

329. Beitrag zur Analytik des α -Tocopherols

von J. P. Vuilleumier, G. Brubacher und M. Kalivoda

Herrn Prof. Dr. KARL BERNHARD zum 60. Geburtstag gewidmet

(31. X. 63)

Die Vitamin-E-Wirksamkeit eines Nahrungs- oder Futtermittels wird in erster Linie von seinem Gehalt an α -Tocopherol bestimmt. Die Beiträge der anderen Tocopherole zur Vitamin-E-Wirksamkeit sind im allgemeinen geringfügig. Chemische Methoden sprechen jedoch auf alle Tocopherole in ähnlicher Art an, so dass es bei Anwendung rein chemischer Methoden zu einer Überwertung der Vitamin-E-Aktivität kommen kann, sofern nicht durch sorgfältige Trennoperationen die Spezifität des Bestimmungsverfahrens gewährleistet ist [s. z. B. BRO-RASMUSSEN & HJARDE¹); Analytical Methods Committee²); KUBIN & FINK³)].

Bei dem am meisten benutzten Verfahren, welches auf der Reduktion von Eisen(III)-Ionen zu Eisen(II)-Ionen durch freies α -Tocopherol und der Bildung eines Farbkomplexes zwischen Eisen(II)-Ionen und α, α' -Dipyridyl beruht (EMMERIE & ENGEL⁴)), müssen zudem Antioxydantien, wie 6-Äthoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylchinolin (EMQ), mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da derartige Agentien Eisen(III)-Ionen ebenfalls zu reduzieren vermögen.

Will man das α -Tocopherol mittels Säulenchromatographie an desaktiviertem Aluminiumoxid abtrennen, ähnlich wie dies bei der Analyse von Vitamin-A-haltigen Präparaten üblich ist, so wirkt der Umstand störend, dass α -Tocopherol weder durch eine Eigenfarbe noch durch eine Fluoreszenz an der Chromatographiesäule zu lokalisieren ist. Man muss daher bei der Elution der Säule entweder sehr kleine Fraktionen auffangen und jede einzeln nach EMMERIE-ENGEL prüfen oder aber relativ grosse Fraktionen wählen, auf die Gefahr hin, dass dieselben noch andere reduzierende Stoffe enthalten. Keines dieser Verfahren kann bei der Routinebestimmung befriedigen.

Wir haben aus diesem Grunde nach einer Indikatorsubstanz gesucht, welche sich an desaktiviertem Aluminiumoxid ähnlich wie α -Tocopherol verhält und welche sich wiederum leicht von α -Tocopherol abtrennen lässt.

Eine solche Substanz wurde in β -Apo-8'-carotinal gefunden. β -Apo-8'-carotinal und α -Tocopherol verhalten sich auf der desaktivierten Aluminiumoxidsäule und auf der normalen mit Silicagel G belegten Dünnschichtplatte so vollkommen ähnlich, dass auch bei sorgfältigster Arbeitsweise ein Gemisch der beiden Substanzen nicht aufgetrennt werden kann. Andererseits lässt sich β -Apo-8'-carotinal aus dem Gemisch mittels Filtration durch Floridinerde XS quantitativ und ohne Verlust an Tocopherolen entfernen.

¹) F. BRO-RASMUSSEN & W. HJARDE, Acta chem. scand. 11, 34 (1957).

²) Analytical Methods Committee, Analyst 84, 356 (1959).

³) H. KUBIN & H. FINK, Fette – Seifen – Anstrichmittel 63, 280 (1961).

⁴) A. EMMERIE & CH. ENGEL, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 57, 1351 (1938); 58, 283/895 (1939); 59, 246 (1940); 60, 104 (1941).

Gibt man zu einem Gemisch von α -, ζ_1 - und ζ_2 -Tocopherol eine geringe Menge β -Apo-8'-carotinal und chromatographiert über desaktiviertem Aluminiumoxid, so enthält das durch β -Apo-8'-carotinal gefärbte Eluat das gesamte α - und ζ_1 -Tocopherol, während J_2 -Tocopherol unmittelbar nach der β -Apo-8'-carotinal-Fraktion aus der Säule tritt.

Zur Auftrennung eines Gemisches von α -, ζ_1 - und ζ_2 -Tocopherol eignet sich nach SOMMER⁵⁾ die Dünnschichtchromatographie in der von BRENNER & NIEDERWIESER⁶⁾ angegebenen Durchlauftechnik, mit Trichloräthylen als Laufmittel. Wir haben mit dieser Technik eine Reihe von Extrakten aus normalen Futtermittelkomponenten (Weizen, Hafer, Roggen, Mais, Sonnenblumenkerne, Sojaextraktionsschrot, Raps- extraktionsschrot, Erdnussextraktionsschrot, Leinkuchenmehl, Luzernenmehl) untersucht und in keinem Fall ζ_2 -Tocopherol nachweisen können.

Eine säulenchromatographische Abtrennung von ζ_2 -Tocopherol erscheint aus diesem Grund nicht notwendig. Dies erlaubt, die Indikatorsubstanz in einer im Verhältnis zum vorhandenen α -Tocopherol hohen Konzentration einzusetzen, was die vollständige Erfassung des α -Tocopherols garantiert.

Eine mit Hilfe von β -Apo-8'-carotinal durchgeführte Analyse gliedert sich in folgende 4 Schritte:

1. Extraktion und Verseifung des Analysenmaterials unter Zugabe von EMQ.
2. Chromatographie an desaktiviertem Aluminiumoxid unter Zuhilfenahme von β -Apo-8'-carotinal.
3. Filtration über aktivierte Floridinerde zur Entfernung von β -Apo-8'-carotinal und EMQ.
4. a) Bestimmung von α - + ζ_1 -Tocopherol nach EMMERIE-ENGEL;
b) Semiquantitative Auftrennung der Tocopherole im Dünnschichtchromatogramm nach BRENNER & NIEDERWIESER⁶⁾.

Die Tabelle enthält einige mit dieser Methode erhaltene Analysenresultate. Die Erfassbarkeit beträgt ca. 2–3 mg/kg α -Tocopherol, wobei bei diesen niederen Gehalten mit einer Genauigkeit von $\pm 20\%$ gerechnet werden muss.

α -Tokopherolgehalt einiger Futtermittelkomponenten

Futtermittelkomponente	α - + ζ_1 -Tocopherol mg/kg	davon α -Tocopherol (semiquantitativ)
Vollweizen gemahlen	13,8	60%
Weizenkleie	27,6	60%
Mais gemahlen	13,6	65%
Hafer gemahlen	9,3	40%
Roggenmehl	10,7	60%
Grasmehl	142,0	100%

Experimentelles. – *Chromatographie an Aluminiumoxid.* In ein Chromatographierohr (21 \times 300 mm) mit Kapillarende legt man etwas Petroläther vor (Siedebereich 60–90°) und reguliert den Durchfluss durch Festpressen eines kleinen Wattcbausches in die Rohrverengung auf etwa zwei Tropfen pro Sekunde. Eine freifliessende Suspension von desaktiviertem Al_2O_3 in Petroläther wird eingegossen, bis das abgesetzte Aluminiumoxid eine Höhe von 10 cm erreicht hat.

⁵⁾ P. SOMMER, F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, unveröffentlichte Arbeiten.

⁶⁾ M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 17, 237 (1961).

(100 g Aluminiumoxid nach BROCKMANN der Aktivitätsstufe I werden in einen Schlifffkolben von 250 ml eingewogen, sofort mit 12 ml Wasser versetzt, geschüttelt, bis alle Knollen zerfallen sind, und gut verschlossen aufbewahrt.) Nach Verseifung des Analysengutes und Extraktion des Unverseifbaren wird ein aliquoter Teil des Petroläther-Extraktes, enthaltend ca. 300 μg α -Tocopherol, mit 100 μg β -Apo-8'-carotinal aus einer Stammlösung versetzt und auf die Al_2O_3 -Säule pipettiert. Nachdem die Lösung in das Adsorbens eingesickert ist, wird solange mit Petroläther entwickelt, bis etwa vorhandenes β -Carotin eluiert ist. Mit einem Gemisch aus 40 Vol.-% Benzol und 60 Vol.-% Petroläther wird anschliessend die rote β -Apo-8'-carotinal-Zone entwickelt und die Vorlage gewechselt, sobald das Eluat gefärbt erscheint. Die gefärbte Fraktion wird quantitativ aufgefangen, im Vakuum eingedampft und in 5 ml Benzol aufgenommen.

Chromatographie an Floridinerde XS. Man chromatographiert über eine 5 cm hohe Säule von aktivierter Floridinerde XS in einem Filterrohr von ca. 20 mm Durchmesser (ALLIHN'sches Rohr). (Aktivierung der Floridinerde: 200 g Floridin XS⁷) werden mit 12,5 g Zinn(II)-chlorid und 500 ml HCl konz. rein 10 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wird die Salzsäure durch ein grosses Glasfilter abgesaugt und die Erde mit mehreren Portionen Alkohol (total ca. 2,5 l) und anschliessend mit mehreren Portionen Benzol gespült, wobei die Erde nie trocken gesaugt werden darf. Nach einer letzten Spülung mit Benzol absol. kristallisierbar wird die Erde unter Benzol derselben Qualität gut verschlossen aufbewahrt. Haltbarkeit: 2–3 Wochen.)

Das β -Apo-8'-carotinal muss als blauer Ring am Säulenkopf adsorbiert bleiben. Vom farblosen Benzoleluat wird ein aliquoter Teil (entspr. 20–80 γ Tocopherol) eingedampft, in Alkohol aufgenommen, filtriert und nach EMMERIE-ENGEL ausgewertet.

Dünnschichtchromatographie. Der Rest der benzolischen Lösung wird eingedampft, in wenigen Tropfen Benzol aufgenommen und auf 5 Startpunkte einer mit Silicagel bestrichenen Dünnschichtplatte in variierender Menge aufgetragen. 2 Startpunkte werden mit α -Tocopherol bzw. mit ζ_1 -Tocopherol gemischt. Man chromatographiert nach der von BRENNER & NIEDERWIESER⁶) beschriebenen horizontalen Durchlauftechnik mit Trichloräthylen als Laufmittel. Die Entwicklungszeit beträgt etwa drei Std. Der Anteil an ζ_1 -Tocopherol in der α -Tocopherolfraktion wird durch Vergleich der Fleckengrösse abgeschätzt.

SUMMARY

A method for the assay of α -tocopherol in food and feed is described, and several results for the α -tocopherol content of feed ingredients are given.

Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co.
AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

⁷) BRITISH DRUG HOUSES LTD., Poole, England.