

Über die quantitative Bestimmung des Phytols*

Von

O. Hromatka und **L. Stentzel**

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 9. September 1957)

Wegen der technischen Bedeutung von Phytol als Rohstoff für Synthesen der Vitamine E und K wurden selektive quantitative Bestimmungsmethoden ausgearbeitet. Diese bestehen 1. in der gravimetrischen Bestimmung der in Methanol schwer löslichen Verbindung des Phytol-3,5-dinitrobenzoesäureesters mit α -Naphthylamin und 2. in der Bildung des orangerot gefärbten Urethans aus Phytol und 4-Benzolazo-phenyl-isocyanat, der chromatographischen Trennung und kolorimetrischen Bestimmung dieser Verbindung.

Phytol, die Alkoholkomponente des Esters Chlorophyll, hat für Synthesen von Vitamin K, besonders aber von Vitamin E (Tocopherol) besondere Bedeutung erlangt und wird daher in größerem Maßstabe aus grünen Pflanzen oder synthetisch gewonnen. Bei der Überprüfung von „Phytol“ verschiedener Erzeugungsstätten zeigte sich, daß die Präparate keineswegs rein waren, sondern trotz annähernd stimmender Siedepunkte bei der Vakuumdestillation Verunreinigungen in sehr unterschiedlichem Prozentsatz enthielten.

Beispielsweise erhielten wir in einem allerdings extremen Fall von einer amerikanischen Firma ein Präparat, das nach Angabe der Lieferfirma aus dem Unverseifbaren von Alfalfa durch Molekulardestillation bei 0,0025 Torr und 120° gewonnen und einer Redestillation bei 2 bis 4 Torr und 180° unterworfen worden war. Wir trennten das Produkt durch Destillation bei 0,1 Torr in 11,1% einer Fraktion vom Sdp. 110 bis 133°, in 69,3% einer Fraktion vom Sdp. 133 bis 143°, in 9,3% einer Fraktion vom Sdp. 143° und endlich einen Rückstand von 10,3%.

* Über die vorliegende Arbeit wurde von *L. Stentzel* in ihrer Dissertation (Universität Wien, 1954) berichtet.

Nur in der 3. Fraktion waren zirka 10% Phytol enthalten. In den anderen ließ es sich nicht mehr nachweisen. Die Fraktionen 1 und 2 kristallisierten beim Kühlen der Petrolätherlösung mit Kohlensäureschnee. Die Kristalle konnten vorderhand auf einen Schmp. 30° gebracht werden.

Aber auch reinste Präparate anerkannter Chemikalienfirmen enthalten nach unseren Erfahrungen nur zirka 80% Phytol. Auf die Schwierigkeit der Reinigung von Phytol weist auch *Bader*¹ hin, der durch oftmalige HV-Destillation ein Präparat vom Sdp. 150 bis 151°/0,06 Torr, $d_4^{25} = 0,8506$ und $n_D^{25} = 1,4637$ herstellte. Die Charakterisierung der Präparate durch Siedeintervall, Dichte, Brechungsindex, Jodzahl und Verseifungszahl ist unseres Erachtens aber nicht ausreichend und es bestand das Bedürfnis nach einer spezifischen, quantitativen Bestimmungsmethode für Phytol. Die in der Literatur angegebenen Methoden erfüllen diesen Zweck nicht. Die Anlagerung von Brom an die Doppelbindung nach *Willstätter* und *Hocheder*² ist selbstverständlich nur anwendbar, wenn ungesättigte Verunreinigungen fehlen. Es ist aber bekannt, daß Phytadien oftmals Phytol verunreinigt. Allgemeine Acylierungsverfahren sind nur dann anwendbar, wenn die Verunreinigungen nicht acylierbar sind.

Folgende kristallisierte Verbindungen des Phytols wurden in der Literatur beschrieben: das Silbersalz der Phetyl-phthalestersäure³, das Semicarbazon des Brenztraubensäureesters⁴, der Ester der Chrysanthemumcarbonsäure⁵, Urethane unter Verwendung von Phenyl- und Naphthylisocyanat⁶, das Allophanat^{7, 8} und endlich der 3-Nitrophthal-säureester⁹.

Bildungsweise und Eigenschaften dieser Derivate gestatten aber nur eine Identifizierung, doch keine quantitative Bestimmung des Phytols.

