

Verdünnen klar, was nach 8—10 Min. der Fall war, wurde die Reduktion noch weitere 3 Min. laufen gelassen und dann durch Verdünnen mit 100 cm³ Wasser und Abgiessen vom Zink beendet. Die wässrige Lösung haben wir im Extraktor mit Äther extrahiert und den getrockneten Ätherauszug eingedampft, zuletzt zur Entfernung des Eisessigs im Vakuum bei 100°. Es blieb ein gelbes Öl zurück, aus dem sich bei Zusatz von Methanol (2 cm³) Kristalle abschieden. Durch fraktionierte Kristallisation erhielt man aus Methanol die Verbindung XII bzw. XIII in etwas über 20% Ausbeute, sowie eine geringe Menge Ausgangsmaterial. Zersetzungspunkt 245°.

C₈H₈O₈ (200,06) Ber. C 48,00 H 4,03% Gef. C 48,44 H 4,52%

Zusammenfassung.

Für zwei aus α , β , δ -Tribrom-muconsäure- γ -lacton durch Hydrolyse gebildete Oxy-dibrom-muconsäure- γ -lactone konnten die in einer früheren Untersuchung aufgestellten vorläufigen Konstitutionsformeln durch weitere Abbaureaktionen bestätigt werden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

73. Microdosage colorimétrique en série de l'azote protéique

par R. A. Boissonnas et C. H. Haselbach.

(21 II 53)

Lorsqu'on procède à des fractionnements, par chromatographie sur colonne ou par répartition à contre-courant, de quantités limitées de substances de nature protéique, il n'est pas possible de déterminer le poids sec de chaque fraction, les quantités de produit présent étant trop faibles pour pouvoir être pesées exactement.

Les méthodes indirectes basées sur le contenu en tyrosine, en groupes aminés libres ou en cuivre complexé ne permettent pas de tirer des conclusions certaines sur la quantité de substance présente car le rapport poids sec/tyrosine (resp.: groupes aminés, ou cuivre complexé) change selon le poids moléculaire et la nature des substances protéiques.

Par contre, la teneur en azote (*Kjeldahl*) des substances de nature protéique varie dans des limites suffisamment faibles pour qu'elle puisse donner une indication satisfaisante sur la quantité de substance présente.

Nous avons donc cherché une méthode permettant de doser simultanément quelques γ d'azote sur une cinquantaine d'échantillons. La difficulté principale résidait dans le dosage en série des faibles quantités d'ammoniaque résultant de l'attaque par micro-*Kjeldahl*.

La méthode de *Nessler* et ses nombreuses modifications ainsi que les méthodes d'oxydation au brome, sont trop délicates et ne donnent

pas de résultats suffisamment reproductibles sur de très faibles quantités d'ammoniaque. Les microdosages alcali-acidimétriques sont trop longs pour pouvoir être effectués en série.

Moore & Stein¹⁾ ont montré qu'en présence d'hydrindantine, la ninhydrine donne une réaction colorée avec l'ammoniaque sous certaines conditions. Nous avons donc modifié cette méthode colorimétrique très sensible pour l'adapter au dosage de l'ammoniaque dans la solution sulfurique résultant de la digestion *Kjeldahl*.

Grâce à un appareillage spécial, la méthode mise au point permet d'attaquer simultanément 50 échantillons contenant chacun de 0,5 γ à 15 γ (optimum 5 γ) d'azote protéique. Après neutralisation par un mélange contenant un tampon et un solvant organique, la solution est additionnée de ninhydrine-hydrindantine. Après chauffage, la densité optique est mesurée au colorimètre (fig. 1). La déviation standard du dosage est de $\pm 2\%$ pour 5 γ d'azote. Une seule personne peut doser 150 échantillons en une journée.

