

Lebensmittelchemie 2004

Für die Analytik fast aller Vitamine existieren heute zuverlässige chromatographische Verfahren. Es fehlt aber noch an Multimethoden. Emulgatoren und Enzyme bei der industriellen Herstellung von Backwaren verbessern sowohl die Verarbeitungseigenschaften als auch die Qualität der Endprodukte.

Vitaminanalytik

◆ Noch vor einigen Jahren war die Ansicht weit verbreitet, dass in der westlichen Welt Vitaminmangel nur bei Randschichten der Bevölkerung aufträte. Seit Volkskrankheiten wie Krebs und Herz-Kreislaufbeschwerden mit der mangelnden Zufuhr bestimmter Vitamingruppen in Verbindung gebracht werden,¹⁾ ist diese Substanzgruppe aber aktueller denn je. Auch die Analytik ist inzwischen weiterentwickelt worden, bleibt aber anspruchsvoll.

Die besondere physiologische Bedeutung der Vitamine – die Notwendigkeit für den Menschen, sie mit der Nahrung aufzunehmen, sowie der Bedarf in geringen Mengen – hatte seit jeher Auswirkungen auf die Analytik: Die zu quantifizierenden Spuren sind zum Teil für hochempfindliche, chemisch-analytische Verfahren zu klein, so dass Bioassays hier immer noch eine Rolle spielen.

Zur Bestimmung der Vitamine eignen sich Organismen, die diese Substanzen nicht selbst produzieren, aber zum Wachstum benötigen. Wurden früher zum Teil Wirbeltiere eingesetzt, wie Hühnerküken für die Vitamin K-Analyse, so sind es heute nur noch Bakterien.

Um den Nährwert eines Lebensmittels zu bestimmen, ist es erforderlich, alle wirksamen Formen eines Vitamins zu erfassen. Vitamine können



als Stereoisomere oder als gebundene Formen mit zum Teil unterschiedlichen physiologischen Aktivitäten vorkommen. Daher müssen sie getrennt erfasst und quantifiziert werden.

Eine zusätzliche Komplikation bei der Analytik entsteht durch synthetische Vitamine mit neuen Derivaten und fehlender Isomerenreinheit der synthetischen Formen, durch die sich die Vitamervielfalt noch erhöht hat. Mit der erhöhten Trennleistung von Säulenmaterialien setzen sich HPLC-Methoden immer mehr durch, da sich damit Vitamere besser differenzieren lassen, sich die Analysensicherheit erhöht und sich die Analysenzeit verkürzt hat. Somit besitzen diese Methoden eindeutige Vorteile gegenüber Bioassays.

Es ist auch heute noch analytisch sinnvoll, Vitamine klassisch in wasser- und fettlösliche einzuteilen.

Fettlösliche Vitamine

◆ Um fettlösliche Vitamine in Lebensmitteln vollständig zu erfassen und von den Fetten zu trennen, werden diese meistens verseift. Dies geht aber mit thermischen und alkalischen Belastungen der Probe einher und kann zu Vitaminverlusten führen.

Für hydrophobe Analyten hat man in der HPLC die Wahl zwischen einer Normalphase mit organischem Fließmittel oder einer Umkehr(RP)-Phase mit wässriger mobiler Phase. Da laufend neue RP-Phasen mit veränderten Selektivitäten und besserer Trennleistung entwickelt werden, und organische Fließmittel nicht kompatibel mit den immer häufiger eingesetzten MS-Anwendungen sind, setzen sich RP-Phasen zunehmend durch. →

Abb. 1.

