

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 Aldrinxonzentration im Futter an. 3 mg Aldrin bzw. 1,5 mg Dieldrin per os beeinflußte die Vitamine -A-Speicherung in der Leber von Ratten nach hohe 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. BRÜGGERMANN, J. und J. TIEWS, Zt. Tierernähr. Futtermittell. **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'DONNEL, 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 B₁ 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 B₁-Gehalt zu analysieren. Auch die Thiamindisulfid-Aufspaltung, die damals noch ein unlösbares 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 B₁ mittels gärender Bäckerhefe. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft der Bäckerhefe, während des Gärens der Nährösung 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 Thiochromatmethode 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 Hefegärtes 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 B₁-Analyse sichtbar. Um sie auszuschalten, stellten wir einen Hefepreßsaft nach LEBEDEW (3) her und entfernen 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 B₁-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 LEBEDEW

Zur Herstellung einer Trockenhefe aus flüssiger Bierhefe (Kronenbrauerei Dortmund) wird die Hefeschlämme 10–12 mal 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 Ausgangsstoff für den Mazerationssaft nach LEBEDEW. 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 ausgetretenes B₁ 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 LEBEDEW, 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 B₁-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 wählt 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 (MACHEREY 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.

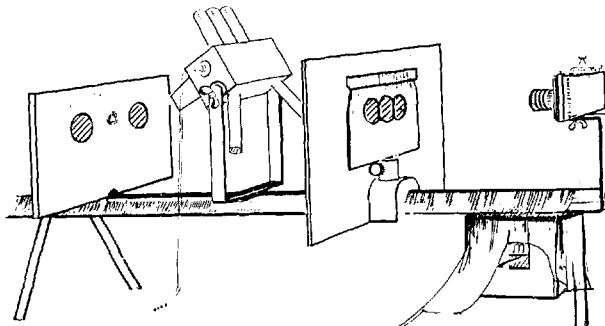


Abb. 1 zeigt den Aufbau der Photoanlage.

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 photographiert.

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 vorgesetzten, 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 GG₃ und BG₁₂ (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.

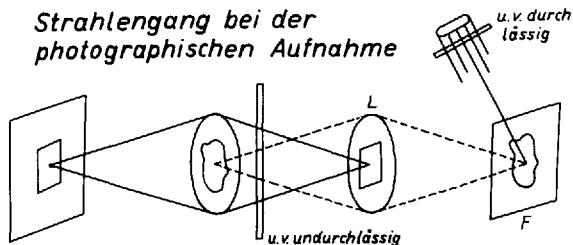


Abb. 2. Vgl. Text.

Die Linsen haben eine Brennweite von 5 Dioptrien. 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,

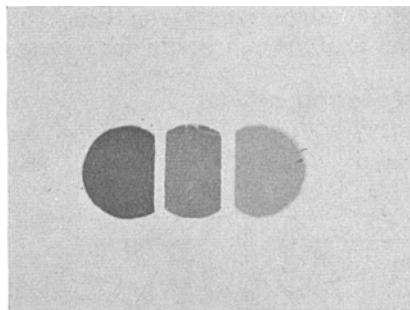


Abb. 3. Vgl. Text.

der nur den blauen Teil des Spektrums aufnimmt [Kodak Spectrum Analysis No. 3, Safety Film, Eastman Kodak Company¹]. Normale Amateurfilme lassen sich nicht mehr verwenden, da sie zu wenig blau empfindlich sind.

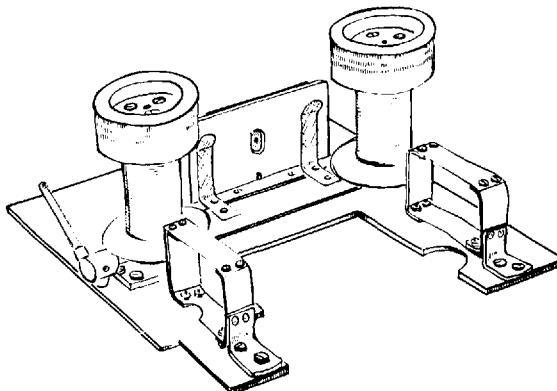


Abb. 4. Vgl. Text.

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 Strahlenweg anstelle eines Filters eine plankonvexe Linse eingeschaltet ist, gemessen.

¹) 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 α und γ . 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 α und γ auswerten. Wie man α und γ ermittelt wird weiter unten beschrieben.

Tabelle 1.

Rechenschema:	Testwert T	Beispiel: Leerwert L	Standardwert St
Gemessene Extinktionen (Schwärzung)	S	782	265
In die Tabelle mit S eingehen, D ablesen	D	78	340
Multiplikation von D mit der Filmkonstanten α in unserem Falle ist $\alpha 0,7$	αD	55	238
Subtraktion der αD -Werte von den Schwärzungswerten	$S - \alpha D$	727	27
Division von $S - \alpha D$ durch die Konstante γ , in unserem Falle 1,18, ergibt die Logarithmen der Fluoreszenzintensitäten Y	$\frac{S - \alpha D}{\gamma} = Y$	617	23
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 handelt sich nach kurzer Übung sehr schnell. Sie erfordert nur 30 Sekunden bei Benutzung des Aristo-Respektra-Rechengerätes 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 Maßgröße 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 μg 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-SOHM und KAISER (6)], die im Anhang abgedruckt ist. Ihre Werte werden im folgenden Rechenschema (Tab. I) mit D bezeichnet, die Schwärzungswerte mit S .

Die Bestimmung der Konstanten α und γ des Filmmaterials

Bestimmung von α

Ein schwächer und ein stärkerer Fluoreszenzfleck von reinem, auf dem Papier mit Kaliumhexacyanoferrat III oxydiertem 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 Sa_1 und Sa_2 sein, von dem schwächeren Sb_1 und Sb_2 . Dabei ist zu beachten, daß Sb_2 bereits im gekrümmten Teil der Schwärzungskurve liegen muß. Die entsprechenden D -Werte aus der Tabelle seien Da_1 , Da_2 , Db_1 und Db_2 .

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

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

Dieser Wert darf für die Fluoreszenzberechnung der Thiaminwerte abgerundet werden.

Berechnung von γ

Die abgelesenen Schwärzungen der vier obengenannten Schwärzungsstufen sind

Sa_1	Sa_2	Sb_1	Sb_2
0,517	0,270	0,360	0,165

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

Da_1	Da_2	Db_1	Db_2
0,157	0,334	0,249	0,500

Die D -Werte werden mit α multipliziert, in unserem Beispiel mit 0,7.

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

Diese Zahlen werden von den Extinktionswerten Sa_1 , Sa_2 , Sb_1 und Sb_2 abgezogen. Man erhält folgende Zahlen, die man gebräuchlicherweise mit P bezeichnet:

Pa_1	Pa_2	Pb_1	Pb_2
0,407	0,036	0,185	-0,186

γ kann aus $Pa_1 - Pa_2$ oder aus $Pb_1 - Pb_2$ 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 α 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. γ gibt die Neigung dieser Kennlinie P an. Sie geht durch Division aller P-Werte durch die Größe γ in die Rechnung ein.

Tabelle 2.
Zahlentafel nach M. HONERJÄGER-SOHM 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	060	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	075	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 Streuberechnungen 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 μg . $W_i = x_1 - x_2$. 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 Auftröpfen des Harns auf Chromatographiepapier erhalten wurden, so beweist diese Streuberechnung 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 μg . 18 Analysenwerte bewegten sich zwischen 0,15 und 0,25 μg , die übrigen 15 zwischen 0,25–0,50 μg .

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

Streuung $i, \mu\text{g}$	$< 0,1 \mu\text{g}$	$< 0,2 \mu\text{g}$	$< 0,3 \mu\text{g}$	$< 0,4 \mu\text{g}$	$< 0,5 \mu\text{g}$	$< 0,6 \mu\text{g}$	$< 0,7 \mu\text{g}$	$< 0,8 \mu\text{g}$	$< 0,9 \mu\text{g}$	$< 1,0 \mu\text{g}$
$\pm 0,004$	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 μg 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 B₁ um Mengen von weit unter 1 mg Thiamin in 100 g Nahrung handelt.

Zusammenfassung

Es wird eine spezifische Methode zur Bestimmung von Vitamin B₁ in Nahrungsmitteln und Harn gegeben in der Größenordnung von 0,1–1,0 μg . Die Genauigkeit der Methode beträgt $\pm 8\%$.

Schrifttum

1. WILDEMANN, L., Nahrung 4, 497 (1960). — 2. Mitt. aus d. Gebiet d. Lebensmitteluntersuchg. u. Hyg., Veröff. v. Eidg. Gesundheitsamt i. Bern 40, 393 (1949). — 3. LEBEDEW, 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. WILDEMANN, 4600 Dortmund, Max-Planck-Inst. f. Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201