

42. Sterine als ionoide Systeme I.

Über eine Vitamine D-Bestimmungsmethode auf Carbeniumsalzbasis

von **Herm. Schaltegger.**

(20. XII. 45.)

Bei der Nachprüfung der wenigen bekannten chemischen Vitamin D-Bestimmungsmethoden zeigte es sich, dass es nicht möglich war, mit der biologischen Methode übereinstimmende Resultate zu erhalten. Es schien daher in vieler Beziehung wünschenswert, zu untersuchen, ob eine Reaktion zu finden ist, welche der biologischen Methode gleichwertig ist. Bis zu welchem Grade dies gelungen ist, sollen die nachstehend beschriebenen Farbreaktionen zeigen (vgl. vorläuf. Mitt.¹⁾).

Von den früher beschriebenen Nachweis- und Bestimmungsmethoden der Sterine und Vitamine D²⁻⁷⁾ hat nur diejenige von *Brockmann* und *Chen*⁸⁾ als quantitative Vitamin D-Bestimmungsmethode Bedeutung erlangt. In der Folge ist diese Methode von verschiedenen Seiten⁹⁻¹²⁾ entsprechend den jeweiligen Verwendungszwecken modifiziert worden, doch blieb nach wie vor der Rattentest die verlässlichste Methode¹¹⁾).

Ausser den üblichen Bedingungen, wie Spezifität, Empfindlichkeit usw. müsste eine leistungsfähige Methode imstande sein, biologisch unwirksames, hauptsächlich durch Luftsauerstoff verändertes Vitamin D, von aktivem Vitamin D chemisch zu unterscheiden.

Ausgangspunkt für die vorliegende Vitamin D-Bestimmungsmethode waren die Arbeiten von *G. Woker* und *I. Antener*⁴⁾ und *I. Scherrer*⁵⁾, sowie von *L. Ekkert*¹³⁾. Diese Autoren fanden, dass

¹⁾ *H. Schaltegger*, Exper. **2**, 27 (1946).

²⁾ *G. E. Schwab*, Überblick über die Chemie der Sterine und ihrer Verbreitung in der Natur. Zürich 1941.

³⁾ *W. Halden* und *H. Tzoni*, Naturwiss. **24**, 296 (1936).

⁴⁾ *G. Woker* und *I. Antener*, Helv. **22**, 47, 511, 1309 (1939).

⁵⁾ *I. Scherrer*, Helv. **22**, 1329 (1939).

⁶⁾ *H. Kägi* und *K. Miescher*, Helv. **22**, 683 (1939).

⁷⁾ *H. Brückner*, Bioch. Z. **279**, 346 (1934).

⁸⁾ *H. Brockmann* und *Y. C. Chen*, Z. physiol. Ch. **241**, 129 (1936).

⁹⁾ *N. A. Milas* und *R. Heggie*, Ind. Eng. Chem. Anal. **13**, 227 (1941).

¹⁰⁾ *L. K. Wolff*, Z. Vitaminf. **7**, 277 (1938).

¹¹⁾ *Ritsert*, Merck's Jahresber. **1938**, 27.

¹²⁾ *E. H. Reerink* und *I. van Niekerk*, Vitaminf. **7**, 269 (1938).

¹³⁾ *L. Ekkert*, Pharm. Zentralh. **69**, 276 (1928).

alkoholische, mit Furfurol oder Benzaldehyd versetzte Sterinlösungen, welche mit konz. Schwefelsäure unterschichtet wurden, charakteristische Farbringe aufwiesen. Es lag nun der Gedanke nahe, diese Reaktionen in homogener Lösung auszubilden, um dadurch konstante Verhältnisse und reproduzierbare Färbungen zu erhalten.

Beim eingehenden Studium der Reaktionen zwischen Ergosterinderivaten und konz. Schwefelsäure mit und ohne Aldehyde wurde festgestellt, dass diese Reaktionen auf Carbeniumsalzbildung beruhen, wie sie *Dilthey* und *Wizinger*¹⁾, sowie *Wizinger* und Mitarbeiter²⁾³⁾ in einem anderen Zusammenhange beschrieben haben. Die Übertragung der Anschauungen von *Wizinger* auf das Steringebiet führte nun zu ungeahnten experimentellen Möglichkeiten, über die später berichtet werden soll. Die Schwefelsäure bei den obgenannten Reaktionen sowie auch bei den meisten Sterinreaktionen betrifft also nur die Bildung von Salzen; sie wirkt höchstens in untergeordnetem Masse dehydrierend oder dehydratisierend. Die Schwefelsäure liefert lediglich das Anion und muss daher durch andere Säuren ersetzbar sein. Dies ist auch tatsächlich der Fall, wenn auch nur unter ganz bestimmten Bedingungen. Das Vitamin D oder auch andere ungesättigte Sterine sind im polarisierten Zustande sehr schwache Basen; sie bilden daher nur mit starken Säuren, z. B. Perchlorsäure, Salze. Mit Wasser erfolgt sofort Spaltung, denn dieses, als stärkere Base⁴⁾ verdrängt das organische Kation aus dem ionoiden Molekelverbande. Es sind daher alle ionisierenden Lösungsmittel, wie Alkohole, Ester, Äther usw. von vorneherein auszuschliessen. Für die Ausführung der Reaktion hat sich deshalb Benzol und Eisessig als Lösungsmittel und Perchlorsäure als anion-lieferndes Agens bisher am besten bewährt. Versetzt man beispielsweise eine benzolische Lösung von Vitamin D₂ und Vanillin in der Wärme mit einer Perchlorsäure-Eisessigmischung, so erhält man die genau gleiche blaue Färbung, wie sie Vanillin-Schwefelsäure mit D₂ in Alkohol gibt. Im ersten Fall liegt ein Carbeniumperchlorat, im zweiten Fall ein Carbeniumsulfat vor. Die Lage der Schwerpunkte der beiden Absorptionsbanden differiert um etwa 10 m μ , und zwar liegt die Bande des Perchlorates bei 590 m μ und die des Sulfates bei etwa 600 m μ . Auf Zusatz von Methanol verschwindet die blaue Farbe und man erhält eine schwach gelbe Lösung. Es gelingt nicht, das Vitamin D mit Vanillin in Abwesenheit einer starken Säure auf irgend eine Weise zur Reaktion zu bringen. Für diese Reaktion ist also die Gegenwart einer Säure unerlässlich, wie *Wizinger* in einem anderen Zusammenhange gezeigt hat³⁾.

¹⁾ *W. Dilthey* und *R. Wizinger*, J. pr. [2] **118**, 321 (1928).

²⁾ *R. Wizinger*, J. pr. [2] **154**, 1 (1939).

³⁾ *R. Wizinger*, J. pr. [2] **157**, 129 (1941).

⁴⁾ *G. Schwarzenbach*, Vortrag an der Wintervers. d. Schweiz. Chem. Ges. vom 25. 2. 45.

