

DIE SPEZIFITÄT DER MIKROMETHODEN ZUR CITRONENSÄUREBESTIMMUNG ALS PENTABROMACETON

VON

F. L. BREUSCH UND RASIM TULUS

II. Chemisches Institut der Universität Istanbul (Türkei)

Die Citronensäure ist heute in den Mittelpunkt der biochemischen Probleme gerückt. Eine kolorimetrische Mikromethode zur quantitativen analytischen Bestimmung ist von PUCHER, SHERMAN und VICKERY¹ ausgearbeitet worden. Die Methode beruht auf der Gelbfärbung von wässrigen Na_2S -Lösungen durch Pentabromaceton, dem altbekannten Reaktionsprodukt aus Citronensäure, Brom und Permanganat in saurer Lösung. (STAHRE²). Die Gelbfärbung wird im Kolorimeter quantitativ ausgemessen; noch 0,1 mg Citronensäure in 100 ml lassen sich so bestimmen.

Da sich bei der Extraktion des Pentabromacetons aus der Reaktionslösung mit Petroläther Schwierigkeiten ergaben, weil die Anwendung von Petroläther verschiedener Herkunft Differenzen der Färbung ergab, hat PUCHER³ auf derselben Reaktion eine Mikrotitrationsmethode aufgebaut, bei der das leicht abspaltbare Brom des Pentabromacetons mit 1/75 normalen AgNO_3 -Lösung titriert wird. Von GOLDBERG und BERNHEIM⁴ wurde gleichzeitig eine ähnliche Methode veröffentlicht.

Die Schwierigkeiten PUCHERS konnten wir leicht umgehen, indem wir den für die Analysen verwendeten Petroläther (Merck, Siedep. 120-180°) sammelten und durch 6 maliges Ausschütteln mit destilliertem Wasser reinigten und immer wieder verwendeten. Die im Zeiss'schen Stufenphotometer gemessenen Absorptionskurven blieben so bei Kontrollen über 2 Jahre innerhalb 5% konstant.

In der vorliegenden Arbeit finden wir, dass andere Substanzen, z.B. Itaconsäure, weiter Triacetsäure und niedere α, γ -Diketofettsäuren sowohl nach der kolorimetrischen als auch nach der titrimetrischen Methode in grösserem oder geringerem Prozentsatz „Citronensäure“ vortäuschen. Nach der Titrationsmethode gibt weiter das Diacetyl unter den angewendeten Bedingungen 30% „Citronensäure“. Die zuerst von BREUSCH⁵ und BREUSCH und TULUS⁶ entdeckte, aber erst von MARTIUS⁷ isolierte Oxalcitramalsäure gibt nach der bisherigen Analysenmethode volle Citronensäurewerte; sie lässt sich durch vorheriges Kochen mit Alkali zerstören und kann dadurch von Citronensäure unterschieden werden. Vollen Citronensäurewert ergibt die Glyoxylcitramalsäure, die man erhält, wenn man eine 0,5%ige Lösung von Oxalcitramalsäure in 10%iger HCl mit wenig Aluminiumpulver bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen lässt. Die so erhaltene Säure ist sowohl gegen Kochen mit Säure wie mit Alkali resistent; sie wurde von uns bisher nur in kleinen Mengen als Syrup dargestellt; sie unterscheidet sich sowohl biologisch wie in ihrer Salzbildung wesentlich von Citronensäure. Sie wird in einer folgenden Arbeit beschrieben, wenn mehr Material zur Verfügung steht.

Viele dieser Stoffe liefern bei der Behandlung mit Brom und Permanganat (speziell Triacetsäure und α, γ -Diketofettsäuren) andere bromhaltige Produkte, durch die die kolorimetrische Bestimmung des Pentabromacetons nur wenig gestört wird,

wohl aber die Titration, die alles organisch gebundene und durch AgNO_3 abspaltbare Brom erfasst.

Manche der Substanzen, die nach den bisherigen Methoden Citronensäure vor-täuschen, lassen sich ausschalten, wenn man vor der sauren Verkochung der Reaktionslösung nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY eine kurze alkalische Verkochung einschaltet. Wir schlagen deshalb als Abänderung der Methode vor, in Zukunft vor der sauren Verkochung die Reaktionslösung kurz alkalisch zu kochen; Citronensäure bleibt dabei unverändert.

