

Aus dem Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund

Eine fluorometrische Bestimmung des Vitamins C in Nahrungsmitteln

Von URSULA IMHOFF

Mit 1 Abbildung und 1 Tabelle

(Eingegangen am 23. Juli 1964)

Die Methode von ROE-KUETHER (1) beruht darauf, daß das rotbraune 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Ascorbinsäure in Schwefelsäure gelöst und photometriert wird. In reinen ascorbinsäurehaltigen Lösungen, in pharmazeutischen Zubereitungen, im Blut und im Harn läßt sich diese Methode gut anwenden. Anders ist es in Substanzgemischen, wo die Ascorbinsäure neben vielen organischen Substanzen vorliegt, die ebenfalls Carbonylgruppen enthalten. Um Störungen durch sie auszuschalten, reduzieren ROE und KUETHER evtl. vorhandene vitaminwirksame Dehydroascorbinsäure mit Schwefelwasserstoff und bestimmen nun ausschließlich die Diketogulonsäure und andere Substanzen mit Aldehyd- bzw. Ketogruppen (nicht Vitamin C-Substanzen). Die gleiche Lösung wird mit Brom oxydiert und die Summe der Vitamin-Substanzen plus Nicht-Vitamin-C-Substanzen, die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin eine rot-braune Färbung geben, gemessen. Die Färbung der Nicht-Vitamin-C-Substanzen wird nachher rechnerisch abgezogen.

Dieses Verfahren schließt Fehler ein: Durch die Oxydation mit Brom entstehen wieder neue Carbonylgruppen, die ein gefärbtes Osazon bilden. Darum versuchen neuerdings verschiedene Autoren die einzelnen Osazone durch Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie zu trennen (2). Ein weiterer Nachteil ist folgender: Bei einigen Analysenproben – besonders bei frischen Pflanzen, die viel ätherisches Öl enthalten, oder bei fettreicher Nahrung – wurde nach Zufügen der zum Lösen der Hydrazone verwendeten Schwefelsäure ein Teil des zur Oxydation verwendeten Broms frei, das wahrscheinlich an Doppelbindungen angelagert war. Die zu prüfende Lösung war durch das Brom stark braun gefärbt; bei der Messung wurde dann ein zu hoher Vitamin C-Gehalt vorgetäuscht.

Um allen diesen Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten aus dem Wege zu gehen, wurde ein neues Prinzip zur Bestimmung des Vitamins C herangezogen. Da sich an unserem Institut die fluorometrische Bestimmung kleinster Substanzmengen bewährt hatte (Vit. B₁, Vit. B₂, Vit. B₆, Biotin) lag es nahe, für das Vitamin C eine ähnliche Methode auszuarbeiten.

In einer Arbeit von OGAWA (3) wird darüber berichtet, daß Dehydroascorbinsäure mit o-Phenylendiamin gekuppelt ein blafluoreszierendes Kondensationsprodukt gibt. Die Fluoreszenz kann im Fluorometer gemessen werden; 1 γ /ml sind noch sichtbar.

Die Messung der Fluoreszenz des Kuppelungsproduktes von Dehydroascorbinsäure mit o-Phenylendiamin nach papierchromatographischer Trennung ist die Grundlage für die neue Bestimmungsmethode des Vitamins C. Dabei erwies sich die photofluorometrische Bestimmung nach KAISER-WILDEMAN (4) als außerordentlich brauchbar.

Methodik

Ascorbinsäure – in 1% Oxalsäure gelöst – wird mit 2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Lösung zur Dehydroascorbinsäure oxydiert (5). Das Indophenol ist ein mildes Oxydationsmittel, das die Ascorbinsäure quantitativ in Dehydroascorbinsäure umwandelt, die in saurer Lösung und bei möglichst tiefer Temperatur stabil ist. Erst in alkalischer Lösung bildet sich unter Aufspaltung des Laktoringes die Diketogulonsäure. Die Dehydroascorbinsäure wird auf Chromatographiepapier aufgetropft; das Chromatogramm absteigend in einem sauren Lösungsmittel entwickelt. Die Dehydroascorbinsäure zersetzt sich während des Chromatographierens nicht; würde man Ascorbinsäure auftropfen, so könnte diese leicht oxydiert werden. Nach dem Entwickeln des Chromatogramms wird dieses mit einer o-Phenylendiaminlösung besprüht. Das o-Phenylendiamin wird an die Dehydroascorbinsäure gekuppelt; das Kuppelungsprodukt fluoresziert stark hellblau bei einem pH -Wert von 3,5. Bei einem pH unter 3 verschwindet die Fluoreszenz unter der UV-Lampe, bei einem pH über 5 zeigt sich eine gelbe Fluoreszenz.

Um den blaufluoreszierenden Flecken vom überschüssigen Reagenz zu trennen, muß das Chromatogramm in einer zweiten Richtung entwickelt werden. Der Flecken wird dann auf einem Streifen konzentriert und die Fluoreszenz anschließend photographisch bestimmt.

Reagenzien:

1%ige Oxalsäure in aqua dest. gelöst
0,18 n Schwefelsäure
Äther DAB₆

Indophenolreagenz:

0,1 g 2,6-Dichlorphenol-indophenol werden in 50 ml aqua dest. von 50° C gelöst. Nach dem Abkühlen füllt man mit aqua dest. auf 100 ml auf. Das Reagenz kann im Kühlschrank vier Wochen lang aufbewahrt werden.

o-Phenylendiaminlösung:

0,1 g o-Phenylendiamin werden in einen 100 ml Meßkolben gegeben. Hierzu fügt man eine Mischung von 10 ml 0,18 n Schwefelsäure und 40 ml aqua dest. Nach Auflösen der Substanz füllt man mit Alkohol absolut. auf 100 ml auf. Die Lösung muß stets frisch bereitet werden; im Dunkeln aufbewahrt ist sie einige Stunden haltbar. Bei Gelbwerden der Lösung ist sie zu verwerfen.

Laufmittel für das Chromatogramm:

Isopropanol – 0,036 n Schwefelsäure im Verhältnis 4:1.

Laufmittel zum Konzentrieren des Fleckens:

Natriumsulfatlösung – Methanol im Verhältnis 2:1.

Natriumsulfatlösung:

35 g Natriumsulfat werden ad 1000 ml aqua dest. gelöst. Nach dem Auflösen wird die Lösung mit einigen Tropfen Schwefelsäure auf pH 3,5 gebracht.

Chromatographiepapier: – Macherey und Nagel – MN 2214 FF.

Analysengang:

Die zu untersuchende Substanz (z.B. Erdbeeren) wird folgendermaßen aufgearbeitet:

Die Erdbeeren werden gewaschen, abgetrocknet und vom Blütenstiel befreit; dann werden sie zerschnitten und ohne Zusatz von Wasser mit dem ESGE-Stabmixer („Zauberstab“) in CO_2 -Atmosphäre zerkleinert. Danach wird möglichst schnell – unter Vermeidung des Zutritts von Luftsauerstoff – der Erdbeerbrei in einen 100 ml-Meßkolben eingewogen und sofort mit 1%iger Oxalsäure ad 100 ml aufgefüllt. Die Einwaage richtet sich nach dem voraussichtlichen Vitamin C-Gehalt; bei Erdbeeren waren es ca. 10 g. Die Kölbchen werden 5 Minuten lang kräftig geschüttelt, um die Ascorbinsäure herauszulösen. Danach zentrifugiert man das Fruchtfleisch ab. Die klare überstehende Lösung wird in einen 500 ml Erlenmeyerkolben filtriert; in diese Lösung leitet man bis zur Sättigung ca. 15 Minuten lang

Schwefelwasserstoff ein, um evtl. vorhandene Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure zu reduzieren. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wird mit CO_2 ausgeblasen. Von der Analysenlösung werden bei Erdbeeren 20 ml im Vakuum auf dem Wasserbad bei 40°C bis fast zur Trockene eingengt.

Bei reinen Ascorbinsäurelösungen läßt man die Substanz bis zur Trockene einengen, um sie dann in einer best. Menge aqua dest. aufzunehmen. Bei Naturprodukten hat der Rückstand ein zu großes Eigenvolumen; beim Aufnehmen mit einer bestimmten Menge aqua dest. würden ungenaue Werte entstehen. Daher spült man bei Nahrungsmittelanalysen den Destillationsrückstand quantitativ mit aqua dest. in ein Meßkölbchen über und füllt auf das bestimmte Volumen auf; bei den Erdbeeren wird auf 10 ml aufgefüllt.

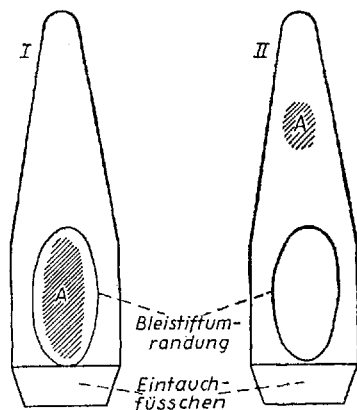


Abb. 1. Konzentrierung des fluoreszierenden Fleckens auf der ausgeschnittenen Papierzunge. I. Papierzunge vor der Konzentrierung. II. Papierzunge nach der Konzentrierung. A. Fluoreszierender Flecken.

Nach gutem Durchschütteln werden die Proben in Zentrifugengläser gefüllt, ca. $\frac{1}{4}$ Stunde lang in den Eisschrank gestellt und anschließend zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit werden 4 ml in einen spitzen Scheidetrichter gegeben und mit einer der geschätzten Vitamin C-Menge entsprechenden Indophenollösung – bei den Erdbeeren sind es 4 ml – versetzt. Nach gutem Durchschütteln läßt man das Indophenol 30 Sekunden auf die Substanz wirken; danach wird überschüssiges Indophenolreagenz mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abtrennen der Ätherschicht sammelt man die klare, wässrige Analysenlösung in spitzen Zentrifugengläsern; nach $\frac{1}{2}$ stündigem Aufbewahren im Eisschrank wird sie zentrifugiert. Bei einigen Analysen bildet sich auf der Lösung ein Häutchen, das dann noch abfiltriert werden muß. Von der klaren wäßrigen Analysenlösung werden bei den Erdbeeren 0,2 ml auf Chromatographiepapier aufgetropft und unter Einwirkung von N_2 in der Apparatur nach KRAUT und WILDEMANN (4) getrocknet.

Das Chromatographiepapier – MN 2214 FF – hat eine Größe von 60×60 cm. Die Auftropfstelle befindet sich 8 cm vom unteren und 10 cm vom linken Rand. Zum Einhängen in die Chromatographiewanne werden vom unteren Rand 6 cm umgeknickt. Anschließend wird das Chromatogramm zweiseitig absteigend in dem angegebenen Lösungsmittel entwickelt. Hierzu werden Chromatographiekästen $80 \times 50 \times 80$ cm verwendet. Nach der 1. Richtung wird der Bogen in einen Trockenschrank von 7,2 cm bei einer Temperatur von 60°C getrocknet. Das Chromatogramm besprüht man nun mit der o-Phenylendiaminlösung (mittels einer Glassprühflasche), bis es gut durchfeuchtet ist und trocknet es wieder. Hierauf wird der Bogen um 90° gedreht, 6 cm des unteren Randes wieder umgeknickt und in dem gleichen Lösungsmittel nochmals chromatographiert und getrocknet. Die Entwicklung für das Chromatogramm in der ersten und zweiten Richtung beträgt ca. 16 Stunden. Da bei der Entwicklung des Chromatogramms jetzt eine andere Substanz vorliegt (nämlich

das Kuppelungsprodukt), ist der RF-Wert ein anderer. Unter der UV-Lampe (Hanauer Analysen-Stablampe PL 335) ist das Vitamin C-Kuppelungsprodukt als hellblau fluoreszierender Flecken deutlich zu sehen. Der RF-Wert beträgt in der 1. Laufrichtung 0,58 und in der 2. Laufrichtung 0,90.

Zur Konzentrierung des Fleckens A wird dieser mit Bleistift umzeichnet, aus dem Bogen ein Streifen herausgeschnitten (Abb. 1) und der Flecken aufsteigend zur Spitze hin mit dem Laufmittel Natriumsulfat-Methanol chromatographiert und anschließend bei 60° C wieder getrocknet.

Nach dem Trocknen des Streifens wird der Flecken im UV-Licht mit Bleistift markiert, ausgeschnitten, photographiert und gemessen wie bei WILDEMANN (4) angegeben.

Die Menge an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure soll in dem zu messenden Flecken 2,5 γ bis 20 γ betragen.

Aufstellung der Eichkurve:

10,00 mg Ascorbinsäure p. a. werden eingewogen und in etwas 1 proz. Oxalsäure gelöst. Nach quantitativem Überspülen in einen 100 ml Meßkolben wird mit Oxalsäure bis zur Marke aufgefüllt.

Von dieser Lösung werden 5, 10, 15 und 20 ml im Vakuum eingengt wie bei der Vollanalyse beschrieben; das Einleiten von Schwefelwasserstoff erübrigt sich.

Der Rückstand wird in 10 ml aqua dest. aufgenommen; weitere Aufarbeitung wie bei der Vollanalyse. Je 4 ml der Ascorbinsäurelösung werden mit 4 ml Indophenollösung oxydiert. Je 0,2 ml werden auf Chromatographiepapier aufgetropft; entsprechend 5, 10, 15 und 20 γ . Die Fluoreszenz von 2,5 γ Ascorbinsäure ist auf dem Papier noch gut zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Vitamin C-Bestimmung in 24 verschiedenen Produkten angegeben. In drei weiteren käuflichen Produkten, nämlich Kirschensaft (Jungborn), Holundersaft (Eden), Meerrettichsaft (Kneipp) wurde auch bei starker Konzentration nicht die geringste Spur gefunden. Aus den angegebenen Daten Nr. 52 bis 63 wurde die Streuung $\pm s$ berechnet und auf den Mittelwert = 100 bezogen. Es ergab sich ein Variabilitätskoeffizient von $\pm 7,5\%$. Die größte Streuung wurde mit $\pm 7,6\%$ beim Sanddornsaft, die kleinste mit $\pm 6,32\%$ bei selbst hergestelltem Meerrettichsaft gefunden. Die Streuung der Eichkurve (reine Ascorbinsäure) betrug $\pm 8,4\%$.

Mit der beschriebenen Methode läßt sich in Nahrungsmitteln und in Nahrungsgemischen das Gesamt-Vitamin C – also Ascorbinsäure plus Dehydroascorbinsäure – erfassen. Andere Vitamin C unwirksame Reduktionsmittel wie Diketogulonsäure und lösliche Kohlenhydrate werden nicht erfaßt; mittels der Papierchromatographie werden diese störenden Substanzen abgetrennt. Da die Ascorbinsäure in der oxydierten Form und später in der zweiten Richtung als ein Kuppelungsprodukt auf dem Papier vorliegt, besteht nicht die Gefahr, daß die Ascorbinsäure während des Chromatographierens oxydiert wird. Es ist darum nicht nötig, ein Antioxydanz zuzusetzen.

Die Bestimmungsergebnisse der neuen Methode liegen meist etwas tiefer als nach ROE-KUETHER (z. B. Bananen, Rhabarber); in einigen Fällen stimmen beide Werte überein (Endivien, Weintrauben hell). Bei den Citrus-Früchten liegen die Werte nach der papierchromatographischen Methode bedeutend höher. In Produkten, in denen früher eine Bestimmung nicht möglich war (z. B. Walnüssen, Petersilie), konnten gesicherte Ergebnisse erhalten werden.

Tabelle 1. Gehalt von Nahrungsmitteln an Vitamin C in Milligrammprozent
(Ascorbinsäure plus Dehydroascorbinsäure)

Nr.	Nahrungsmittel		gefundene Menge in mg%				Mittelwert mg%	Werte nach ROB- KUETHER mg%
1	Bananen	I	14,0	13,7			13,85	20,3
2	Bananen	II	10,8	10,3			10,55	12,2
3	Bananen	II	12,3	11,3			11,8	15,0
4	Weintrauben bl.	I	2,8	2,1			2,45	6,1
5	Weintrauben bl.	II	1,9	1,4			1,65	7,6
6	Weintrauben hell	I	3,7	3,8			3,75	3,7
7	Weintrauben hell	I	4,4	4,8	4,3	4,5	4,5	4,0
8	Weintrauben hell	II	6,2	6,9	6,9	6,7	6,6	6,5
9	Tomaten		11,6	12,8			12,2	
10	dieselbe Sorte		10,8	12,0	11,6		11,5	
11	dieselbe Sorte		12,0	13,6			12,8	
12	Zwetschgen	I	10,6	10,2	8,7	11,2	10,2	16,5
13	Zwetschgen	II	9,2	10,8	8,6		9,2	
14	Zwetschgen	II	11,0	10,6	11,0		10,9	19,2
15	Äpfel – Boskop		26,0	27,5	23,5	25,0	25,4	29,5
16	dieselbe Sorte		26,4	22,2	22,2	25,2	24,0	
17	dieselbe Sorte		18,6	18,9	22,5	22,8	20,7	
18	dieselbe Sorte		18,6	20,7	20,8	22,5	20,7	
19	Äpfel – Cox-Orange	I	22,5	23,5			23,0	17,5
20	Äpfel – Cox-Orange	I	19,4	20,0	17,5		18,9	
21	Birnen (Gute Luise)	I	8,3	6,3	6,4	6,8	6,9	
22	Birnen	II	12,2	11,5	10,5	10,9	11,2	13,1
23	Birnen	II	9,2	9,8	10,8		9,9	
24	Clementinen		86,0	104,0	86,0	106,0	95,5	51,0
25	dieselbe Sorte		96,0	92,0	94,0	96,0	94,5	55,0
26	dieselbe Sorte		94,4	96,0			95,2	
27	Navel-Apfelsinen		104,4	104,0	100,0	100,0	102,1	
28	Navel-Apfelsinen		130,0	140,0	145,0		138,0	75,0
29	Zitronen	I	97,5	99,0	90,0	87,0	91,5	66,0
30	Zitronen	II	110,0	110,0	126,0		115,0	70,0
31	Walnüsse	I	4,42	3,1	3,8	3,3	3,8	
32	Walnüsse	I	4,14	3,6	4,14		3,9	
33	Rhabarber	I	4,9	5,2	5,6	4,4	5,0	9,8
34	Rhabarber	II	5,7	5,7	5,8	6,8	6,0	10,4
35	Rhabarber	III	5,2	4,4	4,1	4,0	4,4	
36	Erdbeeren	I	69,6	66,4	65,0	67,0	67,0	93,5
37	Erdbeeren	II	46,0	52,0	47,0	55,2	50,0	60,0
38	Erdbeeren	III	49,0	48,7			48,8	47,5

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Nr.	Nahrungsmittel		gefundene Menge in mg%				Mittelwert in mg%	Werte nach ROE- KUTHER mg%
39	Kirschen	I	9,4	8,5			8,9	13,5
40	Kirschen	II	8,9	10,0	9,5	8,0	9,1	17,5
41	Möhren	I	6,0	6,0	5,8	6,2	6,0	8,5
42	Möhren	I	10,8	11,0	9,9	13,2	11,2	12,5
43	Petersilie	I	276,0	280,0	268,0		274,0	
44	Petersilie	II	188,0	184,0	220,0		197,0	
45	Feldsalat	I	152,0	123,0	120,0	116,0	128,0	104,0
46	Feldsalat	II	190,0	180,0	182,0	164,0	179,0	
47	Endiviensalat	I	16,1	16,3	16,5		16,3	17,5
48	Endiviensalat	II	13,3	14,5	13,3		13,7	
49	Gemischte Wochen-	I	53,3	66,7	58,7		59,5	100,0
50	nahrung einer Vp.	II	87,5	97,5			92,5	85,0
51	Johannisbeermarmelade		62,0	60,0			61,0	
52	Johannisbeersaft (schwarz)	I	23,5	25,6	26,2	23,8	24,8	
53	derselbe Saft	I	22,5	25,3			23,9	
54	derselbe Saft	I	23,5	27,2			25,3	
55	derselbe Saft	I	27,0	22,8	26,0	23,3	24,8	
56	Meerrettichsaft	I	5,8	5,4	5,2		5,4	
57	derselbe Saft	I	6,15	6,3	6,0	5,55	6,0	
58	derselbe Saft	I	5,55	5,6			5,58	
59	Sanddornsaff	I	650,0	650,0	655,0		650,00	
60	derselbe Saft	I	650,0	650,0	620,0	670,0	642,00	
61	derselbe Saft	I	660,0	680,0	670,0		670,00	
62	derselbe Saft	I	590,0	570,0			580,00	
63	derselbe Saft	I	700,0	720,0			710,00	

Die Methode eignet sich auch zur Vitamin C-Bestimmung im Serum oder Plasma des Blutes.

Zur Bestimmung werden 5 ml Serum mit 1 ml 10 proz. Oxalsäure versetzt; anschließend werden unter stetem Rühren die 4fache Menge Äthanol (mit CO₂ gesättigt; darf mit Äther vergällt sein) hinzugefügt, um das Eiweiß auszufällen. Danach läßt man die Probe 30 Minuten im Eisschrank stehen und zentrifugiert den Niederschlag ab. Der Äthanol-extrakt wird im Vakuum auf dem Wasserbade bei 40° C bis zur Trockene eingengt; der Rückstand wird in 5 ml aqua dest. aufgenommen, 15 Minuten lang in den Eisschrank gestellt, dann zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit werden 4 ml mit 0,2 ml Indophenollösung versetzt, 30 Sekunden stehengelassen und mit Äther geschüttelt. Nach Abtrennen der Ätherschicht wird die wäßrige Lösung nochmals in den Eisschrank gestellt und zentrifugiert. Anschließend werden 0,6 ml auf Chromatographiepapier aufgetropft.

Zur Bestimmung im Plasma werden ca. 20 ml Blut mit 2 ml Natriumoxalatlösung (1,5 proz.) versetzt, in den Eisschrank gestellt und vorsichtig zentrifugiert. Das Plasma wird dann abgehebert und wie das Serum weiter aufgearbeitet.

Die Methode ist nicht zur Ascorbinsäurebestimmung im Harn anwendbar. Die Carboxylgruppen der Dehydroascorbinsäure reagieren wahrscheinlich mit den NH_2 -Gruppen des Harnstoffs unter Bildung eines neuen Komplexes, so daß eine Reaktion mit o-Phenylendiamin nicht erfolgen kann;; Ascorbinsäure, in 3 proz. Harnstofflösung gelöst, gibt mit o-Phenylendiamin kein fluoreszierendes Kuppelungsprodukt. Versuche, vor der Oxydation der Ascorbinsäure den Harnstoff zu entfernen, sind noch im Gange.

In allen Fällen zeigt sich nach dem Besprengen mit o-Phenylendiamin auf dem Papierbogen außer dem fluoreszierenden Kuppelungsprodukt der Dehydroascorbinsäure noch ein stark blau fluoreszierender Flecken von einem Kuppelungsprodukt des Reagenzes mit Oxalsäure. Die Oxalsäure stammt aus dem Extraktionsmittel, um die Ascorbinsäure vor der Oxydation zu schützen. Der RF-Wert ist in der 1. Richtung 0,9; in der 2. Richtung 0,7. Man könnte die Methode also auch zur Oxalsäurebestimmung anwenden, wenn man oxalsäurefreie Extraktionsmittel verwendet. Eichkurven wurden noch nicht aufgestellt.

Nachdem die Methode fertiggestellt war, wurden der Autorin die Arbeiten von OGAWA und KIMURA (6) zugänglich; diese beiden Japaner haben eine ähnliche Methode ausgearbeitet. Da nur die Zusammenfassung englisch ist, konnten genauere Details der Arbeit nicht erkannt werden. Es scheint, daß nur die Dehydroascorbinsäure bestimmt wurde.

Zusammenfassung

Es wird eine kombinierte papierchromatographische und fluorometrische Methode zur Bestimmung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure angegeben. Die Methode arbeitet in einem Bereich von 2,5–25 μg mit einer Genauigkeit von $\pm 8\%$.

Schrifttum

1. ROE, J. H. u. C. A. KUETHER, J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943). — 2. SZOKE, K., Nahrung **4**, 825 (1960); MAPSON, L. W., Biochem. J. **80**, 459 (1961); STROHECKER, R. u. H. PIES, Z. Lebensmittel-Untersuchung u. -Forschg. **118**, 394 (1962); MEHLITZ, A., Chemiker-Ztg. **16**, 573 (1963). — 3. OGAWA, S., J. Pharmacolog. Soc. Japan **73**, 59 (1953). — 4. KAISER, H. u. L. WILDEMAN, Z. Internat. Vitaminforsch. **27**, 131 (1956); KRAUT, H. u. L. WILDEMAN, Z. Internat. Vitaminforsch. **27**, 122 (1956); WILDEMAN, L., Z. Ernährungswiss. (im Druck). — 5. TILLMANS, J., Z. Unters. Lebensmittel **54**, 33 (1927). — 6. KIMURA, K., Vitamins (Kyoto) **9**, 23 (1955).

Anschrift des Verfassers :

Dr. URSULA IMHOFF, Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie
4600 Dortmund, Rheinlanddamm 201