

Direkte Bestimmung von Säuren in Frucht- und Gemüsesäften mittels HPLC = Direct determination of carboxylic acids in fruit and vegetable juices HPLC

Autor(en): **Schwarzenbach, R.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **75 (1984)**

Heft 1

PDF erstellt am: **14.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982692>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

R. Schwarzenbach, Givaudan, Forschungsgesellschaft AG, Dübendorf

Direkte Bestimmung von Säuren in Frucht- und Gemüsesäften mittels HPLC

Direct Determination of Carboxylic Acids in Fruit and Vegetable Juices by HPLC

Einleitung

Die direkte chromatographische Bestimmung organischer Säuren schien lange Zeit eine schwierige, mit viel Mühe und großem Zeitaufwand verbundene Aufgabe zu sein. Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) hat diese Situation jedoch stark verändert. In vielen Fällen wird es nicht mehr nötig sein, die gewünschte Empfindlichkeit und Spezifität mittels Derivatisierung erreichen zu müssen, sondern die direkte Analyse an modernen Trennsystemen mit heutigen Detektoren bringt bereits die gewünschte Antwort.

Zwei unlängst erschienene Review-Artikel zeigen eindrücklich die Fülle an Möglichkeiten, welche für direkte Bestimmungen zur Verfügung stehen (1, 2). Die Ionenaustauschchromatographie an den modernen feinkörnigen Austauschmaterialien ergibt sehr gute Trennungen mit kurzen Analysenzeiten. Der Trennmechanismus ist jedoch nicht mehr reiner Ionenaustausch, sondern eher eine durch Ionen gesteuerte und beeinflusste Verteilungschromatographie. Sehr verbreitet sind auch die Trennsysteme an C_{18} -belegtem Silikagel. Zur Unterdrückung der Dissoziation wird der mobilen Phase eine Säure oder eine Pufferlösung beigemischt. Damit lassen sich die Proben als nicht ionisierte Verbindungen chromatographieren. Die Bildung von Ionenpaaren zur Trennung von Säuren ist eine weitere Möglichkeit, die überall dort bevorzugt angewendet wird, wo es gilt, einzelne Säuren im Gemisch neutraler Verbindungen zu bestimmen. Im weiteren sind in der Literatur verteilungschromatographische Systeme beschrieben, die zwar nur mit Mühe stabil gehalten werden können, dafür sich durch besondere Trennselektivität auszeichnen.

Anhand einiger Beispiele sollen nun im folgenden die geeignetsten Trennsysteme vorgestellt und ihre praktische Bedeutung demonstriert werden. Dabei wird auch auf das Problem der Detektion und der Identifikation der Säuren eingegangen.

Experimenteller Teil

Das HPLC-System ist aus kommerziell erhältlichen Komponenten zusammengestellt.

- Pumpen: Waters Modell M-6000A und Waters Modell M-45.
Gradientensteuerung: Waters Modell M-720 System Controller.
Injektionssysteme: Waters Autosampler WISP 7108 und Waters Injektionsloop U6K für manuelle Probeneingabe.
Kolonnen: Aminex-HPX 87 der Firma Bio Rad, Radial Pak C₁₈, 5 μm , der Firma Waters und Lichrosorb RP-18, 5 μm , der Firma Merck, slurry-gepackt in unserem Labor bei 450 bar, mit Methanol.
Mobile Phase: Die zur Herstellung der mobilen Phase verwendeten Lösungsmittel wurden als HPLC-Qualität angeboten (Fluka, Merck, Rathburn) und ohne weitere Behandlung eingesetzt. Die verwendeten Reagenzien waren von analytischer Reinheit (Fluka, Merck) und wurden ebenfalls so eingesetzt wie geliefert. Das Wasser wurde entionisiert und anschließend bidestilliert.
Detektoren: Pye Unicam LC-UV und Hewlett-Packard Modell 1040A.

Alle Chromatogramme wurden bei Raumtemperatur, ohne Thermostatisierung der Kolonne oder der mobilen Phase, durchgeführt.

