

not or only to a limited extent miscible with the first phase, makes it possible to separate various water soluble substances due to their different distribution tendency between the two phases. This has found wide application not only for the analysis of amino acids and peptides, but also of, e.g., organic acids of plants¹, sugars², creatine³, flavine nucleotides⁴, and the lower volatile fatty acids⁵.

In order to make possible a much broader application of the partition chromatography method, BOSCOFF⁶ has suggested the use of cellulose acetate, which has absorbed a certain amount of an organic solvent, as the stationary phase. However, we did not find any examples in the literature.

We attempted to apply the principle of partition chromatography for analysis of the higher fatty acids and used the paper strip modification. Filter paper strips (Schleicher & Schuell, No. 595) are treated with diluted vulcanized rubber latex, dried in air, rinsed with alcohol and acetone, and stored in the latter solvent until use. When the rubber content was approximately 30% on a dry weight basis the strips had not lost their porous structure, thus enabling organic solvents to move along by capillary forces.

Strips prepared in this way serve well for the separation of esters of higher fatty acids as is shown in the following table, where approximate R_F values for the ethyl esters of six fatty acids in different solvents are recorded. The rubber acts as the stationary "solvent" phase. Moreover, by using a solvent mixture containing a polar and a less polar component, e.g. methanol and benzene, the rubber may also act as a carrier for the less polar solvent by a sort of "salting out" effect. One considerable difficulty which needs to be overcome is the present lack of a suitable colour reaction to trace the ester spots. So far, their detection has been found possible by immersing the dried strips in a solution of Sudan IV in 50% acetone/water for a short period, when the esters become visible as red spots on a slightly less coloured background. To obtain reproducible results the use of perfectly uniform strip material is necessary. As will be seen from the table, the differences between the R_F values of the esters are so pronounced that separation is fairly easily effected if the necessary precautions are taken. The reproducibility is great enough to enable the different fatty acids to be identified from the R_F value. For quantitative purposes two parallel runs should be made since losses will occur during staining.

Ester	Approximate R_F Value	
	Methanol	Methanol/ Acetone 1:1
Ethyl stearate	0.20	0.35
Ethyl palmitate	0.28	0.60
Ethyl myristate	0.39	—
Ethyl laurate	0.49	—
Ethyl oleate	—	0.52
Ethyl erucate	—	0.28

¹ J. W. H. LUGG and B. T. OVERELL, Nature 160, 87 (1947). — F. A. ISHERWOOD, Biochem. J. 40, 688 (1946).

² S. M. PARTRIDGE, Nature 158, 270 (1946). — A. E. FLOOD, E. L. HIRSH, and J. K. N. JONES, Nature 160, 86 (1947).

³ G. A. MAW, Nature 160, 261 (1947).

⁴ J. L. GRAMMER, Nature 161, 349 (1948).

⁵ S. R. ELSDEN, Biochem. J. 40, 252 (1946).

⁶ R. J. BOSCOFF, Nature 159, 342 (1947).

Work is proceeding on further fatty acid esters, on the use of other solvents and of other suitable polymers, on the more sensitive detection of the ester spots, and on the perfection of the method for quantitative analysis of fatty acid esters and lipid constituents.

It is evident that this modification of partition chromatography is very promising in regard to the resolution of mixtures of water-insoluble organic substances in general.

J. BOLDINGH

Research Laboratory Unilever N.V., Zwijndrecht, Holland, April 12, 1948.

Résumé

En appliquant du caoutchouc (ou bien un autre polymère) sur le papier filtre, la méthode chromatographique à partition peut être considérablement amplifiée de manière à rendre possible la séparation des substances non solubles dans l'eau. Le caoutchouc représente donc la phase stationnaire, le dissolvant organique, la phase mobile. Il est fait mention de quelques applications de cette méthode pour séparer les différents esters éthyliques des acides gras.

Beitrag zur Kenntnis oxydierter Stärke

In einer früheren Arbeit¹ wurde über eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Karbonylgruppen in Oxyzellulose durch Oxydation berichtet.

Zum qualitativen Nachweis von Karboxylgruppen in Oxyzellulose wurden als Reagens aromatische Diamine benutzt (Diaminreaktion²). Dabei wurden die Diamine von den Karboxylgruppen durch Addition gebunden und nach anschließender Diazotierung und Kuppelung zu Farbstoffen entwickelt.

In Fortsetzung dieser Arbeit befaßte ich mich mit der quantitativen Bestimmung der Karboxylgruppen in der Oxyzellulose. Es wurde Benzidin benutzt, welches in analoger Weise gebunden wird. Die gefundenen Werte wurden als *Benzidinzahl* ausgedrückt.

