Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 33 (1942)

Heft: 1-2

Artikel: Bestimmung von freiem Aneurin (Vitamin B) und Aneurindisulfid in Lebensmitteln. 2. Mitteilung über chemische Vitaminbestimmung

Autor: Fellenberg, Th. von / Bernhard, K. / Högl, O.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983196

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

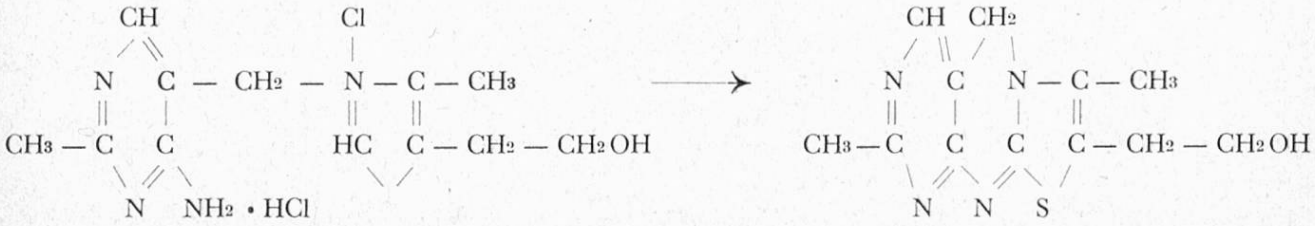
BESTIMMUNG VON FREIEM ANEURIN (VITAMIN B_1) UND ANEURINDISULFID IN LEBENSMITTELN

2. Mitteilung über chemische Vitaminbestimmung

Von Dr. *Th. von Fellenberg* und Priv. Doz. Dr. *K. Bernhard.*

(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes,
Vorstand: Dr. O. Högl.)

Von den bis jetzt bekannten chemischen Bestimmungsmethoden des Aneurins eignet sich für die Untersuchung in Lebensmitteln am besten die Thiochrommethode von *Jansen*[1]). *Barger, Bergel* und *Todd*[2]) haben festgestellt, dass Aneurin in alkalischer Lösung durch Ferricyankalium nach folgender Gleichung zu Thiochrom oxydiert wird, einer Verbindung, welche sich mit Isobutanol leicht ausziehen lässt und unter der Analysenquarzlampe eine blaue Fluoreszenz aufweist.



Aneurin Thiochrom

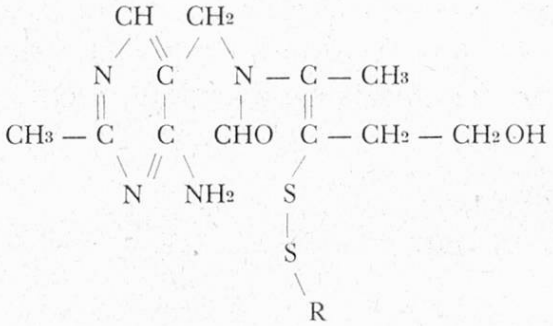
Auch mehrere kolorimetrische Verfahren zur Aneurinbestimmung sind bekannt geworden, so das Verfahren von *Willstädt*[3]) und *Barany*[4]) unter Verwendung von 2,4-Dichlorbenzol-diazoniumchlorid oder der Formaldehydtest von *Kinnersley* und *Peters*[5]). Diese Verfahren mögen bei vitaminreichen Präparaten brauchbar sein, bei Nahrungsmitteln eignen sie sich wegen ihrer zu geringen Empfindlichkeit und der Schwierigkeit, das Aneurin aus den Lebensmitteln in genügend reiner Form quantitativ abzuscheiden, kaum. Jedenfalls misslang uns der Formaldehydazotest aus den genannten Gründen bei mehreren Nahrungsmitteln. Wir hielten uns daher ganz an die Thiochrommethode.

Während Jansen das Thiochrom im elektrischen Fluorometer misst, bestimmen *W. Karrer* und *Kubli*[6]) es durch direkte Beobachtung der Fluoreszenz unter der Hanauer Quarzlampe. Wieder andere Autoren, wie *Lunde, Kringstad* und *Olsen*[7]), kombinieren die Quarzlampe mit dem Stufenphotometer von Pulfrich. Wir ziehen die direkte Beobachtung nach Karrer und Kubli vor.

Zahlreiche Autoren befassten sich mit der Aneurinbestimmung in Harn, wobei zumeist Adsorption an Fullererde, speziell an Frankonit oder auch an Zeolith vorgenommen wird, um das Aneurin von den Verunreinigungen abzutrennen und es anzureichern, wo dies erwünscht ist. Dieses Verfahren ist indessen recht umständlich und kann zu grossen Verlusten führen. Nach *Otto* und *Rühmekorb*[8]) wurden zugesetzte Aneurinmengen nach Fullererdeadsorption teilweise nur recht unvollständig wiedergefunden. Wir haben die Adsorption an zwei verschiedenen uns zur Verfügung stehenden Fullererden in einigen orientierenden Versuchen probiert und ebenfalls grosse Verluste gehabt.

K. Ritsert[9]) beschreibt zur direkten Bestimmung des Aneurins in Harn und Blut eine Methode ohne Adsorption, deren Brauchbarkeit auch für andere Materialien kürzlich *Fink, Just, Scheunert* und *Wagner*[10]) bestätigten, indem sie eine gute Uebereinstimmung der auf chemischem und biologischem Wege ermittelten Werte konstatierten.

Die Isolierung eines antineuritisch wirksamen Oxydationsproduktes des Aneurins durch *Zima* und *Williams*[11]), dem die Konstitution eines Disulfids von folgender Formel zukommt, wobei R den ganzen Aneurinrest nochmals be-



deutet, führte *Zima, Ritsert* und *Moll*[12]) zur Annahme, dass Aneurin selbst die reduzierte Form eines Redox-Systems: Aneurin-Aneurindisulfid darstellt. Das Disulfid wird unter biologischen Bedingungen durch Cystein oder Glutathion zu Aneurin bzw. Aneurin-Thiol reduziert.

Aneurindisulfid lässt sich nicht direkt in Thiochrom überführen. Um es mitzubestimmen, muss man es zuvor durch Reduktion mit Cystein in Aneurin umwandeln. Unterlässt man dies, so können die Werte nicht der biologischen Wirksamkeit entsprechen. Wir haben die Reduktion in vielen Fällen vorgenommen und tatsächlich öfters erhöhte Werte gefunden, womit wir den Befund von Zima und seinen Mitarbeitern bestätigen können.

Das Aneurin kann auch als Ester der Pyrophosphorsäure vorliegen, welcher durch *Lohmann* und *Schuster* als Co-Carboxylase identifiziert worden ist. Die

Co-Carboxylase wird nach *Westenbrink* und *Jansen*[13]) bei der Oxydation mit Ferricyankalium in alkalischer Lösung zu Thiochrompyrophosphat oxydiert. Da dieses im Gegensatz zum Thiochrom in Isobutanol unlöslich ist, wird es nicht mit dem Aneurin zusammen bestimmt. In reinen Lösungen lässt es sich in der wässrigen Phase bestimmen. Lebensmittel geben aber kaum je Auszüge ohne Eigenfluoreszenz, weshalb diese Methode hier nicht anwendbar ist.

Die Co-Carboxylase bestimmt man nach Aufspaltung durch eine Phosphatase. *Kuhn* und *Gerhard*[14]) verwenden dazu Maltin Merk, ein Diastasepräparat, welches genügend Phosphatase enthält, um die Co-Carboxylase zu spalten. Wir haben in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen von Co-Carboxylase nicht berücksichtigt; es ist beabsichtigt, in einer folgenden Arbeit darauf zurückzukommen. Es wird sich dann zeigen, in welchen Nahrungsmitteln sie in grösserer Menge enthalten ist.

Aneurin kommt auch an Eiweiss gebunden vor. Nach *Houston* und *Kon*[15]) ist die Hälfte des Aneurins der Milch in dieser Form vorhanden. *Halliday* und *Deuel*[16]) nehmen an, dass das gebundene Aneurin der Milch sowohl mit Eiweiss als mit Phosphorsäure kombiniert ist; denn es wird weder durch Phosphatase allein, noch durch ein proteolytisches Enzym allein, wohl aber durch Einwirkung beider Enzyme zugleich abgespalten. Auch mit dieser Form des Aneurins beschäftigen wir uns in der vorliegenden Arbeit nicht. Wir bestimmen also nur freies Aneurin und in vielen Fällen Aneurindisulfid. Unsere Werte müssen also, verglichen mit der biologischen Prüfung, in dem Masse zu niedrig sein, als Co-Carboxylase und an Eiweiss oder an Eiweiss und Phosphorsäure zugleich gebundenes Aneurin in den untersuchten Materialien vorkommt. Trotz dieser Einschränkung haben wir bei einigen Nährpräparaten, bei welchen das Resultat der biologischen Prüfung bekannt war, gut übereinstimmende Werte gefunden, wie folgende Zahlen zeigen:

	chemisch	biologisch	
		in Basel	in Lausanne
	γ %	γ %	γ %
Weizenkeime	2200	2100	—
Hefepräparat	6400	—	6450
Nährpräparat	470	480	—

Zur Vorbereitung der Analyse wird das zerkleinerte Material von den meisten Autoren mit Salzsäure behandelt. Wir kochen pulverförmige Materialien in der Regel mit 0,25n-HCl auf und centrifugieren nach dem Abkühlen aus. Wenn wir im gleichen Material Ascorbinsäure bestimmten, benützten wir jeweilen den dafür kalt hergestellten trichloressigsauren Auszug. Bei Parallelbestimmungen fanden wir beim Arbeiten mit Salzsäure und mit Trichloressigsäure stets dieselben Werte, obgleich die letztere Säure das Eiweiss ausfällt. Sollte das an Eiweiss gebundene Aneurin bestimmt werden, so dürfte selbst-

verständlich nicht mit Trichloressigsäure extrahiert werden, auch nicht bei der Bestimmung der Co-Carboxylase, weil dadurch das später zuzusetzende Enzym zerstört werden könnte.

Bei der Oxydation des Aneurins zu Thiochrom soll nach Jansen nicht zu viel Kaliumferricyanid verwendet werden, während nach Karrer und Kubli ein Ueberschuss innert weiten Grenzen nicht schadet.

Wir haben hierüber folgende Versuche gemacht: Je 0,5 γ Aneurinchlorhydrat wurden in 3 cc 10%iger Natronlauge mit steigenden Mengen 1%iger Kaliumferricyanidlösung während 2 Minuten oxydiert und darauf mit 10 cc Isobutanol ausgeschüttelt.

Das Aneurinchlorhydrat verliert bei der Oxydation 2 Atome H und 2 Moleküle HCl. 0,5 γ Aneurinchlorhydrat verbrauchen theoretisch 0,975 γ Kaliumferricyanid. Man erhielt folgende Mengen Thiochrom, wobei die Höchstgehalte mit 100 bezeichnet sind:

cc 1%iges $K_3Fe(CN)_6$	0,025	0,05	0,1	0,2	0,5
Ueberschuss an $K_3Fe(CN)_6$	256-fach	512-fach	1024-fach	2048-fach	5120-fach
Ausbeute an Thiochrom	100	100	83	67	50

Bei 512-fachem Ueberschuss findet man noch denselben Wert wie bei 256-fachem, also den maximalen Wert. Bei 1024-fachem Ueberschuss tritt ein Verlust von 17 %, bei 5120-fachem ein solcher von 50 % ein. Wir sehen also, dass das Thiochrom recht grosse Ueberschüsse an Ferricyankalium aushält, dass es aber durch allzugrossen Ueberschuss allmählich zerstört wird. Rascher findet die Abnahme statt, wenn statt einer frisch bereiteten eine alte Aneurinlösung verwendet wird. Mit einer 6 Wochen alten Lösung erhielt man folgende Werte:

cc 1%iges $K_3Fe(CN)_6$	0,025	0,05	0,1	0,2	0,5
Ueberschuss	256-fach	512-fach	1024-fach	2048-fach	5120-fach
Ausbeute an Thiochrom	92	76	62	46	29

Die Empfindlichkeit gegenüber Kaliumferricyanid hat beim Stehenlassen der Lösung zugenommen.

Man prüfte nun Kartoffeln in derselben Weise, indem man 2 cc eines 1%igen salzsauren Auszugs nach geeigneter Vorbehandlung entsprechend verarbeitete. Man fand:

cc 1%iges $K_3Fe(CN)_6$	0,025	0,05	0,1	0,2	0,5
Ueberschuss	1280-fach	2560-fach	5160-fach	10320-fach	25600-fach
γ Aneurin in 2 cc Auszug	0,100	0,100	0,095	0,080	0,066
γ % Aneurin	50	50	48	40	33

Eine deutliche Abnahme des Wertes macht sich erst bei dem 10000-fachen Ueberschuss an Ferricyanid bemerkbar. Sie ist ähnlich wie bei 1000-fachem Ueberschuss bei reinem Aneurin. Bei der Kartoffel kann also die 10-fache

Menge angewendet werden, bis sich der Ueberschuss schädlich auswirkt. Der Kartoffelauszug enthält somit reduzierende Stoffe, welche Ferricyanid verbrauchen.

Nach unsern Erfahrungen kommen solche reduzierende Stoffe in allen Lebensmitteln vor. Man darf also überall eine verhältnismässig grosse Menge Ferricyanid anwenden, ohne bei genügender Vorsicht befürchten zu müssen, dass das Thiochrom selbst geschädigt werde.

Erfahrungsgemäss eignet sich bei den von uns angewendeten Mengenverhältnissen in den meisten Fällen zur Bestimmung des freien Aneurins eine Menge von 0,05 cc 1%iger Ferricyanidlösung auf 2 cc Salzsäureauszug; nur bei sehr hohen Aneuringehalten etwa in Hefepräparaten oder andern besonders B_1-reichen Materialien wird man etwas höher gehen. Aber auch bei der Bestimmung des Aneurindisulfids, wo ein Zusatz von Cystein erfolgt ist, muss, um dieses zu oxydieren, entsprechend mehr von dem Oxydationsmittel angewendet werden, wie wir dies in der Vorschrift angeben werden. Theoretisch erfordert 1 mg Cystein 0,282 mg 1%ige $K_3Fe(CN)_6$-lösung.

Von grosser Bedeutung ist es, zu wissen, ob die Extraktion des Thiochroms durch das Isobutanol quantitativ verläuft. Sollte das nicht der Fall sein, so müsste streng darauf geachtet werden, dass die Testlösung im Gehalte der Untersuchungslösung möglichst angepasst wäre.

Folgender Versuch zeigt den Grad der Extrahierbarkeit. Wir extrahieren stets 3 cc wässrige Lösung, welche 10 % Natriumhydroxyd enthält, mit 10 cc Isobutanol. Bei einem sehr aneurinreichen Hefetrockenpräparat wurde die Extraktion wie üblich vorgenommen und nach vollständigem Abtrennen der Isobutanolschicht eine zweite Extraktion in gleicher Weise angeschlossen. Man fand darin 1,7 % des Gesamtwertes. Mit der 1. Extraktion sind somit 98,3 % des Thiochroms ausgezogen worden.

Die Extraktion ist also eine sehr vollständige. Es kommt daher auch nicht sehr darauf an, ob eine stärkere oder schwächere Testlösung bei der Bestimmung angewendet wird. Selbstverständlich wird man aus praktischen Gründen nicht allzu abweichende Lösungen verwenden.

Nach Karrer und Kubli ist die nach längerem Stehen abgetrennte Isobutanolschicht durch Papier zu filtrieren, um sie vollständig zu klären. Kuhn und Gerhard warnen vor der Filtration, weil Papier fluoreszierende Stoffe abgibt. Wir können das bestätigen. Da wir die Schichten nicht durch Stehenlassen, sondern durch Zentrifugieren trennen, ist eine weitere Klärung meist überhaupt unnötig. Falls sie erforderlich war, pflegten wir anfänglich etwas wasserfreies Natriumsulfat zuzusetzen und nochmals kurz auszuzentrifugieren. Später gingen wir dazu über, unter Kochsalzzusatz zu extrahieren, und von da an waren die Lösungen nach dem Zentrifugieren stets vollkommen klar.

So einfach sich die Bestimmung des freien Aneurins nach dem Thiochromverfahren bei reinen Lösungen gestaltet, so schwierig kann sie bei Lebensmitteln werden. Es finden sich hier vielfach Stoffe, welche Eigenfluoreszenzen verschie-

dener Art aufweisen und daher die Fluoreszenz des Thiochroms stören. Häufig finden sich weisslichblaue, weisslichgrüne, weisslichgraue, intensiv gelbe oder gelbgrüne oder weisslichrote Fluoreszenzen, welche die Fluoreszenz des Thiochroms, dem die Weisskomponente fehlt, vollständig überdecken können. Es kommen aber auch Eigenfluoreszenzen vor, die denselben Farbton wie Thiochrom haben.

Solche Eigenfluoreszenzen werden erst sichtbar, wenn die Auszüge der Nahrungsmittel ohne Ferricyankaliumzusatz aus alkalischer Lösung mit Isobutanol ausgeschüttelt werden. Wir nennen diese Ausschüttlung, welche kein Thiochrom enthält, den Blindversuch.

Man sollte nun erwarten, dass die Differenz zwischen dem Hauptversuch (mit Ferricyankalium) und dem Blindversuch (ohne Ferricyankalium) der Menge des in dem Nahrungsmittel enthaltenen Aneurins entspreche. Dies ist aber in der Regel durchaus nicht der Fall. Abgesehen davon, dass die Eigenfluoreszenzen die Fluoreszenz des Thichroms überdecken können, tritt häufig der Fall ein, dass die Eigenfluoreszenz oder eine Komponente davon durch Ferricyankalium zu einer nicht fluoreszierenden Verbindung oxydiert wird. Diese Komponente fehlt dann im Hauptversuch, nicht aber im Blindversuch, weshalb das Resultat zu niedrig ausfällt. Oft geben sich Nebenfluoreszenzen dadurch zu erkennen, dass der Hauptversuch und der mit der Testlösung vermischte Blindversuch nicht genau gleich gefärbt sind. Der durch das Auslöschen einer Nebenfluoreszenz im Hauptversuch bewirkte Fehler kann so gross werden, dass man auf Abwesenheit von Aneurin schliessen kann, während ganz erhebliche Mengen davon da sind.

Eine Gewähr für die Richtigkeit der Bestimmung hat man nur, wenn die Eigenfluoreszenzen so gut wie vollständig entfernt sind. Anfänglich suchten wir dies Ziel durch Adsorption der Eigenfluoreszenzen zu erreichen und hatten auch einigen Erfolg durch chromatographische Abtrennung der störenden Faktoren mittelst Filtration durch Aluminiumoxyd. Es zeigte sich, dass Aneurin durch dies Material in saurer Lösung nicht adsorbiert wird, dass aber manche fluoreszierende Stoffe in verschiedenen Schichten zurückgehalten werden. Die Aluminiumoxydsäule zeigt dann bei richtiger Wahl ihrer Länge in der Regel in den obern Teilen intensiv gelb fluoreszierende Partien, während der untere Teil keine Fluoreszenz aufweist.

Es ist in manchen Fällen gelungen, auf diese Weise die Eigenfluoreszenzen zu entfernen, wobei aber nicht verschwiegen werden darf, dass auch manche Fluoreszenzen zurückgehalten werden, welche gar nicht gestört hätten, da sie aus der alkalischen Lösung nicht in das Isobutanol übergehen.

Die Brauchbarkeit der chromatographischen Trennung war indessen ziemlich beschränkt, da eben doch manche Eigenfluoreszenzen die Säule unverändert passieren. Bessere Resultate gab im allgemeinen das Verfahren, welches *Ritsert* (l. c.) bei Harn angewendet hat und welches in einer Vorextraktion mit Isobutanol aus salzsaurer Lösung besteht. Bei Lebensmitteln ist es zwar unnötig, die

salzsaure Lösung noch besonders aufzukochen, wie dies bei Harn geschehen soll; auch kommt man mit weniger Salzsäure aus. Die Salzsäure darf aber keineswegs weggelassen werden, da sonst auch das Aneurin wenigstens teilweise in die Isobutanolschicht geht. Oft muss auch ein zweites und drittes Mal vorextrahiert werden. In gewissen Fällen genügt auch das nicht; dann wird zuerst die Filtration durch Aluminiumoxyd vorgenommen, und darauf wird noch ein- oder zweimal vorextrahiert.

Auf diese Weise gelingt es nun nach unsern Erfahrungen stets, die Eigenfluoreszenz vollständig oder doch soweit zu entfernen, dass der Blindversuch nur noch eine Spur einer Eigenfluoreszenz aufweist, so dass also der genauen Bestimmung nichts mehr im Wege steht.

Man wird sich nun fragen: wie prüft man im Laufe der Analyse, ob die Vorreinigung genügt, so dass dann der Blindversuch fluoreszenzfrei sein wird?

Man geht so vor, dass man die Ausschüttlungen mit Isobutanol unter der Quarzlampe prüft. Fluoreszieren sie stark, so wiederholt man die Extraktion, fluoreszieren sie nur noch sehr schwach, so kann man annehmen, dass eine nächste Ausschüttlung überhaupt nicht mehr fluoreszieren würde; die Reinigung ist dann beendigt. Nun ist aber streng genommen die Fluoreszenz der Ausschüttlung aus saurer Lösung nicht ganz massgebend, da es ja darauf ankommt, ob sich aus der alkalischen Lösung störende Stoffe ausschütteln lassen oder nicht. Es empfiehlt sich daher, besonders anfänglich, wo man noch nicht über viel Erfahrung verfügt, den abgetrennten Isobutylalkohol mit 10%iger Natronlauge auszuschütteln und zu prüfen, ob er jetzt noch fluoresziert. Ist dies nicht der Fall, so kann die Reinigung als abgeschlossen betrachtet werden, obgleich aus saurer Lösung vielleicht noch weiter fluoreszierende Stoffe ausgezogen werden könnten. Erfahrungsgemäss genügt aber die Betrachtung der Fluoreszenz aus saurer Lösung in den meisten Fällen.

Wie aus dem Gesagten hervorgeht, erfordert die Aneurinbestimmung in jedem einzelnen Fall grosse Aufmerksamkeit. Sie lässt sich nicht immer nach demselben Schema ausführen; man muss sich im Gegenteil in jedem einzelnen Fall dem Material anpassen. Allerdings bietet die Bestimmung keine besondere Schwierigkeit mehr, wenn die Vorreinigung einmal in dem genannten Sinn beendigt ist. Trotzdem empfiehlt es sich zur Sicherheit, einen Versuch mit Aneurinzusatz neben dem Hauptversuch vorzunehmen. Stimmt der gefundene Wert innert der Fehlergrenze von etwa 10 % mit dem berechneten überein, so darf die Bestimmung als richtig angesehen werden.

Folgende Bestimmungen zeigen, welche Uebereinstimmung bei solchen Untersuchungen mit Zusatz von Aneurinhydrochlorid erhalten wurden.

γ % Aneurinhydrochlorid

	direkt gef.	zugesetzt	gefunden	berechnet
Reis, polierter	30	100	137	130
Haferflocken	590	100	700	690
Rollgerste	120	100	207	220
Nudeln	340	100	480	440
Zwieback	250	100	360	350

Die Uebereinstimmung ist eine bessere, als man eigentlich erwarten konnte. Sie kam dadurch zustande, dass man jeweilen das Resultat ausrechnete und es dann durch Nachtitration noch verbesserte, insofern man auch dann noch Uebereinstimmung der Fluoreszenzstärke fand.

Im Folgenden geben wir die Bestimmungsmethode, wie wir sie anwenden, möglichst genau wieder.

METHODIK DER BESTIMMUNG DES FREIEN ANEURINS UND DES ANEURINDISULFIDS IN LEBENSMITTELN

Reagentien: Aneurinlösung: eine Stammlösung, die pro cc 0,1 mg Aneurin-Chlorhydrat, Hoffmann-La Roche enthält, wird auf das 10-fache verdünnt. 1 cc = 10 γ Aneurin. Die Lösung soll jede Woche erneuert werden. Cysteinlösung: 1 mg pro cc. 1%ige Lösung von Kaliumferricyanid, 30%ige Natronlauge, 20%ige Trichloressigsäure, gesättigte Kochsalzlösung, Isobutanol.

Apparatur: Analysenquarzlampe von Heraeus, Centrifugen. Wir verwenden zur Klärung des Auszugs eine Ecco-Superior mit 3500 Touren pro Minute, zum Trennen der Schichten eine Gerbersche Milchzentrifuge. Reagensgläser von 18 mm Durchmesser, 175 mm Länge und ca. 50 cc Inhalt. Reagensgläser von 13 mm Durchmesser und 135 mm Länge aus böhmischem, nicht fluoreszierendem Glas. Der Durchmesser der gleichzeitig benutzten Röhrchen soll möglichst gleich sein. Jedes einzelne Röhrchen ist unter der Quarzlampe auf Abwesenheit von Fluoreszenz zu prüfen und zwar nicht nur leer, sondern auch mit Isobutanol. Dieses muss in allen Röhrchen dieselbe schwach bläuliche Färbung aufweisen.

Wiedergewinnung des Isobutanols. Da bei Serienuntersuchungen grosse Mengen Isobutanol benötigt werden, ist die Wiedergewinnung dieses Alkohols selbstverständlich. Dabei sind folgende Punkte zu berücksichtigen.

Das aus alkalischer Lösung abgetrennte Isobutanol wird aus einer Apparatur mit Glasschliffen destilliert, vom mit übergegangenen Wasser getrennt und ist dann ohne weiteres brauchbar. Wird aus Versehen zur Trockne abdestilliert, so dass der Rückstand anbrennt, so enthält das Destillat fluoreszierende Stoffe und muss nochmals destilliert werden. Bei starker Ueberhitzung des Rückstandes können alkalische, fluoreszierende Stoffe übergehen. Sie sind durch erneute Destillation unter Zusatz von etwas nicht flüchtiger Säure, z. B. Oxalsäure, zu beseitigen.

Falls das zu destillierende Isobutanol Salzsäure enthält, wie dies der Fall ist, wenn es zur Vorextraktion benützt worden ist, so muss es vor der Destillation mit Lauge geschüttelt werden. Unterlässt man die Neutralisation und benützt den Alkohol nachher zum Verdünnen bei der Fluoreszenzmessung, so blassen die Fluoreszenzen ab, da Thiochrom gegen Salzsäure empfindlich ist.

Herstellung des sauren Auszugs. Von Cerealien, Teigwaren und dergleichen werden 2,5 g fein gemahlenes Material mit 50 cc n-HCl aufgekocht, abgekühlt und klar zentrifugiert. Bei besonders aneurinreichen Materialien, wie Hefepräparaten, Weizenkeimen, nimmt man nur 0,5—1 g auf 50 cc Salzsäure. Frisches Obst, Gemüse, Kartoffeln werden unter Salzsäurezusatz in einer Reibschale mit etwas Quarzsand verrieben, mit 0,25 n-Salzsäure auf das 10fache Volumen verdünnt und auszentrifugiert. Man kann auch 10 g mit 5 cc 20%iger Trichloressigsäure und Quarzsand verreiben und mit Wasser auf 100 cc verdünnen. Die Trichloressigsäure ist nicht zu verwenden, falls Co-Carboxylase oder an Eiweiss gebundenes Aneurin mitbestimmt werden soll. Ein Aufkochen ist bei Obst und Gemüse unnötig, bei Kartoffeln direkt ungünstig wegen Verkleisterung der Stärke.

Nüsse, Mandeln, Kerne, Samen werden ebenfalls mit Salzsäure und Quarzsand verrieben, nach dem Verdünnen aber kurz aufgekocht.

Bei Milch fällen wir 20 cc mit 3 cc Trichloressigsäure, verdünnen auf 50 cc und zentrifugieren. Kondensmilch und Trockenmilch werden analog verarbeitet unter Verwendung von entsprechend weniger Material.

Bei Eiklar fällt man 10 g mit 8 cc, bei Eidotter mit 10 cc Trichloressigsäure; in beiden Fällen verdünnt man auf 100 cc.

Die auszentrifugierten Auszüge sind meist nicht ganz klar. Oft schwimmen gewisse Bestandteile, wie Fett, an der Oberfläche. In diesem Fall giesst man die Lösung durch einen Wattebausch.

Verarbeitung des Auszugs.

a) *Zur Bestimmung des freien Aneurins.* Wir führen in allen Fällen eine Vorextraktion mit Isobutanol aus. Man versetzt zweimal 2 cc des Auszugs in Reagensgläsern von 50 cc Inhalt mit 0,5 cc gesättigter Kochsalzlösung, 0,1 cc konz. Salzsäure und 10 cc Isobutanol und schüttelt etwa 200 mal kräftig durch. Bei einiger Geschicklichkeit lässt sich dies im offenen Reagensglas gut bewerkstelligen, ohne Verluste durch Verspritzen zu befürchten. Wem das nicht gut gelingt, der verwende dickwandige Reagensgläser gewöhnlicher Grösse mit Glasstopfen. Nach dem Schütteln wird ungefähr 5 Minuten in der Gerberschen Milchzentrifuge ausgeschleudert und die überstehende klare Isobutanollösung so weit wie möglich abgegossen; der Rest wird mit Hilfe einer mit einem kleinen Gummiball versehenen Pipette abgehoben. Die Isobutanollösung enthält in der Regel die Hauptmenge der Nebenfluoreszenzen. Man prüft sie unter der Quarzlampe. Ist die Fluoreszenz geringfügig, so wäscht man die Rückstände zur Sicherheit noch einmal mit einigen cc Isobutanol, welches man ohne zu Schütteln

zugibt und wieder abhebt. Ist die Fluoreszenz aber bedeutend, so wiederholt man die Extraktion ein zweites, eventuell sogar ein drittes Mal nach erneutem Zusatz von 0,1 cc konz. HCl. Durch die mehrfachen Extraktionen hat sich das Volumen des wässrigen Rückstandes verringert. Ist es unter 2 cc heruntergegangen, so ergänzt man es mit Wasser schätzungsweise auf 2 cc.

Ob die Reinigung genügte, zeigt sich mit Sicherheit erst bei der Fluorszenzmessung. Sollte sie nicht genügen, so müsste der Versuch wiederholt werden. Es empfiehlt sich dann die Filtration durch Aluminiumoxyd. Ein 5 mm weites, 120 mm langes, unten ausgezogenes Röhrchen wird mit einem Wattepfropfen verschlossen, worauf man eine Schicht von etwa 50 mm Aluminiumoxyd einfüllt. Es werden unter gutem Absaugen etwa 6 cc des sauren Auszugs hindurchfiltriert. Man prüft nun das Röhrchen unter der Quarzlampe. In der Regel sind in den obern Teilen intensiv fluoreszierende Schichten vorhanden. Reichen sie bis hinunter zum Wattebausch, so wiederholt man die Filtration durch eine neue Schicht Aluminiumoxyd. Das Filtrat muss sauer reagieren. Es wird noch wie angegeben durch Vorextraktion mit Isobutanol gereinigt.

Man schreitet darauf zu der Oxydation. Das eine der beiden Reagensgläser wird mit 0,05—0,1 n Ferricyankaliumlösung und 1 cc 30%iger Natronlauge, das andere, der Blindversuch, nur mit 1 cc Natronlauge versetzt und umgeschüttelt. Sollte die Farbe des Ferricyankaliums rasch verschwinden, so fügt man noch einen Tropfen hinzu. Gleichzeitig setzt man eine Testlösung an, indem man in ein weiteres Reagensglas mit einer in Tausendstel cc eingeteilten 0,1 cc fassenden Pipette eine bestimmte Menge, beispielsweise 0,05 cc Aneurinlösung, entsprechend 0,5 γ Aneurin abpipettiert, mit Wasser auf 2 cc verdünnt und ebenfalls mit Ferricyankaliumlösung und Natronlauge versetzt. Die Ferricyankaliumlösung soll aber hier nur halb so viel ausmachen wie die Aneurinlösung, also pro γ Aneurin 0,05 cc.

Nach 2 Minuten langem Stehen gibt man in jedes der Reagensgläser 10 cc Isobutanol, schüttelt ca. 200 mal kräftig um und centrifugiert einige Minuten. Die Lösungen werden so weit wie möglich in Reagensgläser abgegossen. Sollten sie ausnahmsweise nicht ganz klar sein, so schüttelt man sie mit etwas Natriumsulfat und centrifugiert nochmals.

b) Zur Bestimmung der Summe von freiem Aneurin und Aneurindisulfid. Man misst wieder 2 cc des Auszugs in ein grosses Reagensglas ab, fügt 0,2 cc Cysteinlösung zu, um das Disulfid zu reduzieren und verfährt im übrigen genau gleich wie unter a). Bei der Oxydation werden hier jedoch 0,05 cc mehr Ferricyanid zugesetzt, um das unverbrauchte Cystein zu oxydieren.

Messung der Fluoreszenz unter der Analysenquarzlampe

Man benützt dazu die Reagensgläser aus nicht fluoreszierendem Glas. Zunächst prüft man den Blindversuch unter Vergleichung mit reinem Isobutanol. Sehen beide Flüssigkeiten gleich oder nahezu gleich aus, so geht man hinter die

Vergleichung der Fluoreszenzen. Sollte der Blindversuch aber eine mehr als spurenweise Fluoreszenz zeigen, so müsste der Versuch unter besserer Vorreinigung wiederholt werden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz misst man vom Hauptversuch (b) und vom Blindversuch (a) gleiche Mengen, bei starker Fluoreszenz beispielsweise 1 cc, bei schwacher vielleicht 4—6 cc in die Proberöhrchen ab und verdünnt im erstern Fall beide Flüssigkeiten mit reinem Isobutanol gleich auf etwa 3 cc. Nun gibt man zum Blindversuch portionenweise kleine Mengen Testlösung, beobachtet jedesmal ganz kurz unter der Lampe und fährt mit dem Zusatz fort, bis die Fluoreszenzen ungefähr gleich sind. Nun bringt man die Lösungen durch Zusatz von Isobutanol wieder auf gleiches Volumen und setzt weiter Testlösung zu, bis die Fluoreszenzen identisch sind. Hat man aus Versehen übertitriert, so fügt man in das Röhrchen b noch die nötige Menge Versuchslösung zu, um Gleichheit der Fluoreszenzen zu erhalten, gibt aber gleichzeitig zu a) ebensoviel vom Blindversuch. Zum Schluss müssen die Fluoreszenzen identisch und die Volumina gleich sein. Ferner hat man bei diesem Vorgehen in der Probe a) ebensoviel vom Blindversuch wie in der Probe b) vom Hauptversuch. Dadurch hat man den Ausgleich für die letzten Spuren Eigenfluoreszenz, die etwa noch zugegen sind. Sie befinden sich in gleicher Menge in beiden Röhrchen.

Die Berechnung erfolgt als Chlorhydrat nach der Gleichung:

$$\gamma\ \% \text{ Aneurinchlorhydrat} = \frac{a}{b} \cdot T \cdot \frac{5000}{p}, \text{ wobei}$$

a = cc Testlösung
b = cc Versuchslösung
T = γ Aneurin bei der Testbereitung
P = Prozentgehalt an Ausgangsmaterial im sauren Auszug

Ist Cystein verwendet worden, so findet man die Summe von freiem Aneurin + Aneurindisulfid, ist keines verwendet worden, so hat man das freie Aneurin. Die Differenz zeigt den Gehalt an Disulfid an.

Die folgende Tabelle gibt unsere bisher erhaltenen Resultate wieder. Wir wiederholen, dass es sich um Mindestwerte handelt, da eventuell vorhandene Co-Carboxylase und an Eiweiss gebundenes Aneurin nicht berücksichtigt sind.

Gehalt an freiem Aneurin und an Aneurindisulfid in Nahrungsmitteln

	γ % Aneurin als Chlorhydrat		
Cerealien	frei	als Disulfid	zusammen
Weizen	450	0	450
Weissmehl	84	5	89
Weissbrot, daraus herg. mit 56,2 % Trsbst.	68	0	68
Weissbrot, auf 85 % Trsbst. ber.	100	0	100
Backmehl, 90 % Ausmahlung	680	0	680
Brot, daraus herg. mit 52,4 % Trsbst.	455	0	455
Brot, auf 85 % Trsbst. ber.	740	0	740
Vollkornschrot	840	0	840
Brot, daraus herg. mit 55,0 % Trsbst.	420	0	420
Brot, auf 85 % Trsbst. ber.	640	0	640
Hörnli	320	90	410
Hörnli	525	—	—
Hörnli	675	50	725
Hörnli	480	30	510
Nudeln	340	50	390
Sternli	310	60	370
Spaghetti	490	50	540
Spaghetti	345	120	465
Gerste, ganze	630	90	720
Rollgerste	120	20	140
Hafer, ganz	610	20	630
Hafergrütze	315	15	330
Hafergrütze	520	380	900
Haferflocken	575	150	725
Haferflocken	700	0	700
Vollreis (mit Silberhäutchen)	315	—	—
Reis, polierter	30	5	35
Reis, polierter	12,5	—	—
Reis, Maratello	65	—	—
Reis, Siam	45	—	—
Maisgriess	500	0	500
Nüsse und Kerne			
Baumnüsse	150	0	150
Haselnüsse	285	15	300
Mandeln	450	0	450
Aprikosenkerne	550	0	550
Pfirsichkerne	215	0	215
Zwetschgenkerne	560	0	560

		γ % Aneurin als Chlorhydrat		
		frei	als Disulfid	zusammen
	Quittenkerne	585	0	585
	Apfelkerne	600	130	730
	Birnenkerne	310	0	310
	Zitronenkerne	90	0	90
	Traubenkerne	0	0	0
	Tomatenkerne	1140	—	—
	Kohlgewächse			
21. X.	Kabis, Weisskraut, innerster Teil	31	—	—
21. X.	Kabis, Weisskraut, mittlerer Teil	18	—	—
21. X.	Kabis, Weisskraut, äusserer Teil	22	—	—
4. XI.	Roter Kabis, Rotkraut	93	—	—
25. X.	Roter Kabis, Rotkraut	24	—	—
19. XII.	Roter Kabis, Rotkraut, am 25. X. eingekellert	69	0	69
19. XII.	Roter Kabis, Rotkraut, am 9. XII. eingekellert	76	0	76
4. XI.	Kohl, Grünkohl, Wirz	65	—	—
18. XII.	Kohl Marcelin	29	2	31
28. X.	Rosenkohl	26	0	26
28. X.	Federnkohl	16	0	16
8. X.	Rübkohl, Kohlrabi	18	—	—
	Blattgemüse			
6. X.	Winterspinat	0	—	—
4. X.	Neuseeländerspinat	7	—	—
25. X.	Schnittmangold	37	—	—
4. X.	Rippenmangold, Blattrippen	1	—	—
	Salate			
7. X.	Kopfsalat	11	—	—
6. X.	Wintersalat, kleine Exemplare	0	—	—
6. X.	Endivie, Sonnenwirbel	0	—	—
6. X.	Nüssler, Feldsalat	0	—	—
	Wurzelgewächse			
7. X.	Karotten, Saucenrübli	21	—	—
18. XI.	Karotten, Saucenrübli	28	0	28
7. X.	Feldrüben, Pfälzerrüben	19	—	—
4. XI.	Schwarzwurzeln	74	—	—
3. X.	Rotrettig, Randen	10	—	—
10. X.	Monatsrettig, Radieschen	0	—	—

			γ % Aneurin als Chlorhydrat		
			frei	als Disulfid	zusammen
14. X.	Knollsellerie, grüner Teil		0	—	—
14. X.	Knollsellerie, Knolle		7	—	—
8. X.	Weisse Rübe, Räbe		4	—	—
	Früchtegemüse, a) frische				
7. X.	Bohnen, Italiener		0	—	—
7. X.	Bohnen, Landfrauen		0	—	—
4. X.	Gurken		2,5	—	—
1. X.	Tomaten		5,0	—	—
18. XI.	Tomaten		8,7	—	—
	Früchtegemüse, b) getrocknete				
	Gelbe Erbsen		1180	220	1400
	Grüne Erbsen		1490	0	1490
	Bohnen, weisse		1290	330	1620
	Linsen		15	—	—
	Sojabohnen		270	—	—
	Sojabohnenmehl, unentfettet		120	—	—
	Sojabohnenmehl, entfettet		45	—	—
	Zwiebelgemüse				
8. X.	Zwiebeln		17	—	—
8. X.	Chalotten		16,5	—	—
8. X.	Knoblauch		187	—	—
4. XI.	Lauch		20	—	—
25. XI.	Schnittlauch		6	—	—
	Obst				
7. X.	Aepfel,	Transparent von Croncels	0	—	—
7. X.		Goldparmäne	0	—	—
7. X.		Gravensteiner	0,6	—	—
7. X.		Jakob Lebel	0,5	—	—
7. X.		Kant	0		
17. XI.		Berner Rosen	0	0	0
25. IX.	Butterbirnen,	Klapps Liebling	2,8	—	—
6. X.		Philipps	0	—	—
6. X.		Kongress	0	—	—
6. X.		Gute Luise	0	—	—
8. X.	Quitten		5	—	—
7. X.	Zwetschgen		0	—	—
19. IX.	Aprikosen		0	—	—

	Nährpräparate	γ % Aneurin als Chlorhydrat			
		frei	als Disulfid	zusammen	physiologisch bestimmt
	Trockenhefe (Pulver)	4300	500	4800	
	Hefeextrakt (pastenförmig)	6400	—	—	6450
	Weizenkeime (M)	2000	500	2500	2100
	Weizenkeime (E)	1190	—	—	
	Eimalzin	450	20	470	480
	Tierische Produkte				
18. XI.	Kuhmilch	27	5	32	
3. XII.	Yoghurt	28	0	28	
15. X.	Hühnerei, Eiweiss	0	0	0	
15. X.	Hühnerei, Dotter	180	0	180	
15. X.	Hühnerei, ganzes	54	0	54	

Am aneurinreichsten sind die Cerealien, die Nüsse und Kerne und die Samen der Leguminosen, also ganz allgemein die Samen. Von den frischen Gemüsen weist einzig Knoblauch einen hohen Gehalt auf; er ist 11 mal höher als bei der Zwiebel.

Einzelne Gemüse, sowie auch die meisten Früchte erwiesen sich als frei von Aneurin, was allerdings nur unter Vorbehalt gültig ist, da die Bestimmung der Co-Carboxylase und des an Eiweiss gebundenen Aneurins ja noch aussteht.

Zusammenfassung

Die Methodik der Aneurinbestimmung nach dem Thiochromverfahren von Jansen wird nachgeprüft und speziell für Lebensmittel ausgearbeitet.

Grösstes Gewicht wird auf die Entfernung der Nebenfluoreszenzen gelegt, wobei die Vorextraktion mit Isobutanol nach K. Ritsert gute Dienste leistet. In gewissen Fällen wird sie mit einer Filtration durch Aluminiumoxyd verbunden.

Es werden Bestimmungen des freien Aneurins und des Aneurindisulfids in vielen Lebensmitteln durchgeführt. Die Bestimmungen sollen noch ergänzt werden durch Bestimmung der Co-Carboxylase und des an Eiweiss gebundenen Aneurins.

Résumé

Le mode opératoire du dosage de l'aneurine par le thiochrome d'après Jansen a été contrôlé et adapté spécialement aux denrées alimentaires.

Une attention toute spéciale a été accordée à l'élimination des fluorescences secondaires; l'extraction préliminaire par l'isobutanol, d'après K. Ritsert, a rendu de bons services pour cela. Dans certains cas elle a été combinée avec une filtration sur de l'alumine.

L'aneurine libre et le disulfure d'aneurine ont été dosés dans un grand nombre de denrées alimentaires. Ces dosages seront encore complétés par ceux de la cocarboxylase et de l'aneurine liée aux protéines.

Literatur

[1]) B. C. P. Jansen, Recueil Trav. Chim. Pays Bas, *55*, 1046, 1936.
[2]) G. Barger, F. Bergel und A. R. Todd, Nature, *136*, 259, 1935.
[3]) H. Willstädt, Naturw. *25*, 682, 1937.
[4]) H. Willstaedt und F. Bárány, Encymologia *2*, 316, 1937-38.
[5]) H. W. Kinnersley und R. A. Peters, Biochem. Journ., *28*, 667, 1934; *29*, 2369, 1935; *32*, 1516, 1938.
[6]) W. Karrer und U. Kubli, Helvet. chim. Acta, *20*, 369, 1937.
[7]) Lunde, Kringstedt und Olsen: Gulbrand Lunde, Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln, Julius Springer, Berlin, 1940.
[8]) H. Otto und F. Rühmekorb, Deutsche med. Wochenschr., *64*, 1511, 1938.
[8]) Otto und Rühmekorb, Deutsche med. Wochenschr., *64*, 1511, 1938.
[9]) K. Ritsert, Deutsche med. Wochenschr., *64*, 481, 1938; Klin. Wochenschr., *18*, 1370, 1939; *19*, 446, 1940.
[10]) H. Fink, F. Just, A. Scheunert und K. H. Wagner, Biochem. Z., *309*, 1, 1941.
[11]) O. Zima und R. R. Williams, Ber. chem. Ges., *73*, 941, 1940.
[12]) O. Zima, K. Ritsert und Th. Moll, Z. physiolog. Chem., *267*, 210, 1941.
[13]) H. G. K. Westenbrink und B. C. P. Jansen, Acta brevia neerland. *8*, 119, 1938; C I 4799, 1939.
[14]) A. Kuhn und H. Gerhard, Klin. Wochenschr., *20*, 868, 1941.
[15]) J. Houston und S. K. Kon, Nature, *143*, 558, 1939.
[16]) N. Halliday und H. J. Deuel, Journ. of Biolog. Chem., *140*, 555, 1941.