei Bestimmungsmethoden für Weinsäure
 X-Achse: Kolorimetrische Messung, Y-Achse: HPLC-Analyse von Weinsäure als
 p-Nitrobenzylester. Dimensionen: g/l. Die eingezeichnete Linie stellt die lineare
 Regressionsgerade dar

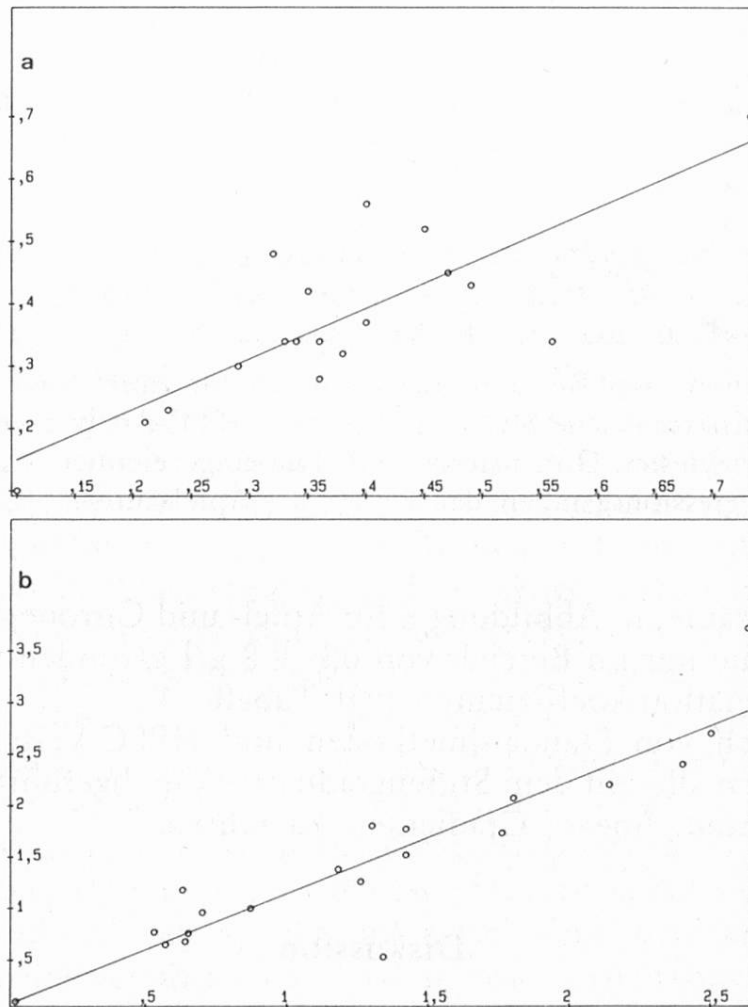


Abb. 5. Vergleich von 2 Bestimmungsmethoden für Essig- und Milchsäure
 X-Achse: Enzymatische Messung, Y-Achse: HPLC-Analyse der beiden Säuren als
 p-Nitrobenzylester. Dimensionen: g/l. Die eingezeichneten Linien stellen die li-
 nearen Regressionsgeraden dar a = Essigsäure b = Milchsäure

