

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Band: 73 (1982)
Heft: 1

Artikel: Enzymatische Bestimmung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Lebensmitteln = Enzymatic determination of polyunsaturated fatty acids in foods
Autor: Battaglia, R. / Mitiska, J. / Romann, E.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983437>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. 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. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

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. [Voir Informations légales.](#)

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. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 15.10.2024

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

R. Battaglia und J. Mitiska, Kantonales Laboratorium, Zürich (Direktor: Dr. E. Romann)

Enzymatische Bestimmung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Lebensmitteln

Enzymatic Determination of Polyunsaturated Fatty Acids in Foods

Einführung

Bereits seit geraumer Zeit ist bekannt, daß das Enzym Lipoxigenase (E.C.1.13.1.13 bzw. E.C.1.13.11.12) die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) katalysiert. Das Enzym kommt hauptsächlich in Leguminosen vor und ist in gereinigter Form im Handel erhältlich (Fluka, Koch-Light usw.).

Die Stereochemie der lipoxigenasekatalysierten Umsetzung von Linolsäure mit Luftsauerstoff wurde eingehend studiert und entspricht dem in Abbildung 1 angegebenen Verlauf (1, 2). Darüber hinaus wurde bewiesen, daß das Enzym eine äußerst hohe Substrat-Spezifität aufweist (1): Lipoxigenase katalysiert ausschließlich die Oxidation von Fettsäuren, welche in ω 6- und ω 9-Stellung cis-Doppelbindungen enthalten.

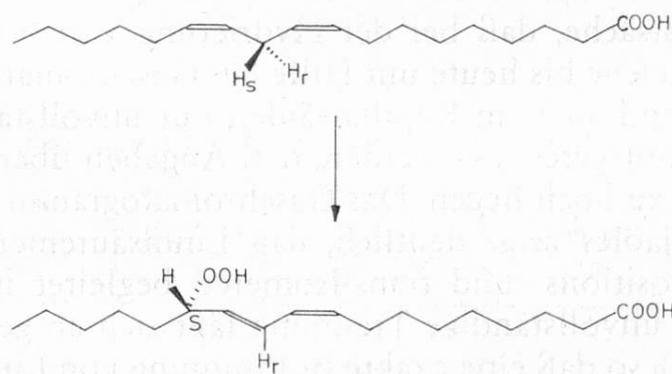


Abb. 1. Stereochemie der lipoxigenasekatalysierten Oxidation von Linolsäure nach (1)

Das erste Reaktionsprodukt einer PUFA ist dabei immer ein konjugiertes Dien-hydroperoxid, welches bei 234 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Es erstaunt somit nicht, daß diese Eigenschaft schon früh dazu führte, die Reaktion

zur quantitativen Bestimmung von PUFA in Fetten einzusetzen. Eine erste brauchbare Vorschrift wurde bereits 1959 von *J. Mac Gee* (3) veröffentlicht. Praktisch sämtliche in der Folge publizierte Arbeiten analytischer Art stützen sich auf die Experimente Mac Gees, wobei die jeweiligen methodischen Modifikationen zum Teil sehr geringfügig waren. Demgegenüber wurden von den verschiedenen Autoren oft beträchtlich unterschiedliche ϵ -Werte des Reaktionsproduktes gemessen (3, 4, 5). Wohl aufgrund dieser Differenzen, welche aus Tabelle 1 ersichtlich sind, basieren die von der IUPAC und AOAC vorgeschlagenen Methoden (6, 7) auf Eichkurven.

Tabelle 1. Zusammenstellung der in der zitierten Literatur gefundenen Extinktionswerte. LHPO = Linolsäurehydroperoxid

UV-Absorption von LHPO

γ max: 234 nm

ϵ -Wert	Quelle*
21 700	<i>J. Mac Gee</i> , 1959 (Linolsäure)
24 500	<i>H. J. Dutton</i> , 1961 (isolierte Me-ester)
25 000	<i>A. J. Sheppard</i> , 1977 (Trilinolein)
25 525 \pm 485 ($n = 6$)	Diese Arbeit (Linolsäure-Standard 98,7 \pm 0,4%, durch on-column-gc ^{2**} bestimmt)

* IUPAC und AOAC-Methoden: Kein festes ϵ , Bezug auf Eichkurve mit Trilinolein verlangt.

