

# Nachweis wasserlöslicher Vitamine

## Einsatz der Kapillarelektrophorese mit UV- und LIF-Detektor in der Lebensmittelanalytik



Jana Boden, Ingo Haumann,  
Antje Mainka



Jürgen Grebner

Seit einigen Jahren wird die Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE) bei der qualitativen und quantitativen Analyse der unterschiedlichsten Produkte eingesetzt, zunehmend auch in der Lebensmittelkontrolle. Ihre hohe Selektivität, die schnelle Probenaufreinigung und die gute Matrixverträglichkeit sind die entscheidenden Vorteile dieser Methode gegenüber den chromatographischen Verfahren. Insbesondere beim Nachweis von Vitaminen ist die CE den herkömmlichen Trenntechniken klar überlegen.

Die Untersuchung und der Nachweis von Vitaminen ist eine besondere Herausforderung für jedes analytische Trennverfahren. Da die Vitamine verschiedensten Stoffklassen zuzuordnen sind, ist

die simultane Bestimmung möglichst vieler Vitamine normalerweise erschwert. Während bei den chromatographischen Trennmechanismen – z.B. Dünnschicht-, Hochdruckflüssigkeits- oder Gaschromato-

graphie – hauptsächlich Unterschiede in der Polarität der Verbindungen und die daraus resultierende unterschiedliche Affinität zur stationären Phase für eine Trennung ausschlaggebend sind, ist in der CE die elektrophoretische Mobilität das entscheidende Selektivitätskriterium. Die einzelnen Vitamine weisen deutliche Unterschiede in ihren Ladungszu-Radius-Verhältnissen beziehungsweise Mobilitäten auf und können daher mit der CE gut getrennt werden.

### Analyse von wasserlöslichen Vitaminen mittels UV-Detektion

Abbildung 1 zeigt, dass bei Verwendung der direkten UV-Detektion prinzipiell neun Vitamine detektierbar sind. Das verwendete Elektrolytssystem wurde dahingehend optimiert, kationische (zum Beispiel Vitamin B1), anionische und nahezu ungeladene Substanzen

(zum Beispiel Vitamin B12) simultan in möglichst kurzer Zeit erfassen zu können.

Da bei den gewählten Bedingungen ein starker Elektroosmotischer Fluss (EOF) und eine negativ geladene Micellenphase vorhanden sind, bewegen sich sowohl die kationischen als auch die anionischen Vitamine in Richtung der Kathode und können so detektiert werden. Die Migrationszeiten werden somit sowohl durch die elektrophoretischen Mobilitäten als auch durch die Affinität zur Micelle bestimmt. Dieses Elektrolytssystem kann beispielsweise zur Untersuchung von vitaminreichen Nahrungsergänzungsmitteln angewandt werden (Abb. 1B).



**Tab. 1: Ergebnisse der Quantifizierung für Riboflavin (Verfahren: Standardaddition)**

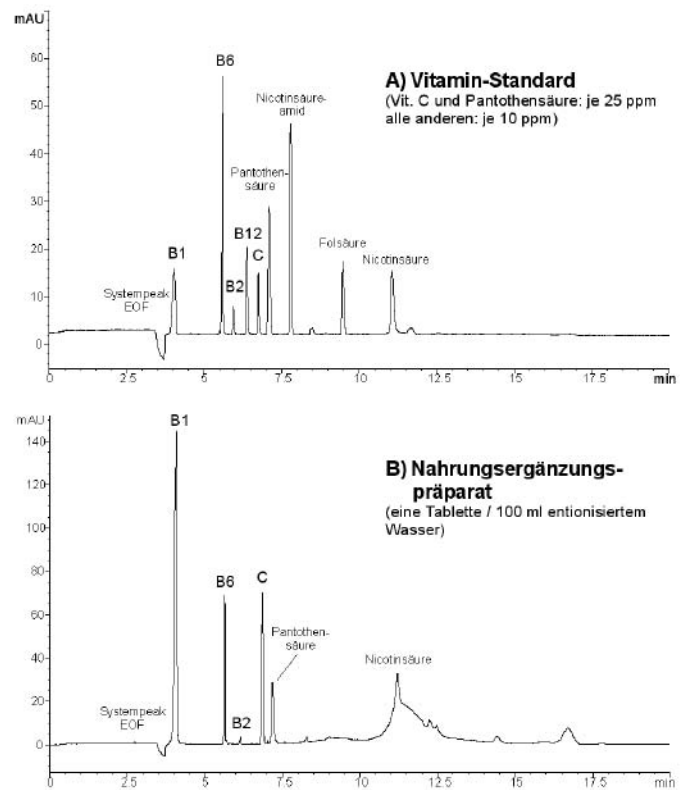
	Tomatensaft	Multivitamin-Saft	Riesen-Champignons
Gehalt in der Probelösung [ppb]	3	30	28
Gehalt in der Probe [%]	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$6,1 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$

Als vorteilhaft erweisen sich die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten und Spektrenverläufe der einzelnen Vitamine, wodurch die Peakzuordnung bei einer einmal angelegten Spektrendatei sehr einfach ist. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,5 ppm und 10 ppm. Sollte diese Nachweisstärke für bestimmte Untersuchungen nicht ausreichend sein, kann ein Anreicherungsverfahren oder die Wahl einer anderen Detektionsart von Vorteil sein.

Die Anwendung für reale Proben ist in Abbildung 2 gezeigt. Aus ihr wird ersichtlich, dass bei der Untersuchung natürlicher Lebensmittel häufig ein regelrechter „Peakwald“ zu beobachten ist. In der Folge kann es zu einer Peaküberla-

gerung der Vitamine mit anderen Inhaltsstoffen kommen, die die eindeutige Zuordnung und Quantifizierung von Vitaminen in komplex zusammengesetzten Proben erschwert. Zum anderen können die natürlichen Gehalte von Vitaminen in Lebensmitteln sehr gering sein, so dass ein sehr nachweisstarkes System angewandt werden muss.

Während für den Multivitamin-Saft (Abb. 2A) noch einige Vitamine zugeordnet werden können, handelt es sich bei den in Tomatensaft und Champignons detektierten Peaks um unbekannte Substanzen, die wahrscheinlich teilweise die Analyten überdecken. Für solche Proben ist dann eine Detektionsart mit höherer Selektivität zu bevorzugen.



**Abb. 1: A) Bestimmung von Vitaminen: Standard (jeweils: 10 ppm; Vitamin C und Pantothensäure: 25 ppm); B) Nahrungsergänzungsmittel (1 Tablette/100 ml) Elektrolyt: 25 mM Borat, 75 mM SDS, pH 9,3; CE-Gerät: HP3D (Agilent Technologies, Waldbronn); Detektion: UV, direkt, 200 nm, Kapillare: Bubble Cell, 50 µm I.D.; 64 cm lang**

### Analyse von Vitamin B2 (Riboflavin) mittels LIF-Detektion

Eine Möglichkeit der drastischen Verbesserung der Nachweisstärke besteht in der Ankopplung eines laserinduzierten Fluoreszenz-Detektors (LIF). Hierbei wird mittels eines Lasers vergleichsweise hoher Energie die Anregung der Moleküle durchgeführt und somit die hohe Selektivität der Fluoreszenzmessung mit der außerordentlichen Sensitivität kombiniert. Von den untersuchten Vitaminen weist Riboflavin (B2) eine natürliche Fluoreszenz auf, so dass eine Bestimmung ohne vorhergehende Derivatisierung erfolgen kann. Die anderen Vitamine können mit diesem Verfahren nicht bestimmt werden beziehungsweise müssten vorher derivatisiert werden. Hinsichtlich der Simultanität bedeutet die Anwendung eines LIF-Detektors somit einen Nachteil, in Hinblick auf die sehr komplex zusammengesetzten Proben

ist eine hohe Selektivität aber von deutlichem Vorteil.

Abbildung 3 zeigt die außerordentliche Verbesserung der Nachweisgrenze für Riboflavin durch die Verwendung eines LIF-Detektors. So kann Vitamin B2 (Riboflavin) im unteren ppb-Bereich in vielen Lebensmitteln mit sehr hoher Selektivität bestimmt werden. Die errechnete Nachweisgrenze in der jeweiligen Probelösung liegt bei 1 ppb.

Die Analysenergebnisse für die gezeigte Applikation sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

### Zusammenfassung

Die stetig wachsenden Anforderungen an die instrumentelle Analytik hinsichtlich hoher Selektivität, hoher Nachweisstärke, kurzen Trennzeiten und schneller Umstellbarkeit des Systems machen die Kapillarelektrophorese in vielen Fällen zu einer geeigneten Alternative zu herkömmlichen Trennverfahren. Die Ankopplung eines externen LIF-Detektors ermöglicht in vielen

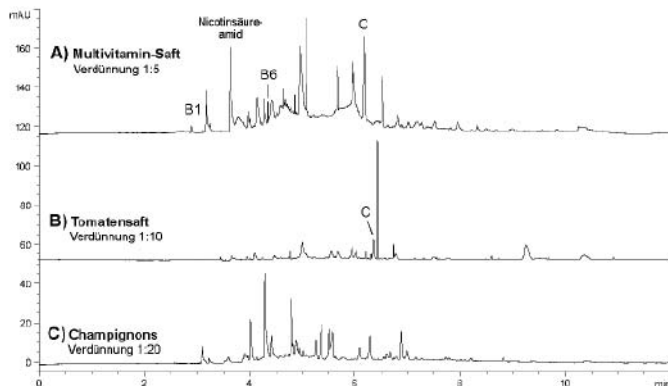


Abb. 2: Bestimmung von Vitaminen in verschiedenen Proben Elektrolyt: 50 mM Borat, pH 9,3; CE-Gerät: HP3D (Agilent Technologies, Waldbronn); Detektion: UV, direkt, 200 nm, Kapillare: Bubble cell; 50  $\mu$ m I.D.; 64 cm lang; Trennung: 30 kV, 25  $^{\circ}$ C

Fällen eine drastische Verbesserung der Nachweisstärke (circa um den Faktor 1.000) bei gleichzeitiger Selektivitätserhöhung. Weitere Applikationen und Literaturstellen können bei den Autoren erfragt werden.

#### Die Autoren

##### Dr. Jana Boden

1985–1991 Chemiestudium an den Universitäten Dresden und Darmstadt; 1996 Promotion in Darmstadt und wissenschaftl. Tätigkeiten bei Merck; 1997 selbstständige Tätigkeit. Seit 1998 bei ICA.

##### Dr. Ingo Haumann

1985–1991 Chemiestudium an den Universitäten Leipzig und Darmstadt; 1995 Promotion in Darmstadt; 1996 Methodenentwicklung im Bereich der Analytischen Chemie bei Merck. Seit 1998 bei ICA.

##### Dr. Antje Mainka

1988–1994 Chemiestudium an den Universitäten Leipzig und Darmstadt; 1998 Promotion in Darmstadt, danach selbstständige Tätigkeit. Seit 1998 bei

ICA – Ingenieurgesellschaft für Chemische Analytik  
Carl-Friedrich-Gauß-Str. 5  
63263 Neu-Isenburg  
Fax: 06102/327397  
ica@ica-analytik.de, www.ica-analytik.de

##### Dr. Jürgen Grebner

Chemiestudium an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/Main; 1992 Promotion im Fachbereich der Physikalische Chemie. Seit 1996 Produktmanager HPLC bei

SunChrom GmbH  
Max-Planck-Str. 22, 61381 Friedrichsdorf  
Fax: 06172/953399  
jgrebner@sunchrom.de, www.sunchrom.de

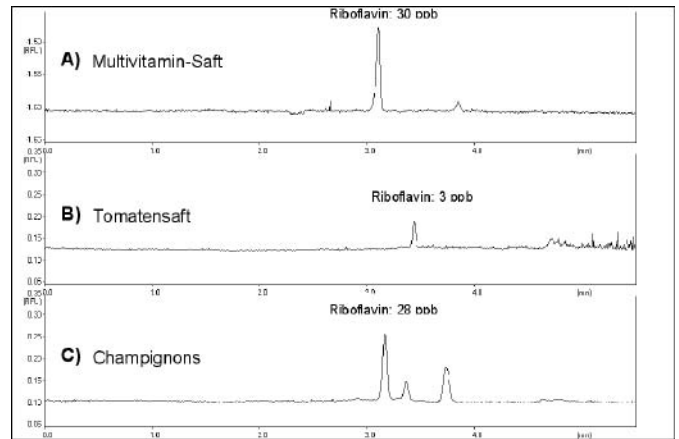


Abb. 3: Bestimmung von Vitamin B2 (Riboflavin); A) Multivitamin-Saft (Verdünnung: 1:200); B) Tomatensaft (Verdünnung: 1:10); C) Weiße Riesen-Champignons (trocken püriert, Einwaage: 1 g/50 ml). Elektrolyt: 20 mM Borat, pH 9,3 CE-Gerät: LIF-Detektor 488 nm (Picometrics, Ramonville, Frankreich) angekoppelt an HP3D (Agilent Technologies, Waldbronn); Detektion: Fluoreszenz, Kapillare: 50  $\mu$ m I.D.; 64 cm lang; Trennung: 30 kV, 25  $^{\circ}$ C