

Nach Erkalten fielen 0,1 g Di-pyrazol des Succinyl-di-(acetessigesters) (VII) als feines Krystallpulver aus. Nach Waschen mit wenig eiskaltem Alkohol zeigten sie den richtigen Smp. 155—157°. Das Präparat war identisch mit dem oben beschriebenen Produkt.

Das alkoholische Filtrat wurde mit etwas Wasser ausgespritzt und das emulgierte Öl durch Erwärmen in Lösung gebracht. Nach Stehen über Nacht krystallisierten 0,3 g Pyrazol-pyrazolon des Succinyl-malonester-acetessigesters (IX), das nach dreimaligem Umlösen aus wässrigem Alkohol fast farblose Nadelchen vom Smp. 114—115° bildete. Die Substanz gibt eine violette Eisen(III)-chlorid-Reaktion.

3,938 mg Subst. gaben 9,565 mg CO₂ und 1,980 mg H₂O

2,292 mg Subst. gaben 0,235 cm³ N₂ (18°, 746 mm)

C₂₇H₂₈O₅N₄ Ber. C 66,38 H 5,78 N 11,47%

Gef. „ 66,28 „ 5,63 „ 11,80%

Eine Anreicherung des Succinyl-di-(acetessigesters) konnte auch durch fraktionierte Fällung mit Kupferacetat erreicht werden. Eine Lösung von 5 g des oben beschriebenen Öls (Gemisch) in 5 cm³ Alkohol wurde tropfenweise unter Reiben mit konz. wässriger Kupferacetatlösung versetzt, bis sich die schön blaue Kupferverbindung abzuscheiden begann. Dann gab man weitere 2 cm³ Kupferacetat zu, saugte ab und wusch aus. Durch Zerlegung erhielt man 1,3 g gelbliches Öl, das mit Phenylhydrazin in Essigsäure zu einer gleichfalls öligen Verbindung umgesetzt wurde. Diese wurde mit 5 cm³ konz. Sodalösung unter Erwärmen verrieben, die überstehende Lösung abdekantiert und mit Wasser nachgespült. Beim Erkalten wurde das Öl fest. Nach Lösen in 8 cm³ warmem Alkohol krystallisierten 0,6 g farblose kleine Prismen vom Smp. 156°, identisch mit dem Di-pyrazol des Succinyl-di-(acetessigesters) (VII).

Universität Basel, Anstalt für Organische Chemie.

52. Chromatographische Trennung von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und β -Carotin und ihre spektrophotometrische bzw. stufenphotometrische Bestimmung

1. Mitteilung

von P. B. Müller.

(11. II. 44.)

A) Allgemeiner Teil.

Sowohl die kolorimetrische¹⁾²⁾ wie die spektrometrischen¹⁾³⁻⁶⁾ Bestimmungen von Vitamin A werden durch gewisse Begleitstoffe (Sterine, Carotinoide, Oxydations- und Abbauprodukte des Vitamin A) beeinträchtigt. Die ermittelten optischen Daten lassen sich deshalb

¹⁾ *Gstirner, Fritz*, „Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden“, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1940, S. 5ff.

²⁾ *Carr, F. H. und Price, E. A.*, Biochem. J. **20**, 497 (1926).

³⁾ *Vere-Jones, N.*, Ind. Chemist **12**, 85 (1936).

⁴⁾ *Chevallier, A. und Chabre, P.*, Biochem. J. **27**, 298 (1933).

⁵⁾ *Drummond, J. C. und Morton, R. A.*, Biochem. J. **23**, 785 (1929).

⁶⁾ *Fuchs, L. und Soos, E.*, Sci. pharm. **8**, 141 (1937).

oft nur schwierig in eine einheitliche Beziehung zu der biologischen Wertigkeit der untersuchten Präparate bringen. Die bestehenden Unsicherheiten äussern sich besonders deutlich bei der Umrechnung der spektrometrisch festgestellten Extinktionen in internationale (biologische) Einheiten¹⁾, für welche Umrechnungsfaktoren von 1000–3600 vorgeschlagen wurden²⁾. Die Unstimmigkeiten traten aber auch dadurch in Erscheinung, dass nach der Auffassung einiger Forscher der Vitamin A-Ester in spektrophotometrisch äquivalenter Menge eine höhere biologische Wertigkeit aufweist als der Vitamin A-Alkohol, während andere Forscher beiden Vitamin A-Formen dieselbe biologische Wirksamkeit zusprechen³⁾. Zu diesen Schwierigkeiten kommt noch hinzu, dass neben den vereinbarten internationalen Einheiten³⁾ und den in den U.S.A. verwendeten U.S.P.-Einheiten^{4–6)} häufig auch empirisch gewonnene Einheiten⁶⁾ gebraucht werden, so dass es oft fast unmöglich ist, verschiedene Angaben zu vergleichen.

Die Unsicherheiten blieben auch noch bestehen, nachdem der 2. Internationale Kongress in London 1934³⁾ für die quantitative physikochemische Vitamin A-Bestimmung lediglich die spektrophotometrischen Methoden im U.V. mit dem Umrechnungsfaktor 1600 anerkannte und vorschrieb, dass Trane unter 10000 i.E. Vitamin A/g (im Folgenden als i.E.A/g angeführt) vorgängig der Bestimmung verseift werden müssen. Nach einer in Chicago aufgestellten Vorschrift, welche am 15. Juni 1941 für den Handel in den U.S.A. allgemein gültig erklärt wurde⁷⁾, darf die quantitative Vitamin A-Bestimmung nur im Unverseifbaren des Untersuchungsmaterials und mit einer spektrometrischen Methode vorgenommen werden. Für die Berechnung des Vitamin A-Gehaltes in U.S.P.-Einheiten wird der Faktor 2000 und ausser der Gehaltsdeklaration auch Angabe des Extinktionswertes $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ vorgeschrieben.

Alle diese Vorschriften betreffen im wesentlichen nur die Auswertung der optischen Messungen von Vitamin A und erstreben eine Reinigung des Untersuchungsmaterials nur durch Verseifung. Ver-

¹⁾ 1 Internationale Einheit Vitamin A (1 i. E.A.) entspricht derjenigen Menge Vitamin A, welche an Vitamin A-frei ernährten Ratten die gleiche Schutz- und Heilwirkung ausübt wie 0,6 γ β -Carotin.

²⁾ Siehe Anmerkung am Schluss der Arbeit. Das Ergebnis der pharmakologischen Überprüfung des Umrechnungsfaktors zur spektrophotometrischen Vitamin A-Bestimmung (nach diesem Verfahren) wird später mitgeteilt.

³⁾ Coward, „Biological Standardisation of the Vitamins“, Verlag Baillière, Tindall and Cox, London 1938, S. 213–218.

⁴⁾ 11. Pharmacopoeia of the United States of America (1936) und 1. Supplement (1937) und 2. Supplement (1939).

⁵⁾ „The Vitamins, A-Symposium“, bearbeitet vom „Council on Pharmacy and Chemistry and the Council on Foods of the American Medical Assoc., Chicago 1939, S. 120.

⁶⁾ Rosenberg, H. R., „Chemistry and Physiology of the Vitamins“, Interscience Publishers, Inc., New-York 1942, S. 83.

⁷⁾ Referat im: Oil Paint and Drug Reporter 139, No. 18, 4, 30 (1941).

seifung allein, obwohl sie für stark verunreinigte Öle ein drastisches Reinigungsverfahren darstellt¹⁾, führt aber nicht zu optisch reinen Lösungen, welche im U.V. zwischen 3000 und 3500 Å ausser dem Vitamin A keine messbaren Mengen mehr von anderen absorbierenden Anteilen enthalten. Auch Messung der Lösung vor und nach der Zerstörung des Vitamin A²⁾³⁾ oder Behandeln der Lösungen mit Brom zur Oxydation von Hemmungssubstanzen der *Carr-Price-Reaktion*⁴⁾ vermögen die Fehler nicht zu beheben, die aus der Anwesenheit von störenden Verunreinigungen erwachsen.

Das von mir kürzlich beschriebene Verfahren⁵⁾⁶⁾ zur Bestimmung der Aktivität von Adsorptionsmitteln und chromatographischen Systemen schien mir nun geeignet, um das vorliegende Problem: Quantitative Trennung eines Gemisches von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und β -Carotin unter Ausschaltung der störenden Beimengungen in besserer Weise zu lösen als die bisher in der Literatur bekannt gewordenen Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Vitamin A⁷⁻¹⁰⁾. Hierzu gelangen Adsorptionskolonnen aus drei übereinandergeschichteten verschieden aktiven Aluminiumoxyd-Präparaten zur Verwendung. Die unterste Schicht besteht in allen Fällen aus maximal aktiviertem Aluminiumoxyd mit einem Wärmetönungswert Q von 83,5 cal. Die Aktivität der mittleren und obersten Schicht variiert mit dem chromatographischen Problem. Sie entspricht, wie in der nachstehenden tabellarischen Übersicht angegeben ist, einem Wärmetönungswert Q von 10,0 bzw. 5,0 cal. zum Zwecke der Abtrennung von Vitamin A-Alkohol (I), 56,5 bzw. 50,0 cal., wenn Vitamin A-Ester isoliert werden soll (II) und 54,0 bzw. 50,0 cal., wenn die Isolierung von β -Carotin angestrebt wird (III).

I	II	III	
5,0 cal	50,0 cal	50,0 cal	1. (oberste) Schicht
10,0 cal	56,5 cal	54,0 cal	2. (mittlere) Schicht
83,5 cal	83,5 cal	83,5 cal	3. (unterste) Schicht

In der obersten, weniger aktiven Schicht werden unter diesen Bedingungen jeweils die Substanzen zurückgehalten, die etwas

¹⁾ Chevallier, A. und Chabre, P., Biochem. J. **27**, 298 (1933).

²⁾ Chevallier, A., Z. Vitaminf. **7**, 10 (1938).

³⁾ Demarest, B., Z. Vitaminf. **9**, 20 (1939).

⁴⁾ Notevarg, O. und Weedon, H. W., Biochem. J. **30**, 1705 (1936); **32**, 1668 (1938).

⁵⁾ Müller, P. B., Helv. **26**, 1945 (1943).

⁶⁾ Müller, P. B., Helv. **27**, 404 (1944).

⁷⁾ Karrer, P., v. Euler, H. und Schöpp, K., Helv. **15**, 493 (1932).

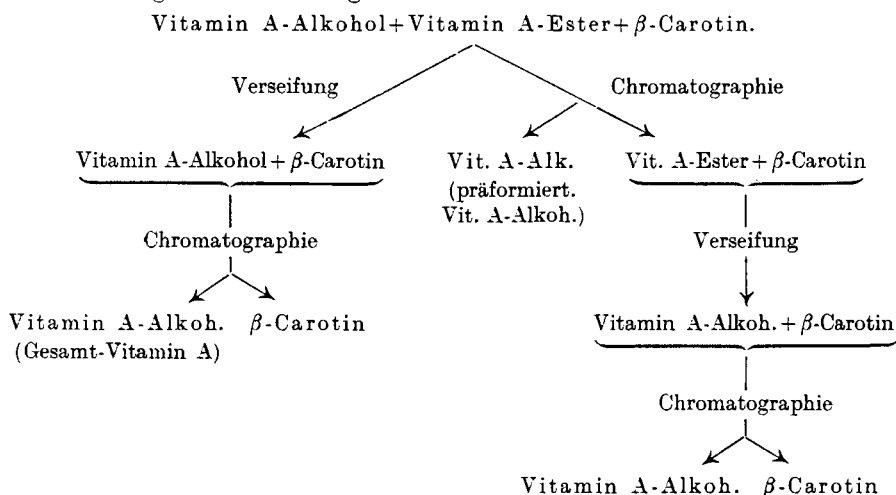
⁸⁾ Willstaedt, H. und With, T. K., Z. physiol. Ch. **253**, 40, 133 (1938).

⁹⁾ Willstaedt, H. und With, T. K., Z. Vitaminf. **9**, 212 (1939).

¹⁰⁾ With, T. K., „Absorption, Metabolism and Storage of Vitamin A and Carotene“, Verl. E. Munksgaard, Kopenhagen 1940, S. 53.

leichter adsorbierbar sind als der zur Isolierung bzw. Bestimmung gelangende Anteil. Dieser wird vollständig in der mittleren Schicht festgehalten. Alle anderen schwächer adsorbierbaren Komponenten gehen in die unterste Schicht, sodass das zur Entwicklung dienende Lösungsmittel (hochsiedender Petroläther) stets rein abläuft und ohne Reinigung wieder für weitere 10—20 Versuche verwendet werden kann. Der an der Mittelschicht haftende Anteil wird nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren eluiert und Vitamin A-Alkohol bzw. Vitamin A-Ester mittels dem Quarzspektrographen und β -Carotin im *Pulfrich*-Stufenphotometer bestimmt.

Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester sind auf Grund ihrer grossen Adsorbierbarkeitsunterschiede chromatographisch leicht trennbar. Dagegen wird Vitamin A-Ester nur sehr wenig stärker adsorbiert als β -Carotin, sodass bei der chromatographischen Trennung stets beide zusammen zur Adsorption gelangen und nur in sehr hohen Kolonnen chromatographisch voneinander getrennt werden könnten. Ihre Trennung gelingt aber auf einfachste Weise, wenn der Vitamin A-Ester vorher durch schonende Verseifung in den Vitamin A-Alkohol übergeführt wird. Um unreine Gemische von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und β -Carotin, wie sie in Form von Extrakten und Konzentraten häufig in den Handel kommen und in Blut und Gewebsextrakten vorliegen, für die spektrophotometrische oder kolorimetrische Analyse vorzubereiten, bestehen also die in folgendem Schema angedeuteten Möglichkeiten:



Am raschesten erfolgt darnach die Bestimmung aller drei Anteile, wenn in einer 1. Probe unter Verwerfung des Vitamin A-Esters und des β -Carotins der präformierte Vitamin A-Alkohol chromatographisch isoliert und in einer 2. Probe nach Verseifung auf Gesamt-Vitamin A und β -Carotin chromatographiert wird.

Zur Abkürzung des chromatographischen Verfahrens kann man auch 5-schichtige Kolonnen verwenden, welche die Trennung von Vitamin A-Alkohol und β -Carotin bzw. Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester in einem Analysengang ermöglichen und folgendermassen zusammengesetzt sind:

Kolonne zur Trennung von

Al ₂ O ₃	Vit. A-Alkohol und β -Carotin Q in cal	Al ₂ O ₃	Vit. A-Alkohol und Vit. A-Ester Q in cal
VII	5,0	VII	5,0 1. (oberste) Schicht
VI	10,0	VI	10,0 2. Schicht
IV	50,0	IV	50,0 3. Schicht
III	54,0	II	56,5 4. Schicht
I	83,5	I	83,5 5. (unterste) Schicht

Die Lösungen von Vitamin A-Alkohol und β -Carotin, die nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren erhalten werden, sind genügend rein, um mit irgend einer einwandfreien Bestimmungsmethode quantitativ ausgewertet zu werden. Die Bestimmung von Vitamin A erfolgt aber am zuverlässigsten durch Auswertung seines U.V.-Spektrums, für welches die Absorption bei 3280 Å (Extinktionsmaximum) und die dieser maximalen Absorption benachbarten Wellenlängen charakteristische Grössen sind. Die der quantitativen Auswertung zugrunde gelegten Absorptions- bzw. Extinktionskurven geben daher gleichzeitig auch Aufschluss über die optische Reinheit der auszuwertenden Lösungen.

Von einer Extinktionskurve, die zur Vitamin A-Bestimmung verwendet werden soll, ist folgendes zu verlangen:

1. Das Extinktionsmaximum der Kurve muss genau bei 3280 Å liegen. Diese Bedingung kann mit einer subjektiven Methode, z. B. im Spektrenprojektor auf ca. ± 20 Å genau durchgeführt werden.
2. Der Kurvenverlauf muss im wesentlichen mit demjenigen der Standardkurve I, Fig. 1 (unter denselben Bedingungen aufgenommen) übereinstimmen.
3. Zwischen 3000 und 3500 Å dürfen keine weiteren Extinktionen die Extinktionskurve von Vitamin A überschneiden. Ganz reine Präparate dürfen ausser der spezifischen Extinktion des Vitamin A im U.V. zwischen 3800 Å bis hinunter gegen 2300 Å überhaupt keine weiteren Extinktionen aufweisen.
4. Zur genaueren Beschreibung der an die Extinktionskurve von reinem Vitamin A zu stellenden Bedingungen fordern Chevallier und Mitarbeiter¹⁾, dass für die Versuchslösung und das reine Lösungsmittel der Punkt gleicher Schwärzung des Spektrums bei 3100 Å tiefer liegt, als derjenige bei 3400 Å.

Diese Bedingung wird nach der chromatographischen Reinigung, entsprechend der Vorschrift, im allgemeinen erfüllt. Erfahrungsgemäss liegen aber auch noch die Ergebnisse von chromatogra-

¹⁾ Chevallier, M. A., Manuel, S. und Faubert, M. P., Bl. Soc. Chim. Biol. **23**, 1429 (1941).

phisch gereinigten Präparaten innerhalb der Fehlergrenze der Methode, wenn bei einem Extinktionsmaximum von 3280 Å der Punkt bei 3100 Å auf gleicher Höhe (Kurve II, Fig. 1) oder nur wenig höher liegt (Kurve III, Fig. 1) als derjenige bei 3400 Å. Kurven, welche sich ohne Kulminations- bzw. Knickpunkt bei 3280 Å mit zunehmender Schichtdicke gleichmässig vom kurzwelligeren nach dem langwelligeren Licht verschieben (Kurve IV, Fig. 1), sind unbrauchbar.

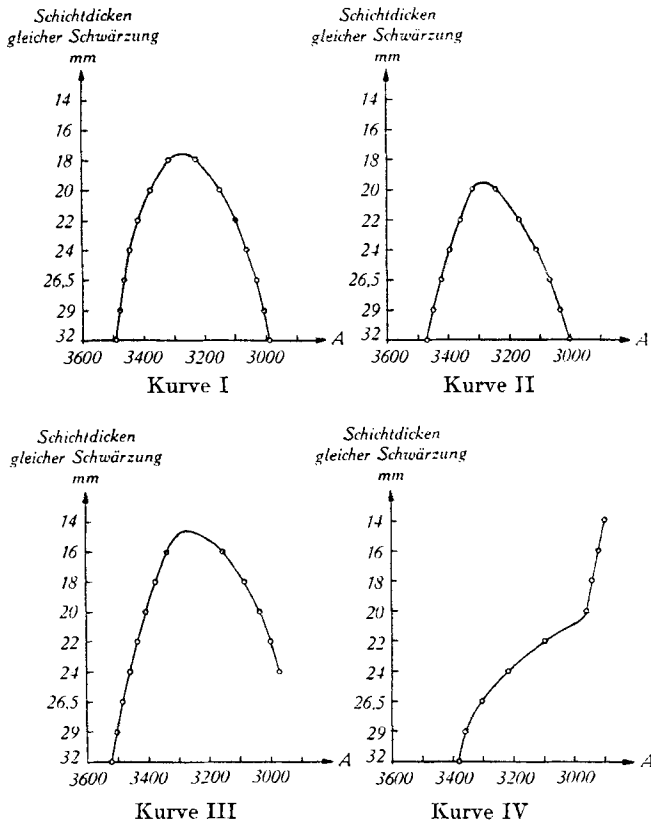


Fig. 1.

Vitamin A-Absorptionskurven.

Bis heute kennt man keine Verbindung, die die gleiche Extinktionskurve wie Vitamin A gibt, ohne auch dieselbe biologische Wirksamkeit zu entfalten. Hingegen gibt es Verbindungen, die über das gesamte Gebiet der U.V.-Absorption des Vitamin A gleichmässig absorbieren. Dadurch kommt es zu einer gleichmässigen Aufhellung des ganzen Spektraluntergrundes und somit auch zu einer Erhöhung des Extinktionsmaximums des Vitamin A bei 3280 Å, ohne dass die Form

der Extinktionskurve merklich verändert wird. Das ist z. B. der Fall, wenn β -Carotin zugegen ist, welches unter den Auswertungsbedingungen des Vitamin A zu einer gleichmässigen Aufhellung des Spektraluntergrundes zwischen 3000 und 3500 Å führt. Bei einem β -Carotiningehalt (in i.E. ber.) von 63,5 % des Vitamin A-Gehaltes werden so gerade 10 % Vitamin A zuviel vorgetäuscht, was bei der Bestimmung von Vitamin A in Gegenwart von β -Carotin zu berücksichtigen ist.

Hingegen stimmt die Extinktionskurve des Vitamin A-Esters sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht mit derjenigen des Vitamin A-Alkohols überein, der aus dem Vitamin A-Ester durch Verseifung erhalten wird. Darnach ist zu schliessen, dass der im Vitamin A-Ester vorhandene Acylrest die Extinktion des Alkoholrestes nicht merklich beeinflusst und dass Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester in äquimolaren Lösungen ein identisches Absorptionsspektrum aufweisen.

Die quantitative Vitamin A- und β -Carotin-Auswertung erfolgt auf bekannte Weise auf Grund des spektrometrisch- bzw. stufenphotometrisch ermittelten Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$. Die biologische Wirksamkeit eines Vitamin A-Präparates errechnet sich daher z. B. auf Grund der internationalen Vereinbarungen von 1934¹⁾ nach der Formel:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} (3280 \text{ Å}) \times 1600 = \text{Int. Einh. Vitamin A/g}$$

Die Auswertung der bei der β -Carotin-Bestimmung bei 4700 Å stufenphotometrisch ermittelten $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (a) erfolgt auf Grund des Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (b) einer reinen β -Carotinlösung in Petroläther I (=2140) nach der Formel:

$$\frac{(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_a}{(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_b} = \frac{(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_a}{2140} = g \text{ } \beta\text{-Carotin/g}$$

Die unterste Erfassbarkeitsgrenze der Methode, welche durch die maximal zulässige Einwage an Untersuchungsmaterial (0,5 g) zur Chromatographie und durch die apparativen Bedingungen bei der spektrophotometrischen und stufenphotometrischen Auswertung festgelegt wird, liegt theoretisch bei ca. 20 i.E.²⁾ Vitamin A und 5 γ β -Carotin pro Ansatz bzw. 40 i.E.A/g und 10 γ β -Carotin/g Untersuchungsmaterial. Während diese berechneten kleinen Mengen β -Carotin auch praktisch noch erfassbar sind, wirken sich die chromatographisch nicht mehr vollständig abtrennbaren Verunreinigungen beim Vitamin A schon so störend aus, dass bei der spektrophotometri-

¹⁾ Coward, „Biological Standardisation of the Vitamins“, Verlag Baillière, Tindall and Cox, London 1938, S. 213–218.

²⁾ Allen Angaben in i.E.A bzw. i.E.A/g liegt der im Jahre 1934 international vereinbarte Faktor 1600 zu Grunde.

schen Bestimmung überhaupt keine auswertbaren Vitamin A-Spektren mehr erhalten werden. Auf Grund unserer Erfahrungen mit zahlreichen schlechten Präparaten liegt die praktisch noch erfassbare kleinste Menge Vitamin A bei ca. 75 i.E.A pro Ansatz, entsprechend ca. 150 i.E.A/g Präparat. Bei niedrigeren Gehalten ist das Vitamin A durch Verseifung und Extraktion des Unverseifbaren vor der Chromatographie von Ballaststoffen zu befreien und anzureichern.

Die höchst zulässige Menge Vitamin A bzw. β -Carotin zur Chromatographie, welche durch die Adsorptionskapazität der 2. und bei der kombinierten Kolonne auch der 4. Adsorptionsschicht gegeben ist, liegt bei ca. 30 000 i.E.A. und 0,6 mg β -Carotin pro Ansatz.

Die Genauigkeit des Verfahrens zur Bestimmung von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und β -Carotin ist im wesentlichen von folgenden Faktoren abhängig:

1. Vom Aktivitätsgrad des Adsorptionsmittels, da Vitamin A, insbesondere Vitamin A-Ester und β -Carotin schon an wenig aktiverem Aluminiumoxyd als zu ihrer Adsorption notwendig ist, teilweise zerstört werden. Aus dem Vitamin A bilden sich dabei im U.V. gelb-orange-rot fluoreszierende Zersetzungsprodukte, die in deutlichen Schlieren durch die 2. (bzw. 4.) Adsorptionsschicht hindurchwandern und erst von noch aktiverem Aluminiumoxyd wieder adsorbiert werden. Aus dem β -Carotin entstehen braune Zersetzungsprodukte, die eine stärkere Adsorbierbarkeit aufweisen. Bei Einhaltung der Versuchsbedingungen treten jedoch noch keine solchen Verluste auf.

2. Von der Entwicklung der Chromatogramme, die so zu leiten ist, dass alles Vitamin A bzw. β -Carotin von der 1. Adsorptionsschicht in die 2. (bzw. 4.) Schicht gelangt, von dieser aber nicht in die 3. (bzw. 5.) Schicht übertritt. Auch diese Verluste sind bei Einhaltung der Versuchsbedingungen praktisch null.

3. Von der Temperatur beim Einengen der Eluate nach der Chromatographie. Während Vitamin A-Alkohol und -Ester weitgehend hitzestabil sind, verändern sich β -Carotinlösungen teilweise beim Erwärmen über 50° C. Beim Einengen der β -Carotin-Eluate wird deshalb die Temperatur stets unterhalb 50° C gehalten.

4. Von der Dauer und der Temperatur der Verseifung des Untersuchungsmaterials. Während Vitamin A-Alkohol und -Ester unter den gewählten Versuchsbedingungen eine kaum nachweisbare Abnahme erleiden, erfährt β -Carotin einen deutlichen, aber reproduzierbaren Verlust, der bei der Berechnung berücksichtigt wird.

5. Von der Grösse der Intervalle zwischen den einzelnen Schichtdicken bei der spektrophotometrischen Auswertung. Bei der Variation der Schichtdicken um 10% lässt sich die Extinktion im Maximum der Extinktionskurve auf $\pm 5\%$ genau abschätzen.

Unter Berücksichtigung aller dieser Fehlermöglichkeiten und gestützt auf die praktische Erfahrung im Laufe von vielen hundert Bestimmungen, kann die maximale Streuung (Fehlergrenze) des gesamten Vitamin A-Bestimmungsverfahrens für Präparate mit 1000 i.E.A/g und mehr mit $\pm 10\%$, für solche mit 500 i.E.A/g und weniger mit $\pm 20\%$ angegeben werden¹⁾. Im Falle einer Verseifung ist bei Präparaten mit 500 i.E.A/g und weniger mit einem Verlust von 5% zu rechnen.

¹⁾ Die durchschnittliche Streuung unserer Analysen überschreitet im allgemeinen nicht 5 bzw. 10%.

Die Streuung (Fehlergrenze) des gesamten β -Carotin-Bestimmungs-Verfahrens liegt bei $\pm 5\%$, wenn folgende Verluste eingerechnet werden:

für Präparate mit 30 γ β -Carotin pro g = 20%
 für Präparate mit 300 γ β -Carotin pro g = 10%
 für Präparate mit 1500 γ β -Carotin pro g = 5%

Verseifungsverlust: einheitlich für alle Dosen = 10 %.

Diese Angaben beziehen sich auf die in der Vorschrift angegebene durchschnittliche Einwage von 0,2 g Untersuchungsmaterial zur Verseifung, Chromatographie und quantitativen Auswertung.

B) Experimenteller Teil.

Reagenzien.

Die Bestimmung der im Folgenden angeführten Wärmetönungswerte Q als Massstab der Aktivität des Aluminiumoxyds und der verschiedenen Adsorptionskolonnen sowie als Charakteristikum des zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittels erfolgte nach den früher veröffentlichten Angaben¹⁾. Die nachfolgend erwähnten Wärmetönungswerte beziehen sich ausschliesslich auf Messungen, die in dem beschriebenen Kalorimeter unter Anwendung von 65 cm³ Lösungsmittel und 50 g Adsorptionsmittel durchgeführt wurden.

Für die Herstellung der verschieden aktiven Aluminiumoxydpräparate²⁾ wurde maximal aktiviertes Aluminiumoxyd I verwendet, welches mit den Testlösungsmitteln Äthyläther und Chloroform Wärmetönungswerte $Q_{0^\circ\text{C}}$ von 132 bzw. 120 cal, mit Hexan einen solchen von 64 cal und mit einem mit Oleum gereinigten hochsiedenden Petroläther IV einen Wert $Q_{0^\circ\text{C}}$ von 65,6 cal aufwies³⁾. Zur Entwicklung der Chromatogramme und zur Aktivitätsmessung der verschieden aktiven Aluminiumoxydpräparate gelangte ein mit Schwefelsäure gereinigter hochsiedender Petroläther I, dem ein mit Aluminiumoxyd I gemessener Wärmetönungswert $Q_{0^\circ\text{C}}$ von 83,5 cal zukommt, zur Verwendung.

Für die Versuche wurden verschiedene Aluminiumoxydpräparate verwendet, welche mit dem Petroläther I die durch folgende Wärmetönungswerte charakterisierten chromatographisch verwertbaren Adsorptionsaktivitäten ergaben:

Al ₂ O ₃ I maximal aktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 83,5$ cal
Al ₂ O ₃ II partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 56,5$ cal (aus 45 g I + 55 g V)
Al ₂ O ₃ III partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 54,0$ cal (aus 35 g I + 65 g V)
Al ₂ O ₃ IV partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 50,0$ cal (aus 20 g I + 80 g V)
Al ₂ O ₃ V partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 45,5$ cal (aus 100 g I + 3,3 g H ₂ O)
Al ₂ O ₃ VI partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 10,0$ cal (aus 100 g I + 16 g H ₂ O)
Al ₂ O ₃ VII partiell desaktiviert	$Q_{0^\circ\text{C}} = 5,0$ cal (aus 100 g I + 21 g H ₂ O)

Zur Regenerierung wird das gebrauchte Aluminiumoxyd so oft mit 95-proz. Äthanol aufgerührt, bis der Alkohol praktisch farblos abgenutzt werden kann. Nach dem Trocknen durch 24-stündiges Stehen an der Luft (eventuell im Trockenschrank) wird, wie früher beschrieben, gegläht und aktiviert.

Da nach diesem Verfahren stets wieder die ursprüngliche Aktivität erhalten wird, ist die Aktivität des aktivierten Adsorptionsmittels jeweils nur bei Verwendung von ganz neuem, noch ungebrauchtem Aluminiumoxyd nach dem kalorimetrischen Verfahren zu

¹⁾ P. B. Müller, Helv. 26, 1945 (1943).

²⁾ loc. cit. S. 1953.

³⁾ loc. cit. S. 1956, 1961, Helv. 27, 408 (1944).

kontrollieren. Erforderlichenfalls ist dann das für die vorgeschriebene Aktivität der Mischungen benötigte Mischungsverhältnis neuerdings festzusetzen.

Als Lösungsmittel wurden verwendet:

Petroläther I, mit Schwefelsäure gereinigt, zur Entwicklung der Chromatogramme und zur stufenphotometrischen β -Carotin-Bestimmung.

Petroläther II, aus Petroläther I mit 5% absolutem Äthanol hergestellt, zur Eluierung der Vitamin A-Adsorbate. (Zur Reinigung des Äthanol wird der Alkohol aus einer ca. 5-proz. äthanolischen NaOH-Lösung in einer Glasschliffapparatur abdestilliert.)

Petroläther III, tiefsiedender Petroläther mit 5% absolutem Äthanol, zur Eluierung der β -Carotin-Adsorbate. — Der Petroläther ist zuvor (wie Petroläther I) mit Schwefelsäure zu reinigen, bis dieses farblos abgetrennt werden kann, dann wie Petroläther I mit KMnO_4 , Fe_2SO_4 und NaOH ohne kalorimetrische Kontrolle weiter zu behandeln.

Petroläther IV, mit Oleum gereinigt, zur spektrophotometrischen Vitamin A-Bestimmung.

1.-n. Äthanolische KOH, aus Kalium hydricum pro analysi und 95-proz. reinem Äthanol, zur Verseifung des Untersuchungsmaterials.

5.-n. wässrige NaOH, aus Natrium hydricum pro analysi, zur Reinigung des Untersuchungsmaterials.

Zur Regenerierung wird der Petroläther I wie bei der Reinigung, die früher beschrieben wurde, destilliert und so oft mit konz. Schwefelsäure ausgerührt, bis diese farblos abläuft und der Petroläther wieder seine ursprüngliche Wärmetönung $Q_{0,0}^{\circ}\text{C} = 83,5$ cal aufweist. Daraufhin wird er mit Kaliumpermanganatlösung, Eisen(II)-sulfatlösung und Natronlauge weiter gereinigt. Petroläther II und III werden destilliert, der Alkohol durch 5maliges Auswaschen mit je $\frac{1}{3}$ Volumen Wasser entfernt, der zurückbleibende Petroläther mit Schwefelsäure ausgerührt, bis diese farblos abläuft und dann ohne Kontrolle der Wärmetönung wie Petroläther I weiter gereinigt. Der hochsiedende Petroläther wird schliesslich mit dem Quarzspektrographen auf die U.V.-Durchlässigkeit hin geprüft. Ist er im U.V. bis gegen 2800 Å durchlässig, so ist er nach dem Äthanolzusatz wieder als Elutions-Petroläther II verwendbar. Der tiefsiedende Petroläther kann ohne weitere Prüfung direkt mit absolutem Äthanol versetzt und wieder wie zuvor verwendet werden. Petroläther IV wird destilliert und auf die U.V.-Durchlässigkeit geprüft. Entspricht sie nicht den an diesen Petroläther gestellten Anforderungen, so ist er wieder mit Oleum zu reinigen. Wird durch diese Reinigung die U.V.-Durchlässigkeit bis gegen 2300 Å nicht mehr erreicht, so kann der Petroläther nicht mehr zur spektrophotometrischen Auswertung verwendet werden.

Apparate.

1. Eine grössere Schliffapparatur zur Destillation von hochsiedendem Petroläther in Ansätzen von ca. 5 Liter im Vakuum.

2. Eine Glasschliffapparatur zur Destillation der Eluate (bis zu 250 cm³) im Vakuum und unter Stickstoffatmosphäre (siehe Fig. 3).

3. Anordnung zur chromatographischen Reinigung der zu untersuchenden Ausgangsmaterialien (siehe Fig. 2).

4. Eine Vorrichtung zum emulsionslosen Auswaschen von Seifen und Alkohol aus verseiften Präparaten (siehe Fig. 4).

5. Ein Hilger'sches A-Vitamer.

6. Ein Quarzspektrograph mit Beleuchtungseinrichtung (Wasserstofflampe) für U.V.-Absorptionsspektren.

7. Ein Plattenauswertungsgerät (z. B. Spektrenprojektor).

8. Ein Pulfrich-Stufenphotometer mit dem Filter S 47 und 1 cm-Küvetten.

Die chromatographische Reinigung von Vitamin A und β -Carotin.

1. Zur Herstellung der weiter unten beschriebenen 3- und 5-schichtigen Kolonnen werden die Al_2O_3 -Schichten unter leichtem Ansaugen von Luft in die Adsorptionsrohre eingefüllt. Die Schichten werden durch ein dazwischengelegtes Rundfilter getrennt und

die Kolonne zu oberst mit einem solchen bedeckt. Schliesslich werden die Chromatogrammrohre zu der in Fig. 2 dargestellten Anordnung zusammengestellt, evakuiert und wieder mit O_2 -freiem Stickstoff gefüllt, ein 2. Mal evakuiert und ohne vorangehende Behandlung mit Stickstoff mit Petroläther I aufgefüllt.

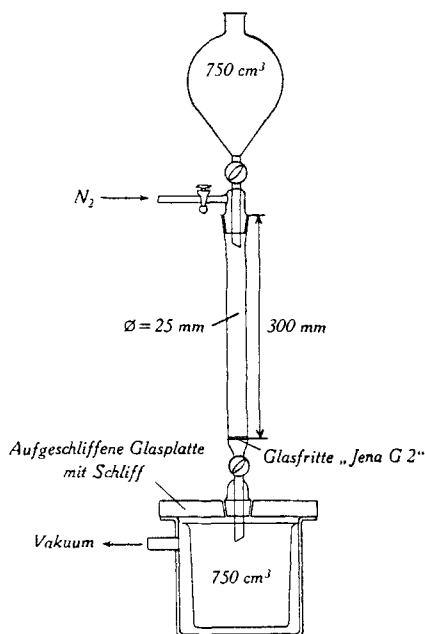


Fig. 2.

Anordnung zur analytisch-chromatographischen Vit. A-Bestimmung.

Die nach diesem Schema aufgestellten Adsorptionskolonnen enthalten von unten nach oben angeordnet folgende Adsorptionsschichten:

Vitamin A-Alkoholkolonne: 35 g Al_2O_3 I, 35 g Al_2O_3 VI, 35 g Al_2O_3 VII.

Vitamin A-Esterkolonne: 20 g Al_2O_3 I, 40 g Al_2O_3 II, 40 g Al_2O_3 IV.

β -Carotinkolonne: 20 g Al_2O_3 I, 40 g Al_2O_3 III, 40 g Al_2O_3 IV.

Kombinierte Vitamin A-Alkohol-Ester-Kolonne: 20 g Al_2O_3 I, 40 g Al_2O_3 II, 40 g Al_2O_3 IV, 35 g Al_2O_3 VI, 35 g Al_2O_3 VII.

Kombinierte Vitamin A-Alkohol- β -Carotin-Kolonne: 20 g Al_2O_3 I, 40 g Al_2O_3 III, 40 g Al_2O_3 IV, 35 g Al_2O_3 VI, 35 g Al_2O_3 VII.

Zur Reinigung von Vitamin A-Alkohol und -Ester und von β -Carotin in Tranen und Ölen werden 0,5 bis maximal 2,5 g (im allgemeinen 1 g) Untersuchungsmaterial in Petroläther I gelöst und auf 50 cm³ gebracht. Die Einwagen sind dem Präparat anzupassen. Von Präparaten mit 300 bis 150000 i. E. A/g ist einheitlich 1 g, von schwächeren Präparaten sind 2 g (maximal 2,5 g), von stärkeren entsprechend weniger in 50 cm³ Petroläther zu lösen. Davon werden jeweils 10 cm³ (= 0,2 g Einwage) zur Chromatographie auf die Adsorptionskolonne gegeben, bis auf eine Schicht von 1 mm Flüssigkeit eingesogen, 2mal mit ca. 10 cm³ Petroläther gespült und wie zuvor eingesogen. Schliesslich wird das Vitamin A-Chromatogramm unter leichtem Saugen mit 350 cm³ Petroläther I, das β -Carotin-Chromatogramm mit 120 cm³ Petroläther I entwickelt. Die Durchflussgeschwindigkeit ist so einzustellen, dass der Petroläther eben als dünner Flüssigkeitsfaden abläuft.

Nach der Entwicklung der Chromatogramme werden die Zonen unter der U.V.-Lampe (z. B. Philora-Lampe) und unter Vorschaltung eines Blaufilters kontrolliert. Der Vitamin A-Alkohol bildet eine sehr schwach dunkelgrün fluoreszierende, der Vitamin A-Ester eine stark hellgrün fluoreszierende Zone. Diese Zonen sollen in den 3-schichtigen Kolonnen vollständig in der 2. Schicht liegen, aber nicht in die 3. Schicht vordringen, während in den 5-schichtigen Kolonnen Vitamin A-Ester und β -Carotin bis in die 4., aber nicht in die 5. Schicht gelangen müssen. Unter Einhaltung der Vorschrift ist dies immer der Fall; eine Kontrolle unter der U.V.-Lampe ist aber zweckmässig. Kleine Abweichungen des Wärmetönungswertes Q des Petroläthers I von der Vorschrift können auf Grund dieser Kontrolle durch Entwicklung der Chromatogramme mit etwas mehr oder weniger Lösungsmittel ausgeglichen werden.

Nach der Entwicklung der Chromatogramme werden die den Vitamin A-Alkohol bzw. den Vitamin A-Ester oder das β -Carotin enthaltenden Al_2O_3 -Schichten mit einem Spatel sorgfältig von den benachbarten Schichten abgetrennt und in ein 100 cm³-Becherglas gegeben. Zur Eluierung des Vitamin A wird das Al_2O_3 sofort mit äthanolischem Petroläther II, zur Eluierung des β -Carotins mit Petroläther III bedeckt, mit dem Spatel aufgerührt, in eine Glasfrittennutsche (Jena, G3, \varnothing 70 mm) gegeben und das Eluat so abgenutscht, dass noch keine Luft durch das Aluminiumoxyd gesogen wird. Hierauf wird das Aluminiumoxyd einmal mit ca. 25 cm³ Lösung II bzw. III übergossen und diese mässig scharf abgesaugt. Schliesslich wird 4mal mit ca. 25 cm³ Elutionsmittel aufgerührt und nun jedesmal scharf abgesaugt. Im ganzen erhält man ca. 150 cm³ Lösung. Sämtliche Filtrate werden in einem 250 cm³ Rundkolben aufgefangen und unter vorsichtigem Anlegen eines Vakuums und bei mässiger Spülung mit O_2 -freiem Stickstoff (eventuell noch unter Vorschaltung eines Turmes mit alkalischer Pyrogallollösung) in der in Fig. 3 dargestellten Apparatur eingengt. Die Vitamin A-Eluate werden im siedenden

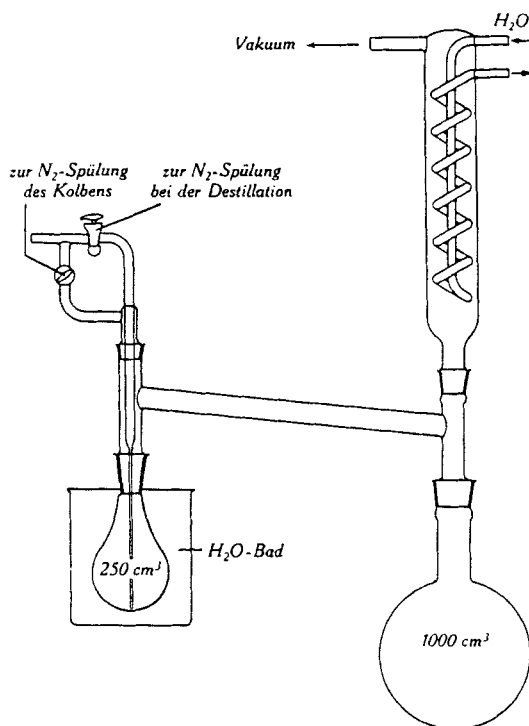


Fig. 3. Anordnung zum Eindampfen der Eluate.

den Wasserbad zur Trockne eingedampft, die β -Carotin-Eluate bei 40° C auf 1—2 cm³ eingengt. Nach dem Abdampfen wird erkalten gelassen, die Apparatur mit absolutem Stickstoff gespült, der Rundkolben abgenommen, die Vitamin A-Rückstände mit ca. 5 cm³ Petroläther IV, die β -Carotin-Rückstände mit 5 cm³ Petroläther I aufgenommen, quantitativ in einen 25 cm³-Messkolben gespült und mit demselben Lösungsmittel auf 25 cm³ aufgefüllt.

Zur raschen Einstellung der für die spektrophotometrische Vitamin A-Bestimmung benötigten Verdünnung wird ein aliquoter Teil (0,5—25 cm³) der eingengten und auf 25 cm³ gebrachten Eluate so lange mit Petroläther IV verdünnt, bis die Lösung im Hilger'schen A-Vitamer eine Extinktion von 0,25—0,3 aufweist. In diesen Lösungen wird das Absorptionsspektrum des Vitamin A (Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester) im U.V. mit dem (Zeiss'schen) Quarzspektrographen (QU 24) bei den Schichtdicken 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26,5, 29, 32, 35 und 40 mm und bei 30 Sekunden Belichtung mit einer Wasserstofflampe als Lichtquelle aufgenommen. Zur quantitativen Auswertung des Spektrums wird zu jeder Schichtdicke noch das Absorptionsspektrum des reinen Lösungsmittels ohne Vitamin A aufgenommen unter Vorschaltung eines Sektors von $\alpha^\circ = \text{ca. } 90^\circ$ und oben und unten auf der Platte die Wellenlängenskala in Å oder m μ aufgeblendet.

Die Beurteilung und quantitative Auswertung der Extinktionskurven erfolgt nach den im allgemeinen Teil gegebenen Weisungen (siehe auch Beispiel weiter unten).

Die stufenphotometrische β -Carotin-Bestimmung erfolgt direkt in den auf 25 cm³ gebrachten Eluaten unter Vorschaltung des Filters „S. 47“ nach den im allgemeinen Teil gegebenen Richtlinien. Konzentrierte Lösungen werden zur Messung mit Petroläther I verdünnt.

Zur Verseifung wird das zur Chromatographie in hochsiedendem Petroläther gelöste Untersuchungsmaterial in der Apparatur zum Eindampfen der Eluate (Fig. 3) im Vakuum und unter ständigem Stickstoffstrom im siedenden Wasserbad zur Trockne eingedampft bzw. Lösungen mit β -Carotin bei 45° C auf 1—2 cm³ eingengt. Nach Zugabe von 10 cm³ der frisch bereiteten 1-n. äthanolischen KOH wird die Apparatur evakuiert und wieder mit Stickstoff durchströmt, der Rundkolben bis zur Grenze des Verseifungsgutes in ein siedendes Wasserbad gestellt, das Untersuchungsmaterial unter leichtem Schwenken genau während 5 Minuten verseift und durch Einstellen in kaltes Wasser rasch abgekühlt. Das erhaltene Verseifungsgut wird in einen 50 cm³ Schüttelzylinder übergeführt, der Kolben 2mal mit ca. 5 cm³ 95-proz. Äthanol gespült, die vereinigten äthanolischen Fraktionen mit einem Teil Wasser verdünnt, mit 1—2 Teilen Petroläther I versetzt (den Kolben damit nochmals schwenken) und während ½ bis 1 Minute energisch ausgeschüttelt. Diese Operation wird ohne Stickstoffstrom unter Luft durchgeführt und die im Versuchsprotokoll¹⁾ angeführten Werte beziehen sich auf diese einfache Arbeitsweise ohne spezielle Vorsichtsmassnahmen zur Vermeidung von Oxydationsverlusten.

