

Trennung von linearen und zyklischen Phosphaten durch Dünnschichtchromatographie

O.DAFFLON, H.KOCH, B.ZUERCHER

Bundesamt für Veterinärwesen, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3097 Liebefeld, Schweiz

Es wird ein einfaches, zeitsparendes, eindimensionales dünnschichtchromatographisches Verfahren vorgestellt, welches zum Nachweis von Mono-, Pyro-, Tripoly-, Trimeta-(zyklisch) und Hexapolyphosphaten in Fleisch und Fleischwaren verwendet werden kann. Die Sichtbarmachung der Phosphate erfolgt durch Besprühen mit Ammoniummolybdatlösung und anschliessende Reduktion.

Separation of linear and cyclic phosphates by means of thin-layer chromatography

A simple, time-saving, one-dimensional method is presented which is used to differentiate between mono-, pyro-, tripoly-, trimeta-(cyclic) and hexapolyphosphates in meat and meat products. The detection of the phosphates is achieved by spraying a solution of ammoniummolybdate on the plates and by subsequent reduction.

1. Einleitung

Phosphate haben dank ihrer Wechselwirkungen mit gewissen Lebensmittelinhaltsstoffen wichtige Funktionen als Zusatzstoffe in der gesamten Nahrungsmittelindustrie.

Die wesentlichsten Einwirkungen auf proteinreiche Matrices wie Fleisch und Fleischwaren lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

- erhöhte Bindefähigkeit infolge Dissoziation des Actomyosin-Komplexes und teilweiser Lösung des Myosins
- gesteigertes Wasserbindungsvermögen des Muskelgewebes durch Beeinflussung der höheren Proteinstrukturen (ATP-analoge Wirkung)
- Erniedrigung der Festigkeit des Gewebes durch Dissoziation des Actomyosins (zartmachende Wirkung)
- Stabilisierung des Myoglobins und des Oxymyoglobins (Farbhaltung)
- teilweise Hemmung der Fettoxidation

Obwohl es viele experimentelle Hinweise auf die genannten Wirkungen der Phosphate gibt, ist man heute noch weit davon entfernt, die dabei ablaufenden chemischen Reaktionen im Detail zu kennen.

Die Nomenklatur der Phosphate, insbesondere der Polyphosphate, ist verwirrend und alles andere als streng systematisch. Man unterscheidet im allgemeinen:

- | | |
|----------------------------|--|
| <u>Lineare Phosphate</u> | - Orthophosphate (monomer) |
| | - Polyphosphate: Pyrophosphat (dimer) |
| | Triphosphat und höher kondensierte |
| | (trimer bis $n=500$) |
| <u>Zyklische Phosphate</u> | zum Beispiel - Trimetaphosphat (trimer) |
| | - Tetrametaphosphat (tetramer) |
| <u>Ultraphosphate</u> | verzweigt-kettig und zyklisch kondensierte |

Eine übermässige Zufuhr von Phosphaten führt - wie allgemein bei anorganischen Salzen - zu einem Ungleichgewicht im Körperhaushalt, wobei der osmotische Druck der Körperflüssigkeiten erhöht wird. Darüber hinaus kann eine zu hohe Phosphateinnahme eine Verarmung an Kalium, Calcium und Magnesium bewirken. Insgesamt ist man heute aber mehrheitlich der experimentell erhärteten Ansicht, dass linear kondensierte Polyphosphate toxikologisch unbedenklich sind. Eine Korrelation zwischen Phosphataufnahme und hyperkinetischem Syndrom bei Kindern konnte bis anhin nicht bewiesen werden. Zyklisch kondensierte Phosphate sind vom toxikologischen Gesichtspunkt aus nicht so unbedenklich, weil sie teilweise emulgierend wirken und gewisse Hinweise auf deren mutagene Eigenschaften bestehen.

Das Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen lehnt sich an die FAO/WHO-Bestimmungen an und schreibt vor, dass kondensierte Phosphate für Fleisch und Fleischwaren folgenden Anforderungen genügen müssen: Es dürfen nur linear kondensierte, höchstens pentamere Na- und K-Phosphate und ihre Gemische verwendet werden. Metaphosphate (zyklische) dürfen nur spurenweise vertreten sein. Der pH-Wert einer 1%igen wässrigen Lösung darf 8,5 nicht übersteigen.

2. Analytik

Der qualitative Nachweis - und von diesem ist hier ausschliesslich die Rede - polymerer Phosphate in Fleischwaren wird durch folgende zwei Umstände erschwert:

- Einerseits werden die nachzuweisenden Phosphate durch fleischeigene Enzyme bzw. Wärmebehandlung der Produkte allmählich zum Monophosphat hydrolysiert, so dass ein negatives Analyseergebnis nicht unbedingt heisst, dass keine Polyphosphate zugesetzt

wurden.

- Zum andern zeigt Trichloressigsäure, die zur Fällung der Proteine bei der Probenaufbereitung nötig ist, ebenfalls einen hydrolysierenden Effekt.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass lediglich die zur Zeit der Untersuchung noch vorhandenen kondensierten Phosphate nachgewiesen werden können.

Für den qualitativen Nachweis von Polyphosphaten und die gleichzeitige Differenzierung von linear und zyklisch kondensierten stehen heute hauptsächlich chromatographische Methoden zur Verfügung. Unter diesen werden papier- und dünnschichtchromatographische Techniken am meisten angewendet. Papierchromatographische und zweidimensionale dünnschichtchromatographische Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass sie sehr viel Zeit benötigen (mehrere Stunden).

Wir stellen hier ein einfaches, zeitsparendes, eindimensional-dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren vor, welches den Nachweis von Polyphosphaten und die Differenzierung zwischen linear und zyklisch kondensierten erlaubt.

Prinzip der Methode

Die Phosphatsalze werden mit einer wässrigen Lösung von Trichloressigsäure aus dem Homogenat extrahiert. Das Filtrat wird mit Trichlorethylen entfettet. 1 - 5 μ l der wässrigen Phase werden auf Celluloseplatten Merck (ohne UV-Indikator) aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch von Aceton/Pyridin (199 ml Aceton + 1 ml Pyridin), 25 ml Wasser und 5 g Trichloressigsäure. Anschliessend werden die Platten zur Komplexbildung mit einer sauren wässrigen Ammoniumheptamolybdat-Lösung besprüht und bei 100°C

getrocknet. Die Reduktion liefert bei Anwesenheit von Phosphaten die intensiv gefärbten "Molybdänblau"-Flecken.

R _f - Werte (Richtwerte):	Monophosphat	0,85
	Pyrophosphat	0,58
	Tripolyphosphat	0,38
	Trimetaphosphat	0,23
	Hexapolyphosphat und höher kondensierte	0

Nachweisgrenze in Fleischwaren: 500 - 1000 ppm

Zeitbedarf pro Chromatographie: ca. 1 h