

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 66 (1975)

Heft: 1

Artikel: Gaschromatographische Zuckerbestimmung : Herstellung und gaschromatische Trennung der Zucker-oxim-silylderivate

Autor: Zürcher, K. / Hadorn, H. / Strack, Ch.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982668>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 23.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Gaschromatographische Zuckerbestimmung

Herstellung und gaschromatische Trennung der Zucker-oxim-silylderivate

K. Zürcher, H. Hadorn und Ch. Strack

Zentrallaboratorium der Coop Schweiz, Basel

Problemstellung

Zur gaschromatographischen Trennung der Zucker müssen diese vorerst in flüchtige Verbindungen übergeführt werden. Dies geschieht durch Acetylieren, öfter jedoch durch Silylieren, weil die Silylderivate wesentlich leichter flüchtig sind und auch Di- und Trisaccharide noch gaschromatographisch getrennt werden können. Zur Herstellung der Zucker-silylätter sind viele Reagenzien entwickelt und noch zahlreichere Arbeitsvorschriften empfohlen worden. *Dutton* (1) hat in seiner Monographie die gaschromatographischen Methoden zur Trennung der Kohlenhydrate ausführlich behandelt und die meisten bis 1972 erschienenen Arbeiten (731 Literaturzitate) berücksichtigt.

In früheren Arbeiten (2, 3, 4) haben wir verschiedene Reagenzien und Methoden zur Silylierung systematisch ausprobiert. Die Zucker-silylätter lassen sich gaschromatographisch sauber trennen, trotzdem ist die Methode mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Eine Fehlerquelle vieler Methoden besteht in der unvollständigen Silylierung einzelner Zuckerarten. Im Gaschromatogramm erscheinen dann mehrere Nebenpeaks. Ein Umstand, der sich oft unangenehm auswirkt, besteht darin, daß alle Zuckerarten mit einer reduzierenden Aldehyd- oder Ketogruppe 2 tautomere Formen bilden. Nach dem Silylieren entstehen jeweils die Silylätter der α - und der β -Form, welche bei Verwendung von leistungsfähigen Säulen im Gaschromatogramm getrennt werden. Bei komplizierten Zuckergemischen erschweren diese zahlreichen Peaks die Auswertung. Besondere Schwierigkeiten bereitet die Fructose, da nach dem Silylieren im Gaschromatogramm nicht nur die zwei zu erwartenden Peaks der α - und der β -Form, sondern 3 bis 5 verschiedene Peaks erscheinen. Dabei handelt es sich nach *Curtius* und Mitarbeitern (5) um die α - und β -Pyranose- und Furanose-Formen. Der 5. Peak entspricht der offenen Ketalform. Auch von anderen Zuckerarten entstehen bei der Silylierung oft mehrere Anomere. *Reid* und Mitarbeiter (6) erhielten bei der Silylierung von Zuckern im Mutarotationsgleichgewicht für Xylose 4 Peaks, für Fructose und Galactose

je 3 Peaks. Nach diesen Autoren ist es nicht nötig, jeden einzelnen Peak auszuwerten. Wenn sich das Zuckergemisch vor der Silylierung im Mutarotationsgleichgewicht befand, genügt es, für jede Zuckerart einen charakteristischen Peak auszuwerten und die Peak-Fläche mit derjenigen eines Eichchromatogrammes zu vergleichen. Um das Mutarotationsgleichgewicht rascher einzustellen, wurde das Zuckergemisch in Pyridin oder N, N-Dimethylformamid-Lösung bei Gegenwart von Katalysatoren erwärmt. Diese Methode leistete bei der Untersuchung von Hydrolysaten von Hemicellulosen gute Resultate. Sie ist jedoch umständlich und bei der Analyse komplizierter Zuckergemische entstehen unübersichtliche Gaschromatogramme. Es ist auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß unter einem charakteristischen Peak, den man auswertet, ein Nebenpeak einer anderen Zuckerart versteckt ist, was zu fehlerhaften Resultaten führt.

Erwünscht wäre eine Methode, bei welcher man für jede Zuckerart nur einen einzigen sauberen Peak erhalten würde. Um dies zu erreichen, wurde vorgeschlagen, die Zucker zunächst zu den entsprechenden Zuckeralkoholen zu reduzieren, diese zu acetylieren oder zu silylieren und gaschromatographisch zu trennen. Die Methode hat den großen Nachteil, daß Glucose und Fructose nicht unterschieden werden können. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die freie Aldehyd- oder Ketogruppe im Zuckermolekül vorerst zu maskieren und anschließend die flüchtigen Derivate herzustellen. *Varma* und Mitarbeiter (7) haben die Zucker zunächst mit Hydroxylamin umgesetzt. Dabei entstehen die Oxime. Anschließend wurden diese mit Essigsäureanhydrid acetyliert. *Varma* und Mitarbeiter bezeichnen die vollständig acetylierten Zuckerderivate als Aldo-nitril-acetate. Im Gaschromatogramm liefert jede Zuckerart nur einen Peak. Versuche nach dieser Methode führten in unserem Laboratorium nicht zu befriedigenden Resultaten.

Wir versuchten nun, die Zucker nach der Ueberführung in die Oxime zu silylieren. Die Methode führte rasch zum Erfolg. Glucose, Fructose sowie die reduzierenden Disaccharide, Lactose und Maltose ergaben auf der von uns benutzten OV-17-Säule nur je einen einzigen Peak (Abb. 2). Beim Literaturstudium fanden wir, daß diese Technik bereits früher von *Sweeley* und Mitarbeitern (8) für qualitative Untersuchungen angewandt worden ist. Nachträglich stießen wir noch auf eine Arbeit von *Mason* und *Slover* (9). Die beiden Autoren haben analog wie wir zunächst die Oxime der Zucker hergestellt und diese anschließend in Pyridin mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in die Silylderivate übergeführt. Nach dieser Methode erhielten sie für Fructose, Glucose, Maltose und Galactose im Gaschromatogramm je 2 Peaks. Die Methode bietet daher gegenüber den bisherigen Methoden, bei welchen die Zucker direkt silyliert werden, keine nennenswerten Vorteile. Hätten wir diese Arbeit früher gekannt, würden wir vermutlich auf die Herstellung von Zucker-oxim-silylderivaten verzichtet haben. Daß diese Silylderivate der direkt reduzierenden Zuckerarten im Gaschromatogramm je zwei Peaks bilden, läßt sich durch die cis- und trans-Form der Oxime erklären, worauf wir später noch zurückkommen werden.

Eine ähnliche Methode haben *Laine* und *Sweeley* (10) benutzt, um Strukturaufklärungen an Kohlenhydraten durch kombinierte Gaschromatographie—Massenspektroskopie durchzuführen. Die Kohlenhydrate wurden mittels Methyloxim-

hydrochlorid in ihre O-Methyloxime übergeführt, diese silyliert, die Trimethyl-O-methyloxime gaschromatographisch getrennt und im Massenspektrographen untersucht.

Neuerdings berichtet auch Petersson (11) über Versuche mit Trimethyl-silylderivaten von Zuckeroximen oder Methyloximen.

Ueber quantitative Bestimmungen durch gaschromatographische Trennung der Oxim-silylderivate haben wir keine Veröffentlichung gefunden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die optimalen Versuchsbedingungen zur Herstellung der Zuckeroxim-silylderivate und deren gaschromatographische Trennung auszuarbeiten, so daß die Methode für zuverlässige quantitative Zuckerbestimmungen in Naturprodukten und Lebensmitteln verwendbar ist.

Vorteile der neuen Methode

Die Vorteile der neuen Methode lassen sich am besten an einem praktischen Beispiel zeigen. In Abbildung 1 ist das GC der Zucker-trimethyl-silyläther einer Modellmischung wiedergegeben. Die Silylierung erfolgte mittels MSHFBA und Trimethylchlorsilan als Katalysator in Pyridin-Lösung.

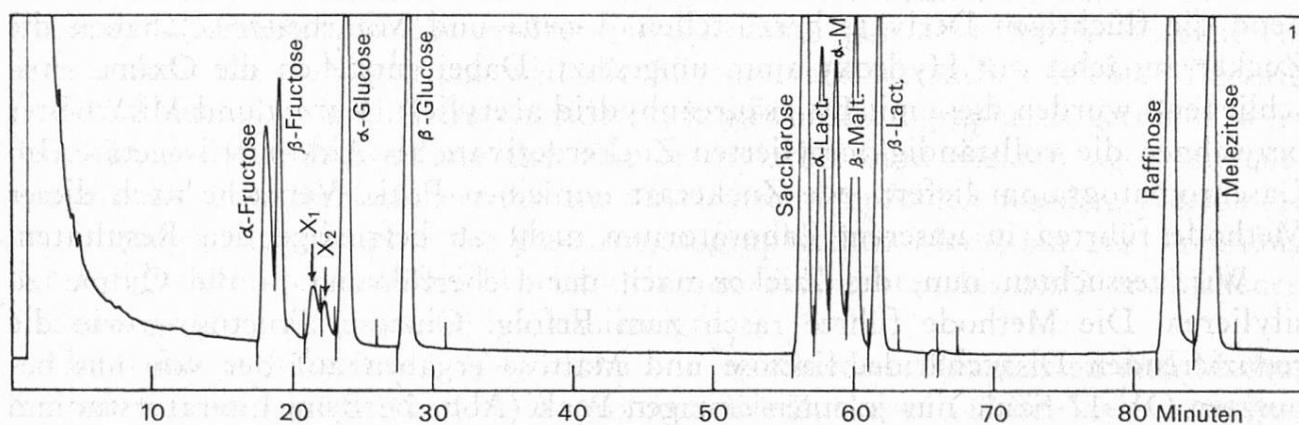


Abb. 1. GC der Zucker-silyläther einer Modellmischung. Stahlsäule $2,5\text{ m} \times \frac{1}{8}\text{''}$, 5% OV-17. Temperaturprogramm: $110^\circ\text{C} + 2^\circ/\text{Min.} \rightarrow 275^\circ\text{C}$.

Für die 7 Zuckerarten der Modellmischung erhält man im Gaschromatogramm 11 Hauptpeaks. Fructose, Glucose, Lactose und Maltose bilden je zwei Peaks der α - und β -Form. Bei Fructose entstehen außerdem noch 3 kleinere Nebenpeaks X_1 , X_2 und ein Peak X_3 , welcher unter dem Peak der α -Glucose versteckt ist. Die quantitative Auswertung derartiger Gaschromatogramme ist problematisch, weil man nie sicher ist, ob nicht unter einem der Hauptpeaks ein unbekannter Nebenpeak versteckt ist.

Abbildung 2 zeigt das GC der Zucker-oxim-silylderivate der gleichen Modellmischung. Für jede Zuckerart erscheint nur ein Peak, was die Auswertung erleichtert. Auch bei hoher Empfindlichkeit der Registrierung sind keine Andeutungen von Nebenpeaks erkennbar, wodurch genauere Resultate erzielt werden. Die Trennungen sind auch in viel kürzerer Zeit durchführbar, weil mit höheren Programmierraten gearbeitet werden kann.

