

33. Die potentiometrische Bestimmung der Tocopherole. Verhalten des *d,l*- α -Tocopherols bei Belichtung

von P. Karrer und H. Keller.

(30. XII. 38.)

Bei der von uns vorgeschlagenen potentiometrischen Bestimmung der Tocopherole¹⁾ mittels Gold(III)-chlorid wirken Carotinoide und ähnliche Verbindungen störend, da sie Gold(III)-chloridlösung auch reduzieren. Es ist schon früher¹⁾ darauf hingewiesen worden, dass dieser „Carotinoidfehler“ berücksichtigt werden muss.

Wir haben diese Fehlerquelle eingehender untersucht und zu ihrer Eliminierung als vorläufig einfachsten und sichersten Weg folgende Arbeitsweise befolgt: man führt mit den unverseifbaren, in Alkali unlöslichen, in Petroläther löslichen Anteilen der auf Tocopherole zu prüfenden Ausgangsmaterialien zwei parallele potentiometrische Titrations mit Gold(III)-chlorid aus, die eine mit dem unverseifbaren Rückstand ohne weitere Vorbehandlung, die andere mit dem durchgreifend acetylierten Rückstand. Durch die Acetylierung gehen die Tocopherole in die nicht reduzierenden Acetate über, während Carotinoide dabei ihr Reduktionsvermögen nicht einbüßen. Die Titration des acetylierten Rückstandes ergibt daher allein das Reduktionsvermögen der Carotinoide und ähnlicher Verbindungen, während die potentiometrische Titration des nicht acetylierten Rückstandes die Summe der Reduktionswirkungen der Tocopherole + Carotinoide anzeigt. Aus der Differenz der beiden Werte lässt sich der Tocopherolgehalt berechnen.

Die unverseifbaren, mit Alkali extrahierten Rückstände der pflanzlichen und tierischen Öle bzw. Lipoidfraktionen sind selbstverständlich frei von sauren Bestandteilen; sie können weder gewöhnliche Phenole noch Enole oder Mercaptane enthalten; schüttelt man die Rückstände noch mit wässriger Salzsäure aus, so müssen sie auch frei von Amininen sein. Nach unseren heutigen Kenntnissen können sie daher kaum irgendwelche andere stark reduzierenden Substanzen als Tocopherole und Carotinoide enthalten. Von diesen verlieren nur die ersteren ihr Reduktionsvermögen bei der Acetylierung. Die vorerwähnte Differenzbestimmung sollte daher erlauben, den Tocopherolgehalt ohne grosse Versuchsfehler zu ermitteln. (Falls reduzierende Verbindungen von Aldehydcharakter anwesend wären, würde dieser Anteil des Reduktionsvermögens, der auch nach der

¹⁾ Helv. 21, 939, 1161 (1938).

Acetylierung unverändert bliebe, bei der Differenzierung vom gesamten Reduktionsvermögen ebenfalls in Abzug kommen.)

Im Folgenden zeigen wir an künstlich zusammengestellten Gemischen von α -Tocopherol und Carotin, dass diese doppelte Titrationmethode brauchbare Werte liefert. Nach früheren Messungen¹⁾ erfordert β -Carotin bei der Oxydation ca. 8 Äquivalente Gold(III)-chlorid. Verschiedene, mit Carotin nahe verwandte Carotinoide zeigen für AuCl_3 ein ungefähr gleich grosses Reduktionsvermögen, während es bei einigen anderen etwas geringer ist und bei den Carotinoid-carbonsäuren bis auf 0 zurückgeht. Darüber orientiert eine demnächst erscheinende Abhandlung des einen von uns mit *W. Jaeger*.

Das Untersuchungsverfahren besteht also in den beiden folgenden Operationen:

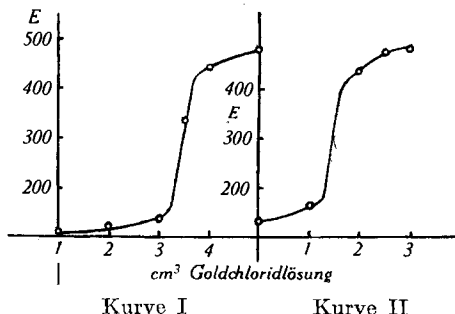
1. Titration der Tocopherole ($\alpha + \beta$) mit Einschluss der Carotinoide durch potentiometrische Bestimmung mittels AuCl_3 an einer Probe des „Unverseifbaren“.

2. Acetylierung einer zweiten Probe des Unverseifbaren mit Essigsäure-anhydrid in Pyridinlösung durch zweistündiges Erwärmen auf dem Wasserbad. Verdünnen mit Petroläther, Auswaschen der Petrolätherschicht mit verdünnter Salzsäure, hierauf mit Wasser (bis zu neutraler Reaktion). Nach dem Verdampfen des Petroläthers potentiometrische Titration des Rückstandes mit Gold(III)-chlorid.

Versuche.

A. Bestimmung des α -Tocopherols in einer künstlich hergestellten Mischung von 0,94 mg β -Carotin und 4,15 mg *d, l*- α -Tocopherol. Titrationstemperatur 65—70°.

Potential-diff.	Verbrauchte cm^3 0,01-n. AuCl_3
I 121	0,00
132	2,00
137	3,00
341	3,50
450	4,00
478	5,00
II 138	0,00
167	1,00
432	2,00
476	2,50



¹⁾ Helv. 21, 1161, 1169 (1938).

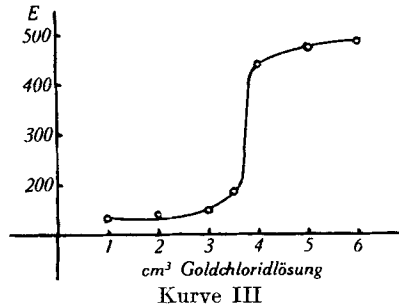
Kurve I stellt den Verbrauch an Gold(III)-chlorid für das Gemisch von Tocopherol + Carotin dar, während Kurve II den Verbrauch von Gold(III)-chlorid nach der Acetylierung des Tocopherols wiedergibt.

Mittelwert der Kurve I	3,40 cm ³ 0,01-n. AuCl ₃ -Lösung
Mittelwert der Kurve II	1,50 cm ³ 0,01-n. AuCl ₃ -Lösung
Verbraucht zur Tocopheroloxydation . . .	1,9 cm ³ 0,01-n. AuCl ₃ -Lösung
Daraus ergibt sich die Tocopherolmenge . .	$\frac{430 \times 1,9}{200} = 4,08 \text{ mg}$
gegenüber 4,15 mg, die zum Versuch angewandt worden waren.	

B. In einem weiteren Versuch wurden andere Gewichtsverhältnisse der beiden Komponenten Tocopherol und Carotin gewählt, wobei wir indessen nur das Reduktionsvermögen nach der Acetylierung bestimmten. Der durch die Veresterung eingetretene Verlust an Reduktionsvermögen wurde in diesen Fällen mit Hilfe des bekannten Reduktionsvermögens der Carotinslösung berechnet.

Einwage: 2,35 mg Carotin, 16,50 mg α -Tocopherol.

Potential-diff.	Verbrauchte cm ³ 0,01-n. AuCl ₃
III 132	1,00
143	2,00
151	3,00
186	3,50
438	4,00
471	5,00
486	6,00



Mittelwert des Potentialsprunges: 3,75 cm³ 0,01-n. AuCl₃-Lösung, statt 3,50 cm³, die 2,35 mg Carotin entsprechen würden. 0,25 cm³ AuCl₃-Lösung sind daher zur Oxydation unvollständig veresterten Tocopherols verbraucht worden, von dem somit noch 3,2% des angewandten Tocopherols vorhanden waren.

Neben Carotin und ähnlichen Pigmenten kann auch Vitamin A mit Tocopherolen zusammen vorkommen, insbesondere in Leberölen. Wie Versuche gezeigt haben, lässt sich Vitamin A mit Gold(III)-chlorid ebenfalls oxydieren, jedoch ohne einen analytisch brauchbaren Potentialsprung aufzuweisen. Bei Gegenwart von viel Vitamin A ist daher eine potentiometrische Tocopherolbestimmung mit AuCl₃ nicht ohne weiteres möglich. Wir haben versucht, ob es gelingt, Vitamin A durch die bekannte Antimontrichloridreaktion zu zerstören, ohne dass die Tocopherole dabei in Mitleidenschaft gezogen werden.

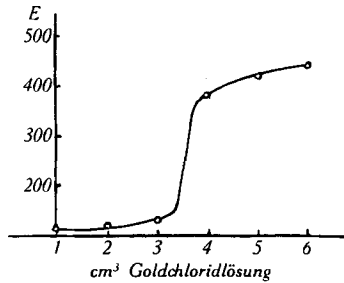
Zu diesem Zweck haben wir zu einer bekannten Menge Tocopherol in Chloroformlösung Vitamin A zugesetzt und mit einem Überschuss von Antimontrichlorid in Chloroform ca. eine halbe Stunde stehen gelassen. Hierauf wurde die Chloroformschicht zwecks

Extraktion der Antimonverbindungen mit 19-proz. wässriger Salzsäure ausgezogen und anschliessend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers gewaschen. Da die wässrige Salzsäure etwas Chloroform löst, ist es notwendig, die salzsauren Waschwasser mit etwas frischem Chloroform auszuschütteln und diesen Chloroform-extrakt mit der Hauptmenge zu vereinigen.

Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels aus den vereinigten Chloroformextrakten wurde im Rückstand das Tocopherol in gewohnter Weise potentiometrisch mit AuCl_3 bestimmt.

a) Angewandt wurde eine Tocopherollösung, die 0,825 mg Tocopherol pro cm^3 enthielt und der pro cm^3 ca. 1 mg eines Vitamin-A-Präparates mit ca. 5000 C.L.O.-Einheiten zugesetzt worden war. Nachfolgende Zerstörung des A-Vitamins durch AuCl_3 . Zur Bestimmung verwendet: 10 cm^3 Lösung.

Potential-diff.	Verbrauchte cm^3 0,01-n. Au-Cl_3 -Lösung
IV. 170	1,00
181	2,00
203	3,00
428	4,00
472	5,00



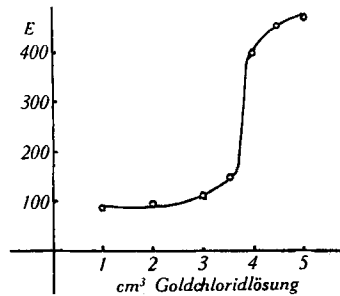
Kurve IV

Mittelwert des Potentialsprungs: 3,5 cm^3 0,01-n. AuCl_3 -Lösung.

Dies entspricht 7,52 mg α -Tocopherol statt der angewandten 8,25 mg.

b) Angewandt 8,25 mg α -Tocopherol; Zusatz pro cm^3 ca. 1 mg Vitamin-A-Präparat mit 5000 C.L.O.-Einheiten. Nachfolgende Zerstörung des A-Vitamins durch Antimontrichloridlösung.

Potential-diff.	Verbrauchte cm^3 0,01-n. AuCl_3 -Lösung
V 091	1,00
101	2,00
118	3,00
148	3,50
408	4,00
445	4,50
468	5,00



Kurve V

Mittelwert des Potentialsprungs: 3,75 cm^3 0,01-n. AuCl_3 -Lösung, entsprechend 8,06 mg α -Tocopherol statt der angewandten 8,25 mg.

Diese beiden Beispiele zeigen, dass es möglich ist, Tocopherol neben Vitamin A zu bestimmen, wenn man letzteres vorher mit Antimontrichlorid zerstört.

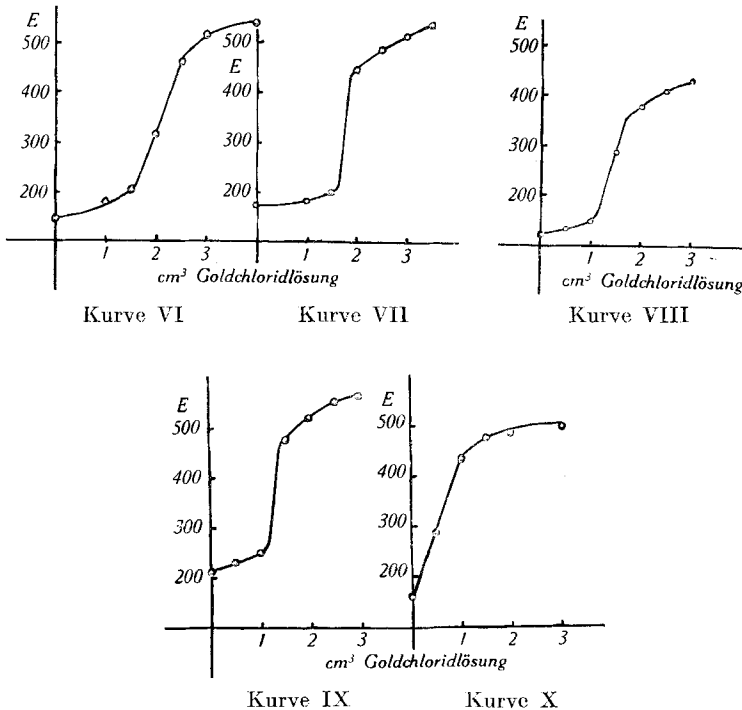
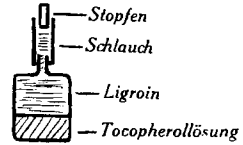
Auf die Anwendung der vorbeschriebenen Methoden zur Ermittlung des Tocopherolgehaltes in tierischen Organen kommen wir in einer späteren Mitteilung zurück.

Die folgenden Versuche sind mit der Absicht ausgeführt worden, das Verhalten der Tocopherole bei Belichtung zu studieren. Über Lichtempfindlichkeit der Tocopherole war bisher kaum etwas bekannt; es hat sich gezeigt, dass diese sehr beträchtlich ist.

1) Bestrahlung unter Luftzutritt. Zur Anwendung kam eine alkoholische Lösung von *d,l*- α -Tocopherol, die 0,825 mg Tocopherol pro cm^3 enthält. Sie verlor innert 3 Stunden Bestrahlungszeit ihr Reduktionsvermögen vollkommen, wie sich aus den folgenden potentiometrischen Messungen (mit Gold(III)-chlorid) ergibt:

Potentialdiff.	AuCl ₃ -Lösung	Potentialdiff.	AuCl ₃ -Lösung
Bestrahlungszeit: $\frac{1}{2}$ Stunde (Kurve VI)		Bestrahlungszeit: 1 Stunde (Kurve VII)	
145	0,00	175	0,00
182	1,00	184	1,00
206	1,50	206	1,50
316	2,00	445	2,00
455	2,50	487	2,50
512	3,00	513	3,00
547	4,00	542	3,50
Mittelwert des Potentialsprungs: 2,05 cm^3 AuCl ₃		Mittelwert des Potentialsprungs: 1,75 cm^3 AuCl ₃	
Bestrahlungszeit: 1 $\frac{1}{2}$ Stunden (Kurve VIII)		Bestrahlungszeit: 2 Stunden (Kurve IX)	
215	0,00	209	0,00
228	0,50	234	0,50
239	1,00	248	1,00
251	1,50	479	1,50
468	2,00	520	2,00
528	2,50	550	2,50
569	3,00	570	3,00
Mittelwert des Potentialsprungs: 1,50 cm^3 AuCl ₃		Mittelwert des Potentialsprungs: 1,25 cm^3 AuCl ₃	
Bestrahlungszeit: 3 Stunden (Kurve X)		1 cm^3 der hier verwendeten AuCl ₃ -Lösung entsprach 1,715 cm^3 0,01-n. AuCl ₃ - Lösung.	
167	0,00		
290	0,50		
435	1,00		
476	1,50		
Mittelwert des Potentialsprungs: 0,50 cm^3 AuCl ₃ .			

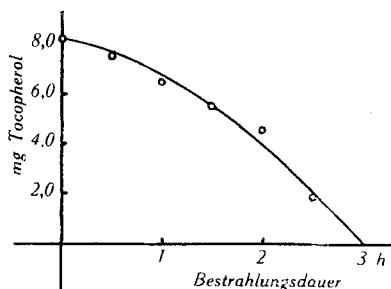
Sämtliche Bestrahlungen wurden mit der Analysenquarzlampe ausgeführt. Bei den Bestrahlungsversuchen unter Luftzutritt haben wir die *d,l*- α -Tocopherollösungen in offener Krystallisierschale unter die Lampe gestellt (Distanz zwischen Schale und Lampe ca. 30 cm). Zu den Bestrahlungen unter Luftausschluss dienten flache Quarzgefäße (vgl. nebenstehende Figur) (Inhalt 30 cm³), deren Füllung wir in folgender Weise vornahmen: zuerst wurde das Gefäß mit Stickstoff ausgespült, dann die Tocopherollösung eingegossen, nachher mit Ligroin, das in Stickstoffatmosphäre destilliert worden war, überschichtet. Den Abschluss des Gefäßes bildete ein Stückchen Schlauch, das ebenfalls vollständig mit Ligroin gefüllt und durch einen Glasstab verschlossen war. Das gefüllte Gefäß wurde unter der Lampe, im Abstand von 30 cm von dieser, belichtet.



Auch eine alkoholische *d,l*- α -Tocopherollösung, die 2 Stunden unter Luftausschluss mit der Analysenquarzlampe bestrahlt worden war, hatte in dieser Zeit 48 % ihres ursprünglichen Tocopherolgehaltes eingebüßt.

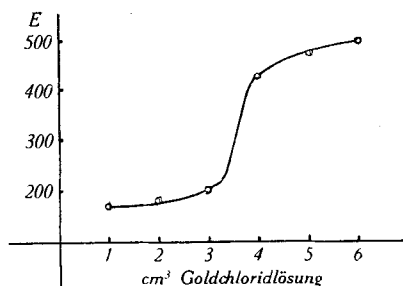
Die Abnahme des Tocopherolgehaltes hing bei diesem Versuch somit in folgender Weise von der Bestrahlungsdauer ab:

Bestrahlungsdauer	mg Tocopherol pro cm ³	Abnahme in %
0 Stunden	8,25	0
½ Stunde	7,56	8,37
1 Stunde	6,45	21,82
1½ Stunden	5,54	32,85
2 Stunden	4,70	43,03
2½ Stunden	1,88	77,22
3 Stunden	0,00	100



Kurve XI

2) Bestrahlung unter Luftausschluss. Die benutzte Lösung von *d,l*- α -Tocopherol in Ligroin enthielt pro cm³ 6,47 mg Tocopherol. Bestrahlungsdauer 2 Stunden. Die nach der Bestrahlung aufgenommene Titrationskurve (XII) ergab noch einen Tocopherolgehalt von 3,76 mg pro cm³, was einer Abnahme von 42,2% entspricht.



Kurve XII

Diese Versuche beweisen, dass α -Tocopherol gegen Ultraviolettlicht empfindlich ist. Es sind Versuche im Gang, die gebildeten Bestrahlungsprodukte aufzuklären und allgemein die Abhängigkeit der Lichtempfindlichkeit der Oxychromanverbindungen von ihrer Konstitution zu erforschen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.