

Kurze Mitteilungen

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

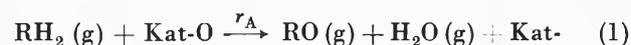
Reaktionskinetische Untersuchungen der heterogenen Gasphasenoxydation von *p*-Xylol

Summary

The kinetic of the heterogeneous gasphase oxidation of *p*-xylene on a vanadiumoxide catalyst at the temperature range of 315 to 435 °C has been studied. The experimental data were best fitted by a steady state adsorption model based on the adsorption of oxygen and the reaction of this chemisorbed species with *p*-xylene in the gasphase. Activation energies for the different reactions are given.

Die Gasphasenoxydation von *p*-Xylol wurde bis heute noch sehr wenig bearbeitet, denn im Gegensatz zu *o*-Xylol, bei dem sich das relativ stabile Phthalsäureanhydrid bilden kann, ist dies bei Terephthalsäure aus sterischen Gründen nicht möglich. In Analogie zu Toluol ist aber bei der Gasphasenoxydation von *p*-Xylol als erstes faßbares Zwischenprodukt *p*-Toluylaldehyd zu erwarten, und es ist daher die Möglichkeit gegeben, diese Verbindung durch Gasphasenoxydation herzustellen.

Die Oxydation von *p*-Xylol am eingesetzten Katalysator verläuft bei Temperaturen unterhalb 430 °C nach einem sogenannten Adsorptionsmechanismus. Auf der Suche nach einem geeigneten mathematischen Ausdruck zur Beschreibung der Kinetik wurde eine ganze Reihe möglicher Langmuir-Hinshelwood-Modelle getestet¹, die aber den mathematischen² und chemischen Selektionsmethoden nicht standhielten. Allen Anforderungen genügte hingegen ein Adsorptionsmodell, das als «steady state adsorption» bereits erfolgreich auf die Gasphasenoxydation von Benzol^{3,4}, Toluol⁵, *o*-Xylol^{6,7,8} und Naphthalin⁵ angewandt worden war. Das kinetische Modell basiert auf einem Redox-Mechanismus. Es sind folgende Voraussetzungen nötig: der Katalysator adsorbiert nur Sauerstoff; das Substrat wie auch die Produkte sowie eventuell vorhandenes Inertgas besetzen keine aktiven Zentren der Kontaktfläche; es kann nur soviel Sauerstoff adsorbiert werden, als durch die chemische Reaktion verbraucht wird; eine Desorption von Sauerstoff kann vernachlässigt werden.



¹ P. FELIX, Diss. ETH 4756 (1971).

² O.A. HOUGEN und K.M. WATSON, *Chem. Proc. Principles* 3 (1947) 902.

³ I.S. JASWAL *et al.*, *Can. J. Chem. Eng.* 47 (1969) 248.

⁴ R. HAYASHI *et al.*, *Can. J. Chem. Eng.* 41 (1962) 220.

⁵ J. DOWNIE *et al.*, *Can. J. Chem. Eng.* 39 (1961) 201.

⁶ J.A. JUUSOLA *et al.*, *J. Catalysis* 17 (1970) 106.

⁷ R.F. MANN und J. DOWNIE, *Can. J. Chem. Eng.* 46 (1968) 71.

⁸ J. HERTEN und G.F. FROMENT, *Ind. Eng. Chem. Proc. Design. Dev.* 7 (1968) 516.



Für die beiden Teilschritte Adsorption und Reaktion gelten die folgenden Gleichungen:

$$-r_A = k_A p_A S \quad (3)$$

$$-r_O = k_O p_O (1 - S) \quad (4)$$

Im stationären Zustand wird soviel Sauerstoff adsorbiert, als durch die chemische Reaktion verbraucht wird ($r_1 = r_2$), wodurch sich aus Gleichungen (3) und (4) für den Reaktionsablauf Gl. (5) ergibt:

$$-r_A = \frac{k_A p_A \cdot k_O p_O}{k_A p_A + k_O p_O} \quad (5)$$

Entsprechend gilt z.B. für zwei Parallelreaktionen ($k_A = k_1 + k_2$):

$$-r_1 = \frac{k_1 p_A \cdot k_O p_O}{(k_1 + k_2) p_A + k_O p_O} \quad (6)$$

Die Konstanten lassen sich entweder durch eine nicht-lineare Regression oder durch Umwandlung von Gleichungen (5) und (6) in Geradengleichungen und anschließender linearer Regression berechnen. Wird bei den Experimenten der Sauerstoff- bzw. *p*-Xylol-Partialdruck variiert und der entsprechende andere konstant gehalten, so kann beispielsweise Gl. (5) wie folgt linearisiert werden:

$$\frac{1}{-r_A} = \frac{1}{k_A p_A} + \frac{1}{k_O p_O} \quad (7)$$

Aufgrund der Vielfalt der gefundenen Oxydationsprodukte (vgl. experimentellen Teil) mußte vorerst ein komplexes Reaktionsschema, bestehend aus mehreren Parallel- und Folgereaktionen, angenommen werden, auf das kein einfaches Modell anwendbar ist. Es zeigte sich aber, daß – basierend auf den beiden Hauptprodukten *p*-Toluylaldehyd und Kohlendioxid, die über 90% der Produkte ausmachen – in guter Näherung das in Abb. 1 gezeigte vereinfachte Reaktionsschema angenommen werden kann.

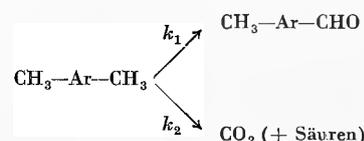


Abb. 1. Vereinfachtes Reaktionsschema

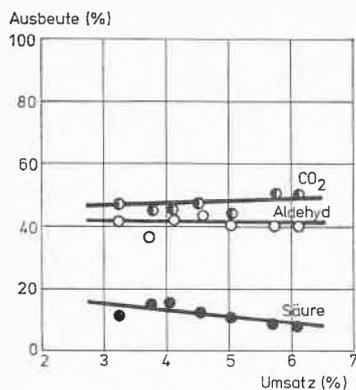


Abb. 2. Produktverteilung in Abhängigkeit des Umsatzes
Temperatur = 370°C

Daß im untersuchten Konzentrations- und Umsatzbereich die zu erwartende Weiteroxydation von *p*-Toluyaldehyd vernachlässigt werden darf, geht aus der in Abb.2 gezeigten Umsatzausbeute hervor.

