

CBS
CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE



HPTLC erweist sich als kostengünstige robuste Methode in der Nahrungsmittelanalytik – Beispiele in diesem Heft

CAMAG 109

Quantitative Bestimmung von Steviolglycosiden (Stevia-Süsstoffe)



Stephanie Meyer

Die hier beschriebene HPTLC-Methode zur schnellen Analytik pflanzlicher Süsstoffe von *Stevia rebaudiana* wurde von Prof. Dr. Morlock, Justus-Liebig-Universität Giessen, entwickelt und im Rahmen der Masterarbeit von Frau Meyer validiert in Kooperation mit Dr. Jean-Marc Roussel, Berater in analytischer Methodenentwicklung und Validierung, Aix-en-Provence.

Einleitung

Diterpen- bzw. Steviolglycosid-Süsstoffe der Pflanze *Stevia rebaudiana*, auch bekannt als Süsskraut, Süssblatt oder Honigkraut, werden seit Jahrhunderten wegen ihrer starken Süßkraft (bis 450-fach von Saccharose) verwendet. In getrockneten Blättern kommen hauptsächlich Steviosid (ca. 10 %) und Rebaudiosid A (2–4 %) vor. In der EU wurden Stevia-Produkte erst Ende 2011 durch die Europäische Kommission formell als Lebensmittelzusatzstoff E 960 zugelassen. Für Steviolglycoside gilt eine tägliche Aufnahme von 4 mg Stevioläquivalent pro kg Körpergewicht als unbedenklich.

Die Analytik von Steviolglycosiden erfolgt meist mit HPLC und Detektion bei 210 nm oder massenspektrometrisch. Jedoch ist für schwierige Lebensmittelmatrices die Auswertung bei 210 nm störanfällig und der routinemässige Einsatz von Massenspektrometern kostenintensiv. Da zunehmend in der Lebensmittelindustrie mit Steviolglycosiden oder Stevia-Formulierungen gesüßte Produkte hergestellt werden, wurde eine robuste HPTLC-Methode mit selektiver Derivatisierung der Steviolgly-

koside in der Lebensmittelmatrix entwickelt. Die Leistungsdaten dieser schnellen und kostengünstigen HPTLC-Methode belegen ihre Eignung für die Kontrolle von Tinkturen bzw. Fluiden, Granulaten und Tabletten sowie Tee, Joghurt und Bonbons im Routineeinsatz.

Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 × 10 cm; bei Bedarf mit Methanol vorgewaschen und bei 100 °C 15 min getrocknet.

Standardlösungen

Steviolglycoside wurden in Gemischen oder einzeln in Methanol gelöst (je 30 ng/μL). Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurden die Standardgemische 1:3 mit Methanol verdünnt. Zur Ermittlung der Genauigkeit der Methode wurde zur Probendotierung eine Steviosid-Lösung (5 μg/μL) hergestellt.

Probenvorbereitung

20 mg Granulat wurden in 20 mL Wasser gelöst und mit Methanol 1:5 verdünnt. 3 g Tee wurden mit 200 mL kochendem Wasser überbrüht und nach einer Einwirkzeit von 5 min abfiltriert. 1 Tablette (60 mg) wurde in 10 mL Wasser gelöst und mit Methanol 1:10 verdünnt. 200 bzw. 50 μL von Fluid I bzw. II wurden mit Methanol auf 2 mL aufgefüllt und 1:10 mit Methanol verdünnt. Sanddorn-Bonbons wurden gemörsert und davon 1 g mit 50 mL Methanol versetzt. Nach 15 min im Ultraschallbad wurde der Extrakt 3 min bei 3500 U zentrifugiert und der Überstand eingesetzt. Für die Methodenvalidierung wurden je 100 mg Naturjoghurt mit Steviosid in 3 unterschiedlichen Konzentrationen von 0,02, 0,13 und 0,2 % dotiert und vermengt (Zusatz von 4, 24 und 40 μL einer 5 μg/μL Steviosid-Lösung), dann in 2 mL mit Methanol gelöst und je 5 μL davon aufgetragen (50, 300 und 500 ng/Band).

