

Über eine Schnellmethode zur Bestimmung des Carotins.

Von O. Hromatka und R. Kerl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 12. April 1946. Vorgelegt in der Sitzung am 29. Mai 1947.)

Nach unseren heutigen Erkenntnissen wirken folgende Carotinfarbstoffe als Provitamin A:

1. Die im gesamten Pflanzenreich verbreiteten Farbstoffe α -, β - und das seltener vorkommende γ -Carotin.
2. Das in einzelnen Pflanzenteilen, z. B. im Gelbmais, reichlich vorhandene Kryptoxanthin.
3. Das in Blaualgen aufgefunden Myroxanthin¹.
4. Die ebenfalls in Blaualgen vorkommenden Carotinfarbstoffe Aphanin und Aphanicin².
5. Das Echinonen³ der Seeigel.

Praktische Bedeutung als Vitamin-A-Quelle für Mensch und Tier hat von all diesen Provitaminen nur das kurz als „Carotin“ bezeichnete Gemisch von α -, β - und γ -Carotin, in dem das β -Carotin stets mengenmäßig vorherrscht und auch biologisch am wichtigsten ist, weil es bei der fermentativen Spaltung im tierischen Organismus 2 Moleküle Vitamin A liefert, während aus den anderen Provitaminen nur ein Molekül Vitamin A entstehen kann. Wenngleich durch die wichtigen Untersuchungen von

¹ I. M. Heilbron, B. Lythgoe, R. F. Phipers, Nature (London) **136**, 989 (1935); I. M. Heilbron, E. G. Parry, R. F. Phipers, Biochemic. J. **29**, 1376–81 (1935); Chem. Zbl. **1935** II, 2529; I. M. Heilbron, B. Lythgoe, J. chem. Soc. London **1936**, 1376–80; Chem. Zbl. **1936**, II, 3803; P. W. Carter, I. M. Heilbron, F. R. S. Lythgoe, B. Lythgoe, Proc. Roy. Soc. (London) **128**, 82–109 (1939); Chem. Zbl. **1940** I, 3938; I. M. Heilbron, J. chem. Soc. London **1942**, 79–89; Chem. Zbl. **1942** II, 1806; I. M. Heilbron, Nature (London) **149**, 398–400 (1942); Chem. Zbl. **1942** II, 2706.

² J. Tischer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **251**, 109 (1938); **260**, 257 (1939).

³ E. Lederer, C. R. Acad. Sci. Paris **201**, 300 (1935); Chem. Zbl. **1936** I, 3146; E. Lederer und T. Moore, Nature (London) **137**, 996–97 (1936); Chem. Zbl. **1936** II, 3132.

*Kuhn*⁴ und *Karrer*⁵ die Trennung von α -, β - und γ -Carotin auf chromatographischem Wege durchgeführt wurde und seither auch in vielen analytischen Bestimmungsverfahren berücksichtigt wird, genügt es für viele praktische Bedürfnisse der Provitamin-A-Bestimmung in pflanzlichen und tierischen Rohstoffen, die Bestimmung des „Carotins“ schlechtweg, also ohne Trennung in α -, β - und γ -Carotin auszuführen. Dies umso mehr, als beim Vergleich von chemisch bestimmtem Provitamin A und den durch den Tierversuch gefundenen Mengen größere Unterschiede z. B. durch unterschiedliche Resorption auftreten als durch die geringere Wirksamkeit der kleinen Mengen α - oder γ -Carotin.

Wegen der großen Wichtigkeit des Vitamins A für die Ernährung wurden in den beiden letzten Jahrzehnten eine sehr große Zahl von Analysenmethoden für das Provitamin A ausgearbeitet und veröffentlicht. Über die im Buche von *F. Ostorner*, Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungs-Methoden⁶, hinaus sind besonders im amerikanischen und englischen Schrifttum viele Analysenmethoden beschrieben, die zum Teil als vereinfachte Schnellmethoden gedacht sind. Es sollen daher in dieser Arbeit — ohne Anspruch auf Vollständigkeit — die neueren Arbeiten erwähnt werden.

Bei der Carotinbestimmung werden meistens die folgenden Arbeitsgänge angewendet:

1. Die *Extraktion* der Farbstoffe aus dem Pflanzenmaterial.
2. Die *Verseifung* der im Extrakte vorhandenen Ester, also besonders des Chlorophylls und der Farbwachse (Xanthophyllester).
3. Die Trennung des Carotins von den hydroxylhaltigen Carotinfarbstoffen (Xanthophyll) durch *Entmischung* zwischen Benzin und Alkohol.
4. Die weitere Trennung der Carotinfarbstoffe durch die *chromatographische Adsorptionsanalyse*.
5. Die quantitative *Bestimmung* des nach 1–4 isolierten Carotins.

Die Extraktion von Pigmenten aus pflanzlichem Material bietet an sich keine Schwierigkeiten. Die besondere Empfindlichkeit des Carotins, besonders gegen Oxydation, erfordert aber eine besondere Auswahl der Lösungsmittel, von denen z. B. gechlort Kohlenwasserstoffe ungeeignet sind, und eine vorsichtige und schnelle Extraktion unter milden Bedingungen. Seit den Arbeiten von *Willstätter* und *Stoll*⁷ wird als Extraktionsmittel für die Pflanzenpigmente häufig bis in die neueste Zeit *Aceton* allein oder zusammen mit anderen Lösungsmitteln angewendet, so von *Russel*, *Taylor* und *Chichester*⁸, von *Miller*⁹, *Ferguson* und

⁴ *R. Kuhn* und *E. Lederer*, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 1349 (1931); *R. Kuhn* und *H. Brockmann*, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 407 (1933).

⁵ *P. Karrer*, *A. Helfenstein*, *H. Wehrli*, *B. Pieper*, *R. Morf*, Helv. chim. Acta **14**, 614 (1931).

⁶ 2. Aufl. F. Enke-Verlag, Stuttgart 1940.

⁷ *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über Chlorophyll, Julius Springer, Berlin 1913.

⁸ *W. C. Russel*, *M. W. Taylor*, *D. F. Chichester*, Plant Physiol. **10**, 325–40 (1935); Chem. Zbl. **1935 II**, 2710.

⁹ *E. S. Miller*, J. Amer. chem. Soc. **57**, 347–49 (1935); Chem. Zbl. **1935 II**, 2711.

*Bishop*¹⁰, *Murri*¹¹, *Zimmermann*, *Tressler* und *Maynard*¹², sowie von *Petering* zusammen mit verschiedenen Mitarbeitern¹³, endlich auch für die industrielle Extraktion von Carotin aus Pflanzen von *Schertz*¹⁴. Die Extraktion der Pflanzenpigmente mit Aceton ist eigentlich nur dann sinnvoll, wenn, wie bei *Willstätter*, auch das Chlorophyll, das in Aceton gut löslich ist, bestimmt werden soll. Bei frischen Pflanzen hat Aceton natürlich noch den Vorteil, daß die Pflanzen durch das Lösungsmittel entwässert werden. Aber letzteres erreicht man auch durch die Anwendung von Methyl- oder Äthylalkohol. Während man das Aceton durch Extraktion mit Wasser entfernen muß, können die alkoholischen Lösungen für die folgende Verseifung und Entmischung verwendet werden. So wurde auch die Extraktion mit Alkoholen mehrfach beschrieben, z. B. durch Rückflußkochen der Probe mit Alkohol von *Bolin* und *Khalapur*¹⁵ und von *Moore*¹⁶. Wie aber *Menke*¹⁷ feststellte, bleibt der Rückstand von pflanzlichem Material nach der Extraktion mit Methanol noch ziegelrot und gibt das Carotin erst bei der Behandlung mit Äther augenblicklich ab. Äther oder Petroläther (Normalbenzin, Skellysolve-Benzin usw.) allein kann man zwar bei getrocknetem Pflanzenmaterial verwenden. Schon im Jahre 1887 beschrieb *Arnaud*¹⁸ die Extraktion grüner Pflanzen mit Petroläther; aber seine Angaben, daß nur Carotin und keine anderen Pflanzenpigmente von diesem Lösungsmittel aufgenommen werden, stimmen nicht, und man kann auch keineswegs durch eine kolorimetrische Analyse der nicht vorbehandelten Petrolätherlösung den Carotingehalt der Pflanzen bestimmen. *L. Zechmeister*¹⁹ trocknet das Pflanzenmaterial vor der mit Äther ausgeführten Extraktion, *L. Wolff*²⁰ verwendet zur Trocknung der Frischpflanzen wasserfreies Natriumsulfat und extrahiert dann mit Petroläther. Günstiger ist es auf jeden Fall, die Extraktion der Pigmente durch gleichzeitige oder aufeinanderfolgende

¹⁰ *W. S. Ferguson* und *G. Bishop*, Analyst **61**, 515–18 (1936); Chem. Zbl. **1936 II**, 3013.

¹¹ *J. K. Murri*, Biochimija (Russ.) **2**, 831–40 (1937); Chem. Zbl. **1938 II**, 1094.

¹² *W. J. Zimmermann*, *D. K. Tressler*, *L. A. Maynard*, Food Res. **5**, 93–101 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 2743.

¹³ *H. G. Petering*, *W. Wolman*, *R. P. Hibbard*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **12**, 148–51 (1940); Chem. Zbl. **1940 I**, 3827; *H. G. Petering*, *P. W. Morgal*, *E. J. Miller*, Ind. Eng. Chem. ind. Edit. **32**, 1407–12 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 1321; *P. W. Morgal*, *H. G. Petering*, *E. J. Miller*, Ind. Eng. Chem. ind. Edit. **33**, 1298–1302 (1941); Chem. Zbl. **1942 I**, 2428; *H. G. Petering*, *E. J. Benne*, *P. W. Morgal*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **13**, 236 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 2299.

¹⁴ *F. M. Schertz*, Ind. Eng. Chem. ind. Edit. **30**, 1073–75 (1938); Chem. Zbl. **1939 I**, 3798; *F. M. Schertz* und *R. H. Sand*, A. P. 2098110; Chem. Zbl. **1938 I**, 1830.

¹⁵ *D. W. Bolin* und *A. M. Khalapur*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **10**, 417–18 (1938); Chem. Zbl. **1939 I**, 4132.

¹⁶ *L. A. Moore*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **12**, 726–29 (1940); Chem. Zbl. **1941 II**, 2715.

¹⁷ *W. Menke*, Naturwiss. **28**, 31 (1940).

¹⁸ *A. Arnaud*, C. R. Acad. Sci. Paris **104**, 1293 (1887).

¹⁹ *L. Zechmeister*, V. Congrès international technique et chimique des industries agricoles, Schéveningen 20–21 (1937); Chem. Zbl. **1938 I**, 2392.

²⁰ *L. Wolff*, Z. Vitaminforschung **7**, 227 (1938).

Extraktion mit Alkoholen (am besten Methanol) und Petroläther oder Äther vorzunehmen, weil man dann, ohne ein drittes Lösungsmittel (Aceton) entfernen zu müssen, die Verseifung oder die Phasentrennung anschließen kann. So arbeiten z. B. *Kuhn* und *Brockmann*²¹ und neben vielen anderen Autoren in neuester Zeit *Fujita*, *Narita* und *Ajisaka*²². Von *Moore* und *Ray Ely*²³ wurde endlich eine Schnellextraktion beschrieben, bei der unter Anwendung eines Rührapparates die Extraktion einer Analysenprobe mit einem Gemisch von 4 Teilen Alkohol und 3 Teilen Petroläther in 5 Minuten vollendet sein soll. Einen neuen Gedanken brachte die Arbeit von *Kuhn* und *Bielig*²⁴, in der das Carotin aus den in frischen Pflanzen (Möhren) vorliegenden Eiweißsymplexen durch den Zusatz der gleichen Menge einer 1,5 – 2,0 % igen Zephiorollösung zum Pflanzenbrei abgelöst und dann mit Petroläther ausgeschüttelt wird.

Der zweite Arbeitsprozeß, die *Verseifung*, wird zweckmäßig zusammen mit dem dritten Vorgang, der *Entmischung*, behandelt. Denn die Verseifung hat folgende Aufgaben:

a) Soll sie im Extrakt vorhandene Chlorophylle in Alkalichlorophyllide verwandeln, die in wäßrig-alkoholischen Laugen löslich, in Äther oder Petroläther unlöslich sind und sich durch die folgende Entmischung vom Carotin trennen lassen.

b) Nach der Feststellung von *Borodin*²⁵ lassen sich die Carotinfarbstoffe in alkohollösliche und benznlösliche einteilen. Zu den ersten gehörten hydroxylhältige Farbstoffe, die unter die Sammelbezeichnung Xanthophyll oder Phytoxanthin fallen; zu letzteren die Kohlenwasserstoffe Carotin, Lykopin, teilweise das eine einzige Hydroxylgruppe tragende Kryptoxanthin und endlich die mit Carbonsäuren veresterten Xanthophylle, die sogenannten Farbwachse. Diese Farbwachse gehen bei der Verseifung in Xanthophyll über, das jetzt bei der Verteilung in die Methanolsschicht geht und von den Kohlenwasserstoffen getrennt werden kann.

c) Endlich erfaßt die Verseifung noch *ungefärbte* Ester (Fette, Wachse usw.), die bei der Verteilung ebenfalls epiphatisch sein würden und verhindert, daß durch die Gegenwart dieser Stoffe in der Petrolätherlösung nachfolgende Vorgänge, z. B. die chromatographische Adsorption, gestört würden.

Man muß bei der Prüfung der Frage, ob und an welcher Stelle des Analysenganges man verseifen soll, sich die Aufgaben der Verseifung vor Augen halten.

Kuhn und *Brockmann*²¹ wollen eine getrennte Bestimmung von Carotin usw., Xantophyll und Farbwachsen durchführen. Daher wird zu-

²¹ *R. Kuhn* und *H. Brockmann*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **206**, 41 (1932).

²² *Akiji Fujita*, *Tsunesaburo Narita* und *Hasanobu Ajisaka*, Biochém. Z. **308**, 420 (1941).

²³ *L. A. Moore* und *Ray Ely*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **13**, 600–01 (1941) Chem. Zbl. **1943 I**, 1687.

²⁴ *R. Kuhn* und *R. J. Bielig*, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 1090 (1940).

