



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

WS 2010/2011

Etablierung einer HPLC-Analysenmethode zur Bestimmung von Galakturonsäure aus pflanzlichem Zellwandmaterial

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

Verfasserin: Sabine Kranzow

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Flick

Prof. Dr. Peter Meurer

Neubrandenburg, 23. Februar 2011

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2010-0629-8

Abstract

The aim of this thesis is to establish a method for analysing galacturonic acid in cell wall material of gherkins (*cucumis sativus*) by high performance liquid chromatography.

Seven methods are found in the literature and compared on the basis of different criteria. The HPLC-PAD method of Kressmann (2001) is chosen and checked in the laboratory of the Hochschule Neubrandenburg. This method is divided into two steps. First the alcohol insoluble substances are dissolved out of the sample and hydrolysed in two stages with sulfuric acid. Second a sample of 25 μ l is quantified by HPLC on a Carbopac PA100 column (Dionex) at 20 °C with 400 mM sodium hydroxide as the mobile phase, coupled with pulsed amperometric detection.

In laboratory a standard of galacturonic acid is quantified by HPLC on a RCX-30 column (Hamilton) at 30 °C. The other conditions are identical to the method of Kressmann (2001). The effectiveness of this column is not given whereby another column was bought. The Carbopac PA1 (Dionex) is checked with the same conditions and is qualified for this analysis. The standard of galacturonic acid (200 μ g/ml) is detected after 10,83 minutes.

Furthermore a reference method is done to estimate the concentration of galacturonic acid in gherkins (*cucumis sativus*). The amount is 151 μ g/g in fresh gherkins.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Symbole sowie Einheiten	3
1 Einleitung	4
2 Stand der Wissenschaft und Technik	5
2.1 Aufbau der Zellwand.....	5
2.2 Pektin.....	6
2.3 Galakturonsäure	7
2.4 Hochleistungs-Flüssigchromatographie	8
2.5 HPLC-Analysenmethoden zur Bestimmung von Galakturonsäure	11
3 Material und Methoden	15
3.1 Verwendetes Untersuchungsmaterial	15
3.2. Probenvorbereitung	15
3.3 Probenuntersuchung mittels HPLC	16
3.4 Referenzmethode.....	18
4 Ergebnisse	21
4.1 Methodenvergleich.....	21
4.2 Laborversuch.....	26
4.2.1 Untersuchungen mit HPLC	26
4.2.2 Referenzmethode.....	30
5 Diskussion	31
6 Zusammenfassung	34
7 Literaturverzeichnis.....	36
8 Verzeichnis der Abbildungen.....	41
9 Verzeichnis der Tabellen	42
10 Verzeichnis der Gleichungen.....	43
12 Anlagen.....	44
Anlage 1 Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC.....	44
Anlage 2 Chromatogramme zu den Versuchen	47
Anlage 3 Ergebnisse der Referenzmethode	51

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Symbole sowie Einheiten

AIS	alkohol-unlösliche Substanz
DVB	Divinylbenzol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLD	Fluoreszenzdetektor
GalA	Galakturonsäure
HPAEC	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
n.a.	nicht angegeben
NaAc	Natriumacetat
PAD	gepulster amperometrischer Detektor
PS-DVB	Polystyrol-Divinylbenzol
RID	Brechungsindexdetektor
SDVB	Styrol-Divinylbenzol
TFA	Trifluoressigsäure
- \bar{x}	Mittelwert

1 Einleitung

An Obst und Gemüse, welches unverarbeitet in den Handel gelangt, werden verschiedenste Ansprüche gestellt. Die größte Bedeutung bei der Kaufentscheidung des Verbrauchers hat die Frische dieser Produkte. Obst und Gemüse sollen knackig, fest und matt glänzend sein und eine typische Färbung aufweisen. Diese meist unbewusste Beurteilung geht vor allem auf die Textur des Obst und Gemüses zurück.

Die Textur kann sehr einfach über die Sensorik beurteilt werden. Das heißt, Obst und Gemüse werden mit den physiologischen Eigenschaften von mehreren Prüfern beschrieben. Jedoch ist die Auswertung schwierig, da diese subjektiv, in den meisten Fällen nicht fachgerecht und somit nicht vergleichbar ist. Eine objektive Methode ist das Ermitteln der chemischen Struktur, um daraus Erkenntnisse zur Texturverbesserung zu erzielen.

