

Bestimmung von organischen Säuren in Fruchtsäften mittels HPLC-UV



H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D, M. Roedel, Düren/D, H. Riering, Düren/D
Dr. H. R. Wollseifen, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Valencienner Str. 11, 52355 Düren/D

Für Fruchtsäfte gelten nach der Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkerverordnung bestimmte Qualitäts- und Herstellungsanforderungen^[1]. Untersuchung von organischen Säuren zur Beurteilung von Fruchtsäften und Fruchtsaftgetränken zählt zu den grundlegenden Untersuchungsparametern der Qualitätsbeurteilung dieser Lebensmittelgruppe^[2]. Dabei stellt die Quantifizierung von organischen Säuren mittels HPLC-UV eine sehr schnelle und kostengünstige Alternative zur enzymatischen Bestimmung dar. Insbesondere die Anwendung von HPLC-Phasen, die unter 100 % wässrigen Bedingungen eingesetzt werden können, trägt sehr zur Kostenreduzierung der flüssig-chromatographischen Bestimmung bei. Ziel bei der Entwicklung war, diese Methodik auf einfachen HPLC-Systemen (Druckbereich kleiner 200 bar) etablieren zu können. Auf eine Säulenkombination von RP18-Phasen mit Polystyrol-Divinylbenzol-Harz-Säulen konnte zusätzlich verzichtet werden. Nachfolgend wird die flüssig-chromatographische Bestimmung und Quantifizierung von organischen Säuren in Orangensaft, Apfelsaft und Traubensaft dargestellt.

Probenvorbereitung

- 1 mL Fruchtsaft mit Eluent auf 5 mL auffüllen
- mit PET-Filter membranfiltrieren, Porengröße 0,20 µm

