

Zeitschrift
für
Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel
sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 10.

15. Mai 1922.

Band 48.

Über die Bestimmung von Benzoesäure in Margarine.

Von

Dr. Otto Köpke und Dr. Emma Bodländer.

Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium des Reichsgesundheitsamts.

[Eingegangen am 29. März 1922.]

Für die Haltbarmachung der Margarine wird in zunehmendem Maße Benzoesäure und benzoesaures Natrium verwendet. Dieses Konservierungsverfahren, das während des Krieges durch ein Rundschreiben des Reichskanzlers an die Bundesregierungen unter den damaligen außergewöhnlichen Verhältnissen als zulässig erklärt worden ist, sofern der Gehalt an Benzoesäure in 1 kg fertiger Margarine nicht mehr als 2 g beträgt, hat sich in der Praxis durchaus bewährt und kann bei Einhaltung der Mengengrenzung nicht als gesundheitsgefährlich angesehen werden. Dieser Umstand ließ es erwünscht erscheinen, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Benzoesäure in Margarine auszuarbeiten.

Zur Abscheidung der Benzoesäure aus Margarine sind zwei Verfahren möglich, entweder die Destillation oder das Ausziehen mit Lösungsmitteln. Von Versuchen, die Benzoesäure durch Destillation zu isolieren, wie es z. B. Griebel¹⁾ bei Preiselbeeren und Krüger²⁾ bei Hackfleisch getan hat, wurde jedoch von vornherein abgesehen, da bei der Destillation von Margarine mit Wasserdampf aus saurer Lösung damit gerechnet werden mußte, daß Fettsäuren mit in das Destillat gelangen und die weitere Verarbeitung stören. Außerdem haben Liverseege und Evers³⁾ für Milch festgestellt, daß Benzoesäure aus dieser durch Destillation nicht quantitativ abgeschieden werden kann; zum Austreiben der Benzoesäure aus Margarine wäre danach voraussichtlich eine sehr langwierige Destillation mit großen Mengen Wasser nötig gewesen, sodaß dann auch die Isolierung der Benzoesäure aus dem Destillat durch Lösungsmittel wie Äther, Petroläther usw. umständlich und kostspielig wäre.

Es wurde daher versucht, Benzoesäure aus der Margarine in Anlehnung an die Vorschrift zur qualitativen Prüfung von Fetten auf Benzoesäure in den „Entwürfen zu Festsetzungen über Lebensmittel“⁴⁾ abzuscheiden und nach dem Verfahren zu bestimmen, das Polenske⁵⁾ für Preiselbeeren ausgearbeitet hat, und das auch der amtlichen Vorschrift zur Bestimmung der Benzoesäure im Wein⁶⁾ zugrunde gelegt ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1910, 19, 241.

²⁾ Diese Zeitschrift 1913, 26, 12.

³⁾ Diese Zeitschrift 1913, 26, 361.

⁴⁾ Heft 2, Speisefette und Speiseöle, S. 49 (Verlag von Julius Springer, Berlin 1912).

⁵⁾ Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1912, 38, 149.

⁶⁾ Anweisung zur chemischen Untersuchung des Weines, II, 29. — Zentralbl. f. d. Deutsche Reich 1920, S. 1601 ff.

Der Anwendung des Verfahrens der „Festsetzungen“ — Ausschütteln der Margarine mit Natriumbicarbonatlösung, Ansäuern und Ausziehen mit Äther — trat die Schwierigkeit entgegen, daß sich beim Ausschütteln mit Äther starke Emulsionen bilden, die eine quantitative Abscheidung der Benzoesäure unmöglich machen. Die gleiche Schwierigkeit ergab sich beim Ausschütteln der Margarine nach Robin¹⁾ mit Natriumcarbonat unter Zusatz von Alkohol, ebenso bei dem Verfahren von Halphen²⁾, das statt Sodalösung Kalkwasser verwendet. Versuche, die alkalischen Lösungen durch Erwärmen, Abkühlen, Filtrieren oder durch Zusatz von Bariumchlorid nach Friese³⁾ von den emulsionsbildenden Stoffen zu befreien, waren erfolglos. Es wurde danach eine Reinigung des bicarbonat-alkalischen Auszuges durch Behandlung mit Kupfersulfat versucht, wie sie von Ritthausen⁴⁾ für die Klärung von Milch angegeben ist. Diese Behandlung, bei der Eiweißstoffe und Fett aus der Lösung niedergeschlagen werden, erwies sich als überraschend gut wirksam. Bei den zahlreichen ausgeführten Versuchen bildeten die durch Kupfersulfat geklärten Lösungen niemals auch nur die geringste Emulsion beim Ausschütteln mit Äther und Petroläther. Auch ließen sich die Lösungen stets schnell und leicht filtrieren. Das Verfahren ist von Fischer und Gruenert⁵⁾ für den Nachweis von Benzoesäure in Fleisch und Fetten benutzt worden. Das von diesen angewendete Neutralisieren der alkalischen Lösung mit Schwefelsäure und spätere Ausfällen des Kupfers mit Kalilauge erschien für den vorliegenden Zweck entbehrlich. Es wurde einfach die bicarbonathaltige Lösung mit Fehling'scher Kupfersulfatlösung versetzt und ein aliquoter Teil des Filtrats nach Einengen und Ansäuern mit einem Gemisch von Äther und Petroläther ausgeschüttelt.

Die Ergebnisse waren anfangs befriedigend, doch zeigten sich namentlich bei Anwendung größerer Mengen von Benzoesäure wiederholt merkliche Verluste. Die Quelle dieser übrigens nicht regelmäßigen Verluste mußte in einer Ausfällung von Kupferbenzoaten zu suchen sein, wie sie auch Baumann und Großfeld⁶⁾ für möglich halten.

Es mußte daher auf die Anwendung von Kupfersulfat verzichtet und ein anderes Klärungsmittel gesucht werden. Als solches bewährte sich das als Eiweißfällungsmittel häufig angewandte Ammoniumsulfat in annähernd gesättigter Lösung. Dieses gab ohne die Gefahr unerwünschter Ausfällungen klare, wasserhelle Lösungen, die sich mit der Äthermischung ohne Bildung von Emulsionen gut ausschütteln ließen.

Von Versuchen, die benzoensäurehaltigen alkalischen Auszüge von der Margarine quantitativ zu trennen, wurde abgesehen, weil dies aussichtslos erschien. Statt dessen wurde die Ausschüttelung der Margarine mit einer gemessenen Menge der Bicarbonatlösung vorgenommen, von welcher dann ein aliquoter Teil weiter verarbeitet wurde. Das Ausziehen der Benzoesäure aus der Margarine muß daher so vorgenommen werden, daß kein Wasser verdampft. Dies gelingt leicht, wenn man die Margarine mit der Bicarbonatlösung in einer weithalsigen, verschlossenen Stöpselflasche durch vorsichtiges Einstellen in ein Wasserbad von etwa 60° gelinde erwärmt. Durch Schütteln

1) Diese Zeitschrift 1909, 18, 479.

2) Diese Zeitschrift 1909, 18, 478.

3) Diese Zeitschrift 1912, 24, 596.

4) Journ. f. prakt. Chem. 1877, 15, 329.

5) Diese Zeitschrift 1910, 20, 580.

6) Diese Zeitschrift 1915, 29, 397.

der dabei geschmolzenen Margarine mit der Lösung geht, wie die Versuche zeigten, die Benzoessäure mit Sicherheit in die wässrige Phase über. Für 50 g Margarine wurden 100 ccm 0,1 N.-Bicarbonatlösung verwendet. Da das in der Margarine von vornherein enthaltene Wasser beim Schmelzen in die Bicarbonatlösung übergeht, so muß für die Benzoessäurebestimmung der Wassergehalt der Margarine bekannt sein und die durch ihn hervorgerufene Volumvermehrung der Lösung bei der Berechnung berücksichtigt werden. Sind z. B. in der Margarine 16% Wasser gefunden und zum Ausschütteln von 50 g Margarine 100 ccm Bicarbonatlösung angewandt worden, so sind bei der Berechnung nicht 100, sondern 108 ccm einzusetzen.

Zur Entnahme des aliquoten Teiles — zweckmäßig 75 ccm — empfiehlt es sich, die Fettschicht zum Erstarren zu bringen, die wässrige Lösung nach Durchbohrung der festen Schicht abzugießen (am besten durch ein Faltenfilter) und bei Zimmertemperatur die 75 ccm abzupipettieren. Bei vorsichtigem Arbeiten ist es jedoch auch möglich, ohne vorheriges Abkühlen, mittels einer Pipette die Hauptmenge der Flüssigkeit unter der geschmolzenen Fettschicht zu entnehmen. Von dieser in ein Kölbchen übergeführten Flüssigkeit wird dann bei Zimmertemperatur der aliquote Teil entnommen, wobei darauf zu achten ist, daß keine Fettklumpchen in die zu verarbeitende Flüssigkeit gelangen.

Um auch nach der Klärung mit Ammoniumsulfat eine quantitative Gewinnung des Filtrats zu vermeiden, wurde wieder nur ein aliquoter Teil des Filtrats der Weiterverarbeitung unterworfen. Es wurden die 75 ccm der Bicarbonatlösung in einem 100 ccm-Meßkölbchen mit 30 g reinem krystallisiertem Ammoniumsulfat¹⁾ versetzt und nach kräftigem Schütteln und etwa halbstündigem Stehenlassen, bis zur Lösung des Ammoniumsulfats, auf 100 ccm aufgefüllt und filtriert. Vom Filtrat wurde eine gemessene Menge, zweckmäßig 80 ccm, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, wobei bisweilen die Benzoessäure schon zum Teil krystallinisch ausfällt, und dann ausgeschüttelt.

Zum Ausziehen der Benzoessäure aus der wässrigen Lösung wurde ein Gemisch von gleichen Raumteilen Äther und Petroläther, dessen Siedepunkt nicht über 60° liegen darf, gewählt, obwohl Benzoessäure in Petroläther weniger leicht löslich ist als in Äther. Das Äther-Petroläthergemisch, das auch von Polenske bei der Benzoessäurebestimmung in Preiselbeeren verwandt worden ist, nimmt jedoch weniger Wasser und Verunreinigungen, als welche besonders Milchsäure, Buttersäure u. a. in Frage kommen, auf als Äther, wie durch vergleichendes Ausschütteln der Auszüge von benzoessäurefreier Margarine mit Äther allein und mit dem Gemisch von Äther und Petroläther in einer Reihe von Versuchen festgestellt wurde.

Um aber die verhältnismäßig geringe Löslichkeit der Benzoessäure in dem Äther-Petroläthergemisch auszugleichen, muß das Ausschütteln mehrfach wiederholt werden. Eine fünfmalige Ausschüttelung der angewandten 80 ccm Lösung mit je 40 ccm des Äthergemisches, wobei jedesmal die wässrige Schicht möglichst vollständig von der ätherischen getrennt wird, erwies sich als ausreichend. Die Abtrennung der beiden Schichten machte im allgemeinen keine Schwierigkeiten. Lediglich bei einer sehr eigelbreichen Margarinesorte entstand eine Emulsion, die aber nach einigem Stehen sich absetzte.

¹⁾ Ein als „pro analysi“ bezeichnetes Produkt erwies sich sonderbarerweise als stark sauer und daher unbrauchbar.

Da aber beim Ausschütteln auch Spuren von Schwefelsäure von der Ätherschicht aufgenommen werden, muß man die vereinigten ätherischen Auszüge mit wenig Wasser nachwaschen. Ein dreimaliges Waschen mit je 5 ccm Wasser entfernt alle Schwefelsäure, ohne dem Äthergemisch merkliche Mengen von Benzoesäure zu entziehen,

Die Verwendung eines besonderen Wasserbades von 37—38° zum Abdestillieren des Äthergemisches, wie es bei der Vorschrift für die Untersuchung des Weines¹⁾ vorgesehen ist, das ja auch bei der Verwendung von Petroläther auf erheblich höhere Temperatur eingestellt werden müßte, erscheint entbehrlich. Die Destillation kann auf einem gewöhnlichen siedenden Wasserbade vorgenommen werden, wenn man durch Zusatz von etwas Bimssteinpulver für ein gleichmäßiges Sieden sorgt und die Destillation so leitet, daß das Destillat in Tropfen und nicht in zusammenhängendem Strahl abfließt. Da trockene Benzoesäure schon beim Erhitzen auf dem Wasserbade sublimiert, wurde die ätherische Lösung nicht bis zur Trockne eingedampft, sondern vorgezogen, die letzten Reste des Lösungsmittels bei Zimmertemperatur durch vorsichtiges Darüberleiten eines Luftstromes zu verjagen. Hierbei blieb die Benzoesäure stets als farblose und reine, in Nadeln oder Blättchen krystallisierte Masse zurück.

Zur Titration der Benzoesäure benutzt man möglichst carbonatfreie (aus Natriummetall hergestellte) 0,1 N.-Natronlauge, die in der Hitze mit Phenolphthalein als Indicator eingestellt ist (am besten gegen reine umkrystallisierte Benzoesäure). Um jeden Verlust an Benzoesäure zu vermeiden, fügt man zu dem Destillationsrückstand zunächst einen kleinen Überschuß an Natronlauge (bleibende Rotfärbung des Phenolphthaleins), erhitzt bis zum beginnenden Sieden, titriert mit 0,1 N.-Salzsäure bis zur Entfärbung und mit 0,1 N.-Lauge wieder bis zur schwachen Rosafärbung.

Von den zahlreichen von uns ausgeführten Analysen seien im folgenden nur diejenigen wiedergegeben, bei denen alle oben angedeuteten Fehlerquellen vermieden worden sind. Da der Benzoesäuregehalt der dem Handel entnommenen Proben vorher nicht bekannt war, wurden nach dessen Ermittlung (vergl. Tabelle I) den einzelnen Margarineproben wechselnde abgewogene Mengen reiner Benzoesäure zugesetzt, die dann, sofern die ursprüngliche Probe benzoesäurefrei war, unverändert, im anderen Falle vermehrt um den ursprünglichen Gehalt wiedergefunden werden mußten (Tab. II).

Tabelle I.
Bestimmung von Benzoesäure in Handelsmargarine.

Marke der Margarine	Wasser %	Zur Titration verbrauchte ccm $\frac{1}{10}$ N.-Natronlauge	mg Benzoesäure in 50 g Margarine
AI	8,89	0,82	17,4
AII	11,13	0,96	20,6
O	16,18	0,78 } 0,77	16,7 } 16,9
		0,76 }	17,1 }
G	12,28	1,00	21,6
V	11,47	2,97 } 2,94	63,8 } 63,2
		2,91 }	62,7 }
B	17,08	0,01 } 0,05	[0,2 } 1,1]
		0,09 }	[1,9 }
K	10,35	0,07	[1,5]

¹⁾ a. a. O. II, 29 b.

Daß es sich auch bei dem in den ersten 4 Marken gefundenen, verhältnismäßig niedrigen Benzoessäuregehalt von 0,03—0,04% in der Tat um Benzoessäure handelte, wurde durch den stark positiven Ausfall der qualitativen Prüfung des Rückstandes nach dem Nachweisverfahren in der Anweisung zur chemischen Untersuchung des Weines¹⁾ für die Marken A^{II} und G bestätigt. Dagegen lagen bei den Marken B und K (scheinbarer Benzoessäuregehalt 0,002—0,003%) offenbar nur verunreinigende Säuren (vielleicht Milchsäure) vor.

Tabelle II.

Bestimmung von Benzoessäure in damit versetzter Margarine.

Marke der Margarine	Wasser %	mg Benzoessäure in 50 g Margarine			Zur Titration verbraucht ccm $\frac{1}{10}$ N.-Lauge	mg Benzoessäure wiedergefunden	Differenz in mg
		ursprünglich vorhanden	zugesetzt	im ganzen			
A I	8,89	17,4	176,7	194,1	9,15	194,5	+ 0,4
"	"	"	280,9	298,3	14,03	298,2	- 0,1
"	"	"	351,1	368,5	17,34	368,5	0
A II	11,13	20,6	113,1	133,7	6,15	132,1	- 1,6
"	"	"	151,8	172,4	7,86	168,8	- 3,6
" ²⁾	"	16,5	146,5	163,0	7,62	161,9	- 1,1
O	16,18	16,9	170,5	187,4	8,77	192,9	+ 5,5
"	"	"	207,2	224,1	10,25	225,4	+ 1,3
"	"	"	162,4	179,3	8,24	181,2	+ 1,9
G	12,28	21,6	105,8	127,4	5,95	128,5	+ 1,1
"	"	"	164,0	185,6	8,63	186,4	+ 0,8
"	"	"	123,4	145,0	6,85	147,9	+ 2,9
V ³⁾	11,47	63,2	291,0	354,2	15,93	342,7	- 11,5
"	"	"	164,0	227,2	10,40	223,8	- 3,4
B	17,08	0	148,5	148,5	6,57	145,1	- 3,4
"	"	0	161,6	161,6	7,26	160,4	- 1,2
"	"	0	106,0	106,0	4,81	106,2	+ 0,2
"	"	0	141,2	141,2	6,37	140,7	- 0,5
"	"	0	193,8	193,8	8,68	191,7	- 2,1
K	10,35	0	95,2	95,2	4,39	94,0	- 1,2
"	"	0	123,5	123,5	5,66	121,1	- 2,4
"	"	0	137,1	137,1	6,42	137,4	+ 0,3

Die Ergebnisse sind, wie Tabelle II zeigt, durchaus befriedigend. Die Abweichungen zwischen der in 50 g Margarine vorhandenen und wiedergefundenen Menge Benzoessäure betragen im allgemeinen nur wenige Milligramm und erreichten nur in einem Falle, bei einer eigelreichen Margarine, deren Auszug zu lästiger Emulsionsbildung neigte, 11 mg von den im ganzen vorhandenen 354 mg. Für den Zweck der Prüfung von Margarine auf einen zulässigen Höchstgehalt von Benzoessäure reicht das Verfahren, das in einem Arbeitstage bequem auszuführen ist, zweifellos aus.

Von Reagenzien werden nur Natriumbicarbonat und Ammoniumsulfat beansprucht, sowie die Mischung von Äther und Petroläther, die unbedenklich nach dem Abdestillieren immer wieder benutzt werden kann.

¹⁾ a. a. O. II, 29 a.²⁾ Statt 50 g Margarine wurden nur 40 g angewandt.³⁾ Diese Margarine war stark eigelhaltig.

Die Anwesenheit von Salicylsäure oder Zimtsäure in der Margarine würde die Benzoesäurebestimmung fehlerhaft machen. Da jedoch als zulässiges Konservierungsmittel für Margarine nur Benzoesäure in Betracht kommt, so wäre eine Margarine, in der Zimtsäure oder Salicylsäure qualitativ nachgewiesen ist, ohne weiteres zu beanstanden und eine Bestimmung der daneben etwa noch vorhandenen Benzoesäure für die Nahrungsmittelkontrolle kaum noch erforderlich.

Die Ausführung des Bestimmungsverfahrens ist im folgenden zusammengefaßt.

Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Benzoesäure in Margarine.

50 g der gut durchgemischten Margarine werden in eine weithalsige Pulverflasche mit eingeschliffenem Stöpsel von etwa 300 ccm Inhalt gebracht und mit einer Pipette 100 ccm einer 0,1 N.-Natriumbicarbonatlösung zugefügt; der Stöpsel wird leicht aufgesetzt und die Flasche in einem Wasserbade von etwa 60° unter wiederholtem Umschwenken bis zum Schmelzen der Margarine erwärmt. Darauf wird die Flasche unter mehrfachem Lüften des Stopfens mindestens zwei Minuten lang kräftig geschüttelt. Man läßt dann nach Einschieben eines Stückchens Papier in den Flaschenhals erkalten, bis die Fettschicht erstarrt ist. Nach Durchstechen der Fettschicht wird die Lösung durch ein trockenes Faltenfilter in ein trockenes Gefäß gegossen und vom Filtrat werden 75 ccm in einen Meßkolben von 100 ccm übergeführt, in dem sich etwa g reines Ammoniumsulfat befinden. Nach kräftigem Umschütteln läßt man den Kolben etwa $\frac{1}{2}$ Stunde, bis zur Lösung des Ammoniumsulfats, stehen, füllt unter Schwenken des Kolbens (um ein Ansammeln der entstandenen Flocken an der Oberfläche zu vermeiden), auf 100 ccm auf und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter in einen trockenen Kolben. Von dem Filtrat werden 80 ccm in einem Scheidetrichter von etwa 200 ccm Inhalt mit etwa 3 ccm verdünnter Schwefelsäure angesäuert und sodann fünfmal mit je 40 ccm einer Mischung von gleichen Raumteilen Äther und unter 60° siedendem Petroläther ausgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge werden in einem zweiten Scheidetrichter von etwa 250 ccm Inhalt gesammelt, dreimal mit je 5 ccm Wasser gewaschen und in ein weithalsiges Kölbchen, das einige Körnchen Bimssteinpulver enthält, gebracht. Auf einem schwach siedenden Wasserbade wird das Lösungsmittel langsam und tropfenweise abdestilliert und der letzte Teil bei Zimmertemperatur durch Darüberleiten eines Luftstroms verjagt. Der Rückstand wird mit etwas Wasser aufgenommen, nach Zusatz von 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung mit 0,1 N.-Lauge bis zur starken, bleibenden Rotfärbung versetzt, zum Sieden erhitzt, mit 0,1 N.-Salzsäure bis zur Entfärbung und nun wieder mit 0,1 N.-Lauge bis zur ersten Rosafärbung titriert.

Bei der Berechnung der Benzoesäure ist der vorher bestimmte Wassergehalt der Margarine zu berücksichtigen, insofern er das Volumen der angewandten Bicarbonatlösung vermehrt. Sind z. B. 50 g einer Margarine mit w% Wassergehalt angewandt und zur Titration der Benzoesäure im ganzen a ccm 0,1 N.-Lauge verbraucht worden, so ist der Prozentgehalt der Margarine an Benzoesäure

$$= a \cdot 0,012208 \cdot \frac{100 + \frac{w}{2}}{75} \cdot \frac{100}{80} \cdot 2 = a \cdot 0,012208 \cdot \frac{100 + \frac{w}{2}}{30}$$