

Z Katedry Chemii Nieorganicznej Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. UMCS  
Kierownik: prof. dr Włodzimierz Hubicki

Kazimierz SYKUT

**Mikrooznaczanie związków organicznych przy  
pomocy nowego typu kulometru relaksacyjnego  
Część III.  
Oznaczanie roślinnych substancji wzrostowych.**

**Микроопределение органических веществ при помощи  
нового типа релаксационного кулометра**

**Часть III.**

**Определение растительных ростовых веществ.**

**Mikrobestimmung organischer Verbindungen mit Hilfe  
eines neuen Typus des Relaxationscoulometers**

**Teil III.**

**Die Bestimmung von Pflanzenwachstumsregulatoren.**

Ważną grupę roślinnych substancji wzrostowych, poznanych dzięki badaniom Kögla, Haagena-Smit'a, Erxlebena, Wielanda, Jonesa i wielu innych, stanowią następujące pochodne indolu: kwas indolo-3-octowy, ester etylowy tego kwasu, kwas indolo-3-propionowy, indolo-3-masłowy oraz nitryle tych kwasów.

Zastosowanie metody chromatograficznej oraz elektroforezy bibułowej pozwala na wyodrębnienie tych związków w czystym stanie z materiału roślinnego.

Według Sena (1) wykrycie jakościowe tych związków na chromatogramie możliwe jest przy ilościach 1—3 mikrogramów za pomocą reakcji Salkowskiego.

Do oznaczeń ilościowych ekstrahuje się odpowiednio wycięte miejsca chromatogramu w mikroaparacie Soxhleta alkoholem, eterem lub wodą i zateża do odpowiedniego stężenia. Uzyskany roz-

twór (zwykle wodny) oznacza się w wypadku nieznanego charakteru chemicznego lub ilości submikromolarnych za pomocą testów biologicznych; w pozostałych wypadkach stosuje się metody mikrochemiczne.

Oznaczanie indolu i jego pochodnych w tak uzyskanych roztworach przeprowadzano do tej pory wyłącznie na drodze kolorymetrycznej, wykorzystując reakcję Salkowskiego, rzadziej Adamkiewicza (Hopkins-Cole), Ehrlicha oraz nitrozo-indolową ze względu na ich mniejszą czułość. Dlatego też większość prac dotyczących oznaczania substancji wzrostowych z grupy indolu omawia metody oznaczenia kwasu indolo-3-otowego, które są różnymi modyfikacjami reakcji Salkowskiego. I tak: Tang i Boner (2) oznaczają wymieniony kwas przy stężeniu 2,5—5  $\mu$ g/ml; Holley (3) doprowadza czułość do nawet 0,1  $\mu$ g/ml; Gordon i Weber (4) — 0,2  $\mu$ g/ml; Linser-Maschek (5) 1  $\mu$ g/ml.

Według Larsena (6) najlepsze wyniki osiągnąć można (ze względu na dobrą powtarzalność) stosując modyfikację według Gordona—Webera przy zawartościach kwasu indolo-3-otowego od 0,2  $\mu$ g/ml.

Przy oznaczaniu innych pochodnych indolu nie można osiągnąć przy użyciu reakcji Salkowskiego tak wysokich czułości. Gordon i Weber przebadali czułość reakcji Salkowskiego w modyfikacji Tang-Bonnera i swojej, wyznaczając wartości ekstynkcji dla roztworów indolu i szereg jego pochodnych dla stężeń 0,125 milimoli/ml przy długości fali 550 milimikronów, w porównaniu z ekstynkcją uzyskiwaną dla roztworów kwasu indolo-3-otowego. Z zestawienia wyników pomiarów można stwierdzić, że reakcja ta jest dla innych pochodnych indolu co najmniej 10—30 razy mniej czuła, tj. dolną granicę oznaczanych stężeń można oszacować na 10—50  $\mu$ g/ml. Innymi metodami kolorymetrycznymi nie można też uzyskać lepszych rezultatów.

Podana w niniejszej pracy metoda kulometryczna pozwala na oznaczanie indolu i jego pochodnych w ilościach powyżej 1  $\mu$ g przy stężeniach dochodzących do 0,05  $\mu$ g/ml. Metoda polega na bromowaniu oznaczanych związków nadmiarem bromu, usunięciu nieprereagowanego bromu rodankiem potasu i oznaczenia jego nadmiaru na drodze kulometrycznego bromowania. Metodę tę zastosowałem uprzednio (7) do mikrooznaczania fenolu i krezoli.

