Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 68 (1977)

Heft: 1

Rubrik: 88. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie am 10. und 11. September 1976 in Sursee, Kanton Luzern = 88ème Assemblée annuelle de la Société suisse de chimie analytique et appliquée les 10 et 11 septembre 1976 à Sursee, canton de Lucerne

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: 13.12.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 1—2 (1977)

88. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

am 10. und 11. September 1976 in Sursee, Kanton Luzern

Es freute uns, an der Versammlung 13 Gäste und Vertreter von Schwestergesellschaften und 3 Ehrenmitglieder begrüßen zu dürfen. Die Teilnehmerzahl betrug 208, davon 48 Damen, die sich zu unserer Freude zu uns gesellt hatten. Die Versammlung war durch ein besonderes Interesse für die Angelegenheiten der Gesellschaft geprägt. Die Schaffung eines Preises von Fr. 2000.—, der alle zwei Jahre einem jungen Schweizer Forscher verliehen werden soll, ist ein erfreuliches Ereignis. Dieser Beschluß läßt auf die ständige Vitalität unserer Gesellschaft schließen. Der Vorstand ist glücklich, sich bei den Teilnehmern der Jahresversammlung von Sursee im Namen der zukünftigen Preisträger zu bedanken. Er dankt den Organisatoren unserer 88. Jahresversammlung, die in einer sehr sympathischen Atmosphäre durchgeführt werden konnte, Herrn Dr. *Josef Wicki*, Kantonschemiker, und Herrn Dr. *Fridolin Roos* herzlich für ihre großen Bemühungen. Der administrative Bericht der Versammlung und das Reglement für den von unserer Gesellschaft ab 1978 verliehenen Preis werden im nächsten Heft unseres offiziellen Organes publiziert.

Für den wissenschaftlichen Teil war als Thema die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gewählt worden. Die gehaltenen zwei Hauptvorträge, der eine von Herrn Prof. *R. W. Frei* und der andere von Herrn Prof. *G. Terplan*, sowie die Kurzvorträge werden im folgenden publiziert. Wir sprechen den Referenten unseren besten Dank aus.

Der Sekretär:
A. Miserez

88ème Assemblée annuelle de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

les 10 et 11 septembre 1976 à Sursee, canton de Lucerne

Nous avons eu l'honneur de saluer à l'assemblée 13 invités et représentants de Sociétés soeurs et 3 membres d'honneur. Le nombre des inscriptions a été de 208, dont 48 dames que nous avons eu le plaisir de trouver parmi nous. L'assemblée a été marquée par un intérêt particulier pour les affaires de la Société. La fondation d'un prix de fr. 2000.— qui sera attribué tous les deux ans à un jeune chercheur de nationalité suisse est un événement réjouissant. Cet acte généreux laisse bien augurer de la vitalité de notre Société. Le comité est heureux d'adresser aux participants de l'assemblée annuelle de Sursee sa gratitude au nom des futurs lauréats. Il remercie très cordialement de leur dévouement Monsieur le Dr *Josef Wicki,* chimiste cantonal, et Monsieur le Dr *Fridolin Roos,* organisateurs de notre 88ème assemblée annuelle qui s'est déroulée dans une très agréable sympathie. Le compte rendu administratif de l'assemblée, ainsi que le règlement du prix décerné dès 1978 par notre Société seront publiés dans le prochain fascicule de notre organe officiel.

Le thème choisi de la partie scientifique était la chromatographie liquide à haute pression. Les deux conférences principales, l'une faite par le Prof. *R. W. Frei* et l'autre par le Prof. *G. Terplan,* ainsi que les communications brèves présentées sont publiées ci-après. Nous adressons nos vifs remerciements aux conférenciers.

Le secrétaire:
A. Miserez

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 3—16 (1977)

R. W. Frei, Analytische Forschung und Entwicklung, Pharmazeutische Abteilung, Sandoz AG, Basel

Allgemeine Aspekte der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Einleitung

Wir sind gegenwärtig Zeugen einer erstaunlichen Renaissance auf einem Gebiet der Chromatographie, das noch vor nicht allzu langer Zeit gegenüber der Gas- und Dünnschichtchromatographie (GC und DC) ein ziemliches Mauerblümchendasein gefristet hat. Die klassische Flüssig-Säulen-Chromatographie, die schon um die Jahrhundertwende durch Tswett eingeführt wurde, findet plötzlich aufgrund der jetzigen zur Verfügung stehenden Technologie einen wichtigen Platz im Konzert der physikalischen Trennmethoden. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie — kurz auch HPLC genannt — ist also nicht so neu, wie viele annehmen möchten. Die theoretischen Prinzipien sind mit wenigen Abweichungen die gleichen geblieben.

HPLC ist auch in den meisten Fällen nicht als Konkurrenz zu GC oder DC zu betrachten, sondern bietet echte Alternativen zu den beiden anderen Techniken, vor allem in Fällen, wo Substanzen mit niedrigem Dampfdruck (oder) geringer Temperaturstabilität oder Lichtempfindlichkeit getrennt werden sollen oder wo Automatisierung des Analysenvorganges gewünscht wird. In diesem Zusammenhang hat sich HPLC gerade für die pharmazeutische und biochemische Analytik als großer Segen ausgewirkt. Ich möchte nun einen kleinen Einblick in die verschiedenen Aspekte der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie geben.

Theorie

Wir unterscheiden Flüssig-flüssig- und Flüssig-fest-Chromatographie, wobei zur ersteren die Verteilung von zu trennenden Molekülen zwischen einer stationären und mobilen flüssigen Phase zu rechnen ist, idealerweise unter Ausschluß von Adsorption. Da dies jedoch in den wenigsten Fällen zutrifft, so ziehen wir den obigen Ausdruck der Bezeichnung «Verteilungschromatographie» vor.

Bei der Flüssig-fest-Chromatographie findet der Trennvorgang zwischen einer festen Materie und der flüssigen mobilen Phase statt. Auch hier sind meistens Mischmechanismen vorhanden, und der Ausdruck «Adsorptionschromatographie» ist in den wenigsten Fällen zutreffend. Die Vorgänge, die hier beim Trennvorgang eine Rolle spielen, sind von Faktoren wie Löslichkeit, Adsorption (vor allem Chemisorption), Wasserstoffbindungen, Komplexierung (metallbeladene Säule),

Lewis-Säure-Basen-Interaktionen (Ionenpaarchromatographie), Polarität usw. abhängig. Daneben gibt es spezielle Trenneffekte wie Molekularsiebeffekt, Ionenaustauschereffekt, spezielle Interaktionen auf chemisch gebundenen Phasen usw., wobei gerade bei den letzteren, wo auch «reserve phase» Chromatographie dazugehört, keine eindeutige Meinung herrscht, ob sie zur Verteilungschromatographie oder Adsorptionschromatographie zu zählen sind.

Eindeutiger ist auch hier eine Einteilung in die Gruppe Flüssig-fest-Chromatographie.

Eine spezielle Spielart für ganz selektive Trenneffekte liegt in der Affinitätschromatographie, wo z. B. auf Glaskügelchen chemisch gebundene Enzyme als Substrat dienen können,

Diese letztere Art wird gerade im Hinblick auf die zunehmende Komplexität der Aufgaben an Bedeutung gewinnen.

Es sollen nun die für die Praxis wichtigsten Begriffe kurz diskutiert werden.

Retention

Die Retentionszeit t_R (siehe auch Abb. 1) wird wie in der GC von der Einspritzzeit an gemessen. Retentionswerte werden auch als Kapazitätsfaktoren k′ angegeben (d. h. relativ zur nicht sorbierten Zeit t_0),

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = K \frac{V_s}{V_m} \qquad \text{(I)}$$

wobei der Wert t_0 (siehe Abb. 1) durch Beigabe einer nicht retardierten Komponente ermittelt wird (z. B. Dodezylbenzol in $CHCl_3$).

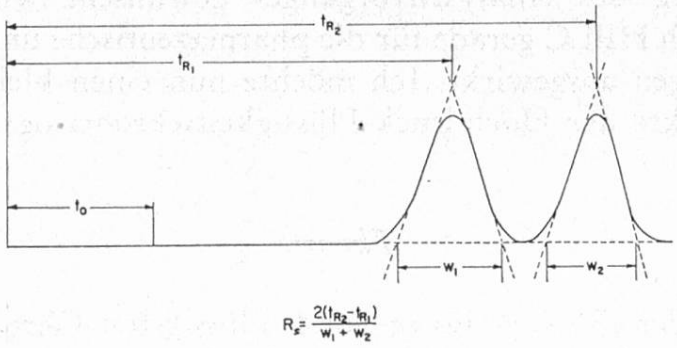


Abb. 1. Modellchromatogramm.

Eine direkte Beziehung zwischen Retention und Gleichgewicht, Säulenlänge L und Durchflußrate v ist in folgender Gleichung gegeben:

$$t_R = \frac{L}{v} (1 + k') \qquad \text{(II)}$$

Nach Gleichung I würde nun z. B. eine Vergrößerung der stationären Phase V_s eine Erhöhung von t_R zur Folge haben.

Auflösung (R_s)

In Abbildung 1 ist gezeigt, wie R_s als wichtiges Trennprinzip experimentell aus dem Chromatogramm ermittelt wird.

Ein Wert R_s von 1 würde einer 4 σ-Trennung entsprechen und ist für quantitative HPLC genügend. Bei Werten von unter 0,8 (Ca. 3 σ) wird eine quantitative Auswertung auch über Peakhöhe schwierig.

Die Abhängigkeit der Auflösung von fundamentalen chromatographischen Parametern ist in Gleichung III dargestellt:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k'}{1 + k'_2}\right) (N_2)^{1/2} \qquad \text{(III)}$$

α ist die relative Retention oder besser das Netto-Retentionsverhältnis zwischen zwei Komponenten. Es kann, wie aus der nächsten Gleichung ersichtlich ist, leicht aus dem Chromatogramm errechnet werden:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} \qquad \text{(IV)}$$

In Wirklichkeit ist α die thermodynamische Verteilungsdifferenz zweier Komponenten (siehe Gleichung V):

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \text{ in } \alpha \qquad \text{(V)}$$

wobei $\Delta(\Delta G^\circ)$ die Differenz in freier Verteilungsenergie darstellt. Mit einem Wert $\alpha = 1$ ist auch mit der besten Säule keine Trennung möglich. Kleine Aenderungen in $\alpha > 1$ können enorme Auflösungseffekte erwirken. In der großen Möglichkeit, α zu beeinflussen, liegt einer der Hauptvorteile der Flüssigchromatographie, z. B. auch der Dünnschichtchromatographie.

Der zweite wichtige Parameter ist N, die Anzahl theoretischer Böden. Gleichung VI dient zur Ermittlung von N aus einem Chromatogramm (siehe auch Abb. 1).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma_t}\right)^2 \qquad \text{(VI)}$$

σ_t ist die St.-Abweichung der Gauss-Kurve in Zeiteinheiten. Aus Gleichung III sieht man, daß R_s proportional zu $\sqrt{N}$ ist. Eine Erhöhung von N führt also zu einer Verbesserung der Auflösung. Auch eine Vergrößerung von k′ führt zu verbesserter R_s, dafür wird mehr Zeit für die Trennung benötigt. Ein Kompromiss ($k' \sim 1{,}5$—10) ist deshalb angebracht.

Oft ist es vorzuziehen, die effektive Bodenzahl N_{eff} zu ermitteln (siehe Gleichung VII), die, wie zu erwarten, von k′ abhängt.

$$N_{eff} = \left(\frac{k'}{1 + k'}\right)^2 (N) = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{w}\right)^2 = \left(\frac{t_R - t_0}{\sigma_t}\right)^2 \qquad \text{(VII)}$$

Es ergibt sich damit eine einfachere Gleichung für R_s.

$$R_s = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)(N_{eff})^{1/2} \qquad \text{(VIII)}$$

Aus Gleichung VIII ist zu ersehen, daß kleine Aenderungen von α große Aenderungen in der benötigten Zahl N_{eff} erwirken.

Nehmen wir als Beispiel, daß eine Auflösung $R_s = 1$ (4 σ-Trennung) gewünscht wird, so benötigen wir bei einem $\alpha = 1{,}01$ etwa 160 000 Böden; bei $\alpha = 1{,}05$ sind es noch 6 800 Böden, bei $\alpha = 1{,}10$ sind es 1 940 Böden usw.

Es wäre nun interessant zu sehen, bei welchen Trennproblemen welche Parameter zu verändern sind, um eine optimale Trennung zu erhalten. In Abbildung 2 sollte z. B. für Chromatogramm A das α verbessert werden; im Chromatogramm B sollte k′ vergrößert werden, um mehr N_{eff} zu kriegen. Im Chromatogramm C müßte eine Trennsäule mit größerer Bodenzahl N verwendet werden, da Aenderungen in α zwar 2 Peaks besser auflösen könnten, andere jedoch wieder zum Ueberlappen bringt.

Bodenhöhe (H)

Aus Gleichung IX ist ersichtlich, wie H aus dem Chromatogramm berechnet wird.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{L}{16}\left(\frac{w}{t_R}\right)^2 \qquad \text{(IX)}$$

Je kleiner der Wert H, desto besser ist die Trennleistung der Säule.

Interessant ist es nun, den Einfluß von Durchflußgeschwindigkeit der mobilen Phase v auf den Wert H zu ermitteln. Ein Vergleich solcher H vs v-Kurven für GC und HPLC ist in Abbildung 3 gegeben.

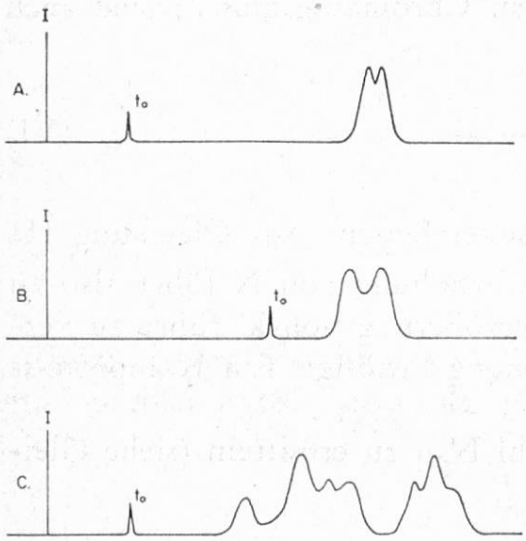


Abb. 2. Chromatogramme für verschiedene Problemtypen.

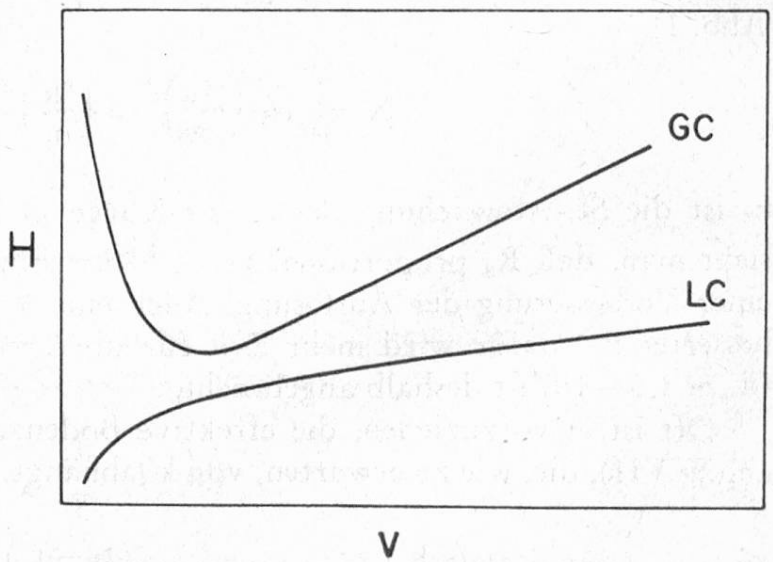


Abb. 3. Bodenhöhe H in Funktion der linearen Geschwindigkeit v der mobilen Phase.

Der Unterschied dieser Kurven ist vor allem auf die erheblich kleineren Diffusionsgeschwindigkeiten in Lösungen zurückzuführen. In einer guten HPLC-Säule ist der Trennverlust infolge erhöhtem v geringfügiger. Große v ermöglichen nun schnelle Trennungen ohne großen Verlust an Trennleistung, was einen großen Vorteil der HPLC ausmacht.

Wenn trotzdem bei hohem v eine Bandenverbreiterung stattfindet, so hängt das mit einer Tendenz zu langsamem Massentransfere zusammen, d. h. es entsteht auf der Säule eine Abweichung von einem idealen Gleichgewichtszustand. Diese Abweichungen können zum Teil auf langsame Diffusionsprozesse in der mobilen und vor allem in der stationären Phase zurückgeführt werden. Weitere Bandenverbreiterungen können auch durch Profilbildung aufgrund hoher Durchflußraten vorkommen. In diesem Sinne haben wir gegenüber der klassischen Säulenchromatographie Abweichungen zu erwarten.

Das Format dieser Arbeit gestattet natürlich keine intensive Betrachtung der Theorie. Abhandlungen verschiedener Schwierigkeitsgrade sind jedoch zur Genüge in der Literatur zu finden (1—5).

Apparatives

Es gibt heute schon eine stattliche Zahl kommerzieller Lieferanten von voll ausgerüsteten Geräten für alle möglichen Einsatzzwecke und in preislichen Varianten von wenigen tausend bis gegen 100 000 Franken. Lieferanten und Produzenten von Einzelbestandteilen ermöglichen auch leicht den Bau eigener Geräte, was heute noch in vielen Fällen zu empfehlen ist.

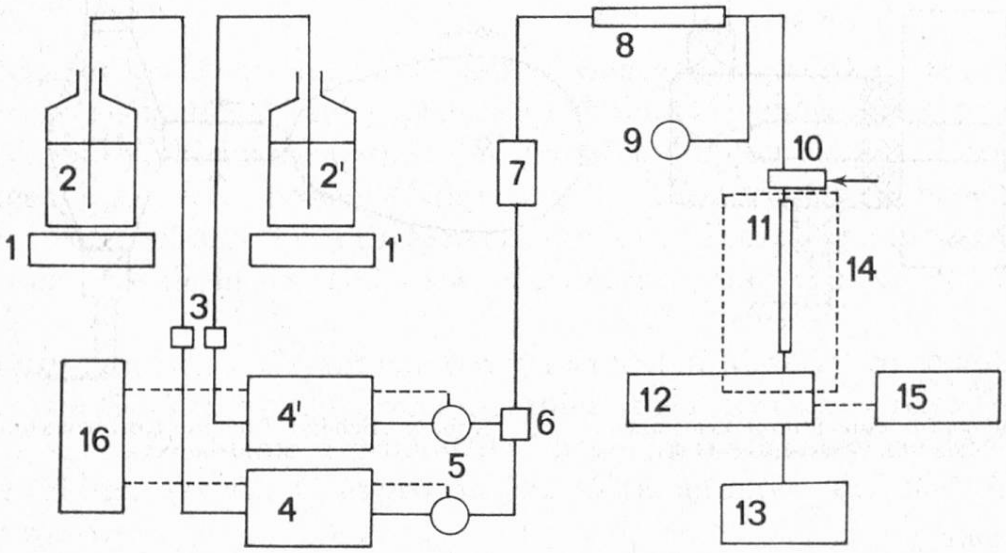


Abb. 4. Schematische Darstellung eines Flüssigchromatographen

1. Magnetrührer mit Heizplatte
2. Lösungsmittelvorrat
3. Filter
4. Pumpe
5. Strömungsmessung und -kontrolle
6. Mischkammer
7. Pulsationsdämpfung
8. Vorsäule
9. Druckmessung
10. Injektor
11. Trennsäule
12. Detektor
13. Fraktionensammler
14. Thermostatierung
15. Schreiber
16. Gradientensteuerung

Das Schema einer HPLC-Apparatur ist in Abbildung 4 dargestellt. Eine ausgezeichnete Diskussion der verschiedenen Komponenten wurde von *A. Wehrli* (6) anläßlich der Ilmac-Ausstellung in Basel 1974 präsentiert (siehe auch Literatur 1—5).

Ich möchte nun in der Funktionsreihenfolge die wichtigsten Komponenten kurz erwähnen:

Pumpen

Einige der Anforderungen, die an eine HPLC-Pumpe gestellt werden, sind chemische Resistenz, Lieferung genauer Durchflußvolumina, variabel von $^1/_{10}$ ml bis einige ml für analytische Zwecke, Druck und (oder) Flußkonstanz von 1—2% (evtl. mit Dämpfungsgliedern), Drucke bis zu mehreren 100 bar, evtl. kleine Totvolumina für schnellen Lösungsmittelwechsel (Gradientenelution).

Die Haupttypen, die eingesetzt worden sind:

Druckkonstante, pneumatische Pumpen mit direkter Gasdruckübertragung oder über einen Verstärkereffekt (Abb. 5), Spritzenpumpen mit mechanischem Schraubenantrieb, Reziprokpumpen des Membrantyps (Abb. 6) oder des Kolbentyps. Die Vor- und Nachteile dieser verschiedenartigen Pumpensysteme wurden schon früher ausführlich erörtert (6).

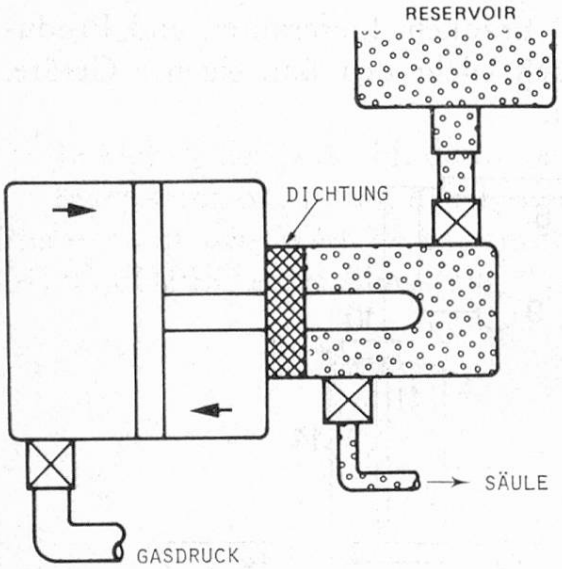


Abb. 5. Schema für eine Pumpe des pneumatischen Typs mit Verstärkereffekt.

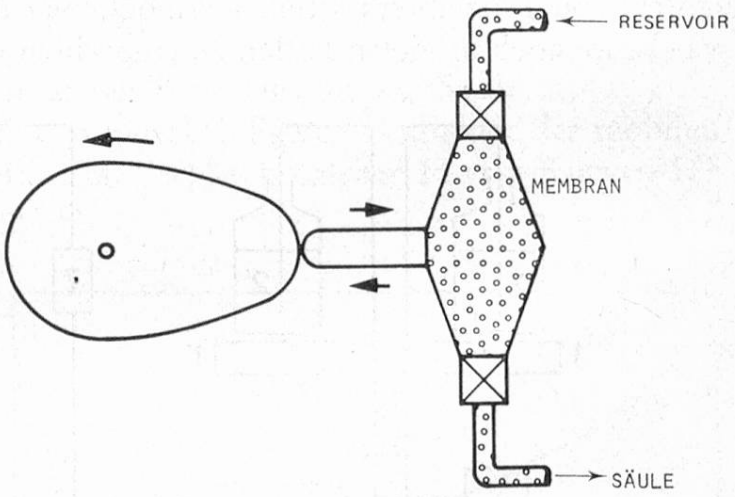


Abb. 6. Schema für eine Reziprokpumpe des Membrantyps.

Dosiersysteme

Aufgrund der niedrigen Diffusionskoeffizienten in der HPLC müssen wir darauf bedacht sein, Totvolumina möglichst niedrig zu halten, um Bandenverbreiterung zu minimalisieren. Diese Bedingung wird umso wichtiger, je kleiner die Säulen sind und muß beim Dosiersystem, bei Verbindungsteilen und bei der Detektion strengstens berücksichtigt werden.

Die Varianzen aufgrund der Totvolumeneffekte können sich wie folgt zusammensetzen:

$$\sigma^2{}_T = \sigma^2 \text{ Säule} + \underbrace{\sigma^2 \text{ Dosiersystem} + \sigma^2 \text{ Detektor} + \sigma^2 \text{ Verbindungsteile}}_{\text{«}\sigma^2 \text{ extra-column effects»}}$$

$\sigma^2{}_T$ ist dann ein Maß für die totale Bandenverbreiterung aufgrund der gesamten Totvolumina.

Andere Bedingungen, die an das Dosiersystem gestellt werden, sind gute Reproduzierbarkeit, Druckresistenz, Chemikalien- und Lösungsmittelresistenz, variable Dosiermenge, gute Spülbarkeit, einfache Handhabung und evtl. Automatisierung.

Wir unterscheiden zwischen verschiedenen Dosierverfahren:

a) Dosierspritzeninjektion einerseits über ein Septum und andererseits über «Stop-Flow»-Verfahren wurde zuerst eingesetzt. Bei der Septuminjektion können auch GC-Einspritzautomaten verwendet werden; dafür erfüllen Septa andere Bedingungen wie Druckresistenz und inertes Verhalten weniger gut.
b) Schlaufeneinspritzventile (Loops) kommen vermehrt in den Einsatz, da sie den idealen Bedingungen am nächsten sind. Daneben existieren auch sogenannte Schleusenverfahren, die eine variable Dosierung ohne Unterbrechung des Flüssigkeitstransportes bei hohen Drucken gestatten. Kürzlich wurde auch ein Rückschlagventilprinzip (wie bei Autoreifen) mit gutem Erfolg eingeführt.
Die Zukunft dürfte jedoch eher bei den Dosierschlaufen liegen, da diese neben anderen Vorteilen auch den der Automatisierbarkeit bieten (siehe auch Literatur 1, 2, 5, 6).

Säulenfüllmaterialien

Es soll nicht im Detail auf dieses Gebiet eingegangen werden, da dies zu weit führen würde. Prinzipielle Säulentypen wurden schon eingangs erwähnt. Es besteht heute der Trend zu kleinen Partikeln bis 2 μ ⌀ und damit auch zu kurzen Säulen mit wenigen mm Durchmesser. Damit werden Trennleistungen bedeutend verbessert (bis zu 75 000 Böden pro Meter) aber auch Totvolumenprobleme kreiert. Adsorbentien, wie sie in der DC verwendet werden, sind auch in der HPLC gebräuchlich.

Silikagele sind sicher die am meisten verwendeten Materialien sowohl für Adsorptions- wie für Verteilungschromatographie (oder gemischt). Kieselgele dienen auch als Träger für chemisch gebundene Phasen, wo verschiedene Molekültypen mit ausgewählten aktiven Gruppen an die Silanolgruppen der SiO_2-Oberfläche gebunden werden (7).

Bei Verwendung von langen Kohlenwasserstoffketten C_8—C_{18} und bei Polymerisationen auf den Kieselgelen entstehen hydrophobe Schichten, die als Oberflächen für «Reverse Phase»-Chromatographie dienen. Chemisch behandelte Phasen, zum Teil auch mit Enzymen oder Metallen beladen, werden in Zukunft für spezifische Trennprobleme vermehrt interessant sein. Glas, Kunststoff, Cellulose, Alumina, Kieselguhr u. a. sind weitere Materialien, die in der HPLC zum

Einsatz gelangen (siehe auch Literatur 2, 7, 8). Als großes Plus jedoch — gerade gegenüber der GC — ist die Flexibilität, die mit der Wahl der mobilen Phase gegeben ist, gerade auch im Zusammenhang mit Gradientenelution anzusehen.

Zur Säulenherstellung wäre noch zu sagen, daß bei Partikeln von ca. unter 15 µ Größe unbedingt Naßpackverfahren gebraucht werden sollten (9). Es ist jedoch heute schon ein relativ großes Angebot an Fertigsäulen auf dem Markt erhältlich.

Detektoren

Man kann sicher auf dem jetzigen Stand der Entwicklung sagen, daß die Detektion noch den schwächsten Punkt in der HPLC darstellt.

Die minimalen Anforderungen, die an einen HPLC-Detektoren gestellt werden, wie z. B.

— Detektionsgrenze $< 0{,}1$ µg/µl
— Linearität über mindestens 3 Größenordnungen
— sowohl in wässerigen als auch in organischen Lösungsmitteln anwendbar
— kommerziell erhältlich

sind auf höchstens drei Typen anwendbar, nämlich

— UV-(sichtbar)Spektrophotometer und -Photometer
— Fluoreszenzdetektor
— RI-Detektor.

Im Prinzip unterscheiden sich die ersten zwei Typen vom RI-Detektor darin, daß sie eine Eigenschaft der Probe messen, die die mobile Phase nicht oder nur geringfügig besitzt. Beim RI-Detektor hingegen wird die Kombination von Substanz und Träger übermittelt. Der letztere hat den Vorteil der größeren Universalität, UV- und Fluoreszenz-Detektoren hingegen den größerer Empfindlichkeit und geringer Temperatur- und Flußabhängigkeit und der Einsetzbarkeit in der Gradientenelution.

Bei der Konstruktion eines Fluoreszenzdetektors besteht immer noch das Problem eines guten Kompromisses zwischen Totvolumen der Zelle und guter Lichtausbeute.

Daneben ist die Forschung nach neuen Detektionsprinzipien in vollem Gange. Es werden neben den schon erwähnten Prinzipien auch elektroanalytische Methoden wie z. B. Leitfähigkeit, Aperometrie, Polarographie benutzt, die meines Erachtens eine gute Zukunft haben, da man viel von dem «know how» in nichtwäßrigen Medien adoptieren könnte.

Radioanalytische Detektion, Dampfdruckosmometrie, Messung von Aerosolladungen, Adsorptionswärmen, Dielelektrizitätskonstanten, Kombination HPLC-MS und vieles andere liegt an Ideen und Daten schon vor (siehe auch Literatur 1, 2, 5, 6).

Kurzfristiger dürfte das Detektionsproblem jedoch ziemlich aktuell bleiben. Als Zwischenlösung bietet sich eher Reaktionschromatographie an, wo ungünstige Moleküle den jetzigen Topdetektoren angepaßt werden (10).

Ueber die Datenerfassung und Auswertung soll hier nicht viel gesagt sein, da der gesamte GC-know how fast unverändert adoptiert werden kann.

Die Nützlichkeit der HPLC soll nun noch kurz an einigen speziellen Beispielen gezeigt werden.

Spezielle Anwendungen

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der HPLC sind soweit gediehen, daß fast in jedem Anwendungsgebiet Einsatzmöglichkeiten gegeben sind. Die Publikationsflut steigt denn auch rapide in Richtung Lösung spezifischer Probleme (siehe auch Literatur 1, 2, 5, 11, 12). In diesem Beitrag möchte ich mich auf drei spezielle Anwendungsgebiete in unseren Labors beschränken:

Kombinierte UV-Fluoreszenz-Detektion

Die Kombination verschiedener Detektoren, z. B. für UV und Fluoreszenz, kann analog zur GC erhebliche Selektivitätsvorteile bringen. In unseren Labors wurde dieser Aspekt u. a. am Beispiel von Thioridazin und Oxidationsprodukten untersucht, wobei zum Teil nicht vollständig aufgelöste Substanzen noch gut quantifiziert werden konnten (13). Ein Beispiel ist in Abbildung 7 gegeben. Die schwierig zu trennenden Substanzen 4 und 5 (Ringoxid und Mesoridazin) können beide über die kombinierte UV-Fluoreszenz-Detektion quantitativ ermittelt werden.

Gradientenelution

Die mobile Phase während eines Chromatogramms kontinuierlich zu variieren, gehört zu den wichtigsten Techniken in der HPLC und erweitert die Basis der Anwendungsmöglichkeit (14). Sie könnte in ihrer Bedeutung einem Temparaturgradienten in der GC gleichgestellt werden.

Entgegen der noch sehr weit verbreiteten Meinung, daß Gradientenelution teurer sei und für quantitative Analytik ungeeignet, haben wir in letzter Zeit zeigen können, daß auch mit einfachen Mitteln Gradientenelution mit anschließender quantitativer Auswertung durchgeführt werden kann. Es wurde zu diesem Zweck ein Stufengradient entwickelt, der es ermöglicht, auf der Niederdruckseite mobile Phasen mit unterschiedlicher Elutionskraft über ein automatisch gesteuertes Mehrwegventil durch die Säule zu pumpen (15) (siehe Abb. 8). Als Beispiel einer Trennung wird in Abbildung 9 die Trennung eines Extraktes von Sennablättern gezeigt. Die Reproduzierbarkeit dieser Trennung auf reversed phase Material ist so gut, daß die dabei interessanten Komponenten Sennoside A, B und C mit Standardabweichungen von $\sim 3\%$ rel. S. D quantifiziert werden konnten.

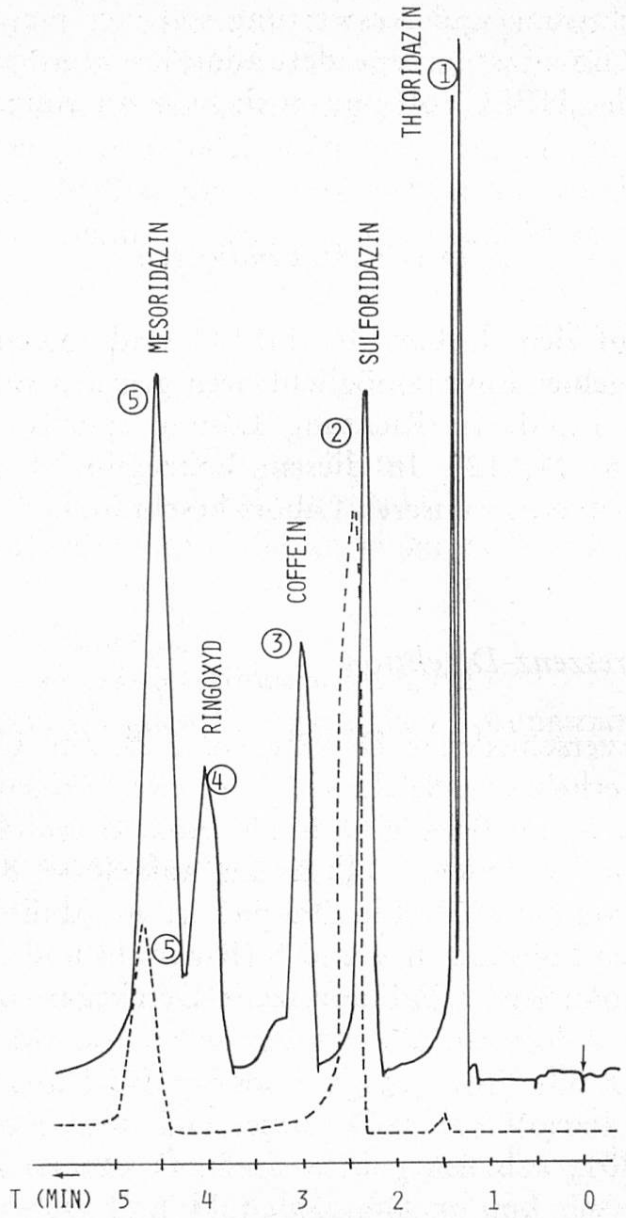


Abb. 7. Chromatogramm von Thioridazin und Abbauprodukten
——— UV-Detektion, — , — — Fluoreszenzdetektion
(Silikagel 10 μ; Isopropanol-Diisopropyläther-konz. Ammoniak 10:90:0,5 v/v).

Chemische Derivatisierung

Wie schon eingangs erwähnt, ist die Detektion gegenwärtig das schwächste Glied in der HPLC. Es liegt deshalb auf der Hand, Substanzen chemisch so zu modifizieren, daß sie für z. B. UV- oder Fluoreszenzdetektion besser geeignet sind. Der Einsatz solcher Techniken ist schon recht verbreitet und wird in einem kürzlich erschienenen Buch (10) beschrieben. Die Derivatisierung kann sowohl vor oder nach der Säule durchgeführt werden. Eine kurze Uebersicht über die Möglichkeiten der Anwendung solcher Verfahren wurde kürzlich veröffentlicht (16).

Ein Beispiel für eine Reaktion, die vor der Säule eingesetzt wurde, ist in Abbildung 10 gegeben.

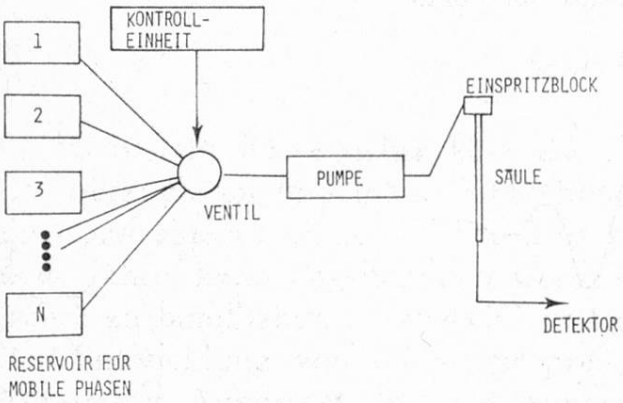


Abb. 8. Schema eines Stufengradienten.

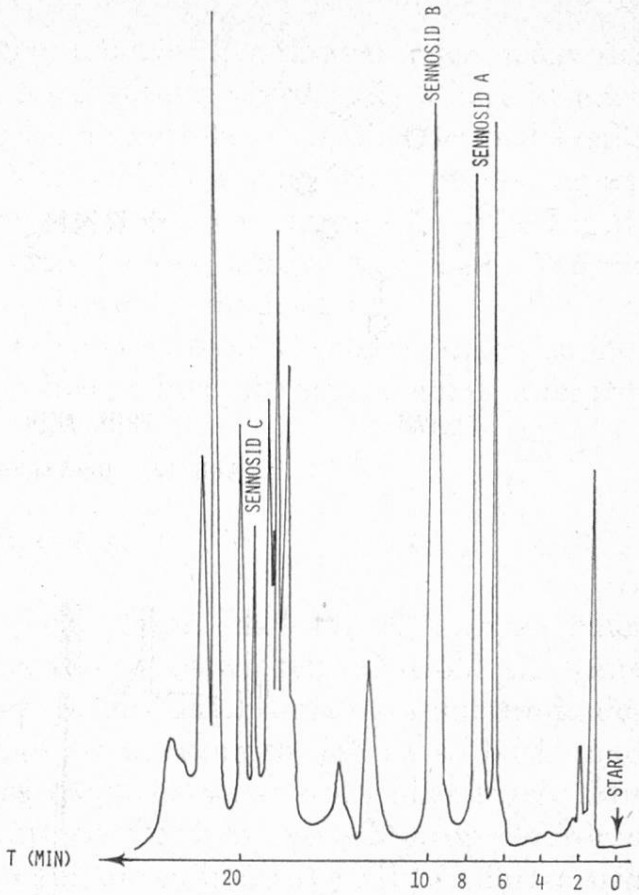


Abb. 9. Gradientenelution eines Sennaextraktes. (Nucleosil C_{18} 5 μ; Gradient Acetonitril/Wasser).

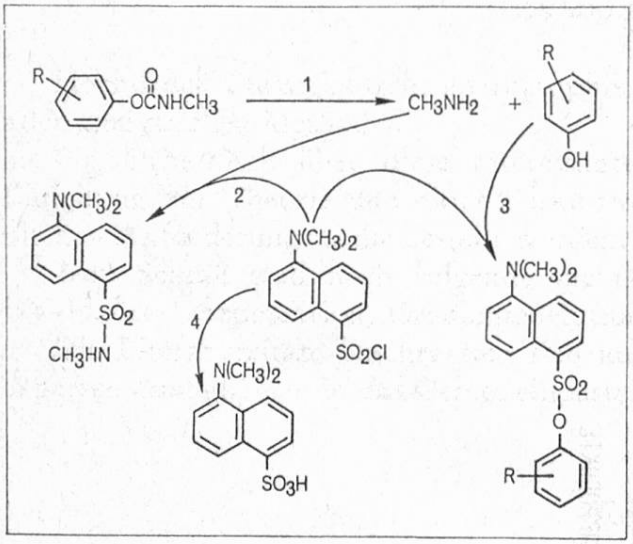


Abb. 10. Reaktion von N-methylcarbamaten mit Dansylchlorid.

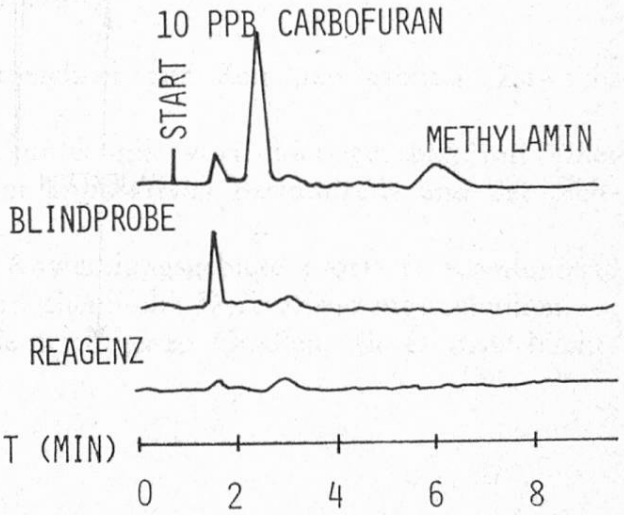


Abb. 11. Chromatogramm von dansyliertem Carbofuran in Wasser. (Zipax mit 5% BoP beladen; 5% Aethanol in Heptan).

Die Dansylierung von Carbamaten führt nicht nur zu einer Verbesserung der Empfindlichkeitsgrenze, sondern erhöht auch die Selektivität, so daß z. B. verschmutzte Wasserproben (siehe Abb. 11) direkt ohne Säulenvorreinigung analysiert werden können.

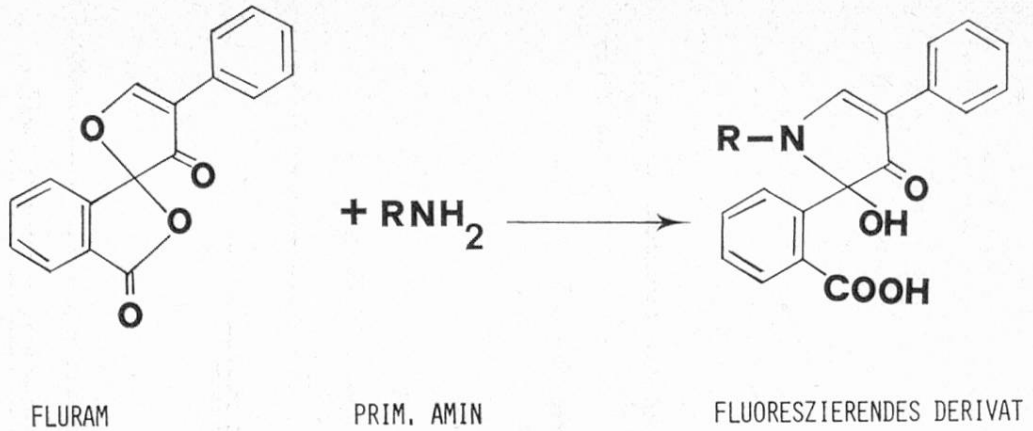


Abb. 12. Reaktionsschema von Fluram.

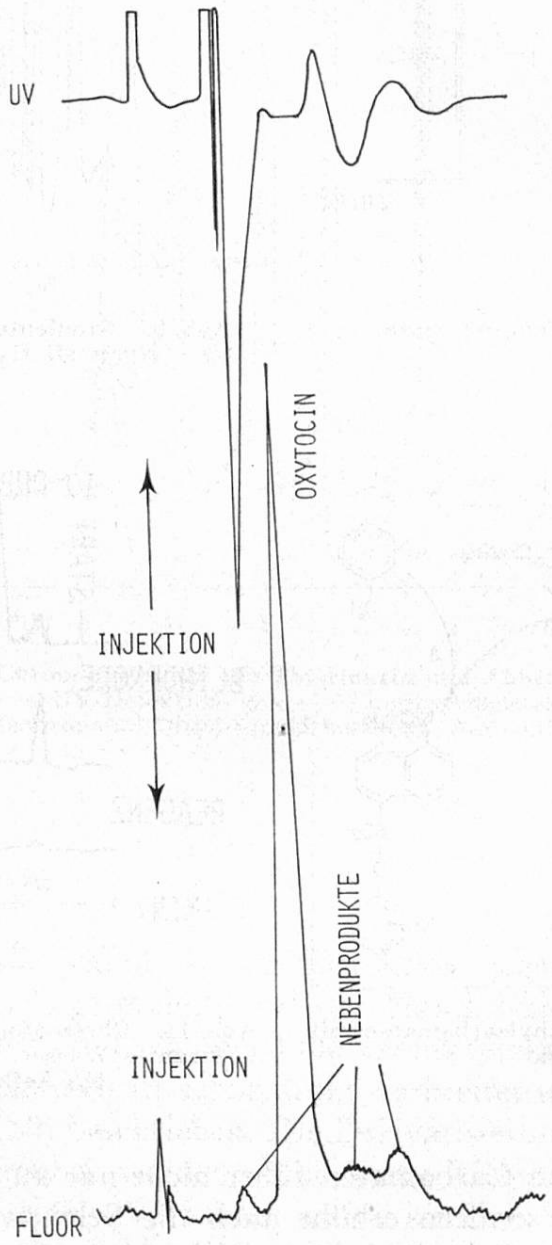


Abb. 13. Chromatogramm von Oxytocin und Nebenprodukten. Für die Fluoreszenzdetektion wurde nach der Säule Fluramlösung zugesetzt (Silikagel 10 μ, Tetrahydrofuran: 0,05 M, Essigsäure 100 : 50).

Bei geeigneten kinetischen Bedingungen können Reaktionen auch nach der Säule durch Zumischung von Reagenzien durchgeführt werden. Das Ziel ist auch dort vor allem eine Verbesserung der Detektionseigenschaften. Ein Beispiel hiefür ist in Abbildung 12 gegeben. Fluram, das hier selektiv auf primäre Aminogruppen eingesetzt wird, erfüllt die Bedingungen wie schnelle Kinetik und niedrige Eigenfluoreszenz in fast idealer Weise. In unseren Labors werden vor allem Peptide über diese Reaktion in hochfluoreszierende Derivate umgesetzt.

In Abbildung 13 ist die Trennung des Nonapeptides Oxytocin und von Begleitsubstanzen gezeigt. Die UV-Detektion bringt hier überhaupt keine interpretierbaren Resultate.

Schlußfolgerung

Es besteht heute sicher kein Zweifel mehr daran, daß HPLC sich zu einer der nützlichsten und meistgebrauchten Techniken entwickelt. Obwohl sie heute noch auf einem technischen Stand ist wie z. B. die Gaschromatographie Ende der 60er Jahre, kann angenommen werden, daß sie in wenigen Jahren so leicht und sicher zu handhaben ist wie GC und diese möglicherweise noch überflügelt. Mit der Entwicklung von einfachen preisgünstigen Geräten, von Mikroprozessoren gesteuerten Apparaten und von Apparaten für die präparative HPLC dürfte sich der Anwenderkreis erheblich vergrößern und auch Nichtspezialisten einschließen.

Zusammenfassung

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie verzeichnet zur Zeit den größten Zuwachs aller analytischen Methoden.

Ein Ueberblick über diese interessante Trenntechnik wird hier gegeben mit einer Einleitung zur Theorie und einer Diskussion der apparativen Bestandteile und der technischen Anforderungen, die gestellt werden.

Zum Schluß sind noch folgende spezielle Anwendungsgebiete erörtert: Kombinierte UV-Fluoreszenzdetektion, Gradientenelution und chemische Derivatisierungstechniken.

Die Literaturzitate beschränken sich auf die wichtigsten Quellen, die es dem Nichtexperten ermöglichen, in das Gebiet einzusteigen.

Résumé

La chromatographie liquide à haute pression connaît actuellement le plus grand développement de toutes les méthodes analytiques.

On donne ici un aperçu de cette très intéressante technique de séparation, ainsi qu'une introduction à sa théorie; on discute également de l'appareillage nécessaire et des exigences techniques qui se posent.

Pour terminer on examine les domaines suivants d'application spéciale de cette technique: détection combinée UV-fluorescence; élution par gradients; techniques chimiques de dérivation.

La bibliographie est limitée aux sources les plus importantes, permettant à celui qui ne le connaît pas de se familiariser avec ce domaine.

Literatur

1. *Kirkland, J. J.* (Ed.): Modern practice of liquid chromatography. J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1971.
   Snyder, L. R. and *Kirkland, J. J.* (Ed.): Introduction to modern liquid chromatography. J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1974.
2. *Engelhardt, H.:* Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie. Springer-Verlag, Berlin 1975.
3. *Karger, B., Snyder, L. R.* and *Horvath, C.:* An introduction to separation science. Wiley Interscience, New York 1975.
4. *Snyder, L. R.:* Principles of adsorption chromatography. Dekker, New York 1968.
5. Autoren von Varian AG: Basic liquid chromatography. Varian Aerograph, USA.
6. *Wehrli, A.:* Apparative Aspekte der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. Chimia **28**, 690 (1974).
7. *Grushka, E.:* Bonded stationary phases in chromatography. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor 1974.
8. *Majors, R. E.:* Support materials in HPLC. International Laboratory, Nov/Dec issue 11—35 (1975).
9. *Linder, H. R., Keller H. P.* and *Frei, R. W.:* A new slurrypacking technique for columns in high-speed liquid chromatography. J. Chromatog. Sci. **14**, 234—239 (1976).
10. *Lawrence, J. F.* and *Frei, R. W.:* Chemical derivatization in liquid chromatography. Elsevier, Amsterdam 1976.
11. *Brown, P. R.:* High pressure liquid chromatography, biochemical and biomedical applications. Academic Press, New York, London 1973.
12. *Done, J. N., Knox, J. H.* and *Loheac, J.:* Applications of high-speed liquid chromatography, J .Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto 1974.
13. *Lindner, W., Frei, R. W.* and *Santi, W.:* Combined ultraviolet-fluorescence detection in high-pressure liquid chromatography of pharmaceuticals. J. Chromatog. **111**, 365—371 (1975).
14. *Liteanu, C.* and *Gocan, S.:* Gradient liquid chromatography. Ellis Horwood Ltd., Chichester; J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1974.
15. *Erni, F.* and *Frei, R. W.:* A low-cost gradient system for high performance liquid chromatography. Arbeit vorgetragen am 2. Symposium für Flüssigchromatographie in Wilmington, USA, Mai 1976. J. Chromatog. **125**, 265—274 (1976).
16. *Frei, R. W.* and *Santi, W.:* Derivatization in modern liquid chromatography. Z. anal. Chem. **277**, 303 (1975).

Neue Adresse:

Prof. Dr. R. W. Frei
Institut für Analytische Chemie
Freie Universität Amsterdam
De Boelelaan 1085
Amsterdam- Buitenveldert
Niederlande

Mitt Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 17—27 (1977)

K. Schröder, G. Terplan und *L. Kotter*, Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Universität München

Fremdstoffproblem im Lebensmittel tierischer Herkunft unter spezieller Berücksichtigung der Antibiotika und Chemotherapeutika

Die Versorgung mit gesundheitlich einwandfreien Lebensmitteln gehört zu den fundamentalen Forderungen des Verbrauchers. Der Normalverbraucher unterstellt, daß Lebensmittel frei sind von gesundheitlich bedenklichen Gehalten an lebensmitteleigenen Toxinen, pathogenen Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten, Parasiten, Arzneimitteln, Wirkstoffen, Lebensmittelzusatzstoffen und Umweltchemikalien. Diese konkrete Erwartung des Verbrauchers und daraus abgeleitete Forderungen von Nulltoleranzen gingen über das real Mögliche ohne Zweifel hinaus. Außerdem ist zu bedenken, daß manche isoliert betrachteten hygienischen Gefährdungen geeignet sind, andere, größere hygienische Gefahren abzuwenden, so daß ohnehin nur eine Interessen- und Gefahrenabwägung sachgerecht ist. Wollte man emotionelle «Verbraucherpräferenzen» zur Richtschnur der Lebensmittelbeurteilung machen, wäre im übrigen eine geordnete Versorgung mit Lebensmitteln heute ausgeschlossen.

Es ist daher zunächst festzustellen, daß beachtliche Verbrauchererwartung hier nur das sein kann, was der vernünftige, ausreichend und sachgerecht informierte Verbraucher berechtigterweise erwarten kann. (Daß die Frage der Zumutbarkeit unter regionalen oder zeitlichen Zwängen u. U. unterschiedlich bewertet werden muß, kann hier außer Betracht bleiben.)

Diese Klarstellung schmälert selbstverständlich keineswegs die Berechtigung der Forderung des Verbrauchers, daß vermeidbare gesundheitliche Gefährdungen durch Lebensmittel ausgeschlossen werden. Da der Verbraucher die gesundheitlichen Gefahren, die von Lebensmitteln ausgehen, in der Regel nicht erkennen und schon deshalb nicht ausreichend respektieren kann, ist der Staat verpflichtet, ausgewogene Schutzmaßnahmen zu treffen.

Zunächst aber zu den Gefahren im einzelnen:

Lebensmitteleigene «Toxine» — ohnehin meist ein mehr quantitatives Problem — spielen bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs eine weit geringere Rolle als bei pflanzlichen Lebensmitteln. In den Lebern bestimmter Polartiere hat z. B. das im Uebermaß vorhandene Vitamin A toxische Wirkung. Bestimmte Fische enthalten echte Toxine. Diese für bestimmte Regionen relevanten Fälle können hier außer Betracht bleiben.

Anders ist es mit *pathogenen Mikroorganismen und Parasiten.* Mikroorganismen können von Tieren stammen, aus denen Lebensmittel gewonnen werden, von Menschen, die Lebensmittel behandeln, oder aus der Umgebung. Parasiten stammen meist von Tieren, gelegentlich aus der Umwelt.

Da gesundheitlich bedenkliche Mikroorganismen und vielfach auch der Verdacht auf das Vorliegen solcher Keime nicht nur von den Konsumenten, sondern auch von Gewerbetreibenden in der Regel nicht erkannt werden können — sie können meist nur allgemeine Verderbniserscheinungen registrieren —, war es notwendig, den Schutz der Verbraucher teilweise durch besondere staatliche Maßnahmen zu erhöhen. Abgesehen von allgemeinen Seuchenschutzvorschriften sei nur an die obligate amtliche Untersuchung der Schlachttierkörper — eine amtliche Warenfreigabeprüfung — und an den Milcherhitzungszwang erinnert. Man darf jdeoch nicht glauben, daß durch solche Maßnahmen alle Gefahren beseitigt sind. Es verbleibt immer noch ein beachtliches Restrisiko. Der Tauglichkeitsstempel bei Tierkörpern, die die Fleischbeschau passiert haben, besagt nicht, daß bei der vorausgegangenen Prüfung alle denkbaren Gefahren ausgeschaltet worden sind. Die Fleischbeschau ist auf reale Möglichkeiten abgestimmt. Sie basiert u. a. auf der Unterstellung, daß auch bei der Produktion der Tiere bereits das Mögliche getan worden ist, um die Gewinnung von gesundheitlich unbedenklichem Fleisch zu begünstigen. Erst auf dieser Grundlage kann sich die Fleischbeschau auf Schwerpunkte konzentrieren und damit unverhältnismäßig hohe Verteuerungen des Fleisches vermeiden.

Im Hinblick auf Krankheitserreger erfolgt derzeit im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Schlachttier- und Fleischuntersuchung zuerst eine Adspektion der lebenden Schlachttiere, um etwaige klinische Krankheitserscheinungen zu erfassen, und nach der Schlachtung eine makroskopische pathologisch-anatomische Untersuchung des Tierkörpers und der Organe. Eine zusätzliche mikroskopische Untersuchung der Muskulatur ist für solche Tiere vorgeschrieben, die Trichinenträger sein können. Ergänzende bakteriologische Untersuchungen von Tierkörperteilen sind für Fälle vorgesehen, in denen bestimmte klinische Erscheinungen oder pathologisch-anatomische Veränderungen einen besonderen Verdacht auf das Vorliegen von pathogenen Keimen begründet haben. Die Art und der Umfang der Untersuchungen an Schlachttieren, Tierkörpern und Organen sind also auf das praktisch Mögliche abgestellt.

Es gibt Zoonosen, die bei der amtlichen Fleischuntersuchung aufgrund spezifischer oder wenigstens deutlicher pathologisch-anatomischer Veränderungen leicht zu erfassen sind. Als Beispiel sei die Tuberkulose genannt, die beim Rind in den verschiedenen Verlaufsformen aufgrund makroskopisch erkennbarer, pathologisch-anatomischer Veränderungen unschwer zu diagnostizieren ist.

Andere Zoonosen können dagegen einer Erfassung im Rahmen der Fleischbeschau entgehen, weil sie gelegentlich weder ausgeprägte klinische Erscheinungen auslösen noch ausgeprägte pathologisch-anatomische Veränderungen bedingen. Zu diesen gelegentlich schwer erkennbaren Zoonosen zählen wir *Salmonellosen,* die nach wie vor ein ernstes lebensmittelhygienisches Problem darstellen. Durch bakteriologische Untersuchungen aller verdächtigen Schlachttierkörper werden massive Salmonella-Infektionen praktisch restlos erfaßt. Latente Infektionen können jedoch unentdeckt bleiben.

Geflügel ist besonders häufig mit Salmonellen behaftet. Allerdings scheint hier der Anteil an salmonellahaltigen Tierkörpern im Verlauf der Schlachtung und der

Bearbeitung durch sekundäre Kontamination stark anzusteigen. Es sei nur an die in manchen Geflügelschlachtbetrieben verwendeten Eiswasserkühler erinnert, in denen symbolisch vorgewaschene Tierkörper in stehendem Wasser gekühlt und gesäubert werden. Daß bei solchem Vorgehen Kreuzkontaminationen möglich sind, steht außer Zweifel. Intensivierung der Bestandsüberwachung, Verbesserung der Schlachthygiene und Einführung einer sachverständigen, amtlichen Geflügeluntersuchung vor und während der Schlachtung sind wesentliche Voraussetzungen für eine Reduzierung der Salmonella-Funde. Daß nicht jeder einzelne Geflügel-Schlachtkörper mit gleicher Intensität untersucht werden kann, wie z. B. ein geschlachtetes Rind, liegt auf der Hand. Beim Geflügel ist es jedoch viel eher als bei anderen Tierarten möglich, Bestandskontrollen in die fleischhygienische Bewertung einzubeziehen.

Beim Wild ist die Situation ebenfalls problematisch. Die Notwendigkeit der Einbeziehung des Wildbrets in eine amtliche Kontrolle ergibt sich aus der Tatsache, daß viele Krankheiten der Haustiere auch in den Wildbeständen anzutreffen sind. Man wird im Rahmen entsprechender Wildfleischhygiene-Vorschriften nicht umhin können, den Jagdberechtigten weitergehende Auflagen zu machen. Ob dabei das erlegte und für die gewerbliche Verwertung bestimmte Wild generell einer amtlichen Untersuchung zugeführt werden sollte oder ob es genügt, wenigstens die Tiere vorzustellen, die sich anomal verhalten haben oder bei denen krankheitsverdächtige Veränderungen vorliegen, muß noch diskutiert werden.

Für Wildimporte hat die BRD bereits eine allgemeine Untersuchungspflicht eingeführt, die sich auf alle Haarwildarten erstreckt. Wettbewerbsrechtlich nimmt es sich allerdings schlecht aus, daß für den nationalen Bereich der BRD keine analoge Regelung besteht.

Natürlich läßt sich auch hier — ähnlich wie beim Geflügel — fragen, wo sind die gesundheitlichen Schäden bei Menschen, die nachweislich auf Wildfleischgenuß zurückzuführen sind. Diesem Vorhalt kann damit begegnet werden, daß viele menschliche Erkrankungen so verlaufen, daß nachträglich nicht mehr festzustellen ist, ob sie mit der Behandlung oder dem Verzehr eines Lebensmittels in Zusammenhang stehen. Potentielle Gefahren sind deshalb durch prophylaktische Maßnahmen überall zu respektieren, wo dies unter realen Umständen möglich ist.

Unter eben diesen Gesichtspunkten ist z. B. auch bemerkenswert, daß bei uns trotz des Vorkommens von Toxoplasmen in Schweinefleisch und trotz der Schwierigkeiten, diese bei der Fleischbeschau zu erfassen, weder vor dem Verzehr von rohem Schweinefleisch, z. B. in Form von Schweinemett gewarnt wird, noch eine Vorschrift besteht, solche Produkte ausschließlich aus gefrorenem Schweinefleisch herzustellen, nachdem Toxoplasmen durch einen entsprechenden Gefrierprozeß sicher abzutöten sind.

Auch dieses Beispiel zeigt, daß sich Fleischhygiene nicht in der Schlachttier- und Fleischbeschau erschöpfen darf.

Bei der Milch sind die Probleme einer gesundheitlichen Gefährdung durch pathogene Makroorganismen dadurch entschärft, daß hier die gesetzlich vorgeschriebene Pasteurisierung einen wirksamen Schutz bietet. Allerdings sollte der

Erhitzungszwang nicht als Alibi für mangelnde Gewinnungshygiene dienen. Und es ist auch zu bedenken, daß in der erhitzten Milch Eigeninhibine und mikrobielle Antagonisten von unerwünschten Keimen abgetötet sind, so daß erhitzte Milch für Sekundärkeime einen besonders günstigen Nährboden darstellt.

In letzter Zeit haben Milchhygieniker Sorge wegen der *Mykotoxine*, die über aflatoxinhaltige Futtermittel in die Milch gelangen können. Ohne Zweifel bedarf diese Frage verstärkter Aufmerksamkeit; denn daß die Aflatoxine in gewissen pflanzlichen Lebensmitteln in weit höheren Mengen gefunden werden, ist ein schwacher Trost.

Von anderen *«biogenen» Rückständen,* die allerdings erst durch mikrobielle Aktivität in Milch und vor allem in Milchprodukten entstehen können, seien die biogenen Amine genannt. In Käse entstehen z. B. aus freigesetztem Histidin und Tyrosin durch Decarboxylierung Histamin und Tyramin. Der originäre Gehalt an Histamin und Tyramin in Lebensmittelrohstoffen ist im allgemeinen niedrig. Durch die Tyrosindecarboxylase des Sc. faecalis kann jedoch vor allem in Milchprodukten eine beachtliche Menge an Tyramin gebildet werden. Erhöhte Mengen in biogenen Aminen können beim Menschen vor allem dann Krankheitserscheinungen hervorrufen, wenn die in der Darmwand lokalisierten Monoaminooxidasen, die die Amine entgiften, durch bestimmte Pharmaka gehemmt werden. Derartige Monoaminooxidasen-Inhibitoren werden vor allem in der psychiatrischen Praxis verwendet (Nialamid, Tranylcypromin, Phenylhydrazin u. a.). Aber auch durch einige andere Medikamente wie Furazolidon und Iproniazid sind Personen bei Aufnahme von biogenen Aminen besonders gefährdet.

Aminhaltige Lebensmittel sind angesichts der möglichen Nitrosamin-Entstehung im übrigen auch dann besonders kritisch, wenn diese zusammen mit Lebensmitteln hocherhitzt werden, die nitrosierende Substanzen enthalten (z. B. nitrithaltige Fleischerzeugnisse oder Spinat), oder wenn, wie bei zahlreichen Schnittkäsen, von vornherein gleichzeitig Nitrat und damit auch Nitrit vorliegt.

Doch nun zu dem Problem, das uns derzeit besonders beschäftigt, nämlich zu den *Rückständen von pharmakologisch wirksamen Stoffen,* die bei der pflanzlichen und tierischen Produktion bewußt verwendet werden. Daß der Ausschluß von Rückständen irreal wäre, wurde einleitend bereits klargestellt. Außerdem gibt es Futtermittelzusätze, die nicht nur völlig harmlos sind, sondern sogar erwünschte Bereicherungen des natürlichen Futters darstellen und auch im späteren Lebensmittel positiv zu bewerten sind. Man müßte also von einer Ablehnung solche Rückstände ausnehmen, die im Lebensmittel erwünscht sind. Die eingeschränkte Forderung, wonach in Lebensmitteln keine Rückstände von Futtermittelzusätzen enthalten sein dürfen, die nicht erwünscht sind, ist sympatisch, denn eine Beschränkung auf solche Rückstände, die erwiesenermaßen geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu schädigen, ist zu wenig.

Es sei daran erinnert, daß es in der BRD angesichts der Schwierigkeiten beim zeitgerechten Nachweis von Eignungen zur Schädigung der menschlichen Gesundheit notwendig geworden war, bezüglich aller Lebensmittelzusatzstoffe das Verbotsprinzip einzuführen, so daß angesichts der damit verbundenen Beweislast-

verlagerung vor der Anwendung eines Stoffes — die nun eine Zulassung voraussetzt — dessen Unbedenklichkeit erwiesen sein muß.

Nicht anders kann dies z. B. mit Futtermittelzusätzen gehandhabt werden, die nicht dazu bestimmt sind, im verzehrsfertigen Lebensmittel noch vorhanden zu sein. Solche Futtermittelzusätze sind nur dann technische Hilfsstoffe (auch im Sinne von § 4 b Nr. 3 unseres früheren LMG*), die bei der tierischen Produktion — wenn man die Futtermittelgesetzgebung einmal ausklammert — ohne Zulassung verwendet werden können, wenn sie bis zum Verzehr des Lebensmittels nicht mehr vorhanden sind oder nur noch in technisch unvermeidbaren, hygienisch und gesundheitlich unbedenklichen Mengen.

Problematisch sind nun aber die Fragen, wo im Einzelfall die Grenze zwischen technisch vermeidbar und technisch unvermeidbar ist und wo die hygienische Bedenklichkeit beginnt.

Schon für Sachverständige ist es meist schwer, die Eignung eines Stoffes zur Gesundheitsschädigung zu erkennen oder gar eindeutig zu beweisen. Es ist deshalb dringend notwendig, in einschlägigen Rechtsvorschriften Kriterien festzulegen, nach denen das Vorliegen dieses Tatbestands beurteilt werden kann. Konkret war es in der BRD bislang nur verboten, den Tieren vor der Schlachtung Antibiotika zu verabreichen, um die Haltbarkeit des Fleisches zu verlängern, und den Tieren Stoffe mit oestrogener oder thyreostatischer Wirkung zu verabfolgen, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beinflussen. Der Gesetzgeber hatte damit die Vermutung rechtlich fixiert, daß diese Stoffe — in bestimmten Dosierungen — geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu schädigen. Angesichts der Vielfalt von Stoffen, die in der tierischen Produktion eingesetzt werden, wurde unser Lebensmittelgesetz inzwischen ergänzt. Nun darf überhaupt kein von Tieren gewonnenes Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht werden, wenn es Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte enthält oder wenn festgesetzte Höchstmengen an solchen Stoffen überschritten werden. Soweit für bestimmte Stoffe mit pharmakologischer Wirkung keine Wartezeiten zwischen letzter Verabreichung und der Schlachtung festgelegt sind, beträgt die Frist mindestens 5 Tage. Aehnliche Regelungen bestehen schon längere Zeit für die Gewinnung und die Verwertung von Milch. Die neuen Vorschriften für Schlachttiere werden allerdings nur dann den erwarteten Effekt haben, wenn die Ueberwachungsorgane die zusätzlichen Aufgaben wirklich verkraften und wenn die Erzeuger von Schlachttieren mehr als in der Vergangenheit zur Mitarbeit bereit sind. Es besteht bei den Tierproduzenten noch immer die Neigung zu unterstellen, daß alle hygienischen Mängel bei der Fleischbeschau erfaßt werden. Eine so weitgehende Alibifunktion der Fleischbeschau ist nachdrücklich abzulehnen, weil sich die Fleischbeschau auf sichtbare Mängel konzentriert, und lediglich beim Vorliegen von bestimmten Verdachtsmomenten oder Informationen weitergehende Untersuchungen veranlaßt werden. Der Tierproduzent kann aus der Fleischbeschau keine Rechtfertigung eines Untätigseins ableiten, wenn

* § 11 (2) Nr. 1 des am 11. Januar 1975 in Kraft getretenen Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes.

ihm Fakten bekannt sind, die für die hygienische Beurteilung eines Tieres möglicherweise oder tatsächlich wesentlich sind. U. E. kommen wir in der Rückstandsfrage nicht weiter, wenn der Tierproduzent nicht ausdrücklich zur Information gegenüber dem Fleischbeschautierarzt verpflichtet wird, zumal auch die in manchen Ländern obligaten Wartezeiten für jede Normalschlachtung bei uns nicht zu realisieren wären. Die bei uns für Arzneimittel und Futtermittelzusätze vorgesehenen selektiven Wartezeiten bringen ohne Zweifel eine gewisse Verbesserung; es ist jedoch zu bedenken, daß Wartezeiten bei Notschlachtungen oder Krankschlachtungen u. U. sogar ignoriert werden müssen. Bisher ist auch eine notwendig werdende Unterschreitung der Wartezeit nicht meldepflichtig.

Besonders unklar ist die Situation in den Bereichen, in denen sich nutritive Wirkung und medikamentelle Prophylaxe und Therapie überschneiden. So werden heute in größerem Umfang *organische Arsenverbindungen* (z. B. Arsanilsäure) gegen die Vibrionen-Enteritis der Schweine und *Imidazolderivate* (z. B. Emtryl) gegen Infektionen des Darmes jüngerer Schweine mit Protozoen verwendet. So ganz nebenbei fördern diese Stoffe ebenso wie Antibiotika- oder Coccidiostatikazusätze zum Futter das Wachstum und verbessern auch die Futterausnützung. Rückwirkungen auf die grobgewebliche Zusammensetung des Tierkörpers sowie die Fleischbeschaffenheit werden ebenfalls vermutet.

Daneben sind *Oestrogene* und *Thyreostatika* zu erwähnen, die in der tierischen Produktion im Hinblick auf eine Erhöhung des Fleisch- und Fettansatzes noch immer einen breiten Anwendungsbereich haben. Oestrogenwirksame Substanzen sind in diesem Zusammenhang besonders bedenklich, da sie den Schlachttieren z. T. als Depotpräparate verabreicht werden und dann bei der Schlachtung noch nicht vollständig resorbiert sind oder sogar abgekapselt im Unterhautgewebe vorliegen.

Im Vordergrund stehen noch immer Rückstände der *Antibiotika* in Fleisch oder anderen tierischen Erzeugnissen, die auf therapeutische, prophylaktische oder nutritive Maßnahmen zurückzuführen sind. Die Notwendigkeit des therapeutischen Einsatzes von Antibiotika bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist heute ebenso unbestritten wie die Notwendigkeit des Antibiotikaeinsatzes beim Menschen. Rückstände in Fleisch nach therapeutischer Antibiotikaanwendung sind vor allem dann zu erwarten, wenn die Tiere kurz danach not- oder krankgeschlachtet werden müssen. Problematisch ist die prophylaktische Verabreichung von hohen Antibiotikadosen; sofern die Antibiotika nicht gezielt und kontrolliert zur Vorbeugung gegen mögliche Infektionen, z. B. Stallwechsel junger Tiere, krassen Aenderungen in Fütterung und Haltung sowie als individueller Infektionsschutz in bereits teilweise erkrankten Beständen eingesetzt werden, ist die prophylaktische Anwendung hoher Antibiotikadosen a priori bedenklich. Hierzu zählt insbesondere die prophylaktische Antibiotikaapplikation, um Auswirkungen eines Transportstresses auszuschließen oder bestehende Erkrankungen, z. B. bis zur Ablieferung der Tiere im Schlachthof, zu überdecken. Auch die ungezielte und unkontrollierte Antibiotikaverabreichung ist hier zu erwähnen, die von Tierproduzenten selbst durchgeführt wird. Sie erfolgt meist in der Annahme, daß auf diese Weise auf die Beiziehung eines Tierarztes verzichtet werden kann oder daß

Wachstum und Futterverwertung der Tiere nach dem Motto «viel hilft viel» zu steigern sind. Der graue bzw. schwarze Arzneimittelmarkt, über den der Tierbesitzer bisher problemlos an die erforderlichen Antibiotika kommen konnte, dürfte eine erhebliche Mitschuld an der aktuellen Rückstandssituation haben.

Als dritte Möglichkeit der Antibiotikaanwendung in der tierischen Produktion verbleibt noch der nutritive Einsatz geringer Dosen über Vermischungen mit Futtermitteln. Ueber die Notwendigkeit einer solchen Prophylaxe bestehen angesichts der gesundheitlichen und wirtschaftlichen Probleme in der modernen Tierproduktion kaum Zweifel. Fütterungsantibiotika sind allerdings kein Ersatz für hochwertige Futtermittel und für hygienische Haltungsbedingungen.

Inzwischen wurden in der BRD die Zahl der zur Fütterung zugelassenen Antibiotikapräparate drastisch eingeschränkt, die Wartezeiten zwischen letzter Verabfolgung und Schlachtung festgelegt und schließlich die pro kg Futter zugelassenen Antibiotikamengen z. T. erheblich reduziert.

Ein unmittelbares Risiko von Antibiotikarückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs für die Gesundheit des Konsumenten konnte konkret nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden, z. B. in Form von allergischen Reaktionen nach Aufnahme antibiotikahaltiger Milch. Toxische Schäden, wie sie nach therapeutischer Antibiotikaanwendung beobachtet wurden, sind beim Verzehr antibiotikahaltiger Lebensmittel nicht zu erwarten. Dagegen verdient die vermehrt zu beobachtende Resistenzbildung verschiedener Darmkeime gegenüber bestimmten Antibiotikaarten besondere Aufmerksamkeit. Nach den Ermittlungen einer WHO-Arbeitsgruppe ist mit der Entstehung bakterieller Resistenz insbesondere beim Einsatz von Chloramphenicol, Aminoglycosid-Antibiotika, Tetracyclinen und Penicillinpräparaten zu rechnen. Da resistente pathogene Keime vom Tier durch direkten Kontakt bzw. mittels sogenannter Vehikel auch auf den Menschen übertragen werden können, sollte beim Tier auf die genannten resistenzbildenden Antibiotika, jedenfalls im nichttherapeutischen Bereich, verzichtet werden, zumal gleichwertige andere Wirkstoffe zur Verfügung stehen, bei denen keine ähnlichen Nebeneffekte beobachtet wurden (Bacitracin, Flavomycin, Virginiamycin, Carbadox und ähnliches). Ohne damit die Notwendigkeit entsprechender Aktivitäten auf dem Lebensmittelsektor schmälern zu wollen, sei in diesem Zusammenhang noch bemerkt, daß maßgebliche Humanmediziner die Meinung vertreten, daß das vermehrte Vorkommen antibiotikaresistenter Keime vor allem mit dem noch immer sehr großzügigen Einsatz der Antibiotika in der Humanmedizin zusammenhängt.

Gleichzeitig sei aber auch noch erwähnt, daß Antibiotikarückstände in Lebensmitteln bakteriologische Untersuchungen (z. B. im Rahmen der Fleischbeschau) und damit die Aufdeckung von Infektionen erschweren können.

Neben den gesundheitlichen Problemen, die sich aus der unsachgemäßen Anwendung der Antibiotika in der tierischen Produktion ergeben haben, sind auch negative Auswirkungen auf die Lebensmittelproduktion zu erwähnen. Es sei an Störungen bei der Herstellung bakteriell-fermentierter Milch- und Fleischerzeugnisse erinnert.

Die Einführung eines bakteriologischen Hemmstofftests im Rahmen der bakteriologischen Untersuchung zur Erfassung von Antibiotikarückständen im Fleisch hatten wir vor 15 Jahren vorgeschlagen. Erst als die Antibiotikaanwendung bei der tierischen Produktion noch weitere Kreise gezogen hatte und empfindlichere Testmethoden nun auch die in erhöhter Menge zugelassenen nutritiven Dosen erfaßten und dadurch in der Oeffentlichkeit ein verzerrtes Bild über eine vermeintlich überwiegend illegale Anwendung der Antibiotika entstanden war, begann eine, allerdings etwas überstürzte Suche nach Konsequenzen. Inzwischen war eine Gewichtung der Dinge möglich. Durch eine Ergänzung der Ausführungbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz (AB.A zum FG), die im weitgehenden Konsens mit den Betroffenen erfolgt ist, wurden einerseits mögliche Gefahren respektiert, andererseits Gemüter beruhigt.

Besonders positiv an der jetzigen Regelung ist, daß von der «Antibiotika-Motivation» herkommend nun alle Rückstände angesprochen wurden und daß bei begründetem Verdacht auch lebende Tiere am Schlachthof oder in den Beständen auf Rückstände untersucht werden können.

Allerdings ist durch die Formulierung in § 20 (3) AB.A, wonach Rückstandsuntersuchungen bei geschlachteten Tieren, insbesondere Untersuchungen auf Hemmstoffe sind, und durch die Vorschrift, daß «von etwa einem Prozent der geschlachteten Tiere» Proben für Rückstandsuntersuchungen zu entnehmen sind, eine Situation entstanden, daß sich Rückstandsuntersuchungen aus Gründen der Praktikabilität zu stark auf Hemmstoffe konzentrieren werden, zumal Untersuchungen auf andere Rückstände z. T. mit großem Aufwand und vor allem erheblichen Kosten verbunden sind. Die Kostenwelle wird allerdings dann noch größer sein, wenn die BU-Tiere, für die die Untersuchung auf Hemmstoffe nun ohnehin obligat ist, nicht — wie von uns s. Z. vorgeschlagen und nach dem neuen Text der AB.A auch möglich — zu den Stichproben gezählt, sondern der Tendenz entsprechend als rückstandsversächtig behandelt würden. Angesichts einer so großen Probenzahl (die BU-Proben machen in der Regel bereits mehr als ein Prozent der geschlachteten Tiere aus), besteht die Gefahr, daß Untersuchungen auf Rückstände, die gesundheitlich bedenklicher sind als Hemmstoffe, aus Kostengründen zugunsten der weniger aufwendigen Hemmstoffuntersuchungen vernachlässigt werden. Dem Verbraucherinteresse würde dies nicht entsprechen. Außerhalb der BU-Proben, die natürlich nicht nur auf Hemmstoffe zu untersuchen wären, sollten nur «gezielte Stichproben» untersucht werden (z. B. Hemmstofftest bei Kälbern und Spanferkeln, die keine kontrollierte Wartezeit hinter sich haben; Untersuchung von Rindern aus Gebieten, in denen mit Schwermetallemissionen zu rechnen ist; Untersuchung von Schweinen auf Pestizide, soweit diese aus Beständen stammen, deren Tiere bei Untersuchungen parallel zur BU noch immer erhöhte Gehalte an Pestiziden aufweisen).

Schließlich noch einige Bemerkungen zu psychosedativ wirkenden Substanzen. *Tranquilizer* und *Neuroleptika* werden in jüngster Zeit in steigendem Maße bei Masttieren zur Verbesserung der Mastleistung und bei Schlachttieren zur Ruhigstellung beim Transport zum Schlachthof eingesetzt.

Rückstände und Wirkungen der Psychopharmaka in Tieren zum Zeitpunkt der Schlachtung sind unerwünscht, weil sie das Ergebnis der Schlachttieruntersuchung beeinträchtigen können und weil beim Verzehr von Fleisch solcher Tiere mit Wirkungen beim Konsumenten gerechnet werden muß. Gegen die Anwendung von Psychopharmaka bei Schlachttieren bestehen nur dann keine Bedenken, wenn die Tiere vor der Schlachtung solange aufgestallt werden können, bis die pharmakologische Wirkung der verabreichten Stoffe beendet ist bzw. die Stoffe oder ihre Metaboliten auf natürlichem Wege ausgeschieden worden sind. Nach bisherigen Erfahrungen sind die Tiere nach ein bis zwei Tagen praktisch rückstandsfrei; doch ist auch nach kürzerer Aufstallfrist nur noch mit sehr geringen Wirkstoffmengen im Tier zu rechnen, da die Stoffe im Stoffwechsel bereits nach wenigen Stunden weitgehend abgebaut werden. Allerdings bereitet die Sicherung bestimmter Wartezeiten vor der Schlachtung Schwierigkeiten. Im übrigen stehen für den routinemäßigen Nachweis derartiger Stoffe noch keine praktikablen Methoden zur Verfügung.

In Zukunft ist wohl auch notwendig, *Pestizide* und *toxische Mikroelemente* vermehrt zu beachten.

Die Höchstmengen an DDT und anderen Pestiziden in oder auf Lebensmitteln tierischer Herkunft sind bei uns inzwischen in einer Verordnung festgelegt worden. Es war schwierig, in allen Fällen unter diesen Werten zu bleiben. Es war jedoch notwendig, eine Einschränkung der weltweiten, oftmals bedenkenlosen Pestizidanwendung zu erzwingen. Natürlich können wir bei der pflanzlichen Produktion, angesichts der Welternährungslage, auf Pestizide nicht ganz verzichten; es ist jedoch ein untragbarer Zustand, daß Pestizide heute schon fast zu natürlichen Begleitstoffen der Futter- und Lebensmittel geworden sind. Die Zukunft wird zeigen, daß wir bei disziplinierter Anwendung der Pestizide weit weniger Rückstände tolerieren müssen, als derzeit in Lebensmitteln vorliegen. Bezüglich der toxischen Mikroelemente ist die Situation, z. B. bei Blei, nur regional kritisch. Toxische Mikroelemente verdienen jedoch mindestens die gleiche Aufmerksamkeit wie Hemmstoffe.

Diese letzte Gruppe von Lebensmittelkontaminanten ist im übrigen ein Beispiel dafür, daß es bezüglich der Rückstände Probleme gibt, deren Lösung auf keinen Fall allein dem Tierproduzenten und dem Lebensmittelhersteller aufgebürdet werden kann, sondern auch von der Allgemeinheit zu respektieren ist.

Es gilt deshalb in nächster Zeit bezüglich der Rückstände wenigstens das real Mögliche zu tun, den gesetzlichen Rahmen vernünftig zu interpretieren und sich an echten Schutzbedürfnissen zu orientieren, nicht aber ut aliquid fiat zu handeln.

Der Verbraucher erwartet zu Recht, daß die vom Tier stammenden Lebensmittel nicht geeignet und auch nicht möglicherweise geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu schädigen. Ein Restrisiko wird allerdings immer bleiben. Nicht nur der Staat, alle beteiligten Kreise müssen mithelfen, das zumutbare Restrisiko möglichst niedrig zu halten. Dies wird allerdings nur dann möglich sein, wenn auch auf internationaler Ebene stärkere Koordination erfolgt — zumal es auch darum gehen muß, gegenwärtige Wettbewerbsverzerrungen zu beseitigen — und wenn die lebensmittelhygienischen Schutzvorschriften von entsprechenden

Regelungen in Arzneimittel-, Futtermittel- und Umweltschutzvorschriften flankiert werden.

Zusammenfassung

Der Verbraucher erwartet, daß die vom Tier stammenden Lebensmittel nicht geeignet und auch nicht möglicherweise geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu schädigen. Der Staat ist verpflichtet, entsprechende Schutzmaßnahmen vorzusehen und einzuleiten. Dennoch wird ein Restrisiko bleiben. Um dieses Restrisiko möglichst niedrig zu halten, ist erforderlich, auch interdisziplinär und international stärker zu kooperieren. Lebensmitteleigene Toxine, Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte, Parasiten sowie pharmakologisch wirksame Substanzen, Lebensmittelzusatzstoffe und Umweltchemikalien werden hinsichtlich ihrer möglichen Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers beim Verzehr von Lebensmitteln tierischen Ursprungs dargestellt und notwendige Schutzmaßnahmen diskutiert.

Résumé

Le consommateur s'attend à ce que des produits alimentaires d'origine animale ne soient en aucune manière de nature à nuire à la santé. L'état est tenu de prévoir et d'organiser les mesures de protection nécessaires. Mais il ne sera jamais possible d'éliminer entièrement tout risque. Pour que ce risque inéluctable soit le plus faible possible, il est indispensable de développer la coopération interdisciplinaire et internationale. On énumère les risques d'une atteinte à la santé du consommateur, lors de l'absorption d'aliments d'origine animale, dus à la présence de toxines alimentaires, de microorganismes et de leurs métabolites, de parasites, de substances pharmacologiquement actives, d'additifs alimentaires et de produits chimiques provenant de l'environnement et l'on envisage les mesures de protection indispensables.

Literatur

1. *Kotter, L.* und *Schröder, K.:* Gesunde Lebensmittel von Tieren als Erwartung des Verbrauchers. Referat gehalten vor der CEA-Expertengruppe «Tiermedizin» zusammen mit Vertretern der Fachausschüsse «Futtermittel» (Copa/Cocega) und «Vieh und Fleisch» am 21. 2. 1974 in Brüssel.
2. *Kreuzer, W.:* Zur Problematik der wirksamen Ueberwachung des Fleisches auf Schadstoffe. Fleischwirtschaft **55**, 1539 (1975).
3. *Schröder, K.:* Antibiotika und Lebensmittel. Vortrag gehalten am 9. 11. 1968 bei der Fortbildungstagung «Medikation, Prophylaxe und Therapie. Arbeitstagung über Antibiotika» der Tierärztlichen Fakultät München.
4. *Schröder, K.* und *Schulze, H.:* Zur fleischhygienerechtlichen Beurteilung hemmstoffhaltigen Fleisches. Arch. Lebensmittelhyg. **24**, 272 (1973).

5. *Terplan, G.* und *Zaadhof, K.-J.:* Antibiotika, Hormone und Thyreostatika in Lebensmitteln tierischer Herkunft sowie ihre Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit. Deut. Aerzteblatt — Aerztl. Mitt. **72**, 344 (1975).

Dr. K. Schröder
Prof. Dr. G. Terplan
Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter
Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Universität München
Fachbereich Tiermedizin
Veterinärstraße 13
D - 8000 München 22

U. Leuenberger, Kantonales Laboratorium, Bern

Analytik der Carotinoide mittels TLC und HPLC — ein Vergleich

Der Inhalt dieses Vortrages wurde bereits publiziert; hier wird nur die Kurzfassung mit Literatur wiedergegeben:

Die Carotinoide bieten ihrer chemischen Labilität wegen besondere Probleme bei der Extraktion, Trennung und quantitativen Bestimmung. Am Beispiel von Orangensaft- und Orangenschalenextrakt wurde gezeigt, daß zur quantitativen Erfassung des Carotinoid-fingerprints die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) der Dünnschichtchromatographie überlegen ist (1, 2). Mit Zinkcarbonatadsorbentien und später mit reverse-phase-Säulen und Gradientengemisch konnte mit einer Wiederfindungsrate von über 90% und einer relativen Standardabweichung von ca. 1% gearbeitet werden.

Das Erkennen einer Nachfärbung von Orangensäften mit Hilfe der HPLC wird diskutiert (2).

Literatur

1. *Stewart, I.* and *Wheaton, T. A.:* Continuous flow separation of carotenoids by liquid chromatography. J. Chromatog. **55**, 325—336 (1971).
2. *Stewart, I.* and *Leuenberger, U.:* Citrus color. Alimenta **15**, 33—36 (1976).

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 28—35 (1977)

R. Battaglia, Kantonales Laboratorium, Zürich

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie in der Lebensmittelanalytik

Im Herbst 1974 haben wir uns im kantonalen Laboratorium Zürich entschlossen, die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) auf dem Gebiet der Lebensmittelanalytik einzusetzen. Ein gutes halbes Jahr dauerte es dann, bis ein Gerät einsatzbereit war, und wir damit die ersten Gehversuche unternahmen.

Eines unserer ersten Probleme war, die Extraktionsmethoden für Konservierungsmittel im kurz vorher erschienenen Kapitel 44 des Lebensmittelbuches zu überprüfen. HPLC war für die Ausbeutebestimmung die Methode der Wahl. Dank der variablen Wellenlänge des UV-Detektors gelang es, trotz der nicht optimalen Trennung zwischen Benzoesäure und Sorbinsäure zu unterscheiden. Die Analysenzeit für eine Einspritzung dauerte ca. 6 Minuten. Wir konnten somit in kurzer Zeit das gesteckte Ziel erreichen.

Tabelle 1. Konservierungsmittel, HPLC-Analysen

Extraktionsausbeuten nach LMB Kap. 44 B, in %

	Benzoesäure		Sorbinsäure		p-Hydroxybenzoesäure-äthylester	
	Aether	Chloroform	Aether	Chloroform	Aether	Chloroform
Wein	100		100		100	
Bier	*	100	*	85	64	90
Tafelgetränke mit Orangensaft	47	100	30	76	100	100
Konfitüre	16	100	5	90	70	100
Kuchen	73	100	38	77	85	61
Kaffeerahm	8	88	10	58	19	59
Joghurt	60	78	21	63	95	59
Mayonnaise	100	*	73	58	100	40
Margarine	*	62	5	59	1	20

* Nicht auswertbar, da durch andere Peaks verdeckt.

Die Tabelle 1 zeigt deutlich, daß die beiden Extraktionsmethoden *nicht* — wie im LMB angegeben — gleichwertig sind. Zudem versagen in gewissen Fällen beide Methoden.

Des weitern sind beide Methoden recht langwierig, und speziell die Aetherextraktion ist arbeitsintensiv. Vereinfachungen des Analysengangs sind somit wünschbar und bei flüssigen Lebensmitteln wesentlich problemloser zu erreichen als bei festen. Dies kann anhand der Bestimmung von Sorbinsäure in Wein (1) gut illustriert werden (Abb. 1).

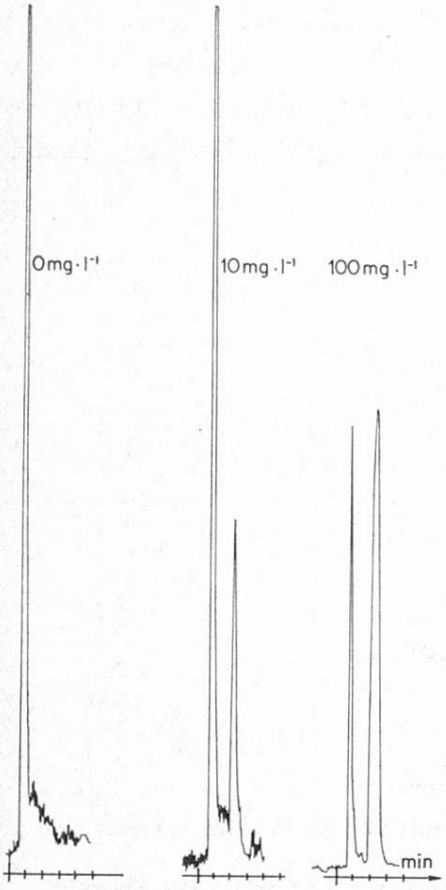


Abb. 1. Sorbinsäure in Wein
Säule: Co: Pell ODS 500 x 3 mm,
Eluens: Wasser, Fluß 2,2 ml/min,
Druck: 40 bar, Detektor: UV 254 nm.

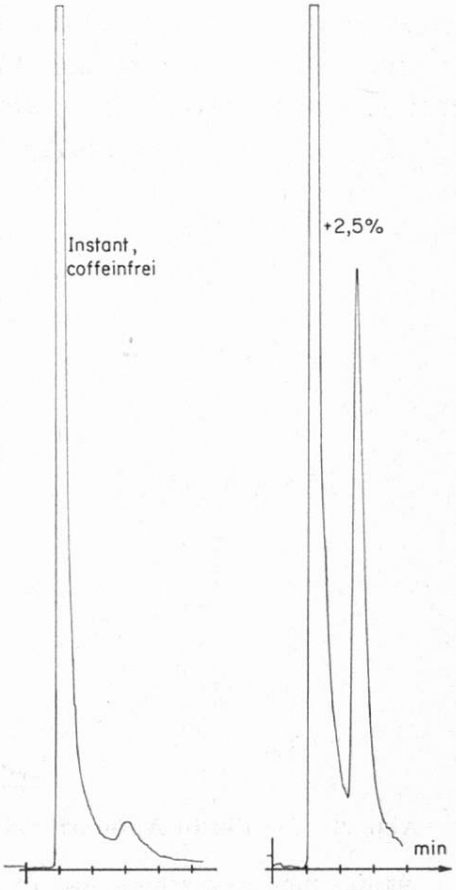


Abb. 2. Coffein in Kaffee
Säule: wie Abb. 1, Eluens: Wasser/
Methanol 9/1, Fluß 1,7 ml/min,
Druck: 30 bar, Detektor: UV 276 nm

Eine Analyse dauert etwas weniger als 5 Minuten. Probenvorbereitung gibt es keine, da der Wein direkt eingespritzt wird. Wasser dient als Laufmittel.

Den in diesem Beispiel frappant zu Tage tretenden Vorteil der Reverse-phase-Materialien, polare Substanzen zuerst zu eluieren, haben wir uns natürlich weiter zunutze gemacht. So gelingt es, eine Coffeinbestimmung durchzuführen, die wesentlich schneller ist als die bisherige offizielle Levine-methode (Abb. 2).

Die Probenvorbereitung ist denkbar einfach: eine 2%ige Kaffeelösung (Instantkaffee) wird filtriert und ohne weitere Behandlung chromatographiert. Dasselbe gilt im wesentlichen für Bohnenkaffee, bei dem man die ammoniakalische Aufschlußlösung chromatographiert. Ein Chromatogramm dauert 5 Minuten.

Nun, nicht immer genügt, wie in den vorausgegangenen Fällen, eine Säule bescheidener Trennleistung für die Lösung eines bestimmten Problems. Oft werden an die chromatographische Leistungsfähigkeit des Systems hohe Ansprüche gestellt, damit saubere Trennungen und somit quantitativ auswertbare Peaks resul-

tieren. Der Nachweis und die Bestimmung von Spurenkomponenten sind repräsentative Beispiele dafür. Dies sei illustriert anhand der Bestimmung von Patulin in Apfelsaft (Abb. 3).

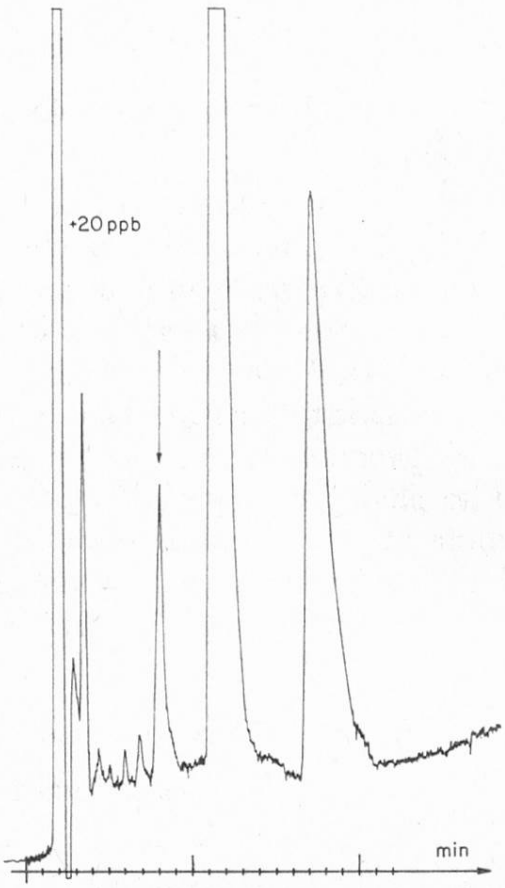


Abb. 3. Patulin in Apfelsaft: ein patulinfreier Apfelsaft wurde mit 20 ppb Patulin versetzt und aufgearbeitet.
Säule: Partisil 5 250×5 mm, Eluens: Di-isopropyläther/Tetrahydrofuran 95/5 mit 0,1% Eisessig, Fluß 2,0 ml/min, Druck: 45 bar, Detektor: UV 276 nm.

Die Abbildung 3 zeigt die komplexe Zusammensetzung der Analysenlösung* deutlich. Die hier verwendete Säule hat einige tausend theoretische Böden und ist imstande, Patulin genügend sauber abzutrennen.

Die bis jetzt besprochenen Beispiele bezogen sich alle auf die Abtrennung und Bestimmung von Substanzen, welche sich in ihren chromatographischen Eigenschaften recht deutlich von ihren jeweiligen Begleitstoffen unterschieden. Größere Probleme können bei der Auftrennung komplexer Gemische ähnlicher Verbindungen auftreten. Ein Paradebeispiel ist die Chromatographie von Fettsäuremethylestern. Es ist bekannt, daß dort die Gaschromatographie die Methode der Wahl ist. Sicherlich wäre es reine Geld- und Zeitverschwendung, die dort erreichten Auftrennungen mit HPLC nachvollziehen zu wollen. Es gibt jedoch einen wesentlichen Aspekt bei der Untersuchung von Fetten, wo die Gaschromatographie an der vorläufigen Grenze ihrer Leistungsfähigkeit arbeitet, und zwar bei der Erkennung und Abtrennung von trans-ungesättigten Fettsäuren in tieri-

* Die Proben wurden nach der AOAC-Vorschrift (2) aufbereitet.

schen Fetten oder Margarinen. Ein IR-Spektrum liefert wohl eine Information über die gesamthaft vorhandenen trans-Doppelbindungen. Hochauflösende Gaschromatographie beschert einem mit einer Fülle von Peaks, von der man weiß, daß es sich um trans-Fettsäuren handeln *kann*. Oft bediente man sich einer dünnschichtchromatographischen Vorreinigung mit silbernitratimprägniertem Kieselgel. Hier ist zweifellos ein Gebiet, auf dem HPLC einen wesentlichen Beitrag leisten kann. Wir haben Partisil 20 mit 2 Prozent Silbernitrat versetzt und unter 300 Atmosphären in eine 25-cm-Kolonne gepackt. Dieses Material ist imstande, gesättigte, einfach ungesättigte cis- und trans-isomere und doppelt-ungesättigte Fettsäurenmethylester sauber voneinander zu trennen (Abb. 4).

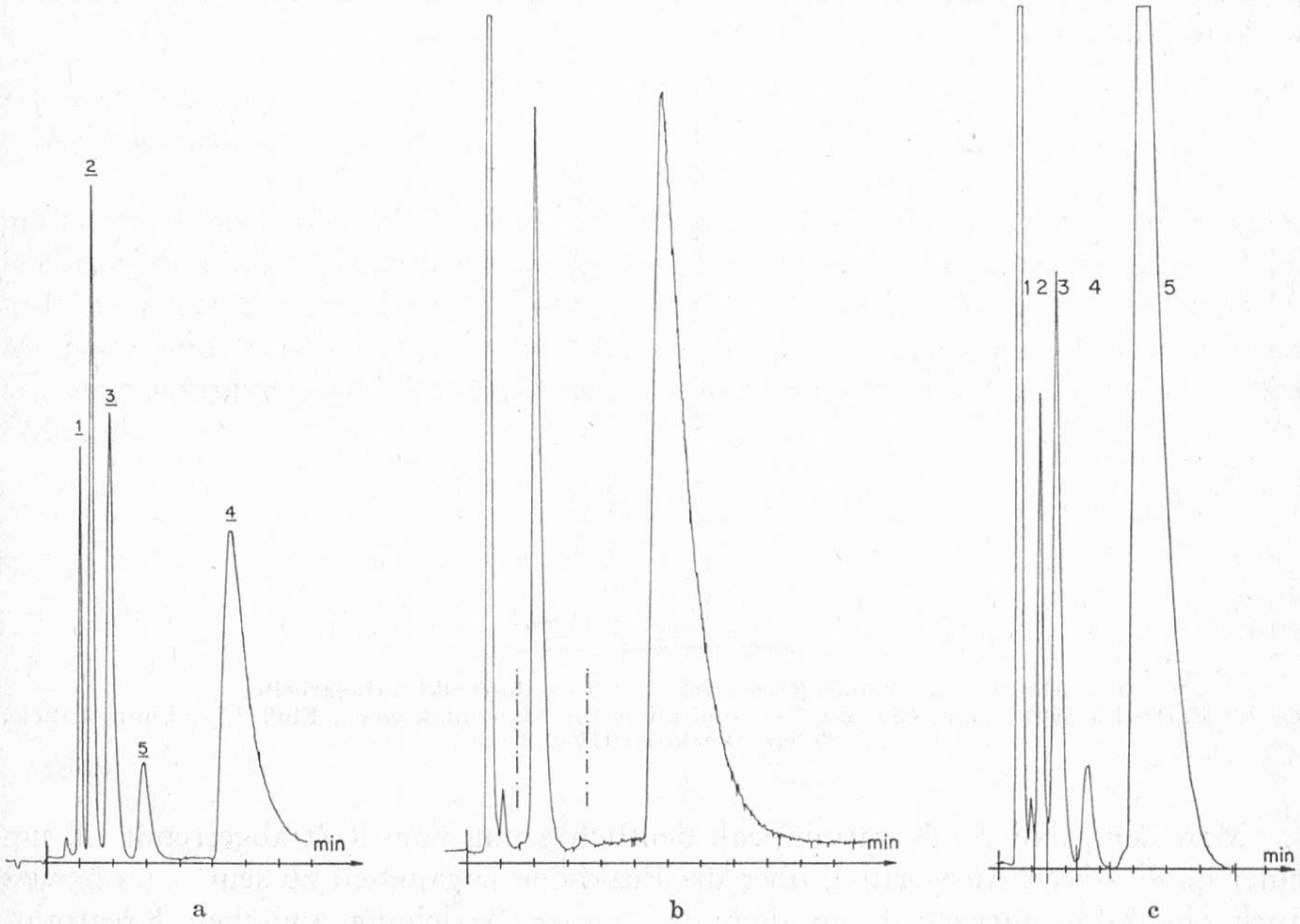


Abb. 4. Trans-ungesättigte Fettsäuremethylester
a) Testgemisch 1: C18, 2: C18:1 trans, 3: C18:1 cis, 4: C18:2 cis, cis, 5: Verunreinigung von 4.
b) Umgeestertes Erdnußöl, keine trans-DB feststellbar.
c) Umgeestertes Margarinenfett, Peak 2 und 4 entsprechen trans-ungesättigten FS-estern (gaschromatographisch bewiesen).

Säule: Partisil 20 mit 2% Silbernitrat 250×3 mm, Eluens: Hexan/Tetrahydrofuran 99/1, Fluß 2,0 ml/min, Druck: 30 bar, Detektor: UV 205 nm.

Zum Abschluß meines Vortrages möchte ich Ihnen noch ein Beispiel einer HPLC-Bestimmungsmethode vorführen, welche wir aufgrund von kürzlich erlebten Frustrationen entwickelten. Es handelt sich um die Bestimmung von Kreatinin in Fleischextrakten, Saucen usw. Mehr und mehr hatten wir in vergangener Zeit die Erfahrung gemacht, daß die klassische Hadorn-Methode (3) nur dann verläßliche Werte liefert, wenn der betreffende Analytiker das Analyseritual wie-

der einige Male «geprobt» hatte und von jedem Produkt mindestens 4 Bestimmungen durchführte. Es ist klar, daß sich für ein Laboratorium, welches selten mehr als 2 Proben gleichzeitig auf Kreatinin untersucht, der zeitliche Aufwand für eine Probe nicht mehr vertreten läßt. Die Carisano-Methode (4) ist aufgrund ihrer apparativen Erfordernisse (eine komplette HPLC-Ausrüstung, eine Spezialsäule und zwei Thermostaten, mit Vorteil alles permanent montiert) für sporadischen Einsatz ebenfalls ungeeignet! Mit Begeisterung hatten wir uns deshalb auf die enzymatische Bestimmung von Kreatinin (5) gestürzt. Eine Ernüchterung erlebten wir allerdings nach der Bekanntgabe der Resultate von Ringversuchen mit verschiedenen Laboratorien. Breite Streuungen und schlechte Reproduzierbarkeit im eigenen Labor führten uns dazu, die Kreatininbestimmung mit HPLC zu entwickeln (Abb. 5).

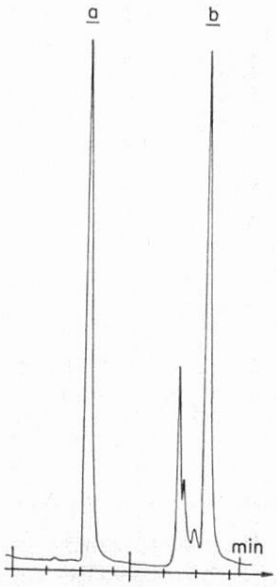


Abb. 5. a) Reines Kreatinin. b) Fleischextrakt aufgearbeitet.
Säule: Partisil 5 250×5 mm, Eluens: Methanol mit 0,1% Ammoniak conc., Fluß 2,7 ml/min, Druck: 80 bar, Detektor: UV 234 nm.

Man sieht, daß der Kreatininpeak deutlich genug vom Rest abgetrennt ist, um einer qualitativen Auswertung über die Peakhöhe zugänglich zu sein. Dies bewies auch ein Additionsversuch, in dem die lineare Beziehung zwischen Kreatininmengen und Peakhöhe bewiesen wurde. Den Beweis, daß wir tatsächlich Kreatinin analysieren, lieferte das folgende Experiment:

Wir sammelten den von uns als Kreatinin interpretierten Peak eines Fleischextraktes und registrierten das UV-Spektrum dieses Eluats. Es zeigte sich identisch mit dem UV-Spektrum von authentischem Kreatinin.

Um die Richtigkeit unserer neuen Methode zu demonstrieren, analysierten wir sechs Fleischextrakte und verglichen die Resultate mit anderen Laboratorien und Methoden (Tabelle 2).

Man sieht, daß die Uebereinstimmung von HPLC und *Carisano* als gut bezeichnet werden kann. Die systematische Abweichung unserer Resultate nach unten um ca. 4% rel. kann durch das Auftreten einer kleinen, mit-integrierten Schulter der bei der Carisano-Methode erhaltenen Kurve erklärt werden. Wir ver-

Tabelle 2. Kreatinin von Fleischextrakten

Resultate in %

Probe/Methode	HPLC	Hadorn[1]	Carisano[1]	Enzymatisch[2]		
1	4,5	4,7	4,6	4,7	4,0	4,7
2	5,0	5,5	5,3	5,5	4,6	5,7
3	5,3	5,6	5,6	5,6	4,8	5,6
4	5,6	5,9	5,8	6,0	5,1	6,2
5	4,9	5,4	5,2	5,2	4,8	4,9
6	5,3	5,6	5,5	5,6	4,7	5,4

[1] Knorr, Thayngen.
[2] Drei kantonale Laboratorien.

muten, daß dort gewisse Nebenbestandteile miterfaßt werden und die Analyse leicht nach oben verfälschen. Dieses Phänomen ist bei Fleischextrakten klein, fällt aber bei Saucen, Bouillon usw. stark ins Gewicht. Auch bei der HPLC-Methode sind diese Effekte zu beobachten, und man muß die mobile Phase der Chromatographie etwas modifizieren, um eine saubere Trennung zu erreichen (Abb. 6).

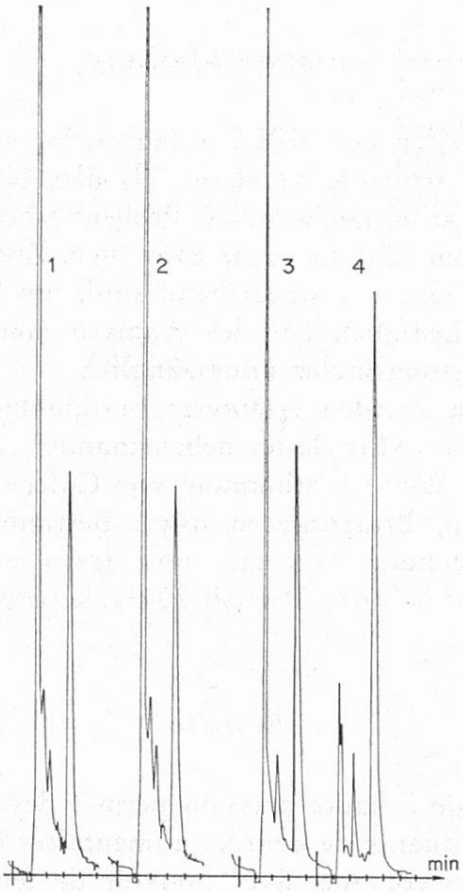


Abb. 6. 1: Bratensauce, gebunden, 2: Bratensauce, pastenförmig, 3: klare Sauce, 4: Bouillon. Säule: Partisil 5 250×5 mm, Eluens: Acetonitrit/Methanol 4/1 mit 0,1% Ammoniak, Fluß 2,7 ml/min, Druck: 60 bar, Detektor: UV 234 nm.

In Ermangelung von Vergleichsdaten aus Ringversuchen waren die betreffenden Hersteller so freundlich, uns die theoretischen Gehalte der Produkte mitzuteilen (Tabelle 3).

Tabelle 3. Kreatinin in Zubereitungen mit Fleischextrakt

Resultate in mg/l fertiger Sauce bzw. Suppe

Probe	HPLC	Dosierung theor.
Bratensauce, Paste	129	140
Bratensauce, gebunden	146	140
Klare Sauce	145	140
Bouillon	81	80

Wie ersichtlich, ist die Uebereinstimmung annehmbar; auch im schlechtesten Fall beträgt die Abweichung weniger als 8%. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß der vom Hersteller errechnete Gehalt des Produkts auf der Kreatininbestimmung des verwendeten Fleischextrakts beruht und somit ebenfalls mit einem Fehler behaftet ist.

Zusammenfassung

Die vielseitigen Möglichkeiten der HPLC erlauben es, viele Probleme in der Lebensmittelanalytik einfacher und schneller zu lösen, als dies bisher der Fall war. Insbesondere kann die üblicherweise arbeitsaufwendige Probenvorbereitung oft stark vereinfacht werden, und in gewissen Fällen fällt sie sogar ganz weg. Zudem erweist sich, daß Bodenzahlen von einigen Hundert sehr oft ausreichend sind, um bestimmte analytische Fragestellungen zu beantworten. Lediglich bei der Analyse von Spurenbestandteilen scheint die Verwendung von Hochleistungssäulen unumgänglich.

Folgende HPLC-Analysen wurden erläutert: Bestimmung von Sorbinsäure, Benzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure-äthylester nebeneinander in diversen Lebensmitteln; Bestimmung von Sorbinsäure in Wein; Bestimmung von Coffein in Kaffee; Bestimmung von Kreatinin in Fleischextrakten, Bratensaucen usw.; Bestimmung von Patulin in Apfelsaft. Ferner wurde die Trennung von cis- und trans-ungesättigten Fettsäuremethylestern an einer mit Silbernitrat belegten Partisil-20-Säule besprochen.

Résumé

La chromatographie liquide à haute pression permet des analyses beaucoup plus rapides et simples pour des constituants de denrées alimentaires que les méthodes conventionnelles. Dans plusieurs cas, des colonnes avec pouvoir de séparation assez faible, rendent de bons services, tandis que pour la détermination des contaminations traces, il faut se servir de colonnes à haute performance.

Les déterminations suivantes ont été exposées: Acide sorbique dans les vins; acide sorbique, acide benzoïque et ester éthylique de l'acide p-hydroxy-benzoïque dans diverses denrées; caféine dans le café; créatinine dans des extraits de viandes, sauces, etc.; patuline dans les jus de pommes. La séparation des acides gras cis- et trans-insaturés sur une colonne traitée au nitrate d'argent a été discutée.

Literatur

1. Merck, Application-Sheet Nr. 75—32.
2. Official methods of analysis of the AOAC, 12th edition, p. 478—480, 1975; s. auch *Ware, G. M.:* HPLC-methods for the determination of patulin in apple butter. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **58**, 754—756 (1975).
3. Provisorisches Kapitel 12 (Fleischextrakte) des Schweiz. Lebensmittelbuches, Methode 12/5; s. auch
   Hadorn, H.: Beitrag zur Kreatininbestimmung in Suppenwürzen und Bouillonpräparaten. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **37**, 342—362 (1946).
4. *Carisano, A., Bonecchi, A.* and *Riva, M.:* Determination of creatinine in soups and soup preparations by ion-exchange chromatography. J. Chromatog. **45**, 264—268 (1969).
5. Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 1975/76. Boehringer, Mannheim.

Dr. R. Battaglia
Kantonales Laboratorium
Fehrenstraße 15
Postfach
CH - 8030 Zürich

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 36—45 (1977)

B. Zimmerli, Eidgenössisches Gesundheitsamt, Bern
Technische Assistenz: O. Blaser

Beitrag zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Einleitung

Aflatoxine sind Stoffwechselprodukte gewisser Schimmelpilzarten, wie zum Beispiel von Aspergillus flavus. Wegen ihrer stark kanzerogenen Wirkung stellen sie eine potentielle Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Es besteht daher ein großes Interesse an einfachen und empfindlichen Analysenmethoden zur Bestimmung der Aflatoxine in Lebensmitteln. Wird berücksichtigt, daß die toxikologische Bewertung der Aufnahme sehr kleiner Mengen kanzerogener Stoffe ein noch nicht ganz gelöstes Problem darstellt, so sollten beispielsweise für das Volksnahrungsmittel Milch sowie für Säuglingspräparate analytische Methoden verfügbar sein, die noch die sichere Bestimmung von Bruchteilen von ppt ($1:10^{12}$) dieser Stoffe gestatten.

Gegenüber den heute normalerweise verwendeten dünnschichtchromatographischen Methoden hätte die moderne Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) folgende Vorteile aufzuweisen: Rasche Trennung bei gleichzeitig hohen theoretischen Bodenzahlen; einfache Detektion und reproduzierbare Quantifizierung der eluierten Substanzen mittels Durchflußdetektoren; Aufgabe relativ großer Probevolumina auf die Trennsäule sowie einfache Gewinnung entsprechender Eluate zwecks weiterer Identifizierung der Aflatoxine mittels Fluoreszenzspektrometrie und/oder Massenspektrometrie; gute Reproduzierbarkeit der Trennbedingungen und somit der Retentionsdaten; Möglichkeit der Automatisierung; während der Trennung ist bei der Verwendung von Stahlsäulen jeglicher Einfluß von Licht und Sauerstoff ausgeschaltet. Als Nachteile der HPLC gegenüber der Dünnschichtchromatographie (DC) ist vor allem auf die mögliche Beeinträchtigung der Chromatogramme durch später eluierende Extraktbegleitstoffe hinzuweisen. Kann die HPLC-Säule schlecht regeneriert werden oder werden keine umschaltbaren Kolonnensysteme verwendet, so bedeutet dies, daß die Vorreinigung der Extrakte aufwendiger ist als bei der DC-Bestimmung. Neben dem bedeutend höheren Preis der ganzen HPLC-Ausrüstung muß auch erwähnt werden, daß der Zeitgewinn mit der HPLC, wenn sie nicht automatisiert ist, bei Routineuntersuchungen hinfällig werden kann, da in der DC oft mehrere Analysenextrakte gleichzeitig untersucht werden können.

Bei allen heute zur Trennung der Aflatoxine vorgeschlagenen HPLC-Trennsystemen werden als Säulenfüllungen Kieselgele verwendet. Als Elutionsmittel dienen Dichlormethan, Chloroform oder deren Mischungen mit Zusatz kleiner Mengen von Wasser und/oder Methyl- oder Aethylalkohol (1—5). Die Elutionsreihenfolge ist entweder Aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2 oder B_1, B_2, G_1 G_2. Aflatoxin B_1 wird in allen diesen Systemen zuerst und Aflatoxin G_2 zuletzt eluiert. Ein anderes Elutionsmittel mit gleicher Elutionscharakteristik wurde kürzlich von *Pons* (6) empfohlen. In Abbildung 1 ist die Trennung der Aflatoxine B_1, G_1, B_2, G_2 und M_1 mit zwei verschiedenen Elutionsmitteln dargestellt. Für beide Trennungen verwendeten wir die μ-Porasil-Fertigsäulen (7) der Firma Waters (30 cm,

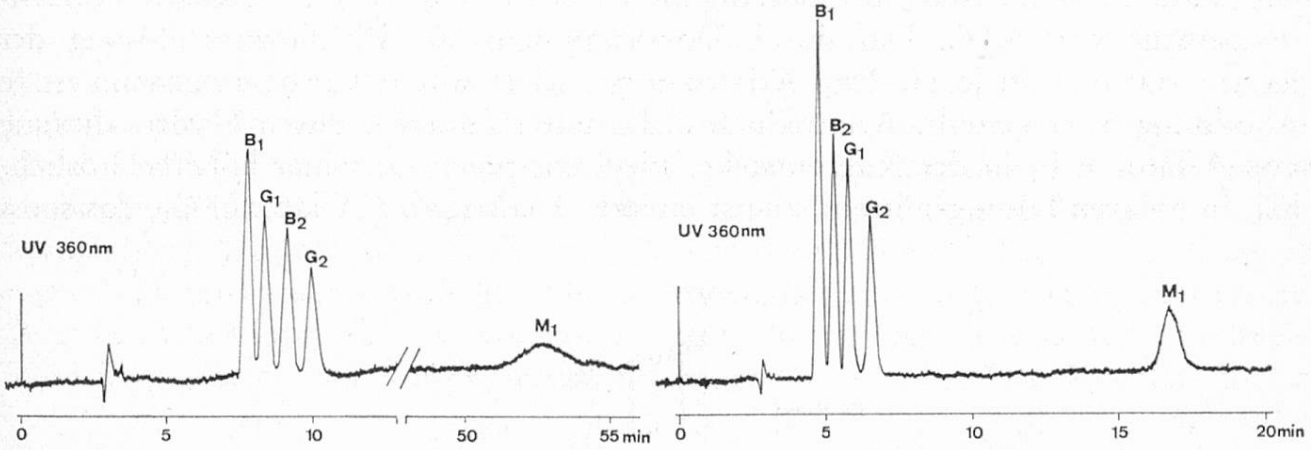


Abb. 1. Trennung der Aflatoxine auf μ-Porasil
linkes Chromatogramm: CH_2Cl_2(H_2O-ges.)/CH_3OH (497:3 v/v),
rechtes Chromatogramm: $CHCl_3$(H_2O-ges.)/c-C_6H_{12}/CH_3CN (50:15:2 v/v) mit Zusatz von 1 Vol% C_2H_5OH zu dieser Mischung;
1,1 cm^3/min; 20°C; je ca 20 ng Aflatoxin; UV-Detektor LC-55 bei 360 nm.

i. D. 4 mm, Teilchengröße 10 μm). Das linke Chromatogramm resultierte mit dem Eluens Dichlormethan (H_2O-gesättigt)/Methanol (497:3 v/v), das rechte mit dem Eluens nach *Pons* (6) bestehend aus Chloroform (H_2O-gesättigt),/Cyclohexan/Acetonitril (50:15:2 v/v), mit Zusatz von 1 Vol% Aethylalkohol zu dieser Mischung. Der UV-Monitor LC-55 (Perkin-Elmer) diente in beiden Fällen als Detektor. Die Volumengeschwindigkeit betrug für beide Elutionsmittel 1,1 cm^3/min ($\bar{u}$ = 0,16 cm/s). Die theoretische Bodenzahl, berechnet aus dem Peak von Aflatoxin M_1, beträgt im ersten Trennsystem ca. 5000 und im zweiten Trennsystem mit dem Eluens nach *Pons* (6) rund 3500. Es ist deutlich ersichtlich, daß die Peakhöhen der Aflatoxine mit dem zweiten Elutionsmittel, bei sonst vergleichbarer Auflösung, um rund einen Faktor 1,5 größer sind.

Für Bestätigungszwecke wäre es wünschenswert, über alternative Trennsysteme zu verfügen, die ganz andere Trenneigenschaften aufweisen als die bisher erwähnten. Auf einem speziell präparierten Sephadex G-10 konnten *Manabe* und *Matsuura* (8) mit dem Eluens Wasser die Aflatoxine G_{2a}, B_{2a}, G_2, B_2, G_1 und B_1,

in dieser Elutionsreihenfolge, trennen. Ebenfalls über die Trennung der Aflatoxine mit Umkehrphasensystemen berichtete *Seitz* (4). Die von ihm untersuchten Kolonnenpackungen waren Permaphase-ODS (Du Pont, mit Oktadecylgruppen modifiziertes Zipax, Korngröße 25—37 µm) sowie Bondapak Phenyl/Corasil (Waters, mit Phenylgruppen modifiziertes Corasil II, Korngröße 37—50 µm). Als mobile Phasen dienten Wasser beziehungsweise Wasser-Methanol-Mischungen. Mit beiden Trennsystemen fand *Seitz* (4) eine ungenügende Trennung der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 sowie einen raschen Abfall der Kolonnentrennleistung nach mehrtägigem Gebrauch. In unserem Laboratorium fanden wir, daß mit dem Kolonnenmaterial µ-Bondapak-C_{18} (Waters) und dem Eluens Wasser/Methanol (29:21 v/v) die Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 gut und reproduzierbar getrennt werden können (9). Eine noch bessere Trennung und kleinere k′-Werte erhielten wir mit dem gleichen Kolonnenmaterial bei Verwendung des Elutionsmittels Acetonitril/Methanol/Wasser (1:1:3 v/v) bei einer Kolonnentemperatur von 50°C. Das durch Dosierung von 10 µl Chloroformlösung der Konzentration von je ca. 2 ng Aflatoxin pro µl erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 2 dargestellt. Aflatoxin M_1, das unter anderem durch Hydroxilierung von Aflatoxin B_1 in der Kuh entsteht, wird, entsprechend seiner höheren Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, zuerst eluiert. Analog wird Aflatoxin G_2, das sonst

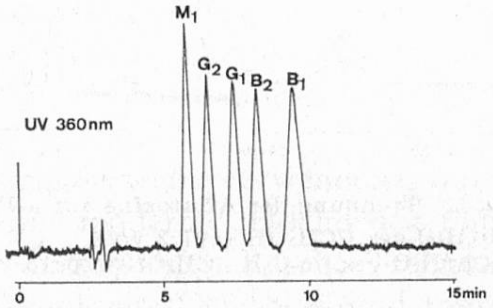


Abb. 2. Trennung der Aflatoxine auf µ-Bondapak-C_{18}
$CH_3OH/CH_3CN/H_2O$ (1:1:3 v/v); 1,1 cm^3/min; 50°C; je ca. 20 ng Aflatoxin; UV-Detektor LC-55 bei 360 nm.

in allen bekannten Adsorptionssystemen nach den Aflatoxinen G_1, B_2 und B_1 eluiert wird, nun vor diesen eluiert. Die Nachweisgrenzen der Aflatoxine in diesem Trennsystem sind, bei Verwendung des UV-Detektors (360) nm), vergleichbar mit denjenigen im Trennsystem µ-Porasil-Dichlormethan (H_2O-gesättigt)/Methanol.

Mit der Säulenfüllung µ-Bondapak-CN (Waters), es handelt sich dabei ebenfalls um ein durch und durch poröses Kieselgel der mittleren Korngröße 10 µm, dessen Oberfläche mit 1-Cyano-2-methyl-propyl-Gruppen modifiziert ist (7) und der mobilen Phase Hexan/Tetrahydrofuran (1:1 v/v) lassen sich die Aflatoxine sehr spezifisch in die zwei Gruppen B_1, B_2, M_1 und G_1, G_2 auftrennen (9). Die relative Retention beträgt beispielsweise bei 20°C für das Paar B_2/G_2 1,94 (9). Infolge der größeren k′-Werte sind die Nachweisgrenzen etwas schlechter als bei den bisher erwähnten Trennsystemen.

Detektion

Ein weiterer wichtiger Punkt beim vorgesehenen Einsatz der HPLC für Aflatoxinbestimmungen ist, neben dem geeigneten Trennsystem, die Wahl des Detektors. Durch dessen Empfindlichkeit wird unter anderem die Nachweisgrenze der Analysenmethode bestimmt. Mit den heute verfügbaren UV-Detektoren werden in der Literatur Nachweisgrenzen von 1—2 ng pro Aflatoxin angegeben (6, 9, 10), falls bei Wellenlängen von rund 360 nm gearbeitet wird. Die Nachweisgrenze bei Verwendung eines UV-Detektors ist also mit 1—2 ng rund eine Zehnerpotenz schlechter als in der Dünnschichtchromatographie, bei der die intensive Fluoreszenz der Aflatoxine auf der DC-Platte zur Detektion und Quantifizierung ausgenützt wird. Zur Senkung der Nachweisgrenzen wurde daher auch auf den Einsatz von Fluoreszenzdetektoren hingewiesen (4, 11). Allerdings werden dabei zwischen den Fluoreszenzsignalen der verschiedenen Aflatoxine erhebliche Unterschiede beobachtet. Während bei der fluorodensitometrischen Auswertung von DC-Platten (Kieselgele) für die Aflatoxine B_1, G_1, B_2, G_2 ein Signalverhältnis von rund 1:0,7:4:3 resultiert (12), ergibt sich aus den publizierten HPLC-Daten mit Fluoreszenzdetektoren sowie gemäß eigenen Messungen (Labotron FFM 32, 50 µl-Zelle, Anregung ca. 360 nm, Primärfilter UG-11, Sekundärfilter Wratten 2A) ein Verhältnis von 1:96:0,8:103 (Tabelle 1). Diese je nach Aflatoxin unterschiedlichen Fluoreszenzsignale sind nicht weiter erstaunlich, denn es ist bekannt, daß die Fluoreszenzeigenschaften der Aflatoxine vom jeweiligen Typ sowie vom Lösungsmittel abhängen (13, 14, 15). Der Nachteil dieser

Tabelle 1. Detektorempfindlichkeiten (a_i) für Aflatoxine[1]

Detektortyp	Zelle	Rauschen (mV)	a_i [mV/(µg/cm³)][2]				
			B_1	G_1	B_2	G_2	M_1
Photometer, 360 nm (LC 55)	leer	0,04	22	20	22	20	18
Fluoromonitor (Labotron FFM 32)	leer	0,04	4	383	3	411	2
Fluoromonitor (Labotron FFM 32)	Kieselgel[3]	0,14	314	548	662	1305	1648
Fluoromonitor LDC Mod. 1209)	Kieselgel[3]	0,14	172	438	347	950	886

[1] Trennsystem µ-Porasil — $CHCl_3$ (H_2O-ges.)/c-C_6H_{12}/CH_3CN (50:15:2 v/v) mit 1% C_2H_5OH; Volumengeschwindigkeit 1,1 cm³/min.

[2] $a_i = \frac{A \cdot \dot{V}}{m}$, A = Peakfläche in mV · s, m = dosierte Menge in µg, $\dot{V}$ = Volumengeschwindigkeit in cm³/s.

[3] Zelle gefüllt mit Kieselgel 60, reinst, Korngröße 100—200 µm (Merck Art. Nr. 7754).

stark unterschiedlichen Fluoreszenzsignale läßt sich dadurch vermeiden, daß die Fluoreszenzzelle des HPLC-Detektors mit geeigneten Adsorbentien gefüllt wird (9). In Tabelle 1 sind verschiedene gemessene Detektorempfindlichkeiten (a_i) zusammengestellt. Der UV-Detektor liefert bei der Meßwellenlänge von 360 nm, entsprechend den ungefähr gleichen molaren Extinktionskoeffizienten, für alle Aflatoxine vergleichbare Detektorempfindlichkeiten. Mit dem Fluoreszenzdetektor erhalten wir beispielsweise für Aflatoxin G_2 eine rund 140mal größere Empfindlichkeit als für Aflatoxin B_2. Wird die Fluoreszenzzelle hingegen mit Kieselgel 60, reinst (Merck Nr. 7754, 100—200 µm) gefüllt, so ergibt sich ein Empfindlichkeitsverhältnis von G_2 zu B_2 von nunmehr 2:1 statt 140:1. Die Detektorempfindlichkeit für Aflatoxin B_2 wurde durch die Zellfüllung um einen Faktor 220 erhöht. Das Verhältnis der Detektorempfindlichkeiten der Aflatoxine B_1, G_1, B_2, G_2 beträgt nun 1:1,7:2,1:4,2 statt 1:96:0,8:103 (Labotron).

Die quantitative Deutung der mit der kieselgelgefüllten Zelle beobachteten Verstärkung der Fluoreszenzsignale ist nicht ganz einfach. Folgende Faktoren dürften jedoch dabei eine Rolle spielen: Konzentrationseffekte im beleuchteten Teil der Zelle, Aenderung der Fluoreszenzquantenausbeute der adsorbierten Aflatoxine sowie die spektralen Eigenschaften der verwendeten Apparatur. Beispielsweise liegt das Emissionsmaximum (Anregung 365 nm) von Aflatoxin B_2 in Chloroform bei 410 nm (13). An Kieselgel adsorbiertes Aflatoxin B_2 besitzt jedoch ein Emissionsmaximum bei 427 nm (12). Die Durchlässigkeit des hier verwendeten Sekundärfilters (Wratten 2A) ist aber bei 427 nm rund 15mal größer als bei 410 nm.

Ohne weiter auf die Deutung der beobachteten Verstärkungseffekte einzugehen, kann festgehalten werden, daß bei den kommerziell verfügbaren filterfluorometrischen HPLC-Detektoren durch die Füllung der Zelle mit geeigneten Adsorbentien für gewisse Aflatoxintypen eine höhere Detektorempfindlichkeit erzielt werden kann. Unter Berücksichtigung des durch die Zellfüllung erhöhten Rauschpegels (Streulicht) und unter den erwähnten chromatographischen Bedingungen, d. h. µ-Porasil-Kolonne und Eluens nach *Pons* (6), ergeben sich durch die Zellfüllung, verglichen mit der UV-Detektion bei 360 nm, folgende Verbesserungen der Nachweisgrenzen: B_1 4,3mal, G_1 8,6mal, B_2 9,3mal und G_2 20mal (Labotron FFM 32).

Der Effekt der Fluoreszenzverstärkung mit der kieselgelgefüllten Zelle gegenüber der leeren Zelle wird durch die in Abbildung 3 dargestellten Chromatogramme illustriert. Als stationäre Phase diente wiederum µ-Porasil und als mobile Phase Dichlormethan (H_2O-gesättigt) / Methanol (124:1 v/v). Das linke Chromatogramm erhielten wir durch die Dosierung von je 2,4 ng Aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2. Mit der ungefüllten Fluoreszenzzelle liefern nur die Aflatoxine G_1 und G_2 ein sichtbares Detektorsignal. Das rechte Chromatogramm erhielten wir durch die Dosierung von je 0,4 ng Aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2. Es ist ersichtlich, daß nun mit der kieselgelgefüllten Zelle alle dosierten Aflatoxine Detektorsignale von gleicher Größenordnung ergeben.

Durch die Füllung der Fluoreszenzzelle mit Kieselgel der Korngröße 100—200 µm wird allerdings die Trennleistung des ganzen Systems reduziert. Mit der 12-µl-Zelle des LDC-Fluoromonitors ergab sich durch die Kieselgelfüllung (ca.

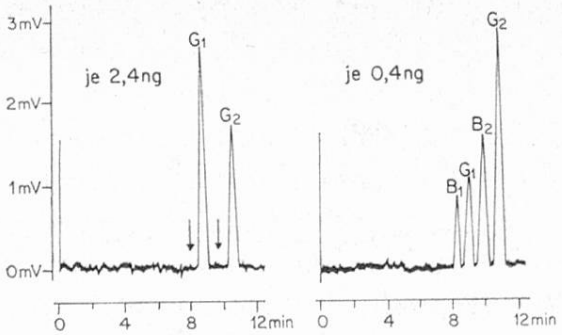


Abb. 3. Einfluß der Kieselgelfüllung auf die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors
μ-Porasil - CH_2Cl_2(H_2O-ges.)/CH_3OH (124:1 v/v) ; 1,05 cm^3/min ; LDC-Fluoromonitor Mod 1209 ;
links: leere Detektorzelle, je 2,4 ng Aflatoxin B_1, G_1, B_2 und G_2,
rechts: mit Kieselgel gefüllte Detektorzelle, je 0,4 ng Aflatoxin B_1, G_1, B_2 und G_2.

8 mg) gegenüber der leeren Zelle eine Reduktion der theoretischen Bodenzahl um maximal 17% (9). Mit kieselgelgefüllten Zellen von 50 μl Inhalt (z. B. Labotron FFM 32) wurden jedoch Reduktionen der theoretischen Bodenzahl von bis zu 40% gemessen.

Anwendungen

Ueber den praktischen Einsatz der HPLC zur Bestimmung von Aflatoxinen in Lebensmittelproben wurde bis jetzt noch sehr wenig publiziert. *Kmieciak* (16) berichtete kürzlich über die Bestimmung von Aflatoxinen in Erdnuß-Schrot. *Williams* und Mitarbeiter (17) zeigten am Beispiel eines Erdnußbutterextraktes, daß bei Verwendung der Wellenlänge 365 nm in der UV-Detektion nicht nur eine höhere Detektorempfindlichkeit als bei 254 nm resultiert, sondern daß im Chromatogramm auch bedeutend weniger Interferenzen sichtbar werden. *Seitz* (4) fand andererseits, daß im Falle von Maisextrakten auch bei Verwendung der Wellenlänge 350 nm so starke Interferenzen auftreten, daß höchstens noch ca. 20—50 ppb Aflatoxin B_1 sicher bestimmt werden können.

Abbildung 4 zeigt das Chromatogramm eines Extraktes gemahlener Mandeln, der nach der Schnellmethode von *Liem* und *Beljaars* (18) hergestellt wurde: Extraktion mit Wasser-Methanol (10:1 v/v), nach Zusatz von Wasser ausschütteln mit Petroläther, dann mit Chloroform, Chloroformextrakt zur Trockene eindampfen und in Benzol-Acetonitril (49:1 v/v) aufnehmen. 10 μl dieser Lösung (entsprechend 0,2 g Mandeln) wurden im Trennsystem μ-Porasil-Dichlormethan/Methanol untersucht. Für diesen Fall wurden der UV-Detektor und der LDC-Fluoromonitor, dessen Zelle mit Kieselgel gefüllt war, in Serie geschaltet. Die Auswertung des mit dem UV-Detektor erhaltenen Signals ergab einen Gehalt von 21,6 ppb Aflatoxin B_1. Aus den Signalen des Fluoreszenzdetektors berechneten wir einen Gehalt von 21,2 ppb Aflatoxin B_1 und 3,4 ppb Aflatoxin B_2. Mindestens für dieses Substrat scheint die HPLC als Bestimmungsmethode gut geeignet zu sein.

In Abbildung 5 sind die Chromatogramme dargestellt, die bei der Untersuchung eines Milchextraktes im Trennsystem μ-Porasil-Chloroform/Cyclohexan/

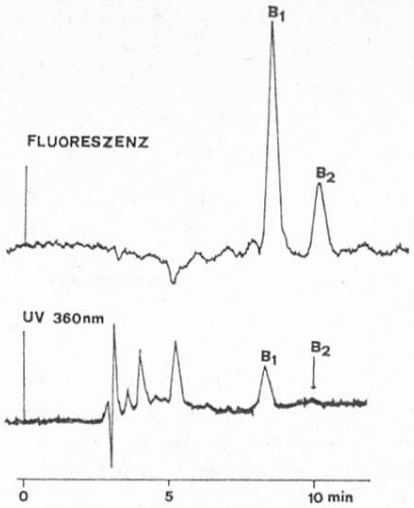


Abb. 4. Chromatogramm eines aflatoxinhaltigen Mandelextraktes auf μ-Porasil CH_2Cl_2(H_2O-ges.)/CH_3OH (497 : 3 v/v), 1,1 cm^3/min ; 20°C ; UV-Detektor LC-55 (360 nm) und LDC-Fluoromonitor mit kieselgelgefüllter Zelle (vgl. Text).

Acetonitril/Aethanol erhalten wurden. Die Extraktion und die Vorreinigung des Extraktes wurden nach der Vorschrift von *Pons* und Mitarbeitern (19) durchgeführt: Extraktionsmittel Aceton, Entfernung der Phospholipide und löslicher Proteine durch Bleiacetatbehandlung, entfernen der noch vorhandenen Lipide mit Hexan und überführen der Aflatoxine in Chloroform. Der praktisch zur Trockene eingeengte Extrakt wurde nach der Vorschrift von *Tuinstra* und *Bronsgeest* (20) in 5 ml Aethyläther aufgnommen und auf eine kleine Kieselgelsäule (i. D. 1 cm, 1,5 g Kieselgel 60, reinst, Merck Nr. 7754, 1 h 105°C, 1% Wasser, über Nacht äquilibriert) aufgetragen. Das erste Eluat mit 20 ml Aethyläther wurde verworfen, das zweite Eluat mit 25 ml Chloroform und 3 Vol%

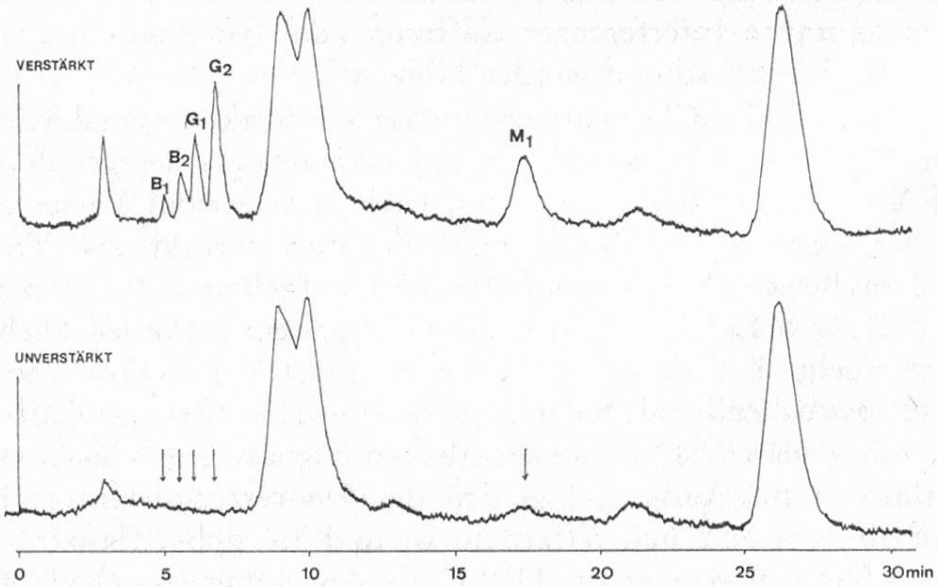


Abb. 5. Chromatogramme eines Milchextraktes auf μ-Porasil
Milch mit je 0,1 ppb Aflatoxin M_1, B_1, G_1, B_2 und G_2 verstärkt. $CHCl_3$(H_2O-ges.)/c-C_6H_{12}/CH_3CN (50 : 15 : 2 v/v) mit Zusatz von 1 Vol% C_2H_5OH zu dieser Mischung ; 1,1 cm^3/min ; 20°C ; LDC-Fluoromonitor mit kieselgelgefüllter Zelle (vgl. Text).

Methanol wurde im Rotationsverdampfer (ca. 40°C, unter N_2) auf rund 50 µl konzentriert und anschließend mit dem zur HPLC verwendeten Elutionsmittel auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. 20 µl dieser Lösung, entsprechend 10 g Milch, wurden mit dem erwähnten HPLC-Trennsystem untersucht. Als Detektor diente der LDC-Fluoromonitor, der mit einer kieselgelgefüllten Zelle versehen war. Das untere Chromatogramm in Abbildung 5 entspricht der unverstärkten und das obere Chromatogramm der mit je 0,1 ppb Aflatoxin B_1, G_1, B_2, G_2 und M_1 verstärkten Milch. Das Chromatogramm der unverstärkten Milch zeigt, daß keine Interferenzen auftreten, welche die Bestimmung der Aflatoxine B_1, G_1, B_2 und G_2 stören würden. Bei der Retentionszeit von Aflatoxin M_1 ist ein kleiner Peak sichtbar, der einem Gehalt von ca. 0,02 ppb Aflatoxin M_1 entsprechen würde. Ob es sich dabei um eine Interferenz oder wirklich um Aflatoxin M_1 handelt, steht zur Zeit noch nicht fest. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen geht jedoch hervor, daß die HPLC grundsätzlich auch zur Bestimmung von Aflatoxinen in Milch eingesetzt werden kann.

Eine abschließende Beurteilung der Eignung der HPLC für die routinemäßige Bestimmung von Aflatoxinen in verschiedensten Lebensmitteln ist gegenwärtig noch nicht möglich. Einfache Bestätigungsmethoden, wie sie in der DC zur Erhärtung der Identität des nachgewiesenen Aflatoxins unbedingt nötig sind, stehen für die HPLC, abgesehen von verschiedenen Trenn- und Detektionssystemen (UV, Fluoreszenz), vorläufig noch nicht zur Verfügung. Verfahren, die die DC daher als Screening- und Bestätigungsmethode und die HPLC als Bestimmungsschritt verwenden, scheinen uns gegenwärtig für Kontrollzwecke am zweckmäßigsten zu sein.

Dank

Herrn Dr. *Marek*, Chef der Sektion Pestizidrückstände und Kontaminationen, danken wir für die stetige Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Herrn Dr. *Guggisberg* vom kantonalen Laboratorium in Frauenfeld danken wir für den zur Verfügung gestellten Mandelextrakt und Herrn *Pfister* von der Firma Kontron für die leihweise Ueberlassung des Labotron Filterfluorometers FFM 32. Herrn Dr. *H. P. van Egmond*, Leiter der Abteilung Mykotoxinforschung, Rijks Instituut voor de Volksgezondheit, Bilthoven, verdanken wir die Aflatoxin M_1-Lösung.

Zusammenfassung

Es wird die HPLC-Trennung der Aflatoxine M_1, B_1, G_1, B_2 und G_2 auf zwei Säulen, µ-Porasil und µ-Bondapak-C_{18}, beschrieben. Bei Verwendung eines UV-Detektors (Wellenlänge 360 nm) betragen die Nachweisgrenzen, je nach Aflatoxin, 1—5 ng. Mit kommerziellen Fluoreszenzdetektoren, deren Zellen mit Kieselgel gefüllt sind, liegt die Nachweisgrenze bei 0,05—0,2 ng. Die beschriebene Technik wurde zur Bestimmung von Aflatoxinen in Mandeln und Milch eingesetzt.

Résumé

On décrit une séparation des aflatoxines M_1, B_1, G_1, B_2 et G_2 par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sur deux colonnes, μ-Porasil et μ-Bondapak-C_{18}. En utilisant un détecteur UV (longueur d'ondes 360 nm) les limites de détection varient, suivant l'aflatoxine en présence, de 1 à 5 ng. Avec des détecteurs à fluorescence du commerce, équipés de cellules remplies de gel de silice, on peut atteindre des limites de détection de 0,05 à 0,2 ng. La technique décrité a été appliquée avec succès au dosage des aflatoxines dans des amandes et dans du lait.

Summary

The HPLC separation of the aflatoxins M_1, B_1, G_1, B_2 and G_2 on two columns, μ-Porasil and μ-Bondapak-C_{18}, is described. Using a UV-detector (wave-length 360 nm) the limits of detection are 1—5 ng, depending on the type of aflatoxin. With commercial fluorescence detectors, equipped with a silica gel-filled cell, detection limits of 0.05—0.2 ng are attainable. The described technique has been successfully applied to the determination of aflatoxins in almonds and milk.

Literatur

1. *Seiber, J. N.* and *Hsieh, D. P. H.:* Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **56**, 827—830 (1973).
2. *Rao, G. H. R.* and *Anders, M. W.:* Aflatoxin detection by high-speed liquid chromatography and mass spectrometry. J. Chromatog. **84**, 402—406 (1973).
3. *Garner, R. C.:* Aflatoxin separation by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatog. **103**, 186—188 (1975).
4. *Seitz, L. M.:* Comparison of methods for aflatoxin analysis by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatog. **104**, 81—89 (1975).
5. *Hsieh, D. P. H., Fitzell, D. L., Miller, J. L.* and *Seiber, J. N.:* High-pressure liquid chromatography of oxidative aflatoxin metabolites. J. Chromatog. **117**, 474—479 (1975).
6. *Pons, W. A., Jr.:* Resolution of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 by high-pressure liquid chromatography. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **59**, 101—105 (1976).
7. *Vivilecchia, R. V., Cotter, R. L., Limpert, R. J., Thimot, N. Z.* and *Little, J. N.:* Considerations of small particles in different modes of liquid chromatography. J. Chromatog. **99**, 407—424 (1974).
8. *Manabe, M.* and *Matsuura, S.:* Liquid chromatography of aflatoxins including aflatoxins B_{2a} and G_{2a}. Agr. Biol. Chem. **35**, 417—423 (1971).
9. *Zimmerli, B.:* Verbesserung der Nachweisgrenze von Aflatoxinen in der HPLC durch Verwendung eines kieselgelgefüllten Fluoreszenzdetektors. J. Chromatog. **131**, 458—463 (1977).
10. *Baker, D. R.:* Du Pont liquid chromatography applications. Lab. Report No 74—01.
11. *Steichen, J. C.:* A dual purpose absorbance-fluorescence detector for high-pressure liquid chromatography. J. Chromatog. **104**, 39—45 (1975).
12. *Robertson, J. A.* and *Pons, W. A., Jr.:* Solid state fluorescence emission of aflatoxins on silica gel. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **51**, 1190—1192 (1968).

13. *Chelkowski, J.:* Spectral behaviour of aflatoxins in different solvents. Photochem. Photobiol. **20**, 279—280 (1974).
14. *Robertson, J. A., Pons, W. A., Jr.* and *Goldblatt, A.:* Preparation of aflatoxins and determination of their ultraviolet and fluorescent characteristics. J. Agr. Food Chem. **15**, 789—801 (1967).
15. *Van Duuren, B. L., Chan, T. L.* and *Irani, F. M.:* Luminescence characteristics of aflatoxin B_1 and G_1. Anal. Chem. **40**, 2024—2027 (1968).
16. *Kmieciak, S.:* Determination of aflatoxins in groundnut meals by high performance liquid chromatography. Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch. **160**, 321—324 (1976).
17. *Williams, R. C., Baker, D. R., Larmann, J. P.* and *Hudson, D. R.:* Small particle silica column packing for high-speed liquid chromatography. Int. Laboratory 1973, November/December, 39—45.
18. *Liem, D. H.* and *Beljaars, P. R.:* Note on a rapid determination of aflatoxins in peanuts and peanut products. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **53**, 1064—1066 (1970).
19. *Pons, W. A., Jr., Cucullu, A. F.* and *Lee, L. D.:* Method for the determination of aflatoxin M_1 in fluid milk and milk products. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **56**, 1431—1436 (1973).
20. *Tuinstra, L. G. M. Th.* and *Bronsgeest, J. M.:* Determination of aflatoxin M_1 in milk at the parts per trillion level. J. Chromatog. **111**, 448—451 (1976).

Dr. B. Zimmerli
Eidg. Gesundheitsamt
Abteilung Lebensmittelkontrolle
Sektion Pestizidrückstände
und Kontaminationen
Haslerstraße 16
CH - 3008 Bern

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 46—63 (1977)

H. Brüschweiler, Eidg. Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen

Analyse von nichtionogenen grenzflächenaktiven Verbindungen (Emulgatoren) mittels Hochdrucksäulenchromatographie

Einleitung

Grenzflächenaktive Verbindungen werden in Wasch-, Reinigungs-, Pflegemitteln, in technischen Produkten und Kosmetika für Reinigungszwecke und zur Herstellung von Emulsionen verwendet. Neben anionaktiven Verbindungen wie Seife, Alkyl-, Alkylbenzolsulfonate und Fettalkoholsulfate gelangen vor allem nichtionogene Emulgatoren auf Polyglykoläther-Basis zum Einsatz (Tabelle 1, Gruppe I).

Auch in Lebensmitteln können emulgierend wirkende Bestandteile natürlicherweise vorhanden sein oder zur Verbesserung von Eigenschaften von Back- und Konditoreiwaren, Cremen, Speiseeis, Schokolade, Instant Food und Fettprodukten zugesetzt werden (1, 2). Emulgatoren sind neben Aromastoffen, Stabilisatoren, Verdickungs- und Geliermitteln die wichtigsten Lebensmittelzusatzstoffe. In Lebensmitteln und kosmetischen Produkten werden Emulgatoren aus Estern von Fettsäuren und Polyalkoholen wie Glyzerin, Sorbitan- Mono- und Disacchariden (Zuckern) verwendet (Tabelle 1, Gruppe II—V).

Mono- und Diglyzeride von Speisefettsäuren, Ester gewisser Genußsäuren und Lezithine sind als unbedenkliche Lebensmittelzusatzstoffe zu beurteilen. Andere Emulgatoren sind in Art, Menge und Anwendung beschränkenden Zulassungsbestimmungen unterworfen (3).

Die Wirkung von Emulgatoren, aus zwei oder mehreren nicht mischbaren Phasen unter mechanischer Einwirkung Dispersionen bzw. Emulsionen zu bilden, hängt mit ihrer molekularen Struktur zusammen. Grenzflächenaktive, organische Verbindungen bestehen aus einem fettlöslichen, lipophilen und einem wasserlöslichen, hydrophilen Anteil, wobei selbstverständlich der fettlösliche Anteil besser in Fettstoffen und der wasserlösliche Anteil besser in der wässerigen Phase löslich ist. Die Anwesenheit von Emulgatoren bewirkt eine Stabilisierung disperser Systeme.

Die Eigenschaften verschiedener grenzflächenaktiver Verbindungen hängen vorwiegend vom hydrophil/lipophil-Verhältnis ab. Emulgatoren mit überwiegend hydrophilem Molekülanteil und dissoziierende, ionogene Verbindungen zeigen bessere Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, während solche mit überwiegend lipophilem Anteil bessere Löslichkeit in apolaren Lösungsmitteln, Fett- und Kohlenwasserstoffen aufweisen.

Tabelle 1
Nichtionogene grenzflächenaktive Verbindungen (Emulgatoren)

In Wasch-, Reinigungs-, Pflege- und technischen Hilfsmitteln

I. *Glykole*

Alkylphenolpolyglykoläther
Fettalkoholpolyglykoläther
Fettsäurepolyglykoläther
Fettaminpolyglykoläther
Fettamidpolyglykoläther
weitere äthoxylierte und
propoxylierte Produkte

In Lebensmitteln und kosmetischen Produkten

II. *Glyzeride*

Mono- und Diglyzeride verschiedener Fettsäuren
Mono- und Diglyzeride verschiedener Fettsäuren und verestert mit Genußsäuren wie Essig-, Zitronen-, Milch-, Wein- und Diacetylweinsäure
Mono- und Diglyzeride, äthoxyliert
Polyglyzerinester verschiedener Fettsäuren
Lezithine (ionogen)

III. *Sorbitan-Fettsäureester*

Sorbitanester verschiedener Fettsäuren (Mono-, Di-, Triester) (Span-Typen)
Sorbitanester verschiedener Fettsäuren, äthoxyliert (Tween-Typen)

IV. *Mono- und Disaccharide*

Mono- und Disaccharide verschiedener Fettsäuren (Zuckerester)

V. *Hydroxyfettsäure-Derivate*

Hydroxyfettsäuren verestert mit Fettsäuren (ionogen)
(z. B. Na- und Ca-salze von Stearoyl-lactat)

Emulgatoren mit besserer Oellöslichkeit wurden durch *Griffin* (4) in seinem Hydrophil-Lipophil-Balance-(HLB-)System von 0—9 und wasserlösliche Emulgatoren von 11—20 numeriert. Die HLB-Werte lassen sich für nichtionogene Emulgatoren aus dem Molekulargewicht des Emulgators (M) und dem Molekulargewichtsanteil der hydrophilen Gruppe (M_H) berechnen: $HLB = 20 \cdot (1 - M_H/M)$. Die HLB-Werte geben Anhaltspunkte über die anwendungstechnischen Eigenschaften von Emulgatoren.

Diese erwähnten unterschiedlich polaren Eigenschaften grenzflächenaktiver Verbindungen bilden eine ausgezeichnete Grundlage für ihre adsorptionschromatographische Trennung. Sie werden nach ihrer Polarität und den hydrophil/lipophil-Eigenschaften getrennt.

Bei der chemischen Analyse von Emulgatoren ist zu berücksichtigen, daß diese Substanzen nicht aus einer Verbindung bestehen, sondern Gemische darstellen. Beispielsweise enthalten handelsübliche Glyzeride 1-Mono-, 2-Mono-, Di- und Triglyzeride verschiedener Fettsäuren und es können Mono-, Di- und Polyglyzeride verschiedener struktureller Konfigurationen (5, 6) vorhanden sein. Aehnlich verhält es sich bei den Sorbitan- und den Zuckerfettsäureestern (7). Polyglykoläther bestehen aus polymerhomologen Anteilen verschiedenen Aethoxylierungsgrades. Im Handel sind neben den Emulgatoren auch Emulgatoren-Mischungen (Blends) und mit Zusatzstoffen versehene Emulgatoren-Präparate (Compounds) erhältlich.

Die einzelnen Emulgatoren lassen sich mit den in der Fettchemie üblichen Kennzahlen wie Säure-, Verseifungs-, Hydroxylzahl usw. charakterisieren und chemisch analysieren (8).

Mit gasflüssigkeitschromatographischen Methoden können sowohl die Hydrolysenprodukte der meisten Emulgatoren, nämlich die Fett- und Hydroxyfettsäuren, Polyalkohole und Saccharide (5, 6, 7, 8, 9, 10) und sofern genügend flüchtig, auch die Emulgatoren direkt als silylierte Derivate nachgewiesen werden.

Dünnschichtenchromatographische Methoden sind relativ einfach und erfolgreich anzuwenden, wobei die Trennung üblicherweise auf mit Kieselgel beschichteten Platten, verschiedenen Fließmitteln und der Nachweis mit allgemeinen und spezifischen Sprühreagenzien erfolgt (5, 6, 7, 11).

Mittels Säulenchromatographie wurden durch *Quinlin* und *Weiser* (12) Mono-, Di- und Triglyzeride an Kieselgel und Eluation mit verschieden polaren Lösungsmitteln (Benzol, Benzol/Aethyläther (9/1), Aethyläther) getrennt. Eine solche präparative Auftrennung von Emulgatoren und Emulgatoren-Gemischen empfiehlt *Mattey (11)* vorgängig dünnschichtenchromatographischer Analysen und *Sahasrabudhe* (5, 6, 7) vor gaschromatographischen Untersuchungen.

Bei der Isolation von Emulgatoren aus Lebensmitteln und kosmetischen Produkten mit Chloroform und Methanol ist es ebenfalls vorteilhaft, die größeren Mengen extrahierter Fettstoffe vorgängig der Emulgator-Analysen durch Säulenchromatographie gemäß *Quinlin* und *Weiser* zu entfernen (11, 13). Die Extraktion und Identifikation von Emulgatoren aus Lebensmitteln kann problematisch sein, wegen der geringen Zusätze dieser Stoffe, ihrer schlecht definierten chemischen Zusammensetzung und wegen der Anwesenheit anderer Lebensmittelbestandteile wie Fettstoffe, Kohlenhydrate, Proteine und Substanzen ähnlicher oder gleicher chemischer Zusammensetzung wie Emulgatoren.

Aus Wasch- und Reinigungsmitteln werden die grenzflächenaktiven Verbindungen (Tenside) üblicherweise durch Extraktion mit Alkohol isoliert, dann die anionaktiven Tenside mittels Ionenaustauscher entfernt und im Eluat die nichtionogenen Tensidanteile bestimmt (14).

Auf dem Gebiete der hochdrucksäulenchromatographischen Trennung von Emulgatoren wurden Alkylphenolpolyglykoläther mittels Gelchromatographie (15) und Flüssig-flüssig-Chromatographie (16) in polymerhomologe Anteile verschiedenen Aethoxylierungsgrades aufgetrennt. *Aitzetmüller* (17) hat kürzlich Finger-

print Chromatogramme verschiedener Lebensmittelemulgatoren unter Anwendung eines Hitzdrahtdetektors beschrieben. Auch Lezithine wurden getrennt (18).

Zweifellos besteht ein Bedürfnis für Hersteller und Verwender sowie auch für Prüfungen und amtliche Kontrollen Emulgatoren zu bestimmen. Das Gebiet der Analyse von Emulgatoren wurde bisher noch relativ wenig bearbeitet. *Bauer* (1) schreibt in einem Review-Artikel über Emulgatoren, daß Hochdrucksäulenchromatographie wahrscheinlich die zukünftige Technik zur Analyse von Emulgatoren sei.

Experimentelle Ergebnisse

Prinzip

Es wurden nichtionogene grenzflächenaktive Verbindungen (Emulgatoren) wie Alkylphenol-, Fettalkohol-, Fettsäure-, Fettamin- und Fettamidpolyglykoläther, ferner Glyzeride (Mono-, Di-, Triglyzeride und mit Genußsäuren veresterte Produkte) sowie Ester von Fettsäuren mit Polyalkoholen (Sorbitan- und Zuckerester) mittels Adsorptions-Hochdrucksäulenchromatographie an Kieselgel (μ Porasil, Waters) getrennt.

Der Nachweis der Trennung erfolgte mit UV-Detektor, und zwar

1. bei den Alkylphenolpolyglykoläthern aufgrund der Absorption des aromatischen Ringes bei 276 nm,
2. bei Alkyl-, Fettalkohol- und anderen Polyglykoläther-Verbindungen nach Derivatisierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid bei 254 nm und
3. bei den Fettsäureestern (Glyzerin-, Sorbitan- und Zuckerestern) durch die UV-Absorption der Karboxylgruppe bei 220 nm.

Apparatur

— Zweistrahl-UV-Spektrophotometer, Beckman Modell 24, Küvetten: 1 cm
— Waters Flüssigkeitschromatograph mit Einspritzblock U6K, Hochdruckpumpe und UV-Detektor Mod. 440 (Filter: 280 nm, 254 nm)
— Säule: μ Porasil (Kieselgel), 10 Mikron, Waters P/N 27477, 30 cm Länge, 4 mm Durchmesser, Raumtemperatur
— UV-Detektor: Spektrophotometer LC-55, Perkin-Elmer
— Gradientenelution: Gefäß von 25 ml Inhalt, mit Magnetrührer, vor Pumpeneingang (als Niederdruckgradient), wobei das Gefäß mit dem weniger polaren Lösungsmittel gefüllt wurde und das stärker polare Lösungsmittel entsprechend dem Abgang in die Pumpe einfloß. Es wurden auch 2 Gefäße in Serie angewandt, das 1. Gefäß enthielt beispielsweise Isooctan/Isopropanol (99/1) und das 2. Gefäß Isopropanol, in das von einem Reservoir Aethanol/Wasser (90/10) einfloß (Abb. 1; Tabelle 3).

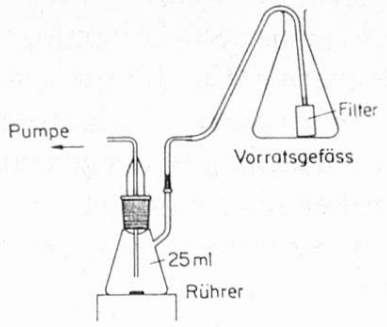


Abb. 1. Mischgefäß für Gradienten

Reagenzien

Elutions- und Lösungsmittel (UV rein)

Isooctan
Isopropanol (0,03% Wasser)
Aethanol (4,3% Wasser)
dest. Wasser

Derivatisierung

3,5-Dinitrobenzoylchlorid
Tetrahydrofuran
Natriumbikarbonat
Aether

Vorarbeiten zur Trennung einzelner Emulgatoren

UV-Spektren

Da der Nachweis einzelner Emulgatoren aufgrund der UV-Absorption vorgenommen wurde, erfolgte vorgängig der hochdrucksäulenchromatographischen Trennung die Aufnahme von UV-Spektren der zu untersuchenden Emulgatoren in Lösungen von Isooctan/Isopropanol (40/60). Typische Spektren sind in Abbildung 2 dargestellt.

Alkylphenolpolyglykoläther zeigten wenig abhängig von der Art des Alkylphenols und des Aethoxylierungsgrades ein Absorptionsmaximum bei 274—278 nm und eine stärkere Absorption bei ca. 224 nm (Abb. 2a). Als Meßwellenlänge für den flüssigkeitschromatographischen Nachweis wurde die Absorption bei 276 nm (mit Filter: 280 nm) benutzt. Bei Messungen im Absorptionsmaximum ist die Extinktion proportional dem Benzolring-Anteil.

Die Bestimmung der mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid derivatisierten Polyglykoläther-Verbindungen erfolgte bei 254 nm (mit Filter: 254 nm) (Abb. 2b).

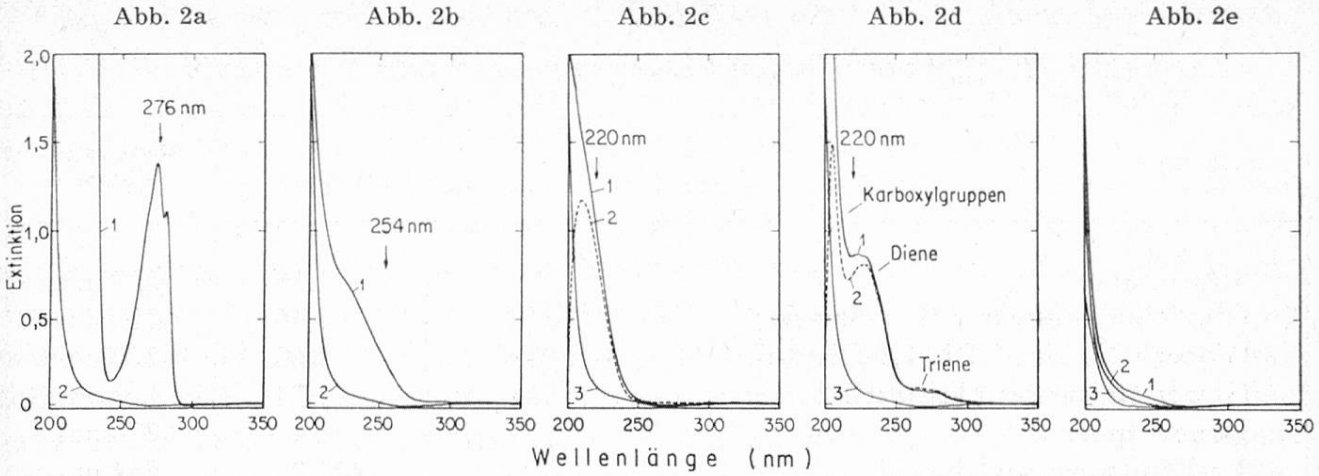


Abb. 2. UV-Spektren

a 1 Nonylphenolpolyglykoläther mit 9 AeO (0,95%).
2 Lösungsmittel: Isooctan/Isopropanol (40/60).

b 1 3,5-Dinitrobenzoylderivat eines C 10/12-Fettalkoholpolyglykoläthers mit 10 AeO (0,0025%).
2 Lösungsmittel: Isooctan/Isopropanol (40/60).

c 1 Glyzerindistearat (0,5%).
2 UV-Differenzspektrum.
3 Lösungsmittel: Isooctan/Isopropanol (40/60).

d 1 Glyzerinmonofettsäureester (0,1%) (vorwiegend Monooleat).
2 UV-Differenzspektrum.
3 Lösungsmittel: Isooctan/Isopropanol (40/60).

e Lösungsmittel: 1 Isopropanol; 2 Aethanol: 3 Isooctan.

Carboxylverbindungen weisen im UV-Bereich unterhalb ca. 250 nm eine Absorption auf. Zum Nachweis der aus der Chromatographiersäule eluierten Fettsäureester wurde die Absorption bei 220 nm gemessen. Das UV-Differenz-Spektrum, das erhalten wurde, indem in die Referenzzelle des Zweistrahl-UV-Spektrophotometers statt Wasser das Lösungsmittelgemisch Isooctan/Isopropanol gegeben wurde, ergab ein Maximum der Carboxylabsorption bei ca. 210 nm (Abb. 2c).

Bei Anwesenheit von konjugierten, ungesättigten Fettsäuren in Emulgatoren ist, neben der Carboxylabsorption, UV-Absorption durch vorhandene konjugierte Diene und Triene (Abb. 2d) festzustellen.

Extinktionswerte die im UV-Bereich für 1%ige Lösungen ermittelt wurden, ergaben für Carboxylgruppen niedrige und für 3,5-Dinitrobenzol-Derivate hohe spezifische Extinktionswerte.

Derivatisierung

Polyglykolätherderivate (Fettalkohol-, Fettsäure-, Fettamin-, Fettamidpolyglykoläther und Aethylenoxid/Propylenoxid-Addukte), die kein UV-Chromophor aufwiesen, wurden mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid verestert.

Tabelle 2

Extinktion ($E^{1\%}_{1\,cm}$) von 1%igen Lösungen in Isooctan/Isopropanol (40/60)

Substanz	$E^{1\%}_{1\,cm}$	Meßwellenlänge
Stearinsäure	1,38	220 nm
Glyzerinmonostearat (L-1-Stearin)	1,46	220 nm
Glyzerindistearat (DL-1,2-Distearin)	1,60	220 nm
Glyzerintristearat (Tristearin)	1,74	220 nm
Isononylphenol	78,4	276 nm
3,5-Dinitrobenzoylchlorid	422,0	254 nm

Lösungsmittel in Referenzzelle: Isooctan/Isopropanol (40/60)

Herstellung der 3,5-Dinitrobenzoylderivate

250 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid wurde in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst zu 250 mg Polyglykoläther-Verbindung gegeben und das Gemisch in einem Reagenzglas mit Schiffstopfen während 1 Stunde im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde dann in einem Scheidetrichter in 50 ml Aether gelöst zweimal mit je 30 ml äthergesättigter 5%iger Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die Aetherlösung wurde darauf mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft.

Elutionsmittel

Die Elutionsmittel sind für hochdrucksäulenchromatographische Trennungen von größter Bedeutung. Um gute Trenneffekte zu erzielen, ist es erforderlich, geeignete Lösungsmittel und im Verlaufe der Elution sich ändernde Lösungsmittelzusammensetzungen ausgewählter Polaritätsbereiche (Gradienten) einzusetzen. Da die Emulgatoren meistens aus einer Vielzahl von Verbindungen mit oft sehr unterschiedlicher Polarität bestehen, ist die Elution mit Gradienten durchzuführen.

Bei der Gradientenelution von Substanzen aus mit Kieselgel gefüllten Säulen wird mit einem apolaren Lösungsmittel (z. B. Isooctan/Isopropanol) begonnen und einem stärker polaren Lösungsmittel (z. B. Aethanol/Wasser) beendet. Die weniger polaren Substanzen werden zuerst und die stärker polaren Substanzen später eluiert.

Die in den vorliegenden Versuchen angewandten Lösungsmittel zunehmender Polarität waren: Isooctan, Isopropanol, Aethanol und Wasser. Durch Kombination und geeignetes Ineinanderfließen dieser Lösungsmittel gelang es, alle zur Trennung von Emulgatoren erforderlichen Polaritätsbereiche zu erhalten. Die gewählten Lösungsmittel weisen zudem im UV-Bereich von 220 nm, der zum Nachweis der Carboxylgruppen erforderlich ist, eine geringe Absorption auf.

Bei der Bildung von Gradienten müssen sich die verschiedenen Lösungsmittel beim Ineinanderfließen klar mischen. Isopropanol ist mit Isooctan und mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar und dient als Lösungsvermittler. Aethanol ist, je nach Wassergehalt, nur in gewissen Bereichen mit Isooctan mischbar.

Für die Gradientenelution sind verschiedene Apparate im Handel erhältlich und in der Literatur beschrieben (19). Bei den vorliegenden Versuchen wurde zur Herstellung der Gradienten ein Mischgefäß von 25 ml Inhalt vor der Hochdruckpumpe (Niederdruckgradient) benutzt. In diesem mit Magnetrührer versehenen Gefäß befand sich das weniger polare Lösungsmittel (z. B. Isooctan/Isopropanol (99/1)). Das stärker polare Lösungsmittel floß, entsprechend dem Abgang in die Pumpe, ein. Durch diese einfache Anordnung erfolgte eine exponentielle Verdünnung durch das stärker polare Lösungsmittel. Größere Gefäße führen zu einem geringeren Anstieg der Verdünnung. Zwei solche in Serie geschaltenen Mischgefäße ermöglichten, den ganzen Polaritätsbereich von Isooctan bis Wasser zu bestreichen.

Nach Beendigung eines Chromatogramms mit einem stark polaren Lösungsmittel soll die Säule zuerst mit einem damit verträglichen Lösungsmittel, z. B. Isopropanol, und dann mit dem Ausgangs-Lösungsmittelgemisch äquilibriert werden.

Bei Anwendung einer mit μ Porasil gefüllten Säule erwiesen sich die in Tabelle 3 angeführten Lösungsmittelgradienten als geeignet. Kieselgelfüllungen anderer Provenienzen erforderten zur Erzielung optimaler Trenneffekte etwas andere Polaritätsbereiche.

Isooctan allein führte zu keiner Elution der Fettstoffe und Emulgatoren und ergab beim Einfließen von Isopropanol ins Isooctan einen starken, unerwünschten Lösungsmittelpeak. Als apolarstes Lösungsmittel wurde deshalb Isooctan/Isopropanol (99/1) verwendet.

Durchführung der hochdrucksäulenchromatographischen Trennung

Es wurden 1—5%ige Lösungen der Emulgatoren in Isooctan/Isopropanol (40/60), gegebenenfalls unter Erwärmen, hergestellt. Die Emulgatorenlösungen von Fettsäureestern sollen frisch hergestellt werden, weil sonst Umesterung stattfinden kann. Nach dem Aequilibrieren der Säule mit dem Ausgangslösungsmittel und beim Erscheinen des Gradienten im Einspritzblock, wurden 25—150 μl der Emulgatorlösung eingespritzt. Bei der Gradienten-Elution war zu beachten, daß die Menge Lösungsmittel zwischen Mischgefäß und Einspritzblock ca. 15 ml betrug. Bei Fließgeschwindigkeiten von 1 ml/min dauerte es deshalb 15 Minuten, bis der Gradient im Einspritzblock erschien und die Substanz eingespritzt werden konnte.

Die UV-Absorption des Eluats wurde dann bei den ausgewählten Wellenlängen gemessen und registriert.

Tabelle 3. Lösungsmittelgradienten

Emulgator	Gradient	Zusammensetzung des Gradienten in % nach 0	5	10	15	30	60 Min.
	1. Gradient, stärker polarer Bereich						
Alkylphenolpolyglykoläther	Isooctan/Isopropanol (40/60) im Gefäß (25 ml),	100	81,9	67,0	54,9	30,1	9,1
	Aethanol/Wasser (90/10) aus Vorratsgefäß	0	18,1	33,0	45,1	69,9	90,9
	2. Gradient, apolarer Bereich						
Fettstoffe, Mono-, Di-, Triglyzeride (evtl. Polyglyzeride, Sorbitane, Zuckerester)	Isooctan/Isopropanol (99/1) im Gefäß (25 ml),	100	81,9	67,0	54,9	30,1	9,1
	Isopropanol (100) aus Vorratsgefäß	0	18,1	33,0	45,1	69,9	90,9
	3. Gradient, apolarer bis stärker polarer Bereich						
Fettalkohol-, Fettsäure-, Fettaminpolyglykoläther usw. derivatisiert mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid; Polyglyzeride, Sorbitane, Zuckerester	Isooctan/Isopropanol (99/1) im 1. Gefäß (25 ml).	100	81,9	67,0	54,9	30,1	9,1
	Isopropanol im 2. Gefäß (25 ml),	0	16,4	26,8	32,9	36,2	21,8
	Aethanol/Wasser (90/10) aus Vorratsgefäß	0	1,7	6,2	12,2	33,7	69,1

Resultate

Glykole

Alkylphenolpolyglykoläther

Alkylphenolpolyglykoläther, insbesondere Isononylphenolpolyglykoläther, haben als grenzflächenaktive Verbindungen (Tenside) in Wasch-, Reinigungs- und technischen Hilfsmitteln weite Verbreitung. Zu ihrer Herstellung werden Alkylphenole mit den erforderlichen Mengen Aethylenoxid umgesetzt. Die gebildeten Produkte bestehen aus Gemischen von Polymerhomologen verschiedenen Aethoxylierungsgrades. Während mit der Gaschromatographie nur Verbindungen bis maximal ca. 8 Aethylenoxidgruppen genügend flüchtig und nachweisbar sind, können mittels der Hochdrucksäulenchromatographie auch höher äthoxylierte Verbindungen erfaßt werden. In Abbildung 3 werden Chromatogramme eines Isononylphenols, das mit 9 Mol Aethylenoxid umgesetzt wurde, bei isokratischer und Gradientenelution dargestellt. Die einzelnen Peaks sind auf Isononylphenolpolyglykoläther gleichen Aethoxylierungsgrades zurückzuführen.

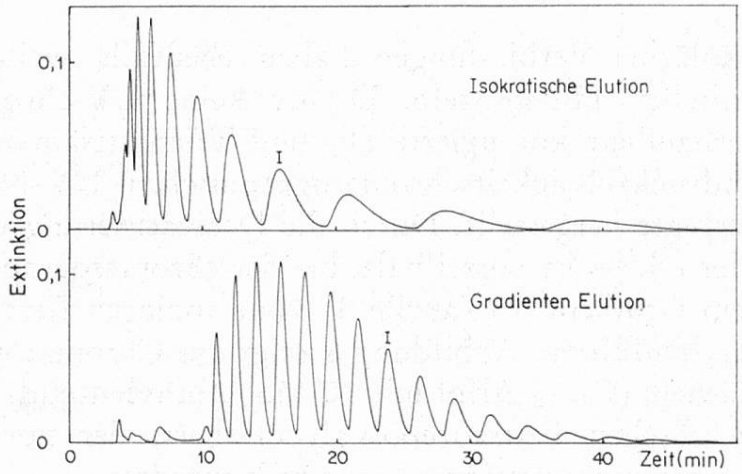


Abb. 3. Isononylphenolpolyglykoläther (9 Mol Aethylenoxid)

20 µl, 2,5% in Isooctan/Isopropanol (40/60); µ Porasil, 10 Mikron, 30 cm/4 mm; Nachweis: UV 276 nm; Isokratische Elution mit Isooctan/Aethanol (55/45), 1 ml/min; Gradienten Elution mit Isooctan/Isopropanol (40/60) und einfließend Aethanol/Wasser (90/10), 1 ml/min (1. Gradient, Tabelle 3), I: identischer Peak.

Abbildung 4 stellt ein Isononylphenol dar, das mit 23 Mol Aethylenoxid umgesetzt wurde.

Die prozentuale molare Verteilung der aus den einzelnen Peakflächen errechneten Anteile von Isononylphenolpolyglykoläthern verschiedener Aethoxylierung ist in Abbildung 5 dargestellt.

Wir hatten auch Gelegenheit, die beim biologischen Abbau von Nonylphenolpolyglykoläthern im Abwasser entstehenden Zwischenprodukte (Metaboliten) durch Ausblasen nach *Wickbold* (22) zu isolieren und hochdruckflüssigkeitschromatographisch nachzuweisen. Dabei zeigten sich als wesentlicher metabolischer

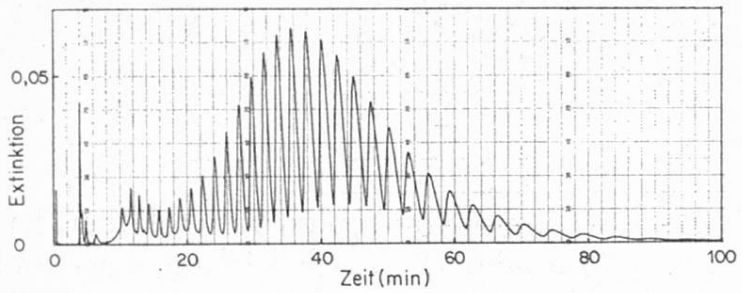


Abb. 4. Isononylphenolpolyglykoläther (23 Mol Aethylenoxid)

25 µl, 5% in Isooctan/Isopropanol (40/60), µ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 276 nm 1. Gradient, Tabelle 3, 1 ml/min.

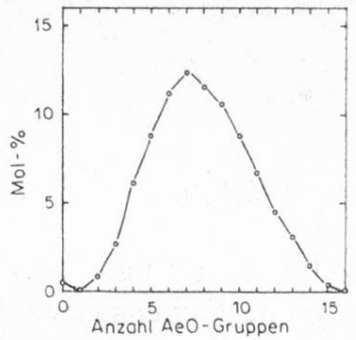


Abb. 5. Verteilung der Nonylphenolpolyglykoläther

verschiedenen Aethoxylierungsgrades, berechnet aus den Peakflächen des Isononylphenolpolyglykoläthers, umgesetzt mit 9 Mol Aethylenoxid (Abb. 3).

Abbauvorgang eine Verkürzung der Polyglykoläthergruppen und relativ schwere Abbaubarkeit des aromatischen Ringes (23).

Fettalkohol-, Fettsäure-, Fettamin-, Fettamidpolylglykoläther und weitere äthoxylierte Produkte

Diese Polyglykoläther-Verbindungen haben ebenfalls weite Verbreitung in Wasch- und technischen Hilfsmitteln. Da sie keine UV-chromophore Gruppe außer eventuell vorhandene konjugierte Di- und Trienfettsäuren aufweisen, wurden für den hochdruckflüssigkeitschromatographischen UV-Nachweis die 3,5-Dinitrobenzoyl-Derivate hergestellt. Durch die Derivatisierung werden diese Verbindungen lipophiler und es ist vorteilhaft, bei der chromatographischen Trennung die Elution mit dem Gradient 3 (Tabelle 3) vom apolaren Bereich bis zum stark polaren Bereich durchzuführen. Abbildung 6 zeigt das Chromatogramm eines Fettalkoholpolyglykoläthers ($C_{10/12}$-Alfol mit 10 Mol Aethylenoxid) und Abbildung 7 dasjenige eines technischen Fettsäurepolyglycoläthers, der zur Hauptsache aus Stearin-, Palmitin- und etwas Oelsäure hergestellt wurde.

Auch Fettamin- und Fettamidpolyglykoläther sowie Aethylenoxid/Propylenoxid-Addukte konnten hochdrucksäulenchromatographisch in Fraktionen auf-

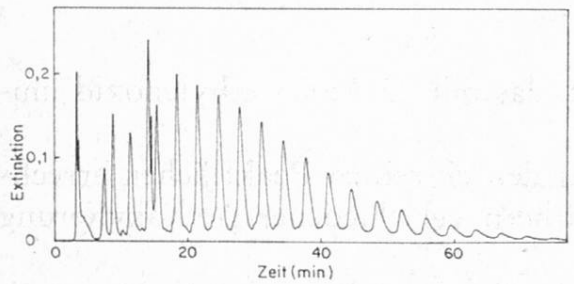


Abb. 6. Fettalkoholpolyglykoläther (10 Mol Aethylenoxid)

derivatisiert mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, 25 µl, 1% in Isooctan/Isopropanol (40/60), µ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 254 nm 3. Gradient Tabelle 3, 1 ml/min.

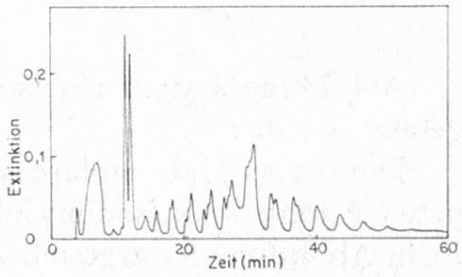


Abb. 7. Fettsäurepolyglykoläther (ca. 9 Mol Aethylenoxid)

derivatisiert mit 3,5-Dinitrobenzylchlorid, Bedingungen wie Abbildung 5.

getrennt werden. Dabei zeigte sich, daß diese Produkte aus Gemischen einer großen Anzahl einzelner Verbindungen bestehen.

Glyzeride

Mono- und Diglyzeride stellen die am meisten verwendeten Lebensmittelemulgatoren dar. Die flüssigkeitschromatographische Trennung und der direkte

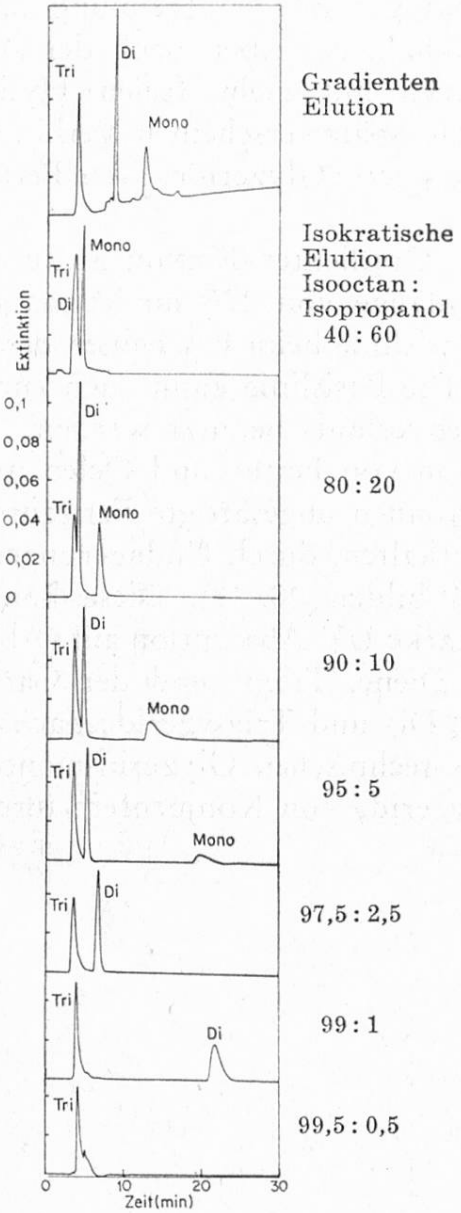


Abb. 8. Trenneffekte bei Mono-, Di- und Tristearin

je 50 μl von 1% Mono-, Di- und Tristearin in Isooctan/Isopropanol (40/60), μ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 220 nm; Gradienten Elution mit Isooctan/Isopropanol (99/01) und einfließend Isopropanol (2. Gradient, Tabelle 3), 1 ml/min; Isokratische Elution mit Isooctan/Isopropanol, verschiedene Mischverhältnisse, 1 ml/min.

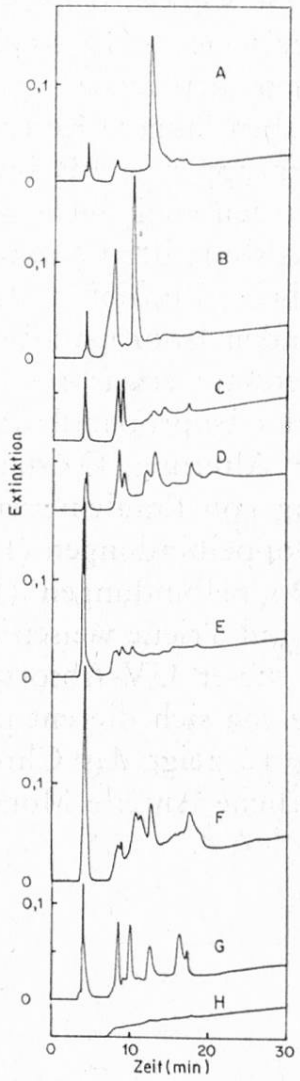


Abb. 9. Fettsäureglyzeride und Derivate von Fettsäureglyzeriden

25—125 μl, 5% in Isooctan/Isopropanol (40/60) μ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 220 nm; Elution mit 2. Gradienten, Tabelle 3, 1 ml/min.

Substanzen:

A: Monodiglyzerid
B: Azetoglyzerid
C: Zitronensäuremonostearat
D: Milchsäuremonodiglyzerid
E: Azetylweinsäuremonoglyzerid
F: Polyglyzerinstearat
G: äthoxiliertes Monodiglyzerid
H: Basislinie

Nachweis von Glyzeriden durch die Carboxylabsorption, ohne zusätzliche Verseifung oder Veresterung, ist nicht nur im Zusammenhang mit Emulgatoren, sondern für die Untersuchung von Fettstoffen als Bestandteile biologischer Systeme von Interesse.

In Abbildung 8 werden die Peaklagen von Mono-, Di- und Tristearin nach Elution mit verschiedenen Isooctan/Isopropanol-Gemischen sowie mit einem Isooctan/Isopropanol-Gradienten dargestellt.

Abbildung 9 zeigt Chromatogramme verschiedener Glyzeride und mit Genußsäuren veresterte Glyzeride.

Glyzeride werden bei der adsorptionschromatographischen Trennung nach der Anzahl der freien Hydroxylgruppen und innerhalb derselben nach der Art der vorhandenen Fettsäuren getrennt. Verbindungen mit mehr freien Hydroxylgruppen haben längere Retentionszeiten, ebenfalls später erscheinen Verbindungen mit Aethergruppen wie Polyglyzeride und äthoxylierte Glyzeride. Freie Fettsäuren werden mit den Diglyzeriden eluiert.

Zur Basislinie der Chromatogramme bei der Gradienten-Elution ist zu erwähnen, daß beim Einfließen des bei einer Wellenlänge von 220 nm etwas stärker absorbierenden Isopropanols ins Isooctan die Basislinie beim Erscheinen des Alkohols im Detektor etwas ansteigt (vgl. Abb. 9). Die Basislinie kann auch zur Registrierung des Isopropanolanteils und Gradientenverlaufs benutzt werden.

Bei der Alterung, Oxidation und Raffination von Fetten und Oelen und der Herstellung von Emulgatoren aus Fettstoffen können ungesättigte Fettsäuren, die isolierte Doppelbindungen (Isolenfettsäuren) enthalten, durch Umlagerungen konjugierte Doppelbindungen (Konjuenfettsäuren) bilden (20, 21). Diese konjugierten Diene und Triene weisen bekanntlich eine starke UV-Absorption auf (Abb. 2d). Aufgrund dieser UV-Absorption konjugierter Diene, Triene und der Carboxylgruppen lassen sich die entsprechenden Mono-, Di- und Triglyzeride nachweisen. Abbildung 10 zeigt das Chromatogramm eines technischen Glyzerin-monooleats, das wesentliche Anteile Mono-, Di- und Triglyzeride von Konjuenfettsäuren enthielt.

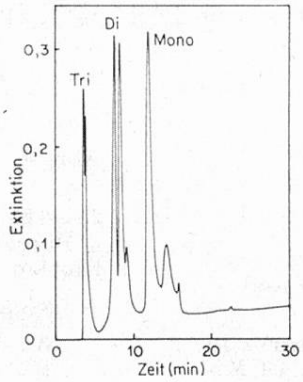
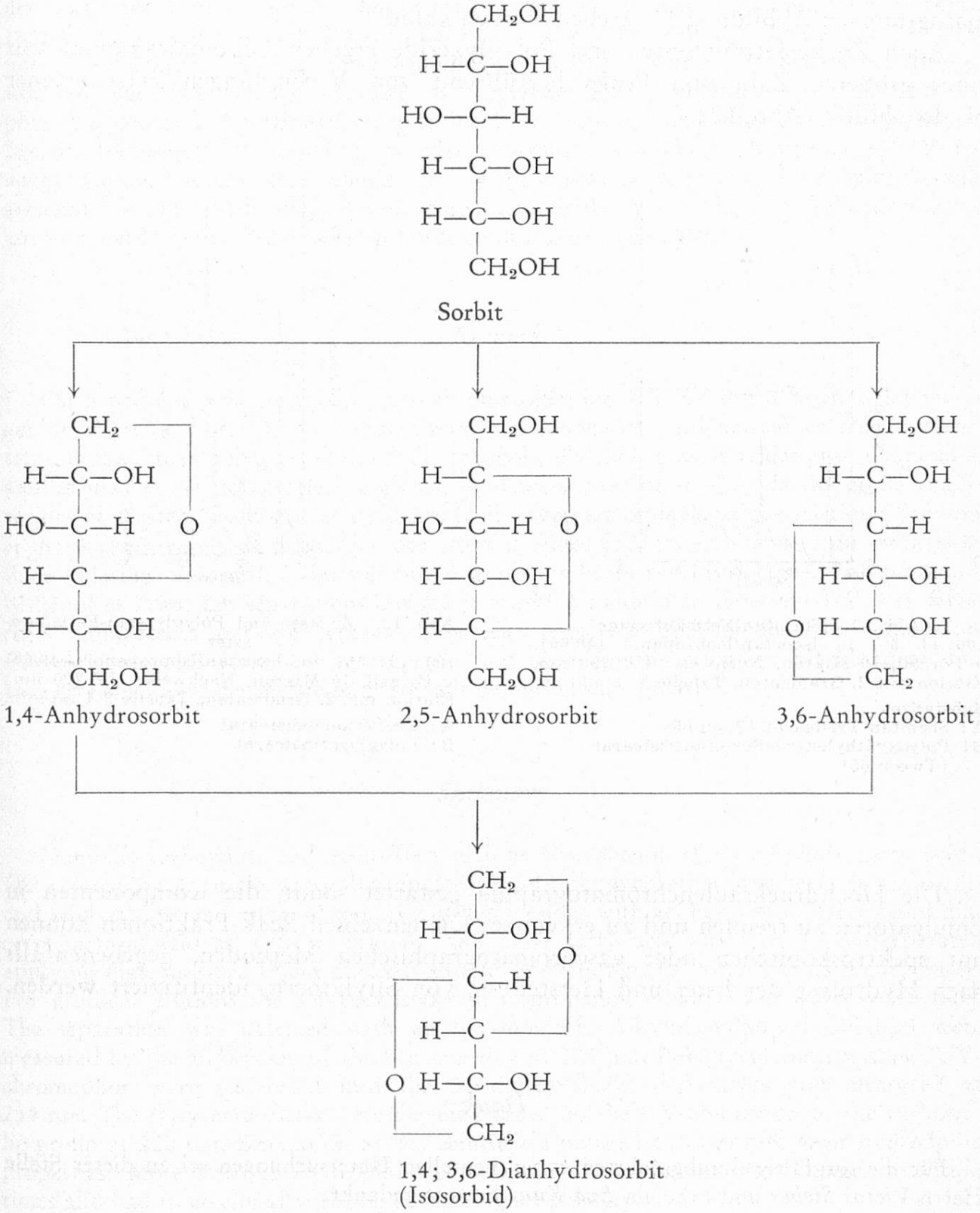


Abb. 10. Technisches Glyzerinmonooleat
25 μl, 5% in Isooctan/Isopropanol (40/60) μ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV; 220 nm; Elution mit 2. Gradienten, Tabelle 3, 1 ml/min.

Sorbitan-Fettsäureester werden durch Veresterung des Sorbits hergestellt. Bei der Veresterung bildet das Ausgangsprodukt Sorbit unter Wasserabspaltung die zyklischen 1,4-, 2,5- und 3,6-Anhydrosorbite sowie bizyklisches Isosorbid und die entsprechenden Mono-, Di- und Trifettsäureester.



Das Chromatogramm eines handelsüblichen Sorbitan-Tristearats (Span-Typ) ist in Abbildung 11 dargestellt.

Bei der Reaktion von Sorbitanfettsäureester mit Aethylenoxid, bilden die freien Hydroxylgruppen Polyglykole verschiedener Kettenlängen. Erfahrungsgemäß findet bei der Aethoxylierung auch teilweise Umesterung der Sorbitanfettsäureester statt. Die gebildeten Polyoxyäthylen-Sorbitan-Fettsäureester (Tweens) bestehen aus einer Vielzahl von Verbindungen wie dies aus den Fingerprint-Chromatogrammen Abbildung 11 ersehen werden kann.

Auch Zuckerfettsäureester und Polyglyzeride ergeben Chromatogramme mit einer größeren Zahl von Peaks herrührend von Verbindungen verschiedener Hydrophilität (Abb. 12).

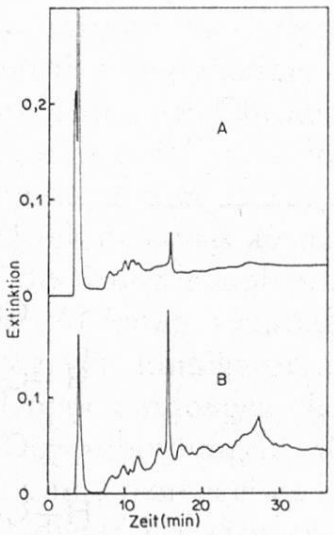


Abb. 11. Sorbitan-Fettsäureester
100 µl, 5% in Isooctan/Isopropanol (40/60), µ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 220 nm, Elution mit 2. Gradienten, Tabelle 3, 1 ml/min.
Substanzen
A: Sorbitan-Tristearat (Span 65)
B: Polyoxyäthylen(20)Sorbitantristearat (Tween 65)

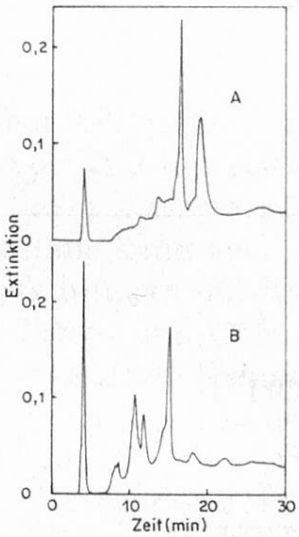


Abb. 12. Zucker- und Polyglyzerin-Fettsäureester
100 µl, 5% in Isooctan/Isopropanol (40/60) µ Porasil, 10 Mikron, Nachweis: UV 220 nm; Elution mit 2. Gradienten, Tabelle 3 1 ml/min.
A: Zuckermonodistearat
B: Polyglyzerinstearat

Die Hochdrucksäulenchromatographie gestattet somit, die Komponenten in Emulgatoren zu trennen und zu erkennen. Die einzelnen Peak-Fraktionen können mit spektroskopischen oder gaschromatographischen Methoden, gegebenenfalls nach Hydrolyse der Ester und Herstellung von Silyläthern, identifiziert werden.

Dank

Für die sorgfältig durchgeführten experimentellen Untersuchungen sei an dieser Stelle Herrn *Victor Sieber* und Fräulein *Eva Kunz* bestens gedankt.

Zusammenfassung

Es wurden nichtionogene grenzflächenaktive Verbindungen und Emulgatoren wie Alkylphenol-, Fettalkohol-, Fettsäure-, Fettamin-, Fettamid- und Polypropylenglykol-Polyglykoläther, ferner Mono-, Di- und Triglyzeride und Veresterungsprodukte von Mono- und Diglyzeriden mit Essig-, Zitronen-, Milch- und Diacetylweinsäure, sowie Sorbitan- und Zuckerfettsäureester hochdrucksäulenchromatographisch in Kieselgel (μ Porasil) getrennt. Zur Elution wurden Gradienten basierend auf den Lösungsmitteln Isooctan, Isopropanol, Aethanol und Wasser angewandt. Der Nachweis der Trennungen erfolgte mit UV-Detektor. Bei den Alkylphenolpolyglykoläthern wurde die Benzolring-Absorption bei einer Wellenlänge von 276 nm gemessen. Polyglykoläther ohne UV-Chromophor wurden mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid derivatisiert und die UV-Absorption bei 254 nm festgestellt. Fettsäureester wurden aufgrund der Carboxylabsorption bei 220 nm nachgewiesen. Die einzelnen Emulgatoren werden entsprechend ihrer Hydrophilität aufgetrennt. Stärker hydrophile Emulgatorenbestandteile weisen längere Retentionszeiten auf und werden mit stärker polaren Lösungsmittelgemischen eluiert.

Résumé

On a procédé à la séparation, par chromatographie à haute pression sur colonnes de gel de silice (μ Porasil), de combinaisons non ionogènes tensioactives et d'émulgateurs tels que des éthers polyglycoliques d'alkylphénols, d'alcools gras, d'acides gras, d'amines et amides gras et de polypropylène-glycol, et d'autre part de mono-, de di- et de triglycérides et d'esters de mono- et de diglycérides avec les acides acétique, citrique, lactique et diacétyl-tartrique, de même que des esters d'acides gras du sorbitane et du saccharose. Pour l'élution on a utilisé des solvants à gradients basés sur l'iso-octane, l'iso-propanol, l'éthanol et l'eau. Les séparations ont été prouvées à l'aide d'un détecteur-UV. Les différents émulgateurs ont été séparés selon leur caractère hydrophyle. Des composants d'émulgateurs plus fortement hydrophyles ont un temps de rétention plus long et doivent être élués avec des mélanges de solvant de plus grande polarité.

Summary

Nonionic surfactants and emulsifiers such as alkylphenol-, fatty alcohol-, fatty acid-, fatty amine-, fatty amide- and polypropyleneglycol-polyglycol ethers, furthermore mono-, di- and triglycerides and esters of mono- and diglycerides with acidic-, citric-, lactic- and diacetyl tartaric acid as well as sorbitan- and sugar fatty acid esters have been separated applying high pressure liquid chromatography and silica gel (μ Porasil) as stationary phase. For gradient elutions the solvents isooctan, isopropanol, ethanol and water were used. The separation was detected with an UV-monitor. Alkylphenolpolyglycolethers were measured by the absorption of the benzene ring at 276 nm. Polyglycolethers without UV-chromophor were converted into the 3,5-dinitrobenzyl derivatives and measured at 254 nm. The fatty acid esters were detected based on the UV-absorption of the carboxylic group at 220 nm. Separation of the emulsifiers occured according to their hydrophilic properties. More strongly hydrophilic components in emulsifiers show longer retention times and had to be eluted with solvents of higher polarity.

Literatur

1. *Bauer, F. J.:* Analytical methodology for emulsifiers used in fatty foods: a review. J. Am. Oil Chemists' Soc. **50**, 85—97 (1973).
2. *Nash, H. N.* and *Brickman, L. M.:* Food emulsifiers-science and art. J. Am. Oil Chemists' Soc. **49**, 457—461 (1972).
3. Richtlinien des Rates vom 18. Juni 1974 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten für Emulgatoren, Stabilisatoren, Verdickungs- und Geliermittel, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 189/1—4 vom 12. 7. 1974.
4. *Griffin, W. C.:* Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. J. Soc. Cosmetic Chemists **5**, 249 (1954).
5. *Sahasrabudhe, M. R.:* Gas-liquid chromatographic analysis of mono- and diglycerides. J. Am. Oil Chemists' Soc. **44**, 379—380 (1967).
6. *Sahasrabudhe, M. R.:* Chromatographic analysis of polyglycerides and their fatty acid esters. J. Am. Oil Chemists' Soc. **44**, 376—378 (1967).
7. *Sahasrabudhe, M. R.:* Chromatographic analysis of Sorbitan fatty acid esters. J. Am. Oil Chemists' Soc. **46**, 8—12 (1969).
8. *Boekenoogen, H. A.:* Analysis and characterisation of oils, fats and fat products. Procedure for the analysis of monoglycerides and related emulsifiers pp. 251—279. Interscience Publ., London 1964.
9. *Hadorn, H.:* Gaschromatographische Zuckerbestimmungen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 92—116 (1975).
10. *Sweeley, C. C.:* Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. Anal. Chem. **85**, 2497—2507 (1963).
11. *Mattey, M. E.:* The detection of fat-solvent extractable emulsifiers. Techn. Circular No 509, BFMIRA Leatherhead 1972.
12. *Quinlin, P.* and *Weiser, H. J.:* Separation and determination of mono-, di- and triglycerides in monoglyceride concentrates. J. Am. Oil Chemists' Soc. **35**, 325—327 (1958).
13. *Kröller, E.:* Untersuchungen zum Nachweis von Emulgatoren in Lebensmitteln. Fette, Seifen, Anstrichmittel **71**, 896—898 (1969).
14. *Kübler, W.:* Bestimmung und Trennung von Tensiden in Wasch-, Reinigungs- und Pflegemitteln. Bericht vom VI. internationalen Kongreß für grenzflächenaktive Stoffe in Zürich, Band 1, Sektion A, S. 407—419. Verlag Carl Hauser, München 1973.
15. *Heitz, W., Bömer, B.* und *Ullner, H.:* Gelchromatographie, 7. Mitt.: Die Auflösung bei der Trennung von Oligomeren. Makromol. Chemie **121**, 102—106 (1969).
16. *Huber, J. F. K., Kolder, F. F. M.* and *Miller, J. M.:* Rapid separation and determination of nonionic surfactants of the polyethylene-glycol-monoalkyl phenol ether-type by column liquid chromatography. Anal. Chem. **44**, 105—110 (1972).
17. *Aitzetmüller, K.:* Analysis of nonionic food emulsifiers by liquid chromatography. Lipids, Vol. 2: Technology. Edited by R. Paoletti, G. Jacini and Porcellati. Raven Press, New York 1976.
18. *Erdahl, W. L.:* Analysis of soybean lecithin by thin-layer and analytical liquid chromatography. J. Am. Oil Chemists' Soc. **50**, 513—515 (1973).
19. *Wehrli, A.:* Instrumentelle Ausrüstung in der modernen Säulenflüssigkeitschromatographie. Chimia **28**, 690—703 (1974).

20. *Kaufmann, H. P.:* Analyse der Fette und Fettprodukte. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1958.
21. *Hadorn H.* und *Zürcher, K.:* Eine vereinfachte Differenz-UV-Absorptions-Analyse für die Beurteilung von Speiseölen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **57**, 27—42; 189 bis 231 (1966).
22. *Wickbold, R.:* Zur analytischen Bestimmung kleiner Mengen nichtionischer Tenside. Tenside, Detergents **10**, 179—182 (1973).
23. *Brüschweiler, H.:* Eigenschaften und biologisches Abbauverhalten von grenzflächenaktiven Verbindungen (Tensiden). Chimia **29**, 31—42 (1975).

Dr. H. Brüschweiler
Eidg. Materialprüfungs- und
Versuchsanstalt
Unterstraße 11
CH - 9001 St. Gallen

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 64—71 (1977)

R. Schwarzenbach, Givaudan Forschungsgesellschaft AG, Dübendorf

Flüssigchromatographische Zuckertrennung

Einleitung

In der Lebensmittelanalytik spielen der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Zucker eine immer größere Rolle. Die gaschromatographische Trennung der Zucker-Silyläther wurde verschiedentlich beschrieben (1). Das Hauptproblem besteht in der quantitativen Ueberführung des Zuckers in sein Silylderivat, ohne daß er sich zersetzt. Die papierchromatographische Trennung von Zuckern gelingt gut, ist jedoch mühsam und langwierig.

Als neues analytisches Werkzeug bietet sich die Flüssigkeitschromatographie an. Hier sind es hauptsächlich drei Typen der Chromatographie, die Verwendung finden:

— Die Ionentauschchromatographie in Gegenwart von Borsäure-Pufferlösung, wobei der Zucker mit der Borsäure zum Ionentausch fähige Komplexe bildet.
— Die Verteilungschromatographie an Ionenaustauschern, wobei die stationäre Phase aus Wasser besteht, das von den Ladungsträgern zu ihrer Hydration adsorbiert wird, während die mobile Phase sich aus einem Wasser/Alkohol-Gemisch zusammensetzt.
— Die Verteilungschromatographie an chemisch gebundenen stationären Phasen.

Nach der Pionier-Arbeit von *Khym und Zill* (2) haben viele Autoren Trennungen von Zucker-Borat-Komplexen an starken Anionenaustauschern beschrieben. Diese Methode erlaubt die Trennung komplexer Mono-, Di- und Trisaccharidgemische. Meistens wird ein Gradientensystem verwendet, bei dem entweder die Konzentration des Boratpuffers (3) oder dessen pH (4) kontinuierlich verändert wird. Diese Systeme sind aufwendig und sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen. Die Analysenzeiten für Trennungen von 3 bis 4 Komponenten liegen zwischen 20 und 60 Minuten. Die komplizierte Zubereitung des Trennsystems, seine aufwendige Equilibrierung und schlechte Stabilität und nicht zuletzt der Zeitaufwand für eine Trennung schränken den Kreis der Benützer solcher Systeme für analytische Arbeiten stark ein.

Mit der Verteilungschromatographie, gleich welcher Art, können sehr oft dieselben Trennungen bei wesentlich geringerem Aufwand durchgeführt werden. Es sind deshalb vor allem diese Systeme, die beim Analytiker Eingang gefunden haben. Ihre Anwendung soll nun im folgenden an Hand einiger Beispiele erläutert werden.

Analyse von Glucosesirup

Der enzymatische Abbau löslicher Stärke zu Glucose ist ein industrieller Großprozeß. Die Analyse des Produkts, der Glucose, wird fast ausschließlich flüssigchromatographisch durchgeführt, da diese Methode einfacher, genauer und zuverlässiger ist als die enzymatische Bestimmung. Neben der Glucose enthält die Analysenprobe meist noch Maltose, Maltotriose und höhere Oligomere der Glucose.

Hier das Chromatogramm (Abb. 1) einer solchen Probe. Die 1 m lange Stahlkolonne ist gepackt mit einem Kationentauscher Aminex Q-15-S. Als mobile Phase wurde Wasser verwendet. Die Trennung wurde mit 80°C Kolonnentemperatur und einem Flow von 0,6 ml/min erhalten.

Die höheren Oligomeren der Glucose (1) können als Summe integriert und berechnet werden. Ihre Responsfaktoren unterscheiden sich nur unwesentlich, so daß keine Einbuße an Genauigkeit befürchtet werden muß. Für Maltotriose (2), Maltose (3) und Glucose (4) müssen die Faktoren einzeln bestimmt werden.

Die beiden Kurven des Chromatogramms (Abb. 1) unterscheiden sich lediglich in der Empfindlichkeit der Aufzeichnung.

Solche Proben bestehen meist zu über 90% aus Glucose und liegen in einer 10—30%igen wässerigen Lösung vor.

Erfolgt der enzymatische Abbau der Stärke kontinuierlich an gebundenen Enzymen in einer Reaktorkolonne, so kann bei niederen Durchflußraten eine Rückpolymerisation der Glucose in Isomaltose stattfinden. Das soeben beschriebene Trennsystem unterscheidet jedoch lediglich zwischen den einzelnen Oligomeren der Glucose; es trennt die Isomeren nicht voneinander. Wenn also zwischen Maltose und Isomaltose unterschieden werden muß, so wird ein anderes chromatographisches System angewendet.

Als Support wird Silikagel verwendet, an dessen Oberfläche eine polymere Schicht von Aminopropylgruppen chemisch gebunden wurde (5). Die mobile Phase besteht aus 20% H_2O/CH_3CN. Die Trennung wird bei Raumtemperatur mit 1,0 ml/min Flow durchgeführt. Die Kolonne besteht aus Glas, ist 25 cm lang und hat einen Innendurchmesser von 3 mm.

Die beiden Chromatogramme (Abb. 2) sind von Glucoseproben, erhalten bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Neben Wasser (1) und Glucose (2) sind Maltose (3) und Isomaltose (4) gut voneinander getrennt.

Analyse von Zuckern in Nahrungsmitteln

Bei der Bestimmung von Zuckern in Nahrungsmitteln stellt sich zum eigentlichen Trennproblem die Frage der Probenzubereitung. Da liegt nun eine der Stärken der Flüssigkeitschromatographie. Sehr oft ist es möglich, das zu untersuchende Produkt direkt oder als Lösung einzuspritzen. Klare Fruchtsäfte können direkt analysiert werden. Säfte von Citrusfrüchten mit Anteilen von Zellmaterial werden vor der Chromatographie filtriert. Honig wird in Wasser gelöst

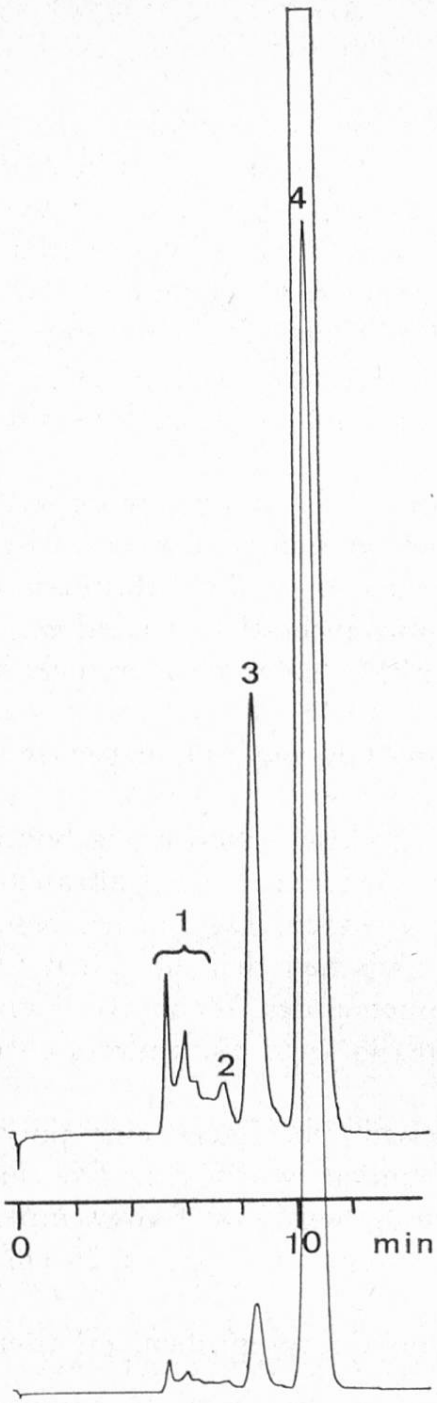


Abb. 1. Chromatogramm einer Glucoseprobe.

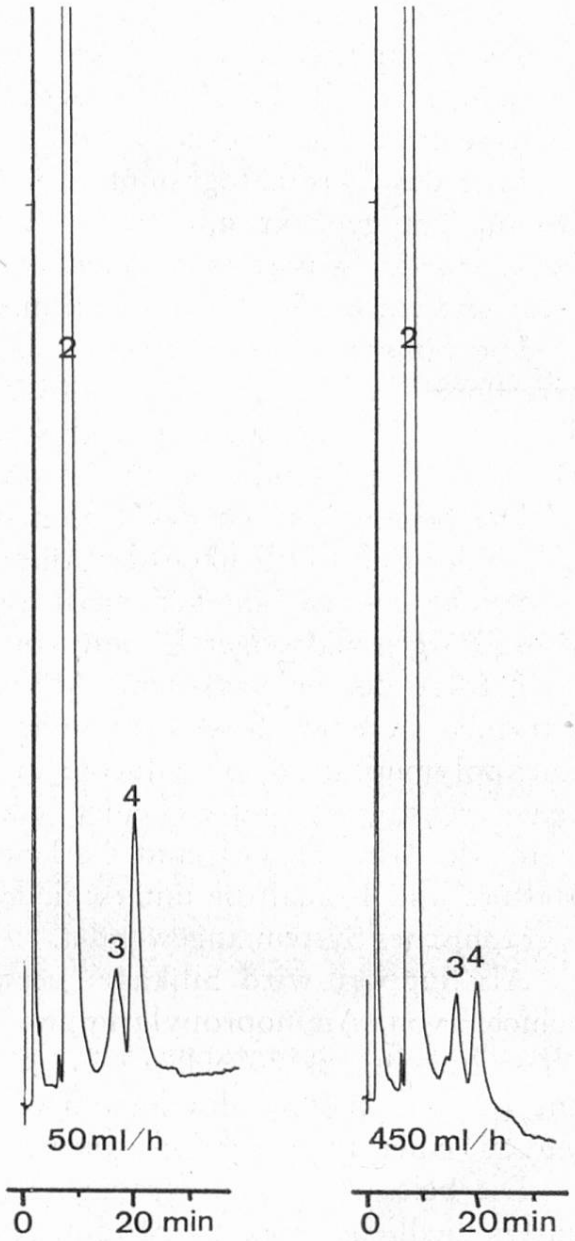


Abb. 2. Glucoseproben analysiert an einer Amino/Silikagel-Kolonne.

und auf die Trennkolonne gegeben usw. Einige Beispiele sollen nun zeigen, welche Möglichkeiten die Flüssigkeitschromatographie auf diesem Gebiet bietet.

Apfelsaft

Klarer Apfelsaft wurde direkt auf eine Aminopropylkolonne gegeben und mit 20% H_2O/CH_3CN bei Raumtemperatur eluiert. Peak 1: Wasser, Peak 2: Fructose, Peak 3: Sorbit und Mannit, Peak 4: Glucose, Peak 5: Saccharose (Abb. 3).

Die Auflösung Fructose-Sorbit/Mannit-Glucose kann durch Erhöhung des CH_3CN-Gehalts der mobilen Phase verbessert werden; eine Trennung von Sorbit und Mannit gelingt bei diesem System nicht.

Traubensaft

Auf genau gleiche Art kann Traubensaft injiziert werden. Die chromatographischen Bedingungen sind gleich wie beim Apfelsaft.

Peak 1: Wasser, Peak 2: Glycerin, Peak 3: Fructose, Peak 4: Glucose (Abb. 4).

In frisch gepreßtem Traubensaft wird bedeutend weniger Glycerin gefunden als in diesem Muster. Das Chromatogramm zeigt jedoch, daß auf diese Art das Glycerin sauber und einfach erfaßt und quantitativ ausgewertet werden kann.

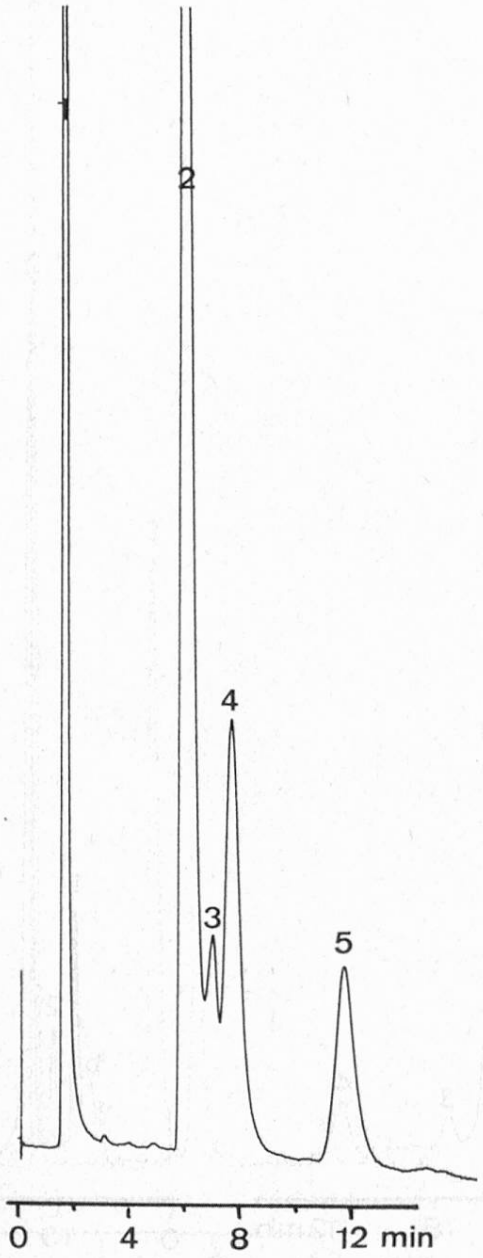


Abb. 3. Chromatogramm eines klaren Apfelsaftes.

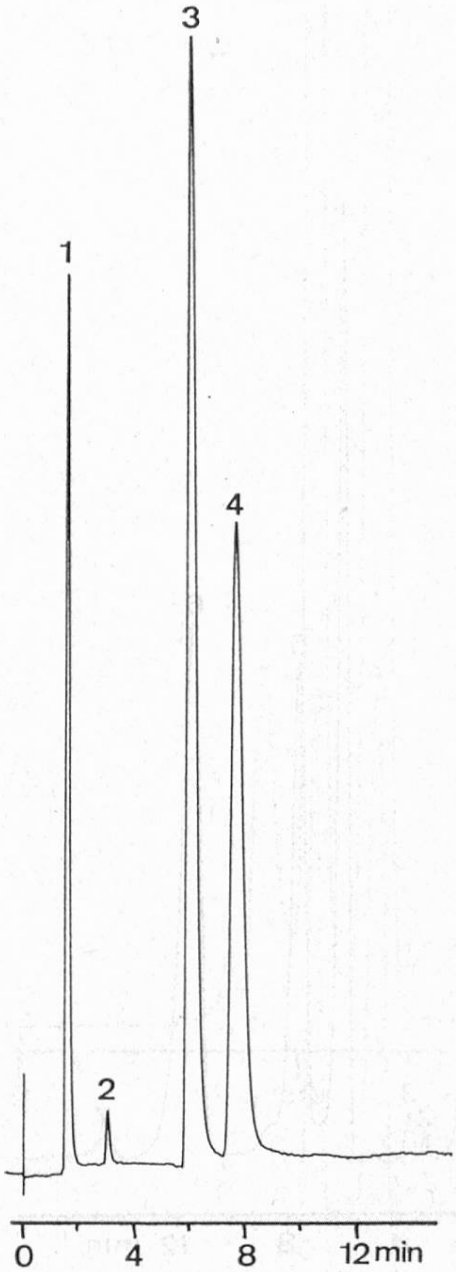


Abb. 4. Chromatogramm eines Traubensaftes.

Orangensaft

Reiner Orangensaft hat Anteile von Zellmaterial, die, um Verstopfungen in der Kolonne zu vermeiden, durch Filtration entfernt werden müssen (Abb. 5).

Peak 1: Wasser, Peak 2+3: unbekannt, Peak 4: Fructose, Peak 5: Glucose, Peak 6: Saccharose, Peak 7: unbekannt. Als Trennsystem wurde wiederum das Aminopropyl-Silikagel verwendet mit Wasser/Acetonitril als mobile Phase.

Orangenlimonade

Im Gegensatz zum Orangensaft enthält die Limonade nur einen Anteil an natürlichem Orangenkonzentrat. Zugegeben werden Aroma, Trübungsmittel, Zucker,

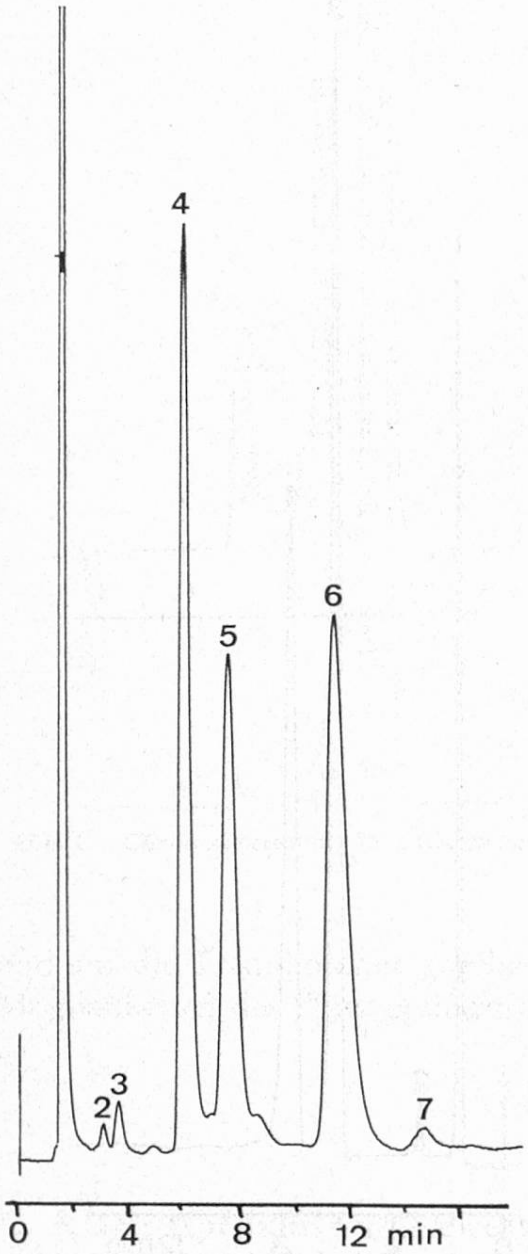


Abb. 5. Chromatogramm eines Orangensaftes.

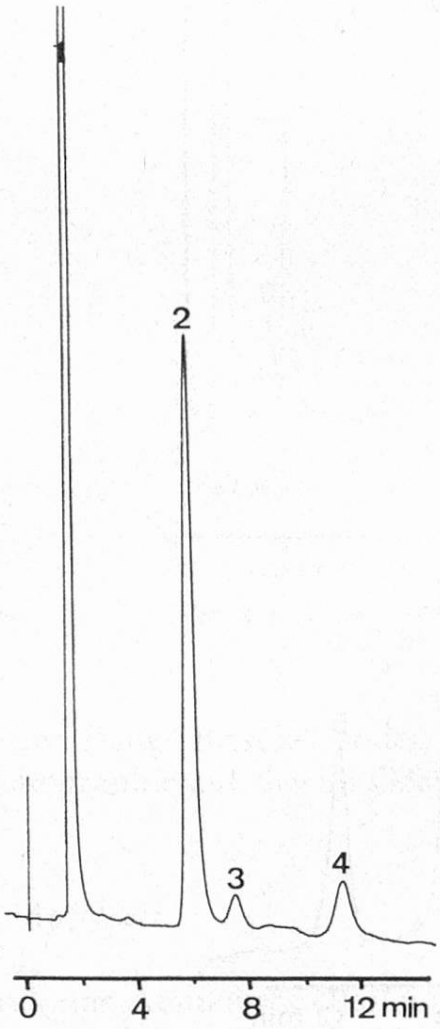


Abb. 6. Orangenlimonade.

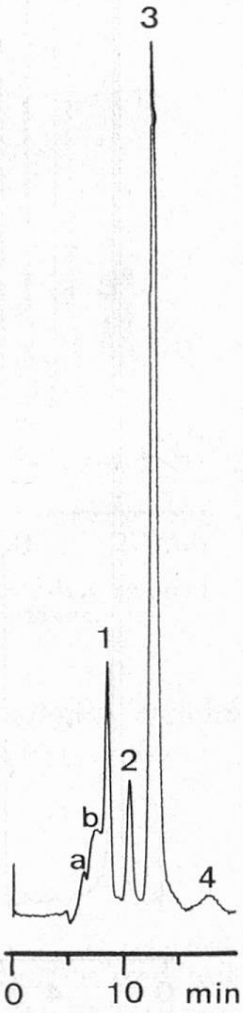


Abb. 7. Orangenlimonade mit Cyclamat und Saccharin.

in den meisten Fällen Fructose, bei Diätgetränken auch Zuckeralkohole wie Xylit und Sorbit, sowie evtl. künstliche Süßstoffe wie Cyclamat oder Saccharin.

Das Chromatogramm (Abb. 6) einer Limonade auf Amino-Silikagel zeigt die Trennung von Wasser (1), Fructose (2), Glucose (3) und Saccharose (4). Intensivsüßstoffe wie Cyclamat und Saccharin werden als Natriumsalz eingesetzt und eluieren in diesem System, mit vorwiegend organischer mobiler Phase, schlecht.

Eine bescheidene Möglichkeit besteht bei der Verwendung einer Aminex Q-15-S-Kolonne. Das Chromatogramm (Abb. 7) erbringt den Nachweis von Cyclamat (a) und Saccharin (b), wenn auch eine quantitative Auswertung unmöglich ist.

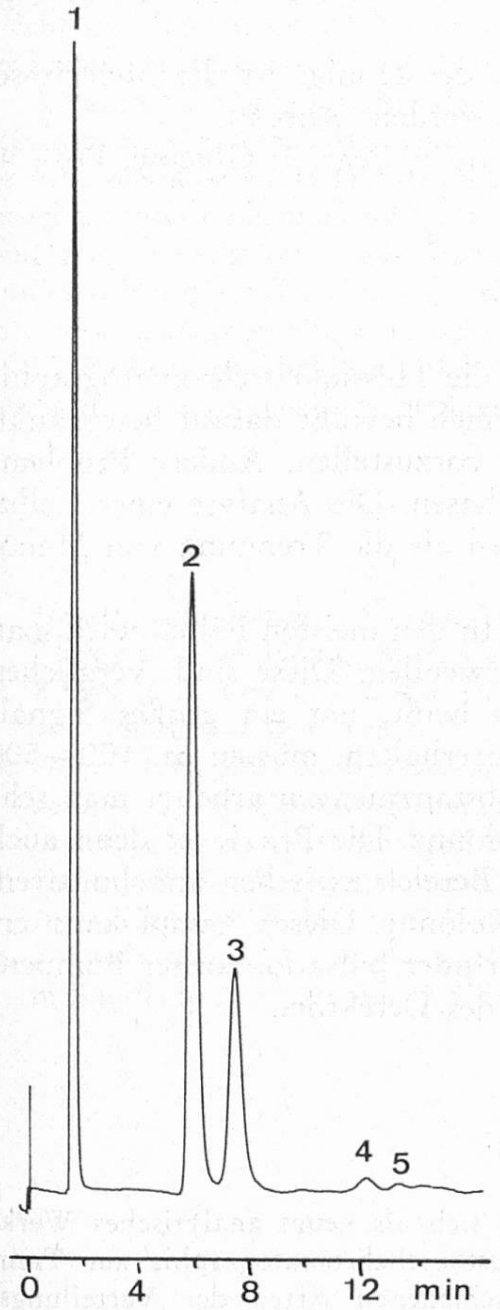


Abb. 8. Honig: Mono- und Disaccharide.

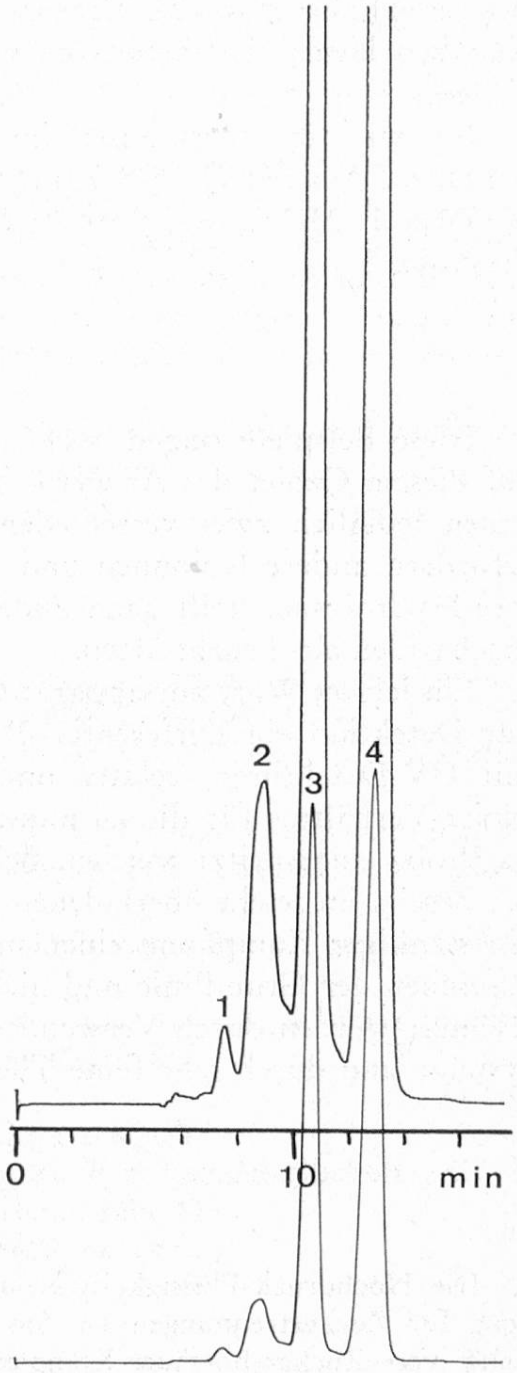


Abb. 9. Honig: Bestimmung der Melezitose.

Peak 1: Saccharose, Peak 2: Glucose, Peak 3: Fructose, Peak 4: Xylit.

Kolonne: 1 m, 4 mm ⌀, Stahl, Aminex Q-15-S in Ca-Form, Temperatur 90°C. Mobile Phase: Wasser, Durchfluß: 0,6 ml/min. Es wurden 20 µl der Limonade direkt eingespritzt.

Honig

Aus der Honigprobe wird zur flüssigchromatographischen Analyse eine ca. 20%ige wässerige Lösung hergestellt. Diese Lösung wird dann direkt injiziert (Abb. 8).

Das Chromatogramm einer Amino-Silikagel-Kolonne zeigt die Trennung von Wasser (1), Fructose (2), Glucose (3), Maltose (4) und Saccharose (5). Aus diesen Angaben lassen sich bereits gewisse Schlüsse über die Naturreinheit des Honigs ziehen.

Ein wichtiger Bestandteil im Zuckerspektrum des Honigs ist die Melezitose. An einem Aminex Q-15-S kann sie sauber erfaßt werden (Abb. 9).

Peak 1: Melezitose, Peak 2: Maltose + Saccharose, Peak 3: Glucose, Peak 4: Fructose.

Schlußbemerkungen

Diese Beispiele zeigen, welche Möglichkeiten die Flüssigkeitschromatographie auf diesem Gebiet der Analytik bietet. Ich habe mich bewußt darauf beschränkt, Ihnen lediglich zwei verschiedene Trennsysteme vorzustellen. Andere Probleme erfordern andere Kolonnen und andere mobile Phasen. Die Analyse eines Cellulose-Hydrolysats stellt ganz andere Anforderungen als die Trennung von Monosacchariden aus Fruchtsäften.

Ein letztes Wort zur apparativen Ausrüstung: In den meisten Fällen wird man zur Detektion ein Differential-Refraktometer verwenden. Diese sind, verglichen mit UV-Detektoren, relativ unempfindlich. Das heißt, um ein großes Signal/Noise-Verhältnis für die zu messende Substanz zu erhalten, müssen ca. 100—500 µg Probe eingespritzt werden. Bei solch hohen Substanzmengen arbeitet man sehr oft bereits im leicht überladenen Zustand der Kolonne. Die Praxis ist denn auch ein ständiger Kampf um einen möglichst großen Bereich zwischen annehmbarem Rauschen der Grundlinie und nicht überladener Kolonne. Dieser Kampf kann erleichtert werden durch Verwenden pulsationsfreier oder pulsationsarmer Pumpensysteme und durch sehr feine Thermostatisierung des Detektors.

Zusammenfassung

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie bietet sich als neues analytisches Werkzeug für Zuckertrennungen an. Sie kann als Ionenaustauschchromatographie zur Trennung von Zucker-Borsäure-Komplexen oder in verschiedenen Arten der Verteilungschromatographie eingesetzt werden.

Anhand von Beispielen aus der Glucoseindustrie und der Nahrungsmittelanalytik werden zwei verteilungschromatographische Trennsysteme vorgestellt. Eine Stärke dieser Methode liegt darin, daß das zu untersuchende Produkt sehr oft direkt oder als Lösung auf die Trennkolonne gebracht werden kann. Klare Fruchtsäfte können direkt analysiert werden. Säfte von Citrusfrüchten mit Anteilen von Zellmaterial werden vor der Analyse lediglich filtriert. Honig wird in Wasser gelöst und direkt eingespritzt usw.

Die Kürze der Analysenzeit (10 bis 15 min) und die minimalen Anforderungen an die Probe erlauben den routinemäßigen Einsatz dieser Methode.

Résumé

La chromatographie liquide à haute pression peut être utilisée comme nouveau moyen analytique pour la séparation des sucres. On peut l'appliquer soit comme chromatographie à échange d'ions pour la séparation de complexes sucre-acide borique, soit sous différentes formes de chromatographie de partage.

A l'aide d'exemples du domaine de l'industrie du glucose et de l'analyse alimentaire, on présente deux systèmes de séparation de la chromatographie de partage. Un avantage de cette méthode est le fait qu'on peut souvent mettre le produit à analyser directement ou en solution en contact avec la colonne de séparation. Des jus de fruits limpides peuvent être analysés tels quels. Pour des jus d'agrumes contenant un peu de pulpe, une simple filtration suffit avant l'analyse. Pour analyser du miel, il suffit de le dissoudre dans un peu d'eau et d'injecter cette solution, etc.

La rapidité de l'analyse (10 à 15 min) et le peu d'exigences quant aux échantillons permettent d'appliquer cette méthode comme méthode de routine.

Literatur

1. *Hadorn, H., Zürcher, K.* und *Strack, Ch.:* Gaschromatographische Bestimmungen der Zuckerarten in Honig. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **65**, 198—208 (1974).
2. *Khym, J. X.* und *Zill, L. P.:* The separation of sugars by ion exchange. J. Am. Chem. Soc. **74**, 2090—2094 (1952).
3. *Ohms, J. I., Zec, J., Benson, J. V.* and *Patterson, J. A.:* Column chromatography of neutral sugars: Operating characteristics and performance of a newly available anion-exchange resin. Anal. Biochem. **20**, 51—57 (1967).
4. *Kesler, R. B.:* Rapid quantitativ anion-exchange chromatography of carbohydrates. Anal. Chem. **39** 1416—1422 (1967).
5. *Schwarzenbach, R.:* A chemically bonded stationary phase for carbohydrate analysis in liquid chromatography. J. Chromatog. **117**, 206—210 (1976).

R. Schwarzenbach
Givaudan Forschungsgesellschaft AG
Ueberlandstraße 138
CH-8600 Dübendorf

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 72—77 (1977)

S. Heyland und *H. Moll*, Beratungsgesellschaft für Nestlé-Produkte AG, La Tour-de-Peilz

Erfassung geschmacksaktiver Nukleotide mit Hilfe der Hochdruckchromatographie an Ionenaustauschern

Als Bausteine der Ribonukleinsäure kommt den *Nukleotiden* im Reich der Naturstoffe eine gewisse Sonderstellung zu.

In der Abbildung 1 sind Vertreter dieser Klasse vorgestellt:

Ein Derivat des Purins bzw. des Pyrimidins ist N-glycosidisch mit Ribose verknüpft, letztere wiederum ist mit Phosphorsäure verestert. Da für diese Veresterung mehrere OH-Gruppen der Pentose zur Verfügung stehen, können Isomere auftreten.

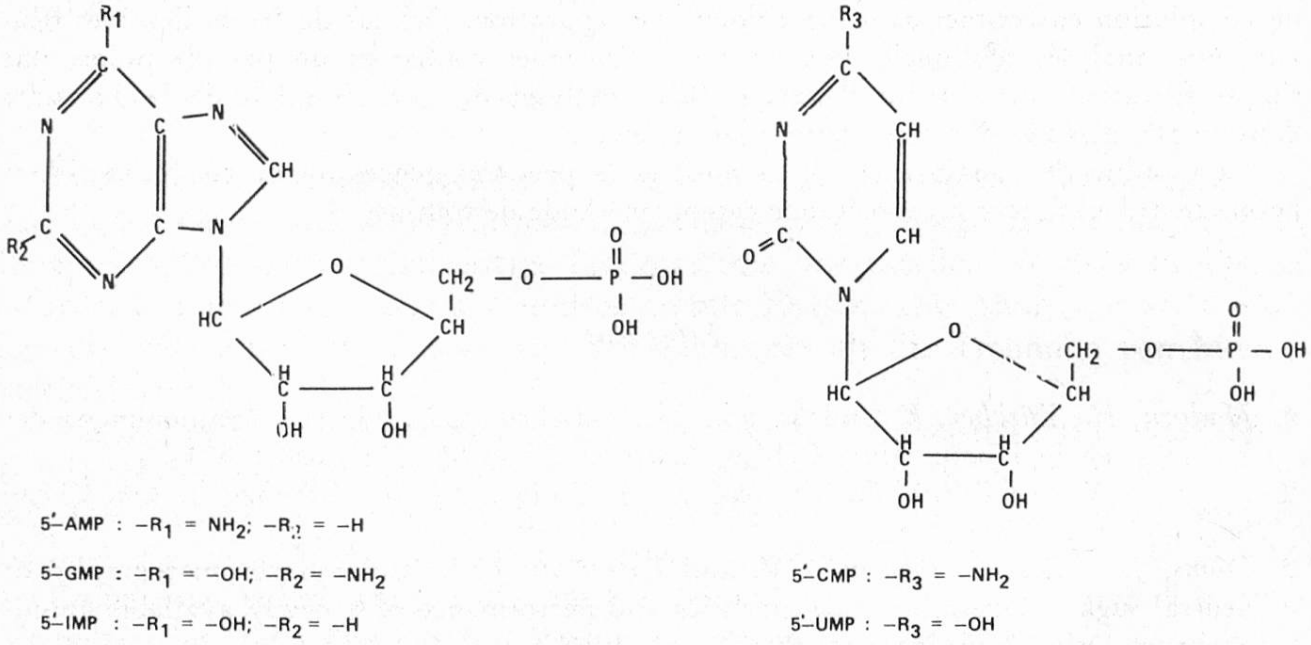


Abb. 1. Chemische Struktur einiger Nukleotide.

Alle lebende Materie enthält Nukleotide; daher findet man diese auch in vielen natürlichen Nahrungsmitteln, wo sie sich uns teilweise durch ihre geschmacklichen Eigenschaften bemerkbar machen. Zwar sind vom gustativen Standpunkt her die reinen Verbindungen nicht besonders interessant, jedoch im Gemisch mit anderen geschmackgebenden Stoffen sind sie imstande, deren Sensation zu verstärken. Die Eigenschaft, als *Geschmacksverstärker* zu wirken, folgt der Reihe 5'-GMP> 5'-IMP>> 5'-AMP. Die 2'- und 3'-Isomeren besitzen diese Eigenschaft nicht. Ebenfalls die 5'-Pyrimidinmonophosphate besitzen nach Literaturangaben keinen oder nur einen schwachen Effekt als Geschmacksverstärker. Es ist für die Lebensmitteltechnologie nicht nur von großem Interesse, den Gehalt eines Nah-

rungsmittels an diesen Stoffen zu kennen, sondern auch etwas darüber zu erfahren, wie er sich ändert, wenn ein Rohprodukt irgend einem Veredlungsprozeß unterworfen wird.

Zur analytischen Erfassung dieser 5′-Monophosphate in Lebensmitteln bzw. -extrakten drängen sich die Methoden der Chromatographie an Ionenaustauschern auf.

Die Eigenschaft der Nukleotide, je nach Milieu als Säure, Base oder Zwitterion aufzutreten, macht sie geradezu zum Paradebeispiel in zahlreichen chromatographischen Lehrbüchern und Prospekten. Zudem erleichtern die chromophoren Eigenschaften des Purin- bzw. Pyrimidinteiles die «on-line»-Detektion im Eluatstrom. Wir waren uns jedoch von vorneherein dessen bewußt, daß es nicht so einfach sein würde, die gerade uns interessierenden Verbindungen in einem Arbeitsgang unter sich sauber auf- und von ihren Isomeren sowie eventuell anderen Konstituenten abzutrennen.

Bereits 1964 (1) wurde in unseren Laboratorien die Ionenaustauscher-Chromatographie zur Erfassung solcher Nukleotide in Milch und Milchprodukten herangezogen. Allerdings sind «klassische», d. h. poröse Ionenaustauscher, ihrer schlechten mechanischen Stabilität zufolge für die schnelle Hochdruckchromatotographie nicht geeignet. In den letzten Jahren gelangte aber eine Vielzahl von sogenannten «solid-core»-Materialien auf den Markt. Es handelt sich dabei um sphärische, nicht poröse Inertkörper, auf deren Oberfläche eine äußerst dünne Schicht des eigentlichen Austauschers entweder mechanisch oder chemisch verankert ist.

Eine weitere Eigenschaft gegenüber dem klassischen Austauscher ist bei der gedanklichen Konzeption des Analysenganges in Betracht zu ziehen: Beim porösen Austauscher ist der Trennvorgang *organischer* Ionen in der Regel eine Ueberlagerung verschiedenster chromatographischer Phänomene; beim «solid-core»-Austauscher dagegen sollten die Gesetzmäßigkeiten der eigentlichen Ion-Ion-Wechselwirkung im Vordergrund stehen. Das heißt, die Chancen, daß der Analytiker voraussehen kann, welche Parameter wann und wie zu ändern sind, damit das gewünschte Resultat eintritt, sind gut.

Für unsere Versuche haben wir ein 1 Meter × $^1/_8$ Zoll Edelstahlrohr, wie es in der Gaschromatographie verwendet wird, nach dem Trockenverfahren mit *«VYDAC AX»* Anionenaustauscher beschickt. Für die Trennungen benützten wir einen Flüssigkeitschromatographen Modell 1220 der Firma Perkin-Elmer mit eingebautem, bei 254 nm messendem UV-Monitor. Die Arbeitstemperatur betrug 60°C und bei einer Elutionsrate von 1,5 ml/min lag der Staudruck bei etwa 58 atü.

Unser Ziel ist, die 5′- von den isomeren 2′- und 3′-Nukleotiden abzutrennen; gleichzeitig sollen die interessierenden 5′-Isomeren unter sich aufgetrennt und quantifiziert werden. Um die besten Bedingungen herauszufinden, haben wir zunächst die einzelnen Nukleotide wiederholt isokratisch unter Verwendung eines Phosphatpuffers chromatographiert. In weiteren Versuchen wurde alsdann bei gleichbleibender Ionenstärke der pH-Wert der mobilen Phase gezielt auf Werte zwischen 2,5 und 4,0 eingestellt und die isokratische Elution der einzelnen Nukleotide wiederholt.

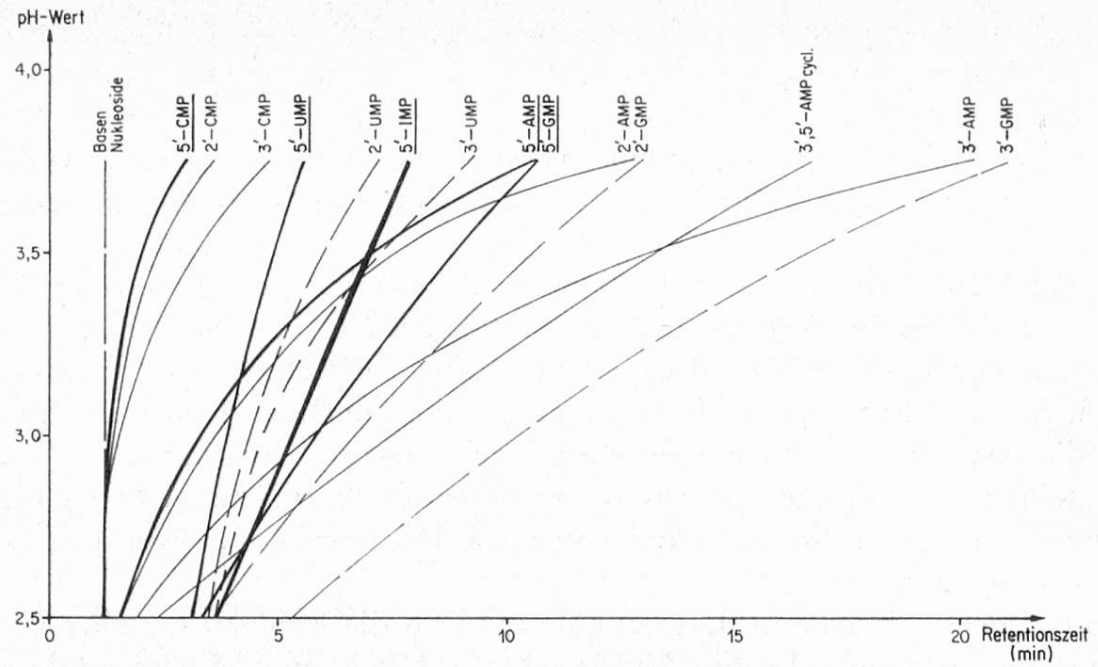


Abb. 2. Korrelation zwischen pH-Wert der mobilen Phase und Retentionszeit bei der Chromatographie von Nukleotiden an «Vydac Ax» mit Phosphatpuffer.

In der Abbildung 2 ist die gefundene Korrelation zwischen dem pH-Wert der mobilen Phase und der Retentionszeit der einzelnen Nukleotide aufgezeigt.

Dieses Diagramm enthält nun interessante Hinweise für das weitere Vorgehen; zum Beispiel in bezug auf ein Gemisch der 5'-Isomeren:

Bei der isokratischen Trennung um pH 3,5 werden AMP und IMP zusammen eluiert; bei pH 3,25 dagegen wird dieses Paar zwar getrennt, jedoch UMP durch AMP gestört sein usw. Man erkennt, daß für eine quantitative Erfassung der fünf 5'-Nukleotide am besten drei Trennungen, und zwar bei pH 3,75; 3,5 und 3,25 durchgeführt werden.

Durch Veränderung der Ionenstärke wird die Steigung der wiedergegebenen Kurven praktisch nicht beeinflußt. Dagegen ergibt sich eine Parallelverschiebung, und zwar derart, daß mit steigender Ionenstärke die Kurvenschar mehr und mehr gestaucht wird. Selbstverständlich kann dieser Effekt innerhalb einer bestimmten Konzentrationsgrenze zur Erzielung einer «schöneren» Auftrennung ausgenutzt werden.

Im folgenden seien nun einige Resultate aufgezeigt:

Abbildung 3 zeigt das Verhalten des Testgemisches bei pH 3,25; 3,50 und 3,75; wie zu erwarten war, wird im ersten Fall IMP abgetrennt, im zweiten Fall CMP, UMP und GMP und im dritten Fall AMP und GMP zusammen eluiert.

In der Abbildung 4 sind die Chromatogramme eines Hefeextraktes bei pH 3,75 und 3,50 wiedergegeben.

Man erkennt, daß es möglich ist, das CMP und UMP bei pH 3,5, das AMP andererseits bei pH 3,75 quantitativ recht gut zu erfassen.

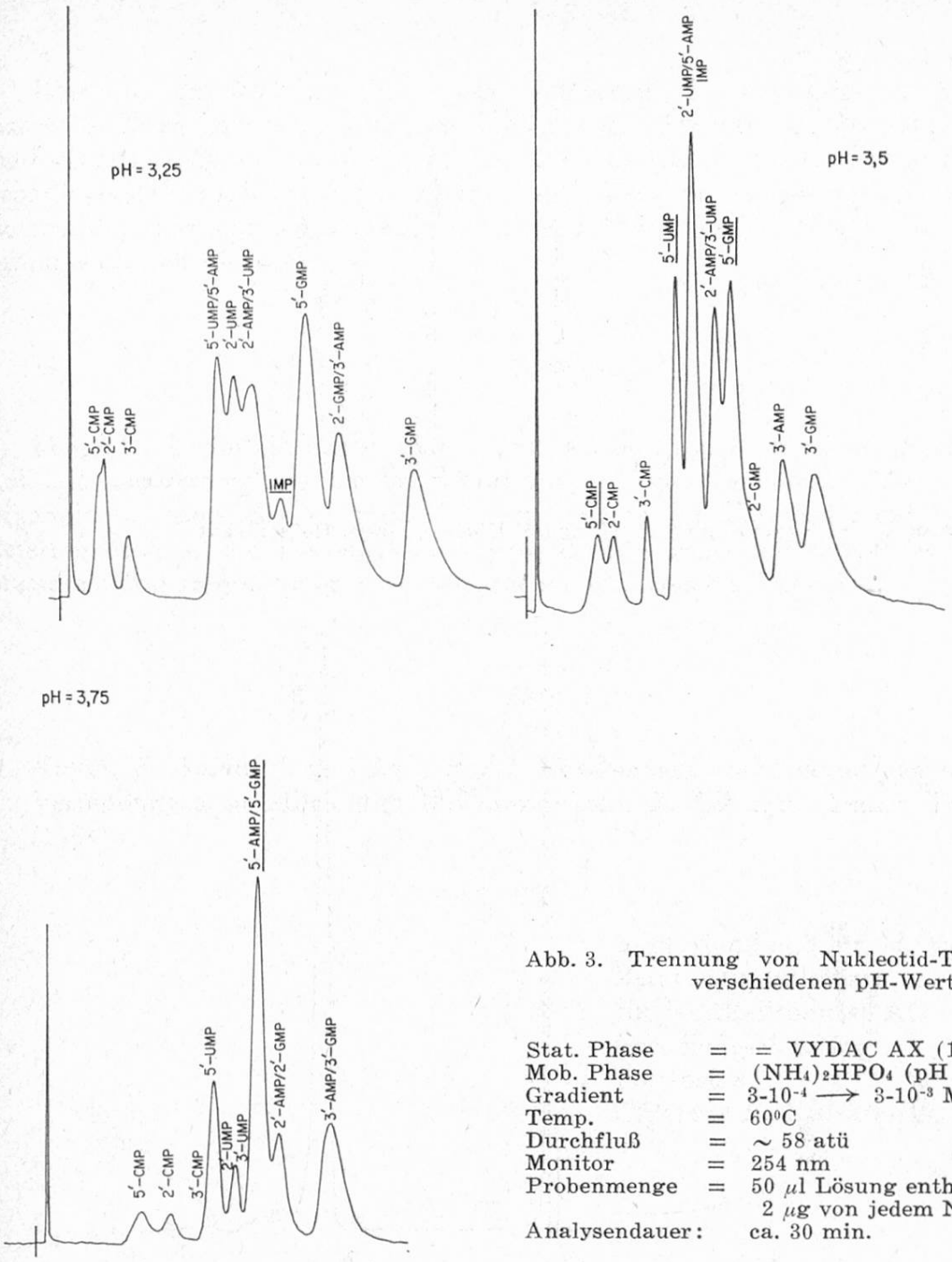


Abb. 3. Trennung von Nukleotid-Testgemischen bei verschiedenen pH-Werten.

Stat. Phase	=	= VYDAC AX (1 m × 1/8'' OD)
Mob. Phase	=	$(NH_4)_2HPO_4$ (pH korrigiert)
Gradient	=	$3\text{-}10^{-4} \longrightarrow 3\text{-}10^{-3}$ M in 30 min.
Temp.	=	60°C
Durchfluß	=	~ 58 atü
Monitor	=	254 nm
Probenmenge	=	50 µl Lösung enthaltend 2 µg von jedem Nukleotid
Analysendauer:		ca. 30 min.

Die Abbildung 5 schließlich zeigt das Chromatogramm eines Morchelextraktes und dasjenige eines Extraktes von rohem Hühnerfleisch. Letzteres enthält fast ausschließlich IMP.

Durch Ermittlung der Peakhöhen und Vergleich mit den Eichkurven der einzelnen Nukleotide wird es möglich, zumindest grobquantitative Angaben über die Nukleotidzusammensetzung zu erhalten. Da die Analysendauer bei 30 Minuten liegt, könnte dieses Verfahren für viele Fälle zur Routine ausgebaut werden.

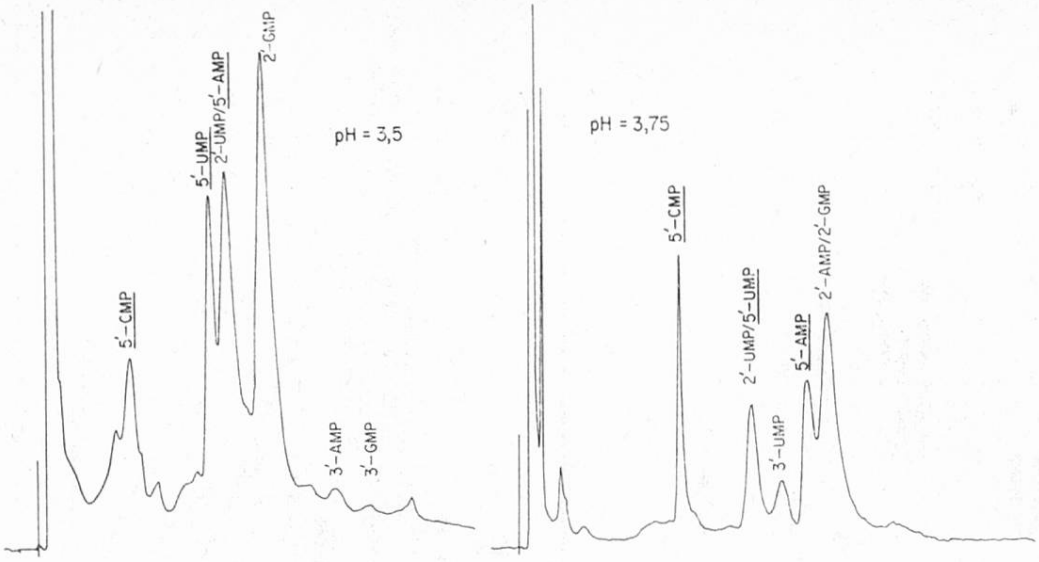


Abb. 4. Erfassung von 5′-CMP und 5′-UMP in einem Hefeextrakt.

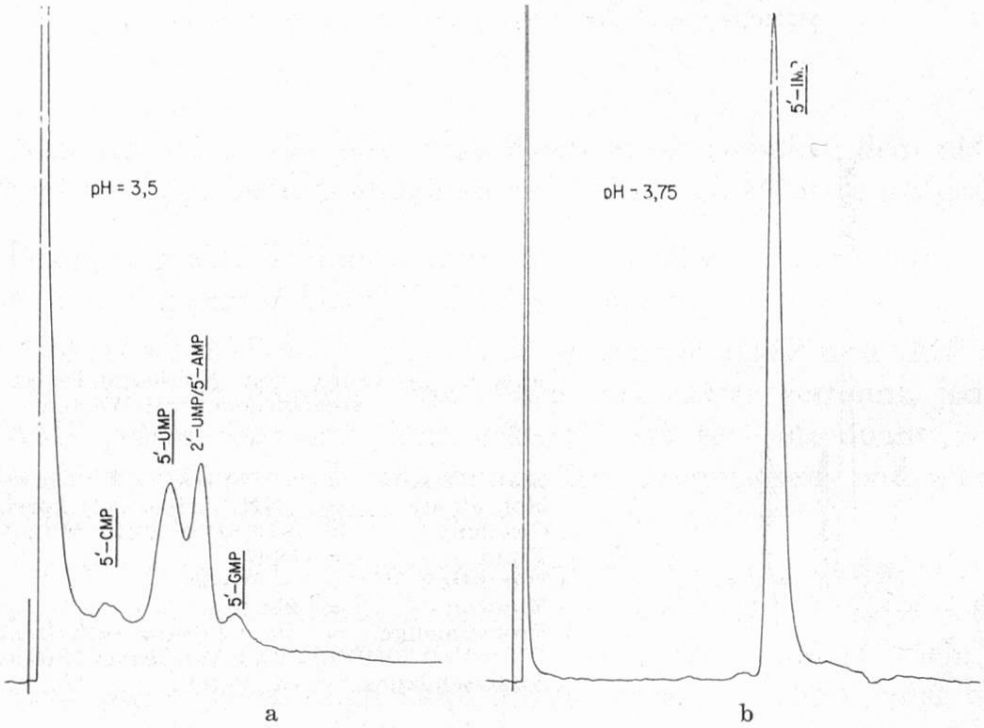


Abb. 5. Analyse weiterer natürlicher Extrakte
a) Morcheln b) Hühnerfleisch

Zusammenfassung

Viele Lebensmittel enthalten Nukleotide als natürliche Bestandteile. Man weiß, daß Inosin-, Guanosin- und Adenosin-5′-monophosphat geschmacksverstärkende Eigenschaften aufweisen; sie können die gustativen Eigenschaften von Mahlzeiten beeinflussen. — Versuche zur Trennung und quantitativen Erfassung dieser 5′-Isomeren, im Gemisch mit anderen Nukleotiden, mit Hilfe der Hochdruckchromatographie an einem «solid-core» Ionenaustauscher werden beschrieben.

Résumé

Beaucoup de produits alimentaires contiennent des nucléotides comme constituants naturells. Il est connu que les 5′-monophosphates d'inosine, de guanosine et d'adénosine renforcent le goût; or, ces substances peuvent modifier les qualités gustatives de nombreux repas. — Des expériences permettant leur séparation et dosage, en présence d'autres nucléotides, par chromatographie à haute pression sur un échangeur d'ions du type «solid core» sont décrites.

Summary

Many foods contain nucleotides as natural constituents. Inosine-, guanosine- and adenosine-5′-monophosphate are known to act as flavour-enhancers; they can modify the organoleptic properties of food. — Experiments for the separation and quantitative determination of the 5′-isomers in the presence of other nucleotides by means of high-pressure chromatography on a «solid-core» ion exchanger are described.

Literatur

1. *Kiefer, F., Solms, J.* und *Egli, R. H.:* Vorkommen von Nucleotiden und verwandten Verbindungen in Milch und Milchprodukten. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **125**, 346 (1964).

S. Heyland und Dr. H. Moll
Beratungsgesellschaft
für Nestlé-Produkte AG
Forschungsabteilung
Postfach 88
CH-1814 La Tour-de-Peilz

H. Günther, Neusäss b. Augsburg

Nachweis von Sojaeiweiß aus auf 120 C° erhitzten Fleischkonserven

Dieser Kurzvortrag wird in Heft 2/1977 publiziert.

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 78—85 (1977)

R. Knutti, Ch. Balsiger und *Ch. Schlatter*, Instiut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich

Probleme der Metall-Spurenanalyse im ppb-Bereich in biologischem Material am Beispiel der Bestimmung von Blei in Blut mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie

Die Normalkonzentrationen der meisten toxikologisch interessanten Spurenelemente in Körpergeweben und -flüssigkeiten liegen im ppb- und im unteren ppm-Bereich. Während der Nachweis akuter Schwermetallvergiftungen keine großen analytischen Schwierigkeiten bietet, ist die Bestimmung kleiner Abweichungen von den Normalwerten problematischer. *Stopps* (1) hat bei einer Zusammenstellung von Blutbleiwerten eine Tendenz zu tieferen Normalwerten im Laufe der letzten Jahrzehnte gefunden. Es ist anzunehmen, daß sich darin eher die bessere Beherrschung der Analysentechnik als eine effektive Abnahme der Blutbleikonzentrationen wiederspiegelt. Aber auch Vergleiche von Analysenwerten aus neuester Zeit sollten nur mit größter Vorsicht angestellt werden. In Tabelle 1 sind von einem europäischen Ringversuch aus dem Jahre 1972 die Meßmethoden und Resultate für eine der getesteten Blutproben zusammengestellt. Als Grundlage für die toxikologische Beurteilung sind Resultate unbrauchbar, die eine solche Fehlerbreite aufweisen; denn die Normalwerte für Blei im Blut liegen im Bereich von 100—200 ppb, 400 ppb gilt als untere Grenze für weitere Untersuchungen und ab 800 ppb treten erste Vergiftungserscheinungen auf.

Tabelle 1
Europäischer Ringversuch 1972 (2) — *Resultate der 22 teilnehmenden Laboratorien für Blut Nr. 1*

Bestimmungsmethode	ppb Blei in Vollblut Nr. 1
Atomabsorptionsspektrometrie	140, 230, 250, 280, 290, 310, 320, 370, 390, 470, 580, 860
Kolorimetrische Dithizonmethode	150, 270, 300, 300, 550, 700, 720, 770,
Polarographie	270, 310, 430
Emissionsspektrometrie	260, 280

Fehlerquellen

Die wichtigsten Fehlerquellen bei Spurenanalysen im ppb-Bereich sind inhomogene Probe, Kontamination und Verluste, Matrixeffekte, Dosierfehler, Eichfehler und apparative Meßfehler.

Kontamination ist die schlimmste Fehlerquelle. Am einfachsten läßt sie sich durch die Wahl eines möglichst kurzen Analysenweges auf ein Minimum reduzieren. Wechsel des Probengefäßes, Zugabe von Reagenzien, Extraktionen und Anreicherungen tragen zur Kontamination bei und sollten wenn immer möglich vermieden werden.

Für die Blutbleibestimmung wird für die Herstellung der Meßlösungen bidestilliertes Wasser verwendet. Leitungswasser ist zwar meistens ebenfalls blindwertfrei bezüglich Blei (< 0,5 ppb Pb), es liefert aber einen zusätzlichen Beitrag zur unspezifischen Absorption. Das in unserem Labor vorhandene deionisierte Wasser enthält hingegen 2 ppb Blei. Mikropipettenspitzen aus Polypropylen, Röhrchen aus Polystyrol und Probenbecher aus Polyäthylen haben sich bisher als blindwertfrei erwiesen. Sie werden deshalb ohne spezielle Nachreinigung verwendet. Die Probengefäße werden nur bis zu einem Drittel gefüllt und alle Operationen im untersten Teil durchgeführt. Die Probe berührt dadurch nie den oberen, besonders kontaminationsgefährdeten Rand oder Deckel.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Blutentnahme. Bei der Verwendung von Kapillarblut vom Finger scheint die Kontaminationsgefahr besonders groß zu sein. Einerseits ist die Probenmenge klein, 75 µl Blut genügen für eine vollständige Analyse mit Standardadditionseichung, andererseits befindet sich auf den Fingern besonders viel Blei. Gibt man einen Tropfen 0,1% Salpetersäure auf eine Fingerspitze und saugt die Flüssigkeit nach einigen Sekunden wieder auf, so findet man darin Werte von wenigen ppb bis vielen ppm Blei. Zur Simulation der Einschleppung von Blei bei Kapillarblutentnahmen vom Finger wurde bei zwei Versuchspersonen zweimal Blut mit bekanntem Bleigehalt auf die mit Seife gewaschenen Fingerspitzen aufgetropft, nach 10 Sekunden wieder abpipettiert und die Bleikonzentration bestimmt. Hierauf wurde auf dem gleichen Finger zweimal der oben beschriebene Säuretest durchgeführt. Die Ergebnisse (Abb. 1) zeigen, daß Blut das auf den Fingern vorhandene Blei viel weniger stark aufnimmt als die verdünnte Säure. In einem weiteren Versuch wurde ein Finger durch kurzes Berühren einer Bleiplatte stark mit Blei verunreinigt. Selbst in diesem Fall stieg die Blutbleikonzentration nur um 20—75 ppb an, während der Säuretest 9 000 und 16 000 ppb Blei ergab. Die Kontamination von Kapillarblut ist deshalb selbst bei relativ hohem Bleigehalt auf dem Finger gering. Das Blei läßt sich zudem mit schwacher Säure oder noch besser mit einem Komplexbildner (z. B. EDTA) vollständig von der Haut entfernen. Kaum wirksam ist hingegen das Waschen der Finger mit Wasser, Seife oder Alkohol. Screeningprogramme können dennoch mit Kapillarblut durchgeführt werden, da bei Personen mit erhöhtem Bleispiegel ohnehin weitere Bestimmungen mit Venenblut durchgeführt werden. Zur Untersuchung kleiner Aenderungen der Blutbleikonzentration wird jedoch die Entnahme einiger Milliliter venösen Blutes vorgezogen. Die für die Blutentnahme üblichen Plastikwegwerfspritzen sind nach unseren Erfahrungen blindwertfrei.

Eine weitere Fehlerquelle bilden die Verluste durch Wandadsorption, Mitfällung und Sedimentation von Blutpartikeln sowie bei Trennoperationen, z. B. bei Extraktionen. Beim Herstellen der Eichlösungen ist zu beachten, daß neutrale wässerige Bleilösungen im ppb-Bereich nicht stabil sind und Bleiverluste bereits

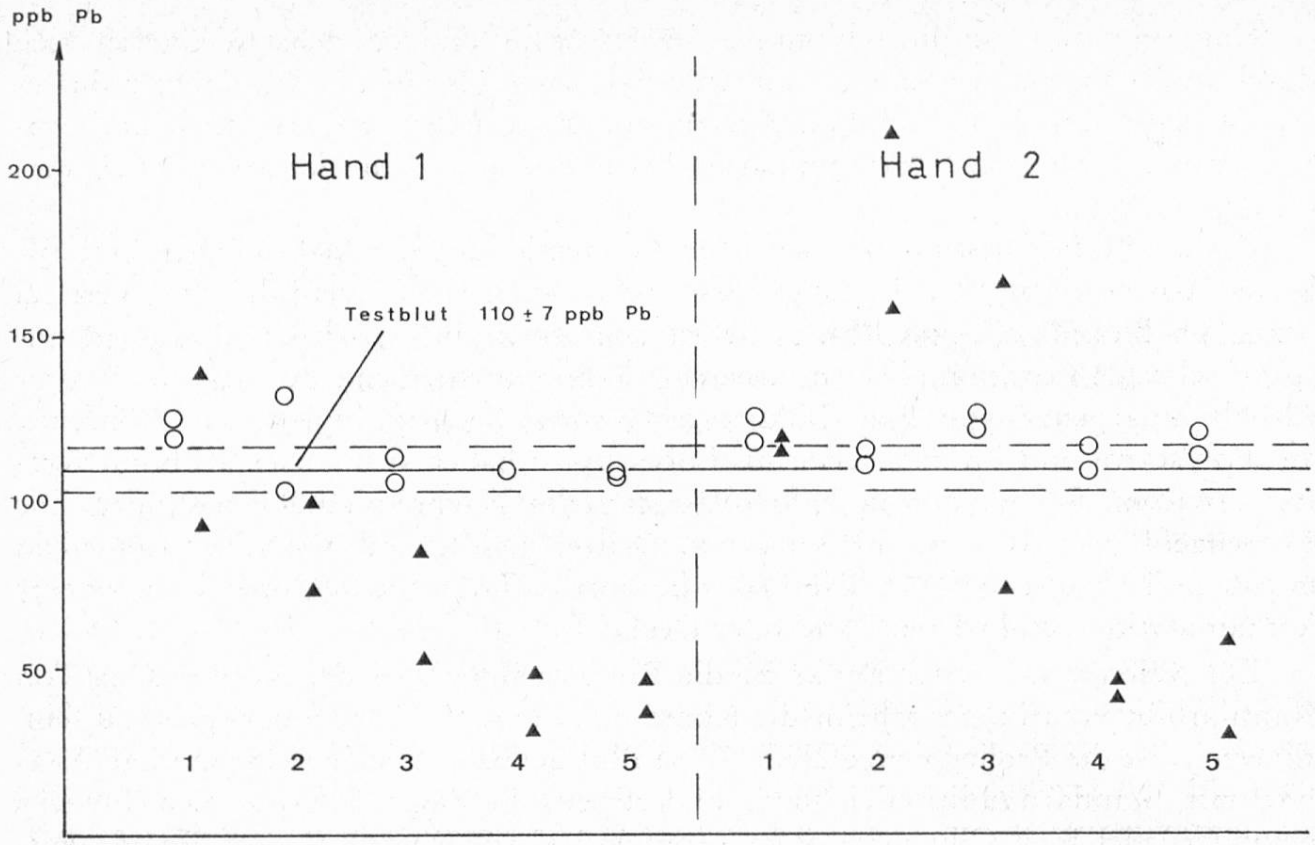


Abb. 1. Simulation der Bleikontamination bei Kapillarblutentnahme vom Finger. Bleikonzentration nach Auftropfen auf mit Seife gewaschene Finger von Testblut ○ und von 0,1% Salpetersäure ▲, 1 Daumen, ..., 5 kleiner Finger.

beim Verdünnen auftreten können. Bekanntlich lassen sich aber Spurenmetalle durch Ansäuern in Lösung halten. Eichlösungen mit 50 bis 200 ppb Blei in 0,1% Salpetersäure zeigten noch nach zwei Monaten die gleichen Konzentrationen. Blut scheint hingegen auch im neutralen Zustand genügend Bindungskapazität für Blei zu haben. Die Bleikonzentration bleibt bei Lagerung im Kühlschrank während mindestens 1 bis 2 Wochen konstant. Blutgerinnsel, die sich trotz Antikoagulierung bilden, können im Ultraschallbad wieder aufgelöst werden. Aeltere Blutproben zeigen allerdings eine erhöhte unspezifische Absorption (siehe unten).

Unter den spezifischen Problemen der Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie gilt es vor allem die Matrixeffekte zu beachten, die bei Spurenanalysen von biologischem Material auftreten. Bezüglich ihrer Auswirkungen können zwei Arten von Matrixeffekten unterschieden werden:

1. Veränderung der Empfindlichkeit (Steigung der Eichgeraden);
2. Nullpunktverschiebung durch unspezifische Absorption.

Die Empfindlichkeit ist stark abhängig von der Verteilung des Probentropfens im Graphitrohr. Eine rein wässerige Eichlösung trocknet als Tropfen ein. Verringert man die Oberflächenspannung durch Zugabe eines Netzmittels, so zerfließt der Tropfen, und die gleiche Menge Blei gibt ein kleineres Signal. Beim Blut ist eine breite Verteilung im Rohr erwünscht, damit die organische Matrix

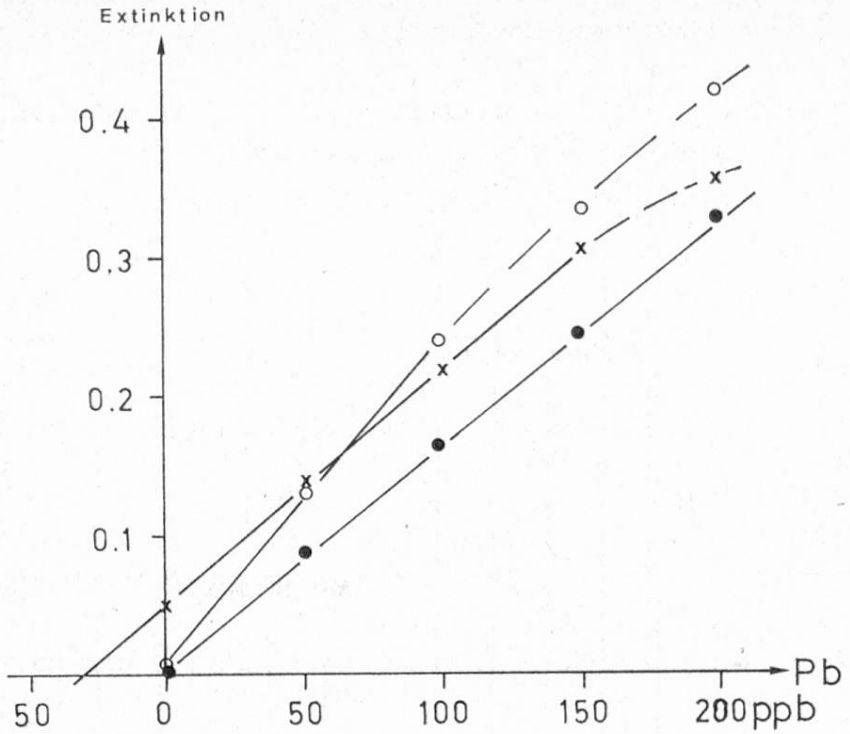


Abb. 2. Variation der Empfindlichkeit für Blei in verschiedenen Matrices.
○ Wasser, ● 0,2% Triton X-100 in Wasser (stark verringerte Oberflächenspannung), x Blut (verdünnt 1+4, 0,2% Triton X-100, 1% NH_4NO_3, 1 mM EDTA).

vollständig verascht werden kann. Der Meßlösung wird deshalb ein Netzmittel (Triton X-100) zugesetzt. Man erhält für die Blutmatrix nochmals eine etwas andere Empfindlichkeit (Abb. 2). Auch die anorganischen Komponenten der Matrix wirken sich auf die Empfindlichkeit aus, da sie den Atomisierungsprozeß beeinflussen können.

Ein weiteres Problem bildet die unspezifische Absorption. Durch genügend langes Veraschen kann die durch organische Verbindung in der Matrix verursachte Absorption vollständig eliminiert werden. Schwieriger ist es, die unspezifische Absorption schwerflüchtiger anorganischer Salze zu reduzieren. Sie kann durch Matrixmodifikation, d. h. durch Veränderung der Zusammensetzung der anorganischen Salze in der Matrix, beeinflußt werden. Abbildung 3 zeigt, daß es gelingt, durch Zugabe von 1% NH_4NO_3 die unspezifische Absorption der Blutmatrix um 50% zu reduzieren. Die verbleibende unspezifische Absorption wird dann mit dem Deuteriumkompensator unterdrückt.

Für die Eichung setzen wir wegen der geschilderten Effekte routinemäßig die Standardadditionsmethode ein. Es werden drei Meßlösungen mit zusätzlich 0, 25 und 50 ppb Blei bestimmt. Durch dieses Verfahren werden gleichzeitig auch Analysenfehler aufgedeckt, wie z. B. Kontamination, Dosierfehler oder falsches Verhältnis der Eichkonzentrationen.

Der apparative Meßfehler stellt wohl bei jeder spurenanalytischen Bestimmungsmethode das kleinste Problem dar. Eine schlechte Meßreproduzierbarkeit läßt sich leicht erkennen und man wird dafür sorgen, daß die Störung behoben wird. Im Falle der hier beschriebenen Blutbleibestimmung liegt der Variationskoeffizient für die reine Meßgenauigkeit bei 2—4% (Tabelle 2 A).

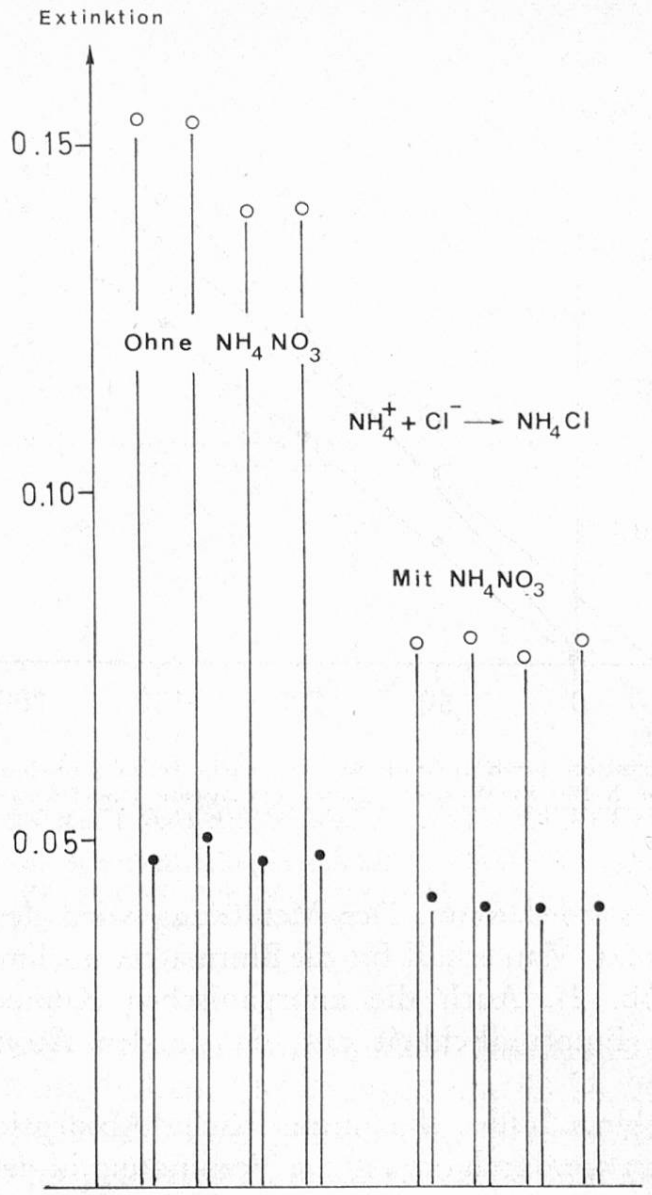


Abb. 3. Matrixmodifikation durch Zugabe von 1% NH_4NO_3 zur Blutlösung.
○ ohne Deuteriumkompensation (spezifisches und unspezifisches Signal)
● mit Deuteriumkompensation (nur spezifisches Signal von Blei).

Tabelle 2. Genauigkeit der Bleibestimmung in Vollblut

A. Reine Meßreproduzierbarkeit

Wiederholte Messung einer Probenlösung aus Vollblut mit ca. 150 ppb Blei (Meßwerte in Milliextinktionseinheiten):

Mittel	51,2
Standardabweichung	1,8
Variationskoeffizient	3,5 %
Anzahl Meßwerte	8

B. Reproduzierbarkeit der gesamten Analyse

Einmalige Messung von 15 separat zubereiteten Probelösungen aus Vollblut unter Zugabe von 0, 25 und 50 ppb Blei
(Meßwerte in Milliextinktionseinheiten)

Pb-Zusatz (ppb)	0	25	50	Pb in Vollblut (ppb)
1. Meßreihe	37	75	120	107 ± 12
2. Meßreihe	38	78	120	114 ± 2
3. Meßreihe	35	82	118	111 ± 8
4. Meßreihe	38	(131)*	121	116
5. Meßreihe	38	77	125	106 ± 17
Mittel	37,2	78,0	120,8	110,8
Standardabweichung	1,3	2,9	2,6	4,3
Variationskoeffizient	3,5%	3,7%	2,2%	3,9%

* Ausreißer, nicht verwendet für Auswertung.

Methode und Resultate

Für die hier beschriebene Methode (3) zur direkten Bestimmung von Blei in Vollblut wurde ein Atomabsorptionsspektrometer Perkin-Elmer, Modell 360 (Wellenlänge 283,3 nm, Spalt 0,7 nm, mit Deuteriumkompensator) mit Grahpitrohrküvette HGA 74 (trocknen 25s, ca. 100°C, veraschen 60s, ca. 500°C, atomisieren 8s, ca. 2000°C bei Miniflow, ausglühen 1s, ca. 2500°C) verwendet. Die Proben (20 µl pro Messung; Blut 1+4 verdünnt, enthält 0,2% Triton X-100, 1% NH_4NO_3, 1 mM EDTA sowie 0, 25 und 50 ppb Bleizusatz) wurden mit dem Dosierautomaten AS1 eingegeben und das Meßsignal mit einem Kompensationsschreiber Perkin-Elmer Modell 56 aufgezeichnet.

Der gesamte Analysengang ist kurz und besteht nur aus den vier Schritten Blutentnahme und Antikoagulieren, Probenvorbereitung, Messen und Auswerten. Dank der einfachen Probenvorbereitung, die nur aus dem Verdünnen des Blutes mit einer Reagenzienlösung besteht, konnte auf aufwendige Vorsichtsmaßnahmen zur Verminderung der Kontaminationsgefahr verzichtet werden. Für die Vorbereitung der Meßlösungen werden pro Blutprobe 2 bis 3 Minuten benötigt. Mit dem Dosierautomaten können anschließend pro Stunde 10 vollständige Bleianalysen durchgeführt werden. Ein Graphitrohr kann bei einer Meßreproduzierbarkeit von 2—4% für etwa 150 Einzelmessungen verwendet werden.

Der Variationskoeffizient von Meßlösung zu Meßlösung kann mit der beschriebenen Methode kleiner als 5% gehalten werden (Tabelle 2 B). Die durch lineare Regression aus 3 Meßwerten berechnete Bleikonzentration im Blut hat einen Variationskoeffizienten von 10—15%. Nicht erfaßt werden mit der Standard-

additionsmethode Effekte, die einen konstanten oder einen mit der Konzentration oder Meßzeit linear veränderten Wert zum Meßsignal addieren ober subtrahieren (Blindwert, apparative Fehler, z. B. Ueber- oder Unterkompensation der unspezifischen Absorption, Veränderung der Graphitrohrempfindlichkeit). Die Richtigkeit der Resultate muß daher mit einer anderen Methode überprüft werden, die nicht die gleichen systematischen Fehlerquellen enthält. Diese Kontrollbestimmung wurde mit einem Extraktionsverfahren (4) durchgeführt, das zwar ebenfalls die Atomabsorption als Meßmethode benützt, das aber auf einer ganz anderen Probenvorbereitung beruht. Dabei ergab sich eine Uebereinstimmung innerhalb von 20%.

Zusammenfassung

Normalwerte der Bleikonzentration in Vollblut können mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie routinemäßig mit etwa 10—15% Reproduzierbarkeit bestimmt werden. Die Richtigkeit der Resultate wird auf 20—30% geschätzt. Durch eine minimale Probenvorbereitung und durch die Methode der Standardadditionseichung können die größten Fehler reduziert und durch parallele, unabhängige Behandlung mehrerer Probenaliquote als Streuung sichtbar gemacht werden.

Résumé

Les taux normaux de plomb dans le sang peuvent être déterminés par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme avec une précision de 10 à 15% et une erreur systématique de 20 à 30%. La méthode décrite utilise un traitement très simple pour la préparation des échantillons et la méthode de standard interne (addition de quantités connues de plomb à l'échantillon) pour l'étalonnage.

Summary

Normal levels of lead in whole blood are determined with graphite furnace atomic absorption spectrometry with a precision of 10 to 15% and an accuracy of 20 to 30%. This is achieved by a very simple and short sample preparation procedure and by using the method of standard addition for calibration.

Literatur

1. *Stopps, G. J.:* Symposium on air quality criteria-lead. J. Occup. Med. **10**, 550—564 (1968).
2. *Berlin, A., Del Castilho, P.* and *Smeets, J.:* European intercomparison programmes, page 1033 in Proceedings International Symposium Environmental Health Aspects of Lead, Amsterdam 1972. Published by the Commission of the European Communities, Luxemburg 1973.

3. Modifizierte Methode nach: *Fernandez, F. J.:* Determination of lead in blood with the HGA-2100 graphite furnace. Perkin-Elmer Application Study Nr. 562 and 565 (1974).
4. Extraktion nach: *Mitchell, D. G., Ryan, F. J.* and *Aldous, K. M.:* The precise determination of lead in whole blood by solvent extraction atomic absorption spectrometry. Atomic Absorption Newsletter **11**, 120—121 (1972). Messung mit Graphitrohr-AAS, Standardadditionseichung.

Dr. R. Knutti
Ch. Balsiger
Prof. Dr. Ch. Schlatter
Institut für Toxikologie
der ETH und der Universität Zürich
Schorenstraße 16
CH - 8603 Schwerzenbach

Trav. chim. aliment. hyg. **68**, 86—99 (1977)

Anne Nabholz, Nestlé Products Technical Assistance Co. Ltd., La Tour-de-Peilz

Chemical Determination of Vitamin D in Dietetic Products

Introduction

For a long time the only determination method for vitamin D has been the biological method, i.e. the prophylactic or curative assay on rats.

It still remains the reference method and the one used to determine vitamin D in biological media and foods.

Chemical determinations have first been studied to be applied to products very rich in vitamin D, i.e. with some 100 to 100 000 i.u./g (2.5 to 2 500 mcg/g), such as oily concentrates and pharmaceuticals.

Since 1960, a method requiring two column chromatographies has been included in the United States Pharmacopeia.

In 1965, *H. R. Bolliger* and *A. König* (1) published a method based on thin-layer chromatography, which proved very useful in practice.

Several attempts have been carried out to elaborate a chemical determination method also applicable to food and dietetic products, mainly to vitamin-enriched milks, where Vitamin D content is low.

The chemical methods described in the literature (2—9) are, however, rather arduous; some of them include a gas chromatography after double purification on column. Moreover, they are not applicable to all kinds of products, e.g. to those containing vegetable fat. Besides, they all concern higher vitamin D contents than those found in most dietetic products.

These contain an average of 100 to 400 i.u. (2.5—10 mcg) vitamin D per 100 g and up to 25% fat.

In this case, the main analytical difficulty is caused by the unfavourable ratio of vitamin D to fat content on the one hand, and of vitamin D to vitamin A content on the other hand.

The problem of the vitamin D determination is the harder to resolve, the higher the fat content and the lower the vitamin D content. Therefore, the most important difficulty is in the cleanup.

Development of our method

In our laboratory, we have tried to develop a routine method, applicable in a normally equipped laboratory, and keeping the colorimetric reaction as the final determination.

The determination conditions are following:
100—400 i.u. (2.5—10 mcg) vitamin D/100 g product
or 0.1—0.4 mcg/g fat, for products with 20—25% fat
Our study is evolved from the work of *H. R. Bolliger* and *A. König* (1).
Three separations had to be worked out:

1. Separation of vitamin D from fat
2. Separation of vitamin D from vitamin A
3. Separation of vitamin D from sterols.

Point 1. Assays have shown that freezing the fat (1) leads to vitamin D loss and we had to resort to saponification, although it should be avoided as far as possible.

Point 2. The saponification has hydrolyzed the vitamin A ester into vitamin A alcohol, which is harder to separate from vitamin D than its ester.

Several attempts of separation of vitamin A from vitamin D, e.g. by thin-layer chromatography, Franconit or fuller's earth column chromatography, were unsuccessful. Only partition chromatography according to *Theivagt* (10) and *Strohecker* (11) has given positive results.

Point 3. We have tried to separate the sterols through precipitation with digitonin according to *Green* (12) and *Eisses* (6). The first method led to vitamin D loss, and the second did not eliminate the sterols. We went on with thin-layer chromatography (TLC), and had to find the most efficient mobile phase (1, 13, 14, 15, 16).

First, we kept the use of chloroform; however, in the case of products containing vegetable fat, we did not obtain a sufficient purification of vitamin D.

We then used gas chromatography (GC) to examine the eluate obtained after TLC. It showed the presence of β-sitosterol brought by vegetable fat. β-sitosterol interferes with the colorimetric reaction and we sought another mobile phase. A new series of assays led us to the solvent described by *A. Pinelli* et al. (16), which gives a definitely better separation (table 1, table 2, figure 1).

Besides, we increased the sensitivity of the method by using cells of 4 or 5 cm to read the colorimetric reaction.

Verification of the method

Biological determination

The values obtained with the chemical method have been confirmed by the biological determination (table 3).

Recovery

92.5—100—90—96—96%; average = 95%.

Table 1

Mobile phases tested with a mixture of vitamin D + cholesterol

— Adsorbent: Silica gel GF_{254}	
1. Cyclohexane/ethyl ether	1 : 1
2. Cyclohexane/ethyl acetate	80 : 20
3. Cyclohexane/ethyl acetate	75 : 25
4. Benzene/ethyl acetate	80 : 20
5. Benzene/ethyl acetate	90 : 10
6. Benzene/ethyl acetate	75 : 25
7. Chloroform	
8. Dichloromethane	
9. Dichloroethane/acetone	85 : 15
10. Dichloroethane/methyl-isobutyl ketone [DE/MIC]	90 : 10
11. Dichloroethane/benzene/acetone	90 : 90 : 20
— Adsorbent: Al_2O_3 G	
12. Hexane/chloroform	75 : 25
13. Hexane/chloroform	50 : 50
14. Chloroform	

Table 2

Thin-layer chromatography. Separating power of $CHCl_3$ (I) and DE/MIC (II)

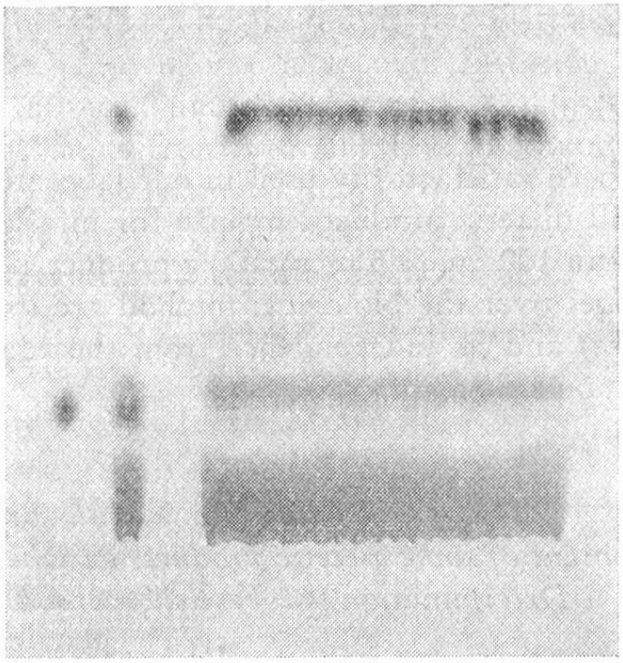
Adsorbent: Silica gel GF_{254}
Thickness of the layer: 0.5 mm

a) Standards — Mixture applied onto thin layer
250 i.u. vitamin D
20 mg cholesterol
20 mg β-sitosterol

b) Unsaponifiable of a milk powder with vegetable fat

Composition of the eluate of the vitamin D zone after TLC

		Cholesterol μg/μl	β-sitosterol μg/μl
Mobile phase I	a)	5.0	7.7
		9.5	11.5
	b)	0.6	1.2
Mobile phase II	a)	0.3	0.2
		0.1	0.2
	b)	0.04	0.35



1 2 3

Fig. 1. Chromatogram of the unsaponifiable matter of a milk powder enriched with vitamins.
Adsorbent: Silica gel GF_{254} ; 0.5 mm
Mobile phase: Dichloroethane/Methyl-isobutyl ketone (90 : 10)
Migration time: 2 hours
Spray reagent: $SbCl_3$, chloroform solution

1 Vitamin D reference 2 Vitamin D + product 3 Product

Table 3
Comparison of results between the chemical and the biological method

	Chemical method*	Biological method**	Difference %
Milk powder 17% fat	1. 375 i.u.	350 i. u.	+ 7
	2. 535	500	+ 7
Milk powder 26% fat	1. 335	350	— 4
	2. 340	330	+ 3
Milk powder 26% fat with vegetable fat	1. 350	360	— 3
	2. 350	360	— 3
Milk cereal	315	315	0

* Averages of duplicate determinations.
** Institut suisse des viamines, Lausanne et Bâle.

Difference between two values of a duplicate analysis

Average of 5% calculated on 28 analyses.

This method has been satisfactorily used in our laboratory for several years as routine method for all dietetic products, mainly for infant foods with vitamin D content even lower than 100 i.u. (2.5 mcg)/100 g product.

Its main advantages over the biological method are its higher rapidity (three days instead of weeks) and its independence from the equipment and specialisation required for tests on animals.

Table 4
Vitamin D content of some dietetic products enriched with vitamins
Determination by chemical method

	i.u./100 g
Chocolate drinks (powder)	2 150
	1 200
	750
Milk cereal	260
Milk powder	330
Milk powder with vegetable fat	350
	120
Sterilized milk	110
Condensed milk	107
	70
Milk before sterilization	35
Milk after sterilization	15

Nowadays, liquid chromatography (HPLC) opens a new way. It might lead to a still easier, more rapid and precise determination.

Procedure

Material

— Spectrophotometer, to be used with 4 or 5 cm cells
— Material for the TLC
— Amber or nonactinic glassware: flasks, separating funnels, etc.
— Chromatography tubes with stopcock, teflon key, int ϕ = 17 mm, l = 300 mm

— Chromatography tube with stopcock, teflon key, sintered plate and ground at the lower end, to be adapted onto a vacuum filtration apparatus, int. ϕ = about 200 mm, l = 150—200 mm
— Centrifuge tubes, graduated from 0 to 10 ml, with ground stopper, amber glass
— Test tubes with ground stopper
— Manual UV lamp, 366 nm
— UV lamp 254 nm, to examine chromatography plate

Chemicals

— Alcohol, absolute, GR, Merck
— Ammonia, 25%, GR, Merck
— Potassium hydroxide pellets, GR, Merck
— Diethyl ether, GR, Merck
— Petroleum ether, Boiling range 40—60°C, GR, Merck
— Petroleum ether, Boiling range 60—80°C, GR, Merck
— Chloroform, GR, Merck
— 1,2-dichloroethane extra pure, Merck
— Methyl-isobutyl ketone, Merck
— Acetyl chloride, GR, Merck
— Acetic anhydride, GR, Merck
— Polyethyleneglycol 400, Merck
— Antimony(III) chloride $SbCl_3$, GR, Merck
— Sodium sulfate, anhydrous, GR, Merck
— Hydroquinone extra pure, Merck
— Kieselguhr for liquid column chromatography, Merck
— Silica gel GF_{254}, Merck
— Vitamin D_3 cryst. for biochemistry, Merck
— Vitamin A alcohol extra pure, Fluka

Principle of the method

1. Extraction of the fat and vitamin D.
2. Saponification of fat.
3. Separation of vitamin D from vitamin A in the unsaponifiable matter by partition chromatography.
4. Separation from sterols by TLC.
5. Colorimetric reaction.

Work with nonactinic glass, or as far as possible protected from light.
All solvent evaporations must be made under vacuum, by means of a rotary evaporator, et a temperature under 40°C.

1. *Extraction of the fat and vitamin D* (see also addendum)

Use a 1 litre separating funnel.
Dissolve a test portion containing about 400 i.u. of vitamin D in just enough water to obtain a semi-liquid mass. Add diastases if starch is present.
Even for products with low vitamin D content, avoid taking more than 100 g test portion of dry products. For liquid products, 200—300 ml may be taken.
Add:

50 ml of ammonia; shake, then add
250 ml of alcohol; shake again. Cool.

Extract four times with:

200 ml of recently distilled ethyl ether
and 200 ml of petroleum ether (40—60°C)

After each addition of ethyl ether, shake the funnel carefully in order to avoid emulsion, then add petroleum ether, mix and allow the phases to separate.
Collect the four extracts in a 2 litre separating funnel, then evaporate the solvents in a 500 ml flask until no more than about 40 ml of liquid remains.

2. *Saponification and extraction of the unsaponifiable matter*

Add 50 ml of 60% (m/v) potassium hydroxide solution, 100 ml of alcohol and a pinch of hydroquinone. Heat for 30 minutes under reflux in a boiling water bath, under a slight nitrogen current, introduced into the flask through an appropriate connection.
When saponification is finished, cool the flask a little under tap water.
Transfer to a 500 ml separating funnel with about 120 ml of distilled water.
Extract the unsaponifiable matter with:

1 × 150 ml
then with 4 × 100 ml of petroleum ether (40—60°C)

Collect the extracts in a 1 litre separating funnel and wash the solution with 200 ml portions of distilled water until the wash water gives a colourless reaction with phenolphthalein.
Then dry the extract with sodium sulfate (or by filtering it through a phase separating filter), and evaporate the solvent under vacuum. Take up the residue with 3 ml of petroleum ether (60—80°C). If the product contains little or no vitamin A, add about 1500 i.u. vitamin A alcohol at this moment, as «indicator» for the chromatography.

3. *Column chromatography*

a) Preparation of the column

Shake 20 g of kieselguhr with 120 ml of petroleum ether (60—80°C) for five minutes in an Erlenmeyer flask with ground stopper.

Add 6 ml polyethyleneglycol and shake on a mechanical shaker for 20 minutes
Place a little glass wool at the bottom of the chromatography tube (inside ϕ 17 mm; length 300 mm) and prepare a *very compact* column with the kieselguhr kept in suspension in the solvent mixture. Add the kieselguhr in portions of 1—2 cm high and press the powder down after each addition with an appropriate instrument. Allow the solvent to flow out, taking care that the column is always covered with liquid.
Finally, rinse the column with 3×10 ml of petroleum ether (60—80°C), always keeping the column covered with liquid.

b) Chromatography

This must be done in total darkness! (darkroom). Use a red light during the manipulations.
Pour the extract quantitatively onto the column. Elute with petroleum ether (60—80°C). Collect the eluate in a heart-shaped flask. The flow rate must be about 6 drops per minute. Follow the fluorescent vitamin A strip with very brief irradiations from a UV lamp (366 nm) and stop the chromatography when the vitamin A is about 5 mm from the bottom of the column.
Duration of the chromatography: about 2 hours.
Evaporate the eluate under vacuum and transfer the residue with a minimum quantity of chloroform to a graduated centrifuge tube. Evaporate the chloroform under vacuum and complete the extract to 1 ml with chloroform.

4. *Thin-layer chromatography*

a) Preparation of the plates

Prepare the chromatography plates on the day before use, according to the known method, with silica gel GF_{254}; thickness of the layer: 0.5 mm. Let them dry for a few hours (2 to 3 hours) without removing them, then heat for 2 hours at 120°C.
Let the plates cool and keep them in a tight metallic box.

b) Chromatography

Work in a darkroom, under red light.
Apply, under N_2, onto the left side of the plate, a little of the extract, to which vitamin D_2 (remark I) has been added as reference. Then, apply 0.5 ml (remark II) of the extract in a ca. 14 cm long line, onto the right side of the plate.

Mobile phase:

Dichloroethane/methyl-isobutyl ketone (90 : 10)

Allow the chromatogram to develop for 1—2 hours, according to the product (in a dark place!).

After this lapse of time, remove the plate from the chamber, *rapidly* localize the vitamin D reference under UV (254 nm) and demarcate the vitamin D zone of the extract.
Cut from the still moist adsorbent layer the strip corresponding to vitamin D, then scrape it into the chromatography tube fixed upon the filtration apparatus and half filled with chloroform. Elute the vitamin D with chloroform (100 to 150 ml).
Evaporate the solvent under vacuum and take up the residue with 5 ml of chloroform.

Remarks:

I. Vitamin D_2 can be used as reference instead of vitamin D_3.
II. Adapt the amount to be chromatographied to the amount of vitamin D present in the solution.

5. *Colorimetric reaction*

a) Reagents

Vitamin D reagent
Dissolve 100 g antimony(III) chloride in 450 ml chloroform. Filter quickly and add 10 ml acetic anhydride.
This solution keeps for several weeks in the refrigerator.
One hour before use, prepare the reagent, by mixing 98 ml antimony chloride solution with 2 ml acetyl chloride.

Inhibitor
Mix 50 ml acetic anhydride with 50 ml chloroform.

Vitamin D reference solution containing 50 i.u./ml
Solution in chloroform, prepared from vitamin D_2 or D_3, depending on the vitamin to be determined.
For products poor in vitamin D, prepare a solution of 30 or 40 i.u./ml.

b) Reaction

The reactions are carried out in duplicate on 1 ml of solution in glass tubes with ground stopper, according to the following chart:

	Standard	Blank of the standard	Sample	Blank of the sample
Standard solution	1 ml	1 ml	—	—
Sample extract	—	—	1 ml	1 ml
Chloroform	1 ml	—	1 ml	—
Inhibitor	—	1 ml	—	1 ml
Reagent $SbCl_3$	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml

Carry out the reactions in one tube after the other, i.e., prepare the four tubes of the standard, for example (2 for the standard, 2 for the blank), up to the reagent, then add the latter to one tube after the other, making the measurement in the spectrophotometer each time before continuing with the next tube. Immediately after adding the reagent, transfer the solution into a 4 or 5 cm cell. Measure the absorbance at 500 nm, as soon as it has reached the maximum (after about 20 sec).

Calculation

The vitamin D content per 100 g of product is calculated as follows:

$$\frac{E_e - E_{be}}{E_s - E_{bs}} \times D \times \text{dilutions made}$$

where: E_e = absorbance of the sample
E_s = absorbance of the standard
E_{be} = absorbance of the blank of the sample
E_{bs} = absorbance of the blank of the standard
D = concentration of the standard solution in i.u. of vitamin D/ml.

Discussion of the method

Saponification might involve a loss of vitamin D, due to its transformation into praevitamin D. However, this is not the case as was demonstrated by:

1. A vitamin D solution, heated for 2 hours gives the same value by colorimetric reaction as the same non-heated solution.
2. On the thin-layer chromatogram, the zone of praevitamin D is included in the zone of viamin D when the latter is eluted.
3. The biological determination confirms the results of the proposed chemical method.

Acknowledgement

We wish to thank especially Mrs. *S. Hofstätter* for her valuable collaboration and for the technical work she has carried out.

Addendum

It is possible to extract fat from most products more rapidly than described above.

When using the extraction procedure described by *J. Bell* and *A. Christie* (9), the total time required for one determination is considerably reduced.

Thus, one determination in duplicate lasts only two days.

Extraction of the fat and Vitamin D

— Quicker alternative

Reagents

— Fat extraction solution: Weigh 200 g of sodium hexametaphosphate in a 1 litre beaker and 100 g of Triton X-100 in a second 1 litre beaker. Add 800 ml of water to each beaker and dissolve the solids by warming. Mix the solutions in a suitable bottle and dilute the volume to 2 litres with water. Shake the solution well and allow it to stand overnight; shake it well the following day before use.

Chemicals

— Polyethyleneglycol mono [p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl] ether (Triton X-100), Merck
— Sodium polyphosphate (Graham's salt), Merck.

Procedure

Weigh 100 g of product into a 1 litre conical flask, add 250 ml of water at a temperature of 80 to 85°C and mix by swirling the flask until a creamy paste free from lumps is formed. Place the flask in a boiling water bath and, after 5 min, add 100 ml of fat extraction solution. Mix well and leave the flask in the water bath for a further 10 min with frequent swirling. Cool the solution for 5 min by placing the flask in an ice-cooled water bath. Add 200 ml of ethanol, mix well and continue cooling until the solution reaches at least room temperature. Transfer the contents of the flask into a 2 litre conical separating funnel fitted with a PTFE key and add 400 ml of a 1+1 mixture of diethyl ether and light petroleum. Shake the mixture vigorously for 1 min and leave it to stand for at least 15 min so as to allow the two phases to separate. Discard the aqueous layer. Wash the sides of the separating funnel with a few millilitres of water, swirl it very gently and when the phases have separated, discard the aqueous layer. Transfer the solution into a rotary evaporating flask and reduce the volume of the solution to about half. Add 50 ml of absolute ethanol to the flask and continue the evaporation until the removal of solvent is complete, i.e., until the residue suddenly becomes clear.

Saponification and extraction of the unsaponifiable matter

Weigh 20 g of potassium hydroxide pellets into a 250 ml conical flask. Add about 10 ml of water followed by 140 ml of absolute ethanol, shake the mixture and heat it at 70 to 80°C until the solid is completely dissolved. Pour the hot ethanolic potassium hydroxide solution into the flask containing the fat extracted from the product and swirl the flask gently until the fat is dissolved. Heat the

flask in a water bath at 70 to 80°C for 15 min, then add 50 ml of water and cool the flask quickly to room temperature.

Transfer the contents into a 1 litre conical separating funnel containing 400 ml of a 1+1 mixture of diethyl ether and light petroleum, rinsing the flask by filling it with water and adding the rinsings to the separating funnel. Shake the funnel vigorously for 1 min and allow the phases to separate completely, usually for 10 min. Discard the aqueous phase and wash the solvent phase with four 250 ml portions of water, taking care to avoid the formation of emulsions, which may occur if the funnel is shaken too vigorously; it is therefore advisable to increase the thoroughness of shaking from a very gentle action in the first wash to a vigorous action in the last wash. If emulsions do form, they can be dispersed by the addition of a few millilitres of ethanol. Transfer the solvent extract into an evaporating flask and reduce the volume of the liquid to about half, then add 50 ml of absolute ethanol and continue the evaporation until the removal of the solvent is complete.

Take up the residue with 3 ml of petroleum ether (60—80°C). If the product contains little or no vitamin A (added or natural content) add about 1500 i.u. vitamin A-alcohol in 1 ml petroleum ether (60—80°C), as «indicator» for the chromatography.

Continue with column chromatography as under 3.

Summary

A chemical determination method is described, which allows to determine vitamin D in dietetic products, mainly in infant foods containing animal and vegetable fat.

After saponification, vitamin D is isolated by partition chromatography on column and by TLC, and then determined by colorimetry.

Vitamin D contents, even under 100 i.u. (2.5 mcg)/100 g product, are determined with an average difference of 5% between duplicates. Recovery: 95%.

The results are confirmed by biological determination.

The proposed method is used as routine method.

Zusammenfassung

Eine chemische Methode zur Bestimmung von Vitamin D in diätetischen Produkten, besonders in Kindernahrung mit Tier- und Pflanzenfett, wird beschrieben.

Nach Verseifung wird das Vitamin D durch Verteilungschromatographie und durch Dünnschichtchromatographie isoliert und dann kolorimetrisch bestimmt.

Vitamin D-Gehalte, selbst unter 100 I.E. (2,5 mcg) pro 100 g Produkt, werden mit einem durchschnittlichen Unterschied von 5% zwischen Doppelwerten bestimmt. Zurückgewinnung: 95%.

Die Resultate wurden durch biologische Bestimmung bestätigt.

Die vorgeschlagene Methode wird als Routinemethode verwendet.

Résumé

Une méthode chimique de dosage est décrite, permettant de doser la vitamine D dans les produits diététiques, en particulier dans les aliments infantiles, contenant de la graisse animale et végétale.

Après saponification, la vitamine D est isolée par chromatographie de partage sur colonne et par chromatographie sur couche mince, puis dosée par colorimétrie.

Des teneurs en vitamine D même inférieures à 100 u.i., soit 2,5 mcg par 100 g de produit sont dosées avec une différence moyenne de 5% entre les valeurs d'une analyse faite en double. Recouvrement: 95%.

Les résultats obtenus ont été confirmés par dosage biologique.

La méthode proposée est utilisée comme méthode de routine.

Literature

1. *Bolliger, H. R.* und *König, A.:* Quantitative Bestimmung von Vitamin D in Konzentraten, Arzneimitteln und weiteren Kombinationspräparaten mittels Dünnschicht-Chromatographie. Z. anal. Chem. **214**, 1—23 (1965).
2. *Osadca, M.* and *De Ritter, E.:* Chemical determination of vitamin D in low potency products by a modified USP procedure. Feedstuffs **35**, 26—32 (1963).
3. *Hove, E. L.* et al.: Collaborative study of a chemical method for vitamin D. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **47**, 747—749 (1964).
4. *Jones, S. W.* et al.: Modification of the USP chemical method for determining vitamin D in evaporated milk. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **48**, 1212—1217 (1965).
5. *Jones, S. W.* and *Libby, D. A.:* Note on chemical determination of vitamin D in evaporated milk. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **49**, 681 (1966).
6. *Eisses, J.* and *de Vries, H.:* Chemical method for the determination of vitamin D in evaporated milk with elimination of cholesterol by digitonin precipitation. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **52**, 1189—1195 (1969).
7. *Panalaks, T.:* Colorimetric method for the determination of vitamin D in fortified whole and partially skim fluid milks. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **54**, 1299—1303 (1971).
8. *Touw, H. D.* et al.: Gas-liquid chromatographic determination of vitamins D_2 and D_3 in infant formulas and feeding preparations. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **55**, 622—630 (1972).
9. *Bell, J. G.* and *Christie, A. A.:* Gas-liquid chromatographic determination of vitamin D_2 in fortified full-cream dried milk. Analyst **99**, 385—396 (1974).
10. *Theivagt, J. G.* and *Campbell D. J.:* Determination of vitamin D in multivitamin mixtures after separation by partition chromatography. Anal. Chem. **31**, 1375—1377 (1959).
11. *Strohecker, R.* und *Pies, H.:* Zur chemischen Bestimmung von Vitamin D in pharmazeutischen Zubereitungen, insbesondere Multivitaminpräparaten. Arch. Pharm. **294/66**, 800—811. (1961).
12. *Green, J.:* Studies on the analysis of vitamin D. 2. The analytical purification of vitamin D by differential solubility, precipitation reactions and Chromatography. Biochem. J. **49**, 45—54 (1951).
13. *Copius Peereboom, J. W.:* Thin-layer Chromatography of sterols. Chromatographic sterol analysis, V.L.O., p. 94—98. Wageningen 1963.

14. *Ponchon, G.* and *Fellers, F. X.:* Thin-layer chromatography of vitamin D and related sterols. J. Chromatog. **35**, 53—65 (1968).
15. *Richter, J.* und *Ropte, D.:* Die Bestimmung von Vitamin D in Naturprodukten und pharmazeutischen Präparaten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Pharmazie **24**, 601—606 (1969).
16. *Pinelli, A.* et al.: Separation of vitamin D from cholesterol by thin-layer chromatography. J. Chromatog. **42**, 271—274 (1969).

Anne Nabholz
Nestlé Products Technical
Assistance Co. Ltd.
Case postale 88
CH - 1814 La Tour-de-Peilz

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 100—111 (1977)

R. Biedermann, Kantonales Laboratorium Schaffhausen
A. L. Prabucki, Instiut für Tierproduktion ETH Zürich und
H. Vogtmann, Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Oberwil BL

Die ernährungsphysiologische Wirkung von Rapsölen verschiedenster Provenienzen

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat in unseren Breitengraden die Produktion von Rapsöl sprunghaft zugenommen. Auf der Konsumentenseite wurde durch die teilweise Diskriminierung der tierischen Fette und durch die Preispolitik auf dem Milchsektor der Ruf nach mehr Oel pflanzlicher Natur beziehungsweise mehr Margarine statt Butter immer lauter. Die Landwirtschaft ist diesem Ruf gerne gefolgt, konnte doch z. B. in Kanada durch Rapsanbau dem wiederholt auftretenden Ueberangebot an Weizen entgegengewirkt werden und auf unserem Kontinent ist das Problem der Milchschwemme immer noch aktuell. So hat als Alternativanbauprodukt die einzige Oelfrucht, die in unsern Breitengraden gedeiht, einen wahren Siegeszug angetreten. Im Kriege noch vom kanadischen Landwirtschaftsministerium als Schmieröl eingesetzt, findet sich Rapsöl heute vor allem in der kalten Küche und als Bestandteil von Margarine und Konditoreihalbfabrikaten. Die Weltproduktion ist denn auch auf über 7 Millionen Tonnen Rapssaat pro Jahr angestiegen (1).

Fütterungsversuche an Ratten, die negative ernährungsphysiologische Effekte des Rapsöls aufzeigten, alarmierten die Rapsanbauer vor ca. 10 bis 15 Jahren. Wissenschaftler aller Fakultäten versuchten, dem Problem auf den Grund zu kommen und glaubten, in der praktisch nur in Cruciferenölen vorkommenden *Erucasäure* die vermeintliche Ursache gefunden zu haben. In der Folge wurden neue Rapssorten gezüchtet, die weitgehend erucasäurefrei sind. Allerdings scheint das Oel dieser neuen Sorten bei Verfütterung an Ratten ebenfalls negative ernährungsphysiologische Wirkungen hervorzurufen, womit wir mitten in eine Diskussion hineingeraten, deren Ende noch nicht abzusehen ist.

Die chemische Zusammensetzung von Rapsöl

Neben dem Unverseifbaren enthält Rapsöl eine Triglyceridfraktion, die vornehmlich aus Fettsäuren des Oelsäuretyps zusammengesetzt ist. Bei den Fettsäuren dieses Typs befindet sich die erste Doppelbindung von Methyl- oder ω-Ende gezählt am neunten C-Atom. Im tierischen Organismus können diese Fettsäuren de novo aufgebaut werden. In Abbildung 1 sind die drei wichtigsten Fettsäuren des Oelsäuretyps aufgezeichnet.

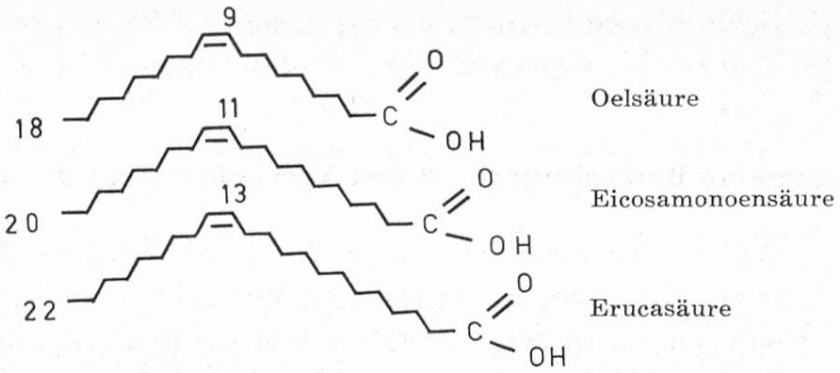


Abb. 1. Fettsäuren des Oelsäuretyps.

Neben 18:1, 20:1 und 22:1 sind noch die 5, 8, 11-Eicosatriensäure und die Nervonsäure (ω 9—24:1) als wichtige Vertreter dieser Gruppe erwähnenswert.

In der Tabelle 1 haben wir die Fettsäuremuster der wichtigsten Cruciferenöle festgehalten.

Je nach Standortbestimmungen werden heute in den Hauptanbauländern sowohl der Winterraps, Brassica napus (2), mit einem Erucasäureanteil von etwa 50% als auch der Sommerraps, Brassica campestris (3), mit einem Erucasäuregehalt von zirka 20% angebaut. Im kanadischen Westen wird praktisch ausschließlich Brassica campestris bevorzugt. Eine der ersten Züchtungen mit geringem Anteil an Erucasäure war die Varietät Oro (4). In Europa wurden die ersten Sorten erst relativ spät lizenziert, so z. B. Primor (4) in Frankreich.

Im *Unverseifbaren* des Rapsöls, dessen Anteil durchschnittlich 1,5% beträgt, finden sich vor allem die Sterole Sitosterol, Campesterol und Brassicasterol (5). Neben den fettlöslichen Vitaminen, Farbstoffen usw. treten im Unverseifbaren

Tabelle 1. Typische Fettsäuremuster von Rapsölen

		Winterraps, B. napus		Sommerraps, B. campestris	
		Herkömmlich %	Primor %	Herkömmlich %	Oro %
Palmitinsäure	C16:0	2,7	4,6	2,9	4,7
Palmitoleinsäure	C16:1	0,3	0,3	0,2	0,4
Stearinsäure	C18:0	0,9	1,2	1,0	2,4
Oelsäure	C18:1	10,2	58,8	31,5	59,8
Linolsäure	C18:2	13,0	21,3	20,0	21,2
Linolensäure	C18:3	9,0	10,8	9,7	7,2
Arachinsäure	C20:0	0,9	0,6	0,7	1,0
Eicosamomoensäure	C20:1	6,6	1,4	11,4	1,5
Behensäure	C22:0	0,5	0,4	0,2	0,3
Erucasäure	C22:1	52,7	0,1	21,4	0,4
Lignocerinsäure	C24:0	0,3	0,1	0,1	
Nervonsäure	C24:1	1,6	0,2	0,2	0,9

auch cyklische Alkohole auf. In einer neueren Untersuchung konnten *Fedeli* und *Jacini* (6) 13 verschiedene cyklische Alkohole nachweisen.

Allgemeine Bemerkungen zu den Versuchen über die Wirkung von Rapsöl

Ein Studium der veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten zeigt uns, daß in den letzten Jahren vor allem mit den Versuchstieren Ratte, Schwein und Huhn gearbeiet worden ist. In den Versuchen wurden praktisch überall isokalorische und eiweißäquivalente Diäten eingesetzt. Der Anteil der Energie, die aus dem Futterfett stammte, bewegte sich zwischen 15 und 80% (5—30% Fett im Futter).

Die Wirkung von Rapsöl auf Versuchstiere

Die ersten systematischen Untersuchungen über histopathologische Effekte bei der Verfütterung von Rapsöl an Ratten wurden 1960 durchgeführt. Das finnische Team *Roine* et al. (7) stellten dabei fest, daß vor allem das Herzgewebe der Tiere verändert wurde. In der Folge haben verschiedene Forschergruppen auf diesem Gebiet Untersuchungen durchgeführt, und sie konnten zeigen, daß bei der Ratte als Folge der Rapsölfütterung zwei pathologische Zustände auftreten, nämlich einerseits die Herzverfettung und anderseits langfristige Schädigungen des Herzgewebes (8).

Verschiedene Autoren (9, 10, 11) stellten fest, daß bei der Verabreichung von herkömmlichem Rapsöl an wachsende Ratten schon nach wenigen Tagen eine schwere intercelluläre Verfettung im Herzgewebe eintritt. Es findet eine Akkumulation von Triglyceriden mit einem hohen Gehalt an Eruca- und Eicosensäure statt. Diese Verfettung erreicht ihr Maximum im Laufe der ersten Versuchswoche.

In den folgenden Wochen haben sich die Herzlipidgehalte durchwegs wieder normalisiert. Die Intensität der Anreicherung dieser Fette im Herzen ist korreliert mit der Aufnahme der Erucasäure. *Beare-Rogers* (12) zeigte 1970, daß auch die Verfütterung anderer Oele mit hohen Anteilen an C 22-Monoensäuren diesen Effekt verursachen können.

Der zweite negative Einfluß von Rapsölen ist die langfristige Schädigung des Herzgewebes. Bei längerer Verfütterung von herkömmlichen Rapsölen, aber auch von erucasäurefreiem Canbra- oder Primoröl, treten in Rattenherzen Läsionen auf, die *Rocquelin* et al. (4) als Vervielfachung des Faseranteils, Strukturschädigung der Mitochondrien und Zellnekrosen beschreibt. Nach unseren Beobachtungen steigt die Zahl der Vakuolen (u. a. leere Blutgefäße) in solchen Rattenherzen an. Zusammen mit den nekrotischen Veränderungen ist zudem eine Vergrößerung des Herzgewichtes und eine vermehrte Einlagerung von Bindegewebe in die Muskulatur festzustellen (13). Interessant ist die Beobachtung, daß hauptsächlich *männliche* Ratten diese nekrotischen Veränderungen des Herzgewebes zeigen und daß je nach *Rasse* unterschiedliche Reaktionen auftreten.

Es bestehen zudem Einflüsse von Rapsöl auf Wachstum, Futteraufnahme und Reproduktion. Bei energieäquivalem Futter wurden bei Ratte, Huhn und teil-

weise auch anderen Tieren als Folge der Rapsölfütterung Wachstumsdepressionen festgestellt. Diese waren immer von einer geringeren Futteraufnahme begleitet. Was die Reproduktionsrate von Legehennen anbetrifft, so ist sie bei Fütterung von herkömmlichem Rapsöl gegenüber Diäten mit Sojaöl deutlich erniedrigt (14, 15). Auch die Verfütterung von erucasäurearmen Rapsölen (z. B. Span) hat einen negativen, allerdings weniger ausgeprägten Einfluß auf Legeleistung und Eigröße (16).

Bei wachsenden Schweinen sind in neueren Untersuchungen bei Verfütterung von herkömmlichem kanadischen Rapsöl keine Wachstumsdepressionen festgestellt worden. Allerdings haben die Tiere bei freier Wahl Futter mit erucasäurearmem Raps- und Sojaöl bevorzugt (17). Gerade was das Phänomen des geringeren Wachstums anbetrifft, liegt heute noch keine wissenschaftliche Erklärung dafür vor. Die Hypothese, daß die Erucasäure der Hauptfaktor für die geringere Futteraufnahme und als Folge davon auch für das geringere Wachstum ist, muß erst noch bewiesen werden.

Ursachen der pathologischen Veränderungen

Die Ursachen der Herzverfettung bei Ratten

Um den Mechanismus der Herzverfettung bei wachsenden, mit herkömmlichem Rapsöl gefütterten Ratten zu ergründen, ist es sinnvoll, im folgenden Schema den Weg des Fettsäureabbaues aufzuzeigen:

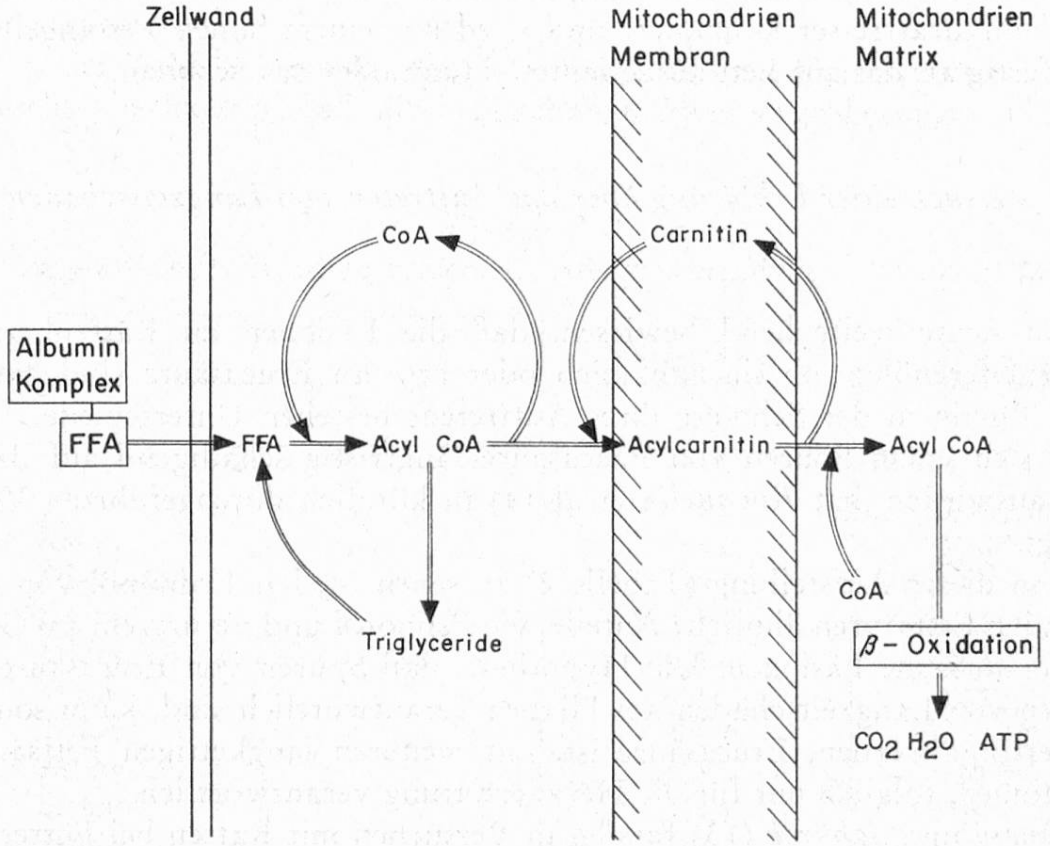


Abb. 2. Fettsäureabbau in der Zelle.

Das im Intestinaltrakt absorbierte Fett und die in der Leber de novo synthetisierten Fettsäuren werden mittels des Blutalbumins bis zur Zellwand transportiert. Innerhalb der Zelle erfolgt die Aktivierung der hier an einen Z-Proteinkomplex gebundenen FFA (freien Fettsäuren) zu Acyl-Co A. Letzteres wird nun über Carnitin-Co A durch die Mitochondrienmembran geschleust und die β-Oxidation kann beginnen.

In vitro-Experimente von *Houtsmuller* et al. (18) mit aus Rattenherzen isolierten Mitochondrien zeigen, daß die ATP-Produktionsrate fällt, wenn vermehrt Rapsöl angeboten wird. Die Fähigkeit, Substrat zu oxidieren, nimmt somit ab und eine Fettakkumulation im Zellraum ist die Folge. Daß die β-Oxidation irgendwie nicht sauber abläuft, ist nach den Versuchen verschiedener Autoren auszuschließen (19, 20, 21).

Vielmehr ist nach Beobachtungen von *Bremer* und *Christophersen* (22) wahrscheinlich, daß der Durchgang der Acylcarnitine durch die Mitochondrienmembran oder der Entkoppelungsmechanismus von Carnitin durch Erucasäure gestört wird. Diese Theorie ist bestechend, entsteht doch so im Zellraum ein Stau von FFA. Diese müssen zu Triglyceriden verarbeitet werden und somit entstehen unerwünschte Fettablagerungen in den Zellen.

Die nur bei der Ratte beobachtete kurzfristige Akkumulation von Fett im Herzgewebe ist durch die diskutierten Fakten erklärbar. Interessanterweise beginnt sich aber die Sachlage nach einer Woche zu normalisieren, der Organismus kann die Erucasäure metabolisieren. Es scheint sich somit hier vor allem um ein *Adaptationsproblem* an Fettsäuren mit sehr langen Ketten, wie Erucasäure oder Cetoleinsäure, zu handeln. Das Nagetier Ratte ist ernährungsmäßig vor allem als Kohlenhydratfresser konzipiert und wird mit einem hohen Fettangebot weniger gut fertig als das auf Fett ausgerichtete Huhn oder das Schwein.

Versuch einer Erklärung über das Auftreten von Langzeitschäden

Erucasäure

Es ist heute weitgehend bewiesen, daß die Läsionen an Rattenherzen von allen Cruciferenölen, ob sie nun reich oder arm an Erucasäure sind, verursacht werden. Einzig in der Schwere ihres Auftretens bestehen Unterschiede.

Daß sich schon Spuren von Erucasäure langfristig schädigend auf das Herzgewebe auswirken, hat *Rocquelin* et al. (4) in kürzlich durchgeführten Versuchen widerlegt.

Wie in dieser Aufstellung (Tabelle 2) zu sehen ist, hat Erdnußöl von den entscheidenden Fettsäuren ähnliche Anteile wie Primoröl und verursacht im Gegensatz zu letzterem keine Läsionen. Die Hypothese, daß Spuren von Erucasäure für das Auftreten von Langzeitschäden am Herzen verantwortlich sind, kann somit nicht weiterverfolgt werden. Erucasäure ist, mit weiteren langkettigen Fettsäuren mit 22 C-Atomen, folglich nur für die Herzverfettung verantwortlich.

Prabucki und *Schürch* (13) fanden in Versuchen mit Ratten bei Fütterung von erucasäurereichen *und* erucasäurearmen Rapsölen im Vergleich zum Sojaöl stark

Tabelle 2
Fettsäuremuster der Oele in den Versuchen von Rocquelin et al (1974)
Ausschnitt (4)

		Erdnuß %	Winterraps	
			Primor %	Herkömmlich %
Oelsäure	18:1	49,3	58,8	11,4
Arachinsäure	20:0	1,4	0,6	0,8
Eicosamonoensäure	20:1	1,3	1,4	7,1
Erucasäure	22:1	0,4	0,1	50,6
Nervonsäure	24:1	0,5	0,2	1,3

erhöhte Bindegewebsanteile im Herzmuskel. Die in den Cruciferenölen enthaltene Noxe stand nicht in direkter Beziehung mit dem Erucasäuregehalt des Futters. Eine der Versuchsreihen dieser Autoren wurde mit dem Ziel angelegt, von neuen Rapssorten Kenntnis über ihre ernährungsphysiologischen Eigenschaften zu gewinnen. Es handelte sich dabei um ein «Screening», um festzustellen, welche Sorten sich für den Anbau im Hinblick auf die Unschädlichkeit des Oels am besten eignen. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß es heute Rapssorten (Lesira, Midas) gibt, die keine Erhöhung des Rattenherzgewichtes, als Indikator für Herzveränderungen, mehr verursachen.

Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, bedeutet aber Erucasäurearmut (z. B. Sorte Tower) nicht gleichzeitig, daß die beobachteten Herzvergrößerungen nicht auf-

Tabelle 3
Screening-Test mit Rapsölen verschiedenster Provenienzen (Prabucki 1975)

Futterfett		Erucasäure im Futter %	Herzgewicht der Ratten g
Soja		—	0,65 ± 0,04
Raps	Rapol	54,0	0,76 ± 0,06
	Diamant	49,5	0,70 ± 0,05
	Lesira	<1	0,64 ± 0,06
	Midas	<1	0,63 ± 0,06
	Torch	<1	0,63 ± 0,02
	Tower	<1	0,70 ± 0,05
	Zephyr	<1	0,61 ± 0,04
Senf	Serepta	24,1	0,79 ± 0,07
	Junius	38,6	0,72 ± 0,09

treten. Es wurden zudem keine Brassicaöle gefunden, die bei einem erhöhten Erucasäuregehalt keinen Einfluß auf das Herzgewicht der Versuchstiere haben.

Faktoren im Unverseifbaren

Es ist nach den an der ETH durchgeführten Untersuchungen sowie auch nach den Arbeiten von *Roquelin* et al. sehr wahrscheinlich, daß ein weiterer Faktor oder weitere Faktoren, die im Unverseifbaren zu suchen sind, für die nekrotischen Veränderungen verantwortlich sein müssen. Demnach wird es sinnvoll sein, mit dem Unverseifbaren der Cruciferenöle weitere Versuche anzustellen, wobei vor allem die Wirksamkeit von Sterolen und Alkoholen überprüft werden muß.

Leider finden sich aber zur Zeit in der Literatur, gerade was diesen Aspekt anbetrifft, noch viele widersprechende Ergebnisse. Ein Versuch, die verschiedenen Meinungen unter ein Dach zu bringen, zeigt folgender Exkurs:

1. Es ist sehr wichtig, daß man überall mit der gleichen Elle mißt: Die Versuchstiere müssen einheitlich sein, denn nach allen Erfahrungen sind Läsionen vor allem bei männlichen Ratten und bestimmten Rassen nach der Fütterung von Cruciferenölen zu beobachten.
2. Das Unverseifbare muß genau definiert sein. So ist z. B. ein Diäthylätherextrakt chemisch anders zusammengesetzt als ein Petrolätherextrakt.
3. Läsionen können Narben einer wieder abgebauten Herzverfettung sein oder sie sind im Laufe eines Fütterungsregimes direkt entstanden.

In Würdigung dieser gesetzten Einschränkungen muß nach dem heutigen Stand der Wissenschaft (23) trotz zum Teil anderslautenden Ergebnissen (24, 25) die Theorie, daß im Unverseifbaren, also nicht nur in der Triglyceridfraktion, eine Noxe vorhanden sein muß, favorisiert werden. Es ist durchaus möglich, daß ein Terpenalkohol für die Toxizität verantwortlich sein kann.

Andere Theorien

Die Hypothese, daß ein größeres Angebot von Monoensäuren (Erucasäure des herkömmlichen Rapsöls, Oelsäure von erucasäurearmen Züchtungen) die Biosynthese von Arachidonsäure aus Linolsäure stört, ist von *Mohrhauer* et al. widerlegt worden (26).

An der Beobachtung, daß sowohl erucasäurearme als auch herkömmliche Rapsöle Läsionen an Rattenherzen verursachen, scheitert die Theorie, daß das Blutalbumin eine zu geringe Bindungskapazität für langkettige Fettsäuren besitzt. Ein Ungleichgewicht zwischen den Fettsäuren im Organismus kann ebenfalls kaum für die Entstehung der Läsionen verantwortlich sein (27). Bedenken wir nur, daß das Fettsäuremuster von z. B. Olivenöl ebenfalls sehr einseitig zusammengesetzt ist und keine toxischen Wirkungen zeigt.

Selbstverständlich ist der Katalog möglicher Faktoren, die diese Effekte hervorrufen können, noch nicht abgeschlossen. Es würde aber zu weit führen, hier sämtliche Hypothesen abzuhandeln.

Zusammenfassende Würdigung der ernährungsphysiologischen Wirkung von Cruciferenölen bei der Ratte

1. Rapsöl verursacht infolge seines Erucasäuregehaltes bei der Ratte eine kurzfristige Herzverfettung, deren Maximum nach einer Woche erreicht ist. Der Fettgehalt des Herzens geht anschließend sukzessive zurück und erreicht wieder Normalwerte. Oele mit hohem Gehalt von anderen C 22-Monoensäuren zeigen zum Teil die gleichen Effekte.
2. Sowohl erucasäurereiche als auch erucasäurearme Cruciferenöle zeigen nach Langzeitfütterung vor allem bei männlichen Ratten Herznekrosen und Läsionen. Die Noxe steht nicht im direkten Zusammenhang mit dem Erucasäuregehalt der Diät. Es scheint sich um einen Faktor X im Unverseifbaren zu handeln. Die etwas schwereren Läsionen bei der Verfütterung von herkömmlichem Rapsöl können eventuell mit der Addition der ersten Schädigung (Herzverfettung) zur zweiten erklärt werden. Das vielfach beobachtete erhöhte Milzgewicht bei der Langzeitfütterung kann durchaus seine Erklärung darin finden, daß dieses Organ stärker zur Entgiftung der Noxe beansprucht wird. Die im Rapsschrot vorkommenden Glucosinolate sind nach Sichtung der bestehenden Literatur nicht für die beobachteten Veränderungen verantwortlich (28, 29, 30).
3. Die Beobachtung, daß bestimmte erucasäurearme Sorten keine Herzveränderungen mehr verursachen, könnte darauf hinweisen, daß mit der Erucasäure zufällig gleichzeitig der Faktor X durch Züchtung eliminiert wurde.

Rückschlüsse von den Tierexperimenten auf den Menschen

Wenn wir nun von den besprochenen Versuchen Rückschlüsse auf den Menschen ziehen, müssen wir als erstes feststellen, daß die Herzverfettung bei Tieren mit einem dem Menschen ähnlicheren Stoffwechsel, wie Affe und Schwein, nicht aufgetreten ist. Vermeintliche Herzveränderungen, die bestimmte Autoren bei Schweinen festzustellen glaubten, sind nach *Aherne* et al. (17) auf einen Befall der Tiere mit Askaridenlarven zurückzuführen. Nach *Alexander* und *Mattson* (31) reagieren ausgewachsene Ratten ebenfalls weniger empfindlich auf Rapsöldiäten. Es scheint, daß die Enzymsysteme und die Transportproteine für FFA bei der wachsenden Ratte, die ja auf kohlenhydratreiche Nahrung ausgerichtet ist, anders ausgebildet ist als bei Mensch und Schwein. Letztere werden mit der Matabolisierung von langkettigen C 22-Monoensäuren besser fertig.

Die *unbekannte* Noxe, die sich immer im herkömmlichen Rapsöl mit seinen 20 bis 50% Erucasäure aber auch, allerdings weniger ausgeprägt, in erucasäure-

armen Sorten findet, ist etwas ernster zu nehmen, scheint doch in bestimmten Tierarten immerhin ein Blockierungsmechanismus vorhanden zu sein, der die Aufnahme solcher Diäten limitiert. Es besteht vorläufig noch absolut kein Beweis dafür, daß der Mensch durch den Genuß von Rapsöl gefährdet ist. Allerdings ist die Ungefährlichkeit der Cruciferenöle für den Menschen ebenfalls nicht bewiesen.

Epidemiologisch betrachtet ist die Wahrscheinlichkeit von Schädigungen des Menschen als äußerst gering zu beurteilen, werden doch zum Beispiel in der Schweiz nur 3% der Kalorien in Form von Rapsöl konsumiert und dies mit einer maximalen Streuung.

Vergleichen wir nun diese von uns konsumierte Menge von Rapsöl mit den in den Versuchsdiäten eingesetzten Zahlen, die sich meistens im Bereiche von 30—50% der Gesamtkalorien bewegten, so kann eine toxische *Gefährdung* der Bevölkerung relativiert werden.

Kritik, Ausblick

Wenn man sich durch die heute verfügbare Literatur über die Rapsölproblematik durchgelesen hat, ist sicher ein abschließendes kritisches Wort gestattet. Es scheint, daß die verschiedenen Forschergruppen sehr unkoordiniert vorgegangen sind und mehr dem Konkurrenzdenken als dem Teamwork angehangen haben. Nur so ist die Versuchsinflation zu erklären, und nur durch das fehlende Gespräch können die vielen zum Teil verwirrenden Daten entstanden sein. Ein Rapsforscherkongreß sollte sich nicht in der Selbstdarstellung einiger Ordinarien erschöpfen, sondern solche Treffen müßten der Verbesserung der Zusammenarbeit dienen. Sehr schwer scheint es auch manchen Wissenschaftern zu fallen, die Tatsache zuzugeben, daß nach jahrelanger Forschung eigentlich eine Noxe im Rapsöl immer noch nicht eruiert worden ist und daß die züchterische Erucasäure-Elimination nicht *den großen Schritt* nach vorn darstellt.

Nach unserer Ansicht muß nun die laufende Entwicklung im Auge behalten werden. Es wird vor allem sehr interessant sein, welcher Natur der *Faktor X* ist, denn es kann dem Lebensmittelchemiker nicht gleichgültig sein, daß unbekannte Faktoren in einem Nahrungsmittel vorkommen, die immerhin in verschiedenen Tierexperimenten Schäden verursachten.

Zusammenfassung

In einem Uebersichtsreferat wird versucht, die Rapsölforschung der letzten 15 Jahre zusammenzufassen. Die von *Roine* et al. 1960 beobachtete kurzfristige Herzverfettung bei mit Rapsöl gefütterten Ratten ist nach Versuchen der verschiedensten Autoren auf den hohen Erucasäuregehalt dieses Cruciferenöls zurückzuführen. Die Fettaccumulation erreicht nach einer Woche das Maximum, der Fettgehalt der Rattenherzen geht aber anschließend sukzessive zurück und erreicht wieder Normalwerte. Oele mit hohem Gehalt von anderen C 22-Monoensäuren bewirken zum Teil den gleichen Effekt.

Untersuchungen aus den Siebzigerjahren zeigen, daß sowohl erucasäurereiche (50%) als auch erucasäurearme (2%) Rapsöle nach Langzeitfütterung vor allem an männlichen Ratten zu Herznekrosen und Läsionen führen. Die Noxe steht nicht im direkten Zusammenhang mit dem Erucasäuregehalt der Diät. Es scheint sich dabei um einen Faktor X im Unverseifbaren zu handeln. Die im Rapsschrot vorkommenden Glucosinolate sind nach Sichtung der bestehenden Literatur nicht für die beobachteten Veränderungen verantwortlich. Heute gibt es einzelne Sorten von erucasäurearmem Raps, dessen Oel keine pathologischen Veränderungen an Rattenherzen mehr verursacht, währenddem noch keine Cruciferenöle bekannt sind, die bei einem erhöhten Gehalt an Erucasäure diese Effekte nicht bewirken. Anscheinend ist bei ersteren mit der Erucasäure zufällig gleichzeitig der Faktor X durch Züchtung eliminiert worden.

Eine Gefährdung des Menschen durch hohe Erucasäureaufnahme ist wenig wahrscheinlich. Während die auf kohlenhydratreiche Diät ausgerichtete Ratte Mühe hat, sich an Fettsäuren mit langen Ketten zu adaptieren, werden andere Monogastriden, die einen dem Menschen ähnlicheren Stoffwechsel haben, wie Affe und Schwein, besser damit fertig.

Abschließend wird die Forschungstätigkeit auf dem Gebiete des Rapses, die sich allzustark auf die Erucasäure konzentriert hat und andere Faktoren vernachlässigte, kritisiert.

Résumé

On a essayé de récapituler dans un abrégé les résultats de la recherche des 15 dernières années sur l'huile de colza. La rapide dégénération graisseuse du coeur observée par *Roine* et coll. en 1960, en nourrissant des rats avec de l'huile de colza est due, d'après les observations de divers auteurs, à la forte teneur en acide érucique de cette huile de crucifères. L'accumulation de la graisse atteint son maximum au bout d'une semaine, puis la teneur en graisse du coeur des rats diminue peu à peu pour atteindre du nouveau des valeurs normales.

D'autre part, des recherches effectuées au cours des années 70 ont permis de constater que lors d'un affouragement prolongé aussi bien des huiles de colza riches en acide érucique (50%) que des mêmes huiles pauvres (2%) en cet acide provoquaient des nécroses et des lésions cardiaques principalement chez les rats mâles. L'agent nocif n'est donc pas en rapport direct avec la teneur du régime alimentaire en acide érucique. Il semblerait qu'il s'agit d'un facteur X de l'insaponifiable. D'après la littérature disponible, les inolates de glucose présents dans le colza égrugé ne sont pas cause des altérations observées. Il existe aujourd'hui des sortes de colza pauvres en acide érucique, dont l'huile ne provoque pas d'altérations pathologiques des coeurs des rats, tandis qu'on ne connaît pas d'huiles de crucifères à teneur élevée en acide érucique qui n'auraient pas cet effet. Il semblerait donc que pour les premières on ait éliminé, par la séléction, par hasard et simultanément, l'acide érucique et le facteur X.

Il est peu problable que l'homme court un risque par l'absorption de trop grandes quantités d'acide érucique. Le rat, dont la nourriture habituelle est riche en glucides, a de la peine à s'adapter à des acides gras à longues chaines, tandis que d'autres monogastrides, ayant un métabolisme plus proche de celui de l'homme, tels le singe ou le porc, s'en accomodent plus facilement.

Pour terminer, la recherche dans le domaine du colza, qui s'est par trop orientée vers l'acide érucique en négligeant d'autres facteurs, fait l'objet d'une certaine critique.

Literatur

1. *Banfield, J. J.:* Place of rapeseed in world market. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 343—346 (1974).
2. *Sietz, F. G.:* Die Fettsäurezusammensetzung wirtschaftlich genutzter Brassica- und Sinapis-Oele. Fette, Seifen, Anstrichmittel **74**, 72—80 (1972).
3. *Vogtmann, H., Clandinin, D. R.* and *Hardin, R. T.:* Utilization of oils of high and low erucic acid contents. Nutr. Metabol. **15**, 252—266 (1973).
4. *Rocquelin, G., Sergiel, J. P., Astorg, P. O., Nitou, G., Vodovar, N., Cluzan, R.* et *Levillain, R.:* Rôle de l'acide érucique dans l'apparition et l'évolution de la lipidose et des lésions cardiaques chez le rat ingérant de l'huile de colza. Proc. 4. Rapskongress, Giessen, 669—683 (1974).
5. *Seher, A.* and *Homberg, E.:* The sterols and related minor constituents of various rapeseed oils. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 301—305 (1974).
6. *Fedeli, E.* and *Jacini, G.:* Lipid composition of vegetable oils. Adv. Lipid Research **9**, 335—382 (1971).
7. *Roine, P., Uksila, E., Teir, H.* and *Rapola, J.:* Histopathological changes in rats and pigs fed rapeseed oil. Z. Ernähr. Wiss. **1**, 118—124 (1960).
8. Proceedings of the international conference on the science, technology and marketing of rapeseed and rapeseed products, St. Adèle 1970.
9. *Abdellatif, A. M.* and *Vles, R. O.:* Pathological effects of dietary rapeseed oil in rats. Nutr. Metabol. **12**, 285—295 (1970).
10. *Abdellatif, A. M.* and *Vles, R. O.:* Physiopathological effects of rapeseed oil and canbra oil in rats. Proc. 3. Int. Rapskongress, St. Adèle, 423—434 (1970).
11. *Beare-Rogers, J. L., Nera, E. A.* and *Craig, B. M.:* Accumulation of cardiac fatty acids in rats fed synthesized oils containing C 22 fatty acids. Lipids **7**, 46—50 (1972).
12. *Beare-Rogers, J. L.:* Nutritional aspects of long-chain fatty acids. Proc. 3. Int. Rapskongress, St. Adèle, 450—471 (1970).
13. *Prabucki, A. L.* und *Schürch, A.:* Vorläufiger Bericht an die EEK über Untersuchungen zur Frage der ernährungsphysiologischen Wirkung von Rapsöl. Zürich 1975.
14. *Biedermann, R.:* Der Einfluß von Art und Menge des Futterfettes auf den Verlauf des Fettstoffwechsels bei der Legehenne und auf die Zusammensetzung des Eierfettes. Diss. ETH, Zürich 1970.
15. *Vogtmann, H., Clandinin, D. R.* and *Robblee, A. R.:* Low and high erucic acid rapeseed oils in rations for laying hens. Poultry Sci. **52**, 955—962 (1973).
16. *Vogtmann, H., Clandinin, D. R.* and *Hardin, R. T.:* The influence of high and low erucic acid rapeseed oils on the productive performance of laying hens and on the lipid fraction of egg yolk. Can. J. Anim. Sci. **54**, 403—410 (1974).
17. *Aherne, F. X., Bowland, J. P., Christian, R. G.* and *Vogtmann, H.:* Comparison of the performance and histological chance in the tissues of pigs fed diets containing high or low erucic acid rapeseed oils or soybean oil. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 701—708 (1974).
18. *Houtsmuller, U. M. T., Struijk, C. B.* und *van der Beele, A.:* Senkung der ATP-Synthese durch Erukasäure in isolierten Rattenherzmitochondrien. Biochem. Biophys. Acta **218**, 564—566 (1970).
19. *Carreau, J. P., Thoron, A., Lapous, D.* et *Raulin, J.:* Bull. soc. chim. biol. **50**, 1973 (1968).
20. *Caroll, K. K.:* Levels of radioactivity in tissues and in expired carbon dioxide after adminstration of 1—14 C-labelled palmitic acid, 2—14 C-labelled erucic acid, or

2—14 C-labelled nervonic acid to rats. Can. J. Biochem. Physiol. **40**, 1229—1238 (1962).
21. *Vogtmann, H., Thompson, J. R., Clandinin, D. R., Fenton, T. W.* and *Turner, B. V.:* Metabolism of 14 C-erucic acid. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 709—717 (1974).
22. *Christophersen, B. O.* und *Bremer, J.:* Erucasäure — Ein Inhibitor der Fettsäureoxidation im Herz. FEBS Letters **23/2** 230—232 (1972). Biochim. Biophys. Acta **280**, 506—514 (1972).
23. *Vles, R. O.:* Nutritional aspects of rapeseed oils. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 17—30 (1974).
24. *Sauer, F. D.:* Nutritional properties of brassica campestris var. Span and its fractions when fed to rats and swine. Proc. 4. Int. Rapskongress, Giessen, 725—731 (1974).
25. *Procter, B. G., Dussault, P., Rona, G.* and *Chappell, G. I.:* Research report for departement of industry, trade and commerce, Ottawa, Canada.
26. *Mohrhauer, H., Rahm, J. J., Seufert, J.* and *Holmann, R. T.:* Metabolism of linoleic acid in relation to dietary monoenic acid in the rat. J. Nutr. **91**, 521—527 (1967).
27. *Rocquelin, B., Marin, B.* and *Cluzan, R.:* Comparative physiological effects of rapeseed and canbra oils in the rat: Influence of the ratio of saturated and monounsaturated fatty acids. Proc. 3. Int. Rapskongress, St. Adèle, 405—422 (1970).
28. *Van Etten, C. H., Daxenbichler, M. E., Peters, J. E.* and *Tookey, H. L.:* Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in crambe abyssinica and brassica napus seed meals. J. Agr. Food Chem. **14**, 426 (1966).
29. *Franzke, Cl., Göbel, R.* und *Hollstein, E.:* Studien über das Verhalten von Fettinhaltsstoffen bei der Raffination. II. Gesamtschwefelgehalt in Rapsölen. Nahrung **16**, 867—871 (1972).
30. *Linder, E.:* Toxikologie der Nahrungsmittel. Stuttgart 1974.
31. *Alexander, J. C.* and *Mattson, F. H.:* A nutritional comparison of rapeseed oil and soybean oil. Can. J. Biochem, Physiol. **44**, 35—43 (1966).

Dr. R. Biedermann
Kantonschemiker,
Hohlenbaumstraße 192
CH - 8204 Schaffhausen