

Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Von Antal Bognár

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Hauswirtschaft, Garbenstraße 13, 7000 Stuttgart 70

Einleitung

In Zusammenhang mit unseren Studien über den Nährwert von Fertigspeisen für die Gemeinschaftsverpflegung und über den Einfluß verschiedener Garverfahren und Lagerbedingungen auf den Vitamingehalt in Lebensmitteln wurde eine sehr große Anzahl von Riboflavin- und Thiaminanalysen durchgeführt. Dabei wurde geprüft, ob die recht arbeits- und zeitaufwendigen klassischen Methoden zur Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln^{1,2)} durch den Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie vereinfacht werden könnten.

Die Anwendung der HPLC zur Analyse von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln ist nicht neu. Die bisher veröffentlichten HPLC-Methoden wurden jedoch vorwiegend für die Vitaminbestimmung in ausgewählten Lebensmitteln entwickelt. Die vorgeschlagenen Analysebedingungen sind dementsprechend recht unterschiedlich. So beschreiben *Rhys Williams* und *Mitarb.*³⁾ eine HPLC-Methode zur Riboflavinbestimmung in Milch mit Hilfe von ODS-Sil-X1-Säule, 8% Acetonitril in Wasser als mobile Phase und Fluoreszenzdetektor. Andere Autoren empfehlen die Anwendung von einer Silica-Säule (10 µm), 0,1 m, Natriumacetatpufferlösung als mobile Phase und Fluoreszenzdetektor zur Analyse von Riboflavin in biologischem Material. *Toma* und *Tabekhia*⁵⁾ schlagen eine Bondopack C 18-Säule, Ionenpaar-Reagenzien und UV-Detektor zur Trennung bzw. Messung von Thiamin und Riboflavin in Reis und Reisprodukten vor. Nach einer Studie von *Ang* und *Moseley*⁶⁾ ist der UV-Detektor zur Bestimmung von Thiamin und Riboflavin in Fleisch und Fleischprodukten, wegen seiner zu geringen Empfindlichkeit, ungeeignet. Sie empfehlen Thiamin und Riboflavin vor der Chromatographie in Thiochrom und Lumiflavin umzuwandeln und die HPLC-Bestimmung mit Hilfe von Spherisorb-Silica-Säule (20 µm), Chloroform/Methanol (90:10) als mobile Phase und Fluoreszenzdetektor durchzuführen.

Aufbauend auf den Erfahrungen, die wir bei der Erprobung der in der Literatur beschriebenen Methoden¹⁻⁶⁾ gesammelt haben, wurde ein neues, für Routineuntersuchungen geeignetes HPLC-Analysenverfahren zur Riboflavin- und Thiaminbestimmung in Lebensmitteln ausgearbeitet.

Im folgenden wird der Analysengang ausführlich beschrieben und die Vor- und Nachteile der Methode anhand von Analyseergebnissen diskutiert.

Beschreibung der Methode

Chemikalien

1. 1 n Schwefelsäure (Titrisol)
2. 0,2 n Schwefelsäure (hergestellt aus R 1)
3. Schwefelsäure, w = 25% (hergestellt aus konz. Schwefelsäure)
4. Natriumacetat, wasserfrei Z. A.
5. 2,5 m Natriumacetatlösung: 205 g Natriumacetat (R 4) in 500 ml dest. Wasser lösen und zu 1000 ml auffüllen
6. Clara-Diastase (Fluka)
7. Clara-Diastase-Suspension w = 10%: 10 g Clara-Diastase (R 6) in einen Meßkolben mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen und durch Magnetrührer mischen (jeweils frisch herstellen)
8. Paraffinöl, (Merck 7160)
9. Natronlauge, w = 50%: Natriumhydroxyd (Merck 2. A) in Wasser lösen und mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen
10. Iso-Butanol Z. A.
11. Natriumchlorid Z. A.
12. Kaliumhexacyanoferrat (III) Z. A.
13. Kaliumhexacyanoferrat-Lösung, w = 25%: 25 g R 9 in dest. Wasser lösen und zu 100 ml auffüllen (jede Woche neu herstellen)
14. Kaliumhexacyanoferrat-Lösung, w = 5%: 20 ml R 10 mit dest. Wasser auf 100 ml verdünnen (jeweils frisch herstellen)
15. Riboflavin für biochem. Zwecke (24 Std. über konz. Schwefelsäure getrocknet)
16. Riboflavin-Stammlösung (50 µg/ml): 50 mg Riboflavin (R

- 15) in 20 ml Schwefelsäure (R 3) unter Rühren lösen und mit dest. Wasser zu 1000 ml auffüllen (in brauner Flasche im Kühlschrank 2 Monate haltbar)
17. Riboflavin-Standardlösung (1 µg/ml): Stammlösung (R 16) mit Schwefelsäure (R 2) entsprechend verdünnen (jeweils frisch herstellen)
 18. Thiamindichlorid für biochemische Zwecke (24 Std. über P₂O₅ getrocknet)
 19. Thiamindichlorid-Stammlösung (1 mg/ml): 100 mg Thiamin (R 18) in Schwefelsäure (R 2) lösen und zu 100 ml auffüllen (im Kühlschrank ca. 2 Monate lang haltbar)
 20. Thiamindichlorid-Standardlösung (1 µg/ml): Stammlösung (R 19) mit Schwefelsäure (R 2) entsprechend verdünnen (jeweils frisch herstellen)
 21. Säulenfüllmaterial für HPLC-Trennung von Riboflavin: LiChrosorb NH₂, Korngröße 10 µm
 22. Säulenfüllmaterial für die HPLC-Trennung von Thiochrom: LiChrosorb RP 8, Korngröße 10 µm
 23. Methanol für die Chromatographie (LiChrosolv)
 24. Acetonitril für die Chromatographie (Li-Chrosolv)
 25. Natriumacetatpuffer-Lösung für die HPLC: 200 ml Schwefelsäure (R 2) mit ca. 25 ml 2,5 m Natriumacetat (R 5) auf pH 4,5 einstellen und mit dest. Wasser zu 1000 ml auffüllen
 26. Iso-Butanol für die HPLC: 150 ml Natriumacetatpuffer (R 25) in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben mit 225 ml Iso-Butanol (R 10) und 22,5 ml Natronlauge (R 19) versetzen, 5 sec. rühren, 6 ml Kaliumhexacyanoferrat-Lösung (R 14) zugeben, 60 sec. rühren, 37,5 g Natriumchlorid (R 11) zugeben, 60 sec. rühren, anschließend die Iso-Butanol-schicht abdekantieren und durch PhasentrennungsfILTER (G 13) filtrieren (in brauner Flasche aufbewahren)
 27. Mobile Phase für die HPLC-Trennung von Riboflavin: 1 l Methanol (R 23) und 1 l Na-Acetatpuffer (R 25) mischen
 28. Mobile Phase für die HPLC-Trennung von Thiochrom: 1600 ml Methanol (R 23), 200 ml Acetonitril (R 24) und 200 ml Iso-Butanol (R 26) mischen.
- Hinweis: Unter „Lösung“ ist bei fehlender Angabe des Lösungsmittels eine wäßrige Lösung zu verstehen.

Geräte und Hilfsmittel

1. Starmix oder Fleischkutter (Hobart)
2. Ultra Turrax
3. Laborautoklav
4. Wasserbad mit Thermostat oder Brutschrank
5. Magnetrührer
6. Zentrifuge
7. 100-ml-Meßkolben
8. 50-ml-Zentrifugengläser mit Schliffstopfen NS 29/32
9. 100-ml-Braunglas-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen NS 29/32
10. 250-ml-Polyäthylen-Weithalsflasche mit Schraubdeckel
11. Meßpipetten (0,4 bis 30 ml)
12. Faltenfilter, Durchmesser 18,5 cm (Macherey u. Nagel 615 1/4)
13. PhasentrennungsfILTER, Durchmesser 18,5 cm (Schleicher u. Schüll 597 Hy 1/2)
14. Hochdruckflüssigkeitschromatograph (Perkin-Elmer LC 601)
15. Spektralfluorometer für die HPLC (Kontron SFM 23)
16. Probenaufgabeventil für die HPLC mit 50 µl Schleife (Rheodyne 7125)
17. Mikroliterspritze 100 µl (Hamilton 710)
18. Edstahlsäulen für die HPLC: Vorsäule 8 cm lang, 4,6 mm i. D., Trennsäule: 25 cm lang, 4,6 mm i. D. (Knauer)
19. Säulenfüllvorrichtung (Knauer)
20. HPLC-Säulen zur Bestimmung von Riboflavin: Vor- und Trennsäulen (G 18) werden mit LiChrosorb NH₂ (R 21) mit

- Hilfe der Säulenfüllvorrichtung (G 19) nach Bedienungsanleitung der Fa. Knauer (6380 Bad Homburg) gefüllt. Das obere Ende der Vorsäule wird zur Verhinderung von Verstopfen statt der vorgeschriebenen Edelstahl-Siebplättchen und Glasfaserfilterplättchen mit ca. 2 mm Glaswattschicht und Strömungsverteilerplättchen abgeschlossen. Die gefüllten Säulen werden anschließend mit der mobilen Phase (R 27) 15 min konditioniert (2 ml/min).
21. HPLC-Säulen zur Bestimmung von Thiamin: Vor- und Trennsäulen (G 18) werden mit LiChrosorb RP 8 (R 22) mit Hilfe der Säulenfüllvorrichtung nach der Bedienungsanleitung der Fa. Knauer gefüllt. Das obere Ende der Vorsäulen wird ähnlich wie bei der Vorsäule für Riboflavin abgeschlossen. Die gefüllten Säulen werden mit der mobilen Phase (R 28) 15 min lang konditioniert (2 ml/min).
 22. Integrator (HP 3380 A)

Analysengang

1. Vorbereitung der Proben

Das Probenmaterial wird im Starmix oder Fleischkutter (G 1) zerkleinert. 30 bis 90 g der homogenisierten Proben werden in eine Polyäthylen-Flasche (G 8) eingewogen, mit 30 g 1 n Schwefelsäure (R 1) und 15 bis 75 ml dest. Wasser versetzt und mit dem Ultra-Turrax (G 2) 1 min lang homogenisiert. Anschließend wird der Homogenisator mit dest. Wasser abgespült und das Homogenisat auf 150 g ergänzt (genau wiegen).

Hinweis: Das Verhältnis Analysenmaterial und Wasser muß so gewählt werden, daß das Homogenisat nach der Homogenisierung frei fließt und die Säurekonzentration ca. 0,2 n beträgt.

Beispiele für die Probeneinwaage:

Suppen, Soßen, Säfte und Milch: 90 g Probe + 30 g 1 n Schwefelsäure (R 1) + 30 g dest. Wasser.

Fleisch, Gemüse, Obst, Kartoffeln, gekochte Teigwaren und Reis: 50 g Probe + 30 g 1 n Schwefelsäure (R 1) + 70 g dest. Wasser. Brot, Kindernährmittel, Mehl, rohe Teigwaren und Reis: 30 g Probe + 30 g 1 n Schwefelsäure (R 1) + 90 g dest. Wasser.

Die Homogenisate können im Kühlschrank bei 4°C bis zu 2 Tage und im Gefrierschrank bei -18°C bis zu 2 Monate ohne wesentlichen Riboflavin- und Thiaminverlust aufbewahrt werden.

2. Säureaufschluß

3 bis 40 g der vorher im Wasserbad auf 20°C aufgewärmten Homogenisate (2 bis 20 µg Riboflavin- bzw. Thiamin) werden in einen Meßkolben (G 7) eingewogen, mit 0,2 n Schwefelsäure (R 2) auf 40 g ergänzt, zur Verhinderung des Schäumens mit 10 Tropfen Paraffinöl (R 8) versetzt und im Autoklav (G 3) bei 120°C 15 min lang erhitzt.

Je Analysenserie wird eine Standardvergleichsprobe mit 2 bis 20 µg Riboflavin (R 17) und Thiamindichlorid (R 20) – je nach dem zu erwartenden Gehalt in den Analysenproben – angesetzt, mit 0,2 n Schwefelsäure (R 2) auf 40 g ergänzt und der volle Analysengang durchgeführt. Zusätzlich wird eine Reagenzienblindprobe mit 40 g 0,2 n Schwefelsäure angesetzt und weiter wie die Analysenproben behandelt.

3. Enzymatische Hydrolyse

Die Säureaufschlußlösungen werden auf etwa 37°C abgekühlt, mit ca. 5,5 ml Natriumacetatlösung (R 5) unter umrühren auf pH 4,5 abgepuffert und nach Zugabe von 5 ml Clara-Diastase-Suspension (R 7) im Brutschrank bei 37°C 15 Stunden lang inkubiert. (Die Enzymatische-Hydrolyse kann auch im Wasserbad bei 45°C durchgeführt werden. Die Inkubationszeit beträgt dann 2 Stunden.)

Anschließend werden die Hydrolysate auf 20°C abgekühlt, mit dest. Wasser zu 100 ml aufgefüllt und zur Abtrennung von Grobteilen durch einen trockenen Faltenfilter (G 12) filtriert (die ersten 10 ml des Filtrates werden weggeschüttet). Das filtrierte Hydrolysat kann im Kühlschrank einen Tag aufbewahrt werden.

4. Bestimmung von Riboflavin

Ein aliquoter Teil des filtrierten Hydrolysates und der Reagenzienblindprobe wird mit Hilfe der Mikroliterspritze (G 17) und des Rheodyne-Einlaßventils (G 18) auf die HPLC-Säule (G 20) aufgetragen, bei Zimmertemperatur mit der mobilen Phase (R 27) isokratisch eluiert und die Fluoreszenz am Spektralfluorometer (G 15) gemessen.

Anmerkung: Zur Eliminierung des evtl. vorhandenen Probenblindwertes wird das Hydrolysat vor der Chromatographie mit Chloroform ausgeschüttelt (10 ml Hydrolysat + 15 ml Chloroform).

4.1 Parameter für die HPLC

Konditionierung der Säulen: 15 min lang vor Beginn einer neuen Analysenserie

Flußgeschwindigkeit: 2 ml/min – Druck: 90 bar

Einspritzvolumen: 50 µl Hydrolysat (1 bis 20 ng Riboflavin)

Retentionszeit: 2,3 min

Detektor: Spektralfluorometer (G 15), Anregungswellenlänge 467 nm, Emissionswellenlänge 525 nm

Empfindlichkeit: Medium 50%, 100% oder High 50%

(Die Fluoreszenzintensität soll zwischen 10 und 70 Skalenteilen liegen.)

Messung der Peakflächen:

Integration (G 22)

Papiervorschub: 1 cm/min

Slopesensitivity: 3 mV/min

Attenuation: 64

4.2 Auswertung: Externe Standardmethode

$$\mu\text{g Riboflavin pro 100 g Probe} = \frac{(A-B) \cdot T \cdot F \cdot 100}{(S-B) \cdot E}$$

A = Peakfläche von der Analysenprobe

B = Peakfläche von der Reagenzienblindprobe

S = Peakfläche von Riboflavinstandardvergleichsprobe

T = µg Riboflavin pro 100 ml Standardvergleichsprobe

F = Verdünnungsfaktor = $\frac{\text{Gesamthomogenisat in g}}{\text{f. d. Analysenprobe}}$ = $\frac{\text{Homogenisateinwaage}}{\text{f. d. Aufschluß in g}}$

E = Probeneinwaage für das Gesamthomogenisat

Beispiel: Schweinefleisch

E = 30 g Schweinefleisch (roh)

Gesamthomogenisat = 150 g

Homogenisateinwaage für Aufschluß = 20 g

Aufschlußlösung = 100 ml

T = 10 µg Riboflavin

A = 462×10^3 Integrationseinheit

B = 29×10^3 Integrationseinheit

S = 491×10^3 Integrationseinheit

F = $\frac{150}{20} = 7,5$

$$\mu\text{g Riboflavin pro 100 g Probe} = \frac{(462-29) \cdot 10 \cdot 7,5 \cdot 100}{(491-29) \cdot 30} = 234,3$$

5. Bestimmung von Thiamin

5.1 Oxidation von Thiamin zu Thiochrom

Je 10 ml der filtrierten Hydrolysate werden in die Zentrifugengläser einpipettiert und unter Rühren mit den in Tabelle 1 angegebenen Reagenzien versetzt. Um eine reproduzierbare

Tab. 1. Durchführung der Thiochromreaktion*).

Lösungen und Reagenzien	Analysenprobe	Thiaminstandardprobe	Analysenblindprobe
Proben-Hydrolysat	10 ml	–	10 ml
Thiaminstandard-Hydrolysat	–	10 ml	–
iso-Butanol (R 10)	15 ml	15 ml	15 ml
Natronlauge (R 9)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Wartezeit	5 sec	5 sec	5 sec
Kaliumhexacyanoferrat (R 14)	0,4 ml	0,4 ml	–
Dest. Wasser	–	–	0,4 ml
Wartezeit	60 sec	60 sec	60 sec
Natriumchlorid (R 11)	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Wartezeit	60 sec	60 sec	60 sec

(Zentrifugenglas während dieser Zeit schließen)

*) unter Ausschluß von Tageslicht bei Rotlicht

Thiochromoxidation zu erreichen, müssen die Reaktionsbedingungen genau eingehalten werden.

Nach der Thiochromoxidation werden die Proben zur Trennung von iso-Butanol- und Wasserphase bei 1500 upm 3 min zentrifugiert (Stopfen vorher lockern). Anschließend werden ca. 10 ml der iso-Butanolschicht vorsichtig, ohne die wäßrige Phase mitaufzuziehen, abpipettiert und durch ein PhasentrennungsfILTER (G 13) in Braunglas-Erlenmeyerkolben (G 9) abfiltriert. Ein aliquoter Teil des iso-Butanolextraktes wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze (G 17) und des Rheodyne-Einlaßventils (G 16) auf die HPLC-Säule (G 21) aufgetragen, bei Zimmertemperatur mit der mobilen Phase (R 28) isokratisch eluiert und die Fluoreszenzintensität am Spektralfluorometer gemessen.

5.2 Parameter für die HPLC

Konditionierung der Säulen: 15 min lang vor Beginn einer neuen Analysenserie

Flußgeschwindigkeit: 2 ml/min

Druck: 55 bar

Temperatur: 20°C

Einspritzvolumen: 50 µl iso-Butanolextrakt (1 bis 10 ng Thiamindichlorid)

Retentionszeit: 2,25 min

Detektor: Spektralfluorometer (G 15) Anregungswellenlänge: 370 nm Emissionswellenlänge: 425 nm

Empfindlichkeit: Medium 50 bis 100% (Fluoreszenzintensität soll zwischen 10 und 70 Skalenteil liegen)

Messung der Peakflächen:

Integration (G 22)

Papiervorschub: 1 cm/min

Slope-Sensitivity: 3 mV/min

Attenuation: 64

5.3 Auswertung: Externe Standardmethode

$$\mu\text{g Thiamindichlorid pro 100 g Probe} = \frac{(A-C) \cdot T \cdot F \cdot 100}{S \cdot E}$$

A = Peakfläche von der Analysenprobe

C = Peakfläche von der Analysenblindprobe

S = Peakfläche von der Thiaminstandardvergleichsprobe

T = µg Thiamindichlorid pro 100 ml

Standardvergleichsprobe

F = Verdünnungsfaktor = $\frac{\text{Gesamthomogenisat in g}}{\text{f. d. Analysenprobe}}$ = $\frac{\text{Homogenisateinwaage}}{\text{f. d. Aufschluß in g}}$

E = Probeneinwaage für das Gesamthomogenisat

Beispiel: Blumenkohl

Gesamthomogenisat = 150 g

Homogenisateinwaage für den Aufschluß = 30 g

Aufschlußlösung = 100 ml

T = 5 µg Thiamindichlorid

A = 480×10^3 Integrationseinheiten

C = 33×10^3 Integrationseinheiten

S = 477×10^3 Integrationseinheiten

F = $\frac{150}{30} = 5$

µg Thiamindichlorid pro 100 g Probe = $\frac{(480-33) \cdot 5 \cdot 5 \cdot 100}{477 \cdot 50} = 46,8$

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 1 und 2 sind typische Chromatogramme von Riboflavin und Thiochrom aus reinen Vitaminlösungen sowie aus Schweinefleisch und Blumenkohl dargestellt. Die Retentionszeiten betragen unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen 2,3 min für Riboflavin und 2,25 min für Thiamin.

Die Peaks waren bei den meisten Lebensmitteln sowohl für Riboflavin als auch für Thiochrom weitgehend frei von Störungen.

Der Peak von der Reagenzienblindprobe bei der Riboflavinanalyse stammte, wie die Stufenkontrolle ergab, aus der verwendeten Clare-Diastase-Suspension. Er wurde eindeutig als Riboflavin identifiziert. Die Überprüfung von mehreren Enzymlieferungen der Fa. *Fluka* ergab einen mittleren Riboflavingehalt von 96 ± 10 µg/100 g Enzympräparat. Zur Vermeidung von Fehlern wird jedoch empfohlen, bei jeder Analysenserie eine Reagenzienblindprobe anzusetzen. Die sehr selten auftretenden Probenblindwerte für Riboflavin können durch Ausschütteln der Lebensmittelextrakte mit Chloroform beseitigt werden.

Bei der HPLC-Trennung von Thiochrom mit reinem iso-Butanol in der mobilen Phase traten mehrere kleine Störpeaks auf, die jedoch durch Verunreinigung des iso-Butanols mit den Reagenzien der Thiochromreaktion vollständig eliminiert werden konnten. Der Ansatz einer Reagenzienblindprobe ist daher nicht erforderlich. Einige Lebensmittel (Blumenkohl und Vollkornbrot) enthielten geringe Mengen an Substanzen, die ähnliche chromatographische und fluorometrische Eigenschaften wie Thiochrom aufwiesen. Die Ermittlung des Probenblindwertes wird deshalb von Fall zu Fall empfohlen.

Die Peakhöhe und Peakfläche stieg in Abhängigkeit der Vitaminkonzentration (1,5 bis 10 ng Riboflavin bzw. Thiochrom in 50 µl Einspritzlösung) linear an. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,999 und 1,000.

In der Praxis empfiehlt sich, die Empfindlichkeit des Fluorometers der jeweiligen Vitaminkonzentration anzupassen. Zur quantitativen Auswertung wird die Verwendung von externen Vitaminstandards vorgeschlagen.

Die aufgrund der Peakfläche und der Peakhöhe berechneten Analyseergebnisse waren bei den meisten Lebensmitteln identisch. Lediglich bei der Riboflavinbestimmung in Vollkornbrot ergab die Peakflächenauswertung wegen der starken Tailing der Peaks zu hohe Werte.

Die beschriebene Analysenmethode wurde an verschiedenen Lebensmitteln (Fleisch, Fleischwaren, Gemüse, Kartoffeln, Kartoffelprodukte, Teigwaren, Reis, Kindernährmittel und Speisenzubereitungen) in den letzten

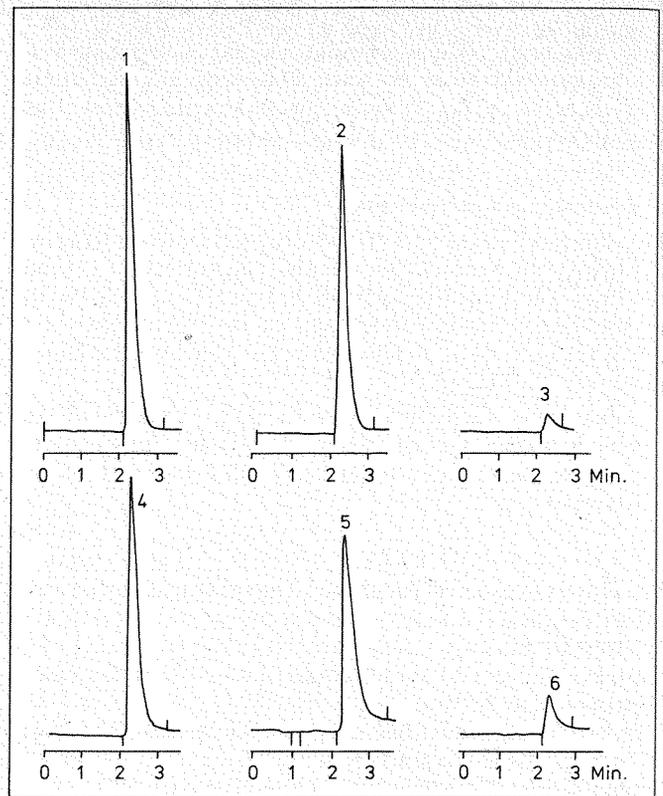


Abb. 1. Typische Chromatogramme von Riboflavin bei der HPLC. – Säule: 8 und 25 cm lang; 4,6 mm I.D.; gepackt mit LiChrosorb NH₂; Mobile Phase: Methanol/Na-Acetatpuffer pH 4,5 (50:50); 2 ml/min; Detektor: Spektralfluorometer; Excitation: 467 nm; Emission: 525 nm.

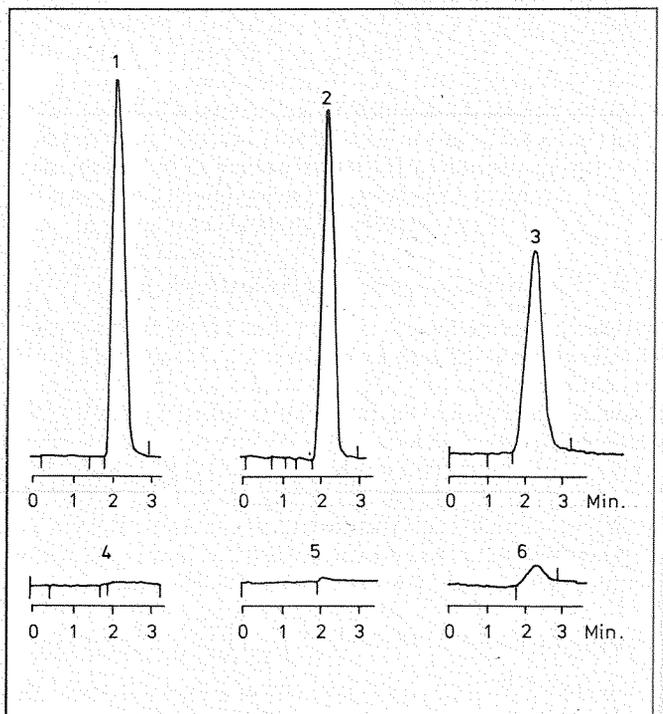


Abb. 2. Typische Chromatogramme von Thiochrom bei der HPLC. – Säule 8 und 25 cm lang; 4,6 mm I.D.; gepackt mit LiChrosorb RP 8; Mobile Phase: Methanol/Acetonitril/iso-Butanol (80:10:10); Detektor: Spektralfluorometer; Excitation: 425 nm; Emission: 370 nm.

anderthalb Jahren getestet. Die Analyseergebnisse waren sowohl bei der Riboflavin- als auch bei der Thiaminbestimmung sehr gut reproduzierbar. Die Variationskoeffizienten der Mittelwerte von drei- bis fünffachen Wiederholungen lagen unter 8%. Die Wiederfindungsrate der zugesetzten Vitamine betrug für Riboflavin 98 bis 103% und für Thiamin 94 bis 105% je nach Art der Lebensmittel.

Die Analysefehler waren weitgehend auf die Inhomogenität der Proben zurückzuführen. Darüber hinaus können

methodische Fehler bei der Oxidation von Thiamin zu Thiochrom auftreten. Auf die genaue Einhaltung der Reaktionsbedingungen ist deshalb besonders zu achten. Der Ansatz von Doppelproben bei der Thiochromreaktion wird empfohlen.

Die Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate im Vergleich zur konventionellen Methode^{1,2)} sind für einige typische Lebensmittel in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß die nach der HPLC-Methode ermittelten Riboflavin- und Thiamingehalte in

Tab. 2. Riboflavingehalt von verschiedenen Lebensmitteln und Wiederfindungsrate (Recovery) bei der HPLC- und konventionellen Bestimmungsmethode.

Probenmaterial	Riboflavin-zusatz µ/100 g Probe	HPLC-Methode						Konventionelle Methode ²⁾					
		Riboflavingehalt µg/100 g Probe			Recovery %			Riboflavin µg/100 g Probe			Recovery %		
		\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	N	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	N
Blumenkohl (roh)	–	86	5	6	–	–	3	84	–	–	–	–	1
	30	117	6	5	103	–	3	–	–	–	–	–	
Kartoffelbrei (aus Trockenprod.)	–	71	3	4	–	–	3	74	6	8	–	–	3
	NB	451	8	2	–	–	3	460	10	2	–	–	3
	70	140	5	4	99	3	3	–	–	–	–	–	
Reis (gekocht)	–	17	1	6	–	–	3	18	1	5	–	–	3
	20	37	3	8	100	–	3	–	–	–	–	–	
Salzkartoffeln	–	28	1	4	–	–	3	27	3	11	–	–	3
	30	57	2	4	97	–	3	56	4	7	97	4	3
Schweinefleisch (roh)	–	250	4	2	–	–	5	237	9	4	–	–	5
	200	446	4	1	98	2	5	427	14	3	95	6	5
Vollkornbrot	–	293	5	2	–	–	3	276	10	4	–	–	2
	200	489	3	1	98	1	–	–	–	–	–	–	

\bar{X} = Mittelwert; S = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient in %; N = Anzahl Wiederholungen; 1) Lumiflavin-Methode¹⁾; NB = nicht bekannt

Tab. 3. Thiamingehalt von verschiedenen Lebensmitteln und Wiederfindungsrate (Recovery) bei der HPLC- und konventionellen Methode.

Probenmaterial	Thiamin-zusatz µg/100 g Probe	HPLC-Methode						Konventionelle Methode ¹⁾						Ascorbin-säure mg/100 g Probe
		Thiamingehalt µ/100 g Probe			Recovery %			Thiamingehalt µg/100 g Probe			Recovery %			
		\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	N	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	N	
Blumenkohl (roh)	–	49	2	4	–	–	6	47	4	9	–	–	3	87,0
	45	94	2	2	98	2	6	88	4	5	91	5	3	–
Kartoffelklöße (gekocht)	–	85	4	5	–	–	4	–	–	–	–	–	–	10,5
	60	146	4	3	102	3	4	–	–	–	–	–	–	–
Kartoffelbrei (aus Trockenprod.)	–	58	1	2	–	–	3	55	3	5	–	–	3	4,1
	30	87	3	3	97	5	3	82	4	4	90	5	3	–
Salzkartoffeln (tiefgefroren)	–	45	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	4,1
	50	97	–	–	104	–	1	–	–	–	–	–	–	–
Schweinefleisch (roh)	–	807	56	7	–	–	6	800	65	8	–	–	3	–
	600	1410	112	8	101	3	6	1382	75	5	97	3	3	–
Schweinefleisch (Lyophilisat)	–	2720	190	7	–	–	10	2600	104	4	–	–	3 ²⁾	–
	–	–	–	–	–	–	–	2850	342	12	–	–	5 ²⁾	–
	1490	4260	213	5	103	–	7	4180	167	4	106	–	3 ²⁾	–
	–	–	–	–	–	–	–	4570	686	15	115	–	5 ²⁾	–
	3040	5580	167	3	94	–	7	5540	166	3	97	–	3 ²⁾	–
							5170	1240	24	76	–	5 ²⁾	–	

\bar{X} = Mittelwert; S = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient in %; N = Anzahl Wiederholungen; 1) nach Rettenmaier²⁾; 2) Ergebnisse aus einem Ringversuch

der gleichen Größenordnung liegen, wie die nach den konventionellen Methoden ermittelten Werte. Die Reproduzierbarkeit und die Wiederfindungsrate waren bei den HPLC-Verfahren meistens etwas besser.

Die in der Literatur beschriebene HPLC-Methode zur Riboflavin- und Thiaminbestimmung in Reis und Reisprodukten mit Hilfe von UV-Detektor⁵⁾ ergab bei unseren Anwendungsversuchen, wegen der zu großen Mengen an Störsubstanzen in den meisten Lebensmitteln und der zu geringen Empfindlichkeit, unbefriedigende Resultate.

Die Umwandlung von Riboflavin zu Lumiflavin und eine säulenchromatographische Reinigung der Lebensmittel-extrakte vor der Thiochromreaktion, wie es von *Ang* und *Moseley*⁶⁾ vorgeschlagen wurde, ist aufgrund unserer Ergebnisse nicht erforderlich.

Die Oxidation von Thiamin zu Thiochrom wird durch die in den Gemüse- und Kartoffelaufschlußlösungen vorhandene Ascorbinsäure (< 90 mg/100 g Probe) und durch geringe Mengen an zugesetzter schwefliger Säure (< 50 mg/100 g Probe) nicht gestört.

Die quantitative Nachweisgrenze der Methode liegt unter 5 µg Riboflavin bzw. Thiamin pro 100 g Lebensmittel.

Die HPLC-Trennsäulen können im allgemeinen für mehr als 3000 Bestimmungen verwendet werden. Der Arbeits- und Zeitaufwand je Analyse sind nach unserer HPLC-Methode erheblich geringer als nach den konventionellen Methoden. Eine Arbeitskraft ist in der Lage, pro Tag in 20 Proben Riboflavin oder in 12 Proben Thiamin zu bestimmen, wenn das Analysenmaterial vorher aufgeschlossen wurde. Durch den Einsatz von automatischen Probengeber und Rechnerintegrator könnte der Analysendurchsatz noch erhöht werden.

Zusammenfassung

Eine Methode zur Routine-Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie und eines Fluoreszenzdetektors wird beschrieben.

Die Vitamine werden durch Säure und enzymatische Hydrolyse aus dem Analysenmaterial freigesetzt. Riboflavin wird direkt aus der Aufschlußlösung auf einer LiChrosorb NH₂-Säule mit Methanol/Natriumacetatpuffer pH 4,5 (50:50) als mobile Phase getrennt und am Fluoreszenzdetektor gemessen. Thiamin wird zu Thiochrom oxidiert und auf einer LiChrosorb RP8-Säule mit Methanol/-Acetonitril/iso-Butanol (80:10:10) als mobile Phase getrennt und am Fluoreszenzdetektor gemessen. Die Analyseergebnisse sind gut reproduzierbar. Die Wiederfindungsrate betrug für Riboflavin 98 bis 103% und für Thiamin 94 bis 105% je nach Art des Lebensmittels. Die Nachweisgrenze der Methode liegt unter 5 µg Riboflavin bzw. Thiamin pro 100 g Lebensmittel. Das Analysenverfahren ist relativ einfach zu handhaben und wenig störanfällig.

Summary

A method is described to routinely determine riboflavin and

thiamine in foodstuffs through high-pressure liquid chromatography and a fluorescence detector.

The vitamins are set free from the analyzing material through acid and enzymatic hydrolysis. Riboflavin is separated directly from the solubilization solution on a LiChrosorb NH₂ column with methanol/sodium acetate buffer pH 4.5 (50:50) as the mobile phase, and measured on the fluorescence detector. Thiamine is oxidized into thiochrome and then separated on a LiChrosorb RP8 column with methanol/acetonitrile/iso-butanol (80:10:10) as the mobile phase, and measured on the fluorescence detector. Analysis results are well reproducible. The find-back rate was 98 to 103% for riboflavin and 94 to 105% for thiamine, depending on the foodstuff involved. The detection limit of the method is under 5 µg of riboflavin or of thiamine per 100 g of foodstuff. The procedure is relatively easy to handle and hardly susceptible to derangement.

Résumé

On décrit une méthode permettant le dosage courant de riboflavine et de thiamine dans les produits alimentaires au moyen de la chromatographie en phase liquide sous haute pression et d'un détecteur à fluorescence.

On libère les vitamines du matériau d'analyse par une macération acide et une hydrolyse enzymatique. On sépare directement la riboflavine de cette solution sur une colonne NH₂-LiChrosorb avec tampon de méthanol/acétate de sodium pH 4,5 50:50 comme phase mobile, et on la mesure sur le détecteur à fluorescence. On oxyde la thiamine pour obtenir du thiochrome, on le sépare sur une colonne RP8 LiChrosorb avec méthanol/acétonitrile/iso-butanol (80:10:10) comme phase mobile et on le mesure sur le détecteur à fluorescence. Les résultats d'analyse sont bien reproductibles. Le taux de récupération a été pour la riboflavine de 98 à 103% et pour la thiamine de 94 à 105% selon le genre de produit alimentaire. La limite de détection de la méthode se situe au-dessous de 5 µg de riboflavine ou de thiamine pour 100 g de produit alimentaire. Le processus analytique est relativement simple à réaliser et peu sensible aux perturbations.

Literatur

- 1) *Strohecker, R.* und *H. M. Henning*: Vitamin-Bestimmungen, Weinheim 1963, S. 68-79 und 113-118.
- 2) *Rettenmaier, R., J. P. Vuilleumier* und *W. M. Müller-Mulot*: Zur quantitativen Vitamin-B₁-Bestimmung in Nahrungsmitteln und biologischem Material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **168**, 120 (1979).
- 3) *Rhys Williams, A. T.* und *W. Slavin*: Determination of Riboflavin in Milk and Riboflavin Clearance in to Urine using HPLC with fluorescence Detection. *Chromatogr. Newsletter*, **5**, 9 (1977).
- 4) *Richardson, P. J., D. J. Favell, G. C. Gidley* und *A. C. Jones*: Critical Comparison of the Determination of Vitamin B₂ in Foods by a High-Performance Liquid Chromatographic Method and the standard microbiological Approach. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, **15**, 53 (1978).
- 5) *Toma, R. B.* und *M. M. Tabekhia*: High performance Liquid Chromatographic Analysis of B-Vitamins in Rice and Rice Products. *J. of Food Sci.* **44**, 263 (1979).
- 6) *Ang, C. Y. W.* und *F. A. Moseley*: Determination of Thiamin and Riboflavin in Meat and Meat Products by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. of Agric. and Food Chemistry*, **28**, 483 (1980).