

## Applikation

### ► Trennung von Steviolglykosiden

Kategorie	Nahrungsmittel
Matrix	Planzen
Methode	HPLC
Schlüsselwörter	Steviosid, Steviolglykoside
Analyten	Steviosid, Rebaudiosid A
ID	VFD 11, 08/09(1)



#### Zusammenfassung

Eine robuste, selektive und empfindliche Trennmethode für die Bestimmung von vier Steviolglykosiden in Pflanzenblättern der Stevia-Pflanze wurde entwickelt. Abgesehen von zwei durch ihre Standards nachgewiesenen Substanzen wurden mittels LC-MS noch zwei weitere Glykoside in den Extrakten der Stevia-Blätter identifiziert. Diese beiden Substanzen wurden mit Kalibrierkurven der bekannten Substanzen quantifiziert. Mit kleinen HPLC-Säulen und einem KNAUER Smartline HPLC System wurde eine schnelle und einfache Methode für die Trennung komplexer Stevia-Extrakte erstellt. Hierbei garantieren die moderaten Methodenparameter in Verbindung mit der etablierten Eurospher NH<sub>2</sub>-Phase eine sehr günstige und sehr gut reproduzierbare Analysenmethode.

#### Einführung

Steviolglykoside sind verantwortlich für den süßen Geschmack der Blätter der Stevia-Pflanzen (200 Arten), die schon seit Jahrhunderten bei den Einwohnern von Brasilien und Paraguay bekannt sind. Die Süßkraft dieser Substanzen ist etwa 75 bis 450fachen stärker als Sucrose und sie zeigen auch nicht den bitteren Nachgeschmack vieler bekannter Süßstoffe. Steviolglykoside sind praktisch kalorienfrei und unterliegen keiner Zersetzung von Mikroorganismen. Daher unterdrücken diese Substanzen auch die Bildung von Karies und Plaque.

Die vier wichtigsten Vertreter der Steviolglykoside in den Blätterextrakten sind das Steviosid mit einem Anteil von 5 – 10%, das Rebaudiosid A mit einem Anteil von 2 – 4%, das Rebaudiosid C mit einem Anteil von 1 – 2% und das Dulcosid A mit einem Anteil von 0,5 – 1% der gelösten Substanzen.

Im Zuge der Zulassung der vier o.g. Stevioglykoside durch die staatlichen Gesundheitsämter wird eine robuste und sensitive Quantifizierungsmethode benötigt.

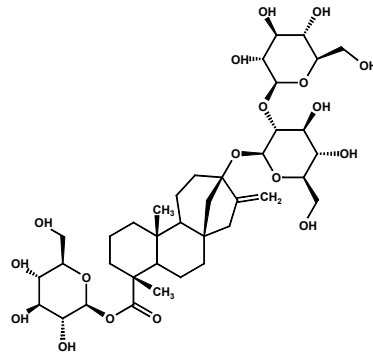
#### Probenvorbereitung

Etwa 2 g getrocknete und gemahlene Stevia-Pflanzenblätter, genau gewogen, werden mit 20 ml Wasser bei 70°C unter Rühren extrahiert. 1 ml dieser Mischung wird dann auf eine vorkonditionierte C2-SPE-Kartusche gegeben und mit Wasser, sowie einer 20%igen Methanolmischung gewaschen. Anschließend wird die Kartusche so lange mit 80%ig Methanol gespült, bis ein Volumen von 62 ml erreicht wird.

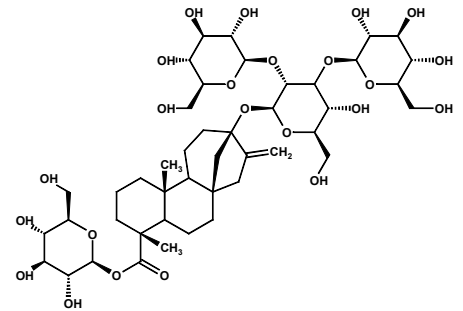
## Standardherstellung

Je 2,5 mg von Steviosid und Rebaudiosid A werden in einen 10 ml Messkolben gewogen, in einer kleinen Menge einer 80%igen wässrigen Methanollösung gelöst und der Kolben mit einer 80%igen wässrigen Methanollösung bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Stammlösung (250 µg/ml) werden Verdünnungen der Konzentration 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml hergestellt.