Probenauftragen

Bandförmig mit DC-Probenautomat 4, 22 Bahnen, Bandlänge 7 mm, Bahnabstand 8 mm, Abstand vom unteren Rand 8 mm und vom seitlichen Rand 16 mm, Auftragevolumen 1–5 μL (Proben) und 1–20 μL (Standards)

Chromatographie

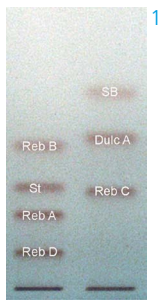
Automatische Entwicklungskammer 2 mit 10 mL Ethylacetat – Methanol – Eisessig 3:1:1 (v/v/v), Laufstrecke 60 mm, Trocknungszeit 30 s vor und 2 min nach der Entwicklung

Postchromatographische Derivatisierung

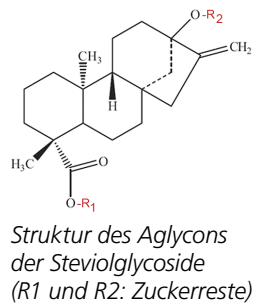
Durch Tauchen mittels Chromatogramm-Tauchvorrichtung (Eintauchgeschwindigkeit 3.5 cm/s, Eintauchzeit 2 s) in β -Naphthol-Reagenz (2 g β -Naphthol wurden mit 180 mL Ethanol und 12 mL 50 %iger Schwefelsäure versetzt); anschliessend Erhitzen auf dem DC-Plattenheizer (120 °C, 5 min). Das Reagenz ist im Kühlschrank mehrere Monate stabil.

Dokumentation

Die Chromatogramme wurden im Weisslicht (Durchlicht- und Auflichtmodus) mittels TLC Visualizer dokumentiert.



Steviolglycoside:
Steviosid (St)
Rebaudioside (Reb)
Dulcosid A (Dulc A)
Steviolbiosid (SB)

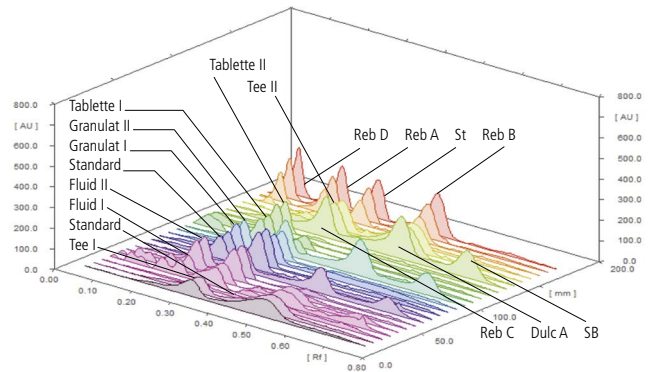


Densitometrie

TLC-Scanner mit winCATS-Software, Absorptionsmessung bei 500 nm, Spaltgrösse 5 x 0.3 mm, Messgeschwindigkeit 20 mm/s; Auswertung mit polynomer Regression

Ergebnisse und Diskussion

Nach einer minimalen Probenvorbereitung wurden auf dem Markt erhältliche Stevia-Produkte (Fluid, Granulat und Tabletten) und Lebensmittel (Tee, Joghurt und Bonbons) in nur 20 min getrennt. Nach Derivatisierung mit dem β -Naphthol-Reagenz wurden die Platten dokumentiert und anschliessend durch Absorptionsmessung bei 500 nm quantitativ ausgewertet.

