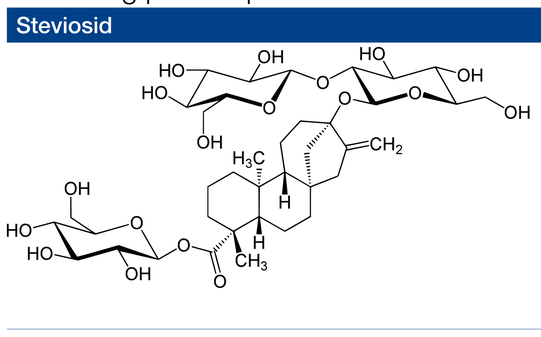
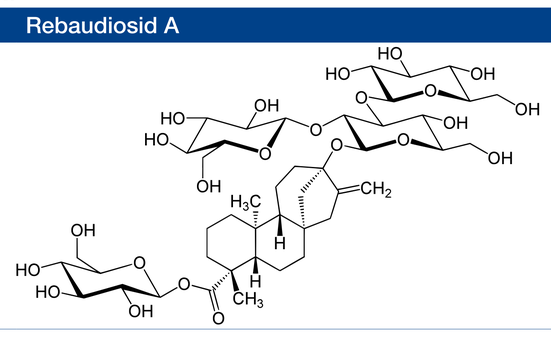
Bestimmung von Steviolglykosiden per HPLC-UV

H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D
Dr. H. R. Wollseifen, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6–8, 52355 Düren, Germany

Einleitung:

Aufgrund eines veränderten Ernährungsbewusstseins nehmen Light-Produkte, bzw. kalorienreduzierte Lebensmittel eine immer stärkere Rolle im Lebensmittelhandel ein. Die Pflanze, *Stevia rebaudiana* Bertoni, wurde ursprünglich als Novel Food bekannt, zwischenzeitlich sind die isolierten Steviolglycoside als Lebensmittelzusatzstoffe (Süßungsmittel) zugelassen und werden bei vielen Produktgruppen wie Getränken oder fruchthaltigen Brotaufstrichen zugesetzt [1]. Es muss jedoch beachtet werden, dass der ADI-Wert von 4 mg/kg Körpergewicht und Tag nicht überschritten wird, so dass eine Einhaltung der vorgeschriebenen Höchstmengen sicher gestellt werden muss [2]. Nachfolgend wurde ein empfindliches Bestimmungsverfahren entwickelt, welches in Abhängigkeit von der Komplexität der Probenmatrix neben der HPLC-UV-Bestimmung eine Anreicherung per Festphasenextraktion beinhaltet.

Steviosid **Rebaudiosid A**

Steviolglycoside	Formel	Süßkraft (Saccharose = 1)
Dulcosid	$C_{38}H_{60}O_{17}$	30
Rebaudiosid A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	200–300
Rebaudiosid B	$C_{38}H_{60}O_{18}$	150
Rebaudiosid C	$C_{44}H_{70}O_{22}$	30
Rebaudiosid D	$C_{50}H_{80}O_{28}$	221
Steviolbiosid	$C_{32}H_{50}O_{13}$	90
Steviosid	$C_{38}H_{60}O_{18}$	150–250

Tabelle1: Steviolglykoside und ihre Süßkraft [3]

Probenvorbereitung

- Probeneinwaage in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen
- Extrahieren der Probe in 20 mL Wasser für 15 min im Ultraschallbad*
- Zentrifugieren bei 4500 rpm für 5 min bei 4 °C
- 10 mL des Überstands werden für die SPE verwendet (bei Direktinjektion des Probenextraktes wird dieser zuvor membranfiltriert (CHROMAFIL® PTFE-20/13, 0,20 µm, REF 729208))

* Getränke werden für 15 min im Ultraschallbad entgast und anschließend direkt für die SPE verwendet.

Festphasenextraktion:

SPE-Säule: CHROMABOND® C_{18} ec 6 mL, 500 mg, (REF 730014)
oder CHROMABOND® HR-X 6 mL, 500 mg, (REF 730939)

Waschen: 10 mL Methanol, 10 mL Wasser

Probenaufgabe: 5 mL Probenextrakt, Flussrate 5 mL/min

Waschen: 10 mL Methanol/Wasser (40 + 60, v/v)

Elution: 5 mL Methanol

Eluententausch

Ein Aliquot von 2 mL des Festphaseneluates wird unter Stickstoffstrom bei 40 °C eingedampft und der Rückstand wird in 2 mL Wasser gelöst. Die Probenlösung wird anschließend membranfiltriert (CHROMAFIL® PET, 0,20 µm, REF 729222).

Anschlussanalytik: HPLC-UV

Chromatographische Bedingungen

Säule: EC 250/2 NUCLEODUR® PolarTec, 3 µm, (REF 760479.20)

Eluent: H_2O (ultrapure)/Acetonitril (66 + 34, v/v)

Fluss: 0,35 mL/min

Temperatur: 40 °C

Injektionsvolumen: 5 µL

Detektion: 200 nm

Waschen der SPE-Säulen

Neben der Anreicherung der Steviolglycoside sollen bei der SPE Matrixbestandteile entfernt werden. Daher wurde nachfolgend der Einfluss des Volumens und des Methanolanteils in der Waschlösung überprüft:

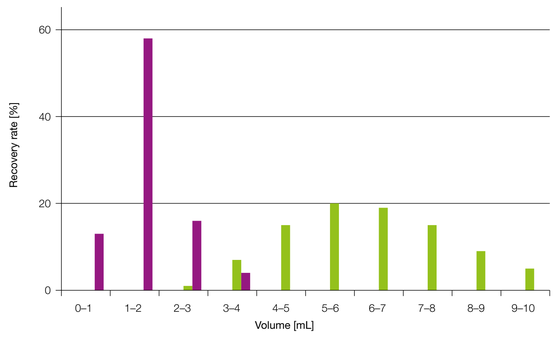


Abb. 1: Einfluss des Methanolsgehalts in der Waschlösung bei CHROMABOND® C_{18} ec

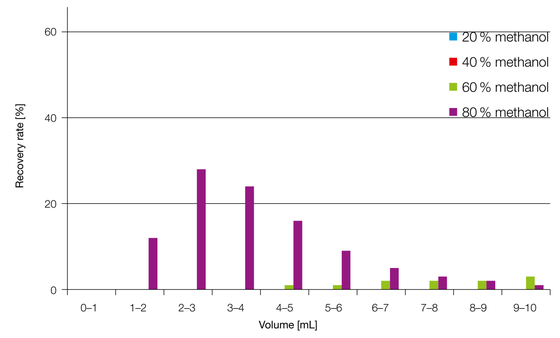


Abb. 2: Einfluss des Methanolsgehalts in der Waschlösung bei CHROMABOND® HR-X

Kontrolle von Lebensmitteln mit Steviazusatz

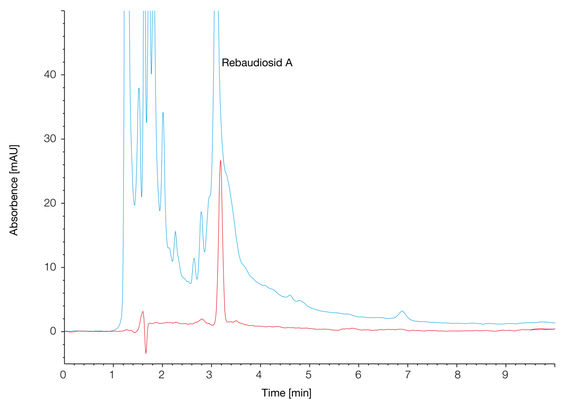


Abb. 3: Clean-up für Lakritzbonbons, blau: Chromatogramm des Probenextraktes, rot: Chromatogramm des Festphaseneluates

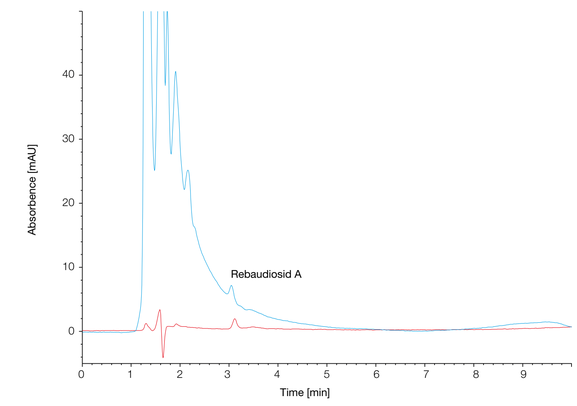


Abb. 4: Clean-up für einen Multivitaminfruchtaufstrich, blau: Chromatogramm des Probenextraktes, rot: Chromatogramm des Festphaseneluates

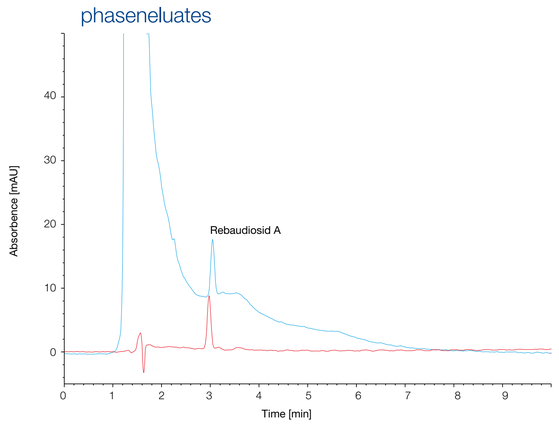


Abb. 5: Clean-up für Tomatenketchup, blau: Chromatogramm des Probenextraktes, rot: Chromatogramm des Festphaseneluates

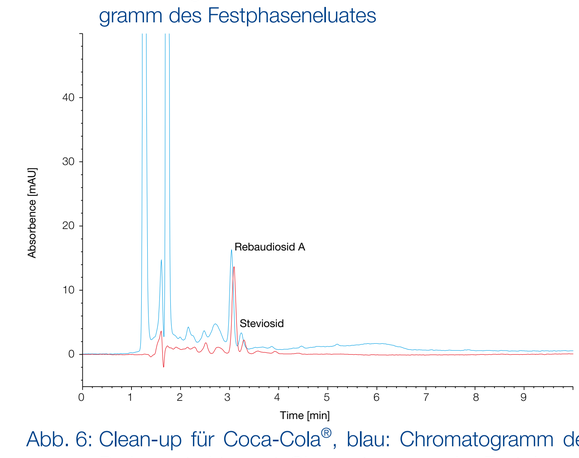


Abb. 6: Clean-up für Coca-Cola®, blau: Chromatogramm des Probenextraktes, rot: Chromatogramm des Festphaseneluates.

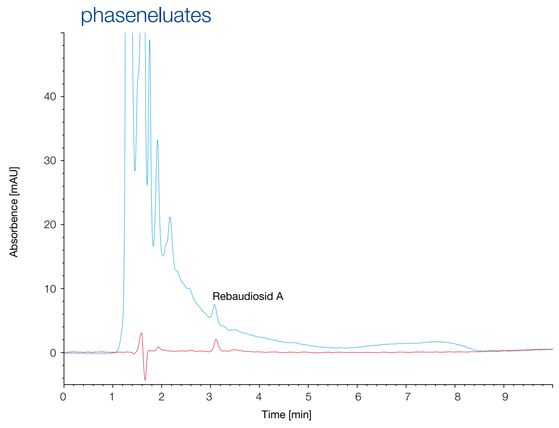


Abb. 7: Clean-up für Erdbeerfruchtaufstrich, blau: Chromatogramm des Probenextraktes, rot: Chromatogramm des Festphaseneluates

Wiederfindungsraten

Probe	CHROMABOND® C_{18} ec Wiederfindung in % (n = 3)
Tomatenketchup	95,0 ± 1,4
Lakritzbonbons	73,3 ± 3,1
Coca-Cola® life	92,3 ± 1,5
Multivitaminfruchtaufstrich	89,1 ± 8,9
Erdbeerfruchtaufstrich	88,4 ± 0,9

Tabelle 2: Wiederfindungsraten

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Festphasenextraktion mit CHROMABOND® C_{18} ec und CHROMABOND® HR-X für schwierige Probenmatrices zu sehr guten Wiederfindungen führt. Unterschiede bestehen beim Waschschritt mit verschiedenen Methanolanteilen in der Waschlösung. Für die untersuchten Probenmatrices wurde festgestellt, dass unter Einsatz von oktadecylmodifiziertem Kieselgel mehr Matrixbestandteile ohne Analytverlust von der stationären Phase gewaschen wurden.

Ferner konnte eine einfache und effiziente chromatographische Trennung der Steviolglycoside auf der NUCLEODUR® PolarTec entwickelt werden. Insbesondere die beiden Hauptkomponenten, Rebaudiosid A und Stevioside zeigten dabei eine gute Auflösung.

Weitere Informationen zu dieser Anwendung sind in Applikationsnote 10/2017 veröffentlicht.

Literatur:

[1] Verordnung (EU) Nr. 1131/2011

[2] Hintergrundinformation Nr. 025/2014 des BfR vom 1. Juli 2014

[3] STEVIOL GLYCOSIDES FAO JECFA, Monographs 10 (2010)