

Zur gaschromatographischen Bestimmung von Essigsäure in Gemüsesäften

HEIDRUN UNTERWEGER und FRANZ BANDION

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
A-1226 Wien, Spargelfeldstraße 191
e-mail: heidrun.unterweger@ages.at

In der vorliegenden Arbeit wird ein gaschromatographisches Verfahren mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID) zur Bestimmung von Essigsäure in Gemüsesäften beschrieben. Durch Spülung des GC-Systems mit Metaphosphorsäure wird die Verschleppung von Essigsäure und somit die Bildung von Geisterpeaks vermindert sowie die Probe stabilisiert. Unter Einbeziehung dieser Methodik lassen sich die matrixbedingten Probleme bei der analytischen Erfassung dieser biogenen Säure bewältigen. Die Absicherung der GC-FID-Ergebnisse erfolgt im Wege der Bestimmung mittels eines massenselektiven Detektors (GC-MSD). Die Bestimmungsgrenze liegt bei Gemüsesaft - unter der Voraussetzung einer entsprechenden Anpassung der Probenverdünnung - durchwegs im Bereich von unter 0,01 g Essigsäure/l. Die Essigsäuregehalte von 23 Gemüsesäften wurden sowohl mittels GC-FID und enzymatischer Methode ermittelt und die Ergebnisse gegenübergestellt.

Schlagwörter: Gemüsesäfte, Essigsäure, Bestimmung, GC-FID, GC-MSD

Gaschromatographic determination of acetic acid in vegetable juices. A gaschromatographic procedure with flame ionisation detection (GC-FID) for the determination of acetic acid in vegetable juices is described. Rinsing the GC-systems with metaphosphoric acid decreases the ghosting of acetic acid and resulting formation of ghosting peaks and stabilizes the sample. Employment of this method facilitates management of problems caused by the matrix and with the analytical determination of this biogenic acid. Verification of the GC-FID results is done by means of determination with a mass selective detector (GC-MSD). The detection limit for vegetable juices - an appropriate adaption of sample dilution given - is below 0.01 g acetic acid/l. Acetic acid contents of 23 vegetable juices were determined by means of GC-FID and an enzymatic method as well and compared.

Key words: Vegetable juices, acetic acid, determination, GC-FID, GC-MSD

La détermination de la teneur des jus de légumes en acide acétique par chromatographie en phase gazeuse. Le présent article décrit une méthode destinée à déterminer la teneur des jus de légumes en acide acétique par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un détecteur d'ionisation de flamme (GC-FID). Le rinçage du système GC avec de l'acide métaphosphorique sert, d'une part, à réduire l'entraînement de l'acide acétique et donc la formation de pics fantôme, et, d'autre part, à stabiliser l'échantillon. L'application de cette méthode permet de surmonter les problèmes dus aux matrices dans la détection analytique de cet acide biogène. Les résultats du GC-FID sont vérifiés par voie de détermination au moyen d'un détecteur de masse (GC-MSD). À condition que l'échantillon ait été dilué de manière correspondante, la limite de détermination pour le jus de légumes se situe sans exception au-dessous de 0,01 g d'acide acétique/l. Les teneurs en acide acétique de 23 jus de légumes ont été déterminées tant par GC-FID que par la méthode enzymatique, et les résultats ont été comparés.

Mots clés : jus de légumes, acide acétique, détermination, GC-FID, GC-MSD

Die Herstellung von Gemüsesäften wird u.a. durch die besondere Anfälligkeit der Produkte gegen qualitätsbeeinträchtigende und mikrobiell induzierte Stoffumsetzungen geprägt. Derartige Aktivitäten von Mikroorganismen sind häufig durch eine Synthese von Essigsäure

charakterisiert. Über die analytische Erfassung dieser Säure lassen sich daher Hinweise bezüglich der bei der Herstellung und Lagerung solcher Getränke gegebenen mikrobiologischen Qualitätsveränderungen ableiten. Zur Bestimmung von Essigsäure in Gemüsesäften ste-

hen in der Getränkeanalytik mehrere Prüfstrategien zur Verfügung. So wird seit langer Zeit der Gehalt an Essigsäure im Wege der Bestimmung der „Flüchtigen Säure(n)“ indirekt erfasst. Begrifflich wird dazu in der Regel die Gesamtheit der unter definierten Bedingungen flüchtigen sauren Verbindungen mit Ausnahme von Kohlendioxid und Schwefeldioxid verstanden. Wegen der im Bereich der flüchtigen sauren Verbindungen von Getränken regelmäßig gegebenen weitgehenden Dominanz von Essigsäure werden die Analysenwerte normalerweise auf diese Säure bezogen bzw. berechnet. Für die Bestimmung ist häufig eine Abtrennung mit Wasserdampf und eine Titration des entkarbonisierten Destillates mit Lauge vorgesehen. Der von allfällig vorhandener Schwefliger Säure verursachte erhöhte Alkaliverbrauch wird dabei auf jodometrischem Wege korrekturmäßig berücksichtigt (z.B. IFU, 1968) oder vernachlässigt (z.B. BgVV, 1983). „Flüchtige Säuren“ lassen sich auch über einen nach dem Abdampfen der Probe verbleibenden Rückstand bestimmen: Die Differenz aus dem Säuregehalt der Probe (Gesamtsäure) und dem Säuregehalt des Abdampfrückstandes wird den „Flüchtigen Säuren“ rechnerisch zugeordnet (z.B. BgVV, 1987).

