

## 199. Die fluorometrische Methode zur Bestimmung von Tocopherol.

2. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Die Bestimmung im Serum, in Milch, tierischen und pflanzlichen Fetten

von M. Kofler.

(28. X. 43.)

In der vorangegangenen Mitteilung<sup>1)</sup> wurde eine Methode zur Bestimmung von Tocopherol beschrieben, die spezifischer und empfindlicher ist, als die bisher bekannt gewordenen chemischen Bestimmungsverfahren. Sie beruht auf der Überführung von Tocopherol in ein Phenazinderivat, dessen Fluoreszenzintensität gemessen wird.

Die Methode wurde seither zur Bestimmung des Tocopherolgehaltes verschiedener Naturprodukte herangezogen, wobei es sich stets als nötig erwies, zur Elimination von Nebenfluoreszenzen das Phenazinderivat chromatographisch zu reinigen. Dasselbe hat dann aber auch mit den Vergleichslösungen zu geschehen, die aus einer bekannten Menge von Tocopherol bereitet werden.

Es ist schon in der ersten Mitteilung darauf hingewiesen worden, dass bei der Oxydation von Tocopherol mit Salpetersäure kein einheitliches Produkt entsteht. Dies lässt sich leicht durch Zonenbildung bei der chromatographischen Trennung an Aluminiumoxyd zeigen. Selbst wenn aber nach vorangegangener chromatographischer Trennung reines „Tocopherolrot“ mit o-Phenylendiamin kondensiert wird, entsteht wiederum kein einheitliches Produkt, sei es, dass die Umsetzung nicht vollständig ist oder dass Nebenprodukte entstehen. Diese Nebenprodukte beeinflussen die Fluoreszenz des Phenazinderivates. Für die fluorometrische Bestimmung von Tocopherol ist es aber wichtig, dass die Vergleichslösungen und die Lösung unbekanntes Gehaltes die gleiche Fluoreszenzfarbe zeigen. Bei Ausgangsprodukten, die sehr reich an Tocopherol sind, wie Öle pflanzlicher Keime, würde sich wegen des Zurücktretens störender Begleitstoffe eine chromatographische Reinigung zwar erübrigen; da es sich aber empfiehlt, als Vergleichslösungen einen Satz von chromatographisch gereinigten Phenazininlösungen zu verwenden, so ist es nötig, die auf Tocopherol zu untersuchenden Extrakte in jedem Falle auf chromatographisch gereinigtes Phenazinderivat zu verarbeiten. Der Satz von Vergleichslösungen kann aber nicht einfach durch beliebiges Verdünnen einer Stammlösung hergestellt werden, denn wie schon in der 1. Mitteilung beschrieben wurde, besteht eine Konzentrationsabhängigkeit der Ausbeute bei der Überführung von Tocopherol in sein Phenazinderivat

<sup>1)</sup> 1. Mitt.: Helv. 25, 1469 (1942).

und zwar in dem Sinne, dass grössere Konzentrationen grössere prozentuale Ausbeuten ergeben. Die unter Stickstoff in Reagensgläsern eingeschmolzenen Vergleichslösungen des Phenazinderivates in Methylalkohol zeigten nach 6-monatigem Aufbewahren im Dunkeln die gleiche Fluoreszenzintensität wie frische Lösungen. Auch nach mehrstündigem Bestrahlen durch die Quarzlampe konnte keine Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt werden.

In der 1. Mitteilung wurde darauf hingewiesen, dass sich auf die gelbgrüne Farbe des Phenazinderivates auch ein kolorimetrisches Bestimmungsverfahren gründen liesse. Für die Bestimmung des Tocopherols im Serum erwies sich aber diese kolorimetrische Methode als zu unempfindlich, da es, besonders bei der Untersuchung menschlicher Seren, erwünscht ist, mit kleinen Mengen an Serum (für die fluorometrische Methode genügen 5 cm<sup>3</sup> vollständig) auszukommen. Bei der Analyse von Ölen dagegen entsteht eine genügend starke Grünfärbung, doch zeigte es sich, dass sie bisweilen nicht allein vom Tocopherol-Phenazinderivat herrührt, so dass dann eine Bestimmung auf diesem Wege zu hohe Werte liefert.

Mit viel intensiverer grüner Farbe als in Methanol löst sich das Phenazinderivat in konzentrierter Schwefelsäure. Auch für diese Lösungen wurden Extinktionskurven aufgenommen, doch versagt auch dieses kolorimetrische Verfahren bei der Bestimmung von Tocopherol im Serum und wohl auch bei der Analyse vieler Naturprodukte, weil die Lösung in Schwefelsäure durch Zersetzung von Begleitsubstanzen eine mehr bräunliche Farbe annimmt. Dieses kolorimetrische Verfahren leistete aber gute Dienste bei der Bestimmung der Verluste, welche beim Chromatographieren durch zu weitgehendes Entwickeln und ungenügendes Auswaschen entstehen.