²⁵ *J. Borodin*, Bull. Acad. Imper. Sci. St. Petersbourg **11**, 512 (1883); Bot. Ztg. **41**, 577–79 (1883).

erst die Entmischung vorgenommen, dann werden die Farbwachse der Petrolätherschicht verseift, und endlich wird die Entmischung wiederholt.

In Anlehnung an diese Vorschrift wurde die Reihenfolge Verteilung, Verseifung, nochmalige Verteilung auch in Analysenvorschriften beibehalten, in denen es nur auf die Bestimmung des Carotins, nicht aber auf die des Xanthophylls und der Farbwachse (Xanthophyllester) ankommt. Dies trifft auch für die im experimentellen Teil als „Standardmethode“ beschriebene Analysenvorschrift zu, mit der die Ergebnisse der neu entwickelten Schnellmethode von uns verglichen wurden. In konsequenter Weise kann aber auf die Verteilung vor der Verseifung verzichtet werden, wenn es auf die getrennte Bestimmung der Xanthophyllester neben Xanthophyll nicht ankommt. Auf diese Weise arbeiten *Deleano* und *Dick*²⁶, *L. Zechmeister*¹⁹, *Bolin* und *Khalapur*¹⁵, *L. Wolff*²⁰ und endlich auch die Standardmethode des Dänischen Landwirtschaftsministeriums (siehe bei *Lodi*²⁷). Andere Autoren gehen noch einen Schritt weiter und unterwerfen das Ausgangsmaterial vor oder gleichzeitig mit der Extraktion der Verseifung mit alkoholischer Lauge und erreichen dabei wahrscheinlich eine gute Aufschließung der Pflanzenzellen, was besonders bei getrocknetem Pflanzenmaterial sehr wichtig ist. Solche Vorschriften finden wir von *Coward*²⁸, *Guilbert*²⁹, *Ferguson* und *Bishop*¹⁰, *Peterson* und Mitarbeiter³⁰, *Moon*³¹ für grüne Pflanzen angegeben, von *Fraps* und *Kemmerer*³² für Mais und von *Skurnik* und *Suhonen*³³ für tierische Organe. *Pyke*³⁴ schüttelt bei einer Schnellbestimmung von Carotin in Grasmehl das Grasmehl 5 Minuten im Zentrifugenglas mit Äther und 25 % iger methanolischer Kalilauge und zentrifugiert nachher. Es sei dahingestellt, ob bei dieser Behandlung die vorliegenden Ester schon vollständig verseift sein können. Auch beim *Petering-Wolman-Hibbard*-Verfahren¹³ und seinen späteren Modifikationen, bei denen das Chlorophyll aus dem Aceton-extrakt der Pflanzenpigmente durch Behandeln mit einer konz. wäßrigen Lösung von Bariumhydroxyd oder durch Zugabe von $\text{Ba}(\text{OH})_2 + 8 \text{H}_2\text{O}$ zum Extrakt als filtrierbarer Niederschlag entfernt wird, scheint es sich weniger um eine verseifende Wirkung der Barytlauge als vielmehr um eine Absorptionswirkung oder um eine Salzbildung mit dem schon vorher

²⁶ *N. T. Deleano* und *J. Dick*, Biochem. Z. **259**, 110 (1933).

²⁷ *M. Lodi*, Vit. und Horm. **4**, 443 (1943).

²⁸ *K. H. Coward*, Biochemic. J. **18**, 1114–22 (1924); Chem. Zbl. **1925 I**, 390.

²⁹ *H. R. Guilbert*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **6**, 452–54 (1934); Chem. Zbl. **1935 II**, 1203.

³⁰ *W. J. Peterson*, *J. S. Hughes*, *H. F. Freeman*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **9**, 71–72 (1937); Chem. Zbl. **1937 II**, 1910; *W. J. Peterson*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **13**, 212–16 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 58.

³¹ *F. E. Moon*, J. Agric. Sci. **29**, 295–301 (1939); Chem. Zbl. **1939 II**, 4126.

³² *G. S. Fraps* und *A. R. Kemmerer*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **13**, 806–09 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 1641.

³³ *L. Skurnik* und *P. Suhonen*, Z. Vitaminforsch. **8**, 316–23 (1938); Chem. Zbl. **1939 II**, 450.

³⁴ *M. A. Pyke*, J. Soc. chem. Ind., Chem. a. Ind. **55**, Trans. 139–40 (1936); Chem. Zbl. **1936 II**, 2046.

enzymatisch verseiften Chlorophyll zu handeln. Eine Verseifung des Acetonextraktes nimmt dagegen *Miller*³⁵ in einer Schnellmethode vor.

Die Arbeitsweisen bei der Verseifung variieren; man verwendet verschiedene konzentrierte Lösungen von Kalilauge in Methanol, das wegen der Beständigkeit der Lösungen am günstigsten ist, oder Alkohol oder Wasser und arbeitet längere Zeit bei Zimmertemperatur oder kurze Zeit bei Siedehitze.

Wesentlich ist es, bei der Verseifung die Luft möglichst auszuschließen, am besten durch Überleiten von Stickstoff. Dagegen ist die Verwendung von Kohlensäure in Gegenwart von Kalilauge³³ sicher unzweckmäßig. Zu bemerken ist, daß verschiedene Analysenvorschriften auf die Verseifung überhaupt verzichten; in diesem Falle muß die Abtrennung der Farbester von anderen Operationen, hauptsächlich der chromatographischen Adsorption, übernommen werden.

Die Entmischung wird seit den Arbeiten von *Willstätter* und *Stoll*⁷ fast immer in der gleichen Weise durch Ausschütteln der Benzin- oder Petrolätherlösung mit ungefähr 90 % igem Methanol vorgenommen. Eine genaue Untersuchung dieses Vorganges hat *Miller*³⁵ vorgenommen. Er stellte fest, daß man eine Methanolkonzentration von 89 – 92 % genau einhalten muß, daß aber auch in diesem günstigsten Falle noch 10 – 6 % Xanthophyll in der Epiphase zurückbleiben. Würde man aber mit 95 % igem Methanol arbeiten, so würde man durch die Aufnahme im Methanol 10 % Carotin verlieren. Um zu vermeiden, daß durch die gegenseitige Löslichkeit von 90 % igem Methanol und Petroläther zu große Konzentrationsänderungen eintreten, kann man „Methanol, mit Petroläther gesättigt“ und „Petroläther, mit Methanol gesättigt“ anwenden²⁷. In neuerer Zeit wurde auch vorgeschlagen, statt 90 % igem Methanol oder 85 % igem Alkohol als hypophasische Flüssigkeit eine Diacetonlösung (100 Vol. Diaceton + 6 Vol. Wasser) anzuwenden^{36, 37}.

Die Mehrzahl der analytischen Verfahren bedient sich der Phasentrennung und die Ergebnisse sprechen voll dafür, daß die dadurch bedingten Fehler entweder nicht groß sind oder sich kompensieren.

Immerhin verzichten manche Autoren auf diese Reinigungsoperation, so z. B. *Fraps* und Mitarbeiter³⁸ und *Bolton* und *Common*³⁹.

In diesem Falle muß dann die chromatographische Adsorption auch die sonst der Phasentrennung zufallenden Reinigungsoperationen leisten. Bei der Anwendung dieser Methode für analytische Zwecke haben wir vor allem klarzustellen, ob durch sie, so wie es ursprünglich von *Tswett*

³⁵ E. S. Miller, J. Amer. chem. Soc. **57**, 347 – 49 (1935); Chem. Zbl. **1935 II**, 2711.

³⁶ D. M. Hegstedt, I. W. Porter und W. H. Peterson, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **11**, 256 – 58 (1939); Chem. Zbl. **1939 II**, 2183.

³⁷ W. I. Zimmermann, D. K. Tressler und L. A. Maynard, Food Res. **5**, 93 – 101 (1940); **6**, 57 – 68 (1941); Chem. Zbl. **1941 I**, 2743; **1941 II**, 1874.

³⁸ G. S. Fraps, A. R. Kemmerer und S. M. Greenberg, J. Assoc. off. agric. Chemists **23**, 659 – 62 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 592.

³⁹ W. Bolton und R. H. Common, Nature (London) **148**, 373 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 474; J. Soc. chem. Ind., **61**, 50 – 51 (1942); Chem. Zbl. **1942 II**, 2325.

gemacht wurde, eine grobe Abtrennung von Farbstoffgruppen erfolgen soll, bei der wir dann die Kohlenwasserstoffe unter den Carotinoiden zusammen vorfinden, oder ob eine Trennung von Lykopin und Carotin oder endlich eine solche von α -, β - und γ -Carotin erreicht werden soll. Für die letzteren Zwecke wurde von *Kuhn* und Mitarbeitern⁴ Fullererde, Fasertonerde und Aluminiumoxyd, von *Karrer*⁴⁰ Calciumhydroxyd angewendet. Besonders das nach *Brockmann* standardisierte Aluminiumoxyd wurde in der Zukunft wegen seiner leichten Handhabung in zahlreichen Analysenmethoden angewendet, so von *Kuhn* und *Brockmann*²¹, *Pfaff* und *Pfützer*⁴¹, *Zechmeister*¹⁹, *Emmerie* und *Wolff*⁴² und vielen anderen.

Als Lösungsmittel für die Carotinoide werden verschiedene Benzinfraktionen und Gemische aus Benzin-Benzol verwendet, den Zusatz von 3% Aceton zum Benzin empfiehlt *Seaber*⁴³. Auch Calciumhydroxyd wurde, obwohl es sich viel schlechter handhaben lässt, bei verschiedenen Analysenvorschriften vorgeschlagen, in jüngster Zeit von *Fujita* und Mitarbeitern²².

In einer interessanten Arbeit untersuchten *v. Euler* und *Gard*⁴⁴ zahlreiche Adsorptionsmittel für die Trennung der Carotinoide, so Magnesiumoxyd, tertiäres Magnesiumphosphat, Calciumoxyd, Calciumcarbonat, Eisenoxyd, Aluminiumoxyd, javanischen Ton und Ceroxyd. Magnesiumoxyd und Magnesiumhydroxyd wurde von *Strain*⁴⁵ als Adsorptionsmittel vorgeschlagen, und zwar sowohl zur Trennung von α - und β -Carotin als auch zur Trennung des „Carotins“ von anderen Pigmenten, wie Lycopin, Xanthophyll und Chlorophyll. *Strain* verwendete als Lösungsmittel auch gechlorte Kohlenwasserstoffe und als Träger für das Magnesiumhydroxyd Kieselerde und Magnesiumsilicate. Das Magnesiumoxyd wurde in der Folgezeit von *Bukin* und *Murri*⁴⁶ zur Trennung von Carotin und Lykopin herangezogen und in einer eigens hergestellten, Magnesiumcarbonat enthaltenden Form von *Fraps* und Mitarbeitern^{32, 47}. Zur Carotingewinnung verwendete *Lindquist-Ryssakowa*⁴⁸ die Adsorption an einer aus Magne-

⁴⁰ *P. Karrer* und *O. Walker*, Helv. chim. Acta **16**, 641 (1933).

⁴¹ *C. Pfaff* und *G. Pfützer*, Z. angew. Chem. **50**, 179 (1937).

⁴² *A. Emmerie* und *L. K. Wolff*, Acta brevia neerland. Physiol. Pharmacolog. Microbiolog. **8**, 88–89 (1938); Chem. Zbl. **1939 I**, 5018.

⁴³ *W. M. Seaber*, Analyst. **65**, 266–78 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 1240.

⁴⁴ *H. V. Euler* und *U. Gard*, Ark. Kemi. Mineral. Geol. Abt. B **10**, Nr. 19, 1–6 (1931); Chem. Zbl. **1932 I**, 1544.

⁴⁵ *H. H. Strain*, J. Biol. Chem. **105**, 523–35 (1934); **111**, 85–93 (1935); **127**, 191–201 (1939); Chem. Zbl. **1935 I**, 1066; **1936 I**, 4167; **1939 II**, 1675. J. Amer. chem. Soc. **63**, 3448–52 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 1126.

⁴⁶ *W. N. Bukin* und *I. K. Murri*, Bull. appl. Bot. Genetics, Plant Breeding Nr. 8 (1935); Chem. Zbl. **1937 I**, 2204.

⁴⁷ *G. S. Fraps* und *A. R. Kemmerer*, J. Assoc. off. agric. Chemists **22**, 190–95 (1939); Chem. Zbl. **1939 II**, 962; News Edit. Americ. chem. Soc. **19**, 846–47 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 564; *G. S. Fraps*, *A. R. Kemmerer* und *S. M. Greenberg*, Ind. Eng. Chem. anal. Edit. **12**, 16–18 (1940); Chem. Zbl. **1940 I**, 3762; J. Assoc. off. agric. Chemists **23**, 422–25 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 674; J. Assoc. off. agric. Chemists **23**, 659–62 (1940); Chem. Zbl. **1941 I**, 592.

⁴⁸ *E. V. Lindquist-Ryssakowa*, Proc. sci. Inst. Vitamin Res. U d S S R **1**, 216–23 (1936); Chem. Zbl. **1937 I**, 4816.

siumchlorid und Ammoniak hergestellten Fällung; Rosenberg⁴⁹ fällt Carotin aus Mohrrübensaft mit Magnesiumchlorid, nachdem er in einer früheren Mitteilung⁵⁰ die Fällung mit einer aus Bleioxyd und Bleiacetat hergestellten Probe vorgenommen hat. Als weitere Adsorptionsmittel wurden vorgeschlagen: sekundäres Calciumphosphat von Moore¹⁶, Bolton und Common³⁹; Kreide zur Trennung von Carotin und Lykopin von Coward²⁸, Hydroraffin K₄ von Marcussen⁵¹ zur Trennung von Carotin und Vitamin A aus Chloroformlösung. In einer größeren Zahl von Arbeiten beschrieben, wie schon früher kurz erwähnt, Petering und Mitarbeiter¹³ die Verwendung von Bariumhydroxyd als Adsorptions- bzw. Fällungsmittel für Chlorophyll. Das Carotin geht dabei in das Acetonfiltrat.

Natürlich hat auch die chromatographische Trennung auf die eine oder andere Art ihre Schwierigkeiten – erhöhter Zeit und Lösungsmittelbedarf – und Fehlerquellen, die man in Carotinverlusten oder in Veränderungen des Carotins – Isomerisierung durch das Adsorptionsmittel – erblicken kann. Willstaedt und With⁵² bestimmen diese Fehler als recht beträchtlich.

Es ist unter diesen Umständen begreiflich, daß manche Analysenmethoden, so die dänische Standardmethode, keine chromatographische Trennung anwenden. Hingegen betonen Svanhof und Dam⁵³ die Notwendigkeit der chromatographischen Trennung, führen aber zum Ausgleich der Fehlerquellen bestimmte Faktoren ein.

Die fünfte Operation, nämlich die Bestimmung des nach der einen oder anderen Weise in Lösung erhaltenen Carotins, kann kürzer behandelt werden, obwohl auch hier eine sehr reiche Literatur vorliegt. Hier liegen die Verhältnisse so, daß sich die auf der Oxydation mit Chromsäure beruhende chemische Methode von Deleano und Dick²⁶ gegenüber den auf der Farbmessung beruhenden Methoden nicht durchsetzen konnte. Die Messung der Farbintensität wurde anfangs durch den Vergleich mit Kalumbichromatlösungen ausgeführt. Krogis⁵⁴ stellte die pH-Abhängigkeit dieses Standards fest und verwendete Kalumbichromat in Gegenwart eines Phosphatpuffers. Auch Azobenzol wurde als Standardlösung zum Kolorimetrieren herangezogen⁵⁵.

In neuerer Zeit hat aber die Absolutkolorimetrie mit dem Stufenphotometer immer mehr in alle Laboratorien Eingang gefunden und es wurden verschiedentlich Eichkurven und Umrechnungsfaktoren veröffentlicht. Die Messung wird oftmals mit der elektrischen Photozelle vorgenommen. Während diese photometrischen Methoden bestimmt in

⁴⁹ G. J. Rosenberg, Russ. P. 48316 (1935); Chem. Zbl. **1937 II**, 108.

⁵⁰ G. J. Rosenberg, Bull. Soc. Chim. biol. (Moskau) **16**, 1761 (1934); Chem. Zbl. **1935 I**, 3806.

⁵¹ E. Marcussen, Danks Tidsskr. Farmac. **12**, 217–25 (1938); Chem. Zbl. **1939 I**, 165.

⁵² H. Willstaedt und T. K. With, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **253**, 40 (1938).

⁵³ K. Svanhof und H. Dam, Z. Vitaminforsch. **11**, 361–72 (1941); Chem. Zbl. **1942 II**, 799.

⁵⁴ A. Krogis, Biochem. Z. **287**, 126–34 (1936).

⁵⁵ R. Kuhn und H. Brockmann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **206**, 43 (1932).

der Ausführung die einfachsten sind, wird auch auf die spektrophotometrische Methode oftmals zurückgegriffen. Es sei hier besonders auf die Arbeiten von *Miller*⁵⁶ verwiesen, der außer genauen Angaben über die Adsorptionsspektren der Carotinoide auch ihre Anwendung für die analytische Bestimmung von binären und ternären Carotinoidgemischen beschreibt.

Trotz — oder vielleicht gerade wegen — dieser äußerst umfangreichen Literatur über die Bestimmung des Carotins ist es zunächst nicht leicht, ein einfaches und schnell ausführbares Verfahren zu finden, das gestattet, den Carotingehalt in verschiedenem Pflanzenmaterial zu bestimmen. Auch wir standen vor dieser Schwierigkeit, als wir in einem anderen Zusammenhang zahlreiche Carotinbestimmungen in Pflanzenteilen möglichst rasch auszuführen hatten. Bei einer kritischen Betrachtung der Literatur, wie wir sie oben in Kürze versucht haben, und durch zahlreiche Versuche, über die hier nicht berichtet werden soll, kamen wir zur Ansicht, daß man die Extraktion und die Verteilung mit Methanol und Petroläther beibehalten solle und diese Arbeitsgänge auch ziemlich rasch ausführen kann; dagegen müßte auf die länger dauernde Verseifung unbedingt verzichtet werden. In der nach der Verteilung zwischen Methanol und Petroläther erhaltenen Petrolätherlösung befand sich nun praktisch alles Carotin, aber es waren noch größere Mengen Chlorophyll und gelbe Farbstoffe (Xanthophyllester) zugegen. Folglich mußte ein weiterer Arbeitsprozeß, und zwar die selektive Adsorption, diese Trennung übernehmen. Wir versuchten zuerst, die Adsorption auf der Säule von Aluminiumoxyd nach *Brockmann* auszuführen. Dies bietet aber zwei Nachteile:

1. wird Chlorophyll und seine grün gefärbten Umwandlungsprodukte vom Aluminiumoxyd nicht sehr intensiv adsorbiert und braucht deshalb eine ziemlich breite obere Zone;

2. tritt im obersten Teil der Säule leicht eine Verstopfung durch die festgehaltenen Farbstoffe ein, die das weitere Durchfließen oder Durchsaugen der Farbstofflösung in lästiger Weise verlangsamt und sich nur durch vorsichtiges Umrühren und Abheben der obersten Zone bekämpfen läßt.

Wir suchten daher nach besser geeigneten Adsorptionsmitteln für die Adsorption der grünen Farbstoffe und fanden, daß das Kieselgel, feinst gepulvert, der Firma Gebr. *Hermann*, Köln-Ehrenfeld das Chlorophyll intensiv adsorbiert und also den unter 1. genannten Mißstand überwinden läßt. Dagegen war es viel schwieriger, mit Kieselgel gleichmäßige Adsorptionssäulen herzustellen als mit dem standardisierten Aluminiumoxyd. Da aber ein so ausgeprägter Unterschied in der Adsorption des

⁵⁶ *E. S. Miller*, Plant. Physiol. **9**, 179, 681–84, 693–94 (1934); Chem. Zbl. **1935 II**, 2961; **1936 I**, 784; Bot. Gaz. **96**, 447–67 (1935); Chem. Zbl. **1935 I**, 3544; Plant. Physiol. **12**, 667–84 (1937); Chem. Zbl. **1938 I**, 4655; Cereal Chem. **15**, 310–16 (1938); Chem. Zbl. **1938 II**, 2363; Plant. Physiol. **12**, 66 (1937); *E. S. Miller*, *G. Mackinney* und *F. F. Zscheile jr.*, Plant. Physiol. **10**, 375–81 (1935); Chem. Zbl. **1936 I**, 564.

Chlorophylls und des Carotins auf Silicagel bestand, versuchten wir ohne Anwendung des *Tswettschen Durchflußverfahrens* auszukommen. Und es gelang tatsächlich, durch langsames Eintragen von Kieselgel in die Petrolätherlösung der Farbstoffe zuerst die grünen Farbstoffe, gleichzeitig aber auch die Xanthophyllester zu adsorbieren. Während Kieselgel aus reinen Carotinlösungen in Petroläther beträchtliche Mengen von Carotin adsorbiert, ist die Adsorptionsfähigkeit des mit Chlorophyll bedeckten Kieselgels für Carotin viel geringer. Mindestens kann man durch ein nachfolgendes Waschen mit Petroläther eventuell festgehaltene Carotinmengen so vollständig eluieren, daß man nach dieser Methode eine quantitative Bestimmung des Carotins im Filtrate vornehmen kann.

Damit war aber gleichzeitig die zeitraubende Operation des Vorbereitens der Adsorptionssäule, des Chromatographierens und Eluierens durch das rasche Eintragen kleinerer Mengen Kieselgel, Filtern und Nachwaschen der Lösung ersetzt. Wir halten uns daher berechtigt, diese Arbeitsweise unter der Bezeichnung einer „Schnellmethode“ den Fachgenossen bekanntzumachen. Die Zuverlässigkeit der Methode haben wir dadurch erhärtet, daß wir sie mit einer Bestimmungsmethode verglichen, die Phasentrennung, Verseifung und chromatographische Trennung verwendet und sich im wesentlichen an die Arbeitsweise von *Kuhn* und *Brockmann*²¹ anschloß. Wir haben diese Vergleichsmethode bei unserer Arbeit als „Standardmethode“ bezeichnet und im Versuchsteil nochmals ausführlich beschrieben. In einer Tabelle des Versuchsteiles sind die Ergebnisse solcher Vergleichsversuche bei verschiedenen grünen Pflanzenteilen angegeben und sie können wohl als befriedigend gelten. Die Übereinstimmung hat sich übrigens auch in zahlreichen anderen Bestimmungen, die hier nicht veröffentlicht werden, in gleicher Weise erwiesen.

Nun wollen wir uns aber den Fehlermöglichkeiten und der Anwendungsbreite der Schnellmethode zuwenden:

a) Bei der Standardmethode haben wir die stufenphotometrische Messung des Carotins in Ätherlösung vorgenommen, bei der Schnellmethode dagegen in Petrolätherlösung. Wir haben durch Vergleichsversuche an eingewogenen Carotinlösungen festgestellt, daß beim Filter S 47 der Unterschied unbedeutend ist. Aus diesem Grunde und weil die Ablesung unseres Erachtens leichter ist, haben wir für alle Bestimmungen S 47 verwendet, obwohl von manchen Autoren S.45 bevorzugt wird.

b) Petroläther ist als Lösungsmittel für Carotin gut geeignet. Wir haben durch zahlreiche quantitative Versuche festgestellt, daß es in diesem Lösungsmittel besser haltbar ist als in peroxydfreiem Äther und natürlich viel besser als in gechlorten Kohlenwasserstoffen. Es muß aber peinlichst dafür gesorgt werden, daß der Petroläther frei von Äther ist und vor der Anwendung des Silicagels durch gründliches Waschen der Lösung mit Wasser vom Methanol befreit wird, da sonst die Adsorption des Chlorophylls nicht glatt erfolgt. Dagegen ist das Siedeintervall des Petroläthers — wir verwenden im allgemeinen Sdp. 40–70° — oder der Gehalt cyclischer Kohlenwasserstoffe von geringer Bedeutung.

c) Da wir schon erwähnt haben, daß frisches Kieselgel Carotin adsorbiert, ist es notwendig, nur soviel Kieselgel zuzugeben, als zur Adsorption der grünen Farbstoffe ausreicht. Eine Zusammenstellung im Versuchsteil zeigt den Einfluß größerer Mengen Kieselgel auf die Analysenergebnisse. Im allgemeinen kommt man mit 0,5 g Kieselgel aus. Bei einiger Übung läßt sich der Endpunkt für den Zusatz des Kieselgels sehr genau finden.

d) Wir prüften auch die Frage, wieweit die Schnellmethode auf Pflanzenteile (z. B. Tomaten) angewendet werden kann, die größere Mengen Lykopin neben Carotin enthalten. Das Lykopin wird als Kohlenwasserstoff von ähnlicher Struktur wie das Carotin von Kieselgel in ähnlich geringer Weise adsorbiert wie Carotin. Die Filtrate unterscheiden sich von reinen Carotinlösungen durch die rötere Farbe, was dadurch besonders deutlich wird, daß die Adsorption beim Filter S 51 größer ist als beim Filter S 47. Um Carotin und Lykopin in solchen Lösungen zu bestimmen, müßte man sie chromatographisch auf MgO oder Al₂O₃ trennen oder aber die Bestimmung spektrographisch vornehmen. Man wird aber in diesen seltenen Fällen besser überhaupt auf die Schnellmethode verzichten und nach der Verseifung und Phasentrennung chromatographieren. In diesem Zusammenhange sei bemerkt, daß wir bei der Untersuchung von grünen Tomatenblättern kein Lykopin, sondern nur Carotin fanden (chromatographische Trennung, Mischchromatogramme, Stuphometrieren mit den Filtern S 43, S 45, S 47, S 51); dementsprechend stimmen auch die Werte zwischen Standard- und Schnellmethode gut überein.

e) Da in der Margarine und anderen Nahrungsmitteln das natürliche Carotin der Butter durch synthetische Farbstoffe ersetzt wird, haben wir auch geprüft, ob, wie zu vermuten war, mit der vorliegenden Schnellmethode eine eindeutige Unterscheidung vorgenommen werden kann. Es zeigte sich, daß der jetzt verwendete Butterfarbstoff II R neu zwar in Petroläther löslich ist, aber bei der Phasentrennung vollständig von 90 % igem Methanol aufgenommen wird. Außerdem wurde er aus der Petrolätherlösung schon durch ganz geringe Mengen Kieselgel vollständig adsorbiert. Es kann also eine Verwechslung von Carotin und Butterfarbstoff II R neu niemals eintreten.

Experimenteller Teil.

A. Genaue Beschreibung der zum Vergleich herangezogenen Analysenmethode (Standardmethode).

Die Einwaage der Pflanzenteile richtet sich nach dem erwarteten Carotingehalt des Ausgangsmaterials. Sie beträgt bei trockenen Blättern 0,10 – 0,15 g, bei trockenen Stengeln 1,0 – 1,5 g, bei frischen Blättern 0,5 – 0,8 g, bei frischen Stengeln 3,0 – 3,5 g. Zur Erzielung von einheitlichen Durchschnittsproben wurde bei trockenen Pflanzenteilen eine größere Menge – ungefähr 50 g – zuerst grob, dann mit einer Schlag-

kreuzmühle so fein zerrieben, daß sich das Pulver vollständig durch ein Sieb mit 576 Maschen pro qcm absieben ließ. Bei frischen Pflanzen wurden ungefähr 100 g mit der Schere fein zerschnitten.

Die Extraktion der Farbstoffe erfolgte in einer Reibschale von ca. 8 cm Durchmesser. Trockenes Pflanzenpulver wurde mit 10 ccm Methanol verrieben und die Lösung durch eine Jenaer Glasfilternutsche 11 G 3 abgesaugt. Der Rückstand wurde mit 10 ccm Petroläther vom Siedeintervall 40 – 70° verrieben und die Lösung wieder abgesaugt. Die abwechselnde Behandlung mit je 9 – 10 ccm Methanol und Petroläther wurde noch viermal, also bis zum Verbrauch von 45 ccm Methanol und 50 ccm Petroläther fortgesetzt. War beim Absaugen viel Pflanzenmaterial auf die Nutsche gelangt, wurde es vor der weiteren Extraktion mit einem Spatel in die Reibschale zurückgebracht. Bei der Verarbeitung von frischen Pflanzen wurde zum Verreiben die gleiche Gewichtsmenge mit Salzsäure gewaschener und geglühter Seesand zugegeben.

Das Filtrat wurde in einen zylindrischen, graduierten Scheidetrichter A von 150 ccm Inhalt gebracht und mit wenig Petroläther nachgespült. Nun wurde so viel Wasser zugesetzt, daß die Methanollösung 90%ig wurde, bei trockenen Pflanzen also 5,0 ccm, bei grünen etwas weniger. Die Lösung wurde vorsichtig, um Emulsionsbildung zu vermeiden, geschüttelt und eine scharfe Trennung der Schichten abgewartet, was manchmal lange dauert. Die Methanolschicht wurde dann in einen Scheidetrichter B abgelassen. Die Petrolätherschicht im Scheidetrichter A wurde noch zwei bis dreimal mit je 20 ccm 90%igem Methanol gewaschen, bis dieses farblos blieb. Auch diese Methanolauszüge wurden in den Scheidetrichter B gebracht. Dort wurde die vereinigte Methanollösung zweimal mit je 5 ccm Petroläther geschüttelt, um ihr kleine Mengen Carotin zu entziehen. Diese beiden Petrolätherauszüge wurden vereint in einem Scheidetrichter C von 50 ccm Inhalt mit 10 ccm 90%igem Methanol ausgeschüttelt.

Die Petrolätherlösungen aus den Scheidetrichtern A und C wurden in einen Jenaer Enghals-*Erlenmeyer*-Kolben mit Normalschliff, 200 ccm Inhalt, *Schott* und Gen. 4090, gebracht, mit dem gleichen Volumen einer alkoholischen Kalilauge (5 g Kaliumhydroxyd in 100 ccm 96%igem Alkohol gelöst) vermischt und drei Stunden auf 40° erwärmt.

Nach dieser Verseifung wurde die Lösung in einen graduierten Scheidetrichter von 150 ccm Inhalt gebracht, mit etwas Petroläther nachgespült und pro ccm der verwendeten alkoholischen Kalilauge 0,20 ccm Wasser zugesetzt. Nach der Trennung der Schichten und Ablassen der wäßrig-alkoholischen Unterschicht wurde die Petrolätherlösung mit je 20 ccm 90%igem Methanol so oft, im allgemeinen zwei- bis viermal, ausgeschüttelt, bis die Methanollösung farblos blieb. Um Reste von Methanol aus der Petrolätherlösung zu entfernen, wurde sie einmal mit 20 ccm Wasser ausgeschüttelt. Hierauf wurde die Petrolätherlösung in einen Enghals-*Erlenmeyer*-Kolben mit Normalschliff – *Schott* und Gen. 4090 – von 100 ccm Inhalt gebracht, mit etwas Petroläther nachgespült und mit 1 – 2 g Natriumsulfat getrocknet. Die Petrolätherlösung wurde

nicht filtriert, sondern vom Natriumsulfat vorsichtig in das Chromatographierrohr, das in üblicher Weise mit einer Schicht von 7 cm Höhe und 1 cm Durchmesser Aluminiumoxyd nach *Brockmann*, also ca. 6 g, hergestellt und mit Petroläther befeuchtet worden war, aufgegossen und mit 30 ccm Petroläther nachgewaschen. Durch ganz schwaches Saugen wurde das Durchfließen beschleunigt.

Das Aussehen des Chromatogramms war je nach den verwendeten Pflanzen verschieden. In jedem Falle war das Carotin als unterste Schicht zu finden, wovon man sich durch das Mischchromatogramm mit reinem Carotin überzeugen kann. Beim angegebenen Verfahren erfolgt die Trennung in α -, β - und γ -Carotin noch nicht. Auf sie wurde bewußt verzichtet. Nach der mechanischen Abtrennung eventuell vorhandener oberer Farbzonen wurde die Carotinsschicht mit einigen ccm Äther eluiert, das gelbe Filtrat je nach dem Carotingehalt auf 25 ccm oder 10 ccm mit Äther aufgefüllt und im Stufenphotometer im allgemeinen bei 1 cm Schichtdicke und dem Filter S 47 kolorimetriert. Die Berechnung des Carotingehaltes im ccm der kolorimetrierten Lösung erfolgt nach der von *Willstaedt* und *Jensen*⁵⁷ angegebenen Eichkurve (Abb. 1) bzw. durch Rechnung nach folgender Formel:

$$A \text{ (Anzahl } \gamma\text{-Carotin in 1 ccm Lösung)} = \frac{446 \times k}{100}$$

k wird entweder am Stufenphotometer abgelesen oder aus den Werten von D % nach einer Tabelle gefunden.

Der Gehalt von 100 g des untersuchten Pflanzenmaterials G ergibt sich dann nach der Formel:

$$G = \frac{100 A \times L}{S}$$

(L = ccm der Ätherlösung, S = g Einwaage der Pflanzen).

B. Genaue Beschreibung der Schnellmethode.

Auch hier richtet sich die Einwaage der Pflanzenteile nach ihrem vermutlichen Carotingehalt, wird aber zweckmäßig etwas höher gehalten, da man das Kolorimetrieren in 100 ccm Petrolätherlösung, also in einer

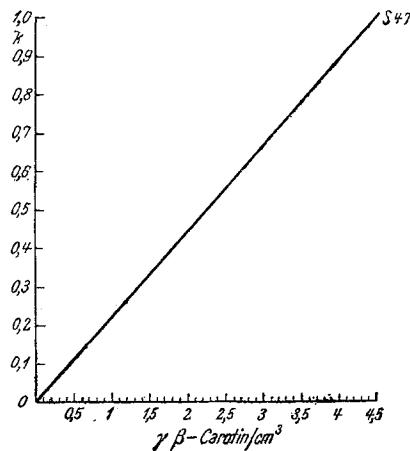


Abb. 1.
Eichkurve von Carotin nach *Willstaedt* und *Jensen*; für 1 cm Schichtdicke.

⁵⁷ *H. Willstaedt und Behrnts Jensen, Z. Vitaminforsch.* 9, 8 (1939).

viel verdünntereren Lösung vornimmt als bei der Standardmethode. So sind von trockenen Blättern 0,4 bis 0,6 g, bei trockenen Stengeln 2,0 bis 5,0 g, bei frischen Blättern 0,6 bis 2,0 g und bei frischen Stengeln 3,0 bis 6,0 g einzuwägen.

Natürlich kann man auch mit kleineren Einwaagen das Auslangen finden und dafür die kolorimetrische Messung im Stufenphotometer bei einer größeren Schichtdicke als 1 cm vornehmen.

Die Extraktion der Farbstoffe aus den Pflanzenteilen erfolgte genau wie bei der Standardmethode durch abwechselndes Behandeln mit Petroläther und Methanol in der Reibschale, eventuell in Gegenwart von geblühtem und gewaschenem Seesand. Die Trennung der Auszüge vom Pflanzenpulver erfolgte durch Absaugen mittels der Jenaer Glasfilternutsche 11 G 3.

