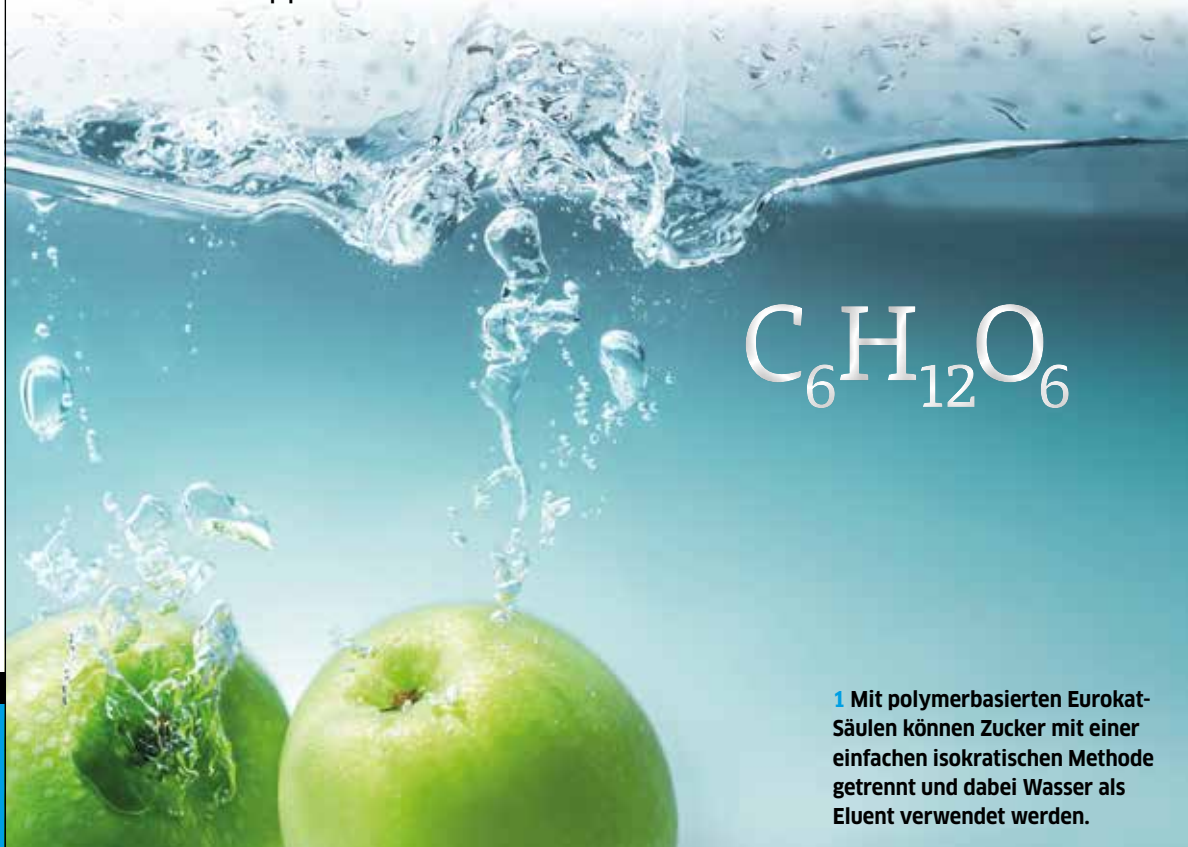


Von Zucker und Wasser

Grüne Zuckeranalytik für Jedermann // Die Analytik von Zuckern reicht von der einfachen Bestimmung per Farbreaktion bis hin zur komplexen Quantifizierung mittels Massenspektrometrie. Wie die Zuckeranalytik per Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gleichermaßen einfach wie „grün“ möglich ist, beschreibt diese Applikation.



LP Tipp+

mehr zum Thema:

- Mehr zu diesem Thema sowie detaillierte Informationen zu den Eurokat-Säulen finden Sie unter den Suchbegriffen „Zuckeranalytik“ und „HPLC“ auf www.laborpraxis.de.
- Besuchen Sie Knauer am 3. April 2019 auf der **Lab Supply Main 2019** (weitere Infos unter www.knauer.net/de/lab-supply-main-2019/e24627).
- Lernen Sie von ausgewiesenen HPLC-Experten Tipps und Tricks rund um die HPLC – auf dem **Praxistag HPLC** der LABORPRAXIS am 6. Juni 2019 in Köln oder am 7. November 2019 in Berlin (jetzt anmelden: www.praxistag-hplc.de).

JAN WENDRICH,
MAREIKE MARGRAF,
JULIANE BÖTTCHER,
KATE MONKS*

Zucker ist aus unser aller Leben nicht wegzudenken. Nicht immer offensichtlich, macht er viele Lebensmittel süßer und gefälliger – mit den allseits bekannten „Nebenwirkungen“ wie Karies oder Gewichtszunahme. Auch bei Zivilisationskrankheiten wie Typ-2-Diabetes wird der übermäßige Verzehr von Mono- und Disacchariden immer wieder als Risikofaktor diskutiert. Doch wie immer in der Chemie

und erst recht in der Analytik gilt es zu differenzieren. Wie viel und welche Zucker, in welcher Probe vorhanden sind – das herauszufinden ist Aufgabe der Zuckeranalytik.

Zur Geschichte der Zuckeranalytik

Die Geschichte der Zuckeranalytik geht zurück auf Hermann Christian von Fehling, der 1848 zum ersten Mal die quantitative Nachweisreaktion für Zucker in Harn veröffentlichte. Die „Fehling-Probe“ beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen durch die Aldehydgruppe der vor-

1 Mit polymerbasierten Eurokat-Säulen können Zucker mit einer einfachen isokratischen Methode getrennt und dabei Wasser als Eluent verwendet werden.

handenen (reduzierenden) Zucker zu dem unlöslichen Cu_2O . Bei der Reaktion kommt es zu einem quantifizierbaren Farbumschlag durch den Niederschlag des rotbraunen Cu_2O aus der ursprünglich blauen Lösung. Nicht nur beschränkte sich diese Methodik ausschließlich auf die Bestimmung reduzierender Zucker, sie war darüber hinaus auch nicht sehr zuverlässig und vor allem nicht „green“. Im Laufe der Jahre

*J. Wendrich, M. Margraf, J. Böttcher, K. Monks:
Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, 14163 Berlin,
Tel. +49-30-809727-0

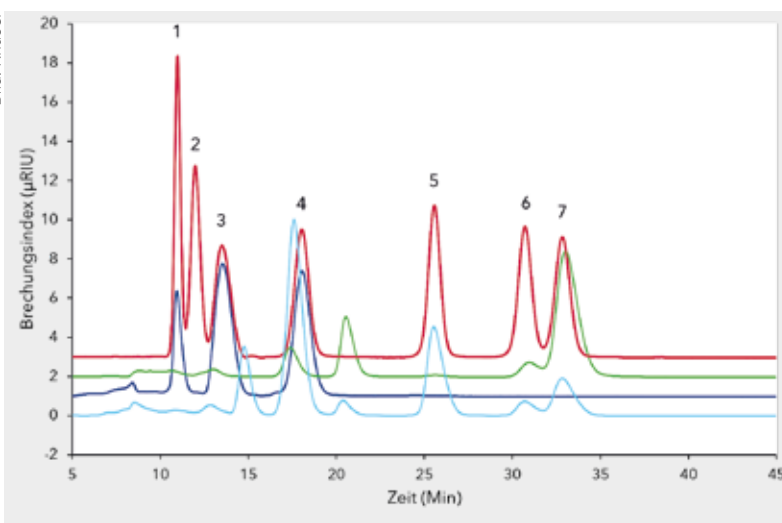
wurden viele andere Methodiken zur Bestimmung von Zuckern entwickelt. Diese reichen von einfachen Bestimmungen per Farbreaktion bis hin zur komplexen Quantifizierung mittels Massenspektrometrie. Eine Methodik, die schon seit Jahrzehnten verwendet wird aber immer noch aktuell ist, stellt die Analytik mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) dar.

Zuckeranalytik per Flüssigkeitschromatographie

Bei der HPLC handelt es sich um eine Chromatographiemethode, bei der im ersten Schritt die Trennung des Stoffgemisches durchgeführt wird und im zweiten Schritt die Detektion der getrennten Stoffe erfolgt. Aufgrund der chemischen Eigenschaften von Zuckern gibt es einige Voraussetzungen, denen das System für diesen Einsatzbereich dabei genügen muss:

- Zucker sind hochpolar: Unpolare Reversed Phase (RP) -Säulen wie C18, die in einem Großteil aller HPLC-Methoden verwendet werden, können aufgrund fehlender Wechselwirkung mit diesen polaren Stoffen nicht benutzt werden. Stattdessen greift man zurück auf HILIC-Säulen oder polymerbasierte Ionenausschluss/Ligandenaustauschsäulen (z.B. Eurokat). Da bei HILIC in der Regel mit einem hohen Anteil an Acetonitril gearbeitet wird, kann hier auch die Löslichkeit der Zucker zum Problem werden. Einschränkungen bei Injektionsvolumen und Konzentration sind die Folge. Daher fällt die Wahl in der Zuckeranalytik häufig auf die polymerbasierten Ionenausschluss/Ligandenaustauschsäulen, bei denen Wasser als Eluent benutzt wird. Das ist nicht nur umweltfreundlich, sondern hat auch den Vorteil, dass man die wasserlöslichen Zucker einfach injizieren kann.
- Zucker haben keinen Chromophor: Die in der HPLC recht gängige UV/VIS-Detektion kann für Kohlenhydrate nicht ohne weiteres angewendet werden, da Zucker über keine Chromophore verfügen. Daher muss die Detektion entweder über die Änderung des Brechungsindex des Eluats,

Bild: Knauer



2 Überlagerung von Chromatogrammen der Messungen eines Mischstandards (rot, Offset +3), Guaranagetränks (1:30 Verdünnung, dunkelblau, Offset +2) und Kaugummi (hellblau); **1**-Saccharose **2**-Sucralose **3**-Glukose **4**-Fruktose **5**-Mannitol **6**-Xylitol **7**-Sorbitol.

eine Lichtstreuung der im Eluat enthaltenen Substanzen oder die elektrochemischen Eigenschaften von Kohlenhydraten erfolgen. Die Verwendung eines RI-Detektors (Refractive Index oder Brechungsindex) stellt hierbei die einfachste und kostengünstigste Möglichkeit dar, die bereits seit Jahrzehnten etabliert ist. Der einfache technische Aufbau erfordert keinen hohen Schulungs- und Wartungsaufwand und es ist keine weitere komplexe Peripherie wie für andere Techniken notwendig. Hingegen ist der technische Aufbau eines ebenfalls für die Detektion von Substanzen ohne Chromophor geeigneten ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) deutlich komplexer und erfordert für den Betrieb die Bereitstellung von Stickstoff oder ölfreier Druckluft. Dafür bestehen ELSDs mit ihrer hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit, Gradientenanalysen durchführen zu können. Die Anschaffungskosten und Betriebskosten für einen ELSD sind ebenfalls deutlich höher als für einen RI-Detektor. Die Entwicklung von neuen Säulenmaterialien in den vergangenen Jahren hat zu einer neuen Trennmöglichkeit für Zucker geführt. Bei der HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) können Kohlenhydrate bei sehr hohem pH-Wert sehr effizient getrennt werden. Die elektrochemische Detektion

ermöglicht hier den Nachweis bereits kleinster Substanzmengen. Im Folgenden soll auf eine äußerst einfache und grüne Applikation für die Zuckeranalyse mittels HPLC eingegangen werden. Die Applikation macht sich die zuvor erwähnte hohe Polarität von Zuckern zu Nutze. Die Trennung erfolgt auf einer der bereits erwähnten polymerbasierten Eurokat-Säulen. Diese Säulen sind nicht nur äußerst langlebig und daher ressourcenschonend, sondern sie ermöglichen auch die Verwendung einer einfachen isokratischen Methode, bei der Wasser als Eluent verwendet wird. Die Detektion der Zucker erfolgt per Differentialrefraktometrie.

Alles in Allem ist die Methode kinderleicht, sehr robust und ressourcenschonend und kann zu Recht als ein gutes Beispiel für grüne Analytik bezeichnet werden. Die

Tabelle 1: Nachweis- (LOD - Limit of Detection) und Bestimmungsgrenzen (LOQ - Limit of Quantification) für die sieben in dieser Methode analysierten Stoffe; Signal-Rausch-Verhältnisse sind als S/N angegeben

Stoff	LOD (S/N = 3) in mg/ml	LOQ (S/N = 10) in mg/ml
Saccharose	0,006	0,018
Sucralose	0,009	0,028
Glukose	0,013	0,043
Fruktose	0,013	0,043
Mannitol	0,013	0,043
Xylitol	0,013	0,043
Sorbitol	0,013	0,043

Tabelle 2: Ergebnisse der Bestimmung von Saccharose, Sucralose, Glukose, Fruktose, Mannitol, Xylitol und Sorbitol in den fünf Getränkeproben sowie der Kaugummi und Zahnpastaprobe; <LOD (Limit of Detection) – der Wert liegt unter der Detektionsgrenze

Peak	Stoff	Probe 1 (Cola) in mg/ml	Probe 2 (Lightgetränk 1) in mg/ml	Probe 3 (Lightgetränk 2) in mg/ml	Probe 4 (Bio-Cola) in mg/ml	Probe 5 (Guaranageränk) in mg/ml	Kaugummi in g/100 g	Zahnpasta in g/100 g
1	Saccharose	47,84	<LOD	<LOD	<LOD	8,54	<LOD	<LOD
2	Sucralose	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	Glukose	17,12	<LOD	<LOD	37,58	30,6	<LOD	<LOD
4	Fruktose	15,6	<LOD	<LOD	34,82	26,52	<LOD	<LOD
5	Mannitol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	10,98	0,23
6	Xylitol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,84	2,11
7	Sorbitol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,84	19,71

Methode ist für die Lebensmittelindustrie besonders geeignet, da die Menge, der dort zu quantifizierenden Analyten normalerweise nicht limitierend ist.

Aufgrund der zuvor genannten Eigenschaften der verwendeten RI-Detektoren ist die Methode leicht skalierbar und kann auch bei der präparativen HPLC verwendet werden.

Bestimmung von Zuckern und Zuckerersatzstoffen

Für die Bestimmung von Zuckern und natürlichen Zuckerersatzstoffen wurde das Azura Dedicated System für Zuckeranalytik mit einem

zusätzlichen Autosampler verwendet. Das System bestand aus einer isokratischen Pumpe Azura P-6. 1L, einem Autosampler Azura AS 6. 1L, einem Säulentermostat Azura CT 2. 1, einem Brechungsindex-Detektor Azura RID 2. 1L sowie einer Eurokat-Calcium-Säule in der Dimension von 300 x 8 mm ID und einer Vorsäule von 30 x 8 mm ID, die mit dem gleichen Material gefüllt ist. Das Eurokat-Calcium-Material ist ein sulfoniertes, vernetztes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit kationenaustauschenden Eigenschaften. Die isokratische Methode lief 45 Minuten bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 100% Wasser als Eluent. Der Säulentermostat wurde auf 60 °C und die Datenrate des Detektors auf 20 Hz eingestellt. Es wurden jeweils 20 µL der Proben und Standards injiziert. Fünf Proben verschiedener Erfrischungsgetränke sowie Kaugummi und Zahnpasta wurden analysiert. Für die Probenvorbereitung wurden die Getränke lediglich in destilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 8 g der Zahnpasta und der Kaugummi wurden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Dafür wurde das Gemisch 20 min erhitzt und gerührt. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurde sie filtriert (0,45 µm) und anschließend injiziert.

Ein gemischter Standard aus Saccharose, Sucralose, Glukose, Fruktose, Mannitol, Xylitol und Sorbitol wurde zur Kalibrierung in einem Bereich von 0,25 mg/ml bis 2,0 mg/ml verwendet. Für die Methode wurden die in der Tabelle 1 aufgelisteten Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) bestimmt. Auf dieser

Basis wurden die verschiedenen Zusammensetzungen der zuvor kalibrierten Analyten in den Proben bestimmt (s. Tab. 1). Abbildung 2 (dunkelblau) zeigt ein Chromatogramm der Probe 5 (Guaranageränk) im Vergleich zur Standardmischung. Es zeigt sich, dass diese Probe ausschließlich Saccharose, Glukose und Fruktose enthält. Die Kaugummi- und Zahnpastaprobe enthalten nur Mannitol, Xylitol und Sorbitol. Zusätzliche Peaks wurden in beiden Chromatogrammen beobachtet, diese entsprechen jedoch nicht den Substanzen im Standardgemisch (s. Abb. 2, grün/hellblau).

Es wurde demonstriert, dass mit dieser einfachen und „grünen“ Methode sowohl Zucker als auch natürliche Zuckeraustauschstoffe nachgewiesen werden konnten. Die getesteten Erfrischungsgetränke enthielten Zucker (Saccharose, Glukose und Fruktose). Zuckerersatzstoffe waren hier wie erwartet nicht messbar. Dagegen enthielten die als „light“ deklarierten Erfrischungsgetränke keine messbare Zuckermengen oder natürliche Zuckerersatzstoffe. Die üblicherweise in „Light“-Produkten verwendeten künstlichen Süßungsmittel wie Aspartam, Acesulfam K oder Natriumcyclamat können mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Es wurde außerdem gezeigt, dass es mit wenig Aufwand bei der Probenvorbereitung sogar möglich ist, feste Proben wie Kaugummi oder Zahnpasta zu analysieren. Sowohl in der Zahnpasta als auch in der Kaugummiprobe konnten Mannit, Xylitol und Sorbitol nachgewiesen werden. ■



LP Info

Dr. Ilka Ottleben, Redakteurin

RI-DETEKTION

Mit einem **Refraktometer** wird durch eine optische Messung der so genannte Brechungsindex eines Mediums bestimmt. Der **Brechungsindex (n)** ist eine Größe die die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht in einem Medium (cM) ins Verhältnis setzt zur Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht im Vakuum oder auch Vakuumlichtgeschwindigkeit (c0), die als 1 definiert ist. Die **Differentialrefraktometrie** ist eine robuste Methodik, die eine universelle Detektion ermöglicht und bereits seit vielen Jahren anerkannt und etabliert ist.

- **Vorteile:** günstig, einfache Handhabung, gutes lineares Verhalten, universell einsetzbar
- **Nachteile:** geringere Empfindlichkeit als andere Universaldetektoren, nicht gradientenkompatibel