

367. Ernst Bayer und Karl-Heinz Reuther: Photometrische Mikrobestimmung von Acylgruppen. Analytische Verwendung von Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexen, I. Mitteil.

[Aus dem Forschungs-Institut für Rebenzüchtung, Abteilung Biochemie und Physiologie,
Geilweilerhof über Landau (Pfalz)]

(Eingegangen am 3. August 1956)

Eine einfache photometrische Mikrobestimmung von esterartig gebundenen Acylgruppen wird beschrieben: Die Ester werden mit Hydroxylamin zu den Hydroxamsäuren umgesetzt und die Extinktion der daraus gebildeten rotvioletteten Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe gemessen. — Je nach dem Acylgruppengehalt werden 0.3—2 mg Substanz zur Bestimmung benötigt. N-Acylgruppen und Säuren werden unter den gewählten Bedingungen nicht erfaßt.

Die von W. Lossen¹⁾ beschriebene Reaktion von Hydroxamsäuren mit Eisen(III)-salzen zu roten Eisen(III)-verbindungen kann zum qualitativen Nachweis von organischen funktionellen Gruppen, die sich in Hydroxamsäuren überführen lassen, herangezogen werden²⁾. A. Angeli³⁾ und E. Rimini⁴⁾ haben so Aldehyde in Hydroxamsäuren umgewandelt und als Eisen(III)-komplexe nachgewiesen, während F. Feigl⁵⁾ Carbonsäureester mit Hydroxylamin umsetzt und die entstandenen Hydroxamsäuren mit Eisen(III)-salz auf der Tüpfelplatte kenntlich macht. U. Hill⁶⁾ hat die Bildung der Eisen(III)-hydroxamate zur kolorimetrischen Bestimmung von Fetten benutzt und auf die Instabilität der roten Verbindungen gegenüber dem Einfluß von Wasser, Ionen und anderen Faktoren hingewiesen.

Die Reaktion von Estern mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren wird in alkalischem Medium nur noch von Säureanhydriden und Säurechloriden gestört²⁾, aus denen bei diesen Bedingungen ebenfalls Hydroxamsäuren entstehen. N-Acylverbindungen und Carbonsäuren treten, nach unseren Untersuchungen, nicht in Reaktion. Bei den in der organischen Analyse üblichen Acylgruppenbestimmungen⁷⁾ durch Verseifen und acidimetrische Titration der gebildeten Säure werden N-Acylverbindungen ebenfalls erfaßt. Bei der Verseifung evtl. entstehende saure Sekundärprodukte führen leicht zu erhöhten Analysenergebnissen.

Es schien uns daher lohnend, durch Überführen der Ester in Hydroxamsäuren und deren anschließende photometrische Messung als Eisen(III)-komplexe eine allgemein anwendbare, spezifische Bestimmung esterartig gebundener Acylgruppen auszuarbeiten. Hierzu mußten zunächst die Existenz-

¹⁾ Liebigs Ann. Chem. **161**, 358 [1892].

²⁾ R. E. Buckles u. C. J. Thelen, Analytic. Chem. **22**, 676 [1950].

³⁾ Gazz. chim. ital. **26** II, 17 [1896]; **34** I, 50 [1905].

⁴⁾ E. Rimini, Gazz. chim. ital. **31** II, 84 [1901]; A. Angeli u. F. Angelico, Gazz. chim. ital. **33** II, 329 [1903].

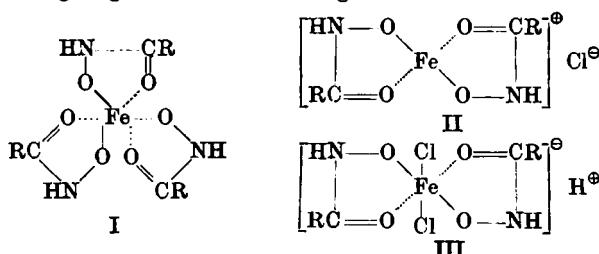
⁵⁾ Spot Tests II, Organic Applications, S. 171, 4. Aufl., Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1954. ⁶⁾ Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. **18**, 317 [1946]; **19**, 932 [1947].

⁷⁾ Vergl. H. Roth in „Methoden der organ. Chemie“ (Houben-Weyl), 4. Aufl., Bd. II, S. 344, Thieme Verlag, Stuttgart 1953.

bedingungen und Konstitutionen der Eisen(III)-verbindungen von Hydroxamsäuren und die Spaltung der Ester mittels Hydroxylamins eingehend untersucht werden.