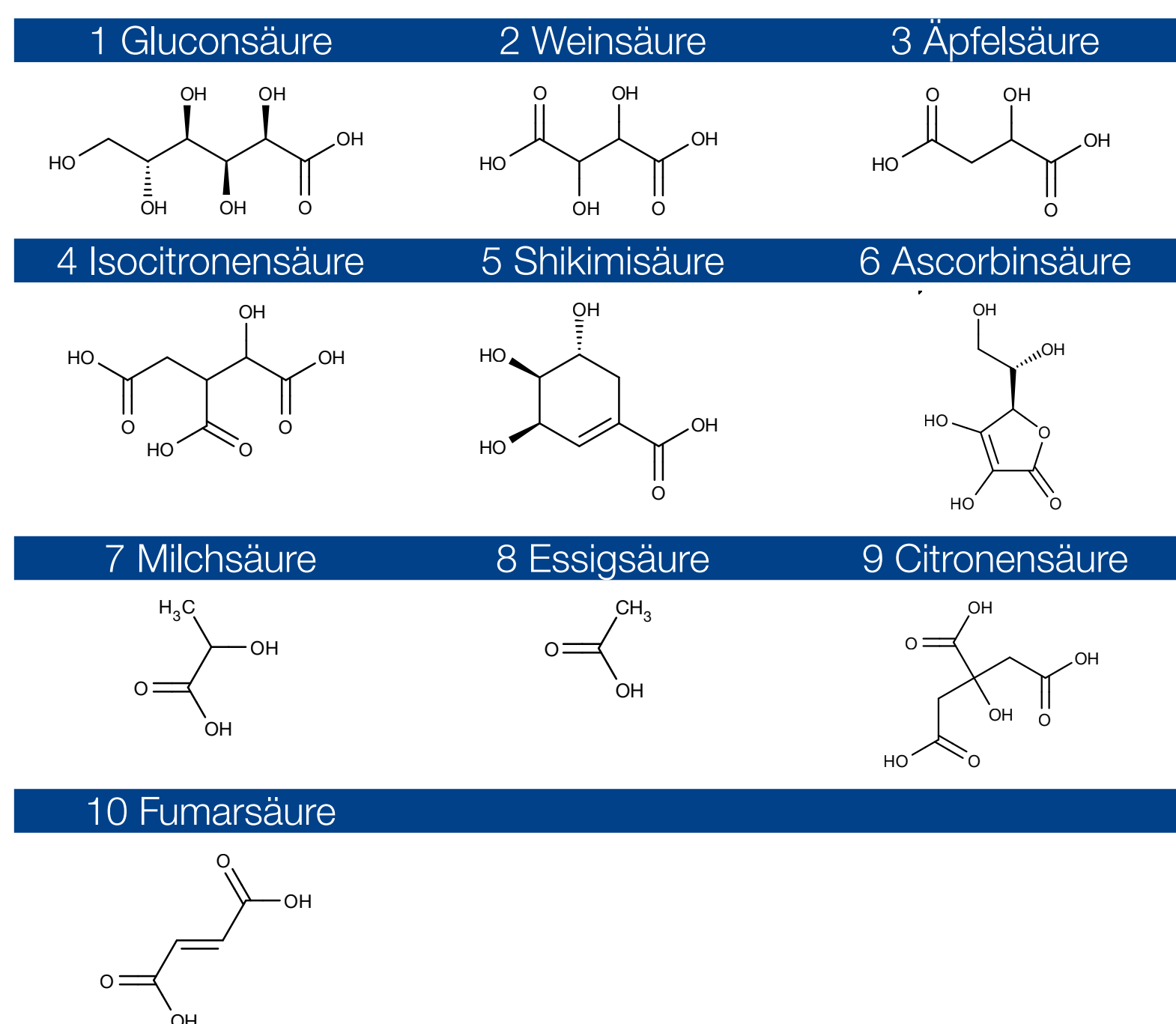
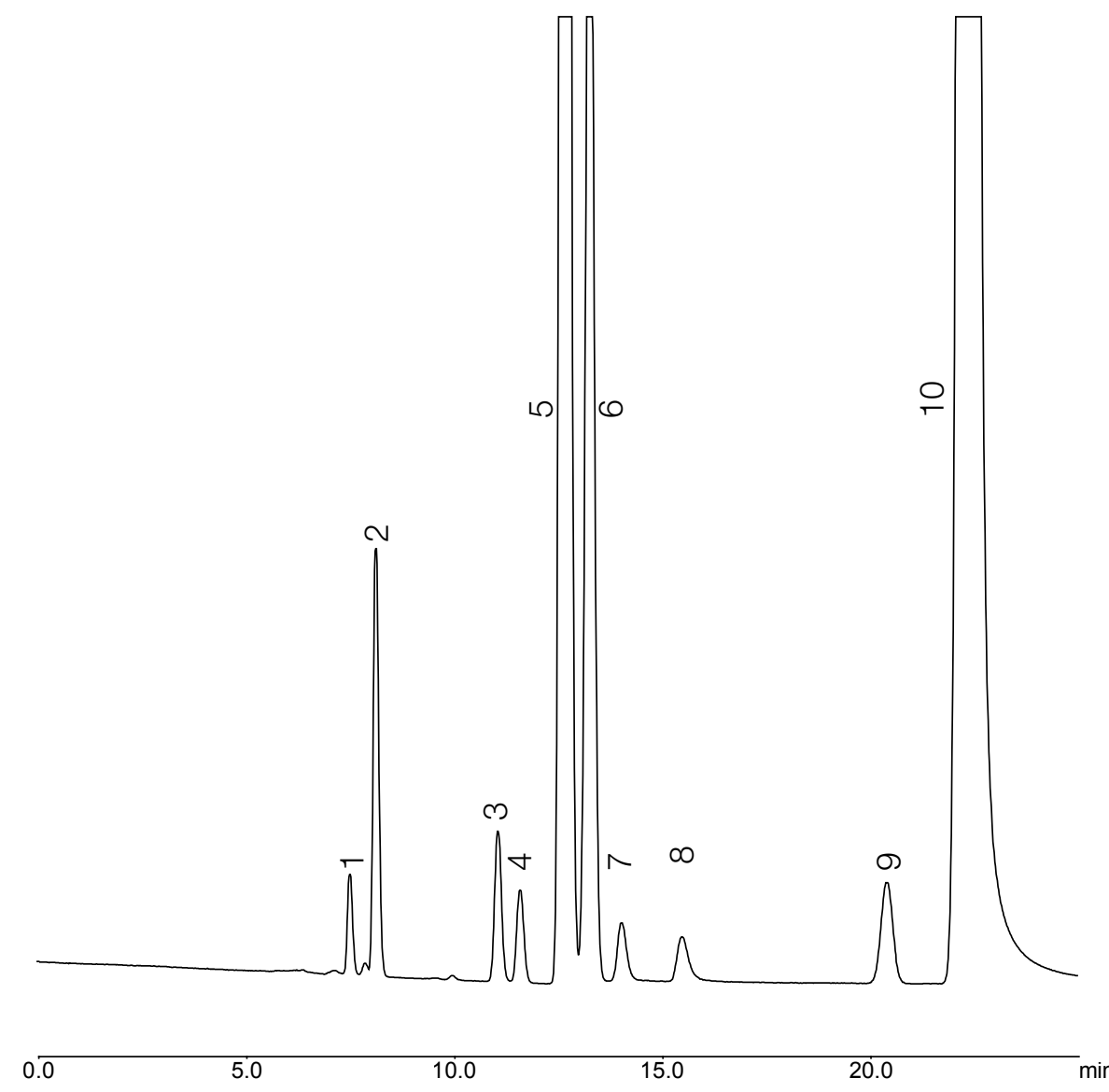


Anschlussanalytik

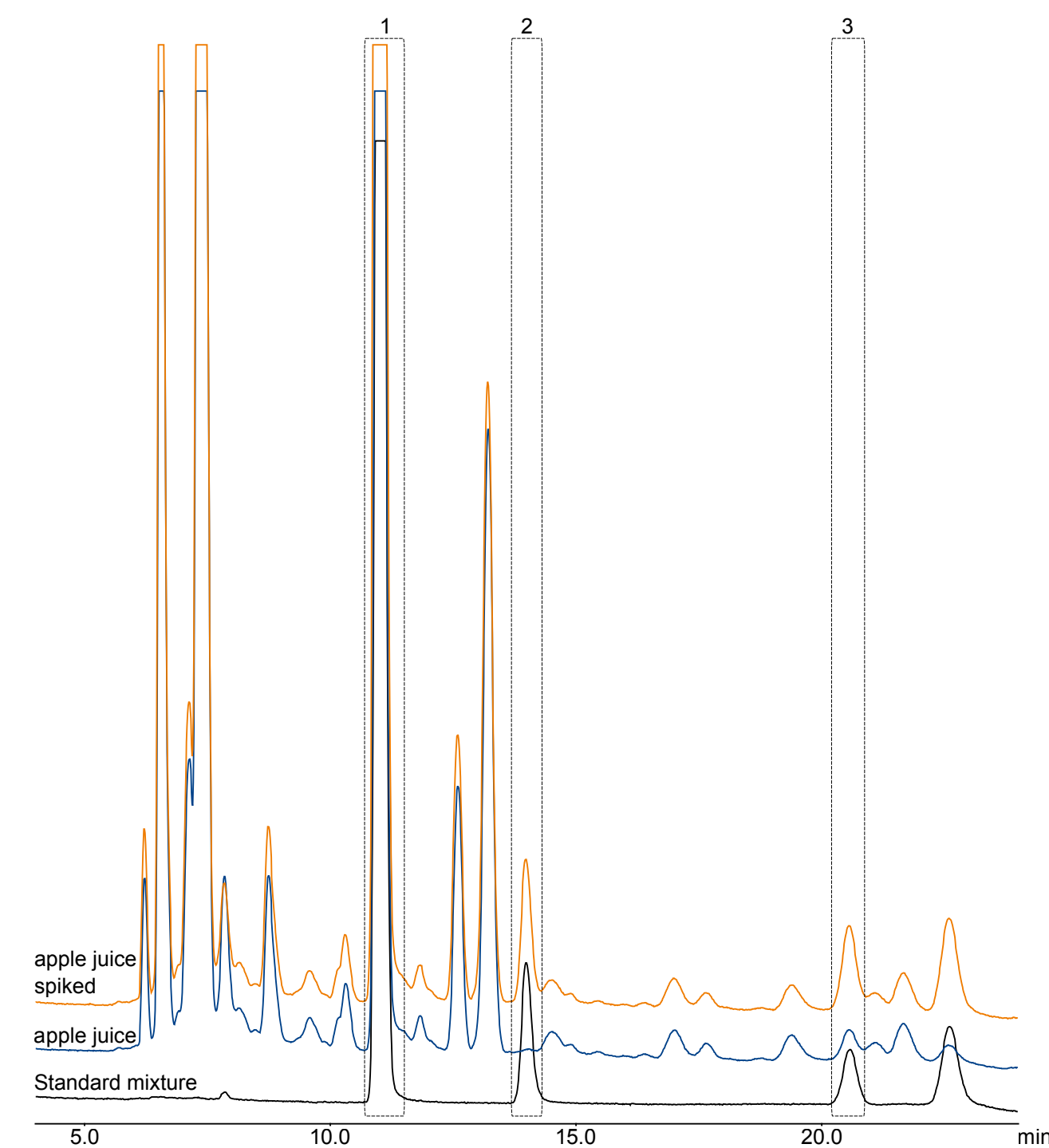
Chromatographische Bedingungen

Säule: EC 250/4,6 NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-SB, 5 µm
Eluent: 50 mmol KH₂PO₄, pH 2,7 (6,80 g KH₂PO₄ und 666 µL Phosphorsäure konz. auf 1 L aufgefüllt)
Gradient: isokratisch (25 min)
Fluss: 0,4 mL/min
Temperatur: 30 °C
Detektionswellenlänge: 205 nm
Injektionsvolumen: 10 µL

Standardmix



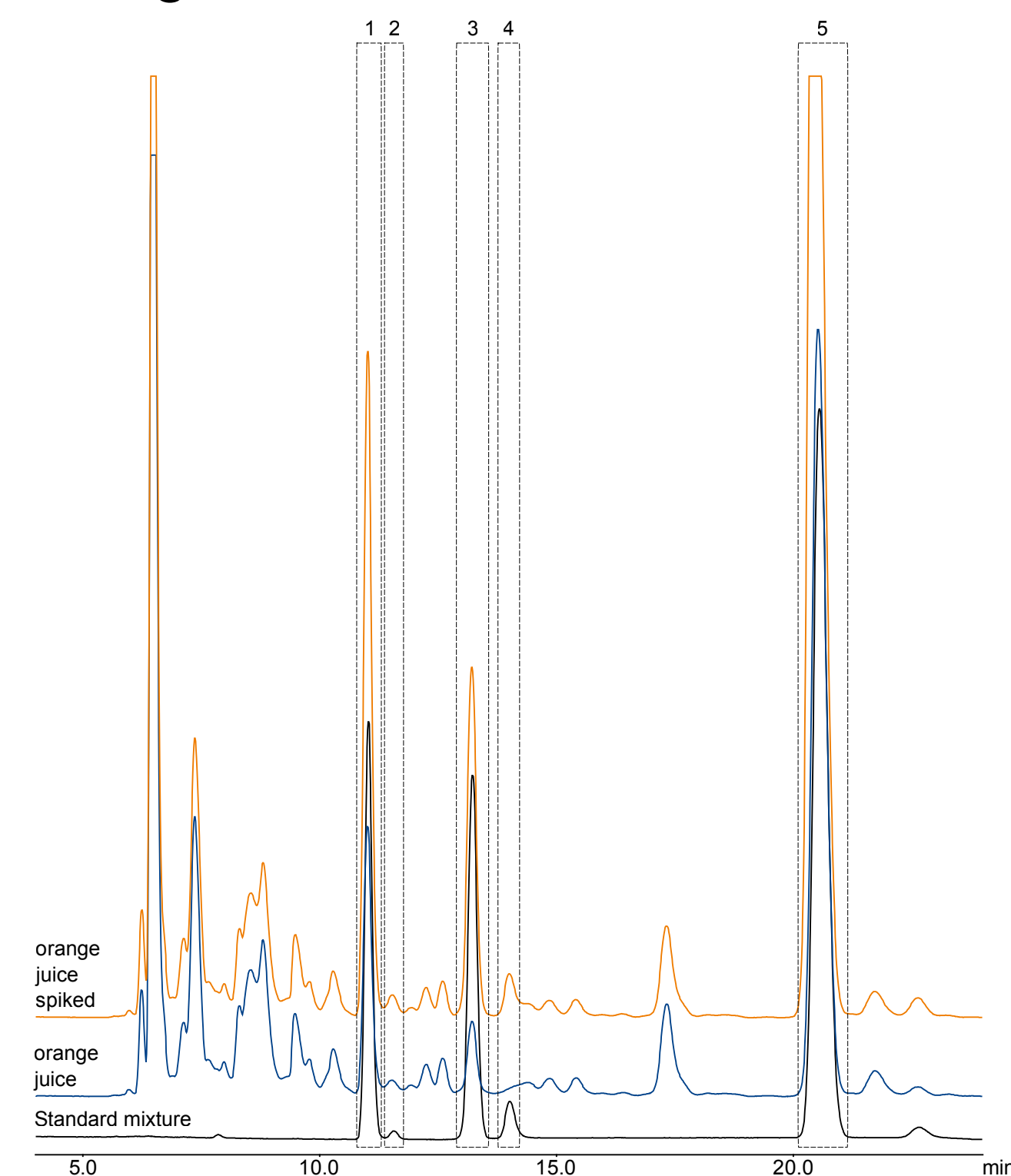
Apfelsaft



- 1 mL Apfelsaft gespickt mit 0,6 mL einer Lösung mit 250 µg/mL Citronensäure, 1,25 mg/mL Milchsäure und 10 mg/mL Äpfelsäure
- mit Eluent auf 5 mL aufgefüllt

Peak-zuordnung	Analyt	externe Kalibrierung (n=3)	Standardaddition (n=3)
1	Äpfelsäure	6,41 ± 0,03 g/L	6,50 ± 0,03 g/L
2	Milchsäure	0,1 ± 0,0 g/L	0,1 ± 0,0 g/L
3	Citronensäure	59,25 ± 0,03 mg/L	60,25 ± 0,03 mg/L

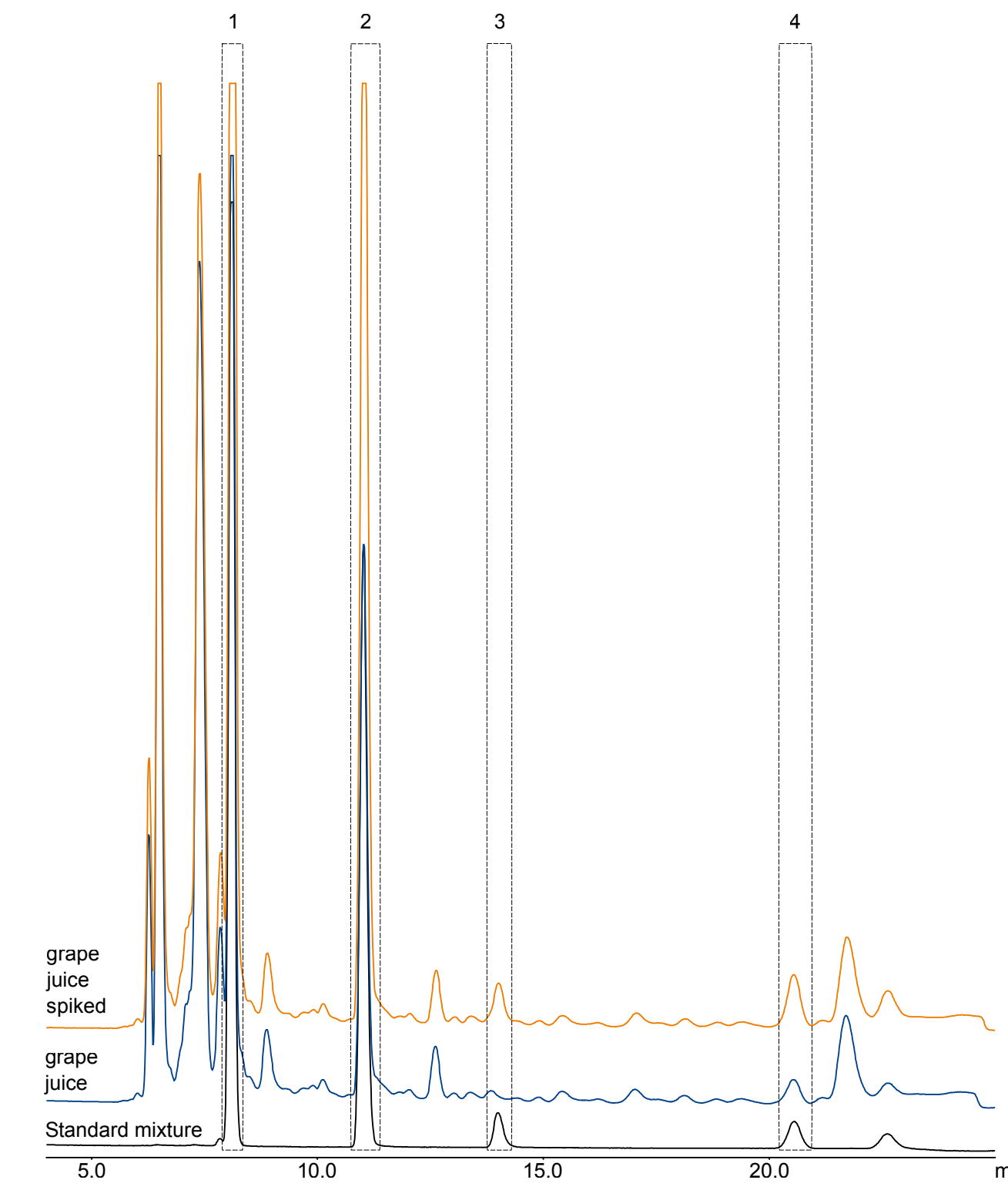
Orangensaft



- 1 mL Orangensaft gespickt mit 0,6 mL einer Lösung mit 15 mg/mL Citronensäure, 150 µg/mL Isocitronensäure, 1,25 mg/mL Milchsäure, 5 mg/mL Äpfelsäure und 500 µg/mL Ascorbinsäure
- mit Eluent auf 5 mL aufgefüllt

Peak-zuordnung	Analyt	externe Kalibrierung (n=3)	Standardaddition (n=3)
1	Äpfelsäure	2,04 ± 0,24 g/L	2,08 ± 0,24 g/L
2	Isocitronensäure	108 ± 0,0 mg/L	111 ± 0,0 mg/L
3	Ascorbinsäure	63 ± 2 mg/L	78 ± 2 mg/L
4	Milchsäure	0,2 ± 0,0 g/L	0,2 ± 0,0 g/L
5	Citronensäure	9,52 ± 0,00 g/L	9,69 ± 0,00 g/L

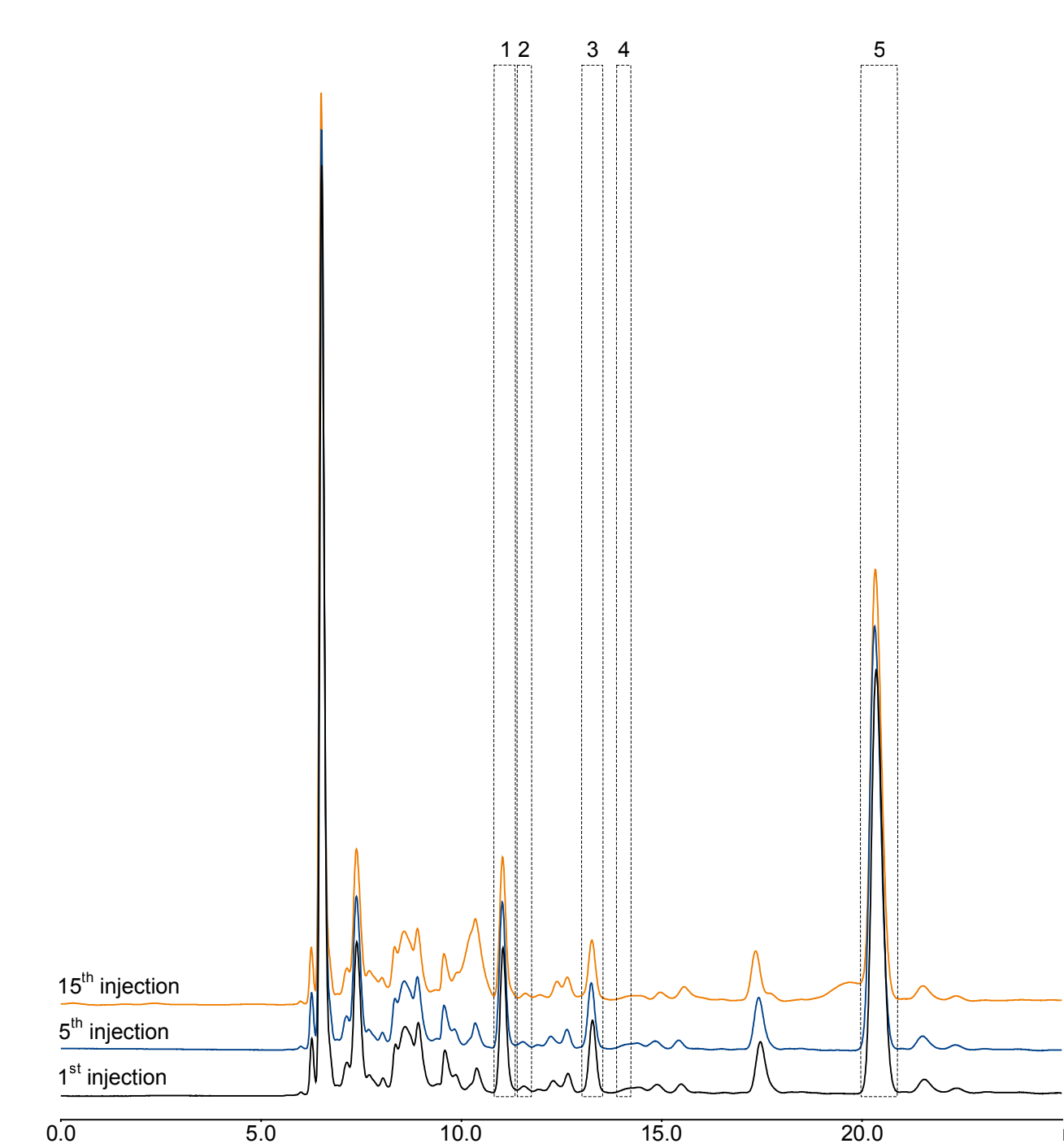
Traubensaft



- 1 mL Traubensaft gespickt mit 0,6 mL einer Lösung mit 500 µg/mL Citronensäure, 5 mg/mL Weinsäure, 1,25 mg/mL Milchsäure und 7,5 mg/mL Äpfelsäure
- mit Eluent auf 5 mL aufgefüllt

Peak-zuordnung	Analyt	externe Kalibrierung (n=3)	Standardaddition (n=3)
1	Weinsäure	2,74 ± 0,00 g/L	2,70 ± 0,00 g/L
2	Äpfelsäure	4,27 ± 0,00 g/L	4,14 ± 0,24 g/L
3	Milchsäure	0,2 ± 0,0 g/L	0,2 ± 0,0 g/L
4	Citronensäure	0,27 ± 0,00 g/L	0,27 ± 0,00 g/L

Retentionszeitvergleich nach Mehrfachinjektion am Beispiel Orangensaft



Nummer	Analyt
1	Äpfelsäure
2	Isocitronensäure
3	Ascorbinsäure
4	Milchsäure
5	Citronensäure

- Empfohlener Spülschritt:
- nach einer Probenreihe sollte die Säule mit einem organischen Lösungsmittel gespült werden
 - Eluent A: 50 mmol KH₂PO₄, pH 2,7 (6,80 g KH₂PO₄ und 666 µL Phosphorsäure konz. auf 1 L aufgefüllt)
 - Eluent B: Methanol
 - Gradient: 0–50 % B in 5 min, 50 % B für 10 min, 50–0 % B in 5 min, 0 % B für 15 min

Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die wichtigsten organischen Säuren in den für Fruchtsäften relevanten Konzentrationsbereichen per flüssig-chromatographischer Trennung erfolgreich identifiziert und quantifiziert werden konnten. Lediglich für Ascorbinsäure sollte die Quantifizierung per Standardaddition durchgeführt werden. Ansonsten ist die Quantifizierung per externer Kalibriergerade durchführbar. Der dargestellte Retentionszeitenvergleich zeigt, dass nach 10 Injektionen das chromatographische Bild deckungsgleich bleibt. Zur Pflege der Säule ist ein Spülschritt mit Methanol zur Entfernung unpolarer Probenmatrix zu empfehlen. Aufgrund der geringen Kosten und der Zeitersparnis bei gleichzeitiger Bestimmung aller relevanten organischen Säuren in einem Lauf stellt die Methodik eine leistungsfähige und kostengünstige Alternative zum enzymatischen Bestimmungsverfahren dar.

Literatur

- [1] Verordnung über Fruchtsaft, einige ähnliche Erzeugnisse, Fruchtnektar und koffeinhaltige Erfrischungsgetränke (Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkerverordnung - FrSaftErfrischGetrV)
[2] AIJN Code of Practice zur Beurteilung von Frucht- und Gemüsesäften

www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11
52355 Düren · Deutschland

DE Tel.: +49 24 21 969-0 info@mn-net.com
CH Tel.: +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com
FR Tel.: +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com
US Tel.: +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com

