



**Entwicklung und Anwendung einer Kapillarelektrophoresemethode zur
Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln**

BACHELORARBEIT

**Zur Erlangung des akademischen Grades
„Bachelor of Science“ (B.Sc.)
im Studiengang Lebensmitteltechnologie**

an der

**Hochschule Neubrandenburg
Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

eingereicht von: Thomas Witthuhn

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christine Wittmann

Zweitgutachter: Dr. rer. nat. Kai-Uwe Niedersen

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2013-0740-7

Neubrandenburg, 10.03.2014

Abstract

A capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed for the simultaneous determination of artificial sweeteners and preservatives.

The usage of CZE has the advantages of lower costs and shorter analysis time compared with most of the HPLC methods, therefore CZE may be a good alternative to the most common HPLC methods for determining sweeteners and preservatives in food.

The CZE method has been successfully applied to fizzy tablets, iced tea, cola drinks and whey drinks.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Süßungsmittel in Lebensmitteln.....	2
1.1.1	Süßungsmittel mit Nährwert	3
1.1.2	Süßungsmittel ohne Nährwert.....	3
1.2	Konservierungsstoffe in Lebensmitteln	6
1.3	Lebensmittelrechtliche Grundlagen	7
1.4	Nachweisverfahren.....	9
1.4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	9
1.4.2	Kapillarelektrophorese	10
1.4.2.1	Kapillarzonenelektrophorese.....	11
1.4.2.2	Aufbau und Funktionsweise eines Kapillarelektrophoresesystems	12
1.4.2.3	Dioden-Array-Detektion	15
1.4.2.4	Auswahl des Laufpuffers	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.2	Herstellung benötigter Lösungen	19
2.1.3	Geräte	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Probenvorbereitung.....	21
2.2.2	Arbeits- und Messbedingungen des CE Systems.....	22
2.2.3	Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Süß- und Konservierungsstoffe....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Untersuchung der Funktionalität der entwickelten Methode.....	25
3.2	qualitativer Nachweis in Lebensmitteln.....	27
3.3	quantitative Bestimmung in Lebensmitteln	33
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung	36
6	Literaturverzeichnis	37
	Tabellenverzeichnis	43
	Abbildungsverzeichnis	43
	Anhang	A 1

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen

ADI	Acceptable Daily Intake	[mg kg ⁻¹]
AEC	anion-exchange chromatography; Anionenaustauscherchromatographie	
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz	
CE	capillary electrophoresis; Kapillarelektrophorese	
CZE	capillary zone electrophoresis; Kapillarzonenelektrophorese	
DAD	diode array detection; Dioden-Array-Detektion	
EC	Elektrochromatographie	
ELSD	evaporative light scattering detector; Lichtstreuendetektor	
EFSA	European Food Safety Authority; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit	
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	
FDA	Food & Drug Administration; behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten	
EOF	Elektroosmotischer Fluss	
JECFA	Joint FAO/WHO Committee on Food Additives	
HILIC	hydrophilic interaction chromatography; Hydrophile Interaktionschromatographie	
HPLC	high performance liquid chromatography; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	
HPTLC	high performance thin layer chromatography; Hochleistungsdünnschichtchromatographie	
IC	ion chromatography; Ionenchromatographie	
IEF	isoelektrische Fokussierung	
IPC	ion-pair chromatography; Ionenpaar-Chromatographie	
ITP	Isotachophorese	
KG	Körpergewicht	
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch	
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz	
MEKC	Micellare Elektrokinetische Chromatographie	
MS	Massenspektrometer	
NOEL	no observed effect level	

p.a.	pro analysis
PIC	ion-paired chromatography;
PHB	para-Hydroxybenzoesäure
PP	Polypropylen
RI	refractive index; Brechungsindex
RPC	reversed-phase chromatography; Umkehrphasenchromatographie
SCF	Scientific Committee on Food of the European Commission
SDS	sodium dodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation

β	Massenkonzentration	[g l ⁻¹]
η	dynamische Viskosität	[mPa · s]
λ	Wellenlänge	[nm]
c	Stoffmengenkonzentration	[mol l ⁻¹]
m	Masse	[mg, g]
mAU	milli absorption unit	
P	Druck	[mbar]
t	Zeit	[s, min]
T	Temperatur	[°C]
U	Spannung	[kV]
V	Volumen	[μ L, mL, L]

1 Einleitung

Für das Erreichen spezifischer Produkteigenschaften ist der Einsatz von Lebensmittelzusatzstoffen teilweise unerlässlich. Diese werden dabei je nach Verwendungszweck in verschiedene Funktionsklassen unterteilt (BMELV, 2014). Während Konservierungsstoffe bspw. der Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln dienen, so werden Süßungsmittel zum Süßen von Lebensmitteln verwendet (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008).

Durch das wachsende Bewusstsein für Erkrankungen wie Diabetes, Zahnkaries oder Fettleibigkeit gewinnt der Einsatz von kalorienfreien Süßstoffen zunehmend an Bedeutung (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009). Häufig bekannte Anwendungsgebiete sind dabei z.B. Frucht- und Obstkonserven, Erfrischungsgetränke aber auch Non-Food Produkte wie z.B. Zahnpasta. Ein Großteil der genannten Zusatzstoffe unterliegt, je nach Lebensmittel, spezifischen Höchstmengen, welche in der Europäischen Union (EU) durch die Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 geregelt sind.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist derzeit die Hauptuntersuchungsmethode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen. Aufgrund längerer Analysenzeiten und relativ hohem Kostenaufwand, sind schnellere und kostengünstigere Analysemethoden – bei gleicher Zuverlässigkeit – mehr und mehr in den Fokus gerückt. Die Kapillarelektrophorese (CE) spielt dabei eine zunehmend wichtigere Rolle bei der Analytik von Süß- und Konservierungsstoffen und hat sich als adäquate Alternative zur Analytik mittels HPLC entwickelt (Lin *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013; McCourt *et al.*, 2005).

Im Rahmen eines Laborpraktikums des Masterstudiengangs für Lebensmitteltechnologie an der Hochschule Neubrandenburg wird die Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen bereits mit einer etablierten HPLC-Methode durchgeführt. Durch entsprechende Etablierung einer CE-Methode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen wäre ein unmittelbarer Vergleich beider Methoden möglich. Daraus ergibt sich als Zielstellung für die vorliegende Arbeit, die Etablierung einer CE-Methode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen, um somit im Rahmen eines Laborpraktikums einen direkten Vergleich zwischen beiden Methoden (HPLC und CE) erhalten zu können.

1.1 Süßungsmittel in Lebensmitteln

Süß ist – neben sauer, bitter, salzig und umami – eine der fünf erkannten und klassifizierten Geschmacksarten (Lindemann, 2001). Im Zuge der menschlichen Evolution spielte Süße, neben Bitterkeit, eine Schlüsselrolle im Kampf ums Überleben. Während Süße als Zeichen für eine Energiequelle in Form von Kohlenhydraten stand, so rief Bitterkeit eine Abneigung gegenüber potentiell gefährlichen Substanzen (wie Alkaloide oder Toxine) hervor (Meyers & Brewer, 2008). Neben dem bekannten Kohlenhydrat Saccharose, finden heutzutage eine Reihe weiterer Süßungsmittel, welche nicht unbedingt zur Gruppe der Kohlenhydrate gehören müssen, umfangreiche Anwendung in der Lebensmittelindustrie (Nollet & Toldra, 2012).

Die in Lebensmitteln eingesetzten Süßungsmittel lassen sich indes in zwei Hauptgruppen unterteilen:

1.1.1 Süßungsmittel mit Nährwert (kalorisch) &

1.1.2 Süßungsmittel ohne Nährwert (non-kalorisch) (Abbildung 1)

Dabei werden nach Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 die Stoffe als „Süßungsmittel“ bezeichnet, „die zum Süßen von Lebensmitteln und in Tafelsüßen verwendet werden.“

Weitere Ausführungen dazu werden in den folgenden Unterkapiteln gegeben.

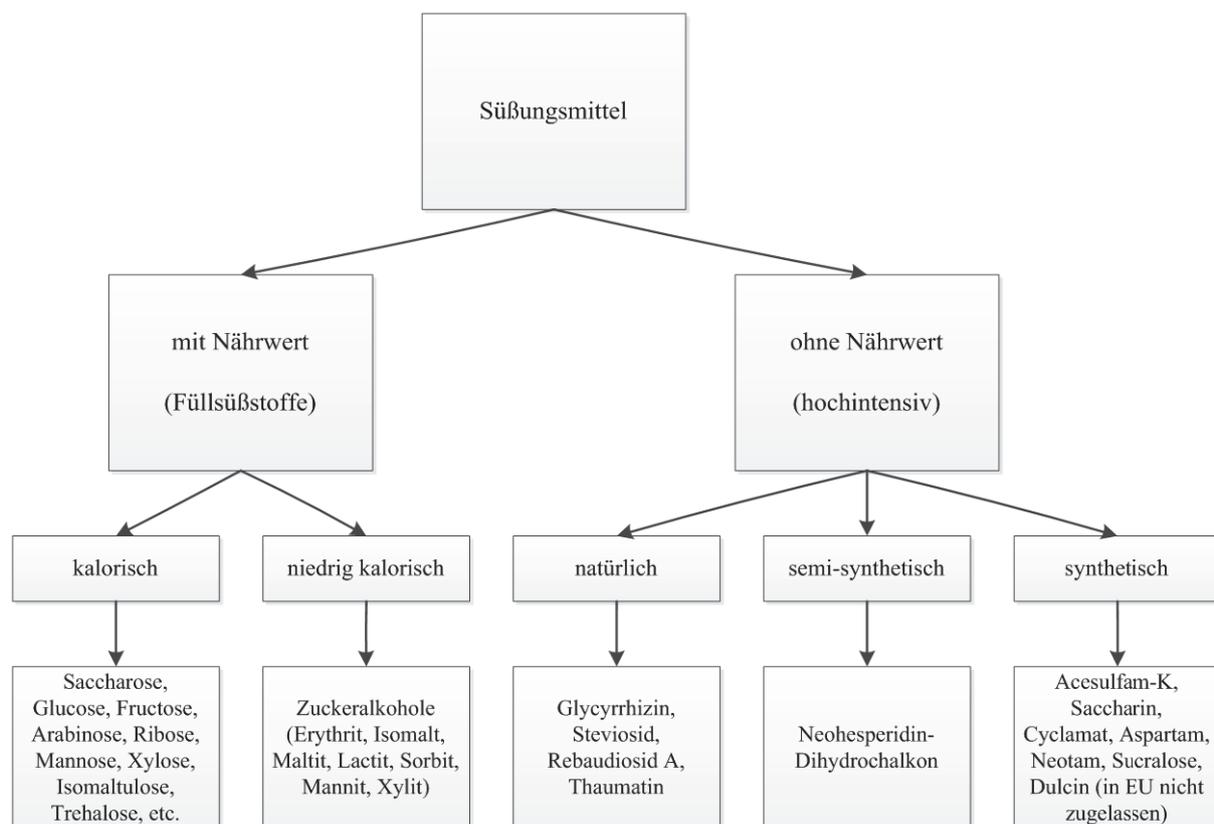


Abb. 1: Klassifizierung in Lebensmitteln eingesetzter Süßungsmittel

1.1.1 Süßungsmittel mit Nährwert

Süßungsmittel mit Nährwert sind in der Natur vorkommende Verbindungen, welche dem Lebensmittel Energie und eine gewisse Fülle hinsichtlich Mundgefühl und Textur verleiht. Vor allem die Gruppe der kalorischen Verbindungen (siehe Abb. 1), welche umgangssprachlich auch als Zucker bezeichnet werden, umfasst gängige natürliche Kohlenhydrate. Diese gelten im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 aber nicht als Lebensmittelzusatzstoffe.

Die Zuckeralkohole bzw. Zuckeraustauschstoffe Sorbit (E 420), Mannit (E 421), Isomalt (E 953), Maltit (E 965), Lactit (E 966), Xylit (E 967) und Erythrit (E 968) sind ebenfalls den Verbindungen mit Nährwert zuzuordnen und gelten im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 hingegen als Lebensmittelzusatzstoffe. Sie werden aufgrund ihres geringeren Energiegehaltes gegenüber Saccharose vorwiegend in kalorienreduzierten Produkten verwendet. Die geringere Wirkung auf den Blutzuckerspiegel macht sie größtenteils auch für Diabetiker geeignet. Laktit und Sorbit bspw. werden nur wenig im Mund abgebaut, weshalb sie nur leicht kariogen sind und somit Zahnkaries vorbeugen. Negative Begleiterscheinung ist, dass einige dieser Zuckeraustauschstoffe bei übermäßigem Verzehr abführend wirken können (Belitz *et al.*, 2008; Thieme, 2009).

1.1.2 Süßungsmittel ohne Nährwert

Im Gegensatz zu den unter 1.1.1 genannten Süßungsmitteln mit Nährwert, sind die sogenannten „Süßstoffe“ primär synthetischen Ursprungs und besitzen praktisch keinen Nährwert. Dafür besitzen die hochintensiven Süßstoffe eine deutlich höhere Süßkraft (Tab. 1), als die Referenzsubstanz Saccharose (Yebra-Biurrun, 2005). Lebensmittelrechtlich zählen Süßstoffe zu den Lebensmittelzusatzstoffen (Richtlinie 94/35/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30.06.1994 über Süßungsmittel, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen). Das steigende Bewusstsein für die Zunahme von Erkrankungen wie Fettleibigkeit, Diabetes und Zahnkaries ließ Süßstoffe mehr und mehr in den Fokus rücken (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009). Durch den Einsatz von Süßstoffen – und der damit verbundene Austausch von Zucker (Saccharose) – können „brennwertverminderte“ Lebensmittel einerseits einen Beitrag zur Bekämpfung von Fettleibigkeit leisten. Andererseits wirken Süßstoffe nicht kariogen und haben keinen Einfluss auf den Insulinspiegel, weshalb sie auch für Diabetiker besonders geeignet sind. Somit nimmt die Bedeutung von Süßstoffen

in Bezug auf die Vorbeugung dieser Volkskrankheiten stetig zu – wengleich der gänzliche Ersatz von Zucker mittels Süßstoffen keine alleinige Lösung dieser Probleme darstellen kann.

