Die Bestimmung von Folsäure (Pteroyl-L-glutaminsäure) in Lebensmitteln mit HPLC = The determination of folic acid (Pteroyl-L-glutamic acid) in food by HPLC

Autor(en): **Gauch, R. / Leuenberger, U. / Müller, U.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 3

PDF erstellt am: **30.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982137

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **84**, 295–302 (1993)
Eingegangen 23. Februar 1993. Angenommen 30. März 1993

Die Bestimmung von Folsäure (Pteroyl-L-glutaminsäure) in Lebensmitteln mit HPLC

The Determination of Folic Acid (Pteroyl-L-Glutamic Acid) in Food by HPLC

R. Gauch, U. Leuenberger und *U. Müller*
Kantonales Laboratorium Bern, Bern

Einleitung

Folsäure kommt als Vitamin in der Natur grösstenteils als Konjugat der Pteroylsäure mit einem oder mehreren Glutaminsäuremolekülen vor. Die wichtigsten natürlichen Lieferanten sind tierische Lebensmittel wie Leber oder Eigelb; aber auch Hefe, Sojabohnen oder Weizenkeime enthalten nennenswerte Mengen dieses Vitamins. Folsäure wird Lebensmitteln vorwiegend in Form von synthetischem Pteroylmonoglutamat zugesetzt. Neben diesem Vitameren existieren in der Natur noch weitere antianämische, endogene Folate (Folacine) mit unterschiedlicher Aktivität. Mit einer mikrobiologischen Bestimmungsmethode, wie sie im schweizerischen Lebensmittelbuch (1) beschrieben ist, wird die Aktivität der Folsäure und einiger Vitameren mikrobiologisch mit dem Testkeim Streptococcus faecium bestimmt. Das dabei gebildete Lactat wird titrimetrisch oder turbidimetrisch gemessen und auf Folsäure umgerechnet. Da diese Methodik zeitaufwendig ist und ein mikrobiologisches Laboratorium voraussetzt, wurden von verschiedenen Autoren HPLC-Methoden entwickelt.

So bestimmt *Schieffer* (2) Folsäure in einer synthetischen Vollwertnahrung mit Hilfe einer HPLC-Säule des Typs C_{18} mit UV-Detektion bei 365 nm. Eine Vorreinigung des Rohextraktes geschieht mit einer Anionen-Kartusche. Ein ähnliches Vorgehen für Leberproben verwendet auch Rebello (3), indem er aber vor der Reinigung auf einer NH_2-Kartusche die Folsäure mit Konjugasen freisetzt. *Hoppner* (4) berichtet über die Bestimmung von Folsäure in Säuglingsnährmitteln auf Milchpulverbasis. Die Vorreinigung erfolgt jedoch auf einer mit DEAE-Cellulose beschickten Kartusche. Die HPLC-Trennung wird mit einem Gradienten auf einer C_{18}-Säule durchgeführt. Andere Arbeiten beschreiben ein Vorgehen, bei dem zur Empfindlichkeitssteigerung eine Nachsäulenderivatisierung durchgeführt wird (5–7). Dadurch kann das Folsäure-Oxidationsprodukt mit einem Fluoreszenzdetektor bestimmt werden. Der grössere apparative Aufwand dieses Vorgehens lässt

sich aber in der Routineanalytik meist nur bei grösseren Probenzahlen rechtfertigen.

Bei komplex zusammengesetzten Lebensmitteln hat es sich gezeigt, dass die beschriebenen Bestimmungsmethoden zum Teil Chromatogramme liefern, welche eine einwandfreie Auswertung der Folsäure nicht gestatten. Erst die Kombination von zwei Vorreinigungsschritten (Ionentauscher und C_{18}-Festphasenextraktion) führt bei allen untersuchten Proben zu brauchbaren Ergebnissen. Im folgenden wird daher eine HPLC-Methode vorgestellt, mit der geringe Konzentrationen Folsäure in Form von zugesetzter Pteroylglutaminsäure in Lebensmitteln komplexer Zusammensetzung, wie zum Beispiel kakao- oder malzhaltige Frühstücksgetränke, selektiv bestimmt werden können. Andere endogene Vitamere werden nicht miterfasst, können aber bei vitaminisierten Lebensmitteln in den meisten Fällen vernachlässigt werden.

Experimenteller Teil

Prinzip

Der Rohextrakt wird enzymatisch hydrolisiert, da die Folsäure starke Adsorption an die Matrix aufweist. Das Hydrolysat wird auf einen Anionenaustauscher aufgezogen und die Folsäure mit gepufferter Kochsalzlösung eluiert. Das Eluat wird einer Festphasenextraktion an C_{18}-Material unterworfen. Die Folsäure wird durch HPLC als Tetrabutylammonium-Ionenpaar auf einer C_{18}-Säule mit einem UV-Detektor bestimmt. Als Variante steht nach der Derivatisierung mit FMOC-Cl eine HPLC-Bestimmung mit Fluoreszenzdetektor zur Verfügung, womit Selektivität und Empfindlichkeit gesteigert werden können.

Geräte

HPLC-Ausrüstung mit Diodenarray-Detektor PE 235 (Perkin-Elmer) oder Fluoreszenz-Detektor 8415 (Shimazu); pH-Meter mit Mikroelektrode; Kühlzentrifuge Minifuge T (Heraeus); Stabmixer Polytron PT 3000 mit Aggregat 3020/2 (D = 20 mm); Reagenzglas-Schüttler Vortex Genie (Bender und Hobein); Rotationsverdampfer (Büchi); Ultraschallbad; Wasserbad; Chromatografie-Glasrohr, ID = 1,4 cm; L = 12 cm; Absaugeinheit Visiprep Vacuum Manifold (Supelco); Adapter zu Chromabond (Macherey-Nagel Art 730100); Trichter zu Chromabond, 30 ml (Macherey-Nagel Art 730103).

Chemikalien

Chromabond C_{18} ec. 1000 mg (Macherey-Nagel Art.730015); Sephadex-DEAE A-25-120 (Fluka Art. 84956); Aceton Uvasol (Merck Art. 22); Acetonitril LiChrosolv (Merck Art. 14291); Ethanol abs. (Merck Art. 983); Methanol LiChrosolv (Merck Art. 6007); Essigsäureethylester LiChrosolv (Merck Art. 868), Natronlauge 10 M, Natronlauge 1 M; Natriumchlorid (Merck Art. 6404); Schwefelsäure 0,5 M; Schwefelsäure 0,05 M; Phosphorsäure konz. min. 85% (Merck Art. 573); Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (Fluka Art.86868); Trypsin (Merck Art. 24579), Clara-Diastase (Fluka Art. 27540); K-dihydrogenphosphat (Merck Art. 4873); di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat (Merck Art. 5099); FMOC-Cl: Chlorameisensäure-9-fluorenylmethyl-ester (Fluka Art. 23185).

Phosphatpuffer pH 7,0 1/15 M: 3.6 g K-dihydrogenphosphat und 8,3 g di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat in 1 Liter Wasser lösen.

Gepufferte Kochsalzlösung: 58 g Natriumchlorid in 1 Liter Phosphatpuffer, pH 7,0 1/15 M lösen.

Kalium-dihydrogenphosphatlösung 0,15%: 0,15 g K-dihydrogenphosphat in 100 ml Wasser lösen.

Phosphorsäure 1/30 M: 2,28 ml Phosphorsäure 85% mit Wasser zu 1 Liter verdünnen.

Phosphorsäure/K-dihydrogenphosphat: 1 Teil Phosphorsäure 1/30 M und 3 Teile K-dihydrogenphosphat 0,15% mischen.

Tetrabutylammoniumhydrogensulfatlösung 0,5% pH 8,5: 5 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 1 Liter Wasser lösen und mit 10 M Natronlauge auf pH 8,5 ± 0,3 einstellen (pH-Korrektur mit 0,5 M Schwefelsäure und 1 M Natronlauge).

FMOC-Cl-Reagenz 10 mg/ml: Ca. 100 mg FMOC-Cl in soviel Aceton (Uvasol) lösen, dass die Konzentration 10 mg/ml beträgt. Reagenzlösung täglich frisch herstellen!

Vergleichslösungen

Stammlösung 0,1 mg/ml (100 ng/µl): Ca. 10 mg Folsäure Art. 47620 (Fluka) genau einwägen und in soviel Phosphatpuffer pH 7,0 1/15 M lösen, dass eine Konzentration von 0,1 mg/ml resultiert. Die Lösung ist bei 4 °C mehrere Tage haltbar.

HPLC-Standardlösung 0,5 ng/µl (für Variante A: UV-Detektion): 0,25 ml der Stammlösung in 50-ml-Messkolben pipettieren und mit Phosphatpuffer pH 7,0 1/15 M zur Marke auffüllen.

Standardlösung zur Derivatisierung 0,5 ng/µl (für Variante B; Fluoreszenz-Detektion): 0,25 ml der Stammlösung in 50-ml-Messkolben pipettieren, mit 25 ml K-dihydrogenphosphatlösung 0,15% versetzen und mit Wasser zur Marke auffüllen (stets frisch herstellen).

Ausführung

Extraktion

Anmerkung: Vorgängig muss das Volumen von 10 g Probe mit 100 ml Puffer bestimmt werden (= A in ml).

10 g einer homogenen Lebensmittelprobe in 250-ml-Erlenmeyer einwägen. Zugabe von 80 mg Clara-Diastase, 80 mg Trypsin und 100 ml Phosphatpuffer. 3 min mit dem Polytron homogenisieren. Während 3 Std. bei 40 °C im Wasserbad hydrolysieren; ca. alle 30 min das Hydrolysat umschwenken. 20 min bei 15 °C und 2000 U/min zentrifugieren. Den Überstand durch Faltenfilter (Schleicher und Schuell 595½, d = 23 cm) filtrieren.

Ionenaustausch

10,0 ml Filtrat in 50-ml-Becherglas pipettieren und 0,8 g DEAE-Sephadex zusetzen. Mind. 30 min bei Zimmertemperatur stehen lassen; von Zeit zu Zeit umschwenken. Mit 1/15 M Phosphatpuffer pH 7,0 den Becherglasinhalt in eine Chromatografiesäule spülen (Puffer aus einer Spritzflasche). Nach Absetzen des Ionentauschers dessen Oberfläche mit Quarzwolle überschichten. Mit Phosphatpuffer nachwaschen und ca. 25 ml Eluat in einem Messzylinder auffangen (Durchflussgeschwindigkeit ca. 2 ml/min). Aufgefangenes Eluat verwerfen. Folsäure mit gepufferter Kochsalzlösung bis zu einem Volumen von 20-25 ml (Durchfluss ca. 1 ml/min) in 25 ml Messzylinder eluieren (= Ionentauscher-Eluat).

Chromabond-Reinigung

Chromabondsäule auf Visiprep Vacuum Manifold stecken. 5 ml Ethanol abs. und 5 ml 1/15 M Phosphatpuffer pH 7,0 nacheinander durchlaufen lassen. Trichter aufsetzen, Ionentauschereluat auf Säule giessen und durchsaugen (ca. 970 mbar, 1 Tropfen/s). Nachwaschen mit 10 ml 1/15 M Phosphatpuffer pH 7,0. Chromabondsäule abnehmen und mit Wasserstrahlpumpe restlichen Puffer während ca. 1 min in Fliessrichtung absaugen. Chromabondsäule erneut auf Visiprep Vacuum Manifold stecken. Folsäure mit 4–4,5 ml Wasser in 5-ml-Messkolben eluieren. Mit Wasser zur Marke ergänzen (= Probelösung UV).

HPLC mit UV-Detektion (Variante A)

System 1: Trennsäule KS-Nucleosil-120, C_{18}, 5 µm (3+10+10 cm); Eluens: Acetonitrie/Tetrabutylammoniumhydrogensulfatlösung 150 + 850; Flussrate: 1,4 ml; UV-Detektor: 1 = 300 nm, 2 = 340 nm (UV-Spektrum Folsäure: Minimum bei 240 nm; Schulter bei 265 nm; Maximum bei 290 nm); Injektion: 50 µl HPLC-Standardlösung enthaltend 25 ng Folsäure, resp. 50 µl Probelösung UV; Retentionszeit: ca. 11 min.

Berechnung: A = Volumen aus 10 g Probe + 100 ml Pufferlösung in ml; B = µg Folsäure in 50 µl Probelösung UV; Folsäure (mg/kg) = A x B.

System 2: Trennsäule KS-Nucleosil-120, C_{18}, 5 µm, (10+10 cm); Eluens: Methanol/Tetrabutylammoniumhydrogensulfatlösung 300 + 700; Flussrate: 1,0 ml/min; UV-Detektor, Injektion und Berechnung wie System 1; Retentionszeit ca. 11 min.

HPLC mit Fluoreszenz-Detektion (Variante B)

Einstellen des pH-Wertes: 4,00 ml Probelösung UV in 10-ml-Becherglas pipettieren; Zugabe von 4,00 ml Phosphorsäure/K-dihydrogenphosphat, pH-Wert am pH-Meter mit Natronlauge 0,1 M und Phosphorsäure 1/30 M aus 0,5-ml-Stabpipette auf pH 4,0–4,5 einstellen (Verbrauch = D in ml, = Probelösung Fluoreszenz).

Derivatisieren der Probelösung Fluoreszenz: 1,00 ml Probelösung B in 10-ml-Schliffreagenzglas pipettieren; Zugabe von 1,00 ml frisch hergestellte FMOC-Cl-Reagenzlösung; mit Vortex sofort mischen, während ca. 20 s in Ultraschallbad stellen und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen lassen (= Derivat aus Probelösung Fluoreszenz).

Derivatisieren der Standardlösung: 0,50 ml Standardlösung zur Derivatisierung in 10-ml-Schliffreagenzglas pipettieren; Zugabe von 0,50 ml Wasser und 1,00 ml frisch hergestellte FMOC-Cl-Reagenzlösung; mit Vortex sofort mischen, während ca. 20 s in Ultraschallbad stellen und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen lassen (= Derivat aus Standardlösung).

HPLC des Folsäure-FMOC-Derivats: Trennsäule KS-Nucleosil-120, C_{18}, 5 µm, (10+10 cm); Eluens: Acetonitril/Tetrabutylammoniumhydrogensulfatlösung 350 + 650; Flussrate: 1,5 ml/min, Retentionszeit: ca. 4 min, Fluoreszenz-Detektor: Anregung bei 360 nm, Emission bei 450 nm; Injektion: 50 µl Derivat aus Standardlösung entsprechend 6,25 ng Folsäure; bzw. 50 µl Derivat aus Probelösung Fluoreszenz.

Berechnung: A = Volumen aus 10 g Probe + 100 ml Pufferlösung in ml; C = µg Folsäure in 50 µl Derivat aus Probelösung Fluoreszenz.

Folsäure [mg/kg] = 0,5 x A x C x (8+D).

Extraktion des FMOC-Folsäure-Derivats: Zum Abtrennen störender Matrixkomponenten oder zum Aufkonzentrieren kann das Derivat wie folgt ausgeschüttelt werden: Zu 1,5 ml «Derivat aus Standardlösung» bzw. zum «Derivat aus Probelösung Fluoreszenz» 0,2 ml 0,05 M Schwefelsäure und 3,0 ml Essigester zugeben; schütteln mit Vortex; ca. 5 min zentrifugieren; 2,7 ml der oberen Phase in Gewindefläschchen pipettieren, mit Stickstoff Lösungsmittel entfernen und Rückstand in 0,24 ml Acetonitril lösen (ca. 1 min in Ultraschallbad) und kurz vor der Injektion unter Schütteln 0,36 ml Tetrabutylammoniumhydrogensulfatlösung zusetzen (= FMOC-Derivat-Extrakt). Beim Stehenlassen dieser Lösung können mit der Zeit feine Kristalle ausfallen. HPLC gemäss *HPLC des Folsäure-FMOC-Derivats.*

Bei Lebensmitteln, deren Wiederfindungsrate für Folsäure noch nicht bekannt ist, muss ein Zusatzversuch durchgeführt werden. Dabei sollte der zugesetzte Gehalt etwa dem im Lebensmittel erwarteten Gehalt entsprechen (Additionsmethode).

Diskussion

Lebensmittel mit hohen Anteilen an Eiweiss und/oder Cellulose müssen vor der Extraktion unbedingt enzymatisch aufgeschlossen werden, damit die Folsäure vollständig vom Lebensmittel desorbiert werden kann. Diese Spaltung erfolgt sinngemäss nach *Ötles* (8) und bewährte sich bereits bei der Bestimmung der Vitameren der B-Gruppe (9).

Der stark hydrophile Charakter sowie die sauren und basischen Gruppen der Folsäure erfordern einen Reinigungsschritt mit Hilfe eines Ionentauschers. DEAE-Sephadex eignet sich hierzu besonders gut, weil unerwünschte Adsorptionen gering sind und das folsäurehaltige Eluat direkt auf eine C_{18}-Kartusche gegeben werden kann. Dabei ist bemerkenswert, dass sich die Folsäure mit dem Phosphatpuffer vom C_{18}-Material nicht eluieren lässt, wohl aber anschliessend mit reinem Wasser. Aus diesem Grunde kann die C_{18}-Kartusche mit Phosphatpuffer gewaschen werden, bevor die Folsäure mit Wasser eluiert wird. Dies ergibt besonders saubere Eluate.

Die Umsetzungsbedingungen wurden bezüglich pH-Wert, Reaktionsdauer, Lösungsmittel und Reagenzkonzentration optimiert. Wenn die Folsäure mit UV-

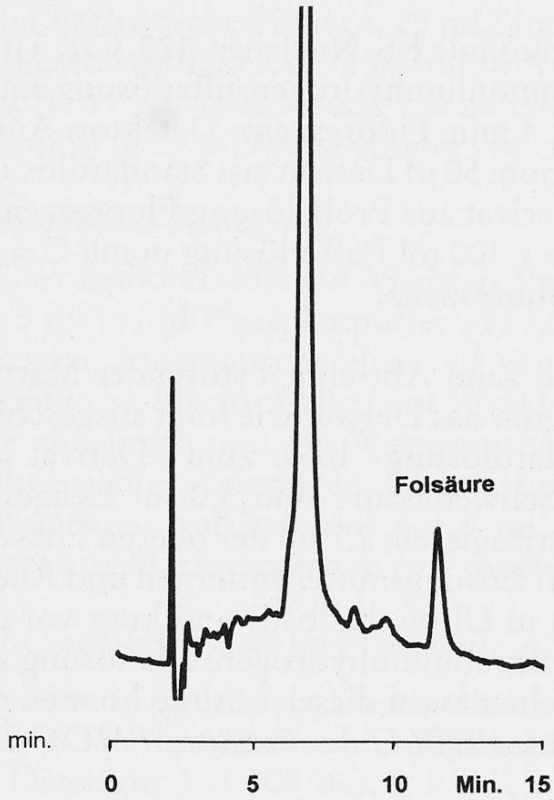

Abb. 1a. Chromatogramm eines Extraktes eines kakaohaltigen Frühstückgetränkes mit 2,7 mg Folsäure/kg (UV-Detektion). Chromatografie-Bedingungen vgl. Text.

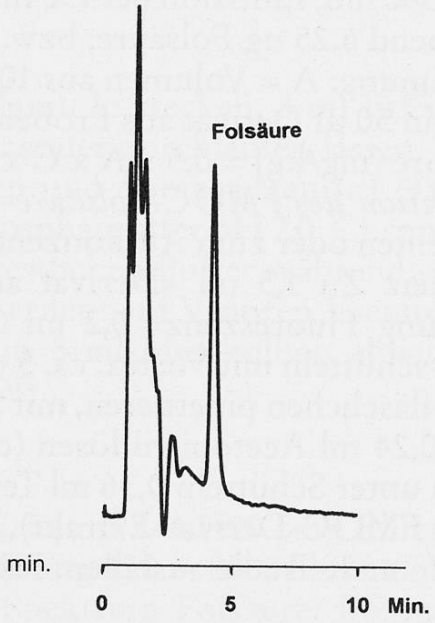

Abb. 1b. Gleicher Extrakt wie Abb. 1a, aber FMOC-Derivat der Folsäure (Fluoreszenz-Detektion).

Detektion nicht vollständig von der Matrix abgetrennt ist, resultiert mit dem Diodenarray-Detektor ein von der Standardsubstanz abweichendes UV-Spektrum. Falls gleichzeitig der Purity Index (Mass der Abweichung des UV-Spektrums von den Werten der Reinsubstanz) grösser als 1,5 ist, muss angenommen werden, dass Fremdsubstanzen mit der Folsäure koeluieren. Aus diesen Gründen ist eine Derivatisierung bei gewissen Lebensmitteln zwingend, um mit dem Derivat neue chromatografische Eigenschaften zu erhalten. Gleichzeitig wird durch die Fluoreszenzdetektion eine optische Selektivitätssteigerung gewonnen. Trotzdem kann der Umsatz in der Probelösung aufgrund von Matrixeffekten bis zu 5% kleiner sein als derjenige in der Standardlösung. Dieser Fehler kann jedoch durch die Additionsmethode korrigiert werden. Die Wiederfindungsrate wurde an folgenden Lebensmitteln bestimmt:

Kakaohaltiges Frühstücksgetränk	86%
Kakaohaltiges Getränk für Säuglinge und Kinder	95%
Corn Flakes	94%

Die relative Standardabweichung beträgt ca. 4%, bestimmt an einem dieser Produkte mit 2,7 mg Folsäure/kg (n = 7). Die Nachweisgrenze liegt bei den untersuchten Lebensmitteln bei 20 µg Folsäure/kg.

Abbildung 1a zeigt das Chromatogramm eines kakaohaltigen Frühstücksgetränkes mit 2,7 mg Folsäure/kg bestimmt mit Variante A (UV), während Abbildung 1b das Chromatogramm des gleichen Präparates nach Derivatisierung zeigt (Variante B, Fluoreszenz).

Dank

Herrn *H.P. Bähler* sei für seine wertvolle Arbeit an der Entwicklung dieser Methodik herzlich gedankt.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, mit der geringe Gehalte an zugesetzter Folsäure in Lebensmitteln bestimmt werden können. Dazu wird das Lebensmittel enzymatisch hydrolisiert, durch Ionentauscher- und C_{18}-Festphasen-Extraktion gereinigt und die Folsäure mit HPLC und UV-Detektion bestimmt. Bei Lebensmitteln mit störender Matrix kann die Folsäure zusätzlich mit FMOC-Cl derivatisiert und das Derivat mit HPLC und Fluoreszenz-Detektion selektiv bestimmt werden. Zudem ist eine Anreicherung des Derivats durch Ausschütteln möglich. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,02 mg Folsäure/kg Lebensmittel.

Résumé

La méthode décrite permet de déterminer sélectivement des traces d'acide folique dans les denrées alimentaires auxquelles cette substance a été ajoutée. Après hydrolyse enzymatique, suivie d'une purification sur cartouche échangeuse d'ions puis extraction sur phase solide C_{18}, l'acide folique est quantifié par HPLC avec détection UV. Pour les denrées alimentaires

ayant une composition complexe, l'acide folique peut être déterminé à l'aide d'un détecteur de fluorescence, après dérivatisation avec FMOC-Cl. De plus, l'extrait peut être enrichi par une extraction. La limite de détection est d'env. 0,02 mg d'acide folique/kg denrée alimentaire.

Summary

The present method allows the selective determination of minute quantities of folic acid in fortified foods. For this purpose, the food sample is enzymatically hydrolysed, cleaned up by ion exchange and by a solid-phase extraction step on C_{18}-material, before folic acid is quantified using HPLC with UV-detection. In case of foods with a complex matrix, the vitamin can be derivatized with FMOC-Cl in order to increase the selectivity with a fluorescence detector. Moreover, a possible extraction of the derivative significantly increases the sensitivity. The detection limit is approx. 0,02 mg folic acid/kg food.

Literatur

1. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Bd. 2, Kap. 62. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1989.
2. *Schieffer, G. W., Wheeler, G. P.* and *Cimino, C. O.:* Determination of folic acid in commercial diets by anion-exchange solid-phase extraction and subsequent reversed-phase HPLC. J. Liquid Chromatogr. **7,** 2659-2669 (1984).
3. *Rebello, T.:* Trace enrichment of biological folates on solid-phase adsorption cartridges and analysis by high-pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. **166,** 55-64 (1987).
4. *Hoppner, K.* and *Lampi, B.:* The determination of folic acid (pteroylmonoglutamic acid) in fortified products by reversed phase high pressure liquid chromatography. J. Liquid Chromatogr. **5,** 953-966 (1982).
5. *Gregory III, J. F., Sartain, D. B.* and *Day, B. P. F.:* Fluorimetric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. J. Nutr. **114,** 341-353 (1984).
6. *Holt, D. L., Wehling, R. L.* and *Zeece, M. G.:* Determination of native folates in milk and other products by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **449,** 271-279 (1988).
7. *Day, B. P. F.* and *Gregory III, J. F. J.:* Determination of folacin derivatives in selected foods by high-performance liquid chromatography. Agric. Food Chem. **29,** 374-377 (1981).
8. *Ötles, S.:* Vergleichende Vitamin-B_1- und B_2-Bestimmungen mit verschiedenen Enzympräparaten in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **193,** 347 (1991).
9. *Gauch, R., Leuenberger, U.* und *Müller, U.:* Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine B_1, B_2, B_6 und B_{12} in Milch durch HPLC. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **195,** 312-315 (1992).

R. Gauch
Dr. U. Leuenberger
Dr. U. Müller
Kantonales Laboratorium Bern
Postfach
CH-3000 Bern 9