

## VITAMINE

*Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles:* Prinzipien der chromatographischen Stoffauftrennung, Redoxreaktionen, Koordinationsbindungen, funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. Bildung von Schiff'sche Basen, Nukleophilie), Verseifung, Radikalchemie.

### *Schlüsselwörter:*

Definition des (Pro)Vitaminbegriffs, Einteilung der Vitamine nach Fettlöslichkeit (Relevanz für mögliche Gefährdung durch Überdosierung) und in Stoffklassen, chemische Strukturen und biomedizinische Funktionen, Stabilität, Resorption, Speicherung, Bedarf, Mangelerscheinungen, negative Effekte bei Überdosierung (z. B. durch  $\beta$ -Carotin bei Rauchern und Vitamin E).

Carotinoide (u. a. Carotine, Xantophyll; Synthese des aktiven Isoprens, Funktion von Dolicholpyrophosphat), Retinoide (u. a. Vitamin A und seine Rolle in der Differenzierung), Vitamin D (von Cholesterol zur Vitaminproduktion im Körper), Vitamin E (u. a. „reactive oxygen species“ und Glutathionperoxidase), essentielle Fettsäuren (Vitamin F), Vitamin K (u. a. klinische Bedeutung von Cumarinderivaten wie Marcumar), Vitamin B1 (Rolle des Thiaminpyrophosphats im Kohlenhydratstoffwechsel), Vitamin B2 (FAD; z. B. Harnsäurebildung und deren Blockierung durch Allopurinol), Vitamin B6 (Rolle als Cofaktor im Aminosäurestoffwechsel und bei Synthesen von Häm/Sphingolipiden), Vitamin B12 (Cobalamin-abhängige Stoffwechselreaktionen: Verknüpfung mit Abbau von Valin/Isoleucin/Methionin und ungeradzahligen Fettsäuren oder ein Weg der Regeneration von Methionin nach Nutzung von S-Adenosylmethionin („aktives Methyl“), z. B. für die Kreatinsynthese), Biotin (Vitamin H, Rolle als prosthetische Gruppe von Carboxylasen), Folsäure (Übertragung von C1-Gruppen u. a. in der Purinbiosynthese, Thymidylatsynthesereaktion und in der Methioninregeneration (s. o.), Folsäureantagonisten als Antibiotika und Chemotherapeutika, Verknüpfung mit Histidinabbau und Bedeutung zur Bestimmung von Mangelzuständen durch His-Belastungstest; Bedeutung von Tetrahydrobiopterin), Niacin (NADH, NADPH: Funktionen im Stoffwechsel mit Oxidoreduktasen/Atmungskette und bei Synthesen, z. B. Fettsäuren und Cholesterol; Beziehung zum Abbau von Tryptophan), Pantothersäure (Coenzym A), Liponsäure (Funktion im Pyruvatdehydrogenasekomplex), Coenzym Q (Ubichinon), Vitamin C

(Synthese, Rolle in der Kollagenbiosynthese und im Tyrosinstoffwechsel, Radikalfänger).

*Literatur:*

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“.

## **Quantitative Bestimmung von Carotin, Xantophyll und Vitamin E (Gesamttocopherol)**

Aufgabe:

Der Carotin-, Vitamin E- (Gesamttocopherol) und Xantophyll-Gehalt einer Luzerne-grünmehlprobe ist analytisch zu ermitteln und in mg/kg (= ppm) Grünmehl anzugeben. Die Einwaage beträgt 2,50 g. Die Probe liegt nach Verseifung und Extraktion bereits in Petrolether gelöst und damit fertig zur Chromatographie vor.

Prinzip:

Nach Extraktion und Verseifung (zur Zerstörung der Chlorophylle) werden die Carotinoide und Vitamin E säulenchromatographisch an Aluminiumoxid getrennt. Entsprechend der Polarität der Verbindungen (OH-Gruppen) werden zur Elution mehr oder weniger unpolare (hydrophobe) organische Lösungsmittel gewählt.

Die spektralphotometrische Bestimmung der Carotinoide geschieht aufgrund ihrer intensiv gelben Eigenfärbung (Grund?), die bei der angegebenen Wellenlänge ein Absorptionsmaximum erreicht. Bei der Vitamin-E-Bestimmung werden Eisen-III-Ionen durch freies Tocopherol reduziert. Die dadurch entstehenden Eisen-II-Ionen ergeben mit 2,2'-Bipyridin einen rotgefärbten Komplex, dessen Konzentration spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

Reagenzien:

1. Für Extraktion und Verseifung:

Hexan-Aceton-Gemisch 7:3; 40-%ige methanolische KOH (Gew. %)

2. Für Chromatographie:

Petrolether; Petrolether-Ethylether-Gemisch 90:10; Ethanol 96%ig;

Aluminiumoxid (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) zur Chromatographie genormter Aktivität mit 9% Wasser

Reagenz nach EMMERIE und ENGEL:

1 Teil Eisen-III-chlorid-Lösung (0,2 g FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O in 100 ml Ethanol) und

1 Teil 2,2'-Bipyridin (0,5 g 2,2'-Bipyridin in 100 ml Ethanol )

werden erst kurz vor Gebrauch gemischt .

Ausführung (wird im Kurs nicht durchgeführt):

**Extraktion und Verseifung**

2,5 g Luzernegrünmehl werden am Vorabend des Untersuchungstages in einem Glaskolben mit 30 ml der Hexan-Acetonmischung versetzt und über Nacht unter Stickstoffbegasung zur Extraktion stehen gelassen. Am nächsten Morgen erfolgt ein Zusatz von 2 ml der 40-%igen methanolischen Kaliumhydroxidlösung. Die Probe wird kräftig geschüttelt und dann 1/2 Stunde stehen gelassen. Dann erfolgt ein Zusatz von Wasser, wonach sich zwei Flüssigkeitsphasen abscheiden. Die obere Phase enthält die Carotinoide und das Tocopherol. Abschließend werden 70 ml n-Hexan zugesetzt und damit das Volumen der oberen Phase auf 100 ml eingestellt. Aus dieser oberen Phase wird ein aliquoter Teil des Extrakts (= 20 ml) in ein Birnenkölbchen pipettiert und bei 40°C im Wasserbad unter leichtem Vakuum zur Trockne eingengt (Wasserstrahlpumpe anschließen). Um einen Siedeverzug zu verhindern, muss der

Kolben kreisend bewegt werden. Jeweils nur kurz in das Wasserbad eintauchen! Ist das Lösungsmittel abdestilliert, zieht man den Schlauch von der Wasserstrahlpumpe ab, ohne vorher das Wasser abzustellen und kühlt den Birnenkolben von außen unter fließendem Wasser. Dann gibt man ca. 5 ml Petrolether zu und bringt durch leichtes Umschwenken die Pigmente in Lösung. Diese Lösung wird nun in der Säulenchromatographie eingesetzt.

## **Säulenchromatographie**

Die Chromatographiesäule wird mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  genormter Aktivität etwa 10 cm hoch gefüllt. Durch leichtes Schütteln der Säule erreicht man, dass das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gut gepackt ist und keine lufthaltigen Zwischenräume bestehen bleiben. Anschließend gibt man ca. 20 ml Petrolether auf die Säule. Sobald die Säule in ihrer ganzen Länge durchfeuchtet ist und der Petrolether in ein Becherglas abtropft, wird die Pigmentlösung mit einer Pipette vorsichtig auf die noch mit wenig Petrolether bedeckte Säule gegeben. Ist der Pigmentextrakt fast aufgesogen, gibt man Portionen von ca. 5 ml Petrolether nach, wobei man darauf achtet, dass der Säulenkopf niemals trockenläuft. Die Tropfgeschwindigkeit der Säule soll etwa 1-2 Tropfen/Sekunde betragen. Man kann sie durch geringen Überdruck (Ballon am Kopf der Säule) oder Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) entsprechend regulieren.

Es ist nun zu erkennen, wie ein Teil des Pigmentes (= Xanthophyllfraktion) am Kopf der Säule absorbiert bleibt, während der andere Teil (= Carotinfraktion) unter der Wirkung des Petrolethers eluiert wird. Man wechselt das Becherglas und fängt das gelbe Carotineluat in einem Messzylinder so lange auf bis der Petrolether farblos abtropft.

Zur Elution des Gesamt-Tocopherols werden insgesamt 60 ml des Petrolether-Ether-Gemisches (90:10) auf die Säule gegeben. Das Eluat wird in einem 100 ml-Messzylinder aufgefangen. Sobald 60 ml durch die Säule geflossen sind, erfolgt die Elution der Xanthophyll-Bande mit 96-%igem Ethanol. Diese Chromatographie ist

durch die Eigenfärbung des Xanthophylls wieder gut zu beobachten. Auch hier bringt man das Elutionsmittel in kleinen Portionen auf die Säule. Anschließend wird das Eluat auf ein geeignetes Volumen (z. B. 40 ml) aufgefüllt.

## Extinktionsmessung

Die Extinktion der intensiv gelb gefärbten Carotinoide erfolgt im Spektralphotometer mit 1 cm-Messküvetten bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Aus der abgelesenen Extinktion der Lösungen lässt sich ihr Carotin- bzw. Xanthophyllgehalt über die aufliegenden Eichkurven und die "prozentualen Extinktionskoeffizienten" für  $\beta$ -Carotin und Xanthophyll bestimmen.

Der "prozentuale Extinktionskoeffizient" ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ ) gibt an, welche Extinktion E eine 1-%ige Lösung (= 1 g/100 ml) des Stoffes in einem bestimmten Lösungsmittel bei einer bestimmten Wellenlänge und 1 cm Schichtdicke der Küvette ( $d = 1$ ) bewirkt. Er beträgt

für  $\beta$ -Carotin (in Petrolether bei 450 nm):  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2600$

und

für Xanthophyll (in Ethanol bei 450 nm):  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2500$

In vorliegenden Versuch liegt jedoch der Extinktionsbereich wesentlich niedriger. Man kann demnach bei einer Konzentration von 100 - 200  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  z. B. für das Carotin eine Extinktion von 0,22 - 0,44 erwarten.

## **Vitamin-E-Bestimmung**

Von der Elutionslösung mit dem Gesamttocopherol wird ein aliquoter Teil (30 ml) im Vakuum (s. o.) zur Trockne eingeengt und in 10 ml Ethanol aufgenommen. Davon werden 5 ml mit 1 ml des Reagenz nach EMMERIE und ENGEL versetzt und genau 3 Minuten danach die Extinktion des roten Farbkomplexes im Spektralphotometer mit 1 cm Messküvetten bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Als Blindwert (Blindküvette) dienen 5 ml Ethanol + 1 ml Reagenz nach EMMERIE und ENGEL. Aus der abgelesenen Extinktion lässt sich der Tocopherolgehalt über die gegebene Eichkurve unter Berücksichtigung der Einwaage und der Verdünnung berechnen.

### Anmerkung:

Die Reaktion nach EMMERIE und ENGEL ist nicht sehr spezifisch (warum?): Für eine exakte Laboranalyse bietet sich eine Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an.