

# Steviolglycoside in Süßwaren

## Entwicklung und Validierung einer Analyse- methode mittels HPLC-UV

Teresa Brandes, Marion Raters und Reinhard Matissek

Der Einsatz von Steviolglycosiden als Süßungsmittel ist seit dem 2.12.2011 in der Europäischen Union (EU) erlaubt. Aufgrund ihrer etwa 200-mal stärkeren Süßkraft im Vergleich zu Saccharose sind Steviolglycoside äußerst attraktiv als Ersatzstoffe, speziell im Süßwarenbereich. Jedoch gibt es von der EU Regelungen bezüglich Reinheit und Zusammensetzung des Süßstoffs, deren Kontrolle erforderlich ist.

*Stevia rebaudiana* Bertoni ist eine mehrjährige, krautige Pflanze aus der Familie der Korbblütler (Asteraceae), welche ursprünglich aus dem Nord-Osten von Paraguay in Südamerika stammt. Schon seit vielen Jahrhunderten wird sie dort angebaut und als Süßungs- und Heilmittel von der indigenen Bevölkerung Paraguays und Brasiliens verwendet, u. a. um ihren Mate-Tee zu süßen (Matissek, 2010). Daher wird die Pflanze auch von den Indianern *ka'a he'ê* genannt, was so viel wie „Süßkraut“ oder „Honigkraut“ bedeutet.

### Die Pflanze „*Stevia rebaudiana*“

Die Pflanze selbst wächst am besten unter tropischen Anbaubedingungen: viel Wärme und Feuchtigkeit. Da sie nicht frosthart ist, kann sie hierzulande nur einjährig oder in Gewächshäusern kultiviert werden (Lemus-Mondaca et al., 2012). Wissenschaftlich untersucht wurde *Stevia rebaudiana* erstmals 1887 von dem nach Paraguay ausgewanderten Schweizer Botaniker Dr. Moises Giacomo Bertoni. Er verfasste 1899 die erste wissenschaftliche Beschreibung und botanische Einordnung (Kienle, 2012). Zu der Gattung *Stevia*

gehören rund 230 verschiedene Spezies, wovon aber nur zwei süßende Eigenschaften besitzen: *Stevia rebaudiana* und *Stevia phlebophylla* (Lemus-Mondaca et al., 2012).

Der süße Geschmack der Steviapflanze wird verursacht durch Diterpen-Glycoside in den Blättern, welche 4–20 % des Trockengewichts ausmachen und deren Gehalte je nach Anbauart und -bedingungen schwanken können (Brandle et al., 1998). Diese Diterpen-Glycoside werden in den Blättern von *Stevia rebaudiana* biosynthetisiert und dort gespeichert. Es handelt sich um sekundäre Stoffwechselprodukte der Pflanze, d. h. es sind Stoffe, die weder für einen funktionierenden Zellstoffwechsel noch für Zellwachstum und -teilung notwendig sind (Nuhn, 1990).

### Steviolglycoside

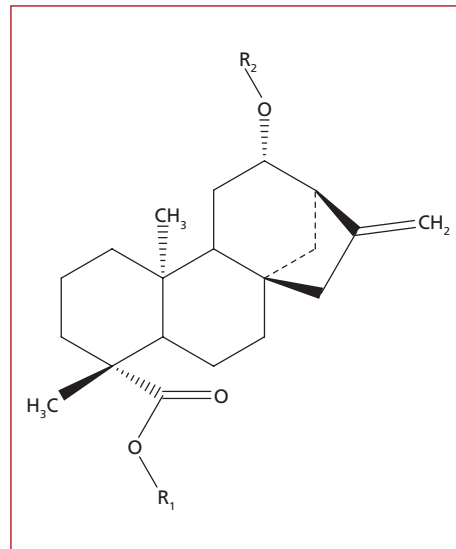
Steviolglycoside bestehen aus dem Aglykon (Nicht-Zucker-Komponente) Steviol, welches mit verschiedenen Zuckerbausteinen glykosidisch verknüpft ist. Steviol selbst ist geschmacklos und erfährt durch die Konjugation mit Zuckern eine enorme Zunahme seiner Wasserlöslich-