Bildung der Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe

Je nach dem bei der Komplexbildung angewandten Verhältnis Eisen(III)-salz:Hydroxamsäure, dem Säuregrad und dem Lösungsmittel erhält man verschiedene Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe, die sich in Farbe und Konstitution sehr unterscheiden⁸⁾: einen rotbraunen (I), einen kirsroten (II) und einen rotvioletten Komplex (III), denen nach der im Gang befindlichen Strukturaufklärung folgende Formelbilder gerecht werden:



In Abbild. 1 sind die Spektren des rotbraunen Benzhydroxamsäure-eisen(III)-komplexes und die aus diesem durch den berechneten Säurezusatz gebildeten kirsroten und rotvioletten Eisenverbindungen aufgezeichnet. Es wird hieraus ersichtlich, daß eine spektralphotometrische Bestimmung von

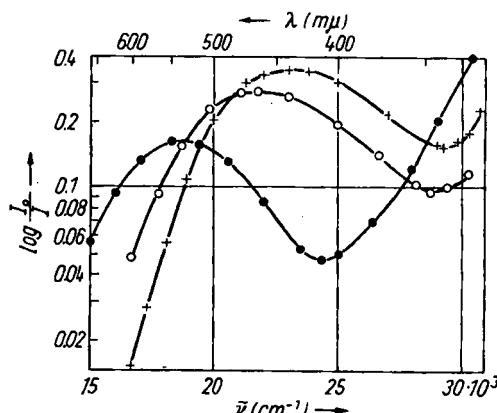


Abbildung 1. Absorptionsspektren der verschiedenen Eisen(III)-benzhydroxamsäurekomplexe. +---+ brauner Eisen(III)-komplex (I); o--o kirsroter Eisen(III)-komplex (II); ●---● rotvioletter Eisen(III)-komplex (III)

esterartig gebundenen Acylgruppen unter Bedingungen durchgeführt werden muß, bei denen nur einer der oben angegebenen Komplextypen entsteht. Nach den während der Konstitutionsaufklärung gewonnenen Erfahrungen eignet sich hierzu der rotviolette Typ III ($\lambda_{\text{max}} = 520-540 \text{ m}\mu$), der bei Überschuß an Eisen(III)-chlorid und Wasserausschluß in methanolischer Lösung am

⁸⁾ E. Bayer, unveröffentlicht.

stabilsten ist. Bei einem Wassergehalt von mehr als 2 % beginnt der rot-violette Komplex unter HCl-Abspaltung in das kirschrote Eisen(III)-hydroxamat (II) überzugehen. Sämtliche bisher untersuchten Hydroxamsäuren bilden mit Eisen(III)-salz rotviolette Verbindungen, deren breite Lichtabsorptionsmaxima, unabhängig von dem an der Hydroxamsäuregruppierung gebundenen organischen Restmolekül R, zwischen 520–540 m μ liegen und den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten besitzen.

Spaltung der Ester

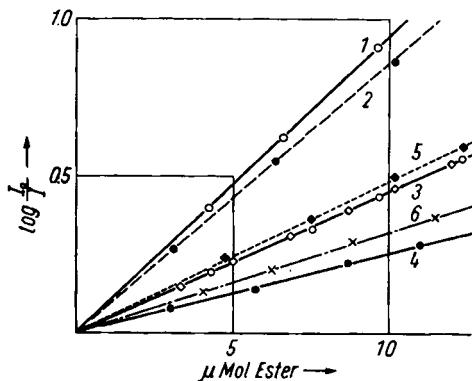
Weitere Untersuchungen galten den optimalen Reaktionsbedingungen der Umsetzung der Carbonsäureester mit Hydroxylamin und Natronlauge zu den entsprechenden Hydroxamsäuren. In Übereinstimmung mit den Befunden von A. R. Thompson⁹⁾ hat sich die Durchführung der Reaktion in Diäthyläther am besten bewährt. Höhere Temperaturen als 25° und längere Reaktionszeiten als 20 Min. sind, insbesondere bei den niederen aliphatischen Carbonsäureestern wegen deren leichter Flüchtigkeit und der damit verbundenen Verluste, ungünstig. Der als Lösungsmittel verwendete Diäthyläther muß weniger als 0,5 % Wasser enthalten und frei von Peroxyden sein. Der Diäthyläther kann bis zu 15 Vol.-% absolut. Methanol enthalten, ohne daß die Spaltungsgeschwindigkeit beeinflußt wird. Dies ist für Substanzen, die in Äther schwer löslich sind, aber bei Gegenwart von Methanol in Lösung bleiben, von Bedeutung. In Methanol-Äther unlösliche Verbindungen können evtl. in Dioxan umgesetzt werden. In diesem Lösungsmittel erreicht die Spaltung und damit die Extinktion der Eisen(III)-hydroxamsäure-Verbindungen 90 % von den in Diäthyläther erzielten Werten. In Tetrahydrofuran und Methanol verlaufen die Spaltungen der Ester mit schlechter Ausbeute.

Das Hydroxylamin-Reagens bereitet man jeden Tag frisch, und die Hydroxylamin-hydrochlorid-Lösung soll nicht älter als 2–3 Tage sein. Unmittelbar nach der Reaktion wird der Ansatz genau neutralisiert, da sowohl Lauge als auch Säure die Farbintensität der Eisen(III)-komplexe beeinflussen.

Hält man die im Versuchsteil dieser Arbeit eingehender beschriebenen Vorsichtsmaßregeln ein, kann man mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ 1–12 · 10⁻⁶ Mol esterartig gebundene Acylgruppe als violette Eisen(III)-hydroxamate spektralphotometrisch bei 530 m μ bestimmen. Nach Vergleich der bei unserer Bestimmung gemessenen Extinktion und der Extinktion der aus reinen Hydroxamsäuren gewonnenen Eisen(III)-komplexe, verläuft die Umsetzung der Ester zu Hydroxamsäuren mit einer Ausbeute von ca. 50 %. Es war daher zu untersuchen, ob bei konstanten Reaktionsbedingungen unabhängig von der jeweiligen Alkoholkomponente immer gleiche Ausbeuten an Hydroxamsäuren erhalten werden und somit eine für die zu bestimmende Acylgruppe allgemein gültige Eichkurve bzw. ein allgemein anwendbarer Faktor benutzt werden kann. Nach der im Versuchsteil beschriebenen Vorschrift wurde mit Äthylacetat die in Abbild. 2 wiedergegebene Eichkurve für die Acetylgruppenbestimmung aufgestellt und an Estern der Essigsäure mit aliphatischen

⁹⁾ Austral. J. sci. Res. 3, 128 [1950].

Alkoholen, Phenolen und Zuckern die Gültigkeit dieser Eichkurve nachgeprüft. Wie aus Tafel 1 ersichtlich wird, ist der für Essigsäure-äthylester bestimmte Faktor generell für die Bestimmung von esterartig gebundeneu



Abbild. 2. Eichkurven zur photometrischen Mikrobestimmung esterartig gebundener Acylgruppen: 1 Zimtsäureester; 2 Ester der Essigsäure, Propionsäure, *n*-Buttersäure, *n*-Valeriansäure, *n*-Caprinsäure, *n*-Capronsäure, Önanthsäure, Pelargonsäure, Caprylsäure und Benzoësäure; 3 Ameisensäureester; 4 Isovaleriansäureester; 5 Salicylsäureester; 6 Isobuttersäureester

Acetylgruppen anwendbar. Das bedeutet, daß unter den gewählten Bedingungen die Ausbeute an Hydroxamsäuren bei der Spaltung von beliebigen Essigsäureestern unabhängig von der Alkoholkomponente ist.

Tafel 1. Berechnete und photometrisch als Eisen(III)-hydroxamat gefundene Acetylgruppengehalte verschiedener Essigsäureester

| Substanz *) | % CH ₃ CO berechnet | % CH ₃ CO gefunden |
|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Pentaacetylgalaktose | 55.4 | 56.1, 56.0 |
| Tetraacetylglucose | 49.9 | 50.1, 49.7 |
| Oktaacetylactobiose | 50.7 | 49.8, 49.9 |
| Diacetylhydrochinon | 44.3 | 44.0, 43.9 |
| Acetobromgalaktose | 41.7 | 40.9 |
| Acetobromglucose | 41.7 | 41.4 |
| Isoamylacetat | 33.1 | 32.9, 33.1 |
| 2,6-Dimethyl-4-jod-phenylacetat | 14.8 | 14.7, 15.1 |
| 3,5-Dinitro-4-methoxy-phenylacetat . | 16.8 | 16.9, 17.1 |

*) Herrn Doz. Dr. H.-J. Bielig und Herrn H. Trischmann, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, danken wir für die Überlassung eines Teils der hier aufgeführten Substanzen.

Überraschend war, daß auch für die Ester der höheren aliphatischen *n*-Monocarbonsäuren (C_3 – C_{10} -Monocarbonsäuren) und der Benzoësäure die gleiche Eichkurve wie für Essigsäure erhalten wird.

Lediglich die *iso*-Carbonsäureester, Ameisensäure-, Zimtsäure- und Salicylsäureester weichen davon ab. Jedoch sind die in Abbild. 2 aufgezeichneten, für die letzteren Ester aufgestellten Eichkurven, unabhängig von der jeweiligen Alkoholkomponente, für die einzelnen Acylgruppen generell gültig.

Gemische verschiedener Carbonsäureester lassen sich, wie wir gefunden haben¹⁰⁾, nach Umsetzung zu den entsprechenden Hydroxamsäuren als Eisen(III)-hydroxamate verlustlos papierchromatographisch trennen und durch Elution der Komplexe mit Methanol photometrisch bestimmen.

Beschreibung der Versuche

Reagenzien:

a) Hydroxylamin-Reagens: unmittelbar vor Gebrauch bereiten durch Mischen gleicher Volumina einer methanolischen 5-proz. Hydroxylamin-hydrochlorid-Lösung (p. a., Merck) und einer 12-proz. Lösung von NaOH in Methanol. Die zur Herstellung des Reagens benützte Hydroxylamin-hydrochlorid-Lösung soll nicht älter als 2 Tage sein.

b) 2-proz. methanolische Lösung von wasserfreiem Eisen(III)-chlorid.

c) Diäthyläther, wasserfrei und peroxydfrei, über Natrium aufbewahrt.

d) Ester-Standardlösungen: Die zur Aufstellung der Eichkurven verwendeten Ester werden durch alkalische Verseifung und Titration der Säuren auf ihren Estergehalt untersucht. Es werden von jedem der untersuchten Ester 1 g in einem Meßkolben mit absol. Äthanol auf 100 ccm aufgefüllt.

Aufstellung der Eichkurven

Von den Ester-Standardlösungen werden 0.0100–0.2000 ccm, entsprechend 100 bis 2000 γ Ester, mit einer Agla-Mikrometerspritze in ein Reagenzglas mit 10 ccm Äther (Reagens c) pipettiert und sogleich mit 1.5 ccm des Hydroxylamin-Reagens a versetzt. Das Reagenzglas wird mit einem gutschützenden Gummistopfen verschlossen und die Reaktion bei $25^\circ \pm 1^\circ$ in einem Thermostaten durchgeführt. Nach genau 20 Min. ist die Umsetzung beendet. Man neutralisiert mit 0.175 ccm Salzsäure, 32-proz. (p. a., Merck), filtriert durch ein hydrophobiertes Filter Nr. 2578 h (Fa. Otto Poerringer, Annweiler am Trifels) vom ausgefallenen Kaliumchlorid ab und wascht dreimal mit je 1.5 ccm wasserfreiem Diäthyläther nach. Die äther. Lösung der Hydroxamsäuren wird im Wasserstrahlvakuum auf ca. 0.75 ccm eingeengt, die mit wasserfreiem Methanol in einen 10-ccm-Meßkolben gespült werden. Nach Zugabe von 0.2 ccm einer 2-proz. methanolischen Eisen(III)-chloridlösung füllt man mit absol. Methanol zur Marke auf und mißt mit einem Photometer die entstandene braunviolette Farbe bei $530 \mu\mu$ (Elko II, Zeiss, Filter S 53; oder Spektralphotometer PMQ II, Zeiss) gegen eine Vergleichsprobe, die man durch Auffüllen von 0.2 ccm 2-proz. Eisen(III)-chloridlösung mit Methanol auf 10 ccm erhält.

Von den einzelnen Carbonsäuren wurden jeweils mit den Estern von C_1 – C_6 -Monooalkoholen, Phenolen und Zuckern die Eichkurven aufgestellt. Zwischen der spektralphotometrisch bestimmten Extinktion und den in 10 ccm Methanol befindlichen Mengen Ester gelten folgende Beziehungen bei $2-11 \cdot 10^{-6}$ Mol Ester Gesamtmenge:

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 11.4, \text{ gültig für die Ester der Essig-, Propion-, } n\text{-Butter-, } n\text{-Valerian-, } n\text{-Caprin-, } n\text{-Capron-, } n\text{-Önanth-, } n\text{-Capryl-, } n\text{-Pelargon- und Benzoësäure:}$$

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 10.6 \text{ für die Zimtsäureester}$$

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 22.4 \text{ für die Ameisensäureester}$$

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 38.9 \text{ für die Isovaleriansäureester}$$

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 31.0 \text{ für die Isobuttersäureester}$$

$$\mu\text{Mol Ester} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 22.2 \text{ für die Salicylsäureester.}$$

¹⁰⁾ E. Bayer u. K.-H. Reuther, Angew. Chem., im Druck.

Bestimmung der Acetylgruppe

Die $2\text{--}10 \cdot 10^{-6}$ Mol (entsprechend 300–2000 γ) zu bestimmende Ester in 10 ccm Äther enthaltenden Lösungen werden nach der bei der Aufstellung der Eichkurven angegebenen Vorschrift mit Hydroxylamin-Reagens versetzt und wie oben weiterverfahren. Aus der erhaltenen Extinktion berechnen sich nach den angegebenen Gleichungen die Estergehalte. – In Äther schwerlösliche Substanzen können durch einen Zusatz von 1–2 ccm Methanol in Lösung gebracht werden. Bei Bestimmung der Acetylgruppe berechnet sich der Gehalt an Acetyl (CH_3CO) nach folgender Gleichung

$$\text{mg Acetyl } (\text{OCCH}_3) = \log \frac{I_0}{I} \cdot 0.490$$

An Stelle von Diäthyläther können auch 10 ccm über Natrium dest. Dioxan verwendet werden, dem man bis zu 2 ccm Methanol zufügen kann. Man verfährt auch in diesem Falle, wie bei der Aufstellung der Eichkurven beschrieben worden ist. Der Gehalt an Acetylgruppen berechnet sich nach der Gleichung

$$\text{mg Acetyl } (\text{OCCH}_3) = \log \frac{I_0}{I} \cdot 0.451$$

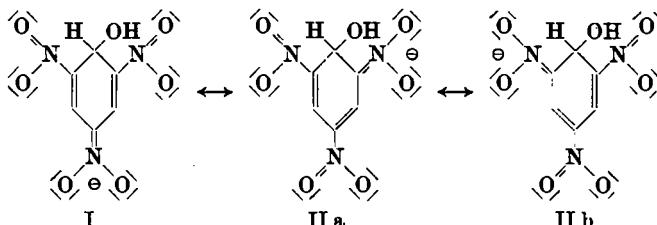
368. Eberhard Liß und Karl Lohmann: Sterische Hinderung der Mesomerie bei Alkylderivaten des 1.3.5-Trinitro-benzols

[Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, Abt. Biochemie]

(Eingegangen am 3. August 1956)

An Hand der Absorptionsspektren der farbigen alkalischen Lösungen von 1.3.5-Trinitro-benzol und einiger seiner Alkylderivate kann das Auftreten von sterischer Hinderung der Mesomerie nachgewiesen werden.

1.3.5-Trinitro-benzol löst sich in wäßrigen Alkalien unter Bildung einer orangefarbenen Lösung. Diese bereits von P. Hepp¹⁾ beobachtete Erscheinung beruht auf der Bildung von Alkalisalzen der Nitroverbindung, deren Konstitution J. Meisenheimer²⁾ bewiesen hat. Die Farbsalze verdanken ihre Stabilität einer Mesomerie, deren wichtigste Grenzstrukturen die folgenden sind:



Das Absorptionsspektrum des im alkalischen Medium entstehenden Farbsalzes wurde zuletzt von G. Kortüm³⁾ und Th. Canbäck⁴⁾ untersucht. Es zeigt sich, daß die Maxima der Absorptionskurve in alkoholischer Lösung

¹⁾ Liebigs Ann. Chem. 215, 345 [1882]. ²⁾ Liebigs Ann. Chem. 323, 219 [1902].

³⁾ Z. physik. Chem., Abt. B. 42, 39 [1938]. ⁴⁾ Farmac. Revy 48, 217 [1949].