



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Chemie 4: Angewandte physikalische Chemie

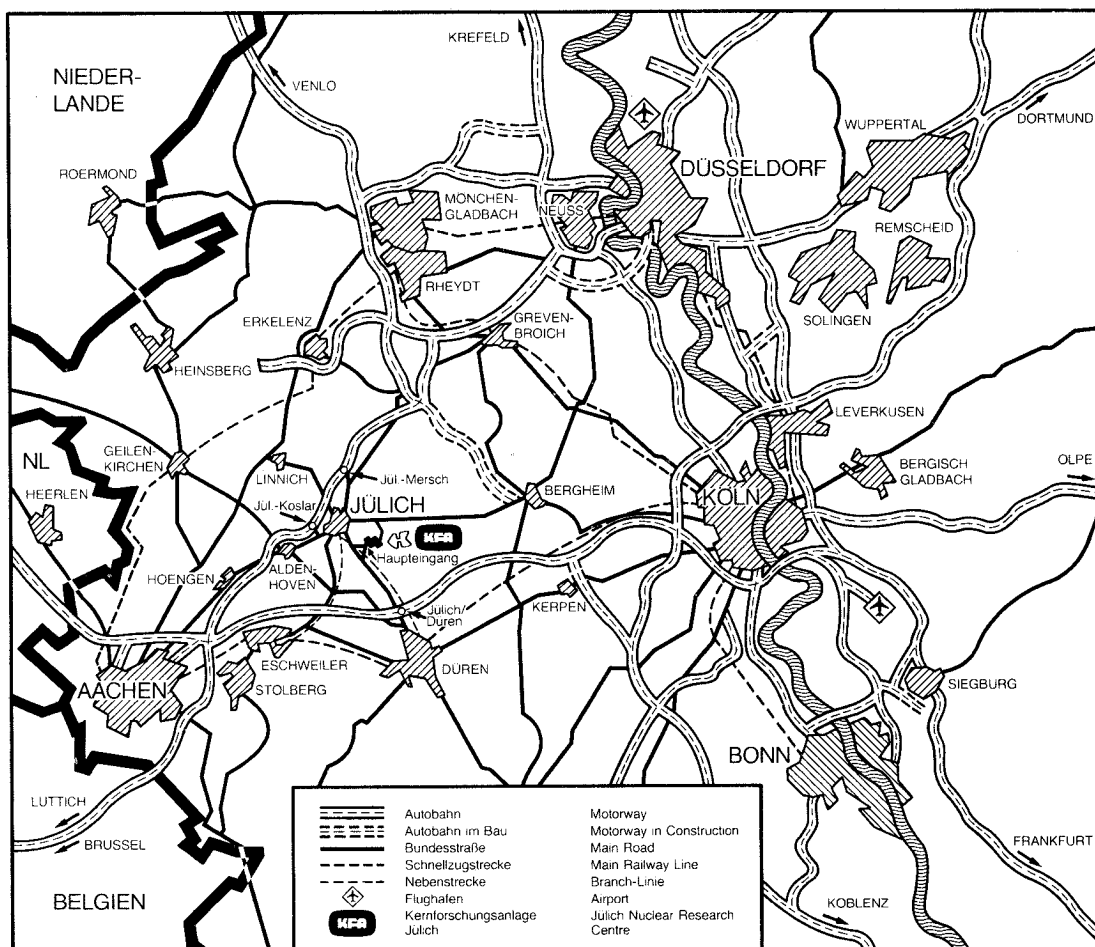
Über den Rückstand biologischer Materialien nach Druckaufschluß mit Salpetersäure

**– Identifizierung der Reaktionsprodukte und
deren Einfluß auf die inversvoltammetrische
Elementbestimmung –**

von

Michael Würfels

Jül-2212
Juli 1988
ISSN 0366-0885



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2212
Institut für Chemie 4: Angewandte physikalische Chemie Jül-2212

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Über den Rückstand biologischer Materialien nach Druckaufschluß mit Salpetersäure

**– Identifizierung der Reaktionsprodukte und
deren Einfluß auf die inversvoltammetrische
Elementbestimmung –**

von

Michael Würfels



Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe für Mikro- und Spurenanalyse der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum und dem Institut für Angewandte Physikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich in der Zeit von März 1985 bis März 1988 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Jackwerth danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für den Gedankenaustausch bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Stoepler und Herrn Dr. H.W. Dürbeck.

Für weitere Anregungen und Diskussionen möchte ich mich bei den Herren G. Wolters, H.D. Narres und Dr. P. Gardiner bedanken. Herrn G. Wolters danke ich zusätzlich für seinen Einsatz bei technischen Fragen des Druckaufschlusses und für die Bereitstellung von Druckaufschlußgeräten.

Für durchgeführte Analysen danke ich Frau B. Telin, Herrn E. Pascher, den Mitarbeitern der Zentralabteilung für chemische Analysen der Kernforschungsanlage Jülich und besonders Herrn Dr. W. Dietrich und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kernresonanzspektroskopie am Lehrstuhl für analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum.

Schließlich möchte ich Herrn Prof. Dr. C.J. Soeder für die Bereitstellung des Coulomaten und Frau A. Lorke für ihre Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts danken.

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ausgangsposition und Zielsetzung	4
3. Theoretische Aspekte	12
3.1 Aufschlußmethoden für biologisches Material	12
3.1.1 Naßaufschluß	12
3.1.1.1 Naßaufschluß in offenen Systemen	12
3.1.1.2 Naßaufschluß in geschlossenen Systemen	13
3.1.2 Aufschluß durch Verbrennung	16
3.2 Coulometrie	17
3.3 Inverse Voltammetrie	19
4. Experimenteller Teil	25
4.1 Auswahl und Charakterisierung der Probenmaterialien	25
4.2 Aufschlußbedingungen	26
4.2.1 Druckaufschluß in PTFE-Gefäßen bis zu 200°C	26
4.2.1.1 Beschreibung der verwendeten Druckaufschlußapparatur	27
4.2.1.2 Hinweise zur Durchführung der Druckaufschlüsse	29
4.2.2 Hinweise zur Nachbehandlung organischer Rückstände mit Perchlorsäure	30
4.2.3 Druckaufschluß bei Temperaturen bis zu 300°C	32
4.2.3.1 Apparatur	32
4.2.3.2 Aufschluß	35
4.3 Behandlung der aufgeschlossenen Proben	36
4.3.1 Kohlenstoffbestimmung	36
4.3.1.1 Kohlenstoffbestimmung nach Abrauchen der Säure	36
4.3.1.2 Bestimmung von organisch gebundenem Kohlenstoff in sauren Aufschlußlösungen	37

	Seite
4.3.2	Voltammetrie 39
4.4	Coulometrische Kohlenstoffbestimmung 40
4.5	Voltammetrische Meßverfahren 47
4.6	Untersuchungen zur Kohlenstoffbilanz 48
4.6.1	Druckaufschluß bei Temperaturen bis zu 200°C 48
4.6.2	Nachbehandlung von Druckaufschluß- Rückständen mit Perchlorsäure 51
4.6.3	Druckaufschluß in abgeschmolzenen Ampullen bei Temperaturen bis zu 300°C 53
4.6.4	Einfluß der Einwaage auf den Rest- kohlenstoffgehalt nach Druckauf- schlüssen bei 180°C 54
4.7	Voltammetrische Untersuchungen 58
4.7.1	Voltammetrische Untersuchungen an Aufschlußlösungen von Algen und Leber 58
4.7.2	Voltammetrische Messungen nach Druck- aufschluß weiterer Materialien; Vergleich mit den Ergebnissen der Algen- und Leber-Untersuchungen 75
4.8	Kohlenstoffbilanz und voltammetrische Untersuchungen an Aufschlußlösungen definierter organischer Verbindungen 83
4.8.1	Auswahl der untersuchten Verbindungen; Aufschlußbedingungen 83
4.8.2	Kohlenstoffbilanz 85
4.8.3	Restkohlenstoffgehalte nach Aufschluß biologischer Proben und Probenkompo- nenten 98
4.8.4	Voltammetrische Untersuchungen an Auf- schlußlösungen organischer Substanzen 105
4.9	Identifizierung der Aufschlußrückstände 122
4.9.1	Identifizierung der Rückstände aus Auf- schlüssen definierter Substanzen 122
4.9.2	Vergleich der NMR-Spektren von Rück- ständen nach Aufschluß biologischer Materialien mit denen von Aufschluß- Rückständen aus definierten Substanzen 139
4.9.2.1	Linolsäure und natürliche Fette 139
4.9.2.2	Weitere biologische Materialien 139
4.9.3	Vergleich der voltammetrischen Signale des Aufschlußrückstandes von Phenylala- nin mit den Signalen identifizierter Reaktionsprodukte 142

		Seite
4.10	Zum elektrochemischen Verhalten nitrierter Benzoessäuren	146
4.11	Schwefel-, Phosphor- und Stickstoff- bilanz beim Druckaufschluß biologischer Materialien	148
4.11.1	Schwefelbilanz	148
4.11.2	Phosphorbilanz	149
4.11.3	Stickstoffbilanz	150
5.	Diskussion	152
6.	Zusammenfassung	175
7.	Literaturverzeichnis	180
8.	Anhang	191

1. Einleitung

Die Bestimmung toxischer Schwermetalle in biologischen Materialien zählt zu den Routineaufgaben der analytischen Chemie, seit die Umweltbelastung durch Emissionen dieser Stoffe sowie die Kenntnisse über deren gesundheitsgefährdende Wirkungen und Einflüsse auf biologische Prozesse zu einer systematischen Kontrolle betroffener Stoffsysteme und Organismen zwingen. Von ähnlichem Interesse sind Informationen über Elemente, bei denen lebensnotwendige (essentielle) Funktionen in biologischen Systemen erkannt worden sind. In vielen Fällen konnte inzwischen sogar nachgewiesen werden, daß Elemente - je nach Konzentration, Wertigkeit und Bindungszustand - sowohl essentielle als auch toxische Wirkungen ausüben können. Da die Konzentrationsunterschiede beim Übergang von einer essentiellen zur toxischen Wirkung bei manchen Elementen vielfach nur sehr gering sind, sind präzise und richtige Daten erforderlich, um deren Einflüsse auf biologische Systeme (Umwelt, Nahrung, Körperflüssigkeiten, Gewebe) sicher beurteilen zu können. Die interessanten Konzentrationen liegen allerdings in vielen Fällen im Grenzbereich des Nachweisvermögens selbst der leistungsfähigsten Methoden; dementsprechend sind Analysenverfahren erforderlich, die auch bei extrem niedrigen Konzentrationen eine Elementbestimmung unter weitgehendem Ausschluß systematischer Fehler ermöglichen.

Wegen ihrer leichten Handhabbarkeit und der geringen Kontaminationsanfälligkeit bieten sich zunächst die sogenannten "Direktmethoden" an, also Methoden, die einen unmittelbaren Einsatz des Probenmaterials ohne wesentliche Vorbehandlung erlauben.

Hier sind neben der Inversvoltammetrie (1-5) und der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) (6-9) von Elementspuren in Körperflüssigkeiten besonders die atomabsorptionsspektrometrische Analyse fester Proben (12) sowie die Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) (11) zu nennen. Allen diesen Methoden ist allerdings gemeinsam, daß die Bestimmung der Spuren durch den hohen Matrixüberschuß im Probenmaterial erschwert wird: Bei der Voltammetrie werden neben den Elementspuren auch organische Bestandteile an der Arbeitselektrode umgesetzt. Der dadurch bedingte Strom kann mit dem Signal des Analyten interferieren. In der AAS fester Proben oder von Körperflüssigkeiten läßt sich die organische Matrix durch Verflüchtigen vor dem eigentlichen Bestimmungsschritt oft nicht genügend vollständig abtrennen, was zu einer Signaldepression oder zu hohen, teilweise unkompensierbaren Untergrundsignalen führen kann. Ein weiterer Nachteil der AAS fester Proben liegt darin, daß die zulässigen geringen Einwaagen bei der unvollkommenen Homogenität vieler Probenmaterialien oft nicht ausreichen, um eine repräsentative Aussage treffen zu können. Wesentlicher Nachteil der RFA in der Spurenanalyse ist ihr gegenüber der AAS und der inversen Voltammetrie geringeres Nachweisvermögen.

Allen Methoden gemeinsam ist das Problem, daß in Proben- und Eichmaterialien die zu bestimmenden Elemente in der Regel nicht streng in der gleichen Bindungsform vorliegen. Daraus resultieren Probleme bei der Kalibrierung, häufig verbunden mit beträchtlichen systematischen Fehlern. Um alle genannten Störungen zu umgehen, bleibt deshalb oft keine andere Möglichkeit, als die organische Matrix in einem der Bestimmung vorgeschalteten Schritt von den interessierenden Spuren zu trennen. Eine Möglichkeit hierzu ist die Mineralisierung der Probeneinwaagen. Der zu diesem Zweck durchzuführende Aufschluß übernimmt dabei mehrere Aufgaben:

- die weitgehende Mineralisierung der organischen Matrix,
- die Überführung der Spurenverbindungen in eine lösliche Form,
- die Isoformierung von Proben- und Eichmaterialien zu artgleichen Spurenkonzentraten.

Die Mehrzahl der bekannten Aufschlußverfahren ermöglicht den Einsatz von Probenmengen ≥ 100 mg, wodurch Homogenitätsprobleme bei vielen Materialien ausgeschlossen werden können. Für die nachfolgende Anreicherung von Elementspuren (12) ist ein Aufschluß der Proben hilfreich, bei dem die Spuren als Ionen in Lösung gebracht werden: Da die Bindungsformen von Schwermetallen in biologischen Materialien, selbst in natürlichen Wässern, oft undefiniert bzw. unbekannt sind, schafft der Aufschluß definierte chemische Verhältnisse und eliminiert so eine der wesentlichen Quellen für Analysenfehler.

Die Auswahl des jeweiligen Aufschlußprozesses als Teil eines spurenanalytischen Verbundverfahrens muß sich u.a. an folgenden Gegebenheiten orientieren:

- Zusammensetzung des Probenmaterials,
- erforderliche bzw. mögliche Einwaage,
- Reaktivität von Probenmaterial und Aufschlußreagenz,
- Art der zu bestimmenden Spuren und ihr Verhalten im Aufschluß,
- Blindwertbelastung der Analyse,
- Erfordernisse des nachfolgenden Bestimmungsverfahrens.

Allgemein gilt für ein Verbundverfahren, daß die Spurenbestimmung um so zuverlässigere Meßergebnisse liefert, je vollständiger die Elemente von der umgebenden Matrix abgetrennt wurden.

2. Ausgangsposition und Zielsetzung

Die Mehrzahl aller Analysenprobleme im Bereich der Elementspurenanalytik biologischer Probenmaterialien erfordert aus den zuvor genannten Gründen einen möglichst vollständigen Aufschluß, verbunden mit einer Abtrennung der organischen Matrix.

Für den Aufschluß biologischer Probenmaterialien haben die "Naßveraschungsverfahren" eine besondere Bedeutung. Die Probe wird dabei mit einem Oxidationsmittel, meist mit einer oxidierenden Säure oder einem Säuregemisch versetzt und nach einem Temperaturprogramm erhitzt, wobei der Kohlenstoff der organischen Matrix in Kohlendioxid überführt und abgetrennt wird. Die wichtigsten zu diesem Zweck benutzten Säuren sind Salpetersäure und Perchlorsäure. Sie werden entweder allein oder als Mischung eingesetzt; auch Gemische mit anderen Säuren, z.B. mit Schwefelsäure und Phosphorsäure, werden angewendet.

Unter den gebräuchlichen Aufschlußreagenzien ist Perchlorsäure wohl das stärkste Oxidationsmittel für organisches Material; ohne ihren Einsatz kann in den meisten Fällen eine vollständige Veraschung nicht erreicht werden. Unvollständig aufgeschlossene Proben verursachen in manchen Fällen so starke Störungen bei der Bestimmung der interessierenden Elementspuren, daß die zugrundeliegenden analytischen Probleme durch Naßaufschluß ohne den Einsatz von Perchlorsäure nicht zu lösen sind. Die Anwendung von Perchlorsäure bringt jedoch auch einige Nachteile: Ihre hohe Reaktivität gegenüber organischem Material liefert zwar gute Aufschlußergebnisse, bei unmittelbarem Einwirken auf das Probenmaterial können jedoch unkontrollierbar explosionsartige Reaktionen mit hoher Brisanz auftreten (13-18). Perchlorsäure sollte deshalb allenfalls in Gemischen mit anderen Säuren, meist mit Salpetersäure, eingesetzt werden, was die Gefahr zwar vermindert, aber nicht völlig besei-

tigt, wie Unfälle zeigen (13,18,19). Unbedingt zu beachten ist, daß Perchlorsäure erst nach vollständigem Umsatz des aufzuschließenden organischen Materials abgeraucht wird. Um zu verhindern, daß Perchlorsäuredämpfe ins Abluftsystem gelangen, wo sie mit organischen Dämpfen und Rückständen explosive Gemische bilden können, dürfen nur spezielle Abzüge verwendet werden, in denen die Abluft durch Berieselung mit Wasser von Perchlorsäuredämpfen weitgehend befreit wird. Ein weiterer Nachteil handelsüblicher Perchlorsäure liegt darin, daß sie, verglichen mit Salpetersäure, meist deutlich stärker kontaminiert ist (20). Die weitere Aufreinigung "analysenreiner" Säure durch Destillation ist zwar möglich, sie muß aber unter besonderer Vorsicht erfolgen (14,17). Schließlich sollte mit Perchlorsäure aufgrund der Explosionsgefahr nicht in geschlossenen Aufschlußsystemen gearbeitet werden, so daß Verluste an bestimmten Elementen durch Verflüchtigung oft nicht zu vermeiden sind.

Wesentlich sicherer ist das Arbeiten mit Salpetersäure; eine explosionsartige Zersetzung beim Kontakt auch 69%iger HNO_3 mit organischem Material ist im allgemeinen nicht zu befürchten. Ihr Oxidationsvermögen reicht allerdings oft nicht aus, um biologische Probenmaterialien für eine störungsfreie Spurenanalyse genügend vollständig zu mineralisieren. Die handelsübliche analysenreine Säure ist leicht durch isotherme Destillation aufzureinigen (21). Da ihre Reaktivität geringer ist als die der Perchlorsäure, kann Salpetersäure auch in geschlossenen Systemen eingesetzt werden. Elementverluste durch Verflüchtigung beim Aufschluß werden so verhindert. Um dies auszunutzen, wurden in der Vergangenheit Druckaufschlußsysteme entwickelt, die die Anwendung von Salpetersäure auch bei Temperaturen oberhalb ihres normalen Siedepunktes ermöglichen. Man erzielt dadurch eine Verbesserung des Oxidationsvermögens, ohne daß es bei der Mehrzahl aller Probenmaterialien zu gefährlichen Reaktionen kommt.

Die für den Druckaufschluß organischer Stoffe mit 69%iger Salpetersäure als optimal ermittelten Arbeitsparameter - 170°C und 3 h Aufschlußzeit - sind praktisch unabhängig von der Art des aufzuschließenden Materials (22,23). Die zum Aufschluß notwendige Säuremenge hängt stark vom Probenmaterial ab, jedoch können mit 2.0 ml 69%iger Salpetersäure für eine Einwaage, die 100 mg Kohlenstoff entspricht, in allen Fällen optimale Aufschlußergebnisse erreicht werden. Dabei werden Kohlenhydrate praktisch quantitativ, Pflanzenöl und eiweißhaltige Stoffe jedoch nur unvollständig abgebaut. Der im Rückstand noch verbleibende Gehalt an organischem Material wurde jeweils durch Verbrennung und coulometrische Titration des gebildeten CO₂ als "% C" ermittelt.

Untersuchungen dieser Art wurden bereits von STOEPPLE, MÜLLER und BACKHAUS (24), sowie von MÜLLER (25) durchgeführt. Der Kohlenstoffumsatz wurde dabei durch Messen des CO₂-Gehaltes der Gasphase bestimmt; eventuell entstandene flüchtige organische Verbindungen wurden nicht miterfaßt. Von den Autoren konnte zwar gezeigt werden, daß der Kohlenstoff in der organischen Matrix beim Druckaufschluß mit Salpetersäure nicht quantitativ zu CO₂ umgesetzt wird, da der Restkohlenstoffgehalt im Aufschlußrückstand selbst nicht gemessen wurde, blieben die Aussagen über die Vollständigkeit von Aufschlüssen allerdings sehr unsicher. Ursache dafür ist, daß als Reaktionsprodukte außer CO₂ auch bei Raumtemperatur flüchtige organische Verbindungen denkbar sind, die beim Öffnen des Druckgefäßes entweichen und das Ergebnis verfälschen.

Messungen zur Vollständigkeit von Aufschlüssen mit Salpetersäure-Perchlorsäure-Mischungen wurden von MARTINIE und SCHILT (26) durchgeführt. Dabei wurden die Restkohlenstoffgehalte nach Aufschluß einer Vielzahl biologischer und anderer organischer Probenmaterialien durch Elementaranalyse bestimmt. Die Untersuchungen zeigen, daß auch mit Perchlor-

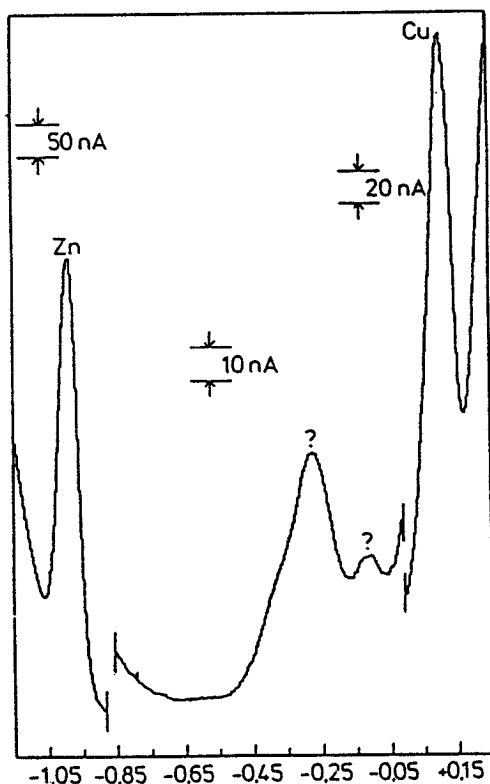
säure nicht in allen Fällen eine vollständige Mineralisierung gelingt.

Die in diesem Zusammenhang zitierten Arbeiten (22-26) befassen sich hauptsächlich mit der Frage, ob unter den gewählten Aufschlußbedingungen eine Oxidation des Kohlenstoffs organischer Probenmaterialien möglich ist und in welchem Umfang unzersetzte Reste im Rückstand verbleiben. Nicht untersucht wurde jeweils der Einfluß unersetzter Reste oder von Zersetzungsprodukten auf die Elementsignale der Spurenbestimmung, noch wurde die Identität der Rückstände aufgeklärt. Lediglich MARTINIE und SCHILT konnten zeigen, daß Alanin und Glutamin von Salpetersäure-Perchlorsäure-Gemischen zu Essigsäure, Methionin zu Methansulfonsäure umgesetzt werden. Bei anderen biologisch relevanten Stoffen wurden entweder keine meßbaren Rückstände oder aber nur unzersetzte Ausgangsstoffe festgestellt.

Organische Zersetzungsprodukte in Spurenkonzentraten können die Elementsignale sowohl der spektroskopischen als auch der elektroanalytischen Spurenbestimmung durch vielfältige additive und multiplikative systematische Fehler beeinträchtigen. Besonders schwerwiegend sind solche Störungen bei der inversen Voltammetrie. Einflüsse unersetzter organischer Stoffe auf voltammetrische Schwermetallsignale nach Aufschluß biologischer Materialien wurden von BAUMGARDT (27), KOTZ et al. (28), OEHME und LUND (29) sowie HERTZ und PANI (30) beschrieben. BAUMGARDT vergleicht die durch differentielle Puls-Inversvoltammetrie (DPASV)¹⁾ erhaltenen Signale der Elemente Zn, Cd, Pb und Cu nach dem Aufschluß von Kohlmeisenfedern mit Hilfe verschiedener Aufschlußverfahren. Die Abb.1-3 zeigen, daß nur der Aufschluß mit Salpeter- und Perchlorsäure zu störungsfreien Voltammogrammen führt. Beim Aufschluß im offenen System sowie beim Druckaufschluß mit Salpetersäure hinterbleiben organische Rück-

¹⁾DPASV ist die in der Literatur gebräuchliche Bezeichnung für "Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry".

stände, die zu Störungen der Voltammogramme durch Fremdsignale und erhöhten Untergrund führen. Auch OEHME und LUND beobachteten störende Signale nach Druckaufschluß von Blut mit Salpetersäure und Analyse durch DPASV (siehe Abb. 50). KOTZ et al. kommen ebenfalls zu dem Schluß, daß nach Druckaufschluß biologischer Materialien bei Temperaturen bis 200°C Lösungen hinterbleiben, deren organische Bestandteile Störsignale bei der Bestimmung von Cd, Pb und Cu durch DPASV liefern. Da in der zitierten Arbeit die Meßbedingungen aber nicht näher angegeben werden, ist eine Interpretation der Ergebnisse über den oben erwähnten Schluß hinaus nicht möglich. Die Autoren vermuten, daß die stören-



Potential (V) vs. gesätt. Ag/AgCl

Abb.1: Voltammogramm (DPASV) des Rückstandes von Kohlmeisenfedern nach Aufschluß im offenen Gefäß mit Salpetersäure (nach BAUMGARDT (27))

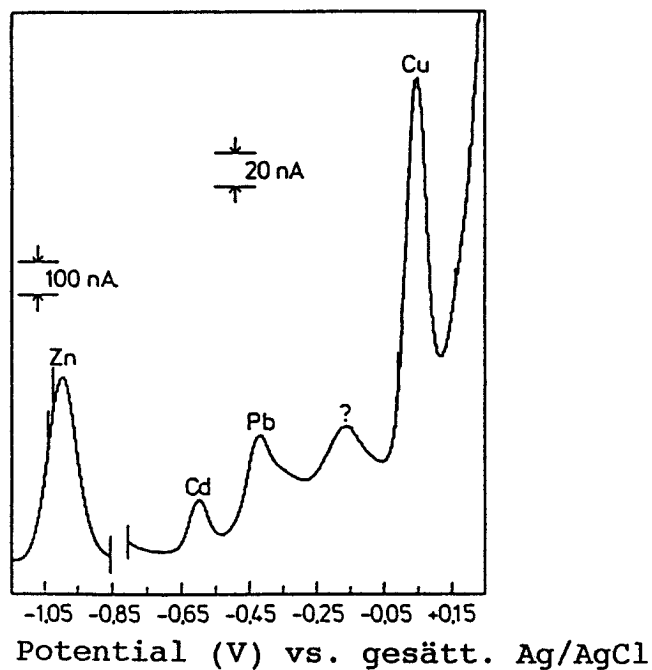


Abb.2: Voltammogramm (DPASV) des Rückstandes von Kohlmeisenfedern nach Druckaufschluß mit Salpetersäure (nach BAUMGARDT (27))

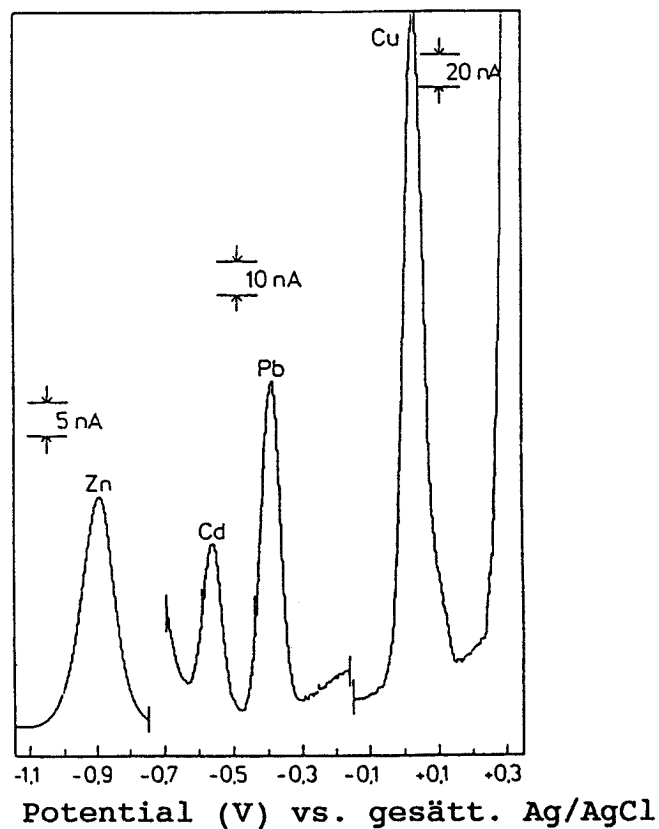


Abb.3: Voltammogramm (DPASV) des Rückstandes von Kohlmeisenfedern nach Aufschluß mit Salpeter- und Perchlorsäure im offenen Gefäß (nach BAUMGARDT (27))

den Substanzen beim Aufschluß gebildete organische Nitroverbindungen sowie nicht umgesetzte organische Makromoleküle sind, ohne diese Aussage jedoch durch Experimente oder Literaturhinweise zu belegen. OEHME und LUND kommen zu der gleichen Aussage und belegen dies mit Literaturhinweisen (31-34). In den zitierten Arbeiten sind jedoch keine Informationen enthalten, die auf die Art der infrage kommenden Verbindungen hindeuten. HERTZ und PANI (30) geben an, daß es sich bei den störenden Substanzen um aromatische Nitroverbindungen handelt und stützen diese Aussage darauf, daß Rückstände nach Druckaufschluß von Olivenblättern im Massenspektrometer eine NO-Abspaltung erleiden. Auch diese Autoren identifizieren die zugrundeliegenden Verbindungen nicht näher.

Die durch organische Rückstände hervorgerufenen Störungen atomspektrometrischer Verfahren sind im allgemeinen weniger gravierend als die der Voltammetrie. Besonders zu erwähnen sind jedoch systematische Fehler, die durch den unterschiedlichen Bindungszustand von Elementspuren in Proben- und Eichlösungen entstehen können. Dies gilt beispielsweise bei Vorhandensein nicht mineralisierter metallorganischer Verbindungen von Spuren, die mit der Hydrid-Technik der AAS bestimmt werden sollen. Organische Zersetzungsprodukte sind außerdem eine häufige Quelle für Untergrundsignale in der Graphitrohr-AAS, wenn deren Abtrennung in der "Veraschungsphase" des Temperaturprogramms unvollständig bleibt. Schließlich muß man bei allen lösungsspektrometrischen Methoden mit Probenansaugung und -zerstäubung damit rechnen, daß organische Stoffe Änderungen in der Viskosität und Oberflächenspannung bewirken, so daß im Vergleich zu den wäßrigen Kalibrierlösungen unter Umständen beträchtliche Unterschiede in den Ansaugraten, den Aerosolausbeuten und damit in der Empfindlichkeit der Analysensignale auftreten.

In dieser Arbeit werden vor allem die Einflüsse der nach Druckaufschluß biologischer Materialien zurückbleibenden organischen Verbindungen auf den Stromverlauf inversvoltammetrischer Spurensignale untersucht. Folgende Teilaufgaben bilden dabei den Schwerpunkt:

1. Optimierung der Parameter für den Druckaufschluß mit Salpetersäure bei Temperaturen bis zu 200°C anhand ausgewählter Probenmaterialien.
2. Versuche zur Nachbehandlung organischer Rückstände mit Perchlorsäure.
3. Versuche zum Druckaufschluß mit Salpetersäure bei Temperaturen bis zu 300°C unter Verwendung eines selbstgebauten Systems sowie des kommerziellen Hochdruckveraschers nach KNAPP (11,35).
4. Untersuchung der Voltammogramme von Aufschlußlösungen im Hinblick auf Störungen bei der Bestimmung von Zn, Cd, Pb und Cu.
5. Versuche zur Isolierung der Aufschlußrückstände unterschiedlicher Probenmaterialien sowie zur Identifizierung der unzersetzten Stoffe.
6. Untersuchungen zum Mechanismus der Störung elektrochemischer Reaktionen durch Aufschlußrückstände.
7. Untersuchungen zum Mechanismus des Abbaus biologischer Materialien im Druckaufschluß durch Salpetersäure.

3. Theoretische Aspekte

Im Folgenden werden gebräuchliche Aufschlußverfahren für biologische Materialien sowie die Grundlagen der coulometrischen Analyse und der Voltammetrie beschrieben.

3.1 Aufschlußmethoden für biologisches Material

3.1.1 Naßaufschluß

Als Reagenz für den Naßaufschluß in offenen oder geschlossenen Systemen verwendet man im allgemeinen oxidierende Säuren oder Wasserstoffperoxid.

3.1.1.1 Naßaufschluß in offenen Systemen

Im einfachsten Fall können biologische Proben durch Erhitzen mit geeigneten oxidierenden Reagenzien in Bechern, Schalen oder Kolben aufgeschlossen werden. Um Verluste an Oxidationsmittel durch Abdampfen zu vermeiden, empfiehlt es sich, unter Rückfluß zu arbeiten. Hierzu wurde eine Reihe von Apparaturen entwickelt (36-41). Von KNAPP (42) wurde ein automatisiertes, kontinuierlich arbeitendes System beschrieben. Als Oxidationsmittel finden Salpetersäure, Perchlorsäure, sowie deren Gemische mit Schwefel- oder Phosphorsäure Verwendung (16,34,39,43-48). Perchlorsäure darf nur im Gemisch mit anderen Säuren angewendet werden, um unkontrollierbare heftige Reaktionen zu vermeiden (13). In einigen Fällen wird auch Chlorsäure zum Aufschluß biologischer Materialien vorgeschlagen (49-53). Eine weitere Methode der Naßveraschung ist der Umsatz mit Wasserstoffperoxid, das entweder im Gemisch mit Salpeter- oder Schwefelsäure oder unter Zusatz von zweiwertigem Eisen als Katalysator eingesetzt wird (54). Ein gravierender Nachteil des

offenen Aufschlusses liegt im Verlust einiger Elemente durch Verflüchtigung.

3.1.1.2 Naßaufschluß in geschlossenen Systemen

Bereits 1860 untersuchte CARIUS das Aufschlußverhalten organischer Stoffe, indem er sie mit Salpetersäure in abgeschmolzenen Glasampullen bei Temperaturen von 200-320°C oxidierte (55,56). Bei den neueren Verfahren wird die Probe zusammen mit den Aufschlußreagenzien in einem druckdichten Aufschlußgefäß temperaturprogrammiert erhitzt.

Gegenüber dem Aufschluß in offenen Gefäßen bietet das Arbeiten in geschlossenen Systemen Vorteile:

- Es entstehen keine Elementverluste durch Verflüchtigung.
- Die Aufschlußzeit wird verkürzt, die Aufschlußleistung wird durch Anwendung von Temperaturen oberhalb des normalen Siedepunktes der Aufschlußreagenzien verbessert.
- Durch den geringeren Reagenzienbedarf wird die Blindwertbelastung des Aufschlußprozesses vermindert.
- Kontaminationen von außen sind weitgehend ausgeschlossen.

Als Gefäßmaterialien dienen heute im allgemeinen Polytetrafluorethylen (PTFE) (24,33,57-68), Glaskohlenstoff (28) und Quarz (11,35). Beschrieben wurde auch die Anwendung von Gefäßen aus V4A-Stahl zum Aufschluß mit Wasserstoffperoxid (151). Die Aufschlußtemperaturen werden vor allem durch die mechanischen Eigenschaften des Gefäßmaterials begrenzt. PTFE läßt, je nach Qualität, Temperaturen von 160-200°C zu, bevor es zu erweichen beginnt (28,46,67,68). Gefäße aus Glaskohlenstoff erlauben Druckaufschlüsse bei Temperaturen bis etwa 250°C (28), solche aus Quarz können noch höher erhitzt werden. Zum wesentlichen Problem werden dann aber die Dichtungen.

Die zu Beginn der Entwicklung beschriebenen Druckaufschlußsysteme dienten hauptsächlich zum Aufschluß geologischer Proben mit Flußsäure (57-59, 69-72). Die Mehrzahl der heute gebräuchlichen Geräte verschiedener Herstellerfirmen leitet sich von den u.a. durch BERNAS (59), sowie TÖLG et al. (68) beschriebenen Apparaturen ab. Ein Druckaufschlußsystem dieser Art ("Aufschlußbombe") besteht danach aus einem PTFE-Tiegel, der von einer Edelstahl-Ummantelung umgeben ist. Durch Federdruck wird der PTFE-Deckel zum Abdichten fest auf das Gefäß gepreßt. Steigt der Innendruck über den zugelassenen Wert an, so wird der Deckel gegen den Federdruck geöffnet, wobei die Reaktionsgase entweichen. Daher kann es nicht zum Zerbersten in Folge eines zu starken Druckanstiegs kommen. Beheizt wird das Aufschlußsystem in Heizblock- oder Luftthermostaten. Es kann auch durch Mikrowellen beheizt werden (73-77), wobei jedoch Sicherheitsdruckbehälter aus Metall nicht eingesetzt werden können. Statt der Überdrucksicherung durch eine Feder besitzen manche Druckaufschlußbomben Berstscheiben; diese Funktion kann auch der Deckel des Aufschlußgefäßes übernehmen (33, 78). Bei Systemen für den gleichzeitigen Aufschluß mehrerer Proben (33, 58, 78, 79), sind jeweils mehrere Tiegel in einem gemeinsamen Heizblock angeordnet.

Wie sich gezeigt hat, kann PTFE in manchen Fällen der extremen Spurenanalyse aufgrund von nestartig eingeschlossenen Verunreinigungen nicht eingesetzt werden (28): Die aus der Herstellung des Kunststoffes herrührenden Staubeinschlüsse werden bei vielfacher Verwendung der Gefäße von der Säure schließlich freigelegt und verursachen zum Teil beträchtliche Blindwerte. Auch diffundieren einige Elemente bei hohen Temperaturen und Drucken in die Gefäßwandung hinein, was Verluste sowie "Memoryeffekte" und somit systematische Fehler zur Folge hat (11). Solche Vorgänge hängen jedoch stark von der Qualität des PTFE und von dessen Verarbeitung ab. Die merkliche Gasdurchlässigkeit des Gefäßmaterials führt schließlich auch zu einer gewissen Passage

nitroser Gase, was in ungünstigen Fällen eine Korrosion des Metallmantels bewirken kann.

Probleme dieser Art treten bei der Benutzung dicht verschlossener Quarzgefäße nicht auf. KNAPP (11,35) hat ein entsprechendes "Hochtemperaturveraschungsgerät" entwickelt, mit dem Proben in Quarzgefäßen bei Temperaturen bis zu 320°C unter Druck aufgeschlossen werden können. Der im Reaktionsverlauf entstehende Innendruck wird durch Vorgabe eines äußeren Druckes kompensiert, so daß bis zu 100 bar toleriert werden können.

Beim Naßaufschluß in geschlossenen Systemen hat sich Salpetersäure als Oxidationsmittel für biologisches Material bewährt (11,22-24,28,33,68,79-81). Müssen Silikate gelöst werden, kann zusätzlich Flußsäure verwendet werden (68,82-88). Der Einsatz von Perchlorsäure im geschlossenen System ist aus Sicherheitsgründen grundsätzlich nicht zu empfehlen. Eventuelle brisante Reaktionen können zur Detonation führen, wobei die Sicherheitssysteme der Druckaufschlußgeräte oft zu träge sind, um der Druckwelle nachzugeben. Dies gilt auch für Mischungen aus Salpeter- und Schwefelsäure, die z.B. zum Aufschluß von Fett im geschlossenen System auf keinen Fall eingesetzt werden dürfen (89).

Allgemein muß die Probeneinwaage dem Gefäßvolumen und dem maximal tolerierbaren Innendruck angepaßt werden. Das Aufschlußverhalten eines Probenmaterials kann dabei durch Steigerung der Einwaage untersucht werden. Eine strikte Begrenzung der Probenmenge vor allem der erwähnten sehr reaktiven organischen Materialien auf 150-300 mg ist auch aus Sicherheitsgründen unbedingt erforderlich.

Eine Übersichtsarbeit zum Thema "Säureaufschluß unter Druck in der Spurenanalyse" wurde von JACKWERTH und GOMIŠČEK veröffentlicht (80).

3.1.2 Aufschluß durch Verbrennung

Da die zahlreichen auf Verbrennung basierenden Aufschlußverfahren nicht unmittelbar Gegenstand dieser Arbeit sind, werden sie hier nur kurz beschrieben. Weitere Informationen sind der zitierten Literatur zu entnehmen.

Folgende Verfahren werden heute hauptsächlich eingesetzt:

- Verbrennung durch Luftzufuhr im Muffelofen bei etwa 500°C mit und ohne Zusatz von Oxidationshilfen (15,16,39,48), teilweise auch in Kombination mit einem Naßaufschluß (90-94). Die Gefahr der Verflüchtigung von Spurenelementen ist hier besonders groß (15,95,96).
- Verbrennung unter "dynamischen Bedingungen" im Sauerstoffstrom; flüchtige Verbindungen werden an einem Kühlfinger zurückgehalten (97).
- Die Verbrennung nach SCHÖNIGER in einem geschlossenen, sauerstoffgefüllten Kolben erlaubt nur geringe Einwaagen (98).
- Verbrennung mit Sauerstoff unter Druck in Edelstahl-Bomben. Zwar lassen sich relativ hohe Einwaagen aufschließen (99-103), es ist aber mit Kontaminationen durch das Gefäßmaterial zu rechnen.
- WICKBOLD-Verbrennung organischer Proben in einer Knallgasflamme, meist zur Bestimmung von Chlor und Schwefel (83,104-106).
- Veraschung mit angeregtem Sauerstoff bei 1 - 5 torr O₂. Im Mikrowellen- oder Hochfrequenzfeld entsteht ein Sauerstoffplasma, mit dem bei Temperaturen unterhalb von 150°C selbst Materialien wie PTFE oder Graphit aufgeschlossen werden können. Flüchtige Verbindungen werden an Kühlvorrichtungen kondensiert (11,51,86,107-109).

3.2 Coulometrie

Die coulometrische Analyse (110) nutzt die Gültigkeit des FARADAY-Gesetzes zur Bestimmung elektrolytischer Reaktionsprodukte aus. Es gilt:

$$G = \frac{M \cdot Q}{F \cdot z}$$

G = umgesetzte Stoffmasse

M = Mol- bzw. Atommasse

F = Faraday-Konstante

Q = gemessene Ladung

z = Wertigkeit bzw. Zahl der Elektronen pro Formelumsatz

Die elektrolytisch umgesetzte Stoffmenge wird aus der zur Reaktion benötigten und gemessenen Ladungsmenge berechnet. Voraussetzung für die Richtigkeit der Analyse ist eine 100%ige Stromausbeute für die elektrolytische Reduktion bzw. Oxidation der zu bestimmenden Probenkomponente. Es ist also wichtig, daß an der Arbeitselektrode allein die analytisch interessierende Reaktion abläuft; Nebenreaktionen jeder Art müssen verhindert werden. Die Anwendung der gebräuchlichen Elektrodenmaterialien Platin bzw. Quecksilber richtet sich nach dem analytischen Problem, da beide Metalle nicht universell eingesetzt werden können. Man unterscheidet, je nach Wahl der Parameter und Meßgrößen, zwei coulometrische Methoden: die "potentiostatische" und die "galvanostatische" Coulometrie.

1. Potentiostatische Coulometrie

Die an den Elektroden anliegende Spannung wird im Verlauf der Elektrolyse konstant gehalten. Die Konzentration des zu

bestimmenden Stoffes nimmt mit zunehmender Elektrolysezeit ab. Dadurch bedingt, verringert sich die Stromdichte, bis sie am Ende der Elektrolyse praktisch gleich Null ist. Die umgesetzte Ladungsmenge kann mit einem Coulometer bestimmt werden.

2. Galvanostatische Coulometrie

Auch bei diesem Verfahren wird die umgesetzte Ladung als Produkt aus der Stromstärke und der Zeit bestimmt. Es gilt:

$$Q = I \cdot t$$

Q = umgesetzte Ladung

I = Stromstärke

t = Zeit

Da hier die Stromstärke mit Hilfe eines Galvanostaten konstant gehalten wird, dient die Zeit, während der der Strom fließt, als Meßgröße. Bei dieser Technik verläuft der elektrolytische Stoffumsatz ähnlich wie in der Maßanalyse; anstelle der Maßlösung wird hier jedoch der elektrische Strom zur Titration benutzt ("Coulometrische Titration").

Der Endpunkt, bei dem die Elektrolyse unterbrochen wird, kann konventionell mit Hilfe von Farbindikatoren oder potentiometrisch über ein zusätzliches Meßelektrodensystem ermittelt werden. Häufig wird auch die "Dead-Stop-Methode" angewandt, ein potentiostatisches Indikationsverfahren mit zwei polarisierbaren Elektroden. Das Verfahren ähnelt also einer üblichen Titration, mit dem Unterschied, daß das Reagenz nicht zugegeben, sondern im Elektrolyten der Probenlösung erzeugt wird. Ein typisches Anwendungsbeispiel für diese heute meist mit Titrierautomaten durchgeführte coulometrische Technik ist die alkalimetrische Bestimmung von Kohlenstoff nach Verbrennung zu CO_2 (111).

3.3 Inverse Voltammetrie

Die inverse Voltammetrie gehört zu den nachweisstärksten Methoden zur Bestimmung einer Reihe von Ionen ("Depolarisatoren") in wäßriger Lösung. Einer der Gründe für das hohe Nachweisvermögen ist die Anreicherung der zu bestimmenden Elemente an einer stationären Arbeitselektrode durch Elektrolyse bei konstantem Potential. Der bei anschließender Wiederauflösung der Elektrolyseprodukte registrierte Strom ist bei geeigneter Wahl der Arbeitsparameter proportional zur Konzentration der betreffenden Ionenart in der Lösung. Die Signale sind peakförmig, da nach primärem Stromanstieg eine zunehmende Verarmung an der Elektrodenoberfläche einsetzt. Der Spitzenstrom gehorcht bei reversiblen Reaktionen an einer stationären Quecksilber-Tropfenelektrode der von NICHOLSON (112) abgeleiteten Gleichung:

$$I = 602 \, z^{3/2} \, q \, D^{1/2} \, v^{1/2} \, c \left(0.4463 + \frac{0.16 \, D}{r \, z \, v} \right) \, 0.7516$$

mit I = Peak-Spitzenstrom (A)

q = Elektrodenoberfläche (cm^2)

D = Diffusionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

v = Spannungsanstiegsrate ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)

c = Depolarisatorkonzentration ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)

r = Tropfenradius (cm)

z = pro Formeleinheit umgesetzte Elektronenzahl

Der Ablauf einer inversvoltammetrischen Metallbestimmung ist in Abbildung 4 dargestellt.

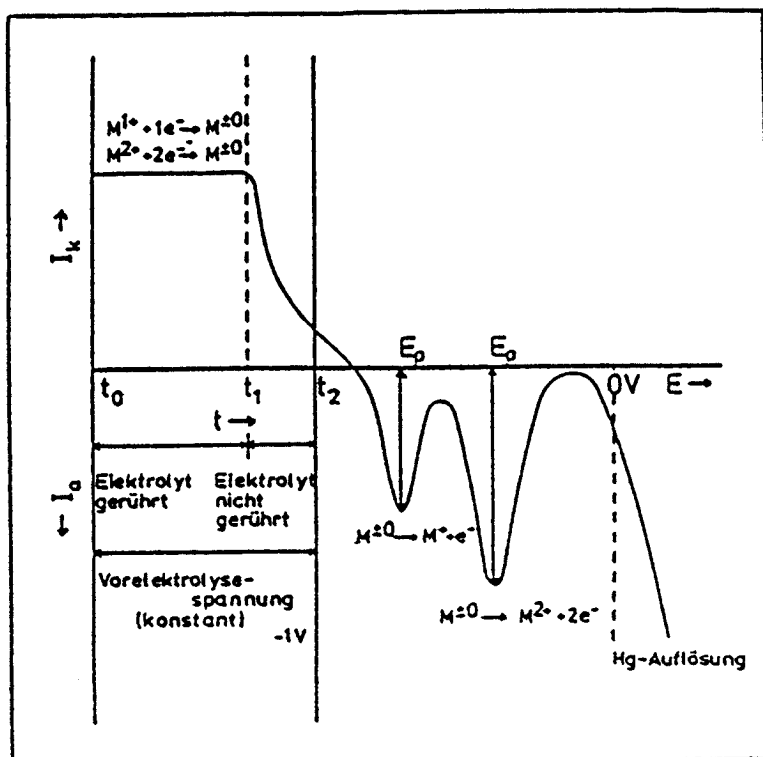


Abb.4: Stromverlauf bei der inversvoltammetrischen Bestimmung von Metallionen (112)

Die Anreicherung beginnt bei t_0 , die Lösung wird bei konstantem Potential bis t_1 unter Rühren elektrolysiert. Während der anschließenden "Ruhezeit", in der nicht gerührt wird, verteilen sich die Elektrolyseprodukte homogen im Quecksilber der Mikroelektrode, wobei der Stromfluß stark abfällt. Anschließend wird der für die Elementbestimmung interessierende Spannungsbereich bis zur Quecksilberauflösung durchfahren. Analysengerät ist im einfachsten Fall ein Gleichstrom-Polarograph. Bei den leistungsfähigeren Verfahren der differentiellen Puls-Inversvoltammetrie werden den Spannungsrampen zusätzliche Impulse überlagert. Dabei erhält man die für die jeweilige Methode charakteristischen Voltammogramme.

Das gegenüber der Polarographie stark erhöhte Nachweisvermögen der inversen Voltammetrie ist, wie erwähnt, auf die hohe Konzentration an angereichertem Depolarisator an der Arbeitselektrode zurückzuführen. Das Nachweisvermögen wird

dabei durch Anwendung impuls-polarographischer Techniken weiter verbessert: Überlagert man der Gleichspannungsrampe rechteckförmige Spannungsimpulse, so steigen sowohl Diffusions- als auch Kapazitätsstrom bei Anlegen jedes Impulses stark an; ausgenutzt wird das unterschiedliche Abklingverhalten von Faraday- und störendem Kapazitätsstrom. Dazu mißt man den Strom jeweils am Ende der Impulse und erzielt ein verbessertes Verhältnis von Signal zu Untergrund, weil der Faraday-Strom (Signal) langsamer abklingt als der Kapazitätsstrom (Untergrund). Es resultieren Signale, die in ihrer Form Gleichstrom-Polarogrammen ähnlich sind.

Eine weitere Verbesserung des Nachweisvermögens erreicht man durch Anwenden der "differentiellen Puls-Inversvoltammetrie (DPASV)" zur Ermittlung der Auflösungsströme, einer Technik, die heute bei der Bestimmung von Schwermetallspuren das bevorzugte voltammetrische Verfahren ist. Das Meßprinzip ist in Abb.5 dargestellt.

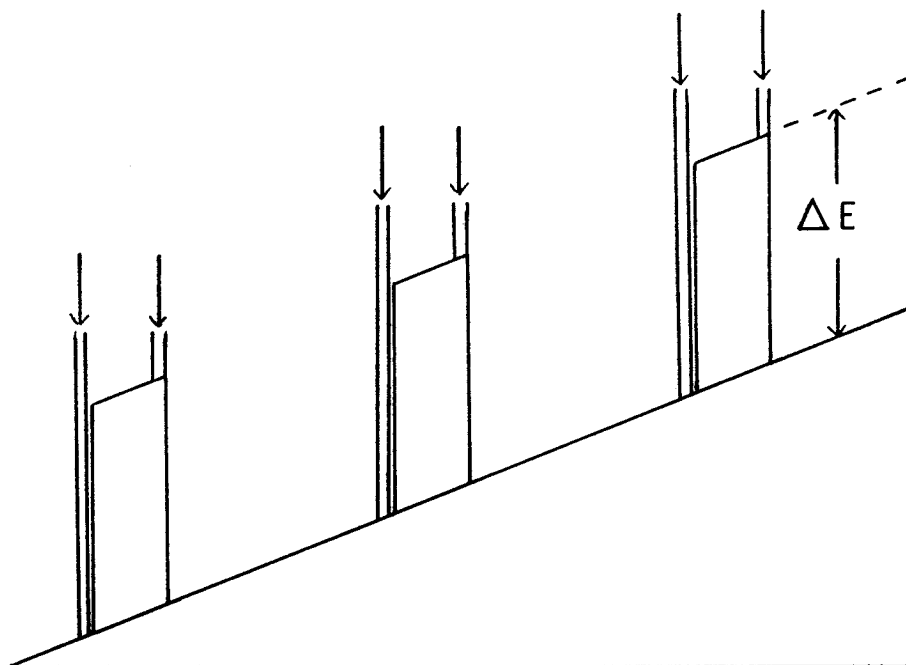


Abb.5: Impulsverlauf und Lage der Meßintervalle bei der differentiellen Puls-Inversvoltammetrie (DPASV)

Der Strom wird unmittelbar vor Anlegen des Spannungsimpulses sowie nach weitgehendem Abklingen des Kapazitätsstroms gemessen. Die Stromdifferenz, aufgetragen gegen das Potential, liefert Voltammogramme mit peakförmigem, weitgehend symmetrischem Verlauf.

Ähnlich arbeitet auch die Square-Wave-Inversvoltammetrie (SWASV)²⁾: Die Gleichspannungsrampe wird mit einer rechteckförmigen Wechselspannung von hoher Frequenz moduliert. Das Meßprinzip ist in Abb.6 dargestellt.

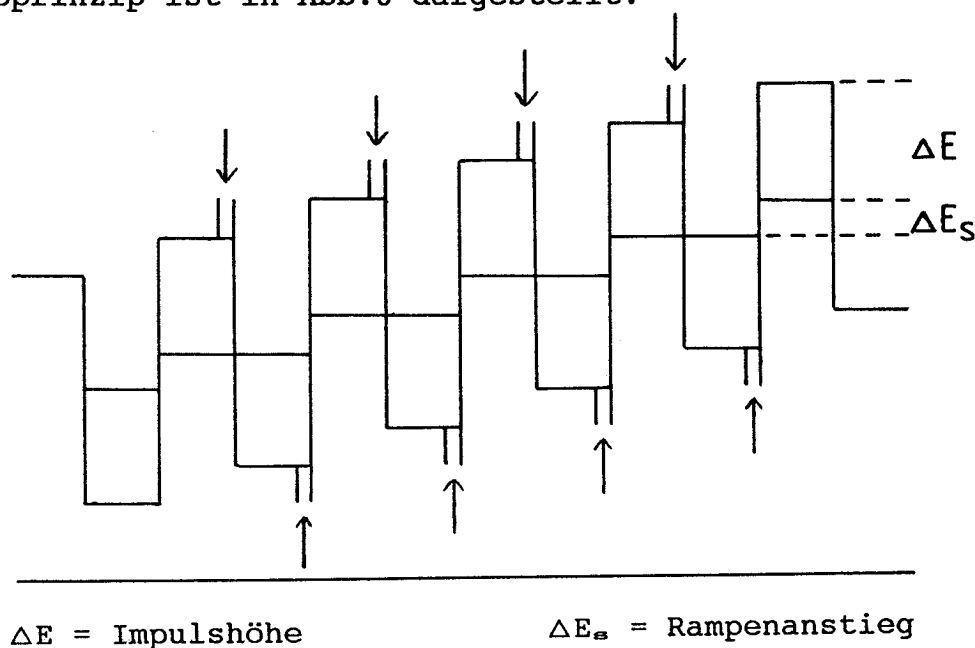
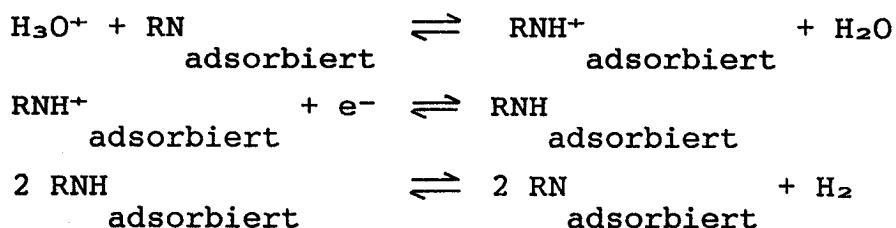


Abb.6: Impulsverlauf und Lage der Meßintervalle bei der Square-Wave-Inversvoltammetrie (SWASV)

Gemessen wird jeweils am Ende der Impulse, um auch hier das unterschiedliche Abklingverhalten von Faraday- und Kapazitätsstrom auszunutzen. Analysensignal ist das aus den Differenzen der Ströme am Ende jeweils zusammengehöriger positiver und negativer Impulse resultierende Voltammogramm. SWASV und DPASV sind sehr ähnliche Meßmethoden; da die Impulsfolge der SWASV jedoch wesentlich schneller ist (etwa 100 s^{-1} bei der SWASV gegenüber etwa 1 s^{-1} bei der DPASV), wird bei reversiblen Redoxsystemen hier ein Faraday-Strom

²⁾ "Square Wave Anodic Stripping Voltammetry"

auch für die Rückreaktion des Elektrodenprozesses gemessen, und zwar im Meßintervall des "negativen Impulses". Bei der DPASV wird aufgrund der erheblich längeren Zeitabstände zwischen den Impulsen ein Strom für die Rückreaktion reversibler Systeme nicht beobachtet, da dieser vor Beginn des nächsten Impulses bereits praktisch auf Null abgefallen ist. Hieraus wird ein weiterer Vorteil der SWASV ersichtlich: Das Verhältnis von Signalen aus reversiblen Reaktionen zu denen aus irreversiblen Reaktionen ist bei der SWASV günstiger als bei der DPASV, hängt jedoch stark von den jeweiligen Meßparametern ab. Reversible Reaktionen, die ihrem Potential nach benachbart zu irreversiblen Prozessen ablaufen, können also mit deutlich verminderten Störungen registriert werden (113). Meßsignal bei der SWASV ist der Wechselstromanteil des Diffusionsstromes. Aufgrund der hohen Impulsfrequenz ist die Aufnahme von Voltammogrammen mit einem Spannungsvorschub von $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ möglich. Die DPASV erlaubt im allgemeinen nur $2-5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Das Nachweisvermögen der SWASV für Zn, Cd, Pb und Cu entspricht etwa dem der DPASV. Zn, Cd, Pb und Cu können durch inverse Voltammetrie in wäßrigen Lösungen simultan bestimmt werden, wenn sie in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen. Bei Konzentrationsunterschieden, die zu Signalinterferenzen führen, kann die Bestimmung bei unterschiedlichen Elektrolysepotentialen und Anreicherungszeiten sequentiell erfolgen. Der analytisch nutzbare Spannungsbereich beträgt in wäßrigen Lösungen bei Benutzung einer Quecksilber-Arbeits-elektrode etwa -1.2 V bis $+0.3 \text{ V}$, bezogen auf die gesättigte Ag/AgCl-Elektrode. Oberhalb von 0.3 V wird Quecksilber aufgelöst ($\text{Hg} \rightarrow \text{Hg}^{2+}$), unterhalb von etwa -1.2 V werden, abhängig vom pH-Wert, H^+ -Ionen zu Wasserstoff entladen. Die Wasserstoffreduktion kann durch organische Stoffe, insbesondere durch Stickstoffbasen, katalysiert und in einen positiveren Potentialbereich verschoben werden; der nutzbare Spannungsbereich wird dadurch verringert, die Zink-Bestimmung bei etwa -1 V unter Umständen erschwert. NÜRNBERG (114) gibt dazu den folgenden Mechanismus an:



Stickstoffbasen RN überführen also die sonst nur unter Aufwendung einer hohen Überspannung an Quecksilber abscheidbaren H_3O^+ -Ionen in das ammoniumanaloge Kation RNH^+ , das ein wesentlich positiveres Entladungspotential hat. Als Depolarisator wirken somit nicht die H_3O^+ -, sondern RNH^+ -Ionen ("Katalytische Wasserstoffstufen"). Neben den bereits erwähnten Störeffekten durch organische Stoffe (siehe Kap.2), die nach oxidativen Abbaureaktionen biologischer Probenmaterialien in der Aufschlußlösung hinterbleiben, werden zahlreiche weitere Einflüsse oberflächenaktiver und komplexierender Verbindungen auf die inversvoltammetrischen Signale der Metallionen beschrieben. Als besonders bei der Analyse natürlicher Wässer häufig vorkommendes Problem ist z.B. die Maskierung von Analyt-Ionen durch organische Komplexbildner zu nennen. Die komplexierten Elemente sind auf Grund ihres veränderten elektrochemischen Verhaltens nicht mehr erfaßbar oder ihre Signale erscheinen - u.U. gestört - bei anderen Potentialen als die der "freien" Metallionen (115). Auch oberflächenaktive Stoffe können beträchtliche Störungen bei der inversen Voltammetrie von Metallionen bewirken. Durch die Adsorption solcher Stoffe wird die Oberfläche der Quecksilber-Elektrode mit einem Film belegt, der eine Depression der Elementsignale verursacht (116, 117).

Schließlich sind Elektrodenreaktionen elektrochemisch aktiver organischer Substanzen zu erwähnen, die zu Signalen führen, welche die Voltammogramme interessierender Stoffe überlagern. Eine Übersicht über derartige Verbindungen, die aufgrund ihrer elektrochemischen Eigenschaften natürlich

auch voltammetrisch bestimmt werden können, findet sich bei ZUMAN und PERRIN (118).

4. Experimenteller Teil

4.1 Auswahl und Charakterisierung der Probenmaterialien

Für erste orientierende Untersuchungen wurden zwei biologische Materialien von unterschiedlicher Zusammensetzung ausgewählt.

- Rinderleber als Vertreter für eiweißreiche, jedoch fett- und kohlenhydratarme Materialien tierischer Herkunft.
- Braunalgen (*Fucus vesiculosus*) als Vertreter für eiweiß- und fettarme, jedoch kohlenhydratreiche Materialien pflanzlicher Herkunft, die einen hohen Mineralstoffgehalt und einen hohen Silikat-Anteil aufweisen.

Beide Stoffe wurden gefriergetrocknet und gemahlen. Der Fettgehalt dieser Materialien ist jeweils gering (zu Untersuchungen an Fetten siehe Kap.4.8). Beide Stoffe wurden zunächst in ihrer Zusammensetzung charakterisiert. Die Schwermetallbestimmungen (Zn, Cd, Pb und Cu) wurden in mehreren Laboratorien, durch verschiedene Analytiker und mit unabhängigen Verfahren durchgeführt (Voltammetrie, Atomabsorptionsspektrometrie, Atomemissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Plasma, Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse). Während Kenntnisse über die Schwermetallgehalte für die Untersuchung von Störungen voltammetrischer Elementsignale notwendig sind, sind Daten über die anderen Bestandteile zum Verständnis von Aufschlußreaktionen von Interesse.

	Algen	Leber
Cd	$0.99 \pm 0.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$1.53 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Pb	$1.78 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$0.65 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Cu	$4.01 \pm 0.14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$67 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Zn	$113 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$125 \pm 6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
C	35.2 %	51.5 %
N	3.11 %	11.5 %
Na	3.15 %	0.21 %
K	2.75 %	1.05 %
Ca	1.34 %	0.20 %
Mg	0.80 %	0.06 %
Cl	3.05 %	0.25 %
P	0.32 %	1.23 %
S	2.42 %	0.83 %
Si	1.24 %	≤ 0.01 %
Eiweiß	18.7 %	65 %
Fett	2.5 %	12.6 %
Kohlenhydrat	53 %	19.6 %

Tab.1: Zusammensetzung der untersuchten Probenmaterialien

4.2 Aufschlußbedingungen

4.2.1 Druckaufschluß in PTFE-Gefäßen bis zu 200°C

Die Druckaufschlüsse wurden mit Aufschlußapparaturen "PRAWOL" (Fleishhacker, Schwerte) durchgeführt.

4.2.1.1 Beschreibung der verwendeten Druckaufschluß- apparatur

Die Druckaufschlußapparatur "PRAWOL" (67) besteht aus einem Magnetheizrührer, auf den ein Aluminium-Heizblock aufgesetzt ist, der mit einer durchgehenden zylindrischen Bohrung zur Aufnahme der Druckbombe sowie einer Bohrung für ein Kontaktthermometer versehen ist. Das angeschlossene Kontaktthermometer ermöglicht es, die eingestellte Aufschlußtemperatur konstantzuhalten (Abb.7).

