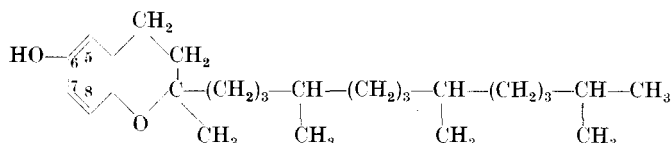


137. Die getrennte Bestimmung der Tocopherole

von M. Kofler.

(10. V. 47.)

Aus pflanzlichen Oelen sind 3 Substanzen mit Vitamin E-Wirksamkeit isoliert worden, die als α -, β - und γ -Tocopherol bezeichnet werden und die als Methylderivate des „Tocols“



aufgefasst werden können. Im α -Tocopherol liegt das 5,7,8-Trimethyl-tocol, im β -Tocopherol das 5,8-Dimethyl-tocol und im γ -Tocopherol das 7,8-Dimethyl-tocol vor. 5,7-Dimethyl-tocol ist in der Natur noch nicht aufgefunden, jedoch synthetisch hergestellt worden. Es besitzt eine biologische Aktivität, die ungefähr derjenigen von α -Tocopherol gleichkommen soll¹⁾. Kürzlich ist von amerikanischen Autoren²⁾ aus Sojaöl eine als δ -Tocopherol bezeichnete Verbindung isoliert worden, in welcher wahrscheinlich 8-Monomethyl-tocol vorliegt. Angaben über die biologische Wirksamkeit dieser Verbindung sind nicht bekannt; das synthetische 8-Monomethyl-tocol, das möglicherweise ein Raumisomeres der aus Sojaöl isolierten Verbindung ist, soll biologisch inaktiv sein³⁾.

Da β - und insbesondere γ -Tocopherol eine bedeutend kleinere biologische Wirksamkeit aufweisen als α -Tocopherol, ist eine getrennte Bestimmung der Tocopherole erwünscht. Über diese Möglichkeit soll im folgenden vorwiegend berichtet werden.

Chromatographische Trennung der Tocopherole.

Die getrennte Bestimmung der Tocopherole würde erleichtert, wenn es gelänge, die Verbindungen chromatographisch zu trennen. Wir haben dies versucht unter Verwendung von Aluminiumoxyd als Adsorbens und sind zu folgendem Ergebnis gelangt: Die Haftfestigkeit steigt in der Reihenfolge α -Tocopherol, 5,7-Dimethyl-tocol, β -, γ -, δ -Tocopherol. Diese Reihenfolge ist auch theoretisch zu erwarten, denn die Adsorptionsaffinität geht in erster Linie von der 6-Oxy-

¹⁾ Jacob, A., Steiger, M., Todd, A. R., und Work, T. S., Soc. **1939**, 542.

²⁾ Stern, M. H., Robeson, Ch. D., Weisler, L. und Baxter, J. G., 110th Meeting Am. Soc. Sept. 1946, S. 36 B.

³⁾ Jacob, A., Suthcliffe, F. K. und Todd, A. R., Soc. **1940**, 327.

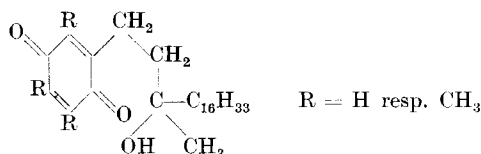
gruppe aus. Benachbarte CH_3 -Gruppen dürften diese Affinität aus sterischen Gründen herabsetzen. Folglich muss die Adsorptionsaffinität bei α -Tocopherol (5,7,8-Trimethyl-tocol) am geringsten und bei 5,7-Dimethyl-tocol nur wenig grösser sein, wie es das Experiment zeigt. Die Affinität muss grösser sein bei β - resp. γ -Tocopherol (5,8- resp. 7,8-Dimethyl-tocol), wo nur 1 Methylgruppe unmittelbar benachbart zur Oxygruppe ist, und zwar dürfte der die Adsorption hemmende Einfluss bei β -Tocopherol grösser sein, weil die beiden Methylgruppen auf verschiedenen Seiten der Oxygruppe liegen. Die geringste Herabsetzung der Adsorptionsaffinität muss schliesslich δ -Tocopherol (8-Methyl-tocol) zeigen, alles in Übereinstimmung mit dem Experiment.

Die Unterschiede in den Adsorptionsaffinitäten reichen gerade aus, um das schwach adsorbierbare α -Tocopherol von dem am stärksten adsorbierbaren γ -, resp. δ -Tocopherol quantitativ zu trennen. Von diesem Trennverfahren machen wir Gebrauch bei der Bestimmung von α -Tocopherol in Gegenwart von γ - und δ -Tocopherol, denn ohne Trennung liesse es sich nur als Differenz bestimmen, da keine Reaktion bekannt ist, die für α -Tocopherol positiv, für die übrigen Tocopherole aber negativ ausfällt.

Bei der chromatographischen Trennung mussten wir uns eines Oxyds bedienen, das wir mit Zinn(II)-chlorid vorbehandelt hatten, ein Verfahren, das andere Autoren¹⁾ bei Floridin angewendet haben. Ohne diese Vorbehandlung konnte nur α -Tocopherol vom Oxyd verlustlos abgelöst werden. Die Verluste stiegen in der Reihenfolge steigender Adsorptionsaffinität und erreichten beim γ -Tocopherol gegen 80%. Offenbar handelt es sich um eine Autoxydation des adsorbierten Tocopherols.

Oxydimetrische Methoden.

Bei diesen Methoden werden die Tocopherole durch ein Oxydationsmittel in p-Chinone übergeführt.



Gemessen wird direkt oder indirekt der Verbrauch an Oxydationsmittel. Ohne vorangehende Trennungen sind diese Methoden naturgemäss sehr unspezifisch.

¹⁾ *Glavind, J., Kjølhede, K. T. und Prange, I.*, Kem. Maanedst. nord. Handelsbl. kem. Ind. **23**, 43 (1942), referiert C. **1942**, II, 555.

Bei der am meisten verwendeten Methode nach *Emmerie* und *Engel*¹⁾ dient FeCl_3 als Oxydationsmittel, die gebildeten Eisen(II)-Ionen werden an α, α' -Dipyridyl gebunden und der gebildete Komplex kolorimetrisch bestimmt. Bei der von uns gewählten Ausführung der Tocopherolbestimmung mit FeCl_3 -Dipyridyl in alkoholischer Lösung ergaben sich für die einzelnen Tocolde deutliche Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit, wie aus Figur 1 hervorgeht. Oxydiert wurden $0,25 \times 10^{-6}$ Mole (das sind ca. 0,1 mg Tocol). Während α - und β -Tocopherol sowie 5,7-Dimethyl-tocol in 2 Minuten praktisch vollständig oxydiert sind und dabei eine Extinktion von 1,34 erreichen, während γ - und δ -Tocopherol viel langsamer reagieren, um schliesslich nach 20 Minuten eine Extinktion zu erreichen, die wesentlich höher ist als 1,34.

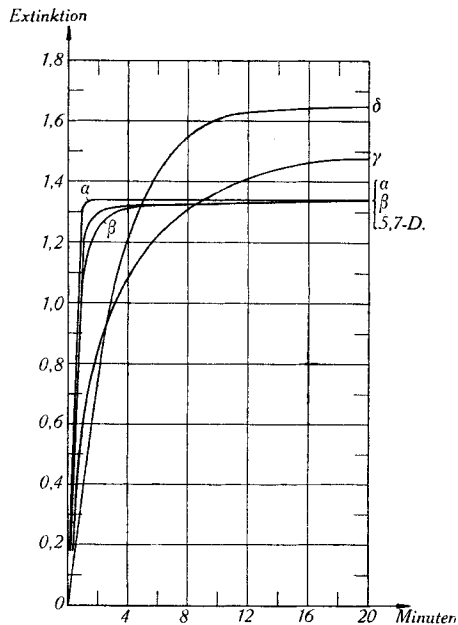


Fig. 1.

Zeitlicher Ablauf der Eisen(III)-chlorid- α, α' -Dipyridyl-Reaktion.

reagieren γ - und δ -Tocopherol viel langsamer, um schliesslich nach 20 Minuten eine Extinktion zu erreichen, die wesentlich höher ist als 1,34. Auf die Tatsache, dass δ -Tocopherol bei der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion ein von den anderen Tocopherolen abweichendes Verhalten zeigt, haben schon andere Autoren hingewiesen²⁾. Eine höhere Extinktion müsste sich ergeben, wenn Eisen(II)-Ionen durch Oxydation des als Lösungsmittel verwendeten Alkohols gebildet würden. Um die Frage zu prüfen, ob dieser Prozess durch δ -Toco-

¹⁾ *Emmerie, A. und Engel, Ch., R. 57, 1351 (1938).*

²⁾ *Stern, M. H., Robeson, Ch. D., Weisler, L. und Baxter, J. G., 110th Meeting Am. Soc. Sept. 1946, S. 36 B.*

pherol katalysiert wird, haben wir die Reaktion in einer Mischung von Wasser-Aceton durchgeführt, wo eine Reduktion der Eisen(III)-Ionen durch das Lösungsmittel kaum möglich ist. Tatsächlich ergab sich nun für α - und δ -Tocopherol derselbe Wert der End-Extinktion, dabei reagiert auch hier α -Tocopherol sehr viel rascher als δ -Tocopherol; die höhere Extinktion in Alkohol rührt also von einer durch δ -Tocopherol katalysierten Oxydation des Lösungsmittels her.

Wenn man annimmt, dass der Katalysator Tocopherol durch ein reversibles Hin- und Herpendeln zwischen reduzierter und oxydierter Stufe wirkt, dann folgt, dass die primär, reversibel erreichte oxydierte Stufe nicht mit Tocopheryl-chinon identisch sein kann, denn Tocopheryl-chinon wirkt nicht katalytisch, sonst würde kein Endwert der Extinktion erreicht.

Führt man die Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion mit einer Mischung der Tocopherole aus, so lässt sich aus der gemessenen Extinktion nur eine ungefähre Abschätzung des Gesamt-Tocopherolgehaltes machen. In Abwesenheit von β -Tocopherol trennt man α -Tocopherol chromatographisch von γ - und δ -Tocopherol ab und kann dann ersteres mit Hilfe der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion bestimmen. Einen anderen Weg beschreiten *E. L. Hove* und *Z. Hove*¹⁾: Auf Grund der verschiedenen Oxydationsgeschwindigkeit bei der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion wird α -Tocopherol getrennt neben β - und γ -Tocopherol bestimmt.

Zur Bestimmung des Tocopherols im Blutplasma haben wir uns neben der fluorometrischen Methode (s. w. u.) auch der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Methode bedient. Fluorometrisch konnten wir zeigen, dass im menschlichen Blutplasma nur α -Tocopherol in messbarer Menge vorkommt. Die Übereinstimmung zwischen den fluorometrisch und oxydimetrisch erhaltenen Werten ist befriedigend, besonders wenn der Plasmaextrakt chromatographisch gereinigt wird. Die Spezifität der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Methode ist also in diesem Falle ausreichend, so dass sich die Methode für Serien-Bestimmungen gut eignet.

Neben der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion bedienen wir uns, wenn es sich um die Bestimmung relativ grosser Tocopherol-Mengen handelt, auch der Cer(IV)-sulfat-Methode²⁾³⁾. Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit sind nicht nachzuweisen, da die Oxydation aller Tocopherole praktisch momentan verläuft. Die Methode eignet sich daher zur volumetrischen Bestimmung.

¹⁾ *Hove, E. L.* und *Hove, Z.*, *J. Biol. Chem.* **156**, 601 (1944).

²⁾ *Kofler, M.*, *Verh. Schweiz. Naturf. Ges.* **1941**, 239.

³⁾ *Schulek, E.* und *Rózsa, P.*, *Z. anal. Ch.* **126**, 253 (1943).

Die *Furter-Meyer*-Reaktion.

Furter und *Meyer*¹⁾ haben gezeigt, dass α -Tocopherol unter der Wirkung von konz. Salpetersäure in heissem Alkohol in ein rotgefärbtes Derivat übergeführt wird und dass diese Reaktion zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von α -Tocopherol verwendet werden kann. Auch andere 6-Oxychromane geben diese Reaktion²⁾, so insbesondere die 3 isomeren Dimethyl-tocole und δ -Tocopherol. Allerdings ist die optimale Einwirkungsdauer der Salpetersäure von Fall zu Fall verschieden. Damit der rotbraune Stoff, das „Tocopherolrot“ entsteht, muss die Reaktion nach *Smith, Irwin* und *Ungnade*²⁾ in Alkohol durchgeführt werden, eine Beschränkung, die nach *Fisher*³⁾ für β - und γ -Tocopherol nicht gilt. Dieser Autor oxydiert in einer Mischung von Chloroform und Eisessig; dabei entsteht bei γ -Tocopherol eine viel intensivere Farbe als bei β -Tocopherol.

Wir haben α -, β -, γ - und δ -Tocopherol während einigen Minuten in verschiedenen Lösungsmitteln der Wirkung konz. Salpetersäure in der Kälte ausgesetzt. In Methanol und Äthanol entstehen keine Färbungen. Dagegen reagieren β - und γ -Tocopherol unter Entstehung rotvioletter bis gelber Lösungen in Butanol, Benzylalkohol, Benzol, Äther, Petroläther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Eisessig, Essigester, Aceton. Eine besonders intensive rotviolette Farbe tritt mit β -Tocopherol in Chloroform auf; bei γ - und δ -Tocopherol ist die Farbe in diesem Lösungsmittel mehr nach Orange verschoben. Bei dieser Farbreaktion handelt es sich um Halochromie, denn schüttelt man die rote Chloroformlösung mit Wasser, so geht die Farbe stark zurück, um beim Schütteln mit konz. Salpetersäure oder 85-proz. Schwefelsäure wieder zu erscheinen. Die Vermutung, dass die Halochromie durch Tocopherolrot bewirkt werde, erwies sich als unzutreffend, denn führt man das in Alkohol hergestellte Tocopherolrot in Chloroform über, so zeigt es ebensowenig Halochromie wie Tocopherol.

Enthält eine Mischung neben α -Tocopherol noch eines der 3 anderen Tocopherole, so kann letzteres durch die Salpetersäure-Reaktion in Chloroform und hierauf α -Tocopherol nach einer Salpetersäure-Oxydation in Alkohol bestimmt werden, wobei von der Extinktion der Betrag abzuziehen ist, welcher dem β -, γ - oder δ -Tocopherol entspricht (vgl. Beispiel im experimentellen Teil).

Fluorometrische Methode.

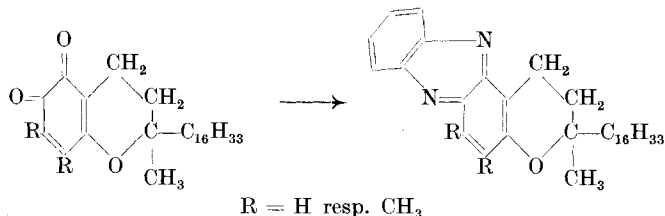
Nach *Smith, Irwin* und *Ungnade*²⁾ liegen in den bei der Salpetersäure-Oxydation aus den Tocopherolen erhaltenen roten Verbindungen Orthochinone vor. Zum Beweis wird unter anderem ange-

¹⁾ *Furter, M.* und *Meyer, R. E.*, *Helv.* **22**, 240 (1939).

²⁾ *Smith, L. I., Irwin, W. B.* und *Ungnade, H. E.*, *Am. Soc.* **61**, 2424 (1939).

³⁾ *Fisher, G. S.*, *Ind. Eng. Chem. Anal.* **17**, 224 (1945).

führt, dass sich diese Verbindungen mit *o*-Phenylendiamin zu Phenazinderivaten kondensieren lassen:



Wir haben auf Grund dieser Reaktion eine fluorometrische Bestimmungsmethode für α -Tocopherol ausgearbeitet¹⁻³). Die 2 isomeren Dimethyl-tocole sowie δ -Tocopherol haben wir nun in gleicher Weise auf deren Phenazinderivate verarbeitet. Dementsprechend wurden die Tocole in siedendem Alkohol mit Salpetersäure oxydiert, in Eisessig kondensiert und die Phenazinderivate chromatographisch an Aluminiumoxyd gereinigt. Dabei stiessen wir auf sehr komplizierte Verhältnisse. Während α -Tocopherol ein einheitliches Phenazinderivat liefert, ist das bei den übrigen Tocopherolen nicht der Fall.

Vergleichen wir zunächst das Paar α -Tocopherol — γ -Tocopherol. Die beiden Tocopherole sollten gemäss obiger Formel das gleiche Phenazinderivat liefern. Tatsächlich resultieren aber bei γ -Tocopherol mindestens zwei verschiedene Phenazinderivate, von denen das am leichtesten eluierbare auf Grund des chromatographischen Verhaltens und der Fluoreszenzfarbe mit dem aus α -Tocopherol hergestelltem Derivat identisch sein dürfte, wie es die Formel verlangt. Daneben entsteht in viel geringerer Ausbeute ein etwas schwerer eluierbares und mehr grün fluoreszierendes Phenazinderivat, das sich von dem leichter eluierbaren, gelbgrün fluoreszierenden Derivat an einer 20 cm hohen Oxydsäule leicht abtrennen lässt. Möglicherweise erfolgt bei diesem Derivat die *o*-Chinonbildung resp. Phenazinkondensation in 6,7-Stellung. Im Ultraviolettabsorptionsspektrum zeigen sich zwar auch bei diesem Derivat die typischen Banden wie sie das Phenazinderivat des α -Tocopherols aufweist (vgl. Figur 2), aber die langwellige Bande besitzt eine relativ zur kurzwelligen Bande viel kleinere Extinktion als dies beim Phenazinderivat des α -Tocopherols der Fall ist.

Auch für das Paar β -Tocopherol — δ -Tocopherol ist ein identisches Phenazinderivat zu erwarten. Untersucht man die Kondensationsprodukte chromatographisch an schwach aktiviertem Aluminiumoxyd, so weisen beide eine gelbgrün fluoreszierende Zone auf,

¹⁾ Kofler, M., Helv. **25**, 1469 (1942).

²⁾ Kofler, M., Helv. **26**, 2166 (1943).

³⁾ Kofler, M., Helv. **28**, 26 (1945).

bei welcher es sich gemäss der Haftfestigkeit, der Farbe der Fluoreszenz und dem Ultraviolettabsorptionsspektrum um ein identisches Phenazinderivat handeln könnte. (Hinsichtlich des chromatographischen Verhaltens haben diese Phenazinderivate grosse Ähnlichkeit mit demjenigen der beiden aus γ -Tocopherol hergestellten Phenazinderivaten, das stärker haftet. Dagegen weist letzteres ein merklich verschiedenes Absorptionsspektrum auf.) Daneben wird aus β - resp. δ -Tocopherol noch ein Phenazinderivat gebildet, das viel stärker

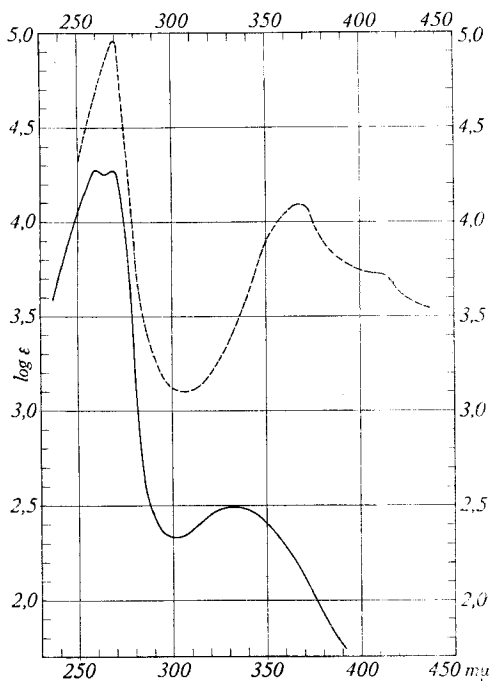


Fig. 2.

Ultraviolett-Absorptions-Spektren von:
 α -Tocopheryl-chinon ———
 Phenazinderivat von α -Tocopherol - - - - -
 Lösungsmittel: Petroläther

haftet und welches im Falle von β -Tocopherol gelb, im Falle von δ -Tocopherol grün fluoresziert. Auch diese Derivate weisen die typischen Phenazinbanden bei 265—270 und 370 $m\mu$ auf. Die Überführung von β - und δ -Tocopherol in deren Phenazinderivate erfolgt in viel schlechterer Ausbeute, als das bei α - und γ -Tocopherol der Fall ist, so dass die fluorometrische Methode zur Bestimmung dieser Tocopherole viel unempfindlicher wird. Dagegen können α - und γ -Tocopherol in Gegenwart dieser Tocopherole fluorometrisch bestimmt werden, da letztere nur einen sehr kleinen Beitrag zur Fluor-

reszenz liefern. Zudem hatten die Phenazinderivate von β - und δ -Tocopherol wesentlich stärker am Oxyd, so dass sie gegebenenfalls chromatographisch abgetrennt werden könnten.

Eine Möglichkeit der fluorometrischen Bestimmung von γ -Tocopherol in Gegenwart von α -Tocopherol ergibt sich, wenn die Salpetersäureoxydation in Chloroform durchgeführt wird, die ja nur bei γ -Tocopherol rasch verläuft. Tatsächlich zeigt eine anschliessende Kondensation, dass man, ausgehend von gleichen Mengen α - und γ -Tocopherol nur bei letzterem zu einem intensiv fluoreszierenden Eluat gelangt. Wenn also eine Mischung von α - und γ -Tocopherol nicht sehr viel α -Tocopherol neben wenig γ -Tocopherol enthält, darf man annehmen, dass die Fluoreszenz des Eluates praktisch nur vom Phenazinderivat des γ -Tocopherols herrührt.

Obschon auch β - und δ -Tocopherol in Chloroform durch Salpetersäure sofort angegriffen werden, gelangt man nach einer Kondensation zu den Phenazinderivaten zu sehr schwach fluoreszierenden Eluaten, die sich nicht zur fluorometrischen Bestimmung eignen. 5,7-Dimethyl-tocol verhält sich wie α -Tocopherol negativ, was nach dem negativen Ausfall der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform zu erwarten war.

Verschiedene kolorimetrische Methoden.

Wir haben früher¹⁾ darauf hingewiesen, dass sich das Phenazinderivat des α -Tocopherols auch kolorimetrisch bestimmen lässt, insbesondere in Schwefelsäure als Lösungsmittel. Dies gelingt allerdings nur dann, wenn keine Begleitsubstanzen vorhanden sind, die durch Schwefelsäure zu gefärbten Produkten zersetzt werden; diese Bedingung dürfte nur ausnahmsweise erfüllt sein.

Eine Rotfärbung der alkoholischen Lösungen von β - und γ -Tocopherol beim Versetzen mit salpetriger Säure erwähnen *Scudi* und *Buhs*²⁾. Dieselben Autoren haben auch die Vermutung ausgesprochen, dass β - und γ -Tocopherol, die ja in ortho-Stellung zum phenolischen Hydroxyl nicht beidseitig substituiert sind, zu einem Azofarbstoff gekuppelt werden könnten. *Quaife*³⁾ hat darauf festgestellt, dass wohl γ -, nicht aber β -Tocopherol mit diazotiertem p-Nitranilin zu einem roten Farbstoff gekuppelt werden kann, der sich mit Petroläther ausschütteln lässt. Bei δ -Tocopherol erhielten wir wesentlich intensiver gefärbte Lösungen als bei Verwendung von γ -Tocopherol. Die Reaktion erfolgt bei δ -Tocopherol etwas langsamer als bei γ -Tocopherol. Eine Trennung der beiden Azofarbstoffe durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gelang uns nicht, dagegen lassen sich chromatographisch farbige Begleitsubstanzen abtrennen.

¹⁾ *Kofler, M.*, Helv. **26**, 2166 (1943).

²⁾ *Scudi, J. V.* und *Buhs, R. P.*, J. Biol. Chem. **146**, 1 (1942).

³⁾ *Quaife, M. L.*, Am. Soc. **66**, 308 (1944).

Enthält die zu analysierende Mischung neben α - und β -Tocopherol noch γ - oder δ -Tocopherol, so lassen sich die letzteren mit Hilfe der Diazoreaktion neben α - und β -Tocopherol bestimmen, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, dass die Diazoreaktion keine sehr spezifische Reaktion darstellt. Eine Möglichkeit, γ - und δ -Tocopherol nebeneinander zu bestimmen, erwähnen amerikanische Autoren¹⁾: gekuppelt wird mit diazotiertem o-Dianisidin und hierauf wird die Lichtabsorption bei 2 verschiedenen Alkalinitäten gemessen.

Spektrographische Methoden.

Die Tocopherole besitzen im Ultraviolett eine Absorptionsbande, deren Maximum in Alkohol für α -Tocopherol bei 292 m μ , für die anderen Tocopherole etwas langwelliger, jedoch nicht über 300 m μ liegt. Der molekulare Extinktionskoeffizient des Maximums liegt zwischen 3100 und 3800, α -Tocopherol absorbiert am kurzwelligsten und schwächsten, δ -Tocopherol am langwelligsten und stärksten; die Methylgruppen bewirken also eine Verfestigung. Die Unterschiede sind aber zu gering, als dass eine spektrographische Bestimmung der einzelnen Tocopherole einer Mischung ohne vorangehende Trennung in Frage käme.

Wir haben versucht, Tocopherol spektrographisch im menschlichen Blutplasma zu bestimmen. Fluorometrisch konnten wir im Plasma nur α -Tocopherol in messbarer Menge nachweisen. Durch Verseifen und Chromatographieren sind wir zu Lösungen gelangt, welche die Absorptionsbande des Tocopherols andeutungsweise erkennen liessen; an eine quantitative Bestimmung war aber nicht zu denken.

Wesentlich stärker als Tocopherol absorbiert Tocopheryl-chinon. Wir haben zunächst diese Verbindung durch Oxydation von Tocopherol mit Cer(IV)-sulfat und nachfolgende chromatographische Reinigung hergestellt und das Absorptionsspektrum der reinen Verbindung aufgenommen (Fig. 2). Tocopheryl-chinon weist eine Bande mit 2 Maxima bei 260 resp. 269 m μ und einem molekularen Extinktionskoeffizienten von 19000 auf und daneben noch eine zweite Bande mit einem flachen Maximum in der Gegend von 330 m μ und einem molekularen Extinktionskoeffizienten von 310. Diese beiden Bandensysteme sind hinsichtlich Lage und Höhe der Extinktion typisch für die Parachinone²⁾. Das kurzwelligere Maximum unseres Präparates entspricht einem Wert von $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 425$, der etwa 30% höher liegt als der von *Emerson*, *Emerson* und *Evans*³⁾ angegebene Wert.

¹⁾ *Weisler, L., Robeson, C. D. und Baxter, J. G.*, 110th Meeting Am. Soc. Sept. 1946, S. 9L.

²⁾ *Braude, E. A.*, Soc. **1945**, 490.

³⁾ *Emerson, O. H., Emerson, G. A. und Evans, H. M.*, J. Biol. Chem. **131**, 409 (1939).

Wir haben nun den Petrolätherextrakt aus dem Blutplasma nach einer Verseifung ebenfalls in alkoholischer Lösung mit Cer(IV)-sulfat oxydiert und gereinigt. Im Spektrum liess sich zwar die Tocopherylinon-Bande erkennen, jedoch zeigte der kurzwellige Ast nicht den erwarteten Abfall. Die Bande war besonders im Kurzwelligen durch Begleitstoffe noch wesentlich erhöht und gab daher zu hohe Werte für den Tocopherolgehalt.

Wir verzichteten auf eine weitere Reinigung und versuchten durch Aufnahme des U.V.-Absorptionsspektrums des Tocopherol-Phenazinderivates zum Ziele zu gelangen. Zu diesem Zwecke haben wir das Phenazinderivat rein hergestellt und sein Spektrum aufgenommen (Fig. 2). Die Verbindung weist eine Bande bei $270\text{ m}\mu$ mit einem ausserordentlich hohen molekularen Extinktionskoeffizienten ϵ von 90 000 (*John und Emte*¹) geben für ein unreines Präparat den Wert 22 100) und eine zweite Bande bei $367\text{ m}\mu$ mit einem ϵ von 12 000 auf. Da es besonders schwer hält, die im Kurzwelligen absorbierenden Verbindungen zu eliminieren, ist auch diese letztere Bande, obschon niedriger, zur Konzentrationsbestimmung geeignet.

Zur Bestimmung des Tocopherols im Blutplasma haben wir den Petrolätherextrakt nach einer chromatographischen Reinigung in der üblichen Weise auf das Phenazinderivat verarbeitet und das Absorptionsspektrum aufgenommen. Die beiden Banden treten sehr deutlich hervor. Da die Überführung des Tocopherols in sein Phenazinderivat aber mit schlechter Ausbeute erfolgt, hat man sich einmalig Vergleichsaufnahmen herzustellen, indem man von bestimmten Mengen Tocopherol ausgeht, dieses in das Phenazinderivat überführt und das Absorptionsspektrum aufnimmt. Die Bestimmung des Tocopherolgehaltes einer unbekannt Probe erfolgt dann durch Interpolation. Zur spektrographischen Bestimmung genügen $5\text{--}10\text{ cm}^3$ Plasma. Man erhält Werte, die mit den nach den übrigen Methoden bestimmten Werten gut übereinstimmen. Für Serienbestimmungen ist diese Methode zu kompliziert, sie kann aber gute Dienste leisten, wenn es sich um eine einmalige Kontrolle der Spezifität einer Tocopherol-Bestimmungsmethode handelt oder wenn man bei der fluorometrischen Methode wegen Nebenfluoreszenzen auf Schwierigkeiten stösst.

Die Bestimmung der Ester des Tocopherols.

Nach den Angaben der Literatur sollen die Tocopherole, insbesondere α -Tocopherol, in der Natur nicht in verestertem Zustand vorkommen. Dagegen sind synthetisch verschiedene Ester des Tocopherols hergestellt worden. Wir haben uns eingehender mit dem Acetat und dem Phosphat des α -Tocopherols beschäftigt. Ersteres dient als Vitamin-E-Standardpräparat, letzteres wird in Form wasserlöslicher

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

Alkalisalze zu Injektionszwecken verwendet. Die Hydrolyse des Acetates erfolgt am besten in alkoholischer, schwefelsaurer Lösung; in alkalischer Lösung treten auch in inerte Gasatmosphäre kleine Verluste ein. Unsere Versuche, den Phosphorsäure-ester in saurer oder alkalischer-alkoholischer Lösung zu spalten, blieben erfolglos. Trotz stundenlangem Kochen in alkoholischer Schwefelsäure liess sich kein Tocopherol nachweisen. Dagegen zerfällt der Ester schon in der Kälte fast momentan in Gegenwart von Cer(IV)-sulfat, eine Erscheinung, die wir schon bei der Hydrolyse des Phosphorsäure-esters von 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon beobachtet hatten¹⁾. Unter diesen Bedingungen wird das freiwerdende Tocopherol sofort zu Tocopherylinchinon oxydiert. Es ist aber zweifelhaft, ob der Grund der leichten Spaltbarkeit in dieser Oxydation zu suchen ist, da Cer(IV)-sulfat bei der Spaltung der Acetate von Tocopherol und 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon ohne wesentlichen Einfluss ist. Die Bestimmung des Tocopherylinchinons erfolgt dann entweder nach *Furter-Meyer* als Tocopherolrot oder fluorometrisch, als Phenazinderivat. Tocopherylinchinon wird bei der Salpetersäure-Reaktion mit gleicher Ausbeute wie Tocopherol in Tocopherolrot übergeführt.

Experimenteller Teil.

Im folgenden werden zunächst die Methoden beschrieben, die wir verwenden, wenn nur eines der Tocopherole anwesend ist, was durch einen qualitativen Versuch entschieden werden kann; s. w. u.

Die Cer(IV)-sulfat-Titration.

Die als Eichsubstanzen verwendeten Tocole (α -Tocopherol synth. „*Roche*“; β -Tocopherol synth. „*Merck*“, Rahway; natürliches γ - und δ -Tocopherol der „*Distillation Products*“, Rochester, N.Y.; 5,7-Dimethyl-tocol synth. „*Roche*“) werden wie folgt cerimetrisch titriert: Ca. 10 mg werden in 10 cm³ Alkohol gelöst, mit 2 Tropfen Diphenylamin-Indikatorlösung versetzt und mit einer 0,01-n. Cer(IV)-sulfatlösung bis zum Farbumschlag nach Violett titriert. Bei schlechtem Farbumschlag kann der Endpunkt auch mit Leukomalachitgrün als äusserem (irreversiblen) Indikator bestimmt werden. 1 cm³ 0,01-n. Cer(IV)-sulfatlösung entspricht 2,15 mg α -Tocopherol bzw. 2,08 mg Dimethyltocol bzw. 2,01 mg δ -Tocopherol.

Die Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion.

Die auf die Tocopherole zu untersuchende Extraktionslösung wird vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 15 cm³ Reagens aufgenommen. Die Extinktion wird nach 10 Minuten (α -, β -Tocopherol) bzw. nach 30 Minuten (γ -, δ -Tocopherol) am *Pulfrich*-Photometer gemessen mit Filter S 50 bei einer Schichtdicke von 5 cm. Als Kompensationslösung dient das Reagens. Dieses wird wie folgt bereitet: Vor Gebrauch verdünnt man eine Vorratslösung von 20 g FeCl₃ · 6H₂O in 100 cm³ Wasser 1:1000 mit Alkohol abs. und mischt diese Lösung mit einer 0,05-proz. Lösung von α , α' -Dipyridyl in Alkohol im Verhältnis 1:1. Das Reagens färbt sich am Licht rot (Reduktion des Eisen(III)-chlorids durch Alkohol), die Lösungen werden daher bis zur Ablesung im Dunkeln aufbewahrt. Die Berechnung geschieht nach einer Eichkurve (Fig. 3). Zur Bestimmung von β -Tocopherol kann die Kurve von α -Tocopherol verwendet werden, wobei entsprechend dem kleineren Molekulargewicht 3% des Gehaltes abzuziehen sind.

¹⁾ *Kofler, M.*, Helv. **28**, 702 (1945).

Zur Bestimmung des Tocopherolgehaltes von Blutplasma mit der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion werden 5–10 cm³ Plasma, wie früher mitgeteilt¹⁾, mit Petroläther ausgeschüttelt und der Petrolätherextrakt an schwach aktiviertem Aluminiumoxyd chromatographisch gereinigt²⁾, wobei Tocopherol mit Benzol eluiert wird. Diese

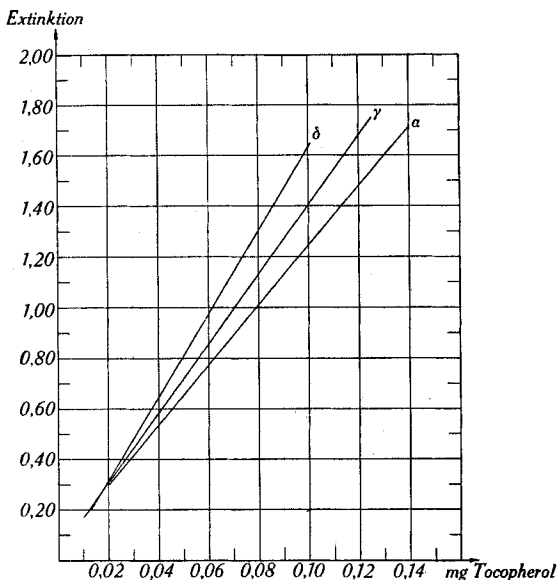


Fig. 3.

Eisen(III)-chlorid- α, α' -Dipyridyl-Reaktion.

Reinigung ist bei Rinderplasma zur Entfernung der Carotinoide unbedingt nötig. Beim Plasma von Mensch und Ratte waren die Unterschiede zwischen gereinigten und nicht gereinigten Proben nur von der Grössenordnung 5–20%. Das vom Lösungsmittel befreite Benzoleluat wird, wie oben angegeben, mit dem Reagens versetzt und die Konzentration aus der Extinktionskurve für α -Tocopherol berechnet.

Die Furter-Meyer-Reaktion.

Alle 4 Tocopherole lassen sich durch Salpetersäure in Alkohol zu rotbraunen Verbindungen oxydieren. Die optimale Einwirkungsdauer ist bei den einzelnen Tocopherolen verschieden. Will man aber die Extinktionskurven auch zur Bestimmung von Mischungen der Tocopherole bestimmen, so empfiehlt sich eine einheitliche Reaktionszeit. Man versetzt 10 cm³ der alkoholischen Lösung mit 2 cm³ konz. Salpetersäure, erhitzt zum Sieden (Siedesteinchen), stellt das Kölbchen während 5 Minuten auf das siedende Wasserbad, kühlt und ergänzt mit Alkohol auf 20 cm³. Die Extinktion wird am Pulfrich-Photometer gemessen mit Filter S 50 bei einer Schichtdicke von 5 cm gegen Alkohol (Fig. 4).

Zur Bestimmung von β -, γ - oder δ -Tocopherol (auch in Gegenwart von α -Tocopherol) durch eine Oxydation in Chloroform gibt man 10 cm³ der Chloroformlösung in einen 25-cm³-Schüttelzylinder, versetzt mit 1 cm³ konz. Salpetersäure und schüttelt während 15 Sekunden. Nach einigen Sekunden lässt man die Chloroformphase in ein Reagensglas

¹⁾ Kofler, M., Helv. **26**, 2166 (1943).

²⁾ Kofler, M., Helv. **28**, 26 (1945).

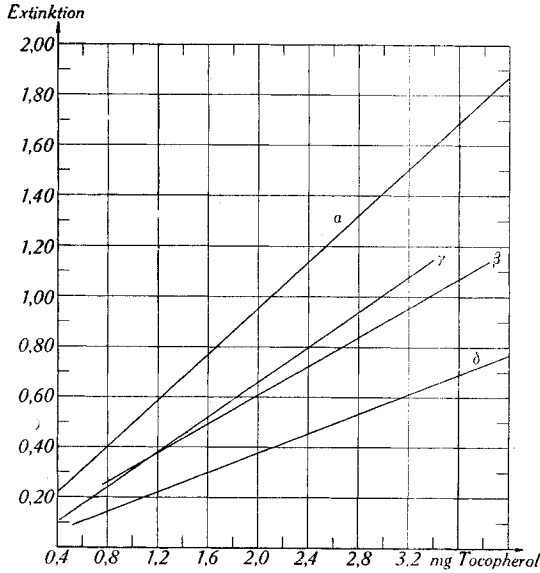


Fig. 4.

Salpetersäure-Reaktion in Alkohol.

ab (noch bevor NO_2 -Dämpfe entstehen) und filtriert in ein dünnwandiges Reagenzglas, hält dieses wenige Sekunden in warmes Wasser zur Vermeidung einer während der Messung entstehenden Trübung und misst am *Pulfrich*-Photometer mit Filter S 50 bei einer Schichtdicke von 2 cm gegen Chloroform (Fig. 5).

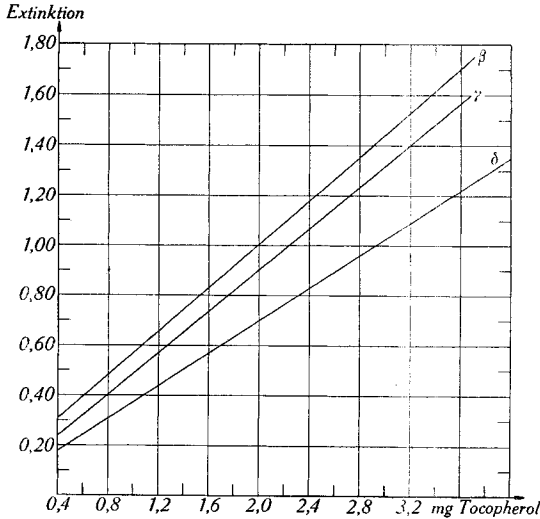


Fig. 5.

Salpetersäure-Reaktion in Chloroform.

Die fluorometrische Methode.

Die der Kondensation zum Phenazinderivat vorangehende Oxydation mit Salpetersäure muss bei α -Tocopherol in Alkohol durchgeführt werden; bei β -, γ - und δ -Tocopherol ist sie sowohl in Alkohol als auch in Chloroform möglich.

Zur Bestimmung nach einer Oxydation in Alkohol verfährt man wie früher angegeben¹⁾. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am besten mit Hilfe eines Fluorometers. In Ermangelung eines solchen sind Vergleichslösungen herzustellen.

Führt man gleiche Mengen von α - und γ -Tocopherol in ihre Phenazinderivate über, so fluoreszieren die aus γ -Tocopherol hergestellten Lösungen etwa halb so stark als die aus α -Tocopherol gewonnenen Lösungen; zudem scheinen sie etwas grünlicher zu fluoreszieren, weil beim analytischen Verfahren eine Trennung der beiden aus γ -Tocopherol gebildeten Phenazinderivate unterbleibt.

Die Methode ist für β - und δ -Tocopherol sowie für 5,7-Dimethyl-tocol viel unempfindlicher als für α - und γ -Tocopherol. Will man trotzdem vor ihr Gebrauch machen, so empfiehlt sich die Verwendung von nur schwach aktiviertem Aluminiumoxyd zur Reinigung der Phenazinderivate.

γ -Tocopherol lässt sich fluorometrisch in Gegenwart von α -Tocopherol bestimmen, wenn die Oxydation in Chloroform durchgeführt wird. Dazu werden 10 cm³ in einen graduierten Schüttelzylinder gegeben, mit 1 cm³ konz. Salpetersäure versetzt und 2 Minuten lang geschüttelt. Dann fügt man sofort ca. 20 cm³ tiefsiedenden Petroläther und ca. 20 cm³ Wasser hinzu, schüttelt, lässt die wässrige Phase ab, wäscht mit Wasser, dann mit konzentrierter Kochsalzlösung und vertreibt das Lösungsmittel. Kondensiert wird wie üblich. Auch diese Methode ist für β - und δ -Tocopherol viel unempfindlicher als für γ -Tocopherol und dürfte sich als Bestimmungsverfahren für diese Verbindungen nicht eignen.

Der zur Kondensation verwendete Eisessig ist mit Tierkohle zu reinigen. Auch die beste käufliche Qualität enthält einen Inhibitor, der die Kondensation des Tocopherolrots hemmt. Die mit gereinigtem Eisessig hergestellte Diaminlösung färbt sich an der Luft rasch braunrot, was nichts schadet. Übrigens beobachtet man auch, dass die bei der Kondensation eintretende Dunkelfärbung um so intensiver wird, je mehr Tocopherolrot kondensiert wird; die Oxydation des o-Phenylendiamins wird also durch Tocopherolrot katalysiert.

Die Diazotierungsmethode.

Zur Bestimmung von γ - bzw. δ -Tocopherol nach dieser Methode werden 15 cm³ der alkoholischen Lösung und gleichzeitig 15 cm³ Alkohol mit je 1 cm³ Diazoniumsalzlösung versetzt. Man misst die Extinktion nach 60 Minuten am *Pulfrich*-Photometer mit Filter S 53 bei einer Schichtdicke von 5 cm (Fig. 6); bis zur Messung werden die Lösungen im Dunkeln aufbewahrt. Zur Herstellung der Diazoniumsalzlösung löst man 0,7 g p-Nitranilin in 20 cm³ konz. Salzsäure plus 20 cm³ Wasser, stellt diese Lösung in den Eisschrank und mischt vor Gebrauch 1 Teil dieser Lösung mit 1 Teil einer kalten 1-proz. Natriumnitritlösung. Da es sich zeigte, dass die Extinktion bei Verwendung von frisch vorbereitetem Reagens etwas kleiner ist als bei Verwendung eines einige Stunden alten Reagens, stellen wir die Diazoniumsalzlösung stets frisch her.

Der Azofarbstoff kann mit Petroläther ausgeschüttelt werden, was insbesondere erforderlich ist, wenn beim Versetzen der zu prüfenden alkoholischen Lösung mit dem wässrigen Reagens eine Trübung entsteht. In diesem Falle setzt man der Farbstofflösung nach Ablauf von 60 Minuten 1 cm³ Wasser zu und schüttelt mit ca. 15 cm³ Petroläther (80–100°) aus, wäscht diesen mit Wasser, filtriert in ein 20-cm³-Messkölbchen und ergänzt zur Marke. Man misst am *Pulfrich*-Photometer mit Filter S 53 gegen Petroläther bei einer Schichtdicke von 5 cm (Fig. 6).

Enthält die Petrolätherlösung farbige Begleitsubstanzen, so versucht man, sie chromatographisch abzutrennen. Dazu wird die Lösung der Azofarbstoffe in Petroläther

¹⁾ *Kofler, M.*, Helv. **26**, 2166 (1943).

auf eine kleine Säule von schwach aktiviertem Aluminiumoxyd aufgetragen und mit einer Mischung von Petroläther-Benzol eluiert. Die Zusammensetzung der Elutionsflüssigkeit richtet sich nach der Aktivität des verwendeten Oxyds.

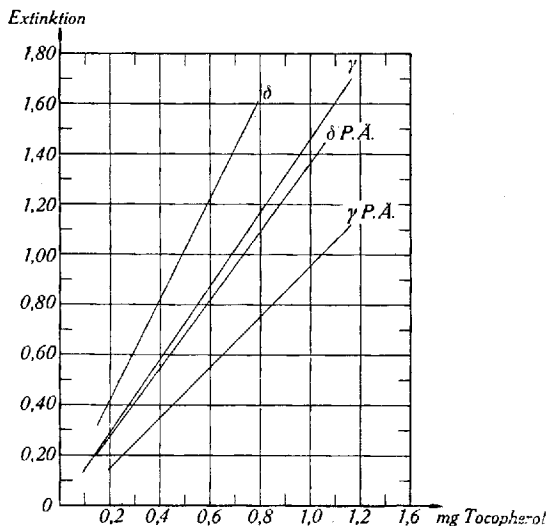


Fig. 6.
Diazoreaktion.

Mischungen der Tocopherole.

Ob neben α -Tocopherol noch ein anderes Tocopherol vorhanden ist, entscheidet man am einfachsten mit der Salpetersäurereaktion in Chloroform, die mit β -, γ - und δ -Tocopherol positiv ausfallen muss. Gleichzeitig orientiert die entstehende Farbe darüber, welches der 3 Tocopherole vorhanden ist: eine rotviolette Farbe deutet auf β -Tocopherol, eine rotorange Farbe auf γ - oder δ -Tocopherol hin.

γ - und δ -Tocopherol lassen sich in Gegenwart von α - und β -Tocopherol mit der Diazoreaktion bestimmen.

β -Tocopherol lässt sich in Gegenwart von α -Tocopherol mit der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform bestimmen; ist noch γ - oder δ -Tocopherol vorhanden, so muss β -Tocopherol als Differenz bestimmt werden, indem man γ - bzw. δ -Tocopherol mit der Diazoreaktion und hierauf β - plus γ - bzw. δ -Tocopherol mit der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform bestimmt.

α -Tocopherol kann von γ - und δ -Tocopherol chromatographisch getrennt und hierauf einzeln ermittelt werden. In Gegenwart von β -Tocopherol misst man entweder fluorometrisch, wobei praktisch nur α -Tocopherol erfasst wird, oder man bestimmt β -Tocopherol mit der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform und hierauf α - plus β -Tocopherol mit der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl- oder der Salpetersäure-Reaktion in Alkohol. Ist gleichzeitig noch γ - oder δ -Tocopherol anwesend, so trennt man diese chromatographisch von α -Tocopherol. Im Benzoleluat findet sich dann α -Tocopherol neben einem Teil des β -Tocopherols. Die Verhältnisse sollen an 2 Beispielen erläutert werden.

Weizenkeimöl. 5 g des Öles werden in einem 100-cm³-Rundkölbchen mit 25 cm³ 2-n. alkoholischer Kalilauge eine halbe Stunde im Stickstoffstrom am Rückfluss erhitzt. Man gießt durch den Kühler 25 cm³ Wasser und lässt im Eisbad erkalten. Die Verseifungslösung wird mit 75 cm³ Eiswasser in einen Scheidetrichter übergeführt und 2-mal mit je 100 cm³ kaltem Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird mit 10 cm³ Wasser, verdünnter

Salzsäure und wieder mit Wasser gewaschen. Vergleichende Versuche ergaben, dass Tocopherol aus den Verseifungslösungen von Ölen besser mit Äther statt mit Petroläther¹⁾ extrahiert wird. Der Äther wird entweder auf ein bestimmtes Volumen eingengt, oder, wenn chromatographiert werden soll, vollständig vertrieben und der Rückstand in Petroläther aufgenommen. Von einem so verseiften Weizenkeimöl wurde die 1 g Öl entsprechende Menge der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform unterworfen. Die gemessene Extinktion von 0,63 entspricht 1,14 mg β -Tocopherol. Die Diazoreaktion, ebenfalls mit einer 1 g Öl entsprechenden Menge ausgeführt, war negativ, auch deutete die rotviolette Farbe bei der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform auf β -Tocopherol hin. Hierauf wurde eine 1 g Öl entsprechende Menge mit Hilfe der Salpetersäure-Reaktion in Alkohol untersucht; von der gemessenen Extinktion von 0,97 wurde die Extinktion 0,36 abgezogen, die sich ergeben würde, wenn 1,14 mg β -Tocopherol in Alkohol mit Salpetersäure oxidiert würden. Die Differenz von 0,61 entspricht 1,26 mg α -Tocopherol. Die Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion, ausgeführt mit einer 50 mg Öl entsprechenden Menge, ergab eine Extinktion von 1,15 entsprechend 1,82 mg α - plus β -Tocopherol pro g Öl. Das ist weniger als sich nach den kombinierten Salpetersäure-Reaktionen ergibt, nämlich 2,40 mg/g. Fluorometrisch fanden wir 1,1 mg α -Tocopherol/g. Kombiniert man dieses Ergebnis mit der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion, so verbleiben für β -Tocopherol 0,72 mg/g, also wesentlich weniger als nach der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform (1,14 mg).

Baumwollsamöl. Die Verseifung wurde analog wie diejenige des Weizenkeimöles durchgeführt unter Verdoppelung aller Mengen. Die mit einer 2 g Öl entsprechenden Menge durchgeführte Salpetersäure-Reaktion in Chloroform fiel positiv aus und ergab eine Extinktion von 0,75. Da durch die fluorometrische Analyse (200 mg Öl entsprechend ausgeführt) β - und δ -Tocopherol ausgeschlossen werden konnten, musste eine Mischung von α - und γ -Tocopherol vorliegen. Aus obiger Extinktion errechnet sich ein Gehalt von 0,82 mg γ -Tocopherol pro g Öl.

Die chromatographische Trennung von α - und γ -Tocopherol wurde wie folgt vorgenommen: Ein Chromatogramm-Rohr von 1 cm lichter Weite wurde 20 cm hoch mit Aluminiumoxyd, das mit Zinn(II)-chlorid vorbehandelt und leicht aktiviert worden war, gefüllt, und das Unverseifbare aus 6 g Öl, in Petroläther gelöst, aufgetragen. Nach dem Durchsaugen von 100 cm³ Petroläther wurde mit 40 cm³ Benzol und anschliessend mit 30 cm³ Methanol eluiert.

Vom Methanoleluat wurde eine je 2 g Öl entsprechende Menge mit der Salpetersäure-Reaktion in Chloroform bzw. der Diazoreaktion und eine je 200 mg Öl entsprechende Menge mit der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion bzw. fluorometrisch auf γ -Tocopherol untersucht. Es ergaben sich die Werte 0,43 mg, 0,35 mg, 0,41 mg und 0,40 mg γ -Tocopherol pro g Öl. Diese Werte liegen nahe beieinander und sind viel kleiner als der oben, ohne chromatographische Trennung erhaltene Wert. Dass die Salpetersäure-Reaktion in Chloroform ohne chromatographische Trennung einen zu hohen Wert liefern musste, ging daraus hervor, dass diese Reaktion mit dem Benzoleluat positiv ausfiel, obschon dieses auf Grund der Diazoreaktion frei von γ -Tocopherol war.

Zur Bestimmung von α -Tocopherol wurde vom Benzoleluat eine je 200 mg Öl entsprechende Menge der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion bzw. der fluorometrischen Analyse unterworfen. Es ergab sich ein Gehalt von 0,38 bzw. 0,35 mg α -Tocopherol pro g Öl, wogegen die Salpetersäure-Reaktion in Alkohol den wesentlich höheren Wert von 0,55 mg lieferte, was zu erwarten war, da ja die Salpetersäure-Reaktion in Chloroform mit dem Benzoleluat positiv ausfiel (s. o.), obschon dieses frei von γ -Tocopherol war und die Reaktion für α -Tocopherol negativ ausfallen muss.

Das zur chromatographischen Trennung verwendete Aluminiumoxyd wurde wie folgt bereitet: 4 kg Oxyd wurden mit 2 Liter konz. Salzsäure übergossen, in der 200 g Zinn(II)-chlorid gelöst waren. Hierauf wurden noch 2 Liter Wasser zugesetzt und von Zeit zu Zeit aufgerührt. Nach 3 Tagen wurde mit Leitungswasser durch Dekantieren und nachher auf der Nutsche gewaschen, bis das Washwasser mit Methylrot eine gelbe Farbe

¹⁾ Kofler, M., Helv. 26, 2166 (1943).

annahm. Dann wurde mit Aceton nachgewaschen und das Oxyd an der Luft getrocknet. Ein Teil des Oxyds wurde geglüht und mit dem nicht geglühten Oxyd gemischt. Die richtige Aktivität wird in der oben beschriebenen Anordnung mit α - und γ -Tocopherol eingestellt. Wir setzen soviel geglühtes Oxyd zu, dass α -Tocopherol mit 40 cm³ Benzol quantitativ und ohne γ -Tocopherol eluiert wird. Letzteres wird dann mit Methanol eluiert.

Die Bestimmung der Ester des Tocopherols.

Zur Gehaltsbestimmung des als Standard-Präparat verwendeten Acetates von α -Tocopherol verseifen wir 50 mg in 30 cm³ einer 4-n. alkoholischen Schwefelsäure 2 Stunden am Rückfluss (eine inerte Gasatmosphäre ist nicht nötig!) und titrieren cerimetrisch 10 cm³ der mit Alkohol auf 50 cm³ ergänzten Verseifungslösung: 1 cm³ 0,01-n. Cer(IV)-sulfatlösung entspricht 2,36 mg α -Tocopherol-acetat.

Wenn es sich darum handelt, Tocopherol-acetat in vitaminisierten Produkten zu bestimmen, so stellt man sich entweder einen Äther- bzw. Petrolätherextrakt her und verseift diesen, oder man verseift die Probe direkt. Die Verseifung führen wir alkalisch durch, wie oben bei den Ölen angegeben wurde; dabei richtet sich die Menge an Lauge nach der Menge des zu verseifenden Produktes. Die Bestimmung des α -Tocopherols im Unverseifbaren erfolgt dann entweder mit der Eisen(III)-chlorid-Dipyridyl-Reaktion, der Salpetersäure-Reaktion in Alkohol oder fluorometrisch. Es ist meist vorteilhaft, das Unverseifbare zuerst chromatographisch zu reinigen¹⁾. Der alkalischen Verseifung bedienen wir uns auch, wenn es sich darum handelt, nach Verabreichung von Tocopherol-acetat dieses im Blutplasma zu bestimmen. Man erhält die Summe aus verestertem und freiem Tocopherol, während eine Bestimmung ohne Verseifung lediglich letzteres liefert.

Zur Bestimmung des Phosphorsäure-esters von α -Tocopherol versetzt man 10 cm³ der alkoholischen Lösung mit 1 cm³ 0,1-n. Cer(IV)-sulfatlösung, 5 cm³ Wasser und 50 cm³ Äther (peroxydfrei) und schüttelt 2 Minuten. Der Äther wird 2-mal mit ca. 10 cm³ Wasser gewaschen und abgedampft. Man nimmt das gebildete Tocopheryl-chinon in 10 cm³ Alkohol auf (Spuren von Wasser schaden nicht) und oxydiert wie üblich mit Salpetersäure. Das gebildete Tocopherolrot wird entweder als solches gemessen oder, falls es sich um sehr kleine Mengen handelt, in das Phenazinderivat übergeführt und fluorometrisch bestimmt. 1 mg Tocopherol entspricht 1,18 mg des Phosphorsäure-esters. Unerklärlicherweise konnten wir stets auch bei längerer Einwirkung des Cer(IV)-sulfates nur 75–80% des Esters erfassen. Ein Versuch mit 2 mg Tocopherol ergab, dass dieses quantitativ erfasst wird, so dass eine Zerstörung des Tocopherols bzw. Tocopheryl-chinons nicht vorliegt. Möglicherweise ist der Verlust darauf zurückzuführen, dass der Phosphorsäure-ester beim Zusatz der wässrigen Cer(IV)-sulfatlösung zum Teil ausfällt und so der Spaltung entgeht.

Ist der Phosphorsäure-ester in Form eines Salzes in Wasser gelöst, so wird sauer ausgeäthert, der vom Äther befreite Rückstand in Alkohol aufgenommen und mit Cer(IV)-sulfat gespalten.

Herstellung von α -Tocopheryl-chinon.

Zu der Lösung von 1 g α -Tocopherol in 300 cm³ 95-proz. Alkohol lässt man langsam 60 cm³ 0,1-n. Cer(IV)-sulfatlösung zufließen, verdünnt nach wenigen Minuten mit 300 cm³ Wasser und schüttelt mit Petroläther aus. Der durch das Chinon gelb gefärbte Petroläther wird mehrmals mit Wasser und schliesslich mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen. Zur chromatographischen Reinigung verwendet man eine 30 cm hohe und 1½ cm dicke Säule von nur schwach aktiviertem Aluminiumoxyd. Die auf ein kleines Volumen eingengte Petrolätherlösung wird aufgetragen, worauf mit Benzol entwickelt wird, bis das Chinon unten an der Säule angelangt ist. Dann werden die Benzoleluate gesondert aufgefangen. Das nach dem Vertreiben des Benzols hinterbleibende Öl wird im Dunkeln im Hochvakuum getrocknet.

$C_{28}H_{50}O_3$	Ber. C 77,96	H 11,29%
	Gef. „ 77,58	„ 11,48%

¹⁾ Kofler, M., Helv. **28**, 26 (1945).

Herstellung des α -Tocopherol-Phenazinderivates.

Zu der Lösung von 1 g α -Tocopherol in 50 cm³ 95-proz. Alkohol gibt man 10 cm³ konz. Salpetersäure, erhitzt zum Sieden und hält die Lösung während 5 Minuten bei Siedetemperatur. Die gekühlte, mit Wasser verdünnte Lösung wird mit Petroläther ausgeschüttelt, der Petroläther mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und abgedampft. Den Rückstand versetzt man mit einer Lösung von 5 g o-Phenylendiamin in 20 cm³ Eisessig und erhitzt während 3 Stunden auf dem Wasserbad. Die Lösung wird mit Wasser verdünnt, mit Petroläther ausgeschüttelt und der Petroläther mit Wasser, verdünnter Salzsäure, verdünnter Lauge und Wasser gewaschen. Die chromatographische Reinigung erfolgt wie diejenige des Tocopheryl-chinons, jedoch an stark aktiviertem Oxyd. Das Entwickeln und Eluieren wird vor der Quarzlampe verfolgt. Der vom Benzol befreite Rückstand wird bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{34}H_{50}ON_2$	Ber. C 81,22	H 10,03	N 5,57%
	Gef. „ 81,51	„ 10,21	„ 5,65%

Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft, Basel.

138. Über die katalytische Hydrierung von Phenyl-benzyl-glyoxal.

(12. Mitteilung über Ketone, Ketonsäuren und Enol-Lactone)

von P. Ruggli † und A. H. Lutz.

(10. V. 47.)

Im Zusammenhang mit früheren Untersuchungen über α , β -Diketone¹⁾ war es von Interesse, das Verhalten von Phenyl-benzyl-glyoxal (I) bei der katalytischen Hydrierung kennen zu lernen.

Aus den Angaben der Literatur²⁾ ist zu entnehmen, dass bei aromatisch-aliphatischen 1,2-Diketonen die dem Phenylkern benachbarte CO-Gruppe sich in ihrem reaktiven Verhalten von der dem aliphatischen Rest benachbarten CO-Gruppe unterscheidet.

Phenyl-benzyl-glyoxal (I) kann, wie Kohler und Barnes³⁾ festgestellt haben, in zwei verschiedenen desmotropen Formen erhalten werden, einer Enolform (I b) vom Schmelzpunkt 89—90° und einer Ketoform (Ia) vom Smp. 36°, welche letztere sich in Lösung bei Gegenwart von Basen rasch in erstere umlagert. Bei den im folgenden zu beschreibenden Hydrierungsversuchen ergaben die beiden Formen die gleichen Produkte.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Alkohol als Lösungsmittel verwendet und die Hydrierung wurde unter geringem Überdruck bei Zimmertemperatur in Gegenwart von Raney-Nickel durchgeführt.

¹⁾ P. Ruggli †, P. Weis und H. Rupe, Helv. **29**, 1788 (1946).

²⁾ P. Couturier, C. r. **207**, 345 (1938); A. Skita und F. Keil, B. **62**, 1142 (1929); R. H. F. Manske und T. B. Johnson, Am. Soc. **51**, 580, 1906 (1929).

³⁾ E. P. Kohler und R. P. Barnes, Am. Soc. **56**, 211 (1934).