

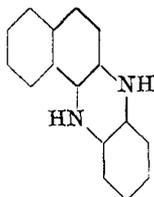
89. Fluorometrische und kolorimetrische Bestimmung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon

von M. Kofler.

(27. IV. 45.)

Bei der Prüfung der Spezifität der fluorometrischen Methode zur Bestimmung von Tocopherol¹⁾ wurde gefunden, dass auch 2-Methyl-1,4-naphthochinon, welches in enger chemischer Beziehung zum Vitamin K steht, mit o-Phenylendiamin zu einer fluoreszierenden Verbindung kondensiert werden kann. Das Kondensationsprodukt (im folgenden mit K.Pr. bezeichnet) konnte in Form von hellgelben Krystallen rein erhalten werden. Seine alkoholischen Lösungen zeigen eine sehr intensive blaue Fluoreszenz, die noch in einer Konzentration von 0,1 γ in 5 cm³ Alkohol wahrnehmbar ist. In wässrigen Säuren löst sich das K.Pr. ziemlich schwer, besser bei Alkoholzusatz, zu blau fluoreszierenden Lösungen. Die Lösung in konz. Schwefelsäure ist intensiv gelb gefärbt und zeigt blaue Fluoreszenz.

Auf Grund der Elementaranalyse und des Molekulargewichtes entspräche die Zusammensetzung der Verbindung einem Methyl-dihydro-naphthophenazin. Indessen handelt es sich hier um die Kondensation eines Para- und nicht eines Ortho-Chinons, weshalb die Bildung eines Dihydro-phenazins unwahrscheinlich ist, zumal das K.Pr. im Gegensatz zum Dihydro-naphthophenazin



(das entsprechende 2-Methylderivat war nicht zugänglich) nicht empfindlich gegen Sauerstoff ist. Es kann sich auch nicht um 2-Methylnaphthophenazin handeln, weil sich das K.Pr. im Gegensatz zum Naphthophenazin bei gewöhnlicher Temperatur mit *Raney*-Nickel als Katalysator nicht hydrieren lässt. Gegen die Annahme eines Dihydro-naphthophenazins spricht auch die Farbe der Fluoreszenz. Naphthophenazin fluoresziert blauviolett, Dihydro-naphthophenazin blaugrün (das gleiche gilt übrigens auch für Phenazin und Dihydro-phenazin); das K.Pr. fluoresziert aber nicht blaugrün, sondern blauviolett. Schliesslich wurde noch das Ultraviolettabsorptionsspektrum von

¹⁾ Kofler, M., Helv. **25**, 1469 (1942); **26**, 2166 (1943); **28**, 26 (1945).

Naphthophenazin und Dihydro-naphthophenazin aufgenommen und mit demjenigen des K.Pr. verglichen (Fig. 1). Im Gegensatz zum Naphthophenazin und Dihydro-naphthophenazin weist das K.Pr. im Gebiet von 3000—3200 Å zwei scharfe Banden auf.

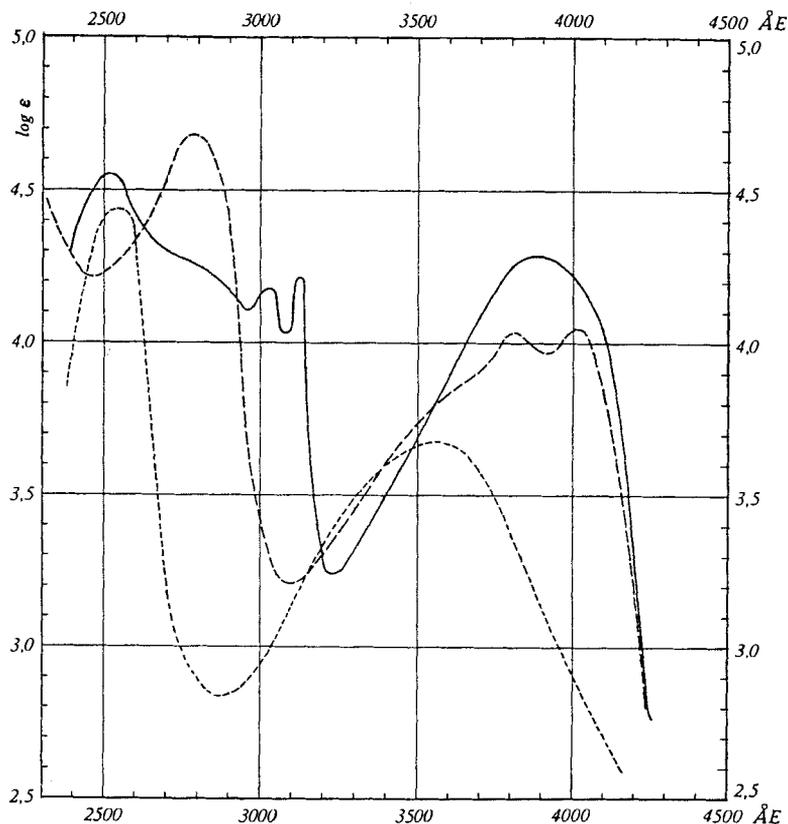


Fig. 1.

Ultraviolett Absorptions-Spektren von:

- Kondensationsprodukt von 2-Methyl-1,4-naphthochinon
 - - - - Naphthophenazin
 - · - · Dihydronephthophenazin
- Lösungsmittel: Äthylalkohol.

Wegen der Löslichkeit des K.Pr. in Säuren stört die Anwesenheit von 2-Methyl-1,4-naphthochinon die fluorometrische Bestimmung von Tocopherol nicht, weil das Phenazinderivat des Tocopherols nach der Kondensation mit Petroläther bei saurer Reaktion extrahiert wird, sodass das K.Pr. in der wässrigen Phase zurückbleibt.

Beim weiteren Studium dieser Reaktion zeigte sich nun, dass sich auf die Bildung des fluoreszierenden K.Pr. eine sehr empfindliche Bestimmungsmethode für 2-Methyl-1,4-naphthochinon gründen lässt.

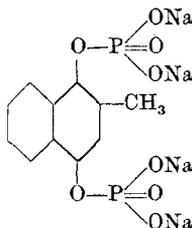
Dazu wird 2-Methyl-1,4-naphthochinon (im folgenden mit Chinon bezeichnet) mit einem grossen Überschuss an o-Phenylendiamin in Eisessig kondensiert. Die Kondensation wird durch Sauerstoff stark katalysiert, eine Beobachtung, die schon bei der Kondensation von Tocopherolrot zum Tocopherol-phenazinderivat gemacht worden war. Das K.Pr. wird alkalisch mit Petroläther extrahiert. In Petroläther fluoresziert die Verbindung schwach. Wird der Petroläther abgedampft und das K.Pr. in Alkohol aufgenommen, so zeigt sich, dass die Lösung starke Nebenfluoreszenzen aufweist im Vergleich zu den Lösungen, die aus reinem K.Pr. hergestellt wurden. Zur Elimination der diese Nebenfluoreszenzen verursachenden Stoffe wird das K.Pr. bei schwach saurer Reaktion aus dem Petroläther herausgeholt und die wässrige Lösung alkalisch mit Petroläther ausgeschüttelt. Bei der Bestimmung des Chinons im Blutplasma erwies sich gelegentlich eine weitere Reinigung als notwendig. Sie besteht entweder in einer chromatographischen Trennung an Aluminiumoxyd oder in einer Extraktion der die Nebenfluoreszenzen bewirkenden Stoffe mit einer Mischung von Petroläther-Butanol aus der sauren, wässrigen Lösung des K.Pr. Zur quantitativen Bestimmung des Chinons wird die Kondensation mit o-Phenylendiamin in der zu analysierenden Probe (bzw. deren Petrolätherextrakt) und gleichzeitig in einer Lösung mit bekanntem Chinongehalt ausgeführt, worauf die Kondensationsprodukte in methylalkoholischer Lösung miteinander verglichen werden, indem man sie durch Verdünnen auf gleiche Fluoreszenzhelligkeit bringt. Die Lösung des K.Pr. in Methylalkohol ist nicht haltbar, insbesondere geht die Fluoreszenz durch das Belichten mit der Quarzlampe schon nach wenigen Minuten merklich zurück. Es lassen sich daher keine stabilen Vergleichslösungen des K.Pr. herstellen, wie das bei der Bestimmung des Tocopherols als Phenazinderivat möglich ist¹⁾. Die angesäuerten Lösungen des K.Pr. in Alkohol sind zwar wesentlich stabiler, aber es machen sich dann weissliche Nebenfluoreszenzen störend bemerkbar. 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon fluoresziert in alkoholischer Lösung in gleicher Farbe, jedoch viel schwächer als das K.Pr.; es eignet sich wegen der Unbeständigkeit der Lösung nicht als Vergleichssubstanz. Die stabilen wässrigen Lösungen des Tetranatriumsalzes des Diphosphorsäure-esters von 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon zeigen eine mehr violette Fluoreszenzfarbe. Es gelang im Äsculin eine Verbindung zu finden, deren alkoholische, schwach angesäuerte Lösung in ähnlicher Farbe fluoresziert wie die alkoholische Lösung des K.Pr. Die Lösungen von Aesculin sind stabil und erlauben einen Satz von Vergleichslösungen abgestuften Gehaltes herzustellen. Es wurde gefunden, dass 1 γ Chinon zu einer Lösung führt, die ungefähr gleich stark fluoresziert wie 5 γ Äsculin. Bemerkte sei

¹⁾ Kofler, M., Helv. 25, 1469 (1942); 26, 2166 (1943); 28, 26 (1945).

noch, dass das Chinon bei der Bestimmungsmethode in etwa 50-proz. Ausbeute in das K.Pr. übergeführt wird, wie durch Vergleich mit Lösungen des rein hergestellten K.Pr. bestimmt werden konnte. Die alkoholischen Lösungen des K.Pr. neigen sehr zur Fluoreszenzauslöschung. So lässt sich die Fluoreszenz durch Einleiten von Sauerstoff reversibel löschen.

Die Kondensation von 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon (im folgenden mit Hydrochinon bezeichnet) führt zum gleichen Kondensationsprodukt, und zwar bleibt es sich auch bei der quantitativen Bestimmung gleich, ob man vom Chinon oder Hydrochinon ausgeht.

Zur fluorometrischen Bestimmung der Ester des Hydrochinons sind diese zuerst zu verseifen. Wir haben entsprechende Versuche ausgeführt mit dem Diphosphorsäure-ester, dessen Tetranatriumsalz in wässriger Lösung zu Injektionszwecken verwendet



wird. Der Ester ist durch nichtoxydierende Säuren recht schwer, in Gegenwart eines Oxydationsmittels aber sehr leicht verseifbar. So wird er durch eine wässrige, stark saure Cer(IV)-sulfatlösung schon bei gewöhnlicher Temperatur in 1 Minute quantitativ gespalten. Auch durch Salpetersäure ist er leicht hydrolysierbar (im Gegensatz dazu ist der Bernsteinsäure-ester alkalisch leicht verseifbar.) Das entstandene Chinon wird durch Äther oder Petroläther, eventuell vorhandenes Hydrochinon durch Äther leicht extrahiert. Der vom Lösungsmittel befreite Rückstand wird dann mit o-Phenylendiamin auf das K.Pr. verarbeitet.

Zur Bestimmung des Chinons bzw. Hydrochinons im Blutplasma und Harn werden diese mit Äther extrahiert. Es lässt sich noch 1 γ Chinon bzw. Hydrochinon in 10 cm³ Plasma oder Harn mit einer Genauigkeit von ca. $\pm 20\%$ bestimmen. Zur Bestimmung des Phosphorsäure-esters im Plasma und Harn werden diese mit einer sauren Lösung von Cer(IV)-sulfat versetzt und das gebildete Chinon mit Äther oder Petroläther extrahiert. Durch passende Wahl der Säurekonzentration lässt sich verhindern, dass Eiweiss aus dem Plasma ausfällt, sodass ein vorangehendes Enteiweissen unnötig ist. Durch Zusatz einer bekannten Menge des Tetranatriumsalzes zu Harn bzw. Plasma konnte erkannt werden, dass bei der Bestimmung Verluste bis zu 40% (Harn) bzw. 60% (Plasma) auftreten, was beim Chinon und

Hydrochinon nicht der Fall ist. Der Phosphorsäure-ester muss also durch Harn- bzw. Plasmabestandteile zum Teil gebunden und dadurch der Verseifung entzogen worden sein. Der diese Verluste bewirkende Stoff ist oxydabel und stört in seiner oxydierten Form nicht mehr: Wird nämlich Cer(IV)-sulfat vor dem Ester zum Harn bzw. Plasma gegeben, so werden die Verluste bei Harn ganz, beim Plasma zum grossen Teil behoben.

Zur Prüfung der Spezifität der Methode wurden Kondensationsversuche mit verschiedenen Chinonen und Naphthochinonen ausgeführt. Bei p-Benzochinon, Toluchinon, 1,4-Naphthochinon, 2-Methyl-3-oxy-1,4-naphthochinon und 2-Methyl-3-chlor-1,4-naphthochinon ergab sich unter den gleichen Bedingungen keine Bildung eines fluoreszierenden Kondensationsproduktes. 2-Äthyl-1,4-naphthochinon dagegen kondensiert sich allerdings viel langsamer zu einer analog zusammengesetzten Verbindung. Noch schwerer erfolgt die Kondensation bei 2,5-Dimethyl-1,4-naphthochinon, während sie bei 2,6-Dimethyl-1,4-naphthochinon annähernd so rasch erfolgt wie bei 2-Methyl-1,4-naphthochinon. Da die Bildung eines fluoreszierenden Kondensationsproduktes bei 2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon ausbleibt, dürfte dies auch für das natürliche Vitamin K (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon) gelten. Dass p-Chinone mit o-Phenyldiamin zu den Phenazinen nahestehenden Verbindungen kondensiert werden können, geht aus einer Arbeit von *Behrens*¹⁾ hervor. Der Autor gibt nicht an, unter welchen Bedingungen kondensiert wurde. Unter den Bedingungen, wie sie hier zur Anwendung kamen, kondensiert sich sogar 1,2-Naphthochinon in kaum merklichem Masse zu Naphthophenazin.

Zur Bestimmung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon sind neben den unspezifischen Redoxmethoden²⁾ auch zwei Farbreaktionen aufgefunden worden, nämlich die Reaktion des Chinons mit Arylhydrazinen³⁾ sowie jene mit Cyanessigester⁴⁾.

Wir haben die Farbreaktion von 2-Methyl-1,4-naphthochinon mit Cyanessigester näher studiert und von ihr bei der Ausarbeitung der fluorometrischen Methode Gebrauch gemacht als Kontrollreaktion, da sie viel rascher ausgeführt werden kann als letztere. *Pinder* und *Singer*⁴⁾ geben in ihrer Arbeit über die quantitative Bestimmung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon mit Cyanessigester an, dass die violette

¹⁾ *Behrens, H.*, CH.-Z. **26**, 1152 (1902).

²⁾ *Pinder, I. L.* und *Singer, I. H.*, *Analyst* **65**, 7 (1940); *Trenner, N. R.* und *Bacher, F. A.*, *J. Biol. Chem.* **137**, 745 (1941); *Scudi, J. V.* und *Buhs, R. P.*, *J. Biol. Chem.* **141**, 451 (1941); *Am. J. Physiol.* **133**, 440 (1941); *Rosin, J.*, *Rosenblum, H.* und *Mack, R.*, *Am. J. Pharm.* **113**, 434 (1941); *Schulek, E.* und *Rózsa, P.*, *Mikroch. und Mikroch. Acta* **29**, 178 (1941); *B.* **75**, 1548 (1942).

³⁾ *Novelli, A.*, *Sci.* **93**, 358 (1941); *Novelli, A.* und *Conticello, J. S.*, *Am. Soc.* **66**, 842 (1944).

⁴⁾ *Pinder, I. L.* und *Singer, I. H.*, loc. cit.

Farbe, die beim Versetzen des Chinons mit Cyanessigester und Ammoniak entsteht, nicht stabil sei; sie kolorimetrieren daher die nach starkem Alkalisieren aus der violetten Lösung erhaltene gelbe Lösung, welcher dieser Nachteil nicht anhaften soll. Wir konnten die Bedingungen so wählen, dass die violette Farbe stundenlang stabil bleibt, sodass sich das Chinon auf diese Weise kolorimetrisch bestimmen lässt.

Die Reaktion zwischen dem Chinon und Cyanessigester stellt nach *Kesting*¹⁾ einen Spezialfall dar aus einer Klasse von Farbreaktionen zwischen Chinonen bzw. Naphthochinonen und Verbindungen mit der $=C-CH_2-C=$ bzw. $\equiv C-CH_2-C\equiv$ -Gruppe. Nach den Untersuchungen von *Ionescu*²⁾ findet die Kondensation in β -Stellung des Chinonringes statt. Tatsächlich tritt die Reaktion mit 2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon nicht ein³⁾. Die Reaktion ist stark vom p_H der Lösung abhängig, und zwar für die einzelnen Chinone in verschiedenem Masse, sodass es möglich ist, auf diesem Wege verschiedene Chinone zu unterscheiden. Ferner kann die Reaktion auch zur Bestimmung des p_H dienen⁴⁾.

Die Cyanessigester-Reaktion gestattet, bei Verwendung von Mikroabsorptionsrohren von 15 cm Länge noch ca. 10 γ 2-Methyl-1,4-naphthochinon zu bestimmen. Bei der Anwendung der Cyanessigester-Reaktion auf Plasma und Harn zeigten sich auch bei Abwesenheit von Chinon bzw. Hydrochinon Färbungen, besonders wenn Harn mit Äther extrahiert wird. Es ist daher von dem zu untersuchenden Harn bzw. Plasma stets ein Blindwert in Abzug zu bringen, der bestimmt wird, indem der Zusatz von Cyanessigester unterbleibt, während alle anderen Operationen in gleicher Weise ausgeführt werden.

Mit Hilfe der Cyanessigester-Reaktion wurde festgestellt, dass das Chinon im Harn und besonders im Plasma nicht stabil ist. Bei einem Gehalt von ursprünglich 0,5 mg pro 10 cm³ ergab sich für Harn nach 6 Stunden eine Abnahme von ca. 25 %; beim Plasma betrug die Abnahme nach 2 Stunden ca. 50 %. Dabei handelt es sich nicht um eine Reduktion zum Hydrochinon, da die Bestimmung im Petroläther- und Äther-Extrakt den gleichen Verlust ergab.

Bei der kolorimetrischen Bestimmung des Phosphorsäure-esters treten wieder die erwähnten Verluste auf. Durch Cer(IV)-sulfat entstehen ferner aus Harnbestandteilen Stoffe, die mit Äther extrahierbar sind und beim Behandeln mit Cyanessigester-Ammoniak eine derart intensive Farbe geben, dass die Bestimmung kleiner Mengen des Esters auf diesem Wege unmöglich ist. In diesem Falle hilft eine Extraktion durch Petroläther, in welchem die störenden Stoffe nicht löslich sind.

¹⁾ *Kesting, W.*, B. **62**, 1422 (1929). ²⁾ *Ionescu, M. V.*, Bl. [4] **41**, 1094 (1927).

³⁾ Vgl. auch *Craven, R.*, Soc. **1931**, 1605, ferner *McKee, R. W.*, *Binkley, S. B.*, *Thayer, S. A.*, *McCorquodale, D. W.* und *Doisy, E. A.*, J. Biol. Chem. **131**, 327 (1939).

⁴⁾ *Kolthoff, I. M.*, Säure-Basen-Indikatoren, Berlin 1932, S. 309.

Experimenteller Teil.

Das Kondensationsprodukt von 2-Methyl-1,4-naphthochinon mit o-Phenylendiamin.

5 g des Chinons werden mit 10 g o-Phenylendiamin in 50 cm³ Eisessig gelöst und 8 Stunden unter Ausschluss von Tageslicht auf dem Wasserbad erhitzt. Die Lösung wird samt Niederschlag zusammen mit 300 cm³ 95-proz. Alkohol in einen Scheidetrichter übergeführt, mit 300 cm³ 60-proz. Kalilauge alkalisch gemacht und sofort gekühlt. Man extrahiert mit 2 Litern und hierauf noch zweimal mit je 1 Liter Petroläther. Eine eventuell gebildete ölige Ausscheidung wird in Alkohol gelöst und wieder mit Petroläther ausgeschüttelt. Ob ein weiteres Extrahieren nötig ist, erkennt man am besten dadurch, dass man von den einzelnen Extraktionslösungen je 1 Tropfen zu 10 cm³ Methanol gibt und die Lösungen vor der Quarzlampe vergleicht. Die vereinigten Petrolätherextrakte werden so lange mit Wasser gewaschen, bis sich keine braunen Flocken mehr bilden, und hierauf auf ca. 500 cm³ eingeengt.

Zur chromatographischen Reinigung des Extraktes haben wir Aluminiumoxyd durch Glühen stark aktiviert und dieses mit nicht aktiviertem Oxyd im Verhältnis 1:1 gemischt. Mit dieser Mischung wurde ein Chromatogrammrohr von 2,5 cm lichter Weite 30 cm hoch gefüllt und der Petroläther aufgetragen. Eluiert wird mit Benzol; ein grünlich fluoreszierender Vorlauf wird verworfen. Es wird so lange eluiert, bis das herausfließende Benzol nur noch schwach blauviolett fluoresziert. Nach dem Vertreiben des Benzols konnte der Rückstand aus Petroläther (80—105°) kristallisiert erhalten werden. Die Krystalle wurden in Benzol gelöst und noch 2—3mal chromatographisch gereinigt. Smp. 162°. Ausbeute 0,8 g.

$C_{17}H_{14}N_2$	Ber. C 82,88	H 5,73	N 11,39%	Mol.-Gew. 246
	Gef. „ 82,92	„ 5,73	„ 11,61%	„ 254 (<i>Rast</i>)

Das Kondensationsprodukt von 2-Äthyl-1,4-naphthochinon mit o-Phenylendiamin.

1 g 2-Äthyl-1,4-naphthochinon wurde mit 4 g o-Phenylendiamin in 10 cm³ Eisessig 9 Stunden auf dem Wasserbad kondensiert und analog wie das 2-Methylderivat aufgearbeitet.

$C_{18}H_{16}N_2$	Ber. C 83,05	H 6,20	N 10,76%
	Gef. „ 83,20	„ 6,03	„ 10,90%

Zur Aufnahme des Ultraviolettabsorptionsspektrums wurde das K.Pr. von 2-Methyl-1,4-naphthochinon in einer Menge von 2,5 mg% bzw. 0,25 mg% in Feinsprit gelöst und das Absorptionsspektrum nach der Sektoren-Methode¹⁾ an einem Zeiss'schen Quarzspektrographen Q 24 aufgenommen. Die Auswertung der Platten erfolgte mit Hilfe eines von der Firma *Schiltknecht* in Zürich hergestellten Plattenmessapparates.

Das Ultraviolettsspektrum von Naphthophenazin wurde mit den Konzentrationen 2,0 mg% und 0,2 mg% aufgenommen.

Zur Aufnahme des Ultraviolettabsorptionsspektrums von Dihydro-naphthophenazin wurde Naphthophenazin in den Konzentrationen von 4,0 mg% bzw. 0,4 mg% in Feinsprit bei gewöhnlicher Temperatur einige Stunden hydriert. Die Dihydroverbindung ist äusserst sauerstoffempfindlich. Um ihr Absorptionsspektrum aufzunehmen, wurde die Lösung aus dem Hydriergefäss direkt in das Absorptionsgefäss vor den Spektrographen gepresst. Dazu bedienen wir uns der in Fig. 2 abgebildeten Apparatur, deren wesentlicher Teil darin besteht, dass die Lösung auf ihrem Wege ins Absorptionsgefäss unter Ausschluss von Luft filtriert wird, um den Katalysator zurückzuhalten. Dazu dient ein birnenförmiges Gefäss mit Schliff, in welches ein Trichter mit Faltenfilter gestellt werden kann. Zunächst wird die ganze Apparatur mit reinem Stick-

¹⁾ v. Halban, H., Kortüm, G. und Szigeti, B., Z. El. Ch. 42, 628 (1936). Vgl. auch Kortüm, G., Kolorimetrie und Spektralphotometrie, Berlin 1942, 132ff.

stoff durchspült, wobei das Einleitungsrohr R_1 in die Flüssigkeit eintaucht, R_2 dagegen nicht. Auch bei R_3 wird Stickstoff eingeleitet und der Stempel des *Baly*-Rohres öfters hin- und hergeschoben (Schliff mit Lösungsmittel befeuchtet!). Nach gründlichem Spülen wird der bei R_1 eintretende Stickstoffstrom fast ganz gedrosselt, R_1 aus der Flüssigkeit herausgezogen, dafür aber R_2 bis fast an den Boden des Hydriergefäßes gestossen. Die Flüssigkeit strömt jetzt durch die Apparatur, wobei die Geschwindigkeit durch den Stickstoffdruck so reguliert wird, dass die Flüssigkeit im Filter nicht überläuft. Man kontrolliert vorteilhaft mit Hilfe einer Quarzlampe. Die Lösung des Dihydro-phenazins fluoresziert intensiv blaugrün; bei Luftzutritt schlägt die Fluoreszenzfarbe sofort nach Blauviolett um. Während der Aufnahme bleibt der Stickstoffstrom durch R_3 im Gang.

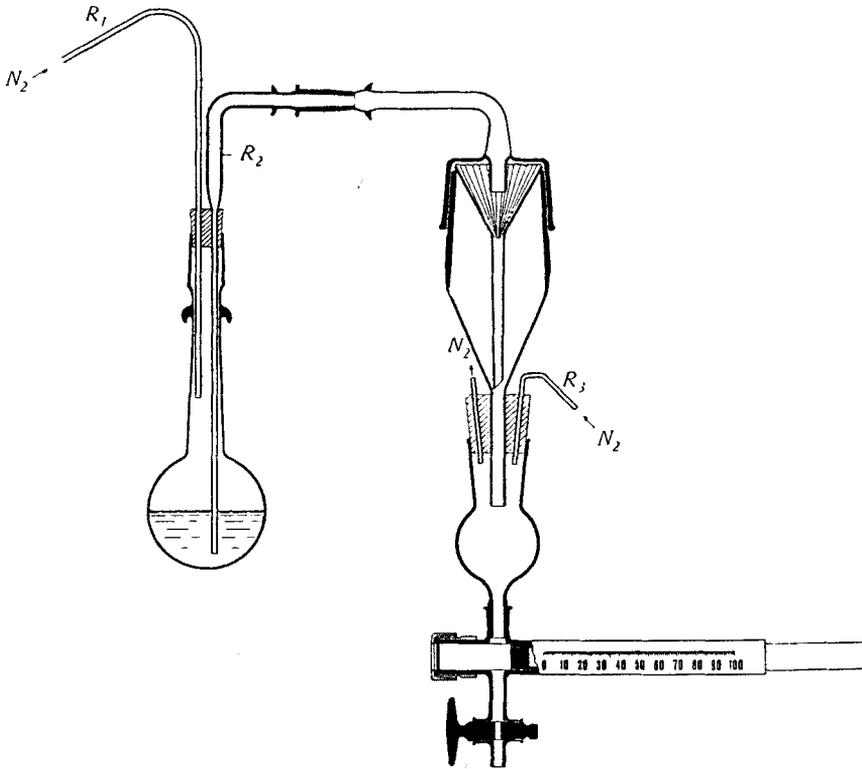


Fig. 2.

Die fluorometrische Bestimmung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon.

Kondensation des Chinons und Vorreinigung des K.Pr.: Von der auf das Chinon bzw. Hydrochinon zu untersuchenden Probe stellt man sich einen Extrakt in Äther her (für das Chinon eignet sich auch Petroläther [40—70°]). Das Lösungsmittel (Äther wird getrocknet) wird vorsichtig unter vermindertem Druck bei höchstens 40° abgedampft. Es ist vorteilhaft, dieses Abdampfen ohne Kapillare durchzuführen, da wegen der grossen Flüchtigkeit des Chinons leicht Verluste entstehen. Den Rückstand versetzt man mit 5 cm³ einer 5-proz. Lösung von o-Phenylendiamin in Eisessig und stellt das Kölbchen 30 Minuten auf das siedende Wasserbad. Die Luft soll freien Zutritt haben, jedoch soll sich kein Wasserdampf im Kölbchen kondensieren. Man spült die gekühlte Lösung zusammen mit 25 cm³ Wasser in einen 100 cm³ Scheidetrichter und schüttelt

2mal mit je 25 cm³ Petroläther aus. Der Petroläther extrahiert eine blau fluoreszierende Verunreinigung; das K.Pr. bleibt in der wässrigen Phase. Diese wird mit 25 cm³ 60-proz. Kalilauge alkalisch gemacht, gekühlt und mit 50 cm³ und hierauf mit 25 cm³ Petroläther extrahiert. Der Petroläther wird mit Wasser gewaschen und die vereinigten Petrolätherextrakte 2mal mit je 25 cm³ 0,5-proz. Essigsäure extrahiert. Die vereinigten wässrigen Extrakte werden mit 10 cm³ 60-proz. Kalilauge alkalisch gemacht und mit 50 und 25 cm³ Petroläther ausgeschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser wird, falls keine weitere Reinigung mehr nötig ist, abgedampft und der Rückstand in 5 oder 10 cm³ Methanol aufgenommen. Um eventuell gelösten Sauerstoff auszutreiben, wird die Lösung $\frac{1}{2}$ Minute lang mit Stickstoff durchspült. Das beschriebene Reinigungsverfahren ist in den meisten Fällen ausreichend. Bei der Bestimmung des Chinons im Blutplasma erwies sich gelegentlich eine weitere Reinigung als notwendig. Es wurden zwei verschiedene Verfahren entwickelt, die sich als ungefähr gleich wirksam erwiesen.

Chromatographische Reinigung. Der nach dem beschriebenen Verfahren vorgereinigte Petrolätherextrakt wird durch eine 10 cm hohe und ca. 0,5 cm dicke Schicht von schwach aktiviertem Aluminiumoxyd filtriert. Dazu bedienen wir uns einer Apparatur, wie wir sie bei der chromatographischen Reinigung des Tocopherol-phenazinderivates beschrieben haben¹⁾. Man wäscht mit ca. 20 cm³ 20-proz. Benzol in Petroläther und eluiert mit ca. 70 cm³ einer Mischung Benzol-Petroläther 1:1. Das Eluat wird vom Lösungsmittel befreit und in 5 bzw. 10 cm³ Methanol aufgenommen. Die angegebenen Verhältnisse richten sich nach der Aktivität des verwendeten Oxyds. Man hat sich durch einen einmaligen Versuch zu überzeugen, dass durch das Eluieren das K.Pr. quantitativ erfasst wird. Dazu fängt man den Vorlauf und das Eluat gesondert auf und eluiert noch mit 20 cm³ Benzol, dampft die drei Lösungen ab und nimmt in Methanol auf. Der Vorlauf und das Benzoleluat müssen frei von Fluoreszenzen sein. Fluoresziert das Benzoleluat, so war das Oxyd zu aktiv. Man hat dann weniger stark aktiviertes Oxyd zu verwenden oder man eluiert mit einer Petroläther-Benzolmischung, die mehr als 50% Benzol enthält.

Reinigung mit Butanol. Der vorgereinigte Petrolätherextrakt wird vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in 5 cm³ Butanol aufgenommen und mit weiteren 2 $\frac{1}{2}$ cm³ Butanol in einen 50 cm³ Scheidetrichter übergeführt. Man versetzt mit 7 $\frac{1}{2}$ cm³ Petroläther und extrahiert 2mal mit je 10 cm³ 0,25-proz. Salzsäure. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 2 cm³ 60-proz. Kalilauge alkalisch gemacht und 2mal mit 15 cm³ Petroläther extrahiert. Nach dem Waschen mit Wasser wird abgedampft und der Rückstand in 5 bzw. 10 cm³ Methanol aufgenommen.

Messung der Fluoreszenzintensität. Zur Messung der Fluoreszenzintensität kann man entweder so vorgehen, dass man eine bekannte Menge des Chinons kondensiert und reinigt, wie oben angegeben, und mit der Probe unbekanntem Gehaltes in der üblichen Weise vor der Quarzlampe vergleicht, oder man vergleicht die Probe unbekanntem Gehaltes mit einem geeichten Satz von Aesculinlösungen. Im ersten Falle kondensiert man mit Vorteil eine solche Menge des Chinons, wie man sie für die unbekannte Probe erwartet. Auf diese Weise müssen keine allzu grossen Verdünnungen vorgenommen werden, störende Nebenfluoreszenzen und Abhängigkeit der Ausbeute an K.Pr. von der Menge an Chinon machen sich weniger bemerkbar. Man hat also eventuell einen orientierenden Vorversuch anzustellen. Einen Satz von Aesculinlösungen stellt man sich her durch Lösen von abgestuften Mengen von Aesculin in 10 cm³ Methanol und Ansäuern mit einem Tropfen 2-n. Salzsäure. Da empirisch gefunden wurde, dass man aus 1 γ des Chinons eine Lösung erhält, die ungefähr gleich stark fluoresziert wie 5 γ Aesculin, stellt man sich den Satz durch Lösen von 20, 16, 12,8, 10, 8, 6,4, 5 und 4 γ Aesculin in 10 cm³ Methanol her. Dieser Satz entspricht der Menge 4 bis 0,8 γ Chinon. Die Lösungen werden in gleiche Reagensgläser in einer Stickstoffatmosphäre eingefüllt und zugeschmolzen. Die Messung kann bei Verwendung eines Fluorometers mit festem Glasstandard vereinfacht werden.

¹⁾ Kofler, M., Helv. 26, 2166 (1943).

Bestimmung des Phosphorsäure-esters. 10 cm³ der wässrigen Lösung des Natriumsalzes des Esters werden mit ca. 1 cm³ 0,1-n. Cer(IV)-sulfat versetzt und mit 20 cm³ Äther oder Petroläther 1 Minute lang geschüttelt. Die wässrige Phase wird nochmals in der gleichen Weise extrahiert. Nach dem Waschen mit Wasser wird vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand auf das K.Pr. verarbeitet. 1 γ des Chinons entspricht 2,45 γ des Tetranatriumsalzes des Diphosphorsäure-esters. Für reduzierende Lösungen, wie Harn und Plasma, ist entsprechend mehr Cer(IV)-sulfat zu nehmen, vgl. weiter unten.

Bestimmung des Chinons bzw. Hydrochinons in Blutplasma und Harn. Durch Äther lässt sich sowohl das Chinon als auch das Hydrochinon extrahieren. Man schüttelt 10 cm³ Plasma, bzw. Harn 2mal mit je 20 cm³ Äther aus, wäscht mit Wasser, schüttelt den Äther einige Male mit konzentrierter Kochsalzlösung, und dampft vorsichtig ab. Durch Petroläther wird lediglich das Chinon extrahiert. Dieses liesse sich also getrennt bestimmen. Man extrahiert 2mal mit 20 cm³ Petroläther, wäscht mit Wasser und dampft ab. Bei der Extraktion von Plasma mit Petroläther resultieren oft schwer trennbare Emulsionen; sie lassen sich einigermassen vermeiden, wenn mehr (bis zu 50 cm³) Petroläther verwendet wird. Oft hilft auch ein Zusatz von einigen cm³ Alkohol nach dem Schütteln.

Bestimmung des Phosphorsäure-esters in Blutplasma und Harn. Ein Enteiweissen des Plasmas lässt sich vermeiden, wenn man zu 10 cm³ Plasma 40 cm³ Wasser, welches 0,75 cm³ konz. Schwefelsäure enthält, gibt und hierauf mit 20 cm³ 0,1-n. Cer(IV)-sulfat versetzt. Bei richtiger Wahl der Acidität fallen dann weder Eiweiss noch basische Cersalze aus. Extrahiert wird mit 100 cm³ Äther. Man dampft den Äther bis auf ein kleines Volumen ab, trocknet, verjagt den Äther vollständig und verarbeitet auf das K.Pr. Zur Bestimmung des Esters im Harn werden 10 cm³ mit 5 cm³ 0,1-n. Cer(IV)-sulfat versetzt und 2mal mit je 20 cm³ Äther 1 Minute ausgeschüttelt. Der Äther wird getrocknet und entsprechend weiterverarbeitet.

Allgemeine Bemerkungen. Der gesamte Analysengang soll bei künstlichem Licht durchgeführt werden; insbesondere sollen die Extrakte nicht der Quarzlampe ausgesetzt werden. Die chromatographische Trennung kann daher nicht vor der Quarzlampe verfolgt werden. Sämtliche Lösungsmittel müssen absolut frei von Fluoreszenzen sein. Es ist zweckmässig, einen Versuch mit 1 γ des Chinons und einen solchen ohne Zusatz von Chinon auszuführen; die Fluoreszenz des Letzteren muss dann bedeutend schwächer sein als jene des Ersteren.

Bestimmung der Aktivität des verwendeten Aluminiumoxyds. Bei der chromatographischen Reinigung des K.Pr., sei es zu dessen präparativer Herstellung oder zur Abtrennung von Stoffen, welche bei der Analyse Nebenfluoreszenzen verursachen, kann es erwünscht sein, Aluminiumoxyd bestimmter Aktivität zu verwenden. Von zwei Adsorptionsmitteln heisst jenes aktiver, welches einen gegebenen Stoff fester bindet. Die Aktivität eines Adsorptionsmittels hängt, wenn es sich um die Adsorption aus nicht wässrigen Lösungen handelt, wesentlich ab vom Wassergehalt des Adsorptionsmittels. Durch Glühen lässt sich dieser innerhalb weiter Grenzen variieren. Um die Aktivität eines Adsorptionsmittels zahlenmässig festzulegen, sind verschiedene Verfahren bekannt¹⁾, so z. B. die Bestimmung der beim Vermischen von Adsorptionsmittel und einer Flüssigkeit auftretenden Benetzungswärme²⁾. Es schien uns am einfachsten, die Aktivität so zu messen, dass die beim Schütteln des Adsorptionsmittels mit einer Farbstofflösung erfolgte Farbstoffabnahme kolorimetrisch bestimmt wird. Als Farbstoff haben wir p-Oxy-azobenzol in benzolischer Lösung gewählt, d. h. den Farbstoff, welcher von Brockmann und Schodder³⁾ zur chromatographischen Standardisierung von Aluminiumoxyd eingeführt wurde. Ein Einwägen des Oxyds ist unvorteilhaft, weil stark aktiviertes Oxyd während des Wägens Wasser aus der Luft anzieht und dadurch desakti-

¹⁾ Krczil, F., Untersuchung und Bewertung technischer Adsorptionsstoffe, Leipzig 1931.

²⁾ Nach diesem Verfahren wird das zur Chromatographie verwendete Aluminiumoxyd von P. B. Müller (Helv. 26, 1945 (1943); 27, 404 (1944)) standardisiert.

³⁾ Brockmann, H. und Schodder, H., B. 74, 73 (1941).

viert wird. Wir haben daher ein kleines zylindrisches Gefäss bis an den Rand durch Einschütten von Oxyd gefüllt ($2,2\text{ g}^1$) und dieses sofort in ein durch einen Schriff verschlossenes Glaskölbchen entleert. Im Kölbchen befinden sich 50 cm^3 einer Lösung von p-Oxy-azobenzol in über Natrium getrocknetem Benzol. Das Kölbchen wird 15 Minuten auf einer hochtourigen Maschine geschüttelt und die dekantierte Lösung zur Entfernung der Trübung zentrifugiert und hierauf die Extinktion am *Pulfrich*-Photometer mit Filter S 43 gemessen. Für das schwach aktivierte Oxyd, wie es zur chromatographischen Reinigung des K.Pr. verwendet wurde, ergab sich beim Schütteln einer 40 mg-proz. Lösung des Farbstoffes eine Extinktion von 0,36, bei einer Schichtdicke von $\frac{1}{2}\text{ cm}$. Vor der Adsorption hatte die Lösung eine Extinktion von 0,90; es sind also rund $\frac{2}{3}$ des Farbstoffes adsorbiert worden. Für stark aktivierte Oxyde hat man eine grössere Farbstoffkonzentration zu wählen, weil sonst praktisch der gesamte Farbstoff adsorbiert wird. Ein Versuch mit sehr stark aktiviertem Oxyd ergab bei einer ursprünglichen Farbstoffkonzentration von $160\text{ mg}\%$ eine Extinktion von 0,32. Für die Extinktion der Lösung vor der Adsorption errechnet sich eine Extinktion von 3,60 (Schichtdicke $\frac{1}{2}\text{ cm}$). Die Konzentrationen von 40 und $160\text{ mg}\%$ dürften für den ganzen interessierenden Aktivitätsbereich ausreichen.

Das als Lösungsmittel verwendete Benzol muss absolut trocken sein oder dann stets den gleichen Feuchtigkeitsgehalt aufweisen. Ein eventuell vorhandener Wassergehalt täuscht eine zu kleine Aktivität des Oxyds vor, da ja Wasser und Farbstoff um die Oberfläche des Adsorptionsmittels konkurrieren. Auch bei der Chromatographie spielt der Wassergehalt des Elutionsmittels eine Rolle, die Verhältnisse sind aber komplizierter, weil das Wasser in den oberen Schichten der Kolonne zurückgehalten wird und nicht wie beim vorliegenden Standardisierungsverfahren mit dem Adsorptionsmittel gleichmässig in Berührung kommt.

In der Regel kann man, wenn ein Adsorptionsmittel bestimmter Aktivität gegeben ist, eine Zusammensetzung der Elutionsflüssigkeit finden, welche die gewünschte chromatographische Trennung ermöglicht. Eine Festlegung der Aktivität des Adsorptionsmittels erlaubt auch eine Festlegung der entsprechenden Zusammensetzung der Elutionsflüssigkeit.

Die Standardisierung der Aktivität eines Adsorptionsmittels kann besonders dann von Wert sein, wenn der adsorbierte Stoff durch stark aktiviertes Adsorptionsmittel zerstört wird (z. B. β -Carotin durch Aluminiumoxyd), indem durch das Glühen auch jene Zentren von Wasser befreit werden, an welchen die Zerstörung erfolgt. (Diese Zentren zeichnen sich auch durch eine besonders hohe Benetzungswärme aus.) Die Kontrolle der Aktivität gestattet ein Oxyd von solcher Aktivität herzustellen, dass eine Zerstörung nicht stattfindet.

Die kolorimetrische Bestimmung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon.

Zur kolorimetrischen Bestimmung des Chinons, bzw. Hydrochinons werden die Verbindungen oder der Extraktionsrückstand in einer Mischung von 95-proz. Alkohol-Wasser 1:1 gelöst und mit Cyanessigester und Ammoniak versetzt. Die violette Farbe entwickelt sich sehr rasch, bei Hydrochinon etwas langsamer, doch ist sie auch hier in spätestens 10 Minuten voll entwickelt. Zweckmässig schüttelt man die Lösung des Hydrochinons etwa 2 Minuten lang, um die Oxydation des Hydrochinons in der alkalischen Lösung zu beschleunigen. Gemessen wird nach 10 Minuten am *Pulfrich*-Photometer mit Filter S 57. Eine Abnahme der Extinktion innerhalb von 2 Stunden konnte nicht festgestellt werden. Je nach der Menge der zu bestimmenden Verbindung wurde nach einer der beiden folgenden Vorschriften gearbeitet:

I. $50\text{--}300\ \gamma$. 5 cm^3 der wässrigen alkoholischen Lösung werden mit je 1 Tropfen Cyanessigester und Ammoniak (10-proz.) versetzt. Schichtdicke $d = 1\text{ cm}$.

II. $10\text{--}50\ \gamma$. 12 cm^3 der wässrigen alkoholischen Lösung werden mit je 3 Tropfen Cyanessigester und Ammoniak (10-proz.) versetzt. Schichtdicke $d = 15\text{ cm}$ (Mikroabsorptionsrohre). Die ermittelten Werte der Extinktion sind aus Fig. 3 ersichtlich.

¹⁾ Das Gewicht hängt wesentlich von der Herstellung des Aluminiumoxyds ab; die durch das Aktivieren bedingte Gewichtsveränderung kann dagegen vernachlässigt werden.

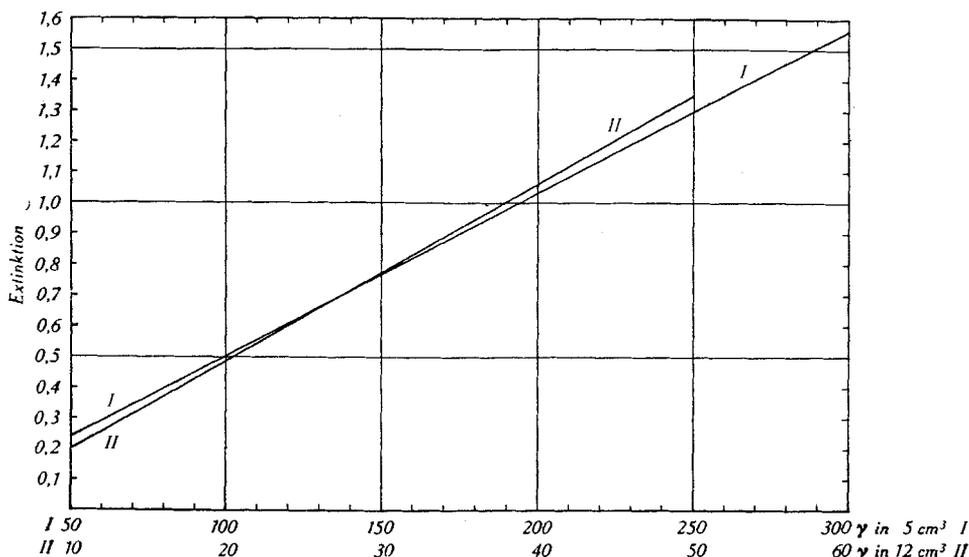


Fig. 3.

2-Methyl-1,4-naphthochinon. Pulfrich Filter S 57.

I Vol. = 5 cm^3 , $d = 1 \text{ cm}$. II Vol. = 12 cm^3 , $d = 15 \text{ cm}$.

Handelt es sich um die Bestimmung des Phosphorsäure-esters, so wird dieser wie oben angegeben, mit Cer(IV)-sulfat gespalten und das gebildete Chinon mit Äther bzw. Petroläther extrahiert und nach dem Vertreiben des Lösungsmittels in einer Mischung von 95-proz. Alkohol-Wasser 1:1 aufgenommen.

Zur Bestimmung des Chinons bzw. Hydrochinons im Blutplasma und Harn werden je 10 cm^3 Plasma bzw. Harn wie bei der fluorometrischen Methode mit 2mal 20 cm^3 Äther bzw. Petroläther (Chinon) extrahiert und der Rückstand in 12 cm^3 Alkohol-Wasser 1:1 aufgenommen und nach Anordnung II gemessen. Der Äther braucht in diesem Falle nicht getrocknet zu werden. Wurde das Chinon mit Petroläther extrahiert, so ergeben die Spuren des nach dem Abdampfen zurückbleibenden Petroläthers (ein scharfes Abdampfen darf wegen der Flüchtigkeit des Chinons nicht vorgenommen werden) mit der zugesetzten Alkohol-Wassermischung eine Emulsion. Man setzt 3 Tropfen Cyanessigester und Ammoniak hinzu, schüttelt 2 Minuten, lässt die Emulsion in einem Scheidetrichter einige Minuten stehen und filtriert durch ein feinporiges Filter, wodurch die Lösung vollkommen klar wird. Verluste durch Adsorption des Farbstoffes treten selbst bei mehrmaligem Filtrieren nicht auf. Da insbesondere bei Harn bei Verwendung von Äther Stoffe mitextrahiert werden, die zwar gelb sind, jedoch auch bei Filter S 57 eine nicht unbeträchtliche Extinktion zeigen, wird eine gleiche Menge Harn bzw. Plasma mit Äther oder Petroläther extrahiert und weiterverarbeitet, jedoch ohne Zusatz von Cyanessigester. Diese Lösung dient als Kompensationslösung bei der photometrischen Bestimmung.

Bei der Bestimmung des Phosphorsäure-esters in Plasma und Harn stösst man wieder auf die erwähnten Verluste. Verseift und extrahiert wird wie bei der fluorometrischen Methode angegeben wurde. Bei Harn kommt eine Ätherextraktion nicht in Frage, da nach der Behandlung mit Cer(IV)-sulfat viele störende Begleitstoffe mitextrahiert werden. Eine entsprechende, d. h. ohne Zusatz von Cyanessigester hergestellte Kompensationslösung ist unbedingt erforderlich.

Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel.