

Essai N <sup>o</sup>	Conc. en enzyme mgr./100 cm <sup>3</sup>	Conc. en hydrate de carbone gr./100 cm <sup>3</sup>	Temps en heures	Maltose hydraté gr./100 cm <sup>3</sup>	Dégradation %	
30 Dégradation d'une solution d'amidon de « waxy maize » obtenue par extraction à l'eau à 65 <sup>o</sup>	0,8	II	0,090	1	0,020	22,2
				16	0,041	45,6
				19½	0,041	45,6
				20½	1. Rajeun.	
				39½	0,053	59,1
				47½	0,057	63,3
				49½	2. Rajeun.	
64	0,065	72,2				
31 Dégradation de la fraction « gel » de « waxy maize » obtenue par électrolyse	0,8	II	0,265	½	0,103	38,9
				14	0,127	47,9
				16	1. Rajeun.	
				23	0,173	65,3
				38	0,166	62,6
				38¼	2. Rajeun.	
				39	0,166	62,6

Genève, Laboratoires de Chimie inorganique et organique de l'Université.

### 168. Weitere Reinigungsversuche an Vitamin A<sub>2</sub>

von P. Karrer und E. Bretscher.

(3. XI. 42.)

In unserer ersten Mitteilung<sup>1)</sup> über das sog. Vitamin A<sub>2</sub> aus Hechtlebern hatten wir ein chromatographisches Reinigungsverfahren für diesen Stoff beschrieben, bei dem eine Calciumhydroxydsäule als Adsorbens diente.

Im vergangenen Winter wurde eine neue Menge von Hechtlebern gesammelt und auf unverseifbaren Rückstand verarbeitet. Das Gewicht des letzteren betrug 6,6 g. Es zeigte sich hierbei, dass in diesem Winteröl das Verhältnis von Vitamin A<sub>2</sub> zu Vitamin A (Axerophthol) gegenüber den Sommerölen von 1941 und 1942 sehr zugunsten des Vitamins A<sub>2</sub> verschoben war. Bei der Ausführung der Antimontrichlorid-Blaureaktion trat die durch Vitamin A hervorgerufene Bande 620 m $\mu$  nur noch sehr schwach auf. Aus diesem Rohprodukt liess sich hierauf durch dreimal wiederholte chromatographische Reinigung in der Calciumhydroxydsäule und eine Molekulardestillation ein Produkt gewinnen, in dessen Blauspektrum die

<sup>1)</sup> Helv. **24**, 161 E (1941).

Vitamin A-Bande ( $620\text{ m}\mu$ ) nicht mehr sicher nachzuweisen war (Fig. 1). Falls dieses Präparat noch einen gewissen Vitamin-A-Gehalt besitzt, so wird seine Absorptionsbande mit dem optischen Schwerpunkt  $620\text{ m}\mu$  in der spektrographisch ermittelten Absorptionskurve des Vitamins  $A_2$  von dieser überdeckt. Für letztere wurde  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  für  $691\text{ m}\mu$  zu ca. 2000 gefunden. Das Ultraviolett-spektrum des Präparates (Fig. 2) wies 2 Maxima auf:  $E_{345\text{ m}\mu} = 1460$  und  $E_{288\text{ m}\mu} = 330$ . Es handelt sich hier um ein Präparat, das jedenfalls beträchtlich weniger Axerophthol enthielt als die bisher gewonnenen Vitamin  $A_2$ -Fraktionen. Auch bei diesem bisher reinsten Vitamin- $A_2$ -Präparat liegt das Absorptionsmaximum nicht langwelliger als  $345\text{ m}\mu$ .

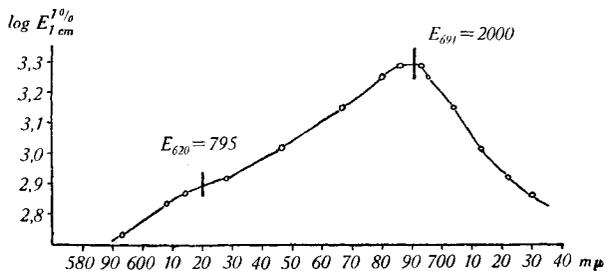


Fig. 1.

Vitamin- $A_2$ -Präparat (Blauspektrum der  $\text{SbCl}_3$ -Reaktion).