In der Europäischen Union sind momentan 10 Süßstoffe zugelassen (Verordnung (EU) Nr. 1131/2011, 2011). Eine detaillierte Übersicht der zugelassenen Süßstoffe ist u.a. in Tabelle 1 gegeben.

Tab. 1: Übersicht der in der Europäischen Union zugelassenen Süßstoffe

E-Nummer	Bezeichnung	ADI* [mg/kg KG]		Süßkraftfaktor ^{*3}	EU-Zulassung seit
		SCF ^{*1}	JECFA ^{*2}		
E 950	Acesulfam-K	9	15	130–200	1990
E 951	Aspartam	40	50	200	1994
E 952	Cyclamat	7	11	30–50	1994
E 954	Saccharin		5	300–500	1995
E 955	Sucralose		15	600	2005
E 957	Thaumatococcus		unbegrenzt	2000–3000	1996
E 959	Neohesperidin DC		5	400–600	1994
E 960	Steviolglycoside		4	300	2011
E 961	Neotam		2	7000–13000	2010
E 962	Aspartam-Acesulfamsalz	bereits durch E 950 & E 951 abgedeckt		350	2004

*1...nach Scientific Committee on Food (SCF)

*2...nach Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (JEFCA)

*3...ggü. Saccharose mit der Süßkraft "1" (International Sweeteners Association, 2014)

Weitere Ausführungen zu lebensmittelrechtlichen Bestimmungen sind u.a. in Kapitel 1.3 gegeben.

Abbildung 2 zeigt die chemischen Strukturformeln einiger ausgewählter Süßstoffe.

Zur Etablierung einer Nachweismethode lagen die Süßstoffe Acesulfam-K (E 950), Aspartam (E 951) und Saccharin (E 954) im Fokus dieser Arbeit (siehe Abbildung 2).

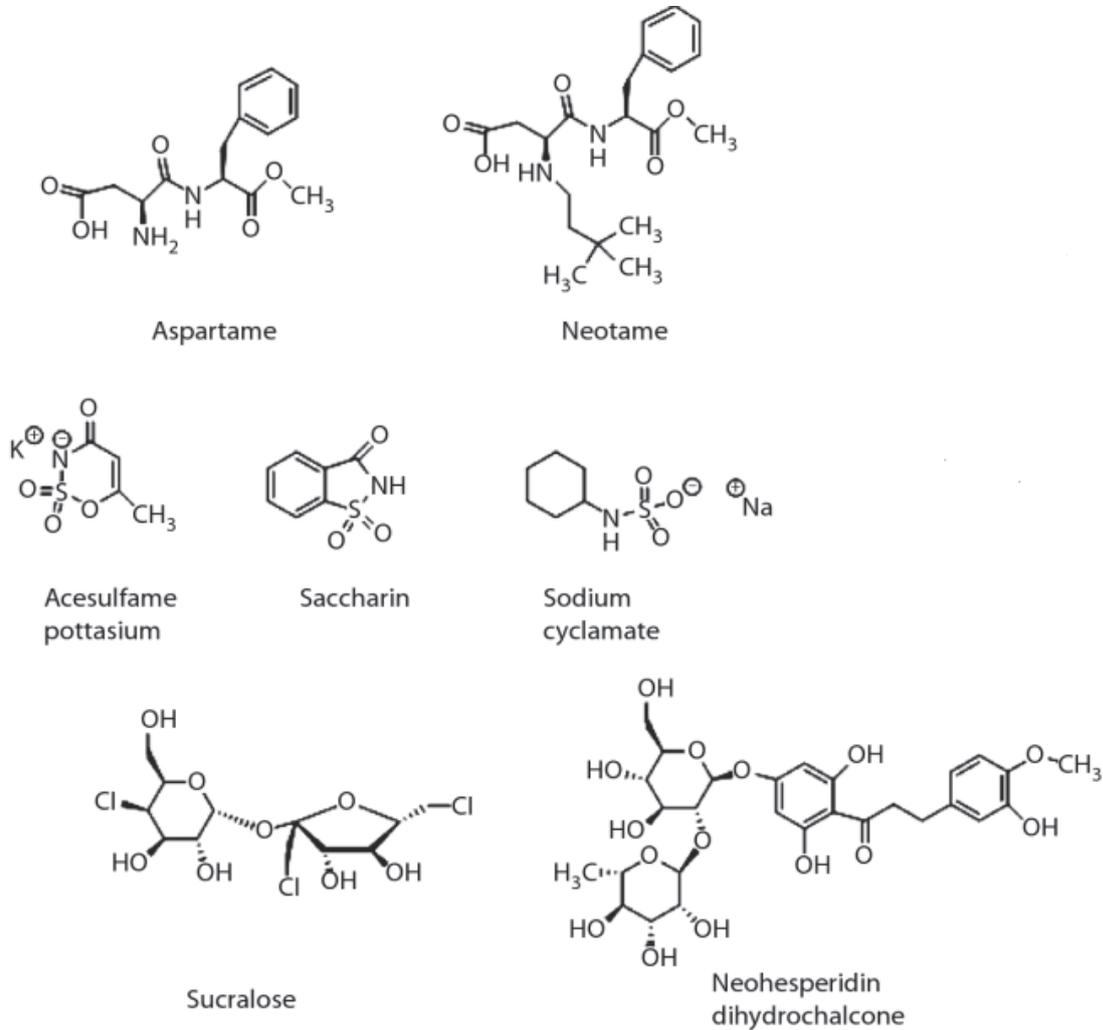


Abb. 2: Chemische Strukturformeln ausgewählter Süßstoffe (modifizierte Darstellung nach Nollet & Toldra, 2012)

Sollte es gelingen, eine valide CE-Methode zum Trennen und Nachweisen der drei o.g. Süßstoffe zu etablieren, so wäre eine Grundlage geschaffen, um möglicherweise auch weitere Süßstoffe voneinander trennen und nachweisen zu können. Zu beachten dabei ist, welche Einschränkungen durch den eingesetzten Detektor bestehen hinsichtlich des Nachweises einzelner Süßstoffe (siehe dazu auch Kapitel 1.4.2).

1.2 Konservierungsstoffe in Lebensmitteln

Allgemein erfüllen Lebensmittelzusatzstoffe wichtige Aufgaben, um in Lebensmitteln eine gleichbleibende Qualität über einen längeren Zeitraum gewährleisten zu können.

Lebensmittelzusatzstoffe können dabei sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sein.

Neben den bereits unter 1.1 genannten Süßungsmitteln, bilden die sogenannten „Konservierungsstoffe“ eine weitere Funktionsklasse von Lebensmittelzusatzstoffen. Sie werden u.a. dazu eingesetzt, um Lebensmittel vor Verderb zu schützen und damit ihre Haltbarkeit zu verlängern. Nach der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 sind Konservierungsstoffe „Stoffe, die die Haltbarkeit von Lebensmitteln verlängern, indem sie sie vor den schädlichen Auswirkungen von Mikroorganismen schützen, und/oder vor dem Wachstum pathogener Mikroorganismen schützen.“

Die Konservierungsstoffe liegen dann gemeinsam mit den Süßstoffen in Lebensmitteln wie Frucht- und Erfrischungsgetränken, Obstkonserven o.Ä. vor. Diese können dann idealerweise mittels Analysemethoden wie HPLC (Punkt 1.4.1) oder CE (Punkt 1.4.2) voneinander getrennt und ebenfalls bestimmt werden.

Als Auszug aus Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 sollen dazu u.a. die Sorbin- und Benzoessäure respektive ihrer Salze und einige PHB-Ester als Beispiele dienen (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: ausgewählte Konservierungsstoffe (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008, 2008)

E-Nummer	Bezeichnung
E 200	Sorbinsäure
E 202	Kaliumsorbat
E 203	Calciumsorbat
E 210	Benzoessäure
E 211	Natriumbenzoat
E 212	Kaliumbenzoat
E 213	Calciumbenzoat
E 214	PHB-Ester (Ethyl-p-hydroxybenzoat)
E 215	PHB-Ethylester-Natriumsalz (Natriumethyl-p-hydroxybenzoat)
E 218	PHB-Methylester (Methyl-p-hydroxybenzoat)
E 219	PHB-Methylester-Natriumsalz (Natriummethyl-p-hydroxybenzoat)

1.3 Lebensmittelrechtliche Grundlagen

Der Einsatz von Lebensmittelzusatzstoffen ist grundsätzlich nur dann erlaubt, wenn sie zugelassen sind. Die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Stoffes und eine gewisse technologische Notwendigkeit sind dabei hinreichende Voraussetzungen für eine Zulassung. Welche Lebensmittelzusatzstoffe in der Europäischen Union (EU) zugelassen sind, und welchen Höchstmengen sie in welchen Produkten unterliegen, ist durch die Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe geregelt. Im Anhang II dieser Verordnung ist die „Gemeinschaftsliste der für die Verwendung in Lebensmitteln zugelassenen Lebensmittelzusatzstoffe und ihrer Verwendungsbedingungen“ zu finden. Diese Gemeinschaftsliste basiert größtenteils auf in der Vergangenheit in Richtlinien festgelegten Zulassungen. Die Vorschriften von Richtlinien und Verordnungen des Europäischen Parlaments gelten unmittelbar in allen Mitgliedsstaaten der EU und werden innerhalb einer jeweiligen Frist in nationales Recht umgesetzt. In Deutschland geschieht dies für die Lebensmittelzusatzstoffe durch entsprechende Anpassung der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuLV) (BMELV, 2014).

Wie bereits unter 1.1.2 und 1.2 geschildert, fallen darunter u.a. auch die Regelungen für Süß- und Konservierungsstoffe.

In der Europäischen Union ist die Verwendung von Süßstoffen 1994 in der „Richtlinie 94/35/EG über Süßungsmittel, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen“ geregelt worden. Diese wurde im stetig durch entsprechende Änderungen und neu zugelassene Süßstoffe ergänzt. So wurden im Laufe der Zeit für die Europäische Union weitere Süßstoffe zugelassen (siehe dazu auch Tabelle 1):

Im Jahre 1995 Saccharin, 1996 Thaumatin, 2004 Aspartam-Acesulfamsalz, 2005 Sucralose, 2010 Neotam und seit November 2011 Stevioglycoside (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008, 2008; International Sweeteners Association, 2014).

Damit ein Zusatz- bzw. Süßstoff in der Europäischen Union zugelassen werden kann, müssen zunächst umfassende wissenschaftliche Untersuchungen bzgl. der gesundheitlichen Unbedenklichkeit der Substanz vorgenommen werden. Dies erfolgt in unabhängigen Einrichtungen und nationalen Lebensmittelbehörden, einschließlich des Scientific Committee on Food (SCF) der Europäischen Kommission – seit 2003 die European Food Safety Authority (EFSA) – bzw. des Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (JEFCA). Die Food and Drug Administration (FDA) ist die behördliche Lebensmittelüberwachungs- und

Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (BfR, 2003; International Sweeteners Association, 2014).

Zwischen der Europäischen Union und den Vereinigten Staaten ergeben sich dadurch – je nach zuständiger Zulassungsbehörde – teilweise Unterschiede für einzelne Süßstoffe im Jahr der Zulassung und der jeweils akzeptablen täglichen Aufnahmemengen (Acceptable Daily Intake, ADI). Ein Blick auf die seit neuestem zugelassenen sogenannten Steviolglycoside zeigt exemplarisch die Unterschiede zwischen der Zulassung von Zusatzstoffen in den Vereinigten Staaten und der Europäischen Union. Während der Einsatz von Steviolglycosiden in den Vereinigten Staaten bereits seit 2008 (FDA, 2014) zulässig ist, so sind sie nach Bewertung der EFSA seit 2011 in der EU erlaubt (Verordnung Nr. 1131/2011, 2011). Für Beispiele unterschiedlich festgelegter ADI-Werte einzelner Süßstoffe sei dazu u.a. auf Tabelle 1 verwiesen. Die Bewertung des JEFCA gilt international, kann aber im jeweiligen Wirtschaftsraum durch die FDA oder den SFC (seit 2003 EFSA) angepasst sein.

Der ADI-Wert basiert auf Ergebnisse von Tierexperimenten, bei denen Tiere den zu untersuchenden Zusatzstoff meist täglich über einen längeren Zeitraum mit dem Futter in verhältnismäßig hohen Konzentrationen verabreicht bekamen. Die höchste Dosis, bei der keine unerwünschten und schädlichen Wirkungen beobachtet werden konnten, wird als No Observed Effect Level (NOEL) bezeichnet. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors (zumeist 100) wird somit aus dem NOEL der ADI-Wert bestimmt (BfR, 2003).

1.4 Nachweisverfahren

1.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC ist die Hauptuntersuchungsmethode zur gleichzeitigen Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln (Chen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013).

Unter den verschiedenen Detektionsmöglichkeiten sind die UV/VIS- und Dioden-Array-Detektion (DAD) für die meisten Analysen von Süßstoffen, nicht zuletzt wegen der geringeren Kosten, die am häufigsten eingesetzten Detektionsmethoden (Montijano *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Nollet & Toldra, 2012).

