

kuumexsiccator gebracht. Die Substanz zeigte die von A. Schmitz¹⁾ bereits angegebenen Eigenschaften: Löslichkeit in verdünnten Säuren wie in Alkalien, Farbstoffbildung der diazotierten Substanz mit Resorcin. Besonders charakteristisch ist, wie wir durch Vergleich unseres Präparates mit dem von Schmitz feststellten, die prächtig blaue Fluoreszenz der Lösung in warmem Eisessig. Die Substanz schmilzt noch nicht bei 280°.

0.1567 g Sbst.: 0.3100 g CO₂, 0.0569 g H₂O. — 0.1385 g Sbst.: 0.2736 g CO₂, 0.0498 g H₂O. — 0.1974 g Sbst.: 44.2 ccm N (18°, 761 mm). — 0.1665 g Sbst.: 34.4 ccm N (19°, 760 mm).

C₈H₇O₂N₃ (177). Ber. C 54.23, H 3.95, N 23.72.
Gef. » 53.95, 53.88, » 4.06, 4.02, » 24.03, 23.64,

Während das Bariumsalz bei der Analyse keine stimmenden Werte gab, hat das Kaliumsalz, das durch Versetzen des Amino-hydrazids mit Kalilauge erhalten wird, die normale Zusammensetzung.

0.2957 g Sbst.: 0.1183 g K₂SO₄.

C₈H₅O₂N₃K (215). Ber. K 18.17. Gef. K 17.95.

Das Natriumsalz wird aus dem Amino-hydrazid durch Eindunsten mit Sodalösung im Vakuum in hexagonalen Täfelchen gewonnen.

142. K. Langheld und A. Zeileis: Zur Analyse von Gemischen niederer Fettsäuren.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg.]

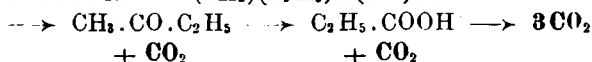
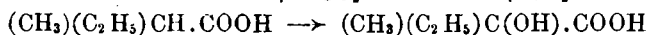
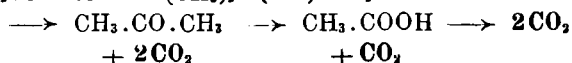
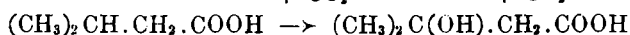
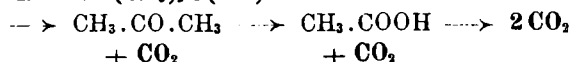
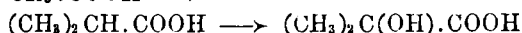
(Eingegangen am 28. März 1913.)

Bei der Mehrzahl aller Arbeiten physiologisch-chemischen Inhaltes sieht sich der Forscher vor die Aufgabe gestellt, Gemische niederer Fettkörper wie von Alkoholen, Aldehyden, Säuren, Aminen oder Aminosäuren auf die Anwesenheit und den Gehalt an den einzelnen Bestandteilen zu untersuchen. Bisher ist keine Methode bekannt geworden, die vielleicht auch nur für einen besonderen Fall eine annähernd quantitative Trennung zuließe. Selbst die qualitative Analyse ist noch nicht soweit durchgebildet worden, daß ein negativer Befund immer mit Sicherheit den Schluß auf die Abwesenheit eines bestimmten Stoffes gestattete. Die zurzeit üblichen Scheidungsverfahren benutzen ausnahmslos die Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften der einzelnen Körper bzw. ihrer Derivate. Die Differenzen in den Siedepunkten, den Schmelzpunkten und den Löslichkeitsverhältnissen sind aber bei der großen chemischen Ähnlichkeit der Versuchsobjekte sehr klein. Entsprechend gering erscheint die Aussicht, auf diesem Wege zum Ziel zu gelangen.

¹⁾ Inaug.-Diss., Heidelberg 1902. S. 39.

