

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 70 (1979)

Heft: 1

Artikel: Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Autor: Hunziker, H.R. / Miserez, A.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983715>

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: 15.03.2025

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

Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

H. R. Hunziker und A. Miserez

Eidg. Gesundheitsamt, Bern

Einleitung

Schon seit 1933 existiert ein Patent von *Lendrich* (1), nach dem durch Dämpfen roher Kaffeebohnen ein bekömmlicher Kaffee hergestellt wird. Beim Kofrostverfahren (2) werden die Röstbohnen mit flüssigem CO₂ behandelt, um die Bekömmlichkeit des Kaffeegetränkes zu steigern. Die bessere Bekömmlichkeit des mit diesen Verfahren behandelten Kaffees wurde in bestimmten Fällen durch klinische Untersuchungen bestätigt (3). Analytisch ließ sich jedoch die Behandlung der Kaffeebohnen schwer nachweisen (4).

Neueste Untersuchungen von *Wurziger* (5) haben gezeigt, daß eine Wasserdampfbehandlung zu einer gut meßbaren Abnahme des Gehaltes an Kahweol, einem Diterpen im Unverseifbaren des Kaffeeöls, führt.

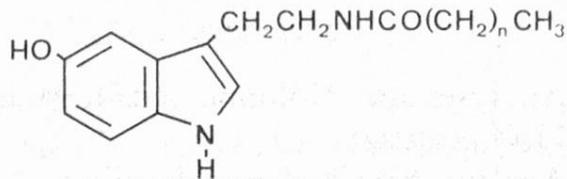
Heute scheinen die Veredlungsverfahren (6) eher darauf hinzuzielen, die in den Wachsauflagerungen befindlichen 5-Hydroxytryptamide (5-HT) zu entfernen. Analytisch lassen sich so behandelte Bohnen eindeutig charakterisieren. Klinische Untersuchungen zeigten auch bei diesem Kaffee eine bessere Bekömmlichkeit (7, 8).

Wie weit die bessere Verträglichkeit dieses Kaffees in erster Linie auf den geringeren 5-HT-Gehalt an sich zurückzuführen ist, wurde noch nicht eindeutig abgeklärt. *Wurziger* (9) stellte 1971 fest, daß 5-HT wasserunlöslich sind und somit bei der üblichen Kaffeezubereitung kaum in den Kaffeeaufguß gelangen. Neuere Untersuchungen (5) zeigen, daß injizierte Kaffeeöle von Tieren schlecht vertragen werden, was möglicherweise auf die hohen Kahweolgehalte zurückzuführen ist.

Bis heute wurde in der Schweiz die Anpreisung «reizarmer Kaffee» nur für Kaffee zugelassen, bei dem die bessere Bekömmlichkeit durch klinische Gutachten erbracht wurde.

Schon *Kaufmann* (10) untersuchte eingehend die Lipoid-Bestandteile des Kaffeegetränkes. *Wurziger* (11) fand unter anderem in der Außenauflagerung grüner

Kaffeebohnen eine dünn-schichtchromatographisch einheitliche Substanz, genannt Substanz I, die sich bei späteren Untersuchungen als Gemisch dreier isomerer 5-Hydroxytryptamide herausstellte:



- n = 18 Arachinsäurederivat
- n = 20 Behensäurederivat
- n = 22 Lignocerinsäurederivat

Die quantitative Bestimmung dieser Verbindungsklasse lieferte ebenfalls *Wurziger* (11). In verschiedenen Arbeiten wurde versucht, die ursprüngliche Bestimmungsmethode zu verbessern (*Hag* (12), *Bürgin* (13), *Culmsee* (14), *Hubert* (15)). Grundlage für alle Bestimmungsmethoden ist die Dünnschichtchromatographie (DC). Nach einer Vorreinigung des Kaffeewachsextraktes mittels Säulenchromatographie wird ein relativ großes Probevolumen (5 ml) aufgetragen (Zirkulartechnik). Die entwickelte DC-Platte wird mit Gibbs-Reagens (2,6-Dichlorchinonchlorimid) besprüht, die äußerste blaue Zone wird extrahiert und photometrisch bestimmt.

Allen diesen Methoden ist gemeinsam, daß die Bestimmung der 5-HT relativ zeitaufwendig ist. Zudem ist der blaue 5-HT-Gibbs-Reagens-Farbstoff nicht stabil, so daß sich Resultate verschiedener Laboratorien nur schwer vergleichen lassen.

In einer ersten Mitteilung (16) stellten wir eine 5-HT-Bestimmung mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie kurz vor. In dieser Arbeit soll eine erweiterte Anwendung dieser Methode dargelegt werden.

Experimenteller Teil

Methode

Die Trennung des komplexen Kaffeewachsextraktes wird mit Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) erreicht.

Die im ersten Artikel (16) publizierte Arbeitsvorschrift wurde wie folgt modifiziert:

an Stelle der 3maligen Extraktion am Rotationsverdampfer mit CHCl₃/C₂H₅OH (7 : 3 v/v) bei 40°C erfolgt die Extraktion der Wachsauflagerung im Soxhlet mit CHCl₃/CH₃OH (87 : 13 v/v).

Die Gehaltsbestimmung an 5-HT wird auf einer Spherisorb-Kieselgelsäule mit CHCl₃/CH₃OH als mobiler Phase ausgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgt über Peakhöhenvergleich mit einer Standarddeichkurve. Integration des 5-HT-Peaks führt bei einem k'-Wert von 2,6 zu größeren Standardabweichungen

(17). Die Homologe der 5-HT werden auf einer Spherisorb ODS-Kolonne mit $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (47 : 4 v/v) als mobiler Phase getrennt. Die Peakflächen werden durch Dreiecksmethode bestimmt.

Reagenzien

Chloroform	zur Analyse, über Kolonne destilliert und bei Raumtemperatur mit H_2O gesättigt
Methanol	zur Analyse, über Kolonne destilliert
H_2O	über Kolonne destilliert
Millipore Filter	FHLPO 1300 (Swinny-Filterhalter)

Geräte

Pumpe	Altex 110
UV-Vis-Detektor	Uvikon LC 725 (Kontron, Schweiz)
Einlaß-System	10 μl Probeschleife (HP-Valve)
Säulen	Spherisorb Kieselgel 5 μm , 3x250 mm (selbstgefüllt) Spherisorb ODS: Fertigsäule «reversed phase» 5 μm , 3x250 mm.

Säulenfüllung (18, 19, 20, 21)

Teilchen unter 20 μm müssen als Suspension («Slurry») gepackt werden. Bei der Wahl des Lösungsmittels muß auf eine gute Benetzbarkeit des Füllmaterials geachtet werden, um Klümpchenbildung zu vermeiden (22). Die Verwendung von Lösungsmitteln hoher Dichte (halogenierte Kohlenwasserstoffe), im englischen als «Balanced Density Method» bekannt, hat den Nachteil, daß das Lösungsmittel eventuell nicht ganz aus der Säule entfernt werden kann.

Wir verwenden statt dessen ein niedrig-viskoses polares Lösungsmittel, wie Methanol. Der Nachteil der schnelleren Sedimentation wird durch hohe Füllgeschwindigkeit und Füllen von unten nach oben praktisch ausgeschaltet: 3 g Spherisorb 5 μm werden in 35 ml Methanol aufgeschlämmt und geschüttelt (2—3 min), bis eine homogene Suspension erhalten wird. Nach einem Aufenthalt von 2 Minuten im Ultraschallbad wird die Suspension nochmals kräftig geschüttelt und in eine präparative Stahlsäule (50x1 cm) gegossen. Möglichst schnell wird die leere analytische Säule (3x250 mm) über ein ausgebohrtes Reduzierstück direkt auf die präparative Säule geschraubt und von unten Methanol mit einer Hochdruckpumpe bei maximaler Förderleistung (mindestens 10 ml/min ist notwendig) hineingepumpt. Schon nach 1 bis 2 Minuten sind 450 atm erreicht. Man läßt noch bei gleichem Druck ca. 100—150 ml CH_3OH durch die Säule passieren, stellt die Pumpe ab und trennt, bevor der Druck ganz auf 0 gesunken ist, die analytische Säule von der präparativen ab. Das Säulenfüllmaterial wird mit dem Säulenrand glattgestrichen, mit Fritte und Endfitting verschraubt und getestet.

Testen der Säule: die Säule wird mit CHCl_3 und anschließend mit der mobilen Phase iso-Oktan + 0,5% CH_3OH gespült. Als Testgemisch wird eine Mi-

sung von Toluol (t_0), Nitrobenzol, Acetophenon und Trinitrotoluol (TNT) verwendet. Bei einem Fluß von 1 ml/min sind Bodenzahlen von N_{tot} von 8000 bis 9000 und N_{eff} von 4500 berechnet für TNT keine Ausnahme.

Extraktion der Tryptamide

10 g ungemahlene* Kaffeebohnen werden mit 200 ml $CHCl_3/CH_3OH$ (87 : 13) eine Stunde am Soxhlet-Apparat extrahiert. Den Extrakt engt man am Rotationsverdampfer ein, löst den Extraktionsrückstand in der mobilen Phase und füllt mit dem gleichen Lösungsmittel auf 100 ml auf. Nach Filtration der Probe mittels Milipore-Filter wird ohne weitere Vorreinigung die Probe direkt auf die Säule aufgegeben.

HPLC-Trennung der gesamt 5-HT (16)

Chromatographie-Parameter

Säule	Spherisorb-Kieselgel 5 μ m; Kolonne 3x250 mm
Mobile Phase	$CHCl_3$ (H_2O gesättigt bei 22°C) + 1,4% v/v CH_3OH
Fluß	1,4 ml/min
Temperatur	22°C (thermostatisiert)
Einspritzmenge	10 μ l
Detektor	UV 278 nm E : 0,04

Bemerkungen

- Um Aenderungen der Retentionszeit möglichst zu verhindern, wurde eine größere Menge Lösungsmittel vorbereitet und die ganze Versuchsreihe mit der gleichen Lösungsmittelmischung durchgeführt.
- Um die Homogenität der Kaffeeproben zu prüfen, werden 10 g Kaffeebohnen abgewogen und die Bohnen gezählt.
- Die Dichte ganzer Kaffeebohnen wurde mit dem Pyknometer bestimmt. Mit Kenntnis der Dichte und der Bohnenzahl läßt sich die ungefähre Oberfläche der Bohnen abschätzen.
- Der Wassergehalt wurde nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch, Kapitel 35A/03 bestimmt.
- Für die 5-HT-Bestimmung wurden pro Kaffeeseite 2 bis 4 Muster (n) extrahiert; pro Extrakt wurden 3mal je 10 μ l eingespritzt. Die aufgeführten 5-HT-Gehalte sind Mittelwerte aus n Extrakten der gleichen Kaffeeseite.

Die Resultate sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Die ermittelten Gehalte an 5-HT weisen im Mittel einen Variationskoeffizient von $\pm 2,2\%$ auf. Auffallend ist, daß die beiden Robustakaffees die tiefsten 5-HT-Gehalte aufweisen. Der mittlere 5-HT-Gehalt der 14 verschiedenen Kaffeeseiten beträgt 747 ppm.

* Gemahlene Kaffeeproben bereiten bei der HPLC-Trennung Schwierigkeiten, da bei der Extraktion unter anderem ca. 10mal mehr Coffein extrahiert wird als bei ungemahlenden Bohnen, was zu einer schlechteren Trennung zwischen 5-HT und Coffein führt.

Tabelle 1. Gesamt-5-HT-Bestimmung

Kaffeesorte**	5-HT-Gehalt			Bohnenzahl/ 10 g n = 4	Dichte n = 2	H ₂ O- Gehalt %
	In ppm	n	Variations- koeffizient %			
Mocca Aethiopia	767	3	1,0	76,8 ± 1,7	1,30	7,8
Columbia Medellin	660	2	2,0	68,7 ± 1,5	1,36	6,8
Guatemala	1083	2	0,3	56,3 ± 0,6	1,33	6,5
Indien Malabar	778	3	4,1	61,0 ± 1,2	0,91*	7,0
Indonesien Mandheling	745	3	1,1	56,0 ± 1,2	1,32	8,6
Kenya	791	2	0	53,2 ± 1,3	1,34	7,9
Mexiko Maragogype	621	2	0,5	37,3 ± 1,0*	1,29	7,3
Salvador	1099	2	0,5	68,0 ± 2,8	1,32	7,5
Santos Bracafe	935	2	2,1	62,0 ± 1,0	1,29	7,1
Santos coffeinfrei	44*	2	2,1	85,7 ± 2,5	1,15	6,4
Sumatra (Robusta)	401	2	6,5	63,8 ± 2,2	1,27	8,7
Zaire (Robusta)	546	2	3,1	72,0 ± 3,6	1,26	7,3
Columbia roh	757	4	1,5	57,0 ± 2,2	1,33	9,7
Columbia geröstet	525	2	5,5	69,8 ± 1,0	0,67*	3,2*
Mittelwerte	747		2,2	65,4 ± 2,6	1,30	7,6

* Werte, die für die Mittelwertbildung nicht berücksichtigt wurden (Ausreißer)

** Ohne nähere Angabe handelt es sich um Rohkaffee des Jahres 1977

Homologe Tryptamide: Bestimmung der Mengenverhältnisse

Chromatographie-Parameter

Säule	Spherisorb ODS (Fertigsäule) 5 µm; Kolonne 3x250 mm
Mobile Phase	CH ₃ OH/H ₂ O 47 : 4 v/v
Fluß	1,2 ml/min
Temperatur	Raumtemperatur
Einspritzmenge	10 µl (3 Spritzungen pro Muster)
Detektor	UV 278 nm

Bemerkungen

- Für die Bestimmung der Mengenverhältnisse der drei Homologe wird der filtrierte Kaffee-Extrakt gleich wie im ersten Artikel (16) auf die «reversed-phase» Säule aufgegeben.
- Die Peakflächen der 3 Homologe werden durch die Dreieck-Methode bestimmt.
- 4 parallel untersuchte Kaffeemuster (Indien Malabar) zeigten relativ geringe Standardabweichungen (siehe Tabelle 2.1), so daß die folgenden Untersuchungen auf ein Extraktmuster beschränkt wurden (Tabellen 2.1, 2.2, 2.3, 2.4).

Tabellen 2

Tabelle 2.1: Mengenverhältnisse der 5-HT-Homologe

Kaffeessorte* (Jahrgang 1977)	% Arachin-säure-HT	% Behen-säure-HT	% Lignocerin-säure-HT
Indien Malabar (n = 4)	33,5 ± 1,4	58,7 ± 1,6	7,7 ± 0,3
Aethiopia Mocca	23,7	65,7	10,6
Columbia Medellin	39,1	51,0	10,0
Guatemala E. P. (washed)	34,1	55,8	10,1
Indonesia	29,1	61,9	9,0
Kenya	28,1	61,5	10,4
Mexiko Maragogype	25,2	56,1	18,7
Santos Bracafe	22,5	68,9	9,1
Salvador (washed)	25,1	65,2	9,6
Sumatra Robusta	38,9	49,0	12,0
Zaire Robusta	39,9	49,3	10,8

Tabelle 2.2: Einfluß des Alters des Kaffees auf die Mengenverhältnisse der 5-HT-Homologe

Kaffeessorte*	Jahrgang	% Arachin-säure-HT	% Behen-säure-HT	% Lignocerin-säure-HT
Indien Malabar	1977	33,5	58,7	7,7
	1972	32,3	60,2	7,5
Santos	1977	22,5	68,9	9,1
	1972	23,1	67,7	9,1

* Rohkaffeemuster

Tabelle 2.3: Einfluß der Röstung auf die Mengenverhältnisse der 5-HT-Homologe

Kaffeessorte	Röstgrad	% Arachin-säure-HT	% Behen-säure-HT	% Lignocerin-säure-HT
Columbia	roh	32,3	60,4	7,4
	geröstet	27,4	33,3	39,3
Robusta	roh	35,4	49,9	14,7
	hell	37,4	51,0	11,7
	dunkel	32,4	55,2	12,3
Arabica	roh	31,4	59,3	9,3
	hell	29,4	54,8	15,9
	dunkel	32,6	49,4	18,0

Tabelle 2.4: Vergleich der Mengenverhältnisse der 5-HT-Homologe zwischen rohem Robusta- und Arabica-Kaffee

Kaffeeart	Untersuchte Muster	% Arachin-säure-HT	% Behen-säure-HT	% Lignocerin-säure-HT
Arabica	15	31,3 ± 5,7	58,1 ± 6,2	10,7 ± 2,8
Robusta	3	38,1 ± 2,4	49,4 ± 0,5	12,5 ± 2,0

Diskussion

Gesamt-5-HT-Bestimmung

Die Extraktion der 5-HT wurde mit ganzen Kaffeebohnen ausgeführt. Mahlen des Kaffees hat zur Folge, daß größere Mengen an Kaffeeinhaltsstoffen extrahiert werden, die eine Trennung erschweren. Insbesondere liegt Coffein in einer 10fach höheren Konzentration im Extrakt eines gemahlten Kaffees vor. Gemahlener Kaffee ergibt sicher ein homogeneres Probegut. Da sich aber andererseits die Hydroxytryptamide vor allem in den äußeren Wachsauflagerungen der Kaffeebohnen befinden und die Bohnenzahl pro 10 g Einwaage im Mittel nur um 2,6 % streut, ist eine Extraktion der ganzen Kaffeebohnen zweckmäßig.

Die Extraktion mittels Soxhlet (an Stelle der 3maligen am Rotovapor) ist weniger arbeitsintensiv und für Serienuntersuchungen bestens geeignet. Als Lösungsmittel wurde ein azeotrop destillierendes Lösungsmittelgemisch ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$: 87/13 v/v, Siedepunkt $53,5^\circ\text{C}$) gewählt. Stabilitätsuntersuchungen mit 20 mg Standardtryptamiden ergaben, daß innerhalb 3 Stunden Extraktionszeit die zugesetzte Tryptamidmenge nicht meßbar verringert wurde. Nach Vorliegen der Extraktlösung ist eine 5-HT-Bestimmung in 10 bis 15 Minuten abgeschlossen. Auf der selbstgefüllten Kieselsäule wurden rund 1500 Einspritzungen von Kaffeewachsextrakten vorgenommen. Leider konnte für das System kein geeigneter interner Standard gefunden werden. Es ist möglich, durch Änderung der mobilen Phase (siehe Abb. 1) einen geeigneten internen Standard zu finden. Mit diesem Lösungsmittelgemisch treten jedoch Korrosionsprobleme auf (vermutlich durch die Kombination $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CH}_3\text{COOH}$).

Wurziger (23) beobachtete, daß Robustakaffees unabhängig von ihrer Herkunft sehr viel mehr Silberhäutchen auf den Bohnenoberflächen besitzen und damit unter üblichen Extraktionsbedingungen sich die 5-HT nur unvollkommen von der Bohnenoberfläche ablösen, was möglicherweise der Grund ist für die gefundenen niedrigen 5-HT-Gehalte.

Wurziger hat 1969 (11) festgestellt, daß sich die 5-HT vor allem in den Wachsablagerungen der Bohnenoberfläche befinden. Es taucht unweigerlich die Frage auf, ob die Menge des 5-HT in einem Zusammenhang steht mit der Größe der Bohnenoberfläche. Wird die Kaffeebohne idealisiert als Halbkugel betrachtet, läßt sich eine Abschätzung der gesamten Bohnenoberfläche machen.

Es ist dann Volumen einer Bohne: $\frac{1}{2} V_{\text{Kugel}} = \frac{2}{3} \pi r^3$

Oberfläche einer Bohne: $\frac{1}{2} O_{\text{Kugel}} + \pi r^2 = 3 \pi r^2$

oder für Z Bohnen $O_{\text{tot}} = Z \cdot 3 \pi r^2$

Andersteils läßt sich das Volumen aus eingesetzter Masse und Dichte berechnen

$$V_{\text{tot}} = \frac{M}{d} = Z \cdot \frac{2}{3} \pi r^3$$

und die Gesamtoberfläche der eingesetzten Bohnen ist dann

$$O_{\text{tot}} = Z \cdot 3\pi \left(\frac{M \cdot 3}{d \cdot Z \cdot 2\pi} \right)^{2/3}$$

daraus folgt

$$O_{\text{tot}} = C \cdot Z^{1/3}$$

r = Radius der Kugel

V = Volumen

O = Oberfläche

M = Maße der Bohnen: 10 g

d = Dichte der Bohnen: 1,30 g/cm³

Z = Anzahl Bohnen pro 10 g

C = 22,4 berechnet aus M, d, Z

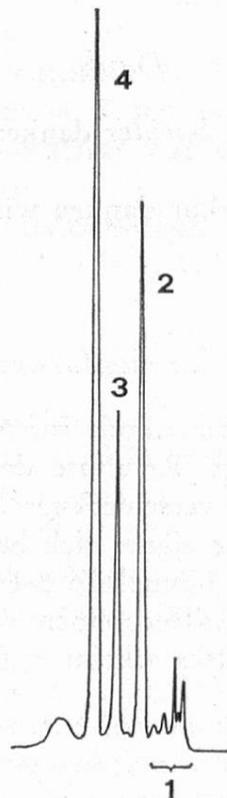


Abb. 1. Kolonne: Spherisorb Kieselgel 5 μm , 3x250 mm

Mobile Phase: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$: 200/4/5 v/v

Fluß: 1 ml/min

1 = Fett

2 = 5-HT-Tryptamide

3 = interner Standard (Sulfanilamid)

4 = Coffein

Betrachtet man die erhaltenen Resultate der 5-HT-Bestimmung mit der Schlußformel, so ist nicht feststellbar, daß die 5-HT-Gehalte proportional der 3. Wurzel der Bohnenzahl variieren. Die Größe der Bohne bzw. deren Oberfläche scheint kein Kriterium für die 5-HT-Gehalte zu sein, sondern eher Provenienz, Pflanzenart und Erntejahr.

Bestimmung der Mengenverhältnisse der Homologe

Die 5-HT grüner Kaffeebohnen setzen sich im allgemeinen relativ konstant zusammen, z. B. streut der Behensäure-5-HT-Anteil im Gesamt-5-HT-Gehalt der 11 untersuchten Rohkaffees um ca. $\pm 12\%$ (Tabelle 2.1).

Das Alter des untersuchten Kaffees scheint auf die Mengenverhältnisse der Homologe keinen Einfluß zu haben (Tabelle 2.2.)

Beim Rösten von Arabica-Kaffee steigt der Lignocerinsäure-5-HT-Anteil an; derjenige des Behensäure-5-HT nimmt ab. *Wurziger* (11) fand, daß beim Rösten der 5-HT-Gehalt abnimmt. Aus diesen Befunden könnte gefolgert werden, daß Behensäure-5-HT stärker abgebaut wird als die beiden anderen 5-HT (Tabelle 2.3).

Die untersuchten Robustakaffees weisen einen höheren Anteil an Arachinsäure-5-HT auf. Ob dies eine allgemeine Eigenschaft der Robustakaffees ist, läßt sich aus der geringen Zahl der untersuchten Kaffeemuster nicht eindeutig schließen (Tabelle 2.4).

Dank

Frau *K. Völgyi* und Fräulein *R. Schneider* danken wir für die Mithilfe bei den praktischen Arbeiten.

Den Firmen *Blaser*, *Haco* und *Merkur* danken wir an dieser Stelle bestens für die uns zur Verfügung gestellten Kaffeemuster.

Zusammenfassung

Die früher publizierte Bestimmungsmethode für 5-Hydroxytryptamide (5-HT) wurde überprüft und geringfügig modifiziert. Resultate der HPLC-Bestimmung von 5-HT in grünen und gerösteten Kaffeebohnen verschiedener Sorten, Provenienz und Alters werden diskutiert. Diese schnelle Methode eignet sich bestens für Serienuntersuchungen. Die Standardabweichung beträgt 2—3%. Homologe 5-HT lassen sich auf «reversed phase» Säulen trennen. Die 5-HT grüner Kaffeebohnen setzen sich relativ konstant zusammen. Das Alter der untersuchten Kaffees scheint auf die Mengenverhältnisse der 5-HT-Homologe keinen Einfluß zu haben.

Résumé

La méthode de dosage des 5-hydroxytryptamides (5-HT) déjà publiée a été revue et légèrement modifiée. Les résultats des dosages par HPLC des 5-HT de cafés verts et torréfiés de sortes et de provenances diverses sont discutés. Cette méthode rapide convient particulièrement pour des dosages en série. L'écart type est de 2 à 3%. Les homo-

logues des 5-HT peuvent être séparés sur une colonne à phase renversée («reversed phase»). La durée de stockage des cafés semble n'avoir aucune influence sur les proportions des homologues des 5-HT.

Summary

The earlier published method for the determination of 5-hydroxytryptamides (5-HT) has been re-examined and slightly modified. Results of the HPLC-determination of 5-HT in green and roasted coffee-beans of different types, provenience and age are discussed. This fast method is best suitable for determinations in series. The standard deviation is 2 to 3%.

Homologous 5-HT are separable on reversed-phase columns. The 5-HT in green coffee-beans are relatively constant in their composition. The age of the tested coffee has apparently no effect on the proportion of the 5-HT.

Literatur

1. *Lendrich, O.*: Patentschrift Nr. 576515, Klasse 53d, Gruppe 202, ausgegeben am 16. 5. 1933.
2. *Bach, H.*: Verfahren zur Aromaverbesserung und Stabilisierung von ungemahlenem Röstkaffee. Deut. Patent Nr. 1 009 006 (1957).
3. *Sziegoleit, W.* und *Förster, W.*: Klinisch-pharmakologischer Doppelblindversuch mit unterschiedlichen Röstkaffeesorten
 - a) bei berufstätigen Probanden. *Pharmazie* **27**, 768—772 (1972)
 - b) bei gastroenterologischen Patienten. *Z. inn. Med.* **27**, 490—492 (1972).*Stieve, F. E.*: Die Wirkung des Kaffees auf den Magen-Darmtrakt aus klinischer Sicht. *Heilkunst* **78**, 55—61 (1965).
4. *Werner, H.* und *Kohley, M.*: Untersuchungen über den Säuregehalt von Roh- und Röstkaffee verschiedener Herkunft. *Kaffee-, Tee-Markt* **15**, 5 ff. (1965).
Diemair, W. und *Jury, E.*: Ueber das 5-Hydroxymethylfurfurol und seine Rolle bei der nicht-enzymatischen Bräunung. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **127**, 249—262 (1965).
5. *Wurziger, J.*: Diterpene in Kaffeeölen zur Beurteilung von Rohkaffee nach Art und Bearbeitung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **79**, 334—339 (1977).
6. *Kurz, G.* und *Wahland, O. H.*: Verfahren zur Herstellung eines an Reizstoffen armen Rohkaffees. Deut. Patent Nr. 1 960 694 (1971).
7. *Frommolt, A.*, *Niedobilek, F.* und *Schmied, E.*: Ueber den Einfluß von Bohnenkaffee und Koffein auf die Heilung des Stressulkus der Ratte. *Z. Gastroenterologie* **10**, 107—113, (1972).
8. *Rösner, P.*, *Kühn, U.* und *Keiner, F.*: Der Einfluß von behandeltem und unbehandeltem Kaffee auf die Magensäuresekretion. *Med. Klinik* **66**, 238—242 (1971).
9. *Wurziger, J.*: Neuentdeckte Kaffee-Inhaltsstoffe. Ihre Bedeutung für die Bekömmlichkeit von Kaffeegetränken. *Med. Heute* **22**, 10—13 (1971).
10. *Kaufmann, H. P.* und *Schickel, R.*: Zur Kenntnis der Lipide der Kaffeebohnen. V. Die Lipid-Bestandteile des Kaffee-Getränkes. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **67**, 115—120 (1965).
11. *Wurziger, J.* und *Harms, U.*: Beiträge zum Genußwert und zur Bekömmlichkeit von Röstkaffee. *Kaffee- und Tee-Markt* **19**, 6 ff. (1969).

- Wurziger, J.*: Les éléments constitutifs nouveaux récemment découverts dans le café et leur importance pour l'appréciation des infusions de café. *Ann. fals. exp. chim.* **66**, 1—18 (1973).
12. Hag AG, Bremen: Private Mitteilung (1973).
 13. *Kummer, P.* und *Bürgin, E.*: Neue Erkenntnisse zur quantitativen Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxytryptamide in Kaffee. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **67**, 212—225 (1976).
 14. *Culmsee, O.*: Methode zur quantitativen Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxytryptamide in Kaffee. *Deut. Lebensm. Rundschau* **71**, 425—427 (1975).
 15. *Hubert, P.*, *Kwasny, H.*, *Werkhoff, P.* und *Turner, U.*: Analytik von Carbonsäurehydroxytryptamiden in Kaffee. *Z. anal. Chem.* **285**, 242—250 (1977).
 16. *Hunziker, H. R.* und *Miserez, A.*: Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **68**, 267—274 (1977).
 17. *Scott, R. P. W.* and *Reese, C. E.*: Precision of contemporary liquid chromatographic measurements. *J. Chromatog.* **138**, 283—307 (1977).
 18. Spectra-Physics: How to pack liquid chromatography columns. Technical Bulletin.
 19. *Linder, H. R.*, *Keller, H. P.* and *Frei, R. W.*: A new slurrypacking technique for columns in high-speed liquid chromatography. *J. Chromatog. Sci.* **14**, 234—239 (1976).
 20. Comtronix, Horgen: HPLC-Säulenfüllkurs-Manual (1977).
 21. *Majors, R. E.*: Review of high performance liquid chromatography. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 186—205 (1977).
 22. *Jones, A. D.*: Preparation, optimisation and slurry packing of an aminobonded phase for the analysis of sugars in food by HPLC. *J. Chromatog.* **144**, 169—180 (1977).
 23. *Wurziger, J.*: Ueber Kaffeeöle zur Beurteilung von grünen und gerösteten Kaffeebohnen. *Fette Seifen, Anstrichmittel* **78**, 172—176 (1976).

Dr. H. R. Hunziker
 Dr. A. Miserez
 Eidg. Gesundheitsamt
 Abteilung Lebensmittelkontrolle
 Haslerstraße 16
 CH-3008 Bern

Zum Wirkungsmechanismus des Saccharoseanstiegs in bestrahlten Kartoffeln

II. Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Saccharosegehaltes und der Saccharosesynthetaseaktivität nach Gammabestrahlung

D. P. Becker, M. Meier und J. C. Somogyi

Institut für Ernährungsforschung, Rüslikon-Zürich

Aus unseren vorhergehenden Arbeiten (1, 2) geht hervor, daß die Behandlung von Kartoffelknollen mit Gammastrahlen (10 krad) sowohl eine wesentliche Erhöhung des Saccharosegehaltes als auch eine ausgeprägte Steigerung der Phosphorylaseaktivität zur Folge hat. Der Anstieg der Aktivität der Phosphorylase — desjenigen Enzyms, das die Reservestärke in der Knolle abbaut — erfolgte in den meisten Fällen zeitlich parallel mit der Saccharosezunahme. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Bausteine für die Saccharosesynthese primär durch die Phosphorylase bereitgestellt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Näheres über den biochemischen Mechanismus der durch die Bestrahlung ausgelösten Saccharosebildung selbst zu erfahren. Hierzu schien es uns wichtig, die Wirkung der Bestrahlung auf die am Saccharosestoffwechsel unmittelbar beteiligten Enzyme, nämlich Saccharosesynthetase und Saccharosephosphatsynthetase, zu untersuchen (3, 4). Da mit der von uns angewandten Methode lediglich die Aktivität der Saccharosesynthetase gut meßbar war, soll in dieser Arbeit vorerst nur über die Ergebnisse der Saccharosesynthetaseuntersuchung berichtet werden (Näheres s. Diskussion).

Ein weiterer Aspekt dieser Versuche war, die Frage abzuklären, ob die Saccharosezunahme nach der Gammabestrahlung tatsächlich enzymatisch bedingt ist und nicht etwa durch einen Strahlungseffekt, z. B. infolge Radikalbildung hervorgerufen wird.

Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten folgende Kartoffelsorten: Bintje, Maritta, Désirée (alle Ernte 1976), Ostara (Ernte 1976 und 1977) sowie Sieglinde (Ernte 1977 und 1978).

Die Bestrahlung, Lagerung und Aufarbeitung der Kartoffelknollen erfolgte in der gleichen Weise wie in der vorhergehenden Arbeit (2) beschrieben. Als Enzympräparat für die Bestimmung der Saccharosesynthetaseaktivität wurde diejenige

Proteinfraktion, die zwischen 30—35% Sättigung mit Ammoniumsulfat aus dem Homogenat ausgefällt wurde, verwendet. Sie enthält nach *de Fekete* (3) den Hauptanteil der Saccharosesynthetase.

Bestimmung der Saccharosesynthetase (UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase (E. C. 2. 4. 1. 13))

Der Ansatz enthielt nach *Pavlinova* und *Prasolova* (5)

0,02 ml MgSO₄ (0,9 m)

0,1 ml NaF (0,1 m) in Tris-Puffer (0,2 m, pH 7,5)

0,02 ml Fructose (0,2 m)

0,02 ml UDPG (0,05 m)

0,2 ml Enzymlösung (in 0,05 m Citratpuffer, pH 6,1 aufgenommenes Ammoniumsulfat-Präzipitat entspricht 3—5 mg Protein)

Beim Ansatz der Kontrollen wurde kein UDPG zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Kochen (10') abgestoppt. Die nicht umgesetzte Fructose wurde durch Zugabe von 1,0 ml NaOH (0,5 n) und anschließendes Kochen zerstört. Die freigesetzte Saccharose wurde nach *Roe* (6) und der Proteingehalt nach *Lowry* (7) bestimmt. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in μ mol freigesetzter Saccharose pro g Protein.

Ergebnisse

Einfluß der Bestrahlung auf die Aktivität der Saccharosesynthetase

Die Ergebnisse der Saccharosesynthetaseuntersuchungen (insgesamt 14 Versuche) sind in Abbildung 1 zusammengefaßt. Wie aus dieser hervorgeht, führt auch bei der Saccharosesynthetase — ähnlich wie bei unseren Phosphorylaseversuchen — die Behandlung der Kartoffelknollen mit Gammastrahlen zu einer

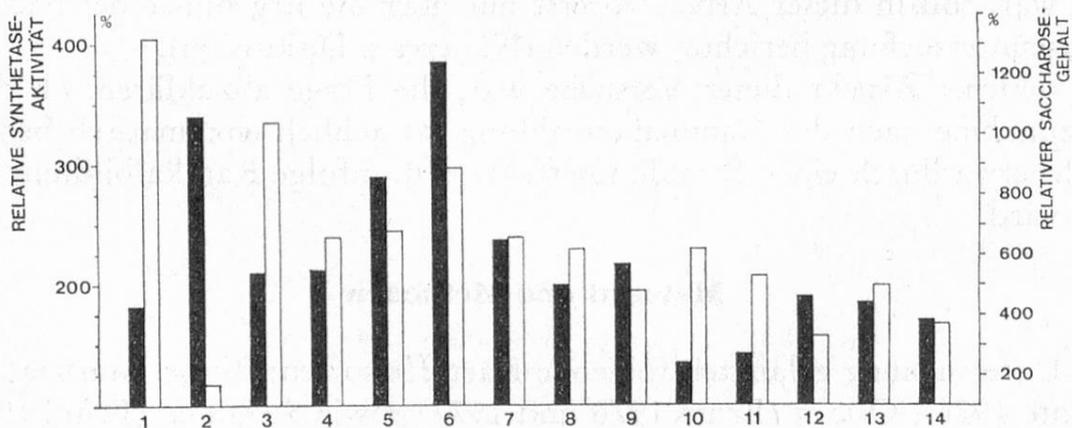


Abb. 1. Maximaler Anstieg der Enzymaktivität der Saccharosesynthetase und maximaler Saccharosegehalt nach der Behandlung mit Gammastrahlen (10 krad) von Kartoffeln (versch. Sorten), bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen = 100%

■ Saccharosesynthetase

□ Saccharose

Steigerung der Enzymaktivität. Die höchsten Aktivitätszunahmen wurden bei den Sorten Maritta (385%) und Bintje (340%) festgestellt.

Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Anstiegs der Saccharosesynthetaseaktivität und der zugehörigen Saccharosezunahme ergab sich innerhalb der einzelnen Versuche kein einheitliches Bild. Eine enge Parallelität wie in Abbildung 2 dargestellt, wurde in sechs Fällen beobachtet.

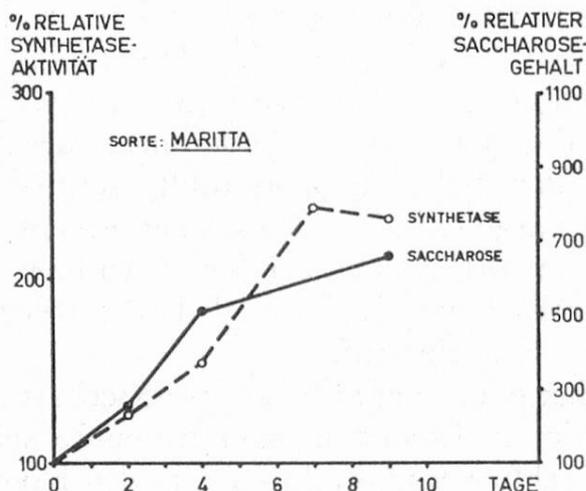


Abb. 2. Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Anstiegs der Enzymaktivität der Saccharosesynthetase und der Zunahme des Saccharosegehaltes nach Bestrahlung (10 krad) bei der Sorte Maritta, bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen = 100%

○ Saccharosesynthetase ● Saccharose

Meist zeigte sich zunächst in den ersten 4—9 Tagen ein paralleler Anstieg; im späteren Verlauf divergierten aber beide Kurven. Dabei kommt es oft zu einem Abfall der Enzymaktivität, während der Zucker noch weiter ansteigt (Abb. 3).

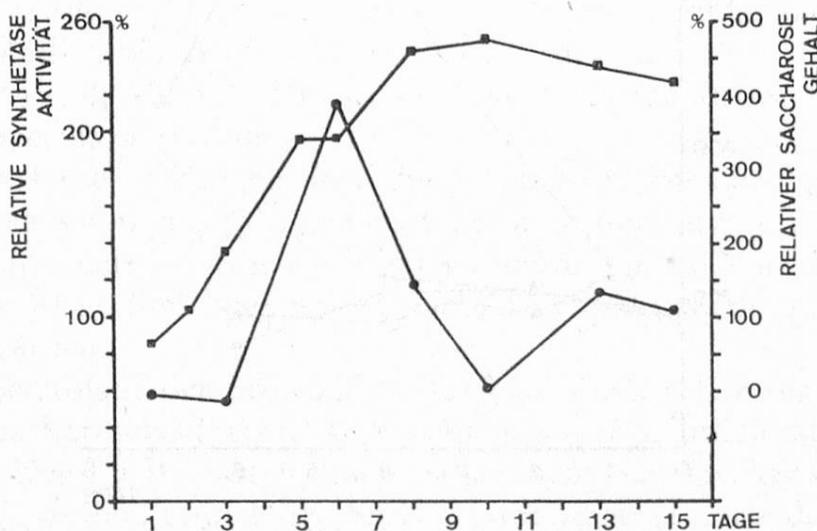


Abb. 3. Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Anstiegs der Enzymaktivität der Saccharosesynthetase und der Zunahme des Saccharosegehaltes nach Bestrahlung (10 krad) bei der Sorte Ostara, bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen = 100%

● Saccharosesynthetase ■ Saccharose

Bei fast allen Versuchen erfolgte unmittelbar nach der Bestrahlung zunächst ein Absinken der Saccharosesynthetaseaktivität unter den Wert der Kontrolle.

Einfluß der Bestrahlung auf den Saccharosegehalt von hitzebehandelten Kartoffeln

Mit diesen Versuchen sollte abgeklärt werden, inwieweit der Saccharoseanstieg nach Gammabestrahlung ausschließlich durch eine Erhöhung von Enzymaktivitäten hervorgerufen wird, oder ob noch andere Strahlungseffekte, wie z. B. Radikalbildung, eine zusätzliche Rolle spielen. Hierzu wurden die Kartoffeln vor der Bestrahlung 18 Minuten mit 1 Atü Druck gekocht, um die Enzyme zu inaktivieren. Dann wurden die zeitlichen Veränderungen des Saccharosegehalts über 7 Tage mit den Kontrollen (gekocht, unbestrahlt) verglichen. Ein typischer Versuch ist in Abbildung 4 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, erfolgte weder bei den gekochten, bestrahlten Kartoffeln noch bei den rohen bzw. gekochten, unbestrahlten Kontrollen ein Saccharoseanstieg. Lediglich die rohen, bestrahlten Knollen wiesen den üblichen Zuckeranstieg auf.

In weiteren Versuchen wurde parallel zu der Saccharose auch die Saccharosesynthetaseaktivität bestimmt. Erwartungsgemäß konnte keine Aktivität weder in den gekochten und bestrahlten Kartoffeln noch in den Kontrollen (gekocht, unbestrahlt) nachgewiesen werden.

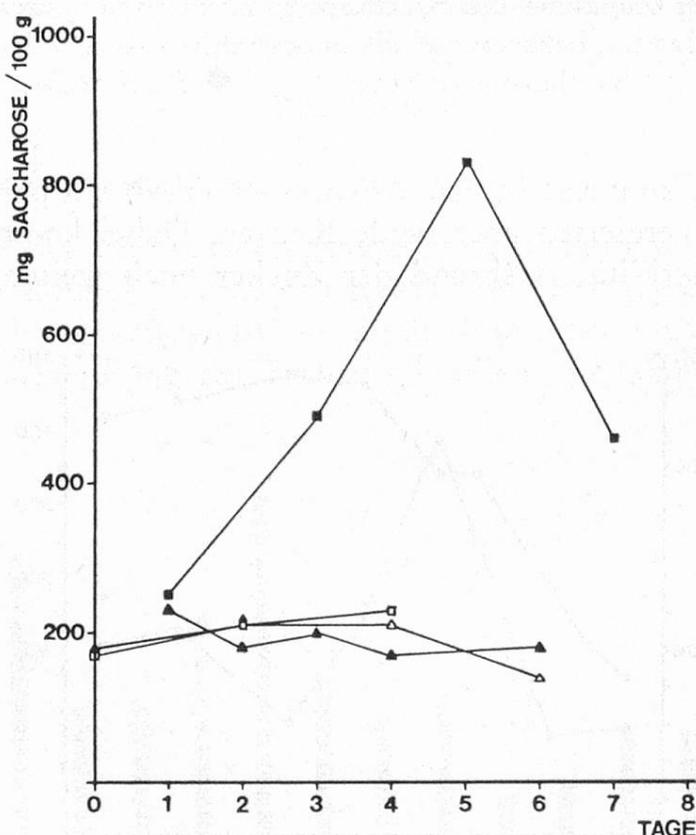


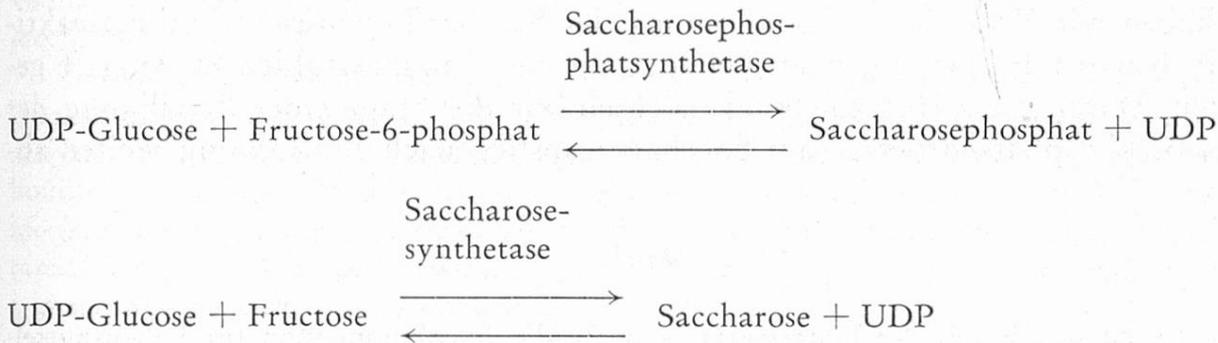
Abb. 4. Veränderung des Saccharosegehaltes in rohen, gekochten und bestrahlten Kartoffeln. Sorte: Ostara

- | | |
|--------------------|------------------------|
| □ Roh, unbehandelt | △ Gekocht, unbehandelt |
| ■ Roh, bestrahlt | ▲ Gekocht, bestrahlt |

Diskussion

Bei den Untersuchungen über den Mechanismus der Saccharosezunahme in Kartoffeln infolge Bestrahlung schien es uns wichtig abzuklären, ob dieser Zuckeranstieg auf enzymatischen Vorgängen basiert oder Sekundärfolge anderer Strahlungseffekte ist. Die vorliegenden Befunde, daß in Kartoffeln, die vor der Bestrahlung gekocht wurden, kein Saccharoseanstieg stattfand, zeigen eindeutig, daß hierzu intakte Enzyme erforderlich sind. Somit kann eine enzymatische Saccharosebildung als gesichert angesehen werden.

Von den an der Saccharosesynthese in Pflanzen beteiligten Enzymen interessierten uns primär die Saccharosesynthetase (E. C. 2. 4. 1. 13.) und die Saccharosephosphatsynthetase (E. C. 2. 4. 1. 14). Diese Enzyme katalysieren folgende Reaktionen:



Beide Reaktionen sind reversibel (8).

Das Gleichgewicht der durch die Saccharosephosphatsynthetase katalysierten Reaktion liegt fast ganz auf der rechten Seite (9). Demnach dürfte die in vivo-Synthese der Saccharose in der Hauptsache durch die Saccharosephosphatsynthetase erfolgen (8). Die Saccharosesynthetase katalysiert nach *Vieweg* (8) sowohl die Synthese als auch den Abbau der Saccharose. Nach Meinung mehrerer Autoren dient sie vornehmlich zur Bereitstellung der Glucosylnukleotide für nachfolgende Syntheseschritte (3, 4, 10, 11). Die wesentliche Funktion dieses Enzymes besteht danach in der Saccharosespaltung.

Aus unseren Untersuchungen über die Saccharosesynthetase geht hervor, daß die Aktivität dieses Enzyms infolge Gammabestrahlung ansteigt. Nach der Phosphorylase konnte somit bei einem weiteren Enzym, das zudem noch unmittelbar am Saccharosestoffwechsel beteiligt ist, ein Aktivitätszuwachs nach Bestrahlung nachgewiesen werden.

Der zeitliche Ablauf der Enzymaktivität und des Saccharoseanstiegs korrelieren bei der Saccharosesynthetase allerdings weniger deutlich als im Falle der Phosphorylase. Der Zuckeranstieg kann daher nicht der Saccharosesynthetase allein zugeordnet werden, zumal der Saccharosesynthetase nach den Angaben der Literatur mehr eine Abbaufunktion zugeschrieben wird.

In dieser Hinsicht wäre es aufschlußreich, Näheres über die Rolle der Saccharosephosphatsynthetase beim Saccharoseanstieg in bestrahlten Kartoffeln in Erfahrung zu bringen.

Während in vielen Saccharose metabolisierenden Geweben, einschließlich Kartoffelknollen (12, 13) Saccharosesynthetase und Saccharosephosphatsynthetase nebeneinander nachgewiesen wurden, konnten wir weder bei bestrahlten Kartoffeln noch bei unbehandelten Kontrollen eine Saccharosephosphatsynthetaseaktivität in unseren Enzympräparaten messen. *Vieweg* (8) berichtet beispielsweise über Aktivitätsverluste der Saccharosephosphatsynthetase von 75% während der Aufarbeitung von Enzympräparaten (ähnlich der unsrigen) gegenüber Enzymbestimmungen in Gewebeschnitten bei den Wurzeln von Tomaten. Diese Verluste beruhen sehr wahrscheinlich auf der Wirkung der — auch in Kartoffeln (2) — sehr aktiven Polyphenoloxidasen, deren Produkte die Aktivität der Saccharosephosphatsynthetase offenbar stark hemmen (vgl. 14). Dieser Effekt dürfte auch unseren negativen Befunden zugrunde liegen.

Da das Arbeiten mit Gewebeschnitten sich nach *Vieweg* (8) als günstiger erwies, haben wir Versuche zur Bestimmung der Saccharosephosphatsynthetaseaktivität in Kartoffeln vor und nach Behandlung mit Gammastrahlen in Angriff genommen. Durch diese Untersuchung möchten wir die Frage einer Beteiligung der Saccharosephosphatsynthetase am Saccharoseanstieg nach Bestrahlung weiter abklären.

Dank

Die Arbeit wurde mit der Unterstützung der Eidg. Fachkommission für Lebensmittelbestrahlung und des Eidg. Gesundheitsamtes durchgeführt, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

Herrn Direktor Prof. Dr. *R. Fritzsche* und Herrn Dipl. Ing.-Agr. ETH *H. J. Zehnder*, Eidg. Forschungsanstalt, Wädenswil, möchten wir für die Durchführung der Bestrahlungen bestens danken.

Für die Ueberlassung einiger Enzympräparate danken wir der Firma Boehringer, Mannheim.

Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung der Behandlung der Kartoffeln mit Gammastrahlen (Dosis: 10 krad) auf den Saccharosegehalt und die Saccharosesynthetase-Aktivität untersucht. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Aktivität der Saccharosesynthetase und der Saccharosegehalt der Knollen durch die Bestrahlung wesentlich ansteigt. Die höchsten Aktivitätszunahmen wurden bei den Sorten Maritta (385%) und Bintje (340%) festgestellt. Eine enge Parallelität zwischen dem zeitlichen Ablauf der Zunahme der Enzymaktivität und des Saccharosegehaltes wurde nur in Einzelfällen beobachtet. Der strahleninduzierte Saccharoseanstieg kann somit nicht der Saccharosesynthetase allein zugeschrieben werden. Darauf weist auch unsere vorhergehende Arbeit hin, aus welcher u. a. hervorgeht, daß sich durch die Gammabestrahlung auch die Phosphorylaseaktivität und der Saccharosegehalt parallel erhöht.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen im weiteren, daß der Saccharoseanstieg nach Gammabestrahlung ausschließlich durch eine Erhöhung der Enzymaktivitäten hervorgerufen wird. Werden die Enzyme nämlich vor der Bestrahlung durch Hitze (Kochen der Kartoffeln während 18 min mit 1 Atü Druck) inaktiviert, so erfolgt kein Saccharoseanstieg und es konnte auch keine Saccharosesynthetase-Aktivität nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang wird auf die möglicherweise wichtige Rolle der Saccharose-phosphatsynthetase hingewiesen.

Résumé

L'effet de l'irradiation des pommes de terre par les rayons gamma (dose: 10 krad) quant à leur teneur en saccharose et l'activité de la saccharosesynthétase a été examiné. Il résulte de ces essais que l'irradiation provoque une augmentation sensible de la teneur en saccharose et de l'activité de la saccharosesynthétase. Les plus fortes augmentations de cette activité ont été constatées pour les variétés Maritta (385%) et Bintje (340%). Un parallélisme étroit entre l'activité enzymatique et la teneur en saccharose n'a pu être établi que dans des cas isolés. On ne peut donc attribuer l'augmentation en saccharose provoquée par l'irradiation à la seule saccharosesynthétase. Cela ressortait d'ailleurs aussi de notre précédent travail qui démontrait que l'irradiation par les rayons gamma provoquait une augmentation parallèle de l'activité de la phosphorylase et de la teneur en saccharose.

Toutefois, les présentes recherches prouvent que l'augmentation de la teneur en saccharose après irradiation par les rayons gamma est due exclusivement à une plus grande activité enzymatique. Si l'on prend soin d'inactiver les enzymes avant l'irradiation (faire bouillir les pommes de terre pendant 18 minutes sous pression de 1 atu), la teneur en saccharose n'augmente pas; en outre, on ne constate aucune activité de saccharosesynthétase. En rapport avec ces constatations, on relève le rôle important qui pourrait revenir à la saccharosesynthétase phosphorique.

Summary

The effect of the treatment of potatoes with gamma rays (dosage: 10 krad) on the sucrose content and the activity of sucrose synthetase has been investigated. Our previous findings on the rise of sucrose were confirmed. Irradiation with gamma rays causes an increase in the sucrose synthetase activity. The highest increment was observed at the variety Maritta (385%) and Bintje (340%). A close relationship between the course of the rise of enzyme activity and of the sucrose content was not established in all cases. Consequently the sucrose elevation caused by gamma irradiation cannot be attributed to sucrose synthetase alone. This follows from our previous paper too, which indicates that also between the rise of the sucrose content of the potatoes and of phosphorylase activity a time dependent relationship exists.

Our present experiments show further that the sucrose increase after gamma irradiation of potatoes is exclusively due to the rise of the activity of enzymes. After inactivation of the enzymes by heat (boiling the potatoes during 18 minutes, at 1 atm. excess pressure) no elevation of sucrose synthetase activity and the sucrose content could be observed.

Finally the possible important role of sucrose phosphate synthetase in the carbohydrate metabolism of potatoes is discussed.

Literatur

1. Somogyi, J. C., Kopp, P. und Trautner, K.: Der Einfluß ionisierender Strahlen und chemischer Keimhemmungsmittel auf Keimung, Zuckergehalt und Verarbeitungsqualität von Kartoffeln. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 117—140 (1975).

2. *Becker, D. P. und Somogyi, J. C.*: Zum Wirkungsmechanismus des Saccharoseanstiegs in bestrahlten Kartoffeln. I. Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Saccharosegehaltes und der Phosphorylaseaktivität nach Gammabestrahlung. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **68**, 409—418 (1977).
3. *Fekete, M. A. R. de*: Zum Stoffwechsel der Stärke. Planta (Berl.) **87**, 324—332 (1969).
4. *Fekete, M. A. R. de*: Die Regulierung der Saccharose-Synthese bei keimenden *Vicia faba*-Samen. Ber. deut. bot. Ges. **83**, 161—164 (1970).
5. *Pavlinova, O. A. and Prasolova, M. F.*: Sucrose-synthesizing enzymes of the sugar beet root. Plenum Publishing Corp. New York 1970, translated from Fiziologiya Rastenii **17**, 295—301 (1970).
6. *Roe, J. H.*: A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. J. Biol. Chem. **107**, 15—22 (1934).
7. *Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Lewis, A. and Randall, R. I.*: Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265—275 (1951).
8. *Vieweg, G. H.*: Enzyme des Saccharosestoffwechsels in Wurzeln. Planta (Berl.) **116**, 347—359 (1974).
9. *Mendicino, J.*: Sucrose phosphate synthesis in wheat germs and green leaves J. Biol. Chem. **235**, 3347—3352 (1960).
10. *Dick, P. S. and ap Rees, T.*: Sucrose metabolism by roots of *Pisum sativum*. Phytochemistry **15**, 255—259 (1976).
11. *Murata, T.*: Sucrose synthetase of sweet potato roots. Agr. Biol. Chem. **35**, 1441—1448 (1971).
12. *Murata, T.*: Sucrose phosphate synthetase from various plant origins. Agr. Biol. Chem. **36**, 1877—1884 (1972).
13. *Murata, T.*: Sucrose synthetase of rice grains and potato tubers. Agr. Biol. Chem. **36**, 1815—1818 (1972).
14. *Slack, C. R.*: Inhibition of UDP glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase from sugar cane stem tissue by phenol oxidation products. Phytochemistry **5**, 397—403 (1966).

Prof. Dr. J. C. Somogyi
 Nidelbadstraße 82
 CH-8803 Rüschtikon

Dr. D. P. Becker
 Dr. M. Meier
 Institut für Ernährungsforschung
 CH-8803 Rüschtikon