ETH zürich

ETH Library

Ueber die Identitäts-, Reinheitsprüfung und Gehaltsbestimmung einiger Vitamine

Doctoral Thesis

Author(s):
Schmid, Hans Werner

Publication date:
1960

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000090780

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Prom. Nr. 2997

Über die Identitäts-, Reinheitsprüfung und Gehaltsbestimmung einiger Vitamine

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

Hans Werner Schmid
eidg. dipl. Apotheker
von Basadingen und Schlattingen (TG)

Referent: Herr Prof. Dr. J. Büchi
Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Flück

Zürich 1960
Offsetdruck: Schmidberger & Müller

Meiner lieben Frau
und
meinen lieben Eltern

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Büchi,

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit am Pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt wurde, möchte ich an dieser Stelle für die wertvollen Anregungen und das lebhafte Interesse, das er meiner Arbeit, sowie für das Wohlwollen, das er mir persönlich stets entgegenbrachte, herzlich danken.

Herrn Dr. X. Perlia danke ich aufrichtig für die vielen guten Ratschläge bei den experimentellen Arbeiten.

Herrn R. Schwegler, Verwalter des Pharmazeutischen Institutes der ETH, bin ich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft zu grösstem Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
2 Allgemeiner Teil	2
2.1 Die untersuchten Handelsmuster	2
2.2 Sinnenprüfung	2
2.3 Chemische Identitäts- und Reinheitsprüfung	2
2.4 Physikalisch-chemische Prüfung	2
2.4.1 Schmelzpunkt	2
2.4.2 Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen	5
2.4.3 Bestimmung des pH-Wertes	5
2.4.4 Papierchromatographie	6
2.4.5 Spektrophotometrie	6
2.5 Gehaltsbestimmungen	7
2.5.1 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl	8
2.5.2 Titration mit Perchlorsäure	10
2.5.3 Titration chinoidartiger Körper mit Cerisulfat und Titanochlorid	10
2.6 Reagenzien	19
3 Spezieller Teil	20
3.1 Acidum folicum	20
3.2 Biotinum	37
3.3 Cholecalciferolum	45
3.4 Menadiono-Natrium bisulfurosum	59
3.5 Pyridoxinum hydrochloricum	74
3.6 Tocopherolum aceticum	90
3.7 Rutinum	103
4 Zusammenfassung	119

Abkürzungen

Apot. Kontr. Labor.	=	Apotekens Kontrollaboratoriums Monografisamling 1953
Brit. Ph. 1958	=	British Pharmacopoeia 1958
Brit. Pharm. Cod. 1954	=	British Pharmaceutical Codex 1954
Cod. Med. Scand.	=	Codex Medicamentarius Scandinavicus, Dansk udgave
D.C.I.	=	Dénominations Communes Internationales
DAB 6	=	Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe
NF X	=	The National Formulary, Tenth Edition 1955
N.N.R.	=	New and Nonofficial Remedies
N.N.R. Tests and Standards	=	Tests and Standards for New and Nonofficial Remedies
Ph.Dan. 1948	=	Pharmacopoea Danica 1948
Ph. Int.	=	Pharmacopoea Internationalis
Svenska F. 1946	=	Svenska Farmakopén 1946
USP XV	=	Pharmacopoeia of the United States of America, Fifteenth Revision 1955

In den Tabellen und bei der Prüfung der Handelsmuster bedeuten:

verd.	=	verdünnt
konz.	=	konzentriert
=	=	entsprechend den Forderungen
≠	=	nicht entsprechend den Forderungen
+	=	positiver Ausfall der Reaktion
-	=	negativer Ausfall der Reaktion

Wir danken den folgenden Hersteller- und Handelsfirmen für die Ueberlassung von Untersuchungsmustern:

Abbott, Laboratories, Chicago
Bayer, Leverkusen
Bonomedic, München
Delta Chemical, New York
Geigy A.G., Basel
Hoffmann - La Roche Co. A.G., Basel
Labaz A.G., Basel
Merck A.G., Darmstadt
Organon, Oss
Oesterreichische Stickstoffwerke, Linz
Penick, New York
Rhein-Chemie, Heidelberg
Siegfried A.G., Zofingen
Wander A.G., Bern

1 EINLEITUNG

In die Pharmacopoea Helvetica Editio Quinta und ihre Supplemente sind aus der Wirkstoffgruppe der Vitamine erst einige Vertreter aufgenommen worden. Da verschiedene Vitamine an Bedeutung gewonnen haben und da vor allem diese Substanzen auch im Handel erhältlich sind, besteht die Notwendigkeit, ihre Reinheit und ihren Gehalt durch Vorschriften zu normieren.

Die Ausarbeitung von Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsprüfungen für die Vitamine: Acidum folicum, Biotinum, Cholecalciferolum, Menadiono-Natrium bisulfurosum, Pyridoxinum hydrochloricum, Tocopherolum aceticum und Rutinum übernahm ich auf Vorschlag des Präsidenten der Eidg. Pharmakopöekommission, Herrn Prof. Dr. J. Büchi. Die Untersuchungen sollten die nötigen Grundlagen für Prüfungsvorschriften der Pharmakopöe liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem die neueren physikalisch-chemischen Methoden: Papierchromatographie, Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer, Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, Perchlorsäure-Titration sowie UV-Spektrophotometrie berücksichtigt. Eine allgemeine Untersuchung über die Redoxtitration einiger chinoider Verbindungen soll einen Beitrag zu der schon in der Pharmakopöe aufgenommenen Redoxometrie liefern. Die experimentellen Untersuchungen haben eindeutig bewiesen, dass diese erwähnten analytischen Methoden zur Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt unumgänglich sind.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 Die untersuchten Handelsmuster

Wir haben Substanzmuster geprüft, wie wir sie von den verschiedenen Hersteller- und Handelsfirmen erhalten haben. Dabei mussten wir in zwei Fällen feststellen, dass die Muster nicht sachgemäss aufbewahrt waren und bei der Prüfung eine Farbänderung und einen Nebengeruch zeigten.

2.2 Sinnenprüfungen

Zur Beurteilung der Farbe der Handelsmuster wurde die Substanz auf weisses Filterpapier gestreut. Da keines der Vitamine einen spezifischen Geruch oder Geschmack besitzt, können diese Sinnenprüfungen vor allem zur Erfassung gewisser Verunreinigungen herangezogen werden.

2.3 Chemische Identitäts- und Reinheitsprüfungen

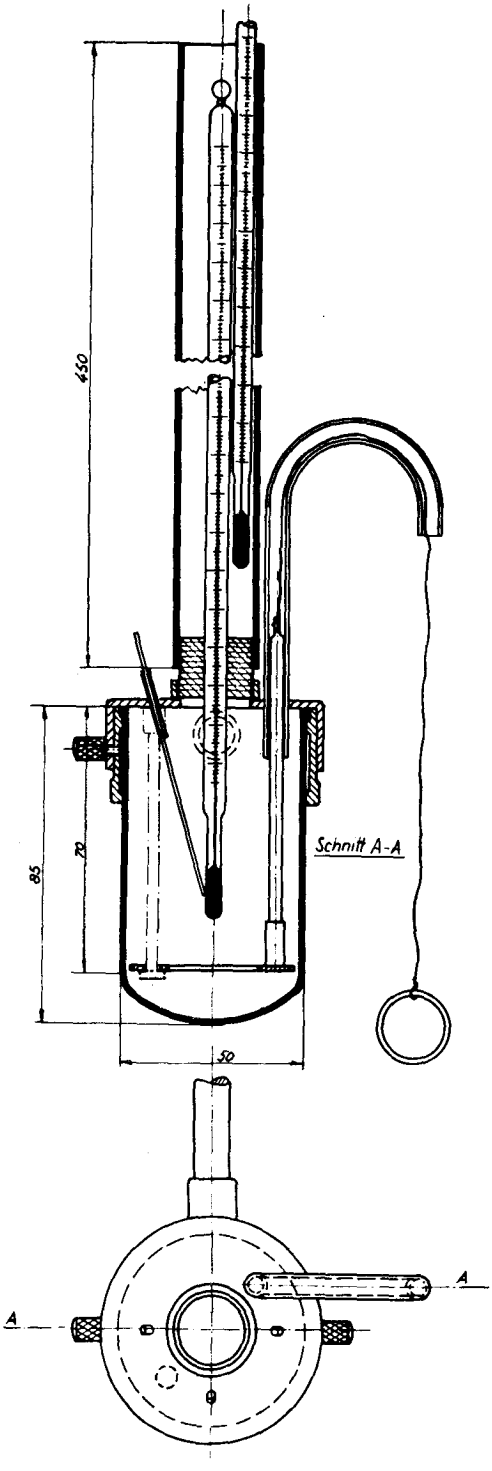
Zur chemischen Prüfung auf Identität und Reinheit hielten wir uns an die Vorschriften der Ph.Helv.V und der Supplemente. So weit es möglich war, verwendeten wir die Reagenzien der Ph.Helv.V.

2.4 Physikalisch-chemische Prüfungen

2.4.1 Schmelzpunkt: Sämtliche Schmelzbereiche haben wir mit der Apparatur, die für die Ph.Helv.VI vorgeschlagen ist und korrigierte Schmelzbereiche ergibt, bestimmt. Unter Schmelzbereich wird das fadenkorrigierte Temperaturintervall vom Beginn des Zusammensinterns bis zur Erreichung der klaren Schmelze der Substanz verstanden.

Apparatur: Die zu benützende Apparatur ist ein aus schwer schmelzbarem Geräteglas hergestelltes zylindrisches Gefäss mit gewölbtem Boden, das einen äusseren Durchmesser von 50 mm, eine Mantellänge von 70 mm und eine grösste Tiefe von höchstens 85 mm aufweist. Das mit Silikonöl SF-96/100 als Badflüssigkeit zu 2/3 (ca. 65 ml) aufgefüllte Glasgefäss wird in einen Metallring eingesetzt, auf dessen Nute der verdickte Rand des Glasgefässes zu liegen kommt. Der das Glasgefäss tragende Metallring wird mittels fixierbarem Bajonettverschluss an einem Ueberfalldeckel aus Metall befestigt. Dieser trägt seitlich einen Haltestab von ca. 120 mm Länge zum Befestigen der Apparatur am Stativ. Auf dem Ueberfalldeckel ist ein ca. 70 mm hohes, im oberen Teil mit einem Radius von ca. 25 mm halbkreisförmig gebogenes Führungsrohr von 5 mm innerem Durch-

Abb. 1



messer aufgesetzt. In dieses Führungsrohr wird der Stab eines Metallrührers geführt, an dessen oberem Ende ein dünnes Kabel befestigt ist, mit welchem der Rührer vertikal bewegt wird. Der Rührer selbst besteht aus einem flachen Metallring von 10 mm Breite, in welchem Löcher von ca. 6 mm Durchmesser gebohrt sind.

Der Rührer wird durch einen am Ueberfalldeckel befestigten vertikalen Metallstab geführt, welcher am unteren Ende einen Kopf trägt, auf dem der Rührer in seiner tiefsten Stellung derart aufliegt, dass er das Glasgefäss nicht mehr berührt.

Ferner besitzt der Ueberfalldeckel eine zentrale Bohrung von 18 mm Durchmesser mit Hals von ca. 5 mm Höhe, für die Aufnahme des Thermometers. Letzteres wird mittels eines durchbohrten Korkes in ein Glasrohr von ca. 450 mm Länge und ca. 15 mm innerem Durchmesser gebracht und so in den Hals der Bohrung eingesetzt, dass das Thermometer mit dem unteren Rand des Quecksilbergefässes die eingeführten Schmelzkapillaren berührt. Im Ueberfalldeckel sind ferner zwei seitliche und ein vorderes schräg geführtes Röhrchen von mindestens 25 mm Länge und 2 mm lichter Weite zum Einführen der Schmelzkapillaren eingelötet. Diese Röhrchen müssen eine solche gegen das Zentrum gerichtete Neigung besitzen, dass ihr gemeinsamer Schnittpunkt ca. 25 - 30 mm oberhalb des tiefsten Punktes des Glasgefässes liegt.

In das zum Schutz des Thermometers vor Luftzug dienende Glasrohr wird ein Hilfsthermometer soweit eingeführt, dass dessen Quecksilbergefäss, entsprechend dem zu erwartenden Schmelzbereich, auf der mittleren Höhe des herausragenden Fadens des zur Bestimmung verwendeten Thermometers liegt.

Ausführung der Bestimmung: Die Substanz, deren Schmelzbereich zu bestimmen ist, wird fein pulverisiert und, sofern nichts anderes vorgeschrieben ist, während wenigstens 24 Stunden im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Hierauf wird von der Substanz rasch so viel in eine dünnwandige, einseitig zugeschmolzene, über Phosphorpentoxyd getrocknete und aus alkaliarmem Glase hergestellte Schmelzkapillare von ca. 1 mm lichter Weite eingefüllt, dass die Schichthöhe nach Aufklopfen der Schmelzkapillare auf eine harte Unterlage ca. 3 mm beträgt.

Die mit der zu prüfenden Substanz beschickte Schmelzkapillare wird an ihrem oberen Ende derart an den Einführungsstutzen befestigt, dass ihr unteres Ende das Quecksilbergefäss des Thermometers berührt. Die Badflüssigkeit wird unter gutem Rühren vorsichtig erwärmt, und die Temperatur von 10° unterhalb des zu erwartenden Schmelzbereiches an so gesteigert, dass zur Erhöhung um 2° ca. 1 Minute erforderlich ist.

Im Verlauf der sorgfältigen Temperatursteigerung werden die Temperaturen des Zusammensinterns und der klaren Schmelze der Substanz an dem zur Bestimmung verwendeten Thermometer, sowie die Temperatur am Hilfsthermometer während des Schmelzvorganges abgelesen. Für diese Ablesung muss sich das Quecksilbergefäss des Hilfsthermometers während des Schmelzvorganges in der Mitte des aus dem Bade herausragenden Quecksilberfadens des zur Bestimmung verwendeten Thermometers befinden.

Die Fadenkorrektur wird für den nicht in der Badflüssigkeit befindlichen Teil des Quecksilberfadens des zur Bestimmung verwendeten Thermometers angebracht. Die Temperatur (t), die das Hilfsthermometer beim Schmelzvorgang der Substanz anzeigt, ist die mittlere Temperatur des herausragenden Quecksilberfadens (N). Die Korrektur in Graden kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Korrektur in Graden} = a \cdot N \cdot (T - t)$$

N = Anzahl Grade des aus dem Dampf herausragenden Quecksilberfadens des Thermometers.
T = Anfangs- bzw. Endtemperatur beim Zusammensintern, bzw. beim Klarschmelzen.
t = am Hilfsthermometer abgelesene Temperatur
a = Koeffizient für Einschlussthermometer 0,00016, für Stabthermometer 0,00017

Die so errechnete Fadenkorrektur ist zu den abgelesenen Werten der Temperatur des Zusammensinterns und des Klarschmelzens der Substanz zu addieren.

Erfahrungen: Die beschriebene Schmelzpunktsapparatur weist die Vorteile auf, dass die Schmelztemperaturen korrigiert sind und dass das Flüssigkeitsbad mit einem Rührer gemischt werden kann. Als Nachteil dieses Apparates hat sich im Verlauf der Arbeit die Verwendung von Siliconöl SF-96/100 als Badflüssigkeit ergeben. Dieses Oel wird nach mehrmaligem Erhitzen auf ca. 150° trüb und verfärbt sich gelb. Infolge seiner ebenfalls geringen Wärmekapazität ist es sehr schwer, bei höheren Temperaturen die gefoderte Temperatursteigerung von 2° pro Minute einzuhalten.

Bei der Bestimmung von Schmelzbereichen oberhalb 100° haben wir die Beobachtung gemacht, dass der Schmelzvorgang nicht in allen drei Kapillaren gleichzeitig eintritt. Wir führten diese Erscheinung auf die unregelmässige Erhitzung der Apparatur, besonders der gut leitenden Metallbestandteile, zurück, so dass die Kapillarröhrchen, die im metallenen Ueberfalldeckel sitzen, geringe Temperaturunterschiede erhielten. Durch Anbringen einer Asbestplatte mit einem entsprechenden Loch für das zylindrische Glasgefäss konnten wir diese unregelmässige Wärmeverteilung verhindern.

2.4.2 Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen: Die Löslichkeit prüften wir allgemein bei der Herstellung der Stammlösung mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser. Bei der Prüfung auf klare, vollständige Löslichkeit verglichen mit der gleichen Menge Wassers sind geringe mechanische Verunreinigungen durch Filterfäserchen oder Staubpartikel nicht zu beanstanden. Alle Angaben betreffend Löslichkeit beziehen sich, sofern nichts anderes angegeben ist, auf die Normaltemperatur von 20°. Die Lösung ist intensiv zu schütteln oder umzurühren.

Zur Prüfung auf färbende Verunreinigungen zogen wir die Farbvergleichslösungen, die für die Ph.Helv.V, Suppl.III, 3. Serie, vorgesehen sind, heran. Zur Erfassung färbender Verunreinigungen eignen sich diese Farbvergleichslösungen sehr gut.

2.4.3 Bestimmung des pH-Wertes: Diese Bestimmung führten wir mit der Farbtabelle der Ph.Helv.V, Suppl.III, 2. Serie, sowie auch potentiometrisch durch. Bei Acidum folicum konnte die pH-Bestimmung nur potentiometrisch durchgeführt werden, da die Stammlösung eine schwach gelbe Farbe aufweist und die Farbtöne der Indikatoren verfälschen würde. Wir konnten bei keinem der untersuchten Vitamine eine unerwünschte Verfärbung oder eine Trübung mit der Indikatorlösung feststellen.

2.4.4 Papierchromatographie: Wir zogen die Papierchromatographie zur Prüfung auf Identität und Reinheit bei den Vitaminen Cholecalciferol und Rutin heran. Da verschiedene Verfahren zur Anwendung gelangten, haben wir diese bei den einzelnen Artikeln beschrieben. Wir hielten uns an die von der Ph.Helv.V, Suppl. III, 1. Serie, gestellten allgemeinen Bestimmungen und konnten ihre Eignung für unsere Untersuchungszwecke feststellen.

2.4.5 Spektrophotometrie: Die spektrophotometrische Messung kann zur Bestimmung der Identität einer Substanz herangezogen werden. So zeigt Folsäure 3 Absorptionsmaxima bei bestimmten Wellenlängen. Die spektrophotometrische Identitätsprüfung wird bei Verbindungen herangezogen, für die keine andere spezifische Identitätsreaktion besteht. Die Reinheitsprüfung mit Hilfe der Spektrophotometrie haben wir bei Cholecalciferol als Dreipunktmessverfahren angewendet. Die spektrophotometrische Gehaltsbestimmung wird allgemein bei den Wellenlängen vorgenommen, bei denen die Substanz maximale Absorption zeigt. Die Grösse dieser Lichtabsorption wird als Extinktion gemessen und daraus die molare oder prozentuale Extinktion berechnet. Um einen Schluss auf den Gehalt ziehen zu können, muss hingegen die Extinktion der Reinsubstanz bekannt sein. Diese Methode liefert uns nur relative Werte. Es wäre hingegen empfehlenswert, wie die USP XV auch in unsere Pharmakopöe Standardsubstanzen aufzunehmen, die als Bezugssubstanzen sowohl zur Eichung der Instrumente wie auch als Bezugssubstanz zur Gehaltsbestimmung herangezogen werden könnten.

Für die spektrophotometrischen Messungen stand uns ein Spektralphotometer Zeiss PMQ II zur Verfügung. Die Genauigkeit der Extinktionsmessung hängt von der Grösse der Extinktion ab. Im allgemeinen ist der absolute Betrag des Messfehlers für den Durchlassgrad konstant. Daraus ergibt sich, dass der relative Fehler der Extinktion zwischen den Extinktionen 0,3 und 0,6 am kleinsten ist. Aus diesem Grund sollen die Lösungen so hergestellt werden, dass Bestimmungen nur im Messbereich von 0,3 bis 0,6 vorgenommen werden. Bei Messungen mit demselben Spektralphotometer darf man so mit einer mittleren Reproduzierbarkeit von etwa $\pm 0{,}5$ % rechnen, während diese aber bei Messungen mit verschiedenen Instrumenten bereits ± 1 % beträgt.

Zur Messung im ultravioletten Bereich benötigten wir Lösungen mit einer molaren Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-6}. Wir haben zur Herstellung dieser Lösungen mit einer Halbmikrowaage ca. 0,1 g Substanz eingewogen und mit dem entsprechenden Lösungsmittel eine Reihe Lösungen verschiedener Konzentration hergestellt. Zur Messung wurden diejenigen Lösungen verwendet, die eine Extinktion zwischen 0,3 und 0,6 ergaben.

Zur Herstellung der gewünschten Verdünnungen verwendeten wir Pipetten und Messkolben. Es war uns aus der Arbeit von Kolthoff (1) bekannt, dass der Benetzungsfehler bei verdünnten, wässerigen Lösungen praktisch derselbe ist wie bei Wasser. Bei Flüssigkeiten mit anderer Oberflächenspannung und Viskosität als Wasser muss der Benetzungsfehler experimentell ermittelt werden. Wir haben bei einer Serie von Pipetten untersucht, wie sich das Volumen Ausfluss verändert, wenn an Stelle von Wasser Alkohol abgemessen wird. Zu dieser Untersuchung verwendeten wir einen absoluten Alkohol von bekanntem spezifischem Gewicht. Aus der Wägung des Ausflusses und unter Berücksichtigung der Temperatur liess sich das Volumen des ausgeflossenen Weingeistes berechnen.

Das Auslaufenlassen der Pipetten wurde genau nach den Prüfungsbestimmungen des Eidg. Amtes für Mass und Gewicht (2) vorgenommen: die Pipetten werden senkrecht gehalten, wenn der zusammenhängende Ausfluss aufgehört hat, wird die Ablaufspitze am Aufnahmegefäss 15 Sekunden abgestrichen. Für die von uns untersuchten Pipetten haben wir folgende Werte gemessen:

Pipettengrösse	max. zulässiger Fehler (2)	Ausfluss abs. Alkohol	Ausfluss Wasser	Δ abs. Alkohol	Δ Wasser
ml	ml	ml	ml	ml	ml
5	± 0,01	4,986	4,992	- 0,014	- 0,008
10	± 0,015	10,002	9,997	+ 0,002	- 0,003
20	± 0,02	19,985	19,980	- 0,015	- 0,020
30		29,972	29,978	- 0,028	- 0,022

Bei den untersuchten Pipetten konnten wir feststellen, dass sich das Volumen Ausfluss bei Alkohol trotz der verschiedenen Oberflächenspannung von Wasser und Alkohol nur gering verändert. Der Fehler liegt innerhalb des maximal zulässigen Fehlers der Prüfungsbestimmungen des Eidg. Amtes für Mass und Gewicht.

2.5 Gehaltsbestimmungen

Wenn möglich verwendeten wir die Masslösungen der Ph.Helv.V. Als neue Masslösungen haben wir Cerisulfat und Titanochlorid untersucht und Cerisulfat zur Aufnahme in die Pharmakopöe vorgeschlagen.

---

1) J.H.Kolthoff, "Die Massanalyse", I. Springer Verlag, Berlin 1928
2) Prüfungsbestimmungen des Eidg. Amtes für Mass und Gewicht, Bern 1912

2.5.1 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: Wir haben die Stickstoffbestimmung bei allen stickstoffhaltigen Verbindungen als zusätzliche Gehaltsbestimmung angewendet.

Vorschrift: In einen Kjeldahlkolben von 100 ml Inhalt gibt man eine 5 - 15 mg Stickstoff entsprechende und in den einzelnen Artikeln angegebene Substanzmenge (genau gewogen), sowie 3 g (± 0,1 g) Katalysator für Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Die Substanzeinwaage erfolgt mit Hilfe eines stickstoffreien Papierschiffchens so, dass am Kolbenhals keine Substanz kleben bleibt. Man übergiesst nun mit 5 ml konzentrierter Schwefelsäure, wobei dafür zu sorgen ist, dass die Substanz mit der Schwefelsäure vollständig benetzt wird. Bei Substanzen, die während des Aufschlusses zu starkem Schäumen neigen, werden noch ca. 5 mg Stearinsäure zugesetzt, was jeweils in den einzelnen Artikeln vorgeschrieben wird. Nach Zugabe von 5 Glasperlen und Aufsetzen eines kleinen Trichters erhitzt man ganz vorsichtig den um ca. 45° geneigten Kolben auf kleiner Flamme, bis das Schäumen und Aufblähen der Mischung aufhören. Einige Substanzen bilden von Anfang an klare Lösungen. Dann schraubt man die Flamme langsam höher, bis die Flüssigkeit gleichmässig und kräftig siedet. Es ist aber dafür zu sorgen, dass während des Siedens die Schwefelsäure nicht höher als bis ca. in die Mitte des Kolbenhalses aufsteigt. Die nötige Aufschlusszeit ist für jede Substanz in den entsprechenden Artikeln angegeben. In der Regel ist für nicht ringgebundene Stickstoffe 1 Stunde, für ringgebundene Stickstoffe 2-3 Stunden erforderlich. Etwas längere Aufschlusszeiten schaden nicht. Nach beendigtem Aufschluss muss eine klare, farblose Lösung vorliegen. Nach dem Erkalten verdünnt man mit 20 ml Wasser in einem Guss und kühlt den Kolben unter fliessendem Wasser rasch auf Zimmertemperatur ab. Die leere Apparatur (Abb. 2) wird zunächst mit Wasserdampf bei abgestelltem Kühler während ca. 15 Minuten ausgedämpft. Dann spült man die kalte, verdünnte Aufschlusslösung mit insgesamt 5 mal 5 ml Wasser quantitativ in den Kolben A der Apparatur. Man legt in einem Erlenmeyerkolben B von 150 ml Inhalt 30 ml Borsäurelösung für Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl vor, so dass das Kühlrohr eintaucht. Durch Einführen von 20 ml Thiosulfatlösung durch den Trichter C wird alkalisiert und sofort die Wasserdampfdestillation in Gang gesetzt. Vom Moment an, da die Indikatorfarbe nach Grün umschlägt, wird 10 Minuten destilliert. Dann senkt man die Vorlage so weit, dass das Kühlrohr 0,5 - 1 cm über die Flüssigkeit zu stehen kommt und destilliert noch 3 Minuten. Dann lässt man vollständig abtropfen. Das Kühlrohr wird mit wenig Wasser aussen abgespritzt, worauf man die Vorlage entfernt. Man titriert mit 0,05 n-Salzsäure auf rotstichiges Violett.

In gleicher Weise ist unter Verwendung derselben Reagenzien unter Ersatz der zu analysierenden Substanz durch 0,2 g Glycosum ad injectionem ein Blindwert zu bestimmen, der vom Titrationsergebnis in Abzug zu bringen ist.

$$\text{Stickstoffgehalt} = \frac{70{,}04 \cdot a \cdot f}{b} \ \%$$

$$\text{theoretischer Stickstoffgehalt} = \frac{5 \cdot c \cdot a \cdot f}{b} \ \%$$

a = ml verbrauchte 0,05 n-Salzsäure
b = Einwaage in mg
c = Aequivalentgewicht der Substanz (=Molekulargewicht der Substanz dividiert durch die Anzahl Stickstoffatome des Moleküls)
f = Faktor der 0,05 n-Salzsäure

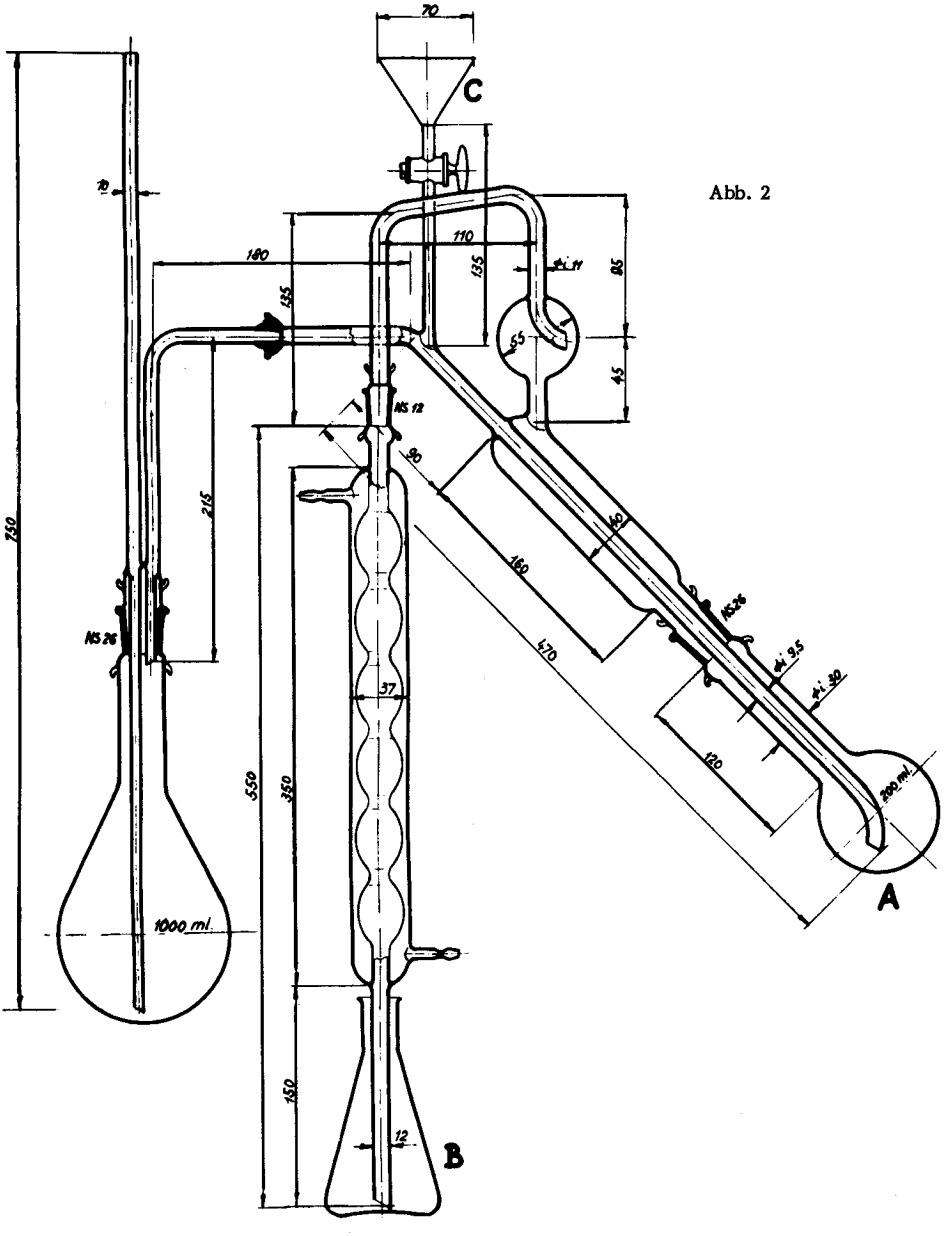

70
C
70
110
180
135
135
85
55
45
NS 14
NS 12
90
215
730
NS 26
160
470
NS 26
37
550
350
150
12
B
1000 ml.
120
200 ml.
A

Abb. 2

Erfahrungen: Wir haben festgestellt, dass sich die Apparatur und die Vorschrift ausgezeichnet eignen. Es ist hingegen bei der Ausarbeitung von Vorschriften darauf zu achten, dass genügend lange Aufschlusszeiten festgesetzt werden. Bei allen unseren Stickstoffbestimmungen lag die Streuung innerhalb ± 0,1 %.

2.5.2 Titration mit Perchlorsäure: Wir haben die Titration in Eisessig mit Perchlorsäure zur Bestimmung des Basenanteils in Pyridoxinhydrochlorid angewendet. Da bei dieser Substanz keine primären oder sekundären Aminogruppen vorhanden sind, die azetyliert werden könnten, lösten wir die Verbindung in Essigsäure mit einem Ueberschuss an Essigsäureanhydrid. Wir haben auch die Perchlorsäure mit einem 2-proz. Essigsäureanhydridüberschuss hergestellt, so dass wir ohne besondere Vorsichtsmassnahmen mit einer Mikrobürette nach Ph.Helv.V titrieren konnten. Als Indikatorlösung verwendeten wir Kristallviolett Ph.Helv.V. Gleichzeitig haben wir aber eine potentiometrische Kontrollmessung mit einer Glaselektrode als Messelektrode und einer Kalomelelektrode als Bezugselektrode (Abb. 10) ausgeführt. Bei unseren Untersuchungen haben wir die Feststellung gemacht, dass das zur komplexen Bindung der Chloridionen gebrauchte Quecksilber (II)-azetat, das wir von verschiedenen Handelsfirmen untersuchten, 0,06 bis 0,10 ml 0,1 n-Perchlorsäure verbrauchte. Bei der Verwendung von Quecksilber (II)-azetat muss also ein Blindwert bestimmt werden, der bei der Berechnung des Gehaltes berücksichtigt wird. Nach unseren Erfahrungen ist die Perchlorsäure-Titration unbedingt zur Gehaltsbestimmung schwacher Basen oder deren Salze heranzuziehen. Die Masslösung, die wir nach Ph.Helv.V, Suppl. III, 2. Serie, herstellten, ist sehr stabil und kann während Monaten aufbewahrt werden. Die Einstellung des Titers ist einfach und fordert wenig Zeit. Zur Titration sollen nur trockene Geräte gebraucht werden, hingegen ist der Einfluss der Luftfeuchtigkeit, wenn nichts Spezielles vermerkt ist, zu vernachlässigen.

2.5.3 Titration chinoidartiger Körper mit Cerisulfat und Titanochlorid: Man bestimmt reduzierbare Substanzen meist auf indirektem Weg. Nach Reduktion mit einem geeigneten Reduktionsmittel auf eine niedrigere Oxydationsstufe wird mit einem kräftigen Oxydationsmittel titriert. Als Titrierflüssigkeiten mit hohem Oxydationspotential werden vor allem verwendet:

Kaliumpermanganat	E_0 = + 1,52 Volt
Kaliumbichromat	E_0 = + 1,3 Volt
Cerisulfat	E_0 = + 1,44 Volt

Reduzierbare Substanzen können hingegen direkt titriert werden mit starken Reduktionsmitteln wie:

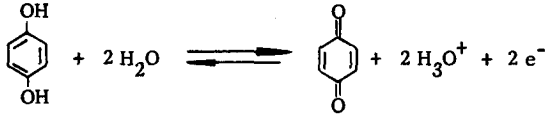
TitanIII-chlorid	E_o = - 0,04 Volt
ChromII -chlorid	E_o = - 0,41 Volt

Die direkte Titration mit starken Reduktionsmitteln verlangt den absoluten Ausschluss des Sauerstoffes der Luft und des Sauerstoffes der Lösungsmittel.

a) Theoretische Grundlagen zur Titration bei Redoxanalysen

Allgemein spricht man von Oxydation bei einem System, das Elektronen abgibt und von Reduktion bei einem System, das Elektronen aufnimmt. Unterscheiden sich die oxydierte und reduzierte Form nur am Elektronengehalt, so ist das Normalpotential vom pH-Wert unabhängig (I), unterscheiden sie sich hingegen auch durch den Minder- bzw. durch den Mehrgehalt an Wasserstoffionen also Protonen und Elektronen (II), so ist das Normalpotential abhängig vom pH-Wert. Massgebend für den Oxydationsgrad ist der Unterschied in der Zahl der Elektronen.

$$Fe^{+++} + e^- \rightleftharpoons Fe^{++} \qquad (I)$$



(II)

Die Grösse der oxydierenden oder reduzierenden Fähigkeit eines Systems ist bestimmt durch sein Redoxpotential. Das Redoxpotential eines korrespondierenden Redoxpaares kann mit Hilfe der Nernstschen Formel berechnet werden, wenn man sein Grundredoxpotential, die Aktivität, bzw. Konzentration seiner Bestandteile und die Temperatur kennt. Aus der Redoxbeziehung

$$m_1 \cdot A_1 + m_2 \cdot A_2 \rightleftharpoons n \cdot e^- + n_1 \cdot B_1 + n_2 \cdot B_2 \qquad (III)$$

kann das zugeordnete Redoxpotential berechnet werden:

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[B_1]^{n_1} \cdot [B_2]^{n_2}}{[A_1]^{m_1} \cdot [A_2]^{m_2}} \qquad (IV)$$

An Stelle der Produkte der Teilchenaktivitäten kann (Ox) und (Red) gesetzt werden.

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \qquad (V)$$

$$= E_o + \frac{RT}{nMF} \cdot \log \frac{[Ox]}{[Red]} \qquad (VI)$$

(M = Modul des dekadischen Log.)

$$\frac{RT}{MF}(18^o) = 0{,}0577; \qquad \frac{RT}{MF}(25^o) = 0{,}0590.$$

Das Normalpotential eines Redoxsystems bei einem bestimmten pH-Wert ist das Potential einer blanken Edelmetallelektrode in einer Mischung, die oxydierenden und reduzierenden Anteil im Verhältnis 1:1 enthält, gemessen gegen die Normalwasserstoffelektrode als Bezugselektrode. Die potentiometrische Messung eines Redoxpotentials wird mit einer Platinelektrode und einer Kalomelelektrode als Bezugselektrode vorgenommen, so dass die Messkette nach folgender Art gebaut ist:

Platin-elektrode	Redox-system	gesättigte KCl-Lösung	Kalomel-elektrode

Die elektromotorische Kraft E der Kette ist nun:

$$E = E_r - E_k \qquad (VII)$$

(E_r = Redoxpotential, E_k = Potential der Kalomelelektrode in bezug auf die Wasserstoffelektrode, bei 18° beträgt 0,337 Volt). Also ist das Redoxpotential $E_r = E + 0{,}337$ V, vorausgesetzt, dass die Platinelektrode positiv ist in bezug auf die Kalomelelektrode. $E_r = 0{,}337$ V - E, wenn die Platinelektrode negativ ist in bezug auf die Kalomelelektrode. Die elektromotorische Kraft E wird gemessen und das Redoxpotential E_r ausgerechnet. Bei verschiedenen Systemen haben wir festgestellt, dass die Potentialbildung an der Platinelektrode nicht nur vom Oxydations- und Reduktionsvermögen sondern ebenso von der Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird. Redoxgleichgewichte, an welchen Protonen beteiligt sind, lassen sich durch das folgende Schema formulieren:

$$Red \rightleftharpoons n \cdot e^- + m \cdot H^+ + Ox \qquad (VIII)$$

In die Nernstsche Formel eingesetzt (Temperatur 25°):

$$E = E_o + \frac{0{,}059}{n} \cdot \log \frac{[Ox] \cdot [H^+]^m}{[Red]} \qquad (IX)$$

$$E = E_o + 0{,}059 \cdot \frac{m}{n} \cdot \log [H^+] + \frac{0{,}059}{n} \cdot \log \frac{[Ox]}{[Red]} \qquad (X)$$

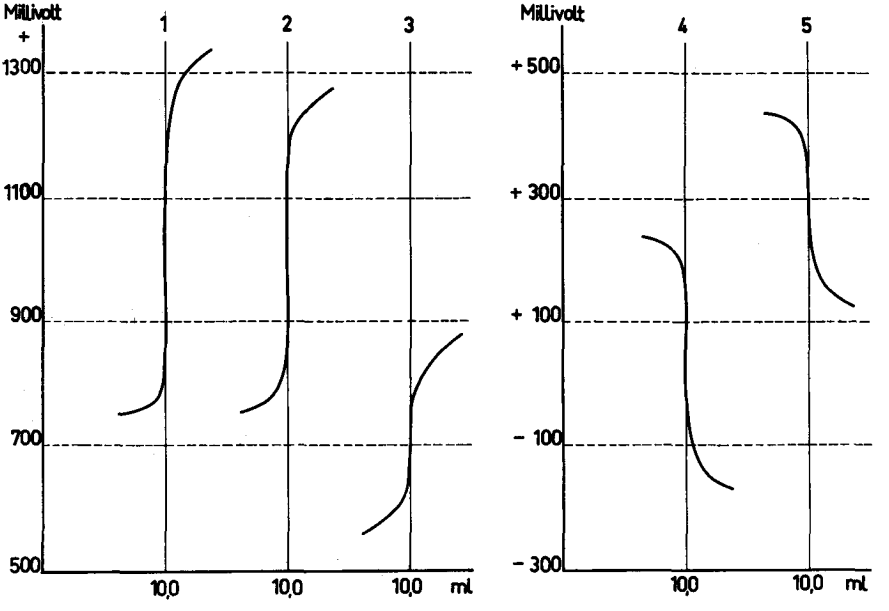
$$E = E_o - 0{,}059 \cdot \frac{m}{n} \cdot pH + \frac{0{,}059}{n} \cdot \log \frac{[Ox]}{[Red]} \qquad (XI)$$

Aus Formel (XI) ist ersichtlich, dass bei Erhöhung des pH-Wertes das Redoxpotential sinkt. Der Wert des Quotienten $\frac{m}{n}$ liegt häufig in der Nähe von 1, so dass sich die Redoxpotentiale im gleichen Redoxsystem von stark saurer (pH = 0) und stark alkalischer Lösung (pH = 14) um 0,059 · 14, also ca. 1 Volt, unterscheiden. Der Einfluss des pH-Wertes auf das Redoxsystem ist deutlich ersichtlich bei der Titration von Menadion mit Titanchlorid. In Abb. 3, Kurve 4, wird die Titration in gepufferter Lösung (Brit.Ph.1958), pH-Wert bei Beginn der Titration: 4,7 und am Umschlagspunkt: 4,0, und in Abb. 3, Kurve 5, die Titration in nicht gepufferter Lösung, pH-Wert bei Beginn der Titration: 1,6 und am Umschlagspunkt: 0,5, dargestellt. Bei der nicht gepufferten Lösung wurde die Menge Pufferlösung durch Wasser ersetzt.

Abbildung 3

Potentiometrische Titration (Metrohm-Potentiometer Typ E 157)

Einwaage: je 1 Milliäquivalent Substanz; Potentialanstieg zwischen 8 ml und 11 ml entsprechender Masslösung
Messelektrode: Platin
Bezugselektrode: Kalomel (KCl-gesättigt)



1 Hydrochinon/Cerisulfat - verdünnte Schwefelsäure
2 α-Tocopherol/Cerisulfat- Schwefelsäure/Weingeist
(Siehe Artikel α-Tocopherolum aceticum)
3 Menadion/Cerisulfat - verdünnte Salzsäure/konz. Essigsäure
(Siehe Artikel Menadiono-Natrium bisulfurosum)
4 Menadion/Titanochlorid - Brit.Ph.1958 gepuffert pH bei Beginn 4,7
pH bei Umschlag 4,0
5 Menadion/Titanochlorid - Brit.Ph.1958 ungepuffert pH bei Beginn 1,6
pH bei Umschlag 0,5

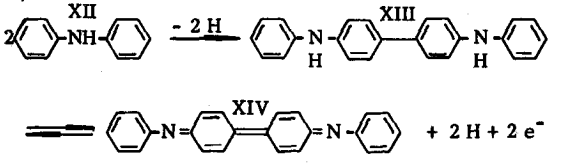
b) Redoxindikatoren

Unter Redoxindikatoren versteht man Farbstoffe, die die Eigenschaft besitzen, sich bei bestimmten Redoxpotentialen umzufärben. Der Redoxindikator stellt selbst ein Redoxsystem dar, wobei er am Endpunkt der Titration oxydiert oder reduziert ist und dabei eine Konstitutionsänderung erfährt, die als Farbänderung sichtbar wird. Ein Redoxindikator ist dann für eine Reaktion geeignet, wenn sein Umschlagpotential innerhalb gewisser Grenzen mit dem Potential beim Aequivalenzpunkt der Lösung zusammenfällt.

Die von uns zur cerimetrischen Bestimmung für die Pharmakopöe vorgeschlagenen Indikatoren sind:

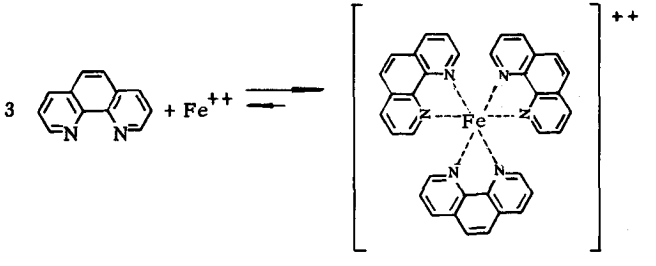
Diphenylamin
o-Phenanthrolin

Diphenylamin: Die Reaktion beim Farbumschlag kann folgendermassen formuliert werden (12):



Durch Oxydation in saurer Lösung wird das sehr schwach basische, farblose Diphenylamin XII über das farblose Diphenylbenzidin XIII oxydiert zu dem holochinoiden Diphenylbenzidinviolett. Das Normalpotential von Diphenylamin liegt bei +0,76 Volt, unterhalb von 0,76 Volt ist die Verbindung farblos, oberhalb violett. Die 0,5-proz. Lösung der Ph.Helv.V eignet sich sehr gut als Indikator.

o-Phenanthrolin: (1,10-Phenanthrolin) bildet mit Ferro-Ionen in möglichst neutraler Lösung ein rot gefärbtes, komplexes Hexamin, das Tri-1,10-phenanthrolin-ferroion



Der Komplex ist pH-empfindlich. In stark saurer Lösung und bei hoher Temperatur ist das Komplexion nur kurze Zeit stabil. Durch Oxydationsmittel wird Eisen II zu Eisen III oxydiert. Das Tri-1,10-phenanthrolin-ferri-ion besitzt nur eine schwach blaue Farbe. Das Normalpotential des Indikators E_0 in molarer Schwefelsäure liegt bei +1,14 Volt. Der Farbumschlag ist erst bei +1,12 Volt, wenn ca. 90 % des Indikators in die oxydierte

Form übergegangen sind, sichtbar. Eine 0,025 m Indikatorlösung wird hergestellt durch Mischen von 1,63 g 1,10-Phenanthrolinhydrochlorid mit einer frisch bereiteten Lösung von 0,695 g Eisensulfat in 100 ml Wasser.

Indigodisulfonat: Bei der titanometrischen Titration von Menadion verwendeten wir die von der Brit.Ph.1958 vorgeschriebene 0,1-proz. Lösung von Indigodisulfonat. Das Redoxpotential dieses Indikators ist pH-abhängig (12) und entspricht bei

pH 0 = + 0,29 Volt
5 = - 0,01 Volt
7 = - 0,13 Volt
9 = - 0,20 Volt.

Das Redoxpotential bei pH 5 = 0,01 Volt, fällt mit dem Umschlagspotential der Kurve 4, Abb. 3, genau zusammen, so dass sich der Indikator für diese Titration eignet.

c) Titration mit Cerisulfat

1. Entwicklung der Methode: Die Verwendbarkeit von CerIV-Salzen in der Massanalyse ist schon lange bekannt (3, 4, 5). Erst aber in neuerer Zeit sind systematische Untersuchungen durchgeführt worden (6, 7, 8, 9). Die Cerimetrie hat in allen modernen Leitfaden der analytischen Chemie und den folgenden Pharmakopöen Aufnahme gefunden: Ph.Int.I, Vol.I, Dtsch.Uebers., Svenska F.XI, Ph.Belg.IV, Suppl. 1951, Ph.Dan.IX, USP XV, Brit.Ph. 1958, NF X.

Cerimetrisch werden Menadion (Abb. 3, Kurve 3) in der USP XV, Ph.Belg. IV Suppl. 1953, Ph.Dan. IX Add. 1954 und α-Tocopherol (Abb. 3, Kurve 2) im Brit.Pharm.Cod. 1954, NF X und Svenska F.XI, titriert. Titanometrisch wird Menadion in der Brit.Ph. 1958 bestimmt.

2. Herstellung und Titerstellung der Masslösungen: Die 0,1 n-Cerisulfatlösung benötigen wir zur Titration von Menadion, die 0,01 n-Cerisulfatlösung zur Gehaltsbestimmung von α-Tocopherolazetat.

---

3) N.H.Furmann, J.amer.chem.Soc. 50, 755 (1928)

4) N.H.Furmann und J.H.Wallace, J.amer.chem.Soc. 52, 1443 (1930)

5) L.J.Smith, P.M.Ruoff und S.Wawzonek, J.org.Chem. 6, 236 (1941)

6) N.H.Furmann, Cer(IV)-Lösungen als massanalytische Oxydationsmittel, Neuere massanalytische Methoden, IV. Aufl., Bd. 33, p. 76, F. Enke Verlag, Stuttgart 1956

7) W.Petzold, Die Cerimetrie, Verlag Chemie, Weinheim 1955

8) F.Seel, Grundlagen der analytischen Chemie und der Chemie in wässerigen Systemen, Verlag Chemie, Weinheim 1955

9) R.E.Kirk und D.F.Othmer, Encyclopedia of chemical Technology, Vol. 7, p. 808, Interscience Encyclopedia 1951

0,1 n-Cerisulfat

1000 ml = 40,433 g $Ce(SO_4)_2 \cdot 4\,H_2O$

Darstellung: 42,0 g Cerisulfat ($Ce(SO_4)_2 \cdot 4\,H_2O$, Mol.-Gewicht 404,33) werden in einer Mischung von 500 ml Wasser und 28 ml konz. Schwefelsäure, wenn nötig unter leichtem Erwärmen, gelöst. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit Wasser zu 1 l verdünnt. Die Lösung wird nach Stehenlassen während 2 Tagen durch ein Glasfilter 1-G-4 filtriert.

Feststellung des Wirkungswertes: In eine Lösung von 1 g festem Kaliumjodid in 5 ml Wasser lässt man 20 ml Cerisulfat (genau gemessen) zufliessen, verdünnt mit Wasser auf 200 ml und titriert mit 0,1 n-Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung (Mikrobürette). Gegen das Ende der Titration werden 10 - 15 Tropfen Stärkelösung zugefügt.

1 ml 0,1 n-$Ce(SO_4)_2$ = 1 ml 0,1 n-$Na_2S_2O_3$

0,01 n-Cerisulfat

1000 ml = 4,0433 g $Ce(SO_4)_2 \cdot 4\,H_2O$

Darstellung: 100 ml 0,1 n-Cerisulfat werden mit 250 ml verdünnter Schwefelsäure (ca. 2 n) und frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser auf 1 l verdünnt.

Feststellung des Wirkungswertes: In eine Lösung von 0,2 g festem Kaliumjodid in 5 ml Wasser lässt man 10 ml 0,01 n-Cerisulfat (genau gemessen) zufliessen und titriert mit 0,005 n-Natriumthiosulfat bis zur Entfärbung (Mikrobürette). Gegen das Ende der Titration werden 10 - 15 Tropfen Stärkelösung zugefügt.

1 ml 0,01 n-$Ce(SO_4)_2$ = 2 ml 0,005 n-$Na_2S_2O_3$

3. Haltbarkeit der Masslösungen: Cerisulfatlösungen in 0,5-bis 1 n-Schwefelsäure sind bei Zimmertemperatur sehr gut haltbar (3). Die Aenderung des Titers 0,01 n- bis 0,1 n-Cerisulfatlösungen beträgt während eines Jahres höchstens 0,1 - 0,2 %. Der Titer der Lösung ist von Zeit zu Zeit zu überprüfen.

d) Titration mit Titanochlorid

1. Entwicklung der Methode: Die Verwendung vonTitanochloridals Masslösung wurde zuerst von Knecht und Hibbert (10) beschrieben. Mit Erfolg titriert wurden Pikrinsäure, Nitrobenzol sowie Benzochinon, o-Naphtochinon und Toluchinon. In der USP XV und in der Brit.Ph.1958 ist Titanochlorid als 0,1 n-Lösung zur Gehaltsbestimmung von Indigokarmin, Kristallviolett und Methylenblau aufgeführt.

2. Herstellung und Titerstellung der Masslösung: 75 ml 20-proz. oder 100 ml 15-proz. Titanochloridlösung werden mit 75 ml konzentrierter Salzsäure und frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser zu 1 l verdünnt.

---

10) E.Knecht und E.Hibbert, Ber.dtsch.chem.Ges. 36, 1549 (1903)

Den Titer stellten wir nach USP XV mit Eisenammoniumsulfat ein. Reines Titanochlorid ist nicht stabil, hingegen ist die 15 - 20-proz. Lösung,in konz. Salzsäure unter Luftabschluss aufbewahrt, ziemlich beständig.

3. Haltbarkeit der Masslösung: Die unter Luftausschluss aufbewahrte Lösung ist ziemlich beständig. Trotzdem soll der Titer vor jeder Titration frisch bestimmt werden. Das Arbeiten mit luftempfindlichen Lösungen erfordert spezielle Vorsichtsmassnahmen der Aufbewahrung und Arbeitsweise. Wir verwendeten die Apparatur zur Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer (Ph.Helv.V. Suppl. III) mit folgenden Zusätzen. Mit Sauerstoff-freiem Kohlendioxyd, das aus der Bombe nach dem Verfahren von Sommer und Flatt (11) durch 2 Waschflaschen mit Leukoindigokarmin vom Sauerstoff gereinigt wurde, verdrängten wir die Luft aus der Apparatur. Die Trocknungsrohre der Vorratsgefässe wurden ebenfalls mit Leukoindigokarminlösung gefüllt. An den Titriergefässen liessen wir einen seitlichen Einführungsstutzen mit Normalschliff für die Kalomelelektrode anbringen. Als Messelektrode diente uns die Doppelplatinelektrode, die wie bei der Dead-Stop-Titration durch den Titrierkopf eingeführt werden kann, die aber zur potentiometrischen Messung nur durch einen Pol mit dem Messgerät verbunden wird.

e) Anwendung der Redoxtitration bei Körpern mit chinoider Struktur

Bereits Furmann und Wallace (4) titrierten Hydrochinon (Abb. 3, Kurve 1) in schwefelsaurer, wässeriger Lösung mit Cerisulfat und Diphenylamin oder Methylrot als Indikator. Auf Grund dieser guten Resultate verwendeten Smith und Mitarb. (5) die Cerimetrie zur Bestimmung von p-Hydroxychromanen und p-Hydroxycumaronen in 50-proz. Weingeist-1n-Schwefelsäure mit Diphenylamin oder o-Phenanthrolin als Indikator. Die Redoxtitrationen können natürlich auch auf andere Stoffklassen wie: Azoverbindungen, Nitro- und Nitrosoverbindungen, Alizarin und Alizarinfarbstoffe angewendet werden.

Erfahrungen: Der Titer der cerimetrischen Masslösungen blieb während unserer Untersuchungen, die sich auf ca. 6 Monate erstreckten, unverändert, während derjenige der Titanochloridlösung bei jeder Titration frisch eingestellt werden musste.

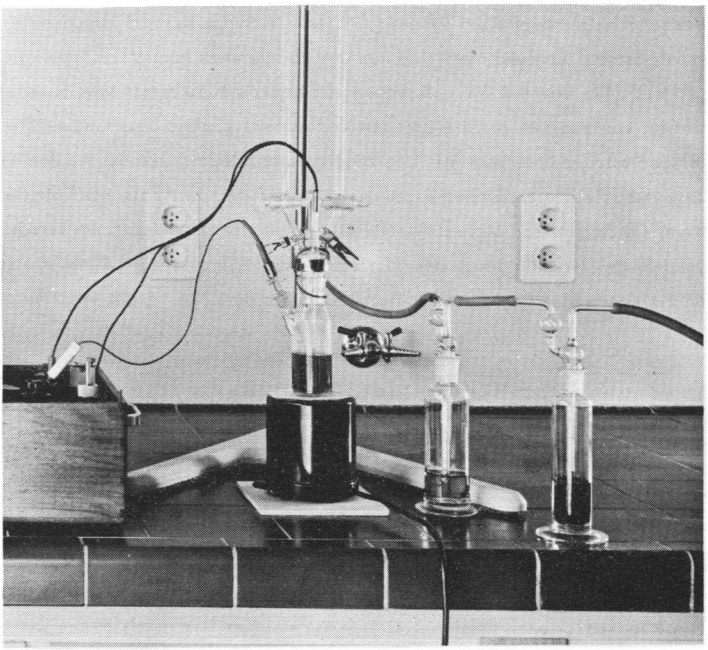
Wie bei der Säure-Basen-Titration wird auch bei der Redox-Titration anhand der Titrationskurve der Indikator mit dem entsprechenden Redoxpotential ausgewählt. Da bei der Titration mit Cerisulfat nur ein Reaktionsprodukt Ce(III)-Verbindungen entstehen können, wird die Cerisulfatlösung in vielen Fällen der Titration mit Kaliumpermanganat vorgezogen.

Abbildung 4

Apparatur zur Bestimmung des Redox-Potentials bei der Titration mit Titanochlorid unter Ausschluss von Sauerstoff

Titrationsapparatur nach K. Fischer zur Bestimmung des Wassergehaltes, Ph.Helv.V Suppl. III Seite 51.

Titrationsgefäss mit Normalschliff NS 26 und seitlichem Einführungsstutzen mit Normalschliff NS 12.



1 Potentiometer Metrohm Typ E 157

2 Kalomelelektrode (KCl-gesättigt) als Bezugselektrode

3 Doppelplatinelektrode zur Dead-Stop-Titration aber nur mit einem Pol verbunden als Messelektrode

4 Waschflaschen mit Leukoindigokarminlösung nach Flatt und Sommer (11)

5 Kohlendioxydzufuhr

---

11) R. Flatt und F. Sommer, Helv.chim.Acta 25, 684, (1942)

12) E. Brennecke und E. Blasius, Oxydations-Reduktions-Indikatoren, Neuere massanalytische Methoden, IV. Aufl. Bd. 33, p. 251, F. Enke Verlag, Stuttgart 1955

2.6 Reagenzien

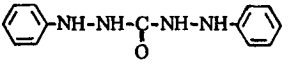
Wo immer möglich, verwendeten wir die Reagenzien der Ph.Helv.V. Hingegen benötigten wir zur Ausführung einiger spezifischer Reaktionen folgende Reagenzien:

Borsäurelösung zur Stickstoffbestimmung
Darstellung: 30 g Borsäure werden in heissem, destilliertem Wasser zu 1 lt gelöst. 1 lt dieser Lösung mischt man 10 ml Indikatorlösung zur Stickstoffbestimmung zu.
Prüfung: 1 Vol. der mit Indikatorlösung versetzten Borsäurelösung muss beim Verdünnen mit 2 Vol. Wasser die Umschlagsfarbe des Indikators (rotstichiges Violett) zeigen. Andernfalls ist mit Salzsäure oder Natronlauge zu korrigieren.

2,6-Dichlorchinon-chlorimid, $C_6H_2OCl_3$, Mol.Gew. 210,46
Hellgelbes, kristallines Pulver, unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol und verdünnten Alkalihydroxyden.
Prüfung: Vgl. USP XV

3,5-Dinitrobenzoylchlorid, $C_7H_3O_5N_2Cl$, Mol.Gew. 230,57
Gelbe Kristalle oder gelbes, kristallines Pulver, das sich an der Luft zersetzt.
Prüfung: Vgl. Brit.Ph.1958
Aufbewahrung: In zugeschmolzenen Ampullen

Diphenylcarbazid, $C_{13}H_{14}ON_4$, Mol.Gew. 242,29



Weisses, kristallines Pulver, das an der Luft allmählich eine rote Farbe annimmt, unlöslich in Wasser, löslich in Weingeist.
Prüfung: Vgl. Brit.Ph.1958
Aufbewahrung: Vor Licht geschützt

Diphenylcarbazidlösung
0,2 g Diphenylcarbazid werden in einer Mischung von 10 g konz. Essigsäure und 90 g Weingeist gelöst.

Cyanessigsäureäthylester, $C_5H_7O_2N$, Mol.Gew. 113,12
Farblose oder höchstens schwach bräunlich gefärbte Flüssigkeit.
Prüfung: Vgl. Brit.Ph.1958

Indikatorlösung zur Stickstoffbestimmung
0,080 g Tetrabrom-m-kresol-sulfonphtalein und 0,016 g p-Dimethylaminoazobenzol-o-karbonsäure werden in Spiritus zu 100 ml gelöst.

Katalysator zur Stickstoffbestimmung
3 g gelbes Quecksilberoxyd werden mit 97 g Kaliumsulfat gleichmässig verrieben.

o-Phenanthrolinlösung
1,63 g 1,10-Phenanthrolinhydrochlorid werden in einer frisch hergestellten Lösung von 0,695 g Eisensulfat in 100 ml Wasser gelöst.

Thiosulfatlauge
Zu einer 40-proz. Lösung von stickstoffreiem Natriumhydroxyd werden 2 % Natriumthiosulfat zugesetzt.

Herstellung und Feststellung des Wirkungswertes von Cerisulfatlösung siehe: 2.5.3 c

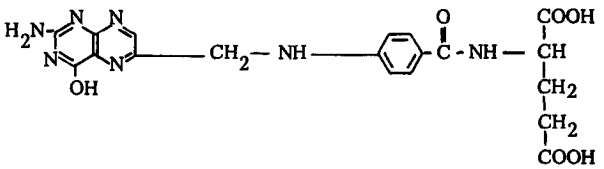
3 SPEZIELLER TEIL

3.1 Acidum folicum (DCI)

Syn.: Acidum pteroylglutaminicum

N-[4-([(2-Amino-4-hydroxy-pteridyl)-methyl]-amino)-benzoyl]-L-(+)glutaminsäure

$C_{19}H_{19}O_6N_7$ Mol.-Gew. 441,42



Folic acid	USP XV,p.298, Brit.Ph.1958,p.278, Brit.Pharm.Cod.1954,p.315, N.N.R.1957,p.532
Acidum folicum	Ph.Int.Vol.II,p.6, Ph.Dan.IX,Add.1954,p.139, DAB 6 3.Nachtrag,p.81

Spezialpräparate

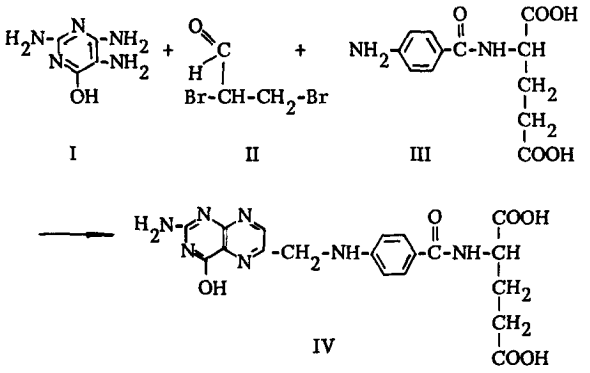
Cytofol® (Lappe), Folbal® (Geigy), Folcidin® (Bayer), Folic acid (Parke Davis), Folsan® (Kali-Chemie), Folvite® (Lederle)

Darstellung

In der Literatur finden wir verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von Folsäure. Die erste Synthese gelang Waller und Mitarb. (13) durch Zugabe von 1,2-Dibrompropionaldehyd (II) zu einer Lösung von Triamino-4-hydroxy-pyrimidin (I) und p-Aminobenzoylglutaminsäure (III) in kalter auf pH 4 gepufferter, wässeriger Lösung. Das Endprodukt enthielt 20 % Folsäure. Nach Reinigung durch Lösen in verdünnten Alkalien, Abfiltrieren der Verunreinigungen und Fällen bei pH 3 erhält man eine Folsäure mit einem Gehalt von 92 %. Die Reaktion verläuft besser und mit höherer Ausbeute durch Zusatz von Jod und Natriumchromat als Oxydationsmittel während der Kondensation (14, 15). An Stelle von Dibrompropionaldehyd kann 1,1-Dichloro-3-bromazeton (16) oder 1,1,3-Tribromazeton (15) verwendet werden.

---

13) C.W.Waller, B.L.Hutchings, I.H.Mowat, E.L.R.Stokstad, J.H.Boothe, R.B.Angier, J.Semb, Y.SubbaRow, D.B.Cosulich, M.J.Fahrenbach, M.E.Hultquist, E.Kuh, E.H.Northey, D.R. Seeger, J.P.Sickels und J.M.Smith, J.amer.chem.Soc. 70, 19 (1948)
14) B.Roth, J.M.Smith und M.E.Hultquist, J.amer.chem.Soc. 72, 1914 (1950)
15) D.R.Seeger, D.B.Cosulich, J.M.Smith und M.E.Hultquist, J.amer.chem.Soc. 71, 1753 (1949)
16) F.E.King und P.C.Spensley, J.chem.Soc. (1952), 2144



Nach einer zweiten Synthese kondensiert man Dibrompropionaldehyd mit Pyridin unter Bildung von N-(2-Formyl-2-bromaethyl)-pyridiniumbromid, das mit Triamino-4-hydroxy-pyrimidin ein quartäres Salz bildet. Dieses letzte reagiert mit p-Aminobenzoyl-L-(+)glutaminsäure unter Bildung von Folsäure (17).

Wahrscheinlich die häufigst verwendete Synthese wird beschrieben von Boothe und Mitarb. (18). Nach ihrer Reaktion wird 6-Brom-methyl-2-amino-4-hydroxy-pteridin mit p-Amino-benzoylglutaminsäure in Glykol bei 100°, in wässeriger alkalischer Lösung (19) oder in kalter Ameisensäure (20) kondensiert. 6-Brom-methyl-pteridine erhält man durch Bromierung von 6-Methyl-pteridinen und diese bilden sich bei der Einwirkung von Methylglyoxal auf 4,5-Diamino-pyrimidin in Gegenwart von Natriumbisulfit.

Mögliche Verunreinigungen

p-Aminobenzoylglutaminsäure, Aminopyrimidine, Pteridine, Brom, Natrium, Pyridin.

---

17) M.E.Hultquist, E.Kuh, D.B.Cosulich, M.J.Fahrenbach, E.H. Northey, D.R.Seeger, J.P.Sickels, J.M.Smith, R.B.Angier, J.H.Boothe, B.L.Hutchings, J.H.Mowat, J.Semb, E.L.R.Stokstad, Y.SubbaRow und C.W.Waller, J.amer.chem.Soc. 70, 23 (1948)

18) J.H.Boothe, C.W.Waller, E.L.R.Stokstad, B.L.Hutchings, J.H. Mowat, R.B.Angier, J.Semb, J.SubbaRow, D.B.Cosulich, M.J. Fahrenbach, M.E.Hultquist, E.Kuh, E.H.Northey, D.R.Seeger, J.P.Sickels und J.M.Smith, J.amer.chem.Soc. 70, 27 (1948)

19) C.W.Waller, M.J.Fahrenbach, J.H.Boothe, R.B.Angier, B.L.Hutchings, J.H.Mowat, J.F.Poletto und J.Semb, J.amer.chem.Soc. 74, 5405 (1952)

20) Roche Products Ltd., Brit.Pat. 624 394 (1949)

Sinnenprüfungen

Alle Handelsmuster liegen als voluminöses, kristallines Pulver von orangegelber Farbe, ohne Geruch und ohne Geschmack vor. Die Farbe ändert sich beim Trocknen der Substanz bei 103 - 105° von Orangegelb nach Zitronengelb. Da aber die getrocknete Substanz an der Luft sofort wieder Wasser aufnimmt, werden die Handelssubstanzen immer als orangegelbe Pulver auftreten, es sei denn, sie werden nach dem Trocknen über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

Wir kommen zu folgender Formulierung:

Kristallines, orangegelbes, geruch- und geschmackloses Pulver, das beim Trocknen bei 103 - 105° zitronengelb wird.

Identitätsprüfungen

Ultraviolett-Absorption: Die Absorption im Ultraviolett ist als Identitätsreaktion in folgenden Arzneibüchern aufgeführt: USP XV, Brit.Ph.1958, Ph.Int.,Vol.II, Ph.Dan. IX,Add.1954, DAB 6, 3.Nachtrag.

Alle Arzneibücher lassen die Extinktion in alkalischer Lösung (0,1 n-NaOH) bestimmen, nur die Ph.Dan.IX, Add.1954, führt die Bestimmung auch in saurer Lösung (0,1 n-HCl) durch. Die aufgeführten Monographien stellen für Folsäure folgende Forderungen auf:

a) in alkalischer Lösung (0,1 n-NaOH)

bei den Maxima	256 mμ	283 mμ	365 mμ
Ph.Int.,Vol.II	570	560	200
Ph.Dan. IX,Add.1954	560	540	200
Merck Index 6.Aufl. 1952	565	540	195
DAB 6, 3.Nachtrag	585		

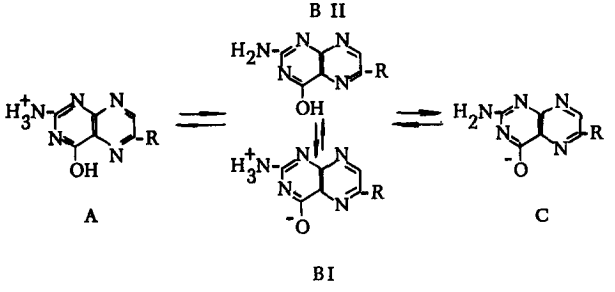
Die USP XV,second Suppl., bestimmt den Quotient der Extinktion bei den beiden Maxima bei 256 mμ und 365 mμ und fordert:

$$\frac{\text{Absorption bei 256 m}\mu}{\text{Absorption bei 365 m}\mu} = 2{,}80 - 3{,}00 \quad \text{(Faktor nach USP XV)}$$

b) in saurer Lösung (0,1 n-HCl): Ph.Dan.IX, Add.1954, schreibt beim Maximum 298 mμ eine Extinktion $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ von 440 und bei 245 mμ einen Inflexionspunkt vor.

Die Ultraviolettabsorption dient zur Feststellung der Identität, denn die Absorptionsmaxima müssen bei bestimmten Wellenlängen liegen. Die bei diesen Wellenlängen gemessenen Extinktionen sind aber proportional zur Konzentration der Lösung und geben

daher auch Auskunft über den Gehalt. Bei Anwesenheit von Verunreinigungen, die im Ultravioletten absorbieren, kann aus der Extinktion kein Schluss mehr auf den Gehalt gezogen werden. Ilver (21) hat bereits diese Beobachtungen bei seinen untersuchten Handelsmustern gemacht. Wir haben hingegen mit unseren Handelsmustern übereinstimmende Resultate erhalten. Die hauptsächlich in Frage kommenden Verunreinigungen sind die Folsäurespaltprodukte, p-Aminobenzoesäure, p-Aminobenzoylglutaminsäure, 2-Amino-4-hydroxy-6-methyl-pteridin und Pteroinsäure. Die UV-Absorptionskurve von p-Aminobenzoesäure und p-Aminobenzoylglutaminsäure wurde schon von Ilver (21) aufgenommen. Daraus ist ersichtlich, dass bei allen Wellenlängen eine allfällig vorhandene Verunreinigung die Extinktion der Folsäure verfälschen würde. Aus diesem Grunde kann die Extinktion nicht zur Gehaltsbestimmung herangezogen werden. Hingegen erhalten wir Auskunft über die Reinheit, wenn wir bei den Absorptionsmaxima der Folsäure die Extinktionen messen. Die Folsäure zeigt als amphoterer Körper eine vom pH-Wert abhängige Absorption im Ultraviolett (21, 22). Je nach Reaktion des Lösungsmittels liegt die Substanz als Kation A, als dipolares B I und ungeladenes B II Zwitterion oder als Anion C vor.



Bei dieser Gleichung haben wir die verschiedenen Ionisationsgrade der Ringstickstoffe nicht berücksichtigt. Der Einfluss der Ionisation der Ringstickstoffe auf das Absorptionsspektrum ist hingegen nicht zu vernachlässigen.

Bis heute sind noch nicht alle Dissoziationskonstanten der Folsäure veröffentlicht worden. Pohland und Mitarb. (22) haben für den Bereich von pH 5 bis pH 10,5 pK-Werte von 5,0 und 8,2 gefunden. Die pK-Werte bei oder unter 5 dürften von den Karboxylgruppen der Glutaminsäure, der pK-Wert von 8,2 von der phenolischen OH-Gruppe stammen.

---

21) K.Ilver, Dansk T.Farm. 27, 81 (1953)
22) A.Pohland, E.H.Flynn, R.C.Jones und W.Shive, J.amer.chem.Soc. 73, 3247 (1951)

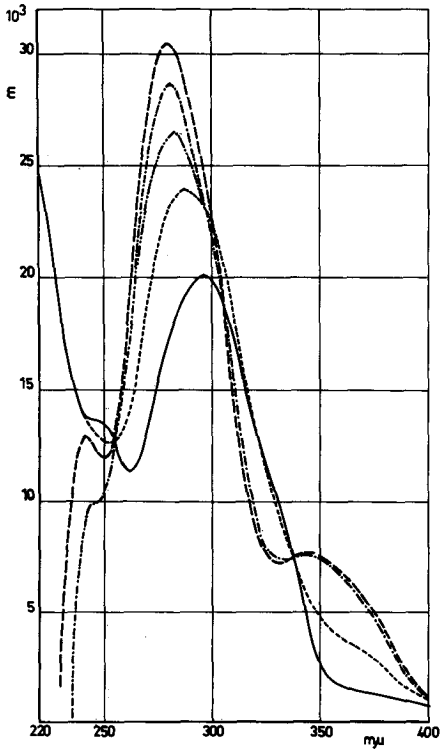


Abb. 5
UV-Spektren von Folsäure

——— in 0,1 n-Salzsäure, pH ca. 1
- - - - - pH 2,2
-·-·-·- pH 3,2
—·—·— pH 4,2
— — — pH 5,3

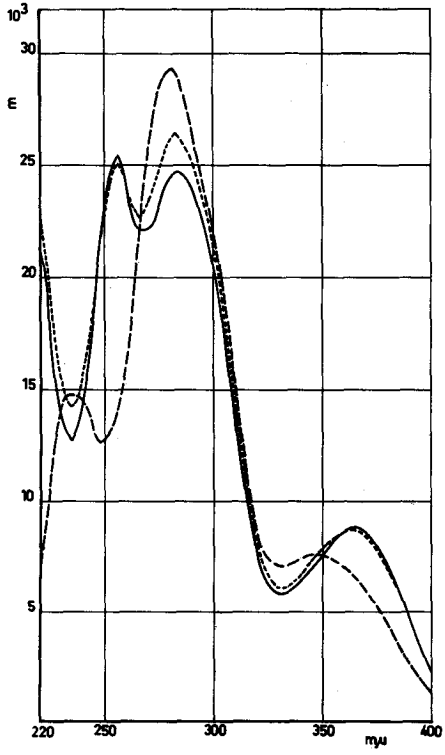


Abb. 6
UV-Spektren von Folsäure

— — — pH 7,1
- - - - pH 9,0
——— in 0,1 n-Natronlauge, pH ca.13

In Abb. 5 und Abb. 6 zeigen wir die Absorptionskurven, die wir bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen haben. Die pH-Werte stellten wir mit den Pufferlösungen der Ph.Helv.V,Suppl.III, ein. Wir mussten die Pufferlösungen 1+4 verdünnen, weil die hohe Salzkonzentration die Löslichkeit der Folsäure stark herabsetzte, so dass die zur Messung nötige Folsäuremenge nicht mehr löslich war.

Wir haben von unseren Handelsmustern die Absorption in alkalischer Lösung (0,1 n-NaOH) und in saurer Lösung (0,1 n-HCl) aufgenommen und den Faktor nach USP XV berechnet:

Handels-muster	Absorption in alkalischer Lösung 256 mμ	283 mμ	365 mμ	saurer Lösung 298 mμ	Faktor nach USP
I	577	561	198	455	2,93
II	576	560	200	453	2,88
III	583	569	201	452	2,90
IV	578	566	200	454	2,89
V	581	570	201	457	2,89

Dabei haben wir festgestellt, dass vor allem in der sauren Lösung die Extinktion stark von der Konzentration der Säure abhängig ist. Damit wir in saurer Lösung genaue Werte erhalten, müssen wir die Folsäure in einer genau 0,1 n-Salzsäure lösen. Wir haben den Einfluss verschiedener Säurekonzentrationen auf die Extinktion untersucht:

Konzentration der Salzsäure	Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1\,cm}$ bei 298 mu
0,08 n	464
0,09 n	456
0,10 n	453
0,11 n	448

Für die Herstellung der verdünnten Folsäurelösung haben wir nach folgender Vorschrift, die wir auch für die Pharmakopöe vorschlagen, gearbeitet:

Ca. 0,140 g ungetrocknete Folsäure (genau gewogen) von bekanntem Wassergehalt werden in einem Messkolben von 250 ml in 0,1 n-Natronlauge gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 200 ml Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge bis zur Marke verdünnt und als Stammlösung für die Spektrophotometrie verwendet.

10 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge zu 100 ml verdünnt. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1\,cm}$ bestimmt in 0,1 n-Natronlauge und berechnet nach der Formel:

$$E^{1\%}_{1\,cm} = \frac{E\ 25'000}{g\ (100-w)}$$

g = Einwaage der ungetrockneten Folsäure
w = Wassergehalt
E = Extinktion

muss bei der Wellenlänge 265 mμ mindestens 570 und darf höchstens 590, bei der Wellenlänge 283 mμ mindestens 555 und höchstens 575 betragen.

20 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge zu 100 ml verdünnt. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1\,cm}$ bestimmt in 0,1 n-Natronlauge und berechnet nach der Formel:

$$E^{1\%}_{1\,cm} = \frac{E\ 12'500}{g\ (100-w)}$$

muss bei der Wellenlänge 365 mu mindestens 195 und darf höchstens 205 betragen.

20 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 20 ml 0,1 n-Salzsäure und mit 10 ml genau 1 n-Salzsäure versetzt und mit Wasser zu 100 ml ergänzt. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ bestimmt in 0,1 n-Salzsäure und berechnet nach der Formel:

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} = \frac{E\ 12'500}{g\,(100-w)}$$

muss bei der Wellenlänge 298 mμ mindestens 445 und darf höchstens 465 betragen.

Wir ziehen die Messung der Extinktionskoeffizienten zur Prüfung auf Identität und Reinheit heran und empfehlen diese Bestimmung zur Aufnahme in die Pharmakopöe.

Nachweis von p-Aminobenzoylglutaminsäure: Nach Hutchings (23) wird die Folsäure durch Reduktion in p-Aminobenzoylglutaminsäure und 2-Amino-4-hydroxy-pteridin gespalten. p-Aminobenzoylglutaminsäure gibt mit Natriumnitrit in saurer Lösung und β-Naphtol in Natronlauge ein blutrotes Diazosalz.

Diese Reaktion wird als Identitätsreaktion in der Ph.Dan.IX,Add.1954, aufgeführt und auch zur Aufnahme in unser Arzneibuch empfohlen.

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzpunkt: Folsäure hat keinen Schmelzpunkt; sie färbt sich dunkel bei 250° und verkohlt bei 360°

Löslichkeit: Folsäure ist sehr schwer löslich in kaltem Wasser, etwas leichter in heissem Wasser. In 1 l Wasser lösen sich bei 25° 0,0016 g, bei 100° ca. 1 g (24, 25). Folsäure löst sich gut in Alkalihydroxyden und -karbonaten sowie etwas in Mineralsäuren. 0,1 g Folsäure müssen sich nach Ph.Dan.IX,Add.1954, in 5 ml verdünntem Ammoniak klar und vollständig lösen. Die Lösung ist gelb gefärbt. Wir empfehlen diese Vorschrift zur Aufnahme in die Pharm.Helv.

Optische Drehung: Die Brit.Ph.1958 bestimmt die optische Drehung in 0,1 n-NaOH. Die ursprünglich vorgeschriebene Bestimmung der optischen Drehung in der USP XV wurde durch das Second Supplement ausser Kraft gesetzt. Infolge der stark gelben Farbe der Folsäurelösung kann die Bestimmung nur mit einer stark verdünnten Lösung vorgenommen

---

23) B.L.Hutchings, E.L.R.Stokstad, J.H.Boothe, J.H.Mowat, C.W. Waller, R.B.Angier, J.Semb und Y.SubbaRow, J.biol.Chem. 168, 705 (1947)

24) W.Stepp, J.Kühnau und H.Schroeder, Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, 7. Aufl., I.Bd., p.444, F. Enke Verlag, Stuttgart 1952

25) Vademecum "Roche" sur les Vitamines, p.53, avril 1952

werden. Wir haben die optische Drehung unserer Handelsmuster gemessen, indem wir 0,07 g Folsäure von bekanntem Feuchtigkeitsgehalt in 10 ml 0,1 n-NaOH lösten. Von unseren Handelsmustern haben wir folgende spezifische optische Drehung gemessen:

Handels-muster	$[\alpha]_D^{20^o}$
I	20,5
II	20,0
III	18,2
IV	20,5
V	19,5

Die grosse Ungenauigkeit veranlasst uns, ihre Aufnahme in das Arzneibuch abzulehnen.

Reaktion einer gesättigten, wässerigen Lösung: Nach Ph.Dan.IX,Add.1954, muss ein wässeriger Auszug der Folsäure schwach sauer reagieren. Wir haben den pH-Wert einer bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung in frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser vom pH 5,9 potentiometrisch bestimmt und bei allen Handelsmustern einen pH-Wert von 4,7 gemessen. Die kolorimetrische Messung des pH-Wertes nach Ph. Helv.V,Suppl.III, ist nicht möglich. da der wässerige Auszug nicht völlig farblos ist.

Wir fordern, dass der pH-Wert einer mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser hergestellten Lösung potentiometrisch gemessen zwischen 4,5 und 5,0 liegen muss.

b) Chemische Reinheitsprüfungen

Die Ph.Dan.IX,Add.1954, Ph.Int.Vol.II, DAB 6,3.Nachtrag prüfen auf freie p-Aminobenzoylglutaminsäure; auf Halogene prüft nur die Ph.Dan.IX,Add.1954. Bei der Reaktion mit konz. Schwefelsäure können wir wegen der starken Braungelbfärbung der Folsäure nichts Spezifisches sehen. Im Ultraviolett ist ein stark grün fluoreszierendes Produkt festzustellen.

Abwesenheit von p-Aminobenzoylglutaminsäure: Bei der Bestimmung des Gehaltes wird von der Ph.Dan.IX,Add.1954, Ph.Int.,Vol.II und DAB 6, 3.Nachtrag, die Extinktion der freien p-Aminobenzoylglutaminsäure durch Diazotierung vor der Reduktion gemessen. Der maximale zulässige Gehalt an freier p-Aminobenzoylglutaminsäure und an p-Aminobenzoylderivaten, die nach der Reaktion von Bratton und Marshall (26) positive Reaktion geben, kann auf verschiedene Arten ausgedrückt werden. Die Untersuchungsresultate sind unter Gehaltsbestimmung (S.33) aufgeführt. Nach diesen Be-

26) A.C.Bratton und E.K.Marshall, J.Biol.Chem. 128, 537 (1939)

stimmungen enthalten alle Handelsmuster geringe Menge freie p-Aminobenzoylglutaminsäure, entsprechend Extinktionswerten zwischen 0,032 und 0,066. Durch Trocknung der Muster bei 103 - 105° tritt eine erhebliche Spaltung der Folsäure auf. Da wir die kolorimetrische Gehaltsbestimmung nicht in die Pharmakopöe vorschlagen, verzichten wir auch auf die Aufnahme dieser Reinheitsprüfung. Mit der spektrophotometrischen Messung wird freie p-Aminobenzoylglutaminsäure ebenfalls erfasst.

Abwesenheit von Halogenid: 40 mg Folsäure werden in 2 ml verdünnter Salpetersäure R durch leichtes Erhitzen gelöst. Zu dieser warmen Lösung werden 4 Tropfen Silbernitrat R gegeben; es bildet sich an der Eintropfstelle ein Niederschlag, der sich aber durch Erhitzen im Wasserbad vollständig lösen muss. Die gelb gefärbte Lösung muss in der Wärme klar sein. In der Kälte scheiden sich allmählich Kristalle von p-Aminobenzoylglutaminsäure, die sich durch Hydrolyse gebildet hat, ab. Werden mehr als 4 Tropfen Silbernitrat R (0,1 n-$AgNO_3$) zugesetzt, so bilden die Silberionen einen Niederschlag mit Folsäure. Silber-, Blei- und Zinkionen reagieren mit Folsäure unter Bildung eines Niederschlages. Alle Handelsmuster waren frei von Chlorid. Wir empfehlen aber die Aufnahme der Prüfung in die Pharmakopöe.

Abwesenheit von Alkalimetallen: Wird nach Ph.Helv.V auf Natrium geprüft, so muss die Reaktion negativ ausfallen. Alle Handelsmuster verbrennen sofort in der Flamme, ohne dass die geringste Flammenfärbung auftritt.

Quantitative Bestimmungen

a) Feuchtigkeit

Die Feuchtigkeit wird in den Monographien nach 3 Methoden bestimmt:

1. Trocknung bei 105° bis zur Gewichtskonstanz
2. Trocknung bei 75° im Vakuum oder in der Trockenpistole
3. Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer.

Die Ph.Dan.IX,Add.1954, lässt nach der ersten Methode eine Feuchtigkeit von nur 5 %, die USP XV nach der dritten Methode 8,5 % und das DAB 6, 3.Nachtrag, nach der zweiten Methode bis 10 % Feuchtigkeit zu.

Wir haben bereits festgestellt (S.22), dass Folsäure beim Trocknen im Trockenschrank bei 103 - 105° ihre orangegelbe Farbe verliert und zitronengelb wird. An der Luft nimmt sie wieder Wasser auf und gewinnt ihre ursprüngliche Farbe zurück. Diese Beobachtung haben schon Pfiffner und Mitarb. (27) gemacht; sie haben auch aus

den kristall-optischen Untersuchungen geschlossen, dass die Folsäure nicht als echtes Dihydrat kristallisiert. Bei der Trocknung bis zur Gewichtskonstanz braucht man ca. 8 bis 12 Stunden. Dazu zersetzt sich die Folsäure bei dieser Trocknungsmethode teilweise (S. 33), so dass die getrocknete Substanz nicht zu weiteren Prüfungen herangezogen werden kann. Cavatorta und Mendella (28) stellten fest, dass sich die Folsäure bei der Bestimmung des Wassergehaltes nach der Karl-Fischer-Methode der USP XV zu Körnchen zusammenballt und der Endpunkt der Titration nur langsam erreicht wird. Sie stützten sich auf die Arbeiten von Peters und Jungnickel (29) und versuchten den Methylalkohol durch verschiedene Lösungsmittel zu ersetzen. Als günstigstes Aufschwemmmittel mit der kürzesten Titrationszeit fanden sie Eisessig; sie schlagen diese Methode vor allem für Serienuntersuchungen vor.

Wir haben die Folsäure in Methanol nach Ph.Helv.V,Suppl.III, aufgeschwemmt. Die Körnchenbildung tritt erst nach der Zugabe des Karl-Fischer-Reagenzes ein. Durch gutes Rühren und feines Aufschwemmen der Folsäurepartikel in Methanol vor dem Zusatz von Karl-Fischer-Reagenz kann dieser auch von uns beobachteten Klumpenbildung gut entgegengewirkt werden. Der Endpunkt stellt sich sofort ein und die Titration benötigt nicht mehr Zeit als eine andere wasserfreie Titration. Für Serienuntersuchungen im Laboratorium eignet sich Eisessig an Stelle von Methanol sicher besser.

Wir haben den Feuchtigkeitsgehalt bestimmt:

a) Durch Trocknung bei 103 - 105° bis zur Gewichtskonstanz mit 0,5 g Folsäure.

b) Durch Titration mit Karl-Fischer-Reagenz mit einer Einwaage von 0,2 g. Den Titrationsendpunkt erfassten wir elektrometrisch mit dem Dead-Stop-Gerät, da der visuelle Endpunkt infolge der gelben Farbe der Folsäure schlecht erkannt werden kann.

Resultate:

Handelsmuster	Trocknung bei 103 - 105°	Karl-Fischer-Methode
I	6,9 %	7,8 %
II	7,0 %	7,6 %
III	6,8 %	8,0 %
IV	6,9 %	8,1 %
V	6,8 %	7,8 %

---

27) J.J.Pfiffner, S.B.Binkley, E.S.Bloom und B.L.O'Dell, J.amer.chem. Soc. 69, 1476 (1947)
28) L.Cavatorta und A.Mendella, Farmaco (Ed.prat.) 12, 559 (1957)
29) E.D.Peters und J.L.Jungnickel, Anal.Chem. 27, 450 (1955)

Die durch Trocknen bei 103 - 105° erhaltenen Resultate sind wegen der grossen Hygroskopizität der Folsäure zu niedrig. Wir empfehlen deshalb die Karl-Fischer-Methode.

Nach unseren Forderungen darf der Wassergehalt, bestimmt nach Karl Fischer, höchstens 8,5 % ausmachen.

b) Verbrennungsrückstand

Die Forderungen betreffend den Verbrennungsrückstand variieren sehr. Die Ph. Int., Vol.II, lässt einen maximalen Verbrennungsrückstand von 0,5 % zu, während die Brit. Ph.1958 maximal 0,1 % erlaubt. Die Ph.Dan.IX, Add.1954, verlangt, dass der Verbrennungsrückstand von 0,25 g höchstens 0,0005 g betrage. Wir haben von 0,25 g Folsäure folgende Verbrennungsrückstände gewogen:

Handelsmuster	Verbrennungsrückstand
I	0,0001 g
II	0,0002 g
III	0,0003 g
IV	0,0000 g
V	0,0001 g

Unsere Forderung lautet: 0,25 g Folsäure dürfen keinen wägbaren Verbrennungsrückstand hinterlassen.

c) Gehaltsbestimmungen

Die azidimetrische Titration kann zur Bestimmung der Folsäure nicht herangezogen werden, was aus der Titrationskurve leicht ersichtlich ist. Pifer und Mitarb (30) haben ohne Erfolg die Titration der Folsäure in wasserfreiem Milieu angewandt. Wir versuchten, die Folsäure in verschiedenen basischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Pyridin, n-Butylamin und Aethylendiamin zu lösen. In allen diesen Lösungsmitteln ist sie aber zu wenig löslich. Wir haben deshalb zur quantitativen Bestimmung von Folsäure die Bestimmung des Stickstoffgehaltes und die kolorimetrische Methode untersucht.

Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl. Mit dieser Methode ermitteln wir die Gesamtstickstoffmenge. Wir können auf jeden Fall nicht feststellen, ob ein Teil der Folsäure gespalten vorliegt. In Anwesenheit von stickstoffhaltigen Verunreinigungen aus der Herstellung werden diese auch erfasst und der Stickstoffgehalt fällt zu hoch aus. Ilver (21) hat mit der Stickstoffbestimmung bei seinen untersuchten Handels-

30) C.W.Pifer, E.G.Wollish und M.Schmall, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 42, 509 (1953)

mustern höhere Werte erhalten als mit der kolorimetrischen Methode, daraus schliesst er, dass die Muster mit stickstoffhaltigen Verunreinigungen verfälscht waren. Wir haben den Stickstoffgehalt unserer Handelsmuster nach folgender Vorschrift bestimmt:

Mit 0,07 g Folsäure (genau gewogen) von bekanntem Wassergehalt wird der Stickstoffgehalt bestimmt (Allgemeine Bestimmungen, S. 8). Bei der Veraschung wird nach dem Klar- und Farblos-Werden des Reaktionsgemisches noch 1 Stunde weiter zum Sieden erhitzt. Der Stickstoffgehalt wird auf wasserfreie Folsäure berechnet.

Der theoretische Stickstoffgehalt beträgt 22,21 %. Wir haben von unseren Handelsmustern folgende Stickstoffgehalte ermittelt:

Handels-muster	Stickstoff-gehalt in %	entsprechender Gehalt wasserfreier Folsäure in %
I	22,16 %	99,78 %
II	22,13 %	99,61 %
III	22,20 %	99,94 %
IV	22,21 %	99,99 %
V	22,00 %	99,02 %

Mit der kolorimetrischen Gehaltsbestimmung haben wir niedrigere Werte erhalten, als mit der Stickstoffbestimmung. Die Elementaranalyse von Handelsmuster V zeigte hingegen, dass die kolorimetrische Bestimmung zu niedrige Werte lieferte:

$C_{19}H_{19}O_6N_7$	Ber. C 51,70	H 4,34	N 22,21 %
(441,42)	Gef. C 51,46	H 4,83	N 22,05 %

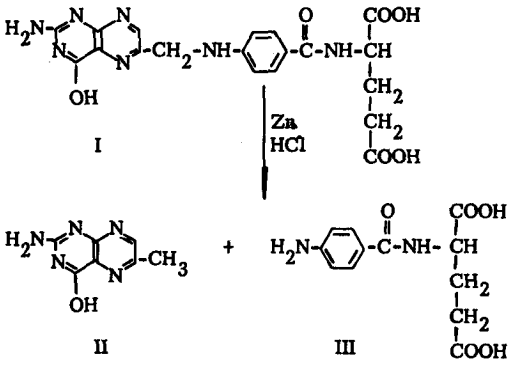
Trotz des Nachteils, dass mit der Stickstoffbestimmung nur der Gesamtstickstoffgehalt erfasst wird, ziehen wir diese Methode zur Gehaltsbestimmung vor, da sie an Genauigkeit alle andern Methoden weit übertrifft. Wir schlagen deshalb die Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach der erwähnten Vorschrift in die Pharmakopöe vor und stellen folgende Forderung:

Der Stickstoffgehalt muss mindestens 22,0 % und darf höchstens 22,3 %, berechnet auf wasserfreie Substanz, entsprechend einem Gehalt an wasserfreier Folsäure von mindestens 99,0 % und höchstens 100,5 %, betragen.

Kolorimetrische Methode. Diese Methode ist in der USP XV, Brit.Ph.1958, Ph. Int.,Vol.II, Ph.Dan.IX,Add.1954 und dem DAB 6, 3.Nachtrag, zur Gehaltsbestimmung aufgeführt. Die Reaktion beruht auf der von Hutchings (23) und Kaselis (31) beschriebenen Spaltung der Folsäure und der Diazotierung der frei werdenden p-Aminobenzoylglutaminsäure. Folsäure (I) wird nach Hutchings (23) durch Reduktion mit Zink in

31) R.A.Kaselis, W.Leibmann, W.Seaman, J.P.Sickels, E.J.Stearns und J.T.Woods, Anal.Chem. 23, 746 (1951)

Salzsäure in 2-Amino-4-hydroxy-pteridin (II) und p-Aminobenzoylglutaminsäure (III) aufgespalten:



Zur Reduktion wurden verschiedene Reduktionsmittel und Verfahren angewandt. Hutchings (23) führte die Reduktion mit Zink in Salzsäure und 0,5-proz. Gelatinelösung als Schutzkolloid durch. Kaselis (31) erwähnt Titanchlorid und Zinkamalgam als Reduktionsmittel mit und ohne Gelatinezusatz. Hingegen führt die Gelatine oft zu falschen Resultaten. Nach Il'ver (21) wird als zuverlässigste Methode die Reduktion mit Zinkstaub in Salzsäure und einer Reduktionszeit von 15 Minuten gebraucht.

Die Diazotierung der freien p-Aminobenzoylglutaminsäure wird nach der Methode von Bratton und Marshall (26) vorgenommen. Der Nitritüberschuss wird mit Ammoniumsulfamat nach Marshall und Lichtfield (32) entfernt, da ein Ueberschuss von Ammoniumsulfamat keinen Einfluss auf die Reaktion hat. Mit N-(1-Naphtyl)-aethylendiamindihydrochlorid bildet sich ein sehr gut lösliches, stabiles Diazoderivat von konstanter Zusammensetzung. Die Reaktion verläuft schnell und ist reaktionsunabhängig zwischen pH 1 und 2.

Der Folsäuregehalt kann aus einer Eichkurve herausgelesen oder mit dem molaren Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Wir haben für unsere Untersuchungen beide Verfahren angewandt. Die Eichkurve sowie den molaren Extinktionskoeffizienten haben wir mit reiner p-Aminobenzoylglutaminsäure aufgenommen. Für den Extinktionskoeffizienten haben wir folgende Werte gemessen:

$5{,}46 \cdot 10^4$
$5{,}39 \cdot 10^4$
$5{,}43 \cdot 10^4$
$5{,}44 \cdot 10^4$

Mittelwert: $5{,}43 \cdot 10^4$

32) E.K.Marshall und J.T.Lichtfield, Science 88, 85 (1938)

Wir haben hingegen festgestellt, dass das p-Aminobenzoylglutaminsäure-Diazoderivat nur in bestimmten Konzentrationen dem Beer-Lambertschen-Gesetz folgt. Diese Abweichung beruht wahrscheinlich auf einer Verschiebung des Ionisationsgrades. Die Beobachtung von Ilver (21), dass die Absorptionsmaxima der Diazoderivate von p-Aminobenzoylglutaminsäure und p-Aminobenzoesäure bei verschiedenen Wellenlängen liegen und von verschiedener Intensität sind, konnten wir an unseren Untersuchungen bestätigen:

Diazoderivat von	Absorptions-maximum bei	Molare Extinktion
p-Aminobenzoylglutaminsäure	243 mμ	$5{,}21 \cdot 10^4$
p-Aminobenzoesäure	248 mμ	$5{,}43 \cdot 10^4$

Wir führten die Bestimmungen der Folsäure nach der Vorschrift der Ph.Int., Vol.II, mit getrockneter (103 - 105°) und ungetrockneter Substanz durch. Bei der Trocknung der Folsäure tritt teilweise Spaltung auf, so dass zur Bestimmung des Folsäuregehaltes unbedingt ungetrocknete Folsäure verwendet werden muss.

Handels-muster	Extinktion vor Reduktion		Folsäuregehalt	
	ungetrocknet	getrocknet	ungetrocknet	getrocknet
I	0,032	0,221	94,8 %	92,1 %
II	0,034	0,167	94,9 %	91,4 %
III	0,066	0,676	95,5 %	83,7 %
IV	0,062	0,158	94,1 %	92,2 %
V	0,061	0,305	92,7 %	90,4 %

Wir haben bei unseren Messungen Streuungen von ± 2 % festgestellt. Auch Hutchings (23) hat bei seinen Untersuchungen mit einem Fehler von 2 % gerechnet. Die kolorimetrische Methode hat zu niedrige Werte ergeben, was die Elementaranalyse eindeutig bewies. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt sicher bei der reduktiven Spaltung der Folsäure. Ilver (21) hat die verschiedenen Reduktionsmittel, die in der Literatur empfohlen werden, untersucht und festgestellt, dass die Reduktion sehr vom Reduktionsmittel und der Reduktionszeit abhängig ist. Obwohl die meisten Pharmakopöen diese Methode zur Gehaltsbestimmung aufgenommen haben, lehnen wir sie wegen der grossen Fehlermöglichkeiten und der Ungenauigkeit der Methode an sich (± 2 % Fehler) ab. Wir schlagen die Stickstoffbestimmung als Gehaltsbestimmung und die Messung der Extinktionskoeffizienten bei den Absorptionsmaxima der Folsäure als Identitäts- und Reinheitsreaktion vor.

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	IV	V
Sinnenprüfungen					
Farbe	orange-gelb	orange-gelb	orange-gelb	orange-gelb	orange-gelb
Geruch	-	-	-	-	-
Geschmack	-	-	-	-	-
Identität					
UV-Absorption $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ in 0,1-n NaOH bei 256 mμ	577	576	583	578	581
283 mμ	561	560	569	566	570
365 mμ	198	200	201	200	201
$E^{1\,\%}_{1\,cm}$ in 0,1-n HCl bei 298 mμ	455	453	452	454	457
$\frac{E^{1\,\%}_{1\,cm}\ 256\ m\mu}{E^{1\,\%}_{1\,cm}\ 365\ m\mu}$	2,93	2,88	2,90	2,89	2,89
Diazoreaktion nach Reduktion	+	+	+	+	+
Reinheit					
Löslichkeit	=	=	=	=	=
Optische Drehung	20,5	20,0	18,2	20,5	19,5
Reaktion, gesättigte Lösung potent.	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
Na	-	-	-	-	-
Chlorid	-	-	-	-	-
p-Aminobenzoylglutaminsäure	=	=	=	=	=
Quantitative Bestimmung					
Wassergehalt nach KFR	7,8 %	7,6 %	8,0 %	8,1 %	7,8 %
Verbrennungsrückstand	0,0001	0,0002	0,0003	0,0000	0,0001
Stickstoffgehalt	22,16 %	22,13 %	22,20 %	22,21 %	22,00 %
Gehalt, kolorimetrisch	94,8 %	94,9 %	95,5 %	94,1 %	92,7 %

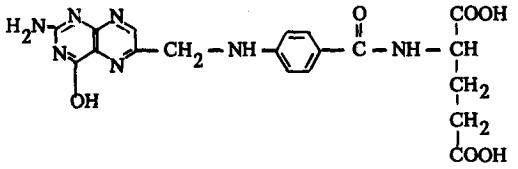
Acidum folicum (DCI)

Syn:: Acidum pteroylglutaminicum

Folsäure Acide folique Acido folico

Folsäure ist N-[4-([(2-Amino-4-hydroxy-pteridyl)-methyl]-amino)-benzoyl]-L-(+)glutaminsäure mit einem Stickstoffgehalt von mindestens 22,0 und höchstens 22,3 berechnet auf wasserfreie Substanz.

$C_{19}H_{19}O_6N_7$ Mol.-Gew. 441,42



Prüfung: Orangegelbes, geruch- und geschmackloses Pulver.

1 cg Folsäure wird unter ständigem Schütteln mit 5 ml verdünnter Salzsäure und 0,1 g Zinkpulver während 5 Minuten reagieren gelassen und anschliessend filtriert. 1 ml Filtrat gibt auf Zusatz von 2 Tropfen Natriumnitrit eine blassgelbe Farbe. Beim darauf folgenden Zutropfen einer Lösung von 1 dg Beta-Naphtol in 3 ml verdünnter Natronlauge entsteht ein orangefarbener Niederschlag, dann eine tiefrote Lösung.

Ca. 0,140 g ungetrocknete Folsäure (genau gewogen) von bekanntem Wassergehalt werden in einem Messkolben von 250 ml in 0,1 n-Natronlauge gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 200 ml Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge bis zur Marke verdünnt und als Stammlösung für die Spektrophotometrie verwendet.

10 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge zu 100 ml verdünnt. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\,\%}_{1\,cm}$, bestimmt in 0,1 n-Natronlauge und berechnet nach der Formel

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} = \frac{E\ 25'000}{g\,(100-w)}$$

g = Einwaage der ungetrockneten Folsäure
w = Wassergehalt
E = Extinktion

muss bei der Wellenlänge 265 mu mindestens 570 und darf höchstens 590, bei der Wellenlänge 283 mu mindestens 555 und höchstens 575 betragen.

20 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 0,1 n-Natronlauge zu 100 ml verdünnt. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\,\%}_{1\,cm}$, bestimmt in 0,1 n-Natronlauge und berechnet nach der Formel

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} = \frac{E\ 12'500}{g\,(100-w)}$$

muss bei der Wellenlänge 365 mu mindestens 195 und darf höchstens 205 betragen.

20 ml Stammlösung werden in einem Messkolben mit 20 ml 0,1 n-Salzsäure und mit 10 ml genau 1 n-Salzsäure versetzt und mit Wasser zu 100 ml verdünnt. Der Extinktionskoeffizient,bestimmt in 0,1 n-Salzsäure und berechnet nach der Formel

$$E_{1\,cm}^{1\,\%} = \frac{E\ 12'500}{g\,(100-w)}$$

muss bei der Wellenlänge 298 mu mindestens 445 und darf höchstens 465 betragen.

10 cg Folsäure werden mit frisch ausgekochtem Wasser bei ca. 70° in einem Erlenmeyerkolben mit Glasstopfen 5 Minuten geschüttelt und anschliessend durch ein Filter filtriert. Das pH dieser Lösung,potentiometrisch gemessen, muss zwischen 4,5 und 5,0 liegen.

Natrium darf mit der Flammenfarbe nicht nachweisbar sein.

4 cg Folsäure werden in 2 ml verdünnter Salpetersäure durch leichtes Erwärmen gelöst. Diese Lösung wird mit 4 Tropfen Silbernitrat R versetzt. Es bildet sich an der Eintropfstelle ein Niederschlag, der sich aber durch Erhitzen im Wasserbad vollständig lösen muss. Die gelb gefärbte Lösung muss in der Wärme klar sein.

Der Wassergehalt nach Karl Fischer, bestimmt mit 0,2 g Folsäure, darf höchstens 8,5 % betragen.

0,25 g Folsäure dürfen keinen wägbaren Verbrennungsrückstand hinterlassen.

Mit ca. 0,070 g Folsäure (genau gewogen) von bekanntem Wassergehalt wird der Stickstoffgehalt bestimmt (Allgemeine Bestimmungen S. 8). Bei der Veraschung wird nach dem Klar- und Farblos-Werden des Reaktionsgemisches noch eine Stunde weiter zum Sieden erhitzt. Der auf wasserfreie Folsäure berechnete Stickstoffgehalt muss mindestens 22,0 und darf höchstens 22,3 % betragen.

Aufbewahrung: In gut verschlossenem Glase, vor Licht geschützt.

Gebrauchsdosen: (Vorschlag)

Dosis usitata simplex	0,005 g
Dosis usitata pro die	0,010 g

Löslichkeit: Sehr schwer löslich in Wasser, schwer löslich in allen organischen Lösungsmitteln, etwas löslich in verdünnten Säuren, löslich in Alkalihydroxyden und Alkalikarbonaten.

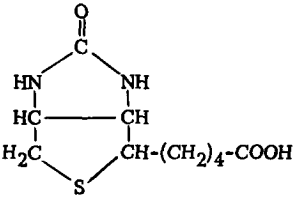
Phantasienamen: Cytofol (E.M.), Folbal (E.M.), Folcidin (E.M.), Folic acid, Folsan (E.M.), Folvite (E.M.).

3.2 Biotinum (DCI)

Syn.: Vitaminum H

3,4-(2-Keto-imidazolido)-2-tetrahydrothiophen-n-valeriansäure

$C_{10}H_{16}O_3N_2S$ Mol.-Gew. 244,32

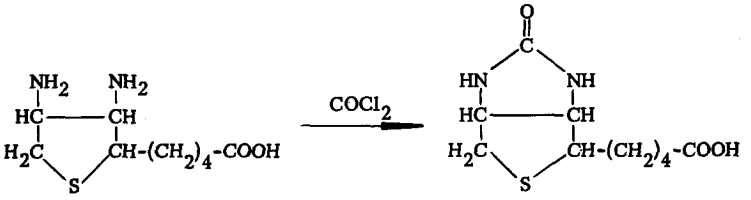


Biotin USP XV, p. 973

Darstellung

Die Synthese von d,l-Biotin wurde ausgeführt von Harris (33, 34, 35) Grüssner (36), Baker und Mitarb. (37). d,l-Biotin wurde in die optischen Antipoden zerlegt nach Wolf (38) mit d(-)-Mandelsäure und l(+)-Arginin.

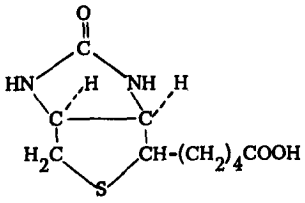
Als Ausgangsprodukte verwendet Baker (37) Pimelinsäure, während Harris (33) Cystein mit Chloressigsäure kondensiert. Ueber mehrere Stufen gelangen beide Synthesenwege zur 3,4-Diaminotetrahydro-2-thiophenvaleriansäure I, die nach Behandlung mit Phosgen d,l-Biotin II liefert.



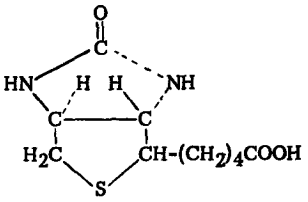
I II

33) S.A.Harris, D.E.Wolf, R.Mozingo, R.C.Anderson, G.E.Arth, N.R.Easton, D.Heyl, A.N.Wilson und K.Folkers, J.amer.chem. Soc. 66, 1756 (1944)
34) S.A.Harris, D.E.Wolf, R.Mozingo und K.Folkers, Science 97, 447 (1943)
35) S.A.Harris, R.Mozingo, D.E.Wolf, A.N.Wilson und K.Folkers, J.amer.chem.Soc. 67, 2102 (1945)
36) O.Schnyder, J.P.Bourquin und K.Grüssner, Helv.chim.Acta 28, 510 (1945)
37) B.R.Baker, J.org.Chem. 12, 186 (1947)
38) D.E.Wolf, R.Mozingo, S.A.Harris, R.C.Anderson und K.Folkers, J.amer.chem.Soc. 67, 2100 (1945)

Von den 4 theoretisch möglichen Razematen konnten nur 3 gewonnen werden: d,l-Biotin, das die Stickstoffe in cis-Konfiguration I enthält sowie d,l-Allobiotin und d,l-Epiallobiotin, in denen die Stickstoffe in trans-Konfiguration II stehen (34, 35, 38). Die beiden letzten Verbindungen, sowie das nicht isolierte d,l-Epibiotin und d,l-Biotin sind epimer am Kohlenstoffatom 2.



"cis" I



"trans" II

Eine physiologische Wirksamkeit mit dem mikrobiologischen Wachstumstest (Lactobazillus arabinosus), sowie mit der prophylaktischen Prüfung an Ratte und Hühnchen zeigt nur d-Biotin (34).

Mögliche Verunreinigungen

d,l-Biotin, freie Amine, Chlorid, Sulfat.

Sinnenprüfungen

Die von uns untersuchten Handelsmuster lagen alle als farblose, kristalline Nadeln oder als weisses kristallines Pulver vor. Die Substanzen sind geruch- und geschmacklos. Wir kommen zu folgender Formulierung:

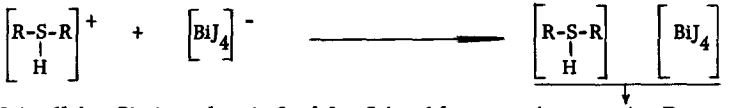
Farblose Kristalle oder weisses, kristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.

Chemische Identitätsprüfungen

Stammlösung: Wir stellten eine Stammlösung her mit 1 cg Biotin, das wir in 10 ml Wasser bei Siedetemperatur lösten und anschliessend auf Zimmertemperatur abkühlten. Diese leicht übersättigte Lösung, aus der sich mit der Zeit einige Kristalle ausscheiden, verwenden wir für die Bestimmung des pH-Wertes sowie für Identitäts- und Reinheitsprüfungen.

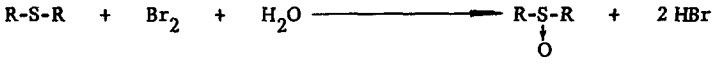
Nachweis des Thioaethers: Zum Nachweis der Thioaether verwenden wir die Dragendorff-Reaktion in bestimmtem saurem Milieu, die Oxydationsreaktion mit Bromwasser, sowie die Oxydation zum Sulfat und dessen Nachweis mit Bariumnitrat.

a) Dragendorff-Reaktion: In stark saurer Lösung (6 n-Schwefelsäure) ist das Protonenangebot genügend gross, dass der Thioaether ein Wasserstoff anlagert unter Bildung eines Kations, das mit dem komplexen Anion Bismuttetrajodid ein schwerlösliches Salz bildet:



Einige Kriställchen Biotin, gelöst in 2 ml 2 n-Schwefelsäure, geben negative Dragendorff-Reaktion, in 6 n-Schwefelsäure fällt die Reaktion positiv aus; in 8 n-Schwefelsäure ist bereits das Dragendorff-Reagenz nicht mehr stabil.

b) Reaktion mit Bromwasser: Brom oxydiert Thioaether in saurer Lösung zu Sulfoxyd:



Die Reaktion ist nicht spezifisch für Thioaether, es reagieren auch Merkaptane, Di- und Polysulfide. 2 ml Stammlösung entfärben 8-9 Tropfen Bromwasser vollständig.

c) Oxydation zu Sulfat und Nachweis nach Ph.Helv.V: Die Oxydation kann durch Schmelzen mit Natriumperoxyd und Natriumkarbonat oder nach der von uns vorgeschlagenen Methode mit Salpetersäure und Perchlorsäure vorgenommen werden.

20 mg Biotin werden in einem kleinen Pyrexbecherglas mit 6 Tropfen Salpetersäure und 1 ml Perchlorsäure versetzt. Die Lösung wird zum Sieden erhitzt bis alle nitrosen Dämpfe verflüchtigt sind. Wenn die weissen Dämpfe der Perchlorsäure auftreten, wird noch 2 Minuten erhitzt. Die schwach gelblich gefärbte Lösung wird abgekühlt und mit 2 ml Wasser verdünnt. Diese Lösung muss die Identitätsreaktion auf Sulfat nach Ph.Helv.V geben.

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzbereich: Nach USP XV (Reagenzienliste) schmilzt die Substanz bei 230 - 232° (korr.) unter Zersetzung. Wir haben den Schmelzbereich für unsere Handelsmuster nach Ph.Helv.VI bestimmt und folgende Werte erhalten:

Handelsmuster	Schmelzbereich korr.
I	228,0 - 231,4°
II	229,1 - 230,8°
III	227,4 - 229,9°
IV	228,0 - 230,9°

Ca. 10° vor der Schmelztemperatur beginnt sich die Substanz langsam unter Braunfärbung zu zersetzen. Wir fordern, dass der Schmelzbereich (korr.) zwischen 227,0 und 231,5° liegen muss.

Reaktion der Stammlösung: Die Reaktion einer wässerigen 0,01-proz. Lösung beträgt nach Merck Index 4,5 pH. Wir haben mit der wässerigen, gesättigten Stammlösung den pH-Wert nach den Farbtabellen der Ph.Helv.V bestimmt:

Handelsmuster	pH-Wert
I	3,2
II	3,4
III	3,2
IV	3,4

Der pH-Wert der Stammlösung soll nicht weniger als 3,0 und darf nicht mehr als 3,6 pH betragen.

Optische Drehung: Nach Kirk und Othmer (39) beträgt die optische Drehung in 0,1 n-Natronlauge: +92°. Wir führten die Prüfung nach folgender Vorschrift aus: 0,050 g während 24 Std. über Phosphorpentoxyd getrocknetes Biotin (genau gewogen) werden in 5 ml 0,1 n-NaOH gelöst und bei 20° mit Natriumlicht die optische Drehung bestimmt. Unsere Handelsmuster zeigen folgende spezifische Drehungen:

Handelsmuster	Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20°}$
I	+ 89,7°
II	+ 90,9°
III	+ 90,3°
IV	+ 90,2°

Die Grenzwerte der spezifischen Drehung können mit $[\alpha]_D^{20°}$ + 89,0° bis +91,5° festgelegt werden.

b) Chemische Reinheitsprüfungen

In der Literatur finden sich keine Angaben über gefundene Verunreinigungen, Verfälschungen oder Verwechslungen. Optische Isomere werden durch die Bestimmung

39) R.E.Kirk und D.E.Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 2, p. 519, Interscience Encyclopedia, New York 1948

der optischen Drehung ausgeschlossen. Auf freie Amine kann mit Dragendorff-Reagenz oder mit der Diazoreaktion geprüft werden. Die Diazoreaktion sowie die Dragendorff-Reaktion in 2 n-Schwefelsäure müssen negativ ausfallen.

Abwesenheit von freien primären Aminen:

1 cg Biotin wird nach Zusatz von 2 Tropfen verdünnter Schwefelsäure in 1 ml Wasser aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung bleibt auf Zusatz von 2 Tropfen Natriumnitrit farblos. Beim darauffolgenden Zutropfen einer Lösung von 1 dg Beta-Naphtol in 2 ml verdünnter Natronlauge darf kein orangefarbener Niederschlag und keine tiefrote Färbung entstehen.

Die Reaktion wird zum Vergleich mit einer Lösung ohne Biotin ausgeführt.

Quantitative Bestimmungen

a) Feuchtigkeit

Wir fanden in der Literatur keine Angaben über den Feuchtigkeitsgehalt. Wegen des hohen Preises der Substanz kommt die Karl-Fischer-Titration nicht in Frage. 0,2 g Biotin, getrocknet bei 103° im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz, zeigt folgende Feuchtigkeitsgehalte:

Handelsmuster	Feuchtigkeitsgehalt
I	0,38 %
II	0,37 %
III	0,48 %
IV	0,47 %

Wir stellen deshalb die folgende Forderung auf:

Der Feuchtigkeitsgehalt, bestimmt mit 0,2 g durch Trocknen bei 103° bis zur Gewichtskonstanz, darf höchstens 0,5 % betragen.

b) Gehaltsbestimmungen

Biotin ist eine etwas schwächere Säure als die Essigsäure mit einem pK_A-Wert: $6{,}3 \cdot 10^{-6}$ (38). Wir bestimmten den Gehalt azidimetrisch. Zusätzlich versuchten wir, die enolische Hydroxyl-Gruppe dieser tautomeren Form in Aethylendiamin mit Lithiummethylat zu erfassen, was uns leider nicht gelang.

Azidimetrische Titration: Als Methode schlagen wir die Rücktitration vor: ca. 0,1 g getrocknetes Biotin (genau gewogen) werden in 20 ml 0,1 n-Natronlauge gelöst und mit 0,1 n-Salzsäure nach Zusatz von 2 Tropfen Phenolphtalein bis zur vollständigen Entfärbung titriert. Der Endpunkt wurde potentiometrisch ermittelt.

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: Zur Stickstoffbestimmung werden ca. 0,1 g getrocknetes Biotin (genau gewogen) verwendet und nach den allgemeinen Bestimmungen verfahren. Die Aufschlusszeit beträgt 2 Stunden.

Resultate

Handelsmuster	Azidimetrie	Stickstoffgehalt
I	99,4 %	11,30 % (98,6 %)
II	100,0 %	11,35 % (99,0 %)
III	99,6 %	11,31 % (98,6 %)
IV	100,9 %	11,34 % (98,9 %)

Wir machen den Vorschlag, die azidimetrische Titration in die Ph.Helv.VI aufzunehmen. Mit der Bestimmung des Stickstoffgehaltes könnten auch allfällige stickstoffhaltige Verunreinigungen erfasst werden. Der grossen Substanzkosten wegen verzichten wir auf die Bestimmung des Stickstoffgehaltes. Wir stellen folgende Forderungen auf:

Der Gehalt, azidimetrisch bestimmt, muss mindestens 98,5 % und darf höchstens 101,0 % betragen.

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	IV
Sinnenprüfungen				
Farbe	weiss kristallin	farblose Kristalle	farblose Kristalle	farblose Kristalle
Geruch	-	-	-	-
Geschmack	-	-	-	-
Identität				
Dragendorff in 6n-H_2SO_4	+	+	+	+
Reduktion mit Bromwasser	+	+	+	+
Oxydation zu SO_4	+	+	+	+
Reinheit				
Schmelzbereich (korr.)	228,0 - 231,4°	229,1 - 230,8°	227,4 - 229,9°	228,0 - 230,9°
Reaktion der Stammlösung	3,2	3,4	3,2	3,4
Spez. Drehung	+89,7°	+90,9°	+90,3°	+90,2°
Diazoreaktion	-	-	-	-
Quantitative Bestimmungen				
Feuchtigkeit	0,38 %	0,37 %	0,48 %	0,47 %
Stickstoffgehalt	11,30 %	11,35 %	11,31 %	11,34 %
Azidimetrische Titration	99,4 %	100,0 %	99,6 %	100,9 %

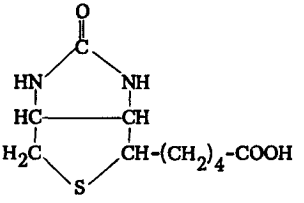
Biotinum (DCI)

Syn.: Vitaminum H

Biotin Biotino Biotine

Biotin ist 3,4-(2-Keto-imidazolido)-2-tetrahydrothiophen-n-valeriansäure mit einem Gehalt von mindestens 98,5 % und höchstens 101,0 % $C_{10}H_{16}O_3N_2S$.

$C_{10}H_{16}O_3N_2S$ Mol.-Gew. 244,32



Prüfung: Farblose Kristalle oder weisses, kristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.

Der Schmelzbereich (korr.) muss zwischen 227,0° und 231,5° liegen.

Ca. 20 mg Biotin werden in einem kleinen Pyrexbecherglas mit 6 Tropfen konz. Salpetersäure und 1 ml Perchlorsäure versetzt. Diese Lösung wird zum Sieden erhitzt bis alle nitrosen Dämpfe entwichen sind. Wenn die weissen Dämpfe von Perchlorsäure auftreten, wird noch 2 Minuten erhitzt. Nach dem Erkalten wird mit 2 ml Wasser verdünnt. Diese Lösung gibt die Identitätsreaktion auf Sulfat.

Ca. 10 mg Biotin müssen sich beim Erhitzen zum Sieden in 10 ml Wasser klar und farblos völlig lösen. Diese Lösung dient nach Abkühlen auf Zimmertemperatur als gesättigte Stammlösung.

2 Tropfen Stammlösung entfärben 5 Tropfen Bromwasser vollständig.

Der pH-Wert der Stammlösung muss zwischen 3,0 und 3,6 liegen.

Die spezifische Drehung von getrocknetem Biotin muss zwischen +89,0° und +91,5° liegen.

(Dementsprechend darf der Drehungswinkel von 0,050 g während 24 Stunden über Phosphorpentoxyd getrockneten Biotins, gelöst in 5,00 ml 0,I n-Natronlauge und bei 20° im 200 mm Mikrorohr bestimmt, nicht weniger als +1,78° und nicht mehr als +1,83° betragen.)

1 cg Biotin wird nach Zusatz von 2 Tropfen verdünnter Salpetersäure in 1 ml Wasser aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung muss auf Zusatz von 2 Tropfen Natriumnitrit farblos bleiben. Beim darauffolgenden Zutropfen einer Lösung von 1 dg Beta-Naphtol in 2 ml verd. Natronlauge darf kein orangefarbener Niederschlag und keine rote Färbung auftreten. Als Vergleich wird die Reaktion mit den gleichen Reagentien aber ohne Biotin ausgeführt.

In 1 ml Stammlösung darf mit Nessler-Reagenz Ammoniak nicht nachweisbar sein. Es darf sich auch kein weisser Niederschlag bilden.

1 cg Biotin wird in 2 ml verd. Salpetersäure durch Erhitzen gelöst und in der Wärme auf Abwesenheit von Sulfat geprüft.

Der Feuchtigkeitsgehalt, bestimmt mit 0,2 g durch Trocknen bei 103° bis zur Gewichtskonstanz, darf höchstens 0,5 % betragen.

Ca. 0,1 g getrocknetes Biotin (genau gewogen) werden in 20 ml 0,1 n-Natronlauge gelöst und nach Zusatz von 2 Tropfen Phenolphtalein mit 0,1 n-Salzsäure bis zur vollständigen Entfärbung titriert.

1 ml 0,1 n-HCl = 0,024432 g $C_{10}H_{16}O_3N_2S$

Der Verbrauch an 0,1 n-Salzsäure muss einem Gehalt von 98,5 - 101,0 % $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ entsprechen.

(0,1000 g müssen also mindestens 4,03 ml und dürfen höchstens 4,14 ml 0,1 n-Salzsäure verbrauchen.)

Aufbewahrung: Vor Licht geschützt, in gut verschlossenem Gefäss.

Gebrauchsdosis: (Vorschlag) 5 - 10 mg i.m.

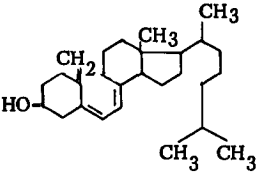
Löslichkeit: Schwer löslich in Wasser, Weingeist und allen organischen Lösungsmitteln. Löslich in verdünnten Alkalien.

Inkompatibilitäten: Oxydationsmittel, Formaldehyd, starke Säuren, konzentrierte Alkalien, ultraviolettes Licht.

3.3 Cholecalciferol

Syn.: Vitamin D_3
Aktiviertes 7-Dehydrocholesterol

$C_{27}H_{44}O$ Mol.-Gew. 384,65



Activated 7-Dehydrocholesterol USP XV, p. 194

Spezialpräparate

Vi-Dé 3® (Wander), D_3-Vigantol® (Merck)

Standardisierung

1 I.E. = 0,025 µg kristallisiertes Vitamin D_3 (1 g Vitamin D_3 entspricht 40 Millionen I.E.)

Darstellung

Die Darstellung von kristallisiertem Vitamin D aus den Bestrahlungsprodukten von Ergosterin durch Windaus und Mitarb. (40) sowie durch Bourdillon und Mitarb. (41) hat als einzigartiger Fall die weitgehende therapeutische Anwendung eines auf chemischem Weg gewonnenen Vitamins ermöglicht, bevor das natürlich vorkommende antirachitische Vitamin isoliert und in seiner Konstitution bekannt war. Windaus (42) beschreibt die erste Synthese von Cholecalciferol. Ausgehend von Cholesterol gelangt man zum Dehydrocholesterol, das durch Ultraviolett-Bestrahlung aktiviert wird. Neben Cholecalciferol bilden sich noch Lumisterol$_3$, Tachysterol$_3$ und Praevitamin D_3. Bei Wellenlängen über 284 mµ bildet sich neben Vitamin D_3 vor allem Lumisterol$_3$, während bei Wellenlängen kleiner als 284 mµ wenig Lumisterol$_3$, vor allem aber Tachysterol$_3$ nebst Vitamin D_3 entsteht. Bei Bestrahlung mit Licht über 290 mµ und unter 254 mµ nimmt die Bildung von Vitamin D_3 ganz beträchtlich ab (43). Zur Bestrahlung wird deshalb Licht von 255 - 285 mµ verwendet.

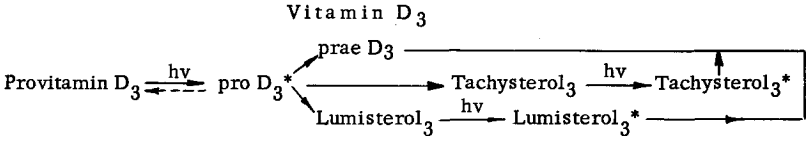
---

40) A.Windaus, A.Lüttringhaus und M.Deppe, Liebigs Ann.Chem. 489,252(1931)
41) F.A.Askew, R.B.Bourdillon, H.M.Bruce, R.K.Callow, J.St.L.Philpot und T.A.Webster, Proc.Roy.Soc. London 109, 488 (1932)
42) A.Windaus, H.Lettré und F.Schenck, Liebigs Ann.Chem. 520, 99 (1935)
43) E.Havinga und J.P.L.Bots, Recu.Trav.chim. Pays-Bas 73, 395 (1954)

Die Bildung von Vitamin D durch Bestrahlung aus Provitaminen D geht nach dem klassischen Schema (44) folgendermassen:

$$\text{Provitamin D} \xrightarrow{h\nu} \text{Lumisterol} \xrightarrow{h\nu} \text{Tachysterol} \xrightarrow{h\nu} \text{Praevitamin D} \longrightarrow \text{Vitamin D}$$

Havinga und Mitarb. (44) stellen sich den Reaktionsverlauf etwas anders vor. Sie nehmen an, dass das Provitamin D durch Bestrahlung in ein aktiviertes Provitamin D übergeht, das sich umwandeln kann sowohl in Lumisterol, Tachysterol wie auch Vitamin D. Die Autoren kommen nach Versuchen mit radioaktiven Substanzen zu folgendem Reaktionsschema:



Velluz und Mitarb. (45) haben Isomerisationsversuche an Praecalciferol und Tachysterol ausgeführt, während Legrand und Mathieu (46) die Isomerisation von Praecalciferol in Calciferol studierten.

Der Weg zur Herstellung von Cholecalciferol nach Windaus hat heute nur noch geschichtliche Bedeutung. Eine Synthese von Cholecalciferol, ausgehend von Cholesterin, wird von Hunziker (47) beschrieben. Cholesterylbenzoat wird in 7-Stellung nach der Methode von Ziegler (48) mit N-Brom-succinimid bromiert und mit N,N-Dimethylanilin dehydrobromiert. Nach Verseifung des rohen Abspaltungsproduktes wurde über das 3,5-Dinitrobenzoat reines Cholecalciferol erhalten. Die Bestrahlungsprodukte fallen nach der Bestrahlung als 3,5-Dinitrobenzoate in leicht bis sehr schwer ätherlöslichen Bestandteilen an. Die leicht ätherlöslichen Dinitrobenzoate werden durch Chromatographie über Aluminiumoxyd aufgeteilt in 9,10-Seco-Bestrahlungsprodukte und intakte Vierringsterine (7-Dehydrocholesterol, Lumisterol_3). Durch Kristallisation der Petrolätherelluate aus Petroläther erhalten wir Vitamin D_3-3,5-dinitrobenzoat, aus dem durch Verseifung Vitamin D_3 gewonnen wird.

Sinnenprüfungen

Die USP XV verlangt ein farbloses, kristallines Pulver. Auch in anderen Arbeiten (49, 50) wird auf die Farblosigkeit der Substanz hingewiesen. Von unseren 4 geprüften Mustern lagen drei als farblose Kristalle oder als weisses, kristallines Pulver vor; ein Han-

---

44) E.Havinga und J.P.L.Bots, Recu.Trav.chim.Pays-Bas 74, 1230 (1955)
45) L.Velluz, G.Amiard und B.Goffinet, C.R.Acad.Sci. 240, 2076, 2156, 2327 (1955)
46) M.Legrand und J.Mathieu, C.R.Acad.Sci. 245, 2502 (1957)
47) F.Hunziker, Helv.chim.Acta 38, 917 (1955)
48) K.Ziegler, A.Späth, E.Schaaf, W.Schumann und E.Winkelmann, Liebigs Ann.Chem. 551, 80 (1942)
49) "Vademecum Roche sur les Vitamines", p. 26, avril 1952
50) "Vitamine Merck", p. 181, Darmstadt 1957

delsmuster war durch unsachgemässe Aufbewahrung schwach gelblich gefärbt, seine physikalischen Konstanten stimmten auch nicht mit denen der anderen geprüften Handelsmuster überein. Die USP XV und Roche (49) fordern ein geruchloses Pulver. Alle vier Handelsmuster entsprechen dieser Forderung. Vorschrift für die Sinnenprüfung:

Farblose, geruchlose Kristalle oder weisses, kristallines, geruchloses Pulver.

Chemische Identitätsprüfungen

Verschiedene chemische Reaktionen können zum Nachweis von Cholecalciferol verwendet werden. Es ist hingegen keine Reaktion bekannt, die nur auf Cholecalciferol ansprechen würde. Schneider (51) gibt eine Zusammenstellung dieser verschiedenen Farbreaktionen, die fast durchwegs allgemeine Sterin-Gruppenreaktionen sind. Die USP XV führt bei Activated 7-Dehydrocholesterol die Liebermann-Burchard-Reaktion aus. Das Vitamin, gelöst in Chloroform, gibt mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure beim Umschütteln eine rote Farbe, die schnell übergeht in Violett, Blau und schliesslich Grün.

Wir schlagen die Identitätsprüfung nach Schaltegger (52) vor, wie sie bei der Identitätsprüfung von Calciferol Ph.Helv.V, Suppl.II, ausgeführt wird. Die Reaktion führt zur Bildung der gleichen Farbe mit Cholecalciferol wie mit Calciferol, hingegen ist sie spezifisch für die beiden Vitamine:

Ein Kriställchen Cholecalciferol wird in einem Reagenzglas in 1 ml Benzol gelöst und mit 1 ml 2-proz. benzolischer Vanillinlösung versetzt. Fügt man zu dieser Mischung 5 ml einer gesättigten benzolischen Lösung von Trichloressigsäure und erwärmt im Wasserbad, so geht die goldgelbe Farbe zunächst in Grün und dann in Blau über.

Alle vier Handelsmuster geben positive Reaktion.

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzbereich: Die USP XV schreibt als Schmelzpunkt für Activated 7-Dehydrocholesterol 84-88° (korr.) vor, bestimmt in einem unter Vakuum zugeschmolzenen Kapillarröhrchen. In der Literatur haben wir noch folgende Angaben über den Schmelzpunkt von Cholecalciferol gefunden. Es ist aber nicht immer ersichtlich, ob der Smp. unter bestimmten Vorsichtsmassnahmen ermittelt wurde und ob es sich um einen korrigierten Schmelzpunkt handelt.

USP XV, p. 194	84 - 88° (korr.)
Merck (50)	84 - 88° (korr.)
Pharm.Ind. (54)	82 - 86° (nicht korr.)
Recu.Trav.chim.Pays-Bas (43)	83 - 84° (nicht korr.)
Helv.chim.Acta (52)	78 - 82°
Naturwissenschaften (53)	82 - 84°

51) H.Schneider, "Die Prüfung und Gehaltsbestimmung von Vitamin D_2-Reinsubstanz", Diss. ETH, Zürich 1952
52) H.Schaltegger, Helv.chim.Acta 33, 2101 (1950)
53) F.Schenck, Naturwissenschaften 25, 159 (1937)
54) E.Schubert, Pharm.Ind. 17, 83 (1955)

Wir haben den Schmelzpunkt in nicht evakuierten und evakuierten Schmelzpunktröhrchen bestimmt und festgestellt, dass bei den nicht evakuierten Mustern die Tröpfchenbildung 1-2 Grad früher beginnt, die Substanz aber nicht früher zusammenfliesst als in evakuierten Röhrchen. Wir haben in evakuierten Schmelzpunktröhrchen in dem auf 70° vorgewärmten Bad folgende Schmelzbereiche gemessen:

Handelsmuster	Schmelzbereich nach Ph.Helv.VI (korr.)
I (gelb gefärbt)	78,5 - 80,8°
II	82,3 - 84,3°
III	83,8 - 85,1°
IV	82,1 - 83,6°

In der Ph.Helv.VI sollte für die Schmelzbereichbestimmung gefordert werden:

Der Schmelzbereich,in evakuierten Kapillarröhrchen bestimmt, muss zwischen 82,0 - 86,0° (korr.) liegen.

Schmelzbereich des 3,5-Dinitrobenzoates von Cholecalciferol:
In der Literatur finden wir sehr oft die verschiedenen Benzoylester, die zur Bestimmung des Schmelzpunktes herangezogen werden. Die USP XV lässt zur Ermittlung der Identität den 3,5-Dinitrobenzoylester herstellen und fordert den Schmelzpunkt von 133 - 135° (korr.). Wir stellten das Derivat nach Vorschrift von Schneider (51) her, kristallisierten aber einmal aus Azeton um. Für den 3,5-Dinitrobenzoylester von Cholecalciferol ermittelten wir folgende Werte:

Handelsmuster	Schmelzbereich nach Ph.Helv.VI (korr.)
I	133,2 - 134,1°
II	132,6 - 133,7°
III	133,0 - 134,5°
IV	132,0 - 133,5°

Wir empfehlen, die Bestimmung des nach folgender Vorschrift hergestellten 3,5-Dinitrobenzoylesters in die Pharmakopöe aufzunehmen:

Ca. 0,25 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid werden in 1 ml wasserfreiem Pyridin durch leichtes Erwärmen gelöst und mit einer Lösung von ca. 0,25 g Cholecalciferol in 0,5 ml wasserfreiem Pyridin versetzt. Die beiden Lösungen werden gemischt und während 10 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt und noch warm in eine Porzellanschale gegossen. Dann werden 5 ml Wasser zugefügt und die klebrige Fällung nach Zusatz von weiteren 5 ml Wasser gut verrührt. Das Gemisch wird filtriert und der Rückstand 4 mal mit 10 ml Wasser ausgewaschen, so dass kein Pyridingeruch mehr wahrnehmbar ist. Dann wird der Rückstand in 5 ml warmem Azeton gelöst. Nach Abkühlen und Stehenlassen während ca. 2 Stunden fällt Cholecalciferol-3,5-dinitrobenzoat aus, das auf dem Filter gesammelt, mit 3 ml eiskaltem Azeton gewaschen und anschliessend noch einmal aus Azeton umkristallisiert wird. Die Substanz wird im Vakuumexsikkator während 24 Stunden getrocknet. Der Schmelzpunkt muss zwischen 132,0° und 135,0° (korr.) liegen.

Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen:
Zur Ueberprüfung der Löslichkeit halten wir uns an die Vorschrift von Calciferolum Ph.Helv. V, Suppl.II, hingegen fordern wir, im Gegensatz zu diesem Artikel, eine farblose Lösung. Handelsmuster II, III und IV lösen sich farblos, während Handelsmuster I, das teilweise zersetzt ist, eine Färbung wie G_2 ergab. Wir schlagen folgende Vorschrift vor:

0,1 g müssen sich in 2,5 ml absolutem Alkohol klar und farblos völlig lösen.

Optische Drehung: Die USP XV verwendet eine 0,5-proz.weingeistige Lösung, Merck (50) und Schubert (54) lösen die Substanz in absolutem Alkohol. Nach Rosenberg (55), Schenk (53) und Merck (56) wird zur Bestimmung Azeton und nach Huber (57) verdünntes Azeton vorgeschlagen. Als spezifische Drehung in Weingeist und absolutem Alkohol finden wir:

USP XV	+ 105 bis 112°
Merck (50)	+ 105 bis 112°
Schubert (54)	+ 103 bis 112°

Die USP XV schreibt die Zeit, während der die Bestimmung zu erfolgen hat, genau vor. Wir haben eine alkoholische Lösung im Dunkeln während 16 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, ohne eine messbare Aenderung der optischen Drehung feststellen zu können, hingegen zersetzt sich die Lösung unter Lichteinfluss. Für die Prüfung der optischen Drehung halten wir uns an die Vorschrift Calciferolum Ph.Helv.V, Suppl.II, fordern aber, dass die optische Drehung spätestens 30 Minuten nach Herstellung der Lösung bestimmt wird. Für unsere Handelsmuster haben wir folgende Werte gemessen:

Handelsmuster	spezifische Drehung
I	104,2°
II	109,5°
III	108,0°
IV	108,1°

Wir schlagen vor, eine spezifische Drehung zwischen + 106 und + 112°, bestimmt in absolutem Alkohol, zu fordern.

Papierchromatographie: Zur Trennung von Steroiden wurden in den letzten Jahren mehrere Arbeiten veröffentlicht. So ist neben den Systemen des Zaffaroni-Typus und Bush-Typs vor allem das System mit umgekehrten Phasen (reversed phase) zur Trennung von sehr schwach polaren Steroiden herangezogen worden (58, 59). In der Chromatographie mit umgekehrten Phasen bildet die unpolare Phase die stationäre und die polare die mobile Phase, was zum Beispiel erreicht wird durch Imprägnierung mit Paraffin.

---

55) H.R.Rosenberg, "Chemistry and Physiology of the Vitamins", Interscience publishers, New York 1945
56) Merck Index, 6th ed., Merck and Co., Rahway USA 1952
57) W.Huber, G.W.Ewing, J.Kriger, J.amer.chem.Soc. 67, 609 (1945)
58) R.Neher und A.Wettstein, Helv.chim.Acta 35, 276 (1952)
59) R.Neher, "Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen", Elsevier Publishing Comp., London 1958

Imprägnieren der Papiere: Verschiedene Papierarten wurden zur Imprägnierung gebraucht. Davis und Mitarb. (60) imprägnieren Whatman Nr. 1 mit Quilon (Chromsäure-Stearinsäurekomplex), Kodicek und Ashbey (61) und nach ihnen auch Mayer, Picard und Wokes (62) arbeiten mit Whatman Nr. 2, imprägniert in einer Mischung von 5-proz. (Vol.) Paraffin in Petroläther. Nach Wokes (62) müssen die Papiere vor der Chromatographie mindestens 2 Tage gelagert werden, damit reproduzierbare Resultate erhalten werden. Nach unserer Erfahrung lässt sich Petroläther von Paraffin sehr schlecht trennen, so dass mehrere Tage bis zur vollständigen Verflüchtigung des Petroläthers vergehen. Wir imprägnierten deshalb 12 cm breite Streifen Whatman Nr. 2 mit folgender Imprägnierlösung:

Paraffinöl (Ph.Helv.V)	5 Vol.T.
Narkoseäther	95 Vol.T.

Das Papier wird vor der Imprägnierung 1 Stunde im Trockenschrank bei 100° getrocknet, sofort in die Imprägnierflüssigkeit getaucht und mit einer Glasplatte bedeckt 15 Minuten liegen gelassen. Nach dieser Zeit wird das Papier aus der Lösung genommen, auf sauberes Filterpapier gelegt, dann 15 Minuten an der Luft im Abzug trocknen gelassen und anschliessend 1Stunde im Trockenschrank bei 100° von Narkoseäther und allfällig gebildetem Kondenswasser befreit. Die so vorbehandelten Papiere dürfen sich im Aussehen nicht unterscheiden von den nicht imprägnierten Papieren. Auf jeden Fall dürfen keine Fettflecken oder Zonenbildungen auftreten.

Behandlung der Chromatographiergefässe: Die Wanne wird mit schwarzem Papier vor Licht geschützt. Die Innenwände der Wanne werden mit Filterpapier, das gesättigt ist mit mobiler Phase, ausgekleidet.

Auftragen der Substanz: Im Abstand von 3 cm werden 0,030 mg Vitamin D_3 gelöst in 0,01 ml Methanol aufgetragen. Anschliessend wird das Papier 1 Stunde in der Wanne vorgehängt.

Entwickeln der Papiere; Wir arbeiteten mit dem absteigenden und aufsteigenden Verfahren. Die R_f-Werte waren nach unserer Methode bei beiden Verfahren gleich. Wokes (62) hatte festgestellt, dass mit aufsteigender Chromatographie höhere R_f-Werte erhalten werden. Die folgenden Arbeiten führten wir mit dem absteigenden Verfahren aus. Wir arbeiteten mit folgender mobilen Phase:

---

60) R.B.Davis, J.M.McMahon und G.Kalnitsky, J.amer.chem.Soc. 74, 4483 (1952)
61) E.Kodicek und D.R.Ashbey, Biochem.J. 57, XII (1954)
62) A.Mayer, C.W.Picard und F.Wokes, Pharm.Acta Helv. 33, 603 (1958)

Methylalkohol zur Papierchromatographie	95 Vol.T.
Wasser	5 Vol.T.

In 4 bis 5 Stunden wandert die Front ca. 25 cm.

Nachweisreaktionen und Auswertung der Chromatogramme: Das Papier wird sorgfältig aus der Wanne genommen, 10 Minuten an der Luft und 15 Minuten im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Anschliessend wird mit Antimontrichloridlösung R, die sich vor allem als Reagenz für Δ5-3-Hydroxysteroide (63) eignet, besprayt. Nach dem Besprayen werden die Papiere 3 Minuten in den Trockenschrank von 100° gelegt und anschliessend im ultravioletten Licht beurteilt. Wir haben verschiedene, als Verunreinigungen oder Verwechslungen in Betracht kommende Substanzen mit Vitamin D_3 chromatographiert und folgende Resultate erhalten:

	Schmelzbereich korr.	Farbe mit Antimontrichlorid im UV	R_f-Werte Mittelwerte
Cholecalciferol	82,1 - 85,1°	orangebraun	0,58
Ergocalciferol	110,5 - 113,0°	orangebraun	0,59
7-Dehydro-cholesterol	143,0 - 145,0°	blau	0,51
Ergosterol	148,5 - 150,0°	grün	0,05
Cholesterol	147,5 - 149,0°	rot	0,50
Lumisterol$_3$	112,5 - 114,0°	gelbgrün	0,48

Wir haben 4 Serien zu 6 Chromatogrammen ausgeführt. Für jede Serie wurde wieder frische Imprägnierlösung hergestellt. Die R_f-Werte der 24 Chromatogramme zeigen eine Streuung von ± 0,08.

Die Papierchromatographie eignet sich sehr gut als Reinheitsprüfung auf bestimmte Verunreinigungen der Steroidklasse. Vitamin D_2 und D_3 können nicht unterschieden werden. Dagegen weisen Vitamin D_2 und D_3 andere R_f-Werte und verschieden farbig leuchtende Flecken im ultravioletten Licht auf als die Verunreinigungen. Bei der Papierchromatographie hat sich weiter gezeigt, dass sich die beiden Vitamine in Methanol gut lösen, während alle untersuchten Verunreinigungen schlecht löslich sind.

Zersetzung auf dem Papier: Alle Vitamin D_2-und-D_3 Handelsmuster zeigen bei der Papierchromatographie einen kleinen, im ultravioletten Licht schwach orangebraun leuchtenden Flecken vom R_f-Wert 0,80 (± 0,08). Diese Feststellung haben schon Wokes und Mitarb. (62) gemacht.

Unsere ersten Untersuchungen über die gaschromatographische Trennung von Vitamin D_2 und Vitamin D_3 haben vorläufig zu keinem Erfolg geführt. Obwohl es uns bis

---

63) R.Neher und A.Wettstein, Helv.chim.Acta 34, 2278 (1951)

heute mit keiner Methode gelungen ist, Vitamin D_2 und D_3 aufzutrennen, empfehlen wir die Aufnahme der Papierchromatographie in die Pharmakopöeprüfungsvorschrift. Die erwähnten Verunreinigungen können mit dieser Methode von Vitamin D_3 sauber getrennt und ermittelt werden.

b) Chemische Reinheitsprüfung

Abwesenheit von 7-Dehydrocholesterol: 7-Dehydrocholesterol zählt zu den natürlichen Sterinen mit β-Orientierung (64); das heisst, die Hydroxylgruppe in 3-Stellung steht auf der Vorderseite der Ringebene. Digitonin ist ein spezifisches Reagenz auf die sterische Stellung der sekundären alkoholischen Hydroxylgruppe in 3-Stellung. β-orientierte Sterine bilden mit Digitonin eine Additionsverbindung im Verhältnis 1:1 (64), die in Aethanol schwer löslich ist. Die Bestrahlungsprodukte: $Lumisterol_3$, $Tachysterol_3$ und Vitamin D_3 haben α-Orientierung. Diese 3-α-Hydroxysteroide, deren Additionsverbindungen viel leichter löslich sind in Aethanol, bleiben in Lösung. Diese spezifische Fällungsreaktion hat Schneider (65) für die Reinheitsprüfung von Vitamin D_2 auf Ergosterol herangezogen. Er konnte Ergosterol noch in einer Konzentration von 2,5 mg%, also noch 0,050 mg in 2 ml alkoholischer Calciferollösung nachweisen. Nach dem Merck Index ist hingegen die 7-Dehydrocholesterol-Additionsverbindung etwas besser löslich in Aethanol. Wir haben aus einer Verdünnungsreihe nach nachstehender Vorschrift noch mit 0,2 mg 7-Dehydrocholesterol, gelöst in 2 ml absolutem Alkohol, eine Fällung erhalten, so dass die noch nachweisbare Konzentration 10 mg% beträgt. Obwohl die Reaktion mit 7-Dehydrocholesterol 4 mal weniger empfindlich ist als mit Ergosterol, genügt sie noch zur Reinheitsprüfung von Vitamin D_3 auf 7-Dehydrocholesterol. Nach folgender Vorschrift, die wir für die Pharmakopöe vorschlagen, können noch 0,5 % 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D_3 nachgewiesen werden:

2 ml einer 2-proz. Lösung von Cholecalciferol in absolutem Alkohol müssen nach Zusatz einer Lösung von 0,01 g Digitonin in 1 ml absolutem Alkohol in einem mit Glasstopfen verschlossenen Reagenzglas während 12 Stunden klar bleiben, und es darf sich kein Niederschlag bilden.

Wir konnten in allen unseren Handelsmustern kein 7-Dehydrocholesterol nachweisen.

---

64) L.F.Fieser und M.Fieser, "Lehrbuch der organischen Chemie", 3. Aufl., p. 1114, Verlag Chemie, Weinheim 1957

65) Houben-Weyl, "Allgemeine Laboratoriumspraxis", Bd.I, 1. Teil, p. 444, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1958

Gehaltsbestimmungen

a) Biologische Methode

Bestimmung von Vitamin D_3 an Hühnchen, bei denen Vitamin D_2 praktisch wirkungslos ist und prophylaktischer und kurativer Test an Ratten.

b) Kolorimetrische Methode

In der Literatur finden wir verschiedene Farbreaktionen für Vitamin D_3, die aber für die quantitative Bestimmung ungeeignet oder nicht spezifisch sind. Eine Zusammenstellung dieser Farbreaktionen hat Schneider (51) gegeben. Wir versuchten die kolorimetrische Bestimmungsmethode von Calciferol Ph.Helv.V, Suppl.II, auch mit Cholecalciferol durchzuführen. Wie Schneider (51) schon für Calciferol festgestellt hat, hängt die Bildung des Farbstoffes von verschiedenen Faktoren ab. Bei unseren Versuchen zeigte sich, dass beim Cholecalciferol mit den gleichen Reagentien und unter gleichen Bedingungen keine übereinstimmenden Werte erhalten werden. Der Verlauf der Reaktion ist von so vielen Unbekannten abhängig, dass an verschiedenen Tagen Schwankungen bis zu 30 % auftraten. Die Methode kommt für die Gehaltsbestimmung von Cholecalciferol in einem Arzneibuch nicht in Frage. Sie ist sehr empfindlich und spezifisch auf die D-Vitamine und eignet sich sehr gut zur Prüfung auf Identität.

Laughland und Phillips (66) veröffentlichten eine Arbeit, nach welcher sie Vitamin D_2 und D_3 in Mischungen quantitativ ermittelten. Der Reaktionsmechanismus ist der gleiche wie bei der Methode von Schneider. Nach der Ueberprüfung der Vorschrift haben wir festgestellt, dass sich diese Methode zur Aufnahme in ein Arzneibuch gar nicht eignet. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich bei der geringsten Aenderung der Temperatur von kleineren zu grösseren Wellenlängen und umgekehrt.

Die kolorimetrischen Methoden sind zu wenig spezifisch und zu viel abhängig von Faktoren wie Lufteinfluss, Feuchtigkeit, Temperatur und Licht, als dass sie für Pharmakopöezwecke in Betracht kommen.

c) Ultraviolett-Absorption

Vitamin D_3 zeigt bei der Wellenlänge 265 mμ maximale Absorption. Im Gegensatz zu dem Provitamin 7-Dehydrocholesterin weist das Vitamin D_3 nur ein Absorptionsmaximum auf. Die Messung der Extinktion beim Absorptionsmaximum 265 mμ wird zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D_3 herangezogen. Mit dieser Methode werden hin-

---

66) D.H.Laughland und W.E.J.Phillips, Anal.Chem. 28, 817 (1956)

gegen nur einwandfreie Resultate erhalten, wenn Vitamin D_3 frei von Verunreinigungen ist. Verunreinigungen, die die Absorption im ultravioletten Licht beeinflussen, sind vor allem die Bestrahlungsnebenprodukte:

	Absorptionsmaxima		
7-Dehydrocholesterol (57)	271,0 mμ	281,5 mμ	293 mμ
Lumisterol$_3$ (44)	271,5 mμ		
Tachysterol$_3$ (67)		281,0 mμ	
Toxisterol (62)	248 mμ		
Suprasterole	absorbieren unterhalb 250 mμ		

Wenn solche Verunreinigungen vorhanden sind, wird die Absorptionskurve von Vitamin D_3 verändert. Am empfindlichsten erfassen wir diese Verschiebung, wenn wir bei den Wellenlängen messen, bei welchen die Verunreinigungen maximale Absorption zeigen, so dass die kleinste Menge an Verunreinigung schon eine messbare Aenderung der Extinktion bewirkt.

Wokes und Mitarb. (62) haben die Extinktionen bei den Wellenlängen 245 mμ, 265 mμ und 285 mμ gemessen. Diese Werte haben sie dann ausgenützt zur Definition der Kurvenkonstanten:

$$K_1 = \frac{\text{Extinktion bei 245 m}\mu}{\text{Extinktion bei 265 m}\mu}$$

$$K_2 = \frac{\text{Extinktion bei 285 m}\mu}{\text{Extinktion bei 265 m}\mu}$$

Mit dieser Methode haben sie bei den von ihnen untersuchten Handelsmustern folgende Werte erhalten:

$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	bei 265 mμ :	443
K_1	:	0,76 - 0,83
K_2	:	0,54 - 0,60

Die zur Erfassung der Verunreinigungen festgesetzten Wellenlängen 245 mμ und 285 mμ sind günstig gewählt. Alle in Frage kommenden Verunreinigungen zeigen bei der einen oder anderen Wellenlänge maximale oder annähernd maximale Absorption. Aus diesem Grund haben wir die Berechnung der Koeffizienten, wie sie Wokes und Mitarb. (62) vorschlagen, zusätzlich zur Messung des Extinktionskoeffizienten bei 265 mμ auch für die von uns untersuchten Handelsmuster vorgenommen und folgende Werte erhalten:

---

67) H.H.Inhoffen und K.Brückner, "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Bd.XI, p.88, Springer Verlag, Wien 1954

Handels-muster	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	K_1	K_2
I	460	0,75	0,55
II	500	0,79	0,55
III	495	0,76	0,56
IV	499	0,76	0,55

Die Extinktionskoeffizienten, die wir für unsere Handelsmuster gefunden haben, liegen, ausser dem bereits teilweise zersetzten Handelsmuster I, bei ca. 500, also wesentlich höher als der von Wokes und Mitarb. (62) angegebene Wert von 443. Havinga und Mitarb. (44) haben für das von ihnen synthetisierte Vitamin D_3 einen Extinktionskoeffizienten von 480 gefunden.

Für die Pharmakopöe schlagen wir deshalb folgende Prüfungsvorschrift vor:

Der Extinktionskoeffizient, bestimmt in Weingeist bei einer Wellenlänge von 265 mμ, muss mindestens 470 und darf höchstens 510 betragen. Die Extinktion, bestimmt in Weingeist bei 245 mμ, dividiert durch die Extinktion bei 265 mμ, muss mindestens 0,74 und darf höchstens 0,81, die Extinktion bei 285 mμ, dividiert durch die Extinktion bei 265 mμ, muss mindestens 0,53 und darf höchstens 0,58 betragen.

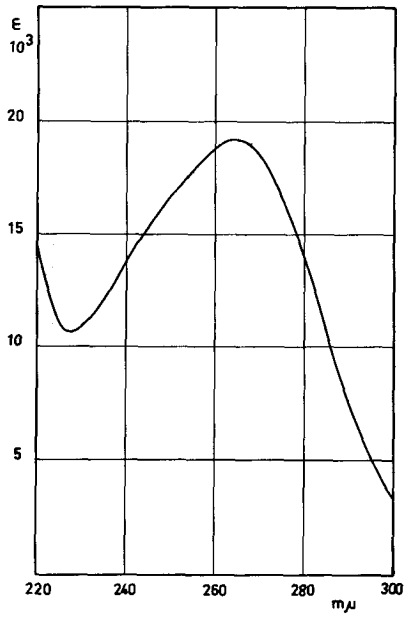


Abb. 7

UV-Spektrum von Cholecalciferol in Weingeist

Untersuchung von Handelsmustern

	I	II	III	IV
Sinnenprüfung				
Farbe	gelblich	weiss	weiss	weiss
Geruch	-	-	-	-
Identität				
Farbreaktion Calciferol Ph.Helv.V, Suppl. II	+	+	+	+
Schmelzbereich 3,5-Dinitrobenzoylester (korr.)	133,2 - 134,1°	132,6 - 133,7°	133,0 - 134,5°	132,0 - 133,5°
Reinheit				
Schmelzbereich (korr.)	78,5 - 80,8°	82,3 - 84,3°	83,8 - 85,1°	82,1 - 83,6°
Löslichkeit	=	=	=	=
Farbe 4-proz.	= G_2	farblos	farblos	farblos
Optische Drehung	104,2°	109,5°	108,0°	108,1°
Ergosterol	-	-	-	-
R_f-Werte	0,58	0,58	0,58	0,58
Kurvenkonstante K_1	0,75	0,79	0,76	0,76
K_2	0,55	0,55	0,56	0,55
Quantitative Bestimmung				
UV-Absorption $E^{1\%}_{1\,cm}$	460	500	495	499

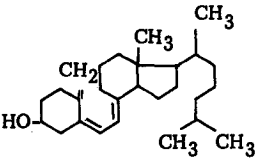
Cholecalciferolum

Syn.: 7-Dehydrocholesterolum activatum
Vitaminum D_3

Cholecalciferol Cholecalciférol Cholecalciferolo

Cholecalciferol ist aktiviertes 7-Dehydrocholesterol mit einem Extinktionskoeffizienten, bestimmt in Weingeist bei einer Wellenlänge von 265 mμ, von mindestens 470 und höchstens 510.

$C_{27}H_{44}O$ Mol.-Gew. 384,65



Prüfung: Weisses, kristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.

Einige Kriställchen Cholecalciferol werden in einem Reagenzglas in 1 ml Benzol gelöst und mit 1 ml einer 2-proz. benzolischen Vanillinlösung versetzt. Fügt man zu dieser Mischung 5 ml einer gesättigten benzolischen Lösung von Trichloressigsäure und erwärmt im Wasserbad, so geht die goldgelbe Farbe zunächst in Grün und dann in Blau über.

Der Schmelzbereich muss zwischen 82,0° und 86,0° liegen. Für die Bestimmung ist das mit der Substanzprobe beschickte Kapillarröhrchen zu evakuieren, zuzuschmelzen und in das auf 70° vorgewärmte Bad einzuführen.

Ca. 0,25 g Cholecalciferol werden in 0,5 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Ca. 0,25 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid werden in 1 ml wasserfreiem Pyridin durch leichtes Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst. Die beiden Lösungen werden gemischt, während 10 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt und noch warm in eine Porzellanschale gegossen. Dann werden 5 ml Wasser zugefügt, und die klebrige Fällung nach Zusatz von weiteren 5 ml Wasser gut verrührt. Das Gemisch wird filtriert, und der Rückstand 4 mal mit 10 ml Wasser ausgewaschen, so dass kein Pyridingeruch mehr wahrnehmbar ist. Dann wird der Rückstand in 5 ml warmem Azeton gelöst. Nach Abkühlen und Stehenlassen während ca. 2 Stunden fällt Cholecalciferol-3,5-Dinitrobenzoat aus, das auf dem Filter gesammelt, mit 3 ml eiskaltem Azeton gewaschen und anschliessend noch einmal aus Azeton umkristallisiert wird. Die Substanz wird während 24 Stunden im Vakuumexsikkator getrocknet. Der Schmelzpunkt muss zwischen 132° und 135° (korr.) liegen.

Ca. 0,1 g Cholecalciferol (genau gewogen) müssen sich in 2,5 ml absolutem Alkohol klar und farblos völlig lösen. Die frisch bereitete Lösung wird mit absolutem Alkohol auf genau 5 ml verdünnt. Sie dient nach der Messung der optischen Drehung als Stammlösung. Die spezifische Drehung des Cholecalciferols muss zwischen +106° und +112° liegen. (Dementsprechend darf der Drehungswinkel von 0,1000 g Cholecalciferol, gelöst in absolutem Alkohol zu 5 ml, bei 20° im 200 mm-Rohr bestimmt, nicht weniger als +4,24° und nicht mehr als +4,48° betragen.)

2 ml der Stammlösung müssen nach Zusatz von 1 ml 1-proz. Lösung von Digitonin in absolutem Alkohol in einem Reagenzglas während 12 Stunden klar bleiben, und es darf sich kein Niederschlag bilden (7-Dehydrocholesterol).

Chromatographierpapier Whatman Nr. 2 wird quer zur Faserrichtung in Streifen von 12 cm Breite geschnitten, die 1 Stunde bei 100° getrocknet und anschliessend in die Imprägnierlösung aus 5 Vol.T. Paraffinöl und 95 Vol.T. Narkoseäther während 15 Minuten getaucht werden. Dann wird auf Filterpapier abtropfen gelassen, 15 Minuten im Abzug und 1 Stunde im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Auf das so vorbehandelte Papier werden 0,01 ml einer 0,3-proz. methanolischen Cholecalciferollösung (= 0,030 mg Cholecalciferol) aufgetragen (Allgemeine Bestimmungen, Seite 53, Suppl. III). Das Papier wird in einer mit schwarzem Papier vor Licht geschützten und mit 95 Vol.-proz. Methalylkohol gesättigten Wanne 1 Stunde lang vorgehängt und anschliessend mit einer Mischung von 5 Vol.T. Wasser und 95 Vol.T. Methylalkohol zur Papierchromatographie absteigend chromatographiert, bis die Frontlinie ca. 25 cm gewandert ist. Hierauf wird der Papierstreifen sorgfältig herausgenommen, mit Bleistift die Frontlinie eingezeichnet und der Streifen 15 Minuten an der Luft und 15 Minuten im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Mit Antimontrichloridlösung R (Ph.Helv.V) wird gleichmässig besprayt und anschliessend im Trockenschrank bei 100° ca. 3 Minuten erhitzt.

Im ultravioletten Licht betrachtet, muss das Chromatogramm einen orangebraunen Flecken mit einem R_f-Wert von 0,58 ± 0,08 und darf höchstens noch einen zweiten schwächeren orangebraunen Flecken mit einem R_f-Wert von ca. 0,80 ± 0,08 aufweisen.

Der Extinktionskoeffizient, bestimmt in Weingeist bei einer Wellenlänge von 265 mμ, muss zwischen 470 und 510 liegen. Die Extinktion, bestimmt in Weingeist bei 245 mμ, dividiert durch die Extinktion bei 265 mμ, muss mindestens 0,74 und darf höchstens 0,81, die Extinktion bei 285 mμ, dividiert durch die Extinktion bei 265 mμ, muss mindestens 0,53 und darf höchstens 0,58 betragen.

Aufbewahrung: Vor Licht geschützt, in zugeschmolzenen Ampullen, die mit einem inerten Gas gefüllt oder evakuiert sind, an einem kühlen Orte.

Maximaldosen (Vorschlag): Dosis maxima simplex 0,015 g (= ca. 600'000 I.E.)
Dosis maxima pro die 0,015 g (= ca. 600'000 I.E.)

Separandum

Löslichkeit: 1 T. löst sich in ca. 100 T. fettem Oel, in ca. 1,5 T. Chloroform, ca. 1,5 T. Aether, ca. 25 T. Weingeist. Beinahe unlöslich in Wasser.

Veränderlichkeiten: Cholecalciferol zersetzt sich rasch unter Einfluss von Luft, Licht und erhöhter Temperatur unter Gelbfärbung.

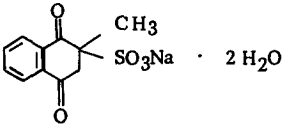
Wirkungswert: 1 mg Cholecalciferol weist einen Wirkungswert von 40'000 Internationalen Kückeneinheiten auf.

3.4 Menadiono-Natrium bisulfurosum

Syn.: Menadioni natrii bisulfis (DCI Vorschlag)

2-Methyl-1,4-naphtochinon-natrium-bisulfit

$C_{11}H_9O_5SNa \cdot 2\,H_2O$ Mol.-Gew. 312,27



Menaphtone Sodium Bisulfite	Brit.Ph. 1958, p. 387
Menadione Sodium Bisulfite	USP XV, p. 394
Menadioni natrii bisulfis	Ph.Dan.IX, Add. 1954, p. 195

Spezialpräparate

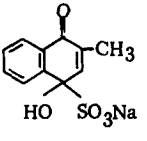
Hykinone ● (Abbott)

Chemische Formel von Menadion-Natriumbisulfit

Mit der Entdeckung von Menadion als antihaemorrhagisch hochwirksames Pharmakon stellte sich auch die Aufgabe, dieses 2-Methyl-1,4-naphtochinon in eine wasserlösliche Form zu bringen. Im Menadion-Natriumbisulfit liegt die Verbindung als wasserlösliche Substanz mit gleicher antihaemorrhagischer Wirksamkeit vor.

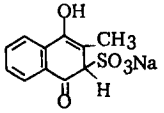
Es war zu untersuchen, in welcher Stellung die Addition des Natriumbisulfit stattfindet. Anfänglich schien die Reaktion klar in Analogie der Addition von Bisulfit an Ketone zu verlaufen:

Entsprechend dieser Auffassung finden wir in der USP XIV und dem Analysmethoder 1949 für Menadion-Natriumbisulfit noch folgende Formel:

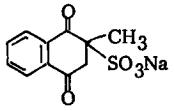


Herrn Prof. Dr. S.A. Schou, Kopenhagen, möchten wir für die Ueberlassung eines Musters Menadion-Natriumbisulfit bestens danken.

Russische Forscher (68) glaubten bewiesen zu haben, dass die Addition nicht in Stellung 4 sondern in 3 stattfindet. Sie stellten folgende Formel als gültig auf:



Neuere Arbeiten amerikanischer Wissenschaftler (69) zeigen aber eindeutig, dass die Addition von Bisulfit in Stellung 2 stattfindet. Diese Formel wurde bereits von der Ph.Dan. IX, Add. 1954, aufgenommen und in der USP XV und der Brit.Ph. 1958 vor die Artikel Menadione Sodium bisulfite gesetzt.



Darstellung

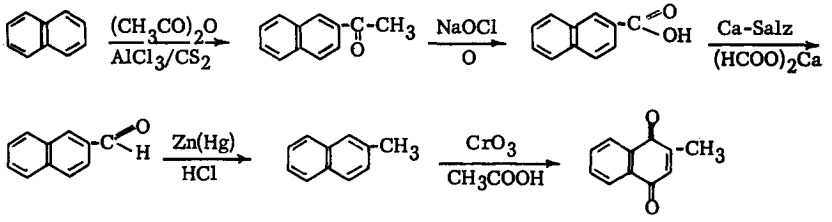
Das Bisulfitadditionsprodukt wird erhalten durch Schütteln von 2-Methyl-1,4-naphtochinon mit einer konzentrierten Lösung von Natriumbisulfit und durch Stehenlassen bei einer Temperatur von 0° (70, 71, 72).

Für die Synthese von 2-Methyl-1,4-naphtochinon werden 2 prinzipiell verschiedene Methoden erwähnt.

Synthesen von Menadion (2-Methyl-1,4-naphtochinon)

A. Naphtalin als Ausgangsprodukt

1. Naphtalin wird mit Essigsäureanhydrid und Aluminiumchlorid in Schwefelkohlenstoff zum β-Azetyl-naphtalin umgesetzt. Die Oxydation zur β-Naphtoesäure geschieht durch Natriumhypochlorit. Durch Destillation des Kalziumsalzes mit Kalziumformiat bildet sich β-Naphtaldehyd, der mit amalgamiertem Zink (Clemmensen-Reduktion) zu 2-Methylnaphtalin reduziert wird. Die Oxydation zum 2-Methyl-1,4-naphtochinon erfolgt mit Chromsäureanhydrid in konzentrierter Essigsäure (73).



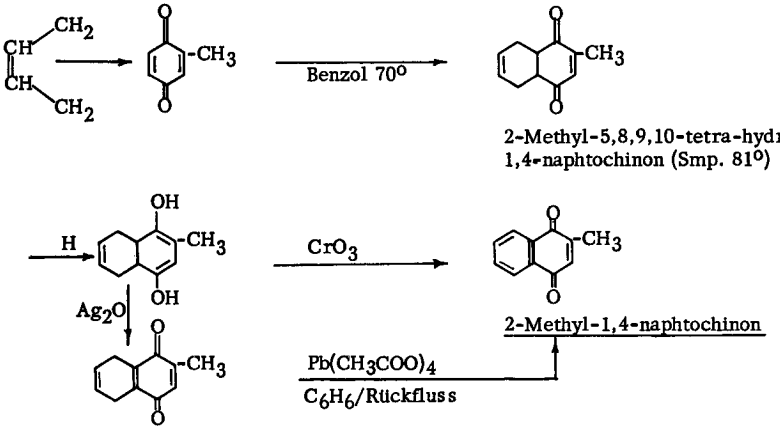
68) D.A.Bochvar, Journ.Gen.Chim. (U.R.S.S.) 16, 2033 (1946)
69) M.Carmack, M.B.Moore und M.E.Balis, J.amer.chem.Soc. 72, 844 (1950)
70) M.B.Moore, J.amer.chem.Soc. 63, 2049 (1941)
71) B.R.Baker, T.H.Davies, L.McElroy u. G.H.Carlosn, J.amer.chem. Soc. 64, 1096 (1942)
72) A.R.Menotti, J.amer.chem.Soc. 65, 1209 (1943)

2. Eine ähnliche Synthese, ebenfalls vom Naphtalin ausgehend, wird von anderen Autoren (74) beschrieben. Sie gelangen über die β-Naphtosulfonsäure zum β-Naphtonitril und auch zur β-Naphtoesäure. Im übrigen verläuft die Synthese analog.

B. Kondensation von Butadien mit p-Toluchinon

Die von Diels und Alder 1928 entdeckte Synthese beruht auf einer 1,4-Addition eines Diens an eine zweite Komponente, die eine durch Carbonyl- oder Carboxylgruppen flankierte Aethylenbindung besitzt.

In den Chinonen liegt eine ähnliche Struktur vor. Diese addieren gleichfalls mit grosser Leichtigkeit Diene (75-78).



Anstelle von Chromsäureanhydrid findet man in der Literatur als Oxydationsmittel auch: Wasserstoffsuperoxyd (79) und Natriumbichromat in Schwefelsäure.

Mögliche Verunreinigungen

Chrom, Quecksilber, Natriumsulfat, Chlorid, Naphtosulfonsäure, Naphtonitril, Toluchinon, Lösungsmittel, besonders Essigsäure und Schwefelkohlenstoff.

---

73) P.P.T.Sah, Recu.Trav.chim.Pays-Bas 59, 461 (1940)
74) P.P.T.Sah, W.Brüll und H.Holzen, Ber.dtsch.chem.Ges. 73, 762 (1940)
75) Chang-Kong Chuang und Chin-Tsien Han, Ber.dtsch.chem.Ges. 68, 876 (1935)
76) L.F.Fieser und F.C.Chang, J.amer.chem.Soc. 64, 2043 (1942)
77) L.F.Fieser und A.E.Oxford, J.amer.chem.Soc. 64, 2060 (1942)
78) L.F.Fieser, M.Tishler und N.L.Wendler, J.amer.chem.Soc. 62, 2861 (1940)
79) K.Fries und W.Lohmann, Ber.dtsch.chem.Ges. 54, 2918 (1921)

Sinnenprüfungen

Die untersuchten Handelsmuster liegen als feine kristalline Pulver vor. Muster I, II, III sind weiss, während Muster IV ganz schwach rötlich und Muster V rötlich gefärbt sind. Die Substanzen sind geruchlos und weisen alle einen bitteren Geschmack auf. Wir stellen folgende Forderungen:

Weisses, kristallines, geruchloses und hygroskopisches Pulver von eigentümlich bitterem Geschmack.

Chemische Identitätsprüfungen

Stammlösung: Für die Identitäts- und Reinheitsprüfung verwendeten wir, wo nichts anderes vorgeschrieben ist, die 2-proz. wässerige Lösung. Die Stammlösung ist ca. 0,066 m.

Neben den unspezifischen Redoxmethoden (80, 81, 82, 83, 84) besitzen wir zwei Identitätsreaktionen, die auf der Reaktionsfähigkeit einer Molekülgruppe basieren.

Farbreaktionen

Reaktion mit Cyanessigsäureaethylester (85-92): Nach den Untersuchungen von Jonescu (93) findet die Reaktion in Stellung 3 des Naphtochinons statt. Die Reaktion tritt mit 2,3-Dimethyl-1,4-naphtochinon nicht ein (94).

Nach Kesting (96) stellt diese Reaktion einen Spezialfall aus einer Reihe von Farbreaktionen zwischen Chinonen bzw. Naphtochinonen und Verbindungen mit der $=CH-CH_2-CH=$ bzw. $\equiv C-CH_2-C\equiv$ Gruppe.

---

80) J.L.Pinder und J.H.Singer, Analyst 65, 7 (1940)
81) N.R.Trenner und F.A.Bacher, J.biol.Chem. 137, 745 (1941)
82) J.V.Scudi und R.P.Buhs, J.biol.Chem. 141, 451 (1941)
83) J.Rosin, H.Rosenblum und H.Mack, Amer.J.Pharm. 113, 434 (1941)
84) E.Schulek und P.Rozsa, Ber.dtsch.chem.Ges. 75, 1548 (1942)
85) E.Schulek und P.Rozsa, Mikrochemie 29, 178 (1941)
86) U.S.P. XV
87) E.Schubert, Pharm.Ind. 16, 315 (1954)
88) M.Kofler, Helv.chim.Acta 28, 702 (1945)
89) Shu-yuan Yeh und G.A.Wiese, Drug Stand. 26, 22 (1958)
90) A.Banchetti, Chimica e Industria 39, 774 (1957)
91) D.T.Ewing, J.M.Vandenbelt u. O.Kamm, J.biol.Chem. 131, 354 (1939)
92) R.Craven, J.chem.Soc. 1605 (1931)
93) M.V.Jonescu, Bull.Soc.chim.France, 4ième, XLI 1094 (1927)
94) R.W.McKee, S.B.Binkley, S.A.Thayer, D.W.McCorquodale und E.A.Doisy, J.biol.Chem. 131, 327 (1939)
95) A.R.Menotti, J.amer.chem.Soc. 65, 1209 (1943)
96) W.Kesting, Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 1422 (1929)

Durch Erhitzen von Menadion-Natriumbisulfit (89) in Lösungen wird das Molekül zerstört unter Bildung der 3-Sulfosäure. Diese Verbindung hat sich als antihämorrhagisch unwirksam gezeigt. Die Identitätsreaktion fällt negativ aus. Es bildet sich nicht der blaue Farbstoff, sondern die Lösung nimmt nur eine tief rote Färbung an. Diese Reaktion beruht auf der alkalischen Reaktion; sie tritt auch ein, wenn anstelle von Ammoniak Alkalien verwendet werden (95). Diese rote Farbe kann auch beobachtet werden bei der quantitativen, cerimetrischen Bestimmung, bei welcher das Menadion-Natriumbisulfit aus alkalischer Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt wird. Wird bei der Cyanessigsäureaethylester-Reaktion nach Bildung des blauen Farbstoffes Natronlauge zugesetzt, so geht die blaue Farbe nach USP XV und nach Brit.Ph. 1958 über Grün nach Gelb (97). Wir schlagen folgende Vorschrift vor:

5 Tropfen Stammlösung (ca. 0,06 m), verdünnt mit 2 ml Wasser, werden nach Zusatz von 1 ml Spiritus und 20 Tropfen konz. Ammoniak geschüttelt. Die Lösung gibt mit 3 Tropfen Cyanessigsäureaethylester eine purpurblaue Farbe, die, mit 1 ml Natronlauge R vermischt, von Blau nach Gelb übergeht.

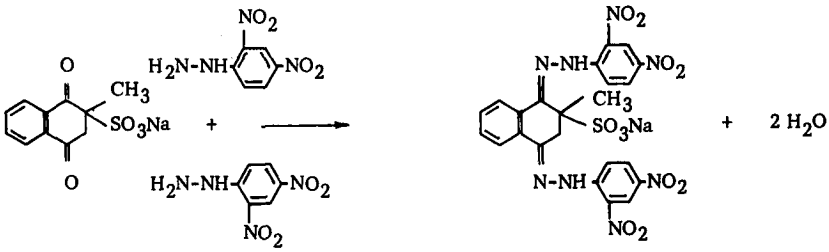
Alle Handelsmuster geben positive Reaktion. Die Reaktion ist spezifisch, wir empfehlen sie deshalb zur Aufnahme in die Pharmakopöe.

Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin: Novelli (98) beschreibt die Reaktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit Menadion in Alkohol und Ammoniak unter Bildung einer blauen bis blaugrünen Farbe. Dieser Farbstoff ist das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des 2-Methyl-1,4-naphtochinon. Menotti (99) hat das Hydrazon untersucht und zur quantitativen Bestimmung eine Vorschrift ausgearbeitet. Die Ph.Dan.IX hat die Reaktion als Identitätsreaktion für Menadion-Natriumbisulfit aufgenommen. Collin und Kirch (101) haben die Bedeutung des Ammoniakzusatzes untersucht. Starke Alkalien führen zu einer ausgedehnten Zersetzung des 2,4-Dinitrophenylhydrazon und zur Bildung farbiger Substanzen, die die typische Farbe verfälschen. Die Endkonzentration der Mischung soll noch 0,5 n sein, damit die Umwandlung des alkoholunlöslichen Hydrazons in das blaue, lösliche Derivat überhaupt vor sich geht.

---

97) "Vitamine Merck", p. 214, Darmstadt 1957
98) A.Novelli, Science 93, 358 (1941)
99) A.R.Menotti, Ind.eng.Chem.anal.Ed. 14, 418 (1942)
100) A.Novelli und J.S.Conticello, J.amer.chem.Soc. 66, 842 (1944)
101) W.R.Collins und E.R.Kirch, J.amer.pharm.Ass. 35, 215 (1946)

Chemismus der Reaktion



Die Reaktion führen wir nach folgender Vorschrift aus:

5 Tropfen Stammlösung (ca. 0,06 m) und 3 Tropfen Dinitrophenylhydrazin (1-proz. in 2 n-HCl) werden 1 Minute im siedenden Wasserbad erhitzt. Auf Zusatz von 1 ml Weingeist und 4 Tropfen konz. Ammoniak entwickelt sich eine grüne Farbe. Man versetzt mit 1 ml Amylalkohol und 2 ml Wasser, schüttelt und lässt stehen. Die grüne Farbe geht in die Alkoholschicht über, während die darunter stehende wässerige Phase gelb gefärbt ist.

Alle Handelsmuster gaben positive Reaktion. Die Methode ist weniger spezifisch als die Cyanessigsäureaethylester-Reaktion, weshalb wir auf diese Farbreaktion verzichteten.

Reaktion mit Dinitrophenol-Indophenol: Nach Bosecke (102) gibt eine methanolische Lösung von Menadion, behandelt mit Natronlauge und Dinitrophenol-Indophenol, eine grüne Farbe, die mit Amylalkohol ausgezogen, kolorimetrisch bestimmt werden kann. Die Methode eignet sich nicht für ein Arzneibuch, da die Reaktion unspezifisch ist.

Nachweis von Bisulfit: 2 ml Stammlösung werden mit 3 ml Salzsäure R versetzt und zum Sieden erhitzt. Stechend riechende Schwefeldioxyd-Dämpfe treten aus.

Alle fünf Muster gaben positive Reaktion. Diese Reaktion sollte in einem Pharmakopöeartikel Aufnahme finden.

Nachweis von Natrium: Alle fünf Muster färben die Flamme deutlich und andauernd gelb. Der Nachweis von Natrium muss in einer Pharmakopöe-Vorschrift berücksichtigt werden.

---

102) W.Bosecke, W.Laves, Biochem.Z. 314, 285 (1943)

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzbereich: Menadion-Natriumbisulfit gibt einen unscharfen Schmelzpunkt infolge Zersetzung. Es wird deshalb Menadion ausgefällt und sein Schmelzbereich nach folgender Vorschrift bestimmt.

5 ml Stammlösung werden mit 1 ml n-Natronlauge versetzt. Der gelbe Niederschlag von Menadion wird auf einer Glasfilternutsche gesammelt,mit 5 mal 10 ml Wasser gewaschen und im Phosphorpentoxydexsikkator während 48 Stunden getrocknet.

In den Monographien finden wir für Menadion folgende Schmelzpunkte:

USP XV	104 - 107° (korr.)
Ph.Dan.IX, Add. 1954	103 - 107° (korr.)
Codex Gall.7, Suppl. 1954	109 - 110°
Ph.Int.I, Vol.I	105 - 107° (korr.)
Brit.Ph. 1958	105 - 107° (korr.)

Wir haben die Schmelzbereiche unserer Handelsmuster nach Ph.Helv.VI (korr.) bestimmt:

Handelsmuster	Schmelzbereich (korr.)
I	103,3 - 105,6°
II	103,6 - 105,8°
III	104,1 - 105,7°
IV	103,9 - 105,3°
V	103,9 - 105,8°

Als Forderung für die Pharmakopöe schlagen wir einen Schmelzbereich von 103,0 - 106,0° (korr.) vor.

Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen: Die USP XV und die Brit.Ph.1958 fordern, dass sich 1 T. in 2 T. Wasser löse, während sich nach der Ph.Dan.IX,Add.1954, 1 T. in 2,5 T. Wasser lösen muss. Auf färbende Verunreinigungen prüft nur die Ph.Dan.IX,Add.1954.

Zur Zubereitung der Stammlösung lösen wir 0,5 g Substanz in 1,25 ml frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser. Die Substanz muss sich vollständig lösen. Mit dieser konzentrierten Lösung wird geprüft auf färbende Verunreinigungen nach Ph.Helv.V, Suppl. III.

Alle fünf Muster lösen sich klar und völlig auf.

Prüfung auf färbende Verunreinigungen:

Handelsmuster	
I	wie GG_4
II	wie GG_4
III	wie G_3
IV	wie G_4
V	wie G_4

Wir limitieren die Löslichkeit und färbende Verunreinigungen wie folgt:

0,5 g müssen sich in 1,25 ml Wasser (frisch ausgekocht und wieder erkaltet) klar und farblös völlig lösen. Diese Lösung darf nicht stärker gefärbt sein als Farbvergleichslösungen G_3 oder GG_3.

Reaktion der Stammlösung

Die Ph.Dan.IX,Add.1954, prüft mit einer 2-proz. Stammlösung und Bromkresolgrün als Indikator. Zugelassen werden ca. pH 4,4 - 5,2. Nach der Brit.Ph.1958 muss eine 2-proz. Lösung auf Lackmus neutral reagieren, während die USP XV überhaupt nicht prüft.

Die mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser zubereitete 2-proz. Stammlösung wird sofort zur Messung verwendet.

Handelsmuster	pH-Wert potentiometrisch	pH-Wert Farbtabelle
I	6,15	6,0
II	5,20	4,8
III	5,00	5,0
IV	5,20	5,0
V	5,95	6,0

Als extremste Werte haben wir gefunden: pH 4,8 und pH 6,15. Dass es sich nicht um einen einheitlichen Körper handelt, zeigen die grossen Schwankungen in der Reaktion. Muster III dürfte ein Antioxydans enthalten. Die Stammlösungen der übrigen Muster färben sich an der Luft langsam braun, während diejenige von Muster III farblos bleibt.

b) Chemische Reinheitsprüfungen

Abwesenheit von 2-Methyl-1,4-naphtohydrochinon-3-sulfonat:
5 ml Stammlösung und 2 Tropfen o-Phenanthrolin R dürfen keine rote Fällung geben.

Alle fünf Handelsmuster gaben negative Reaktion.

Die USP XV, Ph.Dan.IX,Add.1954 und Brit.Ph.1958 prüfen auf diese Verunreinigung.

Abwesenheit von Chlorid: Die Ph.Dan.IX,Add.1954, lässt auf Chlorid prüfen. Alle fünf Muster, geprüft nach Ph.Helv.V, sind frei von Chlorid.

Die Prüfung soll in einem Arzneibuch Aufnahme finden.

Abwesenheit von Natriumsulfat: Die Ph.Dan.IX,Add.1954, prüft nach folgender Vorschrift auf Natriumsulfat:

0,3 g Menadion-Natriumbisulfit werden in einem Erlenmeyer während 1 Minute mit 30 ml Weingeist gekocht. Nach Abkühlen wird gemischt und durch ein Glasfilter 1G4, das vorher bei 103 - 105° getrocknet wurde, filtriert. Das Glasfilter wird mit 2 mal 10 ml Weingeist gewaschen und bei 103 - 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Nach Ph.Dan.IX,Add.1954, darf die Gewichtszunahme des Filters höchstens 0,0060 g ausmachen. Diese Menge entspricht einer Verunreinigung mit Natriumsulfat von 2 %.

Wird nach Ph.Helv.V mit der 2-proz. Stammlösung auf Sulfat geprüft, so fällt mit allen Mustern, die mehr als 3 % Sulfat enthalten, die Reaktion positiv aus, entsprechend der Empfindlichkeitsgrenze der Ph.Helv.V (103).

Handels-muster	%-Gehalt nach Ph.Dan.	Reaktion nach Ph.Helv.V
I	1,0 %	negativ
II	0,3 %	negativ
III	7,7 %	positiv
IV	0,3 %	negativ
V	1,2 %	negativ

Da die Methode der Ph.Helv.V auf Sulfat gleich empfindlich ist wie diejenige der Ph.Dan.IX, Add.1954, schlagen wir vor, nach Ph.Helv.V auf Sulfat zu prüfen.

Abwesenheit von Schwermetallen: Die Ph.Dan.IX, Add.1954, und Analysmethoder XVII 1949 prüfen auf Schwermetalle. Die Prüfung kann nicht direkt mit der wässerigen Lösung ausgeführt werden, da die Bildung von kolloidalem Schwefel eine Trübung verursacht. Wir verwenden die Lösung, wie sie zur Prüfung auf Chrom nach Feuchtveraschung der Substanz hergestellt wird, auch zur Prüfung auf Abwesenheit von Schwermetallen. Alle fünf Handelsmuster geben negative Reaktion.

Abwesenheit von Chrom: Die Prüfung wird ausgeführt von der Ph.Dan.IX, Add.1954, der Brit.Ph.1958. Prüfungsvorschriften finden sich auch in verschiedenen Literaturstellen (80, 87). Zur Prüfung wird die Substanz mit Perchlorsäure verascht. Smith (104) schlägt zur Feuchtveraschung eine Mischung von 5 T.Salpetersäure (64 - 66 %) und 20 T. Perchlorsäure (ca. 60 %) vor. Die Reaktion ist sehr empfindlich auf Metallionen, deshalb ist unbe-

103) Th.Niederer, "Studie über die qualitative Reinheitsprüfung anorganischer Arzneistoffe", Diss. ETH 1926

104) G.F.Smith, Analyt.Chim.Acta 8, 397 (1953); 17, 175 (1957)

dingt auf hohe Reinheit der Reagentien zu achten. Mit der Menge Salpetersäure-Perchlorsäure, die zur Oxydation verwendet wird, soll eine Blindprobe ausgeführt werden, bei der die Reaktion negativ ausfallen muss. Mit Diphenylcarbazid entsteht durch Bildung eines farbigen Komplexes, eine violett-rote Farbe. Das Reagenz wird nach Brit.Ph.1958 hergestellt, indem 0,2 g Diphenylcarbazid in einer Mischung von 10 g konz. Essigsäure und 90 g Weingeist gelöst werden. Zur Beurteilung wird eine Vergleichslösung von Kaliumbichromat hergestellt. Vorschrift:

0,2 g Menadion-Natriumbisulfit werden mit 7 ml Oxydationsgemisch (5 T. konz. Salpetersäure und 20 T. konz. Perchlorsäure) in einem Pyrex-Erlenmeyer von 50 ml Inhalt versetzt. Die Temperatur wird langsam gesteigert. Die anfänglich klare Lösung färbt sich gelb unter Entwicklung nitroser Dämpfe. Bei ca. 150° treten dicke, weisse Perchlorsäuredämpfe auf; die Oxydationsphase der Salpetersäure ist abgeschlossen. Die Perchlorsäure wird in der Kapelle bis auf ca. 2 ml verdampft. Nach Erkalten wird mit Wasser auf genau 10 ml ergänzt. Diese Lösung muss sauer reagieren. 3 ml werden zur Prüfung auf Abwesenheit von Schwermetallen, 5 ml zur Prüfung auf Abwesenheit von Chrom verwendet.

5 ml Lösung werden mit 5 Tropfen Diphenylcarbazid-Reagenz versetzt und mit Wasser auf 10 ml ergänzt. Die Lösung darf nicht stärker rot-violett gefärbt sein als eine Vergleichslösung, hergestellt mit 0,5 ml 0,00283-proz. wässeriger Kaliumbichromatlösung, versetzt mit 1 ml verdünnter Schwefelsäure, 5 Tropfen Diphenylcarbazid-Reagenz und mit Wasser auf 10 ml ergänzt.

Wir haben den Chromgehalt unserer Muster quantitativ anhand einer Eichkurve ermittelt und folgende Werte erhalten:

Handelsmuster	Chromgehalt
I	weniger als 0,0005 %
II	0,0010 - 0,0015 %
III	0,0010 - 0,0015 %
IV	0,0010 - 0,0015 %
V	0,0015 - 0,003 %

Nach unserer Vorschrift werden 0,005 % Chrom zugelassen. Diese Reinheitsforderung entspricht ungefähr der Vorschrift der Ph.Dan.IX, Add.1954, Wir empfehlen die Aufnahme des Chromnachweises in die Prüfungsvorschriften.

Quantitative Bestimmungen

a) Feuchtigkeit

Auf Feuchtigkeit prüfen die USP XV, Brit.Ph.1958 und die Ph.Dan.IX, Add.1954. Menadion Natriumbisulfit wird nach diesen Vorschriften während 3 Stunden bei 100° im Vakuum getrocknet, nach der Brit.Ph.1958 darf der Druck 5 mm Quecksilbersäule nicht überschreiten. Der Feuchtigkeitsgehalt muss zwischen 11,0 und 16,5 % liegen.

Aus der Formel mit 3 Mol Kristallwasser würde sich ein theoretischer Wassergehalt von 16,4 % ergeben. Mit 2 Mol Kristallwasser berechnet sich der Wassergehalt auf 11,5 %. Die von uns untersuchten Handelsmuster enthielten 11,0 - 11,6 % Wasser, bestimmt nach K. Fischer. Verschiedene Fabrikationschargen wurden in der Firma Merck in Darmstadt auf den Wassergehalt geprüft. Die gefundenen Werte liegen zwischen 11 und 13 %, wobei die Mehrzahl der Bestimmungen innerhalb der Grenze von 11,5 und 12,0 % Wasser lag. In der Literatur haben wir keine Angaben über die Untersuchung des Wassergehaltes gefunden.

Der Wassergehalt der vorliegenden Handelsmuster wurde nach 2 verschiedenen Methoden bestimmt:

1. Trocknen der Substanz im Vakuum an der Wasserstrahlpumpe: Druck ca. 10 mm Quecksilber, Temperatur 93 - 97°, Trocknungszeit 3 Stunden.
2. Bestimmung des Wassergehaltes nach der Methode von K. Fischer.

Wir haben folgende Werte gefunden:

Handels-muster	Wassergehalt 1. Methode	2. Methode
I	11,3 %	11,3 %
II	10,5 %	11,2 %
III	8,2 %	11,0 %
IV		11,6 %
V		11,2 %

Auf Grund unserer Untersuchungen an den Handelsmustern von vier verschiedenen Herstellerfirmen und der persönlichen Mitteilungen der Firma Merck deklarieren wir die Formel mit 2 Mol Kristallwasser. Wir schlagen vor, in der Pharmakopöe einen Wassergehalt von 11,0 - 12,0 %, bestimmt nach K. Fischer, zuzulassen.

b) Gehaltsbestimmungen

Zur Bestimmung von Menadion finden wir in der Literatur die spektrophotometrischen Methoden mit Cyanessigsäureäthylester (80, 88) und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (101). Diese beiden Methoden eignen sich vor allem für die Bestimmung von Menadion in verdünnten Lösungen. Für klinisch-chemische Bestimmungen wird die Reaktion von o-Phenylendiamin mit Menadion nach Kofler (88) herangezogen. In den Monographien wird der Gehalt von Menadion-Natriumbisulfit aus der Menge Menadion, die sich nach Ausfällen mit Natronlauge aus einer wässerigen Lösung von Menadion-Natriumbisulfit, Ausschütteln mit Chloroform und Abdampfen des Lösungsmittels bildet, berechnet. So wird nach der Ph.Dan.IX, Add.1954, der Gehalt von Menadion nach Trocknen über konz.

Schwefelsäure gravimetrisch bestimmt. In der Brit.Ph.1958 wird Menadion mit Titanchlorid als Masslösung in gepufferter Lösung titriert. Wir führten die Bestimmungen nach der Vorschrift der Brit.Ph.1958 aus. Wir haben die Reaktion der zu titrierenden Lösung nach Zusatz der Puffersubstanzen gemessen und vor der Titration einen pH-Wert von 4,7, am Umschlagspunkt einen solchen von 4,0, potentiometrisch festgestellt. Zur Titration verwendeten wir eine Apparatur (Abb. 4), die uns ermöglichte, den Sauerstoffeinfluss der Luft auszuschliessen. Nach USP XV und Ph.Belg.IV, Suppl.1951, wird Menadion nach Reduktion mit Zink in salzsaurem Milieu cerimetrisch bestimmt. Wir arbeiteten nach der im Pharmakopöeartikel aufgeführten Vorschrift. Nach unseren Untersuchungen an reinem Menadion verläuft die Reduktion vollständig. 150 mg Menadion werden im Schwefelsäureexsikkator während 24 Stunden getrocknet. Der Gehalt, bestimmt nach den erwähnten Vorschriften, beträgt cerimetrisch 99,1 %, titanometrisch 99,4 % $C_{11}H_8O_2$. Die Berechnung bezogen wir überall auf Menadion-Natriumbisulfit mit 2 Mol Kristallwasser, so dass

$$1 \text{ ml } 0{,}1 \text{ n Masslösung} = 0{,}015614 \text{ g } C_{11}H_9O_5SNa \cdot 2\,H_2O$$

entspricht.

Resultate

Handelsmuster	Gehalt an $C_{11}H_9O_5SNa \cdot 2\,H_2O$		
	Gravimetrisch	Titanometrisch	Cerimetrisch
I		94,9 %	95,8 %
II	100,3 %	92,6 %	93,8 %
III*		62,7 %	62,3 %
IV	100,4 %	93,6 %	93,6 %
V	100,5 %	92,5 %	93,0 %

* als Spezialität im Handel, deklariert mit einem Gehalt von 63,2 %.

Die USP XV und die Brit.Ph.1958 fordern einen Minimalgehalt von 94,0 %, berechnet auf wasserfreie Substanz. Nach der Ph.Dan.IX, Add.1954, muss der Gehalt 96,5 - 101,0 % $C_{11}H_9O_5SNa \cdot 3\,H_2O$ entsprechen. Bei der gravimetrischen Bestimmung erfassen wir den Chloroform-löslichen Rückstand, während bei der Redoxtitration nur der Menadion-Anteil bestimmt wird. Der nach Verdampfen des Chloroforms bleibende Rückstand ist bei den meisten Handelsmustern nicht vollständig löslich in der Weingeist-Eisessigmischung, reines Menadion hingegen löst sich. Der Titer der Titanchloridlösung ist nicht stabil, er muss jedesmal neu ermittelt werden. Die cerimetrische Bestimmungsmethode eignet sich hingegen sehr gut. Der Sauerstoff der Luft beeinflusst die Resultate unter den gegebenen Bedingungen nicht, und der Titer der Masslösung bleibt konstant. Auf Grund unserer Untersuchungen schlagen wir die cerimetrische Bestimmung für die Pharmakopöe vor und fordern einen Minimalgehalt von 93,0 % und einen Maximalgehalt von 100,5 %.

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	VI	V
Sinnenprüfung					
Farbe	weiss	weiss	weiss	schwach rötlich	rötlich
Geruch	-	-	-	-	-
Geschmack	bitter	bitter	bitter	bitter	bitter
Identität					
Cyanessigsäureäthylester-Reaktion	+	+	+	+	+
Natrium	+	+	+	+	+
Reinheit					
Schmelzbereich (korr.)	101,8 - 103,8°	101,3 - 103,3°	102,9 - 105,4°	102,7 - 105,7°	103,8 - 105,5°
Löslichkeit	=	=	=	=	=
Farbe 33-proz.	wie GG_4	wie GG_4	wie G_3	wie G_4	wie G_4
Reaktion der Stammlösung pH	6,0	4,8	5,0	5,0	6,0
2-Methyl-1,4-naphtohydrochinon-3-sulfonat	-	-	-	-	-
Chlorid	-	-	-	-	-
Natriumsulfat	1,0 %	0,3 %	7,7 %	0,3 %	1,2 %
Schwermetalle	-	-	-	-	-
Chrom	< 0,005 %	< 0,005 %	< 0,005 %	< 0,005 %	< 0,005 %
Quantitative Bestimmungen					
Feuchtigkeit KFR	11,3 %	11,2 %	11,0 %	11,6 %	11,2 %
Gehalt: cerimetrisch	95,8 %	93,8 %	62,3 %	93,6 %	93,0 %
titanometrisch	94,9 %	92,6 %	62,7 %	93,6 %	92,5 %
gravimetrisch		100,3 %		100,4 %	100,5 %

Menadiono-Natrium bisulfurosum (DCI)

Syn.: Menadioni natrii bisulfis (DCI)

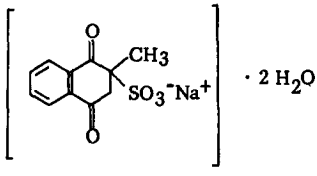
2-Methyl-1,4-naphtochinono-natrium bisulfurosum

Menadion-Natriumbisulfit Menadiono sodio bisulfuroso

Menadione sodium bisulfite

Menadion-Natriumbisulfit ist 2-Methyl-1,4-naphtochinon-Natriumbisulfit mit einem Gehalt von mindestens 93 % und höchstens 100,5 % $C_{11}H_9O_5SNa \cdot 2\,H_2O$.

$C_{11}H_9O_5SNa \cdot 2\,H_2O$ Mol.-Gew. 312,27



Prüfung: Weisses, kristallines, geruchloses, eigentümlich bitter schmeckendes und hygroskopisches Pulver.

0,5 g Menadion-Natriumbisulfit müssen sich in 1,25 ml frisch ausgekochtem und wieder erkaltetem Wasser klar und völlig lösen. Diese Lösung darf nicht stärker gefärbt sein als Farbvergleichslösung GG_3 oder G_3. Die Lösung,mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser auf 25 ml verdünnt, dient als Stammlösung A.

Der pH-Wert der frisch hergestellten Stammlösung A darf nicht weniger als 4,8 und nicht mehr als 6,2 betragen.

5 ml Stammlösung A werden mit 1 ml n-Natronlauge versetzt. Der gelbe Niederschlag von Menadion wird auf einer Glasfilternutsche gesammelt und mit 5 mal 10 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung während 48 Stunden unter Lichtschutz im Phosphorpentoxydexsikkator wird der Schmelzbereich bestimmt, der zwischen 103,0° und 106,0° (korr.) liegen muss.

5 Tropfen Stammlösung A, verdünnt mit 2 ml Wasser, werden nach Zusatz von 1 ml Weingeist und 20 Tropfen konzentriertem Ammoniak geschüttelt. Die Lösung muss mit 3 Tropfen Cyanessigsäureaethylester eine purpurblaue Farbe geben, die,mit 1 ml verd. Natronlauge R versetzt, von Blau über Grün nach Gelb übergeht.

2 ml Stammlösung A und 3 ml verd. Salzsäure R entwickeln, zum Sieden erhitzt, stechend riechende Dämpfe.

Menadion-Natriumbisulfit gibt die Identitätsreaktion auf Natrium.

In der Stammlösung A dürfen Chlorid und Sulfat nicht nachweisbar sein.

5 ml Stammlösung A dürfen auf Zusatz von 2 Tropfen Phenanthrolinreagenz keinen Niederschlag geben (2-Methyl-1,4-naphtochinon-3-sulfonat).

0,2 g Menadion-Natriumbisulfit werden mit 7 ml einer Mischung von 5 ml konz. Salpetersäure und 20 ml konz. Perchlorsäure in einem Pyrexerlenmeyer von 50 ml versetzt. Die Säuren werden langsam bis auf ca. 2 ml verdampft. Nach Erkalten wird mit

Wasser auf 10,0 ml verdünnt. Die Lösung muss sauer reagieren und wird als Stammlösung B verwendet.

5 ml Stammlösung B werden mit 5 Tropfen Diphenylcarbazid versetzt und mit Wasser auf 10,0 ml verdünnt. Diese Mischung darf nicht stärker rotviolett gefärbt sein als eine Vergleichslösung, hergestellt mit 0,5 ml 0,00283 % Kaliumbichromatlösung, 1 ml verdünnter Schwefelsäure R, 5 Tropfen Diphenylcarbazid und Wasser zu 10,0 ml. (Chrom).

In der Stammlösung B dürfen Schwermetalle nicht nachweisbar sein.

Der Wassergehalt, bestimmt mit 3 dg nach der Karl Fischer-Methode, muss zwischen 11,0 und 12,0 % liegen.

Ca. 0,3 g Menadion-Natriumbisulfit (genau gewogen) werden in einem Scheidetrichter von 150 ml in 20 ml Wasser gelöst und mit 5 ml n-Natronlauge versetzt. Das ausgefällte Menadion wird 3 mal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge werden mit 10 ml Wasser geschüttelt, und das Chloroform durch ein mit Chloroform befeuchtetes Papierfilter von 9 cm Durchmesser in einen Erlenmeyer von 150 ml filtriert. Scheidetrichter und Filter werden 2 mal mit 10 ml Chloroform nachgewaschen. Das Filtrat wird durch Ueberleiten eines Luftstromes bei Zimmertemperatur oder in einem Wasserbad von höchstens 40° zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in 15 ml Eisessig und 15 ml verdünnter Salzsäure R unter leichtem Erwärmen auf dem Wasserbad in Lösung gebracht und mit 3 g Zinkstaub versetzt. Der Erlenmeyer wird mit einem Bunsenventil verschlossen und 1 Stunde unter häufigem Schütteln im Dunkeln stehen gelassen. Dann wird die Lösung rasch durch einen Wattepfropfen in einen Erlenmeyer von 200 ml dekantiert und der Reduktionskolben sofort mit 3 mal 10 ml frisch ausgekochtem und wieder erkaltetem Wasser nachgespült. Die vereinigten Filtrate werden mit 0,1 n-Cersulfat unter Zusatz von 2 Tropfen Phenanthrolin titriert. Eine Blindprobe wird mit den gleichen Reagenzien ausgeführt und der Blindwert in Abzug gebracht.

$$1 \text{ ml } 0{,}1 \text{ n-}Ce(SO_4)_2 \;=\; 0{,}01561 \text{ g } C_{11}H_9O_5SNa \cdot H_2O$$

Der Verbrauch an 0,1 n-Cerisulfat muss einem Gehalt von 93,0 - 100,5 % entsprechen.

(0,3000 g müssen also mindestens 17,87 ml und dürfen höchstens 19,31 ml 0,1 n-Cerisulfat verbrauchen.)

Aufbewahrung: Vor Licht und Feuchtigkeit geschützt in gut verschlossenem Glase.

Sterilisation von Lösungen: Durch Keimfiltration oder aseptisches Verfahren. (Allgemeine Bedingungen, Seite 129 des 2. Supplementes.)

Gebrauchsdosen (Vorschlag):

Dosis usitata simplex	0,0005
Dosis usitata pro die	0,002
Dosis maxima simplex	0,1 g
pro die	0,1 g

Separandum

Löslichkeit: 1 T. löst sich in 2 T. Wasser, schwer löslich in Weingeist, unlöslich in Aether und Benzol.

Veränderlichkeit: Die Substanz färbt sich bei Lichteinwirkung violett.

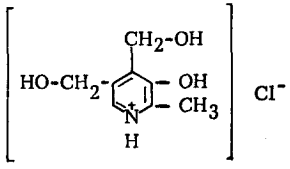
Inkompatibilitäten: Alkalisch reagierende Substanzen (Fällung von Menadion), Oxydationsmittel, Silbersalze (Fällung).

3.5 Pyridoxinum hydrochloricum

Syn.: Vitamin B_6, Adermin, Pyridoxolhydrochlorid, Pyridoxiniumchlorid, Rattenpellagraschutzstoff, Antiakrodyniefaktor, Eluatfaktor, Faktor I.

2-Methyl-3-hydroxy-4,5-bis-(hydroxymethyl-)pyridin-hydrochlorid

$C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$ Mol.-Gew. 205,65



Pyridoxini hydrochloridum	Ph.Int.Suppl.
Pyridoxine hydrochloride	USP XV, p.595, Brit.Pharm.Cod.1954, p.633, N.N.R. Tests and Standards 1955, p.127, N.N.R. 1956
Pyridoxini chloridum	Apot.Kontr.Labor.1953, Cod.Med.Scand. 1951
Pyridoxinum hydrochloricum	DAB 6, 3.Nachtrag

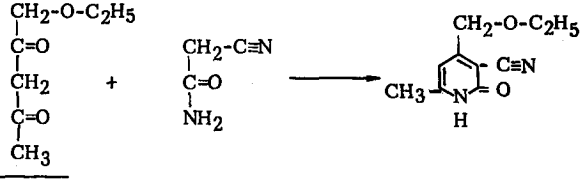
Spezialpräparate

Beadox® (Premo), Becilan® (Spezia), Benadon® (Roche), Hexa-Betalin® (Lilly), Hexavibex® (Parke, Davis), Hexabion® (Merck), Pyrivel® (Vitamins Ltd.)

Darstellung

Zur Synthese von Pyridoxinhydrochlorid sind zwei grundlegend verschiedene Methoden bekannt.

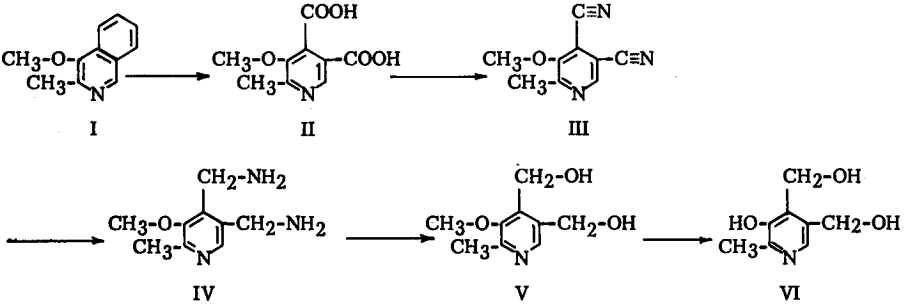
a) Harris and Folkers (105 - 107) führten eine Totalsynthese aus. Durch Kondensation von Cyanoazetamid mit Aethoxyazetylazeton in Gegenwart von Piperidin gelangen sie zum 3-Cyano-4-äthoxy-methyl-6-methyl-2-pyridon.



105) S.A.Harris u. K.Folkers, J.amer.chem.Soc. 61, 1245 (1939)
106) S.A.Harris, E.T.Stiller u. K.Folkers, J.amer.chem.Soc. 61, 1242 (1939)
107) S.A.Harris u. K.Folkers, J.amer.chem.Soc. 61, 3307 (1939)

Ueber weitere sechs Stufen, bei welchen die spezifischen Gruppen in den Ring eingeführt werden, erhalten sie Pyridoxin.

b) Kuhn und Mitarbeiter (108) synthetisieren Pyridoxin durch oxydativen Abbau von Isochinolin. Ausgehend von 2-Methyl-3-methoxy-isochinolin(I) gelangen sie durch Oxydation mit Permanganat zur entsprechenden Dicarbonsäure. Die 2-Methyl-3-methoxy-pyridin-4,5-dikarbonsäure(II) wird über das Diamid in 2-Methyl-3-methoxy-4,5-dicyanopyridin(III) verwandelt, aus dem durch katalytische Reduktion die Base, 2-Methyl-3-methoxy-4,5-diamino-methyl-pyridin(IV) entsteht. Aus diesem Körper erhält man mit Nitrit den farblosen, nadelförmigen Pyridoxinmethylaether (V). Dieser wird durch Kochen mit Bromwasserstoffsäure, durch anschliessenden Austausch des Broms gegen Hydroxyl mit Hilfe von Silberazetat in Pyridoxin (VI) übergeführt. Dieses kristallisiert auf Zusatz von Azeton aus wenig verdünnter Salzsäure aus.



Mögliche Verunreinigungen

Eisen, Silber, Brom, Nitrit, Piperidin, Cyanoazetamid, Methoxyäthylazeton, Isochinolin.

Sinnenprüfungen

Alle Monographien fordern ein weisses, kristallines Pulver oder farblose Kristalle. Die Substanz soll geruchlos und von salzartigem Geschmack sein. Alle unsere Muster entsprachen diesen Forderungen. Wir kommen zu folgender Formulierung:

Farblose Kristalle oder weisses, kristallines, geruchloses Pulver von salzartigem Geschmack.

Chemische Identitätsprüfungen

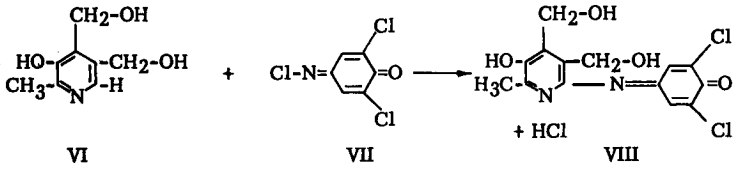
Stammlösung: Wir verwenden für die Identitäts- und Reinheitsprüfung eine 2-proz. (ca. 0,01 mol.) Lösung.

---

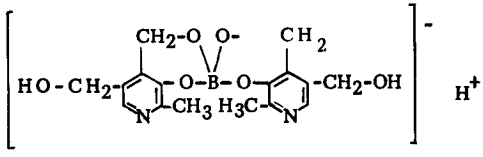
108) R.Kuhn, K.Westphal, G.Wendt u. O.Westphal, Naturwissenschaften 27, 469 (1939)

Nachweis von Pyridoxin: Zum Nachweis von Pyridoxin werden in der Literatur verschiedene Reaktionen aufgeführt. Von allen chemischen Nachweisreaktionen kann nur mit der Indophenolreaktion Pyridoxin von Pyridoxal und Pyridoxamin unterschieden werden.

a) Indophenol-Reaktion: Die Reaktion ist in folgenden Arzneibüchern aufgeführt: USP XV, p.595, Cod.Med.Scand.1951, Apot.Kontr.Labor.1953, Brit.Pharm.Cod.1954, p.633, Ph.Int.Suppl. 2,6-Dichlorchinonchlorimid (VII) gibt mit Pyridoxin (VI) in gepufferter, schwach alkalischer Lösung (109)einen blauen Farbstoff (VIII), der sein Maximum an Intensität nach 1 Minute erreicht hat, nach 3 Minuten langsam verblasst und eine rotbraune Tönung annimmt (109, 110).



In Gegenwart von Borsäure bildet sich die blaue Farbe nicht, es entsteht hingegen nach einigen Minuten eine rotbraune Färbung. Nach Scudi (110) bildet die Borsäure mit Pyridoxin folgende Komplexverbindung:



Nach Stepp (111) und anhand eigener Versuche konnten wir zeigen, dass Pyridoxal und Pyridoxamin mit und ohne Borsäurezusatz unter Bildung eines blauen Farbstoffes reagieren, der allmählich ebenfalls eine rotbraune Färbung annimmt. Wir können also mit der Indophenol-Reaktion Pyridoxin von Pyridoxal und Pyridoxamin unterscheiden. Die USP XV hat diese spezifische Reaktion auf Pyridoxin als Identitätsreaktion aufgenommen. In dieser Reaktion sehen auch wir einen sehr spezifischen und empfindlichen Identitätsnachweis für Pyridoxin.

Vorschrift: In zwei Reagenzgläser wird je 1 Tropfen Stammlösung (2-proz.) gegeben und beiden Reagenzgläsern 2 ml Natriumazetat RS zugefügt. Das erste Reagenz-

---

109) M.Hochberg, D.Melnick and B.L.Oser, J.biol.Chem. 155, 109 (1944)
110) J.V.Scudi, W.A.Bastedo u. T.J.Webb, J.biol.Chem. 136, 399 (1940)
111) W.Stepp, J.Kühnau u. H.Schroeder, Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, 7. Auflage, Bd.I., F. Enke Verlag, Stuttgart 1952

glas versetzt man mit 1 ml Wasser, das zweite mit 1 ml Borwasser und schüttelt. In beide Reagenzgläser wird 1 ml 0,04-proz. alkoholische 2,6-Dichlorchinonchlorimidlösung gegeben und gemischt. Im ersten Reagenzglas bildet sich eine blaue Farbe, die in wenigen Minuten nach rotbraun übergeht, während im zweiten Reagenzglas die Lösung farblos bleibt oder nach einigen Minuten höchstens eine rotbraune Färbung annehmen darf.

Die Reaktion fiel mit allen fünf Handelsmustern positiv aus. Sie übertrifft alle anderen Reaktionen an Spezifität und Empfindlichkeit und soll als Identitätsreaktion in die Pharmakopöe aufgenommen werden.

b) Ferrichlorid-Reaktion: Die Reaktion wird aufgeführt in Apot.Kontr. Lab.1953, Cod.Med.Scand.1951, N.N.R. Tests and Standards 1953 und DAB 6, 3.Nachtrag. Pyridoxin bildet mit Ferrichlorid eine rote Farbe (113 - 115). Die Eisen-III-Komplexe mit Pyridoxin sind zwischen pH 0,7 und 5,0 stabil, wobei das Maximum an Intensität bei pH 2,1 erreicht ist. In mineralsaurer Lösung wird der Eisen-Pyridin-Komplex zerstört. Wir haben die Reaktion mit allen Handelsmustern nach folgender Vorschrift ausgeführt:

1 Tropfen Stammlösung (2-proz.) wird mit 1 ml Wasser versetzt, auf Zusatz von 1 Tropfen Ferrichlorid entsteht eine orangerote Färbung, die auf Zusatz von 1 ml verd. Salzsäure R nach gelb umschlägt.

Die Reaktion ist nicht spezifisch für Pyridoxin, weshalb auf ihre Aufnahme verzichtet wird.

c) Phenol-Reaktion nach Folin und Denis: Die Reaktion beruht auf der Bildung einer blauen Farbe der phenolischen Hydroxylgruppe mit einer Mischung von Natriumwolframat, Phosphorwolframsäure, Phosphorsäure und Lithiumhydroxyd.

Die Reaktion ist nicht spezifisch auf Pyridoxin und eignet sich nicht für ein Arzneibuch.

d) Fällungs-Reaktion mit Phosphorwolframsäure: Diese unspezifische Alkaloidreaktion wird neben der 2,6-Dichlorchinon-chlorimid-Reaktion aufgeführt in: USP XV, p.595; N.N.R. Tests and Standards 1953; Ph.Int.Suppl.

Nachweis des Säureanteils: Chlorid wird nach Ph.Helv.V nachgewiesen.

---

112) J.C.Keresztesy u. J.R.Stevens, J.amer.chem.Soc. 60, 1267 (1938)
113) R.D.Greene, J.biol.Chem. 130, 513 (1939)
114) H.Vogel, Chemie und Technik der Vitamine, F. Enke Verlag, Stuttgart 1940
115) R.Kuhn u. I.Löw, Ber.dtsch.chem.Ges. 72, 1453 (1939)
116) P.Romain u. J.C.Colleter, Bull.Trav.Soc.Pharm. Bordeaux 97, 109 (1958)
117) J.C.Colleter u. P.Romain, Bull.Soc.chim.France 7, 858 (1958)

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzbereich: In allen Arzneibüchern, ausser dem DAB 6, Nachtrag, wird der Schmelzpunkt von Pyridoxinhydrochlorid bestimmt. Das DAB 6, Nachtrag, lässt den Schmelzpunkt von Pyridoxinpikrat ermitteln.

USP XV	204 - 208° (korr.) unter Zersetzung
Ph.Int.Suppl.	204 - 208° (korr.) unter Zersetzung
Cod.Med.Scand.1951	208 - 211°
Apot.Kontr.Labor. 1953	207 - 211°
Brit.Pharm.Cod. 1954	205 - 212° (korr.) unter Zersetzung
Analysmethoder XVI: 64 (1946)	200 - 208° unter Zersetzung
N.N.R. Tests and Standards 1953	200 - 212° (korr.) unter Zersetzung

Die Substanz schmilzt unter Gasblasenbildung und Braunschwarzfärbung. Ein Schmelzintervall ist nicht festzustellen. Wir geben deshalb im folgenden die Temperatur an, bei der sich die ersten Gasblasen bildeten (Zersetzungspunkt).

Resultate:

Handelsmuster	Zersetzungspunkt (korr.)
I	204,7°
II	205,3°
III	207,2°
IV	205,0°
V	204,6°

Wir schlagen für die Bestimmung von Pyridoxinhydrochlorid folgende Vorschrift vor:

Als Zersetzungspunkt gilt die Temperatur, bei der unter Braunschwarzfärbung der Substanz die ersten Gasblasen austreten, diese Temperatur muss zwischen 204 und 208° liegen. Gleichzeitig soll aber auch der Schmelzbereich des Pikrates bestimmt werden.

Schmelzbereich des Pikrates: DAB 6, 3.Nachtrag, p.213, 157 - 159° (nicht korr.). Das Pikrat stellten wir nach DAB 6, 3.Nachtrag, p. 213, her, kristallisierten aber einmal aus Wasser um, so dass wir zu folgender Vorschrift gelangten:

Aus einer Lösung von 0,1 g Pyridoxinhydrochlorid in 0,6 ml Wasser scheiden sich nach Zusatz von 3 ml Pikrinsäurelösung (1 %) innerhalb einiger Stunden in der Kälte gelbe Nadeln ab. Die Kristalle werden einmal aus 1 ml Wasser umkristallisiert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und 2 Stunden bei 100 - 105° getrocknet. Der Schmelzbereich, bestimmt nach Ph.Helv.VI, muss zwischen 158,0° - 160,5° liegen.

Resultate:

Handelsmuster	Schmelzbereich (korr.)
I	159,2 - 159,9°
II	159,0 - 159,7°
III	158,5 - 159,7°
IV	158,8 - 159,8°
V	159,1 - 160,0°

Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen: Nach der Ph.Int.Suppl. löst sich 1 T. in 5 T. Wasser. Wir überprüften die Löslichkeit in frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser bei Zimmertemperatur und benötigten für die verschiedenen Handelsmuster 5,5 - 5,7 T. Wasser zum Lösen von 1 T. Pyridoxinhydrochlorid. Auf Farblosigkeit prüfen: Apot.Kontr.Labor.1953, Cod.Med.Scand.1951, DAB 6, 3.Nachtrag. Alle fünf geprüften Muster lösten sich klar und farblos. Wir kommen zum Vorschlag folgender Vorschrift:

0,5 g Pyridoxinhydrochlorid müssen sich in 3,0 ml frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser klar und farblos völlig lösen. 0,6 ml dieser konzentrierten Stammlösung verwenden wir zur Herstellung des Pikrates, und 1,2 ml werden mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser auf 10 ml verdünnt und dienen als 2-proz. Stammlösung (ca. 0,01 m.).

Reaktion der Stammlösung: Es fordern

		pH
Cod.Med.Scand.1953	2-proz. Lösung	2,7 - 3,2
Brit.Pharm.Cod.1954	10-proz. Lösung	2,6 - 3,0
DAB 6, 3.Nachtrag	10-proz. Lösung	2,5 - 3,2
N.N.R. Tests and Standards 1953	2,9 - 5-proz. Lösung	2,9 - 3,3

Mit der frisch zubereiteten 2-proz. Stammlösung finden wir folgende Resultate:

Handels-muster	pH potentio-metrisch	pH-Farbtabelle (Ph.Helv.V)
I	2,90	3,0
II	2,90	3,0
III	2,95	3,0
IV	2,92	3,0
V	2,95	3,0

Auf Grund unserer Resultate schlagen wir folgende Forderung vor:

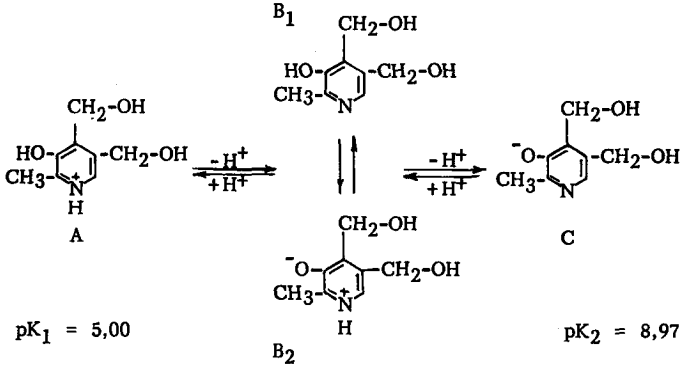
Der pH-Wert der 2-proz. Stammlösung (frisch zubereitet), bestimmt mit der Farbtabelle der Ph.Helv.V, Suppl.III, muss zwischen 2,8 und 3,2 liegen.

Ultraviolett-Absorption: N.N.R. Tests and Standards 1955, p. 128, bestimmen die Absorption von Pyridoxinhydrochlorid in 0,1 n-Salzsäure im ultravioletten Licht beim Maximum: 292 mμ und $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ von ca. 422, das Minimum soll bei ca. 255 mμ liegen. Wir wurden durch frühere Arbeiten aufmerksam auf die pH-Abhängigkeit der Absorption im ultravioletten Licht (118 - 122).

---

118) E.T.Stiller, J.C.Keresztesy u. J.R.Stevens, J.amer.chem.Soc. 61, 1237 (1939)
119) D.E.Metzler u. E.E.Snell, J.amer.chem.Soc. 77, 2431 (1955)
120) S.A.Harris u. K.Folkers, Science 89, 347 (1939)
121) A.K.Lunn u. R.A.Morton, Analyst 77, 718 (1952)
122) S.A.Harris, J.amer.chem.Soc. 62, 3203 (1940)

Capek und Hloch (123) stellten eine spektrophotometrische Bestimmungsvorschrift für eine Gruppe von B-Vitaminen in Gemischen auf, die auf der verschiedenen Absorption bei verschiedenen pH-Werten beruht. Die Verschiedenheit des spektralen Verhaltens hat ihre Ursache darin, dass Pyridoxin ein Ampholyt ist. Bei pH 6,86 liegen 98 % als Zwitterion (dipolar B_1 und ungeladen B_2) in saurer Lösung als Kation (A) und in alkalischer Lösung als Anion (C) vor. Nach Metzler und Snell (119) stehen die verschiedenen Dissoziationsstufen in folgendem Gleichgewicht:



Bei pH 6,86 besteht ein Gleichgewichtszustand zwischen dipolar-ionisierter und neutraler Form. In wässerigem Milieu dominiert die dipolar-ionisierte Form, der Gehalt an dipolar-ionisierter Form lässt sich nach Metzler (119) auf ca. 88 % berechnen. In alkoholischer Lösung dominiert die ungeladene Form.

Die pK-Werte wurden von Harris (120), Lunn (121) und Metzler (119) sowie von Colleter (124) bestimmt. Die erste Dissoziationskonstante, mit dem pK-Wert 4,74 (124) entspricht der phenolischen Hydroxylgruppe, während die zweite Dissoziationskonstante mit dem pK-Wert 9,4 (124) das Gleichgewicht: $B_1B_2 \rightleftharpoons C$ charakterisiert. Nehmen wir von Pyridoxinhydrochlorid die Absorptionskurven bei verschiedenen pH-Werten auf, so stellen wir fest, dass der Verlauf der Kurven pH-abhängig ist. Doch gehen alle Kurven des sauren Bereiches (unterhalb pH 6,86) und des alkalischen Bereiches (oberhalb pH 6,86) durch ganz bestimmte Punkte, die isosbestischen Punkte (= Punkte konstanter Durchlässigkeit). Die isosbestischen Punkte liegen bei den Wellenlängen, bei welchen die einzelnen Komponenten $A\text{-}B_1/B_2$ resp. $B_1/B_2\text{-}C$ mit gleicher Intensität absorbieren.

---

123) K.Capek u. R.Hloch, Pharm.Acta Helv. 33, 163 (1958)
124) J.C.Colleter, J.Croizet u. P.Romain, Bull.Trav.Soc.Pharm. Bordeaux 97, 102 (1958)
125) Houben-Weyl, Physikalische Forschungsmethoden, Bd.III, 2. Teil, p. 749, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955

Nach Houben und Weyl (125) ist das sicherste Kennzeichen für das Vorliegen einer Verbindung das Auftreten von isosbestischen Punkten in einer Schar von Absorptionskurven, die man erhält, wenn bei konstanter molarer Gesamtkonzentration der absorbierenden Bestandteile das Mengenverhältnis der Komponenten variiert.

Wir haben die Absorptionskurven bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen und die isosbestischen Punkte ermittelt. Im sauren Bereich finden wir zwei isosbestische Punkte bei 266,3 mμ und 303,7 mμ (Abb. 8) im basischen Bereich sind es drei isosbestische Punkte bei 231 mμ, 254,4 mμ und 314,5 mμ (Abb. 9). Unsere Werte weichen maximal 0,7 mμ von den von Capek und Hloch (123) gemessenen ab.

Zum Einstellen der pH-Werte benutzten wir die Phosphatpufferlösungen der Ph.Helv.V, Suppl. III, Boraxpufferlösungen dürfen nicht verwendet werden, da die Borsäure mit Pyridoxin eine Komplexverbindung eingeht, die ganz andere Absorption im ultravioletten Licht zeigt als Pyridoxin (110).

Die Messung der Absorption in 0,1 n-Salzsäure ergab eine Kurve mit einem Maximum bei 291 mμ und einem Minimum bei 252 mμ. Wir haben für die verschiedenen Muster die Extinktion bei 291 mμ gemessen und folgende Werte gefunden:

Handelsmuster	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$
I	426
II	424
III	421
IV	425
V	424

N.N.R. Tests and Standards 1955 geben eine Extinktion

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} \text{ bei } 292\ m\mu = 422$$

Wir schlagen folgende Vorschrift vor:

Die Extinktion von Pyridoxinhydrochlorid in 0,1 n-Salzsäure, gemessen bei einer Wellenlänge von 291 mμ, muss

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} = 424 \pm 4 \text{ ergeben.}$$

b) Chemische Reinheitsprüfungen

Reaktion mit konz. Schwefelsäure: Die Prüfung von Pyridoxin mit konz. Schwefelsäure wird in keinem Arzneibuch erwähnt. Wir führten die Reaktion nach folgender Vorschrift aus:

0,1 g Pyridoxinhydrochlorid werden mit 2 ml konz. Schwefelsäure versetzt, die Substanz geht unter Aufbrausen sofort in Lösung.

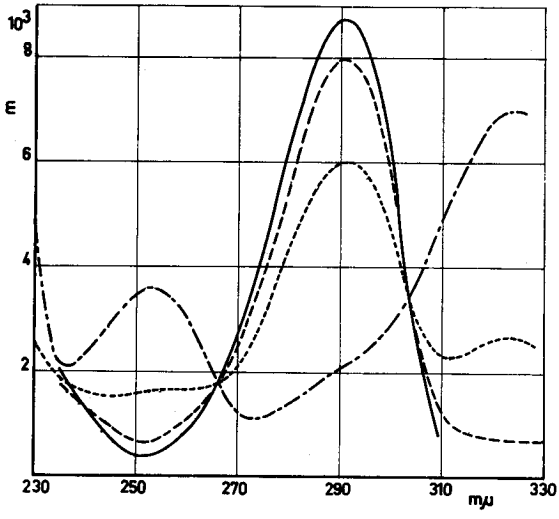


Abb. 8

UV-Spektren von Pyridoxinhydrochlorid

——— pH 1,7 — — — — — pH 4,7
— — — pH 4,0 —·—·— pH 6,6

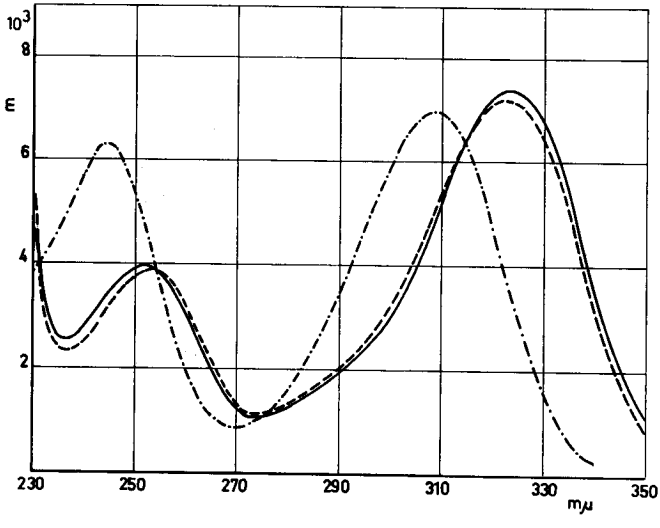


Abb. 9

UV-Spektren von Pyridoxinhydrochlorid

——— pH 7,0 —·—·— pH 11,3
— — — pH 8,0

Die Lösungen blieben 10 Minuten bei Zimmertemperatur klar und farblos und färbten sich nach Erhitzen im siedenden Wasserbad während 10 Minuten höchstens so stark wie Farbvergleichslösung G_4. Wir empfehlen, die Reaktion in die Pharmakopöe aufzunehmen.

Abwesenheit von Schwermetallen: Die verdünnte 2-proz. Stammlösung wird nach Ph.Helv.V auf Schwermetalle geprüft. Alle fünf Handelsmuster geben negative Reaktion.

Abwesenheit von Ammoniak: DAB 6, Nachtrag, und Analysmethoder 1946 prüfen auf Abwesenheit von Ammoniak. Alle fünf Handelsmuster, geprüft mit Nessler-Reagenz Ph.Helv.V, geben Abwesenheit von Ammoniak. Piperidin und Pyridin bilden mit Nessler-Reagenz weisse bis gelbliche Fällungen. Mit der Forderung, dass 1 ml Stammlösung auf Zusatz von 1 ml Nessler-Reagenz keine bräunlich-gelbe Färbung sowie keinen Niederschlag bilden darf, wird Piperidin als Verunreinigung ausgeschlossen.

Abwesenheit von Nitrat und Nitrit: Die Diphenylamin-Reaktion muss mit 1 ml Stammlösung negativ ausfallen.

Quantitative Bestimmungen

a) Feuchtigkeit

Zur Bestimmung der Feuchtigkeit werden in der Literatur verschiedene Methoden erwähnt:

Schwefelsäureexsikkator und Vakuum	USP XV max.	0,5 %
	Ph.Int.,Suppl.	0,5 %
Phosphorpentoxydexsikkator und Vakuum	Cod.Med.Scand.	0,5 %
Titration nach K. Fischer	Apot.Kontr.Labor.	0,5 %
Trocknung im Trockenschrank bei 103 - 105°	DAB 6, 3.Nachtrag	0,2 %

Wir bestimmten den Feuchtigkeitsgehalt durch Trocknung im Trockenschrank bei 103 - 105° und nach K. Fischer:

Handelsmuster	Feuchtigkeitsgehalt Trockenschrank 103-105°	Wassergehalt K. Fischer
I	0,04 %	0,04 %
II	0,06 %	0,08 %
III	0,08 %	0,09 %
IV	0,07 %	0,01 %
V	0,1 %	0,09 %

Nach unseren Resultaten kann der Feuchtigkeitsgehalt durch Trocknung bei 103 - 105° bestimmt werden. Wir kommen deshalb zur Forderung:

Der Feuchtigkeitsgehalt von Pyridoxinhydrochlorid,bestimmt durch Trocknen bei 103 - 105° bis zur Gewichtskonstanz, darf höchstens 0,2 % betragen.

b) Verbrennungsrückstand

Die USP XV, Ph.Int.,Suppl., sowie der Brit.Pharm.Cod.1954 lassen einen Verbrennungsrückstand von höchstens 0,1 % zu. Wir führten die Bestimmungen nach Ph.Helv.V mit 0,5 g Pyridoxinhydrochlorid aus. Bei allen fünf Handelsmustern konnten wir keinen wägbaren Rückstand feststellen.

c) Gehaltsbestimmungen

In den verschiedenen Monographien wird zur quantitativen Bestimmung die Titration mit Perchlorsäure, die Chloridtitration mit Silbernitrat, die Bestimmung des Stickstoffgehaltes und die UV-Spektrophotometrie herangezogen.

1. Bestimmung des Stickstoffgehaltes: Ca. 0,20 g Pyridoxinhydrochlorid (genau gewogen) werden zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes eingewogen und nach der Vorschrift 2.5.1 verfahren. Die Veraschungszeit beträgt ca. 1 1/2 Stunden, die Lösung soll auf jeden Fall, nachdem sie klar und farblos geworden ist, noch 30 Minuten gekocht werden.

2. Titration in Eisessig mit 0,1 n-Perchlorsäure: Die Ph.Int.,Suppl., und Apot.Kontr.Labor.1953 bestimmen den Gehalt von Pyridoxinhydrochlorid durch Titration der Base in wasserfreiem Milieu.

Reaktionsmechanismus:

Das Hydrochlorid kann nicht direkt mit Perchlorsäure titriert werden. Nach der Methode von Pifer und Wollish (126) reagieren durch Zusatz einer Lösung von Quecksilberazetat in Eisessig die Chlorid- mit den Quecksilberionen unter Bildung des in Eisessig nicht dissoziierten Quecksilberchlorids.

$$2\,BHCl \rightleftharpoons 2\,BH^+ + 2\,Cl^-$$

$$(CH_3COO)_2Hg + 2\,Cl^- \longrightarrow HgCl_2 + 2\,CH_3COO^-$$

(undissoziiert) (undissoziiert)

$$2\,BH^+ + 2\,CH_3COO^- \longrightarrow 2\,B + 2\,CH_3COOH$$

126) C.W.Pifer and E.G.Wollish, Analyt.Chem. 24, 300 (1952)

Die Titration der Base geht nach folgender Formulierung:

$$\begin{array}{lcl} HClO_4 + CH_3COOH & \rightleftharpoons & CH_3COOH_2^+ + ClO_4^- \\ B + CH_3COOH & \rightleftharpoons & BH^+ + CH_3COO^- \\ \hline 2\,CH_3COOH & \longleftarrow & CH_3COO^- + CH_3COOH_2^+ \end{array}$$

Wir übernahmen mit einer kleinen Abänderung die Vorschrift der aufgeführten Monographien:

Ca. 0,2 g Pyridoxinhydrochlorid (genau gewogen) werden in 20 ml Eisessig und 5 ml Essigsäureanhydrid durch leichtes Erhitzen gelöst; man lässt auf Zimmertemperatur abkühlen. Nach Zusatz von 10 ml Quecksilberazetatlösung und 3 Tropfen Kristallviolett als Indikator wird mit 0,1 n-Perchlorsäure bis zum Umschlag von Blau nach Blaugrün titriert. Der Blindwert der Quecksilberazetatlösung ist zu berücksichtigen.

1 ml 0,1 n-Perchlorsäure = 0,020565 g $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$

Mit der potentiometrischen Titration wird die Titrationskurve aufgenommen (Abb. 10).

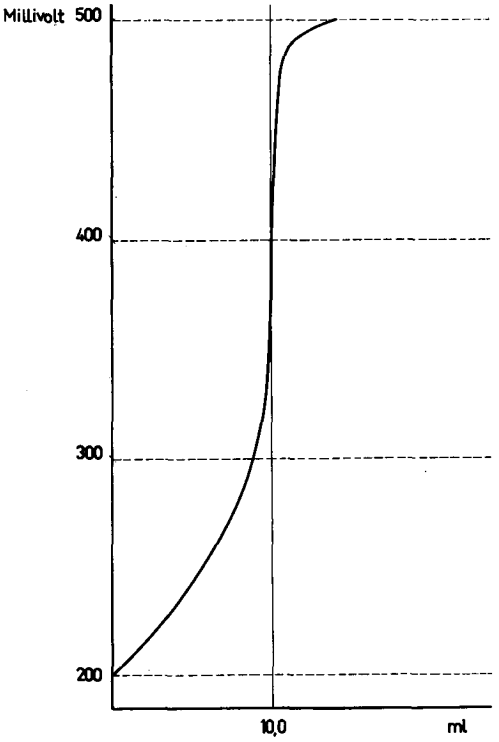


Abb. 10

Titrationskurve von Pyridoxinhydrochlorid, gelöst in Eisessig und titriert mit 0,1 n-Perchlorsäure.

Aufgenommen mit dem Siemens-Halske Schreiberpotentiometer

3. Argentometrische Bestimmung des Säureanteils: Eine azidimetrische Titration des Säureanteils verläuft erfolglos. Pyridoxin ist ein amphoterer Körper mit sehr guten Puffereigenschaften. Bei der potentiometrischen Titration kann kein Potentialsprung gemessen werden. Wir haben deshalb die argentometrische Titration gewählt wie sie die USP XV vorschreibt.

Wir bestimmten unsere Muster nach folgender Vorschrift:

0,3 g Pyridoxinhydrochlorid (genau gewogen) werden in 30 ml Methanol unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach Zusatz von 5 ml konzentrierter Essigsäure und 3 Tropfen Eosinlösung (0,5 %) wird mit 0,1 n-Silbernitrat bis zum Farbumschlag in Rosa titriert.

$$1 \text{ ml } 0{,}1 \text{ n-}AgNO_3 \quad = \quad 0{,}02056 \text{ g } C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$$

Zusammenstellung der Resultate

Handels-	Stickstoff-gehalt in %	Pyridoxinhydrochloridgehalt Perchloräsure Titration in %	Argentometrische Titration in %
I	6,80 %	99,5 %	99,9 %
II	6,81 %	99,8 %	99,9 %
III	6,81 %	99,6 %	100,2 %
IV	6,84 %	99,6 %	99,9 %
V	6,81 %	99,8 %	100,1 %
Streuung	± 0,2 %	± 0,15 %	± 0,2 %

Die argentometrische Bestimmung des Chloridgehaltes wurde nur der Vollständigkeit halber ausgeführt. Wir schlagen vor, die Perchlorsäuretitration in die Ph.Helv. als Gehaltsbestimmungsmethode und die Bestimmung des Stickstoffgehaltes als Methode der Wahl aufzunehmen. Der Gehalt an Pyridoxinhydrochlorid soll 99,0 - 100,5 % $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$ entsprechen.

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	IV	V
Sinnenprüfungen					
Farbe	weiss kristallin	farblose Kristalle	farblose Kristalle	farblose Kristalle	farblose Kristalle
Geruch	-	-	-	-	-
Geschmack	salzig	salzig	salzig	salzig	salzig
Identität					
Indophenol-R	+	+	+	+	+
Ferrichlorid-R	+	+	+	+	+
Reinheit					
Zersetzungspunkt (korr.)	204,7°	205,3°	207,2°	205,0°	204,6°
Pikrat-Smp. (korr.)	159,2 - 159,9°	159,0 - 159,7°	158,5 - 159,7°	158,8 - 159,8°	159,1 - 160,0°
Farbe 16-proz.	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
Reaktion Stammlösung, Farbtab.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
UV-Absorption $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ bei 291 mμ	426	424	421	425	424
Reaktion mit Schwefelsäure	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
Fe, NH_4, Schwermetalle	-	-	-	-	-
Quantitative Bestimmungen					
Feuchtigkeit Ph.Helv.V	0,04 %	0,06 %	0,08 %	0,07 %	0,1 %
Verbrennungsrückstand	-	-	-	-	-
Stickstoffgehalt	6,80 %	6,81 %	6,81 %	6,84 %	6,81 %
Perchlorsäure-Titration	99,5 %	99,8 %	99,6 %	99,6 %	99,8 %
Argentometr. Titration	99,9 %	99,9 %	100,2 %	99,9 %	100,1 %

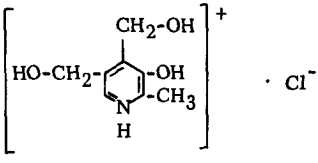
Pyridoxinum hydrochloricum DCI

Syn.: Vitaminum B_6
Aderminum

Pyridoxinhydrochlorid — Cloridrato di pyridoxino
Chlorhydrate de pyridoxine

Pyridoxinhydrochlorid ist 2-Methyl-3-hydroxy-4,5-bis-(hydroxymethyl-) pyridinhydrochlorid mit einem Gehalt von mindestens 99,0 % und höchstens 100,5 % $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$

$C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$ — Mol.-Gew. 205,65



Prüfung

Farblose Kristalle oder weisses, kristallines, geruchloses Pulver von salzartigem Geschmack.

Der Schmelzbereich (korr.) muss zwischen 204° und 208° liegen. Es wird diejenige Temperatur abgelesen, bei der unter Braunschwarz-Färbung der Substanz die ersten Gasblasen austreten.

5 dg Pyridoxinhydrochlorid müssen sich in 3,0 ml frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser klar und farblos völlig lösen. Diese Lösung wird als Stammlösung I verwendet.

0,6 ml Stammlösung I werden mit 3 ml Pikrinsäure RS versetzt, innerhalb einiger Stunden scheiden sich in der Kälte gelbe Nadeln von Pyridoxinpikrat ab. Die Kristalle werden aus 1 ml Wasser einmal umkristallisiert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und 2 Stunden bei 103 - 105° getrocknet. Der Schmelzbereich muss zwischen 158,0° und 160,5° (korr.) liegen.

Der Extinktionskoeffizient, bestimmt in 0,1 n-Salzsäure, bei einer Wellenlänge von 291 mμ, muss 424 ± 4 geben.

1,2 ml Stammlösung I werden mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser zu 10 ml verdünnt. Diese Lösung dient als Stammlösung II.

Der pH-Wert der frisch zubereiteten Stammlösung II, bestimmt nach Ph.Helv., Suppl.III, muss zwischen 2,8 und 3,2 liegen.

In 2 Reagenzgläsern werden je 1 Tropfen Stammlösung II und je 2 ml Natriumazetat RS gegeben. Das erste Reagenzglas versetzt man mit 1 ml Wasser, das zweite mit 1 ml Borwasser und schüttelt. In beide Reagenzgläser wird 1 ml Dichlorchinonchlorimid RS gegeben und gemischt. Im ersten Reagenzglas muss sich eine blaue Farbe bilden, die nach wenigen Minuten in Rotbraun übergeht, während im zweiten Reagenzglas die Lösung

farblos bleiben muss oder nach einigen Minuten höchstens eine rotbraune Färbung annehmen darf.

Die Stammlösung II gibt die Identitätsreaktion auf Chlorid.

In der Stammlösung II dürfen Schwermetalle und Ammoniak (Nessler-Reaktion), Nitrat und Nitrit (Diphenylamin-Reaktion) nicht nachweisbar sein.

Der Feuchtigkeitsgehalt, bestimmt mit 5 dg durch Trocknung bei 103 - 105°, darf höchstens 0,2 % betragen.

5 dg Pyridoxinhydrochlorid dürfen keinen wägbaren Verbrennungsrückstand hinterlassen.

Ca. 0,2 g getrocknetes Pyridoxinhydrochlorid (genau gewogen) werden in einem Erlenmeyer mit Glasstopfen von 100 ml in 20 ml wasserfreiem Eisessig gelöst. Nach Zusatz von 5 ml Essigsäureanhydrid und 10 ml Quecksilberazetat RS wird unter Verwendung von 3 Tropfen Kristallviolett RS mit 0,1 n-Perchlorsäure bis zum Farbumschlag von Blau nach Grünstichigblau titriert (Mikrobürette). Mit der gleichen Menge Quecksilberazetat wird ein Blindwert bestimmt, der von der verbrauchten Menge Perchlorsäure abgezogen wird.

$$1 \text{ ml } 0{,}1 \text{ n-}HClO_4 \quad = \quad 0{,}020565 \text{ g } C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$$

Der Verbrauch an 0,1 n-Perchlorsäure muss einem Gehalt von 99,0 - 100,5 % $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$ entsprechen. (0,2000 g müssen also mindestens 9,63 ml und dürfen höchstens 9,77 ml 0,1 n-Perchlorsäure verbrauchen.)

Aufbewahrung: Vor Licht geschützt in gut verschlossenem Glase.

Sterilisation von Lösungen: Nach g (Allgemeine Bestimmungen, Seite 129 des 2. Supplementes).

Gebrauchsdosen: Dosis usitata simplex 0,005 g
Dosis usitata pro die 0,050 g

Löslichkeit: 1 T. löst sich in 6 T. Wasser, 100 T. Weingeist, schwer löslich in Chloroform und Aether.

Veränderlichkeit: Pyridoxinhydrochlorid ist lichtempfindlich. Durch Bestrahlung mit Sonnen- und Ultraviolettlicht verliert es seine Wirksamkeit.

Inkompatibilitäten: Oxydationsmittel

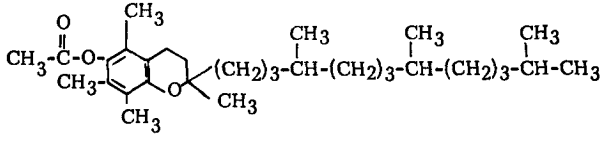
Phantasienamen: Adermin (E.M.), Beadox (E.M.), Becilan (E.M.), Benadon (E.M.), Hexa-Betalin (E.M.), Hexavibex (E.M.), Hexabion (E.M.), Pyrivel (E.M.)

3.6 Tocopherolum aceticum

Syn.: Vitamin E

d,ℓ-2,5,7,8-Tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-acetoxy-chroman

$C_{31}H_{52}O_3$ Mol.-Gew. 472,76



Tocopheroli acetas	Cod.Med.Scand. 1.6.1951
Tocopheryli acetas	Svenska F.XI, p. 648
dl-alpha Tocopheryl acetate	NF X, p. 622
Tocopheryl acetate	Brit.Pharm.Codex 1954, p. 799
	Brit.Veterinary Codex 1953
α-Tocopherol aceticum	DAB 6, 3. Nachtrag

Spezialpräparate

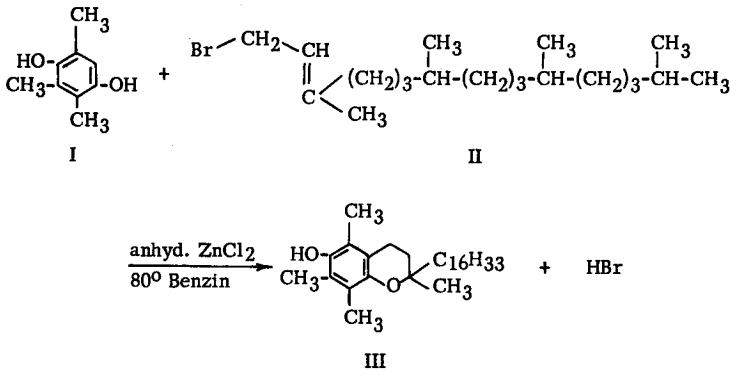
Ephynal® (Roche), Davitamon E® (Organon), Eprolin® (Lilly), Esorb® (Wyeth), Evion® (Merck), E-Viterbin® (Knoll), Tocoferolo Bioglan® (Neopharmed Italia), Tocomine® (Byla), Tocopherex® (Squibb), Ereton® (Hoechst), Vitemonta® (Promonta)

Darstellung

Die erste Synthese von Tocopherol wurde gleichzeitig veröffentlicht von Karrer und Mitarb. (145) sowie von den Amerikanern Bergel und Mitarb. (146) und Smith und Mitarb. (147).

Nach Karrer (145) kondensiert Trimethylhydrochinon I sehr leicht mit Phytylbromid II. Als Kondensationsmittel wird wasserfreies Zinkchlorid verwendet. Die Kondensation wird in einem indifferenten Lösungsmittel wie z.B. Benzin vorgenommen. Zur Herstellung des Azetylesters wird das rohe Kondensationsprodukt in Essigsäureanhydrid gelöst (148). Unter Umrühren der Lösung wird Wasserstoff eingeleitet und wenig Schwefelsäure zugefügt. Die Reaktion wird während 3 Stunden bei 40° gehalten. Die Schwefelsäure wird mit Natriumazetat neutralisiert und das Essigsäureanhydrid im Vakuum vollständig abgedampft. Der Rückstand wird im Hochvakuum destilliert. Nach den Autoren destilliert der α-Tocopherolazetylester bei 0,3 mm und 224°. Der Brechungsindex beträgt n_D^{20} = 1,4967 und das spezifische Gewicht $d_4^{21,3°}$ = 0,9533.

145) P.Karrer, H.Fritzsche, B.H.Ringier und H.Salomon, Helv.chim. Acta 21, 520 (1938)
146) F.Bergel, A.Jacob, A.R.Todd und T.S.Work, Nature 142, 36 (1938)
147) L.J.Smith, H.E.Ungnade und W.W.Prichard, Science 88, 37 (1938)



Robeson (149) stellt ein kristallines α-Tocopherolazetat mit einem Schmelzpunkt von 26,5 bis 27,5° her durch Veresterung von α-Tocopherol mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Nach Destillation des Rückstandes im Hochvakuum wird aus Methanol und Methylformiat umkristallisiert.

Mögliche Verunreinigungen

Bromid, Chlorid, Trimethylhydrochinon, α-Tocopherol, fremde Tocopherole, organische Lösungsmittel, organische Säuren (Essigsäure).

Sinnenprüfungen

Die Substanz ist ein dickflüssiges, schwach gelbes oder gelbgrün gefärbtes durchsichtiges Oel. Sie ist völlig geruch- und geschmacklos und wirkt ölig auf der Zunge. Die Farbe der 5 Handelsmuster ist verschieden, 2 Oele sind fast farblos, 2 weitere schwach grünlichgelb und 1 Handelsmuster schwach gelb.

Wir kommen zu folgender Formulierung:

Schwach gelb oder grünlichgelb gefärbtes, dickflüssiges, klares, geruch- und geschmackloses Oel, das auf der Zunge ölig wirkt.

Chemische Identitätsprüfungen

Farbreaktionen

Reaktion mit konz. Salpetersäure: Nach Furter und Meyer (150) bilden Tocopherole, gelöst in absolutem Alkohol, mit konz. Salpetersäure nach kurzem Erhitzen

148) V.Demole, O.Isler, B.H.Ringier, H.Salomon und P.Karrer, Helv.chim.Acta 22, 65 (1939)
149) C.D.Robeson, J.amer.chem.Soc. 64, 1487 (1942)

das rot gefärbte Oxydationsprodukt Tocopherolrot.

Tocopherolrot

Die Farbintensität ist am grössten, wenn 83,5 Vol.T. absoluter Alkohol und 16,5 Vol.T. konz. Salpetersäure zur Reaktion gelangen. Die Reaktion ist sehr spezifisch. Die durch Einwirkung von Luft und Licht auf Tocopherol entstandenen Zersetzungsprodukte sollen mit Salpetersäure unter den bestimmten Bedingungen keinen roten Farbstoff bilden. Die meisten verwandten Stoffe bilden mit Salpetersäure in Alkohol eine gelbe Farbe.

Kofler (151) hat die Salpetersäurereaktion nach Furter und Meyer (150) in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht und hat festgestellt, dass in Aethanol mit Salpetersäure α-, β-, γ- und δ-Tocopherol in der Wärme Tocopherolrot bilden, während in Chloroform bei Zimmertemperatur α-Tocopherol nicht reagiert, β-Tocopherol eine rotviolette Farbe und γ- und δ-Tocopherol orangerote Farbstoffe bilden.

Salpetersäure reagiert in Alkohol nur mit freiem Tocopherol. Hingegen ist eine Verseifung des Azetyltocopherols vor der Reaktion nicht nötig, da durch Erhitzen der salpetersauren, alkoholischen Lösung im Wasserbad Verseifung eintritt und das frei werdende Tocopherol sofort zu Tocopherolrot oxydiert wird.

Wir schlagen folgende Vorschrift vor:

1 Tropfen Azetyltocopherol wird in 1 ml absolutem Alkohol gelöst, mit 1 ml konz. Salpetersäure versetzt und 5 Min. im Wasserbad zum Sieden erhitzt. Nach dieser Zeit muss sich die anfänglich gelbe Lösung tief ziegelrot verfärben.

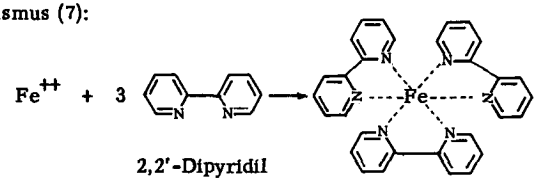
Reaktion mit konz. Schwefelsäure: Einige Milligramme Azetyltocopherol entwickeln mit 2 ml konz. Schwefelsäure eine intensiv gelbe Farbe. Auf Zusatz von 5 Tropfen konz. Salpetersäure wird die Lösung ziegelrot. In konz. Schwefelsäure hydrolisiert der Ester. Durch die Salpetersäure tritt Oxydation des freien Tocopherols zu Tocopherolrot ein. Die Schwefelsäurereaktion soll in einer Pharmakopöevorschrift berücksichtigt werden.

---

150) M.Furter und R.E.Meyer, Helv.chim.Acta 22, 240 (1939)
151) M.Kofler, Helv.chim.Acta 30, 1053 (1947)
152) A.Emmerie und Ch.Engel, Recu.Trav.chim. Pays-Bas 57, 1351 (1938)

Reaktion mit Ferrichlorid und 2,2'-Dipyridil: *Tocopherole reduzieren* Ferriionen. Die entstandenen Ferroionen können durch Bildung eines Komplexions mit 2,2'-Dipyridil nachgewiesen werden. Diese Reaktion nach Emmerie und Engel (152) ist natürlich nicht spezifisch. Eine Reihe anderer Stoffe reagieren ähnlich. Die Komplexbildung tritt ein, wenn möglichst neutrale Eisen-II-Salzlösungen mit 2,2'-Dipyridil zusammengegeben werden. Die rote Färbung der Hexamine erscheint augenblicklich.

Reaktionsmechanismus (7):



Wir führten die Reaktion nach dem Brit.Pharm.Codex 1954 aus und schlagen nach unseren Erfahrungen folgende Vorschrift vor:

Ca. 100 mg (2-3 Tropfen) Azetyltocopherol werden mit 2 ml einer Lösung von 1 g Kaliumhydroxyd in 10 ml Weingeist während 5 Minuten gekocht, abgekühlt, mit 4 ml Wasser versetzt und mit 10 ml Aether ausgeschüttelt. 2 ml Aetherphase versetzt man mit 0,2 ml 0,5-proz. 2,2'-Dipyridillösung in Weingeist. Auf Zusatz von 0,2 ml einer 0,2-proz. Ferrichloridlösung in Weingeist bildet sich eine blutrote Färbung.

Hydrolyse, Nachweis der Essigsäure: Konzentrierte Schwefelsäure bildet mit Azetaten Essigsäure. Wird diese Reaktion in Gegenwart von Aethylalkohol ausgeführt, so entsteht der Essigsäureäthylester (Sdp. 77°), der an seinem charakteristischen Geruch nach Früchten erkennbar ist. Die Reaktion wird im Cod.Med.Scand. mit einer alkoholischen Lösung von Azetyltocopherol und konz. Schwefelsäure durch Erhitzen zum Sieden ausgeführt. Wir haben die Reaktion mit allen Handelsmustern ausgeführt. Dabei bilden sich aber auch stechend riechende Zersetzungsprodukte, die den typischen Essigestergeruch überdecken. Die Reaktion soll nicht in ein Arzneibuch aufgenommen werden, da sie nicht spezifisch ist.

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Löslichkeit, Prüfung auf unlösliche und färbende Verunreinigungen: 5 cg Tocopherolazetat müssen sich nach Cod.Med.Scand. in 2 ml absolutem Alkohol klar und völlig lösen. Die von uns hergestellten Lösungen der Handelsmuster ergaben alle eine klare, farblose Lösung.

Wir schlagen vor, dass 0,1 g Tocopherolazetat in 4 ml absolutem Alkohol eine klare, farblose Lösung geben müssen. Diese Lösung wird weiter verwendet zur Prüfung auf freies Tocopherol.

Reaktion des wässerigen Auszuges: Der Cod.Med.Scand. und der Brit.Pharm. Codex prüfen einen wässerigen Auszug auf freie Säure. Wir prüften unsere Handelsmuster nach folgender Vorschrift, die wir zur Aufnahme in die Pharmakopöe empfehlen:

0,1 g Tocopherolazetat werden in 2 ml Petrolaether gelöst und 1 Minute mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser geschüttelt. Mit dem wässerigen Auszug wird der pH-Wert nach der Farbtabelle bestimmt.

Wir haben folgende pH-Werte gemessen:

Handelsmuster	pH
I	5,2
II	6,4
III	6,2
IV	6,0
V	5,8

Tocopherolazetat, verunreinigt mit 0,1 % Essigsäure, würde bei dieser Probe einen pH-Wert von 3,8 - 4,0 ergeben. Der Petrolaether muss den Vorschriften der Ph.Helv.V entsprechen.

Spezifisches Gewicht: Aus den Monographien können wir folgende Angaben über das spezifische Gewicht entnehmen:

DAB 6, 3. Nachtrag	$20^o/\ 4^o$	0,952 - 0,966
Cod.Med.Scand. 1.6.51	$20^o/\ 4^o$	0,950 - 0,963
N.F. X	$25^o/25^o$	0,950 - 0,964
Svenska F. XI	$20^o/\ 4^o$	0,9545 - 0,9665

Wir haben das spezifische Gewicht von Tocopherolazetat nach Ph.Helv.V $15^o/15^o$ und nach Ph.Helv.VI $20^o/20^o$ bestimmt und folgende Werte erhalten:

Handels-muster	spez.Gew. $15^o/15^o$	spez.Gew. $20^o/20^o$
I	0,9580	0,9570
II	0,9594	0,9581
III	0,9604	0,9593
IV	0,9588	0,9577
V	0,9610	0,9600

Das spezifische Gewicht unserer Handelsmuster ist mit Ausnahme des NF X durchgehend niedriger als die Forderungen in den Monographien. Basierend auf unseren Resultaten kann

das spezifische Gewicht bestimmt nach Ph.Helv.VI ($20^o/20^o$) von 0,9550 bis 0,9620 begrenzt werden.

Brechungsindex: In allen Monographien wird der Brechungsindex bei 20° bestimmt. Die Svenska F.XI stellt die strengsten Forderungen auf mit einem Brechungsindex n_{D20^o} 1,4958 - 1,4972. Wir haben von unseren Handelsmustern mit dem Abbé-Refraktometer (heizbares Doppelprisma) bei 20° Versuchstemperatur folgende Werte gemessen:

Handelsmuster	n_{D20^o}
I	1,4959
II	1,4959
III	1,4960
IV	1,4966
V	1,4967

Für die Pharmakopöe schlagen wir einen Brechungsindex von n_{D20^o} 1,4958 - 1,4970 vor.

Absorption im ultravioletten Licht: In verschiedenen Prüfungsvorschriften wird die Absorption im ultravioletten Licht bestimmt. Als Lösungsmittel kommen absoluter Alkohol, gereinigter Weingeist und Cyclohexan zur Verwendung. Die Extinktion $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ bei 285 mμ liegt nach den verschiedenen Literaturangaben zwischen 42 und 45 in absolutem Alkohol, und zwischen 45 und 50 in Cyclohexan. Wir haben die Messungen in absolutem Alkohol ausgeführt. Beim Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 284 mμ haben wir folgende Extinktion gefunden:

Handelsmuster	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$
I	45,0
II	44,0
III	43,6
IV	44,2
V	46,1

Die Messung der Absorption im ultravioletten Licht wurde auch herangezogen, um bei der Gehaltsbestimmung die Verseifungszeit experimentell festzustellen. Nach Merck (153) zeigen α-Tocopherol und α-Tocopherolazetat folgende Eigenschaften im ultravioletten Licht:

	Absorptionsmaximum in Aethanol	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$
α-Tocopherol	292 mμ	71 - 76
α-Tocopherolazetat	285 mμ	42 - 45

153) "Vitamine Merck", p. 198, Darmstadt 1957

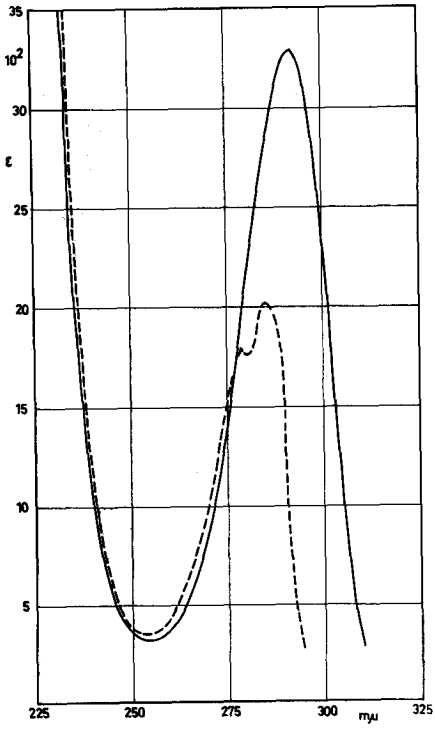


Abb. 11

UV-Spektren von

——— Tocopherolazetat

- - - - - - - Tocopherol

Dank des verschiedenen spektralen Verhaltens von α-Tocopherol und α-Tocopherolazetat kann die Verseifung durch Aufnahme der Absorptionskurven genau verfolgt werden. Bevor alles α-Tocopherolazetat verseift ist, stellt die Absorptionskurve die Resultante der Absorption von α-Tocopherol und α-Tocopherolazetat dar. Nach einer Verseifungszeit von 1 1/2 Stunden fällt die Absorptionskurve bereits mit der von α-Tocopherol zusammen; es kann kein α-Tocopherolazetat mehr nachgewiesen werden. Die Absorptionskurve von α-Tocopherol und α-Tocopherolazetat in absolutem Alkohol vor der Verseifung und nach 2 stündiger Verseifung sind in Abb. 11 dargestellt. α-Tocopherolazetat zeigt ein zweites kleines Maximum bei der Wellenlänge 278 mμ. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten soll in die Pharmakopöevorschrift aufgenommen werden. Der Extinktionskoeffizient $E^{1\,\%}_{1\,cm}$, bestimmt in absolutem Alkohol bei der Wellenlänge 285 mμ, soll mindestens 43,0 und darf höchstens 46,5 betragen.

b) Chemische Reinheitsprüfungen

Die meisten Monographien prüfen auf freies Tocopherol, während nur der Cod. Med.Scand. eine Prüfungsvorschrift auf fremde Tocopherole aufgenommen hat.

Abwesenheit von α-Tocopherol und anderen reduzierenden Verunreinigungen: 0,1 g wird nach Cod.Med.Scand. in 4 ml absolutem Alkohol gelöst. Nach Zusatz von 2 Tropfen Diphenylamin R und 0,05 ml 0,1 n-Cerisulfat muss sofort eine kräftige blauviolette Farbe auftreten, die nach 30 Sekunden wieder verschwindet unter Bildung eines grauschwarzen Niederschlages. Der Reaktionsmechanismus ist der gleiche wie bei der Gehaltsbestimmung der Tocopherole. Bei verschlossener phenolischer Hydroxyl-Gruppe

im Azetyltocopherol wird Cerisulfatlösung nicht reduziert und mit dieser Reaktion nur freies α-Tocopherol und Trimethylhydrochinon erfasst.

Abwesenheit von fremden Tocopherolen: Wie wir bereits bei der Identitätsprüfung festgestellt haben, bilden β-, γ- und δ-Tocopherole mit Salpetersäure in Chloroform bei Zimmertemperatur Tocopherolrot. α-Tocopherol reagiert nicht (151). 1 Tropfen β-Tocopherol wird in 10 ml Chloroform gelöst, in einem 25 ml Scheidetrichter mit 1 ml konz. Salpetersäure versetzt und 15 Sekunden geschüttelt. Die Chloroformphase wird sofort abgetrennt, um die Bildung nitroser Dämpfe zu verhindern. Dabei darf die Chloroformphase höchstens schwach gelb gefärbt sein. Eine rotviolette Farbe deutet auf β-Tocopherol, eine rotorange Farbe auf γ- oder δ-Tocopherol. Das Verfahren von Quaife (154), wie es im Cod.Med.Scand. aufgeführt ist, beruht auf der Bildung gelber Nitrosoderivate, deren Farbe auf Alkalizusatz nach rot umschlägt, wenn alkoholische Lösungen von β-, γ- und δ-Tocopherol mit salpetriger Säure versetzt werden.

Der Cod.Med.Scand. gibt folgende Prüfungsvorschriften:

Eine Lösung von 5 mg Tocopherolazetat in 5 ml absolutem Alkohol wird in einem Messzylinder mit Glasstopfen mit 0,2 ml Eisessig und 5 ml Natriumnitrit (0,1 n) versetzt. Nach Umschütteln und Stehenlassen während 1 Minute versetzt man mit 5 ml Natriumhydroxyd (2 n) und 8 ml Wasser. Anschliessend wird mit 5 ml Petrolaether geschüttelt. Nach der Trennung der beiden Phasen soll die Petrolätherschicht farblos sein.

Unsere Handelsmuster, nach den beiden Verfahren geprüft, zeigen Abwesenheit von fremden Tocopherolen. Wir empfehlen die Vorschrift des Cod.Med.Scand. zur Aufnahme in die Pharmakopöe. Bei der Salpetersäurereaktion in Chloroform bilden sich leicht störend wirkende nitrose Gase.

Quantitative Bestimmungen

a) Verbrennungsrückstand

Ein Verbrennungsrückstand wird nur im Cod.Med.Scand. bestimmt. 0,25 g Tocopherolazetat werden verascht, der Rückstand darf nicht mehr betragen als 0,2 %. Wir bestimmten den Verbrennungsrückstand mit 0,2 g Tocopherolazetat. Die Substanz verbrennt langsam mit leuchtender Flamme. Von den verschiedenen Handelsmustern erhielten wir Rückstände von 0,0000 bis 0,0004 g, so dass wir die Forderung aufstellen können:

0,2 g Tocopherolazetat dürfen keinen wägbaren Verbrennungsrückstand hinterlassen.

---

154) M.L.Quaife, J.biol.Chem. 175, 605 (1948)

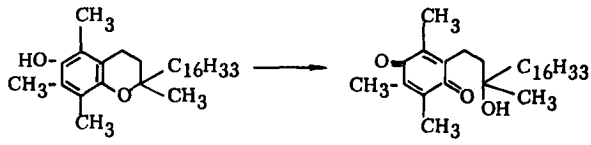
b) Gehaltsbestimmung

In allen Arzneibüchern, in denen α-Tocopherolazetat aufgeführt ist, wird nach der Verseifung der Gehalt cerimetrisch bestimmt. Die ersten oxydimetrischen Bestimmungen von α-Tocopherol wurden von Karrer und Mitarb. (155) mit ammoniakalischem Silbernitrat oder Gold(III)-chlorid ausgeführt. Die Oxydation mit Gold(III)-chlorid verläuft glatt. Als Oxydationsprodukt entsteht p-Chinon. Zur quantitativen Bestimmung kleiner Mengen von α-Tocopherol können die Furter-Meyer-Reaktion (150), die Reaktion nach Emmerie-Engel (152) oder die fluorometrische Methode nach Kofler (151) herangezogen werden.

Verseifung des α-Tocopherolazetates und cerimetrische Bestimmung des freien α-Tocopherols: Kofler (151) verseift α-Tocopherolazetat in 4 n-alkoholischer Schwefelsäure durch Erhitzen während 2 Stunden am Rückflusskühler. In den Monographien wird mit alkoholischer Schwefelsäure verschiedener Konzentration am Rückflusskühler verseift. In Drug Standards (156) wird die Lösung während des Verseifens vor Sonnenlicht geschützt. Die Verseifungszeit wird mit 2 - 3 Stunden angegeben.

Wir haben den Verseifungsvorgang nach verschiedenen Zeiten spektrophotometrisch genau untersucht (siehe Absorption im UV). Eine Verseifungszeit von 1 1/2 Stunden genügt bei unseren Versuchen zur vollständigen Verseifung von α-Tocopherolazetat. Wir legten die Verseifungszeit auf 2 Stunden fest.

α-Tocopherol wird durch Cerisulfat in schwefelsaurer alkoholischer Lösung analog der Oxydation mit Gold(III)-chlorid zum p-Chinon oxydiert (157).



Der Endpunkt der Titration kann potentiometrisch (s.Abb. 3/K. 2) durch Zusatz eines geeigneten Indikators visuell erfasst werden. Für die cerimetrische Bestimmung ist wichtig, dass die Alkoholkonzentration so gewählt wird, dass am Endpunkt die Lösung klar ist. Bei zu hoher Alkoholkonzentration fällt Cerosulfat aus und schliesst beim Fällen Cerisulfat ein; man erhält zu hohe Werte an α-Tocopherolazetat. Wird hingegen die Alkoholkonzen-

155) P.Karrer, R.Escher, H.Fritzsche, H.Keller, B.H.Ringier und H.Salomon, Helv.chim.Acta 21, 939 (1938)
156) Drug Standards, 22, 102 (1954)

tration zu niedrig gewählt, so wird die Löslichkeit des α-Tocopherols und seines p-Chinons überschritten. Nach der Vorschrift von Kofler (151) bildet sich beim Titrieren mit 0,01 n-Cerisulfat anfänglich eine Trübung; nach Zusatz von ca. 3/4 der zur Titration nötigen Menge Lösung wird die Flüssigkeit klar und gelblich gefärbt. Die Mengenverhältnisse sind bei dieser Bestimmung ausschlaggebend.

Als Indikatoren werden o-Phenanthrolin, p-Aethoxychrisoidin (158) oder Diphenylamin vorgeschlagen. Wir wählten Diphenylaminlösung Ph.Helv.V. Am Endpunkt geht die klare zitronengelbe Lösung über Goldgelb, Blaugrau nach Blauviolett. Die blauviolette Farbe soll 10 Sekunden bestehen bleiben.

Beim Verdünnen der verseiften Lösung mit Alkohol ist die Versuchstemperatur genau einzuhalten. Die verdünnte alkoholische Lösung wird mit einer Bürette eingemessen. Pipetten sind auf Auslauf mit Wasser geeicht, mit Alkohol entsteht ein nicht zu vernachlässigender Fehler.

Vorschrift: Wir arbeiteten genau nach der Prüfungsvorschrift, die wir im Vorschlag zum Pharmakopöeartikel aufgenommen haben.

Resultate:

Handelsmuster	Gehalt nach der cerimetrischen Methode
I	99,6 %
II	100,2 %
III	98,7 %
IV	99,4 %
V	99,4 %

Die Streuung beträgt ± 0,4 %. Die Methode eignet sich sehr gut als Pharmakopöemethode. Mit der Forderung, dass der Gehalt mindestens 98,5 und höchstens 100,5 % betragen darf, schlagen wir sie zur Aufnahme in die Ph.Helv.VI vor.

---

157) P.Karrer, Helv.chim.Acta 22, 334 (1939)
158) E.Schulek und P.Rozsa, Z.anal.Chem. 126, 253 (1943)

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	IV	V
Sinnenprüfung					
Farbe	gelb	grünlich gelb	grünlich gelb	fast farblos	fast farblos
Geruch	-	-	-	-	-
Geschmack	ölig	ölig	ölig	ölig	ölig
Identität					
Salpetersäure-Reaktion	+	+	+	+	+
Emmerie-Engel-Reaktion	+	+	+	+	+
Reinheit					
Löslichkeit	=	=	=	=	=
Farbe 2,5-proz.	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
Reaktion des wässerigen Auszuges pH	5,2	6,4	6,2	6,0	5,8
Spez. Gewicht $20^o/20^o$	0,9570	0,9581	0,9593	0,9577	0,9600
$15^o/15^o$	0,9580	0,9594	0,9604	0,9588	0,9610
Brechungsindex	1,4959	1,4959	1,4960	1,4966	1,4967
UV-Absorption $E^{1\,\%}_{1\,cm}$	45,0	44,0	43,6	44,2	46,1
α-Tocopherol	-	-	-	-	-
Fremde Tocopherole	-	-	-	-	-
Quantitative Bestimmung					
Verbrennungsrückstand	0,0002	0,0004	0,0000	0,0003	0,0002
Gehalt, Cerimetrie	99,6 %	100,2 %	98,7 %	99,4 %	99,4 %

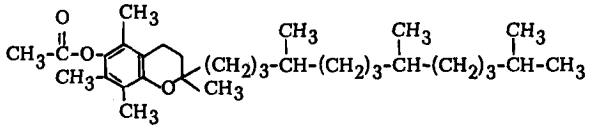
Tocopherolum aceticum

Syn.: Vitaminum E

Tocopherolazetat Acetato di tocopherolo Acetate de tocopherole

α-Tocopherolazetat ist 2,5,7,8-Tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-acetoxychroman mit einem Gehalt von mindestens 98,5 % und höchstens 100,5 % $C_{31}H_{52}O_3$.

$C_{31}H_{52}O_3$ Mol.-Gew. 472,76



Prüfung: Schwach gelblich bis grünlich-gelbes, dickflüssiges, durchsichtiges, geruch- und geschmackloses Oel, das auf der Zunge ölig schmeckt. Tocopherolazetat darf nicht brennend oder sauer schmecken.

Das spezifische Gewicht muss zwischen 0,9550 und 0,9620 liegen.

Der Brechungsindex muss, bestimmt bei 20°, zwischen $n_{D20°}$ 1,4958 und 1,4970 liegen.

Der Extinktionskoeffizient $E^{1\,\%}_{1\,cm}$, bestimmt in absolutem Alkohol bei einer Wellenlänge von 284 mμ, muss mindestens 43,0 und darf höchstens 46,5 betragen.

1 Tropfen Tocopherolazetat löst sich in 2 ml konz. Schwefelsäure unter Bildung einer stark gelben Farbe. Auf Zusatz von 5 Tropfen konz. Salpetersäure muss sich die gelbe Lösung ziegelrot färben.

1 Tropfen Tocopherolazetat wird in 1 ml absolutem Alkohol gelöst, mit 1 ml konz. Salpetersäure versetzt und 5 Minuten im kochenden Wasserbad zum Sieden erhitzt. Die anfänglich gelbe Lösung muss nach dieser Zeit ziegelrot gefärbt sein.

1 dg Tocopherolazetat muss sich in 4 ml absolutem Alkohol klar und farblos völlig lösen. In dieser Lösung muss nach Zusatz von 2 Tropfen Diphenylamin und 1 Tropfen 0,1 n-Cerisulfat eine kräftige blauviolette Farbe auftreten, die nach einigen Sekunden wieder verschwinden darf (freies Tocopherol).

1 dg Tocopherolazetat wird in 2 ml Petroläther gelöst und 1 Minute mit frisch ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser geschüttelt. Der pH-Wert des wässerigen Auszuges muss zwischen 4,8 und 7,0 liegen.

1 Tropfen Tocopherolazetat wird in 5 ml absolutem Alkohol in einem Messzylinder mit Glasstopfen von ca. 30 ml gelöst. Man versetzt mit 0,2 ml Eisessig, 0,5 ml Natriumnitrit, schüttelt und lässt 1 Minute stehen. Diese Lösung wird mit 5 ml verdünnter Natronlauge und 8 ml Wasser verdünnt und mit 5 ml Petroläther geschüttelt. Nach Trennung der beiden Phasen soll die Petrolätherschicht farblos sein (fremde Tocopherole).

2 dg Tocopherolazetat dürfen keinen wägbaren Verbrennungsrückstand hinterlassen.

Ca. 0,1 g Tocopherolazetat (genau gewogen) werden in einem Erlenmeyer mit Normalschliff von 150 ml mit 50 ml 4 n-alkoholischer Schwefelsäure versetzt. Der Erlenmeyer wird mit einem Rückflusskühler mit Normalschliff versehen und, vor direktem Sonnenlicht geschützt, während 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad verseift. Nach dem Verseifen wird die Lösung abgekühlt, mit Weingeist quantitativ in einen Messkolben von 100 ml übergeführt und bei 20° zu 100 ml ergänzt. 25 ml dieser Lösung werden mit einer Bürette in einen 100 ml Erlenmeyer eingemessen. Nach Zusatz von 2 Tropfen Diphenylamin wird mit 0,01 n-Cerisulfat unter Umschwenken bis zur Blauviolettfärbung, die mindestens 10 Sekunden bestehen bleiben muss, titriert (Mikrobürette). Mit den gleichen Reagentien ist nach derselben Methode ein Blindwert zu bestimmen, der vom gefundenen Wert abzuziehen ist.

$$1 \text{ ml } 0{,}01 \text{ n-}Ce(SO_4)_2 \quad = \quad 0{,}002364 \text{ g } C_{31}H_{52}O_3$$

Der Verbrauch an 0,01 n-Cerisulfat muss einem Gehalt von 98,5 - 100,5 % $C_{31}H_{52}O_3$ entsprechen.

(0,0250 g müssen also mindestens 5,71 ml und dürfen höchstens 5,84 ml 0,01 n-Cerisulfat verbrauchen.)

Aufbewahrung: Vor Licht und Feuchtigkeit geschützt in gut verschlossenen Gefässen.

Gebrauchsdosen: (Vorschlag) 0,01 - 0,05 g pro die

Löslichkeit: Fast unlöslich in Wasser, leicht löslich in absolutem Alkohol, Aether, Chloroform, Azeton, Petroläther und fetten Oelen. Löslich in ca. 20 T. Weingeist.

Inkompatibilitäten: Basisch reagierende Stoffe (Hydrolyse), Oxydationsmittel.

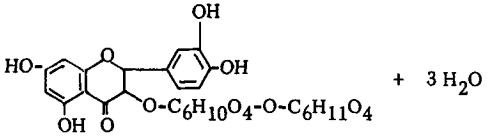
Phantasienamen: Ephynal (E.M.), Davitamon (E.M.), Eprolin (E.M.), Ereton (E.M.), Esorb (E.M.), Evion (E.M.), E-Viterbin (E.M.), Tocopherolo Bioglan (E.M.), Tocomine (E.M.), Tocopherex (E.M.), Vitemonta (E.M.).

3.7 Rutinum

Syn.: Rutosidum (DCI)

5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavonol-3-rhamnoglykosid

$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3\,H_2O$ Mol.-Gew. 664,59



Rutinum (NF X, Cod.Med.Scand. 13.4.57).

Spezialpräparate

Birutan® (Merck), Rutinion® (Rhein-Chemie).

Gewinnung

Rutin wurde bereits vor hundert Jahren aus Ruta graveolens isoliert. Weitere Rutinquellen wurden später gefunden in Capparis pinosa, in Ilex aquifolium und in Fagopyrum esculentum. Es zeigte sich dann auch, dass Rutin identisch ist mit Myrticolorin aus Eucalyptus macrorhyucha, mit Violaquerzetin aus Viola tricoloris und mit Eldrin aus Sambucus canadensis. Nach Krewson und Couch (127) wird Rutin aus Fagopyrum esculentum durch kalte oder warme Extraktion mit Isopropylalkohol gewonnen. Das Rohprodukt wird gereinigt durch Umkristallisieren aus Wasser; Farbstoffe werden mit Silicagel entfernt. Zur Fällung von Rutin wird oft verdünnte Essigsäure zugesetzt.

Mögliche Verunreinigungen

Querzetin, Rutinose, Glukose, Rhamnose, Farbstoffe, Essigsäure.

Sinnenprüfungen

Die untersuchten Handelsmuster lagen als feinkristalline Pulver vor. Nur das Handelsmuster III wies eine klare, gelbe Farbe auf, während die übrigen Handelsmuster grünlich-gelb gefärbt waren. 4 Handelsmuster waren völlig geruchlos, 1 Handelsmuster

zeigte einen typischen Korkgeruch vom Verschluss. Kein Handelsmuster wies einen Essigsäuregeruch auf. Alle 4 Handelsmuster waren geschmacklos.

Wir schlagen für die Sinnenprüfungen folgende Vorschrift vor:

Gelbes oder höchstens schwach grünlich-gelbes, feinkristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.

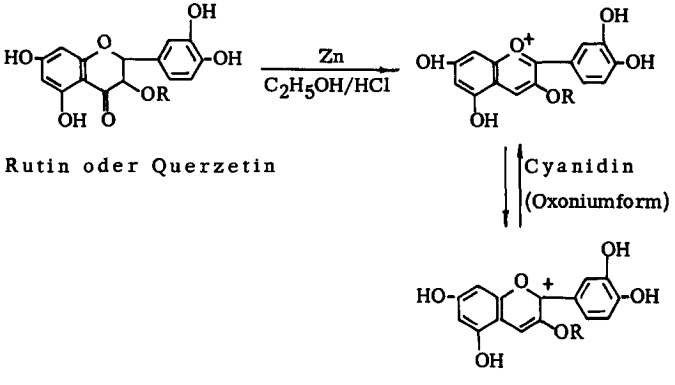
Chemische Identitätsprüfungen

Alle in der Literatur aufgeführten Farbreaktionen sind nicht spezifisch auf Rutin, sondern sind Gruppenreaktionen auf Flavonole, Flavone und Flavanole.

Farbreaktionen

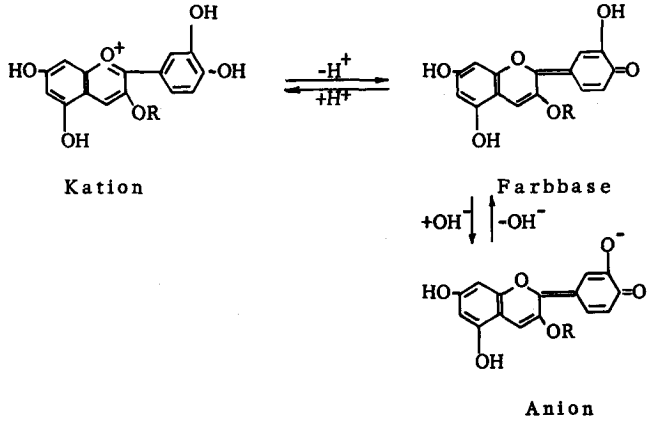
Cyanidin-Reaktion: Bei der Reduktion einer salzsauren alkoholischen Lösung von Rutin mit Zink oder Magnesium (NF X) tritt beim Erwärmen infolge Bildung von Farbstoffen der Anthocyanidingruppe eine Rotfärbung auf. Die Reduktion führten wir nach folgender Vorschrift aus:

0,01 g Rutin wird in 5 ml Weingeist durch schwaches Erwärmen gelöst, mit 1 g Zinkstaub und mit 5 ml verdünnter Salzsäure versetzt. Wird diese Mischung unter häufigem Umschütteln während 15 Minuten stehen gelassen, so färbt sich die Flüssigkeit rot. Im Gegensatz zu Rutin wird reines Querzetin nur zu einem blass bräunlich-roten Derivat reduziert. Die Reduktion verläuft folgendermassen (128, 129):



127) C.F.Krewson und J.F.Couch, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 39, 163 (1950)
128) L.F.Fieser und M.Fieser, "Lehrbuch der organischen Chemie", 3. Aufl., p. 952, Verlag Chemie, Weinheim 1957
129) W.Stepp, J.Kühnau und H.Schroeder, "Die Vitamine und ihre klinische Anwendung", 2. Bd., 7. Aufl., p. 833, Enke Verlag, Stuttgart 1957

Die Anthocyanidine können je nach der Reaktion in verschiedenen Farben auftreten. Es ist bekannt, dass sie sich bei höherem pH-Wert in ihre chinoide Form umlagern und dabei eine Farbänderung erfahren:



Wir haben diese Farbänderung auch bei unseren reduzierten Lösungen beobachten können. Zur Ausführung der Reaktion versetzten wir 2 ml der reduzierten roten Rutinlösung und der reduzierten, blass bräunlichroten Querzetinlösung mit 5 ml Natriumazetat. Unter Ausflocken des Farbstoffes färbt sich bei Rutin die Lösung blaugrün bis blauviolett, bei Querzetin hingegen goldgelb. Zur Untersuchung haben wir jeweils das aus dem entsprechenden Rutin durch Hydrolyse gewonnene Querzetin verwendet.

Die Reaktion führten wir mit allen unseren Handelsmustern aus. Dabei beobachteten wir, dass alle Handelsmuster die beschriebene Reaktion geben. Reine reduzierte Rutinlösung schlägt durch pH-Erhöhung von Rot nach Blauviolett um. Hingegen kann sich während der Reaktion durch Hydrolyse eine kleine Menge Querzetin bilden, so dass eine Mischfarbe von Blauviolett und Gelb entsteht. Darauf führen wir die verschiedenen Farbtöne von Blaugrün bis Blauviolett, die sich durch pH-Erhöhung bei Rutinlösungen bilden, zurück. Zur Ausführung der Cyanidin-Reaktion schlagen wir folgende Vorschrift vor:

Ca. 0,01 g Rutin werden in 5 ml Weingeist durch schwaches Erhitzen auf dem Wasserbad gelöst. Werden dieser Mischung 1 g Zinkstaub und 5 ml verdünnte Salzsäure zugesetzt, so färbt sich die Flüssigkeit nach ca. 15 Minuten tiefrot. 5 ml dieser roten Lösung müssen auf Zusatz von 5 ml Natriumazetat einen blaugrünen bis blauvioletten Farbstoff bilden.

Reaktion mit Metallen: Flavonole bilden mit verschiedenen Metallen gefärbte unspezifische Komplexe. Im NF X sowie im Cod.Med.Scand. wird das Auftreten einer blaugrünen Farbe nach Zusatz von Ferrichlorid zu einer alkoholischen Lösung von Rutin als Identitätsreaktion herangezogen. Wie schon erwähnt, ist diese Reaktion unspezifisch für Rutin. Blei(II)-Ionen bilden mit Rutin einen wasserunlöslichen, orangefarbigen Komplex (130, 131). Nach Hörhammer und Hänsel (132) reagiert Zirkonoxychlorid mit Rutin und Querzetin unter Bildung zweier gelber Farbstoffe, deren Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen liegen. Rutin bildet weiter mit Aluminiumchlorid in wässeriger Lösung einen roten Komplex, der nach der Methode von Dechene (133) zur quantitativen Bestimmung von Rutin herangezogen werden kann.

Fluoreszenzreaktionen

Flavonole mit 5-ständiger Hydroxylgruppe reagieren in wasserfreiem Azeton mit Borsäure und Zitronensäure nach Wilson (134) oder mit Borsäure und Oxalsäure nach Tauböck (135) unter Bildung eines intensiv gelbgrün fluoreszierenden Komplexes. An Stelle von wasserfreiem Azeton können Essigsäureanhydrid oder Dioxan verwendet werden. Wir führten die Reaktion nach der Vorschrift von Bruchhausen und Küssner (131) durch:

Eine Spur Substanz wird zu einer Lösung von je einem Kriställchen Borsäure und Oxalsäure in 3 ml Azeton gegeben und im Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der tiefgelb gefärbte Rückstand löst sich in 3 ml Aether mit gelber Farbe und grüner Fluoreszenz.

Alle untersuchten Handelsmuster gaben positive Reaktion. Die Reaktion ist nicht spezifisch auf Rutin, sie fällt auch mit Querzetin positiv aus, so dass wir auf die Aufnahme dieser Reaktion in die Pharmakopöe verzichten. Ueber die Bildung fluoreszierender Verbindungen von Rutin mit Tetraphenyldiboroxyd wurden von Neu (136) verschiedene Arbeiten veröffentlicht. Hingegen eignen sich diese Methoden nicht als Pharmakopöe-Reaktionen.

Farbvertiefung durch pH-Aenderung: Wir beobachteten bei Rutin in methanolischen Pufferlösungen (Methanol 1 T. und Pufferlösung nach Ph.Helv.V, Suppl.III 1 T.)

---

130) W.Brune, Arch.Pharm. 287, 432 (1954)
131) F.Bruchhausen und W.Küssner, Pharm.Ztg. 100, 203 (1955)
132) L.Hörhammer und R.Hänsel, Arch.Pharm. 284, 276 (1951)
133) E.B.Dechene, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 40, 93 (1951)
134) C.Wilson, J.amer.chem.Soc. 61, 2303 (1939)
135) K.Tauböck, Naturwissenschaften 30, 439 (1942)
136) R.Neu, Z.anal.Chem. 143, 30 (1954)

bei steigendem pH-Wert eine Verstärkung der gelben Farbe. In verdünnter Natronlauge bildet sich sogar eine orangerote Farbe.

Reduzierende Eigenschaften: Rütin und Querzetin reduzieren ammoniakalische Silbernitratlösung in der Kälte. Hingegen wird Fehlingsche Lösung durch Rutin beim Erhitzen bis zum einmaligen Aufkochen und sofortigem Abkühlen nicht reduziert, während Querzetin nach der gleichen Methode reduziert. Diese Eigenschaft kann zur Reinheitsprüfung auf Querzetin herangezogen werden.

Reinheitsprüfungen

a) Physikalische und physikalisch-chemische Prüfungen

Schmelzbereich: Der Schmelzbereich von Rutin ist nicht charakteristisch für die Substanz. Nach Merck Index (137) wird wasserfreies Rutin braun bei 125°, plastisch bei 195 - 197° und zersetzt sich durch Aufbrausen bei 214 - 215°. Querzetin zersetzt sich bei ca. 314°, beginnt sich aber schon beim Aufheizen von ca. 280° an unter Braunfärbung zu zersetzen.

Hingegen haben wir von Querzetin den Pentaazetylester mit einem ziemlich scharfen Schmelzpunkt hergestellt:

0,30 g Querzetin (erhalten durch Hydrolyse aus Rutin bei der gravimetrischen Bestimmung) werden in 8 ml verdünnter Natronlauge gelöst und sofort mit 10 - 20 g Eis versetzt. (Ein Teil des Eises muss ungeschmolzen bleiben.) Dieser rot gefärbten Lösung werden in einem Guss 1,5 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt und sofort während einer Minute kräftig geschüttelt. Unter Gelbfärbung der Lösung fällt das Azetat aus. Dieses wird auf einer Filternutsche gesammelt und mit 50 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 20 ml Weingeist, Trocknen im Trockenschrank bei 103 - 105° während 4 Stunden und Nachtrocknen im Exsikkator während 24 Stunden wird der Schmelzbereich bestimmt.

Handelsmuster	Schmelzbereich (korr.)
I	162,5 - 165,0°
II	165,0 - 170,5°
III	163,4 - 165,0°
IV	167,4 - 170,0°
V	163,0 - 169,5°

Die Analyse der Derivate hat ergeben, dass alle fünf phenolischen OH-Gruppen verestert werden, dass es sich um ein Pentaazetylderivat handelt. Die Bestimmung des Schmelzbereiches dieses Azetylderivates könnte als Identitätsreaktion in die Pharmakopöe aufgenommen werden. Da hingegen die Azetylierung mit Querzetin, welches als Ver-

137) Merck Index, 6th Ed., Merch and Co., Rahway USA 1952

wechslung oder als Verunreinigung in Frage kommt, ausgeführt wird und da wir in der Cyanidin-Reaktion sowie in der Papierchromatographie eindeutige Identitätsreaktionen besitzen, verzichten wir auf die Bestimmung des Azetylderivates.

Löslichkeit: Die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln wurde von Krewson und Naghski (138) untersucht. Bei Zimmertemperatur lösen sich in:

100 ml Wasser	0,013 g
100 ml Methylalkohol	5,5 g
100 ml Aethylalkohol	0,55 g Rutin.

Wir ziehen die Löslichkeit in Methylalkohol zur Prüfung heran:

0,40 g Rutin (in einem 20 ml Messkolben eingewogen) müssen sich in 10 ml Methylalkohol bei Zimmertemperatur vollständig lösen. Diese Lösung wird mit Methylalkohol auf 20 ml verdünnt und dient zur Prüfung auf Abwesenheit von Chlorophyll und roten Farbstoffen.

Nach weiterem Verdünnen wird die Lösung zur papierchromatographischen Prüfung herangezogen. Wir haben unsere Handelsmuster nach obiger Vorschrift geprüft.

Handels-muster	Löslichkeit bei Zimmertemperatur in 10 ml Methanol	in 20 ml Methanol
I	klar, vollständig	klar, vollständig
II	trüb	trüb
III	klar, vollständig	klar, vollständig
IV	klar, vollständig	klar, vollständig
V	trüb	schwach trüb

Ausser den Handelsmustern II und V, die sich auch in 20 ml Methylalkohol nicht vollständig klar lösen, entsprechen die Muster unseren Forderungen.

Optische Drehung: Die optische Drehung in verschiedenen Lösungsmitteln wurde von Krewson und Naghski (138) bestimmt. Sie haben festgestellt, dass Rutin in neutralen Lösungsmitteln und wasserfreien Säuren rechtsdrehend, in verdünnten Säuren und basischen Lösungsmitteln linksdrehend ist. Nach ihren Untersuchungen hängt die optische Drehung auch von der Konzentration des Lösungsmittels ab. So zeigt Rutin in Aethylalkohol verschiedener Konzentrationen folgende unterschiedliche Drehungen:

Aethylalkohol	spezifische Drehung
99,7 %	+ 11,46°
95,0 %	+ 6,77°
49,9 %	- 9,10°

138) C.F.Krewson und J.Naghski, J.amer.pharm.Ass. (Sci.Ed.) 41, 582 (1952)

Zur Messung wurden 0,5000 g Rutin in 100 ml Lösung verwendet. Wir haben von unseren Handelsmustern die optische Drehung in absolutem Alkohol bestimmt und folgende Werte gefunden:

Handelsmuster	spezifische Drehung
I	+ 10°
II	+ 13°
III	+ 13°
IV	+ 11°
V	+ 9°

Die Lösung von 0,5 g Rutin in 100 ml Aethylalkohol ist annähernd gesättigt. Diese Lösung zeigt einen Drehungswinkel von ca. 0,11°. Selbst mit dem modernsten Zeiss-Winkel Kreispolarimeter machen wir einen mittleren Ablesungsfehler von ± 0,01°, so dass bei der vorhandenen Bestimmungsgenauigkeit des Instrumentes Differenzen von ± 10 % entstehen können. Die als Verunreinigung in Frage kommenden Zucker, Rutinose, Rhamnose und Glukose weisen ebenfalls nur eine schwache optische Drehung auf. Aus diesen Gründen verzichten wir auf die Aufnahme der Bestimmung der optischen Drehung in einen Pharmakopöeartikel.

Abwesenheit von Chlorophyll und roten Farbstoffen: Diese als Verunreinigung in Frage kommenden Farbstoffe werden durch die Messung der Absorption zwischen den Wellenlängen von 580 - 660 mμ erfasst. In Aether weist Chlorophyll a ein Maximum bei 660 mμ und Chlorophyll b ein Maximum bei 642 mμ auf. Die roten Pflanzenfarbstoffe zeigen maximale Absorption zwischen 580 und 600 mμ. Wir prüften die 2-proz. methanolische Lösung; die trüben Lösungen der Handelsmuster II und V wurden vorerst filtriert. Die Extinktion der verschiedenen Lösungen war bei keiner Wellenlänge höher als 0,10, was einem Extinktionskoeffizienten von max. 0,05 entspricht. Nach der Vorschrift des Cod.Med.Scand. darf der Extinktionskoeffizient nicht grösser sein als 0,05. Wir schlagen für die Pharmakopöe folgende Vorschrift vor:

Die Extinktion der 2-proz. methanolischen Rutinlösung darf bei den Wellenlängen von 580 - 660 mμ nicht grösser sein als 0,10 ($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 0,05).

Ultraviolett-Absorption: Zur quantitativen Bestimmung von Rutin sowie zur Prüfung auf Abwesenheit von Querzetin wird im NF X die spektrophotometrische Messung der Absorptionskurve im ultravioletten Bereich herangezogen. Nach unseren Untersuchungen konnten wir das von Hansen (139) bei 362,5 mμ gefundene Absorptionsmaximum

---

139) G. Hansen, Arch.Pharm.Chem. 64, 349 (1957)

bestätigen, so dass wir die Messung noch mit der Glühlampe als Lichtquelle durchführen können. Nicht nur Rutin sondern auch Querzetin zeigt in diesem Spektralbereich ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 375 mμ. So wirkt sich die Anwesenheit von Querzetin in Rutin auf die Absorption nur gering aus. Swan (140) hat den Einfluss von genau bekannten Mengen Querzetin in Rutin auf die Absorption untersucht. Mit wachsendem Querzetingehalt wird der Quotient:

$$Q = \frac{\text{Ext. bei 375 m}\mu\text{ (Absorptionsmax. von Querzetin)}}{\text{Ext. bei 362,5 m}\mu\text{ (Absorptionsmax. von Rutin)}}$$

grösser, was im NF X zur Reinheitsprüfung ausgewertet wird. Damit reproduzierbare Werte erhalten werden, müssen die Instrumente vor der Messung genau mit einer Testsubstanz eingestellt werden. Aus diesem Grunde wurde im NF X ein Standard-Rutin eingeführt. Der Einfluss von Querzetin als Verunreinigung in Rutin auf die Absorption im Spektralbereich von 347 bis 375 mμ wurde anhand reiner Substanzen von Hansen (139) untersucht. Wir haben von unseren Handelsmustern die Extinktionen bei den Wellenlängen 347 mμ, 350 mμ, 362 mμ, 373 mμ und 375 mμ gemessen und den Gehalt an Querzetin aus den Quotienten anhand der Resultate von Hansen (139) berechnet:

$$Q_1 = \frac{\text{Ext. bei 373 m}\mu}{\text{Ext. bei 362 m}\mu} \qquad Q_2 = \frac{\text{Ext. bei 347 m}\mu}{\text{Ext. bei 375 m}\mu}$$

$$Q_3 = \frac{\text{Ext. bei 350 m}\mu}{\text{Ext. bei 373 m}\mu}$$

Handelsmuster	Querzetingehalt, nach Hansen berechnet aus Q_1	aus Q_2	aus Q_3
I	7 %	6 %	6 %
II	6 %	5 %	6 %
III	3 %	0 %	1 %
IV	4 %	2 %	2 %
V	2 %	2 %	2 %

Um vergleichbare Werte zu erhalten, müssen, wie schon erwähnt, die Instrumente mit einem Standard-Rutin geeicht sein. Aus diesem Grunde suchten wir nach einem einfacheren Verfahren, um Querzetin als Verunreinigung feststellen zu können. Wir haben in der Papierchromatographie eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Querzetin gefunden, weshalb wir auf die Aufnahme der spektrophotometrischen Bestimmung in die Pharmakopöe verzichten.

---

140) R.V.Swan, J.Pharm.Pharmacol. 1, 323 (1949)

Papierchromatographische Prüfung: Die papierchromatographische Trennung der Flavonoide wurde mit Lösungsmittelsystemen verschiedener Polarität, den schwach polaren Systemen wie Chloroform/Methanol/Ligroin/Wasser nach Lindstedt (141) und den polaren Systemen wie Essigsäure nach Gage, Douglass und Wender (142) vorgenommen. Letztere fanden beim Entwickeln mit einer Mischung von 15 T. Essigsäure und 85 T. Wasser für Rutin einen R_f-Wert von 0,62 und für Querzetin einen R_f-Wert von 0,07. In verdünnten wässerigen Systemen wandern die Glykoside, während die Aglykone am Start bleiben oder höchstens geringe R_f-Werte aufweisen. Die Entwicklung der Chromatogramme mit 15-proz. Essigsäure eignet sich für unsere Untersuchungen zum Nachweis von geringen Mengen Querzetin in Rutin ausgezeichnet. Querzetin bleibt an der Startlinie und infolge der schlechten Löslichkeit der Substanz tritt keine Diffusion ein, so dass die Flecken durch die Entwicklung nicht messbar vergrössert werden. Zum Nachweis der Flavonoide können die verschiedenen Farbreaktionen mit Metallen herangezogen werden. Wir haben vor allem Ferrichloridlösung Ph.Helv.V (1 T. verdünnt mit 9 T. Wasser) als Nachweisreagenz untersucht. Die Papiere wurden durch die Reagenzlösung gezogen und sofort beurteilt. Wir können mit diesem Reagenz noch 0,001 mg Querzetin nachweisen. Mit grösseren Mengen Querzetin treten aber ebenfalls nur schwach gefärbte Flekken auf, so dass sich diese Methode als Grenzreaktion nicht eignet. Bessere Resultate erhielten wir bei der Beurteilung der Chromatogramme im UV-Licht. Das Aglykon kann leicht vom Glykosid unterschieden werden. Es ist bekannt, dass die freie Hydroxylgruppe in 3-Stellung für die leuchtend gelbe Fluoreszenz verantwortlich ist und dass die Flavonol-3-glykoside das UV-Licht absorbieren und auf dem Chromatogramm als dunkle Flekken erscheinen. Auf dem mit 15-proz. Essigsäure entwickelten Papier trat mit 0,0002 mg Querzetin an der Startlinie noch deutlich sichtbare Fluoreszenz auf, während 0,0001 mg keine gelbe Fluoreszenz mehr zeigte. Auf Grund unserer Untersuchungen gelangen wir zu folgender Arbeitsmethode, die wir auch für den Pharmakopöeartikel vorschlagen:

1,0 ml der zur Löslichkeitsprüfung hergestellten methanolischen Lösung (entsprechend 0,02 g Rutin) werden mit Methylalkohol verdünnt zu 10 ml = Lösung I. Zur papierchromatographischen Prüfung werden 2,5 ml Lösung I verdünnt mit Weingeist zu 10 ml = Lösung II.

Chromatographierpapier Schleicher und Schüll 2043 b wird quer zur Richtung des Pfeil-Wasserzeichens in Streifen von 9 cm Breite geschnitten. Auf der Startlinie (Allgemeine Bestimmungen, Seite 53, Suppl. III) markiert man 2 Startpunkte und trägt von Lösung II am Startpunkt a 0,02 ml (entsprechend 0,005 mg Rutin) auf. Die Papierstreifen werden in das zur aufsteigenden Papierchromatographie vorbereitete und mit 15-proz. Essigsäure klimatisierte Gefäss (Allgemeine Bestimmungen, Seite 53, Suppl. III) während 2 Stunden

141) G.Lindstedt, Acta chem.Scand. 4, 448 (1950)
142) T.G.Gage, G.D.Douglass und S.H.Wender, Analyt.Chem. 23, 1582 (1951)

vorgehängt. Nun wird sofort aufsteigend mit 15-proz. Essigsäure chromatographiert, bis die Frontlinie ca. 30 cm über die Startlinie gestiegen ist (ca. 4 Stunden). Hierauf wird das Papier sorgfältig herausgenommen, mit Bleistift die Frontlinie eingezeichnet, und der Streifen anschliessend an der Luft oder im Trockenschrank bei ca. 70° getrocknet. Im ultravioletten Licht betrachtet, weist das Chromatogramm bei a und b einen bräunlichen Flecken mit einem R_f-Wert von 0,51 (±0,05) auf. Bei a darf am Start höchstens ein schwach gelb fluoreszierender Flecken, bei b hingegen keine gelbe Fluoreszenz sichtbar sein.

Mit dieser Methode werden mehr als 2 % Querzetin in Rutin erfasst. Im NF X werden 5 % Querzetin als Verunreinigung toleriert. Da hingegen die Möglichkeit besteht, reines Rutin herzustellen, schlagen wir vor, den maximal zulässigen Querzetingehalt auf 2 % festzusetzen. Wir haben unsere Handelsmuster nach dem beschriebenen Verfahren geprüft und festgestellt, dass 3 Muster unseren Forderungen entsprechen, während 2 Muster mehr als 2 % Querzetin enthalten.

b) Chemische Reinheitsprüfungen

Abwesenheit von Fehling reduzierenden Substanzen (Querzetin, reduzierende Zucker): Rutin reduziert Fehling erst nach Hydrolyse. Beim Erhitzen der Rutinlösung mit Fehling bis zum einmaligen Aufkochen tritt noch keine Hydrolyse ein. Wir führten die Reaktion nach folgender Vorschrift durch:

0,1 g Rutin werden in einer Mischung von 5 ml Fehling I und 5 ml Fehling II bis zum einmaligen Aufkochen erhitzt und die Lösung sofort unter fliessendem Wasser abgekühlt. Innerhalb einer Minute darf weder eine Verfärbung noch eine Fällung auftreten.

Alle untersuchten Handelsmuster gaben negative Reaktion. Die Prüfung soll in einer Pharmakopöevorschrift berücksichtigt werden, da reduzierende Zucker damit erfasst werden.

Abwesenheit von Querzetin: Mit der Fluoreszenzreaktion nach Hörhammer und Hänsel (132) zeigt Querzetin in einer Lösung von Azeton und Methanol auf Zusatz von Aluminiumchlorid bei Tageslicht grüne Fluoreszenz. Mit Rutin bildet sich nur eine gelbe Farbe. Bei Anregung mit der Quarzlampe fluoresziert auch der Rutinkomplex, so dass kein sichtbarer Unterschied zwischen Rutin und Querzetin mehr festzustellen ist.

In Auswertung dieser Eigenschaften haben wir unsere Handelsmuster nach folgender Vorschrift geprüft:

0,1 g Rutin wird in 5 ml Methylalkohol durch leichtes Erwärmen gelöst, mit 10 ml Azeton und mit 1 ml einer 2-proz. Lösung von wasserfreiem Aluminiumchlorid in wasserfreien Methylalkohol versetzt.

In einer Verdünnungsreihe von Querzetin zeigt nach dieser Vorschrift noch 1 mg/ 10 ml eine schwache grüne Fluoreszenz, während 0,5 mg/10 ml nicht mehr fluoreszieren. Wir können also bei einer Einwaage von 0,1 g Rutin noch 0,001 g Querzetin als Verunreinigung nachweisen. Wir haben mit unseren Handelsmustern folgende Resultate erhalten:

Handelsmuster	Fluoreszenz
I	+
II	-
III	-
IV	+
V	-

Die Handelsmuster, die keine Fluoreszenz ergaben, enthalten weniger als 1 % Querzetin, Beide Handelsmuster mit positivem Ausfall der Reaktion fluoreszieren stärker als eine mit 1 % Querzetin verunreinigte Rutinlösung. Diese Reaktion spricht empfindlich auf geringe Mengen von Querzetin an, hingegen ist es schwerer, mit ihrer Hilfe eine Grenzreaktion auszuführen als mit der Papierchromatographie, da je nach der Lichtquelle die Fluoreszenz besser oder schlechter sichtbar wird. Aus diesen Gründen ziehen wir die Papierchromatographie als Reinheitsprüfung auf Querzetin vor.

Quantitative Bestimmungen

a) Feuchtigkeit

Rutin enthält 3 Mol Kristallwasser, so dass der theoretische Wassergehalt 8,13% beträgt. Nach den Untersuchungen von Naghski und Mitarb. (143) ist getrocknetes Rutin äusserst hygroskopisch. Bei der Trocknung im Vakuumschrank müssen spezielle Vorsichtsmassnahmen getroffen werden. So wird im NF X der Wassergehalt durch Trocknen im Vakuumschrank über Bariumhydroxyd während 16 Stunden bei einer Temperatur von 125° bestimmt. Thorn und Huyck (144) haben den Wassergehalt von Rutin nach der K. Fischer-Methode durch Infrarottrocknung und nach der Methode NF X bestimmt. Sie fanden nach der letzten Methode einen etwas geringeren Wassergehalt. Wir haben von unseren Handelsmustern mit 0,2 g Rutin den Wassergehalt nach K. Fischer nach Ph.Helv. V, Suppl. III, bestimmt und folgende Wassergehalte gefunden:

Handels-muster	Wassergehalt nach KFR
I	8,7 %
II	8,0 %
III	8,3 %
IV	8,5 %
V	8,0 %

Im NF X wird ein Wassergehalt von 5,5 - 9,0 % (Vakuumtrockenschrank) und im Cod.Med.Scand. ein solcher von 7 - 9 % (K. Fischer-Titration) zugelassen. Auf Grund unserer Untersuchungen schlagen wir vor, einen Wassergehalt von 7,5 - 9,0 %, bestimmt mit 0,2 g Rutin nach K. Fischer, als zulässig zu erachten.

b) Verbrennungsrückstand

Nach der Vorschrift des NF X und des Cod.Med.Scand. wird ein Verbrennungsrückstand von 0,5 % zugelassen. Wir haben den Verbrennungsrückstand mit 0,5 g Rutin von allen fünf Handelsmusternn bestimmt und folgende Rückstände gewogen:

Handels-muster	Verbrennungs-rückstand
I	0,0005
II	0,0014
III	0,0003
IV	0,0011
V	0,0007

Für die Pharmakopöe schlagen wir folgende Forderung vor:

Der Verbrennungsrückstand, bestimmt mit ca. 0,5 g Substanz, darf höchstens 0,3 % betragen.

c) Gehaltsbestimmung

Die spektrophotometrische Gehaltsbestimmung wurde von Swan (140) bearbeitet. Sie wird im NF X als quantitative Bestimmung aufgeführt. Hingegen wird im NF X das Instrument vor der Messung mit einem Standard-Rutin geeicht. Nur unter diesen Bedingungen kann eine reproduzierbare Methode zur spektrophotometrischen Bestimmung des Rutingehaltes ausgearbeitet werden. Die spektrophotometrische Bestimmung wird dadurch kompliziert, dass nach unseren Forderungen 2 % Querzetin, das im gleichen Spektralbereich absorbiert wie Rutin, als Verunreinigung zuzulassen sind. Die oxydimetrische Titration der nach Hydrolyse gewonnenen Zucker, wie sie nebst der gravimetrischen Bestimmung des Querzetins im Cod.Med.Scand. aufgeführt ist, kommt als Pharmakopöemethode wegen der grossen Fehlermöglichkeiten nicht in Frage. Hingegen schlagen wir die schon erwähnte gravimetrische Bestimmung des nach Hydrolyse von Rutin gebildeten Querzetins vor. Mit Querzetin verfälschtes Rutin gibt nach Hydrolyse einen höheren Querzetingehalt, als effektiv dem Rutingehalt entsprechen würde. Der Einfluss von Querzetin

---

143) J.Naghski, E.F.Mellon, A.H.Korn und C.L.Ogg, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 41, 599 (1952)

144) D.L.Thorn und C.L.Huyck, Drug Standards 21, 199 (1953)

als Verfälschung auf den nach Hydrolyse von Rutin bestimmten Querzetingehalt ist von Hansen (139) berechnet worden. Theoretisch enthält Rutin ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3 H_2O$) 45,48 % wasserfreies Querzetin ($C_{15}H_{10}O_7$). Den Querzetingehalt haben wir nach folgender Vorschrift, die wir auch als Pharmakopöemethode vorschlagen, bestimmt:

0,25 g Rutin (genau gewogen) werden in einem Erlenmeyer von 150 ml mit 15 ml verdünnter Salzsäure und 35 ml Wasser versetzt und am Rückflusskühler während 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen in Eiswasser und Stehenlassen während 1 Stunde wird der Niederschlag auf einem Glasfiltertiegel 1G4, der vorher bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde, gesammelt. Mit 4 mal 10 ml eiskaltem Wasser wird gewaschen. Nach Trocknen bei 120° bis zur Gewichtskonstanz wird gewogen. Das Gewicht des Niederschlages muss mindestens 44,0 und darf höchstens 47,0 % des Gewichtes der eingewogenen Menge Rutin, entsprechend einem Gehalt von mindestens 98,0 % reinem Rutin, betragen.

Wir haben von unseren Handelsmustern den Querzetingehalt nach dieser Vorschrift bestimmt. Die Streuung von ±0,6 %, die wir als maximale Streuung bei 20 Gehaltsbestimmungen festgestellt haben, wurde bei der Forderung in der Vorschrift berücksichtigt. Die mit * bezeichneten Handelsmuster enthalten mehr als 2 % Querzetin (papierchromatographische Prüfung) und entsprechen nicht mehr den von uns gestellten Forderungen.

Handelsmuster	Querzetingehalt
I*	48,9 %
II	46,4 %
III	46,0 %
IV*	46,1 %
V	45,5 %

Die gravimetrische Methode ist einfach auszuführen, sie ist auch genauer als die spektrophotometrische Methode, so dass wir sie zur Aufnahme in die Pharmakopöe empfehlen. Hingegen kann mit Handelsmustern, die mehr als 2 % Querzetin nach der papierchromatographischen Prüfung enthalten, diese Methode zur Gehaltsbestimmung nicht mehr herangezogen werden.

Untersuchung der Handelsmuster

	I	II	III	IV	V
Sinnenprüfung					
Farbe	grüngelb	grüngelb	gelb	grüngelb	grüngelb
Geruch	-	-	-	-	-
Geschmack	-	-	-	-	-
Identität					
Cyanidin-Reaktion	+	+	+	+	+
Querzetin-Pentaazetyl-derivat (Smp. korr.)	162,5-165,0°	165,0-170,5°	163,4-165,0°	167,4-170,0°	163,0-169,5°
Reinheit					
Löslichkeit	=	≠	=	=	≠
Opt. Drehung	10	13	13	11	9
Chlorophyll und Farbstoffe	-	-	-	-	-
Querzetin					
a) Papierchromatographie	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
b) Spektrophotometrie Q_1	7 %	6 %	3 %	4 %	2 %
Q_2	6 %	5 %	0 %	2 %	2 %
Q_3	6 %	6 %	1 %	2 %	2 %
Fehling	-	-	-	-	-
Quantitative Bestimmungen					
Feuchtigkeit	8,7 %	8,0 %	8,3 %	8,5 %	8,0 %
Verbrennungsrückstand	0,0005	0,0014	0,0003	0,0011	0,0007
Gehalt Querzetin gravimetrisch	48,9 %	46,4 %	46,0 %	46,1 %	45,5 %

Beurteilung der Handelsmuster: Von den 5 untersuchten Handelsmustern waren Muster II und V nicht vollständig löslich in Methylalkohol. Muster I und IV enthielten mehr als 2 % Querzetin und nur Muster III entsprach unseren Forderungen.

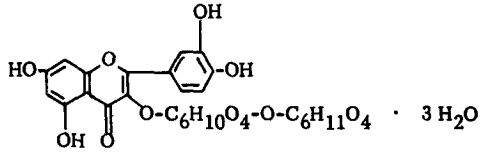
Rutinum

Syn.: Rutosidum DCI

Rutin Rutine Rutina

Rutin ist 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavonol-3-rhamnoglykosid mit einem Gehalt von mindestens 44,0 % und höchstens 47,0 % $C_{15}H_{10}O_7$.

$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3\,H_2O$ Mol.-Gew. 664,59



Prüfung: Gelbes oder höchstens schwach grünlichgelbes, feinkristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.

Ca. 1 cg Rutin werden in 5 ml Weingeist durch schwaches Erhitzen im Wasserbad gelöst. Werden dieser Lösung 1 g Zinkstaub und 5 ml verdünnte Salzsäure zugesetzt, so färbt sich die Flüssigkeit nach ca. 15 Minuten tiefrot. 5 ml dieser roten Lösung müssen auf Zusatz von 5 ml Natriumazetat einen blaugrünen bis blauvioletten Farbstoff bilden.

0,40 g Rutin müssen sich in 10 ml Methylalkohol vollständig lösen. Diese Lösung ist nach dem Verdünnen mit Methylalkohol auf 20 ml als Stammlösung zu den folgenden Prüfungen zu verwenden.

Die Extinktion der Stammlösung bei den Wellenlängen von 580 - 660 mμ darf nicht grösser sein als 0,100.

1,0 ml Stammlösung werden mit Methylalkohol zu 10 ml verdünnt (Lösung I). Zur Papierchromatographie werden 2,5 ml Lösung I mit Weingeist zu 10 ml verdünnt (Lösung II).

Chromatographierpapier Schleicher und Schüll 2043 b wird quer zur Richtung des Pfeil-Wasserzeichens in Streifen von 9 cm Breite geschnitten. Auf der Startlinie (Allgemeine Bestimmungen, Seite 53, Suppl. III) markiert man 2 Startpunkte und trägt von Lösung II am Startpunkt a 0,02 ml (entsprechend 0,010 mg Rutin) und am Startpunkt b 0,01 ml (entsprechend 0,005 mg Rutin) auf. Die Papierstreifen werden in das zur aufsteigenden Papierchromatographie vorbereitete und mit 15-proz. Essigsäure klimatisierte Gefäss (Allgemeine Bestimmungen, Seite 53, Suppl. III) während 2 Stunden vorgehängt. Nun wird sofort aufsteigend mit 15-proz. Essigsäure chromatographiert, bis die Frontlinie ca. 30 cm über die Startlinie gestiegen ist (ca. 4 Stunden). Hierauf wird das Papier sorgfältig herausgenommen, mit Bleistift die Frontlinie eingezeichnet und der Streifen anschliessend im Trockenschrank bei ca. 70° oder an der Luft getrocknet. Im ultravioletten Licht betrachtet, weist das Chromatogramm bei a und b einen bräunlichen Flecken mit einem R_f-Wert von 0,51 (±0,05) auf. Bei a darf am Start höchstens ein schwach gelb fluoreszierender Flecken, bei b hingegen gar keine gelbe Fluoreszenz sichtbar sein.

1 dg Rutin wird in einer Mischung von 5 ml Fehling I und 5 ml Fehling II bis zum einmaligen Aufkochen erhitzt und die Lösung sofort unter fliessendem Wasser abgekühlt. Innerhalb einer Minute darf weder eine Fällung noch eine Verfärbung auftreten.

Der Wassergehalt, bestimmt mit 0,2 g nach Karl Fischer, muss mindestens 7,5 % und darf höchstens 9,0 % betragen.

Der Verbrennungsrückstand, bestimmt mit ca. 0,5 g, darf höchstens 0,3 % betragen.

0,25 g Rutin (genau gewogen) werden in einem Erlenmeyer von 150 ml mit 15 ml verdünnter Salzsäure und 35 ml Wasser versetzt und am Rückflusskühler während 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen in Eiswasser und Stehenlassen während 1 Stunde wird der Niederschlag auf einem Glasfilter 1G4, das vorher bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde, gesammelt. Dann wird 4 mal mit 10 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Nach Trocknen bei 120° bis zur Gewichtskonstanz wird gewogen. Das Gewicht des Niederschlages muss mindestens 44,0 % und darf höchstens 47,0 % des Gewichtes der eingewogenen Menge Rutin betragen.

$$0{,}4548\ g\ \ C_{15}H_{10}O_7 \quad = \quad 1\ g\ \ C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3\,H_2O$$

(0,2500 g Rutin müssen also mindestens 0,1100 g und dürfen höchstens 0,1175 g Querzetin geben.)

Aufbewahrung: Vor Licht geschützt in gut verschlossenem Gefässe.

Gebrauchsdosen (Vorschlag): Dosis usitata simplex 0,05 g
Dosis usitata pro die 0,2 g

Löslichkeit: 1 T. löst sich in ca. 7700 T. Wasser, ca. 1,8 T. Weingeist.

Inkompatibilitäten: Säuren (Hydrolyse), Schwermetallsalze (Komplexbildung).

Phantasienamen: Birutan (E.M.), Rutinion (E.M.)

4 ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Apparatur zur Bestimmung des korrigierten Schmelzbereiches und die Stickstoffbestimmungsapparatur, wie sie für die Pharmakopöe vorgesehen sind, wurden beschrieben und die Erfahrungen zusammengestellt.
2. Es wurde eine allgemeine Untersuchung über die Fehlermöglichkeiten der spektrophotometrischen Messung im ultravioletten Licht angestellt. Bei Folsäure und Pyridoxinhydrochlorid wurde die Absorption in Abhängigkeit des pH-Wertes der Lösung untersucht und die bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen Absorptionskurven in Abb. 5, 6, 8 und 9 wiedergegeben. Von Cholecalciferol und Tocopherolazetat wurde die Ultraviolett-Absorptionskurve in Weingeist aufgenommen und in Abb. 7 und 11 dargestellt.
3. Die Redoxtitration chinoidartiger Verbindungen mit Cerisulfat und Titanochlorid wurde untersucht und die Cerimetrie zur Aufnahme in die Pharmakopöe empfohlen.
4. Die in der Literatur beschriebenen qualitativen Prüfungen und quantitativen Bestimmungen wurden einer kritischen Beurteilung und Ueberprüfung unterzogen.
5. Analytisch bearbeitet wurden folgende Verbindungen:

   Folsäure
   Biotin
   Cholecalciferol
   Menadion-Natriumbisulfit
   Pyridoxinhydrochlorid
   Tocopherolazetat
   Rutin

   Zur Prüfung auf Identität wurden chemische und physikalisch-chemische Methoden herangezogen. Da bei den Vitaminen Verbindungen mit ähnlicher Konstitution, aber entgegengesetzter physiologischer Wirkung bekannt sind, kann nur eine günstige Kombination von zwei bis drei Methoden eine sichere Identität gewährleisten. Aus diesem Grunde war es auch nötig, bei Folsäure die UV-Spektrophotometrie zur Identitätsprüfung heranzuziehen.

   Als Reinheitskriterien wurden die chemischen Reaktionen und die physikalisch-chemischen Methoden, vor allem die UV-Spektrophotometrie und die Papierchromatographie untersucht.

   Für die Gehaltsbestimmung hat sich die Perchlorsäure-Titration bei Pyridoxinhydrochlorid, die Cerimetrie bei Menadion-Natriumbisulfit und Tocopherolazetat, als sehr geeignet erwiesen. Die spektrophotometrische Messung im ultravioletten Licht wird für die Gehaltsbestimmung von Cholecalciferol vorgeschlagen.
6. Da die bearbeiteten Vitamine chemisch ganz verschiedene Verbindungen darstellen, wurden die einzelnen Reaktionen jeweils beim entsprechenden Einzelartikel beschrieben. Für jede Verbindung wurde ein Pharmakopöe-Artikelvorschlag redigiert.

Curriculum vitae

Am 29. Oktober 1931 wurde ich als Sohn des Hans Schmid und der Lydia, geb. Gagg, in Frauenfeld geboren. Nach dem Besuch der Primarschule in Basadingen, Thurgau, und der Sekundarschule in Diessenhofen trat ich im Frühling 1947 in die Gymnasialabteilung der Thurgauischen Kantonsschule in Frauenfeld ein, welche ich im Herbst 1951 mit dem Maturitätsexamen (Typus B) verliess.

Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Universität Lausanne, wo ich nach drei Semestern das naturwissenschaftliche Examen für Apotheker ablegte. Die dreisemestrige Praktikantenzeit verbrachte ich in der Zentral-Apotheke Dr. F. Wiesmann in Neuhausen am Rheinfall. Nach bestandener praktischer Prüfung in Zürich absolvierte ich das Assistentenjahr in der Pharmacie du Lion d'or in Lausanne und der Apotheke Dr. G. E. Brunner in Diessenhofen. Im Herbst 1955 trat ich das Fachstudium im Pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich an, welches ich mit dem Staatsexamen im Herbst 1957 abschloss. Anschliessend begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Büchi mit der vorliegenden Promotionsarbeit und gleichzeitig war ich als Assistent der Eidgenössischen Pharmakopöekommission tätig.