Fortschritte auf dem Gebiete der Instrumentalanalyse organischer Verbindungen*

Von W. Simon

Organisch-Chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

Der Ausdruck Instrumentalanalyse hat in den letzten Jahren verbreitet Eingang gefunden, obschon er einen Pleonasmus enthält und somit bei strenger Beurteilung falsch ist. Jede chemische Analyse wird offensichtlich mit Hilfe von irgendwelchen Instrumenten ausgeführt, und es ist *a priori* kein triftiger Grund vorhanden, die eine Gruppe von analytischen Instrumenten von einer andern abzutrennen.

Ganz allgemein besteht ein analytisches Instrument im wesentlichen aus drei Teilen (Abb. 1)[1]. Diese sind der Geber, die Schaltung und die Anzeige. Der Geber,

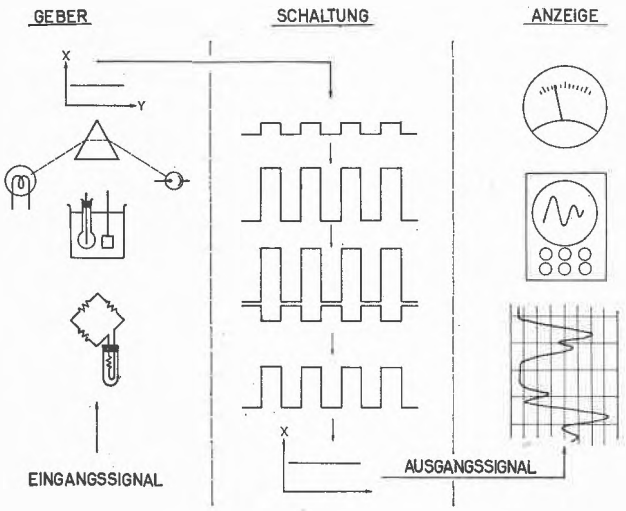


Abb. 1. Schematische Darstellung eines analytischen Instrumentes

der z. B. ein Widerstandsthermometer, eine Glaselektrodenmeßkette oder eine Lichtabsorptionsvorrichtung sei, wandelt eine Eingangsgröße wie die Temperatur, den *p*H einer Lösung oder die Lichtabsorption in ein geeignetes Ausgangssignal um. Dieses Ausgangssignal, das z. B. eine Spannung als Funktion der Zeit sei, wird in der Schaltung umgewandelt. Im vorliegenden Falle (Abb. 1) wird es zerhackt, verstärkt, mit einem Referenzsignal verglichen und wieder gleichgerichtet. Das Ausgangssignal dieses Netzwerkes wird schließlich einem Anzeigeinstrument, wie z. B. einem Schreiber, Kathodenstrahloszillographen, Voltmeter oder menschlichen Sinnesorganen, zugeführt. In den einen Instrumenten lassen sich die erwähnten Teile deutlich erkennen, in anderen Geräten hingegen wird die Funktion von mehr als einem dieser Teile durch ein einzelnes Element erfüllt.

Ein analytisches Instrument läßt sich somit als ein Gerät definieren, das eine bestimmte Eigenschaft eines Systems in eine brauchbare Anzeige umwandelt[1].

Die Fortschritte auf dem Gebiete der sogenannten Instumentalanalyse beruhen nun hauptsächlich darauf, daß der Zusammenhang zwischen dem Eingangssignal und der Anzeige im Laufe der Zeit ganz beträchtlich spitzfindiger geworden ist. Vor nur etwa zwanzig Jahren bestand das Instrumentarium eines Chemikers lediglich aus Waagen, volumetrischen Glaswaren, Kolorimetern bzw. Photometern und besonders einfachen elektrischen Geräten basierend auf der Poggendorffschen Kompensationsschaltung oder der Wheatstoneschen Brückenschaltung. Die Entwicklung der Elektronenröhre und der Elektronik hat in der analytischen Instrumentierung nach etwa 1940 vor allem infolge der Einführung von drei Elementen revolutionierend gewirkt[1]. Es sind dies a) die Verstärker hoher Eingangsimpedanz, b) die Stabilisierung von Schaltungen durch Feedback und c) die Servo-Mechanismen, die den Weg zur automatischen Registrierung von Daten sowie zur Automation allgemein wiesen.

Heute werden in einem organisch-chemischen Laboratorium Methoden wie UV-, IR-, Kernresonanz-Spektroskopie, Spektroskopie im sichtbaren Gebiet, Massenspektrometrie, Röntgenanalyse und Gas-Chromatographie neben den klassischen Analysenmethoden auf breitester Basis eingesetzt, wie dies aus Tabelle 1 ersichtlich ist. Es handelt sich in Tabelle 1 um die pro Jahr anfallende Zahl von Spektren im infraroten sowie ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, von Kernresonanzspektren, Gas-Chromatogrammen und schließlich von Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen. Die Anzahl Messungen wurde einerseits für einige Laboratorien der Basler chemischen Industrie und andererseits für das Organisch-Chemische Labor der ETH ermittelt. Als Einzugsgebiet ist jene Anzahl von Akademikern bezeichnet worden, der das betreffende analytische Labor zur Verfügung steht (Tabelle 1, letzte Kolonne). Die erstaunlich großen Zahlen zeigen, daß die Analytik in den betreffenden Laboratorien tatsächlich eine bedeutende Stellung einnimmt und daß als Folge des großen Verhältnisses der Anzahl Messungen zum Einzugsgebiet der Chemiker sich laufend mit der Interpretation der verschiedenen analytischen Daten auseinanderzusetzen hat.

Von den physikalisch-chemischen Kenngrößen, die in zunehmendem Maße zur Charakterisierung von organischen Verbindungen verwendet werden, lassen sich

* Antrittsvorlesung, gehalten am 10. Februar 1962.

[1] S. Z. Lewin, *Anal. Chem. 33* (1961) 23A.

Tabelle 1: Anzahl Messungen pro Jahr

	IR	UV/Sichtbar	NMR	C/H	Gas-Chromatographie	Einzugsgebiet
Organisch-Chemisches Labor der ETH	9000	2000	1000	5000	9000	117
Basler chemische Industrie	3800	15000	1000	7000	2200	65
	(5000)	(20000)	–	25000	(2000)	?
	800	32000	?	20000	1200	?

Anmerkung: Die eingeklammerten Zahlen sind unsicher.

einige auf rein theoretischer Basis aus der Konstitution und Konstellation der betreffenden Verbindung eindeutig ableiten. Für eine Gruppe anderer Kenngrößen ist dies jedoch nicht der Fall, so daß letztere im wesentlichen zur Klassifikation von organischen Verbindungen herangezogen werden. Das Ziel einer derartigen Klassifikation ist es, schließlich mehr oder weniger empirische Korrelationen zwischen der Konstitution und Konstellation der Verbindungen und ihren Kenngrößen herzuleiten. Eine solche Verwendung bedingt jedoch einerseits, daß die betreffenden Größen mit hoher Reproduzierbarkeit bestimmt werden können, und daß andererseits ein möglichst großes Vergleichsmaterial gesammelt wird. Es ist naheliegend, diese doppelte Zielsetzung durch eine Automatisierung des Bestimmungsprozesses zu erreichen. Dadurch wird die Beeinflussung der Analysenergebnisse durch menschliche Unzulänglichkeiten weitgehend eliminiert, die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse steigt, und gleichzeitig werden die Möglichkeiten geschaffen, mit einem minimalen Arbeitsaufwand das notwendige Vergleichsmaterial zu ermitteln.

Ein Beispiel für die Zunahme der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse durch die Einführung der Automation ist in der Mikrobestimmung von Dissoziationskonstanten in nichtwässerigen Lösungsmitteln gegeben[2] (vgl. Tabelle 2). Die mit pK^*_{MCS} bezeichneten Größen[2] sind durch Titration von 0,1 bis 1,5 mg der zu untersuchenden Säuren oder Basen in einem bestimmten Lösungsmittel (80 Gewichtsprozent Methylcellosolve[MCS]/20 Gewichtsprozent Wasser) entsprechend einem Standardverfahren ermittelt worden. Der pK^*_{MCS}-Wert entspricht dem bei halber Neutralisation der Probe beobachteten, mit einem Glaskalomelelektrodensystem ermittelten sogenannten praktischen pH-Wert[3] der Lösung.

Tabelle 2: Standardabweichung s von pK^*_{MCS}-Werten[2]

Bestimmung	s	Freiheitsgrade
Manuell	0,14	232
Vollautomatisch	0,06	458

Bei manueller Durchführung der Messungen ließ sich aus den über mehrere Jahre gesammelten Ergebnissen eine Standardabweichung der ermittelten pK^*_{MCS}-Werte von 0,14 pK^*_{MCS}-Einheiten errechnen. Durch Einführung der vollautomatischen Bestimmung[4], in der sowohl die Probeneinfüllung in das Meßgefäß als auch die Titration und Spülung der Meßgefäße automatisiert ist, konnte eine Reduktion der Standardabweichung um mehr als einen Faktor 2 beobachtet werden. Die Verkleinerung des Meßfehlers ist darauf zurückzuführen, daß die durch den Menschen verursachten Schwankungen im Operationsablauf weitgehend eliminiert wurden.

Auf Grund des großen Tatsachenmaterials, das infolge der Automation dieses Bestimmungsprozesses gesammelt werden konnte, ließen sich wertvolle Zusammenhänge zwischen der Konstitution und Konstellation von Verbindungen und ihren pK^*_{MCS}-Werten aufdecken, von denen hier lediglich ein Beispiel erwähnt sei:

Es ist seit längerem bekannt[5], daß deutliche Unterschiede in der Acidität zwischen den beiden isomeren Cyclohexancarbonsäuren mit äquatorialer und axialer Lage der Carboxylgruppe bestehen. Die geringere Acidität des axialen Isomeren (höherer pK^*_{MCS}-Wert, vgl. Abb. 2) kann darauf zurückgeführt werden, daß die

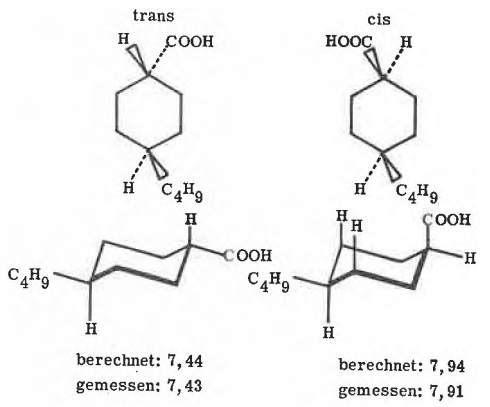
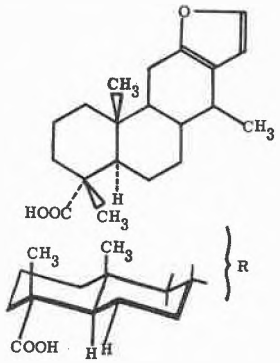


Abb. 2. pK^*_{MCS}-Werte von 4-t-Butylcyclohexan-carbonsäuren[6]

[2] W. Simon, *Helv. Chim. Acta 41* (1958) 1835.
[3] R.G. Bates, *Electrometric pH Determinations*, New York/London 1954, S. 31 und 150.
K. Schwabe, *Fortschritte der pH-Meßtechnik*, Berlin 1953, S. 23.
[4] W. Simon und E. Heilbronner, *Helv. Chim. Acta 40* (1957) 210.
[5] R.D. Stolow, *J. Amer. Chem. Soc. 81* (1959) 5806; J.F.J. Dippy, S.R.C. Hughes und J.W. Laxton, *J. Chem. Soc. 1954*, 4102; H. Van Bekkum, P.E. Verkade und B.M. Wepster, *Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch. (Amsterdam) B 64* (1961) 161.
[6] M. Tichy, J. Jonas und J. Sicher, *Coll. Czech. Chem. Commun. 24* (1959) 3434.

Solvatation des Anions infolge der räumlichen Nähe der beiden axialen Wasserstoffatome (Abb. 2) zusätzlich gestört wird[6]. Unter Annahme der Additivität der Einflüsse dieser axialen Substituenten in 3-Stellung relativ zur axialen Carboxylgruppe lassen sich die pK^*_{MCS}-Werte gewisser Verbindungen im wesentlichen durch einfaches Abzählen analoger Wechselwirkungen abschätzen (Abb. 2)[7]. Die Regel zur Abschätzung dieser pK-Werte ist bis heute an etwa 45 zum Teil recht komplizierten Verbindungen bestätigt worden (Abb. 3). Ausnahmen sind uns bis jetzt noch keine bekanntgeworden.

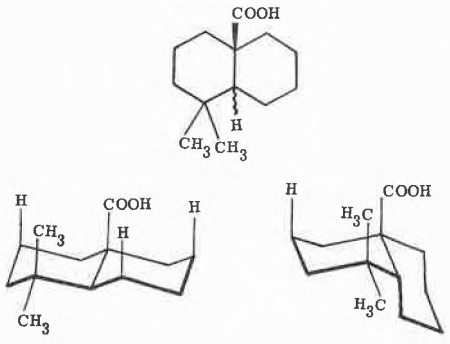


berechnet: 7,91
gemessen: 8,01

Abb. 3. pK^*_{MCS}-Werte von Vinhaticoesäure

Anmerkung: Die Wechselwirkung des äquatorialen Wasserstoffatoms mit der äquatorialen Carboxylgruppe ist geometrisch äquivalent derjenigen zwischen den entsprechenden axialen Substituenten.

Die größte soweit beobachtete Abweichung zwischen berechneten und gemessenen Werten beträgt 0,23 pK^*_{MCS}-Einheiten. Eine typische Anwendung der Methodik ist in Abb. 4 wiedergegeben. Von R. F. C. Brown[8] sind zwei



Smp.: 51°C

berechnet: 8,66
gemessen: 8,86

142-143°C

berechnet: 8,16
gemessen: 8,30

Abb. 4. pK^*_{MCS}-Werte von Decalin-carbonsäuren[8] (R. F. C. Brown, Privatmitteilung)

isomere Verbindungen synthetisiert worden, von denen die eine einen Schmelzpunkt von 51 °C, die andere von 142 bis 143 °C aufweist. Es stellte sich die Frage, welcher der beiden Proben die *cis*- bzw. *trans*-Ringverknüpfung zuzuordnen ist. Die Titration von je 0,7 mg der beiden Verbindungen ergab innerhalb einer Stunde die notwendige Information. Auf Grund der gemessenen pK^*_{MCS}-Werte und ihres Vergleichs mit den berechneten Werten ist der Verbindung mit dem Schmelzpunkt von 51 °C eindeutig die *trans*-Anordnung zuzuschreiben. Eine klare Zuordnung mit Hilfe anderer Methoden wäre kaum möglich gewesen und hätte einen wesentlich größeren Aufwand bedingt.

Bei der Automation analytischer Prozesse lassen sich prinzipiell zwei Wege beschreiten. Der erste besteht darin, daß die Laborarbeit des Analytikers in den wesentlichen Schritten nachgebildet wird. Der zweite im allgemeinen vorzuziehende Weg beruht auf dem Einsatz von Arbeitsmethoden, die grundlegend von der manuellen Arbeitstechnik abweichen, indem beispielsweise kontinuierliche Prozesse angewendet werden. Ein Gerät dieser Art ist in Abb. 5 wiedergegeben. Die zu analysierenden Proben werden in Präparategläsern auf einem horizontal liegenden Teller vorgelegt (Abb. 5, rechts). Mit Hilfe eines Pumpensystems erfolgt selbsttätig ein Absaugen der Proben aus den einzelnen Gläsern. In gleicher Weise werden die notwendigen Reagenzien kontinuierlich aus den entsprechenden Vorratsgefäßen entnommen und mit der Probelösung in einer Mischspirale vereinigt. Eventuell vorhandene störende Verunreinigungen lassen sich in einem Dialysator (Abb. 5, Mitte) abtrennen. Nach der Erwärmung des strömenden Gemisches, die zur Ausbildung einer Farbreaktion zwischen der zu bestimmenden Komponente und den Reagenzien führt, erfolgt eine Messung der Lichtabsorption der Lösung in einem Durchflußkolorimeter. Das Ergebnis wird schließlich mit Hilfe eines Schreibers (Abb. 5, links) festgehalten. Die Meßanlage läßt sich allgemein auf Bestimmungen anwenden, die auf der Ausbildung einer Farbreaktion beruhen. Für eine Einzelbestimmung beansprucht die selbsttätig arbeitende Apparatur in günstigsten Fällen eine Zeit von weniger als 2 Minuten.

Eine ähnliche Arbeitstechnik hat in der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren besonders befruchtend gewirkt. Infolge der Tatsache, daß in den letzten Jahren in den verschiedensten Laboratorien Arbeiten auf dem Gebiete der Eiweißchemie beträchtlich intensiviert wurden, ist das Interesse für Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren in Geweben, physiologischen Flüssigkeiten und Proteinhydrolysaten entsprechend gestiegen. Grundlegende Arbeiten dazu sind von Stein, Moore und Spakman[9] durchgeführt worden, indem Trennungen von kleinen Mengen von Aminosäuren an Ionenaustauschharzen vorgenommen wurden. Diese Arbeitstechnik hat unmittelbar nach ihrer

[7] P. F. Sommer, V. P. Arya und W. Simon, *Tetrahedron Letters 1960*, Nr. 20, S. 18.

[8] R. F. C. Brown, Australian National University, Canberra, danken wir aufrichtig für die Zusendung der Proben und die Erlaubnis zur Veröffentlichung der Daten.

[9] S. Moore und W. H. Stein, *J. Biol. Chem. 192* (1951) 663, *211* (1954) 893.

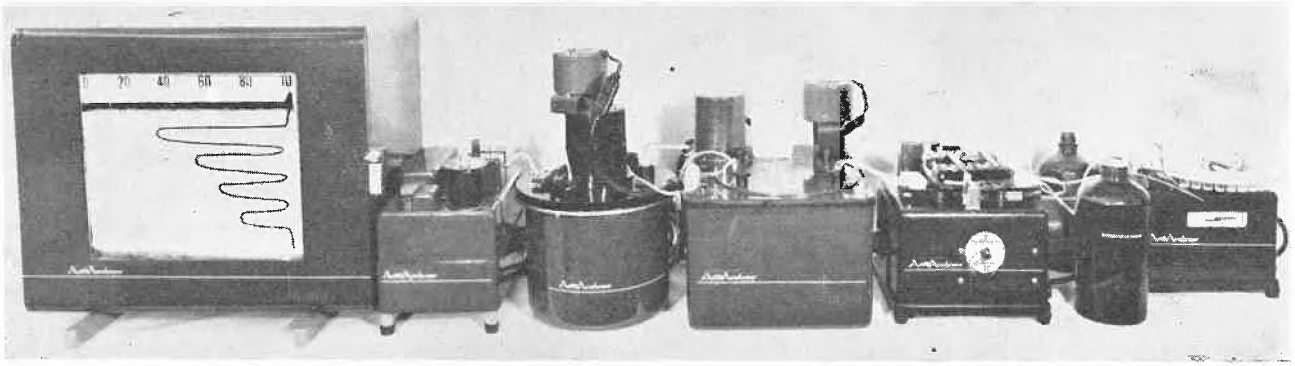


Abb. 5. Technicon Auto Analyzer

Automation und nach der Veröffentlichung der entsprechenden Arbeiten[10] im Jahre 1958 allgemein Eingang gefunden. Normalerweise werden Mengen von Proteinhydrolysaten von etwa 2 bis 3 mg verwendet, die auf eine Ionenaustauschkolonne aufgezogen werden. Die Elution der einzelnen Aminosäuren erfolgt selbsttätig durch die Anlage, indem Pufferlösungen verschiedener *p*H-Werte durch die Kolonne gepumpt werden. Die am Kolonnenende austretende Lösung wird mit Ninhydrin vermischt und die nach dem Aufwärmen der Mischung durch Reaktion der Aminosäuren mit dem Ninhydrin auftretende Blaufärbung kontinuierlich gemessen und registriert. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 6 wiedergegeben, in der die Lichtabsorption der Lösung in Funktion der durch die Kolonne gepumpten Puffermenge dargestellt ist[11]. In einer Zeit von etwa 24 Stunden lassen sich sämtliche in Eiweißstoffen normalerweise vorhandenen Aminosäuren auftrennen. Aminosäuren in Mengen von je zwischen 20 bis 300 γ sind mit einer Präzision von etwa 1 bis 3% erfaßbar.

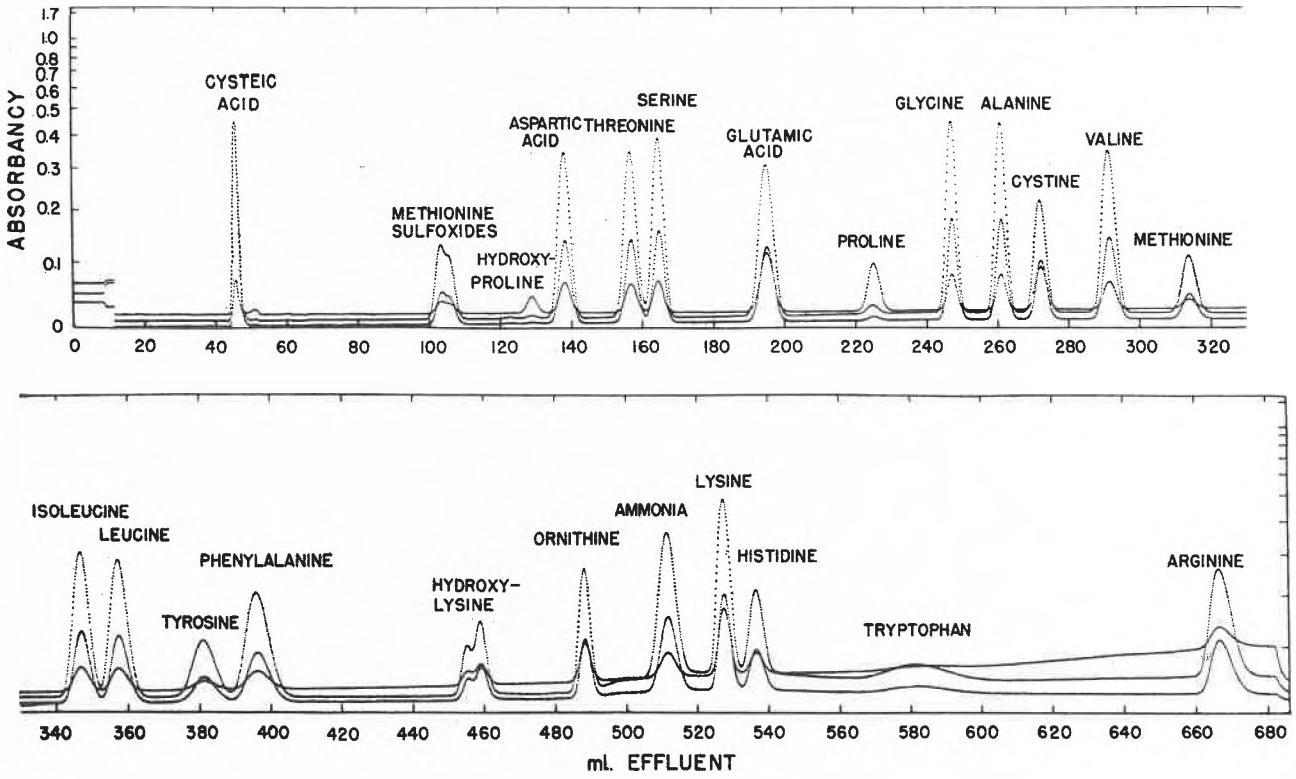


Abb. 6. Chromatogramm eines Aminosäuregemisches
(K. A. Piez und Louise Morris, *Anal. Biochem. 1* [1960] 187)

[10] D. H. Spakman, W. H. Stein und S. Moore, *Anal. Chem. 30* (1958) 1190.

[11] K. A. Piez und Louise Morris, *Anal. Biochem. 1* (1960) 187.

Die rasche und zuverlässige Routinebestimmung von Molekulargewichten organischer Verbindungen an kleinen Probemengen ist ein aktuelles Problem der Analytik. Für Verbindungen mit Molekulargewichten unter etwa 600 lassen sich zwar im allgemeinen mit Hilfe der Massenspektrometrie Bestimmungen hoher Präzision durchführen; die notwendige Meßapparatur ist jedoch recht anspruchsvoll und teuer[12]. Eine weitere zuverlässige Methodik der Molekulargewichtsbestimmung ist die Röntgenanalyse, die leider ebenfalls einen beträchtlichen apparativen Aufwand bedingt und verhältnismäßig viel Arbeitszeit beansprucht. Zur Anwendung der Methodik sind zudem Kristalle notwendig, für die eine Dichtebestimmung vorgenommen werden muß, die denn auch die Hauptfehlerquelle der Methodik bildet[13].

Eine vielversprechende Methodik der Molekulargewichtsbestimmung ist in den letzten drei Jahren in verschiedenen Laboratorien intensiv bearbeitet worden und basiert auf einer Beobachtung von HILL[14] aus dem Jahre 1930[15]. Das Prinzip der Methodik ist in Abb. 7 dargestellt. In einer auf etwa ± 0,001 °C thermostatierten

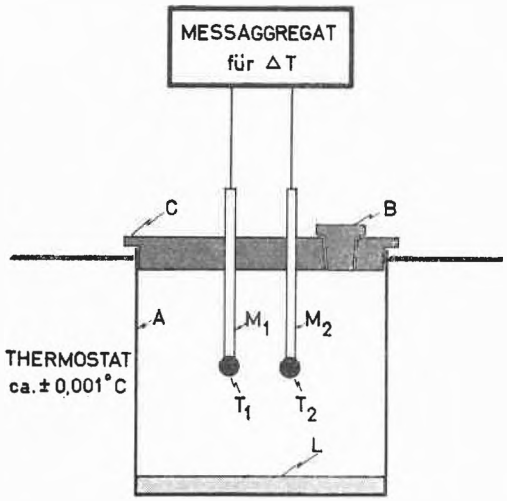


Abb. 7. Schematische Darstellung des Arbeitsprinzipes der thermoelektrischen Molekulargewichtsbestimmung

A Meßzelle. *B* und *C* Stopfen. M_1 und M_2 Sonden zur Temperaturmessung. T_1 Lösungsmitteltropfen. T_2 Lösungstropfen. *L* Lösungsmittel

Zelle befindet sich ein geeignetes Lösungsmittel. In die an Lösungsmittel gesättigte Zellenatmosphäre ragen zwei Temperaturmeßelemente, vorteilhaft Thermistoren. Auf den einen Thermistor wird ein Tropfen Lösungsmittel, auf den zweiten Thermistor ein Tropfen der Lösung der zu untersuchenden Verbindung im gleichen Lösungsmittel gebracht. Bei Versuchsbeginn seien die Temperaturen der beiden Tropfen und der Zelle gleich groß. Der Dampfdruck an der Lösungstropfenoberfläche ist somit kleiner als jener der Zellenatmosphäre, so daß eine Kondensation von Lösungsmittel am Lösungstropfen stattfindet. Dieser wärmt sich so lange auf, bis schließlich ein Dampfdruckgleichgewicht herrscht. Die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Tropfen wird in diesem semistationären Zustand gemessen. Aus dieser Temperaturdifferenz ΔT und der Konzentration der eingebrachten Probelösung läßt sich nach der Eichung der Meßapparatur das Molekulargewicht der Probe berechnen. Im Gegensatz zu den konventionellen kryoskopischen und ebullioskopischen Methoden kann hier bei Zimmertemperatur gearbeitet werden, so daß Probenzersetzungen und Reaktionen der Proben mit dem Lösungsmittel kaum auftreten. Die Anforderungen, die an die Temperaturmessung gestellt werden, sind recht hoch. Bei den etwa 0,01-molaren untersuchten Lösungen betragen die Größen ΔT etwa 0,01 °C, die auf mindestens 1% genau gemessen werden müssen. Somit sind Temperaturdifferenzen von 10^{-4} bis 10^{-5} ° zu erfassen. Ein in unserem Laboratorium entwickeltes Gerät, das in der Routinebestimmung von Molekulargewichten Eingang gefunden hat, ist in Abb. 8 dargestellt[16]. Mit Hilfe dieser Apparatur lassen sich im allgemeinen Molekulargewichte an Probemengen von etwa 1 mg innerhalb von etwa 20 Minuten mit einer Standardabweichung von etwa 2%



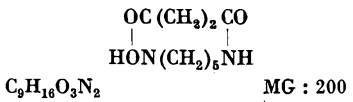
Abb. 8. Gesamtansicht der Apparatur zur thermoelektrischen Molekulargewichtsbestimmung

Links: Speisegerät sowie Einrichtung zur Messung der Temperaturdifferenz. Techts: Thermostat mit Injektionsvorrichtung für die Proben sowie Beobachtungsrohr

bestimmen[16]. Über ein Beispiel für den praktischen Einsatz der Methodik ist von KELLER-SCHIERLEIN und PRELOG[17] im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen an den Ferrioxaminen berichtet worden. Die Ferrioxamine sind eisenhaltige Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. Der eisenfreie Grundkörper des Ferrioxamins E erwies sich überraschenderweise mit dem früher aus einem *Nocardia*-Stamm isolierten Nocard-

[12] J. H. BEYNON, *Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry*, Amsterdam/London/New York/Princeton 1960.
[13] W. L. BRAGG, *Acta Crystallogr. 1* (1948) 46; *International Tables for X-Ray Crystallography*, Vol. III, Birmingham 1962.
[14] A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London) A 127* (1930) 9.
[15] Vgl. dazu W. SIMON und C. TOMLINSON, *Chimia 14* (1960) 301.
[16] DOROTHÉE WEGMANN, C. TOMLINSON und W. SIMON, *Microchem. J.*, im Druck.
[17] W. KELLER-SCHIERLEIN und V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta 44* (1961) 1981.

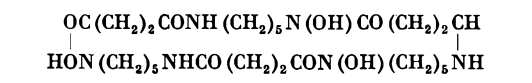
amin[18] identisch, für das seinerzeit die Konstitution mit dem 11-gliedrigen Ring vorgeschlagen wurde[19].



$C_9H_{16}O_3N_2$ MG : 200

I

Auf Grund des spektroskopischen und polarographischen Verhaltens von Ferrioxamin E wäre jedoch für den eisenfreien Grundkörper ein 33-gliedriger Ring mit einem Molekulargewicht von 601 adäquater gewesen.



$C_{27}H_{48}O_9N_6$ MG : 601

II

Die Überprüfung der Molekulargewichtsbestimmungen, die seinerzeit zur Formel I führten, zeigte, daß diese nicht genügend zuverlässig waren. Die kryoskopische Methodik nach RAST mit Campher als Lösungsmittel war nicht anwendbar, da das Lösungsmittel beim Erhitzen mit dem Nocardamin reagierte. Die Methode der isothermen Destillation nach SIGNER mit Methanol als Lösungsmittel gab große Streuungen in den Meßergebnissen, da die Löslichkeit des Nocardamins zu gering war. Mit Hilfe der thermoelektrischen Molekulargewichtsbestimmung[16] ergab sich nun in Methanol und Pyridin als Lösungsmittel ein Molekulargewicht von 545 ± 55 für Nocardamin bzw. von 716 ± 14 für das Acetyl-nocardamin ($C_{33}H_{54}O_{12}N_6$, MG : 727) in bester Übereinstimmung mit der Konstitution II, die dem 33-gliedrigen Ring entspricht und die inzwischen durch Synthese des Ferrioxamins E bewiesen wurde[20].

Die Gas-Chromatographie ist zweifellos neben der Kernresonanzspektroskopie die wertvollste Bereicherung auf dem Gebiete der organischen Analytik, die uns das letzte Jahrzehnt gebracht hat. Mit Hilfe der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie lassen sich bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen praktisch alle Trennprobleme der analytischen organischen Chemie lösen, vorausgesetzt, daß die Verbindungen denügend flüchtig und stabil sind. So sind z. B. Alkaloide[21], Steroide[22], Isotopen[23] sowie optische Isomere[24] erfolgreich getrennt worden. Die Veröffentlichung der ersten Arbeiten auf dem Gebiete der Gas-Flüssigkeit-Chromatographie erfolgte bekanntlich durch JAMES und MARTIN[25] im Jahre 1952, und bereits heute, also zehn Jahre später, wird in nahezu jedem organisch-chemischen Laboratorium diese Arbeitstechnik täglich eingesetzt. Ein Hinweis auf den durchschlagenden Erfolg dieser Methodik ist auch darin zu finden, daß gegenwärtig auf der ganzen Welt fünfundvierzig bis fünfzig Firmen gas-chromatographische Geräte herstellen und tatsächlich auch verkaufen.

Die Bedeutung der Kernresonanzspektroskopie (NMR) für die organische Chemie ist erst nach 1951, also erst etwa fünf Jahre nach der Entdeckung der Kernresonanzspektroskopie[26], offensichtlich geworden. Es hat sich um diese Zeit gezeigt, daß die Frequenz der Absorption von Energie von gewissen Kernen in einem Magnetfeld deutlich von der Umgebung der entsprechenden Kerne abhängt (Chemical Shift), daß also aus der Absorptionsfrequenz Rückschlüsse auf die Struktur von Molekeln gezogen werden können[27]. Noch vor etwa 1958 waren verhältnismäßig wenig Anwendungen auf Probleme der organischen Strukturanalyse bekannt, so daß eine Anschaffung der recht kostspieligen Instrumente nur für wenige Laboratorien in Frage kam. Heute, also etwa drei Jahre später, sind Laboratorien, die nicht im Besitze eines hochauflösenden Kernresonanzspektrometers sind, gegenüber den übrigen Laboratorien entschieden im Nachteil[28].

Neben dem Einsatz für die reine Strukturanalyse läßt sich die NMR-Spektroskopie, wie dies aus Tabelle 3 ersichtlich ist, unter anderem auch für genaue Wasserstoffbestimmungen heranziehen. Die Präzision der Ergebnisse ist durch andere Methoden kaum zu übertreffen.

Tabelle 3: Quantitative Wasserstoffbestimmung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie[29]

Verbindung	% H theoretisch	% H NMR
Naphthalin	6,29	6,28 ± 0,01
Äthylbenzol	9,48	9,48 ± 0,04
Wasser	11,17	11,08 ± 0,04
Chloroform	0,843	0,830 ± 0,01
Dioxan	9,16	9,13 ± 0,09
17α-Hydoxyprogesteron	9,16	9,18 ± 0,04
3α-Acetoxypregnanon-(20)	9,99	9,99 ± 0,06

[18] A. STOLL, A. BRACK und J. RENZ, *Schweiz. Z. Path. Bakt. 14* (1951) 225; A. STOLL, J. RENZ und A. BRACK, *Helv. Chim. Acta 34* (1951) 862.

[19] R. F. C. BROWN, G. BÜCHI, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG und J. RENZ, *Helv. Chim. Acta 43* (1960) 1868.

[20] W. KELLER-SCHIERLEIN und V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta 45* (1962) 590.

[21] H. A. LLOYD, H. M. FALES, P. F. HIGHET, W. J. A. VAN DEN HEUVEL und W. C. WILDMAN, *J. Amer. Chem. Soc. 82* (1960) 379.

[22] W. J. A. VAN DEN HEUVEL, C. C. SWEELEY und E. C. HORNING, *J. Amer. Chem. Soc. 82* (1960) 3481.

[23] E. GLUECKAUF und G. P. KITT, *Disc. Faraday Soc. 7* (1949) 199.

[24] G. GOLDBERG und W. A. ROSS, *Chem. & Ind. 1962*, 657; G. KARAGOUNIS und G. LIPPOLD, *Naturwiss. 46* (1959) 145. Vgl. hingegen N. A. GOECKNER, *Diss. Abstr. 19* (1959) 3127.

[25] A. T. JAMES und A. J. P. MARTIN, *Biochem. J. 50* (1952) 679; *Analyst 77* (1952) 915.

[26] E. M. PURCELL, H. C. TORREY und R. V. POUND, *Physic. Rev. 69* (1946) 37; F. BLOCH, W. W. HANSEN und M. E. PACKARD, *Physic. Rev. 69* (1946) 127.

[27] W. D. KNIGHT, *Physic. Rev. 76* (1949) 1259; W. G. PROCTOR und F. C. YU, *Physic. Rev. 77* (1950) 717; G. LINDSTRÖM, *Physic. Rev. 78* (1950) 817; H. A. THOMAS, *Physic. Rev. 80* (1950) 901; W. C. DICKINSON, *Physic. Rev. 77* (1950) 736.

[28] D. H. R. BARTON in L. M. JACKMAN, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, London/Oxford/New York/Paris 1959, S. ix.

Zur Messung erfolgte eine Integration der Resonanzsignale sämtlicher Protonen der betreffenden Probe. Diese Integrale wurden mit jenen von Standards verglichen[29]. Das heute am meisten verbreitete und billigste Gerät, daß immerhin noch etwa 110000 Schweizer Franken kostet und zur Untersuchung von Wasserstoffkernen allein eingesetzt werden kann, ist in Abb. 9 dargestellt.

Es ist interessant, festzustellen, daß trotz der Einführung von neueren Analysenmethoden auch klassische Verfahren, wie z. B. die quantitative Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Verbindungen, immer noch verbreitet eingesetzt werden und sogar an Interesse gewinnen. Eine Umfrage in den Laboratorien der Basler chemischen Industrie ergab, daß die Anzahl ausgeführter Kohlenstoff/Wasserstoff-Bestimmungen durchwegs etwa parallel der Anzahl aufgenommener Spektren im infraroten sowie ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich um etwa 20% pro Jahr steigt. Der Anstieg ist entschieden größer als der Zuwachs an Chemikern, den diese Firmen erfahren. Die quantitative Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff ist im allgemeinen heute die in organisch-analytischen Laboratorien am häufigsten durchgeführte Analyse. In deff Routinebestimmung von Kohlenstoff und Wasserstor wird die rund fünfzig Jahre alte PREGLsche Methodik mit bescheidenen Abänderungen allgemein verwendet. Die Methodik besteht darin, daß Probemengen von 3 bis 4 mg verbrannt und die Verbrennungsprodukte Kohlendioxyd und Wasser durch selektive Absorption getrennt werden. Die Menge an gebildetem Kohlendioxyd und Wasser wird durch Messungen der Gewichtszunahme der Absorptionsapparate bestimmt. Eine Störquelle der Methodik besteht darin, daß kleine Gewichtszunahmen von verhältnismäßig schweren Absorptionsvorrichtungen bestimmt werden müssen. Es ist dies am besten mit der Methodik zu vergleichen, nach der das Gewicht eines Kapitäns ermittelt wird durch Wägen des Schiffes mit Kapitän, Wägen des Schiffes ohne Kapitän und anschließender Differenzbildung. Eine prinzipielle Grenze in der Anwendbarkeit des PREGLschen Verfahrens liegt darin, daß es auch beim Einsatz empfindlicherer Waagen nicht möglich ist, diese Methodik ohne großen Verlust an Meßgenauigkeit auf Probemengen von 1 mg und weniger anzuwenden[30]. Der Hauptnachteil der Methodik ist jedoch der, daß sie nur dann zu reproduzierbaren Analysenergebnissen führt, wenn sämtliche Versuchsparameter peinlich genau konstant gehalten werden. Dadurch werden an den Analytiker hohe Anforderungen hinsichtlich Geschicklichkeit und besonders hinsichtlich Konzentrationsfähigkeit gestellt. Da sich einerseits die meisten auszuführenden Operationen in jedem Analysengang in derselben genau vorgegebenen Weise wiederholen und da andererseits ein gleichförmiger Operationsablauf von besonderer Wichtigkeit ist, dürfte eine Automation des Bestimmungsprozesses angezeigt sein.

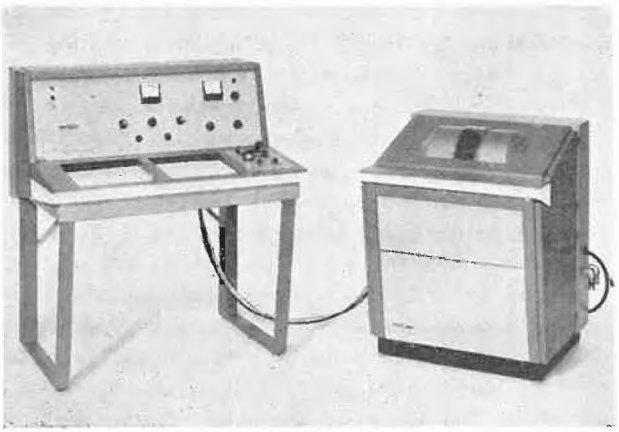


Abb. 9. Kernresonanz-Spektrometer Modell A-60 der Firma Varian Associates, Palo Alto (California, USA)

Eine Methodik zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Verbindungen, die dazu geeignet wäre, die allgemein verwendete PREGLsche Methodik zu ersetzen, muß folgende Bedingungen erfüllen:

a) Es muß eine Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in einem Analysengang an Proben organischer Verbindungen verschiedenster Zusammensetzung möglich sein.
b) Die Standardabweichung einer Einzelbestimmung darf bei einer Probenmenge von rund 1 mg nicht größer sein als jene der konventionellen gravimetrischen Verfahren mit Probemengen von etwa 3 bis 4 mg (Standardfehler einer Einzelbestimmung $< 0{,}2\%$ absolut).
c) Der für eine Einzelbestimmung benötigte Zeitaufwand muß kleiner sein als jener der konventionellen gravimetrischen Verfahren (< 20 Minuten).
d) Die Methodik darf keine besonderen Ansprüche hinsichtlich Geschicklichkeit und Konzentrationsfähigkeit des Analytikers stellen, so daß die Beeinflussung der Analysenergebnisse durch menschliche Unzulänglichkeiten auf ein Minimum reduziert wird.
e) Der apparative Aufwand soll infolge der bestechenden Einfachheit der konventionellen Apparaturen zur gravimetrischen Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung verhältnismäßig klein gehalten werden (unter etwa 15000 Schweizer Franken).

Die Suche nach einer Methodik zur Umgehung der gravimetrischen Erfassung der Verbrennungsprodukte ist besonders in den letzten Jahren intensiv betrieben worden. So sind Verfahren vorgeschlagen worden, bei denen die Verbrennungsprodukte manometrisch bzw. gasvolume-

[29] J. N. SHOOLERY, *NMR & EPR Spectroscopy*, Oxford/London/New York/Paris 1960, S. 122.

[30] J. A. KUCK, P. L. ALTIERI und A. K. TOWNE, *Mikrochim. Acta 1954*, 1; J. R. M., *Chem. Products 21* (1958) 446; G. KAINZ, *Mikrochem. 40* (1953) 299; *Österr. Chemiker-Ztg. 57* (1956) 216.

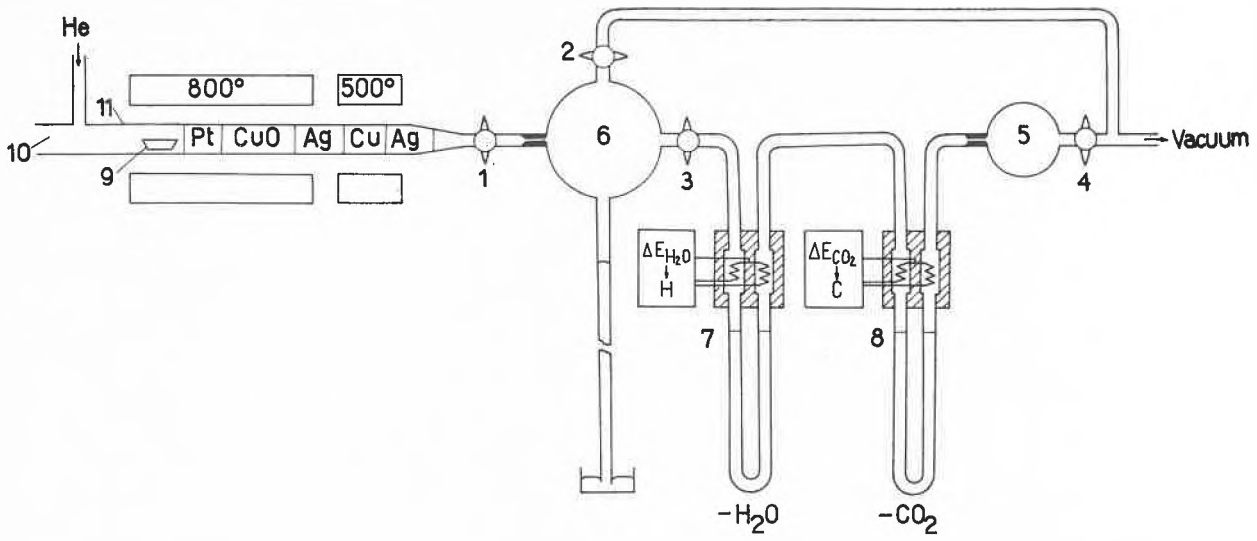


Abb. 10. Schematische Darstellung der Apparatur zur Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung (Wärmeleitfähigkeit)

trisch[31], maßanalytisch[32], konduktometrisch[33], massenspektrometrisch[34], spektroskopisch[35] sowie mit Hilfe von Wärmeleitfähigkeitsmeßzellen in strömenden Systemen[36] quantitativ bestimmt wurden. Keine der vorgeschlagenen Methoden vermochte jedoch den gestellten Bedingungen voll und ganz gerecht zu werden. Der Einsatz von Wärmeleitfähigkeitsmeßzellen schien besonders vielversprechend zu sein. Der von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrittene Weg besteht darin, daß nach der Verbrennung der Probe die Oxydationsprodukte oder ihre Konversionsprodukte im allgemeinen gas-chromatographisch getrennt und mit Hilfe eines Trägergases einem Katharometer zugeführt werden[36]. Die Menge Oxydationsprodukte ergibt sich nach der zeitlichen Integration des Katharometersignals und Vergleich mit Standards. Die erzielten Genauigkeiten lassen aus verschiedenen Gründen zu wünschen übrig. Fehler entstehen durch die Integration, die zudem kostspielig ist, durch Schwankungen in der Trägergasversorgung, durch Instabilität der Signale von Wärmeleitfähigkeitsmeßzellen in strömenden Systemen, sowie Nichtlinearität. Diese Störungen lassen sich durch die in Abb. 10 gegebene einfache Meßanordnung weitgehend beheben[37].

In das einseitig offene Verbrennungsrohr 11 strömt mit einer Geschwindigkeit von etwa 200 ml/min Helium, das über Kupferoxyd bei 700° sowie über Natronasbest und Phosphorpentoxyd bei Zimmertemperatur gereinigt wird. Die Hauptmenge des Heliums verläßt das Verbrennungsrohr durch das offenstehende Ende 10. Die Verbrennung läßt sich auch in Sauerstoff ausführen, wobei Helium anschließend lediglich als Spülgas verwendet wird.

Vorerst wird die Apparatur bei geschlossenem Hahn 1 und geöffneten Hahnen 2, 3 und 4 auf weniger als 1 Torr mit einer konventionellen Ölpumpe evakuiert. Hahn 2 und 3 werden geschlossen, die gewogene Probe in einem Platinschiffchen 9 in die Verbrennungszone geschoben und gleichzeitig der zum etwa 700 ml fassenden, evakuierten Glaskolben 6 führende Glashahn 1 geöffnet. Die Verbrennungsprodukte strömen nun im Verlaufe von etwa 5½ Minuten zusammen mit dem Helium durch ein zwischen dem Hahn 1 und der Kugel 6 sich befindende Verengung (Kanüle von 50 mm Länge mit einem inneren Durchmesser von etwa 0,1 mm) so lange ein, bis ein am Gefäß 6 angeschlossenes Quecksilbermanometer einen Druck von 700 Torr anzeigt. Hahn 1 und 4 werden nun geschlossen, und nach dem unmittelbar folgenden Öffnen von Hahn 3 strömt das Gas durch die Katharometer 7 und 8 sowie durch eine in der Nähe der Glaskugel 5 angebrachte Verengung (Kanüle von 25 mm Länge mit einem inneren Durchmesser von etwa 0,1 mm) in das etwa 30 ml fassende Gefäß 5 ein. Der

[31] R. C. Anderson, Y. Delabarre und A. A. Bothner-By, *Analyt. Chem. 24* (1952) 1298; G. Berraz, *An. Inst. Invest. Ci. Tecnol. (Argentina) 7* (1937) 70; *An. Soc. Ci. Argent., Secc. Santa Fé 9* (1937) 9; D. R. Christman, N. E. Day, P. R. Hansell und R. C. Anderson, *Analyt. Chem. 27* (1955) 1935; W. Kirsten, *Chim. Analyt. 40* (1958) 253; J. J. Naughton und M. M. Frodyma, *Analyt. Chem. 22* (1950) 711.

[32] A. Johansson, *Analyt. Chem. 26* (1954) 1183; J. Lindner, *Z. analyt. Chem. 66* (1925) 305; *Mikro-maßanalytische Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes mit grundlegender Behandlung der Fehlerquellen in der Elementaranalyse*, Berlin 1935, S. 367; J. Unterzaucher, *Chem.-Ing.-Techn. 22* (1950) 39; *Mikrochim. Acta 1957*, 448.

[33] H. Malissa, *Mikrochim. Acta 1957*, 553, *1960*, 127.

[34] A. V. Grosse, S. G. Hindin und A. D. Kirshenbaum, *Analyt. Chem. 21* (1949) 386; A. D. Kirshenbaum, S. G. Hindin und A. V. Grosse, *Nature 160* (1947) 187.

[35] J. A. Kuck, J. W. Berry, A. J. Andreatch und P. A. Lentz, *International Symposium on Microchemical Techniques, August 13–18, 1961*, The Pennsylvania State University, University Park (Pennsylvania, USA).

[36] O. E. Sundberg und Ch. Maresh, *Analyt. Chem. 32* (1960) 274; A. A. Duswalt und W. W. Brandt, *ibid. 32* (1960) 272; M. Vecera, *Coll. Czech. Chem. Comm. 26* (1961) 2298, 2308; W. Walisch, *Chem. Ber. 94* (1961) 2314.

[37] P. F. Sommer, W. Sauter, J. T. Clerc und W. Simon, *Helv. Chim. Acta 45* (1962) 595.

Druckausgleich stellt sich nach etwa 30 sec ein. Die Differenzsignale der Katharometer 7 und 8 werden anschließend mit einer Präzision von $\pm 10\,\mu V$ gemessen.

Zwischen den beiden Meßkanälen des ersten Katharometers 7 wird das Wasser aus dem Gasgemisch entfernt, so daß das im stationären Zustand am ersten Katharometer gemessene Differenzsignal ΔE_{H_2O} proportional dem Wassergehalt des Gasgemisches ist. Analog wird zwischen den beiden Meßkanälen des zweiten Katharometers 8 das Kohlendioxyd entfernt, so daß das Differenzsignal ΔE_{CO_2} der zweiten Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle 8 proportional dem Kohlendioxydgehalt der Gasphase ist. Die Differenzsignale ΔE_{H_2O} und ΔE_{CO_2} werden relativ zu jenen Signalen bestimmt, die in analoger Weise ohne Einführung einer Probe erhalten werden (Nullpunktbestimmung). Das Volumen des Meßsystems (Gasraum zwischen Hahn 1 und 4) sowie der Druck des Gasgemisches im Gefäß 6 vor der Dilatation sind konstant, so daß die Größen ΔE_{H_2O} bzw. ΔE_{CO_2} direkt der Menge Wasserstoff μgH bzw. Kohlenstoff μgC in der untersuchten Probe proportional sind*:

$$\Delta E_{H_2O} = k_{H_2O} \cdot \mu gH \qquad (1)$$

$$\Delta E_{CO_2} = k_{CO_2} \cdot \mu gC \qquad (2)$$

Die Proportionalitätskonstanten k_{H_2O} und k_{CO_2} sind zeitlich invariante Apparatekonstanten und können durch Eichung mit Testverbindungen ermittelt werden.

Das Meßprinzip weist gegenüber den in neuerer Zeit bekanntgewordenen Verfahren[36] die Vorteile auf, daß erstens in einem statischen System gearbeitet wird, in welchem die Signale der Katharometer wesentlich reproduzierbarer sind, als dies in dynamischen Systemen der Fall ist, und daß zweitens keine zeitliche Integration des Katharometersignals notwendig ist. Damit werden die großen durch die zeitliche Integration und die Schwankungen in der Geschwindigkeit des Trägergasstromes verursachten Meßfehler eliminiert, und der verhältnismäßig große Aufwand, der durch Integratoren einer Präzision von etwa 0,1% bedingt ist, entfällt. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, die mit Wärmeleitfähigkeitsmeßzellen zur quantitativen Erfassung der Oxydationsprodukte arbeiten[36], sind hier ebenfalls jene Fehler weitgehend eliminiert, die auf eine nichtlineare Beziehung zwischen dem Katharometersignal und der Konzentration an zu messender Komponente in der Gasphase zurückzuführen sind. Der Grund dafür liegt darin, daß die in den Meßzellen 7 und 8 auftretenden Wasser- und Kohlendioxydkonzentrationen maximal etwa 1% betragen. Bei anderen Verfahren sind dagegen im Bereiche der Wärmeleitfähigkeitsmeßzellen Konzentrationen an

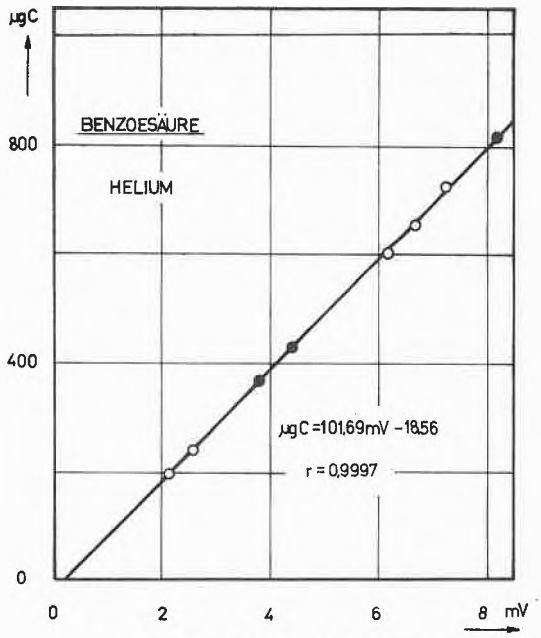


Abb. 11. Eichung für Kohlenstoff

zu bestimmenden Komponenten bis zu 10% durchaus möglich[36]. Die experimentelle Bestätigung der in Gleichung (2) formulierten Linearität ist in Abb. 11 zu finden. Ein Anhaltspunkt über die Größe der verwendeten Proben, die universelle Anwendbarkeit der Methodik sowie die Meßgenauigkeit geben die in Tabelle 4 zusammengestellten Meßergebnisse. Messungen können in einer Zeit von nur etwa 7 min an Mengen von 1 mg und weniger vorgenommen werden. Die Methodik läßt sich zudem für eine gleichzeitige Kohlenstoff-Wasserstoff-Stickstoff-Bestimmung als auch für Sauerstoffbestimmungen einsetzen. Eine Automation des Verfahrens ist besonders leicht erreichbar. Gegenwärtig befindet sich eine Anlage im Aufbau, die die Anzahl Mikrogramme Kohlenstoff und Wasserstoff der analysierten Probe in digitaler Form selbsttätig auf einen Papierstreifen aufgedruckt liefert. Die gestellte Zielsetzung ist somit voll und ganz erreicht worden.

Tabelle 4: Meßergebnisse von Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmungen (Wärmeleitfähigkeit)

Probe	Menge (mg)	C(%) theor.	gem.	H(%) theor.	gem.
Benzoesäure	0,5370	68,84	68,50	4,95	5,04
	0,6255		68,89		5,06
	1,1881		68,63		4,79
Acetanilid	0,6704	71,09	70,95	6,71	6,33
p-Nitrophenol	0,9033	51,80	52,21	3,62	3,71
Benzyldisulfid	0,9192	68,25	68,48	5,73	5,57
Chlordinitrobenzol	1,9102	35,58	35,60	1,49	1,45
	1,5780		35,35		1,42

Anmerkung: Die Proben wurden vor der Verbrennung entweder mit Kaliumchlorat vermischt oder mit Kobaltoxyd überschichtet. Sämtliche Wägungen, die den Ergebnissen der Tabelle sowie den schwarz markierten Punkten der Abb. 11 entsprechen, erfolgten mit der Ultramikrowaage Typ 25 UM der Firma Paul Bunge, Hamburg.

* Infolge der Entfernung von Wasser aus der Gasphase zwischen den beiden Meßkanälen des Katharometers 7 ergeben sich Konzentrationsänderungen, die zur Erzielung einer hohen Meßgenauigkeit durch einfache Korrekturen rechnerisch berücksichtigt werden können.

Ich glaube, daß man zusammenfassend sagen darf, daß die Analytik organischer Verbindungen in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem beachtlichen Wissensgebiet herangewachsen ist, in welchem sich die folgenden drei Tendenzen abzeichnen:

1. Der Einsatz von Instrumenten mit einer Anzeige, die in spitzfindiger Weise mit der zu messenden Eigenschaft des untersuchten Systems zusammenhängt.
2. Die Verdrängung von rein chemischen Analysenmethoden durch physikalisch-chemische Methoden.
3. Die Automation von Analysenprozessen mit dem Ziele, menschliche Unzulänglichkeiten zu eliminieren, eine höhere Genauigkeit in den Meßergebnissen zu erhalten, und die Leistungsfähigkeit analytischer Laboratorien den Bedürfnissen anzupassen.

Leider sind gegenwärtig die Forschungsarbeiten auf dem Gebiete der Analytik organischer Verbindungen oft stark danach ausgerichtet, Analysenmethoden für eng begrenzte Verwendungszwecke auszuarbeiten. Diese Methoden werden oft lediglich auf Grund großer experimenteller Erfahrung, jedoch ohne genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Zusammenhänge ausgearbeitet. Es ist dringend notwendig, eine Reihe derartiger Lücken zu schließen, und es ist zu hoffen, daß der Grundlagenforschung entschieden mehr Beachtung geschenkt wird.

Ein sehr aktuelles Problem besteht zudem darin, daß die rasche Entwicklung von modernen Analysenmethoden dazu geführt hat, daß im Unterricht ernste Schwierigkeiten entstehen, das entsprechende Wissen zu vermitteln. Die heutige Lage läßt sich am besten mit einigen Worten von LEWIN[1] umreißen:

"The character of chemical laboratory instrumentation has undergone a revolutionary change in the past three decades, and most of the more experienced scientists among us (and a great many of the more recent graduates, as well) have a considerable gap to close between their academic training in the use of the tools of their trade, and the current proper practice".[1]

Abb. 10 und 11 sowie Tab. 4 aus P. F. SOMMER, W. SAUTER, J. T. CLERC und W. SIMON, *Helv. Chim. Acta 45* (1962) 595.