Teresa Brandes

### » Zur Person

absolvierte ihr Studium im Fach Lebensmittelchemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn und fertigte im Rahmen des 1. Staatsexamens ihre wissenschaftliche Abschlussarbeit am LCI in Köln an. «



**Abb. 1**  
Allgemeine Struktur  
der Steviolglycoside  
(s. a. Tab. 1)

keit, sodass auch ein Transport innerhalb der Pflanze möglich ist. Die beiden Hauptglycoside Steviosid und Rebaudiosid A machen mit etwa 90 % des Gesamtglycosidgehalts den größten Anteil aus. Daneben treten noch die Steviolglycoside Steviolbiosid, Rebaudiosid B, C, D, F, Dulcosid A und Rubusosid als Minorkomponenten auf, wobei aber nicht alle davon natürlichen Ursprungs sind (Bergs et al., 2012). Auf diese insgesamt neun Steviolglycoside sowie Rebaudiosid E wird auch in Verordnung (EU) Nr. 231/2012 verwiesen, da nur diese als Zusatzstoff in Lebensmitteln unter gewissen Reinheitskriterien verwendet werden dürfen. Abbildung 1

und Tabelle 1 zeigen die allgemeine Struktur der Steviolglycoside.

### Die rechtliche Beurteilung

Die Zulassung von Stevia als Lebensmittel erstreckte sich insgesamt über 14 Jahre. 1997 wurde der 1. Antrag für die Zulassung der Pflanze sowie der aus ihr gewonnenen Erzeugnissen gestellt. Eine Zulassung war notwendig, weil diese „vor dem Stichtag in noch nicht nennenswertem Umfang im Handel“ waren und somit in den Geltungsrahmen der Novel-Food-Verordnung (Verordnung (EG) Nr. 258/97) fallen. Da aber aufgrund unzureichender Datenmenge die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Stevia für den Verbraucher nicht bestätigt werden konnte, wurde die Zulassung im Februar 2000 mit der Entscheidung 2000/196/EG der Europäischen Kommission abgelehnt. 2007 wurde erneut ein Antrag bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) eingereicht, welche im April 2010 zu einer positiven Bewertung des Süßstoffs kam. Das bedeutet, für den Verbraucher sind keine toxischen, kanzerogenen oder ähnliche unerwünschte Wirkungen durch Steviolglycoside bekannt, sodass ein ADI-Wert von 4 mg Stevioläquivalente/kg Körpergewicht/Tag formuliert wurde. Der Begriff ADI steht für „acceptable daily intake“ und stellt die Menge einer Substanz dar, die täglich ein Leben lang auf-

**Tab. 1 Übersicht der 10 zugelassenen Steviolglycoside (modifiziert, Kienle 2012)**

Steviolglycosid	R-Gruppen in Abb. 1		Summenformel	molekulare Masse [g/mol]	Süßkraft im Vergleich zu Zucker (Saccharose = 1)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>			
Rebaudiosid A	β-glc-	(β-glc) <sub>2</sub> -β-glc-	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub>	967,01	200–300
Rebaudiosid B	H	(β-glc) <sub>2</sub> -β-glc-	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	804,88	150
Rebaudiosid C	β-glc-	(β-glc, α-rha)-β-glc-	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>22</sub>	951,01	30
Rebaudiosid D	β-glc-β-glc-	(β-glc) <sub>2</sub> -β-glc-	C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> O <sub>28</sub>	1129,15	221
Rebaudiosid E	β-glc-β-glc-	β-glc-β-glc-	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub>	967,01	174
Rebaudiosid F	β-glc-	(β-glc, β-xyI)-β-glc-	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> O <sub>23</sub>	936,99	200
Steviosid	β-glc-	β-glc-β-glc-	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	804,88	210
Steviolbiosid	H	β-glc-β-glc-	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	642,73	90
Rubusosid	β-glc-	β-glc-	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	642,73	114
Dulcosid A	β-glc-	β-rha-β-glc-	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>17</sub>	788,87	30

genommen werden darf, ohne gesundheitliche Beeinträchtigungen befürchten zu müssen. Am 11. November 2011 wurde schließlich die „Verordnung zur Zulassung von Steviolglycosiden als Süßungsmittel“ (Verordnung (EU) Nr. 1131/2011) erlassen, entsprechend der seit dem 2. Dezember 2011 – unter gewissen Anforderungen bezüglich Reinheit, Zusammensetzung und Höchstmenge – Steviolglycoside als Süßstoff in der gesamten EU verwendet werden dürfen. Zu erkennen ist eine Verwendung dieser im Zutatenverzeichnis an der E-Nummer „E 960“.