Nach der Trennung der Schichten wird die wässrige Lösung abgelassen, der Schüttelzylinder zu der in Fig. 4 dargestellten Auswasch- und Entseifungsanordnung zusammengestellt, mit so viel Wasser aufgefüllt, bis das Wassereinleitungsrohr eben in den Petroläther eintaucht und das Extraktionsgut mit Leitungswasser während 5—10 Minuten ausgewaschen. Die Geschwindigkeit ist so einzustellen, dass kein Petroläther mitgerissen wird. Durch diese Anordnung werden die Extrakte, ohne Emulsionsbildung und ohne Luft in die Lösung einzuführen, in kürzester Zeit vollständig von Seifen und Alkohol befreit.

Nach der Entseifung wird das Wasser vom Extrakt abgetrennt, der Petroläther mit Natriumsulfat getrocknet, durch Watte filtriert, der Schüttelzylinder mit dem Natriumsulfat noch 3mal mit je ca. 5 cm³ Petroläther I geschwenkt und die einzelnen Fraktionen durch dasselbe Wattefilter zum Extrakt gegeben. Die gesammelten und vereinigten Filtrate werden, wie zuvor beschrieben wurde, chromatographiert.

¹⁾ Siehe Anmerkung am Schluss der Arbeit.

Zur chemischen Reinigung werden 10 cm³ der 2—5-proz. Ausgangslösungen in einen 50 cm³ Schüttelzylinder gegeben, weitere 10 cm³ Petroläther I und dann 10 cm³ 1-n. NaOH + 10 cm³ Feinsprit hinzugefügt und während 1 Minute energisch geschüttelt. Trennung der Schichten, Auswaschen der Seifen und des Alkohols und Weiterverarbeitung, wie bei der Verseifung beschrieben wurde. Eine chemische Reinigung des Untersuchungsmaterials ist aber äusserst selten notwendig; sie wird im allgemeinen vorteilhafter durch die Verseifung ersetzt. Das Verfahren ist ohne Einfluss auf das quantitative Ergebnis.

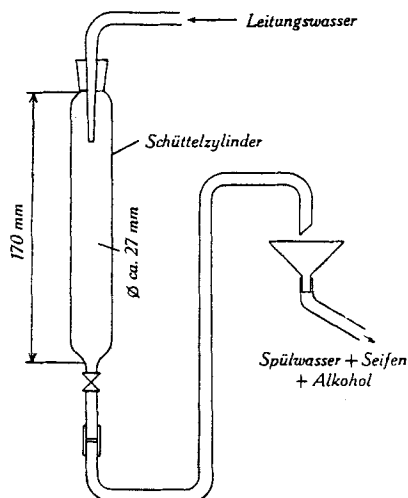


Fig. 4.

Vorrichtung zur emulsionslosen Entseifung und Auswaschung von verseiftem Extraktionsgut.

Zur Illustration des ganzen Arbeitsvorganges einer quantitativen Auswertung seien im Folgenden 2 Beispiele angeführt:

1. Beispiel: Bestimmung von Vitamin A.

Einwage: 1 g Tran pro 50 cm³ Petroläther. Davon werden 10 cm³ zur chromatographischen Reinigung verwendet und nach dem Eindampfen des Eluates auf 25 cm³ aufgefüllt (Lösung a). Von dieser Lösung a mussten 0,5 cm³ auf 50 cm³ verdünnt werden, um im *Hilger'schen* A-Vitamer eine Extinktion von 0,3 zu geben. Die spektrophotometrische Auswertung wurde mit einem Sektor von $\alpha = 88^{\circ}24'$ (entsprechend $\log J_{1/J} = E = 0,6100$) bei den Schichtdicken von: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26,5, 29, 32, 35 und 40 mm durchgeführt und das Extinktionsmaximum bei 3280 Å bei der Schichtdicke von 2,0 cm erreicht. Daraus errechnet sich die $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ zu:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{0,61}{8 \times 10^{-3} \times 2,0} = 38,1 \quad \text{und}$$

die biologische Wirksamkeit des Präparates nach der Vereinbarung des Jahres 1934 zu:
 $38,1 \times 1600 = 61\,000 \text{ int. Einheiten/g.}$

2. Beispiel: Bestimmung von β -Carotin.

Einwage, Chromatographie und Eluierung wie im Beispiel 1. Extinktion des auf 25 cm aufgefüllten und nicht weiter verdünnten Eluates (a) bei 1 cm Schichtdicke = 0,72.

Die $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ des Untersuchungsmaterials beträgt:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{0,72}{0,8 \times 1} = 0,90$$

und der β -Carotingehalt des Untersuchungsmaterials:

$$\frac{(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_{\text{Vers.-Lsg.}}}{(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_{\text{Test-Lsg.}}} = \frac{0,90}{2140} = 0,420 \times 10^{-3} \text{ g } \beta\text{-Carotin/g.}$$

Aus Gründen der zeitbedingten Platz- und Materialeinsparung wird auf die Veröffentlichung der Versuchsunterlagen und einer vollständigen Literaturliste verzichtet. Eine Zusammenstellung von Auszügen aus den Versuchsprotokollen steht Interessenten zur Verfügung.

Basel, den 31. Januar 1944.

Wissenschaftlich-analytisches Laboratorium der
F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.

53. Recherches dans la série des cyclites VII. Sur la cyclite des moules (mytilite) et sur quelques substances voisines¹⁾

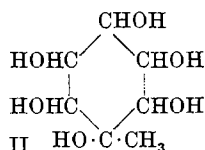
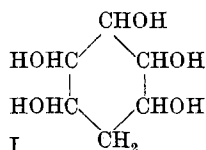
par Théodore Posternak.

(10 II 44)

En 1913, *B. C. P. Jansen*²⁾ isola des muscles obturateurs des moules (*mytilus edulis*) une substance à laquelle il donna le nom de *mytilite* et qu'il considérait comme un cyclchexane-pentol $C_6H_{12}O_5$ (I).

Quelques années plus tard, *D. Ackermann*³⁾ retira à son tour des moules le même composé auquel il attribua la formule $C_7H_{14}O_6$. D'après cet auteur, la mytilite contient 6 groupes hydroxyles et représente une méthyl-inosite (II), chez laquelle, vu l'absence de groupe méthoxy, le reste méthyle ne peut être fixé qu'à un atome de carbone.

En 1926 enfin, *Daniel et Doran*⁴⁾ eurent la mytilite entre les mains et se prononcèrent en faveur de la formule d'*Ackermann*.



¹⁾ Les principaux résultats de ce travail ont été communiqués le 28 II 43 à la Société Suisse de Chimie, à Berne; voir Schw. Ch. Z. **26**, 155 (1943).

²⁾ Z. physiol. Ch. **85**, 231 (1913).

³⁾ B. **54**, 1938 (1921).

⁴⁾ Biochem. J. **20**, 676 (1926).