

Qualitative und quantitative Analyse der Alkalien durch Papierelektrophorese

Von Dipl.-Ing. OSWALD SCHIER, Wien

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien

Es wurde die Papierelektrophorese der Alkali-Ionen untersucht und in ihr ein Verfahren gefunden, das es ermöglicht, Li, Na, K (+ Rb + Cs), Mg zu trennen und qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Störungen durch einige wenige Substanzen sind leicht eliminierbar. Der qualitative Nachweis gelingt mit einem p_{H} -Indikator, die quantitative Bestimmung ist nach Elution durch eine beliebige Mikromethode oder direkt auf dem Papier durch Retention möglich. Die notwendige Analysensubstanz beträgt 10–50 μ bei der qualitativen und 100–1000 μ bei der quantitativen Bestimmung; Analysendauer zwei bis drei Stunden.

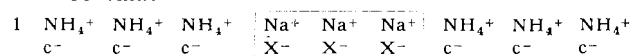
Papierchromatographie und Papierelektrophorese haben auch zur Analyse anorganischer Substanzen vielseitige Verwendung gefunden. Die Papierchromatographie der Alkalien wurde bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Die erhaltenen R_f -Werte sind abhängig von der Art des analysierten Alkalialzes. Diese Vielfalt der möglichen Kombinationen Alkali-Ion + Anion bringt Schwierigkeiten mit sich, erfordert meist eine längere Vorbehandlung der Analysenlösung und bedingt geringe Spezifität. Es wurde daher das Verhalten der Alkali-Ionen bei der Elektrophorese auf Filterpapier untersucht.

Grundlagen

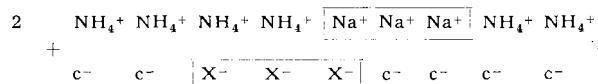
In der Papierelektrophorese spielt die Art der ursprünglichen Analysenlösung eine untergeordnete Rolle. Da Kationen und Anionen in entgegengesetzte Richtungen wandern, werden die beiden Ionenarten rasch getrennt. Es ist daher gleichgültig, welches Salz eines bestimmten Alkalimetalls verwendet wird.

Wichtig ist dagegen die Grundlösung, d. i. die Lösung des Elektrolyten, mit welcher das Papier getränkt wird und in der die Ionen der Analysensubstanz wandern. Nach Trennung der Kationen und Anionen der ursprünglichen Analysenlösung stehen die elektrophoretisch wandernden Alkali-Ionen zu jedem Zeitpunkt der Papierelektrophorese mit entgegengesetzten wandernden Anionen des Grundelektrolyten im Gleichgewicht der Elektroneutralität. Dies bedeutet, daß z. B. die Papierelektrophorese von Natriumsulfat in Salzsäure infolge der Abwanderung des Sulfat-Ions schließlich zur Bildung von Natriumchlorid führt. Durch die Art des Grundelektrolyten wird also das Anion bestimmt, mit dem die Alkali-Ionen am Ende der Papierelektrophorese im Dissoziationsgleichgewicht stehen. Damit ist die Möglichkeit eines indirekten Nachweises der Alkalien über ein mit diesen verbundenes, charakteristisches Anion gegeben. Dieser Nachweis (z. B. des Natriums über das Chlor-Ion) ist natürlich unmöglich, solange das Grundmedium (Salzsäure) im Papier vorhanden ist. Erst dann, wenn dieses am Ende der Papierelektrophorese ohne Veränderung der Substanzverteilungen quantitativ aus dem Papier entfernt werden kann, so daß im genannten Beispiel nur die mit den Na-Ionen im Dissoziationsgleichgewicht stehenden Cl-Ionen verbleiben, ist dieser Nachweis gesichert. Dies ließ sich im Falle der Salzsäure bemerkenswerterweise weder durch Abdunsten in der Kälte, noch durch Erwärmen im Trockenschrank erreichen. Eine salzaure Lösung schied – ebenso wie viele andere – schon aus diesem Grunde aus. Es ergab sich jedoch, daß eine wäßrige Ammoncarbonat-Lösung die gestellten Ansprüche befriedigend erfüllt. Die Wahl dieser Grundlösung und der

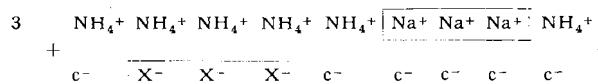
Verlauf der Papierelektrophorese erklärt sich aus folgendem Schema:



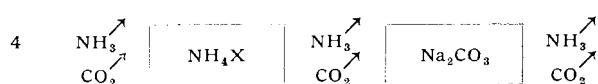
Der Papierstreifen ist mit wäßriger Ammoncarbonat-Lösung ($c = 1/2 \text{ CO}_3$) getränkt, in der Mitte des Streifens wird die Lösung des Alkalialzes NaX (X^- = ein beliebiges Anion) aufgetragen.



Beginn der Papierelektrophorese: Die Kationen (Na^+ , NH_4^+) wandern zur Kathode, die Anionen (X^- , CO_3^{2-}) zur Anode. Der Streifen taucht mit den Enden in Ammoncarbonat-Lösung, die Elektrodenvorgänge gehen daher außerhalb des Papiers vor sich.



Im weiteren Verlauf folgt vollständige Trennung von Na^+ und X^- , d. h. die Analyse ist von der Art des ursprünglich vorliegenden Alkalialzes vollständig unabhängig.



Aus dem Papierstreifen wird der Grundelektrolyt (Ammoncarbonat) durch Wärme entfernt und damit das nicht mit Alkali-Ionen verbundene Carbonat beseitigt. Die in Form einer alkalisch reagierenden Verbindung¹⁾ verbliebenen Alkalien werden durch Sprühen mit einem p_{H} -Indikator nachgewiesen.

Prinzipiell ist die Verwendung jeder flüchtigen Substanz (Ammoniak, Amine, niedere aliphatische Monocarbonäuren, Schweflige Säure u. a.) an Stelle des Ammoncarbonates möglich, sofern das resultierende Anion leicht nachweisbar ist. Das Ammoncarbonat ist jedoch allen geprüften Stoffen überlegen. So ist die Verwendung einer

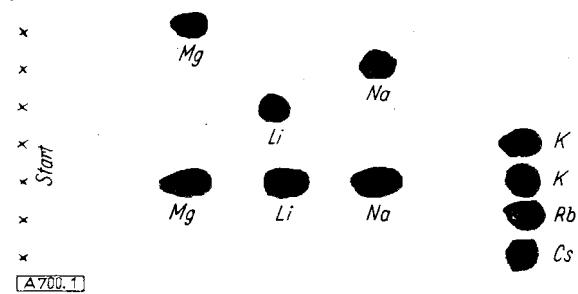


Bild 1
Elektropherogramm der Alkalien und des Magnesiums (punktformig aufgetragen)

¹⁾ In welcher Form die Alkali-Ionen am Ende der Papierelektrophorese vorliegen, wurde nicht untersucht. Die im Schema dargestellte Bildung der Carbonate läßt sich in dieser Form nicht streng aufrecht erhalten, da das verwendete käufliche Ammoncarbonat selbst ein Gemisch von Bicarbonat und Carbamat darstellt. Es liegt daher nahe, als Endzustand die Alkali-bicarbonate bzw. -carbamate oder ähnliche Verbindungen anzunehmen.

alkalischen und carbonatischen Grundlösung für die Spezifität der Alkali-Analyse Bedingung, weil sie die meisten anderen Kationen als unlösliche Verbindungen niederschlägt, so daß diese keine oder eine so geringe Wanderung zeigen, daß die Bestimmung der Alkalien nicht gestört wird. Schließlich bedeutet der Nachweis der Alkalien durch einen pH-Indikator einen großen Vorteil gegenüber qualitativen Methoden, welche komplizierte Reagenzien für denselben Zweck benutzen müssen.

Magnesium wandert wahrscheinlich als Komplex.

	Ionenbeweglichkeit, bei 18°C in 10 ⁵ cm ² ·V ⁻¹ ·sec ⁻¹	Relat. Geschwindigk. (Kalium = 1,00)
Magnesium	45	0,34
Lithium	33,4	0,53
Natrium	43,5	0,72
Kalium	64,6	1,00
Rubidium	64,3	1,00
Caesium	68	1,00

Spezifität

Kationen, welche durch Ammoncarbonat gefällt werden, stören nicht, da die praktisch undissoziierten Niederschläge elektrophoretisch nicht wandern. Dazu gehören z. B. Calcium, Strontium, Barium, Eisen, Chrom. Kationen, welche einen Anionokomplex bilden, stören nicht, da sie zur Anode wandern. Dazu gehört z. B. Uran.

Kationen, welche durch Ammoncarbonat nicht gefällt werden oder mit freiem Ammoniak lösliche Ammine bilden, müssen vor der Papierelektrophorese auf dem Startpunkt in eine unlösliche Verbindung überführt werden. Auf dem Papier fällt man das betr. Kation mit einem alkalifreien Reagens (i. allgem. Besprühen mit Ammonsulfid-Lösung). Derartige störende Kationen sind Cobalt, Kupfer, Nickel, Quecksilber, Silber und Thallium.

Stark basische organische Amine, wie Piperidin oder Pyrrolidin können stören. Durch Erwärmen lassen sie sich aus dem Papier entfernen. Schwach basische Stickstoff-Verbindungen wie Anilin oder Pyridin stören nicht.

Anionen stören nicht, da sie zur Anode wandern. Auch starke Säuren beeinträchtigen die Analyse nicht, selbst bei eventueller Verkohlung der Aufgabestelle.

Mindestkonzentrationen

Durch wiederholtes Auftragen und Eintrocknen der Analysenlösung auf dem Papier kann auch aus sehr gering konzentrierten Proben schließlich die erforderliche Analysenmenge hergestellt werden. Zum qualitativen Nachweis mittels Indikatorprüfung genügen im allgemeinen ca. 10⁻⁶ Grammatom Alkali-Ion, d. s. 10–50 γ; zur quantitativen Analyse benötigt man 100–1000 γ.

Aufkonzentration durch wiederholtes Auftragen und Eintrocknen ist mit einer Infrarotlampe und einem Ventilator sehr rasch möglich, umso mehr, da selbst bei quantitativer Bestimmung eine Messung des aufgegebenen Volumens an Probelösung nicht unbedingt notwendig ist.

Quantitative Bestimmungsmethoden

Quantitative Analyse nach Elution

Wie in der Papierchromatographie kann man die getrennten Substanzen durch Auswaschen quantitativ aus dem Papier entfernen. Danach steht es frei, wie die Substanzen bestimmt werden. Das Vorliegen in ganz reiner Form erlaubt die Anwendung vieler Mikromethoden.

Im Falle der Alkalien sei u. a. auf die Polarographie verwiesen, welche zwar selbst eine Trennung Natrium/Kalium nicht zu leisten vermag, wohl aber bei Reinsubstanzen gute Resultate liefert. Überdies bedeutet die auf eine Papierelektrophorese folgende polarographische Bestimmung

eine weitere Auf trennung Kalium/Rubidium + Caesium. Die benötigte Konzentration von ca. 0,005 n ist mit entspr. Gefäß mit den elektrophoresierten Mengen herstellbar.

Zu quantitativen Analysen benötigt man die Größe der Absolutmenge an Probelösung. Sie kann ermittelt werden: 1.) durch Messung des aufgegebenen Volumens Probelösung mit einer Mikropipette; 2.) durch Volumensmarkierung mit einem Radioelement; 3.) durch Arbeiten mit Leitsubstanz (vgl. den folgenden Abschnitt).

Quantitative Analyse durch Retention

Eine Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der Alkalien bietet die von *Th. Wieland* und Mitarbeitern²⁾ für Aminosäuren und Proteine entwickelte Retentionsanalyse.

Als Retentionsmittel wird Eisen(III)-rhodanid in Dioxan verwendet. Das getrocknete Elektropherogramm wird mit einer Längsseite (= elektrophoretische Laufrichtung) in diese Lösung eingehängt. Die tiefrote Flüssigkeit steigt im Papier in die Höhe, wobei an jenen Stellen, an denen die Alkalien vorliegen, der Rhodanid-Komplex unter Fällung von Eisenhydroxyd entfärbt wird. Während an den alkali-freien Stellen die Rhodanid-Lösung unverändert weiterwandert, erhält man im Bereich der Alkalien weiße Flächen, die sich gegen die intensiv rote Färbung des restlichen Papiers sehr deutlich abheben. Aus der Flächengröße und -form läßt sich die Substanzmenge ermitteln.

Jedes durch alkalische Substanzen fällbare Kation erscheint für die Retention der Alkalien geeignet. Der Vorteil des Eisenrhodanids liegt u. a. in der bereits bei sehr geringen Eisenmengen außerordentlich intensiven Färbung der Lösung. Dies bedeutet eine quantitative Bestimmbarkeit der Alkalien bis zu geringsten Konzentrationen, d. h. solange die Rotfärbung noch wahrnehmbar ist und nicht bereits durch das Filterpapier selbst zerstört wird. Außerdem ist die Retention während ihres ganzen Verlaufes deutlich zu beobachten.

