Journal of Chromatography, 130 (1977) 327–330
© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 9446

Note

Osmiumtetroxid als spezifisches Nachweisreagenz in der Dünnschichtchromatographie

KARSTEN KROHN

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Abteilung Biochemie, 2000 Hamburg 13 (B.R.D.)

(Eingegangen am 12. Februar 1976; geänderte Fassung eingegangen am 16. Juni 1976)

Osmiumtetroxid hat in der organischen Chemie zur *cis*-Hydroxylierung von Olefinen durch die klassischen Arbeiten von Criegee[1] weite Verbreitung gefunden. Bald darauf erlangte es als Reagenz zur Fixierung von Gewebe und Zellorganellen in der Elektronenmikroskopie sowie in der Histologie[2] grosse Bedeutung. Der Fixierungsvorgang beruht auf der Reaktion des Osmiumtetroxids mit reduzierenden oder ungesättigten organischen Verbindungen der zu untersuchenden Probe zum feinverteilten schwarzgefärbten Osmiumdioxid oder weiter zum metallischen Osmium[3]. Wir möchten jetzt eine neue Anwendungsmöglichkeit des Reagenzes zum selektiven Anfärben von reduzierenden oder ungesättigten Verbindungen auf Dünnschichtplatten vorstellen.

Für das Bedampfen von Dünnschichtplatten sind die physikalischen Eigenschaften des Osmiumtetroxids hervorragend geeignet. Es liegt ähnlich wie Jod im geschlossenen System als Gas mit einem Bodenkörper im Gleichgewicht (Partialdruck bei 26.95° $p = 11.03$ mmHg[4]). Auf der Oberfläche des Kieselgels adsorbierte Substanzen sollten im Prinzip die gleichen chemischen Reaktionen wie in Lösung eingehen. Nach neueren Erkenntnissen verlaufen solche Reaktionen auf aktiven Adsorbentien sogar sehr viel rascher ab[5].

EXPERIMENTELLES

Die Bedampfung von Mikrodünnschichtplatten (Merck DC Alufolien, Kieselgel 60 F_{254}, 0.2 mm Schichtdicke) der Grösse 5 × 7 cm wird in einem rechteckigen Glasgefäss (Innenraum 2 × 5 × 8 cm) mit gut schliessendem Deckel durchgeführt. Das Gefäss enthält 100 mg Osmiumtetroxid in einem kleinen Röhrchen; zweckmässigerweise können dazu die geöffneten Originalampullen Verwendung finden. Bindemittel und Fluoreszenzindikator auf käuflichen Dünnschichtplatten stören nicht bei Bedampfungszeiten <2 h. Die erforderliche Einwirkungsdauer ist je nach Substanzklasse sehr verschieden. Bei einigen Reduktionsmitteln (Hydrochinonen, Reduktonen, Mercaptanen) genügt 1 min, bei Olefinen und insbesondere elektronenarmen α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen sind Zeiten bis zu 1 h zur Erreichung der tiefsten Anfärbung erforderlich. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen werden reine Substanzen als Lösungen von 1 mg in 100 ml Lösung mit einer Mikroliterpritze in den Grenzen von 1 ng–0.1 μg aufgetragen und die entwickelten Chromatogramme 10 min

lang mit Osmiumtetroxid bedampft. Nach dem Bedampfen werden die Platten in einem gut ziehenden Abzug vom physikalisch adsorbierten Osmiumtetroxid befreit. Sämtliche Arbeiten mit dem starken Gift müssen selbstverständlich in Abzug durchgeführt werden, das gleiche gilt für die Lagerung der fertigen Dünnschichtplatten.

Die bei olefinischen Verbindungen primär gebildeten cyclischen braunschwarzen Osmatester verwandeln sich nach einiger Zeit durch langsame Hydrolyse auf dem Kieselgel in das tiefschwarze Osmiumdioxid. Die Zeitdauer der Farbvertiefung wird durch kurzes Bedampfen mit konz. HCl verkürzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die bekannten Reaktionen des Osmiumtetroxids lassen sich uneingeschränkt auf die Dünnschichtplatte übertragen[3]. In Tabelle I werden die wesentlichen Ergebnisse der Bedampfung verschiedener Substanzklassen mit Osmiumtetroxid zusammengefasst.

TABELLE I
REAKTION EINIGER SUBSTANZKLASSEN MIT OSMIUMTETROXID

Positive Reaktion	*Keine Reaktion*
1 Olefine α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen und Chinone	Gesättigte Verbindungen Gesättigte Ester und Ketone
2 Reduktionsmittel wie: Reduktone, Hydrochinone, Brenzkatechine und Merkaptane	*Prim.*-, *sek.*- und *tert.*-Alkohole, Monophenole, bei Aldehyden und Zuckern nur sehr langsame Reaktion
3 Amine und Aminosäuren (rötliche Anfärbung)	Nicht basische Stickstoffverbindungen wie Amide und Nitrile

Die reagierenden Substanzen lassen sich grob in drei Klassen einteilen: (1) Olefine, (2) Reduktionsmittel und (3) Amine und Aminosäuren.

Wie Fig. 1 an einigen Beispielen zeigt, sind ungesättigte Verbindungen eindeutig von gesättigten Substanzen durch die Bildung des braun-schwarzen Osmatesters zu unterscheiden. Gesättigte organische Verbindungen, die nicht gleichzeitig als Reduktionsmittel fungieren oder basischen Stickstoff enthalten, werden auch nach 5 h im Reaktionsgefäss nicht angefärbt. Elektronenreiche Olefine reagieren rasch, und nach ungefähr 5 min ist keine Farbvertiefung mehr zu beobachten. Dagegen benötigen Acceptor-substituierte ungesättigte Zentren oft 1 h zur Erreichung der optimalen Schwärze. Dieser subjektive Test könnte zur raschen Orientierung über die Reaktivität eines Olefines dienen. Ebenso kann die Möglichkeit der Umsetzung neuer Substanzklassen mit Osmiumtetroxid schnell getestet werden. So werden beispielsweise Chinone gemäss der kürzlich entdeckten neuen Anwendung zur Umsetzung zum *cis*-hydroxylierten Cyclohexendion[6,7] innerhalb 1 h von Osmiumtetroxid auf Dünnschichtplatten schwarzbraun angefärbt (Fig. 1).

Die Nachweisgrenze ist durch die Zahl der ungesättigten Zentren pro Gewichtseinheit gegeben und schwankt zwischen 5 ng [Ubichinon-(30)] und 0.1 μg (4-Androsten-17α-ol-3-on). Sie könnte durch die Technik der mehrfachen Entwicklung von Dünnschichtplatten[8] noch zu verbessern sein.

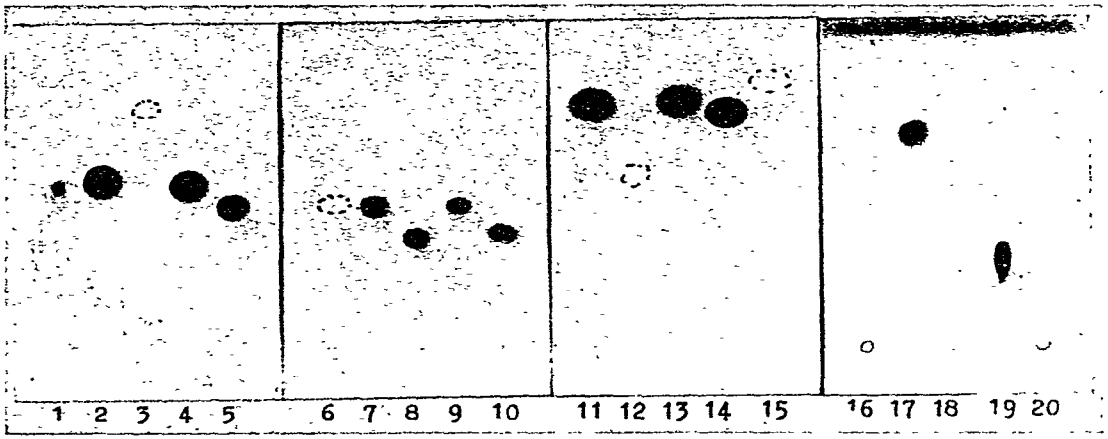

Fig. 1. Dünnschichtchromatogram. 1 = Ubichinon-(30) (10 ng); 2 = Fumarsäure-diäthylester; 3 = Dihydrozimtsäure-methylester; 4 = Zimtsäure-methylester; 5 = Naphthochinon; 6 = Hexöstrol; 7 = Diäthylstilböstrol (*cis* und *trans*); 8 = Hydrochinon; 9 = 2,3-Dihydroxynaphthalin; 10 = Resorcin; 11 = Indol; 12 = Vanillin; 13 = Anthranilsäure-methylester; 14 = Benzoin; 15 = Desoxybenzoin; 16 = Fructose; 17 = Ascorbinsäure; 18 = Galaktose; 19 = Adrenalin; 20 = Inosit.

Durch eine Reihe von Reduktionsmitteln wird Osmiumtetroxid innerhalb von Minuten zum tiefschwarzen Osmiumdioxid reduziert, wodurch sich diese Substanzklasse von den zunächst braun-schwarzen Osmatestern abhebt. Hierzu zählen Reduktone wie Ascorbinsäure[9], Merkaptane, Hydrochinone und Brenzkatechine sowie die mehrfach hydroxylierten Aromaten. Die Nachweisgrenze dieser Verbindungsklasse schwankt zwischen 1 ng (Hydrochinon, Ascorbinsäure) und 10 ng (2,3-Dihydroxynaphthalin).

Alkohole und Ketone reagieren nicht. In Mengen unter 5 μg und bei einer Bedampfungsdauer von weniger als 20 min werden Monophenole, aromatische Aldehyde sowie Zucker (Mannose, Fructose, Galaktose) nicht sichtbar. In grösseren Konzentrationen und nach verlängerter Einwirkungsdauer sind auch aromatische und aliphatische Aldehyde sowie Zucker durch eine schwache Anfärbung zu erkennen.

Amine geben ebenfalls Farbreaktionen mit Osmiumtetroxid und können den spezifischen Nachweis gegebenenfalls stören. Sofern nicht gleichzeitig andere reagierende Funktionen wie Beispielsweise im Indol[10] vorliegen, resultiert jedoch eine rotbraune Anfärbung, die sich auch nach Bedampfen mit HCl nicht in Schwarz umwandelt und sich somit deutlich von der Reaktionsweise der ersten beiden Substanzgruppen unterscheidet. Das gleiche gilt mit Ausnahme von Cystein und Tryptophan für Aminosäuren.

Die oben beschriebene neue Nachweistechnik wird sicher nur in speziellen Fällen Anwendung finden. Die geringe Nachweisgrenze im ng-Bereich, die die Fluoreszenzlöschung auf Dünnschichtplatten bei einigen Substanzen weit übertrifft, scheint jedoch weitere Untersuchungen zu rechtfertigen. Darüber hinaus ist eine Derivatisierung auf der Dünnschichtplatte von Substanzgemischen im Mikromassstab ohne vorherige Isolierung der Bestandteile denkbar. Für grössere Dünnschichtplatten hat sich Osmiumtetroxid (100 mg gelöst in 100 ml CCl_4) auch als Sprühreagenz bewährt.

LITERATUR

1 R. Criegee, *Ann. Chem.*, 522 (1936) 75.
2 K. R. Porter und F. Kallmann, *Exp. Cell Res.*, 4 (1953) 127.
3 G. F. Bahr, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 187.
4 E. Ogawa, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 6 (1931) 307.
5 M. Hudlicky, *J. Org. Chem.*, 39 (1974) 3460.
6 J. Y. Savoie und P. Brassard, *Can. J. Chem.*, 49 (1971) 3515.
7 K. Krohn, *Dissertation*, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1971.
8 J. A. Perry, *J. Chromatogr.*, 113 (1975) 267.
9 W. Wawrzyczeh, *Z. Anal. Chem.*, 184 (1961) 191.
10 D. W. Ockenden und K. Schofield, *Nature (London)*, 168 (1951) 603; *J. Chem. Soc.*, (1953) 612.