

Nicht im Handel

Sonderabdruck aus Heft 1, 1954, der

MIKROCHIMICA ACTA

Schriftleitung: *M. K. Zacherl*, Wien

Springer-Verlag in Wien

Alle Rechte vorbehalten

W. Schöniger, H. Lieb und M. G. El Din Ibrahim:

Über eine mikroanalytische Schnellbestimmung von
Acetyl- und C-Methylgruppen.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium der
Universität Graz.

Über eine mikroanalytische Schnellbestimmung von Acetyl- und C-Methylgruppen*.

Von

W. Schöniger**, H. Lieb und M. G. El Din Ibrahim.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 7. Oktober 1953.)

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahrzehnte befaßten sich mit der Ausarbeitung einer mikroanalytischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Acetylgruppen bzw. C-ständigen Methylgruppen in organischen Verbindungen. Erst *Wiesenberger*¹ gelang es, eine allgemein brauchbare Methode der eindeutigen Ermittlung des Gehaltes an Acetylgruppen zu finden. Mit der von ihm angegebenen Apparatur kann man die bei der Verseifung bzw. Oxydation erhaltene Essigsäure so destillieren, daß nur diese und keine anderen Säuren im Destillat enthalten sind und so der Gehalt an Essigsäure mit *einer* Titration genau ermittelt werden kann.

Da die Anschaffungskosten des Apparates nach *Wiesenberger* ziemlich hoch sind, machten wir den Versuch, die Destillation der bei der Verseifung bzw. Chromsäureoxydation entstehenden Essigsäure mit dem in unserem Laboratorium zur mikroanalytischen Bestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl* in Verwendung stehenden Apparat durchzuführen. Es konnten damit zwar nicht so exakte Ergebnisse erzielt werden wie mit dem Destillationsapparat nach *Wiesenberger*, dafür ließ sich aber die Destillationszeit von 30 bis 40 Minuten auf etwa 10 Minuten verkürzen. Man wird dieses Verfahren vor allem dann anwenden, wenn man sich über die Zahl der vorhandenen Acetyl- bzw. C-Methylgruppen orientieren will. Entgegen unseren Erwartungen zeigten die Versuche,

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Adolf Franke* zum 80. Geburtstag gewidmet!

** Derzeitige Anschrift: Mikroanalytisches Laboratorium der chem.-pharmazeut. Abteilung der Sandoz A. G., Basel, Schweiz.

daß wenige Milligramm Essigsäure noch in einer Menge von 100 ml Wasser mit genügender Genauigkeit zu erfassen sind, um eindeutige Angaben über die Zahl der Acetylgruppen machen zu können.

Beschreibung der Apparatur.

Als Destillationsgerät wird eine modifizierte Form des Kjeldahlapparates nach *Parnas-Wagner*² verwendet (Abb. 1). Dieser besteht aus einem 1 l fassenden Dampfentwickler, der durch einen Tauchsieder elektrisch geheizt wird. Mittels eines vorgeschalteten Regelwiderstandes wird die Stromstärke und damit auch die Dampfentwicklung geregelt und konstant gehalten. Der Kolben ist mit kurzen Gummischläuchen über einen Dreiweghahn mit dem Destillationsgefäß verbunden. Dieses ist von einem Mantelgefäß umgeben, in das der Dampf durch einen seitlichen Ansatz einströmt und das Destillationsgut vorwärmt. Dadurch wird eine allzu große Volumsvermehrung durch kondensierenden Wasserdampf vermieden. Das Mantelgefäß ist unten mit einem zweiten Ansatzrohr versehen, auf das ein Gummischlauch mit Quetschhahn aufgeschoben ist. Oben ist dem Destillationsgefäß ein Trichter mit Hahn zum Einbringen des Destillationsgutes aufgesetzt. Über einen Tropfenfänger ist die Verbindung zu einem Kühler hergestellt. Der oben erwähnte Dreiweghahn ist nicht unbedingt erforderlich. Er ermöglicht jedoch bei Serienanalysen rascheres Arbeiten. Ohne dessen Anwendung muß die Dampfentwicklung durch Ausschalten der elektrischen Heizung unterbrochen werden. Infolge Sinkens des Innendruckes im Dampfentwickler wird das Destillationsgut aus dem inneren Gefäß in das Mantelgefäß zurückgesaugt und kann von dort nach unten durch Öffnen des Quetschhahnes abgelassen werden.

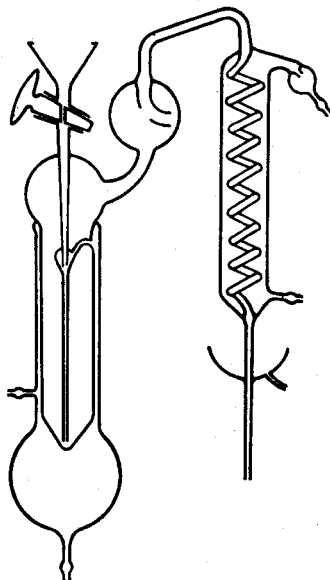


Abb. 1.

Versuche zur Ermittlung der optimalen Destillationsbedingungen.

Von diesen Untersuchungen geben wir nur die abschließenden Experimente an. Die elektrische Heizung des Dampfentwicklers wurde so eingestellt, daß innerhalb von 10 Minuten 100 ml Destillat erhalten wurden. Zunächst wurde der Blindwert bestimmt, der erhalten wird, wenn man 2 ml Schwefelsäure nach *Wenzel* — wie sie zur Verseifung von Acetyl-

verbindungen verwendet wird — mit kaltgesättigter Natriumsulfatlösung* auf 15 ml auffüllt und mit der angegebenen Geschwindigkeit der Wasserdampfdestillation unterwirft. Dieser Blindwert entsprach im Mittel 0,38 ml 0,01-n Lauge und wurde bei der Berechnung der Resultate berücksichtigt. In der Tabelle 1 sind Werte zusammengestellt, die nach Destillation bekannter Mengen Essigsäure erhalten wurden. Die zu destillierende Flüssigkeit wurde vorher mit je 2 ml Schwefelsäure versetzt und mit kaltgesättigter Natriumsulfatlösung auf insgesamt 15 ml aufgefüllt.

Tabelle 1.

mg CH ₃ COOH gegeben	Verbrauch ml 0,01-n NaOH	mg CH ₃ COOH gefunden	Differenz mg
1,20	2,02	1,212	+ 0,012
1,80	3,02	1,812	+ 0,012
2,40	4,01	2,406	+ 0,006
3,00	5,01	3,006	+ 0,006
4,20	6,99	4,194	— 0,006
4,80	7,98	4,788	— 0,012

Der Einfluß der Zugabe von kaltgesättigter Natriumsulfatlösung zur Destillationsflüssigkeit auf die Geschwindigkeit der Überführung der Essigsäure wurde ebenfalls genauer studiert. Bekannte Mengen Essigsäure in der bei Acetylbestimmungen zu erwartenden Größenordnung wurden mit 2 ml Schwefelsäure versetzt, mit Wasser auf 15 ml aufgefüllt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Je 50 ml Destillat wurden aufgefangen und titriert, wobei selbstverständlich ein vorher ermittelter Blindwert bei der Berechnung berücksichtigt wurde (Tab. 2).

Wenn kaltgesättigte Natriumsulfatlösung zum Auffüllen des Destillationsgutes verwendet wurde, war bereits nach 10 Minuten sämtliche Essigsäure in das Destillat übergeführt (vgl. Tab. 3).

Durch Zugabe von kaltgesättigter Natriumsulfatlösung wird somit einerseits die Destillationszeit auf 10 Minuten verkürzt, andererseits das Volumen des Destillates um ein Drittel verringert, ein Vorteil, der für die Titration der Essigsäure mit 0,01-n Natronlauge wichtig ist.

Nachdem durch diese Modellversuche bewiesen war, daß es möglich ist, Essigsäure im modifizierten Destillationsapparat nach *Parnas-Wagner* mit Wasserdampf zu destillieren, wurden einige Bestimmungen von Acetylgruppen in Gemischen von Acetanilid und Phenacetin aus-

* *Conway* und *Downey*⁸ fanden bei der Mikrobestimmung von Essigsäure in biologischen Flüssigkeiten mit Mikrodiffusionsmethoden, daß durch Zugabe von Natriumsulfat die Tension der Essigsäure erhöht und somit die Destillationszeit verkürzt wird.

Tabelle 2.

Destillat Nr.	Verbrauch ml 0,01-n NaOH	mg CH ₃ COOH gefunden	% der ber. Menge	Ergebnis
2,00 ml 0,01-n CH ₃ COOH				
1.	1,62	0,972	81	1,200 mg Essigsäure gegeben
2.	0,29	0,174	14	1,206 mg gefunden
3.	0,10	0,060	5	+ 0,006 mg Differenz
5,00 ml 0,01-n CH ₃ COOH				
1.	4,47	2,682	89	3,000 mg Essigsäure gegeben
2.	0,39	0,234	8	3,012 mg gefunden
3.	0,16	0,096	3	+ 0,012 mg Differenz
10,00 ml 0,01-n CH ₃ COOH				
1.	8,10	4,860	81	6,000 mg Essigsäure gegeben
2.	1,65	0,990	16	6,012 mg gefunden
3.	0,27	0,162	3	+ 0,012 mg Differenz

Tabelle 3.

Destillat Nr.	Verbrauch ml 0,01-n NaOH	mg CH ₃ COOH gefunden	% der ber. Menge	Ergebnis
0,1 ml 0,2-n CH ₃ COOH				
1.	1,91	1,146	96	1,200 mg Essigsäure gegeben
2.	0,11	0,066	4	1,212 mg gefunden
3.	—	—	—	+ 0,012 mg Differenz
0,25 ml 0,2-n CH ₃ COOH				
1.	4,83	2,898	97	3,000 mg Essigsäure gegeben
2.	0,20	0,120	3	3,018 mg gefunden
3.	—	—	—	+ 0,018 mg Differenz
0,5 ml 0,2-n CH ₃ COOH				
1.	9,08	5,448	91	6,000 mg Essigsäure gegeben
2.	0,96	0,576	9	6,024 mg gefunden
3.	—	—	—	+ 0,024 mg Differenz

geführt, die die Brauchbarkeit der entwickelten Schnellbestimmung unter Beweis stellen. Die erzielte Genauigkeit kann als hinreichend zur Bestimmung der Zahl der vorhandenen Acetylgruppen bezeichnet werden.

Methodik.

Verseifung der Substanz.

Die Substanz wird wie üblich verseift, bzw. der Chromsäureoxydation unterworfen, wobei die von *Wiesenberger*¹ angegebenen Vorschriften zu beachten sind.

Tabelle 4.
Gemische von Acetanilid (A) und Phenacetin (P).

mg Substanz	Verbrauch ml 0,01-n NaOH	% CH ₃ COOH		Differenz %
		berechnet	gefunden	
3,353 A <u>3,786 P</u> 7,139	4,62	27,71	27,84	+ 0,13
2,000 A <u>5,696 P</u> 7,696	4,60	26,07	25,71	- 0,36
5,515 A <u>1,822 P</u> 7,337	5,15	29,92	30,19	+ 0,27
1,458 A <u>4,634 P</u> 6,092	3,80	25,90	26,83	+ 0,93
3,935 A <u>3,282 P</u> 7,217	4,85	28,29	28,91	+ 0,62
3,069 A <u>4,974 P</u> 8,043	5,05	27,03	27,01	- 0,02
3,231 A <u>2,218 P</u> 5,449	3,67	28,67	28,97	+ 0,30
3,161 A <u>3,748 P</u> 6,909	4,40	27,62	27,40	- 0,22
1,609 A <u>3,169 P</u> 4,778	2,99	26,68	26,92	+ 0,24
6,932 A <u>2,477 P</u> 9,409	6,50	29,80	29,72	- 0,08
4,055 A <u>2,165 P</u> 6,220	4,30	29,20	29,74	+ 0,54
4,508 A <u>3,737 P</u> 8,245	5,44	28,31	28,38	+ 0,07
5,548 A <u>2,062 P</u> 7,610	5,30	29,74	29,96	+ 0,22

Destillation der Essigsäure.

Während der Verseifung wird durch den oben beschriebenen Apparat zwecks Reinigung Wasserdampf geleitet. Es ist vorteilhaft, während des Ausdämpfens kurzzeitig die Dampfentwicklung zu unterbrechen — der Dreiweghahn wird so gestellt, daß der Dampf zur Seite entweichen kann — und durch den entstehenden Unterdruck vom Kühlerende her dest. Wasser durch die Apparatur zu saugen. Nach Beendigung des Ausdämpfens wird das Destillationsgefäß mit ausgekochtem dest. Wasser in der Weise gewaschen, daß dieses bei geschlossenem Quetschhahn durch den Trichter in das Destillationsgefäß gegossen wird. Schließt man den Trichter, so wird das Waschwasser aus dem Destillationsgefäß sofort in das Mantelgefäß gesaugt. Man öffnet den Quetschhahn, damit das Waschwasser abfließt.

Nun wird bei offenem Quetschhahn die verseifte bzw. oxydierte Probe, in der sich bereits etwas kaltgesättigte Natriumsulfatlösung befindet, in das Destillationsgefäß eingebracht. Vor der erstmaligen Inbetriebnahme des Destillationsapparates wurde bereits eine Marke angebracht, um mit deren Hilfe das Volumen des Destillationsgutes mit kaltgesättigter Natriumsulfatlösung stets auf 15 ml auffüllen zu können. Ist dies geschehen, so wird der Trichter geschlossen. Man legt ein ausgedämpftes 250-ml-Kölbehen aus Jenaer Glas vor und setzt die Destillation in Gang. Sobald der erste Tropfen Kondensat aus dem Kühler tritt, wird die Zeit festgelegt und genau 10 Minuten destilliert. Die Dampfentwicklung ist vorher schon durch entsprechendes Einstellen des Regelwiderstandes der elektrischen Heizung so festgelegt, daß bei einer Destillationszeit von 10 Minuten stets 100 ml Destillat erhalten werden. Nach Ablauf der 10 Minuten wird das Kühlerende mit sehr wenig ausgekochtem dest. Wasser abgespült und die Destillation durch Umstellung des Dreiweghahnes unterbrochen. Während man das Kölbehen mit dem Destillat zur Seite stellt, wird die Apparatur sofort für die nächste Destillation gereinigt, indem bei noch geschlossenem Quetschhahn ausgekochtes dest. Wasser mehrere Male durch den Trichter in das Destillationsgefäß gegossen wird.

Titration der Essigsäure.

Zum Destillat werden — wie auch bei der Ermittlung des Faktors der Lauge — 6 Tropfen 0,1%iger alkoholischer Phenolphthaleinlösung gegeben und in rascher Tropfenfolge bis zum Auftreten des ersten rosa Farbtones titriert. Sodann wird zu der Flüssigkeit 1 ml 0,01-n Salzsäure gegeben und zur Austreibung der Kohlensäure zum Sieden erhitzt. Vom Eintritt des deutlichen Siedens an wird noch 20 Sekunden lang gekocht. Diese Zeit reicht, wie *Wiesenberger*¹ und auch *Kainz*⁴ durch zahlreiche

Versuche bewiesen haben, vollkommen aus, um sämtliche gelöste Kohlensäure aus der Flüssigkeit zu entfernen, ohne daß Essigsäureverluste auftreten. Der von *Kainz*⁴ empfohlene Kühlfinger kann ebenfalls angewendet werden. Die noch heiße Lösung wird mit 0,01-n Natronlauge bis zum Auftreten der ersten, mindestens 30 Sekunden bestehen bleibenden Rosafärbung rücktitriert. Für die richtige Erkennung des Endpunktes der Titration ist es gerade bei Verwendung von Phenolphthalein als Indikator nicht unwichtig, welche Beleuchtung man verwendet. Außerdem spielt auch die Farbe des Hintergrundes, vor welchem man den Titrationsverlauf beobachtet, eine Rolle. Sämtliche Titrationsverfahren werden daher, gleichgültig zu welcher Tageszeit, stets bei gleicher Beleuchtung und gleichem Hintergrund durchgeführt. Nach Abzug des Blindwertes erfolgt die Berechnung nach der Formel:

$$\% \text{ Acetylgehalt} = \frac{\text{ml } 0,01\text{-n NaOH} \cdot 0,4302 \cdot 100}{\text{mg Einwaage}}$$

Bestimmung des Blindwertes.

Um einen möglichst geringen Blindwert zu erzielen, ist es wichtig, an die Reinheit aller Reagenzien und des dest. Wassers die höchsten Anforderungen zu stellen. Zur Ermittlung des Blindwertes führt man die Verseifung und die anschließende Destillation unter den gleichen Bedingungen durch, wie sie bei der Acetylbestimmung vorliegen, aber ohne Substanz.

Zusammenfassung.

Es wird eine Schnellmethode zur quantitativen Bestimmung der bei der Verseifung von Acetylverbindungen bzw. bei der Oxydation C-methylierter Substanzen gebildeten Essigsäure beschrieben. Unter Verwendung eines modifizierten Mikro-Kjeldahl-Apparates nach *Parnas-Wagner* kann die Essigsäure quantitativ innerhalb von 10 Minuten mit Wasserdampf aus der verseiften bzw. oxydierten Probelösung abdestilliert werden. Sie wird dann im Destillat mit 0,01-n Natronlauge titriert. Die Abweichung der so erhaltenen Analysenwerte von den theoretisch berechneten beträgt maximal $\pm 1\%$.

Summary.

A rapid method is described for the quantitative determination of the acetic acid formed by the saponification of acetyl compounds or in the oxidation of C-methylated substances. By using the *Parnas-Wagner* modification of the micro *Kjeldahl* apparatus, the acetic acid can be quantitatively distilled off within 10 minutes with steam from the saponified or oxidized test solution. It is then titrated in the distillate with 0.1 N sodium hydroxide. The deviation of the results obtained from the theoretically calculated figures is $\pm 1\%$ at the maximum.

Résumé.

On décrit une méthode rapide pour le dosage de l'acide acétique formé par saponification des composés acétylés ou par oxydation des substances C-méthylées. Par emploi d'un appareil de micro-Kjeldahl modifié d'après *Parnas et Wagner*, l'acide acétique peut être éliminé quantitativement par distillation à l'aide de la vapeur d'eau en moins de 10 minutes à partir de la solution saponifiée ou oxydée. On titre alors l'acide dans le distillat avec de la lessive de soude 0,01 N; les écarts entre les valeurs calculées et mesurées se montent au maximum à $\pm 1\%$.

Literatur.

¹ *E. Wiesenberger*, Mikrochem. **33**, 51 (1947); daselbst Literaturangaben über alle vorher veröffentlichten Methoden.

² *F. A. Hoppe-Seyler*, Mikrochem. **10**, 446 (1931/32); *J. K. Parnas* und *R. Wagner*, Biochem. Z. **125**, 253 (1921); *J. K. Parnas*, Z. analyt. Chem. **114**, 261 (1938).

³ *E. J. Conway* und *M. Downey*, Biochem. J. **47**, IV (1950).

⁴ *G. Kainz*, Mikrochem. **35**, 89 (1950).