

4%iger Kalilauge gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben angegeben. Der Zimtsäure- β - Δ^2 -zyklopentenyl-äthanoester stellt eine farblose Flüssigkeit vom Sdp._{0.05} 168° dar. $n_D^{15} = 1.5663$.

4.415; 4.399 mg Sbst.: 12.79; 12.75 mg CO₂, 3.04; 2.94 mg H₂O.

C₁₆H₁₈O₂ (242.14). Ber.: C 79.30. H 7.49.

Gef.: C 79.00, 79.04. H 7.71, 7.48.

Chaulmoograsäure- β - Δ^2 -zyklopentenyl-äthanoester: 29.8 g frisch destilliertes Chaulmoograsäurechlorid wurden in 100 ccm Benzol mit 11.2 g β - Δ^2 -Zyklopentenyläthanol in Stickstoffatmosphäre zum Chaulmoograsäure- β - Δ^2 -zyklopentenyl-äthanoester umgesetzt. Farbloses Öl vom Sdp._{0.05} 196°. $n_D^{15} = 1.4770$.

4.313 mg Sbst.: 12.60 mg CO₂, 4.35 mg H₂O.

C₂₆H₄₂O₂ (374.33). Ber.: C 80.14. H 11.31.

Gef.: C 79.66. H 11.29.

Herrn A. Schickedanz bin ich für fleißige und geschickte Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

927. Gábor Vastagh:

Die Bestimmung von Vitamin A, besonders in Arzneipräparaten.

I. Teil.

Mitteilung aus der Chemischen Abteilung des K. Ungarischen Staatl. Hygienischen Institutes, Budapest.

Eingegangen am 23. Dezember 1940.

Seitdem das Vitamin A von der Medizin nicht nur zur Heilung bzw. Verhütung von gewissen Avitaminosen, sondern auch in der Medikation von verschiedenen anderen Krankheiten verwendet wird, mehren sich die Vitamin A allein oder kombiniert mit anderen Vitaminen enthaltenden Arzneipräparate. Der Arzneimittelkontrolle erwächst daher die Aufgabe, den Vitamin-A-Gehalt dieser Präparate festzustellen. Neben dem altbekannten Lebertranöl gibt es heute eine ganze Menge Arzneipräparate, welche Vitamin A in Form von Vitaminkonzentrat, hergestellt durch Verseifung von Leberölen verschiedener Seefischarten und Abtrennung des Unverseifbaren, enthalten und als ölige Lösungen, Dragées, Schokoladentabletten usw. in den Verkehr gebracht werden.

Doch auch in der Lebensmittelchemie, Ernährungslehre sowie Biologie ist die Ermittlung des Vitamingehaltes von großer Wichtigkeit. Mit letzteren Fragen beschäftigte ich mich jetzt nicht, doch lassen sich die vorgeschlagenen Versuchsbedingungen usw. sinngemäß auch bei der Lösung solcher Fragen verwenden.

Wenn man vom Tierversuche, welcher teuer, zeitraubend und umständlich ist, absieht, gibt es zur Bestimmung des Vitamins A zwei

Wege: Messung der für das Vitamin charakteristischen Absorptionsbande im Ultraviolett bei 328 m μ , sowie Messung der mit chloroformischer SbCl₃-Lösung auftretenden blauen Farbe. Die erstere Methode wird, obzwar spezifischer, seltener verwendet, wohl weil sie eine recht teure Apparatur erfordert. Die zweite Methode, nach ihren Entdeckern Carr-Price-Reaktion genannt, ist heute allgemein verbreitet. Sie ist zwar nicht ganz spezifisch für Vitamin A, indem das SbCl₃ im allgemeinen mit Doppelbindungen unter Bildung von gefärbten Verbindungen reagiert, doch nicht mit allen Doppelbindungen und im allgemeinen bedeutend schwächer als mit Vitamin A.

Über die Ausführungsarten der Carr-Price-Reaktion besteht eine umfangreiche Literatur, deren großer Teil im Buche Gstirners¹⁾ zusammengefaßt ist. Auch darüber besteht kein Zweifel, daß sich diese Reaktion, wenn nur entsprechende Kritik geübt wird, sehr wohl zur Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes von Lebensmitteln und anderen Naturprodukten heranziehen läßt²⁾. Sie ist jedenfalls schneller, billiger und einfacher als der biologische Versuch; dabei muß auch noch berücksichtigt werden, daß die Arzneipräparate das Vitamin A im allgemeinen in einer vielmal höheren Konzentration enthalten als die Naturprodukte. Dieses dürfte auch die erzielbare Genauigkeit erhöhen. Jedenfalls ist die Bestrebung erklärlich, wonach auch das Vitamin A, ähnlich den anderen Vitaminen, und wenigstens bei pharmazeutischen Präparaten, auf chemischem Wege bestimmt werden soll.

Es sind eingehende Untersuchungen ausgeführt worden, um festzustellen, welche Fremdsubstanzen den Vitaminnachweis stören³⁾. Im allgemeinen stören die Carotinoide, welche jedoch selber z. T. A-Vitamin-Wirkung besitzen. Im Pflanzenreich, welches die Karotinoide enthält, wurde bisher Vitamin A nicht gefunden oder zumindest ist sein Vorkommen sehr fraglich; und in Fettstoffen tierischen Ursprungs ist wiederum der Karotingehalt niedrig, so daß kein Vitamin A vorgetäuscht wird. Praktisch stören auch die tierischen Sterine nicht. Von gesättigten Fetten bzw. Fettsäuren wird die Reaktion nicht beeinflusst, desgleichen nicht von Spuren von Petroläther, Benzol, Cholesterin. Die Reaktion wird schwach gestört, doch nur in Gegenwart von Vitamin A, durch Methyl-, Äthyl-, Isopropylalkohol, Äther, Azeton (die Entfärbung wird beschleunigt). Stärker stören, indem die Gegenwart von Vitamin A vorgetäuscht wird: un-

1) F. Gstirner, Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden, 2. Auflage. Stuttgart 1940.