Verwendet man statt Vanillin als Kondensationskomponente andere Aldehyde und statt Vitamin D andere Sterine mit ionoiden C-Atomen¹⁾, so erhält man die verschiedensten Farbeffekte (Tab. 1 und 2). Besonders die Reaktionen von Vitamin D mit aromatischen Aldehyden zeigen scharf ausgeprägte Absorptionsbanden (Fig. 1). Führt man hingegen die Reaktion nur mit Perchlorsäure ohne Kondensation mit Aldehyden durch, so erhält man für die Vitamine D₂ und D₃ nur stumpfe schwachgrüne Farbtöne, in grösseren Konzentrationen stumpfblau. Es hat sich gezeigt, dass die grüne Reaktionslösung aus einer blauen, dem Vitamin D-Carbeniumperchlorat, und einer gelben, der anionfreien Verbindung besteht. Durch Zusatz eines Überschusses von HClO₄ kann man das Gleichgewicht zugunsten des Carbeniumperchlorates verschieben; die Farbe der Lösung geht von Grün nach Blau über. Vergleicht man die Intensität des Vitamin-D-Vanillin-Carbeniumperchlorates mit derjenigen des Vitamin D-Carbeniumperchlorates, so fällt die intensive Farbe des ersteren auf, die ihre Ursache in der auxochromen Wirkung des Vanillinrestes hat.

Tabelle 1.

Aldehyde	Ergosterin (2 mg)	Vit. D ₂ (0,2 mg)
Phenylacetaldehyd	orange 498	gelb(grünl.)
Zimmtaldehyd	rot(or.) 470 530	blau 593, Hauptabs. im UR/R
Benzaldehyd	gelb 450 (End)	rot 530
p-Tolyl-aldehyd	gelb(braun) 480	rot(v) 545
p-Cuminaldehyd	gelb(braun) 480	rot 545
Salicylaldehyd	rot(or.) 485	violett(bl) 585
o-Methoxy-benzaldehyd	rot(braun) 505	blau(v) 565
p-Oxybenzaldehyd	rot(braun) 480 510	violett(blau) 560
Anisaldehyd	rot(braun) 476 505	violett(blau) 565
Vanillin	rot 494 535	blau 590
Isovanillin	rot(v) 476 510	blau g
Äthylvanillin	rot (2 Maxima in grün u. bl.)	blau 585
o-Nitrobenzaldehyd	orange(gelb) 500	rot(or) 550
m-Nitrobenzaldehyd	gelb (schwach)	violett (schwach)
p-Nitrobenzaldehyd	gelb (schwach)	violett (schwach)
p-Dimethylamino-benzaldehyd	brauner unlösl. Farbkörper	violetter unlösl. Farbkörper
Piperonal	rot 520	blau g, nur schwache Bande 590
Veratrumaldehyd	rot 500	blau, sehr schwache Bande 590
Benzoyl-vanillin	braun(r) 500	rot 548
p-Nitro-benzoyl-vanillin	gelb(braun)	hellrot 545
Furfurol	violett(braun) schw. Bande 505	violett(r) 552

¹⁾ H. Schaltegger, Exper. 2, 27 (1946).

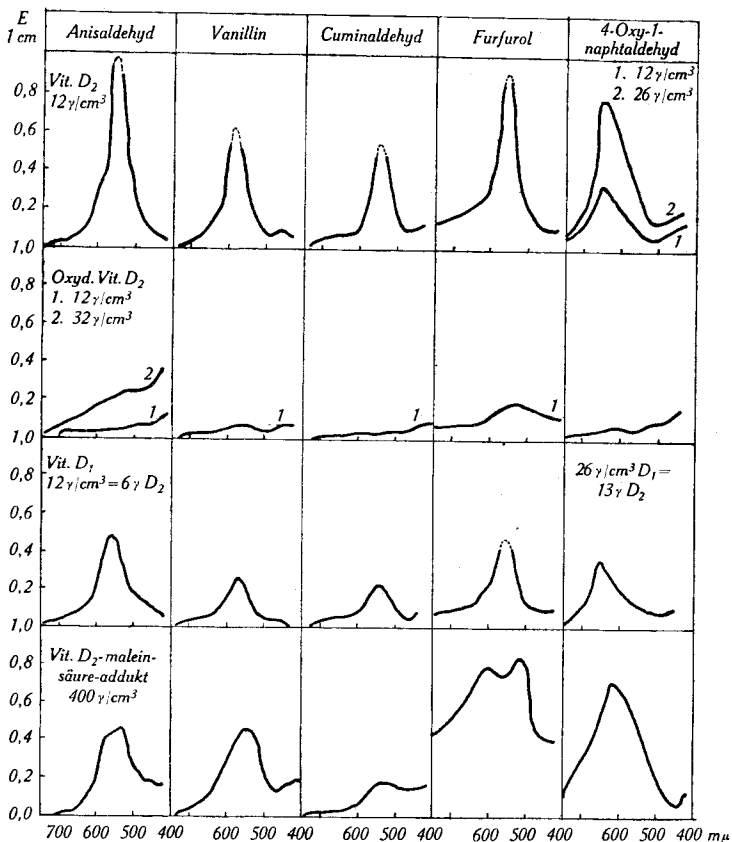


Fig. 1.

Absorptionskurven einiger Sterin-carbeniumperchlorate nach Kondensation mit den Aldehyden CHO 1 bis 5.

Kondensiert man Cholesterin, Ergosterin und Vitamin D_2 der Reihe nach mit folgenden Aldehyden, welche in steigender Anzahl Auxochrome enthalten: Benzaldehyd, Anisaldehyd, Vanillin, 1,4-Oxynaphtaldehyd und Dimethylamino-benzaldehyd, so erhält man nicht nur stabile Carbeniumsalze, die auch gegen Alkohol beständig sind und worin das Perchlorat-Ion durch Anionen schwächerer Säuren ersetzt werden kann, sondern es nimmt auch der bathochrome Effekt zu¹⁾. Geht man z. B. vom 1,4-Oxybenzaldehyd zum 1,4-Oxynaphtaldehyd über, so erfolgt im Falle Vitamin D eine Rotverschiebung der Absorptionsbande um rund $100\text{ m}\mu$. Beim Vitamin D_2 und Dimethylamino-benzaldehyd beobachtet man eine rotviolette Färbung, die auf Zusatz von Alkohol nach Blau umschlägt mit Banden im äussersten Rot. Bei der rotviolettten Farbe handelt es sich wahrscheinlich um Farben zweiter Ordnung²⁾. Bei den Kon-

¹⁾ H. Schaltegger, Exper. 2, 27 (1946).

²⁾ R. Wizinger, Organische Farbstoffe, F. Dümmlers Verl., Bonn 1933.

densoptionsprodukten mit schwächer positivierten Aldehyden führt Alkoholzusatz mehr oder weniger rasch zur Entfärbung. Zu bemerken ist noch, dass Dimethylamino-benzaldehyd sich bedeutend schwerer kondensiert als andere Aldehyde; dafür sind die Kondensationsprodukte des ersteren gegen Hydrolyse bedeutend beständiger als die Kondensationsprodukte anderer Aldehyde. Es findet sich hier bestätigt, was *Wizinger* bei seinen positivierten Äthylenen fand, dass die Zunahme der Hydrolysenbeständigkeit parallel geht mit der Abnahme der Kondensationsfähigkeit der Aldehydkomponente. Dies ist wahrscheinlich auch der Grund, warum mit aromatischen Ketonen bis jetzt noch keine Kondensationsprodukte erhalten werden konnten.

Tabelle 2.

