

KURZE MITTEILUNGEN

*Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht
Es werden auch Manuskripte aus dem Auslande angenommen*

Zur Mikroanalytik phenolischer Hydroxy- und Hydroxycarbonylverbindungen

2,4-Dinitrophenylhydrazin stellt das am meisten benutzte Reagens zur Abscheidung und Charakterisierung von Carbonylverbindungen dar. Die entstehenden Hydrazone zeichnen sich durch Schwerlöslichkeit, gutes Kristallisationsvermögen und scharfe Schmelzpunkte aus. In manchen Fällen reagiert 2,4-Dinitrophenylhydrazin jedoch sehr langsam. Deshalb eignet es sich z.B. nicht für α -Hydroxyketone vom Acyloin- und Benzointypus¹. In der Regel vermindern Hydroxylgruppen bei den ver-

schiedensten Carbonylverbindungen die Geschwindigkeit der Hydrazonebildung und somit die Ausbeute in einer endlichen Reaktionszeit. Dadurch werden häufig Mikromengen an Hydroxycarbonylverbindungen nicht mehr mit Sicherheit erfaßt. Bei der Analytik von Fulvosäurefraktionen steht man u.a. vor der Aufgabe, aromatische Hydroxyaldehyde und -ketone in geringsten

¹ C. F. H. ALLEN, *J. Amer. Chem. Soc.* 52 (1930) 2955.

Tabelle 1. R_f -Werte der DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone

Adsorbens*/Laufmittel**	R_f -Werte $\times 100$									
	K1	M1	M2	M3	K4	M4	A5	K6	M6	A6
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd (I)	64	56	50	67	65	54	49	68	58	73
Vanillin (II)	55	49	42	56	56	40	40	58	34	65
Acetovanillon (III)	59	45	39	47	75	49	32	52	25	52
4-Hydroxy-2-methoxyacetophenon (IV)	68	68	67	73	84	69	70	72	67	86
2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon (V)	52	41	45	63	72	44	64	48	42	77
2,4,6-Trihydroxyacetophenon (VI)	32	34	4	27	25	14	27	58	18	70
3,4-Dihydroxypropiophenon (VII)	40	24	35	49	60	29	58	36	30	61
Dehydrodivanillin (VIII)	37	24	23	36	45	24	22	17	9	26
Dehydrodiacetovanillon (IX)	48	29	30	40	69	33	54	27	13	42

* Adsorbens: K = Kieselgel G; M = Magnesiumsilicat; A = Aluminiumoxid D

** Laufmittel: 1 = Toluol-Essigester (5:1); 2 = Benzol-Dioxan (90:25); 3 = Cyclohexan-Dioxan (1:1); 4 = Benzol-Propylamin (99:1); 5 = Benzol-Dimethylformamid (99:1), 6 = Cyclohexan-Cyclohexanon (3:1)

Konzentrationen neben hydroxylhaltigen Substanzen von intaktem Material abzutrennen. Nach einem Verfahren von ZAHN und WÜRZ² ist es möglich, phenolische Hydroxylgruppen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol quantitativ zu veräthern. Auf diese Weise werden sowohl die Hydroxy- als auch Hydroxycarbonylverbindungen abgeschieden. Da durch die Einführung des DNP-Restes die Reaktionsfähigkeit der Carbonylgruppe gegenüber 2,4-Dinitrophenylhydrazin wesentlich erhöht wird, lassen sich die DNP-Äther, gelöst in Eisessig oder Dimethylformamid (DMF), mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin augenblicklich als schwerlösliche Hydrazone ausfällen. Im Filtrat des Niederschlages befinden sich die carbonylfreien DNP-Verbindungen, die dünnstschichtchromatographisch getrennt werden können³. Aus der Fulvosäurefraktion eines Hochmoortorfes⁴ gelang es, *p*-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin, Acetovanillon (nach Hydrolyse von Glucoacetovanillon), 4-Hydroxy-2-methoxyacetophenon, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon und 3,4-Dihydroxypropiophenon als DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone festzulegen. Auf gleichem Wege wurde aus dem alkalischen Eindampfrückstand des Wasserdampfdestillates der Fulvosäuren 2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon nachgewiesen. Durch Behandlung einer Torfhuminsäure mit Girards Reagens T und nachfolgender Hydrolyse, Reaktion mit 2,4-Dinitrofluorbenzol und 2,4-Dinitrophenylhydrazin konnten Dehydrodivanillin und Dehydrodiacetovanillon als entsprechende Derivate abgeschieden werden. DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone lassen sich an Dünnschichten von Kieselgel G, Magnesiumsilicat und Aluminiumoxid D chromatographieren (Tab. 1).

Die Adsorptionsaffinität ist wesentlich von der Zahl und Stellung der 2,4-Dinitrophenoxygruppen abhängig. An der CN-Doppelbindung substituierte C-Methylgruppen vermindern oder vergrößern in Abhängigkeit vom Laufmittel und Adsorbens die R_f -Werte; lediglich bei Verbindungen vom Biphenyltyp bewirken sie stets eine

Abnahme der Adsorption. Bei Einführung eines Methoxylrestes in *o*(*m*)-Stellung zur Hydrazongruppierung wird der R_f -Wert nach größeren (kleineren) Werten verschoben.