### Die Verwendung von Steviolglycosiden in Süßwaren

Steviolglycoside werden als Süßungsmittel verwendet und gehören somit zu den Lebensmittelzusatzstoffen. Unter der Bezeichnung Süßungsmittel werden natürliche oder synthetisch hergestellte Stoffe zusammengefasst, die als Ersatz für Haushaltszucker (Saccharose) genutzt werden können. Unterschieden wird bei Süßungsmitteln zwischen Zuckeraustauschstoffen und Süßstoffen. Diese beiden Stoffgruppen zeichnen sich durch sehr verschiedene Eigenschaften, aber auch durch Gemeinsamkeiten aus. Generell sind Süßungsmittel für Diabetiker geeignet, da sie kaum einen Einfluss auf den Blutglucose-Spiegel haben. Weiterhin werden sie von der Mundflora nicht verstoffwechselt, d. h. es bilden sich keine Säuren, die den Zahnschmelz schädigen können (*Rosenplenter und Nöhle, 2007*).

Unter Zuckeraustauschstoffen werden Zuckeralkohole, auch Polyole genannt, zusammengefasst, wie etwa Xylit, Mannit oder Sorbit. Sie entstehen bei der Hydrierung ihrer jeweiligen Zuckeräquivalente, haben eine ähnliche Süßkraft wie Zucker und liefern dabei etwa 40 % weniger Kalorien. Den Zuckeraustauschstoffen stehen die Süßstoffe gegenüber, welche zum Teil eine enorme Süßkraft im Vergleich zu Saccharose – das 30–300-fache – besitzen, jedoch kaum Kalorien liefern. Chemisch gesehen handelt es sich bei Süßstoffen um eine sehr heterogene Gruppe, vertreten

sind Peptide, Heterocyclen, Dihydrochalone und andere Substanzklassen. Steviolglycoside gehören wie oben erwähnt zu den Süßstoffen. Durch ihre enorme Süßkraft sind nur geringe Mengen des Zusatzstoffs notwendig. Um die fehlende Masse des bei herkömmlichen Produkten eingesetzten Zuckers zu ersetzen, werden häufig Ballaststoffe wie etwa Polydextrose oder Inulin verwendet. Die große Verbraucherakzeptanz und der Unterschied zu anderen, bisher zugelassenen Süßstoffen, liegt in der Natürlichkeit des neuen Süßstoffs. Er wird ausschließlich durch Extraktion aus den Blättern und nicht wie etwa Saccharin oder Aspartam durch chemische Synthesen gewonnen (*Rosenplenter und Nöhle, 2007; Matissek 2009*).

Zu Beginn ihrer Herstellung wurde beim Verzehr steviahaltiger Lebensmittel häufig ein bitterer Nachgeschmack festgestellt. Das diesen unerwünschten Nachgeschmack verursachende Steviolglycosid – das Steviosid – ist das in der Pflanze mengenmäßig wichtigste Steviolglycosid und war früher dementsprechend auch zu einem großen Teil in den Produkten enthalten. Durch neue Züchtungen und verschiedene Prozessführungen und Kristallisationsschritte bei der Extraktion von Steviolglycosiden aus der Pflanze können nun jedoch auch Extrakte hergestellt werden, die bis zu 99 % Rebaudiosid A enthalten. Dieses gilt als rein süß und hat keinen bitteren Nachgeschmack (*Kienle, 2012*). Aus diesem Grund wird Rebaudiosid A häufig als einziges Steviolglycosid zur Herstellung von steviahaltigen Süßwaren verwendet. Bisher gibt es schon eine kleine Auswahl an steviahaltigen Süßwaren, die im Einzelhandel erworben werden können. Am häufigsten handelt es sich hierbei um Schokoladen und Bonbons, aber auch Kaugummis, Backwaren und Fruchtgummis sind auf dem Markt erhältlich.

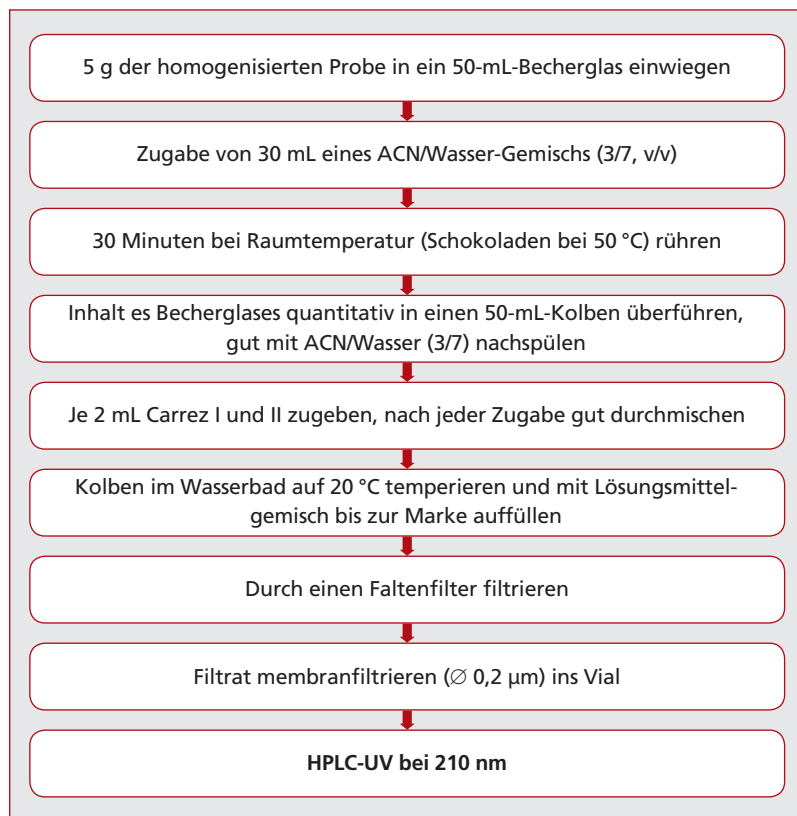
### Methodenentwicklung und -validierung

Aufgrund der bereits beschriebenen Zulassungsbeschränkungen für Steviolglycoside in Lebensmitteln, ist die Analytik



**Dr. Marion Raters**  
Staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin,  
stellvertretende Institutsleiterin, LCI Köln

### » Reiner Süßgeschmack von Rebaudiosid A «



**Abb. 2**  
Schema der entwickelten  
Probenaufarbeitung

dieser Substanzen von großer Bedeutung. Es ist durchaus zu erwarten, dass die Anzahl an steviahaltigen Süßwaren künftig weiter steigen wird. Aus diesem Grund wurde im LCI eine Bestimmungsmethode zur Analytik von Steviolglycosiden in Lebensmitteln – speziell in Süßwaren – entwickelt und validiert.

### Probenaufarbeitung

Als Matrix zur Methodenentwicklung diente eine Zuckerware, gesüßt mit E 960. Die im Rahmen einer Forschungsarbeit im LCI entwickelte Probenaufarbeitung ist

dem Schema in Abbildung 2 zu entnehmen.

### Die Quantifizierung

Für die Bestimmung der Gehalte an Steviolglycosiden in Lebensmitteln ist die RP-HPLC die Methode der Wahl. Hier konnte eine sehr zufriedenstellende Auftrennung innerhalb kurzer Laufzeiten erreicht werden. Zur Quantifizierung der Analyten wurde die Methode des externen Standards verwendet. Ein Beispielchromatogramm eines Standardmix mit insgesamt neun Steviolglycosiden ist in Abbildung 3 zu sehen.

### Die Methodvalidierung

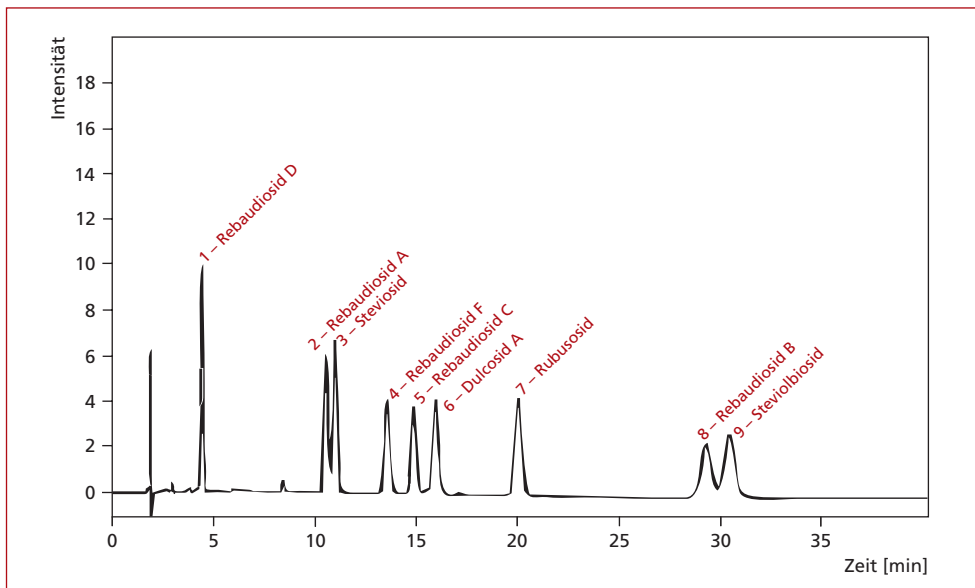
Seit dem verstärkten Einzug von QS-Systemen in Laboratorien und der Einführung der Akkreditierung beschäftigt man sich intensiv mit der Methodvalidierung. Grundsätzlich handelt es sich bei der Methodvalidierung um ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung (QS). Nach der DIN EN ISO/IEC 17025:2005 ist die Validierung definiert als „... die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden.“ So soll sichergestellt werden, ob die für einen bestimmten Parameter ausgesuchte Methode, die verwendeten Geräte und Materialien sowie die Umgebungsbedingungen geeignet sind, um zuverlässige Analyseergebnisse zu erhalten. Der Maximalumfang einer Validierung umfasst Präzision, Richtigkeit (auch Wiederfindungsrate genannt), Linearität, Robustheit und Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Als Ergebnis der im Anschluss an die Methodenentwicklung durchgeführten Methodvalidierung für Rebaudiosid A konnte festgestellt werden, dass die Präzision der entwickelten Methode nur einer geringen relativen Standardabweichung unterliegt. Die Richtigkeit wurde mithilfe eines zertifizierten Referenzmaterials nachgewiesen. Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze der entwickelten



**Prof. Dr. Reinhard Matissek**

Institutsleiter und Direktor des LCI; apl. Professor am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin; u. a. Vorstandsmitglied der Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Hamburg/Bonn, Mitglied in verschiedenen Kommissionen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und Mitglied des Wissenschaftlichen Ausschusses des FEI



**Abb. 3**  
Trennung eines Standardmix mit neun Steviolglycosiden auf einer RP-18-HPLC-Säule mit UV-Detektion; Konzentration der Steviolglycoside beträgt je 0,02 µg/mL

Methode zur Bestimmung von Rebaudiosid A in Süßwaren sind in Tabelle 2 aufgeführt.

### Die Qualitätsregelkarte

Insbesondere bei industriellen Laboren gelten strenge Qualitätsstandards, deren Einhaltung dringend erforderlich ist. Ein laborinternes Mittel einer solchen Qualitätssicherung ist neben der Teilnahme an Ringversuchen (externe Qualitätssicherung) das Führen von sog. Qualitätsregelkarten (QRK) (interne Qualitätssicherung). Eine QRK dient der grafischen Überprüfung der Qualität einer Analysenmethode. Voraussetzung hierfür ist eine Normalverteilung der Messwerte und eine konstante Standardabweichung. Zum Anlegen dieser QRK wird eine stets gleiche Kontrollprobe, im Folgenden als Qualitätssicherungs-Probe (QS-Probe) bezeichnet, in einer Mehrfachbestimmung (mindestens 20 Werte) auf den zu bestimmenden Analyt untersucht. Die QS-Probe dient in der Routineanalytik zur arbeits-täglichen Überprüfung der Kompetenz der Mitarbeiter, der Überprüfung der Chemikalien und Gebrauchsgegenstände sowie zur Funktionsüberprüfung der verwendeten Geräte. Aus den so generierten Messwerten wird der Mittelwert, auch Sollwert genannt, gebildet sowie die Standardabweichung ermittelt. Auf der QRK

sind neben dem Sollwert noch eine sogenannte obere und untere Warngrenze (OWG bzw. UWG) sowie eine obere und untere Eingriffsgrenze (OEG bzw. UEG) zu finden. Die Warngrenzen (WG) bzw. Eingriffsgrenzen (EG) ergeben sich aus der Standardabweichung ( $s_r$ ) und dem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) nach den Formeln 1 und 2.

$$WG = \bar{x} \pm 2s_r \quad \text{Formel 1}$$

$$EG = \bar{x} \pm 3s_r \quad \text{Formel 2}$$

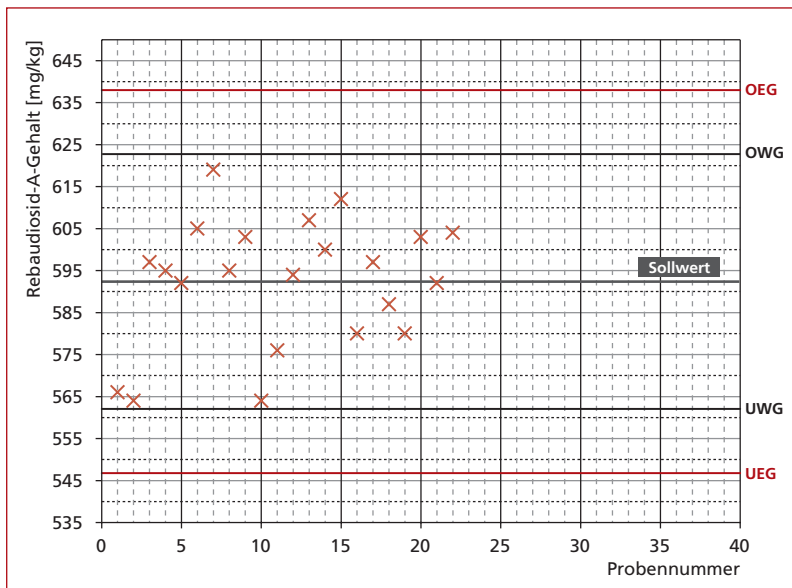
Durch Auftragung des Sollwerts sowie der Warn- und Eingriffsgrenzen in ein Diagramm erhält man eine Shewhart-Regelkarte (benannt nach dem Statistiker Walter A. Shewhart), in die die Messwerte der QS-Probe eingetragen werden. Auf diese Weise können zufällige und systematische Fehler erkannt werden. Überschreiten Messwerte die Warngrenzen, kann dies einmalig toleriert werden, werden jedoch die Eingriffsgrenzen überschritten, so muss nach den Ursachen geforscht und der Fehler behoben werden (Kromidas, 1995; Funk et al., 2005).

Eine solche Qualitätsregelkarte wurde im Rahmen der oben beschriebenen Me-

» Trennung von neun Steviolglycosiden in einem Lauf «

**Tab. 2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Rebaudiosid A mittels UV-Detektion**

Nachweisgrenze [µg/mL]	0,1
Bestimmungsgrenze [µg/mL]	0,4



**Abb. 4**  
Qualitätsregelkarte  
für den Analyten  
Rebaudiosid A

thodenvalidierung für den Analyten Rebaudiosid A angelegt und ist in Abbildung 4 zu sehen. Dieser Qualitätsregelkarte kann somit entnommen werden, dass die Messwerte für Rebaudiosid A zwar geringen Schwankungen unterliegen, diese aber innerhalb der Warngrenzen der QRK liegen. Aufgrund dessen kann von einer gut funktionierenden Analytik ausgegangen werden.

### Fazit

Es ist im LCI gelungen, eine sehr sensitive, praxistaugliche HPLC-UV-Methode zur Bestimmung von Steviolglycosiden in Süß-

waren zu entwickeln. Diese ermöglicht es, die verschiedenen laut EU-Verordnung Nr. 231/2012 relevanten Steviolglycoside selektiv, schnell und robust zu erfassen. Die für Rebaudiosid A durchgeführte Methodenvalidierung lieferte sehr zufriedenstellende Ergebnisse und auch die erstellte Qualitätsregelkarte erfüllt alle Anforderungen an die interne Qualitätssicherung. Somit wird es in Zukunft möglich sein, die durch die EU gestellten Anforderungen bezüglich Reinheit und Zusammensetzung der Steviolglycoside in Süßwaren zu überprüfen. ■

## Anschrift der Autoren

**Teresa Brandes**  
**Dr. Marion Raters**  
**Prof. Dr. Reinhard Matissek**  
Lebensmittelchemisches Institut  
des Bundesverbandes der Deutschen  
Süßwarenindustrie e. V.  
Adamsstr. 52–54  
51063 Köln  
marion.raters@lci-koeln.de  
reinhard.matissek@lci-koeln.de  
www.lci-koeln.de

Verweise finden Sie unter  
[www.dlr-online.de](http://www.dlr-online.de) → DLR Plus  
Passwort: Beinwell

Von Axel Vogelreuter.  
2012. XII, 230 Seiten. 41 farbige  
Abbildungen. 34 farbige Tabellen.  
Mit Anamnesefragebogen.  
Gebunden. € 42,- [D]  
ISBN 978-3-8047-2938-4

E-Book PDF. € 42,- [D]  
ISBN 978-3-8047-3102-8  
E-Book E-PUB. € 42,- [D]  
ISBN 978-3-8047-3116-5



Der Autor dieses kompakten Fachbuchs schildert Bedeutung, Vorkommen und Klinik der häufigsten Nahrungsmittelunverträglichkeiten sowie deren Diagnostik und Therapie. Praxistipps, Fallbeispiele, Differenzialdiagnosen und weitere Zusatzinformationen liefern dem Leser das Rüstzeug für die kompetente Beratung seiner Patienten.

**Gratis-Download**  
des Anamnesefragebogens für alle Interessierten  
unter: [www.Online-PlusBase.de](http://www.Online-PlusBase.de)

(E-Books sind online zum Download erhältlich unter  
[www.buchoffizin.de](http://www.buchoffizin.de))

## Steviolglycoside in Süßwaren

### Entwicklung und Validierung einer Analysenmethode mittels HPLC-UV

Teresa Brandes, Marion Raters und Reinhard Matissek

#### Verweise

- *Bergs D, Burghoff B, Joehneck M, Martin G, Schembecker G*: Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *JVL* **7**, 147–154 (2012).
- *Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M*: *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can J Plant Sci* **78**, 527–536 (1998).
- DIN EN ISO/IEC 17025: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005).
- Entscheidung (2000/196/EG) der Kommission vom 22. Februar 2000 über die Zulassungsverweigerung von „*Stevia rebaudiana* Bertoni: Pflanzen und getrocknete Blätter“ als neuartige Lebensmittel oder neuartige Lebensmittelzutaten gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates.
- *Funk W, Dammann V, Donnevert G*: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005).
- Kienle U: Steviolglycoside – Ein neuer Typ von Süßungsmitteln. *Moderne Ernährung heute* **3**, 7–17 (2012).
- *Kromidas S*: Qualität im analytischen Labor. VCH Verlag, Weinheim (1995).
- *Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K*: *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency, natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem* **132**, 1121–1132 (2012).
- *Matissek R*: Süßungsmittel – Zwischen Zuckeraustauschstoffen, Süßstoffen & Co. Süßwaren **1–2**, 8 (2009).
- *Matissek R*: Neue Süßstoffe im Focus – Stevia. Süßwaren **7–8**, 7 (2010).
- *Nuhn P*: Naturstoffchemie. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1990).
- *Rosenplenter K, Nöhle U*: Handbuch Süßungsmittel. 2. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg (2007).
- Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten.