

bestimmungen von Aldrin und Dieldrin in den Organen gesundheitsschädigende Wirkungen nicht zu erwarten.

### *Zusammenfassung*

In Fütterungsversuchen an Ferkeln wurde der Einfluß des Insektizids Aldrin auf Allgemeinbefinden, Gewichtszunahme, Futterverwertung, Vitamin-A-Gehalt im Blutplasma und Leber, sowie die Rückstandsbildung an Aldrin und Dieldrin in verschiedenen Organen geprüft. Gestaffelte Aldrinzusätze (25–100 ppm) zu einem Milchersatzfutter führten bei 3 Tieren der höchsten Dosierungsstufe (= 3,7 mg Aldrin/kg Körpergewicht täglich) in der 1.–2. Versuchswoche vorübergehend zu nervösen Ausfallserscheinungen: Motorische Unruhe, Muskelzittern, klonische Krämpfe, Dyspnoe, Pupillenstarre, Sehstörungen. Unterschiede im Vitamin-A-Plasmawert zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen wurden nicht festgestellt. Aldrin- und Dieldrinrückstände im Gewebe, besonders im Unterhautfettgewebe stiegen mit der Aldrinkonzentration im Futter an. 3 mg Aldrin bzw. 1,5 mg Dieldrin per os beeinflußte die Vitamine -A-Speicherung in der Leber von Ratten nachhohe Vitamin-A-Dosierung nicht.

### *Literatur*

1. A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington D. C., S. 654 (1960). — 2. Bericht des Wissenschaftlichen Beratungsausschusses des Präsidenten der Vereinigten Staaten von Amerika, „Der Gebrauch von Pestiziden“, Herausgeber: Interparlamentarische Arbeitsgemeinschaft (Bonn 1963). — 3. BRÜGGEMANN, J. und J. TIEWS, Zt. Tierernähr. Futtermittelk. **11**, 21–32 (1956). — 4. GOODWIN, E. S., R. GOULDEN und J. J. REYNOLDS (Persönliche Mitteilung, 1961). — 5. GRAHAM, R.C.B. und U. G. ALLMARK, Canad. J. Publ. Health **49**, 430–434 (1958). — 6. KÜBLER, W., Qualitas plantarum et Materiae Vegetabilis **7**, 229 (1960). — 7. KÜBLER, W., (Persönliche Mitteilung, 1960a). — 8. O'DONNELL, A. E., M. M. NEAL, F. T. WEISS, J. M. BANN, T. J. DELINO und S. C. CAU, Agric. Food Chem. **2**, 573 (1954) und **3**, 757 (1955). — 9. SCHUPHAN, W., Zt. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz **67**, 340 (1960). — 10. TIEWS, J. Vitamine u. Hormone **8**, 185 (1959).

Anschrift der Verfasser:

München 22, Veterinärstraße 13

*Aus dem Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund*

## **Papierchromatographische Thiamin-Bestimmung in Nahrungsmitteln**

VON LIESEL WILDEMANN

Mit 4 Abbildungen und 3 Tabellen

(Eingegangen am 22. Juni 1964)

In der Veröffentlichung über quantitative Bestimmung des Vitamins B<sub>1</sub> in Nahrungsmitteln mit Hilfe der Papierchromatographie aus dem Jahre 1960 (1) wurde zum Schluß erwähnt, daß es nicht möglich sei, Thiamin in stark zuckerhaltigen Lebensmitteln papierchromatographisch zu bestimmen. In der Zwischenzeit ist es gelungen, eine Aufbereitungsform zu finden, die es erlaubt, alle

Nahrungsmittel und Nahrungsgemische auf diesem Wege quantitativ auf ihren Vitamin B<sub>1</sub>-Gehalt zu analysieren. Auch die Thiamindisulfid-Aufspaltung, die damals noch ein ungelöstes Problem darstellte, ist inzwischen möglich geworden.

In der Abhandlung „Vitaminbestimmung in Lebensmitteln mit chemischen Methoden“ (2) beschrieb die Firma Hoffmann-La Roche 1949 die Bestimmung des Vitamins B<sub>1</sub> mittels gärender Bäckerhefe. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft der Bäckerhefe, während des Gärens der Nährlösung alles Thiamin zu entziehen und adsorptionsähnlich an die Hefe anzulagern. Nach kurzem Erhitzen der Hefe bis zum Siedepunkt und Zugabe von Salzlösung sollte es dann wiedergewonnen und ohne störende Beimengungen mittels der Thiochrommethode bestimmt werden können. Diese Methode wurde seit Jahren wieder aufgegeben, weil sie keine befriedigenden Ergebnisse brachte. Sie zeigte aber eine Möglichkeit auf, störende Zucker zu beseitigen. Nach der angegebenen Vorschrift erhielten wir aber wechselnde Werte. Dabei beobachteten wir, daß die Fluoreszenzwerte des einfachen Hefegärtests ohne Zusatz von Thiamin sich meist um Null bewegten, ein Hinweis, daß die Zellwände der Hefe bei der Aufarbeitung nicht geöffnet wurden. Zuweilen lagen die Fluoreszenzwerte allerdings sehr hoch. Das könnte auf Zerreißen einiger Zellwände bei der Herstellung der Preßhefe, die zu jedem Ansatz neu gekauft wurde, hindeuten; denn die Hefezellen selbst enthalten große Mengen an Thiamin.

