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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 83 (1992)

Heft: 3

Artikel: Die Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln = Determination of vitamin D in foods

Autor: Brawand, F. / Walter, P.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982266

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: 15.07.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 83, 270–278 (1992)

Die Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln*

Determination of Vitamin D in Foods

F. Brawand und *P. Walter*
Schweizerisches Vitamin-Institut, Basel

Einleitung

Vitamin D ist in der Natur relativ wenig verbreitet und kommt vor allem in Lebern (Lebertran) und in gewissen Meeresfischen (Leber, Fettanteil) und in geringeren Mengen in Eiern, Milch und Milchprodukten vor. Natürliche Nahrung trägt somit relativ wenig zur Vitamin-D-Versorgung des Menschen bei, und der Vitamin-D-Status wird im wesentlichen durch die endogene Vitamin-D-Bildung durch Sonnenexposition in der Haut bestimmt. Da die UV-Bestrahlung der Haut saisonal oder gewohnheitsbedingt oft zu gering ist, wurden in Industrieländern Empfehlungen ausgearbeitet, die die prophylaktische tägliche D-Einnahme mittels Vitaminierung von Lebensmitteln regeln. In der Schweiz liegt der RDA-Wert (Recommended Dietary Allowance) bei 450 IE = 11 µg. Hypervitaminosen als Folge vermehrter Bestrahlung sind unbekannt. Offenbar wird die Produktion und Abgabe von Vitamin D der Haut biochemisch streng reguliert. Oral aufgenommenes Vitamin D hingegen ist potentiell toxisch und kann in seltenen Fällen bereits in Mengen von 1200 IE durch Mobilisierung von Calciumphosphat aus den Knochen zu kardiovaskulären und renalen Schäden führen (1). Aus diesem Grunde sind die Behörden in der Zulassung von Vitamin-D-Zusätzen, die den Tagesbedarf von 450 IE überschreiten, sehr restriktiv. Aufgabe der Vitamin-D-Analytik muss in der Schweiz also die Kontrolle der Vitaminierung im Bereich von 450 IE pro Tagesportion sein. Eine Ausrichtung der Analytik auf geringe natürliche Vitamin-D-Gehalte bleibt weiterhin eine äusserst problematische Aufgabe.

Die analytische Aufgabe wird erschwert durch die Tatsache, dass es keine mikrobiologische Methode zur Bestimmung von Vitamin D gibt. Bis vor wenigen Jahren war der sogenannte kurative Rattentest (2) die einzige Methode zur Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln. Die klassische kolorimetrische Bestimmung mit Antimontrichlorid versagt in vielen Fällen infolge Interferenz mit Begleitsubstanzen und eignet sich nur für Konzentrate (3). Als Methode der Wahl darf

* Aus dem Vortrag, gehalten an der 103. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für Analytische und Angewandte Chemie vom 6./7. September 1991 in Engelberg.

man heute die HPLC-Analytik bezeichnen, deren Anwendung für die Vitamin-D-Analytik in der Literatur bereits umfangreich beschrieben wurde (4, 5).

Besondere Probleme und Komplikationen in der Vitamin-D-Analytik

Vitamin D kommt in Lebensmitteln (vitaminierte eingeschlossen) in viel niedrigeren Konzentrationen vor als analytisch interferierendes Vitamin A, Vitamin E und Cholesterin (Tabelle 1). Es handelt sich beim Vitamin D, neben Vitamin B_{12}, um die niedrigste Vitaminkonzentration (höchstens 11 µg/Tagesportion), die es zu bestimmen gilt. Der Begriff Tagesportion beinhaltet zudem die verschiedensten Matrices: Flüssigkeiten (z.B. Milch), Fett, Margarine, Babynahrung, Choco-Drink (Pulver), Fertigmenus usw.

Vitamin D befindet sich in der Lipidfraktion von Lebensmitteln. Der Fettanteil stellt dabei den millionenfachen Überschuss dar. Bei der Anreicherung mit organischen Lösungsmitteln kommt man daher kaum um einen konventionellen alkalischen Verseifungsschritt herum. Vitamin D ist stabil im alkalischen Bereich, unterliegt aber beim Erhitzen des Verseifungsgemisches unter Rückfluss bei 80 °C der thermischen Isomerisierung zu 10–20% Prävitamin D (6), das nur etwa die Hälfte der antirachitischen Wirkung von Vitamin D ausübt (7). Abbildung 1 zeigt, dass der Anteil an Prävitamin D nach 30 min bei 80 °C etwa 12% beträgt. Nach Abkühlen der Mischung wird der Zustand gewissermassen eingefroren, da die Umwandlung bei tieferen Temperaturen äusserst langsam erfolgt (Tabelle 2). Da sich Vitamin D_2 und D_3 bei der Isomerisierung gleich verhalten und auch sonst weitgehend identische chemische Eigenschaften besitzen, kann man sie gegenseitig als internen Standard einsetzen.

Die Vitaminierung verschiedener Lebensmittel geschieht mit unterschiedlichen Vitamin-D-Präparaten. Setzt man z. B. Fetten Vitamin D in öllöslicher Form bei der Verarbeitung zu, ist eine homogene Vermischung gewährleistet. Zur Vitaminierung von Pulvern allerdings müssen trockene Formen eingesetzt werden. Kleine Gelatine-Stärke-Kügelchen mit hohen Vitamin-D-Aktivitäten (bis 25 ng) werden eingesetzt und vermischt. Sie unterliegen einer Poissonverteilung mit einer Standardabweichung von $SD = \sqrt{\text{Mittelwert}}$. Die Grösse der Einwaage wird damit zum kritischen Ausgangspunkt der Analyse.

Tabelle 1. Verhältnisse der Vitamine A, E und des Cholesterins zu Vitamin D in einigen Nahrungsmitteln (9)

Nahrungsmittel	Verhältnis relativ zu Vitamin D auf einer Gewichtsbasis			
	D	A	E	Cholesterin
Vollmilch	1	1 500	5 000	600 000
Rinderleber	1	6 000	1 400	300 000
Ganzes Ei	1	75	500	80 000
Lebertran	1	120	60	10 000

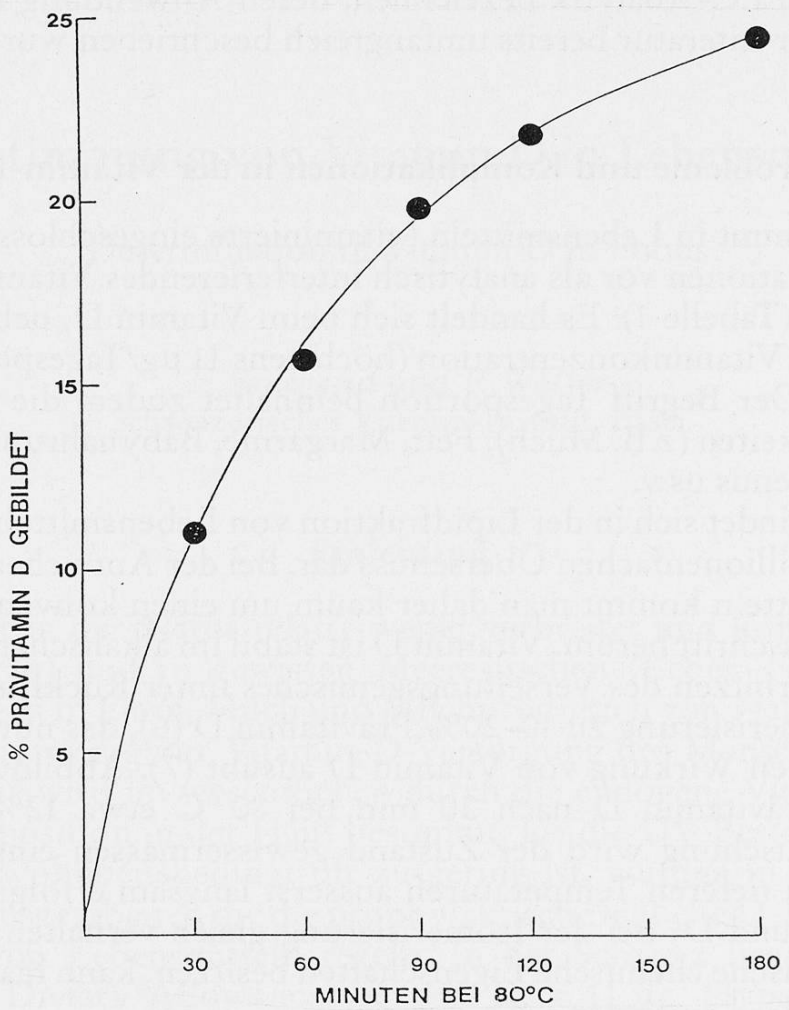


Abb. 1. Umwandlung von Vitamin D_3 in Prävitamin D_3 nach verschiedenen Zeiten bei 80 °C

Tabelle 2. Gleichgewichtszustand von Prävitamin D und Vitamin D in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit (10, 11)

Gleichgewichtszustand			
Temperatur (°C)	Prävitamin D	Vitamin D	Einstellung des Gleichgewichtes in
0	4	96	350 Tagen
20	7	93	30 Tagen
40	11	89	3,5 Tagen
60	16	84	0,5 Tagen
80	22	78	72 Minuten
100	28	72	30 Minuten
120	35	65	7 Minuten

Diskussion der Vitamin-D-Analytik

Probenentnahme und Verseifung

Die Analyse beginnt mit der Einwaage einer repräsentativen Probe. Selbst bei korrekter Zumischung des Vitamins durch den Hersteller können sich Verteilungsprobleme ergeben. In solchen Fällen (z. B. Pulver vitaminiert mit Vitamin D, Gelatine-Stärke-Teilchen bis 1 IE/Teilchen) erhöht man die Einwaage (z. B. auf die Tagesportion) und stellt einen sogenannten «Slurry» her. Man fügt z. B. zu 50 g Pulver 50 g 2% Ammoniak hinzu und homogenisiert. Ein Aliquot (30 g) wird anschliessend verseift. Die Menge des zugeführten Wassers wird bei der Verseifungslösung (Methanol-Ethanol-KOH (50%) 1:1:1) berücksichtigt. Die Quotienten KOH g : Probe g variieren in der Literatur erheblich. Wichtig erscheint eine vollständige Hydrolyse des Verseifbaren (Extraktion mit Ether!). Die Verseifung geschieht in Gegenwart von N_2 bei 80 °C unter Rückfluss. Als Antioxidans dient Ascorbinsäure (1 g/Probe) oder Pyrogallol. Die Verseifung beinhaltet unausweichlich eine thermische Isomerisierung zu Prävitamin D um 10–20%. Da sich D_2 und D_3 gleich verhalten, ist die Zugabe von D_2 oder D_3 als internem Standard angezeigt. In den wenigsten Fällen werden D_2 und D_3 gemeinsam bei der Vitaminierung verwendet. Zudem kommt D_2 in der Natur kaum vor. Ein erheblicher Teil der effektiven Verluste bei der Aufarbeitung lässt sich durch die Isomerisierung erklären (Tabelle 3).

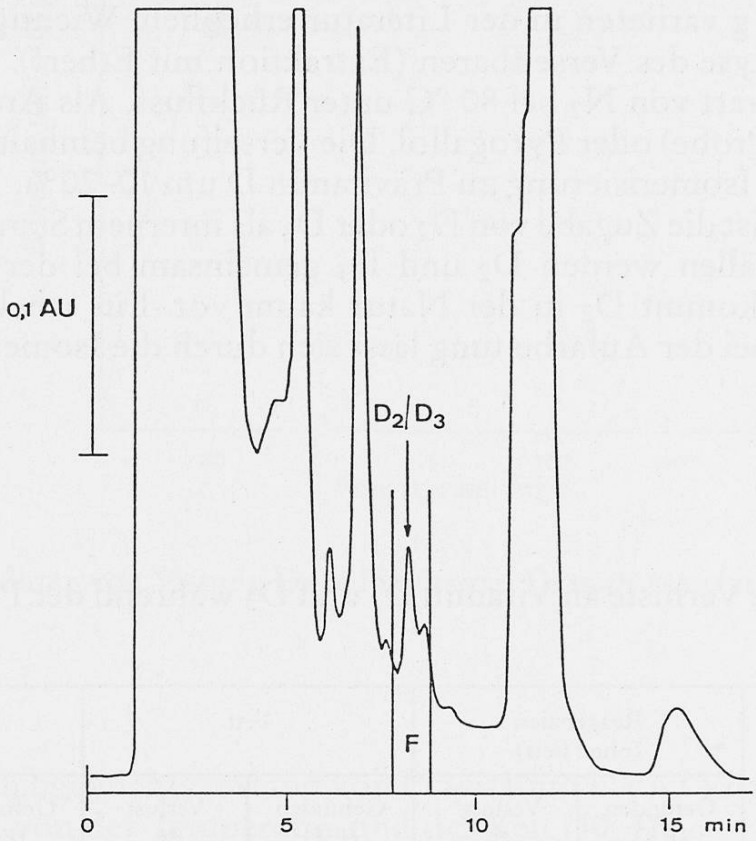
Tabelle 3. Effektive Verluste an Vitamin D_2 und D_3 während der Probenvorbereitung (4)

	Reagenzien (ohne Fett)		Fett		Margarine	
	Gefunden IE D	Verlust* %	Gefunden IE D	Verlust %	Gefunden IE D	Verlust %
Probenvorbereitung						
D_2	426 ± 4	14,8	367 ± 11	26,6	394 ± 9	21,3
D_3	424 ± 3	15,2	350 ± 10	30,1	385 ± 19	23,3
Extraktion						
D_2	497 ± 3	0,6	427 ± 10	14,6	430 ± 4	14,0
D_3	499 ± 1	0,2	413 ± 17	17,5	427 ± 6	14,7
Verseifung						
D_2		14,2		12,1		7,3
D_3		15,0		12,3		8,4

* Vorlage 500 IE Vitamin D

Extraktion

Verschiedene organische Lösungsmittel werden zur Extraktion empfohlen. Wir extrahieren mit Diethylether. Eine vollständig verseifte Probe ist daher wichtig. Spuren von Seifen, die sich in Ether lösen, können mit Wasser oder Kochsalzlösung ausgewaschen werden. Da die Effizienz der Extraktion durch viele Faktoren beeinflusst wird, ist der interne Standard vorteilhaft. Die Extraktionsverluste variieren zudem je nach Fettgehalt der Probe (Tabelle 3). Die Extrakte werden im Rotationsverdampfer in Gegenwart von Butyl-hydroxytoluol (BHT) eingedampft. Sie enthalten Vitamin D und vielfach (je nach Probe) Cholesterin, Phytosterine, fettlösliche Vitamine (A, E) oder Carotinoide in grossem Überschuss. Eine zusätzliche Vorreinigung ist daher unumgänglich.



F = gesammelte, D-haltige Fraktion

Abb. 2. Präparatives Chromatogramm des Etherextraktes von verseifter Margarine (4)

Vorreinigung durch semi-präparative HPLC

Der eingedampfte Etherextrakt wird in Hexan aufgenommen und wie folgt chromatographiert:

- Säule: LiChrosorb SI 60,7 µm, 250 x 4,6 mm
- Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/Tetrahydrofuran (98:1:1)
- Eingespritzte Menge: 500 µl
- Flussrate: 2,5 ml/min
- Detektion: UV 264 nm

Bei der Vorreinigung werden Prävitamin D und alle inaktiven Vitamin-D-Isomere von Vitamin D abgetrennt (8). Vitamin D_2 und D_3 werden genau gleichzeitig eluiert (Abb. 2) und ergeben einen Peak zwischen 7,5 und 8,8 min. Die Vitamin-D-haltige Fraktion wird in einem 50-ml-Kölbchen aufgefangen, am Rotationsverdampfer eingedampft, in 300 µl Acetonitril/Methanol/Chloroform (91:3:6) aufgenommen und in ein Probenfläschchen mit 300-µl-Einsatz übergeführt.

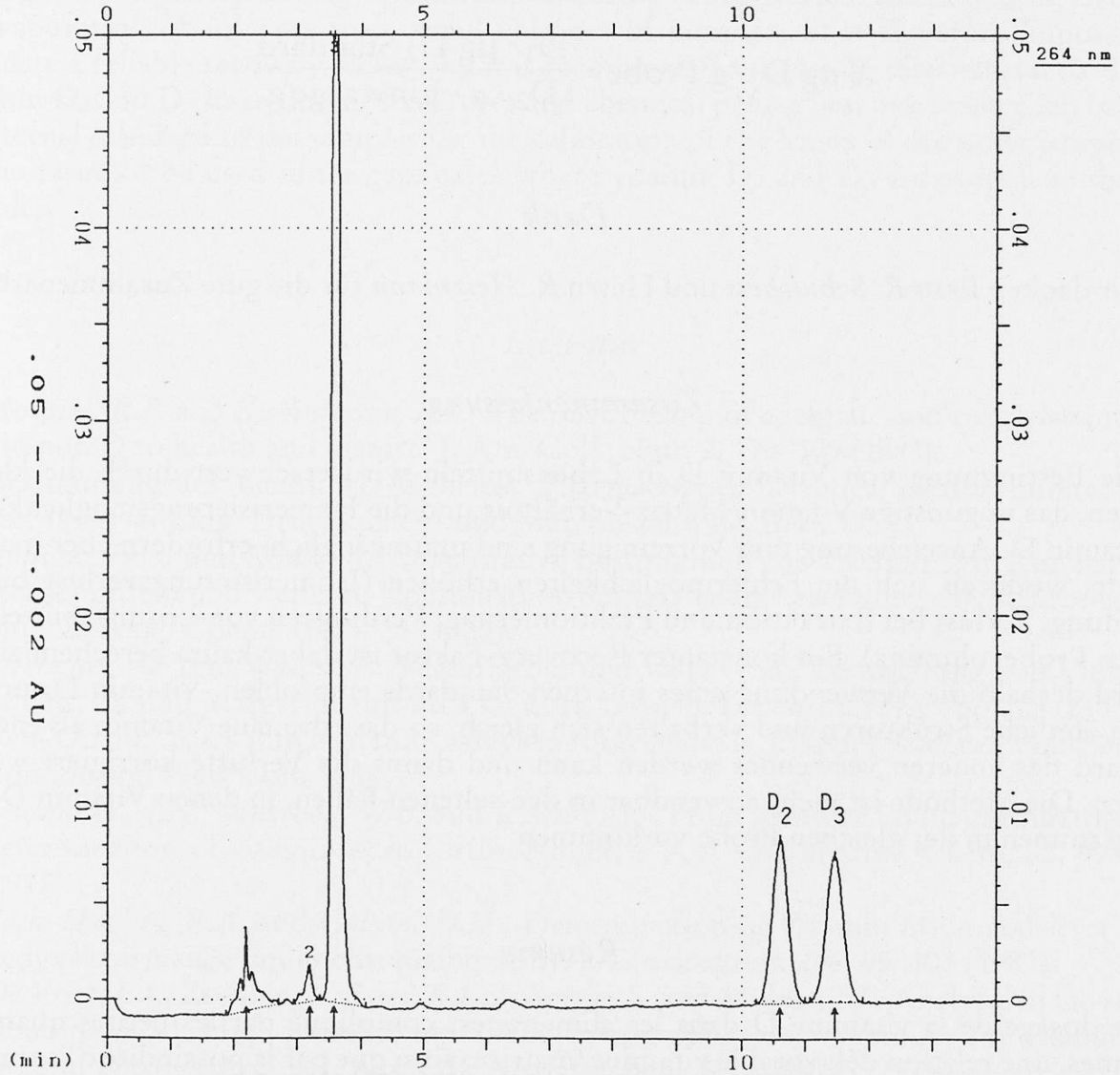


Abb. 3. Analytisches Chromatogramm der Vitamin-D-haltigen Fraktion

Analytische HPLC

Die quantitative Bestimmung erfolgt unter folgenden Bedingungen:

- Säule: Lichrospher Rp18, 250 x 4 mm, 5 µm
- Mobile Phase: $CH_3CN/CHCl_3/MeOH$ 91/6/3
- Einspritzvolumen 20 µl
- Flussrate 1,5 ml . min^{-1}
- Detektion 264 nm
- Nachweisgrenze 2,5 ng

Vitamin D_2 und D_3 lassen sich erfolgreich trennen (Abb. 3). Prävitamin D_2 und D_3 werden auf der präparativen Säule bereits abgetrennt. Die Berechnung des Vitamin-D-Gehalts erfolgt anhand des zugesetzten Standards, wobei zu berücksichtigen ist, dass gleiche Mengen D_2 und D_3 nicht genau die gleichen Peakflächen ergeben, indem der Response-Faktor

$a = D_3$ (Fläche) : D_2 (Fläche) 1,075 beträgt (4).

$$X\ \mu g\ D_3/g\ \text{Probe} = \frac{D_3 \cdot \mu g\ D_2\ \text{Standard}}{D_2 \cdot a \cdot \text{Einwaage g}}$$

Dank

Wir danken Frau *R. Schulthess* und Herrn *R. Heizmann* für die gute Zusammenarbeit.

Zusammenfassung

Die Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln wird erschwert durch die kleinen Mengen, das ungünstige Vitamin/Matrix-Verhältnis und die Isomerisierungsmöglichkeit zu Prävitamin D. Anreicherung und Vorreinigung sind unumgänglich, erfordern aber mehrere Schritte, wodurch sich die Fehlermöglichkeiten erhöhen (Isomerisierungsverlust bei der Verseifung, Verlust bei Extraktion und Fraktionierung, Verdunsten von Lösungsmitteln aus kleinen Probevolumina). Ein konstanter Recovery-Faktor ist daher kaum berechenbar, und es wird deshalb die Verwendung eines internen Standards empfohlen. Vitamin D_2 und D_3 zeigen ähnliche Strukturen und verhalten sich gleich, so dass das eine Vitamin als interner Standard des anderen verwendet werden kann und damit die Verluste korrigiert werden können. Die Methode ist nicht anwendbar in den seltenen Fällen, in denen Vitamin D_2 und D_3 zusammen in der gleichen Probe vorkommen.

Résumé

Le dosage de la vitamine D dans les aliments est compliqué par les petites quantitées présentes, une relation défavorable vitamine/matrice, ainsi que par la possibilité d'isomérisation en prévitamine D. Il est inévitable de procéder à un enrichissement et à une purification préliminaire, ce qui implique plusieurs opérations entraînant à leur tour une augmentation

des erreurs (pertes suite à l'isomérisation lors de la saponification et du fractionnement, évaporisation du solvant dans des petits volumes d'analyses). Un facteur de récupération constant est donc difficile à calculer et l'utilisation d'un standard interne est recommandable. Les vitamines D_2 et D_3 ont des structures semblables et se comportent d'une manière analogue, ce qui implique que l'une des vitamines peut être utilisée comme standard interne de l'autre, permettant ainsi de corriger les pertes. La méthode n'est donc pas applicable dans les cas rares où les vitamines D_2 et D_3 sont présentes dans le même échantillon.

Summary

The determination of vitamin D in food products is difficult due to the very small amounts, the unfavourable ratio of vitamin to matrix and because of the isomerization of vitamin D to previtamin D during the analysis. Concentration and prepurification are essential requiring several steps and leading to errors for the vitamin determination (losses through isomerization during saponification, during extraction and fractionation; errors due to evaporation of solvents from small volumes of samples). It is therefore impossible to calculate a reliable recovery factor and it is recommended to use an internal standard. Since vitamin D_2 and D_3 have similar structures and chemical properties, one isomer can be added as internal standard to the samples for the calibration of the losses of the other isomer. This method cannot be used in the rare cases where vitamin D_2 and D_3 are present in the same sample.

Literatur

1. *Holmes, R.P.* and *Kummerow, F.A.:* The relationship of adequate and excessive intake of vitamin D to health and disease. J. Am. Coll. Nutr. **2,** 173–199 (1983).
2. Bestimmung des Vitamin-D-Gehaltes. Pharmacopoea helvetica, edition quinto, suppl. sec. 141–144. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1955.
3. *Bolliger, H.R.* und *König, A.:* Quantitative Bestimmung von Vitamin D in Konzentraten, Arzneimitteln und weiteren Kombinationspräparaten mittels Dünnschichtchromatographie. Z. Anal. Chem. **214,** 1–23 (1965).
4. *Rychener, M.* und *Walter, P.:* Vereinfachte und verbesserte Bestimmung von Vitamin D in Fett, Öl und Margarine mit HPLC. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **76,** 112–124 (1985).
5. *Ball, G.F.M.:* Fat-soluble vitamin assays in food analysis. Elsevier Science Publishers Ltd, London and New York 1988.
6. *Thompson, J.N., Maxwell, W.B.* and *L'Abbe, M.:* High pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. J. Ass. Off. Analyt. Chem. **60,** 998–1002 (1977).
7. *Pask-Hughes, R.A.* and *Calam, D.H.:* Determination of Vitamin D_3 in cod-liver oil by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **246,** 95–104 (1982).
8. *De Vries, E.J., Zeeman, J., Esser, R.J.E., Borsje, B.* and *Mulder, F.J.:* Analysis of fat-soluble vitamins. XXI. High pressure liquid chromatographic assay methods for vitamin D in vitamin D concentrates. J. Ass. Off. Analyt. Chem. **62,** 129–135 (1979).
9. *Osborne, D.R.* and *Voogt, P.:* Fat-soluble vitamins. In: The analysis of nutrients in Foods, p. 183–200. Academic Press, London 1978.

10. *Isler, O.* und *Brubacher, G.:* Fettlösliche Vitamine. In: Vitamine I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1982.
11. *Mulder, F.J., de Vries, E.J.* and *Borsje, B.:* Chemical analysis of vitamin D in concentrates and its problems. 12. Analysis of fat-soluble vitamins. J. Ass. Off. Analyt. Chem. **54**, 1168–1174 (1971).

Prof. Dr. P. Walter
Schweizerisches Vitamininstitut
Vesalgasse 1
CH-4051 Basel