

COMMUNICATIONS

DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'ANKARA

Série B: Chimie

TOME 26

ANNÉE 1980

**Die spektrophotometrische Bestimmung der Sterine von Colza mit
Hilfe der Enzymreaktionen**

by

Şükran GÜMÜŞ

10

**Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara
Ankara, Turquie**

Communications de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara

Comité de Rédaction de la Série B

A. Olcay G. Tüzün Y. Sarıkaya

Secrétaire de publication

Ö. Çakar

La Revue "Communications de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara" est un organe de publication englobant toutes les disciplines scientifiques représentées à la Faculté.

La Revue, jusqu'à 1975 à l'exception des tomes I, II, III, était composée de trois séries:

Série A: Mathématique, Physique et Astronomie.

Série B: Chimie.

Série C: Sciences naturelles.

A partir de 1975 la Revue comprend sept séries:

Série A₁: Mathématique

Série A₂: Physique

Série A₃: Astronomie

Série B: Chimie

Série C₁: Géologie

Série C₂: Botanique

Série C₃: Zoologie

En principe, la Revue est réservée aux mémoires originaux des membres de la Faculté. Elle accepte cependant, dans la mesure de la place disponible, les communications des auteurs étrangers. Les langues allemande, anglaise et française sont admises indifféremment. Les articles devront être accompagnés d'un bref sommaire en langue turque.

Adresse: Fen Fakültesi Tebliğler Dergisi, Fen Fakültesi, Ankara, Turquie.

Die Spektrophotometrische Bestimmung der Sterine von Colza mit Hilfe der Enzymreaktionen

Şükran GÜMÜŞ

Lehrstuhl für analytischen Chemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ankara

Eingegangen 9. September 1980 Akzeptiert 2. Oktober 1980

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die katalytische Wirkung der Enzyme benützt, um die im Rohöl von Colza sich befindenden Sterine zu bestimmen. Aus unverseifbaren Teil des Rohöls von Colza durch Chloroform-Extraktion gewonnenen Sterine werden von Cholesterin-Oxydase zu Stenone oxydiert (Gleichung 1). Das bei dieser Reaktion entstehende H_2O_2 oxydiert das in die Lösung zugesetzte Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd (Gleichung 2). Formaldehyd bildet mit Acethyl-acetoacetäthyl-ester in Gegenwart von NH_3 und einige Tropfen Dimethylamin 1,4 Dihydro-3,5 dicarboxy-2,6 dimethyl-Pridineäthylester. Nach Oxydation mit konz. HNO_3 wurde die Ester durch die alkoholische $Ca(OH)_2$ Lösung hydrolysiert. Die entstehende 2,6 Dimethyl-Pridine (2,6 Lutidin) wurde auf Grund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 405 nm gemessen. Das Gehalt von Sterine sind äquivalent mit dem Gehalt des 2,6 Dimethylpridin.

EINLEITUNG

Die Sterine sind die wichtigste Bestandteil der Lipide. Sie lösen sich in Öle und lipophilen Lösungsmittel gut. Alle bekannten Pflanzen-Sterine besitzen in C_3 -Stellung eine OH-Gruppe, die durch die katalytische Wirkung von Cholesterin-Oxydase mit Luft-Sauerstoff zu ketone ganz schnell oxydiert.

Die erste Totalsynthese von Sterinen stammt von R.B. Woodward und Mitarbeitern¹². A. Windaus und A. Welsch¹⁰ wurden die Sterine von Colza erstmal isoliert. E. Fernholz und H.E. Stavelly⁶ wurden seine Strukturformel aufgestellt.

Zur Bestimmungsmethode der Sterine eignen sich bis letzten Zeit folgende Reaktionen:

1- A. Windaus¹¹ stellte fest, daß Sterine mit dem Digitonin ($C_{56}N_{92}O_{29}$) eine schwerlösliche Verbindung bilden. Man kann die Sterine durch die Fällung mit Digitonin trennen. Diese Methode verbessert von A. Schramme⁹.

2- Nachdem Liebermann⁸ und Burchard⁴ zur Erkennung der Sterine die empfindlichen Farbreaktionen eröffneten, wurde sie in Öle und in Unverseifbaren durch die Colorimetrie quantitativ bestimmt. Die Sterine trennen gut von fremden Stoffen durch die Chromatographie. Sie sind auf verschiedenen Schichten isolierbar. Zahlreiche Forscher trennten sie aus Öl auf Lufttrockneten Kieselgel G-Schichten mit einem frischher-gestellten Lösungsmittelgemischen mit Erfolg^{2,5,7}.

Zur chemischen Bestimmung der Sterine sind zahlreiche Farbreaktionen bekannt, die unspezifisch und folglich in der Lebensmittelanalytik erst nach sorgfältiger Abtrennung störender Substanzen anwendbar sind.

Enzymatische Lebensmittelanalytik ist ohne aufwendige Probenaufbereitung im Sinne einer Abtrennung chemisch verwandter Verbindungen möglich. Enzymatische Nachweisreaktionen laufen in der Regel auch in Gegenwart anderer Lebensmittelinhaltsstoffe störungsfrei ab¹.

Die zur enzymatischen Analytik benötigen chemischen und biochemischen Reagenzien sollen bei Lagerung zuverlässig und stabil³. Zum Lösen von Reagenzien geeignetes Wasser sollte nicht nur entmineralisiert, sondern auch praktisch frei von Mikroorganismen sein. Man erhält es durch zweifache Destillation.

Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen hängen in wäßriger Lösung von PH-Wert. Die enzymatische Reaktionen beeinflussende Hauptfaktoren sind: Die Art und der Gehalt von Mikroorganismen, Temperatur, Feuchtigkeit, Sauerstoff und Licht, insbesondere UV-Strahlung.

MATERIAL

Das Öl von Colza: Durch Extraktion von Colzasamen wurde hergestellt.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ p.a. Methanol p.a.
 H_3PO_4 85 % p.a. , Acethyl-acetoacetäthylester,
Die Lösung von Katalase ($\text{Cat}(\text{OH})_4$) Böhlinger Mannheim GMBH
Best.-Nr. 15674

Cholesterin-Oxydase: Böhlinger Mannheim GMBH Best.-Nr.
15626

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a, KOH: 10 N wäßrig p.a

M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lösung wäßrig p.a

Cholesterin (Merck), Isopropanol

VIS-UV-Spektrophotometer: Beckmann DU

METHODE

Es wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Methanol und H_3PO_4 eine Pufferlösung gemacht. Ihrer PH-Wert wurde 7,0 eingestellt. 20 ml Methanol und 0,45 ml Katalase wird unter Rühren hinzugefügt (Lösung 1).

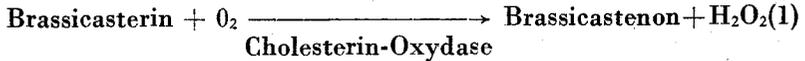
0,3 ml Cholesterin-Oxydase wurde in einem Lösung von 1 ml M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung gelöst. (Lösung 2).

Vorbereitung der Probe: Etwa 10,0 g Öl wurde in einem 50 ml-Rundkolben genau eingewogen. Es wird 25 min. mit 10 N frischhergestellter Ca. 0,5 N methanolischer Kalilauge unter Rühren am Rückflusskühler erhitzt. Die überstehende Lösung wurde mit Pipette in einem 25 ml Meßkolben übergeführt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 6 ml Isopropanol am Rückflußkühler 5 min. gekocht. Die Lösungen wurden im Meßkolben gesammelt, abkühlenlassen und mit Isopropanol bis zur Marke aufgefüllt. Zum spektrophotometrischen Test müssen die Lösungen klar sein.

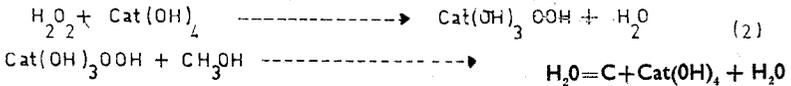
Spektrophotometrische Bestimmung der Sterine: Um der Gehalt der Sterine mit Hilfe der enzymatischen Reaktionen zu bestimmen, wurde 5,25 ml Pufferlösung (Lösung 1), 4,00 ml in Methanol gelösten Acethyl-acetoacetäthylester Lösung und 0,75

ml Ölprobe in einem 10 ml Meßkolben eingebracht und gut gemischt. Diese Gemische wurde als Blindprobe gebraucht. 5 ml von diesem Gemisch wurde in einen anderen Meßkolben mit Pipette übergeführt und 0,02 ml Cholesterin-Oxydase hinzugefügt. Beide Kolben wurden 60 min. bei Ca. 35-40°C in einem Wasserbad gehalten.

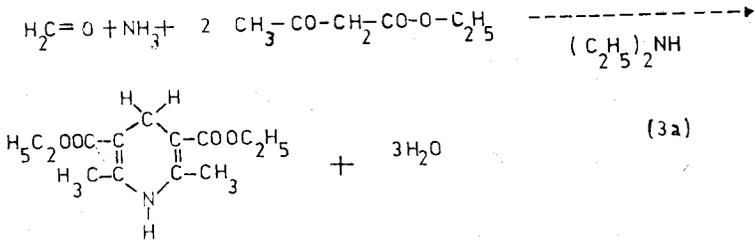
Cholesterin-Oxydase verwendet in dieser Zeit Luftsauerstoff und katalysiert die Oxydation der Sterine zu Stenon. Im ganzen in Öl sich befindenen Sterine wurde hier als Brassicasterin genommen.



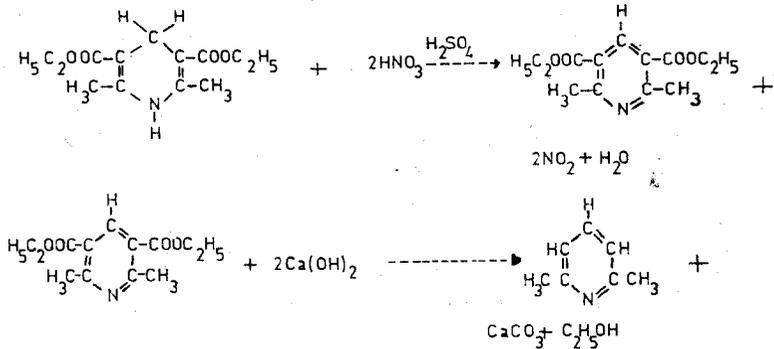
Die entstehende H_2O_2 oxydiert das Methanol durch die katalytische Wirkung von Katalase zu Formaldehyd.



Die in beiden Meßkolben sich befindenen Lösungen wurden im Zimmertemperatur mit NH_3 gesättigt und 15 min. stehengelassen.



Damit die Enzyme in dieser PH-Bereich ihre Aktivität verlieren werden, oxydiert der entstehende Mittelstoff unter Gleichzeitigen Rühren 1 ml mit dem Gemisch von konz. $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1). Dann hydrolisiert es mit alkoholischen $\text{M Ca}(\text{HO})_2$ Lösung.



ERGEBNISSE

Die Reaktionen wurden einmal mit reinen Cholesterin und zweitemal mit Öl von Colzasamen durchgeführt. Der Gehalt des entstehenden 2,6 Lutidin wurde spektrophotometrisch untersucht. Eichkurven wurden mit den hergestellten 2,6 Lutidin-Lösungen ermittelt, die aus Cholesterin mit Hilfe von Enzymreaktionen entstanden. Extinktionkoeffizient ist aus der Werten der Eichkurve gemäß $\epsilon = (E/C.d) \cdot 1000 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ berechnet.

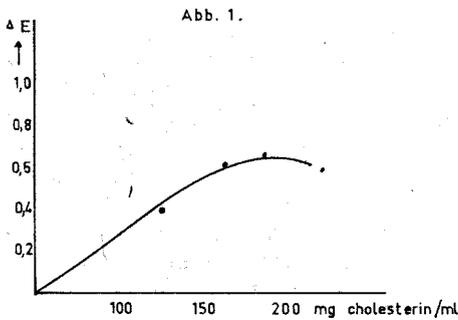


Abb. 1 Eichkurve

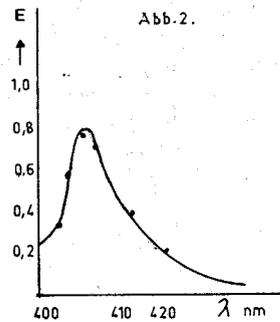
Abb. 2. Extinktionmaxima des
2,6 Lutidins

Abb. 1 zeigt, daß das Gehalt von Sterine mit dem Gehalt des gebildeten 2,6 Lutidin equivalent ist. Die Extinktionmaxima der Verbindung wurde im Alkoholextrakt nach 1 h bestimmt. $C = 200 \text{ ng Cholesterin/ml}$, $d = 1 \text{ cm}$. Die Messung erfolgt bei den Wellenlängen 405 nm, bei denen die Absorption Linear mit steigender Sterinekonzentration zunimmt.

Die Auswertung der Sterinegehalt von Colza erfolgt nach der Formel:

$$C = \frac{MG \cdot V \cdot \Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot 1000 \text{ mg/ml, wobei}$$

V = Gesamtvolumen der Lösungen (ml)

v = Probevolumen (ml)

MG = Molekulargewicht der Brassicasterin

d = Schichtdicke (cm)

ϵ = Extinktionkoeffizient des Lutidin-Farbstoffes bei 405 nm

Es wurde als $7,4 \text{ cm.} / \mu \text{ Mol}$ gefunden.

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

E_2 = Extinktion von Probeleerwert

E_1 = Extinktion von Probe

$$C = 398.5,0 \cdot 0,086 / 7,4 \cdot 1 \cdot 0,375 \cdot 1000 = 0,062 \text{ g}$$

Brassicasterin /lt Öllösung

Eine Serie von 6 Ölproben wurde analysiert. Das Resultat der spektrophotometrischen Bestimmungen stimmten genau mit dem anderen Methoden überein.

ÖZET

Bu çalışmada Colza yağında bulunan Sterinlerin miktarını araştırmak için Kolesterin Oksidaze ve Katalaze (Cat (OH)₄) enzimlerinin katalitik etkilerinden yararlanıldı. Kolesterin-Oksidaze enziminin katalitik etkisi ile Sterinler hava Oksijeni tarafından yükseltgenirken H₂O₂ serbest hale geçer (Denklem 1). Cat (OH)₄ enzimi, H₂O₂'in çözeltiye ilave edilen CH₃OH'ü Formaldehide yükseltgenmesini katalizler (Denklem 2). Bu iki enzim katalitik reaksiyonunun hızı büyüktür'. Üçüncü reaksiyonda Formaldehit ortama ilave edilen NH₃ ve asetilasetoasit-etilesteri ile 1,4 dihidro 3,5 dikarboksi 2,6 dimetilpridinin etil esterini oluşturur. Ester HNO₃ + H₂SO₄ ile yükseltgendikten sonra Ca (OH)₂ çözeltisi ile hidrolizlenir ve oluşan 2,6 dimetilpridinin (2,6 Lutidin) 405 nm de extinksiyonu ölçüldü.

Kolesterin-Oksidaze enziminin 3.Karbon atomunda OH taşıyan bütün Sterinleri etkilediği göz önünde tutularak, reaksiyon önce miktarı belli Cholesterine uygulandı ve absorpsiyonun koşulları ve extinksiyon katsayısı saptandı. Sonra ham Kolza yağına uygulanarak bileşimindeki Sterin miktarı Brassicasterin cinsinden hesaplandı. Bulunan değerlerin literatürde verilen miktara uygun olduğu görüldü. Ayrıca ham yağda bulunan diğer besi elementlerinin, tayini bozucu bir etki göstermedikleri de saptandı.

LITERATUR

- 1- Aebi H. *Methods of Enzymatic (Analysis, in Bergmeyer H. u. ed.)* 673-685 Verlag Chemie, Weinheim u. Academic Press. New York-London- (1974)
- 2- Bennett R.D und E. Heftmann., *J. Chromatogr.* 9, 359 (1952) 12, 245 (1963)
- 3- Bergmeyer H., *Biochem. Z.* 327, 255-258 (1955)
- 4- Burchard H., *Zbl.* 1890 I. 25-27
- 5- Copius-Peereboom J.W. und H.W. Beekas., *J.Chromatogr.* 17, 99 (1965)
- 6- Fernholz E. und H.E. Stavely., *Am. Soc.* 1939 61, 142
- 7- Kaufmann H.P., Z. Makus und T.H. Khoe. *Fette, Seifen Anstrichmittel.*, 64, 1, (1962)
- 8- Liebermann C. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 18, 1804, (1885)
- 9- Schramme A. *Fette unü Seifen* 46, 443-445 (1939)
- 10- Windaus A. und Welsch A. B. 1909 612
- 11- Windaas A. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 41, 2558 (1908)
- 12- Woodward R. B., F. Sondheimer, D. Taub, K. Heusler und W. M. McLamore, *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 2403 (1951)

Prix de l'abonnement annuel

Turquie: 15 TL; Étranger: 30 TL.

Prix de ce numéro : 5 TL (pour la vente en Turquie).

**Prière de s'adresser pour l'abonnement à : Fen Fakültesi
Dekanlığı Ankara, Turquie.**