
FORTSCHRITTE DER CHEMISCHEN FORSCHUNG

Herausgeber:
E. Heilbronner, Zürich
U. Hofmann, Heidelberg
Kl. Schäfer, Heidelberg
G. Wittig, Heidelberg
Schriftleitung:
F. Boschke, Heidelberg

6. BAND

1966

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten. — Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) oder auf andere Art zu vervielfältigen.

© by Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1966 · Library of Congress Catalog Card Number 51-5497

Printed in Germany

Druck: Druckerei Carl Winter, Heidelberg

Inhalt des 6. Bandes

1. Heft

<i>Bodo, G.</i> : Zur chemischen Aufklärung von Eiweißstrukturen	1
<i>Muirhead, H.</i> : The Structure of Haemoglobin	41
<i>Bohlmann, F.</i> : Natürlich vorkommende Acetylen-Verbindungen	65
<i>Harkin, J. M.</i> : Recent Developments in Lignin Chemistry	101
<i>Gröger, D.</i> : Fortschritte der Chemie und Biochemie der Mutterkornalkaloide	159

2. Heft

<i>Hückel, W.</i> : Reduktion von Kohlenwasserstoffen durch Metalle in flüssigem Ammoniak	197
<i>Rüchardt, Ch.</i> : Nichtkatalysierte Perester-Zersetzungen	251
<i>Langenbeck, W.</i> : Organische Katalysatoren	301
<i>Gante, J.</i> : Azapeptide, eine Klasse neuartiger Peptidanaloger	358

3. Heft

<i>Weinges, K., W. Kaltenhäuser</i> und <i>F. Nader</i> : Konformative Effekte im Ablauf stereoselektiver Reaktionen	383
<i>Dulog, L.</i> : Taktizität und Reaktivität, di- und tritaktische Polymere	427
<i>Schlögl, K.</i> : Stereochemie von Metallocenen	479

4. Heft

<i>Langer, H. G.,</i> and <i>R. S. Gohlke</i> : Thermal Analysis by Mass Spectrometry	515
<i>Heyns, K.,</i> und <i>H. F. Grützmacher</i> : Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden	536
<i>Umland, F.,</i> und <i>A. Janßen</i> : Verwendung von Chelaten in der photo-metrischen Analyse	582
<i>Wohlleben, G.</i> : Sonderfälle aus dem Gebiet der Säulen-Chromatographie	640
<i>Machata, G.</i> : Analytische Verfahren der naturwissenschaftlichen Kriminalistik	659

Mitarbeiter des 6. Bandes

- Dr. *G. Bodo*, Arzneimittelforschung GmbH., 1120 Wien, Laskegasse 5—11 Österreich
- Prof. Dr. *F. Bohlmann*, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität, 1 Berlin 12, Straße des 17. Juni 115
- Priv.-Doz. Dr. *L. Dulog*, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 65 Mainz, Joh.-Joaachim-Becher-Weg 18—20
- Dr. *J. Gante*, Institut für Organische Chemie der Freien Universität, 1 Berlin 33, Thielallee 63—67
- Dr. *R. S. Gohlke*, The Dow Chemical Company, Eastern Research Laboratory, P.O.B. 400, Wayland, Mass. 01778/USA
- Doz. Dr. *D. Gröger*, Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, X 401 Halle (Saale), Weinbergweg
- Priv.-Doz. Dr. *H. F. Grützmacher*, Chemisches Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie, 2 Hamburg 13, Papendamm 6
- Dr. *J. M. Harkin*, United States Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin 53705/USA
- Prof. Dr. *K. Heyns*, Chemisches Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie, 2 Hamburg 13, Papendamm 6
- Prof. Dr. *W. Hüchel*, 74 Tübingen, Mohlstraße 78
- Dipl.-Chem. *A. Janßen*, Anorganisch-Chemisches Institut der Universität, 44 Münster, Hindenburgplatz 55
- Dipl.-Chem. *W. Kaltenhäuser*, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 69 Heidelberg, Tiergartenstraße
- Prof. Dr. *W. Langenbeck*, Institut für Organische Katalyseforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, X 25 Rostock, Buchbinderstraße 5—6
- Dr. *H. G. Langer*, The Dow Chemical Company, Eastern Research Laboratory, P.O.B. 400, Wayland, Mass. 01778/USA
- Doz. Dr. *G. Machata*, Institut für Gerichtliche Medizin der Universität, 1090 Wien, Sensengasse 2/Österreich
- Dr. *H. Muirhead*, Department of Chemistry, Harvard University, Cambridge, Mass. 02138/USA
- Dipl.-Chem. *F. Nader*, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 69 Heidelberg, Tiergartenstraße
- Priv.-Doz. Dr. *Ch. Rüchardt*, Institut für Organische Chemie, Chemisches Laboratorium der Universität, 8 München 2, Karlstraße 23
- Prof. Dr. *K. Schlögl*, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 1090 Wien, Währingerstraße 38/Österreich
- Prof. Dr. *F. Umland*, Anorganisch-Chemisches Institut der Universität, 44 Münster, Hindenburgplatz 55
- Doz. Dr. *K. Weinges*, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 69 Heidelberg, Tiergartenstraße
- Dipl.-Chem. *G. Wohlleben*, i. Fa. M. Woelm, Adsorbentien-Abt., 344 Eschwege

Thermal Analysis by Mass Spectrometry

Dr. H. G. Langer and R. S. Gohlke

The Dow Chemical Company, Eastern Research Laboratory, Wayland, Mass., USA

Contents

I. Introduction	516
II. Methods	516
A. Thermal Analysis	516
1. General	516
2. Thermogravimetric Analysis	517
3. Differential Thermal Analysis	517
4. Dynamic Calorimetry	518
5. Specialized Methods	518
B. Mass Spectrometry	518
1. Terminology	518
2. Basic Principles	519
3. Practical Considerations	519
C. Combinations	522
1. General	522
2. Mass Spectrometric Thermal Analysis	522
3. Mass Spectrometric Differential Thermal Analysis	523
III. Applications	524
A. Vaporization	525
Sulfur	525
B. Dehydration	526
1. Triphenyltin Hydroxide	526
2. Magnesium Hydroxide	527
3. Copper Sulfate Penta-Hydrate	527
C. Dehydrochlorination EDTA · 2HCl · 2H ₂ O	528
D. Pyrolysis GeY · 2H ₂ O	528
E. Stepwise Reactions BeSO ₄ · 4H ₂ O	529
F. Chemical Reactions	530
1. MgCl ₂ · 6H ₂ O	530
2. MgCl ₂ · 4DMSO · 2H ₂ O	531
3. Ba(OH) ₂ + AIR	532
4. CaCO ₃ + H ₂ O	532
5. SnCl ₄ · 2DMSO	533
IV. Conclusion	534
References	534

¹ EDTA = Ethylenediamine tetraacetic acid.

² Y = EDTA-anion.

³ DMSO = Dimethyl sulfoxide.

I. Introduction

The transition from classical to modern concepts of analytical chemistry has brought about a blurring of the boundaries between "qualitative" and "quantitative" methods. The goal is to obtain a maximum yield of information with a minimum expenditure of time. This can be accomplished partially by combinations of compatible methods.

The combination of thermal analysis with mass spectrometry represents one of the successful associations.

II. Methods

A. Thermal Analysis

1. *General*

The various methods and techniques described under this heading have one thing in common: they provide a representation of physical or chemical phenomena as a function of temperature, as a function of supplied energy or under certain circumstances the temperature behavior as a function of time. It is the goal of the investigator to be able to ascribe some scientific significance to the phenomena revealed through the utilization of the various available indicating devices (13, 21-24, 30, 32).

Prior to the advent of sophisticated mechanical and electrical instrumentation, the observation of thermal phenomena was restricted to systems which were amenable to detection by the human senses. Such observations included investigations of boiling or melting processes, sublimation, fractional crystallization, color changes and the occurrence of odors. With the invention of the thermometer, the first quantitative experiment was made possible. Development of thermometry led to "thermal analysis" by recording the temperature of a test material as a function of time. Further developments led to calorimetry - the science of measuring quantities of heat.

Dynamic methods of thermal analysis such as "thermogravimetric analysis," "differential thermal analysis" and "dynamic calorimetry" have resulted from more recently achieved technical and instrumental refinements.

Increasingly severe demands for improved sensitivity, accuracy and reproducibility of measurement have perhaps been the main considerations involved in the tendency toward instrumental miniaturization.

Secondary considerations, though, are a reduction in the amount of sample required – since these methods are inherently destructive – and an increasing capability for reducing the magnitude of perturbing environmental changes. And finally, sufficiently precise temperature control has become available to permit the implementation of a linear increase in temperature for the test sample or a linear input of energy.

2. *Thermogravimetric Analysis*

The method known as thermogravimetric analysis (TGA) requires little more than accurate and sensitive weighing equipment since the resulting information consists of the sample weight as a function of time with increasing temperature. The ideal but seldom realized goal is to achieve a uniform temperature increase of the test material.

Temperatures or temperature ranges of chemical or physical decompositions accompanied by weight losses can be detected provided they are separated from each other by sensible ranges of weight stability. The major limitation of TGA is that systems exhibiting strong temperature dependence or slow rates of reaction are equally difficult to study. This limitation could be overcome if it were possible to provide an infinitely slow, linear temperature increase. However, useable information can be obtained if the observed weight losses are identical with calculated proportions of reaction products.

3. *Differential Thermal Analysis*

The technique known as differential thermal analysis (DTA) consists of a measurement of the temperature difference between a thermally inert reference material and the sample as a function of increasing sample temperature. It should be pointed out that DTA is a method whose subtlety is such that erroneous conclusions can be easily reached through the lack of experience. For example, the appearance of the data is strongly dependent on heating and reaction rates, upon particle size and packing techniques, and certainly upon the amount of sample used. In addition a lack of perfection of mechanical and electrical parameters will adversely affect the quality of the investigation. Some equipment allows the identification of melting and boiling points as well as color changes by visual observation. The absolute identification of endo- or exotherms caused by phase changes or chemical interactions, however, requires the use of at least one auxiliary method of analysis. In fact even experts have failed to reach agreement on the methods most likely to produce consistently reliable and reproducible analyses.

Differential thermal analysis, then – which should perhaps be more properly called differential temperature analysis – is capable of detecting the release or absorption of thermal energy, the temperature range within which such changes take place, and, if properly carried out, the number of thermal reactions occurring.

4. *Dynamic Calorimetry*

The term “dynamic calorimetry” (DC) is used here to describe the attempts which are being made to obtain a measure of heats of reactions using available thermoanalytical equipment (1–3). One method is based on a specially constructed DTA cell designed to minimize heat losses (3). Integration of the peak areas obtained by recording the temperature difference as a function of reference temperature is presumed to be “directly proportional to the quantity of heat involved” (3).

Another method known as “differential scanning calorimetry” (1) records the differential electrical energy necessary to maintain sample and reference at an equal and linearly increasing temperature. Here also it is claimed that “the area under a peak is directly proportional to the energy absorbed or liberated in a transition and is unaffected by sample geometry, sample heat capacity, or such instrument operating parameters as scanning rate” (1).

For these methods the problems inherent in calorimetry are added to those which were described previously as being typical for dynamic thermoanalytical methods.

5. *Specialized Methods*

In recent years other methods for the detection of the onset or the progress of thermally dependent reactions have been employed with increasing frequency. The measurements used include those of conductivity, density, optical density and color, volume changes, electron and x-ray diffraction, infrared absorption, nuclear magnetic resonance and various others (24, 32, 33).

B. Mass Spectrometry

1. *Terminology*

Although mass spectrometry has been used for the analysis of gas mixtures for many years, it is, perhaps advisable to review the nomenclature and procedures involved. The reader is referred to Table I for the definition of several commonly used phrases which are unique to this technique (5, 6, 8, 9, 18–20, 27, 29, 31).

Table 1. *Mass Spectrometric Terms and Definitions*

m/e	Mass to charge ratio of an ion. Since the ionic charge is almost always unity, the symbol "m" is commonly substituted
molecular ion parent peak molecular peak	These three phrases are used synonymously to identify the mass of an ion occurring at the molecular weight of any compound
base peak	The ion of greatest intensity is commonly <i>defined</i> as the base peak if the remaining ions are normalized relative to it
ion fragment	Any ion which can result from the fragmentation of the molecular ion
resolution	A numerical value expressing the capability of the mass spectrometer to separate ions of adjacent mass to a useful extent

2. *Basic Principles*

It is perhaps worthwhile to also indicate that *all* mass spectrometers operate at exceedingly low pressure (on the order of 10^{-6} torr). Furthermore, all mass spectrometers produce ions from molecules in the gas phase and analyze the number and kind of positively charged ions produced. It is vital that detection and recording systems appropriate to the proposed application be chosen.

3. *Practical Considerations*

a) *Sampling*. Any presentation of a discussion of sample and sampling requirements for mass spectrometry presents — perhaps surprisingly — enormous difficulties because of the tremendous variety of available techniques as well as the necessity for choosing the single most appropriate one. Basically however, there are only two aspects of importance. The first of these is that the sample vapor must be introduced into the ion source region of the mass spectrometer at a pressure below 10^{-5} torr. In almost all cases, the input of thermal energy is required to either obtain or maintain a stable sample pressure in this range. The sample and its heat source may be either integral with the mass spectrometer or remote to it. We wish to emphasize that the sole reason for supplying heat is to aid vaporization of the sample. The second consideration involves the absolute time scale of the experiment under study since available inlet systems are conveniently subdivided into those capable of providing a stable sample supply on a time scale of hours, *or* minutes, *or* seconds. Further, there is no single inlet system capable of combining

two or more of these useable time scales and hence the proper choice is mandatory.

b) *Ionization*. The ion source of the mass spectrometer consists of a region in which the sample molecules (in the gas phase!) are converted into molecular ions and their fragments. Positive ions, negative ions, and radicals are all formed during ionization, but since the positive ions predominate by perhaps a factor of 10^4 they are the only ones utilized in the analytical procedure⁴. At the present time the most widely used – by a great margin – method for ionization is electron bombardment. The electrons are invariably obtained from an incandescent metallic wire or ribbon. The physical process by which ionization occurs is still as deep a mystery as it was fifty years ago. It is also possible to generate ions by the utilization of electric field gradients on the order of 2–4 volts per angstrom. This method, known as *field ionization*, is of recent origin, and is experiencing very rapid development and in the near future may well supplant electron bombardment ionization for most analytical applications (3a). This prediction is made because field ionization primarily produces molecular ions, thus greatly simplifying the interpretation of the spectra.

c) *Mass Analysis*. The positive ions are extracted from the ion source with a suitable electric field and accelerated into the mass analysis region. At present there are only two methods by which mass separation of the positive ions can be accomplished. The first and most widely used is based upon the fact that charged particles passing through a magnetic field are deflected proportionally to an extent which can be directly related to their specific mass to charge ratio. One should visualize a single heterogeneous beam of ions entering a magnetic field and *ipso facto* leaving the magnetic field as a number of ion bundles homogeneous in mass ascribing discreet paths. The process is a continuous one. It is also possible to accomplish mass separation by injection of the ions into a field free (electrically as well as magnetically) drift region where they separate into ion bunches of the same mass to charge ratio by virtue of their differing respective velocities. This latter method is utilized in “time-of-flight” instruments and is a pulsed, rather than a continuous, operation.

d) *Detection and Recording*. By varying the magnetic field in a controlled manner, it is possible to sweep the ion beams sequentially past an electrode, which can be either a Faraday cup or – if extreme sensitivity of measurement is required – an electron multiplier. The electrical signal developed by this detector is amplified as necessary and transmitted to a device capable of displaying the intensity of the ions as a function of their

⁴ The single exception appears to be chlorinated compounds where this factor drops to approximately 10^3 .

mass to charge ratio.⁵ The primary limitation encountered in magnetic scanning is that the hysteresis of the magnet limits the speed with which the operation can be repeated. In practice, a range encompassing a factor of 10 in mass (m/e 1–10 or m/e 50–500) is seldom scanned in a shorter period of time than one second if magnetic scanning is employed. Electrostatic scanning – which consists of varying the energy with which the ions are injected into an invariant magnetic field – can be employed to achieve scan times on the order of 0.01 to 1.0 seconds for the previously mentioned mass range. The most significant difficulty with electrostatic scanning is that the adjacent mass resolution becomes progressively poorer as the mass of the ions increases, performance which is directly opposed to that desired. If still more rapid mass scanning is required, it is necessary to utilize a time-of-flight mass spectrometer since repetition rates as high as 100 KHz⁶ can be obtained with these devices.

The methods available for producing a permanent record of the mass spectrum are numerous and the correct choice depends upon the application. If the mass spectra are being presented upon an oscilloscope screen, it is a relatively simple matter to prepare a photograph of it. This technique has the advantage of providing an essentially instantaneous record of the spectrum but subsequent interpretation is difficult due to the usually small size of the photographs. Oscilloscope presented spectra can also be converted to a paper recording through the use of “pulse sampling”⁷ techniques. When the spectra are being produced too slowly to permit efficient oscilloscopic presentation, the user must make a choice between use of a pen and ink or an *oscillographic* recorder. The former provides relatively slow response (0.3 second per mass unit), while the latter performs more rapidly at the expense of readability. In any event, however, we end up with a graph in which ion intensity (ion intensity is proportional to the number of molecules present) is plotted against m/c and which represents a unique fingerprint of the original molecule.

e) *Data Handling.* A comparison of the mass spectrum of an unknown compound with those previously obtained from structurally related reference materials will often permit a rapid estimation of gross structural characteristics to be made. Similarly, the presence or absence of a specific component in a mixture, anticipated or not, can usually be

⁵ More precisely, the ion current is displayed versus magnetic field strength.

⁶ KHz = kilohertz; 1 Hz = 1 c.p.s.

⁷ An electronic technique for converting the vertical signal into one suitable for driving an external device.

visually ascertained. The utilization of high speed computer techniques will often permit the refinement of the determination to the point where the complete molecular architecture can be derived.

It should also be mentioned that it is a simple matter to monitor the concentration of suspected components in a mixture as a function of time, pressure or temperature with the mass spectrometer.

C. Combinations

1. General

If the same variable parameter is used for two independent methods of analysis for the purpose of obtaining different information, in general a combination of the two techniques will provide a method which is more powerful than either one taken alone. It is our purpose to show how a combination of thermal methods of analysis with mass spectrometry results in a single technique of exceptionally high significance (13).

2. Mass Spectrometric Thermal Analysis

For mass spectrometric thermal analysis (MTA), a method previously described (16), any ion intensity can be recorded as a function of sample temperature. This method has been developed on a time-of-flight mass spectrometer (12). A small sample is introduced into a miniaturized furnace located within the ion source structure as shown in Fig. 1 by

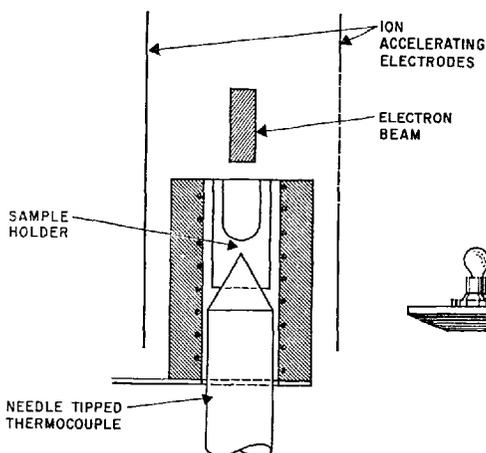


Fig. 1. Schematic of Furnace used for MTA Experiments

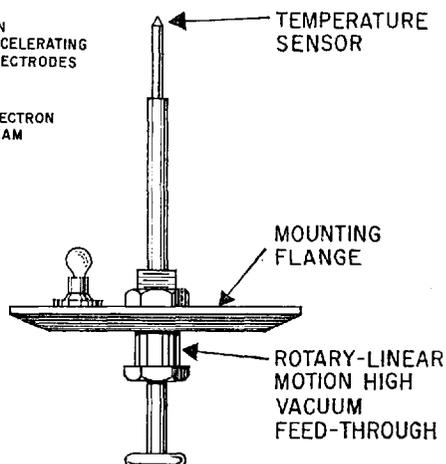


Fig. 2. Sample Carrier Assembly for MTA

Chem. & Ind. (London) 946, 1963. By permission of copyright owner.

means of the thermocouple containing sample carrier illustrated by Fig. 2. Prior to the introduction of the sample into the ion source, the pressure of the loading chamber must be reduced from atmospheric pressure to at least 10^{-5} torr; a procedure which normally requires approximately five minutes. If the sample is wet, however, or if a vapor is being lost from the sample, a considerably longer period of time may be required. The presently used equipment allows any temperature below 900°C to be reached at any selected rate. Switching to isothermal operations at any point during the heating program is also possible. Aided by the capability of continuously observing the complete mass spectra on an oscilloscope screen, the operator retains the freedom of choice between monitoring specific ion intensities or recording entire mass spectra at any point of the experiment. Transient phenomena – as they occur – can be observed and might be of significance for a subsequent evaluation of the data.

If a sufficiently fast recording system is available, entire mass spectra can be recorded repetitively and continually and the intensity of any desired mass peak can later be plotted manually as a function of the simultaneously recorded temperature. This mode of operation is known as time resolved spectroscopy (17a). In addition to ion intensities, a number of instrumental parameters such as pressure, total ionization, voltage, electron energy, etc., can be monitored provided the necessary data channels are available.

3. *Mass Spectrometric Differential Thermal Analysis*

Convenient as the previously described method may be, it is limited by the operational pressure requirement of the mass spectrometer. A possible way to overcome this limitation is through the use of an external sampling device which consists of a DTA cell equipped with an integrally mounted system for reducing the sample pressure in concordance with the mass spectrometer requirements. This method has become known as mass spectrometric differential thermal analysis (MDTA) (17). Even though occasionally MTA and MDTA produce the same information, in general the two methods supplement one another. Since the sample vapor must be physically transported from its point of origin to the ion source of the mass spectrometer, it is advisable to keep all interconnections as short as possible which will minimize fractionation effects⁸ and undesirable side reactions occasionally caused by metallic surfaces.

⁸ These fractionation effects are of several kind. For instance, the different adsorptive characteristics of the various metal surfaces must be considered as well as the different molecular weight dependent velocities of the gas molecules (11).

Modification of a commercially available DTA cell⁹ (Fig. 3) by the addition of the valve shown in Fig. 4 allows operation over a pressure ranging from 1500 to approximately 10^{-3} torr.

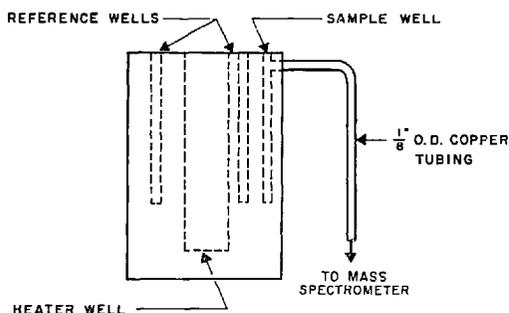


Fig. 3. DTA Cell Modified to permit MDTA Experiments
Anal. Chem. 37, 433 (1965). By permission of copyright owner.

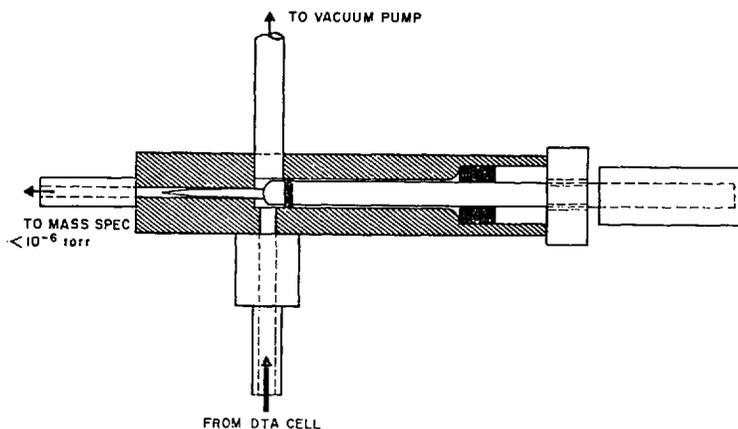


Fig. 4. MDTA Sampling Valve

III. Applications

Examples discussed in the following section in no way present a comprehensive survey, but are intended to demonstrate the capabilities of the methods previously described.

⁹ DuPont 900 Differential Thermal Analyzer.

A. Vaporization

Sulfur

An examination of Table II reveals the importance of experimental conditions in relation to the mass spectra produced. The column headed K. C.¹⁰ represents the equilibrium composition of sulfur vapor at that temperature (4). "Free evaporation" (4) in the first column includes the possibility of producing S₈ molecules by recombination on the edges of baffles used. The low degree of association detected for the third

Table 2. Vapor Composition of Sulfur (S_n) by Mass Spectrometry

	F.E.		K.C.		G.I.		MTA	
	n	I	n	I	n	I	n	I
	8	100	8	100	2	100	2	100
	2	70	2	95	1	8	1	51
	4	48	4	64	6	7	4	40
	5	29	5	41	4	2	8	36
	3	15	6	39	8	2	3	25
	6	15	3	24	5	2	5	17
	1	11	1	10	3	1	6	13
	7	<1	7	8	7	<1	7	2
Temp. °C	73		75		sample: 250 inlet: 120		50-700	

F.E. = "Free Evaporation" through baffles (4) of rhombic sulfur.

K.C. = Knudsen Cell Evaporation (4) of rhombic sulfur

G.I. = Evaporation through gas inlet system (10) of undefined sulfur.

MTA = Evaporation by MTA (14) from sulfur and sulfide containing sample.

I = Intensity (most intense peak \cong 100).

experiment (10) is undoubtedly due to thermal degradation. Finally, since the vapor composition in column four exhibits no sensible change over the temperature range of 600°C (50-700°C), we conclude that the vapor composition as derived by MTA depends on the composition of the condensed phase.

Although all four methods are equally suitable for the detection of sulfur in a given sample, only MTA provides the direct response necessary for thermal analysis.

¹⁰ A "Knudsen cell" experiment.

B. Dehydration

1. *Triphenyltin Hydroxide*

The DTA trace in Fig. 5 (broken line) represents the thermal behavior of triphenyltin hydroxide. Chemical reactions which might be applicable

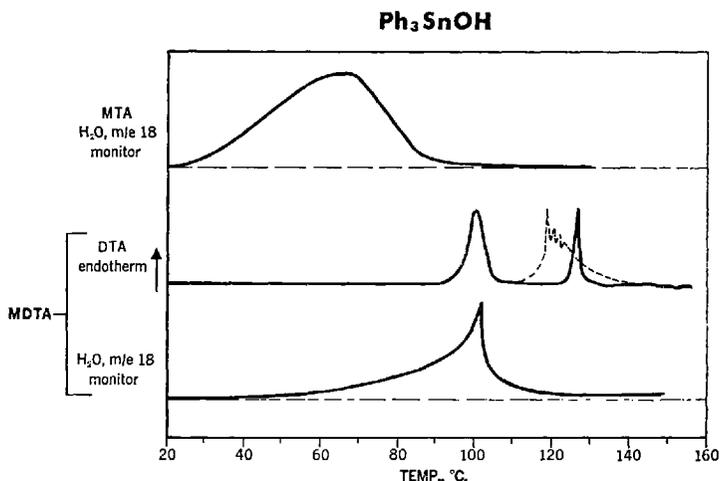
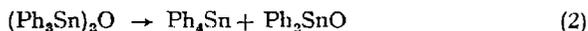
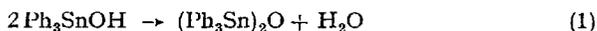


Fig. 5. Thermal Behavior of Ph_3SnOH

Anal. Chem. 37, No. 10, 25A (1955). By permission of copyright owner.

are dehydration (Eq. 1) and disproportionation (Eq. 2) with water, tetraphenyltin and diphenyltin oxide as the products (14, 15). Visual



observation identifies the first peak as the melting endotherm. This is followed by the appearance of bubbles in the sample which may be associated with dehydration.

The MTA trace exhibits a slow increase and decrease of m/e 18 (H_2O) considered to be typical for diffusion controlled dehydration. Apparently it would have been possible to have carried out the dehydration at room temperature by reducing the pressure or applying a desiccant – a behavior atypical of “true” hydroxides.

The additional information, available only from the MDTA experiment makes it clear that solid state dehydration precedes the melting of bis-triphenyltin oxide.

The chemical phenomenon described by equation (2) can be verified by repetitive DTA which detects the presence of bis-triphenyltin oxide and tetraphenyltin by their melting endotherms. Thus by the combination of DTA, MTA, and MDTA, the thermal behavior of triphenyltin hydroxide – or preferably hydrated bis-triphenyltin oxide – can be completely explained. None of the methods taken separately is able to do so.

2. Magnesium Hydroxide

Fig. 6 illustrates the MTA curve (H_2O) for $\text{Mg}(\text{OH})_2$. It demonstrates the shape of the curve and the pressure independence typical for an alkaline-earth hydroxide, compounds which undoubtedly belong among

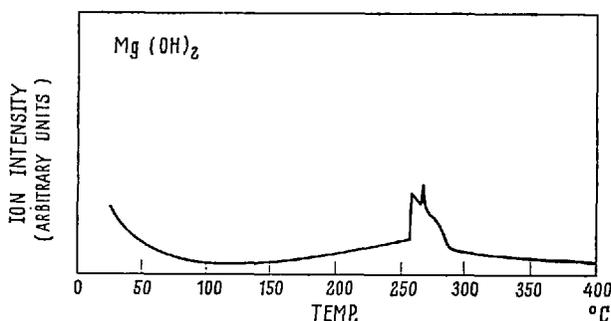
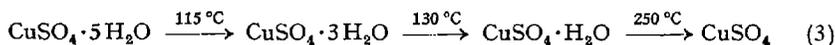


Fig. 6. MTA Trace of $\text{Mg}(\text{OH})_2$

materials which are most difficult to dehydrate. This behavior is typical for a chemical reaction in comparison to the diffusion controlled process previously described.

3. Copper Sulfate Penta-Hydrate

In contrast to the group II hydroxides, compounds containing so-called "water of crystallization" can be readily dehydrated. Eq. (3) represents the reactions reported for copper sulfate penta-hydrate heated at atmospheric pressure (7).



When the sample was evacuated to less than 10^{-6} torr and subsequently investigated by MTA, only a small amount of "adsorbed" water was detected at 70°C – all formally contained water had been removed.

C. Dehydrochlorination



The small amount of H_2O detected during the MTA scan of ethylenediamine tetraacetic acid (Fig. 7) is typical for adsorbed, residual mois-

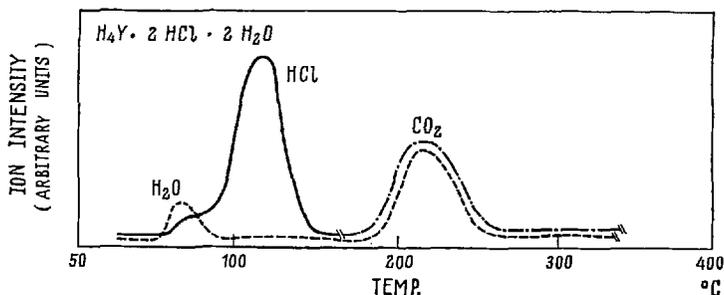


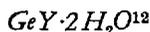
Fig. 7. MTA Trace of $H_4Y \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$

Anal. Chem. 37, No. 10, 25 A (1965). By permission of copyright owner.

ture and further indicates that the two moles of H_2O indicated by the formula were as loosely held as those in $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. In addition, the following conclusions are justified:

1. the dihydrochloride is stable below approximately $100^\circ C$ under the condition of the experiment;
2. dehydrochlorination is complete in one step and no evidence for a monohydrochloride is observed;
3. the free acid is stable to approximately $180^\circ C$;
4. since decarboxylation and dehydration occur concurrently at about $220^\circ C$, EDTA does not form an anhydride.

D. Pyrolysis



Thermal behavior of a different kind is noted for $GeY \cdot 2H_2O$ which appears to be a hydroxo chelate rather than a hydrate. In any event, the water is firmly held and cannot be classified as water of crystallization. Analysis of the curve indicates that:

1. dehydration to a "monohydrate" occurs at about $70^\circ C$;
2. this compound is stable between 90 and $160^\circ C$ and a second dehydration step starts at $160^\circ C$;
3. the anhydrous chelate is stable to $270^\circ C$, whereupon decarboxylation and dehydration occurs followed by complete pyrolysis at $380^\circ C$;

¹¹ EDTA = Ethylenediamine tetraacetic acid. ¹² Y = EDTA-anion.

4. decomposition of the organic matrix begins about 100°C higher for the chelate than for the free acid.

Since the areas under the curve (Fig. 8) are a measure¹³ of the amount of volatile material released, it can be shown that the same quantity of water is liberated at each dehydration step.

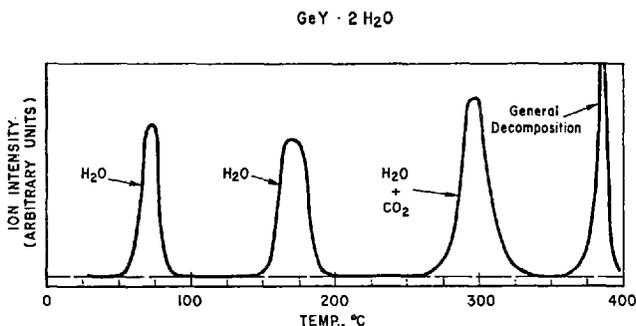
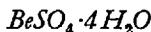


Fig. 8. MTA Trace of $\text{GeY} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Anal. Chem. 35, 1301 (1963). By permission copyright owner.

E. Stepwise Reactions



The comparison between MTA and DTA (26) depicted by Fig. 9 requires little explanation. The time lag observed for the MTA curve is caused by

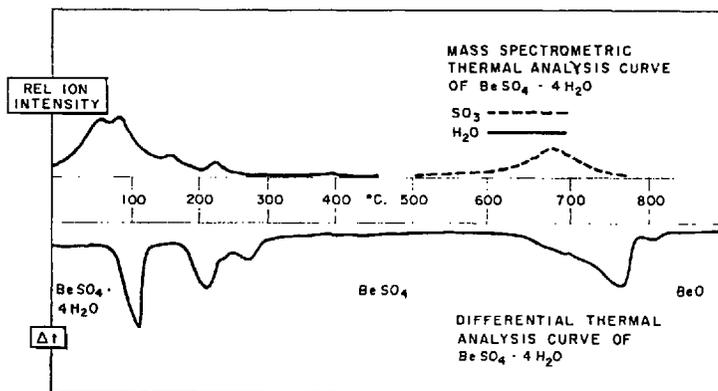


Fig. 9. Comparison of MTA and DTA curves from $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Anal. Chem. 35, 1301 (1963). By permission of copyright owner.

¹³ The ion intensity is proportional to the number of molecules of a species being drawn into the mass spectrometer. Therefore it is possible to determine quantitatively the amount of any species release for which an internal reference material can be supplied.

the low pressure in the mass spectrometer and can be utilized to obtain kinetic information (28) for pressure dependent reactions by recording the ion intensity as a function of time.

F. Chemical Reactions

1. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

Thermal dehydration of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ is always accompanied by hydrolysis producing HCl and $MgOHCl$ (25). Investigations by MTA and MDTA (Fig. 10) have demonstrated that this unwanted side reaction

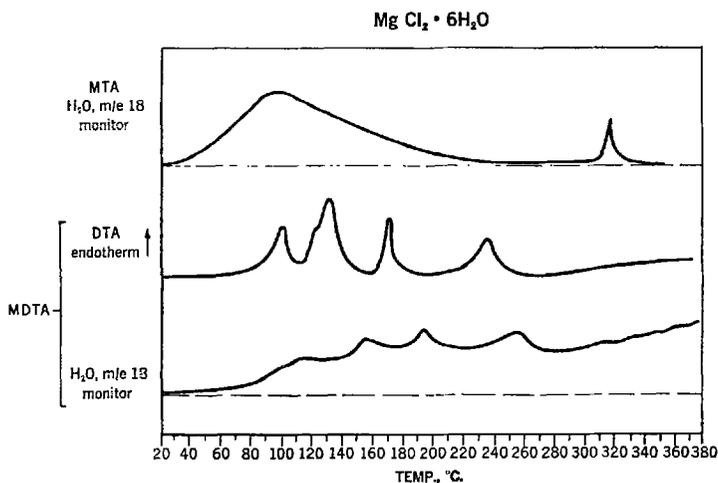


Fig. 10. Comparison of MTA and MDTA curves from $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ Anal. Chem. 37, No. 10, 25 A (1965). By permission of copyright owner.

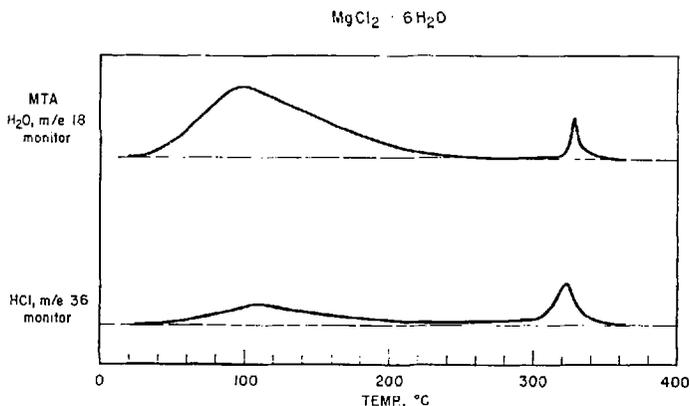
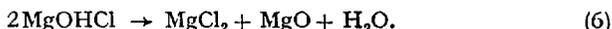


Fig. 11. MTA Traces from $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

cannot be avoided by vacuum dehydration. Even though a concomitant reduction in dehydration temperature is also achieved, the presence of MgOHCl is indicated by the initial release of HCl at its formation (Fig. 11)



and also by the subsequent further release of water and HCl at its decomposition (at 350°C) according to



This behavior offers convincing evidence for the formation of MgOHCl being due to a molecular degradation rather than to a secondary reaction between water and anhydrous magnesium chloride.

2. $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{DMSO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ¹⁴

The previous conclusion is further substantiated by the successful dehydrations of ammonium carnallite (25) and $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{DMSO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

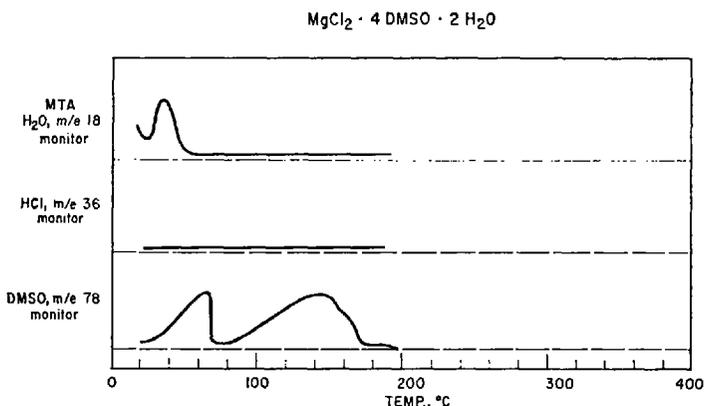


Fig. 12. MTA Traces from $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{DMSO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(Fig. 12). The latter produced pure anhydrous MgCl_2 without any evidence for the release of HCl at any time during the course of the experiment. In addition, H_2O was not observed above 80°C .

¹⁴ DMSO = Dimethyl sulfoxide.

3. $Ba(OH)_2 + AIR$

Barium hydroxide octahydrate apparently is dehydrated to the anhydrous hydroxide below 60°C and to the oxide at 240°C. Immediate reaction with the residual oxygen in the mass spectrometer occurs to form the known stable peroxide (Fig. 13).

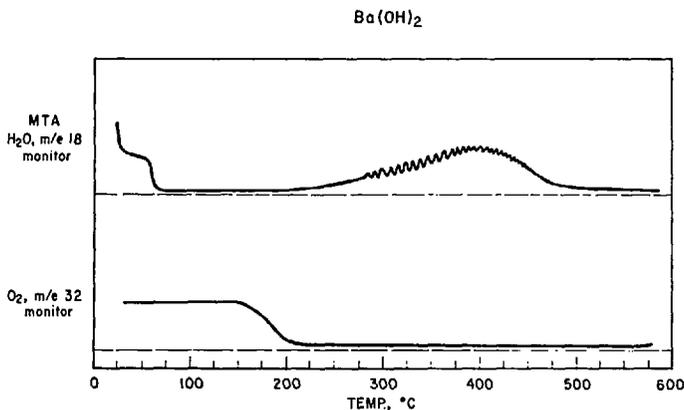


Fig. 13. MTA Traces from $Ba(OH)_2$

4. $CaCO_3 + H_2O$

Fig. 14 demonstrates a similar reaction of calcium carbonate with water:

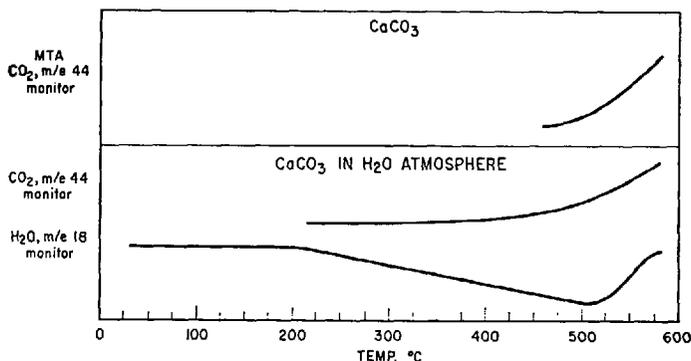
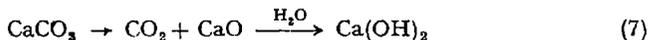


Fig. 14. MTA Traces from $CaCO_3$ and $CaCO_3$ in an Atmosphere of H_2O Vapor



Apparently, decarboxylation of calcium carbonate is facilitated by the presence of water vapor, which for this experiment was artificially introduced into the mass spectrometer.

5. $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$

It was of interest to note whether either of the two endotherms (Fig. 15) observed for $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ was caused by chemical decomposition. The sample was maintained at atmospheric pressure in the DTA cell

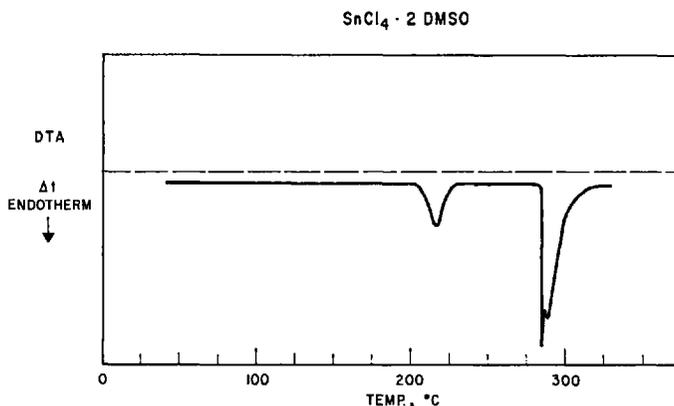


Fig. 15. Differential Thermogram of $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$

and the course of the decomposition was observed on an oscilloscope screen. Both DMSO and SnCl_4 were detected after the solid state transition (215°C) and an increase in the amount of both compounds was observed above the melting and boiling points.

By MTA (10^{-7} torr), DMSO was monitored and two peaks were observed at 70°C and at 150°C (Fig. 16).

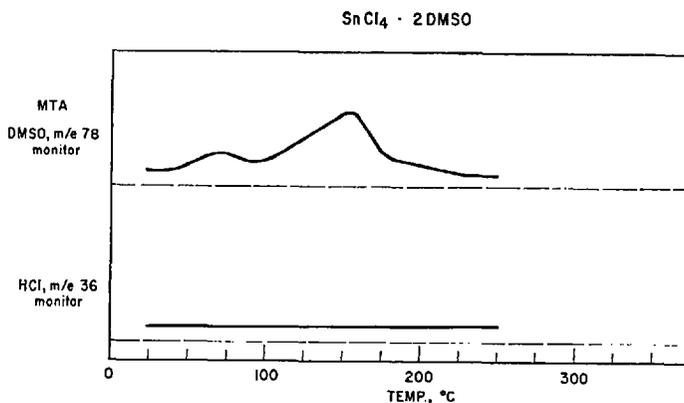


Fig. 16. MTA Traces from $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$

It appears that a 2:1 complex is stable to at least 70°C, and that an equilibrium between the 2:1 and the 1:1 complex exists below 215°C.

IV. Conclusion

Recently demonstrated possibilities of recording mass spectrometric data on magnetic tape offer the intriguing prospect of recreating the course of an experiment in its entirety at will. This allows an evaluation of the collected information by studying the relationship of a particular event with any combination of recorded parameters.

Time compression or expansion of the experiment on replay can be easily accomplished by changing tape speeds. Ultimately, unattended data acquisition becomes practical and reliable.

References

1. *Anonymous*: Differential Scanning Calorimetry, A Quantitative Technique for Differential Thermal Analysis. MPL-6632, Perkin-Elmer Instrument Division, Norwalk, Conn. (1964).
2. — Quantitative DTA Data. DuPont Thermogram 2, 9 (1965).
3. — Calorimeter Cell. E. I. DuPont de Nemours and Co. Thermal Analysis Bulletin, 900-8 (1965) Wilmington, Delaware.
- 3a. *Beckey, H. D.*, and *G. Wagner*: Analytical Applications of a Mass Spectrometer Equipped with a Field Emission Ion Source. Eleventh Annual ASTM Committee E-14, San Francisco, California, U.S.A., May 19, 1963.
4. *Berkowitz, J.*, and *W. A. Chupka*: Vaporization Processes Involving Sulfur. *J. Chem. Phys.* 40, 287 (1964).
5. *Beynon, J. H.*: Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry. Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1960).
6. *Biemann, K.*: Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York (1962).
7. *Borchard, H. J.*, and *F. Daniels*: Differential Thermal Analysis of Inorganic Hydrates. *J. Phys. Chem.* 61, 917 (1957).
8. *Brunnée, C.*, u. *H. Voshage*: Massenspektrometrie. Karl Thieme KG, München (1964).
9. *Budzikiewicz, H.*, *C. Djerassi*, and *D. H. Williams*: Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds. Holden-Day, Inc., San Francisco (1964).
10. *Dilling, M.*: Chemical Phys. Res. Lab., The Dow Chemical Company, Midland, Michigan. Private Communication (1964).
11. *Gohlke, R. S.*: Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Anal. Chem.* 31, 535 (1959).
12. — Obtaining the Mass Spectra of Non-Volatile or Thermally Unstable Compounds. *Chem. and Ind. [London] 1963*, 946.
13. — and *H. G. Langer*: Thermal Analysis by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 37, 25A (1965).

14. *Krause, E., u. R. Pohland*: Dicyclohexyl-zinn, Hexacyclohexyldistannan, und andere Cyclohexyl-zinnverbindungen. *Chem. Ber.* **57**, 540 (1924).
15. *Kushlefsky, B., I. Simmons, and A. Ross*: Characterization of Triphenyltin Hydroxide and Bis-(triphenyltin) Oxide. *Inorg. Chem.* **2**, 187 (1963).
16. *Langer, H. G., and R. S. Gohlke*: Mass Spectrometric Thermal Analysis (MTA). *Anal. Chem.* **35**, 1301 (1963).
17. — — and *D. H. Smith*: Mass Spectrometric Differential Thermal Analysis. *Anal. Chem.* **37**, 433 (1965).
- 17a. *Lincoln, K. A.*: A Simple Display System for Recording Time-Resolved Mass Spectra. *Rev. Sci. Instr.* **35**, 1688 (1964).
18. *McLafferty, F. W.*: Mass Spectrometry, Chapter 2 in "Determination of Organic Structures by Physical Methods". *Nachod, F. C., and W. D. Phillips*, editors. Academic Press, New York (1962).
19. — Editor, Mass Spectrometry of Organic Ions. Academic Press, New York (1963).
20. — and *R. S. Gohlke*: Expanded Analytical Horizons Through Mass Spectrometry. *Chemical and Engineering News* **42**, 96 (1964).
21. *Murphy, C. B.*: Differential Thermal Analysis (review). *Anal. Chem.* **30**, 867 (1958).
22. — Differential Thermal Analysis (review). *Anal. Chem.* **32**, 168R (1960).
23. — Differential Thermal Analysis (review). *Anal. Chem.* **34**, 298R (1962).
24. — Thermal Analysis (review). *Anal. Chem.* **36**, 347R (1964).
25. *Nebergall, W. H., and F. C. Schmidt*: College Chemistry. 617, 619–20. D. C. Heath and Co., Boston (1957).
26. *Peterson, D. R., H. W. Rinn, and S. T. Sutton*: Evidence for the Existence of the Phase $\text{BeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. *J. Phys. Chem.* **68**, 3057 (1964).
27. *Reed, R. I.*: Ion Production by Electron Impact. Academic Press, London (1962).
28. *Sarasohn, I. M.*: Application of the Clausius-Clapeyron Equation to DTA. *DuPont Thermogram* **2**, 1 (1965).
29. *Silverstein, R. M., and G. C. Bassler*: Spectrometric Identification of Organic Compounds, Chapter 2. John Wiley and Sons, Inc., New York (1963).
30. *Smothers, W. J., and Y. Chiang*: Differential Thermal Analysis: Theory and Practice. Chem. Publishing Co., New York (1958).
31. *Spiteller, G.*: Relationship between Structures and Mass Spectra of Organic Compounds. *Angew. Chemie (Int. Ed.)* **4**, 383 (1965).
32. *Wendlandt, W. Wm.*: Thermal Methods of Analysis. Interscience Publishers, New York (1964).
33. — and *T. M. Southern*: An Apparatus for Simultaneous Gas Evolution Analysis and Mass Spectrometric Analysis. *Anal. Chim. Acta* **32**, 405 (1965).

(Received February 25 th, 1966)

Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden*

Prof. Dr. K. Heyns und Priv.-Doz. Dr. H. F. Grützmacher

Chemisches Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Inhaltsübersicht

I. Einleitung	536
II. Massenspektren von Aminosäuren und einfachen Aminosäure-Derivaten	538
1. Freie Aminosäuren und Aminosäureester	538
2. Acylaminosäuren und Acylaminosäureester	548
III. Massenspektren von Cyclopeptiden	556
1. Dioxopiperazine	556
2. Cyclische Oligopeptide	558
3. Cyclische Depsipeptide	561
IV. Massenspektren von Acylpeptiden und Acylpeptidestern	565
1. Peptide einfacher aliphatischer Aminosäuren	565
2. Peptide des Serins, Threonins, der Asparaginsäure und Glutaminsäure	569
3. Peptide aromatischer Aminosäuren.	572
4. Einfluß der N-terminalen Acyl-Gruppe	574
V. Massenspektrometrische Sequenzanalyse linearer Peptide	576
Literatur	580

I. Einleitung

Die zahlreichen Vorteile der massenspektrometrischen Strukturanalyse gegenüber den klassischen chemischen Methoden haben diesem Verfahren zu rascher Verbreitung in der organischen Chemie verholfen. Die Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen zahlreicher organischer Substanzklassen, insbesondere von Alkaloiden, Steroiden und Terpenen, sind von *H. Budzikiewicz*, *C. Djerassi* und *D. H. Williams* in einer Monographie (1) zusammengestellt worden. Die schnelle Entwicklung macht heute bereits eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse einzelner Stoffgruppen wünschenswert. Kürzlich wurde von uns in dieser Reihe über massenspektrometrische Strukturanalysen von Kohlenhydraten berichtet (2). In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse, die von verschiedenen Arbeitskreisen bei der massenspektrometrischen Unter-

* Die in dieser Arbeit gezeigten Massenspektren wurden mit einem ATLAS CH 4-Massenspektrometer mit Hilfe der direkten Einlaßmethode aufgenommen.

suchung von Aminosäuren, Peptiden und deren Derivate erzielt wurden, zusammengefaßt werden.

Die Massenspektrometrie ist zur Analyse von Peptiden von besonderem Interesse, da man aus einem Massenspektrum nicht nur Aufschluß über Art und Anzahl funktioneller Gruppen im untersuchten Molekül erhält, sondern auch die *Reihenfolge* ableiten kann, mit der Atome und Atomgruppen im Molekül miteinander verknüpft sind. Daher sollte eine massenspektrometrische Sequenzanalyse von Peptiden möglich sein.

Eine massenspektrometrische Strukturanalyse setzt voraus, daß der Zusammenhang zwischen Massenspektrum und Struktur hinreichend genau bekannt ist. Dieser Zusammenhang wird durch die Zerfallsreaktionen des ionisierten organischen Moleküls (Molekül-Ion) gegeben. Produkte des Zerfalls eines Molekül-Ions sind positiv geladene Molekül-Bruchstücke (Fragment-Ionen) und neutrale Fragmente. Ein Massenspektrum kann als quantitative Analyse der ionischen Produkte des durch Elektronenstoß induzierten Zerfalls eines organischen Moleküls aufgefaßt werden. Die Kinetik des Zerfalls bestimmt die Art und die relative Intensität, mit der die möglichen Fragment-Ionen beobachtet werden.

Die kinetisch kontrollierte Entstehung des Massenspektrums einer organischen Substanz wird durch die statistische oder Quasi-Gleichgewichts-Theorie der Massenspektren (3) begründet. Nach dieser Theorie wird durch den Elektronenstoß ein positives angeregtes Molekül-Ion gebildet, in dem infolge der sehr dichten Packung der Anregungszustände positive Ladung und Anregungsenergie im ganzen Molekül-Ion fluktuieren können. Bestimmte Anregungszustände, in denen die Energie hinreichend in einer oder mehreren Bindungen lokalisiert ist, sind Übergangszustände für den monomolekularen Zerfall des Molekül-Ions. Die Besetzung dieser „aktiven“ Anregungszustände erfolgt statistisch in einem Quasi-Gleichgewicht mit den übrigen Zuständen. Da in 1. Näherung ein Übergangszustand relativ zu den übrigen durch die Stabilität der entstehenden Produkte begünstigt wird, zerfällt das Molekül-Ion bevorzugt in stabile Fragment-Ionen und neutrale Fragmente.

Obwohl die statistische Theorie die Massenspektren kleiner organischer Moleküle befriedigend erklärt, ist in letzter Zeit ihre Gültigkeit für die Massenspektren großer organischer Moleküle bezweifelt worden (4). Um die Massenspektren organischer Moleküle zu erklären, die Atome und Atomgruppen mit stark unterschiedlicher elektronischer Konfiguration enthalten wie gesättigte Alkyl-Gruppen, ungesättigte und aromatische Systeme und Heteroatome, muß die ursprüngliche Theorie modifiziert werden. In diesen Molekülen sind wahrscheinlich Sätze von mehr oder weniger isolierten Anregungszuständen vorhanden, so daß die

positive Ladung nicht mehr im ganzen Molekül wandern kann, sondern bevorzugt in bestimmten Teilen des Molekül-Ions lokalisiert ist. Die positiven Ladungszentren steuern dann den Zerfall des Molekül-Ions.

Diese Vorstellungen haben sich für die Formulierung der Mechanismen massenspektrometrischer Zerfallsreaktionen gut bewährt (5), sie werden daher auch für die Beschreibung des Abbaus der Molekül-Ionen von Aminosäuren und Peptiden in dieser Arbeit benutzt. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß der tatsächlich vorhandene elektronische Zustand dieser Ionen nicht bekannt ist. Einer Anregung von C. Djerassi und Mitarb. (5) folgend bedeutet ein Pfeil \rightarrow die Wanderung zweier Elektronen im Übergangszustand, ein Haken \rightarrow dagegen die Verschiebung eines Elektrons. Als weitere Abkürzungen werden M für Molekulargewicht und MZ für Massenzahl benutzt.

II. Massenspektren von Aminosäuren und einfachen Aminosäure-Derivaten

1. Freie Aminosäuren und Aminosäureester

Fast alle Aminosäuren können im Vakuum bei 0,3 Torr und Temperaturen um 200°C unzersetzt sublimiert werden (6). Der Druck in der Ionenquelle eines Massenspektrometers beträgt im allgemeinen nur 10^{-7} bis 10^{-6} Torr, der zur Aufnahme eines Massenspektrums hinreichende Partialdruck der Substanz im Gasraum der Ionenquelle ist von ähnlicher Größe. Bringt man daher eine kleine Menge einer Aminosäure direkt in den Ionenquellenraum des Massenspektrometers, so erhält man schon bei 100 bis 150°C eine für die massenspektrometrische Untersuchung genügend große Konzentration der Aminosäure im Gasraum (7). Die auf

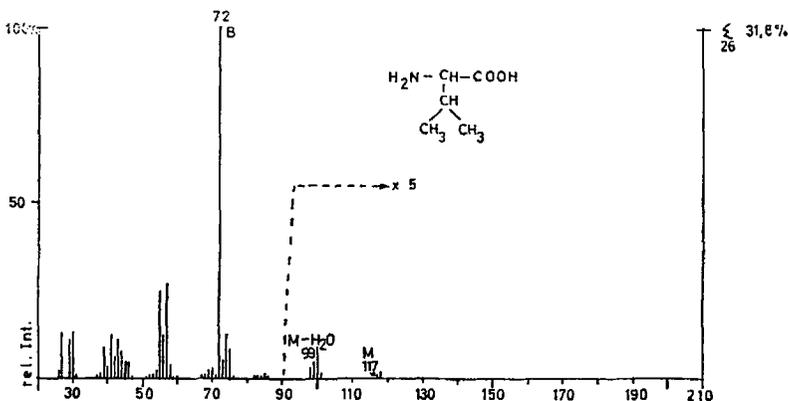
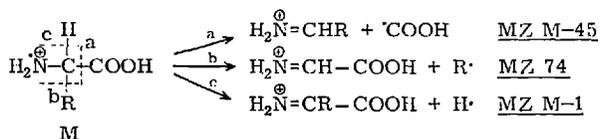


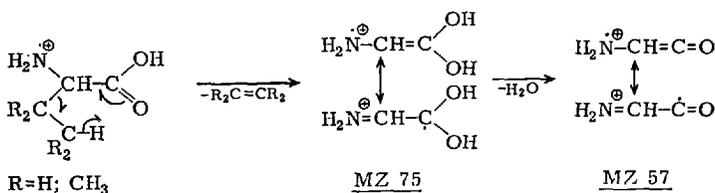
Abb. 1. Massenspektrum des Valins, 70 eV.

diese Weise erhaltenen Massenspektren der freien Aminosäuren (8–10) sind sehr einfach (Abb. 1). Dies gilt besonders für die Massenspektren von Aminosäuren mit einer aliphatischen Seitenkette ohne funktionelle Gruppe. Neben einem kleinen, aber deutlich erkennbaren Peak des Molekül-Ions enthalten sie alle den Hauptpeak MZ M-45 und einen weiteren charakteristischen Peak MZ 74. Man kann annehmen, daß die Aminosäuren in der Gasphase in der unpolaren Form vorliegen. Amine werden, wie ihr kleines Ionisationspotential von 9 bis 9,5 eV (11) zeigt, durch Elektronenstoß leicht unter Verlust eines Elektrons des freien Elektronenpaares am Stickstoff ionisiert. Man muß daher erwarten, daß in den Molekül-Ionen der Aminosäuren die positive Ladung gleichfalls am Stickstoff-Atom weitgehend lokalisiert ist. Eine homolytische Bindungsspaltung in α -Stellung zum Stickstoff-Atom führt dann zu Fragment-Ionen, die durch Iminium-Carbenium-Ion-Mesomerie stabilisiert sind:



Die Bildung der Ionen MZ M-45 durch Abspaltung der Carboxyl-Gruppe als COOH-Radikal (oder CO + HO•) überwiegt, weil neben stabilen Iminium-Ionen auch relativ stabile Radikale entstehen. Von den restlichen beiden α -Spaltungen wird die Abspaltung der Alkylseitenkette zum Ion MZ 74 bevorzugt, ein Ion MZ M-1 tritt nicht auf. Dies entspricht der Regel, daß in dem Massenspektrum die Bildung von Ionen durch Abspaltung eines möglichst großen Molekülteils begünstigt ist. Die relative Intensität der Ionen MZ 74 steigt daher vom Glycin zum Isoleucin mit zunehmender Größe der Seitenkette an.

Ist die Seitenkette eine größere Alkyl-Gruppe, so beobachtet man in den Massenspektren zwei weitere charakteristisch große Peaks MZ 75 und MZ 57. Diese Ionen entstehen durch eine Reaktionsfolge, bei der im 1. Schritt die Aminosäure-Seitenkette als Olefin durch eine McLafferty-Umlagerung eliminiert wird und anschließend ein H₂O-Molekül abgespalten wird:



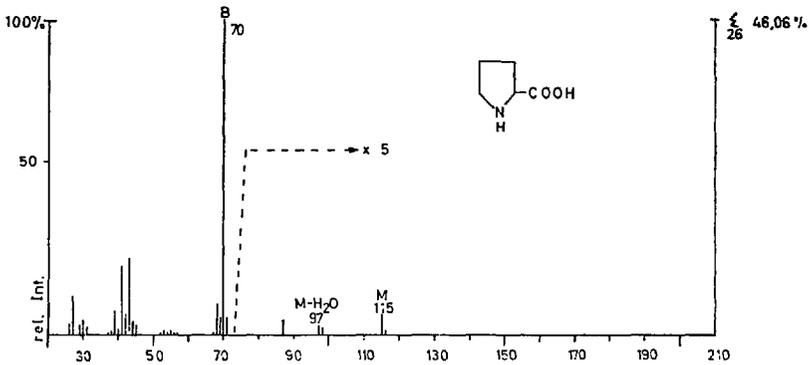


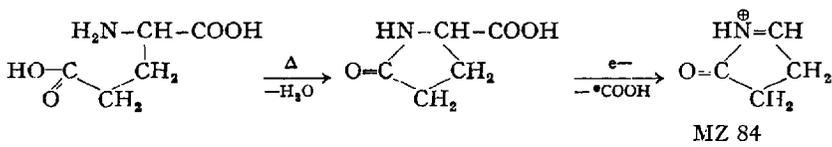
Abb. 2. Massenspektrum des Prolins, 70 eV.

Die McLafferty-Umlagerung (Abspaltung einer Alkyl-Gruppe aus dem Molekül-Ion unter Wanderung eines H-Atoms als Olefin) ist aus den Massenspektren von Keto-Verbindungen gut bekannt. Die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Zerfallsreaktion eintritt, ist von der Struktur der Alkyl-Gruppe abhängig. Einen besonderen Einfluß hat die Größe und die Stabilität des entstehenden Olefins (12). Die sec. Butyl-Seitenkette des Isoleucins wird leichter eliminiert als die Isobutyl-Seitenkette des Leucins, daher kann Isoleucin durch eine erhöhte Intensität der Peaks MZ 75 und MZ 57 von seinem Isomeren massenspektrometrisch unterschieden werden.

Eine Abspaltung der Seitenkette als Radikal oder als Olefin ist bei den Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin nicht möglich. Das Massenspektrum des Prolins (Abb. 2) weist daher neben den Peaks MZ 39 bis 43, die durch einen weitgehenden Abbau des Molekül-Ions entstehen und wenig spezifisch sind, nur einen sehr großen Peak MZ M-45 auf. Ähnlich verhält sich Hydroxyprolin. Die Intensität seines Molekül-Ions ist jedoch so gering, daß es praktisch im Massenspektrum nicht mehr nachgewiesen werden kann. Statt dessen beobachtet man einen deutlichen Peak MZ M-18. Dieses Ion entsteht durch eine Wasserabspaltung aus dem Molekül-Ion. Ebenso findet man 18 ME unterhalb des Peaks MZ M-45 einen weiteren kleineren Peak. Die Wasserabspaltung kann daher auch aus dem Ion MZ M-45 erfolgen.

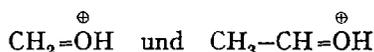
Die Peaks der Molekül-Ionen treten auch in den Massenspektren des Serins, Threonins, der Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht auf, dafür ist die Intensität der Peaks MZ M-18, die in den Massenspektren aller freien Aminosäuren gefunden werden, merklich erhöht. Im Massenspektrum des Serins entsteht der Hauptpeak MZ 60 durch Abspaltung der COOH-Gruppe und durch eine Wasserabspaltung ein weiterer großer Peak MZ 42. Charakteristisch ist, daß neben dem normalen Peak MZ 74

Asparaginsäure scheint ebenfalls in der heißen Ionenquelle thermisch verändert zu werden, denn die von verschiedenen Autoren erhaltenen Massenspektren unterscheiden sich erheblich. Sie enthalten jedoch alle die



deutlichen Peaks MZ 88 und MZ 70, die den Ionen MZ M-45 und MZ M-45-18 entsprechen, sowie die großen Peaks MZ 44 und MZ 43 von Ionen der Struktur $\text{H}_2\text{N}^{\oplus}=\text{CH}-\text{CH}_3$ oder $\text{H}_3\text{N}^{\ominus}-\text{CH}=\text{CH}_2$ und $\text{H}_2\text{N}^{\ominus}-\text{CH}=\text{CH}_2$.

Die Massenspektren von Aminosäuren mit einer Hydroxyl- oder Carboxylgruppe in der Seitenkette zeigen als zusätzliche Zerfallsreaktion nur eine Wasserabspaltung aus Molekül- und Fragment-Ionen. Die relativen Intensitäten von Ionen, die durch eine Lokalisierung der positiven Ladung des Molekül-Ions an den Sauerstoff-Atomen entstanden sind, sind dagegen gering. Molekül-Ionen mit dieser Ladungsverteilung führen zur Bildung von Ionen der Strukturen



mit den MZ 31 und MZ 45 in den Massenspektren des Serins und Threonins, die relative Intensität beträgt aber nur 20 bis 25 %. Da das Ionisationspotential von Alkoholen mit ca. 10,5 eV (77) größer ist als das der Amine, wird die bevorzugte Bildung stabiler Iminium-Ionen aus den Hydroxyaminosäuren verständlich.

Enthält die Aminosäure-Seitenkette ein Schwefelatom (Cystein oder Methionin), eine Amino-Gruppe (Lysin) oder einen Aromaten oder Heteroaromaten, so ist eine tiefgreifende Änderung der massenspektrometrischen Zerfallsreaktionen im Vergleich zu einfachen aliphatischen Aminosäuren zu erwarten. Das Ionisationspotential von Mercaptanen und Sulfiden liegt nahe bei dem der Amine, das von Aromaten sogar tiefer (77). In den Molekül-Ionen dieser trifunktionellen Aminosäuren wird daher in den Seitenketten ein zusätzlicher Schwerpunkt der positiven Ladung auftreten, dessen Bedeutung von den schwefelhaltigen Aminosäuren zu den aromatischen Aminosäuren anwächst. Bei der Elektronenstoß-Fragmentierung dieser Aminosäuren werden daher Ionen durch „Seitenketten-Reaktionen“ gebildet, bei denen Bindungen in der Aminosäure-Seitenkette gespalten werden und die positive Ladung bei dem Seitenketten-Fragment verbleibt.

Der Einfluß der CH_2SH -Seitenkette des Cysteins auf den Zerfall im Massenspektrometer ist noch verhältnismäßig gering. Im Gegensatz zum Serin enthält das Massenspektrum des Cysteins einen deutlichen Peak des Molekül-Ions. Dies ist typisch für die Massenspektren von Schwefelverbindungen. Der größte Peak im Cystein-Spektrum wird, ebenso wie beim Serin, von den Ionen MZ M-45 gegeben. Während aber aus dem Iminium-Ion des Serins sehr leicht H_2O abgespalten wird, eliminiert das Iminium-Ion des Cysteins bevorzugt NH_3 und nur in geringerem Maße auch H_2S . Eine NH_3 -Eliminierung aus Iminium-Ionen läßt sich auch bei den übrigen Aminosäuren nachweisen, sie führt aber nur beim Valin und beim Isoleucin, die beide eine β -verzweigte Seitenkette besitzen, zu größeren Peaks. Ein weiterer charakteristischer Unterschied zwischen den Massenspektren des Serins und des Cysteins ist das Intensitätsverhältnis der Peaks MZ 75 und MZ 74. Während beim Serin die Abspaltung der Seitenkette aus dem Molekül-Ion als $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikal oder als CH_2O -Molekül mit gleicher Wahrscheinlichkeit eintritt, ist beim Cystein die Abspaltung eines Radikals $\bullet\text{CH}_2\text{SH}$ gegenüber der Eliminierung von CH_2S begünstigt. Ein „Seitenketten-Ion“ $\text{CH}_2=\overset{\oplus}{\text{S}}\text{H}$ wird im Massenspektrum des Cysteins nur mit mäßiger Intensität gefunden. Da aber bei der MZ 47 keine Peaks von Kohlenwasserstoff-Ionen aus dem Untergrund des Massenspektrometers auftreten, ist dieser Peak besonders auffällig.

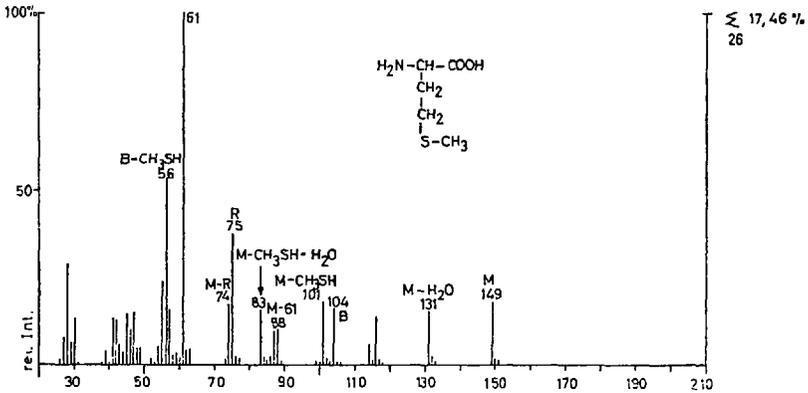
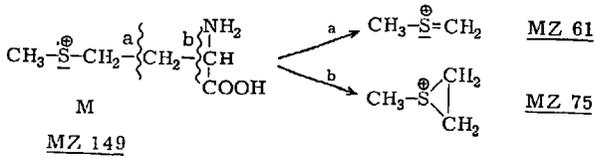


Abb. 4. Massenspektrum des Methionins, 70 eV.

Im Massenspektrum des Methionins (Abb. 4) wird dagegen der Hauptpeak durch eine Seitenkettenreaktion gebildet. Durch Spaltung der C-C-Bindung in α -Stellung zum S-Atom entsteht das Ion MZ 61. Diese Reaktion wird durch die Stabilität des zweifach alkylsubstituierten Sulfenium-Ions begünstigt. Daneben tritt auch die Spaltung der C-C-

Bindung in β -Stellung zum S-Atom ein, so daß auch ein großer Peak MZ 75 vorhanden ist:



Die relativen Intensitäten der Iminium-Ionen MZ 104 (Abspaltung von $\bullet\text{COOH}$) und MZ 74 (Abspaltung der Seitenkette) betragen nur ca. 18% des Hauptpeaks. Aus dem Ion M-45 der MZ 104 kann ein Molekül CH_3SH eliminiert werden zu einem Ion MZ 56. Die Abspaltung von CH_3SH wird auch aus dem Molekül-Ion beobachtet, dessen Peak ebenfalls mit der für S-Verbindungen typischen großen Intensität im Spektrum gefunden wird. Daneben tritt die Eliminierung von H_2O ein, so daß das Spektrum die Peaks MZ 131 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$), 101 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{SH}$) und 83 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{SH}$) enthält.

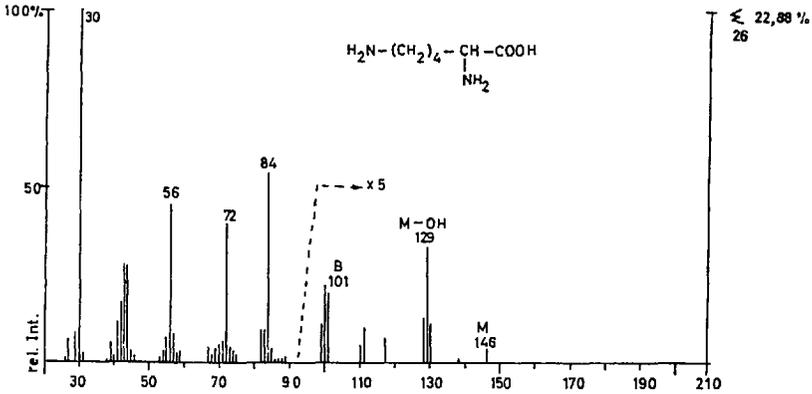
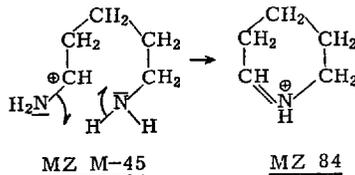


Abb. 5. Massenspektrum des Lysins, 70 eV.

Charakteristisch für das Massenspektrum des Lysins (Abb. 5) ist die große Intensität des Peaks MZ 84. Ein Piperidinium-Ion dieser MZ entsteht durch Ringschluß und Abspaltung von NH_3 aus dem Iminium-Ion MZ M-45, dessen Intensität daher bei dieser Aminosäure sehr gering ist:



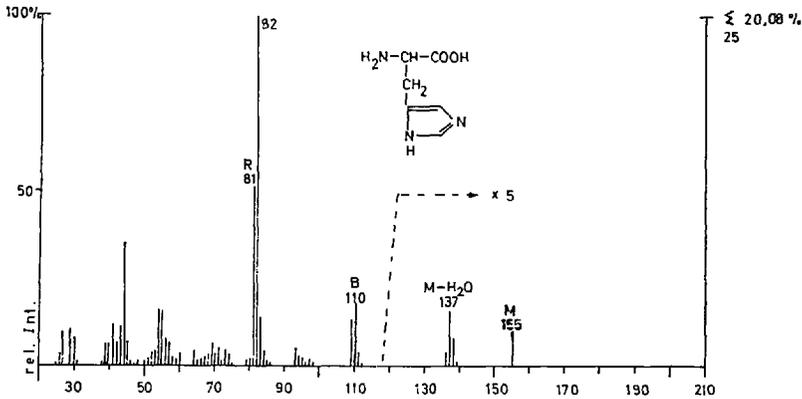
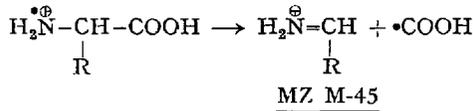


Abb. 6. Massenspektrum des Histidins, 70 eV.

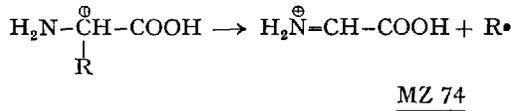
Die Massenspektren des Tyrosins und des Tryptophans werden von den Peaks der Seitenketten-Ionen MZ 107 bzw. MZ 130 beherrscht, die Intensitäten der Peaks der Iminium-Ionen MZ M-45 betragen nur noch 1 bis 2%, daneben werden gleichgroße Peaks bei den MZ M-44 beobachtet. Das Massenspektrum des Tyrosins enthält mit 10% rel. Intensität noch einen deutlichen Peak MZ 74, beim Tryptophan ist jedoch auch dieser Peak klein. Dafür gewinnen solche Ionen an Bedeutung, die durch den Weiterzerfall der Seitenketten-Ionen gebildet werden.

Wie die Analyse der Massenspektren der Aminosäuren zeigt, kann das charakteristische Fragmentierungsmuster der Aminosäuren mit Ausnahme des Methionins und des Lysins durch folgende Reaktionen beschrieben werden:

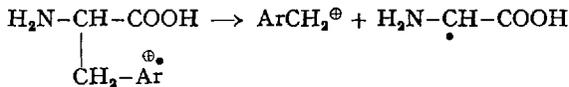
1. Abspaltung der Carboxyl-Gruppe zum Iminium-Ion MZ M-45



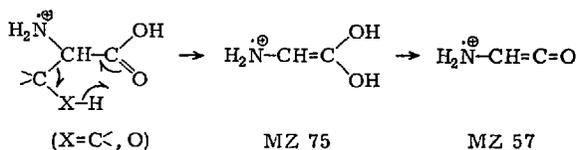
2. Abspaltung der Seitenkette zum Iminium-Ion MZ 74



3. Bildung von Seitenketten-Ionen R



4. Eliminierung der Seitenkette als Olefin oder Aldehyd durch eine McLafferty-Umlagerung zum Ion MZ 75 und anschließende Wasserabspaltung zum Aminoketen-Ion MZ 57:



Das Ausmaß, in dem die einzelnen Reaktionen eintreten, und die Zerfallsreaktionen, die sich der Bildung der angeführten Ionen anschließen, sind in leicht zu erklärender Weise von der Struktur der Aminosäure abhängig.

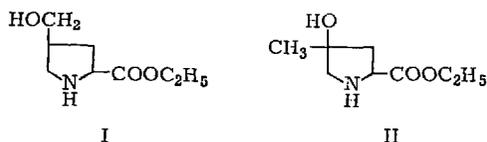
Die gleichen Zerfallsreaktionen, die zu den Massenspektren der freien Aminosäuren führen, können auch zur Deutung der Massenspektren der Aminosäureester (14, 15) herangezogen werden. Da Methyl- und Äthylester der Aminosäuren leicht flüchtig sind, können die Massenspektren dieser Verbindungen mit Hilfe der konventionellen Meßtechnik erhalten werden. Die Massenspektren der Aminosäureester sind daher schon frühzeitig aufgenommen und von *K. Biemann* (14, 16) ausführlich beschrieben worden.

Bei einem Vergleich der Massenspektren freier Aminosäuren mit denen der Methyl- und Äthylester fällt auf, daß die einfache Abspaltung der Seitenkette (Reaktion 2), die bei den Estern zu einem Iminium-Ion der MZ 88 bzw. MZ 102 führt, relativ zur McLafferty-Eliminierung (Reaktion 4) begünstigt ist. In größerem Umfang wird eine Eliminierung der Seitenkette nur noch im Massenspektrum des Threonin-äthylesters beobachtet. Dieser Unterschied im massenspektrometrischen Verhalten von Aminosäuren und deren Estern kann bisher nicht erklärt werden.

Es ist bemerkenswert, daß in den Massenspektren der Diäthylester der Asparaginsäure und Glutaminsäure ebenso wie in den Spektren der freien Aminosäuren große Peaks der MZ 70 bzw. MZ 84 auftreten. In den Spektren der freien Aminosäuren entstehen diese Ionen zum größeren Teil durch eine thermische Wasserabspaltung und anschließende Abspaltung der Carboxyl-Gruppe durch Elektronenstoß. In den Massenspektren der Ester konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden, daß die Abspaltung eines Alkohol-Moleküls nicht thermisch eintritt, sondern aus dem nach Reaktion 1 gebildeten Iminium-Ion erfolgt.

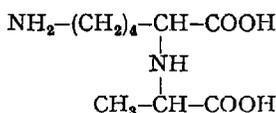
Das übersichtliche Fragmentierungsmuster der Aminosäuren und Aminosäureester wurde von *K. Biemann* und Mitarb. benutzt, um die Struktur unbekannter pflanzlicher Aminosäuren massenspektrometrisch

zu bestimmen. So konnten sie nachweisen (17), daß von den beiden Strukturen, die für eine aus Äpfeln isolierte Iminosäure vorgeschlagen worden waren, nur die Struktur I das Massenspektrum des Äthylesters erklärt. Es enthält einen deutlichen Peak bei der MZ $M-CH_3OH$, nicht aber bei der MZ $M-CH_3$, der bei Zutreffen der Struktur II zu erwarten wäre:



Der Hauptpeak des Spektrums wird von dem Ion $M-COOC_2H_5$ bei der MZ 100 gegeben, der ebenso wie ein Peak bei der MZ 82 ($M-COOC_2H_5-H_2O$) durch beide Strukturformeln erklärt werden kann. Ein dritter größerer Peak wird jedoch bei der MZ 68 beobachtet. Ionen der MZ 68 entstehen durch die Eliminierung von CH_3OH aus den Ionen der MZ 100. Sie können nur gebildet werden, wenn die Iminosäure die Struktur I besitzt.

Auf Grund der ähnlichen Zerfallsreaktionen in den Massenspektren der Äthylester des Lysins und des Lysopins, beide besitzen z. B. den Hauptpeak MZ 84, konnten K. *Biemann* und Mitarb. für das Lysopin folgende Struktur ableiten (18):

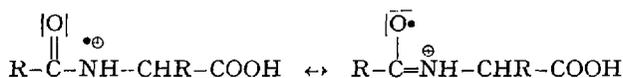


2. Acylaminosäuren und Acylaminosäureester

Die Massenspektren von N-Acetyl- (19), N-Trifluoracetyl- (20)aminosäuren, N-Formyl- (21), N-Acetyl- (22) und N-Trifluoracetyl-(23)aminosäureestern sind eingehend untersucht worden. N-Acylaminosäuren sind erheblich flüchtiger als die freien Aminosäuren. Ihre Massenspektren können daher mit Hilfe der direkten Einlaßtechnik bei relativ niedrigen Ionenquellentemperaturen erhalten werden, so daß die Gefahr einer thermischen Zersetzung in der Ionenquelle stark herabgesetzt ist. Formyl-, Acetyl- und Trifluoracetyl-aminosäureester können gaschromatographisch untersucht werden. Zur Analyse dieser Verbindungen kann daher die sehr leistungsfähige Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie herangezogen werden.

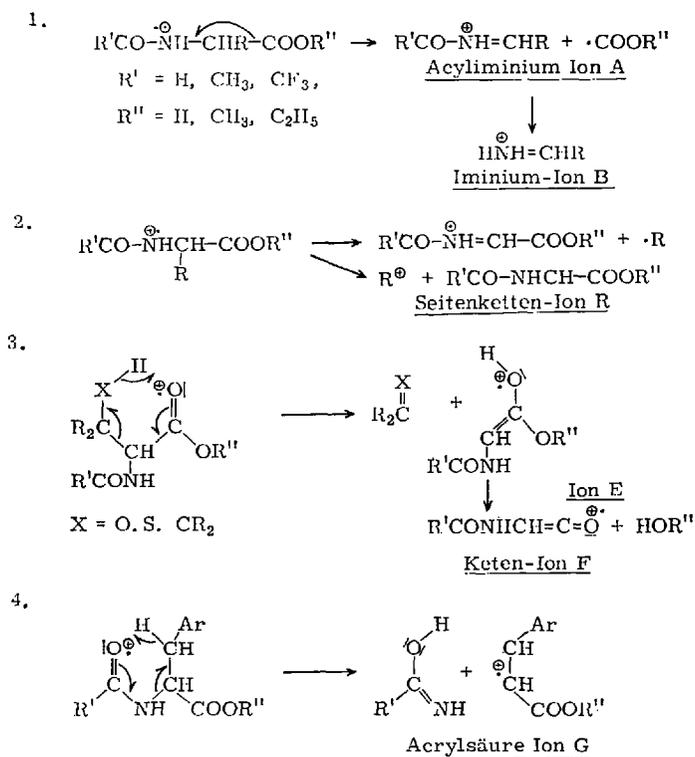
Durch Acylierung wird die Amino-Gruppe der Aminosäure in die Amid-Gruppe eingebaut. Die Ionisationspotentiale von Amiden sind

nicht bekannt, man kann jedoch annehmen, daß sie nahe bei denen der Amine liegen, und in den Molekül-Ionen der Acylaminosäuren die positive Ladung weitgehend in der Amid-Gruppe lokalisiert ist.



Die massenspektrometrischen Zerfallsreaktionen von freien und acylierten Aminosäuren sind einander daher sehr ähnlich. Die wichtigsten Fragmentierungen der Acylaminosäuren und deren Ester sind im Schema I zusammengestellt worden.

Schema 1. Zerfallsmechanismen der Aminosäurederivate



Wie in den Massenspektren freier Aminosäuren und Aminosäureester wird auch bei den Acyl-Derivaten der einfachen aliphatischen Aminosäuren aus dem Molekül-Ion sehr leicht ein COOH- bzw. COOR-Radikal abgespalten und ein Acyl-iminium-Ion A gebildet. Aus dem Ion A der

Formyl- und Acetyl-Derivate kann der Acylrest als CO bzw. Keten eliminiert werden und ein Iminium-Ion B entstehen. Die Eliminierung der Acetyl-Gruppe erfolgt besonders leicht, so daß die Ionen B wie in den Massenspektren der freien Aminosäuren den Hauptpeak geben. Wie man an den Abb. 7a–d erkennt, sind die großen Peaks der Ionen A und B für die Massenspektren aliphatischer N-Acetylaminosäuren sehr

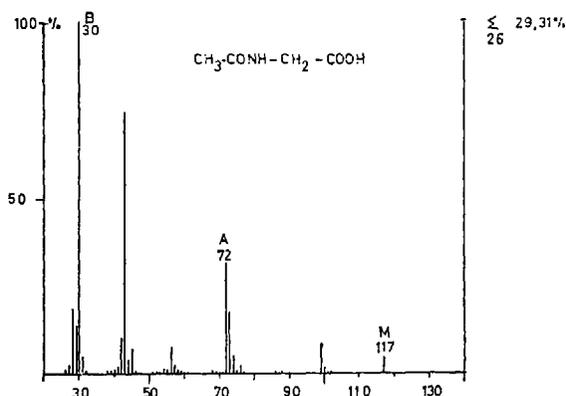
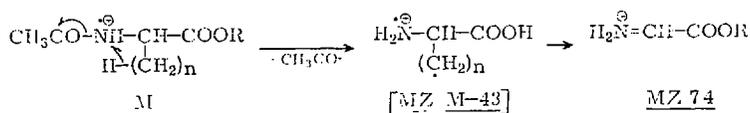


Abb. 7a. Massenspektrum des N-Acetyl-glycins, 70 eV.

charakteristisch. Aus ihren MZ kann die Größe des Substituenten am α -C-Atom leicht abgeleitet werden. Ihre Intensitäten relativ zu denen der übrigen Ionen, insbesondere zu Ionen des Typs E und des Typs F, geben dann Aufschluß über Verzweigungen in der Seitenkette (siehe unten). Eine Eliminierung des Trifluoracetyl-Restes aus Ionen des Typs A ist dagegen nicht möglich, Peaks der Ionen B fehlen in den Massenspektren der Trifluoracetyl-aminosäuren und deren Ester (Abb. 7e).

Im Gegensatz zu den freien Aminosäuren und Aminosäureestern werden in den Massenspektren der acylierten Derivate Acyl-iminium-Ionen durch einfache Abspaltung der Seitenkette nur mit geringer Intensität gebildet. Mit größerer Intensität werden aber Peaks von Ionen gefunden, denen außer der Seitenkette auch der Acylrest fehlt. Es ist vorgeschlagen worden (22), daß diese Ionen durch Spaltung der Amid-Gruppe und anschließende Eliminierung der Seitenkette entstehen:



Die Spaltung der Amid-Gruppe führt auch zu dem großen Peak MZ 43 des CH_3CO^+ -Ions. Die Benachteiligung einer Abspaltung der Seitenkette aus dem Molekül-Ion acylierter Aminosäuren läßt sich durch $-I$ -Effekte der N-Acyl-Gruppe und der Carboxyl-Gruppe erklären, die die Stabilität des entstehenden Iminium-Ions herabsetzen.

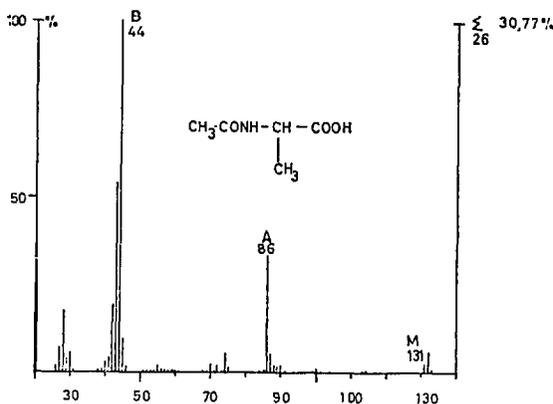


Abb. 7b. Massenspektrum des N-Acetyl-alanins, 70 eV.

Der $-I$ -Effekt der N-Acyl-Gruppe begünstigt dagegen die McLafferty-Eliminierung der Seitenkette aus dem Molekül-Ion. Diese Reaktion tritt besonders stark in den Massenspektren der N-Trifluoracetyl- und N-Acetyl-aminosäuren auf. Bei den letzten Verbindungen entsteht ein Ion E der MZ 117, aus dem H_2O zu einem N-Acetylaminoketen-Ion F der MZ 99 eliminiert werden kann. Schließlich wird auch die Acetyl-Gruppe ab-

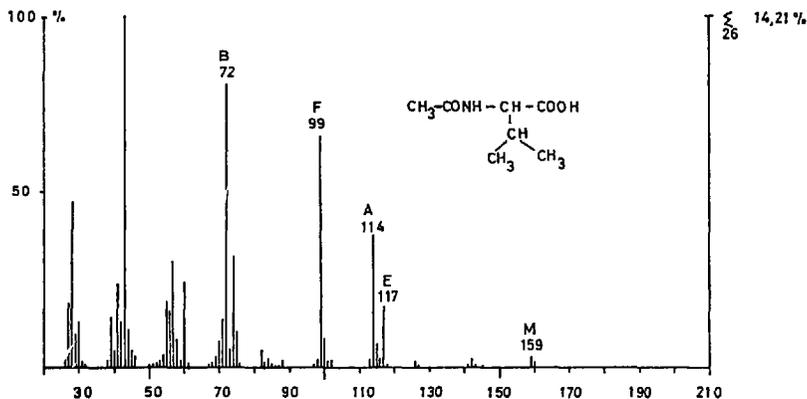


Abb. 7c. Massenspektrum des N-Acetyl-valins, 70 eV.

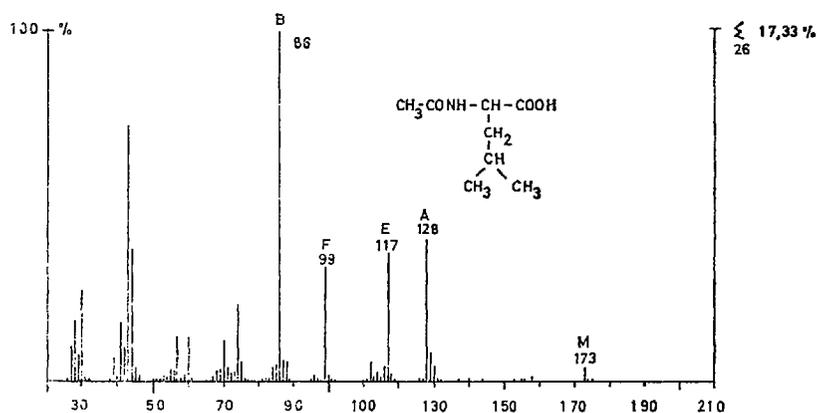


Abb. 7d. Massenspektrum des N-Acetyl-leucins, 70 eV.

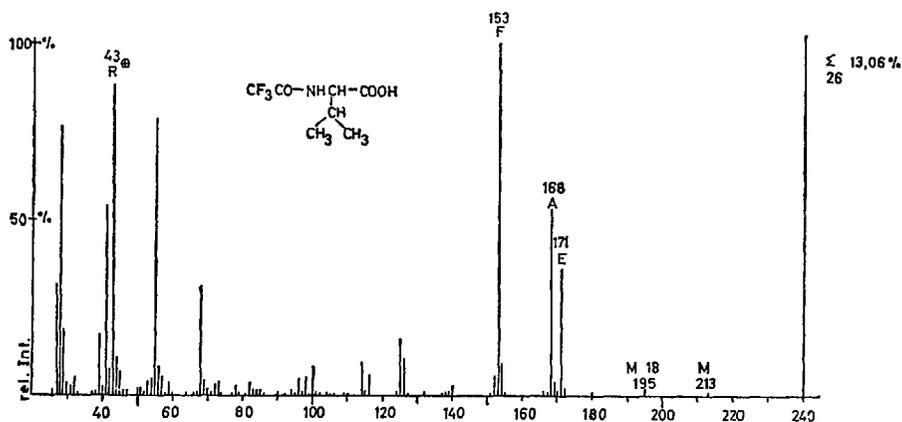


Abb. 7e. Massenspektrum des N-Trifluoroacetyl-valins, 70 eV.

gespalten und ein Ion MZ 57 gebildet. Diese Reaktionsfolge kann durch metastabile Übergänge eindeutig nachgewiesen werden. Die Peaks der Ionen E und F sind im Massenspektrum des Acetyl- und Formylisoleucins besonders groß und gestatten auch bei diesen Aminosäure-Derivaten eine sichere Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin (Abb. 8a u. b).

Eine *neue Zerfallsreaktion* wird in den Massenspektren der acylierten aromatischen Aminosäuren und deren Estern beobachtet (Abb. 9). Während in den Massenspektren der entsprechenden freien Aminosäuren die Eliminierung von NH_3 aus den Molekül-Ionen gering ist, wird bei den acylierten Derivaten die Amino-Gruppe mit dem anhaftenden Acyl-

Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden

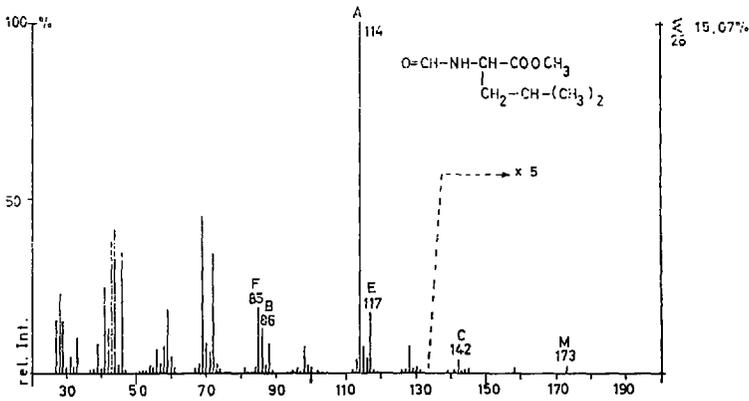


Abb. 8 a. Massenspektrum des N-Formyl-leucin-methylesters, 70 eV.

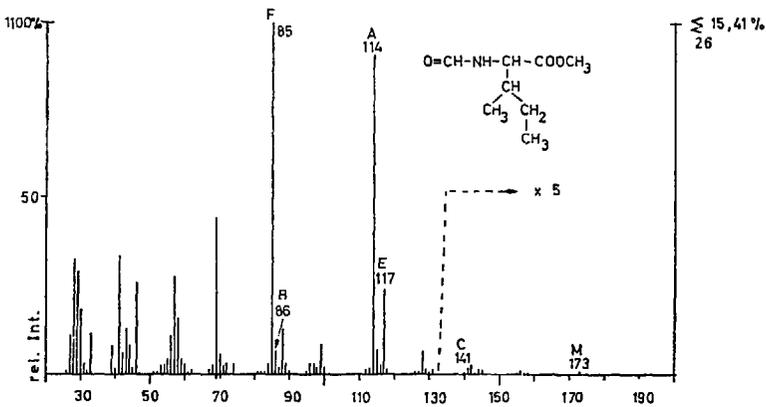


Abb. 8 b. Massenspektrum des N-Formyl-isoleucin-methylesters, 70 eV.

Rest als Amid abgespalten. Der Mechanismus dieser Eliminierung ähnelt dem der McLafferty-Umlagerung, die treibende Kraft dieser Reaktion ist die Ausbildung einer zum aromatischen System konjugierten Doppelbindung, die eine bessere Verteilung der positiven Ladung im aromatischen System gestattet. Der Peak dieses Ions G ist der Hauptpeak in den Massenspektren von Phenylalanin-Derivaten; in den Massenspektren der Derivate des Histidins, des Tyrosins und Tryptophans überwiegt die Bildung der Seitenketten-Ionen R. Das Ion G verliert ein Hydroxyl- oder Alkoxy-Radikal zum Ion G'. Die Massenspektren acylierter aromatischer Aminosäuren zeigen alle einen kleinen, aber charakteristischen Peak

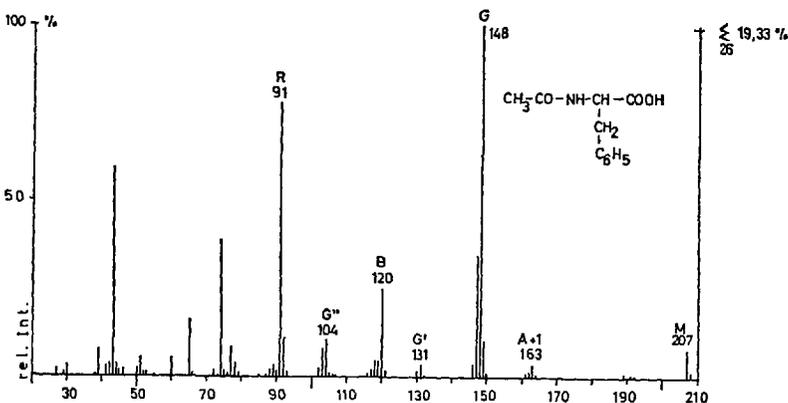


Abb. 9. Massenspektrum des N-Acetyl-phenylalanins, 70 eV.

dieses Ions. Daneben wird in den Massenspektren der Aminosäure-Derivate mit freier Carboxyl-Gruppe auch ein Ion G'' gefunden, das durch eine Abspaltung der Carboxyl-Gruppe des Ions G als CO₂ entsteht.

Berücksichtigt man die Verschiebungen in den MZ der Ionen, die durch die Einführung der N-Acyl-Gruppe bewirkt werden, so können die Massenspektren acylierter trifunktioneller Aminosäuren mit Hilfe der bei der Besprechung der freien Aminosäuren genannten Zerfallsreaktionen gedeutet werden. Das Massenspektrum des N^α,N^ε-Diacetyllysins enthält z. B. außer den großen Peaks MZ 72 und MZ 84 auch solche der MZ 114 und MZ 126, die durch Ionen mit einer N-Acetyl-Gruppe entstehen. Die Acetyl-Derivate des Serins und Threonins, besonders die mit einer freien Carboxyl-Gruppe, spalten thermisch aus der Seitenkette sehr leicht Wasser ab. Man erhält dann Derivate der α-Aminoacrylsäure und α-Aminocrotonsäure, die sich im Massenspektrometer anders verhalten als die Derivate gesättigter Aminosäuren. Die Bildung der Acyliminium-Ionen A ist energetisch ungünstig, weil dazu eine zur Doppelbindung benachbarte Bindung gespalten werden müßte. Statt dessen beobachtet man eine Eliminierung der Acyl-Gruppe aus den Molekül-Ionen.

Acylaminosäureester, insbesondere die N-Trifluoracetyl-aminosäuremethylester, eignen sich zur gaschromatographischen Analyse von Aminosäure-Gemischen (43). Damit ist auch eine direkte Kombination der gaschromatographischen Trennung mit der massenspektrometrischen Identifizierung von Aminosäuren möglich. Abb. 10a zeigt das Gaschromatogramm der N-Trifluoracetyl-methylester eines Aminosäuregemisches. Dieses Gemisch entstand bei der sauren Hydrolyse eines Reaktionsprodukts, das bei der Umsetzung von atomarem Stickstoff mit

Butyl-lithium erhalten wurde (44). In Abb. 10b sind die Massenspektren wiedergegeben, die mit einem schnell registrierenden Massenspektrometer beim Eintritt der gaschromatographischen Fraktionen 3 und 4 in die Ionenquelle aufgenommen wurden.

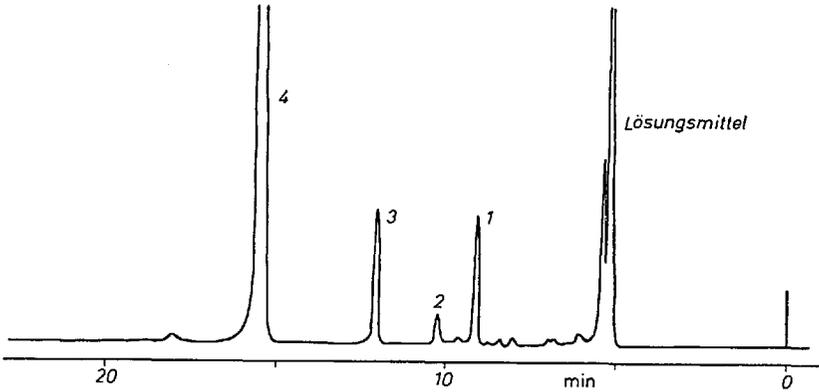


Abb. 10a. Gaschromatogramm eines Gemisches von N-Trifluoracetylaminosäuremethylestern, 50-m-Kapillarsäule Silikonöl 550; 120°C, He-Strom 1 ml/min, Teilungsverhältnis 1:50.

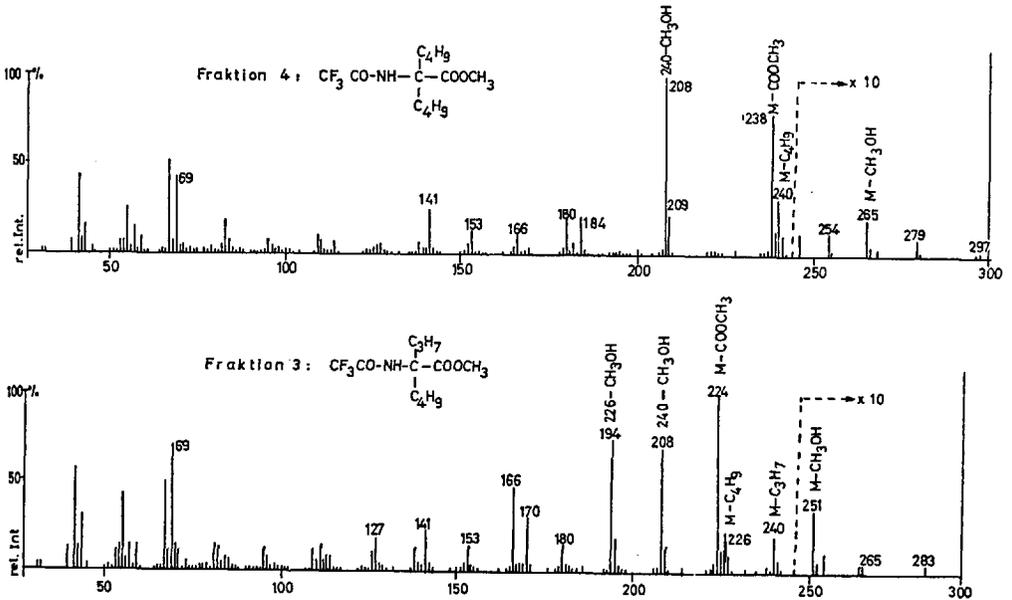
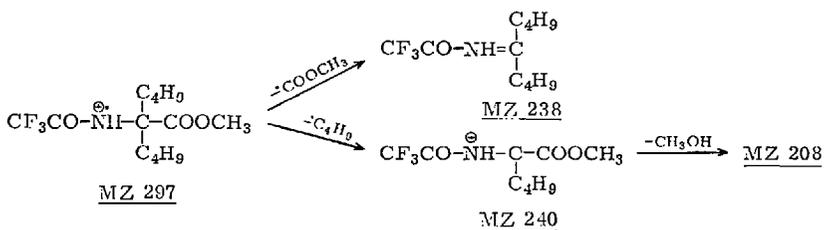


Abb. 10b. Massenspektrum der Fraktionen 3 und 4, 70 eV.

Der Peak des Molekül-Ions in Fraktion 4 erscheint bei MZ 297, die Abspaltung von Methanol aus dem Molekül-Ion ergibt die Ionen MZ 265. Das Trifluoracetyl-iminium-Ion, entstanden durch Abspaltung der COOCH_3 -Gruppe, führt zu dem großen Peak MZ 238. Daraus ergibt sich, daß die Seitenketten der Aminosäure insgesamt 8 C-Atome besitzen müssen. Ionen der MZ 240 entstehen durch die Abspaltung eines C_4H_9 -Radikals aus den Molekül-Ionen. Eine anschließende Eliminierung von Methanol läßt den großen Peak MZ 208 entstehen. Diese Zerfallsreaktionen der Aminosäuren zeigen, daß ein N-Trifluoracetyl-methylester der α -Amino-dibutyllessigsäure vorliegt:



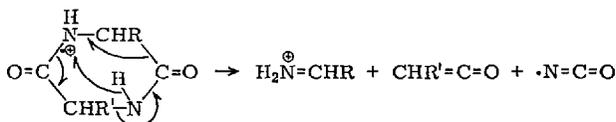
Die Peaks des Molekül-Ions, des Ions $\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}$ und des N-Trifluoracetyl-iminium-Ions sind im zweiten Massenspektrum um 14 Masseneinheiten zu kleineren MZ verschoben. Die in Fraktion 3 enthaltene Aminosäure enthält daher eine CH_2 -Gruppe weniger als die der Fraktion 4. Die Seitenketten können als Propyl-Radikal (Peak MZ 240) oder Butyl-Radikal (Peak MZ 226) abgespalten werden. Methanolabspaltung aus diesen Ionen ergibt Ionen der MZ 208 und MZ 194. Die Aminosäure der Fraktion 3 ist daher die α -Amino-propyl-butyl-essigsäure. Entsprechende Massenspektren wurden auch von den Fraktionen 1 und 2 erhalten und die Aminosäuren als α -Amino-methyl-butyl- und α -Amino-äthyl-butyl-essigsäure identifiziert.

III. Massenspektren von Cyclopeptiden

1. Dioxopiperazine

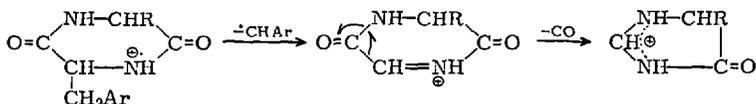
Freie Dipeptide können im Vakuum bei $170-215^\circ\text{C}$ sublimiert werden. Die Sublimationsgeschwindigkeit ist jedoch sehr langsam und das Sublimat enthält stets das Dioxopiperazin, das durch thermische Wasserabspaltung aus dem Dipeptid gebildet wird. Bringt man ein Dipeptid in die heiße Ionenquelle des Massenspektrometers (24), so tritt auch dort schnell die Bildung des Dioxopiperazins ein. Da Dioxopiperazine im all-

Svec und *Junk* (24) haben durch Untersuchung deuterierter Dioxopiperazine nachgewiesen, daß ca. 20% der Iminium-Ionen durch eine zweite einstufige Zerfallsreaktion gebildet werden, bei der ein Wasserstoff-Atom von einem zum anderen Stickstoffatom wandert:



Die Peaks der Ionen MZ M-43, B und B' sind die größten in den Massenspektren der Cyclodipeptide aliphatischer Aminosäuren. Daneben werden kleinere Peaks von Ionen gefunden, die durch eine Abspaltung von CO aus dem Molekül-Ion und den Ionen MZ M-43 entstehen. Diese massenspektrometrische Zerfallsreaktion ist auch bei anderen cyclischen Amiden beobachtet worden.

Die Abspaltung einer aliphatischen Aminosäure-Seitenkette aus dem Molekül-Ion des Dioxopiperazins hat geringe Bedeutung. Wie in den Massenspektren der N-Acylaminosäuren setzten die -I-Effekte der Substituenten am Stickstoff- und -Kohlenstoff-Atom die Stabilität der entstehenden cyclischen Iminium-Ionen soweit herab, daß diese Reaktion nicht mit den übrigen Fragmentierungen konkurrieren kann. Anders ist es in den Massenspektren von Dioxopiperazinen, die einen aromatischen Aminosäure-Rest enthalten. Die Seitenkette kann als stabiles Arylmethyl-Radikal abgespalten werden, so daß diese Zerfallsreaktion wieder energetisch begünstigt wird. In einem zweiten Fragmentierungsschritt wird aus dem entstandenen Dioxopiperazinium-Ion ein Molekül CO abgespalten.



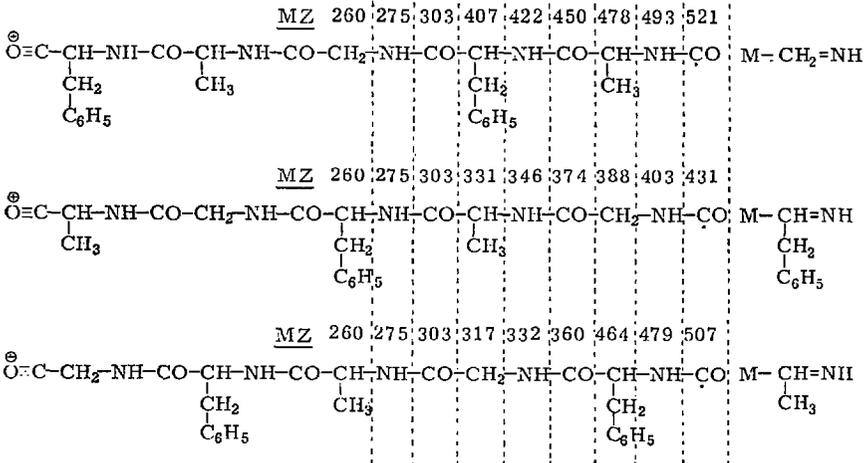
2. Cyclische Oligopeptide

Die Massenspektren einiger cyclischer Penta- und Hexapeptide der Aminosäuren Glycin, Alanin, Leucin und Phenylalanin sind beschrieben worden (25–27). Trotz des großen Molekulargewichts dieser Substanzen können mit Hilfe der direkten Einlaßtechnik gut reproduzierbare Massenspektren erhalten werden, da cyclische Peptide thermisch stabil sind. Die Massenspektren cyclischer Oligopeptide besitzen wie die der Cyclodipeptide einen großen Peak des Molekül-Ions; die Bestimmung des

Molekulargewichts und der Ringgröße ist daher massenspektrometrisch leicht möglich.

Die Elektronenstoß-Fragmentierung der cyclischen Oligopeptide folgt dem Zerfall der Dioxopiperazine. So enthalten auch die Massenspektren der höhermolekularen Cyclopeptide im unteren Massenbereich große Peaks der Ionen des Typs B. Aus den MZ dieser Peaks lassen sich die im Peptid enthaltenen Aminosäuren bestimmen. Im oberen Massenbereich der Spektren werden zahlreiche charakteristische Peaks gefunden, die durch einen schrittweisen Abbau des Molekül-Ions entstehen. In allen Massenspektren wird ein Peak MZ M-43 beobachtet, der wie bei den Dioxopiperazinen durch Eliminierung eines HNCO-Moleküls aus dem Molekül-Ion entsteht. Es war angenommen worden (25), daß durch diesen Reaktionsschritt der Zerfall des Molekül-Ions eingeleitet wird. Eine genaue Massenbestimmung der Ionen mit Hilfe eines hochauflösenden Massenspektrometers hat aber ergeben (26), daß dies nicht zutrifft. Statt dessen wird der Ring des Cyclopeptids durch die Eliminierung eines NH=CHR-Moleküls aus einem der Aminosäure-Reste geöffnet und aus dem entstandenen offenkettigen Radikal-Ion nacheinander kleine Fragmente abgespalten. Für das Peptid Cyclo-(gly-ala-phe-gly-ala-phe) (Abb. 12) ergeben sich dann drei Reihen von Ionen, je nachdem, aus welchem der drei verschiedenen Aminosäurereste im ersten Zerfallsschritt das Azomethin-Molekül eliminiert worden ist (s. Schema 2).

Schema 2



Mit Hilfe dieser Ionenreihen, die in den Massenspektren aller bisher untersuchten Cyclopeptide aufgefunden wurden, kann die Aminosäure-Sequenz in diesen Peptiden bestimmt werden.

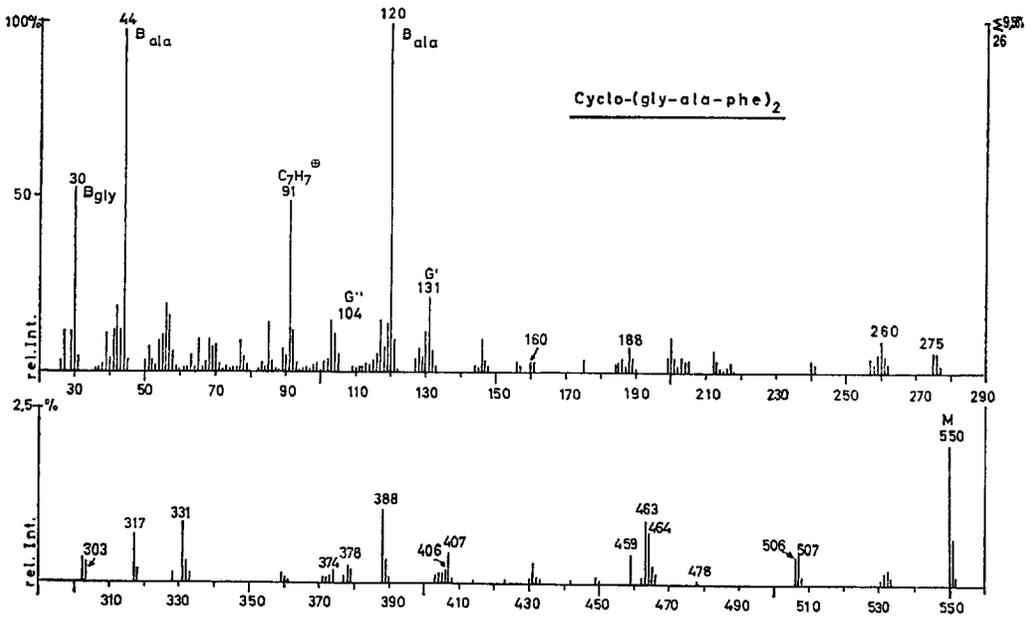
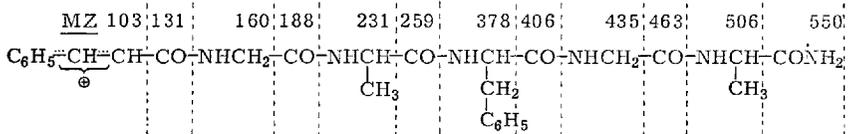


Abb. 12. Massenspektrum des Cyclo-(glycyl-alanyl-phenylalanyl)₂, 70 eV.

In den Massenspektren der Cyclopeptide lassen sich einige Zerfallsreaktionen nachweisen, die charakteristisch für bestimmte Aminosäurereste sind. So eliminieren Cyclopeptide des Leucins die Leucinseitenkette durch eine McLafferty-Umlagerung als Isobuten aus Molekül- und Fragment-Ionen. Die Benzyl-Seitenkette eines Phenylalaninrestes kann, wie bei den Dioxopiperazinen, als Radikal aus dem Molekül-Ion abgespalten werden. Im Massenspektrum des Cyclo-(gly-ala-phe-gly-ala-phe) liefert diese Reaktion die Ionen MZ 459.

Wichtiger ist eine Fragmentierung, bei der analog zum Massenspektrum des N-Acetyl-phenylalanins die acylierte Amino-Gruppe des Phenylalaninrestes als Amid abgespalten wird. Bei den cyclischen Phenylalaninpeptiden wird durch diese Reaktion der Peptid-Ring gesprengt und ein offenkettiges Ion gebildet, das durch Abspaltung kleiner Fragmente weiterzerfällt (Schema 3).

Schema 3



Hierdurch tritt im Massenspektrum eine Reihe weiterer Peaks auf, mit deren Hilfe die Aminosäure-Sequenz gleichfalls bestimmt werden kann.

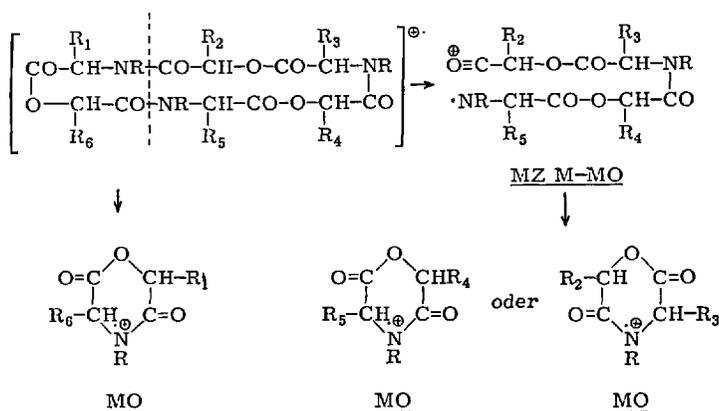
3. Cyclische Depsipeptide

In Depsipeptiden sind die Aminosäure-Reste teilweise gegen α -Hydroxycarbonsäure-Reste ausgetauscht. Reguläre Depsipeptide sind alternierend aus einer Amino- und Hydroxycarbonsäure aufgebaut, während irreguläre Depsipeptide eine unregelmäßige Folge verschiedener Aminosäuren und α -Hydroxysäuren enthalten. Die Massenspektren von cyclischen Depsipeptiden beider Typen sind beschrieben worden (27, 29–31). Man beobachtet in ihnen ähnliche Fragmentierungen wie in den Massenspektren cyclischer Peptide. So findet man im unteren Massenbereich große Peaks der Iminium-Ionen der im Depsipeptid enthaltenen Aminosäure-Reste. Die Intensität der Oxenium-Ionen, die auf analogem Wege aus den α -Hydroxycarbonsäure-Resten entstehen, ist dagegen gering. Statt dessen werden große Peaks von α,β -ungesättigten Acylium-Ionen gefunden, die beim Abbau des Molekül-Ions durch Abspaltung der Hydroxyl-Gruppe und eines Alkyl-Radikals entstehen. Ebenso wie bei den Cyclopeptiden können auch bei den Cyclodepsipeptiden die Seitenketten des Leucins und Valins durch eine McLafferty-Umlagerung aus Molekül- und Fragment-Ionen als Olefine eliminiert werden.

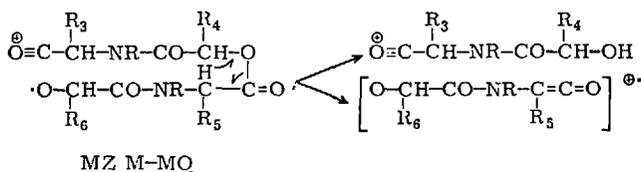
Nach den bisherigen Untersuchungen, vor allem von der russischen Arbeitsgruppe von *N. S. Wulfsen* (29), unterschieden sich die Massenspektren von Cyclopeptiden und Cyclodepsipeptiden in dem bevorzugten Fragmentierungsprozeß, der zur Ringsprengung des Molekül-Ions führt. Während im Molekül-Ion eines Cyclopeptids der Ring durch die Eliminierung eines Azomethin-Moleküls geöffnet wird, tritt im Molekül-Ion eines Cyclodepsipeptids die Ringspaltung durch Eliminierung der Esterbindung als CO_2 ein. Das entstandene Radikal-Ion kann sich durch Abspaltung eines Alkylradikals aus der Seitenkette der α -Hydroxysäure stabilisieren. Sowohl diese Ionen als auch die Radikal-Ionen können durch Abspaltung der α -Hydroxy- und α -Aminosäure-Reste in mehreren Zerfallsschritten abgebaut werden. Dieser Zerfall ist dem offenkettiger Acylpeptide (s. Abschn. D) völlig analog. Die Abspaltung eines α -Hydroxysäure-Restes als Aldehyd- und CO-Molekül erfolgt dabei wahrscheinlich in einem Reaktionsschritt. Ein Aminosäure-Rest wird dagegen in zwei Schritten, als CO und als Azomethin-Molekül, abgespalten. Dieses einfache Fragmentierungsmuster, aus dem die Struktur des Cyclodepsipeptids abgelesen werden kann, ist besonders typisch für die Massenspektren regulärer Cyclotetradepsipeptide. Als Beispiel sind die Zerfallsreaktionen im Massenspektrum des Angolids angeführt, dessen

In den Massenspektren der regulären Cyclohexadepsipeptide wird neben der CO_2 -Abspaltung aus dem Molekül-Ion und den anschließenden Fragmentierungen in größerem Ausmaß eine weitere, als Morpholin-Spaltung (28) bezeichnete Zerfallsreaktion beobachtet. Bei dieser Reaktion werden je ein benachbarter Amino- und α -Hydroxysäure-Rest zusammen als Morpholin-Derivat aus dem Molekül-Ion abgespalten, wobei je nach der Ladungsverteilung Morpholin-Ionen MO oder Radikal-Ionen M-MO entstehen. Das Radikal-Ion M-MO kann durch eine Bindungsspaltung wieder in zwei 2,5-Dioxomorpholin-Fragmente zerfallen (Schema 5).

Schema 5



Die Bildung der 2,5-Dioxomorpholin-Derivate durch eine thermische Zersetzung des Cyclohexadepsipeptids in der heißen Ionenquelle oder dem heißen Einlaßsystem des Massenspektrometers kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die der Morpholin-Spaltung analoge Bildung von Dioxopiperazin-Ionen in den Massenspektren offenkettiger Acylpeptide ist vorwiegend ein thermischer Prozeß (s. Abschn. D). Außer durch Bildung von Ionen des Typs MO kann das Radikal-Ion M-MO auch durch eine Spaltung einer Esterbindung unter Wanderung eines H-Atoms zerfallen. Aus den entstandenen Fragment-Ionen wird H_2O , CO oder ein Alkylradikal abgespalten.



IV. Massenspektren von Acylpeptiden und Acylpeptidestern

Kleinere Peptide lassen sich im Vakuum sublimieren, in den meisten Fällen tritt dabei jedoch Zersetzung ein. Bringt man ein freies Peptid in die heiße Ionenquelle des Massenspektrometers, so sind im Massenspektrum außer den Peaks, deren Ionen direkt aus den Peptid-Molekül-Ionen entstanden sind, auch solche von Zersetzungsprodukten enthalten (24). Bedeutend bessere Ergebnisse werden durch eine massenspektrometrische Untersuchung von Acylpeptiden und Acylpeptidestern (20, 23, 25, 27, 33–36) erzielt, da diese Verbindungen thermisch stabiler und leichter flüchtig sind. Als N-Schutzgruppe sind bisher die Acetyl- und längerkettige aliphatische Acyl-Gruppen sowie der Trifluoracetyl-Rest verwendet worden; die C-terminale Carboxyl-Gruppe und Carboxyl-Gruppen in den Seitenketten von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten der Peptide können durch Überführung in die Methylester blockiert werden.

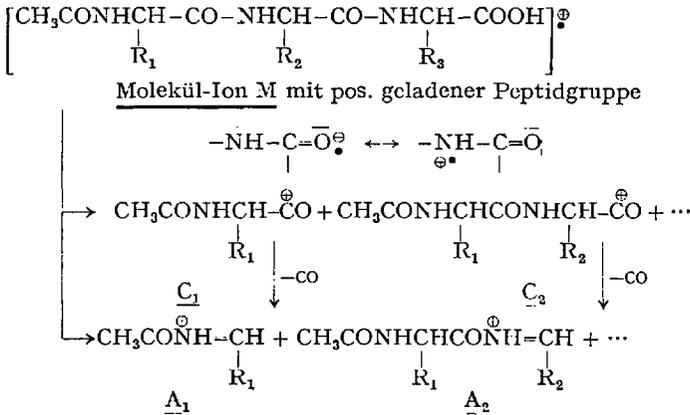
Der Einfluß der Acyl-Gruppe auf die Fragmentierung acylierter Peptide durch Elektronenbeschuß im Massenspektrometer ist verhältnismäßig gering. Da unsere Erfahrung bei der massenspektrometrischen Analyse von Acetylpeptiden besonders groß ist, werden die Zerfallsreaktionen an Hand von Beispielen aus dieser Verbindungs-klasse diskutiert. Auf den Einfluß der N-Acylgruppe, der sich besonders bei den von *Weygand* und Mitarb. (35) eingehend untersuchten N-Trifluoracetylpeptidestern bemerkbar macht, soll am Schluß eingegangen werden.

1. Peptide einfacher aliphatischer Aminosäuren

Der Zerfall von N-Acetylaminosäuren (25, 33) wird durch die positiv geladene Amid-Gruppierung im Molekül-Ion gesteuert. Im Molekül eines N-Acetyl-peptids kann jede Peptidbindung durch Elektronenstoß im Massenspektrometer mit gleicher Wahrscheinlichkeit unter Verlust eines Elektrons positiv geladen werden. Man erhält daher formal eine Serie von Molekül-Ionen, die sich nur durch die Position der Ladung unterscheiden. Jedes dieser Molekül-Ionen zerfällt nach den gleichen Reaktionsmechanismen wie die Molekül-Ionen von N-Acetylaminosäuren: durch Spaltung der Bindung in α -Stellung zum N-Atom der positiv geladenen Peptidgruppe entstehen Acyl-iminium-Ionen des Typs A, Spaltung der ionisierten Peptidbindung führt zu Acylium-Ionen des Typs C (Schema 7).

Das Massenspektrum eines einfachen N-Acetylpeptids (Abb. 13) enthält daher zwei Reihen von Peaks der Ionen A und C. Innerhalb jeder Reihe entspricht die Differenz der MZ benachbarter Peaks den Massen der im

Schema 7



Peptid aufeinanderfolgenden Aminosäure-Reste. Die relative Intensität der Peaks nimmt innerhalb jeder Reihe im allgemeinen mit zunehmender MZ ab. Dieses Verhalten ist typisch für Massenspektren linearer polymerer Stoffe. Die Ursache ist der Weiterzerfall größerer Fragment-Ionen unter Bildung von Ionen niederen Polymerisationsgrades. Ionen des Typs C verlieren ein Molekül CO unter Bildung von Acyl-iminium-Ionen

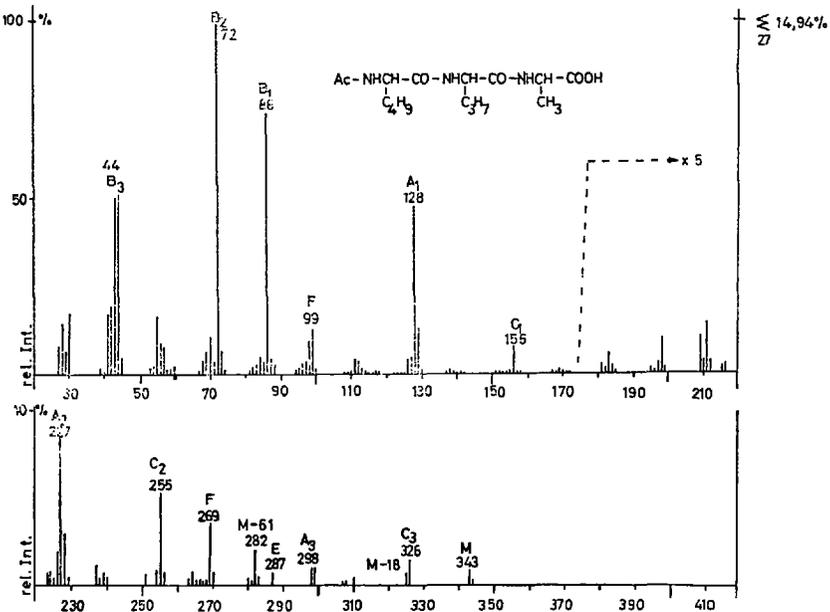
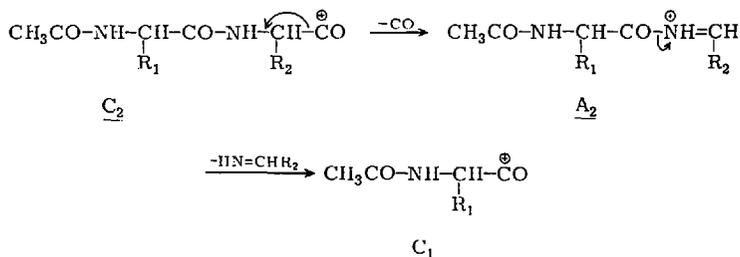


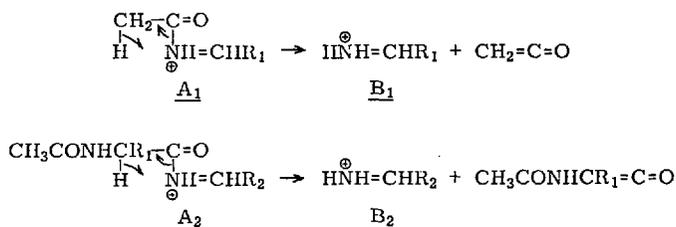
Abb. 13. Massenspektrum des N-Acetyl-leucyl-valyl-alanins, 70 eV.

A. Die Ionen A spalten ein Molekül $RCH=NH$ ab, so daß ein kleineres Fragment-Ion C entsteht. Zusammen ergeben beide Reaktionsschritte, die sich durch metastabile Übergänge im Massenspektrum nachweisen lassen, die Eliminierung eines Aminosäure-Restes aus dem primär entstandenen Fragment-Ion C:

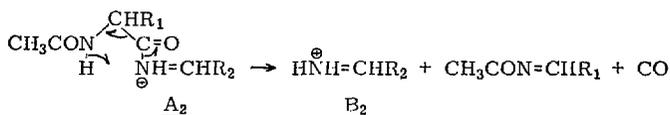


Ausnahmen vom gleichförmigen Intensitätsabfall der Ionen A mit zunehmender Entfernung des gespaltenen Aminosäure-Restes vom N-terminalen Ende des Acetylpeptids machen Ionen, die durch Bindungsspaltung in einem Glycin-Rest entstanden sind. Ihre Intensität ist geringer als nach der Position des Glycins im Peptid zu erwarten ist. In den Acyl-iminium-Ionen A eines Glycin-Restes fehlt die induktive Stabilisierung der positiven Ladung durch Alkyl-Gruppen am α -C-Atom welche bei den übrigen Aminosäure-Resten die Bildung der Ionen A begünstigt. Aus einem Glycinrest werden daher bevorzugt Ionen des Typs C gebildet (Ausnahme ist N-terminales Glycin). Bei den übrigen Aminosäure-Resten ist es von der Stellung in der Peptidkette und den experimentellen Bedingungen bei der Aufnahme des Massenspektrums abhängig, welches der beiden Ionen, A oder C, bevorzugt entsteht.

Durch eine weitere Zerfallsreaktion entstehen aus den Ionen A die Iminium-Ionen B der verschiedenen Aminosäure-Reste des Peptids. Wie in den Massenspektren der Acetylaminosäuren kann die Acetyl-Gruppe des Ions A_1 der N-terminalen Aminosäure des Peptids über einen viergliedrigen Übergangszustand als Keten eliminiert werden. Die gleiche Reaktion ist auch beim Zerfall der anderen Ionen A möglich, es wandert dann das H-Atom vom α -C-Atom des N-ständigen Aminoacyl-Restes zum N-Atom:

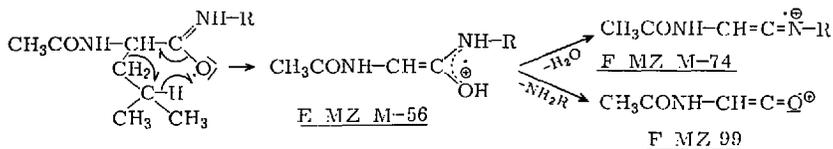


Im Massenspektrum eines N-Acetylpeptids, dessen bewegliche H-Atome an den Peptidgruppen gegen Deuterium ausgetauscht sind, beobachtet man aber Iminium-Ionen B, die zwei Deuterium-Atome enthalten. Die Bildung der Ionen B muß daher auch durch einen Mechanismus möglich sein, bei dem ein H-Atom von einem zum anderen N-Atom wandert. Für diesen Zerfallsweg läßt sich ein fünfgliedriger cyclischer Übergangszustand formulieren, der außer den Ionen B der geforderten Zusammensetzung ein Molekül CO und ein acyliertes Azomethin-Molekül als neutrale Reaktionsprodukte liefert:



Die Massenspektren von acetylierten Peptiden des Prolins werden durch den sehr großen Peak MZ 70 des Ions B des Prolin-Restes beherrscht, unabhängig von der Stellung des Prolins in der Peptidkette. Dies zeigt die besondere Stabilität dieses cyclischen Iminium-Ions an. Außerdem ist die Intensität der Ionen des Typs B der Aminosäure-Reste, die in der Peptidkette auf den Prolin-Rest folgen, sehr klein. Man muß daher annehmen, daß wegen der besonderen Struktur des Prolins in Molekül-Ionen die positive Ladung bevorzugt am N-Atom des Prolin-Restes vorhanden ist.

Ionen der Reihen A, B und C geben die charakteristischen großen Peaks in den Massenspektren einfacher aliphatischer Acetylpeptide. Daneben treten kleinere Peaks von Ionen anderer Struktur auf. Wie die Massenspektren von N-Acetylvalin, -leucin und -isoleucin enthalten auch die Massenspektren der Peptide dieser Aminosäuren Peaks der Ionen E und F. Diese Ionen entstehen durch Eliminierung der Seitenketten als Propen bzw. Buten und eines H₂O-Moleküls. In den Massenspektren der Valinpeptide findet man kleine Peaks bei MZ M-42 und MZ M-60, in denen des Leucins und Isoleucins solche der MZ M-56 und MZ M-74. Im letzten Zerfallsschritt kann statt des H₂O-Moleküls auch die C-ständige Amino-Komponenten des Valyl- oder Leucyl-Restes als Amin abgespalten werden. Bei N-terminaler Position des Valins oder Leucins im Peptid entsteht mit charakteristischer Intensität dann ein Ion MZ 99. N-Acetyl-leucin und N-Acetyl-isoleucin können massenspek-



trometrisch durch die hohe Intensität dieses Ions beim Isoleucin-Derivat unterschieden werden. Eine Unterscheidung von Leucin- und Isoleucin-peptiden ist auf diesem Wege nicht möglich.

Mit unterschiedlichen Intensitäten werden in den Massenspektren Peaks von Ionen des Typs D gefunden. Diese Ionen besitzen die Struktur von Dioxopiperazinen oder lassen sich von diesen Verbindungen ableiten. Hierzu gehören die Ionen MZ M-18 und MZ M-60 bzw. M-61, die in allen Massenspektren auftreten. Daneben werden Peaks bei den MZ von Dioxopiperazinen beobachtet, die aus benachbarten Aminosäure-Resten der Peptidkette entstehen können. Die Intensität dieser Peaks steigt mit der Ionenquellen-Temperatur stark an, so daß an der Bildung dieser Ionen eine thermische Zersetzungsreaktion beteiligt sein muß. Peaks dieser Ionen sind in den Massenspektren von Leucin- und Prolinpeptiden besonders groß. Es ist bekannt, daß aus Peptiden dieser Aminosäuren leicht thermisch Dioxopiperazine gebildet werden (24).

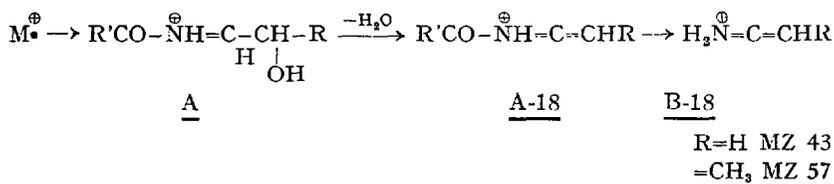
2. Peptide des Serins, Threonins, der Asparaginsäure und Glutaminsäure

Die Analyse der Massenspektren einfacher Derivate aliphatischer Aminosäuren, die in der Seitenkette eine Hydroxyl- oder Carboxyl-Gruppe besitzen, zeigt als zusätzliche Fragmentierung eine Wasserabspaltung aus Molekül- und Fragment-Ionen. Da N-Acetylpeptide schwer flüchtig sind und die Wasserabspaltung weitgehend eine thermische Reaktion beim Verdampfen der Verbindungen in der heißen Ionenquelle ist, tritt diese Reaktion in den Massenspektren von Peptiden dieser Aminosäuren verstärkt ein.

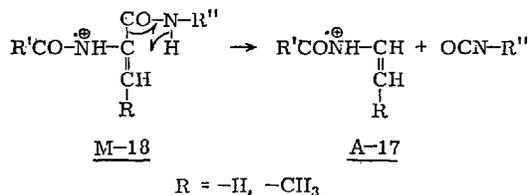
In den Massenspektren der N-Acetylpeptide des Serins und Threonins (37) kann der Peak des Molekül-Ions nicht nachgewiesen werden, sondern nur der Peak MZ M-18. Gleichwohl ist die thermische Wasserabspaltung aus dem Peptid nicht vollständig, denn die Massenspektren der Serinpeptide enthalten einen charakteristischen Peak MZ M-30, die der Threoninpeptide einen Peak MZ M-44. Ionen dieser MZ werden durch eine Eliminierung der hydroxylierten Seitenketten der Serin- und Threonin-Reste als *Formaldehyd* bzw. *Acetaldehyd* aus dem Molekül-Ion des unzersetzten Peptids gebildet.

Charakteristisch für die Massenspektren der Serin- und Threoninpeptide ist die geringe Intensität der Acyl-iminium-Ionen A der Serin- und Threonin-Reste. Statt dessen werden große Peaks 17 und 18 Masseneinheiten tiefer beobachtet. Die Ionen A-18 entstehen durch Abspaltung von H_2O aus den Acyl-iminium-Ionen. Eine Bildung nach einer Wasserabspaltung aus dem Peptid erfordert die energetisch ungünstige homolytische Spaltung einer zur Doppelbindung der Seitenkette benach-

barten Bindung. In den Massenspektren von Derivaten der α -Aminoacrylsäure und α -Aminocrotonsäure (21, 25) treten daher keine Peaks dieser Ionen auf. Die Eliminierung des Acylrestes aus den Ionen A-18 ergibt stabile Ionen der MZ 43 und MZ 57:



Im Gegensatz zu den Ionen A-18 ist die Bildung der Ionen A-17 aus den Acyl-iminium-Ionen der Serin- und Threonin-Reste unwahrscheinlich. Dazu wäre die energetisch ungünstige Abspaltung eines HO-Radikals aus einem Fragment-Ion mit gerader Elektronenzahl notwendig. Für ihre Bildung wird angenommen, daß sie nach der Abspaltung des Wassermoleküls aus der Seitenkette durch Eliminierung der zum Serin oder Threonin C-ständigen Aminosäuren als α -Isocyanato-carbonsäuren entstehen:



Massenspektren, die vor allem im oberen Massenbereich übersichtlicher sind, werden nach einer Acetylierung der Hydroxyl-Gruppe in der Seitenkette des N-Acetylpeptids erhalten (20) (Abb. 14). Der Peak des Molekül-Ions kann bei diesen N,O-acetylierten Peptiden nachgewiesen werden, ebenso werden, wie in den Massenspektren einfacher aliphatischer Peptide, Peaks der verschiedenen Ionen A, B und C mit charakteristischen Intensitäten aufgefunden. Eine Acetoxy-Gruppe kann aus Molekül- und Fragment-Ionen als Keten- oder als Essigsäuremolekül abgespalten werden. Diese Reaktionen treten daher auch in den Massenspektren der N,O-Acetylpeptide auf.

Die thermische Wasserabspaltung in Peptiden der Asparaginsäure und der Glutaminsäure überführt die Reste der Aminocarbonsäuren in cyclische Derivate. Analoge Reaktionen können auch bei der Anregung durch den Elektronenstoß ablaufen. In den N-Acetylpeptiden der Glutaminsäure wird durch Reaktion der γ -Carboxyl-Gruppe und der Amino-

Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden

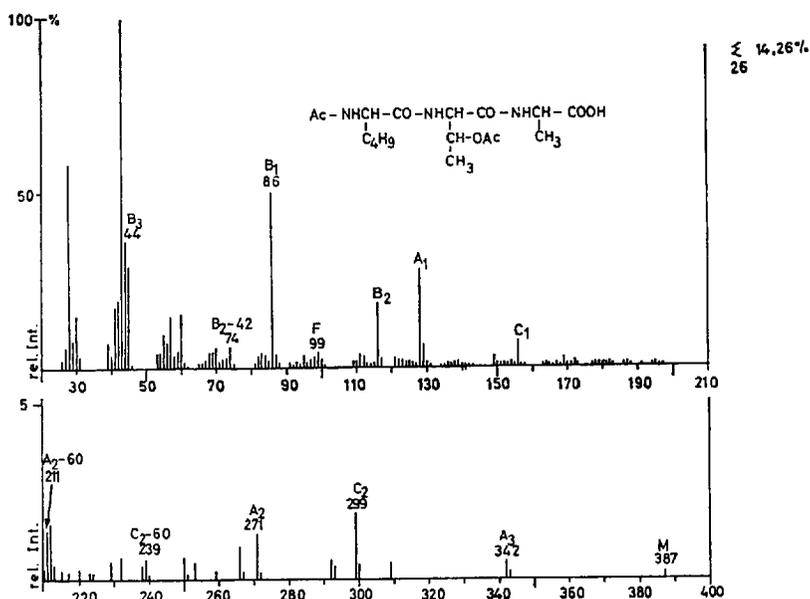


Abb. 14. Massenspektrum des N-Acetyl-leucyl-(O-acetyl)threonyl-alanins

Gruppe des Glutaminsäure-Restes der Pyrrolidon-Ring der Pyroglutaminsäure gebildet. Die Massenspektren der Glutaminsäure-peptide (20, 38) enthalten daher Peaks der Ionen A, B und C des Pyroglutaminsäurerestes mit charakteristisch großen Intensitäten. Asparaginsäure bildet thermisch durch Wasserabspaltung kein cyclisches β -Lactam, sondern ein Anhydrid. Entsprechend muß bei der thermischen Wasserabspaltung aus Asparaginsäure-peptiden die Bildung von Asparaginsäure-imiden angenommen werden. Für die Struktur der Ionen, die aus Asparaginsäure durch Wassereliminierung bei einer Elektronenstoß-Anregung entstehen, ist dagegen eine β -Lactam-Struktur vorgeschlagen worden (70). Thermische und durch Elektronenstoß induzierte Wasserabspaltung ergeben daher wahrscheinlich Produkte verschiedener Struktur. Dies erklärt die wenig übersichtlichen Massenspektren von N-Acetyl-asparaginsäure-peptiden mit freien Carboxyl-Gruppen. Werden dagegen die Massenspektren von N-Acetyl-peptidmethylestern der Asparaginsäure (20, 38) aufgenommen, so erhält man die üblichen großen Peaks der Ionen A, B und C des Asparaginsäure- β -methylester-Restes. Daneben werden Peaks mit einer um 32 kleineren MZ beobachtet. Gleiches gilt für die Massenspektren der Methylester von N-Acetyl-glutaminsäure-peptiden.

3. Peptide aromatischer Aminosäuren

Die Massenspektren von Derivaten der aromatischen Aminosäure besitzen große Peaks der aus den Arylmethyl-Seitenketten entstehenden Ionen R. Ihre Massenzahlen betragen 91 für Phenylalanin, 81 für Histidin, 107 für Tyrosin und 130 für Tryptophan. In dieser Reihenfolge steigt die relative Intensität der Seitenketten-Ionen R in den Massenspektren an. Die gleichen Peaks der Seitenketten-Ionen R werden auch in den Massenspektren acetylierter Peptide aromatischer Aminosäuren (37) (39) gefunden, wobei ihre Bedeutung ebenfalls von Phenylalanin-peptiden zu Tryptophan-peptiden stark anwächst. Eine charakteristische Intensitätsabstufung des Peaks MZ R von der Position der betreffenden aromatischen Aminosäure in der Peptidkette läßt sich nicht feststellen.

Eine typische Zerfallsreaktion der Molekül-Ionen aromatischer N-Acetyl-aminosäuren ist die Eliminierung von Acetamid (s. Schema 1) zu Ionen des Typs G. Treibende Kraft für diese Reaktion ist die Ausbildung einer zum aromatischen System konjugierten Doppelbindung und eine bessere Stabilisierung der positiven Ladung. Diese Reaktion kann auch in den Massenspektren von N-Acetylpeptiden mit C-terminaler aromatischer Aminosäure nachgewiesen werden (Abb. 15). Die Eliminierung der Aminogruppe der aromatischen Aminosäure mit ihren Substituen-

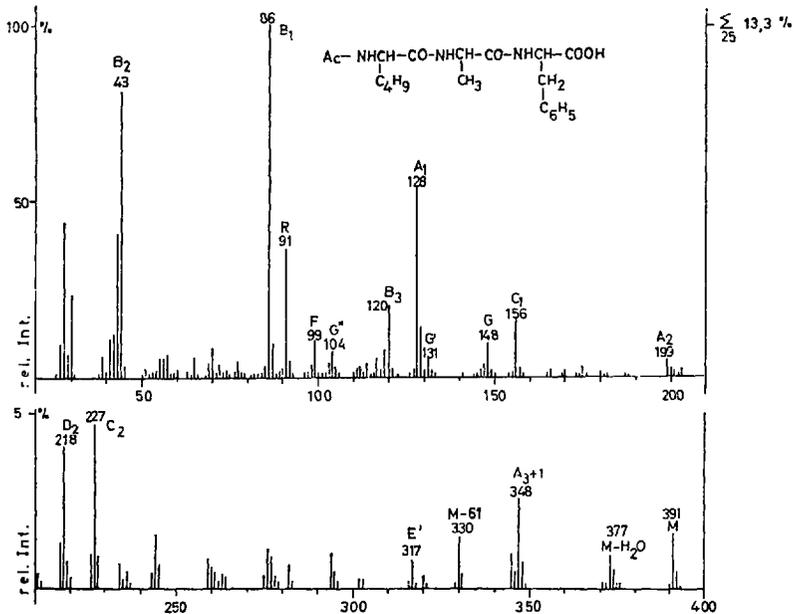
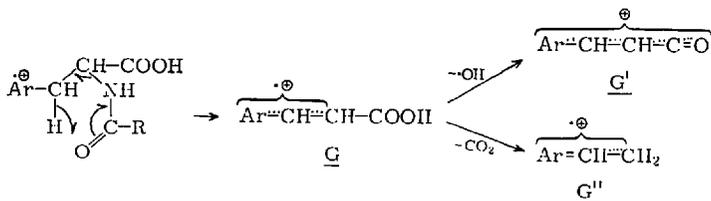
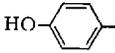
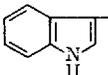


Abb. 15. Massenspektrum des N-Acetyl-leucyl-alanyl-phenylalanins, 70 eV.

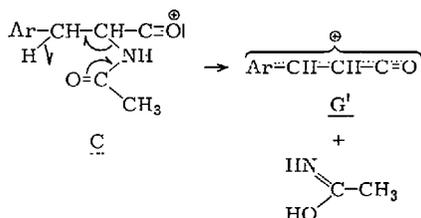
ten als Acetylpeptidamid liefert Ionen G der gleichen MZ wie in den Massenspektren der Acetylaminosäuren. Die Ionen G' und G'', die als Zerfallsprodukte der Ionen G aufgefaßt werden können, geben in den Massenspektren der acetylierten Peptide weitere charakteristische Peaks (Schema 8).

Schema 8



Ar =		G = MZ 148	G' = MZ 131	G'' = MZ 104
		164	147	120
		138	121	94
		187	170	143

Die Massenspektren von Acetylpeptiden mit einem N-terminalen oder mittelständigen aromatischen Aminosäure-Rest zeichnen sich ebenfalls durch einen charakteristisch großen Peak der Ionen G' aus. In den Massenspektren dieser Peptide können die Ionen G' aus den Ionen C des aromatischen Aminosäure-Restes entstehen:



Daneben ist auch eine Bildung aus Ionen des Typs G möglich, die jetzt außer dem Rest der aromatischen Aminosäure auch die zu dieser Aminosäure C-ständigen Aminosäure-Reste enthalten. Eine genaue Analyse der Massenspektren von Peptiden mit N-terminalen oder mittelständigen aromatischen Aminosäuren (39) zeigt, daß Ionen G dieser Art in der

Tat gebildet werden. Da diese Ionen G bevorzugt zu Ionen G' zerfallen, sind die Intensitäten der Ionen A und C, die aus den zur aromatischen Aminosäure C-ständigen Aminosäure-Resten entstehen, in den Massenspektren vergleichsweise gering. Dies gilt vor allem für die Massenspektren von Peptiden des Tyrosins und Tryptophans.

Massenspektren von acylierten Peptiden des Arginins, Lysins, Asparagins, Glutamins, Cysteins und Methionins sind bisher nur vereinzelt (20, 35) oder gar nicht aufgenommen worden. Sowohl in den Massenspektren von Peptiden der Hydroxyaminosäuren und Aminodicarbonsäuren als auch in denen von Peptiden aromatischer Aminosäuren findet man Zerfallsreaktionen wieder, die das Massenspektrum der betreffenden N-Acetylaminosäure auszeichnen und die charakteristisch für die trifunktionellen Aminosäuren sind. Man kann daher auch eine Analogie zwischen den Zerfallsreaktionen in den Massenspektren der übrigen trifunktionellen Aminosäuren und ihren Peptiden erwarten.

4. Einfluß der N-terminalen Acyl-Gruppe

In den Massenspektren der Acetylaminosäuren und Acetylaminosäureester wird im Vergleich zu Aminosäure-Derivaten mit freier Amino-Gruppe die Bildung von Iminium-Ionen durch Abspaltung der COOR-Gruppe gegenüber einer Abspaltung der Seitenkette bevorzugt. Die Seitenkette wird aus den Molekül-Ionen der Acetyl-Derivate dafür leichter durch eine McLafferty-Umlagerung als Olefin eliminiert. Eine weitere, für acetylierte aromatische Aminosäure-Derivate charakteristische Zerfallsreaktion ist die Abspaltung von Acetamid aus dem Molekül-Ion.

Diese Reaktionen sind auch bei einem N-Aminoacyl-Substituenten der Aminosäure möglich. Das Ausmaß, mit dem diese Reaktionen eintreten, gleicht dem von N-Acetylaminosäuren. Im Molekül-Ion eines N-Acetylpeptids wird daher die positive Ladung im wesentlichen gleichmäßig auf alle Peptidbindungen verteilt sein. Zusammen mit dem schrittweisen Abbau großer Fragment-Ionen ist das Ergebnis ein gleichförmiger Intensitätsabfall der Peaks in den Ionenreihen $A_1, A_2 \dots A_n$ und $C_1, C_2 \dots C_n$.

Ähnlich den Acetylpeptiden verhalten sich auch Peptide mit größeren aliphatischen N-Acyl-Gruppen (36). Die große MZ dieser Gruppen, z. B. 155 für die Decanoyl-Gruppe gegenüber 43 für die Acetyl-Gruppe, bedingt eine beträchtliche Erhöhung der MZ der Ionen A und C. Dies hat zur Folge, daß im Bereich der Peaks der Ionen A und C im Massenspektrum keine Peaks kleinerer Fragment-Ionen und von Ionen thermischer Zersetzungsprodukte auftreten. Die für eine massenspektro-

Tabelle 1. Massen der Fragmente von Aminosäuren

	A ₁		C ₁	B	HNCHR	HNCHRCO	charakteristische Ionen
	(CH ₃ CO)	(CF ₃ CO)					
Gly	72,044936	126,016669	100,039850	30,034372	29,026548	57,021462	
Ala	86,060585	140,032318	114,055499	44,050022	43,042197	71,037111	
Val	114,091884	168,063617	142,086798	72,081320	71,073496	99,068410	99,032025 (F)
Leu	128,107533	182,079266	156,102447	86,096970	85,089145	113,084059	99,032025 (F)
Pro	112,076234	166,047967	140,071149	70,065671	69,057846	97,052761	
Hypro	128,071149	182,042882	156,066063	86,060585	85,052761	113,047675	
-H ₂ O	110,060585	164,032319		68,050022			
Ser	102,055499	156,027232	130,050413	60,044936	59,037111	87,032025	43,042197 99,032025 (F)
-OH	85,052760						
-H ₂ O	84,044935	138,016669					
Thr	116,071149	170,042882	144,066063	74,060585	73,052761	101,047675	57,057846 99,032025 (F)
-OH	99,068410						
-H ₂ O	98,060585	152,031319					
Asp-β-OCH ₃	144,066063	198,037796	172,060977	102,055499	101,047675	129,042589	
-CH ₃ OH	112,039850	166,011583	140,034764	70,029286			
Glu- -OCH ₃	158,081712	212,053445	186,076626	116,071149	115,063324	143,058238	
-CH ₃ OH	126,055499	180,027232	154,050413	84,044936			
Phe	162,091884	216,063617	190,086798	120,081320	119,073496	147,068410	91,054773 (R) 148,052426 (G)
His	152,082382	206,054115	180,077296	110,071819	109,063994	137,058908	81,045271 (R) 138,042924 (G)
Tyr	178,086798	232,058531	206,081712	136,076234	135,068410	163,063324	107,049687 (R) 164,047334 (G)
Try	201,102782	255,074515	229,097696	159,092219	158,084394	186,079308	130,065671 (R) 187,063324 (G)
Met	146,063957	200,035690	174,058871	104,053393	103,045569	131,040483	61,011196
Lys- -Ac	185,128995	293,072461	213,123909	143,118432	142,110607	170,105521	84,081320

metrische Sequenzanalyse der Peptide wichtigen Ionen A und C sind daher leicht zu erkennen.

Eine Trifluoracetyl-Gruppe besitzt einen erheblichen negativen induktiven Effekt. Ein N-Trifluoracetyl-Substituent vermindert daher die Bereitschaft des N-Atoms, im Molekül-Ion die positive Ladung zu übernehmen. In den Massenspektren größerer N-Trifluoracetylpeptide (35) ist daher die Bildung der Ionen A_1 gegenüber den übrigen Ionen dieser Reihe benachteiligt. Der N-Trifluoracetylrest kann auch nicht als Ketenderivat aus dem Ion A_1 eliminiert werden, so daß im Massenspektrum der Peak des Ions B_1 fehlt.

V. Massenspektrometrische Sequenzanalyse linearer Peptide

Die im Abschn. III besprochenen übersichtlichen Fragmentierungen von acylierten Peptiden einfacher aliphatischer Aminosäuren im Massenspektrometer erleichtern eine massenspektrometrische Sequenzanalyse. Dazu werden im Massenspektrum die charakteristisch großen Peaks der Acyliminium-Ionen A_1 und Acyl-Ionen C_1 des N-terminalen Aminosäure-Restes aufgesucht. Von diesen Peaks ausgehend gelangt man durch Addition der MZ der einzelnen Aminosäurereste zu den übrigen charakteristischen Peaks der Reihen A und C. Die Anwesenheit einer bestimmten Aminosäure im Peptid kann durch den Peak des Ions B und durch Nebenreaktionen beim Zerfall des Molekül-Ions kontrolliert werden. Die MZ der verschiedenen Ionen A_1 in den Massenspektren von N-Acetyl- und N-Trifluoracetyl-peptiden, der Ionen B und der Aminosäurereste sind zusammen mit Angaben über weitere charakteristische Ionen in Tab. 1 aufgeführt.

Als Erleichterung bei der Ableitung der Aminosäure-Sequenz aus dem Massenspektrum des Peptids ist von *F. Weygand* und Mitarb. (35) ein Differenzschema angegeben worden. In die 1. und 2. Spalte des Schemas werden die Intensitäten und MZ der charakteristischen Peaks eines Massenspektrums eingetragen, in die folgenden Spalten jeweils die Differenzen in den MZ der einzelnen Peaks. Man erhält in Form eines dreieckigen Schemas alle MZ-Differenzen, die im Massenspektrum auftreten. Viele dieser Differenzen besitzen keinerlei mechanistische Bedeutung für die Ableitung der Struktur, jedoch müssen an bestimmten Stellen des Schemas die für eine Sequenzbestimmung wichtigen MZ der Aminosäure-Reste auftauchen. Abb. 16 zeigt ein Differenzschema für ein einfaches Acetylpeptid. Reaktionsfolgen, die im Massenspektrum des Peptids durch metastabile Übergänge nachgewiesen sind, werden durch ausgezogene Linien markiert. Die gestrichelten Linien sollen das Auffinden der nachstehend besprochenen Differenzen erleichtern.

Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden

Rel. Int.	MZ	MZ-Differenzen der Peaks									
		1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10	
0,4	343										
1,7	326	17									
0,7	325	1	18								
0,2	310	15	16								
1,0	299	11	26	27	28						
0,9	298	1	12	23	38	43	44	57	74	88	
0,8	287	11	12	17	28	41	56	70	71	99	
2,5	282	5	16	29	30	44	55	83	98	114	
3,5	269	13	18	32	43	71	72	88	99	101	
4,0	255	14	27	55	60	76	87	89	90	101	
8,4	227	28	42	58	71	73	78	89	100	115	
3,0	211	16	44	60	60	73	84	89	104	115	
2,2	209	2	18	46	57	71	86	99	126	131	188
1,7	198	11	13	29	44	72	99	113	141	154	
1,2	183	15	26	28	55	71	99	127	156	170	
8,8	156	27	42	53	81	83	112	128	156	169	
48,3	128	28	55	70	99	110	112	125	141	155	
12,9	99	29	57	84	97	112	123	137	139	141	
74,7	86	13	42	70	84	111	126	137	139	154	
100,0	72	14	27	56	84	113	128	143	154		
10,0	70	2	16	29	44	73	84	112	113	140	
16,6	55	15	17	31	42	55	56	85	99	126	
51,3	44	11	26	27	29	43	56	69			
50,1	43	1	12	27	40	42	56				
17,3	30	13	14	25	40	42					

Abb. 16. Differenz-Schema für ein Acetyl-tripeptid

Peaks mit den MZ von Ionen des Typs B treten bei den MZ 30, 44, 72 und 86 auf. Das Peptid kann daher die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin und Leucin bzw. Isoleucin enthalten. Als Peak des Acetyliminium-Ions A_1 kommen die Peaks MZ 72, MZ 86 und MZ 128 in Frage, entsprechend N-terminalem Glycin, Alanin oder Leucin. Es ist aber nur einer der möglichen Peaks der Ionen C_1 vorhanden, nämlich der Peak MZ 156, der einem N-terminalen Leucin entspricht. Die großen Intensitäten und die für die Reaktionsfolge MZ 156 \rightarrow MZ 128 \rightarrow MZ 86 gefundenen metastabilen Übergänge bestätigen diese Zuordnung. Ein N-terminaler Leucin-Rest erklärt auch den Peak MZ 99, der dem Ion F zugehört. Auf den N-terminalen Leucin-Rest kann als nächstes in der Peptidkette ein Glycin-, Alanin-, Valin- oder wieder ein Leucin-Rest folgen. Ausgehend vom Peak MZ 156 des Ions C_1 müssen dann zu den nächsten

Peaks der Ionen A_2 und C_2 die MZ-Differenzen 29 und 57 für Glycin, 43 und 71 für Alanin, 71 und 99 für Valin oder 85 und 113 für Leucin auftreten. Diese Bedingung wird nur für einen Valin-Rest als nächste Aminosäure erfüllt. Die Peaks der MZ 227 und 255 entsprechen den Ionen A_2 und C_2 der Sequenz Acetyl-leucyl-valyl. Die gleiche Operation, ausgehend von Peak MZ 255 des Ions C_2 , ergibt als dritte Aminosäure in der Peptidkette Alanin mit den Peaks MZ 298 (A_3) und MZ 326 (C_3). Der kleine Peak MZ 343 gehört dann zum Molekül-Ion des Acetyl-leucyl-valyl-alanins. Diese Zuordnung wird durch die Peaks 325 (M-18) und 299 (M-44) gestützt, außerdem durch den Peak des Ions M-61 bei der MZ 282. Die metastabilen Übergänge für die Reaktionsfolge MZ 343 \rightarrow MZ 287 \rightarrow MZ 269 zeigen die Bildung der Ionen E und F aus dem N-terminalen Leucin-Rest an. Wird aus dem Ion E MZ 287 statt eines Moleküls H_2O die Amin-Komponente Valyl-alanin mit der MZ 188 abgespalten, so entsteht das Ion F MZ 99. Von diesem Ion ausgehend kann mit der MZ-Differenz 99 (Valin) zum Ion MZ 198 und den MZ-Differenzen 71 (Alanin) und 18 zu den Ionen MZ 269 und MZ 257 die Sequenz Acetyl-leucyl-valyl-alanin im Peptid ebenfalls nachgewiesen werden. Glycin ist in dem Peptid nicht vorhanden. Der Peak MZ 30, der mit ähnlicher Intensität auch in den Massenspektren des Acetyl-valins und Acetyl-leucins gefunden wird, entsteht durch Eliminierung der Valin- und Leucin-Seitenkette als Olefin aus den Ionen MZ 72 und MZ 86.

Auf gleichem Wege kann auch die Sequenz größerer Oligopeptide aus den Massenspektren der Acyl-Derivate abgeleitet werden (Beispiele s. (25, 35)). Acetylpeptide und deren Ester besitzen dabei den Vorteil, daß wegen der charakteristisch großen Intensitäten die Aminosäuren am Amino-Ende sehr leicht in jedem Fall erkannt werden können. Ihr Nachteil ist, daß im Massenspektrum besonders häufig isobare Ionen verschiedener Struktur auftreten können. So besitzen zum Beispiel die Acetyliminium-Ionen A_1 und die Iminium-Ionen B der Aminosäure-Paare Glycin und Valin (72) sowie Alanin und Leucin (86) die gleiche nominelle MZ. Diese Schwierigkeit wird bei der Aufnahme des Massenspektrums mit einem hochauflösenden Massenspektrometer vermieden, da sich diese Ionen in ihren genauen Massen deutlich unterscheiden.

Diese isobaren Ionen werden in den Massenspektren des Trifluoracetylpeptids oder -peptidesters nicht gebildet, dafür können an anderer Stelle im Massenspektrum isobare Ionen vorliegen (35). Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz im Peptid kann aber aus dem Massenspektrum des Trifluoracetyl-Derivats Schwierigkeiten bereiten. Da sowohl Acetyl- als auch Trifluoracetyl-Derivate der Peptide im Mikromaßstab leicht erhalten werden können, ist eine massenspektrometrische Analyse beider Derivate zu empfehlen. Dadurch wird die Sicherheit der Sequenzbestimmung erheblich erhöht.

Bei der massenspektrometrischen Sequenzbestimmung nach dem oben beschriebenen einfachen Schema muß bedacht werden, daß im Massenspektrum eines Peptids mit erheblichen Intensitäten Ionen gebildet werden können, die spezifisch für die im Peptid vorliegende Aminosäure-Kombination sind. Ionen dieser Art sind vor allem in den Massenspektren von Peptiden trifunktioneller Aminosäuren beobachtet worden und können die Sequenzanalyse sehr erschweren. Hinzu kommen Peaks, die durch *Verunreinigungen* in der Peptid-Probe erzeugt werden, denn bei der Isolierung geringer Mengen eines Peptids aus Partialhydrolysaten kann das Einschleppen von geringfügigen Verunreinigungen kaum vermieden werden. Auch aus diesen Gründen ist eine genaue Massenbestimmung der verschiedenen Ionen mit Hilfe eines hochauflösenden Massenspektrometers von Vorteil. Ein Teil der Schwierigkeiten kann umgangen werden, wenn statt der Acetyl- oder Trifluoracetyl-Derivate Peptide mit größeren aliphatischen N-Acetyl-Gruppen (27, 36) massenspektrometrisch untersucht werden. Ein Verfahren zur Herstellung dieser Derivate ist von *N. S. Wulfsen* und Mitarb. (40) angegeben worden. Peaks, die durch Verunreinigungen oder thermische Zersetzungsprodukte der Peptide im Massenspektrum auftreten, befinden sich in den meisten Fällen im Bereich unterhalb der MZ 200. Durch die Einführung eines großen Acyl-Restes liegen die MZ der Ionen A und C des Peptids oberhalb dieser MZ. Man kann sich dann auf eine Analyse des oberen Massenbereichs im Spektrum beschränken, am günstigsten wiederum mit Hilfe eines hochauflösenden Geräts. Es kann nach den bisherigen Erfahrungen aber nicht ausgeschlossen werden, daß in einigen Peptiden keine bzw. nicht alle Ionen der Reihen A und C entstehen. Die Erfolge, die *E. Lederer* und Mitarb. (32, 41) bei der massenspektrometrischen Analyse natürlicher Oligopeptide mit der zuletzt angeführten Methode erzielt haben, zeigen jedoch, daß die Massenspektrometrie ein wertvolles Hilfsmittel der Peptid-Chemie geworden ist.

„Dem Bundesminister für wissenschaftliche Forschung danken wir für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung unserer massenspektrometrischen Untersuchungen.“

Anmerkung bei der Korrektur (20. 9. 1966):

Eine Analyse cyclischer Depsipeptide durch hochaufgelöste Massenspektren wurde inzwischen von *C. H. Hassall* und *J. O. Thomas*, *Tetrahedron Letters* 1966, 4485, veröffentlicht. Danach ist die von den russischen Autoren beobachtete „Morpholin-Spaltung“ eine thermische Reaktion.

Literatur

1. *Budzikiewicz, C. Djerassi, and D. H. Williams*: Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vol. I und II, Holden Day Inc., 1964.
2. *Heyns, K., H. F. Grützmacher, H. Scharmann u. D. Müller*: Fortschr. chem. Forsch. 5, 448 (1966).
3. *Rosenstock, H. M., and K. Kraus*: Mass Spectrometry of Organic Ions, ed. *F. W. McLafferty*, Academic Press 1963, Kap. 1.
4. *Spiteller, G., u. M. Spiteller-Friedmann*: Liebigs Ann. Chem. 690, 1 (1966).
5. *Budzikiewicz, H., C. Djerassi, and D. H. Williams*: Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds, Holden Day Inc. 1964.
6. *Gross, D., u. G. Grodsky*: J. Amer. chem. Soc. 77, 1678 (1955).
7. *Heyns, K., u. H. F. Grützmacher*: Angew. Chem. 74, 387 (1962).
8. — — Liebigs Ann. Chem. 667, 194 (1963).
9. *Biemann, K., u. J. A. McCloskey*: J. Amer. chem. Soc. 84, 3192 (1962).
10. *Junk, G. A., u. H. J. Svec*: J. Amer. chem. Soc. 85, 839 (1963).
11. *Field, F. H., and J. L. Franklin*: Electron Impact Phenomena and the Properties of Gaseous Ions. Academic Press, Inc., 1957.
12. *Fritz, H., H. Budzikiewicz u. C. D. Djerassi*: Chem. Ber. 99, 35 (1966).
13. *Duffield, A. M., H. Budzikiewicz, D. H. Williams u. C. D. Djerassi*: J. Amer. chem. Soc. 87, 810 (1965).
14. *Biemann, K., J. Seibl u. F. Gapp*: J. Amer. chem. Soc. 83, 3795 (1961).
15. *Anderssen, C. O., R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen*: Arkiv Kemi 19, 405 (1962).
16. *Biemann, K.*: Chimia 14, 393 (1960).
17. — *G. G. J. Deffner u. F. C. Steward*: Nature 191, 380 (1961).
18. — *C. Liorat, J. Asselineau, E. Lederer u. J. Polonsky*: Biochim. Biophys. Acta 40, 369 (1960).
19. *Heyns, K., u. H. F. Grützmacher*: Liebigs Ann. Chem. 667, 194 (1963).
20. *Grützmacher, H. F.*: Habilitationsschrift. Hambrug 1964.
21. *Heyns, K., u. H. F. Grützmacher*: Z. Naturforsch. 16b, 293 (1961).
22. *Anderssen, C. O., R. Ryhage u. E. Stenhagen*: Arkiv Kemi 19, 417 (1962).
23. *Stenhagen, E.*: Z. Analyt. Chem. 181, 462 (1961).
24. *Svec, H. J., u. G. A. Junk*: J. Amer. chem. Soc. 86, 2278 (1964).
25. *Heyns, K., u. H. F. Grützmacher*: Liebigs Ann. Chem. 669, 189 (1963).
26. *Millard, B. J.*: Tetrahedron Letters 1965, 3041.
27. *Wulfson, N. S., V. A. Puchkov, B. V. Rozinov, Yu. V. Denisov, V. N. Bochkarev, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, E. J. Vinogradova u. M. Yu. Feigina*: Tetrahedron Letters 1965, 2805.
28. — — *V. N. Bochkarev, B. V. Rozinov, A. M. Zyakoon, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. A. Kiryushkin, E. J. Vinogradova, M. Yu. Feigina u. N. A. Aldanova*: Tetrahedron Letters 1964, 951.
29. — — *B. V. Rozinov, A. M. Zyakoon, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. V. T. Ivanov*: Tetrahedron Letters 1965, 2793.
30. *Macdonald, C. G., J. S. Shannon u. A. Taylor*: Tetrahedron Letters 1964, 2087.
31. — — Tetrahedron Letters 1964, 3113.
32. *Barber, M., W. A. Wolstenholme, M. Guinand, G. Michel, B. C. Das u. E. Lederer*: Tetrahedron Letters 1965, 1331.
33. *Heyns, K., u. H. F. Grützmacher*: Tetrahedron Letters 1963, 1761.

Massenspektrometrische Analysen von Aminosäuren und Peptiden

34. *Weygand, F., A. Prox, W. König u. H. H. Fessel*: *Angew. Chem.* 75, 724 (1963).
35. — — *H. Fessel u. K. Kun Sun*: *Z. Naturforsch.* 20b, 1169 (1965).
36. *Bricas, E., J. van Heijenoort, M. Barber, W. A. Wolstenholme, B. C. Das u. E. Lederer*: *Biochemistry* 4, 2254 (1965).
37. *Grützmacher, H. F., and K. Heyns*: ASTM Mass Spectrometry Symposium Paris 1964, in *Advances in Mass Spectrometry*. Vol. III, ed. The Institute of Petroleum, S. 665.
38. *Wulfson, N. S., V. N. Bochkarev, B. V. Rozinov, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. A. J. Miroshnikov*: *Tetrahedron Letters* 1966, 39.
39. *Grützmacher, H. F., u. K. Heyns*: *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
40. *Kiryushkin, A. A., Yu. A. Ovchinnikov, M. M. Shemyakin, V. N. Bochkarev, B. V. Rozinov u. N. S. Wulfson*: *Tetrahedron Letters* 1966, 33.
41. *Barber, M., P. Jollés, E. Vilkas u. E. Lederer*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 469 (1965).
42. *Lanéelle, G., J. Asselineau, W. A. Wolstenholme u. E. Lederer*: *Bull. Soc. Chim. France* 1965, 2133.
43. *Weygand, F., B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak u. J. Tomida*: *Hoppe-Seylers Z. für physiol. Chem.* 322, 38 (1960).
44. *Winkler, J.*: Diplomarbeit Hamburg 1966.

(Eingegangen am 6. Mai 1966)

Verwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse

Prof. Dr. F. Umland und Dipl.-Chem. A. Janßen

Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Münster

Inhaltsübersicht

I. Überblick	582
Geschichtlicher Rückblick	583
II. Besondere Eigenschaften der Chelate	584
Definition	584
Synergismus	585
Stabilität	585
Ringgröße und Zahl der Chelatringe	586
Spezifität und Selektivität	587
Löslichkeit	590
Farbigkeit	591
III. Grundlagen der photometrischen Messung	593
Lambert-Beersches Gesetz	593
Empfindlichkeit	593
Genauigkeit	595
Simultanbestimmung	595
Fluorimetrie	596
IV. Photometrische Bestimmungen in wäßriger Lösung	597
Löslichkeit von Chelaten in Wasser	597
Chelatbildner mit Sulfonat-Gruppen	598
Polyphenole mit Sulfonat-Gruppen	599
Polyphenole ohne Sulfonat-Gruppen	602
Hydroxytriphenylmethanfarbstoffe als Chelatbildner	604
Azofarbstoffe als Chelatbildner	606
Chelatbildner mit der Nitrilodiessigsäure-Gruppe	609
Chelatkationen	610
Indirekte Bestimmungen und gemischte Komplexe	612
V. Photometrische Bestimmungen in nichtwäßriger Phase	612
Grundlagen der Verteilung	612
Chelate mit viergliedrigen Ringen	614
Chelate mit fünfgliedrigen Ringen	617
Chelate mit sechsgliedrigen Ringen	624
Vielzählige Chelatbildner	626
Ionenassoziate	626
VI. Schlußbemerkung	628
Literatur	629

I. Überblick

40 % aller im Jahre 1965 veröffentlichten Arbeiten auf analytischem Gebiet betreffen optische Methoden (105). Zieht man die emissionsspektral-analytischen Methoden ab, so verbleiben rd. 34 % aller analytischen Ar-

beiten, die sich mit Spektrophotometrie, Colorimetrie, Fluorimetrie u. ä. in Lösung befassen. Da die Zahl der einfachen farbigen Ionen beschränkt ist, spielen für die Entwicklung neuer Methoden in der photometrischen Analyse die Komplexverbindungen eine wesentliche Rolle. Sie gestatten, Empfindlichkeit und Selektivität bedeutend zu erhöhen. Man darf schätzen, daß zur Zeit rd. ein Viertel aller erscheinenden analytischen Arbeiten sich mit der Anwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse befassen.

Geschichtlicher Rückblick

Eine beträchtliche Anzahl von Pflanzenfarbstoffen sind Chelate. Pflanzen enthalten demnach Chelatbildner, und die vermutlich älteste Angabe einer analytischen Farbreaktion, die man heute als Chelatbildung bezeichnen würde, verwendet einen Pflanzenextrakt: *Vogel* wies 1815 Borsäure mit Curcumapapier nach (377), eine Reaktion, die in abgewandelter und verbesserter Form heute zu den empfindlichsten photometrischen Methoden überhaupt zählt (370). Die älteste analytische Verwendung eines synthetischen chelatbildenden Reagens stammt von *Ilinski* aus dem chemischen Laboratorium der königlichen Akademie zu Münster (155), der die Trennung des Kobalts von Nickel durch Fällung mit „ α -Nitroso- β -naphthol“ (156) empfiehlt. Die Einführung weiterer Chelatbildner folgte nur zögernd und war mehr oder weniger vom Zufall abhängig. 1905 berichtete *Tschugaeff* (356) über „komplexe Verbindungen der α -Dioxime“, die zur Bestimmung von Nickel, Palladium und Platin Bedeutung erlangten. Der dritte früh bekannte Chelatbildner ist das 8-Hydroxychinolin, von dem bereits *Skraub* 1883 Metallkomplexe (313) beschrieben hat, das aber erst 1926/27 von *Hahn* (134, 135) und *Berg* (25–27) unter dem Namen „Oxin“ als Fällungsreagens in die Analyse eingeführt wurde.

Die wohl erste Anwendung eines *Chelatbildners als colorimetrisches Reagens* wird von *van Klooster* (171) zugeschrieben. Er benutzte die schon lange bekannte Beobachtung von *Hoffmann* (148), daß die Nitrosonaphtholsulfonsäuren mit einigen Kationen lösliche Farbstoffe bilden, zur Bestimmung des Kobalts. Auch dieses Reagens, das 1-Nitroso-2-naphthol-3.6-disulfonat (Nitroso-R-Salz) wird noch heute benutzt. Das Prinzip, gefärbte Chelate durch Einführung von Sulfogruppen wasserlöslich zu machen, wird ebenfalls allgemein angewendet.

Die ersten Übergänge von der Gravimetrie zur *Colorimetrie* verliefen jedoch meist derart, daß eine schwerlösliche Komplexverbindung aus wäßriger Lösung gefällt und nach Filtration und ggf. Trocknung wieder in einem organischen Lösungsmittel gelöst wurde (186). Auch die Ab-

scheidung einer schwerlöslichen Verbindung, wie Aluminiumoxinat, und nachträgliche Kupplung des 8-Hydroxycyclinols mit Diazoverbindungen unter gleichzeitiger Einführung einer Sulfonsäuregruppe wurde vorgeschlagen (6). Mit derartigen Methoden umging man aber nur die Wägung sehr kleiner Mengen. Die Steigerung der Empfindlichkeit war gering und grundsätzlich durch die Fällungsempfindlichkeit begrenzt. Die *Photometrie in organischen Lösungsmitteln* hat deshalb erst Bedeutung erlangt, als die zur Abtrennung notwendige Fällung durch die Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln ersetzt wurde.

Die Einführung *chromophorer Gruppen* in selektive Chelatbildner zur Gewinnung neuer Reagentien ist eine heute oft geübte Praxis. Erstmalig hat wohl *Feigl (101)* dieses Prinzip angewendet und, ausgehend vom Rhodamin, das p-Dimethylaminobenzolrhodamin als jetzt noch benutztes selektives Reagens auf Silber dargestellt.

Moderne Methoden zur Entwicklung neuer Chelatbildner aus bereits bekannten schließen systematische Untersuchungen über Änderung der Farbe und der Selektivität bei Einführung von Substituenten ein mit dem Zweck, daraus *theoretische* Voraussagen für weitere Entwicklungen zu gewinnen. Die systematische Methode hat sich aber erst sehr spät durchgesetzt. Nach *Belcher (21)* war wohl *Smith (314)* der erste, dem es auf Grund solcher systematischer Untersuchungen der 1,10-Phenanthroline gelang, später bestätigte theoretische Voraussagen zu machen.

Der Begriff *Chelat* wurde 1920 von *Morgan und Drew (222)* aus dem griechischen Wort „chela“ für Krepsschere abgeleitet. Bereits *Werner (384)* hatte 1901 vermutet, daß Acetylaceton mit beiden O-Atomen an Platin koordiniert sein kann. Die besondere Bedeutung der cyclischen Struktur von Komplexen erkannte 1904 *Ley (187)* bei der Untersuchung des „Glykokollkupfers“. Von ihm stammt die Bezeichnung „innere Komplexsalze“, die man heute als einen Sonderfall der Chelate ansieht.

II. Besondere Eigenschaften der Chelate

Definition

Chelate sind Komplexe oder Koordinationsverbindungen, in denen zwei oder mehr Elektronendonatoratome eines „mehrzähligen“ Liganden an dasselbe Zentralatom gebunden sind. Die zwischen dem Elektronenacceptor (Zentralatom) und dem Elektronendonator (Chelatbildner) aufgerichteten Elektronenpaarbindungen können mehr oder weniger „polar“ oder „kovalent“ sein, je nach der Natur der beteiligten Atome. Nahezu alle Metalle des Periodensystems und eine Reihe von Metalloiden bil-

den Chelate. Als Elektronendonatoratome fungieren fast nur die ausgesprochen nichtmetallischen Elemente der V. und VI. Hauptgruppe, vorwiegend N, O und S.

Chelatbildner sind im allgemeinen organische Verbindungen. Die entstehenden Chelatringe enthalten neben dem Metall und den Donatoratomen auch noch C-Atome. Es gibt jedoch auch C-freie Chelatringe, insbesondere wenn Derivate der Arsen- und Phosphorsäure als Chelatbildner wirken, wie Phenylarsonsäure und Diäthyl-dithiophosphorsäure. Auch die rein anorganischen Verbindungen, Polyphosphate und Heteropolysäuren müssen definitionsgemäß zu den Chelaten gerechnet werden.

Synergismus

Werden durch den Chelatbildner nicht alle möglichen Koordinationsstellen des Zentralatoms abgesättigt, so lassen sich an diese noch freien Stellen in vielen Fällen weitere Komplexbildner mit nur einem Ligandatom anlagern (368). Die so erhaltenen Komplexe zeigen dann meist andere physikalische und chemische Eigenschaften als wenn jeder der beiden Komplexbildner allein wirksam wäre. Dieser Effekt wird insbesondere bei der Extraktion ausgenutzt und ist eine Sonderform der „synergetischen Wirkung“. Synergismus bedeutet hier, daß die Wirkung eines Gemisches aus zwei Lösungsmitteln größer ist als die Summe der Wirkungen der beiden Lösungsmittel allein (3, 159). Zu dem „synergetischen Effekt“ im weiteren Sinne zählen auch Fälle, in denen durch die Wirkung etwa eines basischen Zusatzes die Anlagerung eines weiteren Liganden bewirkt wird: *Umland* u. a. (362, 363) fanden, daß bei Gegenwart von Aminen Magnesium und Calcium quantitativ mit 8-Hydroxychinolin als $\{RNH_3^+; MeOx_3\}$ extrahierbar sind.

Stabilität

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Chelate ist ihre ungewöhnlich große Stabilität. Äthylendiamin-Komplexe des Nickels sind z. B. wesentlich hydrolysebeständiger als die entsprechenden Methylamin-Komplexe (83). Die Bildungskonstanten für Chelate mehrzähliger Amine in wäßriger Lösung sind viel größer als für die entsprechenden Komplexe monofunktioneller Amine (304, 305).

Bei der Komplexbildung in Lösung muß die Solvathülle des Zentralatoms durch andere Liganden ersetzt werden. Handelt es sich dabei um monofunktionelle Liganden, so werden ebenso viele Solvensmolekeln frei wie Ligandmolekeln aus der Lösung verschwinden. Die Zahl der frei beweglichen Teilchen ändert sich während der Komplexbildung nicht. Er-

setzt jedoch ein polyfunktioneller Chelatbildner die Solvensmolekeln, so wächst während der Komplexbildung die Anzahl der frei beweglichen Teilchen an. Unter sonst völlig gleichen Bedingungen wird also die Wahrscheinlichkeit für den Reaktionsablauf erhöht. Das Entropieglied ΔS in der Beziehung für die freie Enthalpie ΔF nimmt zu.

$$\Delta F = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$$

Die Wärmetönung ΔH sollte sich dagegen kaum ändern, da sowohl bei der Chelatbildung als auch bei der Bildung des einfachen Komplexes die gleiche koordinative Bindung geknüpft wird. Dieser *Entropieeffekt*, der zu einer Vergrößerung der Stabilität führt, wird meist als „*Chelateffekt*“ bezeichnet (211, 274, 304, 305, 330, 392).

Ringgröße und Zahl der Chelatrings

Neben dem Entropieeffekt sind sterische Einflüsse, wie der Abstand der Donatorgruppen voneinander und damit die Ringgröße, für die Komplexstabilität von Bedeutung. So sind fünf- und sechsgliedrige Chelat-Ringe besonders stabil, aber auch 4-, 7-, 8- und noch mehrgliedrige Ringe sind bekannt. Viergliedrige Chelatrings werden insbesondere dann gebildet, wenn der Ring ein oder mehrere größere Atome wie S, P, As, Se enthält. Fünf- und sechsgliedrige Ringe unterscheiden sich wenig in ihrer Stabilität, so daß man bis heute kaum etwas darüber weiß, wann sich der eine oder der andere Typ bevorzugt bildet, wenn, wie bei den α -Dioximen, α -Acyloinoximen, o-Nitrosonaphtholen u. a., beide möglich sind. Allgemein kann man feststellen, daß fünfgliedrige Ringe häufiger bei gesättigten, sechsgliedrige Ringe bevorzugt bei Chelaten mit zwei Doppelbindungen im Ring auftreten. Entstehen Ringe mit nur einer Doppelbindung, so sind beide Ringgrößen gleichberechtigt (212, 253, 259). Von dieser Verallgemeinerung gibt es jedoch eine Reihe von Ausnahmen, so den fünfgliedrigen Ring im Bis-(dimethylglyoximato)-nickel(II) (258) mit zwei Doppelbindungen (s. u.). Ringe mit 7 und mehr Gliedern sind ungewöhnlich, aber doch in einigen Beispielen bekannt (144, 366). Ihre Stabilität ist aber sehr gering. So stellten schon *Tschugaeff* (357, 358) und *Pfeiffer* (262) fest, daß man sieben- oder achtgliedrige Ringe von Diaminen nicht aus wäßriger Lösung, sondern nur aus alkoholischer Lösung gewinnen kann (260).

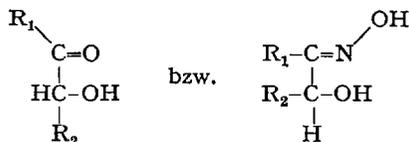
Weiterhin ist die Zahl der Chelatrings, die von einem Chelatbildner gebildet werden, von Bedeutung für die Stabilität. So vergrößert eine Erhöhung der Ringzahl in einer bestimmten Chelatstruktur die Stabilität des Chelates, wie u. a. *Calvin* und *Bailes* (55) an Salicylaldimin-Chelaten des Kupfers und *Schwarzenbach* (303) an einer Anzahl von Zinkkom-

plexen und -chelaten zeigen konnten. Die nach der oben angegebenen Regel unerwartete Stabilität der fünfgliedrigen Ringe im Nickeldimethylglyoximat erklärt sich hiernach durch zusätzliche Ringbildungen über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oximsauerstoffatomen. In der Tat wird die Stabilität noch beträchtlich erhöht, wenn das Proton durch Bor unter Bildung echter, sechsgliedriger Ringe substituiert wird (351, 369).

Spezifität und Selektivität

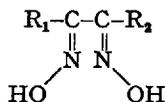
Bei der analytischen Verwendung von Chelaten sucht man meistens nach möglichst spezifischen Reagentien. Spezifisch ist ein Reagenz aber nur dann, wenn es nur — und nur — mit einer einzigen Atom- oder Molekülart reagiert. Es ist daher besser — worauf schon *Feigl (100)* hinwies — die Spezifität als einen relativen Begriff aufzufassen und für den Begriff „spezifisches Reagens“ die treffendere Bezeichnung „spezifische Reaktion“ zu benutzen. Damit wird die Bedeutung des Reaktionsmediums und der Reaktionsbedingungen zur Ausschaltung von Störungen durch andere Ionen zum Ausdruck gebracht. Aber auch echte „spezifische Reaktionen“ sind recht selten. Meistens hat man es mit „selektiven“ Reagentien bzw. Reaktionen zu tun, d. h. eine begrenzte Anzahl von Atom- oder Molekülarten geben ein ähnliches Reaktionsbild; je geringer diese Anzahl ist, um so selektiver ist das Reagens bzw. die Reaktion. „Spezifische“ Nachweise werden dann durch Kombination zweier oder mehrerer „selektiver“ Reaktionen erreicht.

Das Vermögen des Chelatbildners zur Anordnung seiner Donatorgruppen um ein Metallion wird durch dessen Ionengröße und Elektronenzustand einerseits sowie durch die Struktur des Donators andererseits weitgehend beeinflusst. Die hohe *Selektivität* vieler Chelatbildner beruht oft auf sterischen Effekten. So bilden die α -*Acyloime* und besonders die entsprechenden *-oxime*



starke Chelate nur mit einer beschränkten Anzahl von Metallen: Fe, Co, Ni, Cu sowie Pt und Pd, die alle eng miteinander verwandt sind (104, 166).

Eine auffallende Selektivität zeigen auch die α -*Dioxime* für Ni und Pd (84).

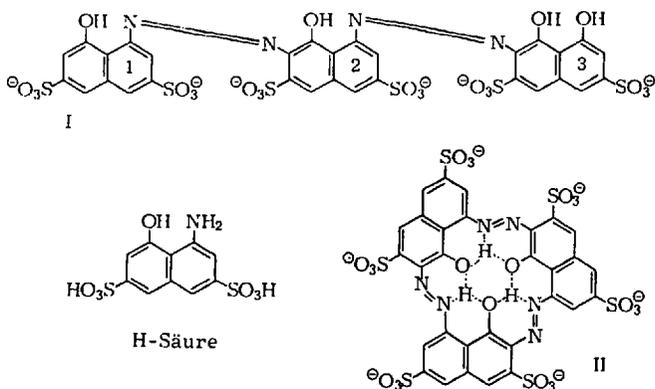


Die *Porphyrine* sind ein weiteres sehr eindrucksvolles und bedeutendes Beispiel für hohe Selektivität in Chelatverbindungen. Es liegt ein Donator vor, der das Metallion durch seine Struktur vollständig umschließen muß und der Chelatbildung seine eigenen sterischen Bedingungen aufzwingt; hier wird also die Größe des Metallions von entscheidender Bedeutung sein.

In vielen Fällen kann die Selektivität durch Einführung von Substituenten in die Chelatbildner erhöht werden. So zeigten *Merritt* (215) und *Irving* u. a. (157), daß die in 2-Stellung substituierten 8-Hydroxychinoline keine schwerlöslichen Chelate mit Al^{3+} -Ionen bilden, wohl aber mit anderen Metallen, weshalb man 2-Methyl- und 2-Phenyl-8-hydroxychinolin z. B. zur Beryllium- oder Zinkfällung in Gegenwart von Aluminium verwendet. Durch Einführung größerer Substituenten in die 7-Stellung des Oxins kann man erreichen, daß nur noch stabile Chelate mit zweiwertigen Kationen gebildet werden (366, 367).

Ähnliche Verhältnisse findet man bei den 1,10-Phenanthrolinen (vgl. S. 610), die normalerweise eine intensive Farbreaktion mit Fe^{2+} und Cu^+ geben (314). Werden jedoch in 2- und 9-Stellung Substituenten eingeführt, so findet keine Reaktion mehr mit Fe^{2+} statt, und das Reagenz ist spezifisch auf Cu^+ (158); denn es enthält jetzt die gleiche Atomgruppierung wie das 2,2'-Bichinolin, das als spezifisches Reagenz auf Cu^+ bekannt ist (41).

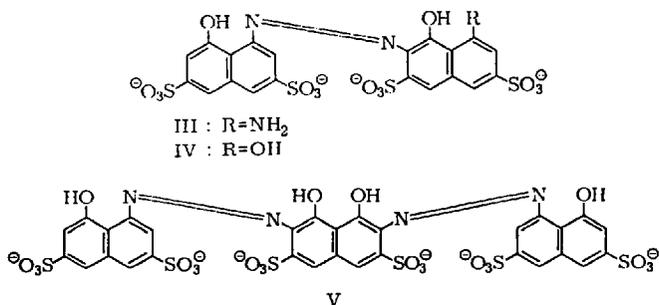
Ein sehr interessantes Beispiel für ein spezifisches Reagens ist das „*Calcion*“ I (198) bzw. „*Calcichrom*“ II (67), das zuerst von *Lukin* und Mitarbeitern (198) als photometrisches und komplexometrisches Reagens auf Calcium hergestellt wurde. Es bildet sich durch Diazotieren und Selbstkuppeln von drei Molekülen „H-Säure“.



Die blaue Farbe des Reagens ändert sich im alkalischen Medium (pH 11 bis 13) nur durch Chelatbildung mit Calcium-Ionen nach rosa. Andere Elemente, selbst Mg, Sr und Ba weisen keinen ähnlichen Farbumschlag auf. Diese Reaktion ist also spezifisch für Calcium, das mit dem Reagens einen 1:1-Komplex bildet.

Die Ursachen für diese Spezifität sind aber noch keineswegs sicher bekannt: „Calcion“ I nach *Lukin* und „Calcichrom“ II nach *West* sind nach neueren Untersuchungen von *Lukin* (197) chemisch identisch. *West* und Mitarbeiter nahmen eine cyclische Struktur des Reagens (II) an, bei der die drei Naphthalinringe in einer Ebene liegen. Diese Anordnung erscheint auf den ersten Blick sehr plausibel, weil daraus eine Struktur des Calciumchelates zu resultieren scheint, die der der Metallporphyrinchelate sehr ähnlich ist. Der Strukturvorschlag von *West* ist deshalb auch weitgehend akzeptiert worden.

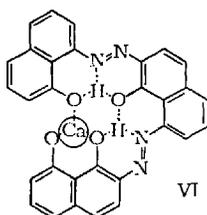
Genauere Betrachtungen zeigen jedoch erhebliche Unterschiede zwischen dem Porphyrin-Ring und der vorgeschlagenen „Calcichromstruktur“ II, und es ist schwer einzusehen, wo ohne große Verzerrungen im Innern der geschlossenen planaren Ringstruktur II für ein Ca-Ion noch Platz sein sollte. Die Untersuchungen von *Lukin* und Mitarbeitern (197) führten zu der Kettenstruktur I des Reagens. Darin ist die NH_2 -Gruppe des Naphthyl-Restes 3 durch eine OH-Gruppe ersetzt worden. *Lukin* und Mitarbeiter zeigten am Beispiel der Calcionanaloge, daß die beiden peri-ständigen Hydroxy-Gruppen zur Chelatbildung mit Calcium notwendig sind. Unter analogen Reaktionsbedingungen wie beim Calcion reagiert von den beiden Verbindungen III und IV nur die Verbindung IV mit Calcium unter Bildung eines violetten Chelates.



Die mit dem Calcion I isomere Verbindung V gibt – aus sterischen Gründen – ebenfalls kein stabiles Calciumchelate. Die für die Chelatbildung maßgebende Gruppierung sind also die beiden peri-ständigen Hydroxy-Gruppen an einem endständigen Naphthalin-Kern (3 in I). Durch Vergleich des Ca-IV- mit dem Ca-I-Chelat fand *Lukin*, daß die Substi-

tuenten am Naphthalin-Ring 1 (I) einen wesentlichen Einfluß auf die Größe der durch die Chelatbildung bedingten Verschiebung des Absorptionsspektrums haben.

Aus diesen Untersuchungen von *Lukin* folgt, daß von den Substituenten am Naphthalin-Kern 1 mindestens einer als Ligandatom wirksam wird. Unterstellt man weiter, daß die Azogruppe $-N=N-$ sich der Azomethin-Gruppe $-N=CH-$ analog verhält, so müssen auf Grund der Untersuchungen an Azomethin-Derivaten (368) zur Chelatbildung oder Wasserstoffbrückenbindung befähigte, zu OH-Gruppen in ortho- oder peri-Stellung stehende Azogruppen trans-Stellung haben. Wie sich am Kalottenmodell zeigen läßt, kann aus sterischen Gründen nicht die Azogruppe, sondern nur die OH-Gruppe am Naphthalin-Kern 1 an das Ca-Ion gebunden sein. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Wasserstoff-Brückenbindungen (368) sei deshalb die Konfiguration VI für das Calcium-Calcion-Chelat vorgeschlagen, bei der Ca außerhalb der Ebene der drei O-Ligandatome liegt (cis-fac-Stellung in oktaedrischer Anordnung).



Diese Struktur VI gibt alle experimentellen Beobachtungen von *Lukin* richtig wieder. Sie unterscheidet sich von dem Strukturvorschlag von *West* insbesondere dadurch, daß ein bis-Azofarbstoff vorliegt und die drei Naphthalin-Kerne nicht genau in einer Ebene zu liegen brauchen. Allerdings ist dann die Spezifität des Reagenses nicht mehr durch sterische Einflüsse allein zu deuten.

Löslichkeit

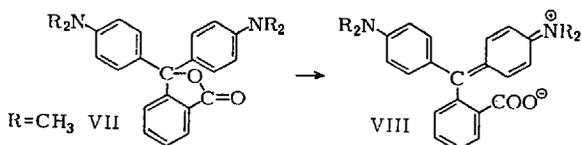
In der Photometrie und für extraktive Trennungen ist die Löslichkeit der Chelatbildner und der gebildeten Chelate von großer Bedeutung. Im allgemeinen sind ungeladene Chelate dann in Wasser unlöslich und mit unpolaren Lösungsmitteln extrahierbar, wenn sie relativ wenige der Hydratisierung zugängliche Gruppen enthalten. Durch Verringerung der Anzahl dieser Gruppen und durch Vergrößerung der nicht hydratisierten Molekelgruppen im Chelat wird die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt.

Dagegen kann durch Einbau stark hydrophiler Gruppen wie Sulfonsäure-, Amino-, Phenol- und Carboxyl-Gruppen, die Löslichkeit in Wasser heraufgesetzt werden. Das ist von Interesse für eine direkte Photometrierung der gebildeten Chelate in der wäßrigen Phase. Dies zeigt sich deutlich beim Vergleich der Löslichkeiten der Kobalt-Chelate mit dem 1-Nitroso-2-naphthol, das als Fällungsmittel benutzt wird, mit dem 1-Nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonat, das zur photometrischen Bestimmung in wäßriger Lösung dient.

Farbigkeit

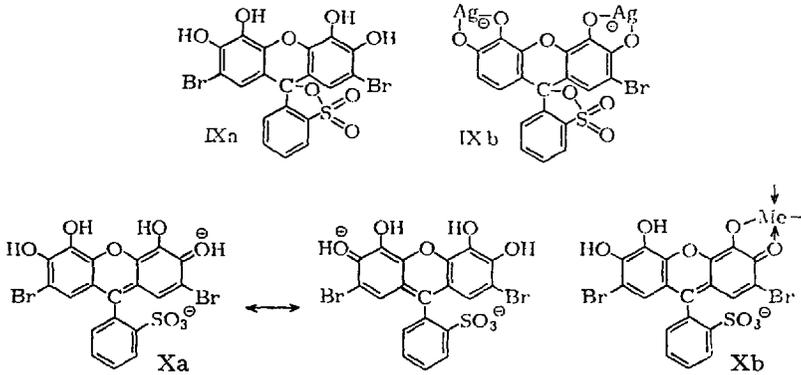
Da sich in vielen Fällen das Metallchelate nicht auf einfache Weise von dem überschüssigen Chelatbildner trennen läßt, kann man die Lichtabsorption des Metallchelates nur dann zur Bestimmung des Metalles verwenden, wenn das Chelat ein anderes Absorptionsspektrum aufweist als der freie Chelatbildner. Die Chelatbildung hat nur dann einen stärkeren Einfluß auf die Lichtabsorption, wenn durch sie das chromophore System in größerem Ausmaß verändert wird. Nun vermag aber das sichtbare Licht die fest gebundenen Valenzelektronen in gesättigten Molekeln nicht anzuregen; es tritt erst dann in Wechselwirkung mit einer Molekel, wenn darin stark ungesättigte Gruppen vorhanden sind. Will man also eine Farbvertiefung (Bathochromie) erreichen, so muß durch die Komplexbildung in dem organischen Molekül das System der ungesättigten Gruppen verändert werden, was z. B. durch Polarisierung möglich ist. Welche bedeutende Rolle die Polarisierung für das Auftreten einer tieferen Farbe spielt, geht aus dem folgenden Beispiel hervor:

Das Lacton des p,p'-Bis-(dimethylaminophenyl)-phthalids (VII) löst sich sowohl in Kohlenwasserstoffen als auch in Alkoholen farblos auf. Es wird aus Benzol von Kieselgel oder Al_2O_3 mit intensiv grünblauer Farbe adsorbiert, wobei das Lacton unter Bildung eines Zwitterions (VIII) polarisiert wird. Das Auftreten der Farbe ist eine Folge der Polarisierung (383).



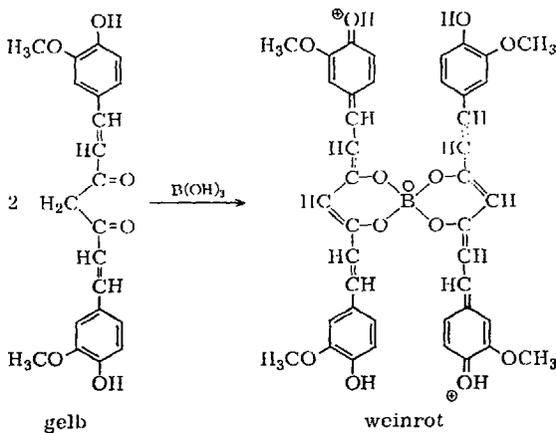
Diese Lacton-Betaïn-Umwandlung kann bei leicht polarisierbaren Lactonen, wie die der Sulfo-phthaleine, schon durch Auflösen in schwach polaren Medien erfolgen. So ist die Lösung des Brompyrogallorot in Alkohol oder verdünnter Essigsäure rot, da das entstehende Zwitterion

einen chinoiden Ring enthält (Xa), während die Verbindung in stark mineralaurer Lösung (IXa) und z.B. auch in ihrem Silber-chelat (IXb) gelb bis orange ist, da dann alle drei Ringe in benzoider Form vorliegen. Dagegen sind die Chelate anderer Elemente (Xb), wie Sn, Sb oder Nb, violett. Diese bathochrome Verschiebung der Lichtabsorption beruht auf



der Beanspruchung eines Elektronenpaares am chinoiden Sauerstoff für die Komplexbildung, so daß zwischen den beiden Phenyl-Resten mit den auxochromen Gruppen keine Mesomerie nach Xa mehr möglich ist.

Bei den *Polyenen* führt die Vergrößerung der Zahl der konjugierten Doppelbindungen zu einer Farbvertiefung. Bei der Chelatbildung des Bors mit Curcumin (337) wird daneben gleichzeitig eine phenolische OH-Gruppe in eine chinoide C=O-Gruppe überführt, die eine Blauverschiebung der Absorptionsbande bewirkt. Hier wird also durch die Chelatbildung ein zur Mesomerie befähigtes System erzeugt, das stets wesentlich tiefer farbig ist.



III. Grundlagen der photometrischen Messung

Lambert-Beersches Gesetz

Das älteste optisch-analytische Verfahren ist die Colorimetrie, bei der ein Farbvergleich, verbunden mit einer Schichtdickenmessung unter Verwendung einer Vergleichslösung bekannter Konzentration c_v des zu bestimmenden Stoffes durchgeführt wird. Dafür gilt dann $c \cdot d = c_v \cdot d_v$.

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung handelt es sich um eine Extinktionsmessung mit Hilfe einer meßbar veränderlichen Lichtschwächungseinrichtung (174). Dafür gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz

$$E_\lambda = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Die Extinktion E_λ ist gleich dem dekadischen Logarithmus der reziproken Durchlässigkeit (I/I_0) der Lösung. Sie ist die eigentliche Meßgröße und der Konzentration c und der Schichtdicke d proportional. Der Proportionalitätsfaktor ϵ_λ ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient (falls c in Molaritäten gemessen wird). Er ist bei streng monochromatischem Licht ($\lambda = \text{const}$) eine Stoffkonstante.

Empfindlichkeit

Die Größe des Extinktionskoeffizienten bestimmt in erster Linie die Empfindlichkeit einer photometrischen Bestimmung. Zur Steigerung der Empfindlichkeit photometrischer Methoden ist deshalb das Hauptaugenmerk auf die Entwicklung von Reagentien zu richten, die Chelate mit hohem Extinktionskoeffizienten ergeben. Obwohl photometrische Bestimmungen als ausgesprochene Spurenbestimmungen gelten, kann ϵ_λ nicht beliebig groß werden. Wie theoretisch abgeleitet werden kann (109), liegt im sichtbaren Bereich die Grenze bei $\epsilon_\lambda \approx 10^5$ [l/Mol · cm] pro Elektronenübergang. Die meisten für photometrische Bestimmungen verwendeten gefärbten Metallchelate haben Extinktionskoeffizienten um $5 \cdot 10^3$ bis $5 \cdot 10^4$. Im UV-Bereich gibt es höhere Extinktionskoeffizienten. Jedoch ist eine genaue photometrische Bestimmung im UV mit Schwierigkeiten verbunden: Wegen der vorhergehenden chemischen Manipulation ist selten eine Lösung absolut optisch klar. Es können feinste Staub- oder Filterpapierteilchen in der Lösung vorhanden sein oder kolloide Ausscheidungen vorliegen. Für die Tyndall-Streuung gilt

$$\Phi = \text{prop} \frac{NV^2}{r^2 \lambda^4} \cdot \Phi_0$$

(Darin sind: N = Zahl der Teilchen pro Volumeneinheit; V = Volumen des einzelnen Teilchens; r = Entfernung vom beleuchteten Volumenelement; λ = Wellenlänge des eingestrahlten Lichts; Φ_0 = eingestrahlte

Lichtintensität). Wegen des Faktors λ^{-4} wird im kurzwelligen Bereich der Streulichtfehler photometrischer Messungen sehr groß, wenn nicht besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Andererseits kann eine Streuungs- oder Trübungsmessung (Turbidimetrie, Nephelometrie) ebenfalls zur Bestimmung sehr kleiner Substanzmengen herangezogen werden (319). Obwohl Metallchelate und besonders die sog. Farblacke – Verbindungen zwischen Metallen und Polyhydroxyverbindungen – häufig kolloid anfallen oder hergestellt werden können, hat diese Methode im Bereich der Metallchelate noch keine Bedeutung erlangt.

Für die Routinemessungen dürfte demnach die kurzwellige Grenze photometrischer Messungen bei etwa 300 nm liegen. Zum IR-Bereich hin existiert dagegen eine solche Grenze nicht. Insbesondere für das nahe IR (1000–2500 nm) gibt es für moderne Spektralphotometer auch geeignete Meßvorrichtungen (PbS-Photowiderstand). Es ist deshalb erstaunlich, daß dieser Bereich zur Zeit noch wenig Beachtung findet.

Setzt man als obere Grenze des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda} = 10^5$ [l/Mol · cm] und als untere ausreichend genaue Meßgrenze der Extinktion $E = 0,01$, so liegt die erreichbare untere Bestimmungsgrenze photometrischer Methoden für $d = 1$ cm bei einer Konzentration von $c = 10^{-7}$ Mol/l. Folgende Möglichkeiten gibt es, diese untere Grenze noch etwas in den „Ultraspurenbereich“ hinauszuschieben:

a) Die Schichtdicke d wird vergrößert. In normalen Photometern sind im allgemeinen noch Küvetten mit $d = 5$ cm vorgesehen. Darüber hinaus gehende Küvetten (bis $d = 100$ cm) bedingen zusätzliche meßtechnische Einrichtungen.

b) Man benutzt Anreicherungsverfahren. Zur Bestimmung sehr kleiner Absolutmengen (Mikromethode) ist die Konzentrierung des gefärbten Chelates auf einem kleinen Papierfleck durch Tüpfel- oder papierchromatographische Methoden geeignet. Ein Beispiel ist die Bestimmung kleiner Mengen Bor bis herab zu $0,2 \pm 0,06$ ng B (370).

c) Eine Farbreaktion wird katalytisch durch das zu bestimmende Ion verstärkt. Es sind bisher einige Methoden bekannt, bei denen die Empfindlichkeit auf diese Weise erheblich gesteigert werden kann (vgl. Bi-Bestimmung (132)). Jedoch ist die Störanfälligkeit im allgemeinen groß.

d) Chelate bzw. Chelat-Ionen werden mit organischen Farbstoffen, die infolge mehrerer Elektronenübergänge höhere Extinktionskoeffizienten haben, als Ionenassoziate extrahiert. Die Empfindlichkeitssteigerung erreicht im allgemeinen keine Zehnerpotenz und ist wegen einer Krümmung der Eichkurve (Dissoziation) gerade bei sehr kleinen Konzentrationen nicht allgemein anwendbar.

e) Es wird eine stöchiometrische chemische „Vervielfachung“ durchgeführt. Diese Möglichkeit wurde für die Bestimmung kleiner Mengen P geprüft (338, 372). Dazu wird P als Dodekamolybdatophosphorsäure extrahiert und das Mo an Stelle des P photometrisch bestimmt. Die Vervielfachung beträgt exakt $\text{Mo} : \text{P} = 12 : 1$ (372).

Unter Berücksichtigung aller Möglichkeiten liegt die derzeitige überhaupt erreichbare untere Grenze photometrischer Bestimmungen bei $c = 10^{-8}$ Mol/l.

Genauigkeit

Man unterscheidet zwischen der Richtigkeit einer Analyse (begrenzt durch systematische Fehler) und der Reproduzierbarkeit (begrenzt durch zufällige Fehler). Bei den meisten Analysen interessiert nur der relative Fehler der Konzentrationsbestimmung dc/c , der in der Photometrie dem relativen Fehler der Extinktionsmessung dE/E proportional ist. Durch Differentiation des Lambert-Beerschen Gesetzes ergibt sich, daß dE/E bei $E = 0,4343$ ein flaches Minimum durchläuft. In der Praxis darf man den Bereich von $E = 0,2$ bis $0,8$ als günstigsten Bereich für Extinktionsmessungen ansehen. Außerhalb dieser Grenzen steigt der relative Fehler stark an.

Die Reproduzierbarkeit photometrischer Bestimmungen mit modernen Geräten ist besser als man gemeinhin annimmt und kann sich durchaus mit der klassischen Verfahren messen. Sie ist besser als die titrimetrischer Methoden mit visueller Endpunktsbestimmung. *Specker* und Mitarbeiter (329) haben einen Vergleich der Genauigkeit verschiedener Methoden zur Bestimmung von Cu, Ni und Co durchgeführt und fanden für photometrische Bestimmungen mit dem Elko II der Fa. Zeiss Varianzen der Konzentration zwischen $0,038$ und $0,085$ %. In der gleichen Größenordnung liegen gravimetrische und jodometrische Verfahren, während bei komplexometrischer Titration mit Metallindikatoren Varianzen von $0,15$ – $0,19$ % erhalten wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Photometrie nicht nur als Spurenanalysenmethode, sondern auch im Makrobereich Beachtung verdient, da sie bei Verwendung selektiver Reagentien den klassischen Methoden an Einfachheit und Schnelligkeit überlegen ist.

Erfreulicherweise setzt sich in den letzten Jahren mehr und mehr die statistische Überprüfung und Bewertung von Analyseverfahren durch (86, 124, 167).

Insbesondere zur Festlegung von Bestimmungsgrenzen (351) und zur Testung neuer Verfahren (125, 126, 372) ist die statistische Bewertung unerlässlich.

Simultanbestimmung

Bei weitgehender Monochromasie des Lichts können mit modernen Photometern Simultanbestimmungen von zwei oder mehr Stoffen durchgeführt werden, wenn die Chelate zweier Metalle mit dem gleichen Chelatbildner in verschiedenen Wellenbereichen absorbieren. Man mißt die

Extinktionen bei zwei Wellenlängen. Wenn die Extinktionskoeffizienten des Stoffes 1 ϵ_{11} und ϵ_{12} und des Stoffes 2 ϵ_{21} und ϵ_{22} bei beiden Wellenlängen bekannt sind, können die Konzentrationen c_1 und c_2 aus den Beziehungen

$$E_1 = \epsilon_{11} \cdot c_1 + \epsilon_{12} \cdot c_2$$

$$E_2 = \epsilon_{21} \cdot c_1 + \epsilon_{22} \cdot c_2$$

berechnet werden.

Ein derartiges in der Gasanalyse bereits seit langem geübtes Verfahren hat auch für die Photometrie von Chelaten Bedeutung, wenn, wie bei medizinischen und biologischen Fragestellungen, nur sehr wenig Probematerial zur Verfügung steht. Ein Beispiel ist die Simultanbestimmung von Cu und Fe in Blutserum mit 8-Hydroxychinolin (377).

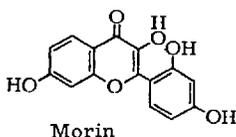
Fluorimetrie

Eine ganze Reihe von Metallchelaten wird von kurzwelligem Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Technik zur Messung der Fluoreszenz ist der der Streuungsmessung ähnlich, hat aber eine erheblich größere Bedeutung erlangt als jene. Für einige Elemente besitzen fluorimetrische Methoden größere Empfindlichkeit und Selektivität als colorimetrische Methoden. Insbesondere für Spurenbestimmungen bietet die Fluorimetrie gegenüber der Absorptionsphotometrie den Vorzug, daß die Fluoreszenzintensität direkt gemessen und verstärkt werden kann, während bei der Absorptionsmessung zwei oft nur wenig unterschiedliche Intensitäten (I_0 und I) miteinander verglichen werden. Zwar verteilt sich die Fluoreszenzstrahlung gleichmäßig über alle Raumrichtungen, so daß nur ein geringer, dem Öffnungswinkel des Empfängers entsprechender Anteil genutzt wird. Aber erstens kann die Fluoreszenzintensität schwach fluoreszierender Stoffe bei der Verwendung sehr intensiver Erregerquellen (Quecksilberhöchstdrucklampe oder Xenonlampe) (174) gesteigert werden und zweitens bietet sich wegen der Direktmessung der Fluoreszenzstrahlung die Möglichkeit einer einfachen elektrischen Verstärkung.

Bei allen Fluoreszenzmessungen sind jedoch gewisse Vorbedingungen zu berücksichtigen, die zum Teil denen bei der Photometrie analog sind: So können bei schwach fluoreszierenden Stoffen schon durch geringe, aber stark fluoreszierende Beimengungen oder durch Lichtstreuung an kolloiden Teilchen beträchtliche Fehler entstehen. Zusätzliche Fehlerquellen treten auf, wenn durch selbst nicht fluoreszierende Fremdstoffe die Fluoreszenz mehr oder weniger stark gelöscht wird. Außerdem beobachtet man fast stets eine sogenannte *Konzentrationslöschung*, die bei

der Absorption kein Gegenstück besitzt: die Fluoreszenz nimmt auch bei genügend hoher Intensität der Erregerstrahlung nicht monoton mit steigender Konzentration des fluoreszenzfähigen Stoffes zu, sondern geht durch ein Maximum und nimmt dann wieder ab, oft bis zum praktisch vollständigen Verschwinden der Fluoreszenz.

Als Beispiel für Reagentien zur fluorimetrischen Metallbestimmung seien erwähnt: *Morin* gibt intensive Fluoreszenz mit Zr, Th, Sc, Al, Ga, In, Y und Ce^{III} in schwach saurem oder neutralem und mit Be (57) in alkalischem Medium.



8-Hydroxychinolin gibt intensiv fluoreszierende Chelate mit Zn, Al, Mg, Sc, Y, Zr, Cd und Hf, wobei die Fluoreszenz jedoch nur bei einigen Chelaten zeitlich konstant ist und somit für analytischen Zwecke ausgenutzt werden kann, so für Al, Zn, Sc und Zr (133, 337). Hafniumoxinat zeigt in besonders hohem Maße Konzentrationslöschung.

IV. Photometrische Bestimmungen in wäßriger Lösung

Löslichkeit von Chelaten in Wasser

Der Vorteil einer photometrischen Bestimmung unmittelbar nach Reagenszugabe zu einer wäßrigen Lösung ohne weitere Trennungen liegt auf der Hand. Die dazu erforderlichen hochselektiven Reagentien sind aber noch selten. Oft läßt sich die Selektivität einer Reaktion durch weitere Chelatbildner, die mit störenden Ionen ungefärbte oder in anderen Wellenbereichen absorbierende Chelate geben, erhöhen. Als derartige Maskierungsmittel dienen neben einigen anorganischen Komplexbildnern, wie Fluorid, Cyanid und Phosphat, insbesondere die Komplexe.

Für die Bestimmung in wäßriger Lösung sind aber noch weitere Voraussetzungen erforderlich. Das gewünschte Chelat muß sehr beständig sein, damit es sich bevorzugt bildet. Normalerweise sind alle wasserlöslichen Chelate mehr oder weniger dissoziiert, so daß man ein Gemisch verschiedener Dissoziationsstufen in der Lösung hat, die u. U. eine beträchtliche scheinbare Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz bedingen können.

Ein weiteres Erfordernis ist die Wasserlöslichkeit der Chelate. Man erreicht sie oft, von bekannten Fällungsmitteln ausgehend, durch Einführung hydrophiler Gruppen. Am häufigsten wird die Sulfonatgruppe ($-\text{SO}_3^-$ -Gruppe) benutzt, die selber nur in Ausnahmefällen an der Chelatbildung beteiligt ist. Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Arson- und Phosphonsäure-Gruppen sind Beispiele für hydrophile Gruppen, die gleichzeitig an der Chelatbildung teilnehmen. Die Gesamtzahl der im Komplex vorhandenen hydrophilen Gruppen soll die Zahl der Ligandatome übersteigen, um ausreichende Löslichkeit zu erzielen. Trotzdem ist es häufig erforderlich, durch Zugabe von Alkohol, Aceton oder ähnlichen mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln die Löslichkeit des Chelates zu erhöhen. Gelegentlich begnügt man sich auch mit einer Stabilisierung einer Kolloidlösung durch Zusatz von Gelatine u. ä.

Wasserlösliche Chelate entstehen aber nicht nur bei Anwesenheit genügend vieler hydrophiler Gruppen, sondern auch, wenn das Chelat in Ionenform vorliegt. Chelate in Ionenform treten auf, wenn die Zahl der ersetzten Protonen in den Chelatbildnern von der Wertigkeit des Zentralatoms verschieden ist. Dazu gehören z. B. die „ungesättigten“ oder stufenweise dissoziierten Chelate, wie ein grünes Chelat des Fe^{3+} mit 8-Hydroxychinolin $[\text{FeOx}]^{2+}$, das von *Sandell* (293) zur Bestimmung des Eisens empfohlen wurde. Auch der Fe(III) -Komplex mit Ferron (vgl. S. 599) gehört hierher, obwohl Ferron noch eine Sulfonatgruppe besitzt. Weiterhin gehören komplexe Anionen, bei denen mehr Protonen abdissoziieren, als der Wertigkeit des Zentralatoms entspricht, in diese Gruppe, z. B. alle Chelate der „Komplexone“.

Eine Sondergruppe bilden Chelate mit ausschließlich koordinativen Bindungen zwischen Zentralatom und Komplexbildner, so daß die Ladung des Zentralatoms gleich der des Chelates ist. Als Chelatbildner fungieren in diesen Fällen Di- oder Polyamine, seltener – und für die photometrische Analyse von geringer Bedeutung – auch Polyalkohole und -äther.

Im folgenden werden einige der wichtigsten Chelatbildner besprochen, die für photometrische Bestimmungen in wäßriger Phase geeignet sind.

Chelatbildner mit Sulfonat-Gruppen

Sulfosalicylsäure gibt in schwach saurem Medium mit Eisen(III) einen tiefroten und mit Titan(IV) einen intensiv gelben Komplex, die beide zur photometrischen Bestimmung dieser Elemente verwendet werden. In ammoniakalischer Lösung geben Eisen(II) und Eisen(III) die gleiche Gelbfärbung, die wesentlich farbintensiver ist als die Rotfärbung mit Fe(III) im sauren Bereich. Dabei stört Mangan; in saurer Lösung stört nur Titan (4, 185, 350).

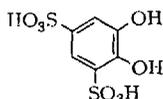
Die Störung der Titan-Bestimmung durch Eisen kann durch Zugabe von Thioglycolsäure beseitigt werden, die das Eisen zur zweiwertigen Stufe reduziert (405).

Durch Einführung von zwei Sulfogruppen in das zur quantitativen Fällung des Kobalts benutzte 1-Nitroso-2-naphthol erhält man die 1-Nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonsäure, deren Dinatriumsalz, das Nitroso-R-salz, mit einer ganzen Reihe von Elementen mehr oder minder tief gefärbte wasserlösliche Chelate gibt. In Gegenwart von Natriumacetat und etwas Salpetersäure bilden sich jedoch nur noch die Chelate von Kupfer, Nickel und Cobalt, von denen beim Kochen die des Kupfers und Nickels hydrolysieren, so daß nach Filtration der rote Kobaltkomplex photometriert werden kann. Unter definierten Reaktionsbedingungen kann also Kobalt mit Nitroso-R-salz in den verschiedensten Produkten selektiv bestimmt werden, so in Stahl (143) und anderen metallurgischen Produkten (250, 401).

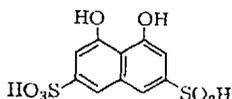
Auch das zur gravimetrischen Bestimmung viel verwendete 8-Hydroxychinolin gibt nach Sulfurierung lösliche, farbige Metallchelate. Bekanntester ist jedoch das Derivat „Ferron“ (7-Jod-8-hydroxychinolin-5-sulfonsäures Natrium). Die „Ferron“-Chelate sind fast ausnahmslos gelb, nur das Eisen(III) gibt einen grünen Komplex in schwach saurem Medium. Diese Reaktion kann zur Eisenbestimmung verwendet werden, wobei allerdings Kupfer, Nickel, Chrom und Kobalt stören (345, 394). In Proben, die kaum andere Metalle enthalten, können auch Aluminium und Eisen nebeneinander bestimmt werden, da der Al-Komplex die Bestimmung des Eisens nicht stört und die durch das Eisen bedingte Störung der Aluminiumbestimmung entsprechend korrigiert werden kann (42, 77); hierbei stören Uran, Thorium, Kupfer, Nickel, Chrom, Molybdän, Mangan, Zirkon und Zink. Wegen der geringen Selektivität ist also „Ferron“ als Reagenz nur in wenigen bestimmten Fällen ohne Schwierigkeiten anwendbar.

Polyphenole mit Sulfonat-Gruppen

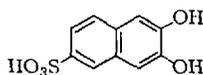
Polyphenole oder -naphthole mit ortho- oder peri-ständigen Hydroxylgruppen und einer oder mehr Sulfongruppen zur Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit gehören zu den wichtigsten analytischen Reagentien. Dabei kann die manchmal geringe Selektivität durch Maskierungsmittel verbessert werden (325). Von besonderer Bedeutung sind:



Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure = „Tiron“



2,3-Dihydroxynaphthalin-6-sulfonsäure



1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure = „Chromotropsäure“

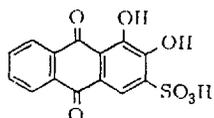
Tiron gibt als verhältnismäßig selektives Reagenz farbige Chelate mit Eisen(III) (blau oder rot, je nach pH-Wert); Molybdän, Osmium, Kupfer, Uran und Titan (gelb); Cer(III) (weinrot) und Vanadin (purpurfarben, wobei die Farbe jedoch nach kurzer Zeit verblaßt). Das Reagens wurde ursprünglich zur Bestimmung von Titan und Eisen eingeführt. Zur Bestimmung beider Elemente in Gegenwart aller anderen sind vorher jedoch umständliche Trennungen durch Fällung erforderlich: Störende Elemente werden zunächst durch eine Sulfidfällung bei pH 1 entfernt. Aus dem Filtrat kann nach Zugabe von Tartrat das Eisen mit Ammoniumsulfid abgetrennt und nach Wiederauflösen störungsfrei mit *Tiron* bestimmt (398) werden. – Führt man stattdessen nach der ersten Sulfidfällung eine Hydroxidfällung durch, so kann man in dem Niederschlag das Titan direkt mit *Tiron* bestimmen. Störende Eisenverbindungen werden durch Thioglykolsäure maskiert (285, 395) oder mit Natriumdithionit reduziert (273). Cer läßt sich nach Reduktion zur dreiwertigen Stufe mit *Tiron* in Gegenwart anderer Seltener Erden und Thorium bestimmen. Bei der Bestimmung stören jedoch Eisen und Titan schon in kleinen Mengen, Aluminium erst im großen Überschuß (279). Die Molybdän-Bestimmung mit *Tiron* wird nur von Fe, Ti und W gestört, deshalb trennt man das Molybdän zunächst durch Fällung mit Benzoinoxim ab. Dabei fällt allerdings Wolfram mit, weshalb man die photometrische Bestimmung dann nicht im Absorptionsmaximum bei 390 nm, sondern bei 420 nm durchführt (388), wo der Wolfram-*Tiron*-komplex kaum noch absorbiert. – Die Bestimmungen von Kupfer (206) und Osmium (207) mit *Tiron* werden durch zahlreiche Ionen gestört und sind nur von geringer Bedeutung.

2,3-Dihydroxynaphthalin-6-sulfonsäure gibt mit den gleichen Elementen farbige Chelate wie das *Tiron*: mit Eisen je nach dem pH-Wert ein blaues oder rotes; mit Titan ein orangefarbenes und mit Cer, Molybdän, Uran, Niob und Vanadin rotbraune Chelate. Diese Elemente stören sich also gegenseitig bei der Bestimmung (325).

Von allen Polyphenolen ist für die Titan-Bestimmung die *Chromotropssäure* am besten geeignet (327); sie liefert je nach der Säurekonzentration einen roten bis violetten Komplex. Zwar bildet sie auch mit einer Reihe anderer Elemente intensiv gefärbte Chelate, doch lassen sich in den meisten Fällen durch entsprechende Reaktionsbedingungen diese Störungen beseitigen. So stört in konzentriert schwefelsaurer Lösung nur noch Eisen (40), das durch Abscheidung an der Quecksilberkathode beseitigt werden kann (289). In schwach saurer Lösung stören außerdem Vanadin, Zirkon und Molybdän. Alle 4 Störelemente können jedoch als Kupferron-Chelate mit Chloroform extrahiert werden (251).

Eleganter erscheint die Reduktion der störenden Elemente mit Ascorbinsäure in schwach saurem Medium. Es verbleibt dann nur noch eine Störung durch Niob (322, 326, 327). Diese Methode wird besonders zur Bestimmung des Titans im Stahl empfohlen (320). – Chromotropsäure kann ferner zur Bestimmung von Niob verwendet werden, mit dem ein rotes Chelat entsteht (324, 325), und zur Bestimmung von Eisen(III), das grüne Komplexe bildet (323).

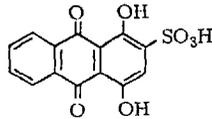
Mit einer Reihe ausgesprochen sauerstoff-affiner Elemente, wie Aluminium, Zirkonium, Yttrium und den Seltenen Erden, bildet *Alizarin S*



rote Komplexe, die insbesondere zur Aluminiumbestimmung geeignet sind. Die Farbintensität des vom Aluminium mit Alizarin S gebildeten Farblackts ist aber außer von der Aluminiumkonzentration auch noch vom pH-Wert der Reaktionslösung und der Konzentration einiger Fremdsalze abhängig. So wurde diese von *Atack* eingeführte Bestimmungsmethode (9) von einer Reihe von Autoren immer wieder neu bearbeitet und verbessert (226, 298, 373, 397). Bei Anwesenheit von Calcium-Ionen wird die Farbe des Aluminiumkomplexes intensiver, was zu einer Empfindlichkeitssteigerung der Bestimmung ausgenutzt werden kann (119, 252). Eisen, Mangan, Fluorid und Phosphat stören und müssen vorher abgetrennt werden. Man extrahiert zunächst Eisen und andere Schwermetalle bei pH 0,4–1 als Kupferron-Komplex mit Chloroform und trennt nach erneuter Zugabe von Kupferron bei pH 4,8 das Aluminiumkupferronat durch Extraktion ab von Mangan, Fluorid und Phosphat (348). – Das Zirkonchelate mit Alizarin S ist noch in stärker saurem Bereich beständig, so daß bei pH ≤ 2 das Aluminium diese Bestimmung nicht mehr stört. Es stören jedoch Fluorid, Sulfat, Phosphat, Silicat, Molybdat, Wolframat, Antimonat und organische Hydroxysäuren, die entweder Niederschläge oder stabile Komplexe mit Zirkon geben (128), so daß diese Methode nur für spezielle Proben geeignet ist, z. B. für Gesteine und Mineralien (87). Hafnium reagiert analog, während der Thorium-Komplex sich erst bei pH-Werten über 2,5 bildet (15, 130).

Wenn die Einzellemente der Seltenen Erden an einer Ionenaustauschersäule voneinander getrennt sind und auch nicht mit anderen Elementen vermischt sind, dann ist Alizarin S ein sehr empfindliches Reagenz zu ihrer Bestimmung bei pH = 4,7 als optimaler H⁺-Ionenkonzentration (287).

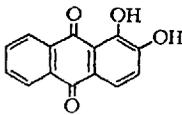
Als weiteres Derivat der Anthrachinonsulfonsäure findet die *Chinizarin-2-sulfonsäure* bedingt Verwendung zur Berylliumbestimmung, wobei



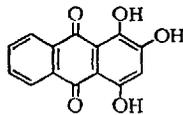
allerdings neben Fluorid und Phosphat auch eine Reihe von Kationen stören, insbesondere Aluminium, so daß die Methode nur empfohlen werden kann, wenn das Beryllium vorher isoliert worden ist (73, 99).

Polyphenole ohne Sulfonat-Gruppen

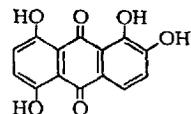
In vielen Fällen sind schon eine Reihe von OH-Gruppen im Molekül des Chelatbildners ausreichend, wasserlösliche Komplexe für photometrische Bestimmungen zu bilden. Die Löslichkeit steigt mit der Zahl der OH-Gruppen vom Alizarin über das Purpurin zum Chinalizarin. Bei Bestimmungen mit Alizarin muß die Löslichkeit durch Zugabe größerer



Alizarin



Purpurin



Chinalizarin

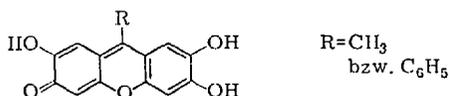
Mengen Alkohol erhöht werden, während Bestimmungen mit Chinalizarin erfolgreich in rein wäßrigen Lösungen durchgeführt werden (188). Da außerdem die Farbtintensität mit steigender Zahl von OH-Gruppen zunimmt, hat das Alizarin im Vergleich zum sulfurierten und somit besser wasserlöslichen Alizarin S und zum Chinalizarin kaum Bedeutung für quantitative Bestimmungen.

Chinalizarin gibt in stark alkalischer Lösung eine Blaufärbung mit Beryllium, Magnesium, Scandium, Zirkon, Thorium, den Seltenen Erden, Kobalt und Nickel, weshalb diese Methode unter anderem besonders zur Berylliumbestimmung neben Aluminium geeignet ist. Die störenden Elemente trennt man am besten ab, indem man den nach Ammoniakfällung erhaltenen Hydroxid-Niederschlag trocknet, mit NaOH schmilzt und die Schmelze mit Eis aufnimmt. Dabei bleiben die störenden Elemente in kompakter, wenig adsorbierender Form zurück (107, 284).

Es sind noch für weitere Elemente Bestimmungsmethoden in alkalischer Lösung ausgearbeitet worden, so für Magnesium (349), Thorium

(280), Gallium (389) und Zirkon (173, 188), die jedoch alle keine größere Bedeutung erlangt haben. — In konzentrierter Schwefelsäure gibt nur noch Bor ein blaugefärbtes Chelat, das für quantitative Borbestimmungen sehr geeignet ist (300). Dabei stören die Anionen Nitrat, Chromat und Fluorid (87). Die Reaktion wird mit steigender Schwefelsäurekonzentration empfindlicher (78).

Mehrere OH-Gruppen enthalten auch die „Fluorone“, von denen das Methyl- und insbesondere das Phenyl-Derivat Verwendung finden.



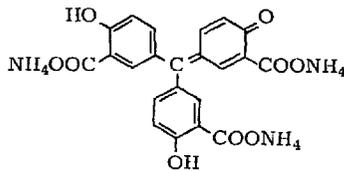
Sie bilden in schwach saurem Medium gefärbte Chelate mit Germanium, Molybdän, Wolfram, Zinn und Antimon (120). Die meisten Chelate sind aber im wäßrigen Medium so schwer löslich, daß zur Verhinderung der Fällung entweder Gelatine als Schutzkolloid oder größere Anteile Alkohol zugesetzt werden müssen. Die größte Bedeutung hat dieses Reagens für die Germaniumbestimmung in schwach saurer Lösung, da man das Germanium leicht durch Destillation (68, 179) oder Extraktion aus 9 n salzsaurer Lösung mit Tetrachlorkohlenstoff (10, 106, 230, 302) als GeCl₄ von störenden Elementen abtrennen kann.

In einigen Fällen können störende Elemente mit ÄDTE (Sb, As, Ga, In, Te, Tl und Sn) oder Zitronensäure (Sb) maskiert werden, wenn sie nicht in zu großem Überschuß vorliegen (53). Der Einfluß von Cu, Fe, Sb und Sn kann auch durch Thiosulfat unterdrückt werden (245). Zur Antimonbestimmung in saurer Lösung sind sowohl Phenylfluoron (229) als auch Methylfluoron (216) geeignet, wobei ersteres ein rotes, letzteres ein orangefarbenes Chelat liefern. Es stören Bi^{III}, Cr^{VI}, Fe^{III}, Ge^{IV}, In^{III}, Ta^V und Zr^{IV}, die aber weniger intensiv gefärbte Komplexe bilden, während Hf^{IV} und Nb^V eine etwa gleich starke und Ga^{III}, Mo^{VI}, Sn^{II}, V^V und Ti^{IV} sogar eine intensivere Färbung geben als Sb^{III}. Von all diesen Elementen muß das Antimon deshalb vorher abgetrennt werden. Andererseits ergibt sich daraus auch die Möglichkeit einer empfindlichen photometrischen Bestimmung dieser Elemente, die für Zinn schon durchgeführt worden ist (121, 190, 192, 310). Das Zinn wird außer von Molybdän von anderen Störelementen als Thiocyanato-Komplex durch Extraktion mit Essigsäureäthylester getrennt (240, 346). Auch für die Bestimmung von Zirkonium (14, 15, 403), Titan (208), Molybdän (209), Indium (218) und Tantal (191) sind Vorschriften ausgearbeitet worden.

Hydroxytriphenylmethanfarbstoffe als Chelatbildner

Polyhydroxy-triphenylmethanfarbstoffe sind auf Grund ihrer OH-Gruppen meist in Wasser recht gut löslich und dazu noch in der Lage, mit einer Reihe von sauerstoff-affinen Elementen tief gefärbte stabile Chelate zu bilden. Sie finden als metallochrome Indikatoren und als colorimetrische Reagentien Verwendung (82). Wenn sich in Nachbarstellung zu den phenolischen Gruppen in 3- und 3'-Stellung noch weitere Substituenten als Ligandgruppen für Metallionen befinden, so wirkt sich eine Chelatbildung unter Einbeziehung des auxochromen O-Atoms in 3-Stellung auf das Absorptionsspektrum aus, da die Elektronen der auxochromen Sauerstoffatome zu dem Elektronensystem gehören, das die Lichtabsorption bedingt (vgl. S. 592).

So bildet das Triammoniumsalz der Aurintricarbonsäure (*Aluminon*) in wäßriger Lösung bei pH 4–6 mehr oder minder tief rotfarbene Chelate mit Be^{II} , Al^{III} , Cu^{II} , Fe^{III} , Sc^{III} , Y^{III} , Th^{IV} , U^{VI} , Seltenen Erden und Platinmetallen. Seit dieses Reagens zum Nachweis für Aluminium (Name!) schon 1925 entwickelt (136) und bald darauf auch zur

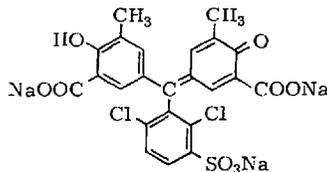


Aluminon

Aluminiumbestimmung verwendet wurde (396), haben sich in den letzten 20 Jahren eine große Anzahl von Autoren mit der Bestimmung von Aluminium mit Aluminon beschäftigt und die genauen Bedingungen für die verschiedensten Probleme ausgearbeitet (16, 57, 71, 119, 193, 220, 238, 317).

Obwohl dieses Reagens trotz der doch zahlreichen Störungen für die Aluminiumbestimmung seine größte Bedeutung erlangt hat, lassen sich auch eine Reihe anderer Elemente damit bestimmen: Beryllium (74, 194, 359), wobei Al, Cu, Fe, Pb, Zn, Ca und Mg mit ÄDTE maskiert werden; Zirkonium (14, 15); Uran (184, 225) und Gallium (220, 286).

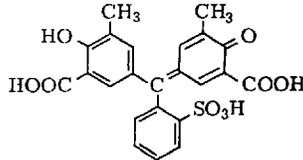
Mit etwa den gleichen Elementen wie Aluminon gibt auch „Chromazurol S“ (82)



Chromazurol S

rot- bis violettfarbene Chelate, die sich in ihrem Verhalten kaum von den vorher erwähnten unterscheiden, so daß dieser Farbstoff als analytisches Reagens gegenüber dem Aluminon keine Vorzüge besitzt.

Größere Bedeutung hat dagegen das chlorfreie Produkt „*Eriochromcyanin*“, oft auch als „*Eriochromcyanin R*“

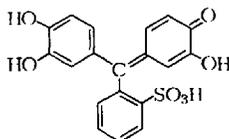


Eriochromcyanin

bezeichnet, das schon sehr lange und erfolgreich zur colorimetrischen Aluminiumbestimmung verwendet wird. Der Farbstoff bildet mit Aluminium in neutraler oder schwach saurer Lösung einen rotvioletten Farbblack (5, 88, 119). Es stören eine Reihe von Metallionen, die ebenfalls gefärbte Lacke geben. Davon können Eisen und Mangan(II) mit Thioglykolsäure maskiert werden (282a). Eisen und Kupfer können auch bei pH 1 als Kupferronate mit Chloroform extrahiert werden (348). Andere störende Ionen sind Be^{2+} , ZrO^{2+} , Th^{4+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , VO_3^- , SiO_3^{2-} , F^- und PO_4^{3-} .

Dieses fast ausschließlich zur Aluminium-Bestimmung verwendete Reagens läßt sich ebenfalls zur Beryllium- (360) und Indium-Bestimmung (12) benutzen, wobei allerdings auch die oben erwähnten Elemente stören.

Brenzcatechinviolett (= Brenzcatechinsulphophthalein) bildet in saurer Lösung mit Bi, Fe, Ga, Hg^{II} , Mo, Th, Ti, W, Zn und Zr tief rote bis blaue Chelate, bei pH-Werten von 6 und höher auch noch mit Ba, Ag, Al, Be, Ca, Cr, Cu, Ge, Ni, Pb, Sb, Sn und Sr, so daß es sich hier sicherlich nicht um ein sehr selektives Reagens handelt. Aber in acetat-gepufferter Lösung bei pH 5,2 in Gegenwart eines großen Überschusses



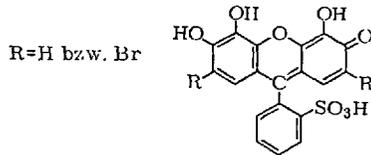
Brenzkatechinviolett

an ÄDTE bilden nur noch Zirkon, Antimon und Zinn(IV) farbige Chelate (108), so daß selektive Bestimmungsmethoden für Zirkon (56, 108, 400) und Zinn (203, 290) zur Verfügung stehen. In bestimmten Fällen wird das Brenzcatechinviolett als empfindliches Reagens zur Bestim-

F. Umland und A. Janßen

mung von Wismut (202, 342), Yttrium (402), Thorium (343), Aluminium (8), Germanium (231), Titan (204) und Kupfer (344) empfohlen.

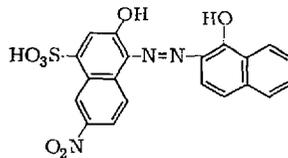
Pyrogallolrot und besonders *Brompyrogallolrot* (Dibrom-pyrogallol-sulfophthalein)



bilden mit einer Reihe von Metallen intensiv gefärbte Metallchelate, so daß es sich schon lange als Indikator bei komplexometrischen Titrations bewährt hat. Aber auch für photometrische Bestimmungsverfahren sind die wasserlöslichen Metallchelate geeignet, so für Silber (75); Uran (195); Seltene Erden, Yttrium und Cer (145); Titan (339); Wismut (340), Niob (23); Zinn (353) und Antimon (61).

Azofarbstoffe als Chelatbildner

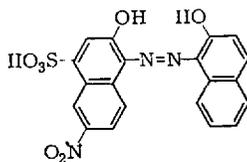
Die gleiche Entwicklung wie bei den Chelatbildnern der Triphenylmethan-Reihe, die neben ihrer Verwendung als Metallindikatoren schon Bedeutung für die photometrische Metallbestimmung erlangt haben, bahnt sich erst bei wenigen Chelatbildnern aus der Gruppe der Azofarbstoffe an, die noch überwiegend nur als Metallindikatoren bei Titrations verwendet werden. Hier ist besonders das *Eriochromschwarz T* zu nennen:



Eriochromschwarz T

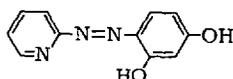
„Erio T“ bildet tief gefärbte Chelate mit einer Reihe von mehrwertigen Metallionen, jedoch sind diese mit Ausnahme des Thoriumchelates weniger stabil als die Chelate mit ÄDTE. Hierauf beruht eine hoch selektive Thorium-Bestimmung, bei der nur Eisen stört: Man reduziert Cer(IV), Vanadin(V) und Uran(VI) mit Hydroxylaminhydrochlorid und gibt dann ÄDTE und Triäthanolamin als Maskierungsmittel zu (189).

Erichromschwarz A ist zur photometrischen Kobalt-Bestimmung in Gegenwart von Nickel und Zink geeignet, wenn die Lösung gleichzeitig ÄDTE enthält (7).



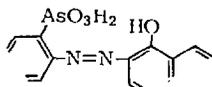
Eriochromschwarz A

4-(2-Pyridylazo)-resorcinol (PAR) bildet mit einer Reihe von Metallionen rote Chelatverbindungen (162, 271). Am empfindlichsten ist diese Reaktion für die photometrische Bestimmung von Kobalt ($\epsilon \approx$

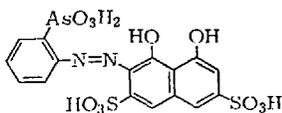


55000), Uran ($\epsilon \approx 38000$), Blei ($\epsilon \approx 35000$) (162) und Niob ($\epsilon \approx 38700$). In Gegenwart von ÄDTE wird die Niobbestimmung nur von Uran und Vanadin gestört, wobei das Uran noch durch Oxalat maskiert werden kann (22, 97).

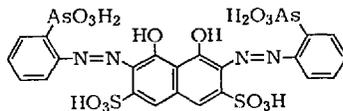
Von großer Bedeutung sind zwei Azofarbstoffe, die die Arsonsäuregruppe im Molekül enthalten. Diese Gruppe reagiert mit Zirkon, den Lanthaniden und Actiniden und einigen wenigen anderen Elementen. Im „Arsenazo I“ ist die entscheidende funktionelle Gruppierung



einmal, im „Arsenazo III“ jedoch zweimal enthalten, aber zur Komplexbildung wird stets nur eine Gruppe beansprucht.



Arsenazo I

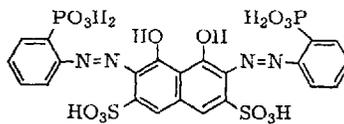


Arsenazo III

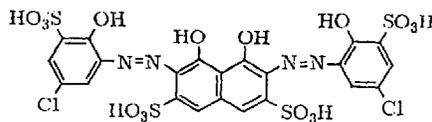
Beide Reagenzien bilden mit Ti, Zr, (Hf), Th, U und anderen Aktiniden in der vierwertigen Form in saurer Lösung (pH 2,0–2,5) Komplexe von der Zusammensetzung Metall : Arsenazo = 1 : 1 mit Absorptionsmaxima im Bereich von 550–575 nm. Bei höheren pH-Werten (4,0–8,0) entstehen auch Chelate mit dem Verhältnis 1 : 2. Die dreiwertigen Elemente Al, Ga,

In, Seltene Erden, Y und Sc geben 1 : 1 Komplexe in schwach saurer Lösung (pH etwa 4,5–6,0) (180, 295, 296). Die Unterschiede in den pH-Intervallen ermöglichen sehr selektive Bestimmungen, denn fast alle zweiwertigen Metallionen geben erst bei pH 11 und höher stabile Komplexe. Somit haben diese Reagentien Bedeutung für die Bestimmung von Thorium (149, 242, 294, 404), Uran (114, 149, 169, 183, 232, 312), Zirkonium (15, 46, 95, 168, 182,) Scandium, Yttrium und den Lanthaniden (43, 45, 115, 228, 243) die aber auch mit *Dicarboxy-arsenazo III* gut bestimmt werden können (48). Auch die Bestimmung des Niobs mit Arsenazo ist möglich (237). Im alkalischen Bereich lassen sich zweiwertige Metallionen mit Arsenazo I bestimmen, z.B. Magnesium (141) und Beryllium (142).

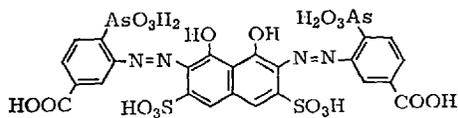
Die Selektivität dieser Reagentien kann nun etwas verändert werden, indem die AsO_3H_2 -Gruppe durch andere Säurereste ersetzt wird. So sind die *Chlorphosphonazo*-Chelate des Uran(VI) stabiler als die mit Arsenazo, so daß die Bestimmungen in stärker saurem Medium möglich sind (233). Der Ersatz beider AsO_3H_2 -Gruppen im Arsenazo III durch SO_3H -Gruppen liefert ein hoch selektives Reagens für Ba und Sr (51, 80, 297). Die Selektivität für Niob wird erhöht durch Ersatz der AsO_3H_2 -Gruppen



Chlorphosphonazo



Chlorsulfonphenol S



Dicarboxyarsenazo III

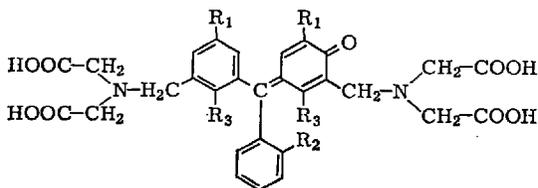
durch OH-Gruppen im Arsenazo III, so daß in 2,3 molarer Perchlorsäure die höherwertigen Elemente Ti, V, Zr, Mo, Th und Al nur noch in mehr als 100fachem Überschuß die Niob-Bestimmung mit *Chlorsulfonphenol S* stören (50).

Chelatbildner mit der Nitrildiessigsäure-Gruppe

Sehr stabile Chelate bilden Verbindungen, die die Nitrildiessigsäure-Gruppe, mehrfach im Molekül enthalten. Derartige Chelatbildner faßt man unter dem Namen „Komplexe“ zusammen. Das einfachste ist die Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTE), bei der zwei Nitrildiessigsäure-Gruppen über eine Äthylen-Brücke verbunden sind. Sie ist in einigen Fällen zur photometrischen Metallbestimmung geeignet, wenn keine hohen Ansprüche an Empfindlichkeit und Selektivität gestellt werden, z. B. zur Kupferbestimmung (125, 126) in Legierungen, deren Gehalte über 5% liegen. Die Färbung der Chelate ist wesentlich intensiver, wenn die Nitrildiessigsäure-Gruppe in Triphenylmethanfarbstoffe oder Azofarbstoffe eingebaut wird. An der Spitze dieser Reagentien steht das *Xylenolorange*, das sich von den Sulfophthaleinen ableitet.¶

Xylenolorange bildet im pH-Bereich < 4 mit einer Reihe von drei- und höherwertigen Metallionen tief rote Komplexe, die sehr gut zur photometrischen Bestimmung dieser Elemente verwendet werden können. Ausführlich bearbeitet ist das Reagens für die Bestimmung der Lanthaniden (47, 276, 399), von Zirkonium (14, 59, 196), Wismut (244), Chrom (201), Eisen (44), Indium (12), Niob (96, 161), Scandium (378), Titan (248), Vanadium (165, 247) und Zinn (76). Bei pH-Werten von 6–7 können auch einige zweiwertige Metallionen mit Xylenolorange bestimmt werden, wenn auch diese Methoden wenig selektiv sind (249).

Noch zwei weitere Sulfophthalein-Indikatoren werden häufiger für photometrische Bestimmungen verwendet: Das *Methylthymolblau* zur Bestimmung von Indium (12) und von Zirkonium und Hafnium (14, 15, 59), mit denen es violette 2 : 1-Chelate bei Reagensüberschuß bildet; das *Thymolphthalexon* zur Bestimmung der Seltenen Erden im alkalischen Medium (optimal pH 9,5) (275).



Xylenolorange:

$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{SO}_3\text{H}$,
 $R_3 = \text{H}$

Methylthymolblau:

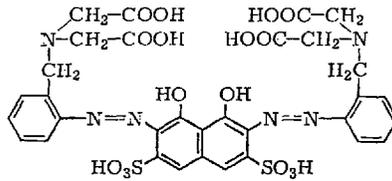
$R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 $R_2 = \text{SO}_3\text{H}$, $R_3 = \text{CH}_3$

Thymolphthalexon:

$R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 $R_2 = \text{COOH}$, $R_3 = \text{H}$

Das einzige bekanntere von den Azofarbstoffen abgeleitete Komplexon ist das *Aminomethylazo III*, das bei pH 11 in Gegenwart von ÄDTE

nur noch mit Kupfer reagiert. Es ist somit für dieses Element spezifisch und zudem noch sehr empfindlich (49).



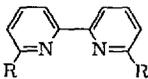
Aminomethylazo III

Chelatkationen

In die Gruppe der Diamine, die Chelatkationen bilden, gehören zwei hoch selektive Verbindungstypen, die Ferroine und die Cuproine.

Die Ferroine (α,α' -Dipyridyl und 1,10-Phenanthrolin) geben intensiv gefärbte kationische Chelate mit Eisen(II) und Kupfer(I), die leicht zu den nur ganz schwach gefärbten komplexen Kationen von Eisen(III) und Kupfer(II) oxydiert werden können (Redoxindikator). Unter bestimmten Bedingungen reagieren auch Kobalt(II) und Nickel(II) unter Bildung von Chelatkationen.

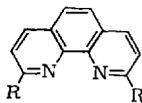
Cuproine (6,6'-substituierte Dipyridyle, 2,9-Methyl- und -Phenyl-derivate des 1,10-Phenanthrolins und 2,2'-Bichinolin) enthalten die gleiche chelatbildende Gruppierung, geben aber nur noch Chelate mit Kupfer(I), da die Bildung von entsprechenden Eisen(II)-Chelaten sterisch gehindert ist (314).



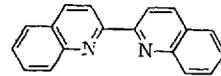
α,α' -Dipyridyl

R = H: Ferroine

R = CH_3 oder C_6H_5 : Cuproine



1,10-Phenanthrolin



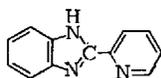
2,2'-Bichinolin

Zur Eisenbestimmung ist das 1,10-Phenanthrolin das bekannteste Reagens (78, 110, 146, 299, 321, 379). Der orange-rote Komplex $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$ besitzt eine hohe Farbintensität und ist über den weiten Bereich von pH 2–9 stabil. Die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) erfolgt gewöhnlich mit Hydroxylaminhydrochlorid, Ascorbinsäure oder Hypophosphit (321). Zwar stören einige Elemente diese Bestimmung, weil sie auch stabile Komplexe bilden (Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} und Zn^{II}), oder

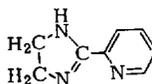
aber bei den erforderlichen pH-Werten schon hydrolysieren (Ti, Sn, Pb, Bi), aber bei Verwendung eines großen Überschusses an Reagens und ÄDTE zur Maskierung ist die Eisenbestimmung praktisch spezifisch (140, 154, 246, 380).

Ganz analog reagiert das α, α' -Dipyridyl (102, 103, 127). – Das 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin bildet wesentlich intensiver gefärbte Eisen(II)-Chelate als das unsubstituierte Reagens und ist somit empfindlicher (316). Diese Chelate bilden leicht extrahierbare Ionenassoziate und werden deshalb häufiger zur Photometrie in zweiphasigen Systemen verwendet (vgl. S. 627).

Die gleiche chelatbildende Atomkonfiguration wie die Ferroine haben einige Imidazolderivate, von denen das 2-(2-Pyridyl)benzimidazol (I) und das 2-(2-Pyridyl)-imidazol (II)

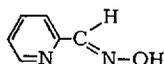


I



II

sehr stabile purpurrote Eisen(II)-chelate und weniger stabile farbige Chelate mit Kupfer(I und II), Kobalt(II) und Eisen(III) geben (382). – Eine ferroin-ähnliche Atomkonfiguration findet man auch im *Pyridin-aldoxim*, das in schwach alkalischem Medium intensiv rote Chelate mit



Eisen(II) bildet. Diese Reaktion ist recht selektiv und zur photometrischen Bestimmung geeignet, denn es stören nur Vanadium, Chrom, Kobalt, Nickel, Mangan und Kupfer, wenn ihre Konzentration größer als die Eisenkonzentration ist (138). – Der grüne Mangan(III)-Komplex des *Pyridin-2,6-dialdoxims* kann auch zur photometrischen Manganbestimmung verwendet werden, wobei Eisen, Kobalt und Nickel (139) stören.

Auch viel einfachere Di- und Polyamine geben stabile Chelate mit den Elementen Cu, Ni, Co, Zn, Cd und Hg, wovon die des Kupfers weitestgehend am intensivsten gefärbt sind. Diese Reaktion wird selektiv, wenn sie in Gegenwart von ÄDTE zur spektrophotometrischen Kupferbestimmung durchgeführt wird (58). Von Bedeutung zur Kupferbestimmung sind Äthylendiamin („en“) (355), Triäthylentetramin („tren“) (58), Tetraäthylenpentamin („tetren“) (58, 72) und Pentaäthylenhexamin

(„penten“) (58). Die Bestimmung von Kobalt und Nickel ist möglich mit Diäthylentriamin (387) und die von Platin mit *o*-Phenylendiamin (131).

Indirekte Bestimmungen und gemischte Komplexe

Die Bildung einer Reihe von Chelaten des Berylliums, Aluminiums, Thoriums und Zirkoniums wird durch Fluorid gestört. Diese Störungen können nun erfolgreich zur indirekten Bestimmung des Fluorids benutzt werden, denn die Abnahme der Farbintensität dieser gefärbten Chelatlösungen ist dem Fluoridgehalt der Lösung proportional. Die *entfärbende Wirkung der Fluoride auf Farblacke und -chelate* folgender Systeme ist zur spektralphotometrischen Fluorbestimmung vorgeschlagen worden. Alizarin S + Zirkonium (52), 1-(*o*-Arsonophenylazo)-2-naphthol-3,6-sulfonsäure (= „Thoron“) + Thorium (129, 150); Chromazurol S + Beryllium (311), Aluminium (11, 239) oder Thorium (282); Eriochromcyanin R + Aluminium (283, 354) oder Zirkonium (213, 376) und neuerdings auch Xylenolorange + Zirkonium (375). Allen diesen Methoden liegt also eine Farbintensitätsabnahme mit steigendem Fluorgehalt zugrunde, weshalb diese indirekten Methoden für kleine Fluormengen keine sehr genauen Werte liefern. In einigen Fällen bilden sich bei Anwesenheit von Fluorid gemischte Fluorochelate, so mit Cer, Lanthan oder Praseodym und 3-[Di(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthrachinon (= „Alizarin-Komplexon“). Dabei tritt eine Farbvertiefung und Farbverschiebung von rot nach blau auf, so daß mit dieser Reagenzkombination eine direkte Methode zur Fluorbestimmung zur Verfügung steht (24, 113, 393).

Chlorid gibt mit Quecksilber(II) undissoziiertes HgCl_2 , wodurch die Bildung des rotvioletten Quecksilber-Diphenylcarbazonkomplexes verhindert wird. Diese Aufhellung der Komplexlösung durch Chlorid läßt sich zu einer empfindlichen indirekten Bestimmungsmethode verwenden (62, 374, 410).

V. Photometrische Bestimmungen in nichtwäßriger Phase

Grundlagen der Verteilung

Wie der vorhergehende Abschnitt zeigte, lassen sich Trennungen vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung in den meisten Fällen nicht vermeiden. Fällungen sind aber zu schwerfällig und insbesondere bei Spurenanalysen infolge von Mitreißeffekten oder unvollständiger Ab-

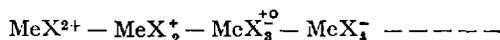
scheidung mit Fehlern behaftet. Hier können mit Vorteil *Verteilungsreaktionen* zwischen zwei nichtmischbaren Lösungsmitteln herangezogen werden. Nach *Nernst* verteilt sich ein Stoff im Verhältnis seiner Löslichkeiten zwischen zwei flüssigen Phasen

$$k = c_0/c_w$$

(*o* = organisch, *w* = wässrig), d. h. der Quotient aus den Konzentrationen in beiden Phasen ist konstant. Für effektvolle „Extraktionen“ werden also Chelate benötigt, die in Wasser möglichst schwer, in organischen Lösungsmitteln leicht löslich sind und unmittelbar in der organischen Phase bestimmt werden können.

Die *Löslichkeit in indifferenten organischen Lösungsmitteln* wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol u. a., wird z. B. durch Einführung von Phenylresten oder längeren aliphatischen Ketten zur Abschirmung hydrophiler Gruppen erhöht. Diese Gruppen erniedrigen gleichzeitig die Löslichkeit in der wässrigen Phase und beeinflussen bei geeigneter Stellung die Selektivität. Chelate mit restlichen hydrophilen Gruppen lassen sich oftmals noch befriedigend mit polaren Lösungsmitteln, wie höheren Alkoholen, Ketonen, Äthern, Estern oder Aminen, extrahieren.

Die in wässriger Lösung auftretende stufenweise Komplexbildung, etwa eines dreiwertigen Metalles *Me* mit dem Chelatbildner *HX*



gibt bei einer Extraktion wenig Störungen, da im allgemeinen nur das ungeladene Chelat, im Beispiel MeX_3 , extrahiert und durch die Extraktion das Gleichgewicht zugunsten dieser Verbindung verschoben wird. Ist das gebildete Chelat koordinativ nicht gesättigt bzw. enthält es koordinativ gebundene Wassermoleküle, was häufig bei Metall(II)-Chelaten vorkommt, so kann durch Zugabe einzähniger Komplexbildner (Alkohol, Amin, Trialkylphosphate), die das Wasser verdrängen, vollständige Extrahierbarkeit erzielt werden (Synergismus). Die Wirksamkeit polarer Lösungsmittel beruht häufig auf solchen synergetischen Effekten.

Die Verteilung ist infolge der Dissoziation des Chelatbildners in wässriger Lösung, aber auch infolge Hydroxokomplexbildung des Zentralatoms pH-abhängig. Der pH-Bereich der Extraktion eines Metallchelates ist deshalb nicht nur von der Konzentration des Chelatbildners abhängig, sondern zur alkalischen Seite hin durch das Verhältnis der Stabilitäten des Chelates und der Hydroxokomplexe begrenzt. Der Extraktionsbeginn auf der sauren Seite verschiebt sich um so mehr zu kleineren pH-Werten, je größer Stabilität des Chelates und Säuredissoziationskonstante des Chelatbildners sind. Man kann deshalb den pH-Bereich der Extraktion innerhalb gewisser Grenzen zum Sauren hin verschieben, wenn durch Substituenten, wie Halogen, oder durch Änderung

der Ligandatome (O in S oder Se) der pK_s -Wert des Chelatbildners verkleinert wird (vgl. Oxin-Thiooxin). In vielen Fällen können auch Chelationen als Ionenassoziate – meist mit polaren Lösungsmitteln – extrahiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, eine Reihe von Chelaten, die vorwiegend zur Bestimmung in wäßriger Lösung benutzt werden, zu Trennungsoperationen durch Verteilung heranzuziehen (vgl. S. 627).

Weitere Vorteile von Verteilungsoperationen ergeben sich daraus, daß Maskierungsmittel störende Elemente in der wäßrigen Phase zurückhalten und damit nicht nur maskieren, sondern auch abtrennen.

Die unterschiedliche Stabilität der Chelate eines Chelatbildners kann nicht nur durch Variation der pH-Bereiche der Extraktion, sondern auch durch einen *Metallionenaustausch* ausgenutzt werden. Dieser Vorgang ist besonders effektiv, wenn das als Reagens eingesetzte Metallchelate farblos, das stabilere Chelat mit dem zu bestimmenden Element aber farbig ist (vgl. DDTC, S. 615).

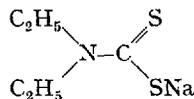
Insgesamt bietet die Kombination der Verteilung eines Chelates mit der anschließenden photometrischen Bestimmung in der organischen Phase so viele Möglichkeiten und Vorteile zur Erhöhung der Selektivität und Empfindlichkeit, daß dagegen andere Trennmethode stark in den Hintergrund treten.

Die für die Metallextraktion und anschließende photometrische Bestimmung in der organischen Phase geeigneten Reagentien sollen hier nach der Anordnung der Atome, die mit dem Zentralatom den Chelatring bilden, aufgegliedert werden. Als Ligandatome kommen fast ausschließlich N, O und S vor. Der Chelatring enthält meist 5 oder 6-Atome. Viergliedrige Ringe treten nur auf, wenn sie größere Atome wie S, P oder As enthalten.

Chelate mit viergliedrigen Ringen



Diese zu einem Vierring führende Atomgruppe ist in den Dithiocarbamidaten enthalten, die aus Schwefelkohlenstoff und primären oder sekundären Aminen in Gegenwart von Natriumhydroxid leicht hergestellt werden können. Das wichtigste Reagens dieser Gruppe (1, 270) ist das *Natriumdiäthyl-dithiocarbamidat* (DDTC).



Es bildet Chelate mit folgender nach abnehmender Stabilität angeordneter Reihe von Metallen und Metalloiden: Hg^{2+} , Pd^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Tl^{3+} , Ni^{2+} , Bi^{3+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Tl^+ , Zn^{2+} , In^{3+} , Sb^{3+} , Fe^{3+} , Te^{4+} und Mn^{2+} (35, 93, 94). Von diesen sind nur einige intensiv gefärbt und zur unmittelbaren photometrischen Bestimmung geeignet. Die Farbe in wäßriger und in organischer Phase ist meist gleich: Bi: gelb; Co: grün; Cu: braun; Fe: braun; Ni: gelbgrün; U: rotbraun; Te: gelb. Dithiocarbamidate lassen sich nur mit Tetrachlorkohlenstoff gut aus der wäßrigen Phase extrahieren. Die Extrahierbarkeit ist vom pH-Wert abhängig. Allgemein kann man dabei eine Aufteilung in mehrere Gruppen vornehmen (31, 32).

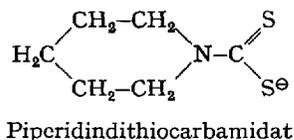
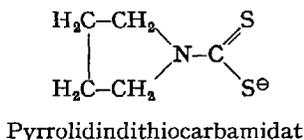
1. Elemente, die oberhalb pH 11 extrahiert werden:
Ag, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Tl und Zn. Von diesen werden durch ÄDTE nicht maskiert: Ag, Bi, Cu, Hg, Pd, Tl^{III} , und durch KCN werden nicht maskiert: Bi, Cd, Pb und Tl.
2. Elemente, die bei pH 9 extrahiert werden:
Fe, In, Mn, Sb, Te. Davon werden durch ÄDTE nicht maskiert: Sb und Te; durch KCN werden nicht maskiert: (Fe), In, Mn, Sb und Te.
3. Elemente, die bei pH 6 extrahiert werden:
As, Se, Sn, V.
4. Elemente, die mit CCl_4 und DDTC nur unvollständig extrahiert werden:
Au, Ga, Ir, Nb, Os, Rh, Ru, Pt und U.
5. Alle übrigen Elemente werden bei pH 4–11 mit CCl_4 und DDTC nicht extrahiert.

Durch geeignete Auswahl der Reaktionsbedingungen ergeben sich daraus eine Reihe von Trennungs- und Bestimmungsverfahren. Größere Selektivität bei der Extraktion von Dithiocarbamidaten erreicht man jedoch erst durch Verwendung von Schwermetall-dithiocarbamidaten als Reagentien, mit denen nur die Elemente extrahiert werden, deren Chelate stabiler sind. So kann z. B. Silber durch eine Austauschextraktion mit Kupfer-dithiocarbamidat (176) bestimmt werden. Kupfer wird selektiv extrahiert in Gegenwart von Eisen-diäthylthiocarbamidat – und Kobalt mit Blei-diäthylthiocarbamidat (164).

Während das Natrium-DDTC in Wasser recht gut löslich ist und sich in saurer Lösung rasch zersetzt, ist das *Diäthylammonium-diäthylthiocarbamidat* in Wasser wenig löslich, gibt aber sehr beständige Lösungen in CCl_4 und CHCl_3 auch in Berührung mit einer sauren wäßrigen Lösung. Die Bedeutung dieses Chelatbildners liegt darin, daß er zur Extraktion von Kationen aus mineral-saurer Lösung verwendet werden kann, wodurch eine Reihe weiterer Trennungen möglich werden (34).

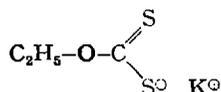
Von weiteren Dithiocarbamidatderivaten haben noch folgende eine gewisse Bedeutung: Das Zink-Chelat des *Dibenzylidithiocarbamids* ist für Austauschreaktionen mit Kupfer (172, 390) und Thallium (98) gut geeignet.

Natrium-Pyrrolidin- und *Piperidindithiocarbamate* dienen zur selektiven Extraktion von Bi, Cu, Sb und Sn (175). Beide Reagentien sind für Extraktionen aus mineralaurer Lösung geeignet; so werden bei $\text{pH} \approx 1$ Fe, Co, Ni, V, Cu, As, Sb, Sn und Pb und aus 6 n Salzsäure nur noch Cu, Sb und Sn vollständig extrahiert (205).



Sie eignen sich auch zur Manganbestimmung. Mangan(II) gibt zwar farblose Chelate, diese werden aber schon beim Schütteln mit Luft leicht zu den tiefviolett gefärbten Mangan(III)-verbindungen oxydiert (328). Die bei dieser Bestimmung störenden Ionen von Fe, Cu, Co, V, Mo und U können vorher als Thiocyanatokomplexe mit einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Äther extrahiert werden.

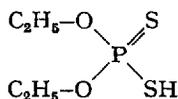
Wie Amine reagieren auch Alkohole mit Schwefelkohlenstoff in Gegenwart von Alkalihydroxid. Die dabei entstehenden Xanthogenate bilden ebenfalls Metallchelate mit dem gleichen Chelating wie die Dithiocarbamate. Einige Bedeutung hat das *Äthylxanthogenat* (1, 269, 307) erlangt, das mit etwa den gleichen Elementen wie die Dithiocarbamate mit CHCl_3 oder CCl_4 extrahierbare Chelate gibt.



Unter bestimmten Bedingungen ist die Extraktion selektiv für Co, Zn und Cd; so kann bei niedrigen pH-Werten Co von einer Reihe anderer Elemente und bei $\text{pH} > 10$ Cd vom Überschuß Zn abgetrennt werden.

S=P-S³

Dialkyl- und Diaryldithiophosphorsäuren geben mit einer Reihe von Metallen gut extrahierbare Chelate (33, 137). Die größte Bedeutung hat die *Diäthylidithiophosphorsäure* (54)



erlangt. Sie bildet in mineral-saurer Lösung mit den schwefelaffinen Elementen Chelate, die in Wasser schwerlöslich sind und mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können. So werden aus über 7 n salz- oder schwefelsauren Lösungen Se^{IV} , Te^{IV} und Pd^{II} vollständig, Cu^{II} nicht ganz vollständig und Hg^{II} zum Teil mit CCl_4 extrahiert. Aus 3–6 n mineral-saurer Lösung werden Cu^{II} , Ag^{I} , Hg^{II} , As^{III} , Sb^{III} , Bi^{III} , Se^{IV} , Te^{IV} und Pd^{II} quantitativ mit CCl_4 extrahiert, aus 1 bis 2 n saurer Lösung können zusätzlich noch Pb^{II} und aus ganz schwach sauren Lösungen ($\text{pH} > 1$) auch noch Cd^{II} und In^{III} (33) quantitativ extrahiert werden. Unter diesen Bedingungen werden Al, Ba, B, Ca, Cr^{III} , Cs, Ge, Ir^{IV} , Fe^{II} , K, La, Li, Mg, Mn^{II} , Na, Pt^{II} und Pt^{IV} , Rb, Rh^{III} , Ru^{III} , Sr, V^{V} , W^{VI} und Y nicht extrahiert. Auf Grund der Chelatstabilität nimmt mit steigendem pH-Wert die Extrahierbarkeit in folgender Reihenfolge ab: Pd^{II} , Se^{IV} , Te^{IV} , Cu^{II} , Hg^{II} , Au^{III} , As^{III} , Sb^{III} , Bi^{III} , Pb^{II} , Cd^{II} , Ni^{II} , Zn^{II} , wobei man wohl noch Sn^{II} , Fe^{III} und Pt^{IV} zwischen Cu^{II} und Pb einordnen muß (137).

Bei Verwendung des länger-kettigen *Di-n-butylesters der Dithiophosphorsäure* nimmt die Zahl der extrahierbaren Kationen zu. Es können hiermit zu den vorgenannten Ionen auch noch Ni^{II} , Tl^{III} und Zn^{II} vollständig und Co^{II} und Cr^{VI} teilweise extrahiert werden (137).

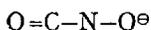
$\text{O}=\text{As}-\text{O}^\ominus$

Auch das große Arsenmolekül ermöglicht die Bildung von 4-Ring-Chelaten. So bilden die Dialkylarsinsäuren Chelate mit einer Reihe von Metallen, die mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können. Auch hier stellt man fest, daß mit zunehmender Kettenlänge der Alkylreste die Extrahierbarkeit der Metallchelate auch bei niederen pH-Werten möglich ist (265), weshalb die *Di-n-butylarsinsäure* als Extraktionsreagens bisher die größte Bedeutung innerhalb dieser Verbindungsgruppe hat (264). Für den Extraktionsbeginn aus wäßriger Phase wird folgende Abstufung von kleinen zu größeren pH-Werten gefunden: Bi^{III} , Zr^{IV} , UO_2^{2+} , Sn^{IV} , Sn^{II} , Ti^{IV} , Fe^{III} , In^{III} , Th^{IV} , Al^{III} , Y^{III} , Cr^{III} , Pb^{II} , Zn^{II} , Cu^{II} , Ce^{III} , La^{III} , Hg^{II} , Fe^{II} , Be^{II} , Mn^{II} , Ni^{II} , Cd^{II} , Co^{II} , Mg^{II} . Hieraus ergeben sich Möglichkeiten für extractive Trennungen und Bestimmungen von Bi (267), UO_2^{2+} (268) und Zn (266).

Chelate mit fünfgliedrigen Ringen

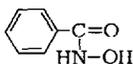
Bei den Fünf-Ring-Chelaten findet man als Ligandatome O, S und N und neben dem Zentralatom noch C und N als ausschließliche Ringatome.

Verbindungen mit der chelatbildenden Gruppierung $^{\ominus}\text{O}-\text{C}=\text{C}-\text{O}^{\ominus}$, also die *o*-Dihydroxybenzole wie *Phenylfluoron*, sind als Reagentien zur photometrischen Bestimmung in wäßriger oder wäßrig-alkoholischer Phase ziemlich verbreitet, haben aber zur Zeit noch keine Bedeutung als Extraktionsreagentien erlangt.

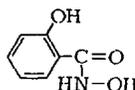


Durch Ersatz eines C-Atoms durch ein N-Atom gelangt man zu den Hydroxamsäuren und N-Acylhydroxylaminen wovon die letzteren die bedeutenderen sind:

Benzhydroxamsäure bildet mit einer Reihe von Metallen gefärbte Chelate, die sich gut mit längerkettigen Alkoholen, wie 1-Hexanol, extrahieren lassen. So läßt sich bei $\text{pH} \approx 2$ Vanadium in Gegenwart von Molybdän und Uran bestimmen (178, 391), da Uran erst bei $\text{pH} \approx 6-7$ extrahiert wird (214). Aus ammoniakalischer Lösung kann auch Mangan(II) extrahiert werden, jedoch müssen die störenden Elemente Fe, Cu, Co durch Ionenaustausch abgetrennt werden (217).

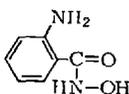


Benzhydroxamsäure

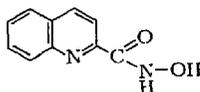


Salicylhydroxamsäure

Zur Vanadium-Bestimmung kann auch die *Salicylhydroxamsäure* verwendet werden, die ebenfalls ein violettes Chelat bildet, das mit Essigsäureäthylester oder längerkettigen primären Alkoholen extrahiert werden kann (29). *Anthranilhydroxamsäure* bildet mit Eisen(II) bei $\text{pH} 4-7$ orangefarbene und mit Mangan(II) bei $\text{pH} > 9$ orangefarbene Chelate, die mit Isobutylalkohol extrahiert werden können (91).



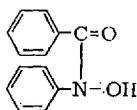
Anthranilhydroxamsäure



Chinaldinhydroxamsäure

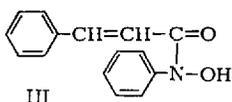
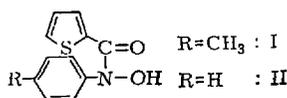
Mit *Chinaldinhydroxamsäure* bilden Eisen und Vanadin rote Chelate, die ebenfalls mit höheren Alkoholen extrahiert werden können (90).

Das wichtigste Reagens mit dieser chelatbildenden Atomgruppierung ist jedoch das *N-Benzoyl-N-phenylhydroxylamin*, das mit einer

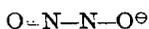


ganzen Reihe von Metallen wasserunlösliche Chelate bildet, die mit Chloroform oder Isoamylalkohol extrahiert werden können (2). So geben Cu^{II} (gelbgrün), Ce^{IV} (orange), Cr^{III} (gelb), Fe^{II} (rot), Fe^{III} (violett), Hg^{II} (gelbgrün), Mn^{II} (gelb), Mo^{VI} (gelb), Pd^{II} (rosa), Ti^{IV} (gelb), V^{V} (purpurrot), W^{VI} (gelb) gefärbte Chelate, die nach der Extraktion zur photometrischen Bestimmung dieser Elemente verwendet werden können, während die Chelate von Al^{III} , Be^{II} , Bi^{III} , Cd^{II} , Ga^{III} , Hf^{IV} , In^{III} , La^{III} , Nb^{V} , Ni^{II} , Pb^{II} , Pr^{III} , Sc^{III} , $\text{Sb}^{\text{III/IV}}$, $\text{Sn}^{\text{II/IV}}$, Ta^{V} , Th^{IV} , Tl^{III} , U^{VI} , Y^{III} , Zn^{II} und Zr^{IV} mehr oder minder farblos sind. Obwohl die Extraktionen stark vom pH-Wert abhängig sind, wird bisher kaum von diesem Reagens für extraktive Trennungen Gebrauch gemacht, während es sich für Trennungen durch Fällung mit anschließender gravimetrischer Bestimmung bewährt hat.

N-2-Thenoyl-N-p-tolylhydroxylamin(I) und *N-2-Thenoyl-N-phenylhydroxylamin(II)* (347) sowie *N-Cinnamoyl-N-phenylhydroxylamin(III)* (277) sind recht selektive Reagentien für die Bestimmung von Vanadium. Aus 3 bis 5 n salzsaurer Lösung läßt sich das violette Vanadium-

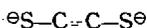


chelate mit Chloroform in Gegenwart von Al^{III} , Ca^{II} , Ce^{IV} , Co^{II} , Cr^{III} , Cu^{II} , Fe^{III} , Mg^{II} , Mn^{II} , Ni^{II} , Th^{IV} , U^{VI} und Zn^{II} extrahieren, wobei dann nur noch Mo^{VI} , Ti^{IV} und Zr^{IV} stören.



Das Ammoniumsalz des *N-Nitrosophenylhydroxylamins* erhielt den Trivialnamen „Cupferron“, weil es zunächst als spezifisches Reagens für Kupfer(II) und Eisen(III) angesehen wurde. Jedoch bilden eine große Anzahl von Metallionen mit „Cupferron“ in Wasser schwerlösliche Chelate, die sich mit Essigsäureäthylester, Diäthyläther, Benzol und Chloroform extrahieren lassen (1, 19, 223). Obwohl sich aus der pH-Abhängigkeit der Extrahierbarkeit (112, 116, 334) eine ganze Reihe von Trennungsmöglichkeiten ergeben, macht man nur wenig Gebrauch davon, da die Extraktionslösungen im allgemeinen nicht direkt photometriert werden können. Cupferron hat somit hauptsächlich nur eine Bedeutung zur Abtrennung einer Reihe von Elementen. Das Thoriumcupferronat je-

doch reagiert in der CHCl_3 -Lösung mit dem *o,o'*-Dihydroxyazofarbstoff 4'-Nitro-2,2'-dihydroxy-4-methyl-5-isopropylazobenzol zu einer intensiv violett gefärbten Verbindung, die direkt photometriert werden kann (92). Dem Cupferron ganz analog reagiert das Ammoniumsalz des *N-Nitroso-N-2-naphthylhydroxylamins* (= „*Neocupferron*“) (19).

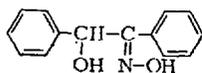


Toluol-3,4-dithiol gibt mit einer Reihe von Schwermetallen stabile Chelate in saurer Lösung (64), von denen aber nur die des Mo^{VI} , Sn^{II} , W^{VI} und Re^{VII} mit Essigsäureamylester extrahierbar sind. Da das freie Reagens schon durch Luftsauerstoff leicht zum Disulfid oxydiert wird, bevorzugt man als Reagens besser den Zinkkomplex des Toluol-3,4-dithiols (65) oder das Diacetyltoluol-3,4-dithiol (63).

Verwendung finden diese Reagentien hauptsächlich zur Bestimmung von Molybdän und Wolfram, auch nebeneinander, denn das Molybdän-chelat wird schon aus stark mineral-saurer Lösung (bis 3,7 n HCl oder bis 12 n H_2SO_4) extrahiert, Wolfram dagegen optimal bei pH 0,5–2,0 (36).



Diese chelatbildende Atomgruppierung findet man sowohl beim α -*Benzoinoxim* als auch beim 8-*Hydroxychinolin* („*Oxin*“) und seinen Derivaten.



α -Benzoinoxim



Oxin

α -*Benzoinoxim* ist ein sehr selektives Extraktionsreagens, denn aus ca. 1 n HCl-saurer Lösung werden nur Molybdän (147, 200) und Wolfram (147, 261), aus schwach saurer Lösung (pH = 2,2) auch noch Vanadin (147) und aus ammoniakalischer tartrathaltiger Lösung nur Kupfer (89, 199) extrahiert. Nur die Extraktion des grünen Kupferchelates mit Chloroform kann direkt zur photometrischen Bestimmung herangezogen werden, wobei allerdings Co und Ni stören.

Eines der wichtigsten Extraktionsreagentien ist das „*Oxin*“, das fast gleichzeitig von *Hahn* (134) und *Berg* (25, 26) als Fällungsreagens in die analytische Chemie eingeführt wurde. Die Eigenschaft der Metalloxinate, sich mit intensiver, meist gelber Farbe gut in vielen organischen Lösungsmitteln zu lösen, wurde erst durch die systematischen Arbeiten von *Gentry* und *Sherrington* (118) bekannt. Oxin reagiert mit allen Metallen, die Hydroxo- oder Ammin-Komplexe bilden (1, 219, 223, 224, 263, 332,

361, 385, 386). Die meisten Metalloxinate sind sehr gut löslich in Chloroform. Anders als gelb gefärbte „Oxinate“ bilden Eisen(III) (braun bis grünlich-schwarz), Vanadin (V) und Mo(V) (violett, bei Gegenwart von Alkohol rot (30, 227, 281)), Cer (IV) und Uran (orangefarben). Systematische Untersuchungen über die Extraktion von Metalloxinaten mit Chloroform (332, 361) haben gezeigt, daß die extrahierbaren Verbindungen verschieden zusammengesetzt sind:

1. Einfache binäre Oxinate: Hierzu gehören die meisten Me^{III} -Oxinate, MeOx_3 , (Al, Bi, Ga, In, Tl^{III} , Ce^{III} , La^{III} , Fe^{III}), ferner einige MeOx_2 (Be, Cu, Pd, Pb), die keine sehr stabilen Dihydrate bilden, und einige MeOx_4 (Zr, Hf).

2. Einige Oxinate enthalten mehr Oxinmoleküle als der Wertigkeit des Zentralatoms entspricht; bei diesen werden weitere Koordinationsstellen am Zentralatom durch Oxin besetzt: $\text{H}[\text{AgOx}_2]$; $\text{H}[\text{Me}^{\text{II}}\text{Ox}_3]$ mit $\text{Me}^{\text{II}} = \text{Sr, Mn, Ni, Co, UO}_2^{2+}$; $\text{H}_2[\text{BaOx}_4]$, sowie $\text{ScOx}_3 \cdot \text{HOx}$ und $\text{ThOx}_4 \cdot \text{HOx}$.

3. Manche aus wäßriger Lösung gefällte Oxinate enthalten noch Kristallwasser. Diese Oxinate lassen sich nur extrahieren wenn das „Kristallwasser“ durch Amine oder Alkohole ersetzt wird. Dabei entstehen Verbindungen des Typs $\text{MeOx}_2 \cdot (\text{RNH}_2)_2$ bzw. $\text{MeOx}_2 \cdot \text{RNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oder $\text{MeOx}_2(\text{ROH})_2$, wobei R ein Alkylrest, z. B. Butyl, und Me = Ca, Sr, Ba, Zn, Cd, Co und Ni (363) ist.

4. Oxinate von höherwertigen Elementen enthalten oft noch Oxo- und Hydroxo-Liganden: $\text{Me}^{\text{IV}}\text{Ox}_2$ (Me = Ti, Zr, V^{IV}), $\text{Me}^{\text{VI}}\text{O}_2\text{Ox}_2$ (Me = Mo und W), NbOOx_3 und $\text{Me}^{\text{VO}}(\text{OH})\text{Ox}_2$ (Me = V^{V} und Mo^{V}). Auch diese Verbindungen können zur koordinativen Absättigung noch zusätzlich freies Oxin enthalten, z. B. $\text{H}[\text{UO}_2\text{Ox}_3]$.

5. Einige Oxinate der Gruppe 2 lassen sich besonders gut als Ionenassoziat mit einem höheren Amin extrahieren: $\text{RNH}_3[\text{MeOx}_3]$ mit Me = Be, Mg, Ca (362) oder UO_2^{2+} (66).

Die Extrahierbarkeit der Metallionen mit Oxin und Chloroform nimmt in folgender Reihenfolge ab (332, 361): Pd^{2+} , MoO_2^{2+} , WO_2^{2+} , VO_2^{2+} , Ti^{3+} , Fe^{3+} , ZrO^{2+} , Ga^{3+} , Cu^{2+} , TiO^{2+} , In^{3+} , Bi^{3+} , Ni^{2+} , UO_2^{2+} , Al^{3+} , Th^{4+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Sc^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Be^{2+} , La^{3+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} . Pd^{2+} kann schon bei pH 0 (332) und Ba^{2+} erst bei pH > 11 mit hohem Oxinüberschuß quantitativ extrahiert werden.

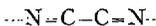
Von den zahlreichen Derivaten des Oxins haben nur wenige wirkliche analytische Bedeutung erlangt. Das *2-Methyl-8-hydroxychinolin* (39, 215, 224) verhält sich bei der Extraktion dem unsubstituierten Oxin analog mit einer Ausnahme: Aluminium wird weder gefällt noch kann es aus wäßriger Lösung extrahiert werden, weshalb man mit diesem

Reagens vor einer Aluminiumbestimmung auf anderem Wege praktisch alle eventuell störenden Ionen entfernen kann. Es eignet sich besonders zur Extraktion des Berylliums bei Gegenwart von Al.

Mit Hilfe einer Mannich-Reaktion können 7-substituierte Oxin-Derivate hergestellt werden, die in der Seitenkette noch ein oder mehrere N-Atome tragen, die als zusätzliche Ligandatome wirksam werden können (366). Die wichtigste Verbindung dieser Gruppe ist das 7-[α -(o-Carbomethoxyanilino)-benzyl]-8-hydroxychinolin („CMAB-Oxin“), das nicht mehr mit drei- und höherwertigen, sondern nur noch mit zweiwertigen Elementen und der Gruppe VO(OH)²⁺ reagiert. Da nun ferner die meisten zweiwertigen Metalle mit Tartrat oder Cyanid maskiert werden können, erweist sich CMAB-Oxin als nahezu spezifisches Reagens für Magnesium (367).

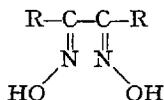


8-Mercaptochinolin (= „Thiooxin“) gibt in wäßriger Lösung mit den Metallen der Schwefelwasserstoff- und der Ammoniumsulfidgruppe Niederschläge, die sich besser in organischen Lösungsmitteln (Brombenzol, Bromoform, Benzol, Toluol) lösen als die entsprechender Verbindungen des Oxins (17, 70, 181). In organischen Lösungsmitteln leicht löslich sind die Thiooxinate von Cu, Zn, Hg^I, Tl, Pb, As^{III}, Sb^{III}, Bi, V, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Pd; weniger löslich die von Au, Cd und W. Die organischen Lösungen sind meist intensiver gefärbt als die der Oxinate und somit besser zur photometrischen Bestimmung der Metalle geeignet. Die intensivsten (braunen) Färbungen besitzen die Lösungen von Mn, Fe, Cu und Co, weniger intensiv sind die Färbungen von Mo (grün), Ni, Pd, Os und Pt (rot); schwach gelb gefärbt sind die Lösungen von Zn, Hg, Bi, Sb, As, Pb, Tl. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist stark pH-abhängig. Auf Grund der größeren Säuredissoziationskonstanten des Thiooxins und der größeren Chelatbildungskonstanten sind die Extraktionen im allgemeinen bei niedrigeren pH-Werten möglich als die Extraktionen der entsprechenden Oxinate (70), nur Zn und Ni machen hiervon eine Ausnahme. Aus analogen Gründen sind Extraktionen mit Chinolin-8-selenol bei noch niedrigeren pH-Werten möglich, so daß Pd(II) noch aus stark sauren Lösungen extrahiert werden kann (306).



Die α -Dioxime haben sich als hoch selektive Fällungsreagentien für Ni^{II} und Pd^{II} erwiesen. Diese in Wasser schwerlöslichen Metallchelate sind in organischen Lösungsmitteln, wie Chloroform, mäßig löslich und lassen sich für spektralphotometrische Bestimmungen im nahen UV verwen-

Verwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse

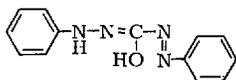


den. Für die Nickel- und Palladiumbestimmungen haben sich das bekannte *Dimethylglyoxim* (235, 236), *α-Benzildioxim* (255, 278), *α-Furildioxim* (256, 257) und *Cyclohexandiondioxim* (221, 278) bewährt. In allen Fällen erfolgt die Palladiumextraktion bei wesentlich niedrigeren pH-Werten als die des Nickels, so daß diese vier Reagentien für beide Elemente hoch selektiv sind und insbesondere eine Abtrennung von den anderen Platinmetallen und Gold ermöglichen.

Nach Reduktion mit SnCl_2 in 0,5–1,5 n salzsaurer Lösung kann auch Rhenium mit α -Furildioxim in Chloroform oder Isoamylalkohol extrahiert werden (254). Ebenso ist Cyclohexandiondioxim (170) geeignet.



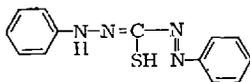
Diphenylcarbazon bildet in schwach saurer Lösung mit Quecksilber(I und II), Kupfer und Cadmium Chelate, die mit Benzol oder Chloroform extrahiert werden können (292).



Auch Organoborsäuren wie Diphenylborinsäure, geben in benzolischer Lösung mit Diphenylcarbazon einen blauen 1 : 1-Komplex, der sich zur photometrischen Bestimmung eignet (352). Die Chelate leiten sich von der tautomeren Hydroxy-Form ab.



Sehr viel wichtiger als das Diphenylcarbazon ist die entsprechende S-haltige Verbindung, das *Diphenylthiocarbazon* (= „*Dithizon*“)



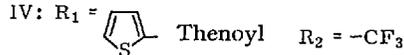
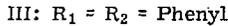
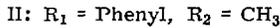
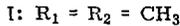
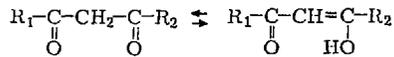
für die Extraktion von Metallen, denn etwa 20 Elemente bilden mit diesem Reagens Chelate, die mit CHCl_3 , CCl_4 und anderen organischen Lösungsmitteln extrahierbar sind – angegeben in der Reihenfolge abnehmender Stabilität: Ag^{I} , $\text{Hg}^{\text{I/II}}$, Pd^{II} , Pt^{II} , $\text{Au}^{\text{I/III}}$, $\text{Cu}^{\text{I/II}}$, Bi^{III} , In^{III} , Sn^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Co^{II} , Pb^{II} , Ni^{II} , Fe^{II} , Mn^{II} und Tl^{I} . Analytisch hat die Extraktion der Dithizonate für Bestimmungen von

Pb, Zn, Hg und Ag sehr große, von Cd, Cu, Bi und Tl große und von Pd, Au, In, Pt und Ni noch gewisse Bedeutung; denn obwohl das Dithizon ein Gruppenreagens ist, läßt sich durch Einstellung eines definierten pH-Bereiches und durch zusätzliche Verwendung von Maskierungsmitteln die Extraktion eines Kations weitgehend selektiv gestalten (111, 163, 223).

Chelate mit sechsgliedrigen Ringen



Von den Chelatbildnern, die zu 6-Ring-Chelaten führen, sind weitaus die wichtigsten die β -Diketone, speziell *Acetylaceton(I)*, *Benzoylaceton(II)*, *Dibenzoylmethan(III)* und *Thenoyltrifluoraceton(IV)*



Acetylaceton bildet mit über 50 Elementen definierte Chelate, die beim Schütteln mit dem flüssigen Reagens allein sofort (177, 335, 336) entstehen. Beim Schütteln mit verdünnten Lösungen von Acetylaceton in CHCl_3 , CCl_4 oder C_6H_6 erfolgt die Bildung der Chelate von Co, Ni, Mo^{VI} und Mg nur sehr langsam und die des Chroms sogar erst in der Hitze (333), so daß hierin eine Möglichkeit zur spezifischen Abtrennung des Chroms besteht. Die Extraktionen mit diesem Reagens dienen hauptsächlich der Abtrennung von Elementen, denn nur die Chelate von Fe^{III} (420–450 nm) und U^{VI} (390 bis 400 nm), absorbieren im sichtbaren Bereich und können somit direkt photometriert werden (333).

Benzoylaceton (333) und *Dibenzoylmethan* (333) reagieren völlig analog. Mit allen drei Reagentien ist eine sehr selektive Eisenbestimmung durch Extraktion aus wäßriger Phase bei pH 2,5 mit einer 0,1 m Reagenslösung in Benzol möglich, da Uran(VI) bei $\text{pH} \leq 2,5$ praktisch noch nicht extrahiert wird. Uran kann dann bei pH 5,5–6,0 aus einer Lösung, die noch 1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure als Maskierungsreagens enthält, mit einer 0,2 m Reagens-Lösung in Benzol extrahiert und spezifisch bestimmt werden.

Beim *2-Thenyltrifluoroacetone* (TTA) bewirkt die CF_3 -Gruppe eine Vergrößerung der Acidität der Enolform, so daß alle Extraktionen bei etwas kleineren pH-Werten ausgeführt werden können (272) als mit den anderen β -Diketonen. Die Hauptanwendung findet es jedoch bei der Abtrennung der Aktinidenelemente. Nur wenige Chelate sind gefärbt und können direkt photometriert werden: Uran(VI) – gelb, Kupfer(II) – grün, Eisen(III) – rot, Chrom(III) – tief gelb und Cer(IV) – tiefrot (79).

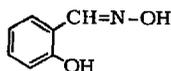
Obwohl die Extraktionen mit TTA sehr erfolgreich sind, können in einigen Fällen die Extraktionskoeffizienten bei Zugabe eines weiteren organischen Komplexbildners zur Extraktionslösung um mehrere Zehnerpotenzen erhöht werden. Dieser synergetische Effekt wurde insbesondere bei der Extraktion von Uran(VI) mit TTA und Tri-*n*-butylphosphat (159) und bei der Thoriumextraktion aus essigsaurer Lösung mit TTA (122) oder aus wäßriger Lösung mit TTA und Tri-*n*-octylamin (234) beobachtet. $\text{Co}(\text{TTA})_2$ wird viel besser mit synergetisch wirkenden Alkoholen oder Ketonen extrahiert als mit Kohlenwasserstoffen (3).



Reagentien mit der *o*-Nitrosophenol-Gruppierung (1) bilden mit einer Reihe von Metallen Chelate. Von analytischer Bedeutung sind diese Reagentien jedoch nur für die Elemente Co, Fe und Pd. Co reagiert nur in der dreiwertigen Form; aber das Reagens selbst kann dabei als Oxydationsmittel dienen. Die Metallchelate des *1-Nitroso-2-naphthols* können mit einer Reihe von organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Für die Co-Chelate sind Benzol, Trichloräthylen, Chloroform, Essigsäureamylester oder Methylbutylketon bei pH 2,9 der wäßrigen Phase geeignet (69, 288, 341). Eisen(III) kann schon bei pH 1,5 extrahiert und somit von Aluminium und Magnesium getrennt werden (13).



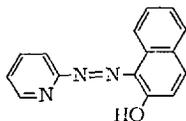
Diese, ebenfalls zu 6-Ring-Chelaten führende Gruppierung findet man im *Salicylaldoxim*, das mit einer Reihe von Metallen gefärbte Chelate bildet,



die mit Chloroform extrahiert werden können (123), aber die analytische Bedeutung ist gering.

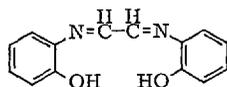
Vielzählige Chelatbildner

1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol (PAN) und damit verwandte Stoffe gehören zu den Chelatbildnern mit mehr als zwei Ligandatomen. PAN bildet mit



einer ganzen Reihe von Metallen sehr stabile Chelate, die mit Chloroform, Amylalkohol, Tetrachlorkohlenstoff oder Diäthyläther extrahiert werden können (28, 60, 308). Die meisten Chelate sind in Chloroform rot gefärbt, nur Palladium(II) ($\lambda_{\max} = 680 \text{ nm}$), und Kobalt(III) ($\lambda_{\max} = 640 \text{ nm}$) geben ein grünes und Vanadium(V) ein blaues ($\lambda_{\max} = 615 \text{ nm}$) Chelat. Das rote Eisen(III)-Chelat besitzt noch ein weiteres Absorptionsmaximum bei 775 nm (309). Neben dieser Selektivität durch die unterschiedliche Lage von λ_{\max} lassen sich auch durch Einstellung bestimmter pH-Bereiche und Verwendung von Maskierungsmitteln Selektivitätssteigerungen erreichen. So reagieren in Gegenwart von KCN nur noch Mn^{2+} , UO_2^{2+} , Y^{3+} , In^{3+} , La^{3+} und Ce^{3+} und in Gegenwart von ÄDTE nur noch UO_2^{2+} , während mit Fluorid oder Citrat Ga^{3+} , Fe^{3+} und Bi^{3+} maskiert werden (309).

Von den weiteren vielzähligen Chelatbildnern soll hier noch das Glyoxal-bis-(2-hydroxy-anil) (GBHA) erwähnt werden, das mit UO_2^{2+} und



zweiwertigen Metallionen in alkalischem Medium rotviolette Chelate bildet (20), die mit Amylalkohol extrahierbar sind (241). Da das Reagens nur 4 Koordinationsstellen am Zentralatom absättigt, enthalten diese Chelate – außer dem UO_2 -Chelat – zusätzlich zwei Moleküle Wasser. Man kann sie deshalb mit Hilfe eines langkettigen Alkohols – der das koordinativ gebundene Wasser verdrängt – aus der wäßrigen Lösung extrahieren (synergetischer Effekt). Z. B. wird das Calcium – GBHA-Chelat mit einem Gemisch aus Hexanol und Chloroform (365) extrahiert.

Ionenassoziat

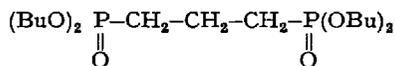
Alle bisher besprochenen extrahierbaren Chelate waren ungeladene neutrale Moleküle. Wie eingangs erwähnt, können auch einige Ionenchelate extrahiert werden, wenn in der wäßrigen Phase geeignete, entgegengesetzt geladene Ionen vorhanden sind. So lassen sich die kationischen

Chelate der Phenanthroline und Polypyridyle und der Tetraalkylmethylendiphosphonate mit geeigneten Anionen als Ionenpaare (Ionenassoziate), und die Chelate von sulfurierten Reagentien mit entsprechenden organischen Ammoniumkationen extrahieren.

In Kap. IV wurden die Reaktionen der Dipyridyle und Phenanthroline als hoch selektiv für Eisen(II) und Kupfer(I) angeführt. Nun kann das Tris-phenanthrolin-eisen(II)-perchlorat mit einer Reihe organischer Lösungsmittel, am besten mit Nitrobenzol, extrahiert werden (270). Fe(II)- und Cu(I)-Chelate von alkylierten oder arylierten Phenanthrolinen werden sehr gut mit höheren Alkoholen, wie Amyl- oder Hexylalkohol extrahiert, wobei als Anionen Cyanid, Jodid oder Perchlorat mit in die organische Phase gehen. Das geeignetste Derivat für die Eisen(II)-Bestimmung ist das *4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin* („*Bathophenanthrolin*“) (37, 85, 316). Durch Substituenten in o-Stellung zum N werden die Reagentien spezifisch für Cu(I) (151): Gebräuchlich sind *2,2'-Dichinolyl* („*Cuproin*“) mit Isoamylalkohol als bestem Extraktionsmittel (152, 153) und *2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin* („*Neocuproin*“) mit höheren Alkoholen oder Gemischen aus Äthanol und Chloroform zur Extraktion (117, 315). Das empfindlichste Reagens der Reihe ist das *2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin* („*Bathocuproin*“), dessen Kupfer(I)-Chelat am besten aus perchlorathaltiger Lösung mit 1-Hexanol (38, 318) extrahiert wird.

Da nun das Tris-(1,10-phenanthrolin)-eisen(II) nur in Gegenwart bestimmter Anionen extrahiert werden kann (85, 387), läßt sich darauf umgekehrt eine sehr empfindliche und selektive Bestimmung von *Cyanid* oder *Jodid* aufbauen (301).

Sehr stabile Chelate werden auch von zweizähligen Organophosphorsäure-Derivaten gebildet, die sich von den analogen β -Diketonen dadurch unterscheiden, daß sie keine Enolform bilden. Daher geben sie mit Metallionen kationische Chelate, die aber gut als Ionenassoziate (meist mit NO_3^- als Anion) extrahiert werden können. So können aus salpetersaurer oder wenigstens nitrathaltiger Lösung mit *Tetraäthylmethylendiphosphonat* zahlreiche Elemente mit Kerosin (Leucht-



petroleum) extrahiert werden (160), was insbesondere angewandt wird zur Abtrennung von Zr, Y, Ce, Pm, Eu und La (291).

In Kap. IV wurde gezeigt, daß sulfonierte Chelatbildner infolge ihrer Wasserlöslichkeit für analytisch-kolorimetrische Verfahren sehr geeignet sind. In wäßriger Lösung liegen diese Chelate stets als Anionen vor, da

die $-\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe vollständig dissoziiert ist. Diese anionischen Chelate können nun mit organisch substituierten Ammonium-, Arsonium- und Phosphoniumkationen extrahiert werden (406). So erlaubt die Extrahierbarkeit des Titans als *Tributylammonium-titan-sulfosalicylat* mit Chloroform die photometrische Bestimmung von Titanyl-Salz neben beträchtlichen Mengen anderer Ionen, wie Fe^{III} (nach Reduktion mit Thioglycolsäure), Ni^{II} , Co^{II} , Mn^{II} , Cr^{III} , Cd^{II} , Al^{III} , Ca^{II} , Cu^{II} , UO_2^{2+} , Pb^{2+} , MoO_4^{2-} , die bei der direkten Bestimmung in wäßriger Phase mehr oder minder stören würden (407). Und das Chelat aus Eisen(III)-Ionen und 7-Jod-8-hydroxychinolin-5-sulfonsäure (*Ferron*) läßt sich mit Amylalkohol in Gegenwart von Tri-n-butylammonium-Kationen aus schwach saurem Medium extrahieren (408, 409).

VI. Schlußbemerkung

Obwohl eine sehr große Zahl, etwa ein Viertel aller veröffentlichten Arbeiten auf analytischem Gebiet sich in irgendeiner Weise mit optischen Eigenschaften von Chelaten befaßt, obwohl die Zahl neuer photometrischer Methoden, neuer Reagentien und der Umfang an Detailwissen ständig zunimmt, scheinen doch zwei wesentliche Punkte noch zu wenig Beachtung zu finden und die volle Ausnutzung aller Möglichkeiten dieser schnellen, empfindlichen und genauen naßchemischen Analysenmethode zu begrenzen:

1. Es gibt zahlreiche Reagentien und Bestimmungsverfahren für jedes Element und besonders bei wenig selektiven Reagentien noch zahlreiche Analogearbeiten für verschiedene Anwendungsbereiche. Objektive Vergleichs- und Bewertungsmaßstäbe fehlen aber häufig. Es wäre deshalb wünschenswert, zukünftig alle neuen analytischen Arbeitsvorschriften einheitlich nach modernen statistischen Methoden zu bewerten und zu vergleichen.

2. Die Auffindung neuer hochselektiver und empfindlicher Reagentien ist auch heute noch mehr oder weniger vom Zufall oder von der Intuition des Bearbeiters abhängig. Wenn man von wenigen hervorstechenden Ausnahmen und einigen allgemeinen Regeln absieht, sind die theoretischen Kenntnisse über die Ursachen der Selektivität noch sehr gering. Es wäre deshalb wünschenswert, viel mehr systematische Untersuchungen über den Einfluß von Substituenten und ihrer Stellung, der Struktur des Komplexes, synergetisch wirkender Teilchen u. a. auf die Stabilität und optischen Eigenschaften von Chelaten zur Verfügung zu haben.

Literatur

1. *Abrahamczik, E.*: Mikrochem. verein. Mikrochim. acta *36/37*, 104—112 (1951).
2. *Alimarin, I. P., F. P. Sudakov u. B. G. Golovkin*: Uspechi. Chim. *31*, 989 (1962).
3. — u. *Ju. A. Zolotov*: Talanta *9*, 891—899 (1962).
4. *Allen, F., H. Weiland u. E. Hille*: Z. anorg. allg. Chem. *215*, 81—91 (1933).
5. — — u. *E. Knippenberg*: Z. analyt. Chem. *96*, 91—98 (1934).
6. — — u. *H. Loofmann*: Angew. Chem. *46*, 668—9 (1933).
7. *Amin, A.-A. M., A. A. Abd El Raheem u. F. A. Osman*: Z. analyt. Chem. *167*, 8—16 (1959).
8. *Anton, A.*: Anal. Chem. *32*, 725—726 (1960).
9. *Atack, F. A.*: J. Soc. Chem. Ind. *34*, 936 (1915); ref. Z. analyt. Chem. *58*, 363 (1919).
10. *Babina, M. D.*: Ž. anal. Chim. *17*, 252—253 (1962).
11. *Babko, A. K., u. P. V. Khodulina*: Ž. anal. Chim. *7*, 317 (1952).
12. — u. *P. P. Kis*: Ž. anal. Chim. *17*, 693—699 (1962).
13. — u. *G. T. Michaltzitzin*: Ukrain. chim. Ž. *22*, 676 (1956).
14. — u. *V. T. Vasilenko*: Ukrain. chim. Ž. *26*, 514—518 (1960); ref. Z. analyt. Chem. *180*, 366 (1961).
15. — — Ukrain. chim. Ž. *27*, 396—402 (1961); ref. Z. analyt. Chem. *188*, 285 (1962).
16. *Banerjee, D. K.*: Anal. Chem. *29*, 55—60 (1957).
17. *Bankovsky, Ju. A., A. F. Ievins u. Z. E. Liepinja*: Ž. anal. Chim. *15*, 4—9 (1960).
18. *Baržická, B., u. A. Krauze*: Chem. analit. (Warszawa) *5*, 791—795 (1960); ref. Z. analyt. Chem. *184*, 79 (1961).
19. *Baudisch, O., u. R. Fürst*: Ber. dtsh. chem. Ges. *50*, 324—327 (1917).
20. *Bayer, E.*: Ber. dtsh. chem. Ges. *90*, 2325—2338 (1957).
21. *Belcher, R.*: Acta chim. Acad. Sci. hung. *33*, 257—265 (1962).
22. — *T. V. Ramakrishna u. T. S. West*: Talanta *10*, 1013—1022 (1963).
23. — — — Talanta *12*, 681—690 (1965).
24. — u. *T. S. West*: Talanta *8*, 853—862 (1961).
25. *Berg, R.*: Z. analyt. Chem. *70*, 341—347 (1927).
26. — Z. analyt. Chem. *71*, 23—36 (1927).
27. — Die analytische Verwendung von o-Oxychinolin („Oxin“) und seiner Derivate. Stuttgart 1938.
28. *Betteridge, D., Q. Fernando u. H. Freiser*: Anal. Chem. *35*, 294—298 (1963).
29. *Bhaduri, A. S., u. P. Ray*: Z. analyt. Chem. *154*, 103—113 (1957).
30. *Blair, A. J., D. A. Pantony u. G. J. Minkoff*: J. Inorg. Nucl. Chem. *5*, 316—331 (1958).
31. *Bode, H.*: Z. analyt. Chem. *143*, 182—195 (1954).
32. — Z. analyt. Chem. *144*, 165—186 (1955).
33. — u. *W. Armswald*: Z. analyt. Chem. *185*, 179—201 (1962).
34. — u. *F. Neumann*: Z. analyt. Chem. *172*, 1—21 (1960).
35. — u. *K.-J. Tusche*: Z. analyt. Chem. *157*, 414—427 (1957).
36. *Bogshawe, B., and R. J. Truman*: Analyst *72*, 189 (1947).

37. *Booth, E.*, u. *T. W. Evett*: *Analyst* 83, 80—82 (1958).
38. *Borchardt, L. G.*, u. *J. P. Butler*: *Anal. Chem.* 29, 414—419 (1957).
39. *Borrel, M.*, u. *R. A. Paris*: *Anal. chim. acta* 6, 389—399 (1952).
40. *Brandt, W. W.*, u. *A. E. Preiser*: *Anal. Chem.* 25, 567—571 (1953).
41. *Breckenridge, J. G.*, *R. W. J. Lewis* u. *L. A. Quirk*: *Canad. J. Res.* 17 B, 258—265 (1939); *ref. C. A.* 33, 9184 (1939).
42. *Bril, J.*: *Mikrochim. Acta* 1958, 212—219.
43. *Budanova, L. M.*, u. *S. N. Pinaeva*: *Ž. anal. Chim.* 20, 320—324 (1965).
44. *Budešinshij, B.*: *Z. analyt. Chem.* 188, 266—272 (1962).
45. — *Z. analyt. Chem.* 202, 96—101 (1964).
46. — *Z. analyt. Chem.* 206, 401—409 (1964).
47. — u. *A. Bezdekova*: *Z. analyt. Chem.* 196, 172—177 (1963).
48. — u. *K. Haas*: *Z. analyt. Chem.* 210, 263—270 (1965).
49. — — *Z. analyt. Chem.* 214, 325—331 (1965).
50. — u. *S. B. Savvin*: *Z. analyt. Chem.* 214, 189—193 (1965).
51. — u. *D. Vrzalova*: *Z. analyt. Chem.* 210, 161—166 (1965).
52. *Bumsted, H. E.*, u. *J. C. Wells*: *Anal. Chem.* 24, 1595—1597 (1952).
53. *Burton, J. D.*, u. *J. P. Riley*: *Mikrochim. Acta* 1959, 585—591.
54. *Busev, A. I.*, u. *M. I. Ivanyutin*: *Trudy Kom. analit. Chim.* 11, 172 (1960).
55. *Calvin, M.*, u. *R. H. Bailes*: *J. Amer. chem. Soc.* 68, 949—954 (1946).
56. *Cernichov, J. A.*, *V. F. Lukjanov* u. *E. M. Knjazeva*: *Ž. anal. Chim.* 14, 207—210 (1959).
57. *Charlot, G.*, *Anal. chim. Acta* 1, 218—248 (1947).
58. *Cheng, K. L.*: *Anal. Chem.* 34, 1392—1396 (1962).
59. — *Anal. chim. acta* 28, 41—53 (1963).
60. — u. *R. H. Bray*: *Anal. Chem.* 27, 782—785 (1955).
61. *Christopher, D. H.*, u. *T. S. West*: *Talanta* 13, 507—513 (1966).
62. *Clarke, F. E.*: *Anal. Chem.* 22, 553—555 (1950).
63. *Clark, R. E. D.*: *Analyst* 83, 103—106 (1958).
64. — *Analyst* 83, 396—402 (1958).
65. — u. *Ch. E. Tamale-Ssali*: *Analyst* 84, 16—23 (1959).
66. *Clifford, W. E.*, *E. P. Bullwinkel*, *L. A. McClaine* u. *P. Noble, jr.*: *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2959—2961 (1958).
67. *Close, R. A.*, u. *T. S. West*: *Talanta* 5, 221—230 (1960).
68. *Chuley, H. J.*: *Analyst* [London] 76, 523—530 (1951); *ref. Z. analyt. Chem.* 143, 52 (1954).
69. *Cogan, E.*: *Anal. Chem.* 32, 973—975 (1960).
70. *Corsini, A.*, *Q. Fernando* u. *H. Freiser*: *Anal. Chem.* 35, 1424—1428 (1963).
71. *Craft, C. H.*, u. *G. R. Makepeace*: *Ind. eng. Chem.; analyt. Edit.* 17, 206—210 (1945).
72. *Crumpler, T. B.*: *Anal. Chem.* 19, 325—326 (1947).
73. *Cucci, M. W.*, *W. F. Neuman* u. *B. J. Mulryan*: *Anal. Chem.* 21, 1358 bis 1360 (1949).
74. *Cyvina, B. S.*, *M. B. Oogareva* u. *S. I. Pljuskova*: *Zavodskaja Laborat.* 28, 917—919 (1962); *ref. Z. analyt. Chem.* 199, 153 (1964).
75. *Dagnall, R. M.*, u. *T. S. West*: *Talanta* 8, 711—719 (1961).
76. *Danilova, V. I.*: *Zavodskaja Laborat.* 29, 407—409 (1963); *ref. Z. analyt. Chem.* 204, 66 (1964).
77. *Davenport, W. H.*: *Anal. Chem.* 21, 710—711 (1949).
78. *Davis, N. F.*, *C. E. Osborne jr.* u. *H. A. Nash*: *Anal. Chem.* 30, 2035 (1958).

79. *De, A. K., u. S. M. Khoḗkar*: Chem. and Ind. 1959, 854.
80. *Dedkov, Y. M., V. P. Maharova, F. A. Vinokurova, M. V. Chashchikhina u. S. B. Savvin*: Ž. anal. Chim. 20, 440—444 (1964).
81. *Degenhardt, H.*: Z. analyt. Chem. 153, 327—335 (1956).
82. *Dey, A. K.*: Mikrochim. Acta 1964, 414—428.
83. *Diehl, H.*: Chem. Rev. 21, 39—111 (1937).
84. — The Application of the Dioximes to Analytical Chemistry. G. F. Smith Chemical Comp., Columbus, Ohio 1940.
85. — u. *E. B. Buchanan, jr.*: Talanta 1, 76—79 (1958).
86. *Doerffel, K.*: Z. analyt. Chem. 185, 1—98 (1962).
87. *MacDougall, M., u. D. A. Biggs*: Anal. Chem. 24, 566—569 (1952).
88. *Dozinel, C.*: Chim. analytique 38, 244—249 (1956). ref. Z. analyt. Chem. 155, 457 (1957).
89. *Dunleavy, R. A., S. E. Wiberley u. J. H. Harley*: Anal. Chem. 22, 170 bis 172 (1950).
90. *Dutta, R. L.*: J. Ind. Chem. Soc. 36, 339 (1959).
91. — J. Ind. Chem. Soc. 37, 169 (1960).
92. *Dziomko, V. M., N. P. Rudenko u. I. N. Kremenskaya*: Ž. Neorgan. Chim. 8, 655 u. 1278 (1962).
93. *Eckert, G.*: Z. analyt. Chem. 148, 14—20 (1955).
94. — Z. analyt. Chem. 155, 23—35 (1957).
95. *Elinson, S. V., u. N. A. Mirzozan*: Zavodskaja Laborat. 27, 798—801 (1961); ref. Z. analyt. Chem. 188, 143 (1962).
96. — u. *L. I. Pobedina*: Ž. anal. Chim. 18, 734—738 (1963).
97. — u. *A. T. Rezova*: Ž. anal. Chim. 20, 676—682 (1965).
98. Extraction Methods in Analytical Chemistry. Sympos. Moscow, Dez. 1961. Tr. Kommis. pro Analit. Chim. 14, 1963.
99. *Fairhall, L. T.*: Natl. Inst. Health, U.S. Public Health Service, Bull. 181, 10—14 (1943); ref. Z. analyt. Chem. 131, 445 (1950).
100. *Feigl, F.*: The Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. Academic Press, Inc. New York 1949.
101. — Z. analyt. Chem. 74, 380—386 (1928).
102. — u. *A. Caldas*: Anal. Chem. 29, 580—582 (1957).
103. — *P. Krumholz u. H. Hamburg*: Z. analyt. Chem. 90, 199—202 (1932).
104. — *G. Sicher u. O. Singer*: Ber. dtsh. chem. Ges. 58, 2294—2303 (1925).
105. *Fischer, R. B.*: Anal. Chem. 37, 13; 27 A—34 A (1965).
106. *Fischer, W., u. W. Harre*: DBP 855 702 IV b/12 n von 1951; ref. Angew. Chem. 64, 600 (1952).
107. — u. *J. Wernet*: Angew. Chem. 60 A, 129—133 (1948).
108. *Flaschka, H., u. M. Y. Farah*: Z. analyt. Chem. 152, 401—411 (1956).
109. *Förster, T.*: Z. Elektrochem. 45, 548—573 (1939).
110. *Fortune, W. B., u. M. G. Mellon*: Ind. eng. Chem.; analyt. Edit. 10, 60—64 (1938).
111. *Freiser, H.*: Chemist-Analyst 50, 62 (1961).
112. — Chemist-Analyst 51, 62 (1962).
113. *Frere, F. J.*: Anal. Chem. 33, 644 (1961).
114. *Fritz, J. S., u. M. Johnson-Richards*: Anal. chim. acta 20, 164—171 (1959).
115. — *M. J. Richard u. W. J. Lane*: Anal. Chem. 30, 1776—1779 (1958).
116. *Furman, N. H., W. B. Mason u. J. S. Pecola*: Anal. Chem. 21, 1325 bis 1330 (1949).
117. *Gahler, A. R.*: Anal. Chem. 26, 577—579 (1954).
118. *Gentry, C. H. R., u. L. G. Sherrington*: Analyst 71, 432—438 (1946).

119. *Giebler, G.*: Z. analyt. Chem. 184, 401—411 (1961).
120. *Gillis, J., J. Hoste u. A. Claeys*: Anal. chim. Acta 7, 291—301 (1947).
121. *Ginsburg, L. B., u. Z. P. Skrobot*: Zavodskaja Laborat. 23, 527—533 (1957); ref. Z. analyt. Chem. 160, 437 (1958).
122. *Goldstein, G., O. Menis u. D. L. Manning*: Anal. Chem. 32, 400—404 (1960).
123. *Gorbach, G., u. F. Pohl*: Mikrochem. 38, 258—267 (1951).
124. *Gotschalk, G.*: Statistik in der quantitativen chemischen Analyse. Stuttgart 1962.
125. — Z. analyt. Chem. 193, 1—15 (1963).
126. — Z. analyt. Chem. 194, 321—333 (1963).
127. *Grat-Cabanac, M.*: Anal. chim. acta 5, 116—118 (1951).
128. *Green, D. E.*: Anal. Chem. 20, 370—372 (1948).
129. *Grimaldi, F. S., B. Ingram u. F. Guttilla*: Anal. Chem. 27, 918—921 (1955).
130. *Gübeli, O., u. A. Jacob*: Helv. chim. acta 38, 1026—1032 (1955).
131. *Sen Gupta, J. G.*: Anal. chim. acta 23, 462—466 (1960).
132. *Guyon, J. C., u. L. J. Cline*: Anal. Chem. 37, 1778—1779 (1965).
133. *Haar, R., u. F. Umland*: Z. analyt. Chem. 191, 81—94 (1962).
134. *Hahn, F. L.*: Angew. Chem. 39, 1198 (1926).
135. — u. *K. Vieweg*: Z. analyt. Chem. 71, 123—130 (1927).
136. *Hammitt, L. P., u. C. T. Sottery*: J. Amer. chem. Soc. 47, 142—143 (1925).
137. *Handley, Th. H., u. J. A. Dean*: Anal. Chem. 34, 1312—1315 (1962).
138. *Hartkamp, H.*: Z. analyt. Chem. 170, 399—407 (1959).
139. — Angew. Chem. 72, 349 (1960).
140. *Hattori, T., u. T. Kuroha*: Jap. Analyst 11, 727—730 (1962); ref. Z. analyt. Chem. 198, 307 (1963).
141. — *I. Tsukahara u. T. Yamamoto*: Jap. Analyst 15, 35—41 (1966).
142. — — — Jap. Analyst 15, 41—46 (1966).
143. *Haywood, F. W., u. A. A. R. Wood*: J. Soc. chem. Ind. 62, 37—39 (1943); ref. Z. analyt. Chem. 128, 348 (1948).
144. *Hein, F. u. W. Jehn*: Z. anorg. allg. Chem. 347, 244—251 (1965).
145. *Herrington, J., u. K. C. Steed*: Anal. chim. acta 22, 180—184 (1960).
146. *Hibbits, J. O., W. F. Davis u. M. R. Menke*: Talanta 8, 163—164 (1961).
147. *Hoenes, H. J., u. K. G. Stone*: Talanta 4, 250—263 (1960).
148. *Hoffmann, O.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 18, I, 46 (1885).
149. *Holcomb, H. P., u. J. H. Yoe*: Microchemic. J. 4, 463—480 (1960); ref. Z. analyt. Chem. 184, 377 (1961).
150. *Horton, A. D., P. F. Thomason u. F. J. Miller*: Anal. Chem. 24, 548 bis 550 (1952).
151. *Hoste, J.*: Anal. chim. acta 4, 23—37 (1950).
152. — *J. Eechhout u. J. Gillis*: Anal. chim. acta 9, 263—274 (1953).
153. — *A. Heiremans u. J. Gillis*: Mikrochem. 36, 349—361 (1951).
154. *Hummel, F. C., u. H. H. Willard*: Ind. eng. Chem., analyt. Edit. 10, 13—15 (1938).
155. *Iünski, M.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 17, II, 2592 (1884).
156. — u. *G. v. Knorre*: Ber. dtsh. chem. Ges. 18, I, 699—704 (1885).
157. *Irving, H., E. J. Butler u. M. F. Ring*: J. chem. Soc. 1949, 1489—1498.
158. — *M. J. Cabell u. D. H. Mellor*: J. chem. Soc. 1953, 3417—3426.
159. — u. *D. N. Edgington*: J. Inorg. Nucl. Chem. 15, 158—170 (1960).
160. *Ishimori, T., K. Kimura, E. Nakamura, J. Akatsu u. T. Kobune*: Nippon Genshiryoku Gakkaishi 5, 633 (1963); ref. Anal. Chem. 36, 107 R (1964).

Verwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse

161. *Ishiwatari, N.*, u. *H. Onishi*: Jap. Analyst 11, 576–581 (1962); ref. Z. analyt. Chem. 199, 136 (1964).
162. *Iwamoto, T.*: Bull. Chem. Soc. Japan 34, 605 (1961).
163. *Iwantscheff, G.*: Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse, Weinheim/Bergstr. 1958.
164. *Jackwerth, E.*: Arch. Pharm., Berlin, 295, 779 (1962).
165. *Janousek, I.*: Coll. czech. chem. Com. 27, 2972–2975 (1962); ref. Z. analyt. Chem. 208, 147 (1965).
166. *Jennings, J. S.*, *E. Sharratt* u. *W. Wardlaw*: J. chem. Soc. 1935, 818 bis 822.
167. *Kaiser, H.*, u. *H. Specker*: Z. analyt. Chem. 149, 46–66 (1956).
168. *Kammori, O.*, *I. Taguchi* u. *R. Komiya*: Jap. Analyst 14, 106–111 (1965).
169. — u. *K. Yoshikawa*: Jap. Analyst 14, 111–115 (1965).
170. *Kassner, J. L.*, *S. F. Ting* u. *E. L. Grove*: Talanta 7, 269 (1961).
171. *Klooster, H. S. van*: J. Amer. chem. Soc. 43, 746–749 (1921).
172. *Kocher, J.*: Chim. analyt. (Paris) 44, 161 (1962).
173. *Komarowsky, A. S.*, u. *I. M. Korenman*: Z. analyt. Chem. 94, 247–249 (1933).
174. *Kortüm, G.*: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie. Springer-Verlag: Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955.
175. *Kovacs, E.*, u. *H. Guyer*: Chimia 13, 164 (1959).
176. *Kreimer, S. E.*, *A. S. Lomekhov* u. *A. V. Stogova*: Ž. anal. Chim. 17, 674 bis 677 (1962).
177. *Krishen, A.*, u. *H. Freiser*: Anal. Chem. 31, 923 (1959).
178. *Kuehn, P. R.*, *O. H. Howard* u. *C. W. Weber*: Anal. Chem. 33, 740–744 (1961).
179. *Kunstmann, F. H.*, u. *E. F. E. Müller*: Analyst 84, 324–325 (1959); ref. Z. analyt. Chem. 173, 242 (1960).
180. *Kulejnikov, A. F.*: Zavodskaja Laborat. 24, 1050–52 (1958); ref. Z. analyt. Chem. 168, 359 (1959).
181. *Kuznecov, V. I.*, *J. A. Bankovskij* u. *A. F. Ievins*: Ž. anal. Chim. 13, 267–273 (1958).
182. — *L. M. Budanova* u. *T. V. Matrosova*: Zavodskaja Laborat. 22, 406 bis 412 (1956); ref. Z. analyt. Chem. 154, 361 (1957).
183. — u. *I. V. Nikol'skaja*: Zavodskaja Laborat. 26, 266–269 (1960); ref. Z. analyt. Chem. 187, 140 (1962).
184. *Lai, T. T.*, u. *T. L. Chang*: J. Chin. chem. Soc.; Ser. 2, 6, 106–117 (1960); ref. Z. analyt. Chem. 192, 314 (1963).
185. *Lapin, L. N.*, u. *W. E. Kill*: Z. f. Hyg. 112, 719 (1931); ref. Z. analyt. Chem. 92, 128 (1933).
186. *Lavollay, M. J.*: Bull. Soc. Chim. biol. 17, 432 (1937).
187. *Ley, H.*: Z. Elektrochem. 10, 954–956 (1904).
188. *Liebhafsky, H. A.*, u. *E. H. Winslow*: J. Amer. chem. Soc. 60, 1776 bis 1784 (1938).
189. *Lott, P. F.*, *K. L. Cheng* u. *B. C. H. Kwan*: Anal. Chem. 32, 1702–1704 (1960).
190. *Luke, C. L.*: Anal. Chem. 28, 1276–1279 (1956).
191. — Anal. Chem. 31, 904–906 (1959).
192. — Anal. Chem. 31, 1783–1785 (1959).
193. — u. *K. C. Braun*: Anal. Chem. 24, 1120–1126 (1952).
194. — u. *M. E. Campbell*: Anal. Chem. 24, 1056–1057 (1952).
195. *Lukjanov, V. F.*, u. *E. P. Duderova*: Ž. anal. Chim. 16, 60–62 (1961).

196. — u. *E. M. Knjazeva*: *Ž. anal. Chim.* 16, 248—249 (1961).
197. *Lukin, A. M., K. A. Smirnova* u. *G. B. Zavarikhina*: *Ž. anal. Chim.* 18, 444—449 (1963).
198. — *G. B. Zavarikhina* u. *N. S. Sysoev*: U.S.S.R.-Patent 110966; ref. C. A. 52, 13546 g (1958).
199. *Madera, J.*: *Anal. Chem.* 27, 2003—2004 (1955).
200. *Maech, W. J., M. E. Kussy* u. *J. E. Rein*: *Anal. Chem.* 33, 237—238 (1961).
201. *Malat, M.*: *Naturw.* 48, 569 (1961).
202. — *Z. analyt. Chem.* 186, 418—423 (1962).
203. — *Z. analyt. Chem.* 187, 404—409 (1962).
204. — *Z. analyt. Chem.* 201, 262—267 (1964).
205. *Malissa, H.* u. *S. Gomisek*: *Z. analyt. Chem.* 169, 401—404 (1959).
206. *Majumdar, A. K.*, u. *C. P. Savariar*: *Anal. chim. acta* 21, 53—57 (1959).
207. — *Anal. chim. acta* 21, 146—150 (1959).
208. — *Anal. chim. acta* 21, 584—587 (1959).
209. — *Anal. chim. acta* 22, 158—162 (1960).
210. *Margerum, D. W.*, u. *C. V. Banks*: *Anal. Chem.* 26, 200—202 (1954).
211. *Martell, A. E.*: *Experientia* [Basel], Suppl. 9, 52—64 (1964).
212. — u. *M. Calvin*: *Die Chemie der Metallchelativverbindungen*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1958.
213. *Megregian, S.*: *Anal. Chem.* 26, 1161—1166 (1954).
214. *Meloan, C. E.*, *P. Holkeboer* u. *W. W. Brandt*: *Anal. Chem.* 32, 791—793 (1960).
215. *Merritt, L. L.*, u. *J. K. Walher*: *Ind. eng. Chem.*; *analyt. Edit.* 16, 387 bis 389 (1944).
216. *Meyer, S.*, u. *O. G. Koch*: *Z. analyt. Chem.* 179, 175—186 (1961).
217. *Miller, D. O.*, u. *J. H. Yoe*: *Talanta* 7, 107—116 (1960).
218. *Minczewski, J.*, u. *U. Stolarczyk*: *Chem. analit.* (Warszawa) 6, 887 (1961); ref. *Z. analyt. Chem.* 193, 287 (1963).
219. *Moeller, T.*: *Ind. eng. Chem.*; *analyt. Edit.* 15, 346—349 (1943).
220. *Molot, L. A.*, u. *L. M. Kulberg*: *Z. anal. Chim.* 11, 198—204 (1956).
221. *Monnier, D.*, u. *W. Haerdi*: *Anal. chim. acta* 20, 444—455 (1959).
222. *Morgan, G. T.*, u. *H. D. K. Drew*: *J. chem. Soc.* 117, 1456—1465 (1920).
223. *Morrison, G. H.*: *Anal. Chem.* 22, 1388—1393 (1950).
224. *Motojima, K.*, u. *H. Hashitani*: *Japan. Analyst* 9, 151—161 (1960); ref. *Z. analyt. Chem.* 178, 49—50 (1960).
225. *Mukherji, u. A. K. Dey*: *Mikrochim. acta* 1958, 736—743.
226. *Mussakin, A. P.*: *Z. analyt. Chem.* 105, 351—361 (1936).
227. *Nakamura, H.*, *Y. Shimura* u. *R. Tsuchida*: *Bull. Chem. Soc. Japan* 34, 1143 (1961).
228. *Nazarenko, V. A.*, u. *E. A. Birjuk*: *Ukrain chim. Ž.* 29, 198—204 (1963); ref. *Z. analyt. Chem.* 200, 318 (1964).
229. — u. *N. V. Lebedeva*: *Ž. anal. Chim.* 11, 560—565 (1956); ref. *Z. analyt. Chem.* 157, 115 (1957).
230. — u. *R. V. Ravickaja*: *Zavodskaja Laborat.* 24, 9—13 (1958); ref. *Z. analyt. Chem.* 166, 205 (1959).
231. — u. *L. I. Vinarova*: *Z. anal. Chim.* 18, 1217—1221 (1963).
232. *Nemodruk, A. A.*, u. *L. P. Gluchova*: *Ž. anal. Chim.* 18, 93—98 (1963).
233. — *Y. P. Novikov, A. M. Lukin* u. *I. D. Kalinina*: *Ž. anal. Chim.* 16, 292—296 (1961).
234. *Newman, L.*, u. *P. Klotz*: *J. Phys. Chem.* 65, 796—800 (1961).
235. *Nielsch, W.*: *Z. analyt. Chem.* 140, 267—271 (1953).

236. — *Z. analyt. Chem.* **142**, 30—35 (1954).
237. *Nikitina, E. I.*: *Zavodskaja Laborat.* **27**, 663—666 (1961); ref. *Z. analyt. Chem.* **189**, 306 (1962).
238. *Norwitz, G.*, u. *M. Codell*: *Anal. Chem.* **25**, 1437—1438 (1953).
239. *MacNulty, B. J.*, u. *L. D. Woollard*: *Anal. chim. acta* **14**, 452—456 (1956).
240. *Oelschläger, W.*: *Z. analyt. Chem.* **174**, 243—254 (1960).
241. *Okac, A.*, u. *M. Vrchlabsky*: *Z. analyt. Chem.* **182**, 425—427 (1961).
242. *Onishi, H.*: *Jap. Analyst* **12**, 1153—1155 (1963); ref. *Z. analyt. Chem.* **212**, 340 (1965).
243. — u. *C. V. Banks*: *Anal. chim. acta* **29**, 240—248 (1963).
244. — u. *N. Ishiwatari*: *Talanta* **8**, 753—757 (1961).
245. *Osman, V. A.*, u. *V. M. Volkov*: *Zavodskaja Laborat.* **27**, 1341—1343 (1961); ref. *Z. analyt. Chem.* **193**, 142 (1963).
246. *Ota, K.*: *Jap. Analyst* **5**, 3—7 (1956); ref. *Z. analyt. Chem.* **157**, 460 (1957).
247. *Otomo, M.*: *Bull. chem. Soc. Japan* **36**, 137—140 (1963); ref. *Z. analyt. Chem.* **202**, 288 (1964).
248. — *Bull. chem. Soc. Japan* **36**, 1577—1581 (1963); ref. *Z. analyt. chem.* **212**, 342 (1965).
249. — *Jap. Analyst* **14**, 45—52 (1965).
250. *Owenston, T. C. J.*, u. *C. A. Parker*: *Anal. chim. acta* **4**, 142—152 (1950).
251. — — u. *C. G. Hatchard*: *Anal. chim. acta* **6**, 7—22 (1952).
252. *Parker, C. A.*, u. *A. P. Goddard*: *Anal. chim. acta* **4**, 517—535 (1950).
253. *Parry, R. W.*: in: *Bailer, J. C. jr.*, u. *D. H. Busch*: *The Chemistry of the Coordination Compounds* S. 220—252, New York 1956.
254. *Peshkova, V. M.*, u. *C. V. Am*: *Vestnik Moscov, Univ. Ser. II* **15**, 59 (1960); ref. *Anal. Chem.* **34**, 66 R (1962).
255. — *V. M. Bochkova* u. *E. K. Astakhova*: *Ž. anal. Chim.* **16**, 596—598 (1961).
256. — — u. *L. I. Lazareva*: *Ž. anal. Chim.* **15**, 610—613 (1960).
257. — *V. I. Shlenskaya* u. *S. S. Sokolov*: *Trudy Kom. analit. Chim.* **11**, 328 (1960).
258. *Pfeiffer, P.*: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **63**, 1811—1816 (1930).
259. — *Angew. Chem.* **53**, 93—98 (1940).
260. — *Naturwiss.* **35**, 190—191 (1948).
261. *Pfeifer, V.*, u. *F. Hecht*: *Z. analyt. Chem.* **177**, 175—185 (1960).
262. *Pfeiffer, P.*, u. *E. Lübbe*: *J. prakt. Chem.* [2] **136**, 321—328 (1933).
263. *Phillips, J. P.*: *Chem. Rev.* **56**, 271—297 (1956).
264. *Pietsch, R.*: *Mikrochim. acta* **1962**, 37—47.
265. — u. *P. Ludwig*: *Mikrochim. acta* **1964**, 1082—1088.
266. — u. *E. Pichler*: *Mikrochim. acta* **1961**, 914—922.
267. — — *Mikrochim. acta* **1962**, 954—958.
268. — — *Z. analyt. Chem.* **190**, 319—325 (1962).
269. *Pitipenko, A. T.*, u. *N. V. Ulko*: *Ž. anal. Chim.* **10**, 299—304 (1955).
270. *Podizaynova, V. H.*: *Trudy Kom. analit. Chim.* **11**, 146 (1960).
271. *Pollard, F. H.*, *P. Hanson* u. *W. J. Geary*: *Anal. chim. acta* **20**, 26—31 (1959).
272. *Poskanzer, A. M.*, u. *B. M. Foreman jr.*: *J. Inorg. Nucl. Chem.* **16**, 323—336 (1961).
273. *Potter, G. V.*, u. *C. E. Armstrong*: *Anal. Chem.* **20**, 1208—09 (1948).
274. *Poulsen, I.*, u. *J. Bjerrum*: *Acta chim. scand.* **9**, 1407—1420 (1955).

275. *Prajsnar, D.*: Chem. analit. (Warszawa) 7, 861–862 (1962); ref. Z. analyt. Chem. 199, 58 (1964).
276. — Chem. analit. (Warszawa) 8, 71–74 (1963); ref. Z. analyt. Chem. 206, 211 (1964).
277. *Priyadarshini, U.*, u. *S. G. Tandon*: Analyst 86, 544–547 (1961); ref. Z. analyt. Chem. 191, 289 (1962).
278. *Pshenitsyn, N. K.*, u. *O. M. Ivonina*: Zovodskaja Laborat. 24, 1185 (1962).
279. *Püschel, R.*: Mikrochim. acta 1960, 344–351.
280. *Purushottam, A.*: Z. analyt. Chem. 145, 245–248 (1955).
281. *Rachwitz, W.*: Dissertation, TH Hannover 1962.
282. *Revinson, D.*, u. *J. H. Harley*: Anal. Chem. 25, 794–797 (1953).
- 282a *Richter, F.*: Z. analyt. Chem. 126, 426–452 (1943)
283. — Chem. Tech. (Berlin) 1, 84–90 (1949).
284. *Rienäcker, G.*: Z. analyt. Chem. 88, 29–38 (1932).
285. *Rigg, T.*, u. *H. A. Wagenbauer*: Anal. Chem. 33, 1347–1349 (1961).
286. *Rinck, E.*, u. *P. Feschotte*: Bull. Soc. chim. France 1957, 230–234; ref. Z. analyt. Chem. 158, 286 (1957).
287. *Rinehart, R. W.*: Anal. Chem. 26, 1820–1822 (1954).
288. *Rooney, R. C.*: Metallurgia [Manchester] 62, 175–180 (1960).
289. *Rosotte, M. R.*, u. *E. Jaudon*: Anal. chim. acta 6, 149–156 (1952).
290. *Ross, W. J.*, u. *J. C. White*: Anal. Chem. 33, 421–424 (1961).
291. *Saisho, H.*: Bull. chem. Soc. Japan 34, 859–861 (1961); ref. Z. analyt. Chem. 191, 447 (1962).
292. *Sandell, E. B.*: Colorimetric Determination of Traces of Metals. New York und London 1959.
293. — u. *D. C. Spindler*: J. Amer. chem. Soc. 71, 3806–3808 (1949).
294. *Savvin, S. B.*: Dokl. Akad. Nauk SSSR 127, 1231–1234 (1959); ref. Z. analyt. Chem. 174, 439 (1960).
295. — Talanta 8, 673–685 (1961).
296. — Ž. anal. Chim. 17, 785–795 (1962); ref. Z. analyt. Chem. 198, 288 (1963).
297. — *Y. M. Dedkov* u. *V. P. Makarova*: Ž. anal. Chim. 17, 43–47 (1962).
298. *Sawtschenko, P. S.*: Zavodskaya Lab. 2, 23 (1933).
299. *Saywell, L. G.*, u. *B. B. Cunningham*: Ind. eng. Chem.; analyt. Edit. 9, 67–69 (1937).
300. *Scharrer, K.*: Z. analyt. Chem. 128, 435–442 (1948).
301. *Schilt, A. A.*: Anal. Chem. 30, 1409–1411 (1958).
302. *Schneider, W. A. jr.*, u. *E. B. Sandell*: Mikrochem. 1954, 263–268.
303. *Schwarzenbach, G.*: Chimia [Buenos Aires] 3, 1. (1949).
304. — Helv. chim. acta 35, 2344–2359 (1952).
305. — Adv. Inorg. Chem. Radiochem. 3, 257–285 (1961).
306. *Sekido, E.*, *Q. Fernando* u. *H. Freiser*: Anal. Chem. 35, 1550 (1963).
307. *Sheyanova, F. R.*, *A. G. Airapetyan*, *S. A. Ryabova* u. *V. M. Ryabov*: Trudy Chim. i Chim. Technol. 2, 410 (1959); ref. C. A. 55, 11184 (1961).
308. *Shibata, S.*: Anal. chim. acta 23, 367–369 (1960).
309. — Anal. chim. acta 25, 348–359 (1961).
310. *Silaeva, E. V.*, u. *V. I. Kurbatova*: Zavodskaja Laborat. 27, 1462–1464 (1961); ref. Z. analyt. Chem. 193, 73 (1963).
311. *Silverman, L.*, u. *M. E. Shideler*: Anal. Chem. 31, 152–155 (1959).
312. *Singer, E.*, u. *M. Matucha*: Z. analyt. Chem. 191, 248–253 (1962).
313. *Skraup, Z. H.*: Mh. Chem. 4, 695–699 (1883).
314. *Smith, G. F.*: Anal. Chem. 26, 1534–1538 (1954).

Verwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse

315. — u. *W. H. McCurdy jr.*: *Anal. Chem.* **24**, 371—373 (1952).
316. — — u. *H. Diehl*: *Analyst* **77**, 418—422 (1952).
317. *Smith, W. H., E. E. Sager u. I. J. Siewers*: *Anal. Chem.* **21**, 1334—1338 (1949).
318. *Smith, G. F., u. D. H. Wilkins*: *Anal. Chem.* **25**, 510—511 (1953).
319. *Snell, F. D., C. T. Snell u. C. A. Snell*: *Colorimetric Methods of Analysis*. New York 1959.
320. *Socolovschi, R.*: *Rev. Chim. (Bucarest)* **2**, 737—738 (1961); *ref. Z. analyt. Chem.* **193**, 290 (1963).
321. *Somidevamma, G., u. G. Gopala Rao*: *Z. analyt. Chem.* **187**, 183—187 (1962).
322. *Sommer, L.*: *Z. analyt. Chem.* **164**, 299—309 (1958).
323. — *Chem. Listy* **52**, 1485—1500 (1958); *ref. Z. analyt. Chem.* **171**, 215 (1959/60).
324. — *Z. analyt. Chem.* **171**, 410—420 (1959/60).
325. — *Z. analyt. Chem.* **187**, 7—16 u. 263—274 (1962).
326. — *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **27**, 2212—2216 (1962); *ref. Z. analyt. Chem.* **197**, 445 (1963).
327. — *Talanta* **9**, 439—447 (1962).
328. *Specker, H., H. Hartkamp u. M. Kuchtner*: *Z. analyt. Chem.* **143**, 425 bis 431 (1954).
329. — *E. Jackwerth u. H. Hartkamp*: *Z. analyt. Chem.* **159**, 165—182 (1958).
330. *Spike, C. G., u. R. W. Parry*: *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2726—29 u. 3770 bis 3772 (1953).
331. *Spicer, G. S., u. J. D. H. Strickland*: *J. chem. Soc.* **1952**, 4644—4650.
332. *Stary, J.*: *Anal. chim. acta* **28**, 132—149 (1963).
333. — u. *E. Hladky*: *Anal. chim. acta* **28**, 227—235 (1963).
334. — u. *J. Smizanska*: *Anal. chim. acta* **29**, 545—551 (1963).
335. *Steinbach, J. F., u. H. Freiser*: *Anal. Chem.* **25**, 881—884 (1953).
336. — — *Anal. Chem.* **26**, 375—379 (1954).
337. *Stevens, H. M.*: *Anal. chim. acta* **20**, 389—396 (1959).
338. *Sugawara, K., u. S. Kanamori*: *Bull. chem. Soc. Japan* **34**, 258—261 (1961); *ref. Z. analyt. Chem.* **192**, 335 (1963).
339. *Suk, V., I. Nemcova u. M. Malat*: *Coll. Czech. Chem. Com.* **30**, 2538 bis 2543 (1965).
340. — u. *M. Smetanova*: *Coll. Czech. Chem. Com.* **30**, 2532—2537 (1965).
341. *Suzuki, N., u. H. Yoshida*: *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.* **80**, 1005 (1959).
342. *Svach, M.*: *Z. analyt. Chem.* **149**, 325—328 (1956).
343. — *Z. analyt. Chem.* **149**, 414—416 (1956).
344. — *Z. analyt. Chem.* **149**, 417—419 (1956).
345. *Swank, H. W., u. M. G. Mellon*: *Ind. eng. Chem.; analyt. Edit.* **9**, 406 bis 409 (1937).
346. *Tanaka, M., u. H. Morikawa*: *Jap. Analyst* **10**, 396—400 (1961); *ref. Z. analyt. Chem.* **189**, 286 (1962).
347. *Tandon, S. G., u. S. C. Bhattacharyya*: *Anal. Chem.* **33**, 1267—1270 (1961).
348. *Thaler, H., u. F. H. Mühlenberger*: *Z. analyt. Chem.* **144**, 241—256 (1955).
349. *Thiel, A., u. E. van Hengel*: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **71**, 1157—1162 (1938).
350. — u. *O. Peter*: *Z. analyt. Chem.* **103**, 161—166 (1935).
351. *Thierig, D., u. F. Ümland*: *Z. analyt. Chem.* **217**, 161—169 (1965).

352. — Z. analyt. Chem. 215, 24—30 (1966).
 353. — Z. analyt. Chem. im Druck (1966).
 354. *Thrun, W. E.*: Anal. Chem. 22, 918—920 (1950).
 355. *Tomic, E. A.*, u. *J. L. Bernard*: Anal. Chem. 34, 632—635 (1962).
 356. *Tschugaeff, L. A.*: Z. anorg. Chem. 46, 144—169 (1905).
 357. — Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 3190—3201 (1906).
 358. — J. prakt. Chem. [2] 75, 153—168 (1907).
 359. *Tsuchiya, Y.*: Jap. Analyst 9, 934—939 (1960); ref. Z. analyt. Chem. 185, 136 (1962).
 360. *Umamoto, S.*: Bull. chem. Soc. Japan 29, 845—852 (1956); ref. Z. analyt. Chem. 157, 354 (1957).
 361. *Umland, F.*: Z. analyt. Chem. 190, 186—208 (1962).
 362. — u. *W. Hoffmann*: Anal. chim. acta 17, 234—246 (1957).
 363. — Z. analyt. Chem. 168, 268—283 (1959).
 364. — u. *K.-U. Meckenstock*: Z. analyt. Chem. 165, 161—179 (1959).
 365. — Z. analyt. Chem. 170, 96—110 (1960).
 366. — Z. analyt. Chem. 177, 244—265 (1960).
 367. — *B. K. Poddar* u. *K.-U. Meckenstock*: Z. analyt. Chem. 185, 362—372 (1962).
 368. — u. *H. Stegemeyer*: Z. analyt. Chem. 216, 125—150 (1966).
 369. — u. *D. Thierig*: Z. analyt. Chem. 197, 151—160 (1963).
 370. — u. *G. Müller*: Z. analyt. Chem. 215, 401—406 (1966).
 371. — u. *F. G. Weyer*: Klin. Wochenschr. 33, 237—38 (1955).
 372. — u. *G. Wünsch*: Z. analyt. Chem. 213, 186—194 (1965).
 373. *Underhill, F. P.*, u. *F. I. Peterman*: Amer. J. Physiol. 90, 1—14 (1929); ref. Chem. Zentralbl. 101, I, 109 (1930).
 374. *Ungar, J.*: Chem. and Ind. 1954, 453—454; ref. Z. analyt. Chem. 145, 230 (1955).
 375. *Valach, R.*: Talanta 8, 443—444 (1961).
 376. — Talanta 9, 341—348 (1962).
 377. *Vogel*: Schweigger's Journal 18, 212. (1815); ref. J. prakt. Chem. (N.F.) 2, 86—98 (1870).
 378. *Volodarshkaja, R. S.*, u. *G. N. Derevjanko*: Zavodskaja Laborat. 29, 148 bis 149 (1963); ref. Z. analyt. Chem. 206, 210 (1964).
 379. *Vydra, F.*, u. *M. Kopanica*: Chemist-Analyst 52, 88—90 u. 92—94 (1963).
 380. — u. *V. Markova*: Z. analyt. Chem. 192, 347—350 (1963).
 381. — u. *R. Pribil*: Talanta 3, 72—80 (1959).
 382. *Walter, J. L.*, u. *H. Freiser*: Anal. Chem. 26, 217—221 (1954).
 383. *Weitz, E.*: Z. Elektrochem. 47, 65—73 (1941).
 384. *Werner, A.*: Ber. dtsh. chem. Ges. 34, 2584—2593 (1901).
 385. *West, T. S.*: Metallurgia [Manchester] 53, 91—96, 132—134, 185—188, 233—236, 240 (1956); ref. Z. analyt. Chem. 153, 281 (1956).
 386. — Metallurgia [Manchester] 53, H. 320, 292—294, H. 321, 47—51, H. 322 und 103—106 (1956); ref. Z. analyt. Chem. 155, 283 (1957).
 387. *Whealy, R. D.*, u. *S. O. Colgate*: Anal. Chem. 28, 1897—1898 (1956).
 388. *Will, F.*, u. *J. H. Yoe*: Anal. chim. acta 8, 546—557 (1953).
 389. *Willard, H. H.*, u. *H. C. Fogg*: J. Amer. chem. Soc. 59, 40—45 (1937).
 390. *Wilson, A. L.*: Analyst 87, 884 (1962).
 391. *Wise, W. M.*, u. *W. W. Brandt*: Anal. Chem. 27, 1392—1395 (1955).
 392. *Wright, D. L.*, *J. H. Holloway* u. *Ch. N. Reilley*: Anal. Chem. 37, 884 bis 892 (1965).

Verwendung von Chelaten in der photometrischen Analyse

393. *Yamamura, S. S., M. A. Wade u. J. H. Sikes*: Anal. Chem. *34*, 1308 bis 1312 (1962).
394. *Yoe, J. H.*: J. Amer. chem. Soc. *54*, 4139–4143 (1932).
395. — Anal. Chem. *29*, 1246–51 (1957).
396. — u. *W. L. Hill*: J. Amer. chem. Soc. *49*, 2395–2407 (1927).
397. — — J. Amer. chem. Soc. *50*, 748–755 (1928).
398. — u. *A. L. Jones*: Ind. eng. Chem.; analyt. Edit. *16*, 111–115 (1944).
399. *Yoshida, H.*: Jap. Analyst. *13*, 203–206 (1964); ref. Z. analyt. Chem. *212*, 442 (1965).
400. *Young, J. P., I. R. French u. J. C. White*: Anal. Chem. *30*, 422–425 (1958).
401. *Young, R. S., E. T. Pinkney u. R. Dick*: Ind. eng. Chem.; analyt. Edit. *18*, 474–476 (1946).
402. *Young, J. P., J. C. White u. R. G. Ball*: Anal. Chem. *32*, 928–930 (1960).
403. *Zarovskij, F. G., u. A. T. Pilipenko*: Zavodskaja Laborat. *23*, 1407 bis 1410 (1957); ref. Z. analyt. Chem. *166*, 145 (1959).
404. *Zatkovskij, F. V., u. L. I. Gerhardt*: Ž. anal. Chim. *13*, 274–279 (1958); ref. Z. analyt. Chem. *166*, 366 (1959).
405. *Ziegler, M., u. O. Glemser*: Z. analyt. Chem. *139*, 92–96 (1953).
406. — — Angew. Chem. *68*, 522 u. 620 (1956).
407. — — u. *A. v. Baeckmann*: Z. analyt. Chem. *160*, 324–332 (1958).
408. — — u. *N. Petri*: Z. analyt. Chem. *154*, 170–182 (1957).
409. — — — Mikrochim. acta *1957*, 215–224.
410. *Zimmermann, M.*: Photometrische Metall- und Wasseranalysen; Stuttgart 1961.

(Eingegangen am 16. Mai 1966)

Sonderfälle aus dem Gebiet der Säulen-Chromatographie

Dipl.-Chem. G. Wohlleben

i. Fa. M. Woelm, Adsorbenzien - Abteilung, Eschwege

Inhaltsübersicht

I. Einleitung	640
II. Veränderungen im Sorptionsmilieu	640
III. Spezielle Säulenfüllungen und Einsätze	644
IV. Geräte und Zubehör	653
Literatur	654

I. Einleitung

Die Anfänge der Säulen-Chromatographie sind jetzt etwa 60 Jahre alt. In der zweiten Hälfte dieses Zeitraums hat sie sich zu einer anerkannten und sehr leistungsfähigen Methode entwickelt. Das Grundprinzip ist bekannt: man bedient sich einer Säulenfüllung aus anorganischem oder organischem Sorptionsmittel (stationäre Phase) und eluiert die Bestandteile eines in Lösung aufgegebenen Substanzgemischs mit einem Solvens (mobile Phase). Während die mobile Phase ausschließlich flüssig ist, kann die stationäre Phase fest oder flüssig sein.

Die allgemeinen Arbeitsregeln sind geläufig (74), doch wurden für spezielle Trennungen gelegentlich Arbeitsbedingungen ausgearbeitet, die ein breiteres Interesse verdienen.

Als chromatographische Trenntechnik betrachtet *Pfann* (47a) in einer kleinen Studie sogar das Zonenschmelzen. Wir haben es hierbei mit dem Phasengleichgewicht flüssig-fest zu tun, und der Vorschub der flüssigen Zone zu Reinigungs- bzw. Trennzwecken läßt einen Vergleich aufkommen. Im speziellen Fall des Zonentrennens werden außerdem ein reiner Stoff und die Schmelzzone, die vorerst alle Komponenten enthält, vorgelegt. Durch die Wahl einer Zusatzkomponente (mit günstigen Lösungseigenschaften für die Gemischkomponenten), die auch leicht wieder entfernbar sein muß, ähnelt das Verfahren der Extraktion oder der Chromatographie, worauf auch *Schildknecht* (55) hinwies.

II. Veränderungen im Sorptionsmilieu

Störungen in chromatographischen Trennsäulen treten häufig infolge von Artefaktbildungen auf, worüber *Hesse* (28) kürzlich zusammenfassend berichtete. Um solche Störungen zu vermeiden oder um eine vollständige

Trennung überhaupt erst zu erreichen, wurden des öfteren Versuche in einem völlig substanzfremden Adsorptionsmilieu durchgeführt. Hierunter sind auch die Verwendung bisher nicht oder selten gebrauchter Sorptions- und Lösungsmittel wie auch Veränderungen in der apparativen Ausrüstung, beispielsweise zur Erzielung von Lösungsmittelgradienten, zu verstehen. Einige solche Sonderfälle sollen hier genannt werden, da sie zu analogem Vorgehen anregen können. Die Arbeitsweisen kommen aber naturgemäß erst dann in Frage, wenn die bei der Säulen-Chromatographie üblichen Variationsmöglichkeiten (Milieu-Schwächung, pH-Änderung, Temperaturänderung, Lichtausschluß, Schutzgas usw.) voll ausgeschöpft sind.

Trotz einheitlichen (Ausgangs-)Materials erscheinen bei der Chromatographie gelegentlich Mehrfachzonen, was theoretisch unmöglich erscheint. *Keller* und *Giddings* (37) berichteten über entspr. Beispiele und diskutieren verschiedene Ursachen. So sind Stoffveränderungen vor und während der Trennung denkbar. Eine Rechromatographie einzelner Zonen kann meist Aufschluß über die möglichen Ursachen bringen.

Das Problem der Zonenschärfen bzw. irregulärer Zonenfronten wurde schon vielfach untersucht, und es fehlt nicht an Vorschlägen zur apparativen Abhilfe. *Hagdahl* (25) benutzt eine unterteilte Säule, bei der die untereinander angeordneten Einheiten jeweils einen kleineren Durchmesser besitzen.

Für ein zeitsparendes Arbeiten mit größeren Säulen empfehlen auch *Teranishi* und *Mon* (61) die Unterteilung, aber ohne dabei den Querschnitt zu ändern. Über der nachfolgenden Säule steht jeweils eine kleine Menge Lösungsmittel, die zunächst das Eluat der Vorsäule verdünnt. Auf diese Weise können sehr große Säulen für präparative Arbeiten benutzt werden, ohne daß infolge zu großen Gewichts die Säulen zusammensintern und so den Säulendurchfluß hindern.

Wenn in der Arbeit davon gesprochen wird, daß die Adsorptionswärme stark adsorbierter Substanzen zu Schwierigkeiten führen kann, so konnte zur Abhilfe nur eine geeignete Desaktivierung des Adsorbens und sorgfältige Abstufung von Solvens zu Solvens empfohlen werden. Es sei hier auf Untersuchungen von *Hesse* und *Engelhardt* (29) über Temperatureinflüsse auf die Zonenprofile hingewiesen. Als Ursache für deren Durchhängen in der Mitte wird die im Vergleich zur Säulenwandung langsamere Abführung der Adsorptionswärme im Säuleninnern festgestellt. Außerdem wird im Säuleninnern die Viskosität des Solvens verringert, d.h. der Zonenprofilfehler durch schnelleres Fließen verstärkt (schnelleres Eluieren und verringerte Aktivität des Adsorbens). Die Störung, die mit dem Säulendurchmesser, der Fließgeschwindigkeit und dem Abstand vom Säulenkopf wächst, verschwindet bei guter Wärmeiso-

lierung der Säule. Dann bleibt die Temperatur über den ganzen Querschnitt konstant. Auf eine unregelmäßige Packung der Säule ist das irreguläre Zonenprofil hier also nicht zurückzuführen.

Chromatographische Trennungen bei höheren Temperaturen wurden bereits verschiedentlich durchgeführt, und zwar meist bei schwer löslichen Substanzen. Entgegen der sonstigen chromatographischen Übung wird das Substanzgemisch dabei auch in fester Form auf den Säulenkopf gebracht und eine selektive Extraktion mit der Chromatographie gekoppelt. Dabei kann man das Elutionsmittel auch im Kreislauf führen, wenn das Eluat kontinuierlich konzentriert bzw. zur Trockne gebracht wird. Vgl. hierzu die Arbeiten von *Meier* und *Fletschinger* (42), *Glemser* und Mitarb. (23) sowie *Terres* und *Hahn* (62). *Purr* (49) bedient sich bei der Chromatographie unter erhöhter Temperatur der Reversed-Phase-Chromatographie: die weniger polare organische Phase (flüssiges Paraffin) ist stationär auf mit Dichlor-dimethylsilan hydrophobierter Kieselgur festgehalten. Die mobile Phase besteht aus paraffingesättigten Aceton-Wasser-Gemischen.

Temperatureinflüsse wurden bisher nur in der Ionenaustausch-Chromatographie untersucht; vgl. hierzu *Helferich* (27). Eine Prüfung der Vor- und Nachteile einer Adsorptions-Chromatographie bei erhöhter Temperatur (bis 65 °C) unternahmen kürzlich *Hesse* und *Engelhardt* (30), da einzelne Literaturangaben widersprüchlich waren. Sie fanden bei Versuchen an mit 3% Glycerin auf Akt. II desaktiviertem basischem Aluminiumoxid und Xylol als Solvens einen günstigen Einfluß der Temperaturerhöhung auf die Trennschärfe von Azofarbstoffen. Die Retentionsvolumina werden dabei stark vermindert, und zwar so, als würde — bei Raumtemperatur — ein polareres Lösungsmittel angewendet. Bei einer kontinuierlichen Steigerung der Temperatur ergibt sich eine noch vorteilhaftere Trennung. Bei Fließmitteln mit geringer Eigenadsorption kann sonach die Gradientenelution durch eine Temperaturprogrammierung ersetzt werden, deren apparativer Aufwand (Heizmantel) nicht größer ist als für eine Mischkammer mit Rührwerk. Außerdem bleibt das Solvens für eine Wiederverwendung unverändert erhalten (wichtig auch für die physikalische Bandenregistrierung) und ebenso die Säule selbst, die nach dem Erkalten wieder einsatzbereit ist, wenigstens soweit vollständige Elution eingetreten war.

Auch der entgegengesetzte Fall kann nützlich sein: *Hüchel* und *Hornung* (34) beschreiben eine Säulen-Anordnung für eine Tieftemperatur-Chromatographie, um leicht flüchtige Terpene mit kondensierten Gasen (Propan, Propen, Dimethyläther) bei -40 °C und tiefer an Aluminiumoxid chromatographieren zu können. Die Abdampfung des Solvens ist naturgemäß einfach, ohne Verluste bei den isolierten Substanzen hervorzurufen.

Wenn man die Adsorptionskapazität einer Adsorptions-Säule weitgehend ausnützen will, um Adsorbens einzusparen, empfiehlt sich ein ähnliches Vorgehen, da dann die Aktivität höher ist als bei Raumtemperatur. Dies dürfte nicht nur bei leicht flüchtigen Stoffen, sondern u. a. auch bei der Anreicherung von Spurenstoffen wichtig sein.

Die bisher für die Chromatographie polarer Substanzen an Polyamid benutzte *eluotrope Reihe* ist durch *Egger (18)* insofern erweitert worden, als nunmehr auch relativ apolare Lösungsmittel wie Chloroform, allein und in Mischungen, bei einzelnen Stoffklassen gute Ergebnisse zeitigten. Er konnte u. a. zeigen, daß sich die R_F -Werte einer Reihe von Flavonglykosiden umkehrten, wenn man von wäßrigen zu chloroformhaltigen Mischungen mit Methanol und Ketonen überging. Bei zunehmendem Chloroform-Gehalt steigen die R_F -Werte zunächst an und nähern sich aber schließlich dem Wert 0. Selbst auf relativ kurzen Säulen konnte mit chloroformhaltigem Fließmittel eine gute Trennung erreicht werden.

Bei den Aglykonen dagegen bringt der Übergang zu Chloroform ein gutes Auseinanderziehen der zuvor relativ eng beieinanderliegenden Banden. Nach *Egger* sind Trennungen an Polyamid nicht immer durch Wasserstoffbrückenbildung, sondern auch als Verteilungs-Chromatographie mit lipophilen Fließmitteln zu deuten, wobei das gequollene Polyamid die polare stationäre Phase darstellt. Bei verdünntem Alkohol als Fließmittel ist Phasenumkehr anzunehmen, da nunmehr die stationäre Phase weniger polar ist als das Fließmittel.

Veränderungen im Fließmittel einer Säule sind meist nur bei aktiven Adsorbentien bekannt. Aber auch auf Cellulosesäulen kann eine Entmischung eintreten. *Michal* und *Ackermann (43)* berichteten, daß sich Alkohole unterschiedlichen Wassergehaltes je nach dem Feuchtigkeitsgrad des Cellulosepulvers und der Art des Alkohols verschieden verhalten. Bei geringem Wassergehalt wird bevorzugt Alkohol von der Cellulose festgehalten. Von einer Grenzkonzentration ab, die um so höher liegt, je niedriger das Molekulargewicht des Alkohols ist, wird bevorzugt Wasser aufgenommen. Wird diesen Alkoholgemischen noch Salzsäure zugefügt, so wird letztere in allen Fällen an der Säule gebunden.

Auch *Weinberg* und *Keller (68)* befaßten sich mit den Veränderungen in stationärer und mobiler Phase bei Cellulosepulver und stellten an Hand gaschromatographischer Analysen der Eluate fest, daß Fließmittel, die mit Wasser mischbar sind, Wasser aus der stationären Phase waschen können, wenn sie anfangs wasserfrei sind. Mit absolutem Äthanol gewonnene Eluate zeigten etwa 9% Wasser. Etwa 25% der stationären Phase konnten eluiert werden. — Die Eluate aus Papierchromatogrammen zeigten dagegen keinen Wassergehalt, vermutlich wegen der Verdunstung der Lösung vom Papier in der Kammer.

Die Verwendung reiner Lösungsmittel muß aus mehreren Gründen Voraussetzung bei allen Arbeiten sein. Nur zu häufig werden Verunreinigungen als Banden des zu trennenden Substanzgemisches angesehen, wodurch Arbeit und Zeit verloren gehen. Dann erfordert eine sorgfältige Einstellung des Adsorptionsmilieus u. a. auch, daß eine unbeabsichtigte Desaktivierung einer sehr aktiven Säule, die durch Einschleppen von Wasser- oder Alkohol-Spuren möglich ist, unterbleibt. Bei der eluotropen Reihe für sauerstoffhaltige Adsorbentien ist also z. B. auf alkoholfreies Chloroform, absoluten Äther usw. zu achten. Bei der „Elutionsanalyse“ führt der Zusatz eines polaren Solvens zu einer „Verdrängungsanalyse“. Auch bei der Gradientenelution kann es bei Verwendung von sehr verschieden starken Elutionsmedien eher zu einer Verdrängung als zu einer Elution kommen, wodurch die Trennmöglichkeit für schwache Adsorbenden verloren geht. — Nach *Snyder* (57) hat ein schwach konvexer Gradient vor einem linearen Elutionsgradienten nur in Einzelfällen geringe Vorteile.

Andererseits muß bei mit Wasser desaktivierten Adsorbentien ein der jeweiligen Aktivitätsstufe isotonischer Wassergehalt im Fließmittel vorhanden sein, um das Desaktivierungswasser nicht abzulösen. Nach *Hesse* und *Roscher* (31) ist für neutrales Aluminiumoxid diese Abstimmung in der eluotropen Reihe von Benzol abwärts notwendig. So beträgt für Aktivität III der Wasseranteil in Diäthyläther bereits 0,55 %, also fast die Hälfte des zur Sättigung nötigen Wassers. — Für wasserempfindliche Trennsubstanzen empfahlen die Autoren auch Glykol oder Glycerin zur Desaktivierung.

An partiell desaktiviertem Aluminiumoxid mit den Fließmitteln Pentan (mit steigenden Anteilen Äther und Aceton), Äther und Methanol trennten *Sawicki* und Mitarb. (54) mehrkernige aromatische Verbindungen aus sehr komplexen Mischungen (Luft-Schwebstoffe, Kohlenteepech). Das größte Molekül verläßt die Säule zuerst. Heterocyclische Kohlenwasserstoffe, die am aza-Stickstoffatom sterisch behindert sind, werden hierbei bereits vor nicht sterisch behinderten aza-Verbindungen eluiert.

III. Spezielle Säulenfüllungen und Einsätze

Eine „Verteilungs-Chromatographie“ mit Quecksilber als stationärer Phase benutzten *Blaedel* und *Strohl* (8) zur Bestimmung von Tl, Pb, Sn und In. Kleine Platindrahtstückchen dienten als Träger für die stationäre Phase. Sie werden in ein poröses Glasrohr gefüllt. Zwischen diesem und einem äußeren Mantel befindet sich granuliertes Silber mit AgCl als Gegen- elektrode und NaCl-Lösung als Elektrolyt. Um die Entfernung gelegent-

licher Blasen zu erleichtern, wurden die wäßrigen Lösungen der Säule am unteren Ende zugeführt. Die Retentionszeiten sind von dem angewandten Potential abhängig. Das Adsorpt besteht aus dem in der stationären Quecksilber-Phase amalgamierten Metall.

Potentiostatische Chromatographie nennt *Roe* (52) ein sehr ähnliches Verfahren zur kontinuierlichen Verteilung zwischen mobiler Phase und stationärer Elektrode. Letztere besteht hier aus amalgamierten Nickelteilchen, die sich in dem Außenring der zuvor beschriebenen Säule befinden. Im Innenrohr ist ein Gegenelektrodenstab in NaCl-Lösung. — Auch gemahlener Graphit diente als Säulenfüllung.

Für analytische Zwecke könnte die solcherart erreichte Konzentrierung von Spuren reduzierbarer Metallionen aus großen Lösungsmittelmengen nützlich sein.

Polyäthylen als völlig inertes Trägermaterial für die stationäre Phase benutzt *Freytag* (19) bei der Reversed-Phase-Chromatographie von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen. Für diese Stoffe wurden anfänglich bei der Verteilungs-Chromatographie folgende Trennsysteme verwendet: Kieselgel mit Nitromethan als stationäre Phase, Petroläther als mobile Phase. Kieselgel wurde auch durch Kieselgur, Nitromethan durch Acetonitril oder Chloräthanol und Petroläther durch Hexan ersetzt (Literatur bei (19)). Hierbei werden die Carbonyl-Verbindungen mit der größten Anzahl C-Atome zuerst eluiert, doch war die Trennung bei Carbonylen mit einer Kettenlänge $>C_{11}$ mit nur einem C-Atom Differenz nicht mehr vollständig.

Für die Säulenfüllung bewährte sich folgendes Verfahren: Polyäthylen (0,15–0,20 mm) wird unter Heptan mehrere Stunden stehengelassen, dann in die Säule geschlämmt und zusammengedrückt. Das Gemisch für die mobile Phase, z. B. Dioxan-Wasser 3:2, wird durch kurzes Sieden von gelösten Gasen befreit und nach dem Abkühlen mit Heptan gesättigt. Zur Äquilibrierung der Säule gibt man nach Entfernung des über dem oberen Säulenende stehenden Heptans etwas Laufmittel durch die Säule, die nach Verdrängung des Heptans keinerlei Lufteinschlüsse aufweist.

Jetzt ist die stationäre Phase unpolar, die mobile polar, und die Dinitrophenylhydrazone verlassen die Säule in der Reihenfolge ihrer C-Atomzahl. Bei Kettenlängen $>C_{10}$ wird eine gute Trennung mit der mobilen Phase Sulfolan-Dioxan-Wasser 4:2:1 erzielt.

Analog konnten *Freytag* und *Baustian* (20) auch die Ester der 4-Dimethylamino-3,5-dinitrobenzoesäure trennen.

In vielen Fällen gelingen diese Trennungen aber auch an partiell desaktiviertem saurem Aluminiumoxid mit Heptan als Fließmittel.

Bei der Reversed-Phase-Chromatographie wurde Polyäthylen als Träger der stationären weniger polaren Phase (Petroläther) auch von *Winsten* (70) bei der Trennung von fettlöslichen Vitaminen (mobile Phasen: Petroläther/Äthanol/Wasser mit steigendem Wassergehalt) und von *Fritz* und *Hedrick* (21) mit stationärem Cyclohexan bei Phenolen (mobile Phase: wäßrige NaCl-Lösung oder Wasser/Methanol) eingesetzt. Im letztgenannten Fall wird statt Polyäthylen auch Polytetrafluoräthylen benutzt. *Hedrick* (26) setzt letzteres mit Cyclohexan auch für die Trennung aromatischer Amine ein (mobile Phase: Wasser oder Methanol/Wasser).

Gelegentlich wird bei der Reversed-Phase-Chromatographie auch Naturgummi als Träger herangezogen, z.B. von *Vereshchagin* (66). Er trennte polare und unpolare Lipide mit stationärer Phase aus höher siedenden aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Das Fließmittel bestand aus Essigsäure bzw. Aceton/Essigsäure. Hierbei konnte er zeigen, daß der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten von gesättigten und ungesättigten höheren Fettsäuren und der Verteilungskoeffizient von Triglyzeriden lineare Funktionen der Polaritätskonstanten dieser Lipide darstellen. Die Reversed-Phase-Chromatographie bromierter Glyceride macht die Trennung von sonst untrennbaren Triglyzerid-Mischungen möglich.

Polytetrafluoräthylen-Pulver diente *Mikulski* und *Stroński* (44) zur radiochemischen Trennung einiger Metalle durch Verteilungs-Chromatographie mit umgekehrten Phasen. Hierzu wurde es in Benzolsuspension in eine Säule gebracht, gewaschen und mit Tri-n-octylamin imprägniert. Bei sehr langsamer Elution wurden Tropfen auf Polystyrolfolie aufgefangen, getrocknet und die Aktivität mit üblichen Methoden gemessen. Die Chloride von Fe, Zn und Cd wurden aus n-HCl stark adsorbiert, die von Mn, Co, Cu, Ca, Sr und Y laufen durch. Fe wird mit n/100 HCl eluiert, aber Zn und Cd bilden stabile Komplexe.

Eine Entfernung von störenden Pflanzenextraktstoffen bei der Insektizidbestimmung erzielten *Hoskins* und Mitarb. (33) durch eine Säule aus mit Polyäthylen überzogenem Aluminiumoxid und Acetonitril-Wasser-Mischungen als Fließmittel. Zu diesem Zweck wurde Polyäthylen in siedendem Toluol gelöst und Oxid zugefügt, abgekühlt und getrocknet. Insektizide passieren die Säule. Es handelt sich zusätzlich zu einer Filterwirkung um einen Verteilungsvorgang mit umgekehrten Phasen.

Austauscher-Cellulosen gehören schon zur ständigen Ausrüstung eines biochemischen Laboratoriums. *Veder* und *Pascha* (65) befaßten sich mit der chromatographischen Trennung von Fibrinogen und antihämphilem Faktor (AHF) aus menschlichem Plasma, wozu sie neben DEAE-

Cellulose vor allem ECTEOLA-Cellulose benutzten. Um bessere und reinere Ausbeuten an AIIF zu erzielen, untersuchten sie den chromatographischen Trennvorgang genauer und fanden, daß Cellulose-Anionenaustauscher bei der Regeneration mit Alkali dahin tendieren, Hydroxylionen während der Äquilibration mit neutralen Puffern beharrlich festzuhalten. Beim Wechsel von einem zum anderen Anion, z.B. bei der Verdrängungs-Chromatographie, kann ein pH-Anstieg resultieren.

Auch die Molekularsieb-Fraktionierung oder Gel-Filtration an quervernetzten Dextran-Gelen (Polysaccharidketten-Netzwerk) mit verschiedenen Ausschlußgrenzen hat heute bei biochemischen Arbeiten ihren festen Platz, zunächst zur Fraktionierung nach dem Molekulargewicht (auch bei synthetischen Polymerisaten), dann aber auch zur Verteilungs-Chromatographie, auch mit umgekehrten Phasen. Vgl. hierzu *Determann (15)*. Auch Ionenaustauscher auf dieser Basis sind verfügbar.

Mit Dextran-Gel konnten *Wieland und Bende (69)* im 100-mg-Maßstab Gemische der diastereomeren Alanyl-tyrosine, Valyl-tyrosine, Alanyl-phenylalanine und Methionyl-alanine in Pyridin/Wasser glatt in die L-L-Formen und D-L-Formen trennen.

Zeleznick (76) benutzte das Verfahren zur Trennung von Zuckern, Aminosäuren usw. mit für diese Substanzen auch bei der Papier-Verteilungs-Chromatographie üblichen Fließmitteln. Allerdings wurde bei den langsameren Zucker-Komponenten eine Schwanzbildung bemerkt, die bei guter Trennung diffuse Peaks ergab. Die Elutionsfolge ist die gleiche wie bei der Papier-Chromatographie.

Als Stützphase für das unpolare Solvens bei der Reversed-Phase-Chromatographie diente *Mussini und Marcucci (15)* ein mit Dimethylsulfat in Alkali methyliertes Gel. Für Fließmittelsysteme mittlerer Polarität (z.B. Methanol/Wasser/Chloroform/Heptan 180:120:45:5 v/v) erwies sich das Verfahren als nützlich zur Trennung von Gallensäuren.

Eine spezielle Säule für das Gel-Verfahren ohne Änderung der Fließmittelgeschwindigkeit bei häufigem Gebrauch mit Fließrichtung von unten nach oben beschrieb *Rothstein (53)*.

Mit wäßriger Silbernitratlösung imprägniertes und wieder getrocknetes Kieselgel eignet sich gut für Lipid-Trennungen, und zwar nach cis-trans-Konfiguration, nach dem Grad der Sättigung und – für Komponenten mit der gleichen Zahl ungesättigter Bindungen – auch nach der Kettenlänge. Für die Selektivität ist die Stärke der komplexen Bindungen zwischen Ag^+ -Ionen und den π -Elektronen der Kohlenstoffdoppel- bzw. -dreifachbindungen verantwortlich. Als Beispiel für diese Methodik seien *Haahki und Mitarb. (24)* genannt, die Serum- und Hautsterinester sowie Hautwaxse trennten. Sie konnten so Serumsterinester-Fractionen

erhalten, die sich durch den Sättigungsgrad der konstituierenden Fettsäuren (gesättigte, mono- bzw. diungesättigte) voneinander unterscheiden.

Zur chromatographischen Spaltung von racemischen Verbindungen bedienten sich *Karagounis* und Mitarb. (36) eines mit optisch aktiver Substanz belegten Adsorbens. Hierzu wurde Aluminiumoxid z.B. mit *D*-Weinsäure bzw. *L*-glutaminsaurem Natrium so präpariert, daß nach dem Verdunsten des Lösungsmittels eine mono- bis bimolekulare Schicht auf dem Adsorbens ausgebreitet war. Bei der Wahl der Elutionsmittel ist zu beachten, daß die als Belegung dienenden optischen Verbindungen praktisch nicht abgelöst werden können. Mit diesem Verfahren konnte z.B. bei *DL*-Mandelsäure mit Petroläther-Aceton 1:1 eine 13%ige bzw. bei *DL*-Menthol mit Petroläther eine 1%ige Spaltung des Racemats erzielt werden. Eine präparativ ergiebige Spaltung gelang noch nicht.

Klemm und Mitarb. (39) benutzten zur optischen Auflösung u. a. von 9-sek.-Butylphenanthren ein Kieselgel, das sie mit (-)- α -(2,4,5,7-Tetra-nitro-9-fluorenylidenaaminoxy)-propionsäure imprägnierten und oberhalb reinem Kieselgel und Kieselgur in eine Säule füllten. Der rote molekulare Komplex wurde mit Cyclohexan sehr langsam eluiert und die Drehung der einzelnen Fraktionen gemessen.

Ein weiterer Weg für die Racemat-Auflösung besteht nach *Curti* und *Colombo* (13) in der „Tailor-Made-Methode“, d. h. ein optischer Antipode wird bei der Kieselgelfällung inkorporiert und wieder ausgewaschen, wonach das Gel selektiv aufnahmefähig wird. Vgl. auch *Reed* und *Rogers* (50).

Ein neuer Weg zur Racemat-Spaltung wurde jetzt von *Lüttringhaus* (41a) eingeschlagen. Mit sehr gutem Erfolg benutzte er lange Säulen aus Cellulose-2 $\frac{1}{2}$ -acetat mit Benzol als Fließmittel, z. B. für atropisomere Ansa-Verbindungen.

Makromolekeln können selbst aus wäßriger Lösung und bei hoher Fließgeschwindigkeit an Aluminiumoxid-Säulen leicht festgehalten werden. Dies hat u. a. Bedeutung bei der Entfernung von Pyrogenen aus Injektions- oder Infusionslösungen (vgl. *Wohlleben* (71)) und bei der Entfernung der Kropfnoxe (Urochrome) aus Trinkwasser (vgl. *Hettche* (32)). Auch bei der Chromatographie von Stärke spielt dies eine Rolle (vgl. *Ulmann* (64)).

Haller (25a) bereitete sich Glaspulver definierter Porengröße für die Trennung von Pflanzenviren.

Auf einer Glaspulversäule, die sektionsweise in einen Ofen gestellt wurde, chromatographierte *Benarie* (6) geschmolzene Salze wie Alkalinitrate und Mischungen von Alkalihalogeniden, denen 0,1 bis 1% Schwermetallchlorid [Cr(III), Cu(I), Ni(II), Co(II) und Mn(II)] zugesetzt wa-

ren, bei Temperaturen bis 400°C. Es konnten wie bei wäßriger Lösung scharfe Zonen beobachtet werden. Die Adsorption nahm in obiger Reihenfolge ab.

S₈, S₇NH und S₄N₄ (u.a. Reaktionsprodukte von Ammoniak mit S₂Cl₂) konnten *Villena-Blanco* und *Jolly* (67) an saurem Aluminiumoxid Akt. I bzw. aktivem Kieselgel mit Benzol bzw. Tetrachlorkohlenstoff (beide gut getrocknet) adsorptiv trennen.

Gelegentlich dient auch wasserfreies Natriumsulfat mit gutem Erfolg als Säulenfüllung. *Barreto* und *Sabino* (4) z.B. trennten hierauf mit Chloroform-Diäthylamin-Elution Isonikotinsäurehydrazid und dessen Stoffwechselprodukte aus biologischem Material.

Auch auf einer frisch bereiteten Raney-Kobalt-Säule kann man nach *Badger* und Mitarb. (2) chromatographieren. Da Kobalt nur ein schwacher Entschwefelungskatalysator ist, schien er unter milden Bedingungen für eine Chemisorption einer Organo-Schwefel-Verbindung brauchbar, ohne eine Entschwefelung zu bewirken. Z.B. konnte aus einer Mischung von Isoeugenol und 2,5-Dimethylthiophen ersteres mit Methanol eluiert, letzteres erst durch Soxhlet-Extraktion des Kobalts mit Methanol abgelöst werden.

Auf Agargel-Säulen führte *Spain* (60) mit Metallsulfiden eine „Fällungs-Chromatographie“ durch. Auf mit Natriumacetat und Ammonsulfid zubereitetes Agargel wurden salzsaure Lösungen von Cu, Zn, Fe usw. gegeben. Während der Diffusion in die Säule wandern die Metallsulfide verschieden schnell. Dies beruht auf einem selektiven, reversiblen Prozeß von Fällung und Lösung. Die Sulfid-Banden sind gut sichtbar.

Als relativ beständige Verbindung wird Zirkoniumphosphat neuerdings für den Ionenaustausch von Metallen benutzt. Es ist auch gegen saure Medien ziemlich stabil und besitzt eine gute Austauschkapazität. *Ahrland* und Mitarb. (7) beschrieben die Darstellung des Gels und sein Verhalten als Kationen-Austauscher. — Es kann auch bei höheren Temperaturen (bis etwa 300°C) eingesetzt werden, was bei den Ionenaustauschharzen nicht möglich ist. *Gal* und *Ruvarac* (22) benutzen Zirkoniumphosphat-Säulen für die Trennung von Plutonium/Uran, da es gegen ionisierende Strahlung sehr widerstandsfähig ist (vgl. auch *Campbell* (11)).

Über den Ionenaustausch mit Metallsulfiden berichtet *Thomas* (63). Das Einsatzgebiet dürfte vor allem bei der Gewinnung wertvoller Metalle aus Lösungen liegen, die überschüssige Alkali- und Erdalkalimetalle enthalten. Hierzu werden z.B. Zinksulfid-Pigmente in eine hydrophile Gerüstsubstanz (z.B. Oxyäthylcellulose) geeigneter Teilchengröße eingebettet. Ein Metallsulfid geht irreversibel mit gelösten Kationen in ein schwerer lösliches Metallsulfid über. Eine Regenerierung ist möglich.

Der Arbeitskreis von *Blasius* (9) befaßt sich besonders mit der Herstellung von chelatbildenden Austauschharzen, die für die Trennung von Metallionen geeignet sind und gute mechanische und chemische Eigenschaften mit hoher Kapazität verbinden. Durch Umsetzung von Polyäthylenimin mit 4-Chlor-pyridin-2,6-dicarbonsäure konnte z. B. ein Harz dargestellt werden, das sich besonders für die $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -Trennung gut eignet, und zwar mit zur Trennung größerer Mengen fähiger Ca^{2+} -Kapazität (4,2 mVal/g).

Über die Radioaktivitätsmessung in Verbindung mit chromatographischen Trennverfahren berichtet *Bremer* (10). Außer bei Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatographie wird auch für die Säule die kontinuierliche Aktivitätsbestimmung beschrieben. Das Eluat kann mit einer Szintillatortlösung intensiv vermischt und durch eine Glasspirale zwischen zwei in Koinzidenz betriebenen Sekundärelektronenvervielfachern geleitet werden. Billiger ist der Einsatz einer mit festem Szintillator gefüllten Meßzelle oder eines Plastikschauches mit eingearbeitetem Szintillator. Falls keine Aktivität am Detektormaterial abgelagert wird, kann das unveränderte Säuleneluat zu weiteren Untersuchungen benutzt werden.

Routine-Trennungen und -Bestimmungen von Kohlenwasserstoffen in schwerem Erdöl führten *Snyder* und *Roth* (59) adsorptionschromatographisch mit Fließrichtung von unten nach oben an einer Aluminiumoxidsäule aus. Mit einer Genauigkeit von $\pm 1\%$ konnten die gesamten gesättigten Kohlenwasserstoffe in oberhalb 400°F ($= 204^\circ\text{C}$) siedenden Proben schnell ermittelt werden. Elutionsmittel waren n-Pentan, Diäthyläther und Benzol-Methanol. Diese Untersuchung räumte die Einwände aus, daß es sich bei einer solchen Methodik u. a. um unvollständige Elutionen, namentlich bei höher polycyclischen Verbindungen, handele.

Der Arbeitskreis von *Snyder* (58), der sich seit längerem u. a. ausführlich mit theoretischen Studien über die lineare Elutions-Adsorptions-Chromatographie bei der LSC befaßt, behandelte kürzlich auch die Beziehungen zwischen der LSC und der GSC (gas-solid chromatography), die gegenüber der GLC (gas-liquid chromatography) an Bedeutung aufholt. Dabei konnte eine quantitative Beziehung zwischen den Retentionsvolumina an Aluminiumoxid bei der GSC und der LSC aufgestellt werden.

Eine für Mikrobestimmungen interessante neue Arbeitsweise mit flüssigen Kunstharz-Ionenaustauschern beschreiben – nach einem Vorschlag von *Bayer* (5) – *Jentzsch* und Mitarb. (35). Sie benutzten die von der Gas-Chromatographie her bekannten Kapillarsäulen, d. h. Säulen, bei denen nur die innere Wandung mit Sorbens belegt ist, während im Zentrum ein offener Längskanal sehr geringen Querschnitts verbleibt. Da

Metallspuren stören konnten, wurde ein Polyäthylenrohr von 10 m Länge und 0,5 mm i. Ø benutzt, durch das der flüssige, schwach basische Anionenaustauscher in Tetrahydrofuranlösung als Pfropfen geschoben wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels verbleiben etwa 150 cm² eines dünnen Films des Austauschers auf der Innenwand. Mit einer solchen Säule gelang es, Nickel(II)/Eisen(III) und Aluminium/Eisen(III) gut zu trennen. Mit Wasser ist der Austauscher praktisch nicht auswaschbar. – *Bayer* benutzte für schnelle Aminosäure- und Peptidtrennungen aktivierte Cu-Kapillaren.

Reinhard und Mitarb. (51) bedienen sich bei der Trennung der Gibberelline in Pflanzenextrakten u. a. einer horizontalen Säulen-Chromatographie. Da die Extrakte noch zu viele Verunreinigungen enthielten, mußte vor der ersten dünnschichtchromatographischen Gruppentrennung an einer Säule unter entsprechenden Verhältnissen getrennt werden. Frangulin, Fluorescein und Eosin werden als Markierungsfarbstoffe (mit einzelnen Gibberellin-Gruppen ähnlichen R_F -Werten) dem Pflanzenextrakt zugefügt. Ein nahtloser Cellophananschlauch wurde nun abwechselnd mit Dünnschicht-Kieselgur, -Kieselgel (eigentliche Trennschicht) und wieder mit -Kieselgur gefüllt. In die Kieselgur-Vorschaltzone wird der vorbereitete Extrakt eingebracht, um die langsam wandernde Gibberelline schnell von der Startzone zu entfernen, auf der die meisten der die biologischen Tests störenden Verunreinigungen zurückbleiben. Der Cellophananschlauch wird horizontal gelegt und mittels eines Dochtes aus dem durch ein eingezogenes Kernschliffstück angeschlossenen Schliffkolben das Fließmittel herangeführt. Nach der Trennung, die durch die Zusatzfarbstoffe verfolgt werden kann, wird die Säule in drei Teile zerschnitten. Die weitere Aufteilung erfolgt dünnschichtchromatographisch. Diese Arbeit ist ein schönes Beispiel für die Kombination von Säule und Dünnschicht.

Eine direkte Übertragung von der Dünnschicht- auf die präparative Säulen-Chromatographie wollen auch *Dahn* und *Fuchs* (14) mit einer horizontalen Säule im Cellophan-Schlauch erreichen. Zu diesem Zweck wurden mit feinem Kieselgel gestopfte Säulen so eingespannt, daß sie das Eluens nur durch Kapillarwirkung aus einer entsprechend gebauten Anschlußkammer nachsaugen. Bei wenig flüchtigen Fließmitteln fanden die Autoren mit der Dünnschicht-Chromatographie korrespondierende R_F -Werte.

Eine Verbindung zwischen Papier- bzw. Dünnschicht-Chromatographie und Säulen-Chromatographie an mikrokristallinem Cellulosepulver stellen *Wolfram* und Mitarb. (75) mit der zuvor bei Adsorbenzien geübten Methodik einer „Ausstoß-Säule“ her. Hierzu wird die Säule nach unter Überdruck erfolgter Auftrennung in Zonen (Zucker, Aminosäuren, Eisenkomplexe usw.) und dem Abtropfen aus dem Mantel gedrückt. Auf

der freiliegenden und zusätzlich durch Warmluft getrockneten Oberfläche können Reagenzien durch Schlitze in Auflagegmasken appliziert werden.

Als weiteres präparatives Analogon zur Dünnschicht-Chromatographie schlägt *Balogh* (3) die Herstellung eines selbsttragenden „Chromatostick“ als verbesserten Chromatobarstab vor. Hierzu wird eine Sorptionsmittel-Anmischung in einen Filterpapierzylinder gegeben, der nach Erstarren des Sorbens entfernt wird, wonach die vollständige Trocknung und Aktivierung des Stabs erfolgt. Als Sorptionsmittel-Ansätze dienen Kieselgel mit Gips und Wasser, Cellulosepulver mit etwas gipshaltigem Kieselgel und Wasser sowie Polyamid mit etwas gipshaltigem Kieselgel und Methanol. Auf den völlig ebenen Säulenkopf wird tropfenweise Analysenlösung aufgegeben. Mit der „Startschicht“ nach unten wird der Stab auf ein mit Solvens getränktes Baumwollkissen gestellt. Ein oder mehrere Stäbe gleichzeitig stehen in einer zuvor gesättigten Entwicklungskammer. Wenn die Lösungsmittelfront die Spitze erreicht hat, wird der Stab entnommen und kann zerschnitten werden. Die optimale Stababmessung soll bei 180 mm Höhe und 20 mm Durchmesser liegen. Die R_F -Werte sollen der Dünnschicht-Chromatographie entsprechen.

Einen bisher in der Gas-Chromatographie bei einfachen Alkoholen usw. schon durchgeführten Isotopenaustausch erzielten *Klein* und *Knight* (38) nunmehr auch in der LSC. Sie behandelten basisches Aluminiumoxid mit HTO und konnten daran mit Tritium markierte Ketosterioide (mit 5–10 mc/mmol) herstellen, die auch nach Rekristallisation aus hydroxylhaltigen Solvenzien erhalten blieben. Ein solches Verfahren besitzt die großen Vorzüge von Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit. Auch eine hohe Reinheit wird erzielt. – Bei der Säulenbehandlung muß sorgfältig auf absolut trockenes Fließmittel (Pentan/Benzol 1:1 v/v) geachtet werden, da Feuchtigkeitsspuren Tritium als Wasser eluieren.

Nach *Schulz* (56) wird die Molekulargewichtsverteilung von Hochpolymeren in einer Säule durch Bewegung eines positiven Lösungsmittel-Fällungsmittelgradienten (LM–FM) gegen einen negativen Temperaturgradienten ermittelt. Auf oberflächenreichem Träger wird eine dünne Gelschicht gebildet, die mit der mobilen Solschicht Polymermoleküle austauscht. Entscheidend für die Trennung ist die Kombination des ternären Systems (Polymer–LM–FM) mit einem gegenüber dem Polymeren inaktiven Trägermaterial. Hierzu dienen meist Glasperlen mit 0,1 mm \varnothing , die zwar gegenüber polaren Polymeren wie Polymethylmethacrylat sehr aktiv sind, was aber durch ein LM–FM-System mit noch polareren Komponenten eliminiert wird, so daß das Polymere von der Oberfläche verdrängt wird.

IV. Geräte und Zubehör

Für die apparative Ausrüstung der Säulen-Chromatographie sei auf die Arbeiten von *Dorfner* (17), *Oehme* (47) und *Wohlleben* (72, 73) hingewiesen, ebenso auf die Bibliographie bei (74). Hier soll auf einige Sonderentwicklungen eingegangen werden.

Speziell für die Gel-Filtration sind sowohl Laborsäulen als auch komplette automatische Geräte entwickelt worden. *Larsson* (41) beschreibt ein System, das selbsttätig den Elutionsgradienten herstellt, ihn in die Säule führt, laufend pH und UV-Absorption des Eluats mißt, Fraktionen sammelt und die Säule auswäscht. Hierbei dient die Trennung von Abbauprodukten eines pharmazeutischen Wirkstoffs in Kaninchenharn als Anwendungsbeispiel.

Mit der Umlauf-Chromatographie (recycling chromatography) führen *Porath* und *Bennich* (48) ein neues Prinzip zur Steigerung des Wirkungsgrads einer Säule ein. Die gleiche Probe durchläuft die Säule im geschlossenen System mehrere Male, bis ein Optimum an Trennung erreicht ist. Voraussetzung ist, daß der Verteilungskoeffizient der Probe zwischen Säulenfüllung und mobiler Phase von der Konzentration weitgehend unabhängig ist und sich die Substanzen in der Probe nicht gegenseitig beeinflussen. Solche Trennungen wurden bisher meist mit Hilfe der Gel-Filtration vorgenommen. Getrennte Fraktionen und störende Anteile können dem Kreislauf jederzeit entnommen werden. Man erspart sich so extrem lange Säulen, z.B. bei nur geringen Unterschieden in der Molekülgröße. Die Anlage arbeitet automatisch. *Chersi* (12) hat das Verfahren z.B. bei der Trennung und Reinigung von Milchsäure-Dehydrogenase vom Herzmuskel angewandt, wobei am Ende noch ein weiterer Arbeitsschritt mit normaler Säule aus Hydroxyapatit adsorptionschromatographisch zum Einsatz kam.

Naona und *Prchal* (46) beschrieben ein neues Detektorprinzip für die kontinuierliche quantitative Gehaltsbestimmung durch Kontrolle des Eluats. Hierzu wird die Erscheinung genutzt, daß alle beim Trenneffekt in der Säule auftretenden Vorgänge (Adsorption, Ionenaustausch, Verteilungsgleichgewicht usw.) von entsprechender Reaktionswärme begleitet sind. Die Temperaturänderungen im System können unter geeigneten Bedingungen im abfließenden Elutionsmittel mit Hilfe einer Meßzelle mit einem hochempfindlichen Thermistor registriert und unter Kompensation mit einer parallelen Säule ohne Analysenprobe zu einer sehr empfindlichen quantitativen Gehaltsbestimmung benutzt werden.

Ein automatisches Anzeigergerät für nichtwäßrige Eluate entwickelten auch *James* und Mitarb. (34a). Ein durch den Säulenausfluß geführter, dünner, endloser Metalldraht transportiert kontinuierlich Spuren der

Fractionen ab. In einer anschließenden Kammer wird das Solvens unter N_2 oder Ar verdampft und in einer Pyrolysekammer bei etwa $600^\circ C$ die organische Substanz zerstört. Die Crackprodukte werden mit Ar in einen Ionisationsdetektor gespült und nachgewiesen.

Für eine Einrichtung zur präparativen Chromatographie mit zusammengesetzten Säulen vgl. auch *Berg* (7).

Für die LLC beschrieben *Lambert* und *Porter* (40) eine der GLC ähnliche Apparatur. Sie dient nicht nur der Analytik, sondern u. a. auch der präparativen Darstellung von Chemikalien zum Gebrauch als Analysenstandards und zur Bestimmung von sehr genauen Verteilungskoeffizienten für Molekularstrukturbeziehungen. Das unter Druck stehende geschlossene System ist ähnlich wie in der GLC mit Einlaßinjektor, Refraktometer als Detektor, Schreiber und Fraktionssammler ausgerüstet. Das System bewährte sich u. a. für die analytische Trennung der cis-trans-Isomeren eines Organophosphor-Insektizids innerhalb einer Stunde. Präparative Trennungen mit 100–1000 mg Ausbeute an Reinsubstanzen benötigten 3 bis 5 Stunden. Stationäre Phase war Wasser-Äthylenglykol, mobile Phase Hexan- CCl_4 .

Dijkstra und Mitarb. (16) setzten eine ähnliche Apparatur mit permanenter Kieselsäule u. a. zur Routinebestimmung von 2,4-Dinitrophenylthioäthern in der Erdöldestillatanalyse ein.

Literatur

1. *Ahland, St., J. Albertsson, L. Johansson, B. Nihlgård, and L. Nilsson*: Inorganic Ion Exchangers. I. Acidity, Hydrolysis and Resistance to Acids of some Inorganic Ion Exchangers, Especially Zirconium Phosphate. *Acta chem. scand.* 18, 707 (1964).
2. *Badger, G. M., N. Kowanko, and W. H. F. Sasse*: Chromatography on a column of runey cobalt. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] 13, 234 (1964).
3. *Balogh, B.*: Preparative Analog to Thin Layer Chromatography. *Analytic. Chem.* 36, 2498 (1964).
4. *Barreto, R. C. R., and S. O. Sabino*: Chromatographic studies on isonicotinic acid hydrazide and its metabolic derivatives. IV. New techniques of isolation and identification. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] 13, 435 (1964).
5. *Bayer, E.*: Vortrag auf der Tagung über Gaschromatographie, Houston (Texas), April 1964. Vgl. *G. Köhlwein*: Neues Verfahren zur Flüssigkeits-Chromatographie. Diss. Karlsruhe 1965.
6. *Benarie, M. M.*: Chromatography of Molten Salts on a Glass Powder Column. *Science* [Washington] 128, 1008 (1958).
7. *Berg, O. W.*: An All-Glass Coupled Column for Large-Scale Chromatographic Separations. *Analytic. Chem.* 37, 774 (1965).
8. *Blaedel, W. J., and J. H. Sirohl*: Partition Chromatography by Electrodeposition in a Mercury Film. *Analytic. Chem.* 37, 64 (1965).

9. *Blasius, E.*, u. *E. Brozio*: Chelatbildende Austauschharze. VI. Pyridin-2,6-Dicarbonsäure-Austauscher für die Trennung $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. J. Chromatogr. [Amsterdam] 18, 572 (1965).
10. *Bremner, K.-H.*: Die Meßmethodik niederenergetischer Betastrahler, Teil 2. Glas-Instrumenten-Techn. 8, 615 (1964).
11. *Campbell, M. H.*: Quantitative Separation for Magnesium, Calcium, and Strontium Using Zirconium Molybdate Ion. Analytic. Chem. 37, 252 (1965).
12. *Chersi, A.*: The purification of lactic dehydrogenase by recycling chromatography. Sci. Tools [Stockholm] 11, 1 (1964).
13. *Curti, R.*, and *U. Colombo*: Chromatography of stereoisomers with „tailor made“ compounds. J. Amer. chem. Soc. 74, 3961 (1952).
14. *Dahn, H.*, u. *H. Fuchs*: Ein präparatives Analogon zur Trennung an dünnen Schichten: Horizontale Säulenchromatographie im Cellophan-schlauch. Helv. chim. Acta 45, 261 (1962).
15. *Determann, H.*: Stofftrennung durch Chromatographie an porösen Gelen. Angew. Chem. 76, 635 (1964).
16. *Dijkstra, R.*, *J. van Duijn* u. *E. A. M. F. Dahmen*: Permanente Säulen für die Flüssigkeitschromatographie. Z. analyt. Chem. 205, 274 (1964).
17. *Dorfner, K.*: Stand und neuere Entwicklung der Gradientenelution. Chemiker-Ztg. 87, 871 (1963).
18. *Egger, K.*: Die Analyse der Flavonverbindungen. Planta med. [Stuttgart] 12, 265 (1964).
19. *Freytag, W.*: Verteilungschromatographie von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen an einer Polyäthylensäule. Fette u. Seifen 65, 603 (1963).
20. – u. *M. Baustian*: Zur Chromatographie von 4-Dimethylamino-3,5-dinitrobenzoesäuren. J. Chromatogr. [Amsterdam] 13, 558 (1964).
21. *Fritz, J. S.*, and *C. E. Hedrick*: Separation of Phenols by Reversed-Phase Chromatography. Analytic. Chem. 37, 1015 (1965).
22. *Gal, I.*, and *A. Ruvarac*: The separation of plutonium from uranium and fission products on zirconium phosphate columns. J. Chromatogr. [Amsterdam] 13, 549 (1964).
23. *Glemser, O.*, *G. Rieck* u. *H. Lackner*: Verwendung von Eisenhydroxyd für die Chromatographie mit heißen Lösungsmitteln. Chem. Ber. 92, 662 (1959).
24. *Haakti, E.*, *T. Nikkari* u. *K. Juwa*: Fraktionierung von Serum und Hautsterinestern sowie Hautwachsen mittels Chromatographie an mit Silbernitrat imprägniertem Silicagel. Acta chem. scand. 17, 538 (1963).
25. *Hagdahl, L.*: Technical improvements in adsorption analysis. Acta chem. scand. 2, 574 (1948).
- 25a. *Haller, W.*: Chromatography on glass of controlled pore size. Nature [London] 206, 693 (1965).
26. *Hedrick, C. E.*: Separation of Aromatic Amines by Reversed-Phase Chromatography. Analytic. Chem. 37, 1044 (1965).
27. *Helfferich, F.*: Ionenaustauscher. Weinheim: Verlag Chemie 1959.
28. *Hesse, G.*: Stoffveränderungen in der chromatographischen Trennsäule. Z. analyt. Chem. 211, 5 (1965).
29. – u. *H. Engelhardt*: Das Zonenprofil bei der Chromatographie von Lösungen. J. Chromatogr. [Amsterdam] 21, 223 (1966).
30. – – Temperaturprogrammierung bei der Adsorptionschromatographie von Lösungen. J. Chromatogr. [Amsterdam] 21, 228 (1966).
31. – u. *G. Roscher*: Die Abstimmung chromatographischer Fließmittel auf Aluminiumoxide eingestellter Aktivität. Z. analyt. Chem. 200, 3 (1964).

32. *Hettche, H. O.*: Urochrome im Wasser als Ursache des endemischen Kropfes. Gas- u. Wasserfach 96, 660 (1955).
33. *Hoskins, W. M., W. R. Erwin, R. Miskus, W. W. Thornburg, and L. N. Werum*: A Polyethylene-Alumina Column for Purification of Tissue Extracts before Analysis. J. agric. Food Chem. 6, 914 (1958).
34. *Hückel, W., u. W. Hornung*: Eine Apparatur zur Chromatographie bei tiefen Temperaturen. Chem. Ber. 90, 2023 (1957).
- 34a. *James, A. T., R. J. Ravenhill, and R. P. W. Scott*: A general method for the monitoring of the effluents from non-aqueous liquid chromatographic systems. Fifth International Gas Chromatography Symposium, Brighton 1964. [Preprints, p. 34]. — Vgl. Chem. and Ind. 1964, 746; ref. Z. analyt. Chem. 211, 61 (1965).
35. *Jentzsch, D., G. Oesterheld, E. Rödel u. H.-G. Zimmermann*: Eine neue Arbeitsweise in der Ionenaustauschchromatographie. Z. analyt. Chem. 205, 237 (1964).
36. *Karagounis, G., B. Charbonnier u. E. Flöss*: Zur chromatographischen Spaltung von racemischen Verbindungen. J. Chromatogr. [Amsterdam] 2, 84 (1959).
37. *Keller, R. A., and J. C. Giddings*: Multiple zones and spots in chromatography. J. Chromatogr. [Amsterdam] 3, 205 (1960).
38. *Klein, P. D., and J. C. Knight*: The Exchange Labeling of Keto Steroids with Tritium by Adsorption Chromatography on Basic Alumina. J. Amer. chem. Soc. 87, 2657 (1965).
39. *Klemm, L. H., K. B. Desai, and J. R. Spooner, Jr.*: Optical resolution of 9-sec.-butylphenanthrene by molecular complexation chromatography. J. Chromatogr. [Amsterdam] 14, 300 (1964).
40. *Lambert, S. M., and P. E. Porter*: Analytical and Preparative Applications of Liquid-Liquid Partition Chromatography. Analytic. Chem. 36, 99 (1964).
41. *Larsson, H.*: A simple device for pH-gradient elution in column chromatography. Sci. Tools [Stockholm] 11, 44 (1964).
- 41a. *Lüttringhaus A.*: Persönliche Mitteilung.
42. *Meier, R., u. J. Fletschinger*: Heißchromatographie. Chromatographic mit siedenden Lösungsmitteln. Angew. Chem. 68, 373 (1956).
43. *Michal, J., u. G. Ackermann*: Zur Entmischung der Lösungsmittel bei der chromatographischen Trennung—II. Talanta [London] 11, 451 (1964).
44. *Mikulski, J., and I. Stroński*: The radiochemical separation of some metals by partition chromatography with reversed phases on teflon in the system tri-n-octylamine-electrolyte. J. Chromatogr. [Amsterdam] 17, 197 (1965).
45. *Mussini, E., and F. Marcucci*: Methylated sephadex as support in reversed phase partition chromatography. J. Chromatogr. [Amsterdam] 17, 574 (1965).
46. *Naono, T., u. K. Prchal*: Grundlagen und Wirkungsweise eines neuartigen universellen Detektors für die Chromatographie mit flüssigen Elutionsmitteln. Vortrag auf der Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie in Innsbruck, 29. 5. 1965. Ref. Programmhft, S. 99. — Ber. Bunsenges. physik. Chem. 69, 900 (1965).
47. *Oehme, F.*: Neue Methoden der Säulenchromatographie und Verfahren zur Eluatkontrolle. Chem. Rdsch. [Solothurn] 16, 317, 398, 624 (1963).
- 47a. *Pfann, W. G.*: Zone Melting Considered as a Chromatographic Separation Technique. Analytic. Chem. 36, 2231 (1964).

48. *Porath, J., and H. Bennich*: Recycling Chromatography. Arch. Biochem. Biophysics Suppl. 1, 152 (1962).
49. *Purr, A.*: Über die Fremdfettbestimmung in Kakaocerzeugnissen IX: Säulenchromatographischer Nachweis geringer Zusätze eines „Englischen Kakaobutter-Ersatzfettes EKE“ auf Palmölbasis in der aus Kakaobutter bei -25°C gewonnenen acetonlöslichen Glyceridfraktion. Fette u. Seifen 61, 119 (1959).
50. *Reed, G. H., and L. B. Rogers*: Adsorption of Methyl Orange and Ethyl Orange on Tailored Silica Gels. Analytic. Chem. 37, 861 (1965).
51. *Reinhard, E., W. Konopka u. R. Sacher*: Zur Trennung der Gibberelline in Pflanzenextrakten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der horizontalen Säulenchromatographie. J. Chromatogr. [Amsterdam] 16, 99 (1964).
52. *Roe, D. K.*: Electrochemical Fractionation: Potentiostatic Chromatography and Elution Voltammetry. Analytic. Chem. 36, 2371 (1964).
53. *Rothstein, F.*: A column design for reverse-flow sephadex gel permeation chromatography. J. Chromatogr. [Amsterdam] 18, 36 (1965).
54. *Sawicki, E., J. E. Meeker, and M. J. Morgan*: Column chromatographic separation of basic polynuclear aromatic compounds from complex mixtures. J. Chromatogr. [Amsterdam] 17, 252 (1965).
55. *Schildknecht, H.*: Zonenschmelzen. S. 70. Weinheim: Verlag Chemie 1964.
56. *Schulz, G. V.*: Zur Theorie und Praxis der Fällungschromatographie von Hochpolymeren. Vortrag auf Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie in Innsbruck, 29. 5. 1965. Ref. Programmheft, S. 71.
57. *Snyder, L. R.*: Linear elution adsorption chromatography. VII. Gradient elution theory. J. Chromatogr. [Amsterdam] 13, 415 (1964).
58. – and *E. R. Fett*: A quantitative theory of the interrelationship between solute retention volumes in gas-solid and liquid-solid chromatography. Studies on water deactivated alumina. J. Chromatogr. [Amsterdam] 18, 461 (1965).
59. – and *W. F. Roth*: Routine Separation and Determination of Total Saturated Hydrocarbons in Heavy Petroleum Samples by Adsorption Chromatography. Analytic. Chem. 36, 128 (1964).
60. *Spain, J. D.*: Precipitation Chromatography. Diffusion and Precipitation of Metal Sulfides on Agar Gel Columns. Analytic. Chem. 32, 1622 (1960).
61. *Teranishi, R., and T. R. Mon*: Large divided columns. J. Chromatogr. [Amsterdam] 12, 410 (1963).
62. *Terres, E., u. H. H. Hahn*: Untersuchung eines Druckvergasungsteeres aus südafrikanischer Steinkohle unter Anwendung neuer Verfahrensweisen. Erdöl u. Kohle 12, 734 (1959).
63. *Thomas, K.*: Ionenaustausch mit Metallsulfiden. Chemiker-Ztg. 88, 75 (1964).
64. *Ulmann, M.*: Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der Al_2O_3 -Chromatographie bei Kartoffelstärke. 2. Mitt. Ernährungsforsch. 5, 170 (1960).
65. *Veder, H. A., and C. N. Pascha*: Chromatography on ECTEOLA-Cellulose at neutral pH values. J. Chromatogr. [Amsterdam] 13, 408 (1964).
66. *Vereshchagin, A. G.*: The partition of polar and non-polar lipids in a reversed-phase chromatography system. J. Chromatogr. [Amsterdam] 14, 184 (1964).

G. Wohlleben

67. *Villena-Blanco, M., and W. L. Jolly*: Separation of S_8 , S_7NH , and S_4N_4 by adsorption chromatography. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] *16*, 214 (1964).
68. *Weinberg, B. B., and R. A. Keller*: Changes in the immobile aqueous phase of cellulose during chromatograms formed with absolute ethanol. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] *16*, 40 (1964).
69. *Wieland, Th., u. H. Bende*: Über Peptidsynthesen, 31. Chromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide und Betrachtungen zur Konformation. *Chem. Ber.* *98*, 504 (1965).
70. *Winsten, W. A.*: Reversed-Phase Partition Chromatography on Microporous Polymeric Supports. *Analytic. Chem.* *34*, 1334 (1962).
71. *Wohlleben, G.*: Zur Adsorption von Pyrogenen aus Injektionslösungen. *Pharmaz. Ztg.* *101*, 1286 (1956).
72. – Chromatographie in Labor und Betrieb. *Dechema-Monographien* *35*, 96 (1959).
73. – Chromatographie-Geräte. Teile 2 u. 3. *Glas-Instrumenten-Techn.* *7*, 1, 43 (1963).
74. – Säulen-Chromatographie. In: *Handbuch der Lebensmittelchemie*. Hrsg. *J. Schormüller*. Bd. II/1, S. 567–596. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.
75. *Wolfrom, M. L., D. H. Busch, R. M. de Lederkremer, S. C. Vergez, and J. R. Vercellotti*: Extrusion column chromatography on cellulose. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] *18*, 42 (1965).
76. *Zeleznick, L. D.*: The use of sephadex G-25 in partition column chromatography. *J. Chromatogr.* [Amsterdam] *14*, 139 (1964).

(Eingegangen am 17. Juli 1966)

Analytische Verfahren der naturwissenschaftlichen Kriminalistik

Doz. Dr. G. Machata

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

Spezielle Analysenverfahren	661
1. Polarographie	662
2. Atomabsorptions-Spektrophotometrie.	663
3. Flammenphotometrie	663
4. Fluorometrie	665
Nachweis flüchtiger Substanzen in biologischem Material	665
1. Alkohole	666
2. Kohlenoxid	667
a) Spektrophotometrische Bestimmung	667
b) Verfahren nach <i>Sachs</i>	667
c) Gaschromatographische Bestimmung	668
3. Andere flüchtige Substanzen.	669
Nachweis organischer Gifte in biologischem Material	671
Untersuchungen in der Kriminaltechnik	674
a) Untersuchung von alkoholischen Getränken	675
b) Untersuchung von Sprengstoffen	676
c) Nahschußzeichen	677
d) Untersuchung von Treibstoffen, Ölen und Wachsen	678
e) Untersuchung von Farbstoffen, Lackpigmenten und Tinten	678
Literatur	679

Mit der Einführung physikalisch-chemischer Methoden in die naturwissenschaftliche Kriminalistik durch *Brüning* (6) ist es zu einem regen Aufschwung in diesem Wissenszweig gekommen. Die subjektiven Befunde der früheren Untersucher wurden zunehmend durch objektive Verfahren ersetzt. Die Aufgaben moderner Analysemethoden können in folgenden fünf Punkten festgehalten werden:

1. Erhöhung des *Aussagewertes* der Analyse
2. Steigerung der *Spezifität*
3. Steigerung der *Meßgenauigkeit*
4. *Rationalisierung* der Arbeitstechnik (Automatisation)
5. *Dokumentation* (Registrierung) des analytischen Ergebnisses

Zu diesen Punkten seien einige Beispiele genannt.

1. Bei der Alkoholbestimmung nach der spezifischen ADH-Methode wird zwar der Äthylalkohol exakt erfaßt, doch ist es nicht möglich, andere flüchtige Substanzen gleichzeitig mitzubestimmen. Mit Hilfe der gaschromatographischen Methode ist dies aber sogar in einem Arbeitsgang möglich geworden.

2. Hinsichtlich der Spezifität übertrifft der Nachweis auf physikalisch-chemischem Wege jede andere klassische Analysenmethode. Die flammenphotometrische Bestimmung der Erdalkalimetalle mittels eines registrierenden Spektralphotometers läßt z.B. Barium, Strontium und Calcium nebeneinander zweifelsfrei erkennen. Der klassische chemische Analysengang war in diesem Fall sehr kompliziert und nicht immer eindeutig.

3. Die Meßgenauigkeit bleibt zwar innerhalb der in der klassischen Analyse geforderten Grenze von etwa 1 % (relativ); für die meisten Untersuchungen genügt es jedoch, mit Fehlergrenzen von 3 bis 5 % zu arbeiten, wobei gleichzeitig eine bedeutende Vereinfachung sowie eine Zeitersparnis zu erzielen sind. Dies ist insbesondere wegen der mehr oder minder großen Streubereiche der zu suchenden Komponenten in biologischem Material zu fordern. Bei Spurenanalysen mit physikalisch-chemischen Methoden ist eine sehr erweiterte Nachweisgrenze möglich, wenn dabei auf höchste Genauigkeit verzichtet wird. Es ist auch vollkommen unnötig, die Genauigkeit zu weit zu treiben; sie sollte stets den Erfordernissen angepaßt werden. Bei emissionsspektralanalytischen Untersuchungen im Bereich von 0,01 % wird man üblicherweise mit einer Fehlergrenze von 10 bis 20 % rechnen müssen, ohne den analytischen Aufwand allzusehr zu erhöhen. Da in der forensischen Chemie die verschiedensten Konzentrationsangaben üblich sind, seien in der Tab. 1 einige Zahlenangaben gebracht.

Tabelle 1. *Konzentrationsangaben*

mg/100 g*)	ppm	‰
1	10	0,01
0,1	1	0,001
100	1000	1

*) Auch als mg % (in der gerichtl. Chemie üblich).

4. In der gegenwärtigen Zeit ist es viel leichter, kostspielige Apparaturen als Personal zu erhalten. Somit muß auf weitgehende Rationalisierung der Arbeitstechnik durch automatisch arbeitende Geräte Wert gelegt werden. Es ist zum Beispiel nicht möglich, den klassischen Analysengang auf Metalle bei biologischem Untersuchungsmaterial durchzu-

führen. Rationell kann auf dem hier zu behandelnden Gebiet heute nur die Emissionsspektral- oder Röntgenfluoreszenzanalyse verwendet werden, allenfalls ist noch eine flammenphotometrische, atomabsorptions- oder polarographische Analyse für ein spezielles Element möglich.

5. Die Dokumentation des Analysenergebnisses erlaubt die spätere Kontrolle und kann vor Gericht als Beweis dienen. Auch ist die Registrierung der Meßwerte bei automatischen Anlagen gleichzeitig eine Kontrolle für das einwandfreie Arbeiten des Gerätes.

Spezielle Analysenverfahren

Chemische Untersuchung von biologischem Material auf Metallgifte, insbesondere auf Blei, Thallium, Quecksilber, Zink, Barium und Arsen.

Die bevorzugten Untersuchungsmaterialien zum Nachweis von Metallen sind die Leber, die Niere und der Harn (57). Bei akuten Vergiftungen ist noch die Analyse verschiedener Abschnitte des Magen-Darmtraktes getrennt nötig. Zweckmäßigerweise muß bei der Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials darauf geachtet werden, daß möglichst alle in Betracht kommenden Gifte gleichzeitig erfaßt werden können. Aus diesen Gründen ist nur ein nasser Aufschluß zulässig, da es sonst, abgesehen von Quecksilber und Arsen, auch bei Thallium (30) zu erheblichen Verlusten kommen kann. Zur Feststellung der Metalle bedient man sich am besten der Emissionsspektralanalyse, die mit einer Aufnahme alle Metalle erfaßt. Ein Arbeitsgang für die Routinebestimmung von Metallgiften gestaltet sich wie folgt:

10 g des Untersuchungsmaterials werden mit etwa 20 %iger Salpetersäure versetzt und wiederholt unter Zusatz von konzentrierter bzw. auch von rauchender Salpetersäure und Perhydrol zur Trockne gedampft. Der Aufschluß ist in etwa 4 Stunden auf einer regelbaren Heizplatte in einem Erlenmeyerkolben durchzuführen. Der weiße, salzartige Rückstand wird mit der geringstmöglichen Menge Wasser aufgenommen und die Lösung zur Analyse verwendet. Bei Harnproben genügt 1 ml Wasser, bei Organteilen 2 ml, so daß eine Konzentrierung um das fünf- bis zehnfache erzielt wird. 0,1 ml der Lösungen wird auf jeweils zwei plangedrehte, spektralreine Graphitelektroden aufgetragen und die Elektroden auf einem Aluminiumblock schwach erwärmt, so daß die Lösung eintrocknet. Die Elektroden werden am besten in einem Wechselstrom-Abreibbogen nach *Pfeilsticker* (38) abgefunkt, wobei auf hohe Bogenstromstärke (etwa 10 A) zu achten ist, um Arsen zu erfassen. Zur Unterdrückung der Cyan-Banden im Spektrum kann eine Schutzgasküvette benutzt werden (42). Das Schutzgas bewirkt jedoch eine verminderte

Nachweisempfindlichkeit. Im allgemeinen werden auch trotz Cyan-Banden brauchbare Analysenlinien zur Auswertung zu finden sein. Die Empfindlichkeit der Linien ist stark von den Begleitsubstanzen abhängig. Zum Anlegen von Eichkurven der verschiedenen Elemente werden Harn- oder Leberaufschlüsse mit den entsprechenden Mengen der Metalle versetzt. Die Spektrallinien können entweder photometrisch oder mit ausreichender Genauigkeit mittels der spd-Skala nach *Addink (1)* ausgemessen werden (29). Für einen mittleren Quarzspektrographen sind die Linien in Tab. 2 empfehlenswert. Gleichzeitig sind die Nachweis-

Tabelle 2. *Wichtigste Emissionslinien der Metallgifte und Nachweisgrenze (Bedingungen: Wechselstromabweißbogen, 10 A, höchstempfindliches Plattenmaterial, Konzentration auf Ausgangsmaterial bezogen (Anreicherung 1 : 10))*

					[mg %]
As	2349,8	2288,1	2780,2		1
Ba	4554,0	3071,6	2336,2		0,5
Pb	4057,8	3683,5	2833,1		0,05
Hg	2536,5	3650,2	4046,8		1
Tl	3775,7	3519,2	2767,9		0,05
Zn	2138,5	3345,0	3302,6		1

grenzen der Metalle bzw. Metalloide bezogen auf natives Organ bzw. Harn angegeben. Nur in den seltensten Fällen werden in der toxikologischen Analyse Anreicherungsverfahren zum Nachweis der Metallgifte nötig sein. Einzig zu dem Zweck der Entfernung von Ballaststoffen (zum Beispiel Alkali- und Erdalkalisalze) sind solche Verfahren für spezielle Analysenverfahren vertretbar, da ja in jedem Fall zuerst noch die Mineralisierung erforderlich ist. Physiologisch bedingte Spuren brauchen bei der Giftanalyse nicht erfaßt zu werden.

Nach einer Übersichtsaufnahme zur Feststellung der vorhandenen Elemente kann die quantitative Ermittlung der aufgefundenen Giftmetalle auf anderem Wege folgen. Von den gebräuchlichen Methoden bieten sich folgende an:

1. Polarographie

Die Bestimmung von Blei und Thallium geschieht in der Aufschlußlösung bzw. bei Blei auch im Aschenrückstand des Untersuchungsmaterials (5, 54, 55). Bei Blei darf die trockene Veraschung nur bis zu einer Temperatur von maximal 550°C geschehen. Hartnäckige Kohlenrückstände kann man nach dem Befeuchten mit sehr verdünnter Ammonitrat-Lösung und durch erneutes Erhitzen leicht entfernen. Man-

delt es sich um Spurenanalysen, so ist in jedem Fall eine Anreicherung empfehlenswert. Für die Polarographie und auch für andere Verfahren ist eine Extraktion mit Natriumdiäthyl-dithiocarbamat oder Pyrrolydin-dithiocarbamat (NaDDTC und PDDTC) bei entsprechendem pH mit Chloroform oder eine Fällung zusammen mit Calciumsalzen und Oxalsäure speziell für Blei vorteilhaft. Die genannten und auch andere Metalle werden angereichert und können ohne Begleitsubstanzen (Kalium- und Natriumsalze) gut bestimmt werden. Bei der Anwendung der Extraktion ist eine Selektivität der Chelatbildung, wie für die Colorimetrie oder Photometrie, nicht erforderlich, da die nachfolgende physikalisch-chemische Bestimmung dafür sorgt.

2. Atomabsorptions-Spektrophotometrie

Die Anreicherung der zu suchenden Elemente ist in den meisten Fällen wie vorher beschrieben notwendig (16, 24, 47). Für jedes Element muß eine entsprechende Hohlkathode vorhanden sein. Für das toxikologische Laboratorium ist die Bestimmung der Elemente Arsen, Thallium, Blei, Quecksilber und Zink mittels dieses Verfahrens zweckmäßig. Die dabei erzielbaren Empfindlichkeiten und die Analysenlinien sind in der Tab. 3

Tabelle 3. *Analysenlinien für die Atomabsorption und Nachweisgrenze (Zerstäuberbrenner 10 cm, Acetylen-Preßluft, Konzentration auf die wäßrige Analysenlösung bezogen)*

	[nm]	[mg %]
As	193,7	0,5
Ba	553,6	0,5
Pb	217,0	0,1
Hg	253,7	2,0
Tl	377,6	0,5
Zn	213,8	0,01

angegeben. Besonders die Empfindlichkeit des Zink-Nachweises erlaubt die direkte Bestimmung im Harn ohne jegliche chemische Verarbeitung.

3. Flammenphotometrie

Geeignet ist nur der Nachweis von Thallium nach Aufschluß des Untersuchungsmaterials und Extraktion mit einem organischen Komplexbildner (50). Bei der Verwendung eines registrierenden Gerätes wird

gegenüber einem nicht registrierenden Gerät eine erhöhte Genauigkeit erhalten, da die Querempfindlichkeit bei störenden Begleitsubstanzen durch Mitregistrierung des Untergrundes ausgeschaltet wird. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit der registrierten Emissionslinien und Banden besser, da durch den gleichmäßigen Wellenlängenvorschub Unregelmäßigkeiten der Flamme kompensiert werden. Bei unseren Versuchen war die Streuung bei Punktmessungen im Maximum der Emissionslinie jeweils viel größer als bei der Aufnahme registrierter Spektren.

Als Beispiel sei die Analyse eines Eiweißhydrolysates angegeben, in dem Bariumsalze verblieben waren. Der hohe Anteil an organischen Substanzen verursachte einen sehr hohen Flammenuntergrund, der durch die Registrierung gut erkennbar ist und bei der Berechnung der Emissionslinien dadurch nicht ins Gewicht fällt. Gleichzeitig ist als Begleit-

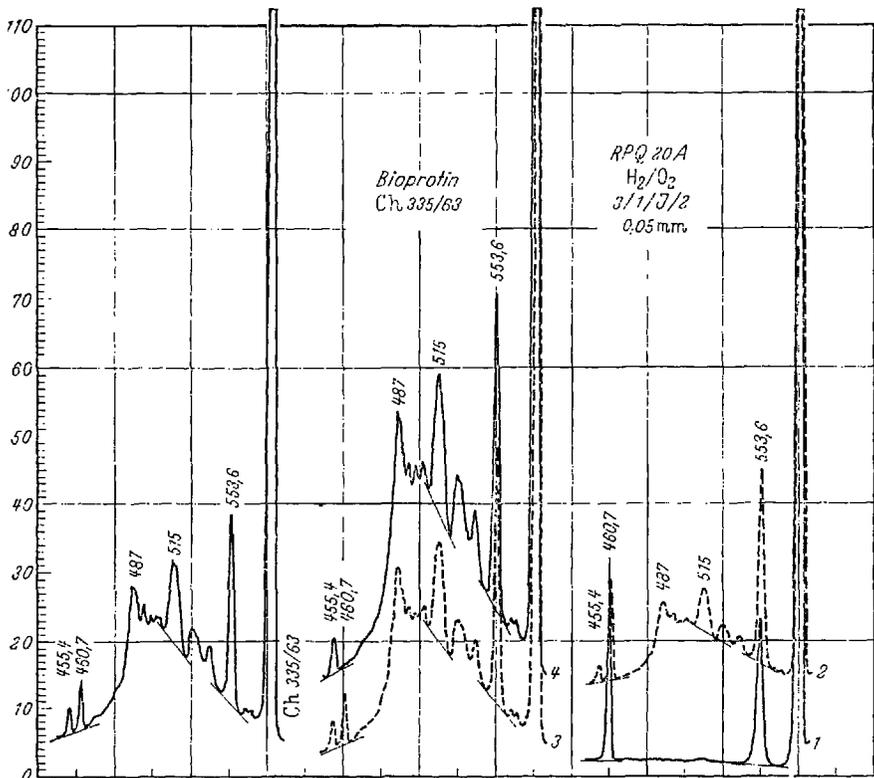


Abb. 1. Flammenphotometrische Bestimmung von Barium und Strontium in Eiweißhydrolysaten. Registrierendes Spektralphotometer, Direkt-Zerstäuber, Wasserstoff-Sauerstoff-Flamme. Analyselinien: Ba 553,6 nm und Sr 460,7 nm

element Strontium zu erkennen, das empfindlicher erfaßt wird. An Hand von Eichkurven, bereitet aus barium-freien Hydrolysaten, war eine quantitative Bestimmung rasch möglich.

4. Fluorometrie

Thallium(III) ist aus saurer Lösung mit Rhodamin B in Benzol extrahierbar. Diese Lösung zeigt im UV-Licht eine starke orangefarbene Fluoreszenz. Mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm wird ein Intensitätsmaximum bei 590 nm erhalten, das konzentrationsabhängig ist (27). Die Nachweisempfindlichkeit beträgt noch 0,1 Mikrogramm Thallium absolut. Die Aufarbeitung von biologischem Material geschieht wie vorher beschrieben, allerdings unter Zusatz von Schwefelsäure. Die schwefelsaure Lösung, etwa 5,5 normal, wird dann extrahiert. Ein Teil dieser schwefelsauren Lösung kann zum Arsen-Nachweis nach *Gutzzeit* verwendet werden.

Zur Bestimmung von Arsen wird ein kleiner Teil der Probe bzw. ein Teil des nassen Aufschlusses mit Schwefelsäure, Salpetersäure und Wasserstoffperoxid (30 %) versetzt und so lange in einem Kolben erhitzt, bis die Lösung farblos ist. Dabei müssen einige Male Wasserstoffperoxid und konzentrierte Salpetersäure zugesetzt werden. Die schwefelsaure Lösung wird mit Zink versetzt und der sich entwickelnde Arsenwasserstoff auf einem mit Silbernitrat oder Quecksilberbromid getränkten Papierblättchen aufgefangen. Vor dem Papierblättchen befindet sich etwas mit Cadmiumacetat getränkte Watte, um Schwefelwasserstoff aufzufangen. Die Färbung der Papierscheibchen nach dem Befeuchten kann halbquantitativ an Hand von Testblättchen oder nach einer Farbskala ausgewertet werden, Mengen bis zu 1 Mikrogramm können noch gut erfaßt werden.

Vielfach ist es nötig, Lebensmittel auf das Vorhandensein von Metallgiften, die in Form von Rattengiftpasten eingebracht wurden, zu untersuchen. In diesem Fall empfiehlt sich eine orientierende Untersuchung unter dem Röntgenschirm. Pastenanteile, zum Beispiel aus Thalliumsulfat oder Zinkphosphid, können sehr leicht als Verschattungen unter dem Leuchtschirm aufgefunden werden.

Nachweis flüchtiger Substanzen in biologischem Material

Apparativ werden die entspr. Nachweismethoden heute durch die Gaschromatographen bestimmt. Allgemein sogar sind die chromatographischen Trennverfahren als größter Fortschritt in der forensischen Toxikologie zu bezeichnen. Durch Auswahl entsprechender Geräte, Säulen und optimalen Bedingungen, gelingt es, fast jede Aufgabe zu lösen.

1. Alkohole

Der Nachweis von Äthylalkohol in Körperflüssigkeiten ist ein eminent wichtiges Problem. Das klassische Verfahren nach *Widmark* (56) ist relativ unspezifisch. Das fermentative ADH-Verfahren (74) ahmt den Alkohol-Abbau im menschlichen Körper nach. Das Verfahren erlaubt es jedoch nicht, andere Substanzen neben dem Äthylalkohol zu erkennen. Beide Verfahren wurden vielfach modifiziert. Als wichtige Modifikation des *Widmark*-Verfahrens ist die photometrische Bestimmung des Bichromat-Verbrauches anstatt der jodometrischen Titration (77) anzusehen und der Ersatz von Bichromatschwefelsäure durch Vanadinschwefelsäure (53). Der Übergang von V^V zu V^{IV} ergibt eine günstigere Extinktionsdifferenz. Das ADH-Verfahren sowie das *Widmark*-Verfahren wurde in den letzten Jahren mittels des Auto-analyzer-Verfahrens (26) weitgehend automatisiert.

Die dritte Möglichkeit ist das gaschromatographische Verfahren. Die Methode der Extraktion flüchtiger Stoffe mit Propylacetat oder Äther aus dem Blut und nachfolgende gaschromatographische Analyse kann heute als überholt gelten (9). Es ist prinzipiell möglich, Blutproben direkt in den Gaschromatographen einzuspritzen und den Äthylalkohol-Gehalt spezifisch und genau zu bestimmen (10, 32, 38).

Daneben können alle anderen flüchtigen Begleitsubstanzen miterfaßt werden, wie z. B. Aceton, Äther, Acetaldehyd, Fuselalkohole, Paraldehyd usw. Das Ergebnis der Analyse wird gleichzeitig durch einen Schreiber festgehalten. Noch besser als die direkte Injektion der Blutproben eignet sich die sog. „Head-Space-Gas-Methode“, bei der nur der Dampf über der Lösung in den Gaschromatographen eingebracht und eine Verschmutzung des Gerätes verhindert (11, 15) wird. Man kann die Verschmutzung auch durch die Verwendung von Vorsäulen umgehen. Für die Head-Space-Gas-Methode sprechen jedoch die ideale Peakform (gasförmige Probe) und daß keinerlei zusätzlicher apparativer Aufwand nötig ist (33).

0,5 ml der Blutprobe werden in einem 20 ml fassenden Serumfläschchen mit 0,1 ml des inneren Standards (2‰ Methyläthylketon) versetzt, das Fläschchen mit einem Einstichstopfen verschlossen und der Stopfen mit einem Klebeband gesichert. Die Fläschchen werden auf 60°C temperiert (Wasserbadthermostat, Brutschrank). Etwa 0,5 ml Dampfphase werden mit einer angewärmten Injektionsspritze dem Probe-fläschchen entnommen und dem Gaschromatographen eingegeben. An Hand einer Eichkurve wird aus dem Quotienten der Peakhöhen oder -flächen (Alkohol zu Standard) der Äthylalkoholgehalt errechnet. Bewährt haben sich eine polare Säulenfüllung (Polyäthylenglycol 1500 oder 1540), ein empfindlicher Flammenionisationsdetektor (FID), der Wasser nicht anzeigt, Säulentemperatur 90°C, Trägergas Stickstoff (30 bis

50 ml/min) und eine elektronische Integration der Peakflächen mit Druckschreiber. Der FID arbeitet bis 5 % Äthylalkohol linear. Die Analyse in der Dampfphase ist die erste Vorstufe einer vollkommenen Automatisierung der Blutalkohol-Analyse.

2. Kohlenoxid

a) Spektrophotometrische Bestimmung

Der Nachweis von Kohlenoxid im Blut geschieht am zweckmäßigsten in der Routinuntersuchung in den mit verdünntem Ammoniak hämolytierten Blutlösungen mit einem Spektralphotometer. Die Ermittlung von Extinktionsquotienten bei drei verschiedenen Wellenlängen (Quotienten nach *Hüfner* und *Heilmeyer*) – 576, 560 und 541 nm – gibt bei *frischen* Bluten einwandfreie Werte (19, 45). Sollten die Blutproben bereits faul sein, so versagt die Methode wegen der gleichzeitigen Anwesenheit von anderen Blutfarbstoffen (z.B. Methämoglobin und Hämatin). In diesem Fall ist die Quotientenbildung bei der reduzierten Blutlösung möglich (46), da CO-Hämoglobin gegen Reduktion beständig ist und auch nach Zusatz des Reduktionsmittels (z.B. Natriumdithionit) erhalten bleibt. Eine einfache Kontrolle läßt sich photometrisch durch die Ermittlung des von uns vorgeschlagenen Quotienten der Extinktionen bei 420 und 416 nm durchführen. Dieser Quotient ist gegen Fäulniserscheinungen relativ unempfindlich. Die angeführten Quotienten sind aus der Tab. 4 ersichtlich.

Tabelle 4. Quotienten zur Kohlenoxid-Hämoglobinbestimmung

	nm	100 % O ₂ -Hb	100 % CO-Hb
<i>Hüfner</i>	576/560	1,75	0,95
<i>Heilmeyer</i>	541/560	1,65	1,18
<i>Schwerdt</i> *)	555/538	1,31	0,80
	555/568	1,13	0,80
<i>Soret-Bande</i>	420/416	0,89	1,15

*) nach Reduktion der Blutlösung.

Spezifisch kann Kohlenoxid allerdings nur gasanalytisch nachgewiesen werden. Zwei Verfahren sind gebräuchlich:

b) Verfahren nach Sachs (41)

Ein kleiner Teil des Blutes wird bei milchsaurer Reaktion mit Kaliumcyanoferrat(II) in einem Meßbeutel zersetzt, der Beutel (1 l) mit Luft gefüllt und das gesamte Volumen mittels einer kleinen Handpumpe durch

ein Dräger-Gasspür Röhrchen mit selektiver Kohlenoxid-Anzeige gesaugt. Die Länge der entstehenden Farbzone ist ein Maß für den CO-Gehalt im Blut und erlaubt auch ohne Ermittlung des Hämoglobin-Gehaltes eine einfache und rasche halbquantitative Bestimmung.

c) *Gaschromatographische Bestimmung*

Eine Blutprobe wird wie vorher beschrieben in einem Serumfläschchen bei Zimmertemperatur zersetzt und der überstehende Dampf gaschromatographisch auf einer Säule mit einem Molckularsieb untersucht. CO wird spezifisch quantitativ angezeigt. Zur Ermittlung des CO-Hb-Gehaltes ist bei exakten Bestimmungen ebenfalls der Hämoglobingehalt festzustellen. Als innerer Standard wird der Peak des angezeigten Sauerstoffes verwendet (13, 22).

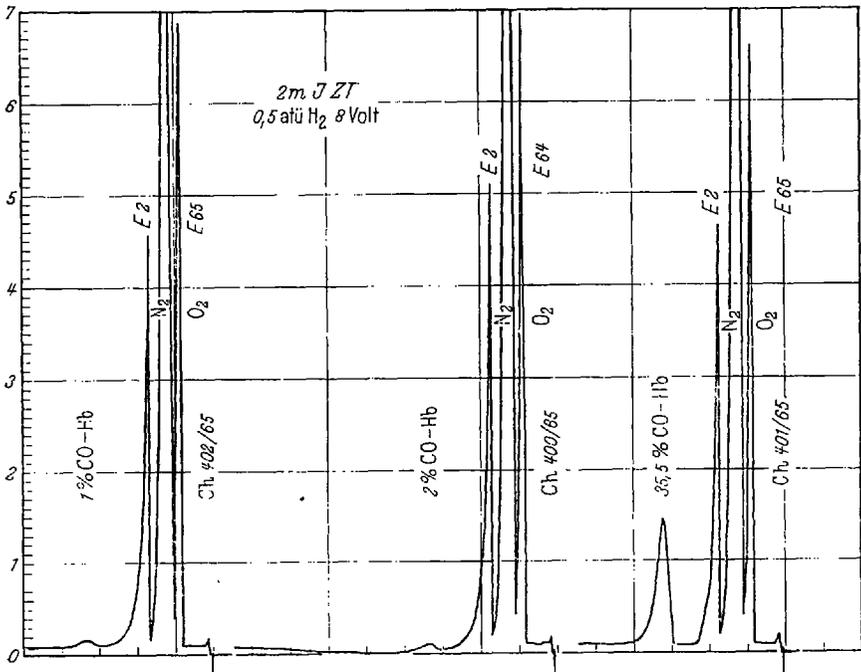


Abb. 2. Gaschromatographische Bestimmung des Kohlenoxid-Gehaltes in Bluten nach Freisetzung des CO

Zur Feststellung der Ursache der Kohlenoxid-Vergiftungen (zum Beispiel Rauchgas oder Sickergas) können die Lungen der Toten ebenfalls untersucht werden. Die unmittelbar nach der Leichenöffnung entnommene Lunge wird in ein dicht schließendes Glasgefäß gebracht und

einige Zeit (Stunden) zusammenfallen gelassen. Die in der Lunge enthaltene Alveolarluft wird zusammen mit der überstehenden Luft durch einen im Deckel des Glases befindlichen Einstichstopfen mittels Injektionsspritze entnommen und auf einer Säule mit Silikagel untersucht. Bei Sickergas bzw. Leuchtgasvergiftungen werden reichliche Mengen Methan und höhere Kohlenwasserstoffe, wie Äthan, Äthylen, Propan usw. gefunden. Bei Rauchgasvergiftungen bzw. bei unvollständiger Verbrennung treten ungesättigte Kohlenwasserstoffe in der Lungenluft auf, insbesondere Äthylen und Acetylen. Die Möglichkeit dieser analytischen Unterscheidung der Kohlenoxid-Vergiftung hinsichtlich ihrer Ursache erlaubt eine gezielte Schadensermittlung am Unfallort (37).

3. Andere flüchtige Substanzen

Besonders der Nachweis von leicht flüchtigen Kohlenwasserstoffen in biologischem Material war früher analytisch kaum möglich. Erst gaschromatographische Verfahren brachten Hilfe und führten überdies zu eindeutigen Differenzierungen der flüchtigen Komponenten.

Üblicherweise wird bei der gaschromatographischen Untersuchung von Benzinkohlenwasserstoffen auf die quantitative Bestimmung verzichtet und das Untersuchungsmaterial direkt nach der Head-Space-Gas-Methode untersucht. Wie bei der Blutalkoholanalyse werden die Probenfläschchen einer erhöhten Temperatur, bevorzugt 60°C, ausgesetzt und so der Dampfdruck der flüchtigen Komponenten erhöht. Es gelang uns, mit diesem Verfahren im Gehirn eines Mannes Kohlen-

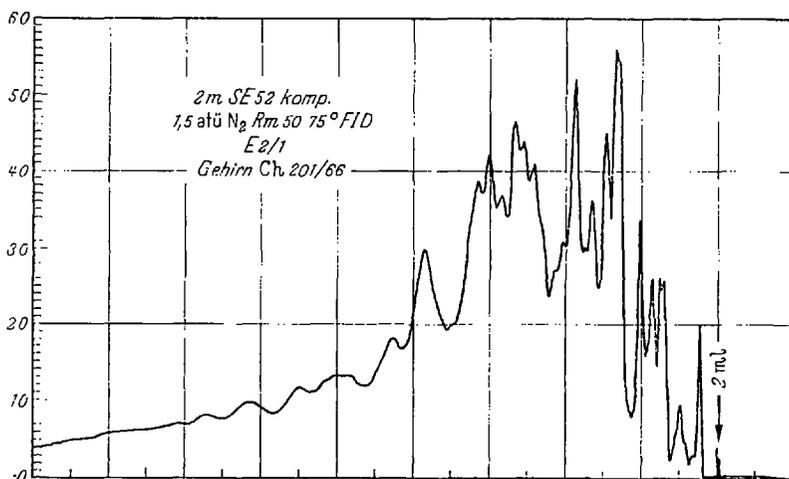


Abb. 3. Gaschromatographische Untersuchung eines Gehirnes nach der Head-Space-Gas-Methode auf Kohlenwasserstoffe (Benzin)

wasserstoffe (Benzin) nachzuweisen. Der Tote war bei einem Verkehrsunfall unter sein Motorrad zu liegen gekommen, wobei sich der Inhalt des Benzintankes über ihn ergossen hatte.

Ein zweiter Fall betraf die Verunreinigung einer Hautwunde mit Petroleum, um eine Rente zu erlangen. Im Wundsekret war der Nachweis von schweren Kohlenwasserstoffen (Petroleum) eindeutig möglich. Die Analyse dieses sehr infektiösen Materials, von dem nur etwa 0,1 g vorhanden war, wäre mit konventionellen Methoden nicht auszuführen gewesen. Die Head-Space-Gas-Methode vermeidet die chemische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials und verhindert bei den leicht verdampfenden, nachzuweisenden Stoffen jeglichen Verlust.

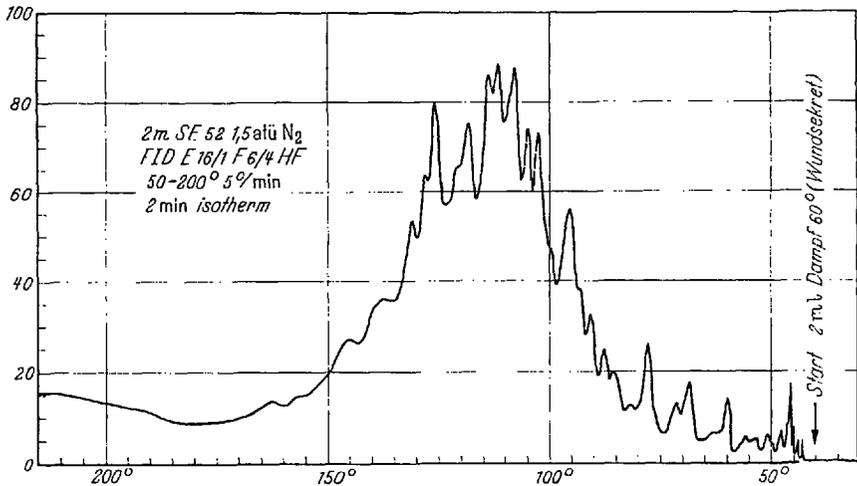


Abb. 4. Gaschromatographische Ermittlung von Petroleum in einem Wundsekret (Dampfanalyse)

In der Toxikologie sind Vergiftungen mit Paraldehyd relativ häufig. Der Nachweis geschah früher chemisch durch Wasserdampfdestillation des Untersuchungsmaterials, Spaltung des anfallenden Destillates mit Schwefelsäure und titrimetrische Ermittlung der entstehenden Essigsäure nach Oxidation des Destillates mit Wasserstoffperoxid. Dieses umständliche, verlustreiche, chemische Verfahren kann sehr einfach durch die gaschromatographische Untersuchung ersetzt werden, wobei wie bei der Alkohol-Analyse mit einem inneren Standard für die quantitative Auswertung gearbeitet wird.

Tabelle 5. *Gesamtretentionszeiten flüchtiger Substanzen und Peakflächen- bzw. Peakhöhen-Quotienten bezogen auf Methyläthylketon als inneren Standard für 1 ‰ige Lösungen*

	t_R [min]	Q_F	Q_H
Äther	0,8	7,02	15,7
Acetaldehyd	1,1	1,64	1,75
Aceton	1,5	0,95	1,47
Methyläthylketon	2,1	—	—
Äthanol	2,5	0,40	0,34
n-Propanol	4,2	0,56	0,32
Paraldehyd	4,6	0,92	0,42
n-Butanol	7,0	0,83	0,27

In der Tab. 5 sind die Retentionszeiten und die Quotienten der Peakflächen bzw. -höhen einiger toxikologisch interessanter Substanzen angegeben, wobei als Säulenfüllung Polyäthylenglycol 1500 verwendet wurde; Analysentemperatur 90°C, Trägergas Stickstoff von 2 Atü, Strömung 32 ml, Detektor FID. Die Flächen bzw. die Höhen beziehen sich auf Head-Space-Analyse bei einer Gleichgewichtstemperatur von 60°C, jeweils 0,5 ml Probe und 0,1 ml innerer Standard (2 ‰). Bei den untersuchten Paraldehyd-Fällen ist gleichzeitig der im Organismus enthaltene Acetaldehyd nachzuweisen (Abb. 5).

Nachweis organischer Gifte in biologischem Material

Der klassische Analysengang nach *Stas-Otto* ist nun über 100 Jahre alt. Trotzdem wird er noch heute in nur leicht veränderter Form verwendet. Es war erforderlich, einen allgemeinen Analysengang für ein unbekanntes organisches Gift zu besitzen, in der die modernen Analysemethoden sinnvoll einzubauen waren (12, 28, 52). Ein solcher Analysengang ist aus dem Schema ersichtlich. Die Extraktion erfolgt automatisch und vermeidet damit Emulsionsbildung durch das Schütteln im Scheidetrichter (48). Die automatische Extraktion isoliert die organischen Substanzen zu 90 bis 100 %, wobei auch die im Lösungsmittel schwerer löslichen Anteile erfassbar sind. Der wichtigste Fortschritt in der Untersuchung auf organische Gifte ist die Einführung der Dünnschichtchromatographie (34, 40, 49). Damit wurde eines der Hauptprobleme in der Toxikologie gelöst, nämlich die Reinigung der anfallenden Extrakte und die Auftrennung und Isolierung der Reinkomponenten. Mit den in jedem Laboratorium vorhandenen tabellierten Rf-Werten für die gebräuchlichsten organischen Gifte auf

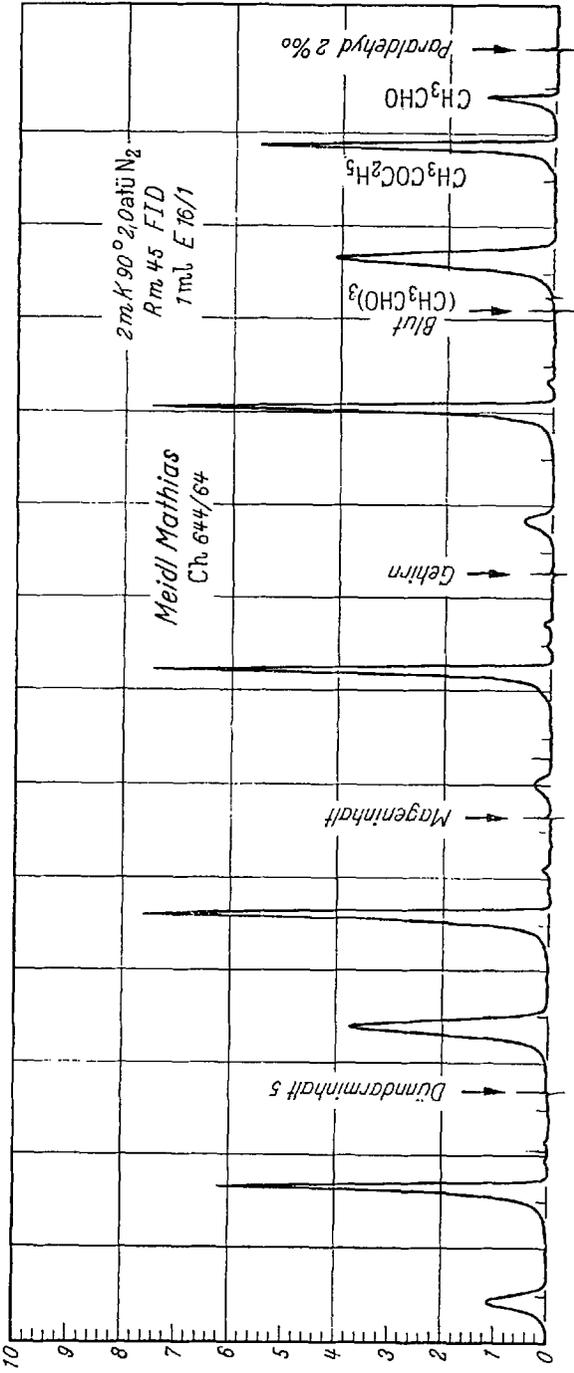
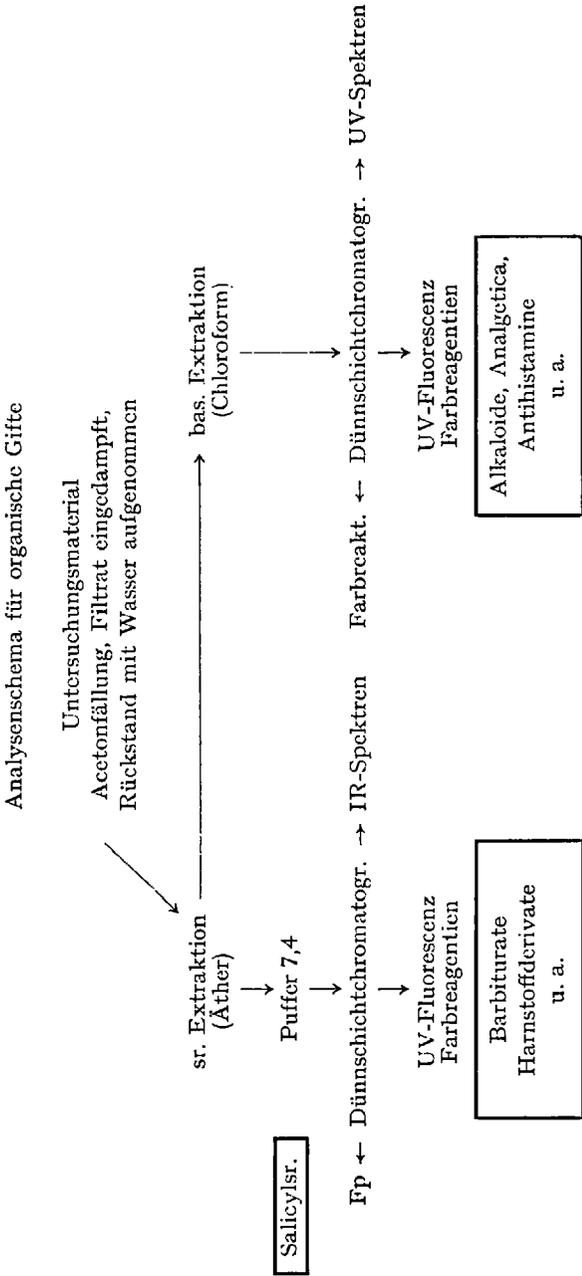


Abb. 5. Gaschromatographische Bestimmung von Paraldehyd in Blut, Gehirn, Magen- und Dünndarminhalt nach der Head-Space-Gas-Methode



Kieselgel G und mit zwei bis drei Eluationsmitteln können alle Probleme gelöst werden. Das gleiche gilt für die Anwendung üblicher Sprühreagenzien. Nur in seltenen Fällen ist die Anfertigung eines Spezialreagenzes erforderlich (28). Selbstverständlich werden die Dünnschichtplatten mit Kieselgel G und einem Fluoreszenzindikator verwendet, um eine zusätzliche Detektionsmöglichkeit im UV-Licht zu haben. Alle anderen Sorptionsmittel, wie Aluminiumoxid, Magnesiumsilicat, Kieselgur und andere, haben nach unseren Untersuchungen keinerlei signifikante Vorteile gegenüber Kieselgel G und würden nur die Analyse komplizieren. Als sehr praktisch haben sich fertige, käufliche Schichten erwiesen, entweder auf Kunststofffolien fixiert oder in ein Glasfasergerüst eingebettet. Substanzflecken können ausgeschnitten werden und sind damit für weitere Untersuchungen (Extraktion, Farbmessungen usw.) leicht zugänglich.

Die R_f -Werte in den Tabellen sollen natürlich nur als Anhaltspunkt dienen; zur exakten Identifizierung muß das Auftragen von Vergleichssubstanzen auf die gleiche Platte gefordert werden. Reicht die Identifizierung durch ein oder mehrere Sprühreagenzien (die auch in manchen Fällen übereinander aufgesprüht werden können) nicht aus, wird die Substanz durch Abkratzen und Extrahieren isoliert und mit physikalisch-chemischen Methoden (z. B. UV- oder IR-Spektrophotometrie), identifiziert. Die Isolierung folgt dabei zweckmäßig nach Entwicklung eines Strichchromatogramms, um mehr Reinsubstanz zu erhalten (bis zu einigen Milligrammen).

Untersuchungen in der Kriminaltechnik

Die meist verlangte Prüfung in der Kriminaltechnik ist die auf Identität. In solchen Fällen muß an Hand von Vergleichsmaterial eine Identität festgestellt oder ausgeschlossen werden. Um zu diesem Ziel zu kommen, ist nach einer verschieden großen Anzahl von charakteristischen Merkmalen in Probe und Vergleich zu suchen und sie miteinander zu vergleichen. Je nach Beweiswert des einzelnen Merkmales ist die Anzahl der zu suchenden analytischen Daten anzusetzen, wobei man sich jedoch in der Regel bemühen wird, die größtmögliche Anzahl auszumitteln. Nicht immer ist bei industriellen Massengütern trotz vieler übereinstimmender Merkmale eine absolute Aussage über Identität bzw. über die gleiche Art (gleiche Teilstücke, gleicher Ursprung) möglich, da einerseits die Fertigungstoleranzen sehr eng sind, andererseits aber bei genügender Analysengenauigkeit immer noch Unterschiede in der Zusammensetzung von Bruchstücken eines gleichartigen Teiles aufgefunden werden.

Es ist also in höchstem Maße von der Erfahrung des Untersuchers abhängig, das Analysenergebnis richtig zu interpretieren.

Es seien einige Beispiele von kriminaltechnischen bzw. chemisch-forensischen Untersuchungen herausgegriffen.

a) *Untersuchung von alkoholischen Getränken*

Bei Trunkenheitsdelikten ist es oft notwendig, zur Berechnung des mutmaßlichen Alkohol-Gehaltes den Alkohol-Wert in Getränken genau zu ermitteln. Gaschromatographisch ist dies einfach möglich, wenn man eine Probe des Getränkes mit einer gemessenen Menge Aceton als inneren Standard versetzt und die Mischung direkt über eine Vorsäule in den Gaschromatographen einbringt (23). An Hand einer Eichkurve läßt sich der Alkohol-Gehalt rasch ermitteln. Die Menge des zugesetzten Acetons richtet sich nach der zu erwartenden Konzentration und ist 10 % für niedere oder 20 % für hohe Äthylalkohol-Werte. Die Formel für die Auswertung bei den angegebenen Betriebsbedingungen lautet:

$$\text{g Äthylalkohol/100 ml} = \frac{F_{\text{Alkohol}}}{F_{\text{Aceton}}} \cdot 19,0$$

4 ml der Probe werden mit 1 ml Aceton versetzt und 5 Mikroliter zur Analyse verwendet. Analysenbedingungen: 2 m Säule, Polyäthylenglycol 1500, 90°C, Wasserstoff 40 ml pro Minute, Hitzdrahtdetektor.

$$\text{g Äthylalkohol/100 ml} = \frac{F_{\text{Alkohol}}}{F_{\text{Aceton}}} \cdot 9,0$$

10 ml der Probe werden mit 1 ml Aceton versetzt. Betriebsbedingungen wie oben.

Diese Methode erspart die zeitraubende und allenfalls verlustreiche Destillationsmethode, wonach der Äthylalkohol-Gehalt im Destillat refraktometrisch oder durch Ermittlung des spezifischen Gewichtes bestimmt wurde.

Für Vergleichsuntersuchungen alkoholischer Getränke kann man die Analyse der *Aromastoffe* heranziehen. Entweder man injiziert das Getränk direkt über eine Vorsäule in den Gaschromatographen oder man extrahiert die Aromastoffe mit einer Mischung von Äther und Pentan (27) und analysiert den Extrakt oder man wendet die Analyse in der Dampfphase bei erhöhter Temperatur an (8, 36, 37). Bei allen diesen Verfahren muß ein höchst empfindlicher Detektor, wie der Flammenionisationsdetektor, benutzt werden, um Spurenkomponenten, wie höhere Alkohole, Ester, Aldehyde und Ketone erfassen zu können. Ein gleichartiges Chromatogramm zeigt die gleichen Aromastoffe und damit

die Identität. Das Verfahren hat sich neuerdings bei der Erkennung illegaler Whisky- und Branntwein-Brennereiprodukte im Blut der Verbraucher bewährt. Jeder „Eigenbrand“ zeigt ein „typisches“ Gaschromatogramm. Es ist allerdings in den meisten Fällen so, daß die Anzeigeempfindlichkeit der üblichen Ionisationsdetektoren nicht ausreicht, um alle aromabestimmenden Komponenten zu erfassen. Oft erweist sich der Geschmacks- und der Geruchssinn als weitaus empfindlicher (1). Trotzdem kann ein Vergleichschromatogramm durch Bestimmung einer Vielzahl von Komponenten die Grundlage für einen Identitätsbeweis liefern, ohne absolut etwas über die Qualität eines Getränkes aussagen zu können.

b) *Untersuchung von Sprengstoffen*

Bei Sprengstoffanschlägen ist es nötig, die Art des Sprengstoffes zu ermitteln. Selbst nach Explosionen können in der nächsten Umgebung des Sprengkörpers geringste, unverbrannte Reste des Sprengstoffes isoliert



Abb. 6. Dünnschichtchromatographische Untersuchung von Sprengstoffen. Bedingungen: Kieselgel G, Benzol als Laufmittel, angefärbt mit 5 %iger Diphenylaminlösung in Äthylalkohol und 15 min UV-Belichtung bei 254 nm. Dozent Dr. G. Machata, „Analytische Verfahren der naturwissenschaftl. Kriminalistik“

werden. Sie werden mit einem mit Aceton getränkten Wattebausch aufgenommen und ein filtrierter Extrakt wird dann dünn-schichtchromatographisch untersucht (25). Die gebräuchlichen Sprengstoffe lassen sich auf der Platte einwandfrei trennen und erkennen. Als Lösungsmittel dient Benzol, zur Detektion sprüht man 5%ige Diphenylamin-Lösung in Äthylalkohol und belichtet die Platten 15 min unter UV-Licht (254 nm) (28).

c) *Nahschußzeichen*

Jede Feuerwaffe hinterläßt, wenn sie in einer geringen Entfernung auf ein Objekt abgefeuert wird, Nahschußzeichen. Diese Nahschußzeichen können unverbrannte Pulverteilchen, Pulverschmauch oder metallische Elemente aus Lauf, Geschoß oder dem Zündsatz der Patrone sein. Praktisch wird auf Pulverteilchen untersucht, die von dem Objekt mit Klebestreifen abgenommen werden können und dann mittels der Reaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure oder nach *Lunge* nachgewiesen werden. Das Erkennen von Pulverschmauch auf dunklem Gewebe bereitet große Schwierigkeiten. Während man früher zur Auffindung die IR-Photographie heranzog, gelingt heute die Untersuchung gezielt mittels eines IR-Bildwandlers. Der Pulverschmauch erscheint dunkel auf hellem Untergrund. Dieses Bild kann über den Bildwandler auch photographisch festgehalten werden. Der Einsatz von IR-Farbfilm zur Pulverschmauchdarstellung ist bei uns sehr zufriedenstellend verlaufen.

Die Bestimmung von metallischen Elementen aus Lauf, Geschoß oder Zündsatz wird zur Ermittlung der Schußentfernung benützt. Erforderlich ist jedoch dann das Vorhandensein der Waffe und der verwendeten Munition zu Vergleichszwecken, um einwandfreie Resultate zu erhalten. Zum Beispiel sei die Ermittlung des Antimon-Gehaltes an den Rändern von Schußlöchern erwähnt (13), ferner die Bestimmung von Barium und Blei aus den Zündladungen (7, 18). Zumindest lassen sich in den einzelnen Fällen, wo das Geschoß mehrere Teile eines Objektes, zum Beispiel eines Kleidungsstückes, durchschlagen hat die Schußrichtungen bzw. die Anzahl der Schüsse ermitteln. Die Mengen der Gehalte an Blei Antimon und Barium müssen bei dem gleichen Schuß in der Schußrichtung immer geringer werden. Zweckmäßigerweise verwendet man zur chemischen Untersuchung ein kleines Segment vom Rande des Schußloches, das direkt emissionsspektralanalytisch oder mittels Röntgenfluoreszenzanalyse untersucht wird. Die halbquantitative Auswertung genügt. In letzter Zeit sind Versuche unternommen worden, diese Schußelemente durch Aktivierungsanalyse zu bestimmen (2).

d) *Untersuchung von Treibstoffen, Ölen und Wachsen*

Die chemische Untersuchung von Treibstoffen gelingt am besten mittels Gaschromatographie. Um den ganzen Siedebereich (etwa 50 bis 200 °C) zu erfassen, muß mit Temperaturprogrammierung gearbeitet werden. Die Markenbenzine unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung nur sehr wenig, da sie nur aus einigen wenigen Produktionsstätten stammen. Die zugemischten Farben lassen sich dünn-schichtchromatographisch trennen und liefern wertvolle Angaben. Gleichzeitig lassen sich auf der Dünnschichtplatte schwerere Fraktionen als fluoreszierende Flecken im UV-Licht entdecken. Die Aufnahme eines UV-Spektrums nach entsprechender Verdünnung mit Alkohol zeigt den Aromaten-Anteil im Benzin, wobei gewisse Superbenzine durch besonders hohe Mengen auffallen können. Eine weitere Möglichkeit besteht in der flammenphotometrischen Untersuchung des Benzines direkt auf blei-haltige, organische Verbindungen (35). Man arbeitet mit einem Direktzerstäuberbrenner und mißt die Extinktion der Blei-Linie bei 403 nm. An Hand von Testlösungen wird der Gehalt an Blei-Alkylen festgestellt. Eine zweite Möglichkeit zur Bestimmung der Blei-Alkyle beruht auf der empfindlichen Anzeige metallorganischer Verbindungen durch den Elektron-Capture-Detektor. Bei diesem Verfahren gelingt es auch, die verschiedenen Blei-Alkyle aufzutrennen und einzeln zu bestimmen.

Bei der gaschromatographischen Untersuchung von Benzinfraktionen werden je nach Trennleistung der Säule eine Unmenge Peaks erhalten. Eine Identifizierung jeder einzelnen Komponente ist meistens nicht möglich. Man beschränkt sich in der Praxis auf die Festlegung der n-Alkane durch Zumischmethoden und arbeitet auf unpolaren Säulenfüllungen, die nach Siedepunkt trennen (3, 20). Zur weiteren Charakterisierung kann noch eine chemische Vortrennung angewandt werden. Die Benzinprobe wird mit 80 %iger und danach mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt (35). Damit werden die ungesättigten Kohlenwasserstoffe bzw. die Aromaten entfernt und durch Aufnahme eines Chromatogrammes vor und nach der Behandlung ermittelt.

e) *Untersuchung von Farbstoffen, Lackpigmenten und Tinten*

Die Untersuchung, besonders der fettlöslichen Farbstoffe, ist einfach und rasch mittels der Dünnschichtchromatographie möglich. In jedem Fall muß ein geeignetes Eluationsmittel durch ein Probechromatogramm festgestellt werden. Kriminalistisch von Bedeutung ist die Identifizierung von Lippenstiftfarben, Plakatfarben, Malerfarben u.a.m.

Die Untersuchung von Lackpigmenten auf chromatographischem Wege, zum Beispiel von Autolack, ist wichtig, da alle neuen Auto-

lackierungen, zumindest bei bestimmten Farben, rein organische Farbpigmente enthalten. Die zu untersuchenden Lackproben werden zweckmäßig in heißem Essigester gelöst und die filtrierten, eingeeengten Extrakte dünn-schichtchromatographisch untersucht. Neben den Farbanteilen der Pigmente können im gefilterten UV-Licht die stark fluoreszierenden Flecken der Weichmacher des Lackes nachgewiesen werden. In jedem Fall ist es nötig, Vergleichsmaterial gleichzeitig zu untersuchen.

Die Untersuchung von Tinten bzw. von Kugelschreiberpasten kann bei der Anwendung entsprechender Lösungsmittel, zum Beispiel Aceton : Alkohol (8:1), gute Resultate ergeben.

Die richtige Deutung aller analytischen Befunde wird stets nicht nur von der Ausrüstung eines Labors abhängig sein, sondern auch vom Analytiker selbst. Es wird deshalb die Forderung erhoben, ihn entsprechend zu informieren, so daß er bei der Analyse die Problemstellung, wie zum Beispiel die Vorgeschichte oder den vermuteten Tatablauf, kennt. Die Beweiskraft seiner Befunde kann nur der Analytiker übersehen. Sein Gutachten stellt somit einen sehr wesentlichen Teil seiner Tätigkeit dar und erleichtert die Wahrheitsfindung in der Rechtsprechung.

Literatur

1. *Addink, N. W. H.*: A rapid and accurate method of measuring line intensities in spectrochemical analysis. *Spectrochim. Acta* 4, 36 (1950).
2. *Baumgärtner, F., H. Stärk u. A. Schöntag*: Aktivierungsanalytische Antimonbestimmung im Nanogrammbereich zur Ermittlung von Schußentfernungen. *Z. analyt. Chem.* 197, 424 (1963).
3. *Bayer, E.*: *Gaschromatographie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg. Springer-Verlag 1962.
4. — Quality and Flavor by Gas Chromatography. *J. Gaschromatogr.* 4, 67 (1966).
5. *Březina, M., u. P. Zuman*: *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie*. Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig 1956.
6. *Brünnig, A.*: Über die nachträgliche Aufklärung eines Kapitalverbrechens durch naturwissenschaftliche Untersuchungsverfahren. *Arch. Kriminol.* 76, 132 (1924).
7. *Burger, E.*: Untersuchungen zum Nachweis von Pulverrückständen an der Schußhand. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* 53, 108 (1963).
8. *Buttery, R. G., and R. Teranishi*: Gas-Liquid Chromatography of Aroma of Vegetables and Fruit. *Analyt. Chemistry* 33, 1439 (1961).
9. *Cadman, W. J., u. Th. Johns*: Gaschromatographische Bestimmung von Äthylalkohol in Blut. *Beckman Report 1959*, Heft 4, 6.
10. *Chundela, B., and J. Janák*: Quantitative Determination of Ethanol. *J. Forensic Med.* 7, 153 (1960).
11. *Curry, A. S.*: Rapid Screening of Blood Samples for Volatile Poisons by Gas Chromatography. *Nature [London]* 195, 603 (1962).

12. — Poison Detection in Human organs. Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill. 1963.
13. *Dominguez, A. M., H. E. Christensen, L. R. Goldbaum, and V. A. Stemberge*: A Sensitive Procedure for Determining Carbon Monoxide in Blood or Tissue Utilizing Gas-Solid Chromatography. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1**, 135 (1959).
14. *Dotzauer, G., H. Redetzki, K. Johannsmeier u. Th. Bücher*: Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur Mikrobestimmung von Äthylalkohol. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* **41**, 15 (1952).
15. *Goldbaum, L. R., T. J. Domanski, and E. L. Schloegel*: Analysis of Biological Specimens for Volatile Compounds by Gas Chromatography. *J. Forensic Sci.* **9**, 63 (1964).
16. *Gorbach, G., u. F. Pohl*: Die Anreicherung und spektralanalytische Bestimmung der Spurenmetalle I, II, III. *Mikrochem.* **38**, 258, 328, 335 (1951).
17. *Grüner, O.*: Photometrische Bestimmung kleinster Alkoholmengen. *Blutalkohol* **2**, 91 (1963).
18. *Harrison, H. C., and R. Gilroy*: Firearms Discharge Residue. *J. Forensic Sci.* **4**, 184 (1959).
19. *Heilmeyer, L.*: Medizinische Spektralphotometrie. Verlag Gustav Fischer. Jena 1933.
20. *Kaiser, R.*: Chromatographie in der Gasphase. Bd. I, II, III, IV. Mannheim: Bibliographisches Institut. 1960, 1961, 1962, 1965.
21. *Kisser, W.*: Fluorometrische Mikrobestimmung von Thallium mit Rhodamin B. *Arch. Toxikol.* **20**, 108 (1963).
22. — unveröffentlicht.
23. — *G. Machata*: unveröffentlicht.
24. *Koch, O. G., u. G. A. Koch-Dedé*: Handbuch der Spurenanalyse. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1965.
25. *Koll, M., F. Wimmer, u. K. Fischer*: Zum Nachweis von Sprengstoffspuren im Schmauch. *Arch. Kriminol.* **130**, 1 (1962).
26. *Leithoff, H.*: Eine automatische Methode der Blutalkoholbestimmung. *Med. Welt* 1963, 959.
27. *Lemperle, E., u. R. Meche*: Gaschromatographische Analyse der flüchtigen Inhaltsstoffe von Weinen, Mosten und Spirituosen. *Z. analyt. Chem.* **212**, 18 (1965).
28. *Lundquist, F., and A. S. Curry*: Methods of Forensic Science. Vol. 1—4. John Wiley & Sons. New York-London 1962—1965.
29. *Machata, G., u. H. Neuninger*: Schnellverfahren zur Ermittlung von Metallgiften. *Arch. Toxikol.* **17**, 41 (1958).
30. — Über den Thalliumgehalt in menschlichen Knochen. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* **54**, 95 (1963).
31. — Neuere Methoden der Gaschromatographie, besonders für die gerichtliche Medizin. *Österr. Chem. Ztg.* **66**, 1 (1965).
32. — Die Routineuntersuchung der Blutalkoholkonzentration mit dem Gaschromatographen. *Mikrochim. Acta (Wien)* 1960, 79.
33. — Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung. Analyse der Dampfphase. *Mikrochim. Acta [Wien]* 1964, 262.
34. — Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie. *Mikrochim. Acta [Wien]* 1960, 80.
35. — Anwendung neuerer Verfahren in der naturwissenschaftlichen Kriminalistik. *Arch. Kriminol.* **127**, 1 (1961).

36. *Mackay, D. A. M., D. A. Lang, and M. Berdick*: Objective Measurement of Odor. *Analyt. Chemistry* **33**, 1369 (1961).
37. *Özeris, S., and R. Bassette*: Quantitative Study of Gas Chromatographic Analysis of Head Space Gas of Dilute Aqueous Solutions. *Analyt. Chemistry* **35**, 1091 (1963).
38. *Parker, K. D., Ch. R. Fontan, J. L. Yee, and P. L. Kirk*: Gas Chromatographic Determination of Ethyl Alcohol in Blood for Medicolegal Purposes. *Analyt. Chemistry* **34**, 1234 (1962).
39. *Pfeilsticker, K.*: Eine spektrochemische Mikrobestimmung des Bleis in biologischem Material. *Mikrochim. Acta [Wien]* **1956**, 319.
40. *Randerath, K.*: Dünnschichtchromatographie. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie. 1962.
41. *Sachs, V., u. G. Drögemeier*: Chromometrische Kohlenoxydbestimmungen in faulem Blut. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* **51**, 627 (1961).
42. *Schöntag, A.*: Die spektrographischen Folgen der Variation des Entladungsgases beim Kohlebogen und Hochspannungsfunken. *Mikrochim. Acta [Wien]* **1955**, 376.
43. — Neue Methode: Bestimmung der Schußentfernung durch spektrographische Spurenanalyse der „Schmauchelemente“ Antimon, Blei oder Barium. *Arch. Kriminol.* **120**, 4 (1957).
44. *Schwerd, W.*: Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. Max Schmidt-Römhild. Lübeck 1962.
45. — Kohlenoxydbestimmung im Blut mit dem Spektralphotometer. *Arch. Toxikol.* **15**, 288 (1955).
46. — u. *G. Schwemmer*: Der Einfluß der Alterung von Blutproben auf das Ergebnis der spektralphotometrischen Kohlenoxydbestimmung. *Arch. Toxikol.* **16**, 393 (1956).
47. *Slavin, W., S. Sprague, F. Rieders, and V. Cordova*: The Determination of Certain Trace Metals by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Perkin-Elmer Atomic Absorption Newsletter No. 17*, 7 (1964).
48. *Soliman El Gendi, W. Kisser u. G. Machata*: Isolierung und Nachweis basischer Arzneimittel in der Toxikologie. *Mikrochim. Acta [Wien]* **1965**, 120.
49. *Stahl, E.*: Dünnschichtchromatographie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1962.
50. *Stavinoha, W. B., and J. B. Nash*: Extraction and Flame Spectrophotometric Estimation of Thallium in Urine. *Analyt. Chemistry* **32**, 1965 (1960).
51. *Stewart, C. P., and A. Stolman*: Toxicology. Vol. I, II. Academic Press. New York-London 1960, 1961.
52. *Stolman, A.*: Progress in Chemical Toxicology. Vol. 1, 2. Academic Press. New York-London 1963, 1965.
53. *Vidic, E.*: Blutalkoholbestimmung nach dem Vanadinschwefelsäureverfahren. *Blutalkohol* **2**, 76, 436 (1963).
54. *Weinig, E.*: Die Polarographie im Dienste der Strafrechtspflege. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* **37**, 322 (1943).
55. — Die polarographische Bestimmung des Thalliums in Leichenteilen. *Dtsch. Ztschr. ges. gerichtl. Med.* **38**, 199 (1944).
56. *Widmark, E. M. P.*: Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung. Urban & Schwarzenberg. Berlin-Wien. 1932.

(Eingegangen am 18. April 1966)