

Aus der Universitäts-Kinderklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H.-R. Wiedemann) und dem Chemischen Institut der Bundesforschungsanstalt für Milchwirtschaft Kiel (Direktor: Prof. Dr. M. E. Schulz)

Über den Nitratgehalt von Spinat, insbesondere von Säuglings-Spinatkonserven, im Hinblick auf die Gefahr einer Methämoglobinämie

Von C. Simon, H. Kay und G. Mrowetz

Einleitung

In letzter Zeit sind von Krienke; Sinios; Zippel; Hölscher und Natzschka; Simon, Manzke, Kay und Mrowetz; Wechselberg; Müller Erkrankungen von Säuglingen an einer Methämoglobinämie nach Verabreichung von Spinat mitgeteilt worden. In einem Teil der beobachteten Fälle konnte durch Untersuchung der Reste der im Haushalt aufbewahrten Spinatmahlzeit Nitrit im Spinat festgestellt werden. In anderen Fällen wurde in frischem Spinat Nitrit gefunden. Da in frischem Spinat und in nichtinfizierten Spinatkonserven kein Nitrit nachgewiesen werden kann, konnte gefolgert werden, daß das toxische Nitrit während der Aufbewahrung des Spinates bei Zimmertemperatur durch bakterielle Reduktion aus Nitrat entstanden war.

Die zunehmende Verwendung von Säuglings-Spinatkonserven und die damit verbundene allgemeine Zunahme der Spinatverfütterung gaben uns Veranlassung, die zur Zeit im Handel befindlichen Spinatkonserven einschließlich Gefrierspinat auf den Nitrat- und Nitritgehalt sowie den Keimgehalt zu untersuchen. Aus den dabei erhaltenen Ergebnissen sollten sich Hinweise für die zweckmäßige Herstellung solcher Konserven ergeben.

Untersuchungsmaterial und -methoden

Zur Untersuchung gelangten 27 Säuglings-Spinatkonserven von 7 Firmen, außerdem 4 Dosen Salatbrei für Säuglinge, 4 Proben Gefrierspinat von 3 Firmen, 4 Proben Spinatsaft und 4 Proben normaler Dosenpinat. Die in verschiedenen Geschäften gekauften Konserven hatten unterschiedliche Herstellungs- bzw. Verfallsdaten. Unmittelbar nach der Öffnung der Gefäße erfolgte die Entnahme zur bakteriologischen Untersuchung. Dazu wurden Blutagarplatten und Traubenzuckerbouillonröhrchen mit je 2 Normalösen Spinat bzw. Spinatsaft beimpft und bei 20° C bzw. 37° C unter aeroben Verhältnissen bebrütet. Gleichzeitig wurden Kulturen auf Blutagar und in Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon mit 0,1 % Natriumthioglykolat unter anaeroben Bedingungen im „Anaerobic Jar“ der Fa. Baird and Tatlock, London (nach Evakuieren und Einleiten von H₂) bei 37° C eine Woche lang bebrütet. Die Untersuchung auf Nitrat und Nitrit erfolgte unmittelbar nach Öffnung der Behälter. Für die Bestimmung des Nitratgehaltes wurde das photometrische Verfahren mit Diphenylamin nach KAY u. MROWETZ benutzt, für die Nitritbestimmung die Reaktion mit Indol nach KAY u. MROWETZ. Beide Methoden wurden in früheren Untersuchungen bereits erfolgreich für Milch und Spinat eingesetzt. Die Richtigkeit der Ergebnisse der Nitratbestimmungen wurde mit einem anderen Verfahren (Xylenol) sichergestellt. Für die Untersuchung von Spinat bzw. Spinatsaft haben sich die folgenden Arbeitsvorschriften bewährt.

Die Nitratbestimmung in Spinat bzw. Spinatsaft

Geräte und Chemikalien:

analytische Waage, Meßkolben (100 ml Inhalt), Mörser mit Pistill, Pipetten für 0,1, 1, 2 und 4 ml, Erlenmeyer-Kolben (100 ml Inhalt), Trichter, Rundfilter, Reagenzgläser. Alle Geräte müssen vor Gebrauch mit NO₃-freiem Wasser gespült werden.

Destilliertes oder entionisiertes Wasser, NO₃-frei; Zinksulfatlösung (30 g in 100 ml); Kaliumferrocyanidlösung (15 g

in 100 ml); Diphenylaminreagenz (85 mg Diphenylamin werden mit einer erkalteten Mischung von 150 ml NO₃-freiem Wasser und 50 ml Schwefelsäure p. a. in einem 500 ml-Meßkolben übergossen und mit konz. Schwefelsäure aufgefüllt. Die entstehende Wärme reicht für die Lösung des Diphenylamins aus. Das Reagenz ist mehrere Monate haltbar); NO₃-Vergleichslösung (81,6 mg KNO₃ werden in Wasser gelöst und zu 500 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthält 0,1 mg NO₃); gesättigte NaCl-Lösung.

Arbeitsvorschrift:

10 (± 0,1) g Spinat werden im Mörser unter Zugabe von einigen ml Wasser fein zerrieben und unter mehrfachem Nachspülen in einen 100 ml-Meßkolben überführt, so daß dieser etwa zur Hälfte gefüllt ist. Nach Zugabe von je 2 ml Zinksulfat- und Kaliumferrocyanidlösung wird mit Wasser aufgefüllt. Nach kräftigem Durchschütteln wird die Lösung über ein Rundfilter in einen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben filtriert. 1 ml des klaren Filtrates wird in einem 100 ml-Meßkolben mit Wasser auf 100 ml verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wird in ein Reagenzglas pipettiert. Nach Zugabe von einem Tropfen Kochsalzlösung werden 4 ml des Diphenylaminreagenzes zugegeben und solange geschüttelt, bis keine Schlierenbildung mehr zu erkennen ist. Nach einer Stunde wird eine Blaufärbung mit Lösungen bekannten Nitratgehaltes verglichen. Eine Reihe solcher Vergleichslösungen wird wie folgt hergestellt: 1 ml der NO₃-Vergleichslösung wird auf 100 ml verdünnt. 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 ml dieser Verdünnung werden mit Wasser zu 1 ml ergänzt, mit einem Tropfen NaCl-Lösung versetzt und zusammen mit den aus Spinat gewonnenen Proben weiter untersucht. Die Verdünnungen entsprechen Nitratgehalten von 0, 200, 400, 600, 800 und 1000 mg NO₃/kg Spinat.

Sofern ein geeignetes Photometer zur Verfügung steht, kann die entstandene Blaufärbung auch bei etwa 600 nm in einer Schichtdicke von 1 cm gemessen werden. Die dafür notwendige Eichkurve wird zweckmäßigerweise bei jeder Untersuchungsserie aufgestellt, da die Farbentwicklung besonders empfindlich ist und u. a. erheblich von der Temperatur des Reaktionsgemisches abhängig ist. Zur Vermeidung von Fehlern sollte die photometrische Messung der einzelnen Probe im übrigen immer genau eine Stunde nach Zugabe des Reagenzes erfolgen. Der Einsatz eines Photometers ist in den meisten Fällen nicht erforderlich, da die Farbabstufungen für die vorgesehenen Konzentrationen gut mit dem bloßen Auge erkannt werden können.

Die Nitritbestimmung in Spinat bzw. Spinatsaft

Geräte und Chemikalien:

wie bei der Nitratbestimmung; außerdem 15-ml- und 0,5-ml-Pipetten, Indollösung (50 mg Indol in 50 ml Alkohol), Schwefelsäure (ca. 50 Vol%).

Arbeitsvorschrift:

15 ml des unverdünnten, für die Nitratbestimmung bereiteten Serums werden in ein Reagenzglas gegeben, das 0,1 ml Indollösung enthält. Nach Zugabe von 0,5 ml Schwefelsäure wird durchgemischt und nach Ablauf von 15 Min. eine entstandene Rotfärbung mit entsprechenden Vergleichslösungen verglichen. Die Vergleichslösungen erhält man durch Verdünnung einer Nitritlösung, die 0,1 mg NO₂/ml enthält, so daß Konzentrationen von 0, 2,5, 5, 7,5 und 10 µg NO₂/15 ml entstehen, entsprechend 0, 1,7, 3,3, 5,0 und 6,7 mg NO₂/kg Spinat. Handelt es sich um Spinatproben mit höheren NO₂-gehalten, so muß das Spinatserum entsprechend verdünnt werden. Die Farbintensität läßt sich gut in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm und einer Schichtdicke von 5 cm messen. Die Eigenfärbung des Serums und ein Blindwert der Reagenzien sind zu berücksichtigen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. In allen untersuchten Spinat- und Salatkonserven waren weder aerobe noch anaerobe Bakterien nachweisbar. Im Spinatsaft konnten *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* und Schimmelpilze angezüchtet werden, die jedoch nicht die Fähigkeit zur Nitratreduktion hatten. Im Tiefkühlspinat kamen mehrere Bakterienarten (*Aerobacter*, aerobe Sporenbazillen, anhämolysierende Staphylokokken, Enterokokken, Sarcinen, vergrünende

Streptokokken, saprophytäre Corynebakterien) vor. Die Fähigkeit zur Nitratreduktion besaßen die nachgewiesenen *Aerobacter*keime, Staphylokokken, Enterokokken und Sarcinen.

Die Ergebnisse der Nitrat- und Nitrituntersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Nitrit wurde in keinem Falle nachgewiesen. Die Nitratgehalte der untersuchten Proben schwankten zwischen 82 und 2800 mg/kg. Wie die Gegenüberstellung verschiedener Herstellungschargen ein und derselben Firma zeigt, liegen die Nitratgehalte eines Herstellers durchweg in der

Tabelle 1
Vorkommen von Bakterien in Chargen von Spinat- bzw. Salatproben verschiedener Firmen

Gemüseart	Firma	Charge Nr.			
		1	2	3	4
Säuglings-Spinat	A	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	B	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	C	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	D	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	E	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	F	0	0	0	0
Säuglings-Spinat	G	0	0	0	0
Säuglings-Salatnahrung	G	0	0	0	0
Spinatsaft	H	<i>Bac.cereus</i> <i>Bac.megaterium</i>	<i>Bac.cereus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
Tiefkühl-Spinat	I	—	—	<i>Aerobacter</i> , <i>Corynebakterien</i> , Staphylokokken,	<i>Aerobacter</i> , Streptokokken, aerobe Sporenbazillen
Tiefkühl-Spinat	J	Aerobe Sporenbazillen, Staphylokokken, Streptokokken,	—	—	—
Tiefkühl-Spinat	K	<i>Aerobacter</i> , Enterokokken, Staphylokokken, aerobe Sporenbazillen	—	—	—
Dosenspinat	L	—	—	—	0
Dosenspinat	M	—	—	—	0
Dosenspinat	N	—	—	—	0
Dosenspinat	O	0	—	—	—

Tabelle 2
Nitrat-, Nitrit- und Trockenmasse-Gehalt in Chargen von Spinat- bzw. Salatproben verschiedener Firmen

Gemüseart	Firma	Charge Nr.								
		1		2		3		4		4
		NO ₃	NO ₂	NO ₃	NO ₂	NO ₃	NO ₂	NO ₃	NO ₂	Trockenmasse
		mg/kg		mg/kg		mg/kg		mg/kg		
Säuglings-Spinat	A	770	0	710	0	720	0	530	0	12,0
Säuglings-Spinat	B	830	0	1080	0	960	0	820	0	10,3
Säuglings-Spinat	C	1090	0	1040	0	1210	0	1100	0	9,9
Säuglings-Spinat	D	660	0	900	0	750	0	580	0	13,2
Säuglings-Spinat	E	430	0	840	0	1020	0	470	0	12,8
Säuglings-Spinat	F	1080	0	1070	0	930	0	—	—	—
Säuglings-Spinat	G	210	0	120	0	135	0	82	0	13,9
Säuglings-Salatnahrung	G	310	0	260	0	320	0	310	0	14,5
Spinatsaft	H	2800	0	2000	0	1320	0	2100	0	4,4
Tiefkühl-Spinat	I	—	—	—	—	630	0	390	0	8,1
Tiefkühl-Spinat	J	—	—	—	—	—	—	800	0	7,5
Tiefkühl-Spinat	K	320	0	—	—	—	—	—	—	—
Dosenspinat	L	—	—	—	—	—	—	930	0	8,5
Dosenspinat	M	—	—	—	—	—	—	1220	0	5,2
Dosenspinat	N	—	—	—	—	—	—	980	0	7,2
Dosenspinat	O	780	0	—	—	—	—	—	—	—

gleichen Größenordnung. Die Annahme, daß die Unterschiede durch einen verschiedenen Gehalt an Trockenmasse hervorgerufen sein könnten, erwies sich als unrichtig, wie die Ergebnisse der Trockenmassebestimmung jeweils einer Charge (Nr. 4 in Tabelle 2) der einzelnen Firmen zeigt.

Diskussion

Das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchungen von Säuglings-Spinat-Konserven überrascht nicht, da diese nach dem Verschluß auf über 100° C erhitzt werden. Wenn auch von einigen Herstellern versichert wird, daß es sich bei den Säuglings-Spinatkonserven um ein Sterilprodukt handelt, so wären doch größere Reihenuntersuchungen erforderlich, um zu zeigen, daß bei den angewandten Erhitzungstemperaturen in jedem Fall alle Sporenbazillen abgetötet werden. Unsere Untersuchungen sprechen dafür, daß Säuglings-Spinatkonserven in bakteriologischer Hinsicht bei sofortiger Verabreichung nach dem Öffnen der Gläser keine Gefahr für den Säugling darstellen.

Die Nitratgehalte der Säuglings-Spinatkonserven sind von Hersteller zu Hersteller verschieden. Die Ursachen hierfür können sowohl im Spinatanbau wie auch in der Art seiner Verarbeitung zu Konserven liegen. So spielen z. B. für die Nitratspeicherung in den Blättern schnell wachsender Blattgewächse wie Spinat, Salat usw. die Art der Düngung, die Bodenbeschaffenheit, das Schnittalter und das Klima eine wichtige Rolle. Über diese Einflüsse ist in der einschlägigen Fachliteratur (Boeck und Schuphan, Kuhlen u. a.) nachzulesen. Aufschlußreiche Untersuchungen über den Nitratgehalt in Pflanzen stammen auch von Wilson und Richardson. Sehr hohe Nitratgehalte ergeben sich vor allem durch häufige und intensive Mineraldüngung dieser Pflanzen. Die von uns gemessenen Nitratgehalte in Spinatkonserven sind teilweise so hoch, daß mit der Möglichkeit von Reizerscheinungen der Magen-Darmschleimhaut bei Säuglingen zu rechnen ist. Vor der Verfütterung von stark nitrathaltigem Spinat an Säuglinge wird auch von dem Pharmakologen Steyn gewarnt. Eine Nitritbildung in der Konserve ist nur dann zu befürchten, wenn diese nach Öffnen des Glases mit nitratreduzierenden Bakterien verunreinigt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird.

Aus den Untersuchungsergebnissen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen: Zunächst sollte von sachverständiger Seite die Frage überprüft werden, ob hohe Nitratgehalte in Spinat und Salat unvermeidbar sind. Ohne daß wir zu dieser pflanzenphysiologischen Frage genauer Stellung nehmen können, möchten wir doch die Vermutung äußern, daß diese hohen Nitratgehalte für den Pflanzenstoffwechsel nicht notwendig oder sogar schädlich sind. Wahrscheinlich ist die starke Speicherung von Nitrat z. T. darauf zurückzuführen, daß die Pflanzen zur gleichzeitigen Versorgung mit anderen Nährstoffen (z. B. P, Ca und Spurenstoffen) mit nitrathaltenden Mineralstoffmischungen gedüngt werden, die zu einem Überangebot an Nitrat führen können. Wenn es möglich ist, die Intensität der Nitratzufuhr zu diesen Pflanzen zu verringern, sollte angestrebt werden, Spinat und Salat zu produzieren, dessen Nitratgehalt nicht über 300 mg/kg liegt. Selbstverständlich stellt eine derartige Herabsetzung des Nitratgehaltes für den Säugling noch keinen sicheren Schutz

vor einer Methämoglobinämie dar, da auch ein Nitratgehalt unter 300 mg/kg, vorausgesetzt, daß eine Reduktion zu Nitrit stattfindet, für das Auftreten einer Erkrankung ausreicht.

Die Forderung nach einer Herabsetzung des Nitratgehaltes in Säuglings-Spinatkonserven darf jedoch vom Hersteller keinesfalls dadurch erfüllt werden, daß der Saft des Rohspinates durch nitratfreies Wasser ersetzt wird, weil der Konserve dadurch wichtige Bestandteile des Spinates entzogen würden.

Da die Gefahr einer Nitratreduktion in der Aufbewahrung von Spinat und Spinatzubereitungen unter unsterilen Bedingungen und bei Temperaturen liegt, die eine Vermehrung von Bakterien zulassen, sollten Säuglings-Spinatkonserven in kleinen Mengen abgefüllt werden, die nur für eine Mahlzeit ausreichen. Sofern alle Hersteller diesen Weg beschritten, würden sich die höheren Verpackungskosten wahrscheinlich nicht negativ auf den Absatz auswirken.

Eine weitere Ausschaltung von Schädigungsmöglichkeiten durch Spinat bei Säuglingen wird zweifelsohne dadurch erreicht, daß die Verabreichung von Spinat und Spinatkonserven erst nach dem 1. Trimenon erfolgt, da die Untersuchungen über Ursachen und Auftreten von Methämoglobinämien ergeben haben, daß der Säugling in den ersten 3 Lebensmonaten nicht genügend über die physiologischen Funktionen verfügt, gebildetes Methämoglobin zu reduzieren. Es ist daher unverständlich, daß einige Hersteller in ihren Gebrauchsanweisungen für Säuglings-Spinat lediglich den 1. bzw. den 1. und 2. Lebensmonat von der Verabreichung ausschließen. Nach unserer Auffassung sollten die Hersteller deutlich darauf hinweisen, daß Säuglings-Spinatkonserven „ab 4. Monat“ verfüttert werden können und daß zubereiteter Spinat bzw. Spinatsaft nach Öffnung des Gefäßes nicht bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden darf. Bei älteren Säuglingen ist die Verfütterung von nitrathaltigem Spinat, sofern dieser kein Nitrit enthält, hinsichtlich der Entstehung einer Methämoglobinämie ungefährlich, wie die Untersuchungen von Kübler an 7 gesunden Säuglingen gezeigt haben.

Zusammenfassung

1. Bei der Untersuchung von Säuglings-Spinatkonserven wurden Nitratgehalte zwischen 82 und 1210 mg/kg, jedoch kein Nitrit und keine Bakterien festgestellt.
2. Zur Vermeidung von Darmstörungen sollte der Nitratgehalt im Säuglings-Spinat möglichst niedrig gehalten werden. Nitratreduzierende Bakterien und Nitrit dürfen in Säuglings-Spinat nicht enthalten sein.
3. Wegen der Gefahr einer Methämoglobinämie sollte Spinat an Säuglinge in den ersten drei Lebensmonaten nicht verabreicht werden.
4. Die Aufbewahrung von Spinat oder Spinatsaft außerhalb des Kühlschranks ist gefährlich, wenn nitratreduzierende Bakterien anwesend sind.
5. Methoden zur Bestimmung von Nitrat und Nitrit im Spinat werden mitgeteilt.

LITERATUR:

- Hölscher, P. M., u. Natzschka, J.
Deutsche Med. Wochenschr. 89 (1964), 1751
- Kay, H., u. Mrowetz, G.
Milchwissenschaft 15 (1960), 550
- Kay, H., u. Mrowetz, G.
Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber. 13 (1961), 43
- Krienke, E. G.
Berl. Med. 14 (1963), 487
- Kübler, W.
Z. Kinderheilk. 81 (1959), 405

Müller, H.

persönliche Mitteilung

Simon, C., Manzke, H., Kay, H., u. Mrowetz, G.

Z. Kinderheilk. 91 (1964), 124

Sinos, A.

Münchn. med. Wschr. 106 (1964), 1180

Steyn, D. C.

The problem of methaemoglobinaemia in man. Publikasies van die Universiteit van Pretoria unwe Reeks Nr. 11

Wechselberg, K.

Herbsttagung der Rheinisch-Westfälischen Kinderärztereinigung vom 7. 11. 1964

Wilson, J. K.

J. of the Amer. Society of Agronomy 35 (1943), 279

Zippel, L.

persönliche Mitteilung

Richardson, W. D.

J. Amer. chem. Soc. 29 (1907), 1757

Boek, K., u. Schuphan, W.

Qdal. Pldnt. Mater, veg. (Den Haag), 199 (1959)

Kuhlen, H.

16th International Horticultural Congress Brüssel 1962, Volume 1, Book of Summaries (Gembloux, Belgique)

Anschrift der Verfasser:

Priv.-Doz. Dr. C. Simon, Kiel, Fröbelstraße 15; Dr. H. Kay und G. Mrowetz, Kiel, Hermann-Weigmann-Straße 3—11.

Die dünn-schichtchromatographische Trennung der Konservierungsstoffe Benzoessäure und Sorbinsäure

Von Dr. Erich Lück und Wolfgang Courtial

(Farbwerke Hoechst AG., vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (M)-Höchst)

Die papier- und dünn-schichtchromatographische Trennung von Sorbinsäure und Benzoessäure bereitet immer wieder Schwierigkeiten, da die R_f -Werte beider Substanzen sehr eng zusammen liegen.

Von Copius-Peereboom und Beekes¹⁾ wurde vorgeschlagen, für die dünn-schichtchromatographische Trennung der beiden Konservierungsstoffe ein Kieselgel-Kieselgur-Gemisch und als Fließmittel n-Hexan-Eisessig zu verwenden. Gegenüber früheren Methoden bringt dieser Vorschlag einige Vorteile, so die bessere Auftrennung gegenüber papierchromatographischen Verfahren, die kurze Laufzeit und gute Anfärbung. Allerdings liegen auch hier die R_f -Werte noch so eng zusammen, daß die Identifizierung der zwei Substanzflecken nur durch die unterschiedliche Anfärbung möglich ist. Für die Trennung von Sorbinsäure und Benzoessäure ist dieses Verfahren dann ausreichend, wenn man mit annähernd bekannten Mengen der zu analysierenden Substanzen arbeitet.

In der Praxis hat man es jedoch mit unbekanntem Substanzen zu tun. Die Erfassung kleiner Mengen des einen Stoffes neben größeren Mengen des anderen kann dann Schwierigkeiten bereiten. Besonders bei Anwesenheit von großen Mengen Benzoessäure findet eine starke Überlagerung der Flecken statt; die Auftrennung ist dann unzureichend.

Von Padmoyo und Baumgartner²⁾ wurde vorgeschlagen, anstelle der Sorbinsäure die durch Bromierung daraus entstehende Bromcapronsäure zu chromatographieren. Das angegebene papierchromatographische Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß durch die Reaktion des Broms mit den am Startfleck aufgetragenen Substanzen in wasserhaltigem Medium ein störender Säurefleck entsteht, der die Identifizierung unter Umständen erschweren kann. Außerdem beträgt die Laufzeit nach Angaben der Verfasser ca. 14 Stunden.

Durch geeignete Kombination und Ausschaltung der Nachteile beider Verfahren konnte eine zuverlässige Analyse-methode entwickelt werden, die eine exakte Trennung auch bei größeren Substanzmengen und gute Identifizierung beider Konservierungsstoffe möglich macht. Infolge der kurzen Laufzeit des Chromatogramms von nur ca. 20 Minuten verringert sich auch der Zeitaufwand für eine Analyse beträchtlich.

Das Bromierungsverfahren

Wie Vorversuche und die bereits zitierte Arbeit von Padmoyo und Baumgartner zeigten, ist die Methode der Bromierung der Sorbinsäure vor der chromatographischen Trennung der Substanzen von besonderer Wichtigkeit für einen guten Trenneffekt bzw. von Einfluß auf das Auftreten von Nebenreaktionen.

Die Direktbromierung der Sorbinsäure sowohl mit Brom als auch mit Lösungen von Brom in organischen Lösungsmitteln führt zu zwei Bromierungsstufen. Neben der Tetrabromcapronsäure (Sorbinsäure-tetrabromid) können Di- oder Tribromcapronsäure entstehen.

Bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung einer gemäß Padmoyo und Baumgartner auf dem Startpunkt bromierten Sorbinsäure fanden wir zwei Substanzflecke, von denen einer mit Tetrabromcapronsäure identisch war, wie eine mitgelaufene Vergleichsprobe zeigte.

Da bei der experimentell zweifellos einfachen Bromierung des Substanzfleckes am Startpunkt des Chromatogramms zwei Bromderivate der Sorbinsäure entstehen, die bei der nachfolgenden Entwicklung aufgetrennt werden und zu Störungen führen können, entschlossen wir uns, ein geeigneteres Bromierungsverfahren zu wählen.

Es bot sich die Umsetzung der Sorbinsäure vor der eigentlichen chromatographischen Entwicklung in wäßrigem Medium an, etwa in der Art, wie sie von Spanyol und Sándor³⁾ für eine quantitative Sorbinsäure-Bestimmung vorgeschlagen worden war. Die Verfasser geben beim Bromieren in wäßrigem Medium mit einer 0,02 n-Kaliumbromat-Lösung ein Äquivalentgewicht der Sorbinsäure von 0,70 mg/ml an. Würde die Tetrabromcapronsäure gebildet, so müßte der Umrechnungsfaktor bei 0,56 mg/ml liegen. Das bedeutet, daß rechnerisch nur drei (genau 3,2) Bromatome pro Molekül statt der theoretischen vier addiert werden.

Durch Ätherextraktion einer in wäßriger Lösung vollständig bromierten Sorbinsäure und anschließende chromatographische Untersuchung konnte keine Tetrabromcapronsäure identifiziert werden, sondern ein Stoff mit etwas höher liegendem R_f -Wert. Es handelt sich möglicherweise um Tribromcapronsäure.