

ein Niederschlag, der abzentrifugiert werden kann und kleberähnliche, d. h. viscose Eigenschaften besitzt. Schon sehr geringe Mengen des wasserlöslichen Stärkekornproteins genügen, um einen relativ dichten Niederschlag zu erreichen (Tab. 8). Die Aminosäurezusammensetzung dieses Niederschlages (Tab. 9) ähnelt der des Freien Proteins und der des Klebers.

Der Fällungsmechanismus kann ebenfalls qualitativ und quantitativ verfolgt werden, wenn die gelösten Reaktionskomponenten sowie die nach Fällung des Klebers durch Zentrifugieren erhaltene klare Lösung säulenchromatographisch an Sephadex G 10 fraktioniert werden. Das Säulenchromatogramm (Abb. 8) zeigt eine Abnahme des wasserlöslichen Anteils des Freien Proteins durch Ausfällung auf 47% (Kurve 3).

Literatur

1. Elton, G. A. H., Ewart, J. A. D.: J. Sci. Food Agr. **13**, 62 (1962).
2. Rohrlich, M., Schlußler, H. J.: Diese Z. **108**, 405 (1958). — Rohrlich, M., Niederauer, Th.: Diese Z. **128**, 228 (1965).
3. — Schulz, W. B. Th.: Diese Z. **113**, 361 (1960).
4. — Gallert, H.: Diese Z. **137**, 149 u. 223 (1968).
5. Beckwith, A. C., Heiner, D. C.: Arch. Biochem. Biophys. **117**, 239 (1966).
6. Woychik, J. H., Huebner, F. R.: Arch. Biochem. Biophys. **105**, 151 (1964).
7. Elton, G. A. H., Ewart, J. A. D.: J. Sci. Food Agr. **14**, 750 (1963).
8. Fukushima, D.: Cereal Chem. **46**, 156 (1969).
9. Hosney, R. C., Finney, K. F., Pomeranz, Y.: Cereal Chem. **47**, 135 (1970).
10. Hess, K.: Kolloid-Z. **136**, 84 (1954).
11. Rohrlich, M., Müller, V., Friedel, K.: Mühle **106**, 385 u. 400 (1969).
12. Kiermeier, F., Petz, E.: Diese Z. **131**, 75 (1966).
13. Benesch, R. E., Lardy, H. A., Benesch, R.: J. Biol. Chem. **216**, 663 (1955).
14. Davis, B. J.: Preprint „Disc-Electrophoresis“, Distillation. Rochester, N. Y.: Prod. Div. Eastman Kodak Co., 1962.
15. Maurer, H. R.: Disk-Elektrophorese, p. 42 u. Anhang. Berlin: Walter de Gruyter 1968.

Prof. Dr. M. Rohrlich, Dr. K. Friedel und Ch. Rajani
Kurt-Hess-Inst. für Mehl- und Eiweißforschung
D-3000 Hannover, Am Kleinen Felde 30/II*

* ab 1. 1. 1972: 8 München 23, Leopoldstraße 175

Dünnschichtchromatographische Isolierung und remissionsphotometrische Bestimmung von Sorbinsäure in Wein*

VÍCTOR M. RÍOS**

Mitteilung aus dem Institut für Chemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelrisikoprüfung Karlsruhe (BRD)

Eingegangen am 30. September 1971

Thin-Layer Chromatographic Separation and Reflectance-Spectrophotometric Determination of Sorbic Acid in Wine

Summary. A rapid method for the determination of sorbic acid in red and white wines is described. The sorbic acid is isolated from the wine by TLC on silica gel and quantitatively determined in situ by reflectance-spectrophotometry. Standard deviation and variation coefficient values are listed.

Zusammenfassung. Es wird eine Schnellmethode zur Bestimmung von Sorbinsäure in Rot- und Weißwein beschrieben. Die Sorbinsäure wird dabei aus dem Wein dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel G-Schichten abgetrennt und remissionsphotometrisch bestimmt. Standardabweichungen und Variationskoeffizienten werden angegeben.

