

Bestimmung kleiner Mengen von Carotinoiden.

Von **Hans v. Euler, Harry Hellström** und
Margareta Rydbom.

(Aus dem Biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingelangt am 13. Juli 1929.)

Wohl in keinem anderen Gebiet unserer chemischen Wissenschaft darf und muß so viel und so mannigfaltige Hilfe von analytischen Mikromethoden erwartet werden als in der Biochemie.

Nachdem die Stoffe, welche die Hauptbestandteile des Tier- und Pflanzenkörpers ausmachen, in großen Zügen chemisch aufgeklärt sind, hat die feinere Ausarbeitung der Chemie der Zellkomponenten immer öfter mit Substanzen und Radikalen zu tun, deren Konzentration mit den gröberen analytischen Methoden nicht mehr bestimmt werden kann. Lebenswichtige Stoffe, wie die Hormone, Co-Enzyme, Enzyme und Vitamine, sind makrochemischen Analysen selten zugänglich. Bei der immer dringlicher werdenden Aufgabe, die Verbreitung solcher Substanzen in Zellen und Geweben quantitativ festzulegen, sind wir also auf Mikromethoden angewiesen, sei es, daß wir wägen oder titrieren, sei es, daß wir uns kolorimetrischer oder anderer optischer Methoden bedienen.

Besonders aber für diejenige Arbeit, welche immer die grundlegende und abschließende der Biochemie bleiben wird, nämlich die analytische und strukturelle Identifizierung der an Stoff- und Kraftwechsel beteiligten Substanzen, wird man immer häufiger seine Zuflucht zur Mikro-Elementaranalyse nehmen müssen, welche F. PREGL der Chemie und damit auch der Biologie geschenkt hat.

Als kleinen Beitrag zu der FRITZ PREGL gewidmeten Festschrift wollen wir Erfahrungen und Ergebnisse über Kolorimetrie der Carotinoide mitteilen. Der Nachweis kleiner Mengen dieser Stoffe hat dadurch ein besonderes Interesse gewonnen, daß es sich neuerdings gezeigt hat¹⁾, daß Carotin, bezw. Carotinoide eng mit der A-Vitaminwirkung verknüpft sind.

¹⁾ B. u. H. v. EULER, Svensk Kem. Tidskr. 40, 242; 1928 (Septemberheft). — B. u. H. v. EULER u. H. HELLSTRÖM, Biochem. Zeitschr. 203, 370; 1928. — P. KARRER, B. u. H. v. EULER, Svenska Vet. Akad. Arkiv. f. Kemi, 10, 2; 1928. — Helv. Chim. Acta, 12, 278; 1929.

Vor etwa einem halben Jahr konnte durch Untersuchungen, welche wir in Gemeinschaft mit Herrn Prof. Dr. P. KARRER, Zürich, durchgeführt haben, gezeigt werden, daß Carotin, und zwar auch hochgereinigtes — das reinste, seither mit positivem Ergebnis geprüfte, unter Stickstoff aus Hexan umkristallisierte Präparat zeigte einen Schmelzpunkt von 182° — noch in Tagesdosen von 0,01 mg deutliche A-Vitaminwirkung an Ratten ausübt.

Kolorimetrie kleiner Carotinoidmengen.

Die Kolorimetrie bildet durch die Einfachheit und Schnelligkeit der Messungen ein ausgezeichnetes Hilfsmittel, wenn es gilt, kleine Mengen stark gefärbter oder stark färbbarer Substanzen zu untersuchen. Die Genauigkeit, welche man dabei erreichen kann, beruht in hohem Grad auf der Konstruktion des angewandten Kolorimeters und auf der Methode der Farbenbestimmung.

Will man zwei „Flächenhelligkeiten“ vergleichen und auf gleiche Intensität einstellen, so kann dies mit um so größerer Genauigkeit geschehen, je größer die zu vergleichenden Felder sind, je näher sie aneinander liegen und je länger ihre Grenzlinie ist. Die erste und letzte dieser drei Bedingungen sind im allgemeinen in den meisten Kolorimetern gut erfüllt, während der gegenseitige Abstand der zu vergleichenden Felder, das heißt die Breite der Grenze je nach Konstruktion des Kolorimeters erheblich variieren kann. In den besten Typen, welche eine gute Optik besitzen, bringt man die Felder durch Spiegel oder Prismen verschiedener Konstruktion unmittelbar nebeneinander, während in einfacheren Konstruktionen der Abstand zwischen den beiden Feldern 1 bis 2 cm betragen kann.

Farben-, bezw. Intensitätsbestimmungen werden im allgemeinen in der Weise ausgeführt, daß von der auf ihre Konzentration zu untersuchenden Substanz eine Standardlösung hergestellt wird, welche man durch geeignete Verdünnung oder durch Veränderung der Schichtdicke auf die gleiche Farbstärke bringt wie die unbekannte Lösung. In diesem Fall wird nur die Gültigkeit des BEERschen Gesetzes vorausgesetzt und der Farbton wird für die beiden Lösungen ohne weiteres der gleiche, wenn die richtige Einstellung

erzielt ist; diese Einstellung kann dann noch weiter verbessert werden. Der Unterschied im Farbenton kann nämlich erhöht werden durch Einschaltung geeigneter Lichtfilter.

Nicht selten erweist es sich indessen schwer oder unmöglich, eine Standardlösung aus der zu prüfenden Substanz herzustellen, nämlich besonders dann, wenn die Substanz nicht haltbar, beziehungsweise chemisch nicht stabil ist.

Dies ist z. B. der Fall bei den Verbindungen, welche entstehen, wenn man gewisse tierische Öle nach CARR und PRICE²⁾ mit Antimontrichlorid in wasserfreiem Chloroform mischt. Die Anwendbarkeit der mit $SbCl_3$ auftretenden blauen Farbenreaktion zur Prüfung des A-Vitamingehaltes von Tranen wurde von der internationalen Hygieneorganisation des Völkerbundes diskutiert und von einem Subkomitee näher behandelt, welches zum Schluß kam, daß bei der Prüfung von Lebertranen auf ihren Gehalt an A-Vitamin die Untersuchungen mit der genannten kolorimetrischen Methode analoge Resultate ergeben, wie mit den biologischen Methoden.

Neuerdings wurde für die kolorimetrische $SbCl_3$ -Methode dadurch ein fester Ausgangspunkt gewonnen, daß durch quantitative Messungen Carotin als kolorimetrischer Standard der $SbCl_3$ -Reaktion festgelegt wurde. Mit Carotin als Standard wurden dann andere Carotinoide nach rationellen Einheiten erstmalig gemessen.

Macht die Herstellung von Standardlösungen Schwierigkeiten, so kann man Farbenfilter mit steigender Farbenintensität benutzen und für diese eine beliebige Einheit wählen. Die wesentlichste Schwierigkeit ist hierbei die, daß man den Farbenton nicht immer mit der zu messenden Lösung in Übereinstimmung bringen kann. Die verschiedenen Filterserien müssen in ihrem, resp. Spektralgebiet annähernd homogene Absorption besitzen und dürfen nicht in mehreren, weit voneinander getrennten, Spektralgebieten absorbieren.

Den von uns bei vorliegenden Messungen angewandten Kolorimeter haben wir erhalten durch Komplettierung eines sogenannten

²⁾ CARR u. PRICE, *Biochem. Journ.* 20, 497; 1926. — Spektrophotometrische Untersuchung von EULER, MYRBÄCK, FINK u. HELLSTRÖM, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 168, 177; 1927.

HÜFNER-Prismas, indem wir dieses teils mit einem Okular und teils mit einem Behälter für Filtra und Absorptionsgefäß versehen haben. Mittels des HÜFNER-Prismas bringt man die beiden Lichtbündel, welche verglichen werden sollen, miteinander in Kontakt, so daß das Gesichtsfeld im Okular in zwei durch eine äußerst schmale Linie geschiedene Hälften geteilt erscheint, von denen die eine von dem aus der Lösung gehenden Licht her stammt, die andere von dem durch die Filtra gegangenen Licht. Unmittelbar vor dem Okular ist eine Öffnung, wo ein Farbenfilter angebracht werden kann, um die Einstellung nach oben angedeutetem Effekt zu erleichtern. Als Farbenfiltra haben wir Gläser nach LOVIBOND

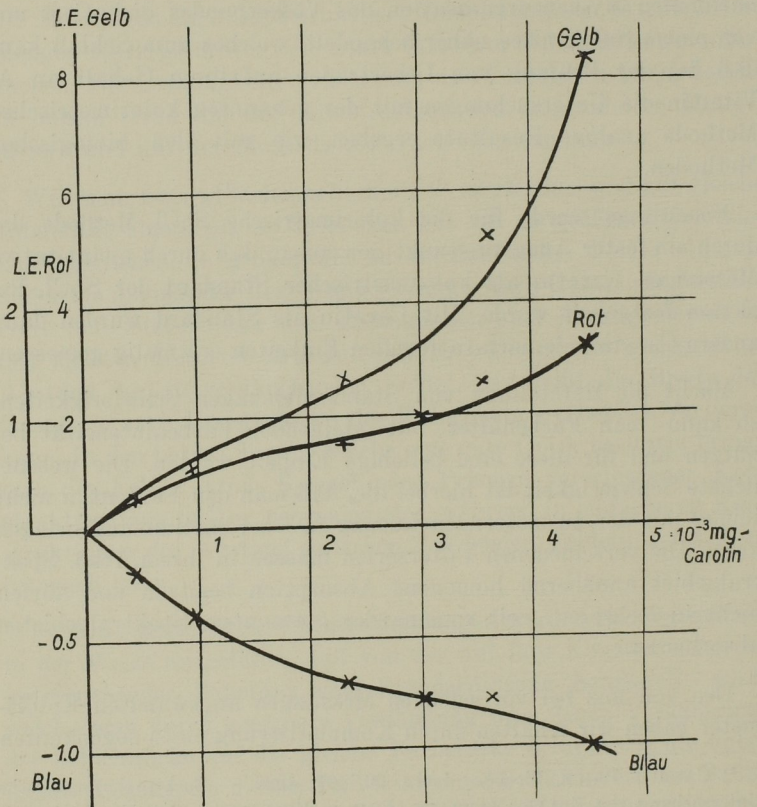


Fig. 1.

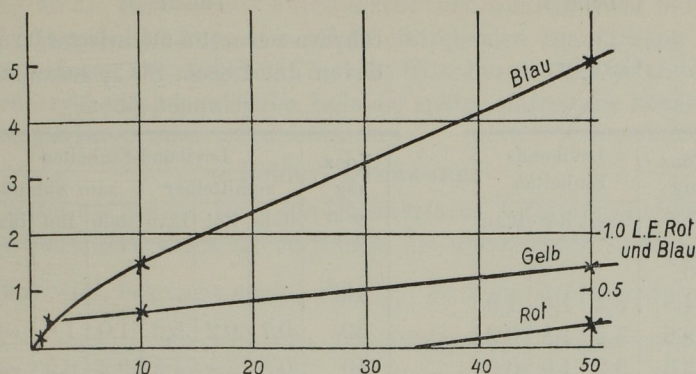


Fig. 2.

Lovibond-Einheiten, blau.

 10^{-3} mg Dihydro- α -crocetin-methylester.

verwendet, welche von der Firma Tintometer Ltd., Salisbury, geliefert werden. Die Farbstärke unserer Gläser ist in LOVIBOND-Einheiten (L. E.) ausgedrückt; jede Serie enthält 19 Filtra von steigender Farbstärke, nämlich Zehntel- von 0,1 bis 0,9 und ganze LOVIBOND-Einheiten von 1 bis 10.

Die Fig. 1 zeigt eine Standardkurve für Carotin; als Ordinate sind LOVIBOND-Einheiten aufgetragen, als Abscisse mg Carotin.

Da die Absorptionsmaxima der angewandten Farbenfiltra nicht mit denen des Carotins zusammenfallen, müssen gelbe Filtra mit roten kombiniert werden, damit der Farbenton der gleiche wird. Dabei absorbiert das rote Filter einen großen Teil vom grünen Gebiet des Spektrums, was wiederum nicht in anderer Weise ausgeglichen werden kann als durch Einschalten blauer Filtra vor das Absorptionsgefäß. Die Wirkung der verschiedenen Filtra geht deutlich aus der Fig. 1 hervor. Die Kurve für das gelbe Filtrum zeigt durch ihr kräftiges Ansteigen, daß dies die Hauptabsorption repräsentiert, während die beiden anderen Kurven wegen der relativ niedrigen Werte, welche sie enthalten, als Farbkorrekturen betrachtet werden können. Die Kurve für Blaufilter ist in der Figur negativ gezeichnet, um damit anzudeuten, daß Blaufilter vor die zu messende Probe gestellt wurden, also nicht vor die übrigen Filtra. Die Figur zeigt dadurch deutlich die Funktion des blauen Filters als Kompensation gegen das rote.

Tabelle I

Carotin

Konz. mg ccm	Lovibond- Einheiten		
	Gelb	Rot	Blau
10^{-3}			
4,5	8,4	1,6	1,0
3,6	5,2	1,3	0,9
3,0	3,2	1,0	0,8
2,3	2,7	0,7	0,7
0,9	1,1	0,5	0,4
0,45	0,6	0,3	0,2

Tabelle II

Dihydro- α -crocetin-methylester, 0,2ccm
davon mit 1,8ccm $SbCl_3$ zusammen-
gebracht, gibt :

Konz. mg ccm	Lovibond-Einheiten					
	unmittelbar			zum Schluß		
	Gelb	Rot	Blau	Gelb	Rot	Blau
10^{-3}						
50	0,7	0,2	5,0	1,0	1,8	—
10	0,3	—	1,5	0,2	0,9	—
3	0,2	—	0,5	0,2	0,2	—
1,5	0,2	—	0,2	—	—	—

Die Tabelle I enthält die für Carotin (KARRER) bei verschiedenen Verdünnungen erhaltenen Werte. Noch bei einer Konzentration von 0,00045 mg/ccm ist die gelbe Farbe meßbar.

In diesem Fall bringt also die kolorimetrische Bestimmung durch die $SbCl_3$ -Reaktion keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Messung am reinen Carotin.

Die Tabelle II gibt die Resultate einer Konzentrationsbestimmung eines anderen Carotinoides, nämlich des Dihydro- α -crocetin-methylesters, mittels der $SbCl_3$ -Reaktion wieder. Das reine Carotinoid ist nur schwach gelb gefärbt, gibt aber mit $SbCl_3$ eine starke Blaufärbung, welche gestattet, Konzentrationen bis herunter zu 0,0015 mg/ccm zu schätzen. Siehe auch Fig. 2.

Die Chlorformlösungen sowohl des Antimontrichlorides als des Carotinoides müssen bei diesen Bestimmungen sorgfältigst vor jeder Spur von Feuchtigkeit geschützt werden, da die kleinste Wassermenge, und sogar eine hohe Luftfeuchtigkeit, bedeutende Fehler in der Konzentrationsbestimmung herbeiführt.

Die sofort eintretende Blaufärbung geht innerhalb sehr kurzer Zeit (10 Sekunden) in einen roten Ton über und nach etwa zwei Minuten ist die Lösung konstant rot. Man muß deshalb die kolorimetrische Bestimmung in der Weise ausführen, daß man mit verschiedenen vorbereitenden Proben eine immer genauere Annähe-

nung an die zu messende Farbe erzielt und schließlich in wenigen Sekunden die Messung der sofort eintretenden Blaufärbung ausführen kann. Die Tabelle II enthält teils diese sofort auftretende, vorübergehende blaue Farbe, teils die später eintretende konstante rote Farbe.

Fehlerberechnung.

Wenn die Stärke der Komplementärfarbe \bar{J} als die relative Intensität dieser Farbe zu derjenigen der absorbierten Farbe J definiert wird, bekommt man: $\bar{J} = a \cdot \frac{\bar{J}_0}{J}$, wo a ein Proportionalitätsfaktor und \bar{J}_0 die wirkliche Intensität der Komplementärfarbe ist. Wird die Stärke der Komplementärfarbe \bar{J} gleich 1 definiert, wenn sie mit der ursprünglichen Intensität J_0 der absorbierten Farbe weißes Licht erzeugt, so wird³⁾

$$1 = a \cdot \frac{\bar{J}_0}{J_0} \quad \text{und} \quad a = \frac{J_0}{\bar{J}_0}.$$

Man bekommt folglich: $\bar{J} = \frac{J_0}{J}$. Dem Absorptionsgesetz gemäß ist die Konzentration einer absorbierenden Lösung proportional dem $\text{Log} \frac{J_0}{J}$, folglich auch dem Logarithmus der oben definierten Farbstärke: $\text{Konz.} = k \cdot \log \bar{J}$.

Der Fehler der Konzentrationsbestimmung ergibt sich durch Differentiation der letzten Gleichung: $dc = k \cdot \frac{d\bar{J}}{J}$ und der prozentuale Fehler $\frac{dc}{c} = \frac{1}{\text{Log} \bar{J}} \cdot \frac{d\bar{J}}{J}$. Infolge des WEBER-FECHNER'schen Gesetzes ist $\frac{d\bar{J}}{J}$ konstant und nur von den früher oben genannten Faktoren der Kolorimeterkonstruktion abhängig.

Weil wir LOVIBOND-Einheiten verwenden, deren Farbstärken in einer willkürlichen Einheit angegeben sind und außerdem gewöhnlich mehrere verschiedene Farbenfilter verwendet werden müssen, wird die Beziehung zwischen den LOVIBOND-Einheiten (x) und der Konzentration c von der allgemeinen Form

$$c = f(x) \quad \text{und} \quad \text{der Fehler} \quad \Delta c = f'(x) \Delta x.$$

³⁾ Aus dieser Definition wird auch ersichtlich, daß man immer dieselbe konstante Lichtquelle verwenden muß, um die gleiche Farbstärke zu erhalten.

Δx wird für das gemessene Intervall zu 0,1 bis 0,2 L. E. geschätzt. $f'(x)$ wird experimentell aus der Kurve als der Winkelkoeffizient ermittelt. Jede Kurve gibt einen Beitrag zum Fehler, den wir bezw. Δc_g , Δc_r , Δc_b nennen. Der gesamte Fehler beträgt dann: $\Delta c = \sqrt{\Delta c_g^2 + \Delta c_r^2 + \Delta c_b^2}$. Δc ergibt sich für Carotin nach folgender Zusammenstellung:

c	f'(x)			f'(x)Δx ⁴			
	Gelb	Rot	Blau	Δc _g	Δc _r	Δc _b	Δc
10 ⁻³							
1	1	1,3	-3	0,1	0,1	0,3	0,3
2	1	3	-5,8	0,1	0,3	0,6	0,7
3	0,8	1,8	-9	0,1	0,2	0,9	0,9
4	0,3	1	-7	0,03	0,1	0,7	0,8

In der Tat sind die Fehler jedoch kleiner als die hier angegebenen, da, wie oben erwähnt, die Kurven für rot und blau nur Korrekturen sind.

⁴) Berechnet für $\Delta x = 0,1$ L. E.