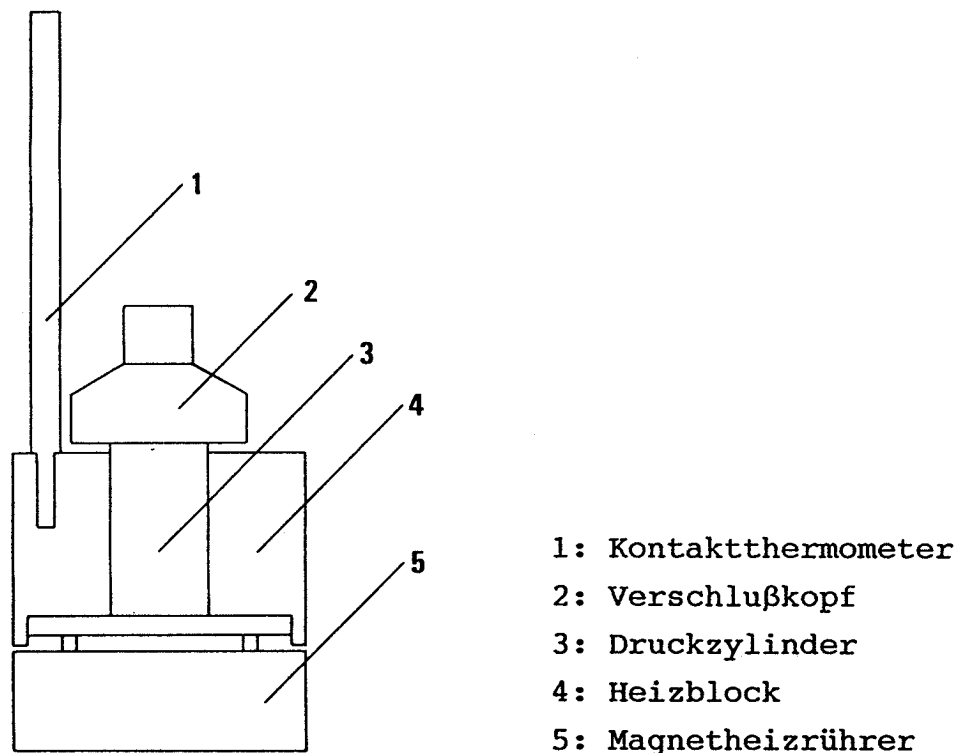
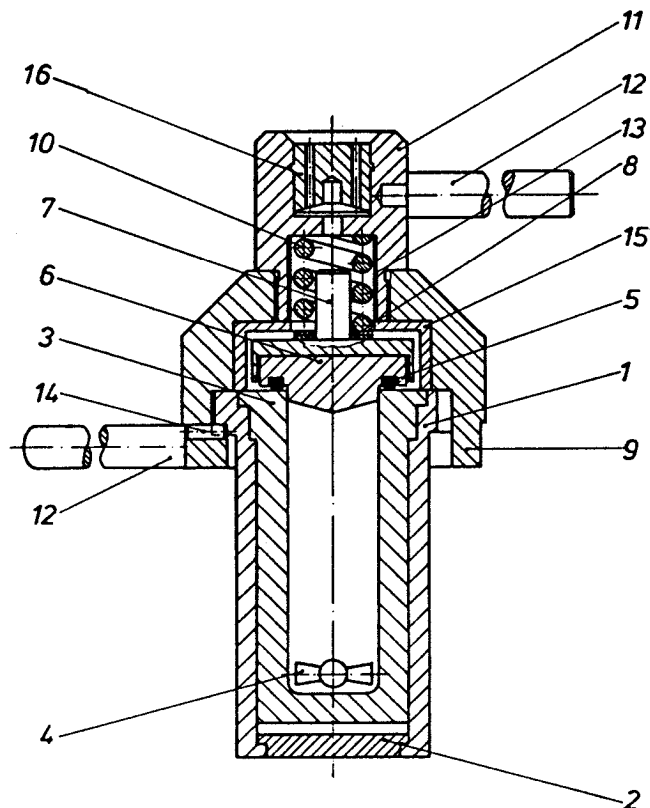


Abb.7: Schematischer Aufbau der Druckaufschlußapparatur
"PRAWOL"

Die eigentliche Druckvorrichtung ist in Abb.8 dargestellt. Sie setzt sich zusammen aus einem verschließbaren Edelstahlzylinder mit Bajonettverschluß und Federspannkopf, die ebenfalls aus Edelstahl gefertigt sind. In den Federspannkopf ist eine Edelstahlfeder eingepaßt, die über einen mit

PTFE beschichteten Deckelhalter den PTFE-Deckel auf das Aufschlußgefäß preßt. Diese Feder ermöglicht ein gefahrloses Abblasen bei zu hohem Innendruck. Die Feder ist so gewählt, daß bei Innendruck bis zu 25 bar gearbeitet werden kann. Das Gerät ist jedoch noch mit einem zweiten Sicherheitssystem ausgerüstet. Der Boden des zylindrischen Druckgefäßes besteht aus einer herausnehmbaren Aluminiumscheibe, die als schwächster Punkt des Systems eine Sollbruchstelle darstellt, falls das durch Deckel und Feder gebildete Sicherheitssystem versagen sollte. Das eigentliche Reaktionsgefäß aus dickwandigem PTFE ist so konstruiert, daß es in kaltem Zustand beim Einsetzen in den Druckzylinder nur auf seinen oberen Rändern aufliegt und zwischen der Aluminium-Bodenplatte und dem Boden des PTFE-Gefäßes Spielraum besteht. Auf diese Weise wird sichergestellt, daß das PTFE beim Erwärmen genügend Raum zur Ausdehnung hat, ein Stauchen des PTFE-Gefäßes also vermieden wird. Bei den von uns benutzten Gefäßen konnte ein Stauchen auch nach mehr als 200-maligem Gebrauch nicht beobachtet werden. Da die Bodenplatte aus Aluminium gefertigt ist, kann die Probe während des Aufschlusses mit Hilfe eines PTFE-Magnetrührstäbchens gerührt werden. Der Deckel des Gefäßes besteht ebenfalls aus PTFE. Seine Funktion läßt sich aus Abb.8 erkennen. Die Abdichtung erfolgt sowohl über die Seitenflächen des in das Gefäß hineinragenden Teils des Deckels als auch über einen PTFE-Ring, der in den Deckel eingepaßt ist und der aus einem etwas weicheren PTFE-Material besteht als Deckel und Gefäß. Der Austritt von nitrogen Gasen wurde, außer beim Abblasen in Folge eines zu hohen Innendruckes, nicht beobachtet. Für das Gerät sind Gefäße der Volumina 25, 35 und 45 ml erhältlich. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden in 35-ml-Gefäßen durchgeführt.



- | | |
|-------------------|------------------------|
| 1: Druckzylinder | 9: Mantelverschlußkopf |
| 2: Bodenverschluß | 10: Druckfeder |
| 3: PTFE-Becher | 11: Federspannkopf |
| 4: PTFE-Rührkern | 12: Verschlußhebel |
| 5: PTFE-Dichtring | 13: PTFE-Federklemme |
| 6: PTFE-Deckel | 14: Anschlagstift |
| 7: Deckelhalter | 15: PTFE-Schutzbuchse |
| 8: Federlager | 16: Überdrucksicherung |

Abb.8: Druckvorrichtung "PRAWOL"

4.2.1.2 Hinweise zur Durchführung der Druckaufschlüsse

200 mg Leber bzw. 300 mg Algen (jeweils etwa 100 mg C entsprechend) wurden in 35-ml-Gefäßen mit konzentrierter Salpetersäure aufgeschlossen (69 %ige HNO_3 ; isotherm destilliert).

Die Aufschlußmischungen wurden nicht gerührt. Die durch das System vorgegebene Aufheizzeit bis zum Erreichen der Aufschlußtemperatur betrug in allen Fällen 40 min. Die sich daran anschließende Zeit wird im folgenden mit "Aufschlußzeit" bezeichnet. Die Säure wurde portionsweise unter Schwenken des Gefäßes zugesetzt, um das trockene Material gleichmäßig zu benetzen. Hierdurch wird eine Verkohlung der Proben vermieden, die zu völlig anderen organischen Rückständen führt. Beim Aufschluß von Algen wurde in manchen Fällen Flußsäure (40 %ig, "Suprapur", Merck, Darmstadt, Art.Nr.335) zum Lösen der enthaltenen Silikate zugegeben. In einigen Versuchen wurden die Lösungen nach dem Aufschluß bei 130°C zur Trockene abgeraucht, um flüchtige organische Stoffe und Stickoxide zu entfernen. Bei Algen-Aufschlüssen unter Flußsäure-Zusatz war dieser Vorgang notwendig, um gebildetes Calciumfluorid und Fluorosilikate zu zerstören und eine klare Lösung zu erhalten.

4.2.2 Hinweise zur Nachbehandlung organischer Rückstände mit Perchlorsäure

Zum weiteren Umsatz organischer Verbindungen, die nach Druckaufschluß mit Salpetersäure im PTFE-Gefäß zurückbleiben, können die Aufschlußlösungen unmittelbar im offenen PTFE-Gefäß mit Perchlorsäure bei Temperaturen bis zu 200°C nachbehandelt werden. Diese Nachbehandlung ist weitgehend gefahrlos, da die zurückbleibenden organischen Verbindungen im allgemeinen wenig reaktionsfreudig sind und - verglichen mit der Einwaage - nur noch wenig Material vorhanden ist. Dampft man die Aufschlußlösungen vor der Nachbehandlung mit Perchlorsäure zur Trockene ein, so wird bereits ein beträchtlicher Teil an organischen Substanzen verflüchtigt (siehe auch Kap.4.6.1). Zur Nachbehandlung wurde die Lösung nach Öffnen des PTFE-Gefäßes zum Sieden erhitzt (Heizblocktemperatur: 130°C). Nach Ablauf der Aufheizzeit (40 min, vergleiche Kap.4.2.1.2) wurde 70 %ige Perchlorsäure

("Suprapur", Merck, Darmstadt, Art.Nr.517) in die siedende Aufschlußlösung gegeben (vgl. Kap.4.6.2). Leichtflüchtige organische Stoffe sind dann bereits aus der Lösung verdampft, so daß deren Reaktion mit Perchlorsäure vermieden wird. Die Probe wurde langsam bei 130°C abgedampft. Beim Entstehen von Perchlorsäure-Nebeln wurde das PTFE-Gefäß sofort mit einem Uhrglas abgedeckt, um ein Entweichen von Säure zu verhindern. Die anschließende Nachbehandlung wurde unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Zeit, Säurezusatz) durchgeführt.

Es zeigte sich, daß diese Art der Nachbehandlung unter bestimmten Bedingungen zu nur wenig reproduzierbaren organischen Restgehalten führt. Sowohl bei der Nachbehandlung von Algen als auch von Leber (180°C, 3h) wurden in Parallelversuchen Streuungen im Restkohlenstoffgehalt bis um den Faktor 2 gemessen, wie das folgende Beispiel belegt:

Algen, Restkohlenstoffgehalte 0.08 - 0.17 % C

Mittelwert: 0.118 % C

Anzahl der Aufschlüsse: 15

Anzahl der Bestimmungen pro Aufschluß: 3

s: 0.033 % C

s_r: 0.28

Zur Erklärung wird angenommen, daß beim Abdampfen der Druckaufschlußlösung ein einziger Tropfen verbleibt, in dem praktisch die gesamten Probenbestandteile gelöst oder in suspendierter Form vorliegen. Die Güte der Nachbehandlung hängt nun davon ab, ob dieser Rückstand auf dem planen Boden des Gefäßes von der vom Uhrglas abtropfenden Perchlorsäure "getroffen" wird oder nicht. Ist dies nicht der Fall, so verdampft die geringe Menge an eingesetzter Perchlorsäure erneut, ohne mit dem Probenmaterial in Berührung gekommen zu sein. Die Folge ist ein unvollständigerer Umsatz des organischen Materials.

Für den Druckaufschluß mit Perchlorsäure-Nachbehandlung wurden daher PTFE-Gefäße angefertigt, bei denen der Boden konvex ausgedreht wurde, ohne das Gesamtvolumen zu verändern. Das Abtropfen der kondensierten Säure wurde durch Anbringen einer Glasspitze an der Unterseite der Uhrgläser erleichtert, um die Menge an Perchlorsäure so gering wie möglich zu halten. An der Außenseite der Uhrgläser wurden zur einfachen und kontaminationsfreien Handhabung kurze Glasstäbe angeschmolzen. Unter den veränderten Bedingungen wurde die Reproduzierbarkeit der Nachbehandlung erheblich verbessert (vgl. Kap.4.6.2). Die modifizierte Gefäßform hat auf das Ergebnis des Salpetersäure-Druckaufschlusses keinen meßbaren Einfluß.

4.2.3 Druckaufschluß bei Temperaturen bis zu 300°C

4.2.3.1 Apparatur

Die speziell für diese Experimente angefertigte Aufschlußapparatur ermöglicht Druckaufschlüsse bei Temperaturen auch oberhalb von 200°C, bei denen PTFE aufgrund seines Fließverhaltens nicht mehr eingesetzt werden kann. Das Druckgefäß ist in Abbildung 9 dargestellt.

Das aus V₄A-Stahl gefertigte und mit Hilfe eines Kupfer-ringes abgedichtete Druckgefäß kann mit 6 Ampullen (Duran, Wandstärke 2,2 mm, Außendurchmesser 13 mm, Volumen 4.2 - 4.6 ml, Länge nach Abschmelzen 93 - 98 mm) beschickt werden. Duran als Werkstoff ist zur Bestimmung des Restkohlenstoffgehaltes brauchbar, für Schwermetalluntersuchungen müssen jedoch entsprechend dimensionierte Quarzampullen eingesetzt werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Ampullen wurden jeweils mit PTFE-Band umwickelt, um zu verhindern, daß sie sich beim Aufheizen infolge der Ausdehnung des Stahls verkanten. In das Druckgefäß wurden 25 ml Wasser

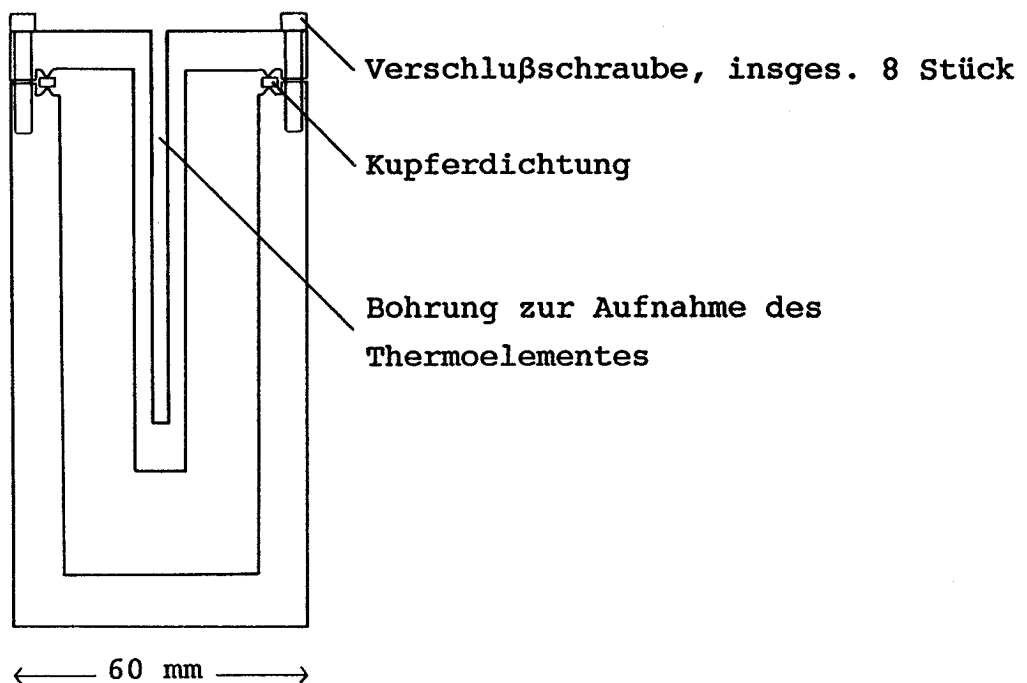


Abb.9: Druckgefäß zur Durchführung von Aufschlüssen in abgeschmolzenen Ampullen

gegeben, um den im Inneren der Ampullen entstehenden Druck zu kompensieren. Die Temperatur wurde mit einem in die Bohrung des T-förmigen Deckels eingeführten Thermoelements unterhalb der Wasseroberfläche gemessen. Die Meßstelle liegt dabei so weit im Inneren des Gefäßes, daß die gemessenen Werte die tatsächliche mittlere Temperatur im Gefäß gut wiedergeben sollten. Die Aufschlüsse erfolgten im Bereich zwischen 180 und 300°C. Dazu wurde das Druckgefäß in einen ähnlich Abb.7 konstruierten und vorgeheizten Block eingesetzt. Für die Temperaturvorgabe und -regelung wurde ein Kontaktthermometer verwendet. Die Aufheizzeit des Systems liegt bei 20 min und ist praktisch unabhängig von der vorgegebenen Aufschlußtemperatur.

Das System wurde aus Sicherheitsgründen in einer für Druckaufschlüsse vorgesehenen Betonbox (119) im Freien betrieben. Das Aufschlußgefäß kann mit einem Seil durch eine Bohrung im Dach der Box aus dem Heizblock gezogen werden. Durch Fixieren des Seilendes an einem außen angebrachten

Haken wurde das heiße Druckgefäß jeweils vor einen Ventilator gehängt, der oberhalb des Heizblocks im Inneren der Box montiert ist und von außen eingeschaltet werden kann. Auf diese Weise läßt sich das Druckgefäß innerhalb von 20 min abkühlen. Die Box kann dann geöffnet und das abgekühlte Druckgefäß gefahrlos entnommen werden. Die Innentemperatur des Gefäßes wurde mit einem Thermoelement gemessen und im Labor registriert. Auf diese Weise können sowohl der Temperaturverlauf als auch die Dichtigkeit des Systems ständig gefahrlos kontrolliert werden: Bei plötzlich auftretender Undichtigkeit sinkt die Tempertur im Drucksystem stark ab, da das eingefüllte Wasser verdampft. In diesem Fall wird das Heizsystem von außen abgeschaltet.

Bei 300°C betragen die Dampfdrucke für Wasser 87.6 bar (120) sowie für 69 %ige Salpetersäure 65 bar (120). Demnach können die Ampullen von außen maximal mit einem Überdruck von 22,6 bar belastet sein, wenn sie mit 69 %iger Salpetersäure beschickt sind. Je verdünnter die Säure ist, desto höher wird der Innendruck, bis bei Beschickung mit Wasser keine Druckunterschiede an der Ampulle mehr vorhanden sind. Glasrohre, aus denen die Ampullen gefertigt sind, halten einem Außendruck von mehr als 500 bar (!) stand (121), der maximal mögliche Innendruck liegt jedoch nur bei 25 bar (122).

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Probenmengen ist der durch Salpetersäure und Wasser aufgebaute Dampfdruck in jedem Fall höher als der Druck der durch die Reaktion entstehenden Gase CO_2 und NO_x . Der Gesamtdruck wird also überwiegend durch die Dampfdrucke der Flüssigkeiten bestimmt.

4.2.3.2 Aufschluß

Die Proben wurden durch Differenzwägung mit Hilfe eines Mikrospatels mit Genauigkeiten von ± 0.1 mg eingewogen und in die Ampullen überführt. Die Einwaagen betrugen jeweils für Leber 20.0 ± 0.2 mg, für Algen 30.0 ± 0.2 mg. Nach Zugabe von 200 μ l 69 %iger Salpetersäure (siehe auch Kap. 4.6.1) wurden die Ampullen abgeschmolzen und die Proben aufgeschlossen. Nach dem Probenaufschluß können die abgekühlten Ampullen folgendermaßen geöffnet werden:

1. Ampullen aus Duran:

- a) Nach Reduzierung des Innendrucks durch Abkühlen mit flüssigem Stickstoff.

Bei -196°C liegen alle Reaktionsprodukte in fester Form vor. Wird der gesamte organische Kohlenstoff nach der formalen (!) Reaktionsgleichung $3 \text{ "C"} + 4 \text{ HNO}_3 \rightarrow 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NO} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ umgesetzt, so herrscht im Inneren der Ampulle - ideales Verhalten der Gase und Dämpfe vorausgesetzt - bei 25°C und 4.2 ml Volumen ein Druck von 12 bar.

- b) Durch Anritzen der Ampulle und Sprengen mit einem in der Flamme des Bunsenbrenners erhitzten Glasstab.

2. Ampullen aus Quarz:

Durch Abkühlen mit Stickstoff und Brechen an einer vorverjüngten Stelle in der Ampullenmitte nach Anritzen mit einem Glasschneidemesser.

Die Probe wird nach Erwärmen auf Raumtemperatur mit Wasser in einen kleinen Meßkolben oder direkt in eine Meßzelle zur voltammetrischen Metallbestimmung überführt. Zur Bestimmung des Restkohlenstoffgehaltes wird sie quantitativ mit Wasser in ein Verbrennungsschiffchen (vgl. Kap.4.3.1) gefüllt.

4.3 Behandlung der aufgeschlossenen Proben

4.3.1 Kohlenstoffbestimmung

4.3.1.1 Kohlenstoffbestimmung nach Abrauchen der Säure

Nach Öffnen der abgekühlten PTFE-Druckaufschlußgefäße wurde die Aufschlußmischung mit Wasser (Wasseraufbereitung: Milli-RO-15-System mit Aufreinigungsanlage Milli-Q; Millipore, Bedford, USA) zu 10.0 ml ergänzt.

Alternativ dazu wurde folgendermaßen verfahren: Nach Öffnen der Druckgefäße wurde bei 130°C zur Trockene eingedampft. Dabei verdampfen die Stickoxide, flüchtige organische Verbindungen sowie Wasser und Salpetersäure. Bei Aufschlüssen unter Zusatz von Flußsäure werden so auch entstandene schwerlösliche Fluoride und überschüssige Flußsäure entfernt. Die Rückstände wurden in beiden Fällen mit je 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure und mit Wasser zu 10.0 ml aufgenommen. Es ergaben sich ausnahmslos klare, rückstandsfreie Lösungen.

Einschließlich 40 min Aufheizzeit bis auf 130°C dauerte der gesamte Vorgang etwa 2 h. Es ist nicht sinnvoll, bei höheren Temperaturen abzurauchen, da die Proben dann teilweise verspritzen. Im Anschluß an Perchlorsäure-Nachbehandlungen wurde nicht abgeraucht. Die verbleibende Perchlorsäure und darin enthaltene Probenbestandteile wurden mit Wasser zu 10.0 ml gelöst. Aus diesen Lösungen wurden je 0.5 ml entnommen und in Porzellan-Verbrennungsschiffchen (zuvor bei 1000°C ausgeglüht) überführt. Aus den nach Perchlorsäure-Behandlung erhaltenen Lösungen wurde mit Rücksicht auf die zu erwartenden geringen Kohlenstoffgehalte je 1.0 ml entnommen. Nach Aufschlüssen in Glas- und Quarzampullen wurden die erhaltenen Lösungen jeweils quantitativ mit Wasser in Porzellanschiffchen überführt. Die zur Kohlenstoffbestimmung benutzte coulometrische Titration basiert auf der pH-

Änderung einer wäßrigen Lösung nach Einleiten des bei der Verbrennung gebildeten CO_2 . Um Störungen zu vermeiden, müssen Säurereste aus den Aufschlußlösungen entfernt werden. Die Lösungen wurden dazu auf einer Heizplatte ($160 \pm 1^\circ\text{C}$ Oberflächentemperatur; effektive Temperatur im Inneren des Schiffchens $130 \pm 5^\circ\text{C}$) zur Trockene abgeraucht. Da diese Temperatur bei perchlorsäurehaltigen Lösungen nicht ausreicht, wurde folgendermaßen verfahren: Um die in 1-ml-Aliquoten der aufgefüllten Aufschlußlösungen enthaltenen etwa 0.02 ml 70 %ige Perchlorsäure zu entfernen, wurde Natriumchlorid-Lösung im Überschuß zugesetzt (27 mg NaCl). Die nach $\text{HClO}_4 + \text{NaCl} \rightleftharpoons \text{NaClO}_4 + \text{HCl}$ entstehende Salzsäure wird bei 130°C vollständig aus der Lösung verdampft. Das gleichzeitig gebildete Natriumperchlorat und das überschüssige Natriumchlorid stören die Kohlenstoffbestimmung nicht, da bei der Verbrennung dieser Stoffe keine sauer reagierenden Gase entstehen.

4.3.1.2 Bestimmung von organisch gebundenem Kohlenstoff in sauren Aufschlußlösungen

Bei dem in Kap.4.3.1.1 beschriebenen Verfahren wird nur derjenige Kohlenstoffanteil erfaßt, der in Form organischer Verbindungen vorliegt, die bei 130°C noch nicht flüchtig sind. Die Werte, die nach Abrauchen bei 130°C erhalten werden, geben den tatsächlichen Kohlenstoffgehalt bei Algen-Aufschlußlösungen wieder, wenn, wie beschrieben, schwerlösliche Fluoride durch Abrauchen zersetzt worden sind. Nicht abgerauchte Aufschlußlösungen enthalten vermutlich noch flüchtige organische Verbindungen. Auch bei der Perchlorsäure-Nachbehandlung (vgl. Kap.4.2.2) können leicht flüchtige organische Spezies gebildet werden, die aber - zumindest teilweise - am Uhrglas kondensieren und zurück in die Lösung gelangen.

Zur Erfassung des Gesamtkohlenstoffgehaltes von Aufschlußlösungen ist die Oxidation unter UV-Bestrahlung geeignet, analog zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs in Wässern (123). Dazu werden 250 ml Wasser unter Zusatz von Kaliumperoxodisulfat und Kupfer-(II)-sulfat bei pH 2-3 unter Einleiten von gereinigtem Sauerstoff mit Hilfe einer Quecksilber-Niederdruck-Tauchlampe (Gräntzel, Karlsruhe) im UV-Bereich 180 - 240 nm bestrahlt. Die Lösung wird während der Bestrahlung auf 40°C thermostatisiert und kräftig gerührt.

Organische Verbindungen werden zu CO_2 oxidiert, das mit Sauerstoff aus der Lösung ausgetrieben und coulometrisch titriert wird. Diese "Naßverbrennung" gelingt bei einer Vielzahl organischer Stoffe (123). Aliquote Teile von Aufschlußlösungen lassen sich analog vermessen, wenn man sie mit Wasser auf 250 ml verdünnt. Störende Gase, wie CO_2 -Eigengehalte des verwendeten Wassers oder Stickoxide in der Aufschlußlösung, werden vor Einschalten der UV-Lampe ausgetrieben. Während der Bestrahlung wurde eine Neubildung störender Gase nicht mehr beobachtet. Die mit der Aufschlußlösung eingebrachten Anteile an Salpeter- bzw. Perchlorsäure haben keinen Einfluß auf die Reaktionszeiten und Meßergebnisse. Dies wurde an Glucose-Lösungen mit bekannten C-Gehalten unter Zusatz von Salpeter- bzw. Perchlorsäure untersucht. Die Reaktionszeit für die vollständige Oxidation der hier untersuchten Proben beträgt 7 min, die Gesamtdauer einer Analyse 12 min. Die Vollständigkeit der UV-Oxidation wurde anhand definierter Glucose-Zusätze sichergestellt. Überprüft wurde auch, daß zumindest die schwerflüchtigen organischen Anteile der Aufschlußrückstände zu CO_2 umgesetzt werden (vgl. Kap.4.6).

Arbeitszyklus:

1. Probe in den Einfülltrichter geben;
2. 5 ml Reaktionsbeschleuniger zusetzen³⁾;
3. 0.15 ml konzentrierte Schwefelsäure ("Suprapur", Merck, Darmstadt, Art.Nr.714) zusetzen;
4. Mischung mit 250 ml Wasser in die Reaktionszelle spülen;
5. Gelöste Gase mit Sauerstoff unter Rühren austreiben;
6. Einschalten der UV-Lampe; Messung des Kohlenstoffgehaltes;
7. Ausschalten der Lampe; Ablassen der Lösung.

4.3.2 Voltammetrie

Für die voltammetrischen Untersuchungen wurden von den zu 10.0 ml aufgefüllten Aufschlußlösungen jeweils 1.0 ml entnommen und mit 5.0 ml Wasser in eine voltammetrische Meßzelle gegeben. So konnte sichergestellt werden, daß bei der Analyse eines der Probenmaterialien jeweils Lösungen gleicher Metallionenkonzentrationen in der Meßzelle vorlagen, deren Voltammogramme unmittelbar miteinander verglichen werden konnten. Zusätzlich wurden 20 mg Leber in Ampullen aufgeschlossen. Um auch hier die den übrigen Leber-Aufschlußlösungen entsprechenden Metallionenkonzentrationen zu erhalten, wurde der Inhalt einer Ampulle mit wenig Wasser in einen Quarztiegel überführt, bei 130°C zur Trockene eingengt und mit 0.05 ml Salpetersäure sowie 5.95 ml Wasser mit Hilfe einer Pipette in die Meßzelle gespült.

³⁾Reaktionsbeschleuniger: 50 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und 33 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (zur Analyse, (Merck, Darmstadt, Art.Nr.2790 und 5091) werden mit Wasser zu 1 l gelöst.

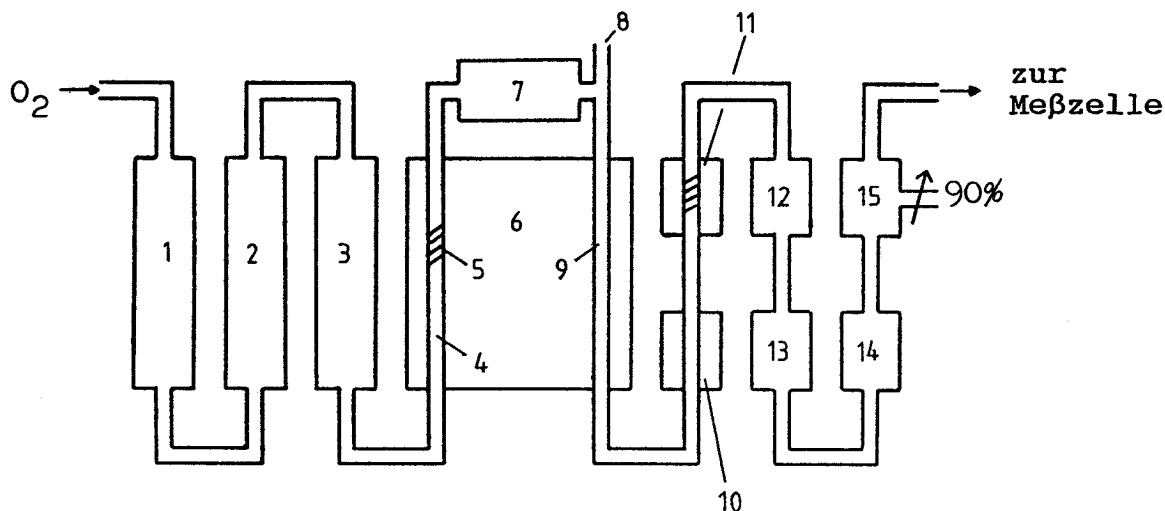
4.4. Coulometrische Kohlenstoffbestimmung

Das durch Verbrennung oder durch photolytische Oxidation der organischen Stoffe gebildete Kohlendioxid wurde coulometrisch titriert (Coulomat Modell 702, Ströhlein, Kaarst).

Abb.10 gibt schematisch Aufbau und Funktion der Verbrennungseinrichtung wieder (124). Der aus einer Druckgasflasche entnommene Sauerstoff wird zunächst zur Reinigung durch 3 Absorptionsrohre geleitet. Wasser wird an Kaliumhydroxid (Nr.1), organische Verbindungen werden an Aktivkohle (Nr.2) gebunden. Im dritten Absorptionsrohr wird CO_2 an Natronasbest (Nr.3) gebunden. Der so vorgereinigte Sauerstoffstrom passiert ein Verbrennungsrohr (Nr.4), dessen Temperatur mit der eines entsprechenden Rohres für die Proben übereinstimmt, da sich beide Rohre im gleichen Ofen (Nr.6) befinden. Hier werden organische Verunreinigungen, die an Aktivkohle nicht adsorbiert werden können, verbrannt. Entstehendes Kohlenmonoxid wird am Platindrahtnetz (Nr.5) zu Kohlendioxid oxidiert. Dieses wird anschließend an Natronasbest gebunden (Nr.7).

Der so gereinigte Sauerstoffstrom gelangt über eine Gaschleuse (Nr.8) in das Probenverbrennungsrohr (Nr.9). Etwa 90 % des Sauerstoffs strömen hier nach außen, wodurch das Verbrennungsrohr gegen eindringende Luft geschützt wird. Der restliche Sauerstoff wird von einer Pumpe (Nr.14) angesaugt. Die zu analysierenden Proben werden über die Gaschleuse in die Reaktionszone geschoben, in der die organischen Substanzen bei 1300°C verbrennen. Dabei entsteht neben CO_2 auch CO , da bei dieser Temperatur das Gleichgewicht bezüglich der Reaktion $\text{C} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons 2 \text{CO}$ weitgehend auf Seiten des CO liegt. Die Ofentemperatur ist bis 1400°C regelbar und kann somit an andere Analysenprobleme angepaßt werden. Die Verbrennungsgase passieren bei 400°C einen Kontaktofen mit Silberwolle (Nr.10). Hier werden Halogene und Halogenwasserstoffe als Silberhalogenide gebunden. Das

vorhandene CO wird anschließend an einem Platindrahtnetz (Nr.11) bei 700°C zu CO₂ oxidiert. Schwefeloxide werden als Schwefelsäure an Perhydrit (Nr.13), Stickoxide an verschiedenen Absorptionsmitteln (vgl. weiter unter) gebunden.



- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1: Kaliumhydroxid | 9: Verbrennungsrrohr (Probe) |
| 2: Aktivkohle | 10: Silberwolle (400°C) |
| 3: Natronasbest | 11: Platindrahtnetz (700°C) |
| 4: Verbrennungsrrohr (Gasreinigung) | 12: Absorptionsvorrichtungen für NO _x |
| 5: Platindrahtnetz | 13: Perhydrit |
| 6: Ofeneinheit | 14: Ansaugpumpe |
| 7: Natronasbest | 15: Teilerpumpe |
| 8: Probeneinlaßöffnung | |

Abb.10: Verbrennungseinrichtung zum Coulomaten

Über die bereits erwähnte Pumpe (Nr.14) gelangt der Gasstrom in die Meßzelle. Die Ansaugleistung der Pumpe beträgt 368 ml/min. Alternativ können aus dem Gasstrom mit Hilfe einer Gasteilerpumpe exakt 90 % des Gasstroms abgepumpt werden, so daß nur 10 % davon in die Meßzelle gelangen. Dies ist bei hohen Kohlenstoffgehalten der Proben sinnvoll, um die Analysenzeit zu verkürzen und den Verbrauch der Absorptionslösung zu verringern. Probleme machte die Absorption bei der Verbrennung gebildeter Stickoxide. Diese

entstehen aus Metallnitraten und führen, wenn sie in die Meßzelle gelangen, wie alle sauren Gase zur pH-Änderung und somit zur Vortäuschung von CO_2 . Organische Stoffe, auch Nitroverbindungen, verbrennen hingegen nicht unter Bildung von Stickoxiden, sondern liefern ausschließlich elementaren Stickstoff. In diesem Zusammenhang war die Frage zu klären, welche Aufschlußrückstände Nitrat enthalten und ggf. in welchen Mengen. Bei der Bilanzierung geht man davon aus, daß die im Aufschluß vorhandenen Kationen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} beim Eindampfen zunächst in die schwerflüchtigen Sulfate und Phosphate überführt werden; nur die überschüssig verbleibenden Kationenanteile bilden Nitrate. Sulfate und Phosphate sind dabei die Reaktionsprodukte organischer bzw. anorganischer Schwefel- und Phosphorverbindungen im Aufschlußprozeß (vgl. Kap.4.11). Die Zuordnung der äquimolaren Ionenanteile ergab, daß bei Leberproben allein der Sulfat-Anteil ausreicht, um alle Kationen als Sulfat zu binden, im Falle der Algen kann jedoch nur etwa die Hälfte der Kationen als Sulfat und Phosphat gebunden werden. Dampft man die Lösungen zur Trockene ein, so enthält der Leber-Rückstand keine Nitrate, bei Algen sind jedoch etwa 50 % der Kationen an Nitrat gebunden. Stickoxide entstehen folglich bei der Verbrennung der Aufschlußrückstände von Algen, nicht aber bei denen der Leber.

Diese Bilanz kann leicht aus den Analysenergebnissen (siehe Seite 26) erstellt werden (zur Bildung von Sulfat und Phosphat: vgl. Kap.4.11). Ebenso konnte gezeigt werden, daß nach dem Abrauchen kein Chlorid mehr vorhanden ist, da Salzsäure noch leichter flüchtig ist als Salpetersäure. Chlorid spielt also in der Bilanz keine Rolle.

Die Absorption von Stickoxiden aus einem CO_2 -haltigen Sauerstoffstrom erfolgt zweckmäßig an mit Wasserdampf bei Raumtemperatur gesättigtem, aktiviertem Mangandioxid (Merck, Darmstadt, Art.Nr.5953) unter Bildung von Mangannitrat (125). Dieses Verfahren wurde bereits ausführlich

beschrieben (22); in der Vorschrift der zitierten Arbeit reicht das Absorptionsvermögen des Mangandioxids für die hohen Stickoxid-Anteile aus Algen-Rückständen jedoch nicht aus. Lediglich etwa 95 % der Stickoxide können aus dem Trägergasstrom abgetrennt werden. Eine Verbesserung wurde nun dadurch erreicht, daß dem Mangandioxid eine mit 80 ml Pufferlösung von pH 5 beschickte 100-ml-Gaswaschflasche mit Fritte vorgeschaltet wurde, in der bereits 80 % der Stickoxide absorbiert werden, ohne daß CO_2 zurückgehalten wird. Bei diesem Verfahren bleibt das Mangandioxid stets feucht, was wichtig ist, da sein Absorptionsvermögen für NO_x beim Austrocknen, wie es in einem nicht angefeuchteten Sauerstoffstrom geschieht, schnell nachläßt, gleichzeitig aber CO_2 festgehalten wird (126,127). Mit Pufferlösung und Mangandioxid wurden insgesamt etwa 98 % der entstehenden Stickoxide absorbiert. Aus dem ionenchromatographisch ermittelten Nitratgehalt der Algen-Rückstände wurde der nicht absorbierte Stickoxidanteil durch Kalibrieren mit Kaliumnitrat ("zur Analyse", Merck, Darmstadt, Art.Nr.5063) ermittelt und am Analysenergebnis korrigiert. Die Präzision des Gesamtverfahrens wird dadurch nicht meßbar verschlechtert (vgl. Kap.4.6.1).

Nach Perchlorsäure-Aufschlüssen ist eine Stickoxid-Absorption nicht erforderlich, weil beim Abrauchen alles Nitrat in Form flüchtiger Salpetersäure entfernt wird. Bei Algen wird der als Nitrat vorliegende Metallionenanteil dabei in Perchlorat überführt, was rechnerisch einen Mehrverbrauch von etwa 50 µl 70 %iger Perchlorsäure erfordert. Bei der Nachbehandlung von Algen-Rückständen muß demnach etwas mehr Perchlorsäure als bei Leber eingesetzt werden, um einen optimalen Umsatz der organischen Verbindungen zu erzielen (siehe auch Kap.4.6.2).

Die Nachweisgrenze für die coulometrische Kohlenstoffbestimmung beträgt $\underline{m}_c = 2.4 \mu\text{g C}$. Der Ermittlung wurde folgende Definition zugrundegelegt:

$$\underline{x} = \bar{x}_b + 3 s_b$$

$$\underline{m}_c = f(\underline{x})$$

Mit: $\underline{x}$ = Meßwert an der Nachweisgrenze

$\bar{x}_b$ = mittlerer Blindwert

$\underline{m}_c$ = Kohlenstoffmasse an der Nachweisgrenze

s_b = Schätzwert der Standardabweichung der Blindwerte

Die Garantiegrenze für Reinheit bezüglich des Restkohlenstoffgehaltes von Aufschlußrückständen wurde analog unter Berücksichtigung der Einwaagen und Aliquotierungsfaktoren aus $G = \bar{x}_b + 6 s_b$ berechnet (128).

Arbeitsvorschrift zur coulometrischen CO_2 -Titration

Der Trägergasstrom, der neben Sauerstoff nur noch das zu bestimmende CO_2 enthält, wird in die coulometrische Meßzelle geleitet (Abb.11) (124). Sie besteht aus dem Kathodenraum (Nr.1), der mit einer 15 %igen wäßrigen Bariumperchloratlösung gefüllt ist, sowie dem Anodenraum (Nr.2), der die gleiche Lösung sowie einen Bodenkörper aus Bariumcarbonat enthält. Beide Räume sind durch ein Diaphragma (Nr.3) voneinander getrennt. Zur Indikation des Titrationsendpunktes sowie zur Kontrolle des pH-Arbeitspunktes dient eine pH-Einstabmeßkette (Nr.4). Anode (Nr.5) und Kathode (Nr.6) sind Platinbleche. Der pH-Wert der Absorptionslösung im Kathodenraum wird so eingestellt, daß sowohl eine vollständige Absorption als auch eine genügend empfindliche Bestimmung des eingeleiteten CO_2 ermöglicht wird. Beide Effekte sind gegenläufig: Bei steigendem pH-Wert wird die Absorption des CO_2 zwar begünstigt, gleichzeitig nimmt die

Empfindlichkeit jedoch ab. Der pH-Arbeitspunkt ist also ein Kompromiß; er liegt bei $\text{pH } 10 \pm 0.1$. Dieser Wert wird zu Beginn eines Arbeitstages eingestellt, indem durch Elektrolyse H^+ - bzw. OH^- -Ionen erzeugt werden, je nachdem, ob die Absorptionslösung zu sauer oder zu alkalisch ist.

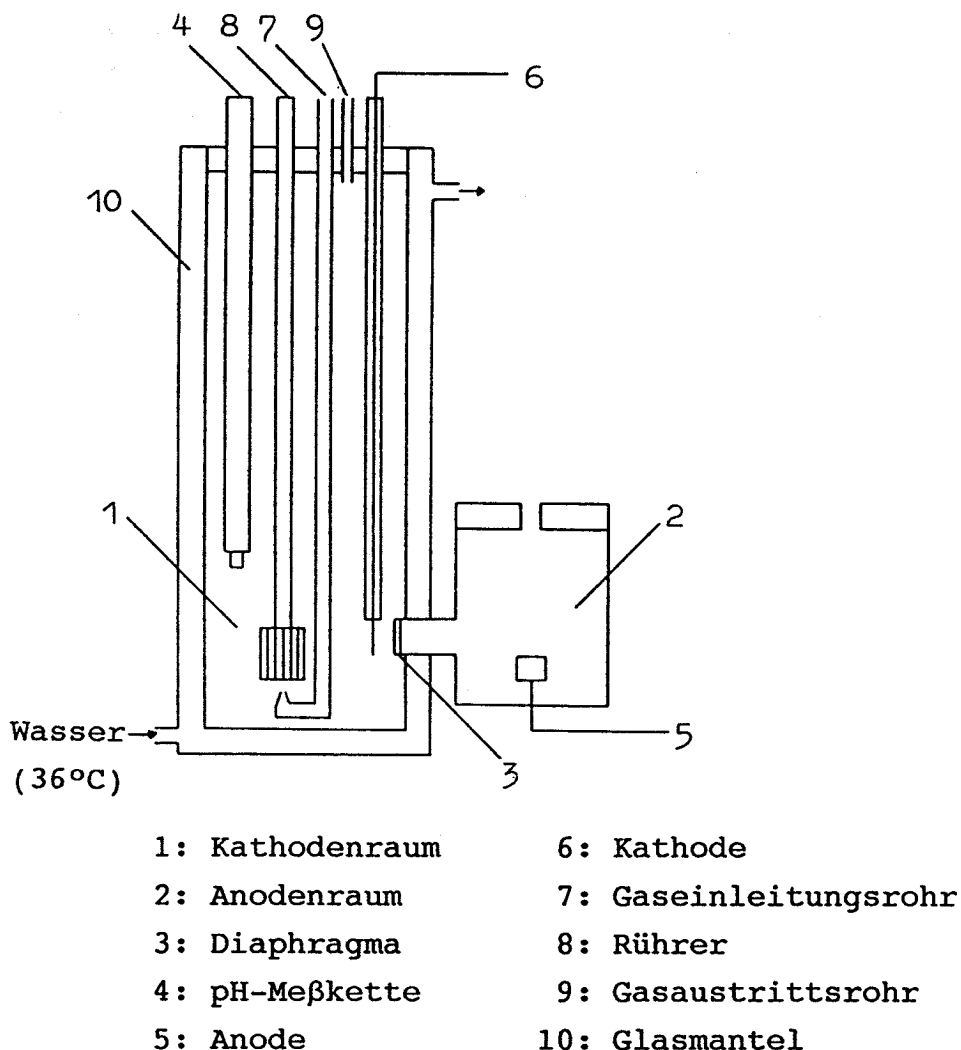


Abb.11: Meßzelle zur coulometrischen Titration von CO_2

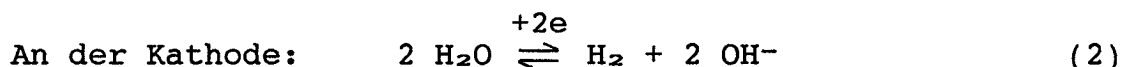
Wichtig ist, daß der einmal eingestellte pH-Wert konstantgehalten wird. Dazu wird der gesamte Kathodenraum auf 36°C gehalten, was durch Zufuhr von thermostatisiertem Wasser in einem Glasmantel (Nr.10) erfolgt.

Der Gasstrom gelangt über das Gaseinleitungsrohr (Nr.7) in die Absorptionslösung und wird durch einen Rührer (Nr.8) in feine Bläschen zerteilt, um eine vollständige Absorption des CO_2 sicherzustellen. Der überschüssige Sauerstoff gelangt über das Austrittsrohr (Nr.9) nach außen.

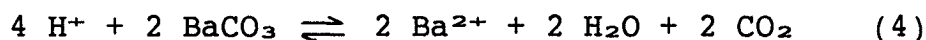
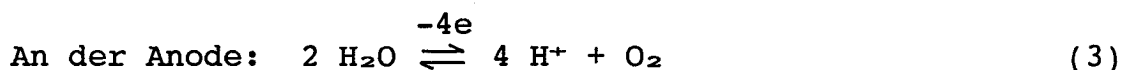
Vor jeder Kohlenstoffbestimmung muß zunächst die Verbrennungszeit über einen Zeitgeber eingestellt werden. Diese vom Analysenproblem abhängende Zeit ist so auszuwählen, daß in der jeweiligen Probe eine vollständige Umsetzung des Kohlenstoffs zu CO_2 gewährleistet ist. Nach Ablauf der Verbrennungszeit beginnt die Titration des absorbierten Kohlendioxides in der gemäß Gleichung 1 zu niedrigeren pH-Werten veränderten Lösung.



Es wird solange elektrolysiert, bis der Ausgangs-pH-Wert wieder erreicht ist. Dabei laufen folgende Reaktionen ab:



Durch die coulometrisch gebildeten OH^- -Ionen wird der pH-Wert wieder ins Alkalische zurückverschoben.



Die erforderlichen Titrationsströme können vorgewählt werden. Dazu ist das Gerät mit zwei Meßeinschüben ausgestattet, von denen einer mit Stromstärken von 10-300 mA, der andere mit Werten von 1-30 mA arbeitet. Die Wahl des Einschubs richtet sich nach der zu bestimmenden CO_2 -Menge.

Zur Ladungsermittlung wird ein Integrationsmotor in eine dem Elektrolysestrom proportionale Umdrehungsgeschwindigkeit

keit gebracht; die Drehzahl wird mit Hilfe einer Lochscheibe in elektrische Impulse überführt, die digital angezeigt werden. Für die Umrechnung auf den Kohlenstoffgehalt gilt:

- "Feiner Einschub": 1 Digit = 20 ng Kohlenstoff
- "Grober Einschub": 1 Digit = 200 ng Kohlenstoff.

Diese Werte gelten, wenn ohne Teilerpumpe gearbeitet wird; werden Anteile des Gasstromes verworfen, so nimmt die Empfindlichkeit proportional dazu ab. Jeder Einschub verfügt über 3 Stromstufen. Der Titrationsstrom wird selbstständig vorgewählt; er richtet sich nach der eingeleiteten CO₂-Menge. Gegen Titrationsende kommt aber in jedem Fall die Feinstufe zum Einsatz, um Übertitrieren zu vermeiden. Eine ständige Kalibrierung des Verfahrens ist zwar nicht nötig, es empfiehlt sich jedoch, gelegentlich die Richtigkeit der Bestimmung durch Analyse von Materialien mit bekanntem Kohlenstoffgehalt zu kontrollieren.

4.5 Voltammetrische Meßverfahren

Die voltammetrischen Messungen wurden mit dem "Polarographic Analyzer" Modell 384 B sowie der Elektrode Modell 303A (stationäre und tropfende Quecksilberelektrode) durchgeführt (EG&G, Princeton Applied Research, Princeton, USA). Als Bezugselektrode diente eine gesättigte Silber/Silberchlorid-Elektrode.

Folgende Meßbedingungen wurden gewählt:

Square-Wave-Voltammetrie, invers (SWASV):

Spannungsvorschub: 200 mV s⁻¹

Impulsfrequenz: 100 s⁻¹

Impulshöhe: 20 mV

Stufenhöhe: 2 mV

Differentielle Pulsvoltammetrie, invers (DPASV):Spannungsvorschub: 5 mV s⁻¹

Impulshöhe: 50 mV

Impulsabstand: 0.4 s

Für beide Verfahren:

Spülen der Meßlösung mit Argon, 1 min

Anreicherungspotentialle:

Zn: -1.2 V

Cd, Pb, Cu: -0.75 V

Anreicherungszeiten:

Algen-Aufschlußlösungen: Zn 10 s

Cd, Pb, Cu 180 s

Leber-Aufschlußlösungen: Zn 10 s

Cd, Pb 180 s

Cu 10 s

Beruhigungszeit nach der Anreicherung: 5 s4.6 Untersuchungen zur Kohlenstoffbilanz4.6.1 Druckaufschluß bei Temperaturen bis zu 200°C

200 mg Leber bzw. 300 mg Algen wurden im 35-ml-PTFE-Gefäß aufgeschlossen. Folgende optimale Bedingungen bezüglich des Kohlenstoffumsatzes wurden ermittelt:

Temperatur: 180°C

Aufschlußzeit: 3 h

Säure: Algen: 1.5 ml 69 %ige Salpetersäure

Leber: 2.0 ml 69 %ige Salpetersäure

Bei Erhöhung der Parameterwerte (Temperatur bis auf 200°C, Aufschlußzeit bis auf 24 h, Säuremenge bis auf 5 ml) wird der Aufschluß bezüglich des Kohlenstoffumsatzes nicht nennenswert weiter verbessert. Die Einflußdiagramme sind den in (22,23) dargestellten Abhängigkeiten ähnlich. Interessant ist hier besonders der Einfluß der Temperatur auf den Restkohlenstoffgehalt⁴⁾ der bei 130°C abgedampften Aufschlußlösungen (Abb.12).

Unter den oben angegebenen Bedingungen erhält man für Algen einen RKG-Wert von 1.10 %, für Leber einen Wert von 3.6 %. Verzichtet man auf das Eindampfen der Aufschlußlösung, so erhält man 2.6 % RKG für Algen, sowie 6.6 % RKG für Leber. Die Werte belegen, daß ein wesentlicher Teil der nach Druckaufschluß vorliegenden organischen Verbindungen bei 130°C flüchtig ist. Ferner fällt auf, daß der Druckaufschluß für Algen vollständiger abläuft als der für Leber, wobei das Verhältnis der Kohlenstoffanteile in leichtflüchtigen und in schwerflüchtigen Verbindungen in beiden Fällen etwa gleich ist. Die resultierenden Aufschlußlösungen sind praktisch farblos und klar, bei Algen bleibt lediglich ungelöstes Silikat zurück.

Um Algen vollständig in Lösung zu bringen, müssen vor dem Druckaufschluß neben 1.5 ml HNO₃ mindestens 0.15 ml 40 %ige Flußsäure zugesetzt werden. Zur Zerstörung des ausfallenden Calciumfluorids und zur Entfernung überschüssiger Flußsäure wurde nach dem Aufschluß bei 130°C zur Trockene eingeeengt, wobei zur vollständigen Abtrennung der Fluorverbindungen vor dem Abrauchen weitere 1.0 ml 69 %ige Salpetersäure zugesetzt wurden.

⁴⁾

$$\text{Restkohlenstoffgehalt} = \frac{\text{Kohlenstoff im Rückstand}}{\text{Kohlenstoff in der Einwaage}} 100 \%,$$

im folgenden mit RKG abgekürzt.

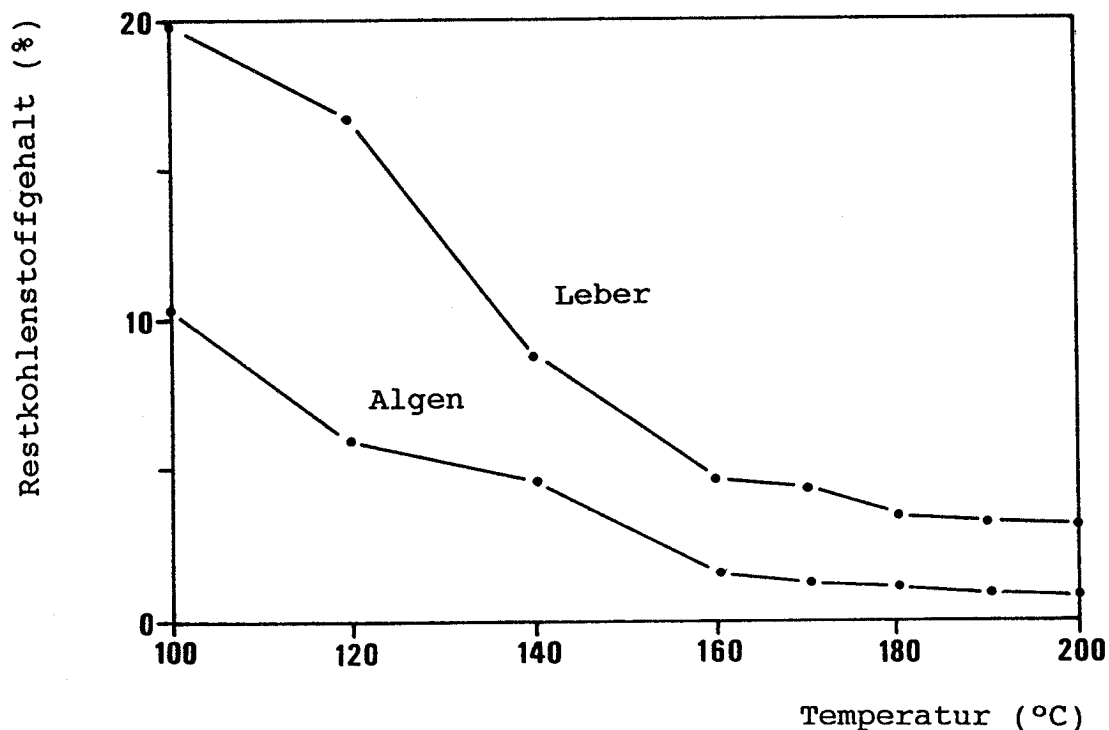


Abb.12: Druckaufschluß; Temperaturabhängigkeit des Restkohlenstoffgehaltes (RKG) im Bereich von 100-200°C (Aufschlußzeit 3 h)

Der verbleibende Rückstand kann anschließend mit 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure und Wasser klar zu 10.0 ml gelöst werden. Die Leberproben wurden - ohne Zusatz von Flußsäure - analog behandelt, um mit den Algen-Aufschlüssen vergleichen zu können. Die Restkohlenstoffgehalte stimmen gut mit den zuvor angegebenen Werten sowie mit denen der UV-Photolyse (Kap.4.3.1.2) überein.

Probenmaterial	Restkohlenstoffgehalt (%)	
	Verbrennung	UV-Photolyse
Algen	1.07	1.18
Leber	3.6	3.6

Tab.2: Vergleich von RKG-Werten nach Druckaufschluß und Abrauchen bei 130°C im PTFE-Gefäß

Nach Aussage der Tabellenwerte ist die UV-Photolyse zumindest für die schwerflüchtigen Stoffe im Aufschlußrückstand quantitativ; ähnliches sollte auch für die leichtflüchtigen Verbindungen gelten, da diese vermutlich aus kleineren Molekülen bestehen. Ferner fällt auf, daß es für die RKG-Werte unerheblich ist, ob die Probe ein- oder zweimal mit HNO_3 abgeraucht wird, da beide Prozesse bei der gleichen Temperatur ablaufen. Auch der Zusatz von Flußsäure hat keinen Einfluß auf den Kohlenstoffumsatz.

Die Streuung des Restkohlenstoffgehaltes nach Aufschluß von Leber und Algen mit sowie ohne Abrauchen des Rückstandes im PTFE-Gefäß wurde an jeweils 5 Ansätzen (insgesamt 20 Aufschlüsse) ermittelt. Dazu wurden aus jeder Aufschlußlösung 5 aliquote Teile zu je 1.0 ml bei 130°C im Porzellanschiffchen abgeraucht und analysiert. Die Werte für die relative Standardabweichung der aus 20 Aufschlüssen je 5 ml wiederholten Kohlenstoffbestimmung liegen zwischen 0.029 und 0.099. Die Reproduzierbarkeit des Aufschlusses selbst ergibt sich aus den Werten für die relative Standardabweichung der aus je 5 Aliquotierungen gebildeten 5 Mittelwerte: Sie liegen im Bereich zwischen 0.024 und 0.035.

4.6.2 Nachbehandlung von Druckaufschluß-Rückständen mit Perchlorsäure

Die Perchlorsäure-Nachbehandlung von Druckaufschluß-Rückständen wurde in Kap.4.2.2 bereits beschrieben. Die zugrundeliegenden Druckaufschlüsse erfolgten unter den in Kap.4.6.1 mitgeteilten Bedingungen. Algen wurden unter Zusatz von 0.15 ml 40 %iger Flußsäure aufgeschlossen. Die Arbeitsparameter wurden im Hinblick auf eine möglichst weitgehende Verminderung der Restkohlenstoffgehalte optimiert. Die RKG-Werte wurden nach Abrauchen der Aufschlußlösung bei 130°C (Verbrennungsschiffchen, Zusatz von NaCl,

vgl. Kap.4.3.1) bestimmt. Folgende optimale Arbeitsbedingungen wurden ermittelt: Temperatur: 180°C; Zeit für die Nachbehandlung: 3 h; Leber: 0.20 ml 70 %ige Perchlorsäure; Algen: 0.25 ml 70 %ige Perchlorsäure. Zur Erfassung auch der flüchtigen Kohlenstoffanteile wurden Kohlenstoffbestimmungen durch UV-Photolyse unmittelbar an nicht eingedampften Aufschlußlösungen durchgeführt. Die RKG-Werte sind gegenüber den nach Abrauchen erhaltenen Ergebnissen nur geringfügig erhöht (Tab.3) und zeigen damit, daß die Rückstände im wesentlichen aus schwerflüchtigen organischen Verbindungen bestehen. Die Streuung des Restkohlenstoffgehaltes und die Reproduzierbarkeit des Aufschlusses wurde entsprechend Kap.4.6.1 ermittelt. Die Werte für die relative Standardabweichung der aus 10 Aufschlüssen je 5 mal wiederholten Kohlenstoffbestimmung liegen zwischen 0.028 und 0.095. Die Werte für die relative Standardabweichung der aus 5 Aliquotierungen gebildeten 5 Mittelwerte (Reproduzierbarkeit des Aufschlusses) liegen in beiden Fällen bei 0.068.

Probenmaterial	Restkohlenstoffgehalt (%)	
	Nach Abrauchen bei 130°C	Unmittelbar in der Lösung
Algen	0.10	0.12
Leber	0.36	0.45

Tab.3: RKG-Werte nach Perchlorsäure-Behandlung von Druckaufschluß-Rückständen

Es fällt auf, daß auch Perchlorsäure unter den hier beschriebenen Bedingungen nicht in der Lage ist, die nach dem Druckaufschluß bei 180°C zurückbleibenden organischen Verbindungen vollständig abzubauen. Gegenüber einem Druckaufschluß mit Salpetersäure kann durch nachfolgende HClO_4 -Behandlung jedoch eine beträchtliche Verringerung des organischen Materials in der Aufschlußlösung erreicht werden.

4.6.3 Druckaufschluß in abgeschmolzenen Ampullen bei Temperaturen bis zu 300°C

20 mg Leber bzw. 30 mg Algen wurden unter Zusatz von 0.2 ml 69 %iger Salpetersäure 1 h (+20 min Aufheizzeit) in abgeschmolzenen Glasampullen mit Hilfe der in Kap.4.2.3.1 beschriebenen Apparatur aufgeschlossen. Die Temperaturabhängigkeit des nach Abrauchen der Lösung im Verbrennungsschiffchen bei 130°C erhaltenen RKG ist in Abb.13 dargestellt. Nach Aufschluß bei 300°C erhält man demnach für beide Materialien Restkohlenstoffgehalte unterhalb der Garantiegrenze für Reinheit ($\text{RKG} \leq 0.04 \%$). Algen erreichen diesen Wert bereits bei etwa 270°C. Weitere Versuche wurden bei 300°C unter den oben angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die nach UV-Photolyse unmittelbar in den Aufschlußlösungen ermittelten RKG-Werte liegen für Algen ebenfalls unterhalb der Garantiegrenze für Reinheit, für Leber bei 0.14 %.

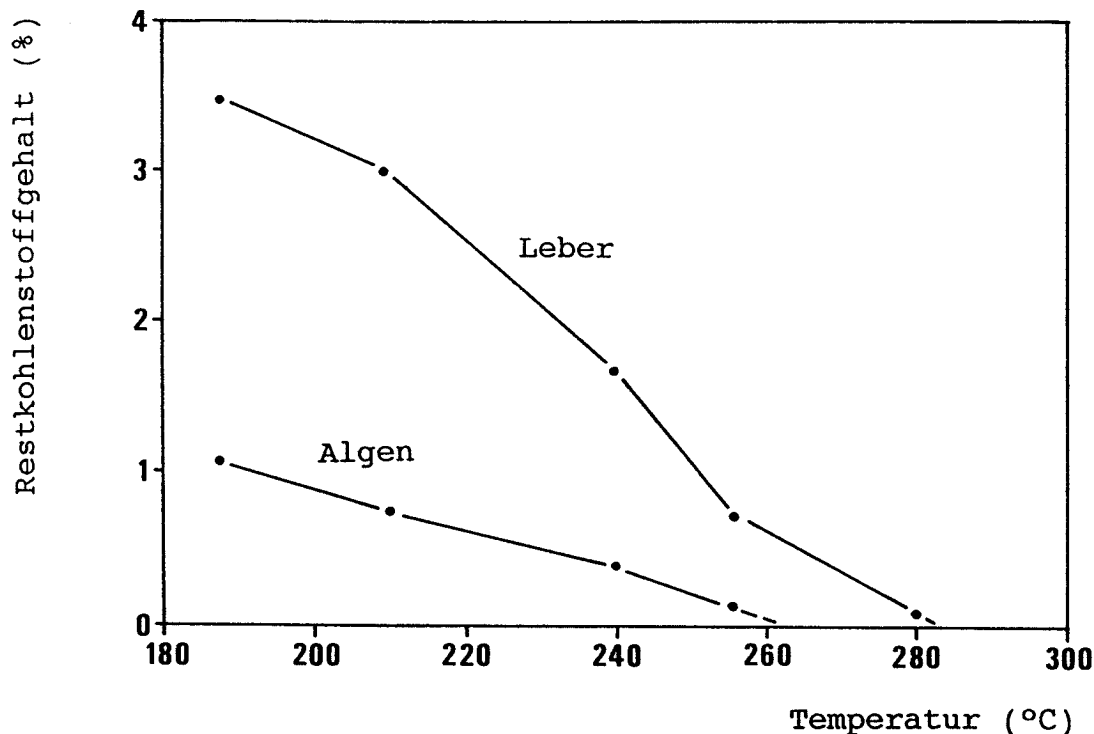


Abb.13: Druckaufschluß; Temperaturabhängigkeit des Restkohlenstoffgehaltes (RKG) im Bereich von 180-300°C (Aufschlußzeit 1 h)

Versuche ergaben, daß diese Ergebnisse auf den von KNAPP (11,35) entwickelten Hochdruckverascher "HPA" (Paar, Graz; Lieferant: Kürner, Rosenheim) übertragbar sind. Mit diesem Gerät können Aufschlüsse bei Temperaturen bis zu 320°C durchgeführt werden. Die von uns bereits publizierten Ergebnisse zeigen (129), daß mit dem Hochdruckverascher praktisch alle biologischen Materialien mit Salpetersäure bis auf RKG-Werte ≤ 0.08 % aufgeschlossen werden können, so daß eine störungsfreie voltammetrische Bestimmung von Zn, Cd, Pb und Cu in der Aufschlußlösung von Leber möglich ist.

Auch nach HASSE et al. ist die störungsfreie inversvoltammetrische Bestimmung von Schwermetallspuren in biologischen Materialien möglich (130); die Autoren verwendeten allerdings neben HNO_3 einen Zusatz von Perchlorsäure. Die in (129) beschriebenen Ergebnisse und die im Rahmen dieser Arbeit (vgl. Kap.4.7.1) gewonnenen Resultate zeigen dagegen, daß Perchlorsäurezusätze unnötig sind, da bei 300°C auch mit Salpetersäure allein ein praktisch vollständiger Abbau biologischer Materialien gelingt.

4.6.4 Einfluß der Einwaage auf den Restkohlenstoffgehalt nach Druckaufschlüssen bei 180°C

Die Versuche wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Aufschlußart:	Druckaufschluß, PTFE-Tiegel, kein Abrauchen
Temperatur:	180°C
Zeit:	3 h
Einwaage:	variiert
Säuremenge:	variiert
Tiegelvolumen:	35 ml
Kohlenstoffbestimmung:	Abrauchen bei 130°C, Verbrennung, coulometrische CO_2 -Titration

Tab.4 enthält die Einwaagen und die zugehörigen Säuremengen für den Aufschluß von Algen sowie die ermittelten Restkohlenstoffgehalte.

Probenein- -waage (mg)	Säurezu- satz (ml)	RKG (%)	Säurezu- satz (ml)	RKG (%)
300	1.50	1.10	-	-
200	1.00	1.11	1.50	1.09
150	0.75	1.10	1.50	1.05
100	0.50	1.37	1.50	1.04
50	0.25	1.74	1.50	1.15
25	0.125	4.1	1.50	2.1

Tab.4: Algen; Einfluß von Einwaage und Säurezusatz auf den Restkohlenstoffgehalt

Verringert man Einwaage und Säuremenge im gleichen Verhältnis, so steigt der RKG unterhalb von etwa 100 mg deutlich an. Hält man dagegen die Säuremenge bei 1.50 ml konstant, so beobachtet man einen entsprechenden Anstieg erst bei deutlich geringeren Einwaagen. Einen analogen Befund erhält man auch bei Leber als Probenmaterial; unterschiedlich ist nur die Höhe des jeweiligen RKG-Wertes. Beispielsweise werden 200 mg Leber mit 2.0 ml Salpetersäure zu einem RKG-Wert von 3.6 % aufgeschlossen, 67 mg mit 0.67 ml Salpetersäure jedoch zu RKG = 6.0 %.

Als Erklärung wird angenommen, daß mit abnehmender Proben-
einwaage der Druck im Aufschlußgefäß abnimmt. Wie im fol-
genden noch gezeigt wird, kann die bei sinkendem Gesamt-
druck abnehmende Konzentration an NO_2 in der flüssigen
Phase für die Verschlechterung des Aufschlusses verant-
wortlich gemacht werden. Unklar bleibt jedoch, warum der
Aufschluß bei Verringerung der Einwaage, aber unter Beibe-

halten des Säurevolumens, erst mit kleineren Probenmengen schlechter wird. Vermutlich wird fehlendes NO_2 hier durch den hohen Salpetersäure-Überschuß teilweise ersetzt. Der Einfluß von Stickstoffdioxid beim Aufschluß organischer Materialien mit Salpetersäure läßt sich nachweisen, wenn man bei sonst gleichen Arbeitsbedingungen Aufschlußgefäße von unterschiedlichem Volumen verwendet (Tab.5).

Probenmaterial	Säurezusatz (69 %ige HNO_3)	Aufschlußtiegel	RKG (%)
Algen, 67 mg	0.33 ml	35 ml	2.4
Algen, 67 mg	0.33 ml	11.5 ml	1.05
Algen, 200 mg	1.0 ml	35 ml	1.11
Leber, 67 mg	0.67 ml	35 ml	6.0
Leber, 67 mg	0.67 ml	11.5 ml	3.6
Leber, 200 mg	2.0 ml	35 ml	3.6

Tab.5: Druckaufschluß; Abhängigkeit des RKG-Wertes vom Gefäßvolumen

Reduziert man Probeneinwaage und Säurezusatz jeweils auf $1/3$, hält das Gefäßvolumen von 35 ml aber bei, so folgt die oben genannte Aufschlußverschlechterung. Verringert man jedoch gleichzeitig auch das Gefäßvolumen um denselben Betrag, so bleibt der Innendruck unverändert und man erhält die optimalen RKG-Werte zurück.

Zur weiteren Bestätigung wurde der nach $3 \text{ "C"} + 4 \text{ HNO}_3 \rightarrow 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ NO}$ zu erwartende Reaktionsdruck (ideales Verhalten vorausgesetzt) durch Zusatz leicht verdampfbarer Verbindungen erhöht. Folgende Stoffe wurden zugesetzt:

CO₂ als Trockeneis, etwa 700 mg

C₂F₄Cl₂, d = 1.5 (Herstellerangabe), 1.8 ml (pipettieren bei -20°C) NO₂, d = 1.4905 (131), 0.5 ml (pipettieren als N₂O₄ bei 0°C (132))

67 mg Probenmaterial wurden dazu im 35-ml-Tiegel mit 0.33 ml (bei Algen) bzw. 0.67 ml 69 %iger Salpetersäure (bei Leber) zu folgenden RKG-Werten aufgeschlossen:

	CO ₂ -Zusatz	C ₂ F ₄ Cl ₂ -Zusatz	NO ₂ -Zusatz
Algen	2.6 %	2.3 %	0.67 %
Leber	5.9 %	4.8 %	2.7 %

Tab.6: RKG-Werte nach Zusatz verschiedener Gase zum Druckaufschluß

Wie die Werte zeigen, führt eine Erhöhung des Druckes durch CO₂ zu keiner Verbesserung des Aufschlusses; da CO₂ jedoch als Reaktionsprodukt an einem thermodynamischen Gleichgewicht beteiligt sein kann, wurde C₂F₄Cl₂ als Inertgas zugesetzt. Jedoch konnte auch hier eine Verbesserung des Aufschlusses nicht erzielt werden. C₂F₄Cl₂ ist unter den Bedingungen des Druckaufschlusses stabil. Dies kann daran erkannt werden, daß unmittelbar nach dem Öffnen des abgekühlten Aufschlußgefäßes eine zweite, aus kondensiertem C₂F₄Cl₂ bestehende flüssige Phase vorliegt, die dann aber innerhalb weniger Sekunden verdampft.

Erst der Zusatz von NO₂ führt zu einer Verbesserung der Aufschlüsse. Aufgrund der sehr hohen NO₂-Konzentration werden die bisherigen optimalen RKG-Werte von 1.1 % (bei Algen) bzw. 3.6 % (bei Leber) sogar deutlich unterschritten. Durch Zusatz von Salpetersäure ist eine solche Verbesserung nicht zu erreichen. Dieses Experiment zeigt deutlich, daß dem Stickstoffdioxid beim Druckaufschluß biolo-

gischer Materialien eine besondere Funktion zukommt. Schließlich kann der Aufschluß von 67 mg Algen bzw. Leber unter den Bedingungen der Tab.5 (35-ml-Aufschlußtiegel) auch dadurch auf RKG-Werte von 1.03 bzw. 3.2 % verbessert werden, daß die Aufschlußzeit auf 24 h verlängert wird. Die Aufschlußreaktion wird also vermutlich kinetisch beeinflusst: Bei abnehmender Stickstoffdioxid-Konzentration laufen die Reaktionen zwar ab, sind jedoch deutlich verlangsamt. Für die Praxis folgt aus diesen Untersuchungen, daß ein Verhältnis von Probeneinwaage (bezogen auf C) zu Tiegelvolumen von etwa 1.4 - 2.8 mg C/ml eingehalten werden sollte, um innerhalb von 3 h einen optimalen Aufschluß zu erreichen. Ferner folgt aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen, daß bei undichten Aufschlußsystemen, aus denen NO_2 entwichen ist, mit einer Verschlechterung des Kohlenstoffumsatzes gerechnet werden muß.

4.7 Voltammetrische Untersuchungen

4.7.1 Voltammetrische Untersuchungen an Aufschlußlösungen von Algen und Leber

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dem Einfluß organischer Aufschlußrückstände auf die Signale von Zn, Cd, Pb und Cu bei ihrer Bestimmung durch inverse Square-Wave-Voltammetrie (SWASV). Zur Vorbereitung der Proben siehe Kap.4.3.2; die Meßparameter enthält Kap.4.5. Die Ergebnisse von Vergleichsmessungen durch Differential-Puls-Inversvoltammetrie (DPASV) werden hier im Einzelnen nicht mit aufgeführt, da sie qualitativ mit denen der SWASV übereinstimmen. Zunächst kann vorweggenommen werden, daß die Auflösungspotentiale der Metallionen durch organische Stoffe oder durch gelöste Stickoxide allenfalls um Werte ≤ 20 mV verschoben werden. Dies gilt für alle in dieser Arbeit durchgeführten Metallbestimmungen. Lediglich die Art und die Konzentration der aus den Aufschlußlösungen herrühren-

den und als Leitelektrolyt dienenden Säure haben Einfluß auf die Potentiallage der Schwermetallsignale. Tab.7 gibt eine Übersicht über die in verschiedenen Lösungen gemessenen Potentiale. Dazu wurden aus der zu 10.0 ml aufgefüllten Aufschlußlösung jeweils 1.0 ml entnommen und zur Messung mit 5.0 ml Wasser versetzt.

Aufschlußlösung	Potential (mV) vs. ges. Ag/AgCl			
	Zn	Cd	Pb	Cu
0.2 ml 70 %ige HClO_4 /10 ml	-968	-564	-348	+103
0.5 ml 69 %ige HNO_3 /10 ml	-980	-562	-369	+45
1.25 ml 69 %ige HNO_3 /10 ml	-994	-582	-394	+22

Tab.7: SWASV; Potentiale der Schwermetallsignale in verschiedenen Lösungen

In der DPASV liegen alle Potentiale gegenüber der SWASV um 40 ± 6 mV negativer. Zum Vergleich wurden wäßrige Modell-Lösungen hergestellt, die in den Metallionenkonzentrationen und Aciditäten den Aufschlußlösungen entsprachen. Die Elementbestimmungen wurden mit Hilfe der Standard-Additionsmethode anhand wäßriger Spurenlösungen kalibriert. Für die Aufnahme der Voltammogramme wurden jeweils 1.0 ml der im folgenden angegebenen Lösungen zu 6.0 ml Meßvolumen mit Wasser ergänzt.

1. Algen
- a) Modell-Lösung: 0.2 ml HClO_4 /10 ml
 - b) Modell-Lösung: 0.5 ml HNO_3 /10 ml
 - c) Druckaufschluß bei 180°C unter Flußsäure-Zusatz, Abrauchen bei 130°C im PTFE-Gefäß, Aufnehmen mit 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure, ergänzen mit Wasser zu 10.0 ml

- d) Druckaufschluß bei 180°C mit Flußsäure-Zusatz,
Perchlorsäure-Nachbehandlung, Rest-Säure:
0.2 ml HClO_4 /10 ml

Beim Aufschluß von Algen bleiben in beiden Fällen Silikate zurück, die nur mit Flußsäure nach Abrauchen der Aufschlußlösung entfernt werden können.

2. Leber
- a) Modell-Lösung: 0.2 ml HClO_4 /10 ml
 - b) Modell-Lösung: 0.5 ml HNO_3 /10 ml
 - c) Druckaufschluß bei 180°C, Abrauchen bei 130°C im PTFE-Gefäß, Aufnehmen mit 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure, ergänzen mit Wasser zu 10.0 ml
 - d) Druckaufschluß bei 180°C, Perchlorsäure-Nachbehandlung, Rest-Säure: 0.2 ml HClO_4 /10 ml

Zusätzlich wurden folgende Lösungen untersucht:

- e) Modell-Lösung: 1.25 ml HNO_3 /10 ml⁵⁾
- f) Druckaufschluß bei 180°C ohne Abrauchen, Rest-Säure: 1.25 ml HNO_3 /10 ml
- g) Aufschluß von 20 mg Leber bei 300°C (Quarz-ampulle), Abrauchen bei 130°C und quantitative Überführung in die Meßzelle (Säure: 0.05 ml HNO_3 /6 ml, Acidität entsprechend Lösungen 2 b und c)

Die Voltammogramme von Modell- und Aufschlußlösungen sind in den Abb.14-24 dargestellt.

⁵⁾Dies entspricht der Acidität einer Leber-Aufschlußlösung, bei der die Säure nicht abgeraucht wurde: Von 2 ml zugesetzter Salpetersäure bleiben 1.25 ml zurück

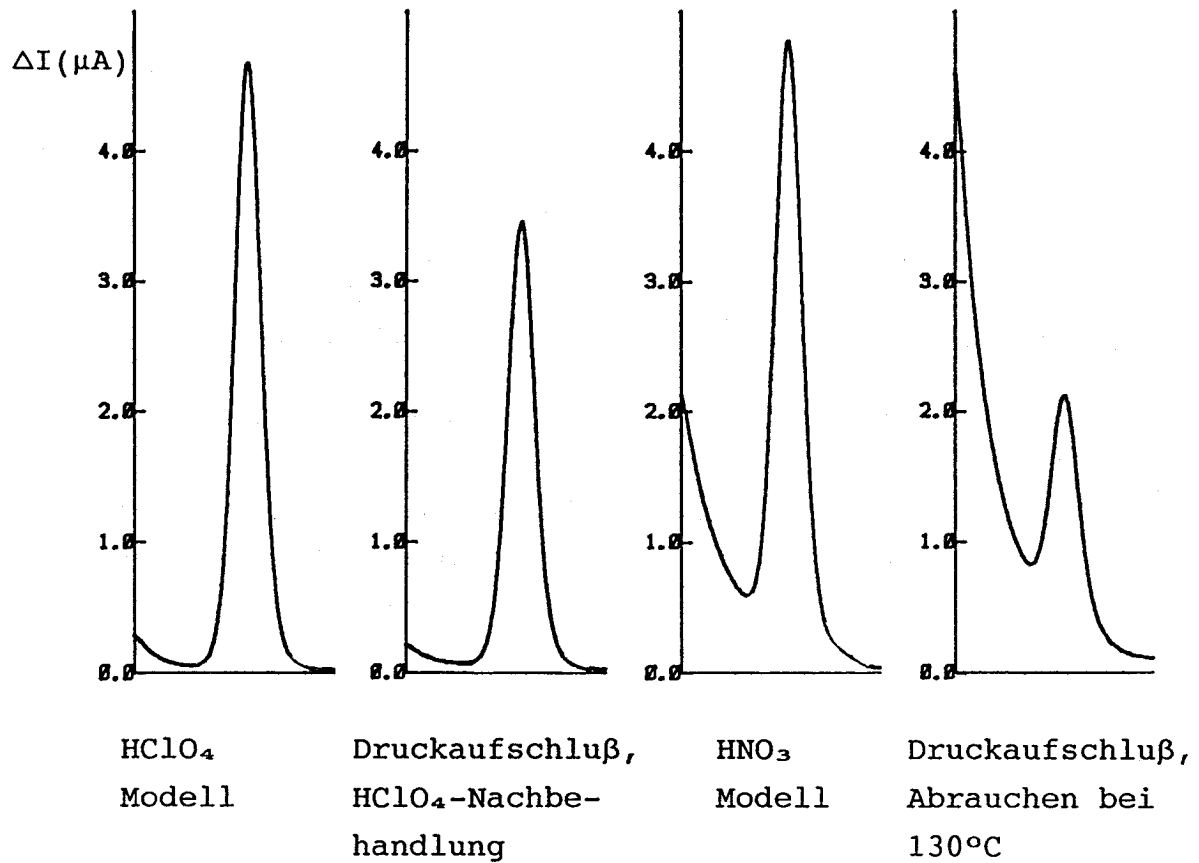


Abb.14: Algen; Zn-Signale der Aufschluß- und Modell-Lösungen (-1.2 → -0.8 V)

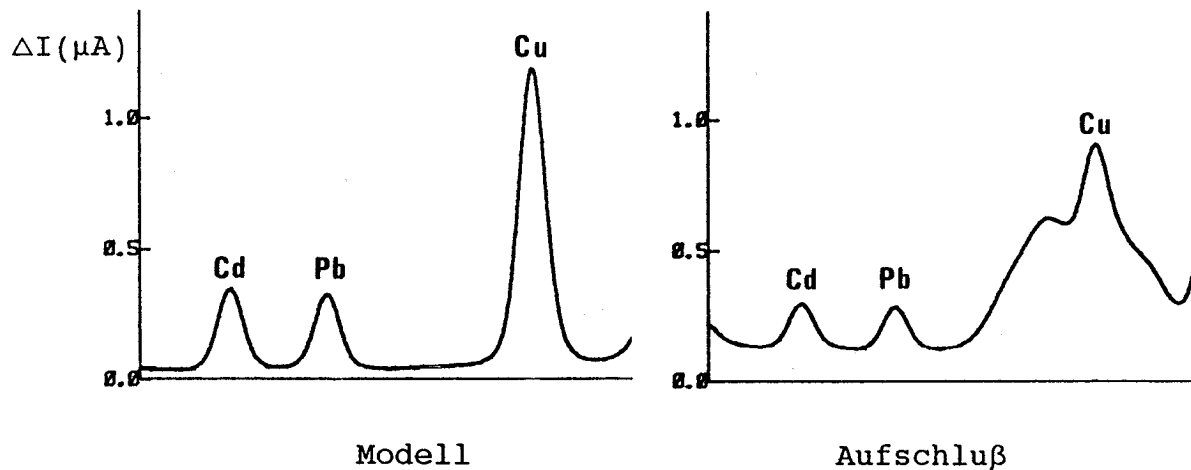


Abb.15: Algen; Signale für Cd, Pb und Cu nach Druckaufschluß und Abrauchen; Vergleich mit Modell-Lösung (-0.75 → 0.25 V)

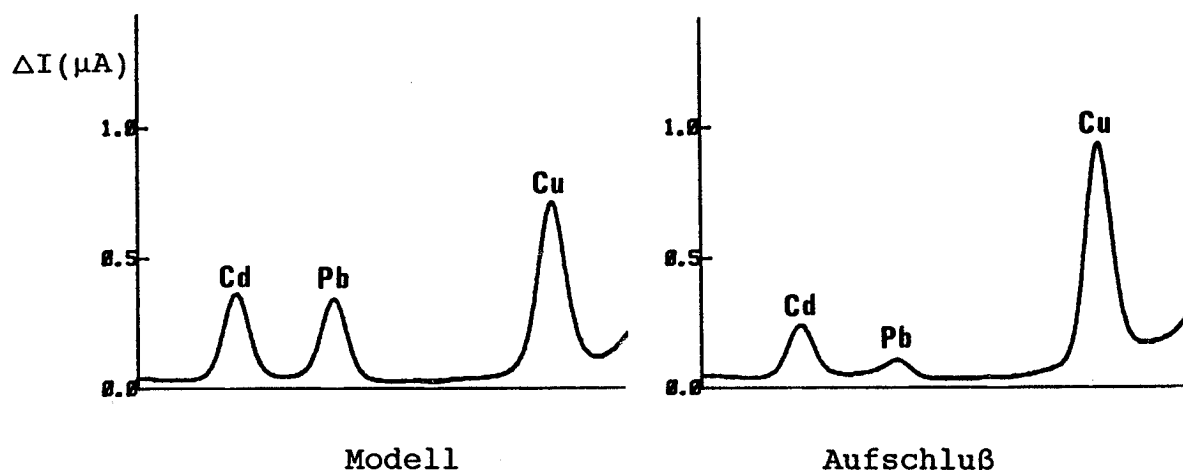


Abb.16: Algen; Signale für Cd, Pb und Cu nach Behandlung eines Druckaufschluß-Rückstandes mit Perchlorsäure; Vergleich mit Modell-Lösung (-0.75 → 0.25 V)

Charakterisierung der Voltammogramme von Algen-Aufschluß-lösungen

1. Zink

Signale und Grundstrom:

- deutliche Signaldepression beim Perchlorsäure-Aufschluß gegenüber der Modell-Lösung, aber unveränderter Strom durch Wasserstoffabscheidung bei -1.2 V;
 - starke Signaldepression beim Druckaufschluß verbunden mit einer beträchtlichen Erhöhung des Wasserstoffstromes bei -1.2 V, verursacht durch organische Stoffe.
- Das Signal/Untergrund-Verhältnis wird durch beide Störeinflüsse verschlechtert.

Analysenergebnisse:

- Die Zink-Bestimmung in den Aufschlußlösungen führt zum richtigen Ergebnis.

2. Cadmium, Blei und Kupfer

Grundstrom:

- Druckaufschluß und Abrauchen: stark erhöhter Grundstrom, verursacht durch organische Rückstände;
- Perchlorsäure-Nachbehandlung: vergleichbar mit der Basislinie im Voltammogramm der Modell-Lösung.

Störsignale:

- Nach Druckaufschluß (Abb.15) ist ein intensives Störsignal zu erkennen;
- Das Voltammogramm nach Perchlorsäure-Behandlung (Abb.16) ist störungsfrei.

Signale:

- Bei Cd und Pb erhält man in beiden Fällen eine Signaldepression, beim Cu nur nach Druckaufschluß ohne Perchlorsäure-Nachbehandlung. Die Erhöhung des Cu-Signals nach Perchlorsäure-Behandlung ist auf Reste an Salpetersäure in der Meßlösung zurückzuführen, die zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit führt. Ursache ist also ein Einfluß des Anions, nicht der Acidität, wie auch durch Vergleich der Voltammogramme der Modell-Lösungen deutlich wird.

Analysenergebnisse:

- Die Bestimmung von Cd führt in beiden Fällen, die von Cu nur nach Perchlorsäure-Behandlung, die von Pb nur beim Druckaufschluß ohne Perchlorsäure-Nachbehandlung, zum richtigen Ergebnis. Cu kann nach Druckaufschluß aufgrund des erwähnten Störsignals nicht bestimmt werden. Das Bleisignal nach Perchlorsäure-Behandlung entspricht nur etwa einem Drittel des zu erwartenden Bleigehaltes der Probe, obwohl das Signal ungestört ist. Analysiert man unmittelbar nach dem Aufschluß, so erhält man ein um 15 % vermindertes Pb-Signal. Der Gehalt der Lösung an voltammetrisch erfaßbarem Pb nimmt innerhalb von 3 Tagen

jedoch kontinuierlich bis auf 1/3 seines Wertes ab und bleibt danach über Monate unverändert. Die Ursache ist vermutlich in einer chemischen Reaktion der Pb-Ionen mit anorganischen Bestandteilen der Aufschlußlösung zu suchen; bei vergleichbaren Leber-Lösungen wurden entsprechende Vorgänge nicht beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die nach Druckaufschluß mit Abrauchen der Lösung verbleibenden organischen Stoffe (Restkohlenstoffgehalt 1.1 %) deutlich Störungen bei der Elementbestimmung verursachen. Nach Behandlung des Rückstandes mit Perchlorsäure (RKG 0.12 %) sind die Störungen behoben.

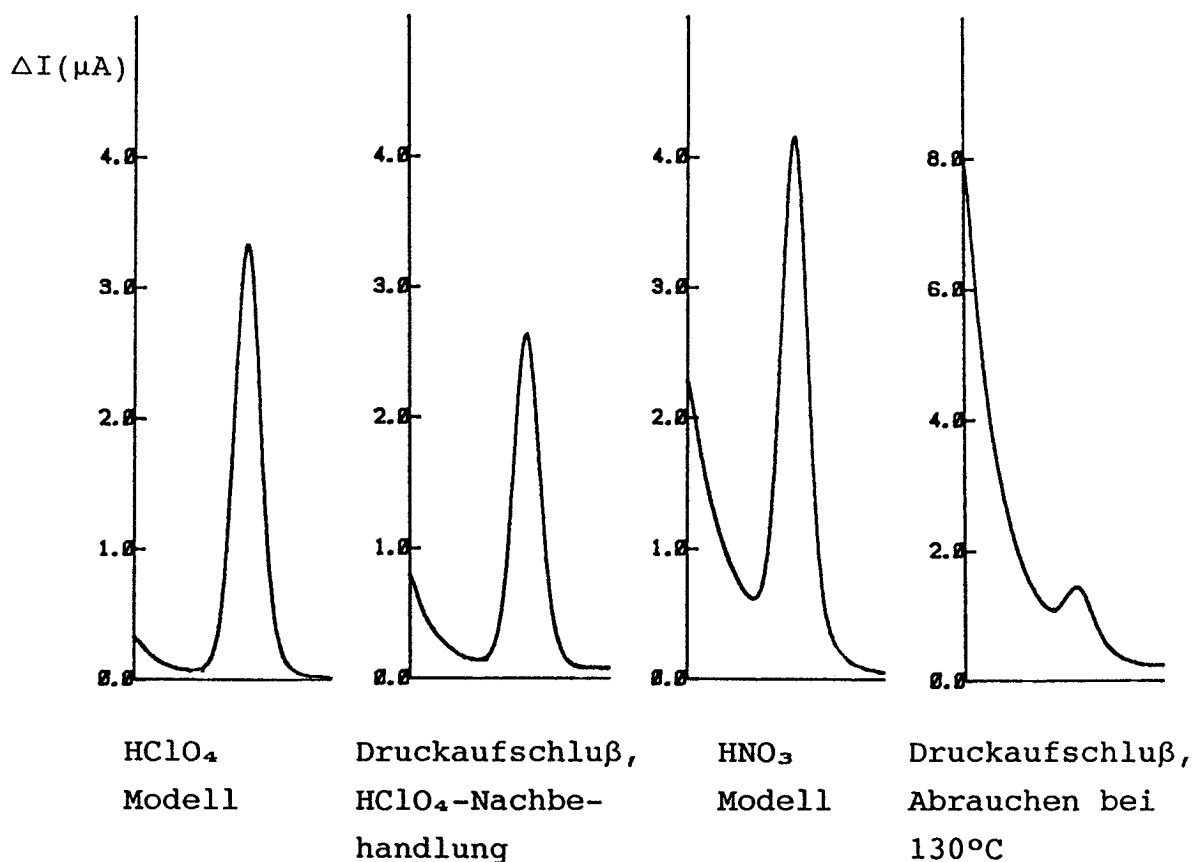


Abb.17: Leber; Zn-Signale der Aufschluß- und Modell-Lösungen (-1.2 → -0.8 V)

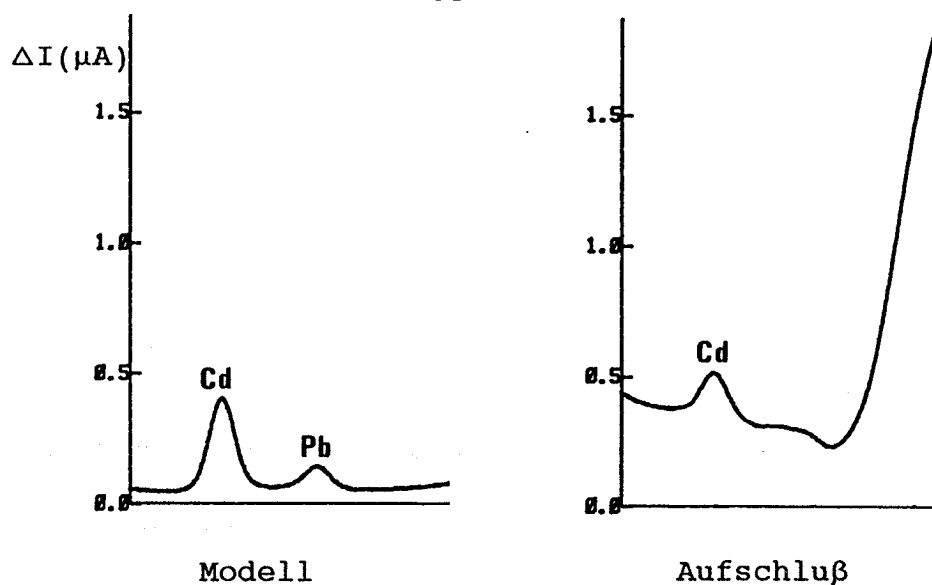


Abb.18: Leber; Signale für Cd und Pb nach Druckaufschluß und Abrauchen; Vergleich mit Modell-Lösung ($-0.75 \rightarrow -0.1$ V)

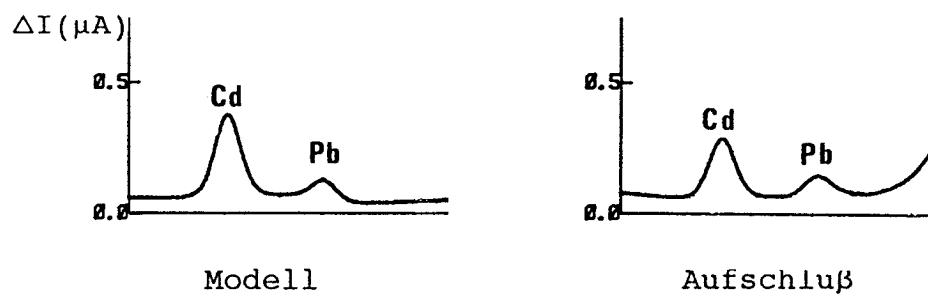


Abb.19: Leber; Signale für Cd und Pb nach Behandlung eines Druckaufschluß-Rückstandes mit Perchlorsäure; Vergleich mit Modell-Lösung ($-0.75 \rightarrow -0.1$ V)

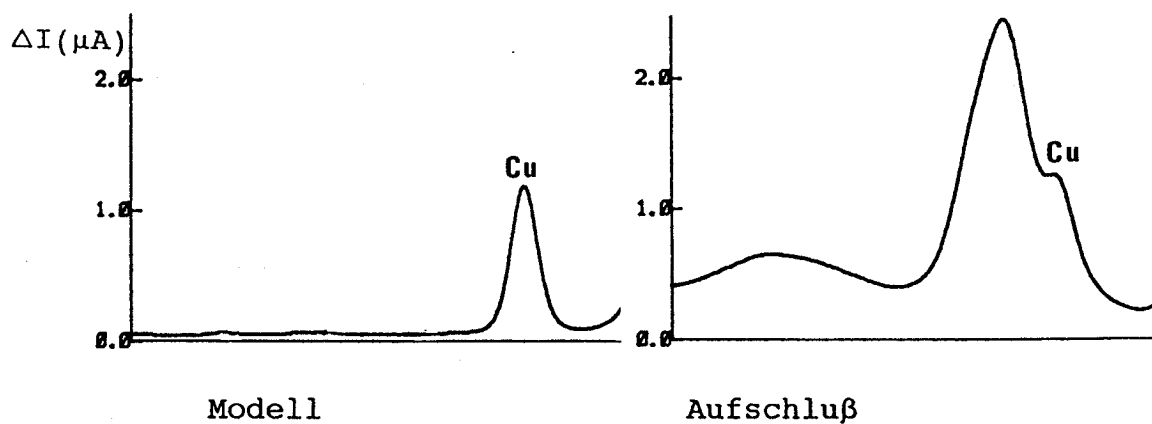


Abb.20: Leber; Cu-Signal nach Druckaufschluß und Abrauchen; Vergleich mit Modell-Lösung ($-0.75 \rightarrow 0.25$ V)

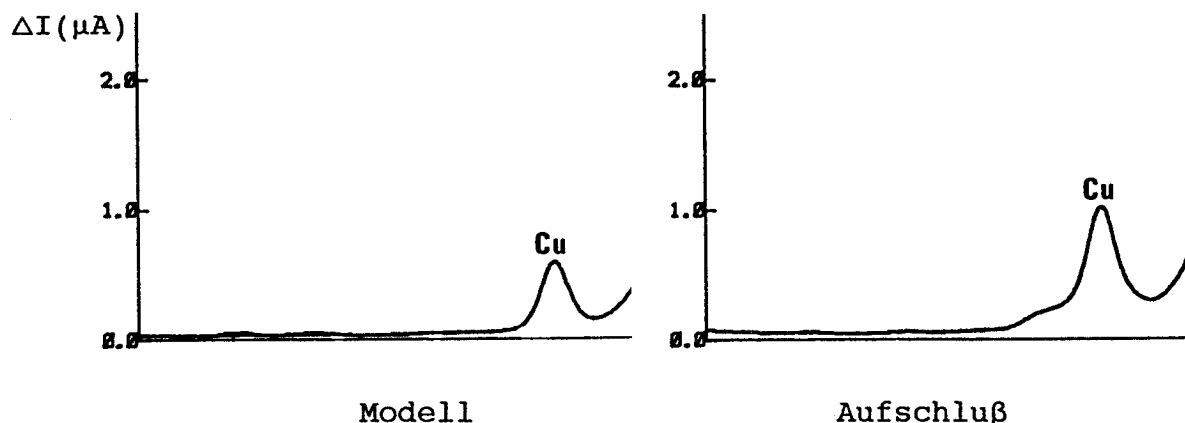


Abb.21: Leber; Cu-Signal nach Behandlung eines Druckaufschluß-Rückstandes mit Perchlorsäure; Vergleich mit Modell-Lösung ($-0.75 \rightarrow 0.25$ V)

Charakterisierung der Voltammogramme von Leber-Aufschlußlösungen

1. Zink

Bei der Zn-Bestimmung werden die gleichen Störungen beobachtet, wie sie bei den Voltammogrammen der Algen (vgl. S. 61) beschrieben wurden. Zusätzlich fällt auf, daß der Wasserstoffstrom bei -1.2 V sowohl nach der Perchlorsäure-Behandlung als auch nach Druckaufschluß und Abrauchen wegen des gegenüber Algen erhöhten Restkohlenstoffgehaltes höher ausfällt als bei vergleichbaren Algen-Aufschlüssen.

Analysenergebnisse:

- Die Zn-Bestimmung führt in beiden Lösungen zum richtigen Ergebnis, sie ist aber für die allein durch Druckaufschluß erhaltenen Rückstände aufgrund des gegenüber Algen deutlich verschlechterten Signal/Untergrund-Verhältnisses ungenau.

2. Cadmium und Blei

Grundstrom:

- Druckaufschluß und Abrauchen: stark erhöhter Grundstrom, verursacht durch organische Rückstände;
- Perchlorsäure-Nachbehandlung: vergleichbar mit der Basislinie im Voltammogramm der Modell-Lösung.

Störsignale:

- Druckaufschluß mit Abrauchen des Rückstandes: Es entsteht, wie bei Algen, ein Störsignal, das unmittelbar hinter dem Pb-Signal beginnt.
- Perchlorsäure-Nachbehandlung: Unmittelbar hinter dem Pb-Signal liegt ein durch eine organische Komponente hervorgerufenen, sehr intensitätsschwaches Störsignal (vgl. Cu-Voltammogramm).

Signale:

- Für Cd und Pb tritt, wie auch bei Algen, eine leichte Signaldepression auf. Nach Druckaufschluß mit nachfolgendem Abrauchen bei 130°C ist das Pb-Signal durch das benachbarte Störsignal so stark verzerrt, daß die Auswertung unmöglich ist.

Analysenergebnisse:

- Die Bestimmung von Cd führt in beiden Fällen, die von Pb nur im Anschluß an eine Perchlorsäure-Behandlung zum richtigen Ergebnis. Nach Druckaufschluß ohne Nachbehandlung des Rückstandes mit HClO_4 ist eine Bleibestimmung nicht möglich.

3. Kupfer

Um mit den Voltammogrammen der Algen-Rückstände vergleichen zu können, wurde zur Cu-Bestimmung eine Anreicherungszeit von nur 10 s gewählt, so daß etwa gleiche Cu-Mengen am

Quecksilbertropfen abgeschieden wurden. Die Intensität der Pb- und Cd-Signale ist in diesen Voltammogrammen deshalb nur gering.

Grundstrom:

- Vergleichbar den Voltammogrammen von Cd und Pb.

Störsignale:

- Nach Druckaufschluß und Abrauchen bei 130°C sind im Voltammogramm Störsignale bei etwa -0.55 und bei -0.05 V zu erkennen. Das zweite, sehr intensive Signal verhindert eine Cu-Bestimmung. Es tritt bei Algen ebenfalls an dieser Stelle auf, während das erste, schwächere Signal bei Algen zwar vorhanden ist, aufgrund der langen Anreicherungszeit durch die Signale von Cd und Pb aber überlagert wird.
- Durch Perchlorsäure-Behandlung des Rückstandes wird die organische Matrix zwar weitgehend zerstört (RKG-Wert 0.45 %), unmittelbar neben dem Cu-Signal ist jedoch noch ein kleines Störsignal zu erkennen, das die Bestimmung des Kupfers aber nicht beeinträchtigt. Dabei ist zu beachten, daß das Cu-Signal bei Verlängerung der Anreicherungszeit intensiver wird, während die Intensität des Störsignals davon unabhängig ist.

Analysenergebnisse:

- Die Cu-Bestimmung nach Druckaufschluß ist nicht möglich; nach Behandlung mit Perchlorsäure führt die Analyse zum richtigen Gehalt.

Die Ergebnisse der voltammetrischen Untersuchungen an Algen- und Leber-Rückständen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Nach Druckaufschluß bei 180°C mit nachfolgendem Abrauchen bei 130°C treten in den Voltammogrammen der Algen- und der Leber-Aufschlußlösungen zwei in der Potentiallage identische Störsignale auf; das Signal der Algen-Lösung (RKG 1.1 %) ist dabei niedriger als das der

Leber-Lösung (RKG 3.6 %). Analoges gilt für die Wasserstoffabscheidung in beiden Lösungen bei -1.2 V. Aufgrund der Störsignale ist die Cu-Bestimmung unmöglich, Pb und Cd können jedoch, abhängig von ihrer Konzentration und von der Intensität der Störsignale, in vielen Fällen noch bestimmt werden. Die Zink-Bestimmung wird durch Wasserstoffentwicklung erschwert, ist jedoch möglich. Die geringfügige Signaldepression bei Pb und Cd ist ohne wesentliche Bedeutung. Lediglich das Zn-Signal wird bei Algen um 56 %, bei Leber um 78 % gegenüber der Modell-Lösung vermindert. Auch hier macht sich der höhere Kohlenstoffgehalt der Leber-Aufschlußlösung bemerkbar.

Nach Behandlung der Rückstände mit Perchlorsäure erhält man problemlos auswertbare Voltammogramme, die keine (Algen; RKG 0.12 %) bzw. nur schwache Störsignale (Leber; RKG 0.45 %) enthalten.

Mit Leber als Probenmaterial wurde weiterhin der Einfluß flüchtiger Komponenten auf die Voltammogramme der Elementspuren untersucht. Abb.23 enthält die Voltammogramme einer Aufschlußlösung, die nach Druckaufschluß bei 180°C ohne abzurauchen erhalten wurde (RKG 6.6 %, gelöste Stickoxide, Rest-Säure: 1.25 ml HNO_3 /10 ml).

Die Voltammogramme einer Modell-Lösung von gleicher Acidität sind in Abb.22 aufgeführt. Vergleicht man die Voltammogramme dieser Lösung mit denen der Modell-Lösung, die lediglich 0.5 ml Salpetersäure in 10 ml Gesamtvolumen enthält (Abb.17,19,21), so fällt auf, daß das Cu-Signal infolge der höheren Salpetersäure-Konzentration verstärkt, das Signal/Untergrund-Verhältnis beim Zink durch den hohen Wasserstoffstrom jedoch deutlich verschlechtert ist.

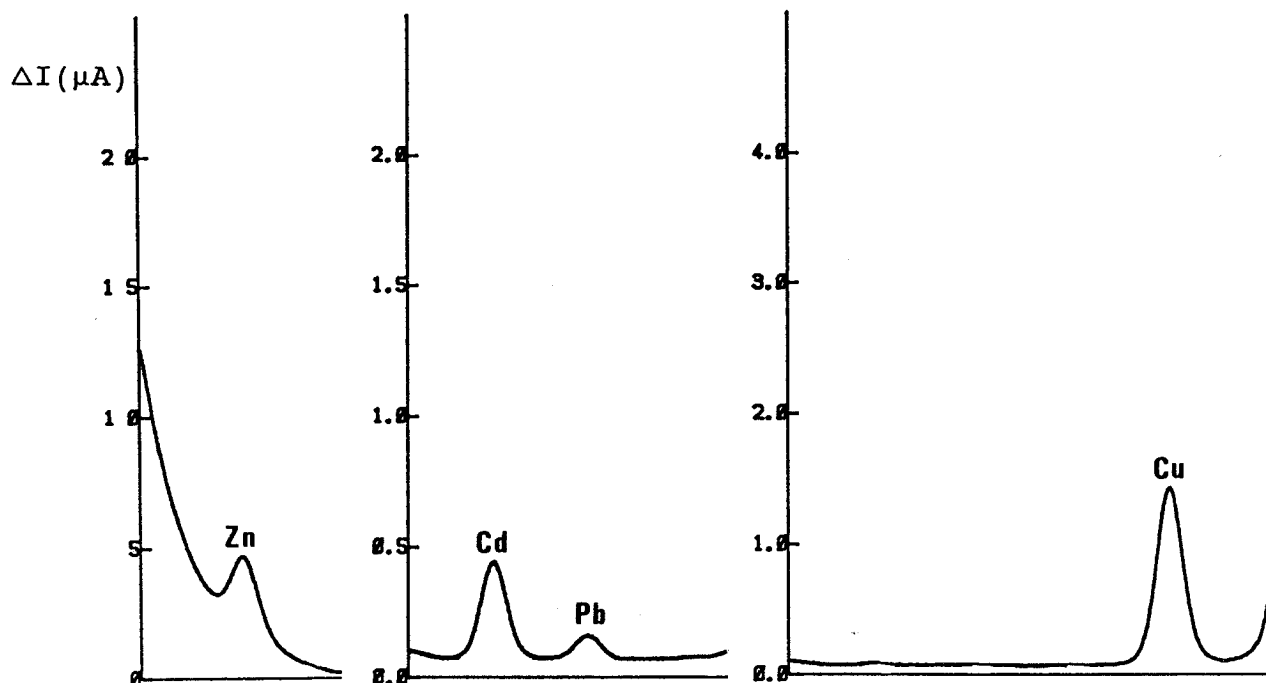


Abb.22: Voltammogramme einer Modell-Lösung (Leber) mit
1.25 ml 69 %iger Salpetersäure in 10 ml
(-1.2 $\rightarrow$ -0.8; -0.75 $\rightarrow$ -0.1; -0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

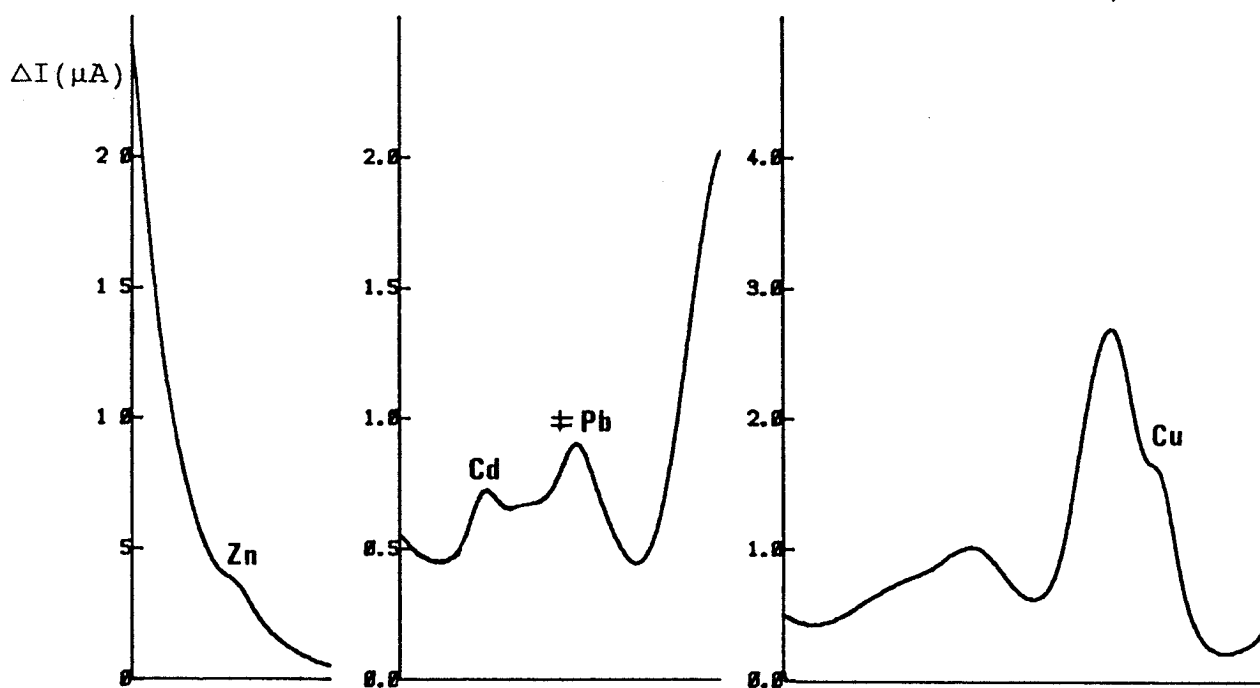


Abb.23: Leber; Voltammogramme nach Druckaufschluß bei 180°C
ohne Abbrauchen des Rückstandes
(-1.2 $\rightarrow$ -0.8; -0.75 $\rightarrow$ -0.1; -0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

Die Voltammogramme der nicht abgerauchten Aufschlußlösung von Leber (Abb.23) zeigen gegenüber denen der zugehörigen Modell-Lösung (Abb.22) sowie im Vergleich zu den Untersuchungen an abgerauchten Leber-Rückständen (Abb.17,18,20) einen durch flüchtige organische Stoffe deutlich erhöhten Wasserstoffstrom. Ebenfalls erhöht ist der Grundstrom, verursacht durch gelöste Stickoxide. Das Störsignal bei -0.55 V wird durch ein zusätzliches Signal bei -0.35 V überlagert. Unverändert bleibt hingegen die Störung bei -0.05 V. Das Signal bei -0.35 V wird durch flüchtige organische Stoffe verursacht (vgl. Kap.5). Insgesamt kann keines der vier untersuchten Elemente ohne Abrauchen des Rückstandes bestimmt werden. Der Aufschluß bei 300°C liefert hingegen gut auswertbare Voltammogramme, wenn die Lösung bei 130°C zur Trockene abgeraucht und mit Salpetersäure und Wasser in die Meßzelle überführt wird (Abb.24).

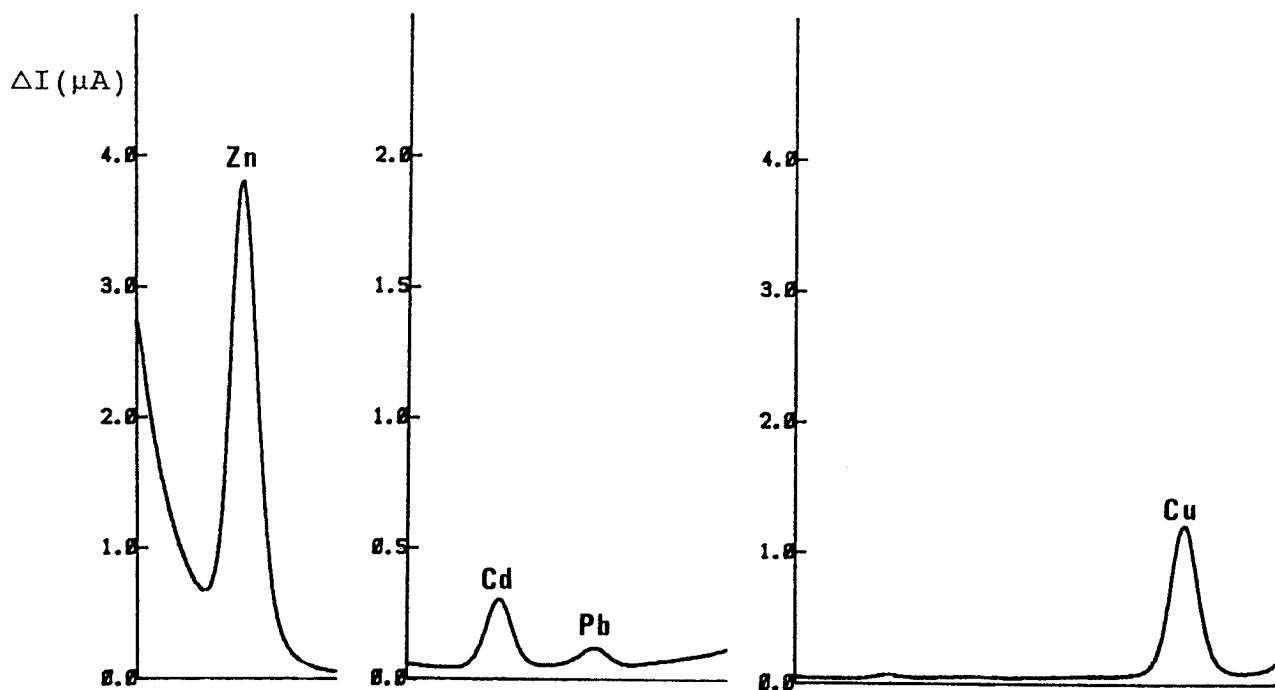


Abb.24: Leber; Voltammogramme nach Druckaufschluß bei 300°C und Abrauchen der Aufschlußlösung
(-1.2 $\rightarrow$ -0.8; -0.75 $\rightarrow$ -0.1; -0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

Ein Vergleich mit der entsprechenden Modell-Lösung (0.5 ml Salpetersäure in 10 ml Lösung; Abb.17,18,20) zeigt, daß keine Störungen auftreten, da die Lösung praktisch frei von organischen Stoffen ($\text{RKG} \leq 0.04 \%$) ist. Die geringe Signaldepression bei Zn, Cd und Pb ist entweder auf Spuren organischer Stoffe oder - was wahrscheinlicher ist - auf die anorganischen Bestandteile der Lösung zurückzuführen. Entscheidend für den Analysenerfolg ist jedoch, daß die Lösung abgeraucht wird, da andernfalls neben organischen Stoffen ($\text{RKG } 0.14 \%$) auch merkliche Mengen an Stickoxiden gelöst sind. Besonders letztere führen vor allem im Potentialbereich der Wasserstoffentwicklung zu einer so starken Erhöhung des Grundstroms, daß eine Elementspuren-Bestimmung nicht möglich ist (Abb.25). Die in der Lösung vorhandenen organischen Stoffe liefern dabei Störsignale, die eine Cd-Bestimmung verhindern und die Cu-Bestimmung erschweren (Abb.25).

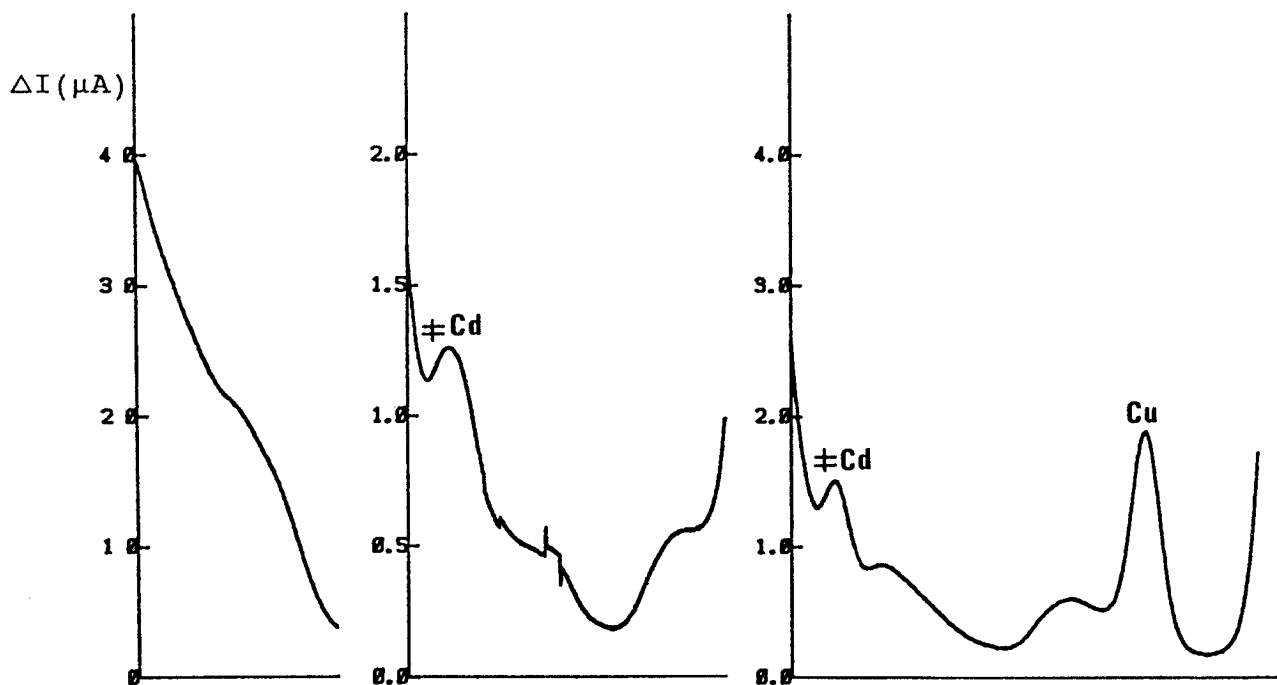


Abb.25: Leber; Voltammogramme nach Druckaufschluß bei 300°C
ohne Abrauchen der Aufschlußlösung
(-1.2 $\rightarrow$ -0.8; -0.75 $\rightarrow$ -0.1; -0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Voltammogramme, die aus einem Aufschluß bei 300°C und Abrauchen der Lösung resultieren, keine Störungen aufweisen. Der Aufschluß ist also dem Druckaufschluß bei 180°C mit Perchlorsäure-Nachbehandlung überlegen. Die hohe Temperatur von 300°C ist allerdings notwendig, da auch noch bei 280°C trotz des Abrauchens der Lösung bei Leberproben Störsignale auftreten, was ebenso der RKG-Wert von 0.11 % andeutet (vgl. Abb.13). Unumgänglich ist außerdem, die Aufschlußlösungen abzdampfen, da vor allem gelöste Stickoxide zu gravierenden Störungen wegen der Erhöhung des Stromes im negativen Potentialbereich führen, so daß die Bestimmung der Elemente Zn, Cd und Pb erschwert oder unmöglich gemacht wird. Ein Beispiel dafür, welchen Einfluß gelöstes NO₂ auf den Stromverlauf haben kann, zeigt Abb.26.

Dazu wurden 0.5 ml 69 %ige Salpetersäure, 0.5 ml flüssiges NO₂ (bei 0°C pipettiert) und 9.5 ml Wasser in einem geschlossenen Druckaufschlußgefäß etwa 30 min geschüttelt. 1.0 ml wurden entnommen, mit 5 ml Wasser in eine voltametrische Meßzelle überführt, mit den einer Algen-Aufschlußlösung entsprechenden Mengen an Zn, Cd, Pb und Cu versetzt und anschließend vermessen. Die Signalstörungen sind denen von Lösungen aus einem nicht abgerauchten Druckaufschluß bei 300°C ähnlich, es fehlen hier allerdings die auf organische Stoffe zurückzuführenden Signale.

Im folgenden werden die flüchtigen organischen Verbindungen in der Aufschlußlösung nicht weiter berücksichtigt, da sie ohnehin vor der Analyse beim Abrauchen der Stickoxide mit entfernt werden und somit keine Störungen verursachen können. Dies gilt auch für die Graphitrohr-AAS, wo diese Stoffe meist schon während der Trocknungs-, spätestens jedoch bei der Veraschungsperiode abgetrennt werden. Ebenso ist eine Identifizierung organischer Rückstände nur für den Druckaufschluß im PTFE-Gefäß bei 180°C von Interesse, weil die nach einer Perchlorsäure-Behandlung bzw. nach Druckauf-

schluß bei 300°C zurückbleibenden Stoffe die voltammetrische Metallbestimmung nur unerheblich stören; sie wurden daher nicht weiter untersucht.

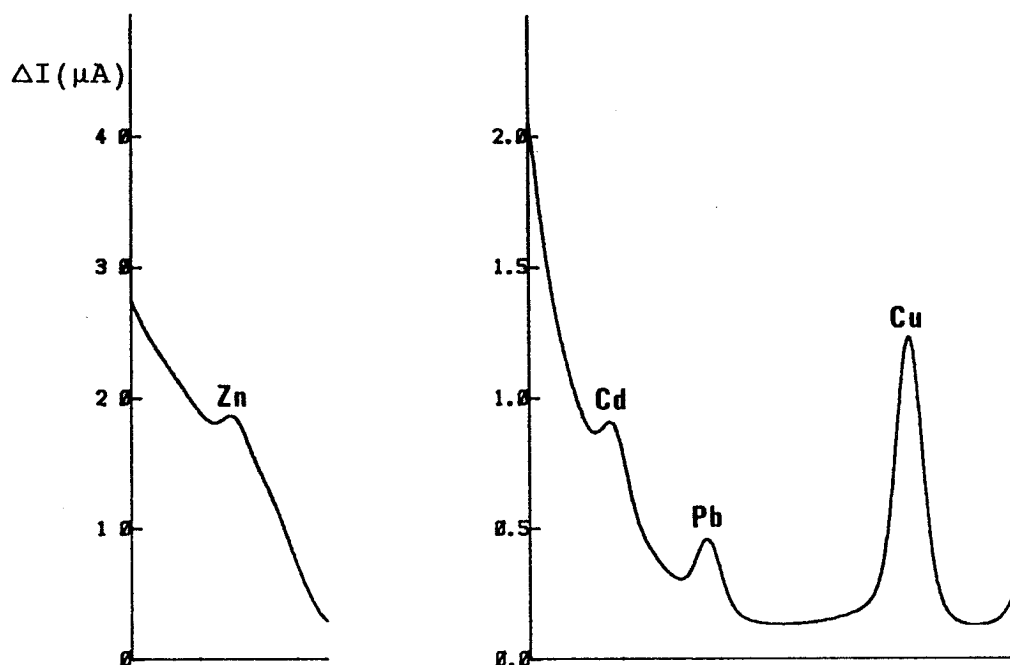


Abb.26: Einfluß von NO_2 auf Voltammogramme einer Algen-Vergleichslösung ($-1.2 \rightarrow -0.8$; $-0.75 \rightarrow 0.25$ V)

Die vielfältige Anwendung von Druckaufschlüssen in PTFE-Gefäßen zur Analyse biologischer Materialien macht es interessant und notwendig, die im Rückstand verbleibenden Stoffe näher zu untersuchen, um die Ursachen für die oft beschriebenen Störungen bei der voltammetrischen Elementbestimmung aufzuklären. Dies gilt, obwohl es - wie auch hier gezeigt wurde - Möglichkeiten gibt, Aufschlußrückstände so weit zu mineralisieren, daß solche Störungen vermieden werden: Druckaufschlüsse bei Temperaturen um 300°C, etwa mit Hilfe des Hochdruckveraschers nach KNAPP, erfordern aber einen hohen apparativen Aufwand; die chemische Nachbehandlung des Rückstandes mit Perchlorsäure erhöht den Zeitbedarf eines Probenaufschlusses ganz beträchtlich.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen beziehen sich daher ausschließlich auf den Druckaufschluß bei 180°C im PTFE-Gefäß, wobei die nach dem Aufschluß erhaltenen Lösungen jeweils bei 130°C unmittelbar im PTFE-Gefäß abgeraucht und mit 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure und Wasser zu 10.0 ml aufgenommen wurden.

4.7.2 Voltammetrische Messungen nach Druckaufschluß weiterer Materialien; Vergleich mit den Ergebnissen der Algen- und Leber-Untersuchungen

Die bei der inversvoltammetrischen Spurenbestimmung nach Druckaufschluß biologischer Materialien bei 180°C auftretenden Störeffekte (erhöhter Wasserstoffstrom bei -1,2 V; Störsignale bei -0.55 und -0.05 V) sind in ihrer Intensität unabhängig von der Anreicherungszeit für die Spuren; die Höhe der Schwermetallsignale nimmt dagegen mit ansteigender Anreicherungszeit zu. Zur näheren Untersuchung dieser Störeinflüsse könnte also auch ohne Voranreicherungsschritt gearbeitet werden. Bei den im folgenden beschriebenen Messungen wurde allerdings die bei der Analyse von Leber-Aufschlußlösungen gewählte Anreicherungszeit von 10 s beibehalten. Für die Untersuchungen wurden die in Tab.8 zusammengestellten Probenmaterialien ausgewählt, von denen jeweils eine 90 mg Kohlenstoff entsprechende Einwaage mit überschüssiger Salpetersäure (3 ml 69 %ige HNO_3) über 3 h bei 180°C im 35-ml-Tiegel aufgeschlossen wurde. Nach Abrauchen bei 130°C wurde der Rückstand mit 0.5 ml Salpetersäure und Wasser zu 10.0 ml aufgenommen. Alle Ergebnisse sind also miteinander vergleichbar, da sie unter gleichen Aufschlußbedingungen erhalten wurden. In Tab.9 sind ebenfalls die durch Verbrennung der Aufschlußrückstände ermittelten RKG-Werte aufgeführt. Wie man sieht, korrelieren diese gut mit dem Stickstoffgehalt des Probenmaterials ($r = 0.93$) (Abb.27). Der Gehalt an Stickstoff kann dabei

Probenmaterial	C-Gehalt (%)	N-Gehalt (%)	RKG (%)
Weizenmehl	43.0	2.5	1.0
Braunalgen	35.2	3.1	1.1
Magermilchpulver	41.3	5.6	1.7
Spinat	37.8	6.3	2.6
Fischfilet	50.6	11.1	4.0
Rinderleber	51.5	11.5	3.6
Hühnerei (Eiklar)	46.0	13.3	4.5
Haemoglobin	46.3	14.9	6.0
Casein	48.8	15.0	3.7
Albumin	48.6	16.0	3.9
Schweineblut	50.6	16.0	5.8

Tab.8: Restkohlenstoffgehalte biologischer Materialien nach Druckaufschluß bei 180°C; C- und N-Gehalte der Ausgangsstoffe

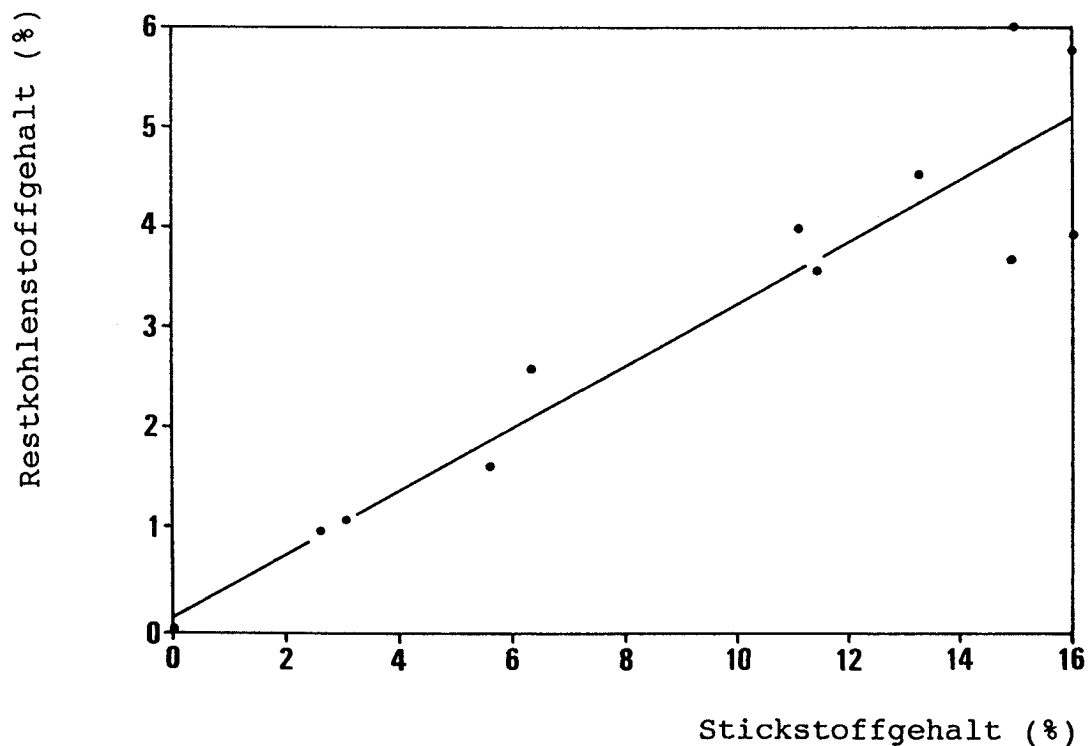


Abb.27: Abhängigkeit des RKG-Wertes vom Stickstoffgehalt der untersuchten Probenmaterialien

weiterhin als Maß für den Eiweißgehalt der Proben angesehen werden. Reine Kohlenhydrate, die keinen meßbaren Stickstoffgehalt aufweisen, werden praktisch vollständig aufgeschlossen ($\text{RKG} \leq 0.08 \%$) (Abb.27). Da es sich bei allen hier untersuchten Stoffen um fettarme Materialien handelt, und Kohlenhydrate wie Stärke (z.B. in Mehl), Cellulose (z.B. in Pflanzen) und Disaccharide (z.B. in Milch) praktisch vollständig abgebaut werden (22,23), kann festgehalten werden, daß der Restkohlenstoffgehalt proportional zum Eiweißgehalt der Proben ansteigt. Offensichtlich sind es also Bestandteile von Proteinen, die beim Aufschluß zu Rückständen führen. Geht man davon aus, daß nur einige der natürlich vorkommenden Aminosäuren unvollständig zersetzt werden, so läßt sich erklären, daß die Korrelation zwischen Stickstoffgehalt und Restkohlenstoffgehalt nicht höher ist: Eiweißstoffe unterscheiden sich, je nach Art und Herkunft, in den sie aufbauenden Aminosäuren.

Die voltammetrischen Untersuchungen unter Anwendung der SWASV unter den in Kap.4.7.1 angegebenen Bedingungen führten bei allen in Tab.8 aufgeführten Substanzen zu identischen Störsignalen. Für vier der untersuchten Materialien (Algen, Milchpulver, Leber, Schweineblut) sind die Voltammogramme im Bereich zwischen -0.75 und 0.25 V in Abb.28 dargestellt. Alle Voltammogramme enthalten auch hier zwei Störsignale, ein intensives bei -0.05 V sowie ein relativ flach verlaufendes bei -0.55 V (vgl. Kap.4.71). DPASV-Messungen führen zu gleichen Störsignalen. Das weniger intensive Signal bei Algen wird trotz der kurzen Anreicherungszeit von den Signalen der in relativ hohen Konzentrationen enthaltenen Schwermetalle Cd und Pb überlagert. Die Abhängigkeit der Signalhöhen beider Störpeaks vom Stickstoffgehalt der Proben (vgl. Abb.28) ist in Abb.29 und 30 dargestellt.