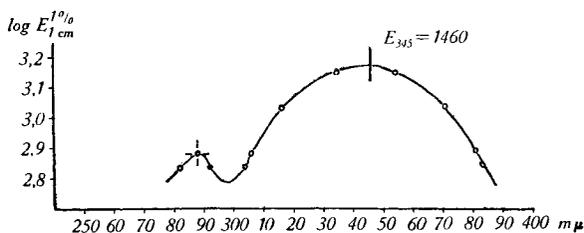


Fig. 2.

Vitamin- $A_2$ -Präparat (U.V.-Spektrum).

Der Vergleich der beiden Absorptionsspektren (Blauspektrum Fig. 1 und U.V.-Spektrum Fig. 2) scheint zu zeigen, dass das Verhältnis der maximalen Extinktionskoeffizienten  $E$  für das Blauspektrum und U.V.-Spektrum bei Vitamin  $A_2$  doch ein anderes ist als bei Axerophthol. Für letzteres beträgt bekanntlich  $E_{328\text{ m}\mu} = 1700$  und  $E_{620\text{ m}\mu} = 5000$  (Blauspektrum). Für unsere beiden hier beschriebenen Fraktionen des Vitamins  $A_2$ , die chromatographisch und durch Molekulardestillation gereinigt waren, wurde  $E_{345\text{ m}\mu} = 1460$  gefunden, während im Blauspektrum  $E_{691\text{ m}\mu}$  nur 2000 betrug. Es ist daher wahrscheinlich, dass die maximale Extinktion für die

Wellenlänge 691  $m\mu$  im Blauspektrum für Vitamin A<sub>2</sub> niedriger als 5000 liegen wird. Diese Verhältnisse müssen jedoch an noch reineren Fraktionen genauer geprüft werden.

Wir haben auch solche molekulardestillierten Präparate mit Ozon abgebaut und hierauf auf Aceton geprüft. Wiederum wurde unter den Bedingungen der Acetonbestimmung<sup>1)</sup> eine beträchtliche Menge Jod verbraucht und Jodoform gebildet. Im Gegensatz zu früher ist es uns aber nicht gelungen, das Aceton als krystallisiertes p-Nitrophenylhydrazon zu fassen, so dass die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Jodoformbildung nicht von Aceton, sondern von einer andern Verbindung unbekannter Natur herrührt. Falls letzteres der Fall sein sollte, könnte die früher diskutierte Konstitutionsformel<sup>2)</sup> für Vitamin A<sub>2</sub> nicht aufrecht erhalten werden. Diese Frage wird sich erst nach Beschaffung von mehr Versuchsmaterial entscheiden lassen.

### Experimentelles.

#### 1. Chromatographische Reinigung.

6,6 g unverseifbarer Rückstand, gelöst in 50 cm<sup>3</sup> Petroläther, wurden unter Stickstoff an einer Calciumhydroxydsäule (56 cm lang, 3 cm Durchmesser), die mit 200 cm<sup>3</sup> Petroläther vorgewaschen war, chromatographiert. Nach der Entwicklung des Chromatogramms mit 220 cm<sup>3</sup> Petroläther und Elution mit einer Mischung von Petroläther und 10 % Methanol wurden folgende Fraktionen erhalten:

Schicht 1 (oberste),	17 cm lang:	0,6 g orangegelbes Öl, durchsetzt mit festen Anteilen (Sterinen);
Schicht 2	15 cm lang:	0,4 g orangegelbes Öl E 693 $m\mu = 1320$ ;
Schicht 3	12 cm lang:	2,2 g gelbrotcs Öl E 693 $m\mu = 1460$ ;
Schicht 4	2 cm lang:	2,0 g rotes, dünnflüssiges Öl E 693 $m\mu = 140$ .

Durch Nache'lution der Schichten 1 bis 4 mit Chloroform erhielt man weitere geringe Mengen: 0,1 g, 0,1 g, 0,2 g und 0,05 g Substanz. Diese zweiten Eluate aus den Schichten 2 und 3 (0,3 g) wurden zusammen in wenig Methanol gelöst, die Lösung auf  $-20^{\circ}$  abgekühlt, wobei Sterine auskrystallisierten. Nachdem diese abgenutscht waren, extrahierten wir die Methanollösung nach Zusatz von wenig Wasser mit Petroläther und erhielten so nach dem Eindampfen des Petrolätherextraktes 0,1 g Substanz mit E 693  $m\mu = 1250$ . (Fraktion P.) Durch Verdampfen der Methanollmutterlauge wurden weitere 0,07 g mit E 693  $m\mu = 750$  gewonnen (Fraktion M).

Hierauf wurden auch die Öle aus den Schichten 2 und 3 vereinigt (zusammen 2,6 g), in wenig Methanol aufgelöst und die Lösung auf  $-20^{\circ}$  abgekühlt. Dabei schied sich ein Niederschlag aus, der hauptsächlich Verunreinigungen enthielt. Die Methanollösung hinterliess nach dem Verdampfen 2,1 g orangegelbes Öl (Fraktion N).

<sup>1)</sup> Helv. 14, 435 (1931); Am. Soc. 42, 39 (1920).

<sup>2)</sup> Helv. 24, 165 E (1941).

## 2. Chromatographische Reinigung.

Die Fraktionen N, P und M, zusammen 2,27 g, löste man in 30 cm<sup>3</sup> Petroläther und chromatographierte an einer Calciumhydroxydsäule von 32 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser. (Vorwaschen mit 100 cm<sup>3</sup> Petroläther, entwickeln mit 80 cm Petroläther). Stickstoffatmosphäre.

Schicht 1 (oberste), 3 cm lang: 0,1 g rotoranges Öl E 693 m $\mu$  = 750;  
 Schicht 2 24 cm lang: 0,6 g rotoranges Öl E 693 m $\mu$  = 2000;  
 E 344 m $\mu$ <sup>1)</sup> = 1450;  
 Schicht 3 5 cm lang: 0,7 g rotoranges Öl E 693 m $\mu$  = 1200;  
 Schicht 4 Durchlauf 0,5 g rotes Öl E 693 m $\mu$  = ca. 400.

Nacheluate mit Chloroform aus den Schichten 1 bis 3 lieferten 0,1 g rotoranges Öl.

## 3. Chromatographische Reinigung.

Die Fraktion aus Schicht 3 der zweiten chromatographischen Reinigung (0,7 g) wurde aus 15 cm<sup>3</sup> Petroläther erneut an Calciumhydroxyd chromatographiert. Länge der Säule 40 cm, Durchmesser 1,4 cm. Vorwaschen mit 30 cm<sup>3</sup> Petroläther, Entwicklung des Chromatogramms mit 40 cm<sup>3</sup> Petroläther.

Schicht 1 (oberste), 1 cm lang: 0,06 g orangefarbiges Öl;  
 Schicht 2 21 cm lang: 0,2 g orangefarbiges Öl E 344 m $\mu$  = 1400;  
 Schicht 3 7,5 cm lang: 0,1 g orangefarbiges Öl E 344 m $\mu$  = ca. 250;  
 Schicht 4 4,0 cm lang: + Durchlauf: 0,2 g rotes Öl.

## Molekulardestillation.

Die Fraktionen aus Schicht 2 des 2. Chromatogramms (E 344 m $\mu$  = 1450) und Schicht 2 des dritten Chromatogramms (E 344 m $\mu$  = 1400) wurden zusammen in einer Molekulardestillationsapparatur bei 10<sup>-5</sup> mm Druck destilliert. Hierbei haben wir zwei Fraktionen aufgefangen:

Destillation	Zeit	Badtemperatur
Beginn	12.30 h	18° C
	13.30 h	105°
	14.10 h	120°
	15.00 h	140°
		} → Fraktion I, 0,4 g orangefarbenes Öl. E 693 m $\mu$ = 2000. E 345 m $\mu$ = 1460
Unterbruch		
Wiederbeginn	16.00 h	18° C
	17.00 h	120°
	17.30 h	160°
		} → Fraktion II, 0,11 g oranges Öl E 344 m $\mu$ = 600

Destillationsrückstand 0,12 g rotoranges Öl. E 693 m $\mu$  = 270 E 327 m $\mu$  = 470.

Eine Analyse der Fraktion I ergab:

C 83,03 H 10,71%.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

1) Ultraviolett-Spektrum.