

129. Eine neue Methode zur Bestimmung von Sauerstoffisotopen in organischen Verbindungen¹⁾

von H. Dahn, H. Moll²⁾ und R. Menassé

(22. IV. 59)

Bei Arbeiten mit sauerstoffmarkierten Verbindungen wird das Konzentrationsverhältnis der Sauerstoffisotopen fast immer massenspektrographisch bestimmt³⁾. In einzelnen Fällen kann dies so geschehen, dass man die betreffende organische Verbindung direkt in das Massenspektrometer einführt und aus dem «cracking pattern» das Isotopenverhältnis ermittelt⁴⁾. Dies ist jedoch auf viele organische Verbindungen nicht anwendbar; ausserdem gestatten die meisten Massenspektrometer nur die Untersuchung von Massen < 100 mit genügender Genauigkeit, so dass man meist zu gasförmigen Sauerstoffträgern greift. Hierzu dienen vor allem CO₂ oder CO; dagegen darf H₂O wegen «memory»-Effekten nicht in das Massenspektrometer eingeführt werden. Die Aufgabe, organisch gebundenen Sauerstoff in ein für den Massenspektrographen geeignetes Gas zu verwandeln, stellt heute noch den schwierigsten Teil der Arbeit mit Sauerstoffisotopen dar.

Die heute gebräuchlichste Methode⁵⁾ beruht auf der UNTERZAUCHER'schen Pyrolyse⁶⁾ organischer Verbindungen an Kohleoberflächen bei 1120°; es bildet sich CO, dieses wird durch J₂O₅ zu CO₂ oxydiert, ohne dass Isotopenaustausch eintritt. Die Pyrolyse verlangt erheblichen apparativen Aufwand; ausserdem besteht die Gefahr von Blindwerten infolge Reaktion zwischen der Kohle und dem SiO₂ des Rohres. Ein Verfahren von BUNTON⁷⁾ vermeidet diese Schwierigkeit, indem im Vakuum an einer kompakten, induktionsgeheizten Graphitoberfläche ohne Kontakt mit SiO₂ pyrolysiert wird; das Verfahren versagt lediglich bei stickstoffhaltigen Stoffen wegen der Bildung von N₂, das die gleiche Masse hat wie CO; auch hier ist eine grössere Apparatur nötig. – Ein sehr einfaches Verfahren bietet nach einem Vorschlag von RITTENBERG & PONTICORVO⁸⁾ die Oxydation der sauerstoffhaltigen organischen Substanz zu CO₂ mit HgCl₂ bei 350–530°. Wir haben das Verfahren mit etwa 20 Verbindungen ausprobiert (vgl. Anhang zum experimentellen Teil) und gefunden, dass die Ausbeute an CO₂ meist unter 30% bleibt und manchmal kaum 5% des vorhandenen Sauerstoffs erreicht; bei Anwesenheit mehrerer O-Atome von verschiedenem ¹⁸O-Gehalt können daher die Resultate durch Fraktionierung verfälscht werden. – Versuche, den organisch gebundenen Sauerstoff in Form von Wasser zu isolieren, sind nur in Spezialfällen unternommen worden. Wie erwähnt kann H₂O

1) Vorläufige Mitteilung: H. DAHN & H. MOLL, *Chemistry & Ind.* **1959**, 399.

2) Aus der Dissertation H. MOLL, Basel 1959.

3) M. DOLE, *Chem. Reviews* **51**, 263 (1952).

4) Z. B. K. WIBERG, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2665 (1953).

5) W. V. E. DOERING & E. DORFMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5595 (1953).

6) J. UNTERZAUCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **73**, 391 (1940).

7) C. A. BUNTON & J. L. WOOD, *J. chem. Soc.* **1955**, 1522.

8) D. RITTENBERG & L. PONTICORVO, *Int. J. Appl. Radiation Isotopes* **1**, 208 (1956); M. HALMAN & S. PINCHAS, *J. chem. Soc.* **1958**, 3264, schlugen HgCl₂ + Hg(CN)₂ vor.

nicht in den Massenspektrographen eingeführt werden, dagegen kann man es mit unmarkiertem CO_2 ins Gleichgewicht setzen⁹⁾, wobei sich ^{18}O gleichmässig (bis auf einen Isotopeneffekt) zwischen H_2O und CO_2 verteilt; letzteres wird hierauf massenspektrographisch analysiert. DOSTROWSKI *et al.*¹⁰⁾ haben die saure Dehydratisierung zur Analyse von Alkoholen empfohlen; wegen der begleitenden Ätherbildung ist die Wasserausbeute ungewiss, so dass man grosse Substanzeinwagen (0,5–1 g) anwenden muss. WIBERG¹¹⁾ verwendete die Dehydratisierung zur Analyse von Säureamiden. – Im folgenden beschreiben wir ein neues Verfahren, das ebenfalls auf der Überführung des organisch gebundenen Sauerstoffs in Wasser und dessen Äquilibrierung mit CO_2 beruht, das jedoch auf eine grössere Mannigfaltigkeit von Sauerstoffverbindungstypen anwendbar ist und im Halbmikromaßstab arbeitet.

o-Phenylendiamin reagiert bekanntlich mit Aldehyden, Ketonen, Carbonsäuren, Estern und Amidn unter Bildung von Azomethinen bzw. Benzimidazolen¹²⁾¹³⁾ und Wasser. Es war ferner zu erwarten, dass bei Anwesenheit von Säure, z. B. mit Phenylendiamin-hydrochlorid, Alkohole teils zu Elimination, teils zu Substitution¹⁴⁾ veranlasst werden, wobei wiederum Wasser entsteht. Daher wurde untersucht, ob sich o-Phenylendiamin-monohydrochlorid¹⁵⁾ zur Isotopenanalyse heranziehen lässt; dies hat sich voll bestätigt.

Zur Analyse wird die sauerstoffhaltige Substanz in einer Menge, die ca. 0,1–0,2 mAtomen Sauerstoff entspricht, mit überschüssigem o-Phenylendiamin-monohydrochlorid erhitzt. Die Äquilibrierung des gebildeten H_2O mit inaktivem CO_2 kann in der gleichen Operation erfolgen; deshalb wird das Gemisch von Substanz und Phenylendiamin-HCl zusammen mit einer genau gemessenen Menge CO_2 in einem Röhrchen eingeschmolzen und 3 Std. bei 300° gehalten. – Vorversuche mit Differentialthermoanalyse¹⁶⁾ hatten gezeigt, dass Phenylendiamin mit Ketonen bei 190° reagiert, mit Säurederivaten bei 220 – 250° . Die erheblich höhere Temperatur von 300° wurde gewählt, um die Reaktionsmasse auch nach Bildung von Benzimidazol-HCl und ähnlichen Verbindungen (Smp. $>$ ca. 280°) homogen flüssig zu halten. – Da der Isotopenaustausch zwischen H_2O und CO_2 rasch vor sich geht¹⁰⁾¹⁷⁾, kann das CO_2 nach Ende der Heizperiode sogleich zur Massenspektrographie umgefüllt werden; ursprünglich¹⁾ wurden die Röhrchen vor dem Öffnen über Nacht liegengelassen.

Ein Präparat von Benzoesäure- ^{18}O wurde einerseits wiederholt mit o-Phenylendiamin-HCl analysiert, andererseits ins Silbersalz verwandelt und dieses wiederholt thermisch decarboxyliert. Tab. 1 zeigt, dass die Mittelwerte aus beiden Reihen nur um ca. 1% voneinander abweichen. Die Streuung der Phenylendiaminwerte ist

⁹⁾ M. COHN & H. C. UREY, J. Amer. chem. Soc. **60**, 679 (1938).

¹⁰⁾ M. ANBAR, I. DOSTROWSKI, F. KLEIN & D. SAMUEL, J. chem. Soc. **1955**, 155.

¹¹⁾ K. B. WIBERG, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3961 (1953).

¹²⁾ J. B. WRIGHT, Chem. Reviews **48**, 397 (1951).

¹³⁾ K. HOFMANN, Imidazole and its Derivatives, New York 1953.

¹⁴⁾ G. KRÄMER & M. GRODZKY, Ber. deutsch. chem. Ges. **13**, 1005 (1880); H. REINHARD & W. STAEDL, *ibid.* **16**, 29 (1883); S. v. NIEMENTOWSKI, *ibid.* **30**, 3062 (1897).

¹⁵⁾ Um bei der Aufarbeitung HCl zurückzuhalten, ist ein Basenüberschuss erwünscht, so dass das Di-hydrochlorid weniger in Frage kommt.

¹⁶⁾ Apparatur von LINSEIS Prüfgerätebau, Selb (Bayern). Wir danken Herrn Dr. M. LINSEIS für die Ausführung der Messungen und Hilfe bei der Interpretation der Resultate.

¹⁷⁾ I. DOSTROWSKI & F. S. KLEIN, Analyt. Chemistry **24**, 414 (1952).

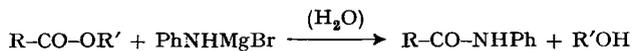
grösser als die der Decarboxylierungsergebnisse, was teilweise damit zusammenhängt, dass in dieser Versuchsserie gleichzeitig der Phenylendiaminüberschuss variiert wurde; der mittlere Fehler aus 5 Werten macht jedoch auch hier weniger als 1% des Messwertes aus.

Tabelle 1. ^{18}O -Gehalt¹⁸⁾ von Benzoesäure- ^{18}O , durch Pyrolyse des Ag-Salzes und nach der Phenylendiamin-Methode bestimmt

	Atom% ^{18}O
Ph-COOAg (Pyrolyse bei 400°)	1,0446
	1,0456
	1,0418
	1,0449
	1,0406 Mittel: 1,043 ± 0,002
Ph-COOH (o-Phenylendiamin-HCl 3 Std. bei 300°)	1,0225 ^{a)}
	1,0282 ^{a)}
	1,0336 ^{a)}
	1,0425 ^{a)}
	1,0376 ^{a)}
	1,0570 ^{b)}
	1,0290 ^{b)} Mittel: 1,036 ± 0,004
^{a)} Nach Heizung über Nacht bei Zimmertemperatur gelagert.	
^{b)} Nach Heizung alsbald geöffnet.	

Zur Prüfung der Methode wurde eine Reihe von Verbindungen mit übereinstimmendem ^{18}O -Gehalt hergestellt: markierte p-Chlorbenzoesäure (I) wurde über das Chlorid bereitet; die Markierung von I wurde mit Phenylendiamin-HCl bestimmt und durch thermische Decarboxylierung des Ag-Salzes (II) kontrolliert; wegen der Säure-dissoziation ist die Markierung in I auf Carbonyl- und Hydroxylsauerstoff gleichmässig verteilt. I wurde mit Diazomethan in den Methylester III verwandelt, in dem ebenfalls beide O-Atome signiert sind und der daher gleiche Markierung aufweisen sollte wie I. Ferner wurde I über das Chlorid einerseits in das Amid IV, andererseits mit *unmarkiertem* Methanol in den carbonyl-signierten Methylester V verwandelt; IV sollte gleiche Markierung¹⁸⁾ aufweisen wie I und III, der carbonyl-signierte Methylester V dagegen wegen des Eintritts eines unmarkierten O-Atoms nur die Hälfte. Tab. 2 zeigt, dass diese Erwartungen erfüllt sind.

Schliesslich wurden der doppelt markierte Ester III und der carbonyl-markierte Ester V mit Hilfe von Anilin-magnesiumbromid in Äther¹⁹⁾ bei Zimmertemperatur in p-Chlorbenzanilid VI verwandelt:



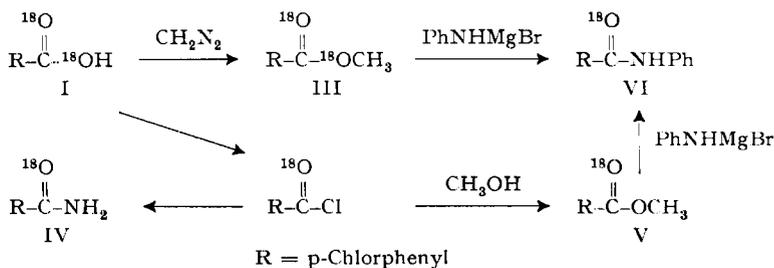
¹⁸⁾ Natürlicher Sauerstoff enthält ca. 0,21 Atom% ^{18}O ; unter «Markierung» oder «Tracergehalt» ist der Überschuss an ^{18}O über den natürlichen Gehalt zu verstehen; mit «Isotopengehalt» oder « ^{18}O -Gehalt» ist dagegen die Gesamtmenge an ^{18}O ohne Abzug des natürlichen Gehaltes gemeint.

¹⁹⁾ F. BODROUX, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. **138**, 1427 (1904); D. V. N. HARDY, J. chem. Soc. **1936**, 398.

Es ist zu erwarten, dass hierbei ausschliesslich der Carbonylsauerstoff des Esters in das Anilid übergeht. Da die Carbonylmarkierung von III und V mit der Markierung von I identisch ist, sollten die beiden Anilidpräparate gleiche Markierung wie I aufweisen: dies ist wirklich der Fall.

Tabelle 2. ^{18}O -Tracergehalt¹⁸⁾ von *p*-Chlorbenzoesäure und Derivaten

Substanz (R = <i>p</i> -Chlorphenyl)	Atom% ^{18}O -Überschuss ¹⁸⁾ (gef.)
R-C ¹⁸ O ¹⁸ OH (I)	0,496; 0,488
R-C ¹⁸ O ¹⁸ OAg (II)	0,513; 0,505 (therm. Decarboxylierung)
R-C ¹⁸ O ¹⁸ OCH ₃ (III)	0,499; 0,497
R-C ¹⁸ O-NH ₂ (IV)	0,506
R-C ¹⁸ O-OCH ₃ (V)	0,254; 0,249
R-C ¹⁸ O-NHC ₆ H ₅ (VI)	
a) aus III	0,501
b) aus V	0,503; 0,501



Aus dieser Übereinstimmung ergibt sich die Möglichkeit, in signierten Estern bei der ^{18}O -Analyse zwischen der Alkoxy- und der Carbonyl-Gruppe zu differenzieren: durch Phenylendiaminabbau des Esters erhält man den Mittelwert des Tracergehaltes von Alkoxy- und Carbonyl-Sauerstoff; Analyse des aus dem Ester erhaltenen Anilids ergibt den Tracergehalt der Carbonylgruppe; aus der Kombination beider Werte resultiert der Tracergehalt der Alkoxygruppe. Falls nötig, kann man zur Kontrolle auch den Alkohol aus der Reaktion des Esters mit Anilin-magnesiumbromid isolieren und analysieren²⁰⁾. – Eine Differenzierung zwischen den O-Atomen von Estern war früher⁵⁾ mit Hilfe der Reduktion mit LiAlH_4 geschehen, doch hat man dann zwei Alkohole zu trennen; ausserdem dürften bei unserer Methode die Anilide infolge geringerer Löslichkeit, grösserer Stabilität gegen Isotopenaustausch und besserer Kristallisationsfähigkeit überlegen sein.

Um zu ermitteln, auf welche Typen von organischen Sauerstoffverbindungen die Phenylendiaminmethode anwendbar ist, müsste man eine grössere Anzahl solcher Stoffe markieren und zur Kontrolle nach einem unabhängigen Verfahren analysieren. Da die Markierung häufig nicht einfach ist und da zudem eine unabhängige Kontrollmethode nicht zur Verfügung stand, wählten wir ein inverses Testverfahren: *unmarkierte* Substanzen wurden mit Phenylendiamin-HCl umgesetzt und das gebildete Wasser mit *markiertem* CO^{18}O von bekanntem ^{18}O -Gehalt äquilibriert. Aus der ge-

²⁰⁾ Unveröffentlichte Versuche, in Zusammenarbeit mit P. D. Dr. CH. TAMM.

messenen Abnahme des ^{18}O -Gehaltes im CO_2 kann auf die entstandene Wassermenge geschlossen werden. Um diesen Test möglichst empfindlich zu gestalten, wurde das Mengenverhältnis von Substanzsauerstoff zu CO_2 -Sauerstoff in der Gegend von 1 gewählt. Die CO_2 -Menge ist durch die Anforderungen des Massenspektrometers bei 1–2 ml festgelegt; daraus ergeben sich Substanzmengen von ca. 0,1 mAtom Sauerstoff, das sind je nach Molekulargewicht und Sauerstoffgehalt 10–50 mg Substanz, d. h. Semimikromengen. Für die signierten Verbindungen haben wir die gleichen Mengenverhältnisse gewählt; man könnte hier jedoch die Genauigkeit der Methode verbessern, wenn man die Einwage vergrößert. Die Resultate von Versuchen mit 50 unmarkierten Verbindungen sind in den Tab. 3 und 4 zusammengestellt; diese enthalten in Spalte 2 die Anzahl der reagierenden (und der Rechnung zugrunde gelegten) O-Atome. Aus dieser Zahl, der Einwage, der CO_2 -Menge sowie dem bekannten Isotopengehalt des CO_2 vor der Reaktion lässt sich nach einfacher Mischungsrechnung angeben, welcher Isotopengehalt²¹⁾ im CO_2 nach der Phenylendiaminreaktion zu erwarten ist (Spalte 3). Diese Zahlen sind mit den gefundenen Werten des ^{18}O -Gehaltes im CO_2 (Spalte 4) zu vergleichen; es besteht eine für normale Tracerarbeiten durchaus befriedigende Übereinstimmung²¹⁾; durch die für alle Tracerarbeiten selbstverständliche Mehrfachbestimmung wird die Genauigkeit erhöht (vgl. Tab. 1).

Um die Beurteilung der Resultate zu erleichtern, sind in Tab. 4 für einige Fälle, vor allem von polyfunktionellen Verbindungen, CO_2 -Werte für verschiedene O-Zahlen berechnet. Es zeigt sich, dass im allgemeinen eine klare Entscheidung zwischen verschiedenen O-Zahlen möglich ist. Nur bei Verbindungen wie Glucose oder Weinsäure, die zu mehr als 50 Gew.-% aus Sauerstoff bestehen, ist eine Unterscheidung von wasserfreier und hydratisierter Form nicht mehr eindeutig.

Tab. 3 und 4 zeigen, dass wie erwartet primäre (7, 9, 23, 34, 49), sekundäre (1, 2, 4, 5, 6, 7, 14, 34, 48, 49), tertiäre Alkohole (3, 21) und Enole (34, 38), Aldehyde (10, 46, 47, 49) und Ketone (11, 12, 13, 14, 15, 36), sowie Säuren (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 44, 48), Säureanhydride (31), Säureamide (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30), Ester (32, 33, 37, 42, 45) und Lactone (34, 35) allen Sauerstoff als Wasser abgeben. Dies gilt auch für Stoffe mit mehreren gleichen oder verschiedenen sauerstoffhaltigen Gruppen; es seien die biochemisch interessanten Verbindungen Glucose (49), Ascorbinsäure (34) und Glycylglycin (24) erwähnt. Einfache Phenol- (30, 43) und Phenoläther-Gruppen (44, 45) lieferten kein H_2O , wohl aber einige Brenzcatechinderivate wie Vanillin (46) und Piperonal (47): es ist bekannt, dass Brenzcatechin mit o-Phenylendiamin zu Phenazinderivaten²²⁾ reagiert; vermutlich werden die Phenoläthergruppen zuerst durch Phenylendiamin-hydrochlorid gespalten²³⁾. Schliesslich fanden wir, dass auch Ketale (9, 41), Epoxyde (36, 37), sowie gewisse Äther (8) reagieren. Nicht an Kohlenstoff gebundener Sauerstoff lässt sich auch erfassen, wie das Beispiel der Nitroverbindungen (39, 40, 41) zeigt; aus einem Tosylester (50) wird nur *ein* O-Atom abgespalten, möglicherweise das an Alkyl gebundene. Es ist denkbar, dass sich die Phenylendiaminmethode auch auf gewisse anorganische Verbindungen anwenden lassen.

²¹⁾ Die Zahlen in Spalte 3 und 4 enthalten noch Substanzeinwage usw.; daher sind die Werte von verschiedenen Analysen der gleichen Substanz *untereinander* nicht vergleichbar.

²²⁾ C. RIG, Ber. deutsch. chem. Ges. **19**, 2206 (1886).

²³⁾ Vgl. A. KLEMENC, Ber. deutsch. chem. Ges. **49**, 1371 (1916).

Tabelle 3. *Abbauversuche mit unmarkierten Testverbindungen*

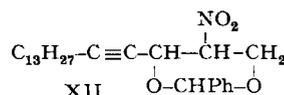
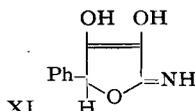
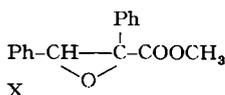
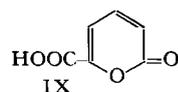
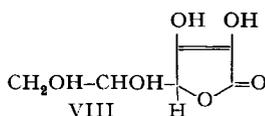
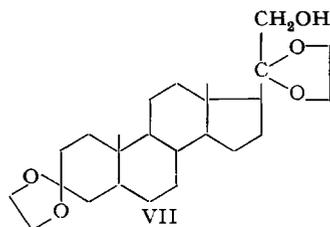
	1	2	3	4
	Verbindung	Zahl der abgebauten Sauerstoffatome	Atom% ¹⁸ O ber.	Atom% ¹⁸ O gef.
1	α -Phenyl-allylalkohol	1	0,770	0,754
2	Benzhydrol	1	1,033 0,430	1,024 0,415
3	Triphenylcarbinol	1	0,807	0,773
4	Cholesterol	1	0,948	0,945
5	Cholesten-(1)-ol-(3 α)	1	1,110	1,093
6	Cholesten-(1)-ol-(3 β)	1	0,986	1,019
7	Mannit	6	0,418	0,401
8	Dibenzyläther	1	0,744	0,723
9	Verbindung VII	5	0,734	0,721
10	2,6-Dichlorbenzaldehyd	1	0,880	0,847
11	Cyclohexanon	1	0,486	0,467
12	Benzophenon	1	0,460	0,458
13	Cholesten-(4)-on-(3)	1	1,171	1,187
14	Benzoin	2	0,703	0,698
15	Benzil	2	0,677	0,669
16	Benzoessäure	2	0,727	0,731
17	p-Chlorbenzoessäure	2	0,728	0,737
18	α -Naphtoesäure	2	0,821	0,822
19	Zimtsäure	2	0,781	0,794
20	Adipinsäure	4	0,688	0,668
21	Benzilsäure	3	0,811	0,829
22	Phenylalanin	2	0,562	0,543
23	Serin	3	0,599	0,581
24	Glycylglycin	3	0,541	0,522
25	Diglycylglycin	4	0,509	0,493
26	Glycinanhydrid	2	0,489	0,472
27	Acetanilid	1	0,825	0,804
28	Benzamid	1	0,893 0,392	0,873 0,392
29	Phtalimid ²⁴⁾	2	0,643 0,813	0,603 0,761
30	N-Salicoyl-glycin ²⁵⁾	3	0,531	0,517
31	Bernsteinsäureanhydrid	3	0,581	0,578
32	α -Naphtoesäure-methylester	2	1,004 0,504	1,007 0,510
33	Oxalsäure-dimethylester	4	0,412	0,415
34	Ascorbinsäure (VIII)	6	0,422	0,415
35	Verbindung IX	4	0,569	0,554
36	1,2- α -Oxidocholestanon-(3)	2	0,905	0,926
37	α,β -Diphenylglycidsäure-methylester (X)	3	0,624	0,644
38	Phenyl-hydroxytetronimid (XI)	3	0,729	0,741
39	o-Dinitrobenzol	4	0,434	0,426
40	3-Nitrophtalsäure	6	0,417	0,400
41	Verbindung XII	4	0,682	0,644

²⁴⁾ Substanz enthielt Phtalanhydrid.²⁵⁾ Versuche in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. BRENNER und J. ROSENTHALER.

