

Analysenmethode zur Bestimmung des Vitamins E in Lebens- und Futtermitteln : (kolorimetrische Bestimmung nach Emmerie-Engel)

Autor(en): **Nobile, S. / Moor, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **44 (1953)**

Heft 4

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982864>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Analysenmethode zur Bestimmung des Vitamins E in Lebens- und Futtermitteln

(Kolorimetrische Bestimmung nach *Emmerie-Engel*)

mitgeteilt von *S. Nobile* und *H. Moor*

(Aus den Laboratorien der Vitamin-Abteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel)

Einleitung

Zur Bestimmung des Vitamin E in Lebensmitteln findet die von *Emmerie & Engel* ¹⁾²⁾³⁾ entwickelte Methode am meisten Verwendung. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Oxydation des Vitamin E mit Ferri-Chlorid. Das entstandene Ferro-Chlorid bildet mit α, α_1 -Dipyridyl einen roten Farbstoff, dessen Intensität kolorimetrisch bestimmt wird. Da diese Reaktion von anderen fettlöslichen reduzierenden Stoffen, wie Sterinen, Carotinoiden, Vitamin A usw., gestört wird, muss das Vitamin E vorerst isoliert werden. Zur Extraktion des Vitamin E aus dem Analysenmaterial und nachfolgenden Reinigung der Extraktionslösung sind in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. *Kofler* ⁷⁾⁸⁾ verseift z. B. das Analysenmaterial in unextrahiertem Zustand, während *Emmerie & Engel* ⁴⁾ eine kontinuierliche Alkoholextraktion vorausgehen lassen. Die Verseifung von Vitamin E haltigen Produkten wird mit aethanolischer ⁷⁾⁸⁾ bzw. methanolischer ⁴⁾ Kali- oder Natronlauge durch 10 bis 60 Minuten langes Erwärmen bei zirka 80° C in Stickstoffatmosphäre ⁷⁾⁸⁾ oder auch in Anwesenheit von Pyrogallol ¹³⁾ vollzogen. Anschliessend extrahieren genannte Autoren das Unverseifbare aus den in Wasser aufgenommenen Seifen mittels peroxydfreiem Äther ⁴⁾⁸⁾ bzw. Petroläther ⁷⁾⁸⁾. Die Entfernung störender Begleitstoffe geschieht durch Adsorption an Aluminiumoxyd ⁷⁾⁸⁾ oder Fullererde ⁴⁾, durch Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure ⁹⁾ bzw. Acetylierung ¹¹⁾.

Im Bestreben, eine für Routine-Analysen in Lebens- und Futtermitteln geeignete Methode auszuarbeiten, wurde die Anwendbarkeit der oben erwähnten Verfahren überprüft. Wir stellten dabei fest, dass keine davon in bezug auf Universalität, Schnelligkeit und Einfachheit unseren Ansprüchen genügen konnte. Ferner begegneten wir auch folgenden analytisch bedingten Schwierigkeiten: Die Extraktion des Vitamin E aus der wässrigen Seifenlösung mittels peroxydfreiem Äther ist nach einmaligem Ausschütteln nicht quantitativ und durch die öfters beobachtete Schichtenverschiebung nicht sicher reproduzierbar. Bei der Verseifung von fettreichen Produkten verhindern die dabei gebildeten grösseren Mengen Seifen eine vollständige Extraktion des Vitamin E. Zur Verseifung von Fetten ist eine starke Lauge notwendig, welche aber die oxydative Zersetzung des Vitamin E durch Peroxyde und Luftsauerstoff beschleunigt.

Durch besondere Anordnung der Versuchsbedingungen gelang es uns, eine einfache und schnelle Methode zu entwickeln, welche sowohl für fettarme als

auch für fettreiche Lebensmittel universell Anwendung finden kann. Die Verseifung des Analysenmaterials führen wir mit In-Kalilauge in absolutem Methanol durch, wobei das Vitamin E während der Behandlung durch Zusatz eines Stabilisators (Natriumascorbinat) vor Oxydationseinflüssen geschützt wird. Der durch Extraktionsbehinderung und Emulsionsbildung störende Einfluss der Seifen wird beseitigt, indem die methanolische Seifenlösung nicht in Wasser, sondern in dem zirka siebenfachen Volumen Methylalkohol aufgenommen wird. Zur Extraktion des Unverseifbaren benützen wir Petroläther, Siedepunkt 30 bis 40° C, welcher das Vitamin E aus dieser weniger als 5 % Wasser enthaltenden methanolischen Verseifungslösung quantitativ ausziehen kann. Die vollständige Trennung der Methylalkohol- und Petrolätherschichten wird durch nachherige Zugabe von 10 % Wasser ohne Emulsionsbildung erreicht. Zur Abtrennung von Carotinoiden, Sterinen usw. wird das petrolätherische Extrakt durch Chromatographie an Aluminiumoxyd bestimmter Aktivität weiter gereinigt. Das Vitamin A, welches durch einfache chromatographische Reinigung nicht beseitigt werden kann, entfernen wir durch Behandlung des unverseifbaren Extraktes mit Antimontrichlorid unmittelbar vor der Chromatographie.

Milch und Milchprodukte, bei welchen das Vitamin E stark an Milcheiweiss gebunden ist, werden nach der Methode von *Röse-Gottlieb*¹⁰⁾¹⁴⁾ extrahiert und durch Verseifung und Chromatographie gereinigt.

Zur Bildung des Farbstoffes erwies sich vorteilhaft, die Eisenchlorid- und α, α_1 -Dipyridyllösungen nach den Angaben von *Ritzert*¹²⁾ dem Vitamin-E-Extrakt separat zuzusetzen. Damit wird die durch die Mischung besonders erhöhte Empfindlichkeit der Reagenzien⁴⁾ gegen Lichteinflüsse ausgeschaltet. Nach 2 Minuten erreicht die Farbintensität ihr Maximum und wird im photoelektrischen Colorimeter Lumetron 402 E unter Anwendung des Filters 515 in einer Cuvette von 2 cm Schichtdicke gemessen. Die Einstellung des Apparate-Nullpunktes

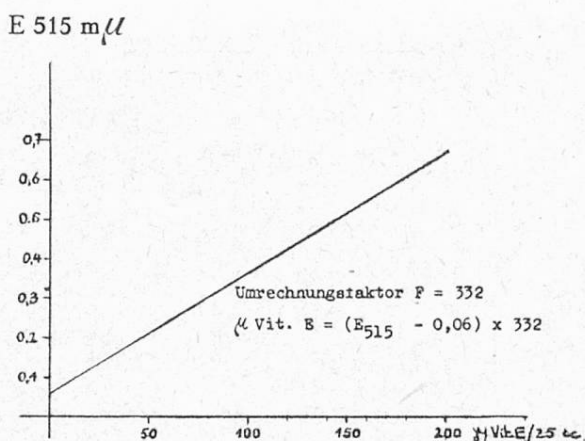


Abbildung 1
 Testkurve von dl- α -Tocopherol.
 Farbreaktion mit Eisen-Dipyridyl
 Ablesung nach 2 Minuten

wird mit absolutem Alkohol ausgeführt. Die Farbintensitäten, entsprechend Vitamin-E-Mengen bis 200 γ , folgen genau dem *Beer'schen* Gesetz, so dass man unter diesen Bedingungen zur Auswertung der Resultate auch einen Umrechnungsfaktor gebrauchen kann (siehe Abbildung 1).

Die gleichzeitige Durchführung eines Zusatzversuches, d. h. eines Versuches, bei welchem eine bekannte Menge Vitamin E zugesetzt wurde, ermöglicht es, die während der Analyse eintretenden Verluste festzustellen.

Diese Methode haben wir zur Bestimmung des Vitamin E in Brot, Butter, Margarine, Kakaopulver, Mehlen usw. mit guter Reproduzierbarkeit angewandt. Die Genauigkeit beträgt $\pm 5\%$, während die unterste Erfassbarkeitsgrenze je nach Art des Analysenmaterials bei 2 bis 10 γ/g liegt.

Experimenteller Teil

Spezial-Apparatur

Verseifungsapparatur bestehend aus Schliffkolben und Steigrohren.

Chromatographieapparatur gemäss Skizze (Abbildung 2).

Photoelektrisches Kolorimeter mit Filter 515 $m\mu$. (Lumetron Modell 402 E).

Zentrifugiergläser mit Stopfen, Inhalt zirka 40 cm^3 .

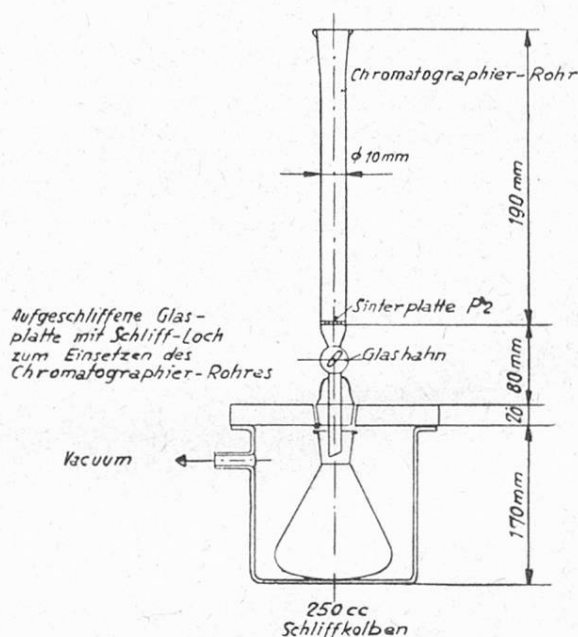


Abbildung 2
Chromatographie-Apparatur

Herstellung der Vitamin-E-Standardlösung

Eine bestimmte Menge (90 bis 100 mg) dl- α -Tocopherol Roche wird in einem 100- cm^3 -Messkolben rasch abgewogen, sofort in abs. Äthanol gelöst und zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung bleibt bei 4° C im Dunkeln 5 bis 10 Tage unverändert.

Testkurve (Abbildung 1)

Abgestufte Mengen (0 bis 200 γ Vitamin E) der Standardlösung werden einzeln in 25-cm³-Messkolben ausgemessen. 1 cm³ 0,2 %ige, alkoholische Eisenchloridlösung und 1 cm³ 0,5 %ige, alkoholische α, α_1 -Dipyridyl-Lösung werden nacheinander in den Kolben zugegeben. Bei Beginn des α, α_1 -Dipyridyl-Zusatzes wird die Stoppuhr laufen gelassen. Inzwischen stellt man den Kolorimeter mit abs. Äthanol auf den Nullpunkt ein, füllt die Farblösung mit abs. Äthanol auf die Marke und giesst die Mischung in die Messcuvette. Nach Ablauf von exakt 2 Minuten wird die Extinktion bei 515 m μ gemessen.

Durchführung der Analyse

Nach zweckmässiger Zubereitung des Analysenmaterials (durch Pulverisieren, Mahlen, Homogenisieren, Mischen usw.) wird in 2 Schliffkolben je die gleiche Menge Substanz eingewogen. Die Einwaage soll mindestens 50 γ Vitamin E enthalten und im Fallen von Fett nicht mehr als 3 g betragen.

Einem Kolben (Zusatzversuch) setzt man eine bestimmte Menge der Vitamin-E-Standardlösung zu. Diese Menge soll dem Vitamin-E-Gehalt der Einwaage entsprechen. Von nun an wird der Inhalt beider Kolben genau gleich weiterbehandelt.

Verseifung

Nach Zugabe von

- 5 cm³ abs. Methylalkohol und
- 0,5 cm³ einer jeweils frisch hergestellten, 50 %igen, wässrigen Natriumaskorbinat-Lösung wird das Steigrohr aufgesetzt und die Mischung unter bisweiligem Rühren im Wasserbad bei 60 bis 70° C 5 Minuten lang erwärmt.
- 15 cm³ In-methanolische Kaulilauge *) zufließen und verseift 15 Minuten bei 60 bis 70° C im Wasserbad.

Extraktion des Unverseifbaren

- Nach Abkühlen der Seifenlösung bis auf zirka 40° C werden durch das Rohr
- 100 cm³ abs. Methanol zugesetzt. Die Mischung wird geschüttelt und danach in einen 250-cm³-Schüttelzylinder gegeben. Mit zusätzlichen
 - 25 cm³ Methanol spült man den Kolben, kühlt die verdünnte Seifenlösung, wenn noch nötig, bis auf Zimmertemperatur ab und extrahiert durch kräftiges Schütteln mit
 - 150 cm³ reinem Petroläther, Sp. 30 bis 40° C. Sobald die Trennung der Schichten stattgefunden hat, setzt man

*) 5,6 g Kalilauge (Schuppen) werden in abs. Methanol aufgelöst und auf 100 cm³ aufgefüllt. Die Lösung ist nur einen Tag verwendbar.

- 15 cm³ dest. Wasser zu und schüttelt nochmals kräftig. Erst durch diese Wasserzugabe wird die Methanol/Petroläther-Mischung vollständig getrennt.
- 125 cm³ petrolätherische Phase werden in einen weiteren Schüttelzylinder ausgemessen und mit
- 20 cm³ dest. Wasser gewaschen. Die Wasserschicht wird durch Heraussaugen mittels einer Pipette entfernt und der Petroläther mit
- 20 cm³ Salzsäure (zirka 1n) durch abermaliges Schütteln nachbehandelt.

Chromatographie

Ein aliquoter Teil der Petroläther-Lösung (entsprechend 50 bis 150 γ Vitamin E) wird in einem Rundkolben unter Vakuum eingedampft (Eindampfrückstand I). Das Chromatographierrohr wird nun mit Aluminiumoxyd *) zirka 12 cm hoch aufgefüllt, Petroläther hindurchgegossen und der Ausflusshahn des Rohres geschlossen, sobald der Petroläther die Aluminiumoxydschicht um zirka 1 cm überdeckt. Der Eindampfrückstand (I) wird in

- 10 cm³ Petroläther aufgenommen, in das Chromatographierrohr gebracht und mit weiteren
- 40 cm³ Petroläther nachgewaschen. Die Vorlage wird nun gewechselt und das Vitamin E mit
- 50 cm³ reinem Benzol eluiert.

Beseitigen des Vitamins A

Der Eindampfrückstand (I) wird zur Entfernung evtl. vorhandenen Vitamins A mit 1 cm³ SbCl₃-Reagens **) versetzt und nach kurzem Umrühren und Erwärmen auf zirka 70° C im Wasserbad unter Vakuum eingedampft (II). Man arbeitet wie unter «Chromatographie» beschrieben weiter, wobei aber unmittelbar nach dem Aufnehmen des Eindampfrückstandes (II) in Petroläther chromatographiert werden muss.

*) Reines Aluminiumoxyd Merck, nach *Brockmann*, wird durch Glühen (zirka 400° C) maximal aktiviert und zur Fernhaltung von Feuchtigkeit im Vakuum erkalten gelassen. Zur Chromatographie werden 50 g max. aktiviertes Aluminiumoxyd in einen Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen gewogen und mit 6 cm³ dest. Wasser versetzt. Sofort Stopfen schliessen und so lange schütteln, bis alle Knollen zerfallen sind. Unter gutem Verschluss aufbewahrt, bleibt die Aktivität zirka 1 Tag unverändert.

**) 22 g reines, evt. frisch destilliertes Antimontrichlorid werden mit 100 cm³ reinem Chloroform versetzt und unter Rückfluss bis zum vollständigen Auflösen erwärmt. Nach dem Abkühlen wird das Reagens in dunkler Flasche über hochaktivem Aluminiumoxyd aufbewahrt. Für den Gebrauch wird gut aufgeschüttelt und durch 3 Papierfilter filtriert.

Farbreaktion und Messung

Nach Eindampfen des Eluates im Vakuum wird der Rückstand in 23 cm³ abs. Äthanol aufgenommen. Der Zusatz von je 1 cm³ Eisenchlorid- und α, α_1 -Dipyridyl-Lösung sowie die Messungen erfolgen nun unter genau denselben Bedingungen, wie bei der «Testkurve» beschrieben.

Berechnung

Aus der abgelesenen Extinktion wird mit Hilfe der Testkurve und des Zusatzversuches der Vitamin-E-Gehalt des Analysenmaterials unter Anwendung folgender Formel berechnet:

$$\text{Formel } \frac{100 \times d \times b}{(a - b) \times c} = \gamma \text{ Vitamin E } \% \text{ g}$$

a = γ Vitamin E im Analysenmaterial + Zusatz

b = γ Vitamin E im Analysenmaterial ohne Zusatz

c = Einwaage in g (d. h. die mit dem Zusatz d versetzte Menge Analysenmaterial)

d = zugesetzte γ Vitamin E der Standardlösung

Extraktion des Vitamin E aus Milch und Milchprodukten

In Milch und Milchprodukten sind die fettlöslichen Vitamine (Vitamin E und A usw.) stark an Milcheiweiss gebunden. Um daher eine vollständige Extraktion des Vitamin E zu gewährleisten, genügen weder die Behandlung mit Fettlösungsmitteln noch eine direkte Verseifung. Dagegen wird unter Anwendung der nachstehend beschriebenen Extraktionsmethode von *Röse-Gottlieb* das Milcheiweiss aufgelöst und das Vitamin E mit Petroläther und Äther daraus quantitativ extrahiert.

40 cm³ Frischmilch, bzw. 40 cm³ eines im physiologischen Verhältnis in dest. Wasser aufgelösten Milchproduktes werden im 250-cm³-Schüttelzylinder nacheinander mit folgenden Reagenzien versetzt (nach jedem Zusatz energisch schütteln):

10 cm³ zirka 25 %ige Ammoniaklösung

40 cm³ reiner abs. Alkohol

80 cm³ peroxydfreier Äthyläther

80 cm³ Petroläther (Siedepunkt 30 bis 40° C).

Die vollständige Schichtentrennung erfolgt nach 15 bis 20 Minuten langem Stehenlassen der Mischung im Dunkeln. Man stellt nun das Volumen der überstehenden Flüssigkeit fest und misst 2 mal einen aliquoten, mindestens 50 γ Vitamin E enthaltenden Teil davon in die Verseifungskolben ein. In einen Kolben (Zusatzversuch) gibt man eine dem Vitamin-E-Gehalt der ausgemessenen Extraktionslösung entsprechende Menge Vitamin-E-Standardlösung hinzu. Der Inhalt beider Kolben wird bei 60 bis 70° C im Vakuum eingedampft und der Rückstand gemäss der Vorschrift «Verseifung» weiterbehandelt.

Zusammenfassung

Es wird eine Analysenmethode zur Bestimmung von Vitamin E in Lebens- und Futtermitteln beschrieben, deren Prinzip auf der bekannten Farbreaktion von *Emmerie-Engel* basiert und besonders für eine universelle und rasche Durchführbarkeit entwickelt worden ist. Verseifung in stabilisiertem Milieu, Extraktion des Vitamins aus den Seifen, Entfernen störender Begleitstoffe, besonders Vitamin A und Chromatographie erfolgen nach neuem Verfahren.

Résumé

Les auteurs présentent une méthode permettant de doser la vitamine E dans les produits alimentaires et les fourrages. Le principe de la méthode repose sur la réaction colorée bien connue d'*Emmerie-Engel*; elle a été développée en vue d'une application rapide et générale. La saponification en milieu stabilisé, l'extraction de la vitamine E des produits résultant de la saponification, l'élimination des substances secondaires gênant la réaction comme par exemple la vitamine A, de même que la chromatographie sont effectuées selon un procédé nouveau.

Summary

An analytical method for the determination of vitamin E is presented. The method is based on the well known colour reaction developed by *Emmerie-Engel* and permits a relatively rapid determination of vitamin E in foods and animal feeding stuffs. The authors describe modifications and improvements in the various steps of the method such as saponification in the stabilized solution, extraction of vitamin E, elimination of substances having a disturbing influence on the assay in particular vitamin A and chromatography.

Literatur

- 1) *A. Emmerie und Chr. Engel*: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1938. **57**, 1351-55.
- 2) — id. **58**, 1939, 283-89.
- 3) — id. **58**, 1939, 895-902.
- 4) — *Z. f. Vitaminforschung.*, **13**, 259-66, 1943.
- 5) *M. Kofler*: Helv. Chim. Acta **25**, 1469, 1942.
- 6) — id. **26**, 2166, 1943.
- 7) — id. **28**, 26, 1945.
- 8) — id. **30**, 1053, 1947.
- 9) *W. E. Parker, W. D. Mc Farlane*: Canadian J. of Res., Sect. B, **18**, 405-9, 1940.
- 10) *Röse-Gottlieb*: Schweiz. Lebensmittelbuch, 4. Ausgabe, 1937, Bern, Seite 53.
- 11) *A. Emmerie*: Rec. Trav. Chim., 1942, **61**, 305.
- 12) *K. Ritsert*: E. Mercks Jber. **55**, 13, 1941, Gstirner Dr. F. Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden, 4. Auflage, Stuttgart, 1951, 237.
- 13) *J. Tosic und T. Moore*: Biochem. J. **39**, 493, 1945.
- 14) *H. Moor*: Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **44**, Nr. 3, 263 (1953).