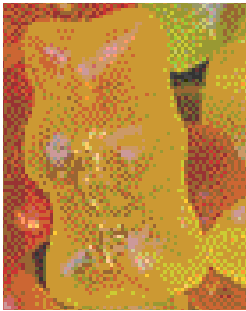
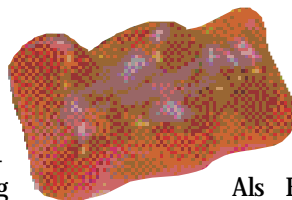


Was haben **Polymere** in Gummibärchen zu suchen?



Ohne die großtechnisch hergestellten Biopolymere wäre die moderne Nahrungsmittelindustrie und Lebensmittelchemie nicht mehr vorstellbar. Am Beispiel von ausgewählten Polysacchariden und Proteinen soll dieser Zusammenhang illustriert werden. Die Molmasse und die Molmassenverteilung bestimmen die chemisch-physikalischen Eigenschaften und somit das Einsatzspektrum dieser Biopolymere.

THORSTEN HOFE* UND GÜNTER REINHOLD*



Polysaccharide sind in der Natur weit verbreitet. Sie haben eine große Bedeutung als strukturbildende Stoffe (Cellulose, Pektine bei Pflanzen, Chitin etc.), als Energielieferanten und Reservestoffe (Stärke, Dextrine, Fructane, Glycogene bei Tieren) sowie als wasserbindende Stoffe (u.a. Carragenane, Agar, Pektin bei Pflanzen, Glycogene bei Tieren). Man findet diese Biopolymere als Gerüstpolymere bei Obst, Gemüse (Cellulose) und Tieren (Glycogen), sowie als Energielieferant oder Nährstoff in Getreide, Kartoffeln und Hülsenfrüchten (Stärke).

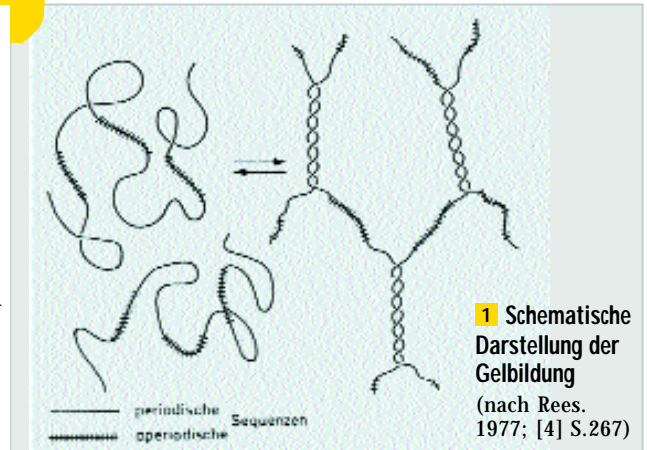
Die Lebensmittelindustrie macht sich die Eigenschaften der Polysaccharide ebenfalls zu Nutze und setzt sie in ihrer nati-

ven oder in modifizierter Form als Hilfsstoffe bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln ein. Als Emulgatoren oder Dispergatoren (Stabilisatoren für die Emulsion oder Dispersion) sowie als Dickungs- oder Geliermittel finden Polysaccharide regelmäßig Verwendung. Füllstoffe zur Steigerung des Ballaststoffanteils von Nahrungsmitteln sind ein weiteres bekanntes Einsatzgebiet von Polysacchariden.

Man findet sie überall

Man findet diese Polymere in Käse (Wasserbindung, Carragenane) ebenso wie in Gelees für Fleisch und Gemüse oder als Geliermittel in Pudding. Auch in Gummibärchen befinden sich neben Gelatine als Proteinbestandteil auch Polysaccharide als Grundbaustein oder – anders ausgedrückt – ohne Gelatine und Polysaccharide gäbe es keine Gummibärchen. Die oben erwähnten Geliereigenschaft (siehe auch Kasten-

text „Die Gelierung“ am Ende des Artikels) machen die Polysaccharide für die Lebensmittelindustrie so interessant. Die Gelatine gehört zur Gruppe der Proteine. Sie ist ein Abbauprodukt des Faserproteins Kollagen und wird durch partielle saure oder alkalische Hydrolyse des Kollagens aus Knochen, Sehnen oder Hautabfällen gewonnen [3]. Hierbei wird



die Triplehelix des unlöslichen Kollagens unter Bildung von löslicher Gelatine aufgebrochen [4].

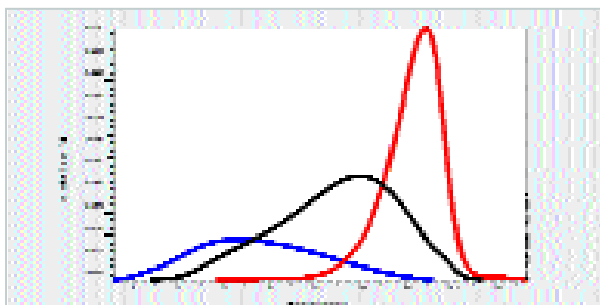
Gelatine wird unter anderem bei der Herstellung photographischer Emulgatoren, in der Pharmaindustrie für Gelatine-kapseln oder Plasmaexpander und auch in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt. Die Geliereigenschaften sind extrem molmassenabhängig. Von den weltweit produzierten 175 bis 200 Kilotonnen gehen 65% in die Nahrungsmittelindustrie und 20% in die Photo- und Pharmaindustrie [3].

BUCHTIPP

Henke, Hans: *Flüssig-Chromatographie* (ISBN 3-8023-1757-2), Vogel Buchverlag, Tel. 0931-418-2419

Das Buch „Flüssig-Chromatographie“ bietet dem Anwender in langjähriger Berufspraxis gesammelte Lösungsbeispiele für die Trennung von Stoffgemischen. Die einzelnen Themen sind: Chromatographische Trennsysteme, Präparative Trennung komplexer Substanzgemische, Spurenanalytik, Polymeranalytik, Analytische HPLC, Präparative Gelchromatographie sowie Analysenvorschriften. Die Beispiele zeigen die breite Anwendbarkeit analytischer und präparativer Trennsysteme und weisen auf die Zusammenhänge zwischen einzelnen Trennverfahren bzw. -mechanismen hin.

*Dr. T. Hofe, Dr. G. Reinhold, PSS GmbH, 55120 Mainz



2 Unterschiedliche Stadien des Chitosanabbaus (blau: frühes Stadium, schwarz: mittleres Stadium, rot: spätes Stadium) Bedingungen: Detektor Agilent RI, Säule PSS Novema 10 µm 3000 Å, Eluent Saure Lösung, Fluss 1 ml/min

Möglichkeiten der GPC

Generell ist das Eigenschaftsspektrum der Biopolymere durch die Polymerzusammensetzung, die Stereostruktur, die Topologie und die Molmasse bestimmt. All diese Informationen lassen sich mittels GPC und geeigneter Kopplungsmethode bestimmen. Die GPC bzw. SEC ist eine flüssigchromatographische Methode, bei der Polymere nach hydrodynamischem Volumen und somit in Korrelation zu ihrer Molmasse separiert werden [5]. Die GPC ist eine Relativmethode. Zur Bestimmung der Molmassen muss eine geeignete Kalibrationskurve zugrunde gelegt werden. Für einen qualitativen Produktvergleich genügt es oftmals schon, wenn einfache Eluogramme der entsprechenden Biopolymere im Rahmen eines

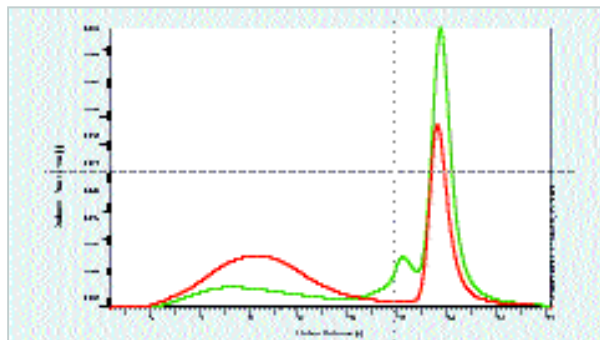
„Gut-Schlecht“-Vergleiches gegenüber gestellt werden (Abb. 3, 4). Peakform und -lage lassen dann schon Schlussfolgerungen bzgl. der eingesetzten Biopolymere zu. Strukturinformationen und absolute Molmassen lassen sich durch GPC in Kombination mit molmassensensitiven Detektoren (Online-Vielwinkellichtstreuendetektor oder -Differentialviskosimeter) schnell und zuverlässig bestimmen.

Die Möglichkeiten der GPC sollen an repräsentativen Polysacchariden wie Pektinen, Gummi Arabicum und Carrageenanen sowie an Gelatine als Vertreter der Proteine gezeigt werden. Als Referenzsubstanz werden die GPC-Ergebnisse von Dextranen gemessen gegen Pullulan-Kalibration dargestellt. Beide Polymere sind chemisch sehr ähnliche Polysaccharide. Abweichungen ergeben sich nur bei großen Molmas-

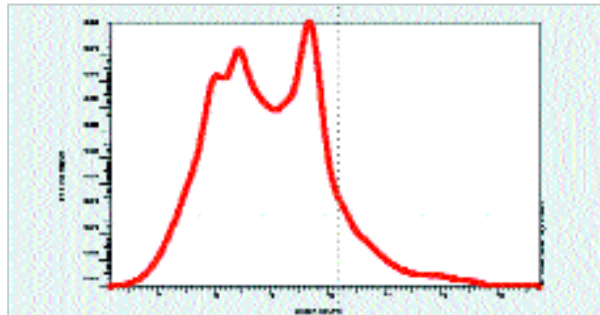
sen aufgrund von Verzweigung. Schon der einfache Vergleich der Eluogramme erlaubt eine qualitative Aussage über die Produktzusammensetzung und das mögliche Eigenschaftsprofil – vorausgesetzt es wurde sichergestellt, dass die zu untersuchenden Proben entsprechend dem GPC-Trennmechanismus eluieren.

Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Molmassenbestimmung verschiedener Biopolymere mittels GPC und geeigneter Kopplungsmethoden (Online-Viskosimeter und Online-Malls-Detektor) vorgestellt. Die Analysenbedingungen sind im Kastentext „Experimentelles Set-up“ zusammengefasst. Die Molmassen der untersuchten, repräsentativen Auswahl von Biopolymeren sind in Tabelle 1 zu-



3 Überlagerung zweier unterschiedlicher Pektine, 6 ml bis 10 ml, rot: Apfel, grün: Zitrone, Retentionsvolumen über 11 ml zeigen die entsprechenden niedermolekularen Saccharide
Bedingungen: Detektor Agilent RL, Säule PSS Suprema 10 µm 1000 Å, Eluent Salz-Puffer, Fluss 1 ml/min



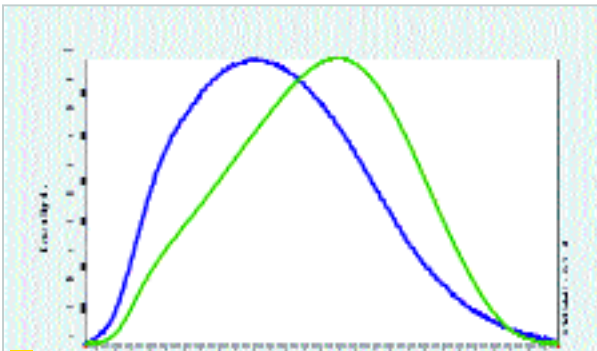
4 Gelatine – technisches Abbauprodukt aus basisch hydrolysiertem Kollagen
Bedingungen: Detektor Agilent UV 230 nm, Säule PSS Suprema 10 µm 1000 Å, Eluent SDS-Puffer, Fluss 1 ml/min

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Molmassen für ausgewählte Biopolymere

Biopolymer	Konventionelle GPC Mw [g/mol] ²	GPC-Viskosimetrie Mw [g/mol]	GPC-Lichtstreuung Mw [g/mol]
κ-Carrageenan	5 600 000	1 400 000	1 200 000
Gummi arabicum	245 000	680 000	660 000
Pectin (Apfel) ¹	690 000	150 000 (Mn = 30 000)	367 000 (Mn = 19 000)
Pectin (Zitrone) ¹	600 000	130 000 (Mn = 25 000)	300 000 (Mn = 23 000)
Dextran	200 000	265 000	260 000
Gelatine	230 000 (Mn = 5000)	nicht gemessen	nicht gemessen

¹ bei den Pectinen handelt es sich um Copolymere; die Lichtstreu-Messung kann hierbei großen Fehlern unterworfen sein, u.U. gelingt die Mn-Bestimmung genauer bzw. lassen sich Mn aus Lichtstreuung und Viskosimetrie in diesem Fall besser vergleichen [6]

² gemessen gegen Pullulan Standards



5 κ -Carragenane – blau ist das Viskositätssignal (dp-Signal), grün das RI-Signal
Bedingungen: Detektoren Agilent RI, PSS ETA1001, Säule PSS Suprema 10 μm 3000 Å, Eluent wässriges Puffersystem, Fluss 1 ml/min

sammengestellt. Sie überstreichen einen Molmassenbereich von 200 000 g/mol bis >1 200 000 g/mol. Die Ergebnisse der konventionellen GPC unterscheiden sich sehr deutlich von denen der GPC-Kopplungsmethoden. Dies ist auf Relativmessung mit Pullulan-Kalibration zurückzuführen. Je mehr sich die zu untersuchende Probe und die Kalibrationsstandards unterscheiden, desto größer wird der Fehler in der Molmassenbestimmung. Die gefundenen Molmassen können schnell um mehr als 100% abweichen. Die Verzweigung der Dextrane

DIE GELIERUNG

Strukturelle Voraussetzung für die Fähigkeit zur Gelbildung bei Polysacchariden ist in allen Fällen die Unterbrechung periodischer, zur Ausbildung regulärer Konformationen geeigneter Sequenzen, bei gleichzeitig ausreichend großer Molmasse der Polymerkette. Die Unterbrechung gelingt unter anderem durch Insertion von Zuckerresten mit anderer Bindungsgeometrie (z.B. Carragenanen oder Pektinen), durch geeignete Verteilung freier und veresterter Carboxylgruppen (Glycoronane) oder durch entsprechende Seitenketten [4]. Die interchenanen Wechselwirkungen der periodischen Strukturen (Doppelhelices, Wechselwirkungen gestreckter Strukturen untereinander oder Wechselwirkungen helicaler und gestreckter Strukturen, u.ä.) führen zu einem supramolekularen reversiblen Netzwerk, das in der Lage ist, über inter- und intramolekulare Wechselwirkungen große Mengen Wasser einzulagern und dabei aufzuquellen. Dieser Vorgang ist als Gelierung bekannt (Abb. 1).

im Vergleich zu den linearen Pullulan-Kalibrationsstandards ist der Grund, warum hier konventionell eine zu kleine Molmasse gefunden wird. Verzweigte Produkte sind kompakter und eluieren somit später als vergleichbare lineare Polymere.

Abgesehen von den Pektinen ist die Übereinstimmung bei den GPC-Kopplungsmethoden zufriedenstellend. Die Unterschiede bei den Pektinen rühren daher, dass das spezifische Brechungssinkrement für Polymere über das gesamte

Molekül nicht konstant ist. Der Lichtstreuendetektor sieht somit variierende Streuintensitäten, die aber nicht auf Molekülgrößenunterschiede zurückzuführen sind.

W. Radke hat gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen die M_n -Bestimmung von Copolymeren aus Online-Lichtstremessungen unabhängig vom dn/dc ist [6]. Da die Molmassenbestimmungen aus Viskositätsmessungen weniger sensibel auf die dn/dc -Abhängigkeit der Polymere reagieren, sind bei den Pektinen deshalb neben den M_w -Werten die Ergebnisse von M_n gegenübergestellt. Betrachtet man die M_n -Werte, so sind die Molmassenunterschiede zwischen GPC-LS und GPC-Visko akzeptabel.

Was die Chromatogramme sagen

Der Chitosanabbau (Abb. 2) ist ein sehr gutes Beispiel für die Prozessbegleitung mittels GPC. Je kleiner das Chitosanhydrolysat, desto größer ist das Elutionsvolumen. Die Chitosane werden unter den angegebenen Bedingungen nach hydrodynamischem Volumen und somit nach Größe separiert. Die Chromatogramme des Apfel- und Zitronenpektins (Abb. 3) unterscheiden sich deutlich. Ein qualitativer Vergleich ist auf diese Weise leicht möglich. Darüber hinaus werden auch die entsprechenden niedermolekularen Saccharide abgetrennt.

Bei der basischen Hydrolyse von Kollagen entsteht ein breitverteiltes heterogenes Gemisch wasserlöslicher Proteine, die Gelatine genannt werden. Das Elugramm (Abb. 4) zeigt deren heterogene Zusammensetzung. Abbildung 5 zeigt einen typischen Kurvenverlauf für hochmolekulare Proben. Die Molmassenabhängigkeit des Viskositätsdetektors führt dazu, dass das Viskositätssignal auf der hochmolekularen Flanke ausgeprägter ist als das Konzentrationssignal. Auf der niedermoleku-

EXPERIMENTELLES SET-UP

- j** Agilent 1100 Anlage
- j** Konzentrations-Detektor: Agilent RI
- j** Viskosimeter: PSS ETA1001
- j** Mehrwinkel-Lichtstreu-Detektor: PSS SLD7000
- j** Eluenten: Wässrige Salz- und Pufferlösungen
- j** GPC-Säulen: PSS 10 μm Suprema; 8 x 300 mm; 100 Å, 1000 Å, 10 000 Å und PSS Novema 10 μm , 8 x 300 mm 100 Å
- j** Temperatur: 25 °C

laren Flanke dominiert das Konzentrationssignal, weil zwar die Teilchenzahl groß ist, nicht aber die Teilchengröße.

Zusammenfassung

Die GPC ist eine geeignete Methode zur Molmassenbestimmung von Biopolymeren. Über die Chromatogramme gelingt sehr schnell ein qualitativer Produktvergleich. Die exakten Molmassen der Biopolymere lassen sich über GPC-Viskositäts- bzw. Lichtstreu-Kopplung bestimmen. Dazu unbedingt notwendig ist eine wechselwirkungsfreie Chromatographie. Für wässrige Eluenten mit Salz-, Puffer- oder Säurezusatz haben sich PSS Suprema und PSS Novema als geeignete Trennphasen bewährt. LP

Literatur:

- [1] Chemie in Lebensmitteln, J.F. Diehl, Wiley-VCH Verlag, 2000; S.3 ff
- [2] Frankfurter Allgemeine Zeitung vom 01.09.1999
- [3] Biopolymere; G.Ebert; Teubner Verlag Stuttgart 1993; S.233ff
- [4] Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Auflage; H.D. Belitz, W.Grosch, Springer 1992
- [5] Grundlagen der GPC; T.Hofe; G.Reinhold; CLB, 50. Jahrgang, Heft 1/1999
- [6] Radke, W., Simon P.F.W.; Müller A.H.E.; Macromolecules 1996, 29, 4926-4930
- [7] dn/dc -Bestimmung; Hofe, T.; Königsmann, H.; Git 4/2003; S. 380-383
- [8] GPC-Viskosimetrie; Held, D.; Labo 4/2003; S. 48-50

Weitere Informationen:

www.laborpraxis.de

103928

- Weitere Details zur Trennphase Suprema
- Weitere Details zur Trennphase Novema
- Fragen an PSS und direkter Kontakt

Fax: +49 (0 61 31) 9 62 39 - 11