

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

Alginate, Chitosane und Xanthane – Charakterisierung von Nahrungsmittel-Zusatzstoffen und -Hilfsstoffen mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Dr. Gerhard Heinzmann, Dr. Bernd Tartsch

„Moderne“ Nahrungsmittel enthalten oft eine Vielzahl an Zusatzstoffen die bestimmte Eigenschaften wie z. B. die Gelierung oder die Haltbarkeit optimieren sollen. Viele dieser Zusatzstoffe werden aus natürlichen Quellen gewonnen. So werden z. B. Alginat aus Braunalgen gewonnen und Chitosane aus den Schalen von Meerestieren. Xanthane werden mit Hilfe von Mikroorganismen aus Zucker gewonnen. Alginat und Xanthane sind Nahrungsmittel-Zusatzstoffe die den Nahrungsmitteln schon bei deren Herstellung beigemischt werden, Chitosan hingegen ist ein Hilfsstoff der getrennt von der Nahrung eingenommen wird um die Fettmenge die vom Körper aufgenommen wird zu reduzieren und somit eine Gewichtsreduzierung zu erreichen.

Immer wieder geraten einige dieser Nahrungsmittel-Zusatzstoffe und -Hilfsstoffe in den Verdacht einer gesundheitsschädlichen Wirkung. Oft kann der gesundheitsschädliche Effekt aber auf bestimmte, z. B. niedermolekulare Anteile der Substanzen eingeschränkt werden. Dann ist es sehr wichtig dass mit einer geeigneten Analysetechnik sichergestellt wird dass diese schädlichen Anteile nicht vorhanden sind oder vor der Beimischung zum Nahrungsmittel entfernt wurden.

Mit der Methode der GPC/SEC mit Dreifachdetektion können Nahrungsmittel-Zusatzstoffe und –Hilfsstoffe umfassend charakterisiert werden wobei aufgrund der Größe der Moleküle vor allem dem Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor eine zentrale Rolle in der Analyse zukommt.

Einleitung

Viele Nahrungsmittel-Zusatzstoffe und –Hilfsstoffe gehören zur Klasse der Bio-Polysaccharide zu der auch Stärke und Dextrane zählen. Während sich einige dieser Stoffe sehr einfach und unter Standardbedingungen mit der GPC/SEC analysieren lassen stellen andere höchste Ansprüche an den Anwender und die Systeme. Besonders anspruchsvoll sind hochmolekulare, vernetzte und partiell geladene Substanzen. Zur Analyse derartiger Proben müssen geeignete Methoden entwickelt und leistungsfähige Geräte verwendet werden. Besonders hervorzuheben ist hier der Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor (LALS=Low Angle Light Scattering). Der LALS-Detektor ist der einzige Lichtstreuendetektor der direkt und zuverlässig das Molekulargewicht einer Probe messen kann ohne auf eine Extrapolation von Messdaten zurückgreifen zu müssen wie dies bei der Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS-Multi Angle Light Scattering) der Fall ist [1,2].

Da aber das Molekulargewicht allein oft nicht ausreicht um eine Probe umfassend beschreiben zu können kann die GPC/SEC mit Dreifachdetektion über den Viskositätsdetektor auch die Struktur der Bio-Polysaccharide aufklären, wobei sich der Begriff Struktur hier auf den Kettenaufbau (Verzweigungen) und den hydrodynamischen Radius der Moleküle in Lösung bezieht [3,4].

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

Alginate

Alginate werden vorwiegend aus Braunalgen gewonnen (Abb. 1). Sie werden in großer Menge als Geliermittel eingesetzt.



Abb. 1: Braunalge

Immer mehr Alginat-Hersteller und -Verarbeiter wie auch akademische Arbeitsgruppen die sich mit Alginaten befassen sind an einer exakten Charakterisierung der Alginate sowohl hinsichtlich des Molekulargewichtes wie auch der Molekülstruktur interessiert.

Eine geeignete Analysenmethode für diese Aufgabe ist die GPC/SEC mit Dreifachdetektion, da diese Technik die Alginat-Moleküle zunächst nach Ihrer Größe auftrennt und dann direkt die Molekulargewichte und Struktureigenschaften an jedem Punkt der Verteilung bestimmt.

Ein typisches Dreifachchromatogramm einer Alginatprobe zeigt Abbildung 2. Es handelt sich um ein Alginat mit einem mittleren Molekulargewicht (M_w) von 993.000 D und einer mittleren intrinsischen Viskosität (IV_w) von 28,1 dl/g. Daraus resultiert ein mittlerer hydrodynamischer Radius ($R_{h,w}$) von 74,4 nm.

