



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmitteltechnologie

Studiengang Lebensmitteltechnologie

SS 2017

**Validierung einer Multimethode zur Bestimmung der
Vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂ sowie A, D, E und K in
Lebensmitteln mittels LC-MS/MS**

Bachelorarbeit

Verfasserin: Susann Goldhahn

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2017-0574-3

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christine Wittmann

Dipl.-LMChem. Karsten Ott

Berlin, 14.08.2017

Abstract

For the determination of vitamins there is yet no multi method. In this context bilacon LTD already developed methods for the analysis of water soluble and fat soluble vitamins.

The aim of this research was to validate the multi methods. At first the methods were acquired then various reference materials were tested for correctness, reproducibility, selectivity and linearity.

As a result the selectivity for all vitamins is given because they can be distinguished by their retention times and by the transitions of the fragment ions. A good correlation was shown in between concentration and measured signal in all fat soluble vitamins and in most of the water soluble vitamins when verifying the linearity.

Reproducible and correct results have been achieved for the vitamins retinol and α -tocopherol in pet food and infant formula. In breakfast cereals all water soluble vitamins, except folic acid and cyanocobalamin, were detected reproducible.

In summary the methods are dependent to the matrix.

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung.....	1
2 Stand der Wissenschaft und Technik.....	3
2.1 Validierung.....	3
2.1.1 Linearität	3
2.1.2 Selektivität	3
2.1.3 Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Präzision	4
2.1.4 Robustheit	4
2.2 Vitamine.....	5
2.2.1 fettlösliche Vitamine	5
2.2.1.1 Vitamin A.....	5
2.2.1.2 Vitamin D.....	6
2.2.1.3 Vitamin E	6
2.2.1.4 Vitamin K.....	7
2.2.2 wasserlösliche Vitamine	7
2.2.2.1 Thiamin	7
2.2.2.2 Riboflavin.....	8
2.2.2.3 Niacin	8
2.2.2.4 Pantothensäure	8
2.2.2.5 B ₆ -Vitamine	9
2.2.2.6 Biotin.....	9
2.2.2.7 Folsäure.....	10
2.2.2.8 Cobalamin	10
2.3 HPLC - high performance liquid chromatography	11
2.3.1 verwendete Säulen	12
2.3.1.1 Stationäre Phase bei der Analyse von fettlöslichen Vitaminen	12
2.3.1.2 Stationäre Phase bei der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen.....	13
2.4 Tandem-Massenspektrometrie	13
2.4.1 Ionisation.....	14
2.4.2 Massenanalysator und Quadrupol.....	14
2.4.3 Messergebnis.....	14

III

2.5	Probenaufarbeitung	15
2.5.1	Verseifung	15
2.5.2	Extraktion bei fettlöslichen Vitaminen	16
2.5.3	Probenaufbereitung bei wasserlöslichen Vitaminen	16
2.6	Dotierung einer Probe	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Geräte und Hilfsmittel	17
3.1.2	Chemikalien und Hilfsstoffe	17
3.1.3	Vitaminstandards	17
3.1.4	Probenmaterial	18
3.2	Basismethoden	18
3.2.1	Analyse von fettlöslichen Vitaminen	18
3.2.2	Analyse von wasserlöslichen Vitaminen	20
3.3	Untersuchung von Ausreißern nach Grubbs	22
3.4	Versuchsplanung	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Ergebnisse des ersten Vorversuchs	25
4.1.1	Analyse der Linearität	25
4.1.2	Analyse neu hergestellter Stammlösungen	27
4.2	Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1	30
4.2.1	Ergebnisse der Analyse von fettlöslichen Vitaminen	31
4.2.2	Ergebnisse der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen	33
4.3	Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2	35
4.3.1	Ergebnisse der Analyse von fettlöslichen Vitaminen	36
4.3.2	Ergebnisse der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen	37
4.4	Schwierigkeiten bei der Probenaufbereitung	39
5	Diskussion	41
6	Zusammenfassung	44
7	Formeln zur Berechnung	46
8	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	47
9	Literaturverzeichnis	49
10	Verzeichnis der Anlagen	54
	Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit	70

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACN	Acetonitril
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BIPEA	Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques
CAS	chemical abstracts service
DIN	Deutsches Institut für Normung
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
Dot	Dotierung
EN	Europäische Norm
ESI	electrospray ionization
FM	Fischmehl
HPLC	high performance liquid chromatography
ISO	International Organization for Standardization
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
MW	Mittelwert
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RP	reverse phase
STD	Standardabweichung
rel. STD	relative Standardabweichung
SEM	secondary electron multiplier
UV	Ultraviolett
WDF	Wiederfindung

1 Einleitung

Vitamine sind für den Menschen essentiell und müssen über die tägliche Nahrung aufgenommen werden, um die Körperfunktionen aufrechterhalten zu können. Sie wirken im Körper als Coenzyme und als hormonähnliche Substanzen steuernd auf den Organismus.

Das Interesse des Verbrauchers nach einer vollwertigen und vitaminreichen Ernährung wächst stetig. Gleichzeitig wächst der Markt an Nahrungsergänzungsmitteln und Vitaminpräparaten (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 2012). Dabei kommt ein Vitaminmangel in Deutschland eher selten vor. Die überwiegende Anzahl der Bevölkerung nimmt Vitamine in ausreichender Menge zu sich (Bechthold, 2012).

Vitamine werden in der Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) in ihren Höchst- und Mindestmengen vorgeschrieben. Eine korrekte Quantifizierung von Vitaminen in Lebensmitteln sowie Nahrungsergänzungsmitteln ist notwendig, um sie für den Kunden sicher in Verkehr bringen zu können.

Einzelne Vitamine können bereits korrekt analysiert und ihr Gehalt in einem Lebensmittel genau bestimmt werden. Allerdings gibt es noch keine Multimethode, die gleich mehrere Vitamine in die Analyse einschließt. Dies würde aber zu einer erheblichen Effizienzsteigerung des Labors führen, was wiederum Zeit und Kosten spart und dadurch auch die Kosten für den Kunden deutlich minimiert.

Die analytischen Trennmethoden lassen sich in die Chromatographie und Elektrophorese einteilen. Letzteres lässt sich wiederum in Flachbettelektrophorese und Kapillarelektrophorese untergliedern. Die Trennung basiert auf dem Prinzip der Wanderung von geladenen Analyten in einem elektrischen Feld. Die Chromatographie ist durch Wechselwirkungen von Analyten mit einer mobilen und stationären Phase charakterisiert, wobei zwischen Gas- und Flüssigchromatographie unterschieden wird. Die HPLC (high performance liquid chromatography) gehört neben der klassischen Säulenchromatographie nach Tswett, der Biochromatographie und der Dünnschichtchromatographie zur Flüssigchromatographie. Als Resultat des Trennprozesses zeigt sich ein Chromatogramm mit Analyten in Form von Peaks mit unterschiedlichen, spezifischen Retentionszeiten (Gey, 2015).

Bei der Vitaminanalyse wird im Allgemeinen die HPLC favorisiert, weil sie nicht nur eine hohe Sensitivität, sondern auch eine hohe Selektivität bei einer großen Anzahl an Proben aufweist

(Naushad, 2014). Der Einsatz einer HPLC-Anlage gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer erzielte erste, anwendbare Resultate.

Von zentraler Bedeutung für die Akkreditierung ist die Methodenvvalidierung. Sie stellt den Nachweis dafür dar, dass eine entwickelte Methode anwendbar ist und richtige Ergebnisse liefert. Ferner ist diese Validierung ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung.

Bei der bilacon GmbH wurde bereits eine Basismethode entwickelt, die die Gehalte von fett- und wasserlöslichen Vitaminen sowohl quali- als auch quantifizierte. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit sollen die Multimethoden validiert und auf Routinetauglichkeit und Robustheit geprüft werden. Besonders die Wiederfindung, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode in verschiedenen Matrices wird überprüft und analysiert.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

Dieses Kapitel soll einen Überblick über die behandelte Problematik geben. Dazu werden nach der Erläuterung der Validierung die fett- und wasserlöslichen Vitamine näher dargestellt. Der letzte Abschnitt von diesem Kapitel beschäftigt sich sowohl mit den verwendeten Geräten als auch mit der Probenaufbereitung.

2.1 Validierung

Eine Validierung dient der Ermittlung, ob ein Prüfverfahren, eine analytische Methode oder eine Messeinrichtung eine bestimmte Aufgabe erfüllt. Zum einen muss dafür bekannt sein, was für eine bestimmte Aufgabe gelöst werden soll. Zum anderen muss feststehen, welche charakteristischen Leistungsmerkmale die Eignung des Verfahrens bestimmen (Kromidas, 2000). Die Erläuterungen der Parameter, die für die Validierung relevant sind, folgen in diesem Abschnitt der Arbeit.

2.1.1 Linearität

Linearität liegt vor, wenn innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches (Arbeitsbereich) die Ergebnisse der Konzentration dem Signal direkt proportional zugeordnet sind. Die Korrelation zwischen dem Signal und der Konzentration sollte im Arbeitsbereich möglichst durch eine Gerade beschrieben werden. Dabei ist die Linearität einer Methode von der Kalibrierfunktion abhängig (Kromidas, 2000).

Bei der Multimethode ist der Arbeitsbereich auf 1 µg/kg bis 200 µg/kg festgelegt. In diesem Bereich sollen die Korrelationskoeffizienten möglichst 1 betragen. Dies ist der höchstmögliche und stets angestrebte Wert. Der Korrelationskoeffizient signalisiert, inwieweit die berechnete Kalibrierungskurve zu den gemessenen Datenpunkten passt (Meyer, 2006).

Konkret bedeutet das, dass Mix-Standards mit den Konzentrationen 1 µg/kg, 2 µg/kg, 5 µg/kg, 8 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg, 50 µg/kg, 80 µg/kg, 100 µg/kg sowie 200 µg/kg hergestellt und gemessen werden. Der Korrelationskoeffizient zeigt den Zusammenhang zwischen den erfassten Signalen und Konzentration. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt im Kapitel 4.1.1.

2.1.2 Selektivität

Zwischen den einzelnen Vitaminen muss die Selektivität gegeben sein. Selektivität bedeutet, dass verschiedene Komponenten in einer Probe ohne Störungen und ohne Beeinflussungen von der Probenmatrix bzw. der Analyten untereinander erfasst und beurteilt werden können (Kromidas, 2000).

Bei der Multimethode wird zur Überprüfung der Selektivität auf die Retentionszeiten zurückgegriffen. Zusätzlich kann eine Unterscheidung der einzelnen Vitamine durch die verschiedenen Übergänge der Fragment-Ionen geschehen. In Kapitel 4.1.2 wird näher auf die einzelnen Retentionszeiten eingegangen.

2.1.3 Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Präzision

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Methode werden die Wiederfindung sowie die relativen Standardabweichungen in einer Matrix betrachtet (Kromidas, 2000). Die relative Standardabweichung sollte möglichst gering sein, um so eine positive Aussage über die Reproduzierbarkeit machen zu können. Hausintern wurde festgelegt, dass bei der Auswertung die relative Standardabweichung unter 20 % und die Wiederfindung im Bereich von 70 % bis 130 % liegen muss.

Ein Wert wird als richtig angesehen, wenn das Analyseresultat nur gering vom Sollwert abweicht. Die Richtigkeit einer Methode ist ein Maß für die systematischen Abweichungen der Methode vom wahren Wert. Sind die Sollwerte bekannt, kann die Richtigkeit über die Wiederfindung analysiert werden. Bei unbekannten Sollwerten kommen Referenzmaterialien, Ringversuche und/ oder Analysen der gleichen Probe mit einer anderen Methode zum Einsatz.

Eine präzise Methode liegt vor, wenn die Streuung der einzelnen Werte bei mehrmaliger Wiederholung gering ist. Präzision wird durch die Standardabweichung beschrieben und lässt Rückschlüsse auf die zufälligen Abweichungen der Methode zu (Meyer, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Wiederholpräzision überprüft. Innerhalb von kurzen Zeitabständen sind die ermittelten Ergebnisse voneinander unabhängig. Dabei wird dasselbe Verfahren, an derselben Probe, im selben Labor mit derselben Gerätausrüstung vom selben Bearbeiter durchgeführt. Die Wiederholgrenze zeigt die absolute Differenz zwischen zwei Einzelwerten an, die bei der Auswertung akzeptiert wird (Kromidas, 2000). Unter Punkt 7 ist die Formel zur Berechnung der Wiederholgrenze dargestellt. Die Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Präzision der Multimethoden sollen mit Hilfe von Tierfutter, Frühstückscerealien und Säuglingsnahrung definiert werden.

2.1.4 Robustheit

Unter der Robustheit wird die Fähigkeit eines Verfahrens verstanden, trotz Änderung von relevanten Einflussparametern nicht oder nur geringfügig verfälschte Ergebnisse zu liefern. Hierbei gilt der Bereich als Maß für die Robustheit, in dem das Ergebnis unabhängig vom variierten Parameter ist (Kromidas, 2000).

2.2 Vitamine

Vitamine sind organische Verbindungen, die essentiell für den menschlichen Körper sind und können vom Menschen nicht oder nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden. Sie sind für fast alle physiologischen Funktionen nötig und können sowohl als Coenzyme oder als Hormone wirken. Anders als essentielle Fettsäuren oder Aminosäuren liefern Vitamine für den menschlichen Körper keinerlei Energie. Der tägliche Bedarf an Vitaminen ist mengenmäßig eher gering und liegt im Mikro- bis Milligrammbereich (Löffler, 2007).

Vitamine besitzen unterschiedliche chemische Strukturen und lassen sich deshalb nicht in Stoffklassen einteilen. Allerdings kann eine Einteilung in zwei unterschiedliche Gruppen nach ihrer Löslichkeit erfolgen. Abhängig davon, ob sich ein Vitamin in einem polaren oder unpolarem Medium löst. Allgemein gibt es die fett- und wasserlöslichen Vitamine, die in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 näher behandelt werden. Vitamin A, D, E und K sind den fettlöslichen Vitaminen zugeordnet. Zu den wasserlöslichen Vitaminen gehören B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ und B₁₂.

2.2.1 fettlösliche Vitamine

In diesem Abschnitt folgt zunächst die Beschreibung der einzelnen fettlöslichen Vitamine. Die Differenzierung zwischen fettlöslichen und wasserlöslichen Vitaminen ist nötig, da die Verfahren für die Probenaufarbeitung verschieden sind.

2.2.1.1 Vitamin A

Der Begriff Vitamin A fasst alle Verbindungen zusammen, die qualitativ die gleiche biologische Aktivität wie Retinol besitzen. Retinoide sind alle natürlichen und synthetischen Formen. Vitamin A setzt sich aus vier Isopreneinheiten (20 C Atome) zusammen. Davon bilden die Atome 1-6 einen Iononring. Die polare Gruppe am azyklischen Ende kann ein Alkohol (Retinol), ein Aldehyd (Retinal) oder eine Säure (Retinsäure) sein. In der Abbildung 1 ist die Strukturformel von Retinol dargestellt. Weiterhin beschreibt die Bezeichnung Pro-Vitamin A Carotinoide, die 8 Isopreneinheiten besitzen. Von ihnen ist β -Carotin die ergiebigste Vitamin A-Vorstufe (Löffler, 2007). Vitamin A wird nach § 35 LMBG L49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) nachgewiesen.

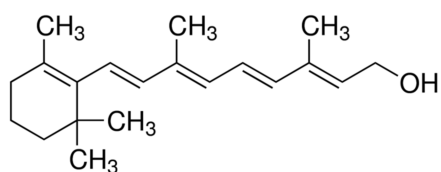


Abbildung 1: Retinol (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.1.2 Vitamin D

D-Vitamine (auch als Calciferole bezeichnet) zählen zur Gruppe der Steroide und könnten aufgrund ihrer Synthese in der Leber aus Squalen auch zu den Hormonen zählen. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Ergocalciferol (D_2) und Cholecalciferol (D_3), die Abbildung 2 sowie Abbildung 3 zeigen. Aus den Provitaminen Ergosterol bzw. 7-Dehydrocholesterin entstehen die D-Vitamine, wobei die UV-Strahlung des Sonnenlichts als Katalysator dient (Löffler, 2007).

In Lebensmitteln sind sie bis zu 180 °C hitzestabil (Domke u.a., 2004). In der DIN EN 12821 wird die Bestimmung von Vitamin D mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie beschrieben.

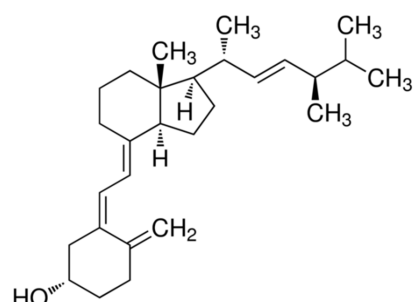


Abbildung 2: Ergocalciferol (Sigma Aldrich, 2017)

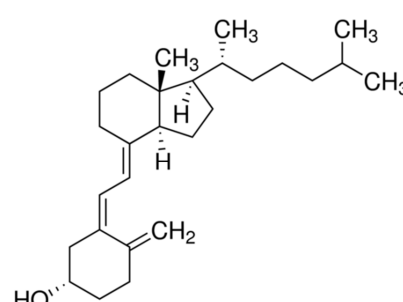


Abbildung 3: Cholecalciferol (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.1.3 Vitamin E

Unter Vitamin E werden die vier Tocopherole α , β , γ und δ sowie die vier Tocotrienole α , β , γ und δ zusammengefasst. Sie sind Prenyllipide und bestehen aus einem in sechs Stellung hydroxylierten Chromanring, der in Position zwei mit einer aliphatischen Seitenkette (C16) verknüpft ist. Die Seitenkette der Tocopherole ist gesättigt, bei den Tocotrienolen besitzt sie drei Doppelbindungen. Durch die Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring wird die α , β , γ und δ - Form bestimmt (Löffler, 2007).

Die Strukturformel von α -Tocopherol ist in Abbildung 4 dargestellt. Die freien Tocopherole sind hitzestabil, unlöslich in Wasser und besitzen antioxidative Eigenschaften (Domke u.a., 2004). Die DIN EN 12822 gibt die Grundlage für die Analyse von Vitamin E in Lebensmitteln wieder.

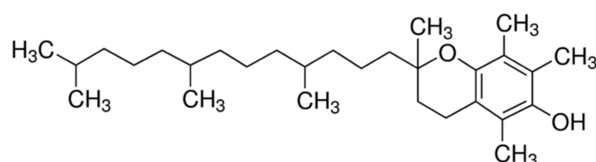


Abbildung 4: α -Tocopherol (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.1.4 Vitamin K

Vitamin K wird als Überbegriff für Menadion-Derivate mit antihämorrhagischer Aktivität verwendet. Als Coenzym ist Vitamin K für die Carboxylierung von Glutamylresten in Proteinen beteiligt. Verschiedene Seitenketten bestimmen die Vitamere. In der vorliegenden Arbeit wird Vitamin K₁ als Standard genutzt. Es besitzt eine Phtylseitenkette und wird als Phyllochinon bezeichnet.

Abbildung 5 zeigt die Strukturformel von Phyllochinon. Die Bestimmung von K₁ in Lebensmitteln ist in der DIN EN 14148 beschrieben.

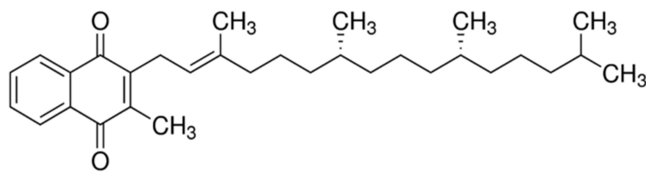


Abbildung 5: Phyllochinon (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2 wasserlösliche Vitamine

Es folgt die nähere Betrachtung der wasserlöslichen Vitamine.

2.2.2.1 Thiamin

Vitamin B₁ (Thiamin) ist Coenzym der α -Ketosäure-Decarboxylasen (oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren) sowie der Transketolase (Enzym des Glucoseabbaus über den Hexosemonophosphat-Weg). Es setzt sich aus einem mit einer CH₃ und NH₂-Gruppe substituierten Pyrimidinring zusammen, der über eine CH₂-Gruppe mit einem 4-Methyl-5-Hydroxyethylthiazol verbunden ist (Löffler, 2007).

In Abbildung 6 ist Thiamin-Hydrochlorid abgebildet, wie es auch in den Versuchen genutzt wurde. Thiamin ist thermolabil und besonders in neutralen oder alkalischen Medien oxidationsempfindlich (Domke u.a., 2004). Als Grundlage zur Bestimmung von Thiamin in Lebensmitteln mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie dient die DIN EN 14122.

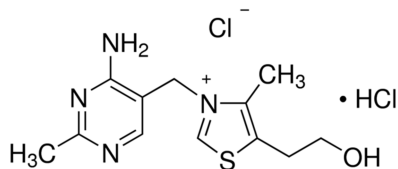


Abbildung 6: Thiamin-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.2 Riboflavin

Bei Vitamin B₂ (Riboflavin) handelt es sich um einen substituierten Iso-alloxazin-Ring, der mit Ribitol verbunden ist. Die Strukturformel von Riboflavin ist in Abbildung 7 zu erkennen. Es ist als Bestandteil von Flavinnucleotiden am Wasserstoff- und Elektronentransport beteiligt und ist ein Baustein der Coenzyme von wasserstoffübertragenden Flavoproteinen (Löffler, 2007).

Die DIN EN 14152 legt die Bestimmung von Vitamin B₂ fest.

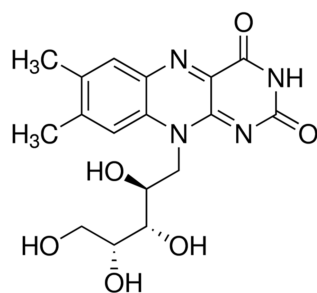


Abbildung 7: Riboflavin (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.3 Niacin

Niacin, auch Vitamin B₃ genannt, ist die Bezeichnung für Pyridin-3-Carboxylsäure und Derivate. Als gängigste Vertreter sind Nicotinsäure und Nicotinamid (oder auch Niacinamid) zu nennen. Die Strukturformeln beider sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 gezeigt.

Niacin ist als essentieller Bestandteil für ihre Funktionen in NAD⁺ und NADP⁺ enthalten. Außerdem ist es an einer Vielzahl von Redoxreaktionen und Wasserstoffübertragungen des Intermediärstoffwechsels beteiligt (Löffler, 2007). Nach DIN EN 15652 zeigt den Nachweis Niacin in Lebensmitteln mittels HPLC auf.

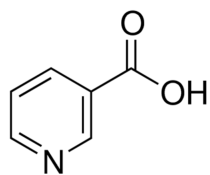


Abbildung 8: Nicotinsäure (Sigma Aldrich, 2017)

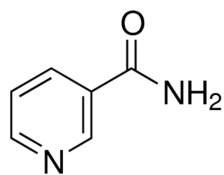


Abbildung 9: Nicotinamid (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.4 Pantothersäure

Durch die Kondensation von β -Alanin mit 2,4-Dihydroxy-3,3-Dimethylbutyrat (Pantoinsäure) entsteht Pantothersäure, das auch Vitamin B₅ genannt wird. Das Coenzym A, das durch Koppelung mit ATP und Cystein in der Zelle entsteht, ist die biologisch aktive Form der Pantothersäure. In proteingebundener Form ist Vitamin B₅ ein Bestandteil des Acyl-Carrier-Proteins bei der

Fettsäurebiosynthese. Pantothensäure ist an Funktionen im Metabolismus von Zellen und an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt (Löffler, 2007).

In Abbildung 10 ist die Strukturformel von Calcium-Pantothenat dargestellt, wie es auch für die Versuche als Vitaminstandard genutzt wurde. Zur Bestimmung von Pantothensäure in Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene kann die ISO 20639 als Grundlage dienen.

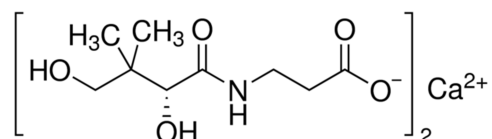


Abbildung 10: Calcium-Pantothenat (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.5 B₆-Vitamine

Die Bezeichnung Vitamin B₆ fasst alle 3-Hydroxy-2-Methylpyridin Derivate zusammen, die die biologische Aktivität von Pyridoxin besitzen. Dazu gehören Pyridoxol (Pyridoxin, Alkohol), Pyridoxamin (Amin) und Pyridoxal (Aldehyd). Pyridoxalphosphat, das von Pyridoxin abgeleitet wird, gilt als zentrales Coenzym des Aminosäurestoffwechsels (Löffler, 2007).

Abbildung 11 zeigt die Strukturformel von Pyridoxamin-Dihydrochlorid. Das Aldehyd in Form von Pyridoxal-Hydrochlorid ist in Abbildung 12 abgebildet. Pyridoxin wird in Abbildung 13 wiedergegeben. Alle drei Abbildungen veranschaulichen die Strukturformel der eingesetzten Standardsubstanzen. Im Stoffwechsel ist eine Umwandlung untereinander zwischen Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin sowie den jeweiligen 5'-Phosphorsäureester möglich (Domke u.a., 2004). In DIN EN 14663 ist die Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln geregelt.

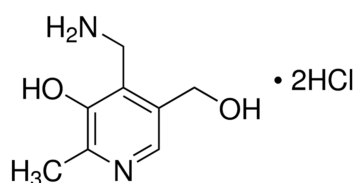


Abbildung 11: Pyridoxamin-Dihydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017)

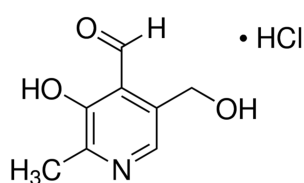


Abbildung 12: Pyridoxal-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017)

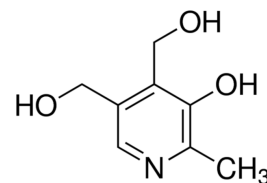


Abbildung 13: Pyridoxin (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.6 Biotin

Formal betrachtet, handelt es sich bei Biotin (Vitamin B₇) um eine Verbindung aus Harnstoff und einem mit Valeriansäure substituierten Thiophanring. Abbildung 14 zeigt die Strukturformel von Biotin. Vitamin B₇ ist das Coenzym für vier Carboxylasen des Menschen. Diese Carboxyla-

sen sind die Acetyl-CoA-, Pyruvat-, Propionyl-CoA- und Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (Löffler, 2007).

Die DIN EN 15607 legt ein HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Biotin in Lebensmitteln fest.

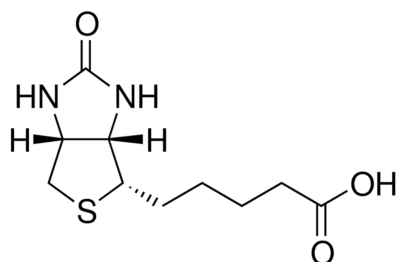


Abbildung 14: Biotin (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.7 Folsäure

Folsäure (Vitamin B₉) besteht aus einem Pteridinkern, p-Aminobenzoessäure und L-Glutamat. Durch die Anzahl der Glutamylreste unterscheiden sich die einzelnen Formen der Folsäure. Die Vitamine der Folsäure sind als Coenzyme für die Übertragungen von C1-Gruppen verantwortlich (Löffler, 2007).

Die Strukturformel von Folsäure ist in Abbildung 15 veranschaulicht. Eine mikrobiologische Bestimmung von Folsäure in Lebensmitteln kann nach DIN EN 14131 erfolgen.

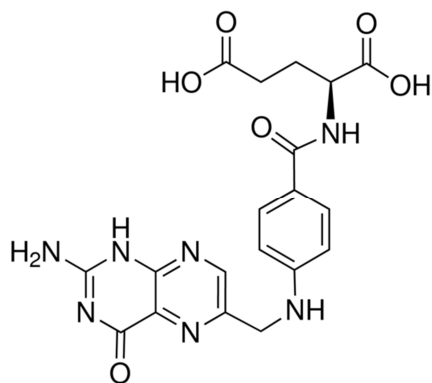


Abbildung 15: Folsäure (Sigma Aldrich, 2017)

2.2.2.8 Cobalamin

Der innere Teil des Cobalamin (Vitamin B₁₂) besteht aus vier reduzierten und voll substituierten Pyrrolringen. Im Zentrum ist dabei ein Kobaltion, das an die Stickstoff-Atome der Pyrrolringe gebunden ist. Weiterhin ist ein 5,6-Dimethylbenzimidazol-Ribonucleotid enthalten, das über Aminoisopropanol an eine Seitenkette des Rings IV gebunden ist. Von dort ist eine Brücke zur 5. Koordinatenstelle des Kobaltions vorhanden. An der 6. Koordinatenstelle können verschiedene Reste gebunden sein. Handelt es sich bei diesem Rest um eine Cyanogruppe, lautet der Name des Derivates Cyanocobalamin.

Abbildung 16 zeigt die Strukturformel vom kommerziell erhältlichen Cyanocobalamin. Vitamin B₁₂ ist für die intramolekulare Umlagerung von Alkylresten und für die Methylierung von Homocystein notwendig. In der Nahrung liegt Cobalamin proteingebunden vor (Löffler, 2007). In Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene kann der Gehalt an Vitamin B₁₂ nach ISO 20634 mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie bestimmt werden.

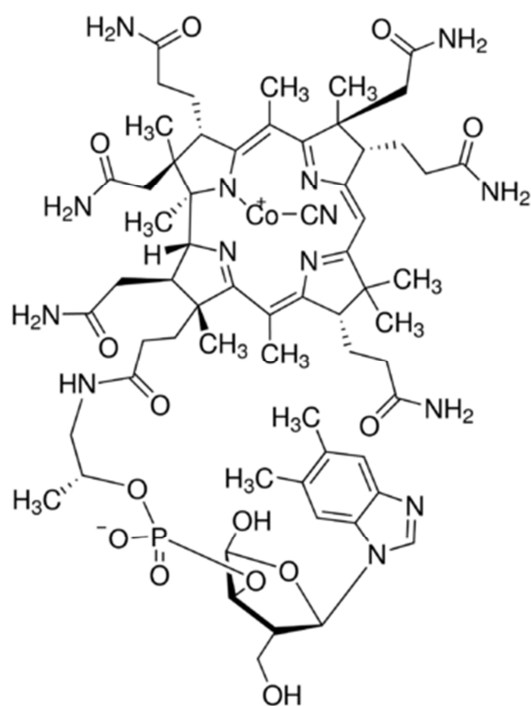


Abbildung 16: Cyanocobalamin (Sigma Aldrich, 2017)

2.3 HPLC - high performance liquid chromatography

Wie bereits erwähnt, wird für die Analyse von Vitaminen die HPLC bevorzugt, da sie sich durch eine hohe Sensitivität und Selektivität auszeichnet. Die Flüssigchromatographie stellt eine Trennmethode dar, bei der Analyten mit einer mobilen und stationären Phase in Wechselwirkung treten. Die Trennung erfolgt nach dem Zeitpunkt, zu dem sie von der Chromatographiesäule eluieren. Die unterschiedlichen verwendeten Säulen werden im Abschnitt 2.3.1 näher beschrieben. Als Ergebnis zeigt sich ein Chromatogramm, in dem ein Signal der einzelnen Analyten gegen die Zeit aufgetragen wird, sodass Peaks resultieren. Jede Substanz hat seine eigene Retentionszeit, die zur Bestimmung der Selektivität dient. Die Quantifizierung der Analyten erfolgt durch die Integration der Peakflächen. In Abbildung 17 ist eine HPLC-Anlage schematisch dargestellt.

Bei der Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie zeigt sich als Resultat ein Chromatogramm, das auf einer großen Anzahl nacheinander aufgenommener Massenspek-

trenn beruht. Es wird auch als Ionenchromatogramm bezeichnet, aufgrund der Darstellung der Ionenhäufigkeit als Funktion der Retentionszeit (Gross, 2013). Die Massenspektrometrie wird im Kapitel 2.4 noch näher erläutert.

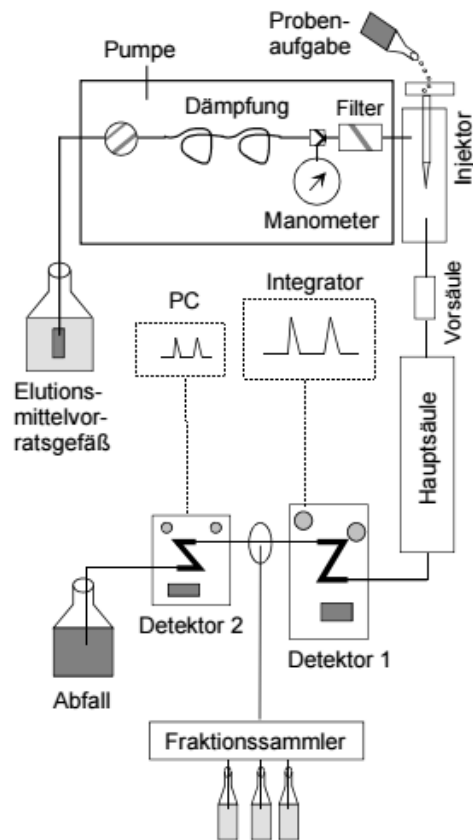


Abbildung 17: HPLC-Anlage (Gey, 2015)

2.3.1 verwendete Säulen

Je nach Methode werden für die Bestimmung von Vitaminen unterschiedliche Säulen genutzt, um eine optimale Sensitivität und Selektivität zu gewährleisten. Bei beiden, eingesetzten Säulen handelt es sich um chemisch modifizierte, stationäre Phasen. Es sind Umkehrphasen (RP), was bedeutet, dass die Eluierung mit einer polaren mobilen Phase erfolgt.

Im Folgenden wird zunächst auf die Säule zur Analyse von fettlöslichen Vitaminen eingegangen. Anschließend folgt die stationäre Phase zur der Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen.

2.3.1.1 Stationäre Phase bei der Analyse von fettlöslichen Vitaminen

Für die Analyse von fettlöslichen Vitaminen kommt die Phenomenex Säule Kinetex™ C18 zum Einsatz, da sie sehr gute Resultate für sehr hydrophobe Verbindungen bringt. Es handelt sich dabei um Core Shell Materialien, die durch eine poröse Hülle und einen Kern charakterisiert sind (Phenomenex, 2017). Der Kern kann von den Analyten nicht durchdrungen werden, sie prallen

von ihm ab. Das hat eine Verkürzung der Diffusionswege zur Folge und die Peaks im Chromatogramm verbreitern sich nicht. Die nachträgliche Modifizierung, auch endcapping genannt, ist durch die weitestgehende Verringerung der Silanolgruppen durch die Substitution von Trimethylsilan und Dimethyl-octadecyl-silan gekennzeichnet (Gey, 2015).

2.3.1.2 Stationäre Phase bei der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen

Die Phenomenex Synergi™ Polar-RP wird bei der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen verwendet. Die stationäre Phase ist vollporöses Siliciumdioxid, das ein Ether-verknüpftes Phenyl mit polarer, hydrophiler Endverkappung aufweist. Laut Hersteller ist sie besonders für die Trennung von polaren, aromatischen Verbindungen geeignet (Phenomenex, 2017).

2.4 Tandem-Massenspektrometrie

Die HPLC-Anlage, wie sie für diese Arbeit genutzt wurde, ist mit einem Massenspektrometer verbunden, um eine genauere Trennung und Detektion der Analyten zu ermöglichen (Gey, 2015). Sind zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet, handelt es sich um eine mehrdimensionalen Massenspektrometrie, Tandem-MS oder MS/MS. Durch eine Kopplung können die spezifischen Fragmentierungen analysiert oder die Selektivität und Sensitivität bei einer quantitativen Bestimmung erhöht werden.

Bei dem Gerät, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um ein Triple Quad Mass Spectrometer. In Abbildung 18 ist der Aufbau einer Tandem-MS-Anlage schematisch dargestellt. Zunächst findet im ersten Quadrupol eine Registrierung des Spektrums der Probesubstanz nach dem Masse-Ladungsverhältnisses (m/z -Verhältnis) statt. Es erfolgt eine Auswahl von speziellen Ionen, die in die Stoßkammer (zweiter Quadrupol) gelangen. Ein inertes Gas (Argon oder Stickstoff) führt dem Analyt Energie zu, wodurch die Ionen spezifisch zu leichteren Ionen zerfallen. Die Fragmente werden im dritten Quadrupol (in Abbildung 18 MS 2) gescannt, um Informationen über die Struktur des Moleküls zu erhalten (Gey, 2015).

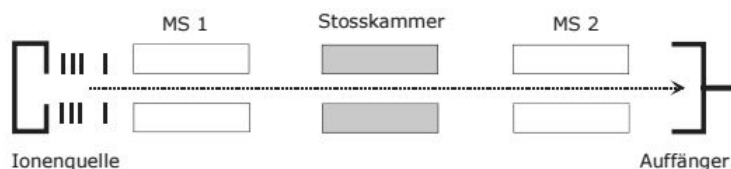


Abbildung 18: MS/MS schematisch (Gey, 2015)

2.4.1 Ionisation

Das verwendete Elektrosprayverfahren stellt eine weiche Ionisationsart dar und zählt zur Gruppe der Atmosphärendruck-Ionisationsverfahren. Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI, electrospray ionization) findet eine Überführung der Ionen von der Flüssigphase in eine Gasphase statt (Gross, 2013). Die Probemoleküle werden durch eine Kapillare gefördert, die von einem elektrischen Feld umgeben ist. Das Versprühen des Eluats ionisiert die Probemoleküle. Dabei bestimmt die an die Kapillare angelegte Spannung die Ladung der erzeugten Ionen. Positive Spannung bringt positive Ionen hervor, bei negativer entstehen negative Ionen. Die entstehenden charakteristischen Quasimoleküle zeigen sich im Massenspektrum entweder als positives ($[M+H]^+$) oder als negatives Signal ($[M-H]^-$) (Gey, 2015).

2.4.2 Massenanalysator und Quadrupol

Für LC-MS/MS werden Quadrupol-Massenanalysatoren genutzt (Gross, 2013). Die angelegte Spannung wird so gewählt, dass Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis auf einer entsprechenden Bahn zum Detektor gelangen. Andere Ionen schlagen auf die Metallstäbe, wodurch sie zerfallen. Die Ionen, die auf den Detektor auftreffen, erzeugen ein elektrisches Signal (Gey, 2015). Als Detektor dient ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEM).

2.4.3 Messergebnis

Die Auswertung und Beurteilung der Messungen erfolgt mithilfe der Software Agilent MassHunter Quantitative Analysis (for QQQ).

Die Anzahl der detektierten Elektronen wird als Count bezeichnet. Als Resultat einer Messung zeigt sich ein Chromatogramm, in dem über die Zeit die Counts aufgetragen werden. Bei einem Gemisch aus mehreren Analyten erfolgt die Identifizierung der einzelnen Substanzen zusätzlich zu ihrer Retentionszeit anhand des jeweiligen Massenspektrums. Generell soll bei einer Messung zum einen das Quasimolekül-Ion des Analyten bekannt sein und zum anderen noch mindestens ein Fragment-Ion.

Als Quantifier wird der Übergang des Quasimolekül-Ions zum Fragment-Ion bezeichnet, der die höchste Intensität aufweist. Er ist konzentrationsabhängig und findet Anwendung bei der Messung von Standardlösungen zur Erstellung einer Kalibriergeraden sowie bei Proben zur Quantifizierung.

Zur korrekten Identifizierung der analysierten Substanz sind weitere Fragment-Ionen nötig. Diese Übergänge werden als Qualifier bezeichnet und dienen der Qualifizierung einer Substanz.

Zur Veranschaulichung fungieren die Abbildungen, die in Anlage 1 bis Anlage 3 dargestellt sind. Es handelt sich dabei um die Darstellungen aus dem Mix-Standard von Pantothensäure mit einer Konzentration von 100 µg/L. Neben dem charakteristischen Quasimolekül-Ion ($[M+H]^+$) besitzt Pantothensäure drei Übergänge, wobei ein Übergang als Quantifier und zwei als Qualifier zur Verfügung stehen.

In Anlage 1 ist der Quantifier im Chromatogramm zu erkennen. Diese Darstellungsweise ist beispielhaft für die Auswertung des Vitamins sowohl in den Standards als auch in den Proben. Die Peakfläche ist grün hinterlegt und wird zur Quantifizierung von Pantothensäure genutzt. Zusätzlich ist noch die Retentionszeit bei 6,589 Minuten ablesbar.

Die Anlage 2 zeigt das Massenspektrum von Pantothensäure. Deutlich zu erkennen, sind hier zum einen das Quasimolekül-Ion mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 220,0 und zum anderen die drei Fragment-Ionen bei 70,0; 89,9 und 202,2. Am intensivsten ist der Übergang bei 89,9. Daher wird er als Quantifier gewählt. Die anderen beiden Übergänge sind als Qualifier zu sehen.

Die Verhältnisse der einzelnen Übergänge der Fragment-Ionen sind in Anlage 3 dargelegt. Bei der obersten, schwarzen Linie handelt es sich um den Quantifier. Die grüne Linie stellt den ersten Qualifier (m/z von 202,2) und die blaue Linie den zweiten Qualifier (m/z von 70,0) dar.

2.5 Probenaufarbeitung

Lebensmittel sind komplexe Matrices, die eine Analyse von bestimmten Vitaminen erschweren. Deshalb ist eine präzise und sorgfältige Probenaufarbeitung grundlegend. Anfangs müssen die Vitamine, die gebunden vorliegen, freigesetzt und die Störsubstanzen entfernt werden. Zusätzlich findet eine Anreicherung der Zielsubstanzen statt. Im Rahmen dieser Arbeit kommen für die Analyse von fettlöslichen Vitaminen eine alkalische Verseifung und eine Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Anwendung. Nähere Erläuterungen befinden sich in den Abschnitten 2.5.1 und 2.5.2. Kapitel 2.5.3 zeigt die Probenaufarbeitung für die wasserlöslichen Vitamine.

2.5.1 Verseifung

Vitamine, die nicht frei vorliegen, sondern an Fettsäuren als Ester gebunden sind, müssen verseift werden (Beyer, 2004). Weiterhin findet eine Verkleinerung der Matrix und eine Entfernung von möglichen Störsubstanzen statt.

Bei der Aufarbeitung der fettlöslichen Vitamine handelt es sich um eine basische Esterhydrolyse von Triglyceriden. Als Resultat entstehen Glycerin und Salze der Fettsäuren (Seife). Um die

Verseifungslösung zu stabilisieren wird Ethanol hinzugegeben. Gleichzeitig wird so verhindert, dass die entstandene Seife ausfällt.

2.5.2 Extraktion bei fettlöslichen Vitaminen

Nach der Verseifung erfolgt die Abtrennung der freien Vitamine vom unverseiften Anteil und die Beseitigung von wasserlöslichen Komponenten, wie z. B. Proteine und Kohlenhydrate. Es wird auf die Flüssig-Flüssig-Extraktion näher eingegangen, da sie im Rahmen dieser Arbeit für die Aufarbeitung von fettlöslichen Vitaminen genutzt wurde. Daneben gibt es noch die Festphasenextraktion.

Allgemein beschreibt die Flüssig-Flüssig-Extraktion eine Extraktion einer wässrigen Lösung mit einem in Wasser nicht löslichen, organischen Lösungsmittel. Damit sich die zu extrahierenden Stoffe nicht ineinander lösen, müssen das Lösungsmittel und das Extraktionsgut eine unterschiedliche Polarität aufweisen (Gey, 2015). Während der Extraktion gehen die fettlöslichen Vitamine aufgrund ihrer Polarität in die organische Phase (n-Hexan) über und die wässrige Phase kann abgetrennt werden.

2.5.3 Probenaufbereitung bei wasserlöslichen Vitaminen

Die Hydrolyse der Probe mit Salzsäure dient der Freisetzung der gebundenen Vitamine. Anschließend erfolgt eine Erhöhung des pH-Wertes auf ca. 4,2. Um ein optimales Milieu für die Enzyme zu schaffen. Während der Inkubation spalten die Enzyme weitere Bindungen und setzen die Vitamine frei.

2.6 Dotierung einer Probe

Bei der Dotierung einer Probe wird sie in vier oder meist fünf Aliquotes geteilt. Durch Hinzufügen einer bestimmten Menge von einer Stammlösung mit bekannter Konzentration auf jeden Teil, ergibt sich nach dem Mischen für alle Teilproben die gleiche Zusammensetzung. Eine Probe muss undotiert bleiben. Bei der Auswertung wird das Signal gegen die hinzugefügte Konzentration der Lösung aufgetragen. Die entstandene Kalibrationskurve schneidet die Signalachse nicht bei null, sondern an einem Punkt, der der Lösung ohne Addition entspricht. Dann kann der Konzentrationswert der Probe durch Extrapolation der Kalibrationskurve abgelesen werden (Matissek, 1992).

Die Formel für die Berechnung des Volumens ist unter Punkt 7 aufgezeigt. Eine Übersicht der Dotierungen bei der Einwaage von 5 g Probe ist in Anlage 4 dargestellt.

3 Material und Methoden

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Versuchsplanung, den verwendeten Materialien sowie den verschiedenen Methoden, die für die Analyse von Vitaminen genutzt wurden.

3.1 Materialien

Nachfolgend sind die verwendeten Geräte, Chemikalien sowie Vitaminstandards aufgelistet.

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Für die Chromatographie wurden im Agilent 1290 Infinity II LC die Säulen Synergi™ Polar-RP (4 µm; 150 x 4,6 mm; Phenomenex) für die Analyse von wasserlöslichen Vitaminen und die Säule Kinetex™ C18 (2,6 µm; 100 x 2,1 mm; Phenomenex) für die Bestimmung der fettlöslichen Vitamine genutzt. Als Massenspektrometer diente der Agilent 6495 Triple Quad Tandem-Massenspektrometer.

Während der Probenaufarbeitung wurden Feinwaagen, Wasserbäder, Rotationsverdampfer, Zentrifugen, pH-Meter, Falterfilter, Vortexmischer, Einmalspritzen und Membranfilter benutzt. Zusätzlich kamen noch verschiedene Labormaterialien wie Erlenmeyerkolben, Spitzkolben und Messzylinder in unterschiedlichen Größen, Rückflusskühler, Scheidetrichter, Vials, Pipetten mit verschiedenen Pipettiermengen, Aluminiumfolie, Magnetrührer, Mikroreaktionsgefäße sowie Spatel zum Einsatz. Außerdem wurden noch destilliertes Wasser und Reinstwasser verwendet.

3.1.2 Chemikalien und Hilfsstoffe

Für die Versuche wurden verschiedene Chemikalien benutzt. Das waren Ascorbinsäure, Ethanol, Kaliumhydroxid, Natriumacetat, Natriumsulfid, n-Hexan, Phenolphthalein, Salzsäure sowie die Enzyme α -Amylase und Taka-Diastase. Zur Herstellung der Laufmittel als mobile Phase der HPLC kamen zusätzlich Ameisensäure, Ammoniumformiat und Methanol hinzu. Für die Herstellung der Stammlösungen standen Acetonitril, Essigsäure und Toluol zur Verfügung.

Die Lösungen, die aus diesen Chemikalien hergestellt und für die Multimethode verwendet wurden, sind in Anlage 5 aufgelistet.

3.1.3 Vitaminstandards

Die Stammlösungen der Vitamine konnten mithilfe von folgenden Standards hergestellt werden: Thiamin-Hydrochlorid, Riboflavin, Nicotinsäure, Nicotinamid, Calcium-Pantothenat, Pyridoxin, Pyridoxal-Hydrochlorid, Pyridoxamin-Dihydrochlorid, Biotin, Folsäure, Cyanocobalamin, Reti-

no1, Retinyl-Acetat, Retinyl-Palmitat, Ergocalciferol, Cholecalciferol, Phyllochinon, DL- α -Tocopherol, rac- β -Tocopherol, γ -Tocopherol und δ -Tocopherol.

Eine vollständige Übersicht der Vitamine mit ihrer CAS-Nr., Reinheit sowie Lot-Nr. ist in Anlage 6 zusammengefasst. Die Vitaminstammlösungen mit ihrer jeweiligen Konzentration sowie ihrer Lösungsmittel ist in Anlage 7 zusammen gestellt.

Bei den Versuchen fanden sowohl Einzelstandards als auch Mix-Standards Verwendung. Bei einem Einzelstandard wurde nur ein Vitamin in Methanol verdünnt. Mix-Standards enthielten verschiedene Vitamine in Methanol.

3.1.4 Probenmaterial

Diese Aufstellung der Probematerialien gibt Auskunft darüber, welche Proben bei welchem Versuch genutzt wurden. Bei allen Proben handelt es sich um Referenzmaterial.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Probematerialien

Probenmaterial	Verwendung bei:
Vitaminpräparat, petfood, sample 2167, März 2017, BIPEA	Hauptversuchsreihe Nr. 1
Säuglingsnahrung, infant formula, TYG009RM, Lot. 495, fapas	Hauptversuchsreihe Nr. 2
Frühstückscerealien, breakfast cereal, TYG003M, Lot. 199, fapas	Hauptversuchsreihe Nr. 2

3.2 Basismethoden

Wie in Kapitel 2.2 erwähnt, existieren bereits Verfahren für die Analyse von einzelnen Vitaminen. Es gibt allerdings keine Multimethode zur Bestimmung von mehreren Vitaminen. Es wurden bereits Basismethoden für die Quali- und Quantifizierung von sowohl fett- als auch wasserlöslichen Vitaminen entwickelt und optimiert. Beide Methoden sollen im Folgenden getrennt voneinander betrachtet und erläutert werden.

3.2.1 Analyse von fettlöslichen Vitaminen

Bei der Aufbereitung der Proben zur Untersuchung auf fettlösliche Vitaminen wurde sich an § 35 LMBG L49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) orientiert.

Die Einwaage der zu untersuchenden Probe beträgt 5 g. Unter Umschwenken kommen 50 mL destilliertes Wasser, 20 mL Kaliumhydroxid-Lösung (siehe Anlage 5, Nr. 1.1), 100 mL Ethanol, 1 g Ascorbinsäure sowie 2 mL Natriumsulfid-Lösung (Anlage 5, Nr. 1.2) zur Probe hinzu. Im Wasserbad wird das Reaktionsgemisch unter ständigem Rühren 30 Minuten am Sieden gehalten.

Nach der Beendigung der Verseifung und Spülung vom Rückflusskühler mit 20 mL destilliertem Wasser, kühlt das Reaktionsgemisch auf ca. 15 °C ab.

Um ein Wasser-Ethanol-Verhältnis von 1:1 zu erhalten, wird dem Gemisch weitere 10 mL destilliertes Wasser hinzugefügt. Nach quantitativer Überführung in einen 500 mL Scheidetrichter erfolgt die Extraktion der Mischung mit 100 mL n-Hexan. Es bilden sich nach ca. 2 minütiger Ruhephase zwei klare Phasen. Die untere, wässrige Phase wird in einen zweiten Scheidetrichter abgelassen, um sie noch zweimal mit jeweils 50 mL n-Hexan zu extrahieren.

Nach Beendigung der Extraktion folgt durch die Zugabe von ca. 50 mL Wasser zu den vereinigten n-Hexanextrakten das Neutralwaschen. Wenn sich die Indikatorlösung (ethanolische Phenolphthalein-Lösung, Anlage 5, Nr. 1.3) nicht mehr rosa verfärbt, liegt der pH-Wert der wässrigen Phase im neutralen Bereich und die Natronlauge ist ausgewaschen. Es sind ca. vier Waschungen mit destilliertem Wasser nötig.

Ein Rotationsverdampfer trennt das Extraktionsmittel ab und der Rückstand an Extrakt wird anschließend mit 5 mL Methanol aufgenommen. In einem letzten Schritt findet eine zweifache Verdünnung des Rückstandes in Methanol statt, jeweils 1:1000, 1:100 und 1:10.

Nachfolgend zeigt Abbildung 19 das Fließschema der Probenvorbereitung für die Aufbereitung von fettlöslichen Vitaminen nochmals zusammengefasst.

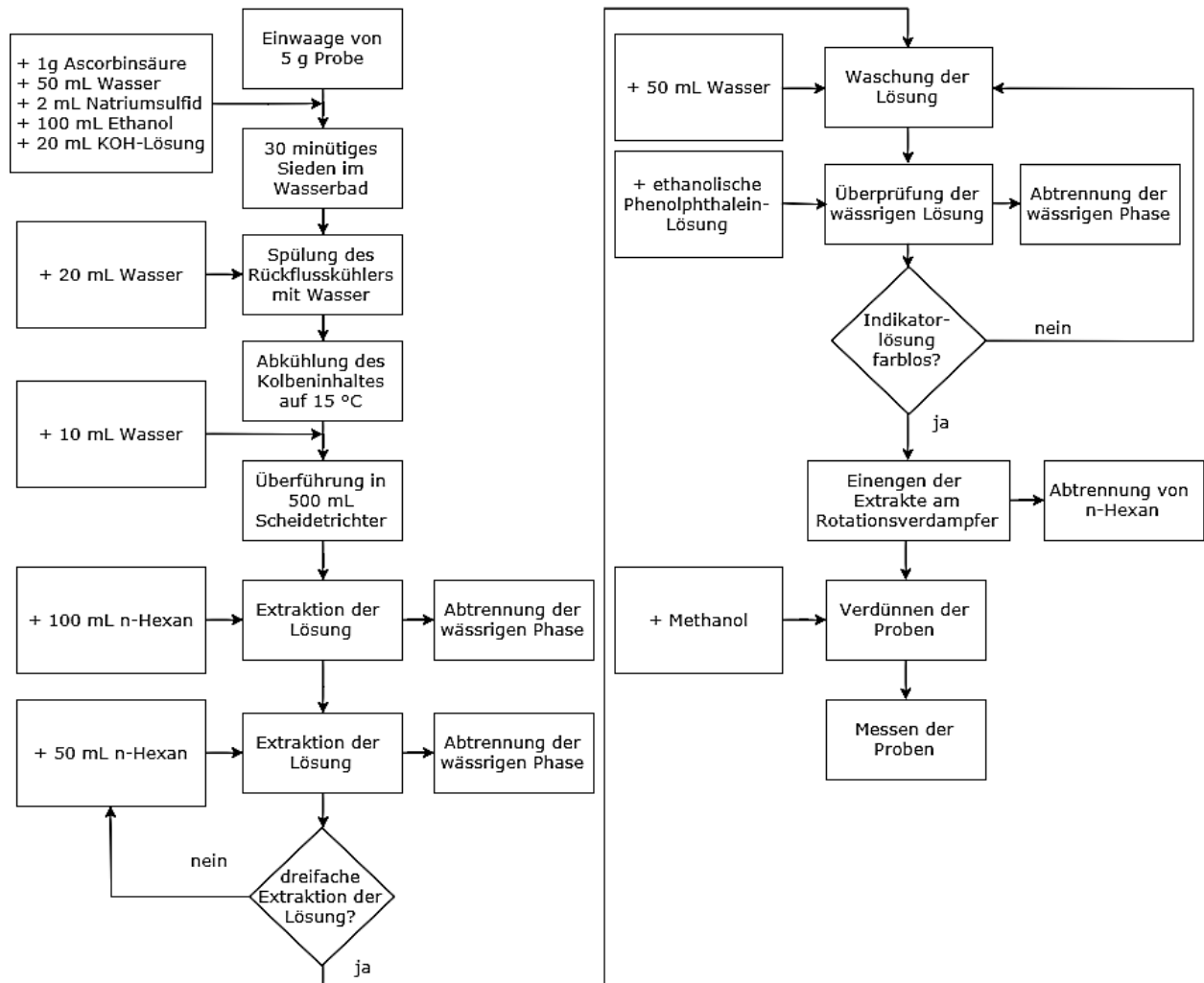


Abbildung 19: Fließschema der Probenaufarbeitung für fettlösliche Vitamine

3.2.2 Analyse von wasserlöslichen Vitaminen

Die Untersuchung von wasserlöslichen Vitaminen richtet sich im Wesentlichen nach der DIN EN 14122: Bestimmung von Vitamin B₁ in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie und der DIN EN 14152: Bestimmung von Vitamin B₂ in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie.

Auf die Probe, dessen Einwaage 5 g beträgt, wird 60 mL der Salzsäure-Lösung (siehe Anlage 5, Nr. 2.1) gegeben. Nach einer einstündigen Hydrolyse im Wasserbad bei 100 °C kühlt die Probelösung auf Zimmertemperatur ab, um anschließend den pH-Wert zu bestimmen. Liegt der pH-Wert im sehr sauren Bereich (ca. 1,0 bis 1,5), wird die Probe mit 3 mL der Natriumacetat-Lösung (Anlage 5, Nr. 2.2) versetzt, um so einen pH-Wert von ca. 4,2 zu erreichen. Dem Gemisch werden 500 mg Taka-Diastase und 50 mg α -Amylase zugegeben und es wird durchmischt. Nach ca. 16-stündiger Inkubation der Probe in einem Wasserbad bei 40 °C, kühlt sie auf Zim-

mertemperatur ab. Anschließend erfolgt eine Filtration der Probe mittels Membranfilter und ggf. eine Verdünnung in Methanol.

Abbildung 20 zeigt die gesamte Probenaufarbeitung der wasserlöslichen Vitamine.

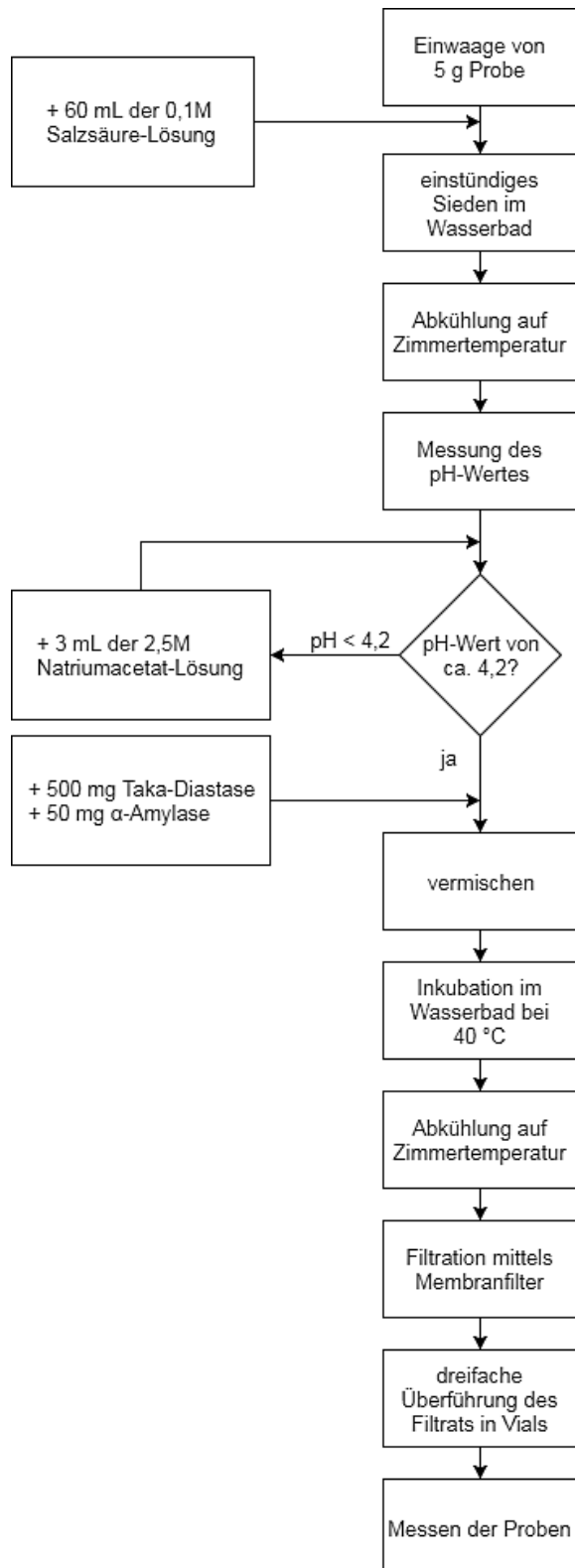


Abbildung 20: Fließschema der Probenaufarbeitung für wasserlösliche Vitamine

3.3 Untersuchung von Ausreißern nach Grubbs

Bei der Erhebung von Daten kommt es automatisch auch zu einer Streuung der Messwerte. Deshalb muss bei der Auswertung der Daten mithilfe eines Ausreißertests oder auch Verlässlichkeitstests überprüft werden, ob ein Wert mit starker Abweichung zufällig von anderen Werten abweicht oder ob es sich bei ihm um einen Ausreißer handelt. Deshalb wurden die Werte nach dem Ausreißertest nach Grubbs getestet. Zunächst wird die Prüfgröße Q errechnet (Formel zur Berechnung unter Punkt 7) und mit den entsprechenden Tabellenwerten verglichen (siehe hierzu Anlage 8). Ist der Prüfwert Q größer als der angegebene Wert bei der Anzahl von N -Versuchen und einem gewählten Signifikanzniveau P (z.B. $P = 0,99$), handelt es sich bei dem Wert um einen Ausreißer (Kromidas, 2000). Liegt der Prüfwert Q unter dem Signifikanzniveau von $P = 0,95$, kann von einem zufälligem Unterschied ausgegangen werden. Bei $0,95 < P < 0,99$ wird ein wahrscheinlicher Unterschied erwartet. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich dann, wenn P größer als 0,99 ist (Schwedt, 2016).

Bei der Auswertung wurden die Werte für die Quantifizierung der Vitamine auf Ausreißer mithilfe von Excel getestet. Wurde ein Ausreißer identifiziert, wurde er ersatzlos gestrichen und ging nicht mit in die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen ein. In den Ergebnistabellen der einzelnen Vitamine sind ermittelte Ausreißer grau hinterlegt.

3.4 Versuchsplanung

Der experimentelle Teil unterteilt sich in zwei verschiedene Phasen.

In der ersten Phase erfolgte die Probenvorbereitung von verschiedenen Matrices, um sich in die unter den Punkten 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Basismethoden einzuarbeiten. Außerdem wurden neue Vitaminstammlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt und gemessen. Einerseits sollten so die Übergänge für jedes Vitamin deutlich gemacht und andererseits die Linearität im Arbeitsbereich überprüft werden.

Im zweiten Teil wurden zwei verschiedene Hauptversuchsreihen durchgeführt und die Multimetoden auf Reproduzierbarkeit und Richtigkeit geprüft.

Zur Veranschaulichung sind in Tabelle 2 die durchgeführten Versuche aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der durchgeführten Versuche

Versuch	Ziel
Herstellung und Messung von neuen Stammlösungen sowie Überprüfung der Linearität	Identifizierung der Retentionszeiten im Einzelstandard sowie der Übergänge der Fragment-Ionen Ermittlung der jeweiligen Linearitäten
Hauptversuchsreihe Nr. 1: Aufarbeitung von Tierfutter	Ermittlung der Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Wiederfindung
Hauptversuchsreihe Nr. 2: Aufarbeitung von Säuglingsnahrung und Frühstückscerealien	

Die erneute Herstellung und Messung von frischen Stammlösungen diente zur Ermittlung der Retentionszeiten der einzelnen Vitamine, ohne dass eine Matrix sie beeinflusst. Zusätzlich war unklar, welche und ob sich die Stammlösungen über die Zeit abbauen. Gleichzeitig wurde die Linearität im Arbeitsbereich durch die Messung von zehn Mix-Standards mit verschiedenen Konzentrationen überprüft.

Die Hauptversuchsreihe Nr. 1 umfasste die Aufarbeitungen von Tierfutter. Die Hauptversuchsreihe Nr. 2 diente zur Analyse von wasserlöslichen Vitaminen in Frühstückscerealien sowie zur Bestimmung von fettlöslichen Vitaminen in Säuglingsnahrung. Da die Basismethoden bekannt waren, wurde bei diesen Aufarbeitungen der Fokus auf die Wiederfindung und die Reproduzierbarkeit gelegt.

4 Ergebnisse

Als Resultat jeder Analyse wurde für jedes Vitamin ein Chromatogramm erstellt. Ein Beispiel für die Quantifizierung von Retinol ist der Abbildung 21 zu entnehmen.

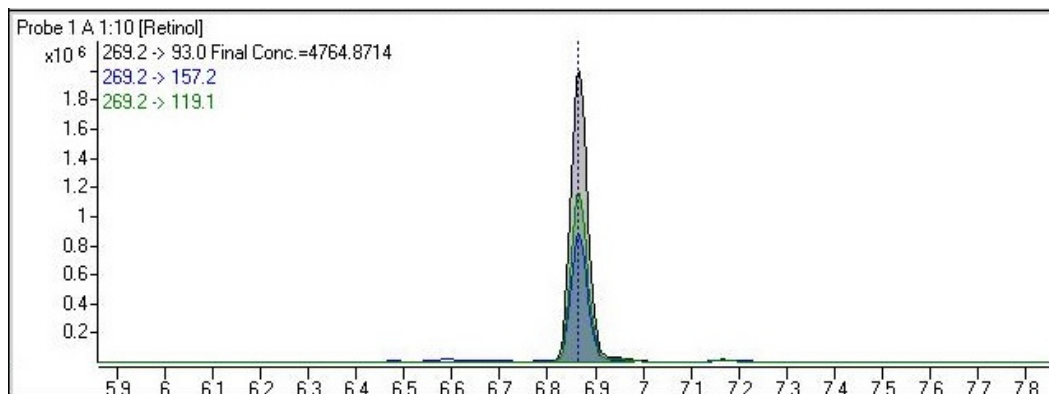


Abbildung 21: Beispiel für die Quantifizierung von Retinol in einer Probe

Bei dieser Abbildung wird durch die gestrichelte Linie die hinterlegte Retentionszeit in dieser Methode angezeigt. Ebenso gut zu erkennen sind die einzelnen Übergänge von Retinol (269,2 → 93,0; 269,2 → 157,2; 269,2 → 119,1) sowie die finale Konzentration (Final Conc.), die in der Probe nachgewiesen wurde. Der integrierte Bereich ist bei dieser Probe farbig hervorgehoben und dient der Quantifizierung von Retinol.

Für die korrekte Analyse ist eine Kalibrationsgerade grundlegend. In Abbildung 22 ist eine solche Gerade dargestellt.

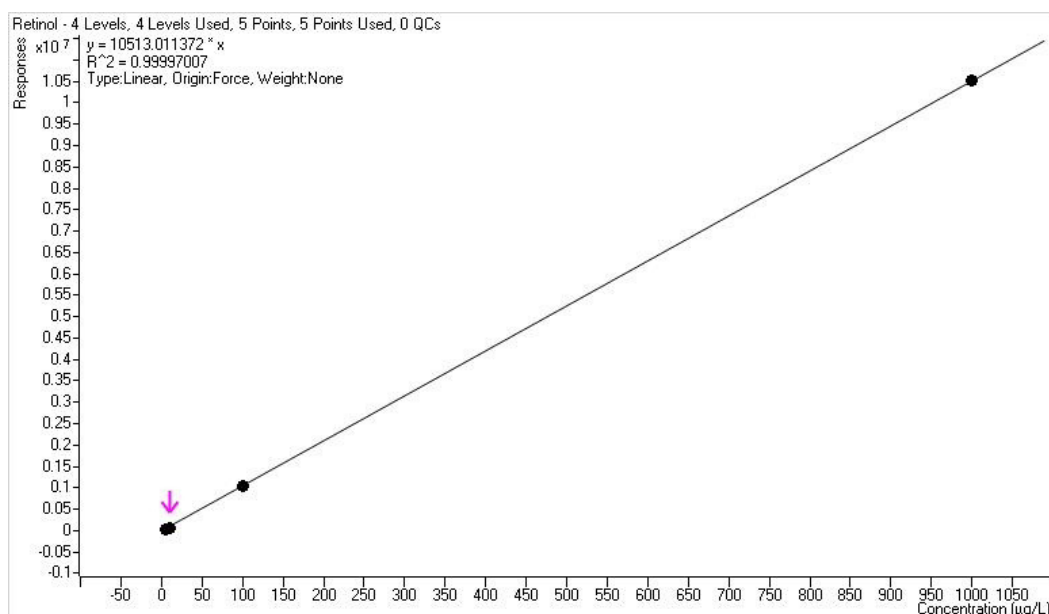


Abbildung 22: Kalibrationsgerade für Retinol

Bei dieser Geraden wurden Mix-Standards mit den Konzentrationen 5 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L und 1000 µg/L gemessen und gegen das entstandene Signal aufgetragen. Zusätzlich kann aus der Abbildung 22 der Korrelationskoeffizient (0,9999) entnommen werden.

4.1 Ergebnisse des Vorversuchs

Der erste Teil dieses Vorversuches beschäftigte sich zunächst mit dem Nachweis der Linearität im Arbeitsbereich. Nach der erneuten Herstellung der Vitaminstammlösungen fand für alle Vitamine eine Überprüfung der Linearität und der Selektivität statt.

Im zweiten Abschnitt erfolgte die Messung und Dokumentation der neu hergestellten Stammlösungen. Zusätzlich wurden anhand der einzelnen Chromatogramme die Retentionszeiten verdeutlicht. Es erfolgte zum einen die Identifizierung der Retentionszeit für jedes Vitamin ohne die mögliche Beeinflussung einer Probenmatrix. Diese konnte dann mit der Retentionszeit verglichen werden, die in der Methode der Agilent MassHunter Quantitative Analysis hinterlegt ist. Zum anderen diente das Programm Qualitative Analysis zur Darstellung der Übergänge der Fragment-Ionen für jedes Vitamin.

4.1.1 Analyse der Linearität

Bei der Analyse der Linearität wurde überprüft, inwieweit die untersuchte Multimethode innerhalb des Arbeitsbereiches von 1 µg/kg bis 200 µg/kg Ergebnisse lieferte, bei der die gemessene Konzentration dem Signal direkt proportional war. Es erfolgte die Messung von zehn hergestellten Mix-Standards und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten mithilfe des aufgezeichneten Signals. Die Mix-Standards wurden mit neu eingewogenen Stammlösungen hergestellt. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 3 zusammengefasst, als Ausgangswerte zur Berechnung dienten die in Anlage 9 aufgelisteten Werte.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten

Vitamin	Korrelationskoeffizient
Retinol	0,9979
Ergocalciferol	0,9970
Cholecalciferol	0,9977
α -Tocopherol	0,9963
Phyllochinon	0,9973
Thiamin	0,9821
Riboflavin	0,9983
Nicotinamid	0,9778
Nicotinsäure	0,9982
Pantothensäure	0,9988
Pyridoxal	0,9714
Pyridoxamin	0,9881
Pyridoxin	0,9147
Biotin	0,9836
Folsäure	0,9918
Cyanocobalamin	0,9990

Durch diese Zusammenstellung zeigt sich die generell gute bis sehr gute Linearität im Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/kg}$ bis 200 $\mu\text{g/kg}$. Allerdings fällt auf, dass einige wasserlösliche Vitamine eine etwas geringere Korrelation aufwiesen.

Sowohl bei Thiamin und Nicotinamid als auch bei Pyridoxal war ersichtlich, dass sich beim Ausschließen des Signals bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/L}$ die Korrelationen verbesserten. Die Korrelationskoeffizienten würden sich wie folgt ergeben: Thiamin 0,9959; Nicotinamid 0,9993 und Pyridoxal 0,9992. Es könnte der Verdacht bestehen, dass sich diese Vitamine ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr linear verhalten. Diese Vermutung sollte durch die erneute Aufnahme einer Standardreihe bestätigt oder widerlegt werden. Dazu ist die Aufnahme von weiteren Werten zwischen den Konzentrationen 100 $\mu\text{g/kg}$ und 200 $\mu\text{g/kg}$ nötig. Ferner ist

es auch möglich, dass es bei der Herstellung des 200 µg/kg Standards zu einem Pipettierfehler kam.

Wird für Pyridoxin die Konzentration in Abhängigkeit vom Signal aufgetragen, so ist ersichtlich, dass die entstandene Funktion durch eine Kurve zu beschreiben ist (vgl. Abbildung 23). Das könnte darauf hindeuten, dass kleine Konzentrationsunterschiede leicht registriert werden können und die Multimethode speziell für Pyridoxin eine hohe Empfindlichkeit besitzt.

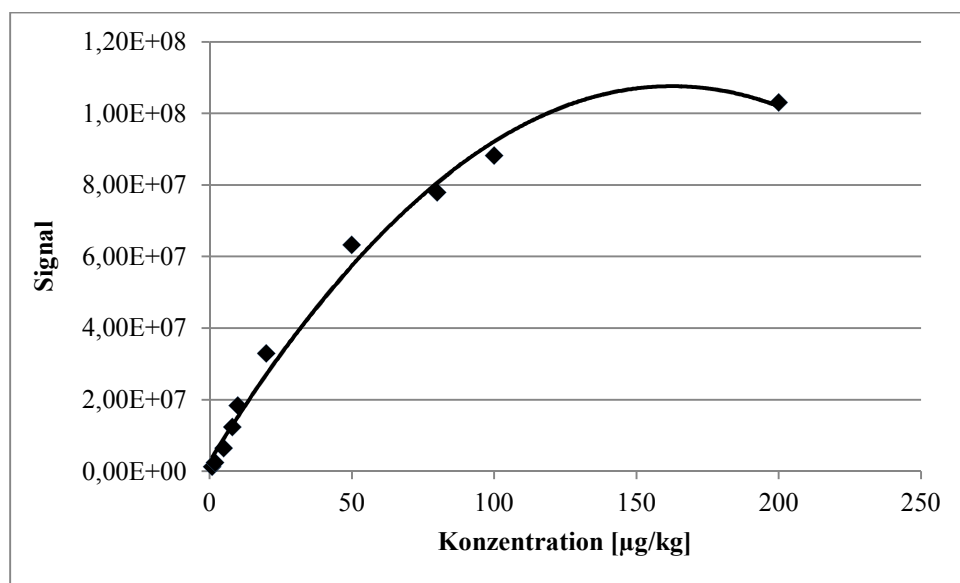


Abbildung 23: Kalibrationsgerade von Pyridoxin

Bei Biotin wiederum zeigte sich ein anderes Bild. Gerade bei der Beurteilung der geringeren Konzentrationen (Werte < 10 µg) war auffällig, dass die Werte sehr breit streuten. Wird die Korrelation erst ab 10 µg/kg ermittelt, ergibt sich als Ergebnis ein Korrelationskoeffizient von 0,9946. Es wird angenommen, dass die Sensitivität für Biotin in diesem Bereich nicht hoch genug ist.

4.1.2 Analyse neu hergestellter Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden nach der Aufstellung in Anlage 7 herstellt. Eine neue Mix-Standardreihe mit den Konzentrationen 10 µg/L und 100 µg/L diente zur Identifizierung der einzelnen Retentionszeiten. Die Einzelstandards der Vitamine wiesen die gleichen Konzentrationen auf. In Abbildung 24 ist das Chromatogramm der fettlöslichen Vitamine mit allen Einzelstandards mit der Konzentration von 100 µg/L dargestellt. Durch diese Abbildung ist gut zu erkennen, zu welcher Zeit welches Vitamin detektiert wurde.

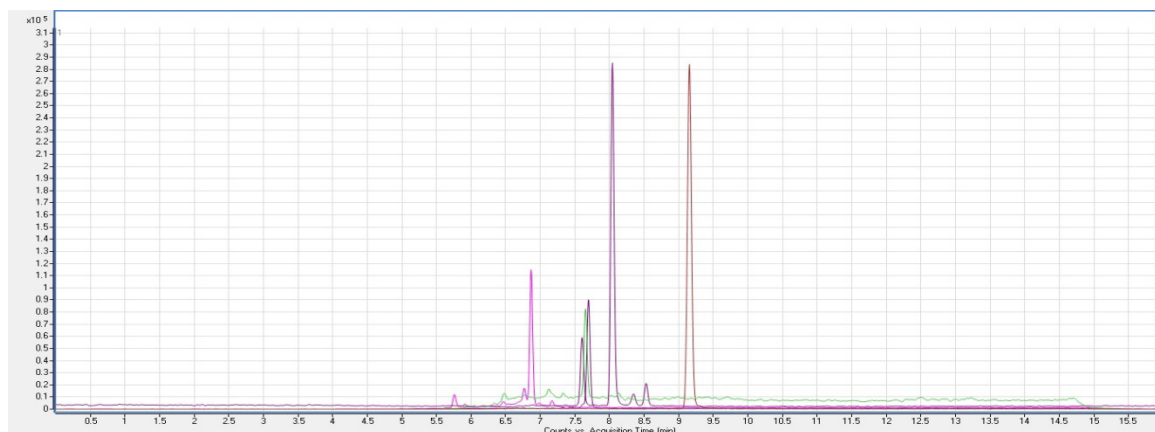


Abbildung 24: Chromatogramm der fettlöslichen Vitamine

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 4 die ermittelten Retentionszeiten im Mix-Standard, im Einzelstandard sowie die Retentionszeit, die in der Methode vorgesehen ist, zusammengefasst.

Tabelle 4: Retentionszeiten [min] im Mix-Standard, Einzelstandard sowie laut Methode

	Mix Std 6.7.	Einzelstandard	laut Methode
Retinol	7,113	6,869	6,868
Ergocalciferol	7,655	7,655	7,637
Cholecalciferol	7,699	7,699	7,681
α -Tocopherol	8,037	8,043	8,013
Phyllochinon	9,154	9,154	9,106
Thiamin	4,356	4,356	4,356
Riboflavin	7,734	7,720	7,761
Nicotinsäure	6,337	6,147	6,323
Nicotinamid	6,217	6,217	6,352
Pantothensäure	6,603	6,603	6,616
Pyridoxin	6,333	6,333	6,320
Pyridoxal	6,282	6,282	6,268
Pyridoxamin	3,753	3,753	3,780
Biotin	7,291	7,291	7,304
Folsäure	6,922	6,908	6,908
Cyanocobalamin	6,759	6,745	6,718

Die drei Retentionszeiten lagen bei allen Vitaminen in einem ähnlichen Bereich. Allerdings ist deutlich zu erkennen, dass sich die einzelnen Retentionszeiten von Retinol sichtbar unterscheiden. Es wird vermutet, dass versehentlich der Mix-Standard mit der alten Stammlösung hergestellt wurde. Bei späteren Messungen wurde im Mix-Standard die gleiche Retentionszeit für Retinol bestimmt, wie sie im Einzelstandard bei diesem Versuch sichtbar war. Ferner lag die Vermutung nahe, dass sich Retinol über die Lagerdauer abgebaut hat und sich deshalb die Retentionszeit verschob. Um diese Theorie zu bestätigen, wurde sowohl ein Mix-Standard aus Retinol und den anderen fettlöslichen Vitaminen als auch ein Einzelstandard von Retinol hergestellt und gemessen. Die Stammlösung, die als Grundlage für den Mix-Standard und den Einzelstandard diente, wurde frisch angefertigt. Weiterhin wurde derselbe Einzelstandard drei Tage später noch einmal vermessen und mit den ersten Daten verglichen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Retentionszeiten von Retinol im Vergleich

	07.07.2017 Mix-Standard	07.07.2017 Einzelstandard	10.07.2017 Einzelstandard
Retentionszeit [min]	7,107	6,868	7,155

Der frisch hergestellte Einzelstandard zeigte am ersten Tag der Messung eine Retentionszeit von 6,868 Minuten. Bei der erneuten Messung nach drei Tagen ergab sich für denselben Einzelstandard eine Retentionszeit von 7,155 Minuten. Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass sich der Einzelstandard von Retinol schon innerhalb von drei Tagen verändert. Der gemessene Standard hatte dabei eine Konzentration von 100 µg/L. Zur Überprüfung, ob es sich bei der Retentionszeit von 6,868 Minuten wirklich um den Peak von Retinol handelte, wurden die Übergänge der Fragment-Ionen betrachtet. Die Übergänge bestätigten, dass es sich bei dem Peak um den von Retinol handelte. Zusätzlich ist in § 35 LMBG L49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) ebenso dargestellt, dass Stammlösungen von Retinylpalmitat mit einer Konzentration von 50 µg/mL frisch am Versuchstag hergestellt werden muss.

Durch die Software Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator konnten die Übergänge der Fragment-Ionen und deren Verhältnisse deutlich bestimmt werden. Bei der Auswertung der Einzelstandards der Vitamine fiel auf, dass die Nicotinsäure keine eindeutigen Übergänge zeigte. Durch eine Fehleranalyse stellte sich heraus, dass es sich um einen Verdünnungsfehler handelte. Deshalb wichen die Retentionszeit im Einzelstandard von den Zeiten der Methode und des Mix-Standards ab. Dieser wurde korrigiert und die Übergänge der Fragment-Ionen wurden eindeutig bestimmt.

Bei der Auswertung der Tabelle 4 ist gut sichtbar, dass Ergocalciferol und Cholecalciferol eine ähnliche Retentionszeit haben. Dennoch war die Selektivität so gut, sodass die Differenzierung zwischen Ergocalciferol und Cholecalciferol möglich war. Ähnliches zeigte sich bei Nicotinamid und Nicotinsäure.

Als Resultat dieses Vorversuches zeigte sich, dass die Stammlösung für Retinol immer am Versuchstag frisch hergestellt werden muss, um so eine korrekte Retentionszeit und Übergänge der Fragment-Ionen zu erhalten. Zusätzlich wurde für jedes Vitamin die Retentionszeit dokumentiert.

4.2 Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1

Nachdem sich die einzelnen Methoden bewiesen haben, stellte sich eine Routine und Standardisierung im Versuchsablauf ein. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben, wobei als Probenmaterial Tierfutter diente.

Die Darstellung der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 erfolgt getrennt voneinander nach wasser- und fettlöslichen Vitaminen in den folgenden Abschnitten.

Für die Bestimmung der Vitamine waren unterschiedliche Verdünnungen der Probe nötig, da der Gehalt zwischen den einzelnen Vitaminen zum Teil stark schwankte. Beispielsweise war für die Auswertung von α -Tocopherol mindestens eine 1:100 Verdünnung nötig. Auf der anderen Seite wurden die D-Vitamine Ergocalciferol und Cholecalciferol unverdünnt gemessen. Zur Quantifizierung wurden die einzelnen Chromatogramme jeder Verdünnung herangezogen. So fand ein Ausschluss der Werte statt, bei denen das Detektorlimit erreicht wurde. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Verdünnungen, die zur korrekten Quantifizierung der Vitamine nötig waren. Dabei diente sie lediglich als Orientierung und bezieht sich nur auf das im Hauptversuch verwendete Tierfutter.

Tabelle 6: Übersicht der nötigen Verdünnungen der Hauptversuchsreihe Nr. 1

	ohne Verdünnung	1:10	1:100	1:500	1:1000
Retinol			X	X	X
Ergocalciferol	X	X	X		
Cholecalciferol	X	X	X		
α -Tocopherol			X	X	X
Phyllochinon	X	X	X		
Thiamin			X	X	X
Riboflavin			X	X	X
Nicotinamid			X	X	X
Nicotinsäure	X	X			
Pantothensäure			X	X	X
Pyridoxal	X	X	X	X	X
Pyridoxamin	X	X	X	X	X
Pyridoxin			X	X	X
Biotin	X	X			
Folsäure	X	X	X	X	X
Cyanocobalamin	X	X			

Ein X markiert die Verdünnung, die bei dem jeweiligen Vitamin zur korrekten Quantifizierung genutzt wurde. Eine 1:10 Verdünnung bedeutet in diesem Fall, dass auf einen Teil der Probe neun Teile Methanol kommen. Alle Verdünnungen wurden stets mit Methanol vorgenommen.

4.2.1 Ergebnisse der Analyse von fettlöslichen Vitaminen

In Anlage 10 und Anlage 11 sind die Ergebnisse der Vitamine für die einzelnen Proben an verschiedenen Versuchstagen aufgelistet. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte, die für die einzelnen Vitamine nachgewiesen wurden.

Tabelle 7 zeigt zusammengefasst die relativen Standardabweichungen der fettlöslichen Vitamine sowie die Wiederfindungsrate bei Retinol und α -Tocopherol.

Tabelle 7: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindung der fettlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 1

	Retinol	Ergocalciferol	Cholecalciferol	α -Tocopherol	Phyllochinon
rel. STD	31,2 %	31,2 %	23,3 %	15,8 %	7,2 %
WDF	96,9 %			69,0 %	

In Tabelle 7 ist deutlich zu sehen, dass bei Retinol die relative Standardabweichung über der im Vorfeld festgelegten relativen Standardabweichung von 20 % lag. Die ermittelte Wiederfindung war mit 96,9 % sehr gut.

Bei α -Tocopherol zeigte sich ein etwas anderes Bild. Die relative Standardabweichung lag unter den geforderten 20 %. Die Wiederfindung war mit rund 70 % nicht so gut, wie bei Retinol, befand sich aber noch im vorgegebenen Bereich. Auffallend war auch die Tatsache, dass die Werte für α -Tocopherol im Laufe der verschiedenen Aufarbeitungen scheinbar geringer wurden. Bei der Berücksichtigung der jeweiligen Signale der Mix-Standards an den verschiedenen Versuchstagen, zeigt sich, dass sich die Signale erhöhen. Dadurch wird in der Probe scheinbar ein geringerer Vitamingehalt ermittelt.

In Anlage 11 sind sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen für Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon dargestellt. Es handelt sich dabei nur um die Werte von der Aufarbeitung vom 22.06.2017, da die Werte aus vorherigen Messungen nicht plausibel schienen. Die Verdünnungen waren zu hoch und deshalb war eine Quantifizierung schwierig. Des Weiteren wurden die Proben nicht in Methanol verdünnt. Durch die Messung der unverdünnten Probe konnten eventuell auftretende Verdünnungsfehler ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die ermittelten Werte als richtig angesehen.

Bei dem Referenzmaterial lagen keine Werte für die D-Vitamine oder für Phyllochinon vor, sodass die Wiederfindung der Vitamine nicht ermittelt werden konnte.

Bei der Auswertung von Tabelle 7 fällt auf, dass keine absolute Aussage über die Reproduzierbarkeit der Basismethode für die Bestimmung von fettlöslichen Vitaminen getroffen werden kann. Die Anzahl der Aufarbeitungen bzw. Messungen war dafür zu gering. Für eine aussagekräftige Analyse sind weitere Versuche nötig. Phyllochinon und α -Tocopherol zeigten eine gute relative Standardabweichung. Retinol hingegen zeichnete sich durch eine sehr gute Wiederfindung aus.

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Basismethode für die Bestimmung von fettlöslichen Vitaminen treffen zu können, wurde eine zweite Hauptversuchsreihe durchgeführt, die in Abschnitt 4.3 näher erläutert und ausgewertet wird.

4.2.2 Ergebnisse der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen

Dieser Abschnitt der Arbeit dokumentiert die Ergebnisse der ersten Hauptversuchsreihe in Bezug auf die wasserlöslichen Vitamine.

In Anlage 12 sind die Ergebnisse für die Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen in Tierfutter aufgelistet. Dabei sind die nach Grubbs getesteten Ausreißer grau hinterlegt und werden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Als Zusammenfassung für die Analyse der wasserlöslichen Vitamine in Tierfutter soll die Tabelle 8 dienen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der wasserlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 1

	rel. STD	WDF
Thiamin	8,6 %	88,6 %
Riboflavin	18,9 %	271,1 %
Nicotinsäure	29,5 %	
Nicotinamid	26,0 %	
Pantothensäure	11,5 %	
Pyridoxin	15,4 %	169,9 %
Pyridoxal	11,6 %	
Pyridoxamin	44,0 %	
Biotin	23,9 %	28,0 %
Folsäure	59,7 %	
Cyanocobalamin	7,7 %	6,7 %

Bei der Auswertung der Tabelle ist deutlich zu erkennen, dass bei den Vitaminen Thiamin, Riboflavin, Pantothensäure, Pyridoxin, Pyridoxal und Cyanocobalamin eine gute Standardabweichung erreicht wurde. Die Werte lagen bei diesen Vitaminen unter der geforderten relativen Standardabweichung von 20 %. Zu diesem Zeitpunkt stellte sich eine gewisse Routine ein, die sich positiv auf die Reproduzierbarkeit auswirkte.

Auf der anderen Seite konnte bei den Vitaminen Nicotinamid, Nicotinsäure, Pyridoxamin, Biotin und Folsäure die relative Standardabweichung nicht unter dem geforderten Wert ermittelt werden. Zunächst lag die Vermutung nahe, dass bei der Auswertung die falschen Verdünnungen miteingeschlossen wurden. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Bei den Vitaminen Biotin und Folsäure könnte ein Grund darin liegen, dass die Bestimmungsgrenze von beiden relativ hoch ist.

Thiamin zeigte eine sehr gute Wiederfindung. Es kam nur zu leichten Verlusten während der Aufarbeitung. Der Grund dafür wird in der späteren Diskussion aufgegriffen.

Im Gegensatz dazu war die Wiederfindung bei Riboflavin und bei den B₆-Vitaminen sehr hoch. Beim Sollwert von B₆ erfolgte keine genaue Aufteilung von Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin. Deshalb war die Identifikation der einzelnen Sollwerte der Vitamine nicht durchführbar. Vermutlich haben sich Pyridoxal und/oder Pyridoxamin in Pyridoxin umgewandelt. Ferner sind Pyridoxal und Pyridoxamin hitzelabil, sodass die im Vergleich zu Pyridoxin geringere Menge der beiden verständlich ist.

Die Wiederfindung von Cyanocobalamin in der Probe war im Vergleich zu den anderen Vitaminen am geringsten. Obwohl es bei B₁₂ nur zu einer minimalen Streuung der Werte kam, wurde nur ein geringer Anteil des Vitamins in der Probe wiedergefunden. Auch Biotin zeigte nur eine ungenügende Wiederfindung.

Die hohe relative Standardabweichung von Folsäure kam durch die hohen Schwankungen zwischen den einzelnen Werten der Aufarbeitung zustande. Die Proben, die an einem Tag aufgearbeitet wurden, wiesen eine geringe Streuung auf. Diese Besonderheit war ebenfalls bei Pyridoxamin, Nicotinsäure und Nicotinamid zu beobachten. Anders ausgedrückt: bei der Betrachtung von einem Versuchstag waren die Ergebnisse präzise, weil die Streuung gering war, und scheinbar richtig, da keine Sollwerte bekannt waren. Gehen jedoch alle Werte mit in die Auswertung mit ein, waren sie weder präzise noch richtig. Der Grund dafür könnte ein systematischer Fehler sein.

Zusammenfassend ist die Multimethode zur Bestimmung von fett- und wasserlöslichen Vitaminen für Tierfutterproben anwendbar. Zum Teil wurden sehr gute Standardabweichungen und Wiederfindungen analysiert.

Zur weiteren Überprüfung der Robustheit und Reproduzierbarkeit wurde eine zweite Hauptversuchsreihe durchgeführt, die im folgenden Kapitel dokumentiert und ausgewertet wird.

4.3 Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2

In dieser Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Referenzmaterialien aufgearbeitet, bei denen die Sollwerte für verschiedene Vitamine bekannt waren. Bei dem Probenmaterial, das für die Analyse von fettlöslichen Vitaminen genutzt wurde, handelte es sich um Säuglingsnahrung (infant formula). Anders als unter Punkt 3.2.1 beschrieben, betrug die Einwaage dieser Probe nur 2,5 g aufgrund der geringeren Menge des Referenzmaterials. Am Schluss der Probenaufarbeitung wurde die Probe in 2,5 mL Methanol aufgenommen. Frühstückscerealien (breakfast cereal) dienten zur Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen.

Wie schon bei der Durchführung der Hauptversuchsreihe Nr. 1 war es zur korrekten Quantifizierung der Vitamine nötig, die Proben zu verdünnen. Eine Übersicht zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Übersicht der nötigen Verdünnungen der Hauptversuchsreihe Nr. 2

	ohne Verdünnung	1:10	1:100	1:1000
Retinol	X	X		
Ergocalciferol	X			
Cholecalciferol	X			
α -Tocopherol			X	X
Phyllochinon	X			
Thiamin		X	X	
Riboflavin	X	X		
Nicotinamid			X	X
Nicotinsäure	X			
Pantothensäure	X			
Pyridoxal	X			
Pyridoxamin	X			
Pyridoxin		X		
Biotin	X			
Folsäure	X			
Cyanocobalamin	X			

Auffällig bei dieser Aufstellung ist die Tatsache, dass eine Verdünnung der Probe für die Quantifizierung bei den meisten Vitaminen nicht nötig war. Dadurch wurden mögliche Verdünnungsfehler direkt ausgeschlossen.

Zunächst folgt im Kapitel 4.3.1 die Dokumentation der Untersuchungsergebnisse der fettlöslichen Vitamine. Anschließend folgt die Auswertung des Referenzmaterials, das für die wasserlöslichen Vitamine genutzt wurde.

4.3.1 Ergebnisse der Analyse von fettlöslichen Vitaminen

Die Ergebnisse zur Bestimmung der fettlöslichen Vitamine in Säuglingsnahrung ist in Anlage 13 vollständig dargestellt. Die ermittelten Ausreißer sind grau hinterlegt und gehen nicht in die Berechnung der Standardabweichungen mit ein. Eine zusammengefasste Übersicht der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen liefert die Tabelle 10.

Tabelle 10: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der fettlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 2

	Retinol	Ergocalciferol	Cholecalciferol	α -Tocopherol	Phyllochinon
rel. STD	13,8 %	60,4 %	69,5 %	35,3 %	42,1 %
WDF	102,0 %		29,2 %	84,5 %	

Tabelle 10 zeigt ein zweigeteiltes Bild. Auf der einen Seite lieferten die Untersuchungen des Referenzmaterials sehr gute Ergebnisse für die Vitamine Retinol und α -Tocopherol. Auf der anderen Seite gibt es noch Optimierungsbedarf bei den Vitaminen Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon.

Die Bestimmung von Retinol im Referenzmaterial brachte sehr gute Ergebnisse hervor. Die Streuung der einzelnen Werte war sehr gering. Die Wiederfindung befand ebenso in einem sehr guten Bereich. Für die Bestimmung von Retinol ist die Multimethode sowohl richtig als auch präzise. Mit einer relativen Standardabweichung von 13,8 % lag sie unter den geforderten 20 %. Zusätzlich befand sich die Wiederfindung mit 102,0 % im optimalen Bereich von 70 % bis 130 %. Ein Grund für diese positiven Ergebnisse ist die Tatsache, dass sich bei der Multimethode an § 35 LMBG L 49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) orientiert wurde.

Auch die Bestimmung von α -Tocopherol zeigte gute Resultate. Die relative Standardabweichung lag bei 35,3 % und war damit etwas höher als die im Vorfeld festgelegten 20 %. Allerdings wird deutlich, dass die Bestimmung von α -Tocopherol richtige Werte erzielt. Nach Meyer (2006) ist

die Richtigkeit wichtiger als die Präzision einer Methode. Daher wird trotz der relativ großen Streuung der Werte die Multimethode auch für α -Tocopherol als praktikabel angesehen.

Bei den Vitaminen Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon bewegten die relativen Standardabweichungen in einem relativ hohen Bereich. Cholecalciferol zeigte mit 69,5 % die größte Streuung von allen Werten und auch die Wiederfindung lag nur bei knapp 30 %. Mit 60,4 % war die Streuung der Werte bei Ergocalciferol fast so hoch wie bei Cholecalciferol. Für die relative Standardabweichung von Phyllochinon ergab sich ein Wert von 42,1 %, der damit mehr als doppelt so hoch wie die geforderte relative Standardabweichung war.

Damit kein Peak mit falscher Retentionszeit im Chromatogramm für die Auswertung von Ergocalciferol herangezogen wurde, fand eine Dotierung der Probe mit D₂ und erneute Auswertung des Chromatogramms statt. Es fiel auf, dass sich das Signal an der für Ergocalciferol registrierten Retentionszeit erhöhte. Bei der Quantifizierung von D₂ kam es folglich zu keinem Fehler in der Auswertung. Die Konzentration von Ergocalciferol war in der Probe so gering bzw. nicht nachweisbar, sodass eine eindeutige Quantifizierung nur schwer möglich war.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass für Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon weiterer Optimierungsbedarf besteht.

4.3.2 Ergebnisse der Analyse von wasserlöslichen Vitaminen

Dieser Abschnitt dient zur Dokumentation der Ergebnisse, die durch die Analyse von wasserlöslichen Vitaminen in Frühstückscerealien erfasst wurden. Die dazugehörigen Daten sind in der Anlage 14 dargestellt. Bei diesem Hauptversuch zeigte sich, dass eine Verdünnung der dritten Probe am letzten Versuchstag nicht möglich war. Durch die Verdünnung Probe in Methanol bildeten sich Schwebstoffe. Deshalb konnte für diese Probe bei den Vitaminen Thiamin, Nicotinamid und Pyridoxin keine Quantifizierung stattfinden.

In Tabelle 11 sind die relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der einzelnen, wasserlöslichen Vitamine zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der wasserlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 2

	rel. STD	WDF
Thiamin	9,4 %	114,2 %
Riboflavin	7,9 %	45,3 %
Nicotinsäure	5,1 %	88,0 %
Nicotinamid	3,6 %	
Pantothensäure	10,7 %	
Pyridoxin	28,0 %	90,0 %
Pyridoxal	12,9 %	
Pyridoxamin	15,0 %	
Biotin	62,0 %	
Folsäure	33,7 %	25,3 %
Cyanocobalamin	58,9 %	61,8 %

Diese Auswertung macht deutlich, dass die Streuung bei den meisten Vitaminen sehr gering ausfällt.

Bei den Vitaminen Thiamin, Riboflavin, Nicotinamid, Nicotinsäure und Pantothensäure zeigten sich im Vergleich zur Hauptversuchsreihe Nr. 1 verbesserte relative Standardabweichungen. Die geringste Streuung wurde bei Nicotinamid mit 3,6 % registriert. Eine ähnlich geringe Streuung wies Nicotinsäure (5,1 %) auf. Für die beiden B₃-Vitamine war ein gesamter Sollwert bekannt, sodass sich die Wiederfindung auf Niacin bezog. Sie lag mit 88,0 % in einem sehr guten Bereich.

Bei Thiamin lagen die relative Standardabweichung bei 9,4 % und die Wiederfindung bei 114,2 %. Dieses Ergebnis stellte deutlich dar, dass die Methode reproduzierbare und richtige Werte lieferte. Auffällig war die erhöhte Wiederfindung, die sich aber im vorgegebenen Rahmen von 70 % bis 130 % bewegte.

Die Streuung von Riboflavin war sehr gering (7,9 %) und deutete damit auf eine präzise Methode hin. Es muss allerdings noch eine Optimierung der Wiederfindung stattfinden. Mit einem Wert von 45,3 % fiel sie zu gering aus.

Die Vitamine Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin zeigten eine etwas höhere Streuung, aber auch sie befanden sich noch unter 20 %. Bei diesen Vitaminen waren keine Sollwerte angege-

ben. Aufgrund der geringen Standardabweichungen sind die ermittelten Werte als richtig zu beurteilen. Sie sollten jedoch mit Dotierungsversuchen bestätigt werden.

Bei Folsäure trat erneut die Besonderheit auf, dass die Streuung an den einzelnen Versuchstagen gering war. Wurden allerdings alle Versuche mit in die Auswertung einbezogen, so ergab sich eine relative Standardabweichung von 33,7 %. Die Wiederfindung von Folsäure war in den untersuchten Proben relativ gering und lag bei 25,3 %. Dieser Punkt wird in der Diskussion unter Kapitel 5 nochmals aufgegriffen.

Sowohl bei Biotin als auch bei Cyanocobalamin zeigte sich eine relative Standardabweichung von ca. 60 %. Gerade bei Cyanocobalamin war die korrekte Quantifizierung aufgrund der geringen Intensität der Peaks im Chromatogramm schwierig. Trotzdem lieferten die Messungen eine relativ gute Wiederfindung von 61,8 %. Bei Biotin war kein Sollwert bekannt, sodass keine Bewertung der Richtigkeit erfolgen konnte.

Die Hauptversuchsreihe Nr. 2 hat gezeigt, dass die Multimethode für die fettlöslichen Vitamine in einer Matrix wie Säuglingsnahrung für Retinol und α -Tocopherol sehr gute Ergebnisse lieferte. Bei der Methode zur Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen in Frühstückscerealien zeigten sich sehr gute bis gute Resultate. Eine Ausnahme davon bildeten jedoch die Vitamine Biotin und Cyanocobalamin.

4.4 Probleme bei der Probenaufbereitung

Während der Probenaufbereitung ergaben sich themenbezogene Probleme, deren Erläuterung in diesem Abschnitt folgen.

Das erste Problem zeigte sich bei der Probenaufbereitung der fettlöslichen Vitamine. Besitzt die Probe einen unlöslichen Feststoffanteil, verstopft der Scheidetrichter, der bei der Extraktion eingesetzt wird. In den Versuchen wurde dieses Problem durch die Verwendung von Faltenfiltern gelöst. Aus der Filterung ergab sich ein erneutes Problem. Die Gewinnung des Filtrats erwies sich als sehr zeitaufwendig, da die Proben zur Trennung mittels Schwerkraft durch den Filter gedrückt wurden. Dabei sorgte der entstandene Filterkuchen teilweise für einen Widerstand, sodass die noch ungefilterte, restliche Probe schwerer durch den Filter drang. Um die Zeit effektiver zu nutzen, wurde die Dauer der Abkühlung nach der Hydrolyse verkürzt und die Probe stattdessen filtriert. Während des Filtrervorganges kam es zur Abkühlung der Probe, sodass eine direkte Überführung in den Scheidetrichter und die Extraktion der Probe erfolgte.

Bei der Aufarbeitung zur Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen wurde vor der Zugabe der Enzyme Natriumacetat in die Mischung gegeben. Die Enzyme können in dem sauren Milieu, wie

es nach der Hydrolyse in der Probe herrscht, nicht optimal arbeiten. Deshalb ist eine Erhöhung des pH-Wertes auf ca. 4,2 durch den Zusatz von Natriumacetat nötig. Allerdings war dies nicht bei jeder Probe notwendig. Vor der Zugabe erfolgte die Messung des pH-Wertes, um eventuell den optimalen pH-Wert mithilfe von Natriumacetat einzustellen zu können. Dabei war das genaue Protokollieren der Menge an Natriumacetat für die spätere Auswertung erforderlich.

Ein weiteres Problem zeigte sich beim Neutralwaschen der vereinigten Hexanextrakte. Für eine Analyse ist es optimal, wenn die Probe nicht im alkalischen Bereich liegt. Deshalb muss die Natronlauge aus der Probe herausgewaschen werden. Allerdings erforderte es teilweise sechs bis sieben Durchgänge. Dadurch stellte sich dieser Schritt bei vielen Proben als sehr zeitaufwendig heraus.

5 Diskussion

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse interpretiert und analysiert werden.

Die Anwendung einer Multimethode zur Bestimmung von wasser- und fettlöslichen Vitaminen brachte vorzeigbare Resultate. Durch die Basismethoden war es möglich verschiedene Vitamine zu bestimmen. Allerdings zeigten sich je nach Matrix unterschiedliche Ergebnisse.

Lebensmittel sind komplexe Matrices. Es muss deshalb für jede neue Probe, die andere Eigenschaften aufweist als die bereits getesteten Proben, eine Überprüfung stattfinden, ob die Multimethode auch hier Anwendung finden kann (Wacker, 2010).

Wie schon von Wacker (2012) bestätigt, gelingt die selektive Bestimmung von α -Tocopherol mittels HPLC sehr gut. In Tierfutterproben wurden die Vitamine A, α -Tocopherol, K₁ sowie alle wasserlösliche Vitamine mit Ausnahme von Folsäure reproduzierbar nachgewiesen. Es ist unklar, warum in Ergocalciferol, Cholecalciferol und Folsäure keine richtigen Werte ermittelt wurden. Hier besteht auf jeden Fall weiterer Forschungsbedarf.

Die Bestimmung von wasserlöslichen Vitaminen in Frühstückscerealien war sehr gut, auch wenn es noch Optimierungsbedarf in Bezug auf die Bestimmung von Biotin und Cyanocobalamin gibt. Die Fachliteratur bestätigt, dass die Signalintensitäten der wasserlöslichen Vitamine mit der Elektrospray-Ionisation im Vergleich zur Atmosphärendruck-Chemische Ionisation (APCI) deutlich stärker ausfallen (Down, 2005). Eine Änderung der Ionisationsmethode ist demzufolge nicht erforderlich.

Des Weiteren eignet sich die Multimethode für die Analyse von fettlöslichen Vitaminen in Säuglingsnahrung. Allerdings ist eine weitere Prüfung zur Bestimmung von Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon sinnvoll.

Im Vorversuch wurde bereits gezeigt, dass sich der verwendete Retinol-Standard innerhalb von drei Tagen verändert und eine korrekte Quantifizierung des Einzelstandards nicht mehr möglich war. In § 35 LMBG: L49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln). Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) sind die Stabilitäten der Stammlösungen von Vitamin A-Palmitat und für Vitamin A-Alkohol beschrieben. Umso höher die Konzentration der Stammlösung ist, umso länger ist sie stabil. Schon bei einer Konzentration von 50 µg/mL muss sie laut § 35 LMBG frisch am Versuchstag hergestellt werden. Die im Versuch gemessene Stammlösung hatte eine Konzentration von 0,1 µg/mL und war weniger als drei Tage stabil. Die Angaben in der Vorschrift wurden bestätigt.

In den entsprechenden DIN Vorschriften sind die Stabilitäten von verschiedenen Stammlösungen dargestellt. Für nachfolgende Arbeiten wären Untersuchungen denkbar, die aufzeigen inwieweit sich die Standards im Mix über die Zeit verändern, um so den Zeitpunkt zur Herstellung von frischen Standards zu definieren.

Beim Vergleich der Hauptversuchsreihe Nr. 1 und Nr. 2 fällt auf, dass die Wiederfindung von Thiamin und Riboflavin zwischen den verschiedenen Matrices sehr schwankt. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Wiederfindung von der jeweiligen Matrix abhängig ist. Die Bestätigung oder Widerlegung dieser Theorie lässt sich durch weitere Untersuchungen in Erfahrung bringen. Die Verluste von Thiamin in der Hauptversuchsreihe Nr. 1 kann durch die Oxidationsanfälligkeit von Vitamin B₁ erklärt werden. Allerdings zeigt sich in der Hauptversuchsreihe Nr. 2 ein anderes Bild und Thiamin weist keinerlei Verluste während der Aufarbeitung auf. Deswegen sind weitere Analysen nötig, inwieweit die Matrix tatsächlich einen Einfluss auf die Wiederfindung hat.

Weitere Untersuchungen müssen der Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dienen. Zusätzlich ist es ratsam eine Dotierung der Probe vorzunehmen, um die Wiederfindung und eventuelle Abweichungen analysieren und interpretieren zu können. Bei der Verwendung der gleichen Referenzmaterialien wie bei der Hauptversuchsreihe Nr. 2 sollte der Fokus besonders auf den Vitaminen Ergocalciferol und Cholecalciferol sowie Biotin und Cyanocobalamin liegen. Zur Bestätigung der Richtigkeit der Methoden ist eine Verringerung der relativen Standardabweichungen bei diesen Vitaminen nötig. Bei weiteren Versuchen ist durch die Änderung der stationären Phase eine bessere Trennung möglich.

Zudem muss bei weiteren Untersuchungen eine Optimierung der Extraktion erfolgen. Es stellt sich die Frage, ob der dreifache Einsatz von frischem Lösungsmittel wirklich notwendig für eine vollständige Extraktion der Vitamine ist. Bei einer Aufarbeitung fand eine einfache Extraktion der Probe statt und die erzielten Resultate waren mit anderen Aufarbeitungen vergleichbar. Eine einmalige Extraktion würde nicht nur Zeit sparen, sondern auch Lösungsmittel. Damit sinken letztendlich die Kosten für die Extraktion.

Weiterhin sollte der Vorgang des Neutralwaschens der Proben nach der Extraktion verkürzt werden. In § 35 LMBG L49.00, 3 (Untersuchung von Lebensmitteln) Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln (Mai 1985) wird für diesen Vorgang 100 mL destilliertes Wasser benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Wasservolumens auf die Anzahl der Wiederholungen des Neutralwaschens nicht geprüft. Untersuchungen auf diesem Gebiet könnten die Basismethode für die Bestimmung von fettlöslichen Vitaminen weiter optimieren.

Zur Bewertung der Wiederholpräzision wird die Wiederholgrenze benutzt. Sie ist für die jeweiligen Vitamine in der entsprechenden DIN Vorschrift angegeben. Für Retinol beispielsweise ist für Milchpulver eine Wiederholpräzision von 0,117 mg/100 g angegeben. Diese Matrix ist nur teilweise mit der untersuchten Säuglingsnahrung zu vergleichen, dennoch zeigt sich bei der Säuglingsnahrung eine Wiederholpräzision von 0,002 mg/100 g.

Aufgrund einer Kundenanfrage wurden bereits Proben mit unbekannter Konzentration an Retinol analysiert. Bei den Proben handelte es sich um verschiedene Nüsse mit Schokoladenüberzug. Diese noch unbekannte Matrix für die Vitaminanalyse brachte Schwierigkeiten durch den hohen Fettgehalt. Während der Verseifung wurden die Triglyceride nicht vollständig gespalten und es kam zu einer Verschleppung, die sich bis zum letzten Schritt der Einengung der Probe hindurch zog. Deswegen stellt sich die Frage, ob es bei fettreichen Lebensmitteln genügt, wenn die Einwäge reduziert wird oder ob eine Verlängerung der Verseifung nötig ist. Hier sollten auf jeden Fall noch weitere Untersuchungen folgen, um mithilfe der Multimethode auch fettreiche Lebensmittel analysieren zu können.

Es fand nur eine begrenzte Anzahl an Aufarbeitungen statt. Deshalb müssen für aussagekräftige Resultate weitere Versuche folgen.

Zusammenfassend ist das Ziel dieser Arbeit erreicht worden. Mit der Anwendung der Multimetoden zur Bestimmung der Vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂ sowie A, D, E und K in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS wurde die Reproduzierbarkeit und Selektivität der Basismethoden nachgewiesen und damit ein positives Ergebnis dieser Bachelorarbeit erreicht. Zur Auswertung der Wiederfindung und damit der Richtigkeit ist die jeweilige Matrix zu beachten.

In diesem Zusammenhang wird für weitere Konkretisierung sowie Aussagefähigkeit empfohlen, eine größere Anzahl von analytischen Untersuchungen durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Für die Analyse von Vitaminen gibt es derzeit noch keine Multimethode. Allerdings wurden bei der bilacon GmbH Basismethoden entwickelt, die gleichzeitig mehrere Vitamine in die Untersuchung einschließen. Dabei sind die Methoden nach fett- und wasserlöslichen Vitaminen getrennt.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Multimethoden zur Bestimmung der Vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂ sowie A, D, E und K in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS zu validieren und zu überprüfen, ob sie robuste Ergebnisse liefern. Dabei war entscheidend, dass die Methoden in verschiedenen Matrices reproduzierbare Ergebnisse liefern und eine selektive Unterscheidung zwischen den einzelnen Vitaminen stattfand.

Die ersten Untersuchungen von Tierfutter und Fischmehl dienten zur Aneignung der Basismethoden. Dabei lagen die Werte bei den ersten Versuchen für die relative Standardabweichung nicht unter den geforderten 20 %. Ebenso wurden Werte für die Wiederfindung berechnet, die weit außerhalb des vorgegebenen Bereiches von 70 % bis 130 % lagen.

Bei der Bestimmung von Vitaminen in Säuglingsnahrung verbesserten sich die Werte der relativen Standardabweichung sowie die der Wiederfindung. Die Untersuchungen der Methoden lieferten reproduzierbare Ergebnisse.

Die Selektivität der Methode wurde anhand der verschiedenen Retentionszeiten der jeweiligen Vitamine sowie der dazugehörigen Übergänge der Fragment-Ionen bestätigt. Zusätzlich ergab die Analyse von frisch hergestellten Stammlösungen, dass im Arbeitsbereich von 1 µg/kg bis 200 µg/kg eine gute Korrelation zwischen Konzentration und gemessenem Signal besteht. Das traf für die Vitamine A, D₂, D₃, α -Tocopherol, K₁, B₂, Nicotinsäure, Pantothersäure, Pyridoxamin, Folsäure und Cyanocobalamin zu. Bei Thiamin, Nicotinamid und Pyridoxal war die Linearität bei Konzentrationen über 100 µg/kg nicht mehr gegeben. Der Verlauf von Pyridoxin war nicht durch eine Gerade, sondern durch eine Kurve beschrieben. Der Nachweis für Linearität für Biotin erfolgte erst ab Werten über 10 µg/kg.

In einem Tierfutter wurden bei den Vitaminen Retinol, α -Tocopherol, Thiamin, Riboflavin, Pantothersäure, Pyridoxal, Pyridoxin und Cyanocobalamin reproduzierbare Ergebnisse hervorgebracht. Allerdings lagen die Wiederfindung nur teilweise im Bereich 70 % bis 130 %.

Weiterhin zeigte sich bei der Aufarbeitung von Referenzmaterial als Resultat, dass für die Vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ und B₇ die Reproduzierbarkeit sowie Richtigkeit der Methode in Frühstückscerealien bestätigt werden konnte.

In einer Säuglingsnahrung wurden mithilfe der Basismethode für die Vitamine Retinol und α -Tocopherol sehr gute Ergebnisse erreicht.

Durch die Untersuchungen wurde gezeigt, dass für die Bestimmung von Vitaminen auch die Matrix entscheidend ist. Zusammenfassend liefert die Multimethode bei den Vitaminen Thiamin, Riboflavin, Pantothersäure, Pyridoxin sowie Pyridoxal sowohl in Tierfutter als auch in Frühstückscerealien reproduzierbare und richtige Ergebnisse. Gleiches gilt für Retinol und α -Tocopherol in Tierfutter und Säuglingsnahrung.

7 Formeln zur Berechnung

mit x_i Einzelwert

\bar{x} Mittelwert

n Anzahl der Messungen

f empirisch ermittelter Zahlenwert, der von dem gewählten Signifikanzniveau und der Verteilung der Werte abhängig (bei Signifikanzniveau $P = 0,95$ und unter Annahme einer Normalverteilung $f = 1,96$)

1. Ermittlung des Mittelwertes MW (Kromidas, 2000)

$$MW = \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2. Ermittlung der Standardabweichung STD (Kromidas, 2000)

$$STD = s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3. Ermittlung der relativen Standardabweichung $rel. STD$ (Kromidas, 2000)

$$rel. STD = \frac{STD}{MW} \cdot 100\%$$

4. Ermittlung der Wiederfindung WDF

$$WDF = \frac{MW}{Sollwert} \cdot 100\%$$

5. Ermittlung der Wiederholgrenze r (Kromidas, 2000)

$$r = f \cdot \sqrt{2s}$$

6. Ermittlung der Korrelation r (Kromidas, 2000)

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}}$$

7. Ermittlung des Volumen für die Dotierung

$$Volumen [\mu L] = \frac{\text{Einwaage [g]} * \text{gewünschte Dotierung } [\frac{\mu g}{kg}]}{\text{Konzentration der Stammlösung } [\frac{mg}{L}]}$$

8. Ermittlung des Prüfwertes Q (Kromidas, 2000)

$$Q = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{s}$$

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Retinol (Sigma Aldrich, 2017).....	5
Abbildung 2: Ergocalciferol (Sigma Aldrich, 2017).....	6
Abbildung 3: Cholecalciferol (Sigma Aldrich, 2017).....	6
Abbildung 4: α -Tocopherol (Sigma Aldrich, 2017).....	6
Abbildung 5: Phyllochinon (Sigma Aldrich, 2017)	7
Abbildung 6: Thiamin-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017)	7
Abbildung 7: Riboflavin (Sigma Aldrich, 2017)	8
Abbildung 8: Nicotinsäure (Sigma Aldrich, 2017)	8
Abbildung 9: Nicotinamid (Sigma Aldrich, 2017).....	8
Abbildung 10: Calcium-Pantothenat (Sigma Aldrich, 2017).....	9
Abbildung 11: Pyridoxamin-Dihydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017).....	9
Abbildung 12: Pyridoxal-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, 2017)	9
Abbildung 13: Pyridoxin (Sigma Aldrich, 2017).....	9
Abbildung 14: Biotin (Sigma Aldrich, 2017).....	10
Abbildung 15: Folsäure (Sigma Aldrich, 2017).....	10
Abbildung 16: Cyanocobalamin (Sigma Aldrich, 2017)	11
Abbildung 17: HPLC-Anlage (Gey, 2015)	12
Abbildung 18: MS/MS schematisch (Gey, 2015)	13
Abbildung 19: Fließschema der Probenaufarbeitung für fettlösliche Vitamine	20
Abbildung 20: Fließschema der Probenaufarbeitung für wasserlösliche Vitamine.....	21
Abbildung 21: Beispiel für die Quantifizierung von Retinol in einer Probe	24
Abbildung 22: Kalibrationsgerade für Retinol.....	24
Abbildung 23: Kalibrationsgerade von Pyridoxin	27
Abbildung 24: Chromatogramm der fettlöslichen Vitamine.....	28
 Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Probematerialien	 18
Tabelle 2: Auflistung der durchgeführten Versuche	23
Tabelle 3: Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten.....	26
Tabelle 4: Retentionszeiten [min] im Mix-Standard, Einzelstandard sowie laut Methode	28
Tabelle 5: Retentionszeiten von Retinol im Vergleich	29
Tabelle 6: Übersicht der nötigen Verdünnungen der Hauptversuchsreihe Nr. 1	31
Tabelle 7: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der fettlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 1	32

Tabelle 8: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der wasserlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 1	33
Tabelle 9: Übersicht der nötigen Verdünnungen der Hauptversuchsreihe Nr. 2	35
Tabelle 10: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der fettlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 2	36
Tabelle 11: Zusammenfassung der relativen Standardabweichungen und Wiederfindungen der wasserlöslichen Vitamine der Hauptversuchsreihe Nr. 2	38

9 Literaturverzeichnis

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: L49.00, 3, (Untersuchung von Lebensmitteln). Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln, Mai 1985.

Bechthold, A: Deutschland ist kein Vitaminmangelland. DGE aus der Wissenschaft 02/2012 vom 17. Juli 2012. <https://www.dge.de/presse/pm/deutschland-ist-kein-vitaminmangelland/> 27.05.2017.

Beyer, Walter, Wittko: Lehrbuch der Organischen Chemie. 24. Aufl. Stuttgart u.a.: Hirzel Verlag, 2004.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Presseinformation: Bunte Pillen für's gute Gewissen – Was bringen Nahrungsergänzungsmittel? DGE aktuell 09/2012 vom 04. Dezember. <https://www.dge.de/presse/pm/bunte-pillen-fuers-gute-gewissen-was-bringen-nahrungsergaenzungsmittel/> 27.05.2017.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN 32645: 2008-11: Chemische Analytik – Nachweis -, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 12821. Bestimmung von Vitamin D mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie . Bestimmung von Cholecalciferol (D₃) oder Ergocalciferol (D₂). Berlin: Beuth, 2009.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 12822. Bestimmung von Vitamin E mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Bestimmung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol. Berlin: Beuth, 2014.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 12823. Bestimmung von Vitamin A in Lebensmitteln mit HPLC. Teil 1: Bestimmung von all-E-Retinol und 13-Z-Retinol. Berlin: Beuth, 2014.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 14122: Lebensmittel - Bestimmung von Vitamin B₁ mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Berlin: Beuth, 2014.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 14131. Mikrobiologische Bestimmung von Folat. Berlin: Beuth, 2003.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 14148. Bestimmung von Vitamin K₁ mit HPLC. Berlin: Beuth, 2003.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 14152: Bestimmung von Vitamin B₂ in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Berlin: Beuth, 2014.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 14663. Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln (einschließlich glycosidisch gebundener Verbindungen) mit HPLC. Berlin: Beuth, 2006.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 15607. Bestimmung von D-Biotin mit HPLC. Berlin: Beuth, 2009.

Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN EN 15652. Bestimmung von Niacin mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Berlin: Beuth, 2009.

Domke, Groflklaus, Niemann, Przyrembel, Richter, Schmidt, Weiflenborn, Wörner, Ziegenhagen (Hrsg.): Verwendung von Vitaminen in Lebensmitteln: Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte. 03/2004. http://www.bfr.bund.de/cm/350/verwendung_von_vitaminen_in_lebensmitteln.pdf. 28.06.2017.

Down, S.: Probing pasta with LC/MS/MS. 23.04.2005. <http://www.separationsnow.com/details/ezone/sepspec747ezone/Probing-pasta-with-LCMSMS.html>. 07.08.2017.

Gey, M.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 3. Aufl. Berlin u.a.: Springer, 2015.

Gross, J.: Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch. 1. Aufl. Berlin u.a.: Springer, 2013.

ISO 20634. Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene. Bestimmung von B₁₂ mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC). Berlin: Beuth, 2015.

ISO 20639. Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene. Bestimmung von Pantothensäure mittels Ultra-Leistungs-Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS). Berlin: Beuth, 2015.

Kromidas (Hrsg.): Handbuch Validierung in der Analytik. 1. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH, 2000.

Löffler, Petrides, Heinrich (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie. 8. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.

Matissek (Hrsg.): High performance liquid chromatography in food control and research. 1. Aufl. Hamburg: Behr, 1992.

Matissek, Baltes: Lebensmittelchemie. 8. Aufl. Berlin u.a.: Springer, 2016.

Meyer, V.: Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. 3. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH, 2006.

Phenomenex: Kinetex® 2,6 µm; 100x2,1 mm. <https://www.phenomenex.com/Kinetex/KinetexOrderNow/c8>. 17.06.2017.

Phenomenex: Synergi™ Polar-RP 4,0 µm; 150x4,6 mm. <http://www.phenomenex.com/Products/Part/00C-4336-B0?culture=de>. 17.06.2017.

Schwedt, Schmidt, Schmitz: Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis. 3. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH, 2016.

Sigma Aldrich: Biotin. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/biotin244315885511?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Calcium Pantothenat. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/calciumpantothenate2382713708611?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Cholecalciferol. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cholecalciferol384646797011?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Cyanocobalamin. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cyanocobalamin1355376819911?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: DL-alpha-Tocopherol. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/47783?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Ergocalciferol. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ergocalciferol396655014611?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Folsäure. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/folicacid441405930311?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Nicotinamid. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/nicotinamidnicotinamide122129892011?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Nicotinsäure. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/niacinnicotinicacid123115967611?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Phyllochinon. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/phyloquinone1450708480011?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Pyridoxal-Hydrochlorid. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/pyridoxalhydrochloride203626522511?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Pyridoxamin-Dihydrochlorid. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/pyridoxaminedihydrochloride2411152436711?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Pyridoxin. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5669?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Retinol. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/retinol286456826811?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Riboflavin. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/riboflavinb2376368388511?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Sigma Aldrich: Thiamin-Hydrochlorid (B₁). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/thiaminehydrochlorideb1337276703811?lang=de®ion=DE>. 11.07.2017.

Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) (idF v. 31.08.2015)

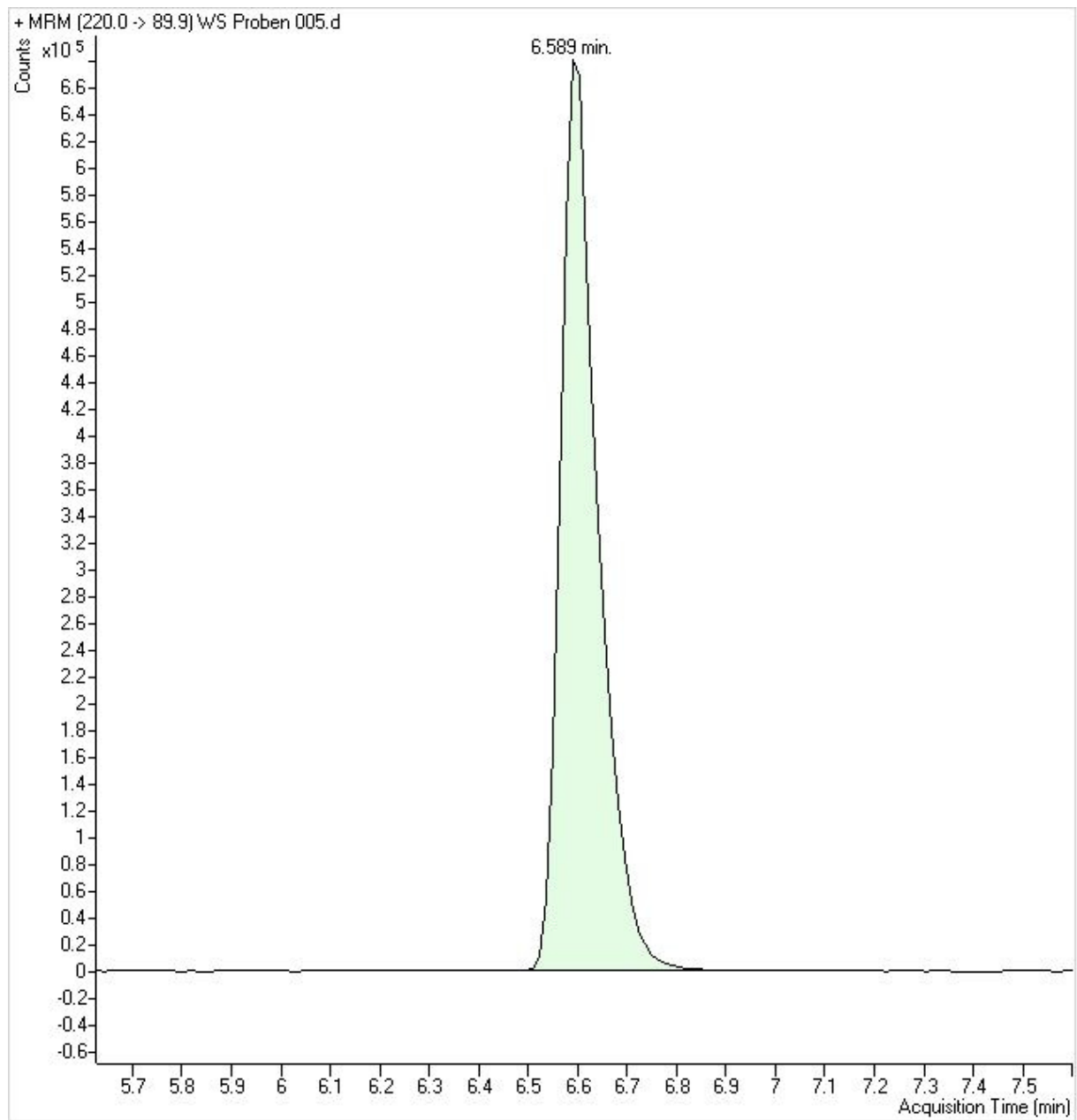
Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel (Nahrungsergänzungsmittelverordnung – NemV) (idF v. 31.08.2015)

Wacker, R.: Analytik von sekundären Pflanzenstoffen I. 07.07.2010. <https://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/biotesys1.pdf>. 07.08.2017.

Wacker, R.: Analytik von sekundären Pflanzenstoffen IV: Vitamin E. 04.07.2012. <https://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/biotesys4.pdf>. 07.08.2017.

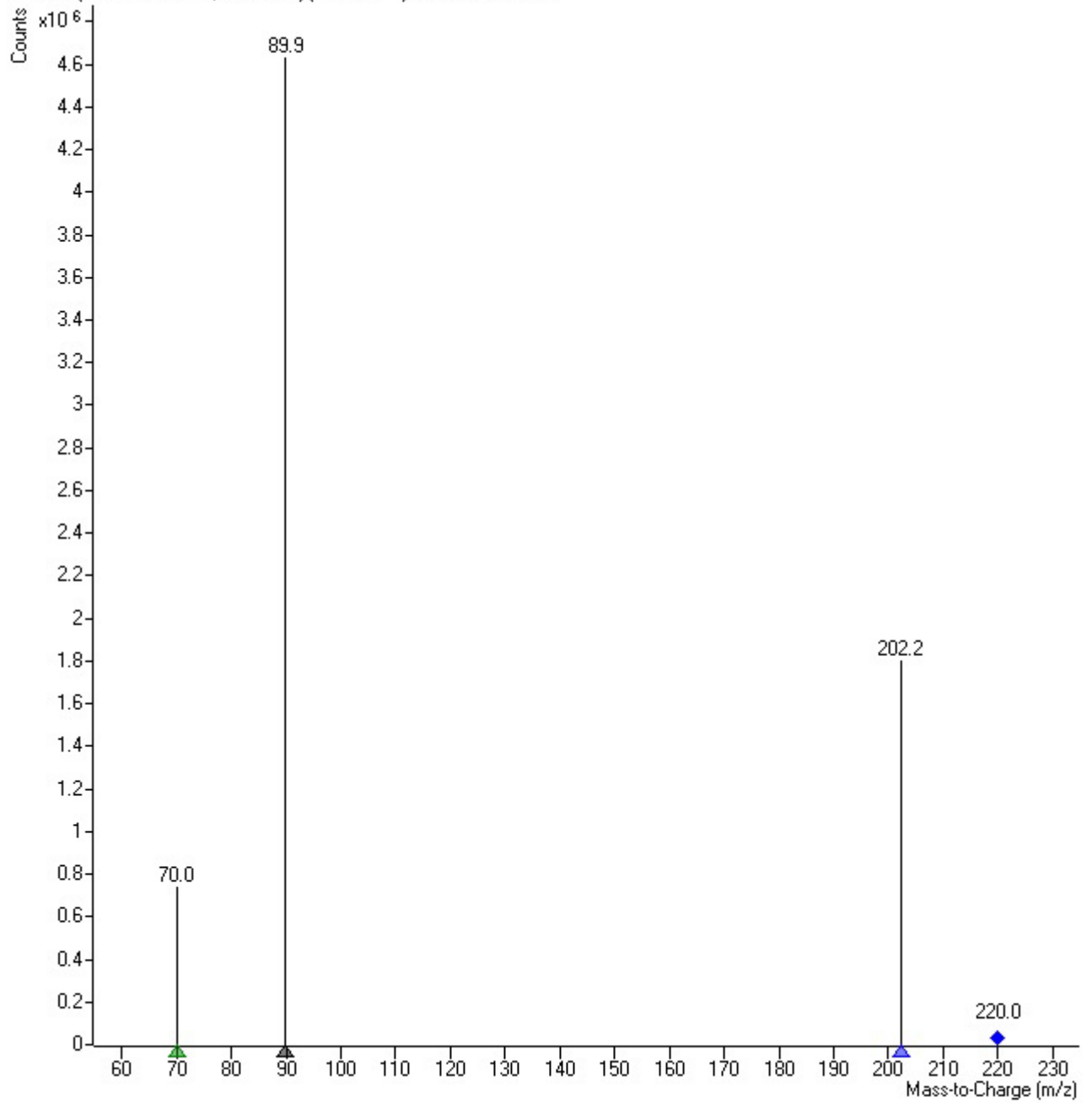
10 Verzeichnis der Anlagen

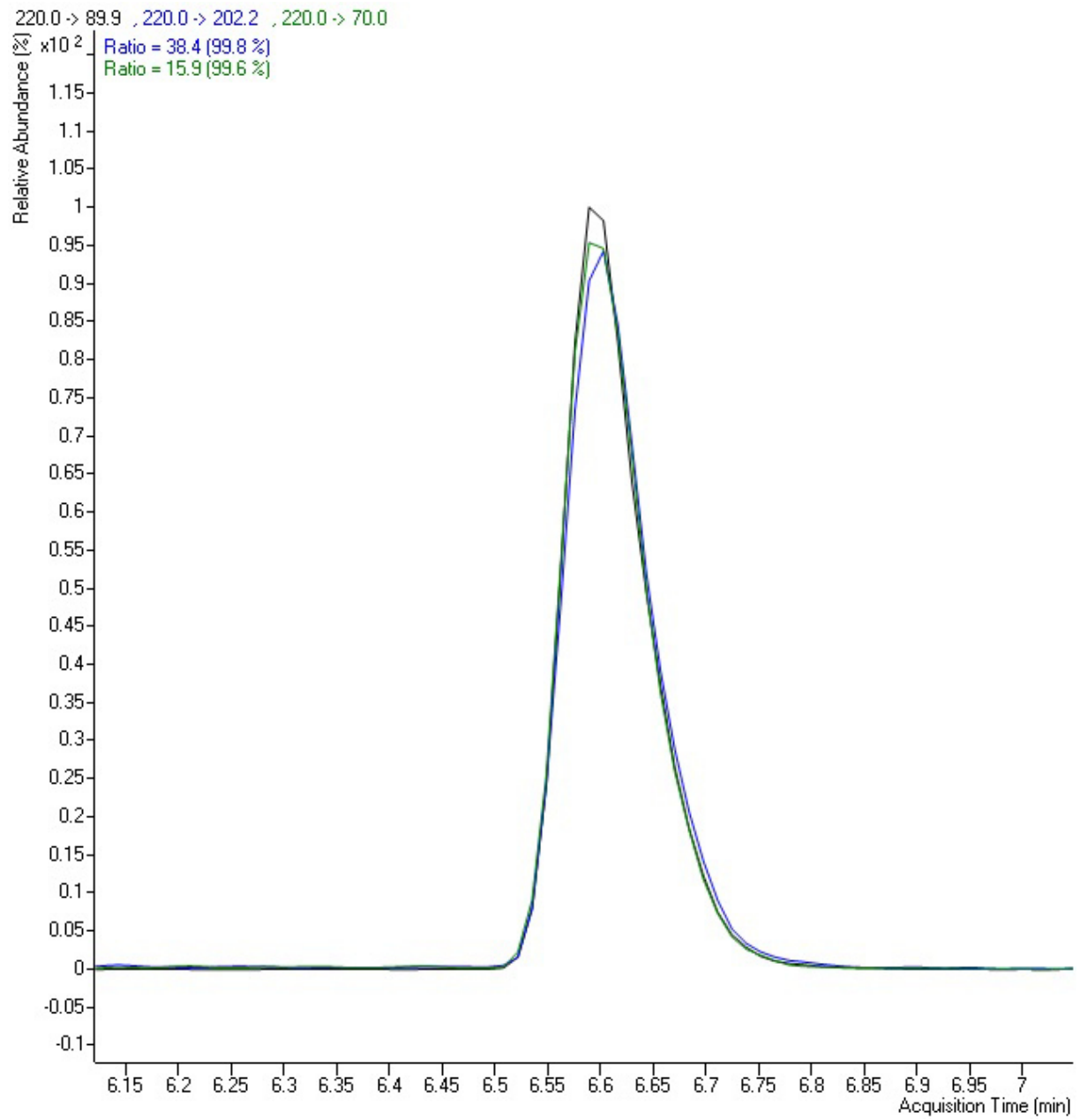
Anlage 1: Quantifizierung von Pantothersäure aus dem Mix-Standard 100 µg/L	55
Anlage 2: Massenspektrum von Pantothersäure aus dem Mix-Standard 100 µg/L	56
Anlage 3: Übergänge der Fragment-Ionen von Pantothersäure aus dem Mix-Standard (100 µg/L)	57
Anlage 4: Volumen für Dotierungen [µL] für die Einwaage von 5 g	58
Anlage 5: verwendete Lösungen	59
Anlage 6: verwendete Vitaminstandards	60
Anlage 7: Übersicht der Vitaminstammlösungen	61
Anlage 8: Prüfdaten für den Ausreißertest nach Grubbs (Kromidas, 2000)	62
Anlage 9: Übersicht der gemessenen Signale bei verschiedenen Konzentrationen	63
Anlage 10: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für Retinol und α-Tocopherol	64
Anlage 11: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon	65
Anlage 12: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für die wasserlöslichen Vitamine	66
Anlage 13: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2 für die fettlöslichen Vitamine	67
Anlage 14: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2 für die wasserlöslichen Vitamine	68

Anlage 1: Quantifier von Pantothensäure aus dem Mix-Standard 100 µg/L

Anlage 2: Massenspektrum von Pantothensäure aus dem Mix-Standard 100 µg/L

+ MRM (6.481-6.927 min, 33 scans) (220.0 → **) W/S Proben 005.d



Anlage 3: Übergänge der Fragment-Ionen von Pantothensäure aus dem Mix-Standard (100 µg/L)

Anlage 4: Volumen für Dotierungen [µL] für die Einwaage von 5 g

Konzentration Stammlösung [mg/L]		1000	200	50	20	10	2
Dotierung [µg/kg]	10	-	-	-	2,50	5,00	25,00
	20	-	-	2,00	5,00	10,00	50,00
	50	-	-	5,00	12,50	25,00	125,00
	100	-	2,50	10,00	25,00	50,00	250,00
	200	-	5,00	20,00	50,00	100,00	500,00
	250	-	6,25	25,00	62,50	125,00	625,00
	500	2,50	12,50	50,00	125,00	250,00	-
	1000	5,00	25,00	100,00	250,00	500,00	-

Anlage 5: verwendete Lösungen

Nr.	Bezeichnung	Konzentration	Herstellung
1.1	Kaliumhydroxid-Lösung	60 g/ 100 mL	60 g Kaliumhydroxid in Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen
1.2	Natriumsulfid-Lösung	4 g/ 100 mL	4 g Natriumsulfid in Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen
1.3	Phenolphthalein-Lösung	2 g/ 100 mL	2 g Phenolphthalein in Messkolben überführen und mit Ethanol auf 100 mL auffüllen
2.1	Salzsäure-Lösung	0,1 mol/L	2 mL Salzsäure in Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen
2.2	Natriumacetat-Lösung	2,5 mol/L	51,3 g Natriumacetat in Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 250 mL auffüllen
3.1	Laufmittel A	5 mM Ammoniumformiat, 0,05 % Ameisensäure in Reinstwasser	315,5 mg Ammoniumformiat und 500 µL Ameisensäure in Messkolben überführen und auf 1 L mit Reinstwasser auffüllen
3.2	Laufmittel B	1 % Ameisensäure in Methanol	100 µL Ameisensäure in Messkolben überführen und auf 1 L mit Methanol auffüllen

Anlage 6: verwendete Vitaminstandards

Bezeichnung	Firma	CAS-Nr.	Lot-Nr.	Reinheit [%]
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich	67-03-8	SLBS0837V	> 99,0
Riboflavin	Sigma Aldrich	83-88-5	LC20521V	99,9
Nicotinsäure	Sigma Aldrich	59-67-6	FN08131501	99,9
Nicotinamid	Sigma Aldrich	98-92-0	BLBS3492V	> 99,5
Calcium-Pantothenat	Sigma Aldrich	137-08-6	SLBL02610V	99,8
Pyridoxamin-Dihydrochlorid	Sigma Aldrich	524-36-7	MBBC047S	98,0
Pyridoxal-Hydrochlorid	Sigma Aldrich	65-22-5	BCBR5453V	98,5
Pyridoxin	Sigma Aldrich	65-23-6	STBF3208V	98,0
Biotin	Sigma Aldrich	58-85-5	LRAA9042	98,5
Folsäure	Sigma Aldrich	59-30-3	SLBN1618V	97,0
Cyanocobalamin	Sigma Aldrich	68-19-9	LC21166V	99,2
Retinol	Sigma Aldrich	68-26-8	BCBT5731	> 95,0
Retinylpalmitat	Sigma Aldrich	79-81-2	LC22398V	97,4
Retinylacetat	Sigma Aldrich	127-47-9	LRAA9043	99,9
Ergocalciferol	Sigma Aldrich	50-14-6	LRAA9044	97,3
Cholecalciferol	Sigma Aldrich	67-97-0	LRAA7908	99,8
DL-alpha-Tocopherol	Sigma Aldrich	10191-41-0	LC25784V	99,9
rac-beta-Tocopherol	Sigma Aldrich	148-03-8	LC26372V	94,0
gamma-Tocopherol	Sigma Aldrich	54-28-4	LC20647V	95,0
delta-Tocopherol	Sigma Aldrich	119-13-1	LC20798V	95,2
Phyllochinon	Sigma Aldrich	84-80-0	BCBR3153V	> 99,0

Anlage 7: Übersicht der Vitaminstammlösungen

Vitamin	Einwaage [mg]	Auffüll- volumen [mL]	Konzentration [g/L]	Lösungsmittel
Retinol	10,00	10,00	1,00	Methanol abs.
Retinylacetat	26,47	25,00	1,06	Methanol abs.
Retinylpalmitat	13,05	25,00	0,52	Toluol
Ergocalciferol	25,82	25,00	1,03	Methanol abs.
Cholecalciferol	25,03	25,00	1,00	Methanol abs.
DL-alpha-Tocopherol	25,32	25,00	1,01	Toluol
rac-B-Tocopherol	25,17	25,00	1,01	Toluol
gamma-Tocopherol	25,02	25,00	1,00	Toluol
delta-Tocopherol	25,85	25,00	1,03	Toluol
Phyllochinon	28,08	25,00	1,12	Methanol abs.
Thiamin-Hydrochlorid	25,45	25,00	0,80	ACN:H ₂ O (1:1)
Riboflavin	6,02	50,00	0,12	0,02M Essigsäure
Nicotinsäure	25,26	25,00	1,01	ACN:H ₂ O (1:1)
Nicotinamid	26,25	25,00	1,05	ACN:H ₂ O (1:1)
Calcium-Pantothenat	25,15	25,00	0,46	ACN:H ₂ O (1:1)
Pyridoxamin-Dihydrochlorid	26,23	25,00	0,73	ACN:H ₂ O (1:1)
Pyridoxal-Hydrochlorid	25,75	25,00	0,85	ACN:H ₂ O (1:1)
Pyridoxin	25,32	25,00	1,01	ACN:H ₂ O (1:1)
Biotin	25,68	25,00	1,03	Methanol abs.
Folsäure	25,21	25,00	1,01	ACN:H ₂ O (1:1)
Cyanocobalamin	25,00	25,00	1,00	ACN:H ₂ O (1:1)

Anlage 8: Prüfdaten für den Ausreißertest nach Grubbs (Kromidas, 2000)

– Grubbs

$P_{\text{einseitig}}$	90 %	95 %	99 %
N			
3	1,148	1,153	1,155
4	1,425	1,463	1,492
5	1,602	1,672	1,749
6	1,729	1,822	1,944
7	1,828	1,938	2,097
8	1,909	2,032	2,221
9	1,977	2,110	2,323
10	2,036	2,176	2,410
11	2,088	2,234	2,485
12	2,134	2,285	2,550
13	2,175	2,331	2,607
14	2,213	2,371	2,659
15	2,247	2,409	2,705
16	2,279	2,443	2,747
17	2,309	2,475	2,785
18	2,335	2,504	2,821
19	2,361	2,532	2,854
20	2,385	2,557	2,884
21	2,408	2,580	2,912
22	2,429	2,603	2,939
23	2,448	2,624	2,963
24	2,467	2,644	2,987
25	2,486	2,663	3,009
26	2,502	2,681	3,029
27	2,519	2,698	3,049
28	2,534	2,714	3,068
29	2,549	2,730	3,085
30	2,563	2,745	3,103
$P_{\text{zweiseitig}}$	–80 %	90 %	98 %

Anlage 9: Übersicht der gemessenen Signale bei verschiedenen Konzentrationen

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	1	2	5	8	10	20	50	80	100	200
Retinol	2.123	3.389	17.310	19.446	30.153	55.178	162.888	261.496	390.196	708.793
Ergocalciferol	5.855	9.240	12.485	4.972	9.930	21.669	50.967	76.993	114.214	214.002
Cholecalciferol	451	2.482	4.342	11.268	18.353	29.630	87.249	148.598	190.473	337.465
α -Tocopherol	5.107	13.227	11.217	22.093	31.757	62.871	181.080	316.518	496.229	915.257
Phyllochinon	4.367	6.467	15.812	20.020	31.719	63.065	183.856	286.069	425.667	881.359
Thiamin	206.297	322.562	1.245.880	2.451.770	3.882.628	5.595.647	26.612.610	45.386.284	61.108.956	87.796.342
Riboflavin	20.649	30.274	45.386	64.679	83.495	132.412	318.263	549.523	781.212	1.457.623
Nicotinamid	497.806	1.039.954	2.390.089	4.411.440	6.209.570	11.079.128	28.010.371	49.025.745	60.540.864	84.999.490
Nicotinsäure	21.877	38.585	116.336	193.093	272.498	452.747	1.084.361	1.785.836	2.587.990	4.679.781
Pantothensäure	48.393	72.200	151.285	281.055	433.001	734.981	1.857.613	3.151.453	4.354.383	8.009.035
Pyridoxal	871.337	845.431	1.698.239	3.245.609	5.116.888	8.316.296	21.329.074	36.998.451	45.678.619	61.307.055
Pyridoxin	1.246.506	2.382.271	6.393.340	12.358.484	18.267.167	32.920.962	63.236.169	77.849.465	88.189.133	102.993.041
Pyridoxamin	341.880	543.224	1.869.375	3.203.141	5.649.908	8.418.933	32.097.449	56.111.228	78.528.234	118.122.666
Biotin	1.043.866	222.296	118.802	1.150.164	1.049.837	928.455	2.965.884	3.510.678	4.090.955	7.304.841
Folsäure	197	523	1.275	1.597	1.527	3.949	8.865	11.099	21.096	39.808
Cyanocobalamin	11.246	19.343	35.073	81.251	110.395	208.793	501.973	936.846	1.208.727	2.488.765

Anlage 10: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für Retinol und α -Tocopherol

Nr.	Datum	Name	Retinol [µg/kg]	α-Tocopherol [µg/kg]
1	07.06.2017	petfood 1	149.389,55	4.323.987,87
2	07.06.2017	petfood 2	134.369,31	4.315.008,69
3	13.06.2017	petfood 1	112.051,41	3.519.533,11
4	13.06.2017	petfood 2	111.036,30	3.708.400,14
5	21.06.2017	petfood 1	264.453,21	3.115.359,56
6	21.06.2017	petfood 2	229.484,92	3.289.693,70
7	21.06.2017	petfood 3	194.352,69	2.855.094,40
8	21.06.2017	petfood 4	135.454,05	2.855.094,40
9	21.06.2017	petfood 5	174.337,11	3.033.664,37
10	21.06.2017	petfood 6	230.743,99	3.223.088,48
MW			173.567,25	3.423.892,47
STD			54.115,95	542.342,26
rel. STD			31,2%	15,8%
Sollwert			179.187,30	4.964.000,00
WDF			96,9%	69,0%

Anlage 11: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für Ergocalciferol, Cholecalciferol und Phyllochinon

Nr.	Datum	Name	Ergocalciferol [µg/kg]	Cholecalciferol [µg/kg]	Phyllochinon [µg/kg]
1	22.06.2017	petfood 1	89,40	3,12	12,88
2	22.06.2017	petfood 2	81,03	2,82	19,10
3	22.06.2017	petfood 3	82,08	4,46	18,57
4	22.06.2017	petfood 4	66,89	3,76	18,46
5	22.06.2017	petfood 5	63,40	5,26	17,08
6	22.06.2017	petfood 6	70,72	5,10	17,54
7	22.06.2017	petfood 7	57,19	3,34	17,43
8	22.06.2017	petfood 8	131,69	4,88	21,28
9	22.06.2017	petfood 9	126,02	12,55	18,28
MW			85,38	4,09	18,47
STD			26,64	0,95	1,32
rel. STD			31,2%	23,3%	7,2%

Anlage 12: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 1 für die wasserlöslichen Vitamine

Nr.	Datum	Name	Thiamin [µg/kg]	Riboflavin [µg/kg]	Nicotinamid [µg/kg]	Nicotinsäure [µg/kg]	Pantothen- säure [µg/kg]	Pyridoxal [µg/kg]	Pyridoxamin [µg/kg]	Pyridoxin [µg/kg]	Biotin [µg/kg]	Folsäure [µg/kg]	Cyanocobal- amin [µg/kg]
1	07.06.2017	petfood 1	267.846,50	6.821.352,92	3.982.589,14	34.520,89	1.441.401,63	121,21	436,32	417.605,15	4.754,32	3.622.530,16	33,30
2	07.06.2017	petfood 2	179.754,78	5.705.624,33	3.834.469,54	33.856,02	1.340.090,87	123,85	424,19	386.290,69	4.280,13	2.776.082,95	52,48
3	13.06.2017	petfood 1	185.118,66	3.788.287,53	6.439.116,84	2.781.522,32	1.110.859,88	134,58	375,61	586.758,84	4.090,35	625.320,52	51,54
4	13.06.2017	petfood 2	196.414,94	3.693.180,47	7.053.782,26	2.903.773,78	1.203.963,45	135,89	354,04	647.287,48	3.651,74	662.509,09	56,42
5	22.06.2017	petfood 1	216.072,04	5.701.267,35	4.174.727,65	67.908,54	1.258.827,86	105,12	203,91	572.115,19	6.619,93	1.723.890,17	46,89
6	22.06.2017	petfood 2	179.445,54	5.050.052,51	4.105.489,62	72.539,93	1.077.315,74	104,81	164,46	556.806,25	6.730,49	1.407.609,76	55,66
7	22.06.2017	petfood 3	160.043,24	4.887.365,08	3.986.471,15	70.239,54	986.229,20	114,89	173,88	526.463,45	6.594,75	1.245.318,99	52,22
8	22.06.2017	petfood 4	181.046,24	5.473.912,85	4.118.970,82	69.375,19	1.207.843,57	102,49	179,00	553.301,01	6.776,04	1.296.469,75	55,35
9	22.06.2017	petfood 5	185.660,66	5.394.630,19	4.061.433,79	71.374,03	1.164.303,22	101,97	152,84	555.491,28	6.573,91	1.362.596,65	60,88
MW			185.444,51	5.168.408,14	4.639.672,31	59.973,45	1.198.981,71	116,09	273,81	533.568,81	5.563,52	1.635.814,23	53,93
STD			15.997,67	976.172,31	1.208.290,30	17.675,75	137.567,44	13,48	120,56	82.040,97	1.330,38	975.819,98	4,14
rel. STD			8,6%	18,9%	26,0%	29,5%	11,5%	11,6%	44,0%	15,4%	23,9%	59,7%	7,7%
Sollwert			209.200,00	1.906.800,00				314.300,00			19.900,00		805,00
WDF			88,6%	271,1%				169,9%			28,0%		6,7%

Anlage 13: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2 für die fettlöslichen Vitamine

Nr.	Datum	Name	Retinol [µg/kg]	Ergocalciferol [µg/kg]	Cholecalciferol [µg/kg]	α-Tocopherol [µg/kg]	Phyllochinon [µg/kg]
1	06.07.2017	Probe 1	2.553,30	18,10	25,69	146.848,77	76,49
2	06.07.2017	Probe 2	4.383,23	3,83	49,42	223.700,86	49,42
3	06.07.2017	Probe 3	4.497,11	4,32	37,18	110.896,92	37,18
4	06.07.2017	Probe 4	5.584,44	4,16	55,81	92.602,80	55,81
5	06.07.2017	Probe 5	4.776,24	2,94	29,99	183.496,06	29,99
6	13.07.2017	Probe 1	5.006,43	2,40	9,40	64.251,80	40,26
7	13.07.2017	Probe 2	3.979,76	2,52	11,57	60.387,01	57,18
8	13.07.2017	Probe 3	4.691,17	3,51	5,09	54.416,67	21,93
9	13.07.2017	Probe 4	4.806,61	9,06	18,56	52.865,64	67,39
10	13.07.2017	Probe 5	6.679,69	3,05	38,29	74.450,09	188,52
11	18.07.2017	Probe 1	5.431,95	7,99	15,23	74.624,07	104,72
12	18.07.2017	Probe 2	5.995,33	8,68	18,34	89.507,96	136,94
13	18.07.2017	Probe 3	6.298,55	6,23	11,54	78.735,55	58,00
14	18.07.2017	Probe 4	6.173,24	4,55	11,55	92.171,85	81,76
15	18.07.2017	Probe 5	5.685,70	12,10	18,27	60.163,29	88,63
16	25.07.2017	Probe 1	4.738,67	4,49	18,86	105.244,76	68,97
17	25.07.2017	Probe 2	4.890,87	11,35	16,23	99.560,01	84,72
18	25.07.2017	Probe 3	4.839,84	9,95	3,27	92.964,45	64,64
19	25.07.2017	Probe 4	4.934,31	1,16	3,52	106.636,04	87,37
20	25.07.2017	Probe 5	5.049,82	2,31	22,02	110.654,35	114,48
MW			5.181,21	5,51	20,99	92.130,43	69,78
STD			715,66	3,33	14,58	32.533,56	29,39
rel. STD			13,8 %	60,4 %	69,5 %	35,3%	42,1 %
Sollwert			5.080,00		71,90	109.000,00	
WDF			102,0%		29,2%	84,5%	

Anlage 14: Übersicht der Ergebnisse der Hauptversuchsreihe Nr. 2 für die wasserlöslichen Vitamine

Nr.	Datum	Name	Thiamin [µg/kg]	Riboflavin [µg/kg]	Nicotinamid [µg/kg]	Nicotinsäure [µg/kg]	Pantothen- säure [µg/kg]	Pyridoxal [µg/kg]	Pyridoxamin [µg/kg]	Pyridoxin [µg/kg]	Biotin [µg/kg]	Folsäure [µg/kg]	Cyanocobal- amin [µg/kg]
1	06.07.2017	Probe 1	10.313,54	7.775,18	143.072,65	6.660,40	39,25	37,84	1,87	13.160,28	45,00	459,71	9,45
2	06.07.2017	Probe 2	10.491,45	7.726,95	147.320,20	6.097,63	35,35	39,18	1,51	13.175,76	18,08	441,36	2,56
3	06.07.2017	Probe 3	9.796,99	7.694,84	147.620,79	6.088,39	35,47	38,12	1,67	12.983,51	26,13	424,71	4,91
4	06.07.2017	Probe 4	9.451,42	8.112,95	145.761,41	6.345,83	35,75	40,24	1,51	12.905,95	17,63	450,08	9,81
5	06.07.2017	Probe 5	10.803,22	8.144,18	148.161,62	6.079,61	36,10	38,70	1,36	13.352,59	27,69	452,14	9,04
6	13.07.2017	Probe 1	9.614,70	7.637,23	141.171,79	6.591,20	35,77	46,18	2,14	14.679,20	873,68	207,07	10,94
7	13.07.2017	Probe 2	8.770,96	7.678,57	140.711,82	6.435,23	34,40	47,47	2,06	14.084,40	1.078,09	206,53	12,88
8	13.07.2017	Probe 3	9.093,04	7.476,04	140.288,87	6.666,41	35,27	45,24	1,82	14.367,16	779,02	218,56	11,51
9	13.07.2017	Probe 4	9.164,20	7.691,62	139.975,60	6.492,58	34,72	44,03	1,90	14.789,65	1.181,70	214,08	10,34
10	13.07.2017	Probe 5	9.068,85	7.363,67	140.689,30	6.879,82	40,73	43,95	2,08	14.382,22	609,11	225,56	8,46
11	20.07.2017	Probe 1	12.095,27	6.854,28	146.839,60	6.156,49	41,44	48,07	1,75	13.314,88	894,77	555,20	4,97
12	20.07.2017	Probe 2	11.166,23	6.666,82	147.382,55	6.288,65	42,36	44,46	1,71	13.884,93	724,74	547,24	5,74
13	20.07.2017	Probe 3	11.448,13	6.788,46	147.444,42	5.842,68	36,07	43,98	1,93	13.538,20	1.091,58	506,26	5,47
14	20.07.2017	Probe 4	10.771,00	7.024,90	144.336,38	6.137,19	35,31	47,32	2,30	13.696,69	757,40	505,35	11,35
15	20.07.2017	Probe 5	11.119,33	6.380,37	150.016,75	6.252,83	36,05	44,11	1,72	13.449,89	788,31	510,72	13,74

Anlage 14: (Fortsetzung)

Nr.	Datum	Name	Thiamin [µg/kg]	Riboflavin [µg/kg]	Nicotinamid [µg/kg]	Nicotinsäure [µg/kg]	Pantothen- säure [µg/kg]	Pyridoxal [µg/kg]	Pyridoxamin [µg/kg]	Pyridoxin [µg/kg]	Biotin [µg/kg]	Folsäure [µg/kg]	Cyanocobal- amin [µg/kg]
16	25.07.2017	Probe 1	10.741,43	6.801,64	152.546,29	5.545,32	54,23	54,28	3,28	24.107,52	477,35	254,69	1,28
17	25.07.2017	Probe 2	9.748,75	6.068,97	150.281,39	5.960,01	40,52	55,04	2,32	22.502,15	959,57	297,78	1,86
18	25.07.2017	Probe 3	k.A.	7.756,53	k.A.	7.868,81	24,63	71,48	2,18	k.A.	739,50	333,74	2,86
19	25.07.2017	Probe 4	11.492,85	7.221,44	155.576,46	6.438,78	40,34	54,94	2,24	24.789,10	798,89	319,90	1,89
20	25.07.2017	Probe 5	11.035,92	6.978,43	159.227,43	6.429,73	39,25	56,28	2,17	25.516,52	926,34	307,97	1,83
MW			10.325,65	7.292,15	146.759,23	6.283,62	36,78	45,76	1,91	15.930,56	640,73	371,93	7,04
STD			970,93	573,36	5.304,97	320,73	3,92	5,88	0,29	4.466,96	397,20	125,48	4,15
rel. STD			9,4%	7,9%	3,6%	5,1%	10,7%	12,9%	15,0%	28,0%	62,0%	33,7%	58,9%
Sollwert			9.040,00	16.100,00	174.000,00					17.700,00		1.470,00	11,40
WDF			114,2%	45,3%	88,0%					90,0%		25,3%	61,8%

k.A. – keine Auswertung

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene elektronische Fassung mit der eingereichten Arbeit identisch ist.

Ort, Datum

Susann Goldhahn