

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 70 (1979)
Heft: 4

Artikel: Quantitative Bestimmung von a-Tocopherol in Lebens- und Futtermitteln, Vitaminvormischungen und Konzentraten
Autor: Manz, U. / Struchen, E. / Zell, R.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983732>

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>

Quantitative Bestimmung von α -Tocopherol in Lebens- und Futtermitteln, Vitaminvormischungen und Konzentraten

U. Manz, E. Struchen und R. Zell
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

Einleitung

Quantitative Bestimmung von Tocopherolen bzw. von Vitamin E in pharmazeutischen Produkten und Vitaminkonzentraten oder -vormischungen werden immer häufiger mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) (1—6) und mit der modernen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) (7—12) durchgeführt. Diese Methoden besitzen den Vorteil, ohne große Reinigungsschritte die aus den Produkten nach herkömmlicher Weise extrahierten Tocopherole einzeln zu erfassen und quantitativ zu bestimmen. Einer allgemeinen Anwendung dieser Methodik stehen jedoch hohe Investitionskosten nachteilig gegenüber. Unternehmen auf dem Futter- oder Lebensmittelsektor, die nicht spezifisch analytische Forschung betreiben, werden sich zur Zeit wohl kaum mit den notwendigen, kostspieligen Geräten ausrüsten, einerseits, weil diese hochempfindlichen Apparaturen in einer schnellen Entwicklungsphase stehen, und andererseits, weil noch keine ausgereiften und allgemein anerkannten GC- und HPLC-Methoden für die Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln erarbeitet worden sind.

Im folgenden wird eine relativ einfach durchzuführende und robuste Analysenmethode beschrieben, die nur die üblichen Laborutensilien benötigt und sich seit acht Jahren in unseren Laboratorien im Routinebetrieb bewährt hat.

Methodischer Teil

Reagenzien und Lösungen

(alle Reagenzien möglichst pro analysi-Qualität)

Ascorbinsäurelösung 0,5%ig (0,5 g reine, krist. Ascorbinsäure in 4 ml dest. Wasser warm lösen, mit 20 ml Aethanol versetzen und mit Methanol ad 100 ml verdünnen. Lösung jeden Tag frisch ansetzen.)

Kaliumhydroxid 50%ig (1 kg KOH-Plätzchen und 1 Liter dest. Wasser)

Diäthyläther, peroxidfrei (Prüfung auf Peroxide: Mit Merckoquant Aetherperoxidstäbchen oder 5 ml Aether und 2 ml Vanadinsulfatlösung — 0,2 g

Ammoniumvanadat in 4 ml konz. Schwefelsäure lösen und zu 100 ml Wasser geben — gut schütteln: Anwesenheit von Peroxiden bei Braun- bis Rotfärbung.)

Natriumsulfat, wasserfrei

Petroleumbenzin (50—75 °C) (Merck)

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254, Schichtdicke 0,25 mm, 20 x 20 cm (Merck)

Chloroform, mit 1% Aethanol stabilisiert

α , α' -Bipyridyllösung 0,25% in Aethanol

Eisen(III)-chloridlösung 0,1% in Aethanol

Iso-Octan reinst, getrocknet durch eine Aluminiumoxidsäule (Esso)

Aethanol abs.

Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (Merck)

Benzol

Aluminiumoxid neutral, Akt. Stufe I (Camag)

Schwefelsäure 80% (v/v)

dl- α -Tocopherol (reinst)

a) für DC-Referenzlösung (100 mg dl- α -Tocopherol in 25 ml Petroleumbenzin).

Im Kühlschrank gelagert bis 3 Monate verwendbar.

b) für Recovery-Versuche (Einwaage z. B. ca. 50 mg α -Tocopherol ad 50 ml (Aethanol), 5 ml ad 100 ml, davon 2 bis 7 ml (100—350 μ g) verseifen, extrahieren usw., 50—175 μ g auf DC-Platte, Farbreaktion, Eichkurve (Abb. 1) bzw. Umrechnungsfaktor.)

Messlösung 12 ml

Ext. 520nm

Ext. E.E.Farbreaktion — mg α -Tocopherol auf DC-Platte

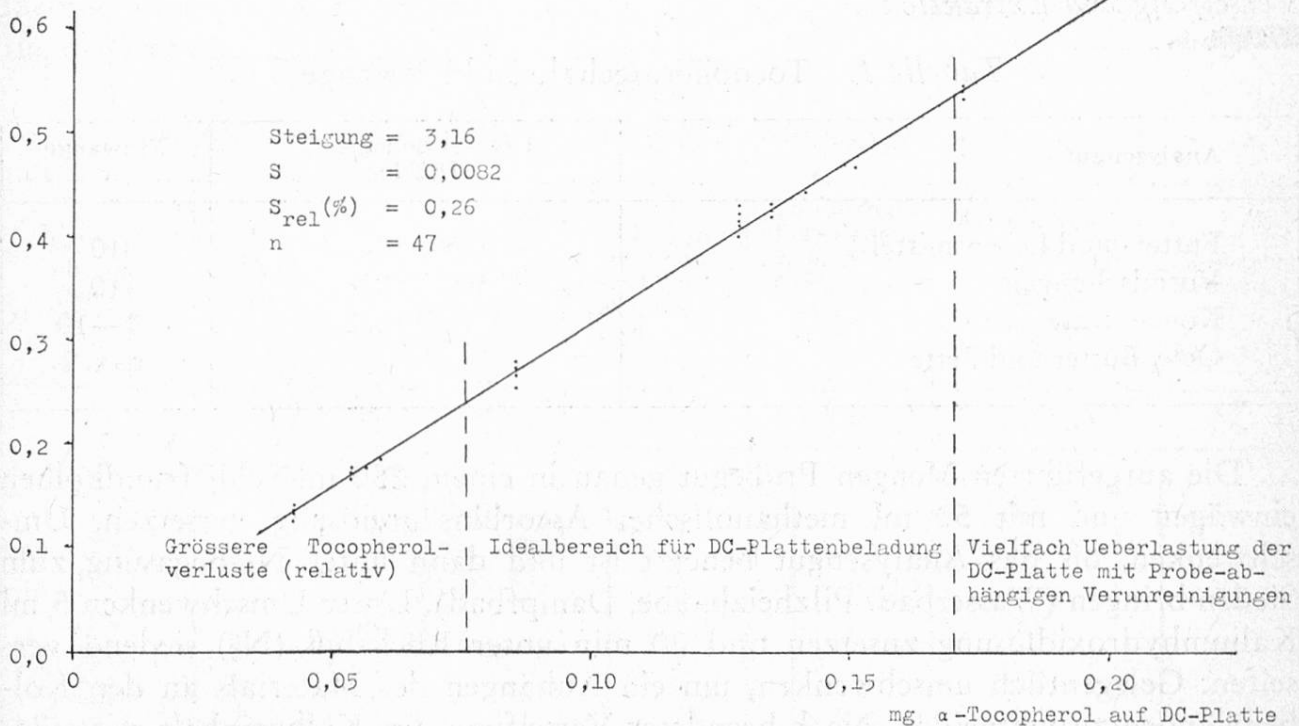


Abb. 1. Eichkurve

Apparaturen

Rotationsverdampfer mit Wasserbad
Zentrifuge
Spektral- oder Filterphotometer
Uebliche Glaswaren

Prinzip der Methode

Alkalische Verseifung des Analysengutes (Beseitigung von Fetten, die bei der Dünnschichtchromatographie stören; Erfassung des natürlichen Tocopherols in den Zellen; zugesetzte Tocopherolester werden verseift und zusammen mit den natürlichen Tocopherolen erfaßt). Extraktion des Unverseifbaren, Reinigung des Rohextraktes an Kieselgel (Entfernung von Sterinen, die die DC-Platte überlasten und eine unsaubere Abtrennung des α -Tocopherols verursachen können) und mit Schwefelsäure (Entfärbung des Extraktes — Zerstörung der Carotinoide, teilweise Zerstörung von Vitamin A). Abtrennung des α -Tocopherols von anderen Tocopherolen und Begleitstoffen mittels Dünnschichtchromatographie. Eluierung des α -Tocopherols und kolorimetrische Bestimmung nach *Emmerie-Engel* (13) (Reduktion von FeIII durch α -Tocopherol zu FeII, welches mit α,α' -Bipyridyl einen kolorimetrisch meßbaren Farbkomplex bildet).

Arbeitsvorschrift

Vorbereitung

Das feste Analysengut (z. B. Preßlinge, auch loses Futter mit gröberem Bestandteilen) zu feinem Pulver mahlen (z. B. Kaffeemühle Braun) und gut mischen.

Verseifung und Extraktion

Tabelle 1. Tocopherolgehalt und Einwaage

Analysengut	Deklarationsgehalt IEE/kg	Einwaage g
Futter- und Lebensmittel	5—500	10
Vormischungen	500—1000	10
Konzentrate	>1000	1—10
Oele, Butter und Fette		max. 2

Die aufgeführten Mengen Probegut genau in einem 250-ml-Schlifftrunkkolben einwiegen und mit 50 ml methanolischer Ascorbinsäurelösung versetzen. Umschwenken, bis das Analysengut benetzt ist und dann unter N_2 -Begasung zum Sieden bringen (Wasserbad, Pilzheizhaube, Dampfbad). Unter Umschwenken 5 ml Kaliumhydroxidlösung zusetzen und 20 min unter Rückfluß (N_2) siedend verseifen. Gelegentlich umschwenken, um ein Anhängen des Materials an den Kolbenwänden zu vermeiden. Nach beendeter Verseifung den Kolbeninhalt mit möglichst wenig Wasser (total 30—50 ml in 2—3 Portionen) in einem 500-ml-Scheide-

trichter (Hahnbohrung 6—8 mm) überspülen und den Verseifungskolben mit 120 ml Aether nachwaschen. Das noch warme Reaktionsgemisch — unter diesen Bedingungen lassen sich Emulsionen weitgehend vermeiden — vor der eigentlichen Extraktion mehrmals belüften. Die Extraktion noch zweimal mit je 120 ml Aether wiederholen. Die vereinigten Aetherphasen dreimal mit je 100 ml dest. Wasser neutral waschen, dann — über Kopf — in einen 500-ml-Schliffkolben, der ca. 30 g Natriumsulfat enthält, transferieren und mit ca. 20 ml Aether nachspülen. Kurz mit Stickstoff begasen, den Kolben verschließen und während 30 min unter gelegentlichem Umschwenken trocknen lassen. Den getrockneten Extrakt durch Watte filtrieren und dreimal mit ca. 20 ml Aether nachspülen. Bei Proben mit einem Tocopherolgehalt unter 200 IEE/kg das gesamte Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne einengen und in ca. 5 ml Benzol aufnehmen; bei höheren Tocopherolgehalten das Filtrat mit Aether ad 500 ml (Extraktvolumen V_E) stellen, 50 ml (Aliquot A_K) entnehmen, eindampfen und in ca. 5 ml Benzol aufnehmen.

Reinigung der Rohextrakte über Kieselgel und mit Schwefelsäure

Eine Säule (ϕ ca. 1 cm) mit P_0 -Fritte und Schliffhahn 10 cm hoch mit in Benzol aufgeschlämmtem Kieselgel füllen und mit 5—10 ml Benzol nachwaschen. Frischen 250-ml-Schliffkolben als Vorlage verwenden und den in Benzol aufgenommenen Verseifungsrückstand quantitativ auf die Säule bringen. Den Kolben noch drei- bis fünfmal mit ca. 5 ml Benzol nachspülen. Die Tocopherole mit 60 ml Benzol eluieren, das Eluat unter Teilvakuum (Rotationsverdampfer) zur Trockne eindampfen, in 50 ml Petroleumbenzin (Volumen V_S) lösen und 10 ml 80%ige Schwefelsäure zugeben.

Am Vibrator mischen oder von Hand schütteln, bis die organische Phase farblos wird. Das Gemisch zur sauberen Trennung der beiden Phasen in Zentrifugengläsern bei ca. 4 000 Upm zentrifugieren.

Tabelle 2. Aliquote Verdünnungen

α -Tocopherolgehalt IEE/kg	Extraktvolumen (ml)	Aliquot für Kieselgelsäule (ml)	Gelöst in ml Benzol für Kieselgelchromatographie	Volumen d. Petroleumbenzinlsg. für Schwefelsäurereinigung (ml)	Aliquot für Dünnschichtchromatogramm (ml)	Meßlösung (ml)
	V_E	A_K		V_S	A_{DC}	
10	} 500	} Gesamtextrakt	} 5	} 50	30	} 12
50					15	
100					7	
200					30	
500					10	
1000					5	

Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatten vor Gebrauch mit reinem Laufmittel zur Reinigung und Desaktivierung vorlaufen lassen)

Ein Aliquot (A_{DC} , Tabelle 2) aus dem Petroleumbenzinextrakt entsprechend 100–150 μg α -Tocopherol) im Vakuum zur Trockne eindampfen, in wenig Petroleumbenzin aufnehmen und quantitativ, streifenförmig auf die A-Seite der Dünnschichtplatte auftragen (siehe Abb. 2). Mit kleinen Portionen Petroleumbenzin sauber nachspülen. Mit Kapillare oder Pipette 3 Tupfer der α -Tocopherol-Referenzlösung auf die B-Seite der Platte auftragen und mit etwas übriggebliebenem, separat eingeeengtem Extrakt überlappen (Berücksichtigung einer Änderung des Rf-Wertes von reinem dl- α -Tocopherol durch Einfluß der Begleitstoffe im Futtermittlextrakt). Die Platte sofort in die mit Filterpapier ausgekleidete Trennkammer (Kammersättigung) stellen (bei schräger Plattenstellung, Schicht nach unten) und zweimal aufsteigend in Chloroform / Iso-Octan (50:50) entwickeln (zweimal je ca. 60 min Laufzeit bzw. ca. 17 cm Laufstrecke, dazwischen Trocknung der Platte im Stickstoffstrom). Die noch feuchte Platte im kurzwelligen UV (254 nm) beurteilen und die α -Tocopherolzonen der A- und B-Seiten leicht mit Bleistift markieren. Falls die Platte nicht überlastet wurde (es sollen nicht mehr als 150 μg α -Tocopherol auf die A-Seite der Platte aufgetragen werden), erscheint die α -Tocopherolzone stets abstandssicher getrennt von allen anderen Zonen. Zum besseren Nachweis kann die A-Seite mit einer Glasplatte abgedeckt und die B-Seite nacheinander mit Bipyridyl- und Eisenchloridlösung besprüht werden. Die genau lokalisierte α -Tocopherolzone der A-Seite quantitativ abkratzen und in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben überführen. Sofort ca. 10–15 ml Chloroform zusetzen, durch eine P4-Glasfilternutsche in einen 100-ml-Rundkolben filtrieren und unter jeweiligem Aufschlänmen des Kieselgels (Glasstab) mit ca. 40 ml Chloroform (in 5 Portionen) nachwaschen.

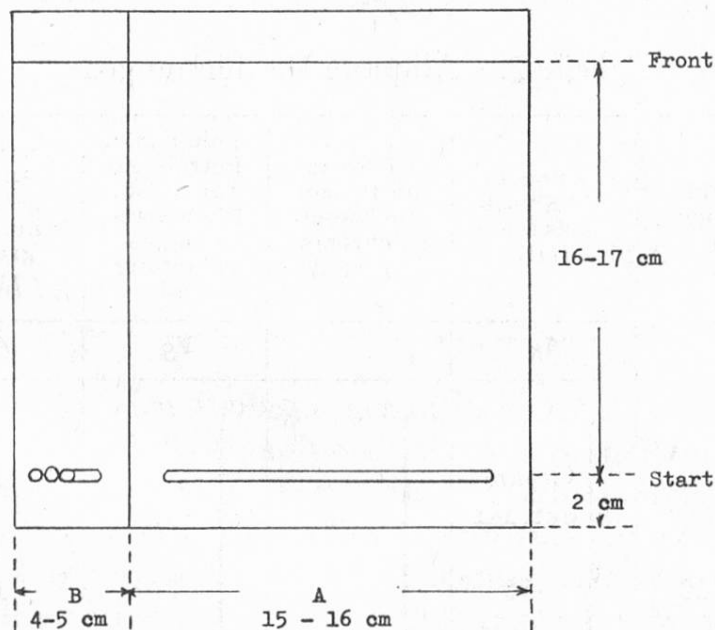


Abb. 2. Schema für Dünnschichtchromatographie

Kolorimetrie (bei der Farbreaktion im abgedunkelten Raum arbeiten; kein direktes oder diffuses Tageslicht; keine Leuchtstoffröhrenbeleuchtung; nur eine schwache Glühlampe darf den Arbeitsplatz indirekt erhellen)

Das Filtrat zur völligen Trockne einengen, auf Zimmertemperatur abkühlen, unter Stickstoff öffnen und aus Pipettoren nacheinander zufügen: 10,0 ml Aethanol, 1,0 ml α, α' -Bipyridyllösung und 1,0 ml Eisen(III)-chloridlösung. Gut mischen und genau 2 min nach beendeter Eisen(III)-chloridzugabe die Extinktion in 1-cm-Küvette bei 520 nm gegen Aethanol messen. Einen Blindwert in analoger Weise aus den gleichen Mengen Reagenzien bestimmen. (Unter der Voraussetzung, daß im abgedunkelten Raum gemischt und gemessen wird, variiert die Extinktion der Blindwerte in den Grenzen 0,018 bis 0,022.)

Berechnung:

$$\text{mg } \alpha\text{-Tocopherol/kg} = \frac{1000 \cdot V_E \cdot V_S \cdot \text{Ext.}_{\text{korr.}}}{\text{Einwaage (g)} \cdot A_K \cdot A_{DC} \cdot 3,16}$$

V_E = Extraktvolumen

A_K = Aliquot aus Extraktvolumen für Kieselgelsäulenchromatographie

V_S = Volumen der Petroleumbenzinlösung für Schwefelsäurereinigung

A_{DC} = Aliquot aus Petroleumbenzinlösung für Dünnschichtchromatographie

$\text{Ext.}_{\text{korr.}}$ = $\text{Ext.}_{\text{gemessen}} - \text{Ext.}_{\text{Blindwert}}$

3,16 = Faktor zur Umrechnung von $\text{Ext.}_{\text{korr.}}$ in mg dl- α -Tocopherol pro Meßvolumen. Er wurde eruiert aus dem Gesamtanalysengang und korrigiert so die im Analysengang auftretenden Verluste. Als mittlerer Verlust in fünf verschiedenen Mustern ($n = 75$) wurden rund 10% gefunden (siehe Abschnitt «Diskussion»).

Empfehlenswert ist die Durchführung eigener Verseifungsversuche mit reinstem dl- α -Tocopherol oder dl- α -Tocopherolacetat, um den Faktor unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen selbst zu überprüfen.

Diskussion

Versuche an verschiedenen Substraten ergaben im Mittel eine Wiederauffindungsrate von $\bar{x} = 89,8\%$ (für die Berechnung = 10% Verluste) in den Grenzen 87,2—92,4% (berechnet nach der Formel $\bar{x} \pm S_M \cdot t_{0,05}$). Für die Berechnung dienten 75 Analysen an fünf verschiedenen Mustern mit Tocopherolgehalten zwischen 20 und 3000 IEE/kg. Andererseits ergaben Versuche mit reinstem dl- α -Tocopherol ($n = 47$), das dem gesamten Analysengang unterworfen wurde, eine Recovery von $\bar{x} = 89,4\%$ in den Grenzen 89,1—89,7%. Als Vergleich dienten Direktmessungen des dl- α -Tocopherols im Emmerie-Engel-Test (13). Tocopherolverlust auf Kieselgelplatten (Beladung 100—150 μg dl- α -Tocopherol) betrug bei $n = 23$ im Mittel 6,0% (5,4—6,6%). An den Bestimmungen waren fünf bis acht Analytiker beteiligt.

Für Vitaminanalysen von Futter- und Lebensmitteln genügt vollauf die Angabe einer mittleren substratunabhängigen Recovery von 90%. Aus diesem

Grunde kann routinemäßig der Faktor $F = 3,16$ zur Umrechnung der gemessenen Extinktion in mg dl- α -Tocopherol pro Meßvolumen benutzt werden. Die untere Grenze für die quantitative Erfassung liegt bei 5 mg α -Tocopherol/kg Produkt.

Die vorliegende Analysenmethode, welche spezifisch α -Tocopherol neben anderen Tocopherolen zu bestimmen erlaubt, hat sich in unseren Laboratorien seit rund 8 Jahren ausnahmslos bewährt.

Der Zeitaufwand bei maximaler Auslastung eines Analytikers beträgt:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Ab Einwaage bis vor DC (4 Bestimmungen) | 3,5—4 Stunden |
| 2. DC + Emmerie-Engel-Bestimmung | 2,5—3 Stunden |

Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens beträgt somit pro Analytiker und Arbeitstag 4 Analysen.

Gaschromatographische Bestimmungen der Tocopherole führten nur dann zu reproduzierbaren und auswertbaren Werten, wenn die Verseifungsextrakte den im Analysengang beschriebenen Reinigungsstufen (Kieselgelsäule, Schwefelsäure und Dünnschichtchromatogramm) unterworfen wurden. Dieses Vorgehen wird dann im Vergleich zur Emmerie-Engel-Bestimmung bedeutend zeitaufwendiger, da die Farbreaktion innerhalb von 5 Minuten durchgeführt werden kann, während eine GC-Bestimmung rund eine halbe Stunde dauert.

Dank

Wir danken Herrn *K. Steiner* für die gewissenhafte Mitarbeit bei der Entwicklung der vorliegenden Analysenmethode.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache, robuste und praktisch universell anwendbare Analysenmethode beschrieben, die es gestattet, im Routinebetrieb 4 α -Tocopherolbestimmungen pro Analytiker und Arbeitstag auszuführen. Nach alkalischer Verseifung des Analysengutes wird das extrahierte Unverseifbare an Kieselgel und mit Schwefelsäure gereinigt und schließlich dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das eluierte α -Tocopherol wird nach Emmerie-Engel kolorimetrisch bestimmt. Die Methode erlaubt die selektive Bestimmung von α -Tocopherol neben anderen Tocopherolen. Die experimentell bestimmten Analysenverluste an α -Tocopherol sind substratunabhängig und betragen rund 10% in den Grenzen 7,6—12,8% ($n = 75$). Die untere, noch quantitativ erfaßbare Tocopherolkonzentration liegt bei 5 mg α -Tocopherol pro kg Produkt.

Résumé

Cet article décrit une méthode d'analyse simple, robuste et universellement applicable permettant d'effectuer quatre dosages d' α -tocophérol par analyste et par jour au laboratoire de routine. Après saponification de l'échantillon, on extrait l'insaponifiable et le

purifié sur gel de silice avec de l'acide sulfurique et on le sépare finalement à l'aide de la chromatographie en couche mince. Ensuite on détermine l' α -tocophérol élué par colorimétrie d'après Emmerie-Engel. Cette méthode permet de doser sélectivement l' α -tocophérol en présence d'autres tocophérols. Les pertes analytiques d' α -tocophérol déterminées expérimentalement sont indépendantes du substrat et s'élèvent à 10% dans les limites de 7,6 à 12,8% ($n = 75$). La concentration de tocophérol la plus basse encore déterminable quantitativement est de 5 mg α -tocophérol par kg de produit.

Summary

A simple and practically universal method for the selective and quantitative determination of α -tocopherol in the presence of other tocopherols is described. After an alkaline saponification of the sample (2–10 g) the unsaponifiable matter is purified by silicic and sulfuric acid and finally submitted to thin layer chromatography. The α -tocopherol is eluted and colorimetrically determined according to Emmerie-Engel. The recovery of α -tocopherol is product independent and amounts to about 90% ($n = 75$). The lower limit for a quantitative determination is in the range of 5 mg α -tocopherol/kg product.

Literatur

1. Wilson, P. W., Kodicek, E. und Booth, V. H.: Separation of tocopherols by gas-liquid chromatography. *Biochem. J.* **84**, 524–531 (1962).
2. Ranfft, K.: Gas-chromatographische Bestimmung von Vitamin E in Futter- und Lebensmitteln. *Z. anal. Chem.* **259**, 28–32 (1972).
3. Association of Official Analytical Chemists: Vitamin E (applicable to pharmaceutical preparations). *Official Methods of Analysis*, 12th ed., Washington, D. C. 20044, No. 43.078—No. 43.085, p. 836–837 (1975).
4. Dompert, W. U. und Beringer, H.: Dünnschicht- und Gaschromatographie von Tocopherolen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **78**, 108–111 (1976).
5. Wiggins, R. A.: Chemical analysis of vitamin A, D and E. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* **13**, 133–137 (1976).
6. Hartmann, K. T.: A simplified gas liquid chromatographic determination for vitamin E in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem.* **54**, 421–423 (1977).
7. Williams, R. C., Schmit, J. A. und Henry, R. A.: Quantitative analysis of the fat-soluble vitamins by high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 494–501 (1972).
8. Shaikh, B., Huang, H. S. and Zielinski, W. L.: High performance liquid chromatographic analysis of supplemental vitamin E in feed. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 137–139 (1977).
9. Vattassery, G. T., Maynard, V. R. und Hagen, D. F.: High-performance liquid chromatography of various tocopherols. *J. Chromatog.* **161**, 299–302 (1978).
10. Söderbjelm, P. und Andersson, B.: Simultaneous determination of vitamins A and E in feeds and foods by reversed phase high-pressure liquid chromatography. *J. Sci. Food Agr.* **29**, 697–702 (1978).
11. Rückemann, H. und Ranfft, K.: Methoden zur Bestimmung von Vitaminen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Bestimmung von Vitamin E in Vitamin-

- konzentraten, Vitaminvormischungen und Mineralfuttermitteln. Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch. **166**, 151—152 (1978).
12. *Thompson, J. N.* und *Hatina, G.*: Determination of tocopherols and tocotrienols in feeds and tissues by high performance liquid chromatography. J. Liquid Chromatog. **2**, 327—344 (1979).
13. *Emmerie, A.* und *Engel, C.*: Colorimetric determination of α -tocopherol. Recueil Trav. chim. Pays-Bas **57**, 1351—1355 (1938).

Dr. Ulrich Manz
E. Struchen
Dr. R. Zell
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
Abteilung für Vitamin-
und Ernährungsforschung
Grenzacherstraße 124
CH-4002 Basel