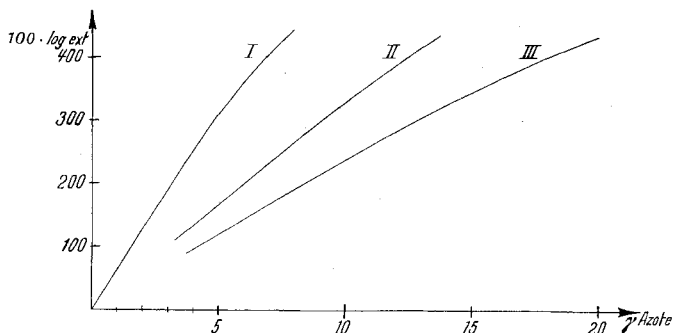


Fig. 1.

Densité optique en fonction des γ d'azote (Klett-Summerson, Filtre 54).

- I: sans dilution.
- II: après dilution par 5 cm³ d'alcool 50%.
- III: après dilution par 10 cm³ d'alcool 50%.

Partie expérimentale.

Réactifs (solutions pour 1000 dosages).

Réactif d'attaque. 200 cm³ d'acide sulfurique *Merk* puriss. sont mélangés à 200 cm³ d'une solution aqueuse contenant 0,2% d'HgCl₂. Ce réactif est gardé sous une cloche de verre pour le préserver des vapeurs ammoniacales.

Perhydrol. 100 cm³ d'eau oxygénée à 30% en poids, stabilisée à l'acide phosphorique et exempte de composés azotés.

Solution de neutralisation. On dissout à chaud, soit 117,5 g de LiOH, H₂O (*Merk purum*) et 570 g de CH₃COOLi, 2 H₂O (*Merk puriss.*) ou bien 352,5 g de LiOH, H₂O et 320 cm³ d'acide acétique glacial (distillé sur anhydride chromique), dans 3 l d'eau, refroidit et filtre sur *Gooch* de verre fritté garni de Celite 535 de *Johns-Manville*. La solution limpide est additionnée de 1 l de méthylcellosolve (monoether méthylique de l'éthylène-glycol, *Union Carbide*) et complétée à 5 l par de l'eau.

¹⁾ J. Biol. Chem. **176**, 367 (1948).

Réactif à la ninhydrine-hydrindantine. On dissout 20 g de ninhydrine puriss. (*Daugherty Chemical Specialities Co.*, New-York) dans 500 cm³ de méthylcellosolve et on ajoute une solution de 0,3 g de borohydrure de sodium (BH₄Na) dans 500 cm³ d'eau. A conserver sous azote.

Diluant. Mélange 1:1 d'éthanol 96% (ou de n-propanol) et d'eau.

Appareillage.

Éprouvettes. Pyrex de 150 × 15 mm en verre épais sans rebord. Ces éprouvettes sont lavées chaque fois en les remplissant d'HCl 0,1-n. et en les chauffant 10 min. à 100°. Après rinçage à l'eau, les éprouvettes sont rincées par NaOH 0,01-n. afin d'éviter toute adsorption d'ammoniac sur les parois, puis recouvertes de capuchons en aluminium afin d'éviter l'introduction de poussières, et séchées à l'étuve. Les capuchons d'aluminium sont obtenus en coupant, à 3 cm du fond, des tubes à comprimés pharmaceutiques de diamètre convenable.

Support en aluminium pouvant contenir 50 éprouvettes.

Bain-marie dans lequel on peut placer le support.

Bac de refroidissement.

Photomètre Klett-Summerson, filtre vert N° 54 (500—570 m μ) ou tout autre spectrophotomètre absorbant à 570 m μ .

Pipettes automatiques (Blitz-Kippautomat) de 1 cm³ et de 5 cm³ (*Gerber & Co.*, Zurich).

Dispositif d'attaque (fig. 2). L'attaque est effectuée dans une *caisse A* de 60 × 22 cm de base et de 30 cm de haut, en tôle plombée, dont le *couvercle A'* amovible pénètre dans une gouttière formant chicane. Pendant l'attaque, un courant d'air (purifié par passage sur acide sulfurique, eau et laine de verre) pénètre par un tuyau dans le fond de la caisse. Les vapeurs qui se dégagent sont ainsi évacuées, et toute pénétration, par le joint du couvercle, de poussières ou de vapeurs ammoniacales du laboratoire est évitée.