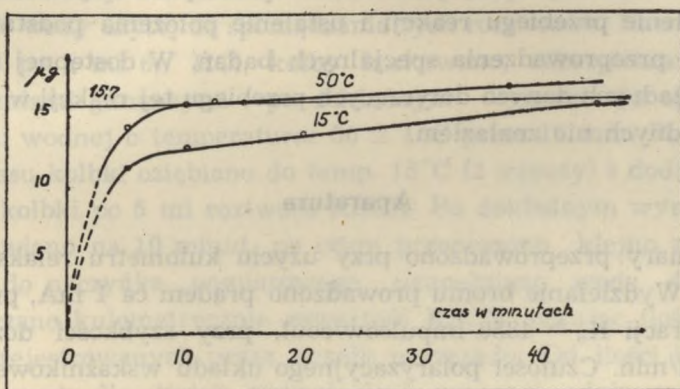
### Przebieg bromowania indolu i jego pochodnych

Aromatyczny charakter pirolu, a zwłaszcza jego podobieństwo do fenolu, pozwalało przypuszczać, że zastosowanie wyżej wspomnianej metody kulometrycznej, także i w wypadku indolu powinno dać pozytywne rezultaty.

W literaturze podawana jest tylko jedna metoda oznaczania indolu Paulyego i Gundermanna (8) polegająca na miareczkowaniu indolu roztworem jodu w środowisku zalkalizowanym NaOH. W wyniku reakcji powstaje  $\beta$ -jodoindol. Działanie jodem w obecności nadmiaru  $\text{NaHCO}_3$  prowadzi do równoczesnego otrzymania indyga i  $\beta$ -jodoindolu. Działanie jodem na roztwór skatolu prowadzi do otrzymania związków przypuszczalnie o składzie  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$  lub  $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$ , przy działaniu nadmiarem jodu otrzymuje się związki o różnej (zmiennej) wartości jodu.

Brunc (9) stwierdza, że indol reaguje energicznie z bromem (w roztworze  $\text{CHCl}_3$ ) i daje różne produkty w zależności od warunków przebiegu reakcji. Faktem tym tłumaczy on brak bliższych danych na ten temat w literaturze.

Pierwsze próby oznaczenia kwasu indolo-3 $\alpha$ -masłowego przeprowadzone w identyczny sposób jak oznaczanie krezoli dały wyniki za niskie i o dużym rozrzucie. Ażeby stwierdzić przyczynę tego, przeprowadzono oznaczanie zmieniając czas i temperaturę bromowania oraz nadmiar bromu. Zależność wyników oznaczania od czasu bromowania i temperatury dla kwasu indolo-3 $\alpha$ -masłowego przedstawiona jest na wykresie 1.



Wykres 1

Zależność wyników oznaczania kwasu indolo-3-masłowego od czasu bromowania i temperatury

Z przebiegu krzywych wywnioskować można, że przy oznaczaniu zachodzi reakcja prowadząca do określonego produktu. Szybkość bromowania przy  $15^{\circ}\text{C}$  jest tak mała, że reakcja dobiega końca dopiero po 60—80 minutach. W temperaturze  $50^{\circ}\text{C}$  wyniki zbliżają się do wartości teoretycznej już po 10 minutach bromowania, dalej krzywa wznosi się powoli, tak że przerwanie reakcji w dziesiątej czy w dwunastej minucie nie powoduje większych różnic w wynikach. To wznoszenie się krzywej można wytłumaczyć powolnym rozkładem indolu, który może mieć miejsce przy działaniu silnymi kwasami w podwyższonej temperaturze.

Reakcję przeprowadzono przy następujących stężeniach:

2,5 mikrogramrównoważnika  $\text{Br}_2$

0,5 „ „ kwasu indolo-3-masłowego

3,0 mikrogramrównoważników KSCN dla usunięcia nadmiaru bromu.

Stężenie elektrolitu pomocniczego i kwasu:  $\text{KBr}$ —0,1n,  $\text{HCl}$ —2n; objętość roztworu wynosiła podczas bromowania 15 ml, podczas oznaczania kulometrycznego 25 ml.

Stwierdzono, że w warunkach tych mol kwasu indolo-3-octowego i indolo-3 $\alpha$ -masłowego reaguje z 6 atomami bromu, natomiast mol indolu z 8 atomami bromu. Biorąc pod uwagę parzystą ilość atomów bromu wchodzących w reakcję, większe o 2 atomy zużycie bromu w wypadku wolnej pozycji  $\beta$ , można przypuszczać, że reakcja prowadzi do utworzenia trój- i cztero-bromopochodnych. Dokładne wyświetlenie przebiegu reakcji i ustalenie położenia podstawników wymaga przeprowadzenia specjalnych badań. W dostępnej mi literaturze żadnych danych dotyczących przebiegu tej reakcji w roztworach wodnych nie znalazłem.

