

Neuere Methoden zur Trennung und kontinuierlichen Messung von ^{14}C -Verbindungen in der Gasphase

Radio- und Reaktions-Gaschromatographie [*]

VON DR. F. DRAWERT UND O. BACHMANN

FORSCHUNGSINSTITUT FÜR REBENZÜCHTUNG GEILWEILERHOF, ABTEILUNG BIOCHEMIE
UND PHYSIOLOGIE, SIEBELDINGEN/PFALZ

Bei biochemischen Arbeiten mit Leit isotopen ist es häufig vorteilhaft, die Proben in der Gasphase zu untersuchen. Hier kann die Selektivität gaschromatographischer Trennsäulen und die Empfindlichkeit der Detektoren sowohl zum Nachweis der gaschromatographischen Fraktionen als auch zur Bestimmung ihres radioaktiven Anteils genutzt werden. Es empfiehlt sich, die gaschromatographisch getrennten Stoffe zur Messung der Radioaktivität stets in die gleiche chemische Verbindung zu überführen. Die Methoden für ^{14}C -Verbindungen können sinngemäß auf ^3H - und ^{35}S -Verbindungen übertragen werden.

I. Einleitung

Der radiochemische Nachweis einer Verbindung ist empfindlicher als andere Methoden, da der Zerfall einzelner Atome registriert werden kann. Unter günstigen Bedingungen lassen sich noch Aktivitäten von 10^{-7} bis 10^{-9} mC [**] messen [1,2].

Gute radiochemische Nachweismethoden und gaschromatographische Trennverfahren sind in ihrer Leistungsfähigkeit vergleichbar. Beide Methoden wurden technisch weit entwickelt, und Bauelemente der zugehörigen Meßapparaturen lassen sich ideal kombinieren. Vereinigt man gaschromatographische Detektoren mit Strahlungsdetektoren, die beide kontinuierlich arbeiten, so können im Durchfluß gleichzeitig die Gesamtmenge einer Verbindung und ihr radioaktiver Anteil bestimmt werden. Die Umwandlung nicht-flüchtiger Verbindungen in flüchtige Derivate ist dabei eine wichtige Aufgabe [3]. Außerdem besteht die Möglichkeit, in einem der Trennsäule vorgeschalteten Reaktionsraum Umsetzungen mit radioaktiv markierten Verbindungen auszuführen und die Produkte im unmittelbar anschließenden System zu trennen [4].

Zur Radio-Gaschromatographie werden Flüssigkeits-Szintillationszähler, Ionisationskammern sowie Geiger-Müller- oder Proportional-Gaszählrohre verwendet.

[*] Gleichzeitig 6. Mitteilung über Reaktions-Gaschromatographie. 5. Mitteilung: F. Drawert u. G. Kupfer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 90 (1962).

[**] 1 mC = $3,7 \cdot 10^7$ Zerfälle/sec.

[1] Vgl. H. Götte in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1955, Bd. III/1, S. 751ff; G. Herrmann in Schwegk-Turba: Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie. 2. Aufl., Springer, Heidelberg 1961, S. 121–304.

[2] H. Simon u. F. Berthold, Atomwirtschaft 7, 498 (1962).

[3] Literatur-Zusammenstellung bei: F. Drawert, R. Felgenhauer u. G. Kupfer, Angew. Chem. 72, 555 (1960).

[4] F. Drawert: Gas Chromatography 1962. Butterworth, London 1963, S. 347; dort weitere Literatur.

II. Strahlungsdetektoren

1. Flüssigkeits-Szintillationszähler [5]

In Verbindung mit der Gaschromatographie kommt einer kontinuierlichen Methode zur ^{14}C -Messung Bedeutung zu, bei der die gaschromatographisch getrennten Fraktionen in der Lösung eines Szintillators (Diphenyl-oxazol in Toluol) aufgefangen werden. Das Trägergas treibt die Szintillationsflüssigkeit im Kreislauf an einem Photomultiplier vorbei und jeder Zuwachs an Radioaktivität wird integral angezeigt [6]. Bei einem anderen Verfahren werden die Fraktionen in einem Fraktions-sammler in Siliconöl mit Anthracen als Szintillator aufgefangen und diskontinuierlich vermessen [7]. Auch spiralförmig angeordnete Kunststoffe, die Szintillatoren enthalten, wurden für Durchflußmessungen von ^{14}C -Verbindungen verwendet [8].

Evans und Willard [9] brachten gaschromatographische Fraktionen in die Nähe eines Szintillator-Kristalls (Nachweis von 10^{-13} g $\text{CH}_3^{82}\text{Br}$ und 10^{-15} g $\text{CH}_3^{80}\text{Br}$). Herr und Mitarbeiter [10] gaben Ampullen mit Bestrahlungsprodukten in einen Ampullenbrecher (gaschromatographisches Aufgabegerät) und führten die Fraktionen mit einer Glasschnecke an einem Szintillator [NaJ(Tl)-Kristall] vorbei. Auch Bestrahlungsprodukte des Benzols [11] und andere β -Strahler [12] wurden nach gaschromatographischer Trennung mit der Szintillationsmethode gemessen.

[5] E. Rapkin, Atomwirtschaft 7, 508 (1962).

[6] G. Popjak, A. E. Lowe, D. Moore, L. Brown u. F. A. Smith, J. Lipid. Res. 1, 29 (1959); Chem. Abstr. 54, 10409 (1960); vgl. A. E. Lowe u. D. Moore, Nature (London) 182, 133 (1958).

[7] A. Karmen u. H. R. Tritch, Nature (London) 186, 150 (1960).

[8] B. L. Funt u. A. Hetherington, Science (Washington) 129, 1429 (1959).

[9] J. B. Evans u. I. E. Willard, J. Amer. chem. Soc. 78, 2908 (1956).

[10] W. Herr, F. Schmidt u. G. Stöcklin, Z. analyt. Chem. 170, 301 (1959).

[11] R. M. Lemmon, F. Mazzetti, F. L. Reynolds u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 78, 6414 (1956).

[12] A. A. Cordus u. I. E. Willard, J. Amer. chem. Soc. 79, 4609 (1957).

Der Übergang von der Gas- in die Flüssigphase zur Messung der Radioaktivität ist nicht unbedingt notwendig, da zahlreiche sehr empfindliche Methoden für die Messung von ^{14}C in der Gasphase zur Verfügung stehen.

2. Ionisationskammern

In Verbindung mit der Gaschromatographie wurden Durchfluß-Ionisationskammern verschiedener Bauart bekannt. *Cacace* [13] beschrieb eine Methode, bei der dem Gasstrom hinter einer Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle (als gaschromatographischem Detektor) und vor der Ionisationskammer weiteres Trägergas zugemischt wird. Dadurch kann, unabhängig von den gaschromatographischen Bedingungen, der Fluß durch die Ionisationskammer konstant gehalten werden (10 l/Std.; 100 ml Kammervolumen). Ein hoher Gasdurchfluß verhindert die Kondensation von Verbindungen mit Siedepunkten bis zu 155 °C. Die minimale nachweisbare Aktivität liegt bei $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{C}$. Zur Messung der Radionuclide ^3H , ^{14}C und ^{35}S wurden verschiedene heizbare Kammern beschrieben [13–16]. Die Ergebnisse werden günstiger, wenn man die gaschromatographisch getrennten Fraktionen vor Passage der Ionisationskammer bei 650 °C zu CO_2 verbrennt [17] oder mit Zink/Nickeloxyd bei 650 °C in Methan und Wasserstoff [18] umwandelt.

Durchfluß-Ionisationskammern werden vorwiegend mit Schwingkondensator-Meßverstärkern betrieben, die in ihrer Empfindlichkeit sehr von den Eingangswiderständen abhängen. Für ^{14}C und ^3H werden Grenzemphindlichkeiten von ca. $10^{-2} \mu\text{C}$ angegeben [15,16]. Die Nulleffekte [*] von Ionisationskammern sind von Natur aus hoch [2] und können nicht wesentlich reduziert werden. Eine Beheizung der Kammer wirkt sich ungünstig auf den Nulleffekt aus; häufig tritt Nulllinienwanderung auf. Ein Vorteil der Ionisationskammern ist, daß auch relativ hohe Aktivitäten (0,1 bis 1 mC) ohne weiteres gemessen werden können.

3. Geiger-Müller- und Proportional-Gaszählrohre

Zur Messung weicher β -Strahler haben sich in den letzten Jahren Geiger-Müller- und vor allem Proportional-Gaszählrohre eingeführt. Beide Typen werden bei der Gaschromatographie als Durchfluß-Zählrohre verwendet.

Emmett und Mitarbeiter [19] studierten das Verhalten von ^{14}C -Äthylen und nicht markiertem Propylen an Katalysa-

[13] *F. Cacace u. I. Ul-Haq*, Science (Washington) 131, 732 (1960).

[14] *L. H. Mason, H. J. Dutton u. L. R. Bair*, J. Chromatogr. 2, 322 (1959).

[15] *H. E. Dobbs*, J. Chromatogr. 5, 32 (1961).

[16] *H. W. Scharpenseel*, Angew. Chem. 73, 615 (1961).

[17] *F. Cacace, A. Guerino u. I. Ul-Haq*, Ann. Chimica 50, 915 (1960); Chem. Abstr. 55, 3269 (1961).

[18] *F. Cacace*, Ann. Chimica 50, 931 (1960); Chem. Abstr. 55, 4338 (1961); *F. Cacace u. G. Ciranni*, Atti Accad. naz. Lincei, Rend., Cl. Sci. fisiche, mat. natur. 28, 865 (1960); Chem. Abstr. 55, 1342 (1961).

[*] Als Nulleffekt bezeichnet man den Impuls-Untergrund einer Meßanordnung.

[19] *R. I. Kokes, H. Tobin u. P. H. Emmett*, J. Amer. chem. Soc. 77, 5860 (1955).

toren (Mikroreaktionsgefäß vor der Trennsäule), indem sie die Produkte gaschromatographisch trennten und ihre Radioaktivität mit einem Geiger-Durchflußzähler [20] bestimmten. *Cacace* und Mitarbeiter [21] trennten die nach Bestrahlung von Pentan/ $^{14}\text{CO}_2$ entstandenen Säuren gaschromatographisch und oxydierten die Fraktionen zu CO_2 , das als Bariumcarbonat mit einem Geiger-Zähler stationär gemessen wurde. *Yanovskii* und Mitarbeiter [22] verwendeten Zähler mit dünnem Glimmerfenster. *James* benutzte Durchfluß-Zählrohre [23] oder ein Durchfluß-Proportionalzählrohr [24] (aus Kupfer und Messing, mit Isolatoren aus Polyäthylen und einem Zählrohr aus Wolfram als Anode) und bestimmte die Radioaktivität gaschromatographischer Fraktionen nach der Verbrennung zu CO_2 .

Eingehende Untersuchungen über Durchfluß-Proportionalzählrohre haben *Wolfgang* und *Rowland* [25] veröffentlicht; mit Helium/Methan betriebene Metall-Zählrohre zeigten gute Ergebnisse. Für innen versilberte Glaszählrohre (Volumen 10, 20 und 85 ml), mit einem Wolfram-Zählrohr, wurden genaue Betriebsbedingungen (Plateau; Zähl- und Trägergase; Auflösungsvermögen; Störungen) angegeben [26]. *Herr* und Mitarbeiter [10] verwendeten für γ -Strahler ein Gasdurchfluß-Zählrohr, durch dessen Zählvolumen eine Durchfluß-Kapillare geführt wird, oder ein Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr aus Edelstahl mit Teflon-Isolierungen und einem Wolfram-Zählrohr (0,05 mm Durchmesser), das bei einer Arbeitstemperatur von 210 °C einen Nulleffekt von 40 Imp./min zeigt [27]. *Lieser* und Mitarbeiter [28] brachten ein Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr (Glasrohr mit eingepaßter Edelstahl-Kathode und einem 26μ starken Wolfram-Zählrohr) zur Beheizung im Thermostatenraum eines Gaschromatographen unter.

III. Meßmethoden

Die genaue Messung schwacher β -Strahler setzt voraus, daß alle Proben in der gleichen chemischen Form vorliegen. Mißt man die Radioaktivität gaschromatographischer Fraktionen im Zählrohr, ohne sie in die gleiche chemische Verbindung zu überführen, so hängen die Zählausbeuten von der Menge und Struktur der Stoffe ab [26]. Nach *Simon* [2] gibt es keine Zählmethode, mit der jede beliebige ^{14}C -markierte Verbindung als solche empfindlich und gut reproduzierbar zu bestimmen ist. Wir haben daher gaschromatographische Fraktionen vor der Bestimmung ihrer Radioaktivität in Anlehnung an die Methode von *James* [24] und *Cacace* [17] zu CO_2

[20] *I. T. Kummer*, Nucleonics 3, 27 (1948).

[21] *B. Aliprandi u. F. Cacace*, Gazz. chim. ital. 89, 2268 (1959); Chem. Abstr. 55, 6364 i (1961).

[22] *M. I. Yanovskii, D. S. Kapustin u. V. A. Nogotkov-Ryutin*, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 9, 391 (1956); Chem. Abstr. 53, 7719b (1959).

[23] *A. T. James* in *D. Glick*: Methods of Biochemical Analysis. Interscience, New York 1960, Bd. 8, S. 1.

[24] *A. T. James u. E. A. Piper*, J. Chromatogr. 5, 265 (1961).

[25] *R. Wolfgang u. F. S. Rowland*, Analytic. Chem. 30, 903 (1958).

[26] *I. K. Lee, E. K. C. Lee, B. Musgrave, Yi-Noo Tang, I. W. Root u. F. S. Rowland*, Analytic. Chem. 34, 741 (1962).

[27] *H. I. Ache, A. Thiemann u. W. Herr*, Z. analyt. Chem. 181, 551 (1961).

[28] *K. H. Lieser, H. Elias u. F. Sorg*, Z. analyt. Chem. 191, 104 (1962).

verbrannt, oder, wie dies ähnlich von Zlatkis [29] beschrieben wurde, in Methan umgewandelt. Damit entfällt die Korrektur des Meßergebnisses, die bei der Messung verschiedenartiger radioaktiver Verbindungen infolge der unterschiedlichen Zählausbeuten notwendig ist [26]. Wie aus Abb. 5 (siehe unten) hervorgeht, ist für Gemische aus 20 bis 40 % Methan und 80 bis 60 % Wasserstoff die Plateaulänge und damit die Zählausbeute konstant.

Durch die Überführung der gaschromatographischen Fraktionen in einheitliche Verbindungen wird auch eine Beheizung des Zählrohres überflüssig. Selbst bei beheizten Zählrohren ist eine teilweise Kondensation und, damit verbunden, eine Kontamination des Zählrohres kaum zu vermeiden. Temperaturerhöhung führt zur Plateauverschiebung bei gleichzeitiger Plateauverflachung und zur Erhöhung des Nulleffektes. Außerdem verhalten sich inaktive Verbindungen beim Durchgang durch ein Zählrohr nicht indifferent sondern verursachen Pseudosignale und unkontrollierbare Nebeneffekte.

Als Trägergas wird der billige Wasserstoff am häufigsten verwendet. In Verbindung mit Gasdurchfluß-Proportionalzählrohren wurden bisher meist Argon [24], Helium [26, 27], Edelgase im Gemisch mit Methan und Propan, sowie Methan [28] oder Propan allein als Träger- und Zählgas benutzt. Lieser und Mitarbeiter [28] fanden mit Wasserstoff oder Argon als Zählgas kein Plateau. Wir konzentrierten uns auf Messungen mit Wasserstoff als Trägergas, gegebenenfalls unter Beimischung von Methan oder Propan als Zählgas. Die verschiedenen Versuchsanordnungen zeigt Abbildung 1.

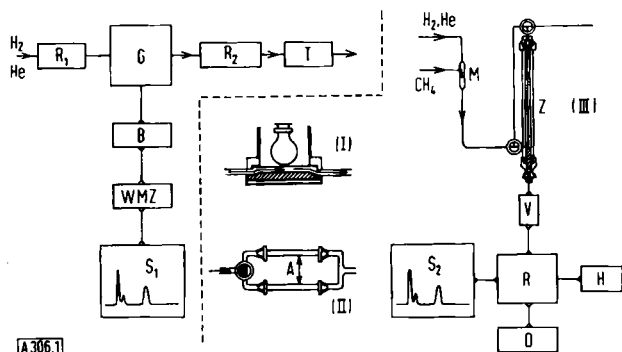


Abb. 1. Prinzip radio-gaschromatographischer Meßanordnungen. G = Gaschromatograph; B = Brückenstromversorgungsgerät (Siemens u. Halske, Karlsruhe); WMZ = Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle (Siemens); S₁ = Kompensations-Linienschreiber (Kompensograph Siemens); R₁, R₂ = Reaktionsräume; T = Trockenzelle.

Meßanordnungen:

- I = Endfenster-Durchflußküvette (siehe Abb. 2).
- II = Absorption von ¹⁴CO₂ nach Verbrennung gaschromatographischer Fraktionen; A = Absorptionsröhrchen.
- III = Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr (siehe Abb. 3). Z = Zählrohr; M = Mischzelle; V = Vorverstärker (FH 524); R = Zählapparat (FH 49); H = Hochspannungseinheit 5 kV (FH 505); D = Zeitdrucker (FH 449); S₂ = Potentiometerschreiber (FH 585).

FH = Gerät der Fa. Frieske u. Hoepfner, Erlangen-Bruck.

1. Versuchsanordnung I

Für orientierende Messungen erwies sich die Kombination einer Durchflußküvette mit einem Methan-Durchflußzähler (Abb. 2) als brauchbar. Die Küvette ist vom Zählraum durch ein dünnes Endfenster getrennt, so daß infolge der räumlichen Trennung von Träger- und Zähl-

[29] A. Zlatkis u. J. A. Ridgway, Nature (London) 182, 130 (1958).

gas das Meßergebnis von der Art des Trägergases weitgehend unabhängig ist. Die Küvette (Abb. 2) ist so gebaut, daß ihr Boden mäßig beheizt werden kann. Zur

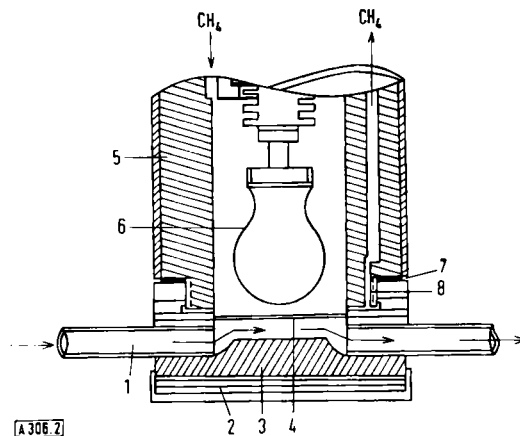


Abb. 2. Endfenster-Durchflußküvette und Methan-Durchflußzähler (FH 407) in Verbindung mit der Zählapparatur FH 49.

1 = Rohrschluß (Ermeto-Rohr, 8 mm Außendurchmesser, 1 mm Wandstärke); 2 = Bodenplatte; 3 = Strömungsprofil; 4 = Endfenster (goldbedampfte Hostaphanfolie, Flächengewicht ca. 0,8 mg/cm²); 5 = Kathode; 6 = Zählrohrscheife (Anode); 7 = Dichtung; 8 = Verschraubung.

Erzielung einer günstigeren Zählgeometrie können zwei Endfenster angebracht werden. Zwischen dem Volumen eines radioaktiven Eichgases und der gemessenen Impulszahl besteht eine lineare Proportionalität. Die Versuchsanordnung I ist vor allem für Respirations- und Assimilations-Messungen mit ¹⁴C-haltigen Gasen nützlich.

2. Versuchsanordnung II

Diese Anordnung gestattet die stationäre Messung von ¹⁴CO₂.

Dazu wird in den Auslaß des Gaschromatographen ein Kupferoxyd-Verbrennungssofen (R₂ in Abb. 1) geschaltet [30]. Kurze Siliconschläuche verbinden das Verbrennungsrohr (Quarz) mit der metallischen Rohrleitung des Gaschromatographen und mit dem nachgeschalteten Wasser-Absorptionsrohr (T in Abb. 1; Magnesiumperchlorat). Jede durch den gaschromatographischen Detektor angezeigte Substanz kann nach Verbrennung separat in einem Absorptionsröhrchen mit Natronkalk aufgefangen werden. Die Natronkalkröhrchen sind leicht auszuwechseln. Die Laufzeit einer Substanz vom Detektor bis zum Umstellhahn ergibt sich aus dem Volumen der Rohrleitungen und dem Gasstrom; sie kann mit einem Strahlungsdetektor ermittelt werden. Der Natronkalk wird in einer Glasapparatur [2, 31, 32] in zweiseitenkeligen, schwenkbaren Zersetzungsgefäßen [1] mit 89-proz. Phosphorsäure zersetzt und das ¹⁴CO₂ in der Gasphase bestimmt.

3. Versuchsanordnung III

Für kontinuierliche Messungen, vor allem mit Wasserstoff als Trägergas, wurde ein Gasdurchfluß-Proportionalzähler erprobt. Proportionalzählrohre haben gegenüber Geiger-Müller-Zählrohren die Vorteile kleiner Tot-

[30] F. Pregl u. H. Roth: Quantitative organische Mikroanalyse. 7. Aufl., Springer, Wien 1958.

[31] H. Simon, H. Daniel u. J. F. Klebe, Angew. Chem. 71, 303 (1959).

[32] F. Drawert u. O. Bachmann, unveröffentlicht.

zeit, erst bei hohen Zählraten auftretender Koinzidenzverluste und der Nachweisbarkeit von Primärelektronen verschiedenen Ionisationsvermögens. Ferner haben sie meist gute und relativ lange Plateaus [2, 33–36] und sind einfach herzustellen. Dies gilt auch für ein Zählrohr, das wir unter Beachtung der von Curran [37] angegebenen Konstruktionsmerkmale gebaut haben (Abb. 3).

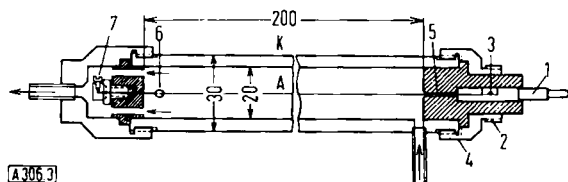


Abb. 3. Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr.

A = Anode (Zähldraht); K = Kathode (Zählrohrwand); 1 = Verbindungskontakt für Vorverstärker (FH 524); 2 = Gewinde für Zwischenstecker zum Vorverstärker; 3 = Fixierung des Zähldrahtes (Lötung); 4 = Überwurfmutter; 5 = Durchführung des Zähldrahtes durch den Teflon-Isolator; 6 = Glasperle; 7 = Spannvorrichtung für Zähldraht. Längenangaben bedeuten Millimeter.

Die Kathode besteht aus einem Messingzylinder von 20 mm Innendurchmesser. Die Innenfläche wird fein geschliffen, poliert und eventuell vergoldet. Als Zähldraht dient ein Platin-Iridium-Draht [*], der an einem Messingstift (1) angelötet ist, durch eine Teflon-Isolierung (Drehteil) mit Hilfe einer Glaskapillare (5) zentrisch geführt wird und kurz vor der gegenüberliegenden Teflon-Isolierung in einer Glasperle (6) endet. Die Glasperle vermeidet eine Verzerrung des elektrischen Feldes; in sie ist ein stärkerer Platindraht (0,4 mm) zur Halterung eingeschmolzen. Er geht zentrisch durch ein Teflonstück und endet in einer Spannvorrichtung (7). Die Strömungsrichtung des Zählgases ist in Abb. 3 durch Pfeile gekennzeichnet. Am Ein- und Ausgang sind Dreiweghähne angebracht, die eine Messung wahlweise im Durchfluß oder stationär gestatten. Der Messingstift, an dem sich der Zähldraht befindet, wird mit dem Vorverstärker verbunden. Zur Verminderung des Nulleffektes stellt man das Zählrohr senkrecht und umkleidet es mit einem Bleimantel (3 bis 10 mm Wandstärke). Die Höhe des Nulleffektes hängt vom Trägergas und der beigemischten Methanmenge ab. Charakteristik und Betriebsdaten sind durch Aufsetzen eines Prüfstrahlers[**] oder mit einem Eichgas ($^{14}\text{CO}_2/\text{CO}_2$) zu ermitteln.

Der Nulleffekt des Zählrohrs liegt bei Wasserstoff als Trägergas ab ca. 10 % Methan-Beimischung unter 100 Imp./min und verbessert sich mit steigenden Methanmengen (3,6 kV; Prüfstrahler). Unter gleichen Bedingungen wird die Zählrate [38] ab ca. 30 % Methan weitgehend konstant. Abbildung 4 zeigt die Plateaukurven bei abgestuftem Wasserstoff/Methan-Verhältnis und konstanter Strahlenquelle (Prüfstrahler). Trägt man das Mischungsverhältnis gegen die Plateaulänge auf, so ergibt sich das optimale Verhältnis Wasserstoff: Methan

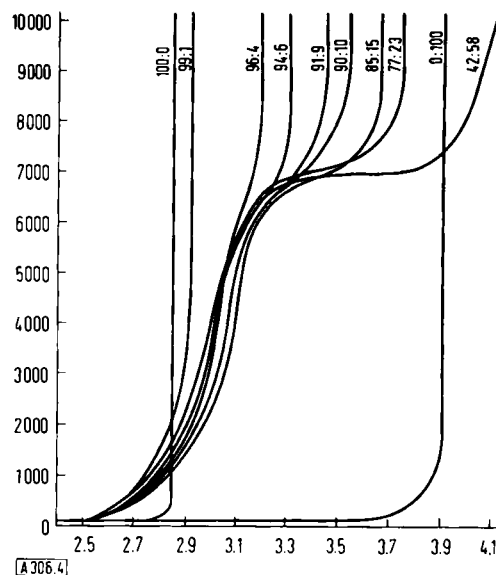


Abb. 4. Plateaukurven des in Abb. 3 gezeigten Gasdurchfluß-Proportionalzählrohrs bei aufgesetztem Prüfstrahler. Die Zahlen an den Kurven geben das Mischungsverhältnis (V/V) Wasserstoff: Methan an.

Ordinate: Zählrate [Imp./min].

Abszisse: Zählrohrpotential [kV].

(Abb. 5). Innerhalb dieses optimalen Bereichs (80 bis 60 % H_2 , 20 bis 40 % CH_4) besteht eine gewisse Pufferwirkung gegen Schwankungen der Gaszusammensetzung.

Die Geometrie des Zählrohrs (Innenvolumen 62,8 ml) gewährleistet eine relativ lange Verweilzeit des Gases im Zählraum. Dabei genügt die Ausspülzeit, um scharfe

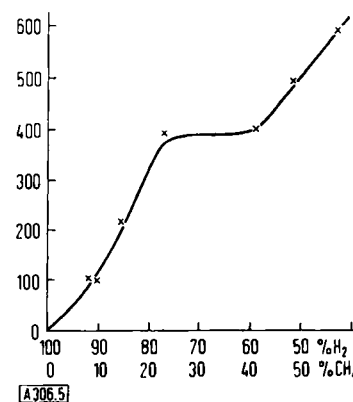


Abb. 5. Optimaler Arbeitsbereich des in Abb. 3 gezeigten Zählrohrs.

Ordinate: Plateaulänge [V].

Abszisse: Zusammensetzung des Zählgases.

Aktivitätsmaxima [4] zu erhalten. Die untere Nachweisgrenze liegt für ^{14}C bei $5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{C}$ (mit Propan als Zählgas: $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{C}$).

Zur Umwandlung gaschromatographischer Fraktionen in eine chemisch einheitliche Verbindung verwendeten wir zwei Verfahren: a) Verbrennung der organischen Substanz im Heliumstrom an CuO bei 700°C zu CO_2 und H_2O (Verbrennungsofen nach Pregl-Roth zur Stickstoffanalyse [30], R_2 in Abb. 1). Das H_2O -Absorptionsrohr, mit grobem $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ beschickt, war 10 bis 20 cm lang und 0,6 cm stark. b) Crackung organischer Sub-

- [33] K. H. Schweer u. E. Uhlmann, Atompraxis 7, 453 (1961).
 [34] R. F. Glascock: Isotopic Gas Analysis for Biochemists. Academic Press, New York 1954; Atomics 6, 329 (1955).
 [35] W. Bernstein u. R. Ballentine, Rev. Sci. Instruments 21, 158 (1950).
 [36] H. Kienitz u. D. Riedel, Z. analyt. Chem. 179, 93 (1961).
 [37] S. C. Curran in S. Flügge: Handbuch der Physik. Springer, Heidelberg 1958, Bd. 45, S. 174.
 [*] Draht aus Platin-Iridium (90:10) mit weitgehend konstantem Durchmesser von 0,08 mm. Heraeus, Hanau.
 [**] ^{137}Cs , 25 μC (5 mr/h).
 [38] Als Zählrate bezeichnet man die Zahl der Impulse pro Minute. Vgl. Friedländer-Kennedy: Lehrbuch der Kern- und Radiochemie. Thieme, München 1962, S. 218 ff.

stanzen bei 420 °C im Wasserstoffstrom an Raney-Nickel [39]. Das metallische Crackungsrohr hatte 10 mm Außen- und 8 mm Innendurchmesser und war 20 cm lang (R_3 in Abb. 1).

IV. Anwendungen der Radio- und Reaktions-Gaschromatographie

1. Mit Versuchsanordnung I lassen sich ^{14}C -markierte Alkohole aus Gäransätzen mit ^{14}C -Glutaminsäure-Zusatz orientierend untersuchen. Die Alkohole wurden mit Äther/Pentan (70:30) extrahiert, in Olefine übergeführt [3,40–42] und diese gaschromatographisch getrennt. Mit Versuchsanordnung II wurde die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Gärungsalkohole genauer analysiert. Die durch Extraktion mit Äthylchlorid

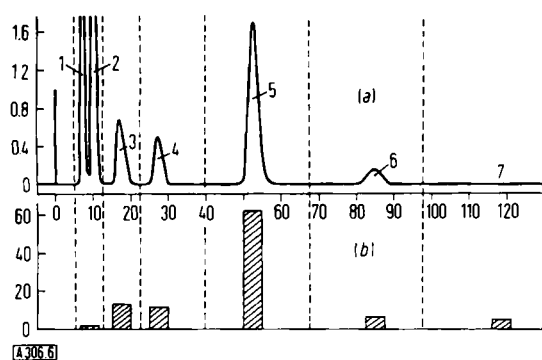


Abb. 6. Radio-gaschromatographische Analyse ^{14}C -markierter Verbindungen aus einem Hefe-Gärungsansatz mit ^{14}C -Glutaminsäure.

a) Gaschromatogramm, b) Radiogramm.

1 = Äthylchlorid; 2 = niedrigsiedende Anteile (Ester, Aldehyde, Methanol); 3 = Äthanol/i-Propanol; 4 = i-Butanol, 5 = i-Amylalkohol; 6 = n-Amylacetat, 7 = höhersiedende Anteile.

Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Wechsel der mit Natronkalk gefüllten CO_2 -Absorptionsrohre.

Trennsäule: 5,80 m langes Ermeto-Rohr (8 mm Außendurchmesser, 1 mm Wandstärke); Füllung: Dinonylphthalat/Sterchamol (20 + 100), dahintergeschaltet: ein 80 cm langes Rohr mit n-Weinsäureäthylester/Kieselgur (65 mesh) (20 + 100); 80 °C; 50 ml He/min; Strahlungsdetektor: Gasfüllzählrohr 85 ml (Fa. Berthold, Wildbad) in Kombination mit einer Apparatur nach Abb. 1.

Ordinaten: a) Schreiberausschlag [mV].

b) Aktivität [% der Summe der Einzelaktivitäten]

Abszisse: Zeit [min].

angereicherten Alkohole wurden gaschromatographisch getrennt, die Fraktionen verbrannt und das CO_2 an Natronkalk adsorbiert. Abbildung 6 zeigt die Verteilung der Radioaktivität.

2. Zur gaschromatographischen Analyse von Fettsäuren wurden diese mit Bortrifluorid/Methanol in die Methyl-ester übergeführt [43,44]. Mit ^{14}C -markierter Essigsäure

[39] Der Katalysator wurde aus Raney-Legierung (50% Al, 50% Ni; Schuchardt) hergestellt. Vgl. K. Wimmer in Houben, Weyl: Methoden der organischen Chemie. 4. Aufl., Thieme-Stuttgart 1955, Bd. IV/2, S. 173.

[40] F. Drawert, Vitis, Ber. Rebenforsch. 2, 172 (1960).

[41] F. Drawert u. K. H. Reuther, Chem. Ber. 93, 3066 (1960).

[42] F. Drawert u. G. Kupfer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 90 (1962).

[43] F. Drawert, H. J. Kuhn u. A. Rapp, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 84 (1962).

[44] L. D. Metcalfe u. A. A. Schmitz, Analytic. Chem. 33, 363 (1961).

sollte festgestellt werden, wie weit eine Veresterung schon bei Zimmertemperatur abläuft. Dazu wurde aus ^{14}C -Natriumacetat mit 89-proz. Phosphorsäure Essigsäure freigesetzt und Bortrifluorid/Methanol im Überschuß zugegeben. Die Veresterungsansätze konnten entweder über ein beheiztes Reaktionsgefäß (Messingrohr 10 cm lang, 8 mm Durchmesser) oder direkt vor die Trennsäule gegeben werden. Es ergab sich, daß die Veresterung erst im beheizten Reaktionsraum bei 180 °C vollständig verläuft.

3. Bei der Verseifung von ^{14}C -KCN zu ^{14}C -Formiat [45] war zu klären, ob diese Reaktion vollständig verläuft und ob flüchtige Nebenprodukte auftreten. Die gaschromatographisch-radiochemische Untersuchung der freigesetzten Ameisensäure oder ihres Methyl-esters ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) erwies, daß Ameisensäure in befriedigender Reinheit entsteht.

4. Zum Studium von Umesterungen wurde folgender Versuch ausgeführt: 10 ml Propionsäuremethylester, 10 ml Propionsäureäthylester, 0,2 ml 98-proz. Phosphorsäure und 0,94 mg ^{14}C -Natriumacetat [46] wurden 30 min unter Rückfluß gekocht. Proben des Ansatzes wurden gaschromatographiert, die Fraktionen zu Methan gecrackt und ihre Radioaktivität im Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr gemessen. Es zeigte sich, daß die Propionsäureester mit der markierten Essigsäure umestern (Abb. 7).

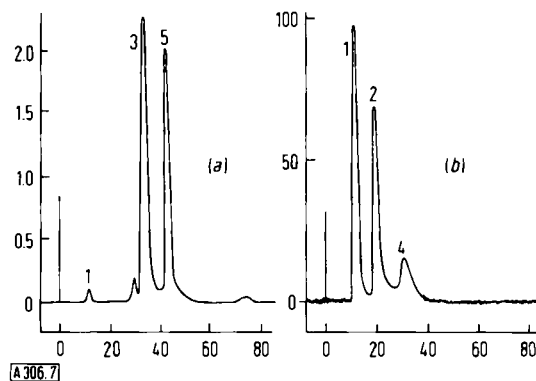


Abb. 7. Umesterung von Propionsäureestern mit ^{14}C -Essigsäure.

a) Gaschromatogramm; b) Radiogramm; 1 = Methylacetat; 2 = Äthylacetat; 3 = Propionsäuremethylester; 4 = Propylacetat; 5 = Propionsäureäthylester. Trennsäule: 5,20 m lang, Füllung: Polywax 2000/Kieselgur (65 mesh) (20 + 100); 80 °C; 52 ml H_2 /min. Strahlungsdetektor: Meßanordnung III; 17,4 ml CH_4 /min; $\text{H}_2 : \text{CH}_4 = 3 : 1$; 3,6 kV.

Ordinaten: Schreiberausschlag [mV].

Abszissen: Zeit [min].

5. Mit einem Gasdurchfluß-Proportionalzählrohr der Versuchsanordnung III, ohne Umwandlungseinheiten, wurde die $^{14}\text{CO}_2$ -Assimilation einer Rebe untersucht. Aus dem geschlossenen Versuchsraum wurden in gleichen Zeitabständen Gasproben entnommen und gaschromatographisch analysiert (Abb. 8).

[45] D. G. Grant u. H. S. Turner, Nature (London) 165, 153 (1950). Wir haben ^{14}C -KCN in 0,1-proz. wäßriger Lösung im Bombenrohr umgesetzt. Vgl. A. Murray u. D. L. Williams: Organic Syntheses with Isotopes. Interscience, New York 1958, Teil I, S. 31.

[46] Lieferant für 1- ^{14}C -Natriumacetat (27,6 $\mu\text{C}/\text{mg}$): Kernforschungszentrum Karlsruhe, Isotopenlaboratorium.

6. Die Wirksamkeit von Hydrierkatalysatoren bei verschiedenen Temperaturen kann man prüfen, indem man in einem Reaktionsrohr am Katalysator hydriert, die Produkte gaschromatographisch trennt und ihre Radioaktivität nach Crackung zu Methan [4] bestimmt.

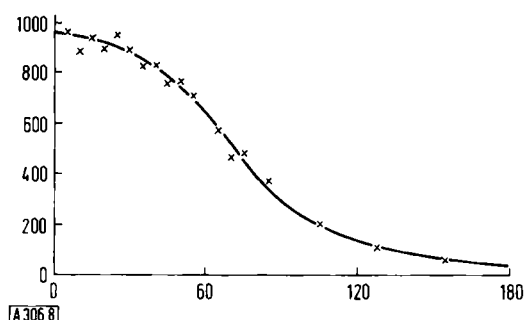


Abb. 8. Verlauf der Assimilation von $^{14}\text{CO}_2$ (Anfangskonzentration $0,913 \mu\text{C/ml CO}_2$) durch eine Rebe im geschlossenen Raum. Das Gasgemisch im Reaktionsraum bestand anfänglich aus 13,7 l Luft und 20 ml CO_2 .

Ordinate: Im Reaktionsraum noch vorhandenes $^{14}\text{CO}_2$ [Imp./(min·ml)].
Abszisse: Zeit [min].

Zusammenfassung

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß man mit Wasserstoff als Träger- und Zählgas unter Beimischung von Methan oder mit Helium/Methan gut reproduzierbare Ergebnisse erhält, wenn die gaschromatographisch getrennten Stoffe in Methan oder CO_2 übergeführt werden. Durch Steigerung der Empfindlichkeit und Genauigkeit der Strahlungsmessung in der Gasphase konnte der Aufwand an markiertem Material vermindert werden. Abgesehen von der damit verbundenen, teilweise erheblichen Kostensenkung wird auch die Strahlungsbelastung bei biologischen Versuchen geringer. Die vollständige Zerstörung der Analysesubstanz kann durch Strömungsteilung und Messung der Radioaktivität im Nebenschluß vermieden werden.

Herrn Prof. Husfeld danken wir für die Förderung unserer Arbeiten, die mit Unterstützung des Bundesministeriums für Atomkernenergie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt wurden.

Eingegangen am 11. März 1963 [A 306]

ZUSCHRIFTEN

Synthese und Eigenschaften von Tricyclo[3.3.2.0^{4,6}]deca-2.7.9-trien (Bullvalen)

Von Dr. Gerhard Schröder

Union Carbide European Research Associates, Brüssel

W. v. E. Doering und W. R. Roth [1] postulierten und diskutierten kürzlich Tricyclo[3.3.2.0^{4,6}]deca-2.7.9-trien (1), auch Bullvalen genannt. (1) soll optimale Möglichkeiten für schnelle und reversible Valenzisomerisierung zeigen. In der Terminologie von Doering und Roth ist (1) das Molekül mit der idealen fluktuierenden Struktur.

Bei Untersuchungen über das Verhalten von Cyclooctatetraen im basischen Medium [2] wurden zwei dimere Cyclooctatetraene isoliert, die schon W. O. Jones [3] beschrieben hatte. Die beiden Kohlenwasserstoffe $\text{C}_{16}\text{H}_{16}$ vom Fp = 53 und 76 °C haben die Strukturen (2) bzw. (3).

(3) nimmt beim Hydrieren 5 Mol Wasserstoff auf und bildet $\text{C}_{16}\text{H}_{26}$ [4], Fp = 52–54 °C. Das UV-Spektrum (3) zeigt ein Maximum bei 282 m μ (ϵ = 2300) und eine Schulter bei 232 m μ (ϵ = 4600). Seine Diels-Alder-Addukte (Maleinsäureanhydrid, Fumarsäurediäthylester, Acetylendicarbonsäureester) absorbieren im UV-Spektrum bei λ = 232 m μ (Schulter, ϵ = 3000–6000). Das Acetylendicarbonsäureesteraddukt zerfällt bei ca. 160 °C in Phthalsäuredimethylester und $\text{C}_{12}\text{H}_{12}$

(4) [4], Fp = 22 °C. (4) absorbiert im UV-Spektrum wiederum bei λ = 232 m μ (Schulter, ϵ = 2300). Hydrierung über Palladium ergibt $\text{C}_{12}\text{H}_{20}$ [4].

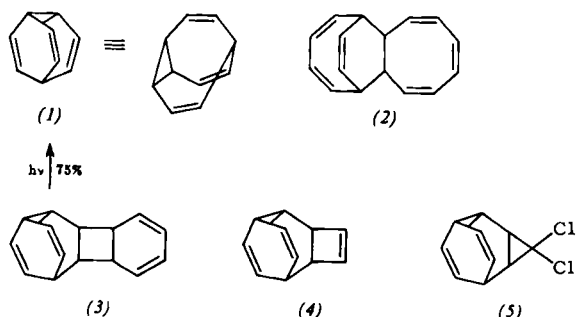
Bestrahlt man nun (3) in Äther mit UV-Licht, so entstehen $\text{C}_{10}\text{H}_{10}$ (1) [4] (75 %; Fp = 96 °C) und Benzol. Über Palladium wird (1) zu $\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ [4], Fp = 180 °C, hydriert. Durch Umsatz mit Natrium in flüssigem Ammoniak bei –75 °C und anschließende Zersetzung mit Methanol entsteht $\text{C}_{10}\text{H}_{12}$ [4], Fp = 45 °C. Das NMR-Spektrum macht als Struktur ein Bicyclo[3.3.2]-3.7.9-trien wahrscheinlich. Im UV-Spektrum absorbiert (1) bei λ = 238 m μ (Schulter, ϵ = 1700). Das IR-Spektrum ist relativ bandenarm. Der oxydative Abbau mit Ozon bei –75 °C in Methanol/Äther und anschließende Reduktion mit NaBH_4 und Veresterung mit Essigsäureanhydrid [5] führen zu $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$ [4], Fp = 58 °C. IR- und NMR-Spektrum stehen mit der Struktur eines cis-1.2.3-Tris(acetoxymethyl)cyclopropan in Einklang. Die NMR-Spektren von (1), (3), (4) und (5) [6] sind temperaturabhängig. (1) zeigt – als auffallendste Eigenschaft – bei 100 °C nur ein scharfes Protonenresonanzsignal bei τ = 5,8. Beim Abkühlen verbreitert sich diese Bande. Schon bei –25 °C zeigen sich zwei Banden, eine zentriert um τ = 4,3 mit der relativen Oberfläche 6, die andere zentriert um τ = 7,9 mit der relativen Oberfläche 4. Weiteres Abkühlen auf –85 °C verändert das Spektrum nicht. (1) bildet mit Dichlorcarben ($\text{CHCl}_3/(\text{CH}_3)_3\text{COK}$) ein Monoaddukt $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{Cl}_2$ (5) [4], Fp = 101 °C.

(1) zerfällt erst oberhalb 400 °C über ein noch nicht identifiziertes Zwischenprodukt in Naphthalin.

Nach vorläufigen Ergebnissen lagert sich (2) bei ca. 100 °C in (3) unter gleichzeitiger Bildung von Cyclooctatetraen um.

Eingegangen am 18. Juni 1963 [Z 537]

Auf Wunsch des Autors erst jetzt veröffentlicht



[1] Angew. Chem. 75, 27 (1963); Tetrahedron 19, 715 (1963).

[2] G. Schröder, Angew. Chem. 75, 91 (1963).

[3] W. O. Jones, Chem. and Ind. 1955, 16.

[4] Alle neuen Substanzen erbrachten gute Analysenwerte.

[5] Methode: A. J. Hubert, J. chem. Soc. (London), im Druck.

[6] Über alle temperaturabhängigen NMR-Spektren soll gesondert berichtet werden.