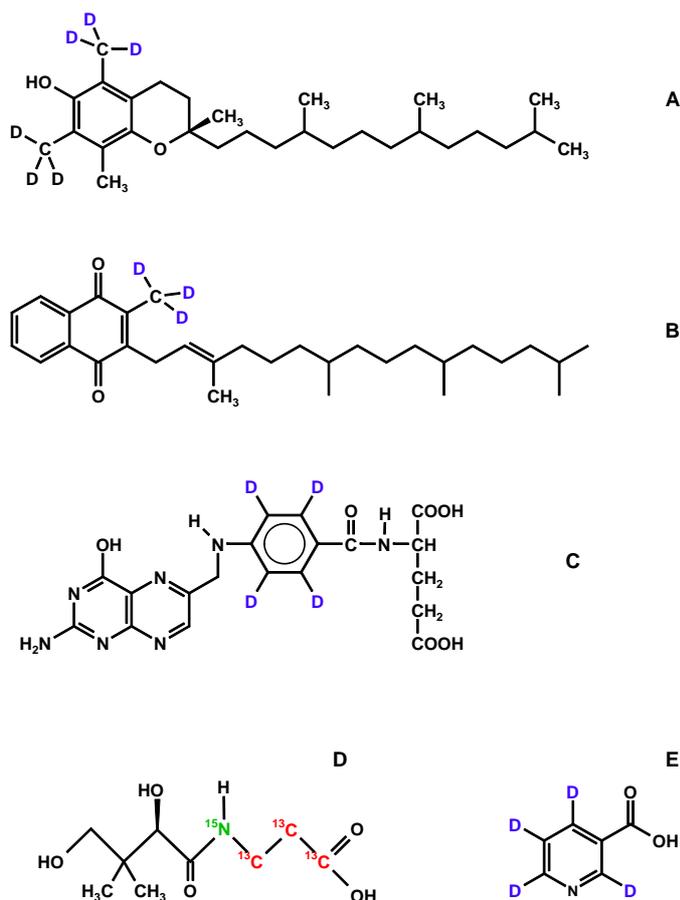
Zur Vitaminbestimmung eingesetzte, stabilisotopenmarkierte Standards:

A: $[D_4]$ - α -Tocopherol;⁴⁾ B: $[D_3]$ -Phyllochinon;⁵⁾

C: $[D_4]$ -Folsäure;⁹⁾

D: $[^{13}C_3, ^{15}N]$ -Pantothensäure;¹¹⁾

E: $[D_4]$ -Nicotinsäure.¹⁰⁾



Vitamin A

Neben der Stammverbindung all-*trans*-Retinol weisen einige ihrer Metaboliten sowie eine Reihe von Carotinoiden als Provitamine Vitaminaktivität auf und sind einzeln zu quantifizieren. Die physiologische Aktivität ist an eine nicht-hydroxylierte β -Ionon-Ringstruktur gebunden. Moderne HPLC-Verfahren erfassen Retinoide gleichzeitig mit den Carotinoiden, wobei als interne Standards die nicht natürlich vorkommenden β -apo-8'-Carotenal oder 3,4-Didehydroretinylacetat dienen. Als stationäre Phasen bewähren sich zunehmend C30-Materialien. Unter den Carotinoiden werden dabei immer noch bisher unbekannte Vertreter identifiziert,²⁾ zum Teil durch innovative Kopplungstechniken wie HPLC-NMR.³⁾

Vitamine D, E und K

Für die Bestimmung der Calciferole und Tocopherole ist die RP-HPLC mit UV-Detektion das Standardverfahren, während die Phyllo-

chinone empfindlich nur mit Nachsäulenreduktion und Fluoreszenzdetektion nachweisbar sind.

Als interne Standards eignen sich Ergocalciferol für Vitamin D₃, Dimethyltolcol für die Tocopherole sowie Vitamin K₁₍₂₅₎ für die Phyllochinone. Stabilisotopenmarkierte Standards spielen bisher eine untergeordnete Rolle, eine erste Anwendung ist für α -Tocopherol beschrieben.⁴⁾ Eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SiVA) für Vitamin K₁₍₂₀₎ in Plasma durch GC-MS⁵⁾ dürfte in Lebensmitteln kaum anwendbar sein, da das an der aciden 2-Methyl-Position markierte $[D_3]$ -Phyllochinon (Abbildung 1 B) in wässrigen Elutionsmitteln einem Deuterium-Protium-Austausch unterliegt.

