

August 1989/187/W

Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld

**Eine verbesserte HPLC-Methode zur Bestimmung von
Sorbinsäure in Milchprodukten unter
spezieller Berücksichtigung von Artefakten**

U. Bütikofer, E. Baumann und J. O. Bosset

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 79, 392-405 (1988)

Einleitung

Sorbinsäure und ihre Salze können das Wachstum von Schimmelpilzen, Hefen und Bakterien hemmen (1). Sie finden deshalb als Konservierungsmittel in Lebensmitteln breite Verwendung. Nach der Zusatzstoffverordnung (2) ist in der Schweiz die Verwendung dieser Substanzen für verschiedene Lebensmittel wie Margarine, Marmelade, Gelees, Konfitüre, frucht- oder fetthaltige Massen zugelassen. Keine Zulassung besteht aber für Milchprodukte (Joghurt, Quark, Speiseeis), wo auch der Einsatz von sorbinsäurehaltigen Früchten, Aromen oder Farbstoffen (carry-over) ausgeschlossen ist, da Fruchtgrundstoffe als Zwischenprodukte nicht konserviert werden dürfen.

Zur Bestimmung der Sorbinsäure in Lebensmitteln, insbesondere in Milchprodukten, stehen neben kolorimetrischen (3), gaschromatographischen (4, 5) auch HPLC-Verfahren (5–10) zur Verfügung. HPLC-Verfahren werden sowohl vom Internationalen Milchwirtschaftsverband (11) als auch vom Schweizerischen Lebensmittelbuch (12) (provisorische Methoden) beschrieben. Wegen vermuteten Artefakten bei der HPLC-Bestimmung von Sorbinsäure hat die Lebensmittelkontrolle in der Schweiz für Milchprodukte vorerst einen Toleranzwert von 20 mg/kg Sorbinsäure angewendet. Ab 1. Januar 1988 wird jedoch die Nulltoleranz gefordert. Damit ist erneut die Frage von analytischen Artefakten aktuell geworden. Es ist deshalb das Ziel dieser Arbeit, der Frage nachzugehen, ob die beiden erwähnten provisorischen Bestimmungsmethoden frei von Artefakten sind, und wie eventuell auftretende Artefakte erkannt und vermieden werden können.

Experimenteller Teil

Proben

Alle verwendeten Proben stammen aus dem Detailhandel der Schweiz. Tabelle 1 zeigt die Liste der Proben und deren Hersteller (anonym). Soweit möglich wurden die zugehörigen Aromen oder Fruchtkonzentrate gesammelt und analysiert, um einen «carry-over»-Effekt zu beweisen.

Reagenzien

Für die Probenvorbereitung und die HPLC-Bestimmung wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

| | Hersteller | Bestellnummer |
|---|------------|---------------|
| Sorbinsäure NF, E 200 | Merck | 662 |
| Benzoessäure, puriss. p. a. | Fluka | 12 349 |
| Kaliumhexacyanoferrat-(II)-trihydrat, puriss. p. a. | Fluka | 60 280 |
| Zinkacetat-dihydrat, purum p. a. | Fluka | 96 458 |
| Kaliumdihydrogenphosphat, purum p. a. | Fluka | 60 230 |
| di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat, purum | Fluka | 60 355 |
| Kaliumdichromat, puriss. p. a. | Fluka | 60 190 |
| 2-Thiobarbitursäure, purum | Fluka | 88 481 |
| Natriumhydroxidlösung 20%, zur Analyse | Merck | 5 594 |
| Schwefelsäure 95–97%, zur Analyse | Merck | 732 |
| Salzsäure 32%, zur Analyse | Merck | 319 |
| Methanol, zur Analyse | Merck | 6 009 |
| Wasser, deionisiert (Milli-Q-Anlage) | Millipore | |

Apparate

Geräte für die HPLC-Bestimmung

Für die Screening-Tests wurden sämtliche Proben mit einem Spectra Physics SP8000B HPLC-Gerät und einem Perkin Elmer LC 75 UV-Detektor auf ihren Gehalt an Sorbinsäure untersucht.

Für die Überprüfung der positiven Resultate des SP8000B wurden die HPLC-Bestimmungen auf einem Analysensystem von Hewlett Packard HP 1090 wiederholt, das mit einem HP 1040 Diodenarraydetektor ausgerüstet war.

Geräte für die photometrische Bestimmung

Für die zusätzliche Überprüfung der HPLC-Resultate wurde eine photometrische Methode mit vorangehender Wasserdampfdestillation eingesetzt. Letztere

wurde mit einem Dampfgenerator der Firma Büchi AG (CH-9230 Flawil) durchgeführt. Die Extinktion wurde auf einem Zeiss PMQII/M4QIII Spektralphotometer mit angeschlossenem Transmissions-Konzentrationswandler bestimmt.

Analysenmethoden

Provisorische FIL/IDF HPLC-Methode (11) und provisorische schweizerische Lebensmittelbuchmethode (12)

20 g homogenisierte Frischmilch, Speiseeis, Joghurt oder andere gesäuerte Milch wurden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. 25 ml 0,1 mol/l Natriumhydroxidlösung wurden zugegeben und gut gemischt. Während 15 min wurde der Kolben in einem Ultraschallbad behandelt oder während der gleichen Zeit in ein Wasserbad bei 70 °C gestellt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit 0,5 mol/l Schwefelsäurelösung auf ca. 8 (Indikatorpapier) eingestellt und je 2 ml 0,25 mol/l Kaliumhexacyanoferrat-(II)-trihydratlösung und 1,0 mol/l Zinkacetatdihydratlösung zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach 15 min wurden etwa 40 ml Methanol zugegeben, durchgemischt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Auffüllen mit Methanol auf 100 ml und Durchmischung wurde die Probe 15 min stehengelassen. Die überstehende Lösung wurde durch ein Milliporefilter (0,45 µm) klarfiltriert.

