

Die Mikroanalysen verdanken wir unserm mikroanalytischen Laboratorium unter Leitung von Herrn Dr. H. Wagner.

Die UV.-Spektren wurden zum Teil auf einem Beckman-DK-2-Spektrographen registriert, zum Teil mit einem Beckman-DU-Spektrographen punktweise gemessen.

Die IR.-Spektren wurden auf einem Spektrographen Perkin-Elmer, Modell 21, aufgenommen (NaCl-Prisma, Resolution 927, Speed 1 Min./ μ , Suppr. 2, Response 1—1).

SUMMARY.

The pK values (in methylcellosolve), the ultraviolet and infrared spectra of a number of pyrazolidine-3,5-dione derivatives and some related compounds have been measured and are discussed.

These data are used to prove the structure of γ -hydroxy-phenylbutazone [1,2-diphenyl-4-(γ -hydroxy-n-butyl)-pyrazolidine-3,5-dione] (II). This compound rearranges easily and reversibly to δ -caprolactone- α -carboxy-N,N'-diphenylhydrazide (V).

Wissenschaftliche Laboratorien und analytisches Laboratorium
der Firma J. R. Geigy AG., Basel.

51. Über eine Methode zur Analyse ^{14}C -markierter Verbindungen durch nasse Verbrennung

von J. Rutschmann und W. Schöniger.

(25. I. 57.)

Vor einigen Jahren hat eine Arbeitsgruppe des Brookhaven National Laboratory¹⁾ eine Methode zur Analyse von ^{14}C -markierten Verbindungen beschrieben, bei der man die Substanz im Sauerstoffstrom verbrennt, aus den Verbrennungsgasen das Wasser und das Kohlendioxyd unter vermindertem Druck fraktioniert kondensiert und nacheinander manometrisch bestimmt. Die Radioaktivität des Kohlendioxyds wird anschliessend z. B. in einem Gaszählrohr gemessen. Wir haben nun diese elegante Methode, die sich in unserem Laboratorium in leicht abgeänderter Form²⁾ ausserordentlich bewährt hat, für die Analyse von biologischem Material und von Lösungen durch Kombination mit der nassen Verbrennung nach *van Slyke* abgeändert

¹⁾ R. C. Anderson, Y. Delabarre & A. A. Bothner-By, Anal. Chemistry **24**, 1298 (1952).

²⁾ Wir benützen die in der C-H-Mikroanalyse allgemein verwendete Verbrennungsröhr-Füllung nach Pregl. Es erwies sich, dass die darin zur Reduktion der Stickoxyde enthaltene Bleidioxydzone bei 180° auch unter den Bedingungen der vorliegenden Methode (Hochvakuum) ihren Zweck zufriedenstellend erfüllt und dass gute C,H-Werte erhalten werden. Durch diese Änderung wird der von Anderson für die Verbrennung von stickstoffhaltigen Substanzen vorgeschriebene, relativ komplizierte Kupferreduktor überflüssig; sämtliche Substanzen können nach der selben Technik verbrannt werden, und die Analysen werden wesentlich abgekürzt und vereinfacht.

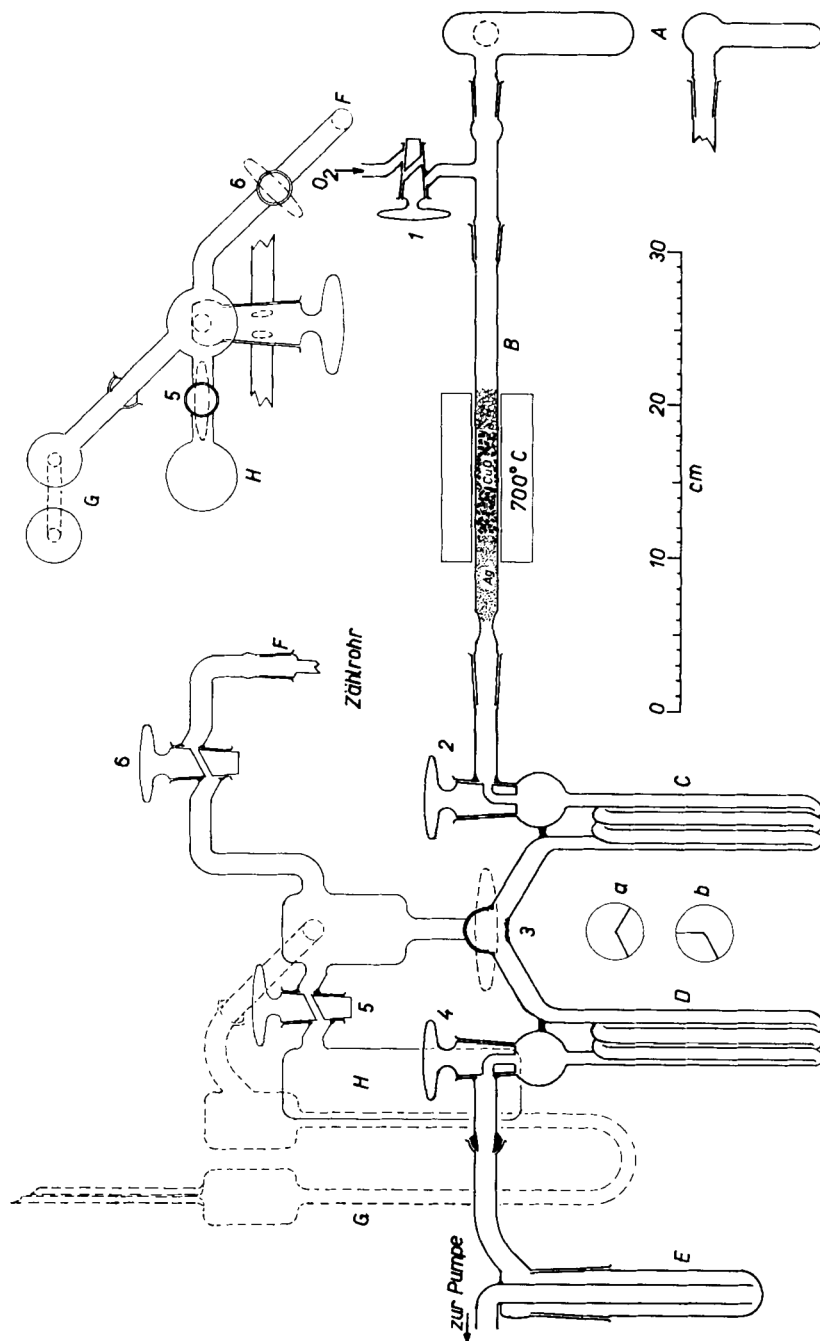


Fig. 1.

Verbrennungsapparatur.

A. Oxydationskölblechen; B. Quarzverbrennungsröhr mit Ofen; C. Kühlfalle (festes CO₂-Aceton); D. Kühlfalle (flüssige Luft); E. Kühlfalle (zur Pumpe); F. Zählrohranschluss; G. Manometer; H. Zusatzvolumen.

und vereinfacht. Wir berichten im folgenden über die von uns seit mehr als zwei Jahren verwendete Apparatur und Analystechnik.

Die Verbrennungsapparatur (Fig. 1) entspricht im Kondensations- und Mess- teil (links von Hahn 2) bis auf einige konstruktive Verbesserungen an Kühlfallen und Hähnen den Angaben von *Anderson* und Mitarb. Das hier nur angedeutete Zweiflüssigkeitsmanometer G wurde weitgehend nach deren Vorschrift hergestellt. Da auf den Wasserstoffwert bei der nassen Verbrennung verzichtet werden muss, ist die Falle C ständig mit Kohlendioxydschnee-Aceton auf -80° gekühlt und dient zur Kondensation von Verunreinigungen des Kohlendioxyds.

Der Verbrennungsteil besteht aus dem kippbaren Oxydationsgefäß A (vgl. auch Fig. 3), der Sauerstoffzuleitung und einem Quarzverbrennungsrohr, dessen auf 700° geheizte Zone mit zwei je 3 cm langen Schichten von Kupferoxyd und dazwischen mit 3 cm platinierter Quarzwolle gefüllt ist. Anschliessend ist eine 5 cm lange Rolle von Silberdrahtnetz angebracht. Dieses Verbrennungsrohr sichert die vollständige Verbrennung flüchtiger Zersetzungsprodukte (CO , Essigsäure, Methan), die bei der nassen Oxydation gewisser Verbindungen entstehen können³⁾.

In Fig. 2 ist die kleine Apparatur abgebildet, die uns zum bequemen Aufbewahren und Abfüllen der hygroskopischen Oxydationsmischung dient. Fig. 3 zeigt ein für die Analyse gefülltes Kippkölbchen.