Wasserlösliche Vitamine

◆ Diese Substanzen eignen sich besonders für eine Analyse durch RP-HPLC. Multimethoden existieren für die Vitamine B₁, B₂, B₆, Folsäure und Niacin in Nahrungsergänzungsmitteln oder angereicherten Lebensmit-

eln. Für die nativ in Lebensmitteln vorkommenden Vitamine ist diese Methode jedoch wenig geeignet, da konjugierte Formen mit Vitaminaktivität erst durch spezifische Enzyme gespalten werden müssen. Mit einer Kombination aus α -Amylase, Papain und saurer Phosphatase lassen sich jedoch Konjugate der Vitamine B₁, B₂ und B₆ gleichzeitig erfassen.⁶⁾

Vitamine B₁ und B₂

Die empfindliche Analyse von Thiamin erfolgt fluorimetrisch durch Vor- oder Nachsäulenderivatisierung zu Thiochrom. Der Einsatz interner Standards hat sich hierbei nicht bewährt.

Aufgrund seiner Fluoreszenz wird Riboflavin bevorzugt durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion (FD) quantifiziert. Seit neuestem lässt es sich simultan mit seinen Konjugaten Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) durch HPLC auf einer Amidphase ohne Verwendung eines Ionenpaarreagens erfassen.⁷⁾

Vitamin B₆

Pyridoxal und seine Vitamere sind aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz gut durch HPLC-FD bestimmbar. Die physiologisch aktiven Phosphatester müssen entweder durch Phosphatasen gespalten werden oder lassen sich durch Nachsäulenderivatisierung mit Hydrogensulfit neben den unveresterten Vitameren quantifizieren.⁸⁾

Folate

Diese Substanzgruppe steht derzeit im Fokus der Diskussion um die Vitaminanreicherung von Lebensmitteln. Während es beispielsweise in Nordamerika gesetzlich vorgeschrieben ist, Weizenmehl mit Folat anzureichern, ist in Deutschland die Supplementierung freiwillig. Neben klassischen, vitaminangereicherten Produkten wie Säften, Molkeprodukten oder Süßigkeiten werden zunehmend Margarine, Speisesalz und Backmischungen mit Folsäure versetzt.

Für die Analytik der synthetischen Folsäure stehen geeignete Methoden zur Verfügung. Die in Lebensmitteln natürlich vorkommenden Vitamere hingegen sind immer noch eine analytische Herausforderung. Im Vergleich zur synthetischen Folsäure sind sie deutlich instabiler gegen Licht und Oxidation, sie kommen nur in Spurenkonzentrationen vor, zusätzlich macht die Vitamerenvielfalt der Analytik zu schaffen.

Um die Variabilität hinsichtlich der Anzahl an Glutamatresten zu verringern, ist es üblich, die Folate durch Konjugasen enzymatisch zu Monoglutamaten abzubauen. Anschließend werden die Proben über Anionenaustauschchromatographie oder Affinitätschromatographie über Folat bindendes Protein (FBP) gereinigt. Die Monoglutamate sind nach HPLC-Trennung durch Fluoreszenzdetektion oder Massenspektrometrie erfassbar, wobei zunehmend stabilisotopenmarkierte Analoge der Monoglutamate als interne Standards dienen.⁹⁾

Der einem Immunoassay sehr ähnliche Bindungsassay über FBP hat den Nachteil, dass FBP unterschiedliche Affinitäten zu den Vitaminen zeigt. Dabei ist dieser gut für die Blutanalytik geeignet, da im Plasma hauptsächlich 5-Methyltetrahydrofolat auftritt. Bei Lebensmitteln ist der Bindungsassay jedoch wenig aussagekräftig.

Niacin und Pantothersäure

Niacin, die Sammelbezeichnung für Nicotinsäure und das entsprechende Amid, muss zur empfindlichen Fluoreszenzdetektion einer Nachsäulenderivatisierung unterworfen werden. Proteingebundenes Niacin sowie Nicotinamidnucleotide sind zuvor durch saure Hydrolyse oder Phosphatasebehandlung zu spalten. Eine Alternative zur HPLC-FD ist die Bestimmung durch LC-MS-MS. Dazu findet sich in der Literatur eine Trennung von Niacin sowie von sechs Metaboliten im Plasma innerhalb von 60 Sekunden auf einer monolithischen HPLC-Phase unter Einsatz der deuterierten Isotopomere.¹⁰⁾