Abhängig von den individuellen Anforderungen, kommen darüber hinaus aber auch andere Detektoren zum Einsatz. Durch das Fehlen jeglicher Chromophore in Sucralose, welches eine Detektion mittels direkter UV Absorption schwierig macht, wird u.a. von einer HPLC-Kopplung mit einem Brechungsindexdetektor (RI Detektor) berichtet (Kobayashi *et al.*, 2001; Tate & Lyle, 2003).

Der Tatsache, dass Cyclamat nicht im nutzbaren UV/VIS-Bereich absorbiert, wird in der Form entgegnet, dass indirekt UV photometrisch (Thompson *et al.*, 1995) oder mittels Leitfähigkeitsdetektor (Bergamo *et al.*, 2011) detektiert wird.

Der Süßstoff Neotam wird den Lebensmitteln aufgrund seiner hochintensiven Süßkraft (Tab. 1) nur in sehr geringen Mengen zugesetzt, weshalb die HPLC auch gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS) oder Lichtstreuendetektor (ELSD) eingesetzt wird (Wasik *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

Die derzeit vorwiegend eingesetzte Variante ist die Umkehrphasenchromatographie (RPC). D.h. die Trennung erfolgt mittels einer unpolaren Säule in Kombination einer (polaren) Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel als mobile Phase (Nollet & Toldra, 2012).

Zur Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin-Natrium in Lebensmitteln existiert mit der Norm DIN EN 12856 in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG ein HPLC-Verfahren zur Untersuchung von Lebensmitteln, bei der die Trennung an einer HPLC-Umkehrphasensäule erfolgt. Sie kann außerdem auch für die Bestimmung von Coffein, Benzoesäure- und Sorbinsäure in Lebensmitteln eingesetzt werden. Die Probe wird dazu mit Wasser extrahiert oder verdünnt und bei Bedarf an einer Festphasen-Extraktionssäule oder mit Carrez-Reagenzien gereinigt (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, 2001).

Als Alternativen zur RPC wird u.a. von Ionenpaar-Chromatographie (IPC), Ionenchromatographie (IC), Anionenaustauscherchromatographie (AEC) und Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) berichtet (Nollet & Toldra, 2012. Spangenberg *et al.* (2003) berichten außerdem von einer erfolgreich angewandten Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Methode (HPTLC).

1.4.2 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist ein instrumentell-analytisches Trennverfahren, welches Ende der 70er Jahre in Ergänzung zu anderen chromatographischen Trennmethode entwickelt wurde (Mikkers *et al.*, 1979; Jorgenson & Lukacs, 1981). Unter dem Begriff CE sind verschiedene Trenntechniken zusammengefasst. Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) stellt, neben der Kapillargelelektrophorese (CGE) und Mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC), das am häufigsten eingesetzte Verfahren dar. Darüber hinaus existieren weitere elektrophoretische Verfahren in Form von isoelektrischer Fokussierung (IEF), Elektrochromatographie (EC) und Isotachophorese (ITP) (Engelhardt *et al.*, 1994).

Die Trennung im elektrischen Feld erfolgt aufgrund unterschiedlicher Ionenbeweglichkeiten in der Elektrolytlösung. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an eine wässrige Lösung, kommt es zur Wanderung geladener Moleküle oder Ionen in Richtung der Elektrode mit entgegen gesetztem Vorzeichen. Die verschiedenartigen Moleküle bzw. Ionen bewegen sich in Abhängigkeit ihrer Ladungen und Massen unterschiedlich schnell und werden somit in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Die Ionenbeweglichkeit, auch elektrophoretische Mobilität genannt, ist maßgeblich abhängig von dem Verhältnis Ionenladung – Ionengröße (Engelhardt *et al.*, 1994; Pyell, 2001).

Die CE stellt ein wirkungsvolles und flexibles Trennverfahren dar, welches in der Lage ist, einzelne Probenkomponenten verschiedener Stoffklassen zu trennen und einzeln nachzuweisen. Diese Fähigkeit macht die CE zu einem idealen Verfahren für die Analyse von Mehrkomponentengemischen, z.B. Erfrischungsgetränke (Frazier *et al.*, 2000).

Die Entwicklung der CE ist inzwischen so weit fortgeschritten und ausgereift, sodass sie eine immer wichtigere Rolle in der Süßstoffanalytik spielt (Hu *et al.*, 2013). Zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen wurden mittlerweile etabliert, weshalb sich die CE als echte Alternative zur HPLC bewährt hat (Thompson *et al.*, 1995; Waldron,

1996; Pesek, 1997; Walker *et al.*, 1997; McDevitt *et al.*, 1998; Boyce *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013;...).

Als Gründe dafür sprechen v.a. kürzere Analysenzeiten und ein geringerer Kostenaufwand – bei sonst vergleichbarer Wiederholbarkeit und Zuverlässigkeit – im Vergleich zu den HPLC-Methoden (Thompson *et al.*, 1995; Razee *et al.*, 1995). Weiterhin sind viele der verwendeten HPLC-Methoden relativ stark abhängig vom organischen Lösungsmittel (als mobile Phase) und erfordern die Verwendung von Puffern niedriger pH-Werte, da sich die meisten stationären Phasen ab pH 8 beginnen aufzulösen (Engelhardt *et al.*, 1994). Bei der CE hingegen steht ein pH-Bereich von 2 bis 12 zur Verfügung, woraus besonders der Vorteil im Alkalischen, gegenüber den meisten HPLC-Verfahren, ersichtlich wird. Durch Veränderung von pH-Wert und Art des Puffers kann somit die Trennung optimiert werden (siehe dazu auch 1.4.2.4).

Daraufhin kamen im Laufe der Zeit mehr und mehr MEKC- und CZE-Methoden für die Analyse von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln zum Einsatz und lösten – aufgrund oben genannter Vorteile – einige HPLC-Methoden als Methode der Wahl ab (Jimidar *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1995; Razee *et al.*, 1995; Frazier *et al.*, 2000).

Anhand der aus der Literatur ersichtlichen Erkenntnisse war es für das Ziel der Etablierung einer CE-Methode für die Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln unumgänglich, sich auf eines der beiden Trennsysteme (MEKC oder CZE) zu konzentrieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde fortan der Fokus auf die Verwendung einer CZE-Methode gelegt, welche im weiteren Verlauf detailliert beleuchtet wird.

1.4.2.1 Kapillarzonenelektrophorese

Die CZE ist das am häufigsten eingesetzte Verfahren. Auf der kompletten Trennstrecke bleiben Puffer, pH-Wert und Feldstärke konstant und die Probenkomponenten aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten getrennt. Die Probenkomponenten werden im Gemisch als konkrete Zone am Anfang der Kapillare aufgetragen und als jeweils getrennte, einzelne Zonen durch den Detektor nachgewiesen. Der Puffer sorgt dafür, dass der pH-Wert konstant gehalten und der Stromtransport gewährleistet wird. Durch den pH-Wert des Puffers wird die Ladung der Probenmoleküle, und damit auch ihre Migrationsrichtung, bestimmt. Weiterhin haben pH-Wert und Pufferkonzentration auch einen Einfluss auf den Elektroosmotischen Fluss (EOF).

Ferner gelingt es durch Auswahl des geeigneten pH-Wertes die Selektivität zu optimieren, während die Analysenzeit dann stark abhängig von Pufferkonzentration, Kapillarlänge und der angelegten Spannung ist. Eine weitere Optimierung der Selektivität kann durch Pufferadditive wie Cyclodextrine, Harnstoff, Detergenzien etc. erzielt werden. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Trennung der einzelnen Komponenten aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten. Bei der üblichen Anordnung des Detektors auf der Kathodenseite – und Probenaufrag auf der Anodenseite – wandern die Kationen, aufgrund ihrer Comigration mit dem EOF, am schnellsten. Die Anionen wiederum wandern dem EOF entgegen (Contramigration), weshalb sie nur dann detektiert werden können, sofern ihre vektorielle, elektrophoretische Migration von geringerem Ausmaß ist, als die Geschwindigkeit des EOF. D.h. umso größer ihre Migrationsgeschwindigkeit in Richtung Anode ist, umso später werden sie auch detektiert. Sind die Migrationsgeschwindigkeiten der Anionen größer als die des EOF, hätte dies zur Folge, dass die Anionen aus der Kapillare wieder zurück in das Anodengefäß wandern. Abhilfe schaffen würde in diesem Fall die Umpolung der Spannungsquelle und Unterdrückung bzw. Umkehrung des EOF durch Zugabe von Kationentensiden (z.B. quarternäre Ammoniumgruppen). Nähere Ausführungen über die Ausbildung des EOF werden in Kapitel 1.4.2.2 gegeben (Engelhardt *et al.*, 1994; Pyell, 2001).

1.4.2.2 Aufbau und Funktionsweise eines Kapillarelektrophoresesystems (am Bsp. CZE)

Der schematische Aufbau des verwendeten CE-Systems ist in Abbildung 3 dargestellt. Im Wesentlichen umfasst das System dabei folgende apparativen Bauteile: die thermostatierte Kapillarkassette, welche die darin installierte Kapillarsäule temperiert; eine Hochspannungsquelle, die mit beiden Elektroden (Anode und Kathode) verbunden ist; ein integrierter DAD in Nähe des Kapillarsäulenausgangs sowie ein automatisierter Probensteller. Darüber hinaus sind eine Abfall- und Versorgungsflasche (Elektrolytflasche) in das System integriert, die ein kontinuierliches Erneuern der Vorratsgefäße mit frischer Elektrolyt- bzw. Pufferlösung ermöglichen.

Die Probenaufnahme erfolgt am aufgabeseitigen Ende (Anodenseite) der Trennkapillare. Dazu wird mithilfe des automatischen Probenstellers das Vorratsgefäß mit Elektrolytlösung gegen ein Gefäß, das die Probe enthält, ausgetauscht (Pyell, 2001).

Anschließend erfolgt die Probeninjektion in die Trennkapillare, welche durch mehrere Verfahren erfolgen. Am verbreitetsten ist die Druckinjektion (Hydrodynamische Injektion), bei der die Aufgabe der Probe durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß

und Kapillarende erfolgt. Dies kann durch Druckerhöhung beim Probengefäß, oder Druckminderung am Kapillarende (Kathodenseite), realisiert werden. Dazu wird für eine definierte Zeit eine bestimmte Druckdifferenz zwischen aufgabeseitigem Ende und dem anderen Ende der Kapillare angelegt. Dadurch wird ein Fluss in der Kapillare bewirkt, wobei die Richtung durch die Druckdifferenz bestimmt wird. Der nun höhere Druck am aufgabeseitigen Ende der Kapillare bewirkt, dass ein durch Druckdifferenz und Injektionszeit festgelegtes Volumen (wenige nL) der Probe als Pfropf in die Kapillare aufgenommen wird. Weitere Injektionstechniken sind zum einen die Hydrostatische Injektion, bei der durch Anheben des Probengefäßes eine entsprechende Druckdifferenz zwischen dem Probengefäß und Elektrolytgefäß erzeugt wird. Infolgedessen wird die Probenlösung durch den sogenannten Siphoneffekt in die Trennkapillare gesaugt, wobei die aufgegebene Probenmenge von der Höhendifferenz, Injektionszeit und den hydrodynamischen Eigenschaften (Dichte und Viskosität) der Probenlösung abhängig ist. Zum anderen wird bei der elektrokinetischen Injektion – nach Eintauchen der Kapillare in das Probengefäß – für eine festgelegte Zeit eine definierte Spannung zwischen beiden Kapillarenden angelegt, wodurch aufgrund elektrokinetischer Effekte eine Flüssigkeitsströmung in der Kapillare erzeugt, und die Probe als Pfropf, aufgetragen wird. Dabei ist die aufgegebene Probenmenge abhängig von der Höhe der angelegten Spannung, der Zeitdauer, in der die Spannung anliegt und der elektrophoretischen Mobilität der Probenkomponenten (Engelhardt *et al.*, 1994; Agilent Technologies, 2000; Pyell, 2001). Nach der Probenaufgabe wird das Probengefäß wieder gegen ein Gefäß mit Elektrolytlösung ausgetauscht. In dieses tauchen nun das aufgabenseitige Ende der Trennkapillare und die Anode. In das andere Elektrolytgefäß tauchen dementsprechend das andere Ende der Trennkapillare und die Kathode. Durch Anlegen einer Hochspannung zwischen den beiden Elektroden von bis zu 35 kV kommt es zur Ausbildung eines elektrischen Feldes. Daraufhin beginnt die elektrophoretische Trennung der Probenkomponenten aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten (1.4.2 & 1.4.2.1). Gleichzeitig verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Puffer- bzw. Elektrolytlösung (EOF) im elektrischen Feld, welcher der elektrophoretischen Wanderung der Ionen in den meisten Fällen überlagert ist (Engelhardt *et al.*, 1994). Der Grund für den EOF ist die entsprechende Ladung der Kapillaroberfläche. Im Falle von Quarzkapillaren liegen durch Deprotonierung der Silanolgruppen bei $\text{pH} > 4$ negative Oberflächenladungen vor, an denen es bevorzugt zur Anlagerung von Kationen aus der Elektrolytlösungen kommt. Dadurch bildet sich eine elektrische Doppelschicht, in der die Kationen überwiegen und sich in einer starren und einer beweglichen, diffusen Grenzschicht

an der Oberfläche anordnen. Aufgrund der Ladungsverteilung kommt es zum Aufbau eines Potentials, welches im Bereich der starren Grenzschicht linear, und im Bereich der diffusen Grenzschicht exponentiell, abnimmt. Das exponentiell abfallende Potential wird als ζ -Potential bezeichnet und ist verantwortlich für die Elektroosmose. Wird nun parallel zur Kapillaroberfläche ein elektrisches Feld angelegt, so werden dadurch die entgegengesetzt geladenen Ionen in der diffusen Schicht (hier die Kationen) angezogen und ziehen infolge ihrer Solvation die umgebenden Moleküle der Elektrolytlösung mit. Durch die Viskosität der Elektrolytlösung, und kleine Innendurchmesser der Kapillare von 25–100 μm , kommt es zur annähernd ideal pfropfenförmigen Bewegung der gesamten Elektrolytlösung in Richtung Kathode. Die durch Elektrophorese in Zonen getrennten Bestandteile der Probe werden somit also Richtung Kathode transportiert, weshalb der Detektor üblicherweise auf der Kathodenseite angeordnet ist (Engelhardt *et al.*, 1994). Meist erfolgt die Detektion direkt in der Trennkapillare (on-line bzw. on-column) mit aus der HPLC modifizierten, optischen Detektoren, wie z.B. UV- oder Fluoreszenzdetektoren.

Darüber hinaus können aber auch Leitfähigkeitsdetektoren oder elektrochemische Detektoren zum Einsatz kommen (Engelhardt *et al.*, 1994). Ebenfalls besteht die Möglichkeit der Kopplung mit einem Massenspektrometer (Agilent Technologies, 2013) und McCourt *et al.* (2005) etablierten eine Methode zur Bestimmung von Sucralose mittels indirekter UV-Detektion.

Im Rahmen des vorliegenden Beispiels erfolgt die Detektion der separierten Probenkomponenten direkt in der Trennsäule mit einem DAD (siehe auch 1.4.2.3).

Der aus dem Anlegen der Hochspannung induzierte Stromfluss erzeugt Wärme (Joulesche Wärme), die in ausreichendem Maße an die Umgebung abgeführt werden muss. Dies wird für die meisten Anwendungen durch einen kühlen Luftstrom in der Kapillarkassette erreicht. Eine konstante Temperierung der Kapillare, welche für vergleichbare Migrationszeiten und hohe Peakschärfen erforderlich ist, wird durch einen integrierten Heizblock in der Kapillarkassette gewährleistet (Engelhardt *et al.*, 1994; Pyell, 2001; Schwedt, 2010).

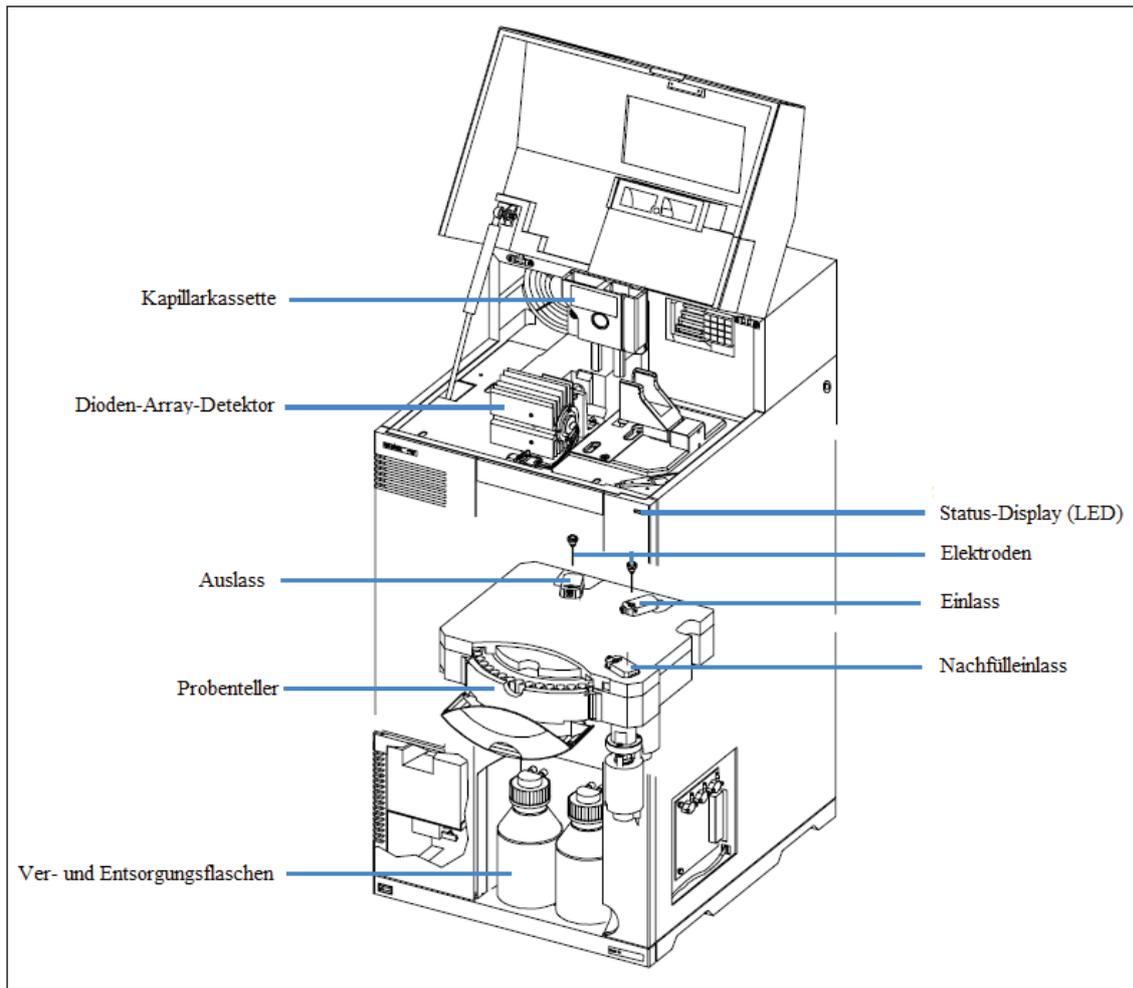


Abb. 3: Schematische Darstellung des verwendeten HP Agilent G1600AX 3D CE Systems (nach Vorlage von Agilent Technologies, 2001)

1.4.2.3 Dioden-Array-Detektion

Kapitel 1.4.2.2 verweist bereits auf einige wesentliche Detektionsmethoden für die CE. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten CE System (1.4.2.2) erfolgt die Detektion mit einem DAD, weshalb im Folgenden kurz das Prinzip dieses Detektors etwas näher beleuchtet werden soll. Die Verwendung eines DAD ermöglicht es, die Absorption bei einer Vielzahl verschiedener Wellenlängen gleichzeitig zu messen. In Abbildung 4 ist dazu ein schematischer Überblick der optischen Bauteile eines DAD gegeben. Die Deuterium-Entladungslampe emittiert polychromatisches Licht, welches durch ein achromatisches Linsensystem auf das Detektionsfenster der Kapillare fokussiert wird. Der Verschluss wird einerseits zum Abschneiden des Lichtstrahls für die Dunkelstromkompensation, andererseits zur Positionierung des Holmiumoxidfilters in der optischen Wegstrecke zu Zwecken der Wellenlängenkalibrierung, genutzt. Der durch das achromatische Liniensystem gebündelte Lichtstrahl passiert nun die probendurchflossene Kapillarsäule und wird je nach angetroffener

Probenkomponente (und deren Konzentration) in unterschiedlichem Ausmaß absorbiert. Das dadurch am Ende erhaltene Spektrum ist dann für den jeweiligen Analyten entsprechend charakteristisch. Ein optischer Spalt hinter der Kapillare verhindert Lichtstreuung und definiert den Eintrittsspalt des Spektrometers. Das Spektrometer besteht weiterhin aus einem holographischen Konkavgitter, welches das Licht auf ein Photodioden-Array dispergiert. Für den Wellenlängenbereich von 190 bis 600 nm werden 205 Dioden verwendet, was eine Auflösung von 2 nm pro Diode ergibt. Die vom Detektor erzeugten elektrischen Signale werden digitalisiert und zum Integrator geleitet. Die Abhängigkeit der Konzentration an Substanzmolekülen von der Länge des Substanzpfropfes, ergibt den sogenannten Peak. Die zeitliche Auftragung der Peaks ergibt abschließend das Elektropherogramm (Kaltenbach, 1995).

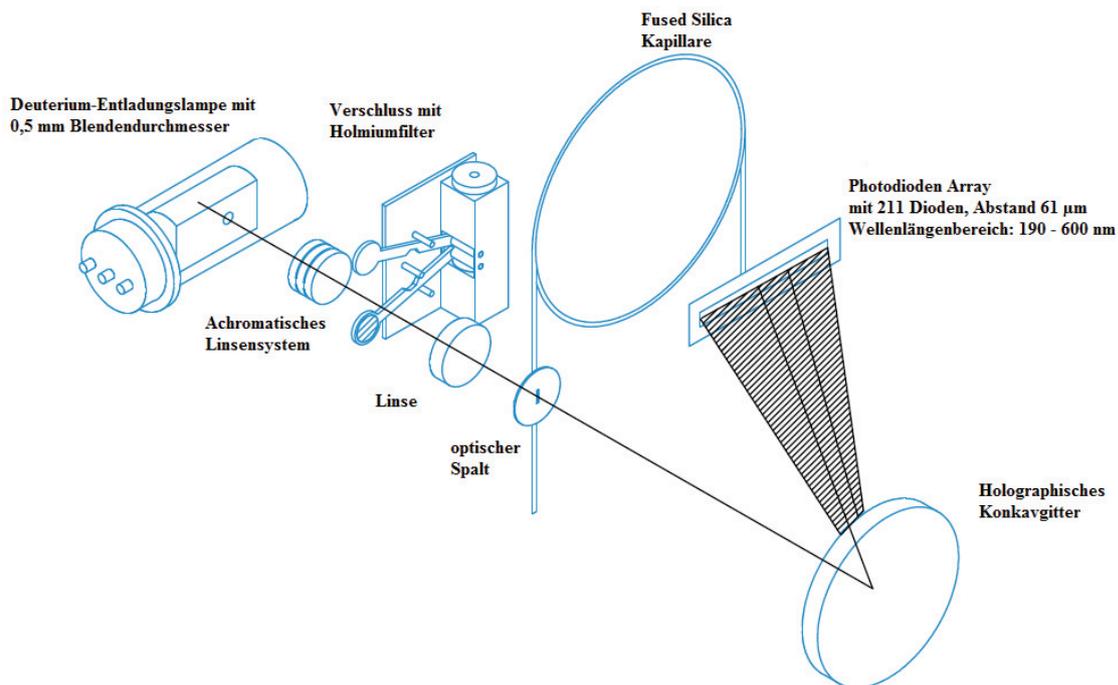


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Dioden-Array-Detektors
(modifiziert nach Vorlage von *Hewlett Packard*, 1995)

1.4.2.4 Auswahl des Laufpuffers

Die Auswahl des Laufpuffers spielt eine wesentliche Rolle für die Trennleistung des Trennsystems. Die Pufferionen sollten in größerer Konzentration vorliegen, als die Ionen in der Probenlösung. Dadurch kommt es seitens der Probenionen zu keiner Beeinflussung des elektrischen Feldes und man erhält symmetrische scharfe Zonen. Allerdings führen zu hohe Pufferkonzentrationen zu längeren Analysenzeiten. Der pH-Wert legt die Ladung der Probenkomponenten fest und beeinflusst somit entscheidend die Selektivität des Trennsystems. An ein Puffersystem in der CZE können allgemein folgende Anforderungen gestellt werden (Engelhardt *et al.*, 1994):

- Gewährleistung der Selektivität
- Stabilisierung des pH-Wertes durch ausreichende Pufferkapazität
- geringe Eigenabsorption bei der Detektionswellenlänge
- möglichst geringe Mobilität des Gegenions für kleine Ströme (Joulesche Wärme ↓)
- reproduzierbare Herstellbarkeit
- Stabilität

Für die Quantifizierung gängiger Süß- und Konservierungsstoffe mittels CZE wird dabei in der Literatur von verschiedensten Laufpuffern berichtet. Ein Großteil der Berichte über die CZE-Analyse von Süßstoffen beinhaltet ebenso die Trennung von Konservierungsstoffen mit der gleichen Methode. Während Jimidar *et al.* (1993) in ihrer CZE-Methode bspw. einen 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 11) zur Trennung von Aspartam, Coffein und Benzoesäure in Erfrischungsgetränken einsetzten, so verwendeten Walker *et al.* (1997) für die Bestimmung der drei Komponenten einen 20 mM Glycinpuffer (pH 9). McCourt *et al.* (2005) setzten als Elektrolytlösung 3 mM 3,5-Dinitrobenzoesäure / 20 mM Natriumhydroxid zur Qualifizierung und Quantifizierung von Sucralose ein. In Berichten, die sich ausschließlich mit der Trennung von Konservierungsstoffen befassten, wird z.B. zur Trennung eines Gemisches aus Sorbinsäure, Benzoesäure und Propionsäure von der Verwendung eines 50 mM Phosphat–50 mM Boratpuffers (pH 7) mit 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Pufferadditiv (Ng *et al.*, 1992) berichtet. Kuo und Hsieh (1997) gelang die gleichzeitige Bestimmung von neun Konservierungsstoffen – darunter Benzoesäure, Sorbinsäure und einige PHB-Alkylester mit Verwendung eines 35 mM Natriumtetraboratpuffers (pH 10) mit 2 mM α -Cyclodextrin als Pufferadditiv.

In jüngeren Veröffentlichungen hat sich ein 20 mM Natriumtetraboratpuffer bei pH 9,4 (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009; Hu *et al.*, 2013) als gut funktionierender und zuverlässiger Laufpuffer bewährt, weshalb dieser auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurde und zur Anwendung kam.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die für die Untersuchungen verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen (Tabelle 3):

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (inkl. Bezugsquelle)

Chemikalie/Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Acesulfam-K, mind. 99 % für Lebensmittelanalytik	Riedel-de Haën®
Aspartam, 98 %	Alfa Aesar
Benzoessäure, mind. 99,5 %	Sigma-Aldrich
Coffein, rein	Sigma-Aldrich
DL-Phenylalanin, 99 %	Alfa Aesar
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, >99% krist.	Roth
L(+)-Ascorbinsäure, ≥ 99 %	Roth
Natriumtetraborat-Decahydrat, > 99 %	Roth
Natronlauge 0,1 M und 1 M	Roth
Saccharin Natriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich
Sorbinsäure, mind. 99 %	Sigma-Aldrich
Theobromin, mind. 99 %	Sigma-Aldrich
Vanillin; ≥ 99 % für die Biochemie	Roth
Wasser, ultrarein	
Zinksulfat-Heptahydrat, ≥ 99,5%, p.a	Roth
Minisart RC15 Membranfilter, 0,45 µm	Sartorius
Vial (aus PP), 1 mL; Part No. 5182-0567	Agilent Technologies
Vial Caps PEO; Part No. 5181-1513	Agilent Technologies

Die Lebensmittelproben wurden von lokalen Supermärkten bezogen. Die Getränkeproben wurden anschließend bei 4-6°C gelagert.

„Brause Tabletten Multivitamin“ von Tip (TI – 003 – 072010)

„Fructiv Orange, Pfirsich-Maracuja“ von Müller (SNI: 1022809: 43079)

„Nestea ohne Zucker, Weißer Pfirsich Geschmack“ von Nestea (LGZ 31081548

„Pepsi light“

„Vita Cola Original“ (20: 26 S 0307)

2.1.2 Herstellung benötigter Lösungen

Herstellung des Laufpuffers

Als Elektrolytlösung bzw. Laufpuffer wurde ein 20 mM Natriumtetraboratpuffer bei pH 9,4 (1.4.2.4) verwendet, welcher wie folgt hergestellt wurde:

Zunächst wird 1 L einer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung der gewünschten Konzentration (20 mM) hergestellt. Anschließend erfolgt unter Rühren die pH-Werteinstellung auf 9,4 mit 1 M oder 0,1 M Natronlauge. Dieser Laufpuffer kann dann aufgrund seiner Stabilität mehrere Wochen in der Elektrolytflasche des CE Systems aufbewahrt werden.

Herstellung der Referenzlösungen

Zum Anlegen einer kleinen Bibliothek (s Tabelle 7) ausgewählter Süß- und Konservierungsstoffe wurde von den einzelnen Substanzen je eine Referenzlösung der Massenkonzentration $\beta = 100 \text{ mg/L}$ hergestellt. Dazu wurden 10 mg auf ein Wägeschiffchen eingewogen, quantitativ in einen 100 mL Maßkolben überführt und auf exakt 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt

Herstellung der Kalibrierlösungen

Um Süß- und Konservierungsstoffe in Lebensmitteln quantifizieren zu können, ist zunächst eine Kalibrierung erforderlich.

Zur Quantifizierung von Aspartam, Saccharin-Na, Acesulfam-K und Coffein in Lebensmitteln wurde vorab in einem 1 L Maßkolben eine Stammlösung, welche alle vier Komponenten enthält, der Massenkonzentration $\beta = 1000 \text{ mg/L}$ hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung drei Kalibrierlösungen mit Massenkonzentrationen von $\beta = 10 \text{ mg/L}$, $\beta = 50 \text{ mg/L}$ und $\beta = 100 \text{ mg/L}$ hergestellt.

Herstellung der Kontrolllösung

Zur Herstellung der Kontrolllösung wurden in einen 100 mL Maßkolben, auf 0,1 mg genau, folgende Substanzen eingewogen, gelöst und anschließend bis zur Eichmarke aufgefüllt:

Tab. 4: Übersicht der in der Kontrolllösung befindlichen Substanzen

Substanz	Einwaage [mg]
Acesulfam-K	35,6
Saccharin-Na	25,0
Aspartam	220,3
Coffein	67,9
Sorbinsäure	103,5
Benzoessäure	119,0
Vanillin	102,0
Phenylalanin	11,4
Theobromin	70,8

Herstellung von Carrez-Lösung I & Carrez-Lösung II

Um die Proben letztendlich analysieren zu können, bedürfen einige Erzeugnisse eine gewisse Probenvorbehandlung. Dies gilt nach § 35 LMBG-Methode L28 z.B. für trübe flüssige Erzeugnisse, wie Säfte oder aromatisierte Milcherzeugnisse, bei denen die nachfolgenden Lösungen erforderlich sind:

Carrez-Lösung I: 15 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat werden in Reinstwasser gelöst und auf 100 mL aufgefüllt (§ 35 LMBG-Methode L28).

Carrez-Lösung II: 30 g Zinksulfat-Heptahydrat werden in einwasser gelöst und auf 100 mL aufgefüllt (§ 35 LMBG-Methode L28).

2.1.3 Geräte

Die für die Versuche verwendeten Geräte sind im Folgenden aufgeführt:

Die Analysen wurden mit einem **Agilent G1600AX 3D CE System** (schematische Darstellung siehe 1.4.2.2.) der Firma *Hewlett Packard* durchgeführt. Dieses umfasst folgende Komponenten:

- **Agilent G1600AX 3D CE System**
- **Integrierter DAD** (Messbereich: 190–600 nm)
- **HPCE Fused-Silica Standardkapillare G1600-61311** von *Agilent Technologies*

gesamte Länge	effektive Länge	Innendurchmesser
64,5 cm	56 cm	75 µm
- **G1601A CE Chemstation Pentium IV Data Station**
- **PC**

Die Einwaagen erfolgten mit der **Analysenwaage BP 210 S** von *Sartorius*.

Zum Entgasen einiger Proben wurde ein *Bandelin SONOREX SUPER RK 130 H* **Ultraschallreiniger** eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt äquivalent zur HPLC-Methode für die Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen (§ 35 LMBG-Methode L28). Demnach werden z.B. klare flüssige Erzeugnisse (wie z.B. Cola) nur 1:5 verdünnt, indem 20 mL Probe in einem 100 mL-Maßkolben mit Reinstwasser korrekt aufgefüllt werden. Andere trübe flüssige Erzeugnisse (wie z.B. „Fructiv Orange, Pfirsich-Maracuja“ von Müller) bzw. halbfeste und feste Erzeugnisse bedürfen einer aufwändigeren Probenvorbereitung, welche detailliert der Methode „§ 35 LMBG-Methode L28, Kapitel. 6.1“ im Anhang entnommen werden kann. Die untersuchte Brausetablette wird in Reinstwasser aufgelöst, quantitativ in einen 100 mL Maßkolben überführt und auf exakt 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Vor der Messung wird diese gleichermaßen wie klare flüssige Erzeugnisse (§ 35 LMBG-Methode L28) 1:5 verdünnt.

Im Anschluss daran wird die Probe je nach Bedarf 20–30 min im Ultraschallbad entgast und anschließend auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Jede Probe- bzw. Referenzlösung wird vor dem Vermessen membranfiltriert (0,45 µm), um zu verhindern, dass eventuelle Trubstoffe in die Kapillare gelangen.

2.2.2 Arbeits- und Messbedingungen des CE Systems

Die Untersuchungen werden mit einem **Agilent G1600AX 3D CE System** der Firma *Hewlett Packard* durchgeführt.

Vor Beginn eines jeden Messtages muss sichergestellt sein, dass die Kapillare zuvor einer gründlichen Reinigung unterzogen wurde. Dies wird gewährleistet, indem die Kapillare am Ende eines jeden Messtages ein gründliches Reinigungsprogramm („Rein1MLG.M) durchläuft. Die Kapillare wird dabei zunächst 30 min lang mit 1 M Natronlauge, anschließend 30 min mit 0,1 M Natronlauge und zum Schluss 15 min mit Reinstwasser gespült.

Zwischen den einzelnen Messungen eines jeweiligen Tages ist im Normalfall keine zusätzliche Reinigung erforderlich, da bei jedem Messvorgang eine Vorkonditionierung (Tabelle 5) integriert ist, die u.a. auch die Aufgabe der Reinigung übernimmt. Weiterhin sollten die Vorratsgefäße (Vials) regelmäßig kontrolliert und rechtzeitig erneuert werden.

Tab. 5: Ablauf der Vorkonditionierung

Substanz	Zeit [min]	Einlass	Auslass
1. 0,1 M Natronlauge	5	Vial 3	Vial 4
2. Reinstwasser	5	Vial 5	Vial 4
3. Laufpuffer	3	Vial 6	Vial 4

Die Messbedingungen und allgemeinen Parameter der angewendeten CE-Methode sind nachfolgend in Tabelle 6 aufgeführt:

Tab. 6: Messbedingungen und Parameter der angewendeten CE-Methode

Name der Methode	SWEET.M
Temperatur der Kassette	25°C
Laufpuffer	20 mM Natriumtetraborat (pH 9,4)
gesamte Länge der Kapillare	64,5 cm
effektive Länge der Kapillare	56 cm
Innendurchmesser der Kapillare	75 µm
Injektion	hydrodynamisch, 50 mbar für 3 s
Elektrik	Polarität: positiv Spannung: 30 kV; Stromstärke: 100 µA
Detektionswellenlängen	192/2 nm 200/2 nm 230/10 nm 270/10 nm
Referenzwellenlänge	450/100 nm
maximale Aufnahmezeit	20 min

2.2.3 Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Süß- und Konservierungsstoffe

Zuerst sind die Arbeitsbedingungen der CE so zu wählen, dass eine möglichst hohe Trennleistung und Auflösung gegeben ist. Falls vorhanden, dienen gegenwärtige Publikationen als gute Orientierung.

Um die in der Probe enthaltenen Prüfsubstanzen identifizieren zu können, müssen zunächst die Prüfsubstanzen – bei gleichen Bedingungen – einzeln vermessen werden. Dazu werden entsprechende Referenzlösungen einer bestimmten Standardkonzentration hergestellt und einzeln vermessen. Die erhaltenen Migrationszeiten und Erkenntnisse über das Absorptionsverhalten dienen anschließend zur Identifizierung der Prüfsubstanzen in der Probe. Mittels Migrationszeitenvergleich und hinzuziehen des Absorptionsverhaltens kann ein Großteil der Prüfsubstanzen relativ sicher identifiziert werden. Um die Identität einer vermuteten Prüfsubstanz in der Probe überprüfen zu können, kann die Probe mit der vermuteten Substanz aufgestockt werden und z.B. auf Schulterbildung untersucht werden. Zur Quantifizierung einzelner Prüfsubstanzen wird vorab eine externe Kalibrierung vorgenommen. Dazu werden für die zu bestimmenden Komponenten mehrere Kalibrierlösungen hergestellt (z.B. siehe 2.1.2.3), welche in dem Konzentrationsbereich liegen sollten, in welchem sie auch in der Probe vermutet werden. Anschließend werden die Kalibrierlösungen nacheinander vermessen – beginnend mit der kleinsten Konzentration, um Verschleppungseffekte möglichst gering zu halten – und eine Kalibrationstabelle erstellt. Mithilfe dieser Kalibrationstabelle ist dann anschließend eine Quantifizierung der Prüfsubstanzen möglich.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Funktionalität der entwickelten Methode

Um die Funktionalität der Methode zu testen, wurden zunächst gängige Süß- und Konservierungsstoffe einzeln vermessen und die Peakform auf Symmetrie überprüft. Die untersuchten Einzelsubstanzen konnten bei der verwendeten Standardkonzentration von $\beta = 100 \text{ mg/L}$ einwandfrei identifiziert werden und lieferten scharfe symmetrische Peaks (u.a. siehe Anlage Dateien 8, 9, 13, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 34).