Resultate und Diskussion

Ionenaustausch- und Ionenausschluß-Chromatographie

Über lange Zeit waren die von *Palmer* und *List* (3) publizierten Trennungen eine Art Standard für die «Kunst», HPLC an Ionentauschern zu betreiben. Die ungenügende Druckstabilität und das von Kolonne zu Kolonne verschiedene Quellungsverhalten des Packungsmaterials waren jedoch nicht befriedigend und die Analysenzeiten und Trennleistungen an diesen Austauschharzen verdienten die Bezeichnung HPLC nicht. Die ersten, speziell für die HPLC entwickelten Ionenaustauscher bestanden aus einer Glaskugel und einem aufpolymerisierten Polystyrolfilm, an dessen Oberfläche die funktionellen Gruppen eingeführt wurden. Diese Packungsmaterialien wiesen die gewünschte Druckstabilität auf, die Retentionszeit wurde durch die dünne Schicht und der damit verbundenen kurzen Diffusionswege stark verkürzt, doch die Partikelgröße dieser Ionenaustauscher (20–40 μm) ergab nur mittelmäßige Bodenhöhen der Kolonnen.

Heute ist es möglich, durch Erhöhung des Vernetzungsgrades druckstabile, vollporöse Ionenaustauscher kleiner Partikelgröße ($<10 \mu\text{m}$) herzustellen. Mit diesen Materialien wird die Trennleistung massiv erhöht und die Analysenzeit wesentlich verkürzt. In Abbildung 1 ist die Trennung organischer Säuren an

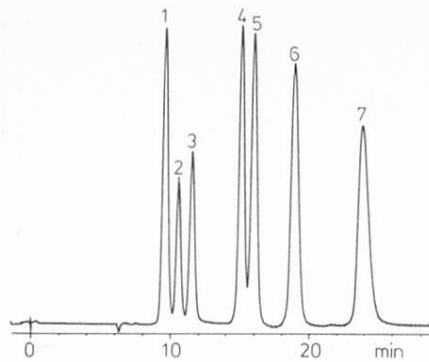


Abb. 1. Trennung einer Säuremischung an einem Kationentauscher

Kolonne: Aminex HPX-87H, 9 μm 300 x 7,8 mm

Mobile Phase: 0,01 n Schwefelsäure

Flußrate: 0,6 ml/min

Peaks:	1 = Zitronensäure	4 = Ameisensäure	7 = Buttersäure
	2 = Weinsäure	5 = Essigsäure	
	3 = Apfelsäure	6 = Propionsäure	

einer solchen Kolonne gezeigt. Die Säuren eluieren in der Reihenfolge zunehmender pK_a -Werte. Es wird bei diesem System oft auch von «ionengesteuerter Verteilungschromatographie» gesprochen und seine Anwendung in den Gebieten der Weinanalytik, der Bestimmung von Säuren in Milchprodukten und alkoholfreien Getränken wurde schon etliche Male beschrieben. Leider werden nicht nur Säuren, sondern auch Zucker und Polyalkohole zurückgehalten und getrennt. Sie eluieren dann zu gleichen Zeiten wie die gängigsten Säuren und können von diesen schlecht unterschieden werden.

Trennung von Säuren an C_{18} -Phasen

Die Zugabe von Säuren oder saurer Puffer zur mobilen Phase erniedrigt deren pH und unterdrückt damit die Dissoziation der sauren funktionellen Gruppen der Probe. Die Trennung basiert in einem solchen System auf der Hydrophobizität der Proben. Die Retention ist das Resultat hydrophobischer Wechselwirkungen zwischen dem Kohlenwasserstoffteil der Probe und der Octadecylkette der stationären Phase (4).

Für den Praktiker bedeutet das, eine mobile Phase zu finden, deren pH und ionische Stärke die Dissoziation der Probe unterdrücken kann und deren Anteil organischer Lösungsmittel eine vernünftige Retention der Probe ergibt. Fruchtsäuren benötigen zur Unterdrückung der Dissoziation relativ konzentrierte Pufferlösungen. Da der Kohlenwasserstoffanteil des Moleküls eher klein ist, muß, um eine vernünftige Retention zu erreichen, der Gehalt an organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase möglichst niedrig gehalten werden. Aus Abbildung 2 ist der Einfluß von Methanol in der mobilen Phase bei der Trennung von Monocarbonsäuren sehr gut ersichtlich. Bei der Chromatographie der Fruchtsäuren (Abb. 3) wird mit einer rein wässrigen Pufferlösung gearbeitet. Ein solches

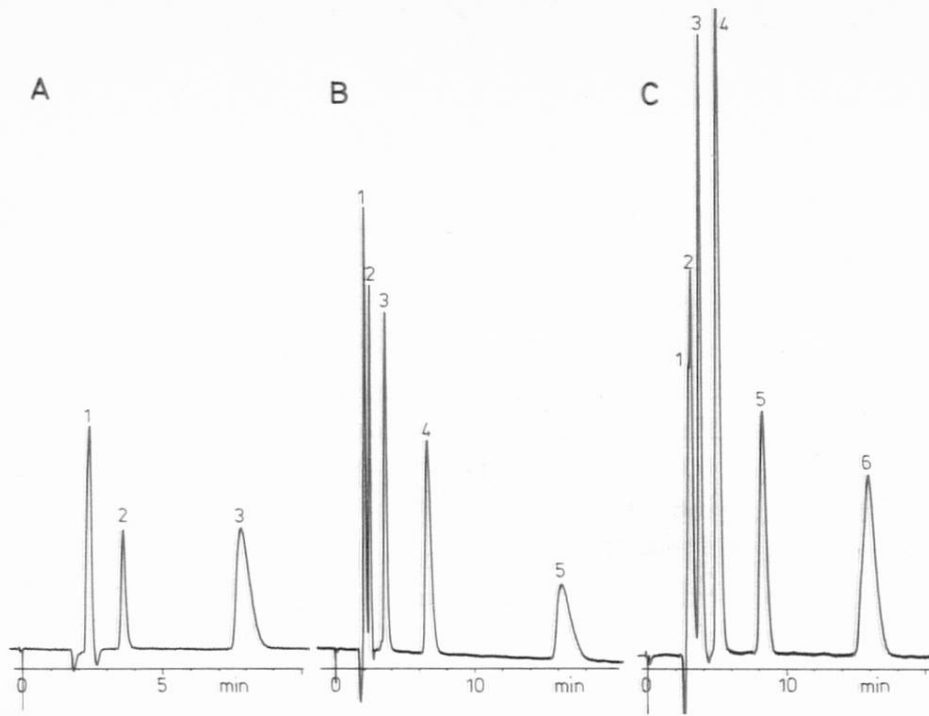


Abb. 2. Einfluß der Methanolkonzentration in der mobilen Phase auf das Retentionsverhalten

Kolonne:	Radial-PAK C ₁₈ , 10 µm Partikel, 100 x 5 mm	
Mobile Phase:	A = 0% Methanol, 100% wässrige 0,01 m K ₂ HPO ₄	
	B = 10% Methanol, 90% wässrige 0,01 m K ₂ HPO ₄	
	C = 50% Methanol, 50% wässrige 0,01 m K ₂ HPO ₄	
pH der mobilen Phasen:	pH 2,5	
Flußrate:	1,0 ml/min	
Peaks:	1 = Ameisensäure	4 = Buttersäure
	2 = Essigsäure	5 = Valeriansäure
	3 = Propionsäure	6 = Capronsäure

Trennsystem erlaubt nun die direkte Injektion einer wässrigen Probenlösung, wie zum Beispiel Wein, Fruchtsaft oder Gemüsesaft. Der in Abbildung 4 analysierte Tomatensaft wurde lediglich durch Zentrifugation von Festteilen geklärt und 20 µl der klaren Lösung direkt eingespritzt.

Zur Chromatographie weniger starker Säuren kann der Puffer durch verdünnte Säure ersetzt werden (Abb. 5). Die Hydroxybenzoesäuren und die Hydroxymzimtsäuren sind oft wichtige Bestandteile im Säurespektrum von Gemüsesäften und Gewürzölen. Ihre Bestimmung wird durch ihre UV-Absorptionseigenschaften wesentlich erleichtert. Abbildung 6 zeigt die Bestimmung von Chlorogensäure in Apfelsaft. Nebst der Phosphorsäure wurden auch Essigsäure, Zitronensäure und andere Carboxysäuren eingesetzt. Phosphorsäure wird jedoch aufgrund ihres nicht aggressiven Verhaltens gegenüber Kolonne und Apparaturen bevorzugt. Die Verwendung flüssiger Säuren oder Puffer erlauben den Einsatz der Gradientenelution ohne Einschränkungen (Abb. 7). Bei Salzlösungen besteht die Gefahr,

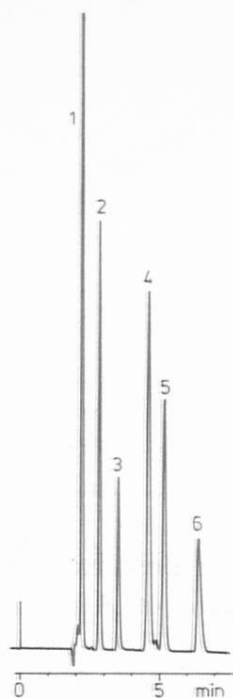


Abb. 3. Trennung von Fruchtsäuren an Silikagel C₁₈
 Kolonne: Lichrosorb RP 18, 5 μ m Partikel, 250 x 3 mm
 Mobile Phase: wässrige 0,2 m KH₂PO₄
 pH der mobilen Phase: pH 2,0
 Flußrate: 1,0 ml/min
 Peaks:
 1 = Weinsäure 4 = Zitronensäure
 2 = Apfelsäure 5 = Fumarsäure
 3 = Milchsäure 6 = Bernsteinsäure

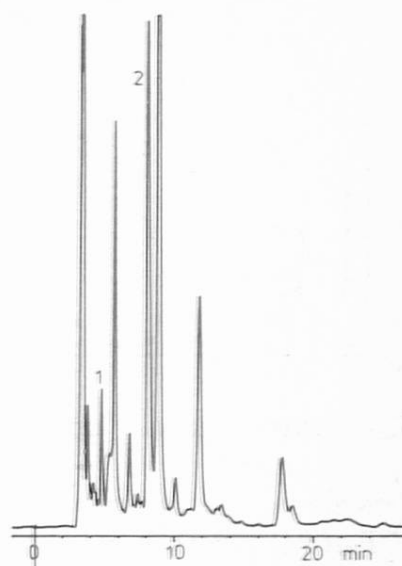


Abb. 4. Direkte Bestimmung organischer Säuren im Tomatensaft
 Kolonne: Lichrosorb RP 18, 5 μ m Partikel, 250 x 3 mm
 Mobile Phase: wässrige 0,2 m KH₂PO₄
 pH der mobilen Phase: pH 2,0
 Flußrate: 0,6 ml/min
 Peaks:
 1 = Apfelsäure 2 = Zitronensäure

daß beim Zusammentreffen mit der organischen Komponente der mobilen Phase Teile des Puffers ausfallen und zu Verstopfungen der Leitungen führen.

Die Trennselektivität kann durch den pH der mobilen Phase und durch die Wahl der organischen Komponente in der mobilen Phase dem Trennproblem angepaßt werden. Bei Änderungen des pH wird das Dissoziationsgleichgewicht verändert und damit das chromatographische Verhalten der Probe. Die Wahl des organischen Lösungsmittels wird bestimmt durch die Löslichkeit der Probe in der mobilen Phase und ergibt damit die Retentionscharakteristik. Daß binäre und ternäre organische Mischungen zu besonderen Selektivitäten führen können, wurde schon zu verschiedenen Malen beschrieben (5).

Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie an «reversed phase»-Systemen hat für die Trennung von organischen Säuren an Bedeutung gewonnen und wird auch in Zu-