Dazu wird das zu untersuchende Trichloressigsäurefiltrat mit 20%iger KOH-Lösung neutralisiert, noch 2 ml der gleichen KOH-Lösung zugegeben, 2 Minuten auf dem Drahtnetz gekocht, kurz abgekühlt, angesäuert und weiter wie nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY analysiert.

Die in dieser Arbeit angewendete Mikrotitrationsmethode war die von PUCHER³; wie bei der kolorimetrischen Methode wurden alle Werte sowohl nach saurer, wie nach saurer und alkalischer Vorkochung bestimmt.

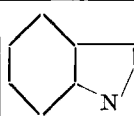
Die einzige Abweichung war, dass wir reinen Merck'schen Petroläther vom Siedep. 120-180° verwendeten, aus Mangel an dem von anderen Autoren verwendeten niedrigsiedenden.

Alle analysierten Säuren waren teils nach Literaturvorschriften selbst synthetisiert, teils reine Präparate von KAHLBAUM und von SCHUCHARDT.


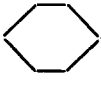
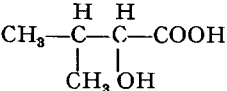
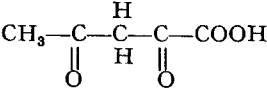
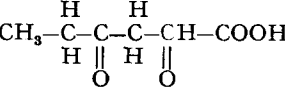
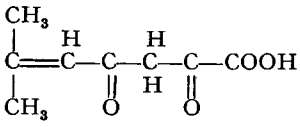
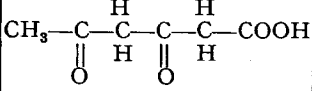
In den folgenden Tabellen geben die beiden ersten Rubriken die von je 1 mg der Substanz vorgetäuschten kolorimetrischen Werte an „Citronensäure“. Rubrik 1 gibt die Werte, wenn man nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY die Reaktionslösung nur sauer vorkocht. Rubrik 2 gibt die Werte, wenn man zuerst alkalisch und dann sauer vorkocht.

Die Rubriken 3 und 4 geben die Werte, wie sie durch Mikrotitration nach PUCHER erhalten wurden. In Rubrik 3 ist die Reaktionslösung nur sauer vorgekocht; in Rubrik 4 alkalisch und sauer.

| Name | Formel | Kolorimetrisch | | Titrimetrisch | |
|------------------------|--|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | | Sauer 1 | Alkalisch 2 | Sauer 3 | Alkalisch 4 |
| Mesoxalsäure | $\text{HOOC}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{COOH}$ | o | o | o | o |
| Methylapfelsäure . . . | $\text{HOOC}-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{COOH}$ | o | o | o | o |
| Aethylapfelsäure . . . | $\text{HOOC}-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{COOH}$ | o | o | o | o |
| Dimethylbernsteinsäure | $\text{HOOC}-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{COOH}$ | o | o | o | o |

| Name | Formel | Kolorimetrisch | | Titrimetrisch | |
|---|--|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | | Sauer 1 | Alkalisch 2 | Sauer 3 | Alkalisch 4 |
| Phenylbernsteinsäure . | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ | o | o | o | o |
| Acetylbernsteinsäure . | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$ | o | o | o | o |
| Citraconsäure | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}=\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | 0,02 | 0,02 | 0,10 | 0,10 |
| Itaconsäure | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ | 0,23 | 0,23 | 0,33 | 0,30 |
| Dimere Brenztraubensäure (krist.) | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array}$ | o | o | 0,10 | o |
| Diacetyl | $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ | o | o | 0,33 | 0,33 |
| Tyrosin | $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | o | o | — | — |
| Tryptophan | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$  | 0,02 | 0,02 | — | — |
| Tricarballysäure . . . | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ | o | o | o | o |
| Citronensäure | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Isocitronensäure . . . | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ | o | o | o | o |
| Oxycitronensäure (Lakton) | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ | o | o | o | o |

