

### 153. Zur kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und $\beta$ -Carotin unter besonderer Berücksichtigung des Vitamin D

von P. B. Müller.

(16. VI. 47.)

Die physiko-chemische Bestimmung des Vitamin D erfolgt heute fast ausschliesslich spektrometrisch durch Messung der Lichtabsorption des Vitamin D im U. V. bei 2650 Å oder kolorimetrisch unter Zugrundelegung der *Carr-Price*-Reaktion. In Naturprodukten wird die spektrometrische Bestimmung<sup>1-8)</sup> des Vitamin D im U. V. durch zahlreiche Begleitstoffe gestört, so dass diese Methode nur für ganz reine Präparate in Frage kommt. Auch die kolorimetrische Bestimmungsmethode mit  $\text{SbCl}_3$ <sup>9-11)</sup> ist für allgemein analytische Zwecke noch zu wenig spezifisch.

Das gleiche gilt auch für andere Farbreaktionen, wie z. B. die Reaktion von Vitamin D mit  $\text{AlCl}_3$  und Pyrogallol<sup>12)</sup>, die *Tortelli-Jaffé*-Reaktion mit Brom in  $\text{CHCl}_3$ <sup>13)</sup><sup>14)</sup> und die Reaktion mit Glycerindichlorhydrin und Acetylchlorid<sup>15)</sup>. Alle diese Verfahren sind aber

<sup>1)</sup> K. Dimroth, Synthesen von Modellsubstanzen der antirachitischen Vitamine. Die Chemie **55**, 80 (1942).

<sup>2)</sup> W. Huber, G. W. Ewing und J. Kriger, The Absorption Spectra of the Vitamins and Provitamins D, Am. Soc. **67**, 609 (1945).

<sup>3)</sup> H. P. Koch, The Light Absorption of Geometrical Isomerides and the Structure of Vitamin-D, Chem. and Ind. **61**, 273 (1942).

<sup>4)</sup> H. Töpelmann und W. Schuknecht, Z. Vitaminf. **4**, 111 (1935).

<sup>5)</sup> J. Wodenitscharoff, Analytische Methoden zur Vitamin D-Bestimmung, C. **1941**, II, 1642.

<sup>6)</sup> Fritz Gstirner, Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1941.

<sup>7)</sup> American Medical Association, The Vitamins, a Symposium, Chicago 1939.

<sup>8)</sup> H. R. Rosenberg, Chemistry and Physiology of the Vitamins, Interscience Publishers, Inc. New York, N. Y., 1945.

<sup>9)</sup> E. M. Shantz, Antimony Trichloride Reaction of Vitamin D, Ind. Eng. Chem., Anal. **16**, 179 (1944).

<sup>10)</sup> C. H. Nield, W. C. Russell, A. Zimmerli, The Spectrophotometric Determination of Vitamins  $\text{D}_2$  and  $\text{D}_3$ , J. Biol. Chem. **136**, 73 (1940).

<sup>11)</sup> R. Raoul und P. Meunier, C. r. **209**, 546 (1939).

<sup>12)</sup> N. A. Milas, A report on the physico-chemical Methods used for the quantitative Estimation of Vitamin D, Abstracts of Papers 100th Meeting, Amer. Chem. Soc., Sept. 1940, B. 16.

<sup>13)</sup> L. A. Rutowski, Über die Brauchbarkeit der *Tortelli-Jaffé*-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D, Biochemica **5**, 528 (1940).

<sup>14)</sup> V. L. Solianikova, Quantitative photokolorimetrische Bestimmung von Vitamin  $\text{D}_2$ , Fette u. Seifen **51**, 40 (1944).

<sup>15)</sup> A. E. Sobel, A. M. Mayer und B. Kramer, New Colorimetric Reaction of Vitamins  $\text{D}_2$  and  $\text{D}_3$  and their Provitamins, Ind. Eng. Chem., Anal. **17**, 160 (1945); A. E. Sobel und H. Werbin, Activated Glycerol Dichlorhydrin. A New Colorimetric Reagent for Vitamin A, ibidem **18**, 570 (1946).

in Gegenwart von Verunreinigungen, wie sie in jedem natürlichen Untersuchungsmaterial vorkommen, so unsicher, dass Vitamin D heute meistens noch mit dem langwierigen und umständlichen biologischen Verfahren ausgewertet wird. Ähnliche Schwierigkeiten gelten auch für die physiko-chemischen Bestimmungen von Vitamin A und von  $\beta$ -Carotin.

Die Ausarbeitung neuer oder die Verbesserung bekannter physiko-chemischer Methoden zur Bestimmung von Vitamin D ist in der letzten Zeit von verschiedenen Seiten erneut an die Hand genommen worden. *H. Schaltegger*<sup>1)</sup> beschrieb kürzlich ein Bestimmungsverfahren, welches auf der Fähigkeit verschiedener Sterine beruht, mit gewissen Aldehyden (Anisaldehyd u. a. m.) in Gegenwart von starken Säuren (Perchlorsäure), stark farbige Carbeniumsalze zu bilden. *J. B. de Witt* und *M. X. Sullivan*<sup>2)</sup> empfehlen zur Herstellung des  $\text{SbCl}_3$ -Reagenses an Stelle von  $\text{CHCl}_3$  Äthylchlorid und zur Trennung der Sterine von Vitamin A ein chromatographisches Verfahren unter Verwendung von Magnesia und Diatomeenerde als Adsorptionsmittel.

Um die Genauigkeit der  $\text{SbCl}_3$ -Bestimmungen von Vitamin B zu erhöhen, wurden verschiedene Vorschläge gemacht, z. B.: Einführung eines Korrekturfaktors bei Anwesenheit von Vitamin A und Carotinoiden, Reinigung durch Verseifung des Untersuchungsmaterials und Bestimmung des Vitamin D im Unverseifbaren, Zerstörung der Verunreinigungen im Unverseifbaren mit Maleinsäure-anhydrid, Abtrennung gewisser Verunreinigungen auf chromatographischem Wege<sup>3)4)</sup>.

Es zeigt sich aber auch, dass das  $\text{SbCl}_3$ -Reagens nicht immer gleichmässig reproduzierbare Ergebnisse gibt, wenn es nach den in der Literatur angegebenen Vorschriften hergestellt wird<sup>5)6)</sup>.

Für ein Präparat, das neben Vitamin D noch Vitamin A und  $\beta$ -Carotin enthält, bestehen theoretisch zur Bestimmung der 3 Komponenten folgende 2 Möglichkeiten: Entweder jedes der 3 Vitamine einzeln aus dem Gemisch quantitativ zu isolieren und für sich mit einer geeigneten Reaktion zu bestimmen, oder aus einem Gemisch der 3 Vitamine jede einzelne Komponente mit einer spezifischen quantitativen Reaktion zu ermitteln.

<sup>1)</sup> *Exper.* **2**, 27 (1946); *Helv.* **29**, 285 (1946).

<sup>2)</sup> *Ind. Eng. Chem., Anal.* **18**, 117 (1946).

<sup>3)</sup> *N. A. Milas, R. Heggie, J. A. Reynolds*, A spectroscopic Method for the quantitative Estimation of Vitamin D, *Ind. Eng. Chem., Anal.* **13**, 227 (1941).

<sup>4)</sup> *J. van der Vliet*, Chromatographie als Hilfsmittel bei der Vitamin D-Untersuchung, *C.* **1942**, **II**, 1353.

<sup>5)</sup> *C. H. Niell, W. C. Russell, A. Zimmerli*, The Spectrophotometric Determination of Vitamins  $\text{D}_2$  and  $\text{D}_3$ , *J. Biol. Chem.* **136**, 73 (1940).

<sup>6)</sup> *M. Lodi*, Vitamine und Hormone **4**, 401 (1943) (Vitamin A-Arbeit).

Da aber weder die Trennungsv erfahren noch die für die einzelnen Komponenten bekannten Bestimmungsmethoden diesen Anforderungen entsprechen, habe ich diese Aufgabe durch Kombination der beiden analytischen Prinzipien der praktischen Lösung zugeführt.

Zur Trennung und Reinigung wird das früher beschriebene chromatographische Verfahren<sup>1)</sup> mit genau standardisiertem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>2)</sup> benutzt. Darnach werden in einer mehrschichtigen Adsorptionskolonne aus verschieden aktivem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Vitamin A-Alkohol und Vitamin D quantitativ von Vitamin A-Ester und  $\beta$ -Carotin getrennt und gleichzeitig von störenden Verunreinigungen befreit. Die Trennung von Vitamin A-Ester und  $\beta$ -Carotin erfolgt nach vorgängiger Verseifung des Vitamin A-Esters durch abermalige Chromatographie.