Aldehyde → ↳ Sterine	Anisaldehyd	Vanillin	Cumin- aldehyd	Furfurol	4-Oxy-1- naphtaldehyd.
Cholesterin ca. 20 mg	rosa-viol. 510	rosa-viol. 540	orange g 490	violett g 500 630	farblos
Choleste- non-(3)	Alle Reaktionen sind negativ. Die Lösungen sind farblos. Negativier. Einfluss der CO-Gruppe.				
Dihydro- vit. D ₂ I	rot(v) 510	lila 530	rosa g	violett gg 500 640	blau g 590
D ₂ -Malein- säureaddukt	rot g 515	violett g 530	orange	violettrot 520	grün
Ergosterin	braunrot 480 510	rot 500 550	gelb 450 500	violett g 480 500	blau 600
Lumisterin	rot(v) 490 520	rot(v) 490 550	gelb 490	violett g 490 530	blau 600
Ergosterin B ₃	orange(r) 480 515	rotviolett 500 550	gelb 500	rotviolett g 490	blaugrün 600
Suprasterine	rotbraun 480 550	braungrün 460 550 590	orange 460 550	violett g 550 620	grün 470 620
Pyrovit. D ₂	rosa	rosa	farblos	rosa(v) 530	farblos
Isopyro- vit. D ₂	rot(v)	rot(v)	gelb	blau	gelbgrün
Vit. D ₂	blauviol. L 565	blau L 590	rot L 550	violettrot L 550	grün L 650
Vit. D ₃	Die Farben sind die gleichen wie bei Vitamin D ₂				
Oxydiertes Vit. D ₂	braun(r) gg	braun(v) gg	or.braun gg	grau(v)	blau(v) g
Ergosterin- maleinsäure- addukt	Alle Reaktionen negativ, die Lösungen sind farblos bis gelblich. Es fehlt das Carbenium-C-Atom.				

Die Reaktionen wurden je nach der Farbstärke mit 1—5 mg Substanz ausgeführt, die Vitamin D-Reaktionen nur mit 0,1 mg Substanz. Die Zahlen geben die Lagen der Banden an. Abkürzungen (gelten auch für die anderen Tabellen): (v) = violettstichig, (r) = rotstichig, (g) = grauhaltig, (gg) = stark grauhaltig, (L) = leuchtende Farbe.

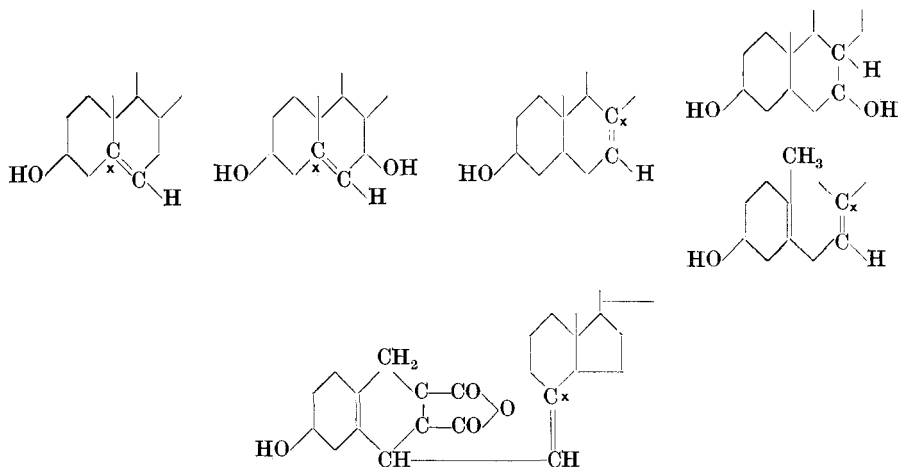
Mit der Aufklärung der Funktionen der Säure und des Aldehyds bei diesen Sterinreaktionen hat man es nun in der Hand, die bestmöglichen Bedingungen für eine quantitative Bestimmungsmethode für Vitamin D abzuleiten. Darüber hinaus bietet sich eine Fülle von Möglichkeiten, geeignete Farbreaktionen der einzelnen Sterin-, Steroid- und Gallensäuregruppen aufzufinden.

Abgrenzung und Spezifität der neuen Farbreaktionen.

Die Resultate aus zahlreichen Versuchen, von denen die wichtigsten in Tabelle 2 figurieren, zeigen bestimmte Gesetzmässigkeiten.

Es wurde früher bereits angedeutet¹⁾, dass sich die Sterine, je nach der Zahl der ionoiden C-Atome in drei Typen einteilen lassen.

Typus I: Alle Sterine, welche ausser der einen positivierten Äthylengruppierung keine weiteren Doppelbindungen oder aber nur solche enthalten, welche nicht in Konjugation zur koordinativen Lücke stehen, sind nur in sehr geringem Masse zur Carbeniumsalzbildung und zur Kondensation mit aromatischen Aldehyden befähigt. Folgende Fälle wurden untersucht (der Carbenium-Kohlenstoff ist durch ein kleines Kreuz gekennzeichnet). Über die Farbe der Reaktionen und die Lage der Banden orientieren die Tabellen 2 und 5.



Typus II: Dieser Typus umfasst alle Sterine mit konjugierten Doppelbindungen mit zwei ionoiden C-Atomen, wie sie im Ergosterin und 7-Dehydro-cholesterin vorliegen. Der Unterschied in der Neigung, Kondensationsprodukte zu bilden, ist bei Typus I und II sehr erheblich. Der Elektronenmangel an den Atomen β und β' bedingt eine starke Lockerung der Protonen, so dass leicht Kondensation mit

¹⁾ H. Schaltegger, *Exper.* **2**, 27 (1946).

Aldehyden eintreten kann. Wie gross der quantitative Unterschied zwischen Typus I und II in der Bildung von Kondensationsprodukten ist, zeigt Tab. 3. Die Reaktionen wurden wie im Versuchsteil beschrieben ausgeführt und photometriert. (Für Ergosterin wurde 100 gesetzt.)

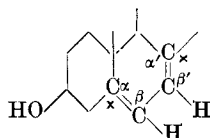
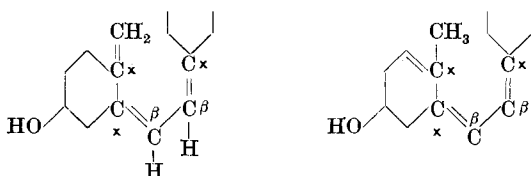


Tabelle 3.

Typus	Aldehyde →	Oxynaphthaldehyd	Cuminaldehyd	Anisaldehyd	Furfurol
	↳ Sterinderivate				
II	Ergosterin . .	100	100	100	100
	Lumisterin . .	90	50	100	85
I	D ₂ -Maleinsäureaddukt . . .	36	8	16	19
	Cholesterin . .	4	3	4	23

Die vertikalen Reihen beziehen sich immer auf ein und denselben Aldehyd. Wenn also der Umsatz für die Sterine vom Typus II 100 % beträgt, so ist unter den gleichen Versuchsbedingungen der Umsatz für die Sterine vom Typus I nur 3—30 %. Die Schwankungen der Ausbeuten sind auf die Konstitution und Eigenschaften der Sterine und Aldehyde zurückzuführen.