Wir suchten zunächst die von *Reichstein*¹⁰ zur Charakterisierung niedriger Alkohole verwendete Methode der Veresterung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in Pyridin und anschließende Umsetzung mit α -Naphthylamin auf Phytol anzuwenden. Während *Reichstein* diese Methode für höhere Alkohole nicht gut geeignet fand, erhielten wir mit Phytol eine in Methanol schwerlösliche, kristallisierte orange Verbindung $C_{37}H_{51}O_6N_3$ vom Schmp. 60 bis 61°. Bei genauer Einhaltung der im experimentellen

¹ *F. Bader*, *Helv. Chim. Acta* **34**, 1632 (1951).

² *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, *Ann. Chem.* **354**, 248 (1907).

³ *R. Willstätter*, *E. W. Mayer* und *E. Hüni*, *Ann. Chem.* **378**, 87 (1910).

⁴ *L. Bouveault*, *C. r. acad. sci.*, Paris **138**, 984 (1904).

⁵ *R. Staudinger* und *L. Ruzicka*, *Helv. Chim. Acta* **7**, 457 (1924).

⁶ *R. Willstätter* und *F. Hocheder*, *Ann. Chem.* **354**, 252 (1907).

⁷ *A. R. Todd*, *F. Bergel* und *Th. S. Work*, *Biochemical. J.* **31**, 2257 (1937).

⁸ *P. Karrer*, *A. Geiger*, *H. Rentschler*, *E. Zbinden* und *A. Kugler*, *Helv. Chim. Acta* **26**, 1741 (1943).

⁹ *Th. Lennartz*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **76**, 248 (1943).

¹⁰ *T. Reichstein*, *Helv. Chim. Acta* **9**, 799 (1926).

Teil angegebenen Arbeitsweise gelang es, die Methode mit erträglicher Fehlerbreite auch quantitativ durchzuführen.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einiger Parallelbestimmungen mit verschiedenen Phytolmustern.

Tabelle 1

Muster Nr.	Herkunft	% Reinphytol	
1	British Drug House $d = 0,862, n_D^{20} = 1,465$	80,00,	80,15
2	British Drug House	78,4,	78,56
3	Frankreich	77,01,	77,04
4	„	73,80,	72,59

Obwohl diese Methode für viele Fälle ausreichend war, suchten wir nach einem Verfahren, das in der chromatographischen Trennung und kolorimetrischen Bestimmung eines gefärbten Phytolderivates bestehen sollte. Derartige Verfahren sind für Alkohole schon öfters angegeben worden. So wurden 3,5-Dinitrobenzoesäureester aliphatischer Alkohole von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen durch Adsorption an Silicagel getrennt¹¹ und durch Fluoreszenz¹² kenntlich gemacht. Für die qualitative Analyse aliphatischer Alkohole durch Papierchromatographie wurden die Halbestere der 3,6-Dinitrophthalsäure herangezogen¹³. Auch die mit 4-Dimethylamino-3,5-dinitrobenzoylchlorid bereiteten farbigen Ester wurden für Trennungen verwendet¹⁴⁻¹⁶. Ziemlich ausgedehnte Verwendung fanden die mit 4-Benzolazobenzoylchlorid hergestellten farbigen Ester¹⁷⁻²¹. Auch die mit 4-Benzolazo-phenylisocyanat aus Alkoholen hergestellten rot gefärbten Urethane wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und der chromatographischen Trennung unter-

¹¹ J. W. White jr. und E. C. Dryden, *Analyt. Chemistry* **20**, 853 (1948).

¹² H. Brockmann und F. Volpers, *Chem. Ber.* **80**, 77 (1947).

¹³ T. Momose und M. Torigoe, *J. Pharmac. Soc. Japan* **71**, 977 (1951); *Chem. Abstr.* **46**, 1921 b (1952).

¹⁴ H. H. Strain, *Chromatographic Adsorption Analysis*, S. 74. New York, 1945.

¹⁵ K. A. Jensen, F. Limborg und W. M. Solstadt, *Acta Chem. Scand.* **4**, 392 (1950).

¹⁶ H. van Duin, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **73**, 68 (1954).

¹⁷ K. Ladenburg, E. Fernholz und E. S. Wallis, *J. Org. Chem.* **3**, 294 (1938).

¹⁸ W. S. Reich, *C. r. acad. sci., Paris* **208**, 748 (1939).

¹⁹ M. R. Crow und M. D. Sutherland, *Chem. Abstr.* **44**, 3945 a (1950).

²⁰ J. K. Mertzweiler, D. M. Carney und F. F. Farley, *J. Amer. Chem. Soc.* **65**, 2367 (1943).

