

31. Eine quantitative photometrische Bestimmung von Vitamin E

von M. Furter und R. E. Meyer.

(30. XII. 38)

Zur quantitativen Bestimmung von Tocopherolen sind bis jetzt zwei Methoden in Vorschlag gebracht worden. Einerseits die von P. Karrer und Mitarbeitern¹⁾ für diese Zwecke angepasste potentiometrische Titration mit Gold(III)-chlorid als Oxydationsmittel und anderseits ein kolorimetrisches Verfahren von Emmerie und Engel²⁾, welches die Reaktion von Tocopherolen mit Eisen(III)-chlorid und des dabei entstehenden Eisen(II)-salzes mit α, α' -Dipyridyl zur Gehaltsbestimmung an Vitamin E benützt. Bei der Anwendung dieser Methoden sind gewisse Vorsichtsmassregeln erforderlich, da eine Reihe Substanzen mit reduzierenden Eigenschaften bei den erwähnten Reaktionen miterfasst werden.

Die potentiometrische Methode hat den Nachteil eines erheblichen Zeitaufwands, da sie für eine Bestimmung auch ohne Berücksichtigung der eventuell notwendigen Operationen zur Vorreinigung 2—3 Stunden erfordert; dies wird besonders bei Reihenversuchen unangenehm empfunden. Wir haben deshalb versucht, ein auf einer neuen Reaktion beruhendes Bestimmungsverfahren auszuarbeiten, das infolge seiner Einfachheit in wesentlich kürzerer Zeit durchführbar ist.

Auf der Suche nach einer möglichst spezifischen, zur analytischen Auswertung geeigneten Umsetzung der Tocopherole, sind wir auf eine bisher nicht bekannte Reaktion mit Salpetersäure gestossen, deren Endprodukt eine tiefrot gefärbte Verbindung darstellt. Der Reaktionsverlauf ist noch nicht völlig geklärt. Die im Gang befindlichen Versuche lassen aber vermuten, dass es sich wahrscheinlich um eine oxoniumsalzartige Verbindung der intermediär durch oxydative Aufspaltung entstandenen Tocopherolchinone mit Salpetersäure handelt.

Es lag nahe, diese in der Durchführung sehr einfache Farb-reaktion in bezug auf ihre Eignung zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung der Tocopherole zu untersuchen. Wir konnten dabei folgende Feststellungen machen.

Spezifität. Die Reaktion mit Salpetersäure ist unter den von uns gewählten und weiter unten beschriebenen Bedingungen in bezug auf die Tocopherole ausserordentlich spezifisch. Aus Tabelle 1 geht hervor, dass eine Grosszahl von Verbindungen, worunter auch die

¹⁾ Helv. **21**, 939, 1161 (1938).

²⁾ Nature **142**, 873 (1938).

durch Einwirkung von Licht und Luft auf Tocopherol entstandenen Zersetzungsprodukte, oder Stoffe, die in natürlichen Lösungen von Tocopherol vorkommen, unter gleichen Voraussetzungen keinen ähnlichen Farbeffekt hervorbringen¹⁾. Selbst β -Carotin scheidet als störender Bestandteil aus, da seine rötliche Lösungsfarbe unter der Einwirkung von Salpetersäure in ein helles Gelb übergeht.

Tabelle 1.

Farbreaktionen verschiedener Stoffe mit konz. Salpetersäure in alkoholischer Lösung²⁾.

<i>Substanz</i>	<i>Farb-Effekt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Farb-Effekt</i>
Tocopherole		Phenole und Phenolsäuren	
<i>d,l</i> - α -Tocopherol (synth.)	tiefrot	p-Kresol	gelb
β -Tocopherol (natürl.) ³⁾	tiefrot	Phenol	farblos
Acetyl- α -Tocopherol . . .	gelb-(rosa) ⁴⁾	α -Resorecylsäure	farblos
Verwandte Stoffe		β -Resorecylsäure	farblos
Hydrochinon	gelb	Salicylsäure	farblos
Xylochinon	gelb	In Tabletten übliche Trägerstoffe	
Trimethyl-hydrochinon . .	tiefgelb	Glucose	farblos
Durohydrochinon	gelb	Stärke	farblos
Naphtochinon	gelb	Milchzucker	farblos
Phytol	farblos	Öle	
Phytylbromid	farblos	Weizenkeimlingsöl . .	rot
In Naturprodukten mögliche Beimengungen		Rizinusöl	hellrosa ⁵⁾
Ascorbinsäure	farblos	Leinöl	gelb
Androsteron	farblos	Sesamöl	gelb
Equilin	hellgelb	Medizinal-Lebertran . .	gelb
Equilenin	hellgelb	Arachisöl	farblos
Oestron	farblos	Olivöl	farblos
Tyrosin	gelb		
β -Carotin ³⁾	hellgelb		