Eine Methode kann die Bestimmung von Galakturonsäure sein. Diese ist ein Baustein des Polysaccharids Pektin, welches zu den Hauptbestandteilen der pflanzlichen Zellwand aller höheren Pflanzen zählt. Durch enzymatische Reaktionen, die während der Lagerung ablaufen, werden die Polymere teilweise in Monomere abgebaut, so dass die feste Struktur aufgebrochen wird und das Gewebe erweicht. Auch thermische Prozesse können dazu beitragen. Daraus resultieren negative Auswirkungen auf die Textur und demzufolge auf die Kaufentscheidung des Verbrauchers. Es existieren bereits verschiedenste Möglichkeiten diese Vorgänge zu verhindern, doch dabei ist entscheidend, den exakten Gehalt der einzelnen Bestandteile zu kennen. In diesem Fall wird der Gehalt an Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigchromatographie bestimmt, um aus den gewonnenen Erkenntnissen weitere Möglichkeiten zur Texturverbesserung zu betrachten.

In dieser Arbeit soll eine Methode zur Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial mittels HPLC etabliert werden. Der erste Schwerpunkt liegt auf der Recherche nach geeigneten Methoden und ihrem Vergleich. Ein zweiter Schwerpunkt umfasst die Auswahl einer Methode und ihre Überprüfung im Labor der Hochschule Neubrandenburg.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Aufbau der Zellwand

Die Zellwand ist ein Bestandteil der pflanzlichen Zelle und setzt sich hauptsächlich aus Kohlenhydraten, aber auch aus Proteinen und Polyphenolen zusammen.

Cellulose als Polysaccharid trägt zur Primärstruktur bei und kommt mit verschiedenen Ein- und Auflagerungen vor. Des Weiteren sind die Nicht-Cellulose-Polysaccharide vorhanden, welche die sauren Polysaccharide wie Pektin und die neutralen Polysaccharide wie Hemicellulose enthalten (Linskens, Jackson, 1996), was in Abbildung 1 veranschaulicht ist.

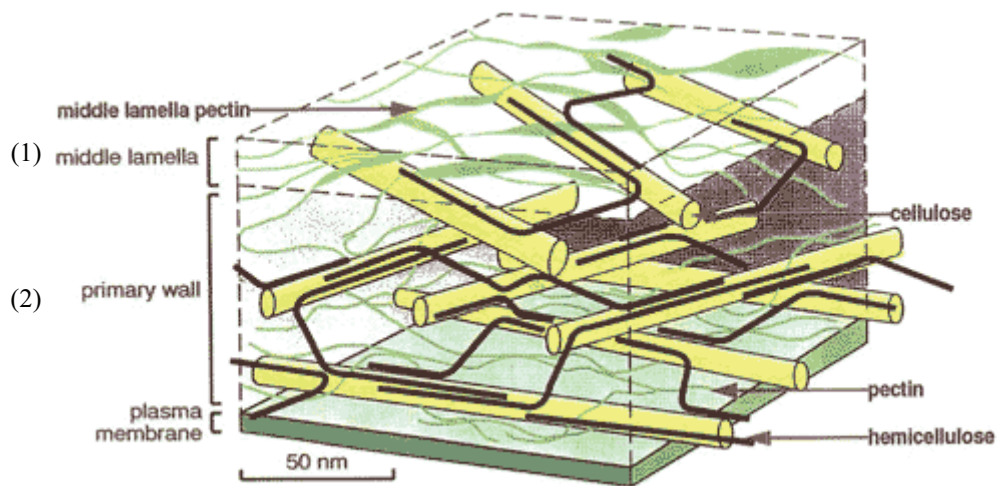


Abbildung 1: Aufbau der pflanzlichen Zellwand (McCann et al., 1991)

Die Zellwand besteht aus mehreren aufeinander gelagerten Wänden, um alle ihre Aufgaben zu erfüllen. Die Primordialwand (1) ist eine dünne Haut, die als Mittellamelle stets erhalten bleibt und hauptsächlich aus Pektin besteht (Kressmann, 2001). Sie verbindet die Zellwände benachbarter Pflanzenzellen miteinander, sodass ein stabiles Zellgewebe entsteht. Darauf aufgelagert ist die Primärwand (2) aus Cellulose, in der Mikrofibrillen regellos gelagert sind. Sie ist eine noch dehnungsfähige Schicht mit Streuungstextur, die bis zum Erreichen der endgültigen Zellgröße wächst. Der Hauptteil der pflanzlichen Zellwand ist die Sekundärwand, die nicht in der Abbildung 1 dargestellt ist. Sie ist eine relativ starre, von beiden Seiten aufgelagerte Schicht mit Paralleltexur und somit für das Dickenwachstum verantwortlich. Die äußerste angelagerte Schicht ist die Tertiärwand, welche als Abschlusslamelle dient (Hoff, Jaenicke, Miram, 1994).

Die Zellwand dient der Zelle als Schutz und Stütze. Die Cellulosefibrillen sorgen hierbei für die Stabilität und Elastizität, während die Pektine und Hemicellulosen gleichzeitig für die Plastizität verantwortlich sind. Pektin spielt dabei eine besondere Rolle, da es beispielsweise durch Enzyme

während der Lagerung abgebaut werden kann. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Stabilität und Wasserregulierung der Zellwand. Das Obst oder Gemüse erweicht und wird vom Verbraucher nicht mehr als frisch angesehen.

2.2 Pektin

Pektin ist ein komplexes, saures Polysaccharid, welches als Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand in vielen Pflanzen, insbesondere in Obst und Gemüse vorkommt. Es wird im Golgi-Apparat der Pflanzenzelle gebildet und erhält durch den hohen Gehalt an Uronsäuren seinen niedrigen pH-Wert. Seiner chemischen Struktur nach ist es ein verzweigtes, stark hydratisiertes Polyuronid (Kressmann, 2001). Das bedeutet, dass die enthaltenen Uronsäuren mit vielen Wassermolekülen verbunden sind. Pektin wird auch als Rhamnogalacturonan bezeichnet. Diese Bezeichnung beruht auf der Blockform, die es strukturell annimmt (Linskens, 1996). Es setzt sich aus glatten, unverzweigten (Homogalacturonan) und behaarten Regionen (Rhamno- und Xylogalacturonan) zusammen, was in Abbildung 2 veranschaulicht wird. Homogalacturonan (1) ist eine lineare Kette von α -1,4-gebundenen Galakturonsäure-Einheiten, dessen Carboxylgruppen am C-6-Atom mit Methanol verestert sein können. Das prozentuale molare Verhältnis zwischen veresteter Galakturonsäure und der Gesamtgalakturonsäure wird als Veresterungsgrad angegeben (Kressmann, 2001). Rhamnogalacturonan (2) besteht zum einen aus alternierender Rhamnose und Galakturonsäure-Einheiten, an die neutrale Zucker, wie beispielsweise Glukose, Galaktose oder Mannose, angelagert sind. Zum anderen werden zwölf verschiedene Zucker, wie 2-O-methyl-Xylose oder 2-O-methyl-Fucose, über 20 unterschiedliche Verbindungen zu einem Komplex (Hilz, 2007).

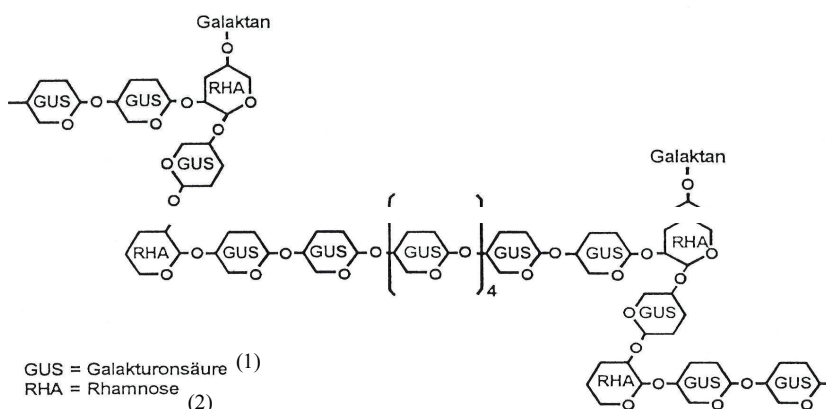


Abbildung 2: Aufbau des Pektins (Hess, 1991)

Die Aufgaben des Pektins sind die Kontrolle der interzellularen Adhäsion, der Porosität und der ionischen Umgebung der Zellwand (Sila et al., 2009). Herbstreith und Fox (1997) definieren Pektin als eine weiße, amorphe Substanz, die in Wasser eine zähflüssige Lösung ergibt. Diese Fähigkeit zur Gelbildung macht sich die Lebensmittelindustrie zu Nutzen, da beispielsweise die Konsistenz von Joghurts und Desserts verbessert werden kann. Pektin ist leicht löslich und chemisch reaktiv, sodass es leicht veränderbar ist. Dies wirkt sich allerdings negativ auf die Textur von Obst und Gemüse aus (Van Buren, 1979). Diese Vorgänge werden deshalb mit dem Ziel erforscht, Verfahren zur Minimierung beziehungsweise Hemmung zu entwickeln.

2.3 Galakturonsäure

Galakturonsäure ist ein Monosaccharid aus der Gruppe der Uronsäuren, welche die Form einer oxidierten D-Galaktose annimmt, wie in Abbildung 3 dargestellt ist. Sie ist mit weiteren Monosacchariden am Aufbau des Pektins beteiligt und damit Bestandteil der pflanzlichen Zellwand (Kressmann, 2001).

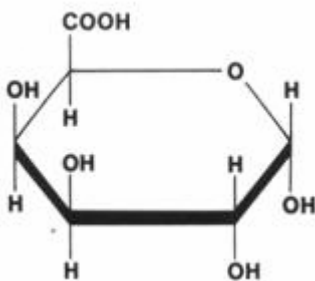


Abbildung 3: Strukturformel von Galakturonsäure (Pektowin, 2010)

Der Gehalt von Galakturonsäure in Pektin ist wichtig für biologische Studien, aber auch für die pharmazeutische und die Lebensmittelindustrie. Für die quantitative Analyse stehen einige Methoden zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem das kalorimetrische Verfahren, die Dünnschicht- und Gaschromatographie sowie die Kapillarelektrophorese (Burana-osot et al., 2010). Darüber hinaus ist die Hochleistungs-Flüssigchromatographie dafür geeignet, da die Trennung in die einzelnen Komponenten präziser und die Analysendauer stark verkürzt ist. Um Galakturonsäure mit dieser Methode nachweisen zu können, muss zunächst die alkohol-unlösliche Substanz (AIS), die das Gesamtpektin in Form von polymerer Galakturonsäure ergibt, aus dem Untersuchungsmaterial gelöst werden (Krause und Bock, 1973). Darauf folgt eine Hydrolyse der AIS, um die Polymere größtenteils in ihre Monomere zu spalten und den

Trennvorgang damit zu begünstigen.

2.4 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, engl. High Performance Liquid Chromatography) ist eine analytische Methode, die zur Trennung von Stoffgemischen eingesetzt wird. Gegenüber anderen chromatographischen Verfahren wird hier mit hohem Druck gearbeitet, sodass die Trennung exakter und innerhalb kürzester Zeit eintritt. Daraus resultiert die häufig verwendete Bezeichnung Hochdruck-Flüssigchromatographie (Meyer, 1999).

Die HPLC arbeitet mit einer stationären und einer mobilen Phase. Die stationäre beziehungsweise ruhende Phase ist in der Trennsäule enthalten und hat die Fähigkeit, die Bestandteile der Probe zu adsorbieren. Die mobile Phase, auch als Eluens oder Fließmittel bezeichnet, strömt konstant durch das System und transportiert die Probe hindurch. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Probe im Fließmittel lösbar ist. Die Zerlegung in die einzelnen Bestandteile erfolgt durch die unterschiedliche Anhaftung an die stationäre Phase und die Ablösung durch die mobile Phase (Unger, 1989).

Für die Bestimmung von Galakturonsäure wird in der Regel die Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Dabei werden Ionen aus der Probe an das Austauschermaterial der Trennsäule gebunden und gegen Ionen gleicher Ladung ausgetauscht, die im Austauschermaterial enthalten sind. Bei der Galakturonsäurebestimmung werden Anionen aus dem Untersuchungsmaterial vorwiegend mit Ammonium-Verbindungen ausgetauscht. Es ergeben sich daraus reversible Gleichgewichtsprozesse, welche die Trennung der Probe ausmachen (Corradini, 2010).

Die HPLC-Anlage besteht aus der Versorgungseinheit, der Dosiervorrichtung, dem Trennsäulensystem, sowie dem Detektions- und Auswertesystem (Unger, 1989), wie in Abbildung 4 veranschaulicht ist.

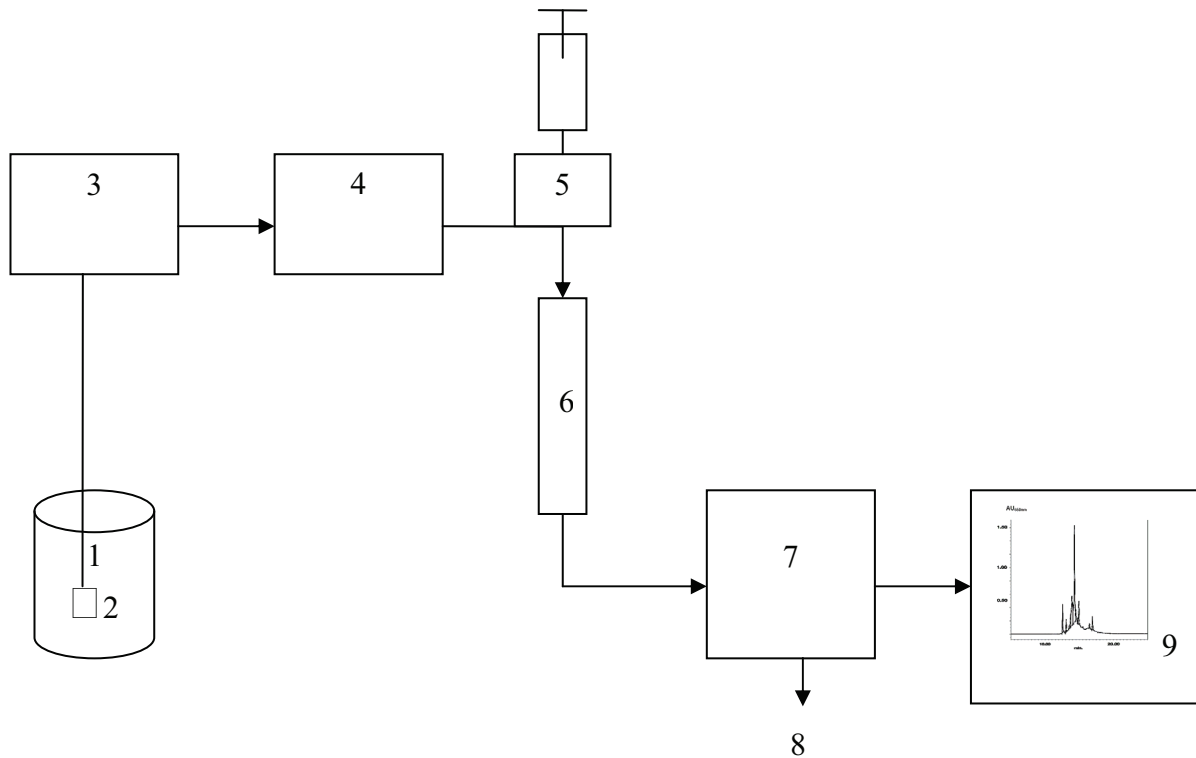


Abbildung 4: Aufbau einer HPLC-Apparatur

Die Versorgungseinheit beinhaltet den Fließmittelvorrat (1), die Zuleitung mit einer Fritte (2), den Degasser (3) und die Pumpe (4). Das Fließmittel als mobile Phase wird mit Hilfe der Pumpe in einem konstanten Fluss durch das System geleitet. Für die Bestimmung von Galakturonsäure wird vorwiegend Natronlauge eingesetzt, da eine Auftrennung von Kohlenhydraten in Lösungen mit hohem pH-Wert eintritt (Lee, 1996). Daher sollte die Fritte nicht aus Edelstahl bestehen, weil Natronlauge diese verstopfen kann. Generell könnte auch Schwefelsäure als Fließmittel eingesetzt werden, doch Auskristallisationsvorgänge und der Einsatz des amperometrisch gepulsten Detektors beeinflussen den Trennvorgang negativ. Zusätzlich wird das Fließmittel entgast, um den gelösten Sauerstoff beziehungsweise Luftblasen zu entfernen, die Störungen bei der Detektion hervorrufen können. Somit stellen die einwandfreie Zusammensetzung und ein konstanter Fluss des Fließmittels eine bedeutende Voraussetzung für eine erfolgreiche Trennung eines Stoffgemisches dar (Lindsay, 1996). Wenn alle Bedingungen konstant gehalten werden, spricht man von einer isokratischen Trennung. Darüber hinaus können die einzelnen Komponenten des Fließmittels in einem unterschiedlichen Mischungsverhältnis dem Trennvorgang zugeführt werden, um die Trennung von komplexen Gemischen zu verbessern. Diese so genannten Gradientensysteme sind entweder binär, tertiär, in Stufen oder stufenlos. Der binäre Gradient enthält zwei Komponenten, die in verschiedenen Konzentrationen eingeleitet werden, der Tertiäre drei. Ein Gradient in Stufen bringt das Fließmittel mit der jeweiligen

Konzentration für bestimmte Zeitintervalle in das Trennsystem ein, während beim stufenlosen Gradient die Konzentration kontinuierlich gesteigert wird (Belcheva, 2004).

Um die Probe in das System zu bringen, ist eine Dosiervorrichtung (5) vorhanden. Dies kann entweder automatisch mit einem Autosampler oder manuell mit einer Spritze erfolgen. Die Probe wird in das System injiziert und über eine Probenschleife gleichmäßig auf den Anfang der Trennsäule gegeben. Da die manuelle Einspritzung häufig mit Fehlern verbunden ist, wird die automatische Injektion in der Regel bevorzugt (Unger, 1989).

Das Trennsäulensystem (6) besteht aus einer Säule und einem Ofen, um bestimmte Temperaturen einstellen zu können. Teilweise ist es möglich die Säule in einen beheizbaren Detektor zu integrieren, sodass der Einbau eines Ofens nicht notwendig ist. Die Trennsäule enthält die feste stationäre Phase, die für die Bestimmung von Galakturonsäure aus unpolarem Polymermaterial wie Polystyrol oder Ethylvinylbenzol, die mit Divinylbenzol quervernetzt sind, besteht. Diese weisen eine geringe Porengröße auf, sodass der Trennvorgang damit unterstützt wird (Corradini, 2010). Zusätzlich kann eine Vorsäule eingebaut werden, um störende Substanzen zu entfernen, die den Trennvorgang beeinflussen könnten.

Durch das Detektionssystem (7) strömt kontinuierlich die mobile Phase, die eine bestimmte Zusammensetzung aufweist. Wenn diese sich ändert, wird es vom Detektor wahrgenommen und in Form eines elektrischen Signals an den Bildschirm oder Schreiber weitergeleitet. Das Signal ist entweder proportional zur Konzentration oder zum Stoffstrom der nachzuweisenden Substanz (Meyer, 1999). Das Fließmittel und die getrennte Probe werden als Abfall (8) abgeführt. Für den Nachweis von Galakturonsäure werden vorwiegend der amperometrisch gepulste (PAD), der Brechungsindexdetektor (RID) oder der Fluoreszenzdetektor (FLD) eingesetzt.

Der PAD nutzt die elektrochemische Aktivität von Substanzen aus, die an einer Elektrode abläuft. Speziell für Kohlenhydrate wird eine Elektrode aus Gold verwendet, weil durch starke Laugen als Fließmittel ein hoher pH-Wert gegeben ist. Die Detektion läuft dreistufig ab: Zuerst wird eine positive Spannung angelegt, um den gesuchten Analyten an der Elektrode zu sammeln. In der zweiten Stufe wird ein Impuls ausgelöst, der stärker positiv ist und durch den die Reaktionsprodukte mittels Oxidation an der Elektrode gemessen werden. Mit Hilfe eines dritten negativen Impulses werden die Oxide auf der Elektrodenoberfläche reduziert und damit wieder entfernt (Strasser, 2002).

Der RID hat die Fähigkeit alle Substanzen zu registrieren, die eine andere Brechung als die mobile Phase aufweisen. Dabei ist entscheidend, dass der Unterschied der Brechungen zwischen Eluent und Probe sehr groß ist, denn dadurch entsteht ein stärkeres Signal. Es wird ein Lichtstrahl durch die Probe und eine vorhandene Referenzzelle geleitet, über einen Spiegel

reflektiert, nochmals durch die Probe und die Referenzzelle geleitet und anschließend der Unterschied zwischen dem Brechungsindex der beiden Proben mit Hilfe einer Fotozelle bestimmt. Dieser Unterschied wird als Signal weitergegeben (Library4Science, 2008).

Beim FLD wird die Probe mit UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Die nachzuweisenden Substanzen fluoreszieren, das bedeutet, dass das Licht absorbiert und in alle Richtungen emittiert wird. Voraussetzung dafür ist, dass in der Probe fluoreszierende Substanzen vorhanden sind oder durch eine Nachsäulenderivatisierung diese Eigenschaft annehmen. Die Fluoreszenz wird senkrecht zur Einstrahlungsrichtung gemessen (Scientific Instruments Manufacturer GmbH, 2010).

Das Auswertesystem (9) zeichnet ein Chromatogramm auf, in dem die Signale des Detektors als Gaußsche Glockenkurven, auch Peaks genannt, dargestellt sind. Zur Auswertung wird die Retentionszeit herangezogen. Das ist die Zeit, die eine Substanz vom Einspritzen bis zur Detektion benötigt. Mit Hilfe eines Standards kann diese vorher ermittelt werden und als Vergleich dienen. Die Höhe und Fläche der Peaks tragen zur Quantifizierung der untersuchten Substanz bei, da sie proportional zur Stoffmenge sind. Mittels einer Kalibrierfunktion kann die genaue Konzentration damit bestimmt werden (Meyer, 1999).

2.5 HPLC-Analysenmethoden zur Bestimmung von Galakturonsäure

Es werden sieben HPLC-Analysenmethoden zur Bestimmung von Galakturonsäure beschrieben. Eine übersichtliche Darstellung in Form von Tabellen befindet sich in Anlage 1.

Methode HPLC-PAD - isokratisch mit Natronlauge:

Die Methode von Kressmann (2001) bestimmt Uronsäuren in schwarzen Johannisbeeren mittels HPLC, um den Pektingehalt von Früchten mit unterschiedlichem Reifegrad zu ermitteln und daraus die Auswirkungen auf die Saffherstellung zu beurteilen. Er stützt seine Untersuchungen auf Grundlagen von Patz et al. (1993) und optimiert diese. Aus den schwarzen Johannisbeeren wird zunächst die AIS extrahiert. Anschließend wird die zweistufige Saeman-Hydrolyse (1954) eingesetzt, da schwarze Johannisbeeren nach Kressmann (2001) schwer zu hydrolysieren sind. Vom Hydrolysat werden 25 µl Probe filtriert (0,2 µm) und injiziert. Die Apparatur besteht unter anderem aus einer Carbopac PA100-Hauptsäule (4 x 250 mm) und einer Carbopac PA100-Vorsäule (4 x 50 mm) von Dionex, die in einem Ofen auf 20 °C temperiert werden. Der PAD enthält eine Elektrode aus Gold und wird auf „Integrierende Amperometrie“ eingestellt. Zur

Quantifizierung wird ein externer Standard mit einer Konzentration von 30 bis 40 µg/ml genutzt. Die Trennung erfolgt isokratisch mit 400 mM Natronlauge als Fließmittel bei einer Flussrate von 1 ml/min. Kressmann (2001) hat dabei festgestellt, dass die optimalen Hydrolysebedingungen bei schwarzen Johannisbeeren in der Haupthydrolyse bei 120 °C für 60 min liegen und der Gehalt an Galakturonsäure 26 Gew% beträgt. Die HPLC-Analyse ist nach Kressmann (2001) zwar für diese Art von Bestimmung möglich, aber gegenüber der Gaschromatographie in Bezug auf das Fließmittel und die Temperatur nicht stabil genug.

Diese HPLC-Analysenmethode wird im Labor der Hochschule Neubrandenburg mit vorhandenen Apparaturbestandteilen durchgeführt. Die Gründe dafür folgen im Verlauf der Arbeit.

Methode HPLC-RID - isokratisch mit Calcium