Aus den experimentell gefundenen Reaktionsgeschwindigkeiten der Bildung von *p*-Toluyaldehyd und Kohlendioxid sowie des Gesamtverbrauches an *p*-Xylol, die in Abb.3 und 4 entsprechend Gl. (7) dargestellt sind,

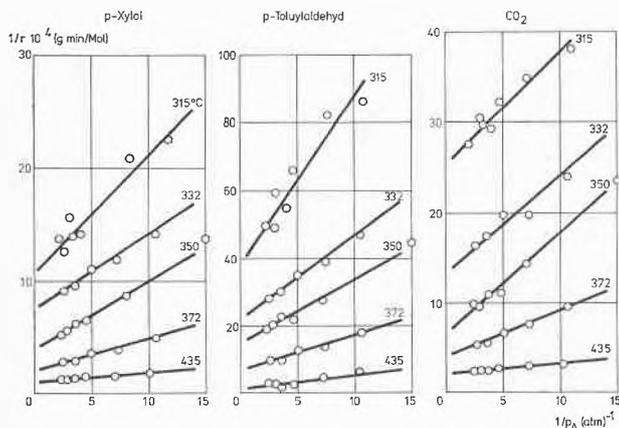


Abb. 3. Reaktionsverlauf in Abhängigkeit vom *p*-Xylol-Partialdruck. $p_O = 0,3 \text{ atm}$

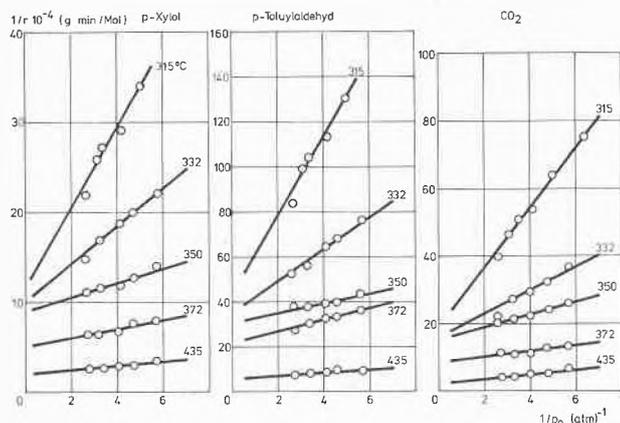


Abb. 4. Reaktionsverlauf in Abhängigkeit vom Sauerstoff-Partialdruck. $p_A = 0,1 \text{ atm}$

wurden durch lineare Regression die Adsorptions- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten berechnet. In Tabelle 1 sind die derart ermittelten Konstanten zusammengestellt.

Tabelle 1. Adsorptions- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Temperatur °C	Konstanten (Mol/g min atm)			
	$k_{tot} \cdot 10^4$	$k_{AlD} \cdot 10^4$	$k_{CO_2} \cdot 10^4$	$k_O \cdot 10^4$
435	8,55	2,01	5,49	9,22
372	2,87	1,00	1,90	1,51
350	1,59	0,45	0,83	0,79
332	1,38	0,36	0,76	0,39
315	0,99	0,28	0,66	0,19

Wie aus der Herleitung des Geschwindigkeitsgesetzes ersichtlich ist, muß die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante des Sauerstoffes für die Einzelschritte gleichgroß sein wie für die Gesamtreaktion und die Gesamtreaktionsgeschwindigkeitskonstante gleich der Summe der Einzelkonstanten. Aus den in Tabelle 2 zusammengestellten Daten ist an einem Beispiel ersichtlich, daß dieses Kriterium innerhalb der 95prozentigen Vertrauensgrenze erfüllt ist.

Tabelle 2. Additionsprinzip der Geschwindigkeitskonstanten

Reaktion	$k \cdot 10^4$ (Mol/g min atm)	$k_O \cdot 10^4$ (Mol/g min atm)
Totalreaktion	4,7 $3,9 < k < 6,0$	1,1 $0,7 < k_O < 1,5$
Toluyaldehyd	2,3 $2,0 < k < 2,7$	1,2 $0,8 < k_O < 1,8$
Kohlendioxid	2,0 $1,8 < k < 2,3$	1,0 $0,7 < k_O < 1,6$

Eine weitere wichtige Auswahlanforderung an ein Adsorptionsmodell ist eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Konstanten. Aus Abb.5 ist ersichtlich, daß die Konstanten diesem Kriterium innerhalb gewisser, von der Versuchsführung her erklärbarer Streuungen standhalten.

In Tabelle 3 sind die aufgrund von Abb.5 berechneten Aktivierungsenergien und Frequenzfaktoren zusammengestellt. Die Aktivierungsenergie der Sauerstoffadsorp-

Tabelle 3. Aktivierungsenergien und Frequenzfaktoren

Reaktion	E_A (kcal/Mol)	k_O (Mol/g min atm)
<i>p</i> -Xylol → <i>p</i> -Toluyaldehyd	14,21	$5,38 \cdot 10^0$
<i>p</i> -Xylol → Kohlendioxid	15,45	$3,14 \cdot 10^1$
<i>p</i> -Xylol → Produkte	14,95	$2,31 \cdot 10^1$
Sauerstoff → Sauerstoff _{adsorb}	26,40	$5,78 \cdot 10^5$

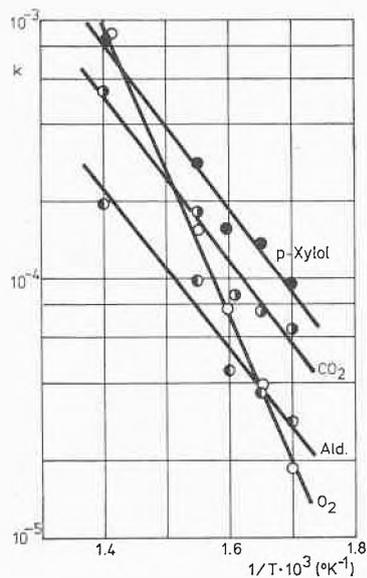


Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten

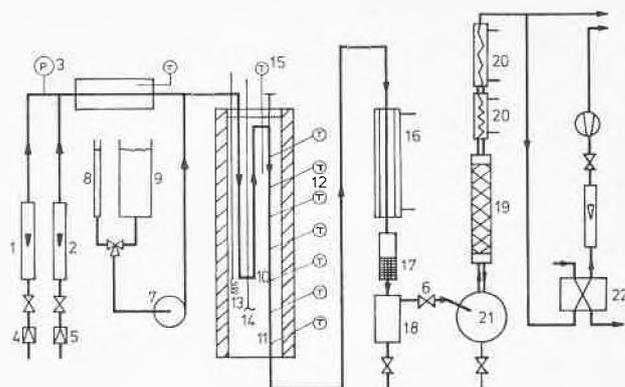
tion ist definitionsgemäß eine Katalysator-konstante und sollte daher unabhängig vom Substrat sein. Daß dies tatsächlich zutrifft, zeigt ein Vergleich mit Werten, die an ähnlichen Kontakten erhalten wurden. So betragen die Aktivierungsenergien für die Sauerstoffadsorption bei Benzol 30,0³ und 27,2⁴; bei Toluol 29,4⁵; bei *o*-Xylole 26,0⁶, 23,0⁷ und 23,6⁸; bei Naphthalin 28,1⁵ kcal/Mol und liegen damit in derselben Größenordnung wie die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte (26,4 kcal/Mol).