Die Vitamin A-Alkohol—Vitamin D-Fraktion enthält bisweilen noch Verunreinigungen, welche die Vitamin D-Auswertung stören. Die störenden Verbindungen lassen sich durch Verseifung und abermalige Chromatographie entfernen. Enthält das Untersuchungsmaterial wenig Vitamin D und viel Lipide oder andere Verbindungen, welche stark eluierend wirken, so empfiehlt es sich, dasselbe vor der Chromatographie in Methanol zu lösen, von den bei 0° C sich abscheidenden Anteilen abzutrennen und nur den in Methanol gelösten Anteil zu verwenden.

Die Bestimmung von Vitamin A und Vitamin D erfolgt kolorimetrisch mit  $\text{SbCl}_3$  an Hand von Testkurven, die mit reinen, kristallisierten Präparaten aufgestellt worden sind. Dabei wird berücksichtigt, dass die Reaktion von Vitamin A mit  $\text{SbCl}_3$  zeit- und temperaturabhängig ist, dass die etwas träge Reaktion des Vitamin D mit  $\text{SbCl}_3$  eine Reaktionstemperatur von etwa 25° C erfordert und dass bei der Vitamin D-Auswertung mit  $\text{SbCl}_3$  ein kleiner, ganz bestimmter Anteil von eventuell anwesendem Vitamin A-Alkohol mit erfasst wird. — Grössere Mengen Vitamin A können jedoch auch spektrophotometrisch im U. V. ausgewertet werden<sup>3)</sup>.

Die Bestimmung von  $\beta$ -Carotin erfolgt durch direkte stufenphotometrische Messung<sup>3)</sup>.

Bei der Bestimmung des Vitamin D-Gehaltes von pharmazeutischen Kombinationspräparaten und Nährprodukten werden bisweilen noch Verunreinigungen mit erfasst, die innerhalb der Messzeit zu einer langsamen Extinktionszunahme der auszuwertenden Lösung führen. Diese Fehlerquelle lässt sich ausschalten, wenn bei der Bestimmung der zeitliche Verlauf der Extinktion in der im experimentellen Teil näher beschriebenen Weise berücksichtigt wird.

Der vorstehend beschriebene Analysengang ist in Figur 1 schematisch dargestellt.

<sup>1)</sup> P. B. Müller, Helv. **27**, 443 (1944).

<sup>2)</sup> P. B. Müller, Helv. **26**, 1945 (1943) und **27**, 404 (1944).

<sup>3)</sup> P. B. Müller, Helv. **27**, 443 (1944).

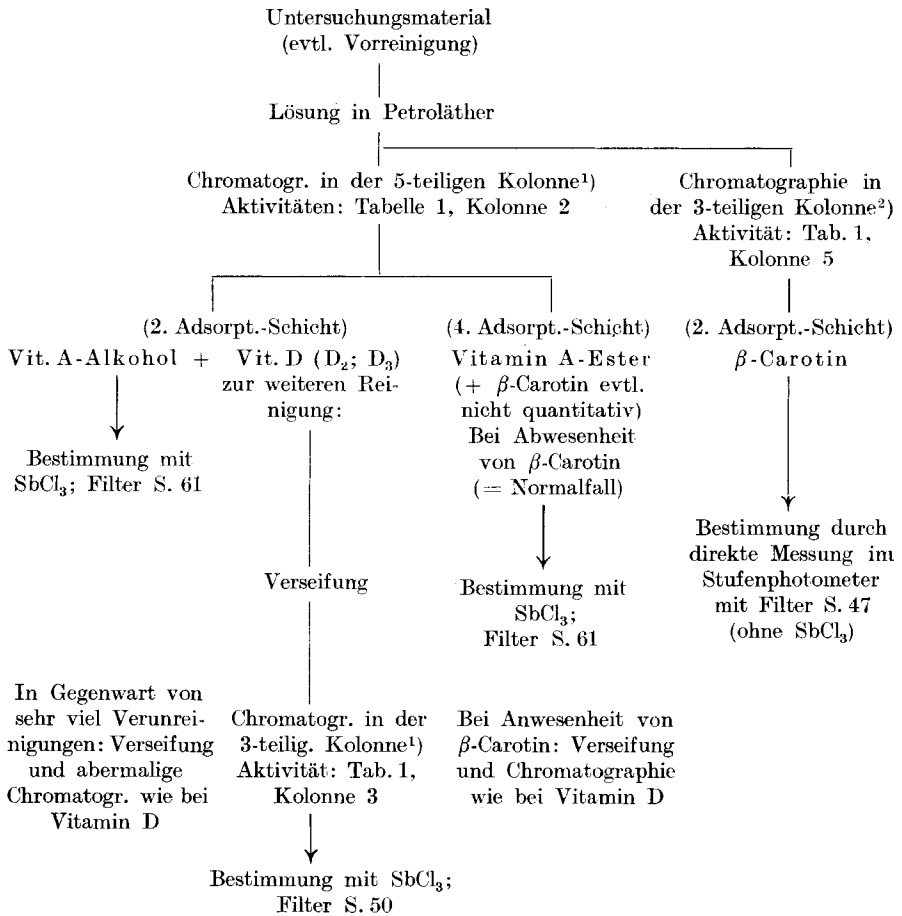


Fig. 1.

Die Trennung mehrerer Vitamine wird vorteilhaft in der 5-teiligen Adsorptionskolonne, die Reinigung eines einzelnen Anteiles in der 3-teiligen Kolonne ausgeführt. Die hierzu benötigten Aktivitätswerte der einzelnen Adsorptionsschichten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Einstellung der verschiedenen Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparate auf die zur Chromatographie benötigten Aktivitätsgrade erfolgt auf kalorimetrischem Wege<sup>3)</sup>. Sie kann aber auch empirisch mit β-Carotin, einem Vitamin A-Ester-Präparat und dem daraus durch Verseifung dargestellten Vitamin A-Alkohol vorgenommen werden. Das genaue Verfahren wird im experimentellen Teil beschrieben.

<sup>1)</sup> Entwicklung mit 350 cm<sup>3</sup> Petroläther.

<sup>2)</sup> Entwicklung mit 120 cm<sup>3</sup> Petroläther.

<sup>3)</sup> P. B. Müller, Helv. **26**, 1945 (1943) und **27**, 404 (1944).

Tabelle 1.

Adsorptions- schicht	Aktivität des $\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>1)</sup>			
	Zur Trennung von Vit. A-Alkohol bzw. Vit. D ( $\text{D}_2$ ; $\text{D}_3$ ) von Vit. A-Ester bzw. $\beta$ -Carotin Q in cal.	Zur Reinigung von		
		Vit. A-Alkohol Vit. D ( $\text{D}_2$ ; $\text{D}_3$ )  Q in cal.	Vit. A-Ester  Q in cal.	$\beta$ -Carotin  Q in cal.
$\text{Al}_2\text{O}_3$ — Merck				
Kolonne 1	2	3	4	5
1. oberste	4	4	50	50
2.	11	11	56,5	54,0
3.	50	83,5	83,5	83,5
4.	56,5			
5. unterste	83,5			
$\text{Al}_2\text{O}_3$ — Neuhausen				
1. oberste	3,5	3,5	42	42
2.	9	9	48,3	46
3.	42	70,8	70,8	70,8
4.	48,3			
5. unterste	70,8			

### Die Spezifität des Bestimmungsverfahrens.

Mit keinem bis heute bekannten physiko-chemischen Vitamin-Analysen-Verfahren gelingt es, sehr ähnliche, z. B. stereoisomere Verbindungen, in jedem Falle quantitativ zu trennen und zu bestimmen. Chemische und physiko-chemische Auswertungen von ganz unbekanntem Untersuchungsmaterialien sind daher besonders vorsichtig zu interpretieren. Dies ist vor allem dann notwendig, wenn, wie im Falle der Vitaminanalyse, nur die biologisch wirksame Verbindung interessiert.

Für  $\beta$ -Carotin ist die Möglichkeit einer Beeinflussung der Untersuchungen durch stereoisomere Verbindungen erwiesen. In Tranen und den daraus hergestellten Konzentraten, Hochkonzentraten sowie Vitamin A- und D-haltigen Pharmazeutika und Handelsprodukten wurde eine Beeinflussung der Auswertungen durch stereoisomere oder andere Verbindungen bisher nicht festgestellt.

Trotzdem ist es ratsam, physiko-chemische Vitamin A- und D-Analysen vorsichtig und kritisch auszuwerten. Jedenfalls nimmt die Sicherheit solcher Auswertungen zu, wenn mit verschiedenen Auswertungsverfahren Übereinstimmung erzielt wird. Am sichersten sind daher physiko-chemische Vitamin A-Auswertungen, wenn mittels des

<sup>1)</sup> Siehe Anmerkungen Figur 1, S. 1175.

*Carr-Price*-Verfahrens bei  $610\text{ m}\mu$  und der spektrophotometrischen Methode im U. V. bei  $328\text{ m}\mu$  übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden und wenn zugleich das chromatographische Trennungs- und Reinigungsverfahren bei der qualitativen fluorometrischen Überprüfung die typische Vitamin A-Fluoreszenz und eine normale und vollständige Abtrennung des Vitamin A von den Verunreinigungen erkennen liess. Ergeben die beiden Auswertungsverfahren unterschiedliche Werte, so ist in Betracht zu ziehen, dass jedenfalls die dem niedrigeren Wert entsprechende biologische Aktivität mit grosser Wahrscheinlichkeit vorhanden ist, dass das ausgewertete Präparat möglicherweise aber noch eine etwas höhere Wirksamkeit entfalten kann, welche auf die nicht mit erfassten Vitamin A-ähnlichen Verbindungen (Stereoisomeren) zurückzuführen ist. Mit einer grösseren biologischen Wirksamkeit als dem höheren der beiden physiko-chemischen Werte entspricht, kann jedoch kaum gerechnet werden.

Schliesslich sei noch darauf hingewiesen, dass zahlreiche Vitaminpräparate Hemmsubstanzen der  $\text{SbCl}_3$ -Reaktion enthalten. Diese werden bei der Reinigung durch Chromatographie bzw. Verseifung und Chromatographie entfernt.

## Experimenteller Teil.

### I. Reagenzien und Apparate.

Die zur chromatographischen Trennung und Reinigung benötigten Reagenzien und Apparate sowie die zur Bestimmung notwendigen Instrumente sind schon früher beschrieben worden<sup>1)</sup>. Nachfolgend werden daher lediglich die Abänderungen und Ergänzungen hierzu angeführt.

$\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparate zur Chromatographie (aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$  „Neuhausen“) mit folgenden Aktivitäten:  $Q = 3,5\text{ cal.}$ ;  $Q = 9\text{ cal.}$ ;  $Q = 42\text{ cal.}$ ;  $Q = 46\text{ cal.}$ ;  $Q = 48,3\text{ cal.}$  und  $Q = 70,8\text{ cal.}$  (= max. aktiviert).

Wenn die Einstellung der verschiedenen aktiven  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparate und des Petroläthers zur Entwicklung der Chromatogramme nicht mit der kalorimetrischen Methode<sup>2)</sup> erfolgen kann, so empfehle ich folgendes Verfahren:

Zur Chromatographie von Vitamin A-Ester können die Aktivitäten der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparate mit  $\beta$ -Carotin getestet werden. Ausgehend von maximal aktiviertem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  werden durch Zusätze von 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5% Wasser usw. verschieden stark desaktivierte  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparate hergestellt. Zu einer ersten Orientierung werden diese in ca. 5 cm hohen Schichten in das grosse Adsorptionsrohr (52 cm Höhe, 2,5 cm  $\varnothing$ ) eingefüllt, und zwar so, dass die Aktivitäten von oben nach unten zunehmen. Nun werden ca. 0,6 mg  $\beta$ -Carotin kryst. gelöst in ca. 10  $\text{cm}^3$  Petroläther auf die Kolonne gebracht und festgestellt, in welcher Schicht das  $\beta$ -Carotin bei der Entwicklung mit 350  $\text{cm}^3$  Petroläther zurückgehalten wird. Die zur Chromatographie benötigten Aktivitätsgrade der Vitamin A-Ester- und der darüber gelagerten Adsorptionsschicht werden dann so eingestellt, dass 0,6 mg  $\beta$ -Carotin bei der Chromatographie in der 3-schichtigen Kolonne (27 cm Höhe, 2,5 cm  $\varnothing$ ) nach Durchfluss von 75  $\text{cm}^3$  Petroläther eben vollständig von der obersten 9 cm langen Adsorptionsschicht in die mittlere Schicht vordringen und nach Durchfluss von 350  $\text{cm}^3$  Petroläther gerade eben beginnen von der 9 cm langen mittleren in die unterste maximal aktivierte Adsorptionsschicht überzutreten. Dieser

<sup>1)</sup> P. B. Müller, Helv. **27**, 443 (1944).

<sup>2)</sup> P. B. Müller, Helv. **26**, 1945 (1943) und **27**, 404 (1944).

Moment wird am besten an der feinen, blassgelben Zone erkannt, die sich in der 3. Adsorptionsschicht auszubilden beginnt. Eine eventuell noch verfeinerte Nacheinstellung kann nun durch 2-malige Chromatographie von einem Vitamin A-Ester-Präparat erfolgen. Bei der 2. Chromatographie von 10000—20000 i. E. Vitamin A-Ester mit 350 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel muss sich die gesamte, im U. V.<sup>1)</sup> hellgrün fluoreszierende Menge in der mittleren Adsorptionsschicht befinden. Die oberste Schicht darf in der ganzen unteren, an die mittlere Schicht angrenzenden Hälfte keine grün fluoreszierenden Anteile mehr aufweisen, und die grün fluoreszierende Zone der mittleren Adsorptionsschicht darf noch nicht in die unterste Schicht übertreten.

Zur Einstellung des Aluminiumoxyds für die Chromatographie von Vitamin A-Alkohol und Vitamin D wird zunächst eine 5000—20000 i. E. Vitamin A-Ester entsprechende Menge eines Vitamin A-Konzentrates auf Vitamin A-Ester chromatographiert, der gereinigte Vitamin A-Ester verseift und als Vitamin A-Alkohol zusammen mit dem Unverseifbaren extrahiert. Die Standardisierung der Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparate erfolgt dann mit ca. 5000 i. E. dieses Vitamin A-Alkohols chromatographisch, analog wie zuvor mit  $\beta$ -Carotin, jedoch unter der U. V.-Lampe durch Beobachtung der dunkelgrünen Fluoreszenz des Vitamin A-Alkohols.

Hierzu werden im vorhinein schon wesentlich weniger aktive Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparate benutzt. Die Aktivität der mittleren Adsorptionsschicht soll hier so eingestellt werden, dass sie nach der Entwicklung mit 350 cm<sup>3</sup> Petroläther von ca. 30000 i. E. Vitamin A-Alkohol nur ca. zur Hälfte ausgefüllt ist, damit unter denselben Bedingungen auch ca. 30000 i. E. Vitamin D noch quantitativ zurückgehalten werden. — Die Chromatographie des Vitamin D, welches sich im Chromatogramm praktisch wie Vitamin A-Alkohol verhält, erfolgt blind, da es nicht fluoresziert.

Die auf diese Weise eingestellten Aktivitätsgrade gelten nur für das verwendete Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparat und den hierzu benutzten Petroläther.

Die „Adsorptionskapazität“ von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparaten verschiedener Provenienz und sogar von solchen, die aus verschiedenen Fabrikationen ein und derselben Firma stammen, ist verschieden gross. Unter optimalen analytischen Bedingungen sollten aber von der gesamten mittleren Adsorptionsschicht 10000—30000 i. E. Vitamin A-Ester bzw. 20000 bis 30000 i. E. Vitamin A-Alkohol oder Vitamin D zurückgehalten werden.

Gereinigtes Chloroform: 1000 cm<sup>3</sup> Narkosechloroform werden nacheinander 3mal mit 500—1000 cm<sup>3</sup> Wasser, 2 mal mit 500 cm<sup>3</sup> 1-n. HCl und wieder 3mal mit Wasser ausgerührt. Zwischen den einzelnen Operationen ist die wässrige Lösung immer möglichst gut abzutrennen. Schliesslich wird mit 40 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> über Nacht oder bei nicht sofortigem Gebrauch der Lösung auch längere Zeit getrocknet. Von dem so vorgereinigten CHCl<sub>3</sub>, von dem auch grössere Vorratsmengen nach dieser Vorschrift hergestellt werden können, wird jeweils eine kleinere Vorratsmenge filtriert, destilliert und insbesondere zur Entfernung von Phosgen mit 25 g Entfärbungskohle pro 1000 cm<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub> über Nacht stehen gelassen. Spätestens 2 Stunden vor Gebrauch wird eine kleinere Menge hiervon abfiltriert und nochmals wie zuvor mit 15—20 g Kohle/1000 cm<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub> behandelt. Von dieser Lösung, die auch längere Zeit, mindestens aber 2 Stunden über Kohle stehen soll, wird jeweils die pro Tag benötigte Menge des gereinigten CHCl<sub>3</sub> abfiltriert und destilliert. (Achtung vor Feuchtigkeitsaufnahme bei der Destillation).

Regenerierung des CHCl<sub>3</sub>: Das Chloroform kann aus den verschiedenen Versuchspartien: den Versuchsansätzen, dem Reagens und den fertig bestimmten Proben wieder regeneriert werden. Hierzu werden die Abfallösungen 1 mal destilliert und das CHCl<sub>3</sub> wie zuvor mit Wasser, 1-n. HCl und wieder mit Wasser gewaschen, mit P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet und mit Entfärbungskohle behandelt. Es empfiehlt sich aber, das regenerierte CHCl<sub>3</sub> vor der Behandlung mit 1-n. HCl 6mal mit Wasser auszurühren.

Acetylchlorid: Sdp. 51° C, frisch destilliert.

<sup>1)</sup> Phyloralampe mit vorgeschaltetem Nickeloxyd-Glasfilter.

$SbCl_3$ -Reagens in  $CHCl_3$ :  $SbCl_3$  pro anal. wird in kleine Stücke zerstoßen und über  $P_2O_5$  im Vakuum getrocknet. Zur Herstellung des Reagens werden  $100\text{ cm}^3$  gereinigtes  $CHCl_3$  in einen Erlenmeyer mit Schliffstopfen gegeben,  $22\text{ g}$  ( $\pm 0,5\text{ g}$ ) des getrockneten  $SbCl_3$  hinzugegeben, der Erlenmeyer verschlossen und zur Lösung des  $SbCl_3$  leicht erwärmt. Von dieser Lösung werden  $100\text{ cm}^3$  durch ein Faltenfilter in einen  $100\text{ cm}^3$ -Messkolben filtriert und mit  $2\text{ cm}^3$  frisch destilliertem Acetylchlorid (Sdp.  $51^\circ\text{ C}$ ) versetzt und gemischt. Das Reagens ist längere Zeit haltbar<sup>1)</sup>. Für genaue Messungen, insbesondere von kleinen Mengen Vitamin D neben Vitamin A-Alkohol, empfehle ich aber, stets frisches Reagens zu verwenden.

Den Petroläther II und III<sup>2)</sup> zur Eluierung der Adsorbate verwende ich heute mit einem Zusatz von 10% absolutem Äthanol.

Der Petroläther IV<sup>2)</sup> ist entbehrlich. Er wird nur für das spektrophotometrische Auswertungsverfahren im U. V. benötigt.

Äthanolische Kalilauge zur Verseifung der Präparate: Es wird eine 5-n. äthanolische Kalilauge mit ca. 10% Wasser verwendet.

Das Hilger'sche A-Vitamer und der Quarzspektrograph für die Auswertungen im U. V. sowie das hierzu benötigte Plattenauswertungsgerät sind entbehrlich. Hingegen ist das Stufenphotometer mit folgenden Filtern auszurüsten: S. 47 (für  $\beta$ -Carotin), S. 50 (für Vitamin D) und S. 61 (für Vitamin A).

## II. Aufstellung der Standardkurven.

Die Standardkurven zur Vitamin A-Auswertung sind mit kristallisierten Vitamin A-Acetat- und -Succinat-Präparaten aufgestellt und nach Verseifung dieser Präparate mit reinem Vitamin A-Alkohol überprüft worden. Da die Vitamin A-Auswertung bei  $610\text{ m}\mu$  temperaturabhängig ist, wurde je eine Testkurve für  $20^\circ$  und für  $25^\circ\text{ C}$  aufgestellt, und zwar zur Messung der veränderlichen Reaktionslösungen bei  $610\text{ m}\mu$  und 1 cm Schichtdicke, nach genau 1 Minute. Die erhaltenen Testwerte sind in Tabelle 2 und die entsprechenden Testkurven in Fig. 2 zusammengestellt. Da für die Vitamin D-Auswertung auch noch die Vitamin A-Extinktionen bei  $500\text{ m}\mu$  nach 30 und 120 Sekunden interessieren, werden diese Werte daselbst mit angeführt.

Tabelle 2.

Zusammenstellung der Mittelwerte von  $E_{S. 61 \text{ u. S. 50}}^{1\text{ cm}}$   
von reinem, kristallisiertem Vitamin A-Alkohol und  
Vitamin A-Ester bei  $20$  und  $25^\circ\text{ C}$ .

Vitamin A- Alkohol $\gamma$	Werte von $E_{S. 61 \text{ u. S. 50}}^{1\text{ cm}}$ bei:					
	$20^\circ\text{ C}$			$25^\circ\text{ C}$		
	S. 61	S. 50		S. 61	S. 50	
	Ablesg. n. 60''	30''	120''	Ablesg. n. 60''	30''	120''
3	0,27	—	0,035	0,255	—	0,035
7,5	0,64	—	0,05	0,595	—	0,060
15	1,17	0,05	0,09	1,09	0,06	0,105
22,5	1,58	—	0,12	1,49	—	0,150
30	1,88	0,085	0,155	1,79	0,10	0,195
37,5	2,09	0,12	0,19	2,0	0,13	0,24

<sup>1)</sup> C. H. Nield, W. C. Russell, A. Zimmerli: The Spectrophotometric Determination of Vitamins  $D_2$  and  $D_3$ , J. Biol. Chem. **136**, 73 (1940).

<sup>2)</sup> P. B. Müller, Helv. 27, 443, (1944).



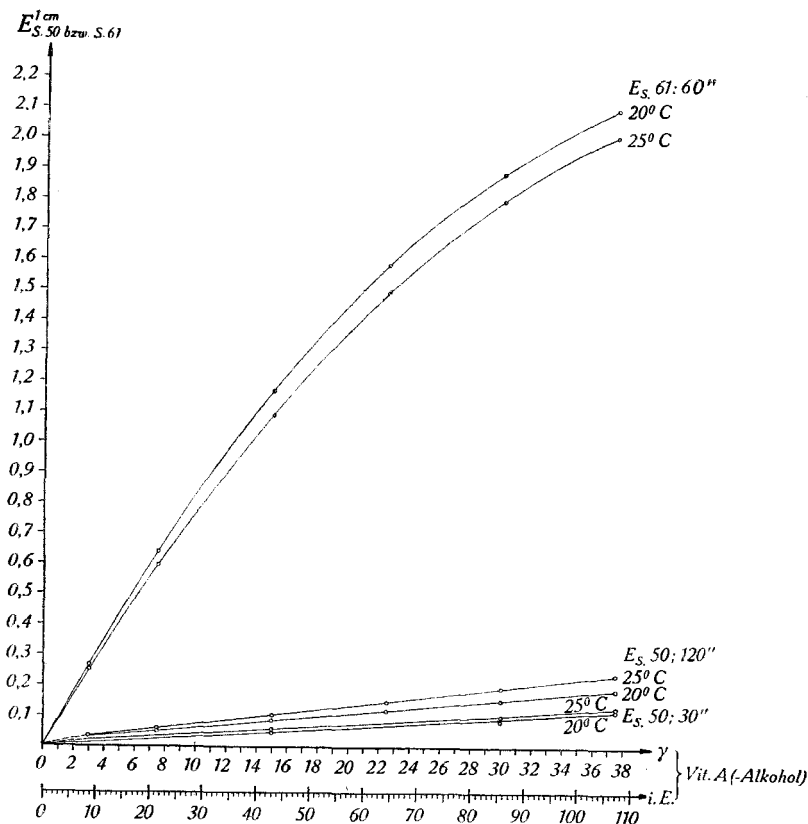


Fig. 2.

Standardkurve der  $SbCl_3$ -Reaktion mit Vitamin A  
(Ausgeführt mit 1 cm<sup>3</sup> Testlösung + 4 cm<sup>3</sup> Reagens)

Testkurven, die mit chromatographisch-spektrophotometrisch<sup>1)</sup> ausgewerteten nicht kristallisierten Vitamin A-Ester und -Alkohol-Präparaten (Trane, Konzentrate, Hochkonzentrate) aufgestellt worden sind, wiesen in ihrem Verlauf eine kleine Abweichung von diesen Standardkurven auf. Daraus muss geschlossen werden, dass die  $SbCl_3$ -Reaktion mit verschiedenen Vitamin A-Präparaten nicht ganz einheitlich verläuft oder dass gewisse Begleitstoffe, welche durch das Reinigungsverfahren nicht quantitativ abgetrennt werden konnten, die  $SbCl_3$ -Reaktion wechselnd, wenn auch nur sehr wenig, beeinflussen. Da nun zwischen der internationalen Einheit und der gewichtsmässigen Angabe von Vitamin A noch keine feste Beziehung besteht, habe ich die für den Umrechnungsfaktor 1600 aufgestellte i. E.-Skala in der Weise Fig. 2 beigegeben, dass diese Abweichungen im praktischen Auswertungsgebiet (bis zu einer Extinktion von ca. 1,5) möglichst klein sind. Die mittleren Abweichungen der nach beiden Testkurven erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

<sup>1)</sup> Umrechnungsfaktor 1600 (2. Internationaler Vitaminkongress 1934).

Tabelle 3.

Abweichungen der an Hand der Standardkurven ermittelten Ergebnisse von denjenigen, die mit den Testkurven der nicht kristallisierten Vitamin A-Präparate errechnet worden sind.

Abweichung			
bei der Messung von			%
Vitamin A		$E_{S.61}^{1\text{cm}} (20^{\circ}\text{C})$	
$\gamma$	i. E.		
1,75	5	0,16	-4,5
3,5	10	0,315	-2,5
7	20	0,60	0
14	40	1,10	+1
21	60	1,505	+1,5
28	80	1,81	+4,5
35	100	2,035	+7,5

Die Standardkurven zur Vitamin D-Auswertung sind mit verschiedenen kristallisierten Vitamin D<sub>2</sub>-Präparaten, einem Vitamin D<sub>2</sub>-3,5-dinitro-benzoessäure-ester und einem Vitamin D<sub>3</sub>-Präparat aufgestellt worden. Die Reaktion von Vitamin D mit SbCl<sub>3</sub> ist nahezu temperaturunabhängig, und die erhaltenen Färbungen sind innerhalb des Auswertungsintervalls von 30 bis 120 Sekunden praktisch konstant. Die erhaltenen Testwerte für 500 m $\mu$  und 1 cm Schichtdicke sind in Tabelle 4 zusammengestellt; die entsprechende Testkurve ist in Fig. 3 wiedergegeben.

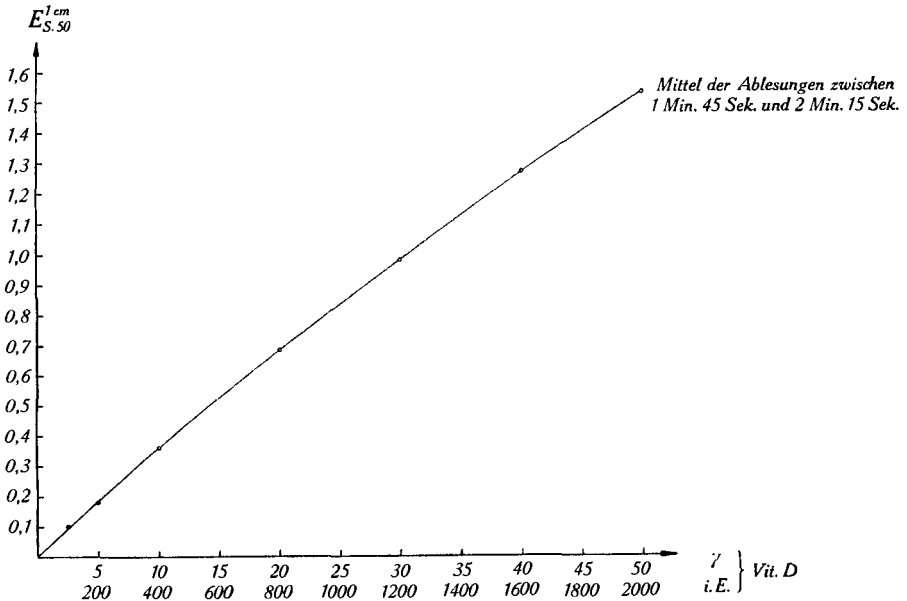


Fig. 3.

Standardkurve der SbCl<sub>3</sub>-Reaktion mit Vitamin D.

Tabelle 4.

Zusammenstellung der Mittelwerte von  $E_{S,50}^{1\text{ cm}}$  von reinen, kristallisierten Vitamin D-Präparaten.

Einwägen an Vit. D <sub>2</sub> (Calciferol)   i. E. D		Werte von $E_{S,50}^{1\text{ cm}}$ (20° C) nach 2 Min.	
2,5 γ	100	0,10	Bei 26° und 31° C und nach 30 Sekunden wurden praktisch dieselben Werte erhalten. Für Auswertungen nach 30 Sekunden ist hierzu aber eine Reaktionstemperatur von 25° C notwendig
5 γ	200	0,18	
10 γ	400	0,36	
20 γ	800	0,685	
30 γ	1200	0,985	
40 γ	1600	1,275	
50 γ	2000	1,535	

### III. Die Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und β-Carotin.

#### 1. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials.

Die nachstehenden vorbereitenden Operationen ergeben die später zur chromatographischen Trennung und Reinigung gelangende Lösung I.

a) Zur Vitamin A-Bestimmung in Ölen werden bis maximal 0,5 g, zumeist 0,1—0,2 g Material in ca. 10 cm<sup>3</sup> Petroläther zur Chromatographie gelöst.

b) Für die Vitamin D-Bestimmung in Ölen gelten dieselben Einwägen.

c) Bei sehr kleinen Vitamin D-Gehalten wird eine grössere Menge Öl (z. B. 5 g) 5mal je 1 Minute unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit ca. 4 Teilen siedendem Methanol ausgeschüttelt, nach Kühlung auf Zimmertemperatur auf ein bekanntes Volumen (z. B. 100 cm<sup>3</sup>) aufgefüllt, der Extrakt 2 Stunden im Kühlschrank bei 0—2° C stehen gelassen, kalt filtriert, das Filtrat auf Zimmertemperatur gebracht und ein aliquoter Teil davon im Vakuum unter Spülung mit absolutem N<sub>2</sub> eingedampft und mit ca. 10 cm<sup>3</sup> Petroläther zur Chromatographie aufgenommen.

d) Zur Vitamin A/D-Bestimmung in fettarmen, festen Materialien (Dragées) werden 1—5 g Untersuchungsmaterial im Mörser verrieben, 5mal je 1 Minute mit 5—7 Teilen Petroläther + 10% Äthanol durch Aufrühren und Abzentrifugieren der festen Anteile und Dekantierung des Petroläthers extrahiert, die vereinigten Extrakte 3mal mit Wasser ausgeschüttelt und, wenn notwendig, wie oben eingedampft und mit Petroläther aufgenommen. Bisweilen empfiehlt es sich, diese Extraktion nach Lösung des Untersuchungsmaterials in Wasser oder in verdünnter Sodalösung vorzunehmen.

e) Zur Vitamin A/D-Bestimmung in fettreichen, harten Materialien (Tabletten) wird eine bestimmte Menge Untersuchungsmaterial zerkleinert, mit 2 Teilen wasserfreiem Natriumsulfat homogen verrieben und 5mal je 1 Minute mit 9—10 Teilen Petroläther + 10% Äthanol extrahiert. Die Extraktion erfolgt die ersten 3 Male zweckmässig durch Ausschütteln im Schütteltrichter, Absitzenlassen und Dekantieren, die letzten 2 Male durch Aufrühren und Abzentrifugieren der festen Anteile im Zentrifugenbecher. Die vereinigten Extrakte werden wie oben eingedampft und mit ca. 10 cm<sup>3</sup> Petroläther zur Chromatographie aufgenommen oder im Falle c) zur Vitamin D-Bestimmung mit Methanol ausgezogen und weiter verfahren, wie unter c) beschrieben wurde.

## 2. Chromatographie und Verseifung des Untersuchungsmaterials.

Betreffend Herstellung und Vorbereitung der Adsorptionskolonnen, die Technik der Chromatographie und der Verseifung, die Eluierung und die Einengung der Eluate siehe frühere Mitteilung<sup>1)</sup>.

Die chromatographische Reinigung der Lösung I oder eines aliquoten Teiles davon mit maximal 20000—30000 i. E. Vitamin A-Ester, 30000 i. E. Vitamin A-Alkohol oder Vitamin D bzw. mit 0,6 mg  $\beta$ -Carotin erfolgt nach dem in Fig. 1 aufgestellten Schema und unter Verwendung der in Tabelle 1 angeführten Adsorptionskolonnen.

Zur Reinigung von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und von  $\beta$ -Carotin genügt in der Regel eine 1-malige Chromatographie. Zur Reinigung von Vitamin D ist dieses kurze Verfahren ausreichend, wenn die Präparate, wie z. B. Lebertran und dessen Konzentrate, keine störenden lipoiden Verbindungen enthalten. Im allgemeinen empfiehlt es sich aber, die Reinigung von Vitamin D-haltigem Untersuchungsmaterial durch Chromatographie, Verseifung des eluierten Adsorbates, Extraktion und abermalige Chromatographie des Unverseifbaren zu vervollständigen. Dieses Verfahren führt in der Regel zum Ziele. In den im allgemeinen Teil erwähnten Ausnahmefällen, wo aber auch dieses Verfahren noch zu keiner ausreichenden Reinigung der zur Auswertung gelangenden Lösungen führt, wird vor der Verseifung 2mal chromatographiert. In Gegenwart von viel eluierenden Anteilen wird dann bei der Chromatographie, welche der Verseifung vorausgeht, zweckmässig ein etwas aktiveres Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Präparat zur Adsorption des Vitamin D (2. Adsorptionsschicht) verwendet. Hierzu hat sich eine Mischung aus zwei Teilen 2 und einem Teil 3 der in Tabelle 1, Kolonne 2 angegebenen Adsorptionspräparate be-

<sup>1)</sup> P. B. Müller, Helv. 27, 443 (1944).

währt. In Zweifelsfällen kann die günstigste Aktivität der Adsorptionsschicht für Vitamin D, wie bei der Standardisierung der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparate beschrieben wurde, nach Zusatz von etwas Vitamin A-Alkohol unter der U. V.-Lampe festgelegt werden.

Die Entwicklung der Vitamin A- und D-Chromatogramme erfolgt mit  $350\text{ cm}^3$  Petroläther I, diejenige der  $\beta$ -Carotin-Chromatogramme mit  $120\text{ cm}^3$  Petroläther I. Die Eluierung der Vitamin A- und Vitamin D-Adsorbate wird mit  $250\text{ cm}^3$  Petroläther II, diejenige der  $\beta$ -Carotin-Adsorbate mit  $250\text{ cm}^3$  Petroläther III durchgeführt. Die Verseifung der Präparate erfolgt wie früher beschrieben<sup>1)</sup> mit 5-n. äthanolischer KOH mit ca. 10% Wassergehalt.

### 3. Bestimmung und Auswertung der gereinigten Lösungen.

Zur stufenphotometrischen Auswertung werden die zur Trockne eingedampften Eluate mit gereinigtem  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen, in ein  $25\text{ cm}^3$ -Messkölbchen übergeführt und auf  $25\text{ cm}^3$  aufgefüllt. Bei kleinen Vitamingehalten werden die Eindampfrückstände mit soviel  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen, dass in  $1\text{ cm}^3$  Lösung noch eine zur Bestimmung ausreichende Menge Vitamin enthalten ist (= Lösung II).

Die Bestimmung erfolgt mit einer so grossen Menge Lösung II, dass die Versuche, wenn immer möglich, im günstigsten Teil der Standardkurven, d. h. zwischen  $E_{S, 61}^{1\text{ cm}}$  bzw.  $50 = 0,2-1,5$  (Fig. 2 und 3) ausgewertet werden können. Diese Menge, maximal aber  $1\text{ cm}^3$  Lösung II, wird in ein  $5\text{ cm}^3$ -Messkölbchen gegeben, wenn notwendig mit  $\text{CHCl}_3$  auf  $1\text{ cm}^3$  ergänzt, das Kölbchen mit  $4\text{ cm}^3$  Reagens zur Marke aufgefüllt, 2mal geschwenkt, die Reaktionslösung in eine  $1\text{ cm}$ -Messküvette gegeben und diese sofort mit einem Glasplättchen bedeckt. Die Auswertung erfolgt nach den unten angegebenen Richtlinien.

Bei sehr kleinen Vitaminmengen wird die  $\text{SbCl}_3$ -Reaktion direkt im Eindampfkölbchen ausgeführt. Dazu wird das Kölbchen mit einem Glasschliffstopfen verschlossen, der Trockenrückstand durch Schwenken des verschlossenen Kolbens mit  $1\text{ cm}^3\text{ CHCl}_3$  aufgenommen,  $4\text{ cm}^3$  Reagens zugegeben, kurz geschwenkt und die Reaktionslösung mit einer Pipette in die  $1\text{ cm}^3$ -Messküvette gegeben.

Die Bestimmung der Extinktion der Reaktionslösung erfolgt also immer mit  $1\text{ cm}^3$  Lösung II oder einer mit  $\text{CHCl}_3$  auf  $1\text{ cm}^3$  Lösung ergänzten kleineren Menge II +  $4\text{ cm}^3$  Reagens in genau  $5\text{ cm}^3$  Gesamtlösung bei  $1\text{ cm}$  Schichtdicke mittels dem Stufenphotometer, unter Berücksichtigung der unten angegebenen Ablesungszeiten und Korrekturen.

Zur Bestimmung von Vitamin A (Alkohol und Ester) wird die Extinktion der Reaktionslösung bei  $610\text{ m}\mu$  (Filter S. 61) nach genau 60 Sekunden gemessen, die Temperatur der Reaktionslösung sofort nach der Messung auf  $1^\circ\text{ C}$  genau bestimmt und die bei  $X^\circ\text{ C}$  ermittelte Extinktion auf die nächstliegende Testbedingung ( $20^\circ$  oder  $25^\circ\text{ C}$ ) umgerechnet. Die Umrechnung erfolgt in der Weise, dass die abgelesene Extinktion um den Wert vergrössert oder verkleinert wird, der sich für den gegebenen Temperaturunterschied (von  $X^\circ\text{ C}$  und  $20^\circ$  bzw.  $25^\circ\text{ C}$ ) aus dem Extinktionsunterschied berechnen lässt, der im Bereich der ermittelten Extinktion für  $5^\circ\text{ C}$  aus den Standardkurven für  $20^\circ$  und  $25^\circ\text{ C}$  (Fig. 2) abgelesen werden kann (siehe Beispiel). Aus den Standardkurven Fig. 2 kann dann der in der vorgelegten Menge Lösung II bestimmte Vitamin A-Gehalt in  $\gamma$  oder in i. E. (Umrechnungsfaktor 1600) abgelesen werden.

<sup>1)</sup> P. B. Müller, Helv. 27, 443 (1944).

Zur Bestimmung von Vitamin D ( $D_2$  und  $D_3$ ) wird die Extinktion der mindestens  $20^\circ\text{C}$  warmen Reaktionslösung bei  $500\text{ m}\mu$  (Filter S. 50) nach 2 Minuten gemessen. Lösungen, deren Extinktion nach der 30. Sekunde laufend zunimmt, werden bei min.  $25^\circ\text{C}$  nach genau 30 und 60 Sekunden gemessen und der Extinktionszuwachs zwischen der 30. und 60. Sekunde von dem nach 30 Sekunden ermittelten Wert in Abzug gebracht. Aus der Standardkurve Fig. 3 kann dann der in der vorgelegten Menge Lösung II bestimmte Vitamin D-Gehalt in  $\gamma$  oder in i. E. abgelesen werden.

Zur Bestimmung von Vitamin D neben Vitamin A (-Alkohol) wird die Extinktion der Reaktionslösung bei  $610\text{ m}\mu$  nach 60 Sekunden und diejenige bei  $500\text{ m}\mu$  nach 120 Sekunden gemessen, oder, wenn notwendig, das Vitamin D wie zuvor bei  $25^\circ\text{C}$  nach 30 und 60 Sekunden und Vitamin A zwischen der 60. und 70. Sekunde oder in einer 2. Probe nach 60 Sekunden bestimmt und die Temperatur der Reaktionslösung nach beendeter Messung ermittelt.

Zur Auswertung der Messung wird zunächst der Vitamin A-Gehalt wie zuvor ermittelt und die darauf zurückzuführende Extinktion bei  $500\text{ m}\mu$  aus der den Messbedingungen am nächsten liegenden Standardkurve für  $20$  oder  $25^\circ\text{C}$  abgelesen. Nach der Umrechnung (analog wie beim Vitamin A), in diesem Falle aber auf die Versuchstemperatur  $X^\circ\text{C}$ , wird der errechnete, dem Vitamin A zukommende Extinktionswert von der Gesamtextinktion der Vitamin D-Bestimmung abgezogen (siehe Beispiel). Die Ermittlung des Vitamin D-Gehaltes erfolgt dann, eventuell nach Berücksichtigung des Extinktionsganges der Reaktionslösung, wie zuvor, an Hand der Vitamin D-Standardkurve Fig. 3 (siehe oben).

Die Bestimmung von  $\beta$ -Carotin, dessen Lösungen nach der 1. chromatographischen Reinigung auf Grund der Gelbfärbung im Stufenphotometer mit dem Filter S. 47 ausgewertet werden, erfolgt wie früher<sup>1)</sup> beschrieben wurde.

Zur Bestimmung von  $\beta$ -Carotin und von Vitamin A-Ester nebeneinander werden die Anteile durch Verseifung und anschließende Chromatographie getrennt und dann einzeln bestimmt, wie oben angegeben wird.

#### 4. Fehlerbreite und Erfassbarkeitsgrenze der Methode.

Die Fehlerbreite bzw. Genauigkeit der Bestimmungen beträgt  $\pm 10\%$ , wenn man die vom verwendeten  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparat abhängigen Versuchsverluste bei der Auswertung einkalkuliert und wenn berücksichtigt wird, dass die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Mischungen zur Chromatographie von Vitamin A-Alkohol und Vitamin D nicht älter als 2 Tage sein dürfen. Die Versuchsverluste sind für ein gegebenes  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Präparat einmal experimentell zu bestimmen.

Im gegebenen Falle betragen sie:

##### $\text{Al}_2\text{O}_3$ —Neuhausen (1. Sendung).

Vitamin A-Alkohol-Bestimmung	= 10% pro Chromatogramm
Vitamin A-Ester-Bestimmung	= 10% pro Chromatogramm
dito Bestimmung durch Verseifung und Chromatographie auf Vitamin A-Alkohol	= 10% pro Chromatogramm
Vitamin D-Bestimmung <sup>2)</sup>	= 5% pro Chromatogramm
dito Bestimmung durch Chromatographie, Verseifung und Chromatographie	= 10% pro Chromatogramm
$\beta$ -Carotin	

<sup>1)</sup> P. B. Müller, Helv. 27, 443 (1944).

<sup>2)</sup> In Gegenwart von Verunreinigungen, welche zu einer laufenden Extinktionszunahme der Lösung zwischen der 30. und 120. Sekunde führen, ist die Genauigkeit etwas kleiner. Bei kleinen Vitamin D-Gehalten ist mit einer Streuung von  $\pm 50$  i. E. zu rechnen.

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>—Neuhausen.

	Chromatographie in der	
	Vit. A-Ester-Kolonne	spez. β-Carotin-Kolonne
1-malige Chromatographie von 10 γ	40—50%	40—50%
50 γ	35%	35%
100 γ	35%	35%
300 γ	20%	20%
600 γ	20%	20%
2-malige Chromatographie mit Verseifung von 600 γ	40%	40%

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> — Merck.

1-malige Chromatographie von 6 γ: Verlust = 20%  
 von 60 γ: Verlust = 10%  
 von 300 γ: Verlust = 5%

Diese Verluste sind auf mindestens ± 5% genau reproduzierbar.

## IV. Beispiele.

## Vitamin A-Ester-Bestimmung (Normalfall).

Reinigung: 1-malige Chromatographie.

Einwage: 1 g Öl pro 50 cm<sup>3</sup> Petroläther (I).

Chromatographiert: 5 cm<sup>3</sup> I = 100 mg Öl. Diese werden nach dem Einengen auf 25 cm<sup>3</sup> aufgefüllt (II).

Bestimmung von 1 cm<sup>3</sup> II (4 mg Öl) mit 4 cm<sup>3</sup> Reagens im Stufo bei 22<sup>o</sup> C:

$$E_{S,61}^{1\text{ cm}} (22^{\circ} \text{ C}) = 0,66.$$

Auswertung:

$$E_{S,61}^{1\text{ cm}} \text{ bei } 22^{\circ} \text{ C} = 0,66$$

$$E_{S,61}^{1\text{ cm}} \text{ bei } 20^{\circ} \text{ C} = 0,66 + \frac{0,05 \times 2}{5} = 0,66 + 0,02 = \mathbf{0,68},$$

Aus der Standardkurve Fig. 2 ermittelte Vitamin A-Menge = 8 γ bzw. 23 i. E. A pro 4 mg entspr. 2000 γ bzw. 5750 i. E. A/g = 90% erfasstes Vitamin A.

Vitamin A-Ester-Gehalt (100%) = **2220 γ/g bzw. 6400 i. E. A/g.**

Vitamin D-Bestimmung in Gegenwart von Vitamin A-Alkohol und nicht abtrennbaren Verunreinigungen (seltener, komplizierter Fall).

Reinigung: Chromatographie, Verseifung, Chromatographie.

Einwage und Chromatographie: Wie oben.

Bestimmung von 1 cm<sup>3</sup> II (= 4 mg Öl) mit 4 cm<sup>3</sup> Reagens im Stufenphotometer bei 27<sup>o</sup> C:

$$E_{S,61}^{1\text{ cm}} (27^{\circ} \text{ C}) = \frac{\text{Ablesung nach } 60''\text{—}70''}{0,61}$$

$$E_{S,50}^{1\text{ cm}} (27^{\circ} \text{ C}) = \text{Ablesung nach:}$$

30''	60''
0,63	0,68

Auswertung.

„Extinktionsgang“ zwischen der 30. und 60. Sekunde:

$$\Delta E_{S,50}^{1\text{ cm}} 27^{\circ} \text{ C} (60'' - 30'') = 0,68 - 0,63 = \mathbf{0,05}.$$

Tabelle 5.

Zusammenstellung der Analyseergebnisse von 3 Untersuchungen.

Reinigungsverfahren	Ergebnisse in i. E./g			
	chromatographisch-spektrophotometrisches Verfahren		chromatograph.-stufenphotometr. Verfahren	
	Vitamin A <sup>1)</sup>	Vitamin D	Vit. A <sup>1)</sup>	Vit. D
Präparat 1. Sollgehalt: Vit. A = 60 000 — 70 000 i. E./g, Vit. D = 15 000 i. E./g				
Nicht gereinigt, direkt bestimmt	115 000	(4 000 000) <sup>2)</sup>	97 000	420 000
1mal chromatographiert:				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	4 340	(70 000) <sup>2)</sup>	1 760	47 700
Vitamin A-Ester . . . . .	66 600	—	67 000	—
Chromatograph. — verseift — chromatographiert:				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	1 735	(54 200) <sup>2)</sup>	1 780	15 200
Vitamin A-Ester . . . . .	62 400	—	64 000	—
Präparat 2. Sollgehalt unbekannt (gelagertes Präparat):				
Nicht gereinigt, direkt bestimmt	1 390	(130 000) <sup>2)</sup>	356 <sup>3)</sup>	16 200
1mal chromatographiert:				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	nicht bestimmbar	(12 300) <sup>2)</sup>	22	1 720
Vitamin A-Ester . . . . .	675	—	330 <sup>3)</sup>	—
Chromatograph. — verseift — chromatographiert:				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	nicht bestimmbar	1 620	4	950
Vitamin A-Ester . . . . .	625	—	655	—
Präparat 3. Sollgehalt: Vit. A = 2 000 i. E./g; Vit. D = 500 i. E./g:				
Nicht gereinigt, direkt bestimmt	nicht bestimmbar		1 400 <sup>3)</sup>	6 500
a) Vorreinigung mit Methanol, Chromatograph. — verseift — chromatographiert:				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	nicht bestimmbar		13	480
dito 2mal chromatographiert vor der Verseifung				
Vit. A-Alkohol/Vitamin D . . . . .	nicht bestimmbar		13	505
b) Direkt chromatographiert				
1mal chromatographiert:				
Vitamin A-Ester . . . . .	—		2 040	—
Chromatograph. — verseift — chromatographiert:				
Vitamin A-Ester . . . . .	—		1 990	—

1) Umrechnungsfaktor = 1600.

2) Nur zu Demonstrationszwecken berechnet. Die diesen Werten zugrunde liegenden Absorptionsspektren lassen deutliche Mengen von Verunreinigungen erkennen.

3) Hemmsubstanzen der SbCl<sub>3</sub>-Reaktion zugegen.



Um diesen approximativen Extinktionswert ist die Messung der Vitamin A/D-Lösung nach 30 Sekunden zufolge der mit erfassten Verunreinigungen zu hoch ausgefallen.

$$E_{S,50}^{1\text{ cm}} (27^{\circ} \text{ C } 30'') \text{ für die reine Vitamin A/D-Lösung} = 0,63 - 0,05 = \mathbf{0,58}.$$

Die mit erfasste Menge Vitamin A-Alkohol wird wie oben ermittelt ( $= 8 \gamma$ ) und der darauf zurückzuführende Extinktionswert bei  $500 \mu\mu$ ,  $25^{\circ} \text{ C}$  und nach 30 Sekunden wird aus Fig. 2 abgelesen. Er beträgt:

$$E_{S,50}^{1\text{ cm}} (25^{\circ} \text{ C}, 30'') = 0,025,$$

und weist bei der Versuchstemperatur von  $27^{\circ} \text{ C}$  folgenden Wert auf:

$$E_{S,50}^{1\text{ cm}} (27^{\circ} \text{ C}, 30'') = 0,025 + \frac{0,01 \times 2}{5} = 0,025 + 0,004 = \mathbf{0,03^1}.$$

Der dem reinen Vitamin D zukommende Extinktionswert beträgt daher:

$$E_{S,50}^{1\text{ cm}} = 0,58 - 0,03 = \mathbf{0,55}.$$

Aus der Standardkurve Fig. 3 ermittelter Vitamin D-Gehalt  $= 15,75 \gamma$  bzw.  $630 \text{ i. E. D/4 mg}$  entspr.  $3938 \gamma$  bzw.  $157500 \text{ i. E. D/g}$   $= 90\%$  erfasstes Vitamin D.

$$\text{Vitamin D-Gehalt (100\%)} = \mathbf{437 \text{ mg/g bzw. 175 000 i. E. D/g.}}$$

Auf die Wiedergabe des weitläufigen Versuchsprotokolles wird verzichtet. Hingegen werden zur Demonstration der Wirksamkeit des Reinigungsverfahrens und der Spezifität der Methode nachfolgend noch 3 Untersuchungen angeführt, und zwar: 1. Eine Untersuchung eines Vitamin A/D-Konzentrates; 2. eine Untersuchung eines Lebertrans und 3. eine Untersuchung eines Vitamin-Kombinationspräparates auf der Basis von Fett und Trockenmilch.

Die Auswertung der 3 Untersuchungen erfolgte sowohl nach dem stufenphotometrischen Verfahren als auch nach der früher beschriebenen spektrophotometrischen Methode<sup>2</sup>).

Präparat 1 stellt den Normalfall dar, Präparat 2 enthält einen Hemmstoff der  $\text{SbCl}_3$ -Reaktion; bereitet im übrigen aber keine Schwierigkeiten bei der Bestimmung<sup>3</sup>); Präparat 3 stellt den typisch komplizierten Fall dar, der durch Kombination aller Möglichkeiten anzugehen ist.

#### Anhang.

In der letzten Zeit wurde das Vitamin A-Auswertungsverfahren mit Glycerindichlorhydrin und Acetylchlorid in der Literatur öfters erwähnt. Die Überprüfung dieses Verfahrens hat im wesentlichen folgendes ergeben:

1. Das Glycerin-dichlorhydrin-Reagens reagiert wie das  $\text{SbCl}_3$ -Reagens häufig mit verschiedenen Beimengungen der Vitamin A-Präparate. Die Spezifität beider Farbreaktionen ist ungefähr gleich gross. In beiden Fällen ist eine Reinigung des Untersuchungsmaterials unumgänglich notwendig.

2. Der Vorteil des neuen Reagens liegt in der relativ guten Beständigkeit der Farbreaktion zwischen der 3. und 10. Minute (im Dunkeln!) und in der geringeren Empfind-

<sup>1</sup>) Für die Praxis sind die Ablesungs- und Berechnungs-Genauigkeiten auf  $\pm 0,01$  vollständig ausreichend. Bei kleineren Vitamin A-Gehalten erübrigt sich daher diese Berechnung.

<sup>2</sup>) P. B. Müller, Helv. **27**, 443 (1944).

<sup>3</sup>) Der einzige Fall von vielen hundert Analysen, der nach der Chromatographie noch einen Hemmungsfaktor der  $\text{SbCl}_3$ -Reaktion aufwies; er ist aber nicht reproduziert worden.

lichkeit auf kleinere Temperaturschwankungen. Zwischen  $+15^{\circ}$  und  $+30^{\circ}$  C tritt für je  $1^{\circ}$  C Temperaturerhöhung eine Extinktionszunahme von ca. 0,5% ein.

Hingegen tritt bei starker Belichtung der Reaktionslösung oder bei längerem Ablesen im Stufenphotometer eine deutlich wahrnehmbare Verblässung der Färbung ein.

3. Der Nachteil des Glycerin-dichlorhydrin-Reagens liegt in der geringeren Empfindlichkeit: Die Farbreaktion mit Vitamin A ist nur ca.  $\frac{1}{3}$  so stark wie die von Vitamin A und  $\text{SbCl}_3$ . Dadurch fällt der Ablesefehler der stufenphotometrischen Messungen ausserordentlich stark ins Gewicht (siehe Fig. 4). Genügend genaue Messungen sind nur mit Mikroküvetten möglich. Die mit 5 cm-Mikroküvetten aufgestellte Standardkurve zur Vitamin A-Auswertung mit  $1 \text{ cm}^3$  Testlösung +  $4 \text{ cm}^3$  Glycerin-dichlorhydrin (wie oben für die Auswertung mit  $\text{SbCl}_3$  beschrieben wurde) bei  $550 \text{ m}\mu$  und 5 cm Schichtdicke zwischen der 3. und 10. Minute und bei  $20^{\circ}$  C wird durch Fig. 5 dargestellt. Für Messtemperaturen zwischen  $+15^{\circ}$  und  $+30^{\circ}$  C sollte der Temperatureinfluss auf Grund der Angabe unter 2. berücksichtigt werden. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Reaktionslösungen sind diese bis zur Messung bei gedämpftem Licht oder im Dunkeln stehen zu lassen. Die Messung hat so rasch als möglich, mindestens aber innerhalb 30 Sekunden zu erfolgen.

Besondere Aufmerksamkeit bedarf die Herstellung des Reagenses, da leicht zu wenig aktive Präparate erhalten werden. Die Wirksamkeit ist in jedem Falle zu kontrollieren.

Zur Vitamin D-Auswertung ist das Glycerin-dichlorhydrin-Reagens wegen der zu geringen Empfindlichkeit nicht geeignet.

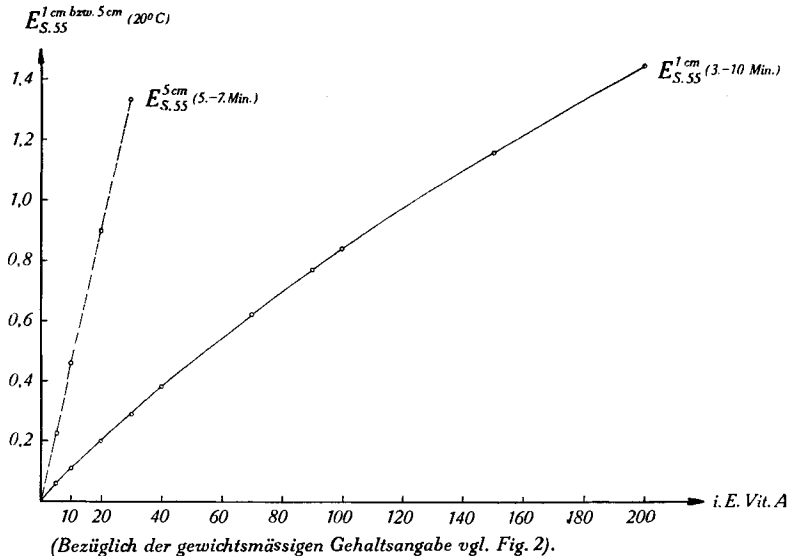


Fig. 4.

Standardkurve der Glycerin-dichlorhydrin-Reaktion mit Vitamin A.

Aufgestellt mit  $4 \text{ cm}^3$  Reagens +  $1 \text{ cm}^3$  Testlösung eines stufenphotometrisch mit  $\text{SbCl}_3$  u. spektrophotometrisch im U. V. (Umrechnungsfaktor 1600) getesteten natürlichen Vit. A-Ester-Hochkonzentrates (800 000 i. E./g).

(Temperatureinfluss: Extinktionszunahme = 0,5%/1 $^{\circ}$  Temperaturerhöhung.)

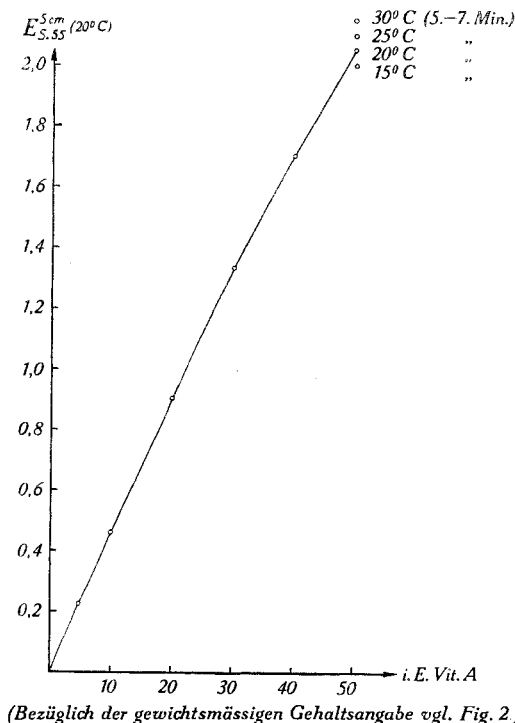


Fig. 5.

Standardkurve der Glycerin-dichlorhydrin-Reaktion mit Vitamin A.  
Ausführung siehe Figur 4.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der  
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

### 154. Action de la soude caustique sur la cellulose en atmosphère exempte d'oxygène

par A. Banderet et B. Rånby.

(17 VI 47)

#### I.

#### Introduction

On admet actuellement que la cellulose est constituée par des groupes anhydro- $\beta$ -glucose liés en 1,4 par des ponts semicyclo-acétaliques. Par ailleurs on sait que, de ces chaînons glucose, un certain nombre peuvent être modifiés; en particulier le groupe alcool primaire en 6 peut être oxydé.