

Szabad ill. kötött tokoferolok és tokotrienolok meghatározásának korszerű lehetőségei

BERNDORFERNÉ, – KRASZNER ÉVA

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszéke

Érkezett: 1970. augusztus 14.

A tokoferolok ill. tokotrienolok eltérő biológiai értéke miatt az összes tokoferoltartalmon belül szükség van az egyes összetevők milyenségének és mennyiségének ismeretére. Érdekes továbbá biológiai és antioxidáns szempontból egyaránt a szabad, illetőleg kötött formában jelenlevő tokoferolok, tokotrienolok megoszlásának ismerete is.

A tokoferolok analitikájával, különböző természetes anyagokban történő meghatározásával igen sokan foglalkoztak és foglalkoznak. Ezeknek a módszereknek kritikai értékelését és felhasználási lehetőségeiknek elemzését a MÉTE Vitamin bizottsága egyik továbbképző előadásának keretén belül magam is elvégeztem (1). Lényegesen szűkebb irodalom található viszont a biológiaiilag és főleg genetikailag ugyancsak érdekes tokotrienolok kimutatására, elkülönítésére és meghatározására vonatkozólag. Éppen ezért jelen munkámban olyan módszert kívánok ismertetni, amely az összes tokoferoltartalom megismerésén belül feleletet ad:

- a) a szabad és kötött formák, továbbá
- b) a különböző tokoferol és tokotrienol frakciók megoszlására ill. megismerésére.

Általános megfontolások

A tokoferolok meghatározásának több lépése van: éspedig az előkészítés, illetve kinyerés, a szappanosítás, a zavaró anyagok elkülönítése, a tokoferolok szétválasztása és végül maga a mennyiségi meghatározás.

Mіндеzen műveleteknek kiválasztása és végrehajtása, egyes lépések esetleges beiktatása, illetve elhagyása, a vizsgálandó anyag milyenségétől, a tokoferoltartalom mennyiségétől stb. függ.

A szappanosítási műveletre általában azért van szükség, mivel a tokoferolok legtöbbször olyan mennyiségű trigliceriddel fordulnak elő, ami a későbbi kromatográfiás szétválasztásnál zavarólag hat.

Bár a tokoferolok – az eddigi vizsgálatok szerint – a természetes szerves anyagokban legtöbbször szabad alkoholként találhatók meg (és ezért észterként történő meghatározásuk a szintetikus, hozzáadott tokoferol-acetát meghatározására limitálódik), mégis kérdéses, hogy észterek a vizsgálati módszerek fejlődésével nem mutathatók-e ki természetes anyagokban is. Ez annál inkább érdekes, mert a tokoferolok kötött formában eredményesebb antioxidánsok lehetnek, mint szabad alkoholokként.

Az előírt szappanosítás során bekövetkező tokoferolveresztések óvatos munkavezetéssel minimálisra csökkenthetők, a szappanosítás azonban a tokotrienolokat roncsolja, továbbá a tokoferol-észtereket, megbontja és így mindkét módozat mennyiségi meghatározását lehetetlenné teszi. Az észterek kimutatására Jáký (2) szerint, lépcsőzetes szappanosítást végezhetünk. Egyébként a szap-

panosításra nincs is mindig szükség, mint pl. gyógyszerkészítményekben, amelyek kevés zavaróanyagot tartalmaznak; ezekben a közvetlen észtermeghatározásnak semmi nehézsége nincsen.

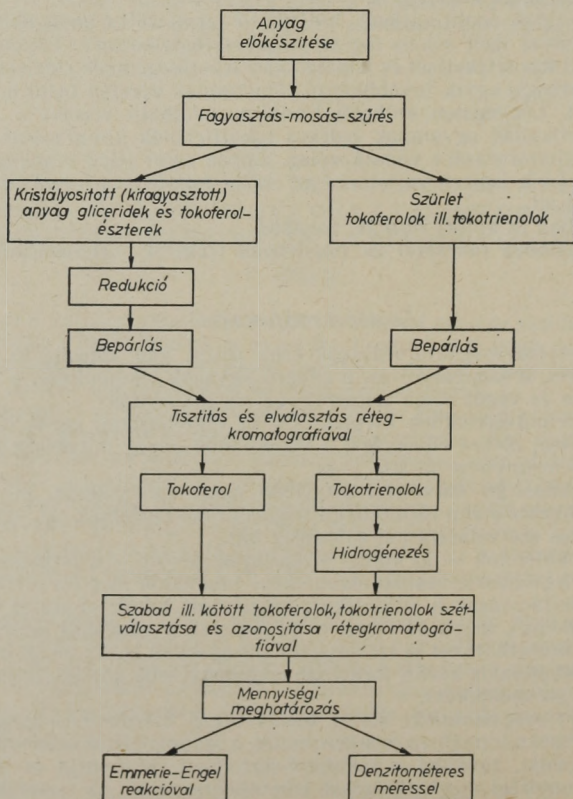
Más a helyzet természetes szerves anyagoknál, pl. csiraolajoknál vagy gabonaneműekben, ahol a különböző szabad, ill. kötött tokoferolok és tokotrienolok jelentős mennyiségű gliceridben oldva fordulnak elő. Ilyen esetekben a gliceridek eltávolítására Csallány és munkatársai (3) kifagyasztással próbálkoztak; e művelettel a tokoferolészterek megbontása is elkerülhető.

A kifagyasztási elvnek felhasználásával dolgoztam ki a szabad illetve kötött tokoferolok és tokotrienolok egymás melletti meghatározására szolgáló eljárásomat. Az eljárás elve és kivitelezése röviden a következőkben foglalható össze:

A módszer felépítése

Főbb lépések a következők:

1. vizsgálati anyag előkészítése,
2. zsiradékok eltávolítása – 70 °C-os szárazjég-acetonos kifagyasztással,



3. mosás utáni szűrlet feldolgozása szabad tokoferolok és tokotrienolok szétválasztására, kimutatására és mennyiségi meghatározására,

4. kristályosítható anyagban a kötött tokoferolok (tokoferol-észterek) redukálása és meghatározása.

A szétválasztás és azonosítás, valamint a mennyiségi meghatározás menetét az 1. szkéma ábrázolja (1. ábra).

Eljárás

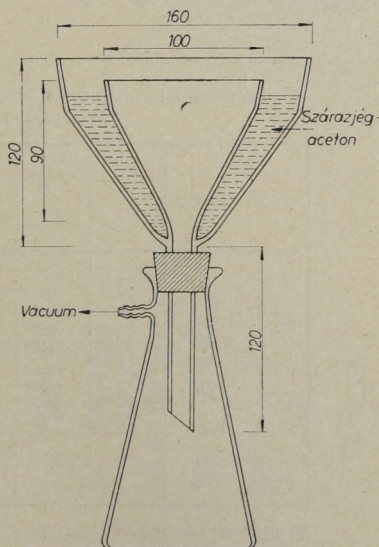
A vizsgálati módszert növényi olajokra, továbbá extrahált búzacsíra olajra dolgoztam ki. A várható tokoferol tartalomtól függően 300–600 mg-ig terjedő olaj mintákat kémcsövekbe mértem be, 50-szeres térfogat acetonnal oldottam, majd 10 percre $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os szárazjég-aceton fürdőbe tettem. Ekkor az elszappanosítható lipidek kristályok formájában váltak ki. A kristályokat 1. Whatman papíron enyhe vákuumba leszűrtem, olyan kettős falú Pyrex-tölcsért használva, amelyet $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os szárazjég-acetonkeverékkel töltöttem meg (2. ábra). A kristályokat a bemérésre számított 5×30 -szoros térfogatú, előrehűtött acetonnal mostam, szűrtem, és az egyesített szűrleteket nitrogénáramban, rotációs vákuumbepárlóban (Rotadeszt, Kutesz) $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on szárazra pároltam. A maradék súlya a bemért anyag 2–20%-át tette ki. Ezt az olajat 2 ml abszolút alkoholban felvettem és a későbbiekben ebből határoztam meg a szabad tokoferolok, illetve tokotrienolok mennyiségét.

A zavaróanyagoktól történő elválasztást, a szabad tokoferolok és tokotrienolok széjjelválasztását és azonosítását rétegekromatográfiával végeztem.