F. MÜLLER³ bestätigte mit seiner Überprüfung die Angaben HALLERS, daß eine Reihe von bisher bekannten Reaktionen zum Nachweis von Oxyzellulose bei der Bestimmung von oxydierter Stärke nicht anwendbar sind. Viele dieser Reaktionen werden bei Temperaturen ausgeführt, die höher sind als die Quellungstemperatur der Stärke.

Die beiden Methoden: 1. Nachweis von Oxyzellulose mit Hilfe von aromatischen Diaminen und 2. Charakterisierung des Oxydationsgrades durch Bestimmung der Karbonyl- und Benzidinzahl versuchte ich nun auch bei den durch Oxydation modifizierten Stärken anzuwenden. Ich fand, daß die Oxymation zur Bestimmung von Aldehyd- und Ketogruppen bei oxydierten Stärken mit Erfolg benutzt werden kann. Gleichzeitig wurde mittels aromatischer Diamine die Anwesenheit von Karboxylgruppen in den oxydierten Stärken nachgewiesen. Auf analoge Art wie bei der Oxyzellulose erfolgte auch bei der oxydierten Stärke die quantitative Bestimmung der Karboxylgruppen durch Feststellung des gebundenen Benzidins.

Einer besonderen Untersuchung wurden auch die Lösungen oxydierten Stärken in kalter Normalnatronlauge unterzogen. In diesen alkalischen Lösungen versuchte ich die Ausfällung der oxydierten Stärke durch Zugabe

¹ M. u. M. KRAJCINOVIC, J. App. Chem. (Moscow) 19, 424 (1946).

² M. u. M. KRAJCINOVIC, J. Text. Inst. 38, t. 11 (1947).

³ F. MÜLLER, Helv. chim. acta 29, 21 (1946).

von Alkohol. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, wieviel Alkohol erforderlich ist, um den Beginn einer Niederschlagsbildung hervorzurufen. Es wurde dabei gefunden, daß die erforderlichen Alkoholkonzentrationen proportional mit dem Anwachsen des Oxydationsgrades ansteigen (s. Tabelle).

Übersicht der für die oxydierte Stärke charakteristischen Zahlen

Konzentration des zur Oxydation der Stärke proben verwendeten H_2O_2	Charakteristische Zahlen				Beginn der Niederschlagsbildung (Alkoholkonzentration in Vol. %)	
	Kupferzahl	Karbonylzahl	Benzidin Zahl	COOH %		
1	12 %	7,70	6,72	6,90	0,169	43
2	6 „	4,95	3,64	4,74	0,115	38
3	4 „	3,19	2,66	3,45	0,084	30
4	2 „	1,54	1,12	2,39	0,058	20

Experimenteller Teil

Die Versuche wurden an oxydierten Kartoffelstärken (*Amylum solani*) ausgeführt, welche durch Behandlung mit Wasserstoffsuperoxid verschiedener Konzentration (2–12%) gewonnen wurden. Zu je 10 g Stärke wurden bei jeder Probe 40 ml H_2O_2 in der angegebenen Konzentration zugesetzt. Die Operation erfolgte in einem gedeckten Becherglase bei Zimmertemperatur und nahm 17 Tage in Anspruch. Der Inhalt wurde von Zeit zu Zeit umgerührt. Dann wurde die Flüssigkeit durch Dekantieren abgegossen und die oxydierte Stärke mit Alkohol ausgewaschen. Zur vollkommenen Entfernung der letzten Reste von anhaftendem H_2O_2 wurden den Proben dreimal je 10 ml Alkohol zugesetzt und jedesmal die bearbeitete Substanz unter geringem Erwärmen (50°) zur Trockne gebracht.

Die Bestimmung der Karbonylzahl in den oxydierten Stärken wurde folgendermaßen vorgenommen: Zu etwa 1 g Oxyamylum wurden 20 ml einer 0,1 n Hydroxylaminchlorhydratlösung und 10 ml 0,1 n NaOH zugesetzt. Mit der frisch bereiteten Reagenslösung war die Oxymation schon nach 20 Minuten bei gewöhnlicher Temperatur vollendet. Durch Titration mit 0,1 n Salzsäure wurde der Überschub des bei der Oxydation nicht aufgebrauchten NH_2OH bestimmt, wobei Methylorange als Indikator diente. Zum Vergleich wurde ein unter den gleichen Bedingungen ausgeführter blinder Versuch angestellt.

Die Berechnung der Karbonylzahl erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\text{CO-Zahl} = \frac{2,8(a-b)}{e}.$$

Dabei ist a die Anzahl ml 0,1 n Salzsäure, die bei dem blinden Versuche verbraucht wurde, b die Anzahl ml 0,1 n Salzsäure, die bei dem Oxydationsversuch verbraucht wurde, und e die Abwaage der oxydierten Stärke in Gramm.

Somit drückt die Karbonylzahl in Milligramm die Menge an Karbonyl (CO) aus, die in einem Gramm oxydieter Stärke enthalten ist.

Ermittlung der Benzidin Zahl zum Zwecke der quantitativen Bestimmung der COOH-Gruppen in den durch Oxydation modifizierten Stärken: 1–2 g oxydieter Stärke werden in einem mit eingeschliffenem Stöpsel versehenen Kolben gebracht. Sodann gibt man 100 ml 0,001 M-Lösung Benzidin hinzu. Nach 50stündiger Einwirkung – oder bei ständigem Schütteln schon nach 4 Stunden – werden von der Lösung genau 50 ml abpipettiert und hierin die Diazotierung des Benzidinüberschusses durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgt eine Zugabe von 6 ml 10%iger HCl- und 4 ml 5%iger $NaNO_2$ -Lösung. Nach 20 bis 30 Minuten ist der Diazotierungsprozeß beendet. Durch Zugabe von Natriumazetat wird der Überschuß an HCl neutralisiert. Das auf diese Art erhältene tetrazotierte Benzidin wird quantitativ an R-Säure gekuppelt, indem man 30 ml 0,02 M-Lösung hinzugibt. Nach 5–10 Minuten ist die Kuppelung beendet und man verdünnt mit Wasser auf 1000 ml. Unter Anwendung einer blinden Probe wird die so entstandene Farblösung mit dem Duboscq-Kolorimeter geprüft. Die zum Vergleich herangezogene Farblösung wird auf die gleiche Art aus 50 ml 0,001-M-Originalbenzidinlösung entwickelt. Die Benzidin Zahl drückt in Milligramm die Menge an addiertem Benzidin

aus, die in 1 g oxydieter Stärke enthalten ist. (Die gleiche Reaktion kann in modifizierter Form zum qualitativen Nachweis von oxydieter Stärke angewendet werden. Zu diesem Zwecke könnten neben Benzidin auch noch andere aromatische Diamine (p-Phenylendiamin, Tolylendiamin usw.) verwendet werden, die nach Addition an die oxydierte Stärke durch Diazotierung und Kuppelung an Entwickler (β -Naphthol, 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon u.dgl.) zu Farbstoffen entwickelt werden können.)

Die Tabelle zeigt die charakteristischen Zahlen, wie sie bei den einzelnen oxydierten Stärken gefunden wurden. Sie enthält ferner die Angaben über die Alkoholkonzentrationen, welche eine Niederschlagsbildung in den alkalischen Lösungen einzelner oxydieter Stärkeproben herbeiführen.

Schlußfolgerung: Oxydierte Stärken enthalten Keto- und Karboxylgruppen. Zu ihrer Bestimmung wurden Verfahren ausgearbeitet, die sich bereits bei der quantitativen Bestimmung dieser Gruppen in der Oxyzellulose bewährt haben.

M. KRAJČINOVIC

Institut für organische Technologie, Technische Fakultät der Universität Zagreb (Jugoslawien), den 28. November 1947.

Summary

Oxidized starches contain keto groups and carboxyl groups. A procedure for their determination is described which already has proved satisfactory for the quantitative determination of these groups in oxycellulose.

The Effect of Ultrasonic Vibration on Benzopyrene

The carcinogenous effect of benzopyrene is well known. Generally it is applied dissolved in a lipoid-dissolving fluid, and the solution is usually dropped several times in series onto the hairless skin of animals. Tumors are caused almost in 100% of the cases.

It was a question whether benzopyrene injected intravenously could equally produce a cancer. This problem became important during Dr. BERENCSI's proceeding investigations, and its solution has significance from the point of view of further experiments.

For the experiments, it was necessary to dissolve benzopyrene in water. This became possible by ultrasonic irradiation produced by GARAY's oscillator¹. The instrument worked with a frequency of 300 kHz, the intensity of the high-frequency current being 450 mA. The voltage used was 13,0 kV, the time of irradiation 60 min. By ultrasonic vibrations benzopyrene could be brought into a bluish-green fluorescent colloidal solution. This solution was stable for weeks. Under the fluorescence microscope the colloidal solution showed a lively fluorescent, seemingly microcrystalline Brownian movement.

In our experiments about 0.10 g benzopyrene was dissolved in 5 cm³ of water. This solution was injected intravenously into rabbits and mice. Mice received once a week 0.10 cm³ of the solution, rabbits 3.0 cm³. Number of the injections was 4–6. After treatment the animals were observed for a long time. Mice were observed till their death. Dissection took place in all cases. In the organs of the animals no tumorous pathological changes were ever found. During the treatment no mouse died. Death occurred for other reasons 3–11 months after treatment. The rabbits continued to live for 1½ years and no pathological changes were observed. The experiments had to be left unfinished on account of war difficulties.

¹ K. GARAY, M. Orv. Arch. 44, 5 (1943).