²¹ Ch. D. Robeson und J. G. Baxter, *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 136 (1947).

worfen^{22, 23}. Wir entschieden uns, auch für den Fall einer Phytolbestimmung das 4-Benzolazo-phenylisocyanat zu verwenden, weil dieses Reagens nach den Angaben von *Masuyama* und *Hamada*²² leicht hergestellt werden kann und die Bildung der Urethane in einer einfachen und vollständig verlaufenden Reaktion erfolgt.

In zahlreichen Versuchen wurden die günstigsten Versuchsbedingungen für die Bildung des gefärbten Urethans, für seine chromatographische Trennung auf Al_2O_3 -Säulen und die kolorimetrische Bestimmung unter Zugrundelegung einer Eichkurve ausgearbeitet. Die Methode gestattet die Bestimmung des Phytolgehaltes mit einer Genauigkeit von $\pm 2\%$. Die Analysenvorschrift und die zugehörigen Bemerkungen sind im experimentellen Teil enthalten.

Experimenteller Teil

A. Gravimetrische Bestimmung der α -Naphthylaminverbindung des 3,5-Dinitrobenzoesäure-phytyl-esters

Im 50-ml-*Erlenmeyer*-Kolben mit Schliffstopfen wird ungefähr 1,0 g „Rohphytol“ genau gewogen, in 5 ml Pyridin gelöst und mit 1,6 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Unter Schütteln wird bis zur völligen Lösung gelinde erwärmt und 1 Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zusatz von 20 ml Wasser wird die Mischung in einen Scheidetrichter gebracht und mit Äther quantitativ nachgespült. Nun setzt man verd. Schwefelsäure bis zur kongosäuren Reaktion zu. Die wäßrige Lösung läßt man in einen 2. Scheidetrichter ab, ebenso 10 ml Wasser, mit dem die Ätherlösung ausgeschüttelt wurde. An der Phasengrenze bleiben unlösliche Flocken von Dinitrobenzoesäureanhydrid, die nicht weiter stören. Die sauren Auszüge in Scheidetrichter 2 werden mit Äther ausgeschüttelt, der Ätherextrakt wird mit wenig Wasser gewaschen und in Scheidetrichter 1 gebracht. In diesem wird nun die vereinte Ätherlösung mit verd. Na_2CO_3 -Lösung und anschließend mit Wasser ausgeschüttelt. Die wäßrig-alkalischen Auszüge werden wieder im Scheidetrichter 2 mit Äther geschüttelt. Auch dieser Ätherauszug wird mit etwas Wasser geschüttelt und mit der Ätherlösung in Scheidetrichter 1 vereinigt. Sie wird quantitativ in einen *Erlenmeyer*-Kolben gespült, über Na_2SO_4 getrocknet, hierauf in einen Rundkolben dekantiert und gründlich mit Äther nachgespült. Zum Schluß wird am Wasserbad im Vak. eingedampft.

Der Dinitrobenzoesäureester des Phytols ist ein hellgelbes, zähes Öl, das in warmem Methanol zwar wenig löslich ist, sich aber trotzdem mit insgesamt 20 ml heißem Methanol in Form von Tröpfchen vollständig in einen 50-ml-*Erlenmeyer*-Kolben spülen läßt. Man fügt eine Lösung von 2,0 g α -Naphthylamin in 10 ml Methanol zu, erwärmt die dunkelrote Lösung auf zirka 50° und versetzt unter Rühren mit soviel Tropfen Äther, bis alles gelöst ist. Beim langsamen Erkalten scheiden sich orangerote feine Nadeln

²² *S. Masuyama* und *M. Hamada*, *J. Chem. Soc. Japan* **70**, 198, 232 (1949); **71**, 47 (1950).

²³ *J. B. Davenport* und *M. D. Sutherland*, *Chem. Abstr.* **45**, 2910 e (1951).

ab. Nach mehrstündiger Eiskühlung wird abgesaugt, mit zirka 10 ml eiskaltem Methanol gewaschen und im Vak. getrocknet. Schmp. 60 bis 61°.

$C_{37}H_{51}O_6N_3$ (633,80). Ber. C 70,11, H 8,11, N 6,63.

Gef. C 70,35, 70,24, H 8,18, 8,22, N 6,47, 6,55.

1,000 g der Verbindung entspricht 0,4678 g Phytol.

B. Kolorimetrische Bestimmung des 4-Benzolazo-phenylurethans des Phytols

0,05 bis 0,15 g Rohphytol werden mit 2,5 Äquivalenten 4-Benzolazo-phenylisocyanat in 15 bis 20 ml Benzol unter sorgfältigem Feuchtigkeitsausschluß 12 bis 20 Stdn. unter Rückfluß erhitzt.