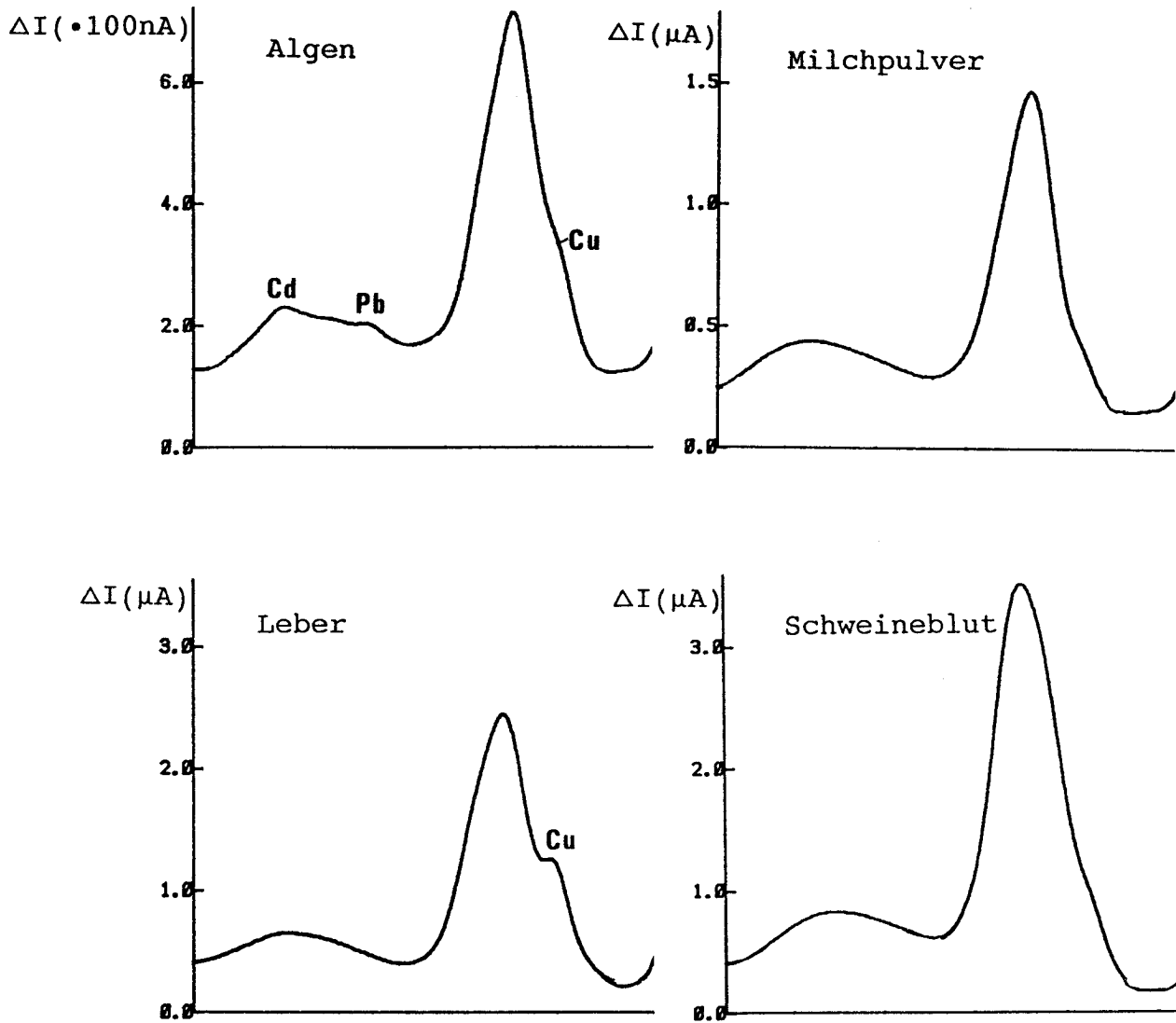


Abb.28: Square-Wave-Voltammogramme von Druckaufschlußlösungen verschiedener biologischer Materialien (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

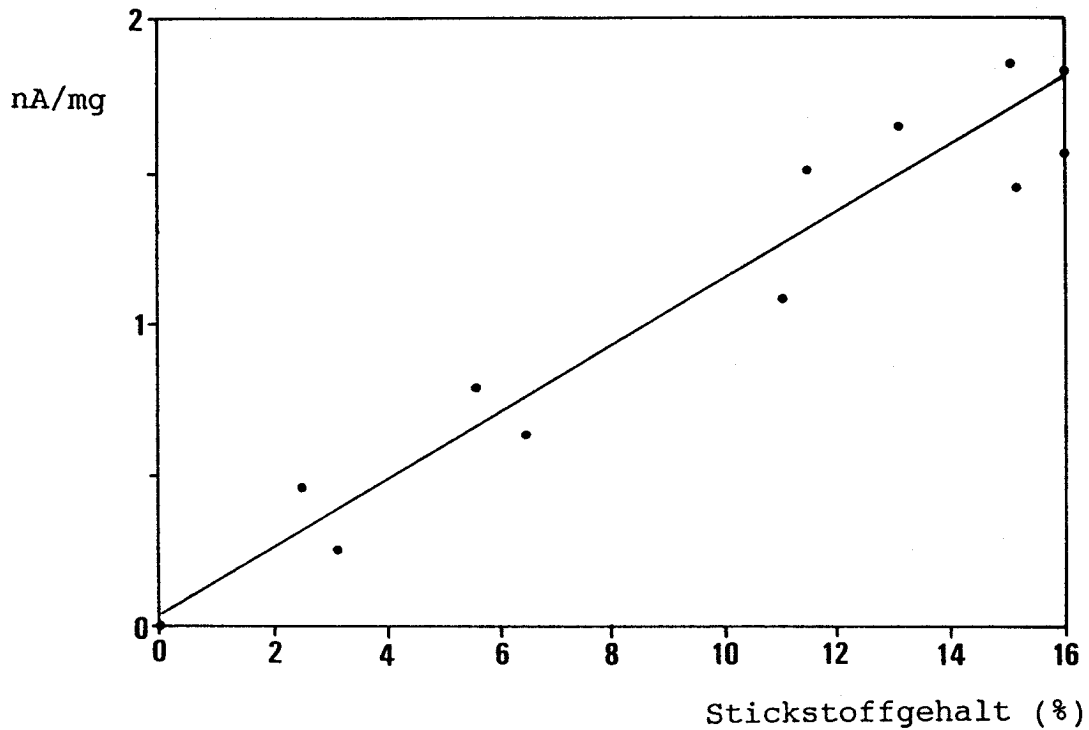


Abb.29: Störsignal 1; Abhängigkeit der Peakhöhe vom Stickstoffgehalt der untersuchten Materialien (SWASV)

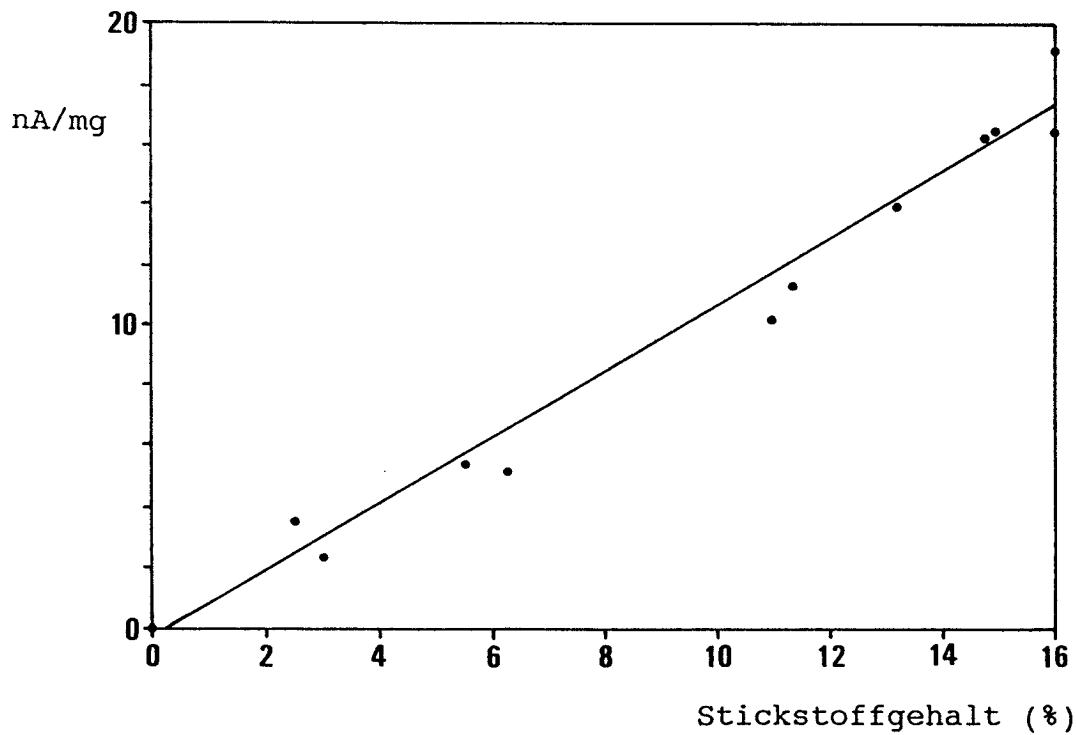


Abb.30: Störsignal 2; Abhängigkeit der Peakhöhe vom Stickstoffgehalt der untersuchten Materialien (SWASV)

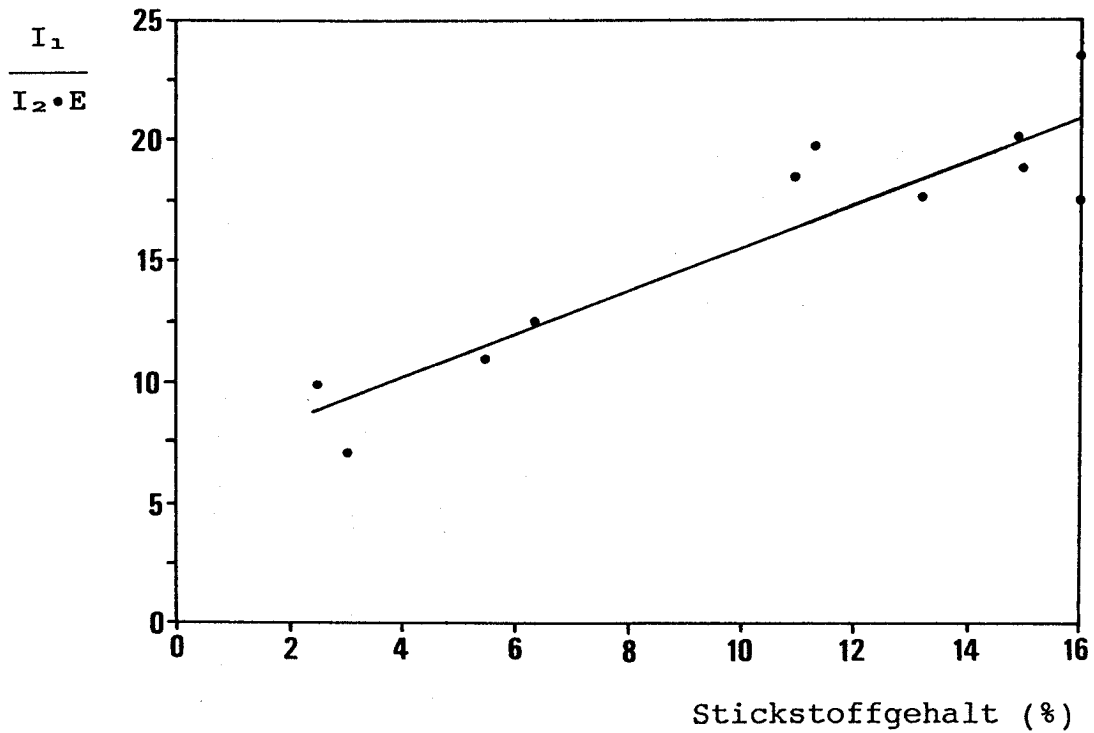
Tab.9 belegt die gute Korrelation von Signalhöhe und Stickstoffgehalt.

Signal	r (SWASV)	r (DPASV)
1	0.965	0.975
2	0.988	0.993

Tab.9: Korrelationskoeffizient r für die Abhängigkeit der Höhe der Störsignale 1 und 2 (Abb.28) vom Stickstoffgehalt der Ausgangsprobe

Der Wasserstoffstrom I_1 bei -1.2 V wurde auf den Strom einer rein wäßrigen Modell-Lösung gleicher Acidität I_2 sowie auf die Einwaage E normiert. Der Quotient $I_1/I_2 \cdot E$ wurde gegen den Stickstoffgehalt der Ausgangssubstanz aufgetragen (Abb.31). Danach nimmt der Wasserstoffstrom mit steigendem Stickstoffgehalt zu, die Korrelation (SWASV: $r = 0.93$; DPASV: $r = 0.90$) ist zwar schlechter als die der Störsignale, sie reicht aber wohl aus, um auch die Erhöhung des Wasserstoffstromes auf Eiweißbestandteile zurückzuführen. Die Reproduzierbarkeit der Störsignale 1 und 2 sowie die des Wasserstoffstromes wurde an 5 Leber-Aufschlußlösungen durch SWASV untersucht. Aus jeder Lösung wurden 5 aliquote Teile analysiert. Die Ergebnisse sind Tab.10 zu entnehmen. Für den an wäßriger Vergleichslösung gemessenen Wasserstoffstrom wurden folgende Daten ermittelt:

$$\bar{x} = 4.0 \mu\text{A}; s_x = 0.05; N = 10.$$



I_1 = Wasserstoffstrom Probe;

I_2 = Wasserstoffstrom Vergleichslösung;

E = Einwaage in g

Abb.31: Wasserstoffstrom bei -1.2 V; Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt des untersuchten Materials (SWASV)

Störeffekt	$\bar{x}$	sr 1	sr 2	sr 3	sr 4	sr 5	sr $\bar{x}$
Störsignal 1	0.27	0.12	0.091	0.059	0.14	0.11	0.045
Störsignal 2	2.10	0.031	0.032	0.059	0.031	0.062	0.067
Wasserstoffstrom bei -1.2 V	15.6	0.065	0.10	0.064	0.032	0.076	0.088

$\bar{x}$ = Mittelwert der Peakhöhe bzw. des Wasserstoffstromes aus insgesamt 25 Einzelwerten (μA)

sr i = Schätzwert der relativen Standardabweichung für Messungen aus je einer Aufschlußlösung (N = 5 Einzelwerte)

sr $\bar{x}$ = Schätzwert der relativen Standardabweichung der 5 Mittelwerte

Tab.10: Reproduzierbarkeit der Störeinflüsse bei Analyse einer Leber-Aufschlußlösung durch SWASV

4.8 Kohlenstoffbilanz und voltammetrische Untersuchungen an Aufschlußlösungen definierter organischer Verbindungen

Um festzustellen, welche in Biomaterialien vorkommenden organischen Stoffe beim Druckaufschluß mit Salpetersäure bei 180°C nicht oder nur unvollständig abgebaut werden, und um einen Einblick zu gewinnen, welche dieser Stoffe bzw. ihrer Zersetzungsprodukte zu den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Störeffekten bei der inversen Voltammetrie beitragen, wurde eine Reihe definierter Verbindungen aufgeschlossen und untersucht.

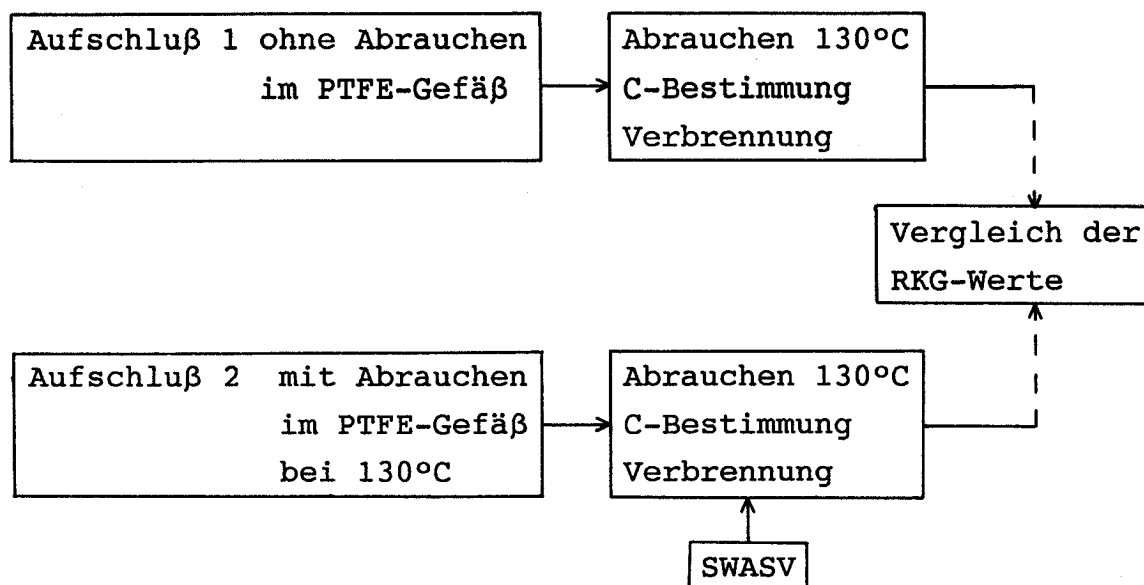
4.8.1 Auswahl der untersuchten Verbindungen; Aufschlußbedingungen

Die Auswahl der untersuchten Stoffe orientiert sich an Literaturangaben über ihr Vorkommen in Biomaterialien (133,134), wobei drei Gesichtspunkte berücksichtigt wurden:

1. Die Substanz ist in biologischen Materialien in so hoher Konzentration vorhanden, daß ihr Kohlenstoffanteil bei der Betrachtung des RKG-Wertes berücksichtigt werden muß.
2. Die Substanz ist interessant, da ihr Aufschlußverhalten Hinweise auf den Mechanismus des Druckaufschlusses erwarten läßt.
3. Die Substanz hat gleiche oder ähnliche Strukturelemente wie eine in Biomaterialien vorkommende Verbindung, die jedoch aus Kostengründen nicht zugänglich ist.

Der Aufschluß wurde unter den bereits mitgeteilten Bedingungen (180°C, 3 h, 3 ml 69 %ige HNO₃, 35-ml-Tiegel) durchgeführt, wobei die Proben mit Einwaagen entsprechend 90 mg Kohlenstoff eingesetzt wurden. Die einheitliche Begrenzung auf 90 mg C war notwendig, um das bei einigen Verbindungen bei höheren Einwaagen auftretende "Abblasen" der Reaktionsgase zu vermeiden. Dazu wurden die Kohlenstoffgehalte der

unzersetzten Ausgangsstoffe durch Elementaranalyse bestimmt. Von jeder Substanz wurden 2 Aufschlüsse durchgeführt; die Rückstände wurden folgendermaßen untersucht:



Die Reproduzierbarkeit der Aufschlüsse wurde durch Vergleich der Restkohlenstoffgehalte in den resultierenden Lösungen überprüft. Für die voltammetrischen Untersuchungen wurden nur die Lösungen aus Aufschluß 2 verwendet.

Unlösliche Rückstände, die beispielsweise nach Aufschluß von Phenylalanin und Benzoesäure zurückbleiben, wurden durch kräftiges Rühren so gut dispergiert, daß sie beim Aliquotieren mit aufgenommen werden konnten.

Zur Reaktivität der Substanzen wurde angenommen, daß der primär ablaufende Schritt beim Aufschluß eines biologischen Materials eine saure Hydrolyse ist, von der folgende Bindungen betroffen sind:

1. Peptidbindungen in Proteinen.
2. Esterbindungen in Fetten und Phosphorsäureestern.
Glykosidische Bindungen in Kohlenhydraten, Nucleosiden, usw. Es wird erwartet, daß die Hydrolyseprodukte aus dieser Primärreaktion (Aminosäuren, Fettsäuren, Gly-

cerin, Monosaccharide, Stickstoffbasen, usw.) anschließend als isolierte Moleküle unabhängig von ihren ehemaligen Bindungspartnern weiterreagieren. Diese Annahme erscheint sinnvoll, da Peptidketten bereits mit 6-N-Salzsäure bei 110°C gespalten werden (135) und auch die Ester-Hydrolyse unter relativ milden Bedingungen abläuft (136).

4.8.2 Kohlenstoffbilanz

Die folgende Tabelle gibt die untersuchten Stoffe, ihre Herkunft und die ermittelten Restkohlenstoffgehalte nach Aufschluß wieder. Die Angabe "Restkohlenstoffgehalt unterhalb der zu $\leq 0.08\%$ C ermittelten Garantiegrenze für Reinheit" wird vereinfacht durch "GR" ersetzt. Die Herkunft der Substanzen wird durch die Lieferfirma (M = Merck, Darmstadt; F = Fluka, Buchs) und die Artikel-Nummer belegt.

Tab.11: Ermittelte Restkohlenstoffgehalte der untersuchten Verbindungen

Verbindung	Lieferant Art.Nr.	% Rest- Kohlenstoff
1. Aminosäuren und Peptide		
Alanin	M 1007	GR
Alanyl-alanin	F 5250	GR
Alanyl-glycin	F 5270	GR
Alanyl-tryptophan	F 5400	5.7
Arginin	M 1542	0.14
Asparagin	M 1565	GR
Asparaginsäure	M 126	GR
Cystein	M 2838	GR
Cystin	M 2837	GR
3,4-Dihydroxyphenylalanin	M 4196	0.14

Glutamin	M 289	GR
Glutaminsäure	M 291	GR
Glycin	M 4201	GR
Glycyl-glycin	F 50200	GR
Glycyl-histidin	F 50280	16
Glycyl-leucin	F 50300	GR
Glycyl-phenylalanin	F 50370	43
Glycyl-tyrosin	F 50471	GR
Histidin	M 4351	31
Hydroxyprolin	M 4506	GR
Isoleucin	M 5362	GR
Leucin	M 5360	GR
Leucyl-glycin	F 61970	GR
Lysin, Monochlorid	M 5700	GR
Methionin	M 5707	10
Phenylalanin	M 7256	57
Phenylalanyl-phenylalanin	F 78120	57
Prolin	M 7434	0.12
Serin	M 7769	GR
Threonin	M 8411	GR
Triglycin	F 50240	GR
Tryptophan	M 8374	12.2
Tyrosin	M 8371	GR
Valin	M 8495	GR

2. N-Methylierte Aminosäuren

Betain	F 14290	81
N,N-Dimethylglycin	F 40360	GR
Sarcosin (N-Methylglycin)	F 84530	GR

3. Kohlenhydrate

Cellulose	M 2330	GR
Desoxyribose	M 7606	GR
Fructose	M 5321	GR
Glucose	M 8342 E	GR
Inosit	M 4731	GR
Lactose	M 7660 E	GR
Ribose	M 7605	GR
Saccharose	M 7653	GR
Stärke	M 1252	GR

4. Fette und Fettbausteine

Glycerin	M 4093	GR
Glycerinmonopalmitat	F 76184	GR
Glycerindipalmitat	F 42553	GR
Glycerintripalmitat	M 4099	GR
Ölsäure (cis-9-Octadecensäure)	M 481	GR
Linolsäure (cis,cis-9,12-Octadecadiensäure)	M 5353	10.3
Linolensäure (cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatriensäure)	F 62160	11.4
Palmitinsäure (gesättigte Carbonsäure C ₁₆)	M 509	GR
Margarinsäure (gesättigte Carbonsäure C ₁₇)	M 398	GR
Stearinsäure (gesättigte Carbonsäure C ₁₈)	M 674	GR
Nonadecansäure (gesättigte Carbonsäure C ₁₉)	M 6840	GR
Arachinsäure (gesättigte Carbonsäure C ₂₀)	M 124	GR

5. Kurzkettige gesättigte Monocarbonsäuren

Ameisensäure	M 264	GR
Essigsäure	M 55	GR
Buttersäure	F 19210	GR
Caprinsäure (gesättigte Carbonsäure C ₁₀)	F 71407	GR

6. Weitere nichtaromatische Carbonsäuren

Ascorbinsäure	M 127	GR
Brenztraubensäure	F 15940	GR
Liponsäure	M 5645	GR
Malonsäure	M 800387	GR
Milchsäure	M 366	GR
Oxalsäure	M 495	GR
Tetradecandisäure	F 87150	GR
Weinsäure	M 804	GR
Zitronensäure	M 244	GR

7. Stickstoffbasen aus Nucleinsäuren

a. Purinderivate

Adenin	M 838	0.34
Guanin	M 4221	0.18
Hypoxanthin	M 4517	0.68

b. Pyrimidinderivate

Cytosin	M 2326	14.1
Thymin	M 8209	0.21
Uracil	M 8460	39

8. Nucleoside

Adenosin	M 862	0.53
Cytidin	F 30270	GR
Inosin	M 4723	0.64
Uridin	F 94320	GR

9. Nucleinsäuren

Desoxyribonucleinsäure (aus Kalbsthymus)	M 24013	0.41
Ribonucleinsäure (aus Bäckerhefe)	M 24018	0.37

10. Coenzyme, Vitamine und Zuckerphosphate

Adenosinmonophosphat, Dinatriumsalz	M 1428	0.46
Adenosintriphosphat, Dinatriumsalz	M 1432	0.59
Dihydronicotinamid-adenin- dinucleotid	M 24644	5.8
Glucose-1-phosphat	M 8345	GR
Glucose-6-phosphat	M 8341	GR
Nicotinamid-adenin-dinucleotid	M 24542	26
Nicotinamid-adenin-dinucleotid- phosphat, Dinatriumsalz	M 24541	25
Nicotinsäure	M 6817	95
Nicotinsäureamid	M 6818	96
Riboflavinmonophosphat	F 83810	2.8

11. Steroide

epi-Androsteron	M 3697	3.1
Cholesterin	M 24622	2.0

12. Porphyrinsysteme

Haematoporphyrin	F 51240	0.08
Haeminchlorid	F 51280	0.86

13. Lecithine

Cholin (als Base)	F 26980	0.83
Dipalmitoylecithin	F 42556	GR
Lecithin aus Eiern	F 61755	2.7

14. Amine und Harnstoff

1,2-Bis-(3-aminopropylamino)-ethan	F 14525	0.28
1,6-Diaminohexan	F 33000	GR
Dimethylamin-Hydrochlorid	F 38960	GR
Ethanolamin	F 2400	GR
Ethylendiamintetraessigsäure	M 8417	GR
Harnstoff	M 8488	GR
Methylamin-Hydrochlorid	F 65600	GR
Trimethylamin-Hydrochlorid	F 92270	GR

15. Sonstige aromatische Verbindungen

4-Aminohippursäure	M 84	5.2
Benzoessäure	M 135	72
Hippursäure (N-Benzoyl-glycin)	F 53280	58
2-Hydroxybenzoessäure	F 84210	GR
3-Hydroxybenzoessäure	F 54610	GR
4-Hydroxybenzoessäure	F 54630	GR

16. Sonstige nichtaromatische Verbindungen

Cyclododecan	F 28710	GR
Eicosan (Alkan C ₂₀)	F 44820	GR
Eicosanol (Alkohol C ₂₀)	F 44860	GR
Polyethylen (Pulver)	M 4722	GR

Die bei zahlreichen Substanzen sehr niedrigen RKG-Werte sind wohl nicht in allen Fällen auf die Hauptkomponente, sondern auf Verunreinigungen in der Ausgangssubstanz zurückzuführen. Stoffe mit RKG < 1 % werden als genügend vollständig aufgeschlossen betrachtet, da ihre Konzentration in Biomaterialien selbst so gering ist, daß die Rückstände keinen nennenswerten Beitrag zum Gesamt-RKG liefern. Dies gilt auch für Cholesterin, Androsteron, Riboflavin und Lecithin, die zwar RKG-Werte zwischen 2 und 3 % liefern, in biologischen Materialien aber in so geringen Konzentrationen auftreten, daß die RKG-Beiträge keine Rolle spielen. Auch der Nicotinsäuregehalt (freie und gebundene Säure) biologischer Stoffe ist ebenfalls sehr gering (137), wie auch die Analyse einiger Materialien (Natec, Hamburg) zeigt: Milchpulver: $7.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Algen: $19.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Leber: $327 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Schweineblut: $10.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Die Werte stimmen

mit Angaben aus (137) gut überein. Leber ist danach eines der nicotinsäurereichsten Biomaterialien; der Beitrag der Nicotinsäure am Restkohlenstoffgehalt des Rückstandes einer Leberprobe errechnet sich zu 0.03 %. Gemessen an dem tatsächlich gefundenen Wert von 3.6 % ist dies zu vernachlässigen. Das Verhalten von Nicotinsäure und ihrer Derivate liefert jedoch interessante Hinweise auf den Reaktionsmechanismus des Druckaufschlusses (siehe Kap.5). Auf die Untersuchung halogenhaltiger Aminosäuren wurde verzichtet, da ihre Gehalte in biologischen Materialien ebenfalls nur gering sind, was durch die Bestimmung von Gesamt-Brom und Gesamt-Jod in Algen und Leber bestätigt wurde (SCHÖNIGER-Aufschluß, Ionenchromatographie). Der Bromgehalt von Algen beträgt demnach etwa $250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, die übrigen Werte liegen unter $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Rechnet man daraus auf mögliche Anteile an halogenhaltigen Aminosäuren im Probenmaterial, so ist auch hier kein nennenswerter Beitrag zum RKG-Wert zu erwarten.

Interessant ist, daß Cytosin und Uracil nur teilweise mineralisiert werden, während die entsprechenden Nucleoside Cytidin und Uridin (Verbindungen aus Base und Zucker) vollständig aufzuschließen sind. Nach dem Aufschluß von Cytosin und Uracil findet man praktisch kein Stickstoffdioxid, bei Cytidin und Uridin ist jedoch, wie beim Aufschluß aller Kohlenhydrate, eine starke Bildung von NO_2 zu beobachten. Wie in Kap.4.6.4 für Algen und Leber bereits gezeigt werden konnte, reicht das verfügbare NO_2 zum optimalen Aufschluß von Cytosin und Uracil offensichtlich nicht aus. Anders ist dies bei den Nucleosiden: Hier wird der an die Basen gebundene Zuckeranteil nach Hydrolse vollständig unter NO_2 -Bildung zersetzt; dies reicht dann aus, um auch die Basen quantitativ abzubauen. Man kann diesen Vorgang, bei dem der im Molekül enthaltene Zuckeranteil den Aufschluß verbessert, auch simulieren. Verringert man die Einwaage an Cytosin und Uracil bei gleichzeitigem Zusatz von Glucose, so gelingt bei sonst unveränderten Bedingungen ebenfalls ein

vollständiger Aufschluß der Basen. Auch bei Betain kann der RKG-Wert durch Zusatz von Glucose von 81 % auf etwa 1 % verringert werden (siehe Abb.35). Aus diesen Befunden kann also wohl geschlossen werden, daß die Anteile an Betain, Cytosin und Uracil in biologischen Materialien - sofern gleichzeitig genügend NO₂-liefernde Stoffe enthalten sind, stets quantitativ abgebaut werden.

Die an den schwierig abbaubaren Basen gewonnenen Ergebnisse legten es nahe, die Wirksamkeit von Glucose als "Aufschlußhilfe" auch an anderen Materialien zu erkunden. Dazu wurden Aufschlüsse durchgeführt, bei denen die zu untersuchende Substanz jeweils nur zu einer 9 mg C entsprechenden Einwaage (also zu 1/10 der ursprünglichen Menge) eingesetzt wurde. Der an 90 mg C fehlende Kohlenstoff wurde jeweils in Form von Glucose zugesetzt, die im Aufschluß vollständig mineralisiert wird. Die in Tab.12 angegebenen RKG-Werte beziehen sich auf den Kohlenstoffanteil, der durch die schwer abbaubare Substanz eingebracht wurde. Die Werte liegen bei Glucose-Zusatz in fast allen Fällen niedriger als ohne Glucose gefunden wird. Dieser Einfluß ist erwartungsgemäß bei denjenigen Stoffen am größten, die die höchsten RKG-Werte aufweisen, die also selbst zu wenig reaktiv sind, um genügend Stickoxid zum optimalen Aufschluß liefern zu können.

Daß tatsächlich die Glucose und nicht das bei Verringerung der Substanzeinwaage veränderte Säure/Probe-Verhältnis für die Verbesserung des Aufschlusses verantwortlich ist, zeigen die auch bei Säure-Erhöhung unverändert bleibenden RKG-Werte (vgl. Kap.4.6.1). Eine zur Glucose analoge Wirkung beim Aufschluß reaktionsträger Probenbestandteile läßt sich auch bei "realen" Matrixkomponenten nachweisen: Mischt man Algenpulver mit Phenylalanin (4 - 15 mg) zu einem Verhältnis, bei dem die Gesamtkohlenstoffmenge der Probe unverändert bei 90 mg bleibt, so findet man für Phenylalanin - unabhängig von der eingesetzten Menge - RKG-Werte von

45 ± 4 % (N = 6). Der entsprechende Wert bei Glucose-Zusatz beträgt 44 % (Tab.12).

Stoff	RKG ohne Glucose-Zusatz (%)	RKG mit Glucose-Zusatz (%)
Methionin	10 ± 3	9 ± 2
Tryptophan	12.2	9.8
Linolsäure	10.3	10.0
Linolensäure	11.4	7.5
Cytosin	14.1	≤ 0.8*)
Uracil	39	≤ 0.8*)
Betain	81	0.9
Nicotinsäure	91	70
NAD	26	23
Histidin	31	25
Benzoessäure	72	41
Hippursäure	58	33
Phenylalanin	57	44

*) Berechnet aus der Garantiegrenze für Reinheit des RKG-Wertes

Tab.12: Vergleich von Restkohlenstoffgehalten beim Druckaufschluß definierter Stoffe mit und ohne Zusatz von Glucose

Nach Aussage von Tab.11 und 12 und unter Berücksichtigung der zu erwartenden Probengehalte liefern beim Aufschluß biologischer Materialien nur folgende Stoffe nennenswerte organische Rückstände:

1. Phenylalanin
2. Methionin
3. Tryptophan
4. Histidin
5. Linolsäure.

Linolensäure ist in natürlichen Fetten nur in geringen Konzentrationen (Oliven-, Maiskeim- und Sonnenblumenöl: $\leq 1\%$; Natec, Hamburg) enthalten. Hippursäure, Benzoessäure, Aminohippursäure und Hydroxybenzoessäuren kommen in biologischen Materialien praktisch nicht vor. Ihr Verhalten liefert aber Hinweise auf den Reaktionsmechanismus des Druckaufschlusses. Cytosin, Uracil und Betain werden in realer Matrix vollständig abgebaut, und auch Nicotinsäure und -derivate spielen aufgrund ihrer niedrigen Konzentrationen bei der Kohlenstoffbilanz keine Rolle. Die Annahme, daß primär gebildete Hydrolyseprodukte unabhängig voneinander weiterreagieren, wird durch das Aufschlußverhalten der Dipeptide, des Triglycins, der Nicotinsäurederivate sowie von Glycerinmonopalmitat, Glycerindipalmitat und Glycerintripalmitat erhärtet. Daraus lassen sich folgende Regeln ableiten:

Regel 1

Reagieren ein Stoff A bzw. ein Stoff B im Druckaufschluß quantitativ, so wird auch die Verbindung A-B vollständig aufgeschlossen, sofern A und B durch Ester-, Peptid- oder Glykosidbindung verknüpft sind. Beispiele: Di- und Polysaccharide, Fette und Fettbausteine mit gesättigten Seitenketten, einige Dipeptide und Triglycin.

Regel 2

Reagiert ein Stoff A im Druckaufschluß quantitativ, ein Stoff B dagegen unvollständig, so wird auch die Verbindung A-B unvollständig aufgeschlossen. Dabei reagieren die Kom-

ponenten A und B nach Spaltung der Bindung unabhängig voneinander und es resultiert ein von B bestimmter Restkohlenstoffgehalt. Kennt man den RKG-Wert des Aufschlußrückstandes von B, so kann man denjenigen der Verbindung A-B aus der Stöchiometrie berechnen.

Beispiele:

a. Berechnet aus dem Gehalt an Nicotinsäure (RKG 96 %):

Derivat	RKG berechnet	RKG gemessen
Nicotinsäureamid	96 %	95 %
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat	26 %	25 %
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-	26 %	25 %

b. Berechnet aus dem Gehalt an Phenylalanin (RKG 57 %):

Derivat	RKG berechnet	RKG gemessen
Phenylalanyl-phenylalanin	57 %	57 %
Glycil-phenylalanin	47 %	43 %

c. Berechnet aus dem Gehalt an Tryptophan (RKG 12.2 %) und Histidin (RKG 31 %):

Derivat	RKG berechnet	RKG gemessen
Alanyl-tryptophan	9.5 %	5.7 %
Glycil-histidin	23 %	16 %

d. Berechnet aus dem Gehalt an Benzoesäure (RKG 72 %):

Derivat	RKG berechnet	RKG gemessen
Hippursäure	56 %	58 %

Die gemessenen RKG-Werte stimmen mit den Erwartungswerten gut überein; in einigen Fällen liegen die Meßwerte niedriger, da die reaktive Komponente der Verbindung die NO₂-Konzentration im System erhöht und somit einen vollständigeren Abbau des schwer abbaubaren Teils ermöglicht.

Regel 3

Reagieren ein Stoff A bzw. ein Stoff B im Druckaufschluß unvollständig, so wird auch die Verbindung A-B unvollständig aufgeschlossen. Der Restkohlenstoffgehalt ergibt sich aus den Einzelwerten der Komponenten A und B sowie aus der Stöchiometrie der Verbindung A-B.

Zur Überprüfung von Regel 3 wurden sechs aus den Aminosäuren Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Histidin aufgebaute Dipeptide (Serva, Heidelberg) untersucht. Dazu wurden jeweils 10 mg unter Zusatz von Glucose (insgesamt 90 mg C) mit 3 ml 69 %iger Salpetersäure aufgeschlossen. In Tab.13 sind die berechneten RKG-Werte den gemessenen Werten gegenübergestellt; sie zeigen eine befriedigende Übereinstimmung. Die Bezugsdaten für die RKG-Werte der einzelnen Aminosäuren wurden Tab.12 entnommen.

Dipeptid	RKG berechnet	RKG gemessen
Methionyl-tryptophan	10.4	8.4
Methionyl-histidin	17.7	23.0
Methionyl-phenylalanin	31.5	29.2
Tryptophyl-phenylalanin	25.9	25.3
Histidyl-phenylalanin	36.4	31.2
Histidyl-tryptophan	15.9	16.0

Tab.13: Aufschluß von Dipeptiden; Vergleich der berechneten und der gemessenen RKG-Werte

4.8.3 Restkohlenstoffgehalte nach Aufschluß biologischer Proben und Probenkomponenten

In einer Reihe biologischer Probenmaterialien wurden die Gehalte an den als unvollständig abbaubar erkannten Komponenten ermittelt (Tab.14).

Die Gehalte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den fettarmen pflanzlichen und tierischen Materialien sind dabei vernachlässigbar gering (137). Dies gilt auch für die Aminosäure-Gehalte in Ölen und geklärter Butter, deren Stickstoffgehalte jeweils unterhalb von 0.2 % liegen. Die Linolsäure-Gehalte in Maiskeimöl 2 und Sonnenblumenöl 2 sind Herstellerangaben.

Um das Abbauverhalten der Aminosäuren in Gegenwart leicht aufschließbarer Matrixkomponenten zu simulieren, wurden zunächst auch hier Mischungen mit Glucose eingesetzt. Die Einwaagen wurden dabei so gewählt, daß bei unveränderter Gesamtkohlenstoffmenge von 90 mg C der Glucose-Anteil der Mischungen erniedrigt wurde. In Abb.32-35 ist der Verlauf der Restkohlenstoffgehalte in diesen Mischungsreihen dar-

gestellt. Bei Methionin (wie auch bei Linolsäure) ist der RKG-Wert vom Glucose-Zusatz unabhängig.

Probenmaterial	Phe(%)	His(%)	Try(%)	Met(%)	Lin(%)
Algen	0.66	0.97	≤ 0.2	0.23	-
Milchpulver	1.46	2.50	≤ 0.2	≤ 0.5	-
Leber	3.63	3.02	0.7	1.41	-
Schweineblut	5.29	7.28	1.2	≤ 0.5	-
Olivenöl					8.2
Maiskeimöl 1					43.7
Maiskeimöl 2					55
Sonnenblumenöl 1					57.8
Sonnenblumenöl 2					60
Butterfett					1.1

Tab.14: Zusammensetzung biologischer Materialien bezüglich der unvollständig abbaubaren Bestandteile

Mit: Phe = Phenylalanin
 His = Histidin
 Try = Tryptophan

Met = Methionin
 Lin = Linolsäure

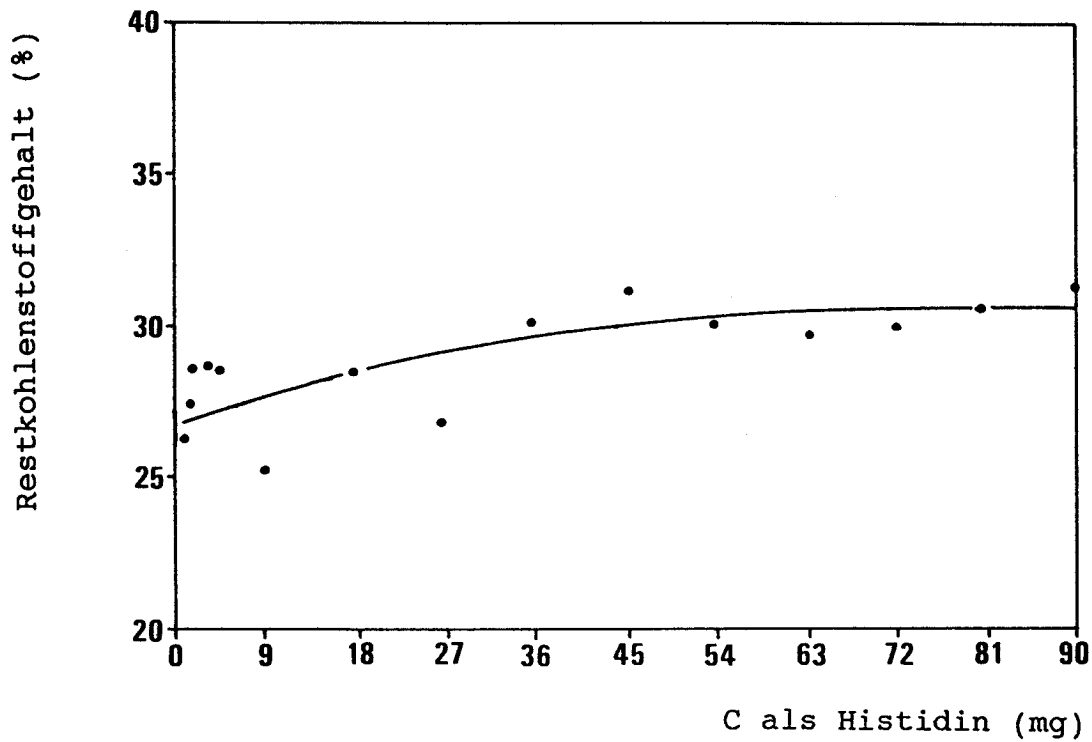


Abb.32: Histidin; Abhängigkeit des RKG von der Einwaage bei Zusatz von Glucose (ergänzt zu 90 mg C gesamt)

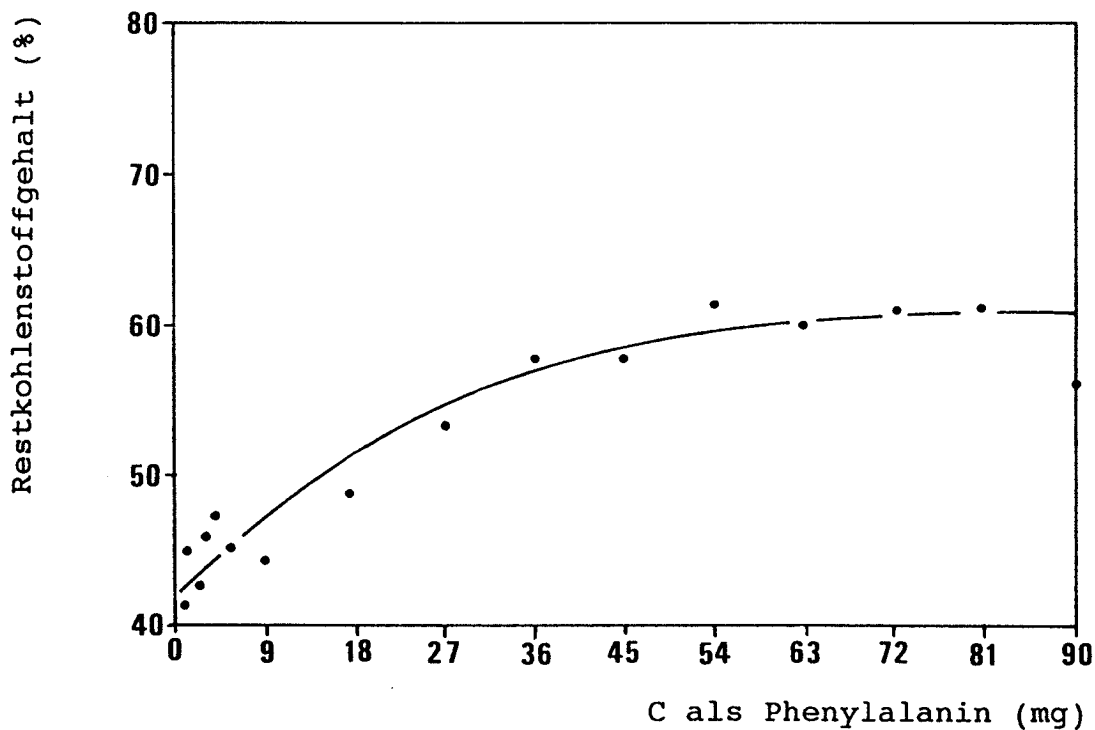


Abb.33: Phenylalanin; Abhängigkeit des RKG von der Einwaage bei Zusatz von Glucose (ergänzt zu 90 mg C gesamt)

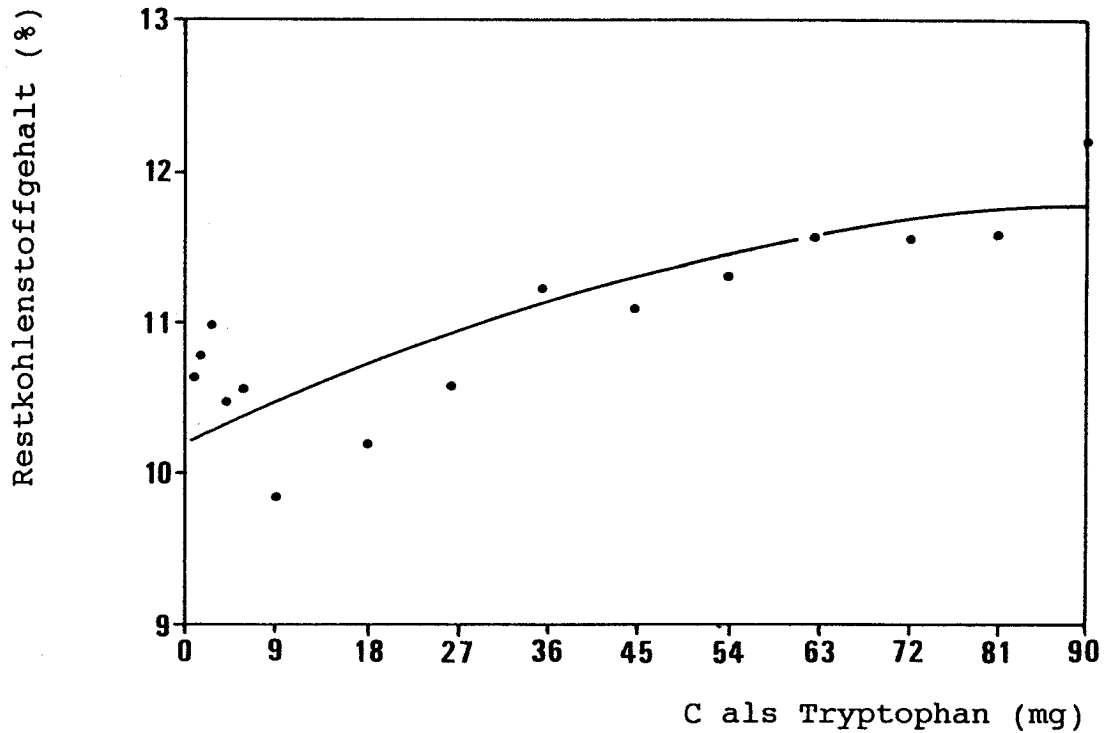


Abb.34: Tryptophan; Abhängigkeit des RKG von der Einwaage bei Zusatz von Glucose (ergänzt zu 90 mg C gesamt)

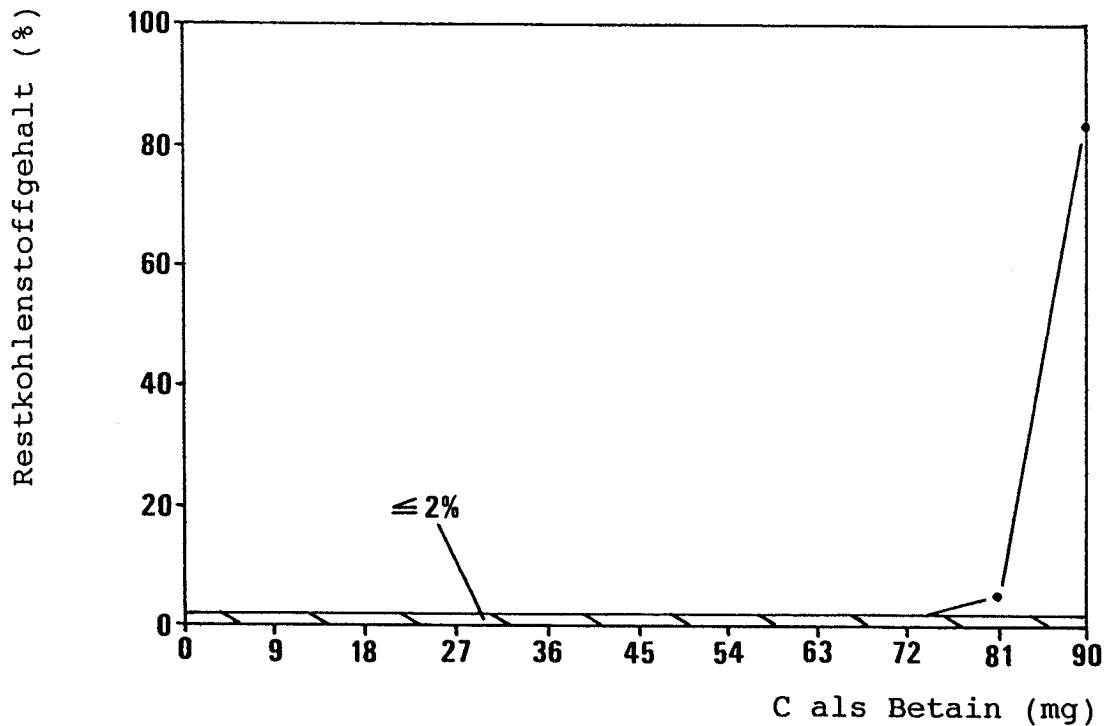


Abb.35: Betain; Abhängigkeit des RKG von der Einwaage bei Zusatz von Glucose (ergänzt zu 90 mg C gesamt)

Bei Phenylalanin, Histidin und Tryptophan gehen die RKG-Werte mit abnehmenden Anteilen in der Probeneinwaage zurück; auch in den entsprechenden realistischen Bereichen, die ihre Konzentration in biologischen Materialien wieder spiegeln, ändern sich die RKG-Werte nur wenig. Daher können die in diesen Bereichen beobachteten Werte durch Mittelung zu dem für biologische Proben realistischen RKG zusammengefaßt werden. Es ergeben sich folgende realistische Restkohlenstoffgehalte:

1. Phenylalanin: 44 %
2. Histidin: 27 %
3. Tryptophan: 11 %
4. Methionin: 9 % *)
5. Linolsäure: 10 % *)

*) Aus Tab.12 übernommen

Während der RKG-Wert bei den erstgenannten drei Aminosäuren auch mit ansteigender NO_2 -Konzentration im Reaktionsgemisch nur langsam auf einen nicht weiter unterschreitbaren Wert abfällt, wird Betain schon durch Zusatz von wenig Glucose praktisch vollständig aufgeschlossen: Setzt man einer 90 mg Kohlenstoff entsprechenden Betain-Einwaage vor dem Aufschluß neben 3 ml 69 %iger Salpetersäure 50 μl flüssiges NO_2 zu, so wird der RKG von sonst 81 auf 7 % verringert. Die kleine Menge NO_2 reicht offensichtlich aus, um die Reaktion "anspringen" zu lassen. Setzt man an Stelle von NO_2 ein Gas wie CO_2 oder $\text{C}_2\text{F}_4\text{Cl}_2$ zu, so wird dieser Effekt nicht beobachtet. Die alleinige Druckerhöhung im System scheidet als Ursache also aus. Die Stickstoffbasen Uracil und Cytosin verhalten sich gegenüber NO_2 analog.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden die in Tab.14 aufgeführten aminosäurehaltigen Materialien mit Einwaagen eingesetzt, die jeweils 90 mg C entsprechen. Die

darin enthaltenen Aminosäure-Mengen - berechnet aus den Werten der Tab.14 - sind in Tab.15 zusammengestellt.

Probenmaterial	Einwaage (mg)	Phe/mg	His/mg	Try/mg	Met/mg
Algen	256	1.7	2.5	≤ 0.5	0.6
Milchpulver	218	3.2	5.5	≤ 0.5	≤ 1
Leber	175	6.4	5.3	1.2	2.5
Schweineblut	178	9.4	13.0	2.1	≤ 1

Tab.15: In 90 mg C entsprechenden Einwaagen biologischer Materialien enthaltene Aminosäure-Mengen

Aus den Tabellenwerten und aus den für jede einzelne Aminosäure in biologischen Materialien zu erwartenden RKG-Werten (vgl. S.102) können die Gesamt-Restkohlenstoffgehalte abgeschätzt werden. In Tab.16 sind solche Werte für vier unterschiedliche Probenmaterialien den entsprechenden Meßergebnissen gegenübergestellt.

Stoff	RKG berechnet (%)	RKG gemessen (%)
Algen	0.9	1.1
Milchpulver	1.7	1.7
Leber	3.0	3.6
Schweineblut	5.0	5.8

Tab.16: Berechnete und beobachtete Gesamt-RKG-Werte beim Druckaufschluß biologischer Materialien

Bei Algen und bei Milchpulver konnten die Beiträge von Tryptophan, bei Milchpulver und Blut die von Methionin

nicht berücksichtigt werden, da deren Gehalte nicht zugänglich waren. Die entsprechenden RKG-Werte können jedoch durch Tryptophan maximal um 0.04 %, durch Methionin maximal um 0.05 % erhöht sein, was für die Bilanz von nur untergeordneter Bedeutung ist. Die gute Übereinstimmung belegt auch hier die Richtigkeit der zugrundeliegenden Annahmen.

In Abb.36 ist die Abhängigkeit des Restkohlenstoffgehaltes vom Linolsäure-Gehalt bei Fetten dargestellt. Der RKG-Wert für reine Linolsäure beträgt 10.3 % (Tab.12). Die Aufschlüsse konnten aus den erwähnten Gründen ohne Zusatz von Glucose durchgeführt werden, wobei die in Tab.14 angegebenen linolsäurehaltigen Fette als Probenmaterialien eingesetzt wurden. Die Linolsäure-Gehalte der untersuchten Fette können ebenfalls Tab.14 entnommen werden. Der experimentell ermittelte Restkohlenstoffgehalt beim Aufschluß von Butterfett mit einem Linolsäure-Gehalt von 1.1 % beträgt 0.11 %. Das Butterfett wurde durch Erhitzen von Butter gewonnen, wobei die enthaltenen Proteine ausflocken und abgetrennt

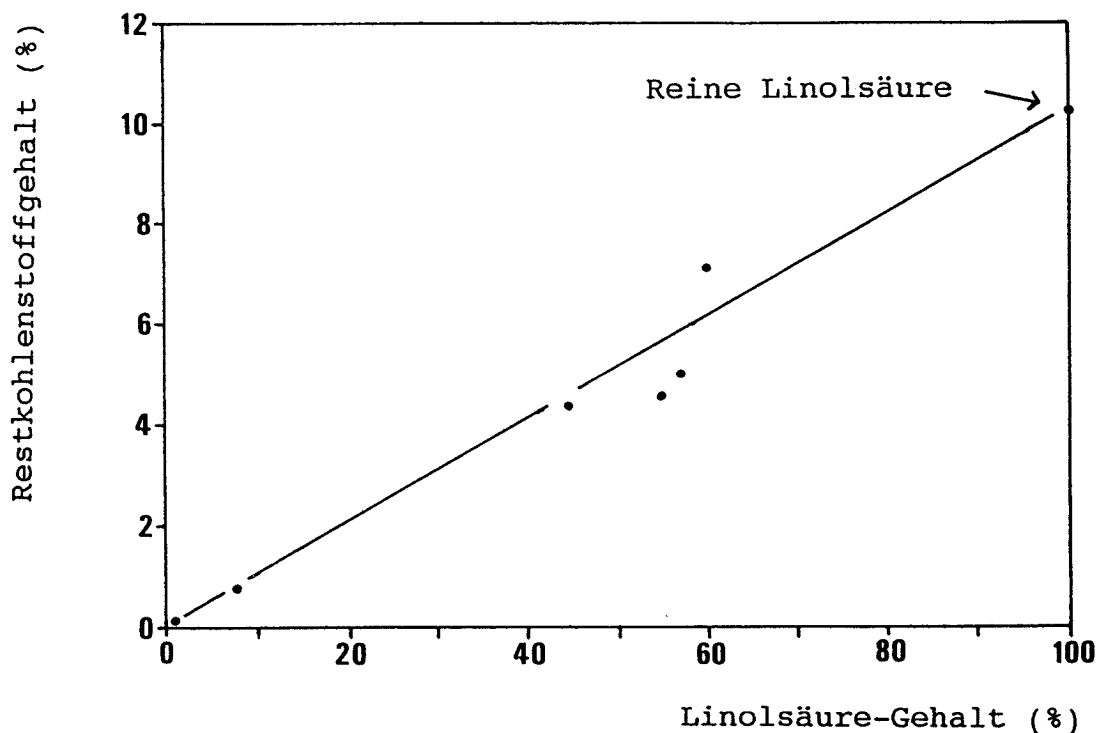


Abb.36: Fette; Abhängigkeit des RKG-Wertes vom Linolsäure-Gehalt

wurden. Das Ergebnis des Aufschlusses zeigt deutlich, daß die gesättigten Fettsäuren der Butter vollständig abgebaut werden und der Rückstand ausschließlich auf Linolsäure zurückgeführt werden kann.

4.8.4 Voltammetrische Untersuchungen an Aufschlußlösungen organischer Substanzen

Für die square-wave-inversvoltammetrischen Untersuchungen wurden Lösungen aus den Aufschlüssen der in Tab.11 aufgeführten Verbindungen ohne Glucose-Zusatz (vgl. Kap.4.8.2) verwendet. Das Meßverfahren wurde in Kap.4.5 beschrieben. Je 1.0 ml einer Aufschlußlösung wurde mit 5 ml Wasser versetzt. Nach Entlüften wurde 10 s bei -1.2 bzw. -0.75 V elektrolytisch angereichert. Die Signale der Substanzen können in eine Reihe ansteigender Intensitäten eingeordnet werden, wenn jeweils das intensivste Störsignal berücksichtigt wird. Wird im Bereich zwischen -0.75 und 0.25 V mehr als ein Peak beobachtet, so wird dies nachfolgend in Klammern vermerkt. Es ergibt sich folgende Rangordnung:

1. Verbindungen mit Signalen ≤ 10 nA

- alle Kohlenhydrate
- alle Fette und Fettbausteine außer ungesättigte Fettsäuren
- alle nichtaromatischen Carbonsäuren
- Prolin und alle vollständig aufschließbaren Aminosäuren und Peptide, außer Tyrosin und seine Derivate
- Glucosephosphate
- Eicosanol
- Methylamine
- Harnstoff, Ethanolamin, Ethylendiamintetraessigsäure
- Palmitoyllecithin und Cholin
- Methylierte Glycine
- Cytidin, Uridin, Guanin
- Methionin

2. Verbindungen mit Signalen 10-100 nA

- Ölsäure
- Eicosan
- Arginin, Tyrosin, Glycyl-tyrosin
- Adenin
- Linolsäure
- Hypoxanthin
- Adenosin
- Diaminohexan
- Linolensäure

3. Verbindungen mit Signalen 100-500 nA

- Desoxyribonucleinsäure, Ribonucleinsäure
- Adenosinmonophosphat, Adenosintriphosphat
- Nicotinsäure und -amid
- Dihydroxyphenylalanin
- Lecithin aus Eiern (2 Signale)
- Haematoporphyrin
- 1,2-Bis-(3-aminopropylamino)-ethan
- Thymin, Inosin
- Cholesterin
- Androsteron (2 Signale)
- Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid

4. Verbindungen mit Signalen ≥ 500 nA

- Haeminchlorid 780 nA
- Aminohippursäure 3700 und 700 nA (2 Signale)
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid 600 nA
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat 600 nA
- Histidin 2500 nA
- Cytosin 82000 nA
- Glycyl-histidin 530 nA
- Riboflavin 6000 nA
- Tryptophan 2300 nA
- Alanyl-tryptophan 1500 nA

- Uracil 88600 nA ⁶⁾
- Glycyl-phenylalanin 27000 und etwa 2000 nA (2 Signale) ⁶⁾
- Phenylalanin 32000 und etwa 3000 nA (2 Signale) ⁶⁾
- Phenylalanyl-phenylalanin 32000 und etwa 3000 nA (2 Signale) ⁶⁾
- Benzoessäure 40000 und etwa 3000 nA (2 Signale) ⁶⁾
- Hippursäure 43000 und etwa 3000 nA (2 Signale) ⁶⁾

Die Lösungen von Cyclododecan, Polyethylen und die der drei Hydroxybenzoessäuren wurden nicht voltammetrisch untersucht. Stoffe, die praktisch vollständig abgebaut werden, liefern keine oder nur geringfügige Störsignale, die unter Umständen auch auf Verunreinigungen der Ausgangsproben zurückzuführen sind. Die in biologischen Materialien zu erwartenden Gehalte der untersuchten Stoffe machen deutlich, daß nur die Aminosäuren Phenylalanin, Histidin und Tryptophan einen nennenswerten Beitrag zu Störsignalen bei der Analyse solcher Stoffe leisten.

Uracil und Cytosin liefern zwar intensive Signale, die entsprechenden Nucleoside Uridin und Cytidin werden jedoch vollständig abgebaut und verursachen deshalb keine nennenswerten Störungen (vgl. Kap.4.8.2). Benzoe-, Hippur- und Aminohippursäure kommen in biologischen Materialien praktisch nicht vor.

Die aus den Aufschlußlösungen von Benzoe- und Hippursäure resultierenden Signale stimmen mit denen nach Aufschluß von Phenylalanin und seiner Derivate überein. Eine quantitative Bewertung der Signale ist bei den letztgenannten Verbindungen aufgrund der hohen unlöslichen Anteile im Aufschlußrückstand nicht möglich. Neben den Störsignalen wurde bei

⁶⁾Die zu 10.0 ml aufgenommenen Aufschlußrückstände konnten nicht vollständig in Lösung gebracht werden. Zur voltammetrischen Untersuchung wurde nur die überstehende Lösung eingesetzt. Die unter Analysenbedingungen auftretenden Störsignale sind also weit intensiver, da in allen Fällen bedeutende Rückstände hinterbleiben.

den Aufschlußlösungen der tabellierten Verbindungen auch der Wasserstoffstrom bei -1.2 V ermittelt. Bildet man den Quotienten aus den Wasserstoffströmen der Probelösungen I_{H_2} (Pr) sowie einer Modell-Lösung von gleicher Acidität I_{H_2} (Mod), so können die untersuchten Verbindungen in einer Reihe ansteigender Verhältniszahlen geordnet werden:

1. I_{H_2} (Pr)/ I_{H_2} (Mod): 1-1.5

- alle Aminosäuren, außer Tryptophan, Histidin und Phenylalanin
- alle Peptide, die keine dieser drei Aminosäuren enthalten
- alle Kohlenhydrate
- alle Fette und Fettbausteine
- alle nichtaromatischen Carbonsäuren
- Glucosephosphate
- Methylamine
- alle Nucleoside
- Eicosan, Eicosanol
- Palmitoyllecithin
- Adenosinmonophosphat und Adenosintriphosphat
- Methylierte Glycine
- Ethylendiamintetraessigsäure
- Cholin, Ethanolamin, Diaminohexan
- alle Purinbasen und Thymin

2. I_{H_2} (Pr)/ I_{H_2} (Mod): 1.5-2

- 1,2-Bis-(3-aminopropylamino)-ethan
- Cholesterin und Androsteron
- Ribonucleinsäure

3. I_{H_2} (Pr)/ I_{H_2} (Mod): ≥ 2

- Harnstoff 3.4
- Haematoporphyrin 2.7
- Desoxyribonucleinsäure 2.8
- Haeminchlorid 2.9
- Lecithin aus Eiern 4.3

- Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid 5.3
- Aminohippursäure 7.2
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid 30
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat 28
- Histidin 4.4
- Cytosin 4.0
- Nicotinsäure 60
- Nicotinsäureamid 58
- Glycyl-histidin 2.8
- Alanyl-tryptophan 9.5
- Tryptophan 8.8
- Riboflavin 16
- Uracil 5.0 6)
- Glycyl-phenylalanin 4.6 6)
- Phenylalanin 4.1 6)
- Phenylalanyl-phenylalanin 4.3 6)
- Benzoessäure 4.3 6)
- Hippursäure 3.3 6)

Alle Verbindungen, die eine Erhöhung des Wasserstoffstromes um den Faktor 1-2 bewirken, sind - auch aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in biologischen Materialien - für die Abschätzung der Bilanz des Wasserstoffstromes belanglos. Da die Aufschlußlösungen durch überschüssige Salpetersäure ohnehin stark sauer sind, fallen beim Aufschluß gebildete anorganische Säuren (Schwefelsäure aus S-haltigen Aminosäuren, Phosphorsäure aus ihren Estern) nicht ins Gewicht. Der Aufschluß von Harnstoff zeigt, daß entstehende Ammonium-Ionen ebenfalls zu einer Erhöhung des Wasserstoffstromes führen. Die Frage, ob und aus welchen Aminosäuren Ammonium gebildet wird, wird zusammen mit der Phosphor- und Schwefel-Bilanz behandelt (Kap.4.11).

6) vgl. Fußnote 6) auf Seite 107

Nicotinsäure und ihre Derivate verursachen - verglichen mit den anderen Substanzen - einen besonders stark erhöhten Wasserstoffstrom. Dies steht mit den von NÜRNBERG (114) mitgeteilten Ergebnissen in Einklang, nach denen organische Stickstoffbasen eine katalytische Erhöhung des Wasserstoffstromes bewirken (vgl. Kap.3.3).

Der erhöhte Wasserstoffstrom und die Tatsache, daß Nicotinsäure praktisch nicht abgebaut wird, deuten deshalb darauf hin, daß das aromatische System der Verbindung beim Aufschluß erhalten bleibt. Dennoch spielen diese Verbindungen bei der Bilanz aufgrund ihrer niedrigen Konzentrationen in biologischen Materialien keine Rolle. Für die Gesamtbilanz der Erzeugung von Wasserstoffströmen sind aus dieser letztgenannten Gruppe wiederum nur die Aminosäuren Phenylalanin, Histidin und Tryptophan von Bedeutung.

Benzoessäure und Hippursäure führen zu Wasserstoffströmen in ähnlicher Höhe wie Phenylalanin und dessen Derivate. Da hier auch übereinstimmende Störsignale im Bereich $-0.75 - 0.25$ V beobachtet werden, ist zu vermuten, daß beim Aufschluß gleiche oder ähnliche Verbindungen gebildet werden.

Festzustellen ist schließlich, daß die genannten Störungen in gleichem Maße auch bei der inversen Differential-Puls-Voltammetrie auftreten, und zwar sowohl die Wasserstoffströme, die in ihrer Höhe gut mit denen der inversen Square-Wave-Voltammetrie übereinstimmen, als auch die Störsignale, die, analog den Metallsignalen, hier weniger intensiv sind. Entsprechendes gilt auch für den Grundstrom, was an Phenylalanin, Histidin, Tryptophan, Nicotinsäure und Benzoessäure überprüft wurde. Eine quantitative Abschätzung der Beiträge einzelner Reaktionsprodukte zum Wasserstoffstrom nach Aufschluß biologischer Materialien erfolgte an Aminosäuren in den für biologische Materialien relevanten Konzentrationsbereichen unter Zusatz von Glucose.

Als unzersetzte Verbindungen verursachen Phenylalanin, Tryptophan und Histidin in salpetersaurer Lösung keine nennenswerten Störsignale, sofern diese Aminosäuren in für Biomaterialien relevanten Mengen eingesetzt werden. Lediglich Histidin (1.0 mg Histidin + 50 µl 69 %ige HNO₃ in 6 ml Meßlösung) erhöht den Wasserstoffstrom bei -1.2 V um den Faktor 3.0, wenn man mit einer wäßrigen Lösung derselben Acidität vergleicht; Phenylalanin und Tryptophan geben den Effekt nicht, der wohl darauf zurückzuführen ist, daß Histidin als Stickstoffbase die Wasserstoffabscheidung katalysiert. Die bei der Analyse von Aufschlußlösungen dieser Stoffe beobachteten Störungen sind folglich auf Umsetzungsprodukte zurückzuführen.

Quantitative Untersuchung der inversvoltammetrischen Störungen

Unter Zusatz von Glucose als "Hilfsmatrix" wurden Tryptophan, Phenylalanin und Histidin in wechselnden Einwaagen aufgeschlossen, wobei die Kohlenstoff-Gesamtmenge jeweils konstant bei 90 mg C gehalten wurde. Eingesetzt wurden: Phenylalanin: 0.217-11.00 mg; Histidin: 1.73-11.12 mg; Tryptophan: 0.168-9.61 mg. Die Verbindungen wurden unter diesen Bedingungen zu klaren, rückstandsfreien Lösungen aufgeschlossen. Aus den Aufschlußlösungen des Phenylalanins aus höheren Einwaagen - auch bei Schweineblut - fällt nach wenigen Tagen ein weißer Niederschlag aus, so daß diese Lösungen nur begrenzt haltbar sind. Die Reaktionsprodukte des Phenylalanins sind also, zumindestens teilweise, in verdünnter Säure schlecht löslich. Aufschlußlösungen des Tryptophans liefern das in Abb.37, solche des Histidins das in Abb.38 dargestellte Störsignal. Die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Aminosäure-Einwaage ist aus Abb.39 und 40 ersichtlich.