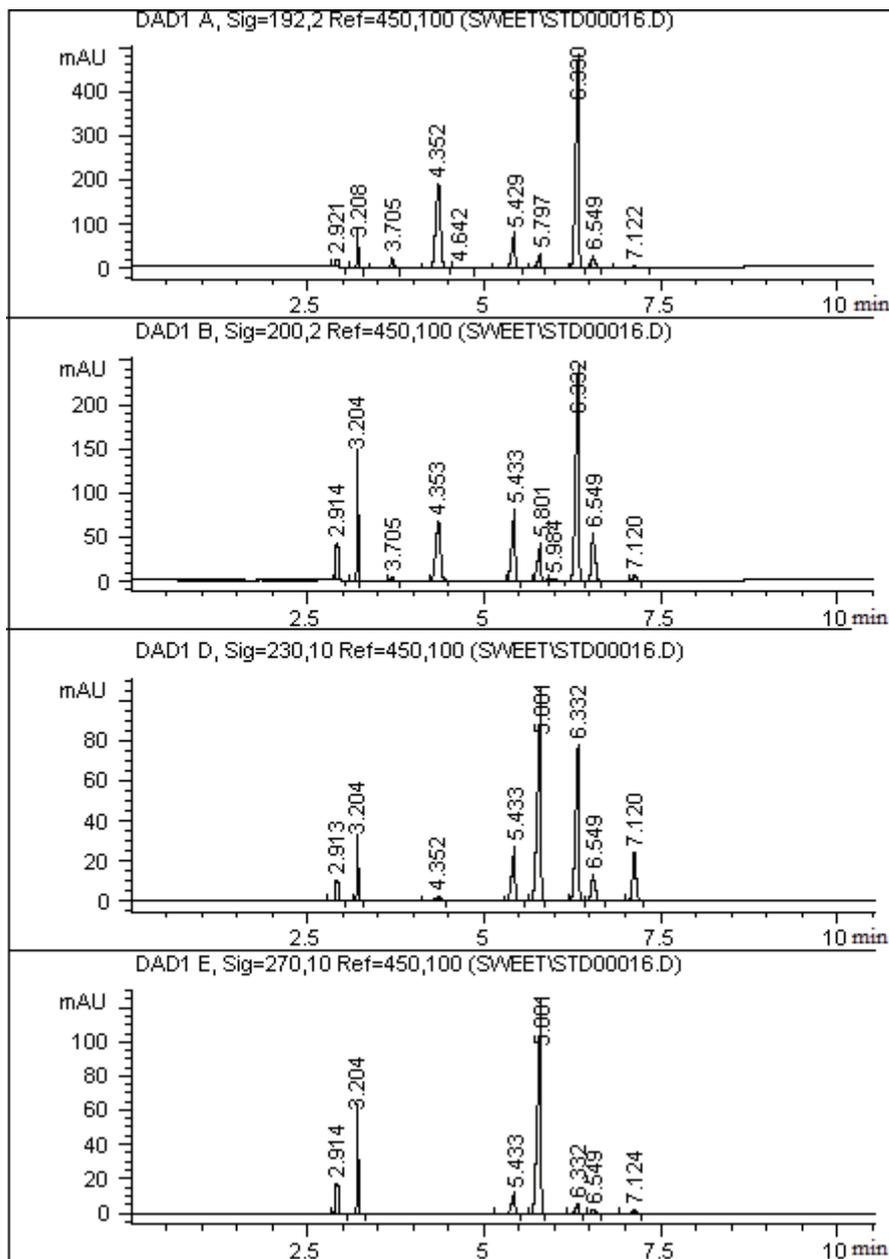


Abb. 5: Trennung eines Mehrkomponentengemisches bei unter 2.2.2 aufgeführten Messbedingungen

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Untersuchung zur Trennung eines Mehrkomponentengemisches (Kontrolllösung). Während dieses Mehrkomponentengemisch mit der HPLC-Methode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen nicht vollständig aufgetrennt werden konnte, so gelang es mit der hier angewendeten CE-Methode (siehe 2.2.2) alle Einzelkomponenten verschiedener Stoffklassen voneinander zu trennen – mit Ausnahme von Aspartam und Phenylalanin, welche hier vermutlich comigrieren. Prinzipiell ist es aber möglich diese beiden Komponenten voneinander zu trennen, wie Datei 10, aus beigefügter Anlage, zeigt.

Eine Übersicht der in der Kontrolllösung enthaltenen Einzelkomponenten, und ihren ermittelten Migrationszeiten, ist in Tabelle 7 gegeben. L(+)-Ascorbinsäure, als häufig eingesetztes Antioxidationsmittel in Lebensmitteln, wurde ebenfalls einzeln bestimmt, war aber nicht in der Kontrolllösung enthalten.

Diese Tabelle dient gleichzeitig als Übersicht und Bibliothek zur Identifizierung der einzelnen Komponenten anhand des Migrationszeitenvergleichs in Kombination mit dem Absorptionsverhalten.

Tab. 7: Charakterisierung einzelner Prüfsubstanzen bzgl. ihrer Migrationszeiten und dem Absorptionsverhalten bei unter 2.2.2 aufgeführten Messbedingungen

Substanz	Migrationszeit bei Einzelmessung [min]	Migrationszeit in der Kontrolllösung [min]	Detektionswellenlänge [nm]
Coffein	2,890	2,914	200
Theobromin	3,207	3,204	200
Phenylalanin	4,241	4,352	192
Aspartam	4,544	4,352	192
L(+)-Ascorbinsäure	5,338	-	270
Vanillin	5,379	5,433	200
Sorbinsäure	5,805	5,801	270
Benzoessäure	6,235	6,330	192
Saccharin-Na	6,454	6,549	200
Acesulfam-K	6,997	7,120	230

3.2 qualitativer Nachweis in Lebensmitteln

Aus einer Standardlösung heraus gelang es bereits die einzelnen darin enthaltenen Standardsubstanzen voneinander zu trennen und nachzuweisen (3.1). Viel relevanter für die Praxis ist die Untersuchung, ob die entwickelte Methode auch für die Anwendung in Lebensmitteln geeignet ist und die entsprechenden Substanzen zuverlässig bestimmt werden können. Dazu wurden verschiedene Lebensmittel untersucht, die zwei oder mehrere der Substanzen aus Tabelle 7 enthalten.

Laut Zutatenliste der „**Brause Tabletten Multivitamin**“ von Tip, sind in diesem Erzeugnis u.a. die Komponenten Saccharin-Na und Vitamin C enthalten, welche im Idealfall auch mit der entwickelten CE-Methode nachzuweisen sind.

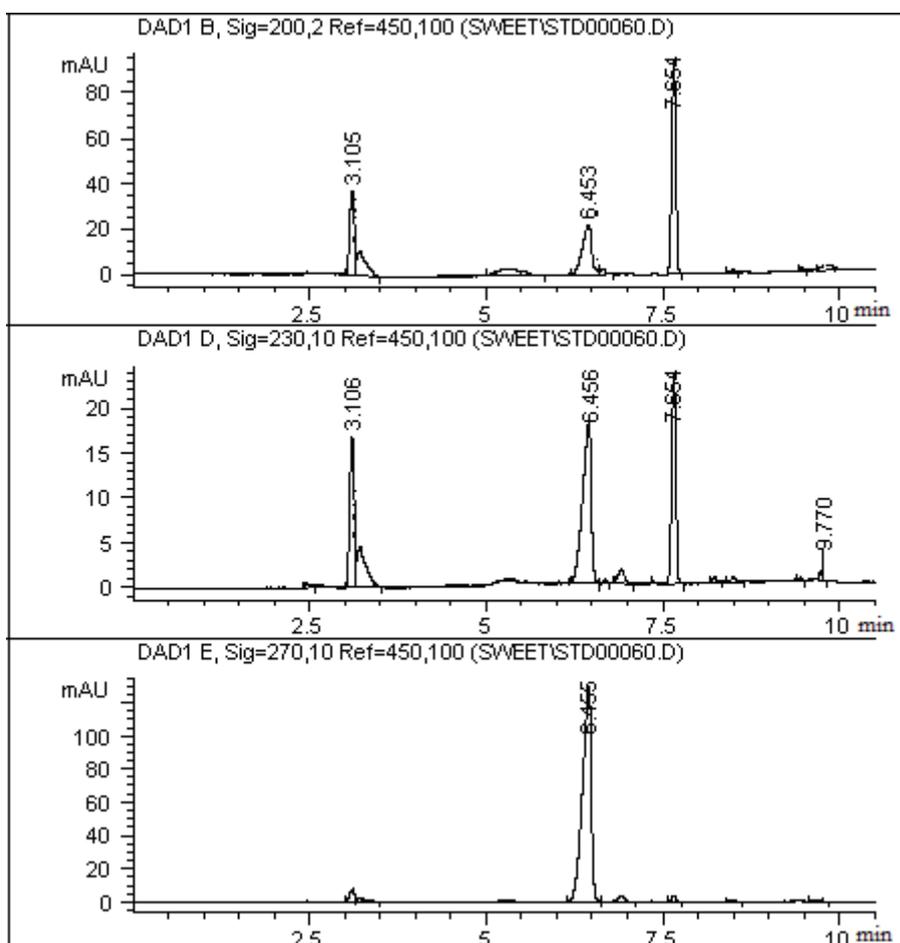


Abb. 6: Nachweis von Saccharin-Na & Ascorbinsäure in „Brause Tabletten Multivitamin“ von Tip

Abbildung 6 zeigt das Elektropherogramm für die Untersuchung der Brausetabletten. Es ist ersichtlich, dass die vermuteten Substanzen in diesem Fall nicht nach den Zeiten migriert sind, wie es nach Tabelle 7 erwartet worden wäre. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die erwarteten Substanzen nicht nachgewiesen wurden. In diesem Fall handelt es sich lediglich um eine Verschiebung der Migrationszeiten, welche möglicherweise in einer Spannungsschwankung begründet liegen kann. Nach $P = U \cdot I$ würde ein Spannungsabfall auch zu einem Leistungsabfall führen, was eine Erklärung für die verringerten Migrationsgeschwindigkeiten sein kann. Des Weiteren ist nur die Kapillare temperiert, sodass Schwankungen der Umgebungstemperatur ebenfalls beeinflussend wirken können.

L(+)-Ascorbinsäure zeigt von den verwendeten Detektionswellenlängen bei 270 nm die höchste Absorption (Tab. 7), was nach Abbildung 6 stark auf die Substanz hindeutet, die nach 6,455 min detektiert wurde. Nach Tabelle 7 beträgt die Differenz der beiden Migrationszeiten von L(+)-Ascorbinsäure und Saccharin-Na etwas mehr als 1,1 min. Legt man diese Differenz als weiteres Charakteristikum zugrunde, so ist diese Differenz der Migrationszeiten zwischen beiden Substanzen auch in Abbildung 6 wiederzufinden und würde ebenfalls für die Vermutung der Verschiebung der Migrationszeiten sprechen. Davon ausgehend, entsprechen die beiden Substanzen, die nach 6,455 min und 7,654 min detektiert worden, mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit der L(+)-Ascorbinsäure und Saccharin-Na.

Um sicher zu gehen, dass es sich in diesem Fall um die vermuteten Substanzen handelt, hätte man die Probe jeweils mit den Prüfsubstanzen aufstocken und anschließend erneut vermessen können.

Laut Zutatenliste des Eistees „Nestea ohne Zucker, Weißer Pfirsich Geschmack“, enthält dieses Getränk u.a. die beide Süßstoffe Aspartam und Acesulfam-K.

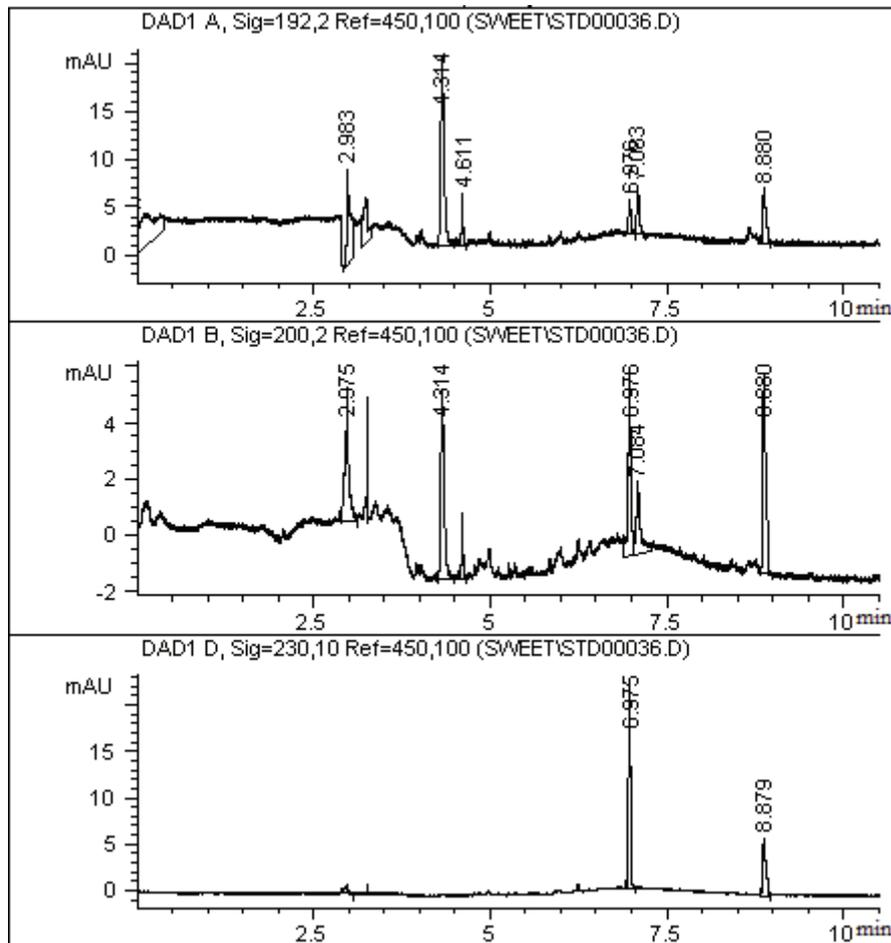


Abb. 7: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K in „Nestea ohne Zucker, Weißer Pfirsich Geschmack“ von Nestea

Nach Abbildung 7 konnten diese beiden Süßstoffe auch nachgewiesen und von den anderen unbekanntem im Eistee befindlichen Komponenten getrennt werden. Aspartam zeigt von den verwendeten Detektionswellenlängen bei 192 nm die höchste Absorption und hat mit dieser Methode eine Migrationszeit von ca. 4,3 min (Einzelmessung) bzw. 4,5 min (Mehrkomponentengemisch). Dies deutet in Abbildung 7 klar auf die Substanz hin, die nach 4,314 min detektiert wurde und auch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 192$ nm die höchste Absorption zeigt. Acesulfam-K besitzt nach Tabelle 7 eine Migrationszeit von ca. 7 min und zeigte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ nm die höchste Absorption. Diese beiden Merkmale sind so auch in Abbildung 7 wiederzufinden, sodass die Substanz, die 6,975 min detektiert wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit Acesulfam-K zugeordnet werden kann.