Die Retentionslücken der einzelnen Substanzstreifen geben nur das Verhältnis der Mengen der einzelnen Alkalimetalle, bzw. des Magnesiums untereinander, jedoch noch nicht die Absolutmengen. Dazu bedarf es des Zusatzes einer „Leitsubstanz“. Liefert z. B. eine Natrium und Kalium enthaltende Probe nach Zusatz einer bekannten Menge Lithium als Leitsubstanz ein Verhältnis Li:Na:K = 1:3:4, so lassen sich als Absolutwerte die 3fache Menge Natrium und die 4fache Menge Kalium im Vergleich zur zugegebenen Menge Lithium feststellen. Die Mengenangaben beziehen sich auf Grammatome, d. h. 23 Gew. T. Na liefern dieselbe Retention wie 39 Gew. T. K oder 24/2 Gew. T. des 2wertigen Mg. In dem seltenen Fall einer Analyse von Magnesium, Lithium, Natrium und Kalium nebeneinander muß man zunächst eine Analyse ohne Leitsubstanz ausführen und dann die Verschiebung des Verhältnisses der Ionen zueinander ermitteln, die auf Zusatz einer bekannten Menge eines der Ionen eintritt.

Große Unterschiede in den Mengen der zu analysierenden Elemente (schlechter als 1:6–10) überwindet man, indem man zwei Analysen mit verschiedenen Mengen Leitsubstanz ansetzt und jeweils nur einer der beiden Elemente durch Vergleich mit der Leitsubstanz analysiert, z. B.:

1. Probe: 10 γ Na + 200 γ K, mit 50 γ Li
2. Probe: 100 γ Na + 2000 γ K, mit 50 γ Li

Da das Retentionsmittel in dem substanzhaltigen Streifen langsamer aufsteigt als im freien Papier, sind die Retentionslücken der Konzentration nicht direkt proportional, sondern es muß eine Umzeichnung vorgenommen werden nach der Formel²⁾

$$c = \text{prop.} \left(\frac{y}{h} - 1 \right) \quad c = \text{Konzentration} \\ h = \text{Höhe der Reagensfront} \\ y = \text{Höhe der Lückengrenzen}$$

Diese Umzeichnung bedeutet die Anpassung des kurzen, retentiometrierten Stückes des hochkonzentrierten Teiles des Substanzstreifens an das größere retentiometrierte Stück des niederkon-

²⁾ *Th. Wieland* u. *L. Wirth*, diese Ztschr. 62, 473 [1950].

zentrierten Teiles durch entsprechende Multiplikation. Die Voraussetzung für die Genauigkeit einer Retentionsanalyse ist daher die konstante Breite eines Substanzstreifens.

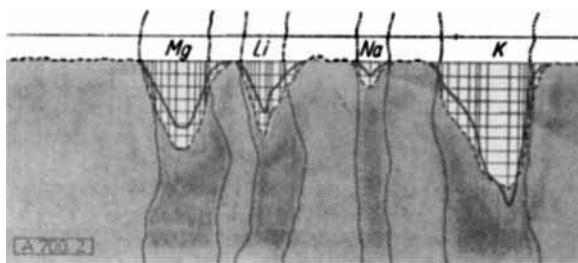


Bild 2

Retentionsanalyse einer Probe Mg-Na-K mit Li als Leitsubstanz. Die punktierten Linien zeigen die Grenzen der einzelnen Substanzstreifen, die Wanderungsweite des Rhodanids ist gestrichelt. Die Umzeichnung wurde auf dem Papier selbst vorgenommen (ausgezogene Linien). Eingewogen wurde ein Verhältnis Mg:Li:Na:K = 560:273:74:1466, gemessen 613:273:48:1522; die starke Abweichung des Na-Wertes erklärt sich aus der zu geringen Na-Konzentration, ein weiteres mit höheren Konzentrationen durchgeführtes Elektropherogramm ergab den richtigen Wert (vgl. Text)

Ein Bild über die Genauigkeit der Retentionsanalyse geben die folgenden Beleganalysen (Lithium jeweils als Leitsubstanz). Die Zahlen sind die analysierten Gewichtsmengen in γ , die Analysendaten die Mittel aus drei Parallelproben:

	Magnesium	Natrium	Kalium
Eingewogen	212	806	801
Gefunden	235	820	792
Eingewogen	423	1000	922
Gefunden	407	969	875
Eingewogen	190	445	1250
Gefunden	205	441	1204

Bei Anwesenheit von Fremdstoffen am Start kann die Bestimmung des langsam wandernden Magnesiums u. U. durch Diffusionseffekte gestört werden.

Quantitative Analyse durch Radiographie

Aus theoretischen Überlegungen ergibt sich die Möglichkeit einer quantitativen Analyse durch Papierelektrophorese in ^{14}C -markiertem Ammoncarbonat. Nach Abdampfen des überschüssigen Ammoncarbonates müßten die Alkalien als radioaktive Verbindungen verbleiben, deren quantitativer Auszählung mit dem Geiger-Gerät nichts im Wege stünde.

Diese Methode wurde jedoch nicht untersucht. Ihrer Verbreitung steht der derzeitige hohe Preis von ^{14}C -markierten Verbindungen entgegen.

Technik der Analyse

Apparatur

Zur Papierelektrophorese der Alkalien können alle Anlagen verwendet werden, welche den Papierstreifen durch direktes Auflegen auf einer Kühlfläche auf 8–10 °C halten. Die Lauffläche soll pro Analysenprobe ca. 35×12 cm betragen.

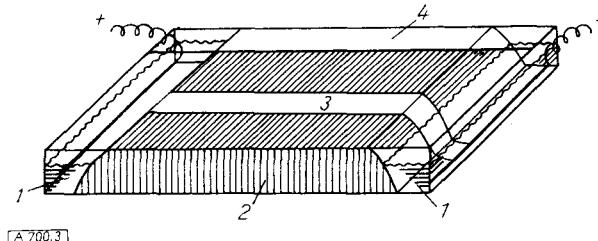


Bild 3

Papierelektrophorese-Anlage zur Alkalianalyse: 1 = Randgefäß mit Grundlösung und Elektroden, 2 = Kühlung, 3 = Filterpapierstreifen zur Ausführung der Analyse, 4 = eine der sechs Deckplatten. Die Kühlfläche beträgt 35×80 cm

Die Anlage des Bildes 3 gestattet sechs quantitative Bestimmungen gleichzeitig. Der Kühlung ist unterteilt, um durch geeigneten Durchfluß eine wirkungsvolle Kühlung zu erzielen. Die Deckplatten liegen entweder direkt auf der Papierfläche auf oder

werden durch seitlich über das Papier gelegte Graphitstäbe in geringem Abstand von dieser gehalten. Als Stromquelle dient ein Gleichrichter für 1000 V = bei einer Maximalbelastung von 1 Amp. (ca. 100 mA Betriebsstrom pro Streifen).

Vor Inbetriebnahme ist zu überprüfen, ob die angewandte Kühlung jede Erwärmung des Papierstreifens unterbindet. Für Spannungen bis 1000 V genügt die Kühlung durch Leitungswasser (10 °C), bei höheren Spannungen ist zur Kühlung eine Solelösung mit Umlaufpumpe nötig.

Aus Sicherheitsgründen soll die Anlage mit einer durchsichtigen Kunststoffplatte verschließbar sein, deren Abnahme gleichzeitig eine Unterbrechung der 220 V-Leitung zu Transformator und Gleichrichter mit sich bringt.

Qualitative Bestimmung

Man verwendet einen Filterpapierstreifen Schleicher und Schüll 2043b von 60 cm Länge. Durch diese Länge wird die Einwanderung von störenden Fremdstoffen aus den Randgefäßen in die eigentliche Meßzone (10–25 cm) verhindert.

Im allgemeinen arbeitet man bei der qualitativen Bestimmung mit einer Konzentrationsreihe, trägt also an mehreren Punkten der Startlinie durch wiederholtes Aufgeben und Eintrocknenlassen steigende Mengen Analysenlösung auf. Derart lassen sich auch geringste Mengen qualitativ erfassen, während man bei nur einer einzigen Konzentration Gefahr läuft, niedrig konzentrierte Alkalimetalle zu übersehen.

Der Einfluß störender Kationen ist zu berücksichtigen und, wie beschrieben, zu eliminieren.

Man läßt eintrocknen (Trockenschrank) und besprüht das ganze Papier gleichmäßig mit Grundlösung (40 g/l Ammoncarbonat des Handels). Das Aufsprühen muß abgebrochen werden, lange bevor am Streifen Zerfließen eintritt.

Als Vergleich wird daneben eine Mg-Li-Na-K-Standardlösung mitelektrophorisiert; dies sichert eine einwandfreie qualitative Identifizierung. Der Nachweis folgt nach dem Trocknen (110 °C) durch Besprühen mit einem bei pH 6–7 umschlagenden Indikator. Aus der Größe der entstehenden Substanzflecken und dem Verlauf der Konzentrationsreihe erhält man Aufschluß über eine u. U. notwendige Aufkonzentrierung oder ein Verdünnen der Analysenlösung für die quantitative Bestimmung sowie über Art und ungefähre Menge der zuzusetzenden Leitsubstanz bei Anwendung der Retentionsanalyse.

Quantitative Bestimmung

Man verwendet einen Filterpapierstreifen Schleicher und Schüll 2043b von ca. 60×10 cm. Die Probelösung wird in Form eines schmalen Streifens, ca. 20 cm von dem der Anode zugewandten Rand der Papierbahn entfernt, senkrecht zur Elektrophoresenrichtung aufgetragen. Wesentlich ist, daß der Aufgabestreifen überall dieselbe Breite (ca. 2 mm) hat.

Man trocknet und besprüht wie bei der qualitativen Bestimmung. Sind störende Ionen, z. B. Kupfer, vorhanden, so wird vor dem Aufsprühen der Grundlösung die Aufgabestelle der Analysenlösung mit Ammonsulfid besprüht und dieses im Trockenschrank wieder entfernt.

Der feuchte Streifen wird der Papierelektrophorese unterworfen. Bei 1000 V beträgt die Analysendauer durchschnittlich 10 bis 35 min. Danach wird der Streifen entnommen, an den Grenzen der Lauffläche abgeschnitten und getrocknet (110 °C).

Vor der quantitativen Analyse sprüht man schwach mit einem bei pH 6–7 umschlagenden Indikator (so z. B. mit Merck-Univer-salindikator, wobei die Alkalien als grünblaue Streifen auf rotem Untergrund erscheinen) und zeichnet die Substanzverteilungen ein. Jeder Substanzstreifen soll rechtwinklig zur Laufrichtung stehen und gleichmäßig breit sein. Durch lokale Überhitzung (schlechte Kühlung) erhält man verzerzte Verteilungen, weil die Ionen in der Wärme rascher wandern.

Bei Analyse nach Elution schneidet man die einzelnen Substanzstreifen aus und wäscht sie nach den üblichen Methoden durch Aufsaugen von Wasser aus. Die Lösungen der einzelnen Reinsubstanzen werden einer geeigneten Mikrobestimmung unterworfen.

Bei Analyse durch Retention schneidet man den trockenen Papierstreifen an den Seiten glatt, biegt ihn zu einer Manschette und stellt diese in einem Dioxandampf-gesättigten Behälter in eine ca. 6 mm hoch mit der Retentionslösung gefüllte Schale.

Als Retentionslösung wird eine Eisen(III)-rhodanid-Lösung verwendet: Man vereinigt 3 Volumeneile einer Lösung von Eisen(III)-ammonsulfat (ca. 25 g Fe/l) und 1 Volumeneile einer Lösung von Ammonrhodanid (ca. 350 g/l) und verdünnt mit der 25fachen Volumenmenge Dioxan. Man läßt absetzen und verwendet die Feststoff-freie Lösung. Die Retentionslösung kann im Bedarfsfall auch höher konzentriert gehalten werden, bzw. ist eine

weitere Verdünnung mit Dioxan möglich, doch werden zu verdünnte Lösungen bereits vom Papier weitgehend zersetzt.

Wenn die vorauswandernde Front des Dioxans den oberen Rand des Papiers erreicht (nach ca. 30 min), wird das Papier aufgerollt und die obere Grenze des tiefroten Rhodanid-Bereiches eingezeichnet. Zur genauen Analyse muß der tiefste Punkt der Lücken mindestens 2 cm vom unteren Rand des Papiers entfernt sein. Die entstandenen Lücken werden umgezeichnet und planimetriert oder ausgeschnitten und gewogen.

Prof. Dr. E. Waldmann, Vorstand des Institutes für Organische Chemie der T. H. Wien, bin ich für die Erlaubnis zur Ausführung dieser Arbeit in seinem Institut zu besonderem Dank verpflichtet. Ferner danke ich Dr. H. Berbalk für wertvolle Hinweise und anregende Diskussionen.

Eingegangen am 3. Oktober 1955 [A 700]

Zuschriften

Hydrazin-Spaltung von Actinomycinen

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN, Dr. G. BOHNSACK
und Dr. C. H. SÜLING

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Beim Abbau von Actinomycin C₂ und C₃¹) mit Hydrazinhydrat²) (3 h, 140 °C) erhielten wir ein Gemisch von Abbauprodukten, aus dem durch chromatographische Adsorption eine kristallisierte Verbindung C₉H₁₆O₂N₂, [α]_D²⁰; -94 ° (Chloroform) vom Fp 118 °C (Kofler-Block, korrig.) abgetrennt werden konnte. Sie gab beim energischen Abbau mit konz. Salzsäure ein Hydrolysat, das im Papierchromatogramm zwei Flecken mit den R_F-Werten des Sarkosins und N-Methyl-valins zeigte. Da die kristallisierte Verbindung Ninhydrin-negativ ist, leicht sublimiert und sich in organischen Lösungsmitteln, z. B. Benzol gut löst, und da ferner ihr IR-Spektrum bis auf geringfügige Differenzen im Gebiet 6,75–7,50 μ mit dem des D,L-N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrides übereinstimmt, halten wir es für sicher, daß ein Anhydrid aus (+)-N-Methyl-valin und Sarkosin vorliegt.

Eine eingehende Untersuchung der Hydrazin-Spaltung ergab, daß bereits unter Bedingungen, wie sie bei normalen Peptiden zur Endgruppenbestimmung angewandt werden³) (12 % äthanolische Hydrazinhydrat-Lösung, 3 h, 100 °C) farblose, kristallisierte Spaltprodukte entstehen. Durch Abbau von Actinomycin I₁¹) kamen wir so u. a. zu einer kristallisierten Verbindung, die mit dem aus Actinomycin C₂ und C₃ gewonnenen optisch aktiven N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid identisch ist. Daneben faßten wir ein zweites, kristallisiertes Spaltstück C₁₀H₁₆O₂N₂ vom Fp 138 °C, [α]_D¹⁹; -167 ° (Chloroform), das bei energischer Säurehydrolyse zwei Aminosäuren mit den R_F-Werten des Prolins und Valins lieferte. Da dieses zweite Abbauprodukt ebenfalls optisch aktiv, Ninhydrin-negativ, leicht sublimierbar und in organischen Solventien gut löslich ist, muß es ein Anhydrid aus den beiden Actinomycin-Aminosäuren L-Prolin und D-Valin sein.

N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid, das wir aus Actinomycin C₂, C₃ und I₁ in Ausbeuten von mindestens 1,2 Mol kristallisiert gewonnen haben, kommt als solches zweifellos nicht in den Actinomycinen vor, denn es enthält keine Gruppen, mit denen es in der Actinomycin-Moleköl verankert sein könnte. Am nahelegensten erscheint die Annahme, daß sich das Anhydrid aus zunächst entstandemem Sarkosyl-N-methyl-valin bzw. N-Methyl-valyl-sarkosin bildet, denn manche Methyl-aminoäure-dipeptide gehen ungewöhnlich leicht in Anhydride über⁴). Wenn diese Vermutung richtig ist, beweist die Isolierung von mehr als 1 Mol N-Methyl-valyl-sarkosinanhydrid, daß in den 2 Mol Sarkosin und 2 Mol N-Methyl-valin enthaltenden⁵) Actinomycinen C₂, C₃ und I₁, jede der beiden Sarkosin-Moleküle mit einer Moleköl N-Methyl-valin verknüpft ist.

Da Prolin-dipeptide ebenfalls leicht zu Anhydriden cyclisieren, ist zweifellos auch das aus Actinomycin I₁ gewonnene Prolyl-valinanhydrid ein Sekundärprodukt, das während der Hydrazinolyse aus einem Dipeptid entsteht. Seine Ausbeute (0,7 Mol) zeigt, daß auf jeden Fall 1 Mol des im Actinomycin I₁ vorhandenen L-Prolins mit 1 Mol D-Valin verbunden ist.

Die Ergebnisse beim Hydrazin-Abbau haben uns veranlaßt, das Verfahren in größerem Maßstab auf die in unserem Institut isolierten Actinomycine anzuwenden. Dabei sind eine Reihe weiterer kristallisierte Abbauprodukte gefaßt worden.

Eingegangen am 17. August 1955 [Z 278]

¹) H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

²) Vgl. A. Stoll, Th. Petzliká u. B. Becker, Helv. chim. Acta 33, 57 [1950].

³) K. Schlägl, F. Wessely u. E. Wawersich, Monatsh. Chem. 85, 957 [1954].

⁴) P. A. Levene, H. S. Simmons u. M. H. Pfaltz, J. biol. Chem. 70, 42 [1926].

⁵) H. Brockmann, G. Bohnsack u. H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 223 [1953].

Neue farbige Abbauprodukte der Actinomycine

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. H. GRÖNE

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Durch energische Säurehydrolyse erhielten wir aus Actinomycin C (Gemisch aus Actinomycin C₁, C₂ und C₃¹) eine in karmoisinroten Plättchen oder Nadeln kristallisierende, Aminosäure-freie Verbindung C₁₅H₁₁O₄N (Zers. oberhalb 260 °C), die wir Actinocinin genannt haben. Sie ist isomer mit dem beim Baryt-Abbau der Actinomycine entstehenden Despeptido-actinomycin²), unterscheidet sich von diesem aber spektroskopisch und chemisch in charakteristischer Weise.

Actinocinin enthält zwei C-Methyl- und zwei durch potentiometrische Titration in 50 proz. Dimethyl-formamid erfaßbare saure Gruppen. Eine davon ist ihrem pK-Wert nach eine Carboxy-Gruppe. Das N-Atom unseres Abbauproduktes ist so schwach basisch, daß eine potentiometrische Titration in Eisessig mit Perchlorsäure nicht möglich war.

Mit Methyljodid-Silberoxyd ließ sich Actinocinin in ein gelbes, kristallisiertes Dimethoxy-Derivat (Fp 210–211 °C) überführen, das in wäßrigem Alkali unlöslich ist, von konz. Mineralsäuren aber unter Farbvertiefung aufgenommen wird. Mit Benzoylchlorid-Pyridin gab Actinocinin ein kristallisiertes, rotes Dibenzoyl-Derivat (Fp 137–138 °C). Seinem IR-Spektrum nach enthält dieses Derivat eine Säureanhydrid-Gruppierung, die dem Actinocinin fehlt. Offenbar bildet die Carboxy-Gruppe des Actinocinins mit Benzoylchlorid ein gemisches Anhydrid. Der zweite Benzoyl-Rest ist zweifellos an eine Oxy-Gruppe gebunden.

Von den beiden restlichen Sauerstoffatomen des Actinocinins gehört mindestens eins einer chinoiden Carbonyl Gruppe an, die sich durch eine Bande bei 6,16 μ zu erkennen gibt. Über die Funktion des fünften Sauerstoffatoms lassen sich noch keine Aussagen machen.

Actinocinin bildet mit o-Phenyldiamin ein rotbraunes Kondensationsprodukt, eine Reaktion, die wir auf das Vorliegen einer zum chinoiden Carbonyl benachbarten Oxy-Gruppe zurückführen. Da solche Oxy-Gruppen ausgeprägte Acidität zeigen, ist somit auch die Natur der zweiten sauren Gruppe geklärt.

Neben Actinocinin erhielten wir ein zweites, kristallisiertes, Aminosäure-freies, rotes Säureabbauprodukt, das dem Actinocinin spektroskopisch sehr ähnlich ist, wie dieses zwei C-Methyl- und zwei saure Gruppen enthält und mit Zinn(II)-chlorid ein blaugrünes Reduktionsprodukt liefert. Im Gegensatz zum Actinocinin ist es Chlor-haltig und gibt beim Erwärmen mit wäßrigem Alkali eine grüne Lösung.

Bei der Säurehydrolyse gehen die Actinomycine zunächst in Desamino-actinomycine³) über. Dabei tauscht der Farbstoffteil der Actinomycin-Moleköl, ohne daß Aminosäuren abgespalten werden, eine Amino-Gruppe gegen eine Oxy-Gruppe aus und erlangt damit die Fähigkeit, mit Zinn(II)-chlorid ein tiefgrünes, semichinoides Reduktionsprodukt⁴) zu bilden. Geht die Säurehydrolyse über die Stufe des Desamino-actinomycins hinaus, so entstehen unter Freisetzung von Aminosäuren, Chromopeptide mit unterschiedlichem Peptid-Rest (Desamino-actinocyl-peptide), eine Reaktionsfolge, die schließlich, wenn alle Aminosäuren abgelöst sind, zum Actinocinin führt. Dabei treten am Farbstoffteil der Desamino-actinomycine bzw. der Desamino-actinocyl-peptide offenbar keine wesentlichen Veränderungen mehr ein, denn Actinocinin ist spektroskopisch den Desamino-actinomycinen sehr ähnlich und gibt ebenso wie diese mit Zinn(II)-chlorid ein tiefgrünes, semichinoides Reduktionsprodukt (Absorptionsspektrum sehr ähnlich wie das des grünen Semiechinons der Desamino-actinomycine⁵).

¹) H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

²) H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwissenschaften 37, 494 [1950]; Chem. Ber. 86, 1407 [1953]; H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Naturwissenschaften 41, 500 [1954]; diese Ztschr. 67, 617 [1955].

³) H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].