

---

## VI. NEUE UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROJEKTE

### 6.1 *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung – Entwicklung und Etablierung von molekularbiologischen Detektionsmethoden

**Infektionen mit *Enterobacter sakazakii* verursachen schwerwiegende Erkrankungen bei Säuglingen. Hauptinfektionsquelle stellt dabei die Säuglingsfertiernahrung auf Milchpulverbasis dar. Um über ein zuverlässiges Verfahren zur Untersuchung zu verfügen wurden molekularbiologische Verfahren, in Form einer Real-Time-PCR und eines VIT-Tests eingeführt.**

Aufgrund der Schwere der durch *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*) hervorgerufenen Symptome bei Säuglingen (Kapitel 2.6.6) werden an die Herstellung von Säuglingsnahrung für Säuglinge unter sechs Monaten strenge mikrobiologische Anforderungen gestellt. Diese sind in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 verankert. Hier wird die Abwesenheit des Erregers in 300 g (30 Stichproben zu je 10 g) gefordert. Als Referenzverfahren ist ein kulturelles Verfahren angegeben. Kulturelle Verfahren bedienen sich der Anreicherung, Isolierung und biochemischen Charakterisierung der Erreger. Solche Verfahren weisen allerdings eine geringe Sensitivität bei gleichzeitig hohem Arbeits- und Zeitaufwand auf. Das kulturelle Verfahren für den Nachweis von *E. sakazakii* kann außerdem falsch-positive Ergebnisse erzielen, die einer aufwendigen Bestätigung bedürfen.

Die Real-Time-PCR hingegen ist mit einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand bei gleichzeitig höherer Sensitivität und Spezifität verbunden. Hierbei werden bestimmte Gene der pathogenen Keime vervielfältigt und nachgewiesen. Durch das Mitführen einer internen Amplifikationskontrolle kann eine Hemmung der Real-Time-PCR sicher erkannt werden. Allerdings kann keine Aussage über die Lebensfähigkeit der nachgewiesenen Keime gemacht werden, dies muss weiterhin über kulturelle Verfahren erfolgen.

Der Nachweis von *E. sakazakii* ist in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien geregelt