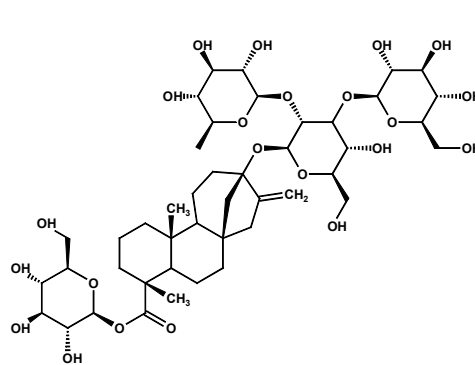
## Chemische Strukturen



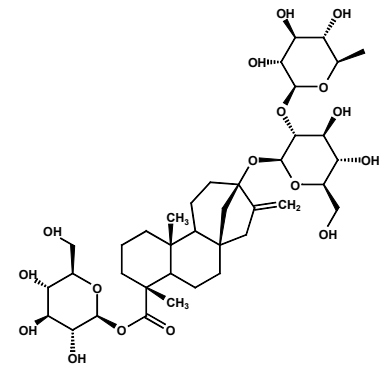
Steviosid



Rebaudiosid A



Rebaudiosid C



Dulcosid A

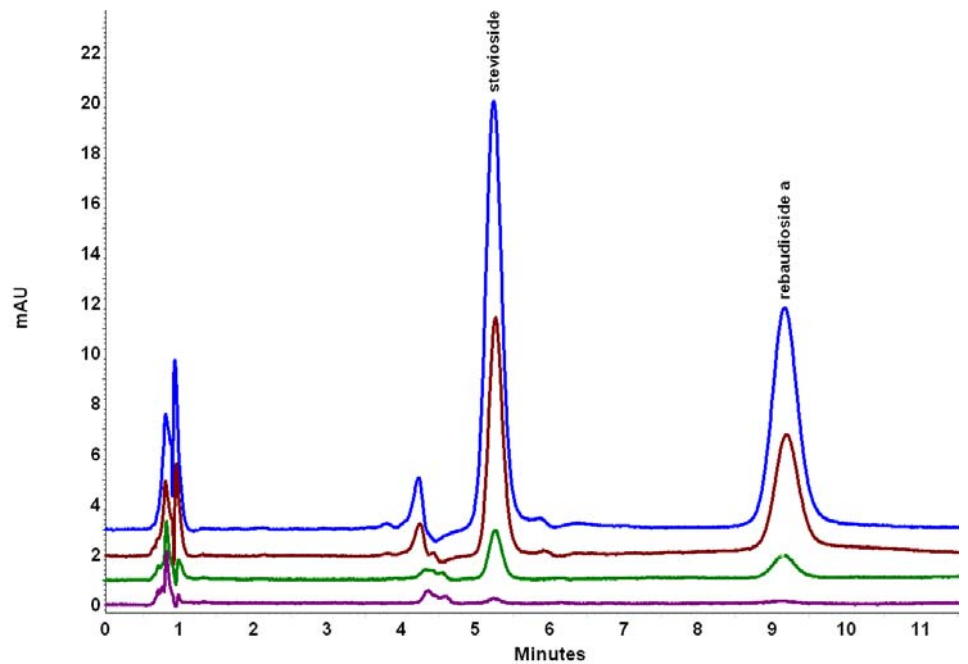
## Methodenparameter

Säule	Eurospher 100-5 NH <sub>2</sub> , 150 x 3 mm
Mobile Phase	Acetonitril / Wasser 80:20 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Säulentemperatur	35 °C
Systemdruck	50 bar
Detektion	UV bei 210 nm
Laufzeit	10 min

Ergebnisse

Darstellung 1

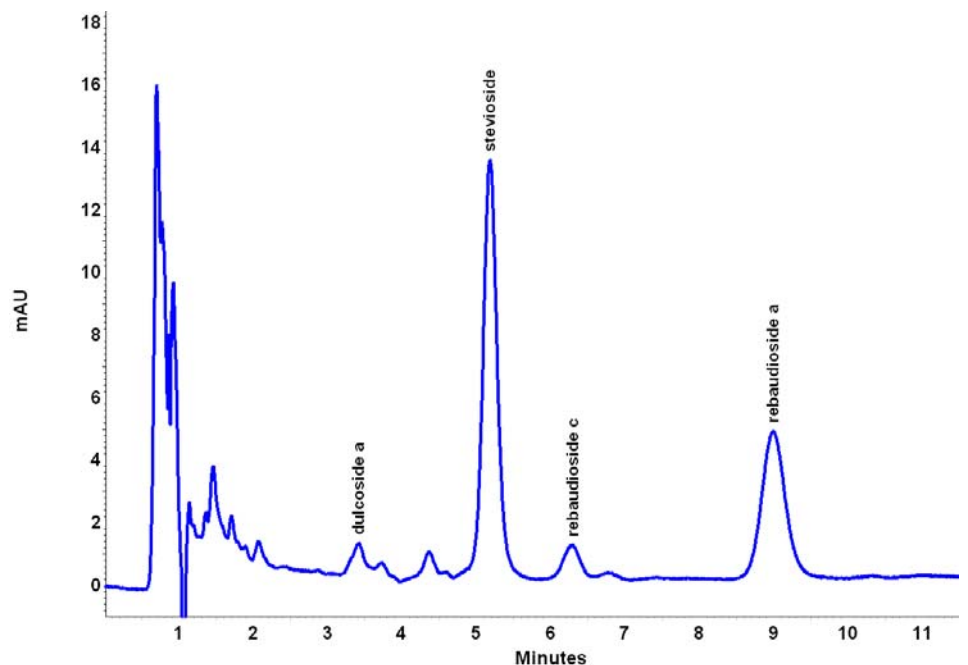
Überlagertes Chromatogramm unterschiedlicher Probenkonzentrationen