** = Glaskapillar-Gaschromatographie

PUFA in reinen Ölen und Fetten

Aufgrund der Tatsache, daß bei der Hydrierung von Fetten komplexe Gemische entstehen, welche bis heute mit Hilfe der Gaschromatographie an gepackten Säulen schlecht und auch an Kapillarsäulen nur unvollständig getrennt werden können, muß damit gerechnet werden, daß Angaben über den Linolsäuregehalt bestimmter Fette zu hoch liegen. Das Gaschromatogramm (Abb. 2) eines teilweise hydrierten Sojaöles zeigt deutlich, daß Linolsäuremethylester von entsprechenden C18:2-Positions- und trans-Isomeren begleitet ist.

Diese, bereits unvollständige Trennung läßt sich an gepackten Säulen kaum erreichen (Abb. 3), so daß eine exakte Bestimmung von Linolsäure nicht möglich ist. Dies wird auch durch die Daten in Tabelle 2 belegt: Je höher der Anteil an hydrierten Fetten in der Probe ist, desto größer wird die Diskrepanz zwischen den chromatographischen und den enzymatischen Analyseergebnissen. Es ist somit durchaus zu rechtfertigen, eine gaschromatographische Linolsäurebestimmung in komplex zusammengesetzten Fetten gelegentlich durch eine enzymatische Bestimmung zu überprüfen!

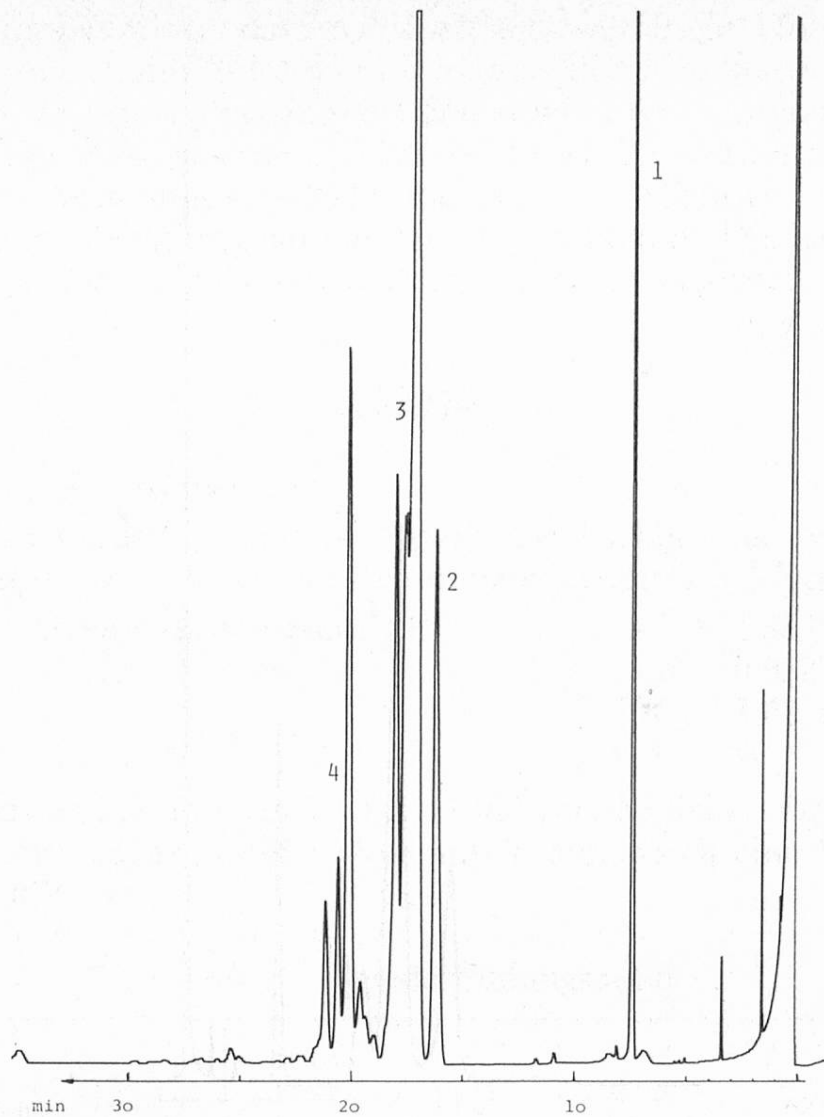


Abb. 2. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester eines hydrierten Sojafettes
 40 m FFAP, Kapillarsäule 0,3 mm i. d., 2 ml H₂/min, 160 °C isotherm.
 1 = C16:0 2 = C18:0 3 = C18:1 4 = C18:2

Tabelle 2. PUFA in «reinen» Fetten

Produkt	GC C18:2 + C18:3	PUFA enz.	Δ rel. %
Speiseöl	35,7	36,1	+ 1,1
Maiskeimöl	58,8	57,3	- 2,6
Margarine 1	37,5	35,4	- 5,6
Margarine 2	22,6	18,7	- 17,3
Frittierfett	44,1	37,2	- 15,6
Sojafett	17,7	13,8	- 22,0

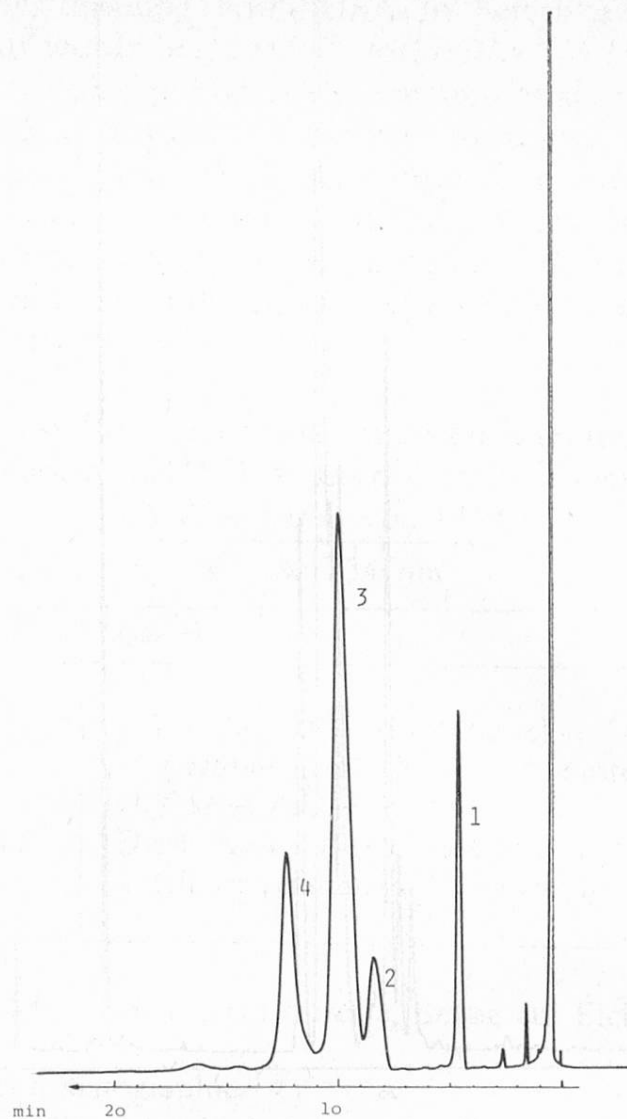


Abb. 3. Gaschromatogramm desselben Gemisches wie in Abbildung 2
3m DEGS 10% i. d., 2 mm, 1,8 atm He, 180 °C isotherm.

1 = C16:0

2 = C18:0

3 = C18:1

4 = C18:2

PUFA in Lebensmitteln

Sowohl in der amtlichen Lebensmittelkontrolle als auch in der Produktkontrolle der Lebensmittelindustrie werden oftmals anstelle von aufwendigen Vollanalysen gezielte Bestimmungen von repräsentativen Einzelparametern durchgeführt. Die Kontrolle des Gehaltes an essentiellen Fettsäuren ist dabei zweifellos von wesentlicher Bedeutung.

Konventionellerweise wird dazu aus den zu analysierenden Lebensmitteln das Fett — üblicherweise nach einem Säureaufschluß — extrahiert, mit Methylat umgeestert, und die Fettsäuremethylester werden darauf gaschromatographisch analysiert. Dabei trifft man oft auf die oben bereits dargelegten, jedoch oft nicht erkannten Schwierigkeiten: Durch das Vorliegen von cis/trans- und Positions-

Isomeren der Linolsäure wird das Analysenergebnis verfälscht. Die hier vorgestellte Methode erlaubt es, mit Hilfe von Lipoxidase PUFA in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln zu bestimmen. Dabei wird, im Gegensatz zur konventionellen gaschromatographischen Methode, die Fettextraktion überflüssig. Die Probe wird unter Ausschluß von Licht und Sauerstoff alkalisch hydrolysiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit Puffer verdünnt. Die resultierende Lösung wird direkt zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt.