Experimentelles

Die Apparatur ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Bei den Versuchen wurden folgende Parameter konstant gehalten: Totaldruck 1,8 atm; Volumenstrom 25,7 Nl/min; Katalysator-menge 132 g.

Als Kontakt diente ein in der Industrie für die Niedrig-temperaturoxydation von Naphthalin verwendeter Katalysator (BASF-Phthalsäure-Katalysator Typ A). Dieser bestand aus einem Silicagelträger mit Vanadiumpentoxid als aktive Masse und Kaliumsulfat als Moderator. Der Kontakt hatte folgende Textureigenschaften: Zylinderdurchmesser und Höhe 4 mm; wahre Dichte 2,50 g/cm³; scheinbare Dichte 1,47 g/cm³; Porosität 0,412; Leervolumenanteil im Bett 0,472; spezifische Oberfläche 22,45 m²/g; äquivalenter Porenradius 250 Å; häufigster Porenradius 150 Å.

Die Analyse der aldehydischen Oxydationsprodukte erfolgte gaschromatographisch. Der Säuregehalt wurde durch Titration mit Natronlauge bestimmt. Kohlendioxid wurde nach Durchleiten eines Teilstromes der Abgase über Hopkalit ebenfalls gaschromatographisch gemessen. Neben *p*-Toluylaldehyd und



- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1 Luftrotameter | 12 Thermoelemente im Kontaktrohr |
| 2 Stickstoffrotameter | 13 Heizspirale |
| 3 Manometer | 14 Rührer |
| 4 Luftdosierventil | 15 Thermoelement im Salzbad |
| 5 Stickstoffdosierventil | 16 Röhrenkühler |
| 6 Druckreduzierventil | 17 Nebelabscheider |
| 7 <i>p</i> -Xylole-Dosierpumpe | 18 Produktsammelgefäß I |
| 8 <i>p</i> -Xylole-Vorratsbehälter I | 19 Adsorptionsturm |
| 9 <i>p</i> -Xylole-Vorratsbehälter II | 20 Intensivkühler |
| 10 Tauchrohr | 21 Produktsammelgefäß II |
| 11 Kontaktrohr | 22 Automatisches Einschleusventil für Gaschromatograph |

Abb. 6. Oxydationsapparatur

Kohlendioxid konnten im Reaktionsgemisch nachfolgende Verbindungen festgestellt werden:

<i>p</i> -Toluylsäure	3 bis 6%
Terephthalaldehyd	2 bis 5%
Benzaldehyd	< 1%
<i>p</i> -Kresol	< 1%
Benzoesäure	< 0,4%
Terephthalaldehydsäure	< 0,4%
Maleinsäureanhydrid	< 0,2%
Citraconsäureanhydrid	< 0,2%
Benzol und Toluol	< 0,2%

Symbole

- k_O Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante des Sauerstoffes (Mol/g min atm)
 k_A Geschwindigkeitskonstante des Eduktverbrauchs (Mol/g min atm)
 p_A Eduktpartialdruck (atm)
 p_O Sauerstoffpartialdruck (atm)
 r_A Reaktionsgeschwindigkeit des Eduktes (Mol/g min)
 r_O Adsorptionsgeschwindigkeit des Sauerstoffes am Katalysator (Mol/g min)
 S mit Sauerstoff bedeckter Teil der aktiven Katalysatorstellen

P. FELIX und G. GUT

Technisch-Chemisches Laboratorium
 Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

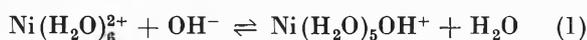
Die Deprotonierung des Ni(II)-Aquoions (Stopped-Flow-Methode)*

Summary

A stopped flow procedure is described which allows to separate the deprotonation reaction of the Ni²⁺-aquoion from the formation of the polynuclear hydroxo species. The pK was determined to be 11,0.

Bei der Diskussion der chemischen Eigenschaften wässriger Metallsalzlösungen wird den pK-Werten der Metallaquoionen eine große Bedeutung beigemessen. Diese pK-Werte sind allerdings wenig geeignet, das tatsächliche Geschehen bei der Metallhydrolyse zu charakterisieren, da in äquilibrierten Lösungen meist gar keine mononuklearen Hydroxokomplexe nachweisbar sind. Insbesondere SILLÉN und Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Deprotonierungsprodukte von Metallaquoionen spontan zu polynuklearen μ -Hydroxokomplexen kondensieren¹. In der älteren Literatur, jedoch auch in neueren Arbeiten, ist dieser grundlegende Sachverhalt oft übersehen worden. So ist es nicht verwunderlich, daß kaum zuverlässige pK-Werte von Metallionen existieren.

Ein besonders krasses Beispiel stellt das Ni(II) dar, wo pK-Werte zwischen 6,5 und 10,9 angegeben werden². Dies ist nicht so erstaunlich, wenn man bedenkt, daß die zahlreichen Autoren nicht berücksichtigt haben, daß bei der Hydrolyse im wesentlichen ein tetrameres Teilchen Ni₄(OH)₄⁴⁺ gebildet wird und sich in äquilibrierten Lösungen kein NiOH⁺ befindet³. Dies bedeutet aber nicht, daß bei der Laugenzugabe zum Aquoion überhaupt kein NiOH⁺ entsteht. Es ist vielmehr naheliegend, anzunehmen, daß zuerst eine einfache Deprotonierung stattfindet (1),



und das intermediäre NiOH⁺ in anschließenden Schritten zum Ni₄(OH)₄⁴⁺ weiterreagiert. Es ist bekannt, daß Protonenübertragungen zu den schnellsten chemischen Reaktionen gehören, die im allgemeinen diffusionskontrolliert verlaufen⁴. Hingegen ist die Bildung von polynuklearen μ -Hydroxokomplexen (Ersatz von H₂O-Molekeln der Koordinationssphäre durch die die Verknüpfung bewerkstelligende OH-Gruppe) im allgemeinen um Größenordnungen langsamer⁵. Beim Ni(II) sind die entsprechenden Gleichgewichte erst nach 20 Minuten eingestellt³.

* Vorgetragen an der Sommersammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 9. Oktober 1971 in Fribourg.

¹ L. G. SILLÉN, *Quart. Rev. Chem. Soc.* (London) 13 (1959) 146.

² *Stability Constants*, Special Publication No. 17, London 1964; Supplement No. 1, Special Publication No. 25 (1970).

³ K. A. BURKOV, L. S. LILIČ und L. G. SILLÉN, *Acta Chem. Scand.* 19 (1965) 14; G. B. KOLSKY, N. K. KILDAHL und D. W. MARGERUM, *Inorg. Chem.* 8 (1969) 1211.

⁴ M. EIGEN, W. KRUSE, G. MAASS und L. DE MAEYER, *Progr. Reaction Kinetics* 2 (1964).

⁵ G. SCHWARZENBACH, *Pure & Appl. Chem.* 5 (1962) 377.

Wir haben versucht, mittels Stopped-Flow-Methode die Deprotonierungsreaktion (1) von den langsameren Kondensationsreaktionen zu separieren. Bereits SCHWARZENBACH und WENGER haben mittels einer mit Glaselektroden ausgerüsteten Strömungsapparatur die Deprotonierung von Metallaquoionen studiert^{5,6}. Allerdings konnten dabei nur solche Metallionen eingesetzt werden, bei denen das metastabile Vorgleichgewicht (1) während einer relativ langen Zeitperiode (etwa 10⁻² s) erhalten bleibt. Die Stopped-Flow-Methode hingegen erlaubt die kontinuierliche spektralphotometrische Registrierung des pH-Wertes anschließend an die Vermischung der Ni²⁺- und OH⁻-Lösungen. Als Indikator diente Phenolphthalein. Bei der verwendeten Wellenlänge ($\lambda = 555 \text{ nm}$) ist die Absorption von Ni²⁺ und dessen Hydrolyseprodukte vernachlässigbar klein. Auch eine eventuelle Komplexbildung zwischen Ni²⁺ und Phenolphthalein ist bei den verwendeten Versuchsbedingungen völlig unerheblich.

Die Halbwertszeit der einfachen Deprotonierungsreaktion kann für die eingesetzten Konzentrationen (siehe Abb. 2) auf etwa 10⁻⁷ s abgeschätzt werden (d. h. sehr viel schneller als der Mischprozeß). Bei sämtlichen Experimenten war das pH zeitlich variabel, je nach [Ni]_t und Hydroxylierungsgrad Z (= {[OH]_t - [OH] + [H]} / [Ni]_t). Dies zeigt, daß die Vernetzungsreaktionen

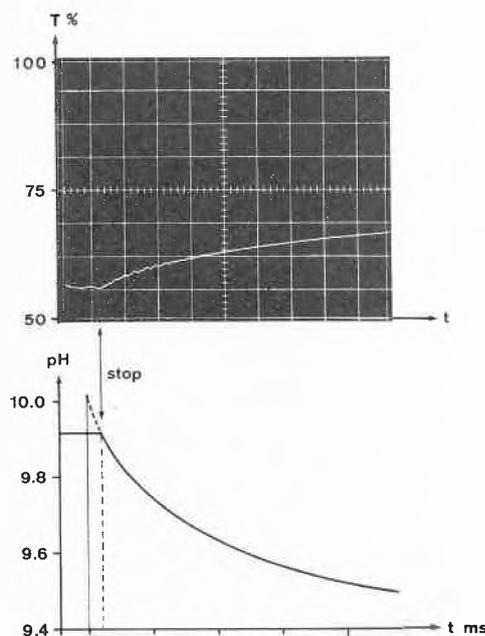
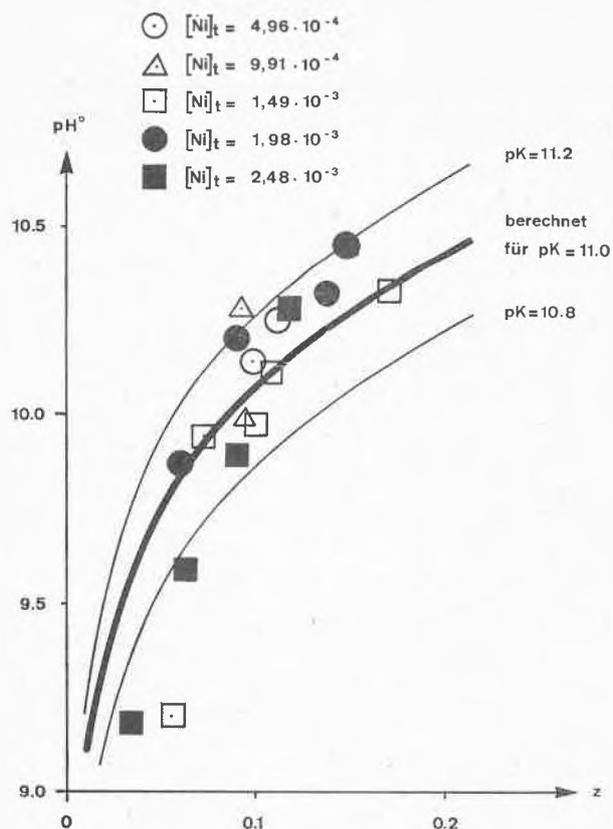


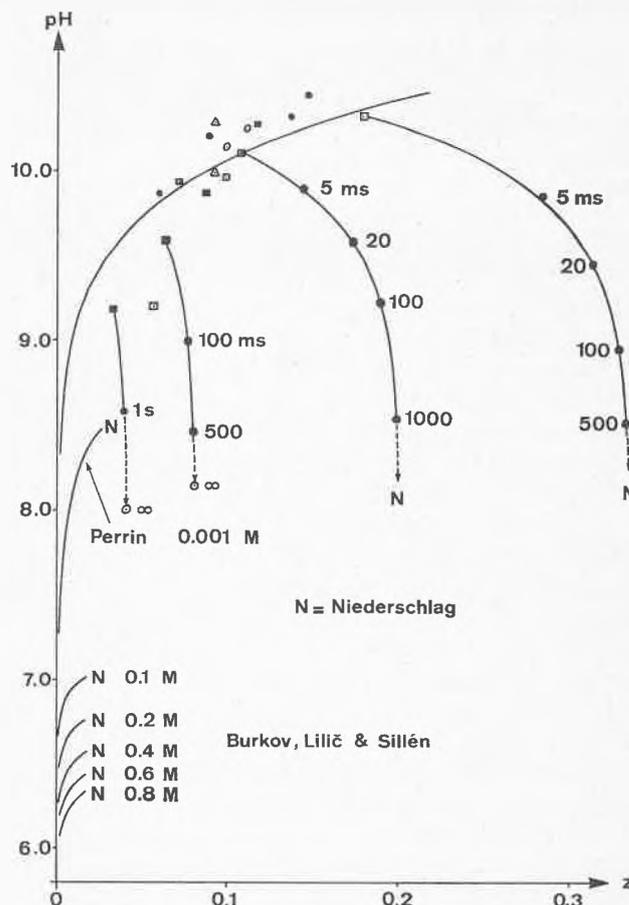
Abb. 1. Typisches Experiment einer Raschalkalisierung einer Ni²⁺-Lösung. [Ni]_t = 1,49 · 10⁻³ M, [OH]_t = 3 · 10⁻⁴ M

⁶ G. SCHWARZENBACH und H. WENGER, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 644.

Abb. 2. Deprotonierung von $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$

bereits 2 ms (= Totzeit der Apparatur) nach dem Mischen eingesetzt haben. Deshalb wurden die pH -Werte auf die Zeit $t = 0$ extrapoliert (pH^0). In Abb. 1 ist im oberen Teil das Oszillogramm eines typischen Experimentes abgebildet (% Transmission in Funktion der Zeit). Im unteren Teil ist das entsprechende pH gegen die Zeit aufgetragen. In Abb. 2 sind die pH^0 -Werte in Funktion von Z bei verschiedenem $[\text{Ni}]_t$ aufgetragen. Die experimentellen Punkte korrelieren relativ gut mit der für $\text{pK} = 11,0$ berechneten Deprotonierungskurve, wenn man bedenkt, daß im untersuchten pH -Bereich $[\text{OH}]$, und die freie OH -Konzentration von vergleichbarer Größe sind. Besonders wichtig ist die Tatsache, daß innerhalb der Streuung der Punkte keine Abhängigkeit von $[\text{Ni}]_t$ festzustellen ist. Dies zeigt, daß der erste Schritt bei der Alkalisierung in der Tat eine einfache Deprotonierung ist und von den Vernetzungsreaktionen eindeutig separierbar ist. Falls diese nämlich bereits während des Mischprozesses zu einem wesentlichen Ausmaß fortgeschritten wären, müßte die Auftragung pH^0 versus Z von $[\text{Ni}]_t$ abhängig sein. Der Verlauf der Hydroxylierungskurven sollte sich außerdem deutlich von demjenigen einer Deprotonierungskurve unterscheiden.

In Abb. 3 sind die pH^0 -Werte den pH -Werten von äquilibrierten Lösungen gegenübergestellt. Man sieht deutlich, daß die Vernetzungsreaktionen mit einer drastischen pH -Senkung verbunden sind. Für einige unserer Meßpunkte ist die zeitliche Änderung der (pH, Z)-Werte-

Abb. 3. pH -Werte nach der Raschkalisierung von $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ und pH -Werte nach Erreichen des Gleichgewichtes

paare eingezeichnet. Es ist offensichtlich, daß auch bei den von PERRIN⁷ verwendeten Ni -Konzentrationen bereits erhebliche Mengen von Polynuklearen vorliegen müssen. Der von ihm angegebene pK -Wert kann somit nicht richtig sein.

Diese Untersuchung zeigt, daß es tatsächlich möglich ist, den pK -Wert von Ni^{2+} mittels Stopped-Flow-Methode recht zuverlässig zu bestimmen, obwohl in äquilibrierten Lösungen der mononukleare Hydroxokomplex nicht nachweisbar ist. Interessant an dieser Methode ist auch der Umstand, daß wesentlich größere Z -Werte realisierbar sind als bei üblichen Gleichgewichtsmessungen. Dies ermöglicht eine eindeutigere Interpretation. Entsprechende Untersuchungen sollten auch bei andern Metallaquoionen zuverlässige pK -Bestimmungen ermöglichen.

Abschließend soll noch eine Bemerkung zu den Kondensationsreaktionen, welche zum $\text{Ni}_4(\text{OH})_4^{4+}$ führen, gemacht werden. Man kann bei diesen Folgereaktionen je nach Versuchsbedingungen zwei separierte Stufen erkennen, und die Reaktionsgeschwindigkeiten sind abhängig von $[\text{Ni}]_t$ und $[\text{OH}]_t$. Falls bereits die erste Poly-

⁷ D. D. PERRIN, *J. Chem. Soc.* 1964, 3644.

merisationsreaktion (Halbwertszeit im Bereich 10 bis 100 ms) zu einem μ -Hydroxokomplex führt, so müßte gemäß einer Überschlagsrechnung die erforderliche H_2O -Substitutionsreaktion beim $NiOH^+$ -Ion etwa 10- bis 100mal schneller erfolgen als beim Ni^{2+} -Aquoion. Es wäre allerdings auch denkbar, daß zunächst ein Assoziat gebildet wird, welches nicht durch OH^- , sondern *via* H-Brücken zusammengehalten wird. Erst in der nachfolgenden Reaktionsstufe würde dann der H_2O -Substi-

tutionsprozeß bzw. die Verknüpfung von Ni(II)-Ionen durch μ -Hydroxobrücken erfolgen.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 2.86.69) für die Unterstützung dieser Arbeit.

H. HOHL und G. GEIER

Laboratorium für Anorganische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

On the analysis of oxidative deamination with the help of the Hammett relationship and other linear free energy relationships*

Whatever the mechanism of a given enzyme system, the geometry of the enzyme-substrate interaction is of paramount importance to the realization of the catalytic event. Quite often a small molecule not only has to reach the proper spot on a thousand times larger molecule, but also has to orient itself exactly in such a way that its reactive part comes into closest proximity to that of the enzyme. With or without "induced fit", very specific forces are needed to lead the two or more partners to the proper eutopic-complex¹ and to overcome the tremendous entropy loss encountered in the complex formation².

Among other approaches to obtain some pertinent information, we exposed a large number of systematically varied substrates to a given enzyme and evaluated the kinetic data with the help of the HAMMETT relationship. Although

$$\log(K/K_0) = \rho \times \sigma$$

this equation relates kinetic parameter with electron density (K and K_0 represent either rate or equilibrium constants determined for the substituted and unsubstituted compounds respectively and ρ , the slope of the line, is an indicator of the sensitivity of the system to changes of the electron density σ at the reaction center), many aberrations from linearity have been encountered in enzymic analysis which commonly are ascribed to

steric factors. It seemed worthwhile to examine experimentally the possible explanations for such deviations because often these irregularities provide us with clues for the understanding of the mechanism involved. No systematic study of this kind has been reported in the literature. The sometimes difficult question, which sigma-values to select or how to calculate missing ones has been thoroughly answered by SWAIN and LUPTON³.

We followed a new line of investigation when we compared kinetic data secured with the same substrates but with different enzymes. With the amine oxidases listed in Table 1, we have three enzymes capable of catalyzing the oxidation of ring-substituted benzylamines. Since two of our oxidases are pyridoxal-copper enzymes and two are flavoproteins, we were interested to find out whether the kinetic analysis would reveal any fundamental differences between the two groups.

* Presented October 9, 1971, at the Summer Meeting of the Swiss Chemical Association in Fribourg.

¹ E. A. ZELLER, *Biochem. Z.* 339 (1963) 13.

² F. H. WESTHEIMER, Mechanisms related to enzymes, *Advanc. Enzymol.* 24 (1962) 441.

³ C. G. SWAIN and E. C. LUPTON jr., *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 4328.

Table 1. Enzymes catalyzing oxidative deamination

	DAO	SPO	MAO	L-AAO
Sensitivity to semicarbazide	+	+	—	±
Non-proteinaceous component	PLP, Cu^{2+}	PLP, Cu^{2+}	FAD	FAD
Secondary and tertiary amines	No substrates	No substrates	Substrates	No substrates (some exceptions)
Benzylamines as substrates	<i>para</i> > <i>meta</i>	<i>para</i> > <i>meta</i>	<i>meta</i> > <i>para</i>	<i>meta</i> > <i>para</i>
Release of β -tritium from histamine	+		None	
Occurrence	Cytoplasm, extracellular	Extracellular	Particle-bound, cellular	Extracellular
E. C. Classification	1.4.3.6	1.5.3.3	1.4.3.4	1.4.3.2
Proposed classification		1.4.3.7		
Trivial names	Histaminase	Monoamine oxidase	Histaminase, amine oxidase	Ophidian L-amino acid oxidase

Table 2. $K_i(10^{-8}M)$ for purified MAO and hydroxylated phenylethylamines

Substrate		$K_m(10^{-5}M)$	Pargyline ^a	Tranlycypromine ^b	Iproniazid ^c
Phenylethylamine		2	29	16	$40 \cdot 10^3$
Phenylethanolamine	β -OH	38	12	25	$50 \cdot 10^3$
Tyramine	4-OH	24	2	7	$2.5 \cdot 10^3$
M-tyramine	3-OH	24	35		
Octopamine	β ,4-OH	57	17	34	$6.6 \cdot 10^3$
Dopamine	3,4-OH	91	45	31	$39 \cdot 10^3$

^a Pargyline: N-Benzyl-N-methyl-propargylamine (Abbott Laboratories).

^b Tranlycypromine: *trans*-2-phenylcyclopropylamine (Smith, Kline & French).

^c Iproniazid: 1-Isonicotinyl-2-isopropylhydrazine (Hoffmann-La Roche).

Types of inhibition: **heavily printed figures** = competitive inhibition; *italicized figures* = non-competitive; other figures = mixed type of inhibition.

Methodology

We measured the rate of oxygen consumption polarographically. The CLARK electrode which was separated from the reaction mixture by a teflon membrane was used (Oxygen monitor, Yellow Springs Instrument Company). The rate of benzaldehyde formation was recorded with a Unicam spectrophotometer at the optimal wave length determined for each aldehyde. To evaluate the kinetic observations, LINEWEAVER-BURK and DIXON plots served our purposes. While the majority of the substrates were synthesized in this laboratory, a few were purchased from various commercial sources.

Monoamine Oxidase (MAO)

This enzyme was prepared from beef liver mitochondria by a 62-fold purification. When the maximal values (V) computed for the degradation of more than 20 benzylamines were plotted according to HAMMETT, regression analysis yielded a line with a small positive slope ($\rho = 0.2$) and a rather low correlation coefficient⁴. When, however, the results were organized on the basis of the HAMMETT relationship which included TAFT's steric factors (E_s) for the *para*-substituted set, then a linear relationship was obtained, characterized by a correlation coefficient $r = 0.94$! These results suggest that several *para*-substituted benzylamines do not fit optimally into the active site.—In contrast to the benzylamine series, the slope ρ computed for the phenylethylamine set appears to be negative (see V -values in Table 2).

As demonstrated by the results summarized in Table 2, these observations are far from being trivial. The degree of inhibition of purified MAO by several inhibitors and the type of inhibition are a function of the *locus* of the hydroxylation of the phenylethyl nucleus. It is, therefore, possible that the biological responses following the *in vivo* administration of MAO inhibitors, depend of the kind of biogenic amines present at the target site.

Spermine Oxidase (SPO)

This enzyme, prepared from beef blood plasma, appeared to be uniform according to the conventional physico-

chemical tests⁵. Benzylamine and two sets of each 11 *meta*- and *para*-substituted benzylamines were analyzed. When the V -data were plotted according to HAMMETT, two distinct lines were obtained, with $\rho_m = 0.8$ and $\rho_p = 2.4$. In contrast to the MAO system, *para*-substitution yielded here better substrates than the *meta*-derivatives, as expressed by V . Since it is known that hydroxylation almost abolished the degradation by SPO⁶, the slope of the HAMMETT relationship pertaining to phenylethylamine derivatives seems to be strongly positive.

Diamine Oxidase (DAO)

This oxidase was prepared as a physico-chemically uniform material from hog kidney cortex. Until recently⁷, benzylamine was reported to be *not* a substrate of DAO. We found, however, that *para*-substitution produced good substrates; in fact, *p*-nitrobenzylamine is more rapidly degraded by DAO than the classical substrate cadaverine! Again, the V -data, secured from the kinetic analysis of the degradation of more than 20 benzylamine derivatives, yielded *two* HAMMETT lines, characterized by $\rho_m = 0.8$ and $r_m = 0.94$, and by $\rho_p = 0.7$ and $r_p = 0.91$. The results recorded for both pyridoxal phosphate enzymes, SPO and FAO, are similar: in both instances the *para*-substituted benzylamines are more rapidly oxidized than their *meta*-counterparts. In the average, V_p was 3.7 times larger than V_m .

Ophidian L-Amino Acid Oxidase (L-AAO)

In previous experiments, we studied the kinetics of the degradation of more than 20 *meta*- and *para*-substituted phenylalanines by crystalline L-AAO prepared from the venom of *Crotalus adamanteus*⁸. The HAMMETT

⁴ J. WALKER and E. A. ZELLER, unpublished data.

⁵ P. K. LI, Ph. D. Dissertation, Northwestern University, Evanston (Illinois) 1971.

⁶ C. W. TABOR, H. TABOR, and S. M. ROSENTHAL, *J. Biol. Chem.* **208** (1954) 645.

⁷ W. G. BARDSLEY *et al.*, *Biochem. J.* **117** (1970) 169.

⁸ L. M. CLAUS, Ph. D. Dissertation, Northwestern University, Evanston (Illinois) 1968.

diagramm displayed a pattern similar to that obtained for MAO: The points determined by the logarithm of V obtained for the degradation of *para*-halogenated phenylalanines were found below the HAMMETT line. The distance of these points from the line correlated well with the VAN DER WAALS radii.

In addition, we tested 8 pairs of *meta*- and *para*-substituted benzoic acids and 4 pairs of phenylacetic acids as competitive inhibitors of L-AAO. When we plotted $\log(K_i/K_i^0)$ against π , two separate lines appeared, both characterized by high correlation coefficients ($r \geq 0.9$). The average of the K_i -values found for the *para*-benzoic acids was 2.8 times higher than that of the *meta*-derivatives. The difference, 1.5, was smaller for the two phenylacetic acid series. According to HANSCH, π is a measure of hydrophobic interaction as influenced by aromatic ring substitution⁹.

Ortho-substituted phenylalanines are even more rapidly oxidized in the presence of L-AAO than *meta*-substituted amino acids. The V -values calculated from the experimental data are of the same order of magnitude as those found for the degradation of L-leucine and L-methionine. In several instances, the kinetic parameters of the oxidation of leucine and *ortho*-substituted phenylalanines formed one set and those related to phenyl-

alanine itself and to the *meta*- and *para*-substituted amino acid another one, when the enzymic system was exposed to several different perturbations. One example has to suffice. When the effect of varying oxygen concentrations on the kinetic parameters were studied, secondary DALZIEL plots clearly indicated fundamentally different kinetics for the degradation of leucine and *o*-chlorophenylalanine on the one hand and of phenylalanine, *m*- and *p*-chlorophenylalanine on the other.

Conclusions

When the kinetic data collected for 4 enzymes were organized according to HAMMETT and HANSCH, linear relationships were found, and sometimes two, one for the *meta*- and one for the *para*-derivatives.

Acknowledgement: This work has been supported by a United States Public Health Service Research Career Award, 5-K6-GM-14,200, by a grant from the National Eye Institute (Ey 00 313) and from the National Institute of Mental Health (MH 20 020).

E. A. ZELLER**, M. HSU, P. K. LI, J. OHLSSON, and K. SUBBARAO

Department of Biochemistry, Northwestern University Medical School, Chicago (Illinois 60611)

⁹ C. HANSCH *et al.*, *Amer. J. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616, 87 (1965) 2738, 5770.

** Present temporary address: Universität Konstanz, Fachbereich Biologie, 7750 Konstanz (BRD)

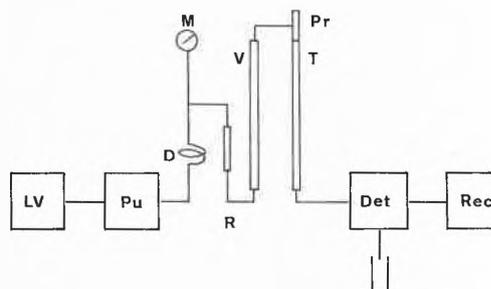
Ein Beispiel zur Anwendung der schnellen Flüssigchromatographie in der organischen Synthese*

Summary

The efficiency of high speed liquid liquid partition chromatography as a tool in organic synthesis is demonstrated by the solution of two separation problems which have arisen in the work towards the synthesis of vitamin B₁₂.

Im vergangenen Jahr waren die Arbeiten über die Totalsynthese von Vitamin B₁₂ in den Laboratorien der ETH in Zürich und der Harvard University in Cambridge in eine Phase geraten, in welcher die herkömmlichen chromatographischen Methoden zur Auftrennung von diastereomeren und konstitutionsisomeren Kobaltkomplexen des Typus A (vgl. Abb.1) bzw. B (vgl. Abb.3) nicht mehr ausreichten. Eine nahezu ideale Lösung der aufgetretenen Trennprobleme gelang durch die sogenannte schnelle Flüssig-flüssig-Verteilungschromatographie auf Kieselgur. Die Technik der schnellen, hochauflösenden Säulenchromatographie ist in den letzten Jahren in verschiedenen Laboratorien entwickelt wor-

den¹; das vorliegende Anwendungsbeispiel soll auf die große Bedeutung dieser Trennmethode für das Gebiet der synthetischen organischen Chemie hinweisen. Unser Chromatographiesystem (Eigenbau) ist in der folgenden Skizze dargestellt.



1. Lösungsmittelvorrat (LV)
2. Dosierpumpe (Pu): Milton Roy «Minipump», Kapazität 0 bis 160 ml/h

* Vorgetragen an der Somerversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 9. Oktober 1971 in Fribourg.

¹ Vgl. z.B. die Monographie *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Editor: J. J. KIRKLAND, John Wiley & Sons, 1971.

3. Pulsationsdämpfer (*D*): von mobiler Phase durchströmte Bourdon-Feder
4. Manometer (*M*): 100 at
5. Röhren (*R*), etwa 4 ml Inhalt, zum Beladen der Säulen mit Stationärphase
6. Vorsäule (*V*): Glasrohr, 3 mm i.D., 9 mm a.D., 300 mm lang
7. Teflon-Endstück (*Pr*) für die Probeneingabe
8. Trennsäule (*T*): Glasrohr 5 mm i.D., 11 mm a.D., 500 mm lang
9. Detektor (*Det*): Filterphotometer, Interferenzfilter B40, 578 nm (Eigenbau)
10. Registriergerät (*Rec*)
11. Trägermaterial: Kieselgur, Merck, gereinigt und gegläht. Durch übliche Schlämntechnik wurde eine Korngrößenfraktion von etwa 5 bis 30 μ (etwa 5% des Gesamtmaterials) abgetrennt, getrocknet und zur Säulenfüllung verwendet. Das trockene Material wurde portionenweise (etwa 50 mg pro Portion) in die Säule gegeben und mit einem passenden Stempel festgedrückt.
12. Phasensystem:

	H ₂ O	MeOH	CHCl ₃	iso-Octan	
System I	3	10	15	40	Volumenteile
System II	3	10	10	30	

Die vier Komponenten des jeweiligen Systems werden während mindestens 2 Std. vermischt und anschließend im Scheidetrichter zur Bildung der beiden Phasen etwa 20 Std. ruhen gelassen. Die obere, wasserarme Phase wird als mobile Phase², die untere, wasserreiche, als stationäre Phase verwendet. Die Beladung der Säulen mit Stationärphase erfolgt bis zur Sättigung durch Einschleusen *via* Röhren *R* oder durch direktes Einspritzen unter gleichzeitigem Durchpumpen der mobilen Phase. Die Säulen sind chromatographiebereit, wenn am Ende keine Stationärphase mehr austritt.

13. Durchflußgeschwindigkeit: 100 bis 120 ml/Std. (40 bis 50 at)
14. Kapazität der Trennsäule: etwa 1 mg Probe pro Charge, gelöst in etwa 2 μ l CHCl₃ + etwa 6 μ l mobiler Phase.
Einzelproben werden mittels einer 10- μ l-Terumo-Spritze auf die Trennsäule gespritzt. (Die Nadelbasis wurde konisch gedreht, so daß durch einen Druck auf die Spritze im Moment der Injektion eine Abdichtung gegen außen erreicht werden kann.) Serie-Injektionen erfolgen mittels einer druckfesten Kolbenspritze (0,5 ml Inhalt) mit Mikrometerschraube, die über eine Stahlkapillare von 0,2 mm i. D., 20 cm Länge mit der Säule verbunden ist.

² Der mobilen Phase wurde in unserem Spezialfall 1 Promille Acetoncyanhydrin zur Stabilisierung der axialen Cyanliganden der Kobaltkomplexe zugegeben.

15. Resultate

Trennbeispiel A:

Bei der photochemisch induzierten Cycloisomerisation von totalsynthetischen A/D-secocorrinoiden Zinkkomplexen (vgl. Abb. 1) entsteht erwartungsgemäß ein Diastereoisomerengemisch, welches weder in Form der Zinkkomplexe noch als entsprechende Dicyano-kobalt-Komplexe durch Schichtchromatographie aufgetrennt werden kann.

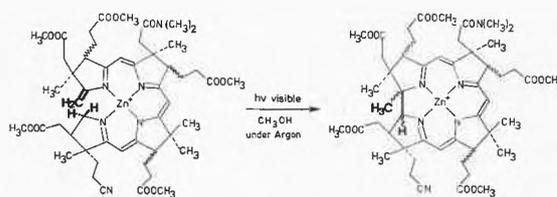


Abb. 1

Das Gemisch der Kobalt-Komplexe wird jedoch durch die oben umschriebene Chromatographie (Lösungsmittelsystem I) in 8 verschiedene, präparativ trennbare Fraktionen aufgetrennt (vgl. Abb. 2), wovon die Fraktionen 1 bis 4 (= 2/3 des Gesamtmaterials) auf Grund ihrer chiroptischen Eigenschaften die natürliche Konfiguration im Ringschlußbezirk der Ringe A und D aufweisen.

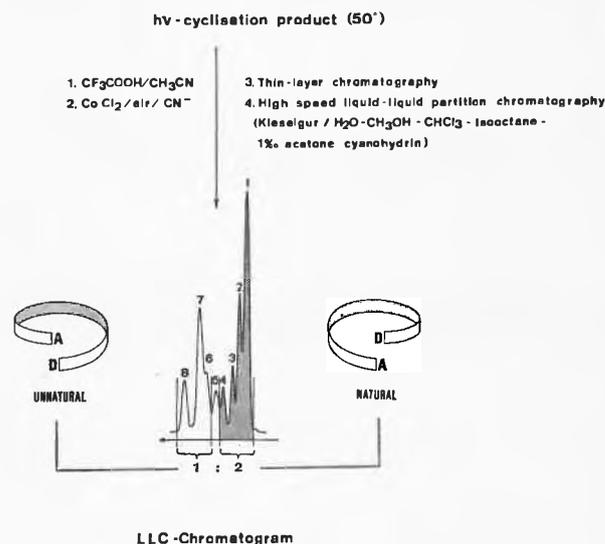


Abb. 2

Die Auftrennung von 350 mg dieses synthetischen Gemisches im repetitiven Einspritzverfahren benötigte pro Charge (etwa 0,8 mg) etwa 10 Min. Die Rückgewinnung des eingesetzten Materials war quantitativ. Die Bodenzahl der Säule, gemessen für die erste Fraktion, betrug 2700.

Trennbeispiel B:

Die im Zusammenhang mit der Identifikation von synthetischem Material untersuchte Ammonolyse von *authentischem* Dicyano-cobyrinsäure-heptamethylester (vgl. Abb. 3) ergab erwartungsgemäß unter bestimmten Reaktionsbedingungen nebst Ausgangsmaterial und

Preparation of Dicyano-hexamethyl-cobyrinate-*f*-monoamide from Dicyano-heptamethyl-cobyrinate

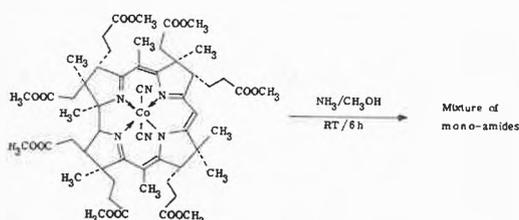


Abb. 3

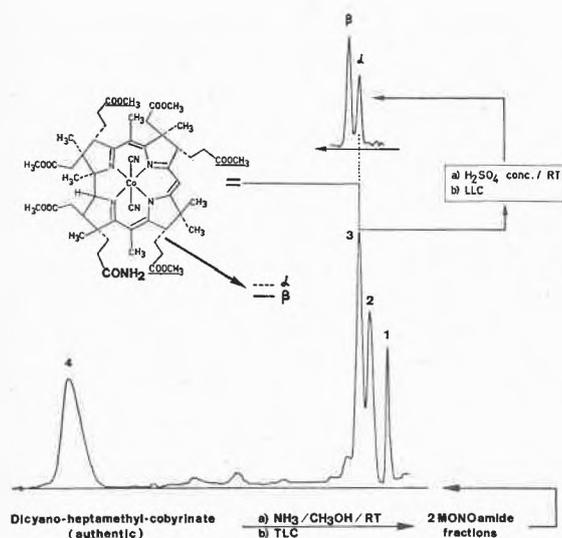


Abb. 4

Polyamidfraktionen ein Gemisch von Hexamethylestermonoamiden, die in der Dünnschichtchromatographie als zwei einheitlich scheinende Fraktionen auftreten. Die Trennleistung der Verteilungschromatographie (Lösungsmittelsystem II) ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Fraktionen 1 bis 3 bzw. 4 entsprechen den beiden dünn-schichtchromatographisch aufgelösten Fraktionen der Monoamide. Das Isomere 3 konnte kristallisiert werden und stellt auf Grund des Vergleiches mit totalsynthetischem Material das im Formelbild der Abb. 4 dargestellte Dicyano-cobyrinsäure-hexamethylester-*f*-monoamid dar.

Diese Identität beruht vorläufig hauptsächlich auf einem exakten Vergleich des chromatographischen Verhaltens durch Ermittlung der theoretischen Bodenzahl der sowohl getrennt als auch gemischt chromatographierten Substanzen (Bodenzahl 2500, Retentionszeit 12 Min.)³.

Nicht nur für die analytische und präparative Trennung von Substanzgemischen, sondern auch für die Identifikation von Substanzen bietet die schnelle Flüssigchromatographie überlegene Möglichkeiten.

Eine eingehende Beschreibung der chemischen Aspekte dieser Arbeiten findet sich bei A. ESCHENMOSER, *Studies on Organic Synthesis, XXIIIrd International Congress of Pure & Applied Chemistry*, Vol. 2, 69, Butterworths, London 1971.

Herrn Professor J.F.K.HUBER, Universität Amsterdam, verdanken wir zahlreiche, wertvolle Instruktionen und Ratschläge.

Die Mitarbeit in der Synthesegruppe von A. E. mit den Herren W. FUHRER, P. SCHNEIDER, H. MAAG, W. SCHILLING und N. OBATA war dem Autor ein Vergnügen.

J. SCHREIBER

Organisch-Chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

³ Für den mit diesem Lösungsmittelsystem rascher eluierten Dicyanocobyrinsäure-heptamethylester wurde eine Bodenzahl von 6900 gemessen (Retentionszeit 4,5 Min.).