Die Bestimmung von Tocopherol im Serum. Von den bekannten Bestimmungsmethoden scheidet jene aus, welche massanalytisch Tocopherol oxydieren, etwa mit Gold(III)-chlorid oder Cer(IV)-sulfat. Bei einem Gehalt der Grössenordnung 1 mg %, wie er auf Grund oxydimetrisch-kolorimetrischer Methoden für das menschliche Serum bestimmt wurde, wären zur Oxydation des Tocopherols von 10 cm<sup>3</sup> Serum nur ca. 0,05 cm<sup>3</sup> einer 0,01-n. Lösung des Oxydationsmittels erforderlich. Auch die an sich spezifischere *Furter-Meyer*-Reaktion ist zu unempfindlich. Die Bestimmung des Tocopherolgehaltes erfolgte deshalb bisher stets kolorimetrisch, indem die bei der Oxydation von Tocopherol durch Eisen(III)-chlorid in Gegenwart von  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl<sup>1)</sup> resp. Kaliumhexacyanoferrat(III)<sup>2)</sup> gebildeten farbigen Eisen(II)-Komplexe in ihrer Farbintensität gemessen werden. Die Spezifität dieser an sich sehr unspezifischen, rein

<sup>1)</sup> *Emmerie, A. und Engel, Chr., R. 58, 895 (1939); Emmerie, A., R. 61, 305 (1942); Mayer, G. G. und Sobotka, H., J. Biol. Chem. 143, 695 (1942).*

<sup>2)</sup> *Vinet, A. und Meunier, P., C. r. 213, 709 (1941).*

oxydimetrischen Methoden wird erhöht durch Adsorption des Serum-extraktes an Floridinerde, wobei Carotinoide entfernt werden oder durch Bestimmung des Tocopherolgehaltes vor und nach einer Acetylierung<sup>1)</sup>; schliesslich kann der Extrakt einer Molekulardestillation unterworfen werden<sup>2)</sup>.

Die fluorometrische Bestimmung des Tocopherols als Phenazinderivat gestattet nun den Tocopherolnachweis im Serum spezifischer und empfindlicher zu gestalten. Die vorgängige Extraktion des Tocopherols aus Serum wird mit Petroläther durchgeführt, teils direkt, teils nach einer alkalischen Verseifung im Stickstoffstrom. Letzteres Verfahren liefert um ca. 10 % niedrigere Werte (wohl infolge Zerstörung des Tocopherols). Dies konnte in Versuchen mit und ohne Zusatz von Tocopherol unter Verwendung der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion festgestellt werden. Bei Verwendung der anderen empfohlenen Extraktionsverfahren<sup>1)3)</sup> erwiesen sich die Verluste als wesentlich grösser. Unter Berücksichtigung des Verseifungsverlustes wird zugesetztes Tocopherol durch die fluorometrische Methode innerhalb der Fehlergrenzen von  $\pm 15\%$  richtig erfasst.

Tocopherolgehalt verschiedener Seren.

|   | fluorometrisch<br>ermittelt | oxydimetrisch<br>ermittelt |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| Mensch . . . . .                                | 0,4—1,4 mg%                 | 0,2—2,6 mg% <sup>4)</sup>  |
| Rind . . . . .                                  | 0,2—1,5 mg%                 | 0,2—0,5 mg% <sup>5)</sup>  |
| Hund. . . . .                                   | 0,3 mg%                     |                            |
| Kaninchen . . . . .                             | 0,45 mg%                    | 0,80—3 mg% <sup>6)</sup>   |
| Meerschweinchen. . . . .                        | 0,15—0,25 mg%               |                            |
| Ratte. . . . .                                  | 0,20—0,25 mg%               | 0,2—0,5 mg% <sup>7)</sup>  |
| Ratte 3 Monate auf<br>Vit. E-fr. Diät . . . . . | 0 mg%                       |                            |
| Pferd . . . . .                                 | 0,2 mg%                     |                            |

In der obenstehenden Tabelle sind die fluorometrisch ermittelten Werte den aus der Literatur bekannten Daten gegenübergestellt. Für das menschliche Serum stimmen die Werte recht gut überein. Aller-

<sup>1)</sup> *Emmerie, A. und Engel, Chr., R. 58, 895 (1939); Emmerie, A., R. 61, 305 (1942); Mayer, G. G. und Sobotka, H., J. Biol. Chem. 143, 695 (1942).*

<sup>2)</sup> *Kjølhed, K. Th., Om Kemisk Bestemmelse af Tocopherol, Kopenhagen 1943; Glavind, J., Heslet, H. und Prange, J., Z. Vitaminf. 13, 266 (1943).*

<sup>3)</sup> *Vinet, A. und Meunier, P., C. r. 213, 709 (1941).*

<sup>4)</sup> *Diss. Emmerie, A., Utrecht 1941; Diss. Engel, Chr., Utrecht 1941; Mayer, G. G. und Sobotka, H., J. Biol. Chem. 143, 695 (1942); Diss. Couperus, J., Utrecht 1942; Meunier, P. und Raoul, Y., Le diagnostic chimique des avitaminoses, Paris, 1942; Diss. d'Oliveijra, E. J., Amsterdam, 1942; Vinet, A. und Meunier, P., C. r. 213, 709 (1941); Wechsler, J. S., Mayer, G. G. und Sobotka, H., Proc. Soc. exptl. Biol. 47, 152 (1941); Meunier, P. und Vinet, A., Bull. Soc. Chim. Biol. 24, 365 (1942).*

<sup>5)</sup> *Emmerie, A., R. 61, 305 (1942).*

<sup>6)</sup> *Vinet, A. und Meunier, P., loc. cit.*

<sup>7)</sup> *Engel, Chr., loc. cit.*

dings lagen die fluorometrisch ermittelten Gehalte viel tiefer, wenn die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Extraktion des Tocopherols benutzt wurden, so dass die Möglichkeit einer nur zufälligen Übereinstimmung besteht, in dem Sinne, dass jene Methoden nur mangelhaft extrahieren, dafür aber infolge geringer Spezifität andere Substanzen als Tocopherol bestimmen. Beim Kaninchenserum liegen die fluorometrisch ermittelten Werte viel tiefer, so dass anzunehmen ist, dass dort die unspezifische oxydimetrische Methode viel zu hohe Werte liefert.

Die Bestimmung von Tocopherol in Milch, tierischen und pflanzlichen Fetten. Zur Bestimmung von Tocopherol in Milch, tierischen und pflanzlichen Fetten nach der fluorometrischen Methode wird der Extraktion stets eine Verseifung vorausgeschickt; im übrigen wird gleich vorgegangen wie bei der Bestimmung des Tocopherolgehaltes im Serum. Schwierigkeiten bereitet bisweilen die Elimination der Nebenfluoreszenzen bei der Analyse von Produkten geringen Tocopherolgehaltes (Kuhmilch, alte tierische Fette, Olivenöl). Diese konnten aber stets durch eine gut kontrollierte chromatographische Reinigung behoben werden.

In der folgenden Tabelle (S. 2170) sind die fluorometrisch ermittelten Tocopherolgehalte den Werten gegenübergestellt, wie sie von anderen Autoren oxydimetrisch gefunden wurden. Die Bestimmungen auf Grund der *Furter-Meyer*-Reaktion sind durch F.-M. gekennzeichnet.

Frauenmilch enthält viel mehr Tocopherol als Kuhmilch; dabei erwies sich ein Muster mit 3,6 mg% als besonders fettreich.

Bei Schweinefett liegt der Gehalt viel höher als der aus der Literatur bekannte oxydimetrisch ermittelte Wert. Der Wert von 1,2 mg% bezieht sich auf ganz frisches Fett. Unsere Versuche bestätigen frühere Angaben, wonach der Tocopherolgehalt tierischer Fette rasch zurückgeht<sup>1)</sup>.

Bei den pflanzlichen Fetten liegen die fluorometrisch ermittelten Gehalte in der Regel wesentlich tiefer als die oxydimetrisch bestimmten Werte, Auch hier konnte konstatiert werden, dass die Gehalte von Proben, die der Luft ausgesetzt waren, abnahmen.

| Methode  | Gehalt in mg% |
|--|---------------|
| Oxydation mit Eisen(III)-chlorid (Dipyridyl) . | 135           |
| <i>Furter-Meyer</i> -Reaktion . . . . .        | 120           |
| fluorometrisch . . . . .                       | 70            |
| Phenazin in Butanol-Methanol kolorim. . . .    | 85            |
| Phenazin in konz. Schwefelsäure kolorim. . .   | 105           |

<sup>1)</sup> Vgl. z. B. W. Stepp, Ernährungslehre, Berlin, 1939, S. 440.

|                            | Gehalt in mg%<br>fluorometrisch                                       | Gehalt in mg%<br>oxydimetr., resp. nach<br>F.-M. |
|----------------------------|---|--|
| Kuhmilch . . . . .         | 0,09—0,12   | 0,02 1)  |
| Frauenmilch . . . . .      | 0,5 1,6 3,6   |  |
| Butter . . . . .           | 2,5—3,5   | 2,0—3,3 2)                                       |
| Schweinefett . . . . .     | 1,2   | 0,2 3)   |
| Rindsfett . . . . .        | 1,0   |  |
| Kalbsfett . . . . .        | 0,5   |  |
| Weizenkeimöl . . . . .     | 100   | 100—500 (z. T. nach F.-M.)                       |
| Olivenöl . . . . .         | 5—30  | 8 4)<br>3 1)<br>25 5) (F.-M.)                    |
| Sojaöl . . . . .           | 40 (roh, alt)<br>10 (raff., alt)                                      | 152—212 (F.-M.) <sup>5)</sup><br>120 1)<br>80 6) |
| Sesamöl . . . . .          | 30 (roh, alt)<br>18 (raff., alt)                                      | 5 4)   |
| Baumwollsamensöl . . . . . | 60 (raff., alt)   | 150 7)   |
| Leinöl . . . . .           | 33 (roh, alt)   | 23 4)  |
| Ricinusöl . . . . .        | 50  | 80—110 8)  |
| Palmöl . . . . .           | 44 (roh, alt)   | 15 6)<br>110 1)                                  |
| Walnussöl . . . . .        | 55 (roh, alt)<br>55 (raff., alt)                                      | 100 6)   |
| Maisöl . . . . .           | 70 (roh, alt)<br>70 (raff., alt)                                      | 95 6)<br>250 1)                                  |
| Bucheckernöl . . . . .     | 60 (roh, frisch)  | 100 1)   |
| Erdnussöl . . . . .        | 20<br>40 (roh, frisch)<br>40 (raff., frisch)<br>30 (hydriert, frisch) | 26 1)  |
| Sonnenblumenöl . . . . .   | 70 (roh)<br>60 (raff.)  |  |
| Rapsöl . . . . .           | 55 (roh, frisch)<br>55 (raff., frisch)                                |  |
| Mohnöl . . . . .           | 44 (roh, frisch)<br>28 (raff., alt)                                   |  |
| Haselnussöl . . . . .      | 45 (roh, frisch)<br>45 (raff., frisch)                                |  |
| Senföl . . . . .           | 30 (roh, alt)<br>30 (raff., alt)                                      |  |
| Hanföl . . . . .           | 40 (roh, alt)   |  |
| Aprikosenkernöl . . . . .  | 40 (alt)  |  |
| Mandelöl . . . . .         | 50 (roh, alt)   |  |

1) *Emmerie, A. und Engel, Chr., Z. Vitaminf.* **13**, 259 (1943).

2) *Emmerie, A., R.* **60**, 104 (1941).

3) *Karrer, P., Jaeger, W., Keller, H., Helv.* **23**, 464 (1940).

4) *Karrer, P., Keller, H., Helv.* **21**, 1161 (1938).

5) *Quackenbush, F. W., Gotlieb, H. L. und Steenbock, H., Ind. Eng. Chem.* **33**, 1276 (1941).

6) *Meunier, P. und Vinet, A., Bull. Soc. Chim. Biol.* **24**, 365 (1942).

7) *Emmerie, A. und Engel, Chr., R.* **57**, 1351 (1938).

8) *Langlois, J., C. r.* **213**, 845 (1941).

Zur Ermittlung der Unterschiede, welche sich bei ein und demselben Öl bei der Bestimmung nach den verschiedenen Methoden ergeben, wurde ein Versuch an Maisöl ausgeführt. Eine grössere Menge des Öles wurde verseift und der Extrakt nach den verschiedenen Bestimmungsmethoden auf Tocopherol untersucht. Das Ergebnis ist in der Tabelle S. 2169 zusammengestellt.

Den höchsten Wert ergibt die rein oxydimetrische Methode. Dabei wurden keinerlei Abtrennungen anderer möglicherweise vorkommender, leicht oxydabler Begleitstoffe vorgenommen. Die *F.-M.*-Reaktion und die kolorimetrische Bestimmung des Phenazinderivates, insbesondere jene in konz. Schwefelsäure geben ebenfalls höhere Werte als die fluorometrische Methode. Dass dafür Begleitstoffe verantwortlich sind, erkennt man schon daraus, dass die Lösungen nicht die gleiche Farbnuance haben, wie Lösungen, die aus reinem Tocopherol hergestellt wurden.