Vergleicht man diese natürliche Alginatprobe mit einer anderen Alginatprobe die vor der Analyse in einem

Autoklaven behandelt wurde, so wird deutlich dass das Autoklavieren zu einem Abbau der Probe führt.

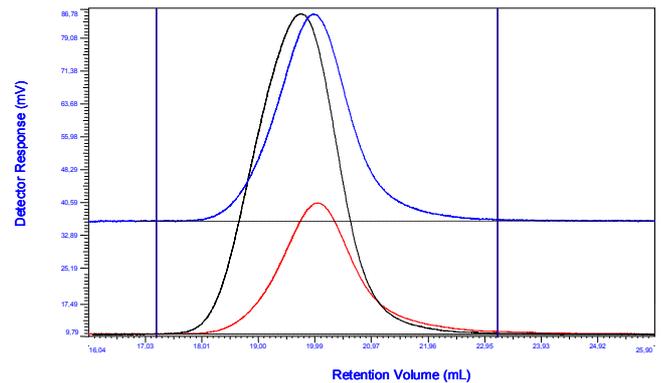


Abb. 2: Dreifachchromatogramm einer Alginat-Probe
Rot: Brechungsindexdetektor,
Blau: Viskositätsdetektor
Schwarz: Kleinwinkel-Lichtstreuungsdetektor

Die autoklavierte Probe weist nur noch ein mittleres Molekulargewicht (M_w) von 105.000 D und eine mittlere intrinsische Viskosität (IV_w) von 4,15 dl/g auf ($R_{h,w}$ =17,9 nm). Abbildungen 3a und 3b zeigen die differentiellen und kumulativen Molekulargewichtsverteilungen der beiden Alginatproben.

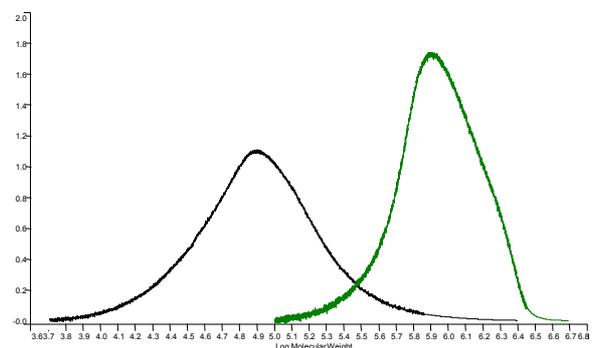


Abb. 3a: Differentielle Molekulargewichtsverteilungen von 2 Alginatproben.
Schwarz: autoklavierte Probe
Grün: natürliche Probe (unbehandelt)

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

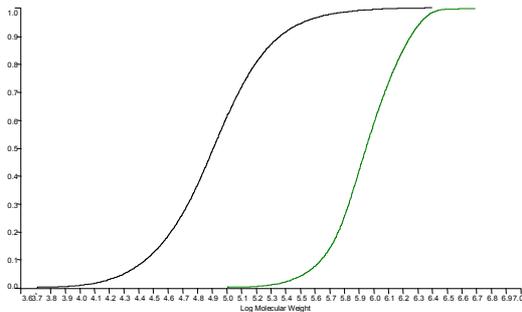


Abb. 3a: Kumulative Molekulargewichtsverteilungen von 2 Alginatproben.
Schwarz: autoklavierte Probe
Grün: natürliche Probe (unbehandelt)

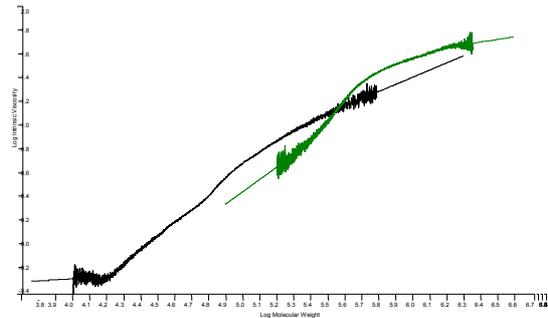


Abb. 4: Mark-Houwink-Plots von 2 Alginatproben.
Schwarz: autoklavierte Probe
Grün: natürliche Probe (unbehandelt)

Die vergleichsweise hohen Werte die für die intrinsischen Viskositäten bei beiden Alginat-Proben gefunden werden zeigen dass die Alginate eine sehr offene, kettensteife Struktur in Lösung ausbilden. Zum Vergleich: Ein Dextranprobe (verzweigte, knäuelartige Polysaccharid-Struktur) hat bei einem Molekulargewicht von 150.000 D nur eine intrinsische Viskosität von 0,34 dl/g und somit nur einen hydrodynamischen Molekülradius von 9,16 nm. Die offene Struktur der Alginatproben wird auch durch den Mark-Houwink-Plot für beide Proben bestätigt (Abbildung 4). Dieser Plot ist der zentrale Strukturplot in der GPC/SEC. Es werden logarithmisch die Intrinsischen Viskositäten (IV) gegen das Molekulargewicht (M) der Probe aufgetragen. Die Werte a und k sind Konstanten wobei a die Steigung einer Geraden und log k deren Achsenabschnitt darstellt.

$$\log IV = \log k + a \times \log M \quad (\text{Mark-Houwink-Gleichung})$$

Für ein Polymer oder Biopolymer das eine lineare Kette ohne Verzweigungen ausbildet ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung von 0,6-0,8 (a-Wert). Für verzweigte Polymere resultiert ein geringerer a-Wert, für kettensteife, gestreckte Moleküle eine höherer a-Wert.

Für die beiden Alginatproben werden a-Werte im Bereich von 0,8 bis 1,1 gefunden was die offene bzw. gestreckte Struktur der Proben bestätigt. Dies bedeutet aber auch, dass für Alginatproben vollkommen falsche Resultate gefunden werden wenn man Sie z. B. vergleichend gegen Dextran- oder Pullulan-Standards analysiert (konventionelle GPC/SEC nur mit Brechungsindexdetektor). Die kettensteife Struktur der Alginate führt zu einem deutlich geringeren Elutionsvolumen bei gleichem Molekulargewicht von z. B. Dextranstandard und Alginatprobe und somit zu völlig überhöhten Molekulargewichten für die Alginatproben. Nur der Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor kann bei diesen Proben exakt und zuverlässig das Molekulargewicht ohne Extrapolation bestimmen.

Chitosane

Chitosane werden als Nahrungsmittel-Hilfsstoff angeboten. Es wird vermutet dass Sie im menschlichen Magen große Mengen Fett binden können welches dann nicht mehr vom Körper aufgenommen werden kann und unverdaut ausgeschieden wird. Dies soll mittelfristig zu einer Gewichtsreduzierung führen. Wissenschaftlich sind diese Thesen aber umstritten. Weiterhin finden Chitosane als Zusatzstoffe in Kosmetika Anwendung.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

Möchte man Chitosanproben mit der GPC/SEC analysieren so muss man zunächst berücksichtigen dass sich Chitosane nur unterhalb eines pH-Wertes von ca. 6,3 lösen. Man muss also auf ein saures Laufmittel zurückgreifen. Dies kann z. B durch die Zugabe von geringen Mengen an Trifluoressigsäure zum wässrigen Puffersystem gewährleistet werden.

Auch muss man die Chitosane sehr lange unter leichtem Erwärmen in Lösung bringen; Lösungszeiten von bis zu 18 Stunden (bei 40°C) sind keine Seltenheit. Es gilt aber darauf zu achten dass während der Lösungszeit keine Abbauprozesse stattfinden.

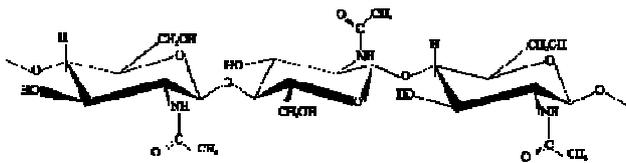


Abb. 5: Chemische Struktur von Chitosan

Vor der Injektion empfiehlt es sich die Proben zu filtrieren (z. B. mit einem 0,45 µm-Filter). Als geeignete Trennsäulen haben sich ViscoGel-Säulen erwiesen. Mit Ihnen können Chitosane bis in den Bereich von mehreren Millionen Dalton Molekulargewicht aufgetrennt werden.

In den Abbildungen 6a und 6b sind die differentiellen Molekulargewichtsverteilungen und die Mark-Houwink-Strukturplots von 3 Chitosanproben abgebildet. Die drei Chitosan-Proben können problemlos anhand Ihrer Molekulargewichtsverteilungen unterschieden werden. Strukturell hingegen sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. In Tabelle 1 sind die berechneten Molekulargewichte, Intrinsic Viscositäten und hydrodynamischen Radien der 3 Chitosan-Proben aufgeführt. Die Radien wurden mit Hilfe des Viskositätsdetektors gemessen, da Radien unter 10 nm mit der Lichtstreuung nicht zugänglich sind.

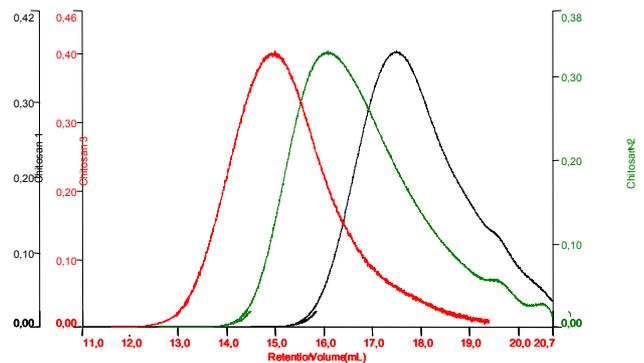


Abb. 6a: Differentielle Molekulargewichtsverteilungen von 3 Chitosanproben

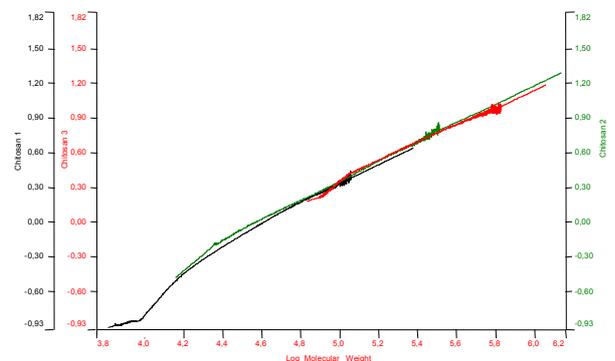


Abb. 6b: Mark-Houwink-Strukturplots von 3 Chitosanproben

Tabelle 1: Berechnete Mittelwerte der Chitosan-Proben

	Chitosan 1	Chitosan 2	Chitosan 3
M _w [g/mol]	19.800	78.700	201.700
IV [dl/g]	0,465	1,780	3,612
R _h [nm]	5,2	12,1	22,9

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

Xanthane

Xanthan ist ein natürliches Verdickungs- und Geliermittel. Es wird mit Hilfe von Bakterien der Gattung Xanthomonas aus zuckerhaltigen Substraten gewonnen und hat als Lebensmittelzusatzstoff die E-Nummer E415.

Xanthanmoleküle sind sehr groß und daher am oberen Ende der GPC/SEC-Skala anzusiedeln. Ihre hydrodynamischen Molekülradien übersteigen die 100 nm Grenze was bereits die Auswahl einer geeigneten Trennsäule mit sehr großen Poren für wässrige Medien voraus setzt. Mit diesen Säulen ist eine GPC/SEC-Analyse von Xanthan möglich.

Abbildung 7 zeigt ein Dreifachchromatogramm einer Xanthanprobe. Wie an den vergleichsweise schmalen Peaks zu erkennen ist weist die Probe nur eine geringe Polydispersität von 1,1 auf.

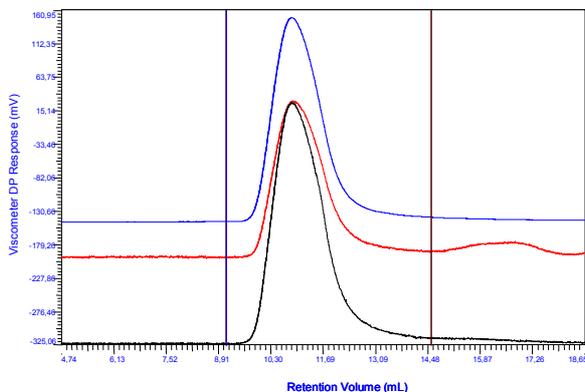


Abb. 7: Dreifachchromatogramm einer Xanthan-Probe
 Rot: Brechungsindexdetektor
 Blau: Viskositätsdetektor
 Schwarz: Kleinwinkel-Lichtstreuungsdetektor

Das mittlere Molekulargewicht der Probe beträgt 7.741.000 D, die intrinsische Viskosität 22,94 dl/g. daraus resultiert ein hydrodynamischer Radius von 140,7 nm.

Der Verlauf des Molekulargewichtes über dem Retentionsvolumen (schwarze Kurve in Abb. 8) zeigt dass die Probe schwach mit dem Packungsmaterial der Trennsäule wechselwirkt.

