

Übersicht über die gebräuchlichen Vitaminbestimmungsmethoden¹

Von O. WISS

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Schweizerisches Vitamininstitut, Basel

Die Entwicklung der Vitaminlehre beginnt mit der Erforschung der Ausfallserscheinungen und deren Behebung; über die Natur der Substanzen, auf deren Fehlen die Mangelercheinungen zurückzuführen sind, ist anfänglich wenig bekannt. Im Zusammenhang mit den Fortschritten der organischen Chemie, vor allem durch den Ausbau der Isolierungsmethoden, erfolgen dann aber bald Strukturaufklärung und Synthese der einzelnen Vitamine. In neuerer Zeit hat die Vitaminforschung großen Auftrieb erfahren durch die Erforschung des Stoffwechsels der Mikroorganismen; eine ganze Reihe neuer, auch für das Tier wirksamer Vitamine ist so aufgefunden worden.

Auch die Vitaminbestimmungsmethoden sind von dieser Entwicklung abhängig. Anfänglich ist man fast ausschließlich auf die langwierige biologische Auswertung am Tier angewiesen. Die chemische Erforschung der Vitamine ermöglicht später die Ausarbeitung einer großen Anzahl von chemischen Bestimmungsmethoden. Schließlich hat sich auch durch die mikrobiologische Arbeitsrichtung eine vollständig neue Vitaminbestimmungsmethodik entwickeln lassen.

In den folgenden Ausführungen soll ein kurzer Überblick über die heute gebräuchlichen Vitaminbestimmungsmethoden gegeben werden. Es ist wohl verständlich, daß es sich bei der großen Anzahl von Möglichkeiten nur um eine Auswahl handeln kann, die sich auf diejenigen Methoden beschränken soll, welche sich im Laufe der Jahre an unserem Institut bei der Kontrolle von Lebensmitteln, Heilmitteln und Futtermitteln als besonders geeignet erwiesen haben.

I. Biologische Methoden

Einleitend wurde festgestellt, daß die Entwicklung der Vitaminbestimmungsmethoden in engem Zusammenhang steht mit der Vitaminforschung im allgemeinen. Dies gilt in besonderem Maße für die biologischen Vitaminbestimmungen im Tierversuch. LUNIN, ein Mitarbeiter BUNGES am physiologisch-chemischen Institut in Basel, hat im Jahre 1881 in Ernährungsversuchen festgestellt, daß Mäuse, welchen Kohlehydrat, Fett, Eiweiß, Salze und Milch verabreicht wurde, lange Zeit überlebten, während solche, denen anstelle der Milch deren Asche verfüttert wurde, in relativ kurzer Zeit zugrunde

gingen. Er hat daraus geschlossen, daß neben den bisher bekannten Nahrungsbestandteilen: Kohlehydrat, Fett, Eiweiß und Salze, noch andere Stoffe vorhanden sein müssen, welche für die Ernährung unentbehrlich sind. Er schreibt ausdrücklich: «Diesen Stoffen nachzuspüren und ihre Bedeutung für die Ernährung zu erforschen, wäre eine Untersuchung von hohem Interesse.» Merkwürdigerweise wurden die Versuche von LUNIN nicht fortgesetzt und sind deshalb frühzeitig in Vergessenheit geraten. Die Erforschung der Vitamine ist später zuerst von ganz anderen Voraussetzungen aus weitergeführt worden. Ohne auf die einzelnen Entwicklungsstufen weiter einzugehen, sei nur erwähnt, daß vor allem die Erforschung der Beriberi, zuerst am Mensch, später an der Taube, zu ähnlichen Ansichten geführt hat, wie sie schon viel früher von LUNIN ausgesprochen worden sind. Erst im Jahre 1906 hat HOPKINS die LUNINSchen Versuche wieder aufgenommen; er hat sich später vor allem auch um die quantitativen Verhältnisse gekümmert und festgestellt, daß diese Stoffe, die in sehr kleiner Menge wirksam sind, auf katalytischem Wege das Wachstum stimulieren müssen. Er hat deshalb wohl als erster die Wirkungsweise dieser Substanzen eindeutig umschrieben.

Lange bevor die Natur der Stoffe bekannt war, bestand das Bedürfnis der quantitativen Bestimmung. Vor der Besprechung der einzelnen Methoden sollen kurz einige wichtige allgemeine Voraussetzungen erwähnt werden. Voraussetzung für eine biologische Bestimmung sind geeignete Laboratoriumstiere, bei denen sich leicht Mangelercheinungen hervorrufen lassen. Für diesen Zweck hat sich mit wenigen Ausnahmen die weiße Ratte als geeignet erwiesen. Eine weitere Voraussetzung ist das Vorhandensein eines sogenannten Grundfutters, das alle für das Leben notwendigen Stoffe, mit Ausnahme des zu bestimmenden Vitamins, in möglichst natürlicher und optimaler Form enthält, so daß die Behebung der Mangelercheinungen vollständig dem zu bestimmenden Vitamin zugeschrieben werden kann. Die Bestimmung kann in Form des prophylaktischen oder des kurativen Testes erfolgen, wobei

¹ Nach einem Vortrag, gehalten vor der Berner Chemischen und Naturforschenden Gesellschaft am 8. Dezember 1949 in Bern.

im prophylaktischen Test einer Anzahl von Tieren von vorneherein abgestufte, bekannte Mengen des zu untersuchenden Vitamins in Form von Standardsubstanz, die gegenwärtig vom «National Institute of Medical Research» in London bezogen werden kann, und der zu testenden Substanz verabreicht werden und wobei festgestellt wird, in welchem Grade die verschiedenen Dosen das Eintreten von Mangelercheinungen verhindern können. Bei der kurativen Methode wird bei allen Tieren ein Mangel erzeugt und dann durch Zugabe von Standarddosen und der zu bestimmenden Substanz der Heilungseffekt beurteilt.

Günstig liegen die Verhältnisse für die Vitamin-A-Bestimmung. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Grundfutters.

Tab. 1

Grundfutter-Vitamin-A-Versuch:	
Casein (Wander, vitaminfrei, extrahiert)	18 %
Stärke (Manioka, Reis- oder Maisstärke)	54 %
Kokosfett	13 %
Salzgemisch Mc. Collum	5 %
Trockenhefe	10 %
Vigantol pro 300 g Fett	0,1 cm ³
Cholinhydrochlorid einmal wöchentlich .	20 mg

Wird jungen Ratten im Alter von etwa dreißig Tagen ausschließlich dieses Futter verabreicht, so stellen sich nach einigen Wochen Ausfallssymptome ein, die sich in erster Linie in einer Beeinträchtigung

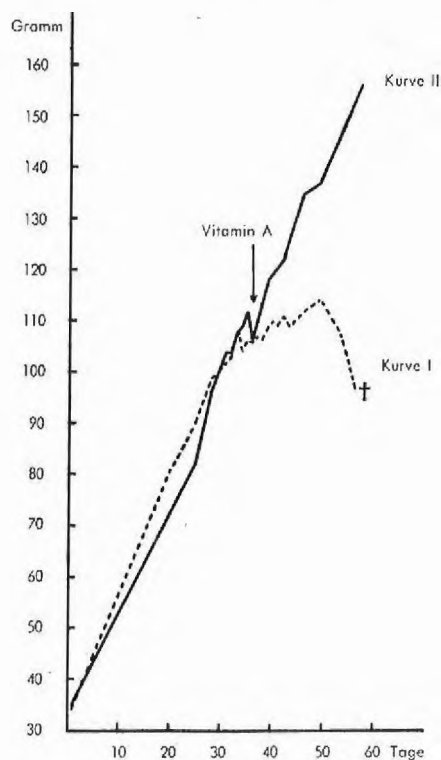


Abb. 1

des Wachstums äußern. Wesentlich ist die Tatsache, daß Mangelercheinungen erst nach etwa vier Wochen auftreten, was darauf zurückzuführen ist, daß Vitamin A in der Leber gespeichert werden kann.

In Abb. 1 sind Wachstumskurven zweier Mangel-tiere zu sehen. Aus der Kurve I ist ersichtlich, daß bei fortgesetzter Mangelnahrung das Tier sehr bald zugrunde geht, während, wie die II. Kurve zeigt, nach Zugabe einer angemessenen Vitamin-A-Menge (3,5 Einheiten pro Tag und Tier) das Wachstum sich wieder vollständig normalisiert. Bei der Durchführung der Vitamin-A-Bestimmung ist die Tatsache zu berücksichtigen, daß Vitamin-A-Mangel nach erfolgtem Wachstumsstillstand eine akute Schädigung verursacht. Es muß deshalb sofort mit der Zufütterung begonnen werden, da sonst die Tiere so geschädigt sind, daß auch nach Zufütterung von Vitamin A keine Normalisierung des Wachstums zustandekommt. Eine weitere Erschwerung des Versuches ist dem Umstand zuzuschreiben, daß Tiere in der Mangelperiode sehr leicht Erkrankungen der Respirationsorgane anheimfallen. Die Wartung der Tiere bedarf deshalb ganz besonderer Sorgfalt. Sie müssen vor allem vor Unterkühlung geschützt werden, das heißt, die Raumtemperatur darf 24°C nie unterschreiten. Im allgemeinen wird zur Auswertung die kurative Methode angewendet, wobei Standarddosen im Bereich von 1,5–3,5 Einheiten einen gut abgestuften Wachstumseffekt ergeben.

Neben der Beeinträchtigung des Wachstums kann die sogenannte Kolpokeratose, ein Symptom, das ebenfalls bei Vitamin-A-Mangel auftritt, zur Auswertung herangezogen werden. Bei der weiblichen geschlechtsreifen Ratte wird von den zyklischen Veränderungen auch die Scheidenschleimhaut betroffen und zwar so, daß im Ruhezustand im Scheidenabstrich im wesentlichen Leukozyten und wenig Zellen sich nachweisen lassen. Im Stadium des Oestrus findet eine Keratinisierung der Scheidenschleimhaut statt, so daß im Ausstrich sogenannte verhornte Epithelschollen zu sehen sind. Diese zyklischen Veränderungen folgen sich in kurzen Zeitabständen. Der gesamte Zyklus benötigt einen Zeitraum von ungefähr fünf Tagen. Vitamin-A-Mangel äußert sich neben der Beeinflussung des Wachstums ganz allgemein in einer gestörten Epithelentwicklung. Das führt zur sogenannten Xerophthalmie, d. h. zu einer Schädigung des Hornhautepithels. Das hat bei der Ratte jedoch auch eine Störung der Entwicklung der Scheidenschleimhaut zur Folge, so daß im Ausstrich von Vitamin-A-Mangelratten während der Mangelperiode immer Schollen zu beobachten sind, während das bei den normalen Tieren nur während des Oestrus der Fall ist. Man kann diese Erscheinung in folgender Weise zur Auswertung heranziehen:

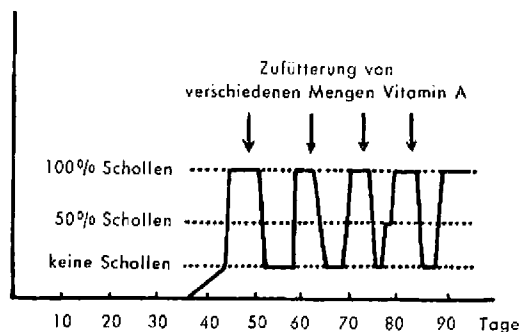


Abb. 2

Kastrierte weibliche Ratten, die somit keine zyklischen Veränderungen mehr durchmachen, werden solange vitamin-A-frei ernährt, bis auf Grund des Vitamin-A-Mangels das Schollenstadium zustande kommt. Zufuhr einer einmaligen Dose von Vitamin A hat eine Normalisierung zur Folge, die um so länger anhält, je größer die verabreichte Vitaminmenge ist. Die Anzahl der normalen Tage kann als Maß der Vitaminwirkung dienen. Beide Methoden, sowohl der kurative Wachstumstest als auch der Kolpokeratosetest sind als Testmethoden geeignet.

Auch für die Vitamin-D-Bestimmung stehen geeignete biologische Bestimmungsmethoden zur Verfügung. Ein Vitamin-D-Mangel hat bekanntlich, wie zuerst von MELLANBY festgestellt worden ist, eine Störung des Knochenwachstums zur Folge, die auf eine mangelnde Verkalkung zurückzuführen ist. Neben dem Vitamin-D-Mangel ist das Calcium-Phosphor-Verhältnis für das Zustandekommen der Rachitis von Bedeutung. Das zeigt sich vor allem sehr deutlich bei der experimentellen Rachitis der Ratte. Sie kommt nämlich nur dann zustande, wenn das Verhältnis Calcium zu Phosphor der Nahrungsbestandteile mindestens drei zu eins beträgt. Bei geringerem Calciumgehalt ist es bei Verabreichung einer vollständig vitamin-D-freien Nahrung nicht möglich, eine Rachitis zu erzeugen; oft ist sogar eine Erhöhung des Calcium-Phosphor-Verhältnisses bis auf zehn zu eins notwendig. Aber nicht allein das Calcium-Phosphor-Verhältnis ist maßgebend, auch der absolute Gehalt an Phosphor darf ein gewisses Maß nicht übersteigen. Ein prozentualer Gehalt in der Nahrung von über 0,5 % kann das Zustandekommen einer experimentellen Rachitis auch bei noch so hoher Calciumzufuhr verunmöglichen. Diese Verhältnisse müssen auch bei der Verabreichung des zu untersuchenden Materials berücksichtigt werden, d. h. es darf durch die Zufuhr der zu untersuchenden Substanz dieses Verhältnis nicht wesentlich geändert werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß Vitamin D durch Bestrahlung mit Ultraviolett *in vivo* synthetisiert werden kann, so daß die Tiere während der ganzen Versuchsperiode im Dunkeln gehalten werden müssen. Nach

Verabreichung einer vitamin-D-freien Nahrung von folgender Zusammensetzung treten die Mangelerscheinungen im allgemeinen schon nach vierzehn Tagen auf, wenn etwa fünf Wochen alte Tiere für den Versuch verwendet werden.

Tab. 2

Grundfutter-Vitamin-D-Versuch:	
Kochsalz jodiert	1 %
Calciumcarbonat	4,5 %
	(evtl. 6 %)
Gluten	15 %
Maismehl (Vitamin-A-Quelle)	33 %
Weizen gemahlen (Vitamin-B-Quelle)	31 %
Gelatine	15 %
Wasser	120 cm ³

Der Krankheitszustand läßt sich am einfachsten durch röntgenologische Kontrolle der Epiphysefuge beurteilen. Besonders geeignet ist die Epiphysefuge unmittelbar unter dem Kniegelenk. Kleine Röntgenapparate, wie sie von Zahnärzten benützt werden, genügen den Anforderungen.

In Abb. 3 sind verschiedene Heilungsgrade dargestellt, wobei das erste Bild den Heilungsgrad 1 = ausgeprägte Rachitis darstellt, während das letzte die Verhältnisse nach erfolgter vollständiger Heilung zeigt. Die Durchführung der Bestimmung kann auf prophylaktischem oder kurativem Wege erfolgen. Der kurativen Methode ist wegen ihrer größeren Genauigkeit der Vorzug zu geben. Es sind in diesem Falle allerdings zwei Aufnahmen pro Tier nötig, die erste nach zweiwöchiger Mangelperiode, die zweite nach einer Zufütterungsperiode von vierzehn Tagen. Die Auswertung erfolgt so, daß die verabreichten Dosen mit den durchschnittlichen Heilungsgraden in Beziehung gesetzt werden. Anstelle der Röntgenmethode kann der sogenannte Knochenlinieutest oder der Knochenaschentest Anwendung finden. Beide Methoden sind langwieriger. In beiden Fällen muß der zu untersuchende Teil des Skelettes isoliert werden. Der Knochenaschentest hat den Vorteil, daß die Auswertung auf gravimetrischem Wege, d. h. objektiv, erfolgt.

Die biologischen Vitamin-D-Bestimmungen haben insofern in den letzten Jahren eine Erweiterung erfahren, als es sich als notwendig erwiesen hat, auf biologischem Wege Vitamin D₂ und D₃ zu unterscheiden. Vitamin D₂ ist das unnatürliche Vitamin, das durch Bestrahlung von Ergosterin dargestellt wird, während Vitamin D₃ in analoger Weise aus 7-Dehydrocholesterin gebildet wird und mit dem natürlicherweise im Lebertran vorkommenden Vitamin D identisch ist. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß das Vitamin D₂, das auch heute noch zur Hauptsache zur Anreicherung verwendet wird, für die Behebung von Mangelerscheinungen bei

Vögeln weitgehend ungeeignet ist. Gegenüber Vitamin D_3 hat Vitamin D_2 beim Vogel eine etwa 20fach geringere Wirkung, während die Wirkung beim Säuger nach den gegenwärtigen Kenntnissen gleich ist. Die Differenzierung zwischen D_2 und D_3 kann dann wichtig werden, wenn es sich um die Beurteilung von Futtermitteln für Geflügel handelt. In diesem Falle muß die Auswertung an jungen Kückchen

Zahnwurzeln histologisch zu beurteilen. Schon sehr frühzeitig bilden sich bei Vitamin-C-Mangel typische Störungen in der Dentinbildung: unregelmäßige Anordnung der Dentinbildner, der sogenannten Odontoblasten, verminderte Dentinbildung, mangelnde Verkalkung des Prädentins. Analog zur Vitamin-D-Auswertung beurteilt man hier das histologische Bild und unterscheidet verschiedene Heilungsgrade.

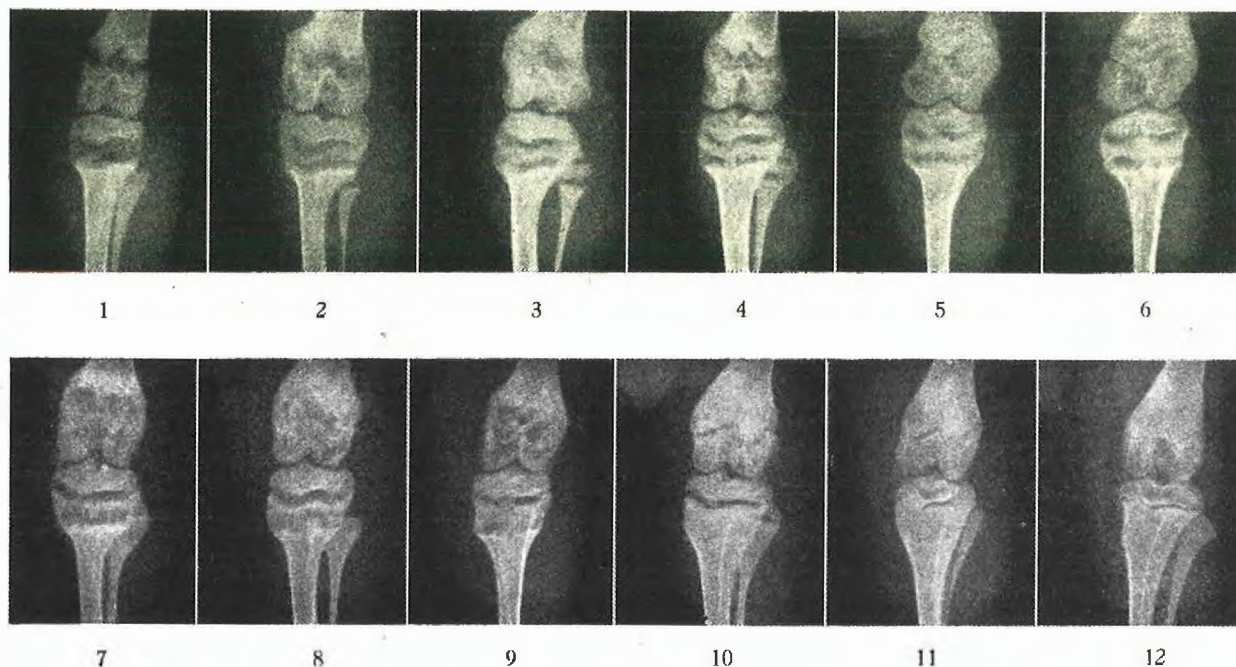


Abb. 3

erfolgen. Sie wird ähnlich durchgeführt wie die Prüfung an der Ratte.

Im Gegensatz zu den erwähnten biologischen Methoden bietet die biologische Bestimmung des Vitamins C erhebliche Schwierigkeiten. Die Ratte ist als Versuchstier ungeeignet, weil sie von der Zufuhr von Vitamin C unabhängig ist, also offenbar diese Verbindung wie übriger Großteil der Säuger synthetisieren kann. Man ist für die Bestimmung auf das Meerschweinchen angewiesen. Die Schutzdosis für das Meerschweinchen ist unverhältnismäßig hoch; sie beträgt etwa 0,5 mg pro Tag und Tier, so daß nur Substanzen geprüft werden können, die einen hohen Vitamin-C-Gehalt aufweisen. Weiter ist zu berücksichtigen, daß eine Anreicherung durch Extraktion im allgemeinen schwieriger ist, weil es sich um ein wasserlösliches Vitamin handelt. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Tatsache, daß es sich bei den Meerschweinchen um Herbivoren handelt. Die Zufuhr des zu untersuchenden Materials ist deshalb im allgemeinen viel schwieriger als bei der «allesfressenden» Ratte. Als Maß für die Wirksamkeit kann das Wachstum herangezogen werden. Es ist aber auch möglich, die

Schwierigkeiten anderer Natur ergeben sich bei der biologischen Auswertung des B-Komplexes. Wie schon aus der Bezeichnung hervorgeht, handelt es sich um eine Gruppe von Substanzen, die häufig, wenigstens einige Vertreter von ihnen, in der Natur miteinander vergesellschaftet vorkommen. Eine wesentliche Voraussetzung für eine einwandfreie biologische Bestimmungsmethode ist aber das Vorhandensein eines Grundfutters, das weitgehend der natürlichen Futterzusammensetzung des betreffenden Versuchstieres entspricht und in dem nur gerade der zu bestimmende Stoff fehlt. Die Tatsache, daß eben diese Gruppe von Stoffen meistens miteinander vergesellschaftet ist und daß diese Stoffgruppe in den natürlichen Nahrungsstoffen sehr verbreitet ist, macht es schwierig, eine solche Grundfutterzusammensetzung zu finden. Meistens ist man gezwungen, weitgehend gereinigte Substanzen zu verabreichen. Vor allem ist es schwierig, das Futter hinsichtlich Vitamingehalt vollwertig zu gestalten. Die einzelnen bekannten Komponenten des Vitamin-B-Komplexes müssen in Form der reinen Vitamine dem Futter zugesetzt werden. Die Forschung der letzten Jahre zeigt jedoch eindrucklich, daß immer

wieder neue lebenswichtige Substanzen entdeckt werden. So gelingt es nicht, ein synthetisches Futter zu finden, das, wenn es auch alle bisher als lebenswichtig bekannten Stoffe enthält, die gleiche Wachstumswirkung hervorruft wie natürliches Futter. Es besteht deshalb immer die Möglichkeit, daß durch Zusatz des zu untersuchenden Substanzgemisches Stoffe zugeführt werden, die ein zusätzliches Wachstum hervorrufen, welches nicht auf die Anwesenheit des zu bestimmenden Vitamins zurückzuführen ist. Es ergibt sich deshalb die Notwendigkeit, für einzelne Vitamine spezifische Ausfallserscheinungen heranzuziehen und sich nicht ausschließlich auf die Wachstumswirkung zu beschränken. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Tatsache, daß zwischen einzelnen Vertretern des Vitamin-B-Komplexes und anderen Nahrungsbestandteilen interessante Wechselwirkungen bestehen, so daß entweder durch solche Stoffe die Ausfallserscheinungen verstärkt oder im Gegenteil aufgehoben werden. Es ist bekannt, daß beispielsweise ein Biotinmangel am Tier nur dann erzeugt werden kann, wenn gleichzeitig Eiereiweiß in großen Mengen verabreicht wird; nur unter diesen speziellen Ernährungsbedingungen ist eine biologische Auswertung möglich. Andererseits weiß man neuerdings, daß interessante Stoffwechselbeziehungen zwischen dem Tryptophan und der Nicotinsäure bestehen, indem diese Aminosäure die Nicotinsäure im Ernährungsversuch ersetzen kann. Zudem beeinflussen auch noch andere Aminosäuren die Mangelerscheinungen. Sie können besonders durch Glykokoll, Alanin, Arginin und Cystin intensiviert werden. Enge Beziehungen bestehen auch zwischen B₆- und Nicotinsäuremangel. So wurde kürzlich gefunden, daß der Nicotinsäurestoffwechsel bei B₆-Mangel gestört ist. — Diese wenigen Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß die biologische Auswertung der einzelnen Vertreter des Vitamin-B-Komplexes am Tier besonders problematisch ist und auch besondere Vorsichtsmaßnahmen erfordert. Praktische Bedeutung besitzt eigentlich nur noch die Vitamin-B₁-Bestimmung. Zweckmäßig wird die sogenannte Bradykardie-Methode verwendet. Sie beruht darauf, daß durch B₁-Mangel, und zwar schon sehr frühzeitig, die Pulsfrequenz herabgesetzt wird und daß nach Zufuhr einer einmaligen Dose des Vitamins eine Normalisierung zustande kommt, die um so länger dauert, je größer die Menge des verabreichten Vitamins ist. Die Zeitdauer der Normalisierung kann als Maß für die Vitaminwirkung herangezogen werden.

Größere Bedeutung als die biologische Auswertung der übrigen Vertreter des Vitamin-B-Komplexes hat die biologische Vitamin-K-Bestimmung. Vitamin K ist für den normalen Ablauf der Blutgerinnung notwendig. Die Erzeugung des Vitamin-K-Mangels

stößt aber auf Schwierigkeiten, weil der Großteil der Tiere von der Zufuhr unabhängig ist, da die Synthese durch die Darmflora im allgemeinen für den Bedarf genügt. Bei Küken gelingt es leicht, Mangelerscheinungen hervorzurufen. Diese äußern sich in vermehrter Blutungsneigung. Die Messung der Prothrombinzeit, die im Mangelstadium stark verlängert ist und nach Zufuhr von Vitamin K wieder auf die Norm zurückgeführt wird, ermöglicht eine quantitative Auswertung.

Schließlich sei noch erwähnt, daß Vitamin E an der weiblichen Ratte bestimmt werden kann. Lang dauernder Vitamin-E-Mangel hat einen habituellen Abort zur Folge. Es wird experimentell diejenige Dose ermittelt, die eben noch bewirkt, daß ein normales Junges zur Welt gebracht werden kann.

Ein wesentliches Problem bei allen biologischen Bestimmungen ist die Auswertung der Ergebnisse. Relativ einfach gestaltet sich die Errechnung des Mittelwertes.

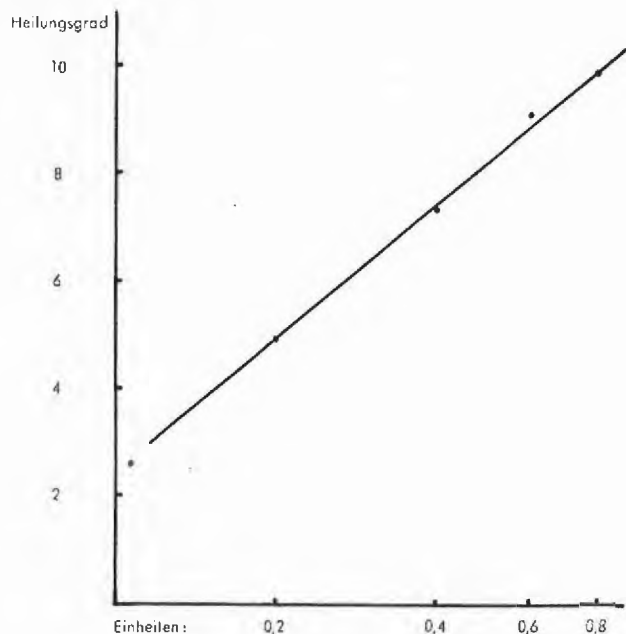


Abb. 4

So werden beispielsweise 4 verschiedenen Gruppen von je 10 Tieren während der Versuchsperiode je 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 Einheiten Vitamin D pro Tag verfüttert und nach Abschluß des Versuches der mittlere Heilungsgrad bestimmt. In einem Koordinatensystem wird auf der Ordinate der Heilungsgrad, auf der Abszisse die dazugehörige Dose in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Unter diesen Bedingungen ergibt sich im allgemeinen eine lineare Abhängigkeit. Das zu untersuchende Präparat wird in zwei Dosen verabreicht, die so gewählt sein müssen, daß der zugehörige Heilungsgrad auf die Standardkurve fällt. Durch Vergleich mit der Standardkurve können die Mittelwerte der beiden

Dosen ohne weiteres abgelesen werden. Damit ist jedoch nichts ausgesagt über die Genauigkeit der erhaltenen Werte. Wegen der Kompliziertheit und Langwierigkeit der Methode ist es auch nicht möglich, durch mehrfache Wiederholung des Versuches die Fehlerbreite zu ermitteln. Neuerdings sind aber statistische Methoden ausgearbeitet worden, die eine Berechnung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse ermöglichen. Die Zuverlässigkeit ist abhängig von der Anzahl der Tiere, der Schwankung der Einzelwerte innerhalb der gleichen Gruppe, der Steilheit der Standardkurve, der Tatsache, ob Männchen oder Weibchen für den Versuch verwendet worden sind. Da in den ersten Lebenswochen die Wachstumstendenz der männlichen Tiere ungefähr doppelt so groß ist wie diejenige der weiblichen, ist für dieselbe Genauigkeit des Ergebnisses die doppelte Anzahl von Weibchen notwendig. Wir verwenden die sogenannte Zweipunktmethode, wobei 4 Gruppen von Tieren je zwei Standard- und zwei Präparatdosen verabreicht werden. Es kann sich hier nicht darum handeln, auf die langwierigen Berechnungen einzugehen. Es soll nur am Beispiel gezeigt werden, wie bei der Vitamin-A-Auswertung die zuverlässigen Grenzen liegen. Tab. 3 zeigt die Versuchsanordnung und die Wachstumswirkung der verschiedenen Präparat- und Standarddosen an 40 Tieren.

Tab. 3

	Standarddosen		Präparatdosen	
	1,5 E	2,5 E	1,5 E*	2,5 E*
	17	32	33	46
	32	42	30	48
	22	35	34	17
	19	18	25	33
	28	29	34	37
	22	41	25	31
	27	34	39	54
	44	52	36	42
	17	33	21	38
	27	43	39	49
Summe . . .	S ₁ 255	S ₂ 359	S ₃ 316	S ₄ 395
Mittelwert . .	d ₁ 25,5	d ₂ 35,9	d ₃ 31,6	d ₄ 39,5

* Auf Grund der Angabe errechnete Werte

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Grenzwerte sagen aus, daß bei einem P von 0,05, d. h. bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, der tatsächliche Wert innerhalb der angegebenen Grenzen liegt.

Tab. 4

Angabe:	200 000 Einheiten Vitamin A pro g
Gefundener Mittelwert:	262 000 Einheiten Vitamin A pro g
Oberer Grenzwert:	363 000 Einheiten Vitamin A pro g
Unterer Grenzwert:	192 400 Einheiten Vitamin A pro g

II. Chemische Bestimmungsmethoden

In den dreißiger Jahren hat die chemische Erforschung der Vitamine großen Aufschwung erfahren. Sie beginnt mit der Isolierung des Vitamins B₁ im Jahre 1926 durch JANSEN, dann erfolgt, vor allem durch Arbeiten von WINDAUS, KARRER, KUHN, WARBURG, REICHSTEIN und anderer, Isolierung und Konstitutionsaufklärung und zum Teil Synthese der Vitamin A, B₁, B₂, C und D. An die Entdeckung der in neuerer Zeit aufgefundenen Vitamine, wie beispielsweise Vitamin E, Vitamin K, Biotin, Folsäure usw., schließt sich die chemische Charakterisierung unmittelbar an.

Relativ frühzeitig wurde versucht, das Vitamin A auf chemischem Wege zu bestimmen, schon bevor die chemische Konstitution dieser Substanz genau bekannt war. Diese Bestimmung, die von CARR und PRICE angegeben worden ist und sich bis heute bewährt hat, beruht auf der Reaktion mit Antimontrichlorid, wobei sich ein blauer Farbstoff bildet, der allerdings sehr bald wieder spontan zersetzt wird. Neben dem Vitamin A reagieren in ähnlicher Weise andere Derivate des Jonons, so vor allem auch die Carotine. Vitamin A kann auch auf spektrophotographischem Wege bestimmt werden. Die Substanz zeigt im ultravioletten Bereich bei 3280 Å ein typisches intensives Absorptionsmaximum ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2100$). Die Methode wird vor allem verwendet für Vitamin-A-Gehaltsbestimmungen im Lebertran, wobei im allgemeinen eine alkoholische 1prozentige Lösung verwendet wird. Die gefundene Extinktion multipliziert mit dem Umrechnungsfaktor von 1900 ergibt die Anzahl Einheiten pro Gramm des untersuchten Materials.

Vitamin B₁ wird zur chemischen Bestimmung nach JANSEN durch Oxydation in alkalischer Lösung in Thiochrom übergeführt. Thiochrom ist eine intensiv fluoreszierende Substanz, so daß schon kleine Mengen auf fluorometrischem Wege bestimmt werden können. Als weitere Möglichkeit der Vitamin-B₁-Bestimmung sei die zuerst von KINNERSLEY und PETERS verwendete Farbreaktion mit Diazobenzolsulfosäure erwähnt.

Das Vitamin B₂ ist ohne Vorbehandlung zur fluorometrischen Bestimmung geeignet. Es besteht auch die Möglichkeit, nach R. KUHN die Substanz durch Belichten in alkalischer Lösung in Lumiflavin überzuführen. Dadurch wird die Bestimmung spezifischer gestaltet.

Unter den Vertretern des B-Komplexes eignet sich noch vor allem die Nicotinsäure bzw. das Amid der Nicotinsäure zur chemischen Bestimmung. Die freie Nicotinsäure oder das Nicotinsäureamid nach erfolgter Hydrolyse reagiert mit Bromcyan und ergibt mit aromatischen Aminen wie beispielsweise p-Methylaminophenolsulfat, Anilin oder Amino-

acetophenon gelb gefärbte Verbindungen. Solche Bestimmungen sind von BANDIER und HALD, MELNICK und FIELD, WANG und KODICEK und anderen ausgearbeitet worden.

Auch für weitere Vertreter des B-Komplexes sind noch Bestimmungen entwickelt worden, die aber im wesentlichen nur für Reinsubstanzen in Frage kommen.

Für die Vitamin-C-Bestimmung wird im allgemeinen die Reaktion mit Dichlorphenol-indophenol nach TILLMANS verwendet, die darauf beruht, daß die Ascorbinsäure stark reduzierende Eigenschaften aufweist, so daß durch Hydrierung des Dichlorphenol-indophenols eine Entfärbung zustande kommt. Meistens wird das Vitamin C auf Grund dieser Reaktion titrimetrisch bestimmt. Man kann jedoch auch auf kolorimetrischem Wege zum Ziele kommen. Eine weitere Methode wurde von ROE und OESTERLING angegeben. Ascorbinsäure wird mit Dinitrophenylhydrazin zur Reaktion gebracht und das entstandene Hydrazon kolorimetrisch bestimmt.

Auch für das Vitamin D sind chemische Bestimmungsmethoden vorgeschlagen worden. BRUCKMANN verwendet Antimontrichlorid als Reagens. Es entsteht in diesem Falle im Gegensatz zur Vitamin-A-Bestimmung ein gelber Farbstoff. Nach SCHALT-EGGER wird Vitamin D mit Perchlorsäure behandelt und durch Zusatz verschiedener aromatischer Aldehyde in gefärbte Carbeniumsalze übergeführt. Weitere Methoden beruhen auf der Aufnahme des Absorptionsspektrums. Das Vitamin D zeigt bei 2650 Å ein charakteristisches Absorptionsoptimum. Es muß aber hervorgehoben werden, daß die Anwendung sowohl der chemischen als auch der spektrophotographischen Vitamin-D-Bestimmungsmethoden praktisch auf die Reinsubstanzen beschränkt ist.

Aus der Reihe der chemischen Vitamin-E-Bestimmungen soll die von KOFLER angegebene Methode hervorgehoben werden, wobei das Tocopherol durch Behandlung mit Salpetersäure in Tocopherolrot übergeführt wird, das mit Ortho-phenylendiamin ein fluoreszierendes Phenazinderivat ergibt. Weitere Methoden stammen von KARRER, EMMERIE, FURTER und MEYER und anderen.

Gewisse Bedeutung kommt noch der chemischen Bestimmung des Naphtochinons zu, das häufig als Vitamin-K-Ersatz verwendet wird. Das natürlich vorkommende Vitamin K enthält außer der Naphtochinon-Komponente den Phytyl-Rest. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß das Naphtochinon eine größere biologische Wirksamkeit besitzt als die natürlich vorkommende Substanz. Durch Behandlung von Naphtochinon in alkalischer Lösung mit Cystein entsteht nach SCUDI und BUHS ein gelber Farbstoff.

III. Mikrobiologische Methoden

Die Fortschritte in der Erforschung des Bakterienstoffwechsels haben sich auf die Entwicklung der Vitaminforschung außerordentlich günstig ausgewirkt. Diese neue Arbeitsrichtung hat einerseits die Auffindung neuer Vitamine, andererseits aber auch eine vollständig neuartige Methodik der Vitaminbestimmung ermöglicht. Ursprünglich interessierte den Bakteriologen der Nahrungsbedarf der verschiedenen Bakterien nur insofern, als er Nährböden benötigte, welche die Züchtung von pathogenen Organismen erlaubten. WILDIER hat sich dann aber eingehend für die Wachstumsbedingungen der Hefe interessiert und festgestellt, daß neben den bisher bekannten Nahrungsbestandteilen ein Stoff notwendig ist, den er als «Bios» bezeichnete. Die Weiterentwicklung dieses Problems hat gezeigt, daß es sich nicht um einen einheitlichen Stoff, sondern um ein Stoffgemisch handelt. So wurde von WILLIAMS festgestellt, daß Vitamin B₁ das Hefewachstum zu stimulieren vermag. Dieser Feststellung kommt ganz besondere Bedeutung zu, weil dadurch bewiesen war, daß ein für den tierischen Organismus notwendiges Vitamin in analoger Weise von den Mikroorganismen benötigt wird. Die weitere Forschung des Stoffwechsels der Mikroorganismen hat dann zur überraschenden Erkenntnis geführt, daß ihr Bedarf an Vitaminen in vielen Fällen weitgehend demjenigen des tierischen Organismus entspricht. So müssen vor allem die Vitamine des B-Komplexes dem Tiere und einer Reihe von Mikroorganismen von außen zugeführt werden. Diese Erscheinung hat neben der Auffindung neuer Vitamine die Möglichkeit gegeben, einzelne Vitamine auf mikrobiologischem Wege quantitativ zu bestimmen. Es ist das Verdienst von SCHOPFER, als erster gezeigt zu haben, daß ein solches Vorgehen möglich ist, indem er eine Vitamin-B₁-Bestimmung ausarbeitete auf Grund der wachstumsfördernden Wirkung auf den *Phycomyces blakesleeana*. In der Folge, vor allem aber in den letzten Jahren, sind dann für jeden einzelnen Vertreter des Vitamin-B-Komplexes solche Bestimmungsmethoden angegeben worden. Als Testorganismen werden vor allem Milchsäurebakterienstämme verwendet. Für einzelne Fälle haben sich auch Mutanten von *Neurospora*-Arten als zweckmäßig erwiesen. Tab. 5 (S. 134) zeigt eine Zusammenstellung von Methoden, die wir für die Bestimmung der einzelnen Faktoren des Vitamin-B-Komplexes verwenden.

Zur einwandfreien Bestimmung müssen hinsichtlich des verwendeten Organismus einige wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein. Der zur Bestimmung verwendete Stamm muß so beschaffen sein, daß der Anspruch auf die Nährbodenbestandteile auch bei längerer Züchtung unverändert bleibt. Es muß ein Nährboden vorliegen, der alle für das

Tab. 5

Vitamin	Stamm	Autoren
B ₁	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	SCHOPFER
B ₁	<i>Lactobacillus fermentum</i> 36	SARETT und CHELDELIN
B ₂	<i>Lactobacillus casei</i>	SNELL und STRONG
PP	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	SNELL und WRIGHT
B ₆	<i>Neurospora sitophila</i> 299	STOKES und Mitarbeiter
Pantothensäure	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	SKEGGS und WRIGHT
Biotin	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	BARTON- WRIGHT
Folsäure	<i>Streptococcus lactis</i> R	CAPPS, HOBBS und FOX
p-Amino- benzoesäure	<i>Acetobacter suboxydans</i>	LANDY und DICKEN
Inosit	<i>Neurospora crassa</i> 37401 a	BEADLE
Cholin	<i>Neurospora crassa</i> 34486	HOROWITZ und BEADLE
B ₁₂	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	LEES und EMERY

Wachstum nötigen Stoffe mit Ausnahme des zu bestimmenden Vitamins in möglichst optimaler Konzentration enthält, so daß durch weitere Zusätze keine zusätzliche Wachstumsstimulierung möglich ist. In einem bestimmten Konzentrationsbereich müssen steigende Mengen des zu bestimmenden Vitamins einen gut abgestuften Wachstumseffekt hervorrufen, so daß die Ermittlung einer Standardkurve möglich ist. Im Prinzip entspricht die Versuchsanordnung derjenigen einer biologischen Auswertung am Tier, d. h. einer Anzahl von Parallelansätzen wird dieselbe Menge Nährlösung und einerseits steigende Dosen des zu bestimmenden Vitamins, andererseits die zu untersuchende Substanz in ungefähr gleich abgestufter Weise zugegeben. Alle Ansätze werden auf dasselbe Volumen gebracht, im Autoklaven sterilisiert und anschließend mit je einem Tropfen einer Reinkultur des Mikroorganismus geimpft. Nach Abschluß des Versuches, d. h. nach wenigen Tagen, wenn es sich um ein Milchsäurebakterium handelt, nach etwa zehn Tagen, wenn es sich um den *Phycomyces* handelt, wird das Wachstum in den Versuchsansätzen bestimmt. Das kann bei Milchsäurebakterien durch einfache Titration der gebildeten Milchsäure oder durch Bestimmung des Trübungswertes der Bakteriensuspension erfolgen. Wenn Pilze verwendet werden, wird das Trockengewicht des Myceliums bestimmt. Zur Illustration mag folgendes Beispiel dienen (Tab. 6).

Es handelt sich um die Nicotinsäurebestimmung mit Hilfe des *Lactobacillus arabinosus*. In der Tabelle sind angegeben die Standarddosen und die Dosen des zu untersuchenden Präparates, daneben die nach Abschluß des Versuches verbrauchte Lauge, die zur

Tab. 6

Standarddosen	Zu untersuchendes Präparat	Titrationwerte	Auswertung
Leerwert		0,85 cm ³ n/10 NaOH	
0,05 γ PP		2,25 cm ³	
0,10 γ		3,4 cm ³	
0,15 γ		4,45 cm ³	
0,20 γ		5,45 cm ³	
0,25 γ		6,4 cm ³	
	5,0 mg	3,05 cm ³	0,086 γ PP
	7,5 mg	4,0 cm ³	0,129 γ
	10,0 mg	4,9 cm ³	0,173 γ

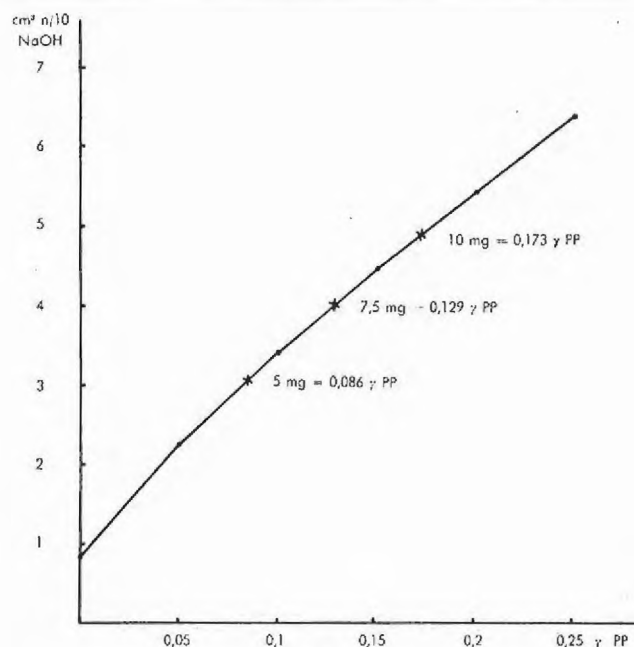


Abb. 5

Neutralisation der gebildeten Milchsäure nötig war. Zur Auswertung wird die Standardkurve aufgezeichnet und aus der Kurve der Gehalt der einzelnen Präparatdosen ermittelt. Für die Beurteilung der Zuverlässigkeit des Ergebnisses ist die Abweichung der erhaltenen Einzelwerte maßgebend. Sie sollten nicht mehr als $\pm 10\%$ voneinander abweichen.

IV. Beurteilung der verschiedenen Methoden

Wenn es sich darum handelt zu beurteilen, welche Bestimmungsmethode für den einzelnen Fall geeignet ist, so muß zum vorneherein einmal festgestellt werden, daß im allgemeinen die Bestimmung der Vitamine besondere Schwierigkeiten bereitet, vor allem wenn sie als Bestandteile kompliziert zusammengesetzter Stoffgemische vorliegen. Eine Reihe von besonderen Umständen ist dafür verantwortlich. Die Vitamine liegen im allgemeinen in sehr kleiner Konzentration vor, so daß nur sehr empfindliche Reaktionen für den Nachweis in Betracht

kommen. Das extreme Beispiel ist das Vitamin D. Als normale Tagesdosis für das Kind werden 400 Einheiten angegeben, d. h. in der Tagesdosis einer bestimmten Nahrung müssen nur 10 γ wirksames Vitamin vorhanden sein. Vitamine sind im allgemeinen kompliziert gebaute organische Verbindungen. Sie sind auf Grund ihrer physiologischen Funktionen als Wirkstoffe besonders reaktionsfähige Körper und deshalb der Gefahr der Zersetzung ausgesetzt. In vielen Fällen bestehen sehr enge Beziehungen zwischen Konstitution und Wirksamkeit, nämlich insofern als eine unbedeutende Abwandlung des Moleküls, beispielsweise Verlagerung einer Doppelbindung beim Vitamin A, oder Einführung einer Hydroxylgruppe, genügt, um die biologische Wirksamkeit vollständig aufzuheben. Es müssen deshalb an die Spezifität der Methoden, wenn es sich um chemische Bestimmungen handelt, ganz besonders hohe Anforderungen gestellt werden.

Zum Abschluß soll eine kurze Beurteilung der einzelnen Methoden versucht werden. Es kann sich allerdings nicht um ein abschließendes Urteil handeln, sondern es soll nur mitgeteilt werden, welche Methoden sich in unserem Institut für die Bestimmung der Vitamine in Heilmitteln, Lebensmitteln und Futtermitteln bewährt haben. Wir sind gezwungen, einzelne Vitaminbestimmungen in sehr verschiedenartig zusammengesetzten Substanzgemischen durchzuführen und bevorzugen deshalb jene Methoden, die einen möglichst allgemeinen Anwendungsbereich besitzen.

Bei der Bestimmung des Vitamins A ist zu unterscheiden, ob es als solches vorliegt oder ob das Provitamin bestimmt werden muß. Als natürliche Vitamin-A-Quelle kommt eigentlich nur der Lebertran in Frage. Für diesen Fall ist sowohl die CARR-PRICE-Reaktion als auch die spektrographische Methode anwendbar. Gewisse Vorsichtsmaßnahmen sind jedoch am Platze. Die CARR-PRICE-Reaktion ist nämlich nicht spezifisch für Vitamin A, sondern die Reaktion fällt auch mit unwirksamen Abbauprodukten oder andern ähnlich gebauten Substanzen positiv aus. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich durch die Tatsache, daß Trane Substanzen enthalten können, die einen hemmenden Einfluß auf die Reaktion ausüben. Die spektrographische Bestimmung gibt nur zuverlässige Werte, wenn der Verlauf der Absorptionskurve weitgehend demjenigen des reinen Vitamins A entspricht, was sehr häufig nicht der Fall ist. Dann kann unter Umständen die Verseifung zum Ziele führen. Es hat sich auch als zweckmäßig erwiesen, beide Bestimmungsmethoden an der gleichen Probe vorzunehmen. Übereinstimmung gibt einen hohen Grad von Zuverlässigkeit. Bei kompliziert zusammengesetzten Präparaten, wie beispielsweise Lebensmitteln und Futtermitteln, erhält man meistens mit der chemi-

schen und der spektrographischen Methode keine befriedigenden Resultate. In solchen Fällen muß die biologische Methode herangezogen werden. Für den Nachweis von Provitamin in natürlichem Material ist die CARR-PRICE-Reaktion ungeeignet, denn neben den Provitaminen, die einen unveränderten β -Iononring enthalten müssen, geben auch andere biologisch unwirksame Carotinderivate Reaktionen. Die chromatographische Trennung in die einzelnen Komponenten kommt, da sie für analytische Zwecke zu kompliziert ist, meistens nicht in Frage. Es bleibt deshalb für die eindeutige Bestimmung der Provitamine in natürlichem Material nur die biologische Methode.

Beim Vitamin B₁ hat sowohl die chemische als auch die mikrobiologische und in geringerem Ausmaß die biologische Bestimmung Bedeutung. Die chemische Methode ist für einfache Fälle geeignet. Störend wirkt unter Umständen die Eigenfluoreszenz; durch Adsorption an Fullererde ist eine gewisse Verbesserung möglich, jedoch nur dann, wenn die Eigenfluoreszenz nicht sehr groß ist, d. h. nicht größer als die durch B₁ bedingte. Einen viel breiteren Anwendungsbereich besitzen die mikrobiologischen Methoden. Ihr Vorteil ist die große Empfindlichkeit. Für allgemeine Anwendung geben wir der *Phycomyces*-Methode nach SCHOPPER den Vorzug, obwohl sie langwieriger ist als die *Lactobacillus*-Methode, vor allem deswegen, weil bei Verwendung des *Lactobacillus* nur die nephelometrische Auswertung möglich ist und somit trübe und intensiv gefärbte Lösungen bei der Auswertung Schwierigkeiten bereiten. Es hat sich allerdings als notwendig erwiesen, den allgemein für den *Phycomyces*-Test verwendeten COONSschen Nährboden zu modifizieren. Erst nach Zusatz eines B₁-freien Hefeextraktes und einer Peptonlösung erhält man im Standardversuch optimales Wachstum. Solange die Spezifitätsfragen bei mikrobiologischen Methoden nicht vollständig abgeklärt sind, kann es unter Umständen nötig sein, hin und wieder zu Kontrollzwecken auf die biologische B₁-Auswertung zurückzugreifen. Man kann aber auch oft zum Ziele kommen, indem man die chemisch erhaltenen Werte mit den mikrobiologischen vergleicht. Übereinstimmung gibt in diesem Falle einen sehr hohen Grad der Zuverlässigkeit, weil die Fehlerquellen der chemischen und der mikrobiologischen Methode auf ganz anderen Gebieten liegen.

Für das Vitamin B₂ und die übrigen Vertreter des B-Komplexes sind die mikrobiologischen Bestimmungen die Methoden der Wahl. Für das B₂ ist in vielen Fällen noch die chemische Methode möglich. Wesentlich ist die Vorbehandlung, d. h. die Zerstörung anderer fluoreszierender Substanzen, die einen B₂-Gehalt vortäuschen könnten. Schwierigkeiten anderer Art ergeben sich für die Nicotin-

säurebestimmung. Im allgemeinen muß hier die chemische Methode weitgehend dem einzelnen Objekt angepaßt werden. Die chemischen Bestimmungen der übrigen Faktoren des B-Komplexes sind praktisch auf Reinsubstanzen beschränkt.

Die biologische C-Bestimmung hat den Nachteil der Unempfindlichkeit und Ungenauigkeit. Sie kommt nur in Frage, wenn aus speziellen Gründen die Prüfung der biologischen Wirksamkeit gewünscht wird. Die chemischen Vitamin-C-Bestimmungsmethoden haben allgemeine Anwendungsmöglichkeiten. Dabei bedeutet es ein großer Fortschritt, daß die ältere Methode unter Verwendung von Dichlorphenol-indophenol durch die von ROE/OESTERLING angegebenen Reaktion ergänzt worden ist. Der Vorteil dieser Methode liegt in der viel größeren Empfindlichkeit und in der Tatsache, daß Reduktone und Sulfhydrylkörper nicht mitbestimmt werden.

Beim Vitamin D liegen die Verhältnisse prinzipiell ähnlich wie beim Vitamin A. Es kommen chemische, spektrographische und biologische Methoden in Frage, doch muß hier ganz eindeutig der biologischen Bestimmung der Vorzug gegeben werden. Daß die chemische und die spektrographische Methode im allgemeinen nicht genügen, ist verschiedenen Umständen zuzuschreiben. Vitamin D ist bekanntlich in sehr geringer Konzentration wirksam. Die Tagesdosis enthält nur wenige γ , so daß die relative Unempfindlichkeit sowohl der chemischen als auch der spektrographischen Methode sich ungünstig auswirkt. Der Bedarf der Ratte ist hingegen gering. Es sind deshalb noch sehr kleine Konzentrationen der biologischen Bestimmung zugänglich. Auch hinsichtlich der Spezifität sind chemische und spektrographische Methode ungenügend, was um so mehr ins Gewicht fällt, als Material, das durch Bestrahlung angereichert worden ist, unwirksame Begleitsubstanzen enthalten kann, die ebenfalls eine positive Reaktion ergeben. Für einen einigermaßen allgemeinen Anwendungsbereich bleibt somit die biologische Bestimmung die Methode der Wahl. Wenn es sich darum handelt, zwischen Vitamin D₂ und D₃ zu unterscheiden, ist man auf alle Fälle auf den Tierversuch an Ratten und Küchken angewiesen.

Die fluorometrische E-Bestimmung ist allgemein anwendbar. Die biologische Methode ist langwierig und ungenau.

Zur Beurteilung des Vitamin-K-Gehaltes ist man im wesentlichen noch auf die biologische Auswertung angewiesen. Wenn ein Präparat mit Methylnaphthochinon angereichert ist, können unter Umständen einfache chemische Methoden Verwendung finden.

Aus der gegebenen Zusammenstellung geht hervor, daß im Laufe der letzten Jahrzehnte in großer Anzahl einfache Vitaminbestimmungsmethoden entwickelt worden sind, welche in vielen Fällen die komplizierten langwierigen biologischen Auswertungen am Tier ersetzen können. Von den biologischen Bestimmungen sind noch die Vitamin-A- und vor allem auch die Vitamin-D-Bestimmung von großer Bedeutung, insbesondere wenn es sich darum handelt, diese Vitamine in kompliziert zusammengesetzten Stoffgemischen zu bestimmen.

Eine große Entwicklung haben im Anschluß an die Strukturaufklärung und Synthese der Vitamine die chemischen Bestimmungsmethoden erfahren. Ihr Anwendungsbereich ist jedoch in vielen Fällen auf Reinsubstanzen oder Substanzgemische beschränkt, die das Vitamin in hoher Konzentration enthalten.

Die mikrobiologischen Methoden sind eine sehr willkommene Ergänzung der biologischen und chemischen Bestimmungsmethoden. Eine ganze Anzahl Faktoren des Vitamin-B-Komplexes lassen sich nur mit ihrer Hilfe mit annehmbarer Genauigkeit ermitteln.

Literatur

- CHRISTIAN BOMSKOV, Methodik der Vitaminforschung. Georg Thieme Verlag, Leipzig 1935.
- KATHARINE H. COWARD, The Biological Standardisation of the Vitamins. Baillière, Tindall and Cox, London 1938.
- J. H. BURN, Biologische Auswertungsmethoden. Julius Springer Verlag, Berlin 1937.
- FRITZ GSTIRNER, Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1941.
- The Association of Vitamin Chemists, Inc., Methods of Vitamin Assay. Interscience Publishers, Inc., New York 1947.
- E. C. BARTON-WRIGHT, Practical Methods for the Microbiological Assay of the Vitamin B Complex and Essential Amino Acids. Ashe Laboratories, Ltd., London.
- P. B. MÜLLER, Vitaminbestimmungen in Lebensmitteln mit chemischen Methoden. Mitt. Lebensm. Hyg. 40, 359 (1949).