Als wir jetzt in Verfolg der Arbeiten des einen von uns über die Spaltung von α -Aminosäuren mittels Natriumhypochlorit¹⁾ erneut an die Aufgabe herangetreten sind, haben wir daher auf Untersuchungen in der alten Richtung verzichtet und glauben, in dem stufenweisen oxydativen Abbau eine geeignetere Grundlage für analytische Versuche gefunden zu haben. Die neue Methode ist von uns zunächst genauer an den Fettsäuren studiert worden. Wir haben diese gewählt, weil die anderen häufiger natürlich auftretenden Gemische niederer Fettkörper wie von Alkoholen, Aldehyden, Aminen oder Aminosäuren sich leicht in sie überführen lassen und dadurch auch der Analyse auf dem neuen Wege zugänglich gemacht werden können. Da unsere Versuche hauptsächlich der Auffindung eines Trennungsverfahrens für Aldehyd-Gemische gelten, wie sie bei der Hypochlorit-Spaltung eines durch Eiweißzerlegung gewonnenen Gemenges von Monoamino-monocarbonsäuren erhalten werden, so haben wir uns als erstes Ziel gestellt: die Aufarbeitung eines Gemisches derjenigen Fettsäuren, die sich von den in den Proteinen sicher nachgewiesenen Monoamino-monocarbonsäuren mit offener Kohlenstoffkette ableiten. Es sind dies: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Ihnen entsprechen die Fettsäuren: Ameisensäure, Essigsäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Methyläthyl-essigsäure. Da für die Bestimmung der Ameisensäure neben anderen Fettsäuren bereits genau arbeitende Verfahren bekannt sind, haben wir sie zunächst nicht berücksichtigt und uns nur mit dem Gemisch der dann verbleibenden vier Säuren näher befaßt.

Läßt man auf sie einzeln oder in Gemengen Oxydationsmittel einwirken, so kann unter Umständen eine vollständige Verbrennung stattfinden. Aber nur bei der Essigsäure wird direkt Kohlensäure gebildet. Die anderen Säuren werden stufenweise abgebaut. Die in der Tabelle zusammengestellten Zwischenprodukte lassen sich bei geeigneter Wahl des oxydierenden Körpers und der äußeren Bedingungen leicht gewinnen und sind schon früher in zahlreichen Fällen untersucht worden.



¹⁾ B. 42, 2360 [1909].

Wir haben die Versuche unter Verwendung der verschiedensten Oxydationsmittel mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen Seite der Reaktion wiederholt. Die reinen Durchgangsstoffe sind in gleicher Weise auf ihr Verhalten geprüft worden. Unsere experimentellen Ergebnisse haben gezeigt, daß der Oxydationsverlauf in allen Fällen auffallend wenig durch die Konzentrationsverhältnisse, dagegen sehr stark durch die Temperatur beeinflusst wird. Je höher sie steigt, desto weiter schreitet die Oxydation fort. Das Endresultat wird durch die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten der Teilprozesse bei der Versuchstemperatur bedingt. Sie wechseln mit dem Oxydationsmittel. Verwendet man eine Lösung von Chromsäure in konzentrierter Schwefelsäure als Sauerstoff-Überträger, so liegen sie praktisch so günstig, daß es möglich ist, den Abbau durch einfache Änderung der Temperatur fast quantitativ die einzelnen Stufen nach einander durchlaufen zu lassen.

Die Beckmannsche Mischung wirkt auf die vier zur engeren Untersuchung stehenden Säuren bei gewöhnlicher Temperatur nur in sehr geringem Grade ein. Bei erhöhten Wärmegraden werden zunächst die Säuren mit verzweigter Kohlenstoffkette (Isobutter-, Isovalerian- und Methyl-äthyl-essigsäure) angegriffen. Die Reaktion setzt bei ihnen gleichmäßig zwischen 60 und 65° ein. Die Lösung färbt sich grün, und es entweicht Kohlensäure. Läßt man dann den Oxydationsprozeß sich konstant bei 65° weiter abspielen, so hört — wieder bei den drei Säuren in voller Übereinstimmung — die Gasentwicklung allmählich auf. Sie tritt bei allen drei erneut ein, sobald die Temperatur auf 100° gebracht wird. Aber auch dieser Wärmegrad genügt bei keiner von ihnen zur völligen Verbrennung. Dazu bedarf es einer abermaligen Temperatursteigerung auf 170°. Diese Beobachtungen lassen zweifelsfrei erkennen, daß der Abbau der drei Säuren in drei Phasen verläuft, die durch die gleichen Temperaturen charakterisiert sind. Völlige Klarheit über die sich abspielenden Vorgänge gibt die quantitative Untersuchung.

