

Methode zur Bestimmung des Phytolgehaltes von Pflanzen*

Von

O. Hromatka, W. Bröll und L. Stentzel

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 5. Oktober 1957)

Die quantitative Methode der Phytolbestimmung durch Bildung des orangeroten Urethans mittels 4-Benzolazophenylisocyanat und die chromatographische Trennung sowie Kolorimetrierung desselben läßt sich nicht ohne weiteres auf den unverseifbaren Anteil der Pflanzenlipide übertragen. Es gelang aber, durch Einschaltung zweier Vorreinigungen, nämlich durch chromatographische Aufteilung der unverseifbaren Lipide und durch Hochvakuumdestillation der phytolhaltigen Fraktion, eine annähernd quantitative Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

Besondere Schwierigkeiten bereitete es bei der Ausarbeitung der Methode, einen bis 230° im Hochvakuum nicht siedenden Anteil auszuschalten, der ebenfalls ein gefärbtes Urethan mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat liefert. Dieser Anteil, der im Blattextrakt von *Aesculus hippocastanum* in größerer Menge zugegen ist als Phytol, wurde einigen Vorversuchen unterzogen.

In einer früheren Mitteilung¹ wurde über Methoden berichtet, die gestatten, den Gehalt von reinem Phytol im Rohphytol quantitativ zu bestimmen. Die Säulenchromatographie des gefärbten, aus Phytol mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat gebildeten Urethans schien uns auch die Möglichkeit zu bieten, das Phytol von den zahlreichen Begleitstoffen abzutrennen, die aus verseiften Pflanzenextrakten als unverseifbarer Lipidanteil gewonnen werden. Es war unsere Absicht, eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Phytols in Pflanzen zu entwickeln, da eine solche unseres Wissens bisher in der Literatur nicht beschrieben

* Über die vorliegende Arbeit wurde in den Dissertationen an der Philosophischen Fakultät der Universität Wien von L. Stentzel (1954) und W. Bröll (1954) berichtet.

¹ O. Hromatka und L. Stentzel, Mh. Chem. 89, 54 (1958).

ist. Man ging vielmehr immer von der Meinung aus, daß Phytol ausschließlich im Ester Chlorophyll vorliegt und man daher aus der Chlorophyllbestimmung auch auf die Phytolmenge rückschließen kann. So bemerkte beispielsweise *R. Kuhn*² in der Fußnote einer Untersuchung über Lycopin, daß das Vorkommen von Phytol in freier Form oder in einer von der Esterbestimmung im Chlorophyll verschiedenen Bindungsform noch nicht beschrieben worden sei.

Dies ist an sich erstaunlich, denn das Phytol wird in der Pflanze völlig unabhängig gebildet und erst in einer späteren Stufe mit Mg-Vinylphaeoporphyrin- α_5 zu Protochlorophyll verestert³. Aus Versuchen und Verfahren zur präparativen oder technischen Gewinnung des Phytols aus grünen Pflanzen, soweit darüber überhaupt Literaturangaben vorliegen, kann man auch nicht auf die Gesamtmenge des Phytols in der Pflanze schließen. Die erste Gewinnungsmethode⁴ ging über das Phaeophytin, schloß also frei oder in anderer Bindungsart vorliegendes Phytol prinzipiell aus. Andere, zum Teil technisch angewendete Methoden spalten zwar die Esterbindung, sei es durch Chlorophyllase in der frischen Pflanze oder durch Alkalien in Pflanzenextrakten und isolieren das Phytol mittels seiner Löslichkeit in Lipoidlösungsmitteln und nachfolgender Destillation im Vakuum^{5, 6, 7}. Sie bieten aber keine Gewähr, daß alles Phytol unverändert gewonnen wird und das Endprodukt rein ist.

Eine quantitative Bestimmungsmethode für alles in der Pflanze im Chlorophyll oder in anderer Form vorliegende Phytol wird gestatten, die günstigsten Rohstoffe auszuwählen und die Ausbeute bei den technischen Gewinnungsmethoden zu beurteilen. Sie wird aber auch eine Antwort auf die Frage nach der Veränderung des Phytolgehaltes im Laufe der jährlichen Vegetationsperiode, besonders bei der herbstlichen Laubverfärbung, und nach dem Phytolgehalt etiolierter Pflanzen ermöglichen.

