

Kaliumhydroxyd nach rechts und durch Zusatz von Kaliumjodid nach links verschoben werden kann.

2. Ein Umsatz erfolgt nur in alkalischer Lösung. Unter einem  $p_{\text{H}}$ -Wert von 12,0 tritt keine Reaktion ein.

3. In Lösungen von 2- bis 12-n. KOH und einer Temperatur von 18—70° scheidet sich „Oxydimercuriammoniumjodid“ ab.

4. In Lösungen von 0,01- bis 1-n. KOH scheidet sich ausser dem „Oxydimercuriammoniumjodid“ noch eine Verbindung dieses Körpers mit Quecksilber(II)-jodid ab (Doppeljodid).

5. In 0,01- bis 0,1-n. KOH ist die Ausfällung nicht quantitativ.

6. Bei der Durchführung von kolorimetrischen Bestimmungen wird zuerst die Prüflösung auf einen Alkaligehalt von 0,105—0,135-n. NaOH oder KOH eingestellt und nachher wird die Kaliumjodomercurat(II)-Lösung zugegeben.

7. Die Kaliumjodomercurat(II)-Lösung, welche als Reagens verwendet wird, enthält einen Überschuss von Quecksilber(II)-jodid, welches mit dem beim Umsatz sich bildenden Kaliumjodid Kaliumjodomercurat(II) bildet.

Dieses Reagens gibt in dem angegebenen Alkalibereich gefärbte, praktisch optisch leere Lösungen.

Herr *Hans Georg Müller* hat mich bei den Untersuchungen unterstützt, wofür ich ihm meinen besten Dank ausspreche.

Chem. Labor. der Société de la Viscose suisse, Emmenbrücke.

---

## 149. Eine fluorometrische Methode zur Bestimmung von Tocopherol

von **M. Kofler**.

(00. IX. 42.)

Bisher sind folgende chemische Methoden zur Bestimmung der Tocopherole bekannt geworden:

1. Tocopherol wird in alkoholischer Lösung mit Gold(III)-chlorid oxydiert und der Endpunkt der Oxydation potentiometrisch festgestellt<sup>1)</sup>.

2. Die Oxydation wird mit Eisen(III)-chlorid in Gegenwart von  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl<sup>2)</sup> bzw. Kaliumhexacyanoferrat(III)<sup>3)</sup> durchgeführt. Die dabei entstandenen Eisen(II)-ionen geben mit  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl bzw. Kaliumhexacyanoferrat(III) farbige Komplexverbindungen. Es wird die Extinktion der farbigen Lösungen gemessen.

<sup>1)</sup> *Karrer, P.* und Mitarbeiter, *Helv.* **21**, 939, 1161 (1938); **22**, 253, 617 (1939).

<sup>2)</sup> *Emmerie, A.* und *Engel, Ch.*, *R.* **57**, 1351 (1938); **58**, 283 (1939).

<sup>3)</sup> *Meunier, P.* und *Vinet, A.*, *C. r.* **211**, 611 (1940).

3. Tocopherol wird mit Cer(IV)-sulfat oder Bleitetraacetat oxydiert und der Endpunkt potentiometrisch, oder im ersten Falle einfacher mit Diphenylamin als Redoxindikator bestimmt<sup>1)</sup>.

4. Tocopherol wird durch Erhitzen mit konz. Salpetersäure in ein rotes Oxydationsprodukt übergeführt; gemessen wird die Intensität der roten Farbe<sup>2)</sup>.

Mit Ausnahme der letzten sind alle diese Methoden unspezifisch. Es sind reine oxydimetrische Methoden, bei denen direkt oder indirekt der Verbrauch an Oxydationsmittel gemessen wird. Dagegen wird bei der letzten Methode (*Furter-Meyer-Reaktion*) die rote Farbe eines Tocopherolderivates, des sogenannten „Tocopherolrots“ gemessen. Da aber auch andere Substanzen beim Behandeln mit Salpetersäure braunrote Lösungen geben, kann auch diese Methode bei niedrigen Tocopherolgehalten nicht als spezifisch angesehen werden.

Nach den Untersuchungen von *Smith, Irwin* und *Ungnade*<sup>3)</sup> und von *John* und *Emte*<sup>4)</sup> liegt im Tocopherolrot ein Ortho-chinon vor. Der Beweis gründet sich darauf, dass Tocopherolrot mit o-Phenylendiamin ein intensiv fluoreszierendes Phenazinderivat liefert.

Es schien mir gegeben, die Fluoreszenzintensität dieses Phenazinderivates zur Bestimmung des Tocopherols heranzuziehen.

Der im experimentellen Teil näher beschriebenen Methode liegt folgendes Verfahren zu Grunde: Tocopherol wird in äthylalkoholischer Lösung mit konz. Salpetersäure zum Tocopherolrot oxydiert, dieses ausgeäthert und in Eisessig in der Wärme mit o-Phenylendiamin zu einem Phenazinderivat kondensiert; letzteres wird in Methylalkohol aufgenommen und seine Fluoreszenzintensität gemessen. Das Phenazinderivat zeigt eine besonders intensive gelbgrüne Fluoreszenz in Alkoholen und unter diesen erwies sich Methylalkohol als dasjenige Lösungsmittel, in welchem die stärkste Fluoreszenz auftritt.

Nach den Untersuchungen von *John* und Mitarbeitern<sup>5)</sup> entsteht bei der Einwirkung von Salpetersäure auf Tocopherol keine einheitliche Substanz. Bei der vorliegenden Methode wird auf eine Isolierung des Tocopherolrots verzichtet.

Die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit ergab, dass 1  $\gamma$  Tocopherol in Form seines Phenazinderivates in 5 cm<sup>3</sup> Methylalkohol noch eine deutliche Fluoreszenz zeigt, 5  $\gamma$  fluoreszieren schon kräftig. Die Methode ist also viel empfindlicher als die bekannten Bestimmungsverfahren.

Die Genauigkeit der Methode hängt wesentlich von dem zur fluorometrischen Intensitätsmessung benutzten Apparat ab. Bei

<sup>1)</sup> *Kofler, M.*, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **1941**, 239.

<sup>2)</sup> *Furter, M.* und *Meyer, R. E.*, Helv. **22**, 240 (1939).

<sup>3)</sup> *Smith, L. J.*, *Irwin, W. B.* und *Ungnade, H. E.*, Am. Soc. **61**, 2424 (1939).

<sup>4)</sup> *John, W.* und *Emte, W.*, Z. physiol. Ch. **268**, 85 (1941).

<sup>5)</sup> *John, W.* und *Emte, W.*, Z. physiol. Ch. **261**, 25 (1938); **268**, 85 (1941).

visuellem Vergleich vor der Quarzlampe kann sie mit ca.  $\pm 15\%$  angegeben werden. Bei Verwendung eines Fluorometers (ein solches stand nicht zur Verfügung) dürfte sich eine grössere Genauigkeit erreichen lassen.

Hinsichtlich der Spezifität der Methode ist zu sagen, dass alle Substanzen, welche bei der Oxydation mit Salpetersäure ein o-Chinon liefern, ebenfalls fluoreszierende Phenazinderivate geben können. Unter diesen Substanzen ist aber bei einer Tocopherolbestimmung nur mit jenen zu rechnen, die lipoidlöslich sind, da man der Bestimmung eine Verteilung zwischen Wasser und Lipoidlösungsmittel vorausschicken kann. Wasserlösliche bzw. lipoidunlösliche, o-Chinon bildende Substanzen, die in Naturprodukten vorkommen können, wie Adrenalin, stören daher die Bestimmung nicht.

Neben  $\alpha$ -Tocopherol, mit welchem die beschriebene Methode ausgearbeitet wurde, gibt auch  $\beta$ -Tocopherol nach Angaben der Literatur<sup>1)2)</sup> ein entsprechendes o-Chinon bzw. Phenazinderivat. Eine getrennte Bestimmung der beiden Tocopherole ist auf diesem Wege also nicht möglich.

Tocopherolrot bildet sich auch bei der Einwirkung von Salpetersäure auf Tocopheryl-chinon, welches die Endstufe des bei den eingangs erwähnten oxydimetrischen Methoden ablaufenden Oxydationsvorgangs darstellt und welches möglicherweise als Begleitsubstanz der natürlichen Tocopherole auftritt. Vom Tocopherol lässt sich Tocopheryl-chinon chromatographisch trennen: Beim Entwickeln eines an Floridin XS adsorbierten Gemisches von Tocopherol und Tocopheryl-chinon zeigt Tocopheryl-chinon eine viel grössere Haftfestigkeit als Tocopherol, das sich mit Benzol eluieren lässt. Durch eine selektive Adsorption dürften auch die meisten fluoreszierenden Stoffe, die unter Umständen Tocopherol in den Lipoidextrakten begleiten können, von Tocopherol bzw. seinem Phenazinderivat abtrennbar sein. Letzteres fluoresziert auch im adsorbierten Zustand kräftig, was eine Abtrennung von anderen fluoreszierenden Begleitsubstanzen erleichtert. Unter den Begleitsubstanzen ist vor allem an Verbindungen vom Typus des Vitamin K und an andere hydroxylierte Naphthalinderivate zu denken.

Im Falle der Bestimmung von Tocopherol im Serum musste eine solche chromatographische Trennung zu Hilfe genommen werden. Darüber wird an anderer Stelle berichtet.

Wie bei allen fluorometrischen Messungen ist auch hier mit Fluoreszenzauslöschung zu rechnen. Tatsächlich ergab sich, dass falls zu den im Verlauf der Reaktion notwendigen Extraktionen Äther verwendet wird, die Fluoreszenz des Phenazinderivates zum Teil ausgelöscht wird. Bei Verwendung von frisch destilliertem Äther tritt

<sup>1)</sup> John, W. und Emte, W., Z. physiol. Ch. **261**, 25 (1938); **268**, 85 (1941).

<sup>2)</sup> John, W., Z. physiol. Ch. **250**, 11 (1937).

diese Erscheinung nicht auf, der gereinigte Äther ist aber nur kurze Zeit haltbar. Bei Verwendung von tiefsiedendem Petroläther trat diese Schwierigkeit nicht auf.

Das aus Tocopherol erhaltene Phenazinderivat ist gelb gefärbt und weist im Sichtbaren (auch im U. V., vgl. *John* und *Emte*<sup>1</sup>) eine viel höhere Extinktion auf als Tocopherolrot, so dass sich hierauf auch eine kolorimetrische Bestimmungsmethode gründen lassen würde.

### Experimenteller Teil.

Herstellung einer Lösung der auf Tocopherol zu untersuchenden Substanz in Äthylalkohol.

Die auf Tocopherol zu untersuchende Substanz bzw. deren Lipoidextrakt wird in einer solchen Menge absoluten Alkohols gelöst, dass 10 cm<sup>3</sup> der Lösung höchstens 1 mg Tocopherol enthalten. Die dazu nötige Menge muss eventuell durch einen Vorversuch ermittelt werden.

### Oxydation mit Salpetersäure.

10 cm<sup>3</sup> der alkoholischen Lösung werden mit 2 cm<sup>3</sup> konz. Salpetersäure versetzt, zum Sieden erhitzt und 5 Minuten auf dem Wasserbad im Sieden erhalten. Ein kurzes Unter- oder Überschreiten dieser Zeit ist belanglos. Die Lösung färbt sich dabei je nach dem Gehalt an Tocopherol gelb bis rot. Man kühlt sie ab und giesst sie zusammen mit 15 cm<sup>3</sup> tiefsiedendem Petroläther (gereinigt durch Destillation) in ein 50 cm<sup>3</sup> Scheidetrichterchen, verdünnt mit Wasser und schüttelt aus. Der Petroläther wird einmal mit Wasser gewaschen und hierauf auf dem Wasserbad vertrieben.

Die Oxydation mit Salpetersäure wurde in Äthylalkohol durchgeführt, weil sich dieser auswaschen lässt. Für die *Furter-Meyer*-Reaktion an sich ist es empfehlenswerter, Butylalkohol zu verwenden<sup>2</sup>).

Falls Tocopherol zum Teil in veresterter Form vorliegt, wird unter den angegebenen Bedingungen nur ein unwesentlicher Teil des Esters verseift, so dass man auf diesem Wege nur das freie Tocopherol bestimmt. Zur Bestimmung des Gesamt-Tocopherolgehaltes ist der Behandlung mit Salpetersäure eine Verseifung vorzuschicken.

### Kondensation mit o-Phenylendiamin.

Den nach dem Vertreiben des Petroläthers erhaltenen Rückstand von Tocopherolrot versetzt man mit 5 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Lösung von o-Phenylendiamin in Eisessig, erhitzt zum Sieden und stellt das

<sup>1</sup>) *John, W.* und *Emte, W.*, Z. physiol. Ch. **268**, 85 (1941).

<sup>2</sup>) *Quackenbush, F. W.*, *Gottlieb, H. L.* und *Steenbock, H.*, Ind. Eng. Chem. **33**, 1276 (1941).

Kölbchen während 1 Stunde aufs Wasserbad (ein längeres Erhitzen führt nur zu unwesentlich höheren, ein nur 10 Minuten langes Erhitzen dagegen zu bedeutend kleineren Ausbeuten). Man kühlt ab und giesst die Lösung zusammen mit 15 cm<sup>3</sup> tiefsiedendem Petroläther in ein 50 cm<sup>3</sup>-Scheidetrichterchen, verdünnt mit Wasser und schüttelt aus. Die Petrolätherphase wird hintereinander mit Wasser, verdünnter Salzsäure, verdünnter Lauge und Wasser gewaschen, der Petroläther vertrieben und der Rückstand in 10 cm<sup>3</sup> Methylalkohol aufgenommen.

#### Bestimmung der Fluoreszenzintensität.

Die Lösung des Phenazins in Methylalkohol vergleicht man vor der Quarzlampe (oder in einem Fluorometer) mit einer aus einer bekannten Menge (höchstens 1 mg) in analoger Weise hergestellten Vergleichslösung. Beim Vergleich vor der Analysenlampe verdünnt man die intensiver fluoreszierende Lösung mit Methylalkohol bis zur Erreichung gleicher Fluoreszenzhelligkeit, oder man stellt sich eine Verdünnungsreihe her. Aus dem Verdünnungsgrad errechnet man den Tocopherolgehalt der ursprünglichen Lösung (vgl. etwa das analoge Verfahren bei der Bestimmung des Vitamin B<sub>1</sub>). Es ist vorteilhaft, den Tocopherolgehalt beim Bereiten der Vergleichslösung so zu bemessen, dass keine allzu grossen Verdünnungen ausgeführt werden müssen, denn da die sich abspielenden chemischen Reaktionen nicht vollständig verlaufen, besteht eine Abhängigkeit zwischen Tocopherolgehalt und Ausbeute an Phenazin.

Sollte die zu untersuchende Lösung beim Vergleich vor der Quarzlampe eine weissliche Nebenfluoreszenz aufweisen, so wird der Vergleich der beiden Lösungen bei Betrachtung durch eine Brille mit braunen Gläsern bedeutend erleichtert.

Als Beispiel sei die Bestimmung des Tocopherolgehaltes eines einige Jahre alten, in einer verkorkten Flasche aufbewahrten Weizenkeimöles beschrieben.

1 g des Weizenkeimöles wurde in 15 cm<sup>3</sup> einer absoluten 4-n. methylalkoholischen Kalilauge im Stickstoffstrom verseift. Hierauf wurde mit tiefsiedendem Petroläther ausgeäthert und die Lösung des Unverseifbaren in Petroläther auf 50 cm<sup>3</sup> gebracht. Von dieser Lösung wurden 10 cm<sup>3</sup> (entsprechend 0,2 g Öl) entnommen, der Petroläther abgedampft, der Rückstand in 10 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol aufgenommen und diese Lösung, wie oben beschrieben, mit 2 cm<sup>3</sup> konz. Salpetersäure oxydiert. Der Petrolätherextrakt dieser Lösung wurde nach Vertreiben des Petroläthers mit 5 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Lösung von o-Phenylendiamin in Eisessig 1 Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt, wiederum mit Petroläther extrahiert und der Rückstand nach Vertreiben des Petroläthers in 10 cm<sup>3</sup> Methylalkohol aufgenommen. Die Vergleichslösung wurde in derselben Weise hergestellt, ausgehend von einer Lösung von 250  $\gamma$  Tocopherol in 10 cm<sup>3</sup> Alkohol. Die beiden Lösungen wurden in Quarzreagensgläsern vor der Analysenlampe verglichen. Bis zur Erreichung gleicher Fluoreszenzhelligkeit mussten 5 cm<sup>3</sup> der Vergleichslösung auf 6,5 cm<sup>3</sup> verdünnt werden. 6,5 cm<sup>3</sup> der verdünnten Vergleichslösung und somit auch der zu untersuchenden Lösung enthalten 125  $\gamma$  Tocopherol (als Phenazinderivat), somit enthalten

10 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Lösung (entsprechend 0,2 g Öl) 192  $\gamma$  Tocopherol. Der Gehalt des Öles an Tocopherol beträgt somit ca. 100 mg%. Die Gehaltsbestimmung nach der Dipyridyl-Methode ergab 140 mg%.

### Allgemeine Bemerkungen.

In jedem Falle hat man sich zu überzeugen, ob Fluoreszenzauslöschung durch Begleitsubstanzen auftritt. Zu diesem Zwecke versetzt man Probelösung und Vergleichslösung nach Erreichen gleicher Fluoreszenzhelligkeit mit der gleichen Menge einer verdünnten Lösung des Tocopherol-Phenazinderivates in Methylalkohol. Die Intensitätsgleichheit muss erhalten bleiben, ansonst besteht teilweise Fluoreszenzauslöschung. In diesem Falle müssen die störenden Stoffe entfernt werden; in welcher Weise, ist von Fall zu Fall zu entscheiden. Bei der Bestimmung des Tocopherols im Serum bedient man sich zur Abtrennung des Phenazinderivates einer chromatographischen Adsorption an Aluminiumoxyd.

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien  
der *F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G.*

29. September 1942.

---

## 150. Über die Durchdringbarkeit der Cellulosefasern

von A. Frey-Wyssling und H. Speich.

(9. X. 42.)

Die Durchdringbarkeit der Textilfasern spielt technisch eine wichtige Rolle für verschiedene Probleme der Färbbarkeit, der Beschwerung, der Faserveredelung (permutoiden Umwandlungen) usw. Es soll daher eine optische Methode mitgeteilt werden, die gestattet, zu entscheiden, ob eine Flüssigkeit in die Fasern eindringt (Imbibition) oder sie nur umhüllt (Immersion). Sie beruht auf dem Effekte der Stäbchendoppelbrechung.

### 1. Stäbchendoppelbrechung.

Da die Cellulosefasern Stäbchenmischkörper vorstellen, in deren submikroskopische Spalträume Flüssigkeiten eindringen können, zeigen sie den interessanten Effekt der Formanisotropie, d. h. ihre Doppelbrechung ist nicht konstant wie bei homogenen Krystallen, sondern sie ist eine Funktion des Brechungsvermögens vom Einlussmittel. Nach der Mischkörpertheorie von *Wiener* folgt diese Abhängigkeit einem hyperbolischen Gesetze; das heisst, wenn man in der graphischen Darstellung auf der Ordinate die gemessene Doppelbrechung und auf der Abszisse den Brechungsindex des