Typus III: Dieser umfasst alle Vitamine D und die Tachysterine. Diesen Verbindungen liegt ein System von drei konjugierten Doppelbindungen in offener Kette zu Grunde. Die Kondensationsgeschwindigkeit der D₂- bzw. D₃-Carbeniumsalze mit aromatischen Aldehyden beträgt etwa das 10-fache derjenigen des Ergosterin-Carbeniumsalzes. Dies ist auch verständlich, denn es wirken drei negativierende Zentren (die Carbeniumatome 5, 8 und 10) auf die β-Atome 6 und 7 ein. Fig. 2 zeigt die Intensitätsunterschiede der drei Sterintypen, hervorgerufen durch die unterschiedliche Kondensationsgeschwindigkeit mit 5 Aldehyden in einer Sterinkonzentration von 4×10^{-5} Mol pro Liter = 16 γ Sterin pro cm³ Reaktionslösung.



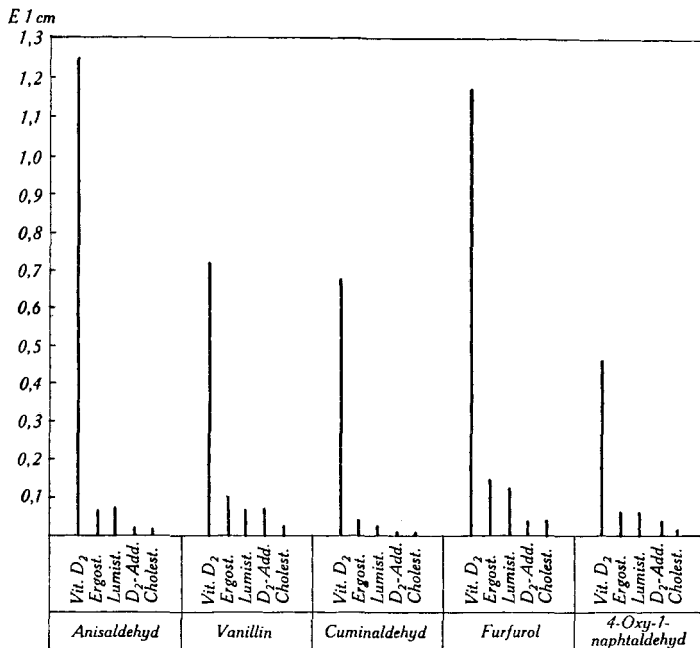


Fig. 2.

Intensitätsunterschiede der Sterinreaktionen.

Die Intensität wurde bei allen Sterinen in der Konzentration von $16 \gamma/\text{cm}^3$ und bei dem Filter gemessen, welches bei Vitamin D₂ das Maximum anzeigt.

Man erkennt daraus, dass die Reaktionen der Vitamine D gegenüber den Reaktionen der Sterine um ein Vielfaches empfindlicher sind. Im weiteren erwies es sich, dass die Reaktionen der D-Vitamine mit den untersuchten Aldehyden in der Steringruppe in bezug auf die auftretende Farbe absolut spezifisch sind. Besonderes Gewicht wurde auf die Frage gelegt, ob biologisch unwirksames D₂ sich auch im chemischen Test anders als das Vitamin D₂ verhalten würde. Für die Zerstörung der antirachitischen Wirksamkeit kommt in erster Linie der Sauerstoff in Frage.

Man liess eine benzolische Lösung von kristallisiertem Vitamin D₂ (500 mg in 20 cm³ Benzol) 50 Tage im offenen Gefäss an der Luft stehen. Nach dieser Zeit zeigte die Lösung keine D-Reaktionen mehr, Tab. 4, Fig. 3.

Tabelle 4.

Aldehyd	Vitamin D ₂	Oxydiertes Vit. D ₂
ohne Aldehyd	schwach grüngelb	braun
Anisaldehyd	blauviolett (rein)	stumpfes Braun
Vanillin	blau (rein)	stumpfes Braun
Antimontrichlorid (n. Brockmann)	orange	orange

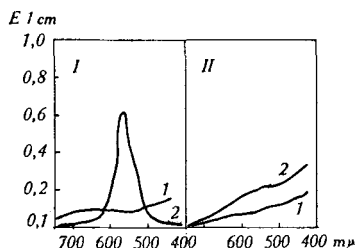


Fig. 3.

I. Vitamin D₂ II. Oxydiertes Vitamin D₂

1. 32 μ ohne Aldehyd 1. 32 μ ohne Aldehyd
2. 8 μ mit Anisaldehyd 2. 32 μ mit Anisaldehyd

Aus den Absorptionskurven geht hervor, dass offenbar keine Kondensation mit den Aldehyden stattgefunden hat.

Reaktionen einiger Gallensäuren. Wegen der geringen Löslichkeit der Gallensäuren in Benzol wurde die Reaktion in Eisessig ausgeführt. Um das Gleichgewicht stark zugunsten des Carbeniumsalzes zu verschieben, wurde ein grosser Überschuss an Perchlorsäure zugefügt.

20 mg Substanz in 2 cm³ Eisessig, dazu in der Wärme 10 Tropfen Perchlorsäure-reagens und 10 mg Vanillin. Nach 2 Minuten Kochen und 10 Minuten Stehenlassen notierte man die Farbe. Auf Methanolzusatz erfolgt Blaufärbung (Tab. 5).

Tabelle 5.

Gallensäuren	ohne Vanillin	mit Vanillin	Methanolzusatz	Tetranitromethan
Cholsäure (3,7,12-Trioxycholansäure)	orange	tief rot mit blauen Ablauf-farben	tief blau 590 m μ kochbeständig	farblos
Desoxycholsäure (3,12-Dioxycholansäure)	farblos bis gelblich	keine Reaktion (gelb)	farblos	farblos
Apocholsäure (3,12-Dioxycholen-7-säure)	orange	tief rot mit blauen Ablauf-farben	tief blau 590 m μ kochbeständig	braungelb

Bei der Cholsäure hat offenbar Wasserabspaltung stattgefunden unter Bildung eines ionoiden C-Atoms in Stellung 8. Daher die gleiche Reaktion wie die Apocholsäure.

Die geschilderten Reaktionen lassen sich zur Identifizierung der drei Säuren heranziehen, wenn man zur Unterscheidung der Apocholsäure von der Cholsäure die Gelbfärbung der ersteren mit Tetranitromethan berücksichtigt.

Reaktionen anderer Vitamine. β -Carotin: 0,7 mg in Benzol (Ausführung wie bei der D-Reaktion) ohne Aldehyd, stark grauhaltige Blaufärbung mit sehr schwachen Banden bei 590 und 630 m μ . Mit Vanillin und Perchlorsäure: tiefblaue graustichige Lösung, schwache Bande bei 550 m μ .

Vitamin A: Zur Prüfung gelangte eine Vitamin A-Fraktion, welche nach der Verteilmethode von *Brockmann*¹⁾ aus einem Vitamin-A-Konzentrat amerikanischer Herkunft mit 850 000 IEA/g erhalten wurde. Über den Ausfall der Reaktionen gibt Tabelle 6 Auskunft.

Tabelle 6.
Betr. CHO vgl. Tab. 7.

Vitamin	ohne CHO	CHO 1	CHO 2	CHO 3	CHO 4	CHO 5
A-Konzentrat 1,5 mg = 1275 IEA	blaugrau keine Banden	violett g 565 m μ	blau g 590 m μ	rotviolett gg keine Bande	blau gg keine Bande	blau (grün- stichig) 630 m μ
D ₂ 100 γ = 4000 ED	farblos	violett 570 m μ	blau 590 m μ	rot 545 m μ	violett 550 m μ	grün 650 m μ

Alle Vit. D-Reaktionen zeigen fast reine Spektralfarben; sie sind alle stark leuchtend im Gegensatz zu den Vit. A-Reaktionen, welche alle stark grauhaltig sind (optische Wirkung der vielen π -Elektronen).