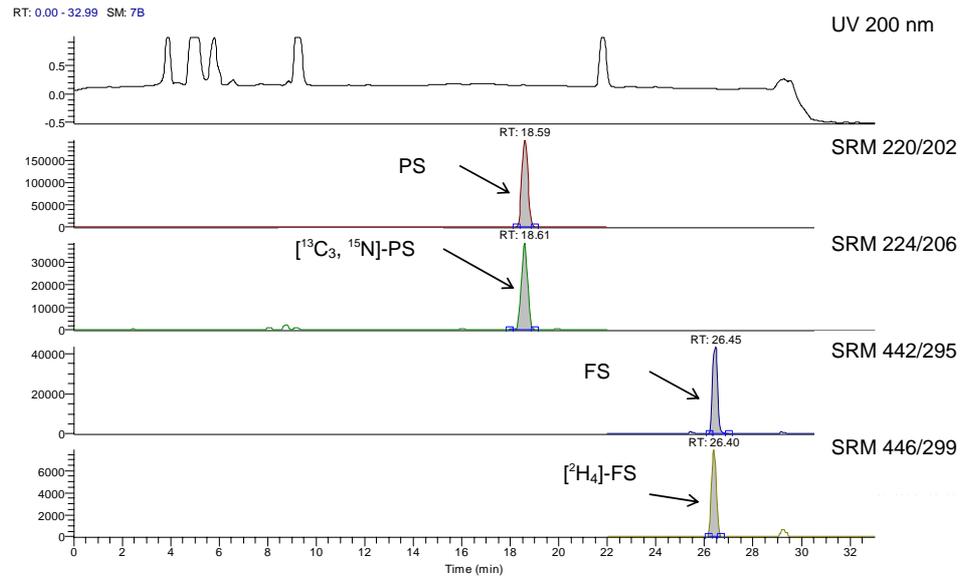


Abb. 2. Simultane Stabilisotopenverdünnungsanalyse von Pantothersäure (PS) und Folsäure (FS) in Multivitaminensaft (LC-MS-MS-Detektion im Selective Reaction Mode, SRM¹⁵⁾).

Pantothersäure (Vitamin B₅) hat den Nachteil, weder UV-Strahlung zu absorbieren noch zu fluoreszieren. Neben GC-MS-Verfahren wurden kürzlich LC-MS-Methoden publiziert, die als internen Standard die homologe Homopantothersäure einsetzen. Aufgrund möglicher Matrixinterferenzen bei der Electrospray-Ionisation ist es günstiger, mit einem isotopomeren Standard zu arbeiten.¹¹⁾

Konjugierte Pantothersäure in Form von Coenzym A oder Acyl-Carrier-Protein lässt sich durch Kombination aus Phosphatase und Pantetheinase freisetzen. Ein kürzlich vorgenommener Methodenvergleich zeigte, dass die Ergebnisse der mikrobiologischen Bestimmung und der SIVA gut übereinstimmen.

Vitamin B₁₂

Cobalamine sind aufgrund ihrer niedrigen Gehalte in Lebensmitteln mit den üblichen chromatographischen Verfahren nicht zu erfassen. Daher bleiben der Radioproteinbindungsassay und die mikrobiologische Bestimmung der zu den Cyanoverbindungen umgesetzten Cobalaminen weiterhin die Mittel der Wahl. Neuere Publikationen beschreiben den Einsatz eines auf der Proteinbindung basierenden, optischen Biosensors.¹²⁾

Vitamin C

Übliche L-Ascorbinsäurebestimmungen beruhen entweder auf enzymatischen Umsetzungen, HPLC-Verfahren oder einer Kombination aus beiden. Als aussagekräftigste Methode gilt ein HPLC-Verfahren, das Ascorbinsäure, Isoascorbinsäure sowie deren Dehydroformen durch Nachsäulenderivatisierung über Oxidation und kombinierter Reaktion mit ortho-Phenylendiamin zu fluoreszierenden Chinoxalinen bestimmt. Eine Vielzahl von Publikationen befasst sich mit der elektro-analytischen Schnellbestimmung durch Elektroden mit modifizierter Oberfläche (Übersicht in Lit.¹³⁾).