Substanz	$t_r$ (min)	LOD (ng)
Steviosid	5,197	7,5
Rebaudiosid A	9,017	16,0

Darstellung 2

Trennung eines Stevia-Pflanzenextraktes



Substanz	$t_r$ (min)	$C_{\text{absolut}}$	$C_{\text{Pflanze}}$
Steviosid	5,197	69,248 $\mu\text{g/ml}$	42.93 mg/g Pflanze
Rebaudiosid A	9,017	50,211 $\mu\text{g/ml}$	31.13 mg/g Pflanze
Rebaudiosid C *	6,300	6,591 $\mu\text{g/ml}^*$	4.09 mg/g Pflanze
Dulcosid A *	3,417	5,773 $\mu\text{g/ml}^*$	3.58 mg/g Pflanze

\* berechnet über Kalibration von Steviosid

### Methodeneigenschaften

<b>Detektionsgrenze</b>	ng Bereich (S/N = 3)
<b>Linearität (r<sup>2</sup>)</b>	0,9996-0,9998
<b>Linearitätsbereich</b>	1 bis 100 ng Steviosid 5 bis 100 ng Rebaudiosid A
<b>Präzision der Retentionszeit*</b>	< 0,2 % RSD Steviosid < 0,2 % RSD Rebaudiosid A
<b>Präzision der Peakfläche*</b>	< 2,7 % RSD Steviosid < 1,4 % RSD Rebaudiosid A

\* berechnet über 9 Wiederholungsmessungen

### Schlussfolgerung

Eine sehr gute und schnelle Trennung von 4 Steviolglykosiden in komplexer Probenmatrix mit exzellenten Peaksymmetrien wurde mit einem Smartline HPLC-System und einer Eurospher NH<sub>2</sub>-Säule im RP-Modus realisiert. Die einfache isokratische Trennmethode mit sehr moderaten Methodenparametern garantieren sehr robuste und sensitive Resultate über einen langen Zeitraum. Weiterhin lässt die entwickelte Methode genügend Abstand zwischen den Zielsubstanzen und auftretenden Matrixpeaks. Damit handelt es sich um eine universelle Bestimmungsmethode für eine Vielzahl verschiedener Matrices.

### Eigenschaften der verwendeten Säule

Das Säulenmaterial Eurospher NH<sub>2</sub> ist eine exzellente Wahl für die Trennung sehr polarer Substanzen im RP-Modus und kann genauso als schwacher Anionentauscher verwendet werden. Weiterhin ist diese Phase auch für den NP- und den PO-Modus geeignet.



<b>Stationäre Phase</b>	Eurospher 100-5 NH <sub>2</sub>	
<b>USP Code</b>	L8	
<b>Porengröße</b>	100 Å	
<b>Partikelgröße</b>	5 µm	
<b>Form</b>	Sphärisch	
<b>Oberfläche</b>	350 m <sup>2</sup> /g	
<b>% C</b>	3	
<b>Endcapping</b>	-	
<b>Dimension</b>	150 x 3 mm	
<b>Anwendungsbereich</b>	Maximale Temperatur	60 °C
	Maximaler Druck	400 bar
	pH-Bereich	2 – 8
<b>Bestellnummer</b>	15CE190ESJ	

### Empfohlene Gerätekonfiguration



Diese Applikation benötigt ein isokratisches HPLC-System, welches mit einem Degasser, einem Autosampler, einem Säulenofen und einem PDA-Detektor ausgerüstet ist. Es sind aber auch andere Gerätekonfigurationen möglich, bitte kontaktieren Sie uns.

Beschreibung	Bestellnummer
Smartline Pumpe 1000, inkl. 10 ml Pumpenkopf	A50303
Smartline Manager 5000 mit Degaser	A5316
SmartMix statischer Mischer	A5351
Autosampler 3950	A5005-1
Smartline Ofen 4050	A5300
Smartline PDA Detektor 2800	A5251
10 mm Flusszelle	A4074
ChromGate Software	A1493

### Autor

René Borstel, Columns and Applications Department, KNAUER

### Kontakt Information

Wissenschaftliche Gerätebau  
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH  
Hegauer Weg 38  
14163 Berlin, Germany

Tel: +49 (0)30 / 809727-0  
Fax: +49 (0)30 / 8015010  
E-Mail: info@knauer.net  
Internet: www.knauer.net