

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	58 (1967)
Heft:	6
Rubrik:	Bericht über die 79. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie am 29. und 30. September 1967 in Genf = Compte-rendu de la 79e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie analytique et appliquée les 29 et 30 septembre 1967 à Genève

Nutzungsbedingungen

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

Conditions d'utilisation

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

Terms of use

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

Download PDF: 05.01.2026

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

MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERRICHTUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 22.— per Jahrgang (Ausland Fr. 27.—)	Preis einzelner Hefte Fr. 4.— (Ausland Fr. 5.—)
Suisse fr. 22.— par année (étranger fr. 27.—)	Prix des fascicules fr. 4.— (étranger fr. 5.—)

Band — Vol. 58

1967

Heft — Fasc. 6

Bericht über die 79. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

am 29. und 30. September 1967 in Genf

Compte-rendu de la 79e Assemblée annuelle de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

les 29 et 30 septembre 1967 à Genève

Teilnehmer - Participants

A. Gäste - Invités

Monsieur *A. Chavannes*

Président du Conseil d'Etat de la République et Canton de Genève

Monsieur *M. Aubert*

Président du Conseil Municipal de la Ville de Genève

Herr und Frau Dr. *R. Burkard*

Präsident des Verbandes der Kantons- und Stadtchemiker der Schweiz

Monsieur le Professeur *E. Cherbuliez*, Genève
Représentant du Comité Suisse de la Chimie et de la Société Suisse de Chimie
Monsieur le Dr. *I. Flament*, Genève
Herr Dr. *W. Fresenius*, Wiesbaden
Herr Prof. Dr. *K. Halačka*, Brno
Herr Prof. Dr. *O. Högl*
Président der Eidg. Weinhandelskommission und des Codex Alimentarius, Bern
Herr Dr. *Fr. Hoeke*, Rotterdam
Monsieur *V. Jans*
Président de la Société des Experts-Chimistes de France, Paris
Monsieur le Professeur *V. Lasalle-Saint-Jean*, Bordeaux
Herr Dr. *K. Möhler*, München
Monsieur le Professeur *D. Monnier*, Genève
Herr Dr. *R. Morf*, Basel, Generalsekretär der IUPAC
Monsieur et Madame *M. Ney*, Metz
Monsieur et Madame *J. Ruffy*
Délégué du Département fédéral de l'Intérieur, Chef du contrôle des denrées alimentaires, Service fédéral de l'hygiène publique, Berne
Herr *H. Schneider*
Président der Gesellschaft Schweizerischer Lebensmittelinspektoren, Bern
Monsieur *R. Souverain*
Représentant du Service de la répression des fraudes, Paris
Herr und Frau Prof. Dr. *H. Thaler*, Braunschweig
Monsieur le Dr. *Ch. Vodoz*, Genève
Herr und Frau Dr. *K. Woidich*, Wien

B. Ehrenmitglied - Membre d'honneur

Herr Prof. Dr. *O. Högl*, Bern

C. 141 Einzel- und Kollektivmitglieder - 141 Membres individuels et collectifs
68 Damen - 68 Dames

Sur l'invitation de Monsieur *Charles Berner*, chimiste cantonal, notre Société a tenu ses assises annuelles à Genève pour la 5ième fois depuis sa fondation. Nous adressons tous nos remerciements à M. Berner et à ses collaborateurs pour nous avoir reçus avec un grand dévouement qui nous a permis d'apprécier tout le charme de Genève et l'hospitalité de son canton. Des dames nombreuses nous ont fait l'honneur de se joindre à nous.

Nous exprimons aussi nos remerciements aux Autorités du canton et de la ville de Genève, pour leur accueil généreux, ainsi qu'à la Direction des Etablissements Firmenich pour la réception qu'elle nous a réservée. Enfin, notre gratitude

va aux nombreuses Maisons mentionnées ci-après qui ont contribué par leur dons à la réussite de notre assemblée annuelle.

Ateliers des Charmilles SA, Genève
Chocolat Fjord, Chêne-Bourg
Ciment Portland SA, Vernier
Ciravegna & Co. SA, Genève-Carouge
Cynamid European Research Institut, Genève
Discount Bank, Genève
Doria SA, Genève
Firmenich & Co., Genève
Givaudan SA, Vernier
Hispano Suiza Suisse SA, Genève-Carouge
Laboratoire Sauter SA, Genève
Laiteries Réunies, Genève
Lorsa SA, Genève
Martini et Rossi SA, Meyrin
Minoteries de Carouge C. Sylvant SA, Genève-Carouge
Minoteries E. Perrollaz SA, Moulin du Rondeau, Genève-Carouge
Minoteries de Plainpalais SA, Genève
Pancosma SA, Genève
Patek Philippe SA, Genève
Pharmacie Principale de Tolédo et Co., Genève
Profar SA, Genève-Carouge
Rhône Poulenc, Genève
Sapos SA Genève
Société Générale de Surveillance, Genève
Sopid SA, Genève
Union Carbide Europa SA, Genève
United Cigarettes Company Ltd., Genève-Carouge
Vin Union, Satigny

1. Sitzung - 1ière Séance

Freitag, den 29. September 1967 - Vendredi, le 29 septembre 1967

Après la visite des Etablissements Firmenich le matin, notre président, M. le Prof. Dr. A. Schürch, ouvre l'assemblée annuelle en début d'après-midi à l'Aula de l'Ecole de commerce:

Sehr verehrte Damen und Herren,
Liebe Kollegen,

Ich begrüße Sie alle herzlich zu unserer 79. Jahresversammlung, zu der uns Stadt und Kanton Genf in großzügiger Weise Gastrecht bieten. Es freut mich sehr, daß wir dieses Jahr unsere Tagung in der Westschweiz abhalten dürfen.

Sicherlich werden auch Sie alle diese Gelegenheit zur engeren Kontaktnahme mit unseren westschweizerischen Kollegen zu schätzen wissen. Wie Sie aus dem Programm ersehen, hat uns Herr *Ch. Berner*, Kantonschemiker, einige ganz besondere Genüsse für unsere Tagung vorbereitet. Wir danken ihm und seinen Mitarbeitern herzlich für die große Vorbereitungsarbeit, die sie geleistet haben.

Mein Dank gilt weiter unseren Referenten für ihre Bereitschaft, uns ihre Forschungsergebnisse darzulegen. Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Prof. *Cherbuliez* für die Uebernahme des Hauptvortrages verpflichtet.

Schließlich sei den Behörden und der Industrie von Stadt und Kanton Genf für ihre großzügige Unterstützung unserer Tagung bestens gedankt.

Jahresbericht - Rapport annuel 1966 / 1967

Der Bericht über die 78. Jahresversammlung, die am 2. und 3. September 1966 in Basel stattgefunden hat, ist in Band 57, Heft 6 der «Mitteilungen» publiziert worden. Da keine Bemerkungen dazu eingegangen sind, ist dieser genehmigt. Im Namen aller Mitglieder danke ich unserem Sekretär, Herrn Dr. *Miserez* bestens für die vorzügliche Abfassung des Berichtes und für die große Arbeit, die er im Laufe des vergangenen Jahres für unsere Gesellschaft geleistet hat.

Mitgliederbewegung - Mouvement des membres

Im Verlaufe des vergangenen Jahres wurden folgende Mitglieder neu aufgenommen:

a) Einzelmitglieder:

Dr. Friedrich Conti, Fribourg
Dipl. Ing.-Agr. Armin Frey, Zollikerberg
Peter Halasz, Birsfelden
Dr. Joseph Jutz, Nidau
Jean-Claude Mathez, Neuchâtel
Dr. Pierre Mivelaz, Martigny
Dr. Jacques Monnin, Neuchâtel
Dr. Hans-Peter Thier, La Tour-de-Peilz
Ing. Chim. Jean Tiercy, Genève
Dr. Jacques Vogel, Genève
Dr. Karl Woidich, Wien

b) Kollektivmitglieder:

Conserveries Estavayer SA, Estavayer-le-Lac
Brauerei A. Hürlimann AG, Zürich

Ich heiße die neuen Mitglieder herzlich willkommen und hoffe, daß sie aus ihrer Mitgliedschaft bei uns nicht nur fachlich, sondern auch durch Anknüpfung freundschaftlicher Beziehungen zu Fachkollegen bereichert werden.

Seit der letzten Jahresversammlung sind drei Mitglieder verstorben:

Am 19. September 1966 verunglückte Ing. Chem. *Fritz Förg* tödlich in seinen geliebten Bündneralpen, im Alter von 51 Jahren.

Am 25. September 1966 verschied alt Kantonschemiker Dr. *Ernst Müller*, Schaffhausen, im Alter von 85 Jahren. Er war seit 1910 Mitglied unserer Gesellschaft.

Nach schwerer Krankheit verschied am 3. März 1967 Dr. *Paul Steinegger*, Adjunkt der Gutsverwaltung und Eidg. landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld-Bern im Alter von 61 Jahren.

Alle, die sie in voller Aktivität gekannt haben, werden die drei verstorbenen Kollegen in guter Erinnerung behalten. Nekrologie werden im Bericht über die Jahresversammlung erscheinen.

Leider muß ich Ihnen weiter bekanntgeben, daß ein mehrmaliger Gast unserer Gesellschaft, mit dem wir enge Beziehungen pflegen durften, Minister Dr. *H. Frenzel*, Präsident des Rechnungshofes, Wien, verstorben ist.

Meine Damen und Herren, ich bitte Sie, sich zum Gedenken an unsere dahingegangenen Kollegen und Freunde zu erheben. Danke.

Auch im vergangenen Jahr haben wir einige Austritte wegen Pensionierung oder Wechsel des Arbeitsgebietes zu verzeichnen.

Es sind dies:

Corplan Associates Consultants to Management, Haag, Scheveningen
Dr. K. Eschle, Basel
Dr. O. Furrer, Köniz
Dott. M. Giriodi, Torino
Prof. Dr. O. Howald, ETH, Zürich
H. Pulver, Liebefeld-Bern
M. R. Rütti, dipl. Ing. agr., Basel
Schweiz. Zentralstelle der Nahrungs- und Genussmittelwirtschaft, Bern

Der Vorstand hat diese Austritte genehmigt.

Der Mitgliederbestand stellt sich damit auf:	1966	1967
Ehrenmitglieder	7	7
Einzelmitglieder	300	302
Kollektivmitglieder	123	123
	430	432

Von den Einzelmitgliedern entfallen 28 auf Freimitglieder, 246 auf Mitglieder des Inlandes und 28 auf ausländische Einzelmitglieder. Unser Bestand hat somit im letzten Jahr um 2 Mitglieder zugenommen.

Es freut mich, heute drei unserer Mitglieder nach 35jähriger Mitgliedschaft zu Freimitgliedern ernennen zu können. Es sind die folgenden Herren, die ich bitte, falls sie anwesend sind, ihre Freikarten in Empfang zu nehmen:

Herrn G. Meyer, Chemiker bei Hero-Conserven, Lenzburg
Herr Dr. A. Schmal, alt Dir. der Versuchsstation schweizerischer
Brauereien, Hirzel ZH
Herr J. Stalé, Station fédéral d'essais agricoles, Lausanne.

Unsern neuen Freimitgliedern gratuliere ich herzlich und danke ihnen, daß sie unserer Gesellschaft so lange die Treue gehalten haben.

Zum Schluß habe ich das große Vergnügen, unserem Freimitglied Herrn E. Addor, La Rosiaz sur Pully, recht herzlich zu gratulieren. Seit 1906 in unserer Gesellschaft, gebührt ihm als langjährigstem Mitglied für seine vorbildliche Treue ganz besondere Erwähnung.

Herrn E. Vautier, Lausanne, ebenfalls Freimitglied, verdanken wir herzlich sein Glückwunschtelegramm, das er uns für die heutige Jahresversammlung zukommen ließ. Beide Herren versichern wir unserer besten und freundlichsten Wünsche für die Zukunft.

Nekrolog - Nécrologies

Ing.-Chem. Fritz J. Förg (1915—1966)

Am 19. September 1966 verunglückte F. Förg tödlich in seinen geliebten Bündnerbergen. Unserer Gesellschaft gehörte er seit dem Jahre 1959 an.

Am 16. Mai 1915 in Nürnberg geboren bestand er 1937 am Ohm-Polytechnikum in Nürnberg das Abschlußexamen als Ingenieur-Chemiker. Der zweite Weltkrieg verunmöglichte ihm zunächst, eine Berufslaufbahn zu beschreiten. Mehrmals verwundet und zweimal verschüttet, kehrte er als Major aus dem Kriege zurück.

Zunächst arbeitete er als Praktikant in der bayrischen Milchversorgung in Nürnberg, wo er bald die chemisch-bakteriologische Betriebskontrolle selbstständig leiten konnte. Im Sommer 1950 organisierte er in der Nordmolkerei Deller in München neben der Betriebskontrolle die Erzeugung einer keimarmen Milch. Er war auch der Mitbegründer der «Interessengemeinschaft milchwirtschaftlicher Laboratoriumsleiter».

In den Jahren 1951/52 konnte er mit einem USA-Stipendium an der Universität Wisconsin studieren, wo er den Grad eines «Master of science in public health» erwarb.

Im Herbst 1955 kam er in die Schweiz, wo er die Leitung eines Laboratoriums zur Entwicklung und zum Vertrieb chemisch-bakteriologischer Testmethoden begründete. Seine erste Entwicklung war das Bactostripverfahren, ein in seiner Einfachheit bestechender Test für den Colinachweis. Auch das Watorpapier

zum Nachweis der Wasserverteilung in Butter fand weltweites Interesse. Zusätzlich entwickelte er eine Reihe origineller Teste für medizinische, kriminalistische und lebensmittelchemische Untersuchungen. Aus diesem Laboratorium entstand dann die ATESMO AG, die mit der Firma Macherey, Nagel & Co. in Düren zusammenarbeitet. Für die Weltgesundheitsorganisation entwickelte er Teste für den Resistenznachweis auf verschiedene Insektizide. Im Jahre 1962 begründete er die internationale Studiengemeinschaft für angewandte Tüpfelanalyse, deren Vorsitz Prof. F. Feigl übernahm.

Fritz Förg besaß die innere Unruhe des Forschers, die ihn immer zu neuen Entwicklungen führte. Daneben war er ein liebenswürdiger, vielseitig gebildeter Kollege.



Dr. Ernst Müller-Hoessly. Schaffhausen (1882—1966)

Am frühen Sonntagmorgen des 25. September 1966, verschied in seinem 85. Altersjahr alt Kantonschemiker Dr. E. Müller-Hoessly an einer Herzkrise. Damit hat sich das Leben eines Mannes erfüllt, der es verdient, daß auch an dieser Stelle seiner gedacht wird.

Ernst Müller wurde als Sproß eines alten Schaffhauser Geschlechtes am 16. April 1882 in Schaffhausen geboren. Bis zur Maturität durchlief er die Schulen seiner Vaterstadt. Schon früh für die Naturwissenschaften begeistert, studierte er Chemie bei den Professoren Lunge, Gnehm, Bamberger und Treadwell am Polytechnikum in Zürich, um darauf bei Professor Diels in Berlin zum Doktor zu promovieren. Nach kurzer Tätigkeit in der Privatindustrie zog es ihn nach Schaffhausen zurück, wo er am 1. Juli 1909 als Mitarbeiter von Professor Meister in das kantonale Laboratorium eintrat. In Anbetracht des kleinen Kantons und der beschränkten Mittel fühlte er sich zu sparsamer Amtsführung verpflichtet. Während 43 Jahren widmete er sich, ohne geschulte Hilfskräfte, der Alltagsarbeit mit voller Hingabe. Seine Beobachtungen im Laboratorium, die von seinem reichen Wissen zeugen, veröffentlichte er in den Mitteilungen des Eidg. Gesundheitsamtes. Aus seiner Feder stammen eine Reihe von Beiträgen, wie: «Ueber die Bestimmung von Salicylsäure in Konfitüren», «Ein einfacher Saponin-Nachweis», «Ueber die Berechnung des Wasserzusatzes bei Milchfälschungen», «Die Berechnung der Milchtrockensubstanz», «Die Untersuchung geronnener Milch» und zahlreiche andere interessante Arbeiten.

Der abstrakte Denker liebte zeitlebens das königliche Schachspiel, das ihm schon während der Studienzeit verdiente Siegerehren eintrug. Im Jahre 1903 wurde er nach harten Kämpfen schweizerischer Schachmeister. Mit selten anzu treffender Selbstdisziplin widmete er sich ferner dem Sport. Er war einer der ältesten aktiven Mitglieder der Bogenschützengesellschaft von Schaffhausen. Er spielte regelmäßig Tennis, dem er wohl seine jugendliche Spannkraft verdankte. Ein begeisterter Freund der Berge, bestieg er noch mit 68 Jahren den Matterhorn-Gipfel. Außerdem zählte er zu den Schaffhauser Ski-Pionieren, die schon vor Jahrzehnten dem damals noch neuen Sport eifrig huldigten.

Fernerstehende mögen die lautere Gesinnung und die hohen menschlichen Qualitäten von *Ernst Müller* nicht so leicht erkannt haben, weil sein schlichtes Wesen ihn nicht in den Vordergrund rücken ließ. Er wirkte, jeder Ueberheblichkeit abhold, mehr durch das Beispiel treuer Pflichterfüllung. Seine langjährigen Staatsdienste, nebenbei auch an der Landwirtschaftsschule, sowie seine ehrenamtliche Tätigkeit als Aktuar der Liga gegen die Tuberkulose zeugen für seine Verbundenheit mit der Heimat, mit Land und Leuten.

Die Frische seines Geistes und die nie versagende Spannkraft seines Wesens sind ihm bis ins hohe Alter erhalten geblieben. So wird er im Andenken seiner Bekannten und Freunde weiterleben als ein Mann, der sich in all seinem Tun durch den Adel seiner Gesinnung auszeichnete.

X Dr. Paul Steinegger (1905—1967)

Dr. *Paul Steinegger*, Adjunkt der Gutsverwaltung der Eidg. landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld, verschied am 3. März 1967 im Alter von 61 Jahren. Der Verstorbene, geboren am 31. Dezember 1905 in Neunkirch (SH) erwarb sich an der Kantonsschule Schaffhausen die Maturität und anschließend an der Landwirtschaftlichen Abteilung der ETH das Diplom eines Ingenieur agronom. Während der Jahre 1930—1934 war er wissenschaftlicher Mitarbeiter der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil und erlangte in dieser Zeit mit der Dissertation: «Zytologisch bedingte Ei- und Zygogensterilität bei triploiden Apfelsorten» den Titel Dr. sc. techn. Von 1934 bis 1952 amtierte Dr. *Steinegger* als Hauptlehrer für Tierzucht an der landwirtschaftlichen Schule Liestal, wo ihm während der Kriegszeit die Leitung der kantonalen Zentralstelle für Heu- und Strohversorgung übertragen wurde und er als Beauftragter für die Schlachtvieh- und Fettversorgung verantwortlich war. 1953 erfolgte auf dem Berufungswege seine Wahl zum Direktor der Schweiz. Geflügelzuchtschule in Zollikofen und Ende 1961 übernahm er die Leitung der Schweinemastversuche an der Gutsverwaltung Liebefeld. *Paul Steinegger* war von jung auf ein frohgemuter, sangesfreudiger und geselliger Mensch. Daneben war er ein ernster und harter Arbeiter, der stets mit vollem Einsatz und großer Begabung an die vielfältigen Probleme herantrat, deren Bearbeitung ihm übertragen war. In seiner Tätigkeit war ein Wesenszug stets zu erkennen, nämlich das Streben, mit seiner Arbeit die Wahrheit zu finden und nicht persönlichen Ruhm und Erfolg. Hatte er neue Erkenntnisse gewonnen, die auf Grund des Experimentes und nach sorgfältigem Abwägen aller Umstände als richtig und wahr gelten konnten, so stand er unerschrocken zu dieser Wahrheit. In freier Rede verstand er es, seine Ansichten freudig und mutig zu vertreten und seine Zuhörer zu fesseln. Auch nahm er in Lehrmitteln und zahlreichen Berichten zu einschlägigen Tagesfragen Stellung. Hier seien nur erwähnt: Rindviehzucht (1. Aufl. 1943, 3. Aufl. 1953) Hühnerhaltung als Nebenerwerb (4. Aufl. 1966). Ergebnisse der Schlachtqualitätskontrol-

le beim Schwein in «Neue Forschungs- und Untersuchungsergebnisse der Schweiz. Tierproduktion 1965». — Nebst großer Anerkennung, die ihm für ein erfolgreiches Schaffen zu Teil wurde, blieben ihm Früchte der Mißgunst und des Neides nicht erspart.

Vorstand — Comité

Der Vorstand erledigte die laufenden Geschäfte des Jahres in 4 Sitzungen. Die Gesellschaft war im vergangenen Jahr wie folgt vertreten:

- im Schweizerischen Komitee für Chemie (*Achermann, Potterat, Schürch*);
- an der Generalversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Chemische Industrie in Neuchâtel (*Potterat*);
- an der Tagung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes in Burgdorf (*Högl*);
- an der Versammlung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft in Fribourg (*Miserez*);
- an der 14. Konferenz der IUPAC (*Cherbuliez* als Präsident des Schweizerischen Komitees für Chemie);
- an einer durch die Gesellschaft Deutscher Chemiker in Frankfurt organisierten Diskussion über den Begriff Automation in der analytischen Chemie (*Simon*).

Einer Einladung des Schweiz. Chemikerverbandes zum 4. Symposium über makromolekulare Stoffe konnte leider nicht Folge geleistet werden. Wegen andern Verpflichtungen des Präsidenten konnte er auch nicht am 7. Kongreß der Association Internationale d'Expertise Chimique (AIDEC) in Paris teilnehmen, zu der ihm Herr Jans eine Einladung zukommen ließ.

Kassabericht - Rapport du caissier

Ueber die Jahresrechnung 1966 berichtet der neue Kassier, *M. Salvisberg*, anhand einer an die Versammlungsteilnehmer abgegebenen Zusammenstellung.
Wichtigste Zahlen:

Postcheck-Saldo auf Ende 1965	Fr. 1 982.93
Postcheck-Einnahmen 1966	Fr. 12 204.97
	<hr/>
Ausgaben 1966	Fr. 14 187.90
	<hr/>
Saldo-Vortrag	Fr. 3 984.05
Gesellschaftsvermögen am 31. Dezember 1966	Fr. 10 203.85
	<hr/>
	Fr. 34 610.80

Nach Verlesen des Berichtes der Revisoren Dr. *M. Refard* und *Tb. Stäheli-Weiß* wird die Rechnung von der Versammlung genehmigt und dem Kassier *M. Salvisberg* unter besonderer Verdankung Decharge erteilt.

Jahresbeitrag - Cotisation annuelle

Der Vorstand schlägt vor, den Jahresbeitrag auf gleicher Höhe wie letztes Jahr zu belassen, d. h., auf

- Fr. 20.— für Einzelmitglieder, Schweiz
- Fr. 25.— für Einzelmitglieder, Ausland
- Fr. 50.— (min.) für Kollektivmitglieder

Der Vorschlag des Vorstandes wird einstimmig genehmigt.

Kommissionsberichte - Rapports des Commissions

Folgende Berichte wurden vor der Jahresversammlung zugestellt: Schweiz. Komitee für Chemie (Prof. *E. Cherbuliez*); Internationale Union für reine und angewandte Chemie (Dr. *R. Morf*); Schweizerische Lebensmittelbuch-Kommission (Prof. Dr. *O. Högl*); Schweizerische Milchkommission (*O. Dönz*); Kommission für Seifen und Waschmittel (Dr. *J. Jutz*); Schweizerische Tabak-Kommission (Dr. *E. Romann*).

Schweizerisches Komitee für Chemie - Comité Suisse de la Chimie pour la période d'août 1966 à août 1967

Rapporteur: Prof. *E. Cherbuliez*, président, Genève

I. Composition. Durant la période sous revue, la composition du Comité a subi deux importantes modifications par suite de l'admission de l'Association Suisse des Chimistes (Schweizerischer Chemiker-Verband) à fin 1966, et de la Gesellschaft Schweizerischer Mikroanalytiker, il y a quelques mois. Les sociétés nationales suisses de chimie les plus importantes se trouvent ainsi toutes groupées au sein du Comité Suisse de la Chimie.

Voici les représentants des sociétés affiliées (dont le président, s'il n'est pas délégué au Comité, prend part aux délibération avec voix consultative):

Société Suisse de Chimie: MM. *Cherbuliez* (Genève), *Guyer* (Zurich) et, comme président de la société, M. *Wettstein* (Bâle).

Société Suisse des Industries chimiques: MM. *Barrelet* (Zofingue), *Sieber* (Attisholz) et, comme président de la société, M. *Junod* (Bâle).

Société Suisse de Chimie analytique et appliquée: MM. *Achermann* (Neuchâtel), *Potterat* (Berne) et, comme président de la société, M. *Schürch* (Zurich).

Société Suisse de Chimie clinique: M. *Roth* (Genève), président de la société.

Société Suisse de Biochimie: M. *Martius* (Zurich), président de la société.

Association Suisse des Chimistes: MM. *Max Lüthi* (Berthoud), président de la société, et *Rutishauser* (Attisholz).

Gesellschaft Schweizerischer Mikroanalytiker: président M. *Lehner* (Berne); les deux délégués de cette société sont encore à désigner.

II. Activités nationales. En dehors des affaires courantes, liquidées soit par correspondance avec les membres du Comité, soit par le président directement, le Comité a tenu sa séance annuelle habituelle. Les décisions les plus importantes concernent l'admission (déjà mentionnée plus haut) de l'Association Suisse des Chimistes et de la Gesellschaft Schweizerischer Mikroanalytiker. D'autre part, le Comité a constitué à cette séance sa délégation (6 délégués) à la XXIVe Conférence de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UICPA) à Prague et arrêté sa position au sujet des divers points à l'ordre du jour de cette conférence.

III. Affaires internationales. C'est avant tout la Conférence précitée de l'UICPA, à laquelle la Suisse a pu prendre part avec les 6 délégués auxquels elle a droit, qui retiendra notre attention. Nous nous contenterons de signaler les décisions les plus importantes qui y ont été prises.

1. Le président en exercice, Prof. *Klemm* (Allemagne) étant arrivé au terme de son mandat, c'est selon les statuts le vice-président, le Prof. *Kondratiev* (URSS) qui assume la présidence pour deux ans, soit dès la fin de la XXIVe Conférence (2 septembre 1967) jusqu'à la fin de la XXVe Conférence qui aura lieu dans deux ans, et qui se réunira à Rome. Comme vice-président a été élu le Prof. *Rees* (Australie).

2. Jusqu'à présent, les conférences ont toujours eu lieu au même endroit et en même temps (soit pendant, soit immédiatement avant) que les congrès internationaux de l'UICPA. Pour des raisons d'économie, la prochaine et XXVe conférence — aux tâches administratives — se tiendra en Europe (Belgique), tandis que le XXIIe congrès international aura lieu en Australie, tous deux en 1969.

3. Statut juridique et siège légal de l'UICPA. Jusqu'ici l'UICPA n'avait pas de statut légal particulier, et son siège était nominalement à Paris. Il a été décidé de transférer le siège légal à Zurich — la localisation du secrétariat n'étant pas encore fixée — et de constituer l'UICPA en association internationale sans but lucratif, ce qui lui conférera des avantages fiscaux.

4. M. *Morf* (Suisse) a été réélu pour un nouveau mandat comme secrétaire général, de même que le trésorier, M. *Baylar jr.* (Etats-Unis).

5. Collaboration UICPA et UIB (Union internationale de Biochimie). L'activité de l'UIB recouvrerait indiscutablement en partie celle de la division de chimie biologique de l'UICPA, malgré la collaboration qui s'était établie entre ces deux Unions, telle p. ex. la commission mixte de nomenclature biochimique. La conférence a décidé la suppression de la division de chimie biologique de l'UICPA, qui s'occupait des aspects chimiques proprement dits de la biochimie, ces aspects pouvant être étudiés par les divisions respectives de chimie organique, de chimie analytique et de chimie macromoléculaire; cette dernière sera représentée à l'avenir au sein de l'UICPA par une division de chimie macromoléculaire dont la création a été décidée à Prague.

6. Collaboration UICPA-Fédération Internationale de Chimie clinique. Ici encore une collaboration plus étroite a été décidée, devant éliminer les doubles emplois et permettre en même temps à l'UICPA de financer, du moins en partie,

certaines activités de la Fédération, notamment les travaux sur les méthodes analytiques. Le Bureau de l'UICPA a été chargé de trouver une solution quant à la forme de cette association, la division de chimie analytique de l'UICPA n'ayant pas voulu créer en son sein une section de chimie clinique.

7. Problèmes financiers. La situation de l'UICPA est toujours tendue en raison de l'accroissement constant de son activité et de son désir de réaliser la participation effective de chimistes qualifiés, quel que soit le lieu de leur résidence. La création d'une catégorie de membres industriels «associés» a déjà apporté un certain allégement; un barème de cotisations basé sur la valeur de la production de l'industrie chimique des divers pays est à l'examen.

Activité de l'IUPAC — août 1966 à août 1967

Rapporteur: Dr. R. Morf, Secrétaire général, Bâle

L'année 1966 ayant été une année sans conférence, c'est-à-dire sans assemblée générale, notre activité s'est concentrée sur les Divisions, Sections et particulièrement les Commissions spécialisées. Dans un rapport tel que celui-ci, il est difficile d'énumérer les activités d'après leur importance ou leur date. Pour cette raison, je me réfère donc à la structure de l'IUPAC et débuterai par l'activité du Comité exécutif:

1. Le Comité exécutif, dont les membres sont recrutés dans trois continents, ne s'est réuni qu'une fois, en avril dernier à La Haye, — ceci à la fois pour des raisons financières et dans le but également de ne pas trop déranger les savants éminents qui le composent. La réduction du nombre des séances du Comité exécutif entraîne, comme conséquence immédiate, un accroissement considérable de la correspondance émanant du Secrétariat.

Afin d'éviter d'énumérer les résultats, je me bornerai à mentionner, ci-après, l'ordre du jour; c'est la manière la plus brève de donner une idée de l'ampleur de sujets traités:

1. Finalization of the Agenda
2. Minutes of the last Meeting (Zürich, 1966)
3. Associated Organizations and independent Sections
 - a) Comité International de Thermodynamique et Cinétique Electrochimiques (CITCE) (already an Associated Organization)
 - b) European Federation of Chemical Engineers (already an Associated Organization)
 - c) International Congress on Catalysis
 - d) International Federation of Clinical Chemistry
 - e) Division on Biochemistry
 - f) CID (Comité International des Dérivés tensio-actifs)

4. Legal Status of IUPAC
5. Applications regarding Membership: change in category - Canada
6. Company Associates
7. President's Report
8. Treasurer's Report
9. Report of the Finance Committee
10. Budget and Day to Day Finances
11. Continuation of Commissions; new Commissions
12. Sponsorship
13. Prague — Conference and Congress
14. Elections; number of Bureau Members
15. Circular letters (July 1966 — March 1967)
16. Publications
17. Developing countries
18. Co-operation with UNESCO
19. Co-operation with CEE
20. Place and date of next meeting
21. Any Other Business

(Le Secrétaire général se fait un plaisir de fournir, sur demande, le texte des procès-verbaux).

2. Etant données les dépenses considérables que comporte une convocation des 23 membres constituant le Bureau de l'Union (quelque 12 000 \$), une réunion du Bureau a été supprimée, ainsi que la réunion statutaire des présidents de Divisions, pour des raisons d'économie.

3. *Les Divisions*

I. *Division de Chimie — Physique — Electrochimie*

Le Président du Comité International de Thermodynamique et de Cinétique Electrochimiques (CITCE), le Professeur *N. Ibl* de Zurich, a soumis des propositions très intéressantes en vue d'amorcer une activité plus fructueuse dans le domaine de l'électrochimie tout en laissant à l'IUPAC la priorité dans les matières traitant des définitions, des symboles, de la terminologie et de la nomenclature. La coopération avec CITCE, à l'échelon du Bureau des deux Associations, est en voie de réalisation.

Chimie macromoléculaire. Le Professeur *O. Wichterle* de Prague, Président de la Commission de Chimie Macromoléculaire, expert éminent de renommée mondiale, a proposé — compte tenu de l'importance de toutes les substances de composition macromoléculaire — de créer une nouvelle division des Sciences de produits de haute polymérisation. Cette Division n'intéresse pas seulement toutes des Divisions de l'IUPAC mais égale-

ment l'industrie chimique. Outre les problèmes se rapportant à l'industrie des matières plastiques, elles traitera des sujets touchant aux substances macromoléculaires ayant une activité biologique.

Colloides et Surfaces. L'on vient de recevoir le premier projet du rapport de cette Commission — rapport qui compte quelque 60 pages — pour distribution et commentaires.

Radioactivité appliquée. La Commission mixte de Radioactivité appliquée a décidé, pour des raisons d'économie, de renoncer à toute réunion internationale et permettre ainsi de patronner, certes assez modestement, les symposia organisés par l'Agence de l'Energie Atomique à Vienne.

II. *Chimie minérale — Nomenclature de chimie inorganique*

La Commission de Nomenclature de chimie inorganique vient d'élaborer de nouvelles règles, déjà imprimées sous forme d'épreuves, en nombre très limité.

Poids atomiques. La Commission des Poids atomiques va publier quelques nouveaux chiffres pour les Poids atomiques. Les nouvelles méthodes appliquées ont permis une précision extrême.

Hautes températures et Réfractaires. La Commission des Hautes températures, réduite à peu de membres, a distribué des rapports très appréciés — rapports qui ont été compilés principalement par les membres du «Bureau of Standards» de Washington.

III. *Chimie organique — Nomenclature de Chimie organique*

La Commission de Nomenclature de Chimie organique vient de publier le livre bleu «Nomenclature of Organic Chemistry Section C» de quelque 260 pages. En voici la préface:

«Section C deals with the nomenclature of compounds with characteristic groups containing carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, halogen, sulfur, selenium, and/or tellurium. It thus supersedes almost all of Sections IV, V and VII of the Lièges rules, and also the relevant parts of the later revision of Section VI.»

Chimie clinique. Le Docteur M. Sanz, Secrétaire de la Fédération de Chimie clinique, et son futur Président, le Docteur M. Rubin, ont proposé d'introduire une nouvelle activité dans ce domaine en plein essor; c'est pour cette raison que l'on a entrepris des échanges de personnel entre la Fédération Internationale de Chimie clinique et l'IUPAC. La Commission de Chimie clinique — sous forme de section — se rattachera à la Division

de Chimie analytique et recevra ainsi toute la stimulation souhaitable de la part de la Division de Chimie analytique, laquelle est en pleine évolution technique.

V. Chimie analytique

La Division de Chimie analytique, consciente de la tendance qui vise à introduire des méthodes analytiques à la fois plus efficaces et plus exactes dans toutes les sphères de la vie humaine, est de plus en plus stimulée par le développement de la technologie et de la recherche en chimie. Cette Division a consenti à coopérer avec celle de Chimie appliquée dans un champ nouveau d'activité. Consciente aussi du développement rapide des Sciences physiques, théoriques et appliquées et, étant donnée la nécessité d'utiliser les possibilités d'automation, la Division de Chimie analytique organise le XXI^e congrès de Chimie Pure et Appliquée à Prague du 4 au 10 septembre 1967. Outre cette discipline centrée sur la Chimie analytique les organiciens tiendront un symposium sur la Chimie des acides nucléiques. Il est à relever également que le congrès de Prague traitera du problème relatif à la toxicologie moderne. Notons encore que la Division de Chimie analytique manifeste un intérêt très vif et étudie très efficacement la détection des substances provoquant ou stimulant la croissance des cellules cancéreuses.

VI. Chimie appliquée

La Division de Chimie appliquée, dans sa coopération très étroite avec l'industrie chimique, a non seulement fourni des données très importantes aux agences spécialisées des Nations-Unies mais aussi, sous la direction de son Président très actif, le professeur René Truhaut, elle a conclu un contrat de coopération avec les autorités du Marché Commun à Bruxelles.

Après la mise en œuvre de la structure du travail, il s'agit surtout d'élaborer des méthodes analytiques pour contrôler les critères de pureté des additifs aux aliments. Toute recherche sur l'environnement humain exige, comme condition sine qua non, la connaissance exacte du dosage et de la présence de toute substance, même existant en quantité infime, dans l'air, les eaux etc. . . Aucune recherche dans ce domaine très vaste ne saurait se faire sans utilisation des méthodes analytiques.

En dépit des efforts incessants du Secrétaire général, il n'a pas encore été possible de trouver l'assistance compétente indispensable pour garantir le succès de notre collaboration avec les autorités du Marché Commun à Bruxelles. Nous cherchons toujours un analyste compétent.

En ce qui concerne les activités des 9 Sections de la Division de Chimie appliquée, je me réfère au rapport du Président de cette Division publié

dans le Bulletin d'Information No 29. Je me permets d'ajouter seulement que la création de la nouvelle Section des Eaux constituera, pour la conférence de Prague, un sujet d'une importance primordiale.

Le travail de base de la XXIVe conférence de l'IUPAC, à Prague du 28 août au 3 septembre, s'établit selon l'ordre du jour ci-après:

1. Ordre du jour définitif
2. Approbation du Procès-verbal (XXIII^e Paris)
3. Nouvelles Organisations adhérentes, changement de catégories
4. Annonce des candidats aux élections
5. Date et lieu des élections
6. Rapport statutaire du Président
7. Rapport biennal du Trésorier
8. Rapport du Comité financier. Examen de la méthode de financement et de la structure des contributions de l'IUPAC — commentaires et recommandations de la part de l'organisation adhérente des Etats-Unis d'Amérique, ayant trait au rapport du Comité financier.
9. Budget pour 1968 et projet de budget pour 1969
10. Rapport des Présidents de Divisions
11. Publications
12. Rapport du Comité pour l'enseignement de la chimie
13. Approbation par le Conseil des décisions prises par le Bureau et le Comité exécutif depuis la XXIII^e conférence
14. Elections
15. Statut juridique de l'IUPAC
16. Siège de l'IUPAC, statut 4.3
17. Compagnies associées
18. Patronage
19. Organisations associées
20. Coopération avec les Agences des Nations-Unies et d'autres organisations internationales
21. Rapports des Présidents de Divisions sur l'activité future des Divisions
22. Détermination de la langue dans laquelle seront rédigés les documents officiels — statut 5.405
23. Dates et lieu de la XXVe Conférence et du XXII^e Congrès
24. Divers

D'ores et déjà, il est à mentionner qu'à l'issue de la conférence l'Acémicien, V. N. Kondratiev, assumera les fonctions de Président de l'IUPAC pour les années 1967 à 1969.

Schweizerische Lebensmittelbuch-Kommission

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Högl, Bern

Der 1. Band des Schweiz. Lebensmittelbuches in 5. Auflage, in deutscher Sprache, der zu Beginn des Jahres 1965 erschien, ist, soweit wir dies den Buchbesprechungen und der Zahl der verkauften Exemplare entnehmen konnten, in Fachkreisen gut aufgenommen worden. Ein Band, der als Ganzes erscheint, wird aber stets der Gefahr ausgesetzt sein, daß einzelne Teile schon bei der Publikation überholt sind, da die Ueberarbeitung infolge der Drucklegung usw. nicht bis zum letzten Augenblick nachgeführt werden kann.

Für den 2. Band, der sich mit den Untersuchungsmethoden für einzelne Lebensmittel befaßt, wurde deshalb, wie bekannt, die Form des Ringbuches gewählt. Sie hat den Vorteil, den Inhalt stets à jour zu halten, aber auch viele Nachteile, was wir an allen Werken, die in Form von Ringbüchern erscheinen, beobachten können: zu Beginn zahlreiche Lücken, langsames Auffüllen derselben durch Nachträge, organisatorische Schwierigkeiten beim Ersatz der Blätter, hohe Kosten usw.

Wir haben darum davon abgesehen, jede einzelne Methode auf einem Blatt zu publizieren, sondern beschlossen, jeweils erst dann mit dem Druck zu beginnen, wenn ein ganzes Kapitel vorliegt.

Es dürfte zweckmäßig sein, einmal eine Uebersicht in personeller Hinsicht über die Mitarbeiter an dem Werk zu geben. Im Stillen wird hier eine gewaltige Leistung vollzogen, die nicht großartig honoriert ist, sondern aus Freude an der Sache und aus Idealismus erfüllt wird. Wir sind es diesen Mitarbeitern, die größtenteils Mitglieder dieser Gesellschaft sind, schuldig, daß wir sie einmal in den «Mitteilungen» nennen. Später ist es vielleicht schwierig, die Namen wieder zu finden.

Die gegenwärtige Zusammensetzung der Schweizerischen Lebensmittelbuch-Kommission ist im 1. Band gegeben. Unterdessen ist an Stelle von Herrn Dr. M. Staub, Zürich, Herr Dr. R. Müller, Basel, getreten. Die Mitarbeiter an dem publizierten 1. Band sind ebenfalls in diesem aufgeführt. Als Sekretär amtete Herr Dr. A. Miserez.

Wie schon in früheren Berichten an dieser Stelle erwähnt, sind am 2. Band etwa 21. Subkommissionen am Werk, die in mehrere Gruppen zusammengefaßt sind.

Als Gruppenobmänner wirken die Herren:

- Gruppe 1: Dr. W. Ritter, Liebefeld-Bern
- Gruppe A: Dr. H. Forster, Zürich
- Gruppe B: Dr. H. Hadorn, Basel
- Gruppe C: Dr. H. Rentschler, Wädenswil
- Gruppe D: Dr. R. Müller, Basel

Subkommissionen

Nr.	Fachgebiet	Vorsitz	Mitglieder und Experten
1	Milch, Milchprodukte	Dr. W. Ritter, Liebefeld-Bern	Dr. H. Baumgartner, Bern Dr. H. Hänni, Bern P. Schild, Bern Dr. J. Stein, Konolfingen Dr. R. Walser (†), Rütti
2	Speisefette und -öle, Mayonnaise	Dr. H. Forster, Zürich	Dr. W. Ritter, Liebefeld-Bern Dr. E. Schüpbach, Steffisburg Dr. H. U. Brügger, Steffisburg
3	Fleischwaren, Suppen- präparate	bisher: Dr. M. Staub, Zürich (in Neubildung begriffen)	
4	Körner- und Hülsen- früchte, Zerealien, Preßhefe, Back- pulver usw.	Dr. E. Ziegler, Zollikerberg	Dr. A. Krieger, Neuenegg M. Schnebli, Baden Dr. K. Escher, Kemptthal Dr. F. Borel, Wädenswil Dr. W. F. Dreyer, Hindelbank
5	Diätetische Lebensmittel, Teigwaren, Eier und Eierkonserven	Dr. H. Hadorn, Basel	Dr. H. Kramer, Belp Dr. A. Krieger, Neuenegg Dr. M. Henzi, Frauenfeld Dr. H. Rauch (†), Bern Dr. E. Hirt, Belp W. Ernstberger, Neuenegg Dr. L. Capol, Bern
6	Obst und Gemüse, Frucht- säfte, alkoholfreie Geträn- ke, Gelées, Konfitüren	Dr. H. Rentschler, Wädenswil	Dr. A. Grob, Märwil K. Braschler, Bern G. Meyer, Lenzburg
7	Honig, Zucker, Konditoreiwaren	Dr. J. Wicki, Luzern	Dr. H. Hadorn, Basel K. H. Eschmann, Zug Dr. W. Fivian, Aarberg Dr. F. Adam (†), Luzern
8	Trinkwasser, Eis, Mineralwasser	Dr. E. Wieser St. Gallen	Dr. R. Burkard, Solothurn Dr. O. Thomann, Zürich
9	Kaffee, Tee, Kakao, Schokolade	Dr. O. Schetty, Neuchâtel	Dr. J. Kleinert, Kilchberg E. Junker, La Tour-de-Peilz Dr. P. Anker, La Tour-de-Peilz
10	Gewürze, Kochsalz	Dr. R. Müller, Basel	Prof. H. Flück A. Massarotti, Lugano R. Rutishauser, Schweizerhalle

Nr.	Fachgebiet	Vorsitz	Mitglieder und Experten
11	Vin, Cidre, Substances pour le traitement en cave	Dr. F. Achermann, Neuchâtel	E. Capt, Lausanne Dr. H. Rentschler Wädenswil Dr. J. Venetz, Sion Dr. S. Janet, Zürich
12	Spirituosen, Bier, Essig	Dr. M. Potterat, Bern	Dr. H. Forster, Zürich Dr. H. Pfenninger, Zürich
13	Agents conservateurs, édulcorants artificiels	Dr. A. Ramuz, Lausanne	Prof. J. Deshusses, Genève Dr. R. Jahn, Bern
14	Gefäße für Lebensmittel, Spielwaren	J. Studinger, Basel	Dr. H. Forster, Zürich Dr. J. Bäumler, Basel
15a	Textilien und dafür dienende Farben, Petroleum, Benzin	Dr. G. Stamm, St. Gallen	Dr. A. Lauchenauer, Horn K. Thierstein, Zürich
15b	Kosmetika, Reinigungsmittel	Dr. H. Brüschweiler, St. Gallen	Dr. E. Jaag (†), Biel Dr. B. Lange, Basel
16	Tabak	Dr. E. Romann, Zürich	Dr. C. Motta, Aarau Prof. K. Grob, Wallisellen Dr. Ch. Corbaz, Nyon Dr. R. Monod, Lausanne
17	Gelier- und Verdickungsmittel	bisher: Prof. O. Högl, Bern (in Neubildung begriffen)	
18	Kunststoffe	Dr. E. Baumgartner, Bern	Dr. P. Fink, St. Gallen Dr. E. Flückiger, Liebefeld-Bern Dr. E. Romann, Zürich Dr. M. Staub, Zürich
19	Schädlingsbekämpfungsmittel	Dr. R. Müller, Basel	M. Gruber, Dielsdorf Dr. Weilenmann, Zürich
20a	Farbstoff-Kommission	bisher: Prof. O. Högl, Bern (in Neubildung begriffen)	
20b	Substances aromatisantes	en formation	
21	Bakteriologisch-hygienische Fragen für alle Lebensmittel	bisher: K. H. Eschmann, Zug ad interim: Dr. E. Wieser, St. Gallen	Dr. T. Emmenegger, Basel Dr. vet. U. Erez, Lugano Dr. H. Lüönd, Zürich E. R. Merk, dipl. Ing. chem. Frauenfeld Dr. P. Ritter, Liebefeld H. Schneider, Bern Dr. O. Thomann, Zürich Dr. J. Wicki, Luzern

Schweizerische Milchkommission

Berichterstatter: O. Dönz, dipl. agr., Chur

Die Spezialkommission für amtliche Kontrolle der Milch und Milchprodukte (Präsident Dr. J. Wicki, Luzern) nahm Stellung zum umfangreichen Entwurf der Spezialkommission für hygienische Milchgewinnung über die Neufassung der Vorschriften in der Lebensmittelverordnung (LMV) für Vorzugsmilch. Ferner wurde beschlossen, den Butterartikel (Art. 93) der LMV neu zu bearbeiten, um dahin zu wirken, die Möglichkeiten zu verringern, daß Butter, aus nicht pasteurisiertem Rahm hergestellt, unter die Bezeichnung Kässerei-, Sennerei-, Berg- oder Alpbutter auf dem Tisch als Tafelbutter Verwendung findet. Im Jahre 1948 wurde der Begriff Doppelrahm aus der LMV gestrichen. Da vor allem in der Westschweiz solcher Rahm, z. B. unter der Bezeichnung «Crème de la Gruyère» in den Handel kommt, soll der Doppelrahm mit 45 % Fett in der LMV wieder aufgeführt werden. Art. 73 der LMV schreibt u. a. vor, daß eine Milch nur als «pasteurisiert» bezeichnet werden darf, «... wenn sie möglichst bald nach der Gewinnung, spätestens aber nach 24 Stunden in geeigneter Weise erhitzt wird». Da durch die Einrichtung von Tiefkühlwanlagen in den Milchsammelstellen, teilweise sogar auf Bauernhöfen, die Milch in vielen Fällen nur noch einmal täglich abgeführt wird, kann die Vorschrift «nach 24 Stunden» in vielen Großmolkerien, die öfters noch Milch ab Regulierstellen erhalten, nicht immer eingehalten werden. Von der Ueberlegung ausgehend, daß eine Milch, die älter als 24 Stunden ist, bei richtiger Behandlung, vor allem bei Einhaltung der geschlossenen Kühlkette, die bessere bakteriologische Beschaffenheit aufweisen kann als eine unrichtig behandelte jüngere Milch, schlägt die Kommission folgenden Abänderungsantrag vor. «Als „pasteurisiert“ darf eine Milch nur dann bezeichnet werden, wenn sie möglichst bald nach der Gewinnung, falls sie nicht tiefgekühlt ist (unter 5 °C), spätestens nach 24 Stunden in geeigneter Weise erhitzt ...»

In Zusammenarbeit mit dem eidgenössischen Veterinäramt befaßte sich die Spezialkommission für hygienische Milchgewinnung (Präsident PD. Dr. H. Baumgartner, Liebefeld-Bern) mit dem bedeutungsvollen Problem der Schaffung eines schweizerischen Eutergesundheitsdienstes. Im weitern wurde beschlossen, ein Merkblatt über vorsorgliche Maßnahmen gegen Krankheitsübertragungen durch die Milch auszuarbeiten.

Es ist zu hoffen, daß die Arbeitsgruppe für die Revision des schweizerischen Milchlieferungsregulatives ihren ersten Entwurf bis zum Herbst dieses Jahres ausgearbeitet haben wird, so daß noch verschiedene Gremien der Milchkommission sich dazu äußern können.

Die Spezialkommission für Ernährungsfragen (Präsident PD. Dr. J. C. Somogyi, Rüschlikon) orientierte sich in Form eines Symposiums über den Käse als Nahrungsmittel und über die biochemischen Vorgänge bei der Käsereifung.

Wiederum umfangreich war die Mitarbeit am «Code des Principes concernant le lait et les Produits laitiers» des «Comité mixte FAO/WHO».

Schweizerische Tabakkommission

Berichterstatter: Dr. E. Romann, Zürich

Im Berichtsjahr hatte die neu ergänzte Kommission mit Vertretern der «Commission scientifique de l'Association suisse des fabricants de cigarettes» eine gemeinsame Aussprache. Die letztgenannte Vereinigung unterbreitete einige Abänderungsvorschläge betreffend die Beurteilungsgrundsätze und die Untersuchungsmethoden über Tabak und Tabakerzeugnisse im provisorischen Lebensmittelbuch, Band II. Die gemeinsamen Beratungen ergaben insofern eine Uebereinstimmung, als voraussichtlich gewisse Analysenmethoden den internationalen Standards angeglichen werden, damit die Resultate allgemein vergleichbar werden.

Die Interpretation der Ergebnisse muß in einem späteren Zeitpunkt mit den abzuändernden gesetzlichen Bestimmungen über Tabak und Tabakwaren in Einklang gebracht werden.

Eine baldige Bereinigung des Kapitels «Tabak und Tabakerzeugnisse» im Lebensmittelbuch ist vorgesehen.

Kommission für Seifen und Waschmittel

Berichterstatter: Dr. J. Jutz, Biel

Das Berichtsjahr war durch verschiedene Abgänge in der Kommission gekennzeichnet. Die Herren Doktoren *H. Sturm*, *E. Jaag* und *O. Wyler* traten nach Erfüllung ihrer Aufgabe aus. Der Berichterstatter konnte sich im Verlauf der letzten Jahre von der hervorragenden Arbeit dieser geistigen Väter des Seifenbuches überzeugen und möchte ihnen an dieser Stelle herzlichen Dank aussprechen.

Damit hat sich die Kommission nach Erfüllung ihres Auftrages von 1938 praktisch aufgelöst.

Die Verkaufsstatistik des Seifenbuches zeigt, daß sich keine Neuauflage aufdrängt und in finanzieller Hinsicht kann bereits geerntet werden. Als eigentliches Handbuch hat das Seifenbuch für schweizerische Verhältnisse noch heute seine volle Berechtigung. In den letzten Jahren hat sich allerdings im Rahmen des CID (Comité international de la détergence) eine fruchtbringende Zusammenarbeit angebahnt, die auch der stürmischen Entwicklung der Tenside und der analytischen Methodik in den Arbeiten der CIA (Commission international d'analyses) Rechnung trägt. In einer allfälligen Neugestaltung des Seifenbuches müßten diese Arbeiten mitberücksichtigt werden, wobei eine Zusammenarbeit auf internationaler Basis nicht ausgeschlossen wäre.

Verkauf des Buches «Seifen und Waschmittel» 2. Auflage und Nachtrag 1963

		1966	1967 (bis 1. 7.)	Restbestand
2. Auflage	deutsch	34	37	154
	französisch	14	9	783
Nachtrag	deutsch	6	0	285
	französisch	1	1	83

Discussion

O. Dönz, rapporteur de la Commission du lait, fait remarquer que l'expression «tiefgekühlt» est employée par les laitiers pour une température inférieure à — 5 °C mais voisine de cette température, alors que généralement on entend par là une température d'au moins — 20 °C.

Prof. O. Högl pense que les milieux laitiers de devraient pas utiliser l'expression «Tiefkühlwanlagen» pour les installations destinées à refroidir le lait avant sa livraison journalière; «tiefgekühlt» signifie bel et bien porté à une température de — 18 °C au moins.

Dr. Wyler bittet mit Schreiben vom 2. August, von der Mitgliedschaft der Seifen-Kommission entbunden zu werden. Er regt an, daß auf die Weiterführung des Seifenbuches verzichtet werden solle. Er schlägt vor, statt dessen in einem internationalen Gremium von Seifenfachleuten an der Bearbeitung der Methoden mitzuarbeiten.

Dr. Jutz, neuer Präsident dieser Kommission, äußert in einem Schreiben vom 23. August ähnliche Gedanken.

Vorschlag: Vom Rücktritt von Dr. Wyler aus der Seifenkommission wird mit Bedauern Kenntnis genommen. Das gute Gelingen des Seifenbuches ist zu einem beträchtlichen Teil seiner aktiven Mitarbeit zu verdanken. Im Namen der Gesellschaft spricht der Präsident Herrn Dr. Wyler die Anerkennung und den Dank für seine langjährige fruchtbare Tätigkeit in der Seifenkommission aus.

Nach Auffassung des Vorstandes soll die Kommission für Seifen und Waschmittel weiter bestehen bleiben. Wenn nötig, ist sie zu ergänzen. Sie soll vor allem Kontakt mit den bestehenden internationalen Gremien aufnehmen und versuchen, mit diesen zusammenzuarbeiten. Die Jahresversammlung ist mit dieser Regelung einverstanden.

Anschließend werden die Kommissions-Berichte einstimmig gutgeheißen.

Wahlen - Elections

Da keine Demissionen im Vorstand vorliegen, sind nur die Rechnungsrevisoren neu zu wählen. Der Vorstand schlägt Ihnen Wiederwahl der bisherigen Revisoren Dr. M. Refardt und Th. Stäheli vor. Dieser Vorschlag wird einstimmig genehmigt.

Festsetzung des nächsten Tagungsortes - Choix du lieu de la prochaine assemblée

Monsieur le Dr. *Y. Siegwart*, chimiste cantonal à Brunnen, nous convie à venir admirer l'année prochaine le berceau de notre pays («Innerschweiz») en tenant nos prochaines assises dans cette région. Cette sympathique invitation est acceptée par applaudissements et M. *Siegwart* remercie pour l'honneur qui lui est ainsi fait.

Verschiedenes - Divers

Die *Statuten*, die an der letzten Jahresversammlung angenommen wurden, sind nun im Druck erschienen und allen Mitgliedern zugestellt worden.

Auf Anfrage des Schweizerischen Chemiker-Verbandes hat der Vorstand sich damit einverstanden erklärt, daß unsere Gesellschaft im Patronatskomitee für die *ILMAC 1968* figuriert.

Dr. *R. H. Egli*, Direktor der AFICO SA, schlägt der Gesellschaft schriftlich vor, neben der Jahresversammlung kleine *Zwischensitzungen* zu organisieren, die der Diskussion neuer Entwicklungen auf dem Gebiet der analytischen Methodik dienen sollen. Der Vorstand, der diesen Vorschlag zu Handen der Jahresversammlung gerne entgegengenommen hat, beantragt Ihnen:

1. Annahme des Vorschages zur Durchführung kleiner Fachtagungen über spezielle Fragen der analytischen Methodik.

2. Wahl einer kleinen Kommission für die Organisation solcher Tagungen. Vorschlag des Vorstandes für die Zusammensetzung dieser Kommission: Dr. *R. H. Egli*, Prof. Dr. *H. Neukom*, Prof. Dr. *W. Simon* und der Präsident als Vertreter des Vorstandes.

Die zwei vorgebrachten Vorschläge werden beide einstimmig gutgeheißen.

Dr. *Sulzberger* vom Forschungsinstitut der Schweizerischen Aluminium AG hat die Freundlichkeit, uns eine Broschüre über «Probleme der Methodik der Fluor-Bestimmung in biologischem Material» vorzulegen. Der Präsident erteilt ihm hierzu das Wort.

«Im Frühjahr 1966 fand im Forschungsinstitut der Schweizerischen Aluminium AG in Neuhausen am Rheinfall ein Kolloquium über die Probleme der Methodik der Fluor-Bestimmung in biologischem Material statt. Dieses Kolloquium wurde von der ALUSUISSE veranstaltet um Fachleuten aus der Schweiz und Deutschland, welche auf diesem Gebiet tätig sind, die Gelegenheit zu geben, sich über die verschiedenen Probleme auszusprechen.

Es wurde allgemein der Wunsch geäußert, die in diesem Kolloquium gehaltenen Referate, welche sowohl analytische als auch physiologische Fragen behandelten, einem größeren Kreise zugänglich zu machen. Die ALUSUISSE hat es unternommen, diese Referate in Buchform herauszugeben, um damit der Wissenschaft auf diesem Gebiet zu dienen.

Da wir der Ansicht sind, daß auch im Kreise der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie ein gewisser Interessenkreis für diese Publikation besteht, möchten wir die Gelegenheit dieser Tagung wahrnehmen um Interessenten mit diesem Buch bekannt zu machen.

Zu diesem Zweck lege ich das Buch zur Einsichtnahme auf, sowie eine Bestell-liste. Das Buch wird von der ALUSUISSE an Interessenten gratis abgegeben. Es enthält folgende Referate:

- Zur Wasserdampf-Destillation des Fluors mittels einer verbesserten Apparatur (Dr. H. J. Huber);
- Quelques problèmes relatifs à l'analyse du fluor dans les tissus végétaux (Prof. Dr. P. E. Pillet);
- Erfahrungen mit der Alizarin-Komplexon-Methode zur photometrischen Fluor-bestimmung (Dr. R. Sulzberger);
- Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung von Fluor; Eliminierung der Fehler-möglichkeiten und Durchführung der Fluor-Bestimmung mit unserer weitge-hend automatisierten Destillations-Apparatur (Dr. W. Oelschläger);
- Zur Problematik der Bestimmung eines biologisch zutreffenden F-Wertes von mit Erde verunreinigten und durch Immission kontaminiertem pflanzlichem Material (Dr. H. J. Huber);
- Ueber Fehlerquellen bei der Analyse und die Interpretation der analytischen Ergebnisse (Dr. Ch. Kopp);
- Der Einfluß von Verunreinigungen der Futterpflanzen auf den Fluor-Stoff-wechsel der Tiere (Prof. Dr. W. Wöhlbier);
- Ueber den Gehalt des Bodens an Fluor, dessen Aufnehmbarkeit durch Pflanzen und Tiere (Dr. L. Gisiger);
- Die Beeinflussung des Fluor-Gehaltes von Heu durch erdige Verunreinigungen (Dr. Ing. E. Moser).»

Wissenschaftlicher Teil - Partie scientifique

La partie scientifique a été ouverte par M. le Professeur *E. Cherbuliez* de l'Uni-versité de Genève, dont la conférence «Progrès récents de la chimie organique et analyse: *Principes immédiats de type nouveau — Méthodes nouvelles d'analyse*», nous a révélé la richesse de la chimie organique dans la domaine des substances que produit la Nature; le conférencier a démontré combien cette partie de la chimie organique doit aux progrès des méthodes analytiques dont elle stimule le développement. Le vendredi, la conférence principale fut suivie de quatre commu-nications sur l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse dans l'analyse, et le samedi matin de six communications sur des sujets divers. La conférence principale et les communications brèves se trouvent publiées ci-après.

Le banquet traditionnel du vendredi soir eut lieu dans les salons de l'Hôtel Richemond, après un apéritif offert par le canton et la ville de Genève. Notre

président souhaita avec grande courtoisie la bienvenue aux Autorités présentes et aux nombreux hôtes de Suisse et de l'Etranger; M. le Président du Gouvernement genevois nous adressa ensuite d'aimables et spirituelles paroles. La partie récréative, agrémentée de productions, permit à chacun de terminer cette première journée dans la cordialité.

Après la séance du samedi matin, une course en autocar dans la campagne genevoise nous révéla tour à tour la densité du trafic en ville de Genève, les richesses du vignoble genevois et aussi des *vallonnements inattendus*. L'hospitalité de la Commune de Dardagny nous valut une halte très appréciée à son Château et le plaisir de déguster d'excellents crus de la région. Le temps passa trop vite. Un dîner d'adieu devait clore l'assemblée annuelle. Encore très cordialement merci à Monsieur *Ch. Berner*, chimiste cantonal, qui a si bien su nous recevoir à Genève.

Je suis enfin particulièrement heureux d'exprimer à notre président, M. le Professeur *A. Schürch*, au nom de la Société et du comité des remerciements très amicaux pour tout le travail qu'il a accompli durant l'année avec un dévouement et une courtoisie dont nous voulons prendre exemple.

Le secrétaire: *A. Miserez*

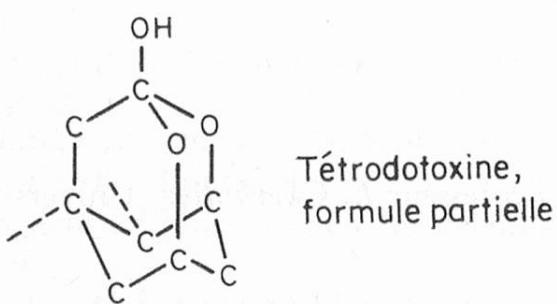
Conférence principale: Professeur *E. Cherbiliez*, Université de Genève.

Progrès récents de la chimie organique et analyse: Principes immédiats de type nouveau — Méthodes nouvelles d'analyse

Lorsque la Société Suisse de Chimie Analytique et appliquée m'a fait le grand honneur de me demander une conférence pour son assemblée générale, j'étais très embarrassé: je ne suis pas analyste; je suis tout simplement un organicien qui s'est intéressé surtout aux substances chimiques définies qui peuvent jouer un rôle dans le chimisme des êtres vivants. Le fait que je m'occupe de chimie organique depuis bientôt 60 ans me permet de me rendre compte, peut-être mieux qu'un autre, des énormes progrès accomplis durant cette période non seulement dans la synthèse mais encore dans l'analyse. Et lorsqu'il s'agit d'étudier les corps produits par la cellule vivante, on constate que ce sont les progrès dans les procédés d'isolement, de séparation, de purification et finalement de détermination de la présence de certains groupes fonctionnels — en un mot des procédés analytiques — qui ont ouvert à la recherche des possibilités merveilleuses. Je parlerai d'abord de certains résultats dans l'étude des produits élaborés par la cellule vivante, ce qu'on désigne d'un terme très heureux mais tombé un peu en désuétude par les «principes immédiats»; je terminerai par quelques remarques sur des progrès auxquels on peut s'attendre dans le développement de certains procédés analytiques.

I. Appliqués aux produits élaborés par la cellule vivante, aux principes immédiats, la recherche a révélé, grâce au progrès de la chimie analytique, une richesse extraordinaire dans les structures chimiques que la nature synthétise, et c'est de toute une série de *principes immédiats de type chimique inattendu* que je parlerai, qui possèdent des structures chimiques connues par la synthèse mais qu'on ne s'attendait guère à rencontrer dans la nature.

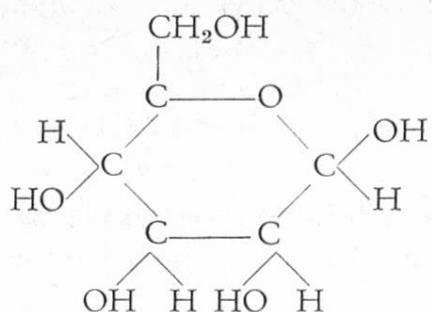
1. *Acides carboxyliques.* — a) Orthoesters. Tout le monde connaît le rôle considérable joué en biochimie par la fonction ester carboxylique ordinaire (v. p. ex. les lipides). Or les chimistes ont préparé depuis longtemps des esters de la forme hypothétique hydratée $-\text{C}(\text{OH})_3$ de la fonction carboxyle $-\text{COOH}$, par exemple l'orthoformiate d'éthyle $\text{HC}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, dérivés considérés jusqu'il y a peu de temps comme étant exclusivement des produits de laboratoire. Mais tout récemment on a pu établir la structure d'une toxine de certains animaux marins, la tétrodotoxine (intéressante aussi en raison de son énorme toxicité dépassant celle de l'acide cyanhydrique), et on y trouve un groupement diester cyclique (dilactonique) d'une fonction orthocarboxylique, selon la formule suivante:



Ce groupement est assez extraordinaire: tout d'abord c'est un dérivé orthocarboxylique; mais en plus c'est un diester, et ici la Nature est en quelque sorte en avance sur la synthèse, car on ne connaît pas d'ester partiel d'une fonction orthocarboxylique, un ester de ce genre se dissociant spontanément en alcool et ester ordinaire, selon l'équation:



La stabilité du groupement diester orthocarboxylique de la tétrodotoxine est certainement due au fait que les deux fonctions ester, voisinent sur le même atome de C avec un groupe $-\text{OH}$ libre, sont représentées par des cycles lactoniques hexagonaux; cela rappelle la stabilisation des hémiacétals $-\text{CH}(\text{OH})\text{OR}$, isolables seulement exceptionnellement, par cyclisation de la fonction éther, comme on la rencontre dans les formes cycliques des pentoses et des hexoses, par exemple:



Pyrano-aldohexose
(formule schématique)

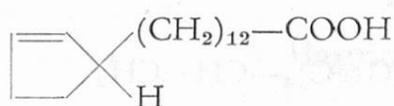
b) Acides gras. Selon le schéma classique, les acides gras estérifiant dans les lipides des polyols (généralement le glycérol) sont caractérisés comme suit: acides monocarboxyliques à chaîne ouverte, non ramifiée, à nombre pair d'atomes de carbone, possédant éventuellement une fonction OH, parfois une ou plusieurs doubles liaisons (isolées lorsqu'elles sont multiples), et très rarement des triples liaisons. Grâce notamment à la chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques, ce schéma étroit est débordé de partout: acides à nombre impair d'atomes de carbone, squelette ramifié, voire cyclisé entre autres. Un représentant particulièrement extravagant est la mycomycine:



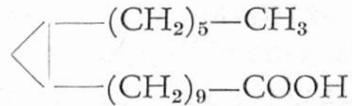
Dans cet acide à nombre impair d'atomes de C on trouve encore deux triples liaisons conjuguées entre elles et avec un groupement allénique, suivi de deux doubles liaisons de nouveau conjuguées!

Quant aux acides gras ramifiés, citons d'abord quelques exemples de dérivés dont la chaîne comporte un carbocycle, ce que l'on peut considérer comme le résultat de la cyclisation d'une ramifications unique. A côté de l'acide chaulmoogrique (18 C), exemple classique et connu depuis longtemps, on a découvert plus récemment des corps tels que les acides lactobacillique et sterculique, à chaîne de 19 C comportant à une certaine distance des extrémités un cycle trigonal pouvant même comprendre une double liaison:

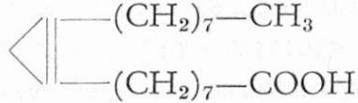
acide chaulmoogrique



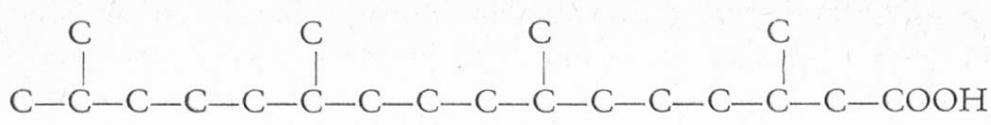
acide lactobacillique



acide sterculique

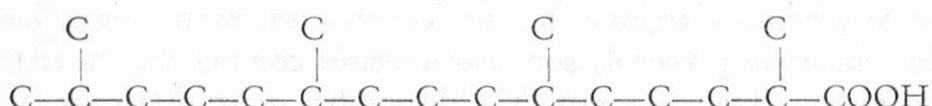


A côté de ces acides cycliques dont on peut considérer la chaîne comme possédant une unique ramifications, nous trouvons toujours dans les acides gras, des substances à chaîne ouverte mais portant des groupes méthyle multiples à espace régulier, chaînes caractérisant les terpènes aliphatiques. Les acides phytanique (à 20 C) et pristanique (à 19 C) en sont des exemples:



acide phytanique
ou tétraméthyl-
3, 7, 11, 15-
hexadécanoïque

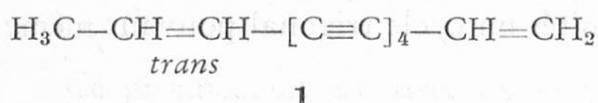
Si la chaîne est raccourcie du côté de la fonction carboxyle par perte de 1 C, nous passons du squelette tétra-isoprénique à 20 C à celui de l'acide pristanique ou 2, 6, 10, 14-pentadécanoïque à 19 C:



acide pristanique

Ces deux acides sont en même temps des exemples frappants de l'efficacité des procédés modernes de séparation et d'analyse structurale physicochimique: en effet, dans les microorganismes, dont on les a isolés, on les trouve à des concentrations de l'ordre de 0,1 µg/g, soit 0,1 ppm, et ils constituent environ 1/10⁴ des acides gras isolés!

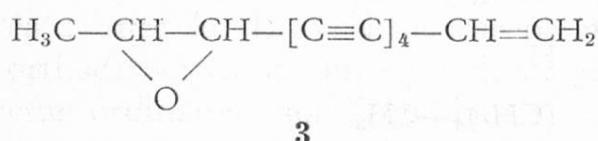
2. Dérivés acétyléniques. C'est à *Bohlmann* que revient le mérite d'avoir montré que les dérivés à triple liaison sont fort répandus, surtout dans le règne végétal; on en connaît actuellement plus de 400. Ce qui est surprenant, c'est la très grande variété de types structuraux qu'on y trouve: les liaisons acétyléniques (une seule ou plusieurs, conjuguées ou non) peuvent être associées à des doubles liaisons (cette description vaut aussi pour la mycomycine déjà mentionnée) ainsi qu'à des systèmes hétérocycliques furanniques, thiophéniques ou éthylèneoxydiques. Parmi la diversité des ces types, ceux à liaison triples multiples sont particulièrement inattendus. En voici quelques exemples:



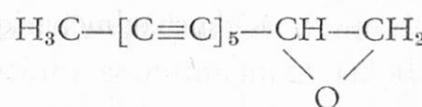
1



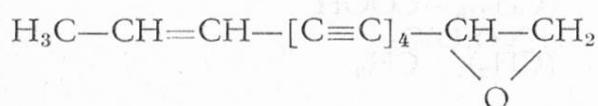
2



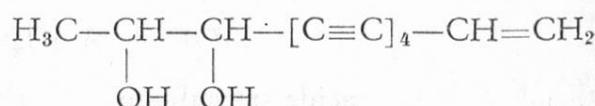
3



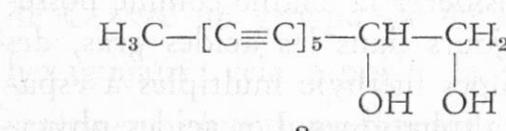
4



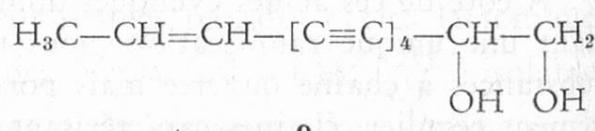
cis 5
trans 6



7

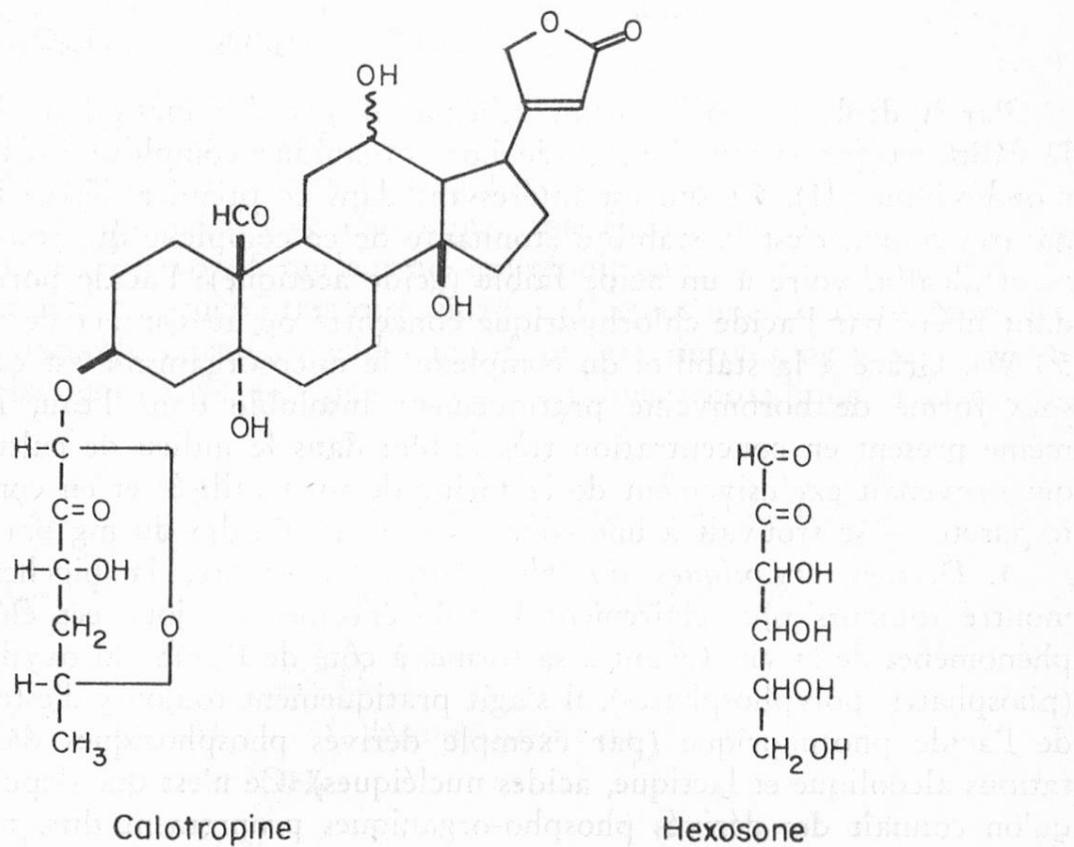


8



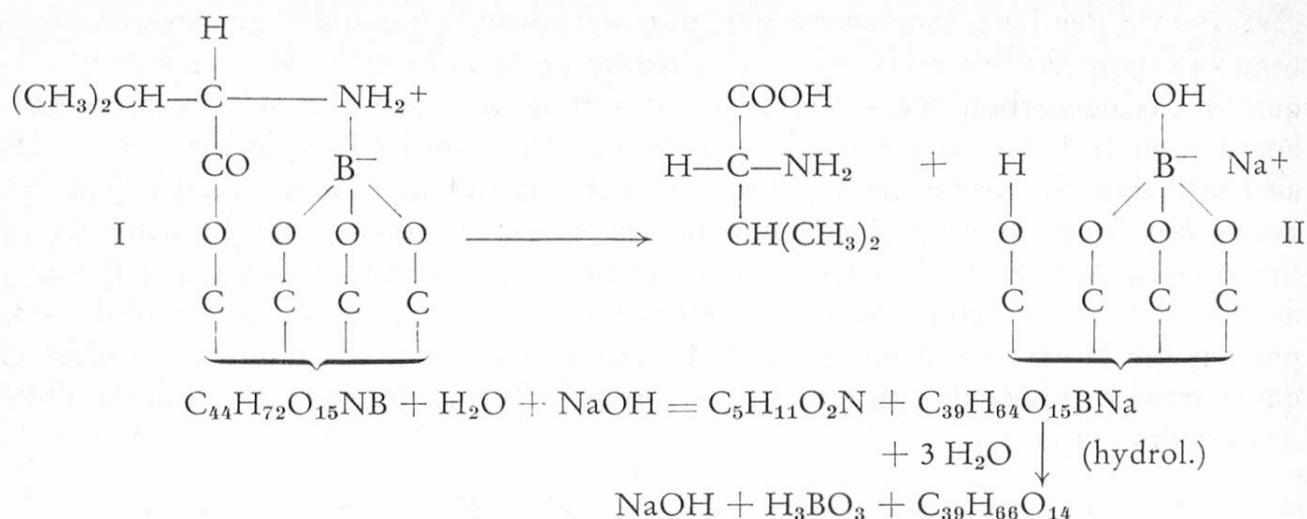
trans 9
cis 10

3. Oses. Comme ce fut le cas pour les acides gras des lipides, les oses ont été caractérisés pendant longtemps par une définition-type qui s'est trouvée être beaucoup trop étroite vis-à-vis de la richesse de la nature: à côté des oses classiques à chaîne carbonique ouverte, non ramifiée, avec une unique fonction carbonyle (sur le 1er ou le second C) et avec une fonction hydroxyle sur chacun des autres C dans la forme non cyclisée, on connaît depuis quelque temps déjà des sucres qui font exception à chacune de ces caractéristiques, sauf l'unicité de la fonction carbonyle. Et là encore, une exception est connue maintenant; il s'agit de la calotropine (voir formule), hétéroside dérivant d'un didésoxyaldohexose portant sur le carbone 2 une seconde fonction carbonyle, ce qu'on ne connaissait que comme produits de synthèse in vitro sous la forme des osones (produits d'hydrolyse des osazones).



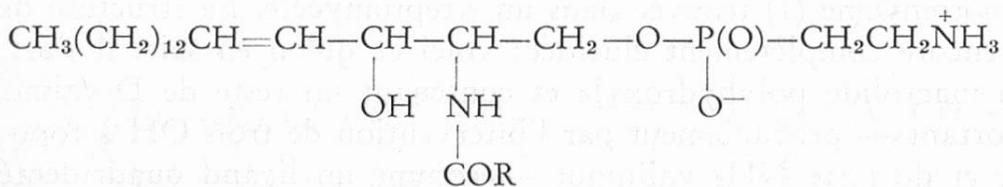
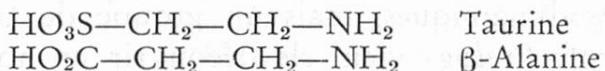
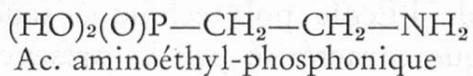
4. Dérivés renfermant des oligoéléments. On comprend de mieux en mieux le rôle essentiel que jouent en biochimie les oligoéléments, souvent présents sous forme de complexes à propriétés enzymatiques. En général il s'agit de métaux oligodynamiques, mais un groupe de travail de l'Ecole polytechnique fédérale (prof. Prelog) vient de découvrir un antibiotique caractérisé par la présence de bore complexé, la boromycine (I) trouvée dans un streptomycète. La structure de ce corps n'est pas encore complètement élucidée; voici ce qu'on en sait: il s'agit probablement d'un macrolide polyhydroxylé et contenant un reste de D-valine, macrolide se comportant — probablement par l'intervention de trois OH à topographie appropriée et du reste NH₂ valinique — comme un ligand quadridenté complexant une molécule d'acide borique selon le schéma suivant:

BOROMYCINE



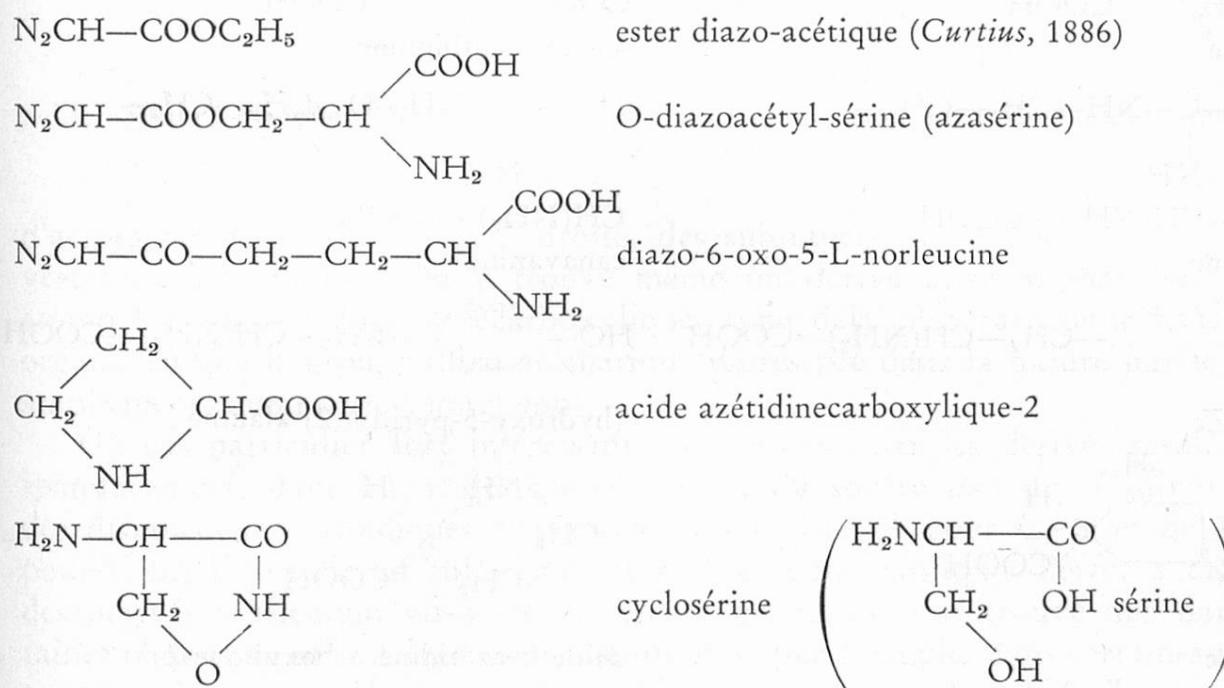
Par hydrolyse alcaline (voir schéma) il y a élimination de la molécule de D-valine et formation d'un acide boro-organique complexe isolable comme sel monosodique (II). Ce qui est intéressant dans ce premier dérivé boro-organique naturel connu, c'est la stabilité étonnante de ce complexe qui résiste à un traitement alcalin, voire à un acide faible (acide acétique); l'acide borique est cependant libéré par l'acide chlorhydrique concentré ou au contact de résines (Dowex 50 W). Grâce à la stabilité du complexe, le microorganisme est capable de fixer sous forme de boromycine pratiquement insoluble dans l'eau, l'acide borique même présent en concentration très faible: dans le milieu de culture, le bore — qui provenait exclusivement de la farine de soya utilisée et en contenant comme impureté — se trouvait à une concentration de l'ordre du mg par litre.

5. Dérivés organiques du phosphore. Ici encore, la biochimie récente a montré toujours plus clairement le rôle énorme que joue cet élément dans les phénomènes de la vie. Quant à sa forme, à côté de P minéral oxydé au maximum (phosphates, polyphosphates), il s'agit pratiquement toujours d'esters ou d'amides de l'acide phosphorique (par exemple dérivés phosphoriques dans les fermentations alcoolique et lactique, acides nucléiques). Ce n'est que depuis peu d'années qu'on connaît des dérivés phospho-organiques proprement dits, naturels, à liaison P-C, et notamment des acides phosphoniques. Citons ici, à titre d'exemple, l'acide amino-2-éthyl-phosphonique que l'on peut considérer comme l'analogique phosphoré de la taurine ou de la β -alanine (voir formules), ou l'acide alanine- β -phosphonique.



Découverts dans des animaux marins d'abord, d'eau douce ensuite, ces corps jouent peut-être un rôle encore insoupçonné; en effet, chez *Tetrahymnis pyriformis*, par exemple, 13,1 % du phosphore organique est non phosphorique et se trouve soit sous forme d'acides phosphoniques libres soit sous forme de phosphonolipides, pour lesquels des formules telles que celle de l'aminoéthylphosphonate-céramide indiqué sont proposées. Découverts par analyse différentielle (P organique total — P minéralisable par hydrolyse complète), ces corps peuvent être révélés assez facilement par ce même procédé, mais la séparation d'individus chimiques purs est souvent fort délicate, puisque les techniques de chromatographie, sur couche mince par exemple, utilisées ne donnent pas toujours des résultats satisfaisants. Il y a là un champ à exploiter encore au point de vue analytique.