* Herrn Dipl.-Chem. R. Duden danke ich für die Unterstützung, die er mir bei dieser Arbeit zuteil werden ließ.

** DAAD-Stipendiat; Heimat-Adresse: Dpto. de Ingeniería Bioquímica Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. México 17, D F. México.

Einleitung

Zum Nachweis und zur Bestimmung der Sorbinsäure sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben [1]. Die verschiedenen Methoden beruhen meist auf dem ungesättigten Charakter des Sorbinsäuremoleküls. Als mehrfach ungesättigte organische Verbindung zeigt Sorbinsäure eine ausgeprägte Absorption bei 262 nm, auf der viele spektralphotometrische Bestimmungsmethoden beruhen [2, 3]. Sorbinsäure kann auch colorimetrisch nach Umsetzung mit Thiobarbitursäure [4] bestimmt werden. Da zahlreiche andere Substanzen stören können, sind spektralphotometrische Methoden nur anwendbar, wenn der Konservierungsstoff zuvor isoliert wird. Zum Abtrennen der Sorbinsäure eignen sich die Wasserdampfdestillation [4] und die direkte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln [5]. Die Nachteile dieser Methoden liegen vor allem darin, daß hierbei die Sorbinsäure nicht frei von störenden Begleitstoffen erhalten wird [6].

Da mit der Wein-Verordnung vom 15. 7. 1971 ein Zusatz von Sorbinsäure zum Wein — bis zu 40 mg/l ohne und bis zu 200 mg/l mit Deklaration — in der BRD zugelassen wurde, sind zum Zwecke der Weinkontrolle möglichst einfache und von Störeinflüssen (SO₂!) freie Analysemethoden erforderlich. Wir fanden, daß die direkte Dünnschichtchromatographie des Weines mit anschließender remissions-photometrischer Bestimmung der Sorbinsäure ein geeignetes Verfahren darstellt.

Experimenteller Teil

1. Dünnschichtchromatographische Technik

Kieselgel G-Fertigplatten (Merck; 250 µm), bei 100—105° C 1 Std lang aktiviert. DC-Trennung in einer Vario-KS-Kammer (CAMAG). Fließmittel A: Toluol/Essigsäureäthylester/Ameisensäure (25 + 20 + 5). Fließmittel B: Toluol/Essigsäureäthylester/Chloroform/Ameisensäure (25 + 13 + 10 + 2). Chromatographieren bei geöffnetem Schieber über dem Fließmittel.

2. Qualitativer Nachweis

Auf die DC-Platten 5—10 µl Weiß- bzw. Rotwein und zum Vergleich 5 µl einer methanologischen Sorbinsäurelösung (1 µg/µl) auftragen. Für die Entwicklung: Fließmittel A. Nach 30 min Laufzeit Platten einige min an der Luft trocknen und mit einer gesättigten wäßrigen 2-Thio-barbitursäure (TBS)-Lösung besprühen [7]. Sorbinsäure-Flecken (R_f = 0,56) färben sich rot.

3. Quantitative Bestimmung

a) *Vorbereitung der Proben.* Weinproben mit einem Mindestgehalt von etwa 50 mg Sorbinsäure je l bei Zimmertemperatur direkt auf die DC-Platten auftragen. Bei Sorbinsäuremengen unter 50 mg/l Weinproben einengen (s. z. B. [4]). Hierzu 50 ml des zu untersuchenden Weines mit n-NaOH oder KOH bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzen und im Rotationsverdampfer bei 35° C zur Trockene dampfen. Rückstand mit 3 ml 2 n-HCl ansäuern, in destilliertem Wasser aufnehmen und in einem 10 ml-Meßkolben bis zur Marke auffüllen.

b) *Ansetzen der Eichlösungen.* 10 mg Sorbinsäure über CaCl₂ bis zur Gewichtskonstanz trocknen, in einem 10 ml-Meßkolben in 1 ml Methanol lösen und mit sorbinsäurefreiem Weiß- bzw. Rotwein zur Marke auffüllen. Von dieser Lösung 0,25, 0,50, 0,75 und 1,0 ml in 5 ml-Meßkolben geben und mit dem gleichen Wein auffüllen. Wie vergleichende Untersuchungen ergaben, kann statt Wein 12%iges Methanol zum Ansetzen der Eichlösungen benutzt werden.

c) *Dünnschichtchromatographie und quantitative Auswertung.* Auf jede Platte 7 × 5 µl des zu untersuchenden Weines bzw. der Konzentrate sowie jeweils 5 µl der Eichlösungen auftragen. Nach dem Chromatographieren (Fließmittel B; Laufzeit 50 min, R_f-Wert der Sorbinsäure 0,46) Platten 15 min an der Luft trocknen. Anschließend Remission bei 262 nm mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer messen. Flächen der automatisch aufgezeichneten glockenförmigen Remissionsgrad-Ort-Kurven aus Halbwertsbreite und Peakhöhe errechnen. Mit Hilfe der aus den aufgetragenen Vergleichslösungen erhaltenen Eichgeraden Sorbinsäure-Gehalt der Proben ermitteln.

Versuchsergebnisse

1. Linearität

Zur Überprüfung der Beziehung $F^2 \sim m$ [8—10] wurden jeweils 5 µl Eichlösungen verschiedener Sorbinsäurekonzentrationen auf DC-Platten aufgetragen. Nach dem Chromatographieren wurden die Remissionsgrad-Ort-Kurven aufgenommen und die Peakflächen bestimmt.

Die Werte erfüllen im Bereich zwischen 0,25 und 1,0 µg Sorbinsäure/Fleck die obige Beziehung, d. h. beim Auftragen der Flächenquadrate (F^2) gegen die Substanzmenge (m) ergeben sich Geraden (Abb. 1); diese gehen allerdings nicht durch den Nullpunkt. Die Ordinatenabschnitte und Steigungen sind von Platte zu Platte verschieden. Die Eichlösungen müssen daher zusammen mit der unbekannt Probe auf derselben Platte chromatographiert werden.

2. Einfluß von Begleitstoffen

a) *Inhaltsstoffe des Weines.* Im Wein enthaltene Sorbinsäure wurde unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen von den verschiedenen Begleitstoffen, die im selben UV-Bereich wie Sorbinsäure absorbieren, einwandfrei abgetrennt. Dies folgt daraus, daß in sorbinsäurefreien Weinproben keine bei 262 nm absorbierenden Verbindungen gefunden wurden, die denselben R_f -Wert wie Sorbinsäure haben (Abb. 2).

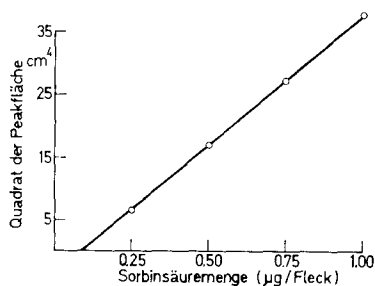


Abb. 1. Eichkurve für Sorbinsäure in Wein

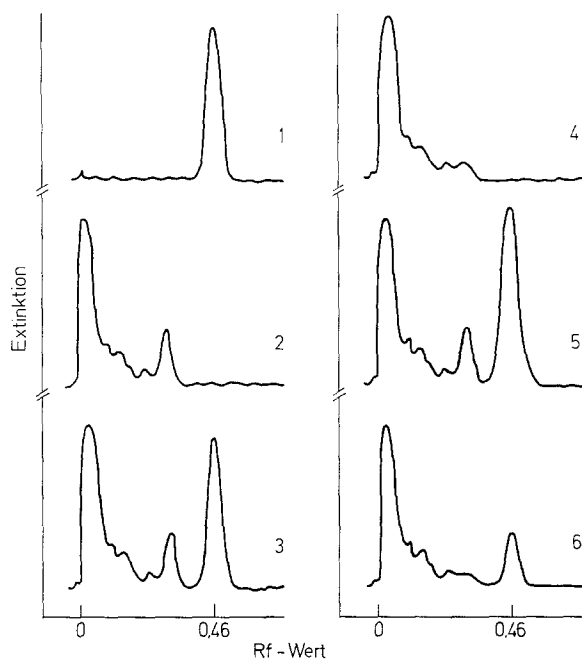


Abb. 2. Remissionsgrad-Ort-Kurven bei 262 nm. 1 Sorbinsäure (0,4 µg/5 µl) in Methanol; 2 sorbinsäurefreier Rotwein (5 µl); 3 Rotwein + Sorbinsäure (2,0 µg/5 µl); 4 Rotwein + Sorbinsäure (2,0 µg/5 µl) nach Bromierung; 5 Rotwein + Sorbinsäure (1,5 µg/5 µl) + Benzoesäure (50 µg/5 µl); 6 Rotwein + Sorbinsäure (1,5 µg/5 µl) + Benzoesäure (50 µg/5 µl) nach Bromierung

b) *Benzoesäure.* Benzoesäure ist in keinem Land als Konservierungsmittel für Wein zugelassen. Da sie aber dem Wein zugesetzt werden könnte und unter den gewählten DC-Bedingungen denselben R_f -Wert wie Sorbinsäure hat, würde sie deren Bestimmung stören, wegen der geringen spezifischen Absorption und des um 30 nm abweichenden Absorptionsmaximums allerdings nur bei hohen Konzentrationen.

Um Sorbinsäure in Anwesenheit von Benzoesäure bestimmen zu können, muß man zunächst die Peakfläche des (nicht getrennten) Gemisches der beiden Komponenten messen. Auf einem zweiten Fleck der gleichen Probe wird die Sorbinsäure vor dem Chromatographieren durch Einwirkung von Brom ausgeschaltet [11]. Das Reaktionsprodukt der Sorbinsäure weist keine Absorption bei 262 nm mehr auf; Benzoesäure wird durch die Bromierung nicht beeinflusst. Man mißt die Remission der Benzoesäure bei 262 nm und zieht das Quadrat der Peakfläche von dem vorher für das Gemisch ermittelten Wert ab.

3. Zuverlässigkeit der Methode

12 verschiedene Weine wurden mit Sorbinsäure (100 mg/l) versetzt und neben sorbinsäurefreien Vergleichsproben nach dem beschriebenen Verfahren untersucht (Tab. 1).

Weiterhin wurde der Sorbinsäuregehalt von je einer Weiß- und Rotweinprobe, die mit verschiedenen Mengen Sorbinsäure versetzt worden waren, in Parallelversuchen unter gleichen Bedingungen bestimmt. Mit den erhaltenen Meßwerten wurden die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten berechnet [12, 13]. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Wiederfindung der dem Wein zugegebenen Sorbinsäure

Weinarten	Wiedergefundene Sorbinsäure in %
1967er weißer Morer (Ungarn)	99,2
1968er weißer Frascati (Italien)	100,0
1971er Weißwein (Italien)	98,4
1969er Siebeldinger Mönchspfad, Weißwein (Deutschland)	101,6
1969er Siebeldinger Glockenstuhl, Weißwein (Deutschland)	99,6
1968er Siebeldinger Mönchspfad, Rotwein (Deutschland)	100,0
1968er Rotwein (Italien)	98,2
1970er Rotwein (Rumänien)	100,4
1970er Ausländischer Rotwein	101,2
Roséwein (Frankreich)	98,4
Cassis (Frankreich)	100,8
Málaga (Spanien)	99,0

Tabelle 2. Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Sorbinsäure-Bestimmung in Weiß- und Rotwein

Kennwerte	Weißwein			Rotwein	
	Aufgetragene Sorbinsäuremenge in $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$	0,375	0,625	0,875	0,625
Wiedergefundene Sorbinsäuremenge Mittelwert \bar{x} aus n Meßpunkten in $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$	0,370	0,620	0,870	0,621	0,879
Standardabweichung $S = \pm \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$	0,0104	0,0077	0,0134	0,0144	0,0083
Variationskoeffizient $V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}}$	2,83%	1,24%	1,54%	2,30%	0,95%

* Weißwein: $n = 8$ (Meßpunkte von 4 Platten); Rotwein: $n = 7$ (Meßpunkte von 2 Platten).

Diskussion

Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in dem geringen Arbeitsaufwand: Die Weinproben werden direkt – ohne vorangehenden Trennungsgang – aufgetragen. Da die Empfindlichkeit der Methode sehr groß ist, läßt sich der Sorbinsäuregehalt bei einer Konzentration von etwa 50 mg/l mit 5 µl Wein je Fleck ermitteln. Durch Einengen des Weines ist es möglich, wesentlich geringere Konzentrationen zu erfassen. Wie die Ergebnisse demonstrieren, ist die Bestimmung in Anwesenheit der Inhaltsstoffe des Weines (auch von Schwefeldioxid) durchführbar.

Literatur

1. Lück, E.: Sorbinsäure. Hamburg: B. Behr's Verlag 1969.
2. Witter, R. F., Newcombund, E. H., Stotz, E.: J. biol. Chem. **185**, 537 (1950).
3. Melnick, D., Luckmann, F. H.: Food Res. **19**, 20 (1954).
4. Schmidt, H.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **58**, 1 (1962).
5. Junge, Ch., Spadinger, Ch.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **10**, 323 (1970).
6. Jacquin, P., Sér, E.: Ann. Technol. Agr. **9**, 393 (1960).
7. Dickes, G. J.: Proc. Soc. analyt. Chem. **5**, 3, 52 (1968).
8. Baltes, W.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **65**, 377 (1969).
9. Meier, J., Felber, E.: CIBA LTD., Basel, Vortrag Pittsburg Conf., 1970.
10. Jork, H.: Z. Anal. Chem. **221**, 17 (1966); **236**, 310 (1968).
11. Lück, E., Courtial, W.: Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **61**, 78 (1965).
12. Merten, R.: Glas-Instr.-Tech. **12**, 381 (1968).
13. Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden, 2. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.

Victor M. Rios
 Inst. für Chemie und Technologie
 der Bundesforschungsanstalt für
 Lebensmittelfrischhaltung
 D-7500 Karlsruhe 1

Soybean Trypsin Inhibitor Neutralization of its Inhibitory Effect Upon the Casein Precipitating Reaction of Trypsin by Rabbit Antiserum

LAURITS ROSSEBØ and JOHN NORDAL

The Department of Food Hygiene, Veterinary College of Norway, Oslo (Norway)*

Received September 27, 1971

Summary. Antiserum produced against Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) was shown to neutralize the SBTI inhibition of the Casein precipitating activity of trypsin thus indicating that the precipitating interactions observed in agar gel double diffusion analysis were at least partly due to reaction between SBTI and specific antibody.

On this basis the use of antiserum for the detection of SBTI in various soy proteins is discussed.

Zusammenfassung. Es konnte gezeigt werden, daß Antiserum, welches gegen die Soja-Trypsin-Hemmer hergestellt worden war, die SBTI Hemmung der caseinfällenden Trypsinaktivität neutralisieren kann; daraus wird gefolgert, daß die bei der Ausfällung mit dem Agar-Gel-Diffusionstest beobachteten Reaktionen zumindest teilweise auf eine Reaktion zwischen SBTI und den spezifischen Antikörpern beruhen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Anwendung von Antiserum zur Bestimmung von SBTI in verschiedenen Soja-Proteinen beschrieben.

* This work was supported by a grant from the Agricultural Research Council of Norway.