Tabelle 4

Abbauversuche mit unmarkierten Verbindungen: Vergleich zwischen verschiedenen O-Zahlen

	1	2	3	4
	Verbindung	Zahl der abgebauten O-Atome	Atom% ¹⁸ O ber.	Atom% ¹⁸ O gef.
42	p-Chlorbenzoesäure-methylester . . .	0	1,362	0,699
		1	0,911	
		2	0,713	
43	p-Cresol	0	1,329	1,366
		1	0,954	
44	Anissäure	2	0,659	0,636
		3	0,727	
45	Anissäure-methylester	1	1,118	0,951
		2	0,949	
		3	0,848	
46	Vanillin	1	0,955	0,645
		2	0,855	
		3	0,635	
47	Piperonal	2	1,090	0,704
		3	0,701	
48	Weinsäure	5	0,535	0,480
		6	0,494	
		7	0,486	
49	Glucose	5	0,496	0,423
		6	0,438	
		7	0,428	
50	Cholestanyl-(3)-tosylat	0	1,797	1,531
		1	1,503	
		2	1,301	



Es ist zu erwarten, dass verschiedenartige sauerstoffhaltige Gruppen verschieden rasch mit Phenylendiamin reagieren. Dies wurde durch die bereits erwähnte¹⁶⁾ Differentialthermoanalyse bestätigt: Aus Säurederivaten werden Benzimidazole bei 220–250° gebildet, während Benzophenon zur Reaktion mit Phenylendiamin nur 190° erfordert; die Chinoxalinbildung aus 1,2-Diketonen geht bei ca. 150° vor sich. Diese Unterschiede können zur Differenzierung zwischen verschiedenartigen funktionellen Gruppen ausgenutzt werden.

Zum Isotopeneffekt

Seit UREY's Untersuchungen⁹⁾¹⁰⁾¹⁷⁾²⁶⁾ ist bekannt, dass sich ¹⁸O zwischen Wasser und CO₂ nicht gleich verteilt, sondern dass das schwere Isotop im CO₂ angereichert wird:

$$\frac{[\text{H}_2\text{O}] [\text{CO}^{18}\text{O}]}{[\text{H}_2^{18}\text{O}] [\text{COO}]} = K \pm 1,00$$

Bei 20° ist K = 1,038, bei ca. 300° nur noch 1,01. Da bei unserem Analysenverfahren H₂O mit CO₂ äquilibriert wird, wäre demnach zu erwarten, dass das CO₂ nach der Reaktion einen etwas zu hohen ¹⁸O-Gehalt aufweist und der ¹⁸O-Gehalt der markierten Verbindungen also in Wahrheit niedriger liegt; in früher beschriebenen Verfahren zur ¹⁸O-Bestimmung über Wasserbildung¹⁰⁾ wurde dem durch Berücksichtigung von K Rechnung getragen. Wir haben jedoch in allen Formeln und Berechnungen dieser Arbeit hiervon abgesehen; einerseits, weil bei normalen Tracerarbeiten eine Differenz von < 4% kaum eine Rolle spielt, vor allem jedoch, weil unser Versuchsmaterial, soweit es hierzu geeignet ist, diesen Effekt nicht aufweist.

Dies zeigt sich z. B. bei Betrachtung der Werte von Tab. 3: wollte man die Isotopenanreicherung im CO₂ berücksichtigen, so müsste man die für ¹⁸O berechneten Werte (Spalte 3) sämtlich um ca. 3–4% erhöhen; d. h. wenn ein realer Isotopeneffekt vorläge, müssten die von uns ohne Isotopeneffekt berechneten Werte (Spalte 3) durchschnittlich 3–4% niedriger liegen als die gefundenen Werte (Spalte 4). Bei der relativ grossen Zahl von Messungen sollte diese Differenz trotz individueller Schwankungen erkennbar sein. Vergleicht man die Mittelwerte der Spalten 3 und 4 in Tab. 3 und 4, so zeigt sich jedoch, dass die Zahlen von Spalte 3 im Mittel nicht niedriger, sondern sogar ein wenig *höher* liegen als die von Spalte 4. – Allerdings lässt sich einwenden, dass die Resultate von Tab. 3 und 4 noch mit einer besonderen Unsicherheit behaftet sind: bei den Berechnungen ist auch der ¹⁸O-Gehalt der unmarkierten Substanzen zu berücksichtigen. Dieser wurde willkürlich gleich dem «natürlichen» Gehalt von CO₂ gesetzt – im Bereich der Isotopeneffekte ist dies jedoch nicht mehr gestattet, da es einen «Normalgehalt» überhaupt nicht gibt und je nach Herstellung und Vorgeschichte unmarkierte Sauerstoffverbindungen unterschiedliche ¹⁸O-Gehalte aufweisen. Indessen wäre es überraschend, wenn dieser Fehler immer in der gleichen Richtung wirken und den H₂O/CO₂-Isotopeneffekt gerade kompensieren würde.

In analoger Weise lassen sich die Resultate von Tab. 1 interpretieren: wenn Benzoesäure und ihr Ag-Salz identischen ¹⁸O-Gehalt besitzen, dann sollte die thermische Decarboxylierung des Ag-Salzes, die ohne Austausch erfolgt, den wahren ¹⁸O-Wert der Benzoesäure liefern; das CO₂ aus der Phenylendiaminmethode sollte infolge Anreicherung in der Gasphase wiederum einen höheren ¹⁸O-Gehalt aufweisen. Tab. 1 zeigt, dass dies nicht der Fall ist. Wiederholungen (vgl. exper. Teil sowie Tab. 2) bestätigten diesen Befund.

Wir haben keine schlüssige Erklärung für das Ausbleiben des Isotopeneffektes²⁷⁾; möglicherweise wird er durch einen verborgenen systematischen Fehler kompensiert.

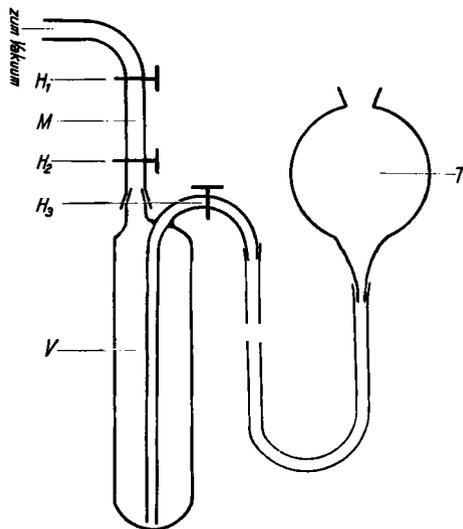
²⁶⁾ H. C. UREY & L. J. GREIFF, J. Amer. chem. Soc. **57**, 321 (1935); L. A. WEBSTER, M. H. WAHL & H. C. UREY, J. chem. Physics **3**, 129 (1935); H. C. UREY, J. chem. Soc. **1947**, 562.

²⁷⁾ Weitere Versuche hierzu siehe Diss. H. MOLL.

Wir danken der *Kommission für Atomwissenschaft des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung dieser Arbeit. H_2^{18}O wurde uns in grosszügiger Weise von den Herren Dr. C. A. BUNTON, London, und Prof. Dr. W. KUHN und Dr. M. THÜRKAUF, Basel, zur Verfügung gestellt. Herrn Dr. BUNTON haben wir ausserdem für wertvollen Rat und Hilfe zu danken.

Experimenteller Teil

Apparatur. Die Apparatur besteht im wesentlichen aus einem Hochvakuumrechen mit 4 Zapfstellen und Hg-Manometer an einer Quecksilberdiffusionspumpe. Der wichtigste Teil ist die CO_2 -Dosieranlage (Fig.). Diese besteht aus einem durch zwei Hähne begrenzten Rohrstück M, dessen Volumen (ca. 2 ml) durch Auswägen mit Quecksilber auf 0,001 ml genau ermittelt werden kann, so dass bei Berücksichtigung von Barometerstand und Temperatur die in M enthaltene CO_2 -Menge genau bekannt ist. Daran schliesst sich das Vorratsgefäss V von ca. 100 ml Volumen an, dessen CO_2 -Inhalt mittels des Niveaugefässes T auf Atmosphärendruck gebracht werden kann; als Sperrflüssigkeit dient Quecksilber.



CO₂-Dosiervorrichtung

Soweit es sich um unmarkiertes CO_2 handelt, wird zur *Füllung des Vorratsgefässes* einfach die ganze Apparatur mit CO_2 gefüllt. Handelte es sich dagegen um CO^{18}O (das seinerseits durch Schütteln von H_2^{18}O mit CO_2 bei Zimmertemperatur erhalten wird⁹⁾), so wird folgendermassen verfahren: das Vorratsgefäss V wird bei geschlossenem Hahn H-3 leergepumpt und dann mit flüssigem Stickstoff auf -180° gekühlt²⁸⁾. Ein Kolben mit ca. 100 ml CO^{18}O wird auf -80° gekühlt; das CO_2 wird darauf zunächst zwecks Reinigung und Trocknung mehrmals umsublimiert und schliesslich in das Vorratsgefäss kondensiert.

Analysenverfahren. An einem ca. 15 cm langen Pyrexrohrstück von 5 mm innerem Durchmesser und 1 mm Wandstärke wird eine ca. 3 cm lange Spitze ausgezogen und abgeschmolzen; da diese Spitze später abgebrochen werden soll, darf das Glas hier nicht zu dickwandig werden. Das so hergerichtete Glasstück wird im Hochvakuum mit der Flamme sorgfältig getrocknet. Nach Erkalten werden zunächst 50–100 mg o-Phenylendiamin-monohydrochlorid eingewogen, darüber dann ca. 10–30 mg Substanz (je nach Molekulargewicht und O-Gehalt); die Stoffe werden mit Hilfe eines Ampullentrichters eingebracht. Anschliessend wird als Vorbereitung für das Zuschmelzen das Glas in der Nähe des offenen Rohrendes verengt und verdickt. Das so vorbereitete Analysenröhrchen wird mittels eines Latexschlauches an den Hochvakuumrechen an-

²⁸⁾ Daher muss V aus dickwandigem Pyrexglas möglichst spannungsfrei geblasen sein.

geschlossen und evakuiert, dann auf -180° gekühlt (bei Substanzen, deren Dampfdruck bei Zimmertemperatur grösser als 10^{-4} Torr ist, muss zuerst gekühlt, dann evakuiert werden). Nun wird CO_2 eingemessen, indem die Meßstrecke zuerst evakuiert, dann vom Vorratsgefäß her unter Barometerdruck mit CO_2 gefüllt wird. Schliesslich wird das abgemessene CO_2 in das Analysenröhrchen kondensiert. Sobald die Kondensation vollständig ist, was mit Hilfe des Manometers kontrolliert werden kann, wird das Analysenröhrchen, das am untern Ende immer noch auf -180° gekühlt ist, zugeschmolzen; der neue Verschluss soll den Boden des Röhrchens bilden und daher möglichst rund sein. Das Röhrchen von nunmehr 10–13 cm Länge wird aufrecht mit der Spitze nach oben in einem Ofen bei $300 \pm 10^\circ$ geheizt.

Nach 3 Std. wird das Röhrchen aus dem Ofen genommen und nach Erkalten geöffnet²⁹⁾. Hierzu wird die dünnwandige Spitze mit einem Latexschlauchstück am Hochvakuumrechen befestigt, das untere Ende des Röhrchens auf -80° gekühlt und die Spitze abgebrochen; das CO_2 wird in ein Gefäß sublimiert, das mittels Schlift an das Massenspektrometer angeschlossen werden kann.

Vom Massenspektrometer wird das Verhältnis r der Massen 46 zu $44 + 45$ geliefert. Daraus erhält man nach

$$\%^{18}\text{O} = r \cdot 100/(r+2) = A_{\text{gef.}} \quad (1)$$

den gefundenen ^{18}O -Gehalt in der CO_2 -Probe, angegeben in At.-%.

Aus dem so ermittelten ^{18}O -Gehalt der CO_2 -Probe, dem ebenso feststellbaren ^{18}O -Gehalt des verwendeten unmarkierten Ausgangs- CO_2 und den Mengen von CO_2 -Sauerstoff und Substratsauerstoff kann man den ^{18}O -Gehalt in der markierten Substanz berechnen:

$$A_s = [A_{\text{gef.}} \cdot (m_c + m_s) - A_c \cdot m_c]/m_s \quad (2)$$

Hierin bedeuten:

- $A_{\text{gef.}}$ = At.-% ^{18}O im Reaktions- CO_2 nach der Verbrennung (s. o).
 A_c = At.-% ^{18}O im (unmarkierten) Ausgangs- CO_2 , ermittelt durch direkte Massenanalysc.
 A_s = At.-% ^{18}O im Substrat-Sauerstoff (bei Verbindungen mit mehreren O-Atomen in der Molekel ist A_s der Mittelwert der erfassten ^{18}O -Atome).
 m_s = mAtome Sauerstoff in der Substratprobe
 = (Einwage in mg) · (Zahl der O-Atome pro Substratmolekel)/(Mol.-Gew.)
 Falls nicht alle O-Atome einer Molekel reagieren, sind nur die reagierenden einzusetzen.
 m_c = mAtome Sauerstoff aus dem CO_2
 = $\frac{2 \cdot (\text{Volumen der Meßstrecke } V \text{ in ml}) \cdot (\text{Barometerstand in Torr})}{760 \cdot 0,082 \cdot T_{\text{abs.}}}$

Bei Vergleichen zwischen Verbindungen mit mehreren O-Atomen, von denen nicht alle signiert sind, ist es praktischer, nicht den *Gesamt*- ^{18}O -Gehalt, sondern nur den ^{18}O -Überschuss über natürliches ^{18}O -Vorkommen, d. h. die eigentliche Markierung zahlenmässig anzugeben. Dies ist die Grösse $A_s - A_c$ (wobei A_c jeweils am gleichen Tage gemessen werden soll wie A_s).

Testversuche mit unmarkierten Substanzen und markiertem CO_2 . Hier wurde der gefundene ^{18}O -Gehalt im CO_2 ($A_{\text{gef.}}$) verglichen mit demjenigen, der sich nach der Mischungsregel berechnet ($A_{\text{ber.}}$):

$$A_{\text{ber.}} = [A_s \cdot m_s + A_c \cdot m_c]/(m_s + m_c) \quad (3)$$

Hierin bedeuten:

- A_s = At.-% ^{18}O im (unmarkierten) Substrat; dies wurde gleichgesetzt dem ^{18}O -Wert des Standard- CO_2 : (im Mittel) 0,2097 At.-% ^{18}O .
 A_c = At.-% ^{18}O im (markierten) CO_2 , ermittelt durch direkte Massenanalyse.
 m_c und m_s wie bei Formel 2.

Es wurden soweit möglich käufliche Präparate verwendet; die übrigen Substanzen wurden nach üblichen Verfahren bereitet. Alle Proben wurden durch Kristallisieren, Destillieren oder Sublimieren gereinigt und über P_2O_5 scharf getrocknet, wenn möglich bei 10^{-4} Torr (Weinsäure war lediglich lufttrocken).

²⁹⁾ Ursprünglich¹⁾ wurde über Nacht bei 20° liegengelassen, um kompletten ^{18}O -Austausch zwischen CO_2 und H_2O zu garantieren; Kontrollversuche (Tab. 1) zeigten jedoch, dass dies nicht nötig ist: mit Lagerung Mittelwert $1,033 \pm 0,008$ At.-%, ohne Lagerung $1,043$ At.-% ^{18}O .

Signierte Verbindungen

Benzoessäure-¹⁸O. 3,35 g Benzoylchlorid (24,5 mMol) wurden in 100 ml H₂¹⁸O (ca. 1 At.-% ¹⁸O) bei Zimmertemperatur unter gutem Rühren eingetropft und anschliessend 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Kühlen auf 0° wurde filtriert; 2,9 g (96,5% d. Th.), ¹⁸O-Gehalt: 1,036 At.-% (s. Tab. I).

Ag-Benzoat-¹⁸O. 1,72 g Benzoessäure-¹⁸O (ca. 14 mMol) wurden in etwa 10 ml gewöhnlichem Wasser suspendiert; nach Zusatz von wenigen Tropfen konz. NH₃ wurde mit 1-n. NaOH gegen Phenolphthalein titriert und nach beendeter Neutralisation mit 1 Tropfen 2-n. HNO₃ versetzt. Eine äquivalente Menge AgNO₃ (2,38 g), in 10 ml gewöhnlichem Wasser und 1 Tropfen konz. NH₃ gelöst, wurde unter kräftigem Rühren rasch zugesetzt. Die rein weisse Fällung von Ag-Benzoat-¹⁸O wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Dunkeln im Vakuum 12 Std. über H₂SO₄ getrocknet; 2,65 g (84%), ¹⁸O-Gehalt: 1,043 At.-% (s. Tab. I).

Zur Kontrolle eines etwaigen Isotopenverlustes wurde dies Präparat von Ag-Benzoat-¹⁸O in Benzoessäure-¹⁸O zurückverwandelt: dazu wurde eine Probe in 50 ml Äther suspendiert und mit 50 ml 2-n. HNO₃ einige Min. kräftig durchgeschüttelt. Die Phasen wurden getrennt, der Äther mit gewöhnlichem H₂O neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und abdestilliert; der Rückstand wurde im Hochvakuum sublimiert; ¹⁸O-Gehalt: 1,033 At.-%. – Dieses Benzoessäurepräparat wurde nochmals ins Ag-Salz verwandelt; ¹⁸O-Gehalt: 1,020 At.-%.

Decarboxylierung der Silbersalze. Je ca. 0,05–0,1 mMol Ag-Salz wurden in gut getrocknete, einseitig abgeschmolzene Pyrexrohre von ca. 20 cm Länge und 5 mm innerem Durchmesser eingewogen und im Hochvakuum eingeschlossen. Zur Decarboxylierung wurde das Ag-Salz auf dem Boden des Rohres während etwa einer Min. auf schwache Rotglut geheizt (ca. 400°). Nach Erkalten wurde auf –80° abgekühlt und das CO₂ auf die beschriebene Art umsublimiert. Alle bei –180° nicht kondensierbaren Gase wurden abgepumpt. Die entstandenen CO₂-Mengen von 1–2 ml entsprachen durchwegs nahezu quantitativen Ausbeuten.

p-Chlorbenzoessäure-¹⁸O (I). 8,7 g p-Chlorbenzoessäure (55,6 mMol) wurden mit ca. 10 ml SOCl₂ 1½ Std. unter Feuchtigkeitsausschluss unter Rückfluss gekocht; überschüssiges SOCl₂ wurde im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in ca. 100 ml H₂¹⁸O (ca. 1 At.-% ¹⁸O-Überschuss) von 100° eingetropft und 16 Std. zur Hydrolyse unter Rückfluss gekocht. Nach Kühlen auf 0° wurde abgesaugt. Zur Homogenisierung wurde die Säure in Äther gelöst, der Äther verdampft und der Rückstand im Hochvakuum sublimiert; Ausbeute: ca. 8 g I von ca. 0,5 At.-% ¹⁸O-Überschuss.

Ag-Salz von I (II). 0,897 g I wurden wie oben für Ag-Benzoat beschrieben in 1,15 g (76%) rein weisses Ag-Salz II verwandelt.

p-Chlorbenzoessäure-methylester-[bis-¹⁸O] (III). 3 g I (19,2 mMol) wurden in 25 ml Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung (aus 5 g Nitrosomethylharnstoff) versetzt. Die Lösung wurde zweimal mit 2-n. Sodalösung extrahiert, mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Der Äther wurde verdampft und der Ester im Vakuum destilliert; 2,33 g (72%) vom Smp. 40–42°.

p-Chlorbenzoessäure-methylester-[carbonyl-¹⁸O] (V). 3 g I (19,2 mMol) wurden in ca. 5 ml SOCl₂ (ca. 70 mMol) bis zur vollständigen Lösung unter Feuchtigkeitsausschluss unter Rückfluss gekocht (ca. 1½ Std.). Überschüssiges SOCl₂ wurde im Vakuum abgedampft. Die Hauptmenge (s. u.) des Rückstandes wurde mit 25 ml absolutem Methanol unter Feuchtigkeitsausschluss 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Das Methanol wurde hierauf im Vakuum verdampft, der ölige Rückstand in ca. 100 ml Äther aufgenommen und mehrmals mit 2-n. Sodalösung extrahiert. Nach Neutralwaschen mit Wasser und Trocknen über Na₂SO₄ wurde der Äther verdampft und der Rückstand im Vakuum destilliert. Ausbeute: ca. 2 g (70%) vom Smp. 40–42°.

p-Chlorbenzamid-¹⁸O (IV). Vom oben hergestellten p-Chlorbenzoylchlorid-¹⁸O wurden ca. 200 mg in 10 ml absolutem Benzol gelöst und unter Durchleiten von trockenem Ammoniak 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Erkalten wurde mehrmals mit Wasser destigiert und anschliessend das in kaltem Benzol und in Wasser schwer lösliche p-Chlorbenzamid abfiltriert und getrocknet. Smp. 180–181°.

Herstellung von Aniliden aus Estern¹⁹⁾. Durch Umsetzung von Äthylbromid mit Magnesium in abs. Äther wurde ein Vorrat an Äthylmagnesiumbromid-Lösung hergestellt, die unter Stickstoff in einem Vorratsgefäss mit angeschlommener Bürette aufbewahrt wurde.

Ca. 10 mMol Anilin wurden in einem trockenen K lbbchen vorsichtig mit etwa 5–7 mMol Äthylmagnesiumbromid aus dem Vorratsgefäss versetzt. Nach beendeter  thanentwicklung wurde eine Esterprobe von ca. 150–200 mg (1–1,2 mMol), in 15–20 ml absolutem Äther gelöst, rasch zugesetzt und das Gemisch unter Feuchtigkeitsausschluss etwa 10 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Erkalten wurde mit 50 ml 2-n. HCl zersetzt, der Äther im Vakuum verdampft, vom kristallinen Niederschlag abgesaugt und mit ca. 0,5-n. HCl und viel Wasser ausgewaschen. Die Ausbeuten an Anilid-¹⁸O waren durchwegs praktisch quantitativ; die so gewonnenen Anilide waren bereits rein: z. B. Smp. des p-Chlorbenzanilids 194–195° (Lit. 194°); die Anilide wurden nach Trocknung direkt zur Isotopenanalyse verwendet.

Anhang: Zersetzungsversuche mit HgCl₂. RITTENBERG & PONTICORVO⁸⁾ oxydierten O-haltige organische Verbindungen mit HgCl₂ bei 350–530° zu CO₂. Wir versuchten diese Methode auf eine Reihe organischer Verbindungen anzuwenden und fanden, dass sehr viel HCl gebildet wird, so dass die empfohlene Reinigung durch Kondensation über Chinolin bei –180° wiederholt wurde, bis sich manometrisch keine Druckveränderung mehr ergab. Die hierauf verbleibende CO₂-Menge war häufig nur gering; in Tab. 5 sind für eine Reihe von Verbindungen die manometrisch ermittelten, angenäherten CO₂-Ausbeuten in % angegeben. Als Konkurrenzreaktion kommt u. a. H₂O-Elimination in Betracht: Olefin + H₂O lieferten unter den Versuchsbedingungen kein CO₂.

Tabelle 5. CO₂-Ausbeuten bei der Zersetzung organischer Substanzen mit HgCl₂
(soweit nicht anders angegeben, 2 Std. bei 350°)

Substanz	% CO ₂	Substanz	% CO ₂
Cyclohexanol	0–4	Indanon-(1)	25
�-Phenylallylalkohol	12	Indandion-(1,2)	18
Zimtalkohol	10	Cholesten-(4)-on-(3) (2 $\frac{1}{2}$ Std. bei 480°)	10–30
Cholesten-(1)-ol-(3)	0	Glucose	28
Cholesterol	0–2	Benzoessäure	80
Chloralhydrat	15	Benzoessäure-�thylester	30
Benzaldehyd	25	Ascorbinsäure	30
Cyclopentanon	2	Diphenyl-cyclopentadien + H ₂ O	0
Benzophenon	30		

Die Massenanalysen wurden von Frau *H. Menass * und Herrn *D. Hauenstein* unter der Leitung von Herrn Dr. *M. Thürkauf* mit einem Massenspektrometer *Consolidated-Nier 21-201* der Physikalisch-chemischen Anstalt, Basel, ausgeführt.

SUMMARY

A procedure involving o-phenylenediamine monohydrochloride as a reagent is recommended for oxygen isotope analysis. In 3 hours at 300° this reagent converts the oxygen of a variety of organic compounds quantitatively to water, which can be equilibrated with isotopically normal CO₂ suitable for mass analysis. Compounds to which the method is applicable include alcohols, ethers, epoxides, aldehydes, ketones, acids, esters, lactones, amides, peptides and nitro compounds. The method is not applicable to simple phenols and phenol ethers.

Carbonyl and alkoxyl oxygen-labelled carboxylic esters may be differentiated by reaction with aniline magnesium bromide prior to analysis, since anilide formation occurs without affecting the tracer content of the carbonyl group.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel