

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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 71 (1980)

Heft: 1

Artikel: Zur routinemässigen Bestimmung der Zucker in Lebensmitteln : praktische Erfahrungen mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie an Aminoalkylsilan-Kolonnen

Autor: Cerny, M. / Blumenthal, A. / Taube, Eva

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983510>

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: 17.01.2025

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

Zur routinemäßigen Bestimmung der Zucker in Lebensmitteln

Praktische Erfahrungen mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie an Aminoalkylsilan-Kolonnen

M. Cerny, A. Blumenthal und Eva Taube

Zentral-Laboratorium des Migros-Genossenschafts-Bundes, Zürich

Einleitung

Zur Beurteilung der Lebensmittel muß heute in vielen Fällen der Gehalt einzelner Zucker, eventuell Zuckeralkohole, ermittelt werden. In solchen Fällen stellt die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit der refraktometrischen Detektion die «Methode der Wahl» dar. Sie ermöglicht eine Bestimmung nach einer einfachen Probenzubereitung und ohne Derivatisierung und mit einer für die routinemäßige Lebensmitteluntersuchung genügenden Empfindlichkeit und Genauigkeit. Die Auswertung der Chromatogramme wird dadurch vereinfacht, daß die Zuckeranomere nicht getrennt werden. Die Methode kann leicht automatisiert werden.

Für die Lebensmitteluntersuchung haben sich vor allem folgende Trennsysteme bewährt:

- chemisch gebundene Aminoalkylsilan-Phase am Kieselgel mit Acetonitril/Wasser-Gemisch als mobile Phase (1—6).
- Kationenaustauscher mit Wasser als Eluens bei erhöhter Temperatur (5, 7).

In unserem Laboratorium wird das erste Trennsystem seit mehr als zwei Jahren für Zuckeruntersuchungen verwendet.

In der vorliegenden Arbeit sind unsere Erfahrungen mit der Optimierung dieses Trennsystems für den routinemäßigen Einsatz sowie eine geeignete Methode für die Probenzubereitung beschrieben.

Experimentelles

Geräte und Reagenzien

- HPLC-System (Hochdruckpumpe pulsfrei oder mit Pulsdämpfer, Dosierventil mit 25 µl Probenschleife);

- RI-Detektor (z. B. LDC Mod. 1107, Vetr. Comptronix AG, Horgen);
- Ultrathermostat, Temperaturkonstanz $\leq 0,01^\circ\text{C}$ zur Thermostatisierung des Detektors und der Trennsäule (z. B. Heto Typ 0,2 PT 623 UL, Vetr. Innovativ-Labor AG, Adliswil);
- Vorsäule und Trennsäule: siehe Abschnitt HPLC Trennung;
- Kompensationsschreiber, Integrator;
- Filtrationsgerät für kleine Flüssigkeitsmengen mit 10 ml Glasspritze (Millipore Kat. Nr. XX 3001200, Millipore AG, Kloten);
- Fluoropore Filter ϕ 13 mm, Porengröße $0,5 \mu\text{m}$ (Millipore Kat. Nr. FHLP 01300);
- Acetonitril für Chromatographie (Merck Nr. 30);
- Zuckerstandardsubstanzen (Merck, evtl. Fluka);
- Zuckerstandardlösungen 1 g/100 ml in Acetonitril/Wasser-Gemisch 1:1. Die Lösungen sind mehrere Monate haltbar;
- Faltenpapierfilter (Nr. 5951/2 / Schneider & Schuell AG, Feldbach);
- kleine Säule mit ca. 0,4 g C 18/Corasil zur Entfernung der Fettreste aus den Extrakten (Sep-Pak C 18 Cartridge, Waters, Part. No. 51910) (8).

Probenvorbereitung

Die Extraktion der Zucker aus den Proben erfolgt mit Wasser. Nach Zugabe des gleichen Volumens Acetonitril fallen die wenig löslichen Probenbestandteile (besonders Eiweißstoffe und Fette) aus und können abgetrennt werden.

Die Probeneinwaage (Bereich 2—10 g) muß dem Zuckergehalt der Probe angepaßt werden. Ist dieser bekannt, wird die Einwaage so berechnet, daß die Gesamtzuckerkonzentration im Acetonitril/Wasser-Gemisch höchstens 4% beträgt (die Konzentration der einzelnen Zucker soll unter 3% liegen). Bei höheren Konzentrationen können als Folge begrenzter Löslichkeit, vor allem bei Maltose und Lactose, Verluste auftreten. Bei einem unbekanntem Zuckergehalt wird zuerst eine orientierende Bestimmung mit 2 g Probe durchgeführt.

Proben mit niederem Anteil an unlöslichen Bestandteilen (Tafelgetränke, Limonaden, Fruchtsäfte, Honige, Sirupe)

Die Probe in dest. Wasser lösen bzw. entsprechend verdünnen. Getränke mit Kohlensäure vorerst im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur vorsichtig entgasen. 25 ml der Probenlösung in einen 50-ml-Meßkolben pipettieren und mit Acetonitril portionenweise (schwenken nach jeder Zugabe) bis zur Marke auffüllen. Das Gemisch kräftig schütteln (1 min) und mindestens 1 Stunde stehen lassen.* 10 ml der obenstehenden klaren Lösung mit Hilfe des Filtrationsgerätes durch einen $0,5 \mu\text{m}$ Millipore-Filter filtrieren, die ersten 2 ml des Filtrates verwerfen. Das restliche Filtrat wird für die HPLC-Trennung verwendet.

* Die Abtrennung der flüssigen Phase kurz nach der Zugabe von Acetonitril könnte einen ungünstigen Einfluß auf die Extraktionsausbeute der schwer löslichen Zucker haben.

Proben mit hohem Anteil an unlöslichen Bestandteilen (Konfitüre, Joghurt, Speiseeis, Nahrungsmittel, Schokolade, Backwaren, Kaugummi)

Die Probe zuerst gut homogenisieren bzw. fein zerkleinern und dann in ein dicht verschließbares Gefäß (z. B. 125 ml Plasmaflasche) einwiegen.

Zur Probe so viel dest. Wasser zugeben, daß die Wasserkonzentration nach der Zugabe von Acetonitril 50% beträgt. Die Wasserzugabe Z (g) wird nach folgender Formel berechnet:

$$Z = 25 + K - X$$

K = Korrektur für Volumenkontraktion des Acetonitril/Wasser-Gemisches; bei Endvolumen 50 ml $K = 1$ g

X = Wassergehalt der eingewogenen Probe in g.

Nach der Wasserzugabe das Gefäß dicht verschließen und im Wasserbad, unter gelegentlichem Schütteln, 1 Stunde auf 60 °C erwärmen.

Zur abgekühlten Probe 25 ml Acetonitril zugeben. Das Gemisch 1 min kräftig schütteln und dann stehen lassen (mind. 4 h).

Für die HPLC-Trennung ca. 10 ml der obenstehenden klaren Lösung durch einen 0,5 µm Millipore-Filter filtrieren. Wenn keine klare Trennung der Flüssigkeit von festen Bestandteilen erfolgte, vorerst durch einen Faltenpapierfilter filtrieren.

Bei den Proben mit einem hohen Fettgehalt (z. B. Schokolade) die evtl. vorhandenen Fettreste mit einer kleinen C 18/Corasil-Säule (Sep-Pak C 18) entfernen. Den Extrakt (ca. 10 ml) mit Hilfe einer 10-ml-Glasspritze tropfenweise durchlassen, danach mit dem Millipore-Filter filtrieren.

HPLC-Trennung

Vorsäule:	Bondapak AX/Corasil, Länge 23 mm, i. D. 4 mm (Waters Assoc., Vertr. Brechbühler AG, Schlieren)
Trennsäule:	µ Bondapak/Carbohydrate, Länge 300 mm, i. D. 4 mm (Waters/Part. No. 84038)
Elutionsmittel:	Acetonitril + Wasser 75 + 25 (v/v)
Durchfluß:	1,0 ml/min
Temperatur:	Trennsäule und RI-Detektor 30 °C (evtl. 40 °C)
Einspritzmenge:	25 µl
RI-Detektor:	Empfindlichkeitsbereich 4—64
Auswertung:	Messung der Peakfläche mit einem Integrator, evtl. Messung der Peakhöhe.

Berechnung der Resultate

Die Konzentration C (g/100 ml) der einzelnen Zucker in der Probe wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$C = \frac{A_p}{A_s} \cdot C_s \cdot \frac{V}{E}$$

- A_p = Peakfläche oder -höhe der Substanz im Probenextrakt
 A_s = Peakfläche oder -höhe der Substanz in der Standardlösung
 C_s = Konzentration der Substanz in der Standardlösung (g/100 ml)
 V = Volumen des Extraktes vor dem Filtrieren (ml)
 E = Einwaage (g)

Ergebnisse und Diskussion

Die hier beschriebene Methode ist bei allen Arten von Lebensmitteln anwendbar.

Die Zucker werden auch aus den Proben mit einem hohen Anteil an unlöslichen Bestandteilen praktisch quantitativ extrahiert.

In der Tabelle 1 sind die ermittelten Wiederfindungsraten mit Zusatzversuchen bei drei verschiedenen Lebensmitteln zusammengefaßt.

Tabelle 1. Wiederfindungsraten bei Zusatzversuchen

a) Joghurt nature

Zucker	Z (g/100 g)	G (g/100 g)	n	s rel. %	W %
Fructose	5	4,91	6	1,7	98,2
Glucose	5	4,96	6	0,9	99,2

d) Nahrungsmittel

Fructose	5	4,91 ¹	6	1,7	98,2
Glucose	5	4,92 ¹	6	1,7	98,4
Saccharose	5	4,84 ¹	6	1,9	96,8

c) Milkschokolade

Fructose	5	5,00	5	2,2	100,0
Glucose	5	4,91	5	1,9	98,2

¹ Werte nach dem Abzug der im Produkt bereits vorhandenen Konzentration.

Z = Zuckerzusatz

G = Durchschnitt der gefundenen Werte

n = Anzahl der Analysen

s rel. = relative Standardabweichung

W = Wiederfindungsrate in %

Die Extrakte enthalten keine mit dem RI-Detektor erfaßbaren Störpeaks. Im Gegensatz zu anderen Probenvorbereitungsmethoden, wie z. B. Klärung mit Carrez-Reagenz, verursacht die wiederholte Einspritzung der Extrakte keine irreversiblen Veränderungen der HPLC-Trennsäule.

Alle Proben, auch die scheinbar völlig klaren Lösungen, müssen vor dem Einspritzen durch den 0,5 µm Feinfilter filtriert werden. Häufige Einspritzungen nicht-filtrierter Extrakte führen zur Erhöhung des Druckwiderstandes im Trennsystem, evtl. zu seiner Verstopfung.

Bei den routinemäßigen Analysen von fetthaltigen Proben sollten die Extrakte mit der kleinen C 18/Corasil-Säule gereinigt werden. Diese Behandlung hat auf die Zuckerkonzentrationen im Extrakt keinen Einfluß.

Die Probenextrakte im Acetonitril/Wasser-Gemisch sind gut haltbar. Eine Veränderung der Zuckerkonzentrationen konnte auch nach mehreren Wochen nicht festgestellt werden.

Bei der HPLC-Trennung werden die Zucker aus diesem Gemisch in Form von schärferen symmetrischen Peaks eluiert als beim Einspritzen von wässrigen Zuckertlösungen. Die Trennleistung der Säule für die meisten Mono- und Disaccharide wird dabei ungefähr verdoppelt.

Die Vorsäule mit dem starken Anionenaustauscher (Bondapak/AX Corasil) schützt die Trennsäule vor der Anreicherung mit schwer- oder nichteluiierbaren Bestandteilen der Probe. Diese verändern die Eigenschaften der Säule und verschlechtern ihre Trennleistung. Das erste Anzeichen dieser Veränderungen ist eine deutliche Unsymmetrie und Verbreiterung des Glucosepeaks. Unsere Versuche, die Säule mit Wasser, Pufferlösungen und Acetonitril zu regenerieren, haben keine Verbesserung bewirkt.

Da die Kapazität der Vorsäule begrenzt ist, muß die Füllung regelmäßig (nach 20—40 Analysen) erneuert werden.

Die Vorsäule wird trocken gepackt.

Unter den hier beschriebenen Bedingungen können mit der Trennsäule mehr als 500 Analysen durchgeführt werden.

Die µ Bondapak/Carbohydrate-Säule hat hohe Kapazitätsfaktoren für Zucker, deshalb kann ein Eluens mit einem hohen Wassergehalt (25 Vol.-Teile) verwendet werden. Im Langzeitbetrieb verringern sich die Kapazitätsfaktoren allmählich, dies verschlechtert die Trennung der Zucker, die nahe aufeinander eluiert werden (z. B. Maltose, Lactose).

Zur Kompensation kann der Wassergehalt des Eluens reduziert werden, jedoch wegen der beschränkten Löslichkeit der Zucker nicht unter 15 Vol.-Teile. Wenn mit diesem Elutionsgemisch keine gute Trennung mehr erreicht werden kann, soll die Trennsäule erneuert werden. Die Herabsetzung des Wassergehaltes verschlechtert etwas die Nachweisempfindlichkeit des RI-Detektors.

Für die Trennung von Mono- und Disacchariden liegt der geeignete Durchfluß des Eluens bei 1 ml/min. Die Erhöhung des Durchflusses (bis 3 ml/min) kann zur Beschleunigung der Elution von Zuckern mit langen Retentionszeiten verwendet werden.

Die relativen Retentionszeiten der in Lebensmitteln häufig vorkommenden Zucker und Polyalkohole an der μ Bondapak/Carbohydrate-Säule sind in der Tabelle 2 dargestellt. Bei den hier verwendeten Bedingungen sind Sorbit und Glucose nicht getrennt. Eine unvollständige Trennung kann durch eine starke Herabsetzung des Wassergehaltes in der mobilen Phase erreicht werden. Besser geeignet für diese Trennung sind die chromatographischen Systeme mit einem Kationenaustauscher und Wasser als Eluens.

Tabelle 2. Relative Retentionszeiten (RRT) der Zucker und Polyalkohole an der μ Bondapak/Carbohydrate-Säule

Eluens: Acetonitril/Wasser 77,5+22,5 (v/v)
Durchfluß 1 ml/min, Temperatur 30 °C

Substanz	RRT	Substanz	RRT
Aethylenglykol	0,49	Mannit	1,03
Glycerin	0,58	Galactose	1,06
Xylit	0,82	Saccharose	1,43
Fructose	0,87	Maltose	1,69
Sorbit	0,99	Lactose	1,88
Glucose	1,00 (530 s)	Maltotriose	3,00

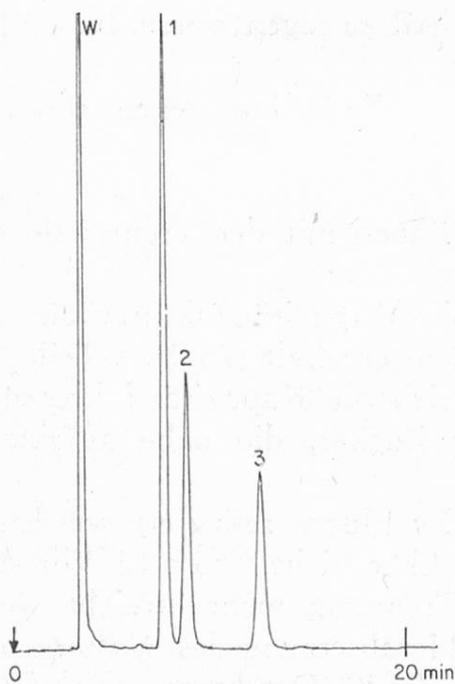


Abb. 1. HPLC-Trennung der Zucker eines Apfelsaftes

W = Wasser 2 = Glucose + Sorbit
1 = Fructose 3 = Saccharose

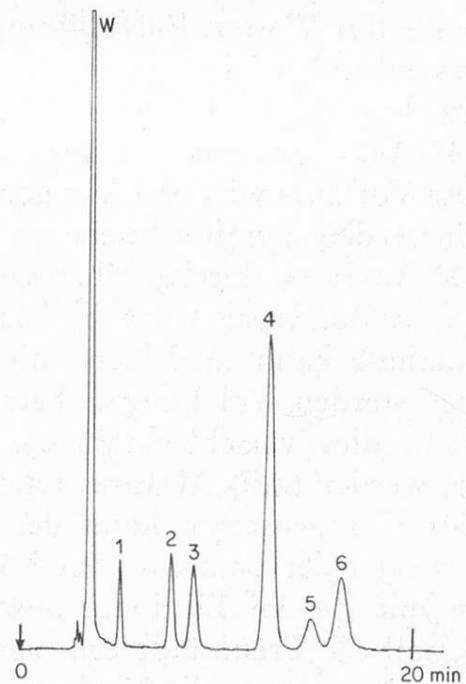


Abb. 2. Bestimmung der Zucker und Polyalkohole in einer Speiseeisprobe

W = Wasser 4 = Saccharose
1 = Glycerin 5 = Maltose
2 = Fructose 6 = Lactose
3 = Glucose

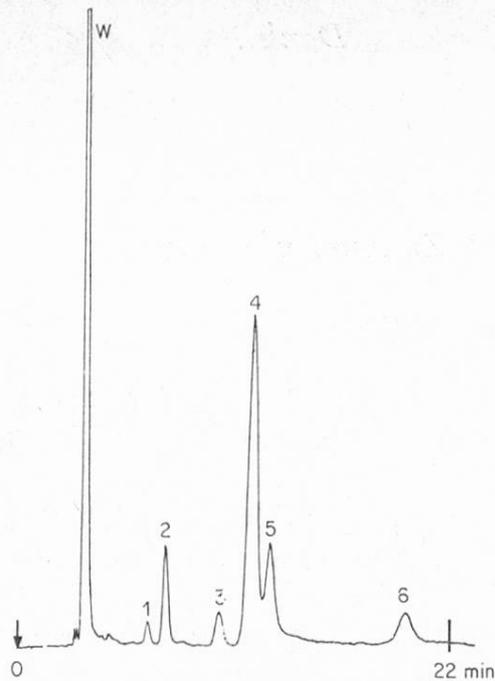


Abb. 3. Trennung der Zucker einer Nahrungsmittelprobe bei 40 °C

W = Wasser	4 = Maltose
1 = Fructose	5 = Lactose
2 = Glucose	6 = Maltotriose
3 = Saccharose	

Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen einige Beispiele der Zuckerbestimmung in verschiedenen Lebensmitteln.

Der RI-Detektor muß im Routinebetrieb thermostabilisiert werden, da auch kleine Temperaturschwankungen eine Veränderung der Basislinie und der Empfindlichkeit verursachen. Der Ultrathermostat darf nicht direkt, sondern über ein isoliertes Puffergefäß (Volumen 1—2 l) an den RI-Detektor angeschlossen werden. Dadurch werden geringe periodische Temperaturschwankungen des Thermostats ausgeglichen, die eine unruhige Basislinie bewirken.

Die Trennsäule wird mit Hilfe eines Wassermantels auf die gleiche Temperatur wie der RI-Detektor thermostatisiert. Diese Maßnahme verbessert die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und verringert den Rauschpegel. Für die Zucker mit langen Retentionszeiten kann eine Erhöhung der Temperatur auf 40 °C die Analysenzeit deutlich verkürzen (Abb. 3).

Die Nachweisgrenze für die Mono- und Disaccharide unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen liegt bei 1 µg Substanz (Signal 2- bis 3mal höher als Rauschen).

Gut meßbare Peaks werden im Bereich 2—3 µg erhalten, dies entspricht beim Dosiervolumen 25 µl und Probeneinwaage 10 g in 50 ml Endvolumen einer Zuckerkonzentration 0,05 g/100 g Probe. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit können größere Volumina (bis 100 µl) eingespritzt werden, dabei muß jedoch mit einem deutlichen Verlust der Trennleistung gerechnet werden.

Wegen der beschränkten Linearität des Detektors sowie einer möglichen Ueberlastung des Trennsystems soll die Dosiermenge beim einzelnen Zucker 700 bis 800 µg nicht übersteigen.

Dank

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes sei Herrn Dr. G. Kiss auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

Zusammenfassung

Es wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung wichtiger Zucker und Polyalkohole in Lebensmitteln beschrieben.

Die Probenvorbereitung ist einfach und für alle Lebensmittel geeignet. Bei Fructose, Glucose und Saccharose wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von $> 98\%$ erreicht.

Das HPLC-Trennsystem mit einer Aminoalkylsilan-Säule (Waters μ , Bondapak/Carbohydrate) wurde optimiert und den Anforderungen des routinemäßigen Betriebes angepaßt.

Die untere Grenze für die quantitative Bestimmung der Mono- und Disaccharide liegt bei 0,05 g/100 g Probe.

Résumé

Une méthode HPLC pour la détermination quantitative dans les denrées alimentaires des sucres et polyalcools importants est décrite.

La préparation des échantillons est simple et applicable à toutes les sortes de denrées alimentaires. On retrouve $> 98\%$ des quantités ajoutées de fructose, glucose et saccharose.

Les conditions optimales ont été établies pour un système de séparation HPLC et le système a été adapté aux analyses en séries.

La limite inférieure du dosage des mono- et disaccharides se situe aux environs de 0,05 g/100 g d'échantillon.

Summary

A HPLC-method for the quantitative determination of important carbohydrates and polyalcohols in foods is described.

The sample preparation is simple and suitable for all types of food. For fructose, glucose and sucrose an average recovery of $> 98\%$ was obtained.

The optimum conditions for the HPLC separation system has been established and the system has been adapted for the routine analysis.

The lower limit of the quantitative determination of mono- and disaccharides is about 0.05 g/100 g sample.

Literatur

1. Rapid separation of saccharide mixtures; Application highlights. Waters Associates, Mai 1974.
2. Palmer, J. K.: A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography. *Analyt. Letters* **8**, 215—224 (1975).

3. *Linden, J. C. and Lawhead, C. L.*: Liquid chromatography of saccharides. *J. Chromatog.* **105**, 125—133 (1975).
4. *Conrad, E. C. and Palmer, J. K.*: Rapid analysis of carbohydrates by high-pressure liquid chromatography. *Food Technol.* **30**, 84—92 (1976).
5. *Schwarzenbach, R.*: A chemically bonded stationary phase for carbohydrate analysis in liquid chromatography. *J. Chromatog.* **117**, 206—210 (1976).
6. *Schwarzenbach, R.*: Flüssigchromatographische Zuckertrennung. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.* **68**, 64—71 (1977).
7. *Palmer, J. K. and Brandes, W. B.*: Determination of sucrose, glucose and fructose by liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.* **22**, 709—712 (1974).
8. Sep-Pak Cartridges for rapid samples preparation. Waters Associates, Feb. 1978.

M. Cerny
Dr. A. Blumenthal
Zentral-Laboratorium des
Migros-Genossenschafts-Bundes
Limmatstraße 152
CH-8031 Zürich