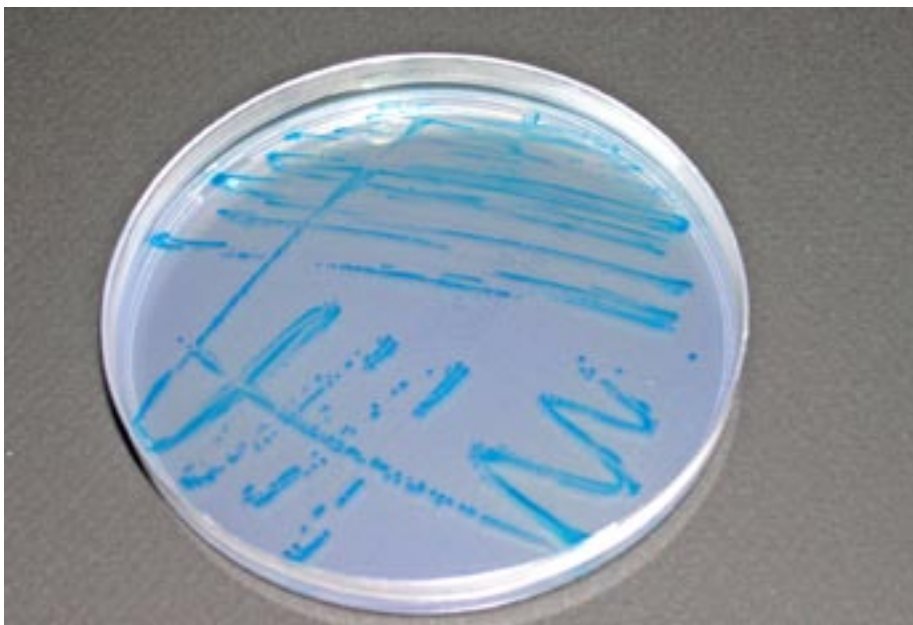


Abbildung: Wachstum von *E. sakazakii* auf dem *E. sakazakii* Isolation Agar

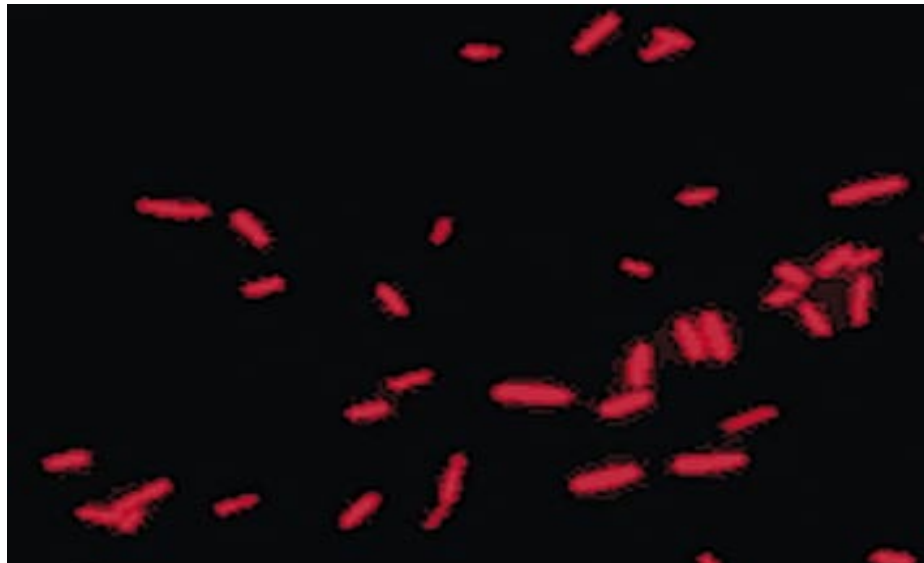


Abbildung: Rotes Fluoreszenzsignal von *E. sakazakii* im VIT-Test

Daher wurde eine Real-Time-PCR-Methode mit einer internen Amplifikationskontrolle entwickelt, die zur näheren Charakterisierung hausintern validiert wurde. Sie wurde mit dem bereits bestehenden kulturellen Verfahren kombiniert. Dafür erfolgt zunächst die Einwaage (10g) der Säuglingsnahrung in nicht-selektive Nährmedien, gefolgt von einer Anreicherung in einem selektiven Nährmedium. Es schließt sich die Durchführung der Real-Time-PCR an, die in der Lage ist, das Ergebnis innerhalb einer Stunde zu liefern. Gleichzeitig wird das selektive Nährmedium zur Isolierung der Keime auf einen Selektivnährboden ausgestrichen, von dem im positiven Fall die weitere biochemische Bestätigung erfolgt (s. Abbildung).

Außerdem wurde ein kommerziell erhältlicher Test (VIT-Test) für den Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung eingeführt. Dieser wurde gemäß den Herstellerangaben mit einer separaten Einwaage (25g) und Anreicherung durchgeführt. Er basiert auf fluoreszenzmarkierten Gensonden, die bei Anwesenheit des Zielbakteriums an dessen DNA-Sequenzen binden und dabei ein Fluoreszenzsignal erzeugen (Abbildung 2).

Mit diesen drei Untersuchungsmethoden wurden im Jahr 2007 134 Proben untersucht. Das Probenkontingent gliederte sich in 76 Proben Säuglingsnahrung für Säuglinge < 6 Monate und 58 Proben Milchpulver. In zwei Proben konnten lebende *E.-sakazakii*-Keime nachgewiesen werden (Tabelle).

Tabelle: Ergebnisse der Untersuchungen auf *E. sakazakii*

Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl <i>E.-sakazakii</i> -positiver Proben
Säuglingsnahrung für Säuglinge < 6 Monate	76	1
Milchpulver	58	1
Gesamt	134	2

---

Bei den 132 negativen Proben und einer positiven Probe (Säuglingsnahrung) konnte mit allen 3 Untersuchungsmethoden (kulturelles Verfahren, Real-Time-PCR und VIT-Test), ein übereinstimmendes Ergebnis erzielt werden.

Die zweite positive Probe (Milchpulver) hingegen, wies offensichtlich nur sehr geringe Keimgehalte an *E. sakazakii* auf, da lediglich in den 25g Probenmaterial des VIT-Tests ein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Eine aus der Anreicherung des VIT-Tests durchgeführte Real-Time-PCR konnte dieses positive Ergebnis jedoch bestätigen.

Mit der neu eingeführten Real-Time-PCR-Methode werden wir auch in Zukunft in Kombination mit dem kulturellen Verfahren Säuglingsnahrung untersuchen, um die Anforderungen der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 zu kontrollieren. Um Infektionen bei Säuglingen zu vermeiden, sollten außerdem die Hinweise in Kapitel 2.6.7 beachtet werden.

## 6.2 Aminosäureanalytik in diätetischen Lebensmitteln – Erfahrungen bei der Methodvalidierung am Beispiel einer Reduktionsdiät mit Kollagen-Hydrolysat

**Zur Analyse von Aminosäuren in verschiedenen Matrices sind zahllose Methoden veröffentlicht. Die Palette der Methoden reicht von verschiedensten Derivatisierungsmethoden über den Einsatz aller Varianten der Gerätetechniken wie HPLC, UPLC, LC-MS, GC-MS und Ionenchromatographischer Verfahren.**

Die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Methoden zeigt, dass es kein Verfahren gibt, das alle Anwenderwünsche befriedigt, also eine einfache, schnell durchzuführende, hoch selektive Methode, die wenig kostenintensiv ist. Alle Verfahren haben spezifische Nachteile, wie Instabilität der Derivate, kostenintensive Reagenzien, hohe Anschaffungskosten der Geräte, mangelnde Trennleistung, hohe Analysenzeiten, um nur einige zu nennen. Bei der Lebensmittelüberwachung muß aufgrund der hohen Tragweite von Messergebnissen vordringlich auf eine hohe Selektivität und gute Trennleistung Wert gelegt werden. Neben den 23 bekannten proteinogenen Aminosäuren werden in der Literatur etwa 250 nicht proteinogene Aminosäuren mit z.B. biologischer Funktion genannt wie Ornithin (Vorstufe von Arginin, Nahrungsergänzungsmittel) oder nicht proteinogene Aminosäuren, die in pflanzlichen Lebensmitteln eine Rolle spielen, wie Citrullin (Wassermelone), Homoserin (Gartenbohne). Dies stellt enorme Anforderungen an ein Trennsystem.

Die Analytik von Aminosäuren in Lebensmitteln stellt hohe Anforderungen an die Kompetenz des Prüflabors

Am CVUA Karlsruhe wird die Aminosäure-Analytik in Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Kosmetika und Arzneimitteln bei guten Erfahrungen seit Jahren mittels Aminosäureanalysator durchgeführt. Das Verfahren besticht, obwohl relativ aufwändig, durch eine hohe Selektivität und gute Trennleistung. Hinzu kommt, dass es in den amtlichen Methoden nach §64 LFGB für den Bereich der diätetischen Lebensmittel genannt ist.

Die Methode basiert auf der Auftrennung von Aminosäuregemischen mittels Säulen-Chromatographie und Lithium-Puffergradienten an einem stark sauren Kationenaustauscherharz und nachfolgender online-Derivatisierung mit Ninhydrin. Freie Aminosäuren können nach Proteinfällung direkt bestimmt werden. In Proteinen gebundene Aminosäuren müssen zuvor durch z.B. eine Säure-

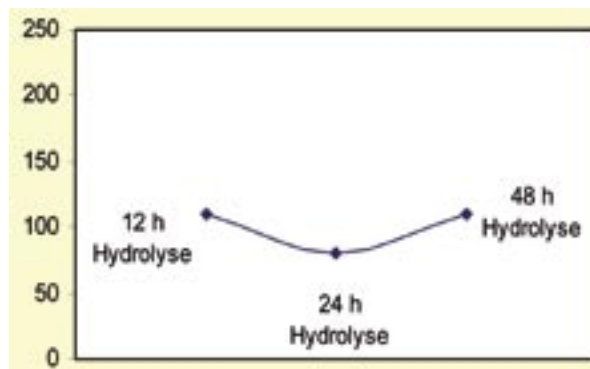
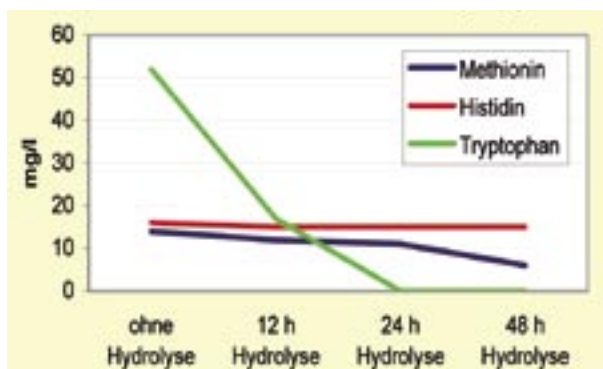
Das Aminosäurespektrum in Schlankheitskost muss stimmen

Hydrolyse freigesetzt werden. Üblich ist die Hydrolyse mit 6N HCl über 12h. Die Säure-Hydrolyse ist eine gängige Methode zur Aufspaltung von Proteinen in Aminosäuren. Dennoch ist die Stabilität der zu untersuchenden Aminosäuren und die Vollständigkeit der Hydrolyse in der jeweiligen Probenmatrix im Einzelfall zu prüfen. Im folgenden wird von den Erfahrungen bei der Validierung der Analyse einer Tomatensuppe, die als Schlankheitskost (Reduktionsdiät) angeboten wurde, berichtet. Insbesondere bei Reduktionsdiäten wird die Verwendung von hochwertigem Eiweiß gefordert, woraus ein bestimmtes Spektrum an Aminosäuren resultiert.

Im vorliegenden Beispiel waren insbesondere die Gehalte der essentiellen Aminosäuren Histidin, Methionin und Tryptophan von Interesse. Ihr Verhalten bei der Hydrolyse wurde genauer untersucht. Abbildung 1 zeigt die Stabilität von Testlösungen der genannten Substanzen bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten (12h/24h/48h) bei Hydrolyse mit 6N HCl. Gut bekannt als instabile Aminosäure, die vor allem bei der sauren Hydrolyse einen starken Abbau erfährt, ist Tryptophan.

Der Tryptophan-Verlust in der Testlösung betrug nach 12h Hydrolysedauer etwa 70%, nach 24h war Tryptophan vollständig abgebaut. Ein Tryptophan-Zusatz zur Probe kann daher auch als Erfolgskontrolle der Hydrolyse dienen. Unerwartet war der deutliche Abbau von Methionin in der Testlösung nach bereits 12h. Der Gehalt an Histidin dagegen veränderte sich in der Testlösung auch nach 48 Stunden Hydrolysedauer nicht. Deutlich abweichend davon verhielt sich Methionin bei Hydrolyse aus der natürlichen Matrix. Der detektierte Methioningehalt war auch nach 48h Hydrolysedauer im Rahmen der Messgenauigkeit konstant (siehe Abbildung 2). Aus dem Verhalten von Testlösungen kann demnach kein Rückschluss auf das Verhalten von Aminosäuren bei der Säurehydrolyse gezogen werden. Dies ist insbesondere bei der Durchführung von Aufstockversuchen zu berücksichtigen.

Eine Entfettung der Probe hatte bei mäßigem Fettgehalt (hier 5%) keinen Einfluss auf Hydrolyse und Wiederfindung. Weitere quantifizierte Aminosäuren, wie Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Leucin, Lysin, Threonin und Valin, zeigten keine Auffälligkeiten. Die Variationskoeffizienten bewegten sich intra-day zwischen 2,1 und 5,4% (n=5), inter-day zwischen 2,6 und 7,9% (n=3×2). Die Messlösungen der Hydrolyseansätze zeigten sich im Kühlschrank über eine Lagerzeit von 7 Wochen stabil.



Abbildungen:

1: Abbau von Aminosäuren bei der Hydrolyse,

2: Verhalten von Methionin in natürlicher Probenmatrix [mg Methionin/100g Protein]

## 6.3 Anwendung der Multivariate Curve Resolution (MCR) zur quantitativen Lebensmittelanalyse

**Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die Partial Least Squares Regression (PLS) sind sicher die am häufigsten verwendeten Verfahren der multivariaten Datenanalyse zum Auffinden und Herausarbeiten von Informationen aus großen Datensätzen. Bei beiden Verfahren erfolgt die Faktorenerlegung nach rein mathematischen Gesichtspunkten, weshalb die Faktoren häufig nur schwer zu verstehen und zu deuten sind.**

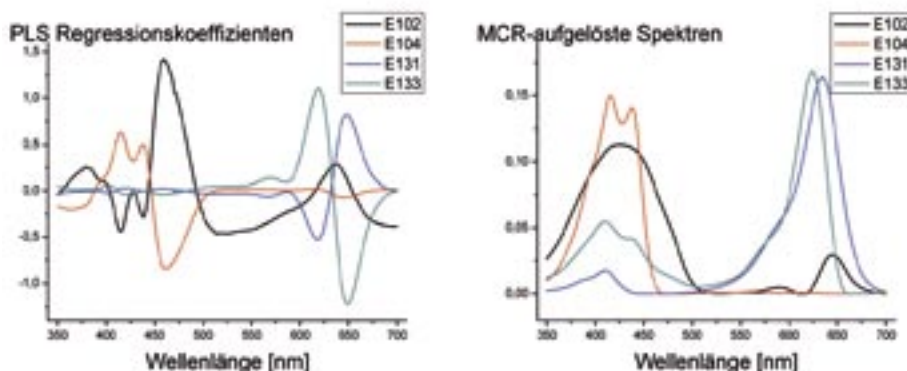
Um die Interpretierbarkeit vor allem vom chemischen Standpunkt aus zu erhöhen, wurden die klassischen multivariaten Verfahren in letzter Zeit durch Rotationsverfahren, sog. selbstmodellierende Kurvenauflösungsverfahren (Self-Modelling Curve Resolution), wie die Multivariate Curve Resolution (MCR) [1] erweitert. Dies bietet dem Anwender vor allem in der Spektroskopie große Vorteile, denn bei der MCR erfolgt die Zerlegung in chemisch interpretierbare Basisspektren, die die Grundkomponenten der vorhandenen Mischungsspektren wiedergeben. Die Scorewerte zeigen dann z.B. die Zu- oder Abnahme einer bestimmten Komponente innerhalb der Datenmatrix [2]. Aus einem Mischungsspektrum (z.B. mehrere Farbstoffe in einem Lebensmittel) lassen sich die Einzelspektren der Bestandteile (d.h. der einzelnen Farbstoffe) berechnen. Eine zeitaufwändige chromatographische Trennung (z.B. mittels Dünnschichtchromatographie oder HPLC) entfällt hierbei, so daß sich ein enormes Einsparungspotential durch die Anwendung dieser Technik ergibt.

MCR bietet enorme Möglichkeiten für die Auswertung von Spektren

Als erste Anwendung in der Lebensmittelkontrolle wird hier die Bestimmung von blauen und gelben Farbstoffen in Absinth mittels Photometrie und MCR vorgestellt. Die korrekte Zerlegung in die Basisspektren wurde anhand von Spektren der Reinsubstanzen überprüft. Eine Quantifizierung war durch Vergleich mit externen Standards möglich. In keinem Fall wurde eine Überschreitung der in der Zusatzstoffzulassungsverordnung vorgeschriebenen Farbstoffhöchstmengen festgestellt, jedoch fehlte bei einigen Produkten die Kenntlichmachung des Farbstoffzusatzes.

### Literatur

1. De Juan A, Maeder M, Martínez M, Tauler R (2000) Chemom. Intell. Lab. Syst. 54: 49–67
2. Kessler W, Kessler RW (2006) Anal. Bioanal. Chem. 384: 1087–1095



Abbildungen: Vergleich zwischen PLS-Regressionskoeffizienten und MCR-aufgelösten Spektren des selben Datensatzes. Man erkennt auf den ersten Blick den Vorteil der MCR, die chemisch interpretierbare Spektren liefert.

## 6.4 Identitätsbestimmung von Spirituosen durch Leitfähigkeitsmessung

Bei Gaststättenkontrollen stellt sich der Lebensmittelüberwachung die Aufgabe, neben einer sensorischen Prüfung auch chemisch-analytische Nachweise dafür zu liefern, daß dem Gast statt einer auf der Speisekarte aufgeführten teuren Markenspirituose ein billiges und u. U. minderwertigeres Produkt ausgeschenkt wird. Als Beispiele für Verdachtsfälle von gefälschten Produkte aus der Praxis der amtlichen Lebensmittelüberwachung seien „Panscherei“ und „Verdünnung“ weißen Rums einer hochwertigen Marke oder „Streckung“ eines hochwertigen Wodkas mit einer Discount-Marke genannt.

Mit Hilfe der üblichen Methodik zur Unterscheidung von Spirituosen anhand der Zusammensetzung der leichtflüchtigen Inhaltsstoffe (GC, GC-MS) kann vor allem bei Spirituosen mit niedrigen Gehalten an Gärungsbegleitalkoholen, z.B. Wodka, keine eindeutige Markenzuordnung getroffen werden. Mittels Leitfähigkeitsmessung und Ionenanalyse ist dagegen ein eindeutiger Identitätsnachweis bzw. eine Markenzuordnung möglich.

Portable Leitfähigkeitsmessgeräte erlauben die Untersuchung „vor Ort“

### Einflüsse auf Leitfähigkeit und Ionengehalt alkoholischer Getränke

Die Unterscheidungsmöglichkeit beruht darauf, daß Spirituosen aus hochprozentigen Destillaten hergestellt und mit Wasser auf Trinkstärke verdünnt werden. Je nach Ionengehalt des verwendeten Wassers und markenspezifischen Zusätzen zur Alkalitätseinstellung des Wassers (z.B.  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ) sind charakteristische Unterschiede in der Leitfähigkeit und der Anionenzusammensetzung festzustellen. Generell ist die Wasserqualität bei der Herstellung von Spirituosen von großer Bedeutung, um beispielsweise qualitätsmindernde Ausscheidungen und Trübungen auszuschließen. Daher wird das Wasser – insbesondere bei Premium-Marken – zumeist durch Ionenaustausch oder Umkehrosmose demineralisiert. Filtrationsmaßnahmen durch Aktivkohle können sich anschließen. Discountprodukte werden dagegen zumeist mit „Leitungswasser“ hergestellt und weisen höhere Ionengehalte auf [1]. Die Ionengehalte zeigen geringe Chargenunterschiede, jedoch liegen große Unterschiede zwischen verschiedenen Herstellern vor [1, 2]. Eine Charakterisierung von Spirituosen ist daher generell anhand ihres Wasseranteils möglich.

### Leitfähigkeitsmessung als Screening-Verfahren

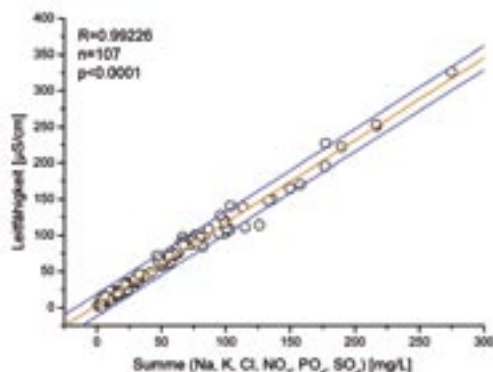


Abb. 1: Korrelation zwischen dem Ionengehalt und der Leitfähigkeit von 107 Wodka-Proben.

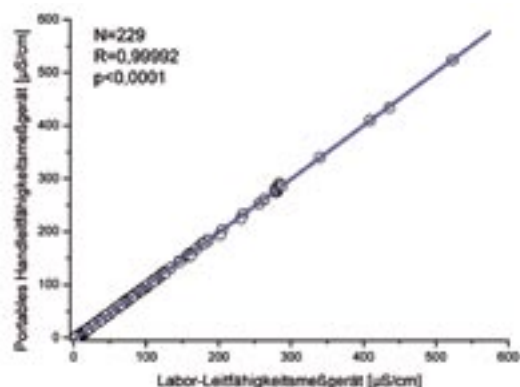


Abb. 2: Vergleich der Analyseergebnisse von 229 Wodka-Proben zwischen einem Labor-Leitfähigkeitsmessgerät (inoLab 83 Cond Level 2 P von WTW) und einem portablen Leitfähigkeitsmessgerät (DIST 3 von Hanna Instruments).

Bei Wodka wird die Leitfähigkeit ausschließlich durch die ionische Zusammensetzung des Wassers beeinflusst (Abb. 1). Portable batteriebetriebene Leitfähigkeitsmessgeräte (ca. 50 EUR) erlauben eine Vorort-Prüfung in Gaststätten durch die Lebensmittelkontrolleure. Leitfähigkeitsmessungen mit einem Labor- und einem portablen Meßgerät zeigen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 2). Proben für eine Bestätigung im Labor können somit auf einfache Weise vorselektiert werden. Weitere Details zur Leitfähigkeitsmessung von alkoholischen Getränken sind in [3] publiziert. Oft erübrigt sich die aufwendigere chromatographische Bestimmung der Ionengehalte vollkommen, wenn bereits bei den Leitfähigkeiten eine signifikante Abweichung zwischen den zu unterscheidenden Produkten vorliegt. Dies ist z.B. der Fall bei Wodka-Premiummarken und Discountprodukten (Abb. 3).

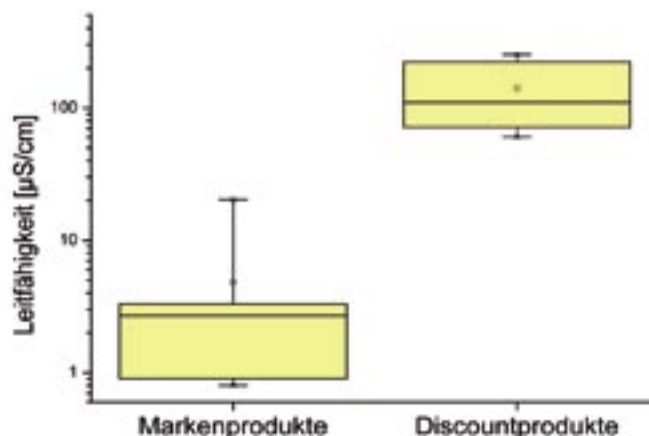


Abbildung 3: Vergleich der Leitfähigkeiten von Marken- und Discount-Wodkas

### Fazit

Die Leitfähigkeitsmessung ist momentan das einzige Screeningverfahren, das eine Markenzuordnung von alkoholischen Getränken direkt „vor Ort“ ermöglicht. Eine eindeutige Unterscheidung ist mit diesem einfachen Verfahren fast immer möglich, da Markenprodukte eine deutlich geringere Leitfähigkeit aufweisen als die häufig zur Verfälschung verwendeten Discountprodukte. Ionenchromatographie kann mit ihrer hohen Selektivität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zur Absicherung der Befunde dienen.

### Literatur

1. Lachenmeier, D.W.; Attig, R.; Frank, W.; Athanasakis, C.: Eur. Food Res. Technol., 218, 105–110 (2003)
2. Arbutov, V.N.; Savchuk, S.A.: J. Anal. Chem., 57, 428–433 (2002)
3. Lachenmeier, D.W.; Schmidt, B.; Bretschneider, T.: Microchim. Acta (2008) 160, 283–289

## 6.5 Bestimmung von Aloe Vera in kosmetischen Mitteln mittels

### Densitometrie

**Aloe Vera ist ein beliebter kosmetischer Rohstoff, da dieser Pflanze positive hautpflegende Eigenschaften nachgesagt werden, die sich werbewirksam ausloben lassen. Für die Kosmetik bedeutsam ist das Innere des Blattes. Es enthält ein Gel, das bis zu 99,5% aus Wasser besteht. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist der wertgebende Inhaltsstoff die Aloverose, eine acetylierte Polymannose (Acemannan). Ein Abbau von Aloverose deutet auf unsachgemäße Herstellung und Lagerung des Aloe-Vera-Gels hin.**

Das Gel der Aloe-Vera-Pflanze enthält ca. 5 g Feststoffe pro 1000 g frischem Gel; neben durchschnittlich 1 g Aloverose u.a. auch Äpfelsäure und Glucose. Das Aloe-Vera-Gel wird auch als aufkonzentrierter Rohstoff (z.B. 10-fach oder 200-fach) angeboten. Die Bestimmung der Aloverose erfolgt mit einem neu entwickelten Verfahren über den Baustein Mannose nach Hydrolyse.

Wertgebender  
Inhaltsstoff  
in Aloe Vera:  
Aloverose

---

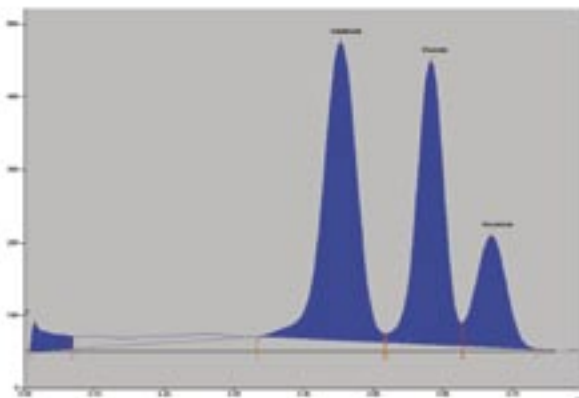
## Grundlagen des Verfahrens

1–5g Probe werden in Wasser gelöst, lipophile Probenbestandteile werden aus der angesäuerten Probelösung durch Ausschütteln mit Diethylether abgetrennt. Aloverose wird durch Hydrolyse (niedriger pH-Wert, 3 Stunden Reaktionsdauer bei 85°C) bis auf den Baustein Mannose abgebaut. Mannose wird mittels Dünnschichtchromatographie von anderen Kohlenhydrat-Probenbestandteilen abgetrennt. Der Nachweis erfolgt mit 4-Aminobenzoesäure (fluoreszierende Verbindung). Die densitometrische Auswertung erfolgt mittels Camag DC Scanner III anhand externer Kalibrierkurve mit Software winCATS. Eine zusätzliche Chromatographie der Probe ohne Hydrolyse ergibt weitere Informationen. Bei Anwesenheit von Aloe Vera muss Glucose nachweisbar sein. Mannosehaltige Dickungsmittel, wie Xanthan oder Galaktomannane, stören. Sie werden über charakteristische Bausteine, wie die Glucuronsäure bei Xanthan und Galaktose bei den Galaktomannanen, bestimmt und über deren Verhältnis zu Mannose in Abzug gebracht. Wasserstoffperoxid stört und muss deshalb vor der Hydrolyse durch Kaliumiodid zerstört werden.

## Dünnschichtchromatographie und Densitometrie

- Stationäre Phase: HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 × 10 cm, Vorher imprägnieren: 1 s in 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung tauchen, antrocknen (Lit. 1) lassen und anschließend 5 min auf der Heizplatte bei 60°C fertig trocknen
- Auftragung: bandförmig mittels Camag Automatic TLC Sampler 4, Probelösung „ohne Hydrolyse“ und „Hydrolyse“ nebeneinander, daneben Kalibrierreihe
- Mobile Phase: 0,1M Ameisensäure/i-Propanol/Aceton (10/20/20 ml) – keine Kammersättigung. Um bessere Auftrennung der Kohlenhydrate (besonders bei hohem Anteil Glucose) zu erzielen, wird zweimal im gleichen Fließmittel entwickelt. Nach erstem und zweitem Lauf wird die Platte 5 min bei 60°C getrocknet.
- Laufhöhe: 9 cm
- Derivatisierung: 4-Aminobenzoesäure-Reagenz; die Platte 1 s tauchen, 10 min auf der Heizplatte bei 110°C derivatisieren, (Lit. 2)
- Detektion: mit Hilfe von Camag TLC Scanner 3, Wellenlänge 366 nm, Fluoreszenzmessung mit Hg-Lampe
- Auswertung: computerunterstützt mit dem Programm winCATS Planar Chromatography Manager; Auswertung über die Fläche

Abbildung: Chromatogramm Galaktose, Glukose, Mannose aus Aloverose





---

### Verfahrenskenndaten

- Eignung der Methode: Bestimmungsgrenze von Aloe Vera Gel 3 g in 100 g Produkt
- Arbeitsbereich der Kalibrierreihe: 8–80 ng Mannose (aus Aloverose) pro Auftragsmenge.
- Verfahrensvariationskoeffizient der Kalibrierreihe aus reinen Testlösungen (bei Zugrundelegung einer linearen Korrelation): 3,5%.
- Verfahrensvariationskoeffizient einer Matrixkalibration (bei Zugrundelegung einer linearen Korrelation): 7,5% (akzeptabel für den Verwendungszweck der Methode).

### Besondere Hinweise

- Die Monosaccharide Mannose, Glukose, Galactose sind aufgrund geringer Polaritätsunterschiede schwer zu trennen. Bessere Trennung wird erzielt durch Imprägnieren des Plattenmaterials (HPTLC) mit Natriumdihydrogenphosphatlösung (Erhöhung der Polarität) und zweimalige Chromatographie.
- Das Derivatisierungsreagenz p-Aminobenzoessäure ist gegenüber anderen in der Zuckeranalytik eingesetzten Derivatisierungsreagenzien wie z. B. Diphenylamin-Anilinreagenz empfindlicher.
- Die Analyse der Probe vor und nach der Hydrolyse lässt erkennen, ob Mannose als Monosaccharid zugesetzt wurde.
- Bei Anwesenheit von Xanthan wird auf der Basis folgender Überlegung vorgegangen: Xanthan enthält im Durchschnitt 26 g/kg Glucuronsäure und 246 g/kg Mannose (bestimmt nach diesem Verfahren). Die Glucuronsäure wird in einem separaten Chromatographieverfahren bestimmt (Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin). Über die Glucuronsäure wird nach Standardverhältnis Glucuronsäure zu Mannose die dem Xanthan zugehörige Mannosemenge errechnet und von der Gesamtmannosemenge abgezogen. Die „Rest“mannosemenge wird dann als Aloverose berechnet.
- Die Vorgehensweise bei Anwesenheit mannosehaltiger Dickungsmittel und Störungen bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (z.B. in Blondiersprays) ist im hausinternen Prüfverfahren beschrieben. Darauf wird allerdings im Rahmen des Jahresberichtes nicht eingegangen. Eine detaillierte Vorschrift wird auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

### Literatur:

1. Q. BI (BI Qionsi), L. LU (Lu Li), H. LIN (Lin Huixiang), (Dep. Chem. Eng., Hunan Univ., Bhangsha, 410082 P.R. China): (Determination of glucomannan and starch in Konjaku by thin-layer chromatography) (Chinese). J. Chinese Chromatogr. 8, 198, 158 (1990).
2. G. LODI\*, C. BIGHI, V. BRANDOLINI, E. MENZIANI, B. TOSI, (\*Dipartimento di Chimica, via L. Borsari 345, Univ. di Ferrara, I-44100 Ferrara, Italy): Automated multiple development HPTLC analysis of sugars on hydrophilic layers: II. Diol layers. J. Planar Chromatogr. 10, 31-37 (1997).