Nimmt man die Oxydation in dem von Messinger für die nasse Verbrennung mit Chromsäure beschriebenen Apparat vor und bestimmt die in den einzelnen Abschnitten abgegebenen Kohlensäuremengen, so ergibt sich, daß von den einzelnen Säuren an Molekülen Kohlensäure entwickelt werden:

	bei 65°	bei 100°	bei 170°
Essigsäure	—	—	2
Isobuttersäure	1	1	2
Isovaleriansäure	2	1	2
Methyl-äthyl-essigsäure	1	1	3

Vergleicht man die erhaltenen Kohlensäure-Werte mit denen, die nach den alten Arbeiten beim stufenweisen Abbau auftreten müssen, so kann vollständige Übereinstimmung festgestellt werden (s. 1. Tabelle). Die bei der Chromsäure-Oxydation beobachteten drei Phasen sind demnach mit den schon früher festgestellten Reaktions-Zwischenstufen identisch. Dieser Umstand erklärt auch in einfacher Weise, warum die für die Zersetzung wesentlichen Temperaturgrade für die drei Säuren die gleichen sind. Der erste entspricht der Oxydation der sekundären Kohlenstoffatome. (Die sich an die Oxy Säurebildung anschließenden Prozesse treten nach außen nicht in Erscheinung, da sie auch schon bei niedriger Temperatur verlaufen.) Bei 100° findet die Umwandlung von Aceton und Methyl-äthyl-keton in Essig- bzw. Propionsäure statt, und 170° werden schließlich nötig, um die Verbrennung der beiden Säuren zu bewirken. Die gute Übereinstimmung der berechneten und gefundenen Kohlensäure-Werte zeigt außerdem, daß die einzelnen Oxydationsprodukte bei Einhaltung unserer Bedingungen fast quantitativ nach einander entstehen.

Wie lassen sich nun diese Beobachtungen zur Analyse des Gemisches von Essig-, Isobutter-, Isovalerian- und Methyl-äthyl-essigsäure verwerten? Genügen die mit Hilfe des stufenweisen Abbaus erhaltenen Daten zur Ermittlung seiner Zusammensetzung? Die allmähliche Oxydation mit Chromsäure liefert für die Bestimmung der Säuren durch die in drei scharf begrenzten Perioden vor sich gehende Kohlensäure-Entwicklung drei Werte. Sie gestattet entsprechend nur die restlose Aufklärung eines Gemenges der drei Säuren mit verzweigter Kohlenstoffkette. Für jede weitere Säure, die zu diesen tritt, ist noch ein neuer analytischer Wert zu ermitteln, abgesehen davon, daß außerdem ihr Verhalten bei der Oxydation bekannt sein muß. Als leicht zu bestimmende Größe empfiehlt sich hier besonders die titrimetrische Feststellung der Gesamtacidität der Säuren. Ihre Kenntnis zusammen mit den drei Werten des stufenweisen Abbaus erlaubt die völlige Analyse des zur Untersuchung stehenden Säuregemisches. Wenn man die drei Kohlensäure-Werte der Reihe nach mit a, b, c und die zur Neutralisation des Säuregemisches nötige Kubikzentimeterzahl von $\frac{1}{10}$ -n. Kalilauge mit t bezeichnet, so ist auf Grund der für den Abbau gültigen Gesetzmäßigkeiten in dem Gemisch vorhanden an

$$\text{Essigsäure} \left(t - \frac{10000 \cdot b}{44} \right) \cdot 0.006 \text{ g,}$$

$$\text{Isobuttersäure} \frac{88}{44} \cdot \left(2b - a - c + 2 \cdot \frac{44 \cdot t}{10000} \right) \text{ g,}$$

$$\text{Isovaleriansäure} \frac{102}{44} \cdot (a - b) \text{ g,}$$

$$\text{Methyl-äthyl-essigsäure} \frac{102}{44} \cdot \left(c - 2 \cdot \frac{44 \cdot t}{10000} \right) \text{ g.}$$

Die praktische Anwendbarkeit des Verfahrens haben wir an 4 Beispielen geprüft. Die erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n. KOH	ange- wandt in g	gefunden		% des Ge- mischtes		Diffe- renz %
			in g	in %	ber.	gef.	
Essigsäure	11.4	0.0685	0.0672	98.11	12.45	12.21	- 0.24
Isobuttersäure	13.4	0.1177	0.1321	112.2	21.39	24.00	+ 2.61
Isovaleriansäure	12.1	0.1229	0.1335	108.6	22.33	24.26	+ 1.93
Methyl-äthyl-essigsäure .	23.6	0.2412	0.2160	89.56	43.83	39.25	- 4.58
Summe	60.5	0.5503					

CO₂-Abspaltung: bei 65° { ber. 0.2692 g; bei 100° { ber. 0.2160 g;
 { gef. 0.2775 g { gef. 0.2169 g;
 bei 170° { ber. 0.6363 g.
 { gef. 0.6254 g.

Essigsäure	11.4	0.0685	0.0684	99.86	12.51	12.49	- 0.02
Isobuttersäure	26.8	0.2354	0.2457	104.2	43.19	44.88	+ 1.69
Isovaleriansäure	12.1	0.1229	0.1269	103.3	22.47	23.18	+ 0.71
Methyl-äthyl-essigsäure .	11.8	0.1206	0.1050	87.08	22.03	19.18	- 2.85
Summe	62.1	0.5474					

CO₂-Abspaltung: bei 65° { ber. 0.2749 g; bei 100° { ber. 0.2230 g;
 { gef. 0.2777 g { gef. 0.2229 g;
 bei 170° { ber. 0.5983 g.
 { gef. 0.5914 g.

Essigsäure	11.4	0.0685	0.0683	99.70	12.40	12.36	- 0.04
Isobuttersäure	13.4	0.1177	0.1331	113.1	21.30	24.08	+ 2.78
Isovaleriansäure	24.1	0.2458	0.2319	94.34	44.43	41.97	- 2.46
Methyl-äthyl-essigsäure .	11.8	0.1206	0.1170	97.03	21.87	21.17	- 0.70
Summe	60.7	0.5526					

CO₂-Abspaltung: bei 65° { ber. 0.3229 g; bei 100° { ber. 0.2169 g;
 { gef. 0.3171 g { gef. 0.2171 g;
 bei 170° { ber. 0.5860 g.
 { gef. 0.5848 g.

Essigsäure	11.4	0.0685	0.0706	103.0	12.40	12.77	+ 0.37
Isobuttersäure	13.4	0.1177	0.1190	101.1	21.30	21.53	+ 0.23
Isovaleriansäure	24.1	0.2458	0.2600	105.8	44.43	47.06	+ 2.63
Methyl-äthyl-essigsäure .	11.8	0.1206	0.1015	84.16	21.87	18.37	- 3.50
Summe	60.7	0.5526					

CO₂-Abspaltung: bei 65° { ber. 0.3229 g; bei 100° { ber. 0.2169 g;
 { gef. 0.3275 g { gef. 0.2154 g;
 bei 170° { ber. 0.5860 g.
 { gef. 0.5781 g.

Das Verfahren kann keinen Anspruch darauf machen, als quantitativ bezeichnet zu werden. Es gibt nur Annäherungswerte. Aber trotzdem erscheint es kaum möglich, auf den alten Wegen ähnlich

günstige Ergebnisse zu erzielen, selbst in Fällen, wo unbeschränkte Materialmengen für die Analyse zur Verfügung stehen sollten. Der sehr geringe Substanzbedarf der neuen Methode ist sicher auch als Vorzug anzuerkennen. Ob das Verfahren das halten wird, was diese ersten Versuche versprechen, kann nur die Praxis entscheiden.

Außer mit Chromsäure haben wir beim stufenweisen oxydativen Abbau nur noch mit Kaliumpermanganat in quantitativer Hinsicht leidliche Resultate erzielt. Bei 70° Reaktionstemperatur führt es die Säuren mit verzweigter Kohlenstoffkette in die entsprechenden Oxy-säuren über. Die Ausbeute kann bis 90% betragen, ist aber wechselnd. Die Menge der gebildeten α -Oxy-säuren kann leicht durch ihre Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure und Titration des entstandenen Ketons mit Jod bestimmt werden.

Augenblicklich sind wir mit Arbeiten beschäftigt, den Anwendungsbereich des Chromsäure-Verfahrens auch auf Gemenge von 5 Säuren, den bisherigen und Propionsäure, auszudehnen. Ihre Aufnahme in den Analysenkreis erscheint uns deshalb wichtig, weil manches darauf hindeutet, daß sich die ihr entsprechende Aminobuttersäure noch unter den Monoamino-monocarbonsäuren des Eiweiß befindet und nur der Forschung bisher entgangen ist, weil geeignete Methoden zu ihrem Nachweis fehlten.

Einige Vorversuche lassen es möglich erscheinen, daß eine direkte Übertragung des Verfahrens auf Gemische anderer niederer Fettkörper wie Alkohole, Amino- oder die den letzteren entsprechenden Oxy-säuren mit Erfolg möglich ist, so daß eine vorherige Verwandlung der Stoffe in Säuren überflüssig wird. Wir bitten die Fachgenossen, uns die Untersuchungen in dieser Richtung, ebenso wie die weitere Ausarbeitung und Anwendung unseres Oxydationsverfahrens zunächst noch allein zu überlassen.

Experimenteller Teil.

Stufenweiser Abbau von niederen Fettsäure-Gemischen mittels Chromsäure-Schwefelsäure unter quantitativer Bestimmung der entwickelten Kohlensäure.

Zum leichten Auffangen der Kohlensäure wird die Oxydation in dem von Messinger beschriebenen Apparat für die nasse Verbrennung vorgenommen. Das zur Analyse bestimmte Säuregemisch wird zunächst genau mit $\frac{1}{10}$ -n. Lauge titriert, und von der Salzlösung für die Bestimmung so viel benutzt, wie 60–70 ccm Lauge entsprechen. Man engt diesen Teil auf ca. 25 ccm ein und bringt ihn in die Zersetzungszelle. Hierzu gibt man unter Kühlung mit Kältemischung

100 ccm konzentrierter Schwefelsäure und läßt die Lösung allmählich auf Zimmertemperatur kommen. Inzwischen wird kohlenstofffreie Luft durch den Apparat geleitet, und nachdem durch sie alle Kohlensäure entfernt ist, das Absorptionsgefäß eingeschaltet. Dann läßt man durch den Tropftrichter eine Lösung von 7 g Chromsäure in 25 ccm Wasser, versetzt mit 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure, zufließen und stellt das Reaktionsgefäß in 65° warmes Wasser, das zur Vollendung der ersten Abspaltung etwa 30 Minuten lang auf dieser Temperatur zu halten ist. Nach beendeter Gasentwicklung wird die im Apparat befindliche Kohlensäure durch Einleiten von kohlenstofffreier Luft in den Auffangeapparat übergeführt und dann dieser gewogen. Die gleichen Manipulationen sind für die zweite und dritte Abspaltung bei 100° und 170° zu wiederholen. Es ist dabei nur zu beachten, daß zur völligen Verbrennung der Essigsäure und Propionsäure meist 3 Stunden nötig sind.

Bestimmung der von Isobutter-, Isovalerian- und Methyl-äthyl-essigsäure bei 65° und 100° abgegebenen Kohlenstoffmengen.

Die Analyse wurde, wie oben angegeben ist, ausgeführt.

	ange- wandt in g	ber. CO ₂ in		gef. CO ₂ in	
		Mol	g	g	%
I. Abspaltung bei 65°.					
Isobuttersäure	0.2287	1	0.1143	0.1208	105.7
Isovaleriansäure	0.4790	2	0.3874	0.4086	105.4
Methyl-äthyl-essigsäure . .	0.1100	1	0.0475	0.0490	103.1
» » » . .	0.1100	1	0.0475	0.0479	100.8
II. Abspaltung bei 100°.					
Isobuttersäure	0.2287	1	0.1143	0.1102	96.4
Isovaleriansäure	0.4790	1	0.1937	0.1860	96.1
Methyl-äthyl-essigsäure . .	0.1100	1	0.0475	0.0461	97.0
» » » . .	0.1100	1	0.0475	0.0488	102.8