

Avec un collecteur automatique de fractions, l'élu-tion peut se faire pendant la nuit; suivant l'opérateur, une analyse complète demande 2 à 3 heures de travail effectif.

Notes. Si l'on veut augmenter le poids de la prise et de l'adsorbant, tout en conservant l'allure du chromatogramme, il faut diminuer la quantité relative d'adsorbant. — On peut préparer d'avance une certaine quantité d'adsorbant que l'on conservera dans un flacon bien bouché.

Tableau 2.

Dosage de l'isomère γ dans un mélange $\alpha + \gamma + \delta$.

Prise mg	% γ réel	% γ trouvé	Erreur rel. %
201	26,4	26,9	1,9
202	25,8	25,3	1,9
223	35,5	36,3	2,2
216	32,4	32,4	0
450	44,4	44,0	0,9
468	55,6	56,6	1,8
505	51,0	50,3	1,4

Tableau 3.

Dosage de l'isomère γ dans un mélange industriel.

N ^o	Prise mg	% γ non corr.	% γ corr.	% écart de la moyenne
A	1551	13,4	13,0	0,8
	1305	13,1	12,7	1,6
	1700	13,4	12,9	0
B	1472	15,5	15,0	0,7
	1545	15,7	15,2	0,7
C	1426	15,8	15,4	—

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur *H. Goldstein* et à Monsieur le Dr *R. Jaumin* pour l'intérêt bienveillant qu'ils ont porté à ce travail.

RÉSUMÉ.

Nous décrivons une méthode de dosage du γ -hexachlorocyclohexane par chromatographie sur charbon actif. Ce procédé est plus avantageux que la méthode au gel de silice, spécialement en ce qui concerne la commodité et la reproductibilité.

Lausanne, Laboratoire de Chimie organique de l'Université.

155. Modifikation der C-Methylbestimmungsmethode bei Verwendung kleinster Substanzmengen

von C. F. Garbers, H. Schmid und P. Karrer.

(6. V. 54.)

Die C-Methylbestimmungen nach *Kuhn-Roth* erfordern bei Anwendung der Mikrotechnik¹⁾ etwa 3 bis 20 mg Substanz. Da wir vor das Problem gestellt waren, mit wesentlich geringeren Substanzmengen solche Bestimmungen ausführen zu müssen, haben wir versucht, die Methode solchen Bedürfnissen anzupassen und zu modifizieren.

Die Abänderung beruht darauf, dass man die bei der Oxydation entstandene Essigsäure nach dem Abdestillieren nicht titriert, son-

¹⁾ Vgl. *Pregl*, Quant. Org. Analyse (1935), Seite 235.

dern papierchromatographisch bestimmt. In dieser Weise lassen sich ca. 50 γ Essigsäure noch recht genau ermitteln, und für die C—CH₃-Bestimmung sind daher 0,2–0,4 mg Substanz ausreichend. Die einzige, aber überwindbare Schwierigkeit der Methode besteht darin, alle Gefässe und Reagenzien (insbesondere das Chromtrioxyd) so zu reinigen, dass die Blindwerte der Bestimmungen möglichst tief ausfallen; diese sollten nicht grösser als ca. 5 γ Essigsäure sein, was bei einiger Sorgfalt unschwer erreichbar ist.

Im folgenden beschreiben wir die Reinigung des Chromtrioxyds, die Bestimmung des Blindwertes und ein Beispiel einer C—CH₃-Bestimmung mittels des modifizierten Verfahrens. Es handelt sich bei diesem Beispiel um die Bestimmung des C—CH₃ in der „Säure B“, welche wir kürzlich als Abbauprodukt des Vitamins B₁₂ beschrieben hatten¹).

Die hier beschriebene Methode ist eine relative Essigsäurebestimmung; sie könnte aber unschwer zu einer absoluten entwickelt werden.

Experimentelles.

1. Vorbereitung des Chromtrioxyds. 22,33 g Chromtrioxyd werden in 166 ml Wasser (doppelt destilliert) gelöst, worauf man nach eintägigem Stehen diese Lösung durch eine engporige Glassinternutsche filtriert. Unter Eiskühlung wird sie hierauf mit 42 ml Schwefelsäure versetzt und anschliessend 16 Std. unter Rückfluss gekocht. Dann werden unter Beibehaltung eines konstant bleibenden Flüssigkeitsvolumens 350 ml Wasser abdestilliert. Hierauf schliesst man das Gefäss an den C—CH₃-Apparat an und destilliert unter Konstanthalten des Volumens 25 ml Wasser ab. Dieses Destillat prüft man auf Essigsäure. Dazu dient die in Acta Chem. Scand. 7, 87 (1953) beschriebene Methode. Das Destillat von 25 ml enthält ca. 5 γ Essigsäure. Reagenzien: Chromsäure reinst z. Analyse Merck, Schwefelsäure $d = 1,84$, reinst Merck.

2. Durchführung der Oxydation²). a) *Bestimmung des Blindwertes.* 1 ml der Chromschwefelsäure wird in das Kölbchen des Kohlenstoffmethyl-Bestimmungsapparates eingeführt und dazu ein Platintetraeder gegeben. Anschliessend erhitzt man unter Rückfluss 1 Std. Nach der Oxydation wird das Kölbchen abgekühlt, in Eiswasser gestellt und der Kühler mit 4 ml Wasser ausgespült. Darauf wird das Kölbchen vorsichtig vom Kühler gelöst und der Schliff mit 2 ml Wasser gewaschen. Dann spült man den Kölbchenschliff mit 1 ml Wasser ab und gibt das zweite Platintetraeder hinzu. Das Kölbchen wird hierauf an den absteigenden Kühler angeschlossen.

Nachdem 6 ml Wasser abdestilliert worden sind, werden 2 ml Wasser zugegeben und wiederum abdestilliert. Dieses Verfahren wiederholt man, bis sich 25 ml Destillat angesammelt haben. Das Destillat überträgt man in ein 100-ml-Schliffkölbchen und versetzt es mit einer karbonatfreien Kaliumhydroxydlösung, bis ein Tröpfchen der neutralisierten Lösung Rotfärbung des empfindlichen Phenolphthaleinpapiers hervorruft. Diese Lösung wird dann im Vakuum unter N₂ zur Trockene eingedampft.

Den Rückstand löst man in 0,3 ml Wasser und filtriert diese Lösung durch eine Säule von 0,5 cm Durchmesser und 4 cm Höhe von Dowex 50 (mit Wasserstoffionen beladene, gut ausgewaschene Form). Sobald die Lösung eingesickert ist, wird das Kölbchen mit 0,6 ml Wasser ausgespült, dieses auf die Adsorptionssäule gegossen und letztere schliesslich

¹) H. Schmid, A. Ebnöther & P. Karrer, Helv. 36, 65 (1953).

²) Literatur: Mikrochemie 33, 51 (1948); B. 66, 1274 (1933); Pregl, Quant. Org. Analyse (1935), Seite 235. Die Oxydation der Substanz geschah im wesentlichen nach den Angaben von E. Wiesenberger, Mikroch. 33, 51 (1948).

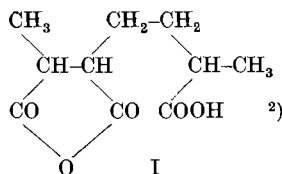
mit 0,6 ml Wasser nachgewaschen. Zum Filtrat gibt man 0,2 ml einer 25-proz. Äthylaminlösung. Diese Lösung wird auf dem Wasserbad von 30–40° im Vakuum bis auf 1–2 Tropfen eingengt und der Rückstand mit einer Kapillare vor dem Föhn auf Papier aufgetragen. Nachher wird das Kölbchen mit wenig Methanol ausgespült, diese Flüssigkeit ebenfalls auf das Papier aufgetragen und chromatographiert. Als mobile Phase diente mit Wasser gesättigtes Butanol; die im Zylinder vorhandene Dampfphase bestand aus mit Wasser gesättigtem Butanol, das so viel Äthylamin enthielt, dass die Lösung 0,025-n. war. Als Papier diente *Whatman* Nr. 1. Blindwert 5 γ Essigsäure.

Auch wenn man z. B. 1,2 mg Bernsteinsäure oxydiert, fällt der Blindwert nicht höher aus (ca. 5 γ Essigsäure) und kann daher vernachlässigt werden.

Die C-CH₃-Bestimmung wird in ähnlicher Weise durchgeführt.

Je nach der Anzahl der C-CH₃-Gruppen benutzt man 0,2–0,4 mg Substanz. Es sollen sich bei der Oxydation ca. 50 γ Essigsäure bilden. Weiterhin ist zu beachten, dass beim Auftragen der Lösung auf das Papier die Fleckengrösse immer annähernd gleich ist. Unter diesen Bedingungen ist die Grösse der nach der Entwicklung des Chromatogramms erhaltenen Flecken der Menge Essigsäure proportional. In der vorliegenden Untersuchung haben wir die Lösung so aufgetragen, dass die Flecken beim Startpunkt 0,9 cm Durchmesser hatten.

b) Die Bestimmung der Zahl der C-CH₃-Gruppen in „Säure B“⁽¹⁾. Einwage: 0,405 mg Säure-B-anhydrid (C₁₀H₁₄O₅). C-CH₃-Bestimmung positiv. Für die quantitative Auswertung wurden als Vergleichssubstanzen 0,226 mg einer Säure C₁₀H₁₄O₅ folgender Konstitution und 0,221 mg Methylbernsteinsäure oxydiert und in ähnlicher Weise aufgearbeitet.



Wenn man annimmt, dass in Säure B nur eine C-CH₃-Gruppe vorhanden ist, so müssen die Mengen Essigsäure, welche sich aus den drei verschiedenen Säuren bilden, im folgenden Verhältnis stehen:

Säure B: C₁₀H₁₄O₅ (I): Methylbernsteinsäure = 1,0:1,13:0,92. Gefunden aus der Fleckengrösse bzw. dem Fleckengewicht das Verhältnis 1:1,12:0,99. Daraus geht hervor, dass Säure B sehr wahrscheinlich nur eine C-CH₃-Gruppe enthält.

Die weitere Bearbeitung der Säure B hat ergeben, dass es sich um eine Tricarbonsäure handelt, die der Zusammensetzung C₁₀H₁₆O₆ entspricht. Darüber soll später ausführlich berichtet werden.

Zusammenfassung.

Die C-Methylbestimmungsmethode nach *Kuhn-Roth* wird in der Weise abgeändert, dass die entstandene Essigsäure papierchromatographisch relativ bestimmt wird. Dadurch gelingt es, die C-Methylbestimmungen mit 0,2–0,4 mg Substanz auszuführen.

Die Methode fand u. a. Anwendung für die C-Methylbestimmung in der „Säure B“, einem Abbauprodukt des Vitamins B₁₂.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ Helv. **36**, 65 (1953).

²⁾ Helv. **17**, 614 (1934). Herrn Prof. *L. Ruzicka* danken wir verbindlichst für eine Probe dieser Substanz.