

Analytik von sekundären Pflanzenstoffen I

BioTeSys GmbH, Esslingen, www.biotesys.de

Vom Kräuterbonbon über Duschgel und Früchtetee bis hin zum Wellness-Getränk oder der Sportlerdiät - kaum ein neues Produkt kommt heute ohne den Zusatz pflanzlicher Extrakte auf den Markt. Die Nutzung von Trockenextrakten, wässrigen Auszügen, Pflanzenölen oder gleich der gesamten, meist getrockneten, Pflanze hat einen guten Grund: die Natur bietet ein enormes Spektrum unterschiedlichster aktiver Inhaltsstoffe, die aufgrund der Herkunft zudem noch eine ausgezeichnete Kundenakzeptanz besitzen.

In den letzten Jahren hat sich im Bereich der Lebensmittel-, Getränke- und Kosmetikindustrie einiges verändert. Eine deutliche Entwicklung ist das verstärkte Auftreten von sprichwörtlich „wertvolleren“ Produkten mit gesteigertem gesundheitlichem oder ernährungsphysiologischem Nutzen, mit imagerträchtigen Produkten oder Produkten mit genau definierten Zielgruppen, wie beispielsweise Sportler, Senioren oder Wellness-Interessierte.

Die rasante Entwicklung dieses Marktes mit oft kurzen Produktlebens-Zyklen sowie die gestiegene Erwartungshaltung der Verbraucher erfordern von jedem Anbieter, diese Bedürfnisse mit immer neueren, innovativen Produkten zu bedienen. Dabei ist es gerade in diesem Marktsektor besonders wichtig, mit strengen Kriterien und objektiven Untersuchungen die Qualität des Produktes und den Nutzen für den Verbraucher wissenschaftlich zu belegen und somit das Kundenvertrauen auch langfristig zu behalten. Neben den staatlichen Aufsichtsbehörden und Verbraucher-Interessenverbänden wacht nicht zuletzt auch die Konkurrenz streng auf die Einhaltung von Deklarationen und Werbeaussagen. Deklarierte Inhaltsstoffe sollten deshalb im eigenen Interesse des Inverkehrbringers unbedingt unter Produktionsbedingungen und Verkaufsbedingungen in dem durch das Mindesthaltbarkeitsdatum gegebenen Produktlebenszyklus untersucht werden, sonst können böse Überraschungen drohen.

Natürliche Additive

Viele natürliche Produkte besitzen positive Wirkungen, die zum Teil einzelnen Inhaltsstoffen zugeordnet werden können, teilweise wirken auch synergistisch ganze Inhaltsstoffkomplexe zusammen. So bieten sich entweder Reinsubstanzen mit erwiesener Unbedenklichkeit (GRAS-Liste der FDA) oder entsprechend untersuchte natürliche Extrakte, Konzentrate, Drogen etc. zur Veredelung von Produkten in besonderer Weise an.

Einige Beispiele von Zusätzen und Leitsubstanzen/Aktivstoffen:

- Anthocyane in Heidelbeerextrakten (EPH 6.2/2394)
- Flavonoide, Terpenlactone und Ginkgolsäuren in Ginkgotrockenextrakt (EPH 6.1/1827)
- Sesquiterpensäuren in Baldriantinkturen (EPH 6.0/1899)
- Ginsenoside in Ginsengwurzel (EPH 6.0/1523)
- Catechine in Grüntee
- Taurin und Koffein in Energy-Drinks
- Q10 in Cremes oder Getränken
- Ascorbinsäure in Dragees

In der Praxis werden oft Vitamine, antioxidativ wirkende Naturstoffe oder Mineralstoffe zugegeben. Besonders viele dieser Additive stammen aus Pflanzen. Neben den primären Inhaltsstoffen wie Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen, sind besonders die sekundären Pflanzenstoffe interessant, welche in Pflanzen für Duft, Farbe, Aroma und Schutz vor Parasiten und Umwelteinflüssen sorgen. Diese strukturell äußerst heterogene und bisher nur unvollständig erfasste Substanzklasse gilt, im Gegensatz zu den Vitaminen, für den Menschen als nicht essentiell. Dennoch besitzen einige Vertreter äußerst interessante Wirkungen, welche sie zum Objekt zahlreicher Untersuchungen machen. Wichtige Unterklassen sind zum Beispiel Polyphenole, Carotinoide, Flavonoide, Terpene, Phytosterine, Glucosinolate, Saponine und Phytoöstrogene.

Analyse von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen

Ist die Entscheidung für einen Zusatz erst einmal gefallen, ergeben sich für den Hersteller zahlreiche neue analytische Fragestellungen: Ist für den angestrebten Zweck eine einzelne Substanz verantwortlich, so müssen analytische Verfahren entwickelt werden, mit deren Hilfe diese Substanz im Produkt und im Rohstoff quantifiziert werden kann. Andererseits muss bei der Zugabe von Multikomponentengemischen wie Pflanzenextrakten, -konzentraten etc. oftmals zunächst eine Leitsubstanz identifiziert werden, welche repräsentativ für den angestrebten Verwendungszweck im fertigen Produkt als auch im Rohstoff vorkommt. Idealerweise handelt es sich dabei um eine der biologisch aktiven Substanzen. Hierzu muss ein schnelles, exaktes und kostengünstiges Analysenverfahren ausgewählt werden, welches in der Lage sein sollte, die oft erhebliche Anzahl an Einzelverbindungen in geringer Konzentration neben den vielfach größeren Anteilen an umgebenden Matrixbestandteilen aufzutrennen und zu quantifizieren. Hierzu eignet sich in ganz besonderer Weise die HPLC (Hochdruck-Flüssigchromatographie). Kaum ein anderes Verfahren ist so vielseitig im Gebrauch und besitzt eine solch große Trennleistung, Empfindlichkeit, Präzision und bietet die Möglichkeit von teils hoch selektiven bzw. sensitiven Multikomponentenanalysen. Die Voraussetzung ist lediglich, dass die Probe ausreichend in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch löslich ist. Dies verdeutlicht Abbildung 1, in welcher eine Auswahl der

bei BioTeSys angebotenen oder machbaren Analysenparameter aus Pflanzen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht (senkrecht) und der Polarität (waagrecht) aufgetragen sind. Alle blau gefärbten Zonen stellen für die HPLC gut bewältigbare Problemstellungen dar, rot gefärbte dagegen solche, welche optimalerweise mit GC-Methoden analysiert werden sollten. Praktisch der gesamte Bereich entlang der Hauptachse von oben links (kleine, hydrophile Moleküle wie Ascorbinsäure oder Glutathion) nach unten rechts (große, hydrophobe Moleküle wie Ubichinon), in welcher der Korridor für die meisten natürlich auftretenden Substanzen liegt, wird durch HPLC-Analysen abgedeckt. Gerade diese Anwendungsbreite ist einer der Gründe für die Erfolgsgeschichte der HPLC in der Analytik organischer Verbindungen.

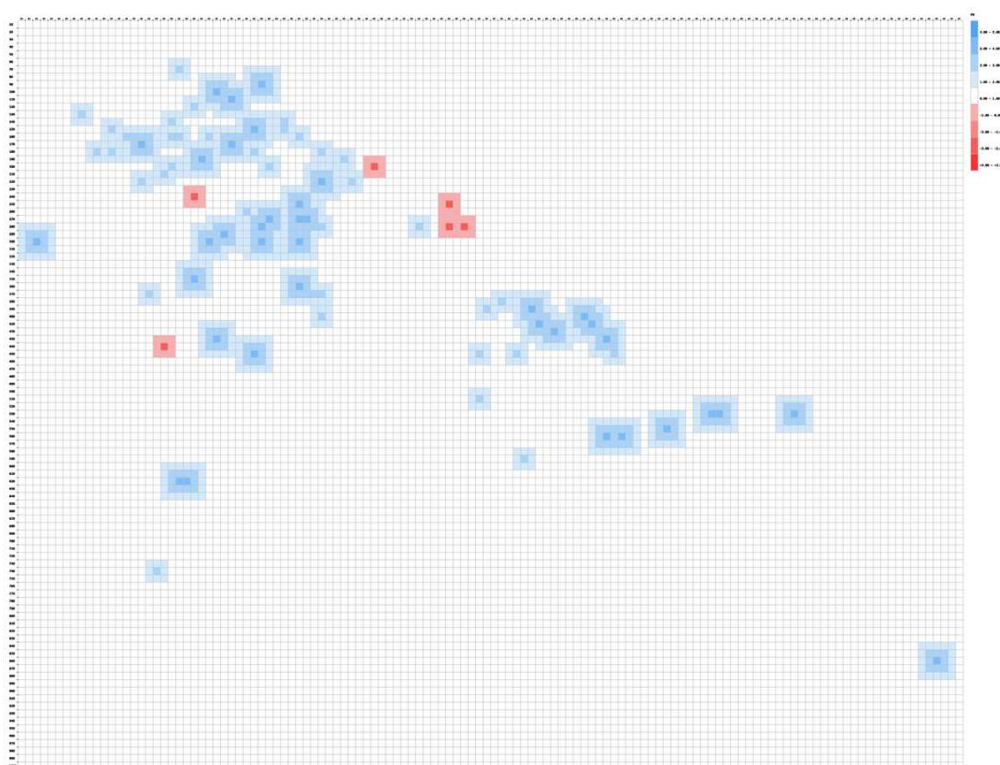


Abbildung 1: „Heatmap“-Darstellung der durch HPLC gut (blau) und nicht bzw. besser mit GC (rot) analysierbaren sekundären Pflanzenstoffe in Abhängigkeit von Polarität (von links nach rechts abnehmend) und Molekulargewicht (nach unten zunehmend). Bis auf wenige Ausnahmen lassen sich diese sehr gut mit HPLC analysieren.

Was ist HPLC?

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem ein Probengemisch (3) in ein System injiziert wird, das aus einer festen stationären Phase (Trennsäule 4) und einer diese kontinuierlich durchfließenden flüssigen Phase (mobile Phase 1, Fließmittel, Eluent) besteht. Eine spezielle HPLC-Pumpe (2) sorgt dabei für den notwendigen, gleichmäßigen, pulsationsfreien Flüssigkeitsstrom bei Drücken bis etwa 300 bar. Durch spezifische Wechselwirkungen verweilen die Probenmoleküle während der Passage durch die Trennsäule (4) unterschiedlich lange an der stationären Phase, sodass für Probenmoleküle mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften unterschiedliche Transportzeiten durch die Säule (Retentionszeiten) resultieren. Die Detektion (Detektor 5) der eluierenden Probensubstanzen erfolgt aufgrund verschiedener physikalisch-chemischer Eigenschaften wie Lichtabsorption, Lichtstreuung, Fluoreszenz, elektrochemisches Potential oder auch Masse in geeigneten Detektoren als so genannte „Peaks“. Im Abfallgefäß (6) werden die mit Probe verunreinigten Eluenten aufgefangen. Die Datenverarbeitung, Darstellung der Chromatogramme, Auswertung etc. erfolgt direkt am PC (7). Durch den Vergleich der erhaltenen Peakflächen mit denen von Standardlösungen derselben Substanz mit bekannter Konzentration lassen sich somit Bestandteile der Probe quantifizieren. Die feste Phase besteht aus einer dicht gepackten Füllung aus kleinen, möglichst regelmäßigen und porösen Teilchen. Als stationäre Phasen werden neben den klassischen Normalphasen aus Kieselgel oder Aluminiumoxid meist mit organischen Molekülen modifizierte Kieselgele, so genannte Umkehrphasen („reversed phase“), eingesetzt. Diese so genannten RP-HPLC-Säulen eignen sich aufgrund ihrer variierbaren Selektivität und Hydrophobizität in Verbindung mit den unterschiedlichsten mobilen Phasen für die meisten organischen Verbindungen besonders gut und sind heute die Standardwahl für viele Anwendungen.

