

Zuckergehalte von Wintergerste und Mais

2. Mitteilung: Methodenvergleich HPLC/Anthron

WOLFGANG LAWS und ELISABETH OLDENBURG

Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung

1 Einleitung

Zur Bestimmung von wasserlöslichen Kohlenhydraten in Futtermitteln eignen sich kolorimetrische, titrimetrische, enzymatische und chromatographische Analysemethoden. Unspezifische Verfahren wie z.B. die Methoden nach Luff-Schoorl (Luff, 1898; Schoorl, 1929), Nelson (Nelson, 1944) und Somogyi (Somogyi, 1945), bzw. die Anthron- sowie die DNS-Methode (Deriaz, 1961; Sumner, 1921) werden häufig zur Ermittlung von Gesamtzuckergehalten eingesetzt, während zur Analyse von Einzelzuckern Enzymtests (Mayer und Apostel, 1990) sowie dünn- oder hochdruckflüssigkeitschromatographische Verfahren zur Anwendung kommen (Sweely et al., 1963; Ugrinovits, 1980; Schleich und Engelhardt, 1989).

Die kolorimetrischen und titrimetrischen Methoden erfordern einen hohen zeitlichen Aufwand, jedoch niedrigen Reagentieneinsatz und führen zu Ergebnissen mit eingeschränkter Aussagekraft, während enzymatische und chromatographische Verfahren mit zeitlich geringem, aber hohem Geräte- bzw. Kostenaufwand differenzierte Aussagen ermöglichen.

Die unterschiedlichen Ausstattungsgrade der Untersuchungslaboratorien bestimmen die Anwendung der einen oder anderen oben genannten Methode, sodaß eine direkte Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse oftmals nicht gegeben ist. Insbesondere erscheint die Vergleichbarkeit von Gesamtzuckeranalysen nach klassischen kolorimetrischen Methoden mit Einzelparameterbestimmungen mittels moderner chromatographischer Verfahren fraglich.

In dieser Arbeit wurde versucht, anhand von Gesamtzuckeranalysen nach der Anthronmethode und Einzelzuckerbestimmungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Übereinstimmungen bzw. Abweichungen der Ergebnisse zu überprüfen und zu interpretieren.

Die Untersuchungen wurden mit Wintergerste und Mais unterschiedlicher Reifegrade durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Es wurde das Probenmaterial entsprechend der Beschreibung der 1. Mitteilung, Abschnitt 2.1 verwendet.

2.2 Analysemethoden

2.2.1 Bestimmung der Trockenmasse

Die Trockenmasse wurde gravimetrisch nach Erhitzung des frischen Probenmaterials auf 105°C (48 Stunden) ermittelt.

2.2.2 Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Probenvorbereitung und die HPLC-Bedingungen entsprachen generell der Beschreibung in der 1. Mitteilung, Abschnitt 2.2.2. Auch das dort beschriebene Extraktionsverfahren wurde in der Regel angewandt. Zusätzlich und abweichend davon wurden ausgewählte Pflanzenproben mit heißem Wasser extrahiert und enzymatisch behandelt. Dazu wurden 2 g gefriergetrocknetes Material in einen 50 ml Meßkolben eingewogen, mit 25 ml VE-Wasser versetzt und 60 Minuten mittels Horizontalschüttler extrahiert. Danach wurde bei 20°C bis zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und durch ein Faltenfilter filtriert. Ein Milliliter des Filtrates wurden mit einem Milliliter des 100fach verdünnten Enzymcocktails Novozym SP 230 (Novo Industri, Kopenhagen; Hauptaktivität: Fructanase) versetzt und in einem verschlossenem Reaktionsgefäß bei 60°C im Wasserbad inkubiert (30 Minuten). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde durch ein Membranfilter (0,45 µm) in eine Autosamplerflasche filtriert und nach den beschriebenen Bedingungen mittels HPLC analysiert.

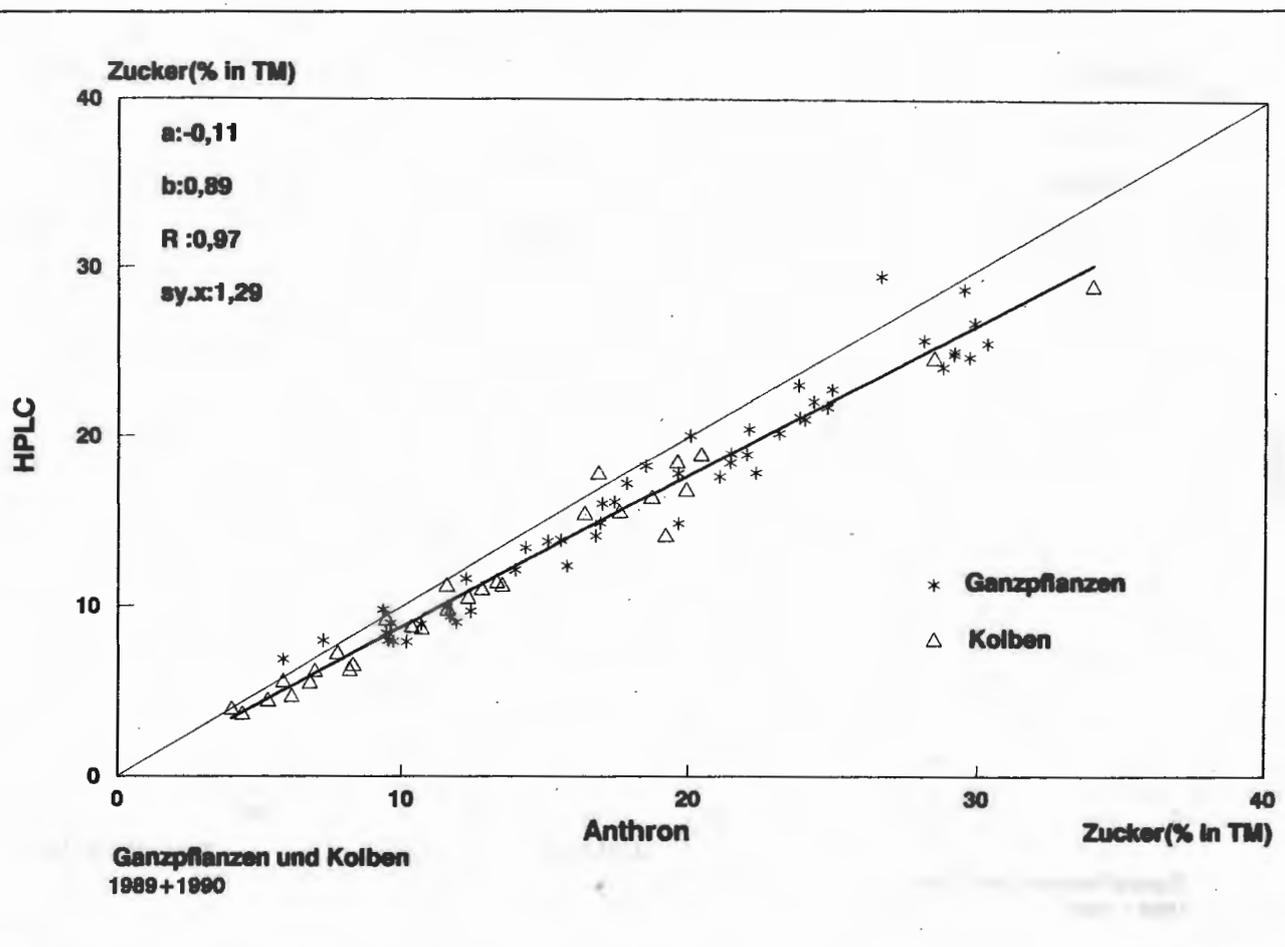
2.2.3 Bestimmung von wasserlöslichen Kohlenhydraten mittels Anthron

Frisches Probenmaterial wurde auf eine theoretische Schnittlänge von 5 mm gehäckselt, 24 Stunden gefriergetrocknet und anschließend auf 1 mm Siebdurchgang (Rundlochsieb) vermahlen. Von diesem Material wurden jeweils 0,5 g in einen 500 ml Meßkolben eingewogen, mit 200 ml kaltem, vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) versetzt und 60 Minuten mit einem Horizontalschüttler (180 Schwingungen/Minute) extrahiert. Danach wurde 1 ml Toluol zugegeben, mit VE-Wasser bis zur Marke aufgefüllt und bei Zimmertemperatur über Nacht stehengelassen. Am nächsten Morgen wurde das Gemisch durch ein trockenes Faltenfilter (Schleicher und Schüll Nr. 1574 1/2) filtriert und der Extrakt nach Carrez geklärt. Dazu wurden 50 ml des Filtrates in einen 100 ml Meßkolben überführt, mit je 2 ml Carrez-Lösung I (150 g Kaliumhexacyanoferrat II, p.A./l) und Carrez-Lösung II (230 g Zinkacetat p.A./l) versetzt, auf 100 ml mit VE-Wasser aufgefüllt, gemischt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert.

Vom Filtrat wurden 2 ml in ein Reagenzglas mit Schraubverschluß pipettiert, 10 ml Anthronreagenz (Herstellung: 780 ml konz. Schwefelsäure, D=1,84, werden unter Kühlung vorsichtig zu 330 ml VE-Wasser gegeben; nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 1 g Thioharnstoff und 1 g Anthron hinzugefügt und die Lösung über Nacht im Kühlschrank stehengelassen) wurden unter Kühlung hinzugefügt und homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend im Wasserbad 20 Minuten auf 100 °C erhitzt, unter fließendem Wasser 10 Minuten abgekühlt und der Farbkomplex photometrisch bei 625 nm in einer 1 cm Küvette gegen den Reagentien-Blindwert gemessen.

Als Standard-Lösungen wurden 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,3, und 0,4 mg wasserfreie Glucose/2 ml VE-Wasser verwendet. Die

Abbildung 1: Zuckergehalt im Mais (Methodenvergleich HPLC/Anthron)



Standard-Lösungen wurden wie Analysenlösungen behandelt, d.h. 2 ml Lösung wurden in einen 100 ml Meßkolben mit 50 ml VE-Wasser verdünnt, mit Carrez-Lösungen versetzt und anschließend wie beschrieben weiterbehandelt.

Die Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten in Wintergerste und Mais wurden bezogen auf Glucose anhand der Eichkurve berechnet und in Prozenten je 100 g Trockenmasse ausgedrückt.

3 Ergebnisse

Die in Maiskolben und -ganzpflanzen mittels Anthronmethode nachgewiesenen Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten sind den mit HPLC ermittelten Gesamtzuckergehalten, definiert als Summe von Glucose, Fructose und Saccharose, in der Abbildung 1 gegenübergestellt.

Das Bestimmtheitsmaß von 0,97 der linearen Regression läßt eine gute Vergleichbarkeit zwischen den nach der Anthronmethode und den mit HPLC gewonnenen Daten erkennen, wobei die Anthronmethode einen Trend zu leicht höheren Werten zeigte. Diese Abweichung war bei höheren Zuckergehalten, d.h. bei unreifem Mais, größer als bei niedrigeren Zuckerkonzentrationen.

Die Abbildung 2 faßt die mit Anthron bzw. HPLC ermittelten Zuckergehalte der Wintergerste, aufgeteilt nach Ganzpflanzen- und Ährenproben, zusammen.

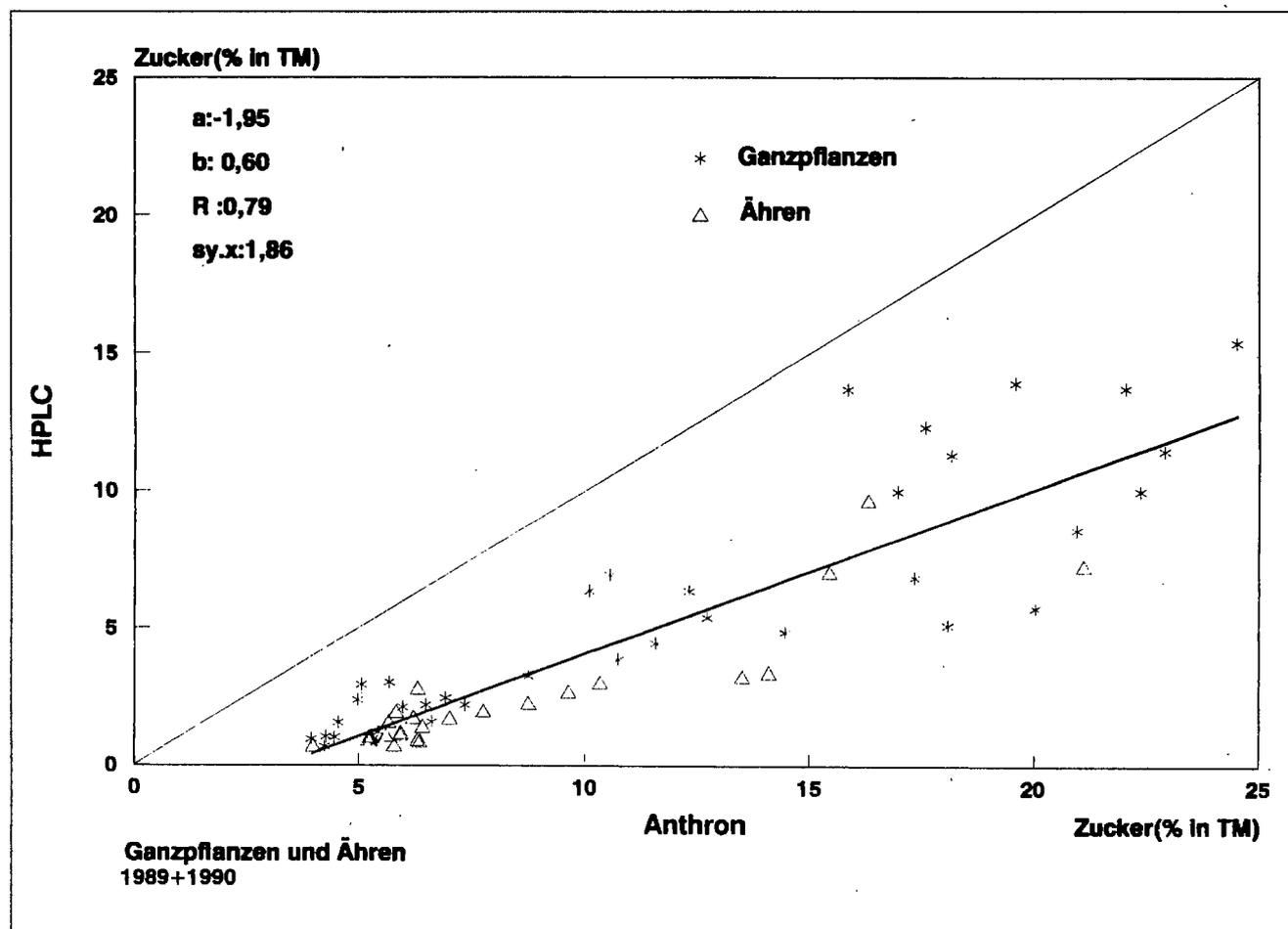
Im Gegensatz zum Mais ergab sich bei der Wintergerste eine wesentlich schlechtere Korrelation der Wertepaare (Bestimmtheitsmaß: 0,79). Die Werte streuten besonders bei den höheren Zuckergehalten des unreifen Pflanzenmaterials. Zudem resultierten bei der Anwendung der Anthronbestimmung wesentlich höhere Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten als bei Einsatz der HPLC-Methode.

Die festgestellten Abweichungen könnten auf höhermolekulare Kohlenhydrate, die mit der Anthronmethode erfaßt, jedoch mit der beschriebenen HPLC-Methode nicht detektiert werden können, zurückzuführen sein. Aus diesem Grunde wurde Probenmaterial der Ganzpflanzen von Wintergerste und Mais nach der wäßrigen Extraktion enzymatisch behandelt, unter den bekannten HPLC-Bedingungen erneut analysiert. Die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit den Anthronwerten zeigte bei der Wintergerste eine erheblich verbesserte Korrelation, beim Mais wurde durch die enzymatische Behandlung jedoch keine Verbesserung der Beziehung erzielt (Abbildung 3).

4 Diskussion

Eine Vergleichbarkeit zwischen der kolorimetrischen Kohlenhydratbestimmung nach dem Anthronverfahren und der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Trennung ist nur fallweise gegeben. Bei der Anthronmethode werden neben Monosacchariden auch deren Oligomere und Polymere erfaßt (Haas und Fleischmann, 1959), die mit der eingesetzten HPLC-Trennsäule nicht detektiert werden können.

Abbildung 2: Zuckergehalt in Wintergerste (Methodenvergleich HPLC/Anthron)



Treten derartige Kohlenhydrate in einer Probenmatrix nicht auf, kann eine große Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren erzielt werden, wie am Beispiel des Mais gezeigt. Entsprechend durchgeführte Versuchsansätze, die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren, zeigten für die Zuckerhirse ebenfalls positive Ergebnisse. Bei diesen Pflanzenmaterialien kann die HPLC die zeitaufwendige Anthronmethode ersetzen.

Wintergerste- und zusätzlich untersuchte Grasproben zeigten dagegen nur unbefriedigende Übereinstimmungen der Analyseergebnisse. In diesen Materialien können erhebliche Anteile der Kohlenhydratfraktion als Fructane vorliegen (Cerning-Beroard und Guilbot, 1975; Kühbauch, 1978), die wahrscheinlich die Korrelationen negativ beeinflussen.

Eine Verbesserung der Vergleichbarkeit beider Methoden ist durch die Zwischenschaltung einer enzymatischen Behandlung der HPLC-Extrakte möglich. Durch diesen Schritt werden Glucose- bzw. Fructosepolymere zu Monosacchariden abgebaut und damit auch einer chromatographischen Trennung und Detektion zugänglich. Alternativ wäre die Erfassung dieser Oligomere bzw. Polymere auch mit einer spezifischen Trennsäule möglich.

5 Zusammenfassung

Es wurden vergleichende Analysenverfahren zur Bestimmung von wasserlöslichen Kohlenhydraten in Wintergerste und Mais durchgeführt. Zur Anwendung kamen die kolorimetrische Methode mittels Anthron sowie ein HPLC-Verfahren

mit NH₂-modifizierter Kieselgel-Trennsäule und RI-Detektion. Eine Vergleichbarkeit der Daten war nur fallweise gegeben. Es zeigten sich pflanzenspezifische Abhängigkeiten, die z.T. zu erheblichen Abweichungen führten. Eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse kann durch eine zusätzliche enzymatische Behandlung der HPLC-Extrakte erzielt werden.

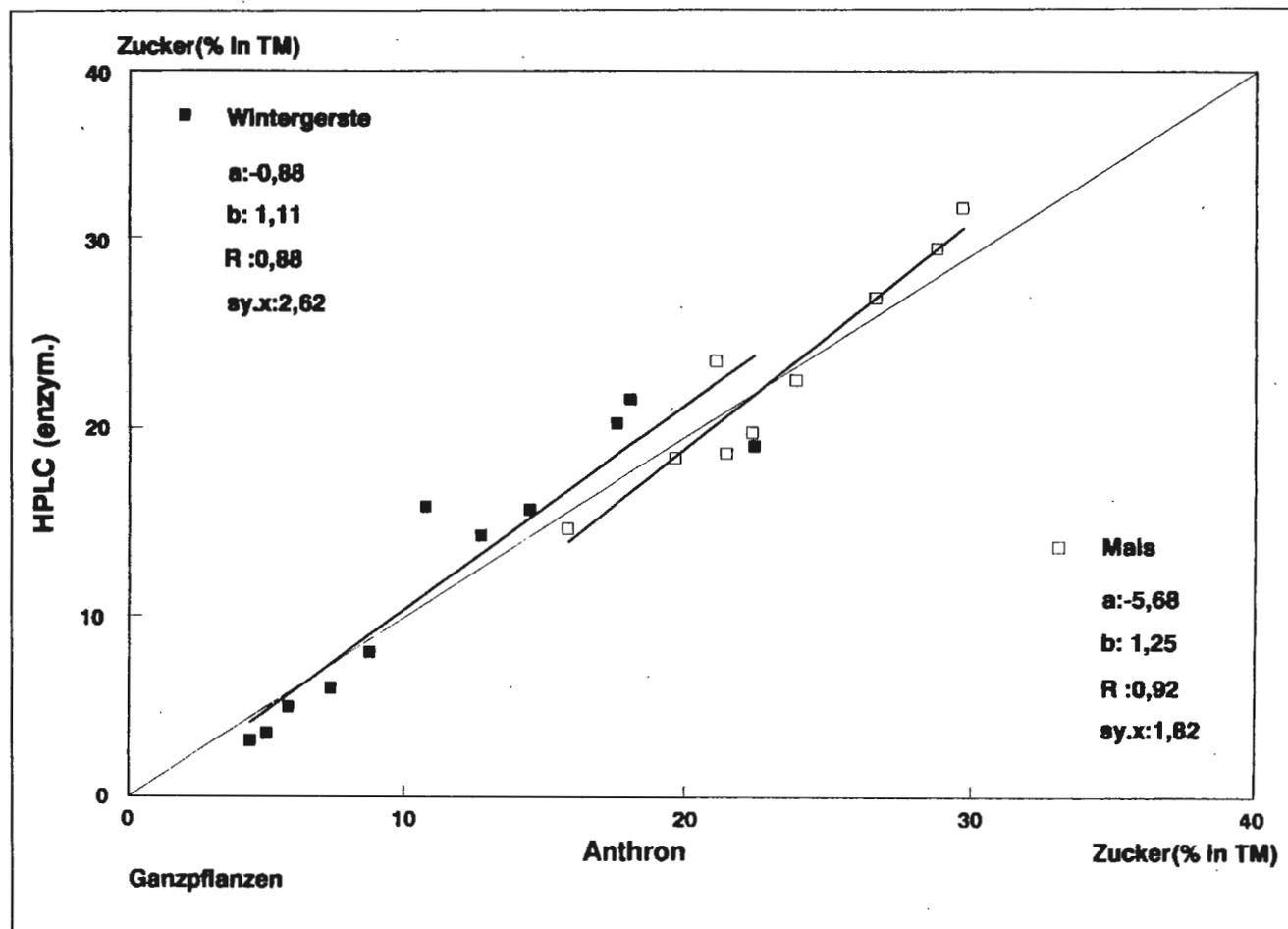
Sugar contents of winter barley and maize Second communication: Comparison of the analytical methods HPLC and Anthrone

Different analytical methods were compared for determination of water soluble carbohydrates in winter barley and maize. The results from a colorimetric method using anthrone and a high pressure liquid chromatographic procedure (HPLC) using a NH₂-modified silicagel column and RI-detection only corresponded to some extent. In dependence of specific properties of the plant material considerable deviations of the data were partly observed. The comparability of the results from both methods can be improved by enzymatic treatment of the sample extract used for HPLC.

Danksagung

Wir danken Herrn Dirk Hillegeist und Frau Birgit Pohl-Runge für die ausgezeichnete technische Assistenz bei der Durchführung dieser Untersuchungen.

Abbildung 3: Vergleich Anthron/HPLC (enzym.)



Literatur

Cerning-Beroard, J., Guilbot, A. (1975): Evolution de la composition glucidique des grains de céréales au cours de leur maturation: maïs, blé, orge. - Ann. Technol. agric. 24 (2), S. 143-170.

Deriaz, R.E. (1961): Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. - J. Sci. Food Agric. 12, S. 152-160.

Haas, G.J., Fleischmann, A.I. (1959): Use of the anthrone procedure in the carbohydrate analysis of beer. - Wallerstein Laboratories Communications 21, S. 139-151.

Kühbauch, W. (1978): Die Nichtstrukturkohlenhydrate in Gräsern des gemäßigten Klimabereiches, ihre Variationsmöglichkeiten und mikrobielle Verwertung. - Landwirtsch. Forschung 31, S. 2-3.

Luff, G. (1898): Z. ges. Brauw. 21, S. 392 ff.

Mayer, H., Apostel, C. (1990): Die enzymatische Simultanbestimmung von verschiedenen Zuckern. - GIT Fachz. Lab. 8, 951-959.

Nelson, N. (1944): A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. - J. Biol. Chem. 153, S. 375-380.

Schleich, W., Engelhardt, H. (1989): Möglichkeiten der HPLC in der Zuckeranalytik. - GIT Fachz. Lab. 7, S. 624-630.

Schoorl, N. (1929): Z. Unters. Lebensm. 57, S. 566 ff.

Somogyi, M. (1945): A new reagent for the determination of sugars. - J. Biol. Chem. 160, S. 61-68.

Sumner, J.B. (1925): A more specific reagent for the determination of sugar in urine. - J. Biol. Chem. 65, S. 393-395.

Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W. (1963): Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. - J. Am. Chem. Soc. 85, S. 2497-2507.

Ugrinovits, M. (1980): Zuckeranalyse mit GC, HPLC, DC und enzymatisch - Ein Vergleich der Methoden. - Chromatographia 13 (7), S. 386-394.

Verfasser: Laws, Wolfgang, Dipl.-Ing.; Oldenburg, Elisabeth, Dr.-Ing., Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Professor Dr. habil. Friedrich Weißbach.