Resultate

Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsrate

Anhand eines Kindernährmittels (Instant Zwiebackbrei mit Milch, Trockenprodukt in Pulverform) wurde die Reproduzierbarkeit der Methoden geprüft:

$$\begin{aligned} \text{PUFA-Gehalt enzymatisch} \quad \bar{x} &= 1,367\% \\ s &= 0,052 \\ VK &= 3,82\% \\ n &= 10 \end{aligned}$$

Die Wiederfindungsrate wurde mit Hilfe verschiedener Proben ermittelt. Über alle Resultate (siehe Tabelle 3) gemittelt, ergibt sich eine Wiederfindung von $100,9 \pm 1,07\%$.

Tabelle 3. Wiederfindungsraten

Probe	PUFA Probe %	+C18:2 %	theor. %	PUFA %	Ausbeute %
Italian Dressing	14,15	1,56	15,71	15,71	100,0
	14,15	1,57	15,72	16,08	102,3
Brotaufstrich Instant Zwiebackbrei mit Milch	13,24	55,6	68,7	69,31	99,9
	1,36	1,06	2,42	2,46	101,7
	1,36	0,77	2,13	2,14	100,5

$$\bar{x} 100,9 \quad s 1,07$$

Vergleichbarkeit mit konventioneller Methode

Eine Reihe von Lebensmitteln wurde sowohl enzymatisch als auch konventionell (d. h. wo nötig Säureaufschluß nach Schweiz. Lebensmittelbuch, Kapitel 22, Fettextraktion, Umesterung und GC) analysiert. Um auch über die Richtigkeit der Methode gleichzeitig ein Bild zu erhalten, wurden für diesen Test Lebensmittel eingesetzt, welche keine oder nur verschwindende Anteile an hydrierten Fetten enthielten. Somit bestand eine gewisse Gewähr für der Wahrheit nahe-

kommende gaschromatographische Resultate. Die Tabelle 4 zeigt, daß die Vergleichbarkeit der beiden Methoden recht akzeptabel ist. Somit erweist sich die hier beschriebene PUFA-Bestimmung als einfache und rationelle Alternativmethode gegenüber den herkömmlichen Verfahren.

Tabelle 4. PUFA-Bestimmungen in diversen Lebensmitteln

Lebensmittel	GC C18:2 + C18:3 %	Enzymatisch PUFA %
Italian Dressing	14,6	14,1 ± 0,6
French Dressing	13,8	13,5 ± 0,2
Vollkornbiscuits	0,86	0,95 ± 0,03
Biscuits mit Sesam	3,80	3,75 ± 0,04
Knäckebrot mit Sesam	3,01	2,5 ± 0,03
Instant Früchtebrei mit Milch	1,23	1,00 ± 0,04
Instant Gemüsebrei mit Milch	1,48	1,20 ± 0,04
Instant Zwiebackbrei mit Milch	1,77	1,36 ± 0,05
Instant Milchsoppen	4,65	4,39 ± 0,02
Kalbfleisch, Gemüse, Früchte, Reis	0,64	0,65 ± 0,05
Poulet, Nudeln, Gemüse	0,57	0,80 ± 0,07
Kalbfleisch, Gemüse	0,32	0,32 ± 0,01

Experimenteller Teil

PUFA in reinen Fetten und Oelen

Reagenzien

a) Puffer pH 9,0

— Vorratslösung 0,5 m

30,95 g Borsäure und 12,5 g Natriumhydroxid werden in ca. 800 ml Wasser gelöst, der pH-Wert wird mit Salzsäure 1 n oder Natronlauge 1 n auf 9,0 eingestellt und die Lösung mit Wasser zum Liter aufgefüllt.

— Gebrauchslösung 0,2 m

Die Vorratslösung wird entsprechend verdünnt.

b) Enzymlösungen

— Vorratslösung

10 mg Lipoxigenase (Fluka oder Koch-Light) werden in 10 ml Puffer 0,2 m gelöst

— Gebrauchslösung

Die Vorratslösung wird mit Puffer 0,2 m fünffach verdünnt.

— Blindlösung

10 ml Gebrauchslösung werden während 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt.

Ausführung der Bestimmung

a) Hydrolyse

100–200 mg Fett werden in einem 100-ml-Meßkolben eingewogen und mit Chloroform zu 100 ml gelöst. Davon wird 1,0 ml in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, und das Lösungsmittel wird mit einem Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird mit 10 ml alkoholischer Kalilauge 0,5 n versetzt und während 17 h im Dunkeln bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehen gelassen. Das Gemisch wird darauf mit 10 ml Salzsäure 0,5 n neutralisiert und mit Puffer 0,2 m auf 100,0 ml aufgefüllt (= Meßlösung).

b) Messung

Küvetten 1 cm, UV 234 nm

In Küvette pipettieren	Leerwert	Probe
Meßlösung	3,0 ml	3,0 ml
Extinktionsablesung	EL_1	EP_1
Enzymblindlösung Enzymgebrauchslösung	0,1 ml —	— 0,1 ml
Extinktionsablesung nach Reaktionsstillstand	EL_2	EP_2

Berechnungsformel, basierend auf $\epsilon = 25\,525$ (siehe Tabelle 1)

$$\% \text{ PUFA} = \frac{\Delta EP - \Delta EL}{A} \cdot 126,3$$

wobei $A = \text{mg Probe in 100 ml Meßlösung}$

PUFA in Lebensmitteln der in dieser Arbeit besprochenen Art

Reagenzien

wie oben

Ausführung

a) Hydrolyse

100 bis 400 mg Probe werden eingewogen und direkt hydrolysiert. Nach der Neutralisation der Lauge und dem Auffüllen mit Puffer 0,2 m wird so

mit dem Puffer weiter verdünnt, daß die resultierende Meßlösung zwischen 0,1 mg und 1,2 mg PUFA in 100 ml Meßlösung enthält. Falls sehr trübe Meßlösungen resultieren, können diese zentrifugiert werden (Filtration wird *nicht* empfohlen, da diese Verlust verursacht).

b) Messung
wie oben

Bemerkung: Aufgrund der in Tabelle 1 dargestellten verschiedenen ε -Werte wird empfohlen, anfänglich eine kleine Eichreihe mit Hilfe einer Linolsäure *bekannter Reinheit* oder eine Probe bekannten PUFA-Gehaltes durchzumessen. Unsere Erfahrungen haben allerdings eine in Anbetracht der «Vorgeschichte» erstaunliche Konstanz des in der Berechnungsformel angegebenen Faktors von 126,3 gezeigt (gemessene Faktoren über einen Zeitraum von 5 Jahren, verschiedene Personen: 123–126).

Dank

Für die Durchführung der gaschromatographischen Analysen danken wir der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. *K. Grob* jun. Für die Ausführung zahlreicher Experimente zur Abklärung der Hydrolysebedingungen danken wir Frau *U. Stemmer*.

Zusammenfassung

In Anlehnung an eine bekannte enzymatische PUFA-Bestimmung in reinen Fetten wird eine Methode beschrieben, die es erlaubt, PUFA in komplexen Lebensmitteln wie Backwaren, trockenen und feuchten Kindernährmitteln unter Umgehung der Fettextraktion direkt zu bestimmen.

Résumé

En partant d'une méthode connue, on a développé une méthode enzymatique simple pour déterminer les acides gras poly-insaturés (PUFA) dans des denrées de composition complexe: biscuits, aliments pour bébés. Toute extraction de la graisse est évitée et la préparation de l'échantillon est très simple.

Summary

Based on a known enzymatic method to determine PUFA in pure fats and oils, a method is described which allows the direct determination of PUFA in complex foods, such as biscuits, dry and wet baby-foods. The sample is directly converted into a suitable form for measurement and no fat extraction is required.

Literatur

1. *Hamberg, P. and Samuelsson, B.*: On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.* **242**, 5329–5335 (1967).
2. *Timm, U.*: Lipoxigenase, Wirkung und Folgereaktionen in Lebensmitteln. *Alimenta* **17**, 31–37 (1978).
3. *Mac Gee, J.*: Enzymatic determination of polyunsaturated fatty acids. *Anal. Chem.* **31**, 298–302 (1959).
4. *Johnston, A. E., Zilch, K. T., Selke, E. and Dutton, H. J.*: Low temperature decomposition of methylinoleate hydroperoxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **38**, 367–371 (1961).
5. *Prosser, A. R., Sheppard, A. J. and Hubbard, W. D.*: Modification of Canadian food and drug directorate lipoxidase method for PUFA determination. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 895–898 (1977).
6. *Pure and Appl. Chem.* **53**, 783–794 (1981).
7. *Sheppard, A. J., Waltking, A. E., Zmachinski, H. and Jones, S. T.*: Two lipoxidase methods for measuring poly unsaturated fatty acids in fats and oils. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **61**, 1419–1423 (1978).

Dr. R. Battaglia
Dr. J. Mitiska
Kantonales Laboratorium Zürich
Postfach
CH-8030 Zürich