Das Getränk „**Fructiv Orange, Pfirsich-Maracuja**“ von Müller enthält laut Zutatenliste u.a. Coffein und die beiden Süßstoffe Aspartam und Acesulfam-K.

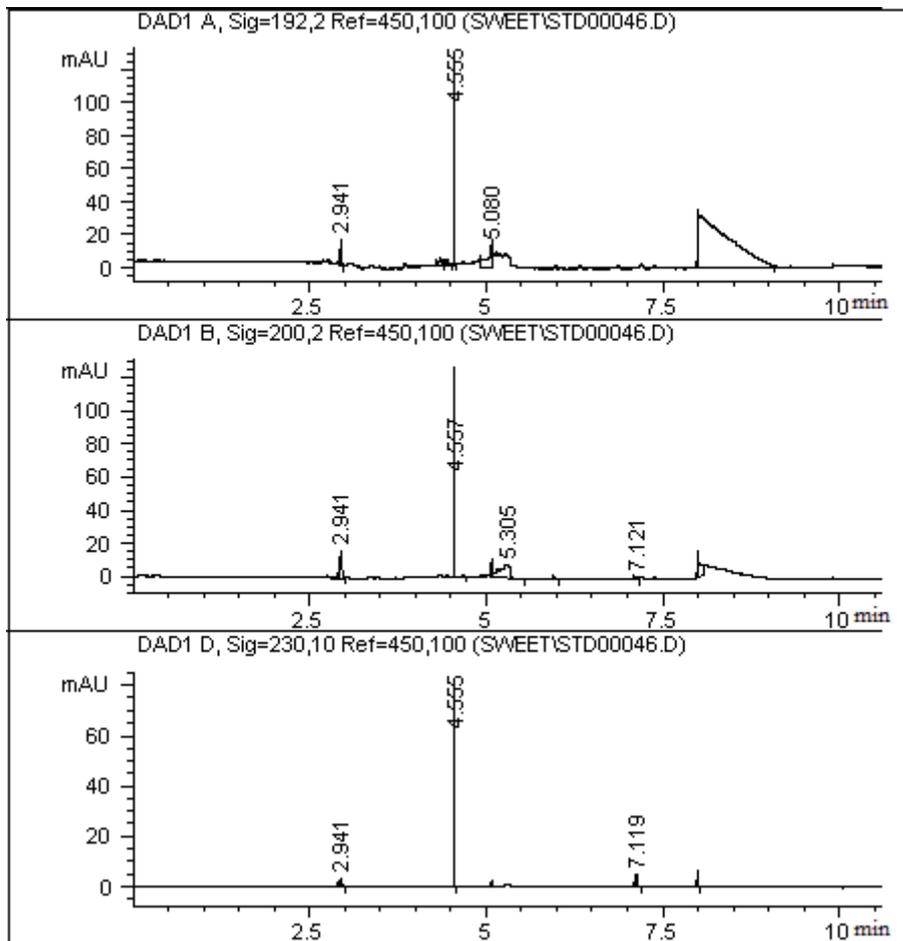


Abb. 8: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K und Coffein in „Fructiv Orange, Pfirsich-Maracuja“ von Müller

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 8 mit den Migrationszeiten und Detektionswellenlängen aus Tabelle 7, so ergibt sich relativ eindeutig die Wiederfindung der drei erwarteten Komponenten. Coffein wurde somit nach einer Migrationszeit von 2,941 min, Aspartam nach 4,555 min und Acesulfam-K nach 7,12 min detektiert.

In „Pepsi light“ sind laut Angabe des Herstellers u.a. Coffein, das Konservierungsmittel Natriumbenzoat und die beiden Süßstoffe Aspartam und Acesulfam-K enthalten.

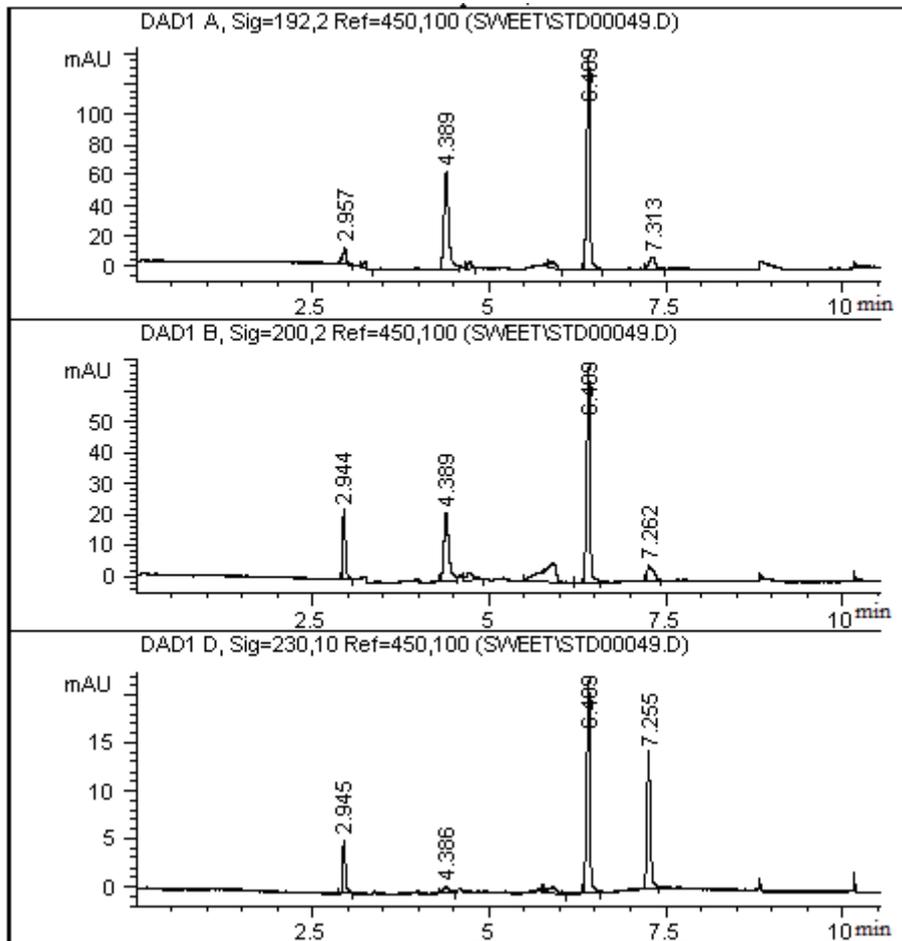


Abb. 9: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K, Coffein & Natriumbenzoat in „Pepsi light“

Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, konnten die vier erwarteten Komponenten aufgetrennt und nachgewiesen werden. Mithilfe der Tabelle 7 kann hiermit folgende Zuordnung erfolgen:

- Coffein entspricht dem Peak bei 2,944 min,
- Aspartam entspricht dem Peak bei 4,389 min,
- Natriumbenzoat, als Salz der Benzoesäure, entspricht dem Peak bei 6,409 min und
- Acesulfam-K entspricht dem Peak bei 7,255 min.

3.3 quantitative Bestimmung in Lebensmitteln

Neben dem qualitativen Nachweis einzelner Substanzen in Lebensmitteln, ist v.a. eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung ein wesentlicher Aspekt in der Lebensmittelanalytik. Im Zuge lebensmittelrechtlicher Bestimmungen und festgelegter Grenzwerte, sind Analysemethoden erforderlich, mit denen die Einhaltung von Grenzwerten zuverlässig überprüft werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und angewendete Methode wurde deshalb ebenfalls zur Quantifizierung von Süßstoffen in Lebensmitteln eingesetzt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels externer Kalibrierung. Kalibrationstabelle und Kalibrierkurven sind der separaten Anlage beigefügt.

Folgende Proben wurden mit der entwickelten Methode untersucht:

- „Brause Tabletten Multivitamin“ von Tip auf den Gehalt an Saccharin-Na
- „Nestea ohne Zucker, Weißer Pfirsich Geschmack“ auf den Gehalt an Aspartam und Acesulfam-K
- „Pepsi light“ auf den Gehalt an Coffein, Aspartam, Acesulfam-K

Die erhaltenen Massenkonzentrationen sind nachfolgend in Tabelle dargestellt. Für die Zwischenergebnisse aus der separaten Anlage, ist aufgrund der Probenvorbereitung ein Verdünnungsfaktor von $f = 5$ zu berücksichtigen.

Tab. 8: ermittelte Werte der quantitativen Untersuchungen in Lebensmitteln

Substanz	Brause Tabletten [mg/100g]	Eistee (Nestea) [mg/L]	Pepsi light [mg/L]
Coffein	-	-	125,01
Aspartam	-	74,80	302,75
Saccharin-Na	*	-	-
Acesulfam-K	-	91,86	42,70

*...nicht auswertbar

Die Einwaage einer Brausetablette entsprach: $m = 3,9716 \text{ g}$

Um von dem erhaltenen Ergebnis der Analyse (siehe Anlage Datei 60) auf den Gehalt an Saccharin-Na in mg/Tablette bzw. mg/100 g schließen zu können, wird das injizierte Volumen benötigt, welches hier nicht bekannt ist.

4 Diskussion

Kernpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung und Anwendung einer Kapillarelektrophorese-methode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln.

Bis dato stellt die HPLC die Hauptuntersuchungsmethode zur gleichzeitigen Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln dar (Chen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013). Als nachteilig bei dieser Untersuchungsmethode haben sich dabei aber v.a. die relativ langen Analysezeiten und der hohe Kostenaufwand für Lösungsmittel und Trennsäulen herausgestellt (Thompson *et al.*, 1995; Razez *et al.*, 1995). Deshalb erscheint es sinnvoll, schnellere und kostengünstigere Alternativen in Betracht zu ziehen, wenn diese im Hinblick auf HPLC-Methoden mit vergleichbarer Wiederholbarkeit und Zuverlässigkeit arbeiten.

Die Kapillarelektrophorese ist ein instrumentell-analytisches Trennverfahren, dessen Entwicklung bereits Ende der 70er Jahre begann (Mikkers *et al.*, 1979; Jorgenson & Lukacs, 1981). Mittlerweile ist die Einsetzbarkeit dieses Trennverfahrens soweit fortgeschritten, dass es eine inzwischen immer wichtigere Rolle in der Süßstoffanalytik spielt (Hu *et al.*, 2013).

Als wirkungsvolles und flexibles Trennverfahren ist die CE in der Lage, einzelne Probenkomponenten verschiedener Stoffklassen zu trennen und nachzuweisen. Diese Fähigkeit macht die CE zu einem idealen Verfahren für die Analyse von Mehrkomponentengemischen, z.B. Erfrischungsgetränke (Frazier *et al.*, 2000).

An der Hochschule Neubrandenburg wird, im Rahmen eines Laborpraktikums des Masterstudiengangs für Lebensmitteltechnologie, die Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen mittels einer validierten HPLC-Methode durchgeführt.

Durch Etablierung einer entsprechenden CE-Methode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen, wäre die Möglichkeit gegeben beide Analyseverfahren unmittelbar miteinander vergleichen zu können. Deshalb machte sich die vorliegende Arbeit diese Aufgabe zum Ziel.

Es existieren bereits einige validierte CE-Methoden zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen, an dessen Anlehnung die Wahl der Methodenparameter erfolgte. So hat sich in jüngeren Publikationen ein 20 mM Natriumtetraboratpuffer als stabiler und zuverlässiger Laufpuffer bewährt (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009; Hu *et al.*, 2013), weshalb er auch in der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode Anwendung fand. Weiterhin wurden der Methode zunächst folgende wesentliche Parameter zugrunde gelegt: Temperatur der Kassette von 25°C, Hydrodynamische Injektion mit 50 mbar für 3 s, positive Polarität, Spannung von 30 kV und Detektionswellenlängen des DAD von 192 nm, 200 nm und 245 nm. Die Untersuchungsergebnisse (Kap. 3) ergaben, dass diese Auswahl an Methodenparametern zur erfolgreichen Trennung eines Mehrkomponentengemisches (3.1) führt, weshalb diese Parameter für anschließende qualitative und quantitative Untersuchungen beibehalten wurden. Allerdings war eine Anpassung der ausgewählten Detektionswellenlängen erforderlich. So existiert Acesulfam-K in diesem Puffer bei gegebenem pH-Wert als tautomeres Gleichgewicht und besitzt bei $\lambda = 245$ nm einen isobestischen Punkt (Schuster & Gratzfeld-Hüsgen, 2009). Die Absorptionsmaxima für Acesulfam-K liegen demnach bei $\lambda = 230$ nm (neutrale Form) und $\lambda = 270$ nm (basische Form). Sorbinsäure und L(+)-Ascorbinsäure (Tab. 7) zeigten von den gewählten Detektionswellenlängen ebenfalls bei $\lambda = 270$ nm die höchste Absorption, weshalb als Konsequenz die Detektionswellenlängen $\lambda = 192$ nm, $\lambda = 200$ nm, $\lambda = 230$ nm und $\lambda = 270$ nm in die Methode integriert wurden.

Wie Kapitel 3.2 zeigt, gelang es mit der entwickelten Methode verschiedene Süß- und Konservierungsstoffe in unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen innerhalb von 10 min voneinander zu trennen und qualitativ nachzuweisen.

Zur Identifizierung der Peaks bzw. Substanzen wurde ein Vergleich der Migrationszeiten und des Absorptionsverhaltens, mit denen von Referenzsubstanzen, herangezogen. Eine Erhöhung der Sicherheit würde zusätzlich durch Aufstocken der Probe mit der vermuteten Substanz erreicht werden können.

Klare flüssige Erzeugnisse, welche nur einer geringen Probenaufarbeitung bedürfen, scheinen also relativ problemlos qualitativ auf Vorhandensein von Süß- und Konservierungsstoffen untersucht werden zu können.

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen sind allerdings kritischer zu hinterfragen. Eine Überprüfung der Richtigkeit der entwickelten Methode durch Vergleich mit einer anderen bereits validierten Methode (HPLC), ist im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nur bedingt möglich. Optimal wäre es, wenn die gleichen Proben an ein und

demselben Tag von einer Person untersucht worden wären, was so nicht gegeben war. Dies schließt eine identische Probenvorbereitung ein und würde schwankende Einflüsse (Temperatur etc.) aus der Umgebung minimieren.

Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen (Kap. 3.2) waren also äußerst vielversprechend in Bezug auf die Entwicklung einer Alternative zur derzeitigen HPLC-Methode. Ausgewählte Süß- und Konservierungsstoffe konnten innerhalb von 10 min vollständig aus einem Mehrkomponentengemisch aufgetrennt und identifiziert werden. Gelingt es nun, auch die quantitativen Untersuchungen in ihrer Richtigkeit sicher zu bestätigen, wäre das Ergebnis die Etablierung einer vollwertigen Alternative zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln.

Somit kann die vorliegende Methode durchaus im Rahmen eines Laborpraktikums als Vergleichsmethode für die Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen zum Einsatz kommen. Eine Vorlage einer möglichen Praktikumsanleitung ist dazu der separaten Anlage beigelegt (siehe „Muster_Praktikumsanleitung“).

5 Zusammenfassung

Die spezifischen Anforderungen an heutige Lebensmittelprodukte, sind ohne Einsatz von Lebensmittelzusatzstoffen teilweise nicht erfüllbar. Süß- und Konservierungsstoffe sind zwei Funktionsklassen von Lebensmittelzusatzstoffen, die den Lebensmitteln zur Gewährleistung bestimmter Produkteigenschaften zugesetzt werden. So haben Konservierungsstoffe die Aufgabe, die Haltbarkeit des Produktes zu verlängern, während Süßstoffe, als Ersatz für Zucker, zum Süßen von Lebensmitteln eingesetzt werden.

Auf Grundlage lebensmittelrechtlicher Bestimmungen und Festlegungen von Grenzwerten unterliegt ein Großteil der Zusatzstoffe spezifischen Höchstmengen in Lebensmitteln (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008), dessen Einhaltung es zu überprüfen gilt.

Die HPLC ist derzeit die Analysemethode der Wahl, besitzt aber auch entscheidende Nachteile (Kap. 1.4.2), weshalb alternative Untersuchungsmethoden, wie bspw. die Kapillarelektrophorese, mehr und mehr in den Fokus rücken (Hu *et al.*, 2013)

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand deshalb die Entwicklung und Anwendung einer alternativen kapillarelektrophoretischen Analysemethode zur Bestimmung von Süß- und Konservierungsstoffen in Lebensmitteln.

Die entwickelte Methode (Kap. 2.2.2) konnte erfolgreich zur Trennung und Identifizierung verschiedener Süß- und Konservierungsstoffe eingesetzt werden und erzielte dabei sogar eine bessere Auftrennung Probenkomponenten der Standardlösung, als die etablierte HPLC-Methode (Kap. 3.1). Die konkrete Anwendung in unterschiedlichen Lebensmitteln, wie z.B. Brausetabletten, Cola-Getränke Eistee oder Molke-Drinks verlief ebenfalls erfolgreich, sodass die entwickelte CE-Methode aussichtsreich im Hinblick einer vollwertigen Alternative zur HPLC-Methode zu sein scheint.

Damit ist also die Möglichkeit gegeben, im Rahmen eines Laborpraktikums beide Methoden unmittelbar miteinander vergleichen zu können – wenngleich die genannten Aspekte zur Quantifizierung (Kap. 4) noch abschließend zu prüfen sind.

6 Literaturverzeichnis

Aboul-Enein, H.Y.; Bakr, S.A.: *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 20 (1997) 1437–1444.

Agilent Technologies: Agilent G1600A Capillary Electrophoresis System – User's guide, 2000.

Agilent Technologies: Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry (CE/MS). Germany, 2013.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: L 00.00-28, (Untersuchung von Lebensmitteln). Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin-Natrium in Lebensmitteln. HPLC-Verfahren (Übernahme der gleichlautenden Norm DIN EN 12856, Ausgabe Juli 1999), Juli 2001.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin; 6., vollständig überarbeitete Auflage 2008; ISBN 978-3-540-73201-3; S. 892

Bergamo, A.B.; Fracassi, J.A.; Da Silva; Dosil Pereira De Jesus: Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Food Chemistry*, Vol. 124, Issue 4, 2011 - pp. 1714-1717.

Boyce MC, Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. *JChromatogrA* **847**:369–375(1999).

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Bewertung von Süßstoffen, 21.08.2003.

Chankvetadze, B.: *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. 1st edition. Chichester: Wiley VCH, 1997 ISBN: 0-471-97415-3

Chen QC, Yu WL and Wang J, Simultaneous determination of various food additives by high performance liquid chromatography. *Chin J Chromatogr* **19**:105–108 (2001).

Engelhardt, E., Beck, W., Schmitt, T.: Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten. 1. Auflage. Braunschweig: Vieweg, 1994. ISBN: 3-528-06597-4

Frazier RA, Inns EL, Dossi N, Ames JM and Nursten HE, Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *J Chromatogr A* **876**:213–220 (2000).

Grundmann, M.; Matysik, F.-M.: CE ergänzt HPLC: Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie. *Nachrichten aus der Chemie*. Vol. 59, 2011.

Hewlett Packard: Referenzhandbuch Dioden-Array-Detektor HP 1100. 1. Ausgabe. Hewlett Packard Company, 1996. Publikationsnummer: G1315-92000

http://www.bmelv.de/DE/Ernaehrung/SichereLebensmittel/SpezielleLebensmittelUndZusaetze/Zusatzstoffe/zusatzstoffe_node.html; Aufrufdatum 09.02.2104.

http://www.fda.gov/search?q=steviol+glycoside&client=FDAgov&site=FDAgov&lr=&proxystylesheet=FDAgov&output=xml_no_dtd&getfields=*; Aufrufdatum 14.01.2014.

Hu, Falian; Xu, Lina; Luan, Feng; Liu, Huitao; Gao, Yuan: Determination of neotame in non-alcoholic beverage by capillary zone electrophoresis. Society of Chemical Industry, 2013.

International Sweeteners Association: <http://www.info-edulcorants.org/de/fach-information>; Aufrufdatum 11.01.2014.

Jimidar, M.; Hamoir, T.P.; Foriers, A.; Massart, D.L.: *J. Chromatogr.* 636 (1993) 179–186.

Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.: *J. Chromatography.* 218, (1981), 209.

Kaltenbach, P.: A High-Sensitive Diode Array Detector for On-Column Detection in Capillary Electrophoresis. *Hewlett-Packard Journal*, 1995.

Kobayashi, C.; Nakazato, M.; Yamajima, Y.; Ohno, I.; Kawano, M.; Yasuda, K. Determination of Sucralose in Foods by HPLC. *Shokuhin-Eiseigata-Zasshi*, 2001, 42, 139–143.

Kuo, K.L.; Hsieh, Y.Z.: *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 334–341.

Leo M. L. Nollet and Fidel Toldra: *Food Analysis by HPLC*, Third Edition, 2012.

Li CH, Li SJ, An J and Li JZ, Simultaneous determination of various kinds of synthetic sweeteners in foods by RPLC/MS/MS. *Sci Technol Food Ind* **30**:319–320 (2009).

Lin, Yu H.; Chou, Shin S.; Sheu, Fuu; Shyu, Yuan T.: Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Preserved Fruits by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 38, 2000.

Lindemann B (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219–225

Lindsay, S.: *Einführung in die HPLC*. 1. Auflage. Braunschweig: Vieweg, 1996
ISBN: 3-540-67016-2

Liu LM and Peng JD, Simultaneous determination of five sweeteners by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Instrum Anal* **27**:549–552 (2008).

Matsumoto H, Hirata K, Sakamaki N, Hagino K and Ushiyama H, Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods by HPLC. *Food Hyg Saf Sci* **49**:31–36 (2008).

McCourt, Josephine; Stroka, Joerg; Anklam, Elke: Experimental design- based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralose in food matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2005), Nr. 382, S. 1269-1278.

McDevitt, V.L.; Rodríguez, A.; Williams, K.R.: *J. Chem. Educ.* 75 (1998) 625–629.

Meyers, B.; Brewer, M.S.: Sweet taste in man: A review. *J. Food Sci.*, 2008, 73:81-90.

Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M: *J. Chromatography*. 169, (1979), 11.

Montijano, H.; Borrego, F.; Canales, I.; Tomás-Barberán: Validated high-performance liquid chromatographic method for quantitation of neohesperidine dihydrochalcone in foodstuffs. , *F.A. Journal of Chromatography A* vol. 758 issue 1 January 10, 1997. p. 163-166.

Ng, C.L.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y.: *J. Chromatogr. Sci.* 30 (1992) 167–170.

Pesek, J.J.; Matyska, M.T.: *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 423–428.

Pyell, U.: *Zur Kapillarelektrophorese*. Universität Marburg, 2001.

Razee, S.; Tamura, A. and Masujima, T.: Improvement in the determination of food additive dyestuffs by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin. *J. Chromatogr. A* **715**: 179–88 (1995).

Richtlinie 94/35/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30.06.1994 über Süßungsmittel, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen (ABI. Nr. L 237 vom 10.09.1994, S. 3)

Schuster, R.; Gratzfeld-Hüsgen, A.: *CZE Analysis of Artificial Sweeteners and Preservatives in Drinks*. Agilent Technologies, Waldbronn, 2009.

Schwedt, G.: *Analytische Trennmethoden*. Weinheim: Wiley-VCH, 2010.

Serdar M¹, Knežević Z.: Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 62:169-173, 2011.

Spangenberg, B.; Stroka, J.; Arranz, I.; Anklam, E.: A simple and reliable HPTLC method for the quantification of the intense sweetner Sucralose®. *liq. chrom. & rel. technol.* **26**. pp.2729 – 2739, 2003.

Süßstoffe. In: Römpp Online. Georg Thieme Verlag, abgerufen am 28. Dezember 2013.

Tate & Lyle (2003) Analytical methodology: analysis of sucralose in food products. Pamphlet from Tate & Lyle, Reading, UK

Thieme Chemistry (Hrsg.): *RÖMPP Online - Version 3.4*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009.

Thompson CO, Trenerry VC and Kemmery B, Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *J Chromatogr A* **704**:203–210 (1995).

Thompson CO, Trenerry VC and Kemmery B, Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods. *J Chromatogr A* **694**:507–514 (1995).

Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe

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.

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 (Text von Bedeutung für den EWR)

Waldron, K.C.; Li, J.: *J. Chromatogr. B* 683 (1996) 47–54.

Walker, J.C.; Zaugg, S.E.; Walker, E.B.: *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 481–485.

Wasik A, McCourt J and Buchgraber M, Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection – development and single-laboratory validation. *J Chromatogr A* **1157**:187–196 (2007).

Yang DJ and Chen B, Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *J Agric Food Chem* **57**:3022–3027 (2009).

Yebra-Biurrun, M.C.: Sweeteners. In *Encyclopedia of Analytical Science*. P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole (Eds), pp. 562-572. San Diego: Elsevier Academic.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Übersicht der in der Europäischen Union zugelassenen Süßstoffe
- Tab. 2: ausgewählte Konservierungsstoffe (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008, 2008)
- Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (inkl. Bezugsquelle)
- Tab. 4: Übersicht der in der Kontrolllösung befindlichen Substanzen
- Tab. 5: Ablauf der Vorkonditionierung
- Tab. 6: Messbedingungen und Parameter der angewendeten CE-Methode
- Tab. 7: Charakterisierung einzelner Prüfsubstanzen bzgl. ihrer Migrationszeiten und dem Absorptionsverhalten bei unter 2.2.2 aufgeführten Messbedingungen
- Tab. 8: ermittelte Werte der quantitativen Untersuchungen in Lebensmitteln

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Klassifizierung in Lebensmitteln eingesetzter Süßungsmittel
- Abb. 2: Chemische Strukturformeln ausgewählter Süßstoffe (modifizierte Darstellung nach Nollet & Toldra, 2012)
- Abb. 3: Schematische Darstellung des verwendeten HP Agilent G1600AX 3D CE Systems (nach Vorlage von Agilent Technologies, 2001)
- Abb. 4: Schematische Darstellung eines Dioden-Array-Detektors (modifiziert nach Vorlage von *Hewlett Packard*, 1995)
- Abb. 5: Trennung eines Mehrkomponentengemisches bei unter 2.2.2 aufgeführten Messbedingungen
- Abb. 6: Nachweis von Saccharin-Na & Ascorbinsäure in „Brause Tabletten Multivitamin“ von Tip
- Abb. 7: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K in „Nestea ohne Zucker, Weißer Pfirsich Geschmack“ von Nestea
- Abb. 8: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K und Coffein in „Fructiv Orange, Pfirsich-Maracuja“ von Müller
- Abb. 9: Nachweis von Aspartam und Acesulfam-K, Coffein & Natriumbenzoat in „Pepsi light“

Anlagen siehe separater Datenträger

Eidesstattliche Erklärung zur Bachelorarbeit

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und ohne unerlaubter Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift
