



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Gehalt und Reinheit von Xanthan - Methodenvalidierung“

verfasst von

Anita Wabra, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Xanthan	3
2.1.1 Aufbau und Struktur von Xanthan	3
2.1.2 Eigenschaften von Xanthan.....	6
2.1.3 Produktion von Xanthan	8
2.1.4 Sicherheit und Anwendung von Xanthan	9
2.2 Fällung von Xanthan	11
2.3 Methodenvalidierung	13
3 Material und Methoden	17
3.1 Fällungsmethode	17
3.1.1 Prinzip der Fällungsmethode	17
3.1.2 Verwendete Geräte.....	17
3.1.3 Verwendete Reagenzien	18
3.1.4 Methode: Durchführung	18
3.2 Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Titration und Ausheizofen	21
3.2.1 Prinzip der Wasserbestimmung mit der volumetrischen Karl-Fischer- Titration und Ausheizofen.....	21
3.2.2 Verwendete Geräte.....	21
3.2.3 Verwendete Reagenzien	22
3.2.4 Aufbau des Karl-Fischer Messgerätes	22
3.2.5 Methode: Durchführung	23

4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	24
4.1	Ergebnisse zur Methodenerstellung	24
4.1.1	Vorlagen zur Methodenerstellung	24
4.1.2	Vorgehensweise bei der Methodenerstellung	25
4.1.3	Zusammenfassung der Fällungsmethode	31
4.2	Ergebnisse der Fällungsmethode	32
4.2.1	Ergebnisse der Jungbunzlauer-Chargen	32
4.2.2	Ergebnisse der Verfälschungen	33
4.2.3	Ergebnisse bei Bezug auf die Trockensubstanz	35
4.3	Beurteilung der Ergebnisse aus Sicht einer Methodenvalidierung	43
4.3.1	Präzision	43
4.3.2	Richtigkeit	50
4.3.3	Linearität	51
4.4	Beurteilung der Ergebnisse der Fällungsmethode	53
5	<i>Schlussbetrachtung</i>	55
6	<i>Zusammenfassung</i>	58
7	<i>Abstract</i>	59
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	60
9	<i>Lebenslauf</i>	63

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AUFNAHME VON XANTHOMONAS CAMPESTRIS MIT EINEM TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOP (12.000 MAL VERGRÖßERT) [GARCÍA-OCHOA ET AL., 2000].....	3
ABBILDUNG 2: PRIMÄRSTRUKTUR VON XANTHAN [SWORN, 2000]	4
ABBILDUNG 3: INTERAKTION ZWISCHEN XANTHAN UND GALACTOMANNAN [CASAS UND GARCÍA-OCHOA, 1999]	7
ABBILDUNG 4: XANTHAN – PRODUKTIONSFLIEßBILD [JUNGBUNZLAUER AUSTRIA AG, 2013].....	8
ABBILDUNG 5: ANALYTISCHE KENNGRÖßEN IN ABHÄNGIGKEIT VON AUSGANGSMATERIAL UND UNTERSUCHUNGSZIEL [TESTO INDUSTRIAL SERVICES GMBH, 2007]	13
ABBILDUNG 6: VALIDIERUNGSPARAMETER FÜR UNTERSCHIEDLICHE ANALYTISCHE VERFAHREN [ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005]	14
ABBILDUNG 7: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PRÄZISION UND RICHTIGKEIT	15
ABBILDUNG 8: SCHRITT 1 – LÖSEN DER XANTHAN-PROBE	18
ABBILDUNG 9: SCHRITT 2 – FÄLLEN DER 1 % XANTHAN-LÖSUNG.....	19
ABBILDUNG 10: SCHRITT 3 – FILTERN DER GEFÄLLTEN XANTHAN-LÖSUNG.....	19
ABBILDUNG 11: SCHRITT 5 – TROCKNEN DER XANTHAN-FASERN	20
ABBILDUNG 12: AUFBAU DES KARL-FISCHER-MESSGERÄTES MIT AUSHEIZOFEN.....	22
ABBILDUNG 13: FÄLLUNGS-METHODE AUS 7 TH JSFA MONOGRAPHIE XANTHAN (JSFA – MONOGRAPHIE, N.D.)	24
ABBILDUNG 14: ALTERNATIVE METHODE ZUR JSFA METHODE	25
ABBILDUNG 15: LINEARITÄT DER VERFÄLSCHUNG DER JUNGBUNZLAUER FN 1 MIT NATRIUM-CHLORID.....	34
ABBILDUNG 16: LINEARITÄT (AUS 6 EINZELMESSUNGEN AM SELBEN TAG) DER VERFÄLSCHUNGEN DER JUNGBUNZLAUER FN 1 MIT SACCHAROSE.....	35
ABBILDUNG 17: TG-ANALYSE DER FN 1	37
ABBILDUNG 18: TG-ANALYSE DER GEFÄLLTEN, GETROCKNETEN FASERN DER FN 1	37
ABBILDUNG 19: DDK-ANALYSE DER FN 1.....	39
ABBILDUNG 20: DDK-ANALYSE DER GEFÄLLTEN, GETROCKNETEN FASERN DER FN 1	39
ABBILDUNG 21: VERGLEICH XG-GEHALT UND XG-GEHALT AUF DIE TROCKENSUBSTANZ BEZOGEN	41
ABBILDUNG 22: BOXPLOT DER VARIABLE „XG-GEHALT [%] DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE	47
ABBILDUNG 23: HISTOGRAMM DER VARIABLE „XG-GEHALT [%] DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE“	48
ABBILDUNG 24: LINEARITÄT DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE	51

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERGLEICH ISOPROPANOL 88 % UND ETHANOL ABSOLUT ALS FÄLLUNGSMITTEL (BEZOGEN AUF 100 ML 1 %IGE XANTHANLÖSUNG)	27
TABELLE 2: VERGLEICH DER WARTEZEITEN ZWISCHEN FÄLLUNG UND FILTRATION.....	27
TABELLE 3: XG-GEHALTS-VERGLEICH BEI UNTERSCHIEDLICHEN TROCKNUNGSZEITEN IM TROCKENSCHRANK BEI 105 °C.....	29
TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG DER GEWÄHLTEN PARAMETER FÜR DIE ERSTELLTE FÄLLUNGSMETHODE.....	31
TABELLE 5: ERGEBNISSE DER JUNGBUNZLAUER-XANTHAN-CHARGEN	32
TABELLE 6: ERGEBNISSE DER VERFÄLSCHUNGEN MIT NATRIUM-CHLORID	33
TABELLE 7: ERGEBNISSE DER VERFÄLSCHUNGEN MIT SACCHAROSE	34
TABELLE 8: EINSTELLUNGEN BEI DER THERMOGRAVIMETRISCHEN ANALYSE	36
TABELLE 9: ERGEBNISSE DER THERMOGRAVIMETRISCHEN ANALYSE	36
TABELLE 10: EINSTELLUNGEN BEI DER DYNAMISCHEN DIFFERENZKALORIMETRIE	38
TABELLE 11: ERGEBNISSE DER DYNAMISCHEN DIFFERENZKALORIMETRIE	38
TABELLE 12: ERGEBNISSE DER WASSERGEHALTSBESTIMMUNG	40
TABELLE 13: VERGLEICH DER ERGEBNISSE XG-GEHALT UND XG-GEHALT AUF DIE TS BEZOGEN	41
TABELLE 14: ERGEBNISSE ZUR PRÄZISION VON TAG ZU TAG DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE	44
TABELLE 15: PRÄZISION VON SERIE ZU SERIE DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE – BESTIMMUNG DES XG-GEHALTES ANFANG APRIL	45
TABELLE 16: PRÄZISION VON SERIE ZU SERIE DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE – BESTIMMUNG DES XG-GEHALTES MITTE MAI	45
TABELLE 17: ERGEBNISSE DES XG-GEHALTES DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE VON ANALYTIKERIN 2	46
TABELLE 18: DESKRIPTIVE STATISTIK DER VARIABLE „XG-GEHALT [%] DER JUNGBUNZLAUER FN 1-CHARGE“	47
TABELLE 19: KOLMOGOROV-SMIRNOV-ANPASSUNGSTEST – TEST AUF NORMALVERTEILUNG.....	48
TABELLE 20: VERGLEICH DES XG-GEHALTES ZWEI VERSCHIEDENER JUNGBUNZLAUER FN-CHARGEN	50
TABELLE 21: XG-GEHALTSBEREICH BEI VERVIELFACHUNG DER STANDARDABWEICHUNG.....	53

1 Einleitung und Fragestellung

Xanthan gehört als Polysaccharid zu den Hydrokolloiden und bildet bereits bei niedrigen Konzentrationen hochviskose Lösungen. Aufgrund der chemischen Struktur weist dieses Polymer ein breites Eigenschaftenprofil auf. Xanthan ist als Lebensmittelzusatzstoff (E 415) und als Hilfsstoff in der pharmazeutischen Industrie zugelassen. Auch im technischen Bereich wird Xanthan als Hilfsmittel eingesetzt.

Die Substanz Xanthan ist in folgenden Kompendien monographiert:

- EU Reinheitskriterien (Verordnung (EU) Nr. 231/2012 der Kommission)
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)
- Food Chemicals Codex (FCC)
- Europäische Pharmakopöe (Ph. Eur.)
- United States Pharmacopeia (USP)
- Japanese Standards of Food Additives (JSFA)
- Japanese Pharmacopoeia (JP)

In einem Teil dieser Monographien wird der Gehalt von Xanthan mit dem „Alginate Assay“ spezifiziert. Dieser „Alginate Assay“ ist eine sehr ungenaue, unspezifische und sehr aufwändige Methode. Dies führt immer wieder zu Nachfragen von Kunden, die bei dem Test falsche Ergebnisse erhalten. Daher soll eine alternative Methode im Rahmen der Industrieassoziation BIOPOLYMER International erarbeitet werden, um in die Monographien Einzug zu halten.

Bei der Gehaltsbestimmung geht es um die Quantifizierung des Gehaltes der eingekauften Substanz, womit sich eine mögliche Verfälschung erkennen lässt und dadurch auch die Reinheit beurteilt werden kann. Dazu gibt es bereits eine Methode:

Die JSFA (Japanese Standards of Food Additives) enthält eine Fällungsmethode, die eine Verfälschung mit Salz und Zucker erkennen lassen soll und der Gehalt quantitativ bestimmt werden kann.

In dieser Masterarbeit wird eine Fällungsmethode erstellt um den Gehalt von Xanthan-Proben zu bestimmen. Des Weiteren soll man mit dieser Methode beurteilen können, ob bei einer Xanthan-Probe eine Verfälschung mit Salz oder Zucker vorliegt.

Nun ergeben sich folgende Fragestellungen, die im Zuge dieser Masterarbeit beantwortet werden sollen:

- Ist die Fällungsmethode zur Gehaltsbestimmung für ihren Einsatzzweck geeignet und erfüllt sie die gestellten Anforderungen?
- Kann diese Methode routinemäßig in einem Qualitätskontrolllabor eingesetzt werden?

2 Literaturübersicht

2.1 Xanthan

Bei Xanthan handelt es sich um ein natürliches Polysaccharid und es ist ein wichtiges industrielles Biopolymer. In den 1950er Jahren wurde diese Substanz von den Northern Regional Research Laboratories in den USA entdeckt. Aufgrund der außergewöhnlichen Eigenschaften von Xanthan wurden in den 1960er Jahren umfassende Forschungsarbeiten rund um dieses Biopolymer durchgeführt. Im Jahr 1964 konnte industriell hergestelltes Xanthan erstmals käuflich erworben werden [BORN, 2002]. Produktionsstätten sind heute weltweit zu finden. Zu den größten Unternehmen gehören Archer-Daniels-Midland Company, Cargill, CP Kelco, Deosen, Fu Feng und Jungbunzlauer Austria AG.

2.1.1 Aufbau und Struktur von Xanthan

Xanthan wird durch den Mikroorganismus *Xanthomonas campestris* synthetisiert, welcher zu den gram negativen, aeroben Bakterien der Gattung *Xanthomonas* gehört. Alle Bakterien dieser Gattung gelten als pflanzenpathogen, welche über 400 Pflanzenarten wie zum Beispiel Kohlgewächse befallen [SIEBER et al., 2006]. *Xanthomonas* Zellen sind stäbchenförmig und besitzen zur Fortbewegung eine polare Geißel (siehe Abbildung 1) [GARCÍA-OCHOA et al., 2000]. *Xanthomonas campestris* bildet gelbe, glatte und muköse Kolonien, welche von Xanthan umgeben sind und somit dem Bakterium Schutz vor Austrocknung bieten [FLORES-CANDIA und DECKWER, 1999].

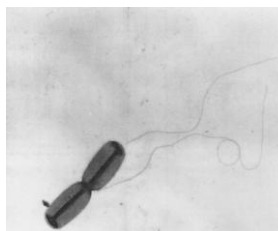


Abbildung 1: Aufnahme von *Xanthomonas campestris* mit einem Transmissionselektronenmikroskop (12.000 Mal vergrößert) [GARCÍA-OCHOA et al., 2000]

DIE PRIMÄRSTRUKTUR VON XANTHAN

Die Primärstruktur gibt Auskunft über die Art und Sequenz der Monomereinheiten in einer Kette. Grundsätzlich besteht die Hauptkette von Xanthan aus D-Glukose-Einheiten, welche β -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch miteinander verbunden sind und ein lineares Grundgerüst bilden. Die Hauptkette gleicht somit dem Cellulose-Grundgerüst. Da es sich bei Xanthan um ein Heteroglucan handelt, enthält es außer der D-Glukose noch zwei weitere Monosaccharide, die Mannose und Glucuronsäure [JANSSON et al., 1975].

Das molare Verhältnis Glucose zu Mannose zu Glucuronsäure ist 2:2:1, somit besteht Xanthan aus sich wiederholenden Pentasaccharid-Einheiten [MELTON et al., 1976]. In der Abbildung 2 ist die Primärstruktur von Xanthan ersichtlich.

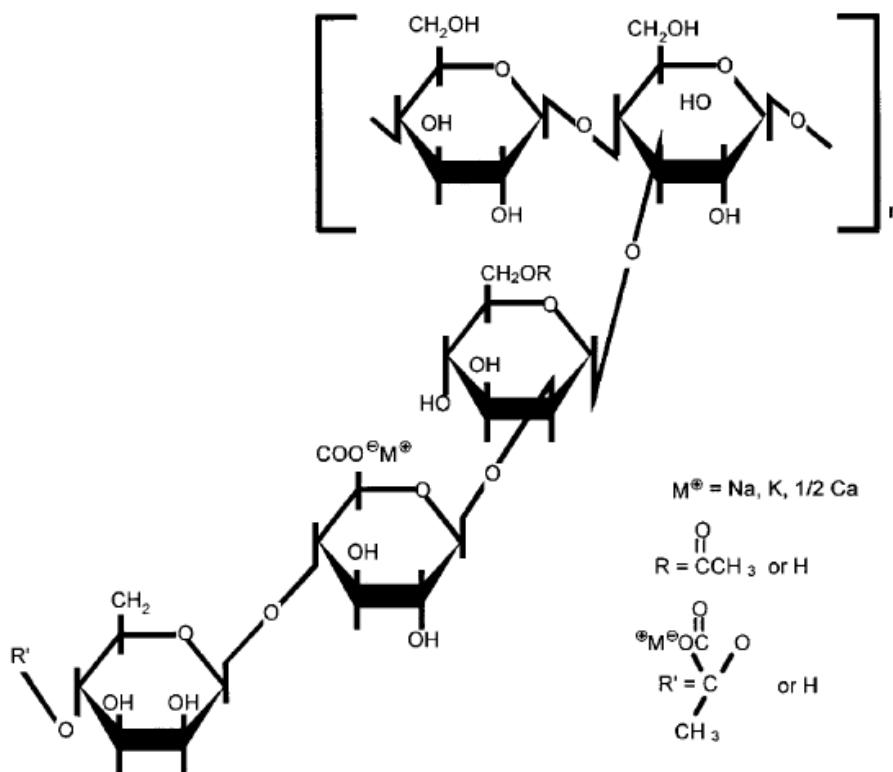


Abbildung 2: Primärstruktur von Xanthan [SWORN, 2000]

An jeder zweiten Glucose-Einheit der Hauptkette ist am C₃ eine α -D-Mannose durch eine (1 $\rightarrow$ 3)-glykosidische Verbindung angeknüpft. An diese Mannose-Einheit bindet die β -D-Glucuronsäure mit einer (1 $\rightarrow$ 2)-glykosidischen

Verbindung. Die zweite Mannose-Einheit (β -D-Mannose) schließt mit einer (1 $\rightarrow$ 4)-glykosidischen Verknüpfung an [JANSSON et al., 1975] und [MELTON et al., 1976].

Die beiden Mannose-Einheiten liegen häufig derivatisiert vor, wobei die innere α -D-Mannose am C₆ acetyliert sein kann (mit 6-O-Acetylesther) und die äußere β -D-Mannose am C₄ und C₆ mit Pyruvat (als 4,6-O-Ketal) [JANSSON et al., 1975] oder nur am C₆ mit einem zweiten Acetat (als 6-O-Acetylesther) verbunden sein kann. Die Anteile an Pyruvat und Acetat variieren, da diese vom verwendeten Bakterienstamm, von den bakteriellen Wachstumsbedingungen und Produktionsbedingungen abhängig sind [STANKOWSKI et al., 1993]. Das anionische Heteropolysaccharid besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 2×10^6 Da [DINTZIS et al., 1970].

DIE SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR VON XANTHAN (KONFORMATION)

Die Konformation von Makromolekülen wird grundsätzlich durch die Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt. Die Sekundärstruktur beschreibt die Anordnung der Primärstruktur eines Makromoleküls, wobei vor allem auf das Polymerückgrat eingegangen wird. Bei Polysacchariden sind helicale und bandartige Sekundärstrukturen bekannt. Des Weiteren gibt es die Tertiärstruktur, die die Anordnung der Sekundärstrukturelemente im Raum definiert.

Die Konformation des Xanthan-Moleküls kann unterschiedlich sein. Sie wird vor allem durch die Temperatur, aber auch durch die Salzkonzentration beeinflusst [MILAS und RINAUDO, 1986].

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einer geordneten und einer ungeordneten Konformation. Die geordnete Form liegt vor, wenn Xanthan in einer 0,01 M NaCl-Lösung gelöst ist. In Wasser liegt das Xanthan-Molekül in einer ungeordneten Konformation vor [BRESOLIN et al., 1997]. In der ungeordneten Konformation wird das Xanthanmolekül als Zufallsknäuel (random coil) beschrieben, wohingegen die geordnete Xanthan-Form als eher unbewegliches Molekül eingestuft wird [SHATWELL et al., 1990].

Das Xanthan-Molekül kann durch Temperaturwechsel und Veränderung der Salzkonzentration von der geordneten Struktur in die ungeordnete Struktur übergehen. Bei niedrigen Salzkonzentrationen und/oder bei hohen Temperaturen wird die ungeordnete Konformation eingenommen, wohingegen die geordnete Struktur bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigen Temperaturen bzw. bei zuvor noch nie erhitztem Xanthan (natives Xanthan) vorliegt. Für diese unterschiedlichen Konformationen ist ein intramolekularer Prozess verantwortlich, der durch Wechselwirkungen zwischen den Trisaccharid-Seitenketten und dem Glucose-Grundgerüst zustande kommt [MILAS und RINAUDO, 1986].

Zur Beschreibung der Konformation gibt es unter Wissenschaftlern verschiedene Ansichten. Auf der einen Seite kann diese als einzelsträngige und auf der anderen Seite als doppelsträngige Helix definiert werden [MILAS et al., 1996] und [CAMESANO und WILKINSON, 2001].

2.1.2 Eigenschaften von Xanthan

Xanthan hat ein sehr breites Eigenschaftenprofil, wobei dieses stark durch den chemischen Aufbau, aber auch durch die Konformation beeinflusst wird.

LÖSLICHKEIT

Xanthan ist sowohl in heißem als auch in kaltem Wasser löslich [SHARMA et al., 2006]. Damit Xanthan gelöst werden kann, muss es während des Lösungsvorganges in ständiger Bewegung gehalten werden, um Klumpenbildung zu vermeiden.

VISKOSITÄT

Das in Wasser gelöste Xanthan ist eine hochviskose Lösung und entsteht bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die Viskosität dient als Maß für die Zähflüssigkeit einer Flüssigkeit, welche von der inneren Reibung abhängig ist. Xanthan-Lösungen gehören zu den nicht-newtonischen Flüssigkeiten. Das heißt, die Viskosität dieser Lösungen ist von der Scherrate abhängig. Für

Xanthan-Lösungen gilt, je höher die Scherrate, desto niedriger die Viskosität. Diese Eigenschaft wird auch als Pseudoplastizität oder Scherverdünnung bezeichnet. Die Änderung ist reversibel [LACHKE, 2004].

Die Viskosität von Xanthan-Lösungen wird durch die Temperatur, den Salzgehalt und durch Säuren und Basen beeinflusst. Die pH-Stabilität reicht über einen weiten Bereich von pH 2 bis 12 [SWORN, 2000].

INTERAKTION MIT GALACTOMANNANEN

Eine weitere Eigenschaft von Xanthan ist der synergistische Effekt mit Galactomannanen wie zum Beispiel Guar Gum und Locust Bean Gum, aber auch mit Glucomannanen wie das Konjac Mannan. Dieser Synergismus resultiert in erhöhter und verbesserter Viskosität oder durch Gelbildung [SWORN, 2000]. Über die genaue Weise dieser Interaktionen wird noch diskutiert, aber es ist im Allgemeinen gültig, dass das Xanthan mit den unsubstituierten, linearen Teilen der Kette (smooth regions) des Galactomannan-Moleküls interagiert, wie in der Abbildung 3 an Locust Bean Gum ersichtlich ist [CASAS und GARCÍA-OCHOA, 1999].

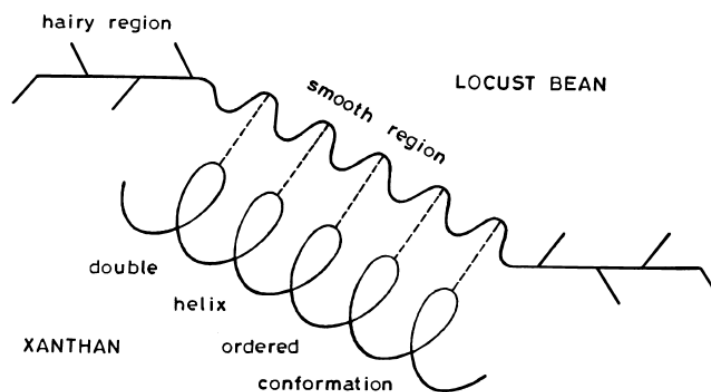


Abbildung 3: Interaktion zwischen Xanthan und Galactomannan
[CASAS und GARCÍA-OCHOA, 1999]

UMWELT

Xanthan ist als natürliches Polymer vollständig biologisch abbaubar und gilt somit als umweltfreundliches Produkt [LACHKE, 2004].

ERNÄHRUNG

Ernährungsphysiologisch gehört Xanthan zu den wasserlöslichen und nicht-pflanzlichen Ballaststoffen. Unmittelbar spielt das Hydrokolloid keine Rolle in der Ernährung, jedoch findet es verbreiteten Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff. Grundsätzlich gilt, dass Ballaststoffe nicht durch die Verdauungsenzyme abgebaut werden und somit unverändert in den Dickdarm gelangen. Xanthan führt durch Viskositätserhöhung zu einem längeren Sättigungsgefühl und verübt einen Quelleffekt im Dickdarmbereich [ALBAN, 2010].

2.1.3 Produktion von Xanthan

Durch Fermentation mit Hilfe des Bakteriums *Xanthomonas campestris* kann das Hydrokolloid Xanthan erzeugt werden. Einen Überblick zur industriellen Herstellung von Xanthan zeigt die Abbildung 4.

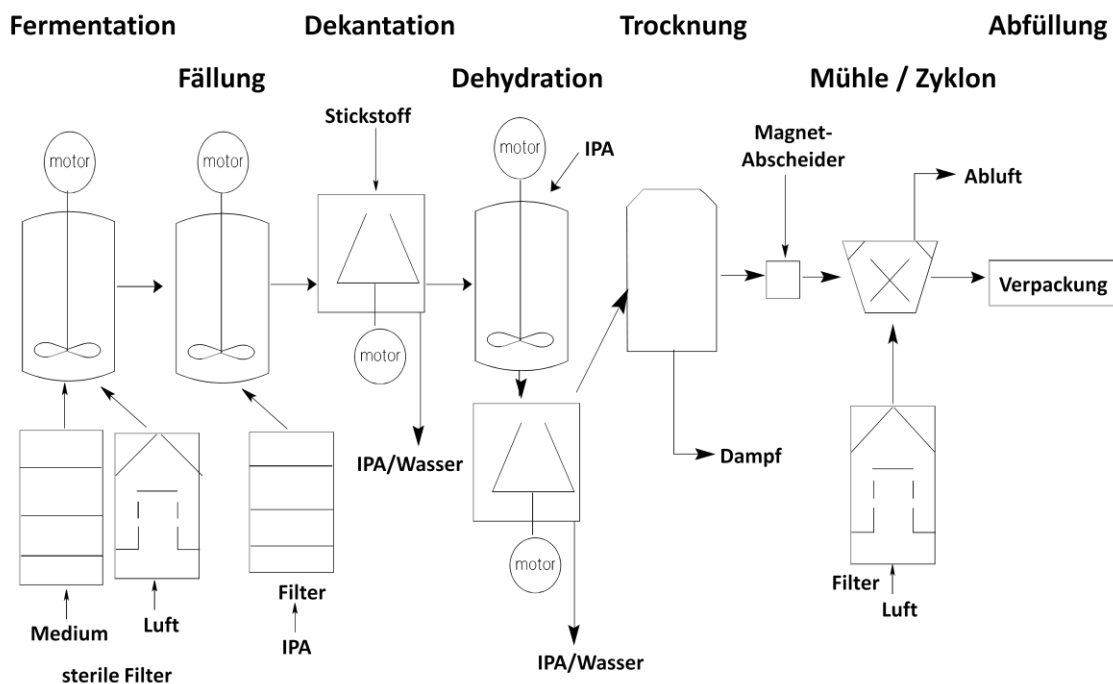


Abbildung 4: Xanthan – Produktionsfließbild [JUNGBUNZLAUER AUSTRIA AG, 2013]

Xanthomonas campestris wird auf festen Oberflächen oder in flüssigen Medien gezüchtet, um ein Inoculum für die großen Fermenter zu erhalten [FLORESCANDIA und DECKWER, 1999]. Zur Fermentation wird eine Kohlenhydratquelle

aus Glucose, Saccharose, Stärke oder Stärkehydrolysaten eingesetzt. Außerdem benötigt *Xanthomonas campestris* eine Stickstoffquelle, Nährstoffe (vor allem Salze) und Sauerstoff [BECKER et al., 1998]. Die Bakterienkultur unterliegt einem aeroben Prozess und wird bei einer Temperatur zwischen 25 und 35 °C und bei einem pH-Wert von ungefähr 7 gehalten [LACHKE, 2004].

Nach Abschluss der Fermentation wird durch Zugabe einer großen Menge an Alkohol (meist Isopropanol oder Ethanol) das in Lösung vorhandene Xanthan ausgefällt. Bei diesem Fällungsschritt wird nicht nur die Löslichkeit herabgesetzt um eine Phasentrennung herbeizurufen, sondern es werden auch Unreinheiten wie Farbkomponenten, irrelevante Salze oder Zellen herausgewaschen [SMITH und PACE, 1982].

In weiterer Folge werden die nassen, festen Xanthanfasern entwässert, gewaschen, getrocknet und vermahlen. Bei der Vermahlung unterscheidet man verschiedene Korngrößen, die zu einem feinen bis groben Endprodukt führen, welches ein weiß bis gelblich gefärbtes Pulver darstellt. Der bei der Produktion verwendete Alkohol wird durch Destillation wieder zurückgewonnen [FLORESCANDIA und DECKWER, 1999].

Bevor das produzierte Xanthan verpackt wird, muss es bestimmte Qualitätsparameter erfüllen. Die Überprüfung erfolgt im Qualitätskontrolllabor. Nach Freigabe kann es dann abgepackt und ausgeliefert werden.

2.1.4 Sicherheit und Anwendung von Xanthan

Wie eingangs erwähnt, beschäftigte man sich mit der Erforschung des Hydrokolloids bereits in den 1960er Jahren. Darunter befanden sich umfangreiche toxikologische und sicherheitsbezogene Studien. Xanthan gilt als nicht toxisch und ist keine sensibilisierende Substanz für den menschlichen Organismus. Nach ausreichenden Untersuchungen wurde Xanthan von der United States Food and Drug Administration (FDA) als Zusatzstoff für Lebensmittel und pharmazeutische Produkte zugelassen. Im Jahr 1980 veranlasste die Euro-

päische Wirtschaftsgemeinschaft, dass Xanthan unter der E-Nummer 415 in der Zusatzstoff-Liste aufgenommen wird [GARCÍA-OCHOA et al., 2000].

Xanthan findet in den Bereichen Lebensmittel, Kosmetika, Pharmazie und in der Technik vielseitige Anwendung. Es wird als Suspensionsmittel, Emulgator, Flockungsmittel, Verdickungsmittel, Stabilisator, Inhibitor der Kristallbildung, Quellmittel, Geliermittel und zur Viskositätskontrolle eingesetzt [SUTHERLAND, 2001].

Im Lebensmittelbereich wird Xanthan in Salatdressings, Backwaren, Getränken, Milchprodukten, Suppen/Soßen und Tiefkühlprodukten angewendet. Die eingesetzte Menge von Xanthan liegt zwischen 0,05 und 0,5 % [GARCÍA-OCHOA et al., 2000]. Nicht nur die Eigenschaften Löslichkeit und Viskosität sind für den Einsatz von Xanthan in Lebensmitteln ausschlaggebend, sondern auch die gute Kompatibilität mit Alkohol und Enzymen wird genutzt [SWORN, 2000]. Des Weiteren findet auch der synergistische Effekt von Xanthan mit Galactomannanen (vor allem mit Guar und Locust Bean Gum) Anwendung. Aufgrund der resultierenden Gelbildung werden diese Mischungen als effektive Stabilisatoren besonders in Tiefkühlprodukten wie Eiscremen eingesetzt [SHARMA et al., 2006].

Bei Kosmetika wird Xanthan in Zahnpasten, Shampoos und Cremes verwendet. In der Pharmazie wird das Hydrokolloid bei Suspensionen, Emulsionen und Tabletten zugesetzt. In der technischen Industrie kommt Xanthan vor allem als Suspensionsmittel und zur Viskositätskontrolle in Agrarchemikalien, Farben, Klebstoffen, sowie bei Ölbohrungen und zur Erdölförderung zum Einsatz. In diesen Bereichen wird Xanthan bis zu einer Konzentration von 1 % eingesetzt [GARCÍA-OCHOA et al., 2000].

2.2 Fällung von Xanthan

Im Fall von Xanthan werden als Fällungsmittel organische Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol, Isopropanol oder auch Aceton verwendet, wobei Isopropanol am häufigsten eingesetzt wird [SMITH und PACE, 1982]. Außerdem kann zur Fällung von Xanthan-Lösungen auch tert-Butanol genutzt werden [FLAHIVE et al., 1994]. Die genannten Alkoholarten sind kurzkettige Alkohole und sind alle mit Wasser beliebig mischbar.

Damit eine Phasentrennung zustande kommt, muss die Löslichkeit des gelösten Polysaccharids vermindert werden. Durch Destabilisierung folgt die Trennung in eine kolloidreiche und eine kolloidarme Phase. Die kolloidreiche Phase kann als Fällungsprodukt (in fester Form) oder als Koazervat (als konzentrierte Lösung) gewonnen werden [SMITH und PACE, 1982].

Es wird nicht nur die Löslichkeit der Xanthan-Lösung gesenkt, sondern auch die polyelektrolytischen Eigenschaften des Polysaccharids verändert, welche ebenfalls zur Ausfällung beitragen. Bei Einsatz von Isopropanol zum Ausfällen einer wässrigen Xanthan-Lösung ist ein Konzentrationsbereich von 45 bis 60 % (w/w) ausreichend, um die Löslichkeit zu senken. In diesem Bereich kommt es zur Bindung der Na^+ und K^+ Ionen an das anionische Polysaccharid. Vorhandenes Wasser zwischen den Xanthan-Molekülen wird verdrängt, wodurch Interaktionen zwischen den Xanthan-Molekülen entstehen. Dadurch bildet sich ein unlösliches, faseriges, kompaktes Fällungsprodukt [SMITH und PACE, 1982].

Eine Studie von Flahive et al. aus dem Jahre 1994 beschäftigte sich mit Fällungen von Xanthan-Lösungen, wobei unter anderem auch Isopropanol als Fällungsmittel herangezogen wurde. Eines der Studienergebnisse war der Effekt der Alkoholkonzentration. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationsbereiche zur Fällung definiert. Unter 30 % Alkohol erfolgte keine Fällung. Zwischen 31 und 40 % Alkohol war ein gelähnliches Fällungsprodukt zu erkennen. Eine Phasentrennung war zwischen 50 und 75 % erreicht, wobei sich sehr kompakte und faserförmige Fällungsprodukte ergaben [FLAHIVE et al., 1994].

Bei Zugabe von Salzen wie Kaliumchlorid ist weniger Alkohol zum Fällen notwendig, da eine höhere Konzentration von kationischen Ionen in der zu fällenden Lösung vorliegt. Dies bringt den Vorteil, dass Produktionskosten gesenkt werden können. Außerdem muss weniger Alkohol durch Destillation zurückgewonnen werden. Der recycelte Alkohol kann für weitere Fällungen wieder eingesetzt werden [SMITH und PACE, 1982].

2.3 Methodenvalidierung

Als Orientierungshilfe für die Methodenvalidierung wurde vor allem das Buch „Validierung in der Analytik“ von Stavros Kromidas herangezogen. Des Weiteren wurden noch die Dokumente „Validierungsfibel“ von Testo und das Dokument „ICH Harmonised tripartite Guideline – Validation of analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)“ von ICH (=International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) aus dem Jahr 1994 verwendet.

Die „Validierungsfibel“ von Testo stellt ein kompaktes Nachschlagewerk für pharmazeutische und biotechnologische Unternehmen dar. Die nachstehende Abbildung 5 gibt eine übersichtliche Darstellung des Validierungsumfanges für Prüfmethoden wieder.

Kenngröße	Klasse A	Klasse B quantitativ	Klasse B Limitgrenze	Klasse C	Klasse D
Bestimmungsgrenze	nein	ja	nein	nein	nein
Genauigkeit	nein	ja	nein	ja	ja
Linearität/linearer Bereich	nein	ja	nein	ja	ja
Präzision	nein	ja	nein	ja	ja
Nachweisgrenze	ja	nein	ja	nein	nein
Robustheit	ja	ja	ja	ja	ja
Selektivität	ja	ja	ja	ja	ja

Klasse A: Testverfahren zur Absicherung der Identität von Bulkware oder einzelnen Bestandteilen von Endprodukten.

Klasse B: Methoden zum Nachweis bzw. zur Quantifizierung von Verunreinigungen in Bulkware oder Endprodukten.

Klasse C: Methoden zur quantitativen Bestimmung eines Hauptbestandteils in Bulkware oder Endprodukten.

Klasse D: Methoden zur Untersuchung charakteristischer Eigenschaften von Endprodukten, wie z. B. Wirkstofffreisetzung.

Abbildung 5: Analytische Kenngrößen in Abhängigkeit von Ausgangsmaterial und Untersuchungsziel [TESTO INDUSTRIAL SERVICES GMBH, 2007]

Da die Fällungsmethode der Klasse C (Methoden zur quantitativen Bestimmung eines Hauptbestandteils in Bulkware oder Endprodukten) zugeordnet werden kann, werden folgende Validierungsparameter vorgeschlagen: Genauigkeit, Linearität, Präzision, Robustheit und Selektivität.

Im Dokument „ICH Harmonised tripartite Guideline – Validation of analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)“ von ICH sind Begriffe und Definitionen der einzelnen Validierungsparameter von den Kompendien der USA, Japan und EU zusammengefasst. In der Abbildung 6 sind die typischen Parameter zur Methodenvvalidierung für verschiedene analytische Verfahren abgebildet.

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES	ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
characteristics		quantitat. limit	
Accuracy	-	+ -	+
Precision			
Repeatability	-	+ -	+
Interm. Precision	-	+ (1) -	+ (1)
Specificity (2)	+	+ +	+
Detection Limit	-	- (3) +	-
Quantitation Limit	-	+ -	-
Linearity	-	+ -	+
Range	-	+ -	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Abbildung 6: Validierungsparameter für unterschiedliche analytische Verfahren

[ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005]

Zur Validierung einer Gehaltsbestimmungsmethode nach ICH werden folgende Parameter empfohlen: Genauigkeit, Präzision, Spezifität, Linearität und Arbeitsbereich.

Für die Validierung von Analysemethoden gibt es verschiedene Ansätze. Die zwei genannten Beispiele stellen eine Auswahl aus vielen dar. Es sind nur geringe Differenzen zu den jeweils empfohlenen Validierungskenngrößen wie auch zu den dazugehörigen Definitionen zu finden. Für die Validierung liegt kein Gesetz vor. In den meisten Branchen, vor allem in der Pharmazie existieren Richtlinien, die als bindend und zwingend anzusehen sind. Die Validierungsparameter sind der jeweiligen analytischen Methode anzupassen [KROMIDAS, 1999].

In beiden Dokumenten wird der Begriff Genauigkeit als Validierungsparameter genannt. Laut Stavros Kromidas ist die Genauigkeit kein eigenständiger Prüfpunkt, sondern fasst die systematischen und zufälligen Fehler zusammen und stellt somit einen Oberbegriff für die Präzision und die Richtigkeit dar [KROMIDAS, 1999].

Der Zusammenhang zwischen Präzision und Richtigkeit von Ergebnissen kann idealerweise mit einer Zielscheibe beschrieben werden (siehe Abbildung 7).

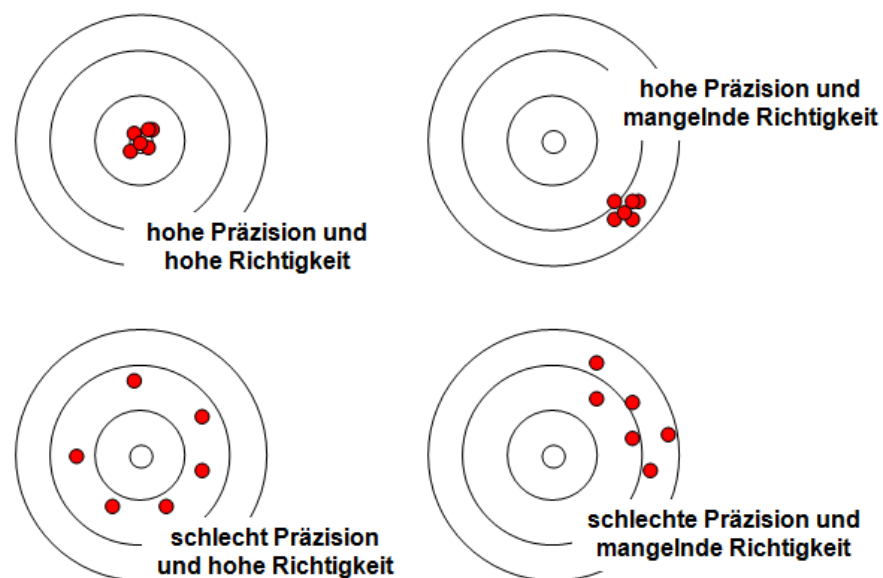


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen Präzision und Richtigkeit

Wie man aus der Abbildung 7 erkennen kann, kann ein Ergebnis mit hoher Genauigkeit nur dann erreicht werden, wenn eine hohe Richtigkeit und hohe

Präzision vorliegt. Dies spricht für den Idealfall. Im Gegensatz dazu sind eine schlechte Präzision und eine mangelnde Richtigkeit für eine Analysemethode nicht akzeptabel.

Bei Analyseenergebnissen mit schlechter Präzision und hoher Richtigkeit, muss vor allem Augenmerk auf die Präzision gelegt werden, da die Ergebnisse im Mittel richtig sind, jedoch stark voneinander streuen. Die Präzision spiegelt die zufälligen Fehler einer Methode wieder, welche jedoch nicht beeinflussbar sind.

Bei einer hohen Präzision und mangelnder Richtigkeit liegen zwar sehr präzise Ergebnisse vor, die aber präzise falsch sind. Hierbei muss die Richtigkeit genauer überprüft werden. Die Richtigkeit gibt Auskunft über systematische Fehler, welche korrigiert werden können.

Als statistische Größe für die Präzision dient die Standardabweichung (s), welche den Grad der Streuung einzelner Messergebnisse um den Mittelwert ($\bar{x}$) angibt. Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) können mit folgender Formel berechnet werden [KROMIDAS, 1999]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \qquad s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Standardabweichung kann auch als relative Standardabweichung ausgedrückt werden, welche auch als Variationskoeffizient (VK) bezeichnet wird. Die Angabe erfolgt in Prozent des Mittelwertes und wird mit folgender Formel berechnet [KROMIDAS, 1999]:

$$VK [\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die benötigten Materialien wie Geräte und Chemikalien für die eingesetzten Methoden beschrieben. Außerdem wird auf die genaue Vorgehensweise der verwendeten Analyseverfahren eingegangen.

3.1 Fällungsmethode

Mit Hilfe der Fällungsmethode soll der Gehalt des Hydrokolloids Xanthan bestimmt werden. Es sollen mögliche Verfälschungen durch Salz oder Zucker festgestellt werden und somit teilweise die Reinheit des Produktes geprüft werden.

3.1.1 Prinzip der Fällungsmethode

Grundsätzlich handelt es sich bei dieser Methode um eine gravimetrische Bestimmung. Durch Zugabe eines Fällungsmittels können Analysesubstanzen in eine unlösliche Verbindung überführt werden. Die Masse des Fällungsproduktes wird nach anschließender Trocknung durch Wägung bestimmt und dadurch der Gehalt der Xanthan-Probe quantitativ ermittelt.

3.1.2 Verwendete Geräte

- Plastikbecher – BRAND 250 ml
- Rührwerk mit Propellerrührer – IKA
- Analysenwaage – XS104 METTLER TOLEDO
- Plastiksüttelkolben mit Drehverschluss – VITALAB 500 ml
- Messzylinder für 300 ml und 20 ml Volumen
- 3-teiliger Trichterhalter bestehend aus Trichter, Lochplatte und Trichteroberteil
- Absaugflasche mit passender Dichtung für Trichterhalter

- Membran-Vakuumpumpe mit passendem Schlauchanschluss für Absaugflasche – VACUUBRAND MZ 2C
- Polyester-Siebgewebe 70 µm mit einem Durchmesser von 90 mm
- Aluminium-Schälchen (Durchmesser 90 mm) – METTLER TOLEDO
- Umluft-Trockenschrank – UT 6060 HERAEUS INSTRUMENTS
- Exsikkator, Löffel, Stoppuhr, Pinzette, Spatel

3.1.3 Verwendete Reagenzien

- unterschiedliche Xanthan-Chargen (XG) der Jungbunzlauer Austria AG
- 1 % Kaliumchlorid-Lösung: mit Kaliumchlorid zur Analyse EMSURE® hergestellt – MERCK 1.04936
- Isopropanol 88 % – Jungbunzlauer Austria AG
- Isopropanol – 2-Propanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur – MERCK 1.09634

3.1.4 Methode: Durchführung

1. LÖSEN

Einwaage ~ 1,00 g Xanthan in 99,0 g 1 % KCl-Lösung langsam einstreuen und mit Propellerrührer bei etwa 800 rpm 1 ½ Stunden lösen (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Schritt 1 – Lösen der Xanthan-Probe

2. FÄLLEN

Die Fällung kann bereits am Vortag durchgeführt werden, damit sich ausreichend Lösungsmittel am Fällungsprodukt anlagern kann, wodurch es zur Entwässerung kommt.

Die 1 %ige XG-Lösung in einen Plastischüttelkolben überführen und mit 300 ml 88 % Isopropanol (IPA) versetzen. Die Zugabe des IPA erfolgt auf 4 Portionen aufgeteilt, wobei dazwischen der Kolben immer etwa 10 sec. geschwenkt wird. Danach Kolben verschließen und 1 min kräftig schütteln (siehe Abbildung 9). Die gefällten Proben werden bis zur Filtration bei 22 °C gelagert.

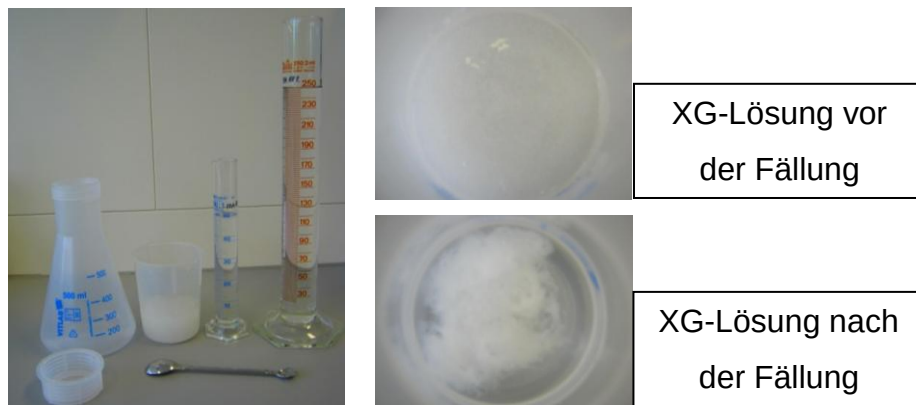


Abbildung 9: Schritt 2 – Fällung der 1 % Xanthan-Lösung

3. FILTERN

Die Filtration erfolgt mit einem Polyester-Schleiergewebe (PE-SG). Den PE-SG-Filter in den Filtertrichterhalter einspannen, wobei der Filter auf die Lochplatte gelegt wird. Um die Filtration zu beschleunigen, wird mittels Absaugflasche und Vakuumpumpe 1 min abgesaugt (siehe Abbildung 10).

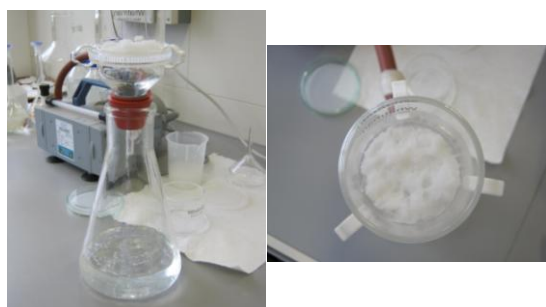


Abbildung 10: Schritt 3 – Filtern der gefällten Xanthan-Lösung

4. WASCHEN

Nach der Filtration wird das Fällungsprodukt zur Entfernung von anhaftenden Fremdstoffen 4-mal mit 20 ml IPA-Standard (Merck) gewaschen. Falls notwendig mit den ersten 20 ml IPA Standard den Schüttelkolben ausspülen, um verbleibende Fasern nicht zu verlieren. Nach jedem Waschschrift 1 min absaugen und nach dem letzten Waschschrift 2 min absaugen.

5. TROCKNEN

Den Filter mit Fällungsprodukt mit Hilfe einer Pinzette auf eine Aluminiumschale überführen. Die Trocknung erfolgt im Trockenschrank bei 105 °C für 2 ½ Stunden. Die Abbildung 11 zeigt Xanthan-Fasern vor und nach der Trocknung.

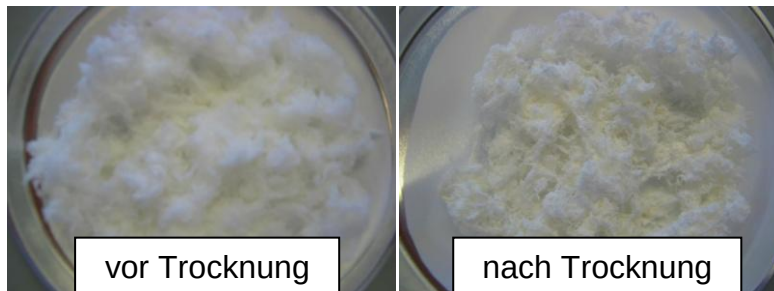


Abbildung 11: Schritt 5 – Trocknen der Xanthan-Fasern

6. ABKÜHLEN UND AUSWAAGE

Vor dem Auswiegen muss das getrocknete Fällungsprodukt im Exsikkator für ein halbe Stunde auskühlen. Die Auswaage erfolgt mittels Analysenwaage, wobei Filter und Fällungsprodukt gemeinsam ausgewogen werden.

Zur Berechnung des XG-Gehalts in Prozent wird folgende Formel herangezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{XG}} [\%] = \frac{\text{Auswaage [g]} - \text{Gewicht des Filters [g]}}{\text{Einwaage [g]}} \cdot 100$$

3.2 Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Titration und Ausheizofen

Zur Analyse des Restwasser-Gehaltes in den gefällten, getrockneten Xanthan-Fasern dient die Karl-Fischer-Titration mit Ausheizofen. Nach Durchführung der Wasserbestimmung kann der XG-Gehalt aus der Fällungsmethode auf den Trockengehalt bezogen werden.

3.2.1 Prinzip der Wasserbestimmung mit der volumetrischen Karl-Fischer-Titration und Ausheizofen

Mit Hilfe des Karl-Fischer-Titrators 787 KF Titrino und 703 TiStand mit Ausheizofen von Metrohm kann der Wassergehalt von festen Proben nach der Ofenmethode bestimmt werden. Durch den Ausheizofen wird die Probe erhitzt, die dabei Feuchtigkeit als Wasserdampf abgibt. Dieser wird durch einen Gasstrom in die Messzelle des Titrators überführt und durch Titration mit Hydranal Composite 5 gemessen. Bei Hydranal Composite 5 handelt es sich um ein Einkomponentenreagenz, wobei Iod, Imidazole als Stickstoffbase und Schwefeldioxid enthalten sind. In der Vorlage befindet sich Methanol als Arbeitsmedium. Durch den Verbrauch der Titrationslösung für die Trockentitration des Alkohols kann der Wassergehalt der Probe ermittelt werden, welcher nach Abschluss der Messung vom Gerät selbst berechnet und in Prozent angezeigt wird.

3.2.2 Verwendete Geräte

- Vials – Rotilabo®-Headspacefläschchen ND20 gerundeter Boden, 5 ml – ROTH LC60.1
- Verschlüsse für Vials – 20 mm Alukappe, Silikon blau – VWR 548-0061
- Analysenwaage – SARTORIUS CP324S
- Bördelzange, Hamilton-Spritze (Exmire Microsyringe MS-25), Becherglas

- Karl-Fischer-Titrator 787 KF Titrino Metrohm und 703 TiStand Metrohm mit Ausheizofen 832 KF Thermoprep Metrohm

3.2.3 Verwendete Reagenzien

- unterschiedliche gemahlene Xanthan-Fasern
- CombiMethanol: Lösungsmittel für die volumetrische Karl Fischer Titration mit Einkomponenten Reagenzien max. 0,01 % H_2O apura® – MERCK 1.88009
- Hydranal Composite 5: Einwegkomponentenreagenz für die volumetrische Karl-Fischer-Titration 1 ml ~ 5 mg H_2O – SIGMA ALDRICH 34805

3.2.4 Aufbau des Karl-Fischer Messgerätes

Der Aufbau ist in der Abbildung 12 ersichtlich. Das Karl-Fischer-Messgerät besteht aus 3 Teilen:

- Karl-Fischer-Titrator 787 KF Titrino Metrohm
- Titrationsgefäß 703 TiStand Metrohm
- Ausheizofen 832 KF Thermoprep Metrohm

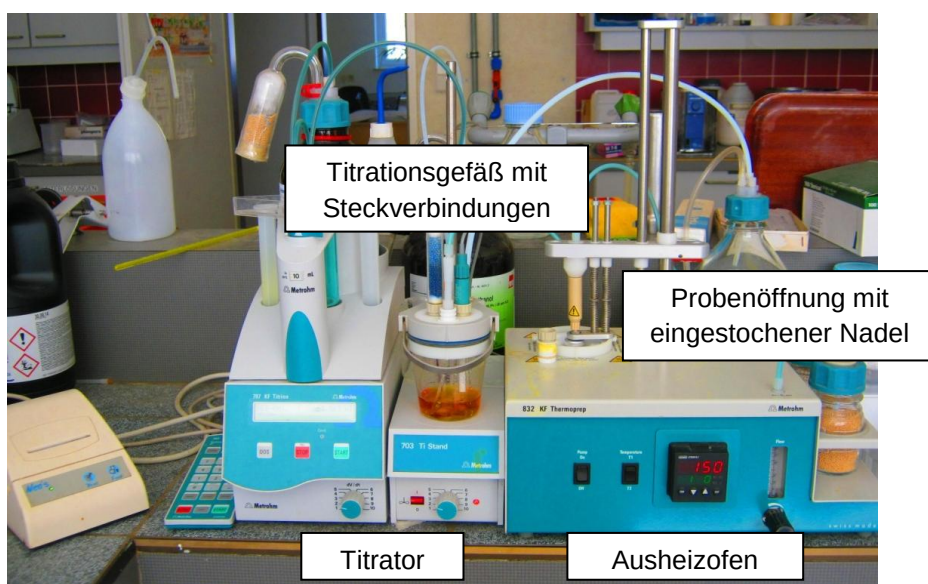


Abbildung 12: Aufbau des Karl-Fischer-Messgerätes mit Ausheizofen

3.2.5 Methode: Durchführung

Der Wassergehalt wird von den gefällten, getrockneten Xanthan-Fasern nach der Auswaage bestimmt. Die getrockneten Xanthan-Fasern werden mit Hilfe eines Mörsers und Stößels fein zermahlen und in die Vials eingewogen. Die Einwaage beträgt ~ 0,20 g. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Vials werden mittels Bördelzange verschlossen und der Wassergehalt mit der Karl-Fischer-Titration und Ausheizofen bei einer Temperatur von 150 °C gemessen.

Anschließend mit folgender Formel den Trockengehalt berechnen.

$$\textbf{Trockengehalt} [\%] = 100 - \textbf{Wassergehalt} [\%]$$

Danach den XG-Gehalt aus der Fällungsmethode auf den Trockengehalt beziehen. Die Berechnung erfolgt nach der untenstehenden Formel.

$$\textbf{Gehalt}_{\text{XG auf TG bezogen}} = \frac{\text{Gehalt}_{\text{XG}}}{\text{Trockengehalt}} \cdot 100$$

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel wird eingangs die Vorgehensweise zur Erstellung der Fällungsmethode beschrieben. Anschließend werden die erhaltenen Messergebnisse bewertet und diskutiert. Des Weiteren wird auf die Methodenvalidierung näher eingegangen

4.1 Ergebnisse zur Methodenerstellung

Als Vorlage zur Erstellung einer passenden Fällungsmethode wurden zwei Methoden herangezogen. Zum einen die Fällungsmethode der Japanese Standards of Food Additives und zum anderen eine Variante dieser Methode. Da sich einige Größen unterschiedlich interpretieren ließen, mussten diverse Untersuchungen durchgeführt werden.

4.1.1 Vorlagen zur Methodenerstellung

Die untenstehende Abbildung 13 zeigt die Original-Fällungsmethode der Japanese Standards of Food Additives (JSFA).

Assay Dry a glass filter (1G4) at 80°C for 30 minutes, allow to cool in a desiccator, weigh accurately. Weigh accurately about 0.50 g of dried Xanthan Gum, add 10 ml of potassium hydroxide solution (1 → 25) and dissolve, and add 90 ml of water. Add 15 ml of diluted hydrochloric acid (1 → 3) and 300 ml of absolute ethanol, and stir vigorously. Allow to stand for 2 hours, and centrifuge with 4,000 rpm for 10 minutes. Remove the supernatant, add absolute ethanol, and prepare the same manner until no chloride reaction develops on the supernatant. Filter the obtained precipitate through the glass filter, with absolute ethanol. Wash the residue with acetone, dry under the reduced pressure at 80°C for 1.5 hours, allow to cool in a desiccator, and weigh accurately. Calculate the content by the formula

$$\text{Content of Xanthan Gum} = \frac{\text{Weight of the residue (g)}}{\text{Weight of the sample (g)}} \times 100 .$$

Abbildung 13: Fällungs-Methode aus 7th JSFA Monographie Xanthan
(JSFA – MONOGRAPHIE, n.d.)

In der Abbildung 14 ist die alternative Fällungsmethode zur JSFA Methode ersichtlich, welche von einem Xanthan-produzierenden Unternehmen stammt.

Weigh accurately about 1 g of dried Xanthan Gum, add 90 ml of water and dissolve. Add 1g of KCl. Then slowly add under stirring 300ml of IPA. Recuparate the precipitate by filtration on a veil. Press and Wash the precipitate with IPA. Then dry it in an oven at 60°C until constant weight. Calculate the content by the formula

Content of Xanthan Gum = Weight of the residue (g) /Weight of the sample (g) ×100

Abbildung 14: Alternative Methode zur JSFA Methode

4.1.2 Vorgehensweise bei der Methodenerstellung

Nach zahlreichen Vorversuchen konnte eine geeignete Fällungsmethode ermittelt werden, die in folgende Phasen gegliedert werden kann: 1. Lösen, 2. Fällung, 3. Filtration, 4. Waschen, 5. Trocknung, 6. Abkühlen und 7. Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Titration. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte näher beschrieben, wobei aufgezeigt wird, wieso bestimmte Parameter ausgewählt wurden.

PHASE 1 – LÖSEN

Hierbei wurde mit verschiedenen Xanthan (XG) Einwaagen gearbeitet wie 1 g, 2 g und 5 g, welche in 1 % KCl-Lösung bei 800 rpm für 1 ½ Stunden eingerührt wurden. Vor allem die 5 g XG Einwaage wies eine äußerst kleisterähnliche Konsistenz auf, die wiederum zu Verlusten führte, welche somit das Endresultat verfälschte. Für die 2 g XG Einwaage musste mehr Fällungsmittel eingesetzt werden und die Trocknung dauerte ebenfalls länger im Vergleich zur Einwaage mit 1 g XG.

Da die Einwaage von 1 g Xanthan-Probe für den weiteren Versuchsverlauf am praktikabelsten war, wurde diese für die darauffolgenden Versuche herangezogen.

PHASE 2 – FÄLLUNG

In dieser Phase wurden Versuche mit unterschiedlichen Fällungsarten und Fällungsmitteln und -mengen durchgeführt.

Zu den getesteten Fällungsarten zählen: das Ausschütteln mit einem Schüttelkolben, das Einrühren des Fällungsmittels am Propellerrührer, das Einrühren des Fällungsmittels am Magnetrührer mit Rührfischchen und das Einrühren des Fällungsmittels mit einem Glasstab.

Als geeignete Fällungsart wurde das Ausschütteln mit einem Schüttelkolben bestimmt, da bei den anderen Arten eher Verluste zustande kamen, wie Verkleben des Propellerrührers mit Fasern oder Restfasern im Becherglas oder Glasstab. Des Weiteren fiel die Entscheidung auf die Verwendung eines Plastischüttelkolbens zum Ausschütteln der Xanthan-Fasern, da mit diesem Schüttelkolben die geringsten Verluste verzeichnet wurden.

Als Fällungsmittel wurden Isopropanol 88 % (Jungbunzlauer) und Ethanol absolut (zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur – MERCK 1.00983) ausprobiert.

Bei den Fällungen mit Isopropanol 88 % wurde eine Fällungsmittelmenge von 300 ml hergenommen, wobei die Menge aus der Methode der Japanese Standards of Food Additives stammt. Die Alkoholkonzentration bei Fällung einer 1 % Xanthan-Lösung mit 88 % Isopropanol und 400 ml Gesamtvolumen beträgt 66 %. Nach den Literaturangaben liegt diese im Bereich, wo ein kompaktes und faseriges Fällungsprodukt erreicht wird [FLAHIVE et al., 1994].

Für Isopropanol 88 % Versuche stellte sich dieses Volumen als geeignet dar, jedoch nicht für Fällungen mit Ethanol absolut. Hierfür musste die doppelte Menge (600 ml) Ethanol absolut eingesetzt werden, um die Gehaltsergebnisse der Fällungen mit Isopropanol 88 % zu erreichen. In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse zum Fällungsmittel-Vergleich ersichtlich.

Tabelle 1: Vergleich Isopropanol 88 % und Ethanol absolut als Fällungsmittel (bezogen auf 100 ml 1 %ige Xanthanlösung)

	Fällen und Waschen mit	Fällungsmittelvolumen [ml]	XG-Gehalt MW [%] (Anzahl der Messungen)
V 57)	Isopropanol 88 %	300	93,59 (3)
V 51)	Ethanol absolut	300	100,07 (3)
V 64)	Ethanol absolut	600	93,33 (1)

Dieser Unterschied im Fällungsmittelvolumen zwischen Isopropanol und Ethanol wurde schon in anderen Studien beobachtet [GARCÍA-OCHOA et al., 1993] und [FLAHIVE et al., 1994]. Beide Autoren kamen zum Schluss, dass zur Fällung von Xanthan-Lösungen eine höhere Konzentration an Ethanol als an Isopropanol benötigt wird.

Ein weiterer Punkt bei dieser Phase war die Variation der Fällungszeit. Hierbei wurde getestet, wie lange die Wartezeit zwischen Fällung und Filtration dauern soll. In der Fällungsmethode der Japanese Standards of Food Additives wird eine Wartezeit von 2 Stunden vorgeschlagen.

Da sich herausstellte, dass sich der XG-Gehalt zwischen einer Wartezeit von 2 und 23 Stunden nicht bedeutsam unterscheiden (siehe Tabelle 2), wurde die Entscheidung getroffen, dass die Fällung bereits am Vortag erfolgen kann. Dadurch kann die Analyse einfacher in den Laboralltag eingegliedert werden.

Tabelle 2: Vergleich der Wartezeiten zwischen Fällung und Filtration

	Fällen und Waschen mit	Wartezeit [h]	XG-Gehalt MW [%] (Anzahl der Messungen)
V 66)	Isopropanol 88 %	2	93,47 (2)
V 67)	Isopropanol 88 %	23	93,17 (2)

Nach Betrachtung der Ergebnisse wurde für die Methode als Fällungsmittel Isopropanol 88 % (Jungbunzlauer) mit einem Volumen von 300 ml gewählt. Die

Wartezeit zwischen Fällung und Filtration wurde mit keiner genauen Stundenanzahl festgelegt, sondern mit Fällung am Vortag fixiert.

PHASE 3 – FILTRATION

Zum Filtrieren der gefällten Xanthan-Fasern wurden Glasmikrofaser-Filter und Polyester-Siebgewebe-Filter getestet. Da sich die Glasmikrofaser-Filter bei der Trocknung zu sehr wölbten, fiel die Entscheidung für die weiteren Versuche auf die Polyester-Siebgewebe-Filter mit einer Maschenweite von 70 µm.

PHASE 4 – WASCHEN

Bei dieser Phase wurden mehrere Lösungsmittel wie Isopropanol 88 % (Jungbunzlauer), Ethanol absolut und Isopropanol (2-Propanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur – MERCK 1.09634) durchprobiert, die zum Waschen des Fällungsproduktes herangezogen wurden. Verschiedene Volumina und Kombinationen der Lösungen wurden getestet.

Da es sich bei dem Isopropanol der Firma Merck um einen kommerziell definierten Alkohol handelt, wurde dieser in weiterer Folge als Waschlösung mit einer Lösungsmittelmenge von 4-mal 20 ml fixiert, um etwaige Fremdstoffen im Fällungsprodukt zu entfernen.

PHASE 5 – TROCKNUNG

Zur Trocknung der gefällten Xanthan-Fasern wurden die Halogentrocknungswaage und der Trockenschrank herangezogen, wobei unterschiedliche Temperaturen im Bereich von 60 bis 120 °C getestet wurden.

Bei der Halogentrocknungswaage wurde ein Abschaltkriterium festgelegt, welches nach Veränderung der Masse auf Zeit arbeitet, um eine einheitliche Trocknung zu gewährleisten. Die Halogentrocknungswaage ist für Einzelanalysen gut geeignet, jedoch nicht für Mehrfachanalysen, da mit der Trockenschrank-Methode zeitgleich mehr Proben getrocknet werden können. Dadurch werden Gehaltsergebnisse von mehreren Proben mit der Trockenschrank-Methode schneller erreicht, als mit der Halogentrocknungswaage, obwohl diese

eine kürzere Trocknungsdauer pro Analyse beansprucht. Außerdem kann die Trockenschrank-Methode einfacher in den Laboralltag eingegliedert werden.

Nach dem Durchtesten von unterschiedlichen Zeiten zwischen 2 und 21 Stunden im Trockenschrank konnte festgestellt werden, dass sich der 2 Stunden Gehaltswert nicht ausschlaggebend von den Werten mit höherer Trocknungsdauer unterscheidet. Die Ergebnisse zeigen Schwankungen zwischen 91,9 und 95,5 % somit liegt der Gehalt des 2 Stunden-Wertes von 93,3 % in der Mitte dieser Werte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Dauer von 2 Stunden zum Trocknen der Xanthan-Fasern ausreichend ist. Die Ergebnisse zu den einzelnen Trocknungszeiten sind in der Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: XG-Gehalts-Vergleich bei unterschiedlichen Trocknungszeiten im Trockenschrank bei 105 °C

	Trocknungs- dauer [h]	XG-Gehalt MW [%] (Anzahl der Messungen)	STABW [%]	VK [%]
V 71)	2	93,34 (2)	0,5118	0,55
V 68)	16	95,30 (2)	0,5118	1,00
V 68)	17	91,90 (2)	1,3594	1,46
V 68)	18	93,99 (2)	1,0115	1,08
V 65)	19	94,04 (2)	0,3689	0,39
V 65)	20	94,32 (2)	0,1479	0,16
V 65)	21	95,51 (2)	0,6436	0,67

Da die Europäische Pharmakopöe für die Trockengewichtsbestimmung eine Trocknungszeit von 2 ½ Stunden bei 105 °C vorschlägt, wurde schlussendlich auf diese Methode zurückgegriffen.

PHASE 6 – ABKÜHLEN

Bei dieser Phase wurden Versuche zur Abkühlung der getrockneten Xanthan-Fasern durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Werte herzustellen, wurde für die Auswaage der Xanthan-Fasern ein Zeitpunkt von einer halben Stunde nach Überführung in den Exsikkator festgelegt.

PHASE 7 – WASSERBESTIMMUNG

Zur Bestimmung des Restwasser-Gehaltes in den gefällten, getrockneten Xanthan-Fasern wurden Versuche mit der Karl-Fischer-Titration inklusive Ausheizofen vollzogen. Dabei wurden die Xanthan-Fasern mit Mörser und Stößel zu feinem Pulver vermahlen und der Wassergehalt gemessen.

Es wurden verschiedene Einwaagen getestet. Eine Einwaage von ~ 0,20 g wurde für die weiteren Versuche herangezogen.

Die Temperatur beim Ausheizofen wurde auf 150 °C eingestellt, da sich bei dieser Temperatur nicht nur das Oberflächenwasser löst, sondern auch das in der Xanthan-Probe gebundene Wasser in die Messung miteinbezogen wird. Diese Temperatur wurde anhand von thermoanalytischen Methoden ermittelt (siehe Kapitel 4.2.3.1 und 4.2.3.2).

Der gemessene Wassergehalt dient der Korrektur des durch die Formel ermittelten Xanthan-Gehaltes, das heißt, dass der Gehalt aus der Fällungsmethode auf den Trockengehalt der gefällten, getrockneten Xanthan-Faser-Probe bezogen wird.

4.1.3 Zusammenfassung der Fällungsmethode

Die untenstehende Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der gewählten Parameter für die einzelnen Phasen der Fällungsmethode.

Tabelle 4: Zusammenfassung der gewählten Parameter für die erstellte Fällungsmethode

Phase	gewählte Parameter	
1. Lösen	Einwaage	~ 1,00 g Xanthan (XG) in 99,0 g 1 % KCl-Lösung mit Propellerrührer bei etwa 800 rpm 1 ½ Stunden lösen
2. Fällen	Fällungsart	Ausschütteln der XG-Fasern mit einem 500 ml Plastischüttelkolben
	Fällungsmittel	300 ml Isopropanol 88 % (Jungbunzlauer)
	Fällungszeitpunkt	am Vortag
3. Filtern	Filterart	Polyester-Siebgewebe 70 µm
4. Waschen	Waschlösung	4-mal 20 ml Isopropanol (Merck 1.09634)
5. Trocknen	Trocknungsart	Trockenschrank
	Trocknungstemperatur	105 °C
	Trocknungsdauer	2,5 Stunden
6. Abkühlen	Abkühlart	½ Stunde im Exsikkator
7. Wasserbestimmung	Einwaage XG-Fasern	~ 0,20 g
	Temperatur des Ausheizofens	150 °C

4.2 Ergebnisse der Fällungsmethode

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Fällungsmethode bei Verwendung unterschiedlicher Xanthan-Proben (XG), sowie das Erkennen von Verfälschungen analysiert. Des Weiteren wird auf die Auswertung der Ergebnisse bei Bezug auf die Trockensubstanz eingegangen, wobei auch Analysen von Wassergehalts-Messungen durch die Karl-Fischer-Titration und thermoanalytischen Methoden zur Materialcharakterisierung angesprochen werden.

4.2.1 Ergebnisse der Jungbunzlauer-Chargen

Für die Versuche wurden verschiedene Xanthan-Chargen mit unterschiedlicher Granulierung verwendet und ausgewertet. Wie man an den Ergebnissen in der Tabelle 5 erkennen kann, liegen die Mittelwerte der Jungbunzlauer-Chargen im Bereich zwischen 95 und 99 %.

Tabelle 5: Ergebnisse der Jungbunzlauer-Xanthan-Chargen

Charge	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
FN 1	30	96,05	1,1608	1,21
FN 2	4	97,60	0,5123	0,52
FNCS 1	4	98,91	0,5484	0,55
FNCS 2	2	95,91	0,2262	0,24
FG	4	97,93	0,8483	0,87
FF	4	94,92	0,4132	0,44

Die Hauptversuche wurden mit der Jungbunzlauer FN 1-Charge durchgeführt, wobei die Ergebnisse auch zur statistischen Auswertung herangezogen wurden. Bei den weiteren Chargen wurden nur wenige Messungen durchgeführt, um einen Trend für den XG-Gehalt festzustellen.

4.2.2 Ergebnisse der Verfälschungen

Die erstellte Fällungsmethode soll der Erkennung von verfälschten Xanthan-Proben dienen. Ob sich eine Verfälschung einer Xanthan-Probe wiederfinden lässt, wurde anhand von speziellen Versuchen erprobt. Dafür wurde die Jungbunzlauer FN 1-Charge absichtlich mit Natriumchlorid (NaCl for analysis, MERCK 1.06404) oder Saccharose (Wiener Zucker – Staubzucker, L521208092 AGRANA) zu einem bestimmten Prozentsatz in der Qualität gemindert und der Fällungsmethode unterzogen.

4.2.2.1 Ergebnisse der Verfälschungen mit Natrium-Chlorid (NaCl)

In der Tabelle 6 sind die Mittelwerte der verfälschten Xanthan-Charge FN 1 mit Natriumchlorid ersichtlich.

Tabelle 6: Ergebnisse der Verfälschungen mit Natrium-Chlorid

Charge + Verfälschung	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
FN 1 + 5 % NaCl	8	89,58	0,7866	0,88
FN 1 + 10 % NaCl	8	84,84	0,3555	0,42
FN 1 + 15 % NaCl	6	81,57	1,1463	1,41
FN 1 + 20 % NaCl	8	76,31	1,3254	1,74

Es wurde ein Verfälschungsbereich von 5 bis 20 % durchgetestet, wobei folgende Linearität ausgewertet wurde (siehe Diagramm in Abbildung 15). In die Linearitätsberechnung wurden alle Messwerte (Anzahl: 30) miteinbezogen. Die 30 Messwerte setzen sich aus Ergebnissen von verschiedenen Tagen zusammen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9929 zeigt einen statistisch starken linearen Zusammenhang, da R^2 fast 1 ist.

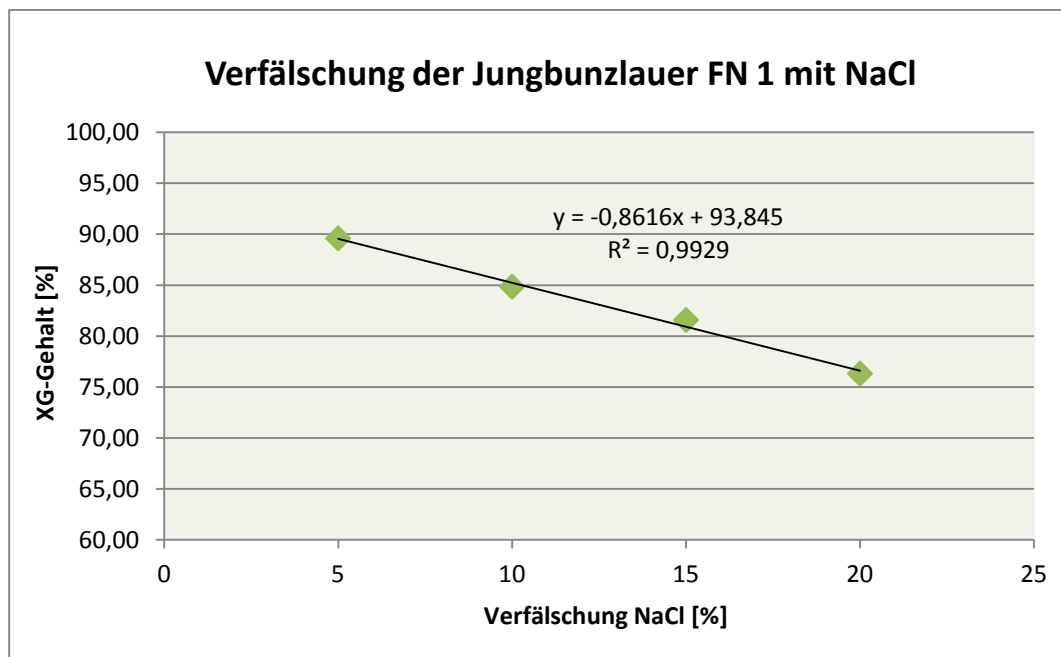


Abbildung 15: Linearität der Verfälschung der Jungbunzlauer FN 1 mit Natrium-Chlorid

4.2.2.2 Ergebnisse der Verfälschungen mit Saccharose (Sacch.)

Eine Verfälschung mit Saccharose wurde ebenfalls ausprobiert, wobei hier wieder die Jungbunzlauer FN 1-Charge mit 5, 10 oder 20 % Saccharose gemischt und der Fällungsmethode unterzogen wurde.

Tabelle 7: Ergebnisse der Verfälschungen mit Saccharose

Charge + Verfälschung	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
FN 1 + 5 % Sacch.	2	89,53	0,7721	0,86
FN 1 + 10 % Sacch.	2	84,20	1,0499	1,25
FN 1 + 20 % Sacch.	2	74,25	0,2736	0,37

Wie an den Ergebnissen der Tabelle 7 erkennbar ist, kann die jeweilige Verfälschung wiedergefunden werden. Bei der Auswertung der Linearität wurde folgendes Diagramm erstellt (siehe Abbildung 16).

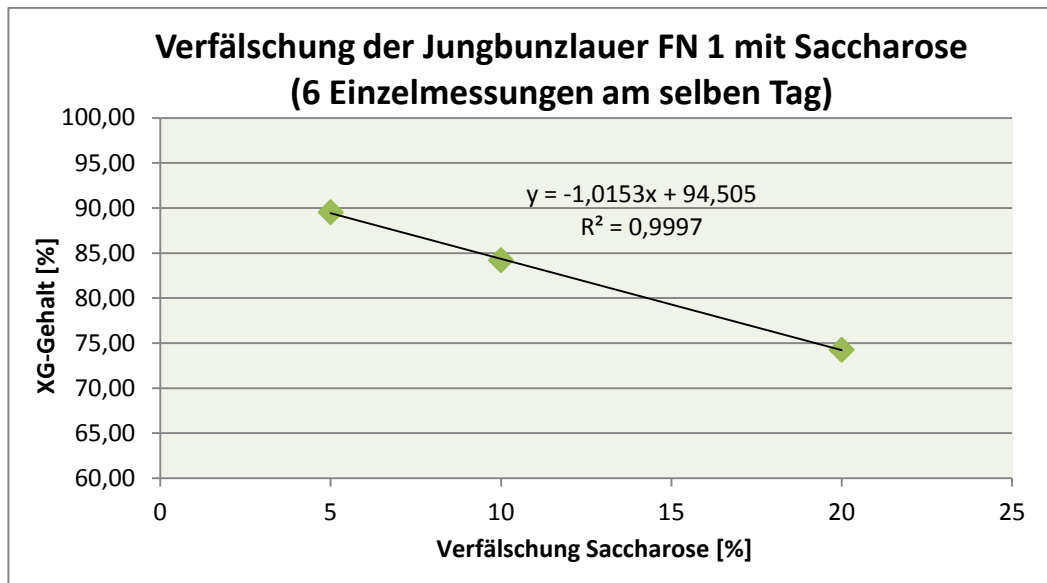


Abbildung 16: Linearität (aus 6 Einzelmessungen am selben Tag) der Verfälschungen der Jungbunzlauer FN 1 mit Saccharose

Im Diagramm in Abbildung 16 wurde jeweils eine Doppelbestimmung der 5, 10 und 20 % Saccharose-Verfälschung vom selben Tag miteinbezogen. Aufgrund des Bestimmtheitsmaßes R^2 von 0,9997 kann wieder auf einen starken linearen Zusammenhang geschlossen werden, da R^2 nahe 1 liegt.

4.2.3 Ergebnisse bei Bezug auf die Trockensubstanz

Da sich Analysenwerte oftmals auf die Trockensubstanz beziehen, wurde zusätzlich zur Gehaltsbestimmung eine Wassergehaltsmessung mittels Karl-Fischer-Titration im Ausheizofen durchgeführt. Der Wassergehalt wurde in den gefällten, getrockneten und gemahlene Xanthan-Fasern gemessen. Durch Umrechnung des Wassergehalts auf die Trockensubstanz kann der Xanthan-Gehalt um den Wassergehalt korrigiert werden.

Die Wassergehaltsbestimmung wurde bei einer Ausheiztemperatur von 150 °C durchgeführt. Diese Temperatur wurde anhand von thermoanalytischen Messungen von Xanthan-Proben festgelegt. Die Analysen zur Materialcharakterisierung wurden von arm.alysis (Deutschland) im Auftrag von Jungbunzlauer Austria AG ausgeführt, die in den nächsten Seiten kurz beschrieben werden.

4.2.3.1 Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse (TGA)

Die Thermogravimetrie erfasst die Masse bzw. Masseänderung einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur und/oder der Zeit bei einer definierten Gasatmosphäre [EHRENSTEIN et al., 2003].

Für die Durchführung der TGA wurden die in der Tabelle 8 gezeigten Einstellungen gewählt. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung analysiert.

Tabelle 8: Einstellungen bei der thermogravimetrischen Analyse

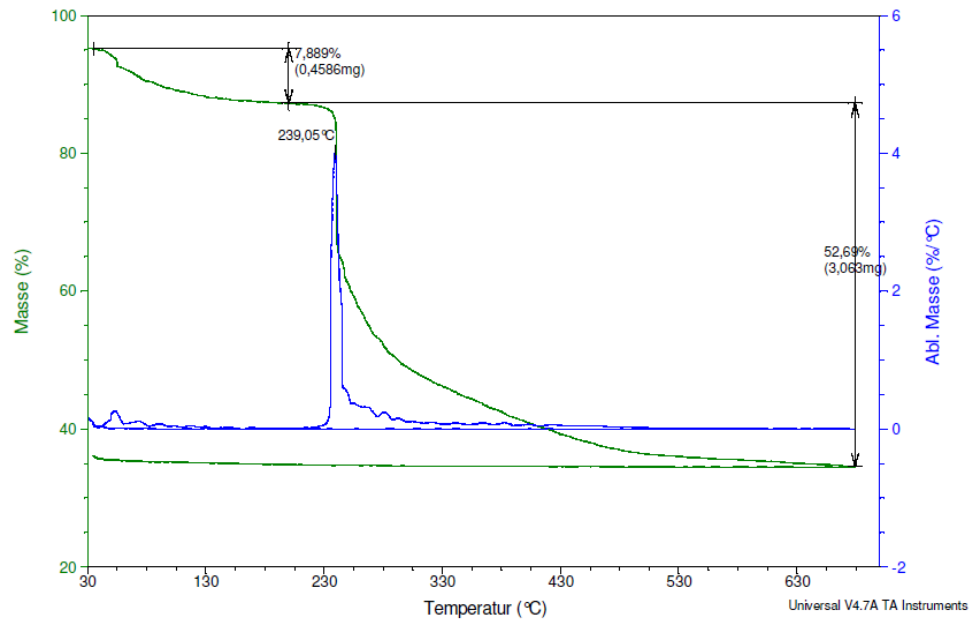
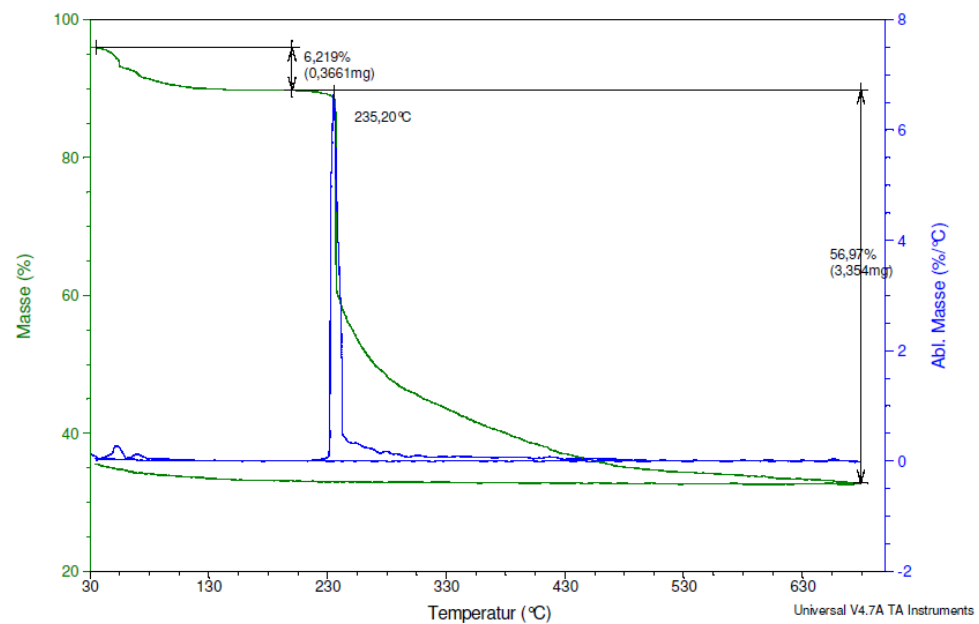
Modul:	TGA Q500, TA Instruments	
Probenmasse:	5,5 +/- 1 mg	
Heizrate:	HiRes-Einstellungen max. 40 °C/min	
Spülgas, Probenraum:	RT bis 700 °C unter Stickstoffatmosphäre	
Spülgasstrom:	Probenraum	60 ml/min elektr. geregelt
	Wägeraum	40 ml/min elektr. geregelt

Die Ergebnisse zur TG-Messung sind in der Tabelle 9 ersichtlich.

Tabelle 9: Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse

Probe	Dpeak [°C]	Stufe 1 [%] 35-200 °C	Stufe 2 [%] 200-700°C	Stufe 3 [%] Rückstand
FN 1	239	7,9	52,7	39,4
	241	8,8	53,4	37,8
gefällte, getrocknete Fasern der FN 1	234	6,2	57,0	36,8
	235	6,2	57,0	36,8

Die dazugehörigen TG-Analysen sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Diese beiden Analysen sind jeweils die erste durchgeführte Messung aus der Doppelbestimmung.

**Abbildung 17:** TG-Analyse der FN 1**Abbildung 18:** TG-Analyse der gefällten, getrockneten Fasern der FN 1

Wie man in den Abbildungen 17 bzw. 18 erkennen kann, erfolgte bis zu einer Temperatur von 200 °C eine Massenabnahme von rund 7,9 % bzw. 6,2 % bei den Fasern. Diese Werte beinhalten vor allem abgedampftes Wasser und eventuell flüchtige Substanzen, die von der Probe abgegeben wurden. Ab einer Temperatur von etwa 150 °C konnten nur äußerst geringe Massenverringere-

rungen verzeichnet werden. Daher kann man sagen, dass eine Temperatur von 150 °C zur Wasserbestimmung mittels Karl-Fischer-Titration und Ausheizofen ausreichend ist. Ab etwa 235 bis 240 °C kommt es zur Zersetzung der Probe.

4.2.3.2 Ergebnisse der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DDK)

Die Dynamische Differenzkalorimetrie registriert durch kalorimetrische Messung direkt die Enthalpieänderung einer Probe im Vergleich zu einer Referenzsubstanz. Das heißt, es wird die Wärmemenge gemessen, die bei einer physikalischen oder chemischen Umwandlung eines Stoffes entsteht oder aufgebracht werden muss [EHRENSTEIN et al., 2003].

Bei der Charakterisierung von Xanthan-Proben mittels DDK wurden zur Messung die in der Tabelle 10 aufgelisteten Einstellungen definiert.

Tabelle 10: Einstellungen bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie

Heizlauf:	-60°C bis 300°C mit 10°C/Minute
Einwaage:	5,0 +/- 0,5 mg
Tiegel:	Aluminiumpfännchen Standard
Spülgas:	Stickstoff 50 ml/min

Für die vergleichende Beurteilung wurden die Auswertegrenzen bei allen Mustern gleich gesetzt (zwischen 0 und 200 °C). Die Ergebnisse der DDK-Messungen sind in der Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Ergebnisse der dynamischen Differenzkalorimetrie

Probe	Heizlauf		
	Peak max. Temp. [°C]	Onset Temp. [°C]	Schmelz- wärme [J/g]
FN 1	117	60	364
gefällte, getrocknete Fasern der FN 1	113	51	327

Die DSC-Analysen für diese beiden Proben sind in den Abbildungen 19 und 20 zu sehen.

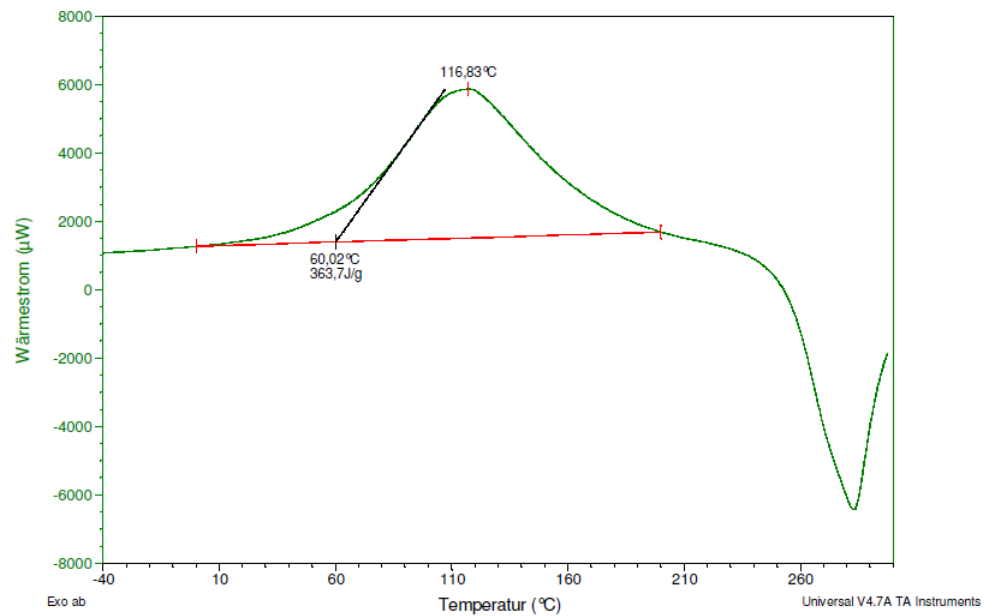


Abbildung 19: DDK-Analyse der FN 1

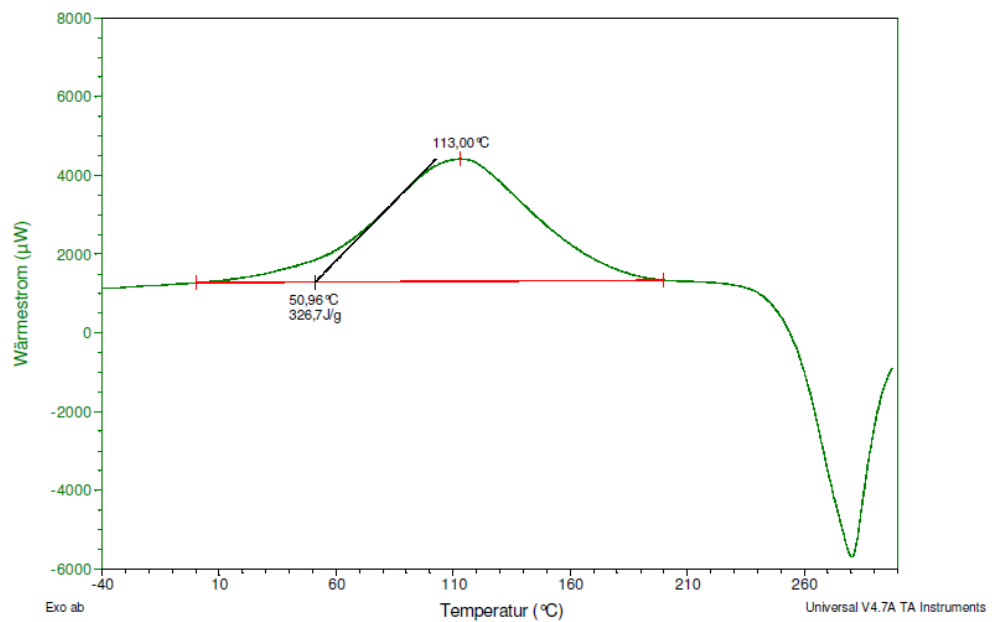


Abbildung 20: DDK-Analyse der gefällten, getrockneten Fasern der FN 1

Die angegebenen Temperaturwerte in den Abbildungen 19 und 20 sowie in der Tabelle 11 werden als Umwandlungstemperaturen bezeichnet. Der Wert Peak

max. Temp. [°C] gibt die Temperatur des Peakmaximums an. Hierbei ist der Wärmestrom am höchsten. Die angegebene Schmelzwärme gibt die benötigte Umwandlungswärme für diesen Vorgang an.

Wie man an den Ergebnissen erkennen kann, liegt für Xanthan ein breiter Bereich um das Peakmaximum vor. Dieser Bereich reicht von etwa 105 bis 120 °C, wo nur geringe Wärmestromänderungen gemessen werden konnten. Zur Trocknung der Xanthan-Fasern wurde eine Temperatur von 105 °C gewählt, da diese von der Europäischen Pharmakopöe vorgeschlagen wird.

4.2.3.3 Ergebnisse der Wassergehaltsmessung mit der Karl-Fischer-Titration

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse (Mittelwert und Variationskoeffizient) des Wassergehaltes der gemessenen gefällten und getrockneten Xanthan-Fasern aufgelistet. Der Wassergehalt der Fasern liegt zwischen 7 und 11 %.

Tabelle 12: Ergebnisse der Wassergehaltsbestimmung

Charge	Anzahl der Messungen	Wassergehalt MW [%]	VK [%]
FN 1	8	9,94	7,80
FN 2	8	9,35	8,21
FG	8	9,87	7,74

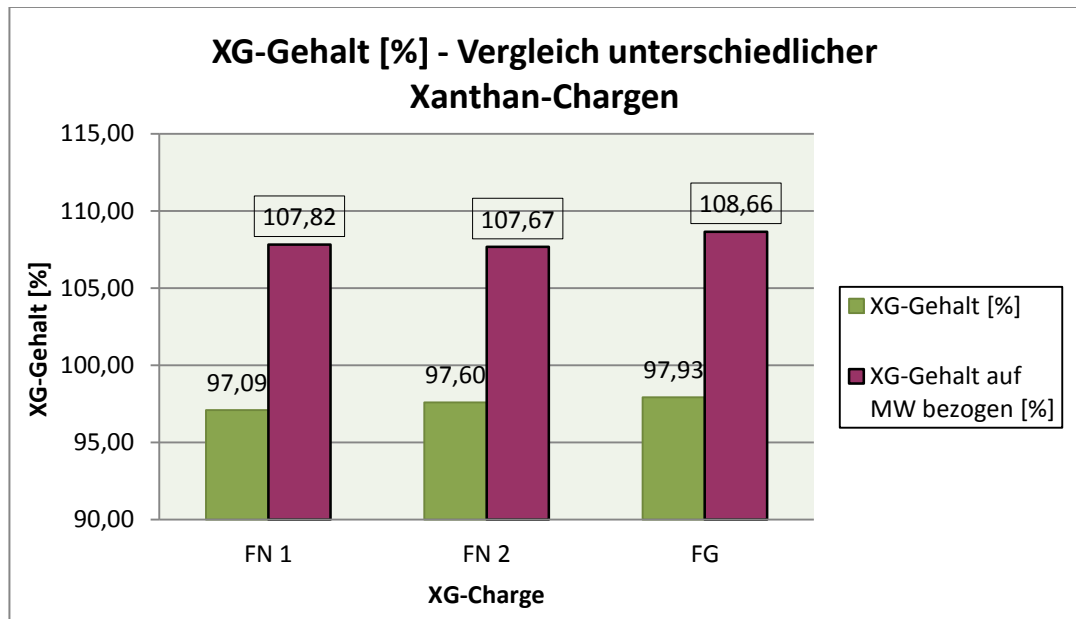
4.2.3.4 Vergleich der Ergebnisse XG-Gehalt und XG-Gehalt auf die Trockensubstanz bezogen

Die Tabelle 13 zeigt eine Darstellung der XG-Gehalte [%] unterschiedlicher Xanthan-Proben der Jungbunzlauer Austria AG. Der XG-Gehalt MW [%] gibt den Mittelwert der jeweiligen Charge wieder. Die Spalte XG-Gehalt auf TS bezogen MW [%] beinhaltet den Mittelwert des XG-Gehaltes auf die Trockensubstanz bezogen.

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse XG-Gehalt und XG-Gehalt auf die TS bezogen

Charge	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	VK [%]	XG-Gehalt auf TS bezogen MW [%]	VK [%]
FN 1	4	97,09	0,62	107,82	0,98
FN 2	4	97,60	0,52	107,67	1,25
FG	4	97,93	0,87	108,66	1,24

In der Abbildung 21 ist zu den angegebenen Daten der grafische Vergleich der XG-Gehalte in Prozent dargestellt.

**Abbildung 21:** Vergleich XG-Gehalt und XG-Gehalt auf die Trockensubstanz bezogen

Da die Karl-Fischer-Titration bei der Messung des Wassergehaltes sehr hohe Schwankungen aufweist, verringert sich durch Korrektur des XG-Gehaltes die Methodenpräzision. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des Variationskoeffizienten.

Zum Vergleich der Messwert-Reihen dient der Variationskoeffizient, welcher in der Tabelle 13 aufgelistet ist.

4.2.3.5 Bewertung der Ergebnisse bei Bezug auf die Trockensubstanz

Durch die Korrektur des Wassergehalts wird lediglich eine Erhöhung des Xanthan-Gehalts und der Standardabweichung erreicht, die wiederum zu einer Erhöhung des Variationskoeffizienten führt. Der Wassergehalt der unterschiedlichen Xanthan-Fasern kann als stabiler Wert angesehen werden. Eine höhere Auswaage ist auf einen höheren Wassergehalt rückführbar. Deshalb ist für die Verwendung der Fällungsmethode die Korrektur um den Wassergehalt nicht notwendig, da sich nur der Gehaltsbereich nach oben verschiebt.

Außerdem nimmt die Wassergehaltsanalyse mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration relativ viel Zeit in Anspruch. Durch den Verzicht der Wassergehaltsanalyse, kann die Fällungsmethode routinemäßig einfacher in den Laboralltag eingegliedert werden.

Nach Betrachtung der Ergebnisse wurde die Wasserbestimmung mit der Karl-Fischer-Titration nicht in die endgültige Version der Fällungsmethode aufgenommen.

4.3 Beurteilung der Ergebnisse aus Sicht einer Methodenvalidierung

Bei der Fällungsmethode handelt es sich um eine neue Methode. Deshalb sollte diese einer Validierung unterzogen werden. Das Ziel der Validierung ist zu beweisen, dass die Fällungsmethode für den Verwendungszweck geeignet ist. Die Methode ist eine Endproduktanalyse zur Gehaltsbestimmung und soll der Qualitätskontrolle von Xanthan-Proben dienen. Sie hat zum Ziel, Verfälschungen von Xanthan-Proben zu erkennen.

In den folgenden Seiten werden die verwendeten Validierungsparameter für die erstellte Fällungsmethode näher definiert und die Ergebnisse des Analyseverfahrens anhand der Kenngrößen ausgewertet. Zur Validierung wurden die Ergebnisse der Jungbunzlauer FN 1-Charge herangezogen.

4.3.1 Präzision

*Definition – **Präzision** (engl. precision): Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander oder einfach ausgedrückt: Maß für die Streuung von Analysenergebnissen [KROMIDAS, 1999]*

Zur Auswertung der Ergebnisse für die Fällungsmethode wurden die Präzisionsarten „Präzision von Tag zu Tag“ und die „Präzision von Serie zu Serie“ beurteilt.

4.3.1.1 Präzision von Tag zu Tag

*Definition – **Präzision von Tag zu Tag** (engl. day to day precision oder inter-day precision): Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ermittlungsergebnissen mit derselben Probe, demselben Verfahren, demselben Bearbeiter, derselben Geräteausrüstung, im selben Labor, aber an verschiedenen Tagen [KROMIDAS, 1999]*

In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse zur Präzision von Tag zu Tag aufgelistet.

Tabelle 14: Ergebnisse zur Präzision von Tag zu Tag der Jungbunzlauer FN 1-Charge

Fällungstag / Wägetag	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
2. / 3.4.2013	10	95,18	0,4286	0,45
3. / 4.4.2013	2	93,94	0,1572	0,17
8. / 9.4.2013	4	95,43	0,4865	0,51
17. / 18.4.2013	2	97,32	0,0355	0,04
29. / 30.4.2013	2	96,87	0,9482	0,98
14. / 15.5.2013	10	97,16	0,3259	0,34
Gesamt	30	96,05	1,1608	1,21
2. bis 9.4.2013	16	95,09	0,6101	0,64
17.4. bis 15.5.2013	14	97,14	0,3988	0,41

Durch das Erreichen eines Variationskoeffizienten von Gesamt 1,21 % kann von einer hohen Präzision ausgegangen werden. Nach Stavros Kromidas sind in der Pharma-Qualitätskontrolle Variationskoeffizienten zwischen 1 bis 2 % üblich [KROMIDAS, 1999].

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, schwankt der XG-Gehalt im Mittel zwischen 93,94 % und 97,32 %. Wenn man die Mittelwerte nach Datum genauer betrachtet, kann man erkennen, dass sich die Werte im Mittel um 2 % erhöht haben, wenn man den Mittelwert 2. bis 9.4.2013 mit 95,09 % mit dem Mittelwert 17.4. bis 15.5.2013 mit 97,14 % vergleicht. Diese Schwankungen spiegeln sich auch in der Auswertung der Präzision von Serie zu Serie wieder.

4.3.1.2 Präzision von Serie zu Serie

*Definition – **Präzision von Serie zu Serie** (engl. between-run precision oder within day precision oder intra-day precision): Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ermittlungsergebnissen mit derselben Probe, dem-*

selben Verfahren, demselben Bearbeiter, derselben Geräteausrüstung, im selben Labor, aber in verschiedenen Serien [KROMIDAS, 1999]

Die Ergebnisse zur Präzision von Serie zu Serie sind in den Tabellen 15 und 16 zu sehen. Die Serien bestehen aus einer 10-fachen Bestimmung und wurden jeweils am selben Tag analysiert. Serie 1 wurde Anfang April und Serie 2 wurde Mitte Mai durchgeführt.

Tabelle 15: Präzision von Serie zu Serie der Jungbunzlauer FN 1-Charge – Bestimmung des XG-Gehaltes Anfang April

Probennr.	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
1 bis 3	3	94,80	0,2308	0,24
4 bis 6	3	95,36	0,6279	0,66
7 bis 10	4	95,33	0,2119	0,22
Gesamt	10	95,18	0,4286	0,45

Tabelle 16: Präzision von Serie zu Serie der Jungbunzlauer FN 1-Charge – Bestimmung des XG-Gehaltes Mitte Mai

Probennr.	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
1 bis 3	3	97,00	0,3394	0,35
4 bis 6	3	97,47	0,2526	0,26
7 bis 10	4	97,05	0,2412	0,25
Gesamt	10	97,16	0,3259	0,34

Bei Betrachtung der Präzision von Serie zu Serie kann man sagen, dass die Mittelwerte in beiden Serien nur geringen Schwankungen unterliegen. Dies ist am Variationskoeffizienten zu erkennen.

Wenn man den Gesamt-Mittelwert des XG-Gehaltes aus Tabelle 15 von 95,18 % mit dem Gesamt-Mittelwert aus Tabelle 16 von 97,16 % vergleicht, kann man die 2 %ige Erhöhung des XG-Gehaltes erkennen. Doch bei beiden Messtagen liegen niedrige Variationskoeffizienten unter 1 % vor. Somit kann man von einer hohen Präzision in beiden Messwertreihen ausgehen.

Da die Werte Anfang April niedriger sind, als Ende April bzw. Mitte Mai wurde die Vermutung aufgestellt, dass dies auf die verbesserte Durchführung der Fällungsmethode zurückzuführen sein könnte. Diese Vermutung kann dadurch erklärt werden, dass mit Ende März die Vorversuche zur Erstellung der Fällungsmethode abgeschlossen wurden. Somit waren Anfang April die ersten Versuche mit der festgelegten Gehaltsanalysemethode. Durch die zahlreichen Versuche wurde die Bearbeitung der Proben immer mehr verbessert und dadurch ein höherer XG-Gehalt erreicht.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden weitere Versuche mit der Fällungsmethode von einer zweiten Analytikerin vollzogen. Die Ergebnisse nach der erstmaligen Durchführung sind in der Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Ergebnisse des XG-Gehaltes der Jungbunzlauer FN 1-Charge von Analytikerin 2

Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
7	92,44	0,8125	0,88

Wie man am Ergebnis in Tabelle 17 erkennen kann, liegt der XG-Gehalt deutlich unter dem Mittelwert (96,05 %) von Bearbeiterin 1. Für eine endgültige Beurteilung der vorgeschlagenen Methode zur Bestimmung des XG-Gehaltes müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden.

4.3.1.3 Statistische Auswertung der Präzision

Zur Auswertung der Präzision und Beurteilung der erhaltenen Messergebnisse der Jungbunzlauer FN 1-Charge können unterschiedliche statistische Tests

durchgeführt werden. Die nachstehenden Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Statistik-Software SPSS Statistics Version 15.0 [SPSS Inc., 2006].

Für die Variable „XG-Gehalt [%] der Jungbunzlauer FN 1-Charge“ wurde folgende deskriptive Statistik erhalten (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Variable „XG-Gehalt [%] der Jungbunzlauer FN 1-Charge“

		Statistik	Standard- fehler
XG-Gehalt [%]	Mittelwert	96,0463	,21198
	Median	95,9050	
	Standardabweichung	1,161	
	Minimum	93,83	
	Maximum	97,76	
	Spannweite	3,93	
	Interquartilbereich	2,22	
	Schiefe	-,173	,427

In der Abbildung 22 ist die grafische Darstellung der ermittelten Streuungs- und Lagemaße als Boxplot ersichtlich. Dieser zeigt in welchem Bereich die Daten liegen und wie diese verteilt sind. Laut Boxplot sind keine Ausreißer in dieser Messwertreihe gegeben.

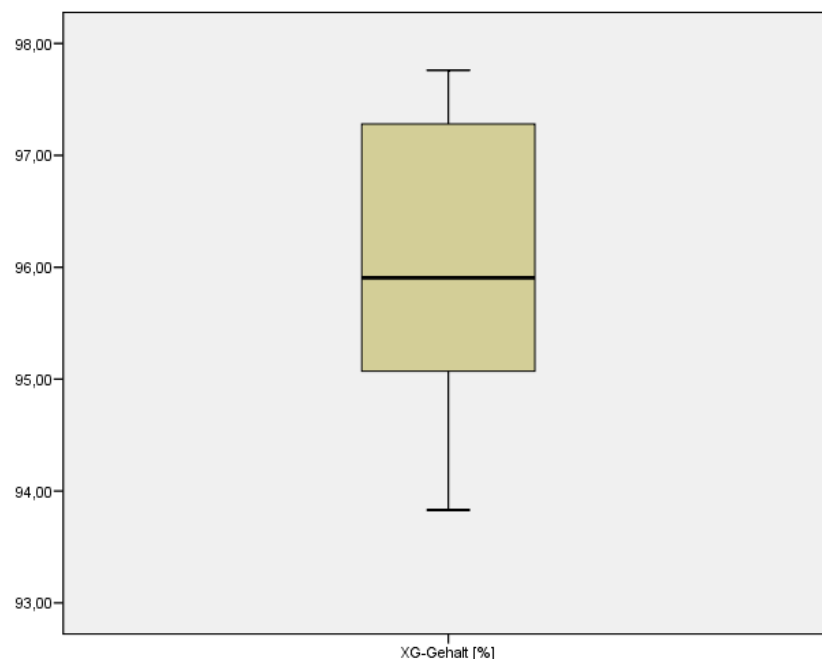


Abbildung 22: Boxplot der Variable „XG-Gehalt [%] der Jungbunzlauer FN 1-Charge

Das Histogramm in Abbildung 23 stellt die Häufigkeitsverteilung der Variable „XG-Gehalt [%] der Jungbunzlauer FN 1-Charge“ grafisch dar. Die schwarze Kurve zeigt die Normalverteilung an.

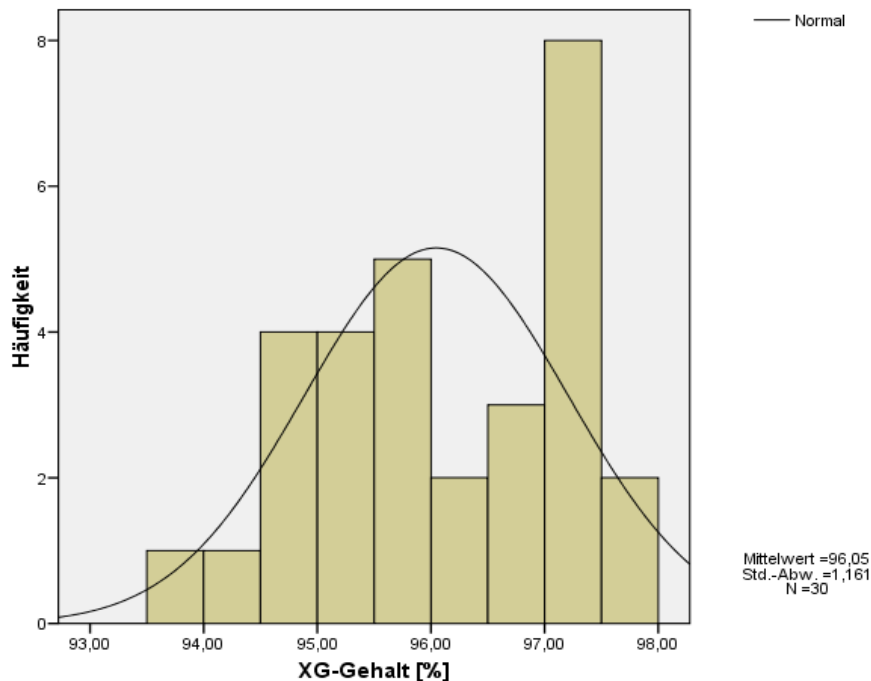


Abbildung 23: Histogramm der Variable „XG-Gehalt [%] der Jungbunzlauer FN 1-Charge“

Normalerweise gilt für statistische Tests als Voraussetzung, dass die Werte einer Messwertreihe normalverteilt sind. Ob eine Normalverteilung bei diesen Daten vorliegt, kann durch den Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest festgestellt werden. In der Tabelle 19 sind die Ergebnisse laut SPSS ersichtlich.

Tabelle 19: Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest – Test auf Normalverteilung

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest		
		XG-Gehalt [%]
N		30
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	96,0463
	Standardabweichung	1,16106
Extremste Differenzen	Absolut	,141
	Positiv	,100
	Negativ	-,141
Kolmogorov-Smirnov-Z		,771
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,592

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

Die Nullhypothese für diesen Test lautet: „Es gibt keinen Unterschied zur Normalverteilung“.

Als Alternativhypothese kann folgende formuliert werden: „Es gibt einen Unterschied zur Normalverteilung“.

Die Auswertung erfolgt mittels der asymptotischen Signifikanz, welche 0,592 beträgt. Diese ist nicht kleiner als das Signifikanzniveau von 0,05 (bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 %). Deshalb kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Daten sind laut Test annähernd normalverteilt.

Um feststellen zu können, ob bei diesen Messergebnissen Ausreißer vorliegen, wurde der Ausreißertest nach Grubbs gewählt [KROMIDAS, 1999]. Die untenstehende Formel gibt die zu bildende Prüfgröße Q an, welche wie folgt berechnet wird:

$$Q = \frac{x_1 - MW}{s}$$

- s (Standardabweichung) 1,1608
- MW (Mittelwert) 96,05
- kritischer Wert laut Tabelle 2,745 zu Wahrscheinlichkeit von 95 % bei Anzahl 30 [KROMIDAS, 1999]
- x_1 ausreißerverdächtiger Wert 97,76 (Maximum)
Q = 1,473 ist kleiner als 2,745 → 97,76 laut Grubbs-Test kein Ausreißer
- x_1 ausreißerverdächtiger Wert 93,83 (Minimum)
Q = 1,912 ist kleiner als 2,745 → 93,83 laut Grubbs-Test kein Ausreißer

Nach dem Ausreißertest von Grubbs können bei den 30 Analysenergebnissen der Jungbunzlauer FN 1-Charge keine Ausreißer festgestellt werden. Es liegt sowohl beim Maximum-Wert als auch beim Minimum-Wert ein zufälliger Unterschied vor.

4.3.2 Richtigkeit

*Definition – **Richtigkeit** (engl. trueness oder accuracy): Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehen Wert [KROMIDAS, 1999]*

Der richtige Wert kann durch ein zertifiziertes Referenzmaterial ermittelt werden. Für Xanthan liegt kein zertifiziertes Referenzmaterial vor. Es besteht auch keine Referenzmethode zum Vergleich mit der Fällungsmethode. Daher können die Ergebnisse nicht nach dem Validierungsparameter „Richtigkeit“ ausgewertet werden.

Zur Bestimmung, ob es sich um annähernd richtige XG-Gehalte handeln könnte, wurden 2 Chargen der gleichen Granulierung miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Vergleich des XG-Gehaltes zwei verschiedener Jungbunzlauer FN-Chargen

Charge	Anzahl der Messungen	XG-Gehalt MW [%]	STABW [%]	VK [%]
FN 1	30	96,05	1,1608	1,21
FN 2	4	97,60	0,5123	0,52

Wie an den Ergebnissen in der Tabelle 20 ersichtlich ist, liegen die beiden Mittelwerte des XG-Gehaltes etwa 1,5 % auseinander. Durch den Vergleich mit weiteren Chargen unterschiedlicher Granulierungen, wobei die Ergebnisse in Tabelle 5 im Kapitel 4.2.1 ersichtlich sind, kann ebenfalls nur von einer annähernden Richtigkeit der Werte ausgegangen werden, da die XG-Gehaltswerte in einem ähnlichen Bereich liegen.

Ob es sich dabei um richtige Werte handelt, kann nicht beurteilt werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial vorhanden ist.

Der nächste Validierungsparameter, die Linearität, kann Hinweise auf die Richtigkeit der Analysenergebnisse geben.

4.3.3 Linearität

*Definition – **Linearität** (engl. linearity): Korrelation (Zusammenhang) zwischen Messwert bzw. Signal und Menge bzw. Konzentration nach Durchführung einer konkreten Analysemethode [KROMIDAS, 1999]*

Die Linearität der Fällungsmethode wurde mit der Jungbunzlauer FN 1-Charge analysiert. Hierzu wurden fünf unterschiedliche Einwaagen zwischen 0,8 und 1,2 g der Fällungsmethode unterzogen und der XG-Gehalt ermittelt. Zwölf Einzelwerte sind in das untenstehende Diagramm in Abbildung 24 mit-einbezogen, wobei diese an zwei verschiedenen Tagen gemessen wurden. An einem Tag wurden die Messungen mit den Einwaagen 0,8 g, 1,0 g und 1,2 g Xanthan durchgeführt und etwa zwei Wochen danach wurden die Einwaagen 0,9 g, 1,0 g und 1,1 g analysiert.

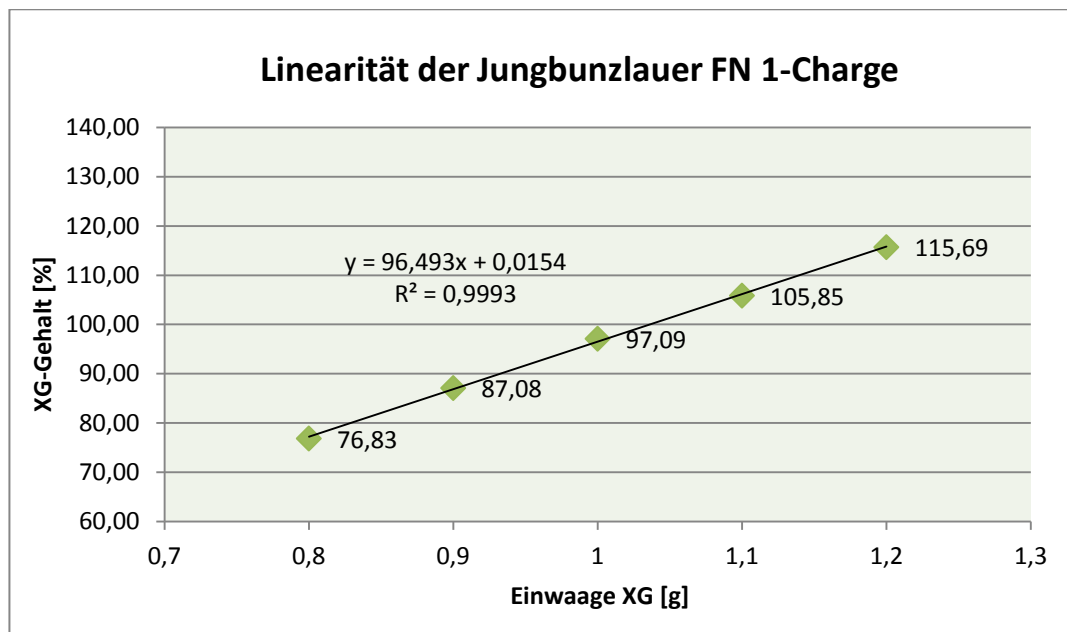


Abbildung 24: Linearität der Jungbunzlauer FN 1-Charge

Wie man im Diagramm in Abbildung 24 erkennen kann, verläuft die Trendlinie aufsteigend, wodurch ein positiver Zusammenhang zwischen Einwaage [g] und XG-Gehalt [%] erhalten wird. Da das Bestimmtheitsmaß R^2 mit 0,9993 fast 1 ergibt, kann von einem starken linearen Zusammenhang ausgegangen werden.

Die passende Regressionsgleichung zur Trendlinie ist ebenfalls im Diagramm enthalten und gilt für dieses Linearitätsmodell. Diese kann wie folgt beschrieben werden:

$$XG_{\text{Gehalt}} [\%] = 96,493 \cdot \text{Einwaage}_{XG} [g] + 0,0154$$

Die Linearität gibt Auskunft über den linearen Zusammenhang zwischen der Einwaage von Xanthan in Gramm und dem resultierenden XG-Gehalt in Prozent. Wie man an der Gleichung erkennen kann, läuft die Regressionsgerade annähernd durch den Null-Punkt. Das heißt, dass bei einer Einwaage von 0 g Xanthan ein äußerst geringer XG-Gehalt von gerundet 0,02 % erhalten wird. Dies kann jedoch vernachlässigt werden, da der Wert in den Schwankungen der Methode liegt.

Durch den vorhandenen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von über 0,999 und dem Durchgang der Regressionsgeraden durch den Null-Punkt, kann ebenfalls von richtigen Ergebnissen ausgegangen werden.

4.4 Beurteilung der Ergebnisse der Fällungsmethode

Nach der Analyse einer Xanthan-Probe mit Hilfe der erstellten Fällungsmethode kann mit der gegebenen Formel der Xanthan-Gehalt der Probe berechnet werden. Anhand des Gehalts kann die Probe wie folgt beurteilt werden:

- Der XG-Gehalt liegt innerhalb des vorgegebenen Bereiches.
- Der XG-Gehalt liegt außerhalb des vorgegebenen Bereiches.

Wenn erstens zutrifft, kann man davon ausgehen, dass keine Verfälschungen mit Salzen oder Mono- bzw. Disacchariden vorliegen. Wenn der XG-Gehalt unterhalb des vorgegebenen Gehaltsbereiches liegt, wurde womöglich eine Verfälschung der Probe entdeckt. Bei Vorhandensein einer Verfälschung kann jedoch nicht die Art des beigemengten Materials bestimmt werden.

Zur Beurteilung der Ergebnisse muss ein Gehaltsbereich definiert werden, wobei die Schwankungen der Fällungsmethode berücksichtigt werden müssen.

Zur Definition des XG-Gehaltsbereiches wurde der Mittelwert der FN 1 mit 96,05 % und die dazugehörige Standardabweichung mit 1,1608 % herangezogen, da diese Charge bei der Erstellung der Methode als Arbeitsstandard diente. Der XG-Gehaltsbereich besteht aus Mittelwert $\pm$ Standardabweichung und ist auf zwei Dezimalstellen gerundet (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: XG-Gehaltsbereich bei Vervielfachung der Standardabweichung

	STABW [%]	XG-Gehaltsbereich	
		Minimum	Maximum
1 mal STABW	1,1608	94,89	97,21
2 mal STABW	2,3216	93,73	98,37
2,5 mal STABW	2,9020	93,15	98,95
3 mal STABW	3,4824	92,57	99,53

Bei Betrachtung aller Einzelergebnisse der erstellten Fällungsmethode fallen alle Analysenwerte in den Bereich von Mittelwert $\pm$ 2,5-fache Standardabweichung. Außerdem ist bei einem Mindestgehalt von 93 % eine Verfälschung mit Natrium-Chlorid oder Saccharose auszuschließen, da eine 5 %ige Verfälschung einen XG-Gehalt von unter 90 % liefert.

Der Gehaltsbereich der Fällungs-Methode aus 7th JSFA Monographie Xanthan liegt zwischen 72,0 und 108,0 % [JSFA – MONOGRAPHIE, n. d.]. Dieser Bereich hat eine Spannweite von 36 %. Die erstellte Fällungsmethode weist eine wesentlich geringere Spannweite auf. Bei Mittelwert $\pm$ der 2,5-fachen Standardabweichung ergibt sich eine Spannweite von 5,8 %.

5 Schlussbetrachtung

Die erstellte Fällungsmethode liefert Ergebnisse mit hoher Präzision, da der Variationskoeffizient unter 1,3 % liegt. Die FN 1-Charge weist einen Variationskoeffizient von 1,21 % auf. Der niedrigste XG-Gehalt liegt bei 93,83 % und das Maximum bei 97,76 %. Aus diesen Daten kann ein Gehaltsbereich von 93 bis 98 % festgelegt werden. Dieser entspricht dem Mittelwert $\pm$ der 2,5-fachen Standardabweichung der FN 1-Probe.

Bei Betrachtung aller gemessenen Xanthan-Chargen (FN 1, FN 2, FNCS 1, FNCS 2, FG, FF) fallen alle XG-Gehalts-Werte in den oben genannten Bereich.

Bei der Auswertung der Präzision von Tag zu Tag bzw. Präzision von Serie zu Serie konnten jedoch Schwankungen des XG-Gehaltes festgestellt werden. Daher sollten vor einer abschließenden Beurteilung der Präzision zur erstellten Fällungsmethode noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Die Richtigkeit der Ergebnisse kann nur annähernd durch den Validierungsparameter „Linearität“ beurteilt werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial vorhanden ist bzw. keine Referenzmethode zum Vergleich mit der Fällungsmethode besteht. Durch den vorhandenen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von über 0,999 und dem Durchgang der Regressionsgeraden durch den Null-Punkt, kann von eher richtigen Ergebnissen ausgegangen werden.

Für eine ausreichende Bewertung der Methodenvvalidierung, vor allem der Validierungsparameter „Präzision“ und „Richtigkeit“ wurden folgende Überlegungen angestellt:

- Durchführung der Fällungsmethode durch andere Mitarbeiterinnen oder Mitarbeiter
- Durchführung der Fällungsmethode in einem oder mehreren anderen Labors
- Durchführung der Fällungsmethode mit weiteren Xanthan-Proben, auch von anderen Produktionsunternehmen

Zum großen Teil wurden die Versuche in dieser Arbeit von nur einer Analytikerin behandelt. Auch die Durchführung der Fällungsmethode in anderen Labors kann wesentlich zur Beurteilung der Methodenvvalidierung beitragen. Ob die Methode auch für anders produzierte Xanthan-Chargen geeignet ist, kann durch die Durchführung der Fällungsmethode mit anderen Xanthan-Proben weiterer Produktionsunternehmen getestet werden.

Durch diese weiterführenden Untersuchungen können Vergleichspräzisionen zwischen zwei verschiedenen Bearbeiterinnen oder Bearbeitern oder zwischen unterschiedlichen Laboratorien ausgewertet werden. Mit den Ergebnissen von weiteren Xanthan-Proben, vor allem von anderen Produktionsunternehmen, kann geprüft werden, ob diese in den Gehaltsbereich der Jungbunzlauer-Chargen hineinfallen.

Bei der Erstellung der Fällungsmethode wurde darauf geachtet, dass diese Methode routinemäßig in einem Qualitätskontrolllabor eingesetzt werden kann. Nach Beurteilung der Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die erstellte Fällungsmethode zur Überprüfung von Xanthan-Proben geeignet ist, da Verfälschungen mit Natriumchlorid oder Saccharose wiedergefunden werden können.

Bei einer 5 %igen Verfälschung ergibt sich ein XG-Gehalt von kleiner 90 %. Die Erstellung eines Vergleiches zwischen verschiedenen Verfälschungskonzentrationen und den resultierenden XG-Gehalts-Werten ergeben einen linearen Zusammenhang. Bei Berechnung des XG-Gehaltes ohne Verfälschung liegt dieser Wert im bereits angesprochenen Gehaltsbereich zwischen 93 und 98 %.

Falls eine Xanthan-Probe mit anderen Hydrokolloiden wie zum Beispiel Guar Gum oder Locust Bean Gum verfälscht ist, kann diese Verfälschung mit der erstellten Fällungsmethode nicht ermittelt werden, da diese ebenfalls ausgefällt werden.

Für dieses Analyseproblem gibt es bereits eine Methode der Europäischen Pharmakopöe, welche den Namen „Other Polysaccharides“ trägt. Bei dieser Methode wird zuerst die Xanthan-Probe einem Aufschluss mit Trifluoressigsäure unterzogen und zur Reinheitsbestimmung die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Diese qualitative Methode soll eine Verfälschung mit anderen Polysacchariden erkennen lassen.

Um eine abschließende Beurteilung zur erstellten Fällungsmethode abzugeben, müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden. Des Weiteren sollten die resultierenden Ergebnisse nach bereits genannten Validierungsparametern ausgewertet werden. Es sollte auch ein geeigneter XG-Gehaltsbereich für die Methode festgelegt werden, wobei die Ergebnisse von anderen Xanthan-Proben weiterer Produktionsunternehmen miteinbezogen werden sollten.

6 Zusammenfassung

Xanthan gehört als Polysaccharid zu den Hydrokolloiden und bildet bereits bei niedrigen Konzentrationen hochviskose Lösungen. Aufgrund der chemischen Struktur weist dieses Polymer ein breites Eigenschaftenprofil auf. Xanthan findet in den Bereichen Lebensmittel, Kosmetika, Pharmazie und in der Technik vielseitige Anwendung.

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde eine Fällungsmethode erstellt, um die Reinheit und den Gehalt von Xanthan-Proben zu beurteilen. Nach zahlreichen Vorversuchen und Variationen wurde eine geeignete Methode entwickelt, die routinemäßig in einem Qualitätskontrolllabor eingesetzt werden kann.

Die Ergebnisse der Fällungsmethode bei Verwendung unterschiedlicher Xanthan-Proben des Produktionsunternehmens Jungbunzlauer Austria AG zeigen eine hohe Präzision. Die Variationskoeffizienten sind kleiner 1,3 %.

Die Richtigkeit der Ergebnisse kann nicht beurteilt werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial vorliegt. Des Weiteren ist keine Referenzmethode zum Vergleich mit der Fällungsmethode vorhanden. Durch die Auswertung der Linearität kann von eher richtigen Ergebnissen ausgegangen werden.

Die Fällungsmethode hat zum Ziel, dass Verfälschungen von Xanthan-Proben erkannt werden können. Daher wurden Xanthan-Proben absichtlich mit Natriumchlorid oder Saccharose verfälscht. Diese Verfälschungen konnten wiedergefunden werden.

Eine Verfälschung mit anderen Hydrokolloiden kann mit Hilfe der Fällungsmethode nicht ermittelt werden, da diese ebenfalls mit ausfallen. Für dieses Analyseproblem besteht bereits eine Methode der Europäischen Pharmakopöe.

Um eine abschließende Beurteilung zur erstellten Fällungsmethode abzugeben, müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden.

7 Abstract

Xanthan as a natural polysaccharide is part of the hydrocolloids. Xanthan gum solutions form high viscosities even at low concentrations. It has unique properties due to its chemical structure. Xanthan gum is found in a variety of foods, cosmetics and pharmaceutical products. In addition, it is used for technical applications.

As part of this master thesis, a precipitation method was developed to evaluate the purity and content of xanthan gum samples. After numerous pre-tests and variations an appropriate method was established. This method is suitable for routine analyses in quality control laboratories.

Different xanthan gum batches taken from Jungbunzlauer Austria AG's production were used to test the developed precipitation method. The results of this testing show a high precision. The coefficient of variation is smaller than 1.3 %.

The accuracy of the results was not statistically analysed due to the lack of reference material. There are also no comparable results deriving from a reference method that could be compared to the developed precipitation method's outcomes. A higher likeliness of correct results can be assumed because of the analyses of linearity.

The aim of the precipitation method is to detect adulterations of xanthan gum samples. Therefore some xanthan gum samples were intentionally adulterated with sodium chloride or saccharose. These adulterations were found to be detectable with the developed precipitation method.

An adulteration with other hydrocolloids cannot be shown because hydrocolloids would also precipitate. However, the European Pharmacopoeia offers a different method for this analytical problem.

To summarize, it can be said that further experimentations with the method are needed to draw a final conclusion.

8 Literaturverzeichnis

ALBAN S. Kohlenhydrate II: Polysaccharide und Polysacchariddrogen. In: Pharmakognosie – Phytopharmazie 9. Auflage (Hänsel R. und Sticher O. Hrsg). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010; 461-590.

BECKER A., KATZEN F., PÜHLER A., IELPI L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Applied Microbiology Biotechnology, 1998; 50: 145-152.

BORN K., LANGENDORFF V., BOULENGUER P. Xanthan. In: Biopolymers Vol.5: Polysaccharides 1: Polysaccharides from Prokaryotes (Vandamme E.J. und Steinbüchel A. Hrsg). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002; 259-298.

BRESOLIN T.M.B., SANDER P.C., REICHER F., SIERAKOWSKI M.R., RINAUDO M. GANTER J.L.M.S. Vicometric studies on xanthan and galactomannan systems. Carbohydrate Polymers, 1997; 33: 131-138.

CAMESANO T.A., WILKINSON K.J. Single Molecule Study of Xanthan Conformation Using Atomic Force Microscopy. Biomacromolecules, 2001; 2: 1184-1191.

CASAS J.A., GARÍCA-OCHOA F. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999; 79:25-31.

DINTZIS F.R., BABCOCK G.E., TOBIN R. Studies on dilute solutions and dispersions of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Carbohydrate Research, 1970; 13: 257-267.

EHRENSTEIN G.W., RIEDEL G., TRAWIEL P. Praxis der thermischen Analyse von Kunststoffen – 2. Auflage. Carl Hanser Verlag, München 2003; 1 & 150.

FLAHIVE III J.J., FOUFOPOULOS A., ETZEL M. R. Alcohol Precipitation of Xanthan Gum from Pure Solutions and Fermentation Broths. Separation Science and Technology, 1994; 29 (13): 1673-1687.

FLORES-CANDIA J.-L., DECKWER W.-D. Xanthan Gum. In: Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation Vol 5 (Flickinger M.C. und Drew S.W. Hrsg). Wiley, New York, 1999; 2695-2711.

GARCÍA-OCHOA F., CASAS J.A., MOHEDANO A.F. Xanthan Precipitation from Solutions and Fermentation Broths. Separation Science and Technology, 1993; 28 (6): 1303-1313.

GARCÍA-OCHOA F., SANTOS V.E., CASAS J.A., GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances, 2000; 18: 549-579.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.

JANSSON P.-E., KENNE L., LINDBERG B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research, 1975; 45: 275-282.

JSFA – MONOGRAPHIE. Fällungsmethode. In: Xanthan Gum – Methode 7th JSFA. Japanese Standards of Food Additives. n.d.

JUNGBUNZLAUER AUSTRIA AG. Produktionsfließbild von Xanthan. Jungbunzlauer Austria AG, Österreich, 2013.

KROMIDAS S. Validierung in der Analytik. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1999.

LACHKE A. Xanthan – A Versatile Gum. Resonance, 2004; 9 (10): 25-33.

MELTON L.D., MINDT L., REES D.A. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: Evidence from partial hydrolysis studies. Carbohydrate Research, 1976; 46: 245-257.

MILAS M., RINAUDO M. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: Role of the conformational transition. Carbohydrate Research, 1986; 158: 191-204.

MILAS M., REED W.F., PRINTZ S. Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1996; 18: 211-221.

SHARMA B.R., NARESH L., DHULDHOYA N.C., MERCHANT S.U., MERCHANT U.C. Xanthan Gum – A Boon to Food Industry. *Food Promotion Chronicle*, 2006; 1 (5): 27-30.

SHATWELL K.P., SUTHERLAND I.W., DEA I.C.M., ROSS-MURPHY S.B. The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan. *Carbohydrate Research*, 1990; 206: 87-103.

SIEBER V., WITTMANN E., BUCHHOLZ S. Polysaccharide. In: *Angewandte Mikrobiologie* (Antranikian G. Hrsg). Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2006; 397-403.

SMITH I.H., PACE G.W. Recovery of Microbial Polysaccharides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1982; 32: 119-129.

SPSS INC. SPSS Statistics Version 15.0 [Statistik-Software]. USA, 2006.

STANKOWSKI J.D., MUELLER B.E., ZELLER S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydrate Research*, 1993; 241: 321-326.

SUTHERLAND I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 2001; 11: 663-674.

SWORN G. Xanthan gum. In: *Handbook of hydrocolloids*. (Phillips G.O. und Williams P.A. Hrsg). Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2000; 103-116.

TESTO INDUSTRIAL SERVICES GMBH. Validierung analytischer Methoden. In: *Praxisfibel Validierung – Validierung in der cGxP/CFR-regulierten Industrie*. Testo Industrial Services GmbH, Kirchzarten (Deutschland), 2007; 48-50.

9 Lebenslauf

Name	Anita Wabra
Reife- und Diplomprüfung	Bundeshandelsakademie Laa an der Thaya im Mai 2008
Bakkalaureatsstudium	der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien von Oktober 2008 bis November 2011
Beginn des Masterstudiums	der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien im November 2011
Berufspraktikum	bei Jungbunzlauer Austria AG im Werk Pernhofen im Qualitätskontrolllabor Xanthan 4. Februar – 31. Mai 2013 1. August – 28. September 2012 1. Februar – 29. Februar 2012 1. August – 30. September 2011 Wichtigste Tätigkeiten und Zuständigkeiten: Entwicklung und Validierung von Methoden im Qualitätskontrolllabor Xanthan, Routineanalysen im Qualitätskontrolllabor Xanthan
Praktikum	am Institut der Ernährungswissenschaften 4. Juni – 15. Juni 2012 Mitarbeit beim Österreichischen Ernährungsbericht 2012: Ermittlung der Enzymaktivität antioxidativ wirkender Enzyme und Bestimmung des Hämoglobinstatus in Blutproben mittels photometrischer Methoden