Die Vitamine B₁, B₂, C, E (*d*- α -Tocopherol, *Roche*), K (Synkavit, *Roche*) und Linol-Linolensäure zeigen keine nennenswerten Reaktionen.

Zusammenfassend wird also festgestellt, dass ausser dem Vitamin A und den Carotinen keines der zahlreichen Sterinderivate und Vitamine die gleichen Farbreaktionen wie die D-Vitamine aufweisen oder deren Intensität erreichen.

Die Vitamin D-Bestimmung.

Für die qualitative und quantitative Ermittlung der D-Vitamine wurden aus 23 untersuchten Aldehyden (Tab. 1) die in der Tabelle 7 angeführten fünf Aldehyde ausgewählt.

Tabelle 7.

Abgek.*) Bezeichnung	Name des Aldehyds	Rk.-Farbe mit D ₂ bzw. D ₃	$\lambda_{\max.}$ **) ca. m μ	Vit. D γ/cm^3
CHO 1	Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd)	blauviolett	570	40
CHO 2	Vanillin (3-Methoxy-4-oxybenzaldehyd)	blau	590	40
CHO 3	Cuminaldehyd (4-Isopropylbenzaldehyd)	rot	545	40
CHO 4	Furfurol (α -Furanaldehyd)	rotviolett	552	40
CHO 5	4-Oxy-1-naphtaldehyd	grün	650	40

*) Wird im folgenden beibehalten.

**) Ermittelt mit dem Kleinspektrographen von *Zeiss*.

¹⁾ *H. Brockmann, Z. physiol. Ch.* **241**, 104 (1936).

Als Identitätsreaktion auf die Vitamine D eignen sich die Aldehyde CHO 1, CHO 2 und CHO 5, einerseits wegen der augenfälligen Farbunterschiede zwischen Vitamin D (blau bzw. grün) und den anderen Sterinen (rot bzw. blau) und andererseits wegen den scharf ausgeprägten Absorptionsbanden, welche noch in einem sehr grossen Überschuss anderer Sterine gut erkennbar sind. Bei Anwesenheit der 1000-fachen Menge Cholesterin ist die Bande von 0,1 mg Vitamin D₂ in 5 cm³ Reaktionslösung noch gut erkennbar.

Fig. 4 stellt die mit den fünf Aldehyden erhaltenen Eichkurven der Vitamin D₂-Reaktionen dar.

Diese Eichkurven wurden statistisch aus einer grossen Zahl von Messungen, welche mit kristallisiertem Vitamin D₂ ausgeführt wurden, ermittelt. Die Streuungen betragen bis zu 20%. Der Grund hierfür liegt in der Natur der Reaktion selbst, z. T. bei der Ausführung der Bestimmung. Diese wurde möglichst einfach gestaltet. Statt Parallelbestimmungen mit ein und demselben Aldehyd auszuführen, bestimmt man den D-Gehalt mit allen 5 Aldehyden. Dadurch wird die Methode absolut zuverlässig. Der mittlere Fehler der Einzelmessung beträgt $\pm 8\%$.

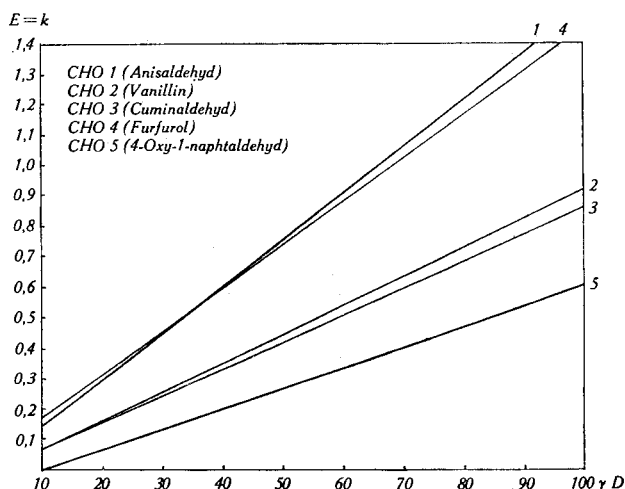


Fig. 4.

Vitamin D — Eichkurven mit CHO 1 bis CHO 5.

Statt der hier dargestellten Eichkurven kann man auch die Formeln der Tabelle 11 zur Ausrechnung benützen.

Bei der Ausführung der Reaktion ist darauf zu achten, dass man nicht zu lange mit dem Photometrieren wartet, weil sich die Farblösungen ändern. Es bilden sich allmählich neue Farbstoffe aus, welche durchwegs langwelligere Absorption zeigen. Am Beispiel des Furfurools und des Anisaldehyds soll die Reaktion gezeigt werden. Fig. 5 gibt die Absorptionskurven einer Reaktionslösung von Vitamin D₂ und Furfurool wieder, gemessen sofort nach Ausführung der Reaktion, dann nach einer Stunde und nach 4 Stunden. Man erkennt gut den Abbau des ersten Maximums bei 550 m μ und die Ausbildung des neuen bei 655 m μ . Beim Anisaldehyd-D₂-Carbeniumperchlorat finden sich ganz ähnliche Verhältnisse (Fig. 6).

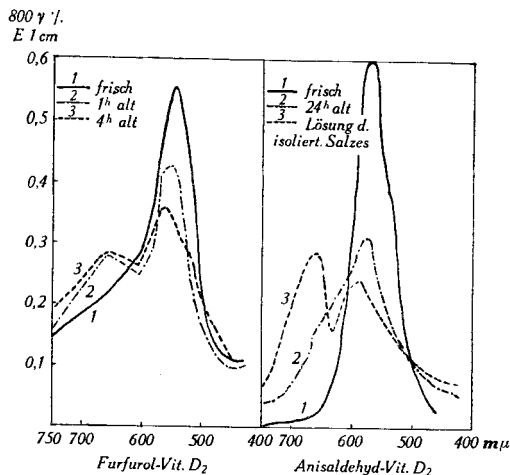


Fig. 5.

Fig. 6.

Bildung des sekundären Farbstoffes.

Zusammenfassend sei auf die drei Faktoren hingewiesen, welche den quantitativen Verlauf der Reaktion beeinflussen:

1. Gleichgewicht Carbeniumsalz \rightleftharpoons gelbe Verbindung.
2. Kondensationsgeschwindigkeit zwischen D_2 und Aldehyd.
3. Bildungsgeschwindigkeit des sekundären Farbstoffes aus dem primären.

Demgemäss verhalten sich die fünf Aldehyde je nach ihren Eigenschaften als positivierete Systeme einerseits und als Kondensationskomponenten andererseits entgegengesetzt. Dieser Antagonismus wirkt sich bei der D-Bestimmung günstig aus. Erhält man nämlich für einen oder zwei Aldehyde zu hohe Werte, dann findet man für die anderen zu tiefe Werte und umgekehrt, je nachdem das verwendete Benzol oder der Eisessig mehr oder weniger Spuren Wasser enthalten, oder ob man zur Kondensation kürzere oder längere Zeit kocht. Auch das Alter des Perchlorsäurereagens spielt hierbei eine Rolle und dann natürlich auch die Zeit vom Ansetzen der Reaktion bis zum Photometrieren, wegen der Bildung des sekundären Farbstoffes. Alle diese Faktoren werden durch die fünf Aldehyde zum großen Teil kompensiert.

Da die Reaktion im offenen Reagensglas ausgeführt wird, in welchem man auch zum Kochen erhitzt, wurde der Fehler ermittelt, der durch mehr oder weniger starkes Verdampfen des Benzols entsteht. Der mittlere Fehler der Einzelmessung (durch Auswägen bestimmt) beträgt bei Ausführung der Bestimmung mit den 5 Aldehyden $\pm 0,6\%$.

Zur Ausschaltung des in Bestrahlungsprodukten des Ergosterins eventuell vorhandenen Tachysterins wurde die Fähigkeit desselben,

Diensynthesen mit Maleinsäure-anhydrid einzugehen, benutzt. Vitamin D₂ und Tachysterin zeigen eine verschiedene Geschwindigkeit der Adduktbildung¹⁾. Vitamin D₂ reagiert gegenüber Tachysterin viel langsamer mit Maleinsäure-anhydrid. Es wurde nun gefunden, dass das Vitamin D₂ erst nach einstündigem Kochen der benzolischen Lösung mit Maleinsäure-anhydrid reagiert (Fig. 7).

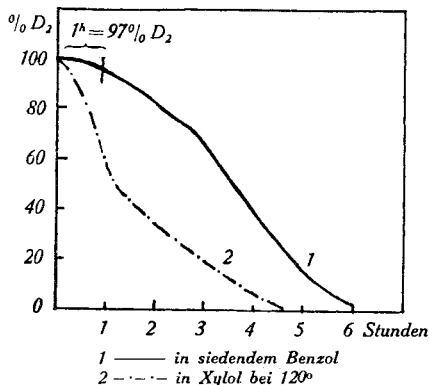


Fig. 7.

Bildung des Vit. D₂-Maleinsäure-adduktes.

Diskussion der Bestimmungsmethode an Hand einiger analytischer Daten.

Als Beispiel für die analytische Verwendbarkeit der fünf Aldehyde seien in der Tab. 8 die Resultate der Bestimmungen reiner

Tabelle 8.

1	2	3					8	9	10	11
		gefunden: Einzelwerte für								
Vit. D	Eingesetzte Menge in gamma	CHO					Mittelwert	m.F. abs. ±	m.F. % ±	F. bez. Kol. 2 ± %
		1	2	3	4	5				
D ₁ *)	100	49,4	48,9	49,2	52,0	51,4	50,2	1,3	2,6	0,4
D ₂	50	51,9	54,4	51,1	48,2	50,2	51,1	2,3	4,5	2,2
D ₂	70	69,9	72,1	71,1	73,0	65,2	70,6	3,1	4,4	0,9
D ₂	50	49,0	49,5	49,7	50,0	50,5	49,7	0,6	1,1	0,6
D ₂	80	80,8	79,0	76,0	82,0	78,0	79,1	2,5	3,2	1,2
D ₂ -acetat	50	50,0	48,5	52,0	47,0	46,7	48,8	2,2	4,6	2,4
D ₂ -	50	52,5	47,3	50,2	50,5	45,3	49,2	2,8	5,6	1,6
D ₃ -	30	33,2	28,3	32,0	32,5	33,3	31,7	2,0	6,1	5,7
D ₃ -	60	58,9	57,5	60,0	64,0	64,0	60,9	3,0	4,9	1,5

Kolonne 11 gibt den relativen Fehler bezogen auf Kol. 2 (eingesetzt D₂).

*) Man findet natürlich nur die Hälfte, nämlich D₂, die andere Hälfte, das Lumisterin ist optisch und biologisch unwirksam.

¹⁾ A. Windaus, A. Lüttringhaus und G. Weidlich, A. **492**, 226 (1932).

Vitamin D₁-, D₂- und D₃-Lösungen angeführt. Die erhaltenen Werte beziehen sich immer auf die in 5 cm³ Reaktionslösung enthaltene Menge Vitamin D. Im Hinblick auf einen möglichst kleinen prozentualen Fehler, sowie in bezug auf die Extinktionsmessung ist es daher am günstigsten, wenn man die Bestimmungen im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 80 γ Vitamin D pro 5 cm³ Reaktionslösung ausführt.

Zum Vergleich mit Tab. 8 findet man in Tab. 9 Analysenresultate von Ergosterinbestrahlungsprodukten, welche etwa folgende mittlere Zusammensetzung aufweisen: 50—70 % Vitamin D₂, 35—25 % Lumisterin, 10—15 % Tachysterin und weniger als 1 % Überbestrahlungsprodukte und Ergosterin. Zur Kontrolle wurden von allen Vitamin D-Lösungen die biologischen Bestimmungen im ernährungsphysiologischen Laboratorium der Dr. A. Wander A.G. ausgeführt.

Tabelle 9.

Präp. Nr.	gefunden gamma Vit. D ₂					Mittelwert	m.F. abs.	m.F. %
	CHO 1	CHO 2	CHO 3	CHO 4	CHO 5			
19*)	67,0	68,7	67,4	74,0	62,5	67,9	±4,1	6,0
19*)	44,7	48,4	41,1	47,1	41,6	44,6	3,1	7,0
20*)	59,7	60,2	60,4	55,0	59,7	59,0	2,3	3,9
20*)	33,9	33,8	31,0	33,3	32,3	32,9	1,2	3,6
22	48,5	47,4	49,1	47,2	49,3	48,3	0,96	2,0
23*)	55,2	52,8	61,6	50,5	53,9	54,8	4,2	7,7
25	80,8	79,0	76,1	80,8	78,7	79,0	1,9	2,4
25	68,5	67,0	70,3	72,5	64,8	68,6	3,0	4,4
26	59,7	60,2	61,5	64,7	63,2	61,9	2,1	3,4
26	46,0	46,5	44,7	45,0	44,6	45,4	0,84	1,9

*) Ölige Lösungen mit 1000000 IED pro Gramm, direkt im Öl bestimmt. Die übrigen: alkoholische Lösung in Benzol übergeführt.

Zusammenfassung.

Ausgehend von den Farbringreaktionen von G. Woker und Mitarbeitern wurde erkannt, dass es sich bei dieser Art von Reaktionen um Carbeniumsalzbildung handelt. Auf dieser Erkenntnis beruht die vorliegende Vitamin D-Bestimmungsmethode. Es konnte gezeigt werden, dass man die Sterine analog den einseitig positivierten Äthylenen von Wizinger als verschieden stark positivierte Systeme, je nach der Zahl der koordinativ ungesättigten C-Atome auffassen kann. Die relativ geringe Farbstärke der Sterincarbeniumsalze wird durch Kondensation mit aromatischen Aldehyden um ein Vielfaches erhöht. Je nach der Zahl und Art der positivierenden Auxochrome kann die Aldehydkomponente die verschiedensten optischen Effekte hervorbringen. Für die Vitamin D-Bestimmung wurden auf Grund

der Eigenschaften der Carbenium-Kondensationsreaktionen fünf verschieden stark positivierte Aldehyde ausgewählt. Die Extinktionen der erhaltenen Färbungen werden mit dem *Pulfrich'schen* Stufenphotometer gemessen.

