

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 56 (1965)
Heft: 5

Artikel: Vergleichende Thiaminbestimmungen in Fischkonserven auf chemischem und mikrobiologischem Wege
Autor: Ganowiak, Z. / Wierzchowski, J. / Wituszyska, B.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982204>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 15.03.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Vergleichende Thiaminbestimmungen in Fischkonserven auf chemischem und mikrobiologischem Wege

Z. Ganowiak, J. Wierzchowski und B. Wituszyńska

Aus dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Medizinischen Akademie in Gdańsk, Polen

I. Einführung

Die bisherigen Thiaminbestimmungsmethoden kann man grundsätzlich in drei Gruppen teilen, und zwar:

1. biologische Methoden,
2. chemische Methoden,
3. mikrobiologische Methoden.

Zur Untersuchung der Lebensmittel fanden die chemischen und mikrobiologischen Methoden in verschiedenen Modifikationen eine praktische Anwendung.

In letzten Jahren wendete man größere Aufmerksamkeit den mikrobiologischen Methoden zu, die auch zur quantitativen Vitaminbestimmung eingeführt wurden. In diesem Zusammenhang hat es den Anschein, daß die klassische, chemische Thiochrommethode der Spezifität und Empfindlichkeit wegen, gegenüber der mikrobiologischen im Nachteil ist.

Untersuchungen von *Adrian, Harris* und *Wang* (1, 2) über die chemischen und mikrobiologischen Thiaminbestimmungen in rohen Fischen, konnten keine bedeutenden Unterschiede der Ergebnisse nachweisen. Die Angaben von *Fitzgerald* und *Hughes* (3) für einige andere Lebensmittel bestätigten diese Beziehung. Die statistische Auswertung der Thiaminbestimmungen von *Haukin* und *Squires* (4) zeigten keine nennenswerte Unterschiede. Die von *Haenel* und *Cienciata* (5) durchgeführten chemischen und mikrobiologischen Thiaminbestimmungen in einigen Lebensmitteln (Mehl, Hefe) wiesen eine große Übereinstimmung der Ergebnisse bei Anwendung beider Methoden auf.

Wenn man die große Empfindlichkeit und Spezifität der mikrobiologischen Bestimmungsmethode in Betracht zieht, dürfen die Nachteile dieser Methode bei Einzelbestimmungen nicht übersehen werden. Bemerkt sei auch, daß nicht alle Laboratorien die nötigen Bedingungen zur Anwendung der mikrobiologischen Methode haben und daher die chemische Methode den Vorzug findet.

Die exakte Thiaminbestimmung für die Nährwerttabellen der einzelnen, wertvolleren Nahrungsprodukte hat eine vergleichende Bestimmung mit beiden Methoden zur Voraussetzung.

An dem Lehrstuhl für Bromatologie der Medizinischen Akademie in Gdańsk werden Untersuchungen zur Bestimmung des Nährwertes von Fischen und Fischerzeugnissen durchgeführt. Zur Bestimmung gelangt neben den Vitaminen A und D auch der Thiamingehalt bei Anwendung der mikrobiologischen und chemischen Methode. Die statistische und vergleichende Analyse der mit beiden Methoden erhaltenen Mittelwerte führte zur besseren Kenntnis des Thiamingehaltes in den untersuchten Fischkonserven.

II. Versuchsmaterial

Die Untersuchungen wurden mit den aus Seefischen hergestellten Fischkonserven durchgeführt. Die Auswahl der untersuchten Fischkonserven wurde mit Rücksicht auf die Verbreitung auf dem hiesigen Markte vorgenommen. Es wurde der Thiamingehalt, sowohl in Fischkonserven in Tomatensauce, wie auch in Öl, geprüft.

Für die Untersuchungen wurden folgende Fischkonserven in Tomatensauce gewählt:

- «Dorsche in Tomatensauce»,
- «Flunder in Tomatensauce»,
- «Hering in Tomatensauce».

Die Thiaminbestimmungen wurden ebenfalls in den Fischkonserven «Hering in Öl», und «Dorsche in Öl», vorgenommen.

Das Untersuchungsmaterial stammte von den im Verkauf sich befindenden Fischkonserven aus dem Gebiete Gdańsk, Gdynia, Sopot.

III. Experimenteller Teil

A. Chemische Methode

In dem Untersuchungsmaterial wurde die von einigen Autoren erprobte (6, 7, 8, 9) Thiochrommethode mit Isobutylalkohol angewandt. Sie beruht auf einer Oxydation des Thiamins mittels alkalischer Kaliumferrizyanid-Lösung zu Thiochrom, das im UV-Licht eine blaue Fluoreszenz aufweist.

a) Reagenzien

Zu den Bestimmungen wurden mit Ausnahme von Säuren (HCl, H₂SO₄), Isobutanol und abs. Aethanol, deren Lösungen auf Fluoreszenz vorher untersucht wurden, Reagenzien pro analysi angewandt.

1. 0,1 N HCl.
2. 0,1 N H₂SO₄.
3. 2,5 M CH₃COONa.

4. Kristallinisches, wasserfreies Na_2SO_4 .
5. 15 % NaOH.
6. 1 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ — dieses Reagens wurde ex tempore vorbereitet.
7. Alkalische $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Lösung — 3 ml 1 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ wurden mit kaltem 15 % NaOH auf 100 ml ergänzt, ebenfalls ex tempore vorbereitet und vor Licht geschützt aufbewahrt.
8. Isobutanol.
9. Enzyme: proteolytisches Pepsin und Papain, amylolytische Diastase und Tackadiastase.
10. 25 % KCl-Lösung.
11. Saure 25 % KCl-Lösung — 250 g KCl hat man auf 1000 ml mit 0,1 N HCl ergänzt.
12. Aktivierter Decalso-Zeolith.
13. Stammlösung des Thiaminstandards — 100 mg über konzentrierter Schwefelsäure getrocknetes Thiamin (der Firma Fluka, Schweiz), wurde in 0,01 N HCl gelöst, auf 1000 ml ergänzt und im Kühlschrank aufbewahrt.
14. Zwischenlösung des Thiaminstandards — 5 ml der Stammlösung (Reagens Nr. 13) hat man auf 100 ml mit 0,01 N HCl ergänzt.
15. Arbeitslösung des Thiaminstandards — 4 ml Zwischenlösung (Reagens Nr. 14) wurde mit saurer 25 % KCl-Lösung (Reagens Nr. 11) auf 100 ml verdünnt. Die Endkonzentration des Thiamins betrug 0,2 mcg/1 ml. Dieses Reagens wurde ebenfalls im Kühlschrank in einer dunklen Flasche aufbewahrt.
16. Stammlösung des Chininsulfates — 100 mg Chininsulfat wurde in 0,1 NH_2SO_4 gelöst und auf 1000 ml ergänzt.
17. Arbeitslösung des Chininsulfates — 3 ml der Stammlösung (Reagens Nr. 16) wurde in 0,1 N H_2SO_4 gelöst und auf 1000 ml ergänzt. Die Endkonzentration dieser Lösung betrug 0,3 mcg/1 ml. Die Reagenzien Nr. 16 und 17 wurden im Kühlschrank in dunklen Flaschen aufbewahrt.
18. 3 % CH_3COOH .
19. Absoluter Aethanol.

b) Apparatur

Die Thiaminbestimmungen wurden auf dem photoelektrischen Fluorometer «Lumetron», Modell 402-EF, mit einem multiple-reflection Galvanometer (Modell 45) durchgeführt. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 365 m μ durchgeführt. Zwei Typen von Filtern wurden angewendet. Der erste sogenannte ursprüngliche, wurde zwischen Quecksilberlampe und Küvetten, der zweite (hellgelbe) zwischen Küvetten mit dem Versuchsmaterial und zwei großen Fotozellen aufgestellt. Um die Eigenfluoreszenz des zweiten Filters auszuschließen, wurden zusätzliche Filter (blaue) aufgestellt. Sie wurden zwischen Fotozellen und dem Gelbfilter aufgestellt und trennten die charakteristische Fluoreszenz des Thiochromes von der Eigenfluoreszenz.

Das Fluorimeter wurde mit der Arbeitslösung des Chininsulfates (Reagens Nr. 17) im Bereich von 0,15—1,5 mcg geeicht.

c) Methodik

Der experimentelle Teil umfaßte nachfolgende Etappen:

1. Vorbereitung der Probe.
2. Säurehydrolyse.
3. Enzymatische Hydrolyse.
4. Die Thiaminabtrennung aus den Hydrolysaten unter Anwendung von mit aktiviertem Decalzo-Zeolith beschickten Säulen.
5. Die Thiaminelution.
6. Oxydation des Eluates.
7. Fluoreszenzmessung.

ad 1. Vorbereitung der Probe

Das Versuchsmaterial wurde in einem Mörser bis zur gleichförmigen Masse zerrieben. Die Zerkleinerung in einer Porzellankugelmühle hatte unbefriedigende Erfolge. Von der erlangten Masse wurden parallel 5 Proben (ca. 7—10 g) von jeder untersuchten Fischkonserve entnommen.

ad 2. Säurehydrolyse

Die auf der analytischen Waage abgewogene Einwaage des Versuchsmaterials wurde in einen Erlenmeyerkolben gebracht und mit der entsprechenden Menge 0,1 N H_2SO_4 versetzt. In den ersten Versuchsproben betrug das Verhältnis der Schwefelsäure zur Probe 1:7. In den nachfolgenden wurde das Volumen sowie die Stärke der angewandten Säure vergrößert. Die mit 0,5 N und 1,0 N H_2SO_4 durchgeführte Hydrolyse war für den weiteren Verlauf des Versuches ungünstig, denn das Hydrolysat zeigte eine Braunfärbung, welche einen bedeutenden Einfluß auf die Blindprobe hatte.

Den besten Verlauf hatte die Hydrolyse bei der Anwendung von 20 ml 0,1 N H_2SO_4 auf 1 g Probe und dieses Verhältnis wurde auch bei den nachfolgenden Bestimmungen beibehalten.

Die Säurehydrolyse wurde in einem Autoklaven bei 120 ° C und dem Druck von einer Atmosphäre innerhalb 15 Minuten durchgeführt.

Nach der Abkühlung auf 40 ° C, wurde das Hydrolysat mittels 2,5 M Na-acetat-Lösung auf den pH-Wert 4,5—5 gebracht.

ad 3. Enzymatische Hydrolyse

In Lebensmitteln, besonders tierischer Herkunft, tritt das Thiamin als Pyrophosphorsäureester auf. Das durch die Oxydation der Cocarboxylase entstandene Thiochrom ist in Isobutanol nicht löslich und bleibt in der wäßrigen Phase. Die Fluoreszenzmessungen dieser Thiaminform sind, besonders bei Fremdfluoreszenz der wäßrigen Phase, erschwert. Um das Thiamin in freier Form, wie auch in

Verbindung von Pyrophosphorsäure zu bestimmen, muß man die enzymatische Hydrolyse durchführen.

Wie *Johannson* und *Rich* mitteilen, haben *Hennessy* und *Cercecedo* zuerst die enzymatische Hydrolyse bei der Thiaminbestimmung als Cocarboxylase mittelst entfettetem Rindernierenextrakt angewandt (10). Nach den Beobachtungen von *Melnick* und *Field* kommt es bei dieser Methode zu keiner vollkommenen Zerspaltung der Cocarboxylase und sie schlagen die Anwendung von Trockenhefe vor (11). *Kinnersley* und *Peters* wie auch *Harris* und *Wang* wendeten die Takadiastase an (12). *Conner* und *Straub* berichteten, daß Takadiastase und Klarase vollständig die Cocarboxylase hydrolysiert, während Amylase nicht so aktiv wäre (13). *Sarett* und *Cheldelin* wie auch *Sakurai* und *Inagaki* empfehlen eine Mischung von Takadiastase und Papain (14, 15). *Pyke* und *Barton-Wright* betonten die Notwendigkeit der Anwendung von Pepsin für die proteolytische Aufschließung des aus dem Tierreich stammenden Materials (16). Nach den obgenannten Autoren hat Pepsin eine selektive Wirkung bei der Verdauung dieses Materials. Für die Befreiung des Thiamins aus Getreide und Getreideprodukten hat *Roth* das Papain und die Diastase für Blut und Tiergewebebestimmungen empfohlen (17).

Was die Inkubation anbetrifft, so sind die Zeit- und Temperaturangaben in der Literatur verschieden. In früheren Untersuchungen wurde eine dreistündige Inkubation bei einer Temperatur von 37 ° C angewendet. *Strohecker* und *Wolff* führten eine enzymatische Inkubation bei einer Temperatur von 45 ° C innerhalb von 3,5 Stunden durch (18). *Brown* empfiehlt das Anwenden von höheren Temperaturen, ca. 50—55 ° C und die Zeit von 2 Stunden (19). Eine Verlängerung der Inkubationszeit ergab nach seinen Beobachtungen keine höheren Werte des Thiamingehaltes. *Connor* berichtet, daß eine zweistündige Inkubation bei höherer Temperatur (45—50 ° C) im Vergleich mit einer 18stündigen bei 37 ° C keine Unterschiede ergab (7). *Harris* und *Wang* haben bei Thiaminbestimmungen in Fleisch und Fleischprodukten die Inkubation in 18 Stunden und bei einer Temperatur von 40—45 ° C durchgeführt (12).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine 18stündige, enzymatische Hydrolyse bei einer Temperatur von 36—37 ° C angewendet. In den ersten Untersuchungen hat man die dreistündige Inkubation bei einer Temperatur von 45—50 ° C verwendet. Die erlangten Ergebnisse waren um ca. 30 % niedriger, was auf eine unvollständige Thiaminspaltung zurückzuführen ist.

Um die Methodik genauer auszuarbeiten, hat man in den Vorbestimmungen zwei Enzymsysteme angewandt:

1. Takadiastase und Papain.
2. Diastase und Pepsin.

Zu den Bestimmungen wurden 20 mg von jedem Enzym pro 1 g Probe abgewogen. Die Bestimmungen wurden mit der Fischkonserve «Flunder in Tomatensauce» mittels obgenannter Enzymsysteme durchgeführt. Da das Papain und Pepsin leichter zu beschaffen waren, fand dieses Enzymsystem bei weiteren Thiamin-Serienbestimmungen in Fischkonserven Anwendung.

ad 4. Die Abtrennung des Thiamins aus den Hydrolysaten unter Anwendung von mit aktiviertem Decalzo-Zeolith beschickten Säulen.

Zur Thiaminabsonderung wurden 20 cm lange Glasröhren von 1 cm Durchmesser als Säulen angewendet. Die Säulen wurden im unteren Teil zu einer Kapillare von ca. 0,3—0,35 mm Durchmesser ausgezogen. Auf die Kapillare wurde ein Gummischlauch mit Klammer aufgelegt. Beim Durchlaufen des Hydrolysates sowie während der Elution wurde der Schlauch entfernt, um eventuelle Verunreinigungen des Eluates mit Fluoreszenzverbindungen des Gummis zu verhindern.

Die Beschickung der Säule mit dem Zeolith erfolgte bei aufgelegtem Gummischlauch. Zunächst wurde auf den Boden der Säule Glaswatte gelegt, mit destilliertem Wasser bis zur Hälfte der Säule aufgefüllt und ca. 2—3 g aktivierter Decalzo-Zeolith in dem Wasser suspendiert (Reagens Nr. 12). Nachdem der Zeolith sich auf den Boden der Säule abgesetzt hatte, öffnete man die Kammer, um den Abfluß des destillierten Wassers zu ermöglichen. Die Säule wurde dreimal mit je 10 ml heißer 3%iger Essigsäure gewaschen. Die so vorbereitete Säule eignete sich zur Durchführung der Analyse.

Nach dem Durchlaufen der Hydrolysate und Eluieren, hat man zunächst die Säule einige Male mit destilliertem Wasser und dann dreimal mit je 10 ml heißer 3%iger Essigsäure gewaschen. Nach dreimaliger Anwendung der Säule, hat man sie von neuem mit Decalzo-Zeolith aufgefüllt.

Das Hydrolysat wurde nach der enzymatischen Inkubation auf Zimmertemperatur abgekühlt, in einen Meßkolben gebracht, mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt, stark geschüttelt und durch ein Filter aus Whatman Nr. 1 Filterpapier filtriert. Die erhaltene Lösung war klar und je nach der analysierten Fischkonserve hellgelb bis hellbraun.

Das Volumen der durch die Säule durchgelassenen Hydrolysate, war von der Thiaminkonzentration des Versuchsmaterials abhängig. Bei Fischkonserven in Öl hat man das ganze Hydrolysat benutzt. Bei den Fischkonserven in Tomatensauce, wurde der Thiamingehalt der Tomatensauce in Betracht gezogen und nur die Hälfte des Hydrolysates in die Säule gegeben.

Beim Durchlaufen der Hydrolysate wurde der Ausfluß so reguliert, daß innerhalb von 3 Minuten 10 ml ausliefen.

In den Vorversuchen wurde die Oxydation der durch die Säule durchgeführten Hydrolysate nachgeprüft. Die negativen Ergebnisse zeigten, daß die Thiaminadsorption vollständig war und das Thiamin nicht in das Lösungsmittel diffundierte. In den nachfolgenden Bestimmungen wurden die Filtrate verworfen.

ad 5. Die Elution

Nach dem Durchlaufen der Eluate, wurde die Säule dreimal mit kaltem, destilliertem Wasser gewaschen. Das auf dem Decalso-Zeolith adsorbierte Thiamin wurde mit einer sauren, heißen (70—80 ° C), 25%igen KCl-Lösung (Reagens Nr. 11) eluiert.

Das Volumen der erhaltenen Eluate war auch vom Thiamingehalt des Versuchsmaterials abhängig. In Fischprodukten in Tomatensauce wurde das Eluieren des Thiamins mit größerer Reagensmenge durchgeführt, und zwar mit 25 ml. Bei Fischkonserven in Öl jedoch wurden nur 10 ml des Reagens angewandt. Das Eluieren wurde mit 2 Portionen des Reagens durchgeführt. Bei Fischkonserven in Tomatensauce eluierte man zweimal mit je 12,5 ml und bei Fischkonserven in Öl zweimal mit je 5 ml. Bei der Durchführung der Elution wurden die ersten vom Lösungsmittel verdrängten 2 ml destillierten Wassers, die aus der Säule flossen, verworfen. Die erhaltenen Eluate wurden mit 25%iger KCl-Lösung ergänzt und im Kühlschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Die Eluate waren klar und hellgelb.

In den Vorversuchen wurde der quantitative Verlauf der Elution mittels erneuter Elution geprüft. Die negativen Ergebnisse der Kontrollelution bewiesen, daß die Elution quantitativ verläuft und die gesamte Thiaminmenge im ersten Eluat vorhanden ist.

ad 6. Oxydation der Eluate

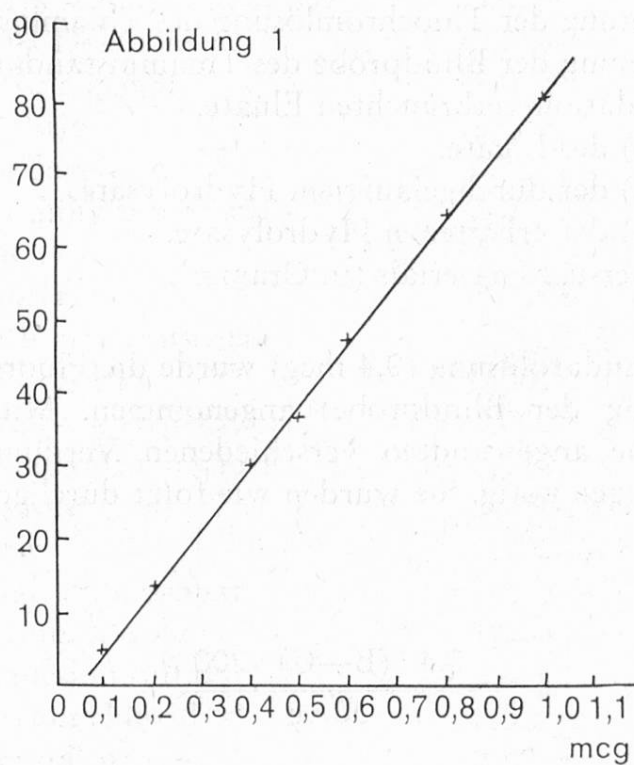
Die Oxydation des Thiamins zum Thiochrom wurde in kleinen, trockenen Scheidetrichtern durchgeführt.

Neben der Oxydation der Eluate wurde eine Blindprobe bestimmt. Die Bestimmungen erfolgten nach folgendem Schema: Die Versuchsprobe wurde mit der Nummer 1, die Blindprobe mit 2 bezeichnet.

In zwei Trichter (Nr. 1 und Nr. 2) wurden je 5 ml der Eluate pipettiert. In den Trichter Nr. 1 wurde 3 ml alkalischer $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung (Reagens Nr. 7), und in den Trichter Nr. 2 3 ml 15 % Natronlauge (Reagens Nr. 5) gegeben. Die Proben wurden zunächst 45 Sekunden und nach Zugabe von 15 ml Isobutanol (Reagens Nr. 8) 90 Sekunden geschüttelt. Die wäßrige Phase wurde verworfen und die alkoholische in ein Reagensglas gebracht. Zur Entwässerung sowie zur Klärung der alkoholischen Phase wurden ca. 1—2 g trockene Na_2SO_4 , sowie ca. 1 ml abs. Aethanol zugegeben. Die dekantierte Isobutanol-Lösung wurde in einen 15 ml Meßzylinder gebracht, einige mal mit Isobutanol nachgespült und schließlich mit Isobutanol zu 15 ml aufgefüllt. In der alkoholischen Lösung bestimmte man die Fluoreszenzintensität mit einem photoelektrischen Fluorimeter.

Der gleiche Arbeitsvorgang wurde auch für die Standardlösung zu Eichzwecken angewandt. Zu diesem Zweck wurden 10 ml des Reagens Nr. 15 (1 ml = 0,2 mcg Thiamin) in die Säule gebracht. Das adsorbierte Thiamin wurde mit heißer,

saurer 25%iger KCl-Lösung (20 ml) eluiert. Die Endkonzentration des Eluates betrug 0,1 mcg/1 ml. Die Eichkurve des Thiamingehaltes im Bereich von 0,1 bis 1,0 mcg ist eine lineare Funktion (Abbildung 1).



ad 7. Die Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden nach 10 Minuten dauernder Erwärmung des Apparates durchgeführt. Nach dem Einsetzen der Küvette wurde der Ausschlag des Lichtfleckens auf der Skala des Galvanometers beobachtet. Mit dem Widerstand wurde der Lichtfleck bis zur Startstelle des Galvanometers gebracht. Nach den Messungen wurde der Widerstand wieder auf Null eingestellt. Die erste Messung wurde mit der Thiochromlösung, die zweite mit der Blindprobe durchgeführt. Die Messungen wurden in einstündigen Abständen vorgenommen. An einem Arbeitstag wurden maximum 6—7 Messungen durchgeführt und das mit Rücksicht auf die Ermüdung der Photozellen.

Berechnung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A \cdot (B - C) \cdot y \cdot w \cdot 100}{(D - E) \cdot v \cdot z \cdot g} = \text{mcg Thiamin} / 100 \text{ g Versuchsmaterial}$$

wobei

- A = mcg der Arbeitslösung des Thiaminstandards.
B = Fluoreszenzablesung der Thiochromlösung im Versuchsmaterial.
C = Fluoreszenzablesung der Blindprobe im Versuchsmaterial.
D = Fluoreszenzablesung der Thiochromlösung des Thiaminstandards.
E = Fluoreszenzablesung der Blindprobe des Thiaminstandards.
v = ml der zur Oxydation verbrauchten Eluate.
y = Volumen (in ml) der Eluate.
z = Volumen (in ml) der durchgelaufenen Hydrolysate.
w = Volumen (in ml) der erhaltenen Hydrolysate.
g = Einwaage des Versuchsmaterials (in Gramm).

Für die Thiaminstandardlösung (0,4 mcg) wurde die Fluoreszenzablesung = 30 (nach Berücksichtigung der Blindprobe) angenommen. Mit Rücksicht auf die während der Versuche angewandten verschiedenen Verdünnungen ist eine Erklärung der Berechnungen nötig. Sie wurden wie folgt durchgeführt:

Fischkonserven in Öl

$$\frac{0,4 \cdot (B-C) \cdot 200}{30 \cdot g}$$

Fischkonserven in Tomatensauce

$$\frac{0,4 \cdot (B-C) \cdot 1000}{30 \cdot g}$$

B. Mikrobiologische Methode

Die quantitativen Bestimmungen wurden nach der Methode von *Sarett und Cheldelin*, von *Braekkan* modifiziert, durchgeführt (14, 20). Als Testmikroorganismus wurde eine Bakterienkultur *Lactobacillus fermenti* 36 (American Type Culture Collection Nr. 9338) angewendet. Die Bakterienkultur *Lactobacillus fermenti* wurde auf einem Nährboden mit folgender Zusammensetzung (auf 100 ml Unterlage) aufbewahrt.

- 0,5 g Glukose
1,0 g Pepton «tryptone»
1,5 g Agar-Agar
1,0 g Hefeauszug «Difco»
10 ml Leberextrakt
10 mcg Thiamin

Als Nährboden wurde das Bacto-Thiamin Assay Medium mit nachfolgender Zusammensetzung angewendet:

Photolysiertes Pepton	22,0 g
Saures Kaseinhydrolysat	5,0 g
Bacto-Dextrose	40,0 g
Natriumacetat	15,0 g
L-Cystin	0,2 g
Adeninsulfat	0,02 g
Guaninhydrochlorid	0,02 g
Uracil	0,02 g
Riboflavin	0,0002 g
Calciumpantothenat	0,0002 g
Vitamin PP	0,0002 g
Pyridoxinhydrochlorid	0,0002 g
p-Aminobenzoessäure	0,0002 g
Folsäure	0,0000005 g
Biotin	0,0000008 g
Dikaliumphosphat	1,0 g
Kaliumphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,4 g
Natriumchlorid	0,02 g
Eisensulfat	0,02 g
Magnesiumsulfid	0,02 g

Die Säure — wie auch die enzymatische Hydrolyse — wurde ähnlich der bei der chemischen Methode beschriebenen durchgeführt. Als optimale Hydrolyse wurde die Säurehydrolyse in einem Verhältnis von 25 ml 0,1 NH_2SO_4 auf 1 g Versuchsmaterial angenommen. Sie wurde in einem Autoklaven bei der Temperatur von 120 ° C innerhalb von 15 Minuten durchgeführt.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurden auf je 1 g Versuchsmaterial 20 mg Pepsin und 20 mg Diastase zugegeben. Die Inkubation wurde innerhalb von 18 Stunden bei der Temperatur von 37 ° C durchgeführt. Um die Enzyme zu inaktivieren, wurde das Hydrolysat auf dem Wasserbad (100 ° C) 10 Minuten erhitzt. Dann wurde das Hydrolysat gekühlt und durch ein Filter aus Whatman Papier filtriert. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurde das Filtrat in einen Meßkolben gebracht und auf 100 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration des Thiamins im Hydrolysat, nach Einstellung des pH auf 6,5 mittels Bromthymolblau-Indikator, betrug 0,005—0,0025 mcg/ml. Während der Versuche zeigte sich eine Anwendung von stärkerer Schwefelsäure zur Säurehydrolyse, z. B. 1 N an Stelle von 0,1 N, als nicht angebracht. Eine Bräunung des Hydrolysates, die bei Anwendung von 0,1 NH_2SO_4 nicht auftrat und erhöhte Ablesungen bei den späteren Messungen verursachte, wurde bemerkt.

a) Verlauf der Bestimmungen

Die Thiamin-Standardlösung wurde vorbereitet, indem man 50 mg Thiamin-chlorid p. A. in 500 ml 0,01 NHCl auflöste. Die erhaltene Lösung enthielt 100 mcg Thiamin pro ml. 5 ml dieser Lösung auf 1000 ml und weitere 2 ml der letzten Verdünnung auf 200 ml, ergaben den sogenannten Standard A mit einer Konzentration von 0,005 mcg/ml.

Ein Teil der Standard A-Lösung wurde zu gleichen Teilen mit Wasser verdünnt und die Standard B-Lösung mit einer Konzentration von 0,0025 mcg/ml erhalten. Eine ähnliche Endkonzentration wiesen alle Extraktlösungen der untersuchten Proben auf.

Standard A:	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025
Standard B:	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,0125

Auf ähnliche Weise wurden alle Extraktlösungen der untersuchten, durch Säure- bzw. enzymatische Hydrolyse erhaltenen Proben vorbereitet. Die Hydrolysate wurden verdünnt und die der Standardlösung annähernd gleiche Verdünnung in Reagensgläser gebracht. Von den Standardlösungen wie auch Versuchslösungen wurden 1; 2; 2,5; 3; 4 und 5 ml mit destilliertem Wasser auf 5 ml aufgefüllt, 5 ml Nährboden zugegeben und 15 Minuten bei 100 ° C sterilisiert.

Verdünnungstabelle

Standard	Standard Nährboden Wasser	ml	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
		ml	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
		ml	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
Probe	Probe Nährboden Wasser	ml	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
		ml	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
		ml	4,0	3,0	2,5	2,0	1,0	0,0

Nach der Sterilisation wurde mit *Lactobacillus fermenti* 36, welcher zuvor auf einem Wachsnährboden angereichert war (16stündige Inkubation bei 37 ° C) geimpft. Die Anwendung des *Lactobacillus fermenti* 36 ist durch das genetisch geprüfte Fehlen einer Eigenthiaminsynthese begründet und dieser Umstand macht ihn für die Thiaminbestimmung besonders brauchbar. Diese Eigenschaft wird als genetischer Defekt mit ionisierter Strahlung, chemischen Mitteln, sowie spezifischen Nährböden erzielt. Der Stabilität der biochemischen und morphologischen Eigenschaften wegen, ist er zur Thiaminbestimmung vielseitig angewandt worden. Die Lebensprozesse dieses Stammes sind mit physikalischen (nephelometrische Messungen) und chemischen (Säureanstieg) Methoden genau zu bestimmen.

Jede Probe wurde mit einem Tropfen einer verdünnten Aufschwemmung, die zweifach zentrifugiert und mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt war, geimpft. Die so geimpften Reagensgläser unterwarf man einer Inkubation von 18 Stunden bei 37 ° C.

Die Trübung wurde auf einem Spektrophotometer bei 650 m μ Wellenlänge gemessen und der Thiamingehalt aus den Eichkurven abgelesen.

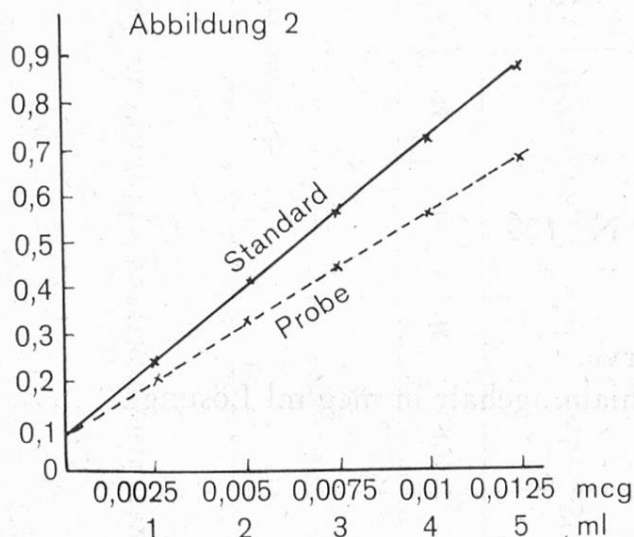
b) Ergebnisberechnung und Anfertigung der Eichkurve.

Nachdem das Wachstum des *Lactobacillus fermenti* beendet war, wurde die Trübung gemessen und auf Grund dieser Messungen eine Standard-Eichkurve angefertigt. Die Messungen wurden mit einem Coleman-Universal-Spektrophotometer bei 650 m μ durchgeführt.

Auf der Abszissenachse der Eichkurve wurde der Thiamingehalt und auf der Ordinatenachse die Trübung festgelegt. Der Thiamingehalt der Versuchsproben wurde durch den Vergleich der erhaltenen Meßwerte mit der Eichkurve errechnet. (Abbildungen 2—6.)

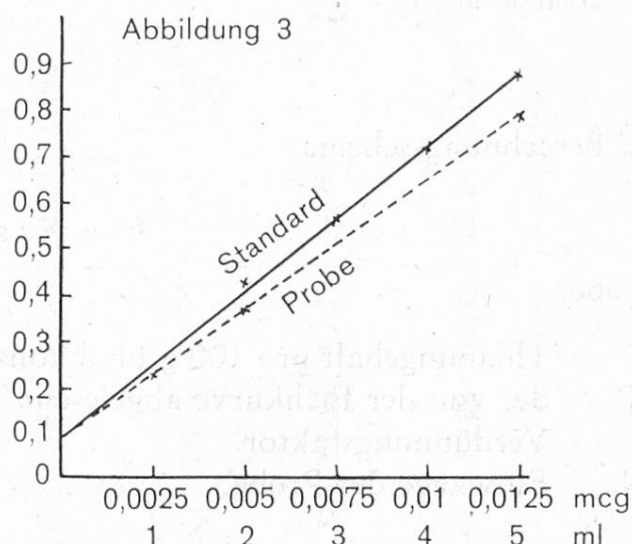
Spektrophotogramme des Thiaminstandards und Proben

Abbildung 2



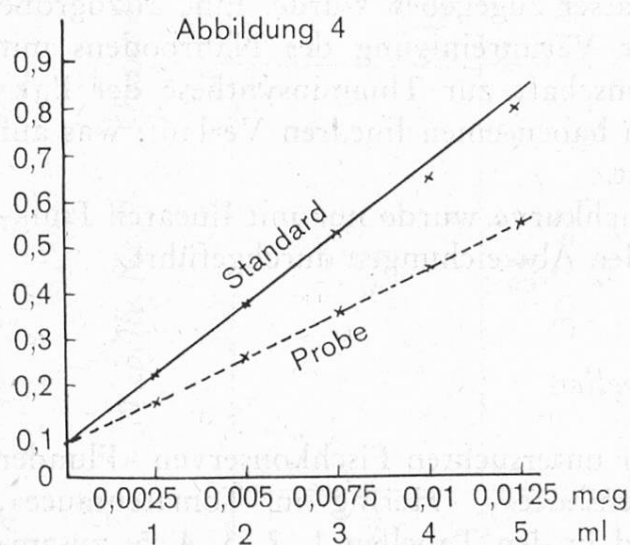
«Dorsche in Tomatensauce»

Abbildung 3



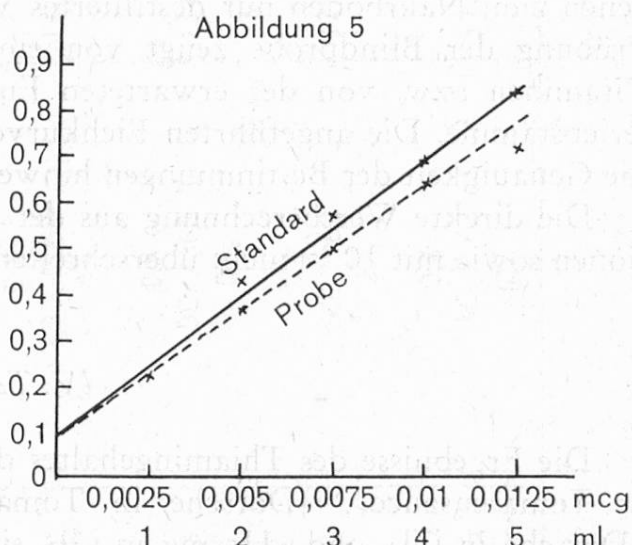
«Hering in Tomatensauce»

Abbildung 4



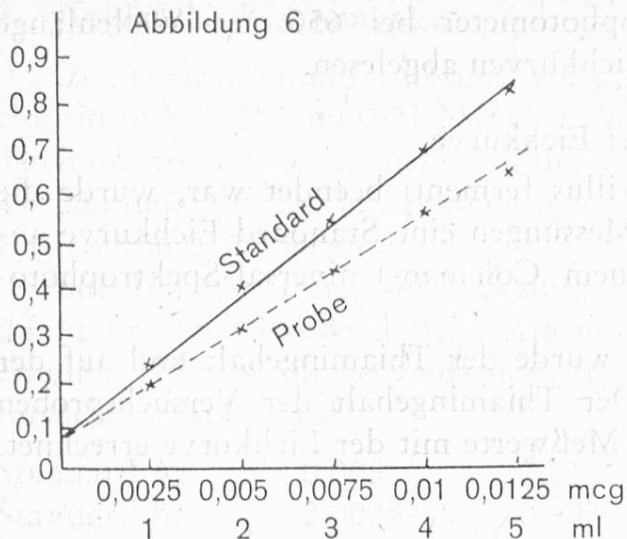
«Flunder in Tomatensauce»

Abbildung 5



«Hering in Öl»

Abbildung 6



«Dorsche in Öl»

Nachdem die Verdünnung sowie Einwaage der zur Untersuchung gelangten Probe berücksichtigt war, wurde der Thiamingehalt in mcg auf 100 g Untersuchungsmaterial berechnet.

c) Berechnungsschema

$$Y = X \cdot a \cdot N \cdot 100$$

wobei

Y = Thiamingehalt pro 100 g Fischkonserve.

X = der von der Eichkurve abgelesene Thiamingehalt in mcg/ml Lösung.

a = Verdünnungsfaktor.

N = Einwaage der Probe.

Die Genauigkeit der Bestimmung mit dieser Methode ist in großem Maße von dem Verlauf der Eichkurve abhängig. Ihr Anfang entspricht den Blindproben, in denen zum Nährboden nur destilliertes Wasser zugegeben wurde. Eine allzugroße Trübung der Blindprobe zeugt von einer Verunreinigung des Nährbodens mit Vitaminen bzw. von der erwarteten Eigenschaft zur Thiaminsynthese der Bakterienstämme. Die angeführten Eichkurven haben einen linearen Verlauf, was auf die Genauigkeit der Bestimmungen hinweist.

Die direkte Wertberechnung aus der Eichkurve wurde nur mit linearen Funktionen sowie mit 10 % nicht überschreitenden Abweichungen durchgeführt.

IV. Tabellen

Die Ergebnisse des Thiamingehaltes der untersuchten Fischkonserven «Flunder in Tomatensauce», «Dorsche in Tomatensauce», «Hering in Tomatensauce», «Dorsche in Öl» und «Hering in Öl» sind in den Tabellen 1, 2, 3, 4, 5, zusammengestellt.

Tabelle Nr. 1 Thiamingehalt der Fischkonserve «Flunder in Tomatensauce» in mcg/100 g

Vers.- Nr.	Kcd	Bestimmungen											
		1		2		3		4		5		$\bar{x}$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.
1	0,8 30. 7. 62 07	12,88	13,92	12,98	13,70	12,66	13,21	11,85	13,05	13,29	12,07	12,73	13,35
2	0,8 30. 7. 62 07	14,23	15,92	15,52	15,83	14,29	15,96	14,45	15,64	15,31	16,08	14,76	15,88
3	0,8 30. 7. 62 07	15,96	16,21	16,35	16,34	15,13	15,92	13,93	15,83	14,13	15,98	15,10	16,05
4	0,8 30. 7. 62 07	12,10	13,70	11,36	13,21	12,28	13,05	13,18	12,87	12,88	13,36	12,36	13,23
5	0,8 30. 7. 62 07	11,89	12,63	12,98	12,82	12,24	11,60	13,86	12,36	13,14	12,93	12,82	12,46

Tabelle Nr. 2 Thiamingehalt der Fischkonserve «Dorsche in Tomatensauce» in mcg/100 g

Vers.- Nr.	Kod	Bestimmungen											
		1		2		3		4		5		$\bar{x}$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.
1	IV 20.05.62 15	10,56	11,10	10,86	11,72	10,74	11,56	12,25	10,96	12,20	11,58	11,32	11,38
2	IV 20.05.62 15	11,89	10,92	9,28	11,62	9,91	11,70	9,54	11,09	9,87	9,73	10,10	11,01
3	IV 20.05.62 15	11,34	11,03	10,40	8,91	9,64	9,27	9,84	9,38	9,61	9,61	10,16	9,64
4	IV 20.05.62 15	9,52	8,88	9,28	9,62	10,47	9,71	9,94	11,76	10,14	11,16	9,87	10,23
5	IV 20.05.62 15	11,45	11,00	11,40	10,96	10,79	10,52	11,53	10,74	11,61	10,36	11,35	10,71

Tabelle Nr. 3 Thiamingehalt der Fischkonserve «Hering in Tomatensauce» in mcg/100 g

Vers.- Nr.	Kod	Bestimmungen											
		1		2		3		4		5		$\bar{x}$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.
1	3 25. 7. 62 10	11,22	10,12	9,82	9,89	10,27	10,05	10,04	9,80	11,28	9,86	10,65	9,94
2	3 25. 7. 62 10	11,72	8,26	9,77	8,09	10,13	8,23	9,32	8,15	10,59	8,12	10,30	8,17
3	3 25. 7. 62 10	10,48	9,46	9,62	9,56	11,29	9,47	12,66	9,59	10,31	10,10	10,87	9,63
4	S6 9. 7. 62 10	11,06	9,92	11,91	9,83	12,34	9,88	10,53	9,72	11,77	9,56	11,52	9,78
5	S6 9. 7. 62 10	9,51	10,39	10,43	11,44	10,11	9,86	10,85	10,11	11,50	10,09	10,48	10,17

Tabelle Nr. 4 Thiamingehalt der Fischkonserve «Dorsche in Öl» in mcg/100 g

Vers.- Nr.	Kod	Bestimmungen											
		1		2		3		4		5		$\bar{x}$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.
1	S6 3. 11. 62 35	7,28	9,63	9,35	8,87	8,26	10,16	7,87	10,36	7,49	11,15	8,05	10,03
2	S6 3. 11. 62 35	7,23	10,36	8,40	10,05	7,60	9,31	6,22	9,83	8,33	9,64	7,56	9,84
3	S6 3. 11. 62 35	6,56	10,02	6,07	9,33	9,73	9,81	8,36	8,96	8,24	8,33	7,79	9,29
4	S6 3. 11. 62 35	6,70	10,26	8,02	10,65	9,73	11,02	9,10	9,87	8,85	9,62	8,48	10,28
5	S6 3. 11. 62 35	8,49	9,10	9,02	9,46	6,82	10,42	6,94	10,14	7,99	9,40	7,85	9,70

Tabelle Nr. 5 Thiamingehalt der Fischkonserve «Hering in Öl» in mcg/100 g

Vers.- Nr.	Kod	Bestimmungen											
		1		2		3		4		5		$\bar{x}$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.
1	SIV 2. 8. 62 34	3,42	3,92	4,32	3,69	3,38	3,93	4,48	3,87	3,79	3,99	3,88	3,88
2	SIV 2. 8. 62 34	2,21	5,17	2,79	5,21	3,03	5,30	3,39	5,83	3,17	5,26	2,92	5,23
3	SIV 2. 8. 62 34	3,13	4,10	2,97	4,16	2,80	4,22	3,01	4,07	3,44	4,12	3,07	4,15
4	SIV 14. 8. 62 34	5,84	5,12	5,88	5,36	5,70	5,18	4,79	5,03	4,47	5,12	5,34	5,17
5	SIV 14. 8. 62 34	3,23	5,83	4,08	5,92	3,67	5,69	3,83	5,78	4,26	5,80	3,81	5,80

Eine zusammenfassende Aufstellung der Ergebnisse der durchgeführten Bestimmungen, mittels der chemischen und mikrobiologischen Methoden, wie auch die Anzahl der Proben und Bestimmungen, zeigt die Tabelle 6.

Die mittels chemischer und mikrobiologischer Methode festgestellten und in den Tabellen zusammengefaßten Thiaminwerte sind Mittelwerte von mindestens zwei Bestimmungen.

Tabelle Nr. 6
Mittelwerte des Thiamingehaltes in den untersuchten Konserven in mcg/100 g

Vers. Nr.	Konservenart	Zahl der untersuchten Konserven		Zahl der untersuchten Proben		Mittelwert des Thiamin- gehaltes		$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	
		Ch.	M.	Ch.	M.	Ch.	M.	Ch. %	M. %
1	Flunder in Tomatensauce	5	5	25	25	13,55	14,19	5,5	12
2	Dorsche in Tomatensauce	5	5	25	25	10,55	10,59	7,5	9,5
3	Hering in Tomatensauce	5	5	25	25	10,76	9,54	7,8	10,7
4	Dorsche in Öl	5	5	25	25	7,94	9,83	13,3	12,7
5	Hering in Öl	5	5	25	25	3,80	4,86	11,8	8,7

V. Diskussion der Methoden und Ergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen erlaubten eine vergleichende Thiaminbestimmung in Fischkonserven mit Hilfe der Thiochrom- und mikrobiologischen Methode.

Die größte Schwierigkeit bestand in der Wahl und Ausarbeitung der richtigen Extraktionsmethode des Thiamins aus den Fischkonserven. Mit Rücksicht darauf, daß das Thiamin in einer Esterverbindung auftritt, mußte eine Hydrolyse gewählt werden, die das gesamte Thiamin aus den organischen Verbindungen freisetzt.

Bei der Auswahl der Hydrolysenmethode wurden die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Thiamins in Betracht gezogen. In Hinsicht auf die Beständigkeit des Thiamins in saurem Milieu wie auch seine Temperaturstabilität in diesem (Autoklav 120 ° C), wurde für beide Methoden eine gleiche Extraktion angewandt.

In der chemischen Thiochrommethode wurde auf je 1 g der Probe 20 ml 0,1 N H₂SO₄, in der mikrobiologischen — 25 ml, verbraucht.

Für die enzymatische Hydrolyse wurde bei beiden Methoden die Zusammensetzung der Enzyme (Pepsin und Diastase) in folgenden Mengen angewandt: 20 mg von jedem Enzym für 1 g Versuchsmaterial.

Ein wichtiges Problem der chemischen Methode ist die Ausführung der Blindproben. Bei der Ausarbeitung der Thiochrommethode wurden die von *Janicki*, *Kamiński* und *Bartold* vorgeschlagenen Vorschriften für die Herstellung von Blindproben mit Hilfe von 25%iger KCl, 15%iger NaOH, 20%iger NaOH mit Zugabe von 3 Tropfen Benzosulfochlorid-Lösung berücksichtigt. Außerdem hat man das Löschen der Fluoreszenz in der eigentlichen Meßprobe mit ca. 19%iger HCl nach Ablesung der Test-Fluoreszenz in Rechnung gezogen (21).

Bei der Anwendung von Thiamin-Standardlösungen sind die Bemerkungen von *Janicki* und Mitarbeiter bestätigt worden, jedoch bei den Eluaten von Fischkonserven «Dorsche in Tomatensauce» und «Flunder in Tomatensauce» konnten bedeutende Unterschiede der erlangten Blindprobenergebnisse nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzmeßwerte der verschiedenen Blindproben sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Reagens	Thiamin- Standard- Lösung = 0,4 meg	Eluate der Fischkonserven		
		Dorsche in Tomatensauce		Flunder in Tomatensauce
		I	II	III
Oxydation des Thiamins zum Thiochrom	33	43	33	47
Blindproben 15%ige NaOH	3	27,5	20	28
25%ige KCl	2	61,5	53	69
20%ige NaOH + 3 Tropfen Benzosulfochlorid-Lösung	3	27,5	21,5	31,5
Löschen der Fluoreszenz mit 19%iger HCl	3	61	40	68

Aus der Zusammenstellung der Ergebnisse ist zu ersehen, daß der Fluoreszenzwert der Blindproben mit 15%iger NaOH und 20%iger NaOH mit Zugabe von 3 Tropfen Benzosulfochlorid-Lösung, in den Fehlergrenzen reproduzierbar ist.

Der Fluoreszenzwert der Blindproben in Eluaten von Fischkonserven in Tomatensauce hält sich in den Grenzen von 11—39, durchschnittlich 20; in Fischkonserven in Öl 17—49, durchschnittlich 32,5.

Bei der mikrobiologischen Methode unterscheidet sich nur die enzymatische Extraktionsweise von der von *Braekkan* und *Mathiesen* vorgeschlagenen (20, 22). Sie findet jedoch eine Bestätigung in den Arbeiten von *Barton-Wright*, welcher die Anwendung von Pepsin im Versuchsmaterial tierischer Herkunft für zweckmäßig hält (16).

Bei der Diskussion der durchgeführten Bestimmungen muß das Übereinstimmen der erlangten Ergebnisse unter Anwendung beider Methoden betont werden.

Die Thiaminbestimmungen wurden in 5 Fischkonservensorten sowohl in Tomatensauce wie auch in Ölfüllung durchgeführt. Es wurden je 5 Fischkonserven von jeder Sorte, von denen man je 5 Proben zur chemischen und mikrobiologischen Bestimmung entnommen hatte, untersucht. Der Mittelwert des Thiamingehaltes wurde auf Grund des Mittelwertes von 5 Bestimmungen mit jeder Methode errechnet.

Die gesamte Aufstellung der Ergebnisse der durchgeführten Bestimmungen mittels der chemischen und mikrobiologischen Methoden zeigt die Tabelle 6. Dies erlaubt zu einer Vergleichung der mittels zweier Methoden bestimmten Thiamingehalte. Die mit der chemischen Methode bestimmten Thiaminwerte in Fischkonserven in Tomatensauce weisen im Vergleich zur mikrobiologischen Methode eine Abweichung von 0,3 bis 12 % auf. In den Fischkonserven in Öl sind die Abweichungen etwas größer und betragen etwa 20 %, zu Gunsten der mikrobiologischen Methode.

Auf Grund aller in dieser Tabelle zusammengefaßten Bestimmungswerte kann eine Vergleichung beider Methoden durchgeführt werden. Die statistische Analyse der Werte zeigte, daß der Mittelwert des Variabilitätsfaktors für Fischkonserven in Tomatensauce für die chemische Methode 5,5—7,8 % und für die mikrobiologische 9,5—12 % beträgt. Bei den Fischkonserven in Öl entsprechend 11,8—13,3 % für die chemische Methode und 8,7—12,7 % für die mikrobiologische (Tabelle 6).

Wenn man den Thiamin-Tagesverbrauch für den Menschen mit 2 mg festlegt, können die Fischkonserven als Ergänzung der Thiaminquellen angesehen werden. Die Mittelwerte der Gesamt-Thiamingehalte stellen sich in den Grenzen von ca. 4 mcg% für «Hering in Öl» bis zu 14 mcg% für «Flunder in Tomatensauce». Der Thiamingehalt des ganzen 300 g netto wiegenden Konserveninhaltes schwankt von 12—42 mcg.

Der Grund dieser großen Abweichung für den Thiamingehalt der einzelnen Konserven ist in den individuellen Unterschieden der Fische innerhalb einer Fischart, sowie in dem Frischegrad und der Technologie der Konserven zu suchen.

Zusammenfassung

1. Die chemische und mikrobiologische Methode wurde für die Thiaminbestimmung in Fischkonserven adaptiert.
2. Die statistische Bewertung beider Methoden ergab keinen bedeutenden Unterschied der aufgefundenen Thiaminwerte.
3. Die Gleichwertigkeit beider Methoden in der praktischen, quantitativen Thiaminbestimmung in Fischkonserven wurde bewiesen.
4. Der Thiamingehalt wurde in ausgewählten, populären, polnischen Fischkonserven bestimmt.

Résumé

1. Le dosage chimique et le dosage microbiologique de la thiamine ont été adaptés pour doser cette vitamine dans les conserves de poisson. Ces deux méthodes de dosages donnent des résultats équivalents.
2. La thiamine a été dosée dans des conserves de poissons polonaises.

Summary

Adaptation of the chemical and microbiological methods for the quantitative determination of thiamine in fish preserves. These two methods have been found to give similar values.

Literatur

1. *Adrian J.*: Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 11, 1, 1957.
2. *Harris L., Wang Y.*: Bioch. J., 35, 1058, 1941.
3. *Fitzgerald E., Hughes E.*: Analyst, 74, 340, 1949.
4. *Haukin L., Squires S.*: Appl. Microbiolog., 8, 4, 209, 1960.
5. *Haenel H., Cienciała M.*: Nahrung, 7/8, 688, 1962.
6. *Bukin W. N., Powołockaja K. L., Kondraszowa A. A., Skorobogarowa E. P.*: Witaminnyje resursy i ich ispolzowanie, Izdatielstwo Akademii Nauk ZSSR, Moskwa, 91, 1955.
7. *Connor J.*: Methods of Vitamins Determination, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1948.
8. *Gaßmann B.*: Nahrung, 4, 143, 1960.
9. Methods of Vitamin Assay, Interscience Publ., Inc., New York, 1951.
10. *Johannson H., Rich C.*: Cereal Chemistry, 18, 473, 1941.
11. *Melnick D., Field H.*: J. Biol. Chem., 127, 505, 1939.
12. *Harris L., Wang Y.*: Bioch. J., 35, 1068, 1941.
13. *Conner R., Straub G.*: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 380, 1941.
14. *Sarett H., Cheldelin V.*: J. Biol. Chem., 155, 153, 1944.
15. *Sakurai V., Inagaki T.*: J. Agric. Chem. Soc. Japan, 16, 751, 1940.
16. *Barton-Wright E.*: The Microbiological Assay of the Vitamin B-Complex and Amino Acids, Pitman, London, 1952.
17. *Roth H.*: Internat. Zeitschr. Vitaminforsch., 19, 309, 1948.
18. *Strohecker R., Wolff G., Lorcher W.*: Z. für Lebensmittelunters. und Forschung, 113, 4, 1960.
19. Methods of Biochemical Analysis, New York, Ed. D. Glick, 6, 1958.
20. *Braekkan R. O.*: Arbeidsfarskrifter for Mikrobiologiske Bestammelser ov B-Vitaminer, Bergen, 1959.
21. *Janicki J., Kamiński E., Bartold Z.*: Nahrung, 4, 423, 1962.
22. *Mathiesen E., Braekkan R. O.*: Særtrykk Av Tideskrift For Hermetikkindustri, 11, 405, 1958.