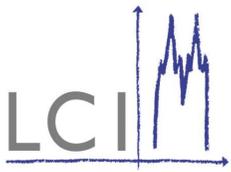


# Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Steviolglycosiden in Süßwaren mittels HPLC-UV



Marion Raters, Teresa Brandes, Reinhard Matissek

LCI, Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie (BDSI) e. V., Adamsstraße 52-54, 51063 Köln  
www.lci-koeln.de

## Hintergrund

Steviolglycoside sind süßende Inhaltsstoffe der Pflanze *Stevia rebaudiana*, die in deren Blättern biosynthetisiert werden. Die Pflanze stammt ursprünglich aus Paraguay und wird dort schon seit vielen Jahrhunderten von der indigenen Bevölkerung zum Süßen des Maté-Tees verwendet. Bisher sind über 30 dieser sekundären Stoffwechselprodukte identifiziert, die alle als Aglykon Steviol, ein Diterpenalkohol, enthalten und sich nur in ihrer Zucker-Komponente unterscheiden. Die Hauptglycoside – das Steviosid (4-13%) und das Rebaudiosid A (2-4%) – machen über 90% des Gesamtglycosidgehalts aus [1, 2].

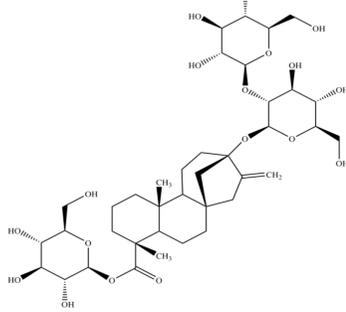


Abb. 1: Steviosid

Der Einsatz von Steviolglycosiden als Süßungsmittel ist seit dem 02. Dezember 2011 durch die Verordnung (EU) Nr. 1131/2011 in der Europäischen Union (EU) erlaubt und geregelt [3]. Aufgrund ihrer etwa 200 mal stärkeren Süßkraft im Vergleich zu Saccharose sind Steviolglycoside äußerst attraktiv, speziell im Getränkereich. Beim Gewinnungsverfahren werden die Steviolglycoside aus den Blättern extrahiert und können mit einer Mindestreinheit von 95% in verschiedenen Lebensmittelgruppen, gekennzeichnet als E 960, eingesetzt werden. Jedoch gibt es von der EU Regelungen bezüglich Zusammensetzung und zugelassenen Höchstmengen des Süßstoffs, deren Kontrolle erforderlich ist. Der ADI-Wert für Steviolglycoside (ausgedrückt als Stevioläquivalente) liegt bei 4 mg/kg Körpergewicht/Tag [4].

## Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf bisher veröffentlichter Literatur [4, 5], eine effiziente HPLC-UV-Methode zur Bestimmung der Gehalte an Steviolglycosiden in Süßwaren zu entwickeln. Die Quantifizierung erfolgte durch die Methode des externen Standards. Ferner wurde die in dieser Arbeit entwickelte Methode umfangreich für das Steviolglycosid Rebaudiosid A validiert.

## Validierung

Die vorgestellte Methode wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Kromidas [6] validiert. Hierzu wurde eine Kräuter-Bonbon-Probe, welche Rebaudiosid A enthält, entsprechend der in dieser Arbeit entwickelten Methode aufgearbeitet und vermessen. In Tabelle 1 sind einige Validierungsdaten wie z. B. die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (RSD<sub>r</sub>) und Vergleichbarkeit (RSD<sub>R</sub>), die Wiederfindung sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze zusammengestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Methodvalidierung für Rebaudiosid A

	Rebaudiosid A
RSD <sub>r</sub> [%]	1,3
RSD <sub>R</sub> [%]	2,5
Wiederfindung [%]	100,6 ± 0,3
Nachweisgrenze [µg/mL]	0,1
Bestimmungsgrenze [µg/mL]	0,4

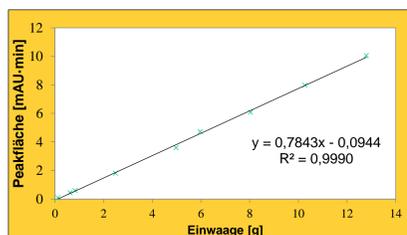


Abb. 2: Linearitätsprüfung

Die beschriebene Methode zeigt sich in einem weiten Messbereich als linear, die Linearitätsprüfung ist in Abbildung 2 dargestellt. Des Weiteren verfügt die Methode über eine gute Reproduzierbarkeit, eine sehr gute Wiederfindung und ist zudem äußerst sensitiv (Nachweisgrenze von 0,1 µg/mL).

## Literatur

- [1] Wölver-Rieck U (2012) Journal of Agricultural and Food Chemistry 60:886–895.
- [2] Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K (2012) Food chemistry 132:1121–1132.
- [3] Verordnung (EU) Nr. 1131/2011 der Kommission vom 11. November 2011 zur Änderung von Anhang II der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Steviolglycosiden.
- [4] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) *Compendium of Food Additive Specifications, 73<sup>rd</sup> Meeting, FAO JECFA Monographs 10*; FAO: Rome, 2010, pp17–22
- [5] Bergs D, Burghoff B, Joehneck M, Martin G (2012) Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 7:147-154.
- [6] Kromidas, S. (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. VCH Verlag, Weinheim.
- [7] Verordnung (EU) Nr. 231/2012 vom 9. März 2012 mit Spezifikationen für die in den Anhängen II und III der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates aufgeführten Lebensmittelzusatzstoffe
- [8] Deutsche Lebensmittel Rundschau (DLR) (eingereicht)

## Aufarbeitung



## HPLC

- Säule: Hypersil ODS C18 5 µm, 250 x 4,6 mm
- Mobile Phase: ACN/H<sub>2</sub>O (auf pH 2,75 mit HCl), (29/71, v/v)
- Säulenofen: 50 °C
- Injektionsvolumen: 20 µL
- Fluss: 1 mL/min
- Detektion: DAD, Wellenlänge λ = 210 nm

Beispiel-Chromatogramme:

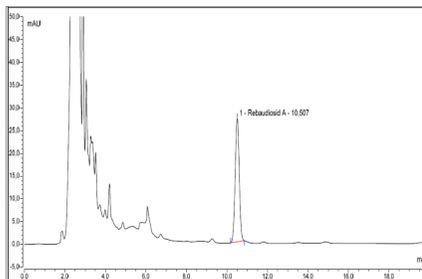


Abbildung 3: Chromatogramm einer Bonbon-Probe

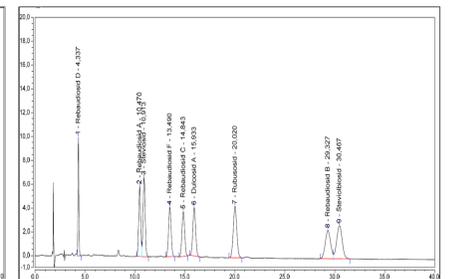


Abbildung 4: Chromatogramm der JECFA Mixed Solution

## Monitoring

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Monitoring an steviolglycosidhaltigen Süßwaren durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt 14 Proben der Kategorien „Schokoladen/erzeugnisse“ und „Zuckerwaren“ auf ihre Steviolglycosidgehalte untersucht. Die Ergebnisse dieses Monitorings sind dem Balkendiagramm in Abbildung 5 zu entnehmen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse erfolgte hier die Angabe der Gehalte an Steviolglycosiden umgerechnet in Stevioläquivalente, gemäß der in Verordnung (EU) Nr. 231/2012 angegebenen Umrechnungsfaktoren [7].

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, schwanken die eingesetzten Mengen an Steviolglycosiden in den untersuchten Süßwaren stark. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass in knapp 80% der untersuchten Proben, nur Rebaudiosid A als Steviolglycosid verwendet wurde. In den anderen Proben waren zusätzlich noch Steviosid und/oder Rebaudiosid C enthalten.

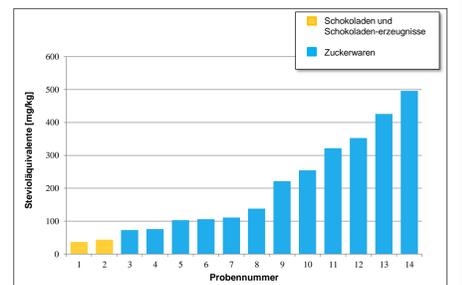


Abb. 5: Ergebnisse des Stevia-Monitorings

## Schlussfolgerung

Es wurde eine Analysenmethode zur schnellen und sensitiven Erfassung sowie Quantifizierung von neun der zehn zugelassenen Steviolglycoside mittels HPLC-UV entwickelt. Die Methode wurde für das Steviolglycosid Rebaudiosid A erfolgreich validiert.

Die entwickelte Methode stellt ein für die Routineanalytik geeignetes, schnelles Verfahren dar. Durch eine wenig aufwändige Probenvorbereitung und mit kurzen Analysenzeiten kann der Steviolglycosidgehalt in Süßwaren bestimmt und somit der Gehalt an Stevioläquivalenten berechnet werden. Ferner bietet das hier vorgestellte Verfahren die Möglichkeit, die Einhaltung der von Seiten der EU festgelegten Höchstmengen zu überprüfen, sowie die Anforderungen bezüglich Reinheit und Zusammensetzung sicher zu stellen [8].