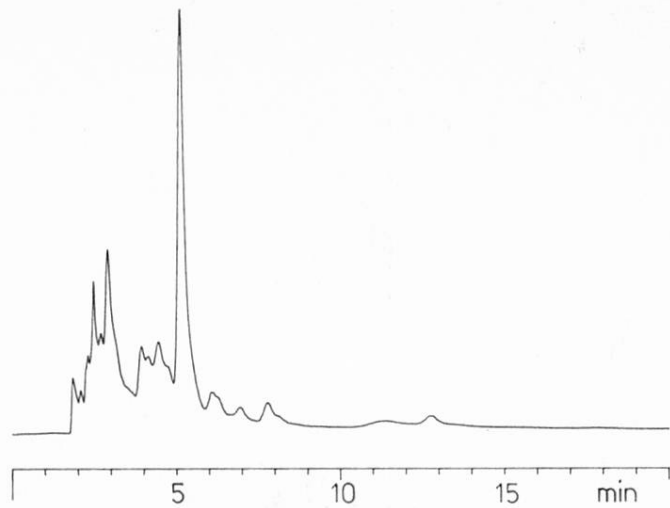
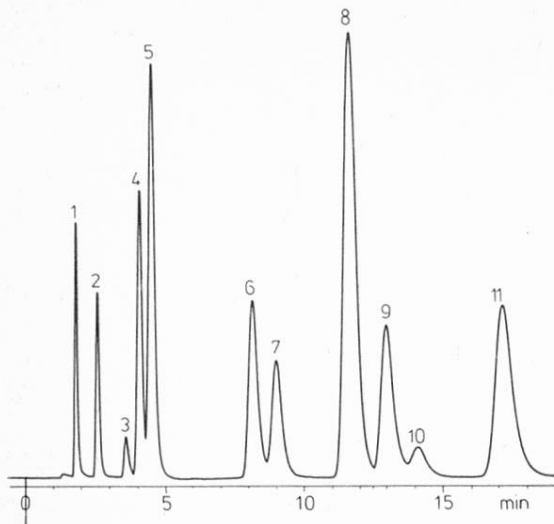


Abb. 5. Hydroxybenzo- und Hydroxycinnamsäuren

Kolonne: Lichrosorb RP 18, 10 μm Partikel, 250 x 3 mm
 Mobile Phase: 70% wässrige 0,05 m Phosphorsäure, 30% Methanol
 pH der mobilen Phase: pH 2,5
 Flußrate: 0,9 ml/min

Peaks:

- 1 = Gallussäure
- 2 = Protocatechusäure
- 3 = Mandelsäure
- 4 = para-Hydroxybenzoesäure
- 5 = Kaffeesäure
- 6 = para-Hydroxycinnamsäure
- 7 = Ferulasäure
- 8 = meta-Hydroxycinnamsäure
- 9 = Benzoesäure
- 10 = ortho-Hydroxybenzoesäure
- 11 = ortho-Hydroxycinnamsäure

Abb. 6. Direkte Bestimmung von Chlorogensäure in Apfelsaft

Kolonne: Lichrosorb RP 18, 5 μm Partikel, 250 x 3 mm
 Mobile Phase:
 70% wässrige
 0,05 m Phosphorsäure
 30% Methanol
 pH der mobilen Phase: pH 2,0
 Flußrate: 1,0 ml/min

kunft noch an Bedeutung zunehmen. Eine praktische Anleitung zum Einsatz der Ionenpaarchromatographie an C_{18} -Phasen wurde von *Gloor* und *Johnson* publiziert (6).

Durch Zugabe eines Gegenions wird im chromatographischen System mit der Säure ein Ionenpaar gebildet, welches praktisch keine Ladung besitzt und eine geringe Polarität aufweist. Wird ein apolares Gegenion verwendet, so wird dieses an der stationären Phase adsorbiert und das Trennsystem kann mit einem in situ präparierten Ionenaustauscher verglichen werden. Polarere Gegenionen befinden sich bevorzugt in der mobilen Phase und das dort gebildete Ionenpaar erhält aufgrund seiner Hydrophobizität seine spezifische Retention.

Die Retention hängt ab von der Art des Gegenions, vom pH der mobilen Phase und von der Konzentration des organischen Lösungsmittels in der mobilen

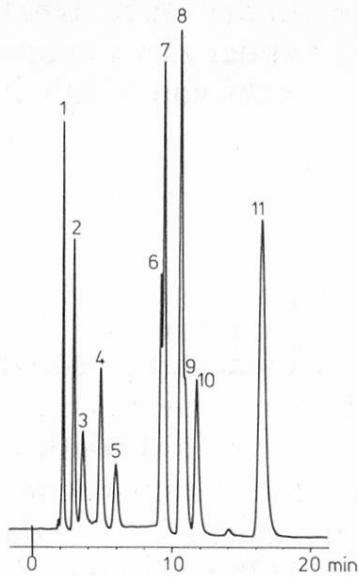


Abb. 7. Gradientenelution einer Mischung aromatischer Säuren
 Kolonne: Radial PAK C₁₈, 10 μm
 Partikel, 100 x 9 mm
 Mobile Phase: Start:
 80% wässrige 10%ige Essigsäure
 20% Methanol
 Ende:
 60% wässrige 10%ige Essigsäure
 40% Methanol
 Gradientenverlauf: konkav, über 8 min, mit 1,5 ml/min
 Peaks:
 1 = Gallussäure
 2 = Protocatechusäure
 3 = Chlorogensäure
 4 = Kaffeesäure
 5 = Mandelsäure
 6 = Ferulasäure
 7 = meta-Hydroxyzimtsäure
 8 = ortho-Hydroxyzimtsäure
 9 = Benzoesäure
 10 = Salicylsäure
 11 = Zimtsäure

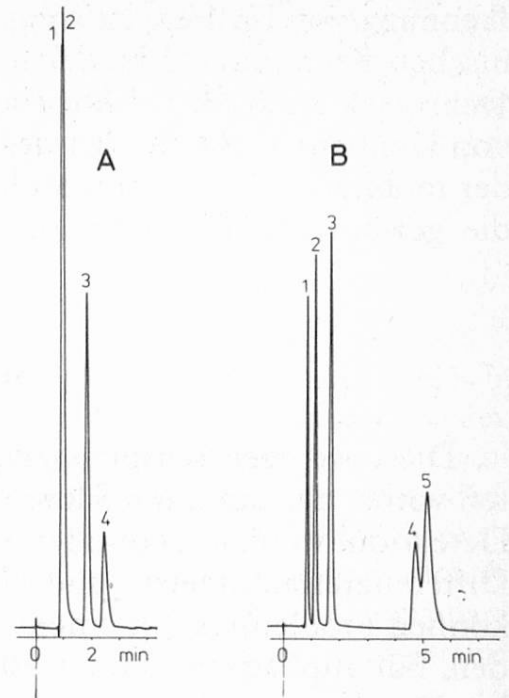


Abb. 8. Ionenpaarchromatographie. Einfluß des pH's auf die Trennung
 Kolonne: Lichrosorb RP 18, 10 μm
 Partikel, 250 x 3 mm
 Mobile Phase: 70% wässrige
 0,05 m Phosphorsäure
 30% Methanol
 0,005 m Hexylamine
 pH der mobilen Phase:
 A = 7,0 B = 2,5
 Flußrate: 1,0 ml/min
 Peaks: Chromatogramm A:
 1 = Gallussäure +
 Protocatechusäure
 2 = para-Hydroxybenzoesäure
 3 = Benzoesäure
 4 = ortho-Hydroxybenzoesäure
 Chromatogramm B:
 1 = Gallussäure
 2 = Protocatechusäure
 3 = para-Hydroxybenzoesäure
 4 = ortho-Hydroxybenzoesäure
 5 = Benzoesäure

Phase. Die Art des Gegenions, seine Größe und Polarität, wird der Art der zu erwartenden Nebenkompenten der Probe angepaßt. Mit dem pH wird die Ionenpaarbildung kontrolliert. Dieser Parameter wird verwendet, um die Trennung der ionischen Verbindungen in einer Probe zu optimieren. Als Beispiel dazu mag die

Trennung von Hydroxybenzoesäuren in Abbildung 8 dienen. Die Wahl der organischen Komponente in der mobilen Phase richtet sich nach der gewünschten Trennselektivität für die nicht ionischen Verbindungen in der Probe. Der Einsatz von Gradienten bei der Art des Gegenions, dem pH und der Zusammensetzung der mobilen Phase ist durchführbar und ergibt eine Unzahl von Möglichkeiten, die gewünschte Trennung zu optimieren.

Schlußbemerkungen

Diese wenigen Beispiele zeigen, wie viele und verschiedenartige Möglichkeiten vorhanden sind, um Säuren direkt qualitativ und quantitativ zu erfassen. Zur Detektion werden hauptsächlich drei Prinzipien angewandt: UV-Absorption, Differenzrefraktometrie und elektrochemische Detektion. Aromatische Säuren können problemlos mit einem UV-Monitor bei 280 nm oder 254 nm erfaßt werden. Für aliphatische Säuren ist die Detektion bei 205–220 nm immer noch 20- bis 40mal empfindlicher als die Erfassung mit dem Differentialrefraktometer. Für sehr spezifische und empfindliche Messungen sind die elektrochemischen Detektoren (7) die geeignetsten. Die Art der Matrix, in welcher die Säuren zu bestimmen sind, die Konzentration und Art der Säuren selbst sowie die Fragestellung werden darüber entscheiden, welches Trennsystem und welches Detektionssystem Verwendung finden soll.

Zusammenfassung

Zur direkten Bestimmung organischer Säuren mittels HPLC stehen dem Analytiker verschiedene Trennsysteme zur Verfügung. Ionenaustauschchromatographie an vollporösen Ionentauschern kleinster Partikelgröße ergeben gute Trennungen bei kurzen Analysenzeiten. Der Trennmechanismus ist jedoch nicht mehr reiner Ionenaustausch, sondern vielmehr eine ionengesteuerte Verteilungschromatographie. Trennungen an C₁₈-Phasen, mit Puffer oder Säuren in der mobilen Phase zur Untedrückung der Dissoziation, sind oft der einfachste Weg zur Analyse von Säuren. Immer mehr an Bedeutung gewinnt die Ionenpaarchromatographie. Sie hat eindeutig die größte Zahl von Parametern, welche zur Optimierung der gewünschten Trennselektivität verwendet werden können. Das Trennproblem wird darüber entscheiden, welches System zur Lösung der Fragestellung am besten geeignet ist.

Résumé

Nous disposons de divers systèmes de séparation pour la détermination directe d'acides organiques au moyen de la chromatographie en phase liquide. La chromatographie d'échange d'ions sur les plus fines résines microréticulées permet de bonnes séparations en un temps d'analyse très court. La cinétique de séparation n'est plus un échange d'ions au sens propre, mais plutôt une chromatographie liquide-liquide contrôlée par des ions. Des séparations sur phases C₁₈, au moyen de tampons ou d'acides dans la phase mobile pour li-

miter la dissociation, sont souvent le moyen le plus simple d'analyser des acides carboxyliques.

Le partage par formation de paires d'ions prend de plus en plus d'importance, son grand nombre de paramètres pouvant augmenter la sélectivité des séparations voulues. Le genre de séparation détermine le choix du système le mieux approprié.

Summary

Several separation systems are used for the direct determination of carboxylic acids by HPLC. Ion exchange chromatography on micro particulated exchange materials gives excellent separations within short analysis time. The separation mechanism, however, is no longer pure ion exchange but often referred to as ion moderated partition chromatography. Reversed phase partition chromatography, using an acid or buffer in the mobile phase to suppress the ionization of the solutes is the most comfortable and simple separation system for carboxylic acids. The use of ion pairing reagents in reversed phase chromatography does facilitate HPLC separation of acidic solutes and gives largest number of parameters for the selection of separation selectivity.

Literatur

1. *Roston, D. A. and Kissinger, P. T.*: Liquid chromatographic determination of phenolic acids of vegetable origin. *J. Liquid Chromatogr.* **5**, 75–103 (1982, Suppl.).
2. *Schwarzenbach, R.*: High-performance liquid chromatography of carboxylic acids. *J. Chromatogr.* **251**, 339–358 (1982).
3. *Palmer, J. and List, D. M.*: Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **21**, 903–906 (1973).
4. *Horvath, C., Melander, W. and Molnar, I.*: Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr.* **125**, 129–156 (1976).
5. *Roggendorf, E. and Spatz, R.*: Systematic use of tetrahydrofuran in reversed phase high performance liquid chromatography. An example of the selectivity benefits of ternary mobile phases. *J. Chromatogr.* **204**, 263–268 (1981).
6. *Gloor, R. and Johnson, E. L.*: Practical aspects of reversed phase ion pair chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **15**, 413–423 (1977).
7. *Felice, L. J. and Kissinger, P. T.*: Determination of homovanillic acid in urine by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.* **48**, 794–795 (1976).

R. Schwarzenbach
Givaudan Forschungsgesellschaft AG
Überlandstraße 138
CH-8600 Dübendorf