

267. Richard Kuhn und Hubert Roth: Mikro-Bestimmung von Acetyl-, Benzoyl- und C-Methylgruppen.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 28. Juli 1933.)

Zur Bestimmung von Acetyl in kleinen Substanzmengen sind bereits verschiedene Arbeitsweisen ausgearbeitet und empfohlen worden. K. Freudenberg und E. Weber¹⁾ kochen mit alkohol. *p*-Toluol-sulfonsäure und destillieren den gebildeten Essigester ab. F. Pregl und A. Soltys²⁾ verwenden wäßrige *p*-Toluol-sulfonsäure, die Essigsäure wird im Vakuum abdestilliert und in $n/100$ -Natronlauge aufgefangen. A. Friedrich und S. Rapoport³⁾ nehmen die Verseifung in gleicher Weise vor; sie destillieren ebenfalls im Vakuum, titrieren jedoch jodometrisch. Die genannten Verfahren liefern sehr befriedigende Werte, doch sind manche Operationen, wie die Vakuum-Destillationen, ohne besondere Übung nicht leicht mit Sicherheit auszuführen. Wer nur gelegentlich Mikro-Acetyl-Bestimmungen auszuführen hat, empfindet das Bedürfnis nach Vereinfachung. Da zahlreiche Substanzen sauer schwer hydrolysierbar sind und mitunter eine 10—15-malige Wiederholung der Verseifung erfordern, ergab sich überdies der Wunsch, das bisher vernachlässigte Prinzip der alkalischen Verseifung der Mikro-bestimmung von Acetylgruppen nutzbar zu machen.

Die von uns verwendete Apparatur (Fig. 1) besteht aus Jenaer Geräte-Glas, nur der Kübler aus klarem Quarz⁴⁾. Das Reaktionskölbchen fasst 45 ccm und trägt 3 Schenkel mit Schliffen, die durch Stahlfedern gesichert sind. Durch den Schenkel A geht ein Einleitungsrohr für Sauerstoff, das bis nahe an den Boden des Kölbchens reicht. Schenkel B dient zum Einbringen der Substanz und der Reagenzien. Durch Lüften des eingeschliffenen Glassstabes S kann man, ohne die Destillation zu unterbrechen, Wasser nachgeben. Schenkel C ist mit dem Quarzkübler verbunden. Dieser trägt an beiden Enden gleiche Schliffe, jedoch unter verschiedenem Winkel, wodurch er sowohl zum Erhitzen unter Rückfluß (Verseifung, Oxydation) als auch zum Abdestillieren verwendet werden kann.

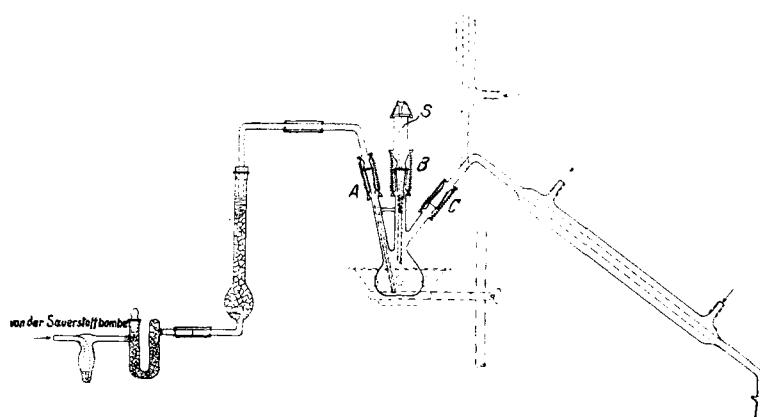


Fig. 1.

¹⁾ Ztschr. angew. Chem. **38**, 280 [1925].

²⁾ Mikrochemie **7**, 1 [1929].

³⁾ Biochem. Ztschr. **251**, 432 [1932].

⁴⁾ Der Apparat kann von W. Vetter, Heidelberg, Hauptstr. 5, bezogen werden.

Diese Schliff-Apparatur hat sich zur Bestimmung von *O*-Acetyl- und *N*-Acetylgruppen sowohl bei saurer, als bei alkalischer Verseifung sehr bewährt. Sie gestattet überdies die Mikro-Bestimmung von Benzoylgruppen auf gleichem Wege. Wir benützen sie ferner zur Mikro-Bestimmung von *C*-ständigen Methylgruppen durch Oxydation mit Chromsäure nach dem Prinzip der Methode von R. Kuhn und F. L'Orsa⁵⁾. Die Einwagen betragen durchschnittlich 5–10 mg, entsprechend einem Verbrauch von 3–10 ccm $n/_{100}$ -NaOH. Die sehr einfache Grundlage des Verfahrens besteht darin, die durch Verseifung oder Oxydation gebildete Essigsäure bzw. Benzoësäure unter Atmosphärendruck abzudestillieren und mit $n/_{100}$ -Natronlauge (Phenol-phthalein) zu titrieren. Die vielseitige Verwendungsmöglichkeit der Schliffapparatur geht aus folgenden Beispielen hervor: Aspirin gibt bei alkalischer Verseifung 2.00 Mole flüchtige Säure (Salicylsäure und Essigsäure), bei Oxydation mit Chromsäure 1.00 Mole (Essigsäure). Tetraacetyl-schleimsäure-diäthylester gibt bei alkalischer Verseifung 4 Mole, bei Oxydation mit Chromsäure 6 Mole Essigsäure (4 Acetyle + 2 Äthoxyle).

Ausführung der Bestimmungen.

Etwa 5–10 mg Substanz werden mit Hilfe des üblichen Einwäge-Röhrchens mit langem Stiel auf den Boden des Kölbens gebracht. Man setzt den Kühl器 auf, wobei der Schliff C durch einen Tropfen Wasser gedichtet wird. Der Sauerstoffstrom⁶⁾ wird auf 30 Blasen je Minute eingestellt und der Zuführungsschliff A mit etwas Metaphosphorsäure gedichtet. Durch B gibt man 4 ccm *1-n.* methylalkohol. Natronlauge (40 g NaOH puriss. + 500 ccm Wasser + 500 ccm Methanol⁷⁾). Schliff B wird mit Metaphosphorsäure gedichtet, der Glasstab S eingesetzt und der Trichter mit 1 ccm Wasser beschickt. Zur Verseifung wird ein Becherglas mit siedendem Wasser, das bis zu den Ansätzen der Schenkel reichen soll, verwendet. Für die meisten *O*-Acetyl-Bestimmungen genügt es, 15 Min. zu verseifen, bei *N*-Acetyl sind bis zu 3 Std. erforderlich. Ist die Verseifung beendet, wird das Kölben gekühlt. Man lüftet S, spült den Kühl器 sorgfältig mit 4–6 ccm Wasser aus und wendet den Kühl器. Dann wird S wieder eingesetzt und 1 ccm Wasser in den Trichter nachgegeben. Zur Entfernung des Methanols werden zunächst bei alkalischer Reaktion etwa 5 ccm abdestilliert. Dann wird wiederum gekühlt, S gelüftet und 1 ccm Schwefelsäure (1 Vol. konz. H_2SO_4 + 2 Vol. Wasser) zugegeben. Vor dem Abdestillieren der Essigsäure ist der Kühl器 sehr gründlich auszuspülen. Es wird bis auf 2–3 ccm abdestilliert und die übergehende Essigsäure durch einen Trichter in einem Quarzkölbchen nach F. Pregl (zur Kjeldahl-Bestimmung) gesammelt. Nach Zugabe von je 5 ccm Wasser wird 3-mal nachdestilliert. Das Destillat (etwa 20 ccm) wird mit etwas Bariumchlorid auf Abwesenheit von Schwefelsäure geprüft, 7–8 Sek. zum Sieden erhitzt und sofort mit $n/_{100}$ -NaOH und Phenol-phthalein nach F. Pregl auf eben beginnende Rosafärbung titriert. Den Faktor der Lauge bestimmen wir mit Oxalsäure bei annähernd gleich starker Verdünnung. Zur zweiten Titration werden 2–3-mal je 5 ccm abdestilliert, für die dritte Titration nur noch 5–10 ccm.

⁵⁾ Ztschr. angew. Chem. **44**, 847 [1931].

⁶⁾ Man kann auch Luft oder Stickstoff verwenden.

⁷⁾ Das Methanol ist über festem Natriumhydroxyd zu kochen und abzudestillieren.

Beispiel für den Destillations-Verlauf:

1. Titration (4×5 ccm Destillat): 6.00 ccm $n/100$ -NaOH,
 2. „ (3 \times 5 „ „): 0.30 „ ,
 3. „ (2 \times 5 „ „): 0.05 „ ,
 4. „ (1 \times 5 „ „): 0.02 „ .

Bei der letzten Titration sollen nicht mehr als 0.03 (bis 0.05) ccm $n/100$ -NaOH verbraucht werden.

Für die Verseifung mit wäßrigem Alkali verwenden wir 1 ccm 5-*n*. Natronlauge. Das Abdestillieren des Alkohols entfällt, alle übrigen Operationen sind gleichartig durchzuführen. Für die saure Verseifung verwenden wir 1 ccm der angeführten Schwefelsäure (1:2) oder der 25-proz. *p*-Toluol-sulfonsäure nach F. Pregl. Vor dem Abdestillieren wird die Sulfonsäure mit 0.5 ccm 1-*n*. Natronlauge abgestumpft.

Durch eine Reihe von jodometrischen Bestimmungen haben wir uns davon überzeugt, daß beim vorgeschriebenen Aufkochen des Destillates SO_2 ebenso wie CO_2 quantitativ ausgetrieben wird. Bei Benzoyl-Bestimmungen erfordert die Destillation der Benzoesäure keine Besonderheiten.

Oxydation mit Chromsäure.

Die Substanz wird mit 1 ccm konz. Schwefelsäure ($d = 1.84$) und 4 ccm 5-n. Chromsäure versetzt und mit freier Flamme (Babo-Trichter) unter Rückfluß $1\frac{1}{2}$ Stdn. erhitzt. Man kühlt, reduziert die überschüssige Chromsäure fast vollständig mit Hydrazin-Hydrat, das in sehr kleinen Tropfen zugegeben wird, stumpft mit 6 ccm 5-n. Natronlauge ab (Kühlung), gibt 1 ccm Phosphorsäure ($d = 1.7$) zu und destilliert in der beschriebenen Weise ab. Diese Arbeitsweise entspricht dem Verfahren B von R. Kuhn und F. L'Orsa. Benzoësäure wird dabei nicht angegriffen, Salicylsäure aber leicht verbrannt.

Aus den Anmerkungen zu den Tabellen 1-4 geht hervor, daß für verschiedene Körperklassen verschiedene Ausführungsformen der Acetyl-Bestimmung zu empfehlen sind, die sich alle mit der hier beschriebenen Apparatur ausführen lassen. Die Verseifung mit alkohol. Lauge ist der allgemeinsten Anwendung fähig, aber sie liefert z. B. beim Pentacetyl-catechin zu hohe Werte, da neben Essigsäure noch andere flüchtige Säuren unter der Einwirkung des Alkalis gebildet werden. Hier führt die Chromsäure-Methode oder die saure Verseifung zum Ziel.

Bei der Mikro-Bestimmung *C*-ständiger Methylgruppen durch Oxydation mit Chromsäure ist zu berücksichtigen, daß die Ausbeuten an Essigsäure wie bei den Makro-Verfahren in sehr hohem Maße von der weiteren Bindungsart dieser Gruppen abhängen. Wir verweisen diesbezüglich auf die von R. Kuhn und F. L'Orsa⁵⁾ gegebenen Anhaltspunkte.

Hrn. Prof. K. Freudenberg danken wir für die Überlassung zahlreicher Acetylverbindungen⁸⁾ und für sein förderndes Interesse an unseren Versuchen. Fräulein Liselotte Linge haben wir für eifrige und geschickte Unterstützung bei der Ausführung vieler Analysen zu danken.

⁸⁾ Der Triacetyl-cholsäure-methylester war ein Präparat von H. Wieland.

Tabelle 1: Acetyl-Bestimmungen (alkalische Verseifung).

Unter V ist die Art der Verseifung, unter t die Verseifungs-Dauer in Min. angegeben.
L bedeutet 5-n. wäßrige Natronlauge, a. L. bedeutet 1-n. methylalkohol. Natronlauge.

Nr.	Substanz	V	t (Min.)	Ein- wage (mg)	ccm		% CH ₃ .CO ber. gef.	
					n/100-NaOH ber.	n/100-NaOH gef.		
1	Pentacetyl-glucose	L.	30	4.815	6.17	6.10	55.13	54.48
2	Pentacetyl-glucose	a. L.	30	5.781	7.41	7.45	55.13	55.38
3	Tetracetyl-schleimsäure- diäthylester	a. L.	30	6.575	6.06	6.06	39.64	39.65
4	Tetracetyl-mono- benzoyl-glucose	a. L. ⁹⁾	30	5.470	6.05	6.04	4 CH ₃ .CO +	
5		a. L. ⁹⁾	30	5.462	6.04	6.11	1 C ₆ H ₅ .CO	
6	Hexacetyl-mannit	L.	60	4.979	6.88	6.86	59.45	59.27
7	Triacetyl-cholsäure- methylester ¹⁰⁾	a. L. ⁹⁾	150	11.798	6.45	6.50	23.52	23.70
8		a. L. ⁹⁾	150	11.390	6.23	6.17	23.52	23.31
9	Acetanilid	L.	30	7.658	5.67	5.73	31.85	32.17
10	Acetanilid	a. L.	30	7.023	5.19	5.08	31.85	31.12
11	Acetyl-glycin ¹⁰⁾	L.	150	5.604	4.74	4.76	36.44	36.54
12	Acetyl-glycin	a. L.	150	6.928	5.87	5.83	36.44	36.20

Tabelle 2: Benzoyl-Bestimmungen (alkalische Verseifung).

Nr.	Substanz	V	t (Min.)	Ein- wage (mg)	ccm		% C ₆ H ₅ .CO ber. gef.	
					n/100-NaOH ber.	n/100-NaOH gef.		
1	Benzoesäure	—	—	6.690	5.48	5.49	86.06	86.16
2	Hippursäure	L.	60	10.286	5.74	5.70	58.62	58.19
3	Hippursäure	L.	60	10.202	5.69	5.68	58.62	58.47
4	Psicain	L.	60	15.922	3.51	3.53	23.18	23.28
5	Psicain	L.	60	15.851	3.49	3.53	23.18	23.38

Tabelle 3: Acetyl-Bestimmungen (saure Verseifung).

Die Analysen 1—4 sind mit Schwefelsäure, 5 und 6 mit p-Toluol-sulfonsäure ausgeführt.

Nr.	Substanz	t (Min.)	Ein- wage (mg)	ccm		% CH ₃ .CO ber. gef.	
				n/100-NaOH ber.	n/100-NaOH gef.		
1	Pentacetyl-glucose	20	4.311	5.52	5.50	55.13	54.87
2	Pentacetyl-glucose	20	5.288	6.78	6.81	55.13	55.38
3	Aspirin	20	6.338	3.52	7.06	—	—
4	Acetanilid	90	7.658	5.67	5.73	31.85	32.17
5	Pentacetyl-glucose	20	5.512	7.00	7.02	55.10	54.80
6	Pentacetyl-catechin	25	5.77	5.75	5.78	43.00	43.09

⁹⁾ Mit wäßriger Natronlauge wurden auch nach 2^{1/2}-stdg. Verseifung zu niedrige Werte erhalten.

¹⁰⁾ Mit Toluol-sulfonsäure mußten K. Freudenberg u. K. Soff, A. 494, 68 [1932], 11-mal bzw. 15-mal verseifen.

Tabelle 4: Essigsäure-Bestimmungen nach Oxydation mit Chromsäure.

Nr.	Substanz	t (Min.)	Ein- wage mg	ccm $n/100$ -NaOH ber.	ccm $n/100$ -NaOH gef.	Mole CH_3COOH ber.	Mole CH_3COOH gef.
1	Essigsäure	—	3.00	5.00	4.95	1	0.99
2	Essigsäure	180	6.00	10.00	10.02	1	1.00
3	Natriumacetat + 3 H_2O	90	14.548	10.70	10.73	1	1.00
4	Sorbinsäure	60	10.08	8.93	8.09	1	0.92
5	Rhamnose + 1 H_2O	45	10.923	6.00	5.43	1	0.90
6	Acetyl-salicylsäure	75	10.926	6.07	6.42	1	1.05
7	Acetyl-salicylsäure	60	13.718	7.62	7.66	1	1.00
8	Schleimsäure-diäthylester	75	5.394	4.94	4.90	2	1.98
9	Schleimsäure-diäthylester-tetra- acetat	60	6.714	9.27	8.96	6	5.82
10	Pentacetyl-glucose	60	7.491	9.60	9.42	5	4.90
11	Pentacetyl-catechin ¹¹⁾	90	6.145	6.145	6.17	5	5.02
12	Pentacetyl-catechin ¹¹⁾	60	6.263	6.263	6.26	5	4.97
13	β,β' -Dimethyl-acrylsäure	90	5.77	—	1.53	—	0.26
14	β,β' -Dimethyl-acrylsäure	180	12.846	—	2.75	—	0.22
15	Methyl-heptenon	90	9.835	—	7.85	—	1.01
16	Methyl-heptenon	120	8.974	—	7.51	—	1.00
17	β -Cyclocitral	60	14.802	—	6.83	—	0.70
18	β -Cyclocitral	150	18.195	—	8.53	—	0.71

Tabelle 5: Carotin-Farbstoffe; Bestimmung der seitenständigen Methylgruppen durch Oxydation mit Chromsäure.

Nr.	Substanz	Formel	t (Min.)	Ein- wage mg	verbr. ccm $n/100$ - NaOH	Mole Essigsäure gef.
1	α -Carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	90	9.501	7.15	4.01
2	α -Carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	120	9.589	7.55	4.22
3	β -Carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	60	9.825	9.81	5.35
4	β -Carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	90	9.766	10.03	5.50
5	Iso-carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	120	11.466	9.62	4.31
6	Iso-carotin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	120	8.655	7.42	4.62
7	Lycopin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	135	8.920	9.14	5.48
8	Lycopin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	150	14.250	14.36	5.42
9	Lutein	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	120	12.460	9.83	4.48
10	Lutein	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	60	11.425	9.10	4.60
11	Zea-xanthin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	105	10.782	7.58	4.00
12	Zea-xanthin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	120	11.215	8.12	4.12
13	Viola-xanthin	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$	120	10.385	9.50	5.49
14	Azafrin	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$	90	11.524	9.75	3.60
15	Azafrin	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$	120	11.405	9.34	3.49
16	Bixin	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$	60	9.275	9.34	3.97
17	Bixin	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$	60	9.945	10.20	4.03
18	<i>trans</i> -Crocin- dimethylester	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$	75	11.088	12.28	3.94
19	<i>trans</i> -Crocin- dimethylester	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$	90	9.173	10.41	4.03

¹¹⁾ Bei alkalischer Verseifung wurden zu hohe Werte erhalten.