¹⁾ In den meisten Fällen resultiert durch die Behandlung mit HNO₃ eine gelbe Farbe (Oxydationsprodukte, z. B. Chinone). Diese beeinflusst aber die Messung eines roten Farbtones im Photometer nicht, wenn für geeignete Filtrierung des Messlichtes gesorgt wird.

²⁾ Zur Durchführung der Versuche wurde in der gleichen Weise vorgegangen, wie dies für die quantitative Bestimmung im experimentellen Teil beschrieben ist. Ausser bei den Ölen wurde durchwegs eine Menge von etwa 5 mg Subst. pro 5 cm³ Lösungsmittel verwendet, bei den Ölen 0,3—0,4 cm³, entsprechend etwa 0,3 g.

³⁾ β -Tocopherol und β -Carotin wurden uns in entgegenkommender Weise von Herrn Prof. Dr. P. Karrer zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle herzlich danken möchten.

⁴⁾ Acetyl- α -tocopherol gibt bei längerer Behandlung unter den erwähnten Bedingungen mit Salpetersäure ebenfalls das rote Umsetzungsprodukt, und zwar in dem Masse wie Verseifung eintritt.

⁵⁾ Die rote Farbe ist wohl der Anwesenheit gewisser Mengen Vitamin E zuzuschreiben.

Sowohl α - als β -Tocopherol ergeben dagegen mit Salpetersäure den tiefroten Farbton, ebenso wie alle Gemische, die Vitamin E in genügender Menge enthalten.

Es kann demnach hervorgehoben werden, dass durch die neue Reaktion die Tocopherole auch in Gemischen mit andern Stoffen eindeutig erkannt werden können. Andererseits ist festzuhalten, dass α - und β -Tocopherol den gleichen photometrischen Wert ergeben, während letzteres in seiner physiologischen Wirksamkeit merklich hinter α -Tocopherol zurücksteht.

Das quantitative Verhalten der Reaktion.

Die Umsetzung von Tocopherolen mit Salpetersäure erfüllt die für die quantitative analytische Auswertung zu stellenden Forderungen in weitgehendem Masse. — Das Absorptionsspektrum des Reaktionsproduktes zeigt im sichtbaren Gebiet eine charakteristische Form, mit einem ausgeprägten Maximum bei $467\text{ m}\mu$ (Fig. 1, Kurve 1). Dadurch wird die Ausfiltrierung von störenden Nebenfarben bedeutend erleichtert, was sich in bezug auf die Spezifität und Genauigkeit der Methode vorteilhaft auswirkt. — Zudem kommt die Tatsache einer relativ grossen Extinktion (tiefer Farbton) ($\log \epsilon_{467\text{ m}\mu} = 2,945$). Dies hat eine gesteigerte Empfindlichkeit des Verfahrens zur Folge, das heisst, es können sehr kleine Mengen Untersuchungsmaterial noch mit Sicherheit erfasst werden. — Als untere Erfassungsgrenze für quantitative Messungen wurde bei unsern Versuchen $0,05\text{‰}$ für $d,l\text{-}\alpha$ -Tocopherol gefunden. (Vgl. Tabelle 2.) Im Hinblick auf die zur Füllung einer Messküvette minimal notwendige Lösungsmenge von 4 cm^3 entspricht dieser Wert einer Menge von $0,2\text{ mg } d,l\text{-}\alpha$ -Tocopherol, die innerhalb erträglicher Fehlergrenzen demnach noch quantitativ bestimmbar ist.