Damit werden schon einige mögliche Fehlerquellen dieser Art der Vitamin B<sub>1</sub>-Analyse sichtbar. Um sie auszuschalten, stellten wir einen Hefepreßsaft nach LEBEDEV (3) her und entfernten aus ihm durch Ausschütteln mit Fullererde das Thiamin. Der so erhaltene thiaminfreie Mazerationssaft ist zwar nicht mehr gärfähig, spaltet aber die Disaccharide in einfache Zucker auf, die die Papierchromatographie nicht störend beeinflussen. Außerdem zeigt er keinerlei Thiaminsynthese aus den Teilstücken Pyrimidin und Thiazol. Statt Bäckerhefe verwenden wir Bierhefe aus der Kronenbrauerei in Dortmund. Die Bierhefe soll laut Literatur (4) keine B<sub>1</sub>-Disulfide enthalten im Gegensatz zur Bäckerhefe. Wir können bestätigen, daß die von uns verwendete Bierhefe davon frei ist. Setzte man dem Hefepreßsaft Thioglykolat und MOHRsches Salz (5) zu, so ergab sich kein Unterschied zu den Thiaminwerten, die ohne diese Zusätze erhalten wurden. Mit der 20fachen Menge Hefesaft als die, die für die spätere Analyse erforderlich ist, resultierten im Durchschnitt aller Analysen 0,6 µg. mit Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

Das zweite noch ausstehende Problem bei Nahrungsanalysen betraf die Disulfidspaltung. Ein Vergleich reiner Thiamin- und Thiamindisulfid-Lösungen, die mit Hefesaft aufgearbeitet wurden, zeigte die vollständige Aufspaltung der Disulfide durch den Mazerationssaft. Die hier beschriebene Methode löst also beide Probleme gleichzeitig.

## Experimenteller Teil

### 1. Darstellung des Hefepreßsaftes nach LEBEDEV

Zur Herstellung einer Trockenhefe aus flüssiger Bierhefe (Kronenbrauerei Dortmund) wird die Hefeschlämme 10–12mal mit Leitungswasser gewaschen, bis die überstehende Flüssigkeit hell und nur noch schwach opaleszent ist. Dann wird zentrifugiert und anschließend abgenutscht, bis die Hefe krümelig wird. Darauf streicht man sie durch ein feines Sieb und trocknet auf Filterpapier bei 30 °C. Diese Trockenhefe ist bei Zimmertemperatur lange haltbar. Sie dient als Ausgangssubstanz für den Mazerationssaft nach LEBEDEV. Wir

suspendieren 10 g Trockenhefe in 50 ml aqua dest. und lassen sie 2 Stunden bei 38 °C unter zeitweiligem Rühren stehen. Danach wird zentrifugiert (10 Minuten bei 4000 Umdrehungen). Die überstehende Flüssigkeit wird mit Essigsäure auf pH 3,5 gebracht und 30 Minuten mit 2 g Frankonit (Frankonit KCl prakt. Nr. 21790 Serva, Heidelberg) geschüttelt, um aus beschädigten Hefezellen getretenes B<sub>1</sub> zu eliminieren. Danach wird 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand filtriert. Dieser Hefesaft wird jedesmal am Vortag der Nahrungsanalyse angesetzt.

## 2. Nahrungsanalyse

8 ml des Mazerationssaftes nach LEBEDEV, die etwa 2 g Trockenhefe entsprechen, werden für je eine Nahrungsanalyse angewandt. Diese Hefemenge genügt, um 12–14 g Disaccharide zu spalten und ist im allgemeinen ausreichend. Die zu analysierende Nahrungsmenge richtet sich nach ihrem ungefähren B<sub>1</sub>-Gehalt, den man aus Tabellen entnimmt. In 0,2–0,4 ml., die wie nachher beschrieben auf das Chromatographiepapier aufgetropft werden, sollen nach Möglichkeit wenigstens 0,2 µg Thiamin enthalten sein. Man wägt die betreffende Menge eines Nahrungsmittels ein, zerkleinert und homogenisiert in 100–200 ml aqua dest. mit einem Ultra Turrax-Gerät. Von einer Ansäuerung konnte abgesehen werden. Aus einem Nahrungsgemisch, etwa einer Tagesnahrung, das nach der Homogenisierung in aqua dest. auf 4000 ml aufgefüllt wird, werden 200 ml entnommen und auf pH 4,8 gebracht (zur Einstellung verwenden wir 2 n HCl oder 2 n NaOH). Es werden 0,5 g in aqua dest. gelöste Taka-Diastase zugesetzt und die Proben zur Aufspaltung der Polysaccharide in Disaccharide sowie des Thiamindiphosphats in Thiamin 30 Minuten bei 55 °C (Temperatur im Inneren der Gefäße) im Trockenschrank stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit gibt man in das Analysengemisch 8 ml Mazerationssaft und stellt auf einen pH-Wert von 6,1 ein.

Unter ständigem mechanischen Rühren bleibt das Nahrungsgemisch 2 Stunden bei 38 °C im Wasserbad stehen. Die Gefäße (600 ml Bechergläser) sind mit einem Kunststoffdeckel versehen, der ein mechanisches Rührwerk trägt, das auf 100 Umdrehungen pro Minute eingestellt ist. Nach 2 Stunden bringt man das Gemisch auf pH 3,5. Dann wird das Gesamtvolumen festgestellt und filtriert.  $\frac{1}{10}$  der Gesamtmenge wird zur Fällung des Proteins mit dem Doppelten der Menge 100%igem Methanol bzw. bei eiweißreichen Nahrungsmitteln, z. B. Eiern, Milch, Käse, mit der 4fachen Menge 100%igem Methanol versetzt und die Mischung für 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt, nach Ablauf dieser Zeit 10 Minuten mit 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und ein möglichst großer aliquoter Teil der klaren überstehenden Flüssigkeit in der rotierenden Vakuumdestillation bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml 80%igem Methanol aufgenommen, 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt, zentrifugiert und dekantiert. 0,2–0,4 ml der klaren Flüssigkeit werden auf das Chromatographiepapier gebracht (MACHÉREY und NAGEL, Düren Nr. 2214 FF, 56 × 58). Das Chromatogramm wird zweiseitig absteigend entwickelt. Für die erste Richtung benutzen wir als Lösungsmittel Isopropanol: Essigsäure (5%ig), für die zweite Isopropanol: Wasser, das mittels NaOH auf pH 12 gebracht wurde. In beiden Fällen ist das Mischungsverhältnis 4:1. Nach Entwicklung des Chromatogramms in der 1. Richtung wird der Papierbogen bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und der das Chromatogramm ent-

haltende Teil des Bogens mit alkalischer Hexacyanoferrat-III-Lösung (0,3%ige  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung und 3,3%iger  $Na_2CO_3$ -Lösung zu gleichen Teilen) besprüht. Dadurch wird das Thiamin zu Thiochrom oxydiert. Der restliche Bogen wird mit 0,5%iger NaOH-Lösung besprüht, um sicher zu gehen, daß das für das Thiochrom notwendige alkalische Milieu erhalten bleibt. Der Bogen wird wieder bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und um 90° gedreht in einen Chromatographiekasten mit der alkalischen Isopropanollösung gehängt. Die Entwicklung der Chromatogramme geschieht in beiden Fällen über Nacht, in 16 Stunden.

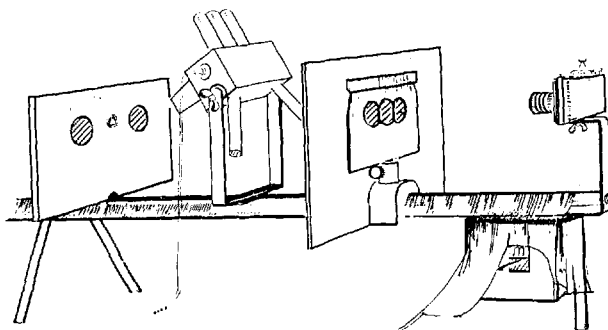


Abb. 1 zeigt den Aufbau der Photoanlage.

Nach der Entwicklung in der 2. Richtung wird wie vorher getrocknet. Nun ist das Thiochrom, isoliert von sämtlichen anderen Beimischungen auf dem Bogen, mittels einer Hanauer Quarzlampe mit Uviolglasscheibe als leuchtend blau-violetter Fleck zu sehen. Der Fleck wird noch etwas verkleinert, indem man ihn mit einem Streifen, der vollkommen frei von Fluoreszenz sein muß, ausschneidet und aufsteigend in Dioxan- und 5%iger  $K_2HPO_4$ -Lösung (pH 9) im Verhältnis 7:3 konzentriert. Danach wird der Streifen bei 60 °C getrocknet, der Thiochromfleck mit einem ihm in Form und Größe gleichenden Leerfleck des Streifens ausgeschnitten und fotografiert.

### 3. Auswertung der Papierchromatographie des Thiamins als Thiochrom

#### a) Aufbau der Photoanlage (Abb. 1)

Auf einer optischen Bank ist von rechts nach links zuerst ein Photoapparat zu sehen. Darunter befindet sich ein mechanisches Zählwerk zur automatischen Einstellung der Belichtungszeit, das mit einem in den Photoapparat eingebauten Auslöser gekoppelt ist. Auf der optischen Bank ist ganz links eine schwarze Wand angebracht, an die der Fluoreszenzfleck und der oben erwähnte Leerfleck angebracht werden (auf die runden Scheiben rechts und links). In der Mitte zwischen beiden befindet sich ein in der Farbe des Thiochroms fluoreszierendes Mineral (Cumberland-Flußspatkristall). In einiger Entfernung von der schwarzen Wand befindet sich ein Hanauer Quarzbrenner Q 81 mit einem vorgeschalteten, UV-durchlässigen Filter UG 1 von 2 mm Dicke der Firma Schott für die Hg-Linie 3660 Å. Die Lampe ist von einem Gehäuse mit 5 Entlüftungsröhren umgeben. Bei Bestrahlung mit der Wellenlänge 3660 Å senden die Flecken und

der Standard ein Fluoreszenzlicht von höherer Wellenlänge aus, von dem durch Vorschalten eines Filters aus den Schottischen Gläsern GG<sub>3</sub> und BG<sub>12</sub> (jeweils in 2 mm Dicke) vor das Objektiv des Photoapparates die spezifische Thiochromfluoreszenz zwischen 4300 und 4800 Å herausgefiltert wird. Das von dem zu testenden Wert, dem Papierwert und dem Standard ausgesandte Licht wird von 3 Sammellinsen aufgenommen. Diese Linsen erscheinen, von der Kamera aus gesehen, gleichmäßig über ihre ganze Fläche hin ausgeleuchtet. Sie befinden sich zwischen der Rückwand mit den 3 fluoreszierenden Objekten und dem Photoapparat. Sie sind zur Abschirmung von Streulicht vor einer schwarzen Wand aufgebaut, die nur in Höhe und Breite der Linsen eine Öffnung frei läßt.

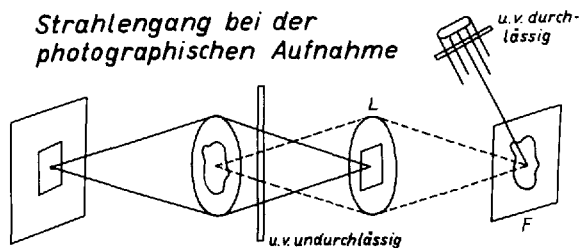


Abb. 2. Vgl. Text.

Die Linsen haben eine Brennweite von 5 Dioptrin. Ohne die Zwischenschaltung dieser Sammellinsen würde der Film die verschiedene Form und Größe der Flecken, sowie die ungleiche Verteilung der Fluoreszenz auf den Flecken wiedergeben. Aus diesem Grund werden die drei Flecken gleichzeitig durch je eine Sammellinse in das Objektiv der Kamera abgebildet und zwar so, daß das Bild der größten vorkommenden Flecken noch in das Objektiv der Kamera hineinpaßt (größere Flecken müssen zerschnitten werden). Durch das Objektiv werden die Linsen dann auf dem Film abgebildet.

Abb. 2 gibt den Strahlengang für eines der 3 fluoreszierenden Objekte wieder.

Erforderlich ist ein lichtstarkes Objektiv. Die Scharfeinstellung auf die Linsen wird ohne Vorschaltung des Filters vor das Objektiv des Photoapparates bei geöffneter Rückwand mit einer Mattscheibe anstelle des Films vorgenommen. Zweckmäßigerweise hängt man über eine der Linsen ein Kalenderblatt mit deutlichen Zahlen und leuchtet es mit einer normalen Lampe an. Für unsere Photoapparate ist die Entfernung zwischen Objektiv und dem Linsensystem zu kurz, um eine Scharfeinstellung zu erreichen. Wir haben daher durch Zwischenschaltung eines Rings (von ca. 8 mm Länge) den Abstand zwischen Objektiv und Film verlängert.

Um die Papierflecken an der Rückwand so anzubringen, daß sie mit den Linsen korrespondieren, heftet man kreisrunde weiße Papierflecken mit einem Durchmesser von etwa 4 cm an die Rückwand der Anlage und verschiebt bei geöffnetem Photoapparat die mit einer normalen Lampe angeleuchteten kreisrunden Flächen so lange, bis sie voll und ganz im Objektiv der Kamera zu sehen sind. Diese Einstellung braucht man nur einmal vorzunehmen, wenn man anschließend statt der weißen kreisrunden Papierflecken schwarze Schaumgummipolster an die Rückwand der Photoanlage klebt und die anfallenden Test- und Leerwerte darauf mit einer Stecknadel feststeckt.

Mit der Einstellung der Linsenentfernung von der Kamera und der Aufnahme der Flecken in das Objektiv ergibt sich der Aufbau der Gesamtapparatur von selbst. Es bleibt noch übrig, die Entfernung der UV-Lampe von der die Flecken tragenden Rückwand einzustellen. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Wand links und rechts gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Die Belichtungszeit beträgt bei unserer Einstellung der Anlage und unserem Filmmaterial 20 Sekunden. Wir benutzen einen hochempfindlichen Spektralfilm,

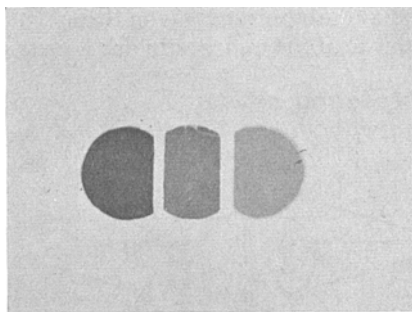


Abb. 3. Vgl. Text.

der nur den blauen Teil des Spektrums aufnimmt [Kodak Spectrum Analysis No. 3, Safety Film, Eastman Kodak Company<sup>1)</sup>]. Normale Amateurfilme lassen sich nicht mehr verwenden, da sie zu wenig blau empfindlich sind.

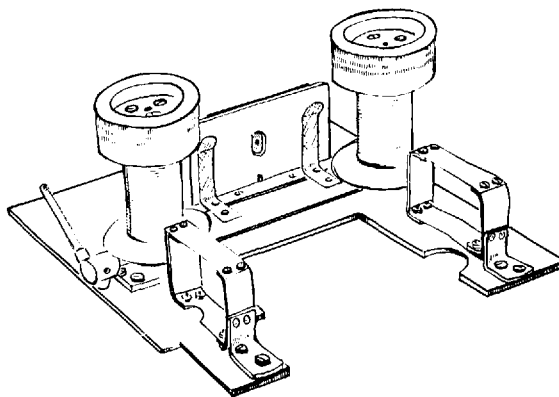


Abb. 4. Vgl. Text.

#### *b) Auswertung der photographischen Werte:*

Auf dem Film sind nach der Aufnahme 3 Schwärzungsflecken in Form der 3 Linsen zu sehen. Es sind der Analysenwert, der Standardwert und der Papierleerwert.

Diese 3 Werte werden in einem normalen Photometer, in dessen Strahlengang anstelle eines Filters eine plankonvexe Linse eingeschaltet ist, gemessen.

<sup>1)</sup> Auslieferungslager: Winopal, Hannover Isernhagen.

Nahe vor oder hinter dem Brennpunkt der Linse, je nach den jeweiligen Möglichkeiten, befindet sich ein kleiner Einsatz für das Photometer mit einer punktförmigen Öffnung, an der die Aufnahmen vorbeigezogen werden. Die Empfindlichkeit des Photometers wird so eingestellt, daß der Zeiger an einer klaren ungeschwärzten Stelle des Films die Schwärzung „Null“ anzeigt.

Die gemessenen Extinktionswerte der 3 Aufnahmen ergeben dann direkt die Schwärzungswerte. Der Standardwert muß zur Berechnung mit herangezogen werden, weil er auftretende Stromschwankungen, die sich in der Helligkeit der UV-Lampe stark bemerkbar machen können, eliminiert. In die Schwärzungswerte geht natürlich die Schwärzungskurve des Films ein, die bei der Berechnung der Analysen berücksichtigt werden muß. Es geschieht durch 2 Konstanten  $\kappa$  und  $\gamma$ . Solange man dasselbe photographische Material verwendet (Filme mit der gleichen Emulsionsnummer) und solange man die Entwicklungsbedingungen konstant hält (auch da Nr. des Entwicklers beachten), kann man alle Aufnahmen mit den einmal bestimmten Konstanten  $\kappa$  und  $\gamma$  auswerten. Wie man  $\kappa$  und  $\gamma$  ermittelt wird weiter unten beschrieben.

Tabelle 1.

| Rechenschema:  |                                   | Testwert<br>T | Beispiel:<br>Leerwert<br>L | Standardwert<br>St |
|--|-----------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------|
| Gemessene Extinktionen (Schwärzung)  | S                                 | 782           | 265                        | 525                |
| In die Tabelle mit S eingehen, D ablesen   | D                                 | 78            | 340                        | 154                |
| Multiplikation von D mit der Filmkonstanten $\kappa$ in unserem Falle ist $\kappa = 0,7$   | $\kappa D$                        | 55            | 238                        | 108                |
| Subtraktion der $\kappa D$ -Werte von den Schwärzungswerten  | $S - \kappa D$                    | 727           | 27                         | 417                |
| Division von $S - \kappa D$ durch die Konstante $\gamma$ , in unserem Falle 1,18, ergibt die Logarithmen der Fluoreszenzintensitäten Y   | $\frac{S - \kappa D}{\gamma} = Y$ | 617           | 23                         | 353                |
| Subtraktion $Y_T - Y_L$  | $Y_T - Y_L$                       |               | 594                        |                    |
| Dieser Wert enthält noch den Papieruntergrund  | D                                 |               | 128                        |                    |
| Der zugehörige D-Wert wird aus der Tabelle aufgesucht und von $Y_T$ abgezogen  | $Y_T - D$                         |               | 617 - 128 = 489            |                    |
| Dies ist der logarithmische Fluoreszenzwert des Thiochroms, der in Beziehung zum transformierten Standardwert gesetzt wird (in diesem Falle subtrahiert, da die Zahlen logarithmisch sind) | $(Y_T - D) - Y_{St}$              |               | 489 - 353 = 136            |                    |

Diese Berechnung handhabt sich nach kurzer Übung sehr schnell. Sie erfordert nur 30 Sekunden bei Benutzung des Aristo-Respektra-Rechengengerätes für spektrochemische Analysen (7), zu beziehen durch die Firma Dennert & Pape, Hamburg.

Man registriert also zuerst die 3 Extinktionen, die die Fluoreszenzintensität des Thiochroms, des Standards und des Papierleerwertes enthalten. Nun muß die Beeinflussung der Schwärzung durch das Papier und das Filmmaterial (sog. Untergrund) eliminiert werden. Zum Schluß erhält man den Logarithmus des Intensitätsverhältnisses von Vitaminfluoreszenz zur Fluoreszenz des Standards. Dieser Wert stellt die eigentliche Meßgröße dar; er kann positiv oder negativ sein. Mit ihm geht man in die Eichkurve ein. Zur Aufnahme der Eichkurve benutzt man vorteilhaft halblogarithmisches Papier. Man braucht dann nicht auf die Nummeri überzugehen. Die Ordinate stellt in logarithmischem Maßstab die  $\mu\text{g}$  Mengen von Thiamin dar, von 0,1  $\mu\text{g}$ –1,0  $\mu\text{g}$ . Die Abszisse gibt die Lichtintensität  $y$  linear wieder. Zur Ausmerzung des Untergrundes benutzt man eine Tabelle von Differenzlogarithmen [HONERJÄGER-SOHN und KAISER (6)], die im Anhang abgedruckt ist. Ihre Werte werden im folgenden Rechenchema (Tab. 1) mit D bezeichnet, die Schwärzungswerte mit S.

### Die Bestimmung der Konstanten $\kappa$ und $\gamma$ des Filmmaterials

#### Bestimmung von $\kappa$

Ein schwacher und ein stärkerer Fluoreszenzfleck von reinem, auf dem Papier mit Kaliumhexacyanoferrat III oxydiertem  $\text{B}_1$ , etwa 0,5 und 0,8  $\mu\text{g}$  werden photographiert. Dabei werden die zwischen Kamera und Flecken befindlichen Linsen zur Hälfte mit 2 gleichen Grauscheiben, die nicht sehr dunkel sein dürfen (Durchlässigkeit 30–50%), abgedeckt. Man erhält dadurch auf dem Film 4 Schwärzungsstufen. Von dem stärkeren Fleck mögen sie  $\text{Sa}_1$  und  $\text{Sa}_2$  sein, von dem schwächeren  $\text{Sb}_1$  und  $\text{Sb}_2$ . Dabei ist zu beachten, daß  $\text{Sb}_2$  bereits im gekrümmten Teil der Schwärzungskurve liegen muß. Die entsprechenden D-Werte aus der Tabelle seien  $\text{Da}_1$ ,  $\text{Da}_2$ ,  $\text{Db}_1$  und  $\text{Db}_2$ .

$$\frac{\text{Sa}_1 - \text{Sa}_2 - (\text{Sb}_1 - \text{Sb}_2)}{\text{Da}_1 - \text{Da}_2 - (\text{Db}_1 - \text{Db}_2)} = \kappa$$

$$\frac{0,517 - 0,270 - (0,360 - 0,165)}{0,157 - 0,334 - (0,249 - 0,500)} = 0,7$$

Dieser Wert darf für die Fluoreszenzberechnung der Thiaminwerte abgerundet werden.

#### Berechnung von $\gamma$

Die abgelesenen Schwärzungen der vier obengenannten Schwärzungsstufen sind

| $\text{Sa}_1$ | $\text{Sa}_2$ | $\text{Sb}_1$ | $\text{Sb}_2$ |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,517         | 0,270         | 0,360         | 0,165         |

Die zugehörigen, aus der Tabelle abzulesenden D-Werte sind:

| $\text{Da}_1$ | $\text{Da}_2$ | $\text{Db}_1$ | $\text{Db}_2$ |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,157         | 0,334         | 0,249         | 0,500         |

Die D-Werte werden mit  $\kappa$  multipliziert, in unserem Beispiel mit 0,7.

|       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|
| 0,110 | 0,234 | 0,175 | 0,351 |
|-------|-------|-------|-------|

Diese Zahlen werden von den Extinktionswerten  $\text{Sa}_1$ ,  $\text{Sa}_2$ ,  $\text{Sb}_1$  und  $\text{Sb}_2$  abgezogen. Man erhält folgende Zahlen, die man gebräuchlicherweise mit P bezeichnet:

| $\text{Pa}_1$ | $\text{Pa}_2$ | $\text{Pb}_1$ | $\text{Pb}_2$ |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,407         | 0,036         | 0,185         | –0,186        |



$\gamma$  kann aus  $\text{Pa}_1 - \text{Pa}_2$  oder aus  $\text{Pb}_1 - \text{Pb}_2$  errechnet werden. Man nimmt aus den beiden Differenzen den Mittelwert und dividiert ihn durch die Extinktion des benutzten Graufilters, die man direkt am Photometer ablesen kann (hier 0,314).

In unserem Fall ergibt sich daher:

$$\gamma = \frac{0,371}{0,314} = 1,18$$

Durch die Umrechnung der Schwärzungswerte mit Hilfe der Konstanten  $\kappa$  zu den P-Werten erhält man aus der S-förmigen Schwärzungskurve, in deren unterem Teil eine Anzahl der Schwärzungswerte liegen kann, eine fast geradlinige Kennlinie P, auf der sich nun alle vorkommenden Schwärzungswerte befinden.  $\gamma$  gibt die Neigung dieser Kennlinie P an. Sie geht durch Division aller P-Werte durch die Größe  $\gamma$  in die Rechnung ein.

Tabelle 2.  
Zahlentafel nach M. HONERJÄGER-SOHN und H. KAISER

| Eingang | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0,99    | 047 | 047 | 047 | 047 | 046 | 046 | 046 | 046 | 046 | 046 |
| 0,98    | 048 | 048 | 048 | 048 | 048 | 047 | 047 | 047 | 047 | 047 |
| 0,97    | 049 | 049 | 049 | 049 | 049 | 049 | 049 | 048 | 048 | 048 |
| 0,96    | 050 | 050 | 050 | 050 | 050 | 050 | 050 | 050 | 049 | 049 |
| 0,95    | 052 | 052 | 051 | 051 | 051 | 051 | 051 | 051 | 051 | 050 |
| 0,94    | 053 | 053 | 053 | 053 | 052 | 052 | 052 | 052 | 052 | 052 |
| 0,93    | 054 | 054 | 054 | 054 | 054 | 054 | 053 | 053 | 053 | 053 |
| 0,92    | 056 | 055 | 055 | 055 | 055 | 055 | 055 | 055 | 055 | 054 |
| 0,91    | 057 | 057 | 057 | 057 | 056 | 056 | 056 | 056 | 056 | 056 |
| 0,90    | 058 | 058 | 058 | 058 | 058 | 058 | 058 | 057 | 057 | 057 |
| 0,89    | 060 | 060 | 060 | 059 | 059 | 059 | 059 | 059 | 059 | 059 |
| 0,88    | 061 | 061 | 061 | 061 | 061 | 061 | 060 | 060 | 060 | 060 |
| 0,87    | 063 | 063 | 063 | 062 | 062 | 062 | 062 | 062 | 062 | 061 |
| 0,86    | 065 | 064 | 064 | 064 | 064 | 064 | 064 | 063 | 063 | 063 |
| 0,85    | 066 | 066 | 066 | 066 | 065 | 065 | 065 | 065 | 065 | 065 |
| 0,84    | 068 | 068 | 067 | 067 | 067 | 067 | 067 | 067 | 066 | 066 |
| 0,83    | 070 | 069 | 069 | 069 | 069 | 069 | 068 | 068 | 068 | 068 |
| 0,82    | 071 | 071 | 071 | 071 | 071 | 070 | 070 | 070 | 070 | 070 |
| 0,81    | 073 | 073 | 073 | 072 | 072 | 072 | 072 | 072 | 072 | 071 |
| 0,80    | 075 | 075 | 075 | 074 | 074 | 074 | 074 | 074 | 073 | 073 |
| 0,79    | 077 | 077 | 076 | 076 | 076 | 076 | 076 | 076 | 075 | 075 |
| 0,78    | 079 | 079 | 078 | 078 | 078 | 078 | 078 | 077 | 077 | 077 |
| 0,77    | 081 | 081 | 080 | 080 | 080 | 080 | 080 | 079 | 079 | 079 |
| 0,76    | 083 | 083 | 082 | 082 | 082 | 082 | 082 | 081 | 081 | 081 |
| 0,75    | 085 | 085 | 085 | 084 | 084 | 084 | 084 | 083 | 083 | 083 |
| 0,74    | 087 | 087 | 087 | 087 | 086 | 086 | 086 | 086 | 085 | 085 |
| 0,73    | 089 | 089 | 089 | 089 | 089 | 088 | 088 | 088 | 088 | 087 |
| 0,72    | 092 | 092 | 091 | 091 | 091 | 091 | 090 | 090 | 090 | 090 |
| 0,71    | 094 | 094 | 094 | 093 | 093 | 093 | 093 | 092 | 092 | 092 |
| 0,70    | 097 | 096 | 096 | 096 | 096 | 095 | 095 | 095 | 095 | 094 |

Allgemeine Funktionsbeziehung: Eingangsspalte:  $\log x$ . Tafelwerte:  $1000 \cdot [\log x - \log (x-1)]$ .

Tabelle 2.  
Zahlentafel (Fortsetzung)

| Eingang | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0,69    | 099 | 099 | 099 | 098 | 098 | 098 | 098 | 097 | 097 | 097 |
| 0,68    | 102 | 101 | 101 | 101 | 101 | 100 | 100 | 100 | 100 | 099 |
| 0,67    | 104 | 104 | 104 | 104 | 103 | 103 | 103 | 103 | 102 | 102 |
| 0,66    | 107 | 107 | 107 | 106 | 106 | 106 | 105 | 105 | 105 | 105 |
| 0,65    | 110 | 110 | 109 | 109 | 109 | 109 | 108 | 108 | 108 | 107 |
| 0,64    | 113 | 113 | 112 | 112 | 112 | 111 | 111 | 111 | 111 | 110 |
| 0,63    | 116 | 116 | 115 | 115 | 115 | 114 | 114 | 114 | 114 | 113 |
| 0,62    | 119 | 119 | 118 | 118 | 118 | 117 | 117 | 117 | 117 | 116 |
| 0,61    | 122 | 122 | 122 | 121 | 121 | 121 | 120 | 120 | 120 | 119 |
| 0,60    | 126 | 125 | 125 | 125 | 124 | 124 | 124 | 123 | 123 | 123 |
| 0,59    | 129 | 129 | 128 | 128 | 128 | 127 | 127 | 127 | 126 | 126 |
| 0,58    | 133 | 132 | 132 | 131 | 131 | 131 | 130 | 130 | 130 | 129 |
| 0,57    | 136 | 136 | 135 | 135 | 135 | 134 | 134 | 134 | 133 | 133 |
| 0,56    | 140 | 140 | 139 | 139 | 138 | 138 | 138 | 137 | 137 | 137 |
| 0,55    | 144 | 143 | 143 | 143 | 142 | 142 | 141 | 141 | 141 | 140 |
| 0,54    | 148 | 147 | 147 | 147 | 146 | 146 | 145 | 145 | 145 | 144 |
| 0,53    | 152 | 151 | 151 | 151 | 150 | 150 | 149 | 149 | 149 | 148 |
| 0,52    | 156 | 156 | 155 | 155 | 154 | 154 | 154 | 153 | 153 | 152 |
| 0,51    | 161 | 160 | 160 | 159 | 159 | 158 | 158 | 157 | 157 | 157 |
| 0,50    | 165 | 165 | 164 | 164 | 163 | 163 | 162 | 162 | 161 | 161 |
| 0,49    | 170 | 169 | 169 | 168 | 168 | 167 | 167 | 166 | 166 | 166 |
| 0,48    | 175 | 174 | 174 | 173 | 173 | 172 | 172 | 171 | 171 | 170 |
| 0,47    | 180 | 179 | 179 | 178 | 178 | 177 | 177 | 176 | 176 | 175 |
| 0,46    | 185 | 184 | 184 | 183 | 183 | 182 | 182 | 181 | 181 | 180 |
| 0,45    | 190 | 190 | 189 | 189 | 188 | 188 | 187 | 187 | 186 | 185 |
| 0,44    | 196 | 195 | 195 | 194 | 194 | 193 | 193 | 192 | 192 | 191 |
| 0,43    | 202 | 201 | 201 | 200 | 199 | 199 | 198 | 198 | 197 | 196 |
| 0,42    | 208 | 207 | 207 | 206 | 205 | 205 | 204 | 203 | 203 | 202 |
| 0,41    | 214 | 213 | 213 | 212 | 211 | 211 | 210 | 210 | 209 | 208 |
| 0,40    | 220 | 219 | 219 | 219 | 218 | 217 | 217 | 216 | 215 | 215 |
| 0,39    | 227 | 226 | 226 | 225 | 224 | 224 | 223 | 222 | 222 | 221 |
| 0,38    | 234 | 233 | 233 | 232 | 231 | 231 | 230 | 229 | 229 | 228 |
| 0,37    | 242 | 240 | 240 | 239 | 239 | 238 | 237 | 236 | 236 | 235 |
| 0,36    | 249 | 248 | 248 | 247 | 246 | 245 | 245 | 244 | 243 | 242 |
| 0,35    | 257 | 255 | 255 | 255 | 254 | 253 | 252 | 251 | 251 | 250 |
| 0,34    | 265 | 264 | 264 | 263 | 262 | 261 | 260 | 259 | 259 | 258 |
| 0,33    | 274 | 273 | 272 | 271 | 270 | 270 | 269 | 268 | 267 | 266 |
| 0,32    | 283 | 282 | 281 | 280 | 279 | 278 | 277 | 277 | 276 | 275 |
| 0,31    | 292 | 291 | 290 | 289 | 288 | 288 | 287 | 286 | 285 | 284 |
| 0,30    | 302 | 301 | 300 | 299 | 298 | 297 | 296 | 295 | 294 | 293 |
| 0,29    | 312 | 311 | 310 | 309 | 308 | 307 | 306 | 305 | 304 | 303 |
| 0,28    | 323 | 322 | 321 | 320 | 319 | 318 | 317 | 316 | 314 | 313 |
| 0,27    | 334 | 333 | 332 | 331 | 330 | 329 | 328 | 326 | 325 | 324 |

Tabelle 2.  
Zahlentafel (Fortsetzung)

| Eingang | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0,26    | 346  | 345  | 344  | 343  | 342  | 340  | 339  | 338  | 337  | 335  |
| 0,25    | 359  | 358  | 356  | 355  | 354  | 353  | 351  | 350  | 349  | 348  |
| 0,24    | 372  | 371  | 369  | 368  | 367  | 365  | 364  | 363  | 361  | 360  |
| 0,23    | 386  | 385  | 383  | 382  | 380  | 379  | 378  | 376  | 375  | 373  |
| 0,22    | 401  | 399  | 398  | 396  | 395  | 393  | 392  | 390  | 389  | 387  |
| 0,21    | 416  | 415  | 413  | 412  | 410  | 408  | 407  | 405  | 404  | 402  |
| 0,20    | 433  | 431  | 430  | 428  | 426  | 425  | 423  | 421  | 420  | 418  |
| 0,19    | 451  | 449  | 447  | 445  | 443  | 442  | 440  | 438  | 436  | 435  |
| 0,18    | 469  | 467  | 466  | 464  | 462  | 460  | 458  | 456  | 454  | 452  |
| 0,17    | 490  | 487  | 485  | 483  | 481  | 479  | 477  | 475  | 473  | 471  |
| 0,16    | 511  | 509  | 507  | 505  | 502  | 500  | 498  | 496  | 494  | 492  |
| 0,15    | 535  | 532  | 530  | 527  | 525  | 523  | 520  | 518  | 516  | 513  |
| 0,14    | 560  | 557  | 555  | 552  | 549  | 547  | 544  | 542  | 539  | 537  |
| 0,13    | 587  | 584  | 582  | 579  | 576  | 573  | 570  | 568  | 565  | 562  |
| 0,12    | 617  | 614  | 611  | 608  | 605  | 602  | 599  | 596  | 593  | 590  |
| 0,11    | 650  | 647  | 643  | 640  | 637  | 633  | 630  | 627  | 624  | 620  |
| 0,10    | 687  | 683  | 679  | 675  | 672  | 668  | 664  | 661  | 657  | 654  |
| 0,09    | 728  | 723  | 719  | 715  | 711  | 707  | 703  | 699  | 695  | 691  |
| 0,08    | 774  | 769  | 764  | 760  | 755  | 750  | 746  | 741  | 737  | 732  |
| 0,07    | 827  | 822  | 816  | 810  | 805  | 800  | 794  | 789  | 784  | 779  |
| 0,06    | 889  | 883  | 876  | 870  | 863  | 857  | 851  | 845  | 839  | 833  |
| 0,05    | 964  | 955  | 948  | 940  | 932  | 925  | 917  | 910  | 903  | 896  |
| 0,04    | 1056 | 1045 | 1035 | 1026 | 1016 | 1007 | 998  | 989  | 980  | 972  |
| 0,03    | 1176 | 1162 | 1149 | 1136 | 1123 | 1111 | 1099 | 1088 | 1077 | 1066 |
| 0,02    | 1347 | 1326 | 1306 | 1287 | 1269 | 1252 | 1236 | 1220 | 1205 | 1190 |
| 0,01    | 1643 | 1602 | 1565 | 1530 | 1499 | 1469 | 1442 | 1416 | 1391 | 1369 |
| 0,00    | ∞    | 2638 | 2338 | 2162 | 2037 | 1941 | 1863 | 1796 | 1739 | 1688 |

## Diskussion

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde geprüft an Hand mehrerer Streuungsberechnungen bei gleichwertigen Analysen von Nahrungs- und Harnproben. Die mittlere quadratische Streuung bei Doppelwerten von 220 Harnanalysen betrug nach der Formel  $S^2 = \frac{\sum W_i^2}{2n}$  für  $S = \pm 0,028 \mu\text{g}$  bei Werten von 0,1–1,0  $\mu\text{g}$ .  $W_i = x_1 - x_2$ . In 35% der Fälle liegt die Abweichung der Doppelwerte bei  $\pm 0,004 \mu\text{g}$  und bei insgesamt 70% der Fälle bei  $\pm 0,012 \mu\text{g}$ . S. Tab. 3.

Da diese Harnwerte durch einfaches Auftropfen des Harns auf Chromatographiepapier erhalten wurden, so beweist diese Streuungsberechnung nur die Genauigkeit der papierchromatographischen Aufarbeitung und der photographischen und photometrischen Auswertung der Chromatogramme.

Zweck dieser Veröffentlichung ist es, eine neue Aufarbeitungsmethode für Nahrungsgemische und kohlenhydratreiche Nahrungsmittel darzustellen. Des-

halb wurde die gleiche Streuungsberechnung für Nahrungsproben unternommen, die je einer Gesamtwochenration entstammen und nach der neuen Methode analysiert wurden. Es ergab sich für  $S \pm 0,020 \mu\text{g}$ . Die Analysenzahl betrug 33, d. h. 66 Doppelwerte. In 76% der Fälle betrug die Streuung nur  $S = \pm 0,012 \mu\text{g}$ . Die aufgetropften Mengen lagen zwischen 0,15 und 0,5  $\mu\text{g}$ . 18 Analysenwerte bewegten sich zwischen 0,15 und 0,25  $\mu\text{g}$ , die übrigen 15 zwischen 0,25–0,50  $\mu\text{g}$ .

Tabelle 3. Verteilung der Fälle innerhalb der Größenordnung verschiedener Thiaminmengen im Harn

| Streuung<br>i. $\mu\text{g}$ | < 0,1<br>$\mu\text{g}$ | < 0,2<br>$\mu\text{g}$ | < 0,3<br>$\mu\text{g}$ | < 0,4<br>$\mu\text{g}$ | < 0,5<br>$\mu\text{g}$ | < 0,6<br>$\mu\text{g}$ | < 0,7<br>$\mu\text{g}$ | < 0,8<br>$\mu\text{g}$ | < 0,9<br>$\mu\text{g}$ | < 1,0<br>$\mu\text{g}$ |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| $\pm 0,004$                  | 19                     | 21                     | 10                     | 15                     | 7                      | 4                      |                        |                        | 1                      | 1                      |
| $\pm 0,012$                  | 28                     | 44                     | 22                     | 21                     | 9                      | 17                     | 2                      | 7                      | 3                      | 1                      |
| $\pm 0,028$                  | 2                      | 10                     | 10                     | 10                     | 10                     | 7                      | 4                      | 3                      | 2                      | 8                      |

Eine Streuungsberechnung nach der Formel

$$S^2 = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n - 1}$$

wurde mit 32 Mehlanalysen durchgeführt. Es handelte sich um käufliches „Diamantmehl“ (Weizen), dem pro kg 4,18 mg Thiaminhydrochlorid zugesetzt worden war. Es wurden 15, 20 und 25 g Mehl eingewogen. Für S ergab sich  $\pm 0,05 \mu\text{g}$ . Auf den Durchschnittswert von 0,55  $\mu\text{g}$  bezogen, ergibt das eine Streuung von  $\pm 9\%$ .

Aus diesen Angaben zeigt sich, daß die durchgeführte Methode zufriedenstellende Resultate ergibt. Streuungen bis zu  $\pm 10\%$  müssen in Kauf genommen werden, da es sich beim Vitamin B<sub>1</sub> um Mengen von weit unter 1 mg Thiamin in 100 g Nahrung handelt.

### Zusammenfassung

Es wird eine spezifische Methode zur Bestimmung von Vitamin B<sub>1</sub> in Nahrungsmitteln und Harn gegeben in der Größenordnung von 0,1–1,0  $\mu\text{g}$ . Die Genauigkeit der Methode beträgt  $\pm 8\%$ .

### Schrifttum

1. WILDEMAN, L., Nahrung 4, 497 (1960). — 2. Mitt. aus d. Gebiet d. Lebensmitteluntersuchg. u. Hyg., Veröff. v. Eidg. Gesundheitsamt i. Bern 40, 393 (1949). — 3. LEDDEW, A. v., Z. physiol. Chem. 73, 447 (1911). — 4. OLIVO, F., C. S. ROSSI und N. SILIPRANDI, Biochim. biophys. Acta (Amst.) 56, 158 (1962). — 5. BONVICINO, G. E. und D. J. HENNESSY, Internat. Z. Vitamin-Forschg. XXX, 83 (1959). — 6. HONERJÄGER-SOHN, M. und H. KAISER, Spectrochim. Acta 2, 396 (1944). — 7. KAISER, H., Spectrochim. Acta 4, 351 (1951).

Anschrift des Verfassers:

Dr. L. WILDEMAN, 4600 Dortmund, Max-Planck-Inst. f. Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201