

Moderne Methoden der Analyse organischer Verbindungen

Die „Sectie voor Analytische Chemie van de Koninklijke Nederlandse Chemische Vereniging“ und die Fachgruppe „Analytische Chemie“ der Gesellschaft Deutscher Chemiker veranstalteten vom 20. bis 23. Mai 1964 in Eindhoven (Niederlande) ein Symposium.

Aus den Vorträgen:

F. Bahner, Heidelberg

Acetessigsäurebestimmung in 0,1 ml Blut

Aus Acetessigsäure wird Aceton freigesetzt und durch Mikrodiffusion isoliert. Die Apparatur von Conway hat den Nachteil, daß die Diffusionszelle bei 30–40 °C undicht wird und daß kein Temperaturgradient zwischen Innen- und Außenzelle angelegt werden kann. Bei einer neuen Apparatur können bei ebenso kleinen Vorlagen beliebige Temperaturdifferenzen zwischen Innen- und Außenlösung erzeugt werden. Das Aceton reagiert in alkalischer Lösung mit Salicylaldehyd unter Bildung des roten Disalicylacetons. Die Reaktion wird beeinflußt 1. durch die Konzentration der Reaktionsteilnehmer, 2. durch den Luftsauerstoff, 3. durch Tageslicht, 4. durch eine langsame thermische Dissoziation des Disalicylacetons in alkalischer Lösung, die die Endfarbe von der Temperatur abhängig macht. Diese Einflüsse wurden ermittelt. Wenn man sie berücksichtigt, lassen sich mit der Apparatur 10⁻⁸ Mol Aceton abtrennen und bestimmen.

K. Beyermann, Mainz

Verbesserung und Automation der Kreatininbestimmung

Kreatinin kann durch Fällung als Tetraphenyloborat-Verbindung unter Zusatz von Butylamin als Träger schnell und selektiv abgetrennt werden. — Die optimalen Fällungsbedingungen (pH = 3 ± 1; 10⁴-facher Tetraphenyloborat-Überschuß und 10³-facher Butylamin-Überschuß gegenüber Kreatinin, Zimmertemperatur) wurden unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem Kreatinin bestimmt [1]. Die Isolierung gelang mit Mengen von 0,01 bis 10³ µg Kreatinin/ml in Ausbeuten zwischen 97 und 100 %. Etwa 300 Substanzen, die als normale Bestandteile biologischen Materials oder als Pharmaka eine Rolle spielen, beeinflußten die Ausfällung nicht. Die wenigen mitfallenden Verbindungen störten die anschließende Bestimmung praktisch nicht. Dazu wurde der Niederschlag in Dimethylformamid gelöst und die Rotfärbung, die Kreatinin nach Pikratzusatz liefert, spektralphotometrisch bestimmt. — Eiweiß mußte durch Fällung mit Trichloressigsäure abgetrennt werden, wobei die Kreatininverluste weniger als 1 % betrugen. Andere Abtrennungsverfahren (Ionen austausch, Adsorption an Fullererde) ergaben schlechtere Ausbeuten. — Eine programmgesteuerte Apparatur ermöglichte 10 vollautomatische Kreatininbestimmungen in der Stunde.

F. C. den Boer, Vlaardingen (Niederlande)

Verwendung von mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel-Dünnschichten

Substanzen mit CC-Doppelbindungen können mit Silberionen Komplexe bilden. Deshalb kann man solche Substanzen an Kieselgel-Dünnschichten trennen, die mit Silbernitrat imprägniert wurden.

Auf den schnell herzustellenden Dünnschichten lassen sich 0,10 bis 100 mg Substanzgemisch rasch und leicht trennen, nachweisen und quantitativ isolieren.

Beispiele derartiger Analysen sind die Trennung von Fettsäure-methylestern gleicher Kettenlänge aus Sojaöl, die sich

[1] K. Beyermann, Z. analyt. Chem., im Druck.

in der Zahl der Doppelbindungen unterscheiden, die Analyse einer Mischung von Triglyceriden aus Linol-, Öl- und Stearin säure, sowie die Analyse einer Mischung von acetylierten Methylsterolen.

Dünnschichtchromatographische Trennung von Sterin-acetaten

J. W. Copius-Peereboom, Leiden (Niederlande)

Mischungen tierischer und pflanzlicher Fette wurden durch Identifizierung der vorhandenen Sterin-Typen analysiert. Dazu eignet sich die Dünnschichtchromatographie mit umgekehrter Phase an Kieselgel G, das mit Undecan (K_p = 190–220 °C) imprägniert ist. Durch Entwicklung mit Essigsäure/Acetonitril (25:75) konnten die Acetate von β -Sito sterin, Stigmaterin, Cholesterin, Desmosterin und $\Delta^{9(1)}$ -Dehydroergosterin als kleine, halbkreisförmige Banden erhalten werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten hängen von der Zahl der C-Atome minus Zahl der Doppelbindungen ab; sie eignen sich daher zur Identifizierung unbekannter Sterin-Typen. Allerdings haben einige Sterin-Paare gleiche R_F -Werte, z. B. Cholesterin/Brassicasterin, Ergosterin/7-Dehydrocholesterol. Diese „kritischen Paare“ wurden nach Kaufmann durch Zusatz von 0,5 % Brom zum Laufmittel getrennt.

Die kritischen Paare lassen sich ebenfalls an Kieselgel G-Schichten, die mit Silbernitrat imprägniert sind, trennen. Beispiele sind Dihydrocholesterin/Cholesterin, Δ^7 -Cholesterin/Cholesterin, Δ^7 -Cholesterin/5-Dihydroergosterin und Lanosterin/Agnosterin. Als Lösungsmittel dient Chloroform/Leichtbenzin/Essigsäure (25:75:0,5). Die Sterine mit der größeren Anzahl Doppelbindungen zeigen dabei niedrigere R_F -Werte.

Colorimetrische Submikrobestimmung von Brom in organischen Substanzen

T. R. F. W. Fennell und J. R. Webb, Farnborough, Hants. (England)

Sulfophthalein-Farbstoffe zeigen in stark saurer Lösung eine sehr intensive Absorption zwischen 500 und 550 m μ . Wenn Bromid und Bromat in dieser sauren Farbstofflösung miteinander reagieren, wird die Intensität der Absorptionsbande entsprechend dem Bromid-Gehalt verringert. Besonders gut eignet sich o-Kresolsulfophthalein (Kresolrot) für diese Brombestimmung.

In Lösungen mit unterschiedlichem Farbstoffgehalt wurden Bromid-Mengen von 2–10, 5–20 und 10–40 µg (Abweichungen 0,08, 0,12 bzw. 0,16 µg) bestimmt. Innerhalb dieser Grenzen waren die Eichkurven linear. Außer Chlorid und Jodid stören Ionen in den Mengen, wie sie bei Submikroanalysen vorkommen, die Bestimmung nicht, wenn Oxydationsmittel und Reduktionsmittel abwesend sind.

Die Analyse von Arzneistoffen in biologischen Flüssigkeiten mit der Tropäolinmethode

A. Häussler und P. Hajdú, Frankfurt/Main-Höchst

Die Eigenschaft vieler basischer Arzneistoffe, mit Tropäolin-00 chloroformlösliche Komplexe zu bilden, gestattet quantitative und qualitative Analysen [2]. Im Autoanalyser [3] konnten kinetische Vorgänge mit dieser Methode kontinuierlich re-

[2] A. Häussler u. P. Hajdú, Arzneimittel-Forsch. 12, 411 (1962).

[3] A. Häussler u. P. Hajdú: Wandel in der chemischen Technik, Hanser, München 1963, S. 112.

gistriert werden, z. B. die Esterspaltung von Lokalanästhetika in niedrigen Konzentrationen (10–50 µ/ml) im Serum. Die berechneten Zersetzungskonstanten zeigten, daß die Hydrolysegeschwindigkeit stark speziesabhängig ist. Dieser Befund entspricht gut den Literaturangaben [4].

Die Komplexbildung ermöglicht außerdem die selektive Extraktion der basischen Arzneistoffe aus Körperflüssigkeiten. Durch Fluorimetrie der Extrakte konnten weniger als 10⁻⁶ g der Arzneistoffe erfaßt werden.

Automatische Kopplung der Dünnschicht-Chromatographie mit der Gas-Chromatographie

R. Kaiser, Ludwigshafen

Mit steigendem Molgewicht der Substanzen steigt die Unsicherheit der qualitativen Aussage der Gas-Chromatographie stark an.

Hier hilft die automatische Kopplung des Gas-Chromatographie-Gerätes mit der Dünnschicht-Chromatographie. An den umgebauten hochgeheizten Ausgang eines (temperaturprogrammierten) Gas-Chromatographen wird eine Dünnschichtplatte angeschlossen, die, vom Schreiber oder nach Zeit gesteuert, verschoben wird. Die Substanz einer jeden kleinen Zone und die Summe der dazwischenliegenden Spuren werden als je ein Startfleck auf der Dünnschichtplatte durch punktähnliche Kühlung niedergeschlagen oder werden – auch ohne Kühlung – kontinuierlich als Strich in der Dünnschicht adsorbiert. Die Dünnschichtplatte wird wie üblich mit Laufmitteln entwickelt. Die den einzelnen Zonen entsprechenden Substanzen werden jetzt nochmals, und zwar prinzipiell anders chromatographiert. Hierbei kann eine weitere Zerlegung stattfinden. Die entwickelte Dünnschichtplatte wird mit äußerst stoffspezifischen chemischen Reagentien behandelt. Das fertige Dünnschicht-Chromatogramm liefert in Verbindung mit dem Gas-Chromatogramm eine Fülle meist überraschender zusätzlicher Aussagen und hilft oder ermöglicht erst, die gaschromatographische Analyse qualitativ richtig zu beenden. Die automatische Kopplung ist einer diskontinuierlichen gemeinsamen Anwendung von Gas- und Dünnschicht-Chromatographie überlegen. Sie dient auch der Kontrolle von Fehlerquellen (Zersetzung, irreversible Adsorption, Umwandlungen in Säule, Detektor und Probengeber sowie bei präparativen Arbeiten).

Zur Reaktion von Nucleotiden und Nucleinsäuren mit Diazoniumsalzen

H. Kössel, München

Wie Zillig und Verwoerd [5] am Beispiel der Reaktion von Hydroxylamin mit s-RNA zeigten, sind chemische Methoden zum basenspezifischen Abbau oder zur basenspezifischen Modifikation von Nucleinsäuren für die Sequenzanalyse nützlich. Unter diesem Aspekt wurde die Einwirkung von Diazoniumsalzen auf Nucleotide und Nucleinsäuren untersucht.

Als Diazoniumsalze wurden diazotierte 1.4-Sulfanilsäure, diazotiertes 2.4-Dichloranilin, diazotiertes p-Nitranilin und diazotierte 4-Nitranilin-3-sulfansäure in 3- bis 10-fachem Überschuß bei 2 °C eingesetzt. Die Reaktionen mit den in Nucleinsäuren vorkommenden Nucleotiden Guanylsäure (Gp), Adenylsäure (Ap) und Cytidylsäure (Cp) lassen sich gut durch die Extinktionszunahmen zwischen 370 und 440 mµ und durch Hochspannungspaperelektrophorese verfolgen.

Mit diazotierter 1.4-Sulfanilsäure reagieren Gp, Ap und Cp; Gp reagiert am raschesten und quantitativ. Cp setzt sich nur zu etwa 20 % um. Uridyl- und Thymidylsäure reagieren nicht. Die pH-Optima liegen bei 10,2 (Gp) und 10,7 (Ap, Cp). Daß es sich bei den entstehenden Farbstoffen nicht oder nur zum

[4] R. Muschawek: Lokalanästhesie u. Lokalanästhetika. Thieme, Stuttgart 1959, S. 103.

[5] W. Zillig, D. W. Verwoerd u. K. Kohlhage, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 332, 184 (1963).

geringen Teil um echte Azoprodukte, sondern um Diazoamino-Derivate mit der Triazenstruktur R¹-N=N-NH-R² handelt, geht aus folgenden Befunden hervor:

1. Die Farbstoffe spalten sich in schwachsäurem Medium in die Ausgangskomponenten.
2. Die Farbstoffe zeigen optische pK_a-Werte bei 11,9 (Gp) und 9,0 (Ap, Cp).
3. Die Farbstoffbildung unterbleibt in Gegenwart von Formaldehyd, welcher mit den Aminogruppen reagiert.

Der Farbstoff mit Ap wird am raschesten wieder gespalten. Bei der Rückspaltung des Gp-Produktes bildet sich z.T. Xanthidylsäure, das Desaminierungsprodukt von Guanylsäure.

Entsprechend verlaufen Umsetzungen von diazotierter 1.4-Sulfanilsäure mit RNA und DNA. Cytidylsäure reagiert nicht.

Im Gegensatz dazu beobachteten Beer und Moudrianakis [6] mit einer diazotierten Naphthylamintrisulfonsäure eine basispezifische Kupplung an DNA.

Mit den Diazoniumsalzen von 2.4-Dichloranilin, p-Nitranilin und 4-Nitranilin-3-sulfansäure reagieren nur die Purin-nucleotide, wiederum setzt sich Gp vor Ap um. Die pH-Optima für beide Nucleotide liegen mit allen drei Diazoniumsalzen bei 8,5.

Anwendungen der NMR-Spektroskopie zur Analyse organischer Verbindungen mit bekannten funktionellen Gruppen

N. van Meurs, Amsterdam (Niederlande)

a) Hochaufgelöste NMR-Spektren dienten zur Unterscheidung von primären, sekundären und tertiären monobasischen Säuren und zur quantitativen Analyse binärer Gemische dieser Säuren;

b) von primären, sekundären und tertiären einwertigen aliphatischen Alkoholen und zur quantitativen Analyse binärer und ternärer Gemische dieser Alkohole.

Die drei Typen der monobasischen Säuren lassen sich nach der Multiplettstruktur und nach dem Intensitätsverhältnis der α-CH₂- und α-CH-Protonenresonanzsignale unterscheiden, vorausgesetzt, daß diese nicht von β-Proton-Multiplets überlappt werden. Die Signale werden auf das Carboxyl-Protonenresonanzsignal bezogen. Zur quantitativen Analyse binärer Säure-Mischungen wird das Intensitätsverhältnis bestimmt.

Bei der Analyse von Alkoholen bildet die Vorbereitung der Probe einen wesentlichen Teil des Verfahrens: sie soll bewirken, daß der Protonenaustausch des Hydroxylprotons praktisch zum Stillstand kommt [7]. Dann unterscheiden sich die drei Alkoholtypen in der Mannigfaltigkeit des OH-Signals und in der chemischen Verschiebung. Sie hängt vom Lösungsmittel und von der Temperatur ab.

Ein zweites Verfahren, das auf dem Vergleich von Peakhöhen basiert, liefert in geeigneten Fällen Ergebnisse von gleicher Genauigkeit (± 5 % abs.).

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Rekombination organischer Säuren

H. W. Nürnberg, Jülich

Mit der elektrochemischen Methode der High Level Faradaic Rectification [8] wurden erstmalig die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Rekombination für 12 kon-

[6] M. Beer u. E. N. Moudrianakis, Proc. nat. Acad. Sci. USA, 48, 409 (1962).

[7] Der Protonenaustausch wird unterdrückt, indem man die Substanzen sorgfältig neutralisiert.

[8] H. W. Nürnberg u. G. C. Barker, Naturwissenschaften 51, 191 (1964).