Das chromatographische Verhalten der DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone ist für eine Identifizierung der ursprünglichen Hydroxycarbonylverbindungen nicht ausreichend. Zusätzliche Informationen müssen spezifische Farbreaktionen, Spektren und Vergleichssubstanzen liefern. Nachfolgend soll insbesondere untersucht werden, inwieweit eine Auswertung der dünnstschichtchromatographisch getrennten Substanzflecken (bzw. -zonen) nach Elution vom Adsorbens IR- und UV-spektroskopisch möglich ist. Über 2,4-Dinitrophenylhydrazone sind umfangreiche spektrophotometrische Studien^{5, 6, 7} durchgeführt worden. Aber in den meisten Fällen kann man nur zwischen aliphatischen, olefinischen, aromatischen und furanoiden Aldehyden bzw. Ketonen differenzieren. Eine Interpretation solcher IR-Spektren gestaltet sich insofern schwierig, als die NO₂-Gruppen in der 2,4-Anordnung Anlaß zu einer großen Zahl intensiver Eigenabsorptionen geben und zum anderen charakteristische Frequenzen aus den Erwartungsbereichen verschieben können. Naturgemäß sollten die DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone ähnliche Spektren liefern, da die NO₂-Gruppen im DNP- und DNPH-Rest die gleiche Anordnung aufweisen und eine weit fortgeschrittene NO₂-Substitution die Lage der übrigen Banden nicht mehr wesentlich beeinflusst. Abb. 1 gibt einen Überblick über die Absorptionsfrequenzen der aus verschiedenen Torfextrakten abgeschiedenen DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone.

Bei diesen Spektren unterscheidet man zwei Arten von Banden. Einmal jene, die durch die DNP- und DNPH-Gruppierungen hervorgerufen und von den gebundenen

² H. ZAHN und A. WÜRZ, *Z. Anal. Chem.* 134 (1951/52) 183.

³ W. WILDENHAIN und G. HENSEKE, *J. Chromatogr.* 19 (1965) 438.

⁴ W. WILDENHAIN und G. HENSEKE, *Z. Chem.* 5 (1965) 457.

⁵ L. A. JONES, J. C. HOLMES und R. B. SELIGMAN, *Anal. Chem.* 28 (1956) 191.

⁶ C. J. TIMMONS, *J. Chem. Soc.* 1957, 2613.

⁷ A. MEHLITZ und T. MINAS, *Chemiker-Ztg.* 89 (1965) 733.

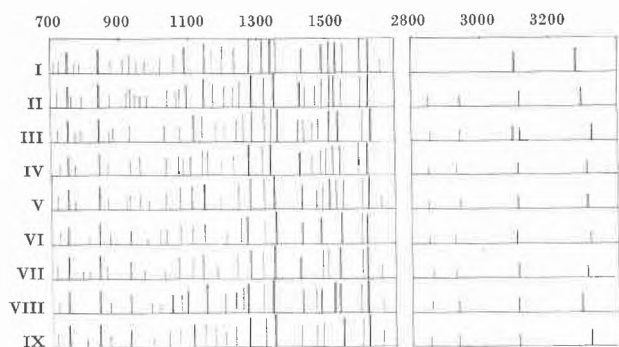


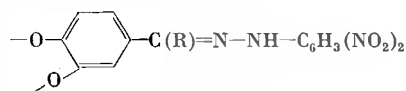
Abb. 1. Bandenpositionen der DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone im Wellenzahlbereich von 700–1700 cm^{-1} und 2800–3400 cm^{-1}

Hydroxycarbonylverbindungen kaum beeinflusst werden. Sie besitzen praktisch keinen Informationswert. Zum anderen beobachtet man solche Banden, die charakteristisch für einzelne Komponenten sind.

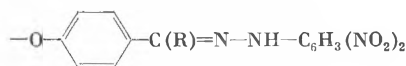
Die aromatische CH-Valenzabsorption erscheint stets zwischen 3115 und 3095 cm^{-1} . Im Bereich von 1630 bis 1620 cm^{-1} wird in allen Spektren die aromatische C=C-Valenzschwingung als intensiver Peak aufgefunden. Die zweite C=C-Aromatenbande liegt zwischen 1605 und 1595 cm^{-1} , teilweise nur als Schulter der kürzerwelligen erkennbar. JONES und Mitarbeiter⁵ führen die relativ starke Intensität dieser Bande auf eine Überlappung mit der C=N-Valenzabsorption zurück. Da eine Reihe gewöhnlicher DNP-Äther (C=N-frei) die schwächere Aromatenbande sogar auf der höherfrequenten Flanke der Hauptbande zeigen, dürfte das angeführte Argument wenig beweiskräftig sein. DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone geben die C=N-Absorption zwischen 1665 und 1660 cm^{-1} . In manchen Fällen ist sie von der kurzwelligen Aromatenbande völlig überdeckt. Im 1550-bis-1485- cm^{-1} -Bereich beobachtet man maximal vier Peaks, die der aromatischen C=C-Valenzabsorption und den verschiedenen asym. NO_2 -Valenzschwingungen zugeordnet werden. Ursache dieser NO_2 -Bandenaufspaltung ist die ungleichwertige Stellung der Nitrogruppen. FRANCK und Mitarbeiter⁸ haben eine charakteristische Abhängigkeit der asym. NO_2 -Valenzschwingung von der Art und Stellung anderer Substituenten festgestellt. In den DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazonen sind die NO_2 -Gruppen stets in *o*- bzw. *p*-Stellung über ein als Elektronendonator fungierendes Brückenatom mit dem Zentrum der Molekel verbunden. Folglich wird das spektrale Verhalten wesentlich von den gleichlaufenden elektronischen Einflüssen bestimmt, so daß die asym. NO_2 -Valenzabsorption kaum Aussagen über die Struktur der ursprünglichen Hydroxycarbonylverbindung zuläßt. Die sym. NO_2 -Valenzschwingung gibt durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke im DNP-H-Rest Anlaß zu einer Bandenaufspaltung (1360–1340 cm^{-1} und 1320–1315 cm^{-1}). Auf eine 1,2,4-Trisubstitution hin-

weisend, ergeben die NO_2 -Gruppen vier weitere Banden bei 1150–1140, 1100, 1075–1070 und 840 cm^{-1} . Die Absorption bei 1100 cm^{-1} wird nach größeren (kleineren) Wellenzahlen verschoben, wenn die ursprüngliche Hydroxycarbonylverbindung ein Keton (Aldehyd) ist. In allen Spektren kann bei 750 cm^{-1} eine scharfe Bande beobachtet werden, die man einer NO_2 -Gerüst- bzw. Deformationsschwingung zuordnet. Die asym. COC-Valenzabsorption liegt zwischen 1285 und 1270 cm^{-1} , die symmetrische im Bereich von 1050–1010 cm^{-1} . Im Gebiet der aliphatischen CH-Valenzschwingung erkennt man zwei Banden bei 2950–2920 cm^{-1} und 2860 bis 2850 cm^{-1} , die zu den asym. bzw. sym. CH-Schwingungen der CH_3 - und CH_2 -Gruppen gehören. Der Nachweis von Methoxylgruppen soll nach HENBEST und Mitarbeitern⁹ durch eine charakteristische CH-Valenzbande bei 2832–2815 cm^{-1} möglich sein. Methoxylhaltige DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone zeigen jedoch in diesem Bereich keine Absorption. Mit Sicherheit lassen sich aber OCH_3 -Gruppen durch die sym. CH_3 -Deformationsschwingung zwischen 1470 und 1460 cm^{-1} erkennen. An der CN-Doppelbindung substituierte C-Methylgruppen verursachen eine langwellige Verschiebung der sym. CH_3 -Deformation in das Absorptionsgebiet der intensiven NO_2 -Valenzschwingung. Ein ausgezeichnetes Mittel zur Erkennung des Substitutionstyps aromatischer Verbindungen stellen normalerweise die CH-Wagging-Schwingungen dar. Im vorliegenden Fall wird die Leistungsfähigkeit dieses Zuordnungsverfahrens durch das Auftreten starker Banden, resultierend aus den für die 1,2,4-Trisubstitution im Dinitrophenylanteil charakteristischen NO_2 - und CH-Schwingungen und der NO_2 -Gerüst- bzw. Deformationsschwingung, in den angegebenen Erwartungsbereichen gemindert. Hinzu kommen die durch weitgehende NO_2 -Substitution auftretenden Frequenzverschiebungen der CH-Wagging-Schwingungen. So beobachtet man bei 930 cm^{-1} und 880–860 cm^{-1} die CH-Wagging-Banden der isolierten und zweier benachbarter Ringwasserstoffatome. Eine Bestimmung des Nitrogruppenanteils in den DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazonen ist unmöglich, da der Intensitätsanstieg nicht linear zur molaren NO_2 -Konzentration erfolgt.

Im Bereich von 1000–930 cm^{-1} werden in einigen Spektren zahlreiche geringe Absorptionen aufgefunden, wobei ein offensichtlicher Zusammenhang mit der Konstitution der ursprünglichen Hydroxycarbonylverbindung nicht feststellbar ist. Bei 790–785 cm^{-1} tritt eine Bande auf, die sich nur in Anwesenheit der Gruppierungen



und



⁸ B. FRANCK, H. HÖRMANN und S. SCHEIBE, *Chem. Ber.* 90 (1957) 330.

⁹ H. B. HENBEST, G. D. MEAKINS, B. NICHOLLS und A. A. WAGLAND, *J. Chem. Soc.* 1957, 1462.

Tabelle 2

Substanz	λ_{max} (m μ) in DMF			λ_{max} (m μ) in DMF/NaOH				A_2-B_2 [m μ]
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	
I	267	394	—	281	368	—	510	26
II	267	395	—	279	370	442	518	25
III	267	391	485	279	368	442	513	23
IV	267	382	—	285	370	444	—	12
V	267	379	493	277	374	446	—	5
VI	267	378	500	277	375	425	513	3
VII	267	385	—	281	372	411	502	13
VIII	267	395	499	285	358	—	510	37
IX	267	377	505	287	356	—	510	21

nachweisen läßt. Die Absorption bei 3300 cm⁻¹, hervorgerufen durch die NH-Valenzschwingung, wird von der aldehydischen Gruppe zur größeren und von der ketonischen Gruppe zur kleineren Wellenlänge verschoben.

Neben den IR-spektroskopischen Befunden wurden zur Strukturaufklärung auch Spektren im sichtbaren und UV-Gebiet herangezogen. Bei der unmittelbaren Messung der nach dünn-schichtchromatographischer Trennung vom Adsorbens mittels DMF eluierten unbekannt Verbindungen können die Spektren nur durch den Parameter der Absorptionsstelle bestimmt werden (Tab. 2).

Für diagnostische Zwecke ist besonders die Bande A₂ geeignet. Diese erfährt durch Substituenten im Benzolkern normalerweise eine Rotverschiebung. Wird jedoch der Aldehydwasserstoff durch Alkylgruppen ersetzt, so beobachtet man den umgekehrten Effekt. In gleicher Richtung wirken auch raumfüllende Substituenten in o-Stellung zur Hydrazongruppierung und DNP-Reste, die sich an der koplanaren Einstellung gegenseitig hindern. Alle diese sterischen Effekte laufen darauf hinaus, daß die für maximale Konjugation erforderliche Koplanarität der Verbindung gestört wird, was sich in einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima äußert. Hinweise für das Maß der sterischen Hinderung sind aus den Wellenlängendifferenzen der Absorptionsbanden A₂ und B₂ erhältlich (siehe Tab. 2).

Den endgültigen Strukturbeweis für die aus verschiedenen Torfextrakten abgeschiedenen DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone lieferte die Synthese dieser Verbindungen.

Experimentelles

Phenolische Hydroxy- und Hydroxycarbonylverbindungen werden nach der Vorschrift von ZAHN und WÜRZ² quantitativ dinitrophenyliert. Die in siedendem Eisessig oder DMF gelösten DNP-Derivate läßt man in das gleiche Volumen einer perchlorsaurigen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (0,12 g DNP in 5 ml 30-prozentiger HClO₄) einfließen, kocht kurz auf und saugt den gelben bis orangen Niederschlag nach dem Erkalten auf einer Mikrofritte ab. Im Filtrat befinden sich die carbonylfreien DNP-Äther, die nach weitgehendem Abdampfen des Lösungsmittels dünn-schichtchromatographisch³ getrennt werden können. Die gefällten DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone löst man in DMF und chromatographiert ebenfalls an Dünnschichten von Kieselgel G «Merck», Magnesiumsilicat «Woelm»

oder Aluminiumoxid «D» (Chemiewerk Greiz-Döhlau). Je Platte (20 × 20 cm) werden 8 g Kieselgel in 16 ml Wasser, 5 g Magnesiumsilicat in 15 ml Wasser oder 12 g Aluminiumoxid in 14 ml Wasser manuell nach der von LEES und DE MURIA¹⁰ angegebenen Methode aufgetragen und anschließend 30 Min. bei 120°C aktiviert. Zur Detektion ist die Eigenfarbe der Hydrazone ausreichend, jedoch läßt sich die Empfindlichkeit durch Besprühen mit DMF und 2N NaOH wesentlich erhöhen. Die DNP-2,4-Dinitrophenylhydrazone erscheinen dann als rotbraune Flecken (Nachweisgrenze: 0,5 µg). Für die IR-spektroskopische Charakterisierung werden die chromatographisch getrennten Substanzen nach den Angaben von SNAVELY und GRASSELLI¹¹ vom Adsorbens eluiert und für die Messung in KBr vorbereitet. Die Elution für die Untersuchung im UV- und sichtbaren Gebiet führt man analog mit DMF durch und mißt entweder nur in DMF oder in einem Gemisch von DMF und NaOH (9 Vol. DMF und 1 Vol. n/10 NaOH).

Die Schmelzpunkte der im präparativen Maßstab dargestellten Vergleichssubstanzen, deren Bruttoformeln durch Elementaranalyse sichergestellt wurden, sind nachfolgend aufgeführt:

4-[2,4-Dinitrophenoxy]-benzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (I)

C₁₀H₁₂N₆O₉. Orange Kristalle (DMF/verd. Essigsäure), Zers.-P. 241–242°

4-[2,4-Dinitrophenoxy]-3-methoxy-benzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon (II)

C₂₀H₁₄N₆O₁₀. Gelborange Nadeln (DMF), Zers.-P. 278–279°

4-[2,4-Dinitrophenoxy]-3-methoxy-acetophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (III)

C₂₁H₁₆N₆O₁₀. Verfilzte orange Nadeln (Diäthylformamid), Smp. 242°

4-[2,4-Dinitrophenoxy]-2-methoxy-acetophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (IV)

C₂₁H₁₆N₆O₁₀. Orange Kristalle (Eisessig/Wasser), Smp. 137 bis 138°

2-[2,4-Dinitrophenoxy]-4-methoxy-acetophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (V)

C₂₁H₁₆N₆O₁₀. Gelborange Kristalle (DMF/verd. Essigsäure), Smp. 192–193°

2,4,6-Tris-[2,4-dinitrophenoxy]-acetophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (VI)

C₃₂H₁₈N₁₀O₁₉. Gelbes amorphes Pulver (DMF/verd. Essigsäure), Zers.-P. 132°

¹⁰ T. M. LEES und P. J. DE MURIA, *J. Chromatogr.* 8 (1962) 108.

¹¹ M. K. SNAVELY und J. G. GRASSELLI, *Develop. Appl. Spectry* 3 (1963) 119.

3,4-Bis-[2,4-dinitrophenoxy]-propiophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon (VII)

$C_{27}H_{18}N_8O_{14}$. Rotorange Kristalle (DMF/verd. Essigsäure), Smp. 206–207°

2,2'-Bis-[2,4-dinitrophenoxy]-3,3'-dimethoxy-biphenyl-dicarboxaldehyd-(5,5')-bis-[2,4-dinitrophenylhydrazon] (VIII)

$C_{40}H_{28}N_{12}O_{20}$. Oranges amorphes Pulver (DMF/verd. Essigsäure), Zers.-P. 220° (sintert bei 176°)

2,2'-Bis-[2,4-dinitrophenoxy]-5,5'-di-[1-(2,4-dinitrophenylhydrazono)-äthyl]-3,3'-dimethoxy-biphenyl (IX)

$C_{42}H_{30}N_{12}O_{20}$. Oranges amorphes Pulver (DMF/verd. Essigsäure), Zers.-P. 175–180° (sintert bei 150°)

WOLFGANG WILDENHAIN und GÜNTER HENSEKE

Institut für Organische Chemie
an der Bergakademie Freiberg (Sachsen, DDR)

Quantitative Thin-Layer Chromatography V*

Direct Fluorometry of Amino Acids as Their Dinitrophenyl-, Dimethylaminonaphtalenesulfonyl- and Phenylthiohydantoin-Derivatives**

Thin-layer chromatography is now widely used for separation and identification of amino acids and amino acid derivatives (for review see ref. 1). For quantitative analysis of compounds resolved on chromatoplates¹ the most practical procedure is the direct scanning of spots. We have recently described the quantitative analysis of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds using direct fluorometry^{2,3}. More recently we have shown that this method is applicable to the quantitative estimation of amino acids as their dinitrophenyl- (DNP)-, dimethylaminonaphtalenesulfonyl- (DNS)-, and phenylthiohydantoin-derivatives^{2,4}. In this communication we would like to describe briefly our procedure concerning direct fluorometry of DNP-, DNS- and PTH-amino acids.

Methods

Chromatography was carried out on Silicagel-G-starch-layers (30 g Kieselgel-G-Merck + 70 ml 1% starch solution) equilibrated in air overnight¹, DNS- and DNP-amino acids were developed with benzene/pyridine/acetic acid (80:20:2 v/v)¹, PTH-amino acids with chloroform (+1,5% ethanol)/formic acid/100:5 v/v¹. Every chromatogram was run in saturated chamber¹. In order to be able to detect the PTH-amino acids it is necessary to carry out the chromatograms on Silicagel/Zinksilikate-layers, as described previously¹, containing starch.

Scanning of spots was made, after drying the chromatoplates in a stream of cold air during exactly 30 min, by fluorometry

using a Turner-Fluorometer 111 fitted with a door for thin-layer plates^o (supplied by Camag, Muttenz, Switzerland).

Conditions for scanning of DNP- and PTH-amino acids: the chromatograms were illuminated with a short wave-length fluorescent lamp (110-851) using Corning 7-54 as primary and Kodak-Wratten 2A as secondary filter. Aperture at door was full open. Sensitivity: 3×, 10× and 30× for DNP- and 1× for PTH-amino acids.

Conditions for scanning of DNS-amino acids: the chromatograms were illuminated with a long wave-length UV-lamp (110-850) using Corning 7-60 as primary and Kodak-Wratten 2A as secondary filter. Aperture at door was full open. Sensitivity: 3×, 10× and 30×.

The fluorometer units were recorded (speed 5 cm/min) by a Varicord Model 43 (Photovolt Co., New York).

In order to avoid interference of neighbouring spots it is advisable to cover the plate, except a small stripe containing the spot under investigation, with e.g. a MN-Polygram-Sil-sheet (Macherey, Nagel & Co., Düren, Germany).

Results and Discussion

As far as we know there are no methods in the literature on fluorometry of DNP- and PTH-amino acids. Since these compounds absorb strongly UV-light (360 and 254 nm respectively), it is possible to scan them by quenching the fluorescence^{2,4}. When we started with our experiments on direct fluorometry of DNS-amino acids^{2,4}, we were able to find only one paper concerning fluorometry of DNS-derivatives: NEADLE and POLLIT⁵ have used the fluorometry after elution of spots with methanol in a study on the formation of dimethylamino-naphtalene-5-sulfonamid during the preparation of DNS-amino acids. These authors have applied a primary filter transmitting between 340 and 380 nm and a secondary filter transmitting above 510 nm. It was felt that these conditions may be applicable also for the direct

* 4th communication cf. ref. 4. Received August 20, 1966.

** 6th communication on "Application of thin-layer chromatography in the sequential analysis of peptides". 5th communication cf. ref. 4.

¹ G. PATAKI, *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, de Gruyter, Berlin 1966.

² G. PATAKI and A. KUNZ, *J. Chromatogr.* 23 (1966) in the press.

³ G. PATAKI and ED. STRASKY, *Chromatographie von Nucleobasen, Nucleosiden, Nucleotiden und verwandten Verbindungen, Lecture on Chromatography Symposium IV*, Brussels 1966, in the press.

⁴ G. PATAKI, *Neuere Anwendungen der Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, Lecture on Chromatography Symposium IV*, Brussels 1966, in the press.

^o We wish to thank Fa. Camag (Muttenz, Switzerland) for having allowed us to use their recently developed apparatus for direct fluorometry of spots on thin layer chromatograms.

⁵ D. J. NEADLE and R. J. POLLIT, *Biochem. J.* 97 (1965) 607.

scanning of spots. After completion of our experiments (for preliminary reports see ref. ² and ⁴) SEILER and WIECHMANN⁶ have published a method for quantitative estimation of DNS-derivatives.

The quantitative analysis of DNP- and PTH-amino acids can be made by illuminating the plate with a fluorescent lamp (254 nm) and by using a primary filter transmitting between 230 and 400 nm^{2,3,4} and a secondary filter transmitting only above 405 nm^{2,3,4} (cf. methods). For the scanning of DNS-amino acids we are using a primary filter transmitting between 300 and 400 nm and a secondary filter transmitting only above 405 nm⁴; the plates are illuminated by a UV-lamp (at 360 nm, cf. methods). Typical peaks produced from scanning spots of DNS-, DNP- and PTH-amino acids

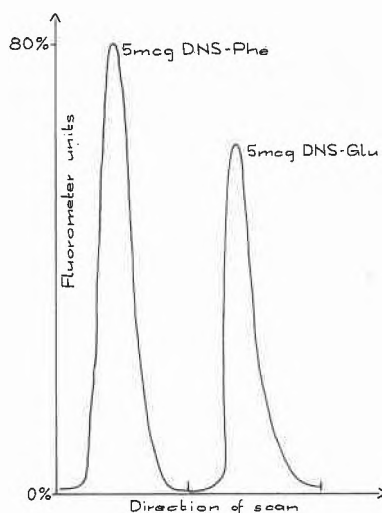


Fig. 1a. Scanning of DNS-Phe and DNS-Glu (5 mcg) using the Camag apparatus. Sensitivity: 30× (cf. methods).

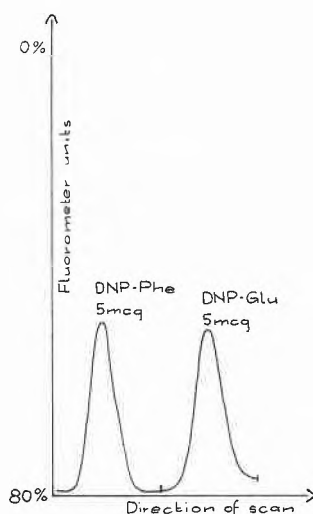


Fig. 1b. Scanning of DNP-Phe and DNP-Glu (5 mcg) using the Camag apparatus. Sensitivity: 30× (cf. methods).

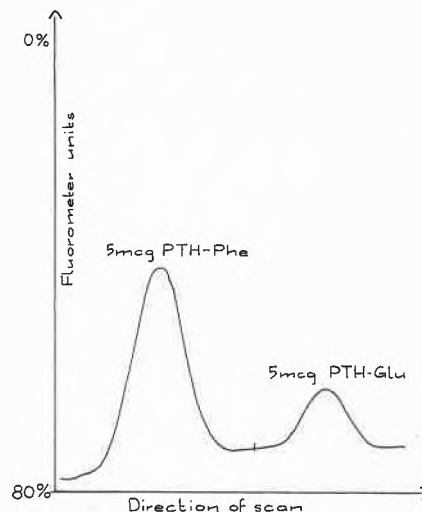


Fig. 1c. Scanning of PTH-Phe and PTH-Glu (5 mcg) using the Camag apparatus. Sensitivity: 1× (cf. methods).

are shown in Figures 1 a-c. As we can expect, the sensitivity of the DNS-amino acids is higher than of DNP- or PTH-amino acids. We have found that the intensity of fluorescence of DNS-derivatives depends on the moisture of the layer (cf. also SEILER and WIECHMANN^{6,7}). Figure 2 shows the decrease of fluorescence between "t=0" min and "t=360" min (cf. methods). The differences between the mean value of "t=0" min and "t=60" min and the single values from "t=0" min up to "t=60" min are however only about 5%. Linearity between the area under peaks and the amount of material applied to the plate exists e.g. for DNS-phenylalanin (Figure 3).

Finally we have investigated the reproducibility of our method. Considering our findings demonstrated in Figure 2, it is necessary to standardize the time of drying, especially in the case of DNS- and DNP-amino

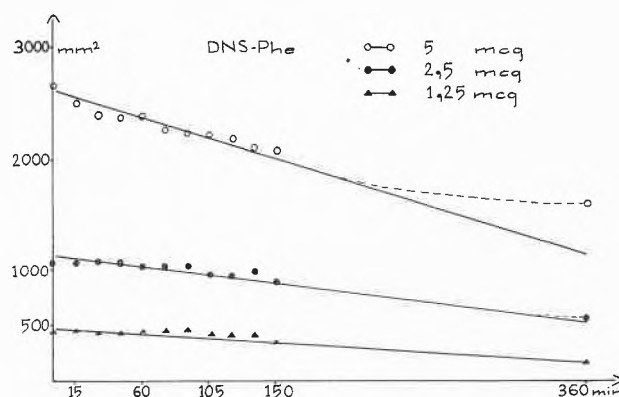


Fig. 2. Decrease of fluorescence between "t=0" min and "t=360" min. Before scanning ("t=0" min.) the plates were dried 30 min in a stream of cold air (cf. methods). Each point is the mean value of three determinations (planimetry: fivefold measurement). Each concentration on different plates

⁶ N. SEILER and M. WIECHMANN, *Z. anal. Chem.* 220 (1966) 109.

⁷ N. SEILER and M. WIECHMANN, *Experientia* 20 (1964) 559.

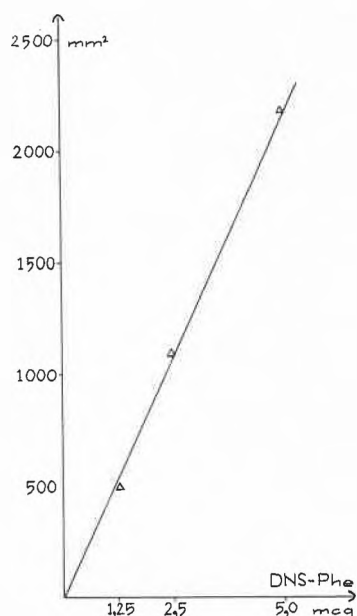


Fig. 3. Peak area plotted against concentration of DNS-Phe. Measurement of peak area by planimetry: mean values of fivefold determinations. Each point is the mean value of two experiments on the same plate

acids. If we scan PTH-derivatives this standardisation is also advisable. The direct fluorometry of DNS-amino acids on the same plate shows about $\pm 3,5-5\%$ standard deviation, depending on the amount applied to the plate. DNP- and PTH-amino acids can be estimated on the same plate with a standard deviation of about $\pm 5-7\%$. Since we would like to apply the direct fluorometry for quantitative analysis of amino acids separated in two-dimensional chromatograms, it was necessary to examine the fluctuation from one plate to another, as we have done for nucleoderivatives³. We have found that the direct fluorometry can be made on several plates with a standard deviation of about 10–12%. It has to be pointed out that the scanning should be made with care, as reported previously³.

The methods described in this paper will be applied now in our laboratory for the quantitative analysis of amino acids in protein- and peptid-hydrolysates and in biological material.

GYÖRGY PATAKI and ED. STRASKY

Analytical Department, Laboratory for Chromatography, Robapharm Ltd., Basle (Switzerland)

Vergleich dreier Methoden zur Bestimmung spezifischer Oberflächen von Pulvern*

Die Bestimmung von Teilchengrößen und spezifischen Oberflächen liefert in den wenigsten Fällen absolute Werte. Die erhaltenen Resultate sind meistens von der angewendeten Methode und von der Definition der Teilchengröße abhängig. Es soll hier ein Beispiel gezeigt werden, bei dem die mit drei verschiedenen Methoden bestimmten Teilchengrößen bzw. spezifischen Oberflächen in guter Übereinstimmung sind.

In unserer Arbeit über die Oxydation von Fe_3O_4 zu $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ^{1,2} haben wir monodisperse Präparate hergestellt,

um den Einfluß der Teilchengrößenverteilung auf die Kinetik der Oxydation auszuschließen. Unter Berücksichtigung verschiedener Maßnahmen wurden nach der Methode von KAUFMANN³ gleichmäßig ausgebildete Fe_3O_4 -Kristallite hergestellt (vgl. Abb. 1).

Folgende Methoden der Teilchengrößenbestimmung gelangten zur Anwendung:

- Elektronenmikroskopie,
- Oberflächenmessungen und
- röntgenographische Bestimmung.

a) Bestimmung der Teilchengröße aus EM-Aufnahmen

Mit einem Siemens Elmiskop I wurden die Proben z. T. als Kohlehüllabdrücke, z. T. direkt präpariert aufgenommen (Vergrößerungen: EM 10000 \times , photographisch 5 \times). Hüllabdrücke und Direktaufnahmen ergeben für die Teilchengröße die gleichen Werte. Insgesamt wurden 1770 Teilchen ausgemessen, wobei als Teilchengröße D_{EM} die Kantenlänge des Würfels gewählt wurde. Nach der graphischen Methode wurde die Standardabweichung σ_g und D_{EM} berechnet^{4a}.

$$D_{EM} = 1940 \pm 100 \text{ \AA}$$

$$\sigma_g = 1,17_8$$

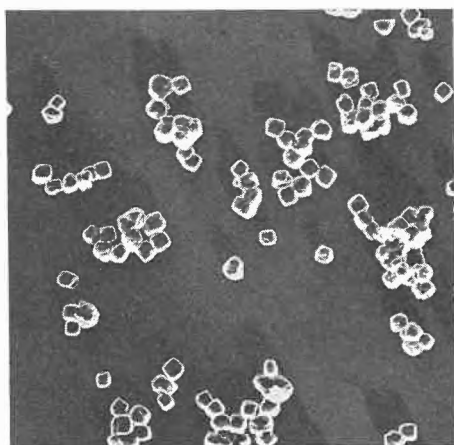


Abb. 1. Kohlehüllabdruck eines Fe_3O_4 -Pulvers
Vergrößerung 10000 \times

* Eingegangen am 23. August 1966.

¹ K. EGGER und W. FEITKNECHT, *Helv. Chim. Acta* 45 (1962) 2042.

² U. MANNWEILER, Dissertation Universität Bern 1965.

³ A. KAUFMANN, *Z. Electrochem.* 7 (1900) 733.

⁴ G. HERDAN, *Small Particle Statistics*, Butterworths, London 1960. a) p. 91, b) p. 81, c) p. 195.

Folgt die Verteilung dem normal logarithmischen Gesetz^{4b}, läßt sich die spezifische Oberfläche berechnen.

$$\log S = \log a_s / \log a_v \cdot \rho - \log D_{EM} - 5,757 \log^2 \sigma_g \quad (I)$$

a_s und a_v sind Oberflächen- bzw. Volumenformfaktoren, wobei der Bruch a_s/a_v im Falle eines Würfels gleich 6,00 beträgt. Die Dichte ρ für Fe_3O_4 ist 5,18 g/cm³. Die nach Formel (I) berechnete spezifische Oberfläche S ergibt:

$$S = 5,60 \pm 0,30 \text{ m}^2/\text{g}$$

b) Bestimmung der Teilchengröße aus der spezifischen Oberfläche

Die Ermittlung der Oberflächenwerte erfolgte nach der BET-Methode mit Stickstoff als Adsorptionsgas. Die Bedeckungsfläche eines N_2 -Moleküls beträgt nach CLYDE ORR und DALLA VALLE⁵ 15,8 Å². Aus drei Messungen bei gleicher Einwaage von 10 Gramm wurde eine spezifische Oberfläche von $6,20 \pm 0,11 \text{ m}^2/\text{g}$ bestimmt. Aus der spezifischen Oberfläche kann man die Teilchengröße nach Formel (I) berechnen, wobei allerdings die Standardabweichung σ_g nicht berücksichtigt werden kann.

$$D_S = a_s/a_v \cdot \rho = 1870 \pm 30 \text{ Å} \quad (II)$$

c) Röntgenographische Ermittlung der Kristallitgröße

Als Ursache der auftretenden Reflexverbreiterungen werden sowohl die Kristallitgröße als auch Gitterstörungen in Betracht gezogen. Liegen beide reflexverbreiternden Einflüsse vor, können diese bei Kenntnis mindestens zweier Breiten β_1 und β_2 näherungsweise getrennt werden.

Nach KOCHENDÖRFER⁶ gilt:

$$D_R = \frac{K \cdot \lambda [\beta_2 \cos \vartheta_2 \sin \vartheta_2 - \beta_1 \cos \vartheta_1 \sin \vartheta_1]}{\beta_1 \cdot \beta_2 \cos \vartheta_1 \cdot \cos \vartheta_2 (\sin \vartheta_2 - \sin \vartheta_1)} \quad (III)$$

D_R ist die Kristallitgröße, K eine Konstante, λ die Wellenlänge der Eisen- K_β -Strahlung und β die Halbwertsbreite.

Die Konstante K wird gleich 1 gesetzt. Sie ist abhängig von der Definition von β und D_R . Mit β wird die reine Breite eines Reflexes definiert, frei von allen Verbreiterungen, die durch das Experiment hervorgerufen werden. D_R wird als dritte Wurzel des Volumens, also der Kantenlänge, definiert. Die Berechnung von β erfolgte nach KLUG und ALEXANDER^{7a}, wobei als Standard ein SiO_2 -Präparat zur Verfügung stand.

⁵ CLYDE ORR und J.M. DALLA VALLE, *Fine Particle Measurements*, Macmillan, New York 1959, p. 185.

⁶ A. KOCHENDÖRFER, *Z. Kristallogr.* 105 (1944) 393.

⁷ H.P. KLUG und L.E. ALEXANDER, *X-Ray Diffraction Procedure*, John Wiley, New York 1959, a) p. 491 ff, b) p. 512.

Aus den beiden Reflexen $K_\beta(220)$ bzw. $K_\beta(440)$ wurde nach Formel (III) die Kristallitgröße berechnet. Mit einem «Philips»-Zählrohrinterferenzgoniometer erstreckte sich die Messung für den (220)-Reflex von 34,00° bis 35,50° (in ° 2 ϑ), und beim (440)-Reflex von 72,00° bis 73,50°. Die K_β -Reflexe wurden gewählt, um eine Korrektur der Dublettaufspaltung der K_α -Linien zu umgehen. Bei fester Winkelposition des Goniometers wurde mittels dem Impulszählwerk dreimal während 32 Sekunden die Anzahl Impulse gezählt. Der Mittelwert aus den drei Messungen ergab die Lage für die entsprechende Winkelseinstellung. Dieser Prozeß wurde bei stufenweisem Vorschub von 0,02° mit der gleichen Zähldauer wiederholt, bis der ganze Winkelbereich abgetastet war. Aus zwölf Bestimmungen verschiedener Proben des gleichen Präparates wurde eine Kristallitgröße berechnet, von $D_r = 1760 \pm 300 \text{ Å}$. Die Fehlergrenze von $\pm 300 \text{ Å}$ (17,4%) ist vor allem durch die Ungenauigkeit der Bestimmung der Halbwertsbreite gegeben, doch kann ein Fehler von 17,4% bei einer Absolutmessung als gut bezeichnet werden^{7b}. Nach Gl. (II) wird die spezifische S zu 6,60 m²/g bestimmt.

In der nachstehenden Tabelle sind die nach den drei Verfahren berechneten Teilchengrößen und spezifischen Oberflächen angegeben.

Methode	Teilchengröße (Länge der Würfelkante)	Spezifische Oberfläche
EM	1940 ± 100 Å *	5,60 ± 0,30 m ² /g
Oberfläche	1870 ± 30 Å	6,20 ± 0,11 m ² /g *
Röntgen	1760 ± 300 Å *	6,60 ± 1,30 m ² /g

* Gemessene Werte.

Der Autor möchte Herrn Prof. Dr. W. FEITKNECHT, Direktor dieses Institutes, für die Unterstützung dieser Arbeit herzlich danken. Ebenso sei Herrn Dr. K. GALLACHER, Universität Swansea (Wales), für die vielen Diskussionen über dieses Problem gedankt.

U. MANNWEILER *

Institut für anorganische, analytische und physikalische Chemie der Universität Bern

* Derzeitige Adresse des Autors: Schweizerische Aluminium AG, Walliserwerke, Chippis.