2) Siehe z. B. B. Bleyer, F. Schlemmer und W. Müller-Pacham, Arch. Pharmaz. Ber. Dtsch. Pharmaz. Ges. 1931, 566; H. Brockmann und K. Maier, Ergebn. Hygiene 20, 158 (1937), A. Black, R. D. Greene, H. L. Sassmann und C. Sabo, J. Amer. pharmac. Ass. 1938, 199; H. E. Munsell, J. Amer. Med. Ass. 111, 245 (1938) usw.

3) H. Brockmann und K. Maier, a. a. O., K. Ritsert, E. Mercks Jahresber. 1935, 19; E. A. Norris und A. E. Church, J. biol. Chemistry 85, 477 (1929-30); R. E. Corbet, H. H. Geisinger und H. N. Holmes, a. a. O. 100, 657 (1933); N. D. Embree, a. a. O. 128, 187 (1939); S. Sabatay, C. R. Acad. Sci. 197, 577 (1933).

gesättigte Fettsäuren (nach anderen Angaben jedoch soll es einige geben, welche im Gegenteil die Aufhellung beschleunigen), Lecithin, Lanolin, Chinin, Olivenöl. Es gibt noch eine ganze Reihe von Verbindungen, welche in dieser oder jener Richtung stören, doch kommen diese bei unsern praktischen Aufgaben nicht vor. Das Verseifbare des Leberöles von einigen Fischen enthält eine Substanz, welche die volle Entwicklung der blauen Farbe verhindert. Die sog. zyklisierte Form des Vitamins (entstanden durch Einwirkung ganz verdünnter Säuren) gibt die Carr-Price-Reaktion, besitzt jedoch keine Vitaminwirkung. Hält man sich jedoch diese Fehlerquellen vor Augen, so kann die Bestimmung des Vitamins A, besonders in Arzneipräparaten, mit ausreichender Genauigkeit durch diese Reaktion vorgenommen werden.

Das eigentliche Problem der Bestimmung, richtiger der Berechnung des Vitamin-A-Gehaltes besteht darin, daß das Vitamin in zwei verschiedenen Formen vorkommen kann. In den Leberölen, den reichsten Vorkommen, liegt es zum größten Teile (90%, ja nach einigen Angaben über 95%) als Ester, wohl Fettsäureester vor. Die zu Arzneipräparaten verwendeten Vitaminkonzentrate werden aus solchen Leberölen gewonnen, und zwar durch Verseifung und Gewinnung des Unverseifbaren. Diese Konzentrate enthalten daher das Vitamin in Form vom freien Alkohol Axerophthol. Es kommen jedoch auch solche Vitamin-A-Präparate in den Verkehr, in welchen der Alkohol nachträglich verestert wurde, ja sogar solche, welche den nativen Ester enthalten sollen. In Form seines Esters besitzt jedoch das Vitamin A eine rund doppelt so große biologische Wirksamkeit. Als Erklärung hierfür wird im allgemeinen angeführt, daß das freie Axerophthol der Oxydation gegenüber empfindlicher ist als das esterifizierte. Wenn dies auch jedenfalls so ist, kann es als Erklärung nicht befriedigen. Wurde das Arzneipräparat richtig hergestellt und aufbewahrt, kann eine Oxydation kaum auftreten, desgleichen ist dieses im Magen-Darm-Trakt unwahrscheinlich. Viel mehr Wahrscheinlichkeit besitzt die Annahme, daß die Resorption des Vitamins unterschiedlich erfolgt, wie auch tatsächlich noch viele Fragen der Resorption von Vitamin A ungeklärt sind.

Daß verschiedene Fraktionen des Vitamins A eine unterschiedliche biologische Wirkung besitzen können, wurde als Anomalie zuerst von H. Pritchard, H. Wilkinson, J. R. Edisbury und R. A. Morton⁴⁾ gezeigt; sie gaben jedoch keine Erklärung hierfür. Später befaßten sich Th. Moll und A. Reid⁵⁾, W. Grab⁶⁾, W. Grab und Th. Moll⁷⁾ mit dieser Frage. Aus ihren eingehenden Untersuchungen geht hervor, daß das als Ester vorliegende Vitamin A eine etwa doppelt so große biologische Wirksamkeit besitzt als das in freier Alkoholform vorliegende. Dabei ist jedoch die Intensität der blauen Farbe, bedingt durch eine gewisse Menge Axerophthol, dieselbe, ob dieses als Ester oder als Alkohol vorliegt. (Auch auf den

⁴⁾ Biochem. J. 31, 258 (1937).

⁵⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 260, 9 (1939).

⁶⁾ Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 193, 170 (1939).

⁷⁾ Klin Wschr. 1939, 563.

ultravioletten Absorptionskoeffizienten hat dies keinen Einfluß.) Es kann also bei den Untersuchungen vorkommen, daß man eine gewisse Intensität der blauen Farbe bei der Reaktion erhält, nach den heutigen Methoden jedoch nicht feststellen kann, ob diese von freiem oder von verestertem Vitamin stammt, so daß die Berechnung unsicher wird. Kennt man also bei einem untersuchten Vitamin-A-Präparat den Zustand des Vitamins nicht, so kann man den Vitamin-gehalt nur annähernd angeben. Auf diesen Umstand sind wohl die vielen Unstimmigkeiten zurückzuführen, welche bei der Vitamin-A-Bestimmung sowohl nach Carr-Price wie durch Messung der Ultraviolett-Absorption nach der sich oft widersprechenden Literatur auftreten. Zur Klärung dieser Frage möchte ich mit meiner Arbeit beitragen.

Herstellung des Lösungsmittels und des Reagens.

Das zum Lösen des Untersuchungsmaterials sowie zur Herstellung des Reagens verwendete Chloroform soll vollkommen frei von Phosgen, sowie möglichst frei von Alkohol und von Feuchtigkeit sein. Diese zwei Forderungen sind schwer miteinander in Einklang zu bringen. Enthält das Chloroform, wie im Arzneibuch gestattet, ein wenig Alkohol oder, wie jahrelange Erfahrungen in unserem Institut zeigen, etwas Feuchtigkeit (vielleicht noch eine Spur Alkohol), so erfolgt keine Bildung von Phosgen, auch bei langdauernder Lagerung nicht. Enthält jedoch das Chloroform keinen Alkohol und keine Feuchtigkeit, so kann man nach 24 Stunden, auch wenn es im Dunkeln aufbewahrt wurde, darin schon Spuren von Phosgen nachweisen. Wenn jedoch das Chloroform noch so wenig Phosgen enthält, so entsteht bei der Carr-Price-Reaktion keine blaue Farbe, sondern eine violette bis weinrote Farbe, auch kann die Farbbildung ganz ausbleiben. In Gegenwart von Alkohol oder Feuchtigkeit blaßt wiederum die blaue Farbe schnell ab. Man muß daher stets frisch gereinigtes Chloroform verwenden, was allerdings unbequem ist. Das zuweilen empfohlene Aufbewahren des gereinigten Chloroforms über geglühter Pottasche kann ich nach meinen Erfahrungen unbedingt abraten, das Chloroform wird schon nach ein bis zwei Tagen stark phosgenhaltig.

Ich nehme die Reinigung des zur Bereitung des Reagens zu verwendenden Chloroforms im allgemeinen nach der Vorschrift von K. Ritsert⁸⁾ vor. Chloroform (ad usum externum, es braucht kein Narkosechloroform zu sein) wird dreimal mit je dem gleichen Volum Wasser durchgeschüttelt. Dann gibt man frisch ausgeglühte Pottasche (etwa 150 g auf 1 Liter) sowie geglühtes Natriumsulfat hinzu und läßt, unter gelegentlichem Umschütteln, gut verkorkt einige (3 bis 4) Stunden im Dunkeln stehen. Nun wird filtriert und sogleich destilliert. Die Destillation nimmt man auch im Dunkeln vor, indem man die ganze Apparatur mit einem schwarzen Tuch bedeckt. Etwa ein Zehntel des Destillates werden als Vorlauf verworfen. Das erhaltene Chloroform wird unverzüglich zur Bereitung der Reagenzlösung verwendet. Das zum Lösen des Untersuchungsmaterials bestimmte

⁸⁾ E. Mercks Jahresbericht 1935, 19.

Chloroform wird auch täglich frisch gereinigt, doch ist hier nach meinen Erfahrungen die umständliche Destillation überflüssig. Man nimmt die Reinigung so vor, wie oben bis zur Zugabe des K_2CO_3 und Na_2SO_4 beschrieben wurde. Von diesen wird das Chloroform nach zwei Stunden durch ein Papierfilter abfiltriert und damit am Untersuchungstag das Lösen und das Verdünnen der Proben vorgenommen. Wenn auch das so gereinigte Chloroform nicht vollkommen wasserfrei ist, kann es für unsere Zwecke sehr gut gebraucht werden.

Das Antimontrichlorid („Stibium chloratum cryst.“) wird zerrieben und über Nacht (nicht länger!) über Schwefelsäure getrocknet. Auf je 100 ccm frisch destillierten Chloroforms werden 25 g $SbCl_3$ genommen und in einer gut schließenden Glasstöpselflasche damit gesättigt. Da die letzten Anteile des $SbCl_3$ schwierig in Lösung gehen, muß die Flasche oft und ausdauernd geschüttelt werden (eventuell im Schüttelapparat). Auch die Bereitung der Reagenzlösung nimmt man zweckmäßig im Dunkeln vor. Da sich die Lösung gewöhnlich übersättigt, läßt man sie gut verschlossen über Nacht stehen und filtriert durch ein dichtes Papierfilter (z. B. Schleicher & Schüll Nr. 507), wenn nötig zweimal. Während des Filtrierens hält man den Trichter gut bedeckt und auch sein Stiel liegt gut am Halse des Rezipienten auf. Die erhaltene Reagenzlösung muß wasserklar sein. Sie wird in einer braunen Glasstöpselflasche, die dabei noch im Dunkeln steht, aufbewahrt. Der Glasstöpsel wird mit Hahnenfett gut beschmiert. Beim Gebrauch wird natürlich nicht aus der Flasche gegossen, vielmehr nimmt man die zur täglichen Bestimmung nötige Menge mittels einer Pipette in eine kleinere Glasstöpselflasche. Die richtig hergestellte und aufbewahrte Reagenzlösung ist recht beständig^{*)}. Das in Chloroform gelöste $SbCl_3$ übt anscheinend eine konservierende Wirkung aus, da im Reagens Phosgen nie nachgewiesen werden kann.

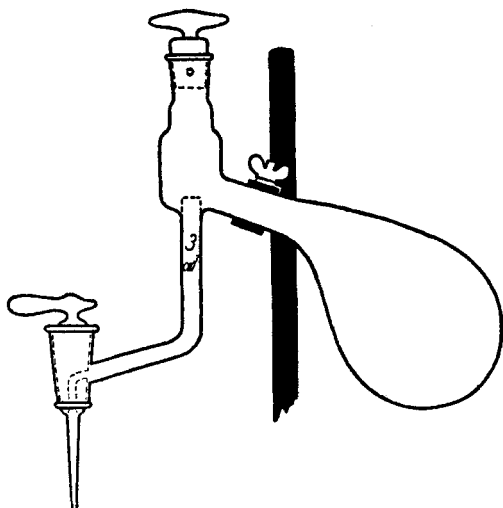
Ausführung der Reaktion.

Ich beschreibe jene Ausführungsform, welche ich nach vielen Versuchen als die zweckmäßigste fand. Die einzelnen Autoren lassen nämlich die Carr-Price-Reaktion auf sehr verschiedene Arten ausführen, besonders was das Volum und den Zeitpunkt der Ablesung betrifft. Auch lassen die verschiedenen Beschreibungen oft an Ausführlichkeit manches zu wünschen übrig.

Von der vitaminhaltigen Substanz (die Vorbereitung dieser gebe ich später an) bereitet man eine Lösung in Chloroform so, daß 1 ccm derselben etwa 20 bis 150 I.E. Vitamin A enthalte. Man läßt mittels einer Bürette (Hahn darf nicht gefettet werden!) in eine 1-cm-Küvette des Pulfrichschen Photometers so viel von dieser Vitaminlösung, daß in der Küvette 5 bis 15 I.E. Vitamin sei. Das Volum der in der Küvette befindlichen Vitaminlösung sei genau 0.3 ccm, man soll also möglichst 0.3 ccm in die Küvette geben oder, falls 0.1 oder 0.2 ccm abgelassen

^{*)} So ergab eine Reagenzlösung mit einer gewissen Menge Vitamin A gleich nach der Zubereitung die Extinktionen 0.640 und 0.648, nach fast fünf Monaten mit derselben Vitaminmenge 0.659, 0.679 und 0.668.

wurden, mit reinem Chloroform aus einer anderen Bürette das Volum zu 0.3 ccm ergänzen. Man setzt die Küvette in das Photometer (als Kompensationsflüssigkeit dient eine in den anderen Strahlengang gesetzte 1-cm-Küvette mit reinem Chloroform) und gibt nun 3.0 ccm Reagenzlösung hinzu. Letztere wird auch vermittle einer Bürette zugegeben; die Bürette wird durch ein Bechergläschen bedeckt gehalten. Zweckmäßig bedient man sich dazu der von L. W. Winkler angegebenen Büretten mit langem seitlichen Ablaufrohr¹⁰⁾, deren Ausflußöffnung sich unmittelbar über der Küvette befindet. Der Querschnitt der Ausflußöffnung der Bürette sei so bemessen, daß das Ausfließen der 3 ccm höchstens 5 bis 8 Sekunden in Anspruch nehme. Dieses schnelle Auslaufen besorgt zugleich das Vermischen



des Küvetteninhaltes. — Noch praktischer ist eine der sog. Nachfüllbürette desselben Autors (a. a. O. 44) nachgebildete Dosiervorrichtung (siehe Abbildung), welche in einem Lager kippbar am Stativ befestigt wird.

Die Intensität der entstehenden blauen Farbe ist nicht beständig; sie erreicht in einigen Sekunden ein Maximum und nimmt von da an auch mit vollkommen wasser- und alkoholfreiem Chloroform ab. Ich versuchte durch Verwendung von eisgekühlter Reagens- und Vitaminlösung die Farbe beständiger zu machen, doch konnte ich damit nur eine gewisse Verzögerung erreichen. Man muß die Ablesung also, um reproduzierbare Werte zu erhalten, in einem festgesetzten Zeitpunkt vornehmen. Die meisten Autoren lassen in

¹⁰⁾ Abbildung in L. W. Winkler: Ausgewählte Untersuchungsverfahren für das chemische Laboratorium. (Band XXIX von: Die chemische Analyse, Stuttgart 1931, Seite 62 und 94.)

jenem Zeitpunkt ablesen, in welchem die Intensität der blauen Färbung das Maximum erreicht. Ich kann das ganz entschieden nicht empfehlen; das Maximum tritt nach Hinzufügen des Reagens so schnell auf, daß man kaum Zeit hat, sich zum Okular des Photometers zu setzen, geschweige die Adaptation des Auges zu erreichen. Ich lese also genau 20 Sekunden nach Hinzufügen des Reagens ab; man kann natürlich auch einen anderen Zeitpunkt wählen, je nach Geschicklichkeit, Eignung des Auges usw., nur muß man alle Ablesungen immer im gewählten Zeitpunkt ausführen¹¹⁾. Im Moment des Öffnens der Bürette mit der Reagenzlösung setzt man eine Stoppuhr in Gang; das Ausfließen nimmt, wie ich schon erwähnte, etwa 5 Sekunden in Anspruch, dann hat man noch reichlich Zeit, sich zum Photometer zu setzen, das Auge an die Farbe des Gesichtsfeldes zu adaptieren, indem man mit der linken Hand die Trommel langsam auf Gleichheit des Gesichtsfeldes eindreht und dadurch dem Verblässen folgt. Von Zeit zu Zeit „schielt“ man auf die Uhr hin und liest genau bei 20 Sekunden die Extinktion (die rote Zahl) ab. Als Farbfilter dient S 61.

Da, im Gegensatz zu der üblichen Kolorimetrie, hier nur eine einzige Ablesung möglich ist, muß die ganze Messung noch wenigstens zweimal wiederholt werden und der Mittelwert der Ablesungen genommen werden. Wäre die Intensität der erhaltenen blauen Farbe zu stark, so nimmt man die Bestimmung mit weniger Vitaminlösung vor (dieses natürlich immer zu 0.3 ccm ergänzend). Die Küvetten (wie allgemein die Apparate) werden mit reinem Chloroform abgespült. Eventuell ausgeschiedenes Antimonhydroxyd wird von Zeit zu Zeit mit konzentrierter Salzsäure entfernt.

