

CHROM. 5979

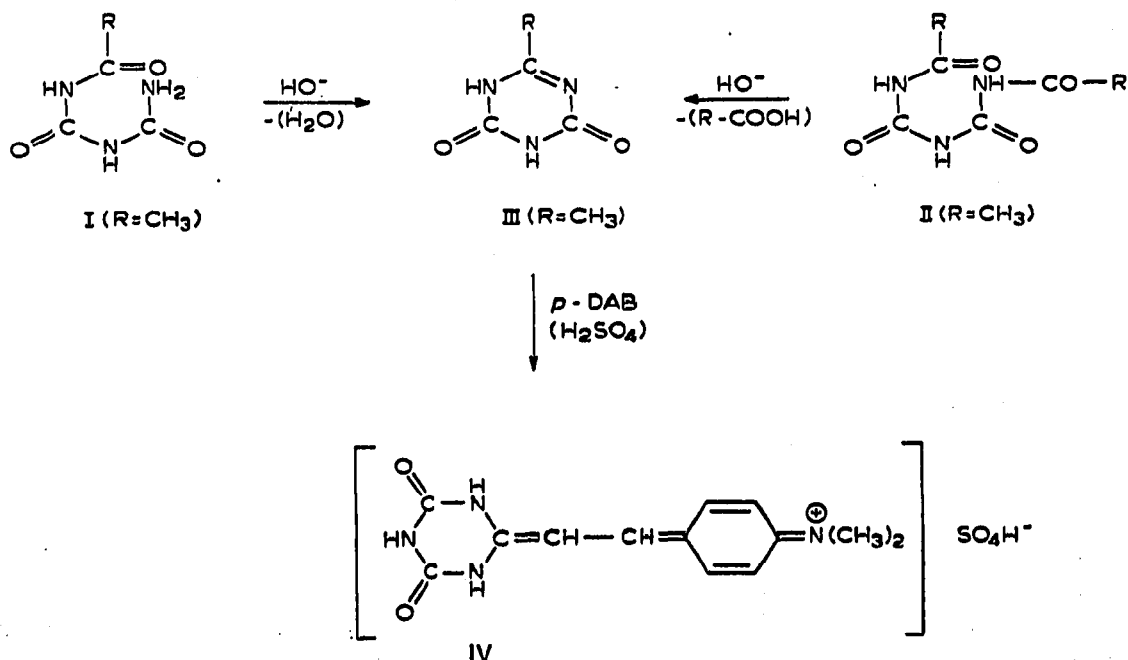
**Papierchromatographische und reflexions-integrationsdichtometrische quantitative Analyse des Gemisches von 1-Acetyl- und 1,5-Diacetyl-biuret mit ihrem Zyklisierungsprodukt, dem 2,4-Dioxo-6-methyl-tetrahydro-s-triazin**

Um die Kinetik des Ringschlusses von Acylbiuretverbindungen (I, II) zu den entsprechenden Dioxo-tetrahydro-s-triazinen (Guanamiden) (III) verfolgen zu können, sollte zunächst eine Analysenmethode ausgearbeitet werden die dieses Gemisch berücksichtigt (I, R = CH<sub>3</sub>; II, R = CH<sub>3</sub>; III, R = CH<sub>3</sub>).

Da die aliphatischen Acyl-Derivate des Biurets, wie ihre Muttersubstanz selbst, nur im fernen Ultraviolett absorbieren und ihre längerwelligen Bande sich gegenseitig stark verdecken, beschlossen wir die Trennung des Gemisches papierchromatographisch durchzuführen und die Möglichkeit der Verwertung dieses Verfahrens zu einer quantitativen analytischen Methode zu studieren. Zu diesem Zweck, d.h. um Flecken von Acetoguanamid (2,4-Dioxo-6-methyl-tetrahydro-s-triazin = "DMT"; III) sichtbar zu machen, musste eine geeignete Farbreaktion gefunden werden.

Dafür wurde die Kondensation mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (*p*-DAB) unter Säurekatalyse (und zwar in Gegenwart von Schwefelsäure) herangezogen, wobei das tiefrotgefärbte Bisulfat des 2,4-Dioxo-6-(*p*-dimethylamino- $\beta$ -styryl)-tetrahydro-s-triazins (IV) entsteht<sup>1,2</sup>.

Andererseits ist die, durch die nachstehenden Schemas aufgezeigte Tatsache bekannt, dass die  $\omega$ -Acylderivate des Biurets unter Basen-Katalyse und zwar in Gegenwart wässriger Alkalilösungen eine Zyklisierung erleiden<sup>3-6</sup>.



Es konnte festgestellt werden, dass der Ringschluss unter den bei der Durchführung der Chromatogramme herrschenden Bedingungen mit einer 7%-ige äthanolischen Alkalihydroxidlösung quantitativ verläuft.

In Tabelle I werden die  $R_F$ -Werte für AB, DIAB und DMT in den in der Literatur zur Trennung von Amidverbindungen empfohlenen Fließmitteln Methyläthylketon-Toluol-Wasser (9:4:3)<sup>7</sup> und Toluol-Äthanol (1:1)<sup>8</sup> zum Vergleich mit den  $R_F$ -Werten in dem von uns vorgeschlagenen Fließmittel wassergesättigter Benzylalkohol, angeführt.

TABELLE I

$R_F$ -WERTE DER DREI KOMPONENTEN DMT, AB UND DIAB IN VERSCHIEDENEN FLIESSMITTELN  
Fließmittel:  $S_1$  = Toluol-Äthanol = (1:1);  $S_2$  = Methyläthylketon-Toluol-Wasser (9:4:3);  $S_3$  = mit Wasser gesättigter Benzylalkohol.

Benennung der Substanz	$R_F$		
	$S_1$	$S_2$	$S_3$
Dioxy-methyl-triazin (DMT)	0.59	0.60	0.41
1-Acetyl-biuret (AB)	0.74	0.84	0.60
1,5-Diacetyl-biuret (DIAB)	0.77	0.88	0.69

### Beschreibung des Verfahrens

Mit einer 10- $\mu$ l Mikropipette wird die wässrige Lösung des ternären Gemisches, mit einer Konzentration der Komponenten von 0.1–0.5%, auf Filterpapier Schleicher und Schüll 2043a (28  $\times$  4 cm Streifen nach MATTHIAS<sup>9</sup>) in Form eines elliptischen 6  $\times$  8 mm grossen Flecks aufgebracht. Das Volumen der auf dem Papier aufgetragenen Lösung muss so gewählt werden, dass der Fleck etwa 10–50  $\mu$ g jeder Komponente enthält. Die Trennung der Komponenten wird durch aufsteigende Chromatographie mit wassergesättigtem Benzylalkohol erreicht (dazu benötigte Zeit  $\sim$  18 Std.). Die Reihenfolge der einzelnen Flecken ist: DMT, AB (1-Acetyl-) und DIAB (1,5-Diacetylbiuret). Die, 30–60 min lang, an der Luft getrockneten Streifen werden im Trockenschrank bis zur gänzlichen Entfernung des Benzylalkohols (6–8 Std. bei 60–70°) aufbewahrt dann mit äthanolischer 7%-iger KOH-Lösung bespritzt und wieder 15 min lang im Trockenschrank bei 60° gehalten.

Die Sichtbarmachung der Flecken geschieht durch Bespritzen mit äthanolischer 1.0 M  $H_2SO_4$ -Lösung, welche 3% *p*-DAB enthält. Die bespritzten Streifen werden 5 min lang im Trockenschrank bei 80° aufbewahrt. Hierbei färben sich alle Flecken tiefrot.

Nach der Sichtbarmachung werden die Streifen in ein "ERI-10" Densitometer (C. Zeiss, Jena) eingeführt, welches die Reflexions-Extinktionskurve registriert. Das Integral der Extinktionskurve ergibt auf Grund einer Eichkurve die Menge der im Fleck enthaltenen Substanz.

### Ergebnisse und Diskussion

Fig. 1 zeigt die von uns mit einer DMT bestimmte Eichkurve. Diese Kurve zeigt die Abhängigkeit der Integralextinktion (d.h. der durch Planimetrieren erhaltenen Fläche unter der Kurve) von der absoluten DMT Menge, welche im Initialfleck aufgetragen wurde.

Wie ersichtlich wird diese Abhängigkeit ab ungefähr 10  $\mu$ g linear.

Die relative Standardabweichung für neun Bestimmungen durch Messung der

durch die Kurve eingeschlossene Fläche bei Auftragen von je 20  $\mu\text{g}$  der einzelnen Komponenten (DMT, AB, DIAB) beträgt 2.7% bzw. 3.8%, bzw. 3.3%).

