

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 40 (1949)
Heft: 5-6

Artikel: Vitaminbestimmung in Lebensmitteln mit chemischen Methoden
Autor: Müller, P.B. / Moor, H.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983813>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. 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. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

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. [Voir Informations légales.](#)

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. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

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

Vitaminbestimmung in Lebensmitteln mit chemischen Methoden

Vorschläge, der eidg. Lebensmittelbuch-Kommission
unterbreitet von *P. B. Müller*, Basel

(Aus den wissenschaftlich-analytischen Laboratorien
der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel)

Die nachfolgenden Analysenmethoden werden als Vorschläge publiziert, in der Meinung, dass es vor der Neuherausgabe des Schweizerischen Lebensmittelbuches wertvoll sein dürfte, auf möglichst breiter Grundlage Erfahrungen über Methoden zu gewinnen, welche für die offizielle Bestimmung der Vitamine A, B₁, B₂, C, D und der Nicotinsäure in Betracht kommen können.

Inhaltsverzeichnis

<i>A. Die Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und von β-Carotin</i>	359
Die Bestimmung von Vitamin A und β -Carotin	359
Die Bestimmung von Vitamin D	376
<i>B. Die Bestimmung von Aneurin und Lactoflavin</i>	387
Die Bestimmung von Aneurin (Vitamin B ₁) nach dem Thiochromverfahren:	387
1. Das Thiochromverfahren	387
2. Verfahren zur Reinigung und Anreicherung des Aneurin-Hydrochlorids mit gärender Bäckerhefe	393
Die Bestimmung von Lactoflavin (Vitamin B ₂) nach dem Lumiflavin- verfahren	397
<i>C. Die Bestimmung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid</i>	402
<i>D. Die Bestimmung von Ascorbinsäure (Vitamin C)</i>	408

A. Die Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und von β -Carotin

Verfahren nach *P. B. Müller*

Die Bestimmung von Vitamin A und von β -Carotin

a) Prinzip

Die Bestimmung des Vitamin A erfolgt entweder spektrophotometrisch durch Messung der Lichtabsorption im U.V. bei 328 m μ . oder kolorimetrisch nach *Carr-Price* durch Messung der mit Antimontrichlorid erhaltenen Blaufärbung bei 610 m μ . Zur Vitamin A-Bestimmung im U.V. wird das Untersuchungsmaterial oder der Trockenrückstand des fettlöslichen Extraktes davon mit Isopropanol oder mit Feinsprit gelöst und das Vitamin A in einem aliquoten Teil dieser Lösung bestimmt. Zur Bestimmung des Vitamin A nach *Carr-Price* wird genau gleich verfahren, aber als Lösungsmittel wird Chloroform verwendet.

Die Bestimmung des β -Carotins erfolgt durch Messung der Gelbfärbung des in Petroläther gelösten Untersuchungsmaterials oder des in Petroläther aufgenommenen Trockenrückstandes des fettlöslichen Extraktes davon bei 470 m μ .

Liegen störende Verunreinigungen vor oder sind einzelne Anteile in komplizierten Gemischen einzeln und getrennt zu bestimmen, wie z. B. Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester oder Vitamin A neben β -Carotin oder Carotinoiden, so werden die Untersuchungslösungen vor der Bestimmung durch Verseifung oder auf chromatographischem Wege gereinigt und die einzelnen Anteile voneinander abgetrennt, wie weiter unten beschrieben wird.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Vitamin A in Butter, Margarine, Fetten, Ölen und Vitamin A-Konzentraten, sowie in mit Vitamin A angereicherten Lebensmitteln, diätetischen Präparaten und pharmazeutischen Spezialitäten.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Die Genauigkeit und Erfassbarkeit der Vitamin A- und β -Carotin-Bestimmung ist abhängig von störenden Begleitstoffen, von der Reinigung des Untersuchungsmaterials und vom Bestimmungsverfahren. Der Einfluss dieser Momente auf die Genauigkeit der Vitamin A-Bestimmung wird bei den einzelnen Verfahren eingehend diskutiert.

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Auf die zu berücksichtigenden Einzelheiten wird in den einzelnen Abschnitten bei der Besprechung der verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten hingewiesen.

e) Apparate

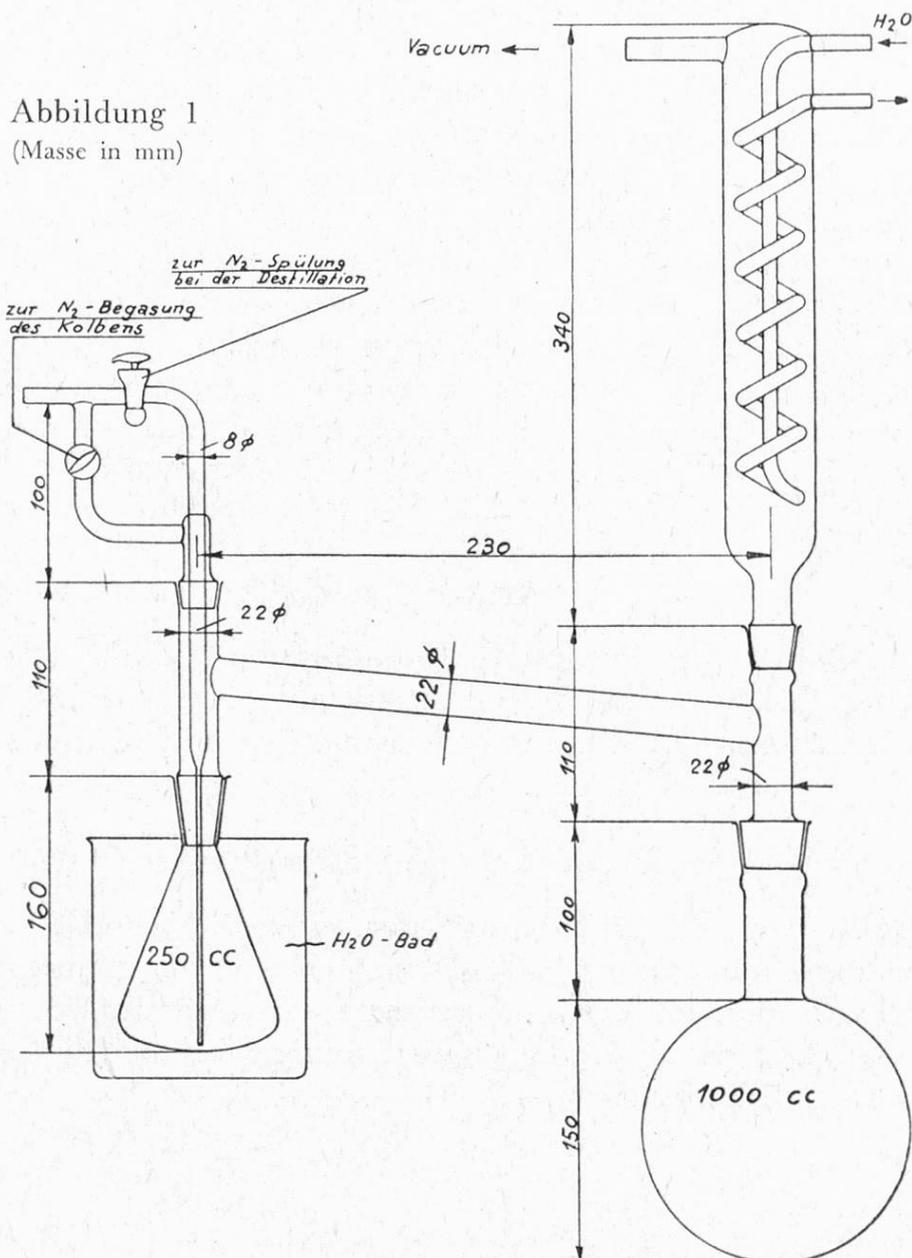
Zur einfachen Bestimmung:

Normales Laboratoriumsgerät.

Quarzspektrophotometer (zur spektrophotometrischen Auswertung im U.V.)
oder ein

Kolorimeter, z.B. photoelektrisches Kolorimeter oder Stufenphotometer von Zeiss mit den Zeiss-Filtern S 61 und S 47 oder mit entsprechenden Filtern und passenden Messküvetten (ca. 5 cm³ Füllung und 1 cm Schichtdicke).

Apparatur zum Eindampfen der Extrakte und der Eluate im Vakuum, mit Vorrichtungen zur Begasung (während des Eindampfens) mittels Kapillare und zur Belüftung der Apparatur nach erfolgter Einengung (siehe Abbildung 1).



Zur Reinigung und Aufteilung des Untersuchungsmaterials:

Apparatur zur Verseifung des Untersuchungsmaterials unter Rückfluss, mit Vorrichtungen zur Evakuierung und zur Begasung der Apparatur.

Wasserbad.

Chromatogrammrohre:

Zur Analyse: *Glasrohr von 10 mm innerem Durchmesser mit Glassinterboden G. 1 und 17 cm nutzbarer Länge. Das Chromatogrammrohr trägt oben einen Normalschliff (11/10) zum Aufsetzen eines 150-cm³-Tropftrichters mit passendem Normalschliff und seitlichem Hahnansatz zur Begasung des Chromatogrammrohres. 3 cm unterhalb der Glassinterplatte ist ein Glashahn angeschmolzen (zur Regulierung der Durchlaufgeschwindigkeit), und dieser mündet seinerseits in einen Normalschliff (11/10) zum Aufsetzen des chromatographischen Systems auf einen kleinen Saugstutzen mit eingeschliffener Glasplatte (siehe Abbildung 2).*

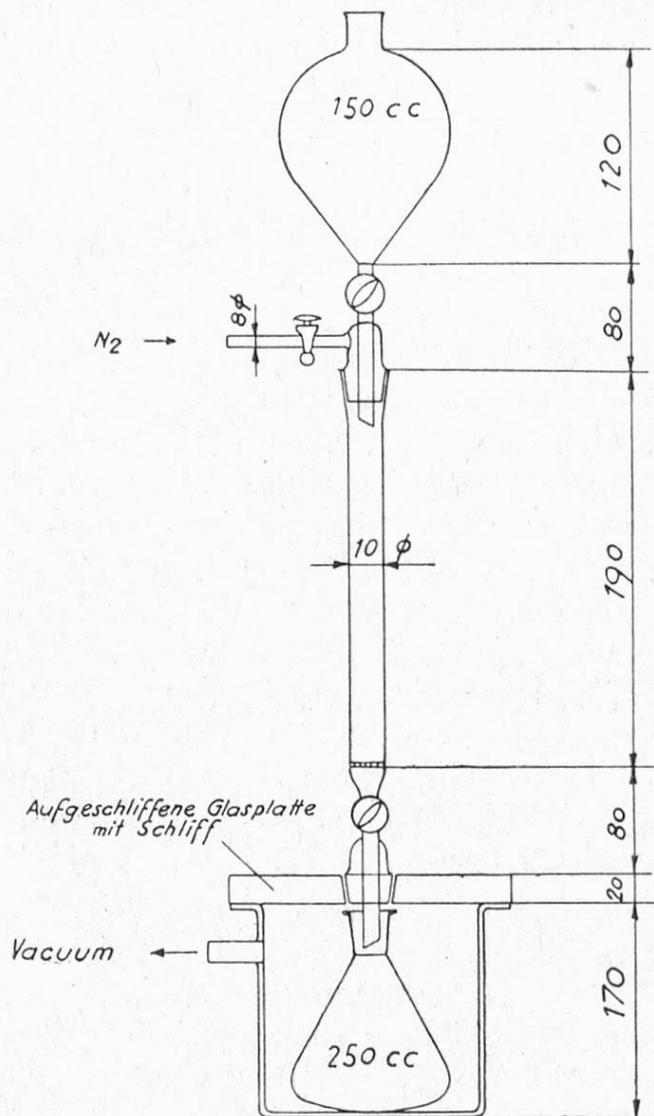


Abbildung 2
(Masse in mm)

Zur Aktivitätseinstellung des Al_2O_3 : *Chromatogrammrohr*, analog dem oberen, jedoch mit ca. 16 mm Durchmesser und ca. 30 cm nutzbarer Länge. Dieses Rohr kann aber auch durch ein einfaches, *unten verjüngtes Glasrohr* ersetzt werden, bei dem die Verbindungen mittels *Gummistopfen* hergestellt werden. An Stelle des Glassinterbodens wird ein Wattepfropfen verwendet.

Philora-U.V.-Lampe, HPW (Schwarzglas), 75 Watt, mit passender Drosselspule und mit Metallabschirmung mit Nickeloxydglasfilterfenster (Jenaer Uviol-filterscheibe) zur Absorption des sichtbaren Lichtes.

f) Reagenzien

Zur einfachen Bestimmung:

1. *Äther*. Reiner, destillierter Äthyläther wird so oft mit einer ca. 2 %igen, wässrigen Lösung von Ferrosulfat geschüttelt, bis sich die wässrige Lösung nicht mehr gelb färbt (von Ferrisulfat). Anschliessend wird 3 mal mit Wasser ausgewaschen und vom Waschwasser abgetrennt. Der Äther wird nicht getrocknet. Die pro Tag benötigte Menge Äther wird täglich frisch gereinigt.
2. *Natriumsulfat*, reinst, wasserfrei. Feuchte Ware wird durch gelindes Glühen getrocknet.
3. *Isopropanol* und *Äthanol, abs.*, Ph. H. V, optisch rein. (Ohne U.V.-Absorption oberhalb 300 m μ .)
4. *Chloroform* (Ph. Helv. V).
Eine grössere Menge CHCl_3 wird 2 mal mit Wasser ausgewaschen und über Phosphorpentoxyd und aktiver Kohle (ca. 500 g P_2O_5 und 50 g Kohle / 25 Liter CHCl_3) getrocknet. Nach 24stündigem Stehen wird abdekantiert, nochmals mit einer kleineren Menge P_2O_5 und Kohle nachgetrocknet, filtriert, destilliert und über aktiver Kohle aufgefangen und gelagert. Von diesem Vorrat wird jeweils die pro Tag benötigte Menge CHCl_3 abfiltriert, nochmals kurze Zeit mit Kohle geschüttelt oder über Kohle stehen gelassen, filtriert und destilliert. Es ist darauf zu achten, dass Kühler und Destillationsapparat vollständig trocken sind.
5. *Antimontrichlorid-Reagens*.
 SbCl_3 pro analysi wird in kleine Stücke zerstoßen und über P_2O_5 im Vakuum getrocknet und gelagert. Hiervon wird jeweils die pro Tag (oder für nur wenige Tage) benötigte Menge Reagens hergestellt. 22 g SbCl_3 werden auf etwa $\frac{1}{2}$ g genau in einen im voraus mit 100 cm³ Chloroform (4) beschickten Erlenmeyer mit Schliffstopfen eingewogen und durch gelindes Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen auf 12—15° C werden genau 100 cm³ Lösung in ein 100-cm³-Messkölbchen filtriert, mit 2 cm³ frisch destilliertem Acetylchlorid (Sdp. 51° C)¹⁾ versetzt und gemischt.

¹⁾ Falls wegen des leicht rauchenden Reagenses, zufolge des Beschlagens und An-greifens von Apparate-teilen (bei un-zweckmässiger Handhabung), Bedenken bestehen, kann Acetylchlorid auch durch Essigsäureanhydrid ersetzt werden.

Das wasserklare, farblose Reagens ist mehrere Tage haltbar und soll bei der Lagerung nicht farbstichig werden. Eine Verfärbung nach Rosa deutet auf Spuren von Feuchtigkeit hin, die möglicherweise bei der letzten Destillation ins Chloroform gelangt sind.

Zur Reinigung und Aufteilung des Untersuchungsmaterials:

6. *Kalilauge*, 10 0/0ige (Gew.Vol.0/0) äthanolische Lösung mit ca. 10 0/0 Wasser (Vol.0/0).
7. *Stickstoff*, 100 0/0ig (in Stahlflasche).
8. *Petroläther*. Eine für $\frac{1}{2}$ bis 1 Jahr ausreichende Menge Petroläther vom Siedepunkt 90—110° C wird zur Reinigung wie folgt ausgerührt: 2—3 mal je 1 Stunde mit $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{10}$ Vol.-Teil reiner, konz. Schwefelsäure, dann je 5 Minuten 1mal mit Wasser, 1mal mit leicht alkalischer, verdünnter Kaliumpermanganatlösung (ca. 0,1 0/0ig), 1mal mit Wasser, 1mal mit verdünnter Ferrosulfatlösung (ca. 2 0/0ig) und dann noch je 1mal 5 Minuten mit je $\frac{1}{5}$ Vol.-Teil Wasser, verdünnter Lauge (ca. 1 0/0ig), Wasser. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird destilliert.
9. *Aluminiumoxyd zur Chromatographie*. Es werden 2 Aktivitätsgrade, nämlich zur Chromatographie von Vitamin A-Alkohol, bzw. zur Chromatographie von Vitamin A-Ester oder von β -Carotin benötigt. Die Aktivierung und Aktivitätseinstellung des Al_2O_3 wird im Abschnitt g, IV beschrieben.
10. *Petroläther-Benzolgemisch*. 1 Teil Petroläther (8) wird mit 1 Teil reinem, destilliertem Benzol gemischt (Vol.-Teile).

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. Das Extraktionsverfahren

Liegt ein Analysenmaterial vor, das in Fettlösungsmitteln nicht oder nur unvollständig löslich ist, so werden Vitamin A und β -Carotin vor der Aufarbeitung extrahiert. Feuchtes Material wird vor der Extraktion durch Verreiben mit Natriumsulfat getrocknet. Im übrigen richtet sich das Extraktionsverfahren stets nach der Menge und dem Gehalt des Untersuchungsmaterials. Als allgemeine Orientierung kann folgendes Beispiel gegeben werden:

- | | |
|------------------------|--|
| 10 g | trockenes <i>Analysenmaterial</i> werden im Messkolben |
| ad 250 cm ³ | mit <i>Äther</i> (1) oder <i>Petroläther</i> (8) + 10 0/0 <i>abs. Äthanol</i> (Ph. H. V) (3) übergossen, durch öfteres Schwenken und Stehenlassen während 15 Minuten extrahiert und der Extrakt auszentrifugiert oder durch wenig Watte filtriert. |
| 200 cm ³ | <i>Dekantat oder Filtrat</i> (entsprechend 8 g Einwage) werden 3 mal mit Wasser gewaschen, |

ad 200 cm³ mit dem *Lösungsmittel* ergänzt, mit
 5 g *Natriumsulfat* (2) 5 Minuten getrocknet, abfiltriert und
 125 cm³ *Filtrat* (entsprechend 5 g Einwage) im Vakuum bei 40—50° C zur
 Trockne²⁾ eingedampft und bestimmt (siehe Abschnitt II).

Bei der Auswertung der Analysenergebnisse ist gegebenenfalls dem Trockenrückstand Rechnung zu tragen. Zur Umgehung dieser Komplikation werden grössere Mengen Untersuchungsmaterial oder mit Na₂SO₄ getrocknete Materialien direkt im Zentrifugenglas durch 5 maliges Aufrühren und Auszentrifugieren erschöpfend extrahiert. Das Auswaschen, Trocknen und Einengen der Extrakte erfolgt wie oben beschrieben.

II. Die Bestimmung von Vitamin A und von β -Carotin

1. Die spektrophotometrische Bestimmung des Vitamin A im U.Ü. bei 328 m μ .

Zur spektrophotometrischen Auswertung im U.V. wird das Untersuchungsmaterial in einem optisch reinen Lösungsmittel — nach der internationalen Vereinbarung in optisch reinem Isopropanol (3) — aufgenommen und der Vitamin A-Gehalt im Quarzspektrographen nach der dem Instrument beigegebenen Vorschrift bestimmt. Die Berechnung des Vitamin A-Gehaltes erfolgt auf Grund der

bestimmten $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ nach der Formel:

$$\frac{(E_{1\text{ cm}}^{1\%}) \text{ Versuchslösung}}{(E_{1\text{ cm}}^{1\%}) \text{ der reinen Vitamin A-Verbindung}}$$

gegebenenfalls für Vitamin A-Alkohol³⁾:

$$\frac{E}{c \cdot d} = \frac{E}{c \cdot d \cdot 1758} =: g \text{ Vitamin A-Alkohol/g Unter-}$$

suchungsmaterial⁴⁾ oder

$[g \text{ Vitamin A-Alkohol/g}] \times 3,33 \cdot 10^6 = i. E. \text{ Vitamin A/g Unter-}$
 suchungsmaterial³⁾).

²⁾ Siehe Anmerkung 11 im Abschnitt III.

³⁾ Siehe unten die tabellarische Zusammenstellung der heute gültigen Daten.

⁴⁾ E = gemessene Extinktion der Lösung bei 325 — 328 m μ , bzw. verwendeter Sektor des Spektrographen.

c = Konzentration der gemessenen Lösung in g/100 cm³.

d = Schichtdicke der gemessenen Lösung in cm.

Häufig erfolgt die Berechnung des Vitamin A-Gehaltes in i. E. direkt auf Grund der bestimmten $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ 0/0}}$ mit Hilfe eines sogenannten Umrechnungsfaktors (F) ⁵⁾ nach der Formel:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ 0/0}} (328\text{ m}\mu) \text{ Versuchslösung} \times F = \frac{E}{c \cdot d} \times 1900 \text{ }^5) = \text{i. E. Vitamin A/g}$$

Bei der *Deklaration des Vitamin A-Gehaltes* ist den heutigen Vereinbarungen Rechnung zu tragen. Am zweckmässigsten wird der Gehalt gewichtsmässig, d.h. in γ oder mg pro Gramm Untersuchungsmaterial deklariert, wobei anzugeben ist, ob es sich um Vitamin A-Alkohol oder Vitamin A-Acetat handelt. Wird der Gehalt in internationalen Einheiten (i. E.) deklariert, so ist der Berechnung dieser biologischen Einheit die unten angegebene, offiziell anerkannte biologische Wirksamkeit von 1 g der deklarierten Vitamin A-Verbindung zu Grunde zu legen. Die heute gültigen Vereinbarungen sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Vitamin A (-Verbindung)	i. E. / g	$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ 0/0}}$ (325–328 m μ)	Umrechnungsfaktor (aufgerundeter Wert)
Vitamin A-Alkohol	3,33 · 10 ⁶	1758	1900
Vitamin A-Acetat	2,906 · 10 ⁶	1532	1900

Die *Genauigkeit, bzw. die Streuung* des Bestimmungsverfahrens ist ± 5 —10 0/0. Bei sehr kleinen Vitamin A-Mengen ist unter günstigen Verhältnissen mit einer Streuung von absolut ± 2 —5 i. E. und mit einer Erfassbarkeit von absolut 10—20 i. E. Vitamin A zu rechnen.

Das spektrophotometrische Bestimmungsverfahren von Vitamin A im U.V. bei 325—328 m μ ist für den mit der Vitamin A-Bestimmung weniger vertrauten Analytiker einfacher als das kolorimetrische Verfahren nach *Carr-Price* und liefert ohne besondere Übung sehr genau reproduzierbare Werte. Zur Untersuchung von Lebensmitteln und von diätetischen und pharmazeutischen Kombinationspräparaten weist dieses Verfahren aber häufig eine geringere Spezifität auf als das kolorimetrische Verfahren. Selbst die Reinigung des Untersuchungsmaterials mittels des weiter unten beschriebenen Verseifungsverfahrens (siehe Abschnitt III) führt nur ausnahmsweise zur quantitativen Eliminierung von im U.V. mehr oder weniger stark störenden Verunreinigungen. Das rührt daher, dass die möglichen Begleitstoffe, die nicht quantitativ abgetrennt werden können, im U.V. normalerweise eine stärkere Absorption aufweisen als im sichtbaren Licht.

Aus diesem Grunde sind in der Literatur auch schon Richtlinien gegeben worden zur qualitativen Beurteilung der Reinheit der zur quantitativen Aus-

⁵⁾ Siehe unten die tabellarische Zusammenstellung der heute gültigen Daten.

wertung benutzten Lösungen von Vitamin A auf Grund des Verlaufes der Extinktions- oder Absorptionskurve (siehe Lit. 1, 21 und 22). Freilich gestattet diese Beurteilung nur dann Korrekturen vorzunehmen, wenn bekannte Stoffe vorliegen, für die diese Korrekturen empirisch ermittelt werden konnten.

Gegen Begleitstoffe ist das kolorimetrische Bestimmungsverfahren weniger empfindlich. Zudem ist das hierzu notwendige Kolorimeter wesentlich billiger.

2. Die kolorimetrische Bestimmung von Vitamin A

Das in *Chloroform* (4) aufgenommene Untersuchungsmaterial wird mit

Chloroform (4) verdünnt, so dass in 0,1—1 cm³ der Lösung 15—40 i. E. Vitamin A enthalten sind (Lösung a).

0,1—1 cm³ der Lösung a mit 15—40 i. E. Vitamin A (am besten etwa 20—25 i. E.) werden direkt im Apparat in die Messküvette gegeben,

ad 1 cm³ ⁶⁾ mit *Chloroform* (4) ergänzt und dann mit einem Male mit 4 cm³ ⁶⁾ *Antimontrichlorid-Reagens* (5) versetzt, so dass sofort vollständige Mischung der Reaktionslösung erfolgt. Sobald die Farbe maximal entwickelt ist (nach 5—10 Sekunden ⁷⁾, wird die Extinktion der Lösung gegen einen Leerwert mit reinem Reagens ⁸⁾ abgelesen. Die Ermittlung der bestimmten Vitamin A-Menge erfolgt an Hand einer Testkurve.

Die *Genauigkeit*, bzw. die *Streuung* des Bestimmungsverfahrens ist $\pm 10\%$. Bei sehr kleinen Vitamin A-Mengen ist unter günstigen Verhältnissen mit einer Streuung von absolut $\pm 1—2$ i. E. und mit einer unteren *Erfassbarkeit* von etwa 5 i. E. zu rechnen.

Die *Testkurve* ⁹⁾ wird unter genau denselben Versuchsbedingungen (gleicher Apparat, gleiche Filter, gleiche Schichtdicke, gleiche Gesamtmenge Reaktionslösung usw.) mit kristallisiertem Vitamin A-Alkohol oder besser noch mit dem stabileren kristallisierten Vitamin A-Acetat ¹⁰⁾ aufgestellt, welches heute in grosser Reinheit im Handel erhältlich ist und zum Standard der Amerikanischen Pharmacopöe erklärt wurde. Sehr gut eignet sich auch der «U.S.P.

⁶⁾ Diese Mengen gelten für die 1-cm-Messküvetten des Stufenphotometers von Zeiss. Sie richten sich nach der Küvettengrösse. Pro 1 cm³ CHCl₃ (4) sollen 3—5 cm³ SbCl₃-Reagens verwendet werden.

⁷⁾ Für den Fall, dass die Vitamin A-Auswertung innerhalb weniger Sekunden nach der Reagenszugabe mit gewissen Apparaten nicht möglich sein sollte, wird im Abschnitt g, V eine geeignete Vorschrift gegeben.

⁸⁾ Da das genau nach der Vorschrift hergestellte Reagens vollständig farblos und klar ist, kann einfachheitshalber an Stelle des SbCl₃-Reagenses auch Chloroform (4) benutzt werden.

⁹⁾ Siehe Fussnote 7.

¹⁰⁾ Erhältlich bei der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

Vitamin A Reference Standard» der Amerikanischen Pharmacopöe, der mit allen notwendigen Unterlagen und Deklarationen vom «Board of Trustees of the United States Pharmacopoeial Convention» herausgegeben wird.

Wenn das Carr-Price-Auswertungsverfahren im richtigen Spektralgebiet, d.h. mit den richtigen Filtern durchgeführt wird, besteht bezüglich der Beeinflussung durch Verunreinigungen eher die Gefahr einer Hemmung der SbCl_3 -Reaktion als die Möglichkeit zu hoher Ergebnisse. Lediglich Anhydro-Vitamin A reagiert praktisch genau gleich wie Vitamin A, und violette Lösungen deuten darauf hin, dass Zersetzungsprodukte des Vitamin A oder Carotinoide die Ergebnisse fälschlicherweise erhöhen. Die Hemmung der Carr-Price-Reaktion kann aus äusseren Merkmalen nicht erkannt werden.

Zur Ausschaltung solcher störender Begleitstoffe muss das Untersuchungsmaterial, bzw. der fettlösliche Extrakt davon im Prinzip vor der Bestimmung des Vitamin A durch Verseifung gereinigt werden (siehe Abschnitt III).

Diese Reinigung des Untersuchungsmaterials ist auch immer notwendig, wenn Vitamin A-arme Fette oder Öle (wie z.B. Butter, Margarine) zu prüfen sind (siehe Abschnitt III).

3. Die Bestimmung von β -Carotin

Das Untersuchungsmaterial, bzw. der Eindampfrückstand der extrahierten fettlöslichen Anteile wird mit

5—20 cm^3 Petroläther (8) aufgenommen und eventuell mit Petroläther weiter verdünnt, so dass in 5 cm^3 Lösung etwa 5—25 γ , bzw. ca. 8—42 i. E. β -Carotin enthalten sind. Die Messung dieser Lösung erfolgt ohne weitere Behandlung bei 470 $\text{m}\mu$ und 1 cm Schichtdicke.

Der β -Carotingehalt wird auf Grund der $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (470 $\text{m}\mu$, Petroläther) von reinem β -Carotin (= 2140) nach der Formel:

$$\frac{E}{c \cdot d \cdot 2140} = \text{g } \beta\text{-Carotin/g Untersuchungsmaterial}$$

berechnet, wobei

E = die gemessene Extinktion bei 470 $\text{m}\mu$,

c = die Konzentration der gemessenen Lösung in Gramm pro 100 cm^3 Lösung und

d = die Schichtdicke der gemessenen Lösung in cm ist.

Die Genauigkeit, bzw. die Streuung des Bestimmungsverfahrens ist $\pm 10\%$. Bei sehr kleinen β -Carotin-Mengen ist unter günstigen Verhältnissen mit einer Streuung von absolut ± 1 —2 γ und mit einer unteren Erfassbarkeit von etwa 4 γ zu rechnen.

In Gegenwart von weiteren Carotinoiden oder von fettlöslichen Farbstoffen muss β -Carotin vor der Bestimmung auf chromatographischem Wege gereinigt werden (siehe Abschnitt IV).

III. Die Reinigung des Untersuchungsmaterials durch Verseifung

- Bis 5 g *Untersuchungsmaterial* oder des extrahierten, fettlöslichen Trockenrückstandes werden in einem 100-cm³-Rundkölbchen mit
- 20 cm³ *äthanolischer Kalilauge* (6) versetzt, das Kölbchen evakuiert, mit *Stickstoff* (7) begast und das Untersuchungsmaterial unter Spülung mit *Stickstoff* (7) unter Rückfluss 15 Minuten im siedenden Wasserbad verseift. Dann wird noch heiss mit
- 50 cm³ *Wasser* versetzt, gekühlt, der Kolbeninhalt in einen 250-cm³ Scheidetrichter gegeben und mit
- 50 cm³ *Wasser* nachgespült. Die Extraktion des Unverseifbaren erfolgt durch 3maliges Ausschütteln während 1 Minute, das erste Mal mit
- 60 cm³ *Äther* (1), das zweite und dritte Mal mit
- je 20 cm³ *Äther* (1). Die vereinigten Ätherextrakte werden 1mal durch vorsichtiges Schwenken mit
- 100 cm³ *Wasser* und 2 mal durch vorsichtiges und dann energisches Schütteln mit je
- 100 cm³ *Wasser* gewaschen, in ein 100-cm³-Messkölbchen gegeben,
- ad 100 cm³ mit *Äther* (1) aufgefüllt und durch öfteres Schwenken mit
- 1—2 g *Natriumsulfat* (2) während 5 Minuten getrocknet und sofort filtriert.
- 80 cm³ des *Extraktes* (= 4 g Einwage) werden im Vakuum und unter Spülung mit *Stickstoff* (7) im Wasserbad von 40° C zur Trockne¹¹⁾ eingedampft und bestimmt (siehe Abschnitt II).

Das Verseifungsverfahren ist praktisch verlustlos, wenn unter Ausschluss von Luft verseift und mit peroxydfreiem Äther extrahiert wird.

Bei Abwesenheit von Carotinoiden enthält das durch Verseifung gereinigte Vitamin A zumeist keine Beimengungen mehr, welche die Carr-Price-Reaktion merklich stören. Für die spektrophotometrische Auswertung ist die Reinigung durch Verseifung aber häufig ungenügend.

Nach der Verseifung des Untersuchungsmaterials wird, wie bei der direkten Auswertung, stets der Gesamt-Vitamin A-Gehalt erfasst. Soll zwischen Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester unterschieden werden oder enthält das Ana-

¹¹⁾ Extrakte mit β -Carotin werden vor dem Eindampfen mit 5—10 cm³ Petroläther (8) versetzt und lediglich auf 1—2 cm³ eingeengt, da β -Carotin-Trockenrückstände bisweilen schwer löslich sind.

lysenmaterial Carotinoide oder Verunreinigungen, welche nach der Verseifung ins Unverseifbare gelangen und sowohl das spektrophotometrische als auch das kolorimetrische Auswertungsverfahren stören, so ist das Untersuchungsmaterial direkt oder nach der Verseifung auf chromatographischem Wege zu reinigen und in die einzelnen Anteile aufzuteilen (siehe Abschnitt IV).

Vitamin A-arme Fette und Öle (wie Butter und Margarine) sind vor der Chromatographie zur Entfernung der Hauptmenge der Fettanteile immer zu verseifen. Dasselbe gilt, wenn Vitamin A-Ester neben β -Carotin zu bestimmen ist, da diese beiden Verbindungen nur als Vitamin A-Alkohol und β -Carotin nach dem unten beschriebenen chromatographischen Verfahren getrennt werden können.

IV. Die Trennung von Vitamin A und β -Carotin sowie von Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester und die Reinigung von Vitamin A und β -Carotin durch Chromatographie

Das zur Chromatographie von Vitamin A-Alkohol, bzw. von Vitamin A-Ester oder β -Carotin eingestellte Aluminiumoxyd¹²⁾ wird trocken in das Chromatogrammrohr eingefüllt, so dass eine Adsorptionssäule von 12 cm Höhe und 1 cm Durchmesser zur Verfügung steht. Nach Aufsetzen eines Tropftrichters wird das Chromatogrammrohr auf einen Saugstutzen gesetzt, evakuiert, 1mal mit reinem Stickstoff begast, wieder evakuiert und dann unter Vakuum mit Petroläther¹²⁾ gefüllt. Auf diese Weise ist der Sauerstoffeinfluss bei der Chromatographie weitgehend ausgeschaltet.

Nun wird das Untersuchungsmaterial oder der Trockenrückstand des fettlöslichen Extraktes davon oder der Trockenrückstand des Unverseifbaren mit

20—5000 i. E. Vitamin A in

20 cm³ Petroläther (8) gelöst, auf die Al₂O₃-Kolonne (9) aufgetragen und das Chromatogramm mit

20—100 cm³ Petroläther (8), der in mässig rascher Tropfenfolge abgesogen wird, so lange entwickelt, bis der abfliessende Petroläther im U.V.¹³⁾ nicht mehr fluoresziert oder die grün fluoreszierende Vitamin A- oder gelb-rote β -Carotin-Zone¹³⁾ eben beginnt, aus der

¹²⁾ Vitamin A-Alkohol wird schon von mässig aktivem Al₂O₃, Vitamin A-Ester und β -Carotin werden praktisch gleich gut, aber erst von einem wesentlich aktiveren Aluminiumoxyd adsorbiert. Für die Einstellung des Al₂O₃-Präparates wird unten eine Vorschrift gegeben; die Reinigung des als Lösungsmittel benutzten Petroläthers ist im Abschnitt f, 5 beschrieben.

¹³⁾ Hierzu wird das Chromatogrammrohr vor eine Philora-U.V.-Schwarzglaslampe gestellt, von der die Hauptmenge des sichtbaren Lichtes erst noch durch ein Nickeloxydglasfilter abgefiltert wurde. Vitamin A-Ester fluoresziert stark hellgrün; Vitamin A-Alkohol fluoresziert wesentlich schwächer dunkelgrün. β -Carotin kann zufolge der gelb-roten Eigenfärbung im sichtbaren Licht beobachtet werden.

Kolonnen ausgewaschen zu werden¹⁴⁾. Nun wird die Vorlage gewechselt, das adsorbierte Vitamin A oder β -Carotin durch ebenso langsames Durchsaugen von

100 cm³ *Petroläther-Benzol-Gemisch (10)* (fraktioniert) eluiert und das Eluat im Vakuum unter Spülung mit Stickstoff im Wasserbad von 50° C zur Trockne eingedampft wenn Vitamin A vorliegt, bzw. nach Zusatz von

5—10 cm³ *Petroläther (8)* auf 1—2 cm³ eingeengt, wenn β -Carotin zu bestimmen ist. Die Bestimmung und Auswertung erfolgt nach der Vorschrift im Abschnitt II.

Das chromatographische Verfahren hat in der Regel einen Verlust von 5 bis 10 % zur Folge. Für die geläufigen Analysen empfiehlt es sich, bei der Auswertung der Ergebnisse nach der Bestimmungsvorschrift g, II generell mit einem Verlust von 8 % zu rechnen. Zur Kontrolle des chromatographischen Verlustes wird der Trockenrückstand des Eluates der 1. chromatographischen Reinigung nach der Vorschrift mit Chloroform aufgenommen, die Hälfte davon zur Bestimmung verwendet und die verbleibende zweite Hälfte nach Eindampfen zur Trockne ein zweites Mal chromatographiert. Der bei der 2. Chromatographie auf den Gehalt nach der 1. Chromatographie berechnete Verlust ist erfahrungsgemäss etwa doppelt so gross wie bei der 1. Chromatographie, da das Vitamin A dort mindestens zum Teil noch durch begleitende Antioxydantien und Schutzstoffe stabilisiert wird.

Sehr wesentlich für die Höhe des chromatographischen Verlustes ist die (Adsorptions-) Aktivität des Aluminiumoxyds. Je aktiver dieses Präparat, desto grösser sind die Verluste an Vitamin A. Ein zur Chromatographie von Vitamin A geeignetes Al₂O₃-Präparat soll so beschaffen sein, dass es in 40—50 cm hoher Schicht noch gut laufende Kolonnen gibt und bei der 2. Chromatographie von Vitamin A-Ester einen auf den Gehalt nach der 1. Chromatographie berechneten Vitamin A-Verlust von maximal 10—15 % zur Folge hat.

Zur *Einstellung der Adsorptionsaktivität des Adsorptionsmittels* wird Aluminiumoxyd zur Chromatographie (gegebenenfalls «nach Brockmann») in einer V2A-Stahl-Bratpfanne an der Luft und unter öfterem Umrühren bis auf 300—500° C (maximal bis zur beginnenden dunklen Rotglut der Pfanne!) ³/₄ Stunden erhitzt und unter Ausschluss von Feuchtigkeit abkühlen gelassen. Von diesem maximal aktivierten Al₂O₃ werden in verschiedene 200-cm³-Erlenmeyer Portionen zu je 100 g möglichst rasch eingewogen, mit 5 cm³, bzw. 10 cm³, bzw. 15 cm³, bzw. 20 cm³ Wasser usf. versetzt, die Erlenmeyer sofort mit Gummi-

¹⁴⁾ Am besten kann der Gang der Chromatographie an der Fluoreszenz des abfliessenden Petroläthers verfolgt werden, welcher sich bei geschlossenem Hahn zwischen diesem und der Sinterplatte des Chromatogrammrohres ansammelt. Durch rasches Öffnen und sofortiges Schliessen des Hahnes kann jeweils gerade so viel Lösungsmittel durch die Kolonne gesogen werden, als in diesem kleinen Teil des Chromatogrammrohres Platz hat.

stopfen verschlossen und unter öfterem kurzem Lüften geschüttelt, bis alle Klümpchen zerfallen sind. Nach kurzem Stehen ist das Material gebrauchsfertig. Es kann gut verschlossen 1—2 Tage gelagert werden. Zu einer ersten Orientierung gibt man die verschieden aktiven Al_2O_3 -Präparate in ca. 5 cm hohen Schichten in ein Chromatogrammrohr von ca. 30 cm Länge und ca. 16 mm Durchmesser, so dass die Aktivitäten von oben nach unten zunehmen, und füllt mit Petroläther¹⁵⁾ auf, wie in der Vorschrift oben beschrieben wurde. Nun werden 500—1000 i. E. β -Carotin oder Vitamin A-Ester, bzw. Vitamin A-Alkohol auf die Kolonne gegeben und beobachtet, in welcher Schicht das eingewogene Material bei der Entwicklung mit Petroläther nur noch sehr langsam nach unten wandert. Dieser Versuch wird dann mit feineren Abstufungen des in erster Annäherung bestimmten Aktivitätsgrades des Al_2O_3 wiederholt. Bei der richtigen Aktivität sollen 500—1000 i. E. Vitamin A-Ester, bzw. -Alkohol in der zur Analyse verwendeten einschichtigen Adsorptionssäule von 12 cm Höhe und 1 cm Durchmesser nach der Entwicklung mit 50 cm³ Petroläther im oberen Drittel der Kolonne zurückgehalten und bei der fraktionierten Eluierung mit 90 cm³ Petroläther-Benzol-Gemisch (10) quantitativ aus der Säule herauseluiert werden.

V. *Feinheiten der kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin A*

Wenn die Ablesung der Extinktion bei dem im Abschnitt II beschriebenen kolorimetrischen Vitamin A-Bestimmungsverfahren nicht innerhalb von 5—10 Sekunden, also im Moment der maximalen Farbentwicklung erfolgen kann, so wird die Extinktion der Reaktionslösung nach einer etwas längeren Reaktionszeit bestimmt und der Vitamin A-Gehalt an Hand einer Testkurve ermittelt, die für diese Versuchsbedingung aufgestellt wurde. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Reaktionslösungen um so rascher ausbleichen, je höher die Reaktionstemperatur ist. Es ist daher zweckmässig, für die Auswertung der bei Zimmertemperatur gemessenen Lösungen 2 Testkurven aufzustellen, nämlich eine Testkurve für Messungen, die genau bei 20° C, und eine Testkurve für Messungen, die bei genau 25° C gemacht werden. Aus dem Unterschied der für eine bestimmte Vitamin A-Menge bei 20° und 25° gemessenen Extinktionen kann dann der Temperatureinfluss für eine benachbarte Versuchstemperatur im Bereiche von etwa +15° bis +30° C errechnet werden.

Bei der Aufstellung der Testkurven sind die Versuchsbedingungen (gleicher Apparat, gleiche Filter, gleiche Schichtdicke, gleiche Menge Reaktionslösung usw.) und die angegebenen Versuchstemperaturen genau einzuhalten.

Zur Illustrierung dieses praktisch exakten und gut reproduzierbaren Bestimmungsverfahrens dienen die unten gegebenen Testkurven. Sie wurden mit ad 1 cm³ CHCl_3 (4) ergänzten Testlösungen und 4 cm³ Reagens (5) — also mit ins-

¹⁵⁾ Die Aktivitätseinstellung gilt nur so lange, als zur Chromatographie der zur Aktivitätseinstellung benutzte Petroläther (8) verwendet wird. Es empfiehlt sich daher, zuerst eine für eine längere Arbeitsperiode genügende Menge Petroläther bereitzustellen (siehe Abschnitt f).

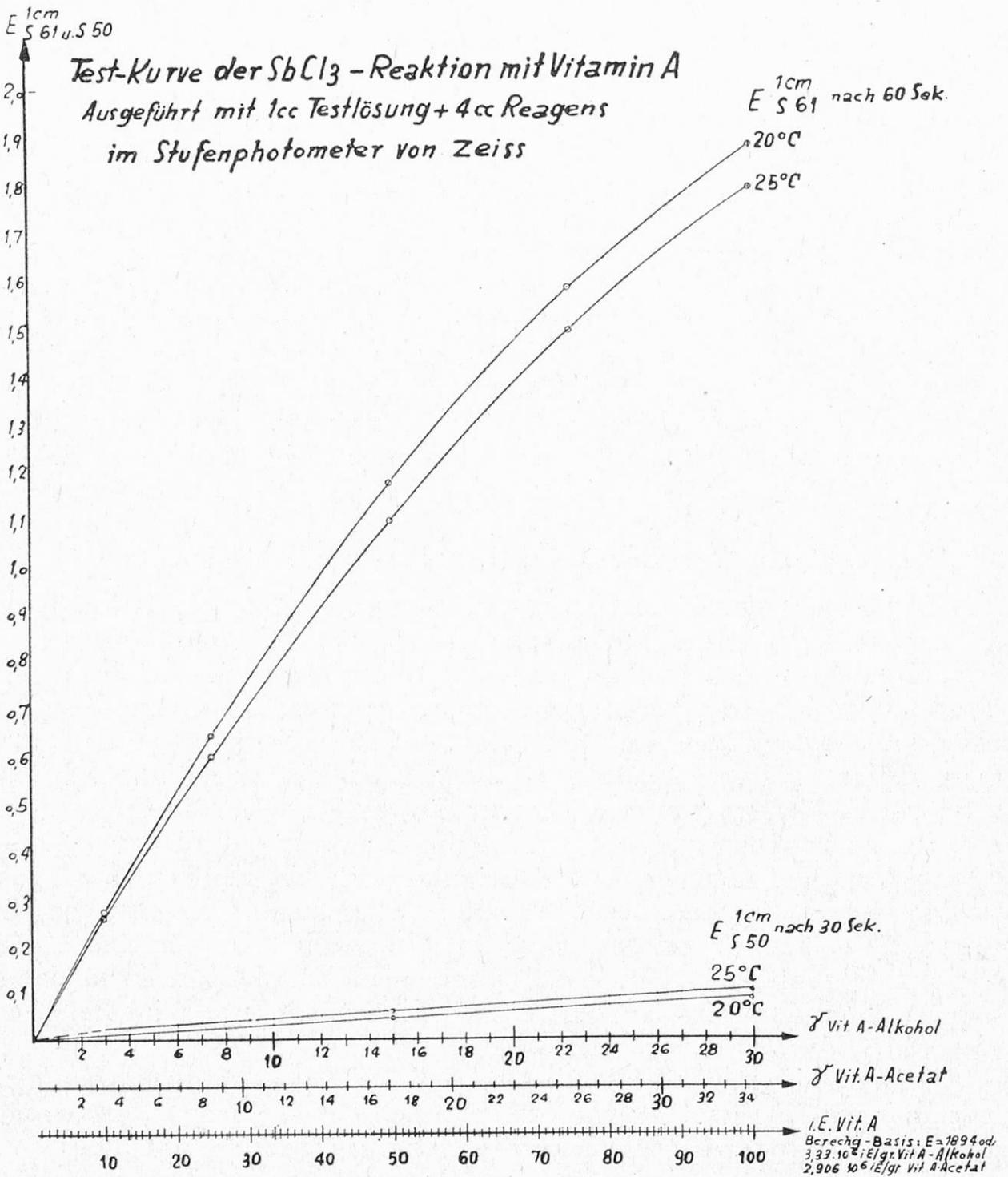


Abbildung 3

gesamt 5 cm³ Reaktionslösung — im Stufenphotometer von Zeiss mit Filter S 61 (Filterschwerpunkt 610 m μ) nach genau 1 Minute Reaktionszeit bei genau 20⁰ und 25⁰ C aufgestellt ¹⁶).

Zur Vitamin A-Bestimmung wird die nach der obenstehenden Vorschrift hergestellte Reaktionslösung mit maximal 100 i. E., am besten mit 20—30 i. E. Vitamin A, nach genau 1 Minute bei 610 m μ gemessen und anschliessend die Reaktionstemperatur (X⁰ C) auf 1⁰ C genau bestimmt. Dann wird die bei X⁰ C bestimmte Extinktion auf die nächstliegende Testbedingung von genau 20⁰, bzw. 25⁰ C umgerechnet. Die Umrechnung erfolgt in der Weise, dass die abgelesene Extinktion um den Wert vergrössert oder verkleinert wird, der sich für den Temperaturunterschied zwischen X⁰ C und 20⁰, bzw. 25⁰ C aus dem Extinktionsunterschied berechnen lässt, der im Bereich der ermittelten Extinktion für 5⁰ C aus den Standardkurven für 20⁰ und 25⁰ C abgelesen wird. Auf Grund des korrigierten Extinktionswertes kann dann der Vitamin A-Gehalt der zur Bestimmung gelangten Menge Untersuchungsmaterial aus der entsprechenden Testkurve direkt in γ Vitamin A-Alkohol oder Vitamin A-Acetat oder in internationalen Einheiten (i. E.) abgelesen werden. Die Angabe des Vitamin A-Gehaltes erfolgt in γ bzw. mg/g oder in i. E./g nach den im Abschnitt II gegebenen Richtlinien (siehe Beispiel unten).

VI. Beispiel

Allgemeiner (häufiger) Fall: Reinigung durch einmalige Chromatographie oder durch Verseifung und Bestimmung nach Abschnitt g, II.

Spezieller, komplizierter Fall: Diätetisches Präparat mit Vitamin A-Ester und β -Carotin. Im Folgenden wird dieser kompliziertere Fall illustriert:

10 g Analysenmaterial werden nach der Vorschrift extrahiert und eine 5 g Einwage entsprechende Menge Extrakt verseift und das Unverseifbare zur Trennung von Vitamin A-Alkohol und β -Carotin auf Vitamin A-Alkohol chromatographiert. Bei der Entwicklung des Chromatogrammes mit reinem Petroläther gelangt β -Carotin in den Vorlauf. Dieser wird im Vakuum auf 2—5 cm³ eingengt und mit Petroläther ad 25 cm³ gebracht (= Lösung I) ¹⁷). Vitamin A-Alkohol wird mit Petroläther-Benzol (10) eluiert, das Eluat zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Chloroform ad 25 cm³ aufgenommen (= Lösung II). Bestimmung nach Abschnitt g, V.

¹⁶) Da bei dem nachstehend beschriebenen Vitamin D-Auswertungsverfahren auch noch die Extinktion von Vitamin A bei 25⁰ C nach genau 30 Sekunden Reaktionszeit bei 500 m μ benötigt wird, empfiehlt es sich, gleichzeitig auch diese Testkurve aufzustellen, was in einem Arbeitsgang gemacht werden kann.

¹⁷) In Gegenwart von weiteren Carotinoiden empfiehlt es sich, direkt einen aliquoten Teil des Extraktes der fettlöslichen Anteile oder dann den eingengten Vorlauf der Vitamin A-Alkohol-Chromatographie auf β -Carotin (wie Vitamin A-Ester) zu chromatographieren.

Die β -Carotin-Bestimmung bei 470 m μ

2,5 cm³ Lösung I (entsprechend 0,5 g Einwage) werden mit Petroläther auf 25 cm³ verdünnt und gemessen.

$$\begin{aligned} \text{Gemessene } E_{S \ 47}^{1 \text{ cm}} &= 0,90 \\ \text{Konzentration} &= c = 2 \text{ g/100 cm}^3 \\ \text{Schichtdicke} &= d = 1 \text{ cm} \\ \beta\text{-Carotingehalt} &= \frac{E}{c \cdot d \cdot 2140^{22)}} = \frac{0,90}{2 \cdot 1 \cdot 2140} = 0,00021 \text{ g/g} \\ &= 0,21 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

Literatur

- 1) P. B. Müller: Chromatographische Trennung von Vitamin A-Alkohol, Vitamin A-Ester und β -Carotin und ihre spektrophotometrische bzw. stufenphotometrische Bestimmung. *Helv. Chim. Acta* **27**, 443—457 (1944).
- 2) P. B. Müller: Zur kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und β -Carotin unter besonderer Berücksichtigung des Vitamin D. *Helv. Chim. Acta* **30**, 1172—1190 (1947).
- 3) F. Gstirner: Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1941.
- 4) Coward: The Biological Standardisation of the Vitamins. Verlag Baillière, Tindall and Cox, London 1938, S. 213—218.
- 5) 13. Pharmacopeia of the United States of America (1947) und 1. Supplement (1948).
- 6) American Medical Assoc.: The Vitamins, a Symposium, Chicago 1939.
- 7) H. R. Rosenberg: Chemistry and Physiology of the Vitamins, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 1945.
- 8) T. K. With: Absorption, Metabolism and Storage of Vitamin A and Carotene. Verlag E. Munksgaard, Kopenhagen 1940, S. 53.
- 9) F. H. Carr und E. A. Price: *Biochem. J.* **20**, 497 (1926).
- 10) N. Vere-Jones: *Ind. Chemist* **12**, 85 (1936).
- 11) A. Chevallier und P. Chabre: *Biochem. J.* **27**, 298 (1933).
- 12) A. Chevallier: *Z. Vitaminf.* **7**, 10 (1938).
- 13) A. Chevallier, S. Manuel und M. P. Faubert: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **23**, 1429 (1941).
- 14) J. C. Drummond und R. A. Morton: *Biochem. J.* **23**, 785 (1929).
- 15) L. Fuchs und E. Soos: *Sci. pharm.* **8**, 141 (1937).
- 16) B. Demarest: *Z. Vitaminf.* **9**, 20 (1939).
- 17) O. Notevarp und H. W. Weedon: *Biochem. J.* **30**, 1705 (1936); **32**, 1668 (1938).
- 18) P. Karrer, H. v. Euler und K. Schöpp: *Helv. Chim. Acta* **15**, 493 (1932).
- 19) H. Willstaedt und T. K. With: *Z. physiol. Ch.* **253**, 40 133 (1938).
- 20) H. Willstaedt und T. K. With: *Z. Vitaminf.* **9**, 212 (1939).
- 21) T. W. Goodwin und R. A. Morton: *Analyst*, **71**, 15 (1946).
- 22) J. L. Bowen, N. T. Gridgeman und G. F. Longman: *Analyst*, **71**, 20—29 (1946).

²²⁾ $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ } 0/0}$ (470 m μ) von reinem β -Carotin = 2140 (Petroläther).

Die Bestimmung von Vitamin D

a) Prinzip

Die Bestimmung von Vitamin D erfolgt entweder spektrophotometrisch durch Messung der Lichtabsorption im U.V. bei 265 m μ . oder kolorimetrisch durch Messung der mit Antimontrichlorid in Gegenwart von etwas Acetylchlorid in Chloroform erhaltenen Gelbfärbung bei 500 m μ . Zur Vitamin D-Bestimmung im U.V. wird das Analysenmaterial oder der Trockenrückstand des fettlöslichen Extraktes davon in Isopropanol oder Feinsprit gelöst und das Vitamin D in einem aliquoten Teil dieser Lösung bestimmt. Zur kolorimetrischen Bestimmung wird genau gleich verfahren; das Vitamin D wird aber in Chloroform gelöst.

Wird die Vitamin D-Bestimmung durch Begleitstoffe gestört oder ist Vitamin D neben Vitamin A-Ester oder neben β -Carotin zu bestimmen, so werden die Untersuchungslösungen durch Verseifung oder auf chromatographischem Wege gereinigt und die einzelnen Anteile voneinander abgetrennt, wie weiter unten beschrieben wird.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Vitamin D in Fetten, Ölen und Vitamin D-Konzentraten, sowie in mit Vitamin D angereicherten Lebensmitteln, diätetischen Präparaten und pharmazeutischen Spezialitäten.

In Anwesenheit von grösseren Mengen Vitamin A-Alkohol wird das Verfahren mehr oder weniger stark gestört; ist mehr Vitamin A-Alkohol als Vitamin D zugegen, beide Gehalte in i. E. ausgedrückt, so versagt das Verfahren.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Die Genauigkeit und Erfassbarkeit der Vitamin D-Bestimmung ist abhängig von störenden Begleitstoffen, von der Reinigung des Untersuchungsmaterials und vom Bestimmungsverfahren. Diese Einflüsse werden bei den einzelnen Verfahren diskutiert.

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Auf die zu berücksichtigenden Einzelheiten wird in den einzelnen Abschnitten bei der Besprechung der verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten hingewiesen.

e) Apparate

Siehe Verfahren zur Bestimmung von Vitamin A und β -Carotin, Abschnitt e. — Das dort angeführte Kolorimeter ist mit den Zeiss-Filtern S 61 und S 50 oder mit entsprechenden Filtern auszurüsten.

f) Reagenzien

Siehe Verfahren zur Bestimmung von Vitamin A und β -Carotin, Abschnitt f, 1—10. Die dort angeführte Fussnote 1 hat aber für die Vitamin D-Auswertung keine Gültigkeit.

11. *Athanol* mit 5 % Wasser.

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. Das Extraktionsverfahren

Die Extraktion des Vitamin D erfolgt gegebenenfalls nach der gleichen Vorschrift, wie sie im Abschnitt g, I für das Vitamin A und β -Carotin gegeben wurde (siehe dort).

II. Die Bestimmung des Vitamin D

1. *Die spektrophotometrische Bestimmung des Vitamin D im U.U. bei 265 m μ .*

Zur spektrophotometrischen Vitamin D-Auswertung wird analog verfahren wie bei der Bestimmung von Vitamin A (siehe dort, Abschnitt g, II).

Die Berechnung des Vitamin D-Gehaltes erfolgt auf Grund der bestimmten Extinktion $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ }0/0}$ nach der Formel:

$$\frac{(E_{1\text{ cm}}^{1\text{ }0/0}) \text{ Versuchslösung}}{(E_{1\text{ cm}}^{1\text{ }0/0}) \text{ des reinen Vit. D}} = \frac{\frac{E}{c \cdot d}}{\frac{474}{1}} = \frac{E}{c \cdot d \cdot 474} = \text{g Vitamin D/g}^{23}) \text{ Unter-}$$

suchungsmaterial oder

$[\text{g Vitamin D/g}] \times 40 \cdot 10^6 = \text{i. E. Vitamin D/g Untersuchungsmaterial}$ (siehe Anmerkung ²³)).

Die *Genauigkeit*, bzw. die *Streuung* des Bestimmungsverfahrens ist $\pm 10\%$. Bei sehr kleinen Vitamin D-Mengen ist unter günstigen Verhältnissen mit einer Streuung von absolut ± 100 — 200 i. E. und mit einer unteren *Erfassbarkeit* von etwa 500 — 1000 i. E. zu rechnen.

²³) E = gemessene Extinktion der Lösung bei $265\text{ m}\mu$, bzw. verwendeter Sektor des Spektrographen.

c = Konzentration der gemessenen Lösung in $\text{g}/100\text{ cm}^3$.

d = Schichtdicke der gemessenen Lösung in cm.

$474 = E_{1\text{ cm}}^{1\text{ }0/0}$ ($265\text{ m}\mu$) des reinen Vitamin D₃ }
 $459 = E_{1\text{ cm}}^{1\text{ }0/0}$ ($265\text{ m}\mu$) des reinen Vitamin D₂ } (siehe Lit. 6).

$1\text{ g Vitamin D} = 40 \cdot 10^6 \text{ i. E.}$

Das spektrophotometrische Bestimmungsverfahren von Vitamin D im U.V. bei 265 m μ kann nur benutzt werden, wenn ganz reine Vitamin D-Präparate vorliegen. Schon geringe Mengen von Verunreinigungen stören so stark, dass das spektrophotometrische Verfahren als völlig ungeeignet zur Bestimmung von Vitamin D in Kombinationspräparaten und insbesondere zur Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln bezeichnet werden muss. Hier gilt das schon bei der Vitamin A-Bestimmung über das kolorimetrische Bestimmungsverfahren hinsichtlich der grösseren Spezifität und geringeren Empfindlichkeit gegenüber Begleitstoffen Gesagte in noch vermehrtem Masse. — Die chemische bzw. physikochemische Vitamin D-Bestimmung in Lebensmitteln und in diätetischen und pharmazeutischen Kombinationspräparaten wird heute daher fast ausschliesslich mit dem kolorimetrischen Verfahren durchgeführt.

2. Die kolorimetrische Bestimmung von Vitamin D

Das in Chloroform (4) aufgenommene Untersuchungsmaterial wird mit Chloroform (4) verdünnt, so dass in 0,1—1 cm³ Lösung 100—1500 i. E. Vitamin D enthalten sind (Lösung a).

- 0,1—1 cm³ Lösung a mit 100—1500 i. E. Vitamin D (am besten 400—1000 i. E.) werden direkt im Apparat in eine auf 25—30° C²⁴⁾ vorgewärmte Messküvette²⁵⁾ gegeben,
- ad 1 cm³²⁶⁾ mit Chloroform (4) ergänzt und dann in einem Male mit 4 cm³ Antimontrichlorid-Reagens (5)²⁶⁾ (von ca. 25° C) versetzt, so dass sofort vollständige Mischung der Reaktionslösung erfolgt. Genau nach 30 und 60 Sekunden wird die Extinktion der Lösung bei 500 m μ gemessen, und zwischen der 60. und 75. Sekunde wird die Extinktion bei 610 m μ gegen einen Leerwert mit reinem Reagens²⁷⁾ bestimmt.

²⁴⁾ Wenn dafür gesorgt wird, dass die Versuchstemperatur der etwas trägen Reaktion 25° C nicht unterschreitet, so ist die auf das Vitamin D zurückzuführende maximale Farbentwicklung nach 30 Sekunden beendet und während mindestens 1—2 Minuten praktisch konstant.

²⁵⁾ Da die Extinktionsmessung erst nach 30 Sekunden Reaktionszeit erfolgt, können die verschiedenen Lösungen auch in einem auf 25—30° C vorgewärmten 5- oder 10-cm³-Messkölbchen gemischt und erst dann in die vorgewärmte Messküvette gegeben werden. Dieses Vorgehen hat bisweilen den Vorteil, Apparatekorrosionen bei unzuweckmässiger Handhabung des Reagens zu vermeiden, da das Acetylchlorid bei der Vitamin D-Bestimmung nicht durch Essigsäureanhydrid ersetzt werden kann.

²⁶⁾ Diese Menge richtet sich nach der Küvettengrösse. Pro 1 cm³ CHCl₃ (4) sollen 3—5 cm³ SbCl₃-Reagens verwendet werden (vgl. Vitamin A-Bestimmung, Anmerkung 6).

²⁷⁾ Da das genau nach der Vorschrift hergestellte Reagens vollständig farblos und klar ist, kann der Einfachheit halber an Stelle des SbCl₃-Reagens auch Chloroform (4) benutzt werden.

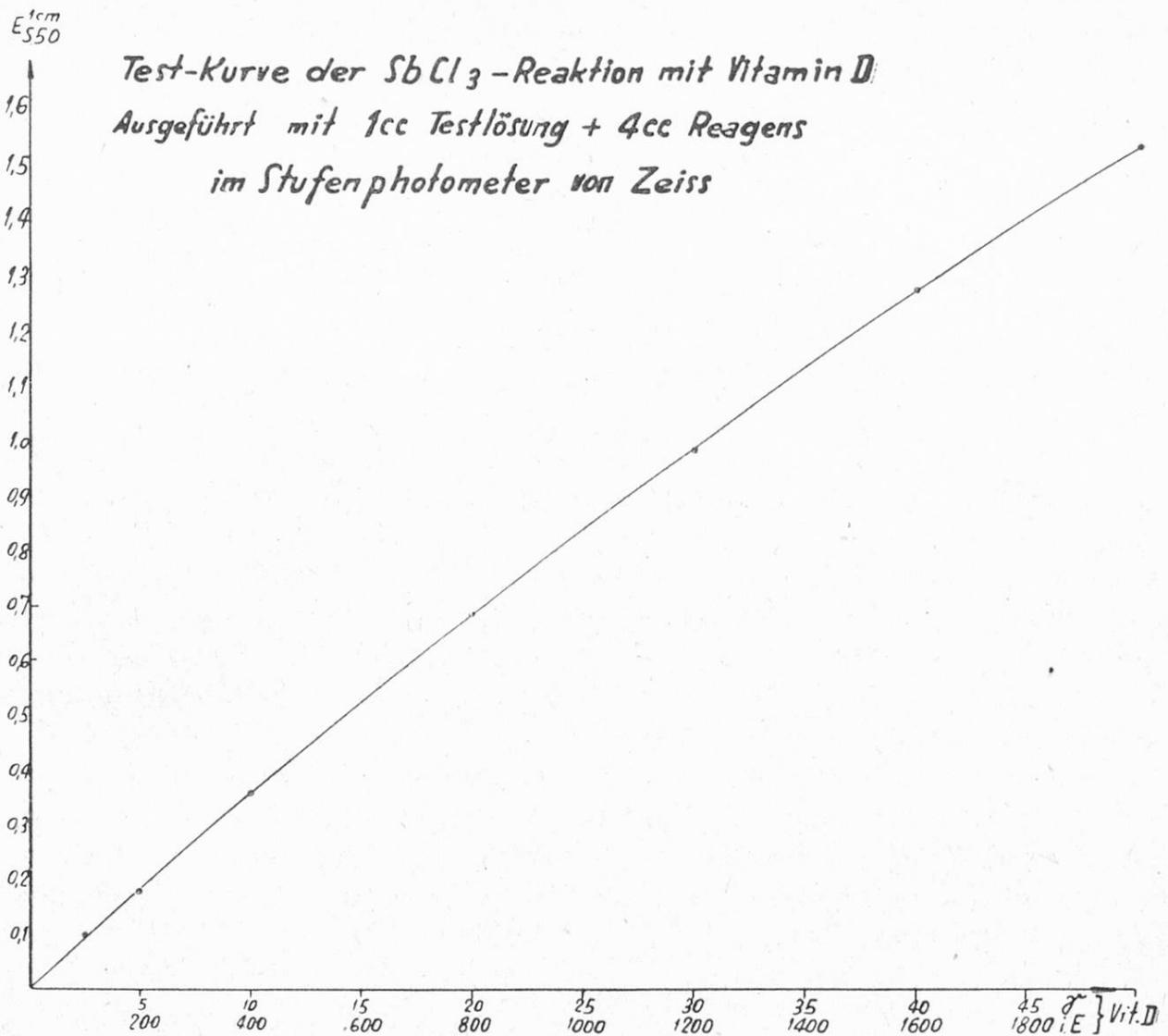


Abbildung 4

Zur Ermittlung des Vitamin D-Gehaltes wird zunächst die von Verunreinigungen herrührende, bei 500 $m\mu$ zwischen der 30. und 60. Sekunde gemessene Extinktionszunahme (ΔE_V) von dem genau nach 30 Sekunden für das Vitamin D gemessenen Extinktionswert (E_D) abgezählt. Auf diese Weise erhält man hinreichend genau die dem reinen Vitamin D zukommende, korrigierte Extinktion (E_D') korr. Die Ermittlung der bestimmten Menge Vitamin D erfolgt an Hand einer Testkurve, die unter genau denselben Versuchsbedingungen mit kristallisiertem Vitamin D₂ oder Vitamin D₃ aufgestellt wird. Der Vitamin D-Gehalt wird in γ oder i. E. Vitamin D pro g Untersuchungsmaterial angegeben.

Ist die Reaktionslösung nicht rein gelb, sondern grün- oder bläulich, so wird zwischen der 60. und 75. Sekunde bei 610 $m\mu$ ebenfalls eine deutliche Extinktion gemessen, welche von kleinen Mengen Vitamin A herrührt. Unter diesen Bedingungen wird die Vitamin D-Auswertung bei 500 $m\mu$ durch das Vitamin A mehr oder weniger stark gestört. Diese Beeinflussung kann in guter

Näherung auf einfache Weise berücksichtigt werden, wenn man aus einer zweiten Testkurve ²⁸⁾ die Extinktion (E_A) abliest, welche der bei 610 m μ gemessenen Vitamin A-Menge bei 500 m μ zukommt und diese Extinktion E_A auch noch von dem bei 500 m μ nach 30 Sekunden für das Vitamin D gemessenen Extinktionswert E_D abzieht.

Die für das reine Vitamin D massgebende Extinktion (E_D) korr. errechnet sich also nach der Formel:

$$E_D - (\Delta E_V + E_A) = (E_D) \text{ korr.}$$

wobei den einzelnen Bezeichnungen die eben besprochene Bedeutung zukommt.

Die *Genauigkeit*, bzw. die *Streuung* des Bestimmungsverfahrens ist $\pm 10\%$. Bei sehr kleinen Vitamin D-Mengen ist unter günstigen Umständen — wenn ΔE_V und $E_A = 0$ oder nahezu Null sind — mit einer Streuung von absolut ± 20 — 40 i. E. und mit einer unteren *Erfassbarkeit* von etwa 100 i. E. zu rechnen. Wenn die Vitamin D-Reaktion durch Begleitstoffe und Vitamin A leicht gestört wird ($\Delta E_V < 50\%$ E_D ; $E_A < 25\%$ E_D), so sind diese Werte, je nach der Grösse dieser Störung zu erhöhen, gegebenenfalls zu verdoppeln. Ist mehr Vitamin A zugegen als Vitamin D, beide Gehalte in i. E. ausgedrückt, so versagt das einfache Bestimmungsverfahren.

In der Mehrzahl der Fälle ist das Vitamin D von so grossen Mengen störender Stoffe begleitet, dass das Untersuchungsmaterial vor der Auswertung gereinigt werden muss. Sind keine grösseren Mengen Vitamin A oder Carotinoide zugegen, so führt sehr oft schon die einfache Verseifung des Analysenmaterials und die Bestimmung des Vitamin D im Unverseifbaren zum Ziel.

III. Die Reinigung des Untersuchungsmaterials durch Verseifung

Die Verseifung erfolgt nach der beim Vitamin A-Bestimmungsverfahren im Abschnitt g, III gegebenen Vorschrift.

Das Verseifungsverfahren ist praktisch verlustlos, wenn unter Ausschluss von Luft verseift und mit peroxydfreiem Äther extrahiert wird.

In zahlreichen Fällen führt die Verseifung zu einer hinreichenden Reinigung des Vitamin D. In Gegenwart von Vitamin A-Ester oder von β -Carotin, welche die kolorimetrische Vitamin D-Bestimmung empfindlich stören und bei der Verseifung mit dem Vitamin D ins Unverseifbare gelangen, oder wenn das Unverseifbare noch viel störende Begleitstoffe enthält, muss Vitamin D auf chromatographischem Wege von diesen Begleitstoffen abgetrennt werden. Auch grössere Mengen störender Steroide lassen sich bisweilen nur mittels des chromatographischen Verfahrens von Vitamin D abtrennen.

²⁸⁾ Diese Testkurve wird zweckmässig gleichzeitig mit der zur Vitamin A-Bestimmung benötigten Testkurve aufgestellt, was gut in einem Arbeitsgang gemacht werden kann. Sie verläuft bis zu 100 i. E. Vitamin A/5 cm³ Reaktionslösung praktisch geradlinig (siehe Verfahren zur Bestimmung von Vitamin A und β -Carotin, Abschnitt g, V).

IV. Die Trennung von Vitamin D und Vitamin A-Ester, sowie von Vitamin D und β -Carotin und die Reinigung von Vitamin D durch Chromatographie

Die chromatographische Abtrennung des Vitamin D von Vitamin A-Ester und von Carotinoiden und die chromatographische Reinigung des Untersuchungsmaterials, bzw. des Trockenrückstandes des fettlöslichen Extraktes davon oder des Rückstandes des Unverseifbaren erfolgt mit

100—5000 i. E. Vitamin D nach der beim Vitamin A-Bestimmungsverfahren im Abschnitt g, IV gegebenen Vorschrift.

Vitamin D gibt bei der Chromatographie keine fluoreszierenden oder sichtbaren Zonen. Da es sich aber bei der Adsorption an Al_2O_3 genau gleich verhält wie Vitamin A-Alkohol, kann Vitamin D blind chromatographiert werden, wenn man die Aktivität des Aluminiumoxyds mit Vitamin A-Alkohol einstellt und das chromatographische Verfahren mit Vitamin A-Alkohol testet.

Dieses Vorgehen, das ohne weiteres von der Vitamin A-Analyse übernommen werden kann, ist so einfach, dass sich das Arbeiten mit fluoreszierenden Kolonnen, auf denen sich Zonen von nicht sichtbaren und nicht fluoreszierenden Verbindungen als dunkle Ringe abheben, erübrigt.

Das chromatographische Verfahren hat einen kleinen Verlust von bis 5 % zur Folge, dem bei der Auswertung der Ergebnisse nach g, II der Vorschrift Rechnung zu tragen ist. Die genaue Ermittlung des chromatographischen Verlustes erfolgt gegebenenfalls, wie beim Vitamin A-Bestimmungsverfahren beschrieben wurde (siehe dort, Abschnitt g, IV).

Das chromatographische Reinigungsverfahren ist in der Mehrzahl der Fälle ausreichend. In komplizierten Produkten und in Gegenwart von viel Fett oder Öl muss das Analysenmaterial aber vor der Chromatographie durch Verseifung von der Hauptmenge der Fettanteile befreit werden.

In Gegenwart von Vitamin A-Ester, der bei der Verseifung in Vitamin A-Alkohol übergeführt und bei der Chromatographie zusammen mit dem Vitamin D adsorbiert wird, sind Vitamin A-Ester und Vitamin D immer zuerst auf chromatographischem Wege zu trennen. In Gegenwart von viel Vitamin A-Alkohol kann Vitamin D nicht mehr bestimmt werden.

Enthält ein Fett oder Öl nur wenig Vitamin D neben viel Vitamin A-Ester, so kann Vitamin D nicht ohne weiteres auf chromatographischem Wege vom Vitamin A-Ester abgetrennt werden, da grössere Mengen von Fettstoffen das chromatographische Verfahren stören. In diesem Falle ist die Hauptmenge der Fettstoffe und des Vitamin A-Esters vor der Chromatographie durch Ausfrieren aus Feinsprit (95 %iges Äthanol), in welchem Vitamin D noch hinreichend löslich ist, vom Vitamin D abzutrennen (siehe weiter unten).

V. Verfahren zur Abtrennung von Fetten und Ölen von Vitamin D durch Ausfrieren der Fettstoffe.

Bis 5 g²⁹⁾ Fett oder Öl, bzw. Trockenrückstand des fettlöslichen Extraktes

²⁹⁾ Bis 2,5 g Fett / 50 cm³ Feinsprit.

des Untersuchungsmaterials werden in einen etwas weithalsigen 100-cm³-Messkolben gegeben und durch Einstellen in ein siedendes Wasserbad und öfteres Schütteln in ca. 90 cm³ Äthanol (11) gelöst. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit Äthanol (11) zur Marke ergänzt, 30 Minuten in eine Eis/Wasser-Mischung gestellt, das ausgeschiedene Fett in vorgekühlten Zentrifugengläsern 1—3 mal kurz, aber scharf abzentrifugiert und der klare Extrakt gegebenenfalls durch wenig Watte abdekantiert. Das Dekantat wird noch einmal wie oben ausgefroren, von ausgeschiedenen festen Anteilen durch Zentrifugieren und Dekantieren abgetrennt, auf Zimmertemperatur aufgewärmt und ein aliquoter Teil bei 40—50° C Wasserbadtemperatur im Vakuum und unter Spülung mit reinem Stickstoff eingengt.

VI. Die Kombination verschiedener Reinigungsverfahren

Durch Kombination der verschiedenen Reinigungsverfahren kann die chemische Vitamin D-Bestimmung selbst auf komplizierte Materialien ausgedehnt werden. Die Kombinationen richten sich nach der Natur des Untersuchungsmaterials und der Begleitstoffe und nach der Menge Vitamin D. Orientierend können folgende Reinigungsverfahren und Kombinationen empfohlen werden:

Vitamin D-reiche Präparate: Reinigung durch Verseifung oder durch Chromatographie. In Gegenwart von Vitamin A-Ester und Carotinoiden ist das chromatographische Verfahren anzuwenden.

Mässig stark vitaminisierte fetthaltige Produkte:

- a) *In Abwesenheit von Vitamin A-Ester:* Reinigung durch Verseifung und anschließende Chromatographie.
- b) *In Gegenwart von Vitamin A-Ester:* Abtrennung des Vitamin A und Reinigung des Vitamin D durch Chromatographie und anschließende Verseifung; bisweilen muss dann noch ein zweites Mal chromatographiert werden.

Vitamin D-arme Fette und Öle mit (viel) Vitamin A-Ester:

1. Abtrennung der Hauptmenge der Fettstoffe und des Vitamin A-Esters durch 2maliges Ausfrieren des Fettes aus alkoholischer Lösung, dann
2. Abtrennung des Vitamin D von Vitamin A-Ester durch Chromatographie der eingengten alkoholischen Extrakte und
3. Abtrennung der Fettstoffe durch Verseifung der eingengten Eluate.
4. Abtrennung des Vitamin D von störenden Carotinoiden und Steroiden durch Chromatographie des Unverseifbaren. Wenn dieses kombinierte Reinigungsverfahren nicht zum Ziele führt, ist die Vitamin D-Bestimmung auf chemischem Wege kaum möglich.

In so komplizierten Fällen liegt die untere Erfassbarkeit des Bestimmungsverfahrens bei etwa 250 i. E. D/g Fett; dabei ist mit einer Streuung der Ergebnisse von absolut 50—100 i. E. zu rechnen.

Im Falle der Kombination von mehreren Reinigungsverfahren ist bei der Auswertung nach Abschnitt g, II generell ein Verlust von 10 % Vitamin D einzurechnen.

VII. Beispiel

Allgemeiner Fall: Reinigung durch einmalige Chromatographie oder durch Verseifung und Bestimmung nach Abschnitt g, II.

Spezieller, komplizierter Fall: Fett-Gemisch mit Vitamin D, Vitamin A-Ester und mit wenig Vitamin A-Alkohol, sowie nicht quantitativ abtrennbaren Verunreinigungen. Im Folgenden wird dieser recht komplizierte Fall illustriert.

5 g Fett werden aus einer ad 100 cm³ mit 95 %igem Äthanol ergänzten Lösung ausgefroren, 60 cm³ auszentrifugierter und filtrierter Extrakt (entsprechend 3 g Einwage) zur Trockne eingedampft und zur Abtrennung von Vitamin A-Ester auf Vitamin D chromatographiert. Bei der Entwicklung des Chromatogrammes mit ca. 20 cm³ Petroläther gelangt der Vitamin A-Ester in den Vorlauf. Das Vitamin D wird mit 100 cm³ Petroläther-Benzol (10) eluiert, der Trockenrückstand des Eluates zur Eliminierung des Fettes verseift, das Unverseifbare mit total 100 cm³ Äther extrahiert, 90 cm³ des gewaschenen und getrockneten Äthers (entsprechend 2,7 g Einwage) eingeengt und störende Steroide durch abermalige Chromatographie auf Vitamin D grösstenteils entfernt. Der Trockenrückstand des Eluates wird direkt im Eindampfkölbchen mit 1 cm³ Chloroform aufgenommen, mit 4 cm³ SbCl₃-Reagens versetzt, geschwenkt und die ca. 25° C warme Reaktionslösung mittels einer Pipette in die über der Gasflamme auf ca. 25° C vorgewärmte Messküvette gegeben. Bestimmung nach Abschnitt g, II. (Für die Vitamin A-Auswertungen siehe Testkurve im Abschnitt g, V des Vitamin A-Bestimmungsverfahrens.)

Messung:

$$\begin{array}{l}
 E_{S\ 50}^{1\ \text{cm}} \text{ nach 30 Sekunden} \\
 E_{S\ 50}^{1\ \text{cm}} \text{ nach 60 Sekunden} \\
 E_{S\ 61}^{1\ \text{cm}} \text{ zwischen der 60. und 75. Sekunde}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 E_D = 0,55 \\
 = 0,60 \\
 = 0,90
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} E_{S\ 50}^{1\ \text{cm}} \\ E_{S\ 50}^{1\ \text{cm}} \\ E_{S\ 61}^{1\ \text{cm}} \end{array}} \right\} = \Delta E_V = 0,05$$

Diese Extinktion für Filter S 61 (25° C) entspricht für Filter S 50 (25° C) einer Vitamin A-Extinktion $E_A = 0,05$ (aus den Vitamin A-Testkurven entnommen).

Berechnung:

$$E_{S\ 50}^{1\ \text{cm}} \text{ des reinen Vitamin D + Vitamin A-Alkohols} = 0,55 - 0,05 = 0,50$$

$E_{S\ 50}^{1\text{ cm}}$ der gemessenen Menge Vitamin A-Alkohol $E_A = \underline{0,05}$

$E_{S\ 50}^{1\text{ cm}}$ des reinen Vitamin D $(E_D) \text{ korr.} = \underline{0,45}$

Vitamin D-Gehalt von 2,7 g Analysenmaterial (aus der Testkurve entnommen)

= $12,75 \gamma/2,7 \text{ g}$ bzw. $510 \text{ i.E.}/2,7 \text{ g} = 4,7 \gamma/\text{g}$ bzw. 189 i.E. D/g

Literatur

- 1) P. B. Müller: Zur kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin A, Vitamin D und β -Carotin unter besonderer Berücksichtigung des Vitamin D. *Helv. Chim. Acta* **30**, 1172—1190 (1947).
- 2) F. Gstirner: Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1941.
- 3) American Medical Association: The Vitamins, a Symposium, Chicago 1939.
- 4) H. R. Rosenberg: Chemistry and Physiology of the Vitamins, Interscience Publishers, Inc. New York, N.Y., 1945.
- 5) N. A. Milas: A report on the physico-chemical Methods used for the quantitative Estimation of Vitamin D, Abstracts of Papers, 100th Meeting, Amer. Chem. Soc., Sept. 1940, B. 16.
- 6) W. Huber, G. W. Ewing und J. Kriger: The Absorption Spectra of the Vitamins and Provitamins D. *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 609 (1945).
- 7) K. Dimroth: Synthesen von Modellsubstanzen der antirachitischen Vitamine. *Die Chemie* **55**, 80 (1942).
- 8) H. P. Koch: The light absorption of geometrical isomerides and the structure of Vitamin D. *Chem. and Ind.* **61**, 273 (1942).
- 9) H. Töpelmann und W. Schuhknecht: *Z. Vitaminf.* **4**, 111 (1935).
- 10) I. Wodenitscharoff: Analytische Methoden zur Vitamin D-Bestimmung. *C.* **1941**, II, 1642.
- 11) E. M. Shantz: Antimony trichloride reaction of Vitamin D. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **16**, 179 (1944).
- 12) C. H. Nield, W. C. Russell, A. Zimmerli: The spectrophotometric determination of Vitamins D₂ and D₃. *J. Biol. Chem.* **136**, 73 (1940).
- 13) R. Raoul und P. Meunier: *C. r.* **209**, 546 (1939).
- 14) L. A. Rutowski: Über die Brauchbarkeit der Tortelli-Jaffé-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D. *Biochemica* **5**, 528 (1940).
- 15) Ü. L. Solianikova: Quantitative photokolorimetrische Bestimmung von Vitamin D₂. *Fette und Seifen* **51**, 40 (1944).
- 16) A. E. Sobel, A. M. Mayer und B. Kramer: New colorimetric reaction of Vitamins D₂ and D₃ and their Provitamins. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **17**, 160 (1945); A. E. Sobel und H. Werbin: Activated glycerol dichlorohydrin. A new colorimetric reagent for Vitamin A, *ibidem* **18**, 570 (1946).
- 17) N. A. Milas, R. Heggie, J. A. Reynolds: A spectroscopic method for the quantitative estimation of Vitamin D. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **13**, 227 (1941).
- 18) J. van der Uliet: Chromatographie als Hilfsmittel bei der Vitamin D-Untersuchung. *C.* **1942**, II, 1353.

Anmerkung zur Vitamin A- und Vitamin D-Bestimmung

Für die Auswertung von Vitamin A und Vitamin D sind Festsetzungen und Vereinbarungen in Vorbereitung, welche dereinst international verbindlich werden sollen. In diesem Zeitpunkt sind dann die heute gültigen oder gebräuchlichen Vorschriften durch die internationalen Vereinbarungen zu ersetzen. Die hier gegebenen Vitamin A- und Vitamin D-Bestimmungsvorschriften haben daher in verschiedenen Teilen provisorischen Charakter.

Um sich heute schon über die vorgesehenen internationalen Vereinbarungen orientieren zu können, werden nachstehend die Beschlüsse angeführt, die das «Sub-Committee of Fat-Soluble Vitamins» im Rahmen der «United Nations World Health Organisation» am 26.—29. April 1949 gefasst hat:

Vitamin A

Internationaler Standard = kristallisiertes *Vitamin A-Acetat* ($C_{22}H_{32}O_2$)

Smp. = 57,8°—59,0° C (korr.)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 325 m μ = 1525 (in Isopropanol)

Molekularer Extinktionskoeffizient ϵ = 50 000

1 int. Einheit (= 1 i. E.) = 0,344 γ

Umrechnungsfaktor (zur Umrechnung der Extinktion in int. Einheiten) = 1900

Für den reinen *Vitamin A - Alkohol* ($C_{20}H_{29}OH$) werden folgende Werte festgelegt:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 325 m μ = 1750 (in Isopropanol)

Molekularer Extinktionskoeffizient ϵ = 50 000

1 int. Einheit (i. E.) = 0,3 γ

Umrechnungsfaktor (siehe oben) = 1900

Für die spektrophotometrische Auswertung werden Richtlinien zur Ausschaltung von störenden Verunreinigungen aufgestellt, und zwar:

1. Das Extinktionsmaximum muss zwischen 325 und 328 m μ liegen.
2. Die Spitze der Absorptionskurve muss mit derjenigen, welche unter genau gleichen Verhältnissen, und nach Kompensation des zur Verdünnung verwendeten Ols, mit einer Standardlösung erhalten wird, zur Deckung gebracht werden können, und die Abweichungen der entsprechenden Werte von

$$\frac{E_{310\text{ m}\mu} \text{ bis } E_{350\text{ m}\mu}}{E_{\text{max.}}}$$

der Test- und Standardkurve dürfen nicht grösser sein als 0,02.

Die Standardkurven werden von Morton und Stubbs gegeben (Biochem. J., 42, 195 (1948)).

Es werden noch weitere Richtlinien gegeben zur Korrektur von Kurven, welche zufolge störender Beimengungen diese Übereinstimmung nicht aufweisen.

Zur Auswertung von Vitamin A-armen Präparaten und von Lebensmitteln wird das kolorimetrische Verfahren mit SbCl_3 empfohlen und darauf hingewiesen, dass auch dieses Verfahren mit einem Vitamin A-Standard zu testen ist. Wenn gleichkonzentrierte Untersuchungs- und Standardlösungen nicht denselben Farbton aufweisen, wird die Analyse durch Verunreinigungen gestört.

Als Lösungsmittel für den Standard soll ein Öl verwendet werden, welches pro Million Teile nicht mehr als 32 Teile total Peroxyd-Sauerstoff und nicht weniger als 0,1 % Tocopherol enthält.

β -Carotin

Internationaler Standard des Provitamin A = β -Carotin ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$)

Smp. = 180° C (korr.)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (465 m μ) = 2290 (in Benzol)

Molekularer Extinktionskoeffizient ϵ = 122 700

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (455 m μ) = 2440 (in Cyclohexan)

Molekularer Extinktionskoeffizient ϵ = 130 800

1 int. Einheit (i. E.) = 0,6 γ

Als Lösungsmittel für den Standard soll ein Öl verwendet werden, welches pro Million Teile nicht mehr als 32 Teile total Peroxyd-Sauerstoff enthält und dem 0,01 % Hydrochinon zugesetzt wurde.

Vitamin D

Internationaler Standard = kristallisiertes Vitamin D₃ ($\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{OH}$)

Smp. = 87—89° C (korr.)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +110° (in Äthanol)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (265 m μ) = 490 (in Äthanol)

Molekularer Extinktionskoeffizient ϵ = 18 800

1 int. Einheit (i. E.) = 0,025 γ

Als Lösungsmittel für den Standard soll ein Öl verwendet werden, welches pro Million Teile nicht mehr als 32 Teile total Peroxyd-Sauerstoff enthält und dem 0,01 % Hydrochinon zugesetzt wurde.

B. Die Bestimmung von Aneurin und Lactoflavin

(gegebenenfalls nach Reinigung und Anreicherung mittels gärender Bäckerhefe)

Verfahren von *P. B. Müller* und *H. Moor*

Die Bestimmung von Aneurin (Vitamin B₁) nach dem Thiochromverfahren

1. Das Thiochromverfahren

a) Prinzip

Das Untersuchungsmaterial wird in salzsaurer Lösung, gegebenenfalls im Turmix-Apparat, zerkleinert und Stärke- und Schleimstoffe, Phosphorverbindungen des Aneurins nach kurzem Erhitzen im Wasserbad mit Clarase fermentativ gespalten. Nach Abscheidung der unlöslichen Anteile wird das Aneurin in alkalischer Lösung mit Kaliumferricyanid zu Thiochrom oxydiert und nach Extraktion mit Isobutanol, auf Grund der Fluoreszenz des Thiochroms, im photoelektrischen Fluorometer bestimmt. Zur Erhöhung der Spezifität des Verfahrens werden fluoreszierende, nicht Vitamin B₁-wirksame Verbindungen nach Zerstörung des Aneurins mit Natriumbisulfit in einem Leerversuch ermittelt und bei der Auswertung in Abzug gebracht. Die Auswertung der Messungen erfolgt an Hand eines genau gleich behandelten Ansatzes, welchem aber eine bekannte Menge Aneurin zugesetzt worden ist, oder im Vergleich mit einem Vitamin B₁-Standard, gegebenenfalls nach Korrektur der abgelesenen Werte mittels einer Eichkurve.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Aneurin-HCl in Mehlen, Mais, Hafer, Reis, Teigwaren, Brot, Zwieback, Biscuits, Milchprodukten, Käse, Schokolade sowie in angereicherten diätetischen und pharmazeutischen Präparaten.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Unter den Bedingungen der gegebenen Vorschrift ist mit einer Streuung der Ergebnisse von ± 10 — 15 %, bzw. bei kleinen Vitamin B₁-Gehalten von $\pm 0,05$ — $0,1$ γ der effektiv (absolut) gemessenen Menge zu rechnen.

Die untere Erfassungsgrenze des beschriebenen Verfahrens liegt bei ca. 25 γ Aneurin-HCl. Diese Erfassbarkeit genügt zur Untersuchung der weiter oben angeführten Materialien.

Durch Kombination mit dem biologischen Reinigungs- und Anreicherungsverfahren lässt sich die Erfassbarkeit noch erheblich steigern.

Die durchschnittlichen Vitamin B₁-Gehalte einiger Nahrungsmittel sind:

Schwarzmehl	ca. 400 $\gamma^0/0$
Halb-Weissbrot	ca. 200 $\gamma^0/0$
Weissmehl	ca. 50 $\gamma^0/0$
Hörnli	ca. 80 $\gamma^0/0$
Reis	ca. 80 $\gamma^0/0$

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Die zu berücksichtigenden Einzelheiten und Feinheiten des Bestimmungsverfahrens werden weiter unten bei der Beschreibung der verschiedenen Auswertungsmöglichkeiten besprochen.

e) Apparate

Normale Laboratoriums-Glaswaren (Erlenmeyer, Pipetten usw.).

Zentrifuge. Sehr geeignet ist die «Wifug-Zentrifuge», die sich, um rasch arbeiten zu können, auch von Hand gut bremsen lässt.

30-cm³-Zentrifugengläser mit eingeschliffenem Glasstopfen, passend zur Zentrifuge (Extraanfertigung).

Wasserbad.

Turmix-Apparat.

Photoelektrisches Fluorometer. Sehr gut bewährt hat sich das «Lumetron».

f) Reagenzien

1. *Salzsäure, reinst*, 0,2 normal.
2. *Octylalkohol*, destilliert.
3. *Natriumacetat, rein, wasserfrei*, 2,5 molare, wässrige Lösung = 205 g wasserfreie Substanz pro Liter.
4. *Clarase*, 10 $^0/0$ ige wässrige Lösung. (Ferment erhältlich bei Takamine Laboratory, Inc., Clifton, N.J. (USA).) Das Ferment ist auf Abwesenheit von Aneurin zu prüfen.
5. *Isobutanol*. Er wird durch Ausschütteln mit aktiver Kohle und anschliessende mehrmalige Filtration und Destillation fluoreszenzfrei gemacht.
6. *Kalilauge*, pro analysi, 30 $^0/0$ ige wässrige Lösung (Gew.Vol. $^0/0$).
7. *Kaliumferricyanid* ($K_3Fe(CN)_6$), pro analysi, 10 $^0/0$ ige, wässrige Lösung.
8. *Äthanol, absolut* (Ph. Helv. V), wie 5. fluoreszenzfrei gemacht.
9. *Natriumbisulfit*, pro analysi, 1 $^0/0$ ige wässrige Lösung (Gew.Vol. $^0/0$), täglich frisch herzustellen.

10. *Aneurin-HCl*- (= *Vitamin B₁*-) *Standard*.

Kristallisiertes, käufliches *Aneurin-HCl* (erhältlich bei der Firma F. Hoffmann - La Roche & Co. AG., Basel) wird bei 50° C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und damit eine 100 mg⁰/oige *Standardlösung I* in Wasser mit ca. 10 cm³ 0,2 n-HCl (1) / 100 cm³ *Standardlösung* bereitgestellt. Die Lösung ist im Kühlschrank mehrere Tage haltbar.

Durch Verdünnung auf ¹/₁₀₀ wird aus der *Standardlösung I* täglich die für den Zusatzversuch benötigte *Standardlösung II* bereitet (1 cm³ = 10 γ *Vitamin B₁*).

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. *Einwage und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials*

100 g *Untersuchungsmaterial*¹⁾ werden im Turmix-Apparat unter Zusatz von

300 cm³ *HCl* (1) 3 Minuten zerkleinert und im Messkolben

ad 500 cm³ mit *HCl* (1) aufgefüllt. Schaum wird durch Zusatz von einigen Tropfen *Octylalkohol* (2) vor dem Auffüllen zur Marke zerstört (Lösung a).

Nun werden

2 × 125 cm³ *Lösung a* (= je 25 g *Untersuchungsmaterial*) in zwei 250-cm³-Messkolben gegeben und dem einen Ansatz (a') eine bekannte, dem erwarteten Gehalt von 25 g *Analysenmaterial* ungefähr entsprechende Menge *Aneurin-HCl* aus der *Standardlösung I* oder *II* (siehe Abschnitt f) zugesetzt. Beide Ansätze (a und a') werden nun gleichzeitig nach der folgenden Vorschrift aufgearbeitet:

Jeder der beiden Ansätze wird im Messkolben 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, auf 50° C abgekühlt, mit

¹⁾ Cerealien, Mehl, Brot, Zwieback usw. Von *Vitamin B₁*-reichen oder angereicherten Produkten kann entsprechend weniger genommen oder eine kleine, fein verriebene Menge direkt im 250-cm³-Messkolben mit 125 cm³ *HCl* (1) wie *Lösung a*) aufgearbeitet werden.

Eiweisshaltige Produkte erfordern zumeist keine spezielle Behandlung. Für den Fall aber, dass eine Ausfällung der Eiweisskörper notwendig ist, empfiehlt es sich, das *Untersuchungsmaterial* bis zur *Lösung a*) mit leicht essigsauerm Wasser aufzuarbeiten. Nach der Behandlung im Wasserbad wird auf 50° gekühlt, 32,5 cm³ eines Puffers aus 12,5 cm³ 2 n-HCl und 20 cm³ *Natriumacetatlösung* (3) zugesetzt und mit *Clarase* weiterbehandelt wie oben.

Ist eine Entfettung des *Untersuchungsmaterials* notwendig, so wird das eingewogene, fein verriebene *Untersuchungsmaterial* direkt oder nach Trocknen im Trockenschrank, bzw. nach Verreiben und Trocknen mit *Natriumsulfat* mit peroxydfreiem Äther extrahiert und vor der Aufarbeitung im Vakuum vom Äther befreit und nachgetrocknet.

- 20 cm³ *Natriumacetat* (3) und
 5 cm³ *Claraselösung* (4) versetzt und 15 Minuten bei 45° C stehen gelassen. Nach dem Abkühlen wird nochmals ein Zusatz von
 20 cm³ *Natriumacetat* (3) gemacht,
 ad 250 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt und die für die Weiterverarbeitung notwendige Menge (siehe unter II) unter Verwerfung der ersten 20 cm³ Filtrat filtriert oder bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert und abdekantiert (Lösungen b und b').

II. *Thiochromtest des Untersuchungsmaterials*

- Je 15 cm³ der *Lösungen b und b'* werden im Zentrifugenglas 30 Sek. mit
 10 cm³ *Isobutanol* (5) geschüttelt und kurz zentrifugiert. Zur Weiterverarbeitung gelangt jeweils die wässrige Phase (Lösungen c und c').
 Je 5 cm³ *Lösung c und c'* werden im Zentrifugenglas unter Schwenken mit
 5 cm³ *Oxydationslösung* ²⁾ versetzt, welche jeweils aus
 50 cm³ *Kalilauge* (6) und
 3 cm³ *Kaliumferricyanidlösung* (7) frisch herzustellen ist.
 Nach 1½ Minuten Stehen ³⁾ wird mit
 10 cm³ *Isobutanol* (5) 5 Sekunden ausgeschüttelt, sofort 1 Minute zentrifugiert,
 5 cm³ aus der *Isobutanolphase* in einen Messkolben pipettiert und
 ad 25 cm³ mit *abs. Äthanol* (8) aufgefüllt (Lösungen d und d').

III. *Leerwert des Untersuchungsmaterials*

- Je 5 cm³ *Lösung c oder c'* werden im Zentrifugenglas nach Zusatz von
 0,5 cm³ *Natriumbisulfitlösung* (9) 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen direkt im Zentrifugenglas nach II mit Kalilauge und Kaliumferricyanid weiterbehandelt (Lösung d₀).

IV. *Messung und Auswertung*

Die Messung der Lösungen d, d' und d₀ erfolgt im photoelektrischen Fluorometer nach der dem Apparat beigegebenen Vorschrift.

²⁾ Diese Lösung ist nur 1—2 Stunden haltbar und muss im Dunkeln stehen.

³⁾ Ist die Reaktionslösung nach dieser Zeit vollständig entfärbt, was auf die Anwesenheit von aussergewöhnlich viel reduzierenden Stoffen schliessen lässt, so ist die Oxydation zu wiederholen und der Oxydationslösung 3 cm³ einer 20 %igen Kaliumferricyanidlösung zuzusetzen.

Am zweckmässigsten wird zunächst die Apparate-Empfindlichkeit so eingestellt, dass die Lösung d' einen möglichst grossen Galvanometer-Ausschlag D' (z.B.: D' = 100), die Leerwertlösung d₀ dagegen keinen Ausschlag D₀ (bzw. D₀ = 0) gibt. Dann wird der Ausschlag D der Lösung d gemessen.

Da der Ausschlag D'—D dem Aneurin-HCl-Zusatz (X) entspricht, der zu 25 g Analysenmaterial gemacht wurde, ist der dem Ausschlag D (von 25 g Material) entsprechende Aneurin Gehalt =

$$\frac{X \cdot D}{D' - D} \quad \text{bzw.}$$

$$\frac{4 \cdot X \cdot D}{D' - D} = \gamma\% \text{ Aneurin-HCl,}$$

wenn X in Gamma eingesetzt wird.

Wenn der Versuchsleerwert D₀ bei der mit der Lösung d' eingestellten Apparate-Empfindlichkeit nicht mehr auf Null gebracht werden kann, so ist die Null-Justierung des Fluorometers mit reinem Lösungsmittel vorzunehmen. In diesem Falle ist dann der Versuchsleerwert D₀ vor der Auswertung der Messungen von den Analysenwerten D' und D abzuziehen.

V. *Feinheiten des Bestimmungsverfahrens*

Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Das Thiochromverfahren weist eine starke Abhängigkeit auf von der Reinheit der Reagenzien, der Natur und der Konzentration der Lauge bei der die Oxydation durchgeführt wird, von der Konzentration und der zur Oxydation verwendeten Menge Kaliumferricyanid, von der Oxydationsdauer, vom Extraktionsverfahren des Thiochroms und der Extraktionsdauer, vom Gehalt an reduzierenden Beimengungen usw. Diese Einflüsse greifen oft stark ineinander über.

Die gegebene Analysenvorschrift, bei der die Auswertung auf Grund eines genau gleich behandelten Zusatzversuches erfolgt, hat den Vorteil, dass durch den Zusatzversuch sowohl die Einflüsse der Reagenzien und der Arbeitsweise als auch diejenigen, die durch das Untersuchungsmaterial bedingt sind, berücksichtigt werden. Da die Ergebnisse auf Grund von zwei Bestimmungen hergeleitet werden, ist aber die Streuung des Bestimmungsverfahrens grösser als bei der direkten Messung.

Bei der Testung des Bestimmungsverfahrens hat es sich gezeigt, dass die Methode in der Praxis in den meisten Fällen auch zur direkten Gehaltsbestimmung ohne Zusatzversuch benützt werden kann, wenn genau nach der Vorschrift gearbeitet wird. Hat man sich für ein gegebenes Untersuchungsmaterial hiervon überzeugt, so kann das Bestimmungsverfahren z. B. für Reihenuntersuchungen durch Weglassung des Zusatzversuches vereinfacht werden. Die Auswertung der Messungen erfolgt dann auf Grund eines Fluoreszenzstandards aus Chininsulfat

oder eines Testversuches mit einem Aneurin-HCl-Standard⁴⁾. Aus den oben erörterten Gründen ist der Aneurin-HCl-Standard, der mit denselben Reagenzien aufgearbeitet wird wie das Untersuchungsmaterial, dem Chininsulfat-Standard vorzuziehen. — Hierzu werden 15 cm³ der oben beschriebenen Vitamin B₁-Testlösung mit den zur Analyse verwendeten Reagenzien nach II und III der Bestimmungsvorschrift aufgearbeitet. Je nach dem Gehalt des Analysenmaterials wird ein Test mit 2,5, 5 oder 10 γ Aneurin-HCl/5 cm³ Testlösung verwendet.

Beim direkten Bestimmungsverfahren gelangt mit 5 cm³ Lösung c) $\frac{1}{200}$ der Einwage, das sind bei 100 g Einwage = 0,5 g Material zur Messung. Bei der Auswertung ist gegebenenfalls dem unlöslichen Trockenanteil der Einwage Rechnung zu tragen. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen tritt dieser Einfluss im Ergebnis mit maximal 5—10 % in Erscheinung und liegt jedenfalls innerhalb der angeführten Bestimmungsgenauigkeit.

In Gegenwart von aussergewöhnlich grossen Mengen an reduzierenden Begleitstoffen ist die Oxydationslösung mit der doppelten Menge Kaliumferricyanid herzustellen. Bei der direkten Bestimmung (ohne Zusatzversuch) kann die Oxydation des Aneurin-HCl zu Thiochrom auch so durchgeführt werden, dass man der Untersuchungslösung an Stelle der 5 cm³ Oxydationslösung unter ständigem Schwenken zuerst 5 cm³ *Kalilauge* (6) und dann sofort bis zur bleibenden Gelbfärbung der Lösung tropfenweise *Kaliumferricyanid* (7) und weiter noch 0,1 cm³ *Kaliumferricyanidlösung* (7) im Überschuss zugibt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt genau nach der Vorschrift. Auf diese Weise wird die Oxydation der verschiedenen Ansätze nicht nur schon auf den ersten Anhub mit einer ausreichenden Menge Oxydationsmittel, sondern auch mit annähernd gleichen Überschüssen an Oxydationsmittel durchgeführt.

Sehr wesentlich für richtige Messungen ist, dass die Ausschläge des verwendeten Fluorometers proportional den gemessenen Aneurin-HCl-, bzw. Thiochrom-Konzentrationen sind, wovon man sich von Zeit zu Zeit an Hand einer Test-Verdünnungsreihe überzeugt. Ist diese Proportionalität nicht vorhanden, so ist das Instrument zu eichen.

Die Apparatekorrekturen werden vorteilhaft kurvenmässig dargestellt, so dass die Analysenmessungen jeweils rasch und einfach an Hand der Eichkurve korrigiert werden können.

⁴⁾ Die Standardlösung wird zweckmässig wie folgt zusammengesetzt:

z. B. Standardlösung mit 2,5 γ Aneurin-HCl / 5 cm³

2,5 cm³ der *Vitamin B₁-Standardlösung II* werden im 50-cm³-Messkolben mit 33 cm³ Pufferlösung, bestehend aus:

25 cm³ 0,2 n-HCl (1)

+ 8 cm³ 2,5 molare Natriumacetatlösung (3) und mit

0,5 cm³ 10 %iger Claraselösung (4) oder 10 %iger Cysteinlösung versetzt und ad 50 cm³ mit Wasser aufgefüllt.

(Cysteinlösung gibt eher gleichmässigere Werte.)

Bei jeder Messung ist darauf zu achten, dass das Instrument mit dem Analysenleerwert, bzw. mit dem als Leerwert verwendeten Lösungsmittel genau Null anzeigt. Diese Null-Justierung ist in der Regel nach jeder Änderung der Empfindlichkeitseinstellung neu vorzunehmen.

VI. Beispiel

100 g Brot werden im Turmix-Apparat zerkleinert, auf 500 cm³ verdünnt und hiervon 2 mal je 125 cm³ Lösung, entsprechend je 25 g Einwage, zur Analyse verwendet. Zu einem dieser Ansätze werden 50 γ Aneurin-HCl (= 5 cm³ Standardlösung II) zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgt genau nach der Analysenvorschrift. Als Fluorometer wird das Lumetron verwendet.

Messung: Nach Einstellung der Apparate-Empfindlichkeit so, dass mit der Lösung d' der Ausschlag D' = 100 erhalten wird, kann der Apparat mit der Lösung d₀ des Versuchsleerwertes nicht mehr auf die Nullstellung gebracht werden. Der Apparat wird daher mit 25 cm³ reiner Isobutanol-Äthanol-Mischung (aus 5 cm³ Isobutanol + abs. Äthanol ad 25 cm³) als Leerwert auf Null gestellt und die Lösungen d', d und d₀ gemessen:

$$\begin{aligned} D' &= 100 \\ D &= 40 \\ D_0 &= 7 \end{aligned}$$

Auswertung: Nach Abzug des Leerwertes D₀ (= 7), der auf fluoreszierende, nicht Vitamin B₁-wirksame Verunreinigungen zurückzuführen ist, werden folgende Werte erhalten:

$$\begin{aligned} D' &= 100 - 7 = 93 \\ D &= 40 - 7 = 33 \end{aligned}$$

Hieraus errechnet sich der Aneurin-HCl-Gehalt in der untersuchten Probe von 25 g zu

$$\frac{50 \cdot 33}{93 - 33} = 27,5 \gamma$$

Aneuringehalt des Brotes = 27,5 · 4 = 110 γ /o.

2. Verfahren zur Reinigung und Anreicherung des Aneurin-HCl mit gärender Bäckerhefe

a) Prinzip

Gärende Bäckerhefe entzieht ihrer Nährlösung begierig Aneurin, welches im intermediären Stoffwechsel der Hefe, je nach der Menge des zur Verfügung stehenden Sauerstoffes, teils in Aneurin-Disulfid und teils in Aneurin-Pyrophosphorsäure (Cocarboxylase) und deren Disulfid übergeführt wird. Dabei werden andere Beimengungen wie z.B. Farbstoffe usw. nicht aufgenommen. 1—2 mg Aneurin-HCl in 1 oder mehreren Litern Flüssigkeit können auf 2 g

Hefe spielend quantitativ angereichert und nach Abscheidung, Auswaschen und Cytolysierung der Hefe (durch Aufkochen) sowie Reduktion der Disulfide (mit Cystein-HCl) in 25—50 cm³ wässriger Lösung, frei von störenden Verunreinigungen, zurückgewonnen werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt dann nach dem oben beschriebenen Thiochromverfahren.

b) Anwendbarkeit

Die Anwendbarkeit wird ausser durch Verbindungen, welche die Gärung hemmen, durch nichts beschränkt. Das Verfahren wurde auf die beim Thiochromverfahren beschriebenen Nahrungsmittel angewandt und eignet sich ganz besonders für schwierig aufzuarbeitende farbstoff- und stark zuckerhaltige Produkte, sowie für stark verdünnte Lösungen von Vitamin B₁.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Die untere Erfassbarkeit wird durch die Genauigkeit des Bestimmungsverfahrens begrenzt. Diese ist zum Teil abhängig vom Aneurinleerwert der Hefe und von der Menge des vergorenen Untersuchungsmaterials. Bei einem durchschnittlichen Aneurinleerwert der verwendeten Bäckerhefe von 2,5—10 γ /g und unter Einhaltung der gegebenen Versuchsbedingungen können noch etwa 0,5—2 γ Aneurin-HCl absolut erfasst werden.

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Das Vergärungsverfahren ist ausserordentlich pH-abhängig. Der optimale pH-Wert liegt bei 6, unterhalb pH 5,5 und oberhalb pH 6,3 verläuft die Aneurinaufnahme sehr mangelhaft. Ausserdem ist der Hefe eine Minimalmenge Kohlenhydrat zur Verfügung zu stellen. Gewisse Stickstoff- und Phosphorsäureverbindungen vermögen die Hefeaktivität günstig zu beeinflussen.

e) Apparate

Normale Laboratoriums-Glaswaren.

Erlenmeyer, weithalsig, 300 cm³ (ausnahmsweise 1000 cm³ oder noch mehr).

Glasrührer.

1 kleines, kräftiges Rührwerk.

1 grosses, automatisch regulierbares Wasserbad.

f) Reagenzien

1. *Traubenzucker, krist., rein.*
2. *Aufschlammung von Bäckerhefe: 50 g feuchte Bäckerhefe (Presshefe) werden 2 mal mit je ca. 100 cm³ Wasser angerührt, scharf abzentrifugiert und im Messkolben mit Wasser auf 250 cm³ aufgefüllt. (Die Aufschlammung ist im Kühlschrank 2—3 Tage haltbar.)*

3. *Kalilauge*, pro analysi, 30 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%).
4. *Salzsäure*, reinst, 0,2 normal.
5. *Natriumacetat*, rein, wasserfrei, 2,5 molare, wässrige Lösung = 205 g wasserfreie Substanz pro Liter.
6. *Cystein-HCl*, krist., 10 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%).
7. *Aufschlammung von cytolysierter Hefe*: 25 cm³ der Hefeaufschlammung (2) werden im Messkolben 1 Stunde mit 20 g Natriumchlorid unter öfterem Schütteln stehen gelassen, mit Wasser auf 50 cm³ aufgefüllt und vom überschüssigen Natriumchlorid abdekantiert. Die Lösung wird ohne Abzentrifugieren der Hefe verwendet. Sie ist täglich frisch herzustellen.

g) Vergärungsvorschrift; Methode

I. Die Einwage und Vorbereitung

des Untersuchungsmaterials erfolgt nach I der vorangehenden Vorschrift, mit dem einzigen Unterschied, dass die Lösungen a und a' nach der Clarasebehandlung und dem anschliessenden Natriumacetatzusatz noch mit Kalilauge und mit Hilfe von Lyphan-Indikatorpapier auf pH = 6—6,1 eingestellt und erst dann mit Wasser auf 250 cm³ aufgefüllt werden.

II. Vergärung

Je 100 cm³ der auf pH 6 — 6,1 eingestellten Lösungen b und b' (oder eine bekannte grössere, vielfache Menge hiervon) werden in einem weithalsigen 300-cm³-Erlenmeyer mit

2 g *Traubenzucker* (1) und

10 cm³ *Hefeaufschlammung* (2) versetzt und unter Rühren 2 Stunden bei 30° C vergoren. Nach Abzentrifugieren der Hefe und Abdekantieren des Gärgutes wird der Heferückstand 1mal mit

ca. 50 cm³ *Wasser* aufgerührt, abermals auszentrifugiert und vom Waschwasser abgetrennt. Der gewaschene Heferückstand wird mit

25 cm³ *HCl* (4) in einen 100-cm³-Erlenmeyer gespült,

0,5 cm³ *Cysteinlösung* (6) hinzugefügt und unter leichtem Schwenken 1 Minute zum beginnenden Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 30° C wird mit

2 cm³ *Natriumacetatlösung* (5) auf pH 4 eingestellt, dann mit

2 cm³ *cytolysierter Hefe* (7) und nach 15 Minuten Stehen bei 30° C mit weiteren

6 cm³ *Natriumacetatlösung* (5) versetzt,

ad 50 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt, gemischt, die Hefe abzentrifugiert und die wasserklaren Lösungen abdekantiert (= Lösung b₁ und b₁').

III. Bestimmung und Auswertung

Die Bestimmung des Vitamin B₁ erfolgt nach II und III der vorangehenden Vorschrift mit je 15 cm³ der Lösungen b₁ und b₁', sowie mit 15 cm³ Lösung eines weiteren Ansatzes, der zur Bestimmung des Hefeleeerwertes ohne Analysenmaterial angesetzt wurde. Dieser Ansatz tritt an Stelle des Versuchsleeerwertes d₀ und ist bei der Justierung des Fluorometers, bzw. bei der Auswertung der Analysenmessungen genau gleich zu berücksichtigen wie der Versuchsleeerwert.

Wird das direkte Bestimmungsverfahren gewählt, so werden zur Auswertung zweckmässig Vitamin B₁-Testlösungen verwendet, die anstatt 0,5 cm³ Clarase 0,5 cm³ einer 10 %igen Cysteinlösung (6) pro 50 cm³ Standard enthalten (siehe Abschnitt g, V der vorangehenden Vorschrift). Des weiteren ist bei der direkten Bestimmung zu beachten, dass nach der Vergärung, bei Einhaltung der gegebenen Vorschrift, mit 5 cm³ Lösung c) ¹/₁₀₀ der Einwage = 1 g Untersuchungsmaterial zur Messung gelangt.

Literatur

- D. J. Hennessy und L. R. Cerecedo: The determination of free and phosphorylated thiamin by a modified thiochrome assay. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 179 (1939).
- D. J. Hennessy: Chemical methods for the determination of vitamin B₁. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **13**, 216 (1941).
- R. T. Conner und G. J. Straub: Determination of thiamin by the thiochrome reaction. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **13**, 380 (1941).
- D. J. Hennessy: A standard thiochrome assay for the determination of thiamin in cereal products. *Cereal Chemist's Bull.* **2**, 2 (1942).
- J. S. Andrews und R. Nordgren: The application of the thiochrome method to the thiamin analysis of cereals and cereal products. *Cereal Chem.* **18**, 686 (1941).
- A. Hoffer, A. W. Alcock und W. F. Geddes: A rapid method for the determination of thiamin in wheat and flour. *Cereal Chem.* **20**, 717 (1943).
- R. Marcuse und T. Widhe: Determination of aneurin by the thiochrome method after its uptake by yeast. *Nature* **154**, 549 (1944).
- K. Myrbäck und J. Uallin: The State of vitamin B₁ in yeast. *Svensk Kem. Tidskr.* **56**, 296 (1944); *C. A.* **40**, 2864 (No. 10) (1946).
- Vitamin B₁ in pressed yeast. The respiration and fermentation of yeast. *Svensk Kem. Tidskr.* **56**, 400 (1944); *C. A.* **40**, 4106/7 (No. 14) (1946).
- An oxidized form of cocarboxylase. (Es handelt sich um Aneurin-disulfid-pyrophosphat und Cocarboxylase-disulfid.) *Svensk Kem. Tidskr.* **57**, 124 (1945); *C. A.* **40**, 4094 (No. 14) (1946).
- K. Schönberg und E. Sperber: Aneurin in Baker's yeast. *Svensk Kem. Tidskr.* **57**, 117 (1945); *C. A.* **40**, 4107 (No. 14) (1946).
- E. Sperber und S. Renvall: Über die Aneurinaufnahme durch Bäckerhefe. *Biochem. Z.* **310**, 160 (1941/42).
- E. Sperber: Aneurin und Bäckerhefe. *Biochem. Ztschr.* **313**, 62 (1942/43).

Die Bestimmung von Lactoflavin (Vitamin B₂) nach dem Lumiflavinverfahren

Verfahren von *P. B. Müller* und *H. Moor*

a) Prinzip

Das Untersuchungsmaterial wird in neutraler oder leicht saurer Lösung, wenn notwendig im Turmix-Apparat, zerkleinert und Stärkestoffe, Schleimstoffe und gegebenenfalls Phosphorsäureverbindungen des Lactoflavins nach kurzem Erhitzen im Wasserbad mit Clarase fermentativ gespalten. Nach Abscheidung der unlöslichen Anteile wird das Lactoflavin in alkalischer Lösung durch Belichtung in Lumiflavin übergeführt und nach Extraktion mit Chloroform, auf Grund der Fluoreszenz des Lumiflavins, im photoelektrischen Fluorometer bestimmt. Zur Erhöhung der Spezifität des Bestimmungsverfahrens werden fluoreszierende, nicht Vitamin B₂-wirksame Verbindungen durch Vorextraktion mit Chloroform weitgehend entfernt. Durch Auswertung der Untersuchungslösung an Hand eines genau gleich behandelten Ansatzes, dem aber eine bekannte Menge Vitamin B₂ von Anfang an zugesetzt worden ist, wird den Einflüssen Rechnung getragen, welche durch Verunreinigungen bedingt sind und welche sich bei der Belichtung, vor allem zufolge der Eigenfärbung der Lösung, in wechselnder und unübersichtlicher Weise auswirken.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Lactoflavin in Mehlen, Mais, Hafer, Reis, Teigwaren, Brot, Zwieback, Biscuits, Milchprodukten, Schokolade, sowie in angereicherten diätetischen und pharmazeutischen Präparaten.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Unter den Bedingungen der gegebenen Vorschrift ist mit einer Streuung der Ergebnisse von $\pm 10 - 15 \%$, bzw. bei kleinen Vitamin B₂-Gehalten von $\pm 0,1 - 0,2 \gamma$ der effektiv (absolut) gemessenen Menge zu rechnen.

Die untere Erfassungsgrenze des beschriebenen Bestimmungsverfahrens liegt bei ca. 25 γ /o Lactoflavin.

Die durchschnittlichen Vitamin B₂-Gehalte einiger Nahrungsmittel sind:

Halb-Weissmehl	70—100 γ /o
Schwarzbrot	60—150 γ /o
Reis je nach dem Grad der Polierung	50—300 γ /o
Polierter Reis	20— 40 γ /o

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Die zu berücksichtigenden Einzelheiten werden bei der Besprechung der Feinheiten des Bestimmungsverfahrens weiter unten beschrieben.

e) Apparate

Siehe Vitamin B₁-Bestimmungsverfahren.

Philipps «Philora»-Lampe (75 Watt, Typ: HP 300) mit Drosselspule.

f) Reagenzien

1. *Octylalkohol*, rein, destilliert.
2. *Clarase*, 10 0/0ige wässrige Lösung (vgl. Vitamin B₁-Bestimmungsverfahren, Abschnitt f).
3. *Essigsäure*, rein (Eisessig).
4. *Chloroform*, Ph. Helv. V, durch Ausschütteln mit aktiver Kohle und anschließende Filtration und Destillation fluoreszenzfrei gemacht.
5. *Kalilauge*, pro analysi, 30 0/0ige wässrige Lösung (Gew.Vol.0/0).
6. *Äthanol abs.*, Ph. Helv. V, wie 4. fluoreszenzfrei gemacht.
7. *Lactoflavin-* (= Vitamin B₂-) Standard.

Kristallisiertes, käufliches Lactoflavin (erhältlich bei der Firma F. Hoffmann - La Roche & Co. AG., Basel) wird bei 60° C im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet und damit eine 5 mg⁰/0ige, leicht essigsäure, wässrige *Standardlösung I* bereitgestellt (1 cm³ = 50 γ Vitamin B₂). Hiezu wird das kristallisierte Lactoflavin vorteilhaft zuerst mit 5 cm³ 0,1n-NaOH gelöst und mit Wasser quantitativ in einen im voraus mit 0,1 cm³ Eisessig und etwa 50 cm³ Wasser beschickten 100-cm³Messkolben gespült. Die Lösung ist im Dunkeln und im Kühlschrank mehrere Tage haltbar.

Standardlösung II: Standardlösung I 1:10 mit Wasser verdünnt (1 cm³ = 5 γ Vitamin B₂).

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. *Einwage und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials*

- 100 g *Untersuchungsmaterial* ⁵⁾ werden im Turmix-Apparat unter Zusatz von
- 300 cm³ *Wasser* während 3 Minuten zerkleinert und im Messkolben
- ad 500 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt. Schaum wird durch Zusatz von einigen Tropfen *Octylalkohol* (1) vor dem Auffüllen zur Marke zerstört (Lösung a).
- Nun werden
- 2 × 125 cm³ *Lösung a* (= je 25 g Untersuchungsmaterial) in zwei 250-cm³-Messkolben gegeben und dem einen Ansatz (a') eine bekannte,

⁵⁾ Cerealien, Mehl, Brot, Zwieback usw. Von Vitamin B₂-reichen oder angereicherten Produkten kann entsprechend weniger genommen oder eine kleine, fein verriebene Menge direkt im 250-cm³-Messkolben mit 125 cm³ Wasser wie Lösung a) aufgearbeitet werden.

Ist eine Entfettung des Untersuchungsmaterials notwendig, so wird das eingewogene, fein verriebene Untersuchungsmaterial direkt oder nach dem Trocknen im Trockenschrank, bzw. nach Verreiben und Trocknen mit Natriumsulfat, mit peroxydfreiem Äther extrahiert und vor der Aufarbeitung im Vakuum vom Äther befreit und nachgetrocknet.

dem erwarteten Gehalt von 25 g Analysenmaterial ungefähr entsprechende Menge Lactoflavin aus der Standardlösung I oder II (siehe Abschnitt f) zugesetzt. Beide Ansätze (a und a') werden nun gleichzeitig nach der folgenden Vorschrift aufgearbeitet.

Jeder der beiden Ansätze wird im Messkolben 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, auf 50° C gekühlt, mit

- 5 cm³ *Claraselösung* (2) versetzt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach weiterem Abkühlen auf 20—25° C wird mit
- 0,5 cm³ *Eisessig* (3) leicht angesäuert (pH 4—5),
- ad 250 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt und gut gemischt (Lösungen b und b').

II. *Lumiflavintest des Untersuchungsmaterials*

Je 60 cm³ *Lösung b und b'* werden ohne vorangehende Abscheidung der unlöslichen festen Anteile mit

40 cm³ *Chloroform* (4) 1 Minute geschüttelt, zur Phasentrennung zentrifugiert und

40 cm³ der nun klaren, *wässerigen Phase*

ad 50 cm³ mit *Kalilauge* (5) aufgefüllt, abermals zentrifugiert und vom Bodensatz abdekantiert (= Lösungen c und c');

je 2×10 cm³ *Lösung c und c'* werden in 4 gleiche Kristallisierschalen mit flachem Boden und 5 cm Durchmesser pipettiert.

Unter Berücksichtigung der unten beschriebenen Feinheiten des Verfahrens werden die 4 Lösungen gleichzeitig und zweckmässig unter Vorschalten einer 1—2 cm hohen Wasserschicht⁶⁾ 5 Minuten mit einer 75 Watt Philipps «Philora»-Lampe (HP 300) aus 20 cm Entfernung belichtet. Die belichteten Lösungen werden in 4 Zentrifugengläser mit Schliffstopfen gegeben und die Glaschalen je mit

ca. 2 cm³ *Wasser* nachgespült. Nach dem Ansäuern mit

2 cm³ *Eisessig* (3) wird 10 Sekunden mit

je 12,5 cm³ *Chloroform* (4) geschüttelt und zentrifugiert.

10 cm³ des *Chloroformextraktes* werden

ad 25 cm³ mit *abs. Athanol* (6) aufgefüllt und gemessen (Lösungen d und d' je im Doppel).

III. *Messung und Auswertung*

Die Messung der Lösungen d und d' erfolgt im photoelektrischen Fluorometer auf genau dieselbe Weise wie beim Vitamin B₁ (siehe dort). An Stelle des Versuchsleerwertes wird hier aber immer das reine Lösungsmittel zur Nulljustierung des Fluorometers verwendet.

⁶⁾ Zur Absorption der Wärmestrahlung.

Für die Auswertung der Messungen gilt die beim Vitamin B₁ gegebene Formel:

$$\frac{X \cdot D}{D' - D}$$

= Lactoflavingehalt von 25 g des untersuchten Analysenmaterials oder

$$\frac{4 \cdot X \cdot D}{D' - D} = \gamma^0/0 \text{ Lactoflavin,}$$

wenn X in Gamma eingesetzt wird (siehe Vitamin B₁-Bestimmungsmethode, Abschnitt g, IV).

IV. *Feinheiten des Bestimmungsverfahrens*

Lactoflavin wird je nach dem pH der Lösungen von den verschiedensten Stoffen mehr oder weniger gut adsorbiert. Es ist daher stets darauf zu achten, dass durch die Abtrennung von unlöslichen und festen Anteilen kein Lactoflavin verloren geht. Dies trifft vor allem in Gegenwart von Eiweisstoffen zu, welche bei der Erwärmung der leicht sauren Lösung ausfallen. Durch Erwärmen oder Aufkochen von Vitamin B₂-Lösungen vor dem Ansäuern und durch Ausschütteln der angesäuerten Versuchslösungen mit Chloroform, vor dem Abtrennen der ungelösten, festen Anteile, kann diesem Nachteil weitgehend begegnet werden. In den seltenen Fällen, wo Lactoflavin nur unvollständig in Lösung geht, was durch zu niedrige Werte und eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erkannt werden kann, empfiehlt es sich, den wässrigen Extraktlösungen (a) vor dem Erhitzen ca. 5 % Nicotylamid zuzusetzen. Dieses ist für Lactoflavin ein guter Lösungsvermittler.

Da Lactoflavin bei der Belichtung relativ leicht in Lumiflavin oder Lumichrom übergeführt wird, sind Lösungen mit Vitamin B₂ vor hellem Tageslicht und vor allem vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

Die Ausbeute an Lumiflavin bei der Belichtung des Lactoflavins ist stark abhängig von der Temperatur der bestrahlten Lösung, von der Belichtungsdauer und der Belichtungsintensität, sowie von der Eigenfärbung des Extraktes. Höhere Temperaturen geben grössere Ausbeuten an Lumiflavin. Das Belichtungsverfahren führt nur dann zu brauchbaren Ergebnissen, wenn eine genügende Menge Licht eingestrahlt wird. Bei der Belichtung überschneiden sich aber verschiedene Vorgänge: Ungenügende oder zu kurze Belichtung hat zu geringe Ausbeuten an Lumiflavin zur Folge; zu lange Belichtung führt zu Verlusten an Lumiflavin oder an Lactoflavin; Farbstoffe haben Filterwirkung, indem sie mehr oder weniger des eingestrahnten Lichtes absorbieren.

Durch Verwendung einer Lichtquelle mit wenig Wärmestrahlung (Quecksilberdampfampe), durch Absorption der restlichen Wärmestrahlung mittels eines vorgeschalteten Wasserfilters und durch Klärung von trüben Lösungen vor

der Belichtung durch scharfes Auszentrifugieren, kann die Belichtung weitgehend standardisiert werden. Unumgehbare und unkontrollierbare Einflüsse von Begleitstoffen werden dadurch berücksichtigt, dass man die Analysenansätze an Hand von genau gleich behandelten Zusatzversuchen auswertet.

Betreffend die Kontrolle und gegebenenfalls die Eichung des Fluorometers, sowie dessen richtige Einstellung und Justierung bei der analytischen Messung, kann auf die beim Vitamin B₁-Bestimmungsverfahren gemachten Ausführungen verwiesen werden (siehe Abschnitt g, IV, V und VI).

V. Beispiel

Da die Messung und Auswertung von Lactoflavin auf dieselbe Weise wie beim Vitamin B₁ erfolgt, kann auf das dort gegebene Beispiel (siehe Abschnitt g, VI) verwiesen werden.

Literatur

- J. S. Andrews*: Abstract, 30th Annual Meeting, Am. Assoc. Cereal Chem. (May, 1944). — *Cereal Chem.* **20**, 3 (1943). *Ibid.* **20**, 613 (1943).
- J. S. Andrews, H. M. Boyd und D. E. Terry*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **14**, 271 (1942).
- J. C. Bauernfeind, A. L. Sotier und C. S. Boruff*: *Ibid.* **14**, 666 (1942).
- R. T. Conner und G. J. Straub*: *Ibid.* **13**, 385 (1941).
- Daniel und Morris*: *Food Research* **9**, 312 (1944).
- P. Ellinger*: *Biochem. J.* **32**, 376 (1938).
- A. D. Emmett, O. D. Bird, R. A. Brown, G. Peacock und J. M. Vandenberg*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **13**, 219 (1941).
- A. Z. Hodson und L. C. Norris*: *J. Biol. Chem.* **131**, 621 (1939).
- W. S. Jones und W. G. Christiansen*: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **30**, 270 (1941).
- A. R. Kemmerer*: *J. Assoc. Official Agr. Chem.* **25**, 459 (1942).
- W. Koschara*: *Ber.* **67**, 761 (1934).
- G. McKinney und J. M. Sugihara*: *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1980 (1942).
- B. A. McLaren, S. Cover und P. B. Pearson*: *Arch. Biochem.* **4**, 1 (1944).
- L. C. Norris und J. C. Bauernfeind*: *Food Research* **5**, 521 (1940).
- W. J. Peterson, D. E. Brady und A. O. Shaw*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **15**, 634 (1943).
- H. R. Rosenberg*: *Chemistry and Physiology of the Vitamins*, p. 182, New York, Interscience Publishers, Inc. New York, N.Y. 1945.
- E. E. Snell und F. M. Strong*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **11**, 346 (1939).
- F. M. Strong und L. E. Carpenter*: *Ibid.* **14**, 909 (1942).
- M. Swaminathan*: *Indian J. Med. Research* **30**, 23 (1942).
- F. O. Van Duyne*: *J. Biol. Chem.* **139**, 207 (1941).

C. Die Bestimmung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid

Verfahren nach *H. Moor*

a) Prinzip

Das Untersuchungsmaterial wird in der Wärme mit methanolischer Kalilauge extrahiert, ein aliquoter Teil davon bei 100° C eingedampft und der stark alkalische Rückstand zwecks Verseifung des Nicotinsäureamids noch eine kurze Zeit bei 100° C stehen gelassen. Eiweißhaltige Lösungen werden zuvor durch Erhitzen in Gegenwart von CaCl_2 enteiwisst.

Die Eindampfrückstände werden dann mit Salzsäure aufgenommen und die Nicotinsäure zur Abtrennung von Verunreinigungen aus stark saurer Lösung an Fullererde adsorbiert. Nach Waschen des Fullererde-Adsorbates wird mit Natronlauge eluiert und das Eluat mit Bleihydroxyd, welches Farbstoffe, nicht aber die Nicotinsäure adsorbiert, weiter gereinigt und geklärt. Nach Abscheidung des Bleihydroxydniederschlags und solcher Verbindungen, welche bei leicht alkalischer Reaktion unlöslich sind, werden die gereinigten Lösungen leicht angesäuert, kurze Zeit mit Bromcyan in der Wärme stehen gelassen, auf Zimmertemperatur abgekühlt und der Leerwert der Lösungen bei 470 m μ bestimmt.

Dann wird das aus der Bromcyanbehandlung der Nicotinsäure hervorgegangene Reaktionsprodukt direkt in der Messküvette mit einem aromatischen Amin gekuppelt und der entstandene Farbstoff kolorimetrisch bestimmt.

Die Auswertung der Analysen erfolgt an Hand eines genau gleich behandelten Ansatzes, dem von Anfang an eine bekannte Menge Nicotinsäure zugesetzt worden ist.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Bestimmung der Nicotinsäure und des Nicotinsäureamids in Brot, Zwieback, Cerealien, Mehlen, Milch, Kondensmilch, sowie in diätetischen Produkten und pharmazeutischen Kombinationspräparaten.

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Die Genauigkeit des Verfahrens ist ± 10 — 15 %. Unter günstigen Bedingungen ist bei sehr kleinen Gehalten mit einer Streuung von ca. ± 50 γ % und mit einer unteren Erfassbarkeit von ca. 50—100 γ % Nicotinsäure zu rechnen.

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Die Extraktion, bzw. Lösung der Nicotinsäure mit Methanol verläuft nur quantitativ, wenn das Untersuchungsmaterial bei alkalischer Reaktion und in der Wärme ausgezogen wird.

Die Nicotinsäure wird in saurer Lösung von Eiweissniederschlägen mehr oder weniger stark adsorbiert und könnte so, bei ungeeigneter Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials, zum Teil verloren gehen. Die Adsorption der Nicotinsäure an Fullererde verläuft dagegen nur quantitativ, wenn für stark saure Reaktion gesorgt wird.

e) Apparate

Normale Laboratoriums-Glasgeräte.

Zentrifuge.

Wasserbad oder Dampfbad.

Kolorimeter mit Filter (Filterschwerpunkt 470 m μ).

f) Reagenzien

1. Standardlösung.

I. *Nicotinsäure-Standard; 100 γ/cm^3 .*

10 mg im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknete Nicotinsäure ¹⁾ werden ad 100 cm³ in 0,2 n-Schwefelsäure gelöst.

II. *Nicotinsäureamid-Standard; 100 γ/cm^3 .*

Herstellung wie Standardlösung I aus zur Gewichtskonstanz getrocknetem Nicotinsäureamid.

2. *Kalilauge, 30 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%)*.
3. *Methanol, rein, destilliert.*
4. *Methanolische Kalilauge, hergestellt durch Mischen von 10 cm³ KOH (2) mit 100 cm³ Methanol (3).*
5. *Calciumchloridlösung, 20 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%)*.
6. *Salzsäure, rein, 3 n.*
7. *Fullererde.*
8. *Schwefelsäure, rein, 0,2 n.*
9. *Natronlauge, 0,76 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%)*.
10. *Bleinitrat, fest, pulverförmig, rein.*
11. *Phenolphthalein, 1 %ige äthanolische Lösung (Gew.Vol.%)*.
12. *Tertiäres Kaliumphosphat (K₃PO₄), rein, kalt gesättigte, wässrige Lösung.*
13. *Phosphorsäure, rein (Ph. Helv. V), 5 %ige wässrige Lösung (Gew.Vol.%)*.
14. *Lyphan-Indikatorpapier, Bereich: pH 4—5.*
15. *Primäres Kaliumphosphat (KH₂PO₄) rein, 10 %ige wässrige Lösung (Gew. Vol.%)*.
16. *Bromcyanlösung.*
Ca. 100 cm³ Wasser werden in Eis/Wasser-Mischung gekühlt und mehrere Male bis zur Sättigung mit Brom geschüttelt. Nach dem Absitzen des überschüssigen Broms wird das Bromwasser abdekantiert und unter Kühlung tropfenweise mit einer 10 %igen, wässrigen Natriumcyanidlösung versetzt,

¹⁾ Erhältlich bei der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

bis die Lösung gerade eben vollständig aufhellt. Ein Überschuss an Natriumcyanid ist unbedingt zu vermeiden. Die Bromcyanlösung wird unter gutem Verschluss im Dunkeln kühl gelagert. (Vorsicht, sehr giftig!)

17. *Salzsäure*, rein, 1n.

18. *Procain-HCl-Lösung* ²⁾).

10 g Procain-HCl (p-Aminobenzoyl-diäthylaminoäthanol-HCl) werden mit HCl (17) im Messkolben ad 100 cm³ gelöst.

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. *Einwage und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials*

a) *Feste Produkte*

Das Untersuchungsmaterial wird im Vakuum über P₂O₅ oder im Trockenschrank bei ca. 100° C getrocknet und gemahlen. Stark fetthaltige Produkte werden mit peroxydfreiem Äther extrahiert und im Vakuum getrocknet.

2 × 10 g des *getrockneten und gemahlenen Untersuchungsmaterials* werden in zwei 100-cm³-Messkölbchen gegeben und dem einen Ansatz (a') eine der Einwage von 10 g ungefähr entsprechende Menge Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid aus der *Standardlösung I oder II (1)* (siehe Abschnitt f) zugesetzt. Die beiden Ansätze (a und a') werden nun genau gleich nach der folgenden Vorschrift aufgearbeitet. Beide Proben werden mit

je 50 cm³ *methanolischer Kalilauge (4)* versetzt, unter öfterem Schütteln im Wasserbad von 75° C während 15 Minuten zum leichten Sieden des Methanols erwärmt, auf Zimmertemperatur ³⁾ abgekühlt,

ad 100 cm³ mit *Methanol (3)* zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert.

Je 20 cm³ *Filtrat von a und a'* werden in kleinen Glasschalen auf dem Wasserbad zur Sirupkonsistenz oder zur Trockne eingedampft und die Eindampfrückstände noch 10 Minuten bei ca. 100° C stehen gelassen (Eindampfrückstand a und a').

b) *Eiweissfreie Lösungen*

2 × 20 cm³ der *eiweissfreien Untersuchungslösung* werden in je eine Glasschale gegeben und dem einen Ansatz (a'), wie oben, eine der Einwage von 20 cm³ ungefähr entsprechende Menge Nicotinsäure zugesetzt. Beide Versuchsansätze werden, wenn nötig, mit *Kalilauge (2)* neutralisiert, dann mit

2 cm³ *Kalilauge (2)* im Überschuss versetzt und die Lösungen auf dem Wasserbad zur Sirupkonsistenz eingedampft (Eindampfrückstand a und a').

²⁾ Erhältlich bei der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

³⁾ In Gegenwart von geringen Mengen Fett oder Wachs werden die Lösungen auf 0° C gekühlt und bei 0° C filtriert.

c) Eiweißhaltige Lösungen

- 2 × 90 cm³ der *eiweißhaltigen Untersuchungslösung* werden in zwei 100-cm³-Messkolben gegeben und auf pH 6—7 eingestellt. Dem Ansatz (a') wird, wie oben, eine der eingemessenen Probe von 90 cm³ ungefähr entsprechende Menge Nicotinsäure zugesetzt. Nach Zugabe von
- je 5 cm³ *Calciumchloridlösung* (5) wird 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, abkühlen gelassen,
- ad 100 cm³ mit *Wasser* ergänzt, gemischt und filtriert.
- Je 20 cm³ *Filtrat a und a'* werden in kleine Glasschalen gegeben, mit 2 cm³ *Kalilauge* (2) versetzt und wie oben auf dem Wasserbad eingedampft (Eindampfrückstand a und a').

II. Reinigung des Untersuchungsmaterials

- Die *Eindampfrückstände a und a'* werden mit
- je 10 cm³ *Salzsäure* (6), gegebenenfalls durch leichtes Erwärmen gelöst, in je ein mit
- 1 g *Fullererde* (7) beschicktes Zentrifugenglas gegeben, die Glasschalen mit weiteren
- 10 cm³ *Salzsäure* (6) nachgespült, die vereinigten Lösungen mit der Fullererde 1 Minute geschüttelt, die Fullererde mit der adsorbierten Nicotinsäure 2—3 Minuten abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Zur Reinigung wird die Fullererde mit
- 20 cm³ *Schwefelsäure* (8) kurz geschüttelt, wieder abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Dann wird mit
- 20 cm³ *Natronlauge* (9) eluiert, 1 Minute kräftig geschüttelt, zentrifugiert, die überstehende, nicotinsäurehaltige Lösung in ein weiteres, im voraus mit
- 0,65 g *Bleinitrat* (10) beschicktes Zentrifugenglas abdekantiert und zur Befreiung von störenden Farbstoffen mit dem gebildeten Pb(OH)₂-Niederschlag kurz geschüttelt. Nach Abzentrifugieren des Bleihydroxyds wird die klare, nicotinsäurehaltige Lösung in ein drittes Zentrifugenglas abdekantiert, mit
- 1 Tropfen *Phenolphthalein* (11) versetzt und tropfenweise mit *tertiärem Kaliumphosphat* (12) bis zur bleibenden Rosafärbung leicht alkalisch gemacht. Der gebildete Niederschlag wird abzentrifugiert, die überstehende, nicotinsäurehaltige Lösung in ein Becherglas abdekantiert und tropfenweise mit *Phosphorsäure* (13) genau auf pH 4,5 eingestellt. Prüfung mit *Indikatorpapier* (14) (Lösungen b und b').

III. Farbreaktion und Messung

- Je 10 cm³ Lösung *b* und *b'* werden in ein 25-cm³-Messkölbchen gegeben,
1 cm³ primäres Kaliumphosphat (15) und
2 cm³ Bromcyanlösung (16) zugesetzt und
ad 25 cm³ mit Wasser aufgefüllt. Beide Proben werden nun gleichzeitig
genau 10 Minuten im Wasserbad von 75—80° C erwärmt und
durch Einstellen in kaltes Wasser wieder auf Zimmertemperatur
abgekühlt (Lösungen *c* und *c'*). Von den Lösungen *c* und *c'* wird
eine gleich grosse Menge in je eine 5-cm-Messküvette gegeben
und pro 25 cm³ Lösung
je 1 cm³ Salzsäure (17)⁴⁾ zugesetzt. Nach 1 Minute Stehen wird der Blind-
wert C₀ bzw. C_{0'} der Lösungen bei 470 mμ bestimmt und nach
Zugabe von
je 1 cm³ Procain-HCl-Lösung (18)⁴⁾ (pro 25 cm³ Reaktionsgemisch) und
weiteren 15 Sekunden Stehen wird die Gesamttextinktion C_g und
C_{g'} der Lösungen bei 470 mμ gemessen.

IV. Auswertung

Die Berechnung des Nicotinsäuregehaltes erfolgt im Vergleich mit dem Zusatzversuch auf Grund der auf die Nicotinsäure zurückzuführenden Extinktionszunahme:

$$\begin{aligned}\Delta C &= C_g - C_0 \quad \text{und} \\ \Delta C' &= C_{g'} - C_0'\end{aligned}$$

analog wie bei der Vitamin B₁- und B₂-Bestimmung nach der Formel:

$$\frac{X \cdot \Delta C}{\Delta C' - \Delta C} = \gamma \text{ Nicotinsäure in der bestimmten Probe von } Y \text{ g Einwage } ^5).$$

Nicotinsäuregehalt des Analysenmaterials:

$$\frac{100 \cdot X^6) \cdot \Delta C}{Y^5) \cdot (\Delta C' - \Delta C)} = \gamma^0/0 \text{ Nicotinsäure}$$

⁴⁾ Diese Lösung wird zweckmässig in ziemlich scharfem Strahl zugegeben (Pipette ausblasen), so dass gleichzeitig gute Mischung eintritt.

⁵⁾ Einwage (Y) in g oder in cm³. Das ist in der gegebenen Vorschrift

bei I a = 10 g
bei I b = 20 cm³
bei I c = 90 cm³ } Untersuchungsmaterial.

⁶⁾ X = Nicotinsäurezusatz zur Vergleichsprobe in γ.

V. Beispiel

10 g trockenes, gemahlenes Untersuchungsmaterial werden nach der Vorschrift Ia, II, III und IV aufgearbeitet und der Vergleichsprobe von 10 g Einwage ein Zusatz von 100 γ Nicotinsäure gemacht.

Messungen:

$$\begin{aligned}C_o &= 0,12; & \text{Einwage: } Y &= 10 \text{ g} \\C_o' &= 0,12; & \text{Zusatz: } X &= 100 \gamma \text{ Nicotinsäure} \\C_g &= 0,52 \\C_g' &= 0,97\end{aligned}$$

Berechnung:

$$\begin{aligned}\Delta C &= C_g - C_o = 0,52 - 0,12 = 0,40 \\ \Delta C' &= C_g' - C_o' = 0,97 - 0,12 = 0,85\end{aligned}$$

Nicotinsäuregehalt in der bestimmten Probe von 10 g:

$$\frac{X \cdot \Delta C}{\Delta C' - \Delta C} = \frac{100 \cdot 0,40}{0,85 - 0,40} = \frac{40}{0,45} = 89 \gamma$$

Nicotinsäuregehalt des Untersuchungsmaterials:

$$\frac{100 \cdot X \cdot \Delta C}{Y \cdot (\Delta C' - \Delta C)} = \frac{100 \cdot 100 \cdot 0,40}{10 (0,85 - 0,40)} = \frac{4000}{4,5} = 890 \gamma\%$$

Literatur

- E. Bandier* (transl. by Dr. P. G. Lund): On nicotinic acid — Especially methods for its quantitative estimation in organic material — Monograph. Ejnar Munksgaard — Copenhagen Denmark (1940).
- E. Bandier* und *J. Hald*: A colorimetric reaction for the quantitative estimation of nicotinic acid. *Biochem. J.* **33**, 264 (1939).
- E. Bandier*: Quantitative estimation of nicotinic acid in biological material. *Biochem. J.* **33**, 1130 (1939).
- D. Melnick*: Collaborative study of the applicability of microbiological and chemical methods to the determination of niacin (nicotinic acid) in cereal products. *Cereal chemistry* **19**, No. 5, 553 (1942).
- D. Melnick*, *B. L. Oser* und *L. Siegel*: Chemical determination of nicotinic acid content of flour and bread. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **13**, 879 (1941).
- A. Arnold*, *C. B. Schreffler* und *S. T. Lipsius*: Chemical determination of nicotinic acid. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **13** 62 (1941).
- P. Karrer* und *H. Keller*: Bestimmung von Nicotinsäure-amid in tierischen Organen. *Helv. Chim. Acta* **22**, 1292 (1939).

D. Die Bestimmung von Ascorbinsäure (Vitamin C)

Verfahren nach *P. B. Müller*

a) Prinzip

Das Untersuchungsmaterial wird in stark saurer Lösung zerkleinert und extrahiert. In einem aliquoten Teil des Extraktes werden die vorgebildete Ascorbinsäure A und die unspezifisch reduzierenden Stoffe RS bestimmt. In einem anderen aliquoten Teil des Extraktes werden die reduzierenden Gruppen der Ascorbinsäure mit Formaldehyd verschlossen oder die Ascorbinsäure mit Ascorbinsäureoxydase oxydiert und die verbleibenden unspezifischen Reduktionsstoffe RS gesondert bestimmt. $(A+RS)-RS$ ergibt dann die vorgebildete Ascorbinsäure A.

Ein weiterer Teil des Extraktes wird mit H_2S gesättigt, wodurch vorgebildete Dehydroascorbinsäure D zu Ascorbinsäure reduziert wird. Nach dem Austreiben des Schwefelwasserstoffes wird in einem aliquoten Teil des behandelten Extraktes die Gesamtascorbinsäure $A+D$ und unspezifisch reduzierende Stoffe RS' bestimmt. In einem weiteren aliquoten Teil des behandelten Extraktes werden wie oben die unspezifischen reduzierenden Stoffe RS' gesondert ermittelt.

$(A+RS)-RS$ ergibt die vorgebildete Ascorbinsäure A,
 $(A+D+RS')-RS'$ ergibt die Gesamtascorbinsäure $A+D$, und
 $(A+D)-A$ ergibt dann die vorgebildete Dehydroascorbinsäure D.

Im Folgenden wird der Einfachheit halber nur noch von Ascorbinsäure (A), Dehydroascorbinsäure (D) und Gesamtascorbinsäure ($A+D$) gesprochen, wobei unter Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure jeweils die vorgebildeten Produkte gemeint sind.

b) Anwendbarkeit

Das Verfahren eignet sich zur Untersuchung von frischem und gelagertem Obst und Gemüse, von Konservenprodukten, Gefrierkonserven, Obst- und Gemüsesäften und Konzentraten usw. Bei der Untersuchung von Produkten, welche in der Hitze getrocknet wurden oder welche eine Überhitzung durchgemacht haben, wird das Verfahren bisweilen durch unspezifisch reduzierende Stoffe gestört, die von Dichlorphenol-indophenol fast gleich gut oxydiert werden wie Ascorbinsäure und ähnlich wie diese, auch auf die Formaldehyd- und Ascorbinsäureoxydasebehandlung ansprechen (siehe unten).

c) Genauigkeit und Erfassbarkeit

Die Genauigkeit der Ergebnisse kann mit $\pm 10\%$ und bei sehr kleinen Gehalten mit $\pm 1\text{ mg}^0/\%$ in Rechnung gesetzt werden.

Die untere Erfassungsgrenze des Bestimmungsverfahrens liegt bei absolut etwa 25 γ Ascorbinsäure, entsprechend ca. 1 mg Ascorbinsäure/100 g Untersuchungsmaterial.

d) Wichtige, zu berücksichtigende Einzelheiten

Frisches Obst und Gemüse enthält häufig Oxydationsfermente, welche die Ascorbinsäure fast momentan oxydieren, wenn sie bei der Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials in mässig saurem Milieu aus dem Zellverband in Freiheit gesetzt werden. Die Aktivität dieser Fermente kann ohne Hitze oder chemische Einwirkung häufig nur in stark saurem Milieu ausgeschaltet werden. In Konservenprodukten sind die Oxydationsfermente zufolge der Hitzebehandlung inaktiviert. Das gilt in der Regel auch für Tiefkühlprodukte, welche zur Inaktivierung der Fermente zuvor einen Blanchierprozess durchmachen.

Bei starker Erhitzung von stärke- oder zuckerhaltigen Produkten entstehen bisweilen durch Karamellisierungsprozesse Verbindungen — wie Reducton, Reductinsäure —, die in frischen Produkten und in gewöhnlichen Konserven und Gefrierkonserven normalerweise nicht vorkommen und ganz ähnliche Reduktionseigenschaften aufweisen wie Ascorbinsäure. Solche Verbindungen sind oft nur durch umständliche, zeitraubende Verfahren, bei denen die Oxydationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Konzentration gemessen werden, von Ascorbinsäure zu unterscheiden (siehe Lit. 6). Da ein Teil dieser Verbindungen von Dichlorphenol-indophenol aber doch etwas weniger rasch oxydiert wird als Ascorbinsäure, ist es bisweilen möglich, noch hinreichend genau auszuwerten, wenn man dafür sorgt, dass die Oxydation der Ascorbinsäure sehr rasch verläuft und dass der Oxydationsprozess nach einer gewissen (kurzen) Zeit durch Extraktion des überschüssigen Dichlorphenol-indophenols mit Äther (Extraktionsverfahren) unterbrochen wird.

In frischen Produkten und in Konserven kommen bisweilen aber schwächer reduzierende Stoffe wie z.B. Kohlenhydrate, schwefelhaltige Verbindungen, Eiweiss- und Stärkestoffe, Aminosäuren usw. vor. Auch bei der Schwefelwasserstoffbehandlung der Extrakte entstehen manchmal reduzierende Verbindungen. Diese Verbindungen stören jedoch die Titration der Ascorbinsäure nicht, wenn nach dem oben erwähnten Extraktionsverfahren gearbeitet wird.

Stark gefärbte Lösungen, welche bei der direkten Titration keinen Umschlag erkennen lassen, werden ebenfalls nach dem Extraktionsverfahren bestimmt.

e) Apparate

Normales Laboratoriumsgerät.

Zentrifuge.

Zerkleinerungs- und Mischmaschine (z.B. Turmix-Apparat).

Entgasungsstutzen: bestehend aus gewöhnlichem *Saugstutzen* mit *aufgeschliffener, durchbohrter Glasplatte*. Durch die Bohrung der Glasplatte wird ein ausgezogenes *Kapillarrohr* (ähnlich wie zur Vakuumdestillation) mit *fein regulierbarem Glashahn* bis fast auf den Boden des Stutzens eingeführt. Zwischen dem Saugstutzen und der *Wasserstrahlpumpe* wird ein fein regulierbarer *Glashahn* zur Regulierung des Vakuums dazwischengeschaltet.

f) Reagenzien

1. *Salzsäure*, 1n, rein.
2. *Octylalkohol*, rein.
3. *CO₂-Gas* aus Stahlflasche.
4. *Eisessig*, rein.
5. *Natriumacetatlösung*, 20 ‰, aus 332 g Natriumacetat, rein, kristallisiert (mit 3 H₂O) ad 1000 cm³ H₂O.
6. *Calciumcarbonat*, pulverisiert, rein.
7. *0,2 ‰ige Dichlorphenol-indophenollösung*: 0,2 g Dichlorphenol-indophenol (erhältlich bei der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel) werden mit 100 cm³ siedendem Wasser gelöst, im Messkolben auf 1000 cm³ aufgefüllt und filtriert.
Zur Titerstellung werden 25 cm³ dest. Wasser mit 1 cm³ Eisessig angesäuert und mit 0,05 cm³ der 0,2 ‰igen Dichlorphenol-indophenollösung versetzt (Vergleichslösung). Nun werden 10 cm³ einer 0,1 ‰igen Ascorbinsäure-Testlösung (siehe unten) mit 1 cm³ Eisessig und 15 cm³ Wasser versetzt und mit der Dichlorphenol-indophenollösung so lange titriert, bis die Färbung der Vergleichslösung erreicht ist. Aus dem Ergebnis dieser Titration minus 0,05 cm³ errechnet sich der Faktor der Dichlorphenol-indophenollösung auf bekannte Weise. 1 cm³ entspricht ungefähr 0,1 mg Ascorbinsäure.
0,1 ‰ige Ascorbinsäure-Testlösung:
10 mg Ascorbinsäure «Roche» werden in ca. 50 cm³ dest. Wasser, das mit 1 cm³ Eisessig angesäuert wurde, gelöst und ad 100 cm³ verdünnt. Das Wasser ist in einer Glasapparatur zu destillieren und kurz vor Gebrauch noch einmal auszukochen. — Die Ascorbinsäure-Testlösung dient zur Titerstellung der Dichlorphenol-indophenollösung und ist jeweils kurz vor Gebrauch herzustellen. 10 cm³ = 1 mg Ascorbinsäure.
8. *Lyphan-Indikatorpapier* (pH-Bereich 4,5—6,0).
9. *Formaldehydlösung*, 35—40 ‰, rein (eventuell denaturiert).
10. *Schwefelwasserstoff-Gas*, hergestellt im Kipp'schen Apparat aus Schwefel-eisen und HCl (konz. HCl mit 1 Teil H₂O verdünnt).
11. *Bleiacetatpapier*: Filterpapier mit Bleiacetatlösung getränkt.

12. *Äther*. Reiner, destillierter Äthyläther wird so oft mit einer 2 %igen, wässrigen Lösung von Ferrosulfat geschüttelt, bis sich die wässrige Lösung nicht mehr gelb färbt (von Ferrisulfat). Anschliessend wird 3 mal mit Wasser ausgewaschen und vom Waschwasser abgetrennt. Der Äther wird nicht getrocknet. Die pro Tag benötigte Menge Äther wird täglich frisch mit Ferrosulfat gereinigt.

g) Bestimmungsvorschrift; Methode

I. *Zerkleinerung, Extraktion und Vorbereitung der Extrakte*

- 100 g *Untersuchungsmaterial* werden in einer Zerkleinerungs- und Mischmaschine mit
- 300 cm³ *HCl* (1) und
- 5 Tropfen *Octylalkohol* (2) versetzt, während 3 Minuten unter *CO₂* (3)-*Spülung* zerkleinert und zugleich extrahiert und im Messkolben
- ad 500 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt. Schaum wird vor dem Auffüllen zur Marke mit einigen Tropfen *Octylalkohol* (2) zerstört (Lösung I).
- 250 cm³ der gut gemischten *Lösung I* werden im 500-cm³-Messkolben mit
- 10 cm³ *Eisessig* (4) versetzt, die Salzsäure (150 cm³ 1n-HCl) mit einer aliquoten Menge =
- ca. 60 cm³ 20 %iger *Natriumacetatlösung* (5) bis zur leicht kongosauren Reaktion abgestumpft, das Reaktionsgemisch
- ad 500 cm³ mit *Wasser* aufgefüllt, unter öfterem Schwenken 5 Minuten stehen gelassen und die festen und unlöslichen Anteile auszentrifugiert oder abfiltriert (Lösung II).
- 150 cm³ *Lösung II* werden mit
- 4 Tropfen *Octylalkohol* (2) versetzt und unter ständigem Rühren durch portionenweises Zugeben von *festem Calciumcarbonat* (6) (bis zum Aufhören der *CO₂*-Entwicklung) auf pH 5,2—5,5 abgepuffert (Kontrolle mit Lyphan-Indikatorpapier) und filtriert (= Lösung III).

II. *Die Bestimmung der Ascorbinsäure A*

Die Bestimmung von A + RS

- 2 × 25 cm³ *Lösung II* (entsprechend je 2,5 g Einwage) werden direkt, wie unter IV beschrieben ist, mit Dichlorphenol-indophenol (7) titriert.

Die Bestimmung von RS

25 cm³ Lösung III werden mit

25 cm³ Formaldehyd (9)¹⁾ versetzt, 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann mit

2 cm³ Eisessig (4) angesäuert und nach IV titriert.

Ascorbinsäure $A = (A + RS) - RS$.

III. Die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure A+D und der Dehydroascorbinsäure D

100 cm³ Lösung III werden in einem 200-cm³-Erlenmeyer mit Schwefelwasserstoff (10) gesättigt²⁾, 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann im Vakuum und unter Spülung mit CO₂ wieder entgast³⁾ und mit Wasser auf 100 cm³ ergänzt (= Lösung IV). (Prüfung auf Abwesenheit von H₂S mit Bleiacetatpapier (11)).

Die Bestimmung von A+D+RS'

2×25 cm³ Lösung IV (entsprechend je 2,5 g Einwage) werden mit je 2 cm³ Eisessig (4) angesäuert und nach IV titriert.

Die Bestimmung von RS'

25 cm³ Lösung IV werden wie zur Bestimmung von RS aufgearbeitet.

Gesamtascorbinsäure $A + D = (A + D + RS') - RS'$.

Vorgebildete Dehydroascorbinsäure $D = (A + D) - A$.

¹⁾ Bei der Analyse von frischem Obst und Gemüse, von Konserven, Gefrierkonserven und Obstsaften werden mit Formaldehyd gute Werte erhalten. In speziellen Fällen kann das Verfahren aber durch Verwendung, an Stelle des Formaldehyds, von Ascorbinsäureoxydase-Lösung in Form des Pressaftes vom frischen (oder tiefgefrorenen) Gurken- oder Kürbisschalen noch spezifischer gestaltet werden. In der Regel genügen 1—2 cm³ Presssaft pro 25 mg^{0/0} A+RS (vgl. auch Lit. 1).

²⁾ Hierzu wird der Erlenmeyer mittels eines doppelt durchbohrten Gummistopfens, der ein Zu- und ein Ableitungsrohr trägt, verschlossen, kurz mit H₂S gespült und immer in Verbindung mit dem H₂S-Kippapparat, bei geschlossenem Ableitungsrohr, 1 Minute energisch geschüttelt. Nach Schliessung des Zuleitungsrohres wird der Erlenmeyer beiseite gestellt.

³⁾ Hierzu wird der Erlenmeyer in den «Entgasungsstutzen» (siehe unter e) gestellt, so dass das ausgezogene Kapillarrohr in die Lösung eintaucht und unter Spülung mit wenig CO₂ vorsichtig Vakuum angelegt, bis die Lösung kräftig, aber nicht übermässig siedet.

IV. Die Titration der Ascorbinsäure

Direktes Verfahren (für farblose und wenig gefärbte Lösungen):

Von den Extrakten zur Bestimmung von A+RS und A+D+RS' werden je $2 \times 25 \text{ cm}^3$ in zwei 100-cm^3 -Erlenmeyer gegeben und die eine Lösung so lange titriert, bis gegenüber der nicht titrierten Lösung bei Zugabe von $0,1 \text{ cm}^3$ Dichlorphenol-indophenollösung (7) eine deutliche Farbvertiefung nach Rot eben 10 Sekunden bestehen bleibt. Dann wird die andere Lösung in einem Male mit $0,5 \text{ cm}^3$ weniger Reagens titriert und, wenn notwendig, wie zuvor zur Farbtiefe des 1. Teiles mit je $0,1 \text{ cm}^3$ nachtitriert. Hat sich die 1. Lösung inzwischen entfärbt, so soll nun die 2. Lösung eine mindestens 10 Sekunden bestehende, leichte Farbvertiefung gegenüber der entfärbten Lösung erkennen lassen. Von den Extrakten zur Bestimmung der Leerwerte RS und RS' werden jeweils 25 cm^3 Lösung vorsichtig titriert.

Extraktionsverfahren (für komplizierte Verhältnisse und stark gefärbte Lösungen):

Die zu titrierende, essigsäure Lösung wird in einen Schütteltrichter gegeben, zur Entfernung von ätherlöslichen Farbstoffen 1—2 mal mit peroxydfreiem Äther (12) extrahiert⁴⁾ (der letzte Ätherauszug soll farblos sein), dann in einem Male mit der mutmasslichen Menge Dichlorphenol-indophenollösung (7) versetzt und sofort kurz, aber energisch geschwenkt. Sofort nach dem Umschwenken wird vorsichtig mit 20 cm^3 peroxydfreiem Äther überschichtet, die Versuchslösung damit zwischen der 10. und 20. Sekunde nach dem Reagenszusatz ausgeschüttelt und zur Phasentrennung stehen gelassen oder kurz zentrifugiert⁴⁾.

Bleibt der abgetrennte Äther farblos, so wurde die Titration nicht zu Ende geführt. In diesem Falle wird mit einer Pipette 1 cm^3 Dichlorphenol-indophenollösung (7) aufgenommen, die Pipette aussen abgerieben, rasch durch die Ätherschicht hindurchgestossen und der wässrigen Versuchslösung abermals in einem Male eine bekannte Menge Reagens zugefügt. Nach dem Schwenken wird wie zuvor zwischen der 10. und 20. Sekunde ausgeschüttelt. Dies wird, wenn notwendig, so oft wiederholt, bis sich der abgetrennte Äther vom extrahierten überschüssigen Dichlorphenol-indophenol rot färbt.

Die Ätherphase wird quantitativ abgetrennt⁴⁾, mit Äther ad 20 cm^3 ergänzt und der Überschuss an Dichlorphenol-indophenol im Vergleich mit einer Testverdünnungsreihe ermittelt.

Zur Herstellung der *Testverdünnungsreihe* werden in 6 genau gleichartige Reagensgläser mit Schliffstopfen $0,05$, $0,1$, $0,2$, $0,3$, $0,4$ und $0,5 \text{ cm}^3$ Dichlorphenol-indophenollösung gegeben, mit essigsäurem Wasser auf ca. 1 cm^3 ergänzt, genau 10 cm^3 Äther (12) hinzugefügt und kurz geschüttelt. Die erhaltenen Test-

⁴⁾ Ist die Trennung der Phasen schlecht, so kann sie durch Zugabe von etwas Äthanol oder durch kurzes Zentrifugieren beschleunigt werden.

verdünnungen entsprechen 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 cm³ Reagens pro 20 cm³ Äther. Die Reagensgläser werden zweckmässig vor einem durchscheinenden, weissen Schreibmaschinenpapier so in ein Reagensglasgestell eingesetzt, dass die Versuchslösung jeweils zwischen 2 Testgläser gestellt werden kann. Die einfache Vorrichtung wird von hinten beleuchtet (Tageslicht vom Fenster her oder künstliches Licht). Da der zwischen 2 Testwerten liegende Mittelwert noch sicher geschätzt werden kann, erfolgt die Titration auf 0,1 cm³ Reagens genau, entsprechend 10 γ Ascorbinsäure.

V. Berechnung der Analysen

Da 25 cm³ der zur Bestimmung verwendeten Lösungen II, III und IV jeweils 2,5 g Einwage und 1 cm³ der Dichlorphenol-indophenollösung = 0,1 mg Ascorbinsäure entsprechen, errechnet sich der Ascorbinsäuregehalt in mg⁰/₀ wie folgt:

$$\frac{X \cdot 100 \cdot 0,1}{2,5} = X \cdot 4 = \text{mg}^0/\text{o Ascorbinsäure } ^5).$$

VI. Beispiel

Einwage zur Zerkleinerung und Extraktion	=	100 g Untersuchungsmaterial/500 cm ³ (I)
Verdünnung von 250 cm ³ Lösung I auf 500 cm ³	=	50 g Untersuchungsmaterial/500 cm ³ (II)
Bestimmung mit je 25 cm ³ Lösung (II, III und IV)	=	2,5 g Untersuchungsmaterial/ 25 cm ³

Ascorbinsäure A:

A+RS	=	3,2 cm ³ Dichlorphenol-indophenol	
RS	=	0,2 cm ³ »	»
A	=	3,0 cm ³ »	= 3,0 · 4 = 12 mg ⁰ / ₀

Gesamtascorbinsäure A+D:

A+D+RS'	=	5,4 cm ³ Dichlorphenol-indophenol	
RS'	=	0,4 cm ³ »	»
A+D	=	5,0 cm ³ »	= 5,0 · 4 = 20 mg ⁰ / ₀

Dehydroascorbinsäure D:

D	=	(A+D)—A	=	8 mg ⁰ / ₀
---	---	---------	---	----------------------------------

⁵⁾ Für sehr genaue Auswertungen ist gegebenenfalls dem Trockenrückstand bei der Extraktion Rechnung zu tragen. Bei der gegebenen Vorschrift ist der darauf zurückzuführende maximale Fehler kleiner als 10 %.

Literatur

- 1) *P. B. Müller*: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene **36**, 189 (1945).
- 2) *Th. von Fellenberg*: Dieselbe Ztschr. **32**, 135 (1941); **33**, 212 (1942).
- 3) *P. B. Müller* und *Th. von Fellenberg*: Dieselbe Ztschr. **36**, 319 (1945).
- 4) *Fritz Gstirner*: Chemisch-physikalische Vitamin - Bestimmungsmethoden, Ferd. Enke-Verlag, Stuttgart, 1941.
- 5) *G. Lunde*: Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln, Verlag Springer, Berlin, 1943.
- 6) *W. Diemair* und *K. Zerban*: Biochem. Z. **316**, 189, 335 (1944).
- 7) *J. Tillmans*: Z. Unters. Lebensmittel **54**, 33 (1927).
- 8) *E. Martini* und *K. Bonsignore*: Biochem. Z. **273**, 170 (1934).
- 9) *M. Ott*: Vorratspflege und Lebensmittelforschung 1939, 10.
- 10) *L. J. Harris*, *L. W. Mapson* and *Y. L. Wang*: Biochem. J. **36**, 183 (1942).
E. Becker und *J. di Gleria*: Ztschr. f. Vitaminforschung **6**, 86 (1937).
- 11) *Th. Østerud*: Tekn. Ukebl. **86**, 216 (1939), C. **1939**, II, 1313.
- 12) *F. Bukatsch*: Ztschr. f. physiol. Chem. **262**, 20 (1939/40).
K. A. Evelyn, *H. T. Malloy* and *C. Rosen*: J. Biol. Chem. **126**, 645 (1938).
- 13) *M. Van Eekelen* und *A. Emmerie*: Biochem. J. **28**, 1153 (1934); **30**, 25 (1936).
Z. f. Vitaminforschung (mit *L. K. Wolf*) **6**, 150 (1937) **7**, 254 (1938).
- 14) *C. Krijt*: Arch. néerl. Physiol. Homme et Animaux, **26**, 457 (1942); C. **1943**, I, 2109.
- 15) *E. Günther*: Vitamine und Hormone **5**, 55 (1944).
- 16) *H. Tauber* und *I. S. Kleiner*: J. Biol. Chem. **110**, 559 (1935).
- 17) *C. Enders*: Biochem. Z. **314**, 389 (1943).
- 18) *A. Scheunert* und *J. Reschke*: Die Ernährung **7**, 115 (1942).
- 19) *L. F. Levy*: Nature **152**, 693 (1943).

Herrn Dr. *Max Kofler* danke ich für die wertvollen Anregungen bei der Ausarbeitung des Vitamin B₁- und des Vitamin B₂-Bestimmungsverfahrens und Herrn Dr. *Hans Waldmann* für die grosse Hilfe bei der Durchsicht der Korrekturabzüge.