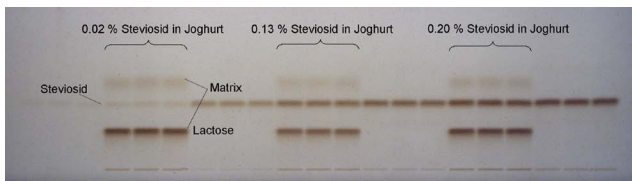


Chromatogramm-Ausschnitt und Analogkurven der Proben und Standardgemische

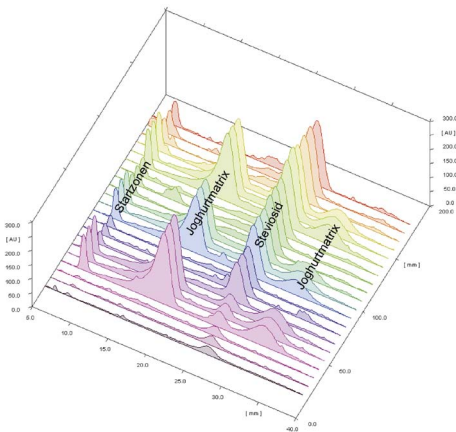
Zur Methodvalidierung wurde Naturjoghurt mit Steviosid dotiert. Die Chromatogramme zeigten klar abgegrenzte Zonen von Steviosid und keine interferierende Matrix. Eine ausreichende Spezifität der Methode war für die gezeigten Probenmatrices gegeben. Die Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze (S/N 3 bzw. 10) lag bei 10 bzw. 30 ng/Band (Peakhöhe/-fläche). Mit der Kalibrierkurvenmethode lag die LOQ sogar bei 12 ng/Band (Peakhöhe) und 20 ng/Band (Peakfläche). Die Genauigkeit der Methode wurde über die Wiederholpräzision (%RSD; n=3; zudem 3 Konzentrationsniveaus pro Platte) und die Laborpräzision (%RSD; n=5; erneute Probenvorbereitung, Dotierung und Bestimmung an verschiedenen Tagen) ermittelt. Der erwartete Toleranzbereich über die gesamte Methode inklusive der Probenvorbereitung wurde für die Wiederfindungsraten über die 3 Konzentrationsniveaus der Proben bestimmt.

Genauigkeit der Methode inklusive Probenvorbereitung (exemplarisch für Peakhöhe)

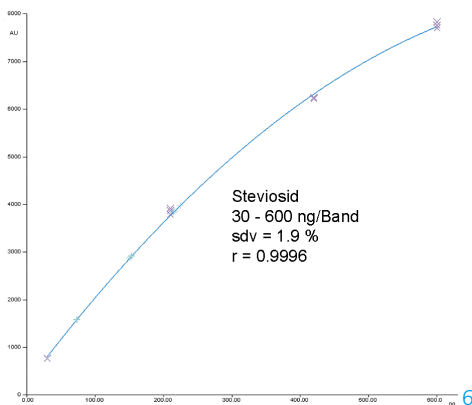
Steviosid-Konzentration im Naturjoghurt [%]	Steviosid-Konzentration [ng/Band]	Unteres Toleranzlimit der WFR (%)	Oberes Toleranzlimit der WFR (%)	Wiederholpräzision (%RSD, n=3)	Laborpräzision (%RSD, n=5)
0,02	50	92	120	4,2	8,4
0,13	300	96	108	3,1	4,0
0,20	500	95	110	5,4	5,4



4



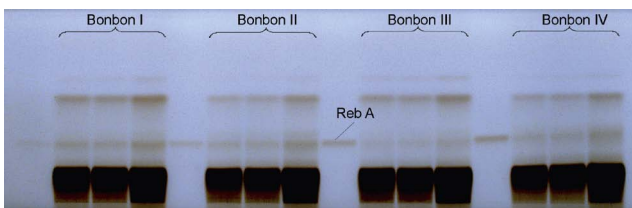
5



6

Chromatogramm und Analogkurven der unterschiedlich dotierten Naturjoghurt-Proben sowie Steviosid-Standard (30–600 ng/Band)

Zur Analyse verschiedener Bonbonchargen (ohne Etikett-Angaben), die aufgrund der Matrix mit der HPLC nicht analysierbar waren, war eine zweite Entwicklung mit einem höheren Ethylacetatgehalt (6 statt 3 Teile) notwendig. Aufgrund der dominierenden Matrixzone im unteren hR_F -Bereich liegt Isomalt als Zuckeralkohol-Basis der Bonbons nahe.



7

Chromatogramm zur Quantifizierung von Rebaudiosid A (30–210 ng/Band) in Bonbonchargen (je $2 \times 5 \mu\text{L}$ und $10 \mu\text{L}$ aufgetragen)

Die ermittelten Ergebnisse in den Probenmatrices waren realistisch, und der umgerechnete Zuckergehalt korrelierte mit dem sensorischen Befund.

Probe	Tee		Bonbon		Joghurt		Fluid		Granulat		Tablette	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Mittelwerte [%]												
Steviosid	0,23	0,08			0,02	0,20	2,5	1,4	44,8	47,4	5,3	2,1
Rebaudiosid A	0,02		0,08	0,09			2,1	1,3	19,8	48,7	14,9	22,9
Rebaudiosid D	0,03						0,80	0,11				
Dulcosid A	0,20	0,10					1,7	0,03				
Steviolbiosid							0,42					
Rebaudiosid B							0,44					
Summe Steviolglycoside	0,48	0,18	0,08	0,09	0,02	0,20	7,9	2,8	64,6	96,0	20,2	25,0
entspricht Zuckergehalt [g]	4,2	1,4	30,4 %	37,6 %	6,0 %	60,0 %	6,9	5,0	2,3	3,3	5,9	6,0
entspricht Probenmenge		3 g					10 bzw. 5 Tropfen		10 mg Granulat		1 Tablette	
pro Volumen [mL]		150					100		100		100	
Angabe bzw. Zielwert [%]			0,09	0,09	0,02	0,20						
Wiederfindungsrate [%]			84	94	106	102						

Fazit

Die erhobenen Leistungskennzahlen der Validierung zeigten, dass die HPTLC-Methode zur Quantifizierung der Steviolglycoside sehr gut geeignet ist. Die entwickelte und validierte HPTLC-Methode ist effektiv hinsichtlich Probendurchsatz, Matrix-Robustheit, Kosten und Analysenzeit.

In einer weiteren Studie werden die HPTLC-Ergebnisse durch Vergleich mit der HPLC verifiziert, alternative Derivatisierungsmöglichkeiten für zuckerhaltige Lebensmittel aufgezeigt, die Trennung kritischer Paare verbessert und auf die Abwesenheit von Steviol und Isosteviol geprüft.

Dank an Dr. Reif und Dr. Schwarz, PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth zur Verfügungstellung von Standardsubstanzen.

Weitere Informationen sind von der Autorin erhältlich.

Kontakt: Prof. Dr. Gertrud Morlock, Justus-Liebig-Universität Giessen, Institut für Ernährungswissenschaften, IFZ, Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Giessen, Gertrud.Morlock@ernaehrung.uni-giessen.de

CAMAG Automatische Entwicklungskammer ADC 2



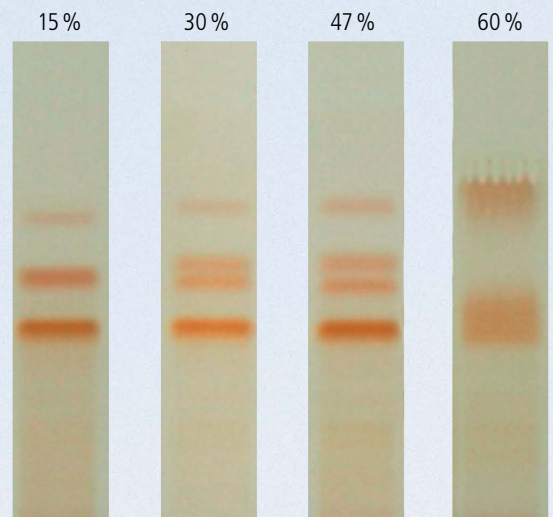
Die Automatische Entwicklungskammer bietet Reproduzierbarkeit, Sicherheit und Benutzerkomfort bei der isokratischen Entwicklung von DC/HPTLC-Platten und -Folien im Format 20×10 und 10×10 cm.

- Auf Grund der Kammergeometrie und der Homogenität der Gasphase ergeben sich konstante Trennstrecken von Platte zu Platte und damit reproduzierbare Ergebnisse. Die Entwicklung erfolgt im geschlossenen System und ist somit unabhängig von Umwelteinflüssen.
- Die eigentliche Kammergeometrie ist die gleiche wie die der CAMAG Doppeltrögenkammer, so dass mit der ADC erarbeitete Verfahren auf diese übertragen werden können.
- Vorkonditionierung der Schicht, Kammersättigung und abschließende Trocknung erfolgen nach vorgewählten Parametern.
- Der Benutzer ist von jeder Überwachungsfunktion entlastet, ein CCD-Sensor sorgt für die Einhaltung der vorgewählten Trennstrecke.
- Die Option »Feuchtekontrolle« ermöglicht bei der Methodenvalidierung die Prüfung, welchen Einfluss die relative Feuchtigkeit auf das Trennergebnis hat und sichert gegebenenfalls die Einhaltung der gewünschten.

Die ADC 2 kann betrieben werden im stand-alone Modus mit Eingabe der Parameter via Tastatur oder komplett Software gesteuert inklusive Überwachung und Dokumentation aller Betriebsparameter.

Weitere Informationen finden Sie im Spezialprospekt »Automatische Entwicklungskammer ADC 2« oder auf unserer Website www.camag.com/adc2

Beachten Sie die in diesem Heft enthaltene Anwendung »Quantitative Bestimmung von Steviolglycosiden (Stevia-Süsstoffe)«, bei der sich die ADC2 vorzüglich bewährt hat (S. 10–12).



Einfluss der relativen Feuchte auf die Trennung von Polyphenolen in Grüntee

Mobile Phase: Toluol – Aceton – Ameisensäure 9:9:2