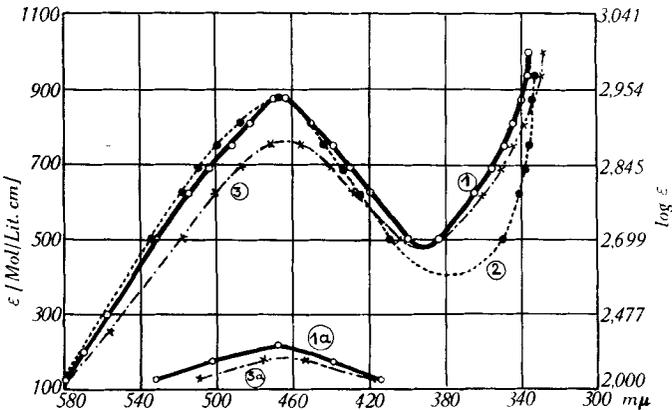


Fig. 1.

Als wichtigste Feststellung ist aber die Erfüllung des *Beer'schen* Gesetzes hervorzuheben. Der Wert der Extinktion des roten Reaktionsproduktes verändert sich über einen für die Messungen genügend breiten Gehaltsbereich proportional der vorhandenen Menge Vitamin E. Das Produkt aus Konzentration und Schichtdicke ist unter Beachtung geeigneter Versuchsbedingungen konstant. Den Beweis dafür erbringt Fig. 2, wo der Zusammenhang zwischen ursprünglichem Gehalt einer Lösung an *d,l- α -Tocopherol* und den Extinktionswerten *E* der entsprechenden Umsetzungsprodukte mit Salpetersäure graphisch dargestellt ist. Es ist daraus ersichtlich, dass für verschiedene Konzentrationen und Schichtdicken der Messlösungen die zugehörigen Extinktionswerte auf im Nullpunkt beginnenden Geraden liegen. Ausserdem gehören zu denselben auf den beiden Geraden liegenden Extinktionswerten Grössen der Konzentration, die den Schichtdicken umgekehrt proportional sind. Diese Angaben, die durch Photometrierung ermittelt worden sind, wurden weiter erhärtet durch spektrographische Beobachtungen. In Fig. 1 gibt die Kurve 1a die Absorptionswirkung einer 0,25-mol. Lösung wieder. Sowohl der Extinktionskoeffizient des Absorptionsmaximums dieser Kurve ($\epsilon_{467\text{ m}\mu} = 220$) als auch die Koeffizienten anderer Wellenlängen ergeben Werte, die genau dem vierten Teil des zugehörigen Koeffizienten für die Absorptionskurve 1 der 1-mol. Lösung entsprechen.

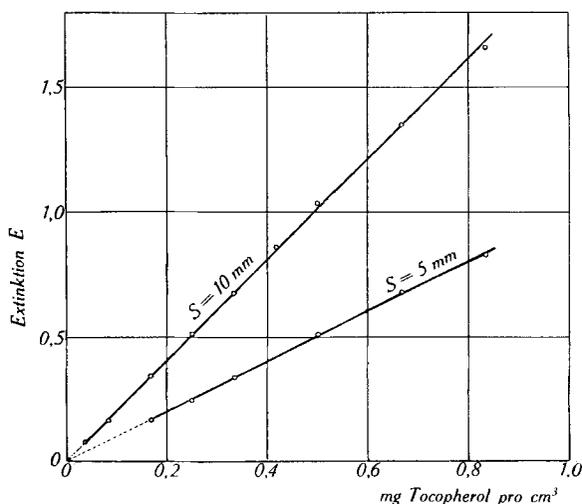


Fig. 2.

Für die Genauigkeit der Methode ist ferner die Feststellung von Wichtigkeit, dass der einmal gebildete Farbstoff in der Reaktionslösung gut haltbar ist. Extinktionsmessungen an ein und derselben Lösung, die sich über ein Zeitintervall von 24 Stunden erstreckten,

ergaben keine ausserhalb der Messfehler liegenden Abweichungen. Diese Beobachtung steht durchaus im Einklang mit der entsprechenden spektrographischen Kontrolle. Kurve 2 in Fig. 1 ist mit derselben Lösung wie Kurve 1 nach 24-stündigem Stehen in der verschlossenen Flasche aufgenommen worden. Das für die photometrischen Messungen ausschlaggebende Absorptionsmaximum zeigt weder in der Lage noch in der Extinktion eine Veränderung¹⁾.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine quantitative photometrische Bestimmungsmethode wohl kaum günstigere als die vorstehend beschriebenen Bedingungen erwartet werden können. Die darauf basierende Methodik liess sich infolge der Spezifität der Reaktion denkbar einfach gestalten, so dass die quantitative Bestimmung der Tocopherole sogar in Ölen, wie Weizenkeimlingsöl direkt ohne vorherige Verseifung oder Anreicherung möglich ist. Die Bestimmung erfolgt in konzentriertem Alkohol und beansprucht minimale apparative Vorbereitungen. Zur Messung der Farbintensität, bzw. der Extinktion, kann ein einfaches Kolorimeter, besser aber ein Stufenphotometer nach *Pulfrich* benützt werden. Der für eine vollständige Analyse notwendige Zeitaufwand, die keine Aufmerksamkeit erfordernde Wartezeit bis zur Erreichung grösster Farbtiefe (minimal 15 Minuten) nicht mitgerechnet, ist mit 15 Minuten eher zu hoch angesetzt. Die Methode eignet sich deshalb besonders für Reihenuntersuchungen²⁾.

Über die mit unserer Methode erreichbaren Genauigkeiten bei quantitativen Bestimmungen an reinem, synthetischem, auch mit der potentiometrischen Titration gemessenen *d,l*- α -Tocopherol gibt Tabelle 2 Aufschluss. Die Resultate dürfen durchwegs als sehr gut bezeichnet werden. Die in der letzten Kolonne herausgestellten Abweichungen vom theoretischen Wert gehen in keinem Fall über die wünschbaren Grenzen hinaus. — Tabelle 3 gibt Einblick in die Streuungen der einzelnen Bestimmungen unter sich, welche sich in der bei solchen photometrischen Messungen üblichen Grössenordnung bewegen. Es sei hier angefügt, dass die Kurvenpunkte in der Fig. 2 Mittelwerte aus solchen Reihenbestimmungen darstellen. In Tabelle 4 sind einige Resultate zusammengestellt, die bei der Untersuchung von Alterungs- und Bestrahlungsprodukten³⁾ ursprüng-

¹⁾ Im kurzwelligen sichtbaren und im anschliessenden ultravioletten Gebiet des Spektrums zeigt die Kurve 2 eine Veränderung. Dies deutet wohl auf eine langsam erfolgende Umsetzung hin, die ihren sichtbaren Ausdruck erst nach mehreren Tagen in einer langsamen Entfärbung der Lösung findet, die aber auf die Bestimmungsmethodik ohne Einfluss ist.

²⁾ Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, das Verfahren noch weiter auszubauen, insbesondere seine Anwendungsmöglichkeit auf die Bestimmung von Derivaten der Tocopherole auszudehnen.

³⁾ Vgl. dazu die unten veröffentlichte Arbeit von *P. Karrer* und *H. Keller*, *Helv.* **22**, 253 (1939).

Tabelle 2.

Resultate.

Quantitative Bestimmung reiner *d,l*- α -Tocopherolpräparate. Gesamtlösungsmenge 6 cm³ (Einwage + 5 cm³ absoluter Alkohol + 1 cm³ konz. Salpetersäure). Messung am *Pulfrich*-Photometer. Filter S 47. Kompensation der Lösungsmittelabsorption durch gleiche Schicht (s) einer Lösung von 5 Volumen absolutem Äthanol und 1 Volumen HNO₃ konz.

<i>d,l</i> - α -Tocopherol mg pro cm ³ Einwage	Extinktion E*		Tocopherol gef. mg		Fehler			
	s = 10 mm		s = 5 mm		s = 10 mm		s = 5 mm	
	mg	%**	mg	%**	mg	%**	mg	%**
0,050	0,074		0,041		-0,009			
0,083	0,161		0,081		-0,002	2,4		
0,125	0,235		0,118		-0,007	5,6		
0,167	0,347	0,167	0,170	0,167	+0,003	1,8	0	0
0,250	0,515	0,242	0,252	0,242	+0,002	0,8	-0,008	3,2
0,334	0,688	0,335	0,340	0,335	+0,006	1,8	-0,001	0,3
0,417	0,867		0,425		+0,008	1,9		
0,500	1,046	0,518	0,515	0,488	+0,015	3	-0,012	2,8
0,667	1,347	0,678	0,667	0,670	0	0	+0,003	0,4
0,834	1,658	0,824	0,847	0,818	-0,013	1,5	-0,006	0,7

* Mittel aus mehreren Einzelbestimmungen.

** Wert für % bezogen auf das Sollgewicht.

Tabelle 3.

Streuung der Einzelbestimmungen.

Einwage <i>d,l</i> - α -Tocopherol mg pro cm ³	Extinktion E s = 10 mm	Tocopherol gef. mg	Fehler		
			mg	% bez. a. Sollgewicht	
				max.	min.
0,083	0,155	0,078	-0,005	6,0	2,4
	0,161	0,081	-0,002		
	0,155	0,078	-0,005		
	0,173	0,087	+0,004		
0,167	0,356	0,175	+0,008	4,8	0,6
	0,347	0,170	+0,003		
	0,347	0,170	+0,003		
	0,337	0,166	-0,001		
	0,337	0,166	-0,001		
0,500	0,337	0,166	-0,001	3,4	0,8
	1,046	0,515	+0,015		
	1,027	0,506	+0,006		
	1,051	0,517	+0,017		
	1,027	0,506	+0,006		

lich reiner *d,l*- α -Tocopherolpräparate erhalten wurden. Es ist hervorzuheben, dass auch solche Produkte sehr eindeutige und reproduzierbare Werte für den unzersetzten Teil an Tocopherol ergeben. Mit Hilfe der potentiometrischen Methode wurden an den gleichen Präparaten grössenordnungsmässig ähnliche Resultate erhalten, wobei die Ermittlung derselben aber mit einer gewissen Unsicherheit verbunden war.

Tabelle 4.

Bestimmung von Tocopherolen neben Zersetzungsprodukten.

Einwage mg pro cm ³	Extinktion E (s = 10 mm)		Tocopherole mg pro cm ³ gef.	% der urspr. vorh. Menge		mit AuCl ₃ - Titrat. gef.
	gef.	theoret.			Mittel	
0,167*	0,166	0,340	0,080	48,5		
0,334*	0,330	0,675	0,168	48,8	47,4	45
0,500*	0,450	1,012	0,225	44,5		
0,250**	0,125	0,510	0,061	24,5	23,9	26
0,417**	0,197	0,845	0,098	23,3		

* Das Untersuchungsmaterial entstammte einer 0,2-proz. Lösung von *d,l*- α -Tocopherol, die in verschlossener Flasche 3 Monate im Laboratorium am Licht gestanden hatte.

** 22,6 mg α -Tocopherol in 10 cm³ absolutem Alkohol wurden 8 Stunden der Strahlungswirkung einer Quecksilberdampfampe ausgesetzt, mit dem Resultat, dass mehr als 75% der wirksamen Substanz dabei zersetzt wurde.

Tabelle 5.

Direkte Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes in Ölen.

Einwage <i>d,l</i> - α - Tocopherol mg	Sesamöl cm ³	Extinktion gef. in (s = 10 mm)		E ₁ + E ₂	α -Tocopherol gef.	
		Äthanol E ₁	Aceton E ₂		mg	%
1,000	0,33	0,258	0,083	0,341	1,00	100
2,000	0,66	0,450	0,230	0,680	1,99	99,6
3,000	1,0	0,545	0,408	0,953	2,80	93,4
Einwage Noury-Öl g	ca. cm ³	E ₁	E ₂	E ₁ + E ₂	Tocopherole gef.	
					mg	mg/g Öl
0,3754	0,4	0,320	0,160	0,480	1,40	3,63
0,6868	0,8	0,433	0,420	0,853	2,50	3,64

Zum Beweis für die umfassende Anwendungsmöglichkeit der beschriebenen Methode fügen wir in Tabelle 5 noch einige mit tocopherolhaltigen Ölen direkt erzielte Resultate an. Die Prüfung dieser speziellen Ausführungsform unserer Methode erfolgte durch Ermittlung des α -Tocopherolgehaltes in Lösungen von bekanntem

Gehalt in Sesamöl. (Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass Sesamöl in den hier in Frage kommenden Mengen mit Salpetersäure keine störende Reaktion aufweist.) Die Versuche 1—3 zeigen die dabei erhaltenen Resultate, die den Erwartungen entsprechen. Natürliche, Vitamin E-haltige Öle ergaben Werte (Versuche 4 und 5), die dem für solche Präparate angegebenen Tocopherolgehalt gut entsprechen und auch unter sich übereinstimmen. Es ist allerdings dabei nicht erwiesen, dass ein vitaminfreies Öl der letzteren Art mit Salpetersäure kein störendes Reaktionsprodukt ergibt. Nach den gemachten Erfahrungen dürfte dies aber sehr unwahrscheinlich sein.

Tabelle 6.

Tocopherolgehalt pro cm^3 einer Lösung und Extinktion E des Reaktionsproduktes mit konz. Salpetersäure¹⁾.

Extinktion E s = 10 mm	α -Tocopherol mg pro cm^3	Extinktion E s = 10 mm	α -Tocopherol mg pro cm^3
0,100	0,048	0,800	0,385
0,150	0,072	0,850	0,408
0,200	0,095	0,900	0,433
0,2500	0,120	0,950	0,457
0,300	0,143	1,000	0,480
0,350	0,167	1,050	0,505
0,400	0,192	1,100	0,529
0,450	0,215	1,150	0,554
0,500	0,240	1,200	0,577
0,550	0,265	1,250	0,600
0,600	0,288	1,300	0,625
0,650	0,314	1,350	0,650
0,700	0,336	1,400	0,674
0,750	0,362	1,500	0,720

Experimenteller Teil.

Einwirkung von Salpetersäure auf Tocopherole.

Tocopherole, gelöst in konzentriertem Alkohol, am besten eignet sich absolutes Äthanol, ergeben bei Zusatz von konz. Salpetersäure und kurzem Aufkochen einen auffallenden Farbumschlag. Die anfänglich farblose bis gelbe Lösung nimmt über orange-rot nach wenigen Minuten eine intensive zinnoberrote Farbe an. Dieser Farbeffekt ist wohl an die Salpetersäure, aber nicht an deren Konzentration gebunden. Auch Lösungen mit wenig Salpetersäure ergeben dieselbe Reaktion, nur ist dann ein längerdauerndes Erwärmen auf

¹⁾ Die Werte dieser Tabelle können dazu benützt werden, eine Eichkurve, ähnlich wie in Fig. 2, zur Ermittlung des Tocopherolgehaltes einer Lösung mit Hilfe der Salpetersäurereaktion aufzustellen, aber nur unter der Voraussetzung, dass die Versuche genau nach unserer Vorschrift durchgeführt werden.

etwa 60—70° (unter Umständen mehrere Tage) notwendig. Im Gegensatz dazu führt eine zu grosse Säurekonzentration erwartungsgemäss zur oxydativen Zerstörung der vorhandenen Produkte, was sich in einer raschen Entfärbung der Lösung manifestiert. Als günstige Verhältnisse, sowohl für Erreichung grösster Farbintensität, als auch rascher Durchführung des Versuches, haben sich die in dem unten beschriebenen Verfahren für die quantitative Methodik erwiesen.

Inwieweit eine minimale Salpetersäurekonzentration zur Ausbildung grösster Farbintensität innerhalb vernünftiger Versuchszeiten notwendig ist, geht aus Fig. 1 hervor. In Kurve 1 ist die Absorption des Farbstoffes in molarer Konzentration unter optimalen Verhältnissen dargestellt, das heisst in einer Lösung, die ausser dem Reaktionsprodukt 83,5 Vol.-% absolutem Äthanol und 16,5 Vol.-% konz. (ca. 65-proz.) Salpetersäure enthält. Kurve 3 wurde erhalten, indem die Lösungsmittelzusammensetzung folgendermassen geändert wurde: 96 Vol.-% absolutes Äthanol, 4 Vol.-% konz. Salpetersäure. Dabei ist nicht nur eine leichte Violettverschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 5 m μ , sondern auch eine deutliche Verkleinerung der Extinktion feststellbar. Interessant ist die Tatsache, dass trotzdem das Beer'sche Gesetz erfüllt wird, was durch die Absorptionskurve 3a bewiesen ist, die unter gleichen Verhältnissen, aber mit einer 0,25-mol. Lösung aufgenommen wurde, wobei wiederum die Extinktionskoeffizienten Werte aufweisen, die dem vierten Teil derjenigen der 1-mol. Lösung entsprechen. Das heisst, dass die quantitative Bestimmung der Tocopherole mit dieser Methode immer gewährleistet ist, wenn nur darauf geachtet wird, dass für alle Versuche gleiche Bedingungen geschaffen werden.

Die Ausführung einer quantitativen Bestimmung.

Eine Substanzmenge von 1—5 mg, die nicht weniger als 0,3 mg Tocopherole enthalten soll, wird in ein 25 cm³-Kölbchen eingewogen und in genau 5 cm³ absolutem Äthanol gelöst. Selbstverständlich können auch 5 cm³ einer in grösserer Menge vorhandenen Lösung des Untersuchungsmaterials in absolutem Äthanol in das Kölbchen eingemessen werden.

Zu dieser Lösung lässt man aus einer Bürette unter fortwährendem Umschwenken des Reaktionskölbchens genau 1 cm³ 65-proz. reine Salpetersäure zufließen. Nach dem Einwerfen eines kleinen Tonstückchens wird der Inhalt des Kölbchens, am besten auf dem Dampfbad, am Rückfluss zum Sieden gebracht und hierauf genau 3 Minuten gekocht. Als Rückflusskühler kann man in einfacher Weise ein Glasrohr von 50 cm Länge und etwa 8 mm lichter Weite in einem gut paraffinierten Kork auf das Kölbchen aufsetzen. Besser haben sich Reaktionsgefässe mit aufgeschmolzenem Rückflusskühler bewährt¹⁾. — Nach dem Auskühlen während einer Minimalzeit von 15 Minuten wird die Farbintensität, bzw. die Extinktion der Lösung unter Zwischenschaltung des Farbfilters S. 47 am Pulfrich-Photometer gemessen. Dazu pipettiert man die zur Füllung einer 1 cm-Küvette notwendige Menge der Lösung vorsichtig aus dem Kölbchen heraus und achtet besonders

¹⁾ M. Furter, Helv. 21, 605 (1938).

darauf, dass keine Konzentrationsänderung durch Verdunstung von Alkohol eintritt. Im zweiten Strahlengang des Photometers wird zur Kompensation der Lösungsmittelabsorption eine gleiche Küvette mit einem Gemisch von 83,5 Vol.-% absolutem Äthanol und 16,5 Vol.-% konz. Salpetersäure eingeschaltet. Zu dem so ermittelten Extinktionswert E sucht man auf der zur Schichtdicke passenden Eichgeraden (vgl. Fig. 2) den entsprechenden Wert für die Konzentration an Tocopherol. Es ist hier beizufügen, dass den in Fig. 2 dargestellten Auswertungsgeraden reines d,l - α -Tocopherol zu Grunde gelegt ist. Wir verwenden diese Geraden aber zur Konzentrationsbestimmung der gesamten Tocopherole, in der wohl berechtigten Annahme, dass die Homologen mit Salpetersäure Reaktionsprodukte liefern, die ähnliche Absorptionswirkungen wie das α -Tocopherol aufweisen. Immerhin ist diese Annahme an Hand eines grösseren Versuchsmaterials noch zu beweisen.

Mit Hilfe der geschilderten Versuchsbedingungen wurden alle in dieser Arbeit angeführten Resultate ermittelt, mit Ausnahme derjenigen Bestimmungen, wo das Untersuchungsmaterial sich in Äthanol nicht vollständig löst und infolgedessen nach der folgenden Modifikation vorgegangen werden muss.

Die quantitative kolorimetrische Bestimmung der Tocopherole in Ölen.

Wenn man ein tocopherol-haltiges Öl in der oben angegebenen Weise zu etwa 0,2—0,3 g in 5 cm³ Äthanol z. T. löst und z. T. suspendiert und dieses Gemisch mit 1 cm³ konz. Salpetersäure behandelt, so bildet sich der rote Farbstoff ebenfalls. Ein Teil davon bleibt in der alkoholischen Schicht, ein anderer Teil löst sich in der sich beim Abkühlen absetzenden Ölschicht. Durch Photometrierung der überstehenden alkoholischen Lösung erhält man infolgedessen nur etwa 50—70% des wirklich vorhandenen Gehaltes an Tocopherol, wobei durch zunehmende Menge Öl erwartungsgemäss das Verhältnis des in Öl, zu dem in Alkohol gelösten Umsetzungsproduktes zu Ungunsten des letzteren verschoben wird. Wir haben uns deshalb bemüht, auch den in Öllösung befindlichen Teil des roten Farbstoffes durch geeignete Versuchsbedingungen der photometrischen Messung zuzuführen. Versuchen, die Reaktion in einem andern, für Öle günstigeren Lösungsmittel durchzuführen, war kein Erfolg beschieden. Wir waren deshalb genötigt, die eigentliche Umsetzung mit Salpetersäure in Alkohol vorzunehmen, um nachher sowohl die alkoholische Schicht als auch die Ölfraction in Acetonlösung jede für sich zu photometrieren¹⁾ und so aus der Summe der beiden Extinktionswerte den Gesamtgehalt an Tocopherolen festzustellen. Modellversuche mit bekannten Lösungen von d,l - α -Tocopherol in Sesamöl zeigten die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens (vgl. Tabelle 5). Die Einzelheiten der Versuchsdurchführung gehen aus der folgenden Beschreibung hervor.

¹⁾ Wegen der Schwerlöslichkeit der Ölanteile ist weder durch direkten Zusatz von Aceton zum Reaktionsgemisch noch durch nachträgliche Vereinigung der Alkohol- und Acetonlösungen eine zur Photometrierung geeignete Lösung erhältlich.

Die gewogene Ölprobe, die zur Erreichung günstiger Verhältnisse 0,6 g nicht überschreiten soll, wird in dem oben erwähnten Reaktionskölbchen mit 5 cm³ absolutem Alkohol übergossen und während 5 Minuten unter Erwärmen energisch geschüttelt. Nach Zugabe von 1 cm³ konz. Salpetersäure wird in genau gleicher Weise wie oben verfahren. Nach dem Abkühlen hat sich die Hauptmenge des Öles am Boden des Kölbchens abgeschieden. Die überstehende Alkohollösung wird nun sorgfältig durch ein Filter abgehebert, am besten unter Verwendung der für die mikroanalytische Bestimmung von Halogenniederschlägen von *Pregl* angegebenen Filtriervorrichtung. Die alkoholische Lösung wird in einem Messgläschen aufgefangen und das Volumen, wenn notwendig, durch Alkoholzusatz auf 6 cm³ gebracht. Die Öllösung wird nun mit 3 cm³ reinem Aceton versetzt und durch dasselbe Filter in ein weiteres Messgläschen abgesaugt. Kölbchen und Filter werden nun mit 3 × ca. 1 cm³ reinem Aceton sorgfältig nachgewaschen, bis das Volumen der Acetonlösung ebenfalls 6 cm³ beträgt. Jede Lösung wird für sich photometriert, wobei selbstverständlich bei der Acetonlösung in den Vergleichsstrahlengang zur Kompensation der Lösungsmittelabsorption eine gleiche Schicht Aceton mit einer entsprechenden Menge des ursprünglichen Öles eingeschaltet wird. — Die Summe der beiden Extinktionswerte ergibt mit Hilfe der Eichkurve den Gehalt an Tocopherolen.

Es wäre gegen diese Methodik einzuwenden, dass die Extinktion des roten Farbstoffes in Acetonlösung nicht mit derjenigen in Alkohol übereinzustimmen braucht. Anscheinend ist ein dadurch hervorgerufener Fehler sehr klein, da sonst die Modellversuche in Sesamöl nicht so gute Resultate liefern könnten. Wir sind im übrigen damit beschäftigt, die Absorption des roten Umsetzungsproduktes unter diesen Bedingungen in Aceton mit derjenigen in Alkohol durch spektrographische Messungen zu vergleichen.

Organ. Chem. Laboratorium, Mikroanalytische Abteilung,
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich und Wissenschaftliche
Laboratorien der *F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G.*, Basel.

32. Phytochemische Hydrierung von Oestron zu α -Oestradiol

von **A. Wettstein.**

(30. XII. 38.)

Im letzten Heft der „Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft“ beschreibt *L. Mamoli*¹⁾ das Verhalten oestrogener Hormone gegenüber gärender Hefe. Er findet, dass von niederen Fettsäuren abgeleitete Ester des Oestrons unter Verseifung der Estergruppe in 3-Stellung und Reduktion der 17-Ketogruppe in α -Oestradiol übergeführt werden; hingegen ergaben seine Versuche zur direkten Hydrierung von Oestron keine befriedigende Ergebnisse.

Ich habe mich vor 1½ Jahren, angeregt durch die elegante biochemische Überführung des Δ^4 -Androsten-3,17-dions in Testosteron²⁾, ebenfalls mit obigen Fragen beschäftigt. So konnte ich

¹⁾ B. **71**, 2696 (1938).

²⁾ *L. Mamoli* und *Vercellone*, B. **70**, 470 (1937).