Als Vorteil der indirekten Verfahren zur Bestimmung von Essigsäure ist vor allem die vergleichsweise einfache und rasche Ausführbarkeit dieser Untersuchungen zu werten, weshalb sie auch bei einschlägigen qualitätsbezogenen Regelungen Berücksichtigung finden. Z.B. wurde von der „Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union“ (A.I.J.N., 1996) für Frucht- und Gemüsesäfte ein Höchstwert an „Flüchtigen Säuren“ mit 0,4 g/l bzw. 0,4 g/kg, berechnet als Essigsäure, festgelegt. Demgegenüber sind solche Verfahren mit grundlegenden und keineswegs exakt kalkulierbaren Unsicherheiten behaftet. So besteht z.B. wegen der thermischen Belastung der Proben bei der Untersuchung die Möglichkeit von relevanten Veränderungen im Säurekomplex. Weiters ist eine präzise Standardisierung der Prüfbedingungen nicht zu realisieren, was im Hinblick auf die in wässrigen Medien vergleichsweise geringe Flüchtigkeit der zu bestimmenden Säuren zum Tragen kommt. Schließlich beeinflussen die in der jeweiligen Probe produktspezifisch vorhandenen flüchtigen und sauer bzw. basisch reagierenden Inhaltsstoffe die Prüfergebnisse, ein Sachverhalt, dem bei Gemüsesäften eine besondere Bedeutung zukommt. Solche Verfahren zur indirekten Bestimmung von Essigsäure liefern daher Prüfergebnisse und Beurteilungsgrundlagen, die bezüg-

lich der Schlussfolgerungen mit entsprechender Vorsicht betrachtet werden müssen.

Dieser Mangel ist bei einer direkten Erfassung der Essigsäure nicht gegeben. Dazu gelangen in der Getränkeanalytik enzymatische Verfahren zur Anwendung (Boehringer Mannheim, 1997; IFU, 1996). Als Vorteil dieser Prüfstrategie ist die vergleichsweise rasche Ausführbarkeit und die Möglichkeit zur Bewältigung auch größerer Probenserien ins Kalkül zu ziehen. Demgegenüber sind Störungen dieser Verfahren in komplexen Naturstoffgemischen, wie sie z.B. Gemüsesäfte darstellen, von Haus aus nicht auszuschließen und bisweilen auch nicht zu beheben. Zur Bestimmung von Essigsäure in Getränken stehen auch zahlreiche gaschromatographische Verfahren zur Verfügung (z.B. YANG and CHOONG, 2001). Diese hinsichtlich der Spezifität vergleichsweise günstige und vielfach konkurrenzlose Prüfstrategie bietet Möglichkeiten zur Untersuchung von komplex zusammengesetzten Proben. Bei der einschlägigen Bestimmung von Essigsäure begründet jedoch vor allem die hohe Polarität dieser Substanz sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht eminente chromatographische Trennprobleme. Solche Störungsmöglichkeiten (z.B. Verschleppungen des Analyten im Trennsystem, Auftreten von „Geisterpeaks“, Instabilität des chromatographischen Systems) werden vielfach nicht ausreichend berücksichtigt, zumal deren Abdeckung bzw. Behebung einen erheblichen Aufwand erfordert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Methodik entwickelt, die im Wege einer weitgehenden und auf Gemüsesäfte speziell abgestellten Automatisierung der chromatographischen Verfahrensabläufe eine sichere sowie relativ kostenschonende Bestimmung von Essigsäure ermöglicht.

Material und Methoden

Chemikalien und Lösungen**)

Essigsäure (Eisessig) zur Analyse, mind. 99,8 % (z.B. Merck, Art. Nr. 1.00063.1000)

Propionsäure puriss., mind. 99,5 % (z.B. Fluka, Art. Nr. 81910)

Metaphosphorsäure zur Analyse, mind. 40 % (z.B. Merck, Art. Nr. 546)

Essigsäure-Standardlösung A (ca. 20 g/l)***):

In einem 20 ml Kolben werden ca. 10 ml Wasser vorgelegt und das Gewicht bestimmt. Nach Zugabe von ca.

0,4 g Essigsäure wird das Gewicht erneut bestimmt, anschließend mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. ^{a)}*)***)

Essigsäure-Standardlösung B (ca. 2,0g/l):

2 ml Essigsäure-Standardlösung A werden mit Wasser zu 20 ml verdünnt. *)

Essigsäure-Standardlösung C (ca. 0,20 g/l):

0,2 ml Essigsäure-Standardlösung A werden mit Wasser zu 20 ml verdünnt. *)

Propionsäure-Standardlösung (40,0 g/l) - Interne Standardlösung (ISTD):

In einem 100 ml Kolben werden ca. 50 ml Wasser vorgelegt und das Gewicht bestimmt. Nach Zugabe von 4 g Propionsäure wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. ^{b)}*)

Metaphosphorsäure-Stammlösung (ca. 50 g/l):

12,5 g Metaphosphorsäure werden in Wasser zu 100 ml gelöst. ^{c)}*)

Metaphosphorsäure-Lösung 1 (ca. 5 g/l):

5 ml Metaphosphorsäure-Stammlösung werden mit Wasser zu 50 ml verdünnt. *)

Anmerkungen

^{a)} Vor dem Einsatz von Essigsäure als Standard ist auf die Abwesenheit von Propionsäure zu prüfen.

^{b)} Vor dem Einsatz von Propionsäure als interner Standard ist auf die Abwesenheit von Essigsäure zu prüfen.

^{c)} Vor dem Einsatz von Metaphosphorsäure ist auf die Abwesenheit von Essigsäure und Propionsäure zu prüfen.

*) Die Lösung ist bei +4 °C mindestens zwei Monate haltbar.

**) Sofern bei den Ansätzen „Wasser“ zu deren Herstellung verwendet wird, ist darunter Reinstwasser mit den nachfolgenden Spezifikationen zu verstehen:

Reinstwasser, hergestellt z.B. mit Milli-Q Plus Reagent Grade Water Purification System, Fa. Millipore, gespeist mit durch Umkehrosmose und nachgeschaltetem Ionentauscher gereinigtem Wasser

(Firmenspezifikation: Widerstand 18,2 Megaohm .cm, < 10 ppb TOC und Partikelfreiheit > 0,22 µm).

**) Konkreter Essigsäuregehalt der Standardlösung A in g/l = Einwaage in Gramm x 50

Bedingungen für die gaschromatographische Untersuchung mit Flammenionisationsdetektor (FID)

Gaschromatograph: Hewlett-Packard 5890 II GC mit FID, MS-DOS-Auswertestation und automatischem Probengeber HP 7673A

Säule: Permabond - FFAP (Nitroterephthalsäure modifiziertes Polyethylenglycol), Fused Silica-Kapillarsäule; 30 m Länge; 0,25 mm innerer Durchmesser; 0,25 µm Filmdicke; Vertrieb z.B. Macherey-Nagel, Prod.Nr. 723116.30

Trägergas: Helium 5.0

Säulenkopfdruck: 10 psi

Mittlere Strömungsgeschwindigkeit [µ]: 22 cm/sec bei 40 °C

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 40 °C

Haltezeit 1: 0,5 min

Aufheizrate 1: 10 °C/min

Endtemperatur 1: 180 °C

Haltezeit 2: 0 min

Aufheizrate 2: 50 °C/min

Endtemperatur 2: 220 °C

Haltezeit 3: 5 min (Ausheizphase)

FID-Brenngase: 30 ml/min Wasserstoff 5.0; 300 ml/min synthetische Luft (KW-frei)

Hilfsgas: 40 ml/min Stickstoff 4.0

Injektortemperatur: 200 °C

Detektortemperatur: 230 °C

Einspritzmodus: Split-Modus; 50 ml/min Splitfluss; Splitverhältnis ca. 1:40 bei 40 °C; Probeninjektion mit HP 7673A (automatischer Probengeber), weiter SiltekTM ^{d)}-Inlet Liner mit 4 mm innerem Durchmesser und silyliertem Glaswollpfropfen

Einspritzmenge: 1 µl

Retentionszeit von Essigsäure unter den genannten Bedingungen: 12,9 min ^{e)}

Retentionszeit von Propionsäure unter den genannten Bedingungen: 14,2 min ^{e)} ^{f)}

Analysendauer je Injektion mit Ausheiz- und Abkühlphase: ca. 25 min

d) Spezielles Deaktivierungsverfahren der Fa. Restek (Vertrieb z.B. Fa. CP-Analytica, Restek Prod.Nr. 20 773-214.1)

e) Siehe dazu auch Abbildung 1

f) Interner Standard (ISTD)

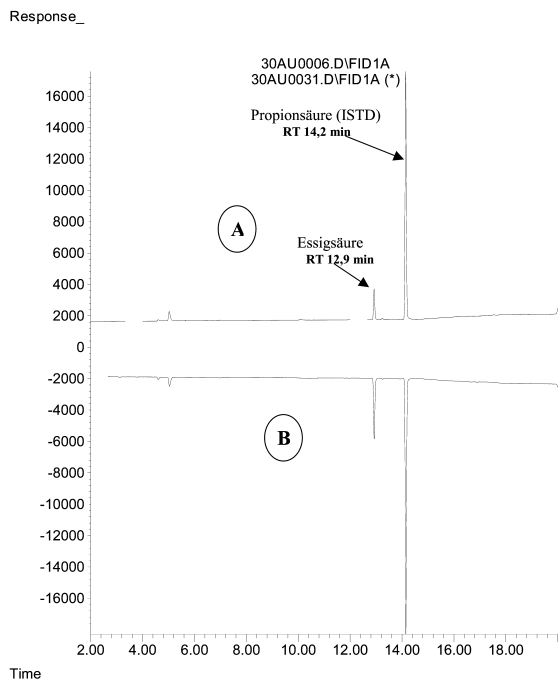


Abb. 1: Gespiegelte FID-Chromatogramme

A = Weißkrautsaft mit einem natürlichen Gehalt von 4,2 g Essigsäure/l (1:10 (v/v) Verdünnung)

B = Weißkrautsaft mit einem natürlichen Gehalt von 4,2 g Essigsäure/l und einer zusätzlichen Dotation von 4,2 g Essigsäure/l [1:10 (v/v) Verdünnung]

Bedingungen für die gaschromatographische Untersuchung mit massenselektivem Detektor (MSD)

Gaschromatograph: Hewlett-Packard 5890 II GC gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor HP 5971, MS-DOS-Auswertestation und automatischem Probengeber HP 7673A

Säule: Permabond-FFAP, Fused Silica-Kapillarsäule, 30 m Länge; 0,25 mm innerer Durchmesser; 0,25 µm

Filmdicke, Vertrieb z.B. Macherey-Nagel, Prod. Nr. 723116.30

Trägergas: Helium 5.0

Säulenkopfdruck: 10 psi

Mittlere Strömungsgeschwindigkeit [µ]: 41 cm/sec bei 40 °C

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur 40 °C

Haltezeit 1: 0,5 min

Aufheizrate 1: 10 °C/min

Endtemperatur 1: 180 °C

Haltezeit 2: 0 min

Aufheizrate 2: 50 °C/min

Endtemperatur 2: 220 °C

Haltezeit 3: 5 min (Ausheizphase)

Injektortemperatur: 200 °C

Interfacetemperatur: 230 °C

Einspritzmodus: Split-Modus; 50 ml/min Splitfluss, Splitverhältnis ca. 1:40 bei 40 °C, Probeninjektion mit HP 7673A (automatischer Probengeber), weiter SiltekTM d)-Inlet Liner mit 4 mm innerem Durchmesser und silyliertem Glaswollpfropfen

Einspritzmenge: 1 µl

Massenspektrometrische Parameter

Ionisierungsart: Elektronenstoßionisation

Ionisierungsenergie: 70 eV

Aufnahmemodus:

SCAN für die qualitative Bestimmung

Scanrate: 10 m/e bis 150 m/e

SIM (Selected Ion Monitoring) für die quantitative Bestimmung:

Akquirierte Ionen für Essigsäure

(Zeitfenster von 8 min bis 9,7 min)

Targetion: 60 m/e; Qualifier: 45 m/e

Akquirierte Ionen für Propionsäure (ISTD)

(Zeitfenster von 9,7 min bis 12 min)

Targetion: 74 m/e; Qualifier: 73 m/e

Retentionszeit von Essigsäure unter den genannten Bedingungen: 9,1 min

Retentionszeit von Propionsäure ^{e)} unter den genannten Bedingungen: 10,1 min

Analysendauer je Injektion mit Ausheiz- und Abkühlphase: ca. 30 min

^{e)} Interner Standard (ISTD)

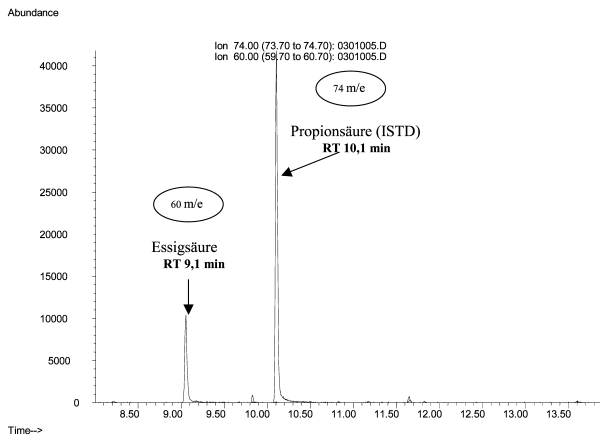


Abb. 2: Totalionenchromatogramm (SCAN 10 m/e bis 150 m/e) eines Weißkrautsaftes (natürlicher Essigsäuregehalt 4,2 g/l [1:10 (v/v) Verdünnung], dargestellt auf den selektiven Ionenspielen 60 m/e (Targetion von Essigsäure) und 74 m/e [Targetion von Propionsäure (ISTD)]

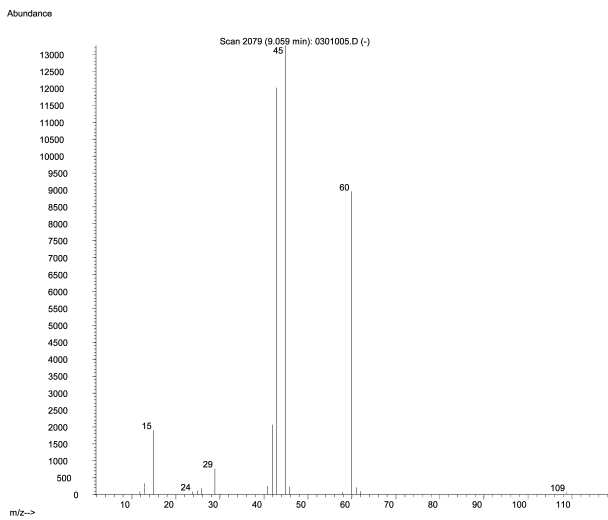


Abb. 3: Massenspektrum von Essigsäure unter den angegebenen Versuchsbedingungen aufgenommen (siehe Abb. 2)

Untersuchung der Proben

Herstellung des Probeansatzes

2 ml Probe (falls die Probe eine relevante Trübung aufweist, ist eine vorherige Homogenisierung durch Schütteln vorzunehmen) werden in einen mit ca. 10 ml Wasser beschickten 20 ml Messkolben gegeben, mit 1 ml interner Standardlösung (ISTD = Propionsäure 40 g/l)

und 2 ml Metaphosphorsäure-Stammlösung (ca. 50 g/l) versetzt und mit Wasser unter Schütteln bis knapp unter das Nennvolumen verdünnt. Nach Thermostatisierung bei 20 °C wird die Probelösung mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. Dies entspricht einer 1:10 (v/v) Verdünnung der Probe. Das Verdünnungsverhältnis kann jedoch bei extrem niedrigen oder hohen Gehalten an Essigsäure verändert bzw. an die Probenbeschaffenheit ohne methodische Veränderungen angepasst werden.

Aliquote Anteile dieses Probeansatzes werden für die Bestimmung der „Probeerwerte“ und der einzelnen Standardadditionen verwendet (siehe Abschnitt b und Tab. 2).

Quantifizierung von Essigsäure

Die quantitative Bestimmung von Essigsäure wird normalerweise im Wege einer externen 8-Punkt-Kalibrierung vorgenommen (Abbildung 4). Bei als problematisch einzustufenden Proben (z. B. stark gefärbte/hochviskose/stark trübe Gemüsesäfte) sind zweckmäßigerweise zur Absicherung des extern ermittelten Analysenwertes auch Standardadditionen (mindestens zwei Dotationen) auszuführen. Die Dotierung soll sich möglichst auch in der mengenmäßig gleichen bzw. halben Größenordnung bewegen, wie sie über das zu prüfende Produkt im Probenansatz vorliegt. Wegen der im Split-Modus ausgeführten gaschromatographischen Analyse muss die Berechnung der Essigsäure grundsätzlich über relative Peakflächen erfolgen. Die so ermittelten Werte werden unter Einbeziehung des jeweiligen Verdünnungsfaktors (in der Regel 10) als Gramm Essigsäure pro Liter Gemüsesaft mit zwei Dezimalen angegeben.

a) Externe Kalibrierung:

In einen 20 ml Messkolben werden 1 ml interne Standardlösung (ISTD = Propionsäure ca. 40 g/l) und 2 ml Metaphosphorsäure-Stammlösung (ca. 50 g/l) gegeben und mit Wasser unter Schütteln bis knapp unter das Nennvolumen versetzt. Nach Thermostatisierung bei 20 °C wird der Ansatz mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt („Grundlösung“).

Für die Quantifizierung von milchsauer vergorenen Gemüsesäften werden Ansätze über den Konzentrationsbereich von ca. 0,05 g Essigsäure/l bis ca. 2 g Essigsäure/l hergestellt (Pipettierschema siehe Tabelle 1a und ergänzend dazu Abb. 4). Diese Kalibrierlösungen werden ebenso wie der Probeansatz direkt der gaschromatographischen Analyse unterzogen (Abb. 1 und 2).

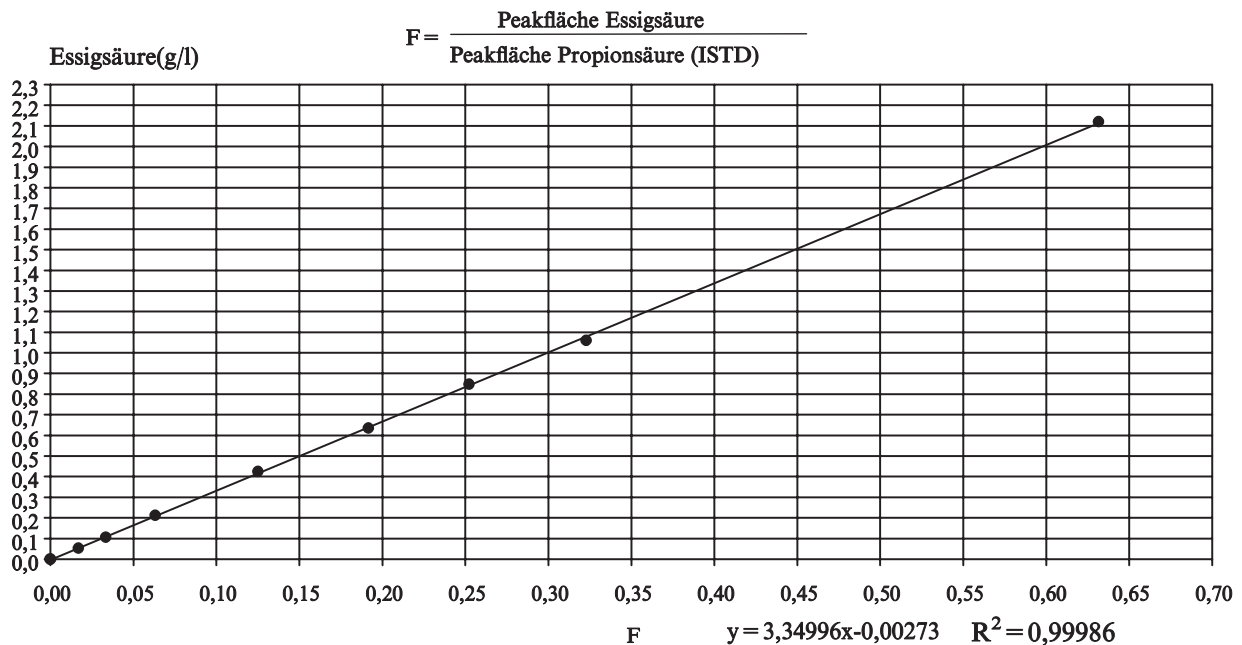


Abb. 4: Beispiel einer externen Kalibrierfunktion für Essigsäure in Metaphosphorsäure-hältiger wässriger Lösung (Herstellung siehe Tabelle 1a)

Die Kalibrierlösungen sind bei 4 °C mindestens einen Monat haltbar. Hingegen sollte der Probeansatz möglichst rasch - d.h. innerhalb von 24 Stunden - der Analyse zugeführt werden. Zur Probensequenz siehe beispielhaft Tabelle 3.

Bei nicht fermentierten Gemüsesäften wird auf Grund der zu erwartenden geringen Essigsäuregehalte zweckmäßigerweise ein Konzentrationsbereich von ca. 0,005 g Essigsäure/l bis ca. 0,2 g Essigsäure/l eingestellt (Pipettierschema siehe Tabelle 1b).

Zur Kontrolle des gaschromatographischen Systems und zur Absicherung der ermittelten Werte wird innerhalb einer Probensequenz mindestens eine Probe mit einer definierten Menge an Essigsäure versetzt, wobei sich die Dotation in der gleichen bzw. halben mengenmäßigen Größenordnung bewegen soll, wie sie über das zu prüfende Produkt bereits im Probeansatz vorliegt. Der Gehalt wird dann sowohl über die externe Kalibrierfunktion als auch nach dem Standardadditionsverfahren berechnet und ein Vergleich der solcherart ermittelten Ergebnisse vorgenommen.

Hinweis zur Verwendung von Propionsäure als interner Standard (ISTD):

Zur Vermeidung von systematischen Fehlern ist es notwendig, eine 1:10 (v/v) Verdünnung der Probe ohne

Propionsäurezugabe (ISTD) der GC-FID-Analyse zu unterziehen. In der Regel wird durch diese Verdünnung die auch in der Probe natürlich vorkommende Propionsäure nicht mehr detektierbar, stört also die Berechnung über eine externe Kalibrierfunktion nicht. Sollte jedoch die Probe einen relevanten Gehalt an Propionsäure aufweisen, muss die Quantifizierung auf jeden Fall im Wege eines Standardadditionsverfahrens ausgeführt werden!

b) Standardadditionsverfahren:

Aus dem Probeansatz werden nach nochmaliger Homogenisierung sofort jeweils Teilmengen von 1 ml entnommen und in mit Septum dicht verschließbare Fläschchen (z.B. 2 ml-Glasfläschchen Agilent, Prod. Nr. 5181-3375) abgefüllt. Zwei Ansätze dienen als so genannter „Probeleerwert“ a bzw. b. Für die Quantifizierung von milchsauer vergorenen Gemüsesäften werden sodann mit Essigsäure dotierte Ansätze über den Konzentrationsbereich von ca. 0,05 g Essigsäure/l bis ca. 2 g Essigsäure/l hergestellt (Pipettierschema siehe Tab. 2). Diese Lösungen werden direkt der gaschromatographischen Analyse unterzogen (siehe Abb. 1 und 2).

Bei nicht fermentierten Gemüsesäften wird zweckmä-

Tabelle 1 a:

Pipettierschema für eine externe Kalibrierung von Essigsäure in Metaphosphorsäure-hältiger wässriger Lösung im höheren Konzentrationsbereich

Kalibrierlösungen	Essigsäure	Grundlösung ¹⁾	Essigsäure-Standardlösung ²⁾		Ausgleich- volumen ³⁾
	[g/l]	[ml]	Bezeichnung	[μ l]	[μ l]
Nulllösung	0	1	–	0	100
Kalibrierlösung 1	0,053	1	B	25	75
Kalibrierlösung 2	0,106	1	B	50	50
Kalibrierlösung 3	0,212	1	B	100	0
Kalibrierlösung 4	0,424	1	A	20	80
Kalibrierlösung 5	0,636	1	A	30	70
Kalibrierlösung 6	0,848	1	A	40	60
Kalibrierlösung 7	1,060	1	A	50	50
Kalibrierlösung 8	2,120	1	A	100	0

¹⁾ „Grundlösung“: siehe Arbeitsanleitung in Abschnitt a) Externe Kalibrierung

²⁾ Herstellung siehe in Abschnitt „Chemikalien und Lösungen“ (konkreter Gehalt der Essigsäure-Standardlösung A = 21,21g/l)

³⁾ Wasser

Tabelle 1 b:

Pipettierschema für eine externe Kalibrierung von Essigsäure in Metaphosphorsäure-hältiger wässriger Lösung im niedrigeren Konzentrationsbereich

Kalibrierlösungen	Essigsäure	Grundlösung ¹⁾	Essigsäure-Standardlösung ²⁾		Ausgleich- volumen ³⁾
	[g/l]	[ml]	Bezeichnung	[μ l]	[μ l]
Nulllösung	0	1	–	0	100
Kalibrierlösung 1	0,0053	1	C	25	75
Kalibrierlösung 2	0,0106	1	C	50	50
Kalibrierlösung 3	0,0212	1	C	100	0
Kalibrierlösung 4	0,0424	1	B	20	80
Kalibrierlösung 5	0,0636	1	B	30	70
Kalibrierlösung 6	0,0848	1	B	40	60
Kalibrierlösung 7	0,1060	1	B	50	50
Kalibrierlösung 8	0,2120	1	B	100	0

¹⁾ „Grundlösung“: siehe Arbeitsanleitung in Abschnitt a) Externe Kalibrierung

²⁾ Herstellung siehe in Abschnitt „Chemikalien und Lösungen“ (konkreter Gehalt der Essigsäure-Standardlösung A = 21,21g/l)

³⁾ Wasser

Tabelle 2:

Pipettierschema zur Herstellung der Probelösungen im Rahmen eines Standardadditionsverfahrens bei milchsauer vergorenen Gemüsesäften

Lösungen	Dotation	Probeansatz ⁴⁾	Essigsäure-Standardlösung ⁵⁾		Ausgleich-
	Essigsäure		Bezeichnung	[μ l]	volumen ⁶⁾
	[g/l]	[ml]			[μ l]
Probeleerwert	0	1	–	0	100
Probeleerwert + Dotation 1	0,053	1	B	25	75
Probeleerwert + Dotation 2	0,106	1	B	50	50
Probeleerwert + Dotation 3	0,212	1	B	100	0
Probeleerwert + Dotation 4	0,424	1	A	20	80
Probeleerwert + Dotation 5	0,636	1	A	30	70
Probeleerwert + Dotation 6	0,848	1	A	40	60
Probeleerwert + Dotation 7	1,060	1	A	50	50
Probeleerwert + Dotation 8	2,120	1	A	100	0

⁴⁾ Siehe Arbeitsanleitung in Abschnitt „Herstellung des Probeansatzes“

⁵⁾ Herstellung siehe in Abschnitt „Chemikalien und Lösungen“ (konkreter Gehalt der Essigsäure-Standardlösung A = 21,21g/l)

⁶⁾ Wasser

ßigerweise ein Konzentrationsbereich von ca. 0,005 g Essigsäure/l bis ca. 0,2 g Essigsäure/l eingestellt.

Identifizierung von Essigsäure und massenspektrometrische Absicherung

Die Zuordnung des Essigsäurepeaks erfolgt über die relative Retentionszeit zum Peak des internen Standards in der Probe im Vergleich zur relativen Retentionszeit von Essigsäure in einer gemäß Abschnitt a) zubereiteten Kalibrierlösung und/oder im Wege einer Standardaddition.

Eine Absicherung der Ergebnisse lässt sich im Wege der Bestimmung mittels eines massenselektiven Detektors erreichen (siehe Abb. 2 und 3). Störungen der GC-FID-Bestimmung durch eine ungenügende chromatographische Trennung der Essigsäure bzw. eine Überlagerung durch die Probenmatrix wurden bisher jedoch nicht festgestellt.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze liegt bei Gemüsesaft unter der Voraussetzung einer entsprechenden Anpassung der Probenverdünnung durchwegs im Bereich von unter 0,01 g Essigsäure/l.

Ergebnisse und Diskussion

Mit dem vorgestellten Verfahren lassen sich die eingangs skizzierten Prüfnotwendigkeiten in aus arbeits-technischer und ökonomischer Sicht verhältnismäßig günstiger Weise abdecken. Dies umso mehr, als die Probenaufbereitung vergleichsweise einfach gestaltet werden konnte und somit nur geringe einschlägige personelle Ressourcen bindet. Durch die automatisierte Konditionierung des Trennsystems im Wege einer dreifachen Injektion von Metaphosphorsäure-Lösung zwischen der chromatographischen Untersuchung (siehe dazu Tab. 3) lässt sich eine Verschleppung von Essigsäure („Ghosting“) in den Bereich von unter 1 % (relativ) absenken. Trotz dieser Vorkehrungen empfiehlt sich jedoch eine Reihung der Proben nach den zu erwartenden Essigsäuregehalten bzw. eine Vermeidung von extremen Konzentrationssprüngen in den jeweiligen Prüfsequenzen (siehe Tab. 3). Die Verwendung der Glaswollpackung im speziell deaktivierten Einspritzsystem begründet stabile Retentionszeiten. In Verbindung mit der Trennsäule vom FFAP-Typ und einem ausreichenden Splitfluss (Splitverhältnis) sind im Wege der angeführten prüftechnischen Bedingungen ausreichend

Tabelle 3:
Beispiel einer Probensequenz für die gaschromatographische Untersuchung

Lauf	MPLSG 1*)	Ofentemperatur	Laufzeit
1-3	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
4	Probeleerwert a (Probe I)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
5-8	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
9	Probeleerwert b (Probe I)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
10-12	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
13	Probeleerwert a (Probe II)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
14-16	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
17	Probeleerwert b (Probe II)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
18-20	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
21	Probeleerwert a (Probe III)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
22-24	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
25	Probeleerwert b (Probe III)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
26-28	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
29	Leerwert Probe III mit Essigsäure dotiert	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
30-32	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
33	Probeleerwert a (Probe IV)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
34-36	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min
37	Probeleerwert b (Probe IV)	gemäß Temperaturprogramm	ca. 25 min
38-40	MPLSG 1*)	isotherm bei 180 °C	je ca. 4 min

*) Metaphosphorsäure-Lösung 1 (ca. 5 g/l)

empfindliche gaschromatographische Bestimmungen von Essigsäure zu realisieren und die bei Prüfungen solcher polarer Substanzen besonders problematischen Störungen (z.B. durch Peaktailing, Peakverbreiterung, Retentionszeitshift) zu vermeiden.

Über die angegebene Dotation von Metaphosphorsäure im Probenansatz wird auch in mikrobiologischer Hinsicht eine ausreichende Stabilisierung sichergestellt bzw. eine weitere Synthese von Essigsäure während der Untersuchung verhindert, was bei den diesbezüglich anfälligen Getränken (besonders bei milchsauer vergorenen und nicht konservierten Gemüsesäften) als essenzielles Prüferfordernis auszuweisen ist.

Die mit metaphosphorsäurehaltiger wässriger Lösung erstellte Kalibrierung (siehe Tab. 1 und Abb. 4) zeigt neben einer zufrieden stellenden Linearität eine weitgehend deckungsgleiche Charakteristik, wie sie nach den bisherigen Erfahrungen bei der Untersuchung von Ge-

müsesäften im Wege von Standardadditionen festzustellen ist (siehe Tab. 2 und Abb. 5). Relevante Störungen der Methodik durch die Probenmatrix sind somit nicht zu unterlegen, weshalb Quantifizierungen im Hinblick auf die Stabilität des Trennsystems auch über externe Kalibrierungen vorgenommen werden können. Propionsäure zeigt unter den gewählten Prüfbedingungen im Vergleich zu Essigsäure ein weitgehend ähnliches Verhalten und wurde daher trotz der Möglichkeit eines (bisher nicht beobachteten) relevanten Vorkommens in den Proben als interne Standardsubstanz gewählt, was einerseits die vorstehend beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen erfordert, andererseits aber die Stabilität des Trennverfahrens wesentlich unterstützt.

Die mit der vorgestellten Methode bestimmten Essigsäuregehalte von Gemüsesäften zeigten gegenüber den nach dem enzymatischen Verfahren (Boehringer Mannheim, 1997) ermittelten Werten zum überwiegenden

Tabelle 4:

Vergleich der gaschromatographisch und enzymatisch bestimmten Gehalte an Essigsäure in milchsauer vergorenen Gemüsesäften

Probe	Essigsäure ^{*)} gaschrom. (g/l)	Essigsäure enzym. (g/l)	Differenz Essigsäure gaschrom.- enzym. (g/l)	Probe	Essigsäure ^{*)} gaschrom. (g/l)	Essigsäure enzym. (g/l)	Differenz Essigsäure gaschrom.- enzym. (g/l)
Kürbis A	1,25	0,87	0,38	Sellerie B	5,71	5,91	- 0,20
Zuckerkarotte	0,45	0,02	0,43	Rote Rüben	4,22	4,08	0,14
Zuckerkarotte	0,47	0,07	0,40	Chinakohl A	0,85	0,74	0,11
Karotte A	4,62	4,42	0,20	Chinakohl B	1,47	1,50	- 0,03
Karotte B	4,70	4,31	0,39	Gelbe Rüben A	3,42	3,48	- 0,06
Weißkraut A	3,79	3,70	0,09	Gelbe Rüben B	3,56	3,70	- 0,14
Weißkraut B	3,79	3,47	0,32	Schwarzer Rettich A	2,26	2,22	0,04
Rotkraut A	3,49	3,54	- 0,05	Schwarzer Rettich B	2,92	2,76	0,16
Rotkraut B	4,60	4,55	0,05	Kartoffel A	2,01	1,99	0,02
Kohl A	1,51	1,60	- 0,09	Kartoffel B	2,62	2,70	- 0,08
Kohl B	4,58	4,83	- 0,25	Rohkartoffelsaft	2,01	2,16	- 0,15
Sellerie A	2,42	2,37	0,05				

^{*)} Berechnung der Gehalte über eine externe Kalibrierfunktion

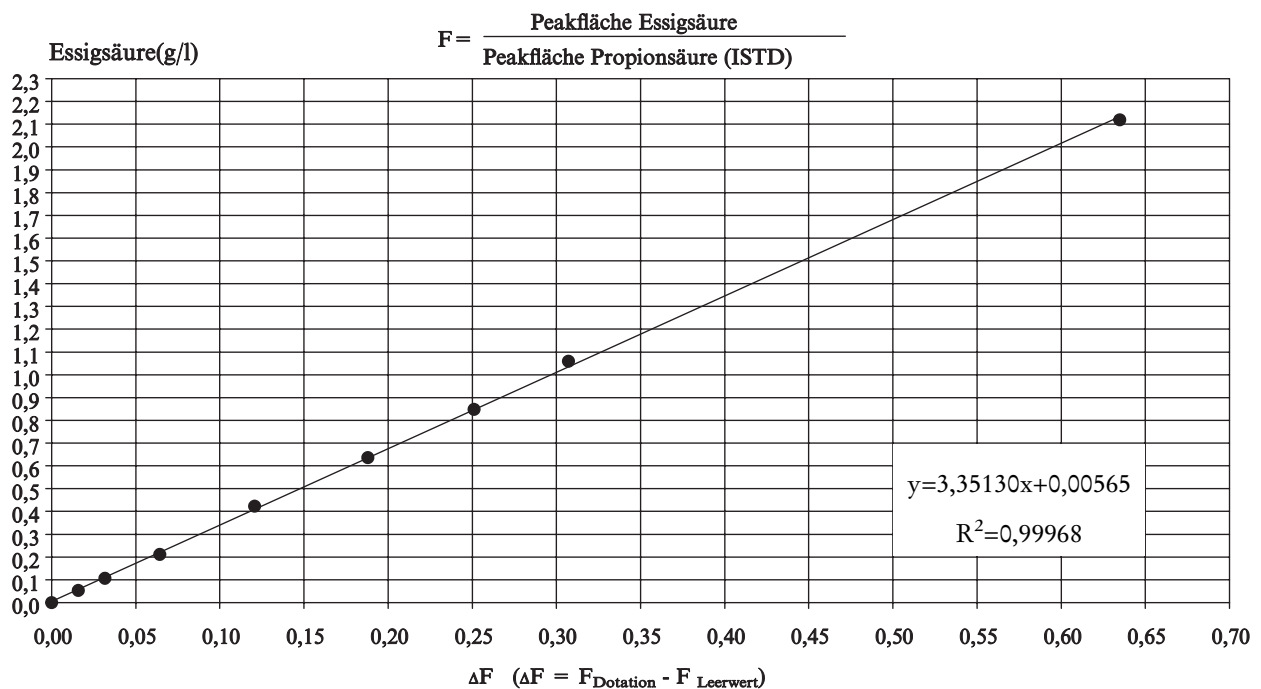


Abb. 5: Beispiel einer Kalibrierfunktion im Rahmen eines Standardadditionsverfahrens für Essigsäure bei einem Weißkrautsaft [natürlicher Gehalt 4,2g Essigsäure/l] bestimmt (Herstellung siehe Tabelle 2).

Teil eine bemerkenswerte Kongruenz. Bei Kürbis- und Karottensaft waren jedoch die mit dem enzymatischen Verfahren bestimmten Werte im Vergleich zu den auf gaschromatographischem Weg ermittelten und auch massenspektrometrisch abgesicherten Gehalten deutlich niedriger (siehe Tab. 4). Diese Diskrepanz musste ursächlich auf matrixbedingte und nicht behebbare Störungen der enzymatischen Prüfungen zurückgeführt werden, die sich in unzureichenden Wiederfindungsraten und/oder schleppenden bzw. nicht zum Stillstand kommenden Reaktionsverläufen manifestierten.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kommt somit für die qualitätsmäßige Beurteilung von Gemüsesäften auch der exakten Erfassung von Essigsäure eine wesentliche Bedeutung zu. Wegen der komplexen Matrix von Gemüsesäften können u.E. auf flüchtige Säure(n) gegründete Prüfparameter und Grenzwertregelungen keine hinreichende Sicherheit für eine produktgerechte Beurteilungsweise liefern und sind daher als nicht zielführend zu qualifizieren. Desgleichen muss eine bewertungsmäßige Unterscheidung zwischen der Anwesenheit von Essigsäure in nicht fermentierten und in milchsauer vergorenen Gemüsesäften vorgenommen werden. Bei unvergorenen Gemüsesäften weisen relevante Gehalte an Essigsäure auf Qualitätsmängel in Verbindung mit einer untauglichen Technologie bzw. einer mangelnden Hygiene hin. Demgegenüber ist die Anwesenheit von Essigsäure in milchsauer vergorenen Gemüsesäften als produktspezifisch sowie der Qualität bzw. der Bekömmlichkeit solcher Getränke eher förderlich und jedenfalls nicht als grundlegend abträglich zu bewerten. Mit dem vorgestellten Verfahren eröffnet

sich somit die Möglichkeit zur sicheren und ausreichend empfindlichen Erfassung von Essigsäure in Gemüsesäften, weshalb ein Einsatz bei der analytischen Prüfung dieser Produkte empfohlen werden kann.

Danksagung

Für die analytische Unterstützung ist Frau Isabella Kohler, Herrn Johann Jäger, Herrn Karl Heili und Frau Elisabeth Aranguiz Rebolledo besonders zu danken.

Literatur

- A.I.J.N. (1996): Code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices. - Brüssel, 1996
- BOEHRINGER MANNHEIM (1997): Essigsäure (Acetat) : UV-Test zur Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien Nr. 148 261. - Mannheim, 1997
- BgVV (1983): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Bestimmung der flüchtigen Säuren in Tomatenketchup und vergleichbaren Erzeugnissen, Methode L 52.01.01-7. - Berlin: Beuth, 2002
- BgVV (1987): Amtliche Sammlung der Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Bestimmung der flüchtigen Säuren in der Aufgussflüssigkeit bzw. der Presslake von Sauerkraut, Methode L 26.04-5. - Berlin: Beuth, 2002
- IFU (1968): Determination of volatile acids, Methode Nr. 5. - Zug: Schweiz. Obstverband, 2001
- IFU (1996): Acetic acid (Enzymatic method), Methode Nr. 66. - Zug: Schweiz. Obstverband, 2001
- YANG, M.-H. und CHOONG, Y.-M. 2001: A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂ - C₁₂) volatile organic acids in foods. Food Chemistry 75: 101-108

Manuskript eingelangt am 10. Februar 2003