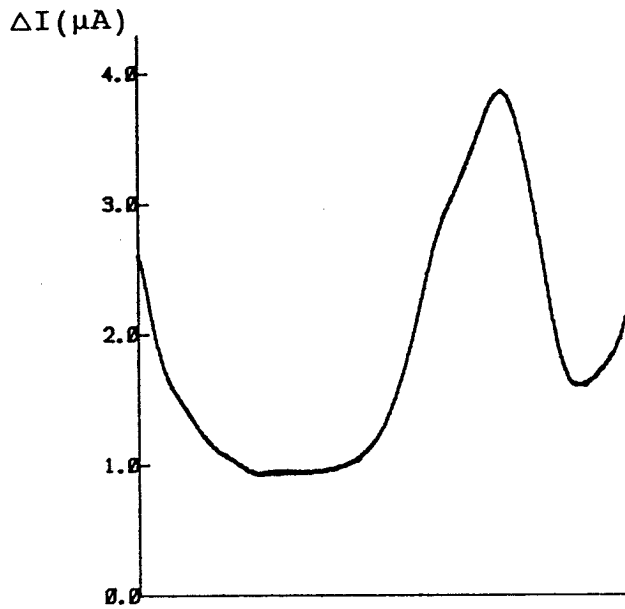


Abb.37: Störsignal nach Druckaufschluß von Tryptophan unter Glucose-Zusatz (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V) (SWASV)

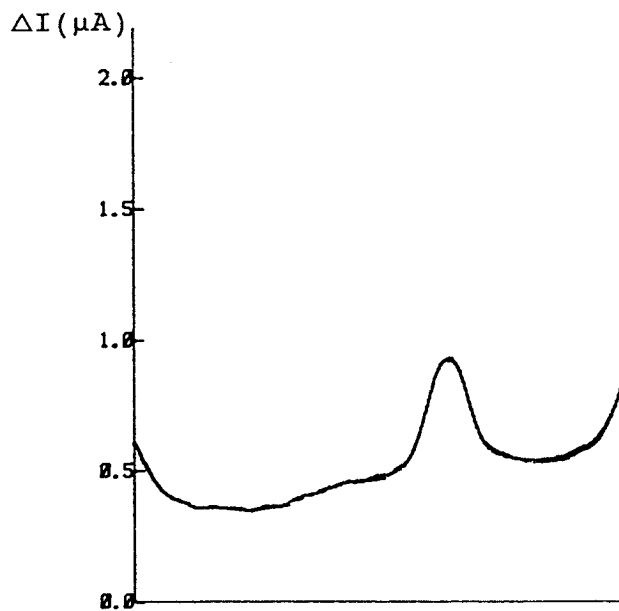


Abb.38: Störsignal nach Druckaufschluß von Histidin unter Glucose-Zusatz (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V) (SWASV)

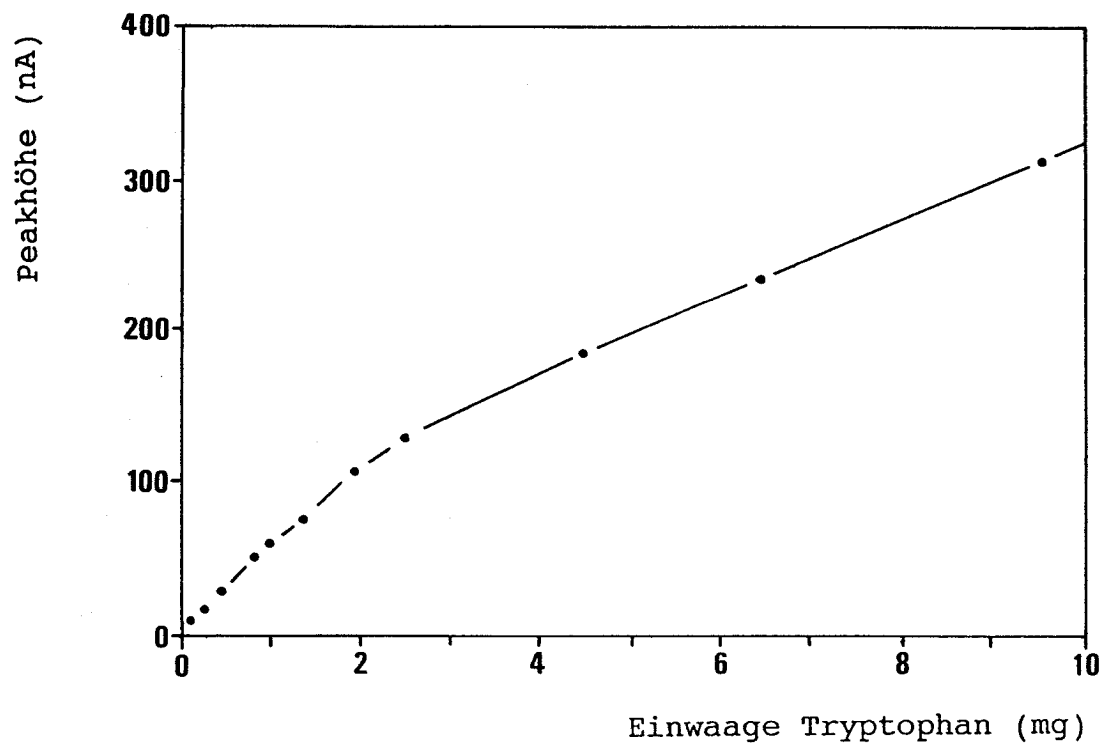


Abb.39: Tryptophan (Aufschluß unter Glucose-Zusatz); Abhängigkeit der Signalhöhe von der Einwaage (SWASV)

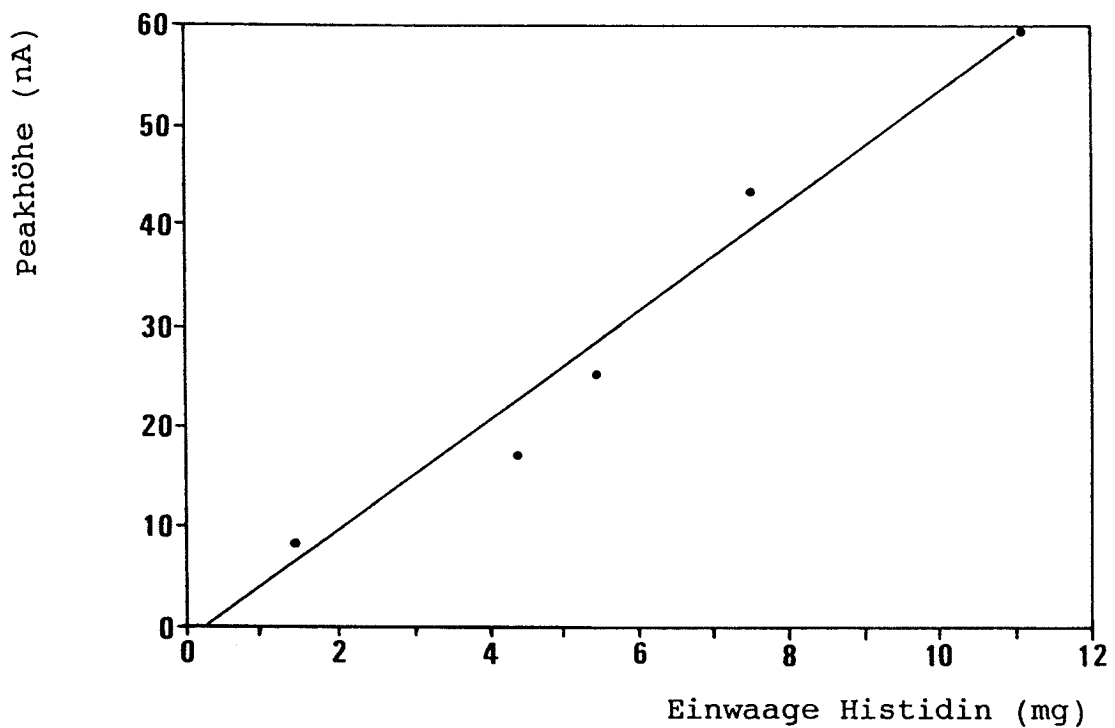


Abb.40: Histidin (Aufschluß unter Glucose-Zusatz); Abhängigkeit der Signalhöhe von der Einwaage (SWASV)

Die mit der Konzentration ansteigenden Signale des Histidins (-0.1 V) und des Tryptophans (0 V) sind in ihrer Form unabhängig von der Einwaage. Das Signal des Histidin-Rückstandes ist allerdings deutlich weniger intensiv. Der Rückstand aus Tryptophan liefert ein zusammengesetztes Signal, was darauf hinweist, daß mindestens zwei Elektrodenreaktionen ablaufen, beim Aufschluß vermutlich also verschiedene Oxidationsprodukte gebildet werden. Der Beitrag des durch den Histidin-Rückstand verursachten Signals zum "Störsignal 2" beim Aufschluß biologischer Materialien (Abb.49) ist gering; analoges gilt für Tryptophan. Beim Aufschluß von Schweineblut kann der Rückstand des Tryptophans maximal 3 %, der des Histidins maximal 2 % zur Peakhöhe des "Signals 2" (Abb.49) beitragen. Das nach Aufschluß biologischer Materialien beobachtete "Störsignal 1" ist also ausschließlich, das "Signal 2" zu etwa 95 % auf Reaktionsprodukte des Phenylalanins zurückzuführen. Die Voltammogramme für Aufschlußlösungen aus verschiedenen Einwaagen von Phenylalanin sind in Abb.41 dargestellt.

Bemerkenswert an Abb.41 ist, daß sich mit der Konzentration nicht nur die Höhe der Signale ändert, sondern auch die Form der Voltammogramme. Während der Aufschluß von 0.217 mg Phenylalanin zu den bei biologischen Materialien beobachteten Störpeaks führt, steigt der Strom im Spannungsbereich zwischen Peak 1 und Peak 2 mit steigender Einwaage an, bis schließlich ein neues Signal an dieser Stelle erscheint. Dieses Verhalten wird bei Aufschlüssen biologischer Probenmaterialien nicht beobachtet (vgl. Abb.28). Die verschiedenen Signale der Voltammogramme können also nicht miteinander verglichen werden. Verdünnt man die Phenylalanin-Aufschlußlösung höchster Konzentration (9.11 mg) bei konstanter Acidität ($50 \mu\text{l HNO}_3/6 \text{ ml}$), so erreicht man den gleichen Effekt wie bei abnehmender Einwaage: Mit zunehmender Verdünnung nimmt das mittlere Störsignal ab und verschwindet schließlich ganz. Der Effekt ist folglich konzentrationsabhängig und kann nicht auf unterschiedliche Reak-

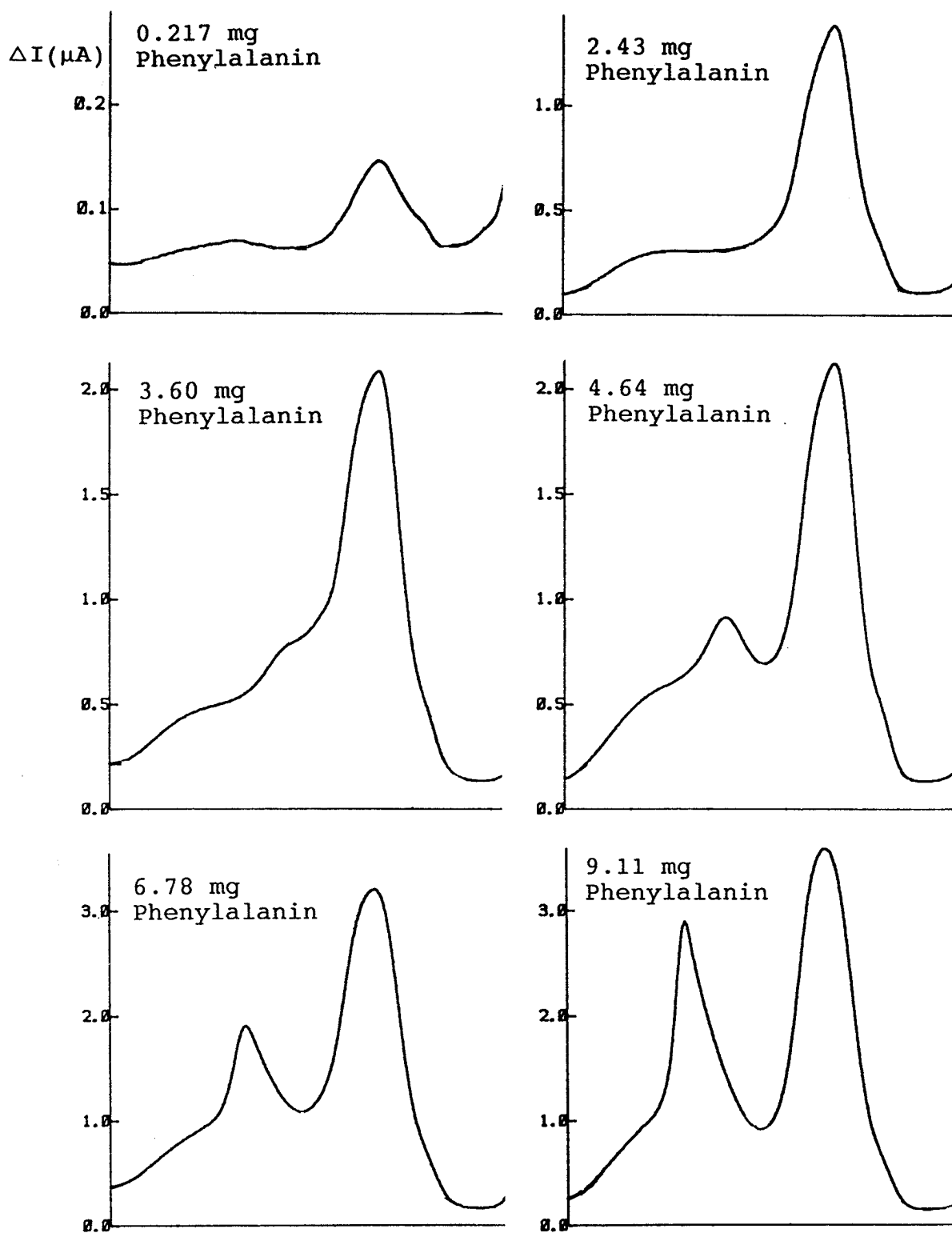


Abb.41: Aufschlüsse von Phenylalanin unter Glucose-Zusatz;
 Abhängigkeit der Signalform von der Einwaage
 (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V) (SWASV)

tionsprodukte beim Aufschluß zurückgeführt werden. Zur näheren Untersuchung dieses Verhaltens wurden die Gleichspannungs-Polarogramme derselben Lösung gemessen (Tropfzeit 0.5 s, Spannungsvorschub $4 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$). Dabei wurde ausgenutzt,

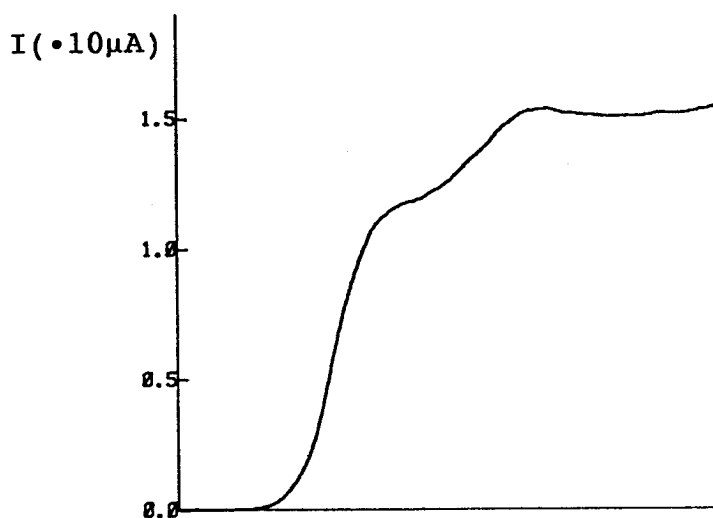


Abb.42: Leber; Gleichspannungs-Polarogramm der Aufschlußlösung ($0.25 \rightarrow -0.85 \text{ V}$)

daß mit dieser Methode infolge der Reaktion der organischen Lösungsbestandteile zwar Stufen erhalten werden, die Schwermetallsignale aufgrund der niedrigen Konzentrationen und wegen der hier fehlenden elektrolytischen Voranreicherung jedoch noch nicht auftreten. Der für biologische Materialien charakteristische Stromverlauf ist in Abb.42 am Beispiel des Polarogramms der Leber-Aufschlußlösung dargestellt. Man beobachtet eine intensive polarographische Stufe bei -0.07 V und eine zweite, weniger intensive bei etwa -0.35 V . Die Stufe bei -0.35 V ist durch ein Maximum überhöht, dessen Intensität jedoch so gering ist, daß es im Square-Wave- und im Differential-Puls-Inversvoltammogramm nicht sichtbar ist. Der Stromverlauf in Abb.42 wird auch bei Aufschlußlösungen von Algen, Milchpulver und Schweineblut beobachtet; hier ändern sich lediglich die Stufenhöhen in Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt der Ausgangsproben.

In Übereinstimmung mit dem durch Square-Wave-Voltammetrie erhaltenen Befund ist das Polarogramm der Lösung aus dem Aufschluß von 0.217 mg Phenylalanin (Abb.43) mit der Kurve aus Aufschlußlösungen biologischer Materialien bezüglich der Stufenform identisch. Bei 2.43 mg Phenylalanin ist das beschriebene polarographische Maximum jedoch bereits intensiver als bei Aufschlußlösungen biologischer Materialien. Dabei nimmt das Maximum mit steigender Phenylalanin-Einwaage zu (Abb.43).

Nach Aussage der Polarogramme kann man also folgern, daß die Rückstände aus Phenylalanin zweistufig umgesetzt werden; bei hoher Konzentration der Reaktionsprodukte wird die zweite polarographische Stufe bei -0.35 V von einem Maximum überlagert. Dieses Maximum tritt in der SWASV und DPASV als zusätzlicher Peak auf, jedoch nicht bei Aufschlußlösungen biologischer Materialien. In der Aufschlußlösung eines entsprechenden biologischen Materials - z.B. von Leber - muß also eine Substanz vorhanden sein, die dieses Maximum weitgehend unterdrückt. Dies wurde zunächst für die anorganischen Bestandteile überprüft: 175 mg Leber (etwa 90 mg C) wurden bei 300°C mit dem Hochdruckverascher nach KNAPP (siehe Kap.4.6.3) mit 2 ml 69 %iger Salpetersäure vollständig aufgeschlossen. Dampft man die erhaltene Lösung zur Trockene ab (130°C), so hinterbleiben praktisch keine organischen Stoffe ($\text{RKG} \leq 0.08 \%$) (129). Die der Leber-Einwaage entsprechende Menge an Phenylalanin (6.4 mg) wurde unter Zusatz von Glucose parallel dazu bei 180°C im PTFE-Gefäß aufgeschlossen. Anschließend wurden beide Lösungen vereint und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 0.5 ml Salpetersäure und Wasser zu 10.0 ml aufgenommen. Im Polarogramm der resultierenden Meßlösung tritt das Maximum unverändert auf. Das Square-Wave-Voltammogramm ist entsprechend gestört.

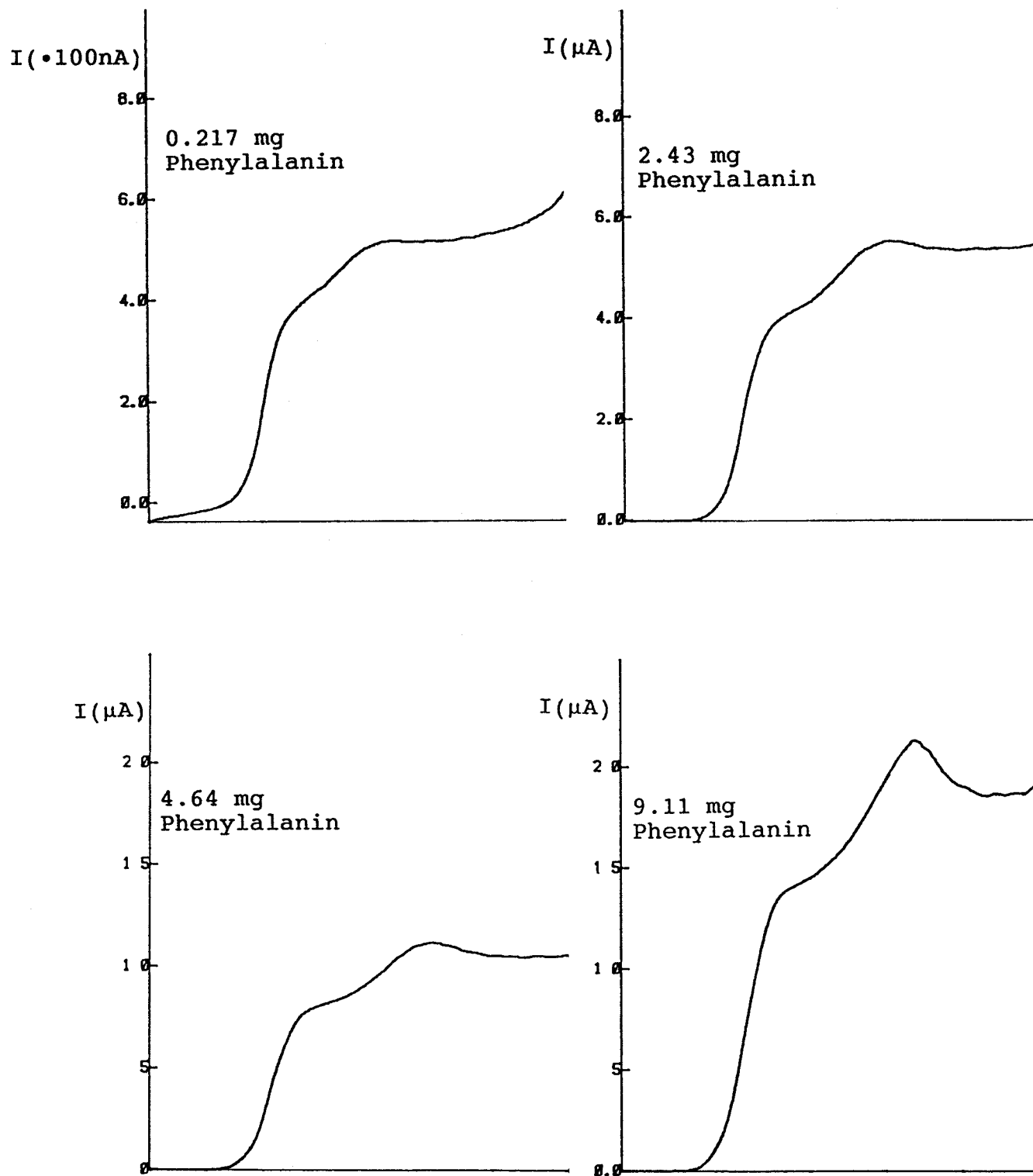


Abb.43: Gleichspannungs-Polarogramme von Phenylalanin-Aufschlußlösungen verschiedener Einwaagen
(0.25 $\rightarrow$ -0.85 V)

In einem weiteren Experiment wurden der Mischung von Phenylalanin und Glucose vor dem Aufschluß die der Leber entsprechenden Mengen an Histidin (5.3 mg), Tryptophan (1.2 mg) und Methionin (2.5 mg) zugesetzt, da nur diese Stoffe zusätzliche organische Rückstände liefern. Hier zeigte sich nun, daß das polarographische Maximum auf die bei Biomaterial-Aufschlüssen übliche geringe Intensität reduziert ist und - analog dazu - das mittlere Störsignal im inversen Square-Wave-Voltammogramm verschwindet. In getrennten Versuchen konnte durch Kombination von Phenylalanin mit jeder der betreffenden Aminosäuren bewiesen werden, daß lediglich der aus Tryptophan gebildete organische Rückstand für die Eliminierung des Maximums verantwortlich ist. Um die aus Phenylalanin-Rückständen resultierenden Signale für einen Vergleich mit denen aufgeschlossener biologischer Proben zu simulieren, muß also zum Aufschluß von Phenylalanin unter Glucose-Zusatz auch Tryptophan zugemischt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß Tryptophan einen geringen Beitrag zum intensiveren "Signal 2" des Phenylalanin-Rückstandes liefert.

Zur Überprüfung wurden 0.45 - 10.2 mg Phenylalanin unter Zusatz von 1.0 ± 0.1 mg Tryptophan und Glucose - insgesamt jeweils 90 mg C - aufgeschlossen. Die anschließende Untersuchung erfolgte durch inverse Square-Wave-Voltammetrie (Bedingungen: vgl. S.105). Die Intensität des bei positivem Potential auftretenden "Störsignals 2" wurde nach Abzug des Tryptophan-Anteils (gemäß Abb.39) gegen die Einwaage an Phenylalanin aufgetragen (Abb.44). Man erhält eine lineare Beziehung (Korrelation $r = 0.9990$). Errechnet man aus Tab.15 und Abb.39 für verschiedene Probenmaterialien die dem Tryptophan-Rückstand zuzuschreibenden Signalanteile und korrigiert diese am "Signal 2" der Proben, so erhält man aus Abb.44 folgende Werte für den Phenylalanin-Gehalt pro Einwaage (entspr. 90 mg C):

Algen: 1.9 mg

Milchpulver: 4.3 mg

Leber: 6.8 mg

Schweineblut: 10.2 mg

Die Werte stimmen gut mit denen aus Tab.15 überein.

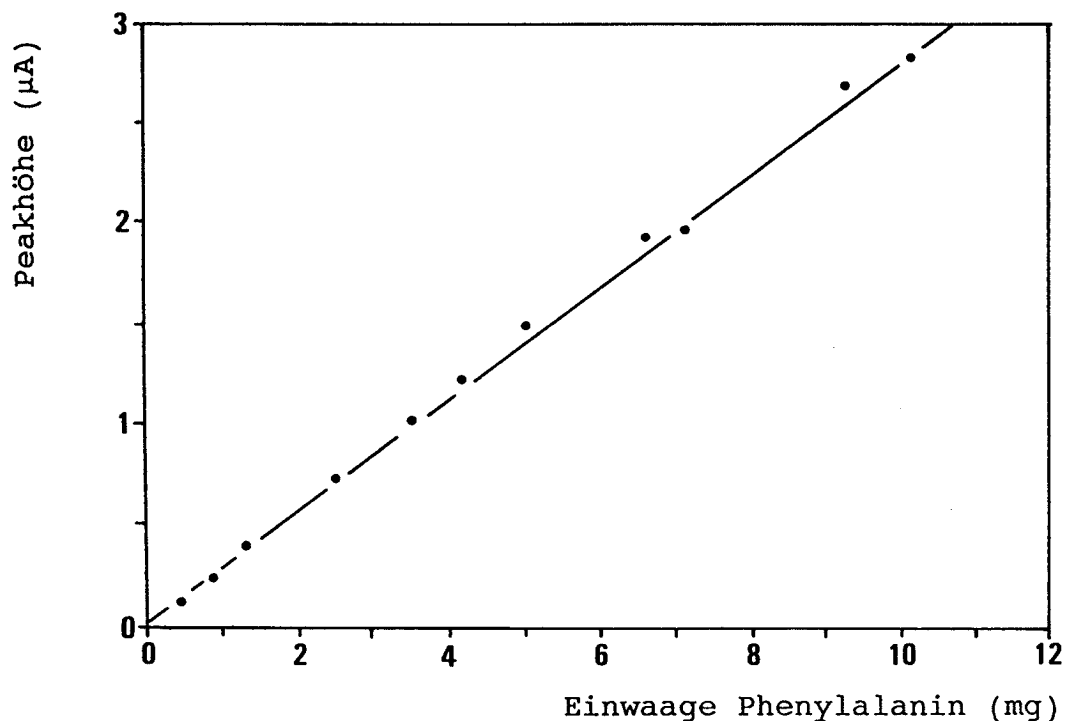


Abb.44: Phenylalanin; Aufschluß unter Zusatz von Glucose und Tryptophan, Abhängigkeit der Peakhöhe des "Störsignals 2" von der Einwaage (SWASV)

Zu erwähnen ist noch, daß das "Störsignal 2" bei Aufschluß von 0.447 mg Phenylalanin bei -0.07 V erscheint, mit zunehmender Einwaage an Phenylalanin jedoch in den negativeren Potentialbereich verschoben wird. Mit 10.17 mg Phenylalanin findet man es bei -0.102 V. Diese Verschiebung wird auch bei Aufschlußlösungen biologischer Materialien beobachtet, wobei die Potentiale mit denen von Modell-Lösungen vergleichbarer Phenylalanin-Einwaagen übereinstimmen. Verdünnt man die Lösung nach Aufschluß von 10.17 mg Phenylalanin, so wird diese Potentialverschiebung bei konstanter Acidität der Meßlösung ebenfalls beobachtet. Sie ist also konzentrationsabhängig und kann nicht auf verschiedene Oxidationsprodukte zurückgeführt werden.

Schließlich war zu belegen, daß Glucose zum Ersatz der im Aufschluß biologischer Materialien vollständig mineralisierbaren Probenbestandteile auch bei den voltammetrischen Untersuchungen problemlos als "Hilfsmatrix" verwendet wer-

den kann. Dazu wurde Einwaagen von 4 - 10 mg Phenylalanin Algenpulver als Matrix zugewogen. Die Intensität des allein aus dem Algen-Anteil resultierenden "Störsignals 2" ist bekannt (Abb.28) und wurde vom Bruttosignal subtrahiert. Die so korrigierten Signalhöhen der Reaktionsprodukte des Phenylalanins stehen in guter Übereinstimmung mit den durch Zusatz von Glucose erhaltenen Werten (Abb.44). Daraus kann abgeleitet werden,

- a.) daß Glucose als "Matrixersatz", der keine voltammetrischen Störsignale liefert, geeignet ist und
- b.) daß sich in Algen gebundenes und freies Phenylalanin beim Aufschluß gleich verhalten.

Dies ist zugleich ein weiterer Hinweis dafür, daß Peptide beim Aufschluß zunächst hydrolytisch gespalten werden und die Aminosäuren nachfolgend unabhängig voneinander weiterreagieren. Hier zunächst nicht diskutiert wird die Beobachtung, nach der die Reaktionsprodukte von Phenylalanin und Tryptophan, abhängig von der Einwaage, zu einer Erhöhung des Wasserstoffstromes führen, wogegen die unzersetzten Aminosäuren diesen Effekt nicht zeigen. Histidin verhält sich umgekehrt: Während die unzersetzte Aminosäure eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Wasserstoffstromes verursacht, findet man dies bei den Reaktionsprodukten nicht mehr, wenn in den bei Biomaterial-Aufschlüssen auftretenden Konzentrationen gemessen wird. Siehe hierzu Kap.4.9.1.

Zusammengefaßt haben die voltammetrischen Untersuchungen folgende Ergebnisse erbracht: Die Störsignale bei der voltammetrischen Elementanalyse von Lösungen biologischer Materialien nach Druckaufschluß bei 180°C mit nachfolgendem Abrauchen bei 130°C sind hauptsächlich auf Reaktionsprodukte des Phenylalanins, zu geringeren Anteilen auf solche des Tryptophans und des Histidins zurückzuführen. Alle anderen in biologischen Materialien vorhandenen Stoffe liefern keine nennenswerten Beiträge zu den beobachteten

Störsignalen, da sie entweder vollständig abgebaut werden oder in so geringen Konzentrationen vorliegen, daß die Störsignale ihrer Reaktionsprodukte nicht gefunden werden. Andere Stoffe, wie Methionin und Linolsäure, liefern offensichtlich Produkte, die im untersuchten Potentialbereich voltammetrisch inaktiv sind.

4.9 Identifizierung der Aufschluß-Rückstände

4.9.1 Identifizierung der Rückstände aus Aufschlüssen definierter Substanzen

Um aus den Aufschluß-Rückständen ausreichende Substanzmengen zur weiteren Untersuchung isolieren zu können, wurden Phenylalanin, Histidin, Methionin, Tryptophan und Linolsäure zunächst ohne Zusatz von Glucose unter den Standard-Bedingungen aufgeschlossen: Temperatur: 180°C; Aufschlußzeit: 3 h; Säure: 3 ml 69 %ige HNO₃; Gefäßvolumen: 35 ml; Abrauchen bei 130°C bis zur Trockene. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die Art der im Aufschlußprozeß gebildeten Verbindungen vom Glucose-Zusatz unabhängig ist und daß bei Phenylalanin, Tryptophan und Histidin lediglich die Menge der Rückstände vom Glucose-Zusatz und somit von der NO₂-Konzentration abhängt. Bei Methionin und Linolsäure hat der Zusatz von Glucose, wie gezeigt wurde, keinen Einfluß auf den RKG-Wert, da bereits beim alleinigen Aufschluß dieser Stoffe genügend NO₂ entsteht, um die problematischen Probenbestandteile optimal zu oxidieren. Zur Identifizierung der enthaltenen Verbindungen wurden die Aufschluß-Rückstände nach dem Abrauchen den abgekühlten PTFE-Tiegeln entnommen. Die Rückstände haben folgende Eigenschaften:

1. Rückstand aus Phenylalanin:

- Erhöht man die Abrauchttemperatur im PTFE-Gefäß auf 180°C und hält diese 1 h bei, so kann der RKG-Wert bezüglich Phenylalanin auf 0.8 % verringert werden; 98 % des im Rückstand gebundenen Kohlenstoffs sind also bei 180°C flüchtig.
- Das "Störsignal 2" der inversen Square-Wave-Voltammetrie (SWASV) ist unsymmetrisch. Dies deutet auf ein Stoffgemisch mit überlagerten Signalen bei unterschiedlichen Potentialen hin.
- Der Rückstand ist hellgelb, fest und löslich in Aceton, jedoch unlöslich in Wasser und Chloroform.

2. Rückstand aus Histidin:

- Der Rückstand ist bei 180°C nicht flüchtig.
- Er liefert nur sehr geringe Störsignale bei der SWASV, die, bezieht man auf den hohen RKG-Wert, vermutlich auf Nebenprodukte von geringer Konzentration zurückzuführen sind. Das Hauptprodukt ist also voltammetrisch inaktiv.
- Der Rückstand ist farblos, fest und löslich in Wasser, jedoch unlöslich in Aceton und Chloroform. Die Substanz ist also polar.

3. Rückstand aus Tryptophan:

- Etwa 50 % des Rückstandes (als C) sind bei 180°C flüchtig; er besteht also aus einem Stoffgemisch.
- Der Rückstand liefert bei der SWASV mindestens 2 überlagerte Signale, was ebenfalls auf ein Stoffgemisch hinweist.
- Der Rückstand ist intensiv gelb, fest, aber von klebriger Konsistenz. Er ist löslich in Aceton, jedoch unlöslich in Wasser und Chloroform.

4. Rückstand aus Linolsäure:

- Der Rückstand (als C berechnet) ist bei 180°C zu 98 % flüchtig.
- Er ist im untersuchten Potentialbereich voltammetrisch inaktiv.
- Er ist farblos, fest und löslich in Wasser und Aceton, jedoch unlöslich in Chloroform

5. Rückstand aus Methionin:

- Der Rückstand ist bei 180°C flüchtig (≥ 99 %).
- Er ist im untersuchten Potentialbereich voltammetrisch inaktiv.
- Er ist farblos und flüssig.
- Er reagiert, in Wasser gelöst, stark sauer.
- Der Rückstand besitzt auch bei 130°C schon einen hohen Dampfdruck, so daß die Kohlenstoffbestimmung nach Abrauchen bei 130°C sehr unreproduzierbare Ergebnisse liefert (RKG 9 %; $s_x = 0.2$). Die coulometrische Kohlenstoffbestimmung nach UV-Photolyse in der nicht abgerauchten Aufschlußlösung führt zu einem gut reproduzierbaren RKG-Wert von 19.8 ± 0.2 %. Da Methionin fünf verschieden gebundene Kohlenstoffatome besitzt, ist zu vermuten, daß nur eine Bindungsform davon beim Aufschluß quantitativ erhalten bleibt. Der unter dieser Annahme zu erwartende RKG-Wert beträgt 20 % und stimmt sehr gut mit dem beobachteten Wert von 19.8 % überein.
- Der Rückstand ist löslich in Wasser, mäßig löslich in Aceton, jedoch unlöslich in Chloroform.

Die Elementaranalyse der Rückstände ergab die in Tab.17 zusammengestellten Werte.

Rückstand aus:	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Phenylalanin	47.8	2.8	9.1	-
Histidin	27.4	2.9	24.5	-
Tryptophan	40.0	2.2	12.3	-
Methionin	12.1	-	≤ 0.002	31.4
Linolsäure	44.7	4.8	≤ 0.2	-

Tab.17: Elementaranalyse von Aufschlußrückständen aus definierten organischen Substanzen

An dieser Stelle kann bereits auf den aus der Aminosäure Methionin gebildeten Rückstand geschlossen werden: Da die Gruppierung $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ bei Glutamin, Lysin und Arginin im Aufschluß abgebaut wird, kann dies auch für Methionin vorausgesetzt werden. Als Oxidationsprodukt bleibt Methansulfonsäure ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) zurück, wobei die endständige Methylgruppe nicht angegriffen, der Schwefel jedoch zur Sulfonsäure oxidiert wird. Die für diese Verbindung erwarteten Gehalte liegen bei 12.5 % C und 33.4 % S. Ein Vergleich mit den Daten aus Tab.17 zeigt, daß Methionin praktisch ausschließlich zu Methansulfonsäure umgesetzt wird.

Zur Aufnahme des ^1H -NMR-Spektrums wurde der Rückstand in D_2O gelöst. Man beobachtet erwartungsgemäß nur ein einziges Singulett bei 2.7 ppm, das Signal der Methylprotonen. Das Vergleichsspektrum handelsüblicher Methansulfonsäure (Fluka, Buchs, Art.Nr.64280) liefert ein identisches Signal. Der Nachweis des sauren Protons ist wegen des Austausches in D_2O nicht möglich; die saure Reaktion in Wasser gibt jedoch einen deutlichen Hinweis. Die Bildung von Methansulfonsäure aus Methionin wurde auch von MARTINIE und SCHILT (26) beim offenen Aufschluß mit Salpeter- und Perchlorsäure beobachtet.

Zur Identifizierung der Rückstände aus Histidin, Tryptophan und Linolsäure wurden Infrarotspektren (KBr-Pressling, Gerät: IR-Spektralphotometer 283 B, Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen) sowie die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Gerät: Impuls-Kernresonanzspektrometer Bruker AM-400, Bruker, Karlsruhe) gemessen. Alle Spektren: siehe Anhang. Zur Aufnahme von NMR-Spektren wurden die Rückstände aus Tryptophan und Linolsäure in Deuteroaceton gelöst. Da der aus Histidin gebildete Rückstand nur in Wasser löslich ist, wurden die sauren Protonen (vgl. IR-Spektrum) zunächst durch Abrauchen eines Aufschlußrückstandes mit 0.5 ml 65 %iger DNO_3 (Merck, Darmstadt, Art.Nr.446) und 2.0 ml D_2O gegen Deuterium ausgetauscht, um die im Protonen-NMR-Spektrum störenden Signale zu vermeiden. Zur Aufnahme der Spektren wurde die D_2O -Lösung verwendet. In Tab.18 sind die interpretierbaren Signale des IR-Spektrums (Abb.53) sowie die der ^1H -NMR- und der entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren aufgeführt.

Die IR-Spektren zeigen, daß alle drei Rückstände Carboxylgruppen enthalten (OH-Valenzschwingung um 3000 cm^{-1} ; CO-Valenzschwingung einer Carbonsäure bei $1710 - 1730\text{ cm}^{-1}$) (138). Weitere Informationen sind den IR-Spektren nicht zu entnehmen; lediglich beim Histidin-Rückstand kann (siehe weiter unten) die Bande bei 1380 cm^{-1} noch zugeordnet werden. Das ^1H -Spektrum des Histidin-Rückstandes (deuteriert) zeigt nur 2 Singulets im aromatischen Bereich im Verhältnis der Integrale von 1:1 (Abb.54). Das ^{13}C -Spektrum weist die Signale von vier unterschiedlichen C-Atomen auf, davon drei im aromatischen Bereich und ein Carboxyl-C bei 160.1 ppm im Verhältnis der Integrale von 1:1:1:1 (Abb.55).

Rückstand aus:	IR-Banden (cm ⁻¹)	¹ H-Signale	¹³ C-Signale
Histidin	2300 - 3600	8.7 (s)	123.3
	1710	7.95 (s)	125.0
	1380		135.3
			160.1
Tryptophan	2300 - 3700	7.8 - 9.5	110 - 150
	1730	12.45 (s)	160 - 170
Linolsäure	2300 - 3600	1.25	12.22
	1710	1.47	21.96
		2.10	172.36
			29.8 (a)
		2.04 (a)	207.6 (a)

(a) = Lösungsmittel-Signal: CD₃COCD₂H

(s) = Singulett

Chemische Verschiebung bei NMR: ppm vs. Tetramethylsilan

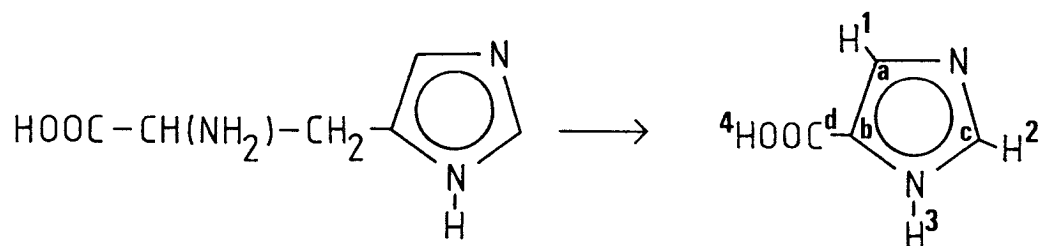
Tab.18: IR- und NMR-Signale von Aufschlußrückständen;
Spektren im Anhang (Abb.53-62)

Die Integrale der ¹³C-Signale wurden, wie auch bei allen noch folgenden Messungen, nach Aufnahme der Spektren mit Hilfe der "Inverse-Gated"-Technik ermittelt, bei der der Protonen-Entkoppler nur während der Aufzeichnungszeit (Aquisitionszeit) eingeschaltet ist. Nach jeder Aufnahmezeit wurde eine Pausenzeit von 10 T₁ eingehalten, um den Übergängen ein vollständiges Relaxieren in die ungestörte Boltzmann-Verteilung zu ermöglichen. Dabei ist T₁ die "longitudinale Relaxationszeit", also die Zeit, die nach Einbringen der Probe in den Magneten vergeht, bis ein betrachteter Übergang sich bis auf den e'ten Teil dem durch

die Boltzmann-Verteilung gegebenen Grenzwert der Magnetisierung angenähert hat. Auf diese Weise wird die Energieübertragung der durch die Entkopplerfrequenz angeregten Protonen (Kern-Overhauser-Effekt) auf die Kohlenstoffkerne ausgeschaltet, die zu einer Verzerrung der Signal-Intensitätsverhältnisse führt.

Die Kohlenstoffatome des Histidin-Rückstandes mit Signalen bei 123.3 und 135.3 ppm sind jeweils an ein Proton gebunden, was im nicht entkoppelten ^{13}C -Spektrum durch Dubletts belegt wird (Abb. 56).

Die beiden anderen C-Atome erscheinen als Singulett und haben demnach quarternären Charakter. Folglich liegt ein carboxyl-substituierter Aromat mit drei unterschiedlichen Ring-Kohlenstoffatomen vor. Beim Aufschluß des Histidins entsteht also durch Oxidation der Seitenkette Imidazol-4-carbonsäure gemäß:



Die Spektren lassen sich folgendermaßen interpretieren: In der deuterierten Substanz sind die sauren Protonen 3 und 4 gegen D ausgetauscht; sie erscheinen folglich nicht im NMR-Spektrum. Die aromatisch gebundenen Protonen 1 und 2 sind für die zwei beobachteten Singulett verantwortlich. Im ^{13}C -Spektrum treten neben dem Signal des Carboxyl-C noch die Signale der Atome a und c bei 123.3 und 135.3 ppm (C-H-Kopplung) sowie das Signal des quarternären C-Atoms b bei 125.0 ppm auf. Das IR-Spektrum der entsprechenden nicht deuterierten Verbindung zeigt die Schwingungen der Carboxylgruppe.

Imidazol-4-carbonsäure hat einen berechneten C-Gehalt von 42.8 % und einen N-Gehalt von 25 %. Während der zu 24.5 % N gemessene Stickstoffgehalt gut damit übereinstimmt, liegt der Kohlenstoffgehalt mit 27.4 % deutlich niedriger als erwartet. Da nach Aussage der NMR-Spektren eine Nitro-Gruppe am Ring ausgeschlossen werden kann, liegt die Verbindung vermutlich (nach Protonierung des freien Elektronenpaares am Stickstoff) als Nitrat vor. Die Zusammensetzung dieser Substanz berechnet sich zu C: 27.4 %; N: 24.0 %; H: 2.9 %. Diese gut mit den Werten aus Tab.17 übereinstimmenden Daten und die Tatsache, daß die Substanz ausschließlich in Wasser gut löslich ist, belegen den Salzcharakter des Rückstandes. Auch die Beobachtung, daß der Rückstand bei 180°C nicht flüchtig ist, kann als Hinweis auf den Salzcharakter aufgefaßt werden. Außerdem kann die im IR-Spektrum beobachtete intensive Bande bei 1380 cm^{-1} der Nitrat-Gruppe zugeordnet werden; sie wird auch von Kaliumnitrat geliefert (138).

Im Gegensatz zu Histidin liefert Imidazol-4-carbonsäure keinen katalytischen Wasserstoffstrom bei der Voltammetrie (Kap.4.8.4). Zur Erklärung kann der Mechanismus der durch Stickstoffbasen katalysierten Wasserstoffabscheidung (Seite 24) herangezogen werden. Bei Histidin wird die Elektronendichte im aromatischen Ring durch den positiv induktiven Effekt des Alkylsubstituenten erhöht, wodurch die Protonierung der Stickstoffbase erleichtert und die katalytische Funktion der Verbindung bei der Wasserstoff-Reduktion bewirkt wird.

Bei Imidazol-4-carbonsäure hingegen wird die Elektronendichte im Ring durch den negativ induktiven Effekt der Carboxylgruppe verringert, wodurch die Protonierung der Stickstoffbase und damit eine Katalyse der Wasserstoffabscheidung verhindert wird. Dies gilt, wie Vergleichsuntersuchungen ergaben, analog auch für die Imidazol-4,5-dicarbon-säure (Aldrich, Steinheim, Art.Nr.24611-5) und für das unsubstituierte Imidazol (Sigma, Deisenhofen, Art.Nr. I0250).

Ein erhöhter Wasserstoffstrom konnte jedoch erwartungsgemäß bei Methylimidazol (Fluka, Buchs, Art.Nr.67580) beobachtet werden, da hier wieder der durch die Methylgruppe verursachte +I-Effekt wirksam ist.

Dem IR-Spektrum nach handelt es sich auch beim Rückstand aus Tryptophan um eine Carbonsäure; das entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb.57) zeigt jedoch, daß mindestens 10 verschieden gebundene Carboxylgruppen vorliegen, angezeigt durch die Signale im Bereich von 162 - 168 ppm (138). Im Protonen-Spektrum (Abb.58) wird daher ein breites, durch Überlagerung geprägtes COOH-Signal bei 10.8 ppm gefunden. Alle anderen in den NMR-Spektren beobachteten Signale treten im aromatischen Bereich auf, was auf ein Gemisch aus aromatischen Carbonsäuren hinweist. Möglicherweise sind jedoch auch aromatische Verbindungen ohne Carboxylgruppe vorhanden. Aufgrund der Fülle der auftretenden Signale konnte den NMR-Spektren keine weitere Information entnommen werden. Der Rückstand wurde daher nach Silylierung⁷⁾ gaschromatographisch untersucht (vgl. Untersuchungen beim Rückstand aus Phenylalanin, Seite 136). Das Gaschromatogramm zeigt etwa 28 verschiedene Signale, von denen 10 deutlich hervortreten. Der Aufschlußrückstand aus Tryptophan ist demnach so komplex zusammengesetzt, daß auf eine detaillierte Aufklärung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wurde. Das ist vertretbar, da die beim Druckaufschluß biologischer Materialien aus Tryptophan gebildeten Stoffe bezüglich der Kohlenstoffbilanz und der in der Voltammetrie verursachten Störungen, mit Ausnahme der Erhöhung des Wasserstoffstromes, ohnehin von nur untergeordneter Bedeutung sind.

Die als Maximum-Dämpfer auf das durch den Phenylalanin-Rückstand verursachte Signal wirkende Substanz konnte nicht identifiziert werden.

⁷⁾Umsatz mit Trimethylsilylchlorid

Analog zu Histidin wird der aromatische Ring auch beim Tryptophan nicht vollständig zerstört, wobei jedoch offen bleibt, ob im Rückstand vorwiegend Benzol- oder Indolderivate vorliegen, da eine Aussage über eine Ringöffnung des stickstoffhaltigen Ringes nicht gemacht werden kann.

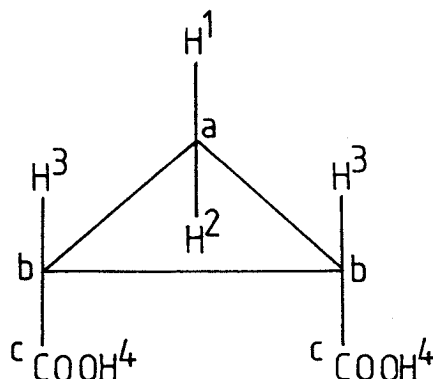
Auch beim Rückstand aus Linolsäure handelt es sich nach Aussage des IR-Spektrums (Abb.53) um eine Carbonsäure. Die NMR-Spektren (Abb.59-62) zeigen, daß die Substanz keine Methylgruppen besitzt und nicht aromatisch ist. Sie verfügt lediglich über drei verschieden gebundene C-Atome im Verhältnis 1:2:2 (Integral ^{13}C -Spektrum) sowie über vier unterschiedliche H-Atome im Verhältnis 1:1:2:2 (Integral ^1H -Spektrum). Sie enthält keinen Stickstoff (Tab.17), ist also eine CHO-Verbindung. Die NMR-Spektren zeigen ferner, daß eine C-C-Doppelbindung nicht vorhanden ist. Insgesamt leitet sich daraus eine ringförmige Carbonsäure mit gesättigtem Ring oder eine gesättigte Dicarbonsäure ab. Die Gruppe $-\text{CH}_2-\text{O}-$ im Molekül ist ausgeschlossen, da das entsprechende Protonen-Signal bei etwa 3.6 ppm, im Epoxid-Ring bei 2.6 ppm (138), fehlt. Auch eine weitere Carbonylfunktion scheidet aus, da im ^{13}C -Spektrum nur das Signal der Carboxylgruppe beobachtet wird. Aus dem Verhältnis der Carboxyl-C-Atome zu den anderen C-Atomen der Verbindung (2:3; vgl. Abb.62) und aus dem Verhältnis der Carboxyl-Protonen zu den übrigen Protonen (1:2; vgl. Abb.59) wird klar, daß die Substanz außerhalb der Carboxylgruppen 3 C-Atome und 4 H-Atome bzw. 6 C-Atome und 8 H-Atome etc. aufweisen muß. Da eine Doppelbindung nicht vorliegt, läßt sich demnach auf eine ringförmige Struktur schließen.

Das Verhältnis von Carboxyl-C-Atomen zu Ring-C-Atomen von 2:3 zeigt, daß die Verbindung entweder eine Dreiring-Dicarbonsäure, eine Sechsring-Tetracarbonsäure oder ein weiteres Vielfaches davon ist. Die im nicht entkoppelten ^{13}C -Spektrum beobachtete H-C-Kopplungskonstante beträgt 167 bzw. 168 Hz und ist typisch für Dreiringe (Abb.61). Aufgrund des

gespannten Ringes haben die C-H-Bindungen weitgehend sp^2 -Charakter (139). Daraus resultiert eine gegenüber einem 6- oder 12-Ring (sp^3 , H-C-Kopplung etwa 125 Hz (139,140)) erhöhte H-C-Kopplungskonstante von etwa 160 Hz (139,140). In Cyclopropan beträgt sie 161 Hz (139,140).

Aus alledem folgt, daß es sich bei dem Rückstand aus Linol-säure um Cyclopropandicarbonsäure handelt. Die Tatsache, daß vier unterschiedliche Protonen-Signale erhalten werden, zeigt, daß es sich um cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure handelt, da die entsprechende trans-Verbindung nur drei, die 1,1-Dicarbonsäure nur zwei verschiedene Signale liefern würde.

Die in den NMR-Spektren beobachteten Signale können demnach folgendermaßen zugeordnet werden.



1H -Signale (Abb.59 und 60):

Die Protonen H^1 und H^2 sind nicht äquivalent; sie führen jeweils zu einem Triplet bei 1.26 und 1.47 ppm durch Kopplung mit H^3 . Da H^1 und H^2 auch untereinander koppeln, sind die Triplets jeweils dublettiert. Die beiden Protonen H^3 sind äquivalent; sie koppeln mit den nicht äquivalenten Protonen H^1 und H^2 zu einem dublettierten Dublett, das bei 2.10 ppm erscheint. Das bei 2.04 ppm auftretende 5-fach aufgespaltene Signal wird durch nicht deuterierte Reste des Lösungsmittels (CD_3COCD_2H) verursacht. Die Signalgruppe bei

1.35 ppm deutet darauf hin, daß die Substanz noch eine Verunreinigung enthält.

^{13}C -Signale (Abb.61 und 62):

Die Ring-Kohlenstoffatome sind zuständig für die Signale bei 12,22 und 21.96 ppm. Der Carboxyl-Kohlenstoff erscheint bei 172.36 ppm. Die H-C-Kopplung (C^{a} koppelt mit den 2 Protonen zu einem Triplett, C^{b} mit H^{a} zu einem Dublett) wurde bereits diskutiert. Die Integrationsverhältnisse stimmen mit der oben angegebenen Struktur überein.

Über das ^{13}C -Spektrum des zugehörigen Dimethylesters kann mit Literaturdaten verglichen werden:

RUPPRECHT und BREMSER (141) geben folgende Verschiebung an:

C^{a} : 11.78 ppm	$\text{C}^{\text{=}}$: 170.36 ppm
C^{b} : 21.49 ppm	Methyl-C: 52.03 ppm

Von ROL und CLAGUE (142) werden folgende Werte mitgeteilt:

C^{a} : 11.10 ppm	$\text{C}^{\text{=}}$: 169.80 ppm
C^{b} : 20.70 ppm	Methyl-C: 51.40 ppm

Der Aufschlußrückstand aus Linolsäure wurde mit Diazomethan gemäß (143) zum Dimethylester umgesetzt. Die anschließend für die chemische Verschiebung ermittelten Werte sind (Abb.63):

C^{a} : 11.68 ppm	$\text{C}^{\text{=}}$: 170.29 ppm
C^{b} : 21.27 ppm	Methyl-C: 52.04 ppm
CDCl_3 (Lösungsmittel): 77.00 ppm	

Die Übereinstimmung ist eine weitere Stütze für die angegebene Struktur. Die durch Elementaranalyse ermittelte Zusammensetzung (44.7 % C; 4.8 % H) stimmt mit den erwarteten Werten genügend gut (46.2 % C; 4.65 % H) überein. Im Massenspektrometer wird ein Molekülpeak von geringer Intensi-

tät bei der Masse 130 beobachtet; die Molmassenbestimmung mit Hilfe der Dampfdruck-Osmometrie ergab eine Molmasse von $132 \pm 4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Auch diese Zahlen belegen, daß nur ein Dreiring vorliegen kann.

cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure ist im Handel nicht erhältlich. Ein von W. Kirmse (Lehrstuhl für Organische Chemie II der Ruhr-Universität Bochum) gemäß (144,145) dargestelltes Präparat liefert in Deuteroaceton ein ^1H -NMR-Spektrum, das mit dem des Rückstandes aus Linolsäure (Abb. 60) übereinstimmt, wenn man von Signalen der Verunreinigungen absieht (Abb.64).

Durch homonukleare zweidimensionale NMR-Spektroskopie (hier: "COSY" = Correlated Spectroscopy) konnte zusätzlich gezeigt werden, daß alle ringständigen Protonen der aus Linolsäure gewonnenen cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure miteinander koppeln, wie für dieses Molekül zu erwarten ist (Abb.65). Die beiden Achsen in Abb.65 enthalten die chemische Verschiebung der Protonen. Nach Einwirken einer von JENEER (146) vorgeschlagenen Impulsfolge und Registrieren der FID (Free Induction Decay) erhält man nach zweidimensionaler Fouriertransformation für nicht koppelnde Protonen lediglich ein Signal auf der Diagonalen, für koppelnde Kerne jedoch zusätzlich Nebendiagonalsignale, die in Form von Höhenlinien aufgezeichnet werden und eine Energieübertragung zwischen den Protonen anzeigen. Ihre Intensität spiegelt den Energietransfer zwischen zwei Kernen wieder und ist ein Maß für die Kopplung. Die zugehörigen Kopplungskonstanten können nach wie vor aus dem eindimensionalen Spektrum der Achsen abgelesen werden.

Um eine Aussage über das den zusätzlichen Signalen im ^1H -NMR-Spektrum zugrundeliegende Nebenprodukt zu gewinnen, wurde der Aufschlußrückstand mit Trimethylsilylchlorid verestert und gaschromatographisch getrennt (Bedingungen siehe Rückstandsanalyse bei Phenylalanin, Seite 136). Man

erhält zwei Signale im Verhältnis 1:20, was den Intensitätsverhältnissen im Protonen-NMR-Spektrum entspricht. Das Nebenprodukt wurde als trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure identifiziert. Zur Absicherung wurde 1,2-Cyclopropandicarbonsäure-diethylester (Aldrich, Steinheim, Art.Nr. 15,729-5; nach GC und ^1H -NMR $\cong$ 99 % trans-Isomeres) durch Druckaufschluß mit Salpetersäure unter den Standard-Bedingungen hydrolysiert, wobei der gebildete Alkohol vollständig abgebaut wird und die freie Dicarbonsäure hinterbleibt. Das ^1H -NMR-Spektrum des Rückstandes enthält neben den zwei sauren Protonen erwartungsgemäß nur zwei Signale bei 1.35 und 2.04 ppm (Abb.66). Das Signal bei 1.35 ppm entspricht dabei demjenigen im Protonen-NMR-Spektrum des Linolsäure-Rückstandes. Eine Aussage über das Signal bei 2.04 ppm ist nicht möglich, da es vom Aceton-Signal ($\text{CD}_3\text{COCD}_2\text{H}$) überlagert wird. Durch Vergleich der Gaschromatogramme der silylierten trans-Dicarbonsäure und des silylierten Rückstandes aus Linolsäure konnte die Verunreinigung jedoch als trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure identifiziert werden.

Der nach Druckaufschluß von Linolsäure und Abrauchen bei 130°C hinterbleibende Rückstand besteht also zu etwa 95 % aus cis- und zu etwa 5 % aus trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß auch trans-Cyclopropandicarbonsäure unter den Bedingungen des Druckaufschlusses nicht zersetzt wird. Dies ist auch dann nicht der Fall, wenn dem trans-Diethylester beim Druckaufschluß Glucose (vgl. Kap.4.8.2) zugesetzt wird.

Auch beim Aufschluß von Phenylalanin entsteht eine Carbonsäure, wie aus dem IR-Spektrum (Abb.53 und Tab.19) hervorgeht.

IR-Bande (cm^{-1})	Schwingung (138)
2200 - 3600	O-H-Valenz, Carbonsäure
1700	C=O-Valenz, Carbonsäure
1540 } 1350 }	Schwingungen der Nitrogruppe
1600	
	C=C-Valenz, Benzolring

Tab.19: Banden im IR-Spektrum des Rückstandes aus
Phenylalanin

Das IR-Spektrum weist auf eine nitrierte Benzoesäure hin. Dieses Produkt würde der Imidazol-4-carbonsäure beim Histidin-Aufschluß entsprechen mit dem Unterschied, daß jetzt ein nitrierter aromatischer Ring vorliegt. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Isomeren handelt, da bei Nitrierungen oft entsprechende Gemische entstehen. Zur näheren Untersuchung wurde der Rückstand silyliert und gaschromatographisch unter den folgenden Bedingungen getrennt:

Meßgerät: Gaschromatograph HRGC 5160
(Carlo Erba Strumentazione, Mailand)
Säule: 23 m DB5; Durchmesser 0.32 mm
Füllung: Methylsilicongummi mit 5 % Phenylsilicon
Trärgas: Helium
Detektor: Flammenionisationsdetektor 300°C
Temperatur: Injektor 300°C
Ofen: zunächst 2 min bei 80°C,
dann mit $10^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ auf 140°C,
30 min bei 140°C.

Das Gaschromatogramm (Abb.67) enthält 7 Signale. Durch Vergleich mit den reinen Isomeren (Fluka, Buchs) konnten die Signale in der Reihenfolge ansteigender Retentionszeiten folgendermaßen zugeordnet werden:

1. 2-Nitrobenzoesäure ($t_R = 13.9$ min)
2. 4-Nitrobenzoesäure ($t_R = 16.0$ min)
3. 3-Nitrobenzoesäure ($t_R = 16.3$ min)
4. 2,4-Dinitrobenzoesäure ($t_R = 33.7$ min)
- 5,6,7. Vermutlich weitere Dinitrobenzoesäuren
($t_R \geq 34$ min)

Bei der Bewertung des Gaschromatogramms (siehe Anhang) ist zu beachten, daß die Signale 4 - 7 mit fünffach höherer Verstärkung als die Signale 1 - 3 registriert sind. Die quantitative Auswertung führt zu folgenden Gehalten im Aufschlußrückstand des Phenylalanins:

2-Nitrobenzoesäure:	15 %
3-Nitrobenzoesäure:	23 %
4-Nitrobenzoesäure:	51 %
2,4-Dinitrobenzoesäure:	etwa 5 %
Übrige Verbindungen:	etwa 5 %

Da die Konzentrationen der den Signalen 5 - 7 zugrundeliegenden Stoffe im Vergleich zu den vier Hauptbestandteilen nur gering sind, wurde nicht näher darauf eingegangen. Es ist aber zu vermuten, daß es sich um weitere nitrierte Benzoesäuren handelt. Eine Überschlagsrechnung erhärtet diese Annahme: Geht man von 10 % Dinitrobenzoesäuren und 90 % Nitrobenzoesäuren aus, so sollte das Gemisch 49.2 % C und 8.9 % N enthalten. Gefunden wurden 47.8 % C und 9.1 % N.

NMR-spektroskopische Messungen wurden nicht durchgeführt; eine weitere Absicherung der Substanzidentität gelang jedoch anhand von Signalen der inversen Square-Wave-Voltammetrie (Kap.4.9.3). Wichtig für die Interpretation ist der

Einfluß beigemischter Glucose auf die Zusammensetzung der Druckaufschluß-Rückstände. Zur Untersuchung wurden die Einwaagen an Phenylalanin, Tryptophan und Histidin auf 1/10 verringert und jeweils soviel Glucose als "Matrixersatz" zugegeben, daß die Gesamt-Masse an Kohlenstoff pro Ansatz 90 mg C betrug. Auf entsprechende Versuche konnte bei Linolsäure und Methionin verzichtet werden, da deren RKG-Werte unabhängig vom Glucose-Zusatz sind (vgl. Kap.4.8.2).

Die ^1H -NMR-Spektren der Rückstände aus Histidin und Tryptophan (Abb.68 und 69) stimmen mit denen der Rückstände aus Aufschlüssen ohne Glucose-Zusatz überein. Der Rückstand aus dem Aufschluß des Phenylalanins unter Zusatz von Glucose besteht nach Aussage des Gaschromatogramms zu 15 % aus 2-Nitrobenzoesäure, zu 19 % aus 3-Nitrobenzoesäure, zu 56 % aus 4-Nitrobenzoesäure und zu etwa 10 % aus anderen Verbindungen. Der Zusatz von Glucose beeinflußt also nur die Menge, nicht aber die Art der zurückbleibenden Verbindungen. Dies gilt auch für den Aufschluß von Benzoessäure: Deren Rückstand besteht, unabhängig vom Glucose-Zusatz, zu 25 % aus 2-Nitro-, zu 70 % aus 3-Nitro- und zu 5 % aus 4-Nitrobenzoesäure. Der Restgehalt an nicht umgesetzter Benzoessäure liegt unterhalb von 0.1 %. Dieses Ergebnis wird in Kap.5 als Hinweis auf den Reaktionsmechanismus diskutiert.

4.9.2 Vergleich der NMR-Spektren von Rückständen nach Aufschluß biologischer Materialien mit denen von Aufschlußrückständen aus definierten Substanzen

4.9.2.1 Linolsäure und natürliche Fette

Der Befund, daß beim Aufschluß natürlicher Fette mit Salpetersäure lediglich 1,2-Cyclopropandicarbonsäure zurückbleibt, wird anhand der ^1H -NMR-Spektren von Rückständen folgender Stoffe erhärtet: Margarine, Olivenöl, Sojaöl, Distelöl, Maiskeimöl, Sonnenblumenöl. Die Spektren weisen gleichermaßen ein cis/trans-Verhältnis von näherungsweise 20:1 aus (Abb.70-75), was an Sonnenblumenöl zusätzlich mit Hilfe der Gaschromatographie überprüft wurde. Das Fehlen weiterer Signale zeigt an, daß alle Fettbestandteile außer den mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Aufschluß vollständig abgetrennt werden, was auch mit den Kohlenstoffbilanzen übereinstimmt.

Linolensäure bildet beim Aufschluß mit Salpetersäure nach Aussage der ^1H -NMR-Spektroskopie und der Gaschromatographie ebenfalls 1,2-Cyclopropandicarbonsäure, jedoch liegen hier etwa 10 % als trans-Isomeres vor (Abb.76). Aus Linolensäure entsteht also im wesentlichen das gleiche Stoffgemisch wie beim Aufschluß der Linolsäure.

4.9.2.2 Weitere biologische Materialien

Um zu zeigen, daß die beim Abbau von Aminosäuren gebildeten Stoffe auch beim Aufschluß relevanter biologischer Materialien entstehen, wurden 200 mg Leber mit 2.0 ml 69 %iger Salpetersäure unter den Standard-Bedingungen aufgeschlossen. Im Anschluß daran wurde bei 130°C zur Trockene abgeraucht. Nach Zusatz von 0.5 ml 65 %iger DNO_3 und 2.0 ml D_2O wurde erneut abgeraucht. Der Rückstand wurde mit 0.5 ml

65 %iger DNO_3 und D_2O zu 10.0 ml gelöst. Das Protonen-NMR-Spektrum dieser Lösung ist in Abb.45 dargestellt; es zeigt die Signale folgender Substanzen:

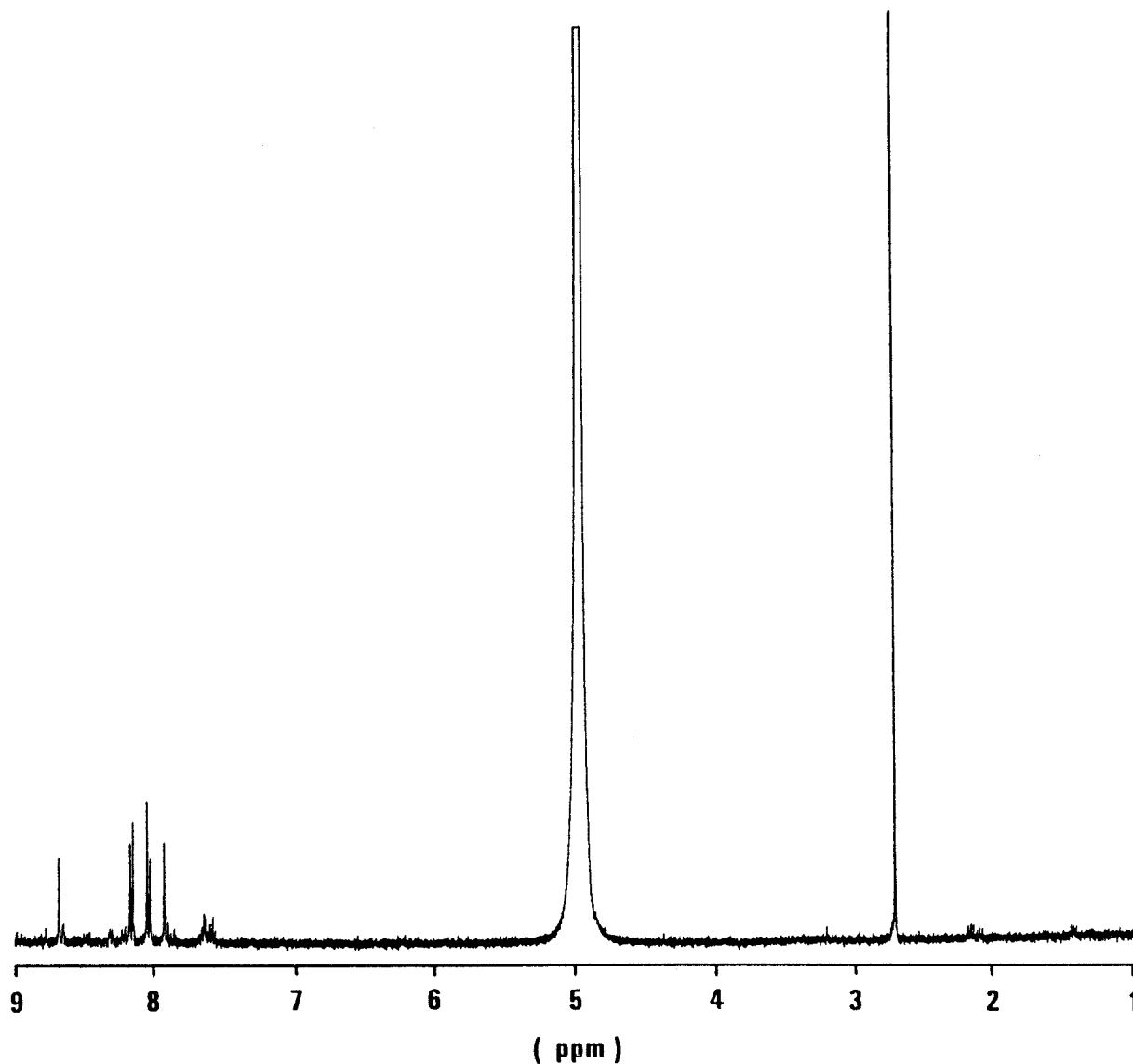


Abb.45: Leber; ^1H -NMR-Spektrum des Druckaufschluß-Rückstandes

Singulett bei 2.7 ppm: Methansulfonsäure

Singulett bei 5.0 ppm: HOD in stark saurer Lösung

Der Bereich der aromatisch gebundenen Protonen ist in Abb.46 gesondert dargestellt und enthält die Signale folgender Stoffe:

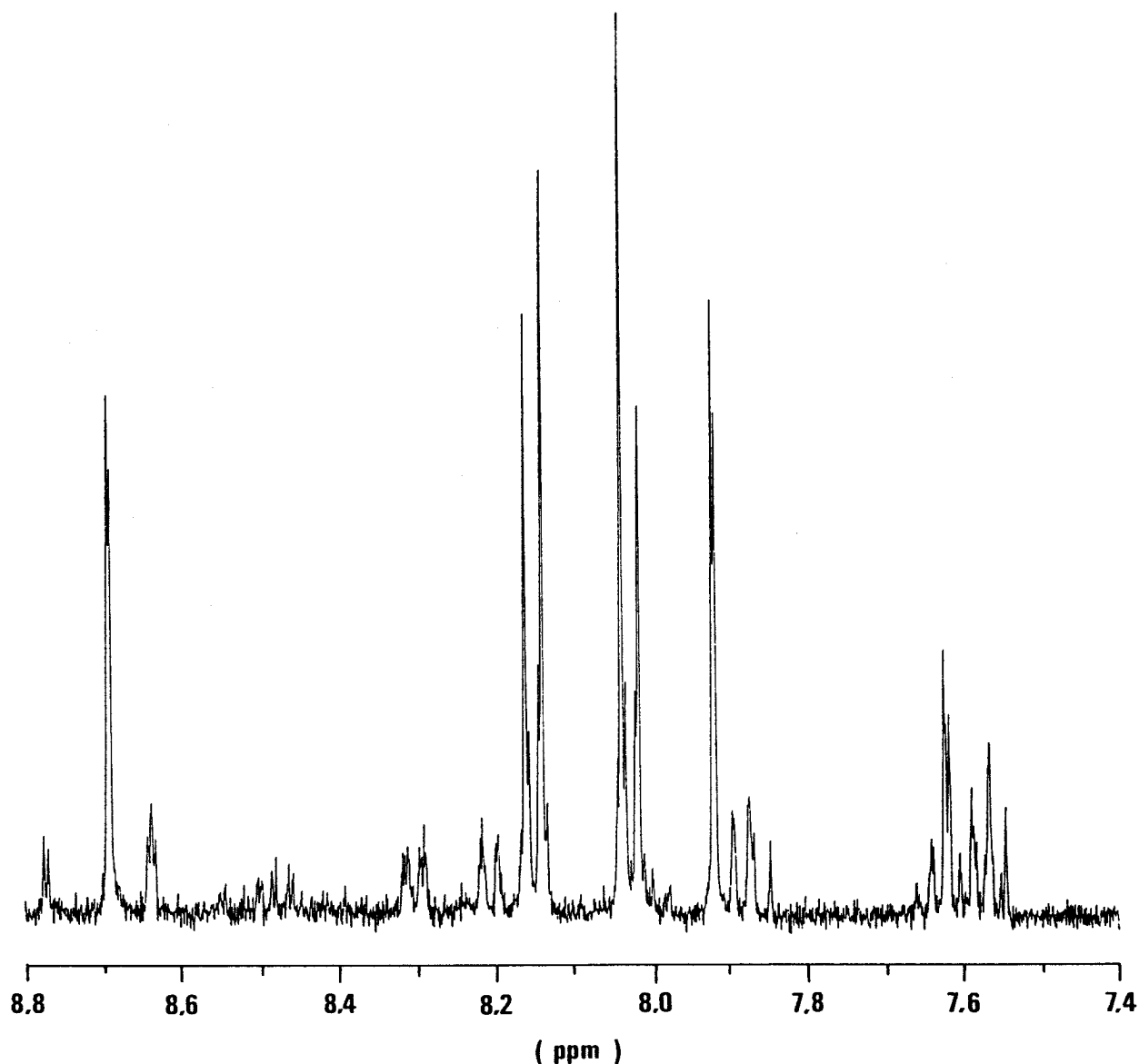


Abb.46: Leber; ^1H -NMR-Spektrum eines Druckaufschluß-Rückstandes; Bereich der aromatisch gebundenen Protonen

Signale bei 7.95 und 8.70 ppm: Imidazol-4-carbonsäure
(vgl. Abb.54)

Signale bei 8.17 und 8.03 ppm: 4-Nitrobenzoesäure
(vgl. Abb.77)

Signalgruppe bei 7.6 ppm: 2-Nitro- und 3-Nitrobenzoesäure
(vgl. Abb.75 und 76)

Signale bei 8.21, 8.30 und 8.64 ppm: 3-Nitrobenzoesäure
(vgl. Abb.75)

Signale bei 7.89 ppm: 2-Nitrobenzoesäure (vgl. Abb.76)

Bezüglich der Signalintensitäten sind folgende Punkte zu beachten:

1. 2- und 3-Nitrobenzoesäure kommen in erheblich niedrigeren Konzentrationen vor als 4-Nitrobenzoesäure.
2. 2- und 3-Nitrobenzoesäure besitzen jeweils vier unterschiedliche H-Atome am Ring, so daß die Intensität der Signale geringer ist als bei 4-Nitrobenzoesäure, die nur zwei Arten von Protonen enthält.
3. Die Konzentrationen aller Stoffe in der Aufschlußlösung sind sehr gering, so daß für das vorliegende Spektrum eine relativ lange Meßzeit (4 h) erforderlich war.
4. Signale von 2,4-Dinitrobenzoesäure sowie der aus Tryptophan gebildeten Stoffe werden aufgrund ihrer niedrigen Konzentrationen nicht beobachtet.

4.9.3 Vergleich der voltammetrischen Signale des Aufschlußrückstandes von Phenylalanin mit den Signalen identifizierter Reaktionsprodukte

In Kap.4.8.4 wurde gezeigt, daß die bei der inversen Square-Wave-Voltammetrie durch Oxidationsprodukte von Phenylalanin verursachten Signale mit denen aufgeschlossener biologischer Materialien übereinstimmen, sofern vor dem Aufschluß Tryptophan zugesetzt wird. Im folgenden werden die nach Aufschluß von Phenylalanin resultierenden Signale (ohne Tryptophan zuzusetzen) mit denen der im Rückstand identifizierten Nitrobenzoesäuren verglichen. Zur Berechnung der zu erwartenden Menge an Reaktionsprodukten wurde ein Aufschluß von 200 mg einer biologischen Substanz mit einem Phenylalanin-Gehalt von 1 % (entsprechend 2 mg Phenylalanin je Aufschluß) angenommen. Bei einem RKG-Wert von 44 % würden im Experiment 0.58 mg Kohlenstoff im Aufschlußrückstand zurückbleiben. Zur voltammetrischen Untersuchung wurden die folgenden Verbindungen mit Einwaagen entsprechend der ermittelten Kohlenstoffmasse von 0.58 mg C

in 0.5 ml 69 %iger Salpetersäure und Wasser zu 10.0 ml gelöst; 1.0 ml der Lösungen wurden mit 5.0 ml Wasser versetzt und die inversen Square-Wave-Voltammogramme registriert. In Einzelversuchen wurden eingesetzt:

1. 2-Nitrobenzoesäure
2. 3-Nitrobenzoesäure
3. 4-Nitrobenzoesäure
4. 2,4-Dinitrobenzoesäure
5. Mischung aus 16 % 2-Nitrobenzoesäure, 25 % 3-Nitrobenzoesäure, 54 % 4-Nitrobenzoesäure und 5 % 2,4-Dinitrobenzoesäure (vgl. Kap.4.9.1).

Man erhält die in Abb.47 und 48 dargestellten Signale.

Das durch den Aufschlußrückstand von Phenylalanin verursachte Maximum (vgl. Abb.41) findet man auch in den Voltammogrammen des Gemisches und der drei einfach nitrierten Benzoesäuren, nicht hingegen bei 2,4-Dinitrobenzoesäure. Verdünnt man die Lösungen, so kann das Maximum, wie auch bei Phenylalanin-Aufschlußlösungen, beseitigt werden. In weiterer Analogie zum Phenylalanin-Rückstand liefern auch die eingesetzten Verbindungen vergleichbare Voltammogramme mit je 2 Signalen. Die Potentiale des intensiveren "Signals 2" sind im folgenden zusammengestellt:

2-Nitrobenzoesäure:	-115 mV
3-Nitrobenzoesäure:	-112 mV
4-Nitrobenzoesäure:	-60 mV
2,4-Dinitrobenzoesäure:	-40 mV
Gemisch:	-70 mV

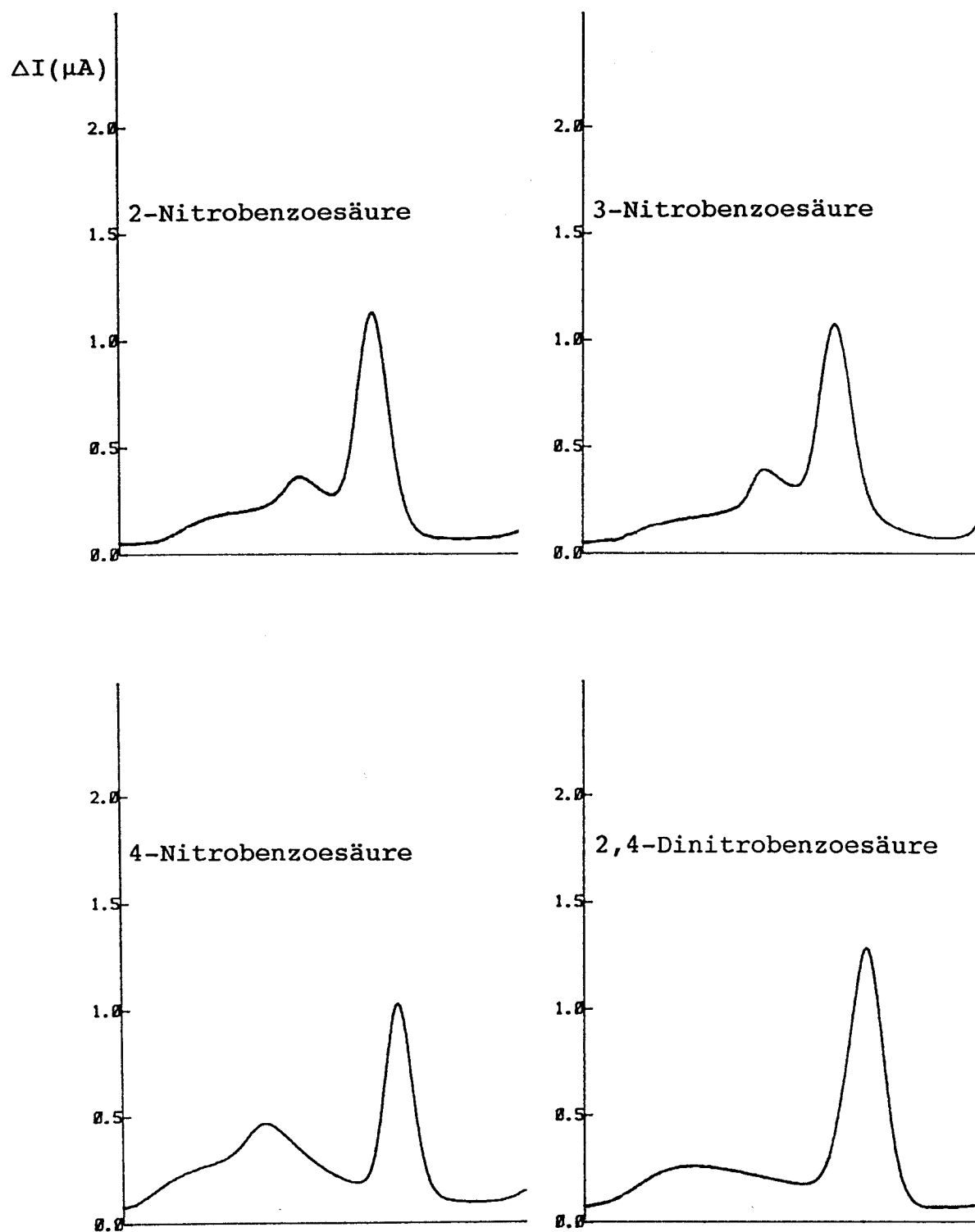


Abb.47: Nitrobenzoesäuren; SWASV-Signale (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

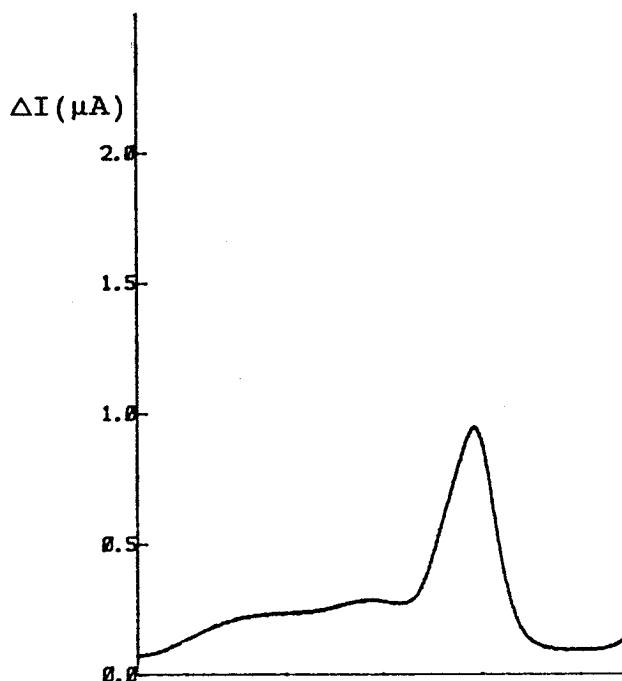


Abb.48: SWASV-Signale der Mischung (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

Die Peakhöhen des "Signals 2" erreichen 700 - 1000 nA. Lediglich das Signal der 2,4-Dinitrobenzoesäure (2 Nitrogruppen!) ist mit 1200 nA intensiver. Schließt man 2 mg Phenylalanin mit Glucosezusatz auf, so liefert der Rückstand ein Signal bei -75 mV mit einer Intensität von etwa 900 nA, was gut mit dem der entsprechenden Mischung von Benzoesäuren (-70 mV, etwa 700 nA) übereinstimmt.

Die Ergebnisse erklären auch die unsymmetrische Form des "Störsignals 2" bei Aufschlußlösungen aus Phenylalanin und biologischen Materialien: Da die Signale von 2-Nitro- und 3-Nitrobenzoesäure bei negativerem Potential auftreten als das der 4-Nitrobenzoesäure, so resultiert in Mischungen ein verbreitertes Kombinationssignal mit einem Spitzenpotential zwischen denen der Einzelverbindungen. Für den "Störpeak 1" kann eine ähnliche Aussage aufgrund seiner flachen Form, die eine genaue Bestimmung des Spitzenpotentials verhindert, nicht getroffen werden.

Schließlich wurde untersucht, welche der vier Säuren einen Beitrag zur Erhöhung des Wasserstoffstromes liefert, wie er bei Aufschlußlösungen von Phenylalanin und bei solchen biologischer Materialien beobachtet wird. Es zeigte sich, daß lediglich 2-Nitro- und 2,4-Dinitrobenzoesäure zu diesem Prozeß beitragen, 3- und 4-Nitrobenzoesäure jedoch nicht. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten ist schwierig, da sowohl die Nitro- als auch die Carboxylgruppe in dieser Hinsicht aktiv sein können: Ersetzt man in 2-Nitrobenzoesäure z.B. zum einen die Carboxylgruppe durch eine Nitrogruppe (1,2-Dinitrobenzol, Fluka, Buchs, Art.Nr. 41970), zum anderen die Nitrogruppe durch eine weitere Carboxylgruppe (Phthalsäure, Fluka, Buchs, Art.Nr.80010), so stellt man fest, daß beide Verbindungen in den der Lösung von 2-Nitrobenzoesäure entsprechenden molaren Konzentrationen einen erhöhten Wasserstoffstrom verursachen. Die Verhältnisse im aromatischen Ring sollten bei den verschiedenen Verbindungen nicht grundlegend unterschiedlich sein, da Carboxyl- und Nitrogruppe beide einen vergleichbaren negativ induktiven Effekt ausüben.

Die Erhöhung des Wasserstoffstromes in Aufschlußlösungen biologischer Materialien kann folglich ausschließlich auf 2-Nitrobenzoesäure, 2,4-Dinitrobenzoesäure und auf Zersetzungsprodukte des Tryptophans (vgl. Kap.4.8.4) zurückgeführt werden.

4.10 Zum elektrochemischen Verhalten nitrierter Benzoessäuren

Die in vorausgehenden Abschnitten der Arbeit beschriebenen voltammetrischen Störsignale, verursacht durch nitrierte Benzoessäuren, sind an dieser Stelle am Beispiel der Leber-Aufschlußlösung noch einmal aufgeführt (Abb.49):

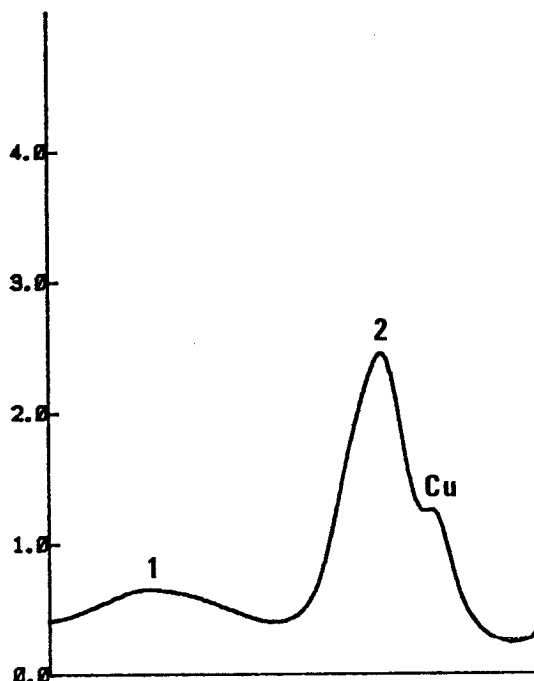
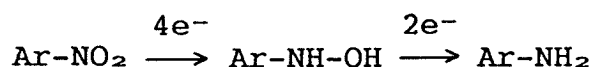


Abb.49: Leber; Durch Nitrobenzoesäuren verursachte SWASV-Störsignale (-0.75 → 0.25 V)

Das voltammetrische Verhalten von Nitrobenzoesäuren ist in der Literatur beschrieben. Danach werden aromatische Nitroverbindungen gemäß



über Hydroxylamine zweistufig zu Aminen reduziert (118,147, 148).

Die Reduktion des Hydroxylamins zum Amin wird nach (118, 147) nur in saurer Lösung ($\text{pH} < 4$) beobachtet. Auch bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurden saure Lösungen ($\text{pH} 0$) verwendet. Die Reduktion zum Amin findet bei negativeren Potentialen statt als die zum Hydroxylamin (118). Somit ist letztere die Grundlage für "Signal 2" (4-Elektronen-Prozeß), während "Signal 1" durch die Reduktion des Hydroxylamins zum Amin verursacht wird (2-Elektronen-Prozeß). Dies

kann auch an den Halbwertsbreiten der Signale abgelesen werden, die mit zunehmender Zahl an umgesetzten Elektronen pro Formelumsatz abnimmt. Die Tatsache, daß die Reduktion zum Hydroxylamin bei 4-Nitrobenzoesäure bei einem um 50 mV positiveren Potential abläuft als bei 3-Nitrobenzoesäure, ist auf den Substituenteneinfluß der unterschiedlich entfernten Carboxylgruppe zurückzuführen und wird auch von ZUMAN (149) beschrieben. Er gibt eine Verschiebung um etwa 60 mV an, führt jedoch 2-Nitrobenzoesäure bei seinen Untersuchungen nicht mit auf. Gemäß (118) ist die Reduktion von Nitrobenzol über Phenylhydroxylamin zu Anilin irreversibel. Dies kann auch für Nitrobenzoesäuren bestätigt werden: 4-Aminobenzoessäure wird unter gleichen Bedingungen im beobachteten Potentialbereich nicht oxidiert.

4.11 Schwefel-, Phosphor- und Stickstoffbilanz beim Druckaufschluß biologischer Materialien

4.11.1 Schwefelbilanz

Schwefel kommt in biologischen Materialien hauptsächlich als Bestandteil der Aminosäuren Methionin, Cystein und Cystin vor. Der in Methionin gebundene Schwefel-Anteil wird beim Druckaufschluß mit Salpetersäure vollständig in Methansulfonsäure überführt (vgl. Kap.4.9). Um die Bindungsform des in Cystin und Cystein gebundenen Schwefels nach dem Aufschluß zu ermitteln, wurden diese Aminosäuren (Eingewichte entsprechend 90 mg C) mit 3 ml 69 %iger HNO_3 unter Druck bei 180°C über 3 h im 35-ml-Tiegel aufgeschlossen. Die ionenchromatographische Analyse der resultierenden Aufschlußlösung ergab, daß der in Cystein und Cystin gebundene Schwefel zu mehr als 95 % in Sulfat überführt wird.

Dies kann auch für Rinderleber bestätigt werden, deren Schwefel-Gehalt 0.83 % und deren Methionin-Gehalt 1.41 % - bezogen auf die Trockenmasse - beträgt (Tab.1 und 14). Aus dem Schwefel-Gehalt des Methionins (21.5 %) folgt, daß 36 % des in Leber gebundenen Schwefels in Form von Methionin, 64 % in Form von Cystein und Cystin vorliegen. Dabei wird davon ausgegangen, daß lediglich die drei genannten Aminosäuren zum Gesamt-Schwefel-Gehalt beitragen. Es ist also zu erwarten, daß 64 % des in Leber enthaltenen Schwefels nach dem Aufschluß als Sulfat vorhanden sind. Die ionenchromatographische Analyse einer Leber-Aufschlußlösung führt zu einem Anteil von 60 %.

4.11.2 Phosphorbilanz

Phosphor tritt in biologischen Materialien im wesentlichen in Phosphorsäureestern auf. Polyphosphorsäuren werden durch Salpetersäure bei 180°C in Monophosphorsäure überführt, Phosphorsäureester, wie z.B. Glucose- und Adenosinphosphate, werden hydrolytisch gespalten (vgl. Kap.4.8.2). Wie ionenchromatographisch gezeigt werden konnte, hinterbleibt beispielsweise nach dem Druckaufschluß von 20 mg $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Art.Nr.6591) mit 3 ml 69 %iger Salpetersäure (180°C, 3 h, 35-ml-Tiegel) ausschließlich Phosphat als Phosphorverbindung. Unter gleichen Aufschlußbedingungen wird auch der in Leber gebundene Phosphor-Anteil quantitativ in Phosphat überführt. Dies konnte durch Ionenchromatographie gezeigt werden, nachdem die Aufschlußlösung mit konzentrierter Salzsäure mehrfach bis fast zur Trockene abgeraucht war, um überschüssige HNO_3 weitgehend zu entfernen. Für die Richtigkeit dieser Bilanz muß jedoch vorausgesetzt werden, daß nach dem Druckaufschluß eventuell vorliegende phosphororganische Verbindungen nicht durch das beim Abrauchen mit HCl entstehende Nitrosylchlorid NOCl zu Phosphat umgesetzt werden.

4.11.3 Stickstoffbilanz

Der Stickstoffgehalt biologischer Materialien wird in erster Linie durch Aminosäuren bestimmt. Diese enthalten eine α -ständige Aminogruppe. Zusätzlich kann Stickstoff in Amidgruppen (Asparagin, Glutamin), in weiteren Aminogruppen der Seitenkette (Lysin, Arginin) sowie als Teil aromatischer Ringsysteme gebunden sein (Tryptophan, Histidin).

Harnstoff wird im Verlauf des Druckaufschlusses vollständig mineralisiert (vgl. Kap.4.8.2). Nach Abrauchen der Aufschlußlösung bei 130°C hinterbleibt Ammoniumnitrat, dessen Ammoniumionen zu einem erhöhten Wasserstoffstrom bei der inversen Voltammetrie führen (vgl. Kap.4.8.4). Zusätzlich wird eine Depression des Zink-Signals beobachtet.

Um zu klären, ob Ammonium auch beim Aufschluß von Aminosäuren entsteht, wurden folgende Aminosäuren (Einwaage entspr. 90 mg C) mit 3 ml 69 %iger HNO_3 bei 180°C über 3 h im 35-ml-Tiegel unter Druck aufgeschlossen: Glutamin, Asparagin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin, Arginin, Leucin. In den nicht zusätzlich abgerauchten Aufschlußlösungen wurde der Ammoniumgehalt nach KJELDAHL bestimmt. Die Analysen ergaben, daß mehr als 99.9 % des eingesetzten Stickstoffs nicht zu Ammonium umgesetzt werden. Der Aufschluß der Aminosäuren Leucin, Asparaginsäure und Glutaminsäure zeigte dabei, daß die α -ständige Aminogruppe nicht zu Ammonium reagiert. Dieses ist unter den oxidierenden Aufschlußbedingungen auch nicht zu erwarten. Analoges gilt auch für alternativ gebundene Aminogruppen, wie der Aufschluß von Lysin und Arginin belegt. Aus den Säureamid-Gruppen von Glutamin und Asparagin ist jedoch primär eine hydrolytische Ammoniak-Abspaltung zu erwarten. Wenn das so ist, kann gefolgert werden, daß Ammoniak während des Druckaufschlusses oxidiert wird. Das Normalpotential für die Reaktion $\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons 1/2 \text{N}_2 + 4 \text{H}^+ + 3 \text{e}^-$ beträgt 0.27 V, jenes für die

Salpetersäure-Reduktion gemäß



Eine Oxidation von NH_3 zu N_2 ist thermodynamisch also möglich. Um die Reaktion experimentell zu belegen, wurden 0.30 ml 25 %ige wäßrige NH_3 -Lösung (Merck, Darmstadt, Art.Nr.5428) mit 3 ml 69 %iger HNO_3 versetzt und im Druckaufschlußsystem erhitzt. In den aus mehreren Versuchen resultierenden Lösungen wurden stark variierende Ammoniumgehalte nachgewiesen (entsprechend ≤ 0.5 bis etwa 90 % des eingesetzten NH_3); eine praktisch vollständige Zersetzung des Ammoniums gelang nur bei etwa einem Zehntel der Aufschlüsse. Ein ähnlich unreproduzierbares Verhalten wurde auch beim Aufschluß von Harnstoff beobachtet. Es wird vermutet, daß die Reaktion zwar möglich ist, jedoch zu verschiedenen Zeiten nach Aufschlußbeginn "anspringt". Je nach Lage dieses Zeitpunktes erhält man einen mehr oder weniger vollständigen Umsatz. Die Ursache für dieses Verhalten konnte nicht ermittelt werden. Interessant ist jedoch, daß auch diese Reaktion durch Glucose-Zusatz gestartet werden kann (vgl. Kap.4.8.3): Setzt man zu 0.30 ml 25 %iger NH_3 -Lösung und 3 ml 69 %iger Salpetersäure 200 mg Glucose zu, so werden bei allen Aufschlüssen mehr als 99.9 % des eingesetzten NH_3 vermutlich zu N_2 umgesetzt. Dies gilt auch für analog durchgeführte Harnstoff-Aufschlüsse. Demnach kann auch beim Abbau des Ammoniums ein Einfluß der NO_2 -Konzentration in der flüssigen Phase angenommen werden, wie er bei organischen Verbindungen beobachtet wird (vgl. Kap.4.6.4 und 4.8.3).

Aus den letztgenannten Experimenten geht hervor, daß nach Druckaufschluß biologischer Materialien kein Ammonium hinterbleibt, was am Beispiel von Rinderleber durch die Ammoniumbestimmung nach KJELDAHL gezeigt werden konnte: Nach Druckaufschluß von 200 mg Leber (Bedingungen siehe Kap.4.6.1) sind weniger als 0.1 % des in Leber gebundenen Stickstoffs in Form von Ammonium im Rückstand enthalten.

5. Diskussion

Der Druckaufschluß biologischer Probenmaterialien in ummantelten Gefäßen aus Polytetrafluorethylen (PTFE), der aus Sicherheitsgründen mit konzentrierter Salpetersäure ohne den Zusatz weiterer Oxidationsmittel erfolgen sollte, kann aufgrund der thermischen Eigenschaften des PTFE nur bei Temperaturen bis maximal 200°C - abhängig von der Güte und Verarbeitung des Kunststoffes - durchgeführt werden. Im Verlauf der Aufschlußreaktion werden zwar die meisten organischen Verbindungen bzw. die Hauptanteile der in biologischen Materialien gebundenen Komponenten mineralisiert, es gelingt aber nicht, die in solchen Proben enthaltenen Stoffe Phenylalanin, Tryptophan, Histidin, Methionin und Linolsäure so weit umzuwandeln, daß sie als bei 130°C flüchtige Verbindungen abgetrennt werden können.

Ein praktisch vollständiger Abbau der oben genannten Stoffe ist erst bei einer Aufschlußtemperatur von 300°C möglich, wie sie mit dem Hochdruckverascher nach KNAPP erreicht werden kann. Auch durch Nachbehandlung von Druckaufschlußrückständen mit Perchlorsäure gelingt eine weitgehende Mineralisierung. In beiden Fällen erhält man Lösungen, in denen die Konzentration organischer Stoffe so gering ist, daß eine störungsfreie inversvoltammetrische Bestimmung von Spuren Zn, Cd, Pb und Cu gelingt. Lediglich die nach Druckaufschluß mit Salpetersäure gelöst zurückbleibenden Stickoxide müssen vor der Analyse durch Abrauchen entfernt werden, da sie andernfalls zu hohen Untergrundströmen führen, die besonders die Bestimmung von Zn und Cd erschweren oder verhindern können. Die durch zusätzliches Abrauchen in einem kleinen Quarztiegel eingebrachte Kontamination ist bei entsprechender Sorgfalt meist belanglos: Für das Gesamtverfahren (Aufschluß mit dem Hochdruckverascher in Quarzgefäßen, Abrauchen im Quarztiegel, Auffüllen auf 10.0 ml im Meßkolben, inversvoltammetrische Bestimmung) wurden die als Blindwerte eingebrachten Schwermetallmengen für Pb und Cd

zu ≤ 0.2 ng ermittelt. Damit ist auch von der Blindwertbelastung her eine Bestimmung dieser Elemente in biologischen Materialien im unteren $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ -Bereich möglich.

Die weite Verbreitung und einfache Handhabung des gut reproduzierbaren Druckaufschlusses im PTFE-Gefäß rechtfertigt es, die mechanistischen Abläufe beim Umsatz biologischer Materialien mit Salpetersäure unter diesen Bedingungen zu verfolgen und die zurückbleibenden organischen Stoffe nach Art und Menge zu untersuchen. Die bereits in einer früheren Arbeit (22) als optimal ermittelten Arbeitsparameter für den Druckaufschluß im PTFE-Gefäß wurden an zwei weiteren Materialien (Rinderleber und Braunalgen, jeweils gefriergetrocknet und pulverisiert) bestätigt. Für den Aufschluß in 35-ml-Gefäßen sind folgende Bedingungen zu empfehlen: Temperatur: 170-180°C; Aufschlußzeit: 3 h; Oxidationsmittel: 2 ml 69 %ige Salpetersäure; Einwaage: Probenmaterial entsprechend 100 mg C. Voraussetzung für die Parametereinstellung ist, daß das System einem Innendruck von etwa 20 bar standhält. Als Zielgröße der Optimierung wurde der Restkohlenstoffgehalt des Aufschlußrückstandes (RKG, Definition siehe S.49) gewählt, der nach Abrauchen überschüssiger Säure bei 130°C (Kp. $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$: 122°C) sowie der gelösten Stickoxide und vorhandener flüchtiger organischer Verbindungen durch Verbrennung und coulometrische CO_2 -Titration bestimmt wurde. Dieses Verfahren erwies sich als ausreichend nachweisstark und ermöglicht eine relativ rasche Analyse (siehe auch (22)). Zur Kohlenstoffbestimmung ist es erforderlich, überschüssige Säure zu entfernen, um Störungen der auf pH-Änderung basierenden coulometrischen CO_2 -Bestimmung zu vermeiden. Die Methode liefert keine Information über eventuell nach dem Aufschluß vorliegende leicht flüchtige organische Verbindungen. Da jedoch bekannt ist, daß Druckaufschlußlösungen zur voltametrischen Bestimmung von Zn, Cd und Pb im allgemeinen abgeraucht werden müssen, um störende Stickoxide zu entfernen, spielen leicht flüchtige organische Verbindungen zur Beurteilung von Ana-

lysenstörungen hier keine Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß nach Druckaufschluß biologischer Proben bei 180°C etwa die Hälfte des organisch gebundenen Kohlenstoffs in Form von Verbindungen vorliegt, die bei 130°C flüchtig sind. Auch die nach Aufschluß mit Salpetersäure bei 300°C bzw. nach Behandlung mit Perchlorsäure noch vorhandenen organischen Stoffe setzen sich aus leichtflüchtigen und schwerflüchtigen Substanzen zusammen. Sofern bei der Perchlorsäure-Nachbehandlung unter Rückfluß gearbeitet wird, verbleiben geringe Mengen flüchtiger organischer Stoffe in der Aufschlußlösung. Die dadurch bedingten Analysenstörungen bei der inversen Voltammetrie sind jedoch bedeutungslos. Untersucht wurden in dieser Arbeit daher nur die schwerflüchtigen organischen Verbindungen, die nach Druckaufschluß bei 180°C mit nachfolgendem Abrauchen bei 130°C zurückbleiben. Es konnte gezeigt werden, daß folgende Umsetzungen zu definierten Verbindungen im Aufschlußrückstand ablaufen.

Phenylalanin → 15 % 2-Nitrobenzoesäure
23 % 3-Nitrobenzoesäure
51 % 4-Nitrobenzoesäure
5 % 2,4-Dinitrobenzoesäure und etwa
5 % weitere Stoffe, vermutlich ebenfalls
nitrierte Benzoesäuren

Histidin $\longrightarrow$ Imidazol-4-carbonsäure als HNO_3 -Addukt

Methionin $\longrightarrow$ Methansulfonsäure

Linolsäure $\longrightarrow$ 95 % cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure
5 % trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure

Tryptophan → Gemisch aus mindestens 10 aromatischen Verbindungen, überwiegend Carbonsäuren

Von diesen Stoffen besitzt lediglich Methansulfonsäure bei 130°C einen so hohen Dampfdruck, daß sie unter den gewählten Abrauchbedingungen etwa zur Hälfte zusammen mit der verdampfenden Salpetersäure verflüchtigt wird. Die Kohlenstoffbestimmung nach Abrauchen bei 130°C ist daher für Methansulfonsäure nur schlecht reproduzierbar. Gut reproduzierbare voltammetrische Störsignale sowie Kohlenstoffgehalte in Aufschlußlösungen biologischer Materialien erhält man jedoch für die bei 130°C praktisch quantitativ im Rückstand verbleibenden Nitrobenzoesäuren. Dies wird deutlich, wenn man das durch Nitrobenzoesäure verursachte "Störsignal 2" bei abgerauchten und nicht abgerauchten Aufschlußlösungen von Leber (Abb. 21 und 23) vergleicht: Die Signale unterscheiden sich nur unerheblich in ihrer Höhe.

Für die gute Reproduzierbarkeit der Kohlenstoffbestimmung nach Abrauchen bei 130°C ist neben der geringen Flüchtigkeit der Nitrobenzoesäuren auch das Verdampfungsverhalten der aus Histidin gebildeten Imidazol-4-carbonsäure verantwortlich. Diese in Form eines ammoniumanalogen salpetersauren Salzes vorliegende Verbindung enthält zusammen mit den Nitrobenzoesäuren die Hauptmenge des im Rückstand verbleibenden organischen Kohlenstoffs und kann selbst bei 180°C nicht verflüchtigt werden, so daß sie quantitativ im Aufschlußrückstand verbleibt. Die aus Tryptophan gebildeten Stoffe spielen, wie auch Methansulfonsäure, aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in dieser Hinsicht keine wesentliche Rolle; jedoch zeigt die gute Reproduzierbarkeit der Kohlenstoffbestimmung aus Tryptophan-Aufschlußlösungen nach Abrauchen bei 130°C, daß die zurückbleibenden Verbindungen auch hier nicht nennenswert flüchtig sind. Analoges gilt für die Cyclopropandicarbonsäuren, welche die Kohlenstoffbilanz bei Fettaufschlüssen bestimmen.

Für die Vollständigkeit von Aufschlüssen definierter organischer Verbindungen ist wesentlich, daß im Aufschlußsystem eine genügend hohe NO_2 -Konzentration entsteht, da Stick-

stoffdioxid an den Abbaureaktionen maßgebend beteiligt ist. Bei Biomaterialien wird eine ausreichende NO_2 -Konzentration bereits durch den Umsatz der im Überschuß vorliegenden leicht abbaubaren organischen Stoffe und die damit verbundene Reduktion der Salpetersäure gewährleistet. Bei manchen Reinsubstanzen können vergleichbare Bedingungen, etwa durch Zusatz einer bestimmten Menge an vollständig abbaubarer Glucose, geschaffen werden. Für die Vollständigkeit des Aufschlusses spielt es keine Rolle, ob Substanzen in Form von Makromolekülen bzw. hydrolysierbaren Verbindungen eingesetzt werden oder ob die Einzelkomponenten solcher Stoffe aufgeschlossen werden. Da unter stark sauren Bedingungen primär eine Hydrolyse von Ester-, Peptid-, Amid- und glykosidischen Bindungen abläuft, liegen vermutlich noch vor den eigentlichen oxidativen Abbauprozessen kleinere Molekülbausteine vor, die dann unabhängig voneinander reagieren. Der Einfluß von NO_2 beim Aufschlußprozeß ist so bedeutend, daß die durch Reaktion allein mit Salpetersäure erreichbaren Aufschlußraten durch weiteren Zusatz von NO_2 deutlich erhöht werden können. Dies gelingt nicht mit anderen Gasen (CO_2 , $\text{C}_2\text{F}_4\text{Cl}_2$), ist also nicht auf eine Druckerhöhung zurückzuführen. Die Wirkung von NO_2 wird auch beim offenen Aufschluß mit Salpetersäure z.B. in einem Kolben mit aufgesetzten Steigrohr (22,23) deutlich: Während nicht gerührte, ruhig siedende Lösungen relativ lange durch gelöstes NO_2 braun gefärbt sind und dementsprechend zu niedrigen Restkohlenstoffgehalten führen, findet man bei gerührten Lösungen, aus denen die gelösten Stickoxide frühzeitig ausgetrieben werden, teilweise erheblich höhere RKG-Werte. Wesentliche Voraussetzungen für die Ergebnisse der zugrundeliegenden Untersuchungen ist ein über alle Aufschlußschritte (Aufheizen, Aufschluß, Abkühlen) völlig dichtes Aufschlußsystem. Bei dem in dieser Arbeit gewählten Gerät ist dies auch langfristig gewährleistet. Bei Aufschlüssen in undichten Tiegeln muß man als Folge des NO_2 -Verlustes mit einer Verschlechterung des Kohlenstoffumsatzes rechnen. NO_2 kann also keineswegs als Endprodukt der

Redoxreaktion, sondern muß als Zwischenprodukt mit weiterer Funktion als Oxidationsmittel angesehen werden.

Unter Beachtung dieser Randbedingungen gelingt es, die beim Aufschluß biologischer Materialien resultierenden Restkohlenstoffgehalte allein aus den Aminosäure- und Linolsäuregehalten dieser Materialien sowie den RKG-Werten dieser Verbindungen zu berechnen. Unter Bezugnahme auf die Restkohlenstoffgehalte der in Biomaterialien enthaltenen Einzelverbindungen lassen sich einige mechanistische Effekte beim Druckaufschluß diskutieren.

Auf den Einfluß von gelöstem NO_2 in der flüssigen Phase und auf die Möglichkeit, NO_2 durch Zusatz von Glucose zu erzeugen, wurde bereits hingewiesen. Dieser Effekt wird beim Aufschluß von Betain besonders deutlich: Während diese Verbindung mit HNO_3 allein praktisch nicht zersetzt wird, kann die Reaktion durch Zusatz von wenig Glucose eingeleitet werden, wobei Betain fast vollständig umgesetzt wird.

Auch die Vermutung, daß Ester-, Peptid-, Amid- und glykosidische Bindungen primär hydrolysiert werden, wobei die Hydrolyseprodukte unabhängig voneinander weiterreagieren, konnte experimentell erhärtet werden.

Bei systematischen Untersuchungen zum Abbauverhalten einer großen Zahl unterschiedlicher Substanzen wurde festgestellt, daß Verbindungen aus bestimmten Stoffgruppen praktisch vollständig im Salpetersäureaufschluß unter Druck zersetzt werden. Dies gilt für Kohlenhydrate und für gesättigte Fettsäuren, ebenfalls für die Alkane Eicosan und Cyclododecan, für Eicosanol als langkettigen Alkohol und für die Dicarbonsäuren Malon- und Tetradecondisäure. Auch eine Doppelbindung (Ölsäure) ändert an diesem Verhalten nichts. Der Aufschluß des Cyclododecans zeigt, daß die Abbaureaktion an einer Methylengruppe der gesättigten Kette einsetzt. Dies wird auch durch den vollständigen Abbau von

Polyethylen untermauert. Endständige Methylgruppen sind dazu offensichtlich nicht notwendig, wie diese Versuche und die Aufschlüsse von Dicarbonsäuren zeigen. Bei Methionin wird die endständige Methylgruppe nicht oxidiert, woraus jedoch nicht geschlossen werden kann, daß endständige Methylgruppen prinzipiell nicht angegriffen werden. Beim Methionin ist möglicherweise ein stabilisierender Effekt vom benachbarten Schwefel her vorhanden. Methylamine gehören z.B. zu den methylhaltigen Verbindungen, die vollständig abgebaut werden. Analoges gilt auch für die drei N-methylierten Aminosäuren. Bei diesen Verbindungen und bei den Methylaminen stellt sich jedoch die Frage, ob der Angriff oxidierender Agentien am Stickstoff oder am Methylkohlenstoff oder, bei den Aminosäuren, an der Seitenkette einsetzt.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können mit HNO_3 bei 180°C nicht quantitativ mineralisiert werden:

Die cis-cis-substituierten Doppelbindungen der Gruppe $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-R}_2$ werden fast ausschließlich zu cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure umgesetzt. Dieses Produkt sowie die ebenfalls nachweisbare trans-Verbindung zeigen, daß der Dreiring so stabil ist, daß er von Salpetersäure bei 180°C nicht angegriffen wird. Die Ausbeute an Cyclopropandicarbonsäure beträgt 36 % der Theorie, woraus folgt, daß zusätzlich Nebenreaktionen ablaufen. Da aus natürlichen Fetten mit HNO_3 unter Druck ausschließlich diese Verbindung (95 % cis- und 5 % trans-Isomeres) in hoher Reinheit erhalten wird, kann die Reaktion auch präparativ angewendet werden. Alle anderen in natürlichen Fetten enthaltenen Stoffe werden beim Druckaufschluß abgebaut. Für eine präparative Anwendung wäre es jedoch notwendig, ein Druckaufschlußsystem mit höherer Kapazität zu entwickeln. Möglicherweise kann die Ausbeute auch durch Optimierung der Aufschlußparameter (z.B. eine Temperaturerniedrigung) gesteigert werden. Eine dritte Doppelbindung, wie bei Linolensäure vorhanden, hat keinen Einfluß auf die Reaktion und auf das Endprodukt.

Lediglich das cis/trans-Verhältnis ist mit 9:1 leicht zugunsten des trans-Isomeren verändert. Das in natürlichen Fetten gebundene Glycerin wird erwartungsgemäß vollständig zersetzt (vgl. Kohlenhydrate).

Aminosäuren als untersuchte dritte große Stoffgruppe werden bis auf wenige Ausnahmen quantitativ zersetzt; grundsätzlich wird ein vollständiger Abbau der Gruppierung $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ beobachtet. Das weitere Verhalten einer Aminosäure hängt von ihrem charakteristischen Rest ab. Während aliphatische Reste bis auf die CH_3 -S-Gruppe des Methionins vollständig zerlegt werden, gelingt dies bei unsubstituierten aromatischen Ringen nicht. So wird bei Histidin lediglich die Seitenkette abgebaut; die zum Ring benachbarte Methylengruppe wird - etwa vergleichbar der Oxidation von Toluol mit Permanganat oder Salpetersäure (143) zu Benzoesäure - zur Carboxylgruppe oxidiert. Die entstehende aromatische Carbonsäure ist bei 180°C gegen Salpetersäure stabil und wird aufgrund der Protonierung der zwei Ring-Stickstoffatome in Salpetersäure nicht nitriert. Der Angriff des nitrierenden NO_2^+ -Ions (Autoprotonierung von HNO_3 gemäß: $2 \text{HNO}_3 \rightleftharpoons \text{NO}_2^+ + \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$) an ein Kation ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Da die Ausbeute an Imidazol-4-carbonsäure nur 38 % der Theorie beträgt, müssen weitere beim Aufschluß ablaufende Reaktionen dafür verantwortlich sein, daß 62 % des Aromaten zu anderen Endprodukten reagieren.

Bei Phenylalanin hingegen wird der Abbau der Seitenkette zur Carboxylgruppe von der Nitrierung des Phenylrestes begleitet. Solange die $-\text{CH}_2-\text{R}$ -Gruppe am Ring vorhanden ist, wird die Nitrierung aufgrund des aktivierenden und dirigierenden Einflusses dieser Gruppe in ortho- und para-Stellung erfolgen. Dabei ist unklar, warum die weniger wahrscheinliche Para-Verbindung im Überschuß entsteht. Möglicherweise wird die Nitrierung der ortho-Position durch den Aminosäurerest zunächst sterisch erschwert. Die Tatsache, daß

3-Nitrobenzoesäure entsteht, deutet darauf hin, daß die Nitrierung teilweise erst im Anschluß an die Oxidation der Seitenkette abläuft. Die dann vorliegende Carboxylgruppe dirigiert in meta-Position. Dies wird auch beim Aufschluß von Benzoesäure deutlich, durch den zu 70 % meta-Nitrobenzoesäure geliefert wird. Für Hippursäure, die zunächst zu Benzoesäure und Glycin hydrolysiert wird, gilt Analoges. Bei Phenylalanin beträgt die Ausbeute an unzersetzten Aromaten 57 % der Theorie. Auch hier werden bei weiteren Abbaureaktionen flüchtige Stoffe gebildet.

Interessant ist der Einfluß von Substituenten, die eine Nitrierung erleichtern: So werden Tyrosin und Dihydroxyphenylalanin sowie die drei isomeren Hydroxybenzoesäuren vollständig zersetzt. Dabei reagieren die substituierten Phenylalanine auf Zusatz von Salpetersäure spontan und heftig. Weniger deutlich ist der Effekt der ebenfalls aktivierenden Aminogruppe in 4-Aminohippursäure. Jedoch wird auch hier ein erheblich niedrigerer RKG-Wert als bei Hippursäure beobachtet, wenn auch unzersetzte organische Verbindungen hinterbleiben.

Die Reaktion des Tryptophans ist kompliziert. Sowohl Gaschromatographie als auch Kernresonanzspektroskopie zeigen die Komplexität des Rückstandes an, der aus etwa 10 dominierenden, insgesamt jedoch aus vermutlich mehr als 30 Stoffen zusammengesetzt ist. Da es sich ausschließlich um Aromaten handelt (NMR), stellt sich die Frage, ob der Heteroring unter Bildung von Benzolderivaten geöffnet wird oder in Form substituierter Indole erhalten bleibt. Da Tryptophan in der Kohlenstoffbilanz nur eine untergeordnete Rolle spielt, wäre eine weitere Identifizierung der im Rückstand enthaltenen Verbindungen nur im Hinblick auf deren nachgewiesene Eigenschaft als Maximum-Dämpfer bei der Voltammetrie von Interesse. Wegen des hohen Aufwands bei der Trennung und Analytik dieser Stoffe wurde auf eine Bearbeitung jedoch verzichtet. Bereits bei der Zugabe von 69 %iger

Salpetersäure zu Tryptophan erfolgt eine heftige Reaktion, die im Verlauf weniger Sekunden abklingt. Sie hinterläßt eine schwarze Suspension, die darauf hinweist, daß vermutlich schon vor dem eigentlichen Aufschluß ein komplexes Stoffgemisch entsteht, das dann weiter umgesetzt wird.

Auch die aromatische Nicotinsäure wird erwartungsgemäß nur unvollständig abgebaut. Die resultierenden Produkte sind hier jedoch nicht näher untersucht worden, da Nicotinsäure in biologischen Materialien nur in vernachlässigbar geringen Konzentrationen vorhanden ist. Die schwachen Signale der inversen Square-Wave-Voltammetrie lassen jedoch vermuten, daß keine nitrierten Stoffe entstanden sind. Dies ist auch deshalb anzunehmen, weil Nicotinsäure wie Imidazol-4-carbonsäure in saurer Lösung als ammoniumanaloges Kation vorliegt, an dem ein Angriff des nitrierenden NO_2^+ -Ions verhindert wird. Die Beobachtung, daß das Reaktionsprodukt zu einer Erhöhung des Wasserstoffstroms bei der Voltammetrie führt, deutet darauf hin, daß nach wie vor eine organische Stickstoffbase im Aufschlußrückstand enthalten ist. Da Imidazol-4-carbonsäure, die eine der Nicotinsäure ähnliche Struktur besitzt, unter den Bedingungen des Druckaufschlusses stabil ist, ist zu vermuten, daß auch Nicotinsäure unter den gleichen Bedingungen nicht angegriffen wird. Unklar bleibt dann jedoch, warum nach dem Aufschluß nur noch 65 % des ursprünglichen Kohlenstoffs vorhanden sind. Es entsteht also entweder ein anderes Endprodukt oder die Umsetzung der Nicotinsäure ist nach 3 h noch nicht abgeschlossen, woraus weiter gefolgert werden müßte, daß Nicotinsäure prinzipiell abbaubar ist. Ein der letzteren Überlegung zugrundeliegender kinetischer Effekt tritt jedoch bei den Stoffen, welche die Kohlenstoffbilanz bestimmen, nicht auf, was daran zu erkennen ist, daß durch Verlängerung der Aufschlußzeit eine Verringerung des RKG-Wertes nicht erreicht werden kann. Dies wurde auch in (22) schon gezeigt: Nach Druckaufschluß von Schweineblut und Sonnenblumenöl wurden die Aufschlußrückstände erneut mit

überschüssiger Salpetersäure über 3 h im Druckgefäß behandelt. Eine Verringerung der RKG-Werte wurde nicht beobachtet. Es liegen also nach dem Aufschluß im Rückstand Verbindungen vor, die gegen HNO_3 bei 180°C beständig sind. Das Verhalten der Nicotinsäure müßte also in weiteren Experimenten untersucht werden. An dieser Stelle soll nur noch mit dem Aufschluß von Dihyronicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) verglichen werden, das eine Art nicht-aromatischer, reduzierter Form der Nicotinsäure - gebunden an Zucker - enthält. Während Nicotinsäure, auch in Form von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP), einen RKG-Wert von 65 % liefert, beobachtet man beim Aufschluß von NADH nur 5.8 % RKG. Bezogen auf die Gruppierung $-\text{N}(\text{C}_5\text{H}_4)-\text{CONH}_2$ entspricht dies einem RKG-Wert von 20 %. Der nichtaromatische Charakter des NADH begünstigt zwar zunächst einen Abbau des Ringes, der dann vermutlich durch Oxidation teilweise aromatisiert wird, so daß schließlich ein stabiler Rückstand hinterbleibt. Dafür spricht, daß eine Aromatisierung beim Aufschluß des 1,4-Cyclohexadiens mit HNO_3 beobachtet wird: Der Rückstand besteht zu etwa 80 % aus 1,3-Dinitrobenzol. Auch das aromatische Riboflavin wird nicht vollständig abgebaut.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß alle hier untersuchten aromatischen Stoffe, die keine aktivierende OH-Gruppen am Ring besitzen, unter den Bedingungen des Druckaufschlusses nicht vollständig abgebaut werden können. Dabei bleiben die aromatischen Ringe bei Tryptophan, Phenylalanin und Histidin erhalten.

Die CH_3S -Gruppe des Methionins wird vollständig zu Methansulfonsäure oxidiert. Die S-H-Gruppe in Cystein und die S-S-Gruppe in Cystin wird dagegen quantitativ zu Sulfat umgesetzt. Da die S-S-Gruppe des Cystins auch in Liponsäure vorhanden ist, sollte auch diese vollständig mineralisierbare Verbindung unter Bildung von Sulfat oxidiert werden. Die drei schwefelhaltigen Aminosäuren und Liponsäure rea-

gieren heftig auf Zusatz von Salpetersäure und werden also bereits vor dem Aufschluß zersetzt. Da bei dieser Anfangsreaktion jedoch nur geringe Stickoxidmengen entstehen, nach dem Aufschluß dagegen erheblich mehr an NO_2 vorliegt, kann nach Zugabe der Salpetersäure wohl noch keine vollständige Umsetzung abgelaufen sein. Vermutlich erfolgt nur ein primärer Angriff, der eine teilweise Zersetzung der Verbindungen zur Folge hat.

Zusammenfassend wurden folgende Primärreaktionen bei der Zugabe von Salpetersäure zu biologischem Material festgestellt:

1. Hydrolyse von Ester-, Peptid-, Amid- und glykosidischen Bindungen,
2. spontane Zersetzung von Tryptophan, Tyrosin und schwefelhaltigen Aminosäuren.

Andere in biologischen Materialien in merklichen Konzentrationen enthaltenen Stoffe zeigen keine spontanen Reaktionen.

Milch-, Zitronen-, Ascorbin- und Weinsäure, die als OH-substituierte aliphatische Carbonsäuren Strukturelemente von Fettsäuren und Zuckern besitzen, werden vollständig zersetzt. Dies gilt ebenso für Brenztraubensäure und belegt, daß auch C-C-Ketten mit angefügten Carbonylgruppen abgebaut werden können. Die Tatsache, daß Oxalsäure quantitativ mineralisiert wird, zeigt, daß prinzipiell auch Carboxylgruppen umgesetzt werden können, was bei aromatischen Carbonsäuren nicht immer gelingt.

Nucleinsäuren werden praktisch quantitativ abgebaut; dies gilt auch für ihre isolierten Bausteine sowie für Adenosintriphosphat und Adenosinmonophosphat. Die Stickstoffbasen Cytosin und Uracil benötigen jedoch eine genügend hohe Startkonzentration an NO_2 , um vollständig reagieren zu können, was beim Aufschluß biologischer Materialien gegeben ist. Die beim Aufschluß dieser Stoffgruppe häufig beobach-

teten RKG-Werte unterhalb von 1 % sind vermutlich auf Verunreinigungen der Ausgangsstoffe oder auf unbedeutende Nebenreaktionen zurückzuführen.

Die untersuchten phosphorhaltigen, nichtaromatischen Stoffe mit Ausnahme des NADH, das vermutlich während des Aufschlusses aromatisiert wird, erleiden einen vollständigen Abbau der organischen Matrix, wobei auch aus Polyphosphaten PO_4^{3-} gebildet wird, wie Untersuchungen an Rinderleber ergaben (vgl. Kap.4.11).

Das einzige in biologischen Materialien in relevanten Konzentrationen auftretende Steroid, Cholesterin (Eidotter, Gehirn: bis zu 3 % (137)), wird zu 98 % abgebaut. Eine vergleichbar aufgebaute Substanz, Androsteron, wird zu 97 % zersetzt, bezogen jeweils auf den Kohlenstoffgehalt. Auch diese cyclischen Systeme, die im Falle des Cholesterins eine C-C-Doppelbindung enthalten, werden praktisch vollkommen aufgeschlossen, da sie ähnliche Strukturelemente enthalten wie bereits diskutierte kettenförmige Verbindungen.

Porphyrinsysteme wurden am Beispiel der Stoffe Haemin und Haematoporphyrin untersucht. Diese werden nahezu quantitativ abgebaut. Der prinzipiell ähnliche Aufbau von Chlorophyll läßt erwarten, daß auch Chlorophyll a und b vollständig zerlegt werden. Dabei sollte der unterschiedliche Aufbau der Seitenketten keine Rolle spielen, da die darin enthaltenen Strukturelemente - wie bei anderen Stoffgruppen diskutiert wurde - mineralisiert werden können. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf Chlorophyll ist möglicherweise aber deshalb unsicher, weil Chlorophyll a und Chlorophyll b über einen nur partiell ungesättigten Ring verfügen. Erfahrungsgemäß sollte jedoch auch dieses Strukturelement leicht abbaubar sein. Reines Chlorophyll selbst konnte aus Kostengründen nicht untersucht werden.

Bei Phosphatiden stellt sich, setzt man eine Primärhydrolyse voraus, nur die Frage nach der Reaktionsfähigkeit der Basen, da die Fettsäurereste und Glycerin vollständig abgebaut werden können, sofern keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren vorhanden sind. Neben den bereits diskutierten Monosacchariden (z.B. Inosit) und der Aminosäure Serin werden auch Cholin und Ethanolamin praktisch quantitativ zersetzt. Auch das Dipalmitoyllecithin mit Cholin als Base wird daher vollkommen abgebaut. Lecithin, das neben einem Palmitoyl- noch einen Ölsäure-Rest aufweist, wird zwar nicht vollständig zersetzt (RKG 2.7 %), da das Probenmaterial jedoch ein aus Eiern isoliertes Naturprodukt ist, dürfte der Rückstand auf Proteine zurückzuführen sein. Dies wird auch aus dem Voltammogramm ersichtlich, das dem Aufschlußrückstand aus Phenylalanin (Nitrobenzoesäuren) entsprechende Signale enthält.

Die Polyamine 1,6-Diaminohexan und 1,2-Bis-(3-aminopropylamino)-ethan reagieren, wie auch Ethanolamin, äußerst heftig auf Zusatz von Salpetersäure. Im nachfolgenden Aufschluß werden sie praktisch vollkommen zersetzt. Die in Alkylketten eingebaute Aminogruppe und die endständige Aminogruppe verhindern den Abbau dieser Ketten nicht (vgl. auch Methylamin und Arginin). Die heftige Reaktion bei Vorhandensein endständiger Aminogruppen läßt vermuten, daß der Abbau gegenüber reinen C-H-Verbindungen erleichtert wird. Die drei Methylamine zeigen die heftige Reaktion bei Salpetersäure-Zusatz nicht. Harnstoff wird vollständig zersetzt, wobei durch Hydrolyse Ammonium und CO_2 gebildet wird. Die Tatsache, daß auch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) abgebaut wird, ist zwar für die Beurteilung des Aufschlußverhaltens biologischer Materialien von geringem Interesse, dieses Verhalten kann aber in anderen Bereichen der analytischen Chemie wichtig sein, da EDTA oft als Komplexierungsmittel eingesetzt wird. Beim Aufschluß von Blut, dem EDTA-Salze oft zur Stabilisierung zugesetzt werden,

braucht es ebenfalls bezüglich der Kohlenstoffbilanz nicht berücksichtigt zu werden.

Die Untersuchungen zur Kohlenstoffbilanz legen es nahe, anzunehmen, daß Esterbindungen unter den Bedingungen des Druckaufschlusses durch Salpetersäure hydrolytisch gespalten werden. Aus dieser Sicht ist die oft als Gefahr hervor gehobene Bildung explosiver Salpetersäureester (etwa mit Glycerin oder Cellulose) nur wenig wahrscheinlich, was auch dadurch erhärtet wird, daß beim Aufschluß dieser Stoffe in keinem Fall explosive Reaktionen beobachtet wurden. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, daß die hohe Konzentration an Salpetersäure bei manchen Probenmaterialien die Bildung von Salpetersäureestern begünstigt, so daß geringe Mengen dieser Verbindungen entstehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffe lassen sich jedoch unter den mitgeteilten Bedingungen gefahrlos aufschließen.

Die durch Zersetzungsprodukte biologischer Materialien hervorgerufenen Signale bei der inversen Voltammetrie von Elementspuren sind bereits in Kap.4.8.4 diskutiert worden. Die Frage der Zuordnung von Störsignalen nach Aufschluß biologischer Proben führte zu dem Ergebnis, daß die Signalintensität zu über 95 % auf das aus Phenylalanin gebildete Nitrobenzoesäure-Gemisch zurückzuführen ist (vgl. Kap.4.9.3). Die in diesem Gemisch enthaltenen Stoffe 2-Nitro- und 2,4-Dinitrobenzoesäure tragen neben dem Rückstand aus Tryptophan außerdem zur Erhöhung des Wasserstoffstromes bei. Die im Druckaufschluß aus Phenylalanin gebildeten Nitrobenzoesäuren werden über das Hydroxylamin zweistufig zum Amin reduziert. Die Höhe der im Voltammogramm beobachteten zwei Störsignale ist unabhängig von der Anreicherungszeit, da die Substanzen elektrolytisch nicht an der Quecksilberelektrode angereichert werden können. Der Reduktionsmechanismus ist in Kap.4.10 beschrieben. Die aus Tryptophan- und Histidin-Rückständen resultierenden Störsignale sind gegenüber denen der Nitrobenzoesäuren vernachlässigbar gering.

Während das Signal nach Histidin-Aufschlüssen nicht von Imidazol-4-carbonsäure, sondern von einem in sehr geringen Anteilen entstehenden Nebenprodukt verursacht wird, konnte die für das Signal nach Tryptophan-Aufschluß verantwortliche Substanz nicht ermittelt werden, weil die Zusammensetzung des komplexen Aufschlußrückstandes nicht bekannt ist. Das beim Aufschluß von Histidin gebildete Nebenprodukt verursacht ein sehr intensitätsschwaches Störsignal, so daß auf eine Identifizierung dieser Substanz verzichtet wurde. Untersuchungen dieser Art wären auch schwierig, da die Imidazol-4-carbonsäure in großem Überschuß im Rückstand vorliegt. Nicht auszuschließen ist ferner, daß das Signal auf Verunreinigungen des Histidins zurückzuführen ist.

Der eliminierende Einfluß des Tryptophan-Rückstandes auf das Maximum bei Nitrobenzoesäure-Signalen wurde bereits in Kap.4.8.4 diskutiert. Nach Aufschluß biologischer Materialien tritt dieses Maximum dementsprechend bei Anwesenheit von Zersetzungsprodukten des Tryptophans nicht auf. Dies wird auch von OEHME und LUND (29) bestätigt, die bei der

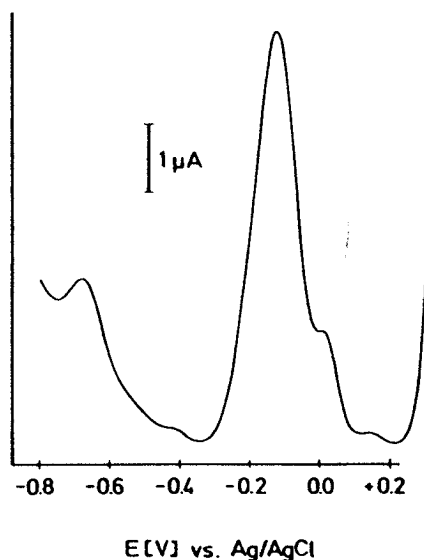


Abb.50: Signale nach Druckaufschluß von Blut (nach (29))

inversen Differential-Pulse-Voltammetrie von Blut-Druckaufschlußlösungen (Aufschluß mit Salpetersäure) die zwei in Abb.50 dargestellten maximumfreien Störsignale beobachteten. Das intensive Signal bei -0.1 V stimmt mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen "Störpeak 2" (vgl. z.B. Abb.49) in den Voltammogrammen der SWASV und analog auch der DPASV überein. Der "Störpeak 1" (vgl. Abb.49) ist bei OEHME und LUND durch einen hohen Grundstrom verzerrt. Dieser rührt vermutlich daher, daß Stickoxide nach dem Aufschluß nicht durch Abrauchen entfernt wurden (vgl. Abb.26). Die Autoren machen darüber keine näheren Angaben. Das Signal des Kupfers erscheint in Abb.50, wie auch bei Rinderleber (Abb.49), als Schulter. Ein Vergleich der gestörten Voltammogramme dieser Arbeit mit dem in Abb.2 dargestellten Voltammogramm einer Untersuchung von BAUMGARDT (27) ist nicht ohne weiteres möglich, da es in acetatgepufferter

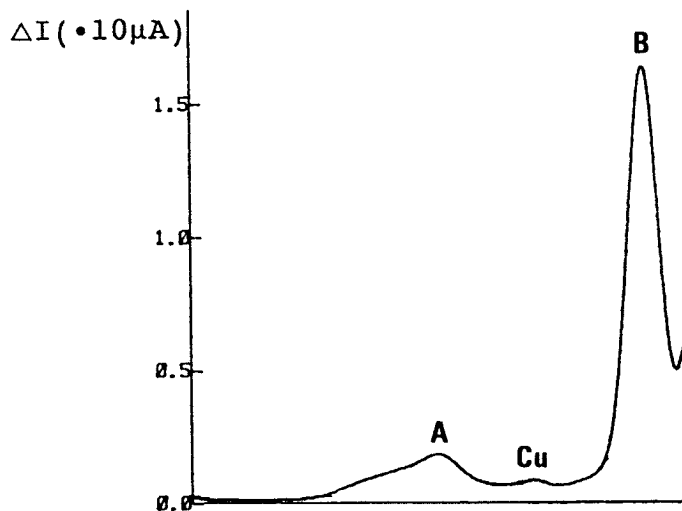


Abb.51: Leber; Square-Wave-Voltammogramm einer nicht abgerauchten Druckaufschlußlösung nach Zusatz von Natriumacetat (-0.75 $\rightarrow$ 0.25 V)

Lösung aufgenommen wurde. Um vergleichen zu können, wurde eine Leber-Druckaufschlußlösung (nicht abgeraucht; Voltammogramm ohne Acetat-Zusatz: Abb.23) in der voltammetrischen Meßzelle mit Natriumacetat auf pH 5-6 eingestellt. Die Analyse dieser Lösung unter den Abb.23 zugrundeliegenden Bedingungen (siehe dort) liefert das in Abb.51 dargestellte Square-Wave-Voltammogramm. Signal B wird durch Nitrobenzoesäuren verursacht. Es ist in seiner Höhe unabhängig von der Anreicherungszeit, schmaler als in stark saurer Lösung und zu positiveren Potentialen hin verschoben. Seine Intensität gegenüber der des Signals aus saurer Lösung ist etwa um den Faktor 5 erhöht. Cu erscheint bei 0.02 V, Pb bei -0.40 V und Cd bei -0.55 V. Dies kann durch Verlängerung der Anreicherungszeit oder durch Eichzusatz der Metallionen gezeigt werden. BAUMGARDT (27) erhält gemäß Abb.2 folgende Potentiale: Cd: -0.5 V; Pb: -0.43 V; Cu: 0.02 V. Ein exakter Vergleich der Potentiale ist zwar nicht möglich, da verschiedene Geräte und Verfahren (DPASV bzw. SWASV) verwendet wurden, dennoch ist die relative Lage der Signale zueinander etwa identisch. Demnach stimmt der bei BAUMGARDT in Abb.2 mit "?" bezeichnete Peak mit Signal A in Abb.51 überein; der intensive Peak B ist in dem von BAUMGARDT gemessenen Voltammogramm nur als Stromanstieg am rechten Bildrand zu erkennen.

Das in Abb.51 gezeigte Störsignal B wird auch von KINARD (5) in der DPASV an acetatgepufferten Druckaufschlußlösungen von Rattenblut beobachtet. Er interpretiert dieses Signal jedoch nicht, da es, wie in Abb.2, nur als Schulter am rechten Rand des Voltammogramms erscheint und so die beginnende Auflösung des Quecksilbers der Mikroelektrode vortäuscht. OEHME und LUND (29) kommen unter Bezugnahme auf KINARD (5) zu dem Schluß, daß die von ihnen beobachteten Störungen durch "elektroaktive nitrierte Substanzen" im Gegensatz zu den Ergebnissen von KINARD stehen. Dies ist jedoch nicht der Fall, da die Voltammogramme aufgrund un-

terschiedlicher Aciditäten und Leitelektrolyte nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Das in Abb.51 enthaltene Signal B kann auf den ersten Blick Kupfer vortäuschen, durch Eichzusatz läßt sich jedoch nachweisen, daß Cu bei deutlich negativerem Potential oxidiert wird. Ein weiteres Beispiel dafür, daß das Signal der Nitrobenzoesäuren mitunter nur schwer von dem des Kupfers zu unterscheiden ist, gibt Abb.52 anhand der Analyse einer Algen-Druckaufschlußlösung (vgl. Abb.15). Bei einer

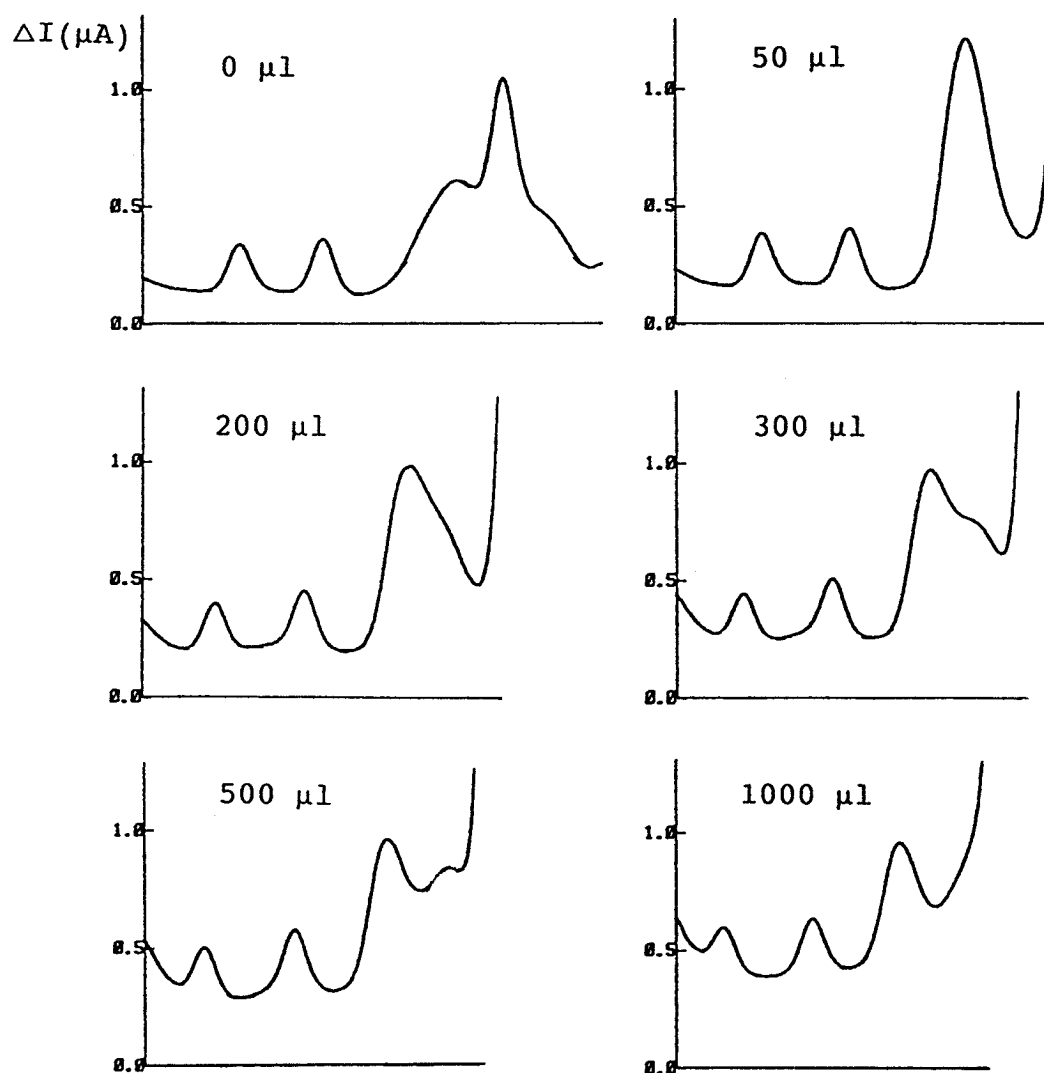


Abb.52: Einfluß von Cl^- auf SWASV-Signale einer Algen-Aufschlußlösung (Zugabe als 30 %ige Salzsäure);
Startvolumen: 6.0 ml Endvolumen: 7.0 ml

elektrolytischen Anreicherungszeit von 3 min wurden steigende Mengen an 30 %iger Salzsäure zugesetzt. Die in Abb.52 aufgeführten Voltammogramme zeigen, daß das Kupfer-Signal zunächst auf dem "Störsignal 2" erscheint. In der zunächst noch chloridfreien Lösung wird Cu unmittelbar zu Cu^{2+} (2-Elektronenübergang, schmales Signal) oxidiert. Bereits nach Zusatz von 50 μl HCl findet vorwiegend der Übergang $\text{Cu} \rightarrow \text{Cu}^+ \rightarrow (\text{CuCl}_2)^-$ statt. Das Kupfer-Signal erscheint folglich bei negativerem Potential und ist vom Störsignal nicht mehr zu unterscheiden. Gleichzeitig wird die Halbwertsbreite des nun 1-Elektronen-Übergangs gegenüber dem des 2-Elektronenübergangs verdoppelt. Eine unkritische Kupferbestimmung an dieser Stelle würde zwangsläufig zu einem stark erhöhten, falschen Meßergebnis führen. Bei weiterer Zugabe von Salzsäure werden sowohl die Cu- als auch die Hg-Oxidation stärker in den negativen Potentialbereich hinein verschoben, da die Bildung von $(\text{CuCl}_2)^-$ und Hg_2Cl_2 mit zunehmender Chloridionenkonzentration gefördert wird. Während das mit 500 μl Salzsäure wieder deutlich sichtbare Störsignal schließlich von dem Strom der Quecksilberoxidation überlagert wird, wird das Cu-Signal zunehmend vom Störsignal getrennt. Nach Zugabe von 1000 μl Salzsäure ist die Trennung so vollständig, daß eine Analyse bei Beachtung der gekrümmten Basislinie annähernd zum richtigen Kupfer-Gehalt führt. Diese von der Chlorid-Konzentration beeinflusste Potentiallage kann an Leber-Aufschlußlösungen (Abb.20) analog vorgeführt werden.

Das in Abb.51 dargestellte "Störsignal A" ist aus dem Signal der Nitrobenzoesäuren (vgl. Abb.49) und dem weiteren Stoffe (vgl. Abb.23) zusammengesetzt. Dabei entsteht die für den letztgenannten Signalanteil verantwortliche Substanz aus Proteinen: Das Signal erscheint jeweils bei der Analyse nicht-abgerauchter Aufschlußlösungen aus Algen, Milchpulver, Leber und Schweineblut, nicht jedoch bei Lösungen aus Fett- und Kohlenhydrataufschlüssen. Um festzustellen, welche der Aminosäuren für das Signal verantwort-

lich ist, wurde einer der Rinderleber entsprechenden Mischung von 6,4 mg Phenylalanin und 1,2 mg Tryptophan in Einzelaufschlüssen je eine weitere Aminosäure zugesetzt, wobei mit Glucose stets zu 90 mg Gesamtkohlenstoff ergänzt wurde. Mit Hilfe der square-wave-voltammetrischen Analyse der nicht abgerauchten Aufschlußlösungen wurde ein zusätzliches Störsignal nur nach Zugabe von Leucin, Valin und Isoleucin gemessen. Nach Aufschluß der Mischung aus Phenylalanin, Tryptophan und Glucose wird ein zusätzliches Signal nicht beobachtet. Die nähere Untersuchung zeigte, daß es sich bei der Störung nicht um ein Maximum, sondern um ein echtes polarographisches Signal handelt, welches durch leichtflüchtige Verbindungen verursacht wird, die aus Leucin, Valin und Isoleucin entstehen. Die Signale werden auch nach Aufschluß der genannten Aminosäuren in Einzelversuchen beobachtet, sind also unabhängig von denen der Nitrobenzoesäuren. Da Valin, Leucin und Isoleucin bei der Reaktion mit HNO_3 genügend NO_2 liefern, kann auf den Zusatz von Glucose verzichtet werden. Auffallend ist, daß das Störsignal nur von diesen drei Aminosäuren verursacht wird, die tertiäre Kohlenstoffatome besitzen und daß ein analoges Signal auch nach Aufschluß von 2,3-Dimethylbutan geliefert wird. Lediglich das Signal des Isoleucin-Rückstandes erscheint um 20 mV negativer als das der anderen Verbindungen. Die zugrundeliegenden Stoffe wurden nicht näher identifiziert. Sie sind zur Beurteilung von Analysenstörungen auch weitgehend bedeutungslos, da sie beim Abrauchen zusammen mit Stickoxiden und überschüssiger Salpetersäure entfernt werden. Vermutlich handelt es sich jedoch um aliphatische Nitroverbindungen. Wie bei den Nitrobenzoesäuren erhält man auch hier Signale, deren Intensität unabhängig von der Anreicherungszeit ist. Die Reduktionssignale von Nitromethan und 3-Nitropropionsäure in entsprechend saurer Lösung liegen bei einem um 0.3 V negativeren Potential, sind aber in ihrer Form identisch mit dem diskutierten Störsignal. Der Aufschluß von 2,3-Dimethylbutan weist darauf hin, daß die Isopropyl-Gruppe wohl für die Bildung der störenden Verbin-

dungen verantwortlich ist. Die Isobutyl-Gruppe $C_2H_5(CH_3)CH-$ des Isoleucins führt vermutlich zu einem davon unterschiedlichen Produkt, wie die erwähnte Potentialverschiebung andeutet.

Aus der Flüchtigkeit der Nitrobenzoesäuren bei $180^\circ C$ (vgl. Kap.4.9.1) kann eine Verbesserung der Analyse von Schwermetallen in Druckaufschlußlösungen abgeleitet werden: Raucht man im PTFE-Gefäß bei $180^\circ C$ bis zur Trockene ab, so werden Nitrobenzoesäuren bis zu 98 % (bezogen auf den C-Gehalt), der Rückstand aus Tryptophan bis zu etwa 50 % entfernt. Da die Ionen Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} und Cu^{2+} auch bei $180^\circ C$ aus Rückständen biologischer Materialien nicht zu verflüchtigen sind, wie an Algen- und Leberproben nachgewiesen wurde, können die beobachteten Störsignale auf diese Weise drastisch verringert und richtige Kupferbestimmungen ermöglicht werden. Völlig störungsfreie Voltammogramme sind so jedoch nicht zu erhalten, da jeweils geringe Anteile der Zersetzungsprodukte bei $180^\circ C$ zurückbleiben und weiterhin zu Störsignalen führen.

Abschließend sollen einige aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultierende Fragestellungen erörtert werden. Trotz der zahlreichen Einzelergebnisse bleiben die Informationen über die Reaktionsmechanismen des Druckaufschlusses bei $180^\circ C$ nur bruchstückhaft. Kaum behandelt wurde z.B. die Bildung und Identifizierung der bei $130^\circ C$ flüchtigen Abbauprodukte von Biomaterialien. Die Arbeit liefert auch keine Hinweise auf den Mechanismus des in der Spurenanalyse ebenfalls gebräuchlichen Abbaus organischer Stoffe bei $300^\circ C$ mit Salpetersäure und bei $180^\circ C$ mit Perchlorsäure. Interessant ist z.B., daß die bei $180^\circ C$ gegen konzentrierte Salpetersäure resistenten Stoffe bei $300^\circ C$ bereits in etwa 3 %iger HNO_3 praktisch vollständig abgebaut werden können. Dies wurde an Algen- und Leberproben gezeigt, bei denen Lösungen aus Druckaufschlüssen bei $180^\circ C$ in einer Quarzampulle bei $300^\circ C$ über 1 h nachbehandelt wurden.

Ebenfalls überraschend ist der Befund, daß Phenylalanin und Tryptophan beim offenen Aufschluß mit Salpeter- und Perchlorsäure unter den von MARTINIE und SCHILT (26) mitgeteilten Bedingungen vollständig abgebaut werden, während dies bei Glycin und Alanin nicht gelingt (RKG 20 bzw. 67 %). Beim Druckaufschluß mit Salpetersäure bei 180°C wird ein praktisch umgekehrtes Verhalten beobachtet. Die von MARTINIE und SCHILT mitgeteilten RKG-Werte konnten dabei durch Vergleichsuntersuchungen bestätigt werden; jedoch werden auch Alanin und Glycin vollständig abgebaut, wenn der Aufschluß allein mit Perchlorsäure bei 203°C - nach dem Abrauchen der Salpetersäure aus der Aufschlußmischung - verlängert wird (vgl. (26)). Die Ergebnisse von MARTINIE und SCHILT sind also nicht aussagekräftig, da die Arbeitsparameter nicht optimiert wurden, so daß eine endgültige Aussage über die Leistungsfähigkeit der Perchlorsäure als Aufschlußreagenz nicht möglich ist.

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß organischer Aufschlußprodukte lediglich auf die Schwermetallbestimmung mit Hilfe voltammetrischer Verfahren untersucht. Spektrochemische Analysenverfahren, die ebenfalls vielfältig durch organische Zersetzungsprodukte gestört werden können, wurden nicht behandelt. Da die nach einem Druckaufschluß biologischer Proben mit Salpetersäure resultierenden organischen Rückstände nun jedoch bekannt sind, kann in Fortführung dieser Arbeit gezielt ihr Einfluß auf die Elementbestimmung mit atomabsorptionspektrometrischen Verfahren, insbesondere mit der Hydrid-, Hg-Dampf- und Graphitrohr-AAS untersucht werden. In Zusammenhang mit der Hydrid- und Hg-Dampf-AAS wäre sicher auch die Untersuchung des Verhaltens der beim Aufschluß gebildeten leicht flüchtigen Verbindungen interessant, wenn Druckaufschlußlösungen unmittelbar zur Analyse eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beziehen sich im wesentlichen auf folgende Untersuchungen:

1. Bilanzierung der Aufschlußreaktion

Als Maß für die Leistungsfähigkeit des Druckaufschlusses mit Salpetersäure zur Mineralisierung biologischer Materialien wurde der von der Probe abgetrennte Kohlenstoffanteil gewählt. Er ergibt sich aus dem coulometrisch bestimmten Restkohlenstoffgehalt in der Aufschlußlösung. Unter optimierten Standardbedingungen (35-ml-PTFE-Tiegel, Einwaage entsprechend 100 mg C, 2 ml 69 %ige HNO_3 , Einengen der Aufschlußlösung bei 130°C) hinterbleiben organische Rückstände, deren Restkohlenstoffgehalt bei eiweißhaltigen Materialien mit dem Stickstoffgehalt, bei Fetten mit dem Gehalt an Linolsäure bis auf etwa 6 % ansteigt. Kohlenhydrate werden praktisch quantitativ abgebaut (Restkohlenstoffgehalt ≤ 0.08 %).

An Hand von Modellsubstanzen wurde gezeigt, daß biologische Materialien beim Druckaufschluß in folgender Reaktionskette zersetzt werden:

- saure Hydrolyse von Ester-, Peptid-, Amid- und Glykosidbindungen;
- oxidativer Abbau der Bruchstücke.

Für die Aufschlußreaktion ist NO_2 in ausreichender Konzentration in der flüssigen Phase erforderlich. Beim Aufschluß biologischer Materialien unter den oben angegebenen Bedingungen ist dies im allgemeinen gewährleistet, da sie genügend leicht abbaubare Verbindungen enthalten, die HNO_3 zu NO_2 reduzieren.

An Proben von Rinderleber und Braunalgen wurde nachgewiesen, daß etwa die Hälfte des nach dem Aufschluß noch vorhandenen organischen Kohlenstoffs in Verbindungen gebunden ist, die bei 130°C flüchtig sind. Diese Verbindungen entstehen - zumindest anteilig - aus den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin.

Insgesamt wurden etwa 120 Verbindungen aufgeschossen und der jeweils verbleibende Rückstand untersucht. Von den in biologischen Materialien in wesentlichen Konzentrationen vorhandenen Stoffen liefern lediglich einige Aminosäuren (Phenylalanin, Histidin, Methionin, Tryptophan) sowie die doppelt ungesättigte Fettsäure Linolsäure Rückstände organischer Produkte, die bei Temperaturen bis zu 130°C nicht zu verflüchtigen sind. Diese Stoffe verbleiben im Aufschlußrückstand also auch dann, wenn die salpetersauren Probenlösungen zur inversvoltammetrischen Elementbestimmung bei dieser Temperatur eingedampft werden.

Untersuchungen zum Druckaufschluß stickstoff-, phosphor- und schwefelhaltiger Verbindungen mit Salpetersäure bei 180°C ergaben, daß der in Aminosäuren gebundene Stickstoff nicht zu Ammonium, sondern vermutlich zu N_2 umgesetzt wird. Der in Cystin und Cystein gebundene Schwefel wird zu Sulfat, der Schwefelanteil des Methionins zu Methansulfonsäure oxidiert. In biologischen Materialien enthaltener Phosphor wird in Phosphat überführt.

2. Identifizierung der Reaktionsprodukte

Im einzelnen wurden folgende Verbindungen in den Rückständen der zum Aufschluß eingesetzten Stoffe nachgewiesen.

Eingesetzt	Im Rückstand nachgewiesen
Phenylalanin	Gemisch aus 15 % 2-Nitrobenzoesäure 23 % 3-Nitrobenzoesäure 51 % 4-Nitrobenzoesäure 5 % 2,4-Dinitrobenzoesäure 5 % weitere Verbindungen, vermutlich isomere Dinitrobenzoesäuren
Histidin	Imidazol-4-carbonsäure als Salpetersäureaddukt
Methionin	Methansulfonsäure
Tryptophan	Gemisch aus mehr als 10 aromatischen Verbindungen, überwiegend Carbonsäure
Linolsäure	Gemisch aus 95 % cis-1,2-Cyclopropandicarbonsäure 5 % trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure

Entsprechend dem Vorkommen der Modellverbindungen konnten deren Reaktionsprodukte auch in den Aufschlußrückständen biologischer Materialien nachgewiesen werden: Nitrobenzoesäuren, Imidazol-4-carbonsäure und Methansulfonsäure findet man im Rückstand des HNO_3 -Druckaufschlusses von Rinderleber; natürliche Fette mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefern als Rückstand ausschließlich cis- und trans-1,2-Cyclopropandicarbonsäure im Verhältnis 20:1. Folgeprodukte des Tryptophans konnten, entsprechend der geringen Gehalte dieser Aminosäure in biologischen Materialien, signifikant nicht nachgewiesen werden.

Für die Nachweise und quantitativen Bestimmungen wurden folgende Analysenmethoden eingesetzt: Elementaranalyse, Gaschromatographie, IR-Spektrometrie, ^1H -Kernresonanzspektrometrie, ^{13}C -Kernresonanzspektrometrie, inverse Voltammetrie.

3. Einfluß der Reaktionsprodukte auf die inversvoltammetrische Elementbestimmung

Während Methansulfonsäure, Imidazol-4-carbonsäure und die Cyclopropandicarbonsäuren im Potentialbereich von -1.2 Volt bis +0.3 Volt gegen gesätt. Ag/AgCl voltammetrisch inaktiv sind, werden die Nitrobenzoesäuren bei pH 0 zweistufig über die Hydroxylamine zu Aminen reduziert. Die zugehörigen Signale findet man bei der inversen Square-Wave-Voltammetrie bei -0.1 Volt (Reduktion zum Hydroxylamin) und bei etwa -0.55 Volt (Reduktion zum Amin) gegen gesätt. Ag/AgCl. Dabei handelt es sich um Ströme, die analog auch bei der differentiellen Pulspolarographie und der differentiellen Puls-Inversvoltammetrie gefunden werden. Auch in den Gleichstropmpolarogrammen beobachtet man zwei entsprechende Stufen. Da die verschiedenen Nitrobenzoesäuren bei etwas unterschiedlichen Potentialen reduziert werden, findet man nach dem Aufschluß biologischer Materialien bei der inversen Voltammetrie stets verbreiterte Kombinationssignale. Das Signal bei -0.55 Volt wird ausschließlich, das bei -0.1 Volt zu etwa 95 % durch nitrierte Benzoessäuren verursacht. Einen geringen Beitrag liefern auch die Zersetzungsprodukte des Tryptophans; das Signal erscheint bei 0 Volt und besteht aus mindestens zwei Einzelteilen. Die in sauren Aufschlußlösungen biologischer Materialien beobachtete Erhöhung des Wasserstoffstromes bei pH 0 ist allein auf 2,4-Dinitrobenzoesäure, 2-Nitrobenzoesäure und auf Zersetzungsprodukte des Tryptophans zurückzuführen.

Bei der Elementspurenanalyse nicht abgerauchter, saurer Aufschlußlösungen durch inverse Square-Wave-Voltammetrie liefern die aus Valin, Leucin und Isoleucin resultierenden Produkte ein Störsignal bei etwa -0.35 Volt vs. gesätt. Ag/AgCl. Es wird vermutet, daß nitrierte aliphatische Verbindungen das Signal verursachen. Da die in einem weiten Potentialbereich ebenfalls störenden gelösten Stickoxide vor der inversvoltammetrischen Spurenbestimmung in Druckaufschlußlösungen durch Abrauchen entfernt werden müssen, werden auch flüchtige organische Substanzen abgetrennt und damit für die Spurenbestimmung bedeutungslos.

Durch die im Aufschlußrückstand nachgewiesenen organischen Verbindungen wird die Bestimmung der Schwermetalle Zn, Cd, Pb und Cu in sauren Aufschlußlösungen erschwert oder sogar verhindert: Neben einer Depression der Signale wird das Signal/Untergrund-Verhältnis bei der Zn-Bestimmung durch den erhöhten Wasserstoffstrom verschlechtert. Die Signale der drei übrigen Metalle interferieren mit denen der Nitrobenzoesäuren, so daß unter ungünstigen Bedingungen eine Trennung der Einzelsignale nicht mehr möglich ist.

4. Möglichkeiten zum rückstandsfreien Aufschluß biologischer Probenmaterialien

Nach Aussage der Temperaturabhängigkeit des Restkohlenstoffgehaltes im Bereich zwischen 100 und 300°C sind mindestens 300°C und Quarzgefäße erforderlich, um die in biologischen Materialien enthaltenen organischen Stoffe so weit abzubauen, daß nach Abrauchen bei 130°C praktisch kohlenstofffreie Lösungen erhalten werden. Auch die Gehalte an leichter flüchtigen organischen Spezies sind in diesen Lösungen nur noch gering. Zn, Cd, Pb und Cu sind in den eingedampften Aufschlußlösungen störungsfrei inversvoltammetrisch zu bestimmen.

Eine Nachbehandlung von Rückständen biologischer Materialien mit Perchorsäure nach Druckaufschluß mit HNO_3 bei 180°C liefert Spurenkonzentrate, die - verglichen mit denen aus dem Druckaufschluß bei 180°C - erheblich niedrigere Restkohlenstoffgehalte aufweisen. Ein vollständiger Abbau organischer Stoffe gelingt zwar auch hierbei nicht, die inversvoltammetrische Bestimmung der angegebenen Elemente führt jedoch zu richtigen Ergebnissen, da die verbleibenden Störeffekte bedeutungslos sind.

7. Literaturverzeichnis

1. J.P. Franke, Dissertation, Groningen (Niederlande) 1978
2. J.P. Franke, R.A. de Zeeuw, Pharmaceutisch Weekblad, Scientific Edition 3 (1981) 1042
3. A.M. Bond, J.B. Reust, Anal.Chim.Acta 162 (1984) 389
4. J.P. Franke, R.A. de Zeeuw, Arch.Toxicol. 37 (1976) 47
5. J.T. Kinard, Anal.Letters 10 (1977) 1147
6. M. Stoeppler, K. Brandt, Fresenius Z.Anal.Chem. 300 (1980) 372
7. H.D. Narres, C. Mohl, M. Stoeppler, Int.J.Environm.Anal.Chem. 18 (1984) 267
8. H.D. Narres, C. Mohl, M. Stoeppler, Z.Lebensm.Unters.Forsch. 181 (1985) 111
9. C. Mohl, P. Ostapczuk, M. Stoeppler, in: B. Welz, Fortschritte in der atomspektrometrischen Spurenanalytik, Band I, S. 317, Verlag Chemie, Weinheim 1984

10. F.J. Langmyhr, G. Wibetoe, Prog.Analyt.Atom.Spectrosc. 8 (1985) 193
11. G. Knapp, Fresenius Z.Anal.Chem. 317 (1984) 213
12. K. Bächmann, CRC Crit.Rev.Anal.Chem. 12 (1981) 1
13. E. Kahane, Fresenius Z.Anal.Chem. 111 (1937) 14
14. Analytical Methods Committee, Analyst 84 (1959) 214
15. T.T. Gorsuch, Analyst 84 (1959) 135
16. T.T. Gorsuch, The Destruction of Organic Matter, Pergamon Press, Oxford 1970
17. R. Kühn, K. Birett, Merkblätter gefährliche Arbeitsstoffe, Vlg. Moderne Industrie, München 1974
18. R.L. Anderson, S. Davis, Clin.Chim.Acta 121 (1982) 111
19. Sichere Chemiearbeit 35 (1983) 85
20. J. Angerer, M. Fleischer, G. Machata, W. Pilz, K.H. Schaller, H. Seiler, M. Stoeppler, H. Zorn, Aufschlußverfahren zur Bestimmung von Metallen in biologischem Material, in: Analytische Methoden, Analysen in biologischem Material, Verlag Chemie, Weinheim 1981
21. P. Tschöpel, L. Kotz, W. Schulz, M. Veber, G. Tölg, Fresenius Z.Anal.Chem. 302 (1980) 1
22. M. Würfels, Diplomarbeit, Bochum 1984
23. M. Würfels, E. Jackwerth, Fresenius Z.Anal.Chem. 322 (1985) 354

24. M. Stoeppler, K.P. Müller, F. Backhaus, Fresenius Z.Anal.Chem. 297 (1979) 107
25. K.P. Müller, Ingenieurarbeit, Jülich 1976
26. G.D. Martinie, A.A. Schilt, Anal.Chem. 48 (1976) 70
27. B. Baumgardt, Diplomarbeit, Bochum 1982
28. L. Kotz, G. Henze, G. Kaiser, S. Pahlke, M. Veber, G. Tölg, Talanta 26 (1979) 681
29. M. Oehme, W. Lund, Fresenius Z.Anal.Chem. 298 (1979) 260
30. J. Hertz, R. Pani, Fresenius Z.Anal.Chem. 328 (1987) 487
31. S. Gomiscek, V. Hudnik, M. Veber, in: S.S. Brown, Chlinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, Elsevier, Amsterdam 1977
32. I. Sinko, S. Gomiscek, Mikrochim.Acta 1972 163
33. M. Stoeppler, F. Backhaus, Fresenius Z.Anal.Chem. 291 (1978) 116
34. M. Stoeppler, F. Backhaus, R. Dahl, M. Dumont, H. Hagedorn-Götz, K. Hilpert, P. Klahre, H. Rützel, P. Valenta, H.W. Nürnberg, Proceedings, International Symposium on Recent Advances in the Assessments of the Health Effects of Environmental Pollution, Paris 1974, Vol. 4, S. 2231, Luxemburg: Commission of the European Communities 1974
35. G. Knapp, Intern.J.Environ.Anal.Chem. 22 (1985) 71

36. P.O. Bethge, Anal.Chim.Acta 10 (1954) 317
37. H. Seiler, Laborpraxis 6 (1979) 23
38. K. May, M. Stoeppler, Fresenius Z.Anal.Chem. 293 (1978) 127
39. Analytical Methods Committee, Analyst 85 (1960) 643
40. S. Bajo, U. Suter, B. Aeschlimann, Anal.Chim.Acta 149 (1983) 321
41. U. Harms, Fresenius Z.Anal.Chem. 322 (1985) 53
42. G. Knapp, Fresenius Z.Anal.Chem. 274 (1975) 271
43. W.G. Dorner, GIT Fachz.f.d.Laboratorium 26 (1982) 750
44. B. Sansoni, V. Iyengar, Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich 13 (1978)
45. G.F. Smyth, Anal.Chim.Acta 8 (1953) 397
46. G. Knapp, Methoden zum Aufschluß organischer Materialien für die Elementspurenanalyse, in: B. Welz, Atom-spektrometrische Spurenanalytik, S. 151, Verlag Chemie, Weinheim 1982
47. B. Lonnerdal, M. Clegg, C.L. Keen, L. Hurley, Trace Elem.Anal.Med.Biol., Proc.Int.Workshop, S. 619, Hrsg.: P. Braetter, P. Schramel, Vlg. de Gruyter, Berlin 1980
48. R. Bock, Aufschlußmethoden in der anorganischen und organischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1972
49. G. Knapp, B. Sadjadi, H. Spitzzy, Fresenius Z.Anal.Chem. 274 (1975) 275

50. B. Zak, H.H. Willard, G.B. Myers, A.J. Boyle,
Anal.Chem. 24 (1952) 1345
51. G. Kaiser, D. Götz, G. Tölg, G. Knapp, B. Maichin, H.
Spitzzy, Fresenius Z.Anal.Chem. 291 (1978) 278
52. J. Piwonka, G. Kaiser, G. Tölg, Fresenius Z.Anal.Chem.
321 (1985) 225
53. F. Schlieckmann, F. Umland, Fresenius Z.Anal.Chem. 318
(1984) 495
54. B. Sansoni, W. Kracke, Fresenius Z.Anal.Chem. 243
(1968) 209
55. G.L. Carius, Ann.Chem. 116 (1860) 1
56. G.L. Carius, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 3 (1870) 697
57. J. Dolezal, J. Lenz, Z. Sulcek, Anal.Chim.Acta 47
(1969) 517
58. J.W. Mitchell, Anal.Chem. 45 (1973) 492 A
59. B. Bernas, Anal.Chem. 40 (1968) 1682
60. O. Buresch, H.G. v.Schnering, Fresenius Z.Anal.Chem.
319 (1984) 418
61. H. Matusiewicz, Chemia Analityczna 28 (1983) 439
62. H.U. Kasper, Fresenius Z.Anal.Chem. 320 (1985) 55
63. F.J. Langmyhr, P.E. Paus, Anal.Chim.Acta 49 (1970) 358
64. P.E. Paus, Atom.Absorpt.Newsl. 10 (1971) 44

65. S.L. Gaffin, Clin.Toxicology 15 (1979) 293
66. P. Broske, Laborpraxis 3 (1985) 152
67. Druckaufschlußapparatur PRAWOL, Bedienungsanleitung, Fleischhacker, Schwerte
68. L. Kotz, G. Kaiser, P. Tschöpel, G. Tölg, Fresenius Z.Anal.Chem. 260 (1972) 207
69. I. May, J.J. Rowe, Anal.Chim.Acta 33 (1965) 648
70. K. Lounamaa, Fresenius Z.Anal.Chem. 146 (1954) 422
71. W. Wahler, Neues Jahrb.Mineral.Abhandl. 101 (1964) 109
72. F.J. Langmyhr, S.Sveen, Anal.Chim.Acta 32 (1965) 1
73. H.M. Kingston, L.B. Jassie, Anal.Chem. 58 (1986) 2535
74. O. Buresch, W. Hönle, U. Haid, H.G. v.Schnering, Fresenius Z.Anal.Chem. 328 (1987) 82
75. C.S.E. Papp, L.B. Fischer, Analyst 112 (1987) 337
76. P. Aysola, P. Anderson, C.H.Langford, Anal.Chem. 59 (1987) 1582
77. L.B. Fischer, Anal.Chem. 58 (1986) 261
78. F. Backhaus, M. Cremer, H.J. Groteklaes, A. Hertling, O. Schneider, M. Stoeppler, Unveröffentlichter Bericht
79. P. Schramel, A. Wolf, R. Seif, B.J. Klose, Fresenius Z.Anal.Chem. 302 (1980) 62

80. E. Jackwerth, S. Gomiscek, Pure Appl. Chem. 56 (1984) 479
81. A. Boorn, J.E. Fulford, W. Wegscheider, Mikrochim.Acta 1985 II 171
82. P. Schramel, G. Lill, R. Seif, Fresenius Z.Anal.Chem. 326 (1987) 135
83. R. Röhl, H.J. Hoffmann, W. Besler, Fresenius Z.Anal.Chem. 317 (1984) 872
84. U. Völlkopf, R. Lehmann, Z. Grobowski, B. Welz, Angewandte Atom-Spektroskopie 26 (1980)
85. A.M. Hartstein, R.W. Freedmann, D.W. Platter, Anal.Chem. 45 (1973) 611
86. G. Kaiser, E. Grallath, P. Tschöpel, G. Tölg, Fresenius Z.Anal.Chem. 259 (1972) 257
87. T. Liese, Fresenius Z.Anal.Chem. 321 (1985) 37
88. H.P. Brückner, G. Drews, K. Kritsotakis, H.J. Tobschall, Fresenius Z.Anal.Chem. 322 (1985) 778
89. L.J. Tyler, Chemical and Engineering News 32 (1973) 20
90. J.W. Jones, R.J. Gajan, K.W. Boyer, J.A. Fiorino, J.Assoc.Off.Anal.Chem. (JAOAC) 60 (1977) 827
91. R.C. Munter, R.A. Grande, P.C. Ahn, ICP Information Newsl. 5 (1979) 368
92. S.B. Adeloju, A.M. Bond, M.L. Noble, Anal.Chim.Acta 161 (1984) 303

93. W. Thornburg, J.Assoc.Off.Anal.Chem. (JAOAC) 65 (1982) 992
94. A.D. Hill, K.Y. Patterson, C. Veillon, E.R. Morris, Anal.Chem. 58 (1986) 2341
95. S.R. Koirtyohann, C.A. Hopkins, Analyst 101 (1976) 870
96. G. Schönhard, H.D. Schenke, Landwirtsch.Forsch. 29 (1976) 248
97. G. Knapp, S.E. Raptis, G. Kaiser, G. Tölg, P. Schrammel, B. Schreiber, Fresenius Z.Anal.Chem. 308 (1981) 790
98. W. Schöniger, Mikrochim.Acta 1955 123
99. E. Scheubeck, A. Nielsen, G. Iwantscheff, Fresenius Z.Anal.Chem. 294 (1979) 398
100. E. Scheubeck, J. Gehring, M. Pickel, Fresenius Z.Anal.Chem. 297 (1979) 113
101. C. Weichan, Chemie-Technik 1 (1981) 53
102. R. Plesch, Fresenius Z.Anal.Chem. 298 (1979) 400
103. H. Narasaki, Anal.Chem. 57 (1985) 2482
104. R. Wickbold, Angew.Chem. 64 (1952) 133
105. R. Wickbold, Angew.Chem. 69 (1957) 530
106. F. Ehrenberger, K. Hommel, S. Gorbach, Fresenius Z.Anal.Chem. 210 (1965) 349
107. C.E. Gleit, W.D. Holland, Anal.Chem. 34 (1962) 1454

108. G. Kaiser, P. Tschöpel, G. Tölg, Fresenius
Z.Anal.Chem. 253 (1971) 177
109. G. Tölg, Fresenius Z.Anal.Chem. 283 (1977) 253
110. G. Kortüm, Elektrochemie, 5. Auflage, Verlag Chemie,
Weinheim 1972
111. F. Ehrenberger, S. Gorbach, Organische Elementar- und
Spurenanalyse, Verlag Chemie, Weinheim 1973
112. M. Geißler, Polarographische Analyse, Verlag Chemie,
Weinheim 1981
113. H. Schmidt, M. v.Stackelberg, Neuartige
polarographische Methoden, Verlag Chemie, Weinheim
1962
114. H.W. Nürnberg, Advances in Polarography, Hrsg. I.S.
Longmyhr, Vol. 2, Pergamon Press, Oxford, London,
New York, Paris 1960
115. T. Ugapo, W.F. Pickering, Talanta 32 (1985) 131
116. Z. Lukaszewski, M.K. Pawlak, J.Electroanal.Chem. 103
(1979) 225
117. G.E. Batley, T.M. Florence, Electroanalytical Che-
mistry and Interfacial Electrochemistry 55 (1974) 23
118. P. Zuman, C.L. Perrin, Organic Polarography, Inter-
science Publishers J. Wiley & Sons, New York, London,
Sidney, Toronto 1969
119. M. Stoeppler, Berichte der Kernforschungsanlage Jülich
Nr.1675, 1980

120. Landoldt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik, Technik, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960
121. GIT Merk- und Arbeitsblätter, GIT 7 (1963) Heft 4, Verlag E. Giebeler, Darmstadt
122. GIT Merk- und Arbeitsblätter, GIT 7 (1963) Heft 1, Verlag E. Giebeler, Darmstadt
123. P. Wölfel, Dissertation, Karlsruhe 1974
124. Coulomat 702, Betriebsanleitung, Ströhlein, Kaarst
125. G. Kainz, J. Mayer, Mikrochim-Acta 1963/64 628
126. G. Kainz, J. Mayer, Mikrochim-Acta 1962 241
127. G. Kainz, J. Mayer, Mikrochim-Acta 1963 542
128. H. Kaiser, Fresenius Z.Anal.Chem. 209 (1965) 1
129. M. Würfels, E. Jackwerth, M. Stoeppler, Fresenius Z.Anal.Chem. 329 (1987) 459
130. P. Schramel, S. Hasse, G. Knapp, Fresenius Z.Anal.Chem. 326 (1987) 142
131. Gmelins Handbuch der anorgansichen Chemie, Stickstoff, Lieferung 1-4, Verlag Chemie, Berlin 1934
132. F.A. Cotton, G. Wilkinson, Anorganische Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel 1982
133. P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 12. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1984

134. A.L. Lehninger, Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1977
135. S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. III, Academic Press, Inc., Publishers, New York 1957
136. A. Streitwieser, C.H. Heathcock, Organische Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel 1980
137. H.D. Cremer, Die große GU Nährwerttabelle, Neuauflage 1984/85, 3. Auflage 1985, Verlag Gräfe & Unzer, München
138. D.H. Williams, I. Fleming, Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, 4. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1979
139. E. Breitmayer, G. Bauer, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1977
140. E. Pretsch, T. Clerk, J. Seibl, W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981
141. R. Rupprecht, W. Bremser, ^{13}C -NMR Spektral-Datenbank, Inka Online Service, Eggenstein-Leopoldshafen 1981
142. N.C. Rol, A.D. Clague, Org.Magn.Resonance 16 (1981) 187
143. Organikum, 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1976

144. W. Kirmse, M. Kapps, R.B. Hager, Chem.Ber. 99 (1966) 2855
145. L.L. McCoy, J.Am.Chem.Soc. 80 (1958) 6568
146. J. Jeneer, Ampère International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien 1971
147. G. Henze, R. Neeb, Elektrochemische Analytik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio 1986
148. M.R. Smyth, W.F. Smyth, Analyst 103 (1978) 529
149. P. Zuman, Substituent Effects in Organic Polarography, Plenum Press, New York 1967
150. A.F. Holleman, E. Wiberg, Lehrbuch der anorganischen Chemie, Verlag W. de Gruyter, Berlin, New York 1976
151. G. Denbsky, Fresenius Z.Anal.Chem. 267 (1973) 350

8. Anhang

LM = Signal des Lösungsmittels

Die chemische Verschiebung ist in den NMR-Spektren in ppm bezogen auf Tetramethylsilan angegeben.

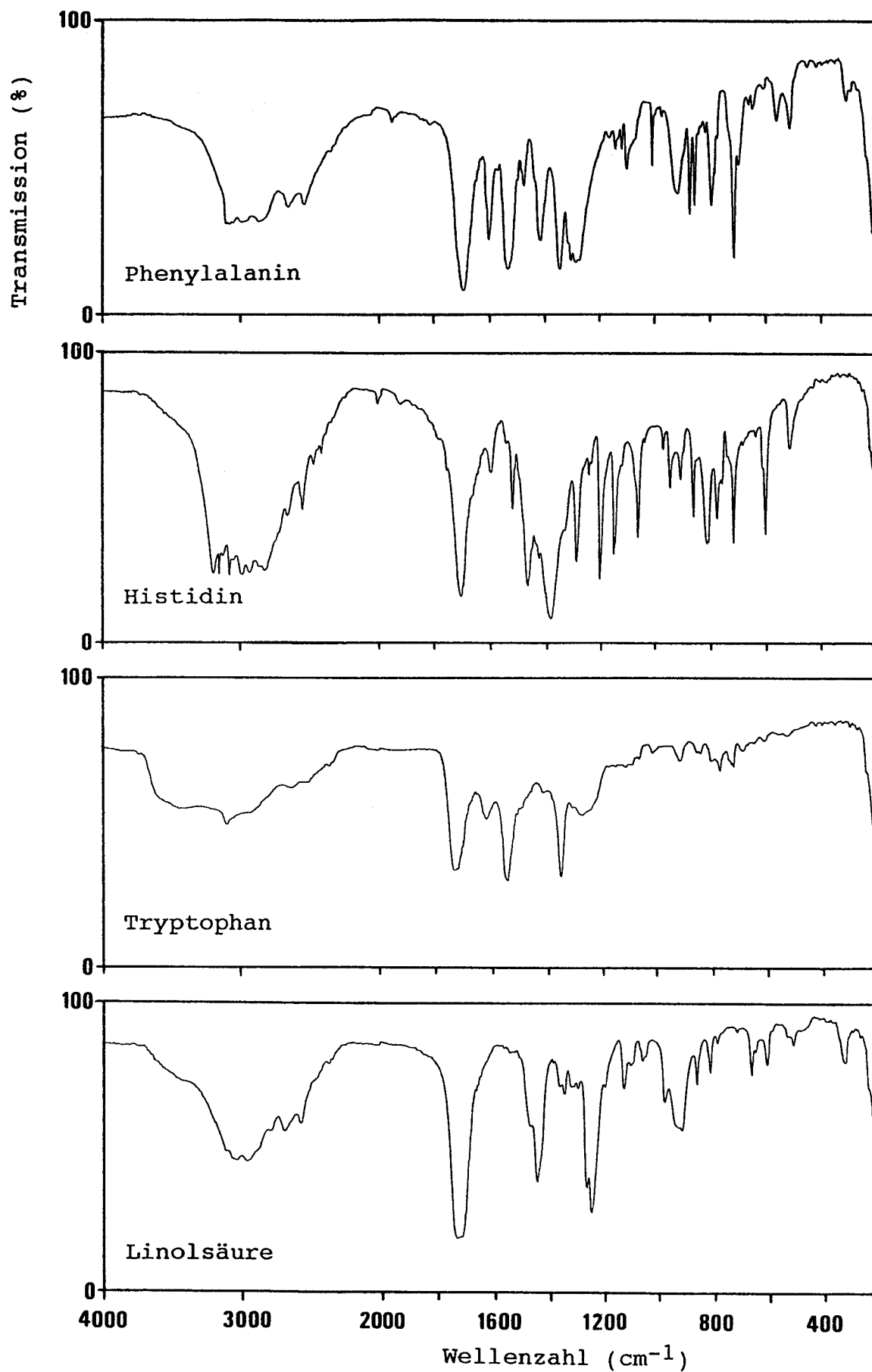


Abb.53: IR-Spektren von Druckaufschlußrückständen
verschiedener Ausgangsstoffe

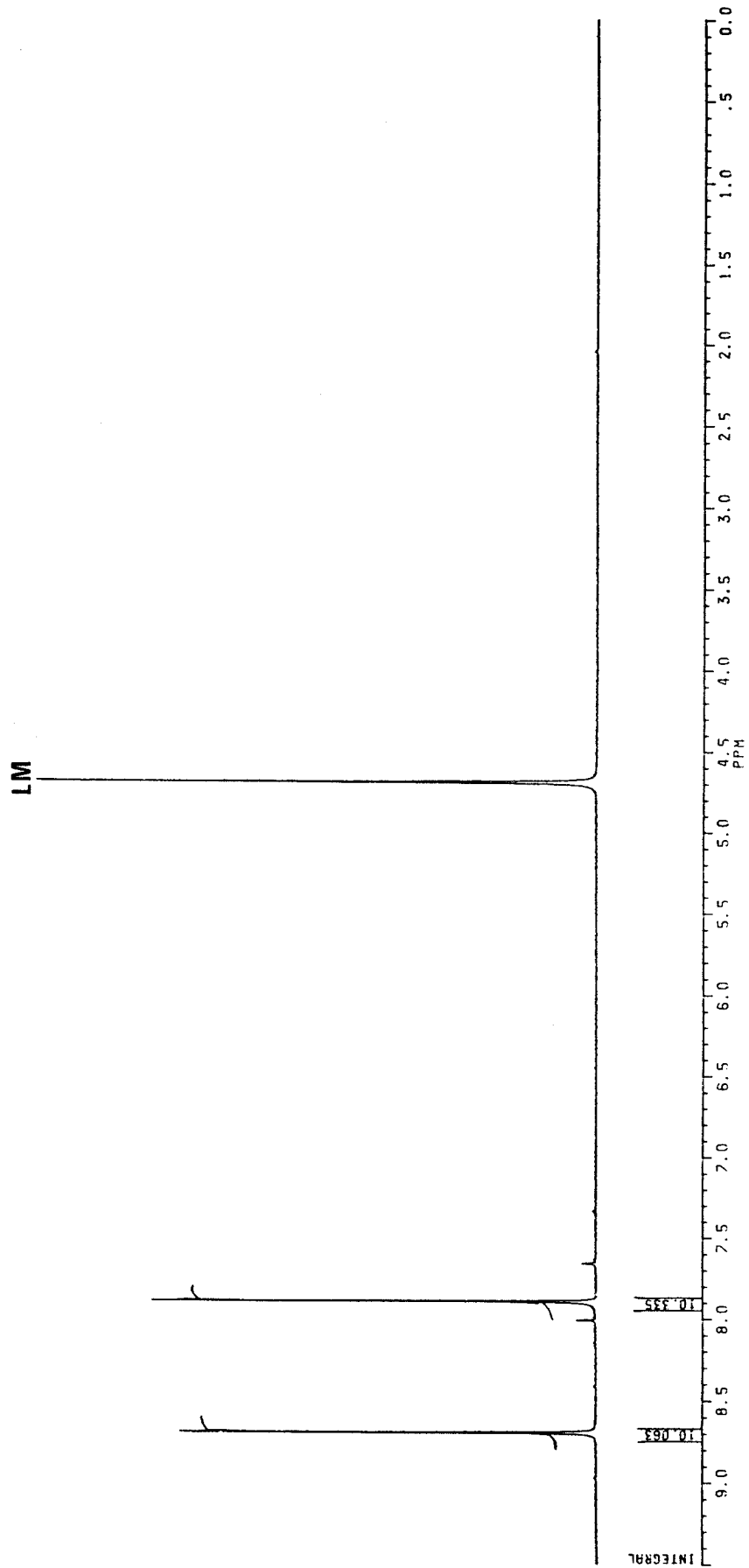


Abb. 54: ^1H -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Histidin

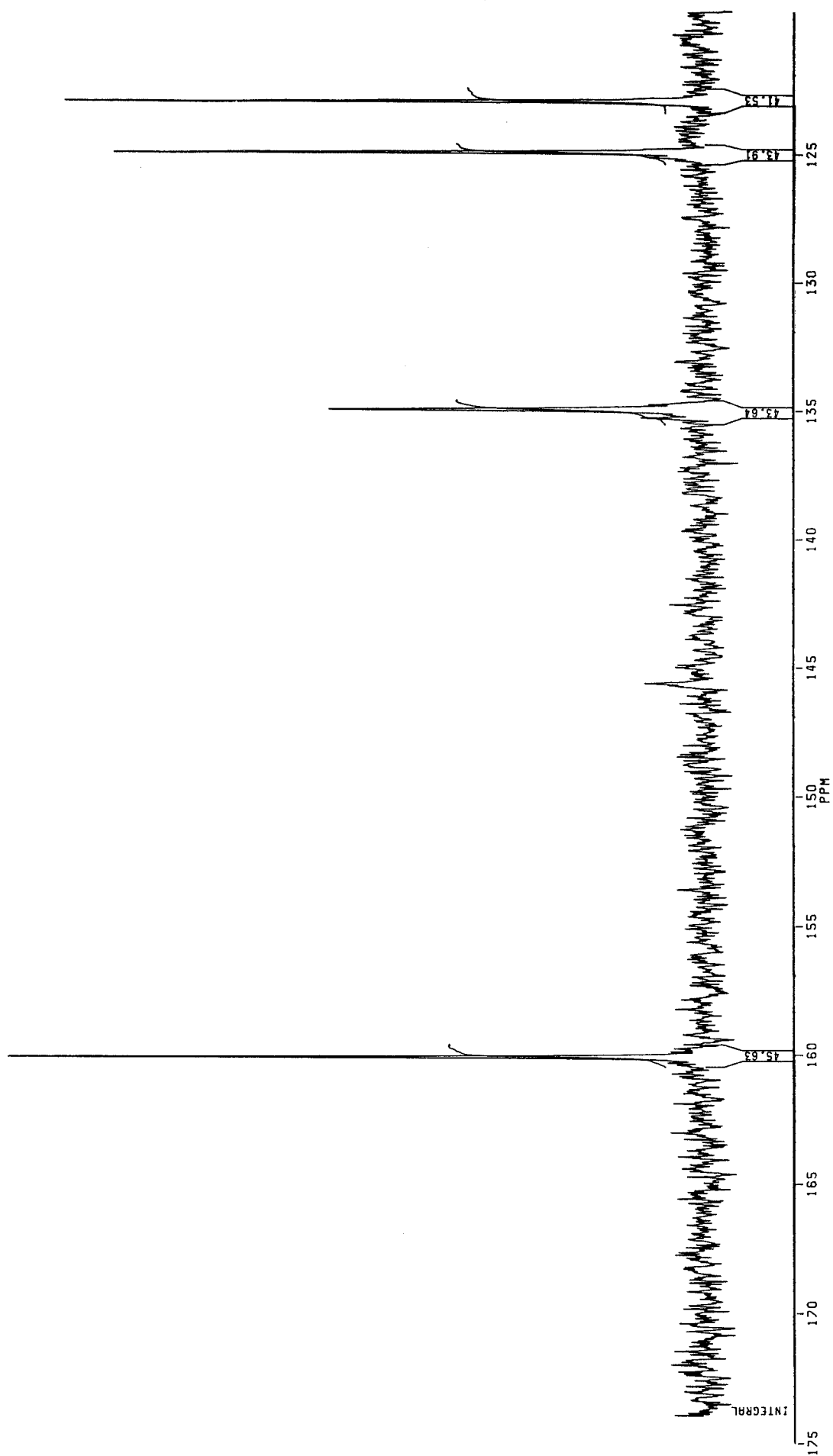


Abb. 55: ^{13}C -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Histidin

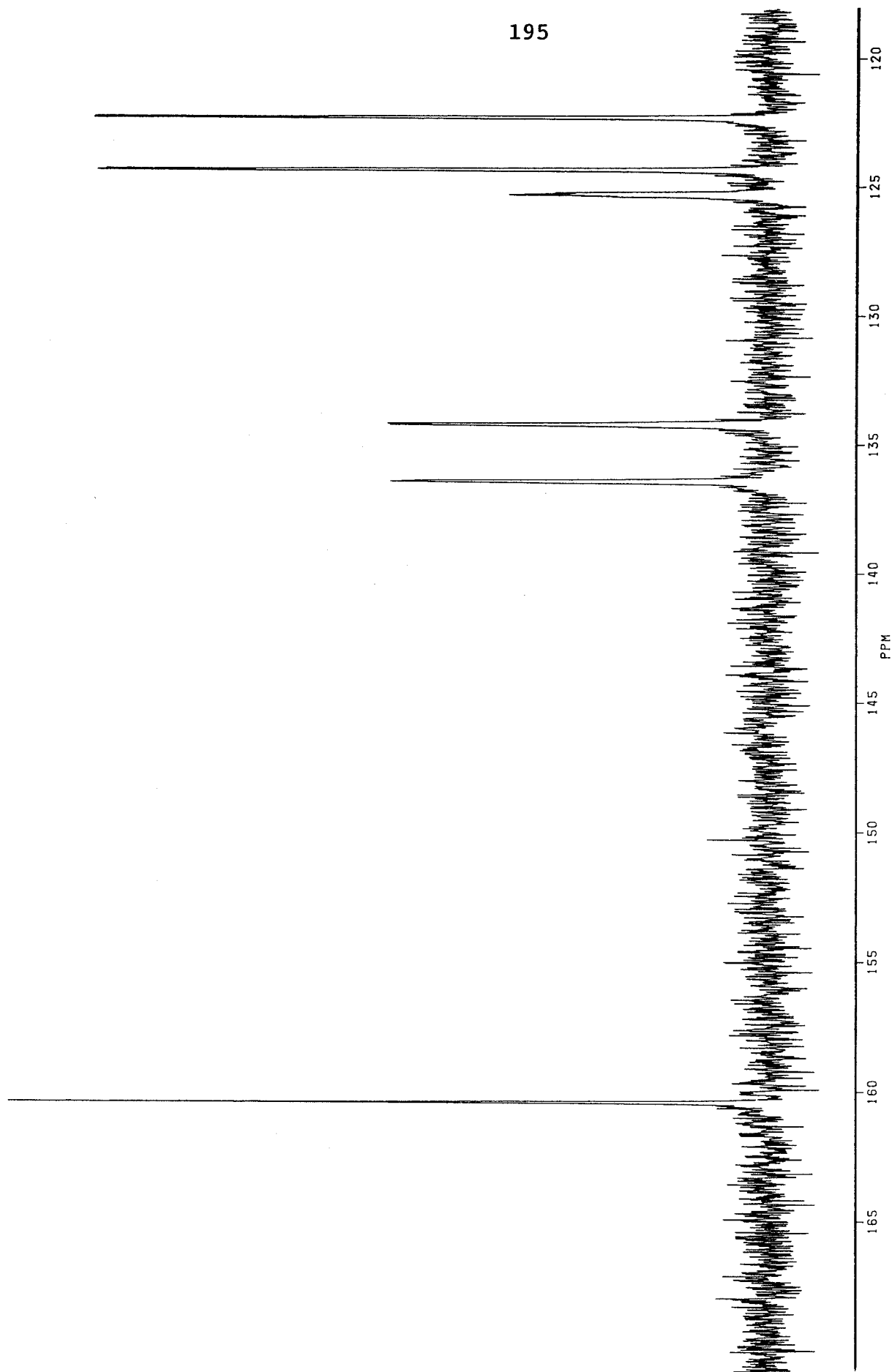


Abb.56: ^{13}C -NMR-Spektrum; nicht entkoppelt; Aufschlußrückstand aus Histidin

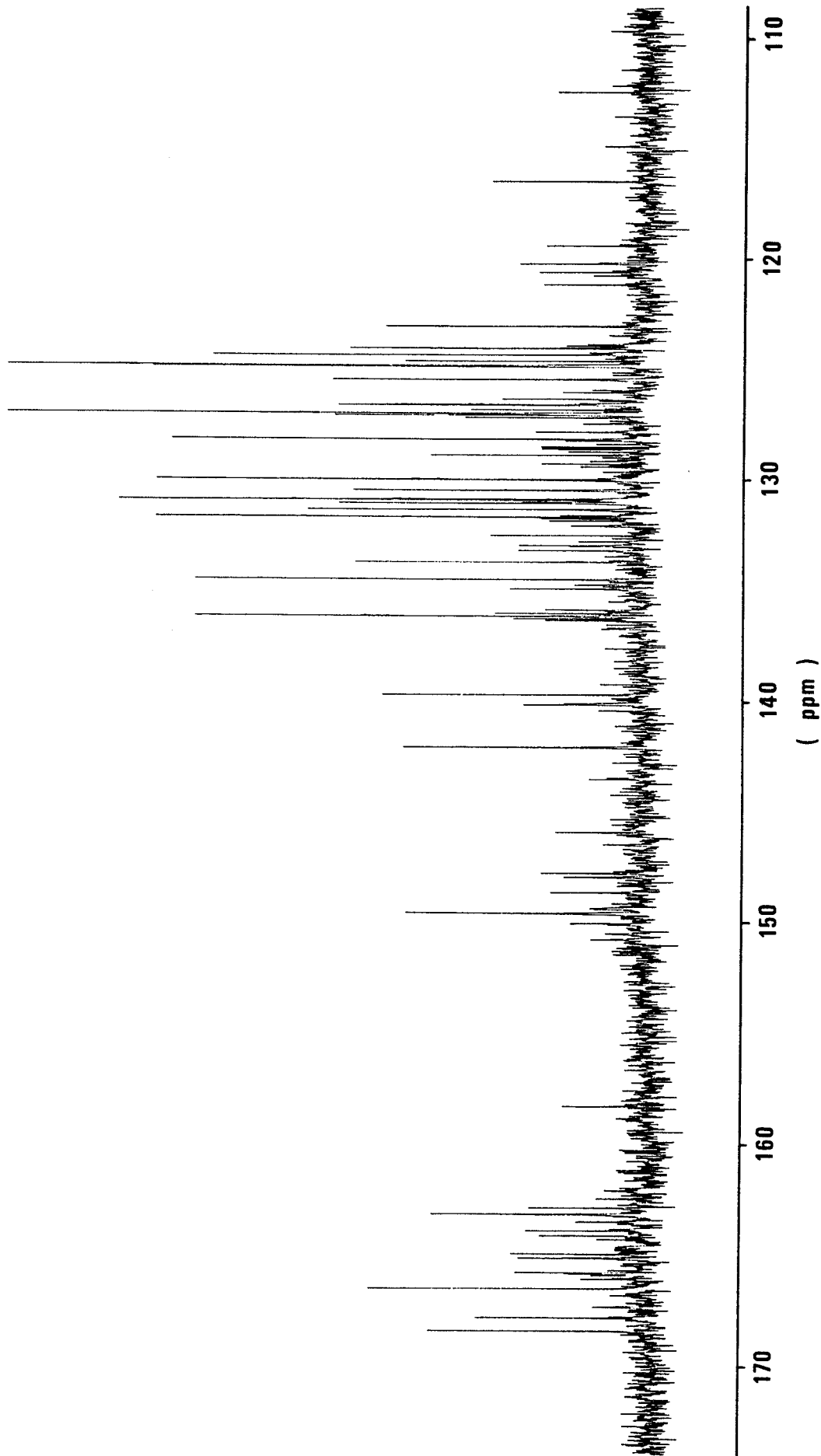


Abb. 57: ^{13}C -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Tryptophan

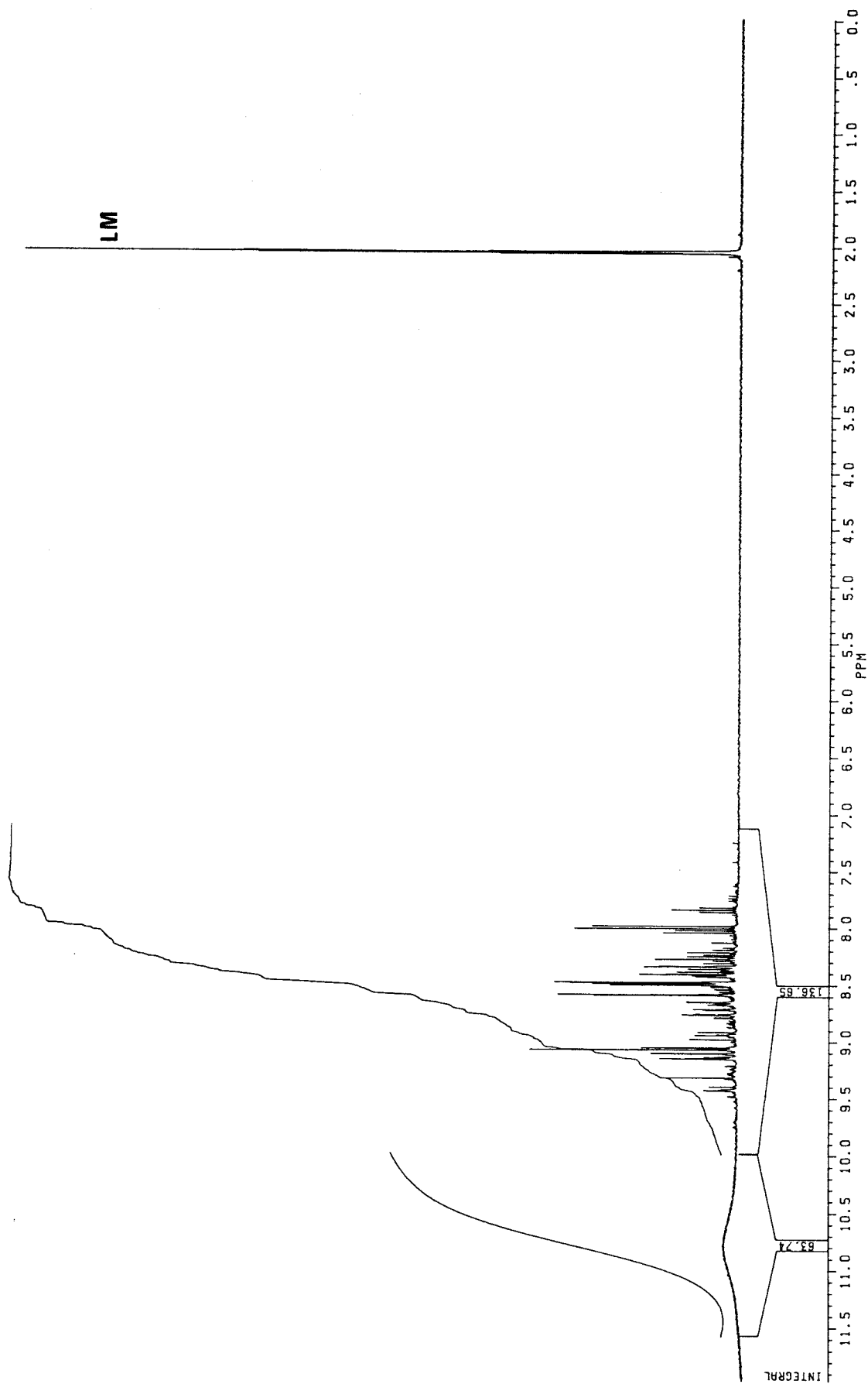


Abb. 58: ^1H -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Tryptophan

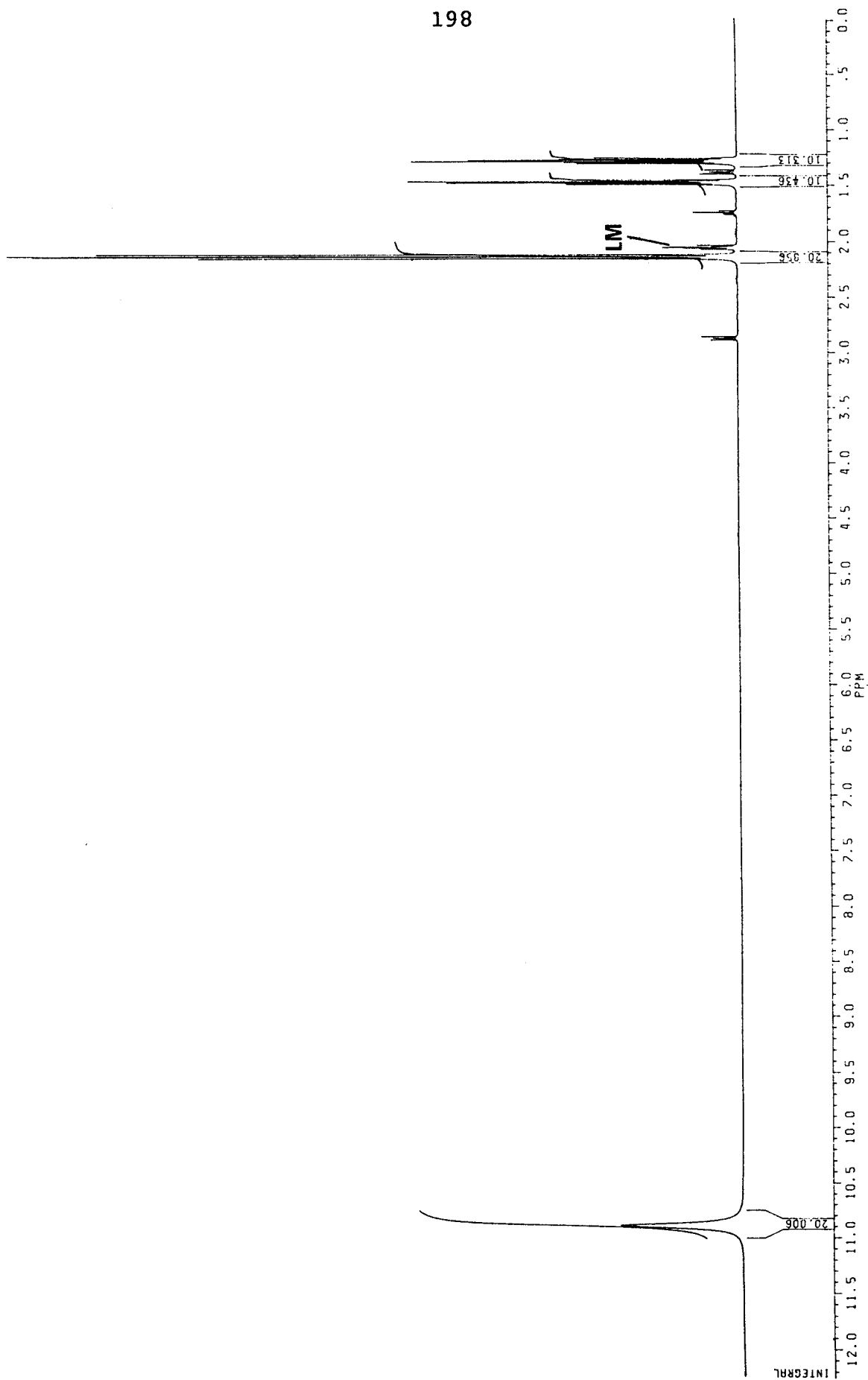


Abb. 59: ^1H -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Linolsäure

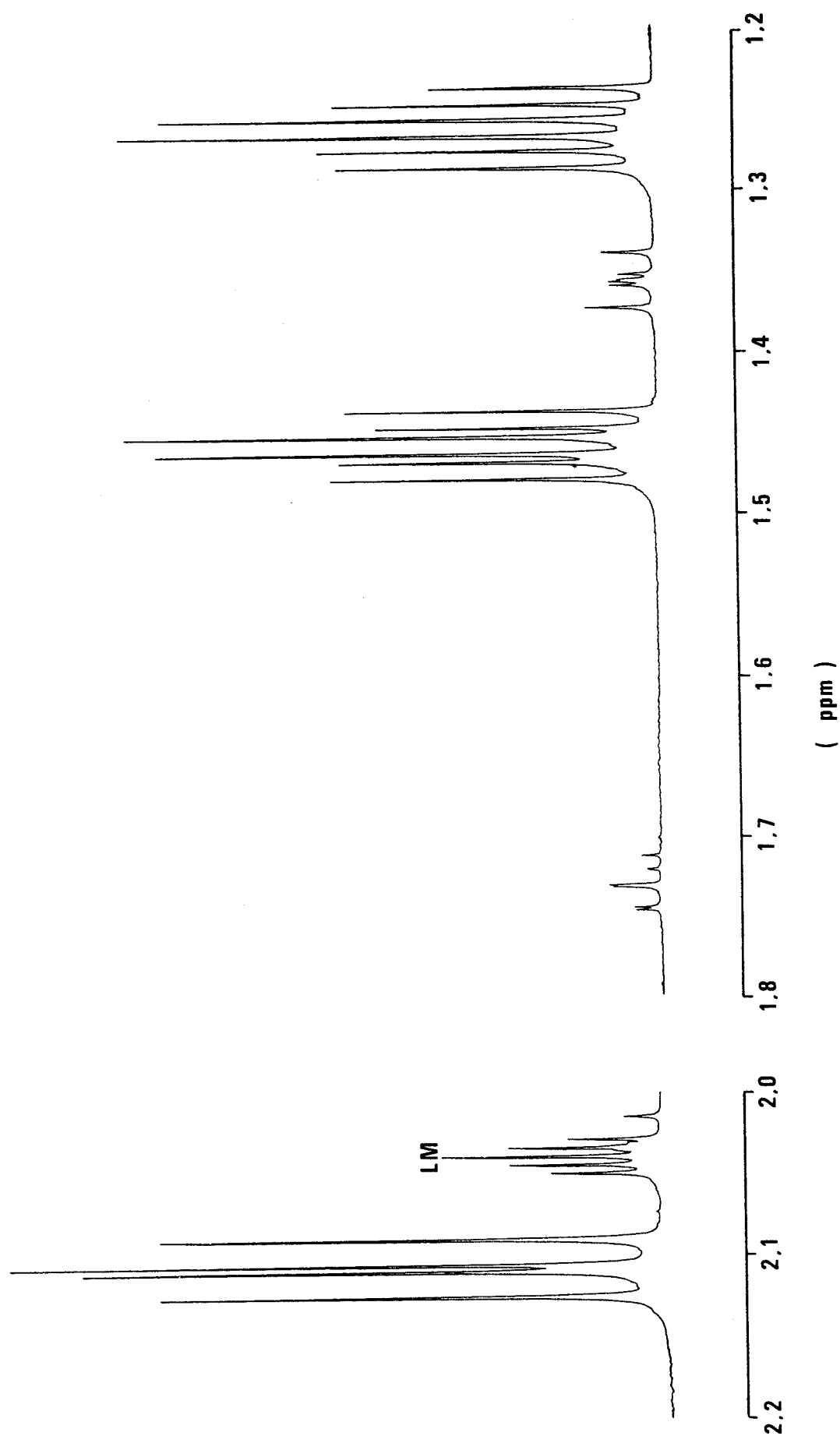


Abb. 60: ^1H -NMR-Spektrum, Ausschnitte; Aufschlußrückstand aus Linolsäure

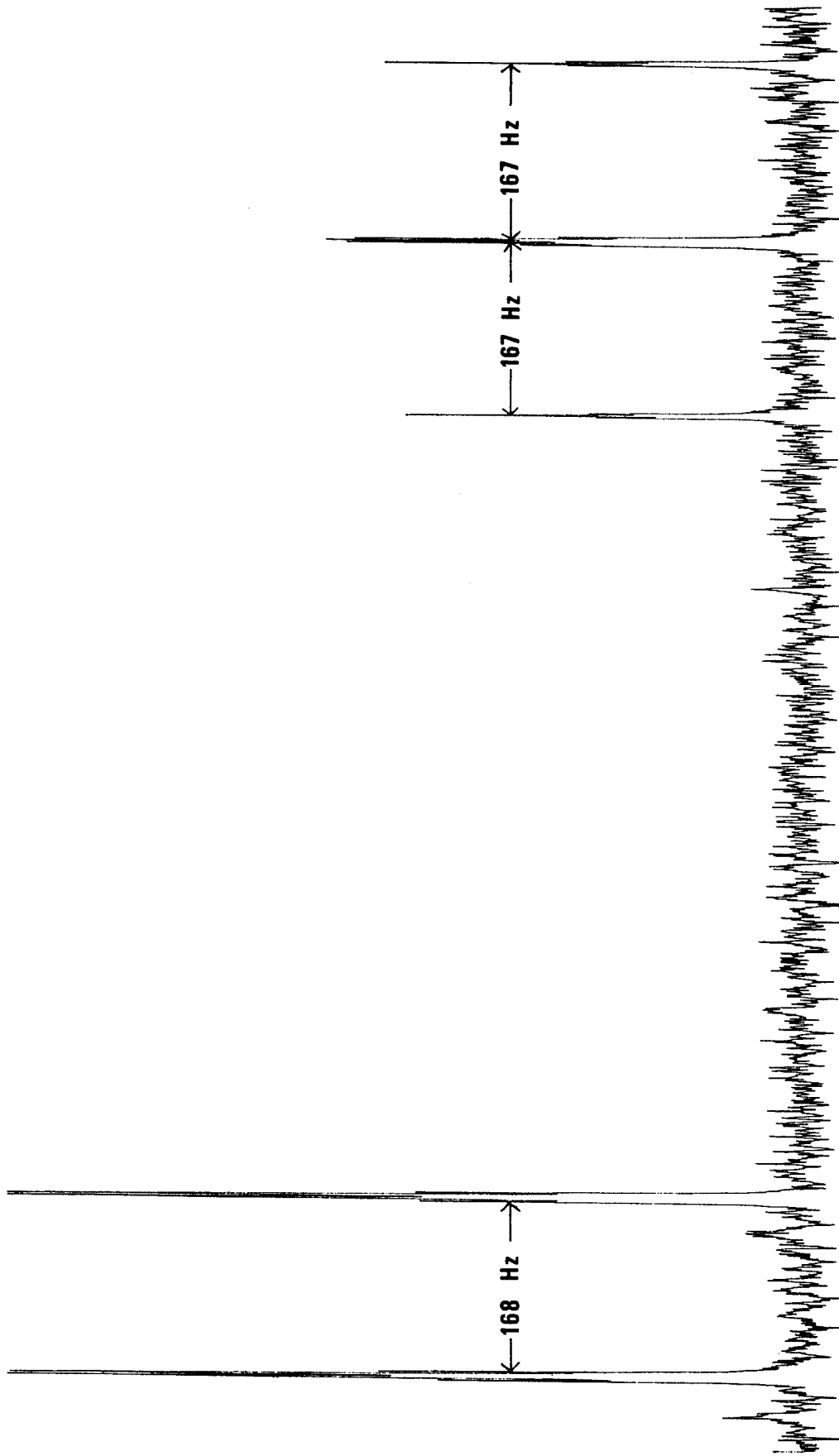


Abb. 61: ^{13}C -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstands aus Linolsäure; H-C-Kopplung der Ring-C-Atome in *cis*-1,2-Cyclopropandicarbonsäure

201

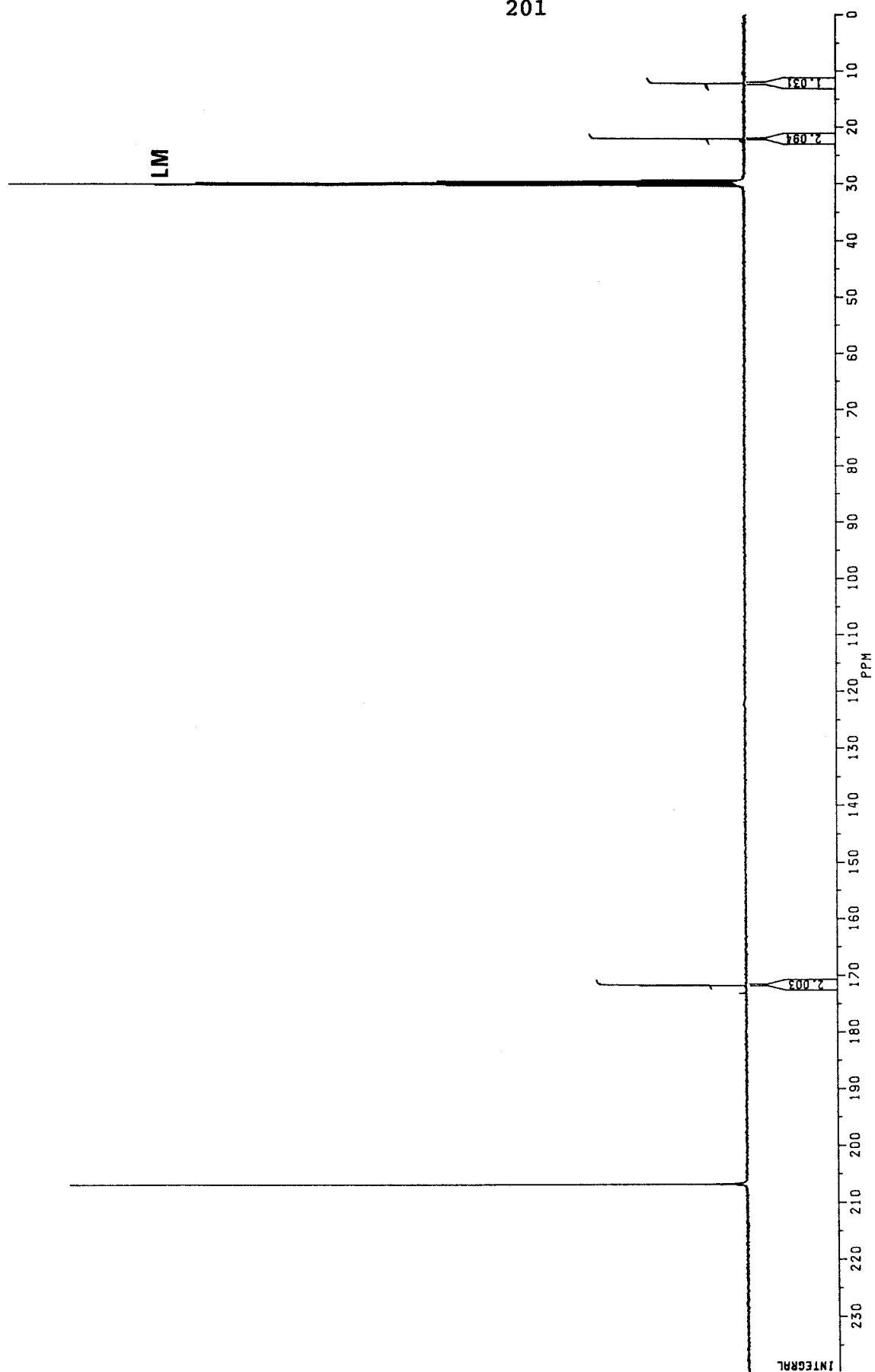


Abb. 62: ^{13}C -NMR-Spektrum; Aufschlußrückstand aus Linolsäure

Abb. 63: ^{13}C -NMR-Spektrum; cis-1,2-Cyclopropanedicarbonsäure-dimethylester, dargestellt aus dem Aufschlußrückstand aus Linolsäure (Verunreinigung: trans-Isomeres)

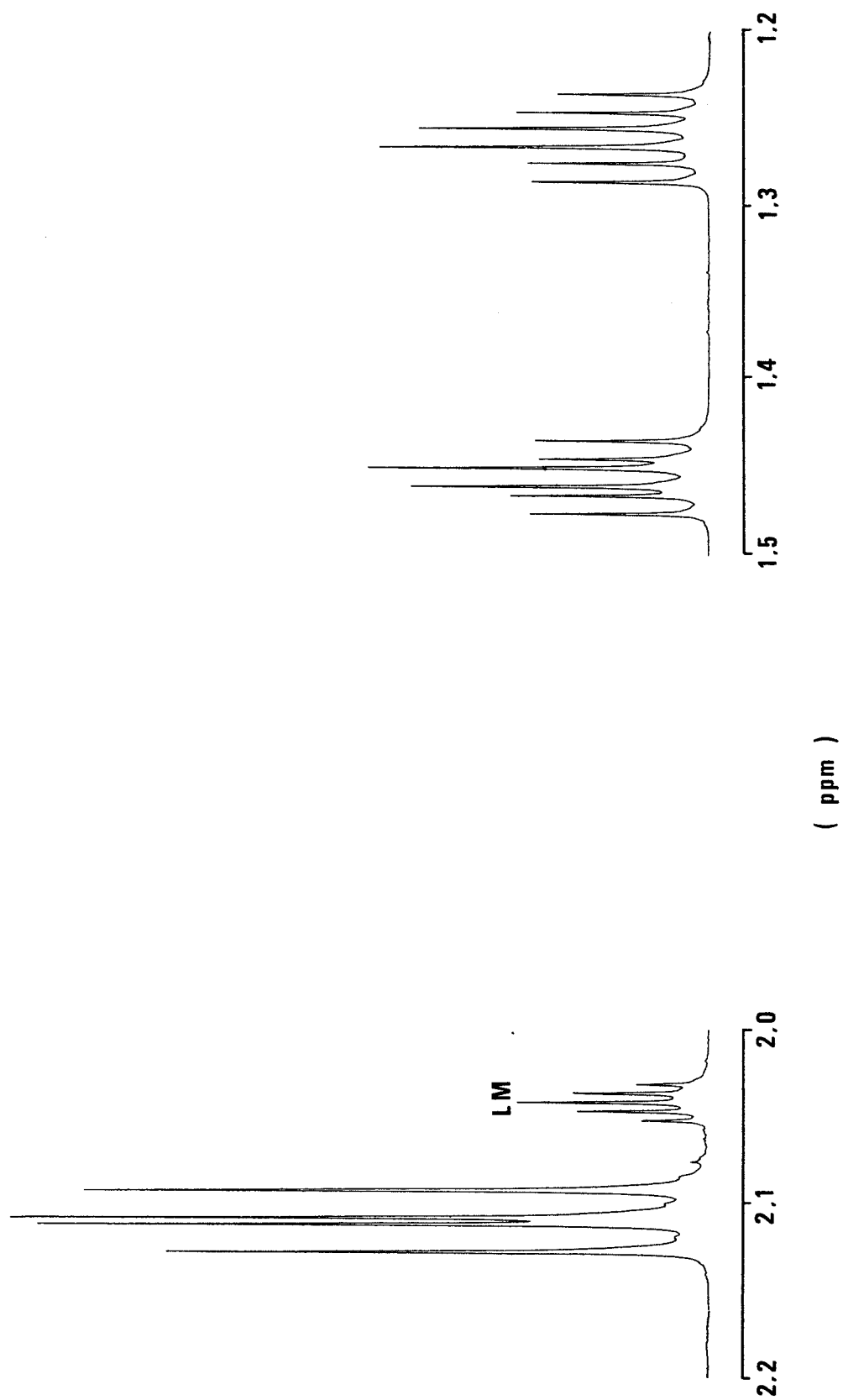


Abb. 64: ^1H -NMR-Spektrum, cis-1,2-Cyclopropanedicarbonsäure (Vergleichssubstanz)

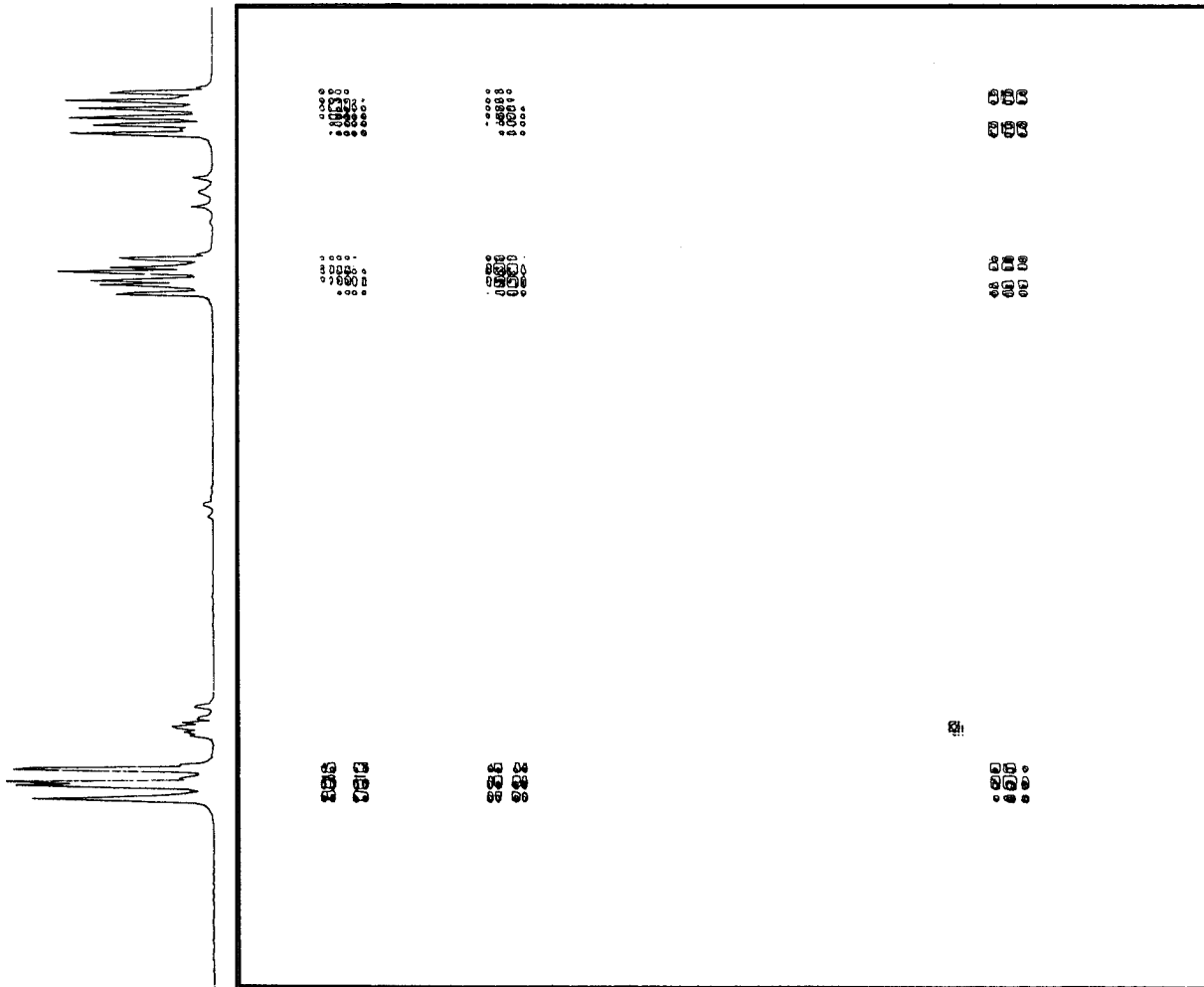


Abb. 65: H-H-Korrelation ("Cosy"-Spektrum); Aufschlußrückstand aus Linolsäure

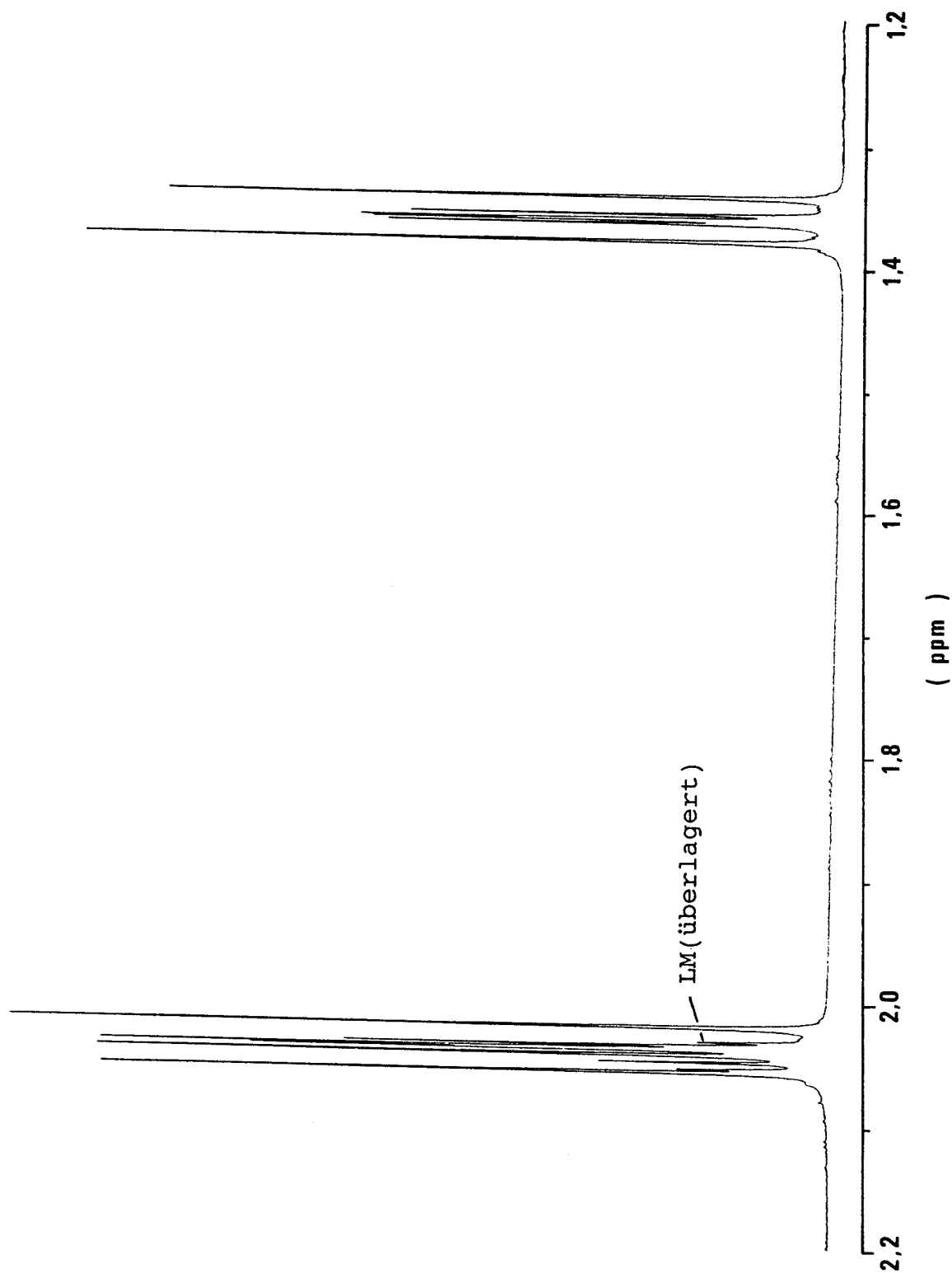


Abb. 66: ^1H -NMR-Spektrum, trans-1,2-Cyclopropanedicarbonsäure, dargestellt durch Druckaufschluß des Diethylesters mit Salpetersäure

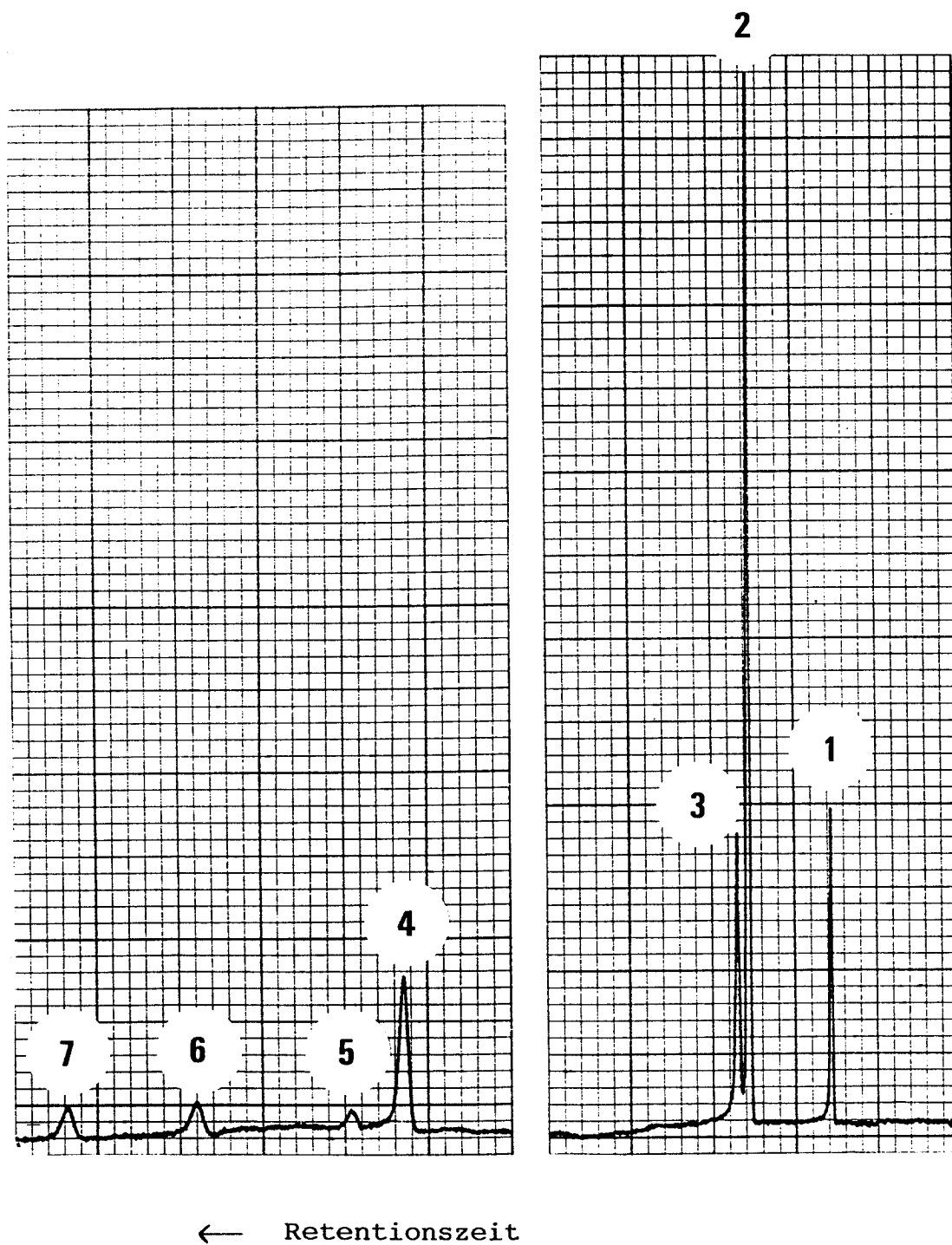


Abb.67: Gaschromatogramm silylierter Carbonsäuren aus dem Druckaufschlußrückstand des Phenylalanins

Zuordnung: Kap.4.9.1; S.137

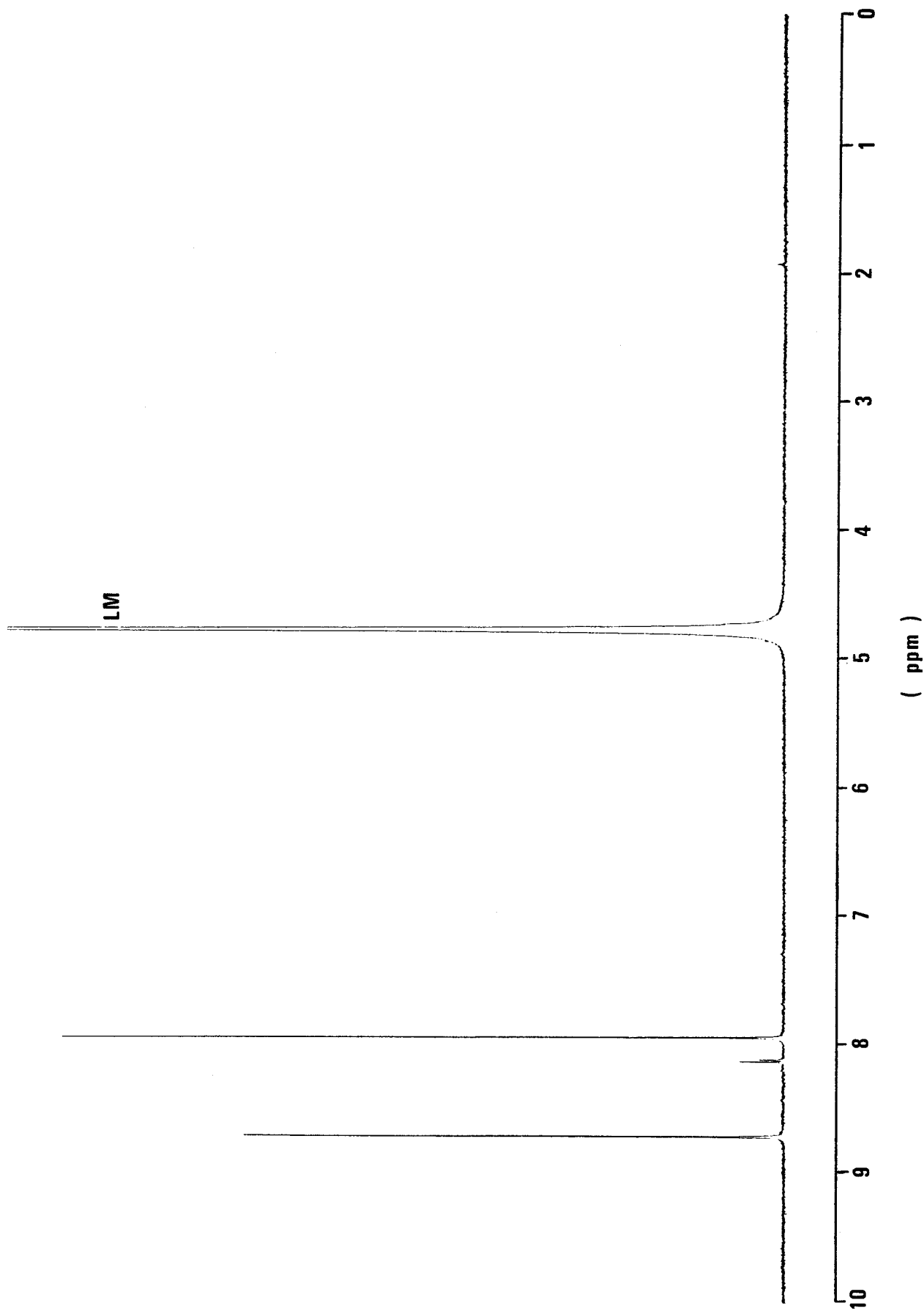


Abb. 68: ^1H -NMR-Spektrum, Aufschlußrückstand aus Histidin nach Aufschluß unter Glucose-Zusatz

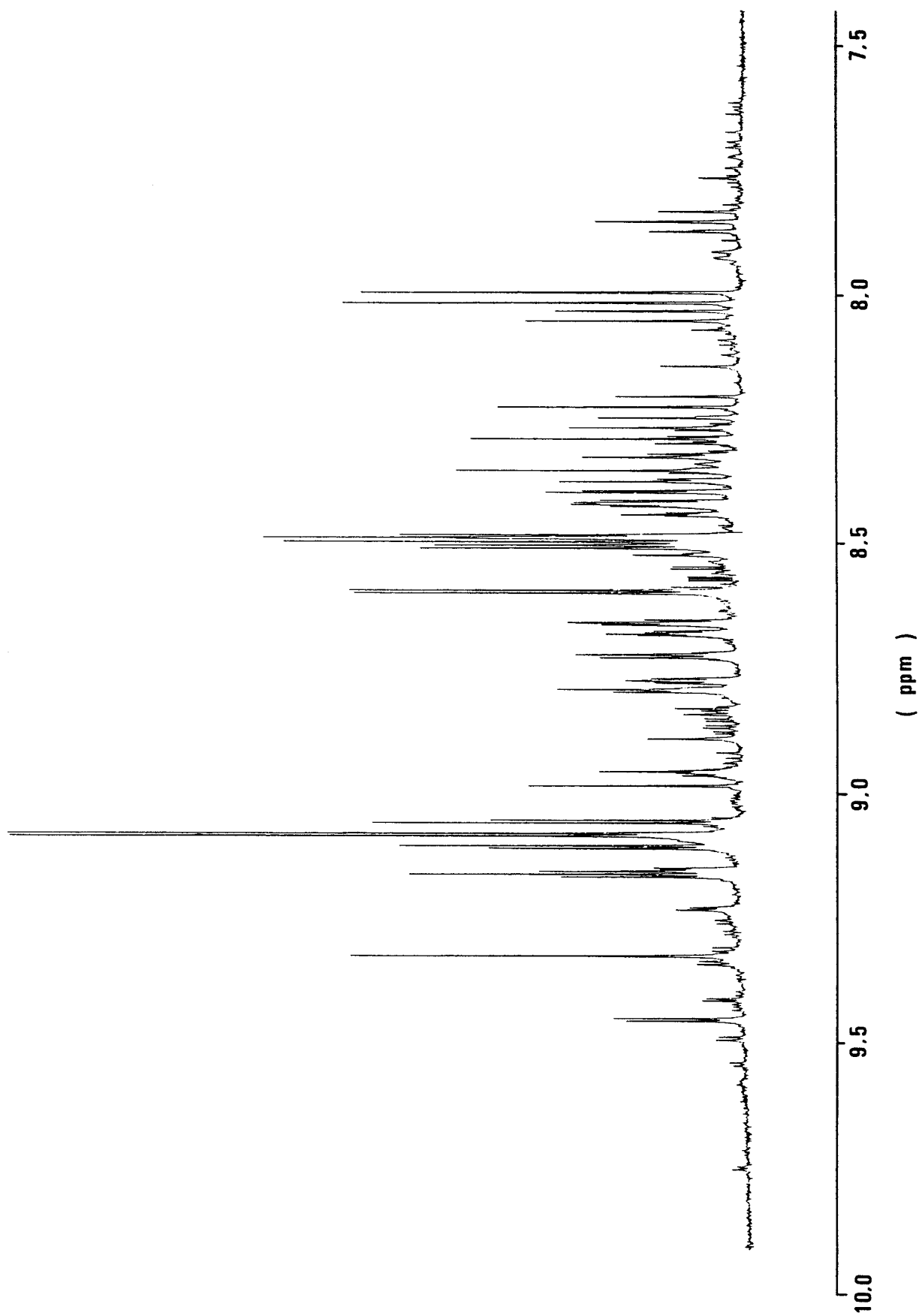


Abb. 69: ^1H -NMR-Spektrum, Aufschlußrückstand aus Tryptophan nach Aufschluß unter Glucose-Zusatz

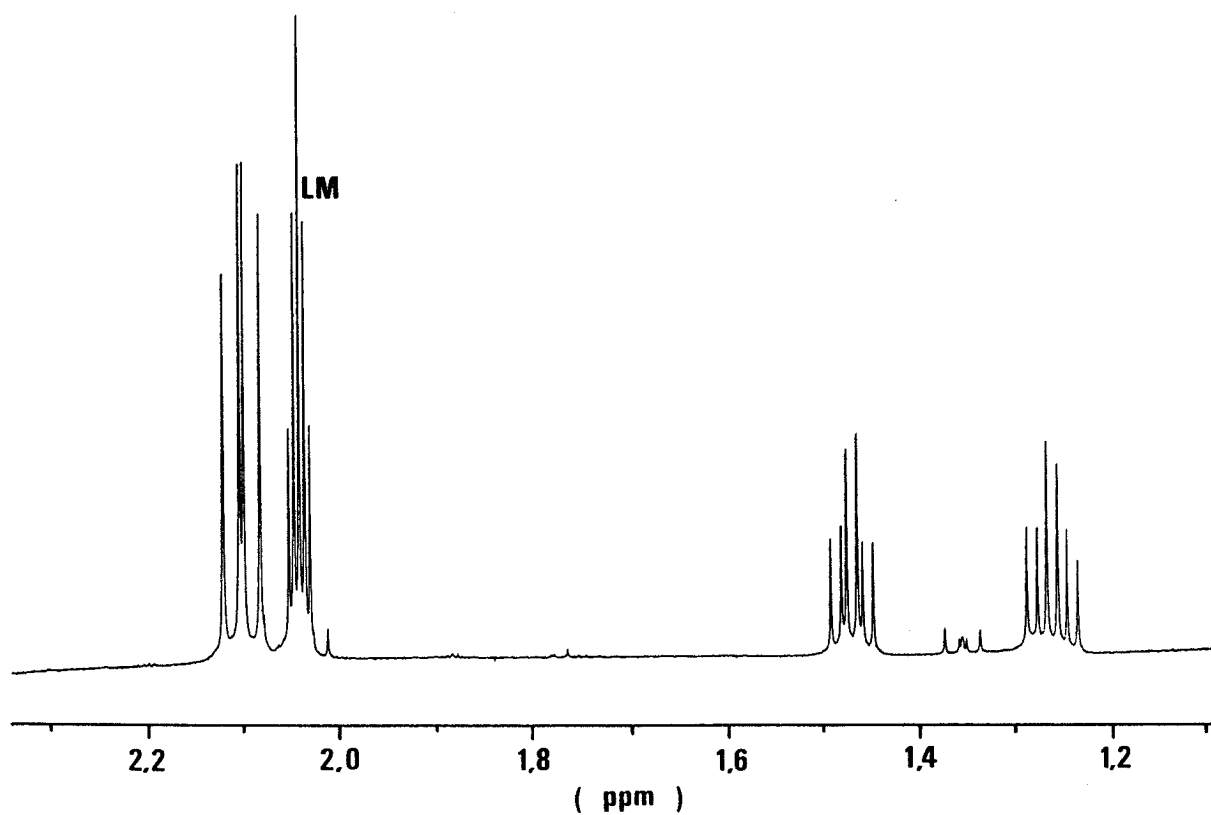


Abb.70: Margarine; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

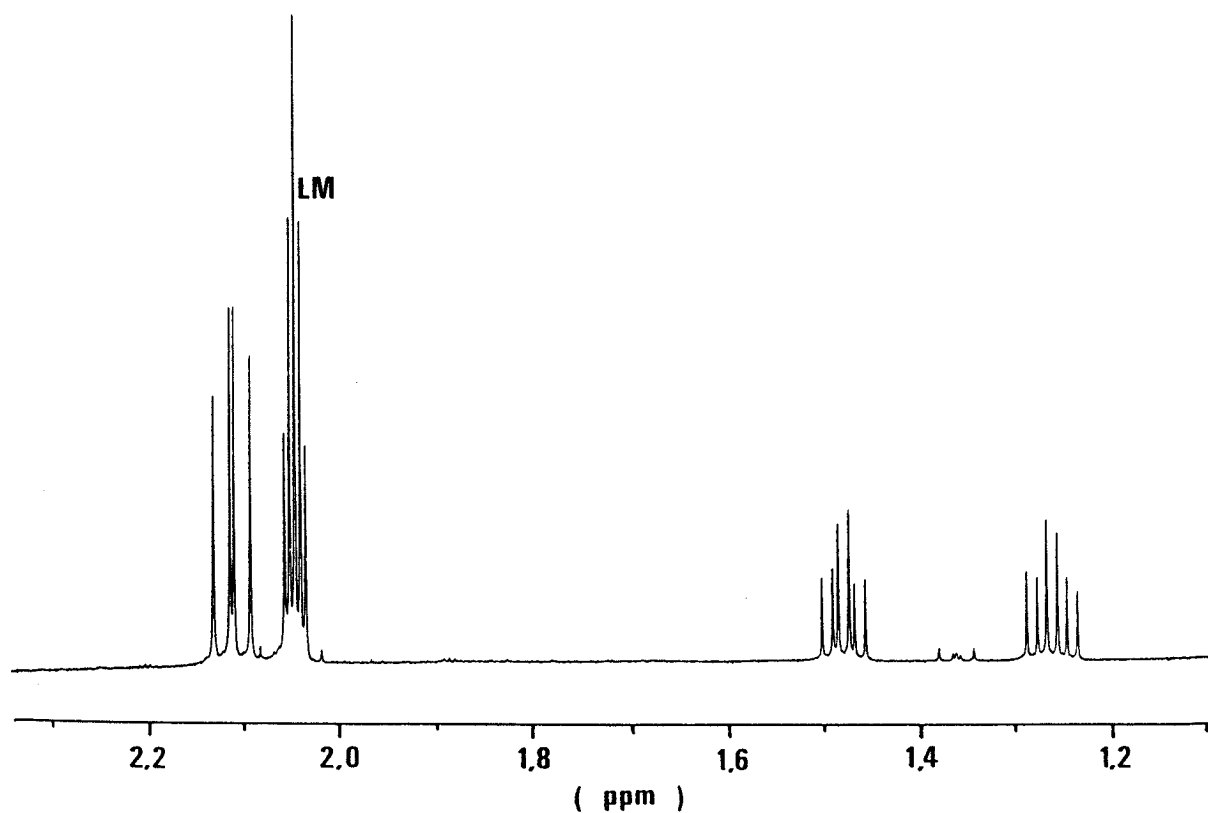


Abb.71: Olivenöl; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

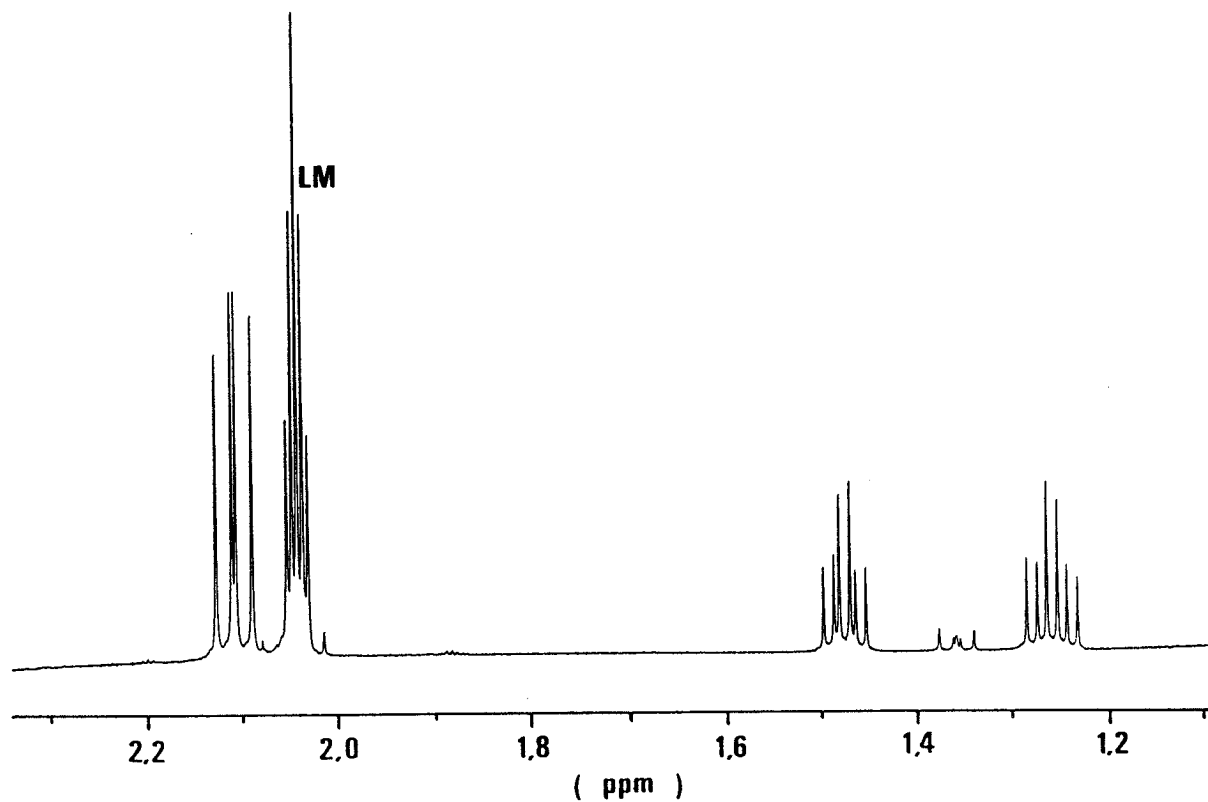


Abb.72: Sojaöl; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

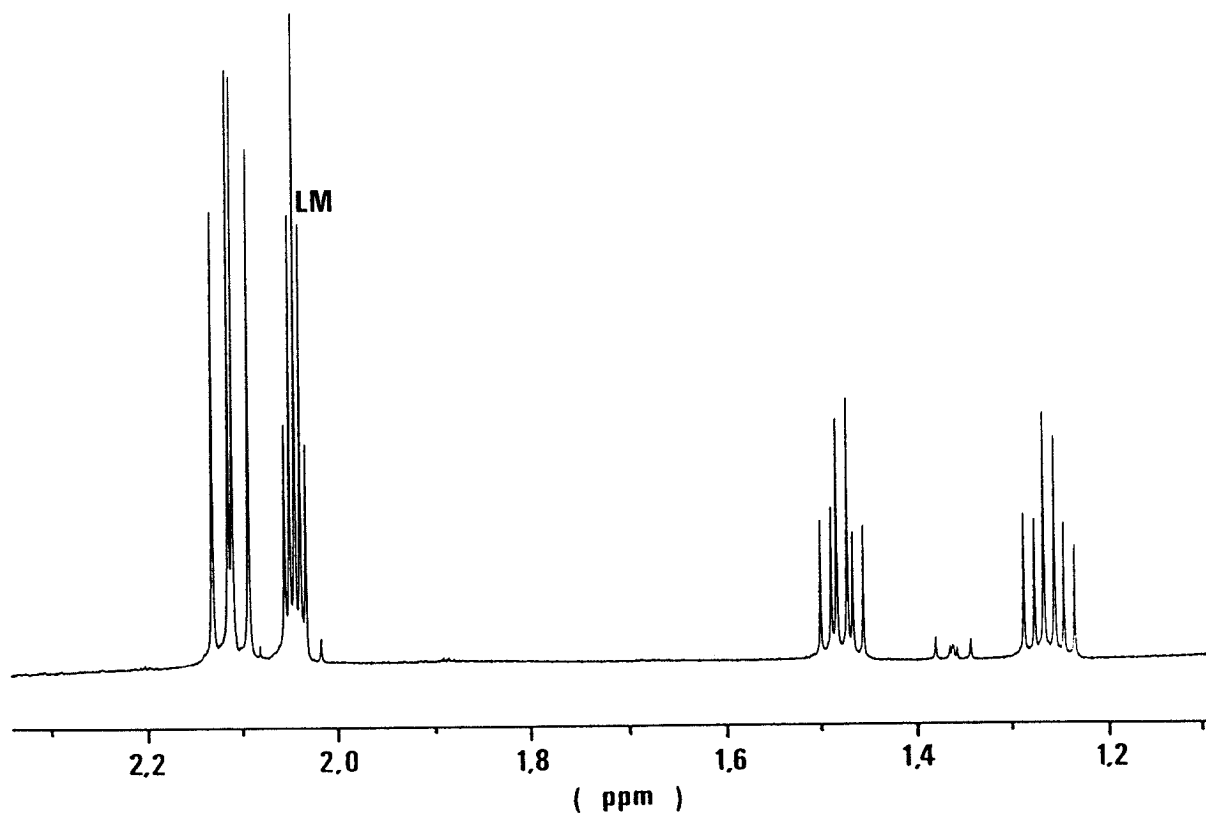


Abb.73: Distelöl; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

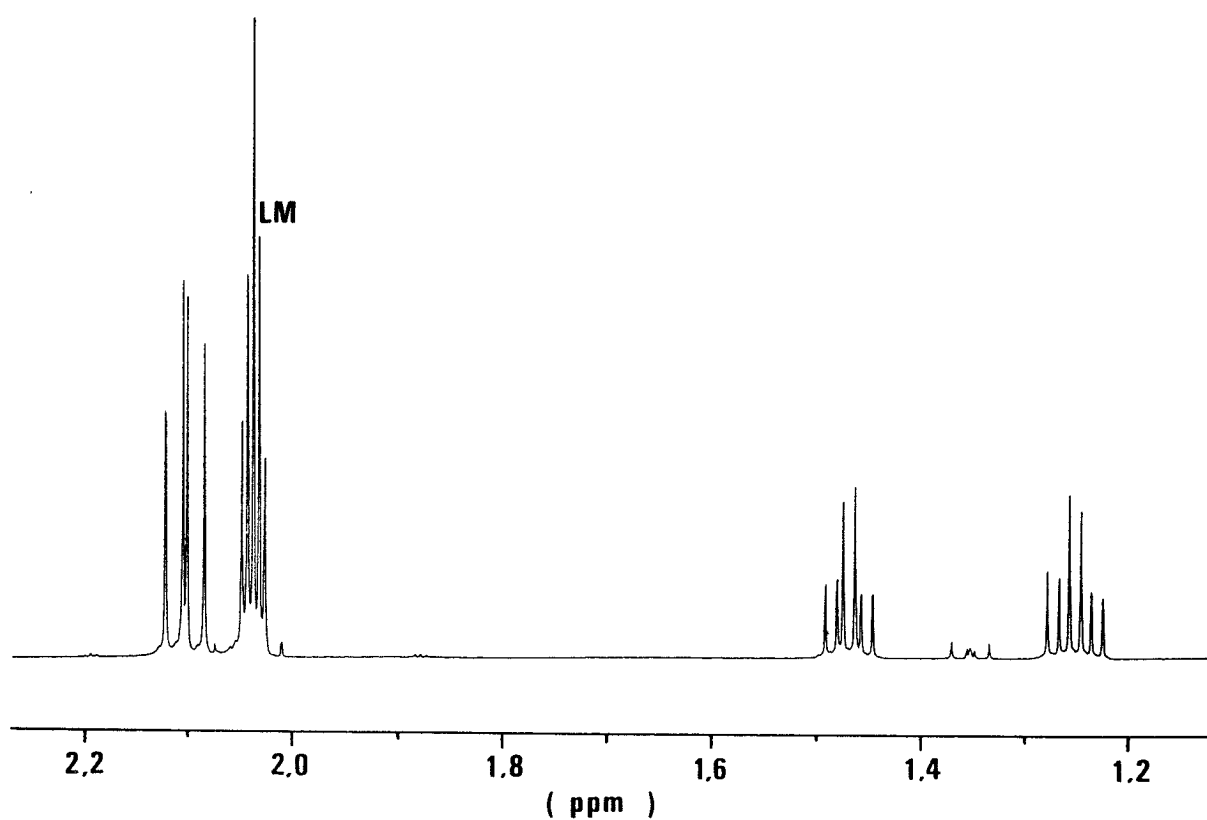


Abb.74: Maiskeimöl; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

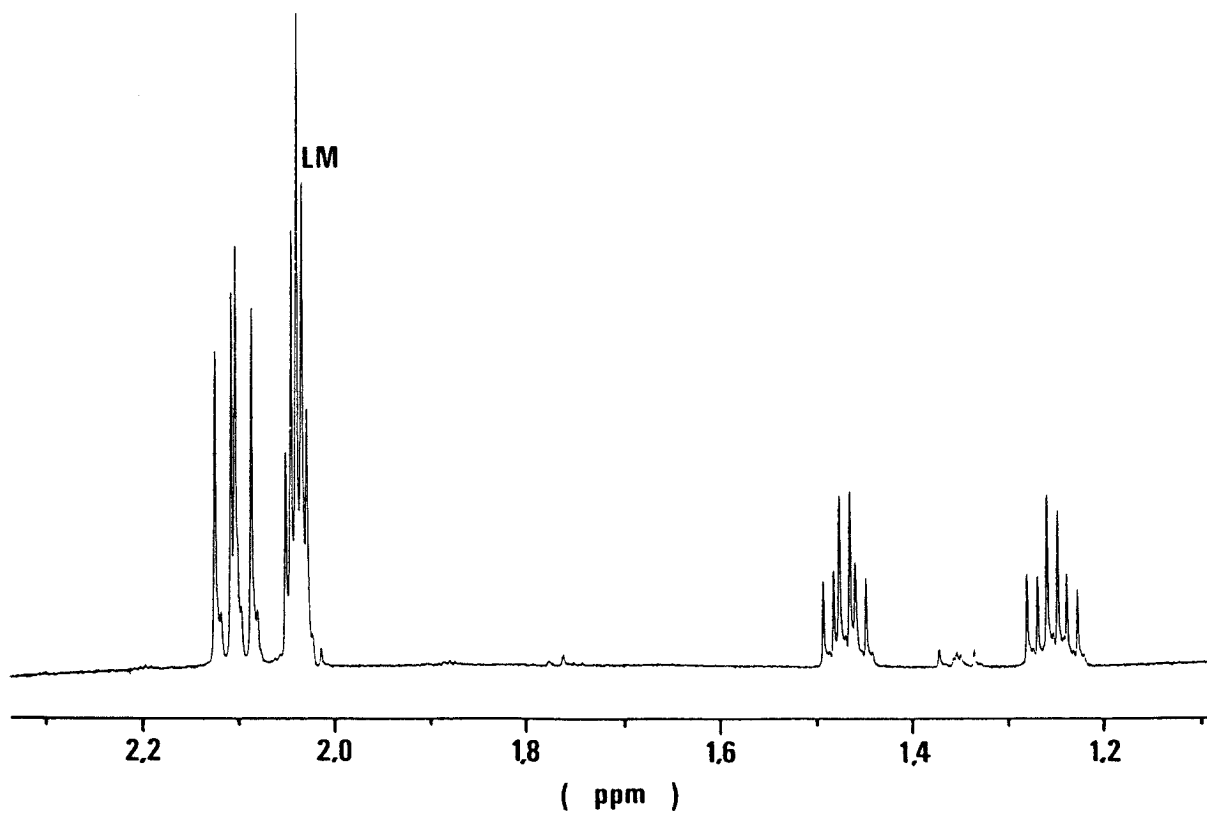


Abb.75: Sonnenblumenöl; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

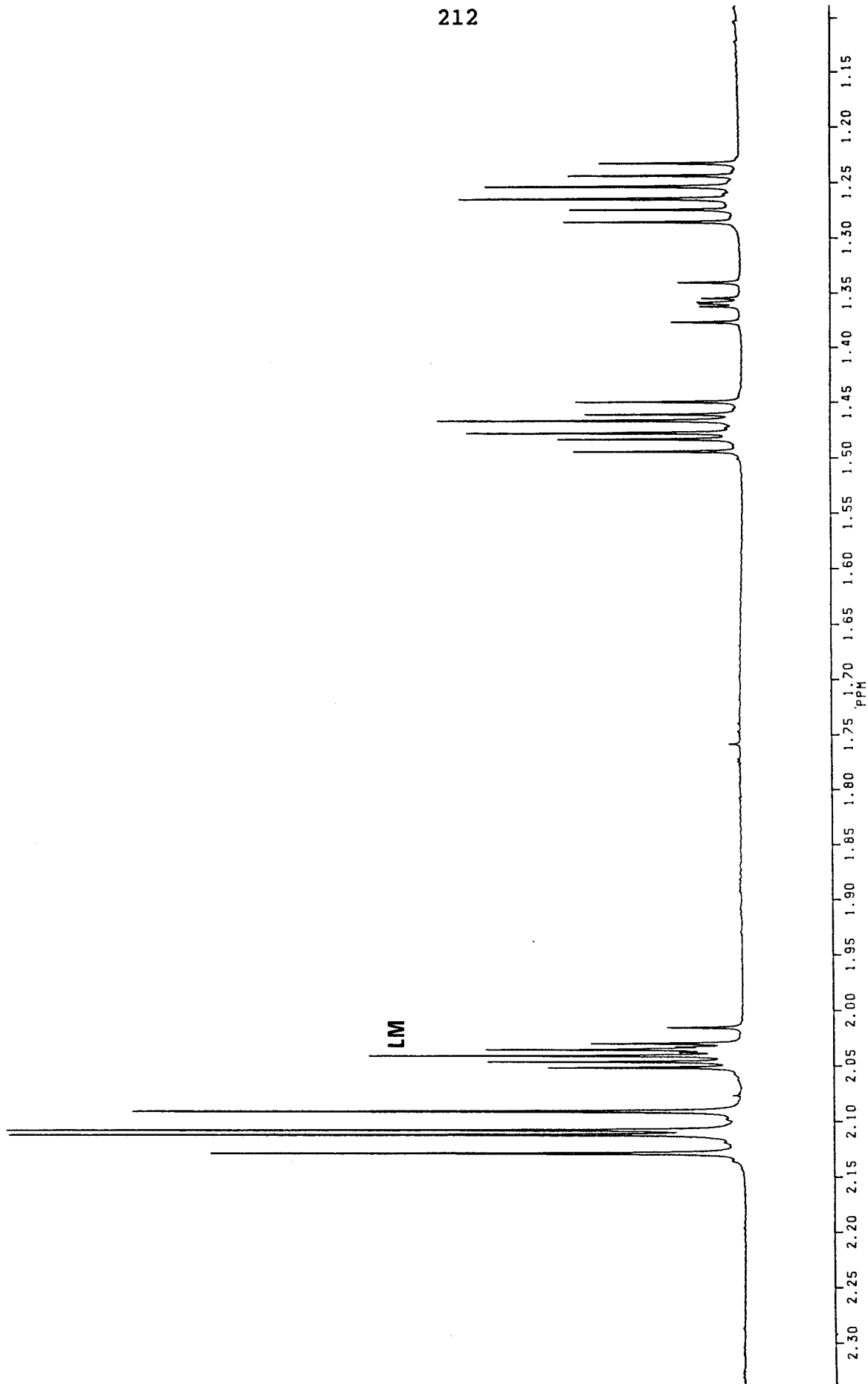


Abb. 76: Linolensäure; ^1H -NMR-Spektrum des Aufschlußrückstandes

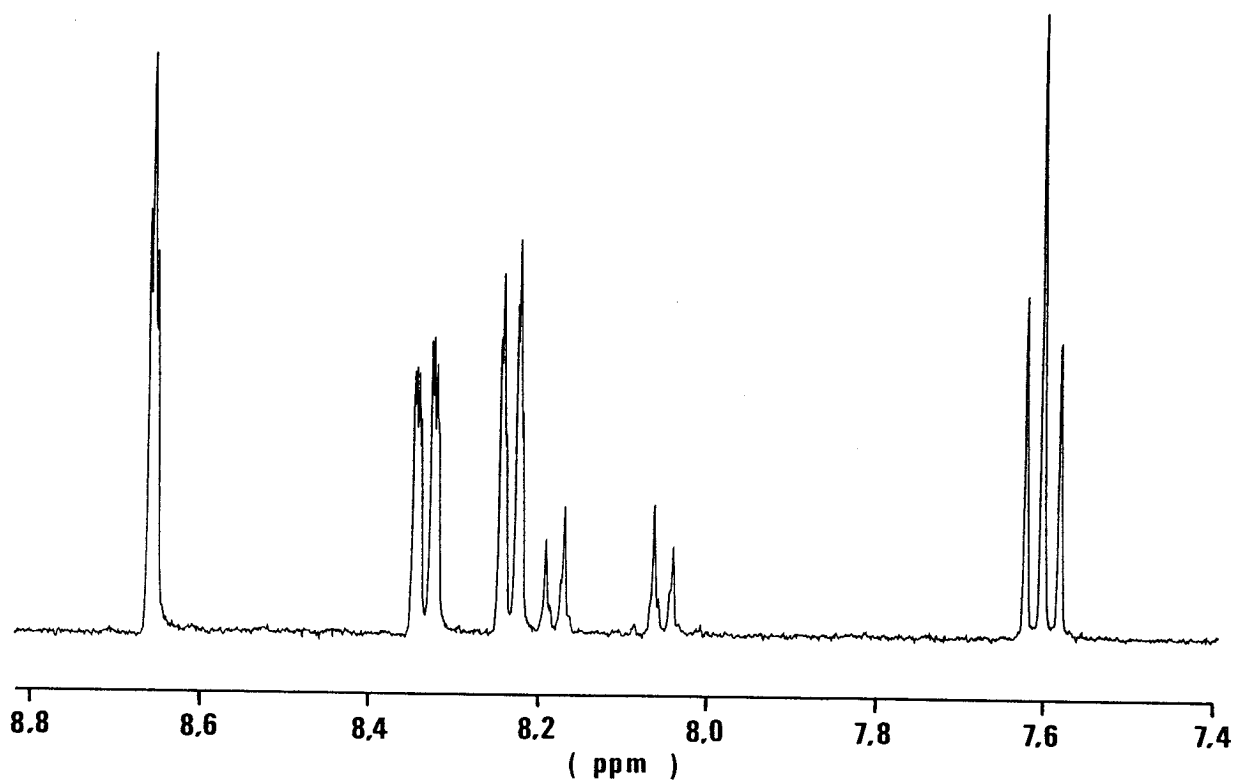


Abb.77: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Nitrobenzoesäure in $\text{DNO}_3/\text{D}_2\text{O}$;
4-Nitrobenzoesäure als Verunreinigung
(Signale bei 8.06 und 8.19 ppm)

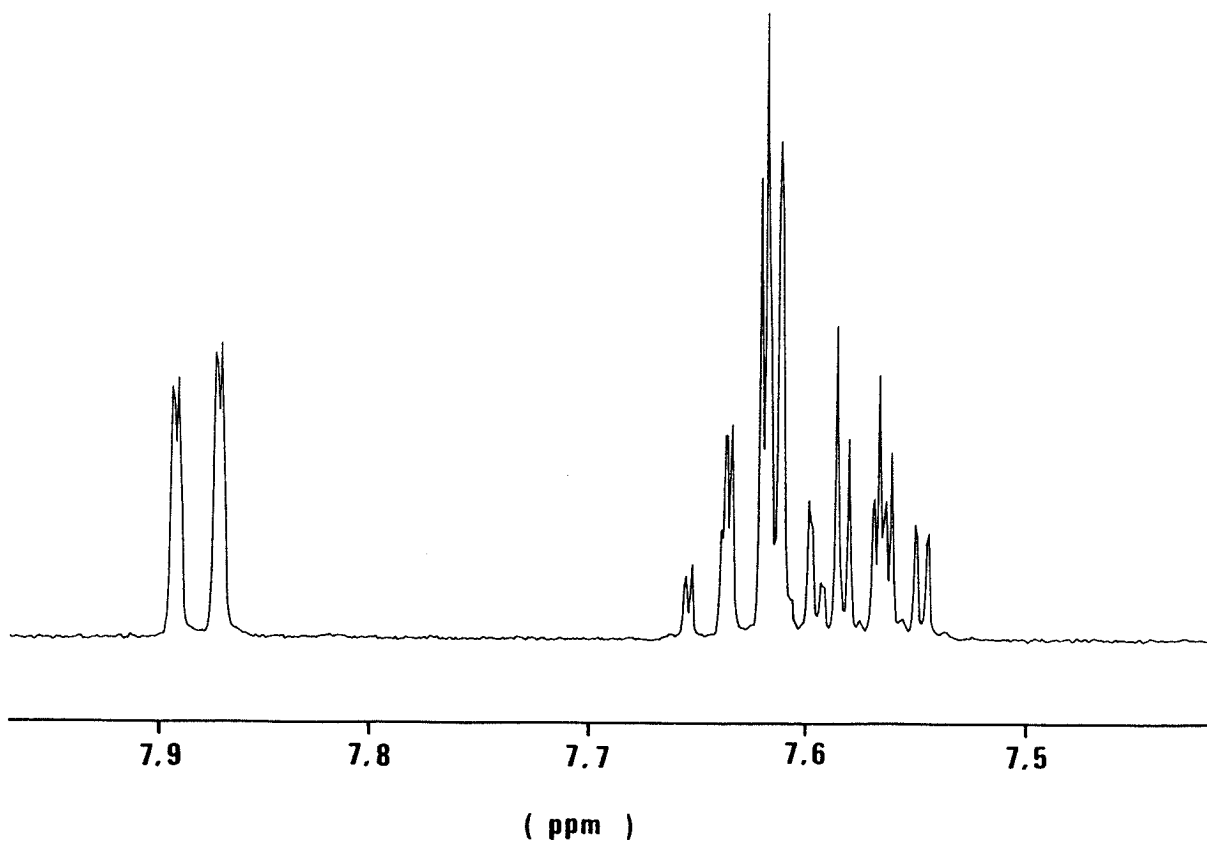


Abb.78: ^1H -NMR-Spektrum von 2-Nitrobenzoesäure in $\text{DNO}_3/\text{D}_2\text{O}$;