Für die Ausarbeitung der Methode zogen wir die Blätter der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum*) heran, für die ein verhältnismäßig sehr hoher Chlorophyllgehalt von 9 bis 10 g/kg Trockenblatt in der Literatur verzeichnet wird, und die darüber hinaus den Vorteil bieten, daß man das Versuchsmaterial weitgehend vom selben Baum gewinnen kann. Es wurden jeweils größere Mengen gesammelt, sofort bei 70° getrocknet, zerkleinert, durch ein feinmaschiges Drahtnetz gesiebt und mit 96proz. Alkohol im *Soxhlet*-Apparat unter öfterem Wechsel der

² *R. Kuhn* und *Ch. Grundmann*, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1880 (1932).

³ Siehe Referat *W. Siedel*, Angew. Chem. **66**, 735 (1954).

⁴ *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, Ann. Chem. **354**, 215, 240 (1907).

⁵ *M. E. Wall*, Ind. Eng. Chem. **41**, 1465 (1949); U. S. Patent 2537 602, 31. Okt. 1950.

⁶ *A. A. Svishchik* und *B. G. Savinov*, Chem. Abstr. **1957**, 4653 c.

⁷ *J. Berka*, *R. Pek* und *S. Vybiral*, Chem. Abstr. **1957**, 7662 f.

Vorlage *erschöpfend* extrahiert. Da es nur auf die quantitative Erfassung des in beliebiger Bindungsform vorliegenden Phytols, nicht aber auf die Vermeidung von Umesterungen ankam, konnte siedender Alkohol ohne Bedenken verwendet werden. Der eingeengte Extrakt wurde mit soviel 50proz. Natronlauge versetzt, daß eine n-NaOH resultierte, 3 Stdn. unter Rückfluß verseift, mit Wasser verdünnt und mit Petroläther vom Sdp. 35 bis 50° erschöpfend extrahiert. Der Rückstand der Petrolätherlösung, als unverseifbare Lipoide (u. L.) bezeichnet, betrug bei dem Versuch, der das Ausgangsmaterial für die meisten der in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen bildete, 23,9 g und wurde aus 750 g trockenen Blättern gewonnen. Selbstverständlich genügt es für die Einzelbestimmung, 20 bis 30 g getrocknete Blätter zu extrahieren; denn wir entwickelten die Methode, indem wir 23,9 g u. L. im 100-ml-Meßkolben in Benzol lösten und für den Einzelversuch nur 3 ml = 0,7177 g u. L. verwendeten.

Anfangs wurde versucht, die u. L. ohne vorherige Auftrennung mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat umzusetzen. Die beim Chromatographieren auf Al_2O_3 -Säulen und Entwickeln mit Petroläther-Äther-Mischungen erhaltenen 5 Farbzonen zeigten keine scharfe Trennung von den farblosen Zwischenzonen. Die Anwendung anderer Lösungsmittel oder anderer Adsorptionsmittel (CaCO_3 , CaO, MgO) war noch ungünstiger. Als brauchbarster Weg erwies sich die Anwendung einer Al_2O_3 -Säule von 1 cm \varnothing , aber einer Länge von 80 cm. Es wurde mit der Petroläther-Äthermischung 3:1 entwickelt, aber auf ein Durchlaufchromatogramm verzichtet, vielmehr die einzelnen Zonen mit der Spatel getrennt und mit Methanol-Äther eluiert. Die 4. Farbzone (von oben) enthielt das gefärbte Urethan des Phytols, wie durch Mischchromatographie mit der reinen Verbindung festgestellt wurde.

Trotz nochmaliger chromatographischer Trennung gab das aus den unverseifbaren Lipoiden gewonnene Urethan falsche Analysenwerte (im Mittel C 80,36%, H 9,93%, N 5,53% gegenüber den berechneten Werten von C 76,25%, H 9,50%, N 8,08%). Die kolorimetrische Bestimmung führte zu dem unwahrscheinlich hohen Mittelwert von 1,03% Phytol im trockenen Blatt. Wir mußten also schließen, daß die Trennungsmethode nicht genügend und das Phytylurethan mit anderen, vermutlich ebenfalls gefärbten Verbindungen verunreinigt ist.

Daher wurden die unverseifbaren Lipoide vor der Umsetzung mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat in Petrolätherlösung auf Al_2O_3 einer Vorchromatographie unterworfen. Auf der Säule entstanden von oben beginnend folgende Zonen, die getrennt eluiert wurden: a) Eine nicht und eine langsam wandernde gelbe Zone, zusammen 22,6% der eingesetzten u. L., b) eine breite farblose Zone, 51,5% der u. L., c) eine schnell wandernde gelbe Zone, 25,6% der u. L. Daß das Phytol in Zone b enthalten

war, stellten wir dadurch fest, daß wir in einem Versuch vor dem Chromatographieren 0,5635 g 82proz. Phytol den 3 ml der u. L.-Lösung zusetzten und den Mehrgehalt an Phytol in Zone b quantitativ wieder fanden.

Das Eluat der Zone b wurde daher mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat umgesetzt und in üblicher Weise chromatographisch getrennt. Die im Durchlaufchromatogramm gewonnene orange gefärbte Substanz erwies sich zwar im Mischchromatogramm als identisch mit Phytylurethan, gab aber noch falsche Analysen, nämlich im Mittel C 80,76%, H 9,88%, N 5,60%. Aus der Kolorimetrie hätte man auf 0,93% Phytol im trockenen Blatt zu schließen. Auch die Vorchromatographierung der u. L. brachte also keine Abtrennung des Phytols.

Als nächster Schritt wurde eine Vorreinigung der u. L. durch Methanol untersucht. Die u. L. aus 3 ml Benzollösung wurden mit 25 ml siedendem Methanol behandelt, im Eisschrank gekühlt und eine gallertige, farblose Substanz durch Zentrifugieren abgetrennt. Das Methanol enthielt noch 62,6% der u. L., die in üblicher Weise mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat umgesetzt und chromatographiert wurden. Die Zone des Phytylurethans gab eine Substanz, deren Analysenwerte zwar besser stimmten (im Mittel C 78,90%, H 9,44%, N 6,44%), die kolorimetrisch bestimmten Phytolwerte lagen aber in Parallelversuchen zwischen 0,66 und 0,87% der Blatt-Trockensubstanz. Die Methode der Methanoltrennung ließ sich also nicht gleichmäßig durchführen und war unbrauchbar. Auch durch Kombination der Methanoltrennung und der Vorchromatographierung konnten keine besseren Resultate erreicht werden.

Wir mußten daher doch die Destillation der u. L. im Vakuum zur Reinigung heranziehen. Im Hochvakuum destillierte aus einem Kugelrohr ab 120° Luftbadtemperatur anfangs hochprozentiges Phytol, ab zirka 135 bis 155° neben Phytol auch wachsartig erstarrende Produkte. Aus den Destillaten konnte in jedem Falle mittels 4-Benzolazo-phenylisocyanat in üblicher Bestimmungsmethode reines Phytylurethan mit stimmenden Analysen (im Mittel N 8,17%) gewonnen werden. Der in Parallelversuchen bestimmte Phytolgehalt der trockenen Blätter gab aber sehr starke Streuungen. Es zeigte sich nämlich, daß es nicht möglich war, das Phytol gleichmäßig und quantitativ aus den sich bei der Destillation bereits zersetzenden Begleitstoffen abzudestillieren.

Daher kombinierten wir die bereits oben besprochene chromatographische Vortrennung der u. L. auf der Al_2O_3 -Säule, bei der die Abscheidung der phytolhaltigen Schicht b von zirka 50% teils gefärbten, in der Hitze unbeständigen Verbindungen möglich ist, mit der anschließenden Hochvakuumdestillation des Eluates b. Jetzt enthielt das im Hochvakuum bei der Luftbadtemperatur von 110 bis 150° übergehende, leicht

bewegliche Öl alles Phytol. Eine zweite, von 160 bis 190° Luftbadtemperatur übergehende ölige, später wachsartig erstarrende Fraktion war phytolfrei. Als Rückstand blieb ein zähes, nicht kristallisierendes Öl.

Wurde Fraktion 1 in üblicher Weise mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat umgesetzt und chromatographiert, so wurde ein Phytylurethan mit stimmenden Analysenwerten erhalten (im Mittel C 76,16%, H 10,02%, N 7,80%). Die kolorimetrische Bestimmung des gefärbten Urethans gab wenig streuende Werte von im Mittel 0,31% Phytol in der Blatt-Trockensubstanz. Dies entspricht einem Chlorophyllgehalt von zirka 1% und zeigt also, daß in grünen Blättern der Roßkastanie mindestens keine großen Mengen Phytol außerhalb der Chlorophyllkomponente enthalten sind.

Die Methode zur Phytolbestimmung in Pflanzen ist also nach den vorher besprochenen Untersuchungen nur durch Kombination einer Anzahl von Verfahrensschritten möglich.

1. Schonende Trocknung des Pflanzenmaterials.

Dabei tritt kein Verlust an Phytol ein. Da mit Alkohol extrahiert wird, kann die Trocknung auch unterbleiben, wenn man frische Pflanzen verarbeiten will.

2. Erschöpfende Extraktion des fein zerkleinerten Pflanzenmaterials mit 96proz. Alkohol und Konzentration der Extrakte.

Freies Phytol und Phytol in Esterform wird hier quantitativ in Lösung gehen.

3. Verseifung des eingeeengten alkoholischen Extraktes mit n-NaOH.

Bei dieser Stufe werden die Ester quantitativ gespalten und es sind keine Phytolverluste zu erwarten.

4. Erschöpfende Extraktion der mit Wasser verdünnten alkalischen Lösung mit Petroläther.

Wenn man auf saubere Schichtentrennung achtet und sich durch Wägung des Rückstandes der letzten Extrakte von der Vollständigkeit überzeugt, geht Phytol quantitativ in den Petroläther.

5. Chromatographie des unverseifbaren Anteils der Lipoide auf Al_2O_3 .

Weil die phytolhaltige Zone von schneller und langsamer wandernden Farbzonen begrenzt wird und die Elution quantitativ erfolgt, bringt auch dieser Verfahrensschritt keine Verluste.

6. Destillation des Rückstandes der Phytolzone im Hochvakuum.

Die Hochvakuumdestillation im Kugelrohr läßt sich infolge der relativ geringen Begleitstoffmengen ohne Zersetzung des Phytols durchführen. Durch Abnehmen von höher siedenden Fraktionen konnten die Bedingungen für das quantitative Überdestillieren des Phytols ermittelt werden.

7. Umsetzung der Phytolfraktion mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat nach der früher publizierten Methode¹.

Während bei der Bestimmung des Prozentgehaltes von Rohphytol (l. c.) 16 bis 20 Stdn. unter Rückfluß gekocht wird, haben wir uns hier durchwegs mit 6 Stdn. begnügt, weil der dadurch eventuell gemachte Fehler für den Zweck der Phytolbestimmung in Pflanzen belanglos ist.

8. Chromatographische Abtrennung des gefärbten Phitylurethans.

Die Trennung und Elution ist vollständig, wie wir uns früher überzeugen konnten.

9. Kolorimetrische Bestimmung des Phitylurethans.

Im Meßbereich der Eichkurve ist diese Bestimmung zuverlässig.

Es ist notwendig, daß sich der Analytiker mit der exakten Ausführung der immerhin komplizierten Bestimmungsmethode vertraut macht; dann wird aber in Parallelbestimmungen eine für die vorliegenden Zwecke ausreichende Genauigkeit erreicht.

Es interessierte uns noch die Frage, welche Verunreinigung ebenso wie Phytol in Methanol löslich war, bei der Chromatographie der u. L. im selben Bereich der Al_2O_3 -Säule adsorbiert wurde wie Phytol und sich auch bei der Chromatographie der mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat gebildeten Urethans nicht vom Phytol trennen ließ.

Wir hatten diese Substanz oder das Gemisch mehrerer Verbindungen im Rückstand der Phytoldestillation zu erwarten. Wir destillierten daher aus diesem Rückstand alle bei 0,001 Torr und der Luftbadtemperatur bis 230° übergehenden Anteile ab und machten mit dem Rückstand einige orientierende Vorversuche.

Der Rückstand wurde auf Al_2O_3 chromatographiert und mit Petroläther-Äther (3:1) entwickelt. Nach Abtrennung der Endzonen der Säule wurde eluiert, das Lösungsmittel vollständig entfernt und der ölige Rückstand analysiert. Die Werte der C-, H-Bestimmung würden die Bruttoformel $C_{60}H_{100}O$ ermöglichen.

Durch Umsetzung mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat und Chromatographie auf Al_2O_3 wurde, abgesehen von den aus dem Reagens stammenden Zonen eine einheitliche, breite orange Zone erhalten. Diese wurde eluiert und gab C-, H- und N-Werte, die sich mit der Bruttoformel $C_{52}H_{84}O$ für einen Alkohol vereinbaren ließen. Es ist interessant, daß ein Mischchromatogramm mit dem entsprechenden Urethan des Phytols ebenfalls eine einheitliche Farbzone ohne jede Andeutung einer Auftrennung liefert.

Die Bestimmung des Molgewichtes nach *Rast* gab für den „Alkohol“ Werte von 750 bis 810, während z. B. für $C_{60}H_{100}O$ 837,4 errechnet ist.

Bei der katalytischen Hydrierung in absol. Alkohol mit Pd-Kohle wurden bei Raumtemperatur in 15 Min. 11 Mole H_2 aufgenommen, wenn man ein Molgewicht 840 zugrunde legt.

Die IR-Aufnahme ließ folgende Strukturelemente erkennen: Alkoholische OH-Gruppe, Paraffinkette, größere Zahl von Doppelbindungen, eine davon eventuell in Allylstellung zur OH-Gruppe; möglicherweise eine Folge von Isoprengerüsten.

Wir sind uns vollständig der Tatsache bewußt, daß eine Isolierung von chemischen Individuen aus höheren öligen Lipoiden eine sehr schwierige Aufgabe ist. Unsere Anhaltspunkte für die Einheitlichkeit der Substanz sind noch ungenügend. Da wir aber in den letzten Jahren das Problem nicht weiter bearbeiten konnten, wollen wir die Ergebnisse der Vorversuche bekanntgeben. Neutrale Verbindungen der Formel $C_{60}H_{118}O$ und $C_{60}H_{120}O$ hat beispielsweise *J. Asselineau*⁸ in den Lipoiden von Tuberkelbakterien aufgefunden. Dagegen wurden bei der Aufarbeitung der Wachse von Alfalfa⁹ nur niedrigere Alkohole gefunden.

Rowland, Latimer und *Giles*¹⁰ beschrieben die Isolierung von Solanesol aus Tabak. Trotz einiger Unterschiede zwischen unseren vorläufigen analytischen Ergebnissen und denen der genannten Autoren und obwohl deren experimentelle Angaben über das IR-Spektrum einen strengen Vergleich noch nicht ermöglichen, vermuten wir die Identität des Solanesols mit unserer Verbindung. Wir sind mit weiteren Untersuchungen beschäftigt.

Experimenteller Teil

Methodik der Phytolbestimmung

1970 g am 5. Oktober gesammelte, aber noch tiefgrüne Blätter der Roßkastanie wurden bei 70° im Trockenschrank getrocknet, zerkleinert und durch ein feimmaschiges Sieb getrieben. Die erhaltenen 750 g Trockensubstanz wurden im Soxhlet-Apparat mit 96proz. Alkohol erschöpfend extrahiert, wobei der Alkohol im Vorlagekolben mehrmals erneuert wurde. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum auf 1 l eingeengt, hierauf mit 80 g 50proz. NaOH versetzt und 3 Stdn. am Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wurden 3 l Wasser zugegeben, wobei der während der Verseifung ausgeschiedene braune Bodenkörper vollständig in Lösung ging. Die Lösung wurde 11mal mit je 1 l Petroläther (Sdp. 35 bis 50°) ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte am Wasserbad eingedampft. Es wurde bei 100° und 12 Torr zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es blieb ein Rückstand von 23,9 g (u. L.). Eine 12. und 13. Extraktion gab zusammen nur 0,35 g u. L. und wurde vernachlässigt.

⁸ *J. Asselineau*, Bull. soc. chim. France 1954, 108.

⁹ *E. H. Blair, H. L. Mitchell* und *R. E. Silker*, Ind. Eng. Chem. 45, 1104 (1953).

¹⁰ *R. L. Rowland, P. H. Latimer* und *J. A. Giles*, J. Amer. Chem. Soc. 78, 4680 (1956).

Die Extraktion einer so großen Blattmenge erfolgte nur, weil genügend einheitliches Material für die Ausarbeitung der Methode nötig war. Für die Einzelbestimmung werden 20 bis 40 g Blatt-Trockensubstanz genügen.

Die 23,9 g u. L. wurden mit Benzol auf 100 ml Lösung gebracht. Davon wurden 3 ml im Vak. von Benzol befreit und der Rückstand in zirka 5 ml Petroläther (Sdp. 35 bis 50°) gelöst.

Für Einzelbestimmungen wird man den gesamten Petrolätherrückstand der vorigen Operation (u. L.) in Petroläther lösen und zur Chromatographie verwenden.

Die Petrolätherlösung wurde mit Petroläther quantitativ auf eine Säule von Al_2O_3 , standardisiert nach *Brockmann*, von zirka 17 mm \varnothing und 35 cm Länge, die vorher mit Petroläther getränkt war, gespült. Die Anwendung von Pipetten ist für die Übertragung viel günstiger als das Übergießen, bei dem das Kriechen über die Gefäßwand unbemerkte Fehler verursachen kann.

Anschließend wurde mit einer Mischung von Petroläther-Äther (3 + 1) entwickelt. Die von gefärbten Zonen oben und unten begrenzte farblose Mittelzone der Al_2O_3 -Säule wurde mechanisch mit einer Spatel abgetrennt und mit einer Mischung von 3 Vol. Methanol und 1 Vol. Äther quantitativ eluiert, die Lösung in einem Schliffkolben eingedampft und in ein Kugelrohr (Glasrohr von zirka 20 cm Länge und zirka 1,0 cm \varnothing , an dessen einem Ende sich eine Kugel von zirka 2,0 cm \varnothing befindet) gebracht. Es wurde zum Schluß bei 10 Torr zur Trockene gedampft und der Rückstand aus einem Luftbad im Hochvak. abdestilliert. Das Kugelrohr wurde während der Destillation öfters bewegt. Das Destillat sammelte sich in dem Rohrteil außerhalb des Luftbades an einer mit einem feuchten Wattebausch gekühlten Stelle. Zwischen den Luftbadtemperaturen 110 und 150° und 0,001 Torr destillierte innerhalb von ungefähr 20 Min. ein leicht bewegliches Öl. Nach Beendigung der Destillation wurde das Destillationsrohr mit dem Destillat von der Kugel mit dem Rückstand abgeschnitten und das Destillat mit 25 ml Benzol in einen Kolben gespült, der Rückflußkühler und Chlorcalciumrohr trug, mit 0,4 g 4-Benzolazo-phenylisocyanat versetzt und 6 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abdampfen des Benzols im Vakuum und Aufnehmen des Rückstandes in Petroläther vom Sdp. 35 bis 50° folgte die chromatographische Trennung auf einer Säule von Al_2O_3 , standardisiert nach *Brockmann*, und die Elution mit Petroläther-Äther (3 + 1) sowie endlich die Kolorimetrie entsprechend der in der früheren Mitteilung¹ gegebenen Vorschrift.

Es sei nochmals darauf verwiesen, daß die kolorimetrische Messung im *Pulfrich*-Stufenphotometer bei S 47 und 1 cm Schichtdicke nur innerhalb des ungefähren Meßbereiches von $E = 0,2$ bis $0,4$ ausgeführt werden soll. In diesem Meßbereich entspricht einem $E = 0,1$ 0,0483 mg Urethan oder 0,0276 mg Phytol in 1 ml Lösung.

In 4 Parallelbestimmungen wurden im verwendeten trockenen Blattmaterial Phytolgehalte von 0,323, 0,310, 0,301 und 0,306 gefunden. Weitere Anwendungsbeispiele der beschriebenen Methode werden in einer späteren Mitteilung angegeben werden.

Gewinnung der Begleitsubstanz im Rückstand der Destillation

Die u. L. wurden auf Al_2O_3 entsprechend der früheren Vorschrift chromatographiert, die farblose Zone b mit Methanol-Äther extrahiert und in ein Kugelrohr überführt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vak. wurde bei 0,001 Torr im Luftbad bis 230° erhitzt und alles Destillierbare

abgetrennt. Der Rückstand, ein dunkelgelbes zähes Öl, wurde in Petroläther gelöst, auf eine mit Petroläther getränkte Säule von Al_2O_3 , standardisiert nach *Brockmann*, gebracht und mit einem Gemisch von 3 Vol. Petroläther (Sdp. 35 bis 50°) und 1 Vol. Äther entwickelt. Die Mittelzone wurde mit Äther-Methanol eluiert und bei 100° im Hochvak. völlig entgast.

Gef. C 86,17, 86,14. H 11,99, 11,90.

Umsetzung des Öles mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat

0,1 g dieses Öles wurden in 25 ml Benzol mit 0,2 g 4-Benzolazo-phenylisocyanat 6 Stdn. unter Feuchtigkeitsausschluß unter Rückfluß erhitzt. Das Benzol wurde im Vak. abgedampft, der Rückstand in Petroläther gelöst und auf eine mit Petroläther getränkte Al_2O_3 -Säule gebracht. Die Entwicklung mit Petroläther-Äther (3 + 1) gab als langsam wandernde Farbzonen 1. überschüssiges 4-Benzolazo-phenylisocyanat und 2. p-Aminoazobenzol. Eine rasch wandernde, einheitliche Farbzone wurde vollständig eluiert und eingedampft. Der Rückstand war ein dunkelrotes Öl.

Gef. C 83,19, 83,06, H 9,81, 9,88, N 4,43, 4,49.

Bestimmung des Molgewichtes der Begleitsubstanz

22,8, 32,2 und 28,7 mg Öl in 83, 102 und 94 mg Kampfer gaben 14,5°, 16,2° und 15,1° Δt und 756, 780 und 810 Mg.

Katalytische Hydrierung der Begleitsubstanz

0,5530 g Öl wurden in 50 ml absol. Äthanol mit 0,5 g vorher aushydrierter 10% Pd-Aktivkohle bei 744 Torr und 26° in der Schüttelente hydriert. Innerhalb von 15 Min. wurden 184 ml H_2 aufgenommen; nachher keine weitere Aufnahme. Das nach dem Eindampfen des Lösungsmittels zurückbleibende Öl wurde im Hochvakuum bei 100° entgast.

Gef. C 83,64, 83,61. H 14,35, 14,43.

IR-Spektren a) der Begleitsubstanz und b) der hydrierten Begleitsubstanz

Die Aufnahmen wurden mit einem Einstrahl-Prismenspektrographen, Modell 12 c, der Firma *Perkin-Elmer* aufgenommen.

a) 3370 cm^{-1} : $\nu\text{-OH}$, durch Assoziation etwas verschoben.

2920 cm^{-1} : $\nu\text{-CH}$.

1670 cm^{-1} : $\nu\text{-C=C}$ —, kann nicht konjugiert sein.

1445 cm^{-1} : $\delta\text{-CH}_2$.

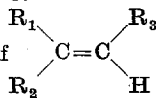
1375 cm^{-1} : $\delta\text{-CH}_3$.

1240 cm^{-1} : für primäre Alkohole nicht sehr spezifisch.

1035 cm^{-1} : $\delta\text{-OH}$.

1000 cm^{-1} : $\nu\text{-C-O}$, besitzt die gleiche Lage wie im Phytol, wahrscheinlich Gruppierung O-C-C=C .

835 cm^{-1} : CH — „wagging-Schwingung“, deutet auf



745 cm^{-1} : CH_2 — „rocking-Schwingung“ bei langkettigen Paraffinen.

- b) 3360 cm^{-1} : ν -OH, durch Assoziation etwas verschoben.
2900 cm^{-1} : ν -CH.
1450 cm^{-1} : δ -CH₂.
1370 cm^{-1} : δ -CH₃.
1150 cm^{-1} : wahrscheinlich C—C-Gerüstschwingung.
1060 cm^{-1} : ν -C—O.
735 cm^{-1} : CH₂— „rocking-Schwingung“ bei langkettigen Paraffinen.

Wir danken Herrn *F. Grass* für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren.

Sämtliche Analysen wurden von Herrn Dr. *W. Padowetz* im Mikroanalytischen Laboratorium des I. Chemischen Universitätsinstitutes ausgeführt.