| Name | Formel | Kolorimetrisch | | Titrimetrisch | |
|---|--|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | | Sauer 1 | Alkalisch 2 | Sauer 3 | Alkalisch 4 |
| Oxalcitramalsäure (Lakton) | $ \begin{array}{ccccc} & \text{H} & & \text{OH} & & \text{H} \\ & & & & & \\ \text{HC} & - & \text{C} & - & \text{CH} \\ & & & & & \\ \text{O}=\text{C} & & & & & \\ & & & & & \\ & \text{COOH} & & \text{COOH} & & \text{COOH} \end{array} $ | 0,50 | 0 | 0,90 | 0 |
| Glyoxylcitramalsäure (Lakton) | $ \begin{array}{ccccc} & \text{H} & & \text{OH} & & \text{H} \\ & & & & & \\ \text{HC} & - & \text{C} & - & \text{CH} \\ & & & & & \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} & & & \text{COOH} & & \text{COOH} \\ & & & & & \\ & \text{COOH} & & & & \end{array} $ | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 |
| β -Oxybuttersäure . . . | $ \begin{array}{ccccc} & \text{H} & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & \text{OH} & & \text{H} & \end{array} $ | 0 | 0 | 0,02 | 0,02 |
| Acetessigsäure | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & \text{O} & & \text{H} & \end{array} $ | 0,01 | 0 | 0 | 0 |
| Laevulinsäure | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{H} & & \text{H} \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & \text{O} & & \text{H} & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| γ -Oxyacetessigsäure (Lakton) | $ \begin{array}{ccccc} & \text{H} & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{HO}-\text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & \text{H} & & \text{O} & & \text{H} \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α -Aethylacetessigsäure . | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & \text{O} & & \text{CH}_2-\text{CH}_3 & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α -Methylacetessigsäure | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & \text{O} & & \text{CH}_3 & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trimethylessigsäure . . | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{CH}_3 & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & - & \text{COOH} \\ & & & & \\ & & \text{CH}_3 & & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Crotonsäure | $ \begin{array}{ccccc} & \text{H} & & \text{H} & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & = & \text{C} & - \text{COOH} \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dimethylacrylsäure . . | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{CH}_3 & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & = & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & & \text{H} & & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tiglinsäure | $ \begin{array}{ccccc} & & & \text{CH}_3 & & \\ & & & & & \\ \text{CH}_3 & - & \text{C} & = & \text{C} & - \text{COOH} \\ & & & & & \\ & & & \text{H} & & \end{array} $ | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Name | Formel | Kolorimetrisch | | Titrimetrisch | |
|--|--|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | | Sauer 1 | Alkalisch 2 | Sauer 3 | Alkalisch 4 |
| β -Oxy- β -phenylpropion- säure |  | 0,02 | 0,02 | 0,15 | 0,16 |
| Phenylbrenztraubensäure |  | 0 | 0 | — | — |
| α -Oxy- β -methyl-but- ter-säure |  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α, γ -Diketo-pentansäure |  | 0,03 | 0 | 0,57 | 0 |
| α, γ -Diketo-hexansäure |  | 0,03 | 0 | 0,20 | 0 |
| α, γ -Diketo- ϵ -methyl- δ -Heptensäure |  | 0,10 | 0,05 | 0,20 | 0 |
| Triacetsäure |  | 0,10 | 0,10 | 0,50 | 0,10 |

Nach den Ergebnissen der Tabellen ist die kolorimetrische Methode, besonders nach Einschaltung alkalischer Vorkochung, spezifischer als die titrimetrische. Das Vorkommen von Itaconsäure in Geweben ist wenig wahrscheinlich; dagegen spielen eventuel α, γ -Diketofettsäuren eine Rolle; ebenso vielleicht die Oxalcitramalsäure und Glyoxylcitramalsäure. Von 6 Tricarbonsäuren geben 3, Tricarballylsäure, Oxycitronensäure und Isocitronensäure keine Pentabromacetonreaktion; die drei anderen, Citronensäure, Oxalcitramalsäure und Glyoxylcitramalsäure geben volle Reaktion. Oxalcitramalsäure ist durch Kochen mit Alkali ausschaltbar.

Keine dieser Methoden ist zu 100% spezifisch; zu einem einwandfreien Nachweis muss die Citronensäure immer nach einer der ausgearbeiteten Methoden als Substanz isoliert werden. (DICKENS⁸, WIELAND und ROSENTHAL⁹, BREUSCH und KESKIN¹⁰).

ZUSAMMENFASSUNG

Die beiden empfindlichsten Mikrobestimmungsmethoden der Citronensäure nach PUCHER, SHERMAN und VICKERY und nach PUCHER werden an einer grösseren Zahl von Substanzen auf ihre Spezifität geprüft.

Die mikrokolorimetrische Methode erwies sich dabei spezifischer wie die mikrotitrimetrische.

Eine Reihe von Säuren, α , γ -Diketofettsäuren, Triacetsäure, Itaconsäure, Oxal-citramalsäure, Glyoxylcitramalsäure geben sowohl kolorimetrisch wie titrimetrisch (so Diacetyl) mehr oder weniger grosse Blindwerte.

Es wird eine Ergänzung der Methode durch Einschaltung einer alkalischen Vorkochung vorgeschlagen. α , γ -Diketofettsäuren, Oxalcitramalsäure werden dadurch zerstört.

Ein einwandfreier Nachweis der Citronensäure kann nach wie vor nur in einer Isolierung als Substanz bestehen.

SUMMARY

The two most sensitive micro-methods for the determination of citric acid according to Pucher, Sherman and Vickery, and according to Pucher, are tested for their specificity towards a large number of substances.

The micro-colorimetric method proved to possess greater specificity than the micro-volumetric one.

A series of acids, α , γ -fatty dicetonic acids; triacetic acid; itaconic acid; oxal-citramalic acid, and glyoxylcitramalic acid, also give greater or lesser positive values, both colorimetrically and volumetrically (e.g., diacetyl).

It is proposed to complete this method by the introduction of previous boiling in an alkaline solution. α , γ -fatty dicetonic acids and oxalcitramalic acids are destroyed thereby.

Conclusive proof of the presence of citric acid can, in any case, be furnished only by its isolation.

RÉSUMÉ

Les deux plus sensibles micro-méthodes pour la détermination de l'acide citrique selon PUCHER, SHERMAN et VICKERY et selon PUCHER ont été appliquées à une grande quantité de substances pour en éprouver la spécificité.

La méthode micro-colorimétrique s'est avérée plus spécifique que la méthode micro-volumétrique.

Une série d'acides, les acides gras dicétoniques α , γ , l'acide triacétique, l'acide itaconique, l'acide oxalcitramalique, l'acide glyoxylcitramalique donnent aussi des valeurs positives plus ou moins grandes, tant colorimétriquement que volumétriquement (le diacétyl, p. ex).

On préconise de compléter cette méthode par une ébullition préalable dans une solution alcaline. Les acides gras dicétoniques α et γ , l'acide oxalcitramalique sont alors détruits.

Une détermination parfaitement sûre de la présence de l'acide citrique n'est possible qu'en isolant cette substance.

LITERATUR

- ¹ G. W. PUCHER, C. C. SHERMAN, and H. B. VICKERY, *J. biol. Chem.*, **113** (1936) 235.
- ² L. STAHR, *Zeitschr. Angewandte Chemie*, **36** (1897) 195.
- ³ G. W. PUCHER, *J. biol. Chem.*, **153** (1944) 133.
- ⁴ A. S. GOLDBERG and A. R. BERNHEIM, *J. biol. Chem.*, **156** (1944) 33.
- ⁵ F. L. BREUSCH, *Z. physiol. Chem.*, **250** (1937) 262.
- ⁶ F. L. BREUSCH und R. TULUS, *Revue de la Facul. Scien. Univ. Istanbul*, **6** (1941) 144.
- ⁷ C. MARTIUS, *Z. physiol. Chem.*, **279** (1943) 103.
- ⁸ F. DICKENS, *Biochem. J.*, **35** (1941) 1011.
- ⁹ H. WIELAND und CH. ROSENTHAL, *Liebigs Ann. Chem.*, **554** (1943) 241.
- ¹⁰ F. L. BREUSCH und H. KESKIN, *Enzymol.*, **9** (1943) 243.

Eingegangen den 26 März 1946.