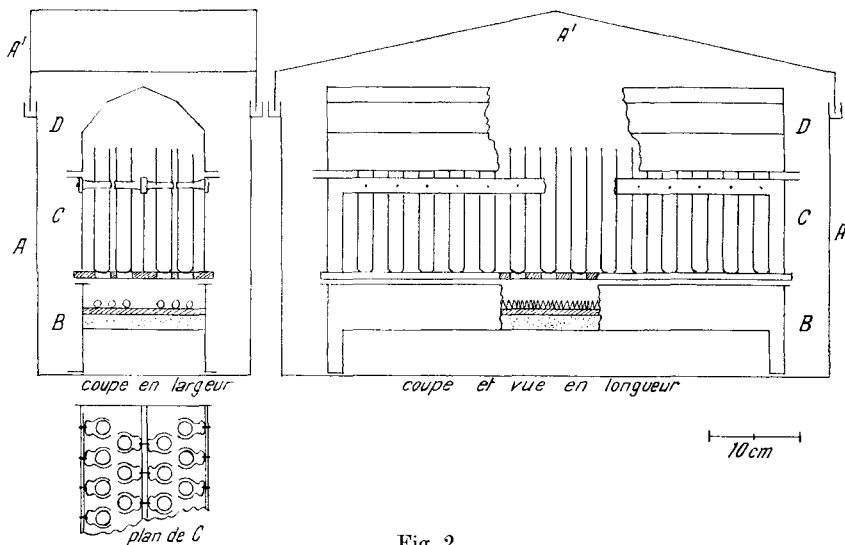


Fig. 2.

Dispositif d'attaque.

- | | | | |
|---------|------------------------|---|-------------------|
| A et A' | caisse avec couvercle. | C | support amovible. |
| B | rampe de chauffage. | D | chapeau amovible. |

La rampe de chauffage B, de 14 × 50 cm de surface, contient dans le sens de la longueur 2 séries de 3 résistances en spirales posées sur amiante, les spires des extrémités étant plus resserrées de façon à assurer une égalité de température sur toute la surface.

La puissance totale est de 400 watts. Un Variac, ou tout autre système permettant de varier la tension aide à régler l'intensité du courant.

Un support amovible *C* permettant de fixer les 50 éprouvettes en 4 rangées par un système de pinces à ressort, et ayant à sa base une plaque d'éternit percée de trous dans lesquels viennent reposer les éprouvettes, est placé sur la rampe de façon que le fond des éprouvettes se trouve à 1,5 cm des résistances. Ce support est surmonté d'un *chapeau amovible D* en tôle d'aluminium.

Méthode.

Les prises, d'un volume inférieur à 1 cm³ ¹⁾ et contenant de 0,5 γ à 15 γ (optimum 5 γ) d'azote protéique, sont placées au fond des éprouvettes. On fait simultanément à chaque lot 2 blancs et 2 standards de 5 γ d'azote (par ex. une solution de protamine étalonnée par *Kjeldahl* ordinaire). On place dans chaque tube 0,3 cm³ de réactif d'attaque et on met le support sur la rampe qui est chauffée à 85% du voltage d'attaque. L'enceinte est fermée et parcourue par un courant d'air lavé sur H₂SO₄ dilué, eau et laine de verre, de façon à entraîner au dehors les vapeurs qui se dégagent. Une fois la concentration effectuée (env. 20 min.), on ajoute dans chaque éprouvette 0,1 cm³ de perhydrol et poursuit pendant 2 h. l'attaque à un voltage tel que l'acide sulfurique reflue à 3 cm au-dessus du fond des éprouvettes. Un trop fort chauffage provoquerait des pertes en acide sulfurique. Le support est sorti de l'enceinte, les éprouvettes sont garnies des couvercles de protection et, après refroidissement, on ajoute à la pipette automatique 5 cm³ de solution de neutralisation à chaque éprouvette. Le pH est alors de 4,6. Il est indispensable de très bien agiter afin d'avoir une solution homogène. On ajoute alors à la pipette automatique 1 cm³ de solution de ninhydrine-hydrindantine, agite, et place pendant exactement 30 min. dans le bain-marie bouillant. On refroidit dans le bac à refroidissement. La couleur violette à chaud devient bleue à froid. Dans l'heure qui suit, on lit au photomètre contre le blanc et exprime les valeurs en γ d'azote à l'aide de la courbe de référence. Lors que les tubes donnent une adsorption trop élevée (plus de 8 γ) ou lorsque le colorimètre utilisé exige un volume final plus grand (p. ex. pour pouvoir rincer chaque fois le tube de lecture avec la solution à mesurer), on dilue le contenu de ces tubes, des blancs et des standards par le mélange diluant. La fig. 1 donne pour le *Klett-Summerson* les rapports *extinction*/ γ d'azote pour différentes dilutions finales. La déviation standard du dosage est de $\pm 2\%$ pour 5 γ d'azote.

Discussion.

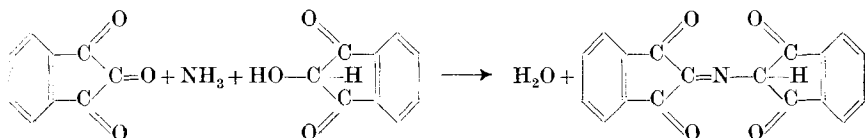
La caisse, entourant la rampe d'attaque, permet d'effectuer ces microanalyses dans n'importe quel laboratoire, même si l'atmosphère de celui-ci est chargée de vapeurs de bases organiques ou d'ammoniaque. D'autre part, le fait d'effectuer l'attaque, la neutralisation et la réaction à la ninhydrine dans la même éprouvette évite les contaminations par des transferts.

Quoiqu'il soit possible d'augmenter la rapidité de l'attaque par l'acide sulfurique en effectuant celle-ci à une température plus élevée, nous avons préféré faire une attaque plus longue à une température plus basse, car il est ainsi plus facile d'assurer des conditions semblables pour tout le lot d'éprouvettes et d'éviter une surchauffe qui provoquerait des pertes en acide sulfurique dans certains tubes.

Après l'attaque, l'acide sulfurique est neutralisé partiellement par de l'hydroxyde de lithium. Par addition d'acétate de lithium, il se forme un tampon acide acétique-acétate de lithium en présence de

¹⁾ Si un solvant organique est présent, il est préférable de l'évaporer avant d'ajouter l'ac. sulfurique afin d'éviter un noircissement des tubes.

sulfate de lithium. A cette solution saline concentrée de pH 4,6, on ajoute une solution de ninhydrine-hydrindantine. Il n'est pas possible de mettre directement la ninhydrine-hydrindantine dans le mélange neutralisant-tamponnant, car il y aurait destruction du réactif par des surconcentrations locales momentanées en acide sulfurique. La proportion d'hydrindantine a été élevée à un tiers de la ninhydrine de façon à rendre quantitative la formation du colorant qui se fait selon la réaction suivante:



On voit que l'hydrindantine doit déjà être présente dans le milieu pour qu'il puisse y avoir réaction avec l'ammoniaque. Dans le cas des acides aminés au contraire, il se forme de l'hydrindantine au cours de la réaction, et l'hydrindantine ajoutée dans le réactif de *Moore & Stein* n'a comme but que de compenser la destruction de celle-ci par l'air dissout.

L'hydrindantine est formée en ajoutant à une solution de ninhydrine du borohydrure de sodium. En effet, à ces concentrations élevées, le chlorure d'étain, employé par *Moore & Stein*, provoque des troubles.

