

Stevia im Visier

Bestimmung von Steviolglycosiden mittels Kapillarelektrophorese

Nachdem die Kommerzialisierung der kalorienfreien Süßkraft von *Stevia rebaudiana* (Bertoni) durch namhafte Konzerne wie Coca-Cola und Cargill initiiert wurde, sind nun auch in Europa die Steviolglycoside, umgangssprachlich häufig als Stevia bezeichnet, als Lebensmittelzusätze erlaubt [1]. Seit Februar diesen Jahres wächst die Palette von Stevia-haltigen Produkten in den Regalen unserer Supermärkte rasant.

Nun ist die Analytik gefordert, um die Reinheit der eingesetzten Steviolglycoside und die Einhaltung der Grenzwerte in den verschiedensten Produkten zu kontrollieren. Im vorliegenden Beitrag wird eine kapillarelektrophoretische Methode vorgestellt, mit der die Quantifizierung der wichtigsten Steviolglycoside sowohl in pflanzlichen Bestandteilen als auch in verarbeiteten Produkten möglich ist.

Kurze Geschichte der Süßstoffe

Seit Einführung der Zuckerrübe durch den Preußenkönig Friedrich II. im Jahre 1799 zur Sicherstellung der Versorgung mit essentiellen Kohlenhydraten haben sich die globalen Ernährungsgewohnheiten grundlegend verändert. Während sich auf der Nordhalbkugel durch einen „Überkonsum“ an Zuckern in hohem Maße Krankheiten wie Diabetes, Herz-Kreislauf-Beschwerden oder Karies weiter als sogenannte „Volkskrankheiten“ ausbreiten, hungern auf der Südhalbkugel noch Millionen von Menschen. Desweiteren werden Zucker oder kohlenhydratreiche landwirtschaftliche Erzeugnisse wie etwa Mais in zunehmendem Maße zur Gewinnung von „Bioethanol“ oder „Biogas“ herangezogen, was zu einer Umgestaltung unserer Kulturlandschaft zu großen Monokulturflächen führt.

Mittlerweile macht sich der Trend bemerkbar, die rigorose Anwendung von Zuckern in unseren Lebensmitteln zu reduzieren, um gesundheitlichen Problemen vorzubeugen. Eine Möglichkeit zum Umdenken (zurück zur Natur im Sinne von Nachhaltigkeit) bestünde in der Nutzung von

Pflanzen, welche bereits seit Jahrhunderten von Naturvölkern zum Süßen verwendet werden.

Eine dieser Pflanzen heisst umgangssprachlich Stevia, mit botanischem Namen *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Die Stevia Pflanze stammt ursprünglich aus dem Hochland in Südamerika, sie wurde bei den indianischen Ureinwohnern als „Honigkraut“ seit langem zum Süßen von Tee und Nahrungsmitteln verwendet.

Zulassung von Steviolglycosiden

Die krautige Blattpflanze enthält eine Reihe von Steviolglycosiden, die eine 200 bis 300 fache Süßkraft im Vergleich zu Industriezucker besitzen. Diese Naturstoffe sind teilweise recht komplex zusammengesetzte Gemische, deren Anwendung als diätetische Süßstoffe im Steigen begriffen ist. Während in den USA bereits 2008 für die Steviolglycoside der GRAS-Status vergeben wurde, ist in Europa erst seit Dezember 2011 der Süßstoff Stevia offiziell als Lebensmittelzusatzstoff E960 zugelassen [1]. Allerdings ist die Zulassung auf die Steviolglycoside beschränkt, die in einem mehrstufigen Extraktionsverfahren aus den Blättern gewonnen werden und eine Reinheit von über 95% aufweisen müssen. Die maximale Tagesaufnahme an Stevioläquivalenten (ADI) wurde auf 4 mg/kg Körpergewicht festgelegt. Die Zulassung zur Vermarktung der Pflanze oder der Blätter und damit die Einstufung als „Novel Food“ wurde von der Europäischen Kommission verweigert, da die eingereichten Informationen bisher nicht für



© Vera Kuttelvaserova - Fotolia.com

Apropos hitzestabil:

Wie wäre es mit ein paar leckeren Weihnachtsplätzchen?

Nuss-Makronen mit Stevia Plus:

3 mittelgroße Eiweiß, 20 g Stevia Plus, 200 g gemahlene Haselnüsse, 3 Prisen Zimtpulver

Zubereitung [4]:

Eiweiß steif schlagen. Stevia Plus mit den gemahlene Haselnüssen vermengen und langsam unter die Eiweißmasse rühren. Backblech mit Backpapier auslegen. Mit 2 Teelöffeln kleine Häufchen auf das Blech setzen. Bei 150 °C Umluft ca. 15–20 Minuten backen. Guten Appetit wünscht das Autorennkollektiv!



Abb. 1: *Stevia rebaudiana* Bertoni (Laborzucht)

eine genaue Spezifizierung aller Inhaltsstoffe der Pflanze ausreichen.

Um zukünftig die Akzeptanz für die Zulassung weiterer Inhaltsstoffe oder der gesamten Pflanze insbesondere in der EU zu erhöhen, ist eine vernünftige analytische Charakterisierung der Stevia Inhaltsstoffe eine unverzichtbare Voraussetzung. Ebenso ist für die physiologische und toxikologische Bewertung der vom Endverbraucher pro Tag aufgenommenen Stevia-Inhaltsstoff-Menge eine verlässliche Analytik erforderlich.

Analytik durch Kapillarelektrophorese

In den letzten zwei Jahren wurden über 30 verschiedene Steviolglycoside in der Literatur beschrieben, die mit unterschiedlichen Verfahren analysiert wurden [2]. Allen gemeinsam ist eine Diterpen-Grundstruktur (s. Abb. 2). Die einzelnen Steviolglycoside enthalten

eine oder mehrere Glycone an den Positionen 1 und 2 [3]. Die wichtigsten Verbindungen sind mit ihren relevanten Eigenschaften in Tabelle 1 zusammengefasst.

Mittlerweile sind die in Tabelle 1 aufgezählten Steviolglycoside als gut charakterisierte Standardsubstanzen kommerziell verfügbar. Mittels dieser Standards ist die Voraussetzung für eine Zuordnung und Gehaltsbestimmung sowohl in Blattextrakten der Pflanze, als auch in den industriell hergestellten Stevia Produkten, seien es pulverförmige oder flüssige Süßungsmittel, auf eine solide Basis gestellt.

Aus Abbildung 3 geht hervor, dass mittels der angewendeten Hochleistungs-Kapillarelektrophorese eine analytische Methode zur Verfügung steht, welche die Anforderung auch im Sinne einer behördlich akzeptierten Validierungsfähigen Analytik in vollem Umfang erfüllt. Die sieben als Haupt-Stevia-Glycoside zu bezeich-

Tabelle 1: Eigenschaften und Süßkraft verschiedener Steviolglycoside (3)

Steviolglycosid	Summenformel	L(H ₂ O) bei 25 °C	Süßkraft (bezogen auf Saccharose = 1)
Dulcosid	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	5,8 g/l	30
Rebaudiosid A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	8,0 g/l	200–300
Rebaudiosid B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	1,1 g/l	150
Rebaudiosid C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	2,1 g/l	30
Rebaudiosid D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1,0 g/l	221
Steviolbiosid	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	0,3 g/l	90
Steviosid	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	1,25 g/l	150–250

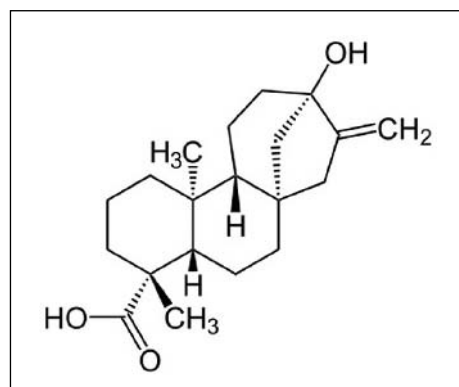


Abb. 2: Grundstruktur Steviolglycoside

nenden Verbindungen werden mit sehr guter Auflösung getrennt und sind so quantifizierbar.

Als theoretische Grundlage für die Entwicklung der hier angewendeten analytischen Methode diente die Fähigkeit dieser Verbindungen mit Borat sogenannte Komplexverbindungen zu bilden, welche dann im elektrischen Hochspannungsfeld eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität besitzen und sich wegen dieser unterschiedlichen „Wanderungsgeschwindigkeit“ letztendlich trennen lassen. Für die praktische Umsetzung können kommerziell erhältliche Kapillarelektrophorese-Geräte eingesetzt werden. Die für die Analytik erforderliche

hocheffiziente Trennung wird dabei in einer dünnen Quarzglas Kapillare (mit einem Innendurchmesser von 50 µm) realisiert, wobei mittels optimierter UV-Detektion die Steviolglycoside mit ausreichend niedrigen Bestimmungsgrenzen quantifiziert werden können.

Die validierte Methode ermöglicht die Quantifizierung der Steviolglycoside in verschiedensten Proben in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 mg/l und 500 mg/l. Sowohl die Präzision der Peakflächen als auch der Migrationszeiten erwies sich nach Auswertung einer Zehnfachinjektion als sehr gut. Mit dieser Methode wird die Untersuchung von Pflan-

ICA Ingenieurgemeinschaft für Chemische Analytik

Wir bieten Dienstleistungen rund um die Kapillarelektrophorese

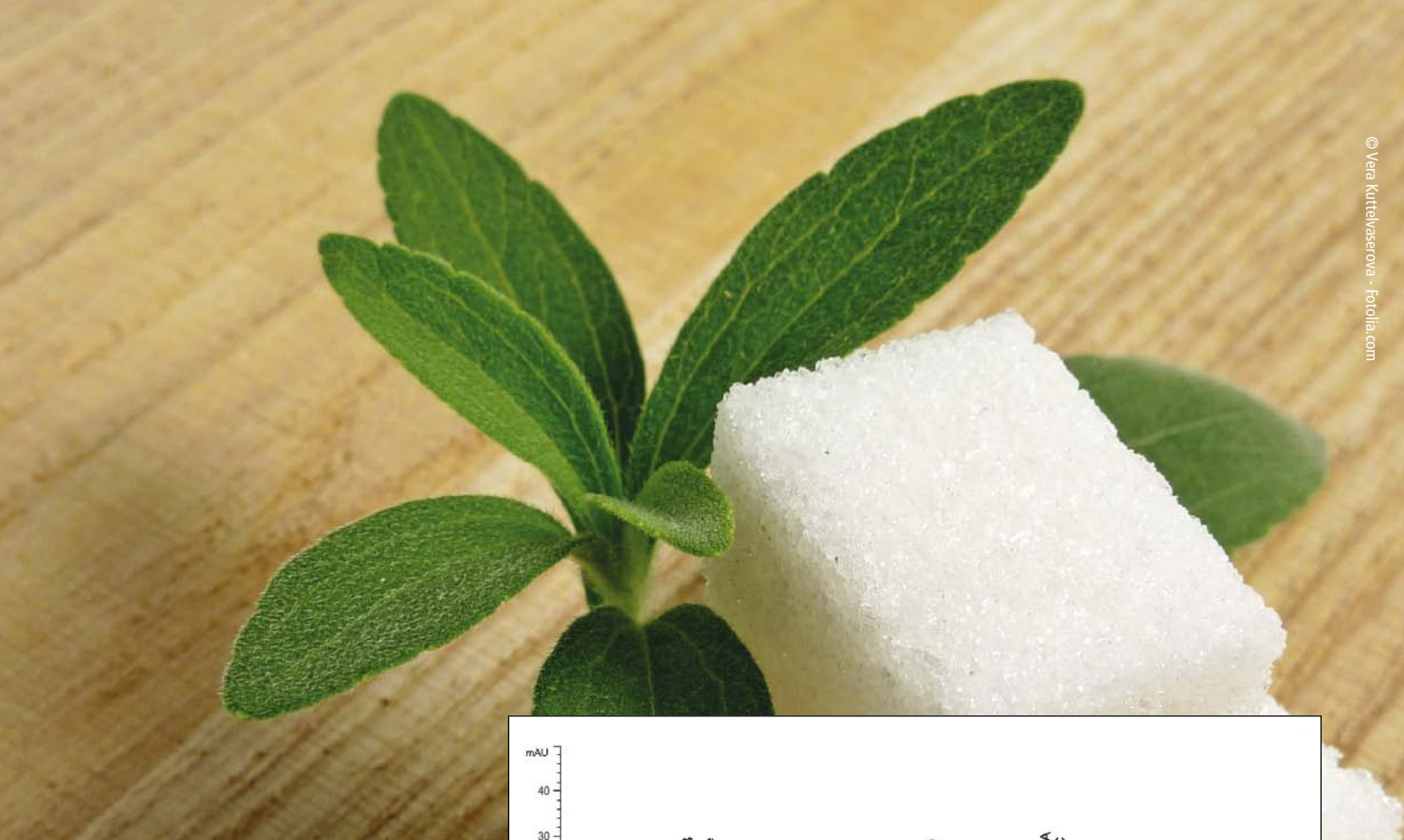
Die nächsten Schulungstermine finden Sie unter www.ica-analytik.de

ICA
Robert-Bosch-Str. 42
Tel.: 06103 8044090
www.ica-analytik.de
www.kapillarelektrophorese.eu
e-mail: ica@ica-analytik.de

ICA Ingenieurgemeinschaft für Chemische Analytik

- Analysen
- Applikationen
- Schulung und Beratung
- Dienstleistungen





zenteilen und auch von steviahaltigen Nahrungsmitteln wie Limonaden, Tees, Süßspeisen oder Marmeladen ermöglicht. In Abbildung 4 ist das Elektropherogramm eines flüssigen Süßungsmittels dargestellt.

Wie es in realen Proben häufig vorkommt, sind auch in diesem Fall die verschiedenen Stevioglycoside in sehr unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Der ausreichend große lineare Arbeitsbereich der hier vorgestellten Methode ermöglicht aber auch in solchen Proben die Quantifizierung der einzelnen Bestandteile in einem Lauf. Zusätzlich ist die einfache Probenvorbereitung ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens, da in der Regel die wässrigen Probelösungen direkt analysiert werden können.

Weitere Abbildungen sind auf der Homepage www.kapillarelektrophorese.eu zusammengestellt oder können von den Autoren angefordert werden.

Fazit

Während der letzten Monate war die unwahrscheinlich schnelle Etablierung von Steviahaltigen Produkten in unseren Supermärkten zu beobachten. Mit der Kapillarelektrophorese ist ein solides Werkzeug vorhanden, den Steviolgehalt in den verwendeten Ausgangsstoffen und in den Fertigprodukten zu bestimmen. Sicher wird in naher Zukunft die Produktentwicklung im Lebensmittelbereich aber auch im kosmetischen Bereich zu einer weiteren Bereicherung in den Regalen führen. Neben der Kalorienreduktion und der antikariösen Wirkung sind vor allem die hervorragenden physikalischen Eigenschaften, wie die gute Hitzestabilität und pH-Akzeptanz der Stevioglycoside

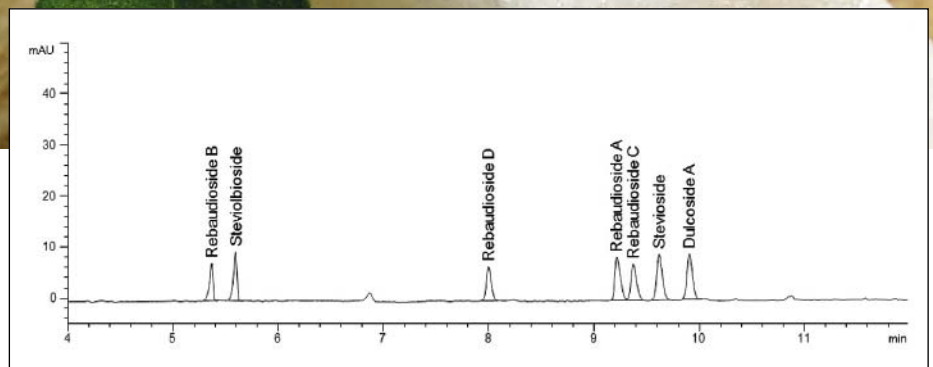


Abb. 3: Hochleistungs-Kapillarzonenelektrophorese: Standardlösung: je 20 mg/l Stevioglycoside.

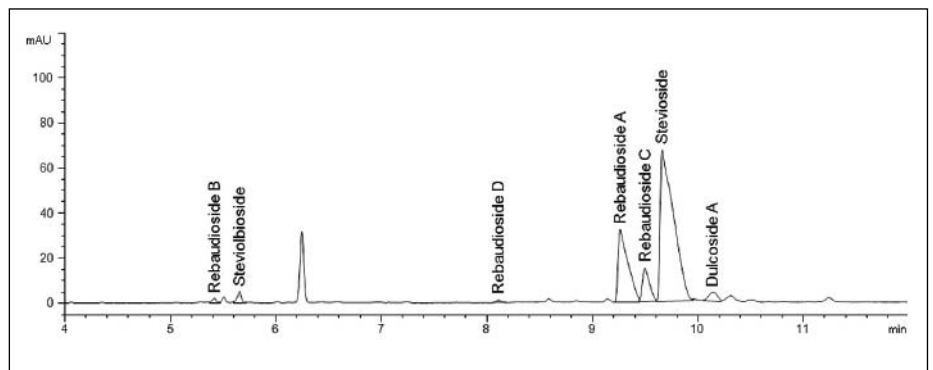


Abb. 4: Süßungsmittel Stevia flüssig mit Alkohol.

interessant und bieten entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen Süßungsmitteln.

Literatur

- [1] Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food on the Safety of Steviol Glycosides for the Proposal Uses As a Food Additive. EFSA J., 8(4), 1537 (2010)
- [2] U. Wölwer-Rieck, J. Agric. Food Chem., 60 (4), 886–895 (2012)
- [3] <http://www.internetchemie.info/chemiewiki/index.php?title=Steviolglycoside>, Zugriff 30.10.2012
- [4] www.chefkoch.de, weitere Rezepte auch unter: www.freestevia.de und www.steviarezepte.org

Autoren

Dr. Jana Boden, Dr. Beate Göttlicher, Dr. Ingo Haumann und Dr. Antje Mainka, ICA – Ingenieurgesellschaft für Chemische Analytik, Langen, Dr. Klaus Feige, Reinheim

► KONTAKT

Dr. Jana Boden
ICA – Ingenieurgesellschaft für Chemische Analytik
Langen
ica@ica-analytik.de
www.ica-analytik.de