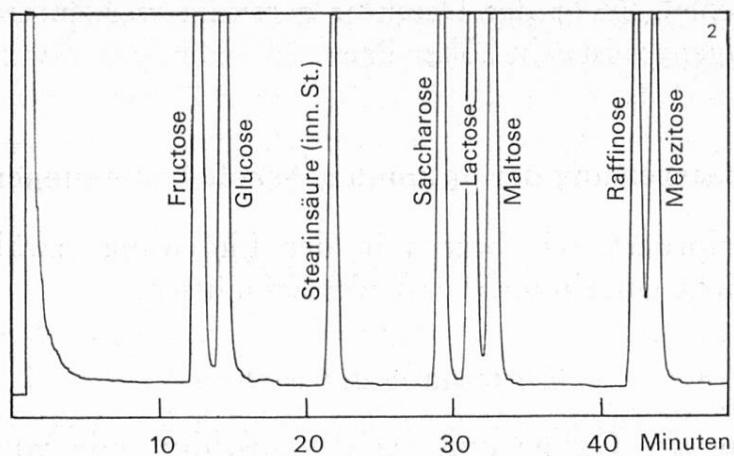
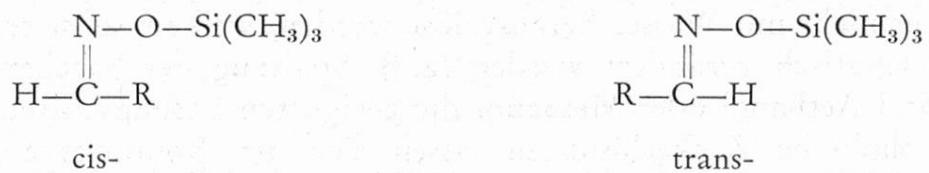


Abb. 2. GC der Zucker-oxim-silylderivate (Stearinsäure als inneren Standard)
Temperaturprogramm: 130°C + 4°/Min. → 275°C.

Bei der direkten Silylierung der Zucker entstehen aus reduzierenden Zuckern wie Glucose und Fructose die Silyläther der cyclischen Halbacetal-Formen. Die α - und β -Pyranose-Formen werden wie erwähnt auf der GC-Säule getrennt (Abb. 1).

Werden dagegen die Zuckeroxime silyliert, so erhält man Silylderivate der offenen Form. Die Oxim-silylderivate bilden zwar ebenfalls zwei isomere Formen. Dabei handelt es sich um cis-trans-Isomerie der Oxime.



Auf der von *Mason* und *Slover* (9) verwendeten SE-30-Säule werden die beiden Formen getrennt. Auf der von uns benutzten Säule (5% OV-17 von 2,5 m Länge) bildet jede Zuckerart nur einen Peak. Im entsprechenden Gaschromatogramm (siehe Abb. 2) sind die 7 Zuckerarten gut voneinander getrennt.

Neues Silylierungsreagenz

Ein Nachteil technischer Art bei der gaschromatographischen Trennung von Zucker-silylderivaten besteht in Störungen, welche die meisten Silylierungsreagenzien im Flammen-Ionisations-Detektor verursachen. Beim Verbrennen bilden sich siliziumhaltige Niederschläge, die den Detektor verschmutzen, was bei unserem Detektor nach wenigen Einspritzungen zu einem Zusammenbruch der Empfindlichkeit führte. In neuerer Zeit sind daher fluorhaltige Silylierungsreagenzien entwickelt worden, die bei der Verbrennung flüchtige Silizium-Fluorverbindungen liefern und die Verschmutzung des Detektors verhindern sollen. Wir verwendeten zur Silylierung der Zuckeroxime das N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorbutyramid (MSHFBA). Dieses fluorreiche Silylierungsreagenz hat den großen Vorteil, daß es die Verschmutzung des Detektors verhindert. Wir konnten 50—100

Einspritzungen machen, bevor der Detektor gereinigt werden mußte. Der einzige Nachteil dieses Reagenzes ist sein hoher Preis.

Ausarbeitung der optimalen Arbeitsbedingungen

Die Analyse erfordert, wie bereits in der Einleitung erwähnt, verschiedene Arbeitsschritte, welche einzeln überprüft werden müssen.

Entfernung des Wassers

Zur Herstellung der Oxime und für die anschließende Silylierung muß das Wasser möglichst vollständig aus dem Untersuchungsmaterial entfernt werden, weil bereits Spuren von Wasser stören können. Aus wässerigen Lösungen läßt sich das Wasser elegant und auf schonende Weise durch Gefriertrocknung entfernen. Die Zucker hinterbleiben in Form einer lockeren, porösen Masse, welche sich leicht und rasch auflösen läßt. Bei alkoholischen Lösungen ist die Gefriertrocknung nicht anwendbar, weil Alkoholdampf am Kondensor nicht einfriert. Alkoholische Lösungen erwiesen sich jedoch als besonders günstig, weil sie haltbar sind. In wässerigen Lösungen werden beispielsweise die Zucker-Modell-Lösungen durch Mikroorganismen in kurzer Zeit verändert, so daß man derartige Lösungen täglich frisch zubereiten müßte. Bei der Untersuchung von enzymhaltigen Lebensmitteln, wie beispielsweise Weizenkeimlingen oder Getreidemehlen, dürfen die Zucker nicht mit Wasser herausgelöst werden, weil sie sonst schon vor der Analyse enzymatisch verändert werden (z. B. Spaltung der Saccharose). In solchen Fällen sind Aethanol oder Methanol die geeigneten Lösungsmittel.

Wässrig-alkoholische Zuckerlösungen lassen sich am Rotationsverdampfer trocknen. Dabei bleibt jedoch das Zuckergemisch meist als glasige, harte Masse zurück, welche sehr langsam und unvollständig in Lösung geht und im Innern meist noch Wasser enthält. Durch Zusatz von Isopropanol zur etwas eingeengten, aber noch flüssigen Zuckerlösung lassen sich die Zucker am Rotationsverdampfer gut trocknen, es entsteht eine lockere Masse.

Einschließen der Reaktionsgemische

Die Bildung der Oxime und die anschließende Silylierung erfolgen bei erhöhter Temperatur. Damit keine Flüssigkeit verdampft und während der Reaktion keine Feuchtigkeit eindringen kann, muß in verschlossenen druckfesten Gefäßen gearbeitet werden. Einschmelzröhrchen haben sich nicht gut bewährt. Vor dem Einspritzen des silylierten Zuckergemisches müssen diese geöffnet werden, wobei Feuchtigkeit eindringen kann, was sich als schädlich erwies und zu stark streuenden Resultaten führte.

Gut bewährt haben sich Reaktionsröhrchen für die Derivatisierung der Firma Serva*. Diese sind mit einer teflonbeschichteten Butylgummimembran verschließ-

* Lieferant: Chemie Brunschwig, Basel.

bar und können mittels einer Kunststoffverschraubung druckfest verschlossen werden. Diese Verschraubung dient zugleich als Verbindungsstück zum Rotationsverdampfer. Die Reaktionsrörchen sowie die Verschraubungen sind beliebig oft verwendbar, lediglich das Gummiseptum muß ersetzt werden (siehe Abb. 13 im Abschnitt «Methodik»).

Herstellung der Oxime

Die Oxime haben wir nach *Neunhoeffer* (12) mit Hydroxylaminhydrochlorid hergestellt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer werden die wasserfreien Zucker (35 mg Zuckergemisch) im SERVA-Reaktionsrörchen in 2 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 0,06 g Natriumacetat wasserfrei und 0,05 g Hydroxylamin-hydrochlorid zugegeben, das Gefäß geschlossen und während einer Stunde bei 80°C erhitzt. Nach dem Erkalten wird zentrifugiert, das Gefäß vorsichtig geöffnet und 1 ml der überstehenden klaren Lösung in ein zweites sauberes Reaktionsgefäß pipettiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer vorsichtig abgedunstet und der wasserfreie Rückstand silyliert.

Die Oximbildung verläuft unter diesen Bedingungen quantitativ. Wäre ein Teil der Fructose oder Glucose nicht in die Oxime übergeführt worden, hätten wir später im GC nach der Silylierung störende Peaks der α - und β -Formen der Silyläther dieser Monosaccharide beobachtet, was nie der Fall war. Der Überschuß an Hydroxylamin wird beim Eindampfen der Lösung zersetzt.

Silylierung

Es sollte noch abgeklärt werden, unter welchen Bedingungen die Silylierung der Oxime durchgeführt werden muß, um gut reproduzierbare und quantitative Resultate zu erhalten.

Einfluß von Temperatur und Reaktionszeit auf die Silylierung

Eine Probe der Zuckeroxime wurde wie üblich im Reaktionsrörchen am Rotationsverdampfer eingedampft und getrocknet. Anschließend haben wir das Silylierungsreagens zugegeben, das Gefäß mit der Gummimembran verschlossen und stehengelassen. Nach verschiedenen Zeiten (1 Std. bis 22 Std.) wurden Proben mittels Injektionsspritze entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Resultate sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Die Silylierung erfolgt bereits in der Kälte ziemlich rasch und für mehrere Zuckerarten nahezu vollständig. In den Gaschromatogrammen waren keine Nebenpeaks zu beobachten. Bei längerem Stehen in der Kälte (5—21 Std.) scheinen die Glucose und Maltosegehalte noch etwas anzusteigen. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend noch während einer Stunde auf 50°C erhitzt. Die Verteilung der Zucker hatte sich dabei nicht verändert. Durch erneutes Erhitzen des Reaktionsgemisches während einer Stunde auf 80°C wurde keine signifikante Änderung der Zuckerverteilung beobachtet. Demnach erfolgt eine vollständige Silylierung bereits in der Kälte bei

Tabelle 1
Einfluß von Reaktionszeit und Temperatur bei der Silylierung
einer Zucker-Modellmischung

Berechnung der Resultate als Flächenprozent (theoret. = 14,3 %)

Spritzg.	Silylierung Temp.	Zeit	Fruc- tose %	Glucose %	Saccha- rose %	Lactose %	Maltose %	Raffi- nose %	Mele- zitose %
1	20°C	1 Std.	17,82	16,95	12,87	13,88	13,19	12,63	12,64
2	20°C	3 Std.	17,68	16,90	12,81	13,87	13,36	12,66	12,72
3	20°C	4 Std.	17,57	16,86	13,02	13,93	13,55	12,42	12,65
4	20°C	5 Std.	17,93	17,10	13,00	13,71	13,58	12,39	12,41
5	20°C	21 Std.	17,64	17,47	13,00	13,68	13,92	12,05	12,25
6	20°C	22 Std.	17,87	17,65	12,87	13,40	13,84	11,68	11,84
7	anschließend auf 50°C erhitzt (1 Std.)		17,96	17,32	12,96	13,56	13,89	12,07	12,23
8	anschließend auf 80°C erhitzt (1 Std.)		17,72	17,21	12,90	13,41	13,88	12,43	12,45
9	stehen lassen bei Zimmertemp.	1 Std.	17,95	17,49	12,80	13,66	13,75	12,07	12,28
10		2 Std.	17,60	17,19	13,02	13,81	13,95	12,10	12,30
11		4 Tage	17,70	17,41	12,75	13,54	13,75	12,27	12,57
Berechnet aus Spritzungen 5—11									
Mittelwert \bar{x}			17,78	17,39	12,90	13,58	13,85	12,09	12,27
Standardabweichung s			0,13	0,17	0,10	0,15	0,07	0,28	0,27
Streubereich ($P = 95\%$) Δx			0,32	0,42	0,25	0,37	0,17	0,69	0,66
relat. Streubereich in % $\Delta x \%$			1,8	2,4	1,9	2,7	1,2	5,7	5,4

20stündigem Stehen. Um die Reaktion zu beschleunigen, haben wir das Reaktionsgemisch jeweils während einer Stunde auf 80°C erwärmt.