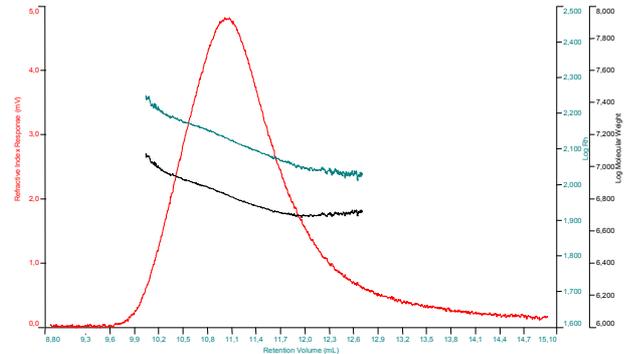


Abb. 8: Ergebnisdarstellung einer Xanthan-Probe
 Rot: basislinienkorrigiertes Brechungsindexchromatogramm
 Schwarz: Log Mw über Retentionsvolumen
 Grün: Log Rh (hydrodynamischer Radius) über Retentionsvolumen

Zu erkennen sind die Wechselwirkungen an den ansteigenden Molekulargewichten bei großen Retentionsvolumina. Dieser Effekt hat auf die Reproduzierbarkeit der Resultate nur einen geringen Einfluss.

Weitere Anwendungen

Neben den bislang aufgeführten Substanzen können natürlich noch sehr viel mehr Proben aus dem Bereich der Nahrungsmittelzusatz- und -Hilfsstoffe mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion analysiert werden. Aufgrund der völlig unterschiedlichen molekularen Strukturen und Molekulargewichte der verschiedenen Bio-Polysaccharide ist es aber wichtig dass das GPC/SEC-System optimal an jede Trennaufgabe angepasst ist. Zu den wichtigen Parametern zählen unter anderem die Zusammensetzung und der pH-Wert des verwendeten Puffersystems, wie auch die Wahl der geeigneten Trennsäulen. Auch die Temperatur der Trennung kann einen maßgeblichen Einfluss auf die Resultate haben; so neigen z. B. Carrageenane bei Temperaturen unterhalb von 60°C zur Dimerisierung (Bildung einer Doppelhelix) wodurch bei zu geringen Trenntemperaturen ein zu hohes Molekulargewicht gefunden wird.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Nahrungsmittel-Zusatzstoffe

Wird als weiterer Detektor noch ein UV-Detektor hinzugezogen so können auch UV-aktive Komponenten bestimmt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Bestimmung des Proteinanteils in Gummi Arabicum, ebenfalls ein Verdickungsmittel wie Xanthan.

Zusammenfassung

Mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion (Kleinwinkel-Lichtstreuung, Viskositätsdetektion und Brechungsindexdetektion) können komplexe Nahrungsmittel-Zusatzstoffe und –Hilfsstoffe auf Polysaccharidbasis umfassend charakterisiert werden.

Neben den absoluten Molekulargewichten der Proben und deren Verteilungen können auch die Molekülstruktur bzw. Verzweigungsstruktur der Makromoleküle und deren hydrodynamische Größe in Lösung bestimmt werden. Besondere Beachtung verdient hier der Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor. Er ist der einzige Lichtstreuendetektor der direkt und zuverlässig das Molekulargewicht einer Probe messen kann ohne auf eine Extrapolation von Messdaten zurückgreifen. Der Viskositätsdetektor misst die Intrinsische Viskosität für den Mark-Houwink-Strukturplot und die Berechnung der hydrodynamischen Radien ohne Größeneinschränkungen.

Literatur:

- [1] S. Mori, H.G. Barth, Size Exclusion Chromatography, Springer Verlag 1999
- [2] G. Heinzmann, R. Walkenhorst: „Bestimmung von absoluten Molekulargewichten mittels GPC-Kleinwinkellichtstreuung“, GIT Separation 1/2002
- [3] B. Tartsch: „Sehen Sie das komplette Bild Ihrer Makromoleküle? Triple Detection in der Gelpermeationschromatographie“, Labo 4/2005, S. 15-18
- [4] G. Heinzmann: „Hyaluronsäure-Charakterisierung eines eigenwilligen Moleküls“, GIT Separation 1/2003, S. 36-37

Kurzbiographie der Autoren:

Dr. Gerhard Heinzmann

Bis 1996 Studium der Chemie und Promotion an der Universität Karlsruhe und am Forschungszentrum Karlsruhe

1996-1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Forschungszentrum Karlsruhe

1998-2000 Vertriebsingenieur im Bereich HPLC und Spektroskopie

seit 2000 Vertriebsingenieur bei der Firma Viscotek GmbH

Dr. Bernd Tartsch

Bis 1999 Studium der Chemie und Physik an der Universität Ulm; 1999-2003 Promotion in der Makromolekularen Chemie an der Universität Ulm. Seit 2003 Mitarbeiter im Vertrieb bei der Firma Viscotek GmbH