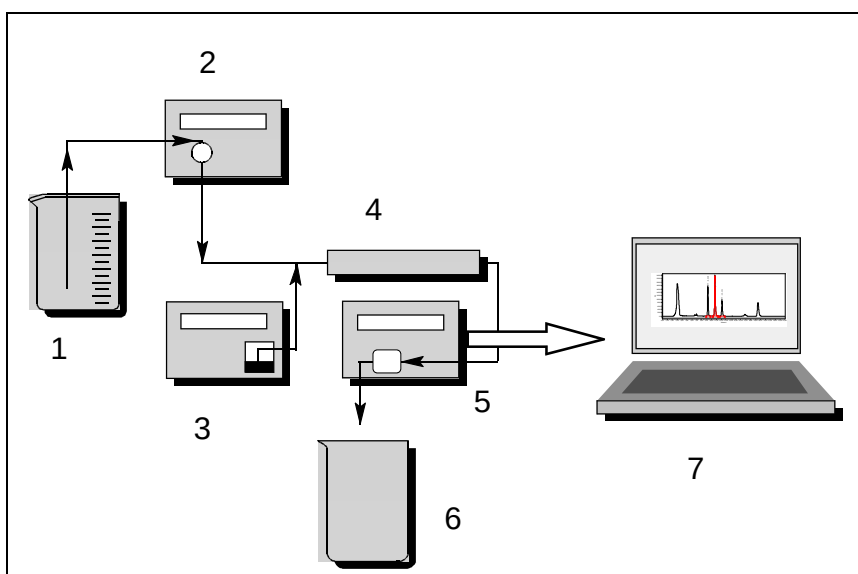


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage. Erläuterung der Zahlen und Symbole im Text.

Haltbarkeit, Stabilitätsprüfung, Rohstoffanalyse

Sind Leitsubstanzen für eine Multikomponentenmischung definiert, kann es erforderlich sein, die Produktqualität oder die Qualität der Rohstoffe zu kennen beziehungsweise anhand dieser Substanzen zu prüfen. Insbesondere die Haltbarkeit und Stabilität der Präparation oder des Produkts unter realen oder forcierten Bedingungen (Belastungstests) erfordern zuverlässige und schnelle Analysen von Leitsubstanzen, um Aussagen zu der Stabilität der Proben zu machen. Besonders schnelle Analysen erfordert auch die Rohstoffprüfung, wenn die Qualität des Ausgangsmaterials anhand von Gehalten an Leitsubstanzen beurteilt wird und letztlich in den Einkaufspreis eingeht.

Matrixkompetenz

Bei all diesen Fragestellungen ist zu beachten, dass kein Analysenverfahren in allen verschiedenen Probenarten, („Matrices“) gleichermaßen anwendbar ist. Um zuverlässige und reproduzierbare Analysenresultate zu erhalten, muss für jede Probenart die Eignung des Verfahrens sowie dessen Kennzahlen mit diesem Probenotyp neu ermittelt werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von der „Validierung“ der Methode.

Dabei werden die Präzision, Robustheit, Richtigkeit, Eigenschaften der Kalibrierfunktion, die Wiederholbarkeit von Messungen und einiges mehr des Verfahrens ermittelt und der experimentelle Nachweis erbracht, dass ein gewähltes Verfahren überhaupt in der Lage ist, ein Ergebnis von vorgegebener Präzision mit den zu untersuchenden Proben zu liefern. Dies ermöglicht dem Kunden erst, die Resultate einer Analyse richtig einzuschätzen. Validierungen sind grundsätzlich vor Probenmessungen durchzuführen, zeitintensiv und somit teuer, und das Ergebnis ist nicht selten die Notwendigkeit, mehr oder weniger große Teile des Analysenverfahrens abzuändern, um dann noch mal von vorne mit dem Validierungsprogramm zu starten. Das sind alles Kosten, die auf Analysenpreise und Probenaufkommen umgerechnet werden müssen. Die Kenntnis des Verhaltens von Methodik und verschiedenen Probenmatrices durch Erfahrung hilft hier aber, deutlich schneller zum Ziel zu kommen - Kompetenz in den zu untersuchenden Matrices und Analysenverfahren zahlt sich also aus.

Qualitätsstandards

Gerade wenn die analytische Fragestellung nicht die Nutzung von durch Normen festgelegten Verfahren erlaubt, sondern neue beziehungsweise laboreigene Verfahren zur Anwendung kommen sollen, rückt die Erfahrung, Sorgfalt und Sachkenntnis des Laborpersonals sowie der Zustand und die Verlässlichkeit der Analysengeräte in den Vordergrund. Nicht zuletzt deshalb sollten hohe Ansprüche an die Sachkompetenz sowie das zugrunde liegende Qualitätssystem in einem analytisch arbeitenden Labor gestellt werden. Ein Umstand, der bei der BioTeSys GmbH

beispielsweise durch die Akkreditierung für Prüflaboratorien nach der international anerkannten Norm EN ISO/IEC 17025 ständig von unabhängiger Seite nachgewiesen wird. Auch die Zertifizierung des Unternehmens nach der internationalen Norm ISO 9001 bescheinigt die Überwachung und Anwendung eines festgelegten betriebseigenen Qualitätssystems.

Zusammenfassung

1. Notwendigkeit von Produktinnovationen und Ausschöpfung natürlicher Ressourcen.
2. Bei Produktinnovation bzw. Neuschöpfung treten umfangreiche analytische Fragestellungen auf.
3. Die HPLC ist für viele dieser Anwendungszwecke ein besonders geeignetes Instrument.
4. Vorteile von externen Dienstleistern durch schnellere Reaktionszeit und Erfahrung durch Fokussierung und Betriebsgröße.
5. Anerkannte Qualitätsstandards und Kompetenz des Personals bei Analytikdienstleistern werden durch die Akkreditierung nach EN ISO/IEC 17025 für Prüflabore unabhängig in besonderer Weise bescheinigt. Eine Zertifizierung eines Gesamt-Unternehmens nach ISO 9001 ist Minimalanforderung, um ein funktionierendes QM-System nach offiziellen Normen nachzuweisen.

Keywords: sekundäre Pflanzenstoffe, pflanzliche Aktivstoffe, Pflanzeninhaltsstoffe, Pflanzenextrakt, Haltbarkeit, Stabilitätsprüfung, Rohstoffanalyse, Matrixkompetenz, HPLC, Qualitätsstandards;

Die BioTeSys GmbH in Esslingen (www.biotesys.de) wurde 1999 gegründet und ist ein Spin-Off des Instituts für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften der Universität Hohenheim. BioTeSys ist Partner bei der Entwicklung und Umsetzung neuer Konzepte auf den Gebieten Kosmetik, Nahrungsmittel, und Consumer Health Care/OTC. Das Angebot umfasst Screening-Verfahren zur Erfassung des bioaktiven Potentials von Substanzen oder Substanzgemischen, in vitro-Testverfahren unter Verwendung von Einzelzellkulturen, Co-Kulturen und verschiedenen Organmodellen sowie klinische Studien. BioTeSys ist nach ISO 9001:2000 zertifiziert; die Abteilung Analytik mit den Schwerpunkten HPLC und Photometrie ist zusätzlich nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert. Alle verwendeten Messverfahren und Versuchsparameter sind auf physiologische Vorgaben hin entwickelt und optimiert. Die Ergebnisse und erhobenen Wirkkonzentrationen haben dadurch unmittelbare Aussagekraft für die Einschätzung biologischer Wirkungen.

Als kompletter Dienstleister auf dem Gebiet der biologischen und chemischen Analyse bietet das Unternehmen ein sehr weitreichendes Service-Angebot einschließlich der Entwicklung neuer Verfahren und Produkte im Kundenauftrag.