Le méthylcellosolve, dont la concentration finale est de 25 % au moment du développement du colorant à chaud, est destiné à permettre une solubilité suffisante de la ninhydrine, de l'hydrindantine et du colorant formé. Si la concentration du méthylcellosolve est inférieure à 25 %, la solubilité de ces corps n'est pas suffisante, il y a précipitation partielle et la réaction colorée n'est plus reproductible. Seul le sulfate de lithium a une solubilité suffisante dans le méthylcellosolve à 25 %. Tous les autres sulfates essayés ont donné des précipités à froid ou à chaud.

Il est indispensable de protéger très soigneusement le collecteur de fractions contre l'entrée de traces de poussières pendant tout le fractionnement. En effet, alors qu'un grain de poussière a relativement peu d'influence sur le dosage des groupes amino selon *Moore & Stein*¹⁾, il donnera des valeurs trop fortes en azote après l'attaque *Kjeldahl*. Une simple couverture en plastique recouvrant le collecteur de fractions s'est révélée amplement suffisante pour empêcher l'entrée de grains de poussière dans les éprouvettes, même lorsque le fractionnement est poursuivi pendant plusieurs jours.

Nous remercions vivement le «Fonds pour l'Encouragement des recherches scientifiques (Berne)» et la «Rockefeller Foundation (New-York)» de l'aide qu'ils nous ont accordée.

¹⁾ J. Biol. Chem. **176**, 367 (1948).

SUMMARY.

A new micromethod for serial colorimetric determination of *Kjeldahl* nitrogen is described.

Samples containing 1–20 γ nitrogen are digested with 0,15 cm³ H₂SO₄. The digests are neutralized by a solution of LiOH and Li-acetate in 20% methylcellosolve, buffering the pH at 4,6. After addition of a ninhydrin-hydrindantin reagent, the blue NH₃-complex is formed by heating and colorimetrically estimated.

A special equipment for serial work is described, which allows one person to perform 150 estimations in one day. The standard deviation is $\pm 2\%$ for 5 γ nitrogen.

This method has been worked out for the simultaneous determination of *Kjeldahl* nitrogen in numerous fractions, as obtained after chromatographic separation or countercurrent distribution of small amounts of proteinic material.

Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève.

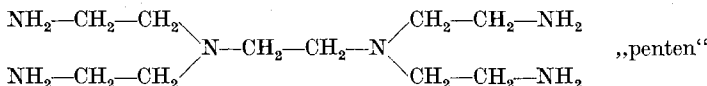
74. Metallkomplexe mit Polyaminen X:

Mit Tetrakis-(β -aminoäthyl)-äthylendiamin = „penten“

von G. Schwarzenbach und P. Moser.

(23. II. 53.)

Das im Titel genannte Hexamin¹⁾:



ist die erste Verbindung, welche einem Metallkation bei der Komplexbildung sechs gleichartige Gruppen, nämlich sechs basische Stickstoffatome, zur Verfügung stellen kann. Der erste hexafunktionelle („hexadentate“) Komplexpartner, der bekannt wurde, ist wohl das Anion Y⁻⁴ der von uns eingehend untersuchten Äthylendiamin-tetraessigsäure. Dieses verfügt über zwei basische Stickstoffatome und vier Carboxylatgruppen, und wir konnten beweisen²⁾, dass in einigen Fällen, wie z. B. beim Co^{III}- und Fe^{III}-Komplex, alle sechs Gruppen vom Metall als Koordinationspartner verwendet werden. Ein weiterer in den letzten Jahren verwendeter hexafunktioneller Komplexpartner ist das Kondensationsprodukt von Salicylaldehyd mit Äthylen-bis-(aminoäthyl)-thioäther³⁾.

¹⁾ Herstellung s. W. Gauss, P. Moser & G. Schwarzenbach, *Helv.* **35**, 2359 (1952).

²⁾ G. Schwarzenbach & J. Heller, *Helv.* **34**, 578 (1951).

³⁾ J. Collins, F. P. Dwyer & F. Lions, *Am. Soc.* **74**, 3134 (1952).