Die isokratische Trennung wurde bei Raumtemperatur auf einer 10 µm C₁₈-Umkehrphase mit den Dimensionen 250 × 4 mm durchgeführt. Die mobile Phase hatte folgende Zusammensetzung: 10 Volumen Methanol und 90 Volumen wässrige Phase bestehend aus 2,5 g Kaliumdihydrogenphosphat und 2,5 g di-Kaliumhydrogenphosphat trihydrat ad 1000 ml. Die HPLC-Bestimmung erfolgte bei einem Fluss der mobilen Phase von 1,2 ml/min (Lebensmittelbuchmethode: 2,0 ml/min). Für die Bestimmung wurden 10 µl des Extraktes oder der Standardlösung eingespritzt. Die Detektion erfolgte bei 227 und 254 nm. Die Retentionszeit der Sorbinsäure betrug ca. 7 min.

Vorgeschlagene Verbesserung der HPLC-Methode

Die Probemenge wurde auf 10 g reduziert. Die Aufarbeitung der Probe unterscheidet sich einzig durch folgenden Verarbeitungsschritt:

Nach dem Auffüllen mit Methanol auf 100 ml und dem Stehenlassen während 15 min wurde die Probe während mindestens 2 h in einen Tiefkühlschrank bei -18 °C gestellt, um die Löslichkeit gewisser Begleitsubstanzen zu reduzieren (stabiler Basislinie im Chromatogramm). Die isokratische Trennung wurde bei 35 °C auf einer Hypersil ODS 5 µm C₁₈-Umkehrphase mit den Dimensionen 200 × 4,6 mm durchgeführt (Vorsäule: Hypersil ODS C₁₈ 20 × 4,6 mm). Die mobile Phase hatte folgende Zusammensetzung: 8 Volumen Methanol und 92 Volumen wässrige Phase bestehend aus 2,0 g Kaliumdihydrogenphosphat und 2,0 g di-Kaliumhydrogenphosphat trihydrat ad 1000 ml. Die HPLC-Bestim-

mung erfolgte bei einem Fluss der mobilen Phase von 1,0 ml/min. Für die Bestimmung wurden 10 μ l des Extraktes oder der Standardlösungen eingespritzt. Die Detektion erfolgte bei 227 und 254 nm. Die Retentionszeit der Sorbinsäure betrug ca. 6,5 min.

Die photometrische Methode

Nach einer Wasserdampfdestillation wurde die Sorbinsäure nach der photometrischen AOAC-Methode (3) bestimmt. 5–20 g der Probe, die maximal 1 mg Sorbinsäure enthalten darf, wurden in einen 250-ml-2-Hals-Rundkolben eingewogen. Es wurden 20 ml Wasser und 10 ml 10%ige Schwefelsäurelösung zugegeben. Während 30–45 min wurde die Suspension mit Wasserdampf destilliert, bis das im Messkolben aufgefangene Volumen des Destillates 300 ml betrug. 2,0 ml des Destillates wurden in einem Reagenzglas mit 1 ml 0,15 mol/l Schwefelsäurelösung und 1 ml 5 mmol/l Kaliumdichromatlösung versetzt. Die Lösung wurde während genau 5 min in ein siedendes Wasserbad gestellt und dann in einem Eisbad auf Raumtemperatur gekühlt, 2 ml Thiobarbitursäurelösung (250 mg 2-Thiobarbitursäure gelöst in 2,5 ml 1 mol/l Natriumhydroxidlösung und 20 ml Wasser mit 0,1 mol/l Salzsäure den pH-Wert auf ca. 7 (Indikatorpapier) eingestellt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt) zugesetzt und wieder während 10 min in dem siedenden Wasserbad gehalten. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde die Extinktion bei 532 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Der Gehalt der unbekanntes Lösung wurde aus der Kalibriergeraden berechnet. Diese wurde durch wässrige Sorbinsäurestandardlösungen bzw. durch Joghurtproben mit bekannten Sorbinsäurezusätzen ermittelt (siehe Abschnitt: Linearität der photometrischen Bestimmung).

Resultate und Diskussion

Linearität, Wiederholbarkeit und Nachweisgrenze der vorgeschlagenen HPLC-Methode

Bis zu einer Konzentration von mindestens 200 mg/kg verläuft die Kalibrierkurve der beiden HPLC-Geräte (SP 8000B und HP 1090) bei 254 nm linear, und zwar unabhängig von der verwendeten HPLC-Methode und der verwendeten Matrix (Wasser oder Joghurt für die Herstellung der Standardlösungen). In Abwesenheit von Artefakten waren die gerechneten Steigungen statistisch gleich in beiden Matrizes. Die Nullpunktordinate α war statistisch nicht von Null verschieden ($F_{(\alpha = 0; P = .95)} = 0,02 < 4,96$). Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,9999$ ($n = 12$).

Die Standardabweichung S_r der Wiederholbarkeit wurde anhand von Doppelbestimmungen wie folgt berechnet:

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{2n} \cdot \sum_{j=i}^n d_j^2} = \underline{1,7 \text{ mg/kg}}$$

Wobei:

- $n = 62$ = Anzahl Doppelbestimmungen
 $d_j =$ Differenz der beiden Werte aus der Doppelbestimmung
 $\Sigma d_j^2 = 377$

Die Nachweisgrenze beträgt 2 mg/kg, bei einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,99$.

Überprüfung der vorgeschlagenen HPLC-Methode

Die in Tabelle 1 mit (*) bezeichneten Proben und Werte weisen Interferenzen bei der FIL/IDF-Methode (11) und der schweizerischen Lebensmittelbuchmethode (12) auf. Interferenzen sind hier durch Retentionszeitdifferenzen $< 0,4$ min zwischen Sorbinsäure und der Artefaktkomponente definiert. Die Artefaktkomponente erscheint als Schulterpeak, als überlappendes Signal (Abb. 1/c + d) oder sogar als Artefakt ohne Sorbinsäure (Abb. 1/e + f). Bei solchen Fällen liefern die beiden provisorischen Methoden zu hohe Gehaltswerte. Die vorgeschlagenen Analysebedingungen verbessern die chromatographische Auflösung und verhüten die vorher beobachteten Interferenzen.

Tabelle 1. Sorbinsäuregehalt von schweizerischen Milchprodukten, bestimmt mit der verbesserten HPLC-Methode (Probenahme: März–Juni 1988)

| Firma | Probearart | Sorbinsäuregehalt (mg/kg) | Sorbinsäuregehalt der Fruchtkonzentrate (mg/kg) |
|-------|--------------------|---------------------------|---|
| A | Kiwi/Stachelbeeren | 4,3 | 21,5 |
| | Kiwi/Stachelbeeren | 96,5 | |
| | Aprikosen | 59 | |
| | Bananen | 93,5 | |
| | Heidelbeeren | 56 | |
| | Erdbeeren | 59 | |
| | Waldbeeren | 76,5 | |
| | Himbeeren | 56 | 38,6 |
| | Haselnuss | 54 | |
| | Erdbeeren | 87,2 | |
| | Aprikosen | 92,5 | |
| | Aprikosen | 4,7 | |
| | Himbeeren | 89,8 | |
| | Heidelbeeren | 69,0 | |
| | Waldbeeren | 108,8 | 2,7 |
| | Birchermüesli | 85,7 | |
| | Erdbeeren | 0 | |

Fortsetzung von Tabelle 1.

| Firma | Probearart | Sorbinsäuregehalt (mg/kg) | Sorbinsäuregehalt der Fruchtkonzentrate (mg/kg) |
|--------------|---------------------|------------------------------|---|
| B | Birchermüesli | 63,9 | 208 |
| | Birchermüesli | 40 | |
| | Espresso | 1,3* | 6,5* |
| | Heidelbeeren | 1,8 | 6,0 |
| | Caramel*** | 1,4* | 46* |
| | Mandarinen | 0 | 2,5 |
| | Erdbeeren | 3,7 | |
| | Aprikosen | 4,7 | |
| | Waldbeeren | 8,4 | |
| | Waldbeeren | 1,8 | |
| | Waldbeeren | 1,4 | |
| | Birchermüesli | 2,9 | |
| | Birchermüesli | 2,8 | |
| | Birchermüesli | 1,3* | |
| | Himbeerquark | 6,6 | |
| | Sauermilch (nature) | 2,7 | |
| | Himbeerdrink | 3,9 | |
| | Mocca | 0 | 1,2 |
| | Kefir | 0 | 38,6 |
| C | Brombeeren | 0 | 4,9* |
| | Aprikosen | 0 | 6,7 |
| | Himbeeren | 0 | 3,3* |
| | Zitronen | 0 | 5,3 |
| | Mandarinen | 0 | 10,0 |
| | Ananas | 0 | 3,6 |
| | Pfirsich | 0 | 5,2 |
| | Blutorangen | 0 | 26,6 |
| | Erdbeeren | 0 | 2,5* |
| | Birchermüesli | 3,2 | 18,3 |
| | Erdbeeren | 3,0 | |
| | E | Himbeeren | 63 |
| Waldbeeren | | 2 | |
| Heidelbeeren | | 57 | |
| F | Erdbeeren | 112 | |

Fortsetzung von Tabelle 1.

| Firma | Probeart | Sorbinsäuregehalt (mg/kg) | Sorbinsäuregehalt der Fruchtkonzentrate (mg/kg) |
|-------|------------|---------------------------|---|
| G | Erdbeeren | 80 | |
| | Aprikosen | 59 | |
| | Pfirsich | 169 | |
| | Zitronen | 57 | |
| | Waldbeeren | 110 | |
| | Pfirsich | 136 | |

In den folgenden Proben (bei Joghurtproben nur Sorte angegeben) wurde keine Sorbinsäure gefunden:

Hersteller A: Haselnuss, Pfirsich, Ananas, Aprikosen, Birnen**, Heidelbeeren, Erdbeeren, Stachelbeeren, Bananen, Mocca, Vanille, Ananas.

Hersteller B: Himbeeren*, Erdbeeren, Pfirsich, Haselnuss, Mocca, Heidelbeeren, Ananas*, Brombeeren, Apfel, Kirschen, Brombeerkefir, Birnenkefir, Caramel, Aprikosen, Birchermüesli*, Erdbeerquark*, Himbeerquark, Waldbeerenquark, Erdbeerdrink, Gartenbeeren, Erdbeerglace, Colaglace, Zitronenglace, Orangenglace, Kirschcoupe.

Hersteller C: Schokolade*, Brombeeren*, Erdbeeren*, Waldbeeren, Aprikosen*, Kirschen*, Himbeer, Bananen, Exotik*, Zitronen, Mandarinen, Trauben, Ananas, Kokos, Südsee, Melone, Diplomat, Vanille, Apfel, Baumnuss, Pfirsich, Heidelbeeren, Haselnuss, Birnen, Kleie, Zwetschgen, Café.

Hersteller D: Aprikosen, Pfirsich, Blutorangen, Birchermüesli, Himbeeren*, Erdbeeren, Zitronen*, Bananen, Kiwi, Ananas, Kirschen, Nektarinen, Heidelbeer, Haselnuss, Mango, Mandarinen, Schokolade.

Hersteller E: Aprikosen, Haselnuss, Pfirsich, Erdbeeren.

Hersteller F: Kirschen, Heidelbeeren.

Hersteller G: Himbeeren, Aprikosen, Heidelbeeren.

* Bei diesen Proben traten analytische Artefakte mit den provisorischen Analysemethoden der FIL/IDF (11) und des schweizerischen Lebensmittelbuches (12) auf.

** Siehe Abb. 1/e + f und Abb. 2/e + f.

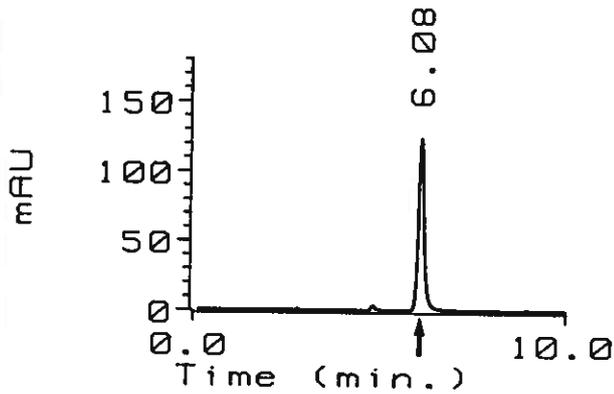
*** Siehe Abb. 1/c + d, Abb. 2/c + d und Abb. 4.

Ermittlung von Artefakten bei der HPLC-Bestimmung mittels Photodiodenarraydetektor

Eine Möglichkeit, Artefakte zu erkennen, ist die Verwendung eines Diodenarraydetektors (DAD), der das UV-Spektrum (200–400 nm) der gelösten Komponenten kontinuierlich erfasst. Dabei wird der vermutete Sorbinsäurepeak mit dem Spektrum von reiner Sorbinsäure verglichen (Abb. 2a–2f). Die verwendete HP-Software berechnet hierzu einen Reinheitsindex.

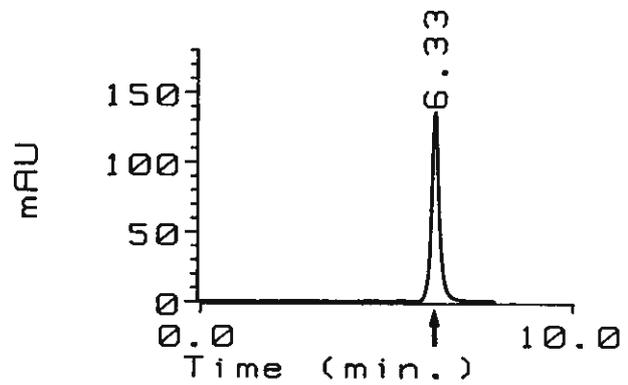
Mit der vorgeschlagenen Methode wurden bei der Überprüfung mit dem DAD in sämtlichen Proben keine Interferenzen mehr festgestellt.

FIL/IDF
HPLC-Methode

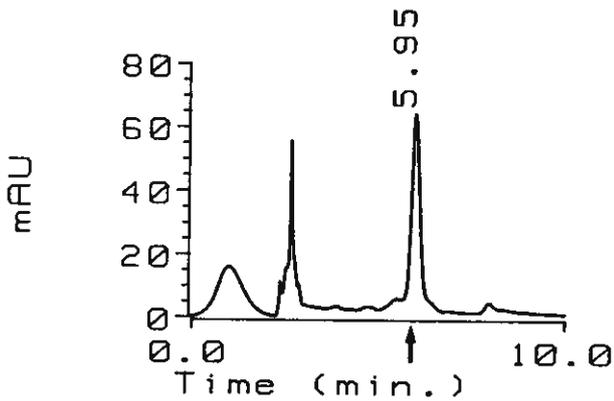


(a) Sorbinsäure-Standardlösung

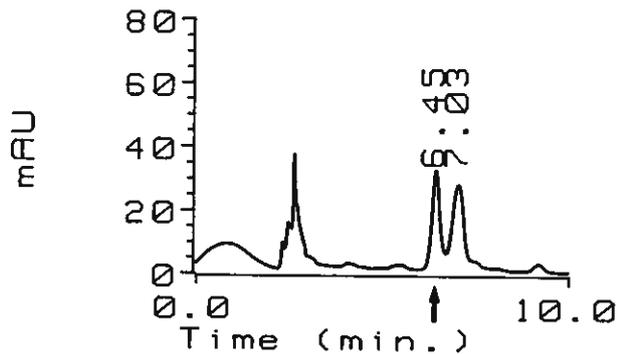
vorgeschlagene
HPLC-Methode



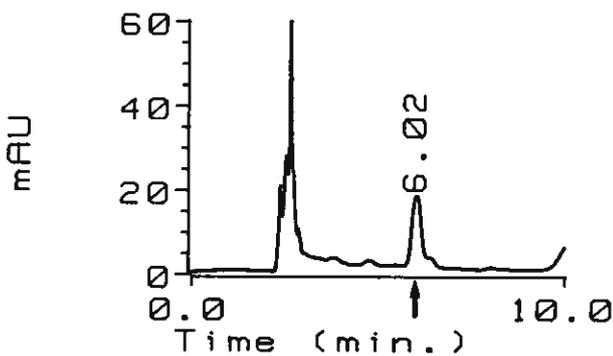
(b) Sorbinsäure-Standardlösung



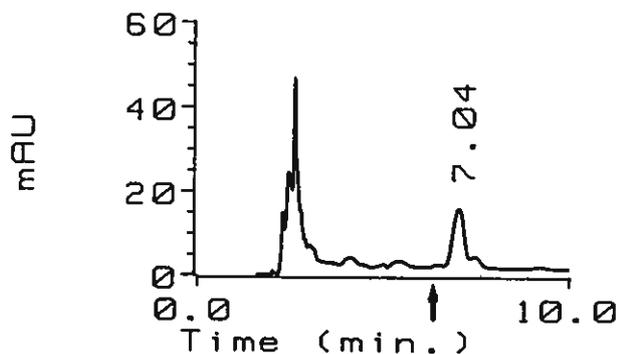
(c) Sorbinsäure und «Artefakt-
komponente» in Caramel-Joghurt



(d) Sorbinsäure und «Artefakt-
komponente» in Caramel-Joghurt
chromatographisch aufgetrennt



(e) «Artefaktkomponente» ohne
Sorbinsäure in Birnen-Joghurt

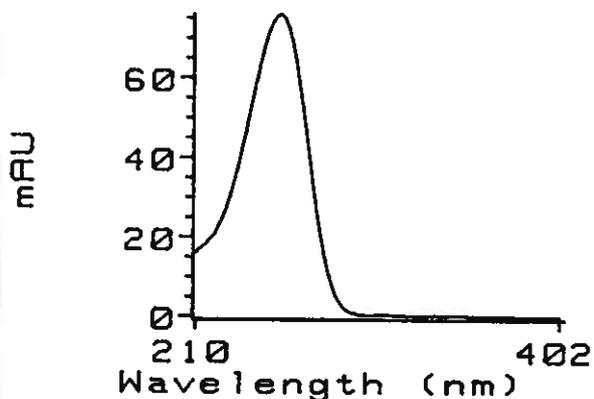


(f) «Artefaktkomponente» ohne
Sorbinsäure in Birnen-Joghurt

Abb. 1. Sorbinsäurebestimmung mittels HPLC bei 254 nm unter Berücksichtigung von Artefakten

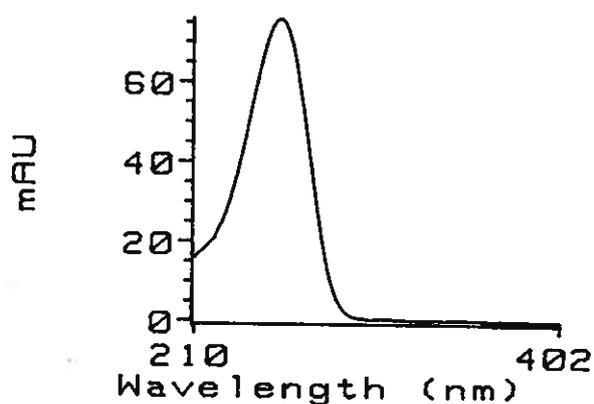
Legende: † Retentionszeitmarkierung von Sorbinsäure

FIL/IDF
HPLC-Methode

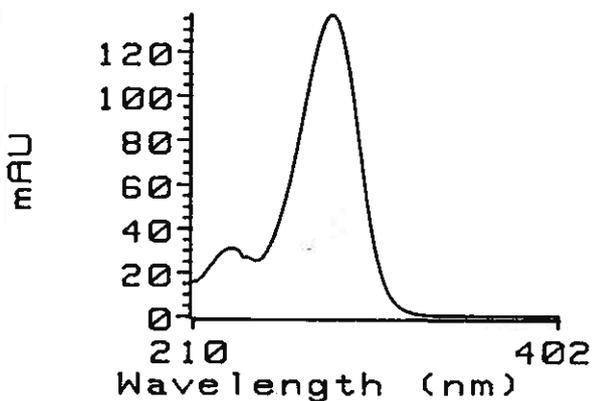


(a) Sorbinsäure-Standardlösung
($t_r = 6,08$ min)

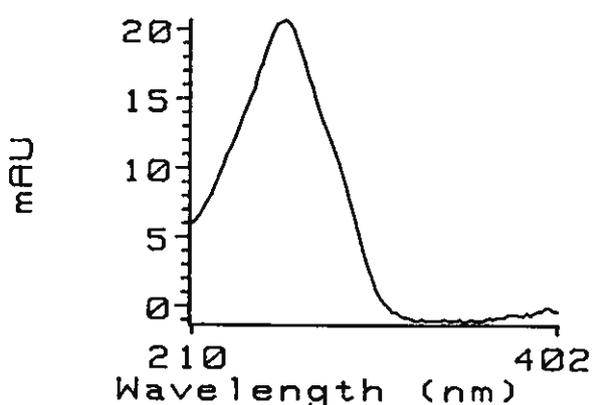
vorgeschlagene
HPLC-Methode



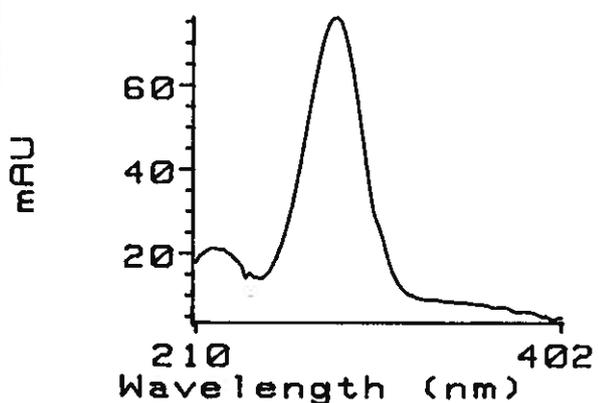
(b) Sorbinsäure-Standardlösung
($t_r = 6,33$ min)