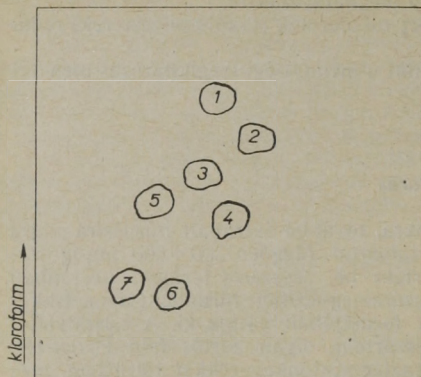
Zavaró anyagoktól történő elválasztásra igen jól alkalmazható az egydimenziós, de tokoferolok és tokotrienolok optimális széjjelválasztására a kétdimenziós rétegekromatográfia az eredményesebb.

Egydimenziós rétegekromatográfiánál adszorbensként: Kiesegel G-t (Merck) vagy Kiesegel GF₂₅₄-t (Merck), futtatószerként: benzol : metanol (98 : 2), vagy benzol : etanol (99 : 1) elegyét, illetve kloroformot használtam. Az adszorbensek és futtatószer alkalmazását variáltam, mert a különböző R_f -értékek tanulmányozása is segítséget nyújtott az azonosításhoz.

Kétdimenziós rétegekromatografálásnál az adszorbens minden esetben Kiesegel GF₂₅₄ (Merck), mert így ultraibolya fényben a foltok megjelölhetők. Az első dimenzióban a futtatószer kloroform, a második dimenzióban izopropiléter : hexan (20 : 80) elegye volt (4). Kétdimenziós futtatás után a tokoferolok és a tokotrienolok a következőképpen válnak szét (3. ábra).



20% izopropiléter hexánban →



3. ábra

Tokoferolok és tokotrienolok szétválasztása
2 dimenziós rétegekromatográfiával Réteg:
Kieselgél GF₂₅₄ (Merck)
Futtatószer: a; kloroform b; 20% izopropi-
léter hexánban Előhívószér: Antimon (V)
klorid 20%-os kloroformos oldata

- Felvitel: 1. α -tokotrienol
2. α -tokoferol
3. β -tokotrienol és γ -tokoferol
4. β -tokoferol
5. γ -tokotrienol
6. δ -tokoferol
7. δ -tokotrienol

Előhívószér: antimon (V)-klorid 20%-os kloroformos oldata, továbbá foszformolibdén-sav 20%-os alkoholos oldata volt. A tokoferolok és tokotrienolok R_f -értékeit, valamint színreakcióit a különböző futtatószerekben és előhívószerek hatására az 1. táblázatban közlöm.

A tokoferolok azonosítása nem okozott problémát, mert megfelelő tisztaságú standardok (Koch – Light) álltak rendelkezésre. A tokotrienolok azonosítására természetes forrásokból izolált összehasonlító anyagaim voltak, így: árpából alfa-tokotrienol, korpából béta-tokotrienol és pálmaolajból gamma- ill. deltato-kotrienol.

1. táblázat

Tokoferolok, tokotrienolok kimutatása különböző előhívószerekkel
(Adsorbens: Kieselgél GF₂₅₄ (Merck))

Megnevezés	Rf × 100		Előhívószér	
	F ₁	F ₂	20%-os alkoholos foszformolibdén-sav	20%-os kloroformos antimon (V) klorid
α -T	47	57	szürkés-kék	narancspiros
β -T	33	40	szürkés-kék	világosbarna
γ -T	31	42	szürkés-kék	zöld
δ -T	23	30	szürkés-kék	vörös-barna
α -T-3	45	58	szürkés-kék	narancsvörös
β -T-3	32	42	szürkés-kék	vörös-barna
γ -T-3	30	41	szürkés-kék	barna
δ -T-3	22	30	szürkés-kék	lilászürke
α -T-acetát .	49	60	szürkés-kék	rőt-barna
α -tokoferil kinon	87,5	91	szürkés-kék	szürke

Megjegyzés: benzol : metanol (98 : 2) : F₁ T: tokoferol
kloroform:: F₂ T-3: tokotrienol

Pennock és munkatársai (4) közlései alapján a tokotrienolok R_f -értékei igen közel állnak a megfelelő tokoferolok R_f -értékeihez, így az összehasonlító anyagok felvitelén túlmenően minden már azonosított 4 tokoferolhoz közeleső foltot eluáltam, hidrogéneztem (5) és utána újból kromatografáltam. A 4. és 5. ábra a vizsgálati anyagok tokoferoljait és tokotrienoljait mutatja hidrogénezés előtt és után, egydimenziós rétegekromatográfiával. A 6. ábra a pálmamagolaj tokoferoljait és tokotrienoljait ábrázolja kétdimenziós rétegekromatográfiás szétválasztás után.

Standardokkal összehasonlításon továbbá redukción és újbóli futtatáson felül Spektromom 202 készüléken, etanolban felvettem a tokotrienolok ultrabolya színképeit is. A kapott értékek az irodalmi adatokkal jól egyeznek (6) (2. táblázat).

4. ábra

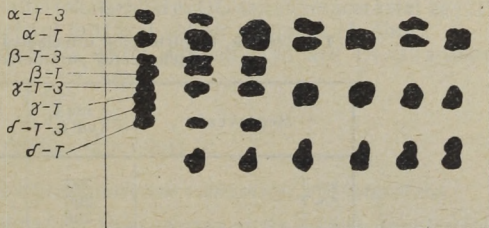
Rétegekromatogram

Réteg: Kieszelgél G (Merck)

Futtatószer: Benzol : metanol (98 : 2)

Előhívó: 20%-os alkoholos foszformolibdén-sav

- Felvitel: 1. α -, β -, γ -, δ -tokoferol
 α -, β -, γ -, δ -tokotrienol
 2. Búzacsíra olaj kifagyasztás után futtatva
 3. Búzacsíra olaj hidrogénezés után
 4. Sajtolt kukoricacsíra olaj kifagyasztás után
 5. Sajtolt kukoricacsíra olaj hidrogénezés után
 6. Extrahált kukoricacsíra olaj kifagyasztás után
 7. Extrahált kukoricacsíra olaj hidrogénezés után



5. ábra

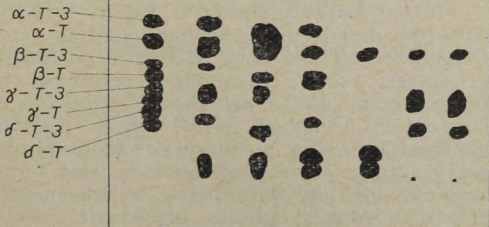
Rétegekromatogram

Réteg: Kieszelgél G (Merck)

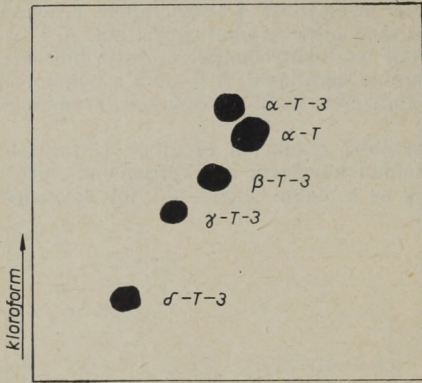
Futtatószer: Benzol : metanol (98 : 2)

Előhívó: 20%-os alkoholos foszformolibdén-sav

- Felvitel: 1. α -, β -, γ -, δ -tokoferol
 α -, β -, γ -, δ -tokotrienol
 2. Nyers napraforgó olaj
 3. Nyers napraforgó olaj hidrogénezés után
 4. Pálmamag olaj
 5. Pálmamag olaj hidrogénezés után
 6. Szója olaj
 7. Szója olaj hidrogénezés után



20 % izopropiléter hexánban



6. ábra

A pálmamag olaj tokoferoljai, ill. tokotrienoljai
 Réteg: Kieselgél GF₂₅₄ (Merck)
 Futtatószer: a; kloroform
 b; 20% izopropiléter hexánban
 Előhívószér: Antimon (V) klorid 20%-os kloroformos oldata

2. táblázat

Tokoferolok, tokotrienolok ultraibolya szinképe etanolban jellegzetes paraméterek

Megnevezés	λ max. (μm)	λ min. (μm)	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
α -T	292	256	75,8
β -T	296	257,5	89,4
γ -T	298	257	91,4
δ -T	298	257,5	87,3
α -T-3	292,5	267,5	91
β -T-3	295,5	257,5	87,5
γ -T-3	298	255	103
δ -T-3	297	257	88,1
α -T-acetát	284	255	43,6

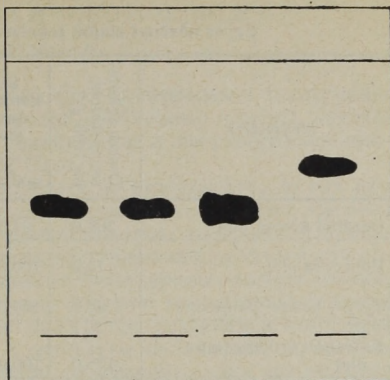
Kötött tokoferolok: tokoferolészterek vizsgálata

A fagyasztásos eljárással kapott kristályok olvadékának egy részletét (10–100 mg) 4 ml hexánban oldottam és LiAlH_4 reagenssel redukáltam. Duggan eredeti módszere szerint (7) a LiAlH_4 -reagens adagolását, majd a keletkezett észter elbontását 5 percenként megszakított rázással, hűtéssel kell elvégezni. Ezt a nehézkes és aprólékos eljárást úgy módosítottuk (8), hogy a 4 ml hexánban felvett mintát jegesvízben lehűtöttük, majd a kötött tokoferoltartalomra számítva – körülbelül tízszeres feleslegben – LiAlH_4 reagenszt adtunk hozzá. Előkísérletek alapján 5 ml reagens minden esetben elegendő volt. Ezután 30 percig az Erlenmeyer-lombikot, rázógépen rázattuk, mialatt a redukció teljesen végbement.

A redukció eredményességéről a következőképpen győződtem meg:

7. ábra
Rétegekromatogram

Réteg: Kieszelgél G (Merck)
Futtatószer: kloroform
Előhívó: 20%-os alkoholos foszformolib-
dénsav
Felvitel: 1. Standard dl- α -tokoferol
2. LiAlH₄-el redukált dl- α -tokoferol-
acetát
3. LiAlH₄-el redukált dl- α -tokoferol-
acetát + dl- α -tokoferol
4. dl- α -tokoferolacetát



A vizsgálattal egyidejűleg standard DL-alfa-tokoferolacetáttal (Koch-Light) is elvégeztem a redukción s ellenőriztem az ultrabolya és infravörös abszorpciós színeképeket, melyek a DL-alfa-tokoferollal egyeztek;

Redukció után standard DL-alfa-tokoferollal és DL-tokoferolacetáttal együtt futtatva a foltok a DL-alfa-tokoferol foltjával voltak azonosak (7. ábra).

A redukción hibáját 6 párhuzamos mérés alapján standard DL-alfa-tokoferolacetátra számítva, megállapítottam, hogy

a középértékek középhibája 0,027,
a relatív középhiba 0,45% volt.

A redukción tehát kielégítő módon játszódott le.

Az összes tokoferol illetve tokotrienol tartalom mennyiségi meghatározása

A szabad tokoferolok, a Pd-oxidos hidrogénezés után kapott tokoferolok (tokotrienolok) és a LiAlH₄-os redukción után kapott tokoferolok (tokoferolészterek) rétegekromatográfiás futtatás után a vizsgálati anyagban levő összes tokoferoltartalmat kétfajtképpen határoztam meg:

1. elución után Emmerie-Engel reakcióval (1),
2. a foltok denzitométeres értékelésével.

A denzitométeres értékeléshez Vitatron N. V. 23. Spoorstraat készüléket használtam, és a regisztrált görbesereg értékelését párhuzamosan 3 módszerrel végeztem:

- a görbe csúcsmagasságának mérésével,
- a görbe alatti terület planimetrálásával, illetőleg
- a regisztráló papírból a görbékkel határolt és kivágott rész súlyának mérése alapján.

Az értékelés során kapott számszerű eredményeket táblázatban foglaltam össze (3. táblázat).

Eredmények értékelése

A meghatározási adatok világosan mutatják, hogy a zavaró anyagok (gliceridek stb.) eltávolítása fagyasztással nagyon kíméletesen hajtható végre, mert fagyasztás után az eredetileg jelenlevő tokoferolok 92-98%-a visszanyerhető, illetőleg biztonsággal kimutatható, míg elszappanosítás után csak 82-90% (nagyon ritka esetben 95%). A kötött tokoferolok (tokoferolészterek)

Egyes növényi olajok tokoferol, illetőleg tokotrienol tartalma

Megjelölés	Összes tokoferol tartalom mg/100 g	Szabad és kötött tokoferol tart. %-os megoszlása		Tokoferolok, tokotrienolok %-os megoszlása							
		szabad	kötött	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T- -3	β -T- -3	γ -T- -3	δ -T- -3
Búzából kivont olaj	208,0	94,0	6,0	52,1	26,8	—	3,5	17,6	—	—	—
Búzacsíra olaj	176,0	100,0	—	50,0	15,0	10,0	5,0	10,0	10,0	—	—
Sajtolt kukoricacsíra olaj	80,2	100,0	—	10,0	—	80,0	—	10,0	—	—	—
Extrahált kukoricacsíra olaj	105,0	100,0	—	15,0	—	75,0	—	10,0	—	—	—
Nyers napraforgó olaj	100,0	100,0	—	80,0	—	10,0	—	10,0	—	—	—
Pálmamag olaj	230,0	100,0	—	40,0	—	—	—	25,0	12,0	17,0	6,0
Szója olaj	129,0	100,0	—	4,0	—	61,0	35,0	—	—	—	—

redukciós meghatározása ugyancsak eredményesen végrehajtható; a kötött tokoferolok 98%-ban kifagynak, azaz a kristályos frakcióban mutathatók ki. A tokoferolok és tokotrienolok egymás melletti kimutatására és mennyiségük megállapítására a kétdimenziós rétegekromatográfia jól alkalmazható. Problémát csak azoknak a természetes anyagoknak vizsgálata jelent, amelyek egyidejűleg gamma-tokoferolt és béta-tokotrienolt tartalmaznak, mert ezek az izomerek jelen módszerrel nem választhatók el. Ilyen esetben hidrogénezés, s a telített forma elválasztása látszik járható útnak.

A vizsgálati adatok szerint a tanulmányozott növényi olajokban kötött formát nem találtam, extrahált búzaszemolajban azonban — az összes tokoferoltartalomra számítva — 6% kötött tokoferol volt alfa-tokoferolacetátként azonosítható. A szójaolaj kivételével tokotrienolok minden mintában kimutathatók voltak, a legnagyobb mennyiségben az alfa-forma s csak a pálmamagolajban mind a négy tokotrienol. A tokotrienolok eddig elhanyagolt, de az ismertett módon meghatározott mennyisége természetesen az összes tokoferoltartalom mennyiségét növeli, ami az eddigi vizsgálati eredmények revízióját igényli. Végül a denzitométeres közvetlen értékelés az eluciós veszteségeket kiküszöböli.

IRODALOM

- (1) Berendorferné Kraszner É.: Élelmezési ipar. 24. 198, 1970.
- (2) Jáky M.: Die Nahrung. 11, 679, 1967.
- (4) Csallány A.: Szóbeli közlés.
- (4) Pennock, J. F., Hemming, F. W., Kerr, J. D.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 17 542, 1964.
- (5) Whittle, K. J., Dunphy, P. J., Pennock, J. F.: Biochem. J., 100, 138, 1966.
- (6) Kofler, M. et al.: Vitamins and Hormones, 20, 409, 1962.
- (7) Duggan, D. E.: Arch. Biochem. Biophys. 84, 116, 1959.
- (8) Hunyadvári E.: Diplomamunka, 1970.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ И ВЯЗАННЫХ ТОКОФЕРОЛОВ И ТОКОТРИЕНОЛОВ

Е. Берндорфер-Краснер

Ввиду различного биологического значения токоферолов и токотриенолов в пределах содержания всех токоферолов необходимо изучить некоторые составляющие даже и разделение токоферолов и токотриенолов присутствующих в свободном или в вязанном виде.

В области определения этих составляющих по отдельности, до сих пор — из-за отсутствия быстрого и относительно простого метода — ещё имеются затруднения. Автор разработал такой порядок анализа, который легко осуществим и применим для разделения всех составляющих, а также для количественного определения. Автор вязанные токоферолы вымораживает, производит повторную тонкослойную хроматографию токотриенолов путем редукции. Удалось им определить смежно два трудно разделимые компоненты: гамма-токоферол и бета-токоферол. Результаты полученные по новому аналитическому методу показали, что эфиры токоферола редко встречаются (только в масле пшеничного зерна), токотриенолы в то же время часто встречаются и их определение повышает до сих пор известных данных токоферола то, есть в действительности содержание всего токоферола больше чем указано в литературе.

ZEITGEMÄSSE MÖGLICHKEITEN DER BESTIMMUNG VON FREIEN, BZW. GEBUNDENEN TOKOPHEROLEN UND TOKOTRIENOLEN

É. Berndorfer-Kraszner

Infolge der verschiedenen biologischen Wertigkeit der Tokopherole bzw. Tokotrienole ist es notwendig, innerhalb des gesamten Tokopherolgehaltes die einzelnen Komponenten zu kennen, es ist sogar die Kenntnis der Verteilung der in freier bzw. gebundener Form vorliegenden Tokopherole, Tokotrienole vonnöten. Die Einzelbestimmung dieser Komponenten war jedoch bis auf den heutigen Tag in Ermangelung von verhältnismässig einfachen Schnellmethoden — mit Schwierigkeiten verbunden. Verfasserin arbeitete einen Analysengang aus, welcher leicht durchzuführen ist und sich zur Trennung und quantitativen Bestimmung aller Komponenten eignet. Die gebundenen Tokopherole werden ausgefroren, die Tokotrienole durch Reduktion von neuem auf einer Dünnschicht chromatographiert. Es gelang, die beiden am schwersten trennbaren Komponenten: gamma-Tokopherol und beta-Tokotrienol nebeneinander zu bestimmen. Die mit dem neuen Analysengang erhaltenen Resultate weisen darauf hin, dass Tokopherolester selten vorkommen (nur im Weizenkernöl waren sie vorhanden); Tokotrienole sind jedoch oft anzutreffen und ihre Bestimmung vermehrt die zurzeit bekannten Tokopherolangaben, das heisst, der gesamte Tokopherolgehalt ist in Wirklichkeit mehr, als wie es aus den bisherigen Literaturangaben hervorgeht.

LES MÉTHODES MODERNES DU DOSAGE DES TOCOPHÉROLS ET DES TOCOTRIÉNOLS

É. Berndorfer-Kraszner

Les valeurs biologiques différentes des tocophérols et tocotriénols exigent la connaissance des composants différents qui forment la teneur totale en tocophérols, de plus, aussi la distribution des tocophérols et tocotriénols libres, respectivement liés. Jusqu'à présent le dosage de ces composés était difficile, étant donné qu'il n'y avait pas de méthode convenable rapide et en même temps relativement simple. L'analyse mise au point par l'auteur est facile à effectuer et peut être utilisée pour la séparation et ensuite le dosage de tous les composés. La séparation des tocophérols liés s'effectue par congélation qui est suivie par la chromatographie en couche mince des tocotriénols réduits. Il est même réussi de doser à la fois les composants les plus difficilement séparables, le gamma-tocophérol et le bêta-tocotriénol. Les résultats obtenus par cette nouvelle voie d'analyse indiquent que les esters des tocophérols sont rares (actuellement on n'en a trouvés que dans l'huile des germes de froment), tandis qu'au contraire on a souvent à faire à des tocotriénols dont le dosage augmente les valeurs de la teneur en tocophérols connues jusqu'à présent, c'est-à-dire, la teneur totale en tocophérols est plus élevée que ne le montrent les données de littérature connues.

ON THE POSSIBILITIES OF THE DETERMINATION OF FREE AND BOUND FORMS OF TOCOPHEROLS AND TOCOTRIENOLS

É. Berndorfer—Kraszner

Since the biological value of tocopherols and tocotrienols differs considerably it is essential to know the total tocopherol content as well as the distribution of various tocopherol various tocopherol forms, furthermore the ratio of tocotrienols and bound tocopherols (tocopherol-esters) in the natural substances investigated. In the present time, however, the separate determination of these tocopherol components is connected with considerable difficulties in lack of adequate quick and — at the same time — relatively simple methods. The author worked out a scheme of analysis with the help of which the isolation and the quantitative determination of each component can be carried out easily. The bound tocopherols (tocopherol-esters) are frozen out, the tocotrienols — after reduction — are identified with repeated thin layer chromatography. In this way the almost inseparable gamma-tocopherol and beta-tocotrienol can be isolated, too. According to data obtained by way of the new analytical scheme, bound tocopherols (tocopherol-esters) seem to occur very seldom (e.g. in wheatseed oil); tocotrienols, however, are ubiquitous, and their amount must be added to the total tocopherol content of the samples hitherto determined. Thus data of total tocopherol content published up-to-date in literature should be corrected accordingly.