

Zur Verseifung wurden 2,6 g des Acetats 1 Stunde mit 5-proz. alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Verdünnen mit Wasser, Ausziehen mit Äther, Waschen der Ätherlösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser und Verdampfen des Lösungsmittels erhielten wir das [C* 2-*d,l*; C* 4,8'-*l*]- α -Tocopherol als farbloses Öl.

Das Allophanat, in üblicher Weise dargestellt und aus Alkohol umkrystallisiert, schmolz bei 172°.

Aus 3 g [C* 2-*d,l*; C* 4',8'-*l*]- α -Tocopherol und 3 g 3-Brom-*d*-campher-7'-sulfochlorid wurde in Pyridin nach früher mitgeteilter Vorschrift¹⁾ das Bromcamphersulfonat bereitet. Dieses schmolz nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 51°, gleich hoch wie das entsprechende Derivat aus natürlichem α -Tocopherol und aus [C* 2-*d,l*; C* 4',8'-*d,l*]- α -Tocopherol. Eine höher schmelzende Bromcamphersulfonatfraktion, die bei der Darstellung des aus synthetischem *d,l*-Phytol hergestellten [C* 2-*d,l*; C* 4',8'-*d,l*]- α -Tocopherols früher²⁾ erhalten worden ist, konnte im vorliegenden Fall nicht beobachtet werden.

Zur Verseifung des Bromcamphersulfonats wurden 0,68 g in 16 cm³ 5-proz. absolut-alkoholischer Kalilauge gelöst und im Bombenrohr 2 Stunden im Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Als Rückstand der ätherischen Lösung blieben 0,4 g [C* 2-*d,l*; C* 4',8'-*l*]- α -Tocopherol zurück, die wir in das Allophanat verwandelten. Dieses schmolz bei 172—173°, also gleich hoch wie das Allophanat der nicht über das Bromcamphersulfonat verarbeiteten Substanz.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

160. Zur Kenntnis des Vitamins A₂

von P. Karrer und E. Bretscher.

(20. VII. 43)

In zwei früheren Mitteilungen³⁾ haben wir uns mit der Konstitution des Vitamins A₂ beschäftigt. Diese Arbeiten konnten nunmehr vervollständigt und zu einem gewissen Abschluss gebracht werden.

Wir gingen wiederum von Leberölen des Hechtes aus, und zwar von solchen, die in den Wintermonaten gesammelt worden waren, da diese viel weniger Axerophytol (Vitamin A) als die Sommeröle enthalten, wodurch die Reinigung des Vitamins A₂ erleichtert wird.

¹⁾ Helv. **21**, 820 (1938); **22**, 1139 (1939).

²⁾ Helv. **22**, 1139 (1939).

³⁾ Helv. **24**, 161 E (1941); **25**, 1650 (1942).

Das Unverseifbare dieser Winteröle wurde durch Ausfrieren weitgehend von Sterinen getrennt und hierauf der chromatographischen Reinigung an der Calciumhydroxydsäule unterworfen. Als Lösungsmittel und Entwicklungsflüssigkeit diente Petroläther. Durch dreimalige chromatographische Trennung liessen sich Vitamin A₂-Präparate gewinnen, deren Extinktionskoeffizient $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ für das Absorptionsmaximum 345 m μ 1300—1400 betrug. $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ für 693 m μ , dem Absorptionsmaximum der blauen Antimontrichloridreaktion des Vitamins A₂, lag bei diesen Präparaten bei ca. 2000—2200 m μ .

Die besten Vitamin A-Fractionen liegen im Chromatogramm in den Mittelschichten. Obwohl die Chromatographie auch in diesem Fall die besten Dienste für die Reinigung leistet, ist sie doch nicht ganz frei von schädigenden Einflüssen auf die Verbindung. Die Präparate färben sich dabei stets etwas dunkler (rot bis braunrot). Erst durch die nachfolgende Molekulardestillation erhält man helle, rötlichgelbe Vitamin A₂-Präparate.

Nach dreimaliger chromatographischer Reinigung haben wir die besten Vitamin A₂-Fraktionen zwei aufeinanderfolgenden Destillationen im Kathodenstrahlvakuum unterworfen und hierbei Produkte erhalten, die durch folgende Extinktionskoeffizienten gekennzeichnet waren:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ für 345 m μ 1450 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ für 693 m μ 2300

Vgl. die Absorptionskurven Fig. 1 und 2.

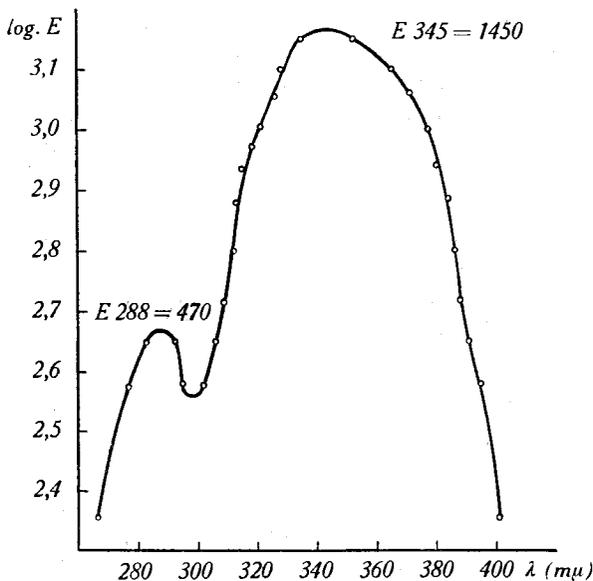


Fig. 1.

Absorptionsspektrum des Vitamin A₂-Präparates im Ultraviolett.

Einmal ging bei der dritten Molekulardestillation eines solchen Präparates $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ für 344 m μ wieder auf 1050 zurück, ein Anzeichen, dass solche hochgereinigten Präparate labil sind und sich leicht (durch Polymerisation?) zersetzen können.

Die Analyse dieser besten Vitamin A₂-Präparate ergab folgende Werte:

C ₂₀ H ₃₀ O	Ber. C 83,85	H 10,56%	Hydrierungszahl 6,0 Mol
	Gef. „ 83,33	„ 10,46%	„ 5,7; 5,8 Mol

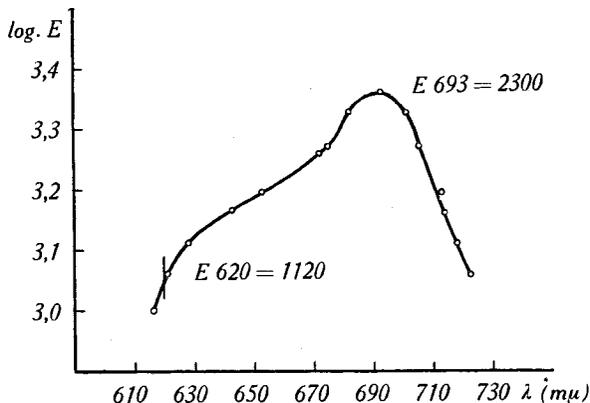


Fig. 2.

Absorptionsspektrum der blauen Farbreaktion von Vitamin A₂ und Antimontrichlorid.

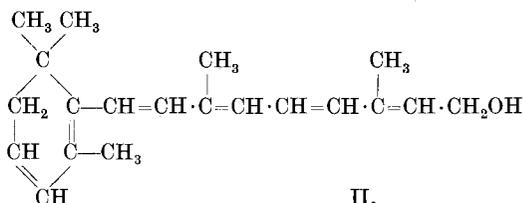
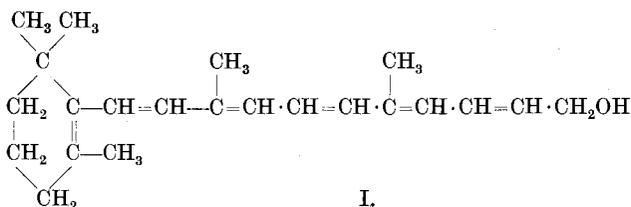
Unsere besten Vitamin A₂-Präparate enthalten wahrscheinlich nur noch 2—3% Vitamin A (Axerophthol). Dies liess sich durch quantitative Geronsäurebestimmungen feststellen. Aus 0,077 g Vitamin A liessen sich nach dem Abbau¹⁾ mit Ozon 42 mg rohes Geronsäure-semicarbazon isolieren, dessen Menge nach dem Umkrystallisieren aus Essigester auf 16 mg reines Semicarbazon zurückging. Demgegenüber lieferten 0,70 g unseres Vitamin A₂-Präparates (d. h. die neunfache Gewichtsmenge) nur 2,1 mg rohes Geronsäure-semicarbazon. Unter Zugrundelegung der Ausbeuten, die man aus reinem Axerophthol erhielt, berechnet sich für unser verwendetes Vitamin A₂-Präparat ein Vitamin A-Gehalt von höchstens 2%.

Durch das Ergebnis dieses Ozonisierungsversuches ist die Vitamin A₂-Formel von Gillam, Heilbron, Jones und Lederer²⁾ (Formel I) widerlegt, denn eine Verbindung dieser Konstitution müsste beim Abbau mit Ozon fast dieselbe Menge Geronsäure ergeben wie Axerophthol. Aber auch die Formel (II) von Gray³⁾ muss fallen gelassen werden, da Vitamin A₂ bei der Oxydation keine Dimethylbernsteinsäure liefert³⁾, was wir durch neue Abbauprobieren mit dem höchstgereinigten Vitamin A₂-Präparat erneut bestätigen konnten.

¹⁾ P. Karrer, R. Morf, K. Schöpp, Helv. **14**, 1431 (1931).

²⁾ Bioch. J. **32**, 405 (1938).

³⁾ Vgl. P. Karrer, A. Geiger, E. Bretscher, Helv. **24**, 161 E (1941).

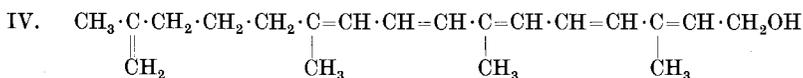


In der ersten Mitteilung über Vitamin A₂¹⁾ hatten wir für diese Verbindung die „offene“ Formel III in Erwägung gezogen



Wir haben daher unser bestes Vitamin A₂-Präparat nochmals mit Ozon abgebaut und geprüft, ob dabei Aceton entsteht. Dies war der Fall und das Aceton wurde als kristallisiertes p-Nitrophenylhydrazon isoliert. Seine Menge betrug in diesem Versuch nur 8,3 %, in früheren Versuchen etwas mehr. Wir prüften daher, ob sich noch ein anderes Abbauprodukt gebildet hatte. Ein solches fanden wir im Formaldehyd auf, den wir nach dem Abbau des Vitamin A₂-Präparates mit Ozon in 38—40 % der Theorie (auf 1 Mol berechnet) nachweisen konnten; da Blindversuche ergaben, dass beim Kochen der ozonhaltigen EisessigsLösung mit Wasser 17—20 % Formaldehyd, vermutlich infolge weiterer Oxydation, verloren gehen, beträgt die korrigierte Formaldehydausbeute aus unserem Vitamin A₂-Präparat 55—60 %.

Man wäre versucht, aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung zu ziehen, dass Vitamin A₂ aus Hechtlebern ein Gemisch der Isopropylidenverbindung III und dem Strukturisomeren IV ist:

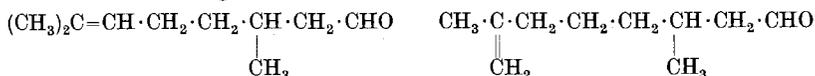


Eine analoge Strukturisomerie wird bekanntlich auch bei verschiedenen aliphatischen Terpenalkoholen und Terpenaldehyden angenommen²⁾, aus denen beim Ozonabbau ebenfalls Aceton und

¹⁾ P. Karrer, A. Geiger, E. Bretscher, *Helv.* **24**, 161 E (1941).

²⁾ s. z. B. V. Grignard, J. Doeuve, R. Escourrou, *Bl.* [4] **35**, 932 (1924). — J. L. Simonsen, *Terpenes I*, S. 59 (Cambridge 1931).

Formaldehyd gebildet werden. Beispielsweise soll natürliches Citronellal eine Mischung der Isomeren



sein und auch Rhodinol und Citronellol stehen wahrscheinlich im gleichen Isomerieverhältnis. Es wird allerdings auch die Meinung vertreten, dass die Anwesenheit zweier Isomeren fraglich ist und das Auftreten von Formaldehyd neben Aceton einer Umlagerung in der Molekel zuzuschreiben ist, die sich unter der Einwirkung von Ozon abspielt.

Auch für Vitamin A₂ müssen wir diese Frage offen lassen, dies umsomehr, als wir fanden, dass auch aus Vitamin A (Axerophthol), Lycopin, ja selbst Carotin beim Abbau mit Ozon etwas Formaldehyd entsteht, aus Axerophthol bedeutend weniger als aus Vitamin A₂, aus Lycopin und Carotin in Mengen von ungefähr gleicher Grössenordnung. In diesen Fällen kann die Bildung des Formaldehyds nur auf irgendwelche Nebenreaktionen bzw. Umlagerungen beim Abbau mit Ozon zurückgeführt werden.

Wenn unsere Auffassung von der Konstitution des Vitamin A₂ richtig war, musste sich die Verbindung durch Hydrierung in Dihydro-phytol überführen lassen. Wir haben diesen Hydrierungsversuch ausgeführt und aus dem Reduktionsprodukt ein Allophanat isoliert, das wie Dihydro-phytol-allophanat nach vorgängigem Sintern bei 73° schmolz und mit diesem gemischt keine Schmelzpunktsenkung zeigte. Auch dieser Versuch steht demnach mit der für Vitamin A₂ vorgeschlagenen Konstitutionsformel im Einklang.

Das höchstgereinigte Vitamin A₂-Präparat, das wir gewonnen hatten, hat Hr. Prof. *H. v. Euler* in Stockholm auf unsere Bitte auf Vitamin A-Wirkung an der Ratte geprüft, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken. Dabei ergab sich, dass dieses eine Zuwachswirkung besass, die ungefähr $\frac{1}{10}$ derjenigen des Axerophthols betrug.

	Dosis	Zahl d. Tiere	Mittl. tägl. Gewichtszunahme	Internat. Einheiten per g
1. Ver-} Vitamin A ₂ -Präparat	9,2 γ	4	1,05 g	366,000
such} β-Carotin	1,8 γ	5	1,0 g	
2. Ver-} Vitamin A ₂ -Präparat	9,2 γ	6	1,54 g	375,000
such} β-Carotin	1,8 γ	6	1,37 g	

4,6 γ Tagesdosen des Vitamin A₂-Präparates sind unzureichend, indem bei diesen Mengen einige Ratten sterben.

Einige Prozente dieser Vitamin A-Wirksamkeit sind auf den kleinen Gehalt an Axerophthol, den unser Präparat noch aufwies, zurückzuführen. Nach Abzug derselben bleiben aber immer noch

gedampft, wobei man die letzten Teile des Lösungsmittels im Vakuum vertrieb. Es hinterblieben gelb bis braun gefärbte Öle, in denen sich beim Stehen häufig Sterine niederschlugen. Bis zur Verseifung behielten wir die Öle in evakuierten Ampullen auf.

Aus 31 kg Lebern von Weissfischen (*Squalius leuciscus*, *Leuciscus rutilus*, *Alburnus alburnus*) erhielten wir so 5,5 kg – d. h. 18 % – Tran, während sich im Laufe von 21 Monaten 108,5 kg meist einheimische, zum Teil auch dänische und ungarische Hechtlebern auf 8,52 kg – d. h. 7,9 % – Tran aufarbeiten liessen. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden, wenn nicht ausdrücklich etwas anderes bemerkt wird, Öle aus Hechtlebern verwendet.

Die Verseifung der Leberöle nahmen wir in Portionen von 300 g bis 500 g vor. Wir versetzten 100 g Öl mit 300 cm³ 12-proz. Kalilauge und erhitzen während 60–70 Minuten unter Durchleiten von Stickstoff auf 60°. Die erkaltete Seifenlösung zogen wir 5–7 mal mit Petroläther aus, wobei wir pro 100 g verseiften Tranes 4–5 Liter Extraktionsmittel benötigten. Nach Zugabe der ersten Portion Petroläther versetzten wir jeweils mit der auf das Seifenvolumen bezogenen halben Menge Wasser, um beim zweiten Ausschütteln nochmals dieselbe Menge Wasser zuzugeben. Wir wuschen dann die Petrolätherlösungen mit Wasser seifenfrei, filtrierten zur Entfernung von Wasserresten dreimal durch grosse Faltenfilter und dampften schliesslich im Stickstoffstrom (zuletzt im Vakuum) ein. Als Unverseifbares hinterblieb ein goldgelber, wachsartiger Rückstand, dessen Gewicht durchschnittlich 5,2 % des Öles oder 0,41 % der angewandten Lebern betrug. Das Unverseifbare wurde jedesmal sofort in der folgenden Weise weiterverarbeitet.

b) Ausfrieren der Sterine aus dem Unverseifbaren.

Um die Hauptmenge der Sterine abzutrennen, lösten wir das Unverseifbare in kochendem Methanol und saugten nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur ab. Dann liessen wir durch Abkühlen der Lösung auf –10° bis –16° weitere Mengen Sterine auskristallisieren und entfernten sie durch rasches Abnutschen. Alle Rückstände wurden jeweils nach dem Absaugen mit Methanol von entsprechender Temperatur gewaschen. Die klare, rote Lösung wurde nun in einer Mischung von festem Kohlendioxyd und Aceton auf –60° bis –70° gebracht und die ausgefrorenen Sterine in einer mit Methanol und festem Kohlendioxyd vorgekühlten Nutsche abgesogen. Das Filtrat engten wir im Vakuum (Stickstoff) auf etwas mehr als die Hälfte ein und froren nach Zusatz von 2–3 % Wasser erneut aus. Diesmal geschah das Absaugen in einer vorgekühlten Nutsche, deren Filter mit einer Schicht zerstoßenen festen Kohlendioxydschnees bedeckt gehalten wurde. Die so abgetrennten Sterine waren meist stark gelb gefärbt; diese Farbe konnte auch durch längeres

Waschen mit Methanol nicht entfernt werden. In den zuletzt ausgefrorenen Portionen fand sich fast immer etwas rote Schmiere, die bei Zimmertemperatur zum Teil in ein tiefrotes Öl übergang. Die Ausbeute an Sterinen betrug durchschnittlich 3 % des zur Verseifung gelangten Tranes. Auf 100 g Sterine kamen im Durchschnitt 12,9 g ausgefrorenes Konzentrat.

Die Hauptmenge der Sterine konnte als Cholesterin durch Schmelzpunkt, Misch-Schmelzpunkt, optische Drehung, Schmelzpunkt und optische Drehung des Dibromids und des Acetats charakterisiert werden.

Die ausgefrorene Methanollösung versetzten wir mit Petroläther und etwas Wasser und trennten die Schichten. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit etwas Petroläther ausgeschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser trockneten wir die vereinigten Benzinauszüge durch Filtrieren und dampften sie im Vakuum (Stickstoff) ein. Der Rückstand war ein viskoses rotes Öl, das wir im Hochvakuum bei 60° trockneten und in hochevakuierte Ampullen einschmolzen. Die Ausbeute an diesem Produkt (im folgenden Konzentrat genannt) belief sich im Durchschnitt auf 7,7 %, bezogen auf das Unverseifbare, oder 0,39 % bezogen auf den Tran, oder 0,031 % bezogen auf die Lebern. Aus den uns zur Verfügung stehenden 8,5 kg Leberölen gewannen wir insgesamt 33,3 g solcher Konzentrate, die wir in Portionen von 4—12 g weiterer Anreicherung unterwarfen.

Die Konzentrate hatten die folgenden Extinktionskoeffizienten (beste und schlechteste Präparate):

Ultravioletspektrum:	E_{\max} :	220—455
<i>Carr-Price</i> -Reaktionsspektrum:	$E_{693}^{1\%}$:	370—1200
	$E_{620}^{1\%}$:	220—600 ²⁾
	$Q = E_{693}/E_{620}$:	0,8—2,0 ²⁾

Die höchsten Q -Werte zeigten die Konzentrate aus Ölen, die während der Monate August bis April (1941/42 und 1942/43) gesammelt worden waren (Winteröle), während die Sommeröle (Mai bis Juli) die Konzentrate mit den kleinen Q -Werten lieferten. Visuell waren im Spektroskop bei den *Carr-Price*-Reaktionen der Konzentrate aus Sommerölen zwei Banden bei 690 und 620 $m\mu$, bei jenen aus Winterölen nur eine bei 690 $m\mu$ zu erkennen.

c) Anreicherung durch Chromatographie.

An einer 56 cm langen und 3 cm dicken Säule von Calciumhydroxyd adsorbierten wir unter Stickstoff 6,6 g eines Konzentrates

¹⁾ Der Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für die Wellenlänge λ $m\mu$ wird in dieser Arbeit abgekürzt als E_{λ} bezeichnet, also z. B. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für 345 $m\mu$ als E_{345} oder $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für 693 $m\mu$ als E_{693} .

²⁾ Bei den besten Konzentraten aus Hechtlebern ist im Spektrum der *Carr-Price*-Reaktion nur noch ein Maximum bei 693 $m\mu$ zu beobachten. Die Absorptionskurven weisen im Gebiete zwischen 600 und 640 $m\mu$ lediglich eine Ausbuchtung auf.

aus Hechtlebern ($E_{690} = \text{ca. } 500$), das wir in 50 cm^3 Petroläther gelöst hatten. Die Säule war vorgewaschen mit 200 cm^3 des Lösungsmittels. Mit 220 cm^3 Petroläther wurde die Adsorptionszone in $3\frac{1}{2}$ Stunden auf eine Länge von 46 cm auseinandergezogen. Im oberen, grösseren Teil dieser Zone zeigte sich ein kontinuierlicher Übergang von farblosem über beige gefärbtes bis zu gelb und dunkelgelb gefärbtem Adsorbens, während zu unterst schmale Ringe von orange, hellgelber und gelber Farbe scharf gegeneinander abgegrenzt waren. Wir trennten die Säule in vier Teile und eluierten mit Petroläther und 10% Methanol und erhielten folgende Fraktionen:

- (oberste) Schicht 1, 17 cm lang: $0,6 \text{ g}$ orangefarbenes Öl, durchsetzt mit festen Anteilen (Sterinen);
 Schicht 2, 15 cm lang: $0,4 \text{ g}$ orangefarbenes Öl,
 $E_{693} = 1320$
 $E_{620} = 420^1$) $Q = 3,1$;
 Schicht 3, 12 cm lang: $0,4 \text{ g}$ gelbrotes Öl,
 $E_{693} = 1460$
 $E_{620} = 560^1$) $Q = 2,6$;
 Schicht 4, 2 cm lang: $2,0 \text{ g}$ rotes, dünnflüssiges Öl,
 $E_{693} = 140$
 $E_{620} = 65^2$) $Q = 2,2$.

Durch Nacheluation der Schichten 1—4 mit Chloroform erhielten wir vier weitere Fraktionen:

- $0,1 \text{ g}$ orangefarbenes Öl;
 $0,1 \text{ g}$ rotoranges Öl;
 $0,2 \text{ g}$ rotoranges Öl;
 $0,05 \text{ g}$ rotes Öl.

Im Calciumhydroxyd sammeln sich also im obersten Teil der Säule sterinartige Stoffe, während dünne, rote Öle durchgewaschen werden. Vitamin A_2 wird stärker adsorbiert als Vitamin A, was der grössere Wert von Q der Fraktion aus Schicht 2 gegenüber jener aus Schicht 3 zeigt.

Nach der geschilderten 1. Adsorption an Calciumhydroxyd lösten wir die Nacheluate aus den Schichten 2 und 3 ($0,3 \text{ g}$) in wenig Methanol, kühlten die Lösung auf -20° ab, 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 $0,1 \text{ g}$ Substanz mit $E_{693} = 1250$ (Fraktion P). Durch Verdampfen der Methanol-Mutterlauge wurden weitere $0,07 \text{ g}$ mit $E_{693} = 750$ gewonnen (Fraktion M). Hierauf wurden auch die Oele aus den Schichten 2 und 3 vereinigt ($2,6 \text{ g}$), in wenig Methanol aufgelöst und die Lösung auf -20° abgekühlt. Dabei schied sich ein Niederschlag aus, der hauptsächlich Verunreinigungen enthielt. Die Methanollösung hinterliess nach dem Verdampfen $2,1 \text{ g}$ orangegelbes Öl (Fraktion N).

¹) Kein Maximum in der Absorptionskurve; der Wert (z. B. 420) entspricht der Ordinate des Kurvenpunktes bei $620 \text{ m}\mu$. ²) Vgl. Note 2, Seite 1765.

2. Chromatogramm: Wir lösten nun die Fraktionen N, P und M, zusammen 2,27 g, in 30 cm³ Petroläther und chromatographierten in Stickstoffatmosphäre an einer Calciumhydroxydsäule von 32 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser, die mit 100 cm³ des Lösungsmittels vorgewaschen war:

- (oberste) Schicht 1, 3 cm lang: 0,1 g rotoranges Öl,
 $E_{693} = 750$;
 Schicht 2, 24 cm lang: 0,6 g rotoranges Öl,
 $E_{693} = 2000$
 $E_{620} = 1000^1$) $Q = 2,0$
 $E_{344} = 1450$;
 Schicht 3, 5 cm lang: 0,7 g rotoranges Öl,
 $E_{693} = 1200$
 $E_{620} = 650^1$) $Q = 1,8$;
 Schicht 4, Durchlauf: 0,5 g rotoranges Öl,
 $E_{693} = \text{ca. } 400$.

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

d) Reinigung durch Molekulardestillation.

Zur Destillation unserer Präparate verwendeten wir eine Apparatur für Molekulardestillation, wobei wir ein spezielles Destillationsgefäß für kleine Substanzmengen an das Vakuumsystem anschlossen (Fig. 3). Die zu destillierenden Präparate wurden mit wenig Petroläther auf den Boden des Destillationsgefäßes gespült, der Petroläther im Vakuum verdampft, und das Öl im Hochvakuum getrocknet.

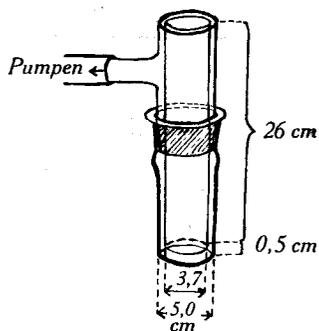


Fig. 3.

Sodann wurde das Destillationsgefäß bei einem Druck von 10^{-5} mm Hg mit seinem untern Teil in ein durchsichtiges Ölbad (Paraffinöl in Glasgefäß) gebracht und langsam angeheizt. Zum Abtrennen einer Fraktion haben wir das Ölbad entfernt, in der erkalteten Apparatur Atmosphärendruck hergestellt und den Kühlzapfen aus dem Destillationsgefäß entfernt. Nach kurzer Zeit erweichte das glasig gefrorene Destillat — die Kühlung des Zapfens erfolgte während der Destillation mit Kohlendioxyd-Aceton-Gemisch — und liess sich

mit Petroläther in ein Filter spülen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft, das zurückbleibende Öl im Hochvakuum getrocknet und eingeschmolzen. Unterdessen setzten wir das Destillationsgefäß wieder zusammen und setzten die Destillation fort. Nach dem Abtrennen der letzten Fraktion wurde der Destillationsrückstand ebenfalls mit Petroläther von der Heizfläche abgespült und weiter wie die Destillate behandelt.

¹⁾ Kein Maximum in der Absorptionskurve bei 620 m μ .

Beispiel: Ein durch Adsorption an Calciumhydroxyd gereinigtes Präparat (2,54 g) mit einem maximalen Extinktionskoeffizienten im U.V. von 1000 und sehr geringem Vitamin A-Gehalt wurde destilliert. Über den Gang der beiden Destillationen orientiert folgendes Schema:

1. Destillation (in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt).

Präparat: 2,54 g, $E_{345} = 1000$.

	Zeit	Badtemperatur und Fraktionen
Beginn	0820	75° C
	0830	88
	0840	92
Unterbruch	0845	100
Wiederbeginn	1020	75
	1030	90
	1045	120
Unterbruch	1115	135
Wiederbeginn	1420	95
	1440	145
	1515	163
	1535	165
Ende		Rückstand: 0,4 g viskoses, rotes Öl, löslich in Petroläther. 0,14 g harzige, braune Schmiere, unlöslich in Petroläther.

2. Destillation:

Fraktion 2 der 1. Destillation, 1,3 g.

	Zeit	Badtemperatur und Fraktionen
Beginn	0825	75° C
	0830	85
	0850	110
Unterbruch	0910	125
Wiederbeginn	1035	75
	1040	100
	1100	130
Ende	1145	145

Eine dritte Destillation ergab keine weitere Vergrößerung der Extinktionskoeffizienten.

Ergebnis der beiden Destillationen: Ein Vitamin A₂-Präparat mit einem E₃₄₅-Wert von 1000 und sehr geringem Vitamin A-Gehalt konnte auf einen E₃₄₅-Wert von 1450 gebracht werden.

C ₂₀ H ₃₀ O	Ber. C 83,85	H 10,56%
	Gef. „ 83,33	„ 10,64%

2. Die spektrographische Bestimmung.

a) Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum.

Die Spektren wurden nach dem Messprinzip der Vergleichsspektren in der Anordnung von *H. v. Halban* und Mitarbeitern¹⁾ mit einem *Hilger*-Quarz-Spektrographen aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Wasserstofflampe. An photographischem Material verwendeten wir Agfa-Isochrom- und Perutz-Persenso-Platten. Ihre Empfindlichkeit gestattet, die Belichtungszeit auf 30–35 Sek. zu halten. Die Präparate wurden zur Aufnahme in reinem 96-proz. Alkohol gelöst.

Vitamin A-Präparate, die frei sind von Vitamin A₂, weisen Absorptionskurven mit einem Maximum bei 328 m μ auf; E_{1^{cm}}^{1%} des reinen Vitamins liegt bei 1700²⁾.

Unsere Präparate aus Hechtlebern zeigten in ihren Kurven ein Maximum zwischen 327 und 345 m μ , sowie ein untergeordnetes Maximum bei 288 m μ . Das Absorptionsmaximum der reinsten Präparate lag stets bei 345 m μ . Eine langwelligere Lage konnten wir nie beobachten. Der Extinktionskoeffizient E₃₄₅ unserer besten Präparate betrug 1450.

b) Das Spektrum der *Carr-Price*'schen Reaktion (Blau-spektrum).

Auch die Spektren der Reaktionsgemische von Vitamin A- und Vitamin A₂-Präparaten mit Antimontrichlorid in Chloroform nahmen wir spektrographisch nach der Methode der Vergleichsspektren auf. Es stand uns dazu ein Spektrograph von Halle mit einer Wolfram-Bandlampe als Lichtquelle zur Verfügung. Als Bezugsspektrum dienten die Emissionsspektren von Helium oder Quecksilber. Als Plattenmaterial erwiesen sich „Agfa Spektral total hart“-Platten besonders geeignet. Belichtungszeit: 45 Sekunden.

Da die Extinktion der genannten Reaktionsgemische sehr rasch abnimmt, musste die allgemeine Methode etwas modifiziert werden: Wir nahmen jeweils zuerst sämtliche Schwärzungsstreifen des Lösungsmittels (Antimontrichloridlösung zur Reaktion von *Carr* und *Price* oder Chloroform) auf. In visuellen Vorversuchen wurde sodann die Konzentration ermittelt, in welcher das zu bestimmende Präparat

¹⁾ *H. v. Halban, G. Kortüm, B. Szigetti, Z. El. Ch. 42, 628 (1936).*

²⁾ *P. Karrer, R. Morf, Helv. 16, 557, 675 (1933). — Baxter und Robeson, Science (New York) 92, 203 (1940).*

in Chloroform gelöst werden musste, damit 1 Teil der Lösung mit 11 Teilen *Carr-Price*-Reagens jene Intensität der Blaufärbung ergab, die für unsere Aufnahmen nötig war. Um die Fehler möglichst klein zu halten, die sich aus Abweichungen vom *Lambert-Beer*'schen Gesetz ergeben könnten, hielten wir bei unseren Versuchen die absoluten Extinktionen in relativ engen Grenzen und wandten immer dasselbe Schema an ($\log \varepsilon = 0,613 - 0,832$ und Schichtdicken $d = 0,8 - 2,5$ cm). Es folgte nun die Aufnahme der Schwärzungsstreifen der Farblösung. Um das Volumen der Messlösung möglichst klein halten zu können, wurden nicht nur die Schichtdicken, sondern auch die Vergleichsextinktionen (Sektoren) in den genannten Grenzen verändert. Für jeden Streifen wurde eine frische Farblösung in folgender Weise hergestellt: Aus einer Bürette wurden 11 Teile *Carr-Price*-Reagens (Herstellung¹⁾) in ein *Baly*-Rohr einlaufen gelassen und nach Zugabe von drei Tropfen Essigsäure-anhydrid 1 Teil der Lösung des Präparates aus einer Mikrobürette zugegeben. Mit dem Stempel des *Baly*-Rohres vermischten wir rasch, setzten das Rohr in den Strahlengang der Apparatur und belichteten 10 Sekunden nach Beginn des Vermischens. (Für die Aufnahmen sind zwei Personen nötig). Nach erfolgter Belichtung wurde das Rohr entleert, sofort mit Chloroform ausgespült und die nächste Füllung vorgenommen.

Die geschilderte Methode ist relativ umständlich und zeitraubend; auch wird dafür viel Antimontrichloridlösung benötigt. Doch gestattet sie, die ganze Absorptionskurve aufzunehmen, nicht nur die Extinktionskoeffizienten bei den Wellenlängen $620 \text{ m}\mu$ und $693 \text{ m}\mu$.

Um die Brauchbarkeit unserer Methode zu prüfen, haben wir folgende Versuche ausgeführt:

1. Reproduzierbarkeit bei Gleichhaltung aller Bedingungen: Eine erste Aufnahme eines Präparates ergab einen E_{693} -Wert von 1530. Mit einer neuen Einwage wurde die Aufnahme nach dem gleichen Aufnahmeschema (gleiche Konzentration, Schichtdicken und Sektorenextinktionen) wiederholt. Es resultierte ein E_{693} -Wert von 1510. Differenz: 1,3 %.

2. Verwendung von Chloroform an Stelle von *Carr-Price*-Reagens als Lösungsmittel im Vergleichsrohr: Bei zwei Aufnahmen wurde das Vergleichs-*Baly*-Rohr das erste Mal mit Chloroform, das zweite Mal mit gesättigter Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform gefüllt. Die E_{693} -Werte betragen 480 bzw. 470. Differenz: 2,1 %.

3. Einfluss der Antimontrichlorid-Konzentration im Reaktionsgemisch: Mit derselben Lösung eines Präparates ($c = 4,66 \times 10^{-3}$) wurden zwei Aufnahmen gemacht. Für die erste Aufnahme wurde zur Herstellung der Farblösung 1 cm^3 dieser Lösung mit 11 cm^3

¹⁾ *Merck's* Jahresberichte XLIX, 1935.

Carr-Price-Reagens vermischt, so dass sich eine Konzentration von $0,388 \times 10^{-3}$ ergab. Bei der zweiten Aufnahme mischten wir 2 cm^3 der Lösung mit 10 cm^3 Reagens, so dass einerseits die Konzentration verdoppelt war; andererseits verwendeten wir gegenüber der ersten Aufnahme die halben Schichtdicken. Erhaltene Werte für E_{693} : 1530 bzw. 1380. Ergebnis: die Konzentration des Antimontrichlorids muss bei allen Aufnahmen gleichgehalten werden (bei uns: auf 1 cm^3 Vitaminlösung 11 cm^3 gesättigte Antimontrichloridlösung).

4. Gültigkeit des *Lambert-Beer*'schen Gesetzes: Bei zwei Aufnahmen des gleichen Präparates betrug die Konzentration des Vitamins im Reaktionsgemisch das erste Mal $1,53 \times 10^{-3}$, das zweite Mal $0,8 \times 10^{-3}$. Beide Aufnahmen ergaben ein E_{693} von 1200.

Das *Carr-Price*-Reaktionsspektrum von Vitamin A weist ein Maximum bei $620 \text{ m}\mu$ auf. Nach *Morton*¹⁾ beträgt $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für diese Wellenlänge 5000.

Die Blauspektren unserer Präparate lassen sich in zwei Reihen einteilen:

1. Spektren mit zwei Maxima um $627 \text{ m}\mu$ und $690 \text{ m}\mu$.
2. Spektren mit nur einem Maximum um $693 \text{ m}\mu$ und einer grösseren oder kleineren Ausbuchtung der Absorptionskurve im Gebiete zwischen $610 \text{ m}\mu$ und $640 \text{ m}\mu$.

Die Spektren der ersten Gruppe gehören zu Ölen, die im wesentlichen im Laufe der Sommermonate gewonnen worden sind, jene der zweiten Gruppe zu Winterölen. Die besten Präparate zeigten nur ein Maximum bei $693 \text{ m}\mu$ und eine ganz geringe Ausbuchtung der Absorptionskurve zwischen $610 \text{ m}\mu$ und $630 \text{ m}\mu$. Der Extinktionskoeffizient E_{693} betrug 2300.

c) Die Bewertung von Vitamin A_2 -Präparaten unter gleichzeitiger Verwendung des U.V.- und des Blauspektrums.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen machten wir die Beobachtung, dass sich die beiden Gruppen von Präparaten, die wir bezüglich des Blauspektrums (zwei oder nur eine Bande) unterscheiden konnten, auch durch gewisse Eigenheiten des U.V.-Spektrums auseinanderhalten lassen.

Bei Präparaten aus Winterölen, die im Blauspektrum nur eine Bande bei $693 \text{ m}\mu$ zeigten, lag das Hauptmaximum der U.V.-Absorption stets bei $345 \text{ m}\mu$. Diese Lage änderte sich auch im Laufe der Anreicherung nie; auch der Quotient Q der Extinktionskoeffizienten des Blauspektrums solcher Anreicherungsreihen blieb nahezu gleich. Sommeröl-Präparate mit zwei erkennbaren Absorptions-

¹⁾ *R. A. Morton*, Nature (London) **137**, 148 (1936); *R. A. Morton*: The Application of Absorption Spectra to the Study of Vitamines and Hormones. London (*Adam Hilger Ltd.*), S. 22.

maxima des *Carr-Price*-Reaktionsgemisches, bei 620 m μ und 693 m μ , besaßen durchwegs Hauptmaxima der U.V.-Absorptionskurven zwischen 328 und 345 m μ , nie aber in der Grenzlage 345 m μ . Mit zunehmender Anreicherung des Vitamins A₂ in solchen Präparaten verschob sich dieses Maximum mehr und mehr gegen 345 m μ , ohne diese Lage aber je zu erreichen, während der Q-Wert der Blauspektren sich vergrößerte.

Beispiele:

	E _{1cm} ^{1%} d. U.V.-Sp.		E _{1cm} ^{1%}	E _{1cm} ^{1%}	Q
	Lage	Wert	693	620	
1. Präp. aus Winterölen:					
Konzentrat	345	195	370	190 ¹⁾	1,9
2mal adsorbiert	345	560	1320	650 ¹⁾	2,0
2mal adsorbiert u. 2mal dest. .	345	1350	2200	1150 ¹⁾	1,9
2. Präp. aus Sommerölen:					
2mal adsorbiert	330	695	1120	760	1,5
3mal adsorbiert	334	740	1490	1110	1,3
3mal adsorbiert u. einmal dest. .	337	845	2100	1000	2,1

Dass bei dieser Parallelität der Q-Wert des Blauspektrums allein nicht entscheidend ist, sondern dass auch die Form der Absorptionskurve des *Carr-Price*-Reaktionsgemisches (ein oder zwei Max.) wesentlich ist, zeigt der Vergleich der folgenden zwei Präparate:

	E _{1cm} ^{1%} d. U.V.-Sp.		E _{1cm} ^{1%}	E _{1cm} ^{1%}	Q
	Lage	Wert	693	620	
1. Präp. aus Winterölen	345	1370	2200	1200 ¹⁾	1,8
2. Präp. aus Sommerölen	334	425	1320	750	1,8

Für die Beurteilung der Präparate aus Winterölen ergibt sich somit folgendes. Die Absorptionskurven im U.V. und die Blauspektren von Ausgangsmaterial und gereinigtem Produkt unterscheiden sich wohl in der Höhe der Extinktion der Maxima, nicht aber in der Form. Das bedeutet nichts anderes, als dass sich das Mengenverhältnis der absorbierenden Stoffe (Vitamin A und Vitamin A₂), falls überhaupt deren mehrere vorhanden sind, nicht merklich verändert hat. Da sich dieses Verhältnis bei der Anreicherung von Vitamin A₂ aus Sommerölen aber zugunsten von Vitamin A₂

¹⁾ Kein Maximum in der Absorptionskurve; der Wert (z. B. 190) entspricht der Ordinate des Kurvenpunktes bei 620 m μ .

verschiebt (Vergrößerung von Q und Verschiebung des Maximums der U.V.-Absorption gegen $345\text{ m}\mu$), folgt daraus, dass der Vitamin A-Gehalt der Winteröle und der daraus gewonnenen Präparate äusserst gering ist.

Diese Erklärung für das spektrale Verhalten unserer Präparate konnte gestützt werden durch die Aufnahme künstlich hergestellter Gemische von Vitamin A_2 -Präparaten, die wenig A-Faktor enthielten, mit A_2 -freien Präparaten von Axerophytol.

Zum Beispiel:

Vitamin A_2 -Präparat aus Winterölen:

$$\begin{array}{ll} E_{343} = 455 & E_{288} = 255 \\ E_{693} = 1200 & Q = 2,0 \end{array}$$

Vitamin A-Präparat:

$$\begin{array}{ll} E_{324} = 520 & \\ E_{618} = 1330 & \text{(Präparate vergleichbarer} \\ & \text{spektraler Stärke)} \end{array}$$

1. U.V.-Spektrum eines Gemisches 1:1 von beiden Präparaten: Von diesen Präparaten wurde je eine alkoholische Lösung von der Konzentration $0,848 \times 10^{-3}$ hergestellt. Von einem Gemisch aus gleichen Teilen beider Lösungen wurde das U.V.-Spektrum aufgenommen. Absorptionskurve mit zwei Maxima (wie bei Präparaten aus Sommerölen): $E_{332} = 450$, $E_{288} = 272$.

Für das Hauptmaximum ergibt sich theoretisch (graphische Ermittlung): $E_{333} = 450$.

2. Blauspektrum eines Gemisches 1:1 aus beiden Präparaten:

Zur Aufnahme des Blauspektrums wurde eine Lösung hergestellt, die je $3,95\text{ mg}$ der Präparate in 100 cm^3 Chloroform enthielt. Die Aufnahme geschah unter Einhaltung der bei der allgemeinen Beschreibung unserer Methode erwähnten Bedingungen. Absorptionskurve mit zwei Maxima (wie bei Präparaten aus Sommerölen):

$$E_{683} = 760, E_{622} = 1300, Q = 0,58$$

Wenn die beiden Maxima, die den Faktoren A und A_2 zuzuschreiben sind, unbeeinflusst durch die Überlagerung der beiden Absorptionskurven im Spektrum des Gemisches erscheinen würden, wären die entsprechenden Extinktionskoeffizienten (siehe oben):

$$E_{693} = 1200, E_{618} = 1330, Q = 0,9$$

3. Der Abbau mit Ozon.

Nachweis und Bestimmung von Aceton und Geronsäure. Versuch zum Nachweis von as.-Dimethylbernsteinsäure.

(Beispiel eines Abbaues mit Blindversuchen.)

a) Blindwert der jodometrischen Titration (für sämtliche Versuche dieser Reihe wurden dieselben Reagenzien und das gleiche, speziell destillierte Wasser verwendet): 9 cm^3 Eisessig und

12,5 cm³ Wasser wurden während 50 Minuten am Rückfluss gekocht. Nach dem Abdestillieren von 20 cm³ wurde im Destillat mit 8 cm³ 2-n. Kalilauge die Essigsäure abgestumpft und die Lösung mit 5 cm³ n. Kaliumpermanganat-Lösung während 10 Minuten am Rückfluss gekocht. Nun wurde wiederum destilliert und das Destillat von 20 cm³ auf 25 cm³ aufgefüllt. Von dieser Lösung titrierten wir 10 cm³ auf Aceton:

1. Zusatz von 5 cm³ 2-n. Kalilauge,
2. Zusatz von 10 cm³ 0,1-n. Jodlösung,
3. 15 Minuten Stehen unter gelegentlichem Schütteln,
4. Zusatz von 10 cm³ 2-n. Schwefelsäure,
5. Rücktitration mit 0,1-n. Thiosulfatlösung.

Jodverbrauch: 0,05 cm³ 0,1-n. Lösung.

Blindwert: 0,05 cm³ für 10 cm³ Destillat.

b) Blindprobe mit 5,0 mg Aceton: Der unter a) beschriebene Versuch wurde wiederholt mit einer Lösung von 5,0 mg Aceton in 5 cm³ Eisessig und 6 cm³ Wasser.

Jodverbrauch:	1,92 cm ³ 0,1-n. Lösung	durch 10 cm ³ Destillat,
	entspr. 1,86 mg Aceton	in 10 cm ³ Destillat,
	entspr. 4,65 mg Aceton	im Gesamtdestillat

Verlust: 0,35 mg = 7% Aceton.

c) Abbau eines Vitamin A-Präparates (Axerophthol), Bestimmung von Aceton und Geronsäure: 0,23 g eines Vitamin A-Präparates aus Heilbutt wurden in 5 cm³ Eisessig gelöst und nach dem Zusatz von 0,5 cm³ Wasser während 5½ Stunden der Einwirkung eines ozonhaltigen Sauerstoffstromes unterworfen (3—4-facher Überschuss an Ozon). Nach dem Verkochen der Ozonide (50 Minuten) wurden 20 cm³ in ein gekühltes Schliffkölbehen abdestilliert.

Acetonbestimmung: Im Destillat wurde auf die unter a) beschriebene Weise der Acetongehalt bestimmt.

Jodverbrauch:	0,23 cm ³ 0,1-n. Lösung	durch 10 cm ³ Destillat,
	entspr. 0,22 mg Aceton	in 10 cm ³ Destillat,
	entspr. 0,55 mg Aceton	im Gesamtdestillat.

Geronsäurebestimmung: Der Destillationsrückstand der verkochten Ozonide wurde auf Geronsäure-semicarbazon aufgearbeitet. Aus der wässerigen Lösung der Säuren liessen sich 100 mg rohes Geronsäure-semicarbazon gewinnen.

Umkrystallisiert aus Alkohol: 24 mg (Smp. 153°), d. h. 7,2% der Theorie. Nochmals umkrystallisiert aus Essigester: 18,3 mg (Smp. 159°).

Um einen Anhaltspunkt für die Empfindlichkeit des Nachweises von Geronsäure zu erhalten, wurde ein zweiter Abbau mit 0,077 g desselben Vitamin A-Präparates durchgeführt:

Rohprodukt: 42 mg Geronsäure-semicarbazon.

Umkrystallisiert aus Essigester: 16 mg (Smp. 154°), d. h. 10% der Theorie.

Nochmals umkrystallisiert aus Alkohol: 5 mg (Smp. 158°).

d) Abbau eines Vitamin A₂-Präparates. 0,70 g eines Vitamin A₂-Präparates (E₆₉₃ = 2200, E₃₄₅ = 1360) wurden in 9 cm³ Eisessig gelöst und nach der Zugabe von 1,5 cm³ Wasser während 6 Stunden ozonisiert. Unter Einhaltung der gleichen Bedingungen wie bei den Blindversuchen wurden dann im Abbaugemisch Aceton und Geronsäure bestimmt.

Acetonnachweis- und Bestimmung:

Jodverbrauch: 4,39 cm³ 0,1-n. Lösung durch 10 cm³ Destillat,
entspr. 10,98 cm³ 0,1-n. Lösung durch das Gesamtdestillat,
entspr. 10,6 mg Aceton

Ausbeute: 8,3% der Theorie (für 95-proz. A₂-Präparat).

Der Rest (15 cm³) des acetonhaltigen Destillates wurde mit 4 cm³ einer 20-proz. Lösung von p-Nitrophenylhydrazin-hydrochlorid und wenig 0,02-n. Salzsäure versetzt. Die Lösung zeigte sofort eine gelbe Trübung und nach einer Stunde hatten sich schöne gelbe Nadeln gebildet. Nach 24-stündigem Stehen bei 0° wurde abgenutscht und der Rückstand in 2 cm³ Alkohol gelöst. Die warme alkoholische Lösung wurde sodann in 5 cm³ warmes Wasser gegossen und über Nacht bei 0° stehen gelassen. Das so umkrystallisierte Aceton-p-nitrophenylhydrazon wurde abgenutscht, gewaschen und getrocknet. Smp. 147°, Misch-Smp. 148°.

Geronsäurebestimmung:

2,1 mg rohes Geronsäure-semicarbazon, Smp. 153°,
aus Essigester umkrystallisiert: Smp. 156°;
Misch-Smp. mit dem Prod. aus Vit. A: 156°.

Wenn man auch hier eine 7–10-proz. Ausbeute an Semicarbazon (bezogen auf das Vitamin A) annimmt, entspricht dieses Resultat einem Vitamin A-Gehalt von 14 bzw. 10 mg in 700 mg des abgebauten Präparates oder 1,4–2,0%.

Versuch des Nachweises von as.-Dimethylbernsteinsäure:

Die Mutterlauge des Geronsäure-semicarbazons wurde mit Salzsäure kongosauer gemacht und im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit im ganzen 500 cm³ Äther extrahiert und aus der getrockneten Lösung der Äther verjagt. Das zurückgebliebene Öl wurde dann mit wenig heissem Benzol ausgezogen, der Extrakt filtriert, eingengt und in der Kälte stehen gelassen. Es schied sich auch nach langem Stehen und Impfen keine Krystalle aus.

Nachweis und Bestimmung von Formaldehyd:

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Formaldehyd im Abbaugemisch von ozonisierten Vitamin A₂-Präparaten diente die Farb-reaktion mit Phenylhydrazin und Eisen(III)-chlorid nach *Arnold und Mentzel*¹⁾.

¹⁾ *Arnold, C. Mentzel, Z. Nahr. Genussm. 5, 353 (1902) — F. Schaffer, Z. Nahr. Genussm. 16, 674 (1908).*

Methoden.

Für die Anwendung dieser Reaktion hat sich folgende Vorschrift bewährt: 5 cm³ der wässrigen Formaldehydlösung werden in nachstehender Reihenfolge versetzt mit:

- 1) 0,2 cm³ 6-proz. Phenylhydrazin-hydrochloridlösung,
- 2) 1,5 cm³ Alkohol,
- 3) 0,1 cm³ konz. Eisen(III)-chloridlösung,
- 4) 0,15 cm³ konz. Schwefelsäure.

Es entsteht eine charakteristische rote Färbung, die sich in einem begrenzten Konzentrationsbereich von Formaldehyd auch für dessen kolorimetrische Bestimmung eignet. Als brauchbare Konzentrationen erwiesen sich jene, die zwischen 10⁻⁴ und 10⁻³ liegen. Die Intensität der Färbung nimmt nach dem Vermischen ständig zu, erreicht aber nach etwa 10 Minuten das Maximum, um sich dann während einigen Stunden nicht mehr zu ändern. Mess- und Standardlösungen werden am besten gleichzeitig hergestellt und nach 15 oder 30 Minuten verglichen. Die einzelnen Reagenzien werden aus Mikrobüretten zugegeben. Der Formaldehyd der Vergleichslösungen wird jodometrisch bestimmt.

Blindversuche.