Haltbarkeit des silylierten Gemisches

Bei Zutritt von Luftfeuchtigkeit sind die Silylderivate der Zucker unbeständig. Bei einer früheren Versuchsserie, bei welcher die Silylierung im Einschmelzrohr durchgeführt wurde und das Gefäß vor jeder Einspritzung geöffnet werden mußte, ergaben sich stark streuende, meist unbrauchbare Resultate. Um zu prüfen, ob das Reaktionsgemisch bei Ausschluß von Feuchtigkeit beständig ist, wurde ein Ansatz, der sich im verschlossenen Röhrchen mit Gummimembran befand, während 4 Tagen stehengelassen, erneut Proben entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Resultate stimmten mit den früheren Werten überein (siehe Tabelle 1, Versuch Nr. 11). Die Zucker-oxim-silylderivate bleiben demnach im luftdicht verschlossenen Gefäß bei Ausschluß von Feuchtigkeit während mindestens 4 Tagen unverändert.

Wahl des inneren Standards zur Berechnung von Korrekturfaktoren

In der Tabelle 1 wurde die Verteilung der Zucker in Flächenprozenten ohne Berücksichtigung von Korrekturfaktoren berechnet. Auf diese Weise erhält man für Fructose und Glucose zu hohe Werte (im Mittel 17,8 und 17,4%), welche signifikant über dem theoretischen Wert 14,3 liegen. Für die Disaccharide und die Trisaccharide ergeben sich etwas zu niedrige Werte. Diese systematischen Fehler lassen sich durch sogenannte Korrekturfaktoren ausgleichen.

Zur genauen Bestimmung der einzelnen Zuckerarten wird dem zu analysierenden Gemisch eine genau bekannte Menge eines inneren Standards zugesetzt. Aus dem Gaschromatogramm einer Modellmischung mit bekannten Mengen von Zuckern und innerem Standard werden die sogenannten Korrekturfaktoren berechnet.

Als inneren Standard haben wir zunächst Stearinsäuremethylester verwendet. Dieser Peak erscheint im Gaschromatogramm zwischen den Mono- und Disacchariden, was besonders günstig wäre, weil in diesem Bereich keine Peaks von Zuckern zu erwarten sind (siehe Abb. 3). Die Faktoren waren jedoch schlecht reproduzierbar. Anscheinend verläuft die Umsetzung des Stearinsäuremethylesters

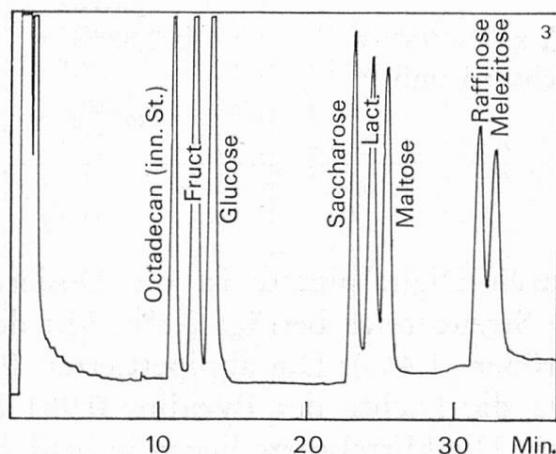


Abb. 3. GC der Zucker-oxim-silylderivate (Octadecan als innerer Standard)
Temperaturprogramm: 130°C + 6°/Min. → 275°C.

mit dem Silylierungsreagens nicht immer genau gleich. Auch Stearinsäure hat sich als innerer Standard nicht gut bewährt (siehe Tabelle 4). Schließlich wurde Octadecan als innerer Standard gewählt. Der Peak des Octadecans erscheint vor dem der Fructose (siehe Abb. 3). Für genaue quantitative Untersuchungen sollte im Gaschromatogramm der Peak des inneren Standards nicht allzuweit von den Peaks der zu bestimmenden Verbindungen liegen. Der Peak des Octadecans liegt vor dem der Fructose, ist somit recht weit von den Peaks der Di- und Trisaccharide entfernt. Höhere Kohlenwasserstoffe, welche im Gaschromatogramm später erscheinen würden, eignen sich nicht als innere Standards, weil sie in Pyridin schlecht löslich sind.

Dosierung des inneren Standards

Zu einem aliquoten Teil der abgewogenen Substanz oder des Zuckergemisches muß eine genau bekannte Menge von innerem Standard zugesetzt werden. Wir benutzten eine 1%ige Lösung von Stearinsäure oder Octadecan in Pyridin. Zu jedem Versuch wurden 0,3 ml Standardlösung zupipettiert. Um die Fehler beim Pipettieren zu ermitteln, haben wir 6mal hintereinander je 0,3 ml Pyridin in ein Kölbchen abpipettiert und gewogen. Als Pipette benutzten wir einmal eine einstellbare Digitalmikroliter-Pipette (0—1 ml) mit Kunststoffspitze, das andere Mal eine 1 ml Stabpipette aus Glas. Die Wägungen ergaben die in der Tabelle 2 aufgeführten Werte.

Tabelle 2. Reproduzierbarkeit der Dosierung des inneren Standards

	Einstellbare Pipette mit Kunststoffspitze	Stabpipette aus Glas
höchster Wert g	0,29915	0,30450
niedrigster Wert g	0,29660	0,30025
Mittelwert \bar{x} g	0,29831	0,30200
Standardabweichung	0,00102	0,00170
relativer Streubereich Δx ($P=95\%$)	$\pm 0,88\%$	$\pm 1,45\%$
Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Wert	0,8 %	1,4 %

Mittels der einstellbaren Digitalpipette ist die Dosierung des inneren Standards genau, der relative Streubereich beträgt 0,8%. Mit der Stabpipette aus Glas ist die Streuung etwas größer (1,4%). Die abpipettierten Pyridinmengen stimmen übrigens nicht genau. Da die Dichte des Pyridins 0,981 beträgt, sollten 0,3 ml theoretisch 0,294 g wiegen. Die Mittelwerte liegen in beiden Fällen höher (1,5 und 2,6% relativ), was auf systematische Pipettierfehler zurückzuführen ist. Die Pipetten sind für Wasser geeicht, Pyridin fließt anscheinend anders aus. Für sehr genaue Analysen könnte man das Gewicht der zur Probe einpipettierten Standardlösung auf der Analysenwaage bestimmen und hieraus die genaue Menge an innerem Standard berechnen. Auf diese Weise ließen sich die Pipettierfehler eliminieren.

Ueberprüfung der Methode

Um die Zuverlässigkeit der Methode zu prüfen, haben wir eine Zuckermodellmischung hergestellt, welche gleiche Teile von Fructose, Glucose, Saccharose, Lactose, Maltose, Raffinose und Melezitose enthielt und diese an verschiedenen Tagen nach der am Schluß dieser Arbeit angegebenen Methode analysiert. Sämtliche Operationen, wie Eindampfen der Zuckerlösung, Herstellen der

Oxime, Zusatz von innerem Standard und die Silylierung, wurden unabhängig voneinander wiederholt. Alle Reaktionslösungen wurden mehrfach in den Gaschromatographen eingespritzt und die Resultate tabelliert.

Wiederholbarkeit der Gaschromatogramme beim Einspritzen der gleichen Lösung

Von jeder silylierten Lösung wurden am gleichen Tag 6—7 Proben hintereinander in den Gaschromatographen eingespritzt. Zur Kontrolle, ob sich die Empfindlichkeit des Detektors nicht verändert hat, haben wir am folgenden Morgen von der gleichen Lösung nochmals zwei Gaschromatogramme aufgenommen. Die Re-

*Tabelle 3. Wiederholbarkeit beim Einspritzen der gleichen Lösung
Verteilung berechnet in Flächenprozenten*

Versuch-Nr.	Datum	Fructose	Glucose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose	Melzitose
1	10. 9. 1974	17,18	17,24	13,35	13,69	14,01	12,38	12,15
2	10. 9. 1974	17,18	17,15	13,32	13,65	14,00	12,49	12,20
3	10. 9. 1974	17,31	17,31	13,42	13,61	13,98	12,25	12,12
4	10. 9. 1974	17,18	17,21	13,26	13,67	13,98	12,45	12,25
5	10. 9. 1974	17,07	17,05	13,30	13,67	14,06	12,52	12,32
6	10. 9. 1974	17,32	17,27	13,35	13,64	14,03	12,30	12,09
7	10. 9. 1974	17,17	17,21	13,30	13,60	14,00	12,46	12,27
8	11. 9. 1974	17,19	17,25	13,22	13,53	13,88	12,58	12,33
9	11. 9. 1974	17,10	17,10	13,33	13,62	14,02	12,59	12,23
Mittelwert \bar{x}		17,18	17,19	13,31	13,63	13,99	12,44	12,21
Standardabweich. s		0,05	0,07	0,05	0,04	0,05	0,09	0,06
Streubereich ($P = 95\%$)		0,12	0,16	0,12	0,09	0,12	0,21	0,14
relat. Streubereich $\%$		0,70	0,93	0,90	0,66	0,86	1,69	1,15

sultate eines derartigen Versuches sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Die Zucker wurden als Flächenprozente berechnet. Man erkennt, daß die Werte sehr gut reproduzierbar sind. Auch am nächsten Tag fanden wir Resultate, die sich innerhalb der normalen Versuchsstreuung bewegten. Die Empfindlichkeit des Detektors hat sich nicht verändert und die silylierte Lösung ist haltbar. Die Reproduzierbarkeit der Werte bei wiederholten Einspritzungen ist sehr gut. Der relative Streubereich für eine statistische Sicherheit $P = 95\%$, bewegt sich zwischen 0,7 und 1,7%.

Reproduzierbarkeit der Silylierung

In Tabelle 4 sind die Resultate aus 4 analogen Versuchsserien wiedergegeben, die zwischen dem 9. und 13. September 1974 durchgeführt wurden. Die beiden letzten Analysen jeder Serie stammen aus Gaschromatogrammen, welche jeweils erst am 3. Tag nach der Silylierung aufgenommen worden sind. Die Zucker wurden wiederum in Flächenprozenten berechnet. Aus den 9 oder 10 Gaschromatogrammen einer Serie wurden jeweils die Mittelwerte, die Standardabweichung und hieraus der relative Streubereich ($P = 95\%$) berechnet. Der relative Wiederholstreubereich bewegt sich zwischen 0,7 und 2,2%. Auch die Mittelwerte der an 4 verschiedenen Tagen durchgeführten Serien stimmen gut überein. Der höchste und der niedrigste Mittelwert aus den 4 Serien unterscheiden sich nur um 0,2—1,6%. Die Silylierung des Zuckergemisches und die gaschromatographische Trennung sind gut reproduzierbar. Bei den Lactosewerten ist ein in Klammern gesetzter Wert nach dem Q-Test als Ausreißer zu betrachten.

In einer ähnlichen Versuchsreihe der Tabelle 5 ergaben sich für die als Flächenprozent berechneten Zucker ähnliche Resultate. Da bei Ansätzen an verschiedenen Tagen übereinstimmende Werte erhalten wurden, ist bewiesen, daß auch die chemischen Reaktionen wie Oximbildung und die Silylierung der Zucker gut reproduzierbar sind.

Reproduzierbarkeit der Korrekturfaktoren

Die aus der Verteilung in Flächenprozenten berechneten Zuckergehalte stimmen, wie erwähnt, nicht genau mit den theoretischen Werten überein. (Theoretischer Wert für jede Zuckerart 14,3%). Anscheinend ist die Ansprechempfindlichkeit des Detektors für jede Zuckerart unterschiedlich. Für genaue Zuckerbestimmungen müssen diese systematischen Fehler mit Hilfe eines inneren Standards und sogenannten Korrekturfaktoren eliminiert werden.

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren haben wir in einer Versuchsserie (Tabelle 4) aliquote Teile unserer Modellmischung zunächst eingedampft und die Zucker in ihre Oxime übergeführt. Ein aliquoter Teil wurde zur Trockne verdampft und eine bekannte Menge Stearinsäure, gelöst in Pyridin als inneren Standard, zugesetzt. Anschließend wurde silyliert und das Gemisch in den Gaschromatographen eingespritzt. Bei der Berechnung der Korrekturfaktoren ergaben sich unerwartet große Streuungen. Die aus verschiedenen Silylierungsversuchen berechneten Mittelwerte stimmten schlecht überein (siehe Tabelle 4). Der höchste und der niedrigste Faktor unterschieden sich um 12—14%, was für quantitative Bestimmungen völlig ungenügend ist. Anscheinend verläuft die Umsetzung der Stearinsäure wie übrigens auch des Stearinsäuremethylesters mit dem Silylierungsreagens nicht reproduzierbar. Schließlich wurde Octadecan als innerer Standard verwendet (vgl. Tabelle 5). Dieser reaktionsträge aliphatische Kohlenwasserstoff wird bei der Silylierung chemisch nicht verändert. Der Peak des Octadecans erscheint im GC unmittelbar vor dem Peak des Fructose-oxim-silyläthers. Wie aus den Resultaten in Tabelle 5 hervorgeht, sind die Faktoren gut

Tabelle 4. Reproduzierbarkeit der Silylierung an verschiedenen Tagen
Stearinsäure als innerer Standard

Zuckerart	Anzahl Einspritzungen N	Zucker ber. aus Verteilung			Korrekturfaktoren		
		Mittelwert \bar{x}	relat. Streubereich (P=95%)	Diff. relat.* %	Mittelwert \bar{x}	rel. Streubereich (P=95%)	Diff. relat.* %
<i>Fructose</i>							
1. Analyse	10	17,32	1,2		0,576	1,6	
2. Analyse	9	17,18	0,7		0,569	0,9	
3. Analyse	9	17,31	1,6	0,7	0,613	1,1	12,8
4. Analyse	10	17,24	1,2		0,534	0,9	
<i>Glucose</i>							
1. Analyse	10	17,36	1,6		0,575	2,1	
2. Analyse	9	17,19	0,9		0,569	1,2	
3. Analyse	9	17,19	1,5	1,0	0,617	0,8	13,4
4. Analyse	10	17,23	1,2		0,534	0,9	
<i>Saccharose</i>							
1. Analyse	10	13,41	0,9		0,745	1,2	
2. Analyse	9	13,31	0,9		0,735	0,7	
3. Analyse	9	13,34	0,7	1,6	0,797	0,9	12,4
4. Analyse	10	13,20	0,4		0,698	1,3	
<i>Lactose</i>							
1. Analyse	10	(13,18)	1,4		0,758	1,8	
2. Analyse	9	13,63	0,7		0,718	1,3	
3. Analyse	9	13,61	1,2	0,9	0,780	1,8	14,1
4. Analyse	10	13,73	0,8		0,670	1,0	
<i>Maltose</i>							
1. Analyse	10	14,03	1,0		0,712	1,3	
2. Analyse	9	13,99	0,9		0,700	1,3	
3. Analyse	9	13,89	1,2	1,0	0,767	3,0	13,6
4. Analyse	10	13,91	1,0		0,663	1,4	
<i>Raffinose</i>							
1. Analyse	10	12,47	2,2		0,801	4,0	
2. Analyse	9	12,44	1,7		0,787	2,9	
3. Analyse	9	12,40	1,3	0,6	0,857	2,1	13,7
4. Analyse	10	12,47	1,1		0,740	1,9	
<i>Melezitose</i>							
1. Analyse	10	12,19	1,2		0,820	3,0	
2. Analyse	9	12,21	1,2		0,801	2,0	
3. Analyse	9	12,21	1,7	0,2	0,869	3,7	13,3
4. Analyse	10	12,20	1,2		0,754	1,9	

* Diff. relat. % = Unterschied zwischen höchstem und niedrigstem Mittelwert in %.

Tabelle 5.
Reproduzierbarkeit der Korrekturfaktoren mit Octadecan als innerem Standard

Zuckerart	Anzahl Einspritzungen N	Zucker ber. aus Verteilung			Korrekturfaktoren		
		Mittel- wert \bar{x}	relat. Streu- bereich (P=95%)	Diff. relat.* %	Mittel- wert \bar{x}	rel. Streu- bereich (P=95%)	Diff. relat.* %
<i>Fructose</i>							
1. Analyse	4	17,1	1,1		0,585	2,2	
2. Analyse	5	17,0	1,5	0,6	0,578	1,0	1,2
3. Analyse	4	17,0	1,3		0,582	1,0	
<i>Glucose</i>							
1. Analyse	4	17,3	1,3		0,578	1,0	
2. Analyse	5	17,4	1,1	1,1	0,564	1,1	2,4
3. Analyse	4	17,5	1,4		0,565	1,1	
<i>Saccharose</i>							
1. Analyse	4	13,5	0,5		0,743	1,4	
2. Analyse	5	13,3	1,4	1,5	0,735	2,6	1,1
3. Analyse	4	13,3	1,2		0,742	2,2	
<i>Lactose</i>							
1. Analyse	4	14,0	1,1		0,716	1,8	
2. Analyse	5	13,8	1,0	1,5	0,715	4,6	1,8
3. Analyse	4	14,0	1,1		0,703	2,3	
<i>Maltose</i>							
1. Analyse	4	13,2	1,7		0,755	2,1	
2. Analyse	5	13,6	2,9	2,5	0,722	3,5	4,4
3. Analyse	4	13,4	2,6		0,737	4,7	
<i>Raffinose</i>							
1. Analyse	4	12,4	1,5		0,809	2,4	
2. Analyse	5	12,5	2,6	2,4	0,785	4,2	3,0
3. Analyse	4	12,2	3,1		0,808	4,7	
<i>Melezitose</i>							
1. Analyse	4	12,5	2,8		0,801	2,5	
2. Analyse	5	12,4	3,1	0,8	0,791	3,2	1,3
3. Analyse	4	12,5	3,0		0,792	5,2	

* Diff. relat. % = Unterschied zwischen höchstem und niedrigstem Mittelwert in %.

reproduzierbar. Bei 3 an verschiedenen Tagen durchgeföhrten Silylierungsversuchen unterschieden sich die Faktoren für Fructose, Glucose, Saccharose und Melezitose um 1—2%. Diejenigen für Maltose und Raffinose um 3—4%. Werden die Faktoren am gleichen Tag ermittelt, an dem die Zuckerbestimmungen durchgeföhr werden, dürfen sich zuverlässige Werte ergeben.

Verhalten von anderen Zuckerarten, Zuckeralkoholen und organischen Säuren

Alle bisherigen Versuche wurden mit Modellmischungen, bestehend aus Fructose, Glucose, Saccharose, Lactose, Maltose, Raffinose und Melezitose durchgeführt. Diese 7 in Lebensmitteln mehr oder weniger häufig vorkommenden Zuckerkarten werden nach unserer Methode auf einer OV-17-Säule gut getrennt.

In Lebensmitteln können gelegentlich noch andere Zuckerarten sowie Zuckerkalkohole vorkommen. Meistens sind auch verschiedene organische Säuren vorhanden, welche die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme stören können. Es sollte noch geprüft werden, wie sich diese Stoffe verhalten und an welcher Stelle im Gaschromatogramm die betreffenden Peaks erscheinen. Zu diesem Zweck haben wir in analoger Weise Gaschromatogramme der Silylderivate verschiedener Verbindungen aufgenommen.

Weitere Zuckerarten

In Abbildung 4 ist das Gaschromatogramm der Oxim-silylderivate von 17 verschiedenen Zuckerarten wiedergegeben. Jede Zuckerart wurde zunächst einzeln mit Hydroxylamin behandelt, dann silyliert und gaschromatographisch untersucht, um ihre Retentionszeit zu bestimmen. Anschließend wurden Zuckermischungen getrennt. Aus Abbildung 4 geht hervor, daß mehrere Zucker nicht getrennt werden. Sie bilden im Gaschromatogramm einen, meist etwas verbreiteten

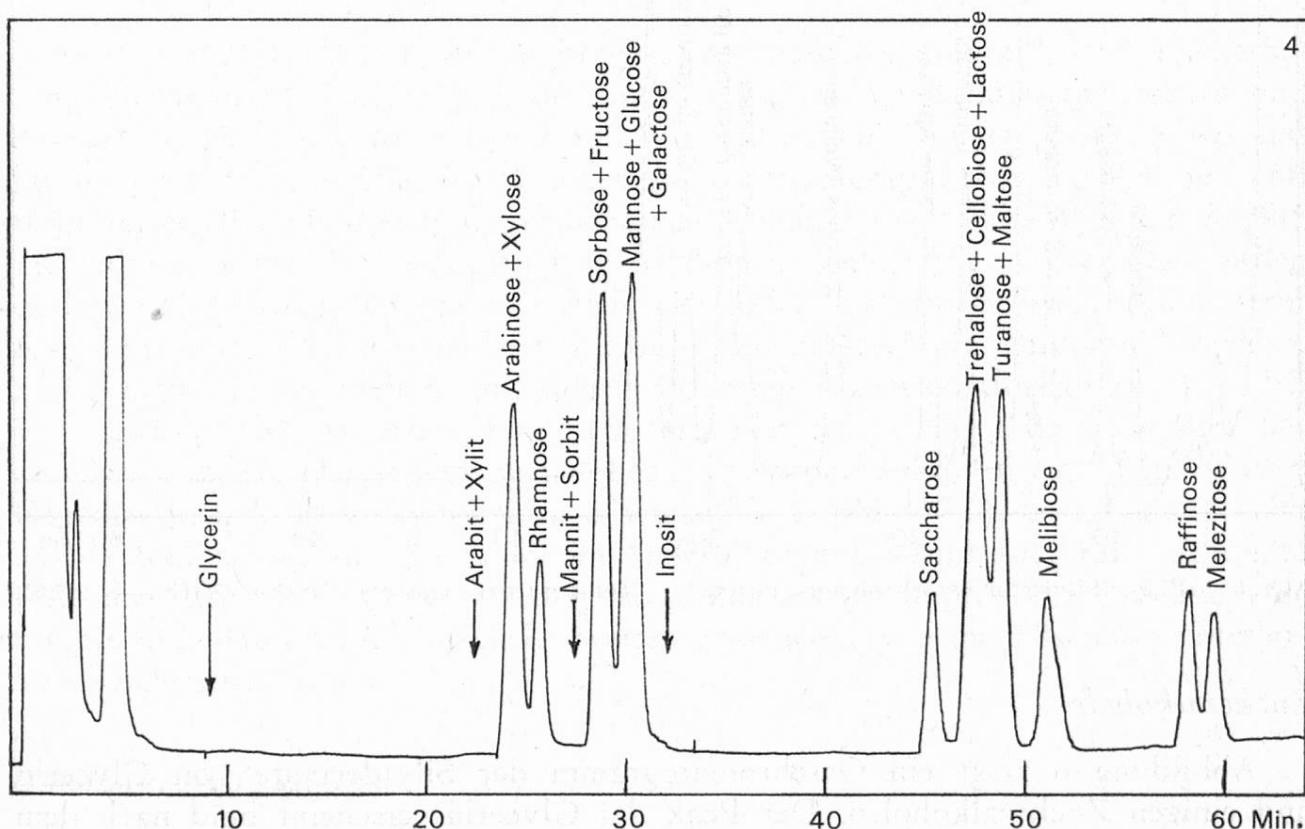


Abb. 4. GC der Zucker-oxim-silylderivate von 17 verschiedenen Zuckerarten. Temperaturprogramm: 80°C + 4°/Min. → 275°C.

terten Peak, wie etwa Arabinose + Xylose oder Mannose + Galactose + Glucose. Die Stellen, an welchen die Peaks der Silylderivate von Glycerin und der Zuckerkalkohole erscheinen würden, sind in Abbildung 4 mit Pfeilen markiert.

Organische Säuren

Organische Säuren lassen sich mit MSHFBA ohne vorherige Behandlung mit Hydroxylamin elegant silylieren und anschließend gaschromatographisch trennen (siehe Abb. 5). Diese in der Natur weit verbreiteten Säuren könnten die Auswertung der Gaschromatogramme der Zucker ganz erheblich stören. Bei der Behandlung mit Hydroxylamin werden organische Säuren zum Teil entfernt, zum Teil umgewandelt und geben nach der Silylierung störende, nicht identifizierte Peaks. Säuren müssen vor der Zuckerbestimmung auf jeden Fall durch eine Behandlung mit Ionenaustauschern entfernt werden. Vom Ionenaustauscher können sie anschließend eluiert werden. Nach dem Silylieren lassen sich die Säuren in einem gesonderten Gaschromatogramm trennen und identifizieren.

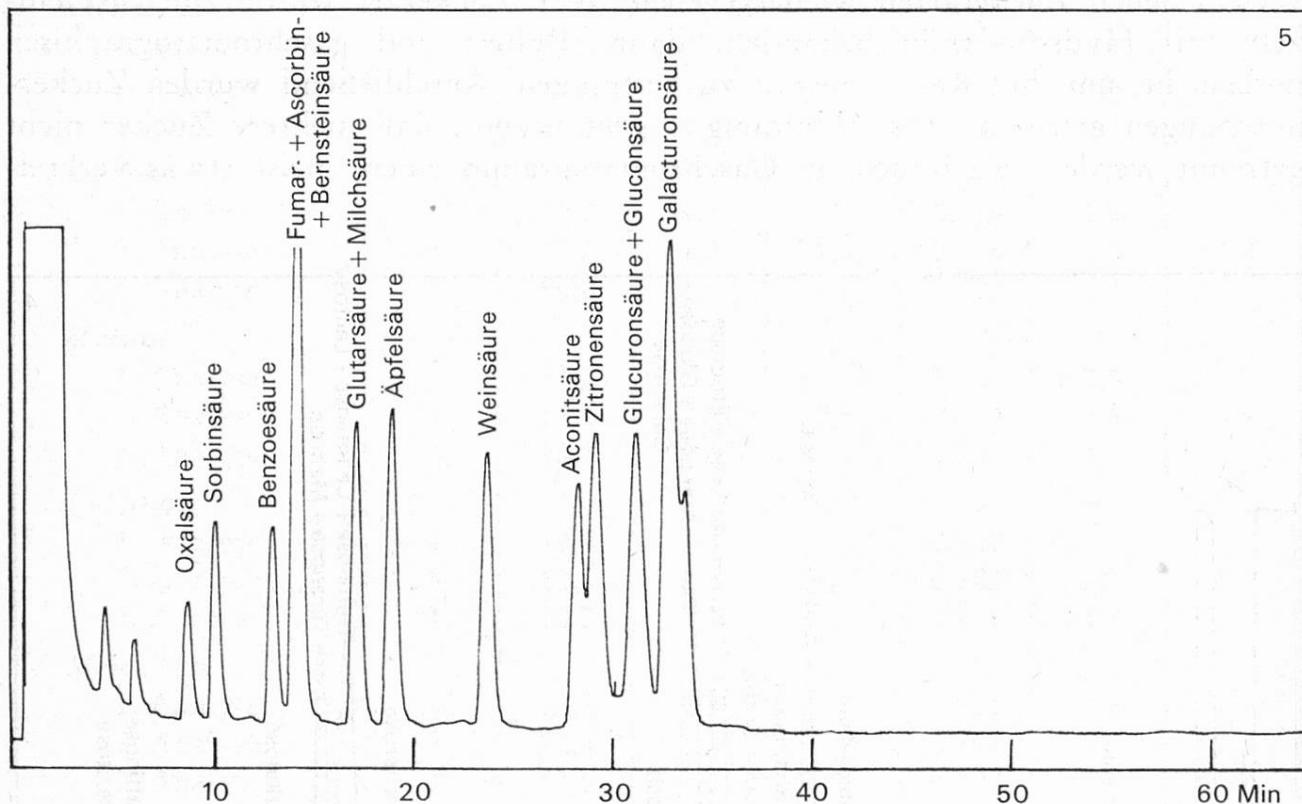


Abb. 5. GC der Silylester verschiedener Säuren.

Temperaturprogramm: 80°C + 4°/Min. → 275°C.

Zuckeralkohole

Abbildung 6 zeigt ein Gaschromatogramm der Silylderivate von Glycerin und einigen Zuckeralkoholen. Der Peak des Glycerins erscheint bald nach dem Lösungsmittel, die Peaks der Zuckeralkohole in der Region der Monosaccharide. Auf der OV-17-Säule nicht getrennt sind Arabin + Xylit, ferner Mannit + Sor-

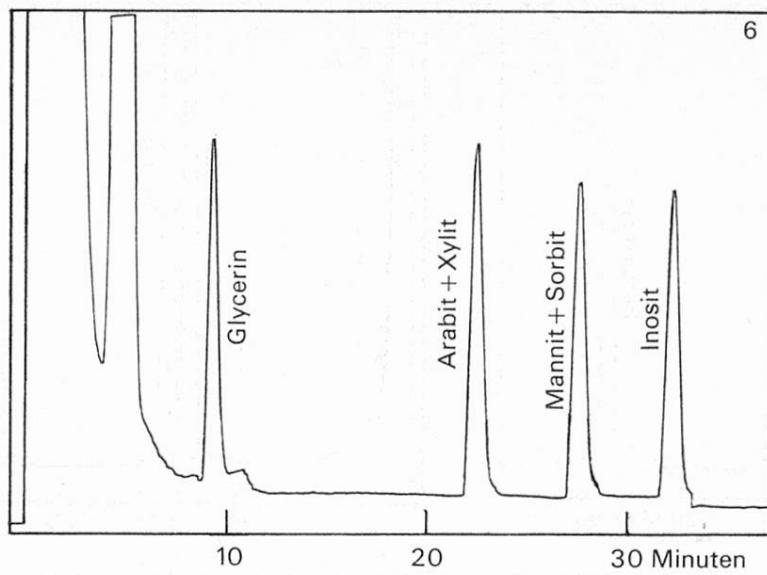


Abb. 6. GC der Silyläther von Glycerin und Zuckeralkoholen.
Temperaturprogramm: $80^{\circ}\text{C} + 4^{\circ}/\text{Min.} \rightarrow 275^{\circ}\text{C}$.

bit. Die Zuckeralkohole stören in der Regel die Auswertung der Peaks der Mono- und Disaccharide nicht.

Anwendungen auf Lebensmittel

Müller und *Göke* (14) haben bereits über gaschromatographische Zuckerbestimmungen in verschiedenen Lebensmitteln wie Honig, Kindernährzuckern und Präparaten für Diabetiker berichtet. Wir haben vor einiger Zeit (15, 16) das Zuckerspektrum von über 50 Honigen gaschromatographisch aufgenommen und ausgewertet. Bei all diesen Untersuchungen erfolgte die Silylierung der Zucker nach älteren, zum Teil mangelhaften Methoden. Zahlreiche Zuckerarten bilden in diesen Gaschromatogrammen jeweils zwei oder noch mehr Peaks. Mit unserer neuen Methode, bei welcher die Zucker-oxim-silylderivate hergestellt werden, erhält man viel einfachere, meistens eindeutige Gaschromatogramme, die sich leicht quantitativ auswerten lassen. Im folgenden sollen einige Beispiele kurz besprochen werden. Die abgewogene Lebensmittelprobe wurde in ca. 25 ml Wasser aufgenommen, wenn nötig mit Lauge neutralisiert ($\text{pH} = 7,0$), anschließend nach *Carrez* geklärt und mit Methanol im Meßkolben auf 50 ml aufgefüllt. Aliquote Teile der filtrierten Lösung wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne verdampft und dann nach Vorschrift weiter verarbeitet wie im Abschnitt «Methodik» beschrieben.

Haselnußkerne (Abb. 7)

Im wässrigen geklärten Auszug von Haselnußkernen findet sich vorwiegend Saccharose neben Spuren von Fructose und Glucose.

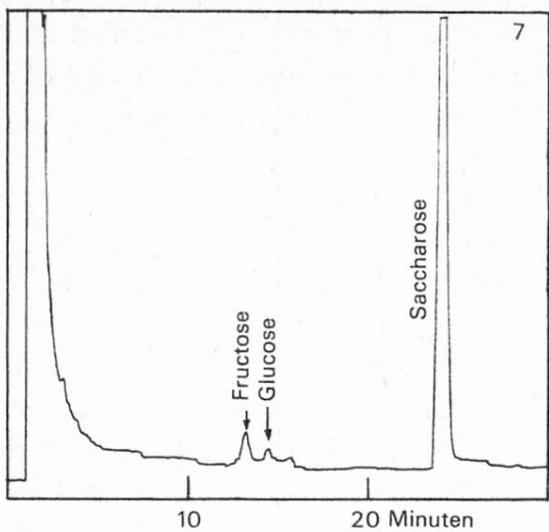


Abb. 7. GC der Zucker aus Haselnusskernen.
Temperaturprogramm: $130^{\circ}\text{C} + 6^{\circ}/\text{Min.} \rightarrow 275^{\circ}\text{C}$.

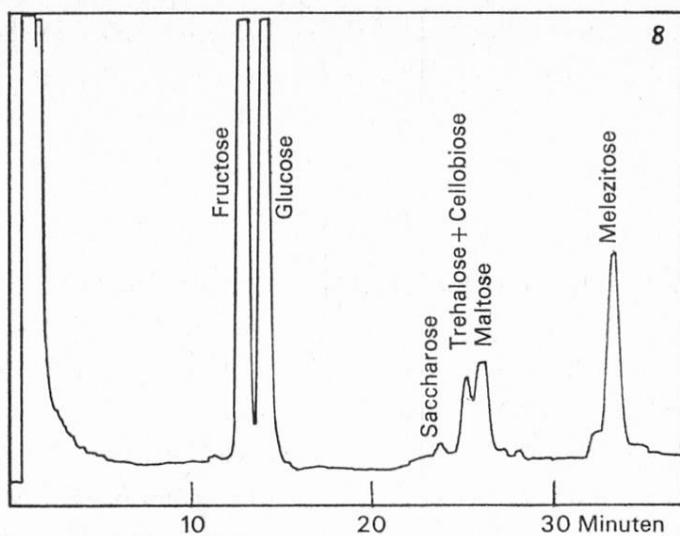


Abb. 8. Zuckerspektrum eines Waldhonigs.
Temperaturprogramm: $130^{\circ}\text{C} + 6^{\circ}/\text{Min.} \rightarrow 275^{\circ}\text{C}$.

Waldhonig (Abb. 8)

Im GC eines Waldhonigs (Honigtauhonig) fanden wir neben den für Honig charakteristischen Hauptzuckerarten Fructose und Glucose eine Spur Saccharose, ferner die Disaccharide Trehalose und Maltose sowie einen starken Peak des Trisaccharids Melezitose. Daneben erkennt man im GC noch einige sehr schwache Peaks, die von Spuren anderer Di- und Trisaccharide herrühren.

Schokolade für Diabetiker (Abb. 9)

Diese Schokolade enthält laut Deklaration auf der Etikette Kakaomasse, Kakaobutter, d-Sorbit, Vollmilchpulver, Haselnussmasse, Vanillin, Lecithin und Saccharin. Im GC erkennen wir den stark ausgeprägten Peak des Sorbits (34%), einen deutlichen Lactose-Peak, vom Milchpulver stammend, und einen schwachen Peak der Saccharose. Letztere dürfte von der Haselnussmasse herrühren. Vor der Saccharose befindet sich ein nicht identifizierter schwacher Peak.

Frühstücksgetränk (Abb. 10)

Pulverförmige oder körnige Trockenpräparate zur Herstellung von Frühstücksgetränken sind meistens ziemlich kompliziert zusammengesetzt. Das von uns untersuchte Präparat enthielt laut Deklaration: Glykose, Malzextrakt, Rohrzucker, Kakao, enträhmte Milch und Mineralsalze.

Im GC finden wir alle zu erwartenden Zuckerarten. Mengenmäßig überwiegt die Saccharose. Unter den Monosacchariden finden wir wenig Fructose (aus dem Malzextrakt), ziemlich viel Glucose (aus Glucose und Malzextrakt stammend). Bei den Disacchariden finden sich wie zu erwarten Lactose (aus Magermilch) und Maltose (aus Malzextrakt). Vor der Saccharose befindet sich ein gut ausgebildeter nicht identifizierter Peak.

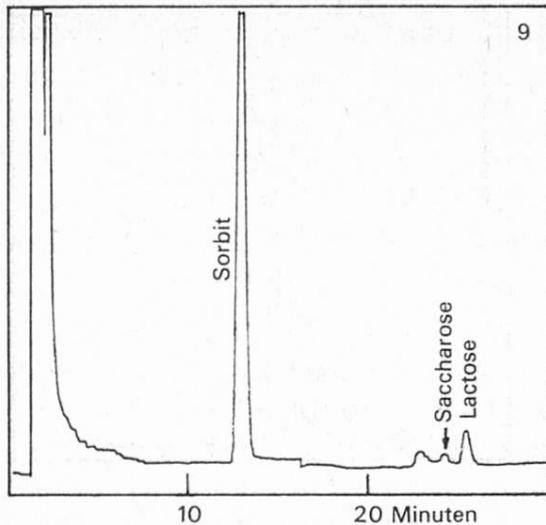


Abb. 9. Diabetiker-Schokolade

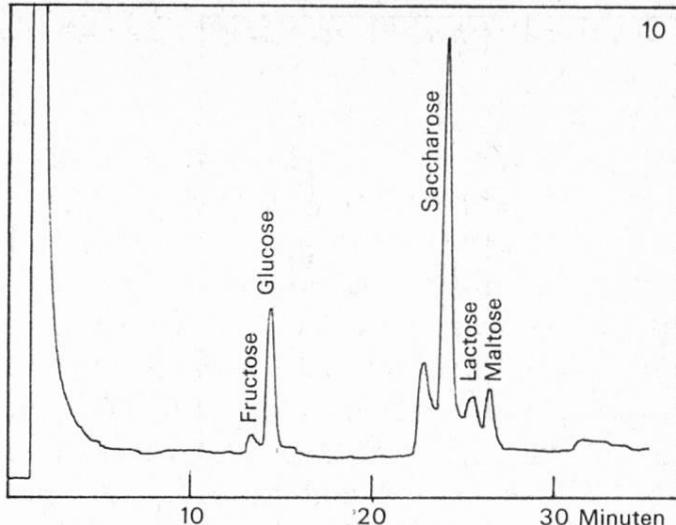


Abb. 10. Frühstücksgetränk

Orangenkonzentrat

Wie bereits früher erwähnt, können Fruchtsäuren und andere saure Verbindungen wie Gluconsäure, Glucuronsäure die Zuckerbestimmung ganz erheblich stören, wenn die sauren Verbindungen im Verhältnis zum Zucker in beträchtlichen Mengen vorkommen. Dies ist im Orangenkonzentrat der Fall.

Die Abbildung 11a zeigt das GC der Oxim-silylverbindungen eines Orangenkonzentrates ohne vorherige Entfernung der Säuren. Neben den 3 Zucker-Peaks (Fructose, Glucose und Saccharose) sind mehrere störende Nebenpeaks erkennbar. Ob unter einem Zucker-Peak ein Peak einer Säure versteckt ist, kann nicht erkannt werden. Abbildung 11b zeigt das entsprechende GC der reinen Zucker. Zunächst wurde das Orangenkonzentrat zur vollständigen Entfernung der Säuren mit Ionenaustauschern (Lewatit) behandelt. Erst anschließend wurden die Zucker-oxim-silyläther hergestellt und gaschromatographisch getrennt. Im GC erscheinen nur die 3 Peaks der Fructose, Glucose und der Saccharose.

Abbildung 11c zeigt das GC der vom Ionenaustauscher eluierten Säuren, welche in ihre Silylester übergeführt wurden. Das Orangenkonzentrat enthielt hauptsächlich Apfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure. Der Peak der Zitronensäure zeigt die gleiche Retentionszeit wie die Fructose. Ohne vorherige Entfernung der Säuren würde man einen unrichtigen, zu hohen Wert für die Fructose finden.

Teilweise vergorener Traubenmost

Im GC der Oxim-silylderivate des Traubenmostes (ohne Entfernen der Säuren) erscheinen neben den Peaks der Fructose und Glucose mehrere Peaks von Säuren und anderen Verunreinigungen. Die Fructose- und Glucose-Peaks erscheinen etwas verbreitert, was darauf hindeutet, daß unter den Zucker-Peaks noch andere Peaks versteckt sind (siehe Abb. 12a). Bei der Oximbildung gehen verschiedene organische Säuren verloren oder sie werden chemisch ver-

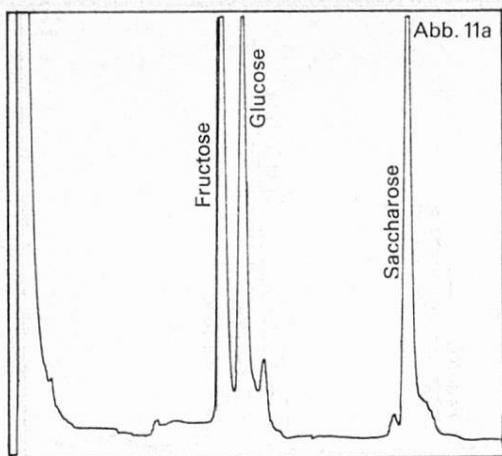


Abb. 11a

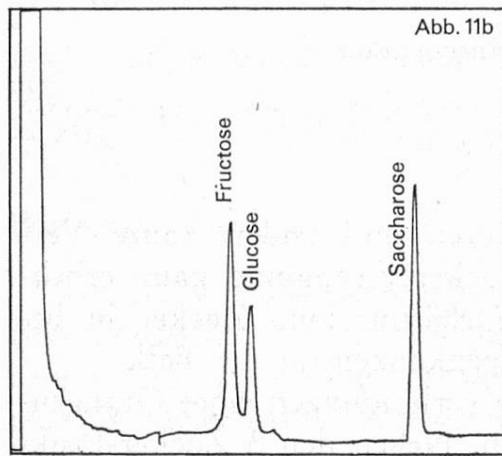


Abb. 11b

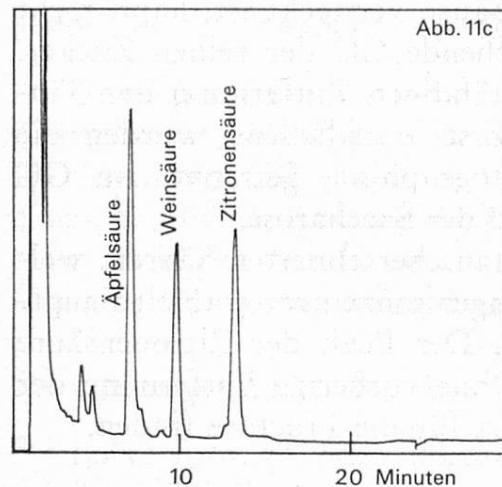


Abb. 11c

Abb. 11. Gaschromatogramme von Orangenkonzentrat

- 11a Gesamter wasserlöslicher Anteil mit Hydroxylamin und MSHFBA behandelt.
- 11b Oxim-silylderivate der Neutralstoffe (wasserlöslicher Anteil nach Behandlung mit Kationen- und Anionenaustauscher).
- 11c Vom Anionenaustauscher eluierte Säuren als Silylester.

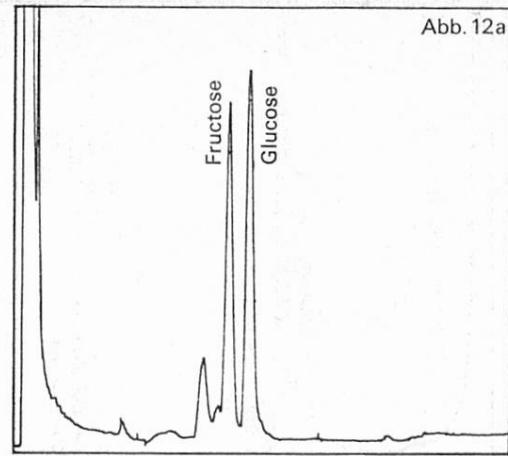


Abb. 12a

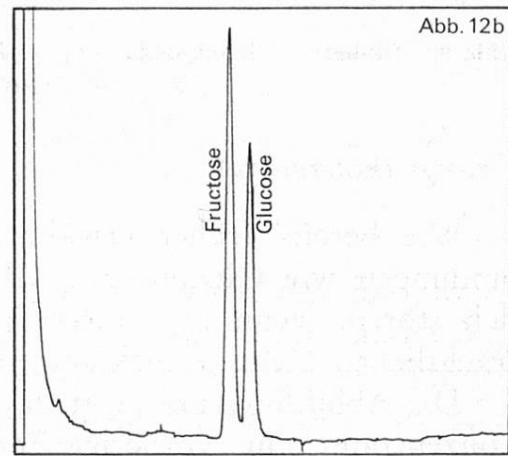


Abb. 12b

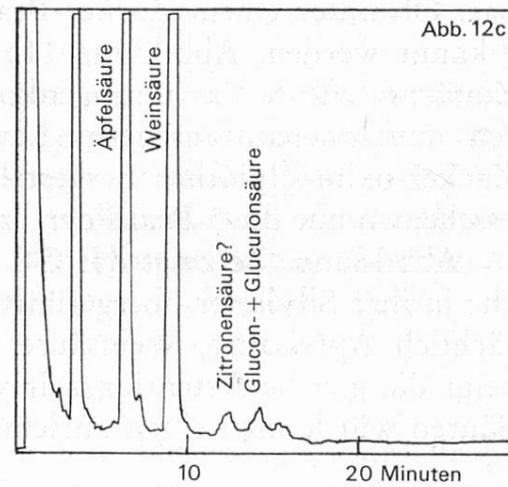


Abb. 12c

Abb. 12. Gaschromatogramme von Traubenmost

- 12a Mit Carrez geklärter Most mit Hydroxylamin und MSHFBA behandelt.
- 12b Oxim-silylderivate der Neutralstoffe (nach Behandlung des geklärten Mostes mit Kationen und Anionenaustauscher).
- 12c Vom Anionenaustauscher eluierte Säuren als Silylester.

ändert. Aus diesem Grund lassen sich die verschiedenen Nebenpeaks im GC nicht einwandfrei identifizieren.

Nach der vollständigen Entfernung der Säuren mittels Ionenaustauschern erscheinen im GC (Abb. 12b) nur noch 2 saubere Peaks von Fructose und Glucose. In Abbildung 12a war der Fructosepeak höher als derjenige der Glucose. Nach dem Entfernen der Säuren ist das Verhältnis umgekehrt, womit bewiesen ist, daß in Abbildung 12a unter dem Peak der Fructose ein anderer Peak versteckt war (vermutlich Zitronensäure). Unter dem Peak der Fructose könnten auch die Zuckeralkohole Mannit und Sorbit versteckt sein, da sich die Silylderivate dieser 3 Verbindungen auf unserer Säule nicht trennen lassen. In Traubenmost ist weder Mannit noch Sorbit zu erwarten. In Obstsaften dagegen kommt Sorbit regelmäßig vor. Zur Bestimmung desselben müßten in einem Teil des Saftes die Zucker mit Hefe vergoren werden. Im vergorenen Saft wäre der Sorbit als Silyläther nachweisbar.

Abbildung 12c zeigt das GC der Silylderivate der vom Ionenaustauscher eluierten Säuren des Traubenmostes. Sicher identifiziert wurden die großen Peaks der Apfelsäure und Weinsäure. Bei 2 kleineren Peaks stimmen die Retentionszeiten für Zitronensäure, für Gluconsäure und Glucuronsäure. Ein großer Peak vor der Apfelsäure konnte vorläufig nicht identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Gärungzwischenprodukt.

Methodik

Prinzip

Die Zuckerlösung wird in einem Röhrchen am Rotationsverdampfer unter Zusatz von Isopropanol zur Trockne verdampft. Die Zucker werden in Methanol gelöst, mit Hydroxylamin-hydrochlorid und Natriumacetat im verschlossenen Gefäß in die Oxime übergeführt. Ein aliquoter Teil der Oximlösung wird zur Trockne verdampft und in Pyridin gelöst. Eine bekannte Menge Octadecan wird als innerer Standard zugegeben und anschließend mit MSHFBA und TMCS in einem mit Gummiseptum verschlossenen Gefäß silyliert. Die Zucker-oxim-silylderivate werden in den Gaschromatographen eingespritzt und getrennt.

Geräte

Reaktionsröhrchen für die Derivatisierung in den Längen 90 mm und 60 mm; Durchmesser 9 mm, mit Septum und passender Kunststoff-Verschraubung (siehe Abb. 13). Hersteller-Firma: Serva Feinbiochemica, Heidelberg. Schweizer-Vertretung: Chemie Brunschwig AG, Basel.

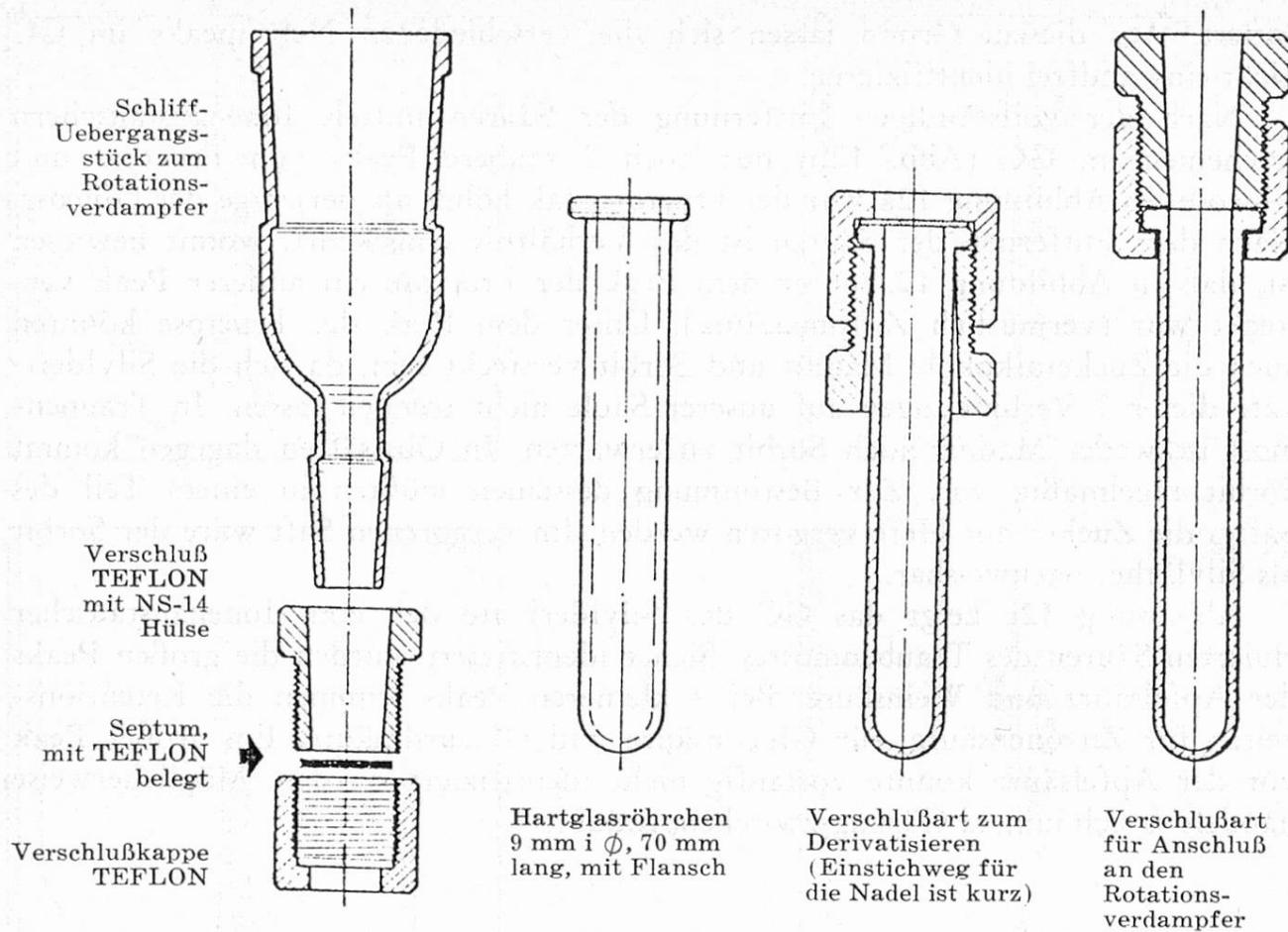


Abb. 13. Reaktionsrörchen für die Derivatisierung. Diese Rörchen eignen sich besonders zur Silylierung, Veresterung und Acetylierung, also zur Umsetzung von Substanzen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß.

Das Septum kann von der Nadel der Mikrospritze durchstochen werden, so daß eine Oeffnung der Verschlußkappe vermieden wird. Ferner können die zu analysierenden Substanzen in dem Reaktionsrörchen konzentriert werden, indem man das Septum entfernt und das Rörchen über ein Uebergangsstück an den Rotationsverdampfer anschließt.

Reagenzien

Zucker-Modellmischung

Von nachstehenden Zuckerarten werden die angegebenen Mengen eingewogen, so daß die Mischung je 1,000 g Trockensubstanz von jedem Zucker enthält. In einem 100-ml-Meßkolben werden die Zucker zunächst in 50 ml Wasser gelöst und dann bei 20°C mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Einwaagen betragen:

Fructose = 1,000 g, Glucose = 1,000 g, Saccharose = 1,000 g, Lactosehydrat = 1,0526 g, Maltosehydrat = 1,0526 g, Raffinosepentahydrat = 1,1784 g, Melezitosehydrat = 1,0714 g. 1 ml dieser Lösung enthält je 10,00 mg von jeder Zuckerart.

Pyridin, rein über KOH aufbewahrt.

Octadecan 1% als innerer Standard

50,0 mg Octadecan in Pyridin lösen und im Meßkolben auf 50 ml verdünnen. 1 ml enthält 10 mg Octadecan.

Methanol, rein wasserfrei.

N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluor-butyramid (MSHFBA)

Bezugsquelle: Hans Mohler & Co., Laborbedarf, Basel. Die Herstellerfirma macht folgende Angaben zum konfektionierten Präparat:

Um dem Verbraucher eine zweckmäßige Verpackungsform zu bieten, haben wir uns für den Bördelkappenverschluß mit teflon-beschichteter Gummischeibe (Septum) entschieden. Bitte bewahren Sie die Präparate möglichst im Kühlschrank bei + 4°C auf und beachten Sie, daß durchstochene Septa nicht mehr absolut dicht sind. In diesem Falle raten wir, den Ampulleninhalt schnellstmöglich aufzubrauchen oder aber zumindest die Ampullen stehend aufzubewahren. Nach Durchstich der Teflonbeschichtung kommt bei liegender Aufbewahrungsweise der Ampulleninhalt mit dem Gummimaterial in Kontakt und verunreinigt den Inhalt bis zur Unbrauchbarkeit.

Trimethylchlorsilan (TMCS)

Isopropanol

Hydroxylamin-hydrochlorid z. A.

Natriumacetat, wasserfrei z. A.

Natriumsulfat, wasserfrei z. A. frisch geglüht bei 500°C

Ausführung der Bestimmung

Eindampfen der Zuckerlösung

- 0,50 ml Zuckerlösung am Rotationsverdampfer unter Vakuum auf dem Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eindampfen.
- vorsichtig Isopropanol zugeben (ca. 0,5 ml) bis Lösung trüb wird und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 70°C trocknen.

Herstellen der Oxime

- wasserfreies Zuckergemisch im 8,5 cm langen Röhrchen mit 2 ml Methanol versetzen und mischen
- 0,05 g Hydroxylamin-hydrochlorid zur Analyse
- 0,06 g Natriumacetat wasserfrei zur Analyse
- 0,2 g Natriumsulfat wasserfrei zur Analyse zusetzen, Röhrchen mit Septum verschließen
- während einer Std. in Trockenschrank auf 80°C erhitzen
- abkühlen, Unlösliches abzentrifugieren.

Silylierung

- Von der klaren überstehenden Lösung 1,00 ml in ein sauberes 6 cm langes Reaktionsröhrchen abpipettieren.
- Am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockne verdampfen.
- Zum wasserfreien Zucker-oximgemisch im Reaktionsröhrchen zusetzen:

- 0,30 ml Octadecanlösung* (enthält 3 mg Octadecan als inneren Standard)
- 0,40 ml MSHFBA
- 3 Tropfen TMCS
- Röhrchen sofort mit Septum verschließen
- während 1 Std. im Trockenschrank bei 80°C erwärmen
- abkühlen und zentrifugieren.

Gaschromatographische Trennung

Zur Entnahme der Probe wird mit der Injektionsnadel durch das Septum gestochen. Das silylierte Reaktionsgemisch ist bei Ausschluß von Feuchtigkeit 8 Tage unverändert haltbar.

Gaschromatographische Bedingungen

Stahlsäule 2,5 m \times $1/8''$ Durchmesser

Säulenfüllung 5% OV-17 auf Varaport-30, 80/100 mesh, Einspritzmenge 2 μ l

Trägergas N₂ = 25 ml/min.

Flammenionisationsdetektor (FID)

Empfindlichkeit $32 \cdot 10^{-10}$ Amp.

Temperaturprogramm siehe Abbildung 7 (Säulenendtemperatur 300°C)

Injektor- und Detektor-Temperatur 310°C.

Hinweis auf eine vereinfachte Arbeitstechnik

Bei einer weiteren Bearbeitung der Methode ist es gelungen, die Technik noch wesentlich zu vereinfachen. Die Oxime werden in Pyridinlösung hergestellt und können anschließend im gleichen Reaktionsröhrchen direkt silyliert werden. Als innerer Standard hat sich Phenyl- β -D-glucopyranosid bewährt.

Zusammenfassung

1. Es wird eine neue Methode zur gaschromatographischen Trennung und quantitativen Bestimmung der verschiedenen Zuckerarten beschrieben, bei welcher jeder Zucker auf dem Gaschromatogramm nur einen Peak bildet. Durch eine Behandlung mit Hydroxylamin entstehen aus den reduzierenden Zuckern zunächst die entsprechenden Oxime. Anschließend wird silyliert und das Gemisch in den Gaschromatographen eingespritzt.
2. Eine Modellmischung, bestehend aus Fructose, Glucose, Saccharose, Lactose, Maltose, Raffinose und Melezitose, wurde sauber getrennt. Es entstehen keine störenden Nebenpeaks; auch Fructose gibt nur einen sauberen Peak.
3. Als inneren Standard für die quantitativen Bestimmungen verwendeten wir Octadecan.

* Wir benutzten den Pipetman der Fa. Gilson. Es handelt sich um eine einstellbare Digital-Mikroliter-Pipette. 0 bis 1 ml. Bezugsquelle: Lightning-Instrumentation, CH-1012 Lausanne.

4. An Modellversuchen wurde die Zuverlässigkeit der Methode geprüft. Die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Streubereich wurden für die 7 Zuckerarten berechnet.
5. Das Verhalten von 17 verschiedenen Zuckerarten und einiger Zuckeralkohole wurde geprüft. Verschiedene Zuckerarten lassen sich auf der von uns benutzten OV-17-Säule nicht trennen.
6. Die gaschromatographische Zuckerbestimmung wurde auf verschiedene Lebensmittel angewendet und die entsprechenden Gaschromatogramme werden abgebildet. Bei Traubenmost und Orangenkonzentrat haben wir die störenden Säuren vor der Zuckerbestimmung durch Ionenaustauscher entfernt.

Résumé

1. Il est décrit une nouvelle méthode de séparation et de dosage des divers sucres par chromatographie en phase gazeuse. On n'obtient avec cette méthode qu'un seul peak pour chaque sorte de sucre. Les sucres réducteurs sont d'abord transformés en oximes par réaction avec l'hydroxylamine, puis silylés et l'on injecte la solution dans le chromatographe.
2. On a obtenu une séparation nette des sucres d'une solution modèle de fructose, glucose, saccharose, lactose, maltose, raffinose et mélécitose. Il n'est apparu aucun peak étranger gênant. Même le fructose ne donne qu'un seul peak net.
3. L'octadécane sert de standard interne dans les dosages quantitatifs.
4. La précision de la méthode a été vérifiée. On a calculé les moyennes arithmétiques, la déviation standard et la variabilité pour les sortes de sucres susmentionnées.
5. On a contrôlé le comportement de 17 sortes de sucres et de quelques hexols. Certains sucres ne sont pas séparés par la colonne OV 17 utilisée.
6. On a effectué le dosage par chromatographie en phase gazeuse des sucres de diverses denrées alimentaires. Les chromatogrammes correspondants sont reproduits. Pour le moût de raisin et le concentré d'orange on a éliminé les acides gênants, avant le dosage des sucres, par échangeurs d'ions.

Literatur

1. Dutton, G. G. S.: Applications of gas liquid chromatography to carbohydrates, Part. I. In: Advances in Carbohydrate chemistry and biochemistry **28**, 9—160. Academic Press, New York and London 1973.
2. Hadorn, H., Zürcher, K. und Strack, Ch.: Gaschromatographische Bestimmung der Zuckerarten in Honig. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **65**, 198—208 (1974).
3. Zürcher, K. und Hadorn, H.: Versuche zur Herstellung und gaschromatographischen Trennung der Zucker-silyläther. Deut. Lebensmittel-Rundschau **70**, 425—431 (1974).
4. Zürcher, K. und Hadorn, H.: Optimierung der Versuchsbedingungen zur Silylierung der Zucker mit BSA und HMDS und der gaschromatographischen Trennung. Deut. Lebensm. Rundschau **71**, 68—71 (1975).
5. Curtius, H.-C., Völlmin, J. A. und Müller, M.: Bestimmung der Mutarotation von Monosacchariden mittels Gaschromatographie. Aufklärung verschiedener Fructose- und Sorboseformen mit Gaschromatographie, Infrarot- und Massenspektroskopie. Z. anal. Chem. **243**, 341—349 (1968).

6. Reid, P. E., Donaldson, B., Secret, D. A. and Bradford, B.: A simple rapid isothermal gas chromatographic procedure for the analysis of monosaccharide mixtures. *J. Chromatog.* **47**, 199—208 (1970).
7. Varma, R., Varma, R. S. and Wardi, A. H.: Separation of aldonitrile acetates of neutral sugars by gas-liquid chromatography and its application to polysaccharides. *J. Chromatog.* **77**, 222—227 (1973).
8. Sweeney, C. C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2495 (1963).
9. Mason, B. S. and Slover, H. T.: Gas chromatic method for the determination of sugars in foods. *J. Agr. Food. Chem.* **19**, 551—554 (1971).
10. Laine, R. and Sweeney, Ch.: Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **43**, 533—538 (1971).
11. Petersson, G.: Gas-chromatic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives. *Carbohydrate Rs.* **33**, 47—61 (1974).
12. Neunhoeffer, O.: Analytische Trennung und Identifizierung organischer Substanzen, 2. Aufl., S. 110. Verlag Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1965.
13. Dean, R. B. und Dixon, W. J.: Vereinfachte Statistik für eine kleine Zahl von Beobachtungen. *Anal. Chem.* **23**, 636 (1951). Zitiert nach Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase, Bd. IV, Seite 40. Hochschultaschenbücher 92/92a. Bibliographisches Institut, Mannheim 1965.
14. Müller, B. und Göke, G.: Beitrag zur gaschromatographischen Bestimmung von Zuckern und Zuckerkoholen in Lebensmitteln. *Deut. Lebensm. Rundsch.* **68**, 222—227 (1972).
15. Zürcher, K., Maurizio, A. und Hadorn, H.: Untersuchungen an Handelshonigen mit spezieller Berücksichtigung des Zuckerspektrums Apidologie (im Druck).
16. Hadorn, H. und Zürcher, K.: Zuckerspektrum und Kristallisationstendenz von Honigen. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **65**, 407—420 (1974).

K. Zürcher
 Dr. H. Hadorn
 Ch. Strack
 Zentrallaboratorium der Coop Schweiz
 Thiersteinerallee 14
 CH-4002 Basel