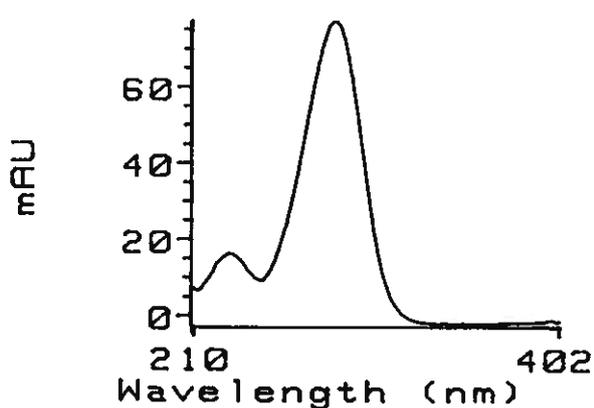
(c) Sorbinsäure und Artefakt-
komponente in Caramel-Joghurt
($t_r = 5,95$ min)



(d) Sorbinsäure in Caramel-Joghurt
($t_r = 6,45$ min)



(e) Artefaktkomponente in
Birnen-Joghurt
($t_r = 6,02$ min)



(f) Artefaktkomponente in
Birnen-Joghurt
($t_r = 7,04$ min)

Abb. 2. UV-Spektren der bei der Retentionszeit von Sorbinsäure oder des «Artefaktes» eluierten Substanzen

Vergleich mit der photometrischen Methode

Eine quantitative photometrische Bestimmung mit Hilfe einer leicht abgeänderten AOAC-Methode (3) (Wasserdampfdestillation statt flüssig-flüssig Extraktion) wurde parallel eingesetzt, um die vorgeschlagene HPLC-Methode zu überprüfen.

Linearität der photometrischen Bestimmung

Die für die photometrische Methode angegebene Maximalmenge (1 mg/Probe) Sorbinsäure darf auf keinen Fall überschritten werden, da die Destillationsausbeute sonst nicht mehr quantitativ ist. Die Regressionsrechnung zeigte, dass die Nullpunktordinate a statistisch nicht von Null verschieden war ($F_{(a=0; P=.95)} = 10^{-6} < 4,75$); die Kalibriergerade mit wässrigen Standardlösungen ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,996$ ($n = 14$). Bei der Additionsmethode mit sorbinsäurefreien Joghurten war die Nullpunktordinate a statistisch von Null verschieden ($F_{(a=0; P=.95)} = 1220 > 4,49$); der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,991$ ($n = 16$).

Es ist also eine signifikante Interferenz festzustellen, was bedeutet, dass die Kalibrierung in Anwesenheit einer Joghurtmatrix (Additionsmethode) erstellt werden muss.

Vergleich der photometrischen Methode mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode

Abbildung 3 zeigt die Übereinstimmung der beiden Methoden, was einen zusätzlichen Beweis der Abwesenheit der Interferenz in der vorgeschlagenen HPLC-Methode erbringt.

Die Steigung β der Regressionsgerade war statistisch nicht von 1 verschieden ($F_{(\beta=1; P=.95)} = 0,46 < 4,11$). Die Nullpunktordinate α war statistisch nicht von Null verschieden ($F_{(\alpha=0; P=.95)} = 1,49 < 4,11$). Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,983$ ($n = 38$).

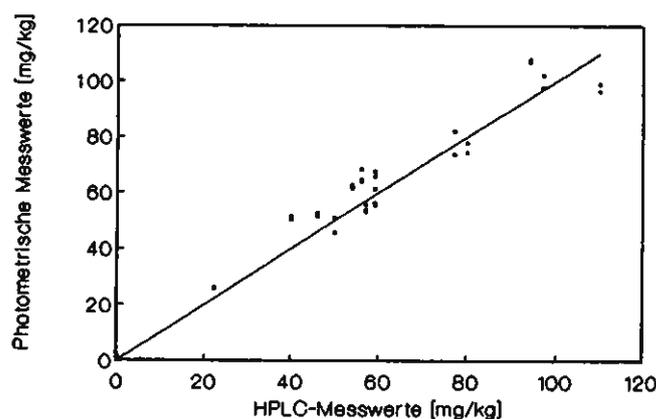


Abb. 3. Vergleich der vorgeschlagenen HPLC-Methode mit einer photometrischen Methode für die Sorbinsäurebestimmung unter Berücksichtigung von eventuellen Artefakten

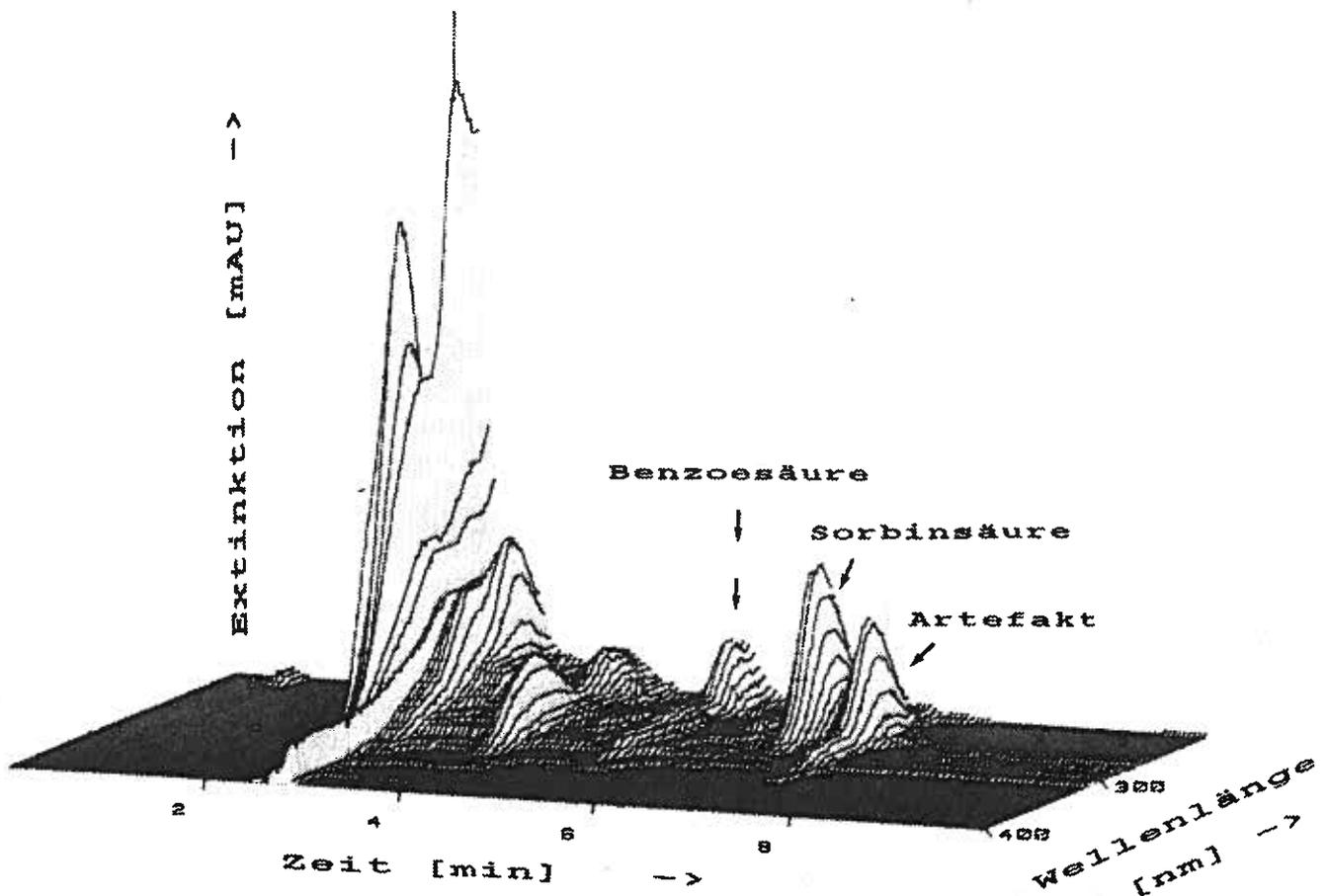


Abb. 4. Dreidimensionales Chromatogramm der Auftrennung von Benzooesäure, Sorbinsäure und Sorbinsäure-Artefakt nach der vorgeschlagenen HPLC-Methode (Probe: Caramel-Joghurt)

Gleichzeitige Bestimmung von Benzooesäure

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (6–11) kann mit diesem Verfahren neben Sorbinsäure gleichzeitig auch Benzooesäure nachgewiesen werden. Abbildung 4 zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Trennung von Benzooesäure, Sorbinsäure und Sorbinsäureartefakt nach der vorgeschlagenen Methode bei einem Caramel-Joghurt.

Schlussfolgerung

Analytisch wurde bestätigt, dass Artefakte mit den provisorischen Methoden der FIL/IDF und des schweizerischen Lebensmittelbuches in gewissen Proben als Sorbinsäure erfasst werden. Die Anwendung einer mobilen Phase mit einem höheren wässrigen Anteil (92 Volumen Phosphatpuffer + 8 Volumen Methanol statt 90 + 10 Volumen) und tieferer Pufferkonzentration (je 2,0 g Kaliumdihydro-

genphosphat + di-Kaliumhydrogenphosphat trihydrat pro Liter statt je 2,5 g/l) ermöglicht es, solche Artefakte zu vermeiden. Die praktische Nachweisgrenze der vorgeschlagenen Methode zur Bestimmung von Sorbinsäure liegt bei 2 mg/kg. Mit dem Einsatz eines Diodenarraydetektors kann die Reinheit der eluierten Komponenten überprüft werden. Die photometrische Bestimmung der Sorbinsäure nach einer Wasserdampfdestillation ergibt eine weitere Quantifizierungsmöglichkeit dieses Konservierungsmittels. Mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode kann gleichzeitig Benzoesäure bestimmt werden.

Trotz der Nichtzulassung von Sorbinsäure in Milchprodukten gibt es immer noch Proben aus dem Handel, die Sorbinsäure enthalten. Dieses Konservierungsmittel ist in einigen Staaten (z. B. USA) bei der Herstellung von Milchprodukten gesetzlich zugelassen.

Dank

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit danken wir unserem Kollegen Dr. R. Sieber. Im weiteren danken wir Herrn Zeller vom Zentralverband schweizerischer Milchproduzenten für die Lieferung von diversen Proben.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Artefakte bei der Bestimmung der Sorbinsäure in verschiedenen aromatisierten und fruchthaltigen Milchprodukten wie Joghurt, Quark und Speiseeis, in welchen nach der schweizerischen Zusatzstoffverordnung Sorbinsäure nicht enthalten sein darf. Bei den provisorischen HPLC-Methoden der FIL-IDF (139:1987) sowie des Lebensmittelbuches (Kap. 44/4.2) können analytische Artefakte auftreten, was zu hohe Gehaltswerte ergibt. Es wird eine modifizierte Methode vorgeschlagen, bei welcher der wässrige Anteil der mobilen Phase erhöht und gleichzeitig die Pufferkonzentration vermindert wird. Die verbesserte Methode wurde mit Hilfe eines Diodenarraydetektors sowie anhand einer photometrischen Bestimmung nach einer Wasserdampfdestillation überprüft. Die Nachweisgrenze der verbesserten Methode liegt bei 2 mg/kg. Die Methode wurde für die Routineuntersuchung an ungefähr 300 handelsüblichen Proben eingesetzt. Eine Anzahl Proben enthielt immer noch recht hohe Sorbinsäurekonzentrationen (bis 208 mg/kg). Auch Benzoesäure wird mit dieser Methode gut aufgetrennt.

Résumé

Le présent travail a pour objet l'étude des artéfacts lors du dosage de l'acide sorbique dans divers produits laitiers aromatisés et aux fruits tels que sérés, glaces et yoghourts, qui ne doivent pas contenir d'agents conservateurs (Ordonnance fédérale sur les additifs). Les méthodes provisoires tant de la FIL/IDF (139:1987) que du Manuel suisse des denrées alimentaires (chapitre 44/4.2) peuvent en effet engendrer des artéfacts analytiques et donner ainsi des résultats trop élevés. Une modification de la méthode y est proposée dans laquelle la composante aqueuse est augmentée et la concentration du tampon phosphate dimi-

nuée. La méthode modifiée a été testée à l'aide d'un détecteur à réseau de photodiodes ainsi que d'un dosage photométrique après entraînement à la vapeur d'eau. La limite de détection se situe à 2 mg/kg. La méthode proposée a été appliquée en routine à environ 300 échantillons provenant du commerce dont bon nombre contiennent de l'acide sorbique (jusqu'à 208 mg/kg). Elle permet également une bonne séparation de l'acide benzoïque.

Summary

The aim of this work was to examine artifacts occurring during sorbic acid determination in flavoured and fruit containing dairy products such as yoghurts, quark and ice cream. According to Swiss food regulations, such products must be free of preservatives. The provisional FIL/IDF method (139:1987) as well as the provisional method of the Swiss Food Manual (Chapter 44/4.2) can produce analytical artifacts and yield too high results. A new eluent is proposed with a slightly higher water content and a lower phosphate buffer concentration. The new procedure was tested using a diode array detector and compared to a photometric method after steam distillation. The detection limit of the new method is 2 mg/kg. The method was submitted to a routine screening-test where approximately 300 commercial samples were analysed. Many contained up to 208 mg/kg sorbic acid. The method also provides good separation of benzoic acid.

Literatur

1. *Liewen, M. B. and Marth, E. H.*: Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. *J. Food Protect.* **48**, 364–375 (1985).
2. Verordnung über die in Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe (Zusatzstoffverordnung) vom 20. Januar 1982. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1987.
3. *AOAC*: Sorbic acid in dairy products. Official methods of analysis of the AOAC No. 20.119, 391 (1984).
4. *Hulstkamp, J. und Steiger, G.*: Eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Sorbinsäure in Milchprodukten. *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* **7**, 15–19 (1978).
5. *Saito, I., Oshima, H., Kawamura, N., Uno, K. and Yamada, M.*: Determination of sorbic, dehydroacetic and propionic acids in cheese by liquid chromatography and gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 507–509 (1987).
6. *Leuenberger, U., Gauch, R. and Baumgartner, E.*: Determination of food preservatives and saccharin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **173**, 343–348 (1979).
7. *Arimoto, M., Tsujisawa, J. and Yokoyama, T.*: Rapid determination of benzoic acid and sorbic acid in yoghurt by HPLC. Annual Rep. Wakayama Prefectural Res. Center Environm. Publ. Hlth. 193–197 (No. 29) (1983), ref. *Dairy Sci. Abstr.* **49**, 613 (1987).
8. *Stijve, T. and Hischenhuber, C.*: High performance liquid chromatographic determination of low levels of benzoic acid and sorbic acid in yoghurts. *Deut. Lebensm. Rdsch.* **80**, 81–84 (1984).
9. *Puttemans, M. L., Branders, C., Dryon, L. and Massart, D. L.*: Extraction of organic acids by ion-pair formation with tri-n octylamine. Part 6. Determination of sorbic acid, benzoic acid and saccharin in yoghurt. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 80–82 (1985).

10. *Bui, L. V. and Cooper, C.*: Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 892–896 (1987).
11. Internationaler Milchwirtschaftsverband: Determination of benzoic and sorbic acid content. Provisional FIL/IDF Standard 139 (1987).
12. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 44, Methode 4.2. Dosage des acides sorbique, benzoïque, salicylique et des esters de l'acide p-hydroxybenzoïque par HPLC. Entwurf 1988.

U. Bütikofer, E. Baumann, Dr. J. O. Bosset
Sektion Chemie
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld-Bern