

Organische Säuren: Pyruvat, Lactat, Formiat und Acetat

Prinzip

Die Auftrennung erfolgt über eine Ionen-Chromatographie-Säule für organische Säuren, welche auf einer konstanten Temperatur von 40°C gehalten wird. Als Laufmittel dient verdünnte Schwefelsäure. Die Substanzen werden durch ein Differential-Refraktometer detektiert (Konzentration ist proportional zur Lichtbrechung).

Anwendungsbereich

Retentionszeiten und Daten zu den Eichkurven von Pyruvat, Lactat, Formiat und Acetat

Substanz	Pyruvat	Lactat	Formiat	Acetat
Retentionszeiten (Minuten)	12.8	17.2	18.4	20.1
Gültigkeitsbereich (μM)	75-5000	100-5000	250-1000	250-5000
LQDC (μM)	7.24	2.41	11.64	2.23
Rel. Standardfehler <5% (in μM)	75-5000	150-5000	500-5000	500-5000
Rel. Standardfehler >5% (in μM)	-	100-150	250-500	250-500

LQDC lowest quantitatively determinable concentration

Reagenzien/ Messapparaturen

- Laufmittel: 0.01 N H_2SO_4 (0.558 ml konzentrierte H_2SO_4 mit 2000 ml destilliertem Wasser mischen, filtrieren (Millipore GS, 0.22 μm Porengrösse) und 10 Minuten lang über eine ins Laufmittel eingetauchte Fritte mit Helium begasen.
- Flussrate: 0.7 ml/Minute. Pumpe: HPLC Pumpe 420 und Autosampler: MSI 660 T (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz). Wasserbad: Haake FE (Haake Karlsruhe, BRD).
- Vorsäule: Micro-Guard, Refill Cartridge CationH, Säule: Aminex Ion Exclusion HPX-87H (9micron), beide von BioRad Chemical Division, Richmond, California.
- Detektor: Differential-Refraktometer für analytische und halbpräparative Anwendungen Typ 98.00 (KNAUER Wissenschaftliche Geräte KG, Bad Homburg, BRD).

Vorgehen

- **Probenkonservierung**
240 μl konzentrierte H_2SO_4 in 5 ml Polystyrolröhrchen (Seeprobe) oder 900 μl destilliertes Wasser und 50 μl konzentrierte H_2SO_4 in Eppendorfröhrchen (Laborprobe) vorlegen
- **Mit Seewasserprobe auf 5 ml auffüllen oder 0.1 ml Kultur zugeben; einfrieren, falls Proben für längere Zeit aufbewahrt werden.**
- **Proben auftauen und in die Autosamplergefässe transferieren. Von dort aus werden sie über den Loop (100 μl) auf die Vorsäule geladen.**
- **Autosampler beladen und Proben mittels HPLC/Refraktometer analysieren**
- **Standards**
- **Für die Erstellung einer Eichkurve können 1000 μM Stammlösungen und entsprechende Verdünnungsreihen der einzelnen Substanzen verwendet werden, andererseits Verdünnungen eines Multi-standards, der Pyruvat, Lactat, Formiat und Acetat enthält.**

Falls die einzelnen Messserien mit dem Autosampler zeitlich weit auseinander liegen, ist es empfehlenswert für jede Serie eine neue Eichkurve zu erstellen.

Literatur

- Känel B, Mez K. 1992. *Vielfalt und Dynamik mikrobieller Stoffwechselaktivitäten in der Redoxtransitionszone des Lago di Cadagno*. Diplomarbeit Universität Zürich