Fräulein Prof. Dr. G. Woker danke ich für die Hinweise betreffend ihrer Farbringreaktionen. Das Studium der zahlreichen Reaktionen wurde sehr erleichtert durch den verwendeten Kleinspektrographen von *Zeiss*, für dessen Benützung ich der *Wanderstiftung* meinen besten Dank ausspreche.

Die Ausführung der Vitamin D-Bestimmung.

Reagentien und Apparate:

Benzol: Man kocht dieses 2 Stunden mit wasserfreiem Aluminiumchlorid technisch am Rückflusskühler ¹⁾. Nach dem Abdestillieren, Waschen mit Wasser und Trocknen mit Natriumsulfat wird rektifiziert. Das so gereinigte Benzol zeigt mit den fünf Aldehyden keine Blindfärbungen.

Eisessig: Der käufliche Eisessig wird durch Ausfrieren vom Wasser befreit ²⁾.

Aldehyde: von diesen stellt man sich 0,1-proz. Lösungen in Benzol her; vom Cuminaldehyd eine 0,15-proz. Lösung. Das Furfurol muss auf jeden Fall vorher destilliert werden. Der 4-Oxy-1-naphtaldehyd wird nach der Herstellung ³⁾ aus Benzol umkristallisiert. Alle Aldehydlösungen, mit Ausnahme der Furfurollösung sind mindestens 8 Tage bei tiefer Temperatur haltbar. Alte Aldehydlösungen geben abgesehen von graufarbigem Blindwerten in Eisessig schwer lösliche Kondensationsprodukte, die beim Photometrieren nicht erfasst werden.

Perchlorsäure-Reagens: Man setzt zu einer Mischung von 2 cm³ Essigsäureanhydrid und 2,5 cm³ Eisessig langsam unter Schütteln 0,5 cm³ 70-proz. Perchlorsäure (*Kahlbaum*). Die schwach gelbliche Lösung erwärmt man unter Ausschluss von Feuchtigkeit eine halbe Stunde im Ölbad von 95—100°. Das Reagens ist braun gefärbt und raucht anfangs an der Luft. Man füllt es noch warm in eine kleine Pipettenflasche. Das verjüngte Ende des Pipettenrohres ist so bemessen, dass 2 Tropfen des Reagens ca. 39 mg wiegen. Zur Ausführung der Reaktion werden 2 Tropfen verwendet. Es ist gut verschlossen mindestens 8 Tage haltbar.

Maleinsäure-anhydrid: Dieses wird vor der Verwendung mit gleichen Teilen Phosphorpentoxyd ⁴⁾ im Apparat Fig. 8, S. 300, destilliert.

Mikrovakuum-destillationsapparatur (Fig. 8): Der von *C. Marburg* ⁴⁾ beschriebene Sublimationsapparat wurde etwas modifiziert, so dass er auch zur Destillation verwendet werden kann. Für die Destillation der Aldehyde verwendet man das Kölbchen a mit der Vorlage c; für feste Substanzen das Kölbchen b. Zur Destillation der Aldehyde beschickt man das Kölbchen a mit reinem Quarzsand und trinkt diesen mit 0,5—1 cm³ der zu destillierenden Flüssigkeit. Man destilliert im Vakuum (12 mm Hg) und bei Wasserbadtemperatur. Nötigenfalls taucht man das Vorlagekölbchen in kaltes Wasser.

Reagensgläser: Für eine Konzentrationsbestimmung werden entsprechend den 5 Aldehyden 5 Gläser 16/160 mm Grösse verwendet. Reagensgläser mit eher längerem Hals sind vorzuziehen.

¹⁾ *E. Clar*, Aromatische Kohlenwasserstoffe, Verl. Springer 1941, S. 88.

²⁾ *Vanino*, Handbuch d. präp. Chemie, Bd. II.

³⁾ *N. A. Milas* und *R. Heggie*, Ind. Eng. Chem. Anal. **13**, 227 (1941).

⁴⁾ *C. M. Marburg*, Am. Soc. **60**, 509 (1938).

Quarzküvette: ca. 6—7 cm³ Inhalt, Bestrahlungsfläche von ca. 10 cm². Durch einen Schliff lässt sich die Küvette mit einem Vakuumbahn verbinden. Sie dient zum spezifischen Nachweis der Provitamine durch Bestrahlung und Nachweis des gebildeten Vitamins D.

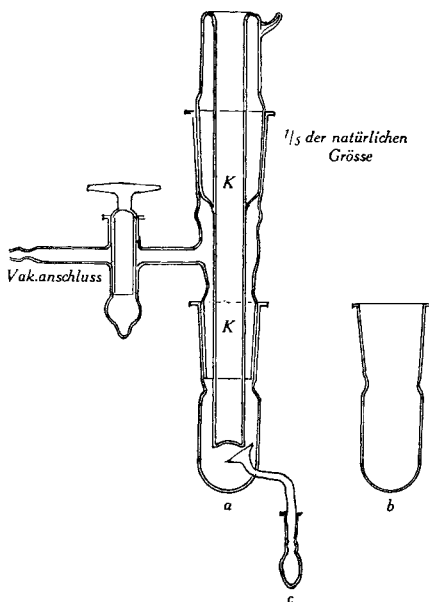


Fig. 8.

Mikro-Vakuum-Destillationsapparat.

Stufenphotometer von *Pulfrich*: Die für die Bestimmung zu verwendenden Spektralfilter sind in Tab. 10 zusammengestellt. Zum Photometrieren verwendet man Küvetten mit 1 cm Schichtdicke.

Tabelle 10.

CHO →	1	2	3	4	5
Filter → . . .	S 57	S 57	S 55	S 55	S 66

Der qualitative Nachweis der Provitamine und Vitamine D.

Alle vier Provitamine (Ergosterin, 7-Dehydro-cholesterin, Lumisterin₂, und Lumisterin₃), sowie deren Ester zeigen die gleichen Farbreaktionen. Für den Nachweis verwendet man die Aldehyde CHO 1, CHO 2 und CHO 5. Über die auftretende Farbe siehe Tab. 2. Die Ausführung ist die gleiche wie bei der quantitativen D-Bestimmung. Es lassen sich noch 0,1 mg Provitamine neben 10 mg Cholesterin nachweisen. Die Spezifität und Empfindlichkeit kann man bedeutend erhöhen, wenn man die Sterinlösungen in einer flachen Quarzküvette 10—15 Minuten im Vakuum der Bestrahlung einer Hanauer Quarzlampe aussetzt. Nach der Bestrahlung erhält man bei Anwesenheit von 10—20 γ Provitamin pro cm³ Reaktionslösung die charakteristischen Färbungen für die Vitamine D. Liegen noch schwächere Provitamin-Sterinmischungen vor, so adsorbiert man aus benzolischer Lösung an Aluminiumoxyd III. Die obersten Säulenbezirke enthalten das Provitamin in der 4—6-fachen Anreicherung.

Als Identitätsreaktion auf alle Vitamine D (frei oder verestert) eignen sich die Farbreaktionen mit CHO 1, CHO 2 und CHO 5. Zur sichereren Identifizierung stellt man die Lage der Absorptionsbanden in einem kleinen Handspektroskop fest (Tab. 7). Bei Anwesenheit von 100 γ Vitamin D₂ in 5 cm³ Reaktionslösung erhält man neben der 1000-fachen Menge Öl oder Sterine vom Typus I die charakteristischen D-Reaktionen. Linol-Linolensäuregemische (Vitamin F) stören in der 100-fachen Konzentration noch nicht. Über die Ausführung der Reaktion sei auf die quantitative Bestimmung verwiesen.

Die quantitative Bestimmung der Vitamine D.

Alle D-Vitamine oder deren Ester geben die gleichen Reaktionen und zeigen die gleichen Intensitäten für ein und denselben Aldehyd. Zur Vitamin D-Bestimmung in Bestrahlungsprodukten des Ergosterins bzw. des 7-Dehydro-cholesterins verfährt man folgendermassen: Das bestrahlte Ergosterin wird zur Abscheidung der Hauptmenge des unveränderten Ergosterins in Alkohol gelöst und nach Abkühlung auf 0° vom auskristallisierten Ergosterin abgesaugt. Von der alkoholischen Vitamin D-Lösung entnimmt man eine Menge, welche 0,2—0,3 g Trockensubstanz entspricht, dampft sie zur Trockne ein und evakuiert hernach 2 Stunden im Exsikkator. Den genau gewogenen Trockenrückstand löst man mit Benzol auf das Volumen von 20 cm³. 2 cm³ dieser Lösung versetzt man mit 0,1—0,15 cm³ Essigsäure-anhydrid, spült mit 5 cm³ Benzol nach und hält das Gemisch eine halbe Stunde bei 75°. Das acetylierte Bestrahlungsprodukt wird zur Inaktivierung des eventuell vorhandenen Tachysterins mit 10—15 mg frisch destilliertem Maleinsäure-anhydrid und 5 cm³ Benzol versetzt und 20—30 Minuten auf 75° erwärmt. Es ist darauf zu achten, dass die Lösung nicht eindunstet, allenfalls ergänzt man mit Benzol auf das ursprüngliche Volumen. Nach der Adduktbildung kühlt man ab und füllt mit Benzol auf 20 cm³ auf. Die so erhaltene Vitamin D-Lösung ist meist noch zu stark, man verdünnt deshalb auf das 10-fache mit Benzol. Von der zuletzt erhaltenen Verdünnung, welche $a/2 \gamma$ bestrahltes Ergosterin pro cm³ enthält, ermittelt man in einer Vorbestimmung den ungefähren Vitamin D-Gehalt: 1 cm³ der Lösung, 1 cm³ CHO 5 und 1,5 cm³ Benzol erhitzt man zum Kochen, fügt 2 Tropfen Perchlorsäure-Reagens zu, kocht noch ca. 1 Minute und lässt bei Zimmertemperatur erkalten; danach versetzt man die trübe grüne Lösung mit 1,5 cm³ Eisessig und misst die Extinktion bei 1 cm Schichtdicke gegen eine mit Wasser gefüllte Küvette mit Filter S 66. Aus der Tabelle 11 berechnet man den Vitamin D-Gehalt. Für die Hauptbestimmung wählt man dann diejenige Menge der letzten benzolischen Verdünnung, welche 50—80 γ Vitamin D enthält, setzt 1 cm³ CHO 1 zu und ergänzt mit Benzol auf 3,5 cm³. Man erhitzt zum Kochen, setzt 2 Tropfen Perchlorsäure-Reagens zu, kocht maximal 1 Minute und lässt höchstens 10 Minuten bis zum Erkalten stehen. Danach ergänzt man mit 1,5 cm³ Eisessig auf 5 cm³ Volumen und photometriert. Für die anderen 4 Aldehyde gilt das Gleiche. Die jeweils zu verwendenden Spektralfilter sind in Tab. 10 angeführt. Aus den abgelesenen Extinktionswerten berechnet man nach Fig. 4 oder Tab. 11 die Vitamin D-Werte.

Tabelle 11.

Formeln zur Berechnung der Vit. D-Gehalte aus den abgelesenen Extinktionswerten.

CHO γ	gamma Vit. D =	k = abgelesene Extinktionswerte
1	=	62,1 k + 2,5
2	=	106,5 k + 2,75
3	=	113,4 k + 2,5
4	=	69,3 k - 1,3
5	=	150,0 k + 10

Bestimmung des Tachysterins.

Dieses wird erhalten aus der Differenz der Werte: Bestimmung ohne Maleinsäure-anhydrid-Behandlung minus Bestimmung mit Maleinsäure-anhydrid-Behandlung.

Bestimmung der Vitamine D in Öl.

Liegen Vitamin D-Konzentrate vor, welche mindestens $500000 \text{ IED/cm}^3 = 12,5 \text{ mg}$ Vitamin D₂ enthalten, so kann man das Vitamin D direkt ohne vorherige Verseifung bestimmen. Hiefür ist es aber notwendig, den Blindwert des Öles zu ermitteln. Bei niedrigeren Vitamin D-Konzentrationen wird nach den Vorschriften des Schweiz. Lebensmittelbuches verseift und das Vitamin D im Unverseifbaren in der angegebenen Weise ermittelt.

Wissenschaftliche Forschungsabteilung
der Dr. A. Wander A.G. Bern, und Laboratorium für
physikalisch-chemische Biologie der Universität Bern.

43. Über die Reduktion von Diphenyl-tetraketon und von Benzoyl-formoin

(Synthesen in der 1,4-Diphenyl-butan-Reihe III¹⁾)

von Paul Ruggli †, Hans Dahn und Peter Fries.

(21. I. 46.)

Während die Reduktion von vic. Diketonen²⁾ und vic. Triketonen³⁾ bereits ausführlich bearbeitet worden ist, fehlen noch entsprechende Untersuchungen über die Reduktion von vic. Tetraketonen. Um festzustellen, an welcher Ketongruppe die Reaktion einsetzt, unternahmen wir Reduktionsversuche mit dem einfachsten Tetraketon der aromatischen Reihe, dem Diphenyl-tetraketon⁴⁾ (I), dessen mögliche Reduktionsprodukte uns auch in anderem Zusammenhang interessierten.

Das Tetraketon (I) lässt sich aus dem ausführlich untersuchten und einfach zugänglichen Benzoyl-formoin⁵⁾ (II) durch Oxydation mit Salpetersäure leicht darstellen. Wir verwendeten zu den weiteren Versuchen das dabei entstehende Tetraketon-Monohydrat.

Bei Einwirkung von Wasserstoff in Gegenwart von Platin als Katalysator wird das Tetraketon-Hydrat leicht zum Benzoyl-formoin (II) reduziert. Dass die Reduktion an einer der mittleren

¹⁾ II. Mitt. P. Ruggli, P. Zeller, Helv. **28**, 741 (1945).

²⁾ Reduktion von Benzil: J. A. Pearl, W. M. Dehn, Am. Soc. **60**, 57 (1938).

³⁾ Hydrierung von Diphenyl-triketon: L. A. Bigelow, H. G. Rule, W. A. P. Black, Soc. **1935**, 83.

⁴⁾ P. W. Abenius, H. G. Söderbaum, B. **24**, 3034 (1891). Vgl. A. H. Blatt, W. L. Hawkins, Am. Soc. **58**, 1894 (1936).

⁵⁾ P. W. Abenius, H. G. Söderbaum, loc. cit.