

Zur Bestimmung der absoluten Sauerstoffkonzentration wird eine Eichkurve aufgenommen, indem die Stufenhöhe in Lösungen verschiedener Sauerstoffkonzentration gemessen wird¹⁾. Die Abhängigkeit ist streng linear.

Die Beziehung zwischen der Höhe des Grenzstromes und der Temperatur zeigt Fig. 2 für zwei Lösungen verschiedener Sauerstoffkonzentration. Bei einem Gehalt von 9,8 mg O₂/Liter (Lösung im Gleichgewicht mit Luft) beträgt das Gefälle $di/d\vartheta = 1,13$ Galv.-Tlstr./Grad, bei 4,0 mg O₂/Liter 1,02 Tlstr./Grad. Der Unterschied dürfte innerhalb der Fehlergrenzen liegen.

Mit diesen Werten lässt sich für jede Temperatur der Temperaturkoeffizient des Grenzstromes $\alpha = 1/i \cdot di/d\vartheta$ berechnen. Durch Einsetzen in Gleichung (4) erhält man daraus den Temperaturkoeffizienten β der Diffusion. Für die Lösung mit der Sauerstoffkonzentration 9,8 mg/l erhält man z. B. bei 16°

$$\beta_{16} = 0,014$$

Dieser Wert stimmt gut überein mit dem aus direkt experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten berechneten $\beta_{16} = 0,015$ von in Wasser gelöstem Wasserstoff. Für CO₂ erhält man ebenfalls aus experimentellen Werten für die Diffusionskoeffizienten bei verschiedenen Temperaturen (Int. Crit. Tables²⁾) ein $\beta_{16} = 0,019$.

Es wäre für den auf dem Gebiete der Zellatmung arbeitenden Biologen wünschenswert, wenn ähnliche Messungen in verschiedenen Lösungen mit grösserer Genauigkeit als sie uns möglich war, durchgeführt werden könnten.

Universität Zürich, Institut für allgemeine Botanik.

4. Die fluorometrische Methode zur Bestimmung von Tocopherol

3. Mitteilung

von **M. Kofler**.

(24. XI. 44.)

Die Bestimmung in Pflanzen und in tierischen Organen.

In der vorangegangenen Mitteilung³⁾ wurde eine Methode beschrieben zur fluorometrischen Bestimmung von Tocopherol in Serum, Milch, tierischen und pflanzlichen Fetten. Bei der Bestimmung des Tocopherolgehaltes von Pflanzen und tierischen Organen wird prinzipiell gleich verfahren. Die Extraktion erfolgt durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge im Stickstoffstrom und anschliessendes Ausschütteln der mit Wasser verdünnten Extraktions-

¹⁾ Für die Durchführung der Sauerstoffanalysen (*Winkler*) bin ich Herrn Kantonschemiker Dr. *M. Staub* zu grossem Dank verpflichtet.

²⁾ loc. cit. ³⁾ 2. Mitt. *Helv.* **26**, 2166 (1943).

lauge mit Petroläther. Tierische Organe gehen meist schon nach wenigen Minuten in Lösung; aber auch aus Pflanzen lässt sich Tocopherol auf diese Weise gut extrahieren. In gewissen Fällen (siehe weiter unten) erwies es sich als nötig, den Petrolätherextrakt einer Vorreinigung zu unterziehen.

Die Bestimmung des Tocopherols in dem vom Lösungsmittel befreiten Extrakt erfolgt wie in der 2. Mitteilung beschrieben wurde. Da sowohl die Oxydation des Tocopherols zum Tocopherolrot als auch die Kondensation des Tocopherolrots zum Tocopherol-Phenazinderivat unvollständig verlaufende Reaktionen sind, ist auf die Konstanz der Bedingungen grosse Sorgfalt zu verwenden.

So sind zur Kondensation stets Kölbchen von gleicher Form zu wählen, und ihre Eintauchtiefe in das siedende Wasserbad soll annähernd die gleiche sein; ein wesentlich stärkeres Eintauchen führte zu merklich schlechteren Ausbeuten, was wohl auf den durch das Verdampfen des Eisessigs behinderten Zutritt der Luft zurückzuführen ist: die katalytische Wirkung des Sauerstoffes wurde schon in der 2. Mitteilung erwähnt. Die Kondensation hat bei gedämpftem Tageslicht oder künstlichem Licht zu erfolgen, im direkten Sonnenlicht wird das Phenazinderivat unter den gewählten Kondensationsbedingungen zerstört. Der Analysengang gestattet eine Unterbrechung nach der Oxydation zum Tocopherolrot. Ein Stehenlassen der Lösung von Tocopherolrot in Petroläther über Nacht führte zu keinen Verlusten. Dasselbe gilt von der Lösung des Phenazinderivates in Eisessig, falls die Lösung im Dunkeln aufbewahrt wird. Ein 12 Stunden langes Stehen im Tageslicht führte aber zu Verlusten.

Schwierigkeiten traten auf bei der Bestimmung des Tocopherolgehaltes von Hirn, wo die grosse Menge an Unverseifbarem sehr schlechte Phasentrennungen nach der Oxydation bzw. Kondensation zur Folge hatte. Die Schwierigkeiten konnten behoben werden durch Filtration des Petrolätherextraktes durch eine Säule von schwach aktiviertem Aluminiumoxyd und darauffolgende Elution des Tocopherols durch Benzol. Unter diesen Umständen bleibt die Hauptmenge des Unverseifbaren am Aluminiumoxyd zurück. Bei dieser Filtration wird auch Tocopheryl-chinon quantitativ zurückgehalten, welches bei der Analyse sonst ebenfalls als Tocopherol bestimmt wird, da es bei der Oxydation mit Salpetersäure in Tocopherolrot übergeführt wird. Tocopheryl-chinon soll keine Vitamin E-Wirksamkeit besitzen, seine Abtrennung kann also erwünscht sein. Es wird durch Methanol aus dem Aluminiumoxyd eluiert und kann im Eluat durch Überführen in das Tocopherol-Phenazinderivat einzeln bestimmt werden, sofern nicht, wie bei Hirn, grosse Mengen an Unverseifbarem vorhanden sind, welche durch Methanol ebenfalls eluiert werden.

Die getrennte Bestimmung von Tocopherol und Tocopheryl-chinon ergab, dass bei Serum, tierischen Organen und frischen Pflanzen nicht mit der Anwesenheit von Tocopheryl-chinon zu rechnen ist. Dagegen konnten in getrockneten Pflanzen Mengen von Tocopheryl-chinon festgestellt werden, die bis zu 50% des Tocopherols ausmachen.

Im folgenden werden die bei Pflanzen und tierischen Organen fluorometrisch ermittelten Tocopherolgehalte aufgeführt und den Gehalten gegenübergestellt, wie sie andere Autoren oxydimetrisch bestimmt haben. Die Zahlenwerte bei den Pflanzen beziehen sich auf das Trockengewicht. Wo nur Angaben bezüglich des schlecht definierten Frischgewichtes vorhanden waren, ist dies durch F.G. gekennzeichnet.

	fluorometrisch	oxydimetrisch
Kopfsalat	9, 10, 14, 17, 26, 35 mg%	17—56 mg% ¹⁾
Schnittsalat	17 mg%	
Nüsslisalat (Feldsalat)	14 mg%	1,85 F.G. ²⁾
Kresse	20, 43 mg%	
Junger Löwenzahn	7 mg%	
Petersilien	15, 16, 30 mg%	27,7 mg% ²⁾ 5,5 F.G. ³⁾
Spinat	4, 6, 16, 23, 24 mg%	50 mg% ⁴⁾
Mangold	2, 24 mg%	weniger als 0,01 mg% F.G. ⁴⁾

Die einzelnen Pflanzen zeigen stark schwankenden Tocopherolgehalt. Grössenordnungsmässig stimmen die fluorometrisch ermittelten Werte mit den oxydimetrisch ermittelten überein, doch liegen sie im Mittel etwas niedriger, was sich durch die grössere Spezifität des fluorometrischen Verfahrens erklärt.

Unter den tierischen Organen galten nach den Untersuchungen von *Evans* und *Sure* auf Grund von biologischen Bestimmungen Placenta und Hypophyse als besonders Vitamin E-reich. Die fluorometrische Bestimmung ergab für eine menschliche Placenta den relativ niedrigen Wert von 0,5 mg % Tocopherol, bestätigte dagegen den hohen Tocopherolgehalt von Hypophysen, besonders des Vorderlappens. Untersucht wurden Rinderhypophysen. Für den Vorderlappen wurden Werte von 2,6, 2,8 und 3,0 mg % gefunden, für den Hinterlappen 0,9 und 1,1 mg %. Letztere Zahlen stellen Mittelwerte dar, da wegen des kleinen Gewichtes der Drüse gleichzeitig die Masse von 6 Hinterlappen zur Analyse angesetzt wurde. *Meunier* und *Vinet*⁵⁾ geben auf Grund oxydimetrischer Messungen für den Gehalt einer Rinderhypophyse 1 mg %, für Pferdehypophysen Werte zwischen 2,2 und 3,15 mg % an.

¹⁾ *Kjølhed, K. Th.*, Om Kemisk Bestemmelse af Tocopherol, Kopenhagen 1943.
²⁾ *Meunier, P.* und *Vinet, A.*, Bl. Soc. Chim. biol. **24**, 365 (1942).
³⁾ *Emmerie, A.* und *Engel, Chr.*, Z. Vitaminf. **13**, 259 (1943).
⁴⁾ *Dam, H., Glavind, J., Prange, I.* und *Ottesen, J.*, Danske Vid. Selsk., Biologiske Meddelelser **16**, S. 13 (1941).
⁵⁾ *Meunier, P.* und *Vinet, A.*, loc. cit.

Beachtenswert sind die hohen Werte, welche für Rinderhirn gefunden wurden, die mit 2,2—3,3 mg% ebenso hoch liegen wie die der Hypophyse. Eine eingehendere Untersuchung ergab bei einem Rinderhirn für die weisse Substanz 2,3 mg% und für die graue Substanz 1,2 mg%.

Um Aufschluss zu erhalten, welche Organe besonders tocopherolreich sind, wurden verschiedene Kaninchenorgane analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Hirn	0,5 (3mal), 1,0, 1,5, 1,8 (2mal) mg%
Lunge	1,0, 1,9 mg%
Herz	0,7, 1,2, 1,3 mg%
Milz	1,0 mg%
Leber	0,9, 1,0, 1,2, 1,4 mg%
Niere	0,5, 0,7 mg%
Darm	0,4, 0,6, 0,7 mg%
Magen	0,6, 1,2 mg%
Haut	0,26 mg%
Muskeln (Schenkel)	0,13, 0,24, 0,25, 0,26, 0,30, 0,33 mg%
Fett	0,6 mg%

Besonders grosse Schwankungen wurden beim Tocopherolgehalt des Hirnes festgestellt. Aus den bisherigen Ergebnissen zu schliessen, scheinen junge Tiere bedeutend tocopherolärmer zu sein als ausgewachsene Tiere. Ein solcher Zusammenhang ergab sich auch bei der Bestimmung des Tocopherolgehaltes des menschlichen Serums, wo der Gehalt beim Säugling etwa 5mal niedriger liegt als derjenige bei der Mutter, eine Erscheinung, auf welche auch *d'Oliveijra*¹⁾ auf Grund oxydimetrischer Bestimmungen hingewiesen hat. Aus der Tabelle ergibt sich der auffallend niedrige Tocopherolgehalt des Muskelfleisches. *Meunier* und *Vinet*²⁾ fanden oxydimetrisch für Kaninchenmuskeln 0,48 mg%. Für Rindermuskeln wurden fluorometrisch 0,33 mg% gefunden, während *Karrer*, *Jaeger* und *Keller*³⁾ oxydimetrisch 0,58 mg% bestimmten.

Experimenteller Teil.

Die Bestimmung des Tocopherols in Pflanzen.

Da es sich gezeigt hat, dass beim Trocknen der Pflanzen leicht Verluste an Tocopherol eintreten, ist es vorteilhaft, frische Pflanzen zu extrahieren und zur Umrechnung des Tocopherolgehaltes auf das Trockengewicht gleichzeitig eine Wasserbestimmung auszuführen. Zu diesem Zwecke werden die Pflanzen ca. 12 Stunden im Vakuum bei 80° getrocknet.

Zur Analyse der frischen Pflanzen werden dieselben mit dem Messer zerkleinert und 10 g mit 50 cm³ 2-n. alkoholischer Kalilauge (95-proz. Alkohol) 1 Stunde im Stickstoffstrom im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten (Eiswasser) wird durch eine grobporige Glassinternutsche filtriert, mit ca. 50 cm³ Petroläther (tiefsiedend) nachgewaschen und das Filtrat mit weiteren 50 cm³ Petroläther in einen Scheidetrichter über-

¹⁾ *d'Oliveijra, E. J.*, Diss. Amsterdam, 1942.

²⁾ *Meunier, P.* und *Vinet, A.*, loc. cit.

³⁾ *Helv.* **23**, 464 (1940).

geführt. Man verdünnt mit 50 cm³ Eiswasser und schüttelt kräftig aus. Die wässrige Phase wird noch einmal mit 100 cm³ Petroläther ausgeschüttelt. Gewaschen wird mit ca. 20 cm³ 50-proz. Alkohol, verdünnter Salzsäure und Wasser, wie in der 2. Mitteilung angegeben.

Soll Tocopherol neben Tocopheryl-chinon bestimmt werden, so filtriert man den Petrolätherextrakt, wie unten angegeben, durch schwach aktiviertes Aluminiumoxyd. Dabei läuft Carotin mit dem Petroläther durch, Xanthophyll wird erst durch Methanol eluiert, das Benzoleluat ist praktisch farblos. (Im Gegensatz zur Adsorption an Floridin haftet Tocopherol stärker an Aluminiumoxyd als Carotin!) Durch diese Vorreinigung wird also Tocopherol von den Carotinoiden getrennt, was auch bei der oxydimetrischen Bestimmung des Tocopherols von Nutzen sein kann. Verluste an Tocopherol treten keine auf. Die Vorreinigung erwies sich auch zur Elimination von Nebenfluoreszenzen verursachenden Stoffen als wirksam, ist also besonders bei niedrigen Tocopherolgehalten angezeigt.

Die Eluate werden nach dem Vertreiben des Lösungsmittels in der üblichen Weise auf das Phenazinderivat verarbeitet.

Zur Bestimmung des Tocopherolgehaltes getrockneter Pflanzen werden 1—2 g des pulverisierten Materials mit 20 cm³ 2-n. alkoholischer Kalilauge erhitzt, gekühlt, mit 20 cm³ Wasser verdünnt und mit 2 × 50 cm³ Petroläther analog wie oben ausgeschüttelt.

Die Bestimmung des Tocopherols in tierischen Organen.

Von tocopherolreichen Organen, wie Hirn, werden 2 g, von tocopherolarmen, wie Muskeln, 10 g zur Analyse angesetzt. Die Menge an 20-proz. alkoholischer Kalilauge beträgt stets 15 cm³. (Die Lauge wird hergestellt durch Lösen von Kaliumhydroxyd in 95-proz. Alkohol unter Erwärmen im Stickstoffstrom; sie bleibt, im Eisschrank aufbewahrt, längere Zeit farblos.) Die Organe lösen sich in der siedenden Lauge (Stickstoffstrom) schon nach wenigen Minuten meist vollständig auf; bei Leber beobachtet man bisweilen weisse Flocken von Glykogen. Sobald die Organe gelöst sind, wird mit Eiswasser gekühlt, die Lauge mit 50 cm³ Petroläther und 15 cm³ Eiswasser in einen Scheidetrichter übergeführt. Man schüttelt 2 Minuten kräftig aus, lässt die wässrige Phase in einen zweiten Scheidetrichter ab, wo sie nochmals mit 50 cm³ Petroläther ausgeschüttelt wird und wäscht in der üblichen Weise mit ca. 10 cm³ 50-proz. Alkohol, verdünnter Salzsäure und Wasser.

Die Vorreinigung des Extraktes, wie sie unten beschrieben wird, ist bei der Analyse von Hirn unbedingt nötig. Sie erwies sich auch als vorteilhaft bei der Analyse von Kaninchenmuskeln zur Elimination von Nebenfluoreszenzen.

Die vom Lösungsmittel befreiten Extrakte bzw. Eluate werden wie oben weiterverarbeitet.

Die Vorreinigung des Petrolätherextraktes.

Ist man genötigt, den aus Pflanzen oder tierischen Organen hergestellten Petrolätherextrakt einer Vorreinigung zu unterwerfen, sei es zur Entfernung der Hauptmenge des Unverseifbaren oder von Nebenfluoreszenzen bewirkenden Stoffen, so wird wie folgt verfahren: Auf einen Saugstutzen (vgl. Fig. 1 der 2. Mitteilung) setzt man ein Chromatogrammrohr von ca. 2 cm lichter Weite, das 10 cm hoch mit schwach aktiviertem Aluminiumoxyd gefüllt ist. Zur gewünschten Aktivität gelangt man am einfachsten durch Mischen von aktiviertem und nichtaktiviertem Aluminiumoxyd in bestimmten Verhältnissen. Auf diese Schicht giesst man den auf Tocopherol zu untersuchenden Petrolätherextrakt, wäscht mit 50 cm³ Petroläther und eluiert das Tocopherol mit 50 cm³ Benzol. Nach dem vorsichtigen Vertreiben des Lösungsmittels wird der Rückstand des Benzol-eluates in 10 cm³ Alkohol gelöst und in der üblichen Weise auf das Phenazinderivat verarbeitet. Das verwendete Aluminiumoxyd soll einerseits Tocopherol aus dem Petroläther quantitativ zurückhalten, andererseits soll Tocopherol durch die 50 cm³ Benzol quantitativ eluierbar sein. Ob diese Forderung erfüllt ist, wird durch einen einmaligen Versuch bestimmt. Dazu werden z. B. 50 γ Tocopherol, gelöst in ca. 100 cm³ Petroläther, aufgetragen, mit 50 cm³ Benzol und anschliessend mit 30 cm³ Methanol eluiert.

Petroläther-, Benzol- und Methanoleluat werden getrennt aufgefangen und auf das Phenazinderivat verarbeitet. Das Benzoleluat muss die gesamte Tocopherolmenge enthalten. Ist der Petroläther bzw. das Methanoleluat tocopherolhaltig, so war das Oxyd zu schwach bzw. zu stark aktiviert.

Die getrennte Bestimmung von Tocopherol und Tocopheryl-chinon.

Soll das Filtrieren durch Aluminiumoxyd nicht nur zur Vorreinigung des Extraktes dienen, sondern zur getrennten Bestimmung von Tocopherol und Tocopheryl-chinon, so wird nach der Elution des Tocopherols mit 50 cm³ Benzol noch eine Elution mit 30 cm³ Methanol zur Elution des Tocopheryl-chinons angeschlossen. Um zu prüfen, ob bei der gewählten Aktivität des Aluminiumoxyds Tocopheryl-chinon nicht durch Benzol eluiert wird, sondern sich quantitativ im Methanoleluat befindet, stellt man sich eine Lösung von Tocopheryl-chinon in Petroläther her, am einfachsten durch Oxydation einer alkoholischen Lösung von Tocopherol mit einer wässrigen Cer(IV)-sulfat-Lösung, Verdünnen mit Wasser und Ausschütteln des Chinons mit Petroläther. Von dieser Lösung trägt man eine bestimmte Menge, entsprechend etwa 50 γ Tocopheryl-chinon, auf, eluiert mit 50 cm³ Benzol und 30 cm³ Methanol und verarbeitet die Eluate auf das Tocopherol-Phenazinderivat.

Zur ersten Orientierung über die Aktivität des Aluminiumoxyds genügt es, die Tocopherol- bzw. Tocopheryl-chinon enthaltenden Eluate nach der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Methode bzw. der *Furter-Meyer*-Reaktion zu untersuchen; man hat dann aber etwa 200 γ Tocopherol bzw. 1—2 mg Tocopheryl-chinon anzusetzen.

Das Abdampfen des Lösungsmittels bei den auf Tocopherol zu untersuchenden Extrakten bzw. Eluaten, insbesondere des Benzols, hat unter vermindertem Druck unter Vermeidung starken Erhitzens zu geschehen; auf die Verwendung eines inerten Gases kann dagegen verzichtet werden.

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

5. Die Glykogen-Phosphorylierung durch Muskel und Leber bei normalen und adrenaletomierten Tieren

von R. Doetsch.

(28. XI. 44.)

Den ersten direkten Nachweis für die Störung der Phosphorylierung des Glykogens bei nebennierenlosen, adynamen Tieren hat *Schumann*¹⁾ an Ratten erbracht. Er untersuchte in einem Ansatz aus Muskelbrei, Glykogen und Natriumfluorid die Abnahme des freien Phosphates bzw. die Zunahme der veresterten Phosphorsäure. Dieser Prozess war beim nebennierenlosen adynamen Tier deutlich vermindert. *Verzár* und *Montigel*²⁻⁷⁾ haben diesen Befund an Muskeln von Ratten, Katzen und Hunden erweitert. Sie konnten

¹⁾ *Schumann, H.*, *Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

²⁾ *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Schweiz. med. Wschr.* **71**, 101 (1941).

³⁾ *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Verh. Schweiz. Physiologen*, Jan. 1942.

⁴⁾ *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Helv.* **25**, 9 (1942).

⁵⁾ *Montigel, C.* und *F. Verzár*, *Helv.* **25**, 22 (1942).

⁶⁾ *Montigel, C.*, *Helv.* **26**, 883 (1943).

⁷⁾ *Verzár, F.* und *C. Montigel*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **1**, 115 (1943).