#### Aparatura

Pomiary przeprowadzono przy użyciu kulometru relaksacyjnego (10). Wydzielanie bromu prowadzono prądem ca 1 mA, przy stałej kalibracji  $K_0 = 4850$  impulsów/coul, przy szybkości dozowania 0,06 coul/min. Czulości polaryzacyjnego układu wskaźnikowego wynosiła  $5 \cdot 10^{-9}$  gramrównoważnika  $\text{Br}_2$ , co w przeliczeniu na kwas indolo-3-octowy wynosi 0,15  $\mu\text{g}$ . Objętość roztworu oznaczanego 25 ml.

### Roztwory

Do sporządzenia roztworów użyto chemicznie czystych substancji.

Kwas indolo-3-octowy firmy Hoffman La-Roche, Bazylea;  
Kwas indolo-3 $\alpha$ -masłowy firmy Pal Chemicals LTD, London;  
Indol firmy Schuchardt, Görlitz;  
Bromian potasu i rodanek potasu firmy Merck;

Kwas solny F.O.Ch. Gliwice rozcieńczano do 6n i destylowano (Odrzucając pierwsze 100 ml destylatu aby uwolnić go od zawartych w nim śladów substancji utleniających).

Do oznaczeń sporządzono roztwory o przybliżonej normalności

0,0005n  $\text{KBrO}_3$  — 40 g  $\text{KBr}$ /litr

0,0006n  $\text{KSCN}$

oraz roztwory substancji wzorcowych o odpowiednio dobranych koncentracjach. Wodę destylowaną używaną do sporządzania roztworów wzorcowych przechowywano celem użycia jej w ślepych próbach.

### Przeprowadzenie oznaczenia

Do trzech kolbek miarowych jenajskich o pojemności 25 ml z dobrze doszlifowanymi korkami (!) odmierzono po 5 ml roztworu bromianu. Do dwóch kolbek wprowadzano następnie 1 do 5 ml roztworu substancji oznaczanej: do trzeciej (ślepa próba) taką samą objętość wody użytej do sporządzania tych roztworów. Następnie dodawano po 5 ml 6n  $\text{HCl}$ , kolby korkowano, zabezpieczano korki pierścieniami gumowymi i po dokładnym wymieszaniu ogrzewano na łaźni wodnej o temperaturze  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  przez 10 min. Po upływie tego czasu kolbki oziębiano do temp.  $15^\circ\text{C}$  (2 minuty) i dodawano do każdej kolbki po 5 ml roztworu  $\text{KSCN}$ . Po dokładnym wymieszaniu pozostawiono na 10 minut, po czym przenoszono klejną zawartość kolbek do naczynka pomiarowego, uzupełniano wodą do 25 ml i oznaczano kulometrycznie zawartość  $\text{KSCN}$ , notując ilość impulsów zarejestrowanych przez licznik przyrządu. Od ilości impulsów otrzymanych dla dwóch równoległych oznaczeń odejmowano ilość impulsów przypadającą na nadmiar rodanku względem bromianu (ślepa próba). Otrzymane różnice (n) przeliczano na oznaczaną sub-

Tabela I

Zestawienie wyników kulometrycznego oznaczania pochodnych indolu

Oznaczana substancja	zawartość we wzorcu μg	oznaczono kulometry- cznie μg	△	
			μg	%
Kwas indolo-3-octowy E $\frac{M}{6}$	1,32	1,24	0,08	
		1,31	-0,01	
	3,84	4,05	0,2	
		4,05	0,2	5%
	7,68	4,17	0,3	
		7,72	0,0	
11,52	7,47	0,2		
	12,13	0,6	5%	
13,2	12,3	0,8	6,3%	
	13,4	0,2		
19,3	13,5	0,3		
	19,85	0,5	2,5%	
19,3	19,75	0,4		
	Kwas indolo-3-α-masłowy E $\frac{M}{6}$	3,14	3,84	0,7
2,97			-0,2	
9,42		3,33	0,2	5%
		2,97	-0,2	
15,7		9,55	0,5	
		9,74	0,3	5%
15,7	15,9	0,2		

stancję korzystającą z uprzednio wyznaczonych wartości równoważników:

Indol —

$$M = 117,144 \quad E = \frac{M}{8} = 14,643 \quad \frac{E}{F} = 1,517 \cdot 10^{-4}$$

Kwas indolo-3-octowy —

$$M = 175,190; \quad E = \frac{M}{6} = 29,198; \quad \frac{E}{F} = 3,026 \cdot 10^{-4}$$

Kwas indolo-3α-masłowy —

$$M = 203,233; \quad E = \frac{M}{6} = 33,872; \quad \frac{E}{F} = 3,51 \cdot 10^{-4}$$

na podstawie wzoru:

$$m = \frac{E}{F} \cdot \frac{n}{K_0}$$

- $\frac{E}{F}$  — równoważnik elektrochemiczny oznaczanej substancji  
g/coul
- n — różnica ilości impulsów
- $k_0$  — stała kalibracji kulometru imp/coul
- m — ilość gramów oznaczanej substancji

Wyniki oznaczeń kwasu indolo-3-octowego i indolo-3 $\alpha$ --masłowego zestawione są w tabelce I.

W kolejnych rubrykach podano: rodzaj oznaczanej substancji, jej zawartość w oznaczanej próbce, wyniki kulometrycznego oznaczenia i różnicę pomiędzy tymi wartościami oraz błąd procentowy. Podobne wyniki otrzymano także przy oznaczaniu indolu.

### Wnioski

1. W niniejszej pracy podano nową metodę oznaczania indolu i jego pochodnych na drodze kulometrycznej. Praca nie wyczerpuje wszystkich możliwości metody — można ją zmodyfikować zarówno pod względem czułości jak i dokładności, a zwłaszcza zakresu zastosowań.
2. Metodę tę można stosować do oznaczania innych pochodnych indolu — wartość równoważnika tych pochodnych zależeć będzie od położenia i charakteru podstawników.
3. Opisaną metodą można osiągnąć równorzędne wyniki przy oznaczaniu kwasu indolo-3-octowego, jak i kolorymetrycznymi metodami opartymi na reakcji Salkowskiego. Przy oznaczaniu innych pochodnych indolu metoda kulometryczna zachowuje swą czułość i dokładność, dzięki czemu jest znacznie lepsza od metod opartych na reakcji Salkowskiego, których czułość zmniejsza się 10 do 50 razy, a nawet i więcej (jak np. przy kwasie indolo-3-propionowym).
4. Powyższą metodę można będzie prawdopodobnie oznaczać pochodne indolu wprost na odpowiednio wyciętych i rozdrobionych miejscach chromatogramu pomijając proces ekstrahowania.
5. Oznaczenia przeprowadzić można także przy pomocy innych typów kulometrów pozwalających na pomiar ładunku w granicach 0,005—0,1 coul. z dokładnością co najmniej 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub>.

### LITERATURA

1. Sen S. P., patrz Linskens W. F. — Papierchromatographie in der Botanik. Springer Verlag 1955, s. 156.
2. Tang Y. W., Bonner J. — Arch. of Biochem. 13,11—25, 1947.

3. Holley R. W., Boyle F. P., Durfee H. K., Holley A. N. — Arch. of Biochem. Biophys. 32, 192—199, 1951.
4. Gordon S. A., Weber R. P. — Plant. Physiol. 26, 192—195, 1951.
5. Linser H., Maschek — Planta 41, 567—588, 1953.
6. Larsen P., patrz Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Paech K., Tracey M. V., Springer Verlag 1955, s. 612.
7. Sykut K. — Annales U.M.C.S. Sec. A.A. Vol. X, 3, 1955.
8. Pauly H., Gundermann K. — Ber. 41—III—4001—4004.
9. Brunck — Ann. d. Chemie 272, 206, 1893.
10. Sykut K. — Annales U.M.C.S. Sec. A. A. IX, 9, 1954.

### Р Е З Ю М Е

В настоящей работе приведен кулонометрический метод определения микрограммовых количеств индола, 3 — индолилуксусной кислоты и 3 — индолил-3 $\alpha$ -масляной кислоты. Метод основан на бромировании этих веществ избытком брома при темп. 50° C и кулонометрическом определении количества связанного брома раствором KSCN. Измерения проводились при употреблении релаксационного кулонометра, результаты определений представляет табл. I. Кроме указанных веществ метод можно применять с этой же точностью для определения других производных индола (напр. 3 — индолил — пропиновой кислоты), которых при концентрациях 1 — 10  $\mu$ g не возможно определить колориметрическими методами основанными на реакции Сальковского.

### ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Mikrogrammengen von Indol, Indol-3-Essigsäure und Indol-3 $\alpha$ -Buttersäure mit der coulometrischen Methode angegeben. Nach dieser Methode werden die genannten Verbindungen mit dem Überschuss von Brom bei 50°C bromiert und die Menge des gebundenen Broms bei Anwendung von KSCN-Lösung coulometrisch bestimmt. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Relaxationscoulometers durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in der Tabelle 1. angegeben. Ausser den genannten Verbindungen kann man mit dieser Methode auch andere Derivate des Indols mit derselben Genauigkeit bestimmen (z. B. die Indol-3-Propionsäure), die man bisher bei der Konzentration 1—10 $\mu$ g mit colorimetrischen, auf die Reaktion von Salkowski gestützten Methoden, nicht bestimmen konnte.