

derung des Hydroxyls in 17 bei cis-Stellung zum Methyl in 13 (gegenüber der trans-Stellung) zu zeigen. Da aber der Fünfring mit den starren tetraedrisch angeordneten Valenzen in trans-Stellung nicht ganz geschlossen werden kann, ist eine zuverlässige Untersuchung der vorliegenden Frage nicht möglich.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

66. Die Isolierung der Tocopherole aus Weizenkeimlingsöl

von P. Karrer und H. Salomon.

(27. XI. 37.)¹⁾

In unserer ersten Abhandlung über den unverseifbaren Anteil des Weizenkeimlingsöls²⁾ haben wir über die Isolierung einiger neuer Sterine, die wir als Tritisterine bezeichneten, berichtet. Die biologische Prüfung hat gezeigt, dass sie keine Vitamin-E-Wirkung haben. Weitere Untersuchungen führten dann zur Isolierung eines Allophanats, das wir als Neo-tocopherol-allophanat³⁾ bezeichneten. In der nachstehenden Abhandlung geben wir nun eine etwas nähere Beschreibung der Aufarbeitung des unverseifbaren Anteils des Weizenkeimlingsöls mit besonderer Berücksichtigung der Inhaltsstoffe, die Vitamin-E-Wirkung zeigen.

Evans, Emerson und *Emerson*⁴⁾ haben zuerst die Isolierung von Vitamin-E-Präparaten in Form der Allophanate beschrieben und den entsprechenden freien Alkoholen den Namen α - und β -Tocopherol gegeben. Sie besitzen beide Vitamin-E-Wirkung. *Drummond, Singer* und *Macwalter*⁵⁾ haben durch chromatographische Adsorptionsanalyse an Aluminiumoxyd hochaktive Konzentrate gewonnen. Wir haben weder nach der Methode von *Evans* noch nach der von *Drummond* befriedigende Resultate erzielen können. Dagegen liefert der im nachstehenden beschriebene Arbeitsgang relativ gute Ausbeuten, besonders an α -Tocopherol, und in ziemlich einfacher Weise. Die schon in unserer letzten Arbeit erwähnten Krystallisate von sogenannten β -, γ - und Neo-tocopherol werden als prachttvoll krystallisierte Körper erhalten, deren Analysenwerte als Allophanate auf den freien Alkohol umgerechnet alle auf die Formel $C_{29}H_{50}O_2$ oder $C_{28}H_{48}O_2$ gut stimmen. In reiner Form sind auch diese drei Allophanate in den

¹⁾ Datum der Deposition als versiegeltes Schreiben bei der Schweiz. Chem. Gesellschaft; der Redaktion zur Veröffentlichung übergeben am 31. III. 38.

²⁾ Helv. **20**, 424 (1937).

⁴⁾ J. biol. Chem. **113**, 319 (1936).

³⁾ Helv. **20**, 1422 (1937).

⁵⁾ Biochem. J. **29**, 457 (1937).

meisten Lösungsmitteln, mit Ausnahme von Benzol und Äther, in denen sie sich ziemlich leicht lösen, recht schwer löslich. Sie besitzen alle die Eigenschaft, sehr langsam zu krystallisieren, manchmal erst nach Tagen und sogar Wochen. Im Krystallhabitus und in der Löslichkeit in Aceton, Äthanol, Essigester bestehen kaum grössere Unterschiede, in Petroläther sind sie äusserst schwer löslich. Die Schmelzpunktsdifferenzen zwischen den drei Krystallisaten sind zwar immer vorhanden, aber besonders zwischen β - und dem sogenannten γ -Tocopherol sehr gering; ob es sich bei β - und γ -Tocopherol um unreinere Formen des Neo-tocopherols handelt, lassen wir dahingestellt. Wir halten es aber für möglich, dass das Weizenkeimlingsöl ausser α -Tocopherol und Neo-tocopherol noch ein drittes Tocopherol enthält. Trotz aller Bemühungen ist es uns nicht gelungen, das Allophanat des α -Tocopherols in deutlich krystalliner Form zu erhalten. Dessen Analysenwerte stimmen mit dem Allophanat eines Alkohols $C_{29}H_{50}O_2$ überein. Wir haben dann α -Tocopherol-allophanat verseift und das α -Tocopherol in das 3,5-Dinitro-benzoat übergeführt, das relativ gut krystallisiert und den Smp. 86—87° zeigt.

Experimenteller Teil.

Die Aufarbeitung des unverseifbaren Anteils des Weizenkeimlingsöls haben wir bis zur zweiten Adsorption an Aluminiumoxyd (*Brockmann*) und der darauf folgenden Ausfällung der Sterine mit Digitonin, in unserer früheren Abhandlung beschrieben¹⁾. Für die weitere Verarbeitung auf Vitamin E kommen nur die schon dort erwähnten Fraktionen B, C und D in Betracht. Die Fraktion A, d. h. die zuerst farblos abfliessende Petrolätherwaschflüssigkeit, enthält keine wirksamen Anteile und die im obersten Teil des Chromatogramms befindlichen Adsorbate E und F enthalten neben grossen Anteilen von Sterinen und Pigmenten so geringe Mengen der Vitamin-E-wirksamen Stoffe, dass sich ihre Weiterverarbeitung auf Vitamin E nicht lohnt.

Fraktion B.

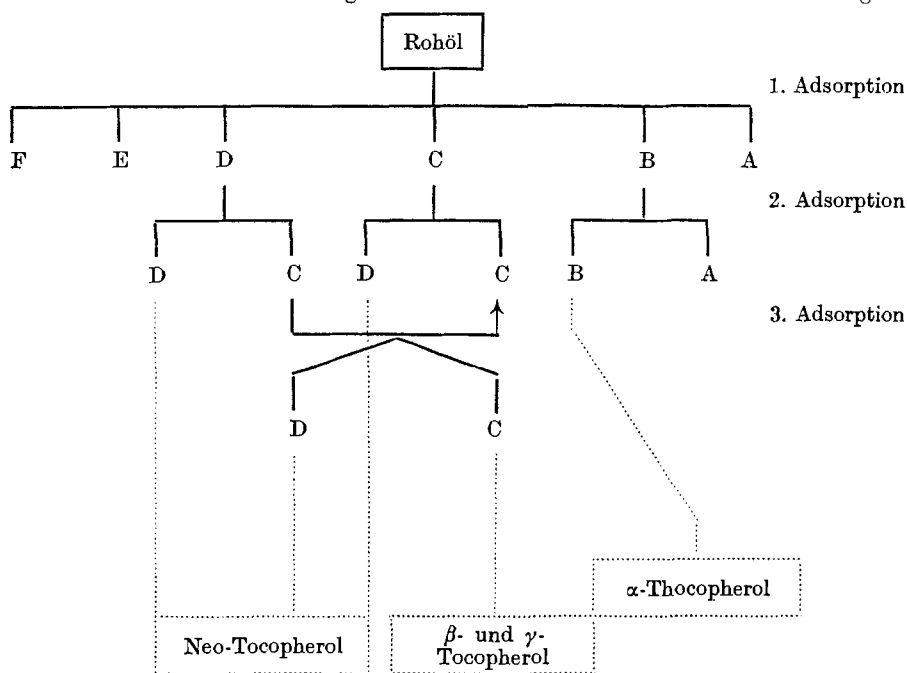
Dieses ist der Anteil, der bei gründlichem Waschen mit Petroläther²⁾ in der Adsorptionsröhre so schwach haftet, dass er grösstenteils schon bei der ersten Adsorption durchgewaschen wird. Er enthält fast die Gesamtmenge des α -Tocopherols. Bei richtiger Adsorption findet man, dass die Fraktion B keine durch Digitonin fällbaren Sterine enthält. Sie kann daher direkt weiterverarbeitet werden. Nach dem Abdestillieren des Petroläthers hinterbleibt ein orange-farbenes Öl. Aus verschiedenen Adsorptionen werden dann jeweils 30 g dieses Öles wieder in Petroläther aufgenommen und in der früher

¹⁾ Helv. 20, 424 (1937).

²⁾ Wir gebrauchten gewöhnlich zum Nachwaschen pro Röhre 4 Liter Petroläther.

beschriebenen Weise zum zweiten Male an Aluminiumhydroxyd (*Brockmann*) adsorbiert. Das Rohöl enthält bedeutende Mengen an Ölen, die in Methanol und selbst in Äthanol sehr wenig löslich sind und keine Vitamin-E-Wirkung besitzen. Sie zeigen auch gegenüber methylalkoholischer Silbernitratlösung keinerlei Reduktionskraft.

Schema der Fraktionierung des Unverseifbaren aus Weizenkeimlingen.



In der Hauptsache bezweckt die zweite Adsorption, den Grossteil dieser inaktiven Öle zu entfernen. Sie haften an Aluminiumoxyd bedeutend weniger als die übrigen Anteile; da bei der zweiten Adsorption die Petrolätherwaschflüssigkeit sofort gelbgefärbt abfließt, darf man hier nicht so lange waschen, bis sie farblos geworden ist, da sonst allmählich bedeutende Mengen reduzierender Substanzen durchgewaschen werden. Wir haben gefunden, dass bei Adsorption von 30 g Öl ca. 3 Liter Petroläther nötig waren, um die Hauptmenge der inaktiven Substanz durchzuwaschen, ohne dass das Filtrat schon grössere Reduktionskraft zeigt.

Das Chromatogramm in der ca. 70 cm hohen Säule ist sehr wenig differenziert. In der Hauptsache bildet es eine von unten nach oben etwas dunkler werdende, ganz schwach gelbliche Säule, die oben von einer 2—3 cm langen, etwas missfarbenen Schicht bedeckt wird. Diese oberste Schicht wird abgetrennt und kann vernachlässigt werden. Versuche haben uns dann gezeigt, dass eine Aufteilung der Röhre nicht nötig ist, da die verschiedenen Schichten sich nicht

wesentlich voneinander unterscheiden, und das α -Tocopherol ziemlich gleichmässig über die ganze Röhre verteilt ist. Es sind darin natürlich noch bedeutende Mengen anderer Substanzen vorhanden, deren weitere Aufarbeitung noch bevorsteht. Dasselbe trifft auch für die andern, durch Chromatographieren erhaltenen Fraktionen zu.

Die Elution geschieht, wie früher beschrieben, mit Methanol-Äther-Gemisch (80:20). Die Eluate werden vom Lösungsmittel im Vakuum befreit, die Rückstände in Petroläther aufgenommen, die Lösungen einige Male mit Wasser durchgeschüttelt und schliesslich sorgfältig über Natriumsulfat getrocknet. Hierauf destilliert man den Petroläther unter Feuchtigkeitsabschluss im Vakuum ab, nimmt je 10 g des hinterbliebenen Öles in 250 cm³ trockenem Benzol auf, und sättigt die Benzollösung in bekannter Weise mit aus 15 g Cyansäure gewonnener Cyansäure. Die Benzollösungen werden nach 10—12-tägigem Stehen bei ca. 5° auf einer Glasritze abgenutscht, der unlösliche Rückstand mit warmem Benzol gewaschen und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende Öl löst man in heissem Aceton, wobei man auf ca. 10 g Öl 60—70 cm³ Aceton verwendet. Eine geringe gallertartige Masse geht nicht in Lösung und wird sofort von der noch warmen Flüssigkeit abfiltriert. Die Acetonlösung beginnt alsbald, schon bei Zimmertemperatur, schwach gelblich gefärbte Krusten abzuscheiden, die nach 24-stündigem Stehen abgenutscht werden. Aus 10 g Öl der Fraktion B erhält man so 1,5—1,75 g einer schwach gelblich gefärbten Substanz, die den Smp. 152—154° zeigt. Zum Umkrystallisieren bzw. Umlösen dieses α -Tocopherol-allophanats fanden wir Essigester besonders gut geeignet. Er löst α -Tocopherol-allophanat in der Wärme leicht und dieses scheidet sich in der Kälte grösstenteils wieder als farblose Masse ab. Die färbenden Begleitstoffe bleiben fast restlos in der Mutterlauge. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Essigester liegt der Schmelzpunkt bei 159—160°. Versuche, α -Tocopherol-allophanat durch weitere Fraktionierung in besser krystallisierter Form zu erhalten oder dessen Schmelzpunkt zu erhöhen, waren erfolglos. Die Verbindung ist ein rein weisser Körper, der sich immer in Krusten an den Gefässwandungen abscheidet und unter dem Mikroskop die schon von *Evans* erwähnten, körnigen Aggregate zeigt. Die Acetonmutterlauge, aus denen sich die ersten Anteile des α -Tocopherol-allophanats abgeschieden haben, geben bei weiterer Konzentration und längerem Stehen im Kälteraum noch weitere Mengen der Verbindung, die aber ziemlich stark verunreinigt sind. Bei diesen später ausfallenden Anteilen ist es zweckmässig, sie vor dem Umlösen aus Essigester zuerst einmal aus heissem Aceton umzulösen, wodurch die begleitenden Öle in Lösung bleiben. In kaltem Aceton, Äthanol, Methanol ist α -Tocopherol-allophanat sehr wenig löslich, bedeutend mehr in der Hitze.

Fraktion C¹⁾.

Die nach der zweiten Adsorption und Elution erhaltene Fraktion C, die, wie angegeben, von Sterinen befreit war, wird im Vakuum möglichst vom Lösungsmittel befreit, in Petroläther aufgenommen und vom abgeschiedenen überschüssigen Digitonin und geringen Mengen Digitoniden abfiltriert. Hierauf wäscht man den Filterrückstand gut mit Petroläther aus, schüttelt die Petrolätherlösung einige Male mit Wasser durch und trocknet sie mit Natriumsulfat. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels werden verschiedene solcher Fraktionen gesammelt und in Mengen von 25—30 g zum dritten Male in der früher beschriebenen Weise aus Petrolätherlösung an Aluminiumoxyd adsorbiert. Eventuell anfallende Fraktion B vereinigt man natürlich mit den anderen Fraktionen B; diese werden auf α -Tocopherol verarbeitet.

Die Adsorptionssäule des dritten Chromatogramms sieht in den unteren zwei Dritteln farblos bis schwach gelblich aus; diese repräsentieren die neue Fraktion C. Das obere Drittel ist etwas stärker pigmentiert und ist Fraktion D, überlagert von einer ganz schmalen Schicht, die meist etwas heller ist und die abgetrennt und vernachlässigt wird. Elution und Überführung der einzelnen Fraktionen aus dem Chromatogramm in die Allophanate erfolgt in genau derselben Weise, wie dies bei Fraktion B oben beschrieben wurde.

Aus der Benzollösung, in welcher durch Einleiten von Cyansäure die Allophanate entstanden sind, wird das Lösungsmittel Benzol im Vakuum abdestilliert und das hinterbleibende Öl, ca. 11 g, erneut in 60—70 cm³ Aceton heiss gelöst. Nach 1—2-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur hat sich eine geringe Menge schwer löslicher Substanz abgeschieden, die man abnutscht. Sie enthält neben einem gallertartigen Produkt immer etwas β -Amyrin-allophanat. Das Acetonfiltrat wird noch über Nacht im Kälteraum aufbewahrt. Sollte sich wieder etwas Schwerlösliches abgeschieden haben, nutscht man dieses nochmals ab. Im Gegensatz zur Fraktion B und der im nachfolgenden beschriebenen Fraktion D sind die bei -2 bis -3° aus Aceton ausfallenden Niederschläge hier sehr gering. Es wäre auch möglich, den Rückstand anstatt in Aceton direkt in Alkohol aufzunehmen und die alkoholische Lösung von schwerlöslichen Produkten abzufiltrieren. Wir haben es aber vorgezogen, zuerst zu sehen, ob nicht möglicherweise durch die Behandlung mit Aceton α - oder Neotocopherol abgeschieden wurden, und erst dann die Weiterverarbeitung durchzuführen.

Das Aceton wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in ca. 50 cm³ 96-proz. Äthanol heiss gelöst. Nach einiger Zeit beginnt bei Zimmertemperatur die Krystallisation. Man lässt 3—4 Tage stehen und nutscht die nur wenig gefärbte Substanz ab. Sie lässt

¹⁾ Helv. 20, 428 (1937).

sich sowohl aus siedendem Alkohol wie aus Aceton gut umkrystallisieren. Bei alkoholischen Lösungen ist es nötig, die Substanz in der 50-fachen Menge Lösungsmittel aufzunehmen, um schöne Krystalle zu erhalten. Sie krystallisiert aus Alkohol gewöhnlich sehr langsam und gleicht in vielen Beziehungen dem β -Tocopherol, schmilzt aber auch nach häufigem Umkrystallisieren immer etwas niedriger. Aus Aceton scheidet sie sich in derben, prachtvollen Nadelbüscheln ab und lässt sich auch aus Essigester gut umkrystallisieren. Smp. 135—136°. Aus 20 g der Fraktion C erhält man ca. 1,5 g dieses γ -Tocopherol-allophanats. Die alkoholischen Mutterlaugen scheiden in der Kälte gewöhnlich nur Öl ab. Sie enthalten neben geringen Mengen β -Tocopherol-allophanat, das, wie schon *Evans* beschrieben hat, sich bei wochenlangem Stehen aus den nicht zu konzentrierten Mutterlaugen abscheidet, beträchtliche Mengen des von uns früher beschriebenen, physiologisch nicht aktiven Triticol-allophanats vom Smp. 73°.

Fraktion D.

Die bei der ersten Adsorption der noch sterinhaltigen Rohöle anfallende Fraktion D ist sehr reich an Sterinen und sehr stark durch Pigmente gefärbt. Nach der Elution entfernt man aus der Methanol-lösung zuerst die Hauptmenge der Sterine durch Ausfrieren. Der Rest wird durch Fällung mit Digitonin beseitigt. Nach dem Aufnehmen in Petroläther adsorbiert man diese Fraktion D zum zweiten Male und entwickelt das Chromatogramm in üblicher Weise. Die so erhaltenen Fraktionen C und D werden mit den nach der zweiten Adsorption erhaltenen Fraktionen C und D vereinigt. Die nach der zweiten Adsorption der Fraktion C anfallende Fraktion D, von Sterinen befreit, braucht nicht zum dritten Male adsorbiert zu werden, sondern kann direkt auf Allophanate verarbeitet werden, ebenso die bei der dritten Adsorption von C anfallende Fraktion D.

Nach Überführung der Fraktion D in die Allophanate und Abdestillieren des Benzols wird der Rückstand in ca. 70 cm³ heissem Aceton aufgenommen. Die heisse Acetonlösung nutschts man nach kurzem Stehen noch warm von einer geringen Menge eines schwer löslichen Niederschlags ab. Das Filtrat beginnt schon bei Zimmertemperatur alsbald zu krystallisieren. Nach 24-stündigem Aufbewahren bei 0° wird das Krystallinat abgenutschts und mit Aceton nachgewaschen. Dieses ist unser Neo-tocopherol-allophanat. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Aceton und zum Schluss aus Essigester ist der Schmelzpunkt auf 143–144° gestiegen. Neo-tocopherol-allophanat krystallisiert in typischen, fast zentimeterlangen, derben Nadeln, die zu halb-kugligen Gebilden vereint sind. Aus absolutem Alkohol krystallisiert es dagegen in prachtvollen, feinen Nadeln. Die Acetonmutterlaugen geben nach weiterer Konzentration noch weitere Mengen Neo-tocopherol-allophanat. Ausbeute aus 20 g Öl (Fraktion D) 1,7—2 g.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.