Michael Rychlik, Jahrgang 1964, studierte Lebensmittelchemie in Kaiserslautern und legte sein zweites Staatsexamen in Speyer und Koblenz ab. Er promovierte bei Werner Grosch an der TU München und habilitierte sich dort 2003 über Stabilisotopenverdünnungsanalysen. Seitdem ist er als Privatdozent und akademischer Rat am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München tätig und befasst sich mit der Entwicklung von Stabilisotopenverdünnungsanalysen für Mykotoxine, Vitamine und Aromastoffe sowie deren Anwendung in Toxikologie und Physiologie.

Ausblick

◆ Außer für Vitamin B₁₂ liegen für die einzelnen Vitamine zuverlässige chromatographische Verfahren vor. Die Empfindlichkeit, wie sie für Bioverfügbarkeitsmessungen erforderlich ist, lässt sich durch Kopplung mit der Beschleuniger-Massenspektrometrie enorm steigern, wie die Messung attomolarer Mengen von 5-Methyltetrahydrofolat in Blutplasma zeigt.¹⁴⁾

Multivitaminmethoden existieren bisher nur für vitaminangereicherte Produkte, für nichtangereicherte Lebensmittel sind sie mittelfristig zu erwarten. Kombinierte Enzymbehandlungen, um Konjugate zu erfassen, und simultane SIVAS (Abbildung 2), zum Beispiel für Folsäure und Pantothenäure, sind Schritte in diese Richtung.¹⁵⁾

Michael Rychlik
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der
TU München, Garching
michael.rychlik@lrz.tu-muenchen.de

- 1) B. N. Ames, *Mutation Res.* 2001, 475, 7–20.
- 2) I. Pott, D. E. Breithaupt, R. Carle, *Phytochemistry* 2003, 64, 825–829.
- 3) T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert, *Chromatographia* 2003, 57, 5/19–5/25.
- 4) A. Kalman, C. Mujahid, P. Mottier, O. Heudj, *Rap. Comm. Mass Spectrom.* 2003, 17, 723–727.
- 5) G. Fauler, H. J. Leis, J. Schalamon, W. Muntean, H. Gleispach, *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 655–660.
- 6) S. Ndaw, M. Bergaentzle, D. Aoude-Werner, C. Hasselmann, *Food Chemistry* 2000, 71, 129–138.
- 7) P. Vinas, N. Balsalobre, C. Lopez-Eroz, M. Hernandez-Cordoba, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1789–1794.
- 8) P. Vinas, N. Balsalobre, C. Lopez-Eroz, M. Hernandez-Cordoba, *Chromatographia* 2004, 5, 381–386.
- 9) A. Freisleben, P. Schieberle, M. Rychlik, *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 376, 149–156.
- 10) A. C. Li, Y.-L. Chen, H. Junga, W. Z. Shou, X. Jiang, W. Naidong, *Chromatographia* 2003, 58, 723–731.
- 11) M. Rychlik, *Analyst* 2003, 128, 832–837.
- 12) A. Malinauskas, R. Garjonyte, R. Mazeikiene, I. Jureviciute, *Talanta* 2004, 64, 121–129.
- 13) H. E. Indyk, E. A. Evans, M. C. B. Caselunghe, B. S. Persson, P. M. Finglas, D. C. Woollard, E. L. Filonzi, *J. AOAC Int.* 2000, 83, 1141–1148.
- 14) B. A. Buchholz, A. Arjomand, S. R. Dueker, P. D. Schneider, A. J. Clifford, J. S. Vogel, *Anal. Biochem.* 1999, 269, 348–352.
- 15) M. Rychlik, *Analytica Chim. Acta* 2003, 495, 133–141.

Wirkung von Emulgatoren und Enzymen in Backwaren

◆ Zusatzstoffe werden Lebensmitteln zugesetzt, um bestimmte Effekte zu erzielen. Bei Brot und Backwaren beziehen sich diese Effekte auf die Verarbeitungseigenschaften einerseits und die Qualität der Endprodukte andererseits. Erwünschte Eigenschaften, insbesondere bei der industriellen Herstellung von Backwaren, sind hohe Wasseraufnahmefähigkeit des Mehls, geringe Klebrigkeit, gute Maschinengängigkeit, gutes Gashaltvermögen und hohe Gärtoleranz der Teige. Wichtige Qualitätsparameter der fertigen Backwaren sind gutes Aroma, hohes Gebäckvolumen, ansprechende Farbe und Struktur der Kruste, elastische und gleichmäßige Krume, die nach dem Backen möglichst lange erhalten bleiben soll. Um dies zu erreichen, werden verschiedene Zusatzstoffe meist als Bestandteil von Backmitteln zugegeben. Dazu gehören Redoxreagenzien wie Ascorbinsäure und Cystein ebenso wie Emulgatoren, Hydrokolloide und Enzyme.

Die Wirkung von Zusatzstoffen messen

◆ Um die Wirkung von Zusatzstoffen in Backwaren beurteilen zu können, bedarf es empfindlicher Methoden, die die Effekte beim Anteigen, die Eigenschaften der Teige und des daraus hergestellten Gebäcks objektiv bestimmen. Da häufig nur geringe Mengen an Emulgator vorliegen, vor allem wenn Emulgatorpräparate fraktioniert oder synthetisiert wurden, ist es erforderlich, mit kleinen Mehlmengen zu arbeiten. Allerdings müssen die Ergebnisse dieser Mikroversuche ohne Einschränkung auf den Normalmaßstab übertragbar sein. Diese Anforderungen erfüllen Mikroversuche mit 10 g Mehl.^{1,2)}

Die Wirkung von Zusatzstoffen bei der Herstellung eines Teiges wird mit Mikrofarinographen untersucht. Diese Geräte messen über ein Kraft-Zeit-Diagramm, wie viel Wasser das

Mehl aufnehmen muss, damit der Teig eine definierte Konsistenz bekommt. Zugversuche an einem Mikro-Extensographen geben Auskunft über die Eigenschaften des fertig entwickelten Teiges. Für Mikromengen eignet sich auch die Messung von Teigeigenschaften an dynamischen Rheometern. Diese liefern physikalische Größen wie dynamische Viskosität oder Elastizität, deren Bedeutung für die Backeigenschaften bisher nicht abschließend geklärt ist.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse zur Wirksamkeit von Zusätzen liefern Backversuche, die ebenfalls im Mikromaßstab möglich sind. Der wichtigste Parameter ist dabei das Brotvolumen. Die Krume der Mikrobrote lässt sich dann unmittelbar für die Messung der Krumenfestigkeit und des Altbackenwerdens heranziehen. Dazu dient das Komprimieren und Entspannen der Krumenstücke an speziellen Messgeräten („Texture Analyser“). Die Verkleisterungseigenschaften von Stärke bestimmt die Differential Scanning Calorimetry (DSC). Auch hierfür sind nur kleine Materialmengen (10 mg bis 100 mg Stärke) erforderlich.

Emulgatoren

◆ Emulgatoren dienen als grenzflächenaktive Verbindungen dazu, disperse Systeme zweier nicht mischbarer Phasen zu stabilisieren. Bei Backwaren können reine Emulsionen vorliegen, wenn die äußere Phase ei-



Peter Köhler, Jahrgang 1960, studierte Lebensmittelchemie in Stuttgart. Nach dem zweiten Staatsexamen an der Chemischen Landesuniversitätsanstalt Karlsruhe promovierte er 1992 bei Hans-Dieter Belitz an der TU München. 1999 habilitierte er sich an der TU München über Struktur-Wirkungsbeziehungen synthetischer Emulgatoren bei Backwaren. Seit 2001 leitet er die Arbeitsgruppe „Polysaccharide, Enzyme, Zusatzstoffe“ an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, und seit 2003 ist er stellvertretender Direktor des Hans-Dieter-Belitz-Instituts für Mehl- und Eiweißforschung in Garching.