

### Reinigung von 2,4-Dinitrotoluol

Ein Praktikumspräparat wurde einer 1,5-stündigen Kolonnenkristallisation unterzogen. Die erhaltene Schmelzpunktskurve zeigt Abb. 11. Der reine Teil war hellgelb, das unreine Ende dunkelbraun gefärbt. Aus dem waagerechten Verlauf der Schmelzpunktskurve im linken Teil des Diagramms und dem daran anschließenden steilen Abfall nach rechts ist zu entnehmen, daß die in dem Präparat enthaltene Verunreinigung mit 2,4-Dinitrotoluol keine Mischkristalle bildet.

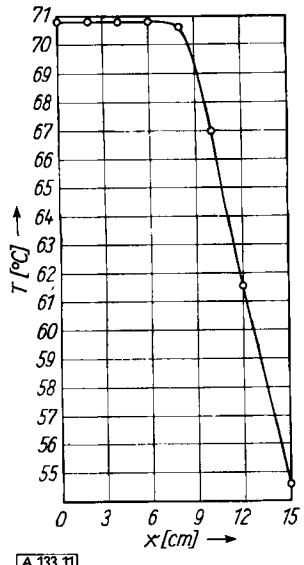


Abb. 11.  
Schmelzpunktsverlauf entlang  
eines kolonnenkristallisierten  
Stabes aus 2,4-Dinitrotoluol

[A 133.11]

### Diskussion

Wegen der Analogie zur Gegenstromdestillation können die für diese geltenden Prinzipien sinngemäß auf die Gegenstromkristallisation von Mischkristallsystemen angewandt werden. Scheiden sich aus einer Mischschmelze von Stoffen die reinen Komponenten ab, dann genügt eine einzige Trennstufe, um die Trennung in reine Komponente und Eutektikum zu erreichen. In einem Arbeitsgang kann beliebig viel Substanz durchgesetzt und das reine Produkt bzw. das Eutektikum an den Enden der Kolonne abgenommen werden. Gewisse Schwierigkeiten bei der Bearbeitung solcher Systeme ergeben sich daraus, daß — denkt man sich — das Gemisch in der Kolonne in reinen Stoff und Eutektikum

getrennt — zur Aufrechterhaltung dieses Zustandes kein Temperaturgradient an der Kolonne anliegen darf, sondern an der Grenze zwischen reiner Komponente und Eutektikum ein dem Unterschied der Schmelztemperaturen entsprechender Temperatursprung auftreten müßte. Aus verschiedenen Gründen ist das nicht möglich: der Gegenstrom wie auch die Wärmeleitfähigkeit der Kolonne und des in ihr enthaltenen Materials zielen auf eine „Einebnung“ dieses Temperatursprunges. Man wird also keine säuberliche Trennschicht zwischen reiner Komponente und Eutektikum erhalten, sondern beide werden, entsprechend den Möglichkeiten zur Überbrückung des Temperatursprunges, längs eines mehr oder weniger großen Übergangsbereiches ineinander übergehen.

Zusammenfassend darf man daraus schließen, daß immer, wenn man es mit kleinsten Mengen zu tun hat, die bisher beschriebenen Methoden des Zonenschmelzens und normalen Erstarrens<sup>7)</sup> angebracht sind; sei es zur Trennung und Reinigung im mg-Bereich durch Mikrozonenschmelzen<sup>2)</sup> oder gar zur Anreicherung von  $\gamma$ -Mengen durch normales Erstarren<sup>8)</sup>. Auch die Reinstdarstellung von Substanzen wird den Zonenschmelzmethoden vorbehalten bleiben. Zur rationellen Reinigung und Trennung von größeren Mengen wird man aber das Kolonnenkristallisieren anwenden.

Seine besonderen Vorteile liegen in der Möglichkeit der kontinuierlichen Ausführung und der gegenüber dem Zonenschmelzen wesentlich höheren zeitlichen Leistung. Für vergleichbare Mengen und einen vergleichbaren Trenneffekt haben wir ermittelt, daß das Zonenschmelzen einen 100-mal größeren Zeitaufwand erfordert, daß also ein durch Kolonnenkristallisieren in 2,5 h erreichter Trenneffekt durch Zonenschmelzen erst nach zehn Tagen erzielt wird.

*Die Untersuchungen wurden ermöglicht durch Beihilfen finanzieller und sachlicher Art der Max-Buchner-Stiftung, des Bundesministeriums für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, wofür wir herzlich danken.*

Eingegangen am 6. März 1961 [A 133]

<sup>7)</sup> H. Schildknecht, Habilitationsschrift, Erlangen 1959.

<sup>8)</sup> H. Schildknecht, G. Rauch u. F. Schlegelmilch, Chemiker-Ztg. 83, 549 [1959].

## Die kombinierte Gaschromatographie und Aktivitätsmessung $^{14}\text{C}$ - und $^3\text{H}$ - markierter Substanzen

Von Dr. H. W. SCHARPENSEEL

Institut für Bodenkunde der Universität Bonn

Die Radiogaschromatographie  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -markierter Substanzen eignet sich zur Identifizierung und Kontrolle bestrahlungsmarkierter Verbindungen, zur Untersuchung radiochemischer Präparate, organischer Reaktionen und ihrer Mechanismen und biochemischer Reaktionsketten sowie zum Studium von Isotopeneffekten. Zur Messung dient die Kombination von Gaschromatograph mit Durchfluß-Ionisationskammer und Vibrationsselektrometer bzw. mit einem Durchfluß-Proportionalzählrohr oder dem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer. Es wird eine Durchflußionisationskammer beschrieben, die  $10^{-2} \mu\text{c}$   $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$  als Grenzaktivitäten zu bestimmen vermag.

Die radiochromatographischen Methoden wurden in letzter Zeit zunehmend ausgebaut<sup>1,2)</sup>. Beim Arbeiten mit durch harte  $\beta$ - oder durch  $\gamma$ -Strahler markierten Verbindungen bietet eine Kombination zwischen gaschromatographischer Trennung und unmittelbar anschließender Aktivitätsmessung der isolierten Fraktionen keine besonderen

Schwierigkeiten. Willard und Mitarb.<sup>3,4)</sup> benutzten eine solche Anordnung bereits 1956 zur Untersuchung der durch Kernrückstoß erzeugten chemischen Reaktionen sowie zur Trennung trägerfreier Bestrahlungsprodukte<sup>5)</sup>, wobei auch minimale Beiträge von Nebenprodukten und Artefakten bei

<sup>1)</sup> J. B. Evans u. J. E. Willard, J. Amer. chem. Soc. 78, 2908 [1956].

<sup>2)</sup> A. Gordus u. J. E. Willard, ebenda 79, 4609 [1957].

<sup>3)</sup> J. B. Evans, J. E. Quintan u. J. E. Willard, Ind. Engng. Chem. 50, 192 [1958].

<sup>4)</sup> H. W. Sharpenseel u. K. H. Menke, Z. analyt. Chem., im Druck.

<sup>5)</sup> H. W. Sharpenseel u. K. H. Menke, ebenda, im Druck.

genügend hoher spezifischer Aktivität noch erfaßt werden können.

Diesglichen wurde durch Herr und Mitarb.<sup>6,7)</sup> nach Neutronenbestrahlung von Alkylhalogeniden die  $\gamma$ -Strahlung des gebildeten  $^{82}\text{Br}$  zur radiogaschromatographischen Identifizierung der Bestrahlungsprodukte wie zum Studium von „Radikalfänger-Mechanismen“ herangezogen. Wegen des höheren Auflösungsvermögens von  $10^{-8}$  sec und generellen Vorteilen bei der Messung von  $\gamma$ -Photonen erwies sich eine auf den Meßkopf eines Szintillationszählers gesetzte, von aktiven Substanzfraktionen und Trägergas durchflossene Glasschnecke einem Methan-Durchflußzähler (max. Auflösungsvermögen  $10^{-4}$  sec), bei welchem Probe und Trägergas durch eine eingeschmolzene Kapillare hindurchströmten, als überlegen.

Die radiogaschromatographische Messung von mit schwachen  $\beta$ -Strahlern markierten Verbindungen stellt eo ipso ein kompliziertes Problem dar, weil hier mit Ausnahme der Flüssigkeits-Szintillations-Messung ein unmittelbarer Kontakt zwischen den aktiven Gasfraktionen und dem Detektor unerlässlich ist.

### Anwendungsmöglichkeiten

Die folgenden spezifischen Problemstellungen, deren Zahl sich sicherlich noch erweitern wird, machen eine kombinierte radiogaschromatographische Messung, z. B.  $^{14}\text{C}$ - oder  $^3\text{H}$ -markierter Substanzen, wünschenswert:

1. Kontrolle bestrahlungsmarkierter Substanzen auf ihre Identität. Außer dem aktivierten Material der bestrahlten Ausgangssubstanz werden Homologe oder Derivate der bestrahlten Ausgangssubstanz mitchromatographiert. Durch gleichzeitige Aktivitätsmessung ist es möglich, die Aktivitätsgipfel den einzelnen Verbindungen zuzuordnen und eventuell — bei Verwendung einer präparativen Säule — die Einzelkomponenten zu isolieren. Dieser Ansatz wurde speziell bedeutungsvoll für die Kontrolle von Wilzbach-tritierten Substanzen.

Hier zeigte sich, daß bei Tritiierung ungesättigter Verbindungen durch Addition von Tritium an Stelle der erwarteten Substitution von H-Atomen erhebliche Mengen hydrierter Ausgangssubstanz entstanden. Dies geht aus der Untersuchung tritiierter Formen von Toluol, Cyclohexen<sup>8</sup>), Öl- und Linolsäure (bzw. ihrer Methyl-ester)<sup>9</sup>), Isobutylen und Cholesterin sowie Vitamin A-acetat<sup>10,11)</sup> hervor. Durch Behandlung des  $^3\text{H}$ -markierten Vitamin A-esters mit Maleinsäureanhydrid und Bildung des Diels-Alder-Addukts zeigten hier Nystrom und Sunko<sup>10)</sup>, daß die konjugierten Doppelbindungen der Seitenkette bei fast allen markierten Molekülen teilweise durch Tritium-Anlagerung gesättigt worden waren.

Die kombinierte Radiogaschromatographie ermöglicht darüber hinaus grundsätzliche Studien der kinetischen Vorgänge bei der Wilzbach-Markierung, bevor sie durch interne Strahlenschäden überdeckt werden<sup>12,13)</sup>. Gant<sup>14)</sup> gelang es, mit Hilfe der Radiogaschromatographie die verschiedenen Markierungsreaktionen, die durch das  $\beta$ -Teilchen sowie andererseits das  $(^3\text{HeT})^+$ -Ion ausgelöst werden, näher zu beschreiben.

- <sup>6)</sup> W. Herr, F. Schmidt u. G. Stöcklin, Z. analyt. Chem. 170, 1, 301 [1959].
- <sup>7)</sup> W. Herr, G. Stöcklin u. F. Schmidt, Z. Naturforsch. 14b, 11, 693 [1959].
- <sup>8)</sup> R. F. Nystrom, Symposium on Ionization Chamber Measurement of Radioactivity and Radiation, sponsored by Atomic Ass. Inc. u. Appl. Physics Corp., Carygraph 1,4,3 [1960].
- <sup>9)</sup> H. J. Dutton, E. P. Jones, L. A. Mason u. R. F. Nystrom, Chem. and Ind. 1958, 1176.
- <sup>10)</sup> R. F. Nystrom u. D. E. Sunko, Symposium on Advances in Tritium Applications, Oct. 1958; Atomlight 7, 1 [1959].
- <sup>11)</sup> H. W. Scharpenseel, Landwirtsch. Forsch., 12. Sonderheft, 120 [1959].
- <sup>12)</sup> R. F. Nystrom, D. E. Sunko u. J. White, unveröffentl.
- <sup>13)</sup> P. L. Gant, Symposium on Ionization Chamber Measurement of Radioactivity and Radiation, Carygraph 1,4,5 [1960].
- <sup>14)</sup> P. L. Gant, J. chem. Physics 37, 1589 [1959].

2. Untersuchung radiochemischer Präparate hinsichtlich der Markierungspositionen durch radiogaschromatographische Messung von Degradationsprodukten und Derivaten bezüglich ihrer Aktivitätsanteile.

3. Studium des Mechanismus organischer Reaktionen durch gaschromatographische Trennung der Reaktionskomponenten, ihrer Degradationsprodukte und Derivate bei gleichzeitiger Messung der in die Reaktionsprodukte eingehenden Aktivitäten positionsdefiniert markierter Ausgangssubstanzen<sup>15)</sup>.

4. Ganz analog erlauben radiogaschromatographische Messungen die Charakterisierung von biochemischen Reaktionsketten durch gleichzeitige chemische Identifizierung und Bestimmung der aus einem markierten „Precursor“ in die Folgeprodukte übergehenden Substanz- und Strahlungsanteile.

5. Zur Untersuchung von Isotopeneffekten, die z. B. bei Reaktionen mit  $^{14}\text{C}$ - oder  $^3\text{H}$ -markierten Substanzen auftreten, läßt sich die gleichzeitige gaschromatographische Messung der reagierenden Gesamtmenge und Registrierung des Anteils an radioaktiver Substanz heranziehen<sup>16)</sup>.

6. Wie bereits eingangs mit Bezug auf durchdringende  $\gamma$ -Strahler kurz erwähnt wurde, ist die Radiogaschromatographie besonders gut geeignet für Meßprobleme der Chemie „heißen“ Atome<sup>3-7)</sup>.

### Meßverfahren

Drei Strahlungsmeßverfahren eignen sich zur Kombination mit der Gaschromatographie:

#### 1. Messung in Durchfluß-Ionisationskammer und Vibrationsselektrometer

Wilzbach und Riesz<sup>18)</sup> konstruierten eine Durchfluß-Ionisationskammer, welche an den Ausgang des Gaschromatographen gekoppelt und mit dem Schwingkondensator eines Vibrationsselektrometers verbunden wurde. Sie diente zum Studium der bei der Gaschromatographie von  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -Verbindungen auftretenden Isotopeneffekte.

Ein sehr ähnliches Kammermodell wurde von Nystrom<sup>9)</sup> zur Untersuchung des Mechanismus der Wilzbach-Tritiierung und organischer Umlagerungsreaktionen verwandt. Durch Unterbringung im thermostatisierten Raum des Gaschromatographen (Perkin-Elmer) erübrigte sich eine spezielle Kammerheizung.

In den meisten Konstruktionselementen ähnlich ist auch die von Gant<sup>13)</sup> gebaute Durchflußkammer, die zur Untersuchung der Kinetik der Wilzbach-Markierung diente.

Mason, Dutton und Bair<sup>17)</sup> entwickelten zur Identifizierung Wilzbach-tritiierter Verbindungen<sup>9)</sup> eine Durchfluß-Ionisationskammer von 10 ml Volumen, bei welcher die isolierenden Teile aus Teflon gedreht sind. Den Materialeigenschaften des Tefflons entsprechend ist sie bis zu Maximaltemperaturen von 240 °C verwendbar.

In den wesentlichen Konstruktionselementen ähnlich wurde von uns ebenfalls eine Kammer mit Teflonisolatoren gebaut, die, vornehmlich zur Trennung von phenolischen Verbindungen bestimmt, ebenfalls bis zur Grenze der Thermostabilität des Tefflons verwendet werden kann.

#### 2. Messung im Durchfluß-Proportionalzählrohr

Es lag nahe, an Stelle der Durchfluß-Ionisationskammer auch ein Durchfluß-Proportionalzählrohr zu verwenden. Wolfgang und Rowland<sup>18)</sup> benutzten Helium als Trägergas im Gaschromatographen, welches sie an dessen Ausgang in konstanter Proportion mit Methan als Zählgas mischten und in ein etwa 20 ml fassendes Proportionaldurchflußzähl-

<sup>15)</sup> Vgl. z. B. R. Berger, Dissertation, Univers. of Illinois 1960.

<sup>16)</sup> K. E. Wilzbach u. P. Riesz, Science [Washington] 126, 748 [1957].

<sup>17)</sup> L. H. Mason, H. J. Dutton u. L. R. Bair, J. Chromatography 2, 322 [1959].

<sup>18)</sup> R. Wolfgang u. F. S. Rowland, Analytic. Chem. 30, 903 [1958].

rohr leiteten (1 ml/sec). Die untere Erfassbarkeitsgrenze liegt ähnlich den Ionisationskammern bei etwa  $10^{-3}$   $\mu$ c. Ein gewisser Nachteil des Zählrohrs gegenüber der Durchfluß-Ionisationskammer ist außer der notwendigen Gasdosiervorrichtung für Träger- und Zählgas die größere Schwierigkeit beim Arbeiten mit höher siedenden Substanzen. Wenn das Durchflußzählrohr nicht aufgeheizt wird, besteht die Gefahr des Auskondensierens der getrennten Substanzfraktionen. Bei Zählrohraufheizung andererseits ist der weitgehend kapazitätsarm dem Zählrohr angeschlossene Vorverstärker schlecht vor Nulleffekt-schädlichen Temperaturerhöhungen zu bewahren.

### 3. Messung im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer

Die Messung der aktiven Substanzfraktionen nach Auffangen am Ende des Gaschromatographen in einem Lösungsmittel (Toluol, Anisol, Xylol usw.) mit gelöstem organischem Szintillator gestattet unter idealen Verhältnissen die höchstmögliche Strahlungsausbeute. Die Firma Packard\*) hat deshalb zu ihrem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (TRI CARB) einen Fraktionssammler konstruiert (Abb. 1), welcher hinter den Gaschromatographen



Abb. 1. Fraktionssammler

gehängt wird. Er besitzt eine schwenkbare Injektionsdüse, welche in gewissen Zeitintervallen oder durch Handauslösung die im Gaschromatographen getrennten Fraktionen in oben mit einem Tropfen Siliconöl abgedeckte, mit Anthracen-Kristallen gefüllte Gläserchen einspritzt. Diese Gläschchen werden anschließend im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen und ergeben bei Anschluß eines Schreibers eine Treppenkurve der Aktivitätsverteilung. Obgleich die Methode recht empfindlich und namentlich im Falle sehr kleiner Probemengen (wie es bei Verwendung von Argon-Ionisations-<sup>19)</sup> oder Flammenionisations-Detektoren<sup>20, 21)</sup> Voraussetzung ist) leistungsfähig ist, besitzt sie gewisse Nachteile gegenüber der gleichzeitig mit der Wärmeleitfähigkeit erfolgenden Aktivitätsmessung in der Durchfluß-Ionisationskammer. Einmal ist bei der getrennt nachfolgenden Flüssigkeits-Szintillationsmessung der Arbeitsaufwand höher als bei unmittelbarer Durchflußmessung, zweitens bekommt man nicht die zwei in den Retentionszeiten direkt vergleichbaren Kurvenbilder (Wärmeleitfähigkeits-

<sup>19)</sup> J. E. Lovelock, *J. Chromatography* 1, 35 [1958].  
<sup>20)</sup> R. P. W. Scott, in D. H. Desty u. C. L. A. Harbourn: *Vapour Phase Chromatography*, Butterworths, London 1957.  
<sup>21)</sup> J. G. McWilliam u. R. A. Dewar, *Nature* [London] 181, 760 [1958].  
\*) Packard Instrument Company, Inc., La Grange, Illinois, USA.

und Aktivitätsmessung), und endlich sind die Anthracen-Kristalle in den Auffangrörchen kostspielig\*\*).

Für Substanzen mit niedrigem Siedepunkt ( $<150^{\circ}\text{C}$ ) kann man den Gasstrom direkt in eine Plastik-Szintillatorspirale oder Glasspirale mit Plastik-Szintillatorkügelchen einleiten, welche zwischen den beiden Photomultipliern des Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometers steckt. Die Zu- und Ableitungen werden mit Asbestschnur wärmeisoliert, so daß die getrennten Fraktionen sich nicht an den Innenflächen abkühlen und hier auskondensieren können<sup>1)</sup>. Der Gastransport bis zur Plastik-Szintillatorspirale durch den Tiefkühler des Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometers dauert nur etwa 1 sec. Substanzen mit Siedepunkten über  $150^{\circ}\text{C}$  kondensieren bei diesem Durchgang teilweise aus.

### Experimentelles

#### 1. Aufbau des Geräts

Ein Vergleich der experimentellen Ansätze ließ die kombinierte radiogaschromatographische Messung unter Verwendung einer Durchfluß-Ionisationskammer als Methode der Wahl erscheinen. Wir konstruierten daher eine Kammer, die sich an das Bauprinzip von *Mason, Dutton und Bair*<sup>17)</sup> anlehnt<sup>†</sup>). Abb. 2 zeigt einen Längsschnitt, aus dem die einzelnen Konstruktionselemente zu erkennen sind. Der zentrale Draht (bei den amerikanischen Modellen Anode, beim Friesene & Höpfner-Vibrationselektrometer Kathode), besteht aus Wolfram, die Aluminiumhülse, welche zur Aufnahme der Kammerheizung dient, ist mit Asbestwolle gefüllt. Die vorzugsweise Verwendung von Teflon für alle isolierenden Teile erlaubt die Verwendung der Kammer bis zu  $240-250^{\circ}\text{C}$ . Durch Austausch der isolierenden <sup>®</sup>Teflon-Verbindung zwischen der Ermetokupplung mit dem Gaschromatographen und dem eigentlichen Messingkörper der Durchflußkammer gegen einen Keramik- oder Glaszwischenisolator wie auch durch zusätzliche Ventilation des Teflon-Kerns hinter der Messingkammer sollte es möglich sein, bis herauf zu  $300^{\circ}\text{C}$  zu arbeiten. Eine solche Metall-Glas- oder Metall/Keramik-Verbindung über das gesamte Intervall von Zimmertemperatur bis zu  $300^{\circ}\text{C}$  hin dicht zu halten, erwies sich jedoch als schwierig. Bei Einbau der Kammer in das Innere des Thermostatenraums im Gaschromatographen ist die Verwendung solcher Kupplungen bei hohen Temperaturen nur ratsam, wenn man den bei

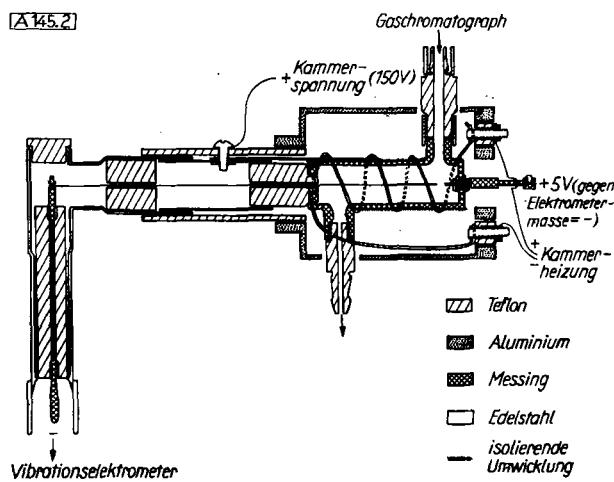


Abb. 2. Durchfluß-Ionisationskammer für Anschluß an Gaschromatographen und Vibrationselektrometer

\*\*) Pilot Chemicals, Inc., 36 Pleasant Str., Watertown 72, Mass., USA. 50 g Anthracen kosten 85.— DM.

†) Bauliche Ausführung durch Dr. Virus K.G., Bonn.

Undichtigkeiten leicht explosiven Wasserstoff gegen Helium, Argon oder ein anderes nicht explosives Trägergas austauscht. Darüber hinaus sind die Isolationseigenschaften der meisten keramischen Materialien bei hohen Temperaturen schlecht.

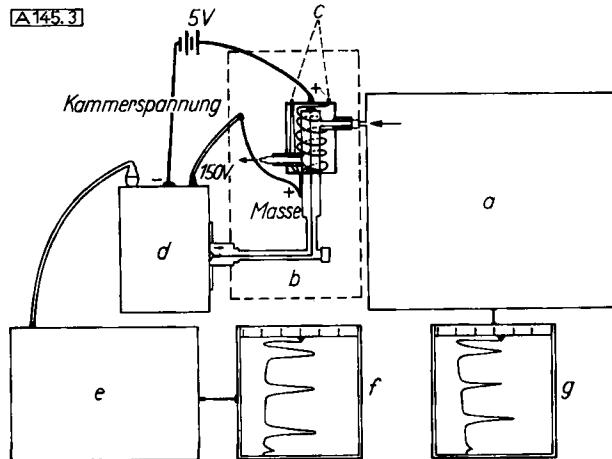


Abb. 3. Blockdiagramm eines Radiogaschromatographiegerätes  
a Gaschromatograph (Gasfrakt.), b Durchfluß-Ionisationskammer,  
c Kammerheizung über Ringtransformator, d Schwingkondensator,  
e Elektrometer, f Kompensationsschreiber für Aktivitätsmessung,  
g Kompensationsschreiber für Wärmeleitfähigkeitsmessung

Abb. 3 zeigt die Verbindung der Durchflußionisationskammer mit Gaschromatograph und Vibrationselektrometer. Wärmeleitfähigkeits- und Aktivitätskurve werden auf zwei in Papierbreite und -vorschub identischen Schreibern registriert, so daß die Aktivitätsgipfel mittels der relativ gleichen, für alle Fraktionen um eine gleichbleibende Zeitspanne verzögerten Retentionszeiten ohne Mühe den entsprechenden Wärmeleitfähigkeitsgipfeln zugeordnet werden können.

Die Kammer wird durch einen Ringtransformator geheizt. Die ganze Anlage ist fahrbar auf einem Wagen aufgebaut, so daß man beim Arbeiten im höheren Temperaturbereich ( $> 200^\circ\text{C}$ ) dicht an einen ventilierten Abzug mit eingeschaltetem Exhauster heranfahren kann, um den toxischen Wirkungen der eventuell bei hohen Temperaturen von Teflon abgegebenen Fluorverbindungen vorzubeugen. Die Durchflußkammer ist einerseits durch eine Ermetokupplung mit dem Gaschromatographen, andererseits durch eine V4A-Rohrführung und Bananenstecker mit dem Standardanschlußstück für das Normalelement auf dem Schwingkondensator teil des Friesene & Höpfner FH 56 Vibrations-Elektrometers verbunden.

## 2. Meßempfindlichkeit für den Ionisationsstrom

Die Meßempfindlichkeit für  $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$  in der Durchflußionisationskammer (9–10 ml Volumen) hängt in erster Linie von der Art des Meßverstärkers ab. Mason, Dutton und Bair<sup>17)</sup> arbeiteten mit einem Brownschen Elektrometer und benötigten Proben mit Aktivitäten um 1  $\mu\text{c}$ . Bei Kopplung mit einem Vibrationselektrometer ließen sich Gipfel bis herunter zu  $10^{-2} \mu\text{c}$  registrieren<sup>8)</sup>. Dies ist auch die Grenzempfindlichkeit unserer Kammer sowohl für  $^{14}\text{C}$  wie für  $^3\text{H}$ .

Die Meß- und Nulllinienstabilität ist bei Verwendung eines Widerstandes von  $10^{11} \Omega$  besser als für einen von  $10^{12} \Omega$ ; sie wird weiterhin durch hohe Temperaturen etwas nachteilig beeinflußt. Keramische Materialien wie die von Nyström<sup>9)</sup> benutzten Stupakov-Isolatoren eignen sich nur für Arbeiten bei niedriger Temperatur, während Teflon bei  $225^\circ\text{C}$  nach Tolbert<sup>22)</sup> mangelhaftes dielektrisches Verhalten zeigt, was sich auch bei unseren Untersuchungen in Form von Nulllinienabwanderungen und stärkeren Ausschlägen bestätigte.

Die Radiogaschromatographie mittels Durchfluß-Ionisationskammer eignet sich in erster Linie für Gasmischungen mit radioaktiven Komponenten (Abb. 4) sowie für Lösungen aktiver Substanzen mit einer spezifischen Aktivi-

tät von mindestens 1  $\mu\text{c}$ , so daß eine Probe von 50  $\mu\text{l}$  noch eine für mehrere Gipfel ausreichende Aktivität enthält.

Tolbert<sup>22)</sup> weist bereits auf Täuschungsmöglichkeiten durch Ionisationskammer-Aktivitätsgipfel bei Durchfluß inaktiver Substanzfraktionen hin. Abb. 5 zeigt eine Anzahl von Pseudogipfeln, wie sie von 50  $\mu\text{l}$ -Beträgen verschiedener inaktiver Lösungsmittel erzeugt werden können. Derartige Gipfel entstehen vornehmlich gleichzeitig mit dem Lösungsmittelpeak, nicht aber durch mengenmäßig geringere inaktive Fraktionsanteile (siehe auch Abb. 6). Smith und Carter<sup>23)</sup> beobachteten solche Pseudogipfel bei der gaschromatographischen Trennung der Wasserstoff-Isotope (als Gemisch aus  $^1\text{H}_2$ ,  $^3\text{H}_2$  und  $^1\text{H}^3\text{H}$ ), wenn  $^1\text{H}$  in großem Überschuß (ca. 10<sup>4</sup>:1) vorlag.



Abb. 4. Radiogaschromatogramm eines Gemisches von Athanol- $^3\text{H}$  (1), Brenzkechin- $^3\text{H}$  (2) und Hydrochinon- $^3\text{H}$  (3). Oben Gaschromatogramm (15  $\mu\text{l}$ , 0,75 atm  $\text{H}_2$ ,  $210^\circ\text{C}$ , Säule 1,50 m, Siliconett auf Celite; 150 mA, 10 mV); unten Aktivitätskurve

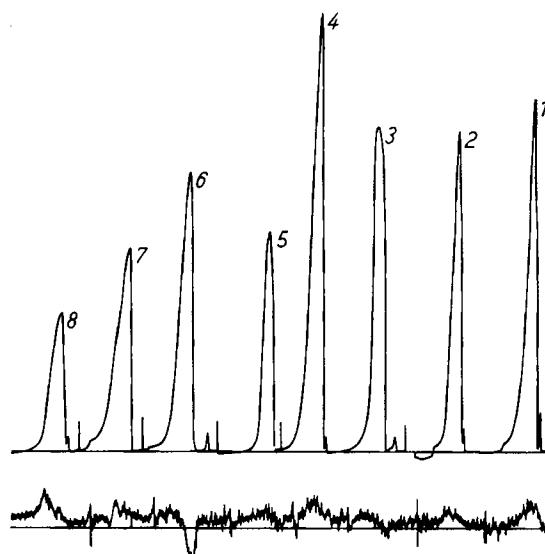


Abb. 5. Pseudogipfel einiger inaktiver Lösungsmittel (Silikonöl auf Stercharol,  $120^\circ\text{C}$ , Injektionsdosis 50  $\mu\text{l}$ ). 1 Benzol, 2 Amylalkohol, 3 Methylcellosolve, 4 Äthyldichlorid, 5 Athylacetat, 6 Pyridin, 7 Ameisensäure, 8 Essigsäure

Durch den plötzlichen Einbruch der hohen Lösungsmittel-Substanzmenge in die Ionisationskammer kann sich das zwischen Ohmschem Bereich und Zährohrbereich liegende Saturationsplateau, die Operationsbasis der Ionisationskammer, im Sinne einer Erniedrigung der Durchbruchsspannung verengen. Die Pseudogipfel könnten durch solche lokale Potentialveränderungen mit Überschreiten der Durchbruchsspannung entstehen. Weiterhin könnten durch die hohe Lösungsmittel-Konzentration in der Ionisationskammer Isolations-Störungseffekte eintreten, oder es könnten während des gemeinsamen Einbringens von Lösungsmittel und radioaktiver Substanz – nach dem Modell, welches in den sehr empfindlichen Ionisationsdetektoren<sup>18)</sup> zur Ausbildung eines Signals durch metastabile Argon-Moleküle führt – metastabile Zustände eintreten, die zur Ausbildung eines meßbaren Ionenstroms und Pseudopeaks führen. Die Pseudogipfel sind, wie Abb. 7 zeigt, abhängig vom Lösungsvolumen. Die Variation der Kammerspannung mittels einer Anodenbatterie von 30–250 V ergab nur unwesentliche Unterschiede in der Höhe solcher Pseudogipfel und scheidet daher als Mittel zu ihrer Kontrolle aus.

Wenn auch das Auftreten solcher Störgipfel offenbar an eine größere Substanzmenge gebunden ist, wirft dieses Phänomen doch einen Schatten auf die anderweitig beson-

<sup>22)</sup> H. A. Smith u. E. H. Carter jr., Internat. Sympos. on Detection and Use of Tritium, Paper TTS I 109, Wien, Mai 1961.



ders praktische Radiogaschromatographie mittels Durchfluß-Ionisationskammer. Bei Vorhandensein eines Flüssigkeits-Szintillations Spektrometers ist eine Kontrolle leicht möglich, indem der Gasaustritt der Durchfluß-Ionisationskammer über eine Teflon-Schlauchverbindung bei Beginn der gaschromatographischen und Ionisationskammer-Gipfel in Flüssigkeits-Szintillations - Fläschchen mit Toluol oder Toluol/Äthan usw. (je nach den Löslichkeitseigenschaften der erwarteten Fraktionen) plus organischem Szintillator getaucht wird. Die Fläschchen stehen in Bohrungen in einem Plexiglas-Block, der einfach unter dem starr befestigten Teflonschlauch entlang geschoben wird. Man kann so innerhalb von Minuten feststellen, ob es sich bei den Gipfeln um echte oder um Pseudopeaks handelt. Diese Methode ist billiger als die Anschaffung des Zusatzgerätes (Abb. 1) mit Anthracenröhren (Packard TRI CARB Gas Fraction Collector, model 830) und gestattet

Abb. 6. Pseudogipfel (↓) des inaktiven Lösungsmittels (Äther, 1) neben echtem  $^3\text{H}$ -Gipfel (Toluol- $^3\text{H}$ , 2). 20 µl Äther, 20 µl Toluol- $^3\text{H}$

die Übernahme der Ionisationskammer-Aktivitätskurve unter Ersparnis der nicht unbeträchtlichen Arbeit, aus den Aktivitäten der Anthracen-Röhren ein dimensionsgetreues, zur Wärmeleitfähigkeitskurve passendes Aktivitätsdiagramm aufzutragen zu müssen.

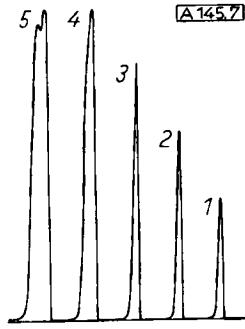


Abb. 7. Zunehmende Höhe des Pseudogipfels von Benzol bei wachsendem Injektionsvolumen (Silicon auf Sterchamol, 1 m, 100 °C). 1 = 15 µl; 2 = 30 µl; 3 = 45 µl; 4 = 60 µl; 5 = 75 µl



Durch Verbinden des Schreibers mit einem Integrationszusatz, wie sie vom Handel in zahlreichen Modellen angeboten werden (z. B. Integratron, Integracord, Integramot, Intemocord)<sup>†</sup>), ist es bei vorheriger Eichung mit dem verwandten Isotop und Einhalten eines konstanten Trägergasstromes möglich, die den aktiven Fraktionen zukommenden Aktivitäten abzulesen.

Eingegangen am 17. April 1961 [A 145]

## Zuschriften

### Nicht-enzymatische Synthese von Polysacchariden, Nucleosiden und Nucleinsäuren\*)

Von Prof. Dr. G. S C H R A M M, Dr. H. G R Ö T S C H und Dipl.-Chem. W. P O L L M A N N

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

Schramm und Wissmann<sup>1)</sup> beschrieben eine Synthese von Polypeptiden, bei der die Aminokomponente durch Umsetzung mit Polyphosphorsäureester aktiviert wird. Das Verfahren eignet sich auch zur Polykondensation von Oligopeptiden<sup>1)</sup> und Aminosäuren. Vorteilhaft sind die sehr milden Reaktionsbedingungen. Racemisierung wurde nicht beobachtet.

Auch Hydroxylgruppen lassen sich mit Polyphosphorsäureester aktivieren. Läßt man z. B. Glucose in Dimethylformamid und in Gegenwart von Polyphosphorsäureester auf Methylglucose einwirken, so erhält man – nach Abspaltung der Methylgruppe – Cellobiose (Ausbeute etwa 40%). Auffallend ist der sterisch einheitliche Verlauf der Reaktion.

Zucker mit freier Carbonylfunktion reagieren in einem inerten Lösungsmittel und in Gegenwart von Polyphosphorsäureester zu hochmolekularen Polyglykosiden, in denen die Zuckerkette überwiegend einheitlich und linear miteinander verknüpft sind. Glucose bildet in Dimethylformamid-Lösung mit etwa 40 % Ausbeute ein Polyglucosid mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 50000, das jedoch zum Teil phosphoryliert ist. Diese Phosphorylierung lässt sich unterdrücken, wenn man in Formamid-Lösung arbeitet. Unter diesen Bedingungen entsteht aus Glucose mit 15 % Gesamtausbeute ein phosphatfreies Polyglucosid (Molgewicht etwa 50000,  $[\alpha]_D = 16^\circ$ ), dessen Konstitutionsermittlung noch im Gang ist. Beim Abbau mit Perjodat verbraucht es 1 Mol  $\text{NaJO}_4$ , was zu erwarten ist, wenn nur 1→4-glucosidische Verknüpfungen vorliegen. Ketosen (z. B. Fructose) sowie Pentosen lassen sich gleichfalls polykondensieren. So wurde aus Ribose ein Polyribosid mit dem Molekulargewicht 40000 und dem spezifischen Drehwert +35° hergestellt, in dem nach bisherigen Untersuchungen die Ribosereste  $\alpha$ -1→5 verknüpft sind. Das Verfahren liefert einheitliche Produkte, auch empfindliche Polyglykoside können dargestellt werden, und geringe Mengen Wasser stören nicht.

Nucleoside gewinnt man mit Polyphosphorsäureester in einem Reaktionsschritt aus freiem Zucker und Purin- oder Pyrimidinbase. Desoxyribose liefert mit 30 % Ausbeute 2'-Desoxyadenosin, das in allen Eigenschaften mit dem natürlichen Produkt übereinstimmt. Ribose reagiert mit Adenin in guter Ausbeute zum Adenosin. Als Nebenprodukte treten geringe Mengen 2'- und 3'-Adenylsäure auf.

Setzt man Apurinsäuren (d. h. Nucleinsäuren, aus denen ein Teil der Purine abgespalten wurde) mit Purinen oder Pyrimidinen und Polyphosphorsäureester um, so werden die Lücken mehr oder weni-

ger quantitativ gefüllt. Pyrimidine werden langsamer eingebaut als Purine. Die Reaktion gelingt nicht nur in Dimethylformamid, sondern auch – allerdings mit geringerer Ausbeute – in wässriger Lösung. Damit ergibt sich die Möglichkeit, in der Zelle Desoxyribonucleinsäure in definierter Weise abzuändern und die Auswirkung der Änderung des Basenmusters auf die Gent Funktion zu untersuchen. Entsprechende Versuche sind im Gang.

Nucleinsäuren schließlich erhält man bei der Reaktion von Nucleotiden mit Polyphosphorsäureester ohne Lösungsmittel (50–60 °C). Auch die empfindlichen 2'-Desoxynucleotide können polykondensiert werden. Molgewichte der Produkte liegen zwischen 15000 und 50000. Mehrere Versuche ergaben, daß zumindest überwiegend die Konfiguration der natürlichen Nucleinsäuren entsteht. So lassen sich die synthetischen Polyribonucleotide, soweit sie Pyrimidin-nucleotide enthalten, durch Pankreas-Ribonuclease spalten, was nicht der Fall sein dürfte, wenn sie überwiegend die unnatürliche 2'-3'- oder 2'-5'-Verknüpfung aufwiesen. Im Elektronenmikroskop beobachtet man lange Fäden, die der natürlichen Ribonucleinsäure gleichen.

Aus den Versuchen von Rich<sup>2)</sup> ist bekannt, daß sich enzymatisch hergestellte Polyadenylsäure mit der hierzu komplementären Polyuridylsäure unter Erniedrigung der Extinktion zu einer Doppelhelix zusammenfügt. Den gleichen Effekt beobachtet man beim Vermischen synthetischer Polyadenylsäure mit synthetischer Polyuridylsäure. Interessanterweise beschleunigt Polyadenylsäure die Polykondensation von Uridylsäure auf mehr als das 10-fache. Polyuridylsäure zeigt diesen Effekt nicht. Diese gegenseitige Beeinflussung komplementärer Nucleotidstränge bildet die experimentelle Grundlage für eine Theorie über die Entstehung selbstvermehrungsfähiger Systeme im Laufe der Erdgeschichte.

Eingegangen am 20. Juli 1961 [Z 126]

\*) Eine ausführliche Mitteilung erscheint demnächst in dieser Zeitschrift. — <sup>1)</sup> G. Schramm u. H. Wissmann, Chem. Ber. 91, 1073 [1958]. — <sup>2)</sup> G. Felsenfeld u. A. Rich, Biochem. biophysica Acta 26, 437 [1957].

### Neue Synthesen der „Königinnen-Substanz“

Von Priv.-Doz. Dr. K. E I T E R

Wissenschaftliches Hauptlaboratorium der Farbenfabriken  
Bayer A.-G., Leverkusen

Die als „Königinnen-Substanz“ bekannte 2-trans-Decenon-(9)-säure-(1) (VII) ist eine von der Königin der Honigbienen (*apis mellifera*) sezernierte Verbindung, die in sehr geringen Konzentrationen die Weiselzellenbildung unterbindet. Für diese Substanz sind bisher zwei Synthesen veröffentlicht worden<sup>1).</sup>