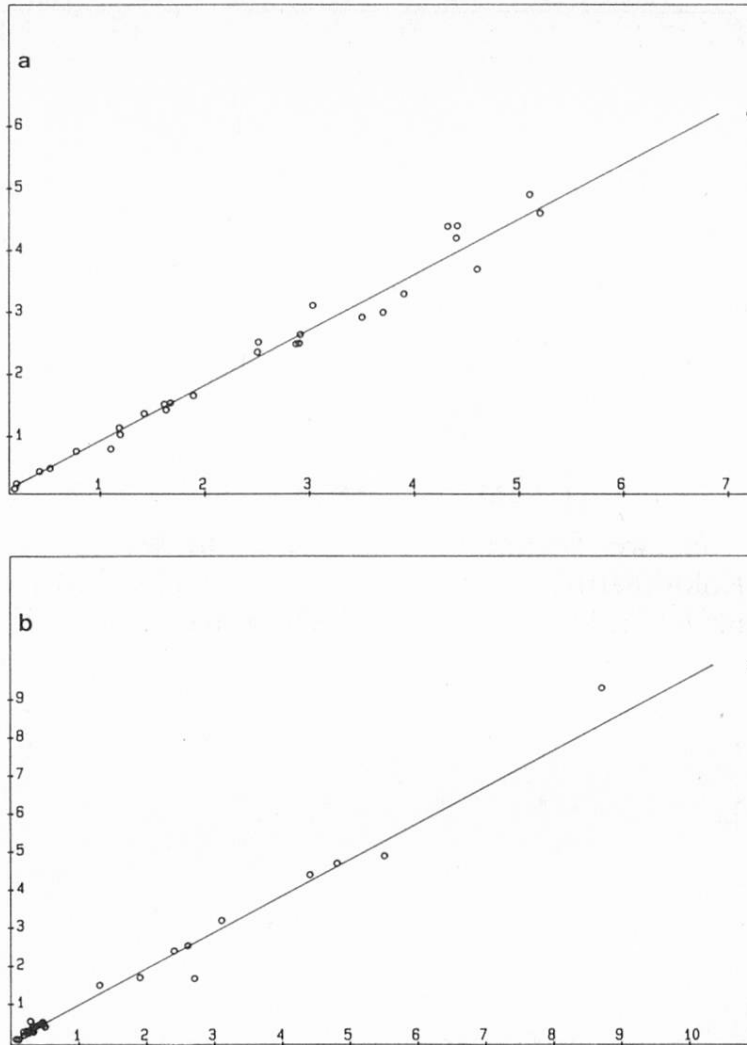


Abb. 6. Vergleich von zwei Bestimmungsmethoden für Äpfel- und Citronensäure
 X-Achse: Enzymatische Messung, Y-Achse: HPLC-Analyse der beiden Säuren als p-Nitrobenzylester. Dimensionen: g/l. Die eingezeichneten Linien stellen die linearen Regressionsgeraden dar a = Äpfelsäure b = Citronensäure

Essig- und Milchsäure, in Abbildung 6 für Äpfel- und Citronensäure eingezeichnet. Essigsäure, die nur im Bereich von 0,1–0,8 g/l gefunden wurde, ergab den niedrigsten Korrelationskoeffizienten (vgl. Tabelle 4).

Beim Vergleich von Standardmethoden und HPLC-Verfahren wurden die HPLC-Trennungen alle mit dem Stufengradienten durchgeführt, weil noch keine Möglichkeit bestand, lineare Gradienten zu fahren.

Diskussion

Die Veresterung der untersuchten Carbonsäuren mit PNBDI verläuft mit Ausnahme von Weinsäure in guter Ausbeute (Tabelle 3). Die Reaktion wird von Wasser wenig beeinflusst; mit der Hälfte Wasser in der Reaktionslösung wurde die Ausbeute bei der Derivatisierung einer Standardlösung mit je 1 g Säure/l Wasser

Tabelle 4. Konzentrationsbereiche der in den untersuchten Proben gefundenen Säuren und Korrelationskoeffizienten der linearen Regression zwischen HPLC- und Referenzverfahren

Säuren	n*	Korrelationskoeffizient	Konzentrationsbereiche der gefundenen Säure (g/l)		
			Gesamthaft	In Fruchtsäften**	In Wein
Äpfelsäure	29	0,99	0,1– 7,2	1,1– 7,2	0,2–2,6
Bernsteinsäure	17		0,1– 0,7		0,1–0,7
Citronensäure	33	0,99	0,1–10,9	0,1–10,9	0,1–0,6
Essigsäure	18	0,81	0,1– 0,8	0,1– 0,4	0,2–0,8
Milchsäure	20	0,92	0,1– 4,0		0,1–4,0
Weinsäure	30	0,93	0,8– 6,0	2,8–6,0	0,8–2,5

* Anzahl Proben, welche die entsprechende Säure enthielten

** 1 Apfelsaft, 2 Aprikosennektar, 1 Aprikosensaft, 1 Birnennektar, 2 Orangensäfte, 6 Traubensäfte

nicht beeinträchtigt, es entstanden aber vermehrt Nebenprodukte. — Für die Veresterung wurde von anderen Autoren Dichlormethan als Lösungsmittel gebraucht (17, 18). Wir verwendeten Tetrahydrofuran, weil es eine gute Löslichkeit für p-Nitrobenzylester besitzt und mit wässrigen Proben mischbar ist. Diethylether kann aber auch eingesetzt werden. So bestimmten wir z. B. Propionsäure in einem Etherextrakt von Brot durch Derivatisierung mit PNBDI.

Die Reaktionsdauer von 2 h (17, 18) erwies sich für die von uns untersuchten Veresterungen als nicht erforderlich. Die Ausbeuten nach 1 und 2 h waren vergleichbar (vgl. Abb. 2). Ameisensäure ergab bei längerer Reaktionsdauer zu hohe Ausbeuten, weil sich eine mit zunehmender Reaktionsdauer bildende Komponente nicht von Ameisensäurenitrobenzylester abtrennte.

Für die Durchführung der HPLC-Analyse von Carbonsäuren als p-Nitrobenzylester sind die Ester in reiner Form nicht erforderlich. Die Derivatisierung der reinen Säure(n) liefert einen externen Standard, der zusätzlich als Identitätsnachweis verwendet werden kann. Die Säurekonzentrationen der Proben werden anhand der mit den Proben derivatisierten Standards berechnet. Die unterschiedlichen Ausbeuten der Säuren werden auf diese Weise berücksichtigt.

Das beschriebene Verfahren zur Analyse von Carbonsäuren erfordert einen geringen Arbeitsaufwand. Die Probe wird in eine vorbereitete PNBDI-Lösung eingetragen und verestert. Nach einer Reinigung der Reaktionslösung über eine Sep-Pak-Kartusche wird die Probe eingedampft, in wenig Lösungsmittel aufgenommen und zur HPLC-Analyse verwendet. Die Aufarbeitung über Sep Pak

kann umgangen werden, indem die Reaktionslösung direkt über eine Vorsäule der Trennsäule zugeführt wird. Die Vorsäule muß aber nach ca. 10 Injektionen ausgewechselt werden.

Dank

Wir danken Herrn *R. Schwarzenbach* für die Aufnahme der NMR- und Herrn Dr. *P. Nägeli* für die Hilfe bei der Aufnahme der Massenspektren.

Zusammenfassung

Mit PNBDI, einem einfach synthetisierbaren Reagenz, wurden Carbonsäuren aus 13 Fruchtsäften und 21 Weinproben in p-Nitrobenzylester überführt. Dazu wurden 50 µl Probe in eine Lösung von PNBDI in Tetrahydrofuran gegeben. Nach 1 Stunde Reaktionszeit bei 80 °C wurde die Lösung über eine Kieselgel-Sep-Pak-Kartusche gereinigt. Die p-Nitrobenzylester im Eluat wurden auf einer RP-18-Kolonnen aufgetrennt und mittels eines UV-Detektors bei 265 nm quantifiziert. Die HPLC-Analyse von Äpfel-, Citronen-, Essig-, Milch- und Weinsäure wurde mit einer Referenzmethode verglichen. Folgende Korrelationskoeffizienten in der Reihenfolge der genannten Säuren wurden erhalten: 0,99, 0,99, 0,81, 0,92 und 0,93. Essigsäure lag in untersuchten Proben nur in Konzentrationen von 0,1–0,8 g/l vor.

Die Analyse von Ameisen-, Bernstein- und Propionsäure wurde im selben Arbeitsgang durchgeführt, die erhaltenen Resultate aber nicht an einer anderen Referenzmethode überprüft.

Die Veresterungsausbeuten waren mit Ausnahme jener für Weinsäure (58%) über 78%.

Résumé

Des acides carboxyliques de 13 jus de fruits et de 21 vins ont été transformés en esters p-nitrobenzyliques avec PNBDI, un réactif aisé à synthétiser. 50 µl de jus ou de vin sont ajoutés à une solution de PNBDI dans du tétrahydrofurane. Après une heure à 80 °C la solution est passée à travers une cartouche Sep-Pak silicagel. Les esters élués sont séparés par HPLC sur une colonne RP-18 et quantifiés avec un détecteur UV à 265 nm. Les analyses par HPLC des acides acétique, citrique, lactique, malique et tartrique ont été comparées aux résultats d'une méthode de référence. Pour ces acides on a obtenu dans l'ordre les coefficients de corrélation suivants: 0,81, 0,99, 0,92, 0,99, 0,93. Les concentrations en acide acétique ont été de 0,1–0,8 g/l.

Le dosage des acides formique, propionique et succinique a été effectué comme celui des autres acides décrits, mais les résultats obtenus n'ont pas été comparés à ceux obtenus par une méthode de référence.

Les rendements de l'estérification ont été supérieurs à 78%, à l'exception de celui de l'acide tartarique (58%).

Summary

Carboxylic acids from 13 samples of fruit juices and 21 samples of wine were derivatized to their p-nitrobenzyl esters with PNBDI, an easily synthesized reagent. 50 μ l sample were added to a solution of PNBDI in tetrahydrofuran and after one hour at 80 °C, the solution was passed through a Sep-Pak Silica Cartridge. The eluted p-nitrobenzyl esters were separated on a RP-18 column and quantified with an UV-detector at 265 nm. The HPLC-analysis of acetic, citric, lactic, malic and tartaric acid were compared with the results obtained by a reference method. The correlation coefficients for the acids mentioned above were: 0.81, 0.99, 0.92, 0.99, 0.93 respectively. Acetic acid was only found in concentrations between 0.1–0.8 g/l.

The results of the analysis of formic, propionic and succinic acid were obtained together with those of the other described acids, but were not examined with another reference method.

The recoveries of the esterifications were above 78% with the exception of tartaric acid (58%).

Literatur

1. *Palmer, J. and List, D.*: Determination of organic acids in food by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **21**, 903–906 (1973).
2. *Rapp, A. und Ziegler, A.*: Bestimmung von Zuckern, Glycerin, Aethanol und Carbon-säuren im Traubenmost und Wein mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* **75**, 396–398 (1979).
3. *Droz, C. und Tanner, H.*: Über die Trennung und quantitative Bestimmung organischer Säuren in Fruchtsäften und Weinen mittels HPLC. *Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau* **15**, 434–438 (1982).
4. *Schneyder, J. und Flak, W.*: Quantitative Bestimmung der Säure-Hauptkomponenten von Weinen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. *Mitt. Klosterneuburg* **31**, 57–61 (1981).
5. *Vrátrý, P., Mikeš, O., Štrop, P., Čoupek, J., Rexová-Benková, L. and Chadimová, D.*: High-performance anion-exchange chromatography of organic acids. *J. Chromatogr.* **257**, 23–35 (1983).
6. *Schwarzenbach, R.*: High-performance liquid chromatography of carboxylic acids. *J. Chromatogr.* **251**, 339–358 (1982).
7. *Dünges, W.*: 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin as a new fluorescent label for fatty acids. *Anal. Chem.* **49**, 442–445 (1977).
8. *Dünges, W.*: Fluorescence labeling of picomole amounts of acidic herbicides for toxicological analysis. *Chromatographia* **9**, 624–626 (1976).
9. *Grushka, E., Lam, S. and Chassin, J.*: Fluorescence labeling of dicarboxylic acids for high performance liquid chromatographic separation. *Anal. Chem.* **50**, 1398–1399, (1978).
10. *Crozier, A., Zaerr, J. and Morris, R.*: Reversed- and normal-phase high-performance liquid chromatography of gibberellin methoxycoumarylestere. *J. Chromatogr.* **238**, 157–166 (1982).
11. *Tsuchiya, H., Hayashi, T., Naruse, H. and Takagi, N.*: High-performance liquid chromatography of carboxylic acids using 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin as fluorescence reagent. *J. Chromatogr.* **234**, 121–130 (1982).

12. *L'Emeillat, Y., Menez, J., Berthou, F. and Bardou, L.*: Quantitative gas chromatographic determination of low molecular-weight straight-chain carboxylic acids as their p-bromphenacyl esters after extractive alkylation in acidic medium. *J. Chromatogr.* **206**, 89–100 (1981).
13. *Patience, R. and Thomas, J.*: Rapid concentration and analysis of short chain carboxylic acids: variation on a theme. *J. Chromatogr.* **234**, 225–230 (1982).
14. *Grushka, E., Durst, H. and Kikta, E.*: Liquid chromatographic separation and detection of nanogram quantities of biologically important dicarboxylic acids. *J. Chromatogr.* **112**, 673–678 (1975).
15. *Jupille, T.*: UV-visible absorption derivatisation in liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **17**, 160–167 (1979).
16. *Hoffmann, N. and Liao, J.*: High pressure liquid chromatography of p-methoxyanilides of fatty acids. *Anal. Chem.* **48**, 1104–1106 (1976).
17. *Knapp, D. and Krueger, S.*: Use of p-nitrobenzyl-N,N'-diisopropylisourea as a chromogenic reagent for liquid chromatographic analysis of carboxylic acids. *Anal. Lett* **8**, 603–610 (1975).
18. *Shaikh, B., Pontzer, N., Molina, J. and Kelsey, M.*: Separation and detection of UV absorbing derivatives of fecal bile acid metabolites by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **85**, 47–55 (1978).
19. *Heftmann, E., Saunders, G. and Haddon W.*: Argentation high-pressure liquid chromatography and mass spectrometry of gibberelin esters. *J. Chromatogr.* **156**, 71–77 (1978).
20. *Schmidt, E., Dörbitz, E., Thulke, K. and Graßmann, E.*: Zur Kenntnis aliphatischer Carbo-diimide, XIV. *Ann.* **685**, 163 (1965).
21. *Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik.* Boehringer, Mannheim 1980.
22. *Rebelein, H.*: Verfahren zur genauen serienmäßigen Bestimmung der Wein- und Milchsäure in Wein und ähnlichen Getränken. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **2**, 33–38 (1973).

Dr. W. Steiner
Kantonales Laboratorium
Postfach
CH-8030 Zürich