Nun wurden die gesammelten Filtrate in einen zylindrischen, graduierten Scheidetrichter von 150 ccm Inhalt gebracht, mit wenig Petroläther nachgespült, mit soviel Wasser versetzt, daß die Methanolösung 90 % ig wurde, bei trockenen Pflanzen also mit 5 ccm, bei frischen mit entsprechend weniger. Nach vorsichtigem Schütteln wurde eine vollständige Abtrennung der Schichten abgewartet. Die Methanolsschicht wurde in einen Scheidetrichter B abgelassen. Die Petrolätherschicht im Scheidetrichter A wurde noch 2- bis 3 mal mit je 20 ccm 90 % igem Methanol gewaschen, bis dieses farblos blieb; auch diese Methanolauszüge wurden in den Scheidetrichter B gebracht. Dort wurde die vereinigte Methanolösung zweimal mit je 5 ccm Petroläther geschüttelt, um ihr kleine Mengen Carotin zu entziehen. Diese beiden Petrolätherauszüge wurden vereint in einem Scheidetrichter C von 50 ccm Inhalt mit 10 ccm 90 % igem Methanol ausgeschüttelt. Nun wurden die Petrolätherauszüge aus den Scheidetrichtern A und C vereint und zur vollständigen Entfernung von Methanol zweimal mit je 20 ccm Wasser ausgeschüttelt. Die Petrolätherlösung wurde jetzt in einen 200 ccm Schliff-Erlenmeyer-Kolben gebracht und mit 1 bis 2 g wasserfreiem Natriumsulfat kurze Zeit geschüttelt. Nun wurde die Lösung vom Natriumsulfat abgegossen und letzteres mit ca. 10 ccm Petroläther nachgewaschen. Man bringt die Petrolätherlösung in einen 100 ccm Meßzylinder mit Schliffstopfen und gibt unter öfterem Schütteln feinstpulverisiertes Kieselgel in kleineren Anteilen zu. Gut hat sich die von den Gebr. *Hermann*, Köln-Ehrenfeld, hergestellte Kieselgelsorte obiger Beschreibung bewährt. Das Kieselgel muß trocken sein und wird allenfalls vor der Verwendung auf 200° erhitzt.

Im hohen Meßzylinder setzt sich die geringe Menge Kieselgel sehr schnell ab, und man kann gut erkennen, wann die grünen Farbstoffe vom Kieselgel adsorbiert sind und die Petrolätherlösung rein gelb geworden ist. Dies ist meist nach einem Verbrauch von 0,5 g Kieselgel der Fall. Nun wurde die Petrolätherlösung durch ein Alliehnsches Rohr (*Schott* und Gen. Jena 15a G 3), auf dessen Sinterplatte man vor der Filtration eine 2 mm dicke Schicht von Kieselgur aufgebracht und festgedrückt hatte, unter gelindem Saugen filtriert. Das Kieselgel wurde mit ungefähr 20 ccm Petroläther nachgewaschen, bis das Filtrat farblos ablief.

Dann wurde das Filtrat in einen Meßkolben von 100 ccm Inhalt oder in einen Meßzylinder gebracht und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Diese Lösung wurde zur kolorimetrischen Bestimmung im Stufenphotometer verwendet, die bei einer Schichtdicke von 1 cm und dem Filter S 47 vorgenommen wurde. Ist der Carotingehalt gering, muß man mit größerer Schichtdicke kolorimetrieren und dies bei der Rechnung berücksichtigen.

C. Zusammenstellung von Vergleichsbestimmungen nach der Standardmethode und nach der Schnellmethode.

Untersuchte Pflanzenart	Gehalt in mg Carotin pro 100g Pflanze			
	A. Standardmethode	B. Schnellmethode		
1. Brennesselblätter (frisch), September	16,67	16,76	16,65	16,58
2. Roßkastanienblätter (frisch), September	21,3	21,5	21,0	21,0
3. Platanenblätter (frisch), September	11,3	11,0	11,4	11,3
4. Tomatenblätter (frisch), Muster 1, September	9,24	9,15	9,15	9,07
5. Tomatenblätter (frisch), Muster 2, September	5,91	5,87	5,88	5,81
6. Maisblätter (frisch), September	21,0	21,0	20,8	21,0
7. Fichtenadeln, Muster 1	8,25	8,20	8,70	8,61
8. Fichtenadeln, Muster 2	4,46	4,42	4,83	4,75
9. Mohrrüben, (frisch)	15,75	15,92	15,83	15,92
10. Kastanienblätter, trocken	60,7	60,3	60,9	60,6
11. Luzernepflanzen, trocken	3,80	3,87	3,75	3,78
12. Luzerneblätter, trocken	37,0	36,8	39,7	39,8

25 ccm einer Lösung von 0,760 mg Carotin in Petroläther wurden im Meßzylinder 30 Minuten mit 0,50 g Kieselgel, feinstpulverisiert, geschüttelt. Nach dem Absetzen wurde in 1 ccm der Lösung das Carotin kolorimetrisch bestimmt. Es waren noch 0,543 mg Carotin enthalten, bzw. 0,217 mg Carotin von 0,5 g Kiesel säuregel adsorbiert worden. Nun wurde das Kieselgel auf eine Nutsche gebracht und mit Petroläther nachgewaschen, bis dieser völlig farblos ablief. Das Filtrat wurde mit den 24 ccm der dekantierten Lösung vereinigt und auf 50 ccm aufgefüllt. In dieser Lösung wurde das Carotin erneut kolorimetrisch bestimmt. Der Gehalt von 0,542 mg entsprach 0,565 mg Carotin in der ursprünglichen Lösung, wenn man den zur 1. Bestimmung verwendeten 1 ccm durch Multiplikation mit $\frac{25}{24}$ berücksichtigt. Es wurden also 0,195 mg Carotin nicht mit Petroläther auswaschbar adsorbiert.

Während reines Carotin aus Petrolätherlösungen mit Kiesel säuregel in beträchtlicher Menge adsorbiert wird, liegen die Verhältnisse wesentlich günstiger, wenn in der Lösung außer Carotin leichter adsorbierbare grüne Farbstoffe (Chlorophylle) und hydroxylhaltige gelbe Farbstoffe (Carotinoide) zugegen sind. Das Kiesel säuregel nimmt dann erwartungsgemäß

zuerst diese Farbstoffe auf und adsorbiert dann das Carotin selbst in geringerer Menge.

Die Beeinflussung der Analysenergebnisse durch die Anwendung größerer Kieselgelmengen wird durch folgende Versuche gezeigt: Frische Brennesselblätter (September), in denen nach der Standardmethode ein Gehalt von 16,76 und 16,67 mg Carotin in 100 g gefunden worden war, wurden nach der Schnellmethode untersucht und dabei zur Adsorption der grünen Farbstoffe wechselnde Mengen Kieselgel zugegeben.

Einwaage der Blätter	Kieselgel	γ -Carotin in 100 ccm Petroläther	mg Carotin 100 g Blätter
0,60 g	0,50 g	99,0	16,5
0,60 „	1,00 „	79,4	14,2
0,60 „	2,00 „	38,3	6,4
0,60 „	5,00 „	25,0	4,2

Nach den Ergebnissen dieser Versuche ist also ein Überschuß von Kieselgel zu vermeiden und der Endpunkt der Zugabe des Adsorptionsmittels so zu wählen, daß gerade alle grünen Farbstoffe adsorbiert sind.