

Bestimmung des Bremsstrahlenuntergrundes bei Zählrohrdiagrammen

Von Dr. KONRAD HOFFMANN, Farbwerte Hoechst AG.

Die direkte Aufnahme von Röntgenstreuendiagrammen mittels der Zählrohrmethode ist für die Untersuchung von Kunststoffen zur Bestimmung des amorphen Anteils geeignet, da 1.) keine Umrechnung von Schwärzungen in Intensitäten notwendig ist und 2.) die Nachweisgrenze für schwache Intensitäten direkt proportional der Wurzel der Zahl der in der Registraturzeit eintreffenden Impulse ist. Dabei ist der Streuuntergrund, aus dem sich die Interferenzen hervorheben, zusammengesetzt aus Streuung des amorphen Anteils und dem Bremsstrahlenuntergrund der nichtmonochromatischen Röntgenstrahlung.

Es ist relativ einfach, die monochromatische Strahlung von dem Bremsuntergrund ohne Verwendung von Kristallmonochromatoren zu trennen, wenn man nach der Filterdifferenzmethode

arbeitet, die für photographische Verfahren bereits früher von P. A. Ross¹⁾ angegeben und vom Verfasser²⁾ für die Trennung von kohärenter und inkohärenter Streustrahlung an Gasinterferenzen benutzt worden ist. Hierzu wird zusätzlich zu dem Filter, dessen Absorptionskante kurzwelliger liegt als die verwendete Liniestrahlung, und das neben der gewünschten Linie noch einen Teil des Bremsuntergrundes durchlässt, ein weiteres Filter aus einem Element mit der nächstniedrigen Ordnungszahl im Periodensystem eingeschaltet. Dieses Filter läßt dann bei passendem Abgleich den Untergrund in derselben Intensität durch, absorbiert aber die Liniestrahlung noch so stark, daß die Differenz beider Filter dann die Intensität der monochromatischen Strahlung allein angibt. Die Monochromatisierung ist um so besser, je weniger sich die Absorptionskurven der beiden Filter unterscheiden. Für die beiden Filter Kobalt und Nickel kann gegen Cu-K α -Strahlung praktisch ein volliger Abgleich erreicht werden, wie an Hand von Bild 1 gezeigt sei.

Die Kobalt-Folien wurden elektrolytisch hergestellt. Als Unterlage dienten 0,2 mm dicke Kupferfolien, die auf einer Seite blank poliert und während der Elektrolyse auf der Rückseite abgedeckt

waren. Als Elektrolytlösung diente ein Bad³⁾ mit 312 g CoSO₄, 20 g NaCl und 30 g H₃BO₃ je Liter. Nach etwa 20 min bei 50 mA Stromstärke auf einer Fläche von 1,3 cm² konnten die Folien abgezogen werden. Sie wurden anschließend noch etwa 15–20 min unter gleichen Stromverhältnissen im selben Bad nachbehandelt. Durch Bestimmung der Röntgenabsorption bei etwa 0,8 bis 0,9 Å wurde das Co-FILTER gegen ein 20 μ dickes Ni-FILTER abgeglichen. Die erreichbare Genauigkeit des Abgleichs war lediglich durch die Konstanz der Röntgenanlage bedingt, bei der beide Filter nacheinander den gleichen Ausschlag geben mußten.

Beide Filter ergaben bei einer Vergleichs-Registrierung übereinstimmende Kurven, die nur im Bereich um 1,5 Å auseinanderliefen. Für die Messung wurde ein Berthold-Zählrohr-Goniometer und Leeds & Northrup-Schreiber in Verbindung mit einem NaCl-Kristall verwendet. Da die Konstanz des an unserer Anlage verwendeten Spannungsstabilisators (regelbarer Transformator, der über einen Stellmotor die Netzspannung konstant hielt) nicht ausreichte, wurde noch der Röhrenstrom über ein kleines Siemens-Telegraphen-Relais zusätzlich stabilisiert, so daß eine Konstanz der Stromstärke auf weniger als ½ % erreicht wurde.

Bild 2 zeigt ein Streudiagramm eines relativ kristallinen Kunststoffs, bei dem die untere Kurve die Bremsstreuung, die mit Co-FILTER erhalten wurde, wiedergibt. Der kurzwelligere Begleiter der

¹⁾ P. A. Ross, Physic. Rev. 28, 425 [1928].

²⁾ K. Hoffmann, Physik. Z. 39, 695 [1938].

³⁾ W. Machu: Metallische Überzüge, 2. Aufl. Leipzig 1943

110-Reflexion tritt in der Untergrundkurve mit gleicher Stärke auf und ist der Kβ-Reflex der 110-Linie. Außerdem erkennt man in der Untergrundkurve noch einen geringen Anteil der 110-Reflexion, während die 210-Reflexion zu schwach wird und im Untergrund nicht mehr herauskommt.

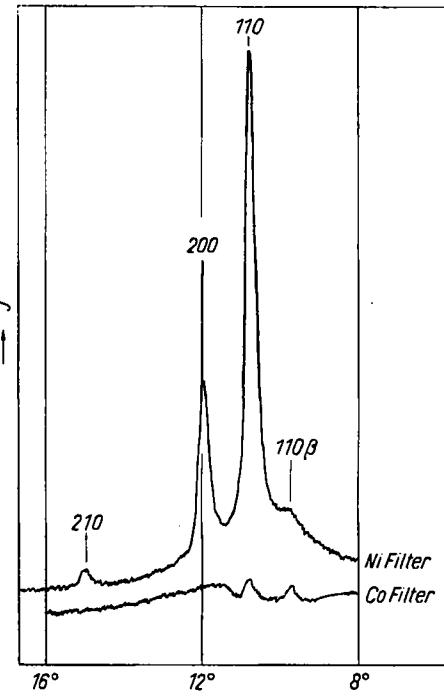


Bild 2
Streudiagramm eines Kunststoffs

Die Differenzbildung ergibt also eine viel genauere Erfassung der amorphen Untergrundstrahlung. Die Schwierigkeiten bei der Zerlegung des Untergrundes in den Anteil der Bremsstrahlung und den amorphen Anteil sind damit beseitigt, ohne daß man auf Kristall-Monochromatoren zurückzugreifen braucht.

Eingeg. am 27. Sept. 1954 [Z 132]

Papierchromatographischer Nachweis des Aldosterons

Von Dipl.-Chem. H. E. SCHMIDT und
Doz. Dr. H. STAUDINGER

Aus dem Zentrallaboratorium der Städt. Krankenanstalten Mannheim

Vor kurzem haben wir in einer Arbeit über das Vorkommen von drei höherpolaren Verbindungen in den von uns untersuchten Nobennierenextrakten berichtet¹⁾ (vgl. Bild 1). Diese Substanzen haben ein UV-Spektrum mit einem ausgeprägten Maximum bei 240 m μ . Sie besitzen somit vermutlich die Δ⁴-3-Keto-Gruppe. Zwei dieser Verbindungen, wovon eine relativ nahe beim 17-Oxy-corticosteron liegt, haben außerdem gegenüber TTC stark reduzierende Eigenschaften, was für das Vorhandensein einer α-Ketol-Gruppe spricht. Nach dem Bekanntwerden der Arbeiten über das „Elektrocortin“ bzw. Aldosteron^{2–6)} haben wir vermutet, daß eine der unbekannten höherpolaren Substanzen mit diesem Steroid identisch sei.

Durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Dr. Wettestein⁷⁾ wurden uns zur Prüfung dieser Frage 400 γ reines Aldosteron als Vergleichssubstanz zur Verfügung gestellt.

¹⁾ Herrn Dir. Dr. Dr. A. Wettestein, Ciba Aktiengesellschaft Basel, danken wir für das freundliche Entgegenkommen auch an dieser Stelle sehr herzlich.

²⁾ H. Schmidt u. H. Staudinger, Biochem. Z. 325, 288 [1954].

³⁾ S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettestein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler u. T. Reichstein, Experientia [Basel] 10, 132 [1954].

⁴⁾ S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettestein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 37, 1163 [1954].

⁵⁾ S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettestein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 37, 1200 [1954].

⁶⁾ S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettestein, R. Neher, J. v. Euw, T. Reichstein, Experientia [Basel] 9, 333 [1953].

⁷⁾ H. M. Grundy, S. A. Simpson, J. F. Tait u. M. Woodford, Acta endocrinol. 11, 199 [1952].

Im Gegensatz zu dem bisher angewandten Verfahren zur papierchromatographischen Abtrennung des Aldosterons von den übrigen Corticosteroiden, bei dem die Trennung von ähnlich polaren Steroiden, wie z. B. Cortison, nur nach 2- bis 3maliger Chromatographie gelingt^{8, 9}) benutzen wir ein inverses System^{7).}

In diesem System hat das Aldosteron einen R_F -Wert von 0,60. Wird das Aldosteron im Gemisch mit den anderen 6 Corticosteroiden aufgetragen, so trennt es sich schon bei einmaliger Chromatographie glatt von diesen. Die dem Aldosteron zunächst liegenden Substanzen 11-Dehydro-17-oxy-corticosteron und 17-Oxy-corticosteron haben einen R_F -Wert von 0,47 und 0,48. Wir bestimmen im allgemeinen nicht den R_F -Wert, sondern den R_x -Wert, den wir auf Cortison = 0,50 bzw. Desoxycorticosteron = 0,10 beziehen. Man ist so unabhängig von äußeren Einflüssen (Ungleichmäßigkeiten im Papier, Temperatur u.a.m.). Der R_x -Wert des Aldosterons beträgt dann 0,63.

Zweifellos genügt zur Identifizierung einer Substanz der R_F -Wert allein nicht. Als weiteres Kriterium kann das UV-Spektrum, das bereits von Simpson, Wettstein, Reichstein u. a. angegeben wurde, dienen^{6).} Ferner ist das Reduktionsvermögen gegenüber einer alkalischen TTC-Lösung bei den hier in Frage kommenden Stoffen charakteristisch für das Vorhandensein einer α -Ketoalkohol-Gruppierung an den C-Atomen 20 und 21. Außerdem kann noch die Fluoreszenz unter der Analysenquarzlampe nach alkalischer Behandlung nach Bush⁸⁾ herangezogen werden.

Auf Grund des Reaktionsvermögens oder der Liechtsorption bei 240 μm läßt sich der dem Aldosteron zuzuordnende Fleck in Nebennierenextrakten nach dem Eluieren mit Methylglykol oder Methanol auch quantitativ bestimmen^{7).}

Papierchromatogrammen von Corticosteroiden

1. Corticosteroid-Gemisch, bestehend aus 25 γ Desoxycorticosteron (Doc.), 25 γ Substanz S, 25 γ Corticosteron (B), 25 γ Cortison (E) und 10–20 γ Aldosteron (Ald.).
2. Nebennierenextrakt mit höherpolaren Steroiden I, II, III. I = Aldosteron. F = 17-Oxycorticosteron.
3. Nebennierenextrakt ohne höherpolare Steroide (Spur I = Aldosteron)

Papierchromatogrammen von Corticosteroiden

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeiten sehr.

Eingeg. am 15. Okt. 1954 [Z 135]

Über den Wirkungsmechanismus der p-Aminosalicylsäure

Stoffwechseluntersuchungen bei Mikroorganismen mit Hilfe radioaktiver Isotope. IX. Mittell.

Von Doz. Dr. ADOLF WACKER, Dr. H. GRISEBACH, Dipl.-Chem. A. TREBST, MARIA EBERT und Prof. Dr. FRIEDRICH WEYGAND

Aus dem Chemischen Institut der Universität Tübingen

J. Lehmann berichtete 1946 über die Hemmung des Wachstums von Tuberkelbazillen durch p-Aminosalicylsäure (PAS)^{9).} Wenig später zeigten verschiedene Forschergruppen, daß

- p-Aminobenzoësäure (PAB) die PAS-Hemmung¹⁰⁾ und
- b) PAS die Sulfonamid-Hemmung¹¹⁾ aufhebt.

Obwohl man aus diesen Befunden hätte schließen können, daß der Wirkungsmechanismus der PAS ähnlich dem der Sulfonamide

⁷⁾ H. Schmidt u. H. Staudinger, Biochem. Z. 324, 128 [1953].

⁸⁾ I. E. Bush, Biochem. J. 50, 370 [1952].

⁹⁾ J. Lehmann, Lancet 250, 14 [1946].

¹⁰⁾ G. P. Youmans, G. W. Raleigh u. A. S. Youmans, J. Bacteriol. 54, 409 [1947]. J. Vonkennel, P. P. Koelzer u. J. Giesen, Med. Mschr. 1949, 499.

¹¹⁾ P. P. Koelzer u. J. Giesen, Naturwissenschaften 37, 476 [1950].

ist, hielten verschiedene Arbeitskreise¹²⁾ dies für unwahrscheinlich. Im Rahmen unserer Arbeiten über den Stoffwechsel der PAB-¹⁴C und der Folsäure-¹⁴C haben wir uns nunmehr auch mit dem der PAS-¹⁴C beschäftigt.

Synthese der p-Aminosalicylsäure-[carboxyl-¹⁴C]

1. 2-Methoxy-4-nitro-benzonitril-[nitril-¹⁴C]: Die Diazoniumsalzlösung aus 1,2 g (6,75 mMol) 5-Nitro-2-amino-anisol wurde mit Calciumcarbonat neutralisiert, filtriert und zu einer 40° warmen Lösung von 325 mg $K^{14}CN$ (5 mMol, 3,6 mC) und 150 mg CuCN (1,67 mMol) in 10 cm³ Wasser gegeben. Nach einer Stunde bei 40° wurde das entstandene Nitril abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Es wurde in Benzol gelöst, an Aluminiumoxyd zur Reinigung chromatographiert und aus Aceton/Wasser umkristallisiert. F_p 178 °C, Ausb. 995 mg (84 % d.Th., ber. auf $K^{14}CN + CuCN$). $C_8H_8O_2N_4$ (178,1) Ber.: C 53,93; H 3,40; N 15,73; Gef.: C 53,99; H 3,35; N 15,70 (Analyse von nicht-radioaktivem Material).

2. 4-Nitrosalicylsäure-[carboxyl-¹⁴C]: 995 mg Nitril wurden 6 h in 16 cm³ Eisessig und 22 cm³ konstant siedender Bromwasserstoff-säure unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die nach dem Abkühlen auskristallisierte 4-Nitrosalicylsäure wurde abgesaugt und mit wenig Eisessig gewaschen. F_p 230–234 °C. Ausb. 620 mg (60 % d.Th.), Reinigung durch Sublimation im Ölumpenvakuum, Badtemperatur 160 °C.

3. 4-Aminosalicylsäure-[carboxyl-¹⁴C]: 4-Nitrosalicylsäure wurde in Alkohol mit H_2 und PtO_2 reduziert. Ausb. 500 mg (49 % d.Th., ber. auf $K^{14}CN + CuCN$), F_p 149 °C. Nach der papierchromatographischen Analyse enthielt die Verbindung keine radioaktive Verunreinigung. Farbreaktion mit essigsaurer o-Diacetylbenzol-Lösung: blau.

Züchtung der Bakterien: Herkunft und Züchtung von *Enterococcus Stei* sowie Zusammensetzung des Nährmediums s.¹³⁾. Das Medium enthielt keine PAB. Aufarbeitung der Bakterien und Lösungsmittel für die Papierchromatographie s.¹⁴⁾.

Ergebnisse

Wie wir bei *Enterococcus Stei* fanden¹⁵⁾, läßt sich bei diesem Bakterium die PAS-Hemmung (16 γ/cm^2) mit Formyl-folsäure (1,6 $\text{m}\gamma/cm^2$), Tetrahydro-formyl-folsäure (1,6 $\text{m}\gamma/cm^2$) oder Thymin (1,6 $\text{m}\gamma/cm^2$) nichtkompetitiv aufheben, dagegen ist die Folsäure unwirksam, ja in höheren Konzentrationen (16 $\text{m}\gamma/cm^2$) verstärkt sie sogar die PAS-Hemmung. 5-Brom-uracil, ein Antagonist des Thymins, verstärkt ebenfalls die PAS-Hemmung bei *Enterococcus Stei*.

Nach dem Wachstum von *Enterococcus Stei* in Gegenwart von

- PAS-¹⁴C (10 $\text{m}\gamma/cm^2$) oder

2. Sulfathiazol (1 $\text{m}\gamma/cm^2$) + PAS-¹⁴C (10 $\text{m}\gamma/cm^2$)

(mit Sulfathiazol allein wäre das Wachstum vollständig gehemmt) konnten wir in beiden Versuchen aus den Bakterien papierchromatographisch eine radioaktive Substanz isolieren, die für *Leuconostoc citrovorum* 8081 ein Wuchsstoff ist, dagegen nicht für *Streptococcus faecalis R*. Auf Grund der Radioaktivität, der mikrobiologischen Aktivität und den R_F -Werten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen¹⁴⁾ schließen wir, daß die isolierte Verbindung eine hydrierte und in 7-Stellung (nach US-Nomenklatur: 5-Stellung) formyierte Folsäure-Verbindung mit PAS an Stelle von PAB ist. Die neue Verbindung hat ähnliche R_F -Werte wie die aus PAB-¹⁴C durch *Enterococcus Stei* gebildete Verbindung¹⁴⁾. Daß die aus PAS-¹⁴C entstandene wuchsstoffaktive und radioaktive Verbindung ein Pteridin-Akkomeling ist, zeigten Abbauversuche. Nach Elution des Fleckens wurde 30 min in 1 n-HCl bei 100° gehalten, sodann ammoniakalisch mit Permanganat in der Hitze oxydiert und der Permanganat-Überschuß mit Alkohol zerstört. Dabei bildete sich die 2-Amino-6-oxy-pteridin-carbonsäure-8, die papierchromatographisch nachgewiesen wurde¹⁶⁾.

Neben der radioaktiven und gleichzeitig für *Leuconostoc citrovorum* 8081 aktiven Substanz fanden wir in Versuch 1) papierchromatographisch noch in kleiner Menge eine weitere radioaktive Verbindung, die aber keine Wuchsstoffaktivität bei *Leuconostoc citrovorum* 8081 oder *Streptococcus faecalis R* besitzt.

Diskussion

Wie schon die Hemm- und Enthemm-Versuche mit den Folsäure-Verbindungen zeigen, läßt sich der Wirkungsmechanismus der PAS ähnlich dem der Sulfonamide erklären. Die für den Aufbau des Coenzyms F¹⁴⁾ unbedingt notwendige PAB wird durch die in ihrer Struktur der PAB ähnliche PAS verdrängt. Dadurch kommt es zu einer Hemmung des Bakterienwachstums, die aber bei unseren Versuchen, auch bei größten Konzentrationen an

¹²⁾ D. Yegian u. R. T. Long, J. Bacteriol. 61, 747 [1951]. N. L. Edson, Bact. Rev. 15, 176 [1951]. A. Albert, Abstr. of Papers, VIth Int. Congress of Microbiology, Rom 1953, Symposium on Growth Inhibition and Chemotherapy, S. 10–18.

¹³⁾ E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Z. Naturforsch. 4b, 92 [1949].

¹⁴⁾ A. Wacker, H. Grisebach, A. Trebst u. F. Weygand, diese Ztschr. 66, 326 [1954].

¹⁵⁾ Bei *Enterococcus Stei* kann man die Sulfonamid-Hemmung nichtkompetitiv mit allen Folsäure-Verbindungen und Thymin aufheben.

¹⁶⁾ F. Weygand, A. Wacker u. V. Schmid-Kowarzik, Experientia [Basel] 6, 184 [1950]. Außer dem dort angegebenen Lösungsmittelgemisch wurden die bereits zitierten⁶⁾ verwendet.