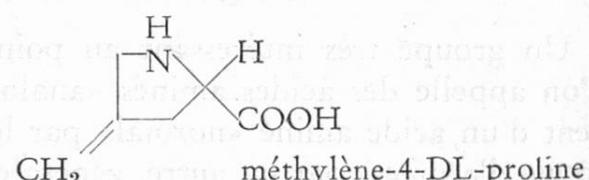
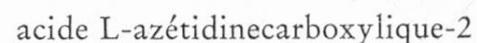
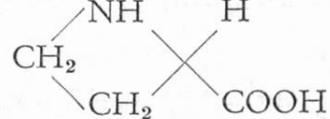
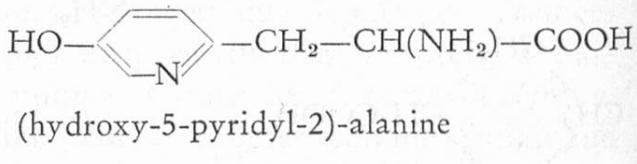
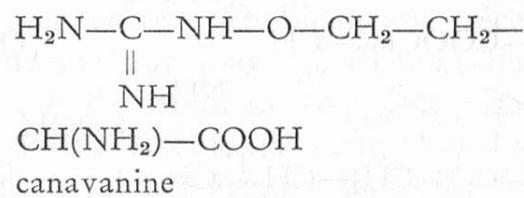
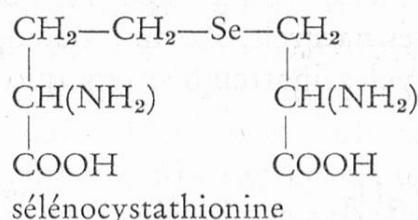
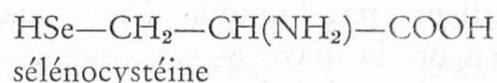
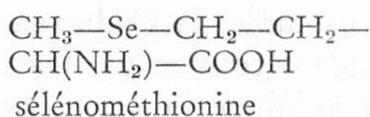
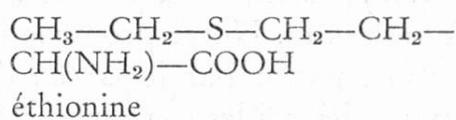
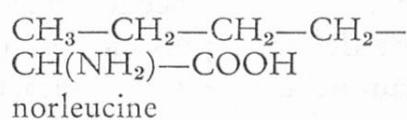
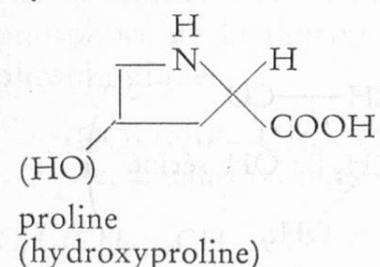
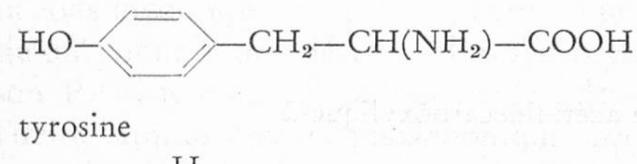
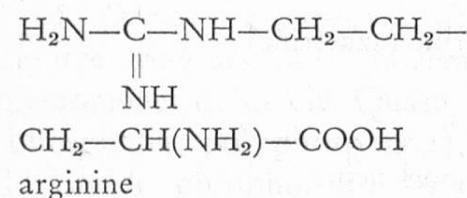
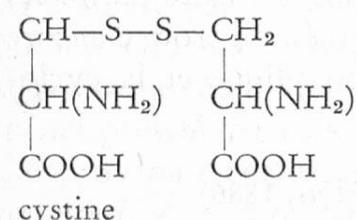
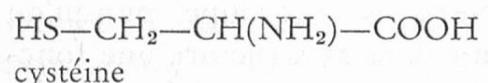
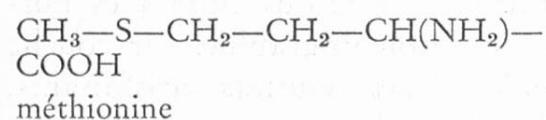
6. *Acide α-aminés*. Notre promenade parmi les curiosités de la nature ne nous a pas encore fait passer par le jardin des matières protéiques et de leurs composants principaux, les acides α-aminés. Ici encore, il y a une riche moisson de choses inattendues. Par exemple, la O-diazoacétyl-sérine (azasérine), un ester de l'acide diazoacétique (acide découvert par *Curtius* en 1886 et considéré comme un produit exclusivement de synthèse *in vitro*) avec la fonction alcoolique de la sérine; ce n'est d'ailleurs pas l'unique dérivé diazoïque trouvé dans ce groupe, puisqu'on connaît encore la diazo-6-oxo-5-norleucine, qui réunit dans sa structure une fonction carbonyle à côté du groupe très rare diazo, également une curiosité parmi les acides α-aminés naturels. Parmi les acides aminés et leurs dérivés, on trouve encore des corps à cycles inattendus, tels que l'acide azétidinecarboxylique et la cyclosérine:

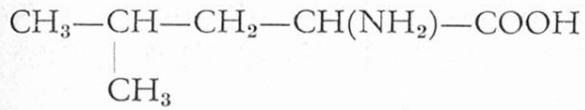
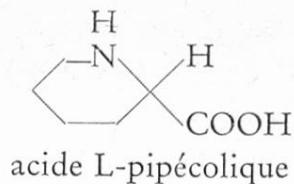


Un groupe très intéressant au point de vue biologique est constitué par ce qu'on appelle des acides aminés «analogues», c'est-à-dire des corps qui se distinguent d'un acide aminé «normal» par le remplacement d'un atome (ou d'un petit groupe d'atomes) par un autre, généralement de volume pas trop différent, ce qui

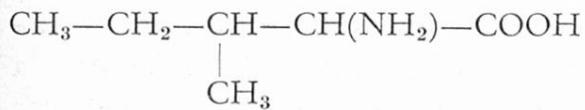
conduit à des molécules dites isostères et qui, souvent, ont *in vivo* des effets antagonistes très frappants vis-à-vis des acides normaux dont ils sont des «analogues». Le tableau 1 suivant comporte dans la colonne de gauche un certains nombre

Tableau 1
Acides α-aminés «analogues»

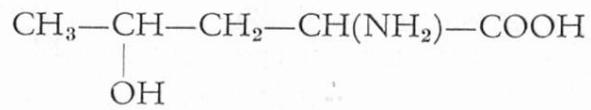
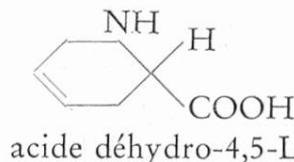




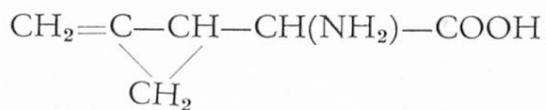
leucine



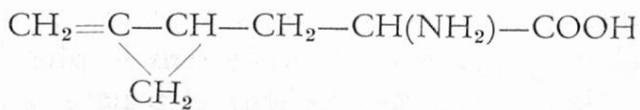
isoleucine



acide α -amino- γ -hydroxy-valérianique



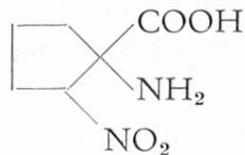
α -(méthylènecyclopropyl)-glycine



β -(méthylènecyclopropyl)-alanine



acide amino-1-cyclopentanecarboxylique



acide amino-1-nitro-2-cyclopentanecarboxylique

d'acides aminés normaux et, à droite, des substances «analogues» toutes découvertes dans la nature. On y trouve même un dérivé nitré aliphatique, l'acide amino-1-nitro-2-cyclopentanecarboxylique, type déjà plus rare pour le chimiste organicien que le groupe nitro aromatique représenté dans la nature par le chloramphénicol connu depuis longtemps.

Un cas particulier fort intéressant est constitué par les dérivés résultant du remplacement, dans un acide aminé soufré, du soufre par du sélénium. Avec des distances interatomiques respectivement de 1,84 Å pour C—S et de 1,98 Å pour C—Se, l'isostérie est suffisamment réalisée pour expliquer l'effet antagoniste des dérivés à sélénium vis-à-vis de ceux à soufre, et il se trouve que dans certaines régions au sol suffisamment sélénifère — par exemple, dans certaines régions en Australie — ce sélénium est incorporé par les plantes dans leurs acides aminés et leurs protides. Comme ces protides séléniques sont très toxiques pour les mammifères, ces acides aminés séléniques ont causé de très grandes pertes aux éleveurs de moutons. Toute l'étude de ce problème eût été irréalisable sans la précision des méthodes analytiques d'isolement de composants et de dosage!

7. Dérivés fluorés. Le fluor joue un certain rôle biologique comme composant de la partie minérale des os et des dents. On sait aussi qu'une quantité de dérivés fluorés de substances organiques à activité biologique marquée sont intéressants en raison de leurs propriétés pharmacologiques: les dérivés fluorés peuvent être plus actifs que les corps non fluorés; ils présentent aussi parfois des propriétés antagonistes. Toutefois, aucune des substances fluorées étudiées jusqu'à présent n'a été rencontrée dans la nature. C'est dans ce contexte qu'il me semble intéressant qu'on a trouvé tout récemment dans certaines fluorines des hydrocarbures aliphatiques fluorés tels que CH_3F , CH_2F_2 , CHF_3 , $\text{C}_3\text{H}_6\text{F}_2$. L'identification de ces composés, qui sont dégagés en de très petites quantités par ces fluorines dans le vide à chaud, n'a du reste été possible que grâce aux méthodes spectroscopiques modernes, notamment la spectrographie de masse.

II. Méthodes nouvelles d'analyse. La revue succincte qui précède était destinée à montrer la diversité étonnante des structures chimiques élaborées par la nature, même dans le domaine des molécules en somme assez petites. Ce que cette revue n'a pas mis en évidence, c'est le fait que ces résultats n'ont pu être acquis que grâce aux méthodes toujours plus efficaces et toujours plus sûres que la chimie analytique dans le sens le plus large met à la disposition des chercheurs. Comme exemples de leur efficacité je voudrais citer seulement deux recherches dans des domaines auxquels aucune allusion n'a été faite plus haut. Dans le goudron de houille, on a pu identifier 413 composés avec certitude, la présence de 62 autres étant rendue très probable. Dans l'association directe de la chromatographie en phase vapeur à la spectrométrie de masse, on a un procédé à la fois plus sensible et plus rapide que ce que peut fournir soit l'un soit l'autre de ces deux procédés appliqués isolément. C'est ainsi qu'avec 3 chromatographies en phase vapeur-spectrographies de masse combinées, on a pu identifier dans la fumée de cigarettes 68 corps et rendre très probable la présence de 11 autres, à côté de 32 supplémentaires dont on a pu établir la formule brute et de 39 substances caractérisées au moins par leur poids moléculaire. Voilà des performances qui ouvrent des horizons magnifiques. — Une méthode très prometteuse, tout à fait nouvelle et qui n'en est qu'à ses débuts, me semble être la spectroscopie électronique, qu'un groupe du professeur *Siegbahn* (Upsala) développe depuis deux ans. Elle est basée sur le fait que le déplacement des lignes électroniques d'un élément, observé avec des électrons *Auger* et des photo-électrons produits par des rayons X, est fonction du degré d'oxydation d'un élément déterminé au sein d'une molécule, donc fonction de son mode de liaison. C'est ainsi que dans le benzoate de sodium, on a pu constater la présence de 1 C d'une espèce donnée, et de 6 C semblables d'une espèce différente: ce sont respectivement le C de la fonction carboxyle et les 6 C du noyau aromatique. Cette méthode de différenciation d'atomes du même élément, mais se trouvant dans des états d'oxydation différents, a déjà été appliquée au soufre; elle semble devoir s'appliquer aussi à l'oxygène et à l'azote, et d'autres éléments suivront certainement. Ce sera un outil magnifique pour l'organicien obligé de travailler avec des quantités de substances de plus en

plus petites. — Qu'il me soit permis finalement de faire allusion à un perfectionnement éventuel de la chromatographie sur couche mince, proposé par mon laboratoire (p. ex. *Br. Baehler*, Pharmaceut. Acta Helv. **39**, 457 [1964]) et applicable aux substances pouvant être sublimées sans altération. Par sublimation, on fait passer du chromatogramme, développé par exemple sur couche mince de silice, sur une plaque réceptrice placée à très faible distance de la plaque chromatographique, les produits présents dans les diverses taches; on obtient ainsi une sorte de décalque du chromatogramme, décalque contenant les taches dans la disposition spatiale du chromatogramme; ce décalque permet de déterminer les R_f , sans intervention d'agents révélateurs qui souvent altèrent les substances; il permet encore d'observer les formes cristallines éventuelles des produits sublimés, ainsi que d'effectuer des réactions microchimiques sur du verre comme support. Il nous a semblé que ce procédé mériterait d'être développé.

K. Möhler (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München), gemeinsam mit O. L. Mayrhofer (1)

Integration von gaschromatographischen Fraktionen mit Dünnschichtplatten

Zusammenfassung

Nitrosamine sind physiologisch außerordentlich interessante Stoffe, da sie bereits in sehr kleinen Mengen Tumore und Krebs erzeugen können. In Abhängigkeit von der Struktur der Alkyl- oder Arylgruppen werden manche Organe spezifisch befallen. Es ist daher zu prüfen, ob in Lebensmitteln durch einen Zusatz von Nitrit bzw. Nitrat oder als Folge einer Behandlung mit Rauch oder Abgasen Nitrosamine auftreten können. Ein eventueller Gehalt kann nach bisherigen Ergebnissen (2) nur unter 1 p. p. m. liegen. Spezifische Eigenschaften der Nitrosamine mit kurzen Alkylketten, wie hoher Dampfdruck, Löslichkeit in Fett und Wasser, erschweren die Isolierung, Begleitstoffe der Lebensmittel die Identifizierung. Eine weitere Auftrennung der Neutralfraktion ist durch Gaschromatographie möglich, jedoch müssen die Fraktionen zusätzlich identifiziert werden. Hierzu werden sie auf Dünnschichtplatten aufgefangen und durch mehrmaliges Auftragen an der gleichen Plattenstelle aus mehreren Trennungen angereichert. Janák (3) und Kaiser (4) haben das Verfahren mit beweglichen Platten beschrieben, die das ganze Spektrum aufnehmen und nur einmal eingesetzt werden können. Die stationäre Anwendung der im vorliegenden Fall mit Kieselgel beschichteten Platte, begrenzt durch die Aufzeichnung des Wärmeleitfähigkeitsdetektors, erlaubt dagegen eine Integration der gleichen Komponente. Das Verfahren dürfte einer allgemeinen Anwendung zugänglich sein, da nicht nur das Plattenmaterial variiert werden kann, sondern unter Umständen schon während des Auffangens auf der

Platte Reaktionen vorgenommen werden können. *Tumlinson* und Mitarbeiter (5) fangen z. B. Carbonyle mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als Hydrazone auf. Die angegebene Methodik versetzt uns in die Lage, Dimethyl-, Diäthyl- und Di-n-propylnitrosamin auch im p. p. b.-Bereich zu isolieren und zu identifizieren. Ueber weitere Untersuchungen an Lebensmitteln werden wir zu gegebener Zeit an anderer Stelle berichten.

Literatur

1. O. L. Mayrhofer und K. Möhler, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **134** (1967) 246.
2. K. Möhler und O. L. Mayrhofer, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **135** (1968) 313.
3. J. Janák, J. Chromatogr. **15** (1964) 15 sowie **18** (1965) 270.
4. R. Kaiser, Z. anal. Chem. **205** (1964) 284.
5. J. H. Tumlinson, J. P. Minyard, P. A. Hedin und A. C. Thompson, J. Chromatogr. **29** (1967) 80 und 88.

O. Wyler, Laboratorium des Eidg. Veterinäramtes, Bern

Anwendung der Gas- und Dünnschichtchromatographie zur Ueberprüfung der Naturreinheit von Gewürzextrakten und dgl.

In den letzten Jahren sind auch in unserem Lande in steigendem Maße Gewürzextrakte als Hilfsstoffe bei der Fleischverarbeitung, aber auch auf anderen Gebieten der Lebensmittelindustrie, anstelle der Naturgewürze, zur Anwendung gelangt. Damit zeichnet sich eine Tendenz ab, welche vor 5—10 Jahren in den Vereinigten Staaten von Amerika begonnen hat und sich dann nach England und Deutschland und weiteren europäischen Ländern ausdehnte.

Zunächst ist einmal der Begriff «Gewürzextrakt» zu präzisieren und gleichzeitig abzuklären, warum Naturgewürze mit ihren so kostbaren Eigenschaften ersetzt werden sollen. Auch sind die Anforderungen, welche der Verbraucher und der Gesetzgeber an derartige Erzeugnisse zu stellen hat, festzulegen.

Gewürze sind seit altersher Bestandteile unserer Lebensmittel. In die gleiche Kategorie fallen auch die aromatischen Küchenkräuter und -blätter sowie gewisse Wurzelarten und Knollen. Gewöhnlich geben pulverisierte oder auch getrocknete sowie unzerkleinerte Rohmaterialien, insbesondere auch die Blattgewürze relativ rasch die leichter flüchtigen charakteristischen Bestandteile an die Umgebung ab, oder verändern durch andere, zum Teil biologische Vorgänge ihre Wirkkraft. Dazu kommt noch, daß viele Gewürze in großer Zahl unerwünschte Keime enthalten, welche die Lebensmittel, wie Wurstwaren und dgl., in ihrer Haltbarkeit und auch in ihren übrigen Eigenschaften ungünstig beeinflussen. Man hat wohl versucht, diesem Uebel, wenigstens teilweise, durch Begasung von Gewürzpackungen mit keimtötenden Mitteln, wie Aethylenoxyd, zu begegnen; eine absolute Keim-

freiheit konnte aber damit nicht erzielt werden. So führen z. B. zurückbleibende Hefearten bei Dauerwürsten zu Fehlgärungen und damit zu Fehlerzeugnissen (1).

Mit der Verwendung von Gewürzersatzmitteln in Form von Gewürzextrakten kann solchen Nachteilen der Naturgewürze wenigstens teilweise begegnet werden. Dabei stellt sich aber die Frage, ob es möglich sei, in technischem Maßstabe Gewürzextrakte herzustellen, welche die wesentlichsten und charakteristischsten Aromabestandteile der Naturprodukte noch enthalten, und ob diese Erzeugnisse den Verbrauchern in einer geeigneten Form zugeführt werden können, die auch eine leichte Dosierung und eine sinngemäße Anwendung bei der Herstellung ihrer Produkte zuläßt. Heute darf festgestellt werden, daß diese Frage befriedigend gelöst werden konnte, indem die Industrie in der Lage ist,

- a) konzentrierte flüssige oder pastöse Gewürzextrakte für den Großverbraucher und
- b) verdünntere Präparate in Form von flüssigen oder pulverförmigen Massen, mit Wasser, Saccharose, Traubenzucker, Kochsalz und dgl. als Trägersubstanzen für den Kleinverbraucher herzustellen.

Da die Eidg. Fleischschauverordnung vom 11. Oktober 1957 die Verwendung von Gewürzersatzmitteln bei Fleischwaren, worunter lebensmittelrechtlich auch die Gewürzextrakte fallen, nicht vorsieht, veranlaßten wir im Jahre 1964 die Eidg. Ernährungskommission, zur Frage der Zulassung solcher Präparate als Zwischenprodukte und Hilfsstoffe für die Fabrikation von Fleischwaren Stellung zu nehmen. Diese kam unter gewissen sichernden Vorbehalten zu einer Befürwortung, wobei diese Stoffe in gleicher Weise wie andere Hilfsstoffe der Fleischwarenfabrikation der Bewilligungspflicht durch das Eidg. Veterinäramt zu unterstellen seien.

Als eine der sichernden Maßnahmen galt vor allem der Nachweis der natürlichen Herkunft und der Abwesenheit künstlicher, z. B. verstärkender Zusätze oder synthetischer Präparate. Damit wurde uns die Aufgabe überbunden, Kontrollmethoden bereitzustellen, welche mit einiger Wahrscheinlichkeit die einwandfreie Beschaffenheit solcher Produkte nachweisen lassen. Gleichzeitig galt es auch, die Stabilität und Lagerfestigkeit der Extrakte zu prüfen und festzustellen, ob sie die wesentlichsten Charakteristiken der Ausgangsgewürze aufwiesen, was im Sinne von Art. 327 der Eidg. Lebensmittelverordnung eine Vorbedingung für deren Zulassung als Gewürzersatzmittel darstellt.

Jedermann, welcher sich mit derartigen komplexen Gemischen zu befassen hat, weiß, daß ein solcher Nachweis sich nicht mit einfachen Mitteln durchführen läßt und daß auch dann noch gewisse Fälschungsmöglichkeiten bestehen bleiben. Es ist aber auch bekannt, daß es mit modernen analytischen Verfahren, z. B. anhand nachgewiesener Rückstände, oft gelingt, festzustellen, ob ein Produkt als Ganzes oder mindestens teilweise natürlicher Herkunft sei oder nicht. Es würde zu weit führen, hier die verschiedensten, teilweise streng geheim gehaltenen Herstellungsverfahren für Gewürz- und Küchenkräuterextrakte zu beschreiben. Je-

doch muß festgehalten werden, daß sich bei den Gewürzextrakten zwei Hauptkomponenten unterscheiden lassen, welche auf die Herstellungsverfahren für solche Produkte zurückzuführen sind:

- a) *Die aetherischen Oele*, enthaltend vorwiegend die wichtigsten wasserdampf-flüchtigen Bestandteile der Gewürze.
- b) *Die Resinoide*, d. h. die Extrakte aus den Rückständen der Wasserdampfdestillation oder auch Direktextrakte, welche Bestandteile enthalten, die an der Aromabildung mindestens abrundend beteiligt sind, oder auch Produkte, welche z. B. aus den Preß-Säften oder dgl. gewisser Rohmaterialien gewonnen werden und naturgemäß weniger flüchtige Bestandteile enthalten. Anhand eines Gaschromatogrammes ist leicht festzustellen, daß die Resinoide meistens nur schwerflüchtige Bestandteile enthalten und im Dünnschichtchromatogramm kommt zum Ausdruck, daß es sich dabei vorwiegend um höhermolekulare Stoffe handelt, mit niedrigen R_F -Werten.

Solche grundlegende Beobachtungen mußten auch bei der Ausarbeitung von Prüfmethoden berücksichtigt werden.

Der Nachweis der Naturreinheit von Gewürzextrakten erfolgt mit Vorteil durch gleichartige Vergleichsuntersuchungen mit authentischen, aus analogen Gewürzen selbst hergestellten Extraktpräparaten. Ein gewichtiger Faktor zur Identifizierung fällt indessen weg, nämlich die artspezifische Struktur der Pflanze mit ihren eindeutigen mikroskopischen Bildern. Die klassisch-analytisch-chemische Prüfung mit Hilfe der Oxydationsmethode nach vorheriger Wasserdampfdestillation oder Diffusion (2) gibt zwar Auskunft über die Gesamtheit der aetherischen Oele, aber bietet keinerlei Gewähr für die natürliche Herkunft eines Erzeugnisses und über dessen Reinheit. Anderseits verlangt die *Degustation*, welche oft zu sehr aufschlußreichen Resultaten führt, ein Spezialistentum, über welches die meisten Kontroll-Laboratorien nicht verfügen. Außerdem bestehen heute Möglichkeiten, Mischungen von synthetischen oder halbsynthetischen Komponenten so auszuarbeiten, daß der Laie oft kaum in der Lage ist, künstliche Gemische von natürlichen Präparaten zu unterscheiden. Oft sind aber auch die künstlich erzeugten Gewürzersatzmittel im Preise bedeutend vorteilhafter als die analogen natürlichen Gewürzextrakte.

Eine erste Möglichkeit zur Feststellung von Einzelkomponenten besteht in der Aufnahme von Papier- oder Dünnschichtchromatogrammen, welche zur Triage und ersten Charakterisierung einzelner Präparate dienen können. Ueber die Mengenverhältnisse sagt jedoch diese Methode wenig oder gar nichts aus. Bestimmte Flecken aber geben Aufschluß über das Vorhandensein von nur in natürlichen Produkten enthaltenen Komponenten. Dies sei an zwei Dünnschichtchromatogrammen dargelegt, (Abbildungen 1 und 2), ohne auf Einzelheiten einzutreten. Wesentlich ist aber der Zustand der Ausgangsgewürze. Ueberlagerte oder gealterte Gewürze geben in den wenigsten Fällen einwandfreie Gewürzextrakte.

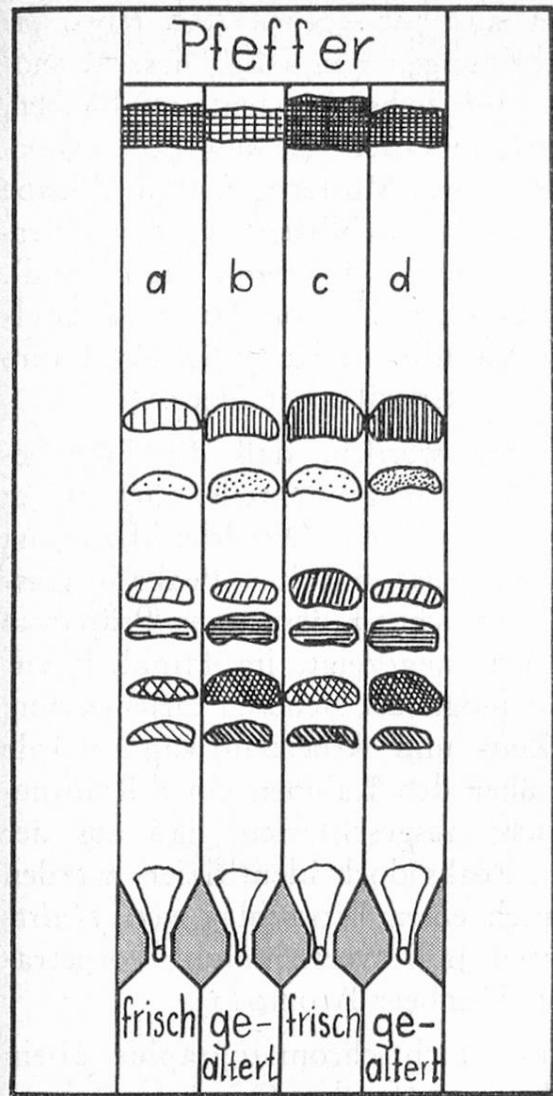


Abbildung 1
Pfeffer, frisch und gealtert
a), b) mit $0,25 \mu\text{l}$
c), d) mit $0,50 \mu\text{l}$

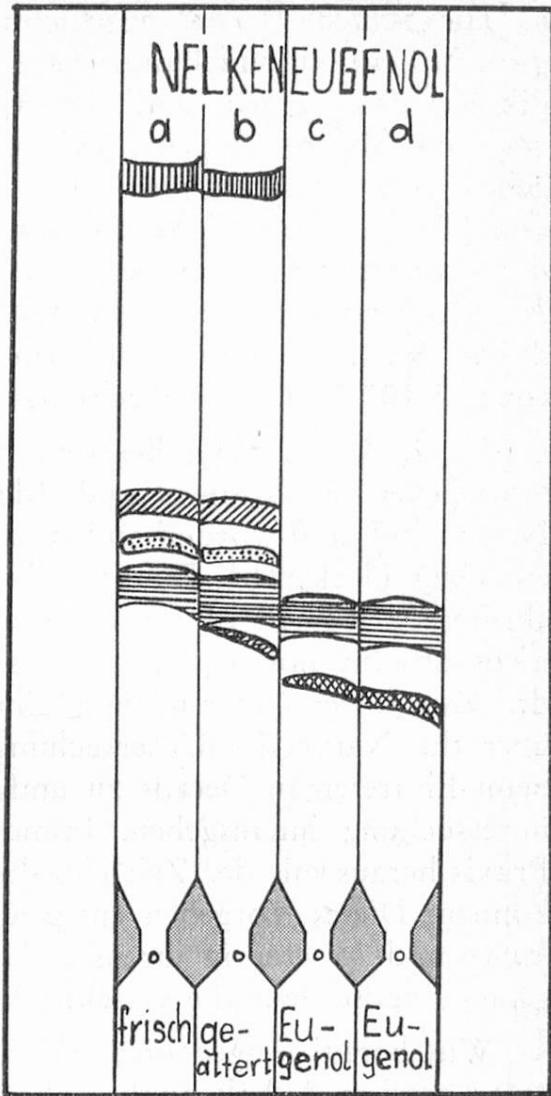


Abbildung 2
Nelken, frisch und gealtert
Feststellung des R_F von Eugenol
a) b) : $0,50 \mu\text{l}$; c) : $0,25 \mu\text{l}$; d) : $0,5 \mu\text{l}$

Die dunkel gezeichneten Sechsecke, welche zur Bildung von Brücken, mit anschließenden Banden, dienen, sind aus der Schicht augespart. Die Startpunkte befinden sich am Eingang zur Brücke.

Zur Herstellung der Vergleichsextrakte destillierten wir die pulverisierten Naturprodukte mit auf 125° überhitztem Wasserdampf während ca. $\frac{1}{2}$ Stunde und extrahierten die übergetriebenen aetherischen Oele mit Pentan oder noch besser mit Dichlormethan, wobei die Hauptmenge des zurückbleibenden Lösungsmittels bei Zimmertemperatur durch einen darüber hinwegstreichenden Luftstrom wieder entfernt wurde. Diese Methode hat sich für Untersuchungszwecke besser bewährt als das bisherige Verfahren der stundenlangen «quälenden» Destillation mit 100grädigem Wasserdampf, wobei zwangsläufig Umsetzungerscheinungen und größere Verluste von aetherischen Oelen und anderen Bestandteilen eintreten müssen.

Die Schicht der Dünnschichtplatten besteht aus Kieselgel-G (0,3 mm); sie wird in Brücken und Bahnen eingeteilt (vgl. Abbildungen 1 und 2). Diese Methodik hat den Vorteil, daß die einzelnen Flecken möglichst konzentriert bleiben, was eine höhere Empfindlichkeit erreichen läßt; außerdem erlaubt dieses Vorgehen gute Vergleichsmöglichkeiten mit authentischen Mustern. Durch Zugabe von 1 % Reisstärke kann die Schicht mechanisch besser stabilisiert werden; allerdings verlangsamt sich dabei die Laufzeit etwas (ca. $\frac{1}{4}$ längerer Zeitaufwand). Als Laufmittel verwendeten wir mit Vorteil ein Gemisch von Hexan-Aethylacetat, 9 : 1, und zur Sichtbarmachung diente Vanillin/Aethanol/Schwefelsäure conc., 3/100/5; dieses Reagens erzeugt eine Vielfalt artspezifischer Flecken.

Es muß, als Zwischenbemerkung, festgehalten werden, daß die hier beschriebenen Reaktionen und Identifizierungsmethoden großenteils empirischer Natur sind und vorderhand auch nicht mehr sein wollen. Die Identifizierung einzelner Flecken bei Dünnschichtchromatogrammen und einzelner Peaks in Gaschromatogrammen ist für die routinemäßige Untersuchung derartiger Präparate nicht absolut notwendig und erscheint auch nicht angezeigt, im Hinblick auf den Zweck der Untersuchung, einer raschen und möglichst sicheren Orientierung über die Natur des Untersuchungsgutes; der Zeit- und Arbeitsaufwand würde beim Eintreten in Details zu umfangreich und über den Rahmen einer Routineuntersuchung hinausgehen. Immerhin ist es nicht ausgeschlossen, daß aus der Praxis heraus mit der Zeit einzelne Flecken und Peaks doch identifiziert werden können. Dieses Vorgehen entspricht übrigens auch einem Vorschlag von *Hulstkamp* und *Miserez* in ihrem, anlässlich der letzten Jahresversammlung vorgetragenen Exposé über die Gaschromatographie von Himbeer-Aroma (3).

Wie bereits angedeutet, vermittelt die Dünnschichtschromatographie allein zwar gewisse Anhaltspunkte über die Natur des betreffenden Gewürzextraktes, kann aber für sich allein keine befriedigende und erschöpfende Auskunft über die natürliche Herkunft eines solchen Materials geben. Dazu benötigen wir noch Kombinationen mit anderen Untersuchungsverfahren. Es war naheliegend, die Gaschromatographie mit ihren verschiedensten Möglichkeiten dazu heranzuziehen. Zunächst war einmal rein statistisch festzustellen, wie weit sich Gewürzextrakte zum Teil unbekannter Herkunft oder verschiedenen Ursprungs, überhaupt untereinander vergleichen lassen, selbstverständlich unter Einhaltung gleichbleibender Bedingungen. Die Natur scheint in dieser Beziehung gewissen Gesetzmäßigkeiten unterworfen zu sein, indem Pflanzen gleicher Spezies, wenn auch anderer Herkunft, unter sich mehr oder weniger vergleichbare Kurvenbilder ergeben, und somit mögliche Verfälschungen in den meisten Fällen erkennen lassen. Dazu dient Abbildung 3 als Beispiel, wo Gaschromatogramme von natürlichem und von verfälschtem Korianderöl, das sich grobsinnlich kaum vom natürlichen unterscheiden läßt, einander gegenübergestellt werden. Während das natürliche Öl eine große Zahl Nebenpeaks aufweist, welche offenbar die Ursache für gewisse organoleptische Feinheiten und Nuancen im echten Produkt sind, finden wir im Gaschromatogramm der verfälschten Ware außer Lösungsmittelkomponenten in erster Linie einen Hauptpeak, jedoch bedeutend weniger Nebenpeaks.

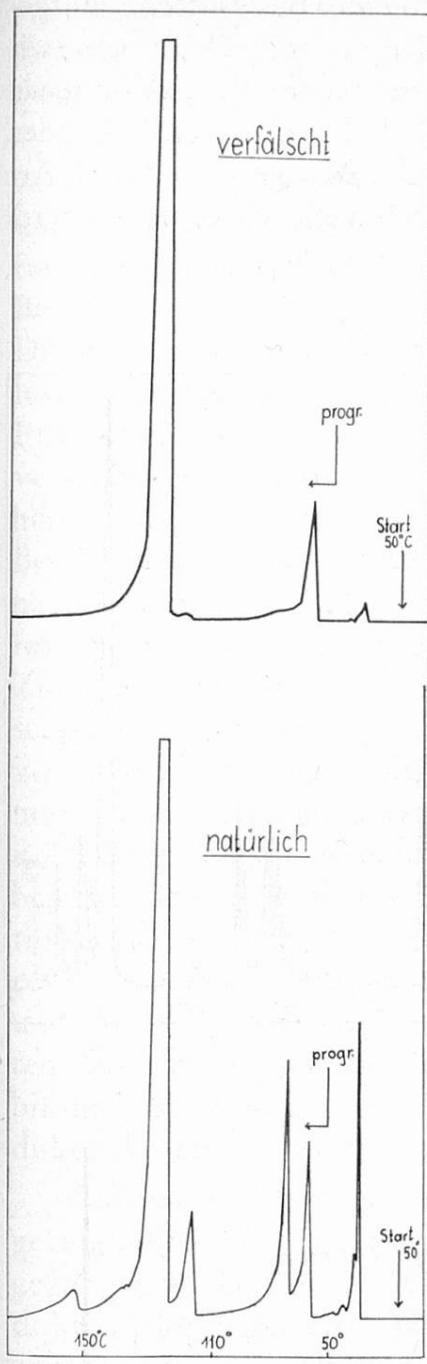


Abbildung 3
Korianderöl (2 m-Säule)
Vergleich von natürlichem mit
verfälschtem

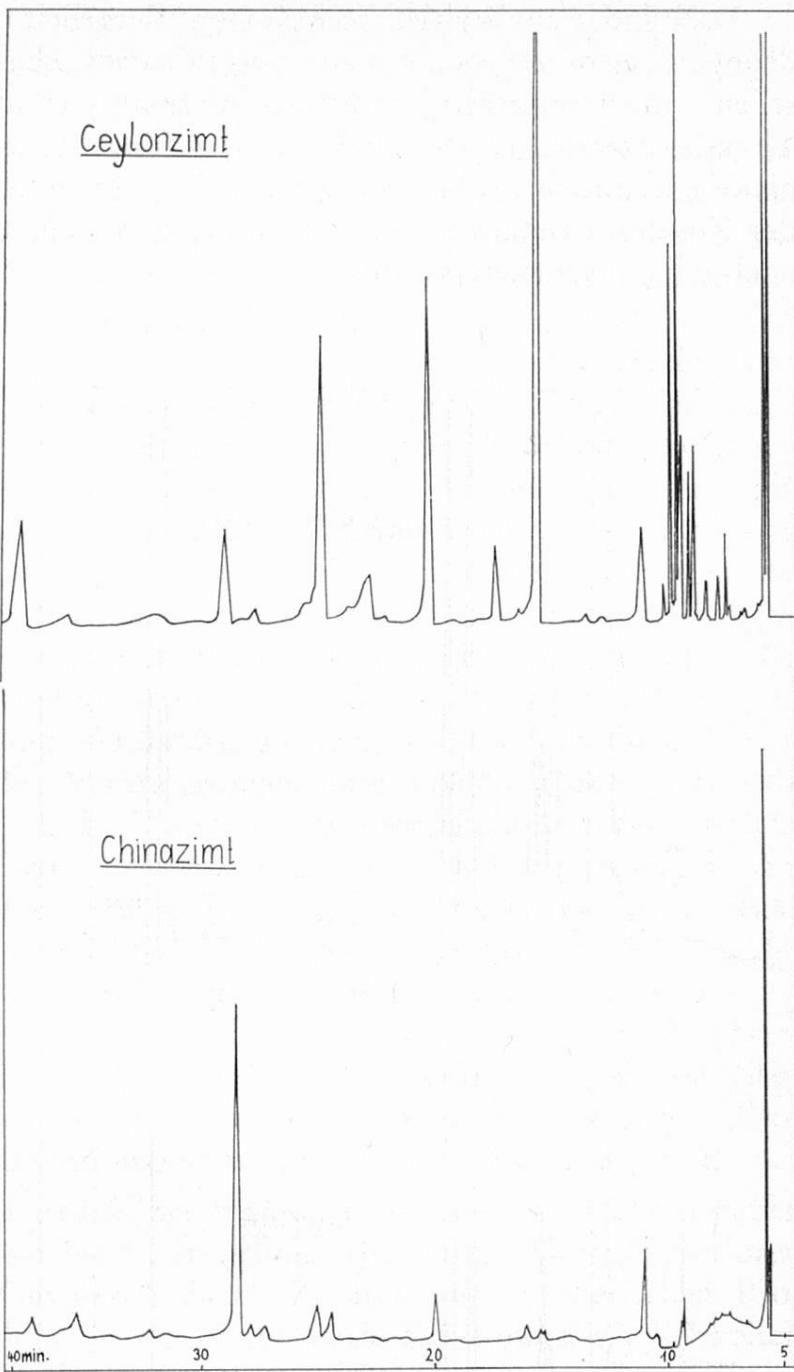


Abbildung 4
Ceylon- und Chinazimt-Extrakte
mit Kapillarsäule, isotherm 130°C

Als ein Beispiel verschiedener Pflanzenspezies mit ähnlichen Geschmacksrichtungen mögen Gaschromatogramme in Abbildung 4 von Ceylon-Zimt (*Cinnamomum ceylanicum* Breyne) und von Chinazimt (*Cinnamomum cassia* Blume) dienen, aus welchen vor allem eine Vielzahl von Komponenten beim kostbareren Ceylon-Zimt und die relative Armut an Komponenten im weniger gesuchten China-Zimt hervorgeht; nach Angaben von Fachleuten dürfte neben der Verschiedenheit der Spezies auch das Alter der Pflanzen eine Rolle spielen.

Daß indessen bei der technischen Verarbeitung einzelne Bestandteile notgedrungen verloren gehen müssen, zeigen Vergleiche von Gaschromatogrammen zwischen einem sorgfältig laboratoriumsmäßig und einem technisch gewonnenen Thymianextrakt (Abbildung 5), wo festzustellen ist, daß vor allem bei den niedrigsiedenden Fraktionen gewisse Verschiebungen in der Menge und in der Art der Zusammensetzung eintreten, ohne daß sich dies geschmacklich ohne weiteres nachteilig auswirken würde.

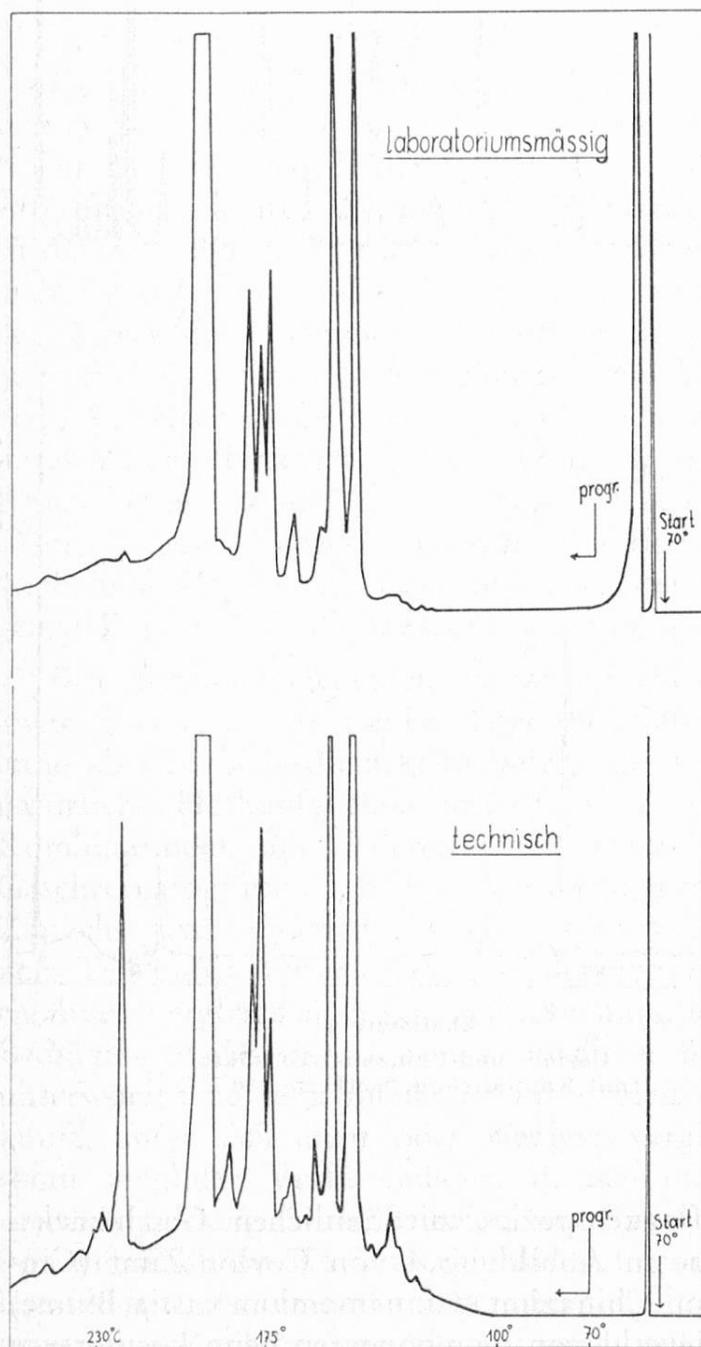


Abbildung 5

Thymian-Extrakt

laboratoriumsmäßig und technisch gewonnen

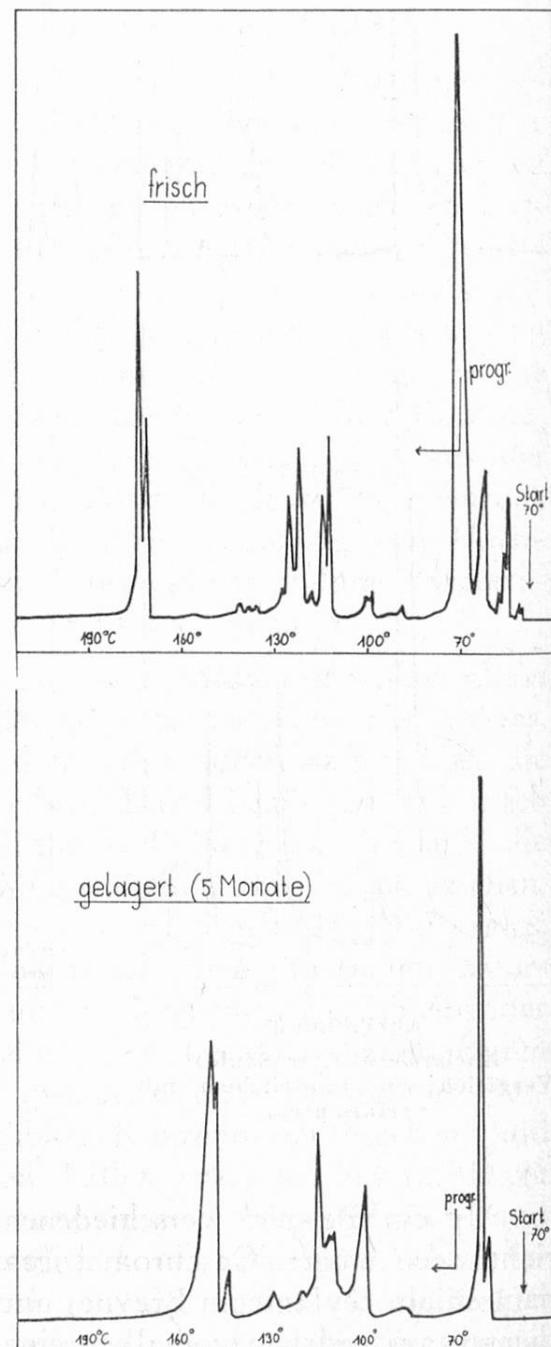


Abbildung 6

Thymian-Extrakt

frisch und gelagert

Als weiteres Problem stellt sich die Frage des Verhaltens von Gewürzextrakten und von Naturgewürzen während der *Lagerung* unter verschiedenen Bedingungen.

Es ist bekannt, daß Pulvergewürze und Blattgewürzpflanzen, aber auch unzerkleinerte Naturgewürze verhältnismäßig rasch einen Teil der feinen flüchtigen und leicht oxydierbaren Bestandteile verlieren, die in erster Linie charakteristisch für die betreffenden Gewürzarten sind, sofern sie nicht unter strengen sichernden Bedingungen, z. B. in neutraler Gasatmosphäre unter Druck, gelagert wurden. Die Hersteller von Gewürzextrakten andererseits versichern, daß derartige Verluste unter normalen und praktisch durchführbaren Lagerverhältnissen bei ihren Produkten nicht oder nur unwesentlich feststellbar sind. Unsere bisherigen Lagerversuche, welche zur Zeit noch teilweise im Gange sind, scheinen aufgrund bisheriger degustativer und gaschromatographischer Prüfungen im allgemeinen eine Bestätigung dieser Angaben zu ergeben; es mag aber verfrüh erscheinen, heute, nach 5monatigen Lagerversuchen, schon ein abschließendes Urteil zu bilden. So fanden wir bei einer Anzahl von Extrakten nach Lagerung von 5 Monaten bei Zimmertemperatur und bei Kühlschranktemperatur, daß ihre gaschromatographischen Charakteristiken nur wenig verändert wurden, während analoge Pulver von Naturgewürzen weitgehenden Veränderungen unterworfen waren. Immerhin mußten bei einigen Extrakten doch Umsetzungen festgestellt werden, welche u. E. mehr inneren Kondensationen, Umlagerungen oder Oxydationen zugeschrieben werden müssen als Verlusten infolge Verdampfung: dies wäre auch reaktionskinetisch einigermaßen verständlich. Derartige Vorgänge werden in der pflanzlichen Zelle unter dem Einfluß vorhandener natürlicher Antioxydantien und Antifermenre sowie infolge des Zell-Abschlusses weniger in Erscheinung treten. So stellten wir bei Thymian-Extrakten deutliche Veränderungen fest (Abbildung 6), wobei beim Vergleich der Kurven der frischen und gelagerten Produkte die etwas verschobenen Retentionszeiten ohne weitere Bedeutung sind.

Gewisse Erfahrungen aus der Praxis des Handels mit Gewürzextrakten haben gezeigt, daß hin und wieder unseriöse Unternehmer die durch Alterung verloren gegangenen Komponenten bei Gewürzen durch Zusätze von synthetischen Produkten «korrigierten». Wir suchten in der Folge nach Erkennungsmöglichkeiten zum Nachweis gealterter und wieder aufgefrischter Präparate. Am Beispiel von *Kümmel* (Abbildung 7), bei welchem infolge Alterung vor allem die d-Limonen-Komponente stark abgebaut und auch oxydativ verändert wurde, konnten wir feststellen, daß dabei gewisse «Oxydationspeaks» (als unbekannte Komponenten bezeichnet) auftreten, welche zwar degustativ im aufgefrischten Produkt kaum nachweisbar sind, hingegen gaschromatographisch ohne weiteres festgestellt werden konnten. Auch Pfeffer, bei welchem die natürliche l-Phellandrenkomponente (mit 3 auftretenden Peaks) großenteils bei der Alterung verschwindet, zeigt bei den höheren Fraktionen des Gaschromatogramms neu auftretende Peaks, ebenso Piment.

Wie schon früher festgestellt, betrachten wir keineswegs die Dünnschicht- und die Gaschromatographie als Universalmittel zum Nachweis einer Vollwertigkeit

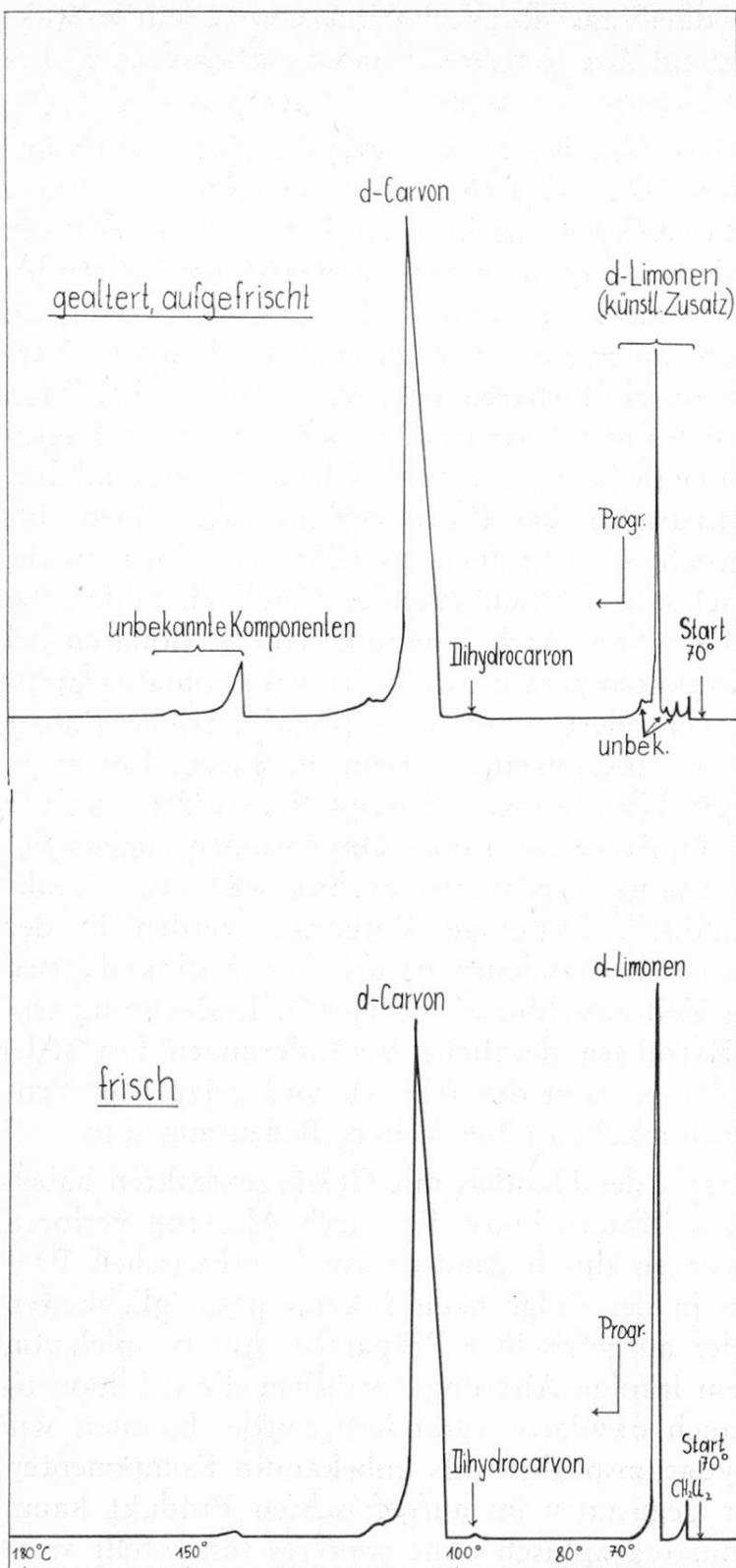


Abbildung 7
Kümmel-Extrakte
frische und aufgefrischte gealterte Ware

Der wirksame Bestandteil von Paprika, das Capsaicin, zeigt ein charakteristisches Transmissions-Maximum bei 250 m μ und ein Minimum bei 280 m μ ; weitere

oder einer Verfälschung von Gewürzextrakten. Sie sollen in dieser Mitteilung nur als interessante Beispiele in den Vordergrund gestellt werden, auf deren Grundlage eine Beurteilung möglich ist. In der Lebensmittelchemie darf man sich bekanntlich nie stur an bestimmte systematische Arbeitsvorschriften klammern, sondern muß bei der Durchführung derartiger Untersuchungen beweglich bleiben und auch weitere analytische und physikalisch-chemische Möglichkeiten erschöpfen. So versagt z. B. die Gaschromatographie als Beweismittel bei jenen Gewürzen und Küchenkräutern, welche wenig oder gar keine flüchtigen Bestandteile enthalten, wie die Küchenzwiebel oder verschiedene Paprika-Arten. Während das Dünnenschichtchromatogramm von Gemüse-Paprika ein ganzes Spektrum verschiedenster Farbstoffe aufdeckt, die allerdings nach ihrer Auf trennung zum Teil schon nach kurzer Zeit an der Luft verblassen, gibt das Gaschromatogramm sozusagen keinen Aufschluß über die Beschaffenheit der Ware. Hier müssen andere Hilfsmittel herangezogen werden: wir haben Absorptionsmessungen im UV- und im sichtbaren Licht vorgenommen (Abbildung 8).

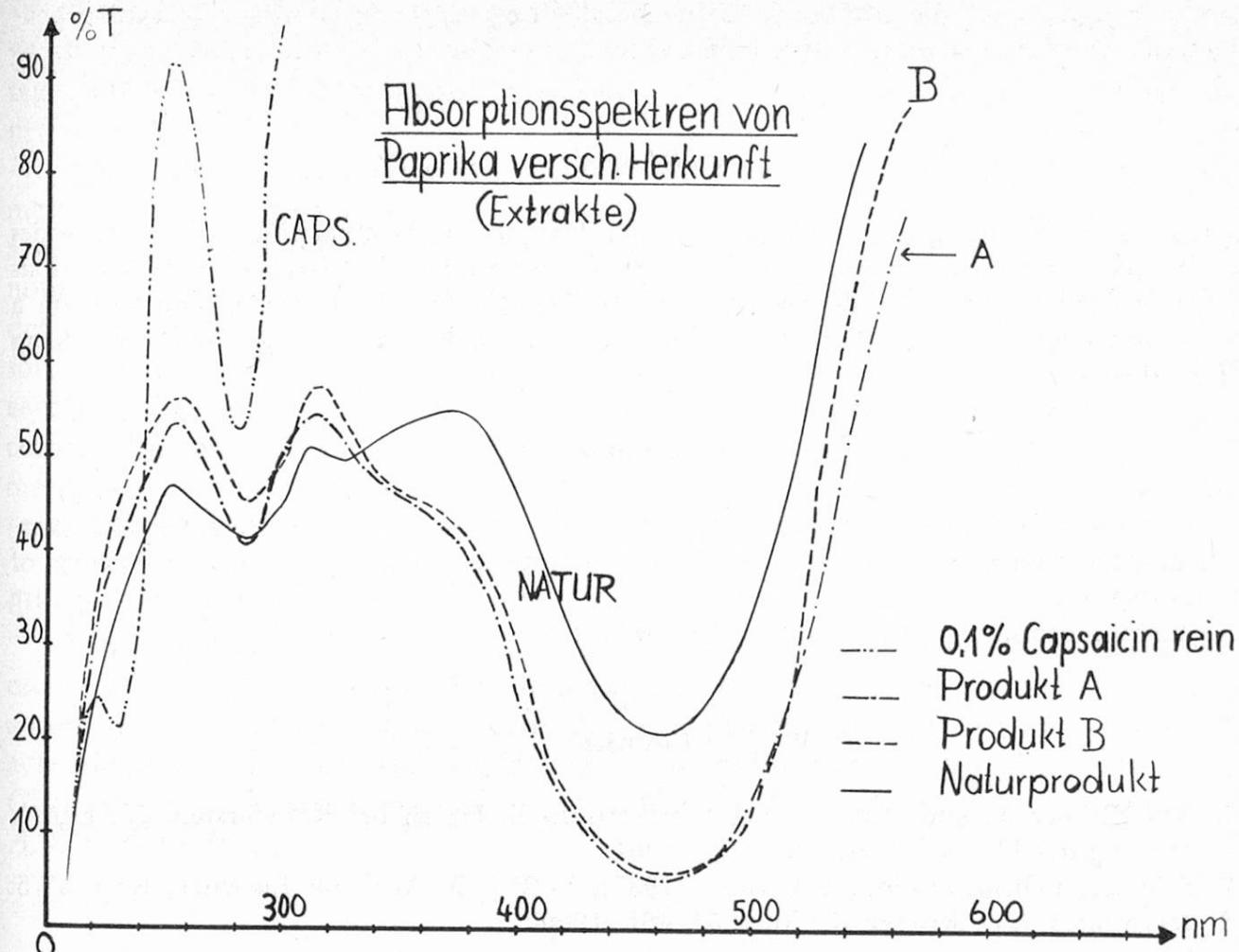


Abbildung 8
Paprika
Absorptionskurven

natürliche Bestandteile von Paprika ergeben ein charakteristisches Minimum bei 460 m μ . Wellenlänge. Auch die IR-Spektrographie eröffnet weitere Möglichkeiten.

Bei der Bearbeitung dieses Gebietes eröffnet sich dem analytisch arbeitenden Chemiker ein neues und interessantes Tätigkeitsfeld, über welches bis heute leider recht wenig in der Öffentlichkeit bekannt ist. Ein systematisches Studium dieses für die Lebensmittelproduktion wichtigen Gebietes würde in gleicher Weise sowohl der einschlägigen Industrie als auch der Analytik wertvolle neue Hinweise geben.

Den Firmen Dragoco, La Tour-de-Peilz/Holzminden und Griffith Laboratories, Chicago/Union sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung von Mustern und Reinpräparaten bestens gedankt; ebensolcher Dank gebührt meinen Mitarbeitern, den Herren Peter Uebersax und Walter Künzler.

Zusammenfassung

Anhand einiger charakteristischer Beispiele wird gezeigt, daß es in vielen Fällen möglich ist, mit Hilfe moderner physikalisch-chemisch-analytischer Arbeitsmethoden die Naturreinheit bzw. die Verfälschung von Gewürzextrakten nachzuweisen. Mit analogen

Methoden kann auch die größere Stabilität bei der Lagerung von Gewürzextrakten gegenüber einigen Naturgewürzen festgestellt werden.

Résumé

Il est démontré par quelques exemples caractéristiques qu'il est possible par des méthodes analytiques modernes de nature physico-chimique de prouver la présence de falsifications ou la provenance naturelle de certains extraits d'épices. Par des procédés similaires on a pu constater que beaucoup d'extraits d'épices sont plus stables à l'entreposage que les épices originales.

Summary

It is shown by some characteristical examples, that by modern physico-chemical analytical proceedings it is possible to prove falsifications or the natural provenience of certain spice-extracts. By analogical methods can be demonstrated that spice-extracts are in general more stable during storage than natural spices.

Literatur

1. Kniewallner K. und Haas J.: Fehlfabrikate durch Hefen bei Rohwürsten. 10. Europ. Meeting der Fleischforscher, Roskilde 1964.
2. Schweiz. Lebensmittelbuch, 4. Aufl. (1937), S. 253; 5. Aufl. im Entwurf: Kap. 37/5.
3. Hulstkamp J. et Miserez A.: Mitt. **57**, 461 (1966).

J. Vogel et Ch. Berner, Laboratoire cantonal de chimie, Genève

Différenciation des blés tendres et des blés durs par chromatographie en phase gazeuse

La recherche et la détermination quantitative d'une adjonction de blé tendre dans les produits ne devant en principe contenir que du blé dur est un problème analytique difficile et ceci principalement pour deux raisons:

Tout d'abord, la teneur en palmitate de sitostérol qui est un des constituants de l'insaponifiable de la matière grasse entrant en jeu lors de la détermination suivant les méthodes analytiques de M. Matweef (1), de K. A. Gilles et V. L. Youngs (2) et probablement de M. Brogioni et V. Franconi (3) varie dans de larges limites suivant les espèces considérées (4). S'il est possible, en mélangeant dans des proportions différentes un blé dur et un blé tendre de qualités déterminées, d'obtenir de relativement bonnes courbes d'étalonnages, il n'en va plus du tout de même lorsqu'on utilise pour les différents mélanges des qualités variées de matières premières.

D'autre part, la répartition du palmitate de sitostérol à l'intérieur du grain va en diminuant à partir du centre vers l'extérieur, de sorte que le taux de blutage intervient très certainement comme deuxième variable dans les données du problème.

Il découle de ceci qu'il n'existe pas actuellement de méthode analytique permettant de donner avec une précision rigoureuse le pourcentage de blé tendre qui a été ajouté à du blé dur. Dans une série d'analyses, on constate qu'un certain nombre de résultats sont exacts ou relativement bons, alors que d'autres présentent des écarts pouvant aller jusqu'à 50 % sans que la technique opératoire elle-même soit en cause (ces écarts se reproduisent si l'on répète l'analyse). C'est ainsi que certains blés donnent avec la méthode *Brogioni* des résultats les faisant classer comme durs alors qu'ils doivent être classés comme tendres sans hésitation selon la méthode de *Matweef* (exemple le *Manitoba*); la réciproque est également vraie (exemple le *Generoso* (4)).

La seule façon d'obtenir un résultat sûr serait de disposer des matières premières utilisées.

Nous insisterons donc sur le fait que dans le cas d'une expertise, il est absolument indispensable de rassembler le maximum de données analytiques différentes avant de pouvoir tirer une conclusion. Les principales méthodes à disposition actuellement sont celles qui ont été mises au point par *M. Matweef*, par *K. A. Gilles* et *V. L. Youngs*, par *M. Brogioni* et *V. Franconi* et par *A. Jaforte* et *A. Cavallaro* (5).

La méthode de M. Matweef

Elle consiste à extraire l'ensemble des stérols par l'acétone, puis à séparer le palmitate de sitostérol par cristallisation à $-4,5^{\circ}$ dans des conditions strictement déterminées. On effectue ensuite le dosage par la réaction de *Liebermann*. La méthode est délicate et nécessite la disposition d'une enceinte froide thermostatée, ainsi que d'une autre enceinte dans laquelle on puisse travailler de manière adéquate.

La méthode de K. A. Gilles et V. L. Youngs

Méthode basée également sur la présence de palmitate de sitostérol. On effectue une extraction des lipides par agitation à l'aide d'éther de pétrole. Après filtration, l'éther de pétrole est évaporé et le résidu lipidique déposé sur plaque de Kieselgel G. On chromatographie en utilisant comme solvant le tétrachlorure de carbone et on révèle les spots par l'acide sulfurique à 50 % et chauffage. Le palmitate de sitostérol donne un spot très net ayant un Rf de 0,8 environ. En déposant une série de spots étalons sur la même plaque, on peut obtenir une bonne approximation de la teneur en blé tendre de l'échantillon à contrôler. Comme l'indi-

quent les auteurs, un densitomètre peut éventuellement être utilisé pour préciser les résultats, mais il oblige à passer par l'intermédiaire d'une reproduction photographique.

La méthode de A. Jaforte et A. Cavallaro

Les lipides extraits des produits de la mouture par l'acétone sont séparés en deux fractions sur une colonne d'acide silicique, la première étant éluee par un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole, la seconde par l'acétone. Le rapport pondéral de ces deux fractions permet de différencier entre eux les blés tendres et les blés durs. Une semoule ou une pâte est considérée comme ne contenant pas de blé tendre lorsque le rapport est égal ou supérieur à 2.

Cette méthode simple et relativement rapide nécessite peu de matériel, mais comme nous le verrons par la suite, elle ne peut, moins que toute autre, être utilisée seule.

La méthode de M. Brogioni et V. Franconi

Les lipides du blé sont extraits à l'acétone par contact et agitation intermittente durant 24 heures. On relève le spectre infrarouge de ces lipides mis sous forme de film mince entre deux lames de chlorure de sodium. On mesure ensuite la surface de la bande à 9,1—9,3 microns. Cette surface est d'autant plus grande que la proportion de blé tendre augmente dans le mélange. Il y a également évolution dans la forme et dans la longueur d'onde du maximum d'absorption. Dans une version modifiée de cette méthode, *Brogioni* propose d'effectuer la spectrophotométrie IR en solution dans le tétrachlorure de carbone et de déterminer le rapport des bandes à 8,6 et 9,1 microns. Ce rapport, divisé par le pourcentage de cendres, doit donner un chiffre supérieur à 8,5. Ce chiffre peut descendre jusqu'à 2,5 dans le cas d'un produit ne contenant que du blé tendre.

Lors d'une étude sur l'application analytique de cette méthode, *P. A. Sturm, R. M. Parkhurst et W. A. Skinner* (6) ont montré que la modification de la méthode originale ne présente pas d'avantages particuliers et qu'il est préférable de s'en tenir au procédé le plus simple. Ces auteurs, par contre, ont proposé de mesurer les surfaces d'une façon différente de celle de *Brogioni*. Ils tracent des droites de base partant de longueurs d'onde bien déterminées et, comme *Brogioni*, établissent le rapport des surfaces des deux bandes ainsi délimitées. L'avantage de prendre pour base des déterminations la valeur de ce rapport n'est pas évident, car l'on constate sur une série d'analyses des écarts considérablement supérieurs à ceux que présentent la bande de 9,1 microns seule. Pour un Durum 1 par exemple, les valeurs extrêmes de la surface du pic à 9,1 microns sont de 0,94 et 1,04 sq. in., alors que celles du rapport sont de 0,276 et 0,361.

Ces auteurs montrent également que l'addition de lipides étrangers sous forme d'huiles végétales diverses permet de masquer dans une certaine mesure l'addition de blé tendre.

Détection d'une addition de blé tendre par chromatographie en phase gazeuse

Dans le but d'obtenir un élément d'appréciation supplémentaire lors de l'analyse d'une semoule ou d'une pâte alimentaire, nous avons pensé à examiner le comportement en chromatographie gazeuse de la matière grasse extraite. Nous avons alors constaté que dans les conditions opératoires indiquées ci-dessous, les lipides extraits à l'aide d'éther de pétrole d'une semoule de blé tendre présentent un pic important ayant un temps de rétention de 5 minutes. Ce pic est également présent dans la matière grasse provenant de blé dur, mais dans une proportion beaucoup plus réduite. Nous avons également examiné les acides gras obtenus par l'hydrolyse de ces lipides, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence appréciable dans ce domaine.

Dans le but de standardiser les valeurs fournies par la chromatographie en phase gazeuse, nous avons tenté de rapporter la surface du pic considéré à la quantité totale de matière grasse extraite. Nous avons immédiatement constaté qu'il n'y a pas de relation définie entre ces deux valeurs. C'est ainsi que des semoules présentant à l'examen IR et à la chromatographie gazeuse les mêmes caractéristiques, soit de blé dur, soit de blé tendre, donnent souvent des extraits pondéraux de matière grasse nettement différents. Il devient ainsi malheureusement impossible de rapporter la surface du pic obtenu à une quantité donnée de matière grasse. L'exemple suivant illustre cette constatation:

L'analyse de deux semoules provenant d'un même lot de blé dur, soit un fin finot spécial contenant une majorité d'éléments provenant du centre du grain et un fin finot ordinaire no 2 contenant une proportion plus grande d'éléments venant de la partie externe du grain, nous a donné les valeurs suivantes:

	Surface du pic	Poids de lipides extraits
Fin finot spécial	2,4 cm ²	53,2 mg
Fin finot ordinaire no 2	2,2 cm ²	94,1 mg

Si l'on rapportait la surface du pic à la quantité totale de matière grasse extraite, on pourrait conclure que la qualité de la deuxième semoule est bien supérieure en ce qui concerne sa composition, ce qui n'est pas le cas.

En fait, les chiffres obtenus s'expliquent très bien. Comme nous le verrons plus loin, la substance donnant le pic chromatographique a un gradient de concentration qui va en diminuant vers l'extérieur du grain, ce qui n'est pas le cas pour la matière grasse. Le fin finot ordinaire, par un apport d'éléments externes du grain, voit la teneur en lipides de son extrait augmenter et ceci sans augmentation corrélative de la substance cause du pic chromatographique. On retrouve ainsi les constatations faites lors de l'emploi de la méthode Brogioni qui donne toujours un résultat apparent meilleur pour une semoule de qualité inférieure.

Comme on pouvait s'y attendre, une extraction quantitative des lipides ne permet pas non plus d'obtenir une constante. Des essais effectués dans ce sens

en appliquant la méthode d'extraction de *Terrier* à l'alcool et à l'éther (7) et l'extraction précédée d'une hydrolyse acide ménagée ont été en effet sans résultats.

Identification de la substance donnant un pic en chromatographie gazeuse

Nous avons tout d'abord vérifié que cette substance n'est pas le palmitate de sitostérol. En procédant suivant la méthode de *Matweef* mais en partant d'une prise plus important permettant de purifier le plus possible le palmitate de sitostérol, nous avons établi que ce produit ne donne aucune pic chromatographique dans nos conditions de travail. D'autre part, les lipides débarrassés du palmitate de sitostérol montrent toujours la présence du pic inchangé. Ce pic est donc bien dû à un produit différent que nous avons cherché à isoler.

Si l'on soumet à l'hydrolyse la matière grasse provenant d'une farine de blé tendre (traitement par la potasse caustique 2 n à reflux durant 1 heure) et que l'on examine par chromatographie gazeuse le résidu insaponifiable réextrait à l'éther, on constate que le produit cherché se retrouve intégralement. Il ne s'agit donc vraisemblablement pas d'un ester (à moins qu'il ne soit d'une stabilité exceptionnelle). Si par contre la réextraction est faite à l'aide d'éther de pétrole, on constate que le pic est beaucoup moins important. Cette différence de solubilité indique que le corps cherché est probablement un alcool supérieur.

Pour isoler cette substance et en déterminer la nature, nous avons procédé à des chromatographies préparatives sur couche mince. Après une série d'essais, les meilleurs résultats ont été obtenus en effectuant la séparation en deux temps:

Lors d'une première opération, on chromatographie sur alumine G Merck en utilisant comme solvant le mélange pentane-éther éthylique (80/20) et on reprend par grattage la bande de départ. Dans une deuxième opération, on chromatographie sur Kieselgel G Merck en utilisant comme solvant le mélange éther éthylique-heptane-chloroforme (75/25/10). Le produit se retrouve alors sous forme d'une bande jaune pâle de Rf 0,1 environ.

Du produit ainsi séparé et purifié, il a été fait un spectre IR d'un part et, grâce à l'obligeance de la Maison Firmenich à Genève, un spectre de résonnance magnétique et un spectre de masse d'autre part. Du spectre IR, on peut conclure qu'il y a présence d'un groupement —OH primaire et probablement de doubles liaisons conjuguées.

Le spectre de résonnance magnétique indique la présence de chaînes de —CH₂ et d'un groupement —CH₃ en bout de chaîne. Le spectre de masse assigne au produit le poids moléculaire de 252.

Il est donc très vraisemblable que nous sommes en présence d'un alcool supérieur en C₁₇ avec doubles liaisons conjuguées. Il y a en fait une très forte ressemblance du spectre IR obtenu avec celui de l'hexadécadiènol 10_{cis} 12_{cis}.

La synthèse de cette substance étant extrêmement complexe et sortant un peu du cadre de cette étude, elle n'a pas été entreprise. Elle permettrait cependant de vérifier l'exactitude des conclusions auxquelles nous sommes parvenus.

On peut se poser la question de savoir si cet alcool supérieur se trouve en quantité plus grande dans le blé tendre que dans le blé dur ou s'il s'agit d'une liaison plus au moins complète selon le cas. En fait, c'est cette deuxième hypothèse qui semble la plus probable car si l'on examine les lipides extraits après un traitement acide à ébullition, on constate que la différence entre blé dur et blé tendre s'atténue considérablement.

Mode opératoire

Appareillage

Chromatographe à gaz «Aerograph Hi-Fi» modèle 600-C avec détecteur à ionisation de flamme.

Moulin électrique

Tamis à mailles no V

Secoueuse

Evaporateur rotatif

Planimètre

Réactifs

Ether de pétrole rectifié

Acétone rectifié

Chloroforme rectifié

Extraction des lipides

1. Réduire le produit à analyser en poudre fine passant au tamis no 5. Placer 10,0 g de poudre tamisée dans un poudrier rodé de 250 ml. Ajouter 40 ml de solvant: éther de pétrole dans le cas des semoules, éther de pétrole-acétone (80/20) saturé d'eau dans le cas des pâtes alimentaires. Secouer mécaniquement durant 20 minutes.
2. Laisser ensuite décanter quelques minutes la solution et verser sur un filtre plissé. Laver le produit restant dans le poudrier avec deux fois 15 ml de solvant en laissant décanter dans le poudrier la première fois et en versant le tout sur le filtre la seconde fois. Les solutions réunies dans un ballon rodé de 250 ml sont évaporées sous vide à 50° jusqu'à élimination complète de l'eau éventuellement présente et obtention d'un résidu huileux limpide.
3. Bien refroidir le ballon sous l'eau courante et dissoudre le résidu dans 2 ml de chloroforme en tenant le ballon bouché par le col pour éviter l'évaporation partielle du chloroforme. La solution ainsi obtenue est prête pour la chromatographie.

Traiter de manière analogue une semoule, respectivement une pâte fabriquée à partir de blé tendre uniquement. On obtiendra ainsi une solution étalon permettant, par comparaison, l'évaluation du produit analysé.

Chromatographie gazeuse de l'extrait

Les conditions opératoires choisies sont les suivantes:

Colonne 1 % de silicone SE-30 sur chromosorb W 80/100 mesh, longueur 5 ft, diamètre $\frac{1}{8}$ inch.

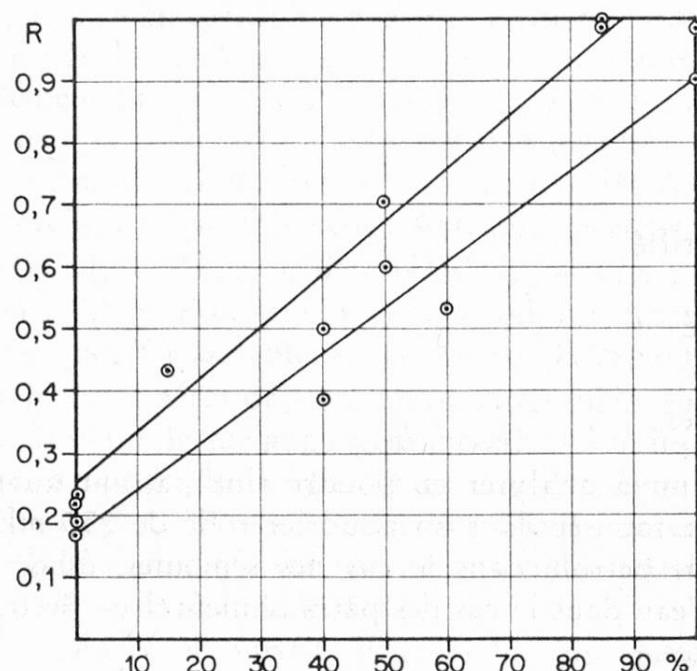
Températures colonne = 220 °, injecteur = 300 °

Gaz porteur Azote au débit de 50 ml par minute.

Injecter 2 μ l de solution dans l'appareil. Opérer ensuite de même pour la solution étalon.

La surface des pics respectifs obtenus est évaluée à l'aide d'un planimètre. Le rapport de ces deux surfaces est fonction de la teneur de blé tendre dans le produit analysé.

Figure 1



Nous donnons ci-contre (fig. 1) le graphique que nous avons établi en portant en ordonnées les rapports des surfaces de pics comparativement à un étalon type de blé tendre (semoule ou pâte) et en abscisses les proportions des mélanges correspondants. Il représente une zone moyenne des écarts tracée de part et d'autre d'une droite théorique.

Résultats analytiques comparatifs des différentes méthodes

La méthode chromatographique sur couche mince de *Gilles et Youngs* n'appelle pas de commentaires particuliers. Elle permet une bonne orientation et un contrôle supplémentaire des valeurs obtenues par les autres méthodes. Il est diffi-

cile, dans le cas d'adjonctions modérées de blé tendre, d'en tirer une conclusion certaine. Ne disposant pas d'un densitomètre, nous ne l'avons utilisée que de manière qualitative.

La méthode *Jafforte* et *Cavallaro* illustre particulièrement bien la difficulté fondamentale du problème, c'est à dire la diversité de constitution lipidique des diverses espèces de blé et sa répartition inégale à l'intérieur du grain. Comme les auteurs l'ont déterminé, la proportion de substance grasse qui constitue la seconde fraction éluée décroît du centre vers la périphérie du grain (c'est également cette fraction qui donne la bande caractéristique du spectre IR servant à la détermination suivant la méthode *Brogioni*).

Le tableau suivant montre la relation que nous avons notée au cours d'une série d'analyses entre la surface *Brogioni* et le rapport *Jafforte*:

No analyse	Surface Brogioni (cm ²)	Rapport Jafforte
1	1,0	4,25
2	1,3	3,66
3	1,7	2,93
4	2,3	3,18
5	3,2	2,81

On trouvera plus loin d'autres comparaisons de ce rapport avec les valeurs que donnent les méthodes par mesure infrarouge et par chromatographie gazeuse.

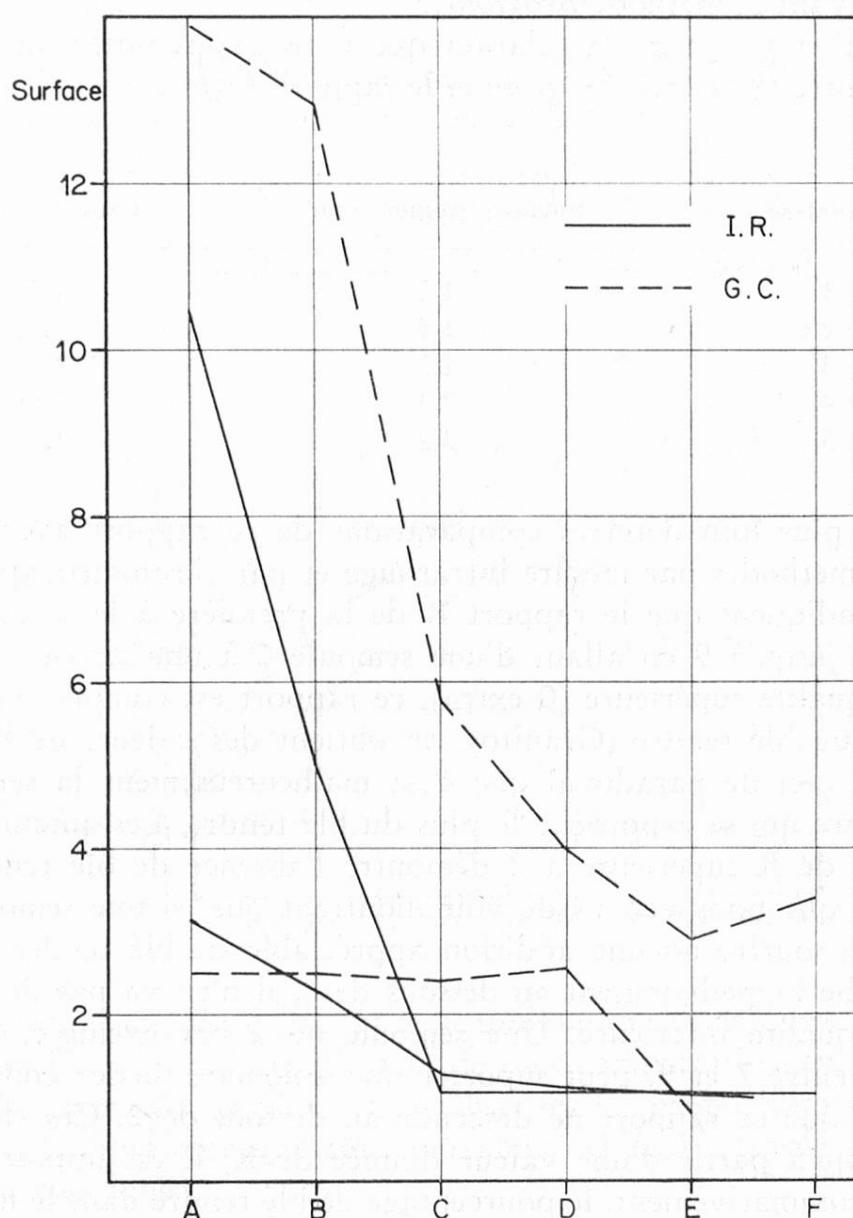
Les auteurs indiquent que le rapport R de la première à la seconde fraction peut varier de 3 jusqu'à 9 en allant d'une semoule 0 à une semoule no 3. Pour une semoule de qualité supérieure (0 extra), ce rapport est compris entre 2 et 2,7 tandis que pour un blé tendre (*Granito*), on obtient des valeurs de l'ordre de 1. Les résultats ont ceci de paradoxal que c'est malheureusement la semoule de la qualité la meilleure qui se rapproche le plus du blé tendre. Les auteurs admettent que toute valeur de R supérieure à 2 démontre l'absence de blé tendre. Cependant, les chiffres que nous venons de voir montrent que, si une semoule de qualité supérieure ne souffre aucune addition appréciable de blé tendre sans que la valeur de R tombe immédiatement au dessous de 2, il n'en va pas de même pour les semoules de qualité inférieure. Une semoule no 2 par exemple, donnant un rapport compris entre 7 et 9, peut supporter une adjonction assez considérable de blé tendre avant que ce rapport ne descende au dessous de 2. Ces chiffres montrent également qu'à partir d'une valeur donnée de R, il est impossible de calculer, même approximativement, le pourcentage de blé tendre dans le mélange.

Ces constatations peuvent également permettre d'expliquer les écarts que l'on observe lorsqu'on applique les méthodes infrarouge ou par chromatographie gazeuse à des mélanges dont on connaît la composition pondérale mais non la qualité des matières premières.

Comme nous l'avons signalé au début de cet exposé, l'un des facteurs entrant certainement en ligne de compte pour influencer les résultats est le taux d'extrac-

tion. Aussi avons nous voulu étudier systématiquement les différents produits de mouture d'un blé dur et d'un blé tendre typique. Pour cela, nous avons pu obtenir auprès des Moulins de Plainpalais S. A. à Genève les différentes fractions provenant du blutrage. Ces produits ont été analysés par la méthode *Brogioni* et par chromatographie gazeuse. Nous indiquons sur le graphique ci-contre (fig. 2) les valeurs trouvées par l'une et l'autre méthode.

Figure 2



Blé tendre

- A: Farine fleur
- B: Farine mi-blanche
- C: Farine fourragère I
- D: Farine fourragère II
- E: Fin son
- F: Son

Blé dur

- Semoule de cuisine
- Semoule pour pâtes
- Troisième no 1
- Troisième no 2

On constate que la répartition de l'alcool supérieur intervenant en chromatographie gazeuse est reparti d'une manière plus uniforme que le palmitate de sitostérol, ce qui, dans ce domaine, avantage la méthode chromatographique. Pour cette dernière méthode, la variation du résultat en fonction du taux d'extraction est en effet moins rapide, tout au moins dans le domaine des produits commerciaux (points A et B du graphique). Malheureusement, pour l'un et l'autre cas, cette variation en fonction du taux d'extraction se produit dans un sens défavorable, c'est à dire qu'une semoule no 2 provenant d'un blé dur de qualité inférieure peut, si l'on se fie à ces seuls résultats, passer pour un fin finot provenant d'un blé dur de qualité supérieure.

Lors de ces travaux, la méthode *Brogioni et Franconi* a été appliquée en effectuant les mesures spectrophotométriques à l'aide d'un appareil Beckmann IR-8 directement sur les lipides extraits. Les manipulations analytiques sont plus simples et, comme *Sturm* et collaborateurs l'ont constaté, les résultats sont équivalents.

Nous avons examiné si la teneur en eau des produits pouvait avoir une influence sur le résultat et nous avons constaté qu'effectivement on observe une augmentation de la surface de la bande mesurée en fonction de l'augmentation de l'humidité. Cependant, étant donné que cette influence est minime et que l'humidité des semoules et pâtes ne varie que dans des limites assez faibles, ce facteur n'apporte pas de perturbation appréciable à l'analyse lorsqu'on utilisé toujours de l'acétone anhydre pour les extractions.

Par contre, nous avons constaté qu'une distinction doit être faite entre les semoules et les pâtes. Si l'on examine parallèlement une semoule et une pâte contenant une addition identique de blé tendre, on obtient toujours une bande caractéristique plus faible dans le cas des pâtes que dans celui des semoules et l'écart est loin d'être négligeable. Une courbe d'étalonnage distincte doit donc être établie pour chacun de ces deux cas (nous avons vu que dans le cas de la chromatographie gazeuse, la correction se fait par le choix de l'étalon correspondant au produit à analyser).

A titre d'exemple, nous donnons ci-contre les courbes établies dans notre laboratoire à partir de semoules (fig. 3) et de pâtes (fig. 4) de composition connue.

Cette différence d'extractibilité est plus sensible encore dans le cas de la chromatographie gazeuse. C'est ainsi que l'éther de pétrole seul ne suffit plus à assurer l'extraction dans des conditions con-

Figure 3

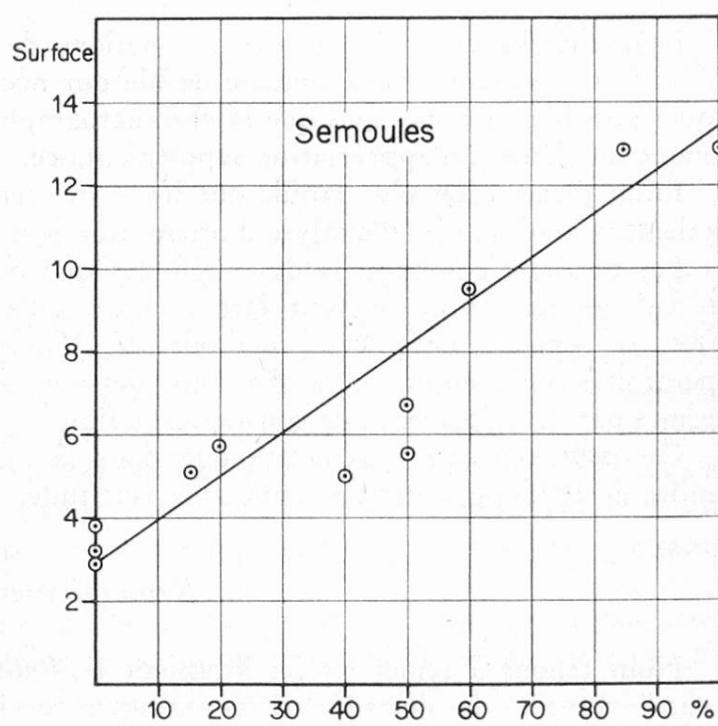
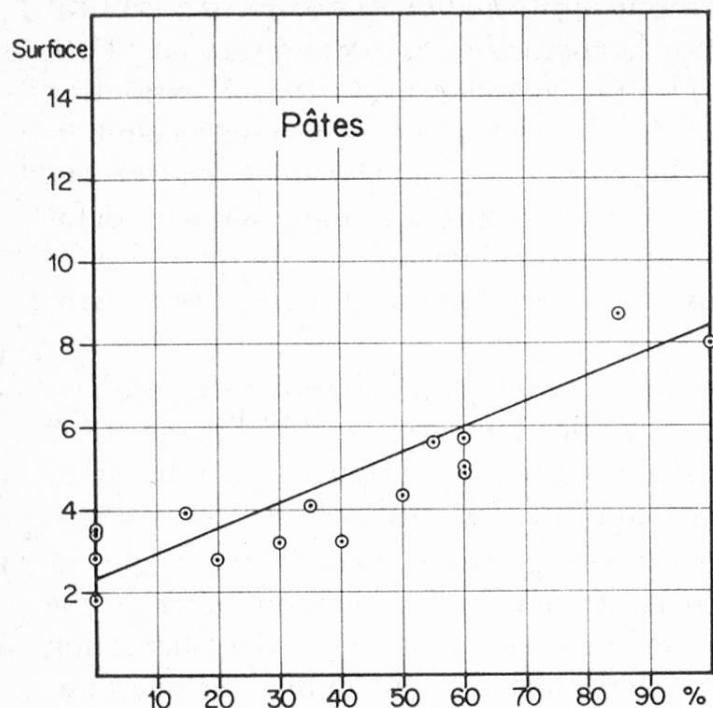


Figure 4



œuvre la méthode *Brogioni*, la chromatographie gazeuse et pour certaines, la méthode *Jaforte*. Les résultats ont été notés dans le tableau ci-contre.

Le rapport *Jaforte*, qui a été déterminé pour quelques-unes des analyses ne donne une valeur inférieure à 2 que pour un seul cas, et ceci lorsque l'addition de blé tendre est déjà importante.

Conclusion

La recherche et le dosage des adjonctions de blé tendre dans les semoules et pâtes alimentaires déclarées pure semoule de blé dur nécessitant le maximum de données analytiques possible, nous pensons que la chromatographie gazeuse peut être utilement employée comme un élément d'appréciation supplémentaire.

Etant d'exécution plus rapide que les autres techniques actuellement utilisées, elle peut également jouer le rôle d'analyse d'orientation lors de travaux de série.

Les résultats comparatifs des méthodes que nous venons de voir nous montrent que les valeurs finales ne doivent être données qu'avec une large marge de tolérance. En effet, si contrairement à la méthode de *Matweef* très délicate, les risques d'erreurs opératoires sont minimes, la diversité de composition possible des espèces de blés ne permet pas l'établissement de constantes définies.

On peut cependant admettre que dans la majorité des cas, une adjonction de blé tendre de 20 % peut être reconnue avec certitude.

Remerciements

Nous tenons à remercier ici Monsieur *E. Palluy*, de la Maison Firmenich à Genève, pour l'exécution des déterminations physiques spéciales.

venables. Une série de tentatives a été faite pour augmenter le coefficient d'extraction, mais un résultat comparable à celui des semoules n'a pu encore être atteint. Nous avons essayé divers solvants, soit par agitation, soit par emploi d'un exacteur soxhlet durant des temps prolongés et nous avons finalement choisi d'opérer par agitation en utilisant un mélange d'éther de pétrole et d'acétone (80/20) saturé d'eau (voir mode opératoire).

Nous ayant été possible de nous procurer auprès du Professeur *Brogioni* et de l'Union des fabricants suisse de pâtes alimentaires des semoules et pâtes de composition connue, nous avons procédé à des analyses comparatives mettant en

Teneur en blé tendre indiquée (%)	Teneur en blé tendre trouvé (%) par:		Rapport Jaforte
	Méthode Brogioni	Chromatographie gazeuse	
<i>Semoules</i>			
0	0	0	3,08
0	0—15	0	3,37
40	15—30	30—40	2,10
20	20—35	35—45	2,71
15	35—45	25—35	
50	65—80	60—80	
0	10—20	0	
60	100	100	
100	100	100	
50	40—50	45—55	
85	100	100	
<i>Pâtes</i>			
60	30—60	50—80	1,99
60	40—70	50—80	2,60
0	0	0	
40	20—35	15—25	
0	5—15	0	
60	45—60	30—50	
100	80—100	100	
85	100	100	

Résumé

Les principales méthodes actuellement à disposition pour reconnaître et doser une adjonction de blé tendre dans des produits ne devant en principe contenir que du blé dur ont été mises au point par *M. Matweef* (1), *K. A. Gilles* et *V. L. Youngs* (2), *M. Brogioni* et *V. Franconi* (3), *A. Jaforte* et *A. Cavallaro* (4a). Elles sont principalement basées sur la présence, dans le blé tendre, d'une quantité de palmitate de sitostérol nettement supérieure à celle qu'on rencontre dans le blé dur. Cependant, la teneur en palmitate de sitostérol varie dans de larges limites suivant les espèces considérées et un résultat valable ne peut être obtenu qu'à partir d'un maximum de données analytiques possible. C'est la raison pour laquelle une étude des constituants lipidiques a été entreprise, mettant en œuvre la chromatographie en phase gazeuse.

Si l'on chromatographie sur colonne de silicone SE-30 à 1 % la matière grasse extraite des produits de la mouture à l'aide d'éther de pétrole pour le cas des farines et semoules et du mélange éther de pétrole-acétone-eau pour le cas des pâtes alimentaires, on observe un pic

présentant à 220° un temps de rétention de 5 minutes environ. Le produit qui est à l'origine de ce pic a été isolé par chromatographie sur couche mince et étudié par spectro-photométrie infrarouge, résonance magnétique nucléaire et spectrographie de masse; il s'agit vraisemblablement d'un alcool supérieur en C₁₇.

La chromatographie en phase gazeuse peut être ainsi utilement employée comme élément d'appréciation supplémentaire lors de la recherche des additions de blé tendre dans les produits du blé dur. Étant d'exécution plus rapide que les autres techniques actuellement utilisées, elle peut également jouer le rôle d'analyse d'orientation lors de travaux de série. On peut admettre que dans la majorité des cas, l'ensemble des résultats analytiques permet de reconnaître avec certitude une adjonction de 20 % de blé tendre.

Bibliographie

1. *M. Matweef*: C. R. Acad. Agric. **39**, 658 (1952).
2. *K. A. Gilles et V. L. Youngs*: Cereal Chemistry **41**, 502 (1964).
3. *M. Brogioni et U. Franconi*, Boll. Lab. Chim. Prov., **14**, 135 (1963).
M. Brogioni et U. Franconi, Boll. Lab. Chim. Prov., **15**, 557 (1964).
4. *F. Custot, R. Mezonnet et M. Caley*: Ann. Fals., **59**, 300 (1966).
- 4a *A. Jaforte et A. Cavallaro*, Riv. Ital. Sost Grasse **41**, 641 (1964).
5. *A. Jaforte et A. Cavallaro*: Riv. Ital. Sost. Grasse **41**, 641 (1964).
6. *P. A. Sturme, R. M. Parkhurst et W. A. Skinner*: Cereal Science Today **11**, (12), (1966).
7. *J. Terrier*, M. L. H. **32**, 237 (1941).

F. Müggler-Chavan et D. Reymond, Laboratoire de Recherche des produits Nestlé,
Vevey.

Constituants aromatiques de cacaos de diverses provenances

Une étude systématique de l'arôme de cacao (1) nous a permis d'identifier 70 constituants dont 35 sont nouveaux par rapport à la littérature. Nous décrivons ici l'influence de la provenance des fèves sur la composition de l'arôme de cacao.

Nous avons analysé huit lots de fèves provenant de cinq régions différentes et qui appartenaient à divers types botaniques indiqués dans la table No 1; les lettres italiques représentent les abréviations utilisées.

Table No 1

Nom	Région	Variété botanique
Puerto Gabello	Venezuela	Hybrides de Criollo
Trinidad	Trinidad	Forastero Trinitario
Caracas	Venezuela	Forastero Criollo
Arriba	Equateur	Nacional Trinitario
Carupano	Venezuela	Forastero
Bahia	Brésil	Forastero
Accra	Ghana	Forastero
Para	Brésil	Forastero

Les échantillons ont été rôtis dans des conditions assurant un bon développement d'aromes; le concassage mécanique a donné un grué débarassé des pelures et des germes. Les huit grués ont été ensuite broyés pour donner des pâtes homogènes.

Les arômes de «tête» ont été entraînés, à partir de 50 g de pâte, par un courant de gaz inerte et condensés à — 60 °C. En chauffant le piège, on introduit les substances retenues dans une colonne micro-capillaire UCON-LB-550-X de 50 mètres, à travers un «by-pass».

Les composés de point d'ébullition plus élevé sont entraînés à la vapeur d'eau sous vide (prise d'échantillon: 250 g de pâte). Le distillat est extrait au dichlorométhane, séché et concentré: l'extrait organique est injecté sur une colonne de 4,5 m de longueur et 0,3 cm de diamètre contenant du Chromosorb W (100 à 120 mesh), chargé de 5 % de succinate de diéthylène glycol (2, 3).

Pour faciliter les comparaisons, le cacao Accra a été choisi comme standard étant donné que sa production est de loin la plus importante.

Un indice d'équilibre E a été calculé, en prenant comme standard interne, pour les substances de l'arôme de «tête», l'isovaléraldéhyde:

$$E = \frac{\text{surface du pic}}{\text{surface de l'isovaléraldéhyde}} \times \frac{\text{surface de l'isovaléraldéhyde Accra}}{\text{surface du pic Accra}}$$

Nous avons considéré comme significatifs d'un déséquilibre, des indices inférieurs à 0,5 ou supérieurs à 2,0.

Douze composés ont été détectés dans l'arôme de «tête». Ils avaient été identifiés précédemment par Bailey et coll. (4), dans une étude sur le rôtissage et les variétés de fèves. Cinq substances montrent des différences significatives comme l'indique la table No 2. Le cacao Carupano possède une teneur relativement élevée en sulfure de diméthyle, tandis que les fèves provenant du Brésil (Bahia et Para) présentent un excès d'éthanol.

Table No 2

	Indices d'équilibre de substances très volatiles						
	PUGA	TRIN	CARA	ARRI	CARU	BAHI	PARA
Ethanal	0,9	1,2	0,8	0,7	1,0	0,4	1,5
Diméthylsulfide	0,4	0,1	0,6	0,1	2,6	0,1	0,1
Butanal	0,5	2,6	2,2	1,1	4,4	0,3	2,0
Ethanol	0,1	1,0	0,7	1,7	0,1	3,4	3,0
Diacétyle	0,7	1,4	0,1	0,9	0,4	1,1	0,3

L'examen des substances entraînables à la vapeur d'eau donne une information plus complète.

L'indice d'équilibre E a été choisi en prenant comme standard interne, le pic du phényl-2-éthanol, une des substances les plus abondantes du cacao:

$$E = \frac{\text{surface du pic}}{\text{surface de phénylethanol}} \times \frac{\text{surface du phénylethanol Accra}}{\text{surface du pic Accra}}$$

Les indices d'équilibre peuvent être donnés pour différentes classes de constituants. Parmi les alcools, le butanol, l'isopentanol, l'hexanol et l'octanol montrent des variations très importantes. Les valeurs (voir table 3) pour les cacaos Puerto Gabello, Trinidad, Caracas et Arriba sont très élevées, si on les compare à celles des cacaos Carupano, Bahia, Para et Accra. Le premier groupe appartient aux variétés Criollo et Trinitario Nacional, tandis que le second est du type Forastero.

Table No 3

	Indices d'équilibre des alcools						
	PUGA	TRIN	CARA	ARRI	CARU	BAHI	PARA
Butanol	3,5	4,7	1,4	3,6	0,2	1,8	1,0
Isopentanol	8,0	4,0	0,7	2,5	0,1	1,2	0,1
Hexanol	28,5	19,9	9,3	6,1	2,1	1,2	0,3
Octanol	4,3	4,0	3,2	0,1	1,1	1,7	0,4

Les valeurs d'équilibre des pyrazines indiquent une quantité relativement élevée de triméthyléthylpyrazine dans les fèves Arriba (table No 4).

Table No 4

	Indices d'équilibre des pyrazines						
	PUGA	TRIN	CARA	ARRI	CARU	BAHI	PARA
Diméthyl	1,8	3,2	1,1	1,1	1,1	1,2	0,5
Méthyléthyl	0,8	0,1	0,7	0,3	0,3	1,5	0,1
Triméthyl	1,8	1,0	0,7	0,1	0,6	1,0	0,5
Tetraméthyl	0,6	0,6	0,4	0,3	0,3	0,5	0,3
Triméthyléthyl	1,8	0,9	1,9	14,7	1,9	3,1	1,0

On peut aussi caractériser de cette manière la note aromatique particulière d'un échantillon: le cacao Bahia contient du phénol, du gaïacol, du phénylbuténal et de la γ -butyrolactone en excès (table No 5). Il est reconnu que les fèves de Bahia ont assez fréquemment une odeur de jambon fumé et il est donc possible que ces substances jouent un rôle dans ce parfum caractéristique.

Table No 5

	Indices d'équilibre caractéristiques du cacao Bahia						
	PUGA	TRIN	CARA	ARRI	CARU	BAHI	PARA
γ -butyrolactone	2,0	1,1	1,8	1,7	1,8	3,1	0,8
Gaïacol	2,0	1,7	1,1	0,8	0,9	2,6	0,6
Phénol	1,6	1,0	0,8	0,8	0,5	2,0	0,7
Phénylbuténal	1,5	0,8	1,1	0,6	1,2	3,7	0,8
Formyl-2-pyrrole	1,5	1,0	1,0	0,9	0,7	2,8	0,7

Pour illustrer ces comparaisons, nous avons superposé, dans la figure 1, les chromatogrammes de 3 cacaos (Bahia, Arriba, Caracas) à celui du cacao Accra; il s'agit d'aromes entraînables à la vapeur d'eau de fèves rôties.

La table No 6 donne l'identification des pics principaux des chromatogrammes. Les analyses ont été exécutés à l'aide de la colonne DEGS utilisée sous un débit d'azote de 30 ml/min. et avec la programmation de température suivante: 4 min. isotherme à 50 °; 8 min. programmé à 6 °/min.; 20 min. à 4 °/min.

Les substances citées dans la table No 6, ont été identifiées dans un arôme préparé à partir de 500 kg de fèves Accra rôties. Nous avons vérifié certaines identifications par chromatographie en phase gazeuse préparative et spectrographie de masse, en travaillant sur 50 kg de fèves Bahia, Carupano et Accra. Ces trois sortes contiennent les mêmes composés, mais leurs valeurs d'équilibre les différencient.

Nous avons indiqué, dans la table No 6, l'abondance relative de certains constituants dans les grués Bahia et Carupano, en comparant grossièrement leurs rendements à ceux obtenus à partir du grué Accra. Certains composés n'ont pas été retrouvés lors de cette analyse, étant donné la quantité relativement faible de cacao que nous avions utilisée.

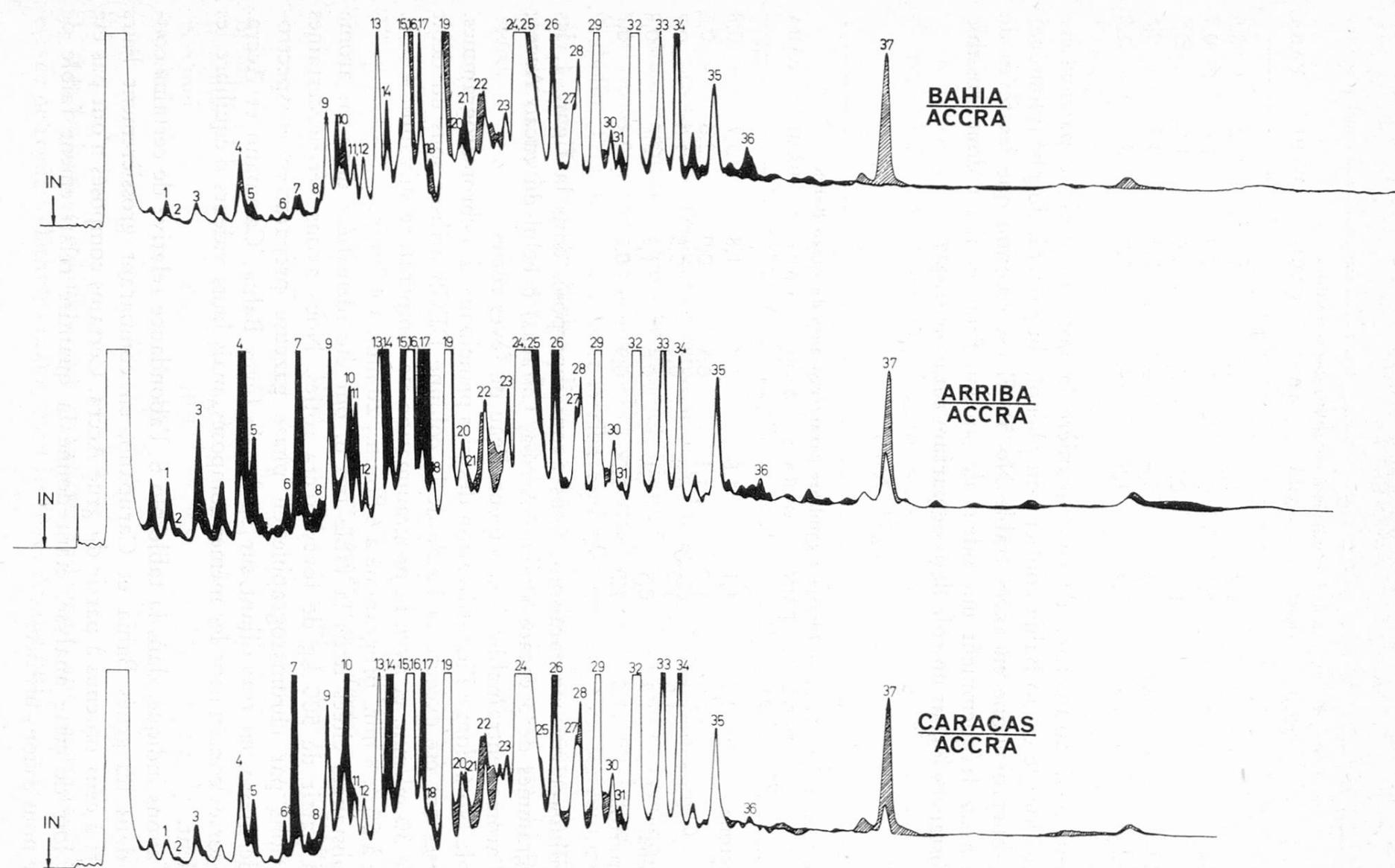


Figure 1
Chromatogrammes comparatifs de trois sortes de fèves de cacao

Zone blanche: commune aux deux chromatogrammes ;
Zone hachurée: constituants en excès dans les cacaos Bahia, Arriba et Caracas ;

constituants en excès dans le cacao Accra de référence.

Table No 6
Composition des arômes entrainables à la vapeur d'eau

No pic	Substance	Substance retrouvée par CP - SM	
		BAHIA	CARUPANO
1	Pentane-dione-2,3		
2	Iso-butanol-1		
3	Pantanol-2		s
	Crotonaldéhyde		
	Blutanol-1		
	Sulfure de diméthyle		
4	Iso-pentanol-1		
5	Caproate d'éthyle		
6	Pantanol-1		
7	Hexanol-1		
8	Méthyl-2-pyrazine	s	s
9	Diméthyl-2,5-pyrazine	w	w
	Diméthyl-2,6-pyrazine		
	Diméthyl-2,3-pyrazine		
10	Méthyl-2-tétrahydrofurannone-3	s	w
	Butanone-2-ol-3	w	w
11	Octène-1-ol-3		
12	Méthyl-2-éthyl-5-pyrazine	x	
13	Triméthylpyrazine		x
14	Octanol-1	x	x
	Diméthyl-2,5-éthyl-3-pyrazine		
15	Pyrrole		
	Acide iso-butyrique	x	
	Cis-vinyl-2-méthyl-2 (hydroxy-1-méthyl-1-éthyl)-5-tétrahydrofuranne (oxyde de linalol II)		
16	Tétraméthylpyrazine	w	w
17	Triméthyléthylpyrazine	x	x
	Furfural		
18	Acétate d'acétol	w	w
	Phénylacétaldéhyde	m	m
19	Furyl-méthyl-cétone	m	m
	Benzaldéhyde		
20	Acétate de furfuryle		
21	Butane-diol-2,3		
22	Benzonitrile		
23	Benzoate d'éthyle		
	Alcool furfurylique		
	Méthyl-1-formyl-2-pyrrole		
24	Acétophénone	s	s

No pic	Substance	Substance retrouvée par CP - SM	
		BAHIA	CARUPANO
25	γ -valérolactone	x	x
26	Phényl-2-propanol-2		
	γ -butyrolactone	s	s
27	γ -caprolactone		
28	Phényl-1-éthanol	m	m
	Phénylacétate d'éthyle	s	s
29	Acétate de phényl-2-éthyle	s	m
	Sulfure de méthyle et de méthyl-5-furfuryle		
30	Alcool benzylique	x	x
	o-Hydroxyacétophénone		x
31	Gaïacol	s	
	Méthyl-3-cyclo-pentane-dione-1,2		
32	Phényl-2-éthanol	m	m
33	Phénol	s	
34	Phényl-buténal	x	x
35	Formyl-2-pyrrole	s	x
36	Méthyl-5-formyl-2-pyrrole	x	
37	Acétyl-2-pyrrole	m	w

Abréviations de la Table No 6

CP == chromatographie en phase gazeuse préparative

SM == spectrographie de masse

w == quantité plus faible que dans l'Accra

s == quantité plus grande que dans l'Accra

m == quantité égale à celle de l'Accra

x == détection de la substance sans détermination quantitative.

Les quantités élevées de γ -butyrolactone, gaïacol, phénol et formyl-2-pyrrole dans les fèves de Bahia confirment les chiffres de la table No 5.

Résumé

Les fèves de cacao de diverses origines contiennent les mêmes constituants aromatiques. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet cependant de différencier certaines sortes de cacao si l'on détermine des valeurs d'équilibre par rapport à un cacao standard. Les variations observées peuvent être dues à la provenance ou à l'espèce botanique.

Bibliographie

1. J. P. Marion, F. Müggler-Chavan, R. Viani, J. Bricout, D. Reymond, R. H. Egli: Helv. Chim. Acta, **50**, 1509 (1967).
2. D. Reymond, F. Müggler-Chavan, R. Viani, L. Vuataz, R. H. Egli: J. Gas Chrom. **28** (1966).
3. D. Reymond, F. Müggler-Chavan, R. Viani, R. H. Egli: Travaux de Chimie Alimentaire, **57**, 484 (1966).
4. S. D. Bailey, D. G. Mitchell, M. L. Bazinet, C. Weurman: J. Food Science, **27**, 165 (1962).

H. Thaler und U. Gieger*, Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig.

Zur Bestimmung der Gesamt-Ascorbinsäure in Wein

In der Absicht, wenigstens einen Teil der schwefligen Säure im Wein durch andere, gesundheitlich als völlig unbedenklich anzusehende Stoffe zu ersetzen, ist im Laufe der letzten Jahre in mehreren europäischen und außereuropäischen Staaten die Verwendung von Ascorbinsäure bei der Weinbereitung genehmigt worden. Die Höhe des Zusatzes ist in manchen Ländern begrenzt, in anderen aber beliebig. Für die Weinanalytik ergibt sich damit die Aufgabe, einen solchen Zusatz quantitativ ermitteln zu müssen. Im Gegensatz zur üblichen «Vitamin C-Bestimmung» handelt es sich im vorliegenden Falle aber nicht um die Feststellung der mehr oder weniger großen physiologischen Wirksamkeit, sondern darum, wieviel Ascorbinsäure dem betreffenden Wein überhaupt zugefügt wurde.

Der analytischen Bestimmung kommt einerseits die Tatsache entgegen, daß in natürlichen Weinen bisher keine nennenswerten Mengen an Ascorbinsäure gefunden wurden (1). Anderseits ergibt sich eine beträchtliche Erschwerung der Ermittlung dadurch, daß diese Substanz im Wein nicht als solche erhalten bleibt, sondern einen oxidativen Abbau erleidet. Dessen erstes Produkt, die Dehydroascorbinsäure, und die in der Folge durch Aufspaltung des Lactonringes entstehende Diketogulonsäure müssen auf alle Fälle bei der analytischen Ermittlung als «Gesamt-Ascorbinsäure» erfaßt werden. Weitere Umwandlungsprodukte wie Furfurol, L-Threonsäure, Hydroxybrenztraubensäure, Brenztraubensäure, Glycerinaldehyd, Glykolsäure, Glyoxylsäure, Oxalsäure, Glyoxal, Milchsäure, Ameisensäure, 2,5-Dihydro-2-furansäure und Kohlendioxid können dagegen ebenso aus dem Abbau anderer Weininhaltstoffe herrühren und dürfen deshalb vernachlässigt werden.

* Dem Bundesgesundheitsamt, Berlin, sei auch an dieser Stelle für die Unterstützung der Arbeit herzlich gedankt.

Von den außerordentlich zahlreichen Verfahren zur Ermittlung der Ascorbinsäure scheiden die allermeisten von vornehmerein aus, da sie entweder nur diese selbst und evtl. die Dehydroascorbinsäure zu erfassen erlauben oder Störungen durch irgendwelche Bestandteile des Weines eintreten. Es erschien daher ratsam, auf möglichst kurzem Wege ein stabiles Derivat der Ascorbinsäure und der beiden ersten Produkte ihres Abbaus herzustellen, um dieses dann von störenden Begleitsubstanzen zu trennen. Diese Arbeitsweise sollte Verluste während des Analysenganges so weit wie möglich ausschalten und die Gewähr für eine zuverlässige und genaue Bestimmung der Gesamt-Ascorbinsäure bieten. Als aussichtsreich bot sich die Methode von Roe und Oesterling (2) an, d. h. die Ueberführung in das mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin entstehende Reaktionsprodukt. Dieses Reaktionsprodukt, das sich sowohl mit Dehydroascorbinsäure als auch mit Diketogulonsäure bildet, zeichnet sich durch außerordentlich gute Kristallisierfähigkeit, Stabilität und Unlöslichkeit in Wasser aus. Da sich die Ascorbinsäure sehr bequem zur Dehydroascorbinsäure oxidieren lässt, war die Möglichkeit für die Erfassung der Gesamt-Ascorbinsäure auf diesem Wege gegeben, zumal sich die Möglichkeit bot, das Dinitrophenylhydrazone dünnenschichtchromatographisch von störenden Begleitstoffen trennen zu können.

Ueberprüfung der Bestimmungsmethoden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Die von Kotake und Nishigaki (3) zum erstenmal in der Literatur beschriebene Reaktion des Vitamin C mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (im folgenden als DNPH abgekürzt) wurde von ihnen zum Nachweis der Ascorbinsäure im Kammerwasser des Auges von Kaninchen sowie in tierischen und pflanzlichen Geweben benutzt. In der Folge verwendeten auch andere Autoren das DNPH als Reagens für Vitamin C (4).

Eine photometrische Auswertung des aus oxidiertener Ascorbinsäure und DNPH erhaltenen Derivates beschrieben Roe und Kuether (5). Sie versetzten das Reaktionsprodukt mit 85%iger Schwefelsäure und ermittelten die Absorptionsmaxima der rot gefärbten Lösung bei 500 bis 550 nm und 350 bis 380 nm. Die Farbintensität stand in guter Uebereinstimmung mit dem Beer'schen Gesetz. Die Derivate von Pentosen und Hexosen, die eine Störung hätten verursachen können, zeigten bei 540 nm praktisch keine Absorption. In späteren Arbeiten (2, 6a, 6b, 6c) gaben die Autoren ausführliche Arbeitsvorschriften für die Bestimmung der Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure in Blut, Urin, Gewebeextrakten und Nahrungsmitteln. Sie nahmen die Oxidation der Ascorbinsäure in trichloressigsaurer Lösung mit Norite-Kohle vor, um gleichzeitig eine Klärung der Analysenlösung zu erhalten. Das Reagens wurde in 9 n-Schwefelsäure gelöst und die Reaktion über 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Mit einem Thioharnstoffzusatz sollte ein mild reduzierendes Medium geschaffen werden, um oxidierende Substanzen (Fe^{++} ; H_2O_2) auszuschließen, die mit DNPH eine störende Färbung ergaben. Die rote Farblösung wurde 30 Minuten nach Zusatz von 85%iger

Schwefelsäure gegen einen Blindwert gemessen. Für diesen letzteren wurde das Reagens erst nach der dreistündigen Reaktionszeit und nach dem Schwefelsäurezusatz zu der Analysenlösung hinzugefügt. Auf Grund eigener Untersuchungen sowie der Angaben von *Penney* und *Zilva* (7) sei hier bemerkt, daß schon eine Reaktionszeit von 30 Minuten unter Umständen ausreicht, um das bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon der Diketogulonsäure zu erhalten, so daß der Blindwert bei Vorliegen von Diketogulonsäure für eine Bestimmung der Gesamt-Ascorbinsäure zu hoch ausfällt. Die Dehydroascorbinsäure benötigt bei Raumtemperatur längere Zeit, um das rote bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon zu bilden.

Modifizierungen der Methode von *Roe* und *Kuether* wurden durch mehrere Autoren gegeben. *Meyer* und Mitarbeiter (8) wie auch *Schaffert* und *Kingsley* (9) verkürzten die Reaktionszeit auf 5 Minuten in der Siedehitze. Hierdurch wird die Spezifität jedoch keineswegs erhöht, denn vor allen Dingen die Hydrazone und bis-Hydrazone der Zucker werden bei erhöhter Temperatur sehr rasch gebildet. *Feldheim* und *Schmidt* (10) sowie *Feldheim* (11) beschrieben eine Methode, mit der sie zunächst die Ascorbinsäure volumetrisch bzw. photometrisch mit 2,6-Dichlorphenolindophenol im Ueberschuß bestimmten und anschließend in der oxidierten Lösung die Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure nach *Roe* und *Kuether* ermittelten. Auch diese Technik ist für Weine und Fruchtsäfte nicht spezifisch genug, da bei der Oxidation reduzierende Substanzen stören können, während bei der Fällung mit DNPH Aldehyd- und Ketoverbindungen teilweise mit erfaßt werden.

Die Bestimmung der Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure nebeneinander führten *Roe* und Mitarbeiter (6b) durch. Sie bestimmten zunächst in meta-phosphorsaurer Lösung, der zur Vermeidung der Ascorbinsäureoxidation Zinn(II)chlorid zugesetzt wurde, Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure zusammen mit DNPH. In einer zweiten Probe wurde die Dehydroascorbinsäure mit Schwefelwasserstoff bei pH 1,25 bis 1,30 (in 15 Minuten) zu Ascorbinsäure reduziert und die verbleibende Diketogulonsäure bestimmt. Nach Oxidation mit Brom lieferte eine dritte Probe die Summe aus Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure. In Analysenproben, die keine beachtenswerten Mengen an Reduktonen, Aldehyden und Ketonen enthalten, liefert die beschriebene Methode zufriedenstellende Werte. Soll jedoch der Gesamtascorbinsäuregehalt in so komplexen und zum Teil durch starke Eigenfärbung ausgezeichneten Produkten wie Wein und Fruchtsaft bestimmt werden, so kann der auftretende Fehler durch den Blindwert nicht mehr ausgeglichen werden (vgl. auch *Penney* und *Zilva* (12); *Hewston* und Mitarbeiter (13). Eigene Versuche, nach dieser Vorschrift Weine und Fruchtsäfte zu analysieren, ergaben stark streuende Werte für die Gesamtascorbinsäure; sie scheiterten in einigen Fällen ganz, da in der photometrisch ausgewerteten schwefelsauren Lösung der Hydrazone Trübungen und Verkohlungen auftraten.

Aethanol anstelle von Schwefelsäure für die photometrische Auswertung zu verwenden, empfahl *Szöke* (14). Jedoch wurde nach eigenen Untersuchungen dadurch die Empfindlichkeit beachtlich herabgesetzt. *Tewari* und *Krishnan* (15)

fanden nach der Methode von *Roe* und Mitarbeiter in pflanzlichen Extrakten für die Gesamtascorbinsäure niedrigere Werte als für die Summe aus Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure. Sie stellten Relationen auf zwischen der Dauer der Schwefelwasserstoff-Behandlung und den gefundenen Ergebnissen. *Penney* und *Zilva* (7a) beobachteten eine Zersetzung der Diketogulonsäure durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff.

Die Vielzahl an Möglichkeiten für auftretende Störungen bei der Analytik von Weinen und Fruchtsäften ließ es sinnvoll erscheinen, die Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure zu oxidieren, diese zusammen mit der Diketogulonsäure in das DNPH-Derivat überzuführen und chromatographisch von den eventuell entstandenen Hydrazonen anderer Carbonylverbindungen zu trennen. So sollte es möglich sein, gut reproduzierbare und dem tatsächlichen Gehalt an Gesamtascorbinsäure entsprechende Ergebnisse zu erhalten.

Eine papierchromatographische Isolierung des DNPH-Derivates oxiderter Ascorbinsäurelösungen wurde von *Patschky* (16) beschrieben, und zwar Fällung bei 20 °C, papierchromatographische Trennung (auf Papier Schleicher und Schüll Nr. 598 g) des roten bis-DNPHydrazone von den Begleitsubstanzen mit Chlorbenzol und Chloroform, anschließend Eluierung der roten Zone mit Alkohol-Aceton und photometrische Messung bei 470 nm. Es wurde mit dieser Technik ein Fehler von 10 % ermittelt. Für absteigende papierchromatographische Trennung der nach *Roe* und *Oesterling* (2) erhaltenen DNPHydrazone gaben *Drevon* und Mitarbeiter (17) das Fließmittel Toluol/Aceton/5%ige Essigsäure (2/1/1) an. *Gordon* und *Noble* (18) empfahlen die Auftrennung der nach *Roe* und Mitarbeiter (6b) gewonnenen DNPHydrazone an einer Säule mit Magnesiumphosphat/Hyflo Super-Cel (3/1). Die schwefelsaure Reaktionslösung wurde filtriert, getrocknet, mit Aceton extrahiert, durch die Säule gereinigt und nach Verdampfen des Acetons in Schwefelsäure gelöst und bei 520 nm photometrisch ausgewertet. *Mapson* (19) empfahl eine Anreicherung des DNPH-Derivates der Dehydroascorbinsäure an einer Säule mit Aluminiumoxid (sauer). Eigene Versuche zur Reinigung der Reaktionslösung an Kieselgel- bzw. Aluminiumoxid-Säulen ergaben keine befriedigenden Resultate. Es wurde keine scharfe Abgrenzung der Zonen erhalten bei Extrakten, die aus Wein (vor allem aus Rotwein) gewonnen worden waren.

Strohecker und *Pies* (20) führten die Reaktion mit DNPH nach Oxidation mit 2,6-Dichlorphenolindophenol über zwei Stunden bei 45 bis 50 °C durch, sammelten den Niederschlag auf einem Glasfilter und nahmen ihn in Essigsäure-äthylester auf. Nach Eindampfen des Eluates bis zur Trockene lösten sie den Rückstand in einer definierten Menge Aceton und führten mit einem aliquoten Teil dieser Lösung auf Kieselgel-G-Platten mit Chloroform/Essigsäureäthylester (1/1) eine dünnenschichtchromatographische Trennung durch. Sie brachten die rote Zone des Ascorbinsäurederivates mit 85%iger Schwefelsäure in Lösung, filtrierten durch Glaswolle und konnten bei 520 bis 525 nm gegen Wasser die photometrische Messung vornehmen. Für die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in Weinen und Fruchtsäften stellte sich bei dieser Methodik die Reaktions-

temperatur als zu hoch heraus. Der erhaltene Niederschlag der DNPH-Derivate war sehr voluminös und gewährleistete keine saubere Trennung. Außerdem bereitete das Wiederauflösen des getrockneten Niederschlages in Aceton Schwierigkeiten.

Eine zweifache chromatographische Reinigung der DNPHydrazone wendeten *Vuilleumier* und *Nobile* (21) sowie *Vuilleumier* und *Müller-Mulot* (22) an. Sie extrahierten die bei 20° C (in etwa 14 Stunden) erhaltenen Reaktionsprodukte aus der schwefelsauren Lösung mit Essigsäureäthylester. Das Lösungsmittel wurde eingedampft, der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und die Lösung dann zur Befreiung von überschüssigem Reagens über eine Kieselgelsäule geschickt. Die Eluierung des roten bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones der oxidierten Ascorbinsäure erfolgte mit Essigester (mit 2% Eisessig), welchen man bis auf ca. 1 ml (gravimetrisch bestimmt) eindampfte. Ein aliquoter Teil wurde auf Kieselgel-G-Platten mit dem Fließmittel Aether/Essigsäureäthylester/Eisessig (75/25/4) dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt, die rote Zone (*Rf* 0,6) mit Essigsäureäthylester eluiert, das Lösungsmittel nach Filtration durch eine Glasfritte wiederum eingedampft und nun das rote bis-2,4-DNPHydrazon in 4 ml Schwefelsäure gelöst und photometrisch bei 520 nm gemessen. Das Verfahren wurde in der Modifikation von *Genevois* von der Unterkommission für Wein-Analytik und Weinbestandteile des Internationalen Wein-Amtes als Einheits-Verfahren zur Bestimmung der Ascorbinsäure im Wein angenommen (35).

Diese sehr sorgfältige Reinigung der erhaltenen DNPH-Reaktionsprodukte ist sehr zeitraubend und nach eigenen Versuchen mit nicht reproduzierbaren Verlusten behaftet. Das Wiederauflösen der Abdampfrückstände gelingt auch bei dieser Technik nicht zufriedenstellend. Hinzu kommt die Beobachtung, daß in schwefelsaurem Reaktionsmedium aus der oxidierten Ascorbinsäurelösung fast immer drei rot bis orangerot gefärbte Zonen erhalten wurden, die nicht aus überschüssigem Reagens stammten und mit zur Auswertung hätten herangezogen werden müssen. Drei Zonen jedoch für eine quantitative Bestimmung zu eluieren, bringt einen zu großen Fehler mit sich. Eine weitere Ursache für das Auftreten fehlerhafter Resultate liegt darin, daß die zur photometrischen Messung gelangende schwefelsaure Lösung häufig getrübt ist, und zwar durch sehr feine Kieselgelteilchen, die durch Glasfrittenfiltration nicht zurückgehalten werden konnten.

Nach Ueberprüfung der angegebenen Methoden mit DNPH wurde zunächst versucht, die bei der Wein- und Fruchtsaftanalyse auftretenden Störungen aufzuklären und zu beseitigen, um so zu einer zuverlässigen Bestimmungsmethode zu gelangen.

Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Es wurden zunächst Versuche an Modellsolutions mit Ascorbinsäure pro analysi (Merck) ausgeführt, um die optimalen Fällungsbedingungen für das Reaktionsprodukt aus oxidierte Ascorbinsäure und DNPH bei 20° zu ermitteln. Die

Reaktionstemperatur von 20 °C wurde bei allen Versuchen eingehalten, damit von vornherein eine selektive Fällung gewährleistet war.

Stabilisierung: Ein Zusatz von 1 % m-Phosphorsäure (frisch bereitet), hat sich in der Ascorbinsäureanalytik sehr bewährt und wurde auch bei den eigenen Untersuchungen gewählt, um eine Zersetzung vor der Reaktion mit DNPH zu verhindern.

Oxidation: Um die Ascorbinsäure mit DNPH zur Reaktion zu bringen, ist zunächst ihre Oxidation erforderlich, die jedoch nicht weiter als bis zur Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure gehen darf. Hierfür wurde 0,1 n-Jodlösung gewählt, die im sauren Medium Ascorbinsäure quantitativ zur Dehydroascorbinsäure oxidiert. Der Überschuss an Jod kann leicht durch Thioharnstoff beseitigt werden, wodurch gleichzeitig ein mild reduzierendes Medium entsteht und das bei der Oxidation gebildete Wasserstoffperoxid abgefangen wird.

Reaktionsmedium: Bei den aus der Literatur bekannten Bestimmungs- bzw. Nachweismethoden der Ascorbinsäure über ihr DNPH-Derivat wird die Reaktion entweder in alkoholischer, salzsaurer oder schwefelsaurer Lösung vorgenommen. Eigene Versuche ergaben bei Fällungen in Schwefelsäure und Salzsäure kein einheitliches Reaktionsprodukt. Es wurden bei der dünnenschichtchromatographischen Trennung außer der roten Hauptzone, die als bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone der 2,3-Diketogulonsäure identifiziert werden konnte, zwei schwächere, orangefarbene Zonen beobachtet, die nicht von überschüssigem Reagens herrührten und möglicherweise aus Abbauprodukten stammten bzw. das mono-2,4-Dinitrophenylhydrazone der enolisierten Diketogulonsäure darstellten (23, Kenyon und Munro). Bei essigsaurer Fällung erschien auf der Dünnenschichtplatte nur eine rote Zone neben zwei isomeren Formen des überschüssigen Reagens.

Tabelle 1

Einfluß des Eisessig-Schwefelsäure-Verhältnisses auf die Ausbeute bei der Reaktion der oxidierten Ascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Volumenverhältnis des Säurezusatzes		Extinktion in Eisessig nach dc-Trennung
Eisessig Vol.-%	Schwefelsäure Vol.-%	E ₅₀₀
100	0	0,560
75	25	0,651
60	40	0,682
55	45	0,689
50	50	0,693
40	60	0,692
0	100	0,693

Tabelle 2

*Einfluß der Reagenskonzentration auf die Ausbeute bei der Reaktion
der oxidierten Ascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin*

DNPH in Eisessig/ Schwefelsäure (1/1) %	Extinktion in Eisessig nach dc-Trennung E_{500}
1	0,203
2	0,299
3	0,350
4	0,375
5	0,385
6	0,384
7	0,386
8	0,385

Allerdings erwies sich ein rein essigsaurer Reaktionsmedium als nicht ausreichend für eine quantitative Fällung. Ein Gemisch aus gleichen Volumeneilen Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure als Zusatz zur Reaktionslösung gewährleistete die quantitative Fällung in Form nur einer dünnenschichtchromatographisch nicht weiter auftrennbaren roten Zone.

Tabelle 1 zeigt die hierzu angestellten Versuche mit gleichbleibender Ascorbinsäurekonzentration und Fällung bei 20 °C über Nacht.

Reagenskonzentration: Bei den Versuchen trat deutlich eine Abhängigkeit der quantitativen Fällung von der Reagenskonzentration zutage. Das Reagens 2,4-Dinitrophenylhydrazin p. a. (Merck) wurde in Eisessig suspendiert und mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach gründlichem Durchmischen löste es sich in einigen Minuten unter Erwärmung. In dieser Weise wurden Reagenslösungen mit 1 bis 8 % DNPH hergestellt und je 4 ml zu 21 ml oxiderter Ascorbinsäurelösung definierter Konzentration hinzugefügt. Mit 1 bis 5%iger Reagenslösung war ein deutlicher Anstieg der gemessenen Extinktionen nach dünnenschichtchromatographischer Trennung zu verzeichnen (vgl. Tabelle 2). Für alle folgenden Versuche wurde daher die Reagenslösung mit 6 % DNPH gewählt, denn es muß damit gerechnet werden, daß die außer Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure reagierenden Substanzen einen Reagensüberschuss erforderlich machen.

Reaktionszeit: Die Reaktion der oxidierten Ascorbinsäurelösung mit DNPH wurde im Thermostaten bei 20 °C über Nacht (etwa 16 Stunden) ausgeführt. Längere Reaktionszeiten von 24 Stunden und 40 Stunden ergaben nach dünnenschichtchromatographischer Trennung keine höhere Extinktion. Nach 8stündiger Reaktionszeit war die Umsetzung noch nicht quantitativ verlaufen.

Extraktion: Nach erfolgter Umsetzung der oxidierten Ascorbinsäure mit DNPH konnte das gebildete bis-DNPHydrazon aus der essig- und schwefelsauren Lösung leicht mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Das frisch gefällte bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon der Diketogulonsäure löst sich sehr gut in Essigsäureäthylester. Dieser wiederum eignet sich zum Auftragen relativ großer Mengen auf Dünnschichtplatten für die chromatographische Trennung. Die Reaktion selbst wurde ausgeführt in 50 ml Zentrifugengläsern, die durch Schliffstopfen verschließbar waren. Hierin konnte auch die Extraktion mit Essigester vorgenommen werden. Ein Zusatz von 2 % Eisessig zum Essigester sollte die Bedingungen für eine «Mutarotation» der Lactonform in die offenkettige Form schaffen (24, Herbert, Hirst und Mitarbeiter). Genau 15 ml Essigsäureäthylester (mit 2 % Eisessig) wurden zu der Reaktionslösung pipettiert, 30 Sekunden verschlossen geschüttelt und zur Trennung der Schichten kurz mit 1000 bis 1200 U/min zentrifugiert. Von dem Essigesterextrakt wurden 10 ml in ein mit Schliffstopfen verschließbares Reagensglas pipettiert und der Vorgang der Extraktion mit 5 ml wiederholt. Es konnte sowohl bei Modellsolutions als auch bei Weinen und Fruchtsäften in der wäßrigen Phase nach zweimaliger Extraktion dünnschichtchromatographisch kein rotes bis-DNPHydrazon der Diketogulonsäure mehr nachgewiesen werden.

Dünnschichtchromatographische Trennung: Um Verluste durch Einengen des die Hydrazone enthaltenden Extraktes und ähnliche Manipulationen zu vermeiden, wurde der Versuch unternommen, den Essigesterextrakt unmittelbar ohne weitere Reinigung dünnschichtchromatographisch aufzutrennen. Allerdings mußte die Menge der zur Eluierung gelangenden roten Zone des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones der Diketogulonsäure groß genug sein für die photometrische Auswertung. Bei Verwendung von 20 ml Analysenflüssigkeit mit 20 bis 100 mg/l Ascorbinsäure und daraus gewonnenen 15 ml Essigesterextrakt ergaben sich Extinktionswerte zwischen 0,1 und 0,6 nach dünnschichtchromatographischer Trennung von 0,2 ml. Diese wurden strichförmig über eine ganze 20×20 cm Platte mit Hilfe des CAMAG-Chromatochargers nach Firmenich aus einer Mikrospritze (0,1 ml) aufgetragen. Am besten bewährt haben sich Platten, die mit 0,3 mm Kieselgel G beschichtet und nach Lufttrocknung 90 Minuten bei 150 bis 160 °C aktiviert worden waren.

Für eine einwandfreie Trennung der DNPH-Derivate empfiehlt es sich, mit wasserfreien Lösungsmitteln zu arbeiten. Chloroform wurde deshalb über Aluminiumoxid (Aktivität I, basisch) gereinigt und entwässert. Essigsäureäthylester und Eisessig waren analysenrein für Chromatographie. Das Mischungsverhältnis dieser drei Lösungsmittel für eine befriedigende Entwicklung der Chromatogramme mußte in Abhängigkeit von der Raumtemperatur geringfügig verändert werden. Gute Trennungen der gesuchten roten Zone von den übrigen gelben bis bräunlichgelben Zonen der Begleitsubstanzen wurden mit Essigsäureäthylester/Chloroform/Eisessig (50/60/5) bei 20 bis 22 °C und (50/50/5) bei 22 bis 24 °C in kammergesättigter Atmosphäre erhalten.

Bei dieser Trennung erreichte das rote bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon der Diketogulonsäure einen Rf-Wert von 0,3. In Extrakten, die einige Stunden bei Raumtemperatur gestanden hatten, trat zusätzlich eine ebenfalls rote Zone mit einem Rf-Wert von 0,6 auf. Es empfiehlt sich demnach, die Trennung nur in frischen Extrakten vorzunehmen, um durch eventuelle Strukturumwandlungen der Derivate bedingte Fehler zu vermeiden.

Front

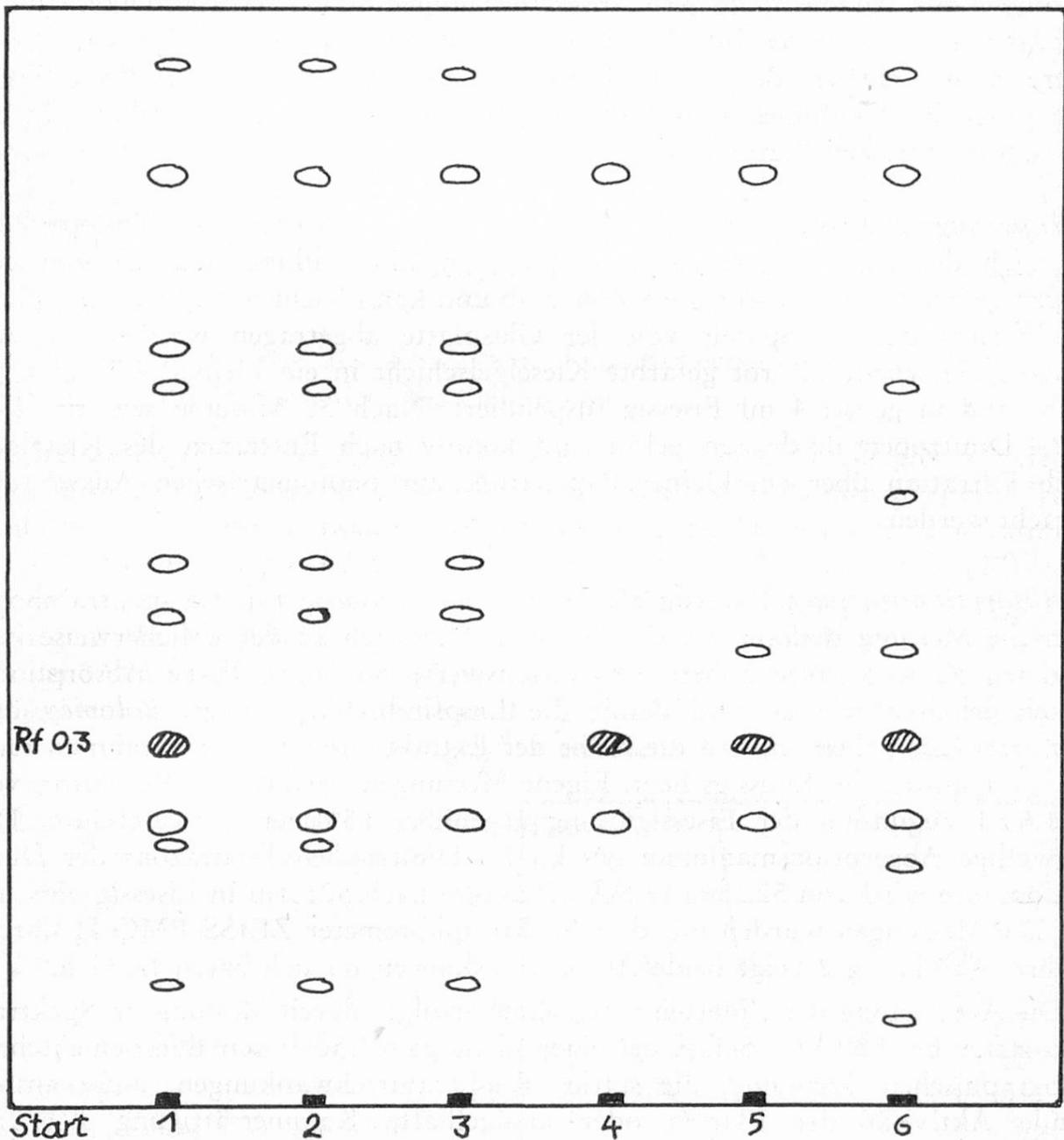


Abbildung 1

Skizze eines Dünnschichtchromatogrammes auf Kieselgel G

- | | |
|---|---|
| 1 = Weißwein mit Ascorbinsäure | 5 = Orangensaft |
| 2 = Weißwein ohne Ascorbinsäure | 6 = schwarzer Johannisbeersüßmost |
| 3 = Rotwein ohne Ascorbinsäure | Fließmittel: Essigester/Chloroform/Eisessig (50/60/5) |
| 4 = m-phosphorsaure Ascorbinsäurelösung | Temperatur: 20 bis 22 °C |

Das von *Strobecker* und *Pies* (20) angegebene Fließmittel Essigsäureäthylester/Chloroform (1/1) gewährleistete keine deutliche Trennung des roten Derivates vom Reagens. Bei der Entwicklung nach *Vuilleumier* und *Nobile* (21) mit Aether-Essigsäureäthylester/Eisessig (75/25/4) hatten das rote bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon der Diketogulonsäure und das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure den gleichen Rf-Wert.

In Weinproben, die keine Ascorbinsäure enthielten, traten mit dem angegebenen Fließmittel Essigsäureäthylester/Chloroform/Eisessig (50/60/5) keine Überlagerungen auf. An der Stelle des Chromatogrammes, an der das rote Diketogulonsäurederivat erscheint, ist bei Weißwein und Rotwein ohne Ascorbinsäure keine andere Zone sichtbar. Bei Fruchtsäften war ebenfalls eine einwandfreie Trennung möglich. Abbildung 1 gibt die Skizze einer entsprechenden dünnenschichtchromatographischen Platte wieder.

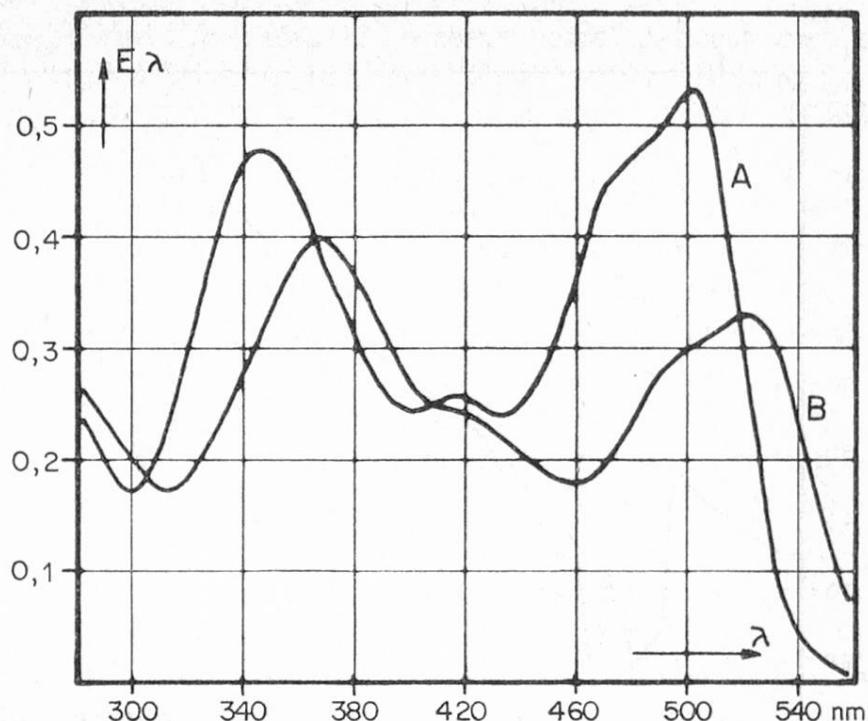
Eluierung: Die rote Zone des DNPH-Derivates oxidierter Ascorbinsäure hebt sich nach der dünnenschichtchromatographischen Entwicklung deutlich von den übrigen gelben bis bräunlichgelben Zonen ab und kann leicht mit Hilfe eines plangeschliffenen dünnen Spatels von der Glasplatte abgetragen werden. Im Arbeitsvorgang wurde die rot gefärbte Kieselgelschicht in ein kleines Wägeglas gebracht und in genau 4 ml Eisessig suspendiert. Nach 30 Minuten war das rote bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon gelöst und konnte nach Entfernen des Kieselgels durch Filtration über ein kleines Papierfilter zur photometrischen Auswertung gebracht werden.

Absorptionsmessung: Eisessig als Lösungsmittel wurde für die spektralphotometrische Messung deshalb gewählt, weil im Vergleich zu der üblicherweise verwendeten Schwefelsäure höhere Extinktionswerte im langwelligen Absorptionsbereich erhalten werden und damit die Empfindlichkeit steigt. *Bolomey* und *Kemmerer* (25) gaben an, daß die Höhe der Extinktionswerte am Maximum etwa 1,3 : 1 zugunsten des Eisessigs liegt. Eigene Messungen ergaben das Verhältnis von ca. 1,6 : 1 zugunsten der Eisessiglösung gegenüber 65%iger Schwefelsäure. Das langwellige Absorptionsmaximum des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazons der Diketogulonsäure wird von 522 nm in Schwefelsäure nach 501 nm in Eisessig verschoben. Die Messungen wurden mit dem Spektralphotometer ZEISS PMQ II durchgeführt. Abbildung 2 zeigt beide Absorptionskurven im sichtbaren Bereich.

Die Auswertung der eluierten roten Zone erfolgte durch Messung im Spektralphotometer bei 500 nm. Selbst bei einer nicht ganz tadellosen dünnenschichtchromatographischen Trennung, die starke Temperaturschwankungen, nicht ausreichende Aktivität der Platten oder mangelhafte Kammersättigung u. ä. als Ursache haben kann, wird das Meßergebnis bei Gesamtascorbinsäuregehaltenen von 40 bis 100 mg/l kaum beeinflußt, wenn die Ränder der benachbarten Zonen mit eluiert werden. Dies zeigen die in Abbildung 3 wiedergegebenen Absorptionskurven der oberhalb und unterhalb des roten Diketogulonsäure-bis-DNPHydrazones auftretenden Derivate aus Weinen. Die Abbildung 3 enthält außerdem die

Abbildung 2

Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich von präparativ hergestelltem bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon der 2,3-Diketogulonsäure in Eisessig (A) und 65%iger Schwefelsäure (B).

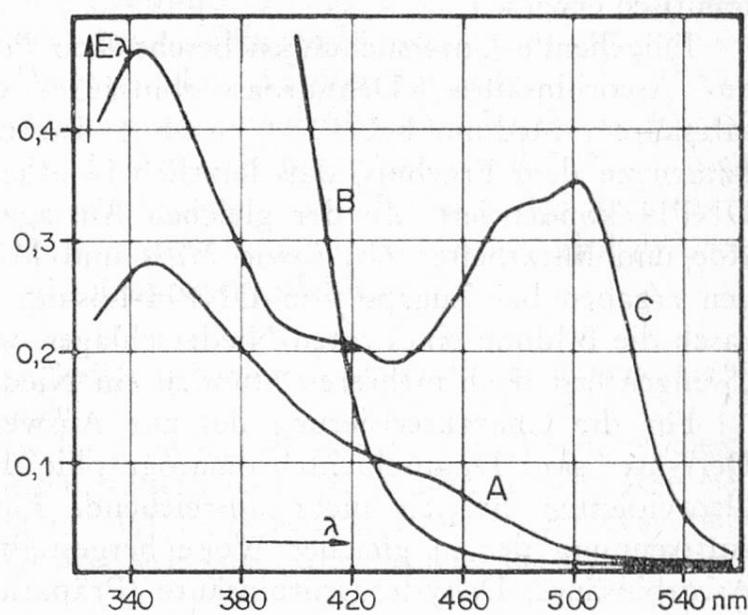


Absorptionskurve eines aus schwarzem Johannisbeersüßmost isolierten bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones der Diketogulonsäure.

Charakterisierung des 2,4-DNPH-Derivates: In der Literatur gibt es verschiedene Ansichten darüber, ob es sich bei dem roten bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon oxidierte Ascorbinsäurelösungen um das Derivat der Dehydroascorbinsäure oder der Diketogulonsäure handelt. v. Euler und Eistert (26) sowie Szöke (27) geben an, daß in saurer Lösung sowohl die Lactonform als auch die offenkettige Form vorliegen. Mapson (19) trennte aus schwefelsaurer Reaktionslösung (nach 3 Stunden bei 37 °C) papierchromatographisch eine rote und eine orangefarbene Verbindung. Dem roten Derivat ordnete er die Lactonform zu und gab an, daß in Gegenwart von Oxalsäure die orangegelbe Substanz vollständig in die rote über-

Abbildung 3

Absorptionsspektren in Eisessig im sichtbaren Bereich
 A = bräunlich-gelbe Zone aus Wein, im DC oberhalb und
 B = gelbe Zone (Reagens-Isomeres), im DC unterhalb des roten bis-DNPHydratzones der Diketogulonsäure
 C = bis-DNPHydrazone der Diketogulonsäure aus schwarzem Johannisbeersüßmost isoliert.



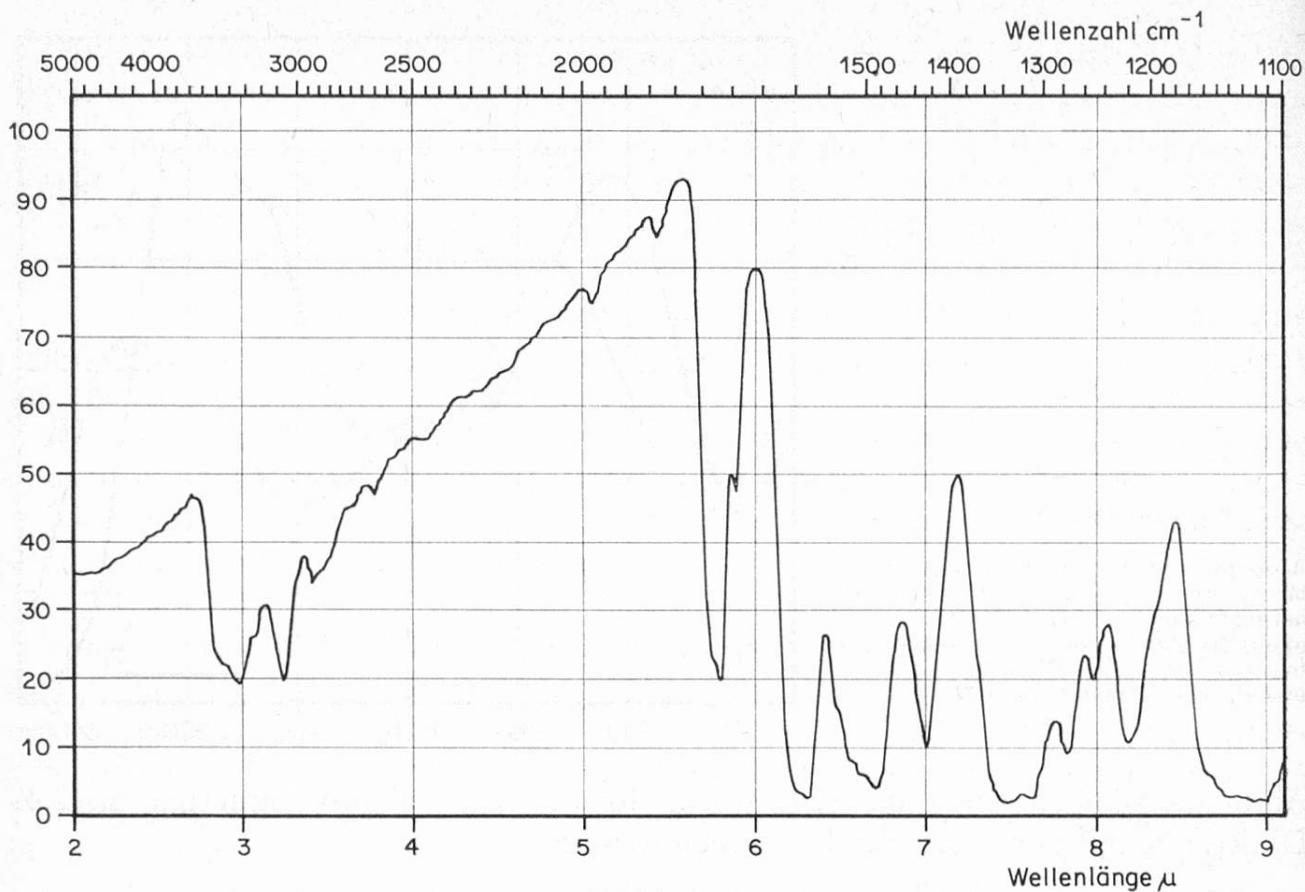


Abbildung 4

IR-Spektrum (in KBr) des präparativ hergestellten bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones der Diketogulonsäure.

ginge. Bei der Reaktion in schwefelsaurem Medium über ca. 14 Stunden bei 20 °C bleibt nach Angaben von *Vuilleumier* und *Müller-Mulot* (22) der Anteil der Lactonform unter Einhaltung der gegebenen Reaktionsbedingungen konstant und bildet das Hauptprodukt.

Drumm und Mitarbeiter (4) beobachteten bei säulenchromatographischer Trennung zwei ineinander übergehende rote Zonen, die sich nach der Elution als identisch erwiesen.

Eingehende Untersuchungen beschrieben *Penney* und *Zilva* (7b). Sie erhielten aus Ascorbinsäure-, Dehydroascorbinsäure- und Diketogulonsäurelösungen in salzsaurer Medium bei 40 °C nach 5 Tagen jeweils das gleiche Derivat und kamen zu dem Ergebnis, daß letztlich in allen Fällen die Diketogulonsäure mit DNPH kondensiert. Zu der gleichen Aussage kamen *Kenyon* und *Munro* (23), *Roe* und Mitarbeiter (6b) sowie *Mills* und Mitarbeiter (6c). Eigene Beobachtungen ergaben bei Zugabe von DNPH-Lösung zu Diketogulonsäurelösungen sehr rasch die Bildung eines roten Niederschlages, während bei Dehydroascorbinsäurelösungen erst nach mehreren Stunden ein Niederschlag sichtbar wurde.

Für die Charakterisierung des zur Auswertung gelangenden roten DNPH-Derivates sind Dünnschichtchromatographie und Absorption im sichtbaren und ultravioletten Bereich nicht ausreichend. Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der in gleicher Weise hergestellten Derivate aus frisch oxidiert Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure (Präparat der Firma Fluka), Diketogulon-

säure (nach Angaben von Penney und Zilva [7a, 12] bereitet*), D-Isoascorbinsäure (von der Firma Hofmann-La Roche in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt) sowie eines präparativ aus oxidiertem Ascorbinsäure hergestellten Derivates** gelang nicht. Alle fünf roten Derivate zeigten den gleichen Rf-Wert. (Das Vorliegen von D-Isoascorbinsäure neben L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, Diketogulonsäure, Reduktinsäure und Redukton kann nach Mapson und Partridge (28), Chen und Mitarbeiter (29), Kadin und Osadca (30) sowie Miki und Mitarbeiter (31) durch direkte Papierchromatographie festgestellt werden).

Die Absorptionsspektren der fünf Derivate im sichtbaren Bereich waren ebenfalls identisch. Sie zeigten die für bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone von 1,2-Dicarbonylverbindungen typischen drei Absorptionsmaxima, wobei für das langwellige Maximum die Konjugation zwischen den beiden Hydrazonsystemen verantwortlich ist (32).

Die Infrarot-Spektroskopie konnte hier weiterführen. Aufgenommene IR-Spektren (in KBr) des präparativ hergestellten bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone des oxidierten Ascorbinsäure (Abbildung 4) zeigten eindeutig die Säure-Carbonylbande gesättigter aliphatischer Säuren bei 5,80 μ sowie die Kombinationsbande von C—O Streckung und OH in ebener Deformation bei 7,00 μ neben den Frequenzen bei 2,86 μ (OH), 2,98 μ (NH), 6,32 μ (Aromaten), 6,61—6,71 μ (NO₂). Gesättigte γ -Lactone haben die Lacton-Carbonylfrequenz zwischen 5,62 und 5,68 μ (33), die hier jedoch nicht vorhanden ist.

Im IR-Spectrum (in KBr) der Dehydroascorbinsäure (Präparat der Firma Fluka) trat dagegen deutlich die Lacton-Carbonylbande bei 5,62 μ hervor (Abbildung 5). Die Messung der IR-Spektren wurde mit einem Beckmann IR 5 vorgenommen.

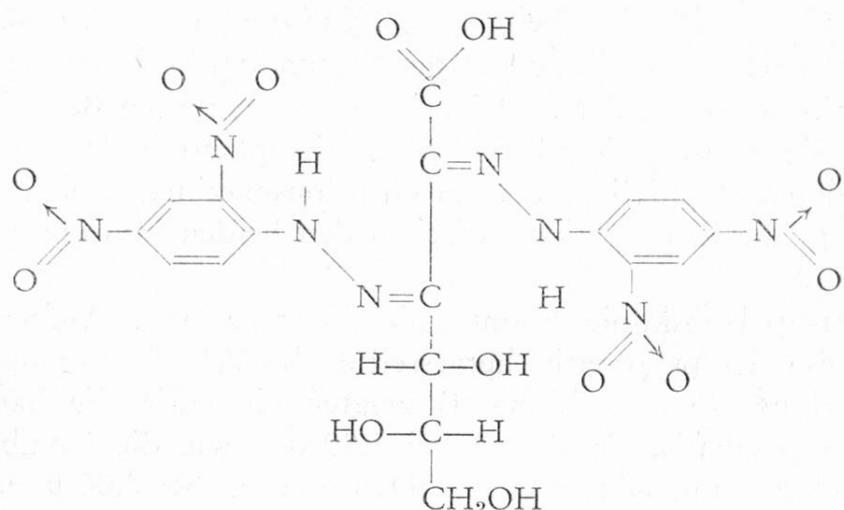
Trotter und Mitarbeiter (34) fanden im IR-Spektrum (in Paraffin) der Ascorbinsäure die Lacton-Carbonylfrequenz α - β -ungesättigter γ -Lactone bei 5,71 μ .

Es handelte sich demnach bei dem bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone des oxidierten Ascorbinsäure, das unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen erhalten wurde, um die offenkettige und nicht um die Lactonform. Für diese Aussage sprechen auch die von Albers und Mitarbeiter (41) durchgeführten Molekulargewichtsbestimmungen von Dehydroascorbinsäurederivaten. Die Autoren fanden für das «Oszon der Dehydroascorbinsäure» ein Molekulargewicht, das um 18,6 Einheiten zu hoch gegenüber dem berechneten lag. Es ist also anzunehmen, daß auch hier das Derivat der Diketogulonsäure vorlag, denn die Derivate der Dehydroascorbinsäure und der Diketogulonsäure unterscheiden sich um ein Mol Wasser (18 Molekulargewichtseinheiten), das der Lactonform fehlt.

* Mit der äquivalenten Menge 0,1 n-Jodlösung oxidierte Ascorbinsäurelösung wurde über 18 Tage der «Mutarotation» überlassen.

** 5 g Ascorbinsäure in 1% m-Phosphorsäure wurden mit 0,1 n-Jodlösung oxidiert, mit 12 g DNPH in Eisessig/Schwefelsäure versetzt, nach 18 Stunden Reaktionszeit bei 20 °C der Niederschlag abgesaugt und mit 0,1 n-Schwefelsäurelösung gewaschen; aus Alkohol/Aceton (1/1) umkristallisiert ergaben sich lange rote Nadeln, die dünnenschichtchromatographisch rein waren.

Für die Struktur der bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone von 1,2-Dicarbonylverbindungen gaben *Jones* und *Hancock* (36) auf Grund umfangreicher Untersuchungen und an Hand von Molekülmodellen die syn-syn-Form an. In Annahme dieser Struktur ist zu vermuten, daß 1 1 und 1 4 nicht über den Lactonsauerstoff verbunden sind, sondern ein coplanares Molekül der offenkettigen Diketogulonsäure vorliegt:



Die sterische Hinderung hinsichtlich der Coplanarität durch eine Sauerstoffbrücke wäre erheblich. Als Folge davon würden sich eine hypsochrome Verschie-

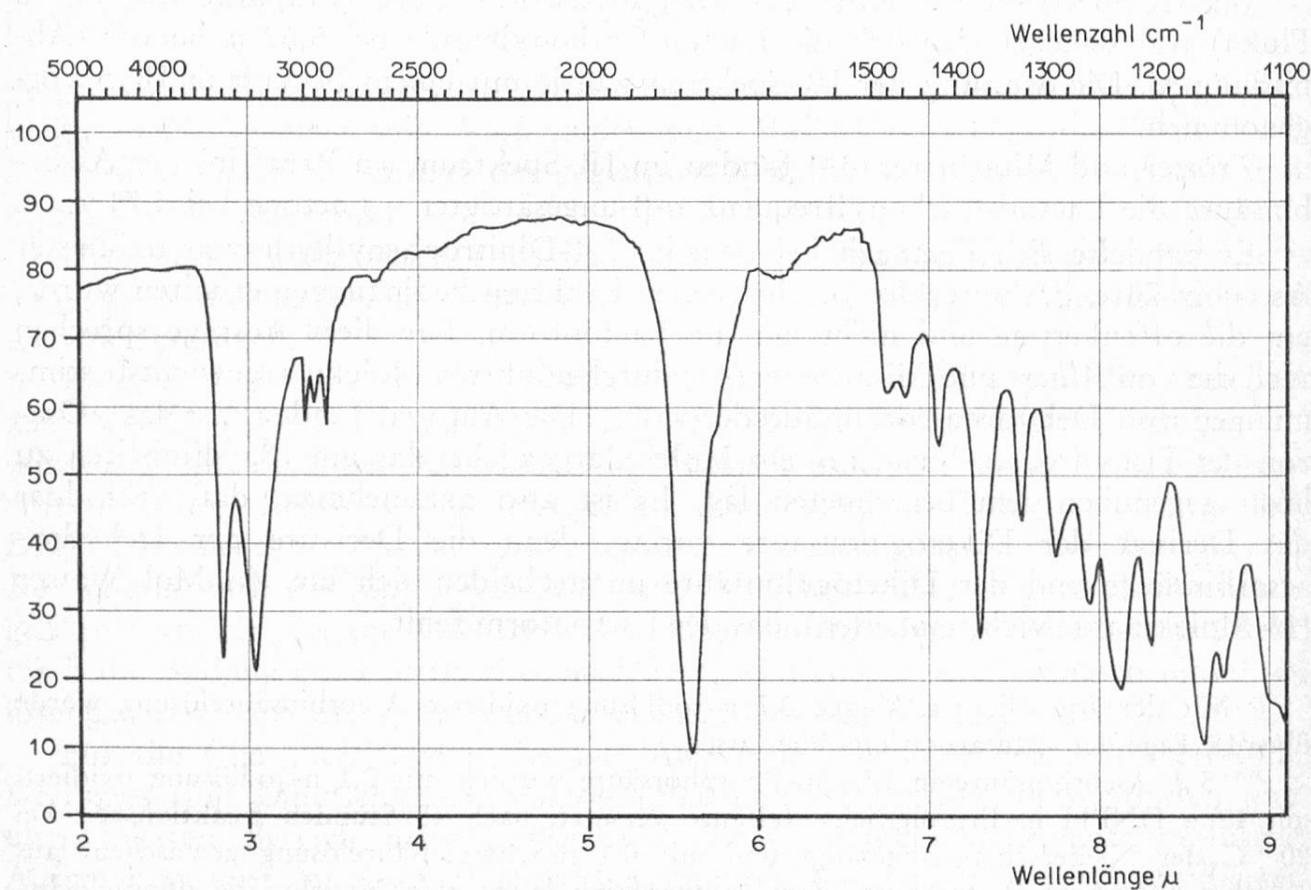


Abbildung 5
IR-Spektrum (in KBr) der Dehydro-L-ascorbinsäure (Fluka).

bung des Absorptionsmaximums und eine Abnahme in der Intensität der Absorption (30) ergeben. Das von mehreren Autoren bestimmte langwellige Absorptionsmaximum des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones oxidierter Ascorbinsäure liegt in Schwefelsäure im Bereich zwischen 515 und 530 nm (9, 18, 20, 25, 37). Bei eigenen Versuchen wurde es bei 522 nm bestimmt. Die beträchtlichen Differenzen zwischen den von den verschiedenen Untersuchern bestimmten Absorptionsmaxima lassen in dieser Hinsicht jedoch keine Aussage zu. Es sei denn, man könnte die Lactonform vergleichsweise heranziehen.

Entfernung der Gerbstoffe: Nach Ausarbeitung der optimalen Fällungsbedingungen, der dünnsschichtchromatographischen Trennung und der Grundlagen für die Auswertung wurde die quantitative Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in verschiedenen Weinen versucht, die selbst keine Ascorbinsäure enthielten, so daß definierte Zusätze an Ascorbinsäure vorgenommen werden konnten.

Beim Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit einer entsprechend aufgestellten Eichgeraden wurden bei Ascorbinsäurezusätzen zwischen 40 mg/l und 100 mg/l stets zu niedrige Werte gefunden, und zwar betrug die aus Mittelwerten von zehn verschiedenen Weinen berechnete Abweichung von der Eichgeraden —2,4 bis —16,7 %. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3
Extinktions-Mittelwerte aus zehn analysierten Weinen mit definiertem Ascorbinsäurezusatz sowie aus metaphosphorsaurer Ascorbinsäurelösung

Bezeichnung des Weines	Extinktion bei einer zugesetzten Ascorbinsäuremenge von				
	20 mg/l E ₅₀₀	40 mg/l E ₅₀₀	60 mg/l E ₅₀₀	80 mg/l E ₅₀₀	100 mg/l E ₅₀₀
Rheinpfalz 64	0,094	0,172	0,227	0,274	0,353
Rheinhessen 64	0,090	0,170	0,235	0,290	0,347
Mosel 64	0,097	0,172	0,225	0,284	0,350
Portugiesischer Weißwein	0,095	0,163	0,218	0,289	0,352
Jugoslawischer Weißwein	0,097	0,175	0,236	0,290	0,345
Nahe-Rotwein 64	0,092	0,157	0,223	0,286	0,345
Beaujolais 62	0,086	0,155	0,220	0,280	0,339
Französischer Burgunder 62	0,090	0,158	0,221	0,283	0,347
Jugoslawischer Rotwein	0,098	0,164	0,230	0,274	0,345
Ausländischer Rotwein	0,096	0,175	0,236	0,290	0,341
Mittelwert:	0,094	0,166	0,227	0,284	0,346
Echlösung					
Mittelwert:	0,090	0,170	0,251	0,333	0,415
Mittlere Abweichung:	+ 0,004	— 0,004	— 0,024	— 0,049	— 0,069
Mittlere relative Abweichung:	+ 4,4 %	— 2,4 %	— 9,6 %	— 14,7 %	— 16,7 %

Um die diese Störung verursachende Substanz herauszufinden, wurde an Hand von Weininhaltsstoffen ein Modellwein aufgebaut und nach jedem neuen Zusatz eine Bestimmung der Gesamtascorbinsäure durchgeführt. Es kam jeweils eine metaphosphorsaure Lösung von gleichem Ascorbinsäuregehalt (ca. 80 mg/l) zur Anwendung. Während Alkohol, Weinsäure, Glutaminsäure, Pektin, Aepfelsäure, Citronensäure, Galacturonsäure und Salze keinen Einfluß auf die erhaltenen Ascorbinsäurewerte hatten, ergab ein Zusatz von Tannin (DAB 6) eine beträchtliche Erniedrigung. Tabelle 4 gibt eine entsprechende Versuchsreihe wieder.

*Tabelle 4
Einfluß von Weinbestandteilen auf das Ergebnis der
Gesamtascorbinsäurebestimmung*

Nacheinander zugesetzte Substanzen	Menge g/l	Extinktion in Eisessig (Mittelwerte) E_{500}
Ascorbinsäure	0,08	0,495
Alkohol	63	0,493
Weinsäure	3	0,491
Glutaminsäure	1	0,494
Tannin	0,3	0,451
Kaliumsulfat	0,8	0,452
Pektin	0,15	0,449
Aepfelsäure	3	0,452
Natriumphosphat	0,3	0,451
Citronensäure	0,1	0,452
Galacturonsäure	1	0,451

Mit zunehmender Erhöhung des Tanninzusatzes wurde eine Abnahme der Gesamtascorbinsäurewerte festgestellt. Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der erhaltenen Extinktionswerte von der Tanninkonzentration.

Der bei der Reaktion entstandene Niederschlag wie auch der Essigesterextrakt wurden mit steigender Tanninkonzentration zunehmend dunkler braunrot. *Sondheimer* und *Kertesz* (38) beobachteten eine Zerstörung von Anthocyinanen in Gegenwart von Ascorbinsäure, wobei letztere oxidiert wurde. Es ist aber auch möglich, daß die Kondensation der oxidierten Ascorbinsäure mit DNPH durch die Anwesenheit von Gerbstoffen beeinflußt wird.

Es erschien daher zweckmäßig, diese durch Tannin hervorgerufene Störung zu beseitigen. Dabei kamen die Beobachtungen aus der Gerbstoffchemie zu Hilfe. *Grassmann* und Mitarbeiter (39) sowie *Endres* (40) haben das Verhalten von Gerbstoffen und gerbstoffähnlichen Substanzen gegenüber Polyamid untersucht. Die freien Elektronenpaare des Carbonylsauerstoffes und des Amidstickstoffs in

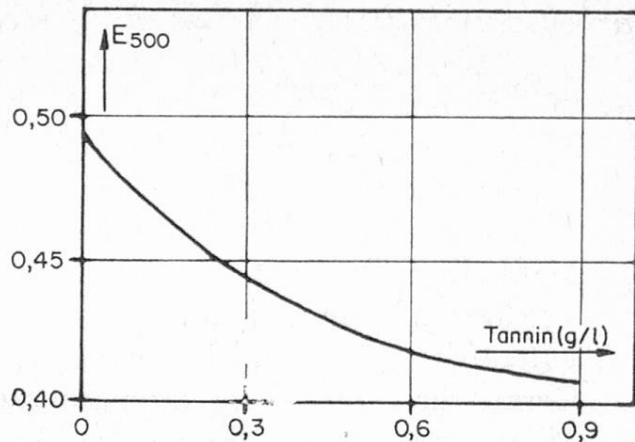


Abbildung 6

Einfluß der Tanninkonzentration auf die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure.

den CO—NH-Gruppen des Polyamids sind zur Wasserstoffbrückenbindung mit phenolischen OH—Gruppen befähigt.

Die Polyhydroxyphenole sowie die daraus durch Kondensation entstandenen Gerbstoffe des Weines und vieler Früchte werden sehr stark an Polyamid adsorbiert, so daß eine Vorbehandlung hiermit zu ihrer Entfernung vor der Reaktion der oxidierten Ascorbinsäure mit DNPH gewählt wurde. Grassmann und Mitarbeiter (39) gaben an, daß z. B. Tannin in wäßriger und saurer Lösung praktisch irreversibel adsorbiert bleibt. Eigene Versuche bestätigen dieses Ergebnis. Ebenso konnte im Wein- und Fruchtsaftfiltrat nach einstündiger Polyamidbehandlung keine positive Gerbstoffreaktion mehr erhalten werden. Der Gesamtascorbinsäuregehalt metaphosphorsaurer Lösungen wurde dagegen durch Polyamid nicht verändert. Tabelle 5 gibt einige Mittelwerte von Ascorbinsäurelösungen und Weinen mit Ascorbinsäurezusatz nach der Polyamidbehandlung wieder. Die vor und nach der Polyamidbehandlung in m-Phosphorsäurelösung sowie nach Behandlung mit Polyamid in Wein erhaltenen Werte für den Gesamtascorbinsäuregehalt blieben danach unverändert.

Tabelle 5

Einfluß der Polyamidbehandlung auf das Ergebnis der Gesamtascorbinsäurebestimmung

80 mg/l Zusatz an Ascorbinsäure zu	Behandlung	Extinktion in Eisessig E ₅₀₀
1 % m-Phosphorsäure	ohne Polyamid	0,495
1 % m-Phosphorsäure	mit Polyamid	0,494
Weißwein	mit Polyamid	0,496
Rotwein	mit Polyamid	0,493

Auf Grund der angestellten Untersuchungen konnte nun eine Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in Weinen und Fruchtsäften gegeben werden.

Arbeitsvorschrift:

Erforderliche Geräte:

Zentrifugengläser mit Schiffstopfen, 50 ml Inhalt
Reagensgläser mit Schliffstopfen
Wägegläser mit Schliffdeckel (30×35 mm)
Meßkolben, Pipetten
Trichter (35 mm und 60 mm ϕ)
Faltenfilter (7 cm und 12,5 cm ϕ)
Geräte für Dünnschichtchromatographie (Platten 20×20 cm)
Mikropipette oder Mikrospritze (0,1 bzw. 0,2 ml)
CAMAG-Chromatocharger oder ein ähnliches Auftragegerät
Trockenschrank
Thermostat
Zentrifuge
Spekralphotometer

Reagentien:

Ascorbinsäure p. a.
m-Phosphorsäure p. a. in Stangen
Polyamid für Chromatographie (Woelm)
Thioharnstoff p. a.
2,4-Dinitrophenylhydrazin p. a.
Schwefelsäure 95—97 % p. a.
Eisessig p. a.
Essigsäureäthylester p. a.
Chloroform (über Al_2O_3 , Akt. I, basisch gereinigt)
Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie

Zu bereitende Lösungen:

m-Phosphorsäure 1%ig und 20%ig (die 1%ige Lösung ist frisch zu bereiten; die 20%ige Lösung ist eine Woche im Kühlschrank haltbar);

Polyamid-Suspension: 10 g Polyamid in 60 ml Wasser 2 Stunden quellen lassen (ausreichend für 4 Bestimmungen)

0,1 n-Jodlösung

2,4-Dinitrophenylhydrazin 6%ig in Eisessig/Schwefelsäure (1/1): das DNPH wird zunächst in Eisessig suspendiert und danach durch Zugabe des gleichen Volumens konz. Schwefelsäure in Lösung gebracht (frisch herzustellen).

Extraktionslösung: Essigsäureäthylester mit 2 % Eisessig versetzen.

Fließmittel für DC: Essigester/Chloroform/Eisessig (50/60/5) für Trennungen bei 20 bis 22 °C, (50/50/5) für Trennungen bei 22 bis 24 °C. Zur Einstellung des Mischungsgleichgewichtes lässt man das Fließmittel über Nacht stehen.

Kieselgel-G-Platten für DC: 30 g Kieselgel G in 70 ml Wasser suspendieren (für 5 Platten) und in einer Schichtdicke von 0,3 mm auf 20×20 cm Platten auftragen. Die Platten nach Lufttrocknung 90 Minuten bei 150 bis 160 °C im Trockenschrank aktivieren.

Ausführung:

In einen 100 ml Meßkolben bringt man 80 ml des zu untersuchenden Weines, (das Untersuchungsmaterial darf nicht mehr als 100 mg/l Gesamtascorbinsäure enthalten und muß gegebenenfalls mit 1%iger m-Phosphorsäure verdünnt werden) fügt 15 ml der Polyamid-Suspension zu und füllt mit 20%iger m-Phosphorsäurelösung zur Marke auf. Man lässt eine Stunde unter häufigem Durchschütteln verschlossen stehen und filtriert durch ein Faltenfilter.

20 ml des Filtrates pipettiert man in ein 50 ml Zentrifugenglas mit Schliffstopfen, fügt 1 ml einer 0,1 n-Jodlösung hinzu und mischt durch. Nach etwa 1 Minute wird der Jodüberschuss durch Zugabe einer Spatelspitze (ca. 25 mg) Thioharnstoff beseitigt. Das Glas wird in ein Wasserbad von 5 bis 10 °C gestellt und 4 ml DNPH-Lösung hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen (ohne den Schliff zu benetzen) bleibt das Glas gut verschlossen über Nacht (ca. 16 Stunden) im Thermostaten bei 20 °C stehen.

Am nächsten Tag pipettiert man 15 ml des mit 2 % Eisessig versetzten Essigsäureäthylesters in das Zentrifugenglas, verschließt mit dem Schliffstopfen, schüttelt es 30 Sekunden kräftig und zentrifugiert zur Trennung der Schichten wenige Minuten mit 1000 bis 1200 U/min. Von der Essigesterphase werden 10 ml in ein mit Schliffstopfen verschließbares Reagensglas pipettiert. Zu der Reaktionslösung gibt man nun 5 ml des Essigesters mit 2 % Eisessig, schüttelt wiederum 30 Sekunden und zentrifugiert. 5 ml der Essigesterphase werden mit einer Pipette abgenommen und zu den 10 ml des im Reagensglas befindlichen ersten Extraktes gegeben und damit gemischt.

Aus einer Mikropipette oder besser einer Mikrospritze mit Hilfe des Chromatochargers nach Firmenich bzw. eines ähnlichen Gerätes trägt man 0,2 ml des Essigesterextraktes über die ganze Startlinie einer Kieselgel-G-Platte auf und chromatographiert bis zum oberen Plattenrand bei 20 bis 22 °C in kammergesättigter Atmosphäre, wobei das Fließmittel am besten schon am Vortage in die Trennkammer gebracht wird*. Die chromatographische Trennung ist zweimal mit je 0,2 ml und innerhalb von 2 Stunden nach der Extraktion auszuführen (s. S. 480).

Die durch ihre rote Färbung auffallende Zone des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazones der Diketogulonsäure (R_f 0,3) wird mit Hilfe eines plangeschliffenen dünnen Spatels quantitativ in ein Wägegläschen gebracht**. Mit einer Pipette

* Sehr gut eignen sich die sog. «Sandwich-Trennkammern», in denen im Vergleich zu den üblichen Trennkammern zwar längere Laufzeiten, jedoch auch noch bessere Trennungen erhalten werden.

** Bei nicht ganz einwandfreier Trennung können die Ränder der benachbarten Zonen mit eluiert werden. Die dadurch eventuell bedingte Abweichung tritt nur bei geringen Ascorbinsäurekonzentrationen (20 mg/l) in Erscheinung.

werden 4 ml Eisessig in das Wägeglas gegeben, dieses wird verschlossen und unter zeitweiligem Durchmischen 30 min stehengelassen. Die Suspension filtriert man durch ein kleines Faltenfilter unmittelbar in eine 1 cm Küvette, wobei die ersten 25 bis 30 Tropfen in das Wägeglas und von dort wieder auf das Filter zurückgebracht werden, um eine vollkommen blanke Lösung zu erhalten. Das blanke Filtrat wird gegen Eisessig im Spektralphotometer bei 500 nm gemessen.

Eine Eichkurve wird mit Lösungen von 20, 40, 60 und 100 mg/l Ascorbinsäure in 1%iger m-Phosphorsäurelösung in der entsprechenden Weise aufgestellt.

Tabelle 6

Nach der ausgearbeiteten Bestimmungsmethode gefundene Extinktions-Mittelwerte der Eichlösung und Weine

Bezeichnung des Weines	Extinktion bei einer zugesetzten Ascorbinsäuremenge von			
	20 mg/l E ₅₀₀	40 mg/l E ₅₀₀	60 mg/l E ₅₀₀	100 mg/l E ₅₀₀
Rheinpfalz 64	0,115	0,217	0,314	0,518
Rheinhessen 64	0,124	0,220	0,324	0,516
Mosel 65	0,125	0,229	0,325	0,518
Tiroler Weißwein	0,125	0,230	0,327	0,525
Französischer Roséwein	0,125	0,230	0,322	0,527
Nahe-Rotwein 64	0,126	0,227	0,316	0,531
Beaujolais 61	0,115	0,219	0,313	0,523
Algerischer Rotwein	0,124	0,224	0,321	0,513
Mittelwert:	0,123	0,224	0,320	0,521
Eichlösung	0,117	0,223	0,334	0,545
	0,115	0,224	0,335	0,542
	0,118	0,226	0,331	0,542
	0,119	0,223	0,328	0,538
Mittelwert:	0,117	0,224	0,332	0,542

Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in Weinen und Fruchtsäften

Nach der angegebenen Methode wurde zunächst eine Eichgerade aufgestellt. Sie zeigte einen linearen Verlauf und schnitt die Ordinate bei 0,010 Extinktioneinheiten (vgl. Abbildung 7). Acht verschiedene handelsübliche Weine, die keine Ascorbinsäure enthielten, wurden mit jeweils 20, 40, 60 und 100 mg/l Ascorbinsäure versetzt und gleichfalls analysiert. Das Mittel der gefundenen Werte ist in Abbildung 7 graphisch aufgetragen. Auch hier ergab sich ein linearer Verlauf der

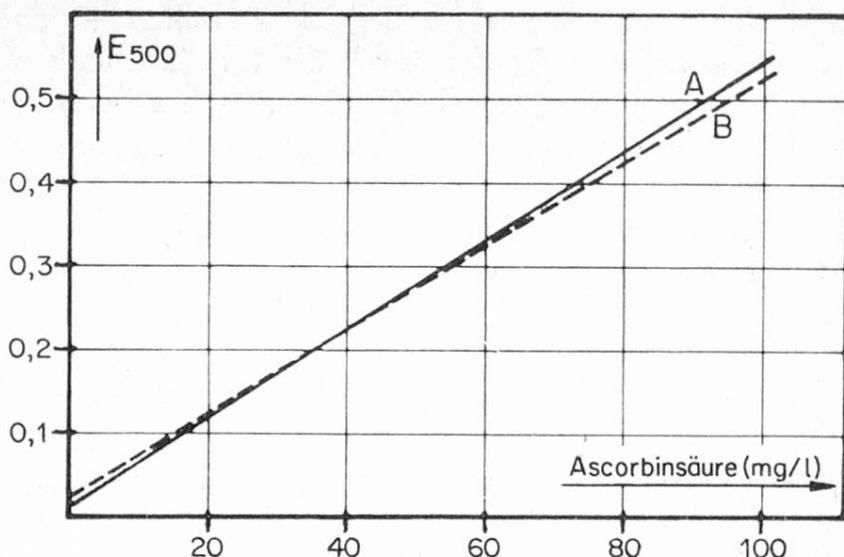


Abbildung 7

Nach der ausgearbeiteten Bestimmungsmethode gefundene Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Gesamtascorbinsärekonzentration.

A = Mittelwerte Eichung;
B = Mittelwerte aus 8 Weinen.

Geraden mit einem Schnittpunkt der Ordinate bei 0,024 Extinktionseinheiten. Die Abweichung von der Eichgeraden betrug + 6 % bei 20 mg/l, ± 0 bei 40 mg/l, — 3,6 % bei 60 mg/l und — 3,9 % bei 100 mg/l. In Tabelle 6 sind die gefundenen Mittelwerte zusammengestellt.

Die Abweichung der Wein-Mittelwerte von denen der Eichung ergibt als Arbeitsfehler bei der Weinanalyse:

Bezeichnung	Ascorbinsäuregehalt			
	20 mg/l	40 mg/l	60 mg/l	100 mg/l
Eich-Mittelwert E_{500}	0,117	0,224	0,332	0,542
Wein-Mittelwert E_{500}	0,123	0,224	0,320	0,521
Abweichung	+ 0,007	± 0	- 0,012	- 0,021
Relative Abweichung %	+ 6,0	± 0	- 3,6	- 3,9

Die Ursache für die zu hohen Werte bei niedrigen Ascorbinsärekonzentrationen ist in systematischen Fehlern zu suchen. Die photometrische Messung ist in niedrigen Absorptionsbereichen gegenüber miteluierten, makroskopisch kaum wahrnehmbaren Begleitsubstanzen natürlicherweise recht empfindlich. Es empfiehlt sich daher unter Umständen, die Eichgerade nicht mit metaphosphorsaurer Ascorbinsäurelösung, sondern mit handelsüblichem, ascorbinsäurefreiem Wein, dem definierte Mengen an Ascorbinsäure zugesetzt werden, aufzustellen.

Die ausgearbeitete Methode zur Bestimmung der Gesamtascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ergab bei der Erprobung zufriedenstellende und gut

reproduzierbare Werte im Bereich zwischen 40 und 100 mg/l Gesamtascorbinsäure. Bei 20 mg/l ist die durch die Empfindlichkeit der Messung bedingte Erhöhung der Werte zu berücksichtigen. Nach unseren Erfahrungen ist diese Methode ohne weiteres auch zur Ermittlung der Gesamtascorbinsäure in Fruchtsäften anwendbar.

Der Zeitaufwand für die Durchführung einer Analyse beträgt maximal 36 Stunden, wovon als reine Arbeitszeit etwa 4 Stunden anzusetzen sind.

Zusammenfassung

Die analytische Erfassung der zugesetzten bzw. natürlich vorhandenen Ascorbinsäure in Weinen war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde die zur Bestimmung gelangende Gesamtascorbinsäure als die Summe aus L-Ascorbinsäure, Dehydro-L-Ascorbinsäure und 2,3-Diketo-L-Gulonsäure begrenzt.

Die aus der Literatur bekannten Bestimmungsmethoden wurden einer Prüfung auf ihre Eignung für die Weinanalytik unterzogen. Wegen der großen Oxidationsempfindlichkeit der Ascorbinsäure erschien es sinnvoll, sie zusammen mit ihrem ersten Oxidationsprodukt, der Dehydroascorbinsäure, und der durch Oeffnung des Lactonringes entstehenden Diketogulonsäure in ein stabiles Derivat überzuführen und für die photometrische Messung von den störenden Begleitsubstanzen zu trennen.

Es bot sich die Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin an, die einen derartigen Analysengang ermöglicht.

Für die Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden die optimalen Fällungsbedingungen hinsichtlich Oxidation, Reaktionsmedium, Reagenskonzentration und Reaktionszeit ermittelt. Dabei trat eine Störung der Reaktion durch Gerbstoffe hervor, die durch deren Adsorption an Polyamid beseitigt werden konnte. Das Reaktionsprodukt wurde extrahiert und in einem aliquoten Teil die dünn-schichtchromatographische Trennung ausgeführt, worauf nach Eluierung des roten 2,4-Dinitrophenylhydrazinderivates die spektralphotometrische Auswertung erfolgte.

Eine Charakterisierung des erhaltenen Reaktionsproduktes aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin und oxidiertem Ascorbinsäurelösung konnte mit Hilfe der Infrarot-Spektrometrie erreicht werden. Sie ergab das Vorliegen des bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone der 2,3-Diketo-L-Gulonsäure.

Auf Grund der angestellten Untersuchungen wird eine Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in Weinen gegeben, die an entsprechenden handelsüblichen Erzeugnissen erprobt wurde.

Literatur

1. Genevois L.: Compte-rendue de la 6e réunion de la Sous-Commission des méthodes d'analyses et éléments constitutifs des vins. S. 18, Paris 1964.
2. Roe J. H. und Oesterling M. J.: J. Biol. Chem. **152**, 511 (1944).
3. Kotake Y. und Nishigaki M.: Z. Physiolog. Chemie **219**, 224 (1933).
4. Ammon R.: Biochem. Ztschr. **288**, 93 (1936).
Drumm P. J., Scarborough H. und Stewart C. P.: Biochem. J. **31**, 1874 (1937).
Noyons E. C. H. J.: Acta br. Niederl. Physiol., Pharmacol., Mikrobiol. **7**, 79 (1937).

5. Roe J. H. und Kuether C. A.: *Science* **95**, 77 (1942).
- 6a Roe J. H. und Kuether C. A.: *J. Biol. Chem.* **147**, 399 (1943).
- 6b Roe J. H., Mills M. B. und Oesterling M. J.: *J. Biol. Chem.* **174**, 201 (1948).
- 6c Mills M. B., Damron C. M. und Roe J. H.: *Analytical Chem.* **21**, 707 (1949).
7. Penney J. R. und Zilva S. S.: *Biochem. J.* **37**, 39 (1943) a; **37**, 403 (1943) b.
8. Meyer K. H., Haselbach C. H. und Boissonnas R. A.: *Helv. Chim. Acta* **35**, 1781 (1952).
9. Schaffert R. R. und Kingsley G. R.: *J. Biol. Chem.* **212**, 59 (1955).
10. Feldheim W. und Schmidt R.: *Vitamine und Hormone* **7**, 331 (1957).
11. Feldheim W.: *Nahrung* **4**, 153 (1960).
12. Penney J. R. und Zilva S. S.: *Biochem. J.* **39**, 1; 392 (1945).
13. Hewston E. M., Fisher M. und Orent-Keiles E.: U. S. Dep. Agric. Washington, Techn. Bull. Nr. 1023 (1951).
14. Szöke K.: *Nahrung* **3**, 292 (1959).
15. Tewari C. P. und Krishnan P. S.: *J. Food Sci.* **26**, 11 (1961).
16. Patschky A.: *Angew. Chemie* **62**, 50 (1950); priv. Mitt.
17. Drevon B., Nofre C. und Cier A.: *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* **243**, 607 (1956).
18. Gordon J. und Noble I.: *Food Res.* **24**, 1; 6 (1959).
19. Mapson L. W.: *Biochem. J.* **80**, 459 (1961).
20. Strohecker R. und Pies H.: *Z. Lebensm.unters.Forsch.* **118**, 394 (1962).
21. Vuilleumier J. P. und Nobile S.: *Proceedings, 12th World's Poultry Congr.*, 238 (1962).
22. Vuilleumier J. P. und Müller-Mulot W.: *Wiss. Veröff. Dt. Ges Ernähr. (Darmstadt)* **14**, 168 (1965).
23. Kenyon J. und Munro N.: *J. Chem. Soc. (London)* **1948**, 158.
24. Herbert R. W., Hirst E. L., Persival E. G. V., Reynolds R. J. W., Smith F.: *J. Chem. Soc. (London)* **1933**, 127.
25. Bolomey R. A. und Kemmerer A. R.: *J. Biol. Chem.* **167**, 781 (1947).
26. Euler H. v. und Eistert B.: *Chemie und Biochemie der Reduktone u. Reduktonate (Stuttgart)* 1957, S. 196 ff.
27. Kzöke K.: *Nahrung* **4**, 825 (1960).
28. Mapson L. W. und Partridge S. M.: *Nature* **164**, 479 (1949).
29. Chen Y. T., Isherwood F. A. und Mapson L. W.: *Biochem. J.* **55**, 821 (1953).
30. Kadin H. und Osadca M.: *J. Agric. Food Chem.* **7**, 358 (1959).
31. Miki T. und Mitarb.: *Vitamine (Jap. Vitamin Soc.)* **25**, 171 (1962).
32. Braude E. A. und Jones E. R. H.: *J. Chem. Soc. (London)* **1945**, 498.
33. Cross A. D.: *Introduction to Practical Infra-Red Spectroscopy (London)* 1964.
34. Trotter I. F., Thompson H. W. und Wokes F.: *Biochem. J.* **42**, 601 (1948).
35. Recueil des Méthodes internationales d'Analyse des Vins, A 28 d, Office International de la Vigne et du Vin, Paris 1962.
36. Jones L. A. und Hancock C. K.: *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 105 (1960).
37. Probst G. W. und Schultze M. O.: *J. Biol. Chem.* **187**, 453 (1950).
38. Sondheimer E. und Kertesz Z. I.: *Food Res.* **18**, 475 (1953).
39. Grassmann W., Hörmann H. und Hartl A.: *Makromol. Chem.* **20**, 37 (1956).
Grassmann W., Endres H., Oppelt M. und El. Sissi H.: *Leder* **10**, 149 (1959).
40. Endres H.: *Z. analyt. Chem.* **181**, 331 (1961).
41. Albers H., Müller E. und Dietz H.: *Z. Physiol. Chem.* **334**, 243 (1963).

Elektrophorese phenolischer Substanzen in Getränken

Für die elektrophoretische Trennung von Aminosäuren und Eiweiß gibt es eine Flut von Literatur, die ständig wächst. Ganz im Gegensatz dazu steht die Armut an Veröffentlichungen über die elektrophoretische Analyse von Gerbstoffen, ihren Bausteinen und anderen phenolischen Verbindungen. Hinweise auf Versuche für Elektrophorese vegetabilischer Gerbstoffe gibt es aus dem Anfang der 20er Jahre. Doch war damals die Elektrophorese noch nicht so sehr technisch entwickelt und vervollkommenet, wie das heute der Fall ist, so daß diese Versuche wieder der Vergessenheit anheim fielen. *D. R. Cooper* und *D. G. Roux* (1) trennten gerbende Substanzen aus Mimosen- und Akazienholz durch Elektrophorese. Bei Getränken ist die Trennung und Bestimmung von in ihnen vorkommenden phenolischen Verbindungen durch Wanderung im elektrischen Feld bisher noch kaum untersucht worden.

In ersten tastenden Versuchen wurde Papier als Träger gewählt. Der beste pH-Bereich für die Wanderung phenolischer Verbindungen sollte durch Variation der Zusammensetzung des Puffers aus Pyridin und Eisessig ermittelt werden. Es zeigt sich jedoch bald, daß die Bedingungen nicht zum gewünschten Erfolg führen konnten. Da Cellulose infolge ihrer Struktur (gehäufte OH-Gruppen) Affinität zu gewissen phenolischen Verbindungen besitzt, neigen eben diese phenolischen Verbindungen bei der Elektrophorese wegen Adsorption zu Schleppbildung. Eine exakte Trennung ist daher auf diesem Trägermaterial nicht gut zu verwirklichen.

Wirkungsvoller für eine Trennung sind Gele, bei denen zur Wanderung der Verbindungen im elektrischen Feld eine Siebwirkung durch die Beschaffenheit der gewählten Gele hinzukommt. Dadurch lassen sich höher molekulare Verbindungen leichter von niedrig molekularen Verbindungen scheiden. Außerdem entfällt bei dem verwendeten Cellogel einer gelatinierten Acetylcellulose, durch die teilweise Veresterung der alkoholischen Hydroxylgruppen der Cellulose die Affinität zu den phenolischen Verbindungen und damit die Adsorption und Schleppenbildung. Das Ergebnis ist eine bessere und schärfere Trennung auf Cellogel als auf Papier.

Die Wahl des Puffersystems ist für die Elektrophorese phenolischer Verbindungen von großer und ausschlaggebender Bedeutung, denn es bestimmt die Beweglichkeit und den Ladungssinn. Im allgemeinen wandern sie bei pH 1,0—2,4 kathodisch. Bei pH 2,5—3,5 findet je nach Struktur keine Wanderung statt, denn in diesem Bereich liegen die isoelektrischen Punkte und bei pH 3,5—6,8 findet Wanderung zur Anode statt. Mit steigenden pH-Werten wird bei der Analyse aber eine Oxydation begünstigt. Das führt dazu, daß die phenolischen Verbindungen unlöslich werden und die Fähigkeit, im elektrischen Feld zu wandern, einbüßen.

Es ist aber möglich, durch die Wahl geeigneter Puffer Löslichkeit und Beweglichkeit im alkalischen Gebiet bei Substanzen mit o-Diphenol-Charakter oder ähnlicher Konfiguration zu erzwingen. Systeme, welche z. B. die Ausbildung negativer Komplex-Ionen gestatten, ermöglichen eine elektrophoretische Wanderung zur Anode. Die Anzahl der cis-ständigen Hydroxylgruppen im Molekül bedingt den mehr oder weniger weit zurückgelegten Weg pro Zeiteinheit. Durch Komplexbildung scheint ein o-Diphenol blockiert, so daß eine Kondensation, Oxydation und ein unlöslichwerden in Alkali verzögert wird oder unterbleibt. Z. B. läuft Catechin bei pH 8,75 in Pyridin-Eisessig nicht im elektrischen Feld. Es bleibt ungelöst am Start liegen. In Chelat bildenden Puffern dagegen bewegt es sich auch noch bei höheren pH-Werten.

Besondere Reinigung ist bei den Proben wie Teeaufgüssen geeigneter Konzentration, bei Ellagen-Gerbstoffen aus Eichen- und Kastanienholz, wie sie in Weinbränden vorkommen, bei Apfelweinen und Traubenweinen, sowie anderen gerbstoffhaltigen Getränken in der Regel nicht notwendig. Im gegebenen Fall muß verdünnt werden, z. B. bei Deckrotweinen, oder durch schonende Gefriertrocknung konzentriert werden, z. B. bei einfachen Weißweinen, daß die Mengen in der Größenordnung der Kurvenwerte einer als Eichsubstanz gewählten Verbindung liegen, z. B. Catechin oder Phloridzin. Nach der Trennung, die 1½ bis 3 Stunden dauert, empfiehlt sich Kontrolle und Markierung im ultravioletten Licht. Doch sollte ein Markierung nur so vorgenommen werden, daß sie eine nachfolgende Anfärbung mit Diazoniumsalz nicht stört und auch die spätere automatische quantitative Registrierung der transparent gemachten Folie mit einem Extinktionsschreiber und Grünfilter nicht unmöglich macht.

Flavanole wie Catechine, gewisse Anthozyane und Dihydrochalkone, Verbindungen also, die zum Teil der sich überlagernden Oxydation und Kondensation und damit gerbender Wirkung zugänglich sind, färben sich mit Echtschwarzsalz K (2) (Diazotiertes 4-Amino, 3,6-Dimethoxy-4-nitro-azobenzol) violett, die höher molekularen Oligomere violettblau und blau, während vergesellschaftet vorkommende, nicht gerbende Verbindungen, die ebenfalls elektrophoretisch wandern, z. B. Chlorogensäuren, sich durch Gelbfärbung unterscheiden und eine andere Wegstrecke zurücklegen.

Mit der Methode lassen sich durch Kombination der eben genannten Bedingungen,

1. der Siebwirkung durch das Cellogel und
2. mit den durch Komplexbildung erzwungenen Wanderungswegen nicht nur die niedermolekularen von den höhermolekularen und unlöslichen hochmolekularen Gerbstoffen trennen. Sie sind auch einem quantitativen Vergleich zugänglich, wenn man sie auf eine unter identischen Bedingungen erhaltene Eichkurve bezieht. Mit der Methode läßt sich auch das Verhalten von Gerbstoff-Fällungsmitteln bearbeiten und die Wirkungsweise adsorbierender Schönungsmittel verfolgen. Selbst an Hefe-Eiweiß, Gelatine oder künstliche Klärungsmittel, wie sie heute die Industrie herstellt, adsorbierte phenolische Verbindungen, lassen sich, solange die Gerbung noch frisch und daher reversibel ist, ebenso untersuchen wie

reines Farbstoff-Gerbstoff-Depot, Niederschläge also, die bisher mit den üblichen Methoden und Mitteln nicht recht aufzuklären waren.

Zu bemerken ist aber, daß durch den Faktor «Zeit» die Reaktion vegetabiler Gerbstoffe mit produkt-eigenem oder fremdem Eiweiß zu irreversibler Vernetzung führt. In diesen Fällen kann dann meist keine völlige Lösung mehr erhalten werden, und auch die elektrophoretische Beweglichkeit geht verloren.

Apfelkerne enthalten bemerkenswerte Mengen eines für die Frucht charakteristischen Dihydrochalkon-glukosids, das bei der Apfelsaft- und Apfelweinbereitung als solches bzw. als Aglykon in diese Getränke gelangt. Man kann über das Vorhandensein oder Fehlen von Phloridzin bzw. Phloretin den Verdacht eines Verschnittes von Apfelwein mit Traubenwein, der nicht erlaubt ist, bestätigen oder entkräften, ohne das umständliche Benzalsorbit-Verfahren anwenden zu müssen.

Die Wanderungswege der sowohl in Apfel- als auch in Traubenkernen vorhandenen Flavanole, die bei der Herstellung der Getränke sich diesen mitteilen, sind länger als diejenigen des Dihydrochalkons, das den Traubenkernen fehlt.

Phloridzin und Phloretin lassen sich aber auch in einfachen zweidimensionalen Chromatogrammen neben den Flavanolen finden und durch ihre unterschiedlichen Rf-Werte identifizieren.

Das elektrophoretische Verhalten der Ellagen-Gerbstoffe von Eiche und Kastanie in Weinbränden wurde nur am Rande beobachtet. Diese hydrolysierbaren Gerbstoffe werden ebenfalls im elektrischen Feld gut getrennt, doch sollte für sie ein anderes Verfahren zur fixierenden Färbung und Extinktionsmessung ausgearbeitet werden.

Zur Analyse wurde das Gerät zur Dünnschicht-Elektrophorese der Firma Desaga Nachfolger E. Fecht, Heidelberg, eingesetzt. Für die freundliche Leihgabe der Apparatur habe ich der Firma Desaga sehr zu danken. Die Cellogel-Folien lagen dabei auf einer äußerst dünnen Plexiglasplatte oder einer ebensolchen Glasplatte dem vom Wasser durchflossenen Kühlkörper an. Die Brücke zu den Elektrodenräumen vermittelten entsprechend zurechtgeschnittene Papierzungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß eine elektrophoretische Trennung und quantitative Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffe von Getränken sich einfach und schnell durchführen lassen, wenn man mit chelatbildendem Puffer in alkalischem Gebiet arbeitet und als Trägermaterial eine gelatinisierte Celluloseacetat-Folie wählt, welche fixierende Färbung und Transparenz zu erzielen erlaubt. Die genaue Arbeitsvorschrift wird an anderer Stelle bekanntgegeben.

Literatur

1. Cooper D. R. und Roux D. G.: J. Chromatogr. **17**, (1965) 396.
2. Neu R.: Z. analyt. Chem. **151**, (1956) 321 und 328 **153**, (1956) 183.
3. Die Nahrung (1968) im Druck.

Weitere Untersuchungen zum Nachweis von Sojaextrakten in Orangensaftkonzentraten

In einer ersten Mitteilung (1) wurde über die Verwendung von wässerigen Extrakten aus entölten Sojabohnen zur Herstellung von Grundstoffen für alkoholfreie Getränke in Japan und die Möglichkeit der Verfälschung von Orangensaftkonzentraten mit derartigen Sojaextrakten berichtet. Dabei wurde festgestellt, daß als Hinweise auf einen Zusatz von Sojaextrakten zu Orangensaften, je nach der Herstellungsweise dieser Extrakte, ein erniedrigter oder erhöhter Kaliumgehalt, ein erhöhter Gehalt an Phosphat, Calcium, flüchtiger Säure, Stickstoffverbindungen und Asche sowie das Auftreten von Xylose nach Hydrolyse der Polysaccharide in Betracht kommen.

In der Folgezeit gelangten wir in den Besitz eines japanischen Sojaextraktes zur Getränkeherstellung. Die Untersuchung dieses Extraktes führte zu nachstehenden Ergebnissen:

Tabelle 1: Aus Japan eingeführter Sojaextrakt zur Getränkeherstellung

Sinnenbefund	klar, bräunlich gelb, stark sauer, süßlich, geruchlos
Formolwert (10 g)	2,4
Dichte 20 ° C, pyknometrisch	1,25 entsprechend
Extrakt	53,28 %
Extrakt, refraktometrisch	50,20 %
Zuckerarten, durch Rundfilterchromatographie	Fructose, Glucose, Raffinose, höher-molekulares Polysaccharid, keine Dextrine
Zuckerarten, durch Rundfilterchromatographie nach 3stündiger Hydrolyse mit Salzsäure	Fructose, Glucose, Galactose
Reduzierende Zucker (als Invertzucker)	32,2 %
Stickstoffverbindungen (N × 6,25)	825 mg %
Aminosäuren, dünnenschichtchromatographisch	Alanin, Glutaminsäure, Serin, wenig Asparaginsäure, Leucin, Prolin, Valin, Spuren von Arginin, Lysin
Genußsäuren, papierchromatographisch	Zitronensäure, Phosphorsäure, wenig Apfel-, Bernstein- und Weinsäure
pH-Wert	1,85
Gesamtsäure (als Zitronensäure ber.)	7,19 %

Phosphorsäure, 2-Stufentitration, als H_3PO_4 berechnet	6,13 %
Phosphorsäure als P_2O_5 berechnet	4,61 %
Asche (550 ° C)	2,05 %

Angeregt durch die Mitteilung von *Kuhnke* (2), daß Sojaextrakte Raffinose (Melitose) enthalten sollen, wurde in die Untersuchung auch eine Prüfung auf vorhandene Zuckerarten mit Hilfe der Rundfilterchromatographie einbezogen. Unter Anwendung dieses Untersuchungsverfahrens wurde nicht nur in dem japanischen Sojaextrakt, sondern auch bei einigen selbst hergestellten Sojaextrakten Raffinose und nach Hydrolyse Fructose, Glucose und Galactose gefunden. Damit war das Vorkommen von Raffinose eindeutig bestätigt, da dieselbe aus je 1 Mol Fructose, Glucose und Galactose besteht. Außer in Sojabohnen kommt Raffinose auch in Ahornsirup, Gerste, Weizen, Honig, Kartoffeln, Erbsen, Bohnen, Zuckerrübenmelasse, Baumwollsamen und Eukalyptusmanna vor (3—10). Neben Fructose, Glucose, Saccharose und Raffinose fand sich regelmäßig noch ein weiterer Farbstreifen, der offenbar einen höhermolekularen Zucker anzeigt. Nach *Täufel* und Mitarbeiter (9) handelt es sich bei diesem Zucker um Stachyose, ein kristallisierbares Tetrasaccharid, das aus je 1 Mol Fructose, Glucose und 2 Mol Lactose aufgebaut ist. Lactose zerfällt ihrerseits bei der Hydrolyse in Gluctose und Galactose. Stachyose findet sich außerdem in den Wurzelknollen der japanischen Artischoke *Stachys tubifera* (11), in Erbsen und Bohnen (9), Kakao (12) sowie Nüssen und Mandeln (13) und in Eschenmanna (11).

Sofern Raffinose und Stachyose in der Orange nicht vorkommen, kann der Nachweis dieser beiden Zucker zur Feststellung einer Verfälschung von Orangensaft und der daraus hergestellten Zubereitungen dienen. Wir untersuchten mit Hilfe der Rundfilter-Chromatographie insgesamt 31 selbst gepreßte Orangensafte aus Früchten von Südafrika, Griechenland, Italien, Israel, Cypern, Marokko und Spanien. Bei keinem dieser Säfte konnte Raffinose oder Stachyose festgestellt werden. Vorhanden sind lediglich Saccharose, Glucose und Fructose.

Weiterhin wurden je 10 wässrige Auszüge aus Albedo und Flavedo südafrikanischer Orangen auf das Vorhandensein von Raffinose und Stachyose geprüft. Auch hierbei ergaben sich keine Anhaltspunkte für deren Vorkommen in diesen Teilen der Orange.

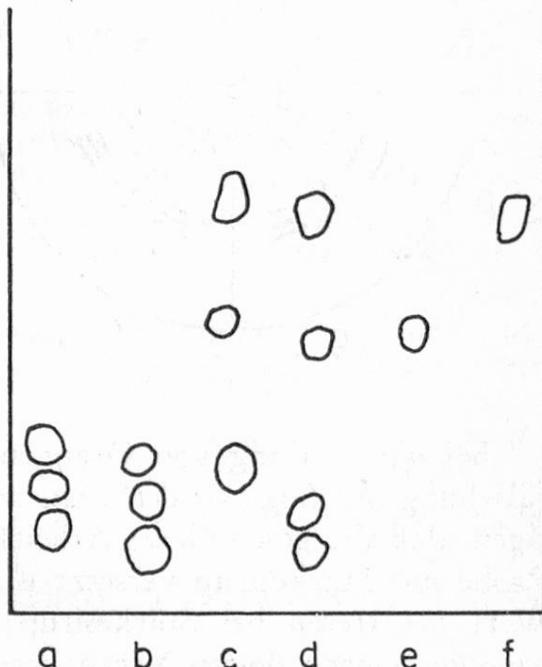
Auch 5 Proben von Orangensaften des Handels in Dosen, 7 Proben von Orangensaftkonzentraten und 2 Grundstoffe für Limonaden mit Orangensaft erwiesen sich als frei von Raffinose und Stachyose.

5 aus südafrikanischen Orangen im Umlaufvakuumverdampfer bei 40 ° C selbst hergestellte Orangensaftkonzentrate ließen beim Chromatographieren ebenfalls weder Raffinose noch Stachyose erkennen. Es trat lediglich in einem Fall ein schwach bräunlicher zusätzlicher Farbstreifen zwischen Saccharose und Raffinose auf. Möglicherweise beruht dessen Entstehen auf der Bildung neuer Polysaccharide während des Einengens in saurer Lösung durch die sogenannte Reversion.

Die Zahl der bis jetzt an unverfälschten Orangenzubereitungen durchgeföhrten Untersuchungen auf das Vorkommen von Raffinose und Stachyose ist zwar noch verhältnismäßig gering. Da jedoch auch im einschlägigen Schrifttum (14—18) Raffinose und Stachyose nicht als Inhaltsstoffe von Orangen genannt werden, erscheint es berechtigt davon auszugehen, daß diese Zuckerarten in Orangen nicht vorkommen. Täufel und Mitarbeiter (9) bedienten sich zum Nachweis der Raffinose und Stachyose der absteigenden Papierchromatographie auf Schleicher und Schüll-Papier 2040 b mit dem Fließmittel Butanol-Wasser-Aethanol (4 : 5 : 1) bei einer Laufzeit von 3 bis 5 Tagen. Als Sprühmittel wurde Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure verwendet. Nach dieser Arbeitsweise wurde nachstehendes Chromatogramm erhalten:

Abbildung 1:

Absteigendes Chromatogramm der Zucker von Orangensaft und Sojaextrakten



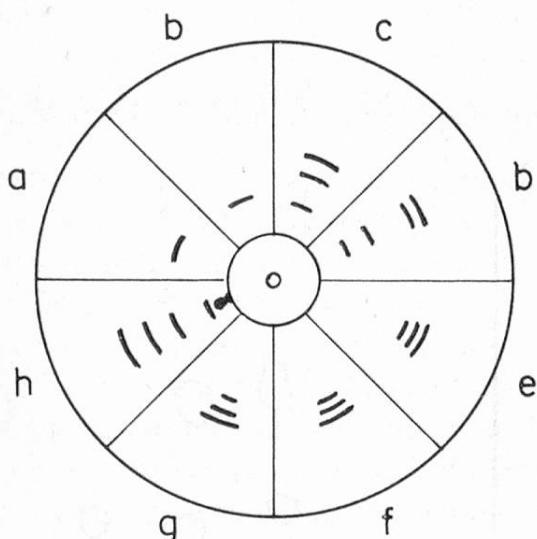
Bei a und b handelt es sich um Fructose, Glucose und Saccharose aus Orangensaften, bei c um Saccharose, Raffinose und Stachyose aus einem rein wässerigen Sojaauszug, bei d um Fructose, Glucose, Raffinose und Stachyose aus dem stark sauren japanischen Sojaauszug zur Getränkeherstellung, bei e um Raffinose und bei f um Stachyose.

Wegen der langen Laufzeit der absteigenden Papierchromatographie wurde in Anlehnung an die Arbeitsweise von Mühlberger (19) ohne weitere Vorbehandlung der Säfte, Saftlösungen oder wässerigen Schalenauszüge die Rundfilter-Chromatographie unter Verwendung folgender Geräte und Reagenzien herangezogen:

Trennkammer für Rundfilter-Chromatographie Desaga; Macherey und Nagel — Papier MN 261, \varnothing 29,5 cm. Laufmittel: n-Propanol-Aethylacetat-Wasser (65:10:25) bei einer Laufzeit von ungefähr 15 Stunden (über Nacht). Sprühmittel: 4%ige alkoholische Anilinlösung 5 Teile, 4%ige alkoholische Diphenylaminlösung 5 Teile, 85%ige Phosphorsäure 1 Teil, mit anschließender Trocknung während einer Dauer von 5 bis 10 Minuten bei 100 °C. Vergleichszucker: Raffinose (Merck), Stachyose (Carl Roth, Karlsruhe).

Mit dieser Arbeitsweise ergab sich als mittlerer Rf-Wert für Fructose 0,61, für Glucose 0,56, für Saccharose 0,48, für Raffinose 0,33 und für Stachyose 0,17. Die Farbtöne liegen bei Fructose zwischen gelbbraun und braun, bei Glucose zwischen graublau und grünblau, bei Saccharose zwischen grünlichbraun und grünbraun, bei Raffinose zwischen hellgrau und grau und bei Stachyose zwischen grau und graublau.

*Abbildung 2:
Rundfilter-Chromatogramm von Orangensaften, Schalenauszügen und Sojaextrakten*



In diesem Chromatogramm sind unter a) Raffinose, b) Stachyose, c) wässriger Sojaextrakt, d) stark saurer japanischer Sojaextrakt, e) selbst hergestellter Orangensaft, f) Auszug aus Flavedo, g) Auszug aus Albedo und h) Stärkesirup aufgetragen.

Bei der Prüfung von Orangensaften und deren Zubereitungen auf eine Verfälschung mit Sojaextrakten ist, wie Abbildung 2 zeigt, allerdings zu berücksichtigen, daß die geschilderte Arbeitsweise gestört wird, wenn die zu untersuchende Probe mit Stärkesirup versetzt ist. Im Bereich vom Startpunkt bis ungefähr Rf-Wert 0,4 treten bei Stärkesirup unter Verwendung der Rundfilter-Chromatographie je nach dessen Verzuckerungsgrad mehrere Farbstreifen auf. Auf welche Weise es gelingt, den störenden Einfluß des Stärkesirups auszuschalten, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Da Raffinose und Stachyose im Bereich des Startpunkts keine Streifen oder Flecken geben, ist umgekehrt eine Störung des Stärkesirup-Nachweises durch Sojaextrakt nicht gegeben.

Zusammenfassung

Die Untersuchungsergebnisse eines japanischen Sojaextraktes zur Getränkeherstellung werden mitgeteilt. Weiterhin wurde gefunden bzw. bestätigt, daß Sojaextrakte Raffinose und Stachyose enthalten. Nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen fehlen diese Zucker sowohl im Orangensaft als auch in der Orangenschale. Bei der angewandten Arbeitsweise der Rundfilter-Chromatographie wird der Nachweis der Raffinose und Sta-

chyose in Zubereitungen aus Orangen gegebenenfalls jedoch dadurch gestört, daß die Polymaltosen des Stärkesirups Farbstreifen ergeben, deren Rf-Werte im Bereich derjenigen von Raffinose und Stachyose liegen. Die Ausschaltung dieser Störung bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Literatur

1. *Benk E. und Seibold H.*: Sojaextrakte als mögliche Fälschungsmittel für Orangensaftkonzentrate; Diese Mitt. 57, 505, (1966).
2. *Kuhnke A.*: Verfahren zur Herstellung von Erfrischungsgetränken aus ölfreien Sojabohnenflocken; Brauwelt 106, 318 (1966).
3. *Porter W. L., Hoban N. und Willits C. O.*: Beitrag zur Kohlenhydratchemie des Ahornsafes und -sirups; Food Res. 19, 957 (1954); ref.: ZUL 102, 293 (1955).
4. *Harris G. und Mac William I. C.*: Die Kohlenhydrate in Mälzerei und Brauerei, II: Veränderungen im Kohlenhydratgehalt der Gerste während der Reife, Trocknung und Lagerung; J. Inst. Brewing 60, 387 (1954); ref.: ZUL 103, 64 (1956).
5. *Montgomery R. und Smith F.*: Die Zusammensetzung von Getreide: Eine Uebersicht über die Kohlenhydrate des Weizens und anderer Getreidearten; J. Agric. Food Chemistry 4, 716 (1956); ref.: ZUL 107, 185 (1958).
6. *Goldschmid S. und Burkert H.*: Ueber das Vorkommen einiger im Bienenhonig bisher unbekannter Zucker; Hoppe-Seylers Z. 300, 188 (1955); ref.: ZUL 103, 313 (1956).
7. *Schwimmer S., Bevenue A., Weston W. J. und Potter A. L.*: Zusammensetzung der Kartoffel: Ueberblick über die hauptsächlichsten und die sekundären Zucker- und Stärkekomponenten der Kartoffel; J. Agric. Food Chemistry 2, 1284 (1954); ref.: ZUL 102, 269 (1955).
8. *Lásztity R. und Mosonyi A.*: Papierchromatographische Untersuchung von Mono- und Oligosacchariden der Roggenmehle; Elelmiszerizsgálati Közlemények 5, 298 (1959); ref.: ZUL 114, 159 (1961).
9. *Täufel K., Steinbach K. J. und Vogel E.*: Mono- und Oligosaccharide einiger Leguminosensamen sowie ihr Verhalten bei Lagerung und Keimung; ZUL 112, 31 (1960).
10. *Römpf H.*: Chemie-Lexikon Bd. III, 5309; Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart, 1966.
11. *Römpf H.*: Chemie-Lexikon Bd. IV, 6090; Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart, 1966.
12. *Thaler H.*: Die Oligosaccharide von Rohkakao, Nüssen und Mandeln; Fette und Seifen 62, 701 (1960).
13. *Thaler H.*: Die löslichen Kohlenhydrate einiger Rohstoffe der Schokoladenindustrie, II. Mitteilung: Die Oligosaccharide von Nüssen und Mandeln; ZUL 105, 198 (1957).
14. *Sinclair W. B.*: The Orange, its Biochemistry and Physiology; University of California Printing Department, 1961.
15. *Braverman J. B. S.*: Citrus Products; Interscience Publishers New-York-London, 1949.
16. *Treßler D. K. und Joslyn M. A.*: Fruit and Vegetable Juice; The Avi Publishing Comp., Inc., Westport, Connecticut, 1961.
17. *Herrmann K.*: Obst, Obstdauerwaren und Obsterzeugnisse; Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg, 1966.
18. *Rauen H. M.*: Biochemisches Taschenbuch, Erster Teil; Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964.
19. *Mühlberger F. H.*: Zum Nachweis eines Invertzuckerzusatzes in Traubenmosten und Weinen; ZUL 113, 265, 1960.

Hydroxylation aromatique de l'acide caféïque par la peroxydase

On explique (1) la biosynthèse des coumarines, à partir de dérivés de l'acide cinnamique, par la série suivante de réactions: (*a*) hydroxylation du noyau aromatique en position *ortho*, sans ou avec la formation d'un glucoside à cette position, (*b*) isomérisation *trans-cis* de la double liaison, et (*c*) formation d'une δ-lactone. Cependant, il n'est pas encore clair lesquelles de ces réactions sont catalysées par une action enzymatique. La réaction (*c*) se fait spontanément et rapidement si le groupement hydroxyle à la position *ortho* est libre (2), et l'isomérisation (*b*) est catalysée par la lumière ultra-violette, ou par la lumière du soleil (2, 3).

Récemment plusieurs auteurs ont observé que la transformation entière peut être catalysée par la lumière UV, en présence de l'oxygène de l'air. Ainsi, Butler et Siegelman (4) ont remarqué la conversion de l'acide caféïque en ésculétine sur les chromatoplaques exposées à l'ultraviolet, et ils ont trouvée que la vitesse de la réaction dépendait de la présence des ions de fer. Kagan (5) a plus tard confirmé ces observations, et il a isolé l'ésculétine sous forme cristalline; il a suggéré l'importance de cette transformation photochimique dans la nature. Dans ce laboratoire, nous avons également observé que cette conversion se fait très facilement, même dans la lumière du soleil.

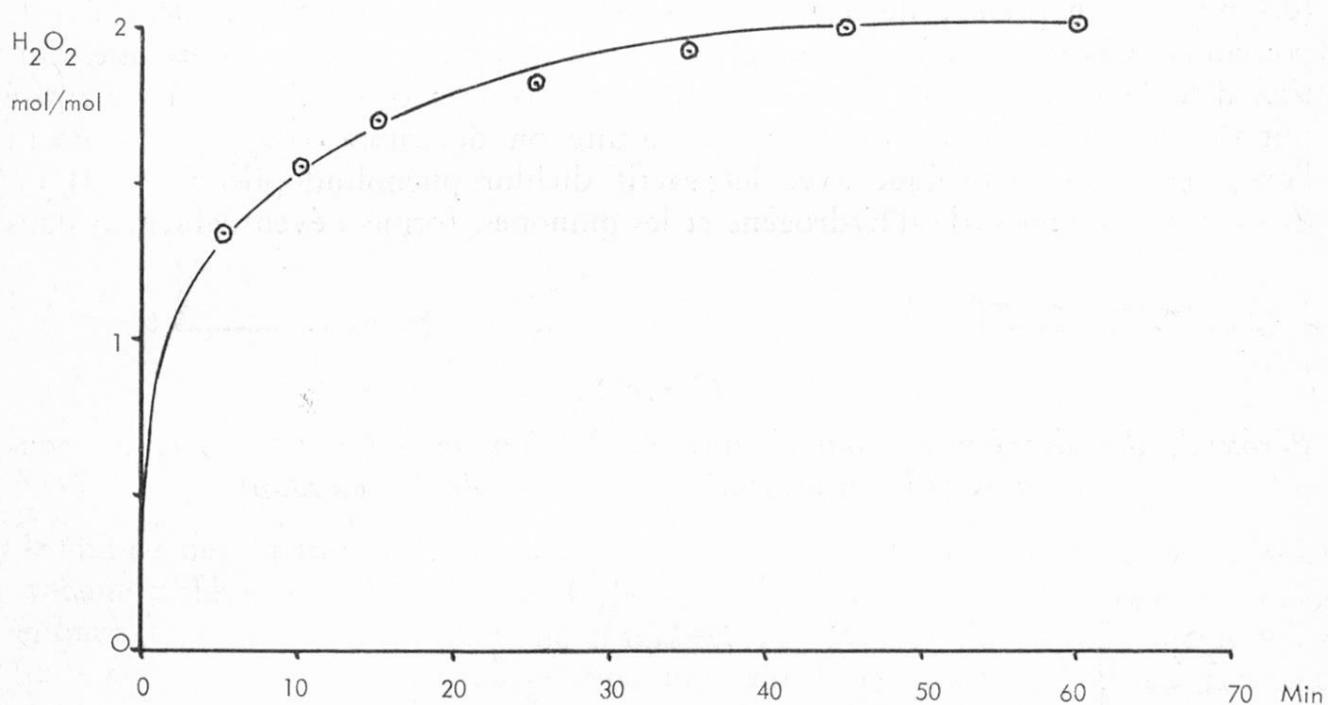
Le mécanisme de la transformation photochimique n'est pas encore établi, probablement parce qu'il est impossible d'étudier séparément les réactions différentes qui ont lieu. Cependant, à la suite de travaux effectués pour étudier l'oxydation de l'acide caféïque par la peroxydase, nous avons pu faire des observations qui nous ont permis de comprendre le mécanisme probable de la conversion photochimique.

Nous avons oxydé l'acide *cis-caféïque* par la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène (0,7 mol./mol.) dans un milieu tamponné (acétate de soude, pH 6,9) et nous avons pu isoler l'ésculétine cristalline avec un rendement de 35 %. Moyennant la chromatographie nous avons également observé la formation d'une trace de daphnétine. Étant donné que ces coumarines elles-mêmes sont aussi susceptibles à l'action enzymatique de la peroxydase, on peut en déduire que ce résultat est un indicateur d'un chemin important de l'oxydation.

Nous avons également soumis l'acide *trans-caféïque* à une oxydation partielle similaire, mais à l'abri de la lumière. Dans ce cas, nous n'avons pas pu obtenir de l'ésculétine. À sa place, nous avons isolé un mélange complexe de produits acidiques, qui, après exposition à l'ultraviolet, s'est transformé en ésculétine et d'autres coumarines inconnus.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'oxydation de l'acide *trans*-caféique, en éliminant ainsi les complications d'isomérisation et de lactonisation dans le milieu de réaction. Nous avons oxydé cette acide (sel soudique) en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène (2,5 moles/mole de substrat) à pH 6,9. Après des intervalles de temps différents, nous avons ensuite décomposé l'excès de l'oxydant avec la catalase et nous avons mesuré volumétriquement l'oxygène libéré par cette réaction. Les résultats de l'expérience, exprimés en moles de peroxyde d'hydrogène consommées pendant l'oxydation, sont indiqués dans la Figure 1.

Figure 1. Consommation du peroxyde d'hydrogène par l'acide caféïque



La courbe indique que la réaction ne s'arrête pas après consommation d'une mole de réactif, mais se poursuit jusqu'à la consommation de deux moles de l'oxydant. Ainsi nous avons pu conclure qu'il ne s'agit pas seulement de la formation de la 3,4-orthoquinone. Le premier produit de réaction est capable de consommer encore une mole de peroxyde d'hydrogène. On peut s'imaginer deux explications possibles (*i*) hydroxylation directe du noyau aromatique, avec formation d'une acide trihydroxycinnamique, qui peut réagir ensuite avec une autre mole de l'oxydant, ou (*ii*) formation de la 3,4-orthoquinone, qui entre ensuite en réaction avec de l'eau, formant une acide trihydroxycinnamique.

Nous avons ensuite examiné la séquence exacte des réactions oxydatives à l'aide d'une étude cinétique. Cette étude se base sur la propriété bien connue de l'acide ascorbique de réduire les orthoquinones et les radicaux phénoliques libres.

Cette réaction a déjà trouvé beaucoup d'applications, par exemple pour la détermination de l'activité enzymatique de la catécholase (6). Quand on titre un mélange de l'acide ascorbique (1 mole), de l'acide caféïque (1 mole) et de la peroxydase avec une solution de peroxyde d'hydrogène, on trouve que la consommation d'exactement 1 mole de l'oxydant est indiquée par l'apparence de la couleur brune de l'acide caféïque oxydée. On trouve aussi que la peroxydase peut effectuer directement l'oxydation de l'acide ascorbique par le peroxyde d'hydrogène, sans intermédiaire de l'acide caféïque, bien que la vitesse de cette réaction soit réduite. Ces observations nous ont conduit à l'élaboration de la méthode cinétique suivante.

On prépare une solution (50 ml) de l'acide caféïque (sel sodique, 0,4 mM) et du peroxyde d'hydrogène (0,4 mM ou 0,8 mM) dans un tampon d'acétate de soude (0,2 M; pH 6,9). On commence la réaction par l'addition de peroxydase (0,1 mg), et on prélève de temps en temps des parties aliquotes et détermine le pouvoir oxydant et ces échantillons. Pour cette détermination, on ajoute une solution d'acide ascorbique (si possible d'une concentration équimolaire à la quantité initiale en peroxyde d'hydrogène), et ensuite on détermine colorimétriquement l'excès en acide ascorbique avec le réactif dichlorophénolindophénol (7). Il est évident que le peroxyde d'hydrogène et les quinones, formées éventuellement dans

Figure 2

Peroxyde d'hydrogène consommé avec production de quinones (X) et de non-quinones (○) en présence de 1 mole/mole de l'oxydant

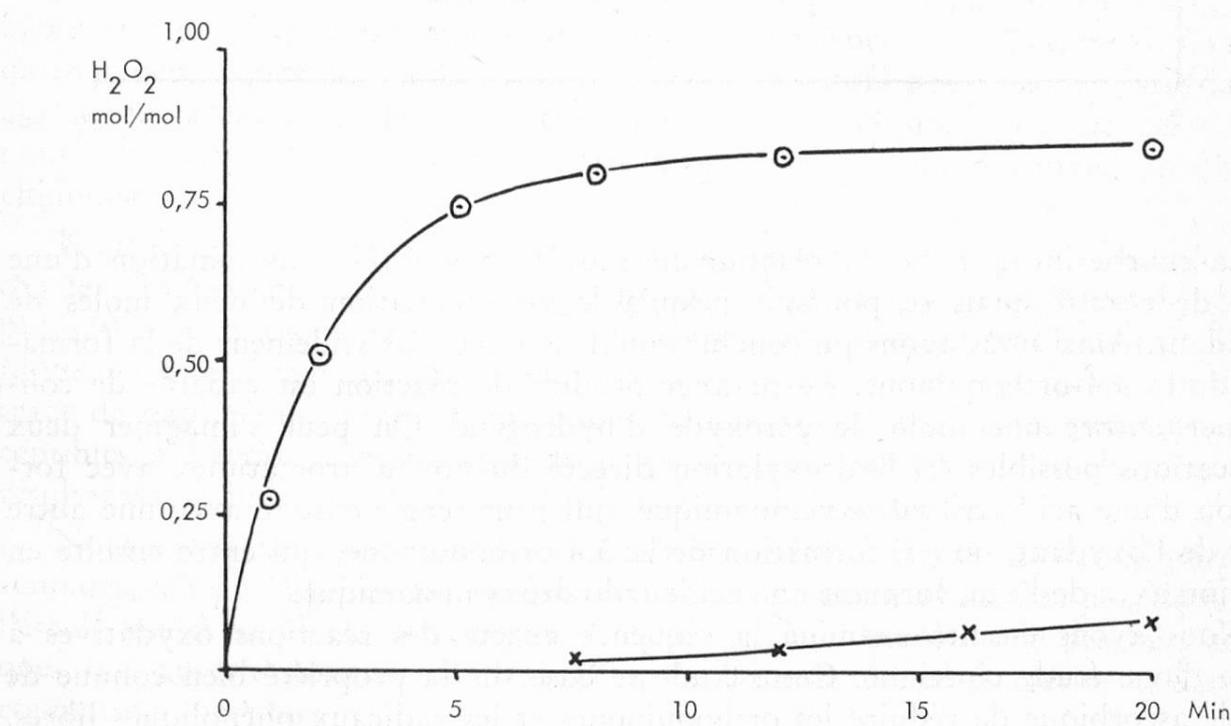
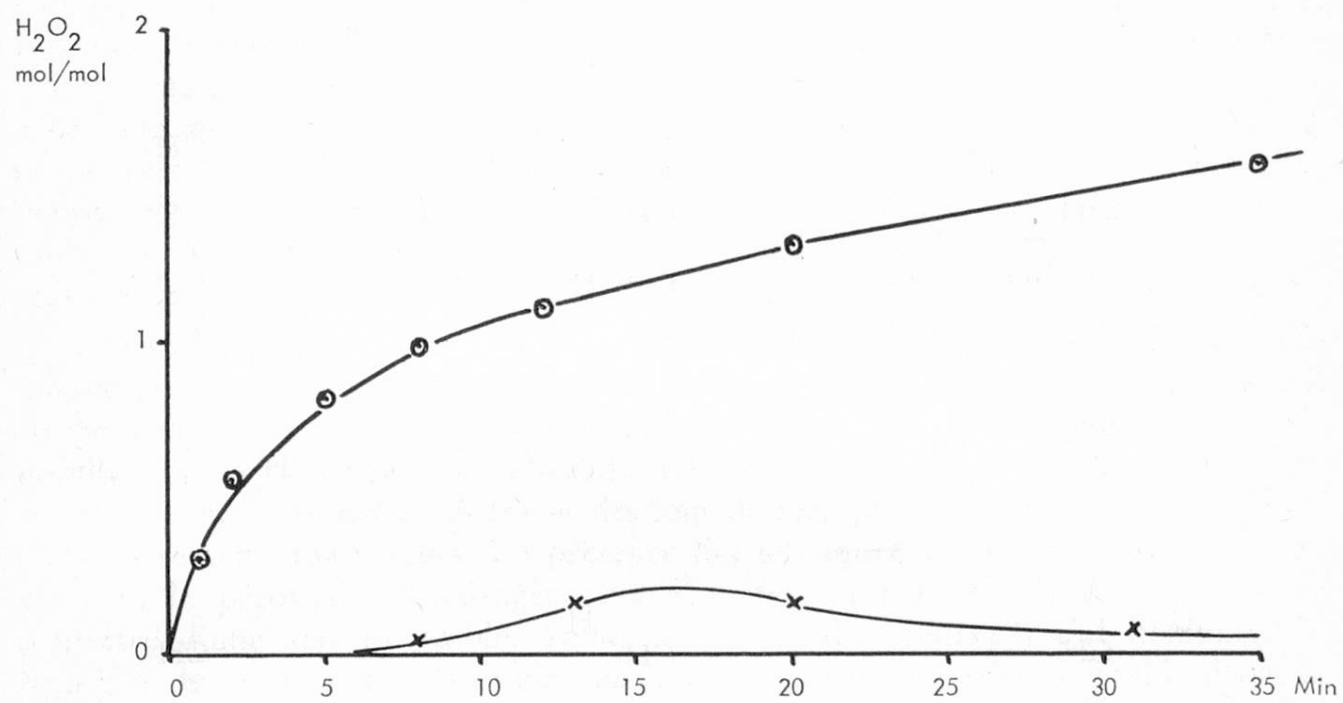


Figure 3

Péroxyde d'hydrogène consommé avec production de quinones (\times) et de non-quinones (\odot) en présence de moles/moles de l'oxydant



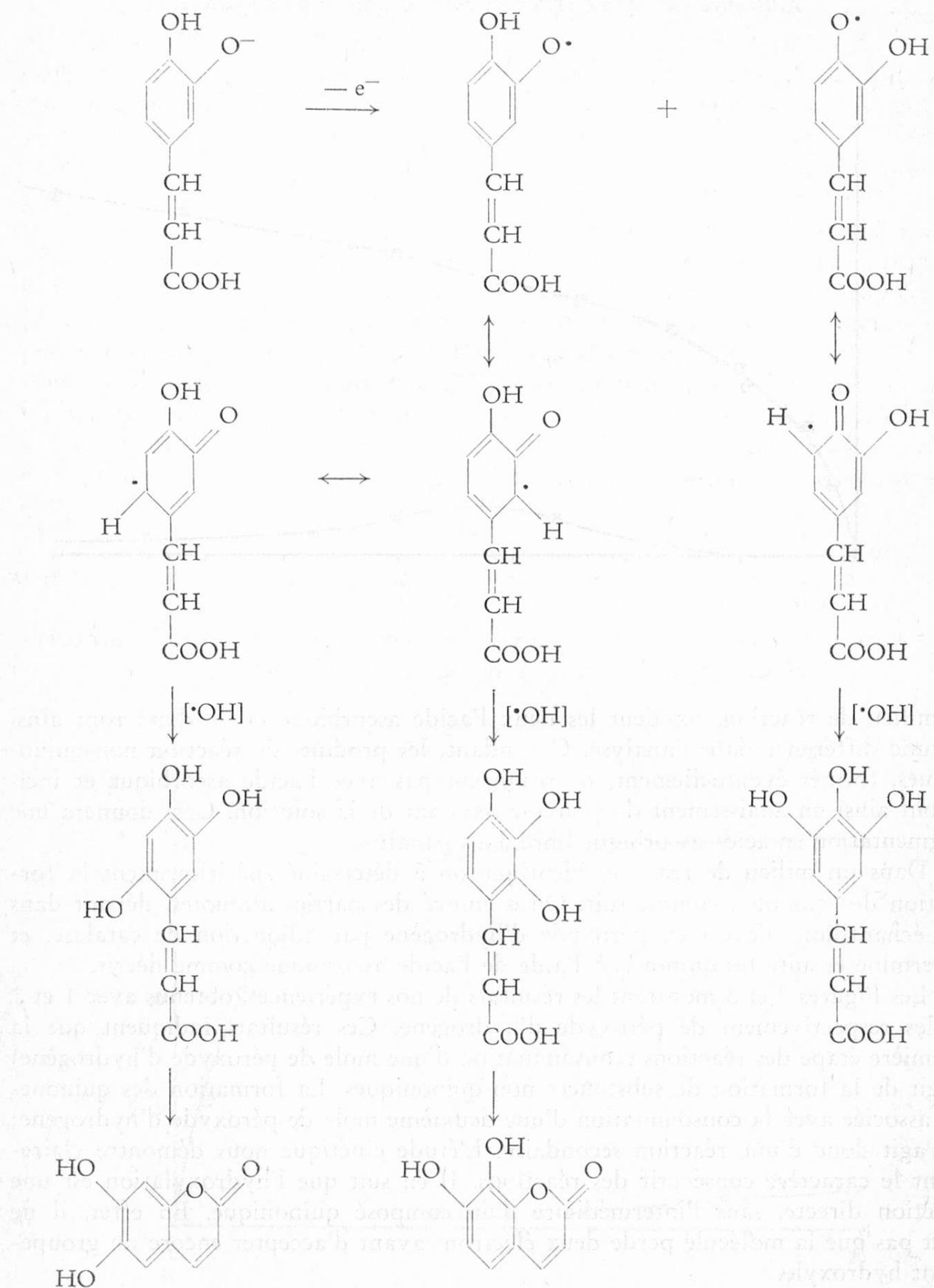
le milieu de réaction, oxydent les deux l'acide ascorbique et ne donneront ainsi aucune différence dans l'analyse. Cependant, les produits de réaction non-quinoxiques, formés éventuellement, ne réagissent pas avec l'acide ascorbique et inciteront ainsi un abaissement du pouvoir oxydant de la solution. Ceci donnera une augmentation en acide ascorbique libre dans l'analyse.

Dans un milieu de réaction identique on a déterminé spécifiquement la formation des quinones comme suit. On a enlevé des parties aliquotes, détruit dans ces échantillons l'exces en péroxyde d'hydrogène par adjonction de catalase, et déterminé ensuite les quinones à l'aide de l'acide ascorbique comme décrit.

Les Figures 2 et 3 montrent les résultats de nos expériences, obtenus avec 1 et 2 moles respectivement de péroxyde d'hydrogène. Ces résultats indiquent que la première étape des réactions (consommation d'une mole de péroxyde d'hydrogène) s'agit de la formation de substances non-quinoxiques. La formation des quinones est associée avec la consommation d'une deuxième mole de péroxyde d'hydrogène; il s'agit donc d'une réaction secondaire. L'étude cinétique nous démontre clairement le caractère consécutif des réactions. Il en suit que l'hydroxylation est une réaction directe, sans l'intermédiaire d'un composé quinonique. En effet, il ne faut pas que la molécule perde deux électrons avant d'accepter encore un groupement hydroxyle.

Figure 4

Mécanisme de la conversion de l'acide caféïque en ésculétine et daphnétine



Nous proposons donc le mécanisme d'hydroxylation présenté dans la Figure 4. L'acide caféïque, sous forme ionique, donne une électron à la peroxydase, et se transforme en radical libre. On peut représenter le radical par structures différentes (Figure 4), avec une localisation de l'électron solitaire, soit au noyau aromatique, soit à la chaîne latérale (seulement celle au noyau aromatique sont montrées dans la Figure). Ces structures différentes ne sont certainement pas équivalentes. Les radicaux libres d'une structure ou d'une autre peuvent entrer en réaction avec des radicaux hydroxyles, en formant un composé phénolique avec trois hydroxyles. On peut également envisager une suite de réactions selon le même mécanisme avec formation des acides tetrahydroxycinnamiques. Plus d'oxydation donnerait ensuite des hydroxyquinones, et ce sont probablement des hydroxyquinones qui sont responsables de l'oxydation de l'acide ascorbique par le milieu de réaction, après décomposition de l'exces de peroxyde d'hydrogène (Figures 2 et 3).

Il reste le problème de l'origine des radicaux libres hydroxyles. Selon quelques auteurs (8) ces radicaux ne sont pas produits par la peroxydase. Cependant il est possible qu'ils soient le produit d'une réaction entre des radicaux libres phénoliques et des molécules de peroxyde d'hydrogène. Il faut également prendre en considération la présence des traces des ions de fer, qui se trouvent partout, même dans les réactifs analytiques. En présence des sels inorganiques, par exemple d'un tampon, le peroxyde d'hydrogène est en effet un réactif «Fenton», bien que peut-être d'une activité faible. Smidsrød et collaborateurs (9) ont démontré la présence des radicaux hydroxyles dans une solution de peroxyde d'hydrogène (0,1 M), en présence des traces d'ions de fer en concentrations de 3×10^{-6} M. Étant donné que la plupart des sels inorganiques de qualité analytique contiennent 0,005 % de fer, on peut facilement calculer qu'une solution 0,1 M de n'importe quel sel contient assez de fer pour déclencher la réaction surmentionnée.

Le mélange complexe obtenu après oxydation limitée de l'acide *trans*-caféïque indique que la réaction enzymatique n'est pas spécifique. La fonction de la peroxydase est probablement limitée à la formation des radicaux phénoliques libres, et on peut accepter que l'hydroxylation ne se fait pas en contact étroit avec l'enzyme.

Au cours d'autres travaux, nous avons effectué des oxydations sans intervention de la peroxydase, soit par l'oxygène, soit par le peroxyde d'hydrogène, avec ou sans adjonction des traces de fer. Et nous avons trouvé en effet un mélange de substances très analogues aux produits obtenus par oxydation enzymatique. Nous avons aussi examiné la réaction photochimique par la chromatographie, et nous avons trouvé des mélanges de produits intermédiaires comparables à ceux obtenus par les autres méthodes d'oxydation. Ces résultats indiquent que la phase oxydative de la transformation photochimique de l'acide caféïque en ésculetine n'est pas de caractère unique.

Mason (8) a publié une revue complète de la littérature sur l'hydroxylation aromatique.

Nous sommes reconnaissants au Département d'Agriculture des Etats Unis pour une allocation de recherche (PL 480).

Summary

Oxidation of *cis*-caffeic acid by hydrogen peroxide (0,7 mole/mole) in the presence of peroxidase afforded esculetin in a yield of 35 % together with a trace of daphnetin. Oxidation of *trans*-caffeic acid under the same conditions yielded no esculetin, but gave a mixture of acidic substances which was partially converted into esculetin upon irradiation with UV light. Kinetic studies, entailing measurement of the consumption of hydrogen peroxide by a gasometric method, and the use of ascorbic acid to determine quinones, indicate that a major pathway in the reaction consists in the direct introduction of additional hydroxyl groups into the aromatic nucleus. A mechanism is proposed for this.

Bibliographie

1. Neish A. C.: Biochemistry of Phenolic Compounds, éd. par Harborne J. B.: Acad. Press, London et New York, 1964, p. 323.
2. Williams A. H.: Chem. & Ind. **1955**, 120.
3. Lutzmann H.: Ber. **73b**, 632 (1940); Haskins F. A. et Gorz H. J.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **6**, 298 (1961); Haskins F. A., Williams L. G. et Gorz H. J.: Plant Physiol. **39**, 777 (1964); Edwards K. G. et Stoker J. R.: Phytochemistry **6**, 655 (1967); Kahnt G.: Phytochemistry **6**, 755 (1967).
4. Butler W. L. et Siegelman H. W.: Nature **183**, 1813 (1959).
5. Kagan J.: J. Amer. Chem. Soc. **88**, 2617 (1966).
6. Dawson C. R. et Magee R. J.: Methods in Enzymology Vol. II, éd. par Colowick S. P. et Kaplan N. O.: Acad. Press, New York, 1955, p. 817.
7. Roe J. H.: Methods of Biochemical Analysis Vol. I, éd. par Glick D.: Interscience, New York et London, 1954, p. 115.
8. Mason H. S.: Advances in Enzymology Vol. XIX, éd. par Nord F. F.: Interscience, New York et London, 1957, p. 79.
9. Smidsrød O., Haug A. et Larsen B.: Acta Chem. Scand. **19**, 143 (1965).

P. Gross, D. Monnier et W. Haerdi, Laboratoire de chimie analytique et minérale,
Ecole de chimie de l'Université, Genève.

Séparations rapides de traces de Pb^{+2} au moyen du mercure (échanges rédox)

(Résumé des auteurs)

Cette méthode permet d'extraire le Pb^{+2} d'une solution par simple agitation avec une goutte de mercure.

I. Principe

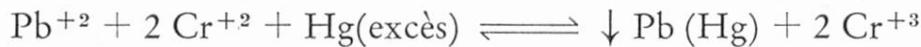
Le Pb^{+2} doit être réduit et s'amalgamer avec le mercure.

a) *Réduction:* Le potentiel du réducteur ajouté à la phase aqueuse doit, pour des raisons de sélectivité, être le plus proche possible de celui du plomb. D'autre

part, des calculs théoriques montrent que pour que la réduction du plomb soit quantitative (à 1 % près) il faut que:

$$\Delta E = E_{\text{Pb}} - E_{\text{réducteur}} \approx 0,1 \text{ volt}$$

Pour la réduction du Pb^{+2} , nous avons utilisé le couple $\text{Cr}^{+2}/\text{Cr}^{+3}$ ($E_0 = -0,4$ volt). La différence de potentiel (ΔE) dans le cas d'une solution 10^{-5} M de Pb^{+2} et d'une solution $\text{Cr}^{+2}/\text{Cr}^{+3}$ équimoléculaire a une valeur de + 0,13 volt; une solution équimoléculaire $\text{Cr}^{+2}/\text{Cr}^{+3}$ satisfait donc, pour la réduction du plomb, à la condition électrochimique citée ci-dessus, selon la formule:

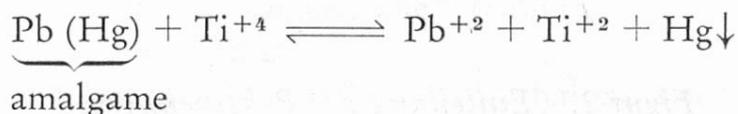


b) *Amalgamation*: Pour qu'une séparation par échanges rédox soit possible, il faut que la solubilité du métal à extraire dans le mercure soit $\geq 10^{-4}$ % en poids. Le plomb, dont la solubilité dans le mercure est de 1,6 % en poids, convient donc parfaitement à la séparation par échange rédox.

II. *Amalgamation*

Tous les métaux qui sont réduits avec le plomb et qui sont solubles dans le mercure, s'amalgament. Pour augmenter la sélectivité de la méthode on remet le plomb en solution aqueuse en l'oxydant par agitation de l'amalgame (contenant le Pb et les autres métaux de potentiels plus élevés) avec une solution aqueuse dont le potentiel rédox est supérieur à celui du plomb, mais aussi voisin que possible.

Pour réextraire le plomb, nous avons utilisé le couple $\text{Ti}^{+4}/\text{Ti}^{+2}$ ($E_0 = -0,21$ volt).



III. *Applications*

Avec 1 ml d'une solution de Cr^{+3} (0,1 M)/ Cr^{+2} (0,1 M) on peut extraire très rapidement de 1 à 100 µg de plomb en solution dans HCl 0,01 M (concentration du plomb de 10^{-6} à 10^{-4} ion g/l).

Dans tous les cas, la réaction était quantitative déjà après 1 min 30'' d'agitation.

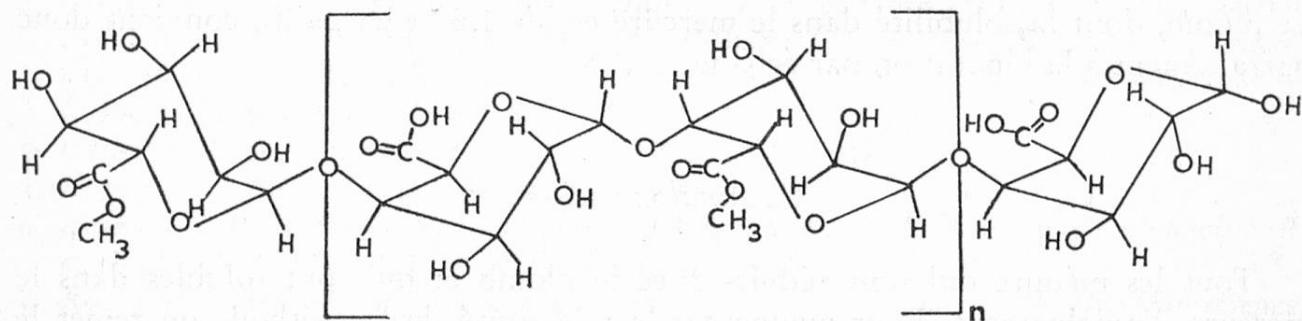
La réaction de réextraction est également très rapide; elle est quantitative après une agitation ≤ 2 minutes.

Par cette méthode, nous avons pu séparer et doser le plomb dans divers alliages et liquides biologiques tels que le sang, l'urine.

Untersuchungen über die pektolytischen Enzyme von *Aspergillus niger*

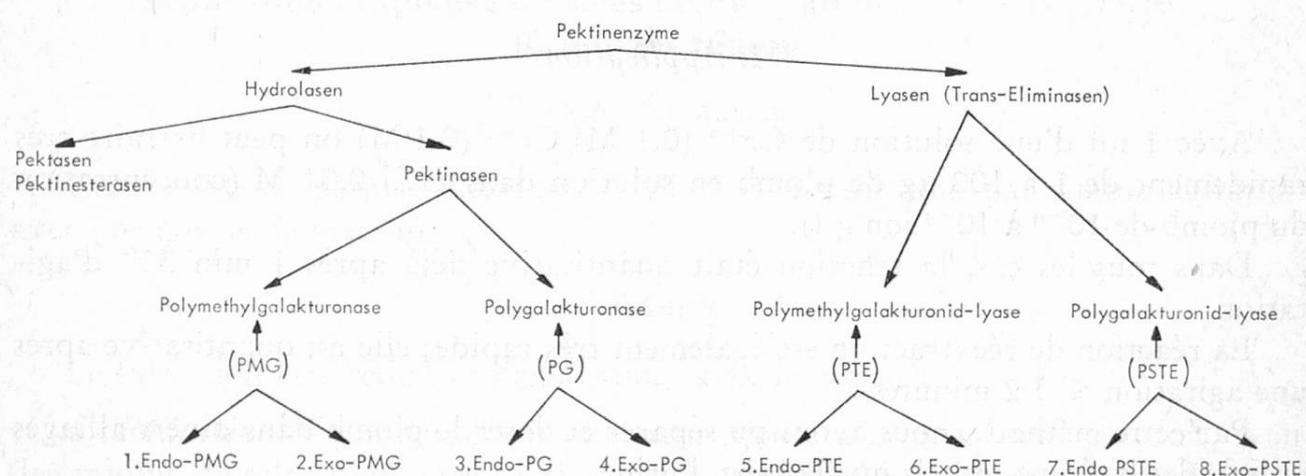
Unter Pektinenzymen versteht man die Gesamtheit aller Enzyme, die auf Pektin oder Pektinsäure wirken (1, 2, 3). Das Pektin, ein wichtiges Pflanzenzellwand-Polysaccharid, ist ein Poly- α -1,4-D-Galakturonid, welches teilweise mit Methanol verestert ist. Liegen alle Carboxylgruppen in der Säureform vor, so spricht man von Pektinsäure.

Figur 1. Formel für Pektin



Je nach Art des Abbaus, hydrolytisch oder eliminativ (unter Bildung einer Doppelbindung an C₄ zu C₅), je nach Substratsspezifität, Abbau von Pektin oder Pektinsäure, und je nach Mechanismus des Abbaus, d. h. vom Kettenende her oder in der Kette, können die in Figur 2 angegebenen Pektinenzyme unterschieden werden.

Figur 2. Einteilung der Pektinenzyme



Auf der linken Seite stehen die Hydrolasen und rechts die Lyasen. Die Hydrolasen teilen sich in 2 Klassen, in Enzyme, welche die Ester-Bindung hydrolyseren, die sog. Pektinesterasen oder Pektasen (Pektin pektyl-hydrolasen, EC 3. 1. 1. 11) und in Enzyme, welche die α -1,4-glykosidische Bindung spalten, die sog. Pektinasen (Poly- α -1,4-D-Galakturonid glycanohydrolase, EC 3. 2. 1. 15). Die Pektinasen teilen sich nach Substratspezifität in Polymethylgalakturonasen (PMG) und in Polygalacturonasen (PG). In jeder dieser Klassen lassen sich Endo- und Exo-Enzyme unterscheiden. Analog geht die Einteilung bei den Lyasen (Poly- α -1,4-D-Galakturonid-lyase, EC 4. 2. 99. 3).

Innerhalb der einzelnen Gruppen treten multiple Enzymformen auf (4).

Pektolytische Enzyme mikrobiellen Ursprungs werden schon seit langem großtechnisch hergestellt und in der Fruchtsafttechnologie verwendet. Diese Enzympräparate enthalten neben pektolytischen Enzymen in der Regel eine Reihe von weiteren polysaccharidspaltenden Enzymen wie Amylasen, Cellulasen und Hemicellulasen (5, 6, 7, 8).

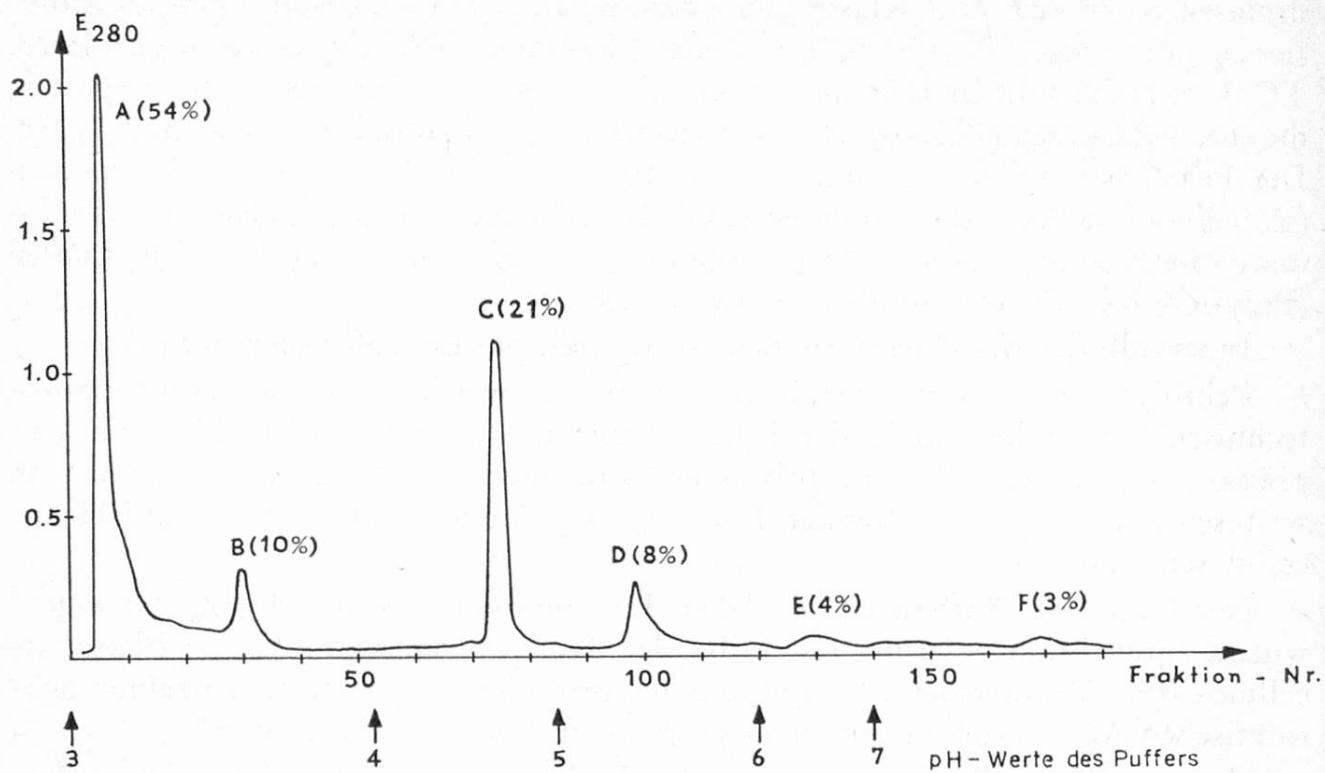
Der komplexe Aufbau eines solchen Enzympräparates aus *Aspergillus niger** wurde durch Fraktionierung mit Hilfe der Säulenchromatographie an Phosphatcellulose (9, 10) untersucht. Es wurde dabei besonders versucht, die einzelnen pektolytischen Aktivitäten voneinander zu trennen und zu charakterisieren.

Vor der Säulen-Trennung wurde das Enzymgemisch folgendermaßen aufgearbeitet. Das Enzymkonzentrat, das neben den Enzymen noch Zucker, Säuren und Salze enthält, wurde mit kaltem Methanol gefällt (der größte Teil der Zucker und Säuren bleibt dabei in Lösung), der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und in wenig Wasser aufgenommen. Dabei bleibt ein großer Anteil an Salzen unlöslich infolge der pH-Verschiebung von pH 4 auf pH 6. Der lösliche Teil wurde gefriergetrocknet und für die Säulenchromatographie verwendet. Wie erwähnt, wurde die Chromatographie an Phosphatcellulose vorgenommen und stufenweise mit verdünntem (1 Teil Puffer, 2 Teile H₂O) McIlvaine-Puffer (Phosphat-Citrat-Puffer) eluiert. Die Trennung wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt.

Wie Figur 3 zeigt, wurden 6 Peaks (A—F) erhalten. Die Elution wurde mit pH 3 begonnen und die Peaks A und B erhalten. Bei der Elution mit Puffer von pH 4 trat Peak C bei einem pH-Wert von 3,3—3,7 aus der Säule. Der Peak D wurde bei einem pH-Wert von 4,5—4,9, der Peak E bei einem pH-Wert von 5,0—5,2 und der Peak F bei einem pH-Wert von 6,2—6,8 aus der Säule eluiert. In Figur 3 ist in Klammern die prozentuale Verteilung berechnet nach der UV-Absorption der einzelnen Fraktionen angegeben. Auf die enzymatisch inaktiven Peaks A, B und E fallen dabei fast 70 %. Die Verteilung der Enzymaktivität auf die Peaks C, D und F ergibt folgende Werte: die gesamte Aktivität auf Pektin (95 % verestert) ist im Peak C lokalisiert, während der Anteil der Aktivität auf Pektinsäure 21 % ausmacht. Im Peak D findet sich 38 %, im Peak F 41 % der Gesamtaktivität auf Pektinsäure.

* PEKTINEX der Firma Ferment A. G., Basel.

Figur 3. Fraktionierung durch Chromatographie an Phosphatcellulose



Peak C

Obwohl sich Peak C von den andern gut abtrennen läßt, zeigten Aktivitätsmessungen doch, daß in dieser Fraktion mehrere Enzyme enthalten sind (10). So wird Pektin (95 % verestert) bei pH 4, 6 und 7 optimal abgebaut, Pektinsäure bei pH 4. Zudem enthält diese Fraktion noch eine alkalilabile Cellulase mit dem pH-Optimum 4, sowie eine Pektase (Esterase) mit pH-Optimum 4,5. Die Aktivitäten wurden durch Messung der Zunahme der durch die Hydrolyse freigesetzten reduzierenden Gruppen bestimmt (11), und im Falle der Esterase durch Titration der freigesetzten Carboxylgruppen (12). Die Enzyme konnten auch durch Elektrophorese nicht weiter aufgetrennt werden. Ihr IEP liegt bei pH 3,8 und sie sind im pH-Bereich von 3—8 (mit Ausnahme der Cellulase) stabil. Sie unterscheiden sich aber in der Hitzestabilität.

Erhitzt man das Enzymgemisch während 10 Minuten auf 60 °C, so sinkt die Aktivität des Pektinabbaus bei pH 4 auf $\frac{1}{3}$ der ursprünglichen Aktivität. Der Pektinabbau bei pH 7 und der Abbau von Pektinsäure bei pH 4 dagegen werden nicht beeinflußt. Da anderseits bei pH 7 nur Pektin und keine Pektinsäure abgebaut wird, so handelt es sich um 3 Enzyme. Der Pektinabbau bei pH 6 konnte mit Hilfe der UV-Spektroskopie (Zunahme der Absorption bei 235 nm im Verlaufe der Reaktion) als ein eliminativer Abbau aufgeklärt werden; es handelt sich hier demnach um eine Pektin-trans-Eliminase. Nach dem Wirkungsmechanismus sind die 3 anderen Enzyme Endo-Enzyme. Die Entscheidung ob ein Endo- oder Exo-Enzym vorliegt, kann durch Vergleich der Viskositätsabnahme mit

der Zunahme der reduzierenden Gruppen und dünnenschichtchromatographische Untersuchung (13) der Reaktionsprodukte zu Beginn der Reaktion geklärt werden. Ein starker Viskositätsabfall bei kleinem Abbaugrad zeigt, daß das Makromolekül nicht vom Ende her abgebaut, sondern in der Kette gespalten wird und daher sind auch zu Beginn der Reaktion keine Oligomeren nachweisbar. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal der einzelnen Enzyme dient der Hydrolysegrad und die Verteilung der oligomeren Bruchstücke nach beendigter Reaktion (10). Auf Grund dieser Kriterien können im Peak C folgende Pektinenzyme unterschieden werden:

- eine Pektinesterase mit pH-Optimum 4,5.
- eine Endo-PMG mit pH-Optimum 4, die das Substrat zu 57 % hydrolysiert.
In den Abbauprodukten finden sich Mono- bis Penta-Galakturonsäuren.
- Eine Endo-PMG mit pH-Optimum 7, die das Substrat zu 39 % hydrolysiert.
Nach dem Abbau sind oligomere Galakturonsäuren (Penta-, Tetra-, Tri- und wenig Di-mere) nachweisbar.
- eine PTE mit pH-Optimum 6.
- Eine Endo-PGA mit pH-Optimum 4, die das Substrat zu 63 % hydrolysiert und vorwiegend Di-Galakturonsäure bildet neben wenig Mono- und Tri-Galakturonsäure.

Peak D

Dieser Peak zeigt starke Aktivität auf Pektinsäure. Pektin und Cellulose werden nur nach langer Inkubationszeit (mehrere Stunden) nachweisbar abgebaut. Die entsprechenden Enzyme dürften Verunreinigungen sein, welche vom vorhergehenden Peak stammen. Der Pektinsäureabbau wird durch eine PG bewirkt, die bei pH 4,5 optimal wirkt. Da bei einem Abbau von ca. 6 % die Viskosität der Substratlösung nur noch 50 % des Ausgangswertes beträgt und im Dünnenschichtchromatogramm noch keine Oligomeren nachweisbar sind, handelt es sich um eine Endo-PG_B. Das Enzym vermag Pektinsäure bis zu 58 % zu hydrolysieren. Im Hydrolysat sind Mono-, Di- und Tri-Galakturonsäure in etwa gleicher Menge nachweisbar.

Peak F

Der Peak F wird als letzte Fraktion eluiert und ist am reinsten. Er enthält eine PG, die bei pH 5,5 optimal wirkt. Pektin mit einem Veresterungsgrad von größer als 73 % wird nicht angegriffen. Pektinsäure wird nach der Wirkungsweise eines Endo-Enzyms bis zu 48 % hydrolysiert. Im Hydrolysat lassen sich Di-, wenig Mono- und viel Tri-Galakturonsäure nachweisen. Das Enzym ist alkali-labil und verliert rasch an Aktivität, wenn man es in Pufferlösungen von pH 7 an aufwärts stehen läßt. Temperaturen bis zu 35 °C verträgt das Enzym ohne Schädigung, wird aber bei höheren Temperaturen inaktiviert. Nach 2,5 Stunden bei 50 °C zeigt das Enzym keine Aktivität mehr. Die Aktivierungsenergie der enzymatischen Hydrolyse beträgt 8,3 kcal/Mol. Der IEP des Enzyms liegt bei pH 4,5. Verfolgt man die Hydrolysegeschwindigkeit als Funktion der Substrat-

Tabelle 1.

Zusammenstellung der pektolytischen Enzyme eines Enzympräparates aus *Aspergillus niger* (PEKTINEX)

Enzym	pH-Opt.	IEP	Stabilität			pH-Bereich stabil	Hydrolysegrad	Verteilung der Oligomeren nach beendigtem Abbau						
			Temperatur Restaktivität in %					+ wenig, ++ mittel, +++ viel						
			50°	60°	70°			Mono	Di	Tri	Tetra	Penta		
Endo-PG _A	4	3,8	100	100	0	3—8	0,63	++	+++	+				
Endo-PG _B	4,5						0,58	++	++	++				
Endo-PG _C	5,5	4,5	0			4—6	0,48	+	++	+++				
Endo-PMG	4	3,8	100	33	0	3—8	0,57	++	++	++	++	++		
Endo-PMG	7	3,8	100	50	26	3—8	0,39	+	++	++	++	++		
PTE	6	3,8	100	0		3—8								
Pektase	4,5		100	55	0									

konzentration, so findet man einen Kurvenverlauf, wie er für eine Substratinhibition typisch ist (14). Die Michaeliskonstante beträgt 1,66 mg/ml (10).

In Tabelle 1 sind die pektolytischen Enzyme des Enzymkonzentrates aus *Aspergillus niger* zusammengestellt. Damit soll vor allem demonstriert werden, wie komplex die Zusammenstellung solcher Pektinase-Präparate ist. Für das Verständnis der Wirksamkeit dieser Enzympräparate in der Praxis bildet die genaue Kenntnis des Aufbaus eine wichtige Voraussetzung.

Zusammenfassung

Ein Pektinenzymkonzentrat von *Aspergillus niger* (PEKTINEX) wurde an Phosphatcellulose chromatographiert und dabei 6 Peaks (A—F) erhalten. Die Peaks C, D und F zeigten enzymatische Aktivität auf Pektin oder Pektinsäure. Die Pektinenzyme wurden untersucht auf Substratspezifität, Wirkungsmechanismus, pH-Optimum, IEP, Temperatur- sowie pH-Stabilität, Hydrolysegrad und Verteilung der oligomeren Bruchstücke nach beendetem Abbau.

Der Peak C enthält 2 Endo-PMG, eine PTE, eine Endo-PG_A sowie eine Pektinesterase. Der Peak D enthält eine Endo-PG_B und der Peak F eine Endo-PG_C.

Summary

A concentrate (PEKTINEX) of enzymes from *Aspergillus niger* was separated on cellulose phosphate into six components (A—F). Three of these (C, D, and F) were active towards either pectin or pectic acid, and were characterised with respect to substrate specificity, action pattern, optimum pH, isoelectric point, thermal stability, stability at different pH values, rate of hydrolysis and the pattern of oligomeric degradation products. Components D and F consisted of a single endo-PG_B and a single endo-PG_C respectively. Fraction C was a mixture of two different endo-PMG's, one PTE, one endo-PG_A, and one pectin-esterase.

Literatur

1. Lineweaver H. und Jansen E. F.: Adv. Enzym. **11**, 267 (1951).
2. Deuel H. und Stutz E.: Adv. Enzym. **20**, 341 (1958).
3. Fischer E.H. und Stein E. A.: The Enzymes (ed. Boyer P. D., Lardy H. und Myrbäck K.) **4**, 340, 307 (1960).
4. Wieland T. und Pfleiderer G.: Adv. Enzym. **25**, 330 (1963).
5. McClendon J. H. und Hess J. L.: J. Food Sci. **28**, 289 (1963).
6. McClendon J. H. und Kreisher J. H.: Anal. Biochem. **5**, 295 (1963).
7. Schubert E.: Helv. Chim. Acta **37**, 691 (1954).
8. Endo A.: Agric. and Biol. Chem. (Japan) **25**, 382 (1961).
9. McClendon J. H.: Biochim. Biophys. Acta **48**, 398 (1961).
10. Koller A.: Fraktionierung und Charakterisierung der pektolytischen Enzyme von *Aspergillus niger*. Diss. ETH, Zürich, 1966.
11. Borel E., Hostettler F. und Deuel H.: Helv. Chim. Acta **35**, 115 (1952).
12. Schubert E.: Schweizer Brauerei-Rundschau Nr. 3 und 4 (1951).
13. Koller A. und Neukom H.: Biochim. Biophys. Acta **83**, 366 (1964).
14. Webb J. L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Acad. Press, London **1**, 122 (1963).

La Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires, Paris, nous prie d'insérer l'annonce suivante:

Un symposium international sur les sources nouvelles de protéines dans l'alimentation humaine

se tiendra à Amsterdam, du *24 au 29 Novembre 1968*. Il est essentiellement consacré à l'étude des problèmes scientifiques, techniques et économiques se rapportant aux sources nouvelles de protéines d'origine animale (concentrés de poison, caséinates, etc...) et végétale (céréales, soja, arachides, algues, feuilles, etc...), aux levures alimentaires, aux amino-acides de synthèse et aux levures de pétrole.

Ce Symposium est organisé par la Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires (CIIA-ICAI) et le Bureau International Permanent de Chimie Analytique (BIPCA-PIBAC), avec le concours de l'Organisation Néerlandaise de la Nutrition et de la Technologie Alimentaire (Voorlichtingsbureau Voor de Voeding). Il bénéficie de la participation de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (OAA-FAO), de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS-WHO) et du Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (FISE-UNICEF).

Les travaux du Symposium auront lieu en français, anglais et allemand, avec interprétation simultanée.

Un droit d'inscription de 100 florins est à verser au Comité Néerlandais d'Organisation.

Pour recevoir tous renseignements concernant le Symposium s'adresser:

soit à la *Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires*, 18, Avenue de Villars, 75-Paris 7;

soit au Comité néerlandais d'organisation *Voorlichtingsbureau Voor de Voeding*, Laan Copes Van Cattenburch 44, La Haye 3.