### Experimenteller Teil.

In allen bisher untersuchten Fällen ging der Überführung von Tocopherol in sein Phenanzinderivat eine Extraktion des Tocopherols mit Petroläther voraus. Die Weiterverarbeitung des Extraktes, d. h. die Überführung des Tocopherols in sein Phenazinderivat, sei nachstehend noch einmal beschrieben, da gegenüber der Arbeitsweise der 1. Mitteilung mehrere Abänderungen vorgenommen wurden. Die Menge des Extraktes, die zur Analyse verwendet wird, soll so bemessen werden, dass sie 20—100  $\gamma$  Tocopherol enthält, da in diesem Bereich der fluorometrische Vergleich am leichtesten ist. Die richtige Menge bestimmt man bei einem noch nicht analysierten Produkt durch einen Vorversuch, wobei man die Lösung des Phenazinderivates mit Methylalkohol so lange verdünnt, bis man in diesen Bereich gelangt. Zur genauen Analyse ist dieses Verfahren aber aus den im allgemeinen Teil auseinandergesetzten Gründen nicht zulässig.

Oxydation mit Salpetersäure. Der Rückstand des Petrolätherextraktes wird in 10 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol aufgenommen (eventuell unter Erwärmen). Die Lösung ist bei menschlichen Seren schwach, bei carotinoidreichen Produkten dagegen intensiv gelb gefärbt. Man fügt ein kleines Siedesteinchen hinzu, versetzt mit 2 cm<sup>3</sup> konz. Salpetersäure, erhitzt auf kleinem Flämmchen zum Sieden und stellt das Kölbchen 5 Minuten auf das siedende Wasserbad. Hierauf wird sofort gekühlt und der Inhalt in einen 50—100 cm<sup>3</sup> Scheidetrichter gegossen, mit ca. 2 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol und ca. 15 cm<sup>3</sup> Petroläther nachgespült und nach dem Verdünnen mit ca. 15 cm<sup>3</sup> Wasser 2 Minuten ausgeschüttelt. Nachdem sich eine scharfe Phasentrennung eingestellt hat, lässt man die wässrige Phase in einen gleichen Scheidetrichter ab, wo sie nochmals mit ca. 15 cm<sup>3</sup> Petroläther 2 Minuten ausgeschüttelt wird. Der Petroläther des 1. Scheidetricht-

ters wird mit Wasser gewaschen und das Waschwasser im zweiten Trichter ausgeschüttelt. Der Petroläther wird in einem 50 cm<sup>3</sup> *Erlenmeyer*-Kölbchen abgedampft, die letzten Spuren durch Aufblasen von Luft.

Kondensation mit *o*-Phenylendiamin. Den nach dem Verreiben des Petroläthers erhaltenen Rückstand versetzt man mit 5 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Lösung von *o*-Phenylendiamin in Eisessig (diese Lösung färbt sich beim Stehen an der Luft braun, was aber nicht schadet) und stellt das Kölbchen während 1 Stunde auf das siedende Wasserbad. Dann kühlt man sofort ab, giesst den Inhalt in einen trockenen 50—100 cm<sup>3</sup> Scheidetrichter, spült mit ca. 5 cm<sup>3</sup> Eisessig, dann mit ca. 15 cm<sup>3</sup> Petroläther nach, verdünnt mit ca. 15 cm<sup>3</sup> Wasser und schüttelt während 2 Minuten aus. (Es ist wichtig, dass der Petroläther vor dem Verdünnen mit Wasser zugegeben wird, wobei sich eine homogene Phase bildet, ansonst ist der Übertritt des Phenazinderivates in den Petroläther erschwert, was sich durch ein milchiges Aussehen der wässrigen Phase anzeigt. In diesem Falle treten selbst nach längerem Schütteln Verluste ein.) Die untere Phase wird in einen gleichen Scheidetrichter abgelassen und nochmals mit ca. 15 cm<sup>3</sup> Petroläther 2 Minuten ausgeschüttelt. Dann wäscht man der Reihe nach mit Wasser, verdünnter Salzsäure, verdünnter Natronlauge und wieder mit Wasser, wobei jedesmal die untere Phase des 1. Scheidetrichters zum Waschen des Petroläthers des 2. Scheidetrichters benutzt wird. Stets ist eine saubere Phasentrennung abzuwarten. Gelegentlich beschleunigt der Zusatz von einigen cm<sup>3</sup> Kochsalzlösung die Klärung.

Die Kondensation des „Tocopherolrots“ zum Phenazinderivat hat sofort zu geschehen, nachdem das Tocopherolrot in der Lösung von *o*-Phenylendiamin in Eisessig aufgenommen ist, und nach dem Kondensieren ist sofort auszuschütteln, ansonst treten Verluste durch die Gegenwart des Eisessigs auf. Während der Kondensation soll die Luft freien Zutritt zur Lösung haben. Eine Kondensation im Stickstoffstrom führt zu viel kleineren Ausbeuten; dem Sauerstoff scheint also eine katalytische Wirkung zuzukommen.

Die vereinigten Petrolätherextrakte werden chromatographisch gereinigt.

Chromatographische Reinigung. Für die chromatographische Reinigung hat sich die in Fig. 1 abgebildete Anordnung als sehr zweckmässig erwiesen. Auf einem Absaugstutzen sitzt eine dicht anliegende Glasplatte, die in der Mitte durchbohrt ist. In diese Bohrung passt der Schliff eines Chromatogrammröhres von ca. 1 cm lichter Weite. Dieses wird 8—10 cm hoch mit aktiviertem Aluminiumoxyd gefüllt, einige cm<sup>3</sup> Petroläther daraufgegossen und langsam durchgesogen. Dann wird die zu reinigende Lösung aufgegossen. Vor

der Quarzlampe beobachtet man, dass sich zuoberst an der Aluminiumoxydschicht ein gelbgrün fluoreszierender Ring ausbildet. Nachdem die Flüssigkeit nur noch einige mm über dem Aluminiumoxyd steht, wird mit 25—50 cm<sup>3</sup> einer Mischung von 20 % Benzol in Petroläther entwickelt. Vor der Quarzlampe konstatiert man, dass sich

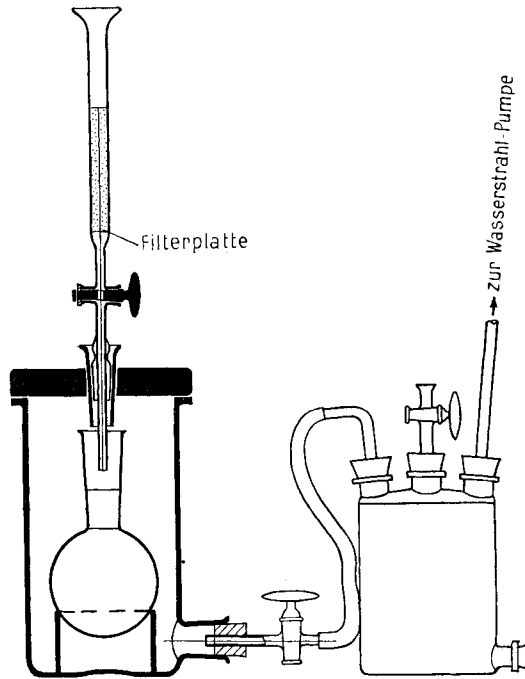


Fig. 1.

der fluoreszierende Ring verbreitert und nach unten wandert. Nach dem Entwickeln eluiert man das Tocopherol-Phenazinderivat mit 30—50 cm<sup>3</sup> einer Mischung von Benzol-Petroläther 1 : 1. Vor der Quarzlampe überzeugt man sich, dass die fluoreszierende Zone sofort nach unten wandert. Die Elutionsflüssigkeit wird in einem Schliffkölbchen aufgefangen, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 1 cm<sup>3</sup> Butanol unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst, mit 9 cm<sup>3</sup> Methanol verdünnt und in ein Reagensglas gegossen. Sollte beim Zusatz von Methylalkohol eine Trübung auftreten, so wird diese durch Zugabe von mehr Butylalkohol behoben. Der zur Trockne eingedampfte Rückstand löst sich ziemlich schwer. Es ist daher ratsam, vor der Quarzlampe zu kontrollieren, ob alles in Lösung gegangen ist; nicht Gelöstes leuchtet unter der Lampe hell auf. Die Lösung ist nun bereit zur fluorometrischen Messung.



Bereitung der Vergleichslösungen. Durch Verdünnen einer Stammlösung in absolutem Alkohol bereitet man sich Lösungen, welche pro 10 cm<sup>3</sup> 150, 100, 63, 40, 25 und 16  $\gamma$  Tocopherol enthalten. Diese Lösungen werden mit 2 cm<sup>3</sup> Salpetersäure oxydiert, mit o-Phenyldiamin kondensiert, chromatographiert und schliesslich in 1 + 9 cm<sup>3</sup> Butanol-Methanol genau wie oben beschrieben aufgenommen. Von jeder Lösung entnimmt man 4 cm<sup>3</sup> und setzt 1 cm<sup>3</sup> einer Mischung Butanol-Methanol 1 : 10 hinzu. So erhält man einen Satz von Vergleichslösungen, entsprechend den Tocopherolmengen: 150, 120, 100, 80, 63, 50, 40, 32, 25, 20, 16 und 13  $\gamma$  pro 10 cm<sup>3</sup> Lösung. Die Lösungen werden in Reagensgläsern von gleichem Durchmesser unter Stickstoffatmosphäre eingeschmolzen.

Messung der Fluoreszenzintensität. Sie wurde visuell vor der Quarzlampe vorgenommen. Man bestimmt, zwischen welchen zwei Vergleichslösungen die unbekannte Lösung liegt, resp. ob sie näher an der Lösung mit höherem oder tieferem Phenazingehalt liegt. Dann kennt man den Tocopherolgehalt der angesetzten Extraktmenge. Durch das Chromatographieren wird die weissliche Nebenfluoreszenz so weit eliminiert, dass sie in der Regel nicht mehr als störend empfunden wird. Andernfalls erleichtert ein Betrachten durch eine Brille mit dunkelbraunen Gläsern den Vergleich.

Aktivierung des Aluminiumoxyds. Aluminiumoxyd (*Merck*, reinst, wasserfrei) wird in einer Pfanne aus V2A-Stahl über einem starken Brenner  $\frac{3}{4}$  Stunden lang unter Rühren kräftig erhitzt, dann in eine Aluminiumflasche übergeführt, die während des Abkühlens durch einen Calciumchlorid-Turm vor dem Zutritt feuchter Luft geschützt wird. Bei der Entnahme von Aluminiumoxyd ist die Flasche sofort zu schliessen, damit das Oxyd seine Aktivität nicht einbüsst. Gebrauchtes Oxyd wird gesammelt und nach gründlichem Waschen mit 95-proz. Alkohol in gleicher Weise wie oben beschrieben, reaktiviert. Sollte sich das so aktivierte Aluminiumoxyd bei einem Versuch vor der Quarzlampe als zu aktiv erweisen, was dadurch zu erkennen ist, dass die Mischung von Petroläther-Benzol 1 : 1 das Tocopherol-Phenazinderivat nicht zu eluieren vermag, so mischt man aktiviertes Oxyd mit nicht aktiviertem bis zur gewünschten Aktivität oder man eluiert mit Benzol allein. Aus Versuchen geht hervor, dass die hier bezüglich des Chromatographierens angegebenen Bedingungen nicht genau eingehalten zu werden brauchen. Auch mit mehr Wasch- und Elutionsflüssigkeit ergaben sich die gleichen Resultate. Wesentlich ist nur, dass man sich davon überzeugt, dass die Entwicklungsflüssigkeit kein, die Elutionsflüssigkeit dagegen das gesamte Phenazinderivat eluiert. Ein nachträgliches Eluieren mit Alkohol darf keine fluoreszierenden Anteile mehr ergeben. Man prüfe daher das Aluminiumoxyd in der Weise, dass man Entwicklungsflüssigkeit, Elutionsflüssigkeit und Alkoholeluat einzeln auffängt, vom Lösungsmittel befreit, in Butanol-Methanol aufnimmt und vor die Quarzlampe bringt.

Die Bestimmung von Tocopherol im Serum. Die Menge des zur Analyse angesetzten Serums richtet sich nach der Art des Serums. Ein Mindestgehalt von 20  $\gamma$  Tocopherol ist bei der Ausführung, wie sie hier beschrieben wird, erwünscht. Bei menschlichen Seren genügen 5 cm<sup>3</sup>, bei tierischen Seren wurden Ansätze mit 10 bis 20 cm<sup>3</sup> ausgeführt.

Zur Extraktion des Serums ohne Verseifung werden 5 cm<sup>3</sup> Serum mit 2½ cm<sup>3</sup> 60-proz. wässriger Kalilauge und 7½ cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol versetzt und zweimal mit 50 cm<sup>3</sup> Petroläther kräftig ausgeschüttelt. Der Petroläther wird mit 20 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol, Salzsäure und Wasser gewaschen, wobei jedesmal die Waschflüssigkeit in einem zweiten Scheidetrichter extrahiert wird. Bei grösseren Mengen Serum werden entsprechende Verhältnisse gewählt; es genügt aber auch bei 10 cm<sup>3</sup> Serum mit 2 × 50 cm<sup>3</sup> Petroläther auszuschütteln. Ein Versuch mit Rinderserum zeigte, dass schon durch das erste Ausschütteln 90% des Tocopherols extrahiert werden. Dass die Carotinoide viel schlechter extrahiert werden, sieht man daran, dass noch eine dritte Extraktion eine stark gelbe Farbe aufweist.

Zur Extraktion des Serums nach vorangegangener Verseifung werden 5 cm<sup>3</sup> mit 2,5 cm<sup>3</sup> 60-proz. wässriger Kalilauge und 20 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol in einem 50 cm<sup>3</sup> Schliffkolben im Stickstoffstrom 1 Stunde lang am Rückflusskühler in gelindem Sieden erhalten. Der verwendete Stickstoff soll 100-proz. sein. Vorsichtshalber lässt man ihn durch eine Waschflasche mit Sinterplatte perlen, die mit einer alkalischen Pyrogallollösung gefüllt ist. Die Luft wird anfänglich aus Verseifungskolben und Kühler durch einen energischen Stickstoffstrom vertrieben, dann wird der Strom fast vollständig gedrosselt und erhitzt. Nach dem Erkalten giesst man den Inhalt des Kolbens in einen 150—200 cm<sup>3</sup> Scheidetrichter mit kurzem Auslauf, spült den Kolben mit 5 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol und 50 cm<sup>3</sup> tiefsiedendem Petroläther nach, verdünnt mit 25 cm<sup>3</sup> Wasser und schüttelt 2 Minuten energisch (der Übertritt des Tocopherols in den Petroläther erfolgt nicht leicht). Nachdem sich eine saubere Phasentrennung hergestellt hat, lässt man die untere Phase in einen zweiten Scheidetrichter ab, wo sie nochmals mit 50 cm<sup>3</sup> Petroläther kräftig ausgeschüttelt wird. Den Petroläther des 1. Scheidetrichters wäscht man nacheinander mit 20 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol, verdünnter Salzsäure und Wasser, wie oben angegeben. Nach dem Verdampfen des Petroläthers wird der Rückstand auf das Phenazinderivat weiterverarbeitet.

Die Bestimmung von Tocopherol in Milch, tierischen und pflanzlichen Fetten. Bei sämtlichen Produkten wurde bis auf die Verseifung dasselbe Analysenverfahren angewendet. Die chromatographische Reinigung des Phenazinderivates wurde wie folgt durchgeführt: Die Lösung in Petroläther wird auf eine ca. 10 cm hohe Säule von Aluminiumoxyd gegossen, mit ca. 50 cm<sup>3</sup> einer 20-proz. Lösung von Benzol in Petroläther entwickelt und mit ca. 50 cm<sup>3</sup> einer Benzol-Petroläthermischung 1:1 eluiert. Entwickelt wird so lange, bis die Front der gelb fluoreszierenden Schicht fast das Ende der Säule erreicht hat.

### Verseifung.

**Kuhmilch.** 50 cm<sup>3</sup> Milch werden nach Zusatz von 25 cm<sup>3</sup> 60-proz. wässriger Kalilauge und 75 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol 1 Stunde lang auf dem siedenden Wasserbad im Stickstoffstrom erhitzt und nach dem Erkalten mit 2 × 100 cm<sup>3</sup> Petroläther, wie bei der Analyse von Serum angegeben, extrahiert. Gewaschen wird der Petroläther mit 30 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol, Säure und Wasser. Nach dem Abdampfen des Petroläthers wird der Rückstand in gewohnter Weise weiterverarbeitet.

**Frauenmilch.** In Anbetracht des hohen Gehaltes genügt es, 5—20 cm<sup>3</sup> zur Analyse anzusetzen. Man verseift beispielsweise 10 cm<sup>3</sup> mit 5 cm<sup>3</sup> 60-proz. wässriger Kalilauge und 15 cm<sup>3</sup> 95-proz. Alkohol und extrahiert mit 2 × 50 cm<sup>3</sup> Petroläther.

**Butter.** 3—5 g werden mit 10 cm<sup>3</sup> 2-n. alkoholischer Kalilauge 1 Stunde lang verseift. Während des Abkühlens giesst man durch den Kühler zur Verhinderung des Gelierens ca. 40 cm<sup>3</sup> Petroläther und spült nach dem Erkalten mit 10 cm<sup>3</sup> Petroläther in einen Scheidetrichter, verdünnt mit 10 cm<sup>3</sup> Wasser und schüttelt kräftig aus. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit 50 cm<sup>3</sup> Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden mit 50 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol, Säure und Wasser gewaschen, der Petroläther abgedampft und der Rückstand aufgearbeitet.

**Tierische Fette.** Man verseift 5 g mit 20 cm<sup>3</sup> 2-n. alkoholischer Kalilauge, verdünnt nach dem Verseifen mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser und verfährt im übrigen gleich wie bei der Analyse von Butter. Sollte bei der Aufnahme des Phenazinderivates in Butanol-Methanol eine Trübung auftreten (unverseifte Anteile), so kann diese durch Zusatz von mehr Butanol zum Verschwinden gebracht werden.

**Pflanzliche Öle.** 2 g werden mit 10 cm<sup>3</sup> alkoholischer Kalilauge, wie im Falle von Butter, verseift und extrahiert. Der Petroläther wird auf 200 cm<sup>3</sup> ergänzt und ein solcher Teil weiterverarbeitet, der etwa 50—100 γ Tocopherol entspricht.

**Allgemeine Bemerkungen.** Sämtliche Extraktionen werden mit tiefsiedendem Petroläther (30—70°) durchgeführt. Dieser, sowie das verwendete Benzol und der Methylalkohol werden durch Destillation gereinigt. Der käufliche Methylalkohol zeigt vor der Destillation eine blaue Fluoreszenz, die beim fluorometrischen Vergleich stark stört.

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

---