Ein Idealfall wäre, wenn man nun die abgelesene Extinktion so auf Vitamin-A-Gehalt umrechnen könnte, daß man den Vitamin-gehalt des untersuchten Präparates nicht in Internationalen Einheiten, sondern in γ ausdrücken könnte. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen noch nicht möglich. Erstens steht uns noch kein gut definiertes, reines und stabiles Vitamin A zur Verfügung. In der Frage der biologischen Wirksamkeit der von verschiedenen Forschern hergestellten oder isolierten Vitamine scheint auch noch manches ungeklärt zu sein. Der Wirkungswert von 1 g kristallisiertem Vitamin A wird zu 2 265 000 I. E. bis 3 400 000 I. E. angegeben¹²⁾. Diese Unstimmigkeiten dürften z. T. wohl auf den Unterschied im Wirkungswert des freien und des veresterten Vitamins zurückzuführen sein. Und letzteres ist zugleich der zweite Grund dafür,

¹¹⁾ Schon aus diesem Grunde ist ein unmittelbarer Vergleich der von verschiedenen Autoren in verschiedenen Zeitpunkten abgelesenen, mit anderswie vorbereitetem Chloroform usw. ausgeführten Messungen erhaltenen Blauwerte nicht möglich. Die Geschwindigkeit des Verblässens der Farbe hängt in erster Reihe vom Feuchtigkeits- und Alkoholgehalt des Chloroforms ab. So gezogene Folgerungen können vollkommen falsch sein.

¹²⁾ Th. M. Mead, *Biochemical J.* 33, 589 (1939); H. E. Munsell, *J. Amer. med. Ass.* 111, 248 (1938); H. N. Holmes und R. E. Corbet, *J. Amer. chem. Soc.* 59, 2042 (1937); P. Karrer, *Helv. chim. Acta* 22, 1149 (1939).

daß eine Umrechnung der Extinktion auf I. E. nicht einfach möglich ist. Dieser Umstand erschwert auch eine Annahme irgendeines Vitamin-A-Präparates mit gut definiertem Wirkungswert als Standard; auch die langsame Abnahme des Wirkungswertes auch bei richtiger Lagerung muß berücksichtigt werden. Wie groß die Schwierigkeiten gerade in dieser Frage sind, zeigt, daß ein angenommener, ja einfach in Vorschlag gebrachter Umrechnungsfaktor von Extinktion (oder des Blauwertes des Lovibondschen Tintometers der angelsächsischen Nationen) auf Internationale Einheiten auch heute noch nicht existiert. Vgl. auch das unter Note 11 Gesagte. Viele Autoren geben eben deshalb bei ihren Untersuchungen nicht den Vitamin-A-Gehalt, sondern nur den Blauwert an. Es ist jedoch zu erstreben, daß auch der Vitamin-A-Gehalt von pharmazeutischen Präparaten, sodann von Lebensmitteln gerade so in Gewichtseinheiten angegeben werden kann, wie dieses schon für die meisten anderen Vitamine geschieht.

Um also vorerst die sogenannte Wirkungsstärke der Reagenzlösung standardisieren zu können, bedarf es einer gut definierten Substanz, welche zwar nicht Vitamin A ist, doch mit SbCl_3 eine dem Axerophthol im Spektrum möglichst ähnliche blaue Farbe gibt, deren Intensität mit der Zeit möglichst auch abnimmt. Dies vorerst unter der Voraussetzung, daß die in verschiedenen Zeitpunkten, wenn auch möglichst nach Gleichförmigkeit trachtend, hergestellten Reagenzlösungen mit dem Vitamin A nicht gleich intensive Blaufärbungen hervorrufen. Ob dies so ist, kann ich noch nicht sagen; es ist auch möglich, daß fortgesetzte Untersuchungen mit vielen Reagenzlösungen ergeben werden, daß ihre Wirkungsstärke praktisch immer dieselbe ist. In diesem Fall wäre ein „Aushilfsstandard“ nicht notwendig. Bis dahin aber verfare ich so: ich stelle fest, welche intensive Blaufärbung eine gewisse Reagenzlösung mit dem Standard ergibt; stelle dann fest, welche intensive Blaufärbung dieselbe Reagenzlösung mit einigen Vitamin-A-Präparaten von bekannter biologischer Wirksamkeit gibt. Wird sich dann der Verlauf der Farbenintensität von Standard und Axerophthol auch bei zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellten, oder aber längere Zeit gelagerten Reagenzlösungen immer als parallel verlaufend erweisen (ich habe gute Gründe, dieses schon annehmen zu dürfen), so kann man jedwede Reagenzlösung immer auf diese Substanz einstellen. Als solche Substanz kann reines kristallisiertes β -Karotin dienen; natürlich nicht seine als internationales Vitamin-A-Standard im biologischen Versuch dienende Lösung in Kokosöl, da diese hierzu nicht geeignet ist¹³⁾. Ob die besagte Parallelität tatsächlich bei zu ver-

¹³⁾ Daß das β -Karotin zugleich als internationales Vitamin-A-Standard dient, ist in diesem Fall bloß Zufall, an einen numerischen Zusammenhang zwischen blauer Farbe und Vitaminwirkung braucht man nicht zu denken. — Bei der Bestimmung von Vitamin + Karotine im Blut verwendete schon H. D o s t (Klin.-Wschr. 1937, 273) β -Karotin. Sein Meßverfahren sowie seine Berechnung ist von meiner grundlegend verschieden und kann auch für unsere Zwecke nicht gebraucht werden.

schiedenen Zeitpunkten hergestellten oder älteren Reagenzlösungen immer besteht, kann ich noch nicht mit Sicherheit behaupten, doch scheinen die bisherigen Versuche dafür zu sprechen. Ursprünglich dachte ich auch, daß nicht nur jede einzelne Reagenzlösung, sondern auch das täglich zu reinigende Chloroform jedesmal auf Karotin einzustellen sind. Anscheinend läßt sich jedoch das Chloroform auf die geschilderte Weise immer gleich wasser- und alkoholfrei herstellen; geringe Unterschiede in der Konzentration der Reagenzlösung wiederum scheinen auch keinen so entscheidenden Einfluß auf die Farbenintensität auszuüben, wie aus der Tabelle 1 ersichtlich.

Man wägt daher zur Einstellung etwa 0.020 g β -Karotin ab, löst es in gereinigtem Chloroform zu 100 ccm auf und entnimmt von dieser Lösung 0.3, 0.2 und 0.1 ccm (eventuell auch noch 0.05 ccm; ergänzt jedoch jedesmal zu 0.3 ccm) und verfährt damit gerade so, wie oben bei der Bestimmung des Vitamins A beschrieben wurde. Man kann so die Extinktionskurve des Karotins feststellen. Tabelle 1 zeigt die für reines β -Karotin zu verschiedenen Malen gefundenen Extinktionswerte sowie deren Mittelwerte. Die zweite Kolonne der Rubrik „Extinktion“ enthält jene Werte, die ich so erhielt, daß ich die vorschriftsgemäß hergestellte Reagenzlösung mit 10 Vol.-% gereinigtem Chloroform verdünnte. Diese ziemliche Veränderung in der Konzentration des Reagens scheint also keinen besonders großen Einfluß auf die Extinktion zu haben!

Tabelle I.

Vorgelegt	Extinktion	
87 γ	0.675, 0.690, 0.680; im Mittel 0.682	—
72 γ	0.560, 0.571, 0.570, 0.562; im Mittel 0.566	—
57 γ	0.449, 0.450, 0.455; im Mittel 0.451	0.460, 0.470
48 γ	0.392, 0.386, 0.390; im Mittel 0.389	—
45 γ	0.370, 0.365, 0.380; im Mittel 0.371	—
38 γ	0.306, 0.310, 0.318; im Mittel 0.311	0.330, 0.321
30 γ	0.270, 0.276, 0.382; im Mittel 0.276	—
24 γ	0.210, 0.209, 0.216, 0.220; im Mittel 0.214	—
19 γ	0.180, 0.190, 0.175; im Mittel 0.182	0.210, 0.212
15 γ	0.140, 0.140, 0.138, 0.145; im Mittel 0.141	—
12 γ	0.120, 0.128, 0.132, 0.125; im Mittel 0.126	—
9.5 γ	0.110, 0.115; im Mittel 0.113	0.126
7.5 γ	0.090, 0.090, 0.098; im Mittel 0.093	—

In der II. Tabelle sind die Ergebnisse von Messungen zusammengestellt, welche ich mit verschiedenen Vitamin-A-Präparaten bzw. Konzentraten, deren biologischen Wirkungswert ich guten Grund hatte, als zuverlässig anzunehmen, erhielt. Die Übereinstimmung der Extinktionen der einzelnen Messungen ist, in Anbetracht der Versuchsschwierigkeiten, insbesondere daß nur je ein einziges Mal abgelesen werden kann, recht gut zu nennen, d. h. man kann unter genau einzuhaltenden Versuchsbedingungen reproduzierbare Werte erhalten.

Es standen mir folgende Präparate zur Verfügung: Voganöl, welches in Deutschland wohl allgemein bekannt ist; es enthält das Vitamin A zum größten Teile als Ester (wahrscheinlich als nativen Ester) in Öl gelöst. 1 g besitzt eine biologische Wirksamkeit von $126\,000 \pm 20\,000$ I.E. Muster I lagerte bei uns etwa ein Jahr, Muster II habe ich frisch erhalten.

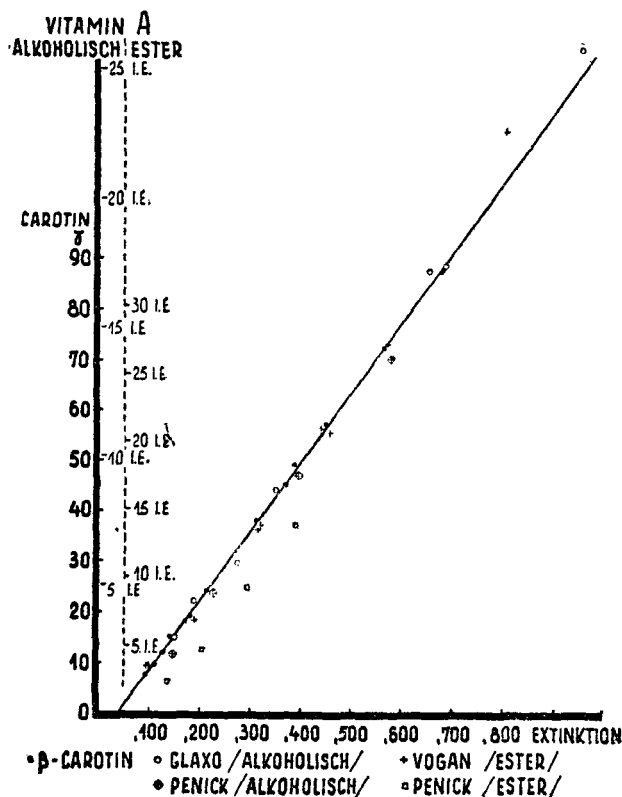
Glaxo ist ein amerikanisches Konzentrat aus Fischleberölen. Es enthält das Vitamin in freier Alkoholform. 1 g besitzt 750 000 I.E. Penick-Konzentrate sind auch amerikanischen Ursprungs, eines enthält freies Axerophthol, das andere verestertes. Da beide je 1 g 1 Million I.E. besitzen, dürften sie zu rund ein Drittel aus reinem Vitamin A bestehen.

„Vorgelegte Menge“ bedeutet immer die in der Küvette enthaltene Vitamin-A-Menge. Es wurden 0.01 bis 0.10 g Vitaminkonzentrat eingewogen, aus je einem Muster auch verschiedene Einwaagen, zu 100 bis 200 bis 300 ccm aufgefüllt und 0.1 bis 0.2 bis 0.3 ccm entnommen.

Tabelle II.

Substanz	Vor- gelegt	Extinktion
Voganöl	Muster I	40.7 I.E. 0.810, 0.805, 0.820, 0.810; im Mittel 0.811
	Muster I	27.1 I.E. 0.570, 0.580, 0.590, 0.560, 0.570; im Mittel 0.574
	Muster II	20.9 I.E. 0.436, 0.449, 0.432, 0.445; im Mittel 0.441
	Muster I	20.5 I.E. 0.450, 0.448, 0.470, 0.460; im Mittel 0.457
	Muster I	13.7 I.E. 0.330, 0.320, 0.310; im Mittel 0.320
	Muster I	13.6 I.E. 0.335, 0.320, 0.304, 0.310; im Mittel 0.317
	Muster II	13.6 I.E. 0.310, 0.329, 0.307, 0.320; im Mittel 0.317
	Muster I	6.8 I.E. 0.180, 0.174, 0.179, 0.170, 0.170; im Mittel 0.175
	Muster II	6.8 I.E. 0.194, 0.190, 0.190; im Mittel 0.191
	Muster I	3.4 I.E. 0.091, 0.101, 0.100; im Mittel 0.097
	Muster II	3.4 I.E. 0.099, 0.095, 0.104; im Mittel 0.099
Glaxo-Konzentrat	25.7 I.E.	0.950, 0.952, 0.964, 0.960, 0.970; im Mittel 0.959
	17.3 I.E.	0.680, 0.690, 0.685, 0.695; im Mittel 0.688
	17.1 I.E.	0.658, 0.669, 0.650, 0.655; im Mittel 0.658
	11.5 I.E.	0.462, 0.469, 0.475; im Mittel 0.469
	8.6 I.E.	0.360, 0.350, 0.345; im Mittel 0.351
	5.8 I.E.	0.280, 0.275, 0.270; im Mittel 0.275
	4.3 I.E.	0.180, 0.182, 0.202, 0.190; im Mittel 0.189
	2.9 I.E.	0.149, 0.150, 0.155; im Mittel 0.151
Penick-Konzentrat Alkoholform	13.8 I.E.	0.580, 0.581; im Mittel 0.580
	9.2 I.E.	0.400, 0.390, 0.390, 0.395; im Mittel 0.394
	4.6 I.E.	0.220, 0.231, 0.228; im Mittel 0.226
	2.3 I.E.	0.159, 0.143, 0.139, 0.148; im Mittel 0.147
Penick-Konzentrat Esterform	13.8 I.E.	0.390, 0.390, 0.400; im Mittel 0.393
	9.2 I.E.	0.302, 0.290, 0.292, 0.295; im Mittel 0.295
	4.6 I.E.	0.203, 0.200, 0.210; im Mittel 0.204
	2.3 I.E.	0.130, 0.130, 0.140, 0.140; im Mittel 0.135

Die Abbildung zeigt die auf Grund der Zahlentafeln zusammengestellte Schaulinie. Man trägt, sog. Koordinatenpapier benutzend, auf die Abszisse die Extinktion, auf die Ordinate die in der Küvette enthaltene, in γ ausgedrückte Menge von β -Karotin auf. Der Maßstab sei so, daß die einer Extinktion von 0.100 entsprechende Entfernung gleich sei einer 10 γ Karotin entsprechende Entfernung. Trägt man



nun die aus Tabelle I ersichtlichen, den einzelnen Karotinmengen entsprechenden Extinktionen in das Koordinationssystem ein, so erhält man eine Reihe von Punkten, durch welche sich eine Gerade ziehen läßt; innerhalb gewisser Konzentrationsgrenzen ist also die Extinktion des Karotins der Konzentration linear entsprechend. Wenn man den erwähnten Maßstab gebraucht, wird die Neigung der Geraden etwa 45° sein. Auf die Ordinate sollte man nun die in internationalen Einheiten ausgedrückten Mengen des vorgelegten Vitamins A auftragen, um dann mit Hilfe der Karotinkurve (bzw. der hieraus abzuleitenden Formel) aus einer abgelesenen Extinktion den Vitamin-A-Gehalt berechnen zu können. Wir wissen jedoch

nicht, in welchem Maßstab das geschehen soll. Man sucht daher aus den Angaben der Tabelle II einen Wert aus, welcher das Ergebnis mehrerer gut übereinstimmender Messungen war und eine Extinktion um 0.500 darstellt. Ein solcher Wert ist z. B. die Extinktion 0.469 von 11.5 I.E. Glaxokonzentrat. Man zählt nun ab, wie viele kleine Quadrate des Koordinatenpapiers auf der Ordinate einer in der Karotinkurve abgegriffenen Extinktion von 0.469 entsprechen; es sind 117 Quadrate. Dann entsprechen einer I.E. $117/11.5 = 10.17$ Quadrate. Dieser Maßstab wird also auf die Ordinate für 1 I.E. Vitamin A aufgetragen. Um unsere Messungen kontrollieren zu können, trägt man in das Koordinatensystem auch die übrigen Glaxowerte auf, für 1 I.E. immer 10.17 Quadrate rechnend. (Man kann diese Rechnungen sehr bequem mit dem Rechenstab vornehmen.) Wie das Schaubild zeigt, reihen sich auch diese Werte linear an. Ähnlich verhalten sich die Werte des alkoholförmigen Penick-Konzentrates.

Haben wir also eine für Karotin festgestellte Kurve, so können wir mit Hilfe des wie oben berechneten Ordinatenmaßstabes den Vitamingehalt eines das Vitamin in freier Alkoholförmigkeit enthaltenden Präparates ausrechnen, wenn wir die der abgelesenen Extinktion entsprechende I.E. am Schaubild aussuchen. Oder man kann auch mit einer Formel rechnen:

$$x = (E - 0.040) \cdot 26.87$$

Hier bedeutet x die Zahl der gesuchten I.E.en, E die abgelesene Extinktion. 0.040 ist der Betrag, um welche die Gerade des Karotins (oder eigentlich jetzt schon des Axerophytols) auf der Abszisse vom Nullpunkt abweicht, ausgedrückt im Extinktionsmaßstab und graphisch (am Koordinatenpapier) ausgesucht. Der Zahlenwert des Faktors wiederum ergibt sich, wenn man die einzelnen Mengen an I.E.en mit den je für sie gemessenen, um 0.040 substrahierten Extinktionswerten dividiert und hiervon einen Mittelwert nimmt.

Bei obigen Überlegungen war immer supponiert, daß jede Reagenzlösung ganz ähnliche Extinktionswerte ergibt, sowohl für Karotin wie auch für Axerophtol, und zwar gleichwohl an absoluten Werten wie auch an Parallelität. Ich halte dieses auf Grund meiner bisherigen Messungen für wahrscheinlich, obzwar es nur an zwei bis drei Reagenzlösungen gemessen wurde. Weitere Versuche sind natürlich noch notwendig. Doch wird man in Zukunft nicht mehr die vielen langwierigen Messungen ausführen müssen. Meine Messungen zeigten, daß innerhalb gewisser Grenzen sowohl Karotin als auch das Axerophtol lineare Kurven ergeben, man wird also, um die Parallelität bzw. den Ordinationsmaßstab für eine neue Reagenzlösung festzustellen, bloß 2 bis 3 Punkte feststellen müssen. Jedenfalls gebe ich obigen Faktor nur mit Vorbehalt, nur als Beispiel der Berechnung.

Obige Rechnung gilt aber nur für freies Axerophtol. Wenn man die Berechnung mit einem Esterpräparat vornimmt, so erhält man auf der Ordinate einen ganz anderen Maßstab der I.E.en. Dieser Maßstab des Schaubildes wurde auf Grund der 0.574-Extinktion von

27.1 I.E. Vogan durchgeführt. 1 I.E. entspricht 5.36 Quadraten. Wenn man auch die übrigen Voganwerte einträgt, sowie auch diejenigen des Penickschen Esters, ist ersichtlich, daß die I.E.en, d. h. der Gehalt an Vitamin A eine lineare Funktion der Extinktion ist. Zugleich fällt jedoch auf, daß der Penicksche Ester bei gleicher Extinktion eine etwas schwächere biologische Wirksamkeit hat als das Voganöl. Dies ist z. T. mit der $\pm 20\%$ igen Fehlerbreite der biologischen Einstellung erklärlich, z. T. vielleicht auch damit, daß Vogan native Ester enthält, welche wirksamer sein sollen. An den erhaltenen zweierlei Maßstäben ist jedoch zugleich ersichtlich, daß die Esterform bei gleicher Extinktion rund zweimal so große biologische Wirkung besitzt als die Alkoholform. Diese Beobachtung ist in vollkommener Übereinstimmung mit den Resultaten der unter 5, 6, und 7 genannten Autoren.

Man kann auch hier mit einer Formel rechnen, welche sich für esterförmiges Vitamin (berechnet für Vogan und auf Grund obiger Überlegungen) als

$$x = (E - 0.040) \cdot 51.04$$

berechnet. Wenn man nicht weiß, welche Ester vorliegen, kann man aus den Werten von Vogan und von Penick-Ester einen Mittelwert nehmen.

Wie ersichtlich, müßte man jedoch immer wissen, ob im untersuchten Präparat das Vitamin A als freies Axerophthol oder als sein Ester vorliegt. Bei Fischleberölen kann man mit der für native Ester charakteristischen Voganformel rechnen. Vitaminkonzentrate jedoch können sowohl Ester (native oder künstliche) als auch freien Alkohol enthalten. Wir besitzen derzeit noch kein Verfahren, um zwischen beiden analytisch differenzieren zu können, so daß unseren Untersuchungen eine gewisse Unsicherheit anhaften wird. Im zweiten Teil meiner Arbeit gedenke ich zu versuchen, diese zwei Formen analytisch zu unterscheiden. Meine diesbezüglichen Voruntersuchungen sind versprechend.

Mit dem oben angegebenen Verfahren habe ich gelegentlich unserer laufenden Arbeiten den Vitamin-A-Gehalt von verschiedenen Arzneipräparaten (in Form von öligen Lösungen, Dragées, Schokoladenmassen usw.) mit gutem Erfolge bestimmt.

*

Ich mußte aus äußeren Gründen meine diesbezüglichen Untersuchungen unterbrechen, doch hoffe ich, daß ich bald in einem zweiten Teil über den Abschluß werde berichten können. In dieser Fortsetzung gedenke ich, außer der Differenzierung zwischen Alkohol und Ester, auch über die zur quantitativen Bestimmung des Vitamins nötige Isolierung neben Fremdstoffen, Vehikeln, sowie auch anderen Vitaminen berichten zu können.