4-Benzolazo-phenylisocyanat wird in Mengen von 0,1 bis 0,2 g in Glasröhrchen eingeschmolzen aufbewahrt. Die Berechnung der Menge erfolgt so, als wäre das Rohphytol 100prozentig.

Anfängliche Versuche mit nur 1,5 Äquivalenten 4-Benzolazo-phenylisocyanat gaben ungleichmäßige Ergebnisse. Bei nur 1 Std. Rückflußkochen und 12 bis 48 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur lagen die Phytolwerte bis zu 4 Absolutprozent unter den bei längerem Erhitzen gefundenen Durchschnittswerten. Außerdem war im Chromatogramm die später als Zone e bezeichnete schmale Farbzone zu beobachten, die bei längerer Reaktionsdauer verschwand. Vielleicht handelt es sich bei dieser Zone um die instabile *cis*-Form des 4-Benzolazo-phenylurethans des Phytols, die bei längerem Erhitzen in die als Hauptmenge vorliegende stabile *trans*-Form übergeht.

Das Benzol wird im Vak. bis auf zirka 2 ml eingedampft, dann mit zirka 8 ml Petroläther vom Sdp. 35 bis 50° versetzt, mittels einer Pipette auf die Chromatographiersäule gebracht und mit Petroläther quantitativ nachgespült. Als Säule (35 cm Länge, 1,7 cm \varnothing) wird Aluminiumoxyd, standardisiert nach Brockmann, verwendet und mit Petroläther getränkt. Es wird mit einer Mischung von 3 Vol. Petroläther vom Sdp. 35 bis 50° und 1 Vol. Äther entwickelt, bis das als schnellste Zone wandernde orangegelbe Phytolurethan quantitativ eluiert ist.

Wird mit Benzol eluiert, ist die Trennung der Zonen unschärfer, was besonders bei niedrigprozentigen Phytolmustern stört. Die endgültig verwendete Petroläther-Äther-Mischung ist auch günstiger als Mischungen von Benzol und Benzin (Sdp. 70 bis 90°) und bewährt sich auch bei sehr unreinem, niedrigprozentigem Rohphytol. Im allgemeinen entstehen an der Säule im Laufe des Eluierens folgende Zonen:

- a) Als oberste Zone nicht umgesetztes 4-Benzolazo-phenylisocyanat.
- b) Eine hellgelbe Zone, die Zersetzungsprodukte des Reagens durch nicht wasserfreie Lösungsmittel enthielt.
- c) Eine dunkelgelbe Zone von p-Amino-azobenzol, das durch Mischschmp. identifiziert wurde.

Die Zonen a bis c werden in gleicher Lage auch erhalten, wenn man in Vergleichsversuchen 4-Benzolazo-phenylisocyanat allein chromatographiert.

- d) Eine breite farblose Zone.
- e) In den Sonderfällen einer zu kurzen Erhitzungsdauer eine sehr schmale, orange Zone, vermutlich das *cis*-isomere Urethan.
- f) Eine schmale farblose Zone.

g) Eine breite orange Zone des 4-Benzolazo-phenylurethans des Phytols.

Durch Eindampfen des Eluates der Zone g und Trocknen des Rückstandes bei 10 Torr und 56° über P_2O_5 wurde das 4-Benzolazo-phenylurethan des Phytols als rotes Öl erhalten, das unter 15° wachstartig kristallin erstarrt.

$C_{33}H_{49}O_2N_3$ (515,75). Ber. C 76,25, H 9,50, N 8,08,
Gef. C 76,36, 76,56, H 9,80, 9,86, N 7,95, 7,95.

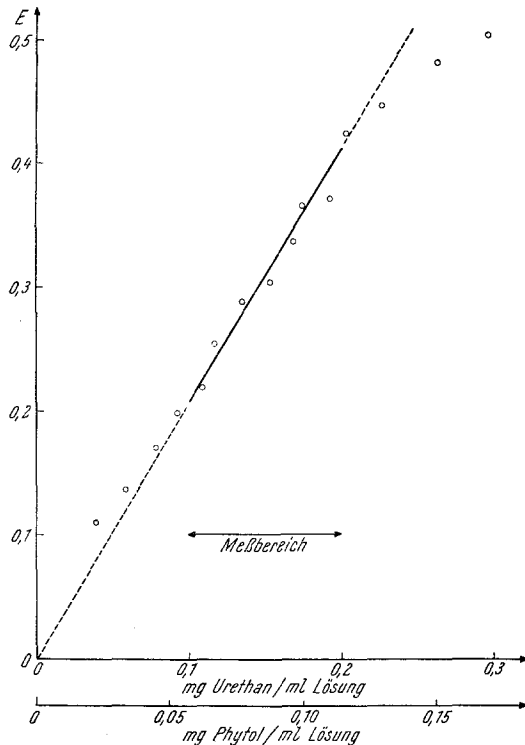


Abb. 1. Eichkurve zur kolorimetr. Phytolbestimmung

Durch Chromatographieren und Eluieren einer gewogenen Menge von reinem Urethan wurde festgestellt, daß bei diesem Vorgang keine Verluste eintreten.

Falls das Urethan eines Rohphytols chromatographiert wird, das als Verunreinigung Carotinoide enthält, wandern diese als gelbe Zone schneller durch die Säule als das Urethan und werden vor dessen Gewinnung abgetrennt.

Das Eluat des Urethans wird am Wasserbad im Vak. eingedampft, wobei eine Überhitzung des Rückstandes vermieden wird.

Längeres Erhitzen führt ebenso wie länger dauernde Lichteinwirkung zu einer Farbvertiefung, wodurch bei der kolorimetrischen Messung zu hohe Phytolwerte vorgetäuscht werden.

Der Rückstand wird mit Benzol quantitativ in einen geeigneten Meßkolben gebracht. Zur kolorimetrischen Messung mit dem Stufenphotometer nach *Pulfrich* der Firma C. Zeiß unter Verwendung des Filters S 47 und einer Schichtdicke von 1 cm zieht man möglichst eine Konzentration von 0,12 bis 0,2 mg Urethan pro Milliliter heran. Mittels der in Abb. 1 gegebenen Eichkurve können in diesem Meßbereich die mg Urethan/ml Lösung direkt abgelesen werden. 1,000 mg Urethan entspricht 0,575 mg Phytol. Innerhalb des Meßbereiches entspricht $E = 0,1$ einem Gehalt von 0,0483 mg Urethan oder 0,0276 mg Phytol pro 1 ml Lösung.

Die Eichkurve wurde mit reinstem, mehrfach chromatographiertem 4-Benzolazo-phenylurethan des Phytols ermittelt.

In Tabelle 2 werden die Ergebnisse verschiedener Analysen verzeichnet.

Tabelle 2

A. Niedrigprozentiges Handelsphytol

Ver- such Nr.	g Roh- phytol	Isoocyanat		Stdn. Erhitzung	% Rein- phytol	Bemerkungen
		g	äquival.			
1	0,0379	0,0432	1,5	1 + 15 Stdn. Raumtemp.	38,1	„Zone e“ sichtbar
2	0,0401	0,0453	1,5	1 + 48 Stdn. Raumtemp.	42,25	„Zone e“ in Spuren, nicht meßbar
3	0,0427	0,0830	2,5	10	43,8	Verh. analog Versuch 2
4	0,0487	0,0551	1,5	11	38	„Zone e“ sichtbar
5	0,0900	0,1712	2,5	16	43	„Zone e“ nicht mehr vor- handen
6	0,0946	0,1779	2,5	20	42,7	„Zone e“ nicht mehr vor- handen
7	0,0713	0,1331	2,5	14 bei 60°	40,15	„Zone e“ in geringster Menge vorhanden
8	0,0653	0,1440	2,93	14	43,8	„Zone e“ nicht vorhanden
9	0,0702	0,1326	2,5	17	44,8	„Zone e“ nicht vorhanden

B. Hochprozentiges Handelsphytol

1	0,0416	0,0471	1,5	9,5	63,2	„Zone e“ sichtbar
2	0,0871	0,0985	1,5	15	72,8	„Zone e“ nicht vorhanden, Lösung lange unter Lichteinfluß gestanden
3	0,0809	0,0915	1,5	15	66	„Zone e“ nicht vorhanden
4	0,0867	0,1640	2,5	7,5	62,2	„Zone e“ sichtbar
5	0,0875	0,1661	2,5	16	66	„Zone e“ nicht vorhanden
6	0,0639	0,1288	2,5	12	65,5	„Zone e“ nicht vorhanden
7	0,0758	0,1482	2,5	20	67,3	„Zone e“ nicht vorhanden
8	0,0607	0,1195	2,5	17	65,3	„Zone e“ nicht vorhanden
9	0,0711	0,1353	2,5	17,5	65	„Zone e“ nicht vorhanden
10	0,0633	0,1110	2,5	24 elektrische Heizplatte	69,3	„Zone e“ nicht vorhanden