

ERNST BAYER, KARL-HEINZ REUTHER und ROELOF TER HEIDE

Eisen-hydroxamsäurekomplexe, III<sup>1,2)</sup>

PHOTOMETRISCHE MIKROBESTIMMUNG UND  
PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON ALDEHYDEN

Aus dem Forschungs-Institut für Rebenzüchtung, Abteilung Biochemie und Physiologie,  
Geilweilerhof über Landau (Pfalz)  
(Eingegangen am 14. Juni 1957)

Aliphatische Aldehyde, Zimtaldehyd, Benzaldehyd und Furfurol lassen sich nach Umwandlung zu Hydroxamsäuren und Bildung der rotvioletten Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe durch Extinktionsmessung quantitativ bestimmen. Je nach dem Carbonylgruppengehalt werden 0.1 – 0.5 mg Substanz zur Bestimmung benötigt. Durch papierchromatographische Trennung der zuvor gebildeten Eisen(III)-hydroxamate können Aldehyde identifiziert werden.

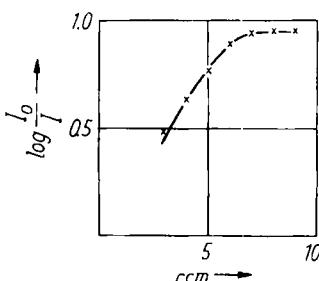
Der qualitative Nachweis von Aldehyden durch Bildung der Hydroxamsäuren und deren Erkennung mittels Eisen(III)-salzen ist von A. ANGELI<sup>3)</sup> und E. RIMINI<sup>4)</sup> in die Analytik organischer funktioneller Gruppen eingeführt worden. Die bei der Untersuchung der Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe<sup>1,2)</sup> gewonnenen Erfahrungen sollten nun auch eine quantitative Bestimmung der Carbonylgruppen auf Grund der Reaktion nach Angeli-Rimini ermöglichen.

SPALTUNG DER ALDEHYDE

In alkalischem Medium werden Aldehyde mittels Benzulsulfhydroxamsäure zu Hydroxamsäuren umgesetzt und die Extinktion der entsprechenden braunvioletten Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe bei 525 m $\mu$  spektralphotometrisch gemessen. Wie bei der photometrischen Mikrobestimmung von Acylgruppen<sup>1)</sup> wird der rotviolette Eisen(III)-hydroxamsäurekomplex zur Bestimmung gebildet. Über die hierbei notwendigen Vorsichtsmaßregeln wurde schon berichtet<sup>1,2)</sup>.

Die Umsetzung der Aldehyde zu Hydroxamsäuren ist sehr stark von der Konzentration der Benzulsulfhydroxamsäure abhängig. Wie Abbild. 1 zeigt, ist

Abbildung 1. Abhängigkeit der Extinktion (525 m $\mu$ ) von der Menge zugesetzter Benzulsulfhydroxamsäure (8-proz. methanol. Lösung) bei der Spaltung von 0.4 m Mol Capronaldehyd. Photometrisch gemessen wurde ein 14.6  $\mu$ Mol entsprechender aliquoter Anteil



<sup>1)</sup> I. Mitteil.: E. BAYER und K.-H. REUTHER, Chem. Ber. **89**, 2541 [1956].

<sup>2)</sup> II. Mitteil.: E. BAYER und K.-H. REUTHER, Angew. Chem. **68**, 698 [1956].

<sup>3)</sup> Gazz. chim. ital. **26** II, 17 [1896]; **34** I, 50 [1905]; vgl. auch A. ANGELI und F. ANGELICO, Gazz. chim. ital. **33** II, 329 [1903]. <sup>4)</sup> Gazz. chim. ital. **31** II, 84 [1901].

eine maximale Farbentwicklung nur von einem ca. 8fachen molaren Überschuß an Benzsulfhydroxamsäure ab gewährleistet. Als Lösungsmittel hat sich peroxyd- und aldehydfreier Diäthyläther am besten bewährt. In anderen Äthern, z. B. Tetrahydrofuran oder sek.-Butyläther<sup>5)</sup>, ist die Empfindlichkeit geringer. Es ist nicht notwendig, absolut wasserfreien Äther zu verwenden. Eine Reaktion in wäßrigem Medium, wie sie von G. DAMKÖHLER und W. EGGERSGLÜSS<sup>6)</sup> empfohlen wurde, erbringt jedoch geringe Ausbeuten an Hydroxamsäuren und unkontrollierbare Erscheinungen bei der Bildung der Eisen(III)-komplexe<sup>1)</sup>. Bei 25° erreicht die Bildung der Hydroxamsäuren innerhalb von 40 Min. ihren Gleichgewichtszustand.

Nach der im Versuchsteil gegebenen Vorschrift wurden die Eichkurven zur Aldehydbestimmung aufgestellt. Unter unseren Reaktionsbedingungen ergeben kernsubstituierte aromatische Aldehyde, z. B. Salicylaldehyd, Nitrobenzaldehyd, Vanillin, sowie Dialdehyde, z. B. Glyoxal und Ketone, keine Hydroxamsäuren und somit auch keine Rotfärbung. Die geschilderte Reaktion ist also spezifisch auf aliphatische sowie unsubstituierte aromatische und heterocyclische Aldehyde und erlaubt deren quantitative Bestimmung bei Gegenwart von Ketonen.

#### AUFSTELLUNG DER EICHKURVEN

Die zur Aufstellung der Eichkurven benutzten Aldehyde wurden aus handelsüblichen Produkten durch fraktionierte Destillation rein dargestellt. Eine zusätzliche Reinheitsprüfung wurde durch die noch zu beschreibenden papierchromatographischen Untersuchungen und mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt. Für die Gaschromatographie von Aldehyden haben sich insbesondere die von A. I. M. KEULEMANS und A. KWANTES<sup>7)</sup> empfohlenen, mit Sterchamol als Trägersubstanz und Silikonöl DC 550-Stearinsäure<sup>8)</sup> als stationärer, flüssiger Phase beschickten Säulen bewährt<sup>9)</sup>. In Abbild. 2 ist die Analyse eines durch geringe Mengen Acet- und Propionaldehyd verunreinigten Butyraldehyds dargestellt.

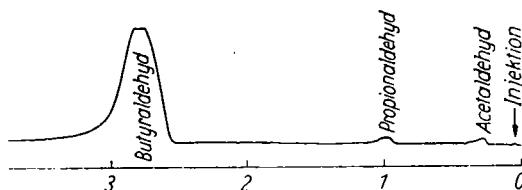


Abbildung 2. Trennung eines Gemisches von Butyr-(99 %), Propion-(0.5 %) und Acetaldehyd (0.5 %) mittels Gasverteilungschromatographie bei 20°  
Durchflußgeschwindigkeit: 70 ccm H<sub>2</sub>/Min. Abszisse: Zeit (Std.), Ordinate: gemessene relative Wärmeleitfähigkeit

<sup>5)</sup> Der RHEINPREUSSEN G.m.b.H., Homberg, danken wir für die freundliche Überlassung von sek.-Butyläther.

<sup>6)</sup> Z. physik. Chem., Abt. B **51**, 157 [1942].

<sup>7)</sup> Proc. of the Fourth World Petroleum Congress, Section V/B, Reprint 4; Carlo Colombo Publishers Rom 1955.

<sup>8)</sup> A. T. JAMES und A. J. P. MARTIN, Biochem. J. **50**, 679 [1952].

<sup>9)</sup> Nach unveröffentlichten Versuchen von E. BAYER und F. BORN.

Wie bei den Estern, ist die Bildung der Hydroxamsäuren aus den aliphatischen Aldehyden von der Länge der Seitenkette weitgehend unabhängig und wird nur durch die Carbonylgruppe bestimmt. Für aliphatische Aldehyde und Benzaldehyd ist die pro Mol Carbonylgruppe bestimmte Extinktion (Abbildung 3) identisch. Mit Abweichungen von höchstens  $\pm 5\%$  wird eine allgemein gültige Eichkurve von den in Abbild. 3 genannten aliphatischen Aldehyden mit 2–12 Kohlenstoffatomen und Benzaldehyd nach der Beschreibung im Versuchsteil erhalten. Furfurol und Zimtaldehyd weichen ab. Mit der beschriebenen Reaktion lässt sich demgemäß eine quantitative Bestimmung aliphatischer Aldehydgruppen durchführen. Die untere Erfassungsgrenze beträgt  $1 \mu\text{Mol}$  Aldehyd, das sind z. B. etwa  $40 \gamma$  Acetaldehyd.

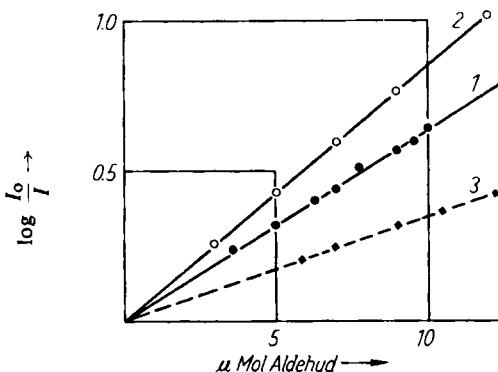


Abbildung 3. Eichkurven zur photometrischen Aldehydbestimmung für Acet-, Propion-, Butyr-, Valer-, Capron-, Oenanth-, Caprin-, Undecylen- und Benzaldehyd (Kurve 1), Furfurol (Kurve 2) und Zimtaldehyd (Kurve 3)

#### PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE ALDEHYDBESTIMMUNG

Da wir früher bereits über die Papierchromatographie der Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe auf  $\text{FeCl}_3$ -imprägniertem Papier berichtet hatten<sup>2)</sup>, lag es nahe, diese Methode auch zur Identifizierung und Bestimmung einzelner Aldehyde in Gemischen heranzuziehen. Auf Grund der weit auseinanderliegenden  $R_F$ -Werte ist die papierchromatographische Auftrennung der Eisenhydroxamate in Butanol/Dimethylformamid/Wasser wesentlich günstiger zur Trennung der  $C_1$ – $C_{10}$ -Aldehyde, als die von H. J. STRUCK<sup>10)</sup> hierfür angewandte Trennung der Hydroxamsäuren selbst. Bis zu  $10 \mu\text{Mol}$  Aldehyd lassen sich nach Umsetzung zur Hydroxamsäure und papierchromatographischer Trennung als Eisen-hydroxamsäureverbindung noch qualitativ erkennen. Eine genaue Beschreibung der papierchromatographischen Aldehydbestimmung ist im Versuchsteil wiedergegeben. Da die Spaltprodukte der Benzolsulfhydroxamsäure braungelbe Eisen(III)-Verbindungen ergeben, ist es bei der quantitativen Bestimmung und der papierchromatographischen Analyse unbedingt notwendig, immer eine unter gleichartigen Bedingungen hergestellte Blindprobe als Vergleich heranzuziehen.

<sup>10)</sup> Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 1956, 1277.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### *Reagenzien:*

- a) Benzulsulfhydroxamsäure-Reagenz: Die als Reagenz benutzte Benzulsulfhydroxamsäure wird aus Hydroxylamin und Benzolsulfochlorid dargestellt<sup>11)</sup>, mehrmals aus Wasser umkristallisiert und im Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet und aufbewahrt.
- 8 g Benzulsulfhydroxamsäure werden in 100 ccm absol. Methanol gelöst. Diese Lösungen sollen nicht älter als 2 Tage sein.
- b) 12.5-proz. methanolische Lösung von Natriumhydroxyd (p. A. Merck).
- c) 32-proz. Salzsäure (p. A. Merck).
- d) Diäthyläther, peroxydfrei, über Natrium aufbewahrt.
- e) 2-proz. Lösung von wasserfreiem Eisen(III)-chlorid in Methanol.
- f) Aldehyd-Standardlösungen: Die aus käuflichen Präparaten durch fraktionierte Destillation analysenrein erhaltenen Aldehyde werden durch Gaschromatographie und papierchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft und dann von den reinen Aldehyden je 1 g in einem Meßkolben mit absol. Äthanol auf 100 ccm aufgefüllt.

### *Aufstellung der Eichkurven*

In ein Reagenzglas werden 20 ccm absol. Diäthyläther (Reagenz d) vorgelegt und 0.005 bis 0.200 ccm der Aldehyd-Standardlösungen hinzugefügt. Danach pipettiert man 8 ccm des Benzulsulfhydroxamsäure-Reagenz a) und 2 ccm Reagenz b) hinzu und verschließt das Reagenzglas sogleich mit einem gutschützenden Gummistopfen. Die Reaktion wird bei  $25^\circ \pm 1^\circ$  in einem Thermostaten durchgeführt. Nach genau 40 Min. wird die Umsetzung unterbrochen, sofort mit 0.46 ccm Salzsäure (Reagenz c) neutralisiert, durch ein hydrophobiertes Filter Nr. 560 (Schleicher & Schüll) vom ausgefallenen Natriumchlorid abfiltriert und 3 mal mit je 2 ccm Diäthyläther nachgewaschen. Die ätherischen Lösungen der Hydroxamsäure werden im Wasserstrahlvakuum auf etwa 1 ccm eingeengt und mit wasserfreiem Methanol in einen 10-ccm-Meßkolben gespült. Nach Zugabe von 0.2 ccm einer 2-proz. Eisen(III)-chloridlösung (Reagenz e) wird mit Methanol auf 10 ccm aufgefüllt und mit einem Photometer (Elko II, Zeiß; Spektralphotometer PMQ II, Zeiß) gegen eine Vergleichsprobe die Extinktion bei  $525 \text{ m}\mu$  bestimmt. Die Vergleichsprobe wird nach der oben gegebenen Vorschrift hergestellt; es wird lediglich an Stelle der Aldehydlösung 0.2 ccm aldehydfreies Äthanol eingesetzt.

Eichkurven wurden mit aliphatischen Aldehyden von 2–11 Kohlenstoffatomen, Furfurol, Zimtaldehyd und Benzaldehyd aufgestellt. Zwischen der spektralphotometrisch bestimmten Extinktion und den in 10 ccm Methanol befindlichen Mengen Fe-Hydroxamat gelten folgende Beziehungen bei  $1 - 12 \cdot 10^{-6}$  Mol ursprünglich vorhandenem Aldehyd:

$$\mu\text{Mol Aldehyd} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 15.6$$

für Acetaldehyd, Propionaldehyd, Butyraldehyd, Valeraldehyd, n-Capronaldehyd, n-Önanthialdehyd, n-Caprylaldehyd, Pelargonaldehyd, Caprinaldehyd, Undecylen- und Benzaldehyd.

$$\mu\text{Mol Aldehyd} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 28.6 \text{ für Zimtaldehyd}$$

$$\mu\text{Mol Aldehyd} = \log \frac{I_0}{I} \cdot 11.8 \text{ für Furfurol}$$

<sup>11)</sup> Nach GATTERMANN-WIELAND, Die Praxis des organischen Chemikers, 33. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin 1948; zit. S. 176.

### *Bestimmung der Aldehyde*

Die 50—2000 γ Aldehyd in 20 ccm Äther enthaltenden Lösungen werden nach der bei der Aufstellung der Eichkurven angegebenen Vorschrift mit Benzulsulfhydroxamsäure-Reagenz und Natronlauge versetzt und, wie oben beschrieben, weiterverfahren. Aus den gemessenen Extinktionen berechnen sich nach den oben angegebenen Gleichungen die Aldehydgehalte.

### *Papierchromatographische Bestimmung und Trennung von Aldehyden*

Zur qualitativen Erkennung der Aldehyde wird ebenfalls die Umsetzung in der bei der Aufstellung der Eichkurven beschriebenen Weise vorgenommen. Von dieser so erhaltenen, ätherischen Hydroxamsäurelösung werden je 5—50 γ ursprünglich eingesetztem Aldehyd entsprechende Mengen auf mit Eisen(III)-chlorid imprägniertes Chromatographiepapier Nr. 2043b M (Schleicher & Schüll) aufgetragen und in n-Butanol/Dimethylformamid/Wasser 4.5:0.5:5.0 (organische Phase) absteigend chromatographiert. Nach maximal 20 stdg. Laufzeit sind die Eisen(III)-hydroxamate getrennt ( $R_F$ -Werte siehe folgende Tabelle). Die Eisen(III)-hydroxamsäurekomplexe aus Zimtaldehyd und Furfurol weisen die gleichen  $R_F$ -Werte auf wie diejenigen aus Capronaldehyd bzw. Butyraldehyd, sind aber an ihrer blauen Eigenfärbung gut zu erkennen.

Die Imprägnierung des Chromatographiepapiers mit  $\text{FeCl}_3$  wird durch Baden in 2-proz. methanolischer Eisen(III)-chloridlösung, Abtropfen (30 Sek.) und Trocknen bei 80° im Ventilatortrockenschrank bewirkt.

Zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung werden von den nach der Bildung der Hydroxamsäuren erhaltenen ätherischen Lösungen je 50—2000 γ Aldehyd entsprechende aliquote Anteile in 3—5 ccm langen Streifen auf mit Eisen(III)-chlorid imprägniertem Papier aufgetragen und nach obiger Vorschrift chromatographiert. Die rotvioletten Eisen(III)-hydroxamsäure-Flecke werden ausgeschnitten, mit 9.8 ccm Methanol in einem Reagenzglas unter gelegentlichem Umschütteln eluiert, 0.2 ccm Reagenz e) zugegeben und die Extinktion bei 525  $\mu\text{m}$  gegen eine Vergleichsprobe bestimmt. Die Vergleichsprobe wird durch Chromatographie der bei der Aufstellung der Eichkurve beschriebenen Blindprobe, Ausschneiden und Elution des dem jeweiligen Eisen(III)-hydroxamat entsprechenden Papiersektors dieser Vergleichsprobe hergestellt.

Nach den oben angegebenen Gleichungen berechnen sich dann die Aldehydgehalte.

$R_F$ -Werte der aus Aldehyden dargestellten Eisen(III)-hydroxamate  
in Butanol/Dimethylformamid/Wasser 4.5:0.5:5.0

Fe <sup>III</sup> -Hydroxamat aus $R_F$ -Wert	Form- 0.24	Acet- 0.32	Propion- 0.50	Butyr- 0.68	Valer-aldehyd 0.80
Fe <sup>III</sup> -Hydroxamat aus $R_F$ -Wert	Capron- 0.90	Caprin- 0.95	Benz- 0.83	Zimt-aldehyd 0.90	Furfurol 0.70