1. Einfluss von Acetaldehyd, Aceton und Eisessig:

Aus entsprechenden Blindversuchen ging hervor, dass weder die Anwesenheit von Acetaldehyd, noch die von Aceton oder Eisessig die kolorimetrische Bestimmung des Formaldehyds nach dieser Methode beeinflussen.

2. Ausbeute der Bestimmungsmethode:

Durch eine Lösung von 5 cm³ Eisessig und 0,5 cm³ Wasser wurde unter Eiskühlung während 2 Stunden Ozon geleitet. Nach dem Hinzufügen von 3 cm³ Formaldehydlösung ($c = 1,17 \times 10^{-1}$, entsprechend 3,51 mg Formaldehyd, jodometrisch bestimmt) und 20 cm³ Acetaldehydlösung ($c = \text{ca. } 3 \times 10^{-2}$, entsprechend ca. 3 mg Acetaldehyd) wurde eine Stunde lang am Rückfluss gekocht (Spezialkühler für Acetonbestimmung nach *Kuhn* und *Roth*, Vorstoss des Kühlers in Vorlage mit wenig eisgekühltem Wasser tauchend). In abwärts gedrehter Stellung des Kühlers wurden hierauf ca. 40 cm³ abdestilliert und das Destillat auf 50 cm³ aufgefüllt.

Von diesem Destillat wurde ein Teil 10mal verdünnt und in der so erhaltenen Messlösung der Formaldehyd kolorimetrisch bestimmt (Leifo-Photometer).

Gefunden: 2,28 mg Formaldehyd im Gesamtdestillat,
Einwage: 3,51 mg Formaldehyd,

Ausbeute: 65 %.

Abbau eines Vitamin A₂-Präparates.

0,108 g eines ca. 70-proz. Vitamin A₂-Präparates (d. h. 75,6 mg) mit minimalem Axerophtholgehalt wurden in 6 cm³ Eisessig gelöst und nach Zufügen von 0,6 cm³ Wasser während 4 Stunden ozonisiert. Die Ozonide wurden hierauf mit dem Nachschaltwasser während einer Stunde am Rückfluss gekocht (Spezialkühler) und anschliessend ca. 20 cm³ des Gemisches abdestilliert. Das auf 25 cm³ aufgefüllte Destillat (Gesamtdestillat) wurde zur Bestimmung des Formaldehyds verwendet.

Kolorimetrie:

Vergleichslösung: Formaldehyd $c = 1,31 \times 10^{-3}$,
 Acetaldehyd $c = \text{ca. } 5 \times 10^{-3}$,
 Essigsäure ca. 50%.

Messlösung: 5 cm³ des Gesamtdestillates auf 50 cm³ verdünnt; je 5 cm³ dieser Lösung für die Herstellung der Farblösung verwendet.

Ablesungen: 30 Minuten nach der Herstellung der Farblösungen (Vergleichs- und Messlösung gleichzeitig). Leifo-Photometer.

Ergebnis: Formaldehydgehalt der Messlösung: $c = 1,2 \times 10^{-3}$,
 Gesamtdestillat: $c = 1,2 \times 10^{-2}$, d. h. 3,0 mg Formaldehyd.

Ergebnis einer zweiten Bestimmung mit einer andern Vergleichslösung (Formaldehyd $c = 7,3 \times 10^{-4}$):

2,85 mg Formaldehyd.

Berechnet: 7,9 mg Formaldehyd aus 75,6 mg Vitamin A₂ C₂₀H₃₀O.

Ausbeute: 36–38%.

Korrigierte Ausbeute: 55–60% (auf Grund des Blindversuches 2 über die Ausbeute der Methode).

Nach dem Abbau eines Vitamin A-Präparates (Axerophthol) konnten bei gleicher Arbeitsweise etwa 13% Formaldehyd (berechnet für 1 Mol CH₂O pro Mol Vitamin) nachgewiesen werden.

4. Die katalytische Hydrierung.

a) Mikrohydrierung.

3,23 mg eines höchstgereinigten Vitamin A₂-Präparates wurden in 5 cm³ Eisessig mit 20 mg Platinkatalysator in einer Mikrohydrierungs-Apparatur hydriert. Aufnahme 1,60 cm³ Wasserstoff (725 mm, 16^o C).

Bei einem zweiten Versuch nahmen 4,71 mg des Vitamin A₂-Präparates 2,36 cm³ Wasserstoff auf (728 mm, 17^o C).

C₂₀H₃₀O Ber. 6 Mol Gef. 5,7 Mol; 5,8 Mol.

b) Präparative Hydrierung. Allophanat des Perhydrovitamins A₂.

Nach der Hydrierung des Vitamin A₂-Präparates mit Platin in alkoholischer Lösung wurde das Hydrierungsprodukt in Benzollösung mit Cyansäure behandelt. Das ölige Reaktionsprodukt nahm man

in wenig Alkohol auf. Nach längerem Stehen im Eisschrank hatte sich das Allophanat ausgeschieden. Es wurde aus wenig Alkohol umkristallisiert, wobei eine sehr geringe Menge eines schwerlöslichen Nebenproduktes zur Abtrennung gelangte.

Das so gewonnene Allophanat schmolz nach vorgängigem Sintern bei 73° und zeigte mit dem Allophanat des Dihydro-phytols (Smp. 73°, Gef. C = 68,76, H = 11,83 %) keine Schmelzpunktserniedrigung.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

161. Über die Photosynthese eines fluoreszierenden Stoffes der Thiazolreihe (Vitachrom)

von P. Karrer und M. C. Sanz¹⁾.

(23. VII. 43.)

Bei Bestrahlungsversuchen der Thiazolkomponente des Aneurins (4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol²⁾) auf der photochemischen Wirkplatte wurde von R. Stämpfli³⁾ das Auftreten einer starken Fluoreszenz im Gebiete zwischen 210 und 400 m μ beobachtet. Dieselbe starke Fluoreszenz tritt auf bei der Bestrahlung einer wässrigen Lösung desselben Präparates mit einer Quecksilberdampf Lampe: schon nach einer Minute Bestrahlungsdauer erscheint die Lösung hellblau fluoreszierend im Wood'schen Licht. Die Fluoreszenz nimmt während einer langen Bestrahlungsdauer (bis zu 40 Stunden) sehr stark zu. Sie ist sehr ähnlich derjenigen von Thiochrom, besitzt aber eine viel grössere p_H-Beständigkeit als letztere. Die Fluoreszenz ist am stärksten im sauren Gebiet (sehr kräftig sogar in konz. Schwefelsäure) und nimmt in alkalischem Milieu ab, ist aber bei p_H 13 noch deutlich sichtbar, während Thiochrom nur in alkalischem Gebiet fluoresziert. Mit Natriumdithionit entsteht eine nicht fluoreszierende Leukoverbindung, die an der Luft wieder in die fluoreszierende übergeführt wird.

W. H. Schopfer⁴⁾ hat in Fortsetzung seiner Arbeiten mit fluoreszierenden Vitalfarbstoffen wie Thiochrom, Lumiflavin und Lumichrom diesen neuen fluoreszierenden Stoff auf seine Verwendbarkeit in der Cytophysiologie untersucht. Er diffundiert ausserordentlich schnell in die Zellen ein und reichert sich in der Vakuole an, wird aber in sehr

¹⁾ Mit Unterstützung der „Roche“-Studienstiftung.

²⁾ Synthetisches Präparat der Fa. Hoffmann-La Roche & Co., Basel.

³⁾ R. Stämpfli, Med. Diss. 1942, Bern; R. Stämpfli, Verh. Schweiz. Physiol., Juni 1942, S. 9.

⁴⁾ W. H. Schopfer, Helv. physiol. Acta 1, 49—50 (1943).