

Mengen verhältnismäßig gering, so daß die Rohstoffbasis fehlte, um eine großtechnische Anlage zu erstellen. Nunmehr steht aber einer weiten betriebsmäßigen Ausdehnung des Verfahrens nichts mehr im Wege, da man in Zukunft Paraffin in steigenden Mengen als Nebenprodukt bei den neuen Treibstoffanlagen nach dem I. G.-Tief temperaturhydrier- und dem Fischer-Tropsch-Verfahren erhalten wird.

Aus diesen Gründen ist geplant, noch weitere Großanlagen für die Fettsäuresynthese zu errichten.

Nie aber wollen wir vergessen, daß die volkswirtschaftliche Ausnutzung des Verfahrens erst unter der nationalsozialistischen Regierung Adolf Hitlers möglich war. Wir wollen auch an dieser Stelle hierfür unserem Führer unsere tiefste Dankbarkeit zum Ausdruck bringen.

[A. 51.]

## Tierversuch oder chemische Bestimmung des Vitamins C

### Über einen neuen Apparat zur Bestimmung des Vitamins C

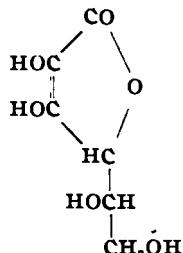
Von Dr. M. OTT

Aus dem Laboratorium für Sonderuntersuchungen der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Darmstadt.

Direktor: Dozent Dr. L. Schmitt.

Eingeg. 23. Mai 1938

Die Eigenart in der analytischen Erfassung der Vitamine liegt darin begründet, daß ihre erste Definition keine chemische, sondern eine medizinische, oder zumindest eine physiologische war. Bei der ganzen Entwicklung hat sich die Zusammenarbeit von medizinischer Forschung, Tierversuch und chemischer Arbeit als so fruchtbar erwiesen, daß sie für die weitere Forschung auf diesem Gebiete bestimmt nie wieder aufgegeben werden kann. Dagegen scheint es, daß zur mengenmäßigen Ermittlung der bekannten Vitamine in der Nahrung die chemische Bestimmung dem Tierversuch bald den Rang abgelaufen haben wird. Daß dies aber nur mit strenger Kritik und unter Beachtung einer ganzen Reihe von Faktoren unbedenklich geschehen darf, sei im folgenden am Beispiel des Vitamins C ausgeführt, das chemisch als Ascorbinsäure



definiert ist.

Wie aus seiner Struktur hervorgeht, ist es den Zuckern verwandt und besitzt ein sehr hohes Reduktionsvermögen. Es ist also Oxydationsreaktionen in sehr hohem Maße ausgesetzt. Das erschwert seine quantitative chemische Erfassung ganz ungeheuer. Schon die gewöhnliche Art der Zerkleinerung von pflanzlichen Nahrungsmitteln muß unweigerlich zu einer weitgehenden Zerstörung dieses Vitamins führen, zumal bereits geringste Mengen Eisen oder Kupfer die Oxydation mit Hilfe von in der gleichen Pflanze vorhandenen Fermenten enorm beschleunigen. Doch auch unter möglichster Beachtung und Ausschaltung dieser technischen Schwierigkeit besteht z. T. eine sehr schlechte Übereinstimmung zwischen der chemisch erfaßten Ascorbinsäure und der Vitamin-C-Wirksamkeit verschiedener Nahrungsmittel. Eine vergleichende Aufstellung von Ergebnissen aus dem Tierversuch und durch die chemische Bestimmung (nach Tillmans) gibt die nebenstehende Tabelle<sup>1)</sup>.

Die chemisch erhaltenen Zahlen liegen also z. T. beträchtlich über den im Tierversuch erhaltenen Werten, zum anderen Teil ebenso beträchtlich darunter.

<sup>1)</sup> Aus W. Stepp u. H. Schröder, Über den Antagonismus der Vitamine und seine Bedeutung für die Vitamintherapie. Klin. Wschr. 15, 548 [1936].

Tabelle.

Vitamin-C-Gehalt von Nahrungsmitteln, chemisch (Tillmans) und biologisch (v. Hahn) bestimmt. (Die Angaben für ME [Meerschweinchen-Einheit] beziehen sich auf 100 g Substanz.)

Nahrungsmittel	Tillmans ME	v. Hahn ME
Himbeere .....	35	50
Stachelbeere .....	50—65	50
Apfel .....	10—20	10—12
Pflaume .....	10—20	10
*Grünkohl .....	210—290	150
*Rosenkohl .....	235	100
*Spinat .....	60	16
*Tomate .....	60—70	20—50
*Kohlrübe .....	65	33
*Karotten .....	35	10
Apfelsine .....	110—115	200
Zitrone .....	100—110	200
Mandarine .....	15—70	50

\* Enthalten deutliche Mengen Vitamin A bzw. Provitamin in Form des Carotins neben Vitamin C.

Zur Erklärung der zu hohen chemischen Werte müssen zwei Möglichkeiten herangezogen werden:

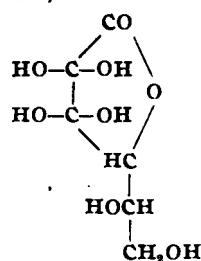
1. Es gibt für die Bestimmung der Ascorbinsäure bisher noch keine spezifische Reaktion, sondern nur Oxydationsreaktionen, vor allem mit 2,6-Dichlorphenol-Indophenol, Methylenblau und Phosphor-Wolframsäure. Dadurch ist es schwer, andere reduzierende Stoffe sicher auszuschließen. Als solche kommen vor allem Schwefelverbindungen, wie Thiosulfat, Cystein, Ergothionein, Glutathion und außerdem noch Karamell in Frage. In frischen Nahrungsmitteln sind davon allerdings nur Cystein, Ergothionein und Glutathion in Betracht zu ziehen, und zwar außer in tierischen Produkten u. U. noch in Kohlarten, Spinat, Spargel u. a. Diese Stoffe können also z. T. die zu hohen Werte erklären. Sie können bei der Methode mit Phosphor-Wolframsäure durch Monojodessigsäure unwirksam gemacht werden; bei der Titration mit Dichlorphenol-Indophenol stört das Glutathion dann nicht, wenn die Bestimmung — wie heute fast durchweg — in stark saurer Lösung vorgenommen wird. Die beiden anderen Stoffe geben sich dem erfahrenen Analytiker durch ein langsames Verblassen des Farbstoffes zu erkennen.

2. Nach Stepp u. Mitarb. üben verschiedene Vitamine aufeinander eine beeinträchtigende — oder vielleicht richtiger gesagt — ausgleichende Wirkung aus. So wurde z. B. beobachtet, daß die B-Vitamine eine schädliche Überdosierung der Vitamine A und D auszugleichen vermögen. In ähnlicher Weise beeinträchtigt Vitamin A die Wirkung verabreichten C-Vitamins. Man muß demnach annehmen, daß diejenigen Nahrungsmittel, die verhältnismäßig bedeutende Mengen Vitamin A oder dessen Vorstufe Carotin enthalten, eine geringere antiskorbutische Wirksamkeit zeigen, als ihrem tatsächlichen Gehalt an Ascorbinsäure entspricht. Stepp erklärt die Unstimmigkeiten in der angeführten Tabelle vor allem mit dieser Annahme.

Für die Erklärung der zu niedrigen chemischen Werte müssen ebenfalls zwei Möglichkeiten beachtet werden.

1. Durch bestimmte Fermente kann die Oxydation der Ascorbinsäure — wie schon erwähnt — so schnell vor sich gehen, daß es fast unmöglich ist, in der rohen Frucht den wirklichen Ascorbinsäuregehalt festzustellen. Durch kurzes Dämpfen (im natürlichen Zustand, d. h. ungeschält usw. und unzerkleinert) werden die betreffenden Fermente zerstört und der biologische Zustand stabilisiert.

2. In vielen Pflanzen kann außer der Ascorbinsäure oder an Stelle der Ascorbinsäure ihr reversibles Oxydationsprodukt, die Dehydroascorbinsäure,



vorkommen.

Diese kann im Organismus leicht zur Ascorbinsäure reduziert werden, muß also als eine Art „Provitamin C“ angesehen werden. Sie wirkt dementsprechend ebenfalls antiskorbutisch, kann aber natürlich durch die genannten Oxydationsmethoden nicht erfaßt werden. Man muß sie dazu erst mit Schwefelwasserstoff reduzieren.

Um ein biologisch zutreffendes Bild über die antiskorbutische Wirksamkeit eines Nahrungsmittels auf chemischem Wege zu erhalten, ist also in vielen Fällen die Bestimmung der Ascorbinsäure durch die der Dehydroascorbinsäure und des Vitamins A bzw. dessen Provitamin Carotin zu ergänzen. Ob man darüber hinaus noch bei einigen Früchten, besonders Citrusarten, einen weiteren antiskorbutischen Faktor C, annehmen muß, ist noch nicht geklärt.

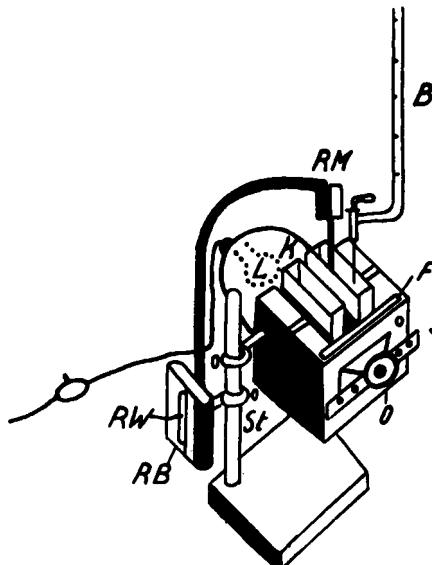
Die chemische Bestimmung des antiskorbutischen Vitamins hat also erhebliche Schwierigkeiten zu überwinden. Ihr gegenüber verbürgt der Tierversuch außer seinen gewöhnlichen Vorteilen — wie qualitative Treffsicherheit, „Verarbeitung“ einer guten Durchschnittsprobe, sichere Zerkleinerung und quantitative Extraktion — auch den Ausschluß einer oxydativen Schädigung während der Zerkleinerung und Extraktion und die Miterfassung des Provitamins wie des Antagonisten. Die Nachteile des Tierversuchs: individuelle Unsicherheit, verhältnismäßig große Fehlergrenze, Notwendigkeit des Vorhandenseins einer qualitativ gleichbleibenden großen Menge des Nahrungsmittels, lange Zeitdauer und ganz erhebliche Kosten, sind aber so schwerwiegend, daß dauernd an der Verbesserung der chemischen Methode gearbeitet wurde, bis sie nunmehr als mindestens ebenso sicher gelten kann, dazu schnell und billig ist. Bisher wies sie aber noch einen technischen Mangel auf, der wohl daran schuld ist, daß die Bestimmung noch in verhältnismäßig wenigen Laboratorien Eingang gefunden hat. Es handelt sich um die schlechte Erkennbarkeit des Endpunktes der Titration nach *Tillmans*. War schon im schwach sauren Medium das Bestehenbleiben des Blautones in den meist trüben und gefärbten Extrakten nicht leicht, so ließ diese Schwierigkeit im stark sauren Gebiet, in dem der Farbstoff in ein ziemlich blasses Rot übergeht, manchen die Methode verwerfen. Und wenn auch mit entsprechender Erfahrung und Übung praktisch brauchbare Werte erzielt werden können, so wird doch der an genaue Methoden gewöhnte Analytiker ein gewisses „Unbehagen“ dabei nicht los.

Im folgenden soll daher eine Arbeitsmethode beschrieben werden, die auch noch kleinste Vitamin-C-Mengen (bis 0,003 mg) von Ernteprodukten auch in trüben und gefärbten Extrakten erfaßt und eine tägliche Bewältigung von 20—30 Proben (von Beginn der Probennahme bis zur Beendigung der Bestimmung) für einen Chemiker mit zwei Hilfskräften ermöglicht. Dazu wird von einem einfachen

Spezialkomparator, der unten näher beschrieben ist, Gebrauch gemacht<sup>2)</sup>.

#### Chemische Bestimmung des Vitamins C in Pflanzen und Pflanzenprodukten.

**Herstellung des Extraktes:** Von der sachgemäß mit rostfreiem Material zerkleinerten Pflanzensubstanz wird eine möglichst kleine Probe (2,5—10 g) in der Reibschale unter Zugabe von eisenfreiem Glas- oder Quarzsand mit etwa 50 cm<sup>3</sup> einer heißen (etwa 60°) 2%igen Metaphosphorsäurelösung zu einem dünnen homogenen Brei zerrieben. Dieser wird zentrifugiert, die Lösung in einen 200-cm<sup>3</sup>-Meßkolben abgegossen. Dann wird noch zweimal mit etwa 50 cm<sup>3</sup> der Metaphosphorsäurelösung gut aufgerührt und wieder zentrifugiert. Die Flüssigkeit kommt jeweils in den Meßkolben, der nunmehr mit der Metaphosphorsäurelösung zur Marke aufgefüllt wird. Dann wird mit Normalbenzin bis zum Rand überschichtet und schließlich durchgemischt. Wesentlich ist, daß bei der ganzen Aufarbeitung flott gearbeitet wird, besonders beim Verreiben, um die Ascorbinsäure nicht unnötig lange der Oxydation durch den Luftsauerstoff auszusetzen. Von dem Extrakt werden 100 cm<sup>3</sup> zur Gesamt-Vitamin-C-Bestimmung herauspipettiert.



Hellige-Vitaminometer nach Dr. Ott.

B = Bürette  
RM = Rührer-Motor  
RB = Rührer-Batterie

K = Küvetten  
L = Lichtquelle  
F = Farbscheibe

O = Okular  
St = Stativ  
RW = Rührer-Widerstand  
S = Farb-Skala

**Bestimmung der Ascorbinsäure:** Im Rest wird sofort durch Titration mit etwa m/1000 Dichlorphenol-Indophenol-Lösung die Ascorbinsäure titriert. Eine bestimmte Menge des Extraktes, die möglichst nicht viel mehr als 0,3 mg Ascorbinsäure enthält, wird dazu in eine entsprechende Küvette gefüllt und in die rechte Seite des abgeblenden Komparators gestellt. Die linke (Vergleichs-)Küvette wird ebenfalls mit dem Extrakt gefüllt. Ihr ist eine Farbscheibe aus hellrotem Glas vorgeschaltet, die den Endpunkt der Titration angibt. Um unabhängig von Tageslicht und Raumbeleuchtung arbeiten zu können und selbst starke Trübungen auszuschalten, ist hinter dem Komparator eine künstliche Lichtquelle mit angenehmem, tageslichtähnlichem Licht angebracht. Um das Arbeiten noch weiter zu erleichtern, ist der Apparat mit einem automatischen Kleinführer versehen, der an einem beweglichen Arm befestigt ist. Da die oft starken Eigenfärbungen der Extrakte den zu erreichen Farbtön abschwächen und so die Genauigkeit der Titration herabsetzen können, ist am Okular eine bewegliche Farbskala abgebracht, die es ermöglicht, die beiden Küvettenfelder gemeinsam durch dasjenige Farbfilter zu betrachten, das den Endpunkt der Reaktion am deutlichsten wiedergibt. Als Bürette wird am besten eine Feinbürette mit 5 cm<sup>3</sup> Inhalt

<sup>2)</sup> Vgl. diese Ztschr. 50, 75 [1937].

gewählt. Wenn der Rührer eingebracht und angestellt ist, wird jetzt in die rechte Küvette die Farblösung zugegeben, bis die Farbe auf der rechten Seite etwas stärker rosa bzw. dunkler erscheint. Es empfiehlt sich, die Küvetten nach jeder Bestimmung mit einem kleinen Glasheber zu entleeren, weil man dann den Rührer in seiner Stellung belassen kann.

Der oben beschriebene Apparat wird von der Firma Hellige, Freiburg, unter der Bezeichnung „Hellige-Vitaminometer“ (nach Dr. Ott) geliefert. Es wurde durch Kombination von z.T. schon in anderen Apparaten verwendeten Bestandteilen zusammengestellt nach Vorschlägen des Verfassers auf Grund umfangreicher Vitaminuntersuchungen in der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Darmstadt.

**Bestimmung von Gesamt-Vitamin C:** Der dazu bereitgestellte Teil des Extrakte wird in einem 200-cm<sup>3</sup>-Meßkolben mit 20 cm<sup>3</sup> Quecksilberacetatlösung und 20 cm<sup>3</sup> Bleiacetat-Natriumacetat-Lösung versetzt. Ungeachtet einer dabei entstehenden Fällung wird Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit klar geworden ist. Dann wird mit einem Stopfen verschlossen und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird mit 4%iger Metaphosphorsäurelösung bis zur Marke aufgefüllt, durchgemischt und filtriert. Aus etwa 100 cm<sup>3</sup> des Filtrats wird nun in einem Erlenmeyer-Kölbchen der Schwefelwasserstoff mit sauerstofffreiem Stickstoff oder Kohlendioxyd quantitativ (Bleipapier!) herausgetrieben. Schließlich wird wie oben titriert. Das Resultat wird, entsprechend seiner Verdünnung, mit 2 multipliziert.

### Herstellung der Lösungen.

1. Dichlorphenol-Indophenol-Lösung: Etwa 250 mg 2,6-Dichlorphenol-Indophenol werden in 1 l lauwarmem, frischdestilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird unter häufigem Umschütteln 24 h stehen gelassen und dann vom Ungelösten abfiltriert. Eine so hergestellte Lösung ist je nach der Reinheit des Farbstoffes etwa  $\frac{1}{1000}$  normal. Etwa 12 cm<sup>3</sup> entsprechen 1 mg Ascorbinsäure. Die Lösung wird in einer dunklen Flasche im Eisschrank aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen hält sich der Titer etwa 14 Tage.

Einstellung der Farblösung: Eine  $\frac{n}{10}$  Cebion-(Merck)-Lösung (= 880 mg in 100 cm<sup>3</sup> 2%iger Metaphosphorsäurelösung) wird mit einer eingestellten  $\frac{n}{10}$  Jodlösung titriert, um die Reinheit des Cebions zu kontrollieren. Dann wird eine bestimmte Menge der Cebionlösung mit 2%iger Metaphosphorsäurelösung auf das 1000fache verdünnt. 20 cm<sup>3</sup> dieser Lösung werden nun in dem Apparat wie oben angegeben titriert.

2. Quecksilberacetatlösung: 125 g Mercuriacetat werden auf 1 l Wasser gelöst.

3. Bleiacetat-Natriumacetat-Lösung: 500 g Natriumacetat und 125 g Bleiacetat werden auf 1 l Wasser gelöst.

Um auch in tierischen Extrakten, die störende Substanzen enthalten, das Vitamin C in dem neuen Apparat bequem bestimmen zu können, sollen die Möglichkeiten des Apparates durch Anwendung besonderer Farbscheiben auch auf die Methylenblautitration und die colorimetrische Bestimmung mit Phosphor-Wolframsäure ausgedehnt werden.

[A. 48.]

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Die analytische Bestimmung der Eisencyanverbindungen

Von Dr.-Ing. RICHARD HÜNERBEIN

Mitt. aus dem Laboratorium für technische Chemie Dr.-Ing. R. Hünerbein, Frankfurt a. M.

Eingeg. 5. Mai 1938

Nach dem Vorschlag von Feld wird das Cyanid der Eisen-cyanverbindung überführt in Quecksilbercyanid durch Behandeln mit Quecksilberoxyd in alkalischer, magnesium-chloridhaltiger Lösung; aus dem Reaktionsgemisch wird dann nach Zugabe von Säure Cyanwasserstoff abdestilliert, der in einer mit Ätznatronlösung beschickten Vorlage aufgefangen wird. Das auf diese Weise isolierte Cyanid wird nach „Liebig-Deniges“ titriert (in schwach ammoniakalischer, jodidhaltiger Lösung). Das Verfahren von Feld wird in der Praxis kaum angewandt, es steht in dem Ruf, unzuverlässig zu sein und ohne erkennbare Ursache bald zu hohe, oft aber zu niedrige Werte zu geben.

Eingehende Untersuchungen ergaben, daß die Umsetzung von Eisencyansalz mit Quecksilberoxyd unter den von Feld angegebenen Reaktionsbedingungen leicht unvollständig bleibt. Verschiedene Nebenreaktionen machen es schwer, den Verlauf dieser Umsetzung zu erkennen. Die Primärreaktion verläuft gemäß der Gleichung:



(in einer Aufschwemmung von Quecksilberoxyd darf man sich den gelösten Anteil hydratisiert vorstellen als Quecksilberhydroxyd).

Die Triebkraft der obigen Umsetzung ist die Bildung der völlig undissozierten Molekülverbindung „Quecksilbercyanid“, die Umsetzung wird jedoch gehemmt durch die Bildung von Alkalihydroxyd. Es kommt zur Ausbildung eines Gleichgewichtszustandes, der die Umsetzung mit steigender Konzentration an Alkalihydroxyd immer stärker unvollständig bleiben läßt. Umgekehrt kann durch Einwirkung von Ferrohydroxyd auf Quecksilbercyanid in stark alkalischer Lösung bei genügend langer Einwirkungsdauer Ferrocyanid gebildet werden.

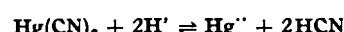
Diese Primärreaktion wird überlagert durch eine Oxydationsreaktion. Ferrohydroxyd wird in schwach alkalischer

Lösung sehr rasch zu Ferrihydroxyd durch Quecksilber(II)-Ionen oxydiert, wobei — bei Abwesenheit eines schwerlöslichen Mercurosalze bildenden Anions — Quecksilbermetall entsteht.



Zur restlosen Überführung von Ferrocyanid in Mercuriacyanid ist es nach diesen Untersuchungen notwendig, das Ferrocyanid in schwach alkalischer Lösung zur Umsetzung zu bringen mit einer Quecksilberverbindung, die unter diesen Bedingungen eine große Mercurionenkonzentration besitzt. Als am zweckmäßigsten erwies sich die Anwendung von Mercuriacetatlösung. Diese setzt sich bei der Einwirkung auf eine heiße, schwach alkalische Ferrocyanidlösung um, ohne Quecksilber(II)-oxyd entstehen zu lassen. Ionen, die wenig dissozierte Mercuriverbindungen bilden, sind dem Reaktionsgemisch fernzuhalten — vor allem also Chloride usw.

Für den zweiten Teil des Verfahrens — die Zerlegung des im Reaktionsgemisch vorhandenen Mercuricyanides unter Abspaltung von Cyanwasserstoff — sind folgende Gesichtspunkte maßgebend: Mercuricyanid ist beständig in Gegenwart solcher Säuren, die stark dissozierte Mercurisalze bilden. Das Gleichgewicht:



kann nur dann zu einer Umsetzung unter Bildung von Cyanwasserstoff geführt werden, wenn die entstehenden Mercurionen durch gleichzeitig anwesende Anionen unter Bildung wenig dissoziierter Mercuriverbindungen abgefangen und der Cyanwasserstoff durch Abdestillieren aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird. Zur Bildung dieser wenig dissoziierten Mercurisalze sind geeignet: Chlorwasserstoffsäure und — in noch höherem Maße — Bromwasserstoffsäure. (Die Konzentration an Hg<sup>++</sup>-Ionen hat in einer gesättigten Mercurichlorid-