

### 237. Ludwig Kofler und Maria Brandstätter: Zur Beurteilung der Reinheit organischer Substanzen, die unter Zersetzung schmelzen.

[Aus d. Pharmakognost. Institut d. Universität Innsbruck.]

(Eingegangen am 15. September 1941.)

Vor kurzem wurde über die Reinheitsprüfung organischer Substanzen mit Hilfe der Schmelzpunkt-Mikrobestimmung berichtet<sup>1)</sup>. Die dort beschriebenen, besonders empfindlichen Beobachtungen an erstarrten Schmelzen und die Bestimmungen im „Gleichgewicht“ sind bei Substanzen, die unter Zersetzung schmelzen, nicht durchführbar. Hier bleibt nur die Möglichkeit, auf das vorzeitige Schmelzen einzelner Teilchen zu achten. Aber auch diese Beobachtungen sind manchmal unsicher oder undurchführbar, wenn die Substanz sich schon vor dem eigentlichen Schmelzen zu zersetzen oder stark zu verflüchtigen beginnt.

Wir ziehen daher noch ein weiteres einfaches Verfahren heran, das in vielen Fällen auch bei zersetzlichen Substanzen eine Reinheitsprüfung ermöglicht. Man mischt zu der Substanz eine geeignete Testsubstanz und bestimmt auf dem Mikro-Schmelzpunktapparat die eutektische Temperatur<sup>2)</sup>. Ist die Untersuchungssubstanz rein, so beobachtet man den Beginn des Schmelzens bei der für das Gemisch charakteristischen eutektischen Temperatur, bei Unreinheit liegt der Schmelzbeginn tiefer.

Auf dem Heizmikroskop läßt sich die eutektische Temperatur von Zwei-, Drei- und Mehrstoffgemischen leicht und sicher feststellen<sup>3)</sup>. Bei Zweistoffgemischen genügt das Vorhandensein von nur 1%, häufig sogar von  $\frac{1}{2}$  oder  $\frac{1}{4}$ % der einen Komponente, um die eutektische Temperatur beobachten zu können<sup>1)</sup>.

Wir haben nun Versuche durchgeführt, um festzustellen, welcher Zusatz von einer Komponente bei Dreistoffgemischen noch ausreicht, um die ternäre eutektische Temperatur erkennen zu lassen. Zunächst gingen wir von einem unzersetzt schmelzenden Stoff aus, und zwar vom Naphthalin puriss. cryst. pro us. int. von Merck, das sich uns als verhältnismäßig rein erwiesen hatte<sup>1)</sup> und das „im Gleichgewicht“ einen Schmelzpunkt von 81° aufwies. Mischungen dieses Naphthalins mit 1%,  $\frac{1}{2}$ % und  $\frac{1}{4}$ %  $\alpha$ -Naphthol wurden auf dem Heizmikroskop untersucht. Bei 1- und  $\frac{1}{2}$ -proz. Mischungen war der Schmelzbeginn deutlich bei 59°, das ist bei der eutektischen Temperatur des Gemisches Naphthalin +  $\alpha$ -Naphthol, zu erkennen. Bei  $\frac{1}{4}$ -proz.  $\alpha$ -Naphtholzusatz war der Schmelzbeginn nur undeutlich bei etwa 60° zu sehen.

Als Testsubstanz zogen wir Azobenzol heran und bestimmten zunächst die eutektische Temperatur von Naphthalin und Azobenzol mit 41° und die ternäre eutektische Temperatur von Naphthalin,  $\alpha$ -Naphthol und Azobenzol mit 34°. Eine Beimengung von  $\alpha$ -Naphthol zum Naphthalin muß sich also dadurch zu erkennen geben, daß das verunreinigte Naphthalin im Gemisch mit Azobenzol bei 34° zu schmelzen beginnt. Es galt nun festzustellen, welche Mengen von  $\alpha$ -Naphthol sich im Naphthalin auf diese Weise noch erkennen lassen. Zu diesem Zweck versetzten wir die Naphthalin- $\alpha$ -Naphthol-Mischungen mit ungefähr 25% Azobenzol. Bei 1-,  $\frac{1}{2}$ - und  $\frac{1}{4}$ -proz. Naphtholgehalt sieht man bei 34° den Schmelzbeginn, und zwar ist er bei 1- und  $\frac{1}{2}$ -proz. Gehalt sehr gut bzw. gut und bei  $\frac{1}{4}$ -proz. eben noch erkennbar.

<sup>1)</sup> A. Kofler u. L. Kofler, B. 74, 1394 [1941].

<sup>2)</sup> L. Kofler u. A. Kofler, Angew. Chem. 53, 434 [1940].

<sup>3)</sup> L. Kofler u. M. Brandstätter, Angew. Chem. 54, 322 [1941].

Bei dem mit  $\frac{1}{4}$ -proz.  $\alpha$ -Naphthol versetzten Naphthalin ist im Gemisch mit Azobenzol die ternäre eutektische Temperatur eher besser zu sehen als ohne Azobenzolzusatz die binäre eutektische Temperatur. Bei derartig geringen Zusätzen muß man während der Beobachtung den Objektträger auf dem Heizztisch verschieben, weil nicht in jedem mikroskopischen Gesichtsfeld Schmelztropfen auftreten.

Was am Beispiel einer unzersetzt schmelzenden Substanz gezeigt wurde, gilt im allgemeinen auch für die unter Zersetzung schmelzenden Substanzen. Hier ist diese Art der Reinheitsprüfung deswegen von besonderem Wert, weil der Schmelzpunkt der Substanz als solcher wenig oder keine Auskunft über den Reinheitsgrad zu geben vermag.

Im folgenden sind einige Beispiele angeführt. Die zersetzliche Substanz, die geprüft werden soll, wird als Hauptsubstanz bezeichnet. Von ihr ist als Schmelzpunkt das Temperaturintervall vom deutlichen Beginn des Schmelzens bzw. der Zersetzung bis zum vollständigen Schmelzen angeführt. Alle diese Angaben beziehen sich auf unsere bei der Schmelzpunkt-Mikrobestimmung übliche Arbeitsweise, wobei der Temperaturanstieg im Bereich des Schmelzpunktes ungefähr  $4^{\circ}$  in der Minute beträgt<sup>4)</sup>. Bei jedem Beispiel ist die eutektische Temperatur (E. T.) des Gemisches der Hauptsubstanz mit der Substanz angegeben, die dann als Verunreinigung zugesetzt werden soll; ferner die eutektische Temperatur des Gemisches der Hauptsubstanz mit der Testsubstanz. Bei dem Beispiel des Jodoforms bedeutet also „E. T. mit Pikrinsäure  $115^{\circ}$ “ die eutektische Temperatur des Gemisches von Jodoform mit Pikrinsäure. Endlich ist bei jedem Beispiel als „Tern. E.“ die eutektische Temperatur des ternären Gemisches der Hauptsubstanz (Jodoform) mit der Verunreinigung (Pikrinsäure) und mit der Testsubstanz (Acetanilid) beigefügt. Der Hauptsubstanz wurden dann 2% oder 1% oder weniger von der Verunreinigung zugemischt und auf dem Heizmikroskop der Beginn und das Ende des Schmelzens verfolgt. Dann wurde dieser verunreinigten Hauptsubstanz nach dem Augenmaß etwa 25% Testsubstanz beigemischt und der Beginn des Schmelzens beobachtet. Wenn genügend von der Verunreinigung vorhanden ist, erfolgt der Schmelzbeginn bei der eutektischen Temperatur des ternären Gemisches. Bei weiterem Erhitzen sieht man keine oder nur eine geringe Zunahme der Schmelztropfen, bis dann ein wesentlich stärkeres Schmelzen erfolgt, wenn die binäre eutektische Temperatur des Gemisches der Hauptsubstanz mit der Testsubstanz erreicht ist. In der folgenden Zusammenstellung bezeichnen wir diese Temperatur als „Schub“.

Wenn bei einem Zwei- oder Dreistoffgemisch von der einen Substanz nur sehr wenig vorhanden ist, aber doch so viel, daß der Schmelzbeginn bei der eutektischen Temperatur eben wahrnehmbar ist, so beobachtet man bei weiterem Steigen der Temperatur häufig nicht nur keine Zunahme der Schmelze, sondern sogar eine Abnahme. An sich müßte mit steigender Temperatur die Schmelze an Menge etwas zunehmen. Dem wirkt aber häufig die Flüchtigkeit entgegen, indem aus den wenigen kleinen Schmelztröpfchen eine oder auch zwei Substanzen sich verflüchtigen, so daß dann mit steigender Temperatur die Schmelztropfen ganz verschwinden. Bei Vorhandensein geringer Mengen von Verunreinigung ist es infolgedessen wichtig, das Präparat während

<sup>4)</sup> L. Kofler, Mikroskopische Methoden zur Identifizierung organischer Substanzen. Beiheft zur Ztschr. d. VDCh, Nr. 36 [1940].

des Erhitzens unter dem Mikroskop ständig zu beobachten, um die eutektische Temperatur nicht zu übersehen.

#### Jodoform.

Schmp. 122—123°, E. T. mit Pikrinsäure 115°, E. T. mit Acetanilid 102°, Tern. E. 70°.

+1% Pikrinsäure: Schmp. 122—123°, E. T. 115°, Tern. E. mit Acetanilid 70°, Schub 100°.

+ $\frac{1}{4}$ % Pikrinsäure: Schmp. 122—123°, E. T. 115°, Tern. E. mit Acetanilid 70°, Schub 100°.

+ $\frac{1}{4}$ % Pikrinsäure: Schmp. 122—123°, E. T. 115° schlecht zu sehen wegen starker Sublimation. Tern. E. mit Acetanilid 70° deutlich, Schub 101°.

#### Thiosalicylsäure.

Schmp. 163—166°, bei weiterem Erhitzen bilden sich in zunehmendem Maße Nadeln, E. T. mit Salicylsäure 130°, E. T. mit Acetanilid 88°. Tern. E. 74°.

+2% Salicylsäure: Schmp. 163—166°, E. T. infolge starker Sublimation nicht zu sehen, Tern. E. mit Acetanilid 74°, Schub 86°.

+1% Salicylsäure: Schmp. 163—166°, E. T. nicht zu sehen, Tern. E. mit Acetanilid 74°, Schub 86°.

#### Phenanthrenchinon.

Schmp. 204—208°, E. T. mit Phenanthren 88°, E. T. mit Benzil 90°, Tern. E. 59°.

+2% Phenanthren: Schmp. 204—208°, E. T. bei 90° schwach zu sehen. Tern. E. mit Benzil 60°, Schub 89°.

+1% Phenanthren: Schmp. 204—208°, E. T. nicht zu sehen, Tern. E. mit Benzil 60°, Schub 90°.

E. T. mit Anthrachinon 192°, E. T. mit Salophen (= Acetyl-*p*-aminosalol) 160°, Tern. E. 155°.

+2% Anthrachinon: Schmp. 202—206°, E. T. 192°, Tern. E. mit Salophen 155°, Schub 160°.

+1% Anthrachinon: Schmp. 203—207°, E. T. 192°, Tern. E. mit Salophen 155°, Schub 160°.

#### *symm.* Di-*p*-tolyl-sulfoharnstoff.

Schmp. 184—190°, E. T. Sulfoharnstoff 174°, E. T. mit Salophen 167°, Tern. E. 158°.

+2% Sulfoharnstoff: Schmp. 180—183°, E. T. 174° schwach, Tern. E. mit Salophen 158°.

+1% Sulfoharnstoff: Schmp. 181—183°, E. T. 174° sehr schwach, Tern. E. mit Salophen 158°.

Das Jodoform schmilzt bei 122—123° unter Zersetzung. Bei Jodoform mit 1-proz. Pikrinsäure-Zusatz erfolgt bei 115° Schmelzen des Eutektikums. Der Vorgang ist aber infolge starker Sublimation nicht deutlich zu sehen. Ein großer Teil des Jodoforms ist nämlich bei dieser Temperatur schon an die Unterseite des Deckglases sublimiert. Das Schmelzen des Eutektikums ist nicht in den Sublimaten, sondern nur in der noch nicht sublimierten Substanz auf dem Objektträger zu sehen. Die Beobachtung dieser Substanz ist aber durch die dichten an der Deckglasunterseite liegenden Sublimatete erschwert. Die Ursache, weshalb in den Sublimaten selbst kein Schmelzen des Eutektikums erfolgt, ist darin zu suchen, daß die Pikrinsäure viel weniger flüchtig ist als das Jodoform. Dagegen sieht man mit Acetanilid als Testsubstanz den Schmelzbeginn bei der ternären eutektischen Temperatur von 70° sehr deutlich. Bei weiterem Erhitzen nimmt die Schmelze ständig zu, bei 100° setzt ein stärkerer Schub ein, entsprechend dem binären Eutektikum von Jodoform mit Acetanilid.

Ähnlich verhält sich Jodoform mit  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{4}$ % Pikrinsäure-Zusatz, nur ist hier das binäre Eutektikum noch undeutlicher zu sehen. Das ternäre Eutektikum dagegen

ist auch bei  $\frac{1}{4}\%$  Pikrinsäure in seinem Beginn bei  $70^\circ$  zu erkennen und dann bei etwa  $80^\circ$  immer deutlicher. Bei  $101^\circ$  erfolgt ein Schub.

Beim Beispiel der Thiosalicylsäure ist sogar bei 2-proz. Salicylsäure-Zusatz das eutektische Schmelzen infolge starker Sublimation nicht zu erkennen, während mit Acetanilid als Mischsubstanz das ternäre Eutektikum bei 2% und 1% Salicylsäure-Zusatz zu erkennen ist.

Nicht jede Testsubstanz ist in gleicher Weise geeignet. Während z. B. die Beimengung von 2% oder 1% Salicylsäure zur Thiosalicylsäure an der ternären eutektischen Temperatur mit Acetanilid gut zu erkennen ist, ist mit Salophen (Acetyl-*p*-aminosalol) die ternäre eutektische Temperatur auch bei 2% Salicylsäure kaum zu sehen. Im allgemeinen versucht man zunächst Testsubstanzen, deren Schmelzpunkte etwa gleich hoch oder bis etwa  $20^\circ$  niedriger liegen als die Hauptsubstanz. Bestehen durch Beobachtung von frühem vorzeitigem Schmelzen oder aus anderen Gründen Anhaltspunkte dafür, daß niedrig schmelzende Verunreinigungen vorhanden sind, so versucht man eine entsprechend niedrig schmelzende Testsubstanz. Da ein einzelner Versuch in wenigen Minuten durchführbar ist, empfiehlt es sich, bei einer Reinheitsprüfung mehrere Testsubstanzen nacheinander heranzuziehen.

Unreinheit einer Substanz verrät sich bei der Beobachtung mit einer Testsubstanz häufig auch ohne Kenntnis der eutektischen Temperatur des reinen Gemisches. Schon oben wurde erwähnt, daß man bei der ternären eutektischen Temperatur den Schmelzbeginn sieht, daß dann bei weiterem Erhitzen oft zunächst keine oder nur eine geringe Zunahme der Schmelztropfen erfolgt, und daß dann ein starker „Schub“ zu sehen ist, sobald die eutektische Temperatur des Gemisches der Hauptsubstanz mit der Mischsubstanz erreicht ist. Wenn man einen solchen Schub beobachtet, so spricht dies für das Vorhandensein von Verunreinigungen. Umgekehrt darf man aber das Ausbleiben eines Schubs nicht als sicheren Beweis für die Reinheit einer Substanz werten.

Die Anwendung des Verfahrens ist dann am einfachsten, wenn man eine Substanz einmal in reinem Zustande in Händen und damit die Möglichkeit hatte, die eutektische Temperatur der reinen Substanz mit der Testsubstanz festzustellen. Man kann dann verlangen, daß z. B. ein aus dem Handel bezogenes oder ein als Heilmittel dienendes Präparat mit einer bestimmten Testsubstanz nicht unterhalb der einmal festgestellten eutektischen Temperatur zu schmelzen beginnt.

Bei einer zum erstenmal aus der Natur oder synthetisch gewonnenen Substanz, die unter Zersetzung schmilzt, kann man die Mikromethoden sehr gut zur Kontrolle des Erfolges von Reinigungsmaßnahmen verwenden. Zunächst prüft man, ob durch die Reinigung der Schmelzbeginn der unvermischten Substanz ein höherer wird. Dann prüft man mit einer Testsubstanz, ob man einen „Schub“ erkennt. Vor allem aber achtet man darauf, ob durch die Reinigungsmaßnahmen der Beginn des Schmelzens im Gemisch mit einer Testsubstanz später einsetzt. Genau so, wie man bei unzersetzt schmelzenden Substanzen eine Erhöhung des Schmelzpunktes als Zeichen der zunehmenden Reinheit betrachtet, so werten wir hier eine Erhöhung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz als Beweis für die fortschreitende Reinigung.