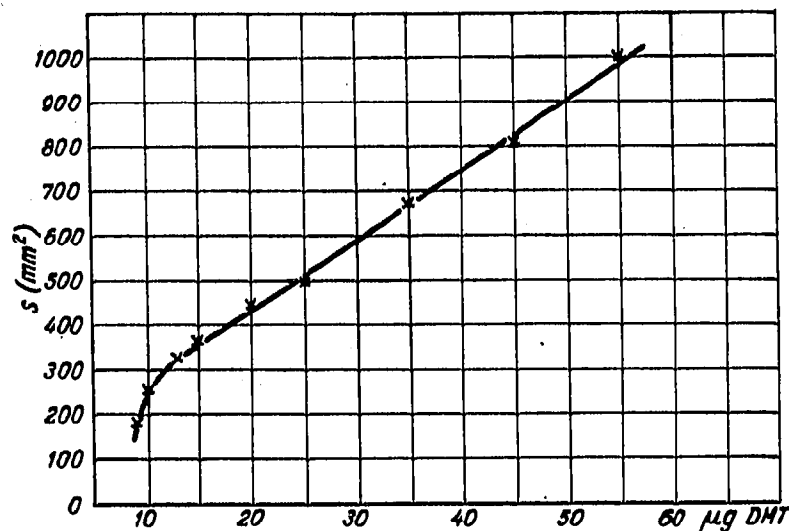


Fig. 1. Abhängigkeit der Integralextinktion von der absoluten DMT-Menge.

TABELLE II

RELATIVE FEHLER BEI DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER IN DMT UMGEWANDELTEN KOMPONENTEN AB UND DIAB

AB Aufgetragen ( $\mu\text{g}$ )	DMT		Relative Fehler (%)
	Berechnet ( $\mu\text{g}$ )	Gefunden <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}$ )	
15	13.1	13.6	+4
		12.5	-4.7
20	17.5	16.3	-6.9
		17.3	-1.2
25	21.9	21.0	-4.2
30	26.3	26.5	+0.7
		25.0	-4.5
40	35.0	36.0	+3
		33.8	-5.5
50	43.8	43.0	-1.9
		44.7	+2

DIAB Aufgetragen ( $\mu\text{g}$ )	DMT		Relative Fehler (%)
	Berechnet ( $\mu\text{g}$ )	Gefunden ( $\mu\text{g}$ )	
15	10.2	10.0	-2
20	13.6	12.8	-5.9
		13.6	0
25	17.0	16.5	-3
30	20.4	20.6	+1
		20.2	-1
40	27.2	27.0	-0.8
		28.7	+5.5
50	34.0	33.5	-1.5
		34.0	0

<sup>a</sup> Aus der mit Dioxy-methyl-s-triazin erhaltenen Eichkurve.

In Tabelle II werden die, bei der quantitativen Bestimmung der Komponenten AB und DIAB in Form von DMT auf Grund der mit DMT allein aufgestellten Eichkurve registrierten relativen Fehler angeführt. Es kann beobachtet werden, dass der maximale prozentuelle Fehler dieser Reihe von elf Kontrollbestimmungen bei variablen Mengen zwischen 15 und 50  $\mu\text{g}$  den Wert von 7% erreicht hat.

Wenn mit grösseren Substanzmengen als 50  $\mu\text{g}$  gearbeitet wird, ist die Trennung nicht mehr zufriedenstellend.

Grössere Fehler kommen auch vor, wenn die Grundfarbe des Chromatogramms nicht homogen ist. Es ist also zweckmässig, dass die Bespritzung mit dem Reagens vollkommen gleichmässig geschieht.

Wir sprechen Frau Ing. M. ELIAS unseren besten Dank aus für das zur Verfügung stellen des im Analytischen Laboratorium der Kinderklinik befindlichen Densitometers ERI-10 (Carl Zeiss, Jena).

*Laboratorium für organische Chemie,  
Technische Hochschule\*, Timișoara (Rumänien)*

MARIUS SAFTA  
GEORGE OSTROGOVICH

- 1 N. V. HROMOV-BORISOV UND E. N. KISAREVA, *Zh. Obsshch. Khim.*, 29 (1959) 3010.
- 2 G. OSTROGOVICH UND M. SAFTA, *Rev. Roum. Chim.*, 15 (1970) 799.
- 3 A. OSTROGOVICH, *Bul. Soc. Stiint. Cluj*, 4 (1929) 521.
- 4 A. OSTROGOVICH UND I. TANISLAU, *Gazz. Chim. Ital.*, 64 (1934) 824.
- 5 G. OSTROGOVICH, *Bul. Stiint Teh. Inst. Politeh. Timișoara (Ser. Chim.)*, im Druck.
- 6 P. ADAMS, D. W. KAISER, D. E. NAGY, G. A. PETERS, R. L. SPERRY UND J. T. THURSTON, *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 1162.
- 7 M. KELLY, *J. Chromatogr.*, 15 (1964) 264.
- 8 J. E. KEILLES UND R. H. JAMES, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 846.
- 9 W. MATTHIAS, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 17; *Züchter*, 24 (1954) 313.

Eingegangen am 29. November 1971; geänderte Fassung am 15. Februar 1972

---

\* Str. Bocșa 6, Timișoara.