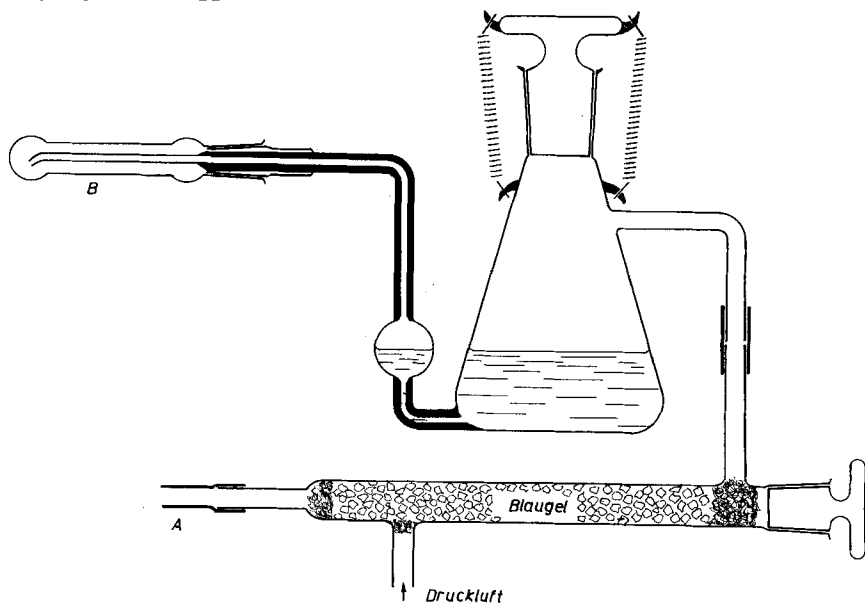


Fig. 2.

Abfüllgefäß für Oxydationsmischung.

Als Vakuumpumpe dient eine rotierende, zweistufige Ölpumpe mit Gasballast (Modell *Leybold* D 2), welche über die immer mit flüssiger Luft gekühlte Falle E mit der Apparatur verbunden ist. Das benötigte Vakuum beträgt 0,005–0,001 mm Hg.

Analysenmethode: *Reagentien*: 1. Schwefelsäure-Phosphorsäure-Mischung nach *van Slyke* und Mitarb.⁴⁾. — 2. Kaliumjodat-Kaliumdichromat-Mischung 2:1⁴⁾. — Sauerstoff, über CuO bei 500° und Natronkalk gereinigt.

³⁾ *H. Lieb & H. G. Krainick*, *Mikrochem.* **9**, 367 (1931).

⁴⁾ *D. D. Van Slyke, J. Plazin & J. R. Weisiger*, *J. biol. Chemistry* **191**, 299 (1951).

Ausgangslage (vgl. Fig. 1): Die Falle E ist in flüssiger Luft, die Falle C in Trockeneis-Aceton gekühlt. Ein Zählrohr wird bei F angeschlossen. Die Hähne 1, 4, 5, 6 und der Zählrohrhahn sind offen, der Dreiweghahn 3 in Stellung a und der Hahn 2 geschlossen. Man pumpt bis 0,005 mm (3–5 Min.) und notiert zur Kontrolle den Leerstand des Manometers.

Füllung des Kippkölbchens (vgl. Fig. 3): Feste Substanzen werden im Platinschiffchen eingewogen und in den weiteren Schenkel des Kölbchens eingeworfen. Von Lösungen werden 1 oder 2 cm³ mit der Pipette eingefüllt und im Vakuum eingedampft (event. Gefriertrocknung). Dann werden 300 mg festes Oxydationsgemisch (angenähert mit einem Messlöffelchen aus Glas dosiert) beigelegt. Die Kappe B wird vom Abfüllgerät (Fig. 2) abgenommen, das Röhrchen in die Öffnung des Kippkölbchens eingeführt und durch Zudrücken des Gummischlauches A die Säure zum Ausfliessen in den mit einer 2-cm³-Marke versehenen, engeren Schenkel gebracht. Das Kölbchen wird in der Stellung von Fig. 3 an die Verbrennungsapparatur angeschlossen (Fig. 1, A), nachdem man den Schliff mit wenig Apiezon gefettet hat; bei flüchtigen Analysensubstanzen wird der grössere Schenkel mit Trockeneis-Aceton gekühlt. Man schliesst 1 und 6, öffnet 2 und pumpt 3 Min.

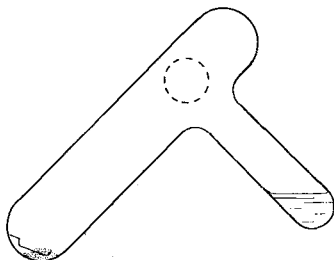


Fig. 3.

Oxydationskölbchen.

Verbrennung: Man schliesst 4 und lässt durch vorsichtiges Drehen des geritzten Hahnes 1 Sauerstoff bis zu einem Manometerstand von 20–25 cm eintreten. Dann schliesst man 1 und 2, öffnet 6 und pumpt den Messteil der Apparatur während der nun folgenden Verbrennung wieder aus (3–4 Min.).

Das Oxydationskölbchen wird gekippt, bis der grössere Schenkel senkrecht steht und die Säure in diesen fliesst. Man erhitzt, anfangs vorsichtig, mit einer leicht bewegten Mikroflamme 3 Min. zum Kochen, so dass die Säure bis fast zur Öffnung des Kölbchens hinaufsieht. Man schliesst 6, kühlt Falle D mit flüssiger Luft und lässt nun die Verbrennungsgase durch sehr vorsichtiges Öffnen von 2 (geritzt) ausströmen, so dass das Manometer nie mehr als 2,5 cm über seinen Leerstand steigt. Man evakuiert bei voll geöffnetem Hahn 2 während 3 Min., schliesst diesen dann und pumpt noch 1 Min.

Messung: Man liest den Leerstand des Manometers ab (Stand 0), bringt darauf den Dreiweghahn 3 in Stellung b, entfernt die Kühlung von D und erwärmt die Falle durch Eintauchen in Wasser von Zimmertemperatur. Nach 1 Min. wird der Manometerstand abgelesen (Stand 1). Nun öffnet man 6, kühlt den untersten Teil des Zählrohres mit flüssiger Luft, schliesst nach 1 Min. 6 wieder und liest den Manometerstand ab (Stand 2⁵).

Nun wird der Zählrohrhahn (vgl. die folgende Mitt.) um 180° gedreht und das Zählrohr kann abgenommen werden. Es ist nach Auffüllen mit Argon-Methan 9:1 auf Atmosphärendruck im wesentlichen zur Zählung bereit.

An der Verbrennungsapparatur öffnet man Hahn 1, nimmt das Kippkölbchen A ab und schliesst bei F ein neues Zählrohr an, worauf die Hähne wieder in Ausgangsstellung gebracht werden.

⁵) Wenn dieser mehr als einige mm über Stand 0 liegt, muss mit der Anwesenheit nicht kondensierbarer Gase infolge Undichtigkeit der Apparatur gerechnet werden, wodurch natürlich die Transfergeschwindigkeit des Kohlendioxyds durch die Kapillare in das Zählrohr wesentlich vermindert wird.

Bei der Analyse von Substanzen hoher Aktivität (Zählungen von ca. 15000 cpm und mehr) empfiehlt es sich, die Pumpzeit für das Zählrohr am Anfang der Analyse um einige Min. zu verlängern. Unter diesen Umständen ist auch bei den höchsten Aktivitäten, die mit der verwendeten Zählordnung ohne wesentliche Koinzidenzverluste noch gemessen werden können (200000 cpm) bei einer anschliessenden Background-Bestimmung mit Verbrennung inaktiver Substanz kein „Memory-Effekt“ der Apparatur festzustellen.

Die Analysen werden mit Einwagen von 2–8 mg, am besten mit 3–5 mg Substanz durchgeführt. Bei verd. Lösungen wird das Trockengewicht durch Zugabe eines inaktiven Trägers in passender Menge ergänzt. Es ist im Prinzip möglich, die für eine Analyse nötige Substanzmenge zu verkleinern, wenn die Empfindlichkeit des Manometer-teils durch Ausschaltung des Raumes H (Schliessen von 5) gesteigert wird. In diesem Falle ist natürlich eine neue Eichung des Manometers vorzunehmen.

Das Manometer wird durch eine Serie von Testverbrennungen (Benzoessäure) geeicht, so dass die Steighöhe S pro mg Kohlenstoff bekannt ist. Der Kohlenstoffgehalt einer Einwaage E ist dann

$$(\text{Stand 1} - \text{Stand 0}) \cdot 100/S \times E \%$$

und die in das Zählrohr übergeführte Menge Kohlenstoff

$$(\text{Stand 1} - \text{Stand 2})/S \text{ mg.}$$

Die spezifische Aktivität einer Substanz in cpm/mg ergibt sich zu

$$\text{spez. Akt.} = \frac{(Z - BG)F}{E} \times \frac{\text{Stand 1} - \text{Stand 0}}{\text{Stand 1} - \text{Stand 2}} \text{ cpm/mg,}$$

worin Z = Zählung in cpm, BG = Background in cpm und F die Rohrkonstante (vgl. folgende Arbeit) ist.

Die erhaltenen C-Analysenwerte sind auf 0,3% genau. Es gibt Substanzen, z. B. Polynitro-polyhalogen-benzole, die sich nicht nass verbrennen lassen, sondern beim Erhitzen der Säure in den kalten Teil des Verbrennungssystems abdestillieren. Nitroverbindungen (z. B. Pikrin- und Pikrolonsäure) ergeben zu hohe C-Werte, da die Stickoxyde teilweise mit dem Kohlendioxyd kondensiert werden. Diese Einschränkungen der Methode spielen aber bei biochemischen Arbeiten keine Rolle.

Bei geschickter Zeiteinteilung dauert eine Analyse ohne Zählung 17–20 Min.

Zusammenfassung.

Es wird eine Apparatur beschrieben, mit der eine schnelle und genaue Bestimmung des Kohlenstoffes und der ^{14}C -Radioaktivität in festen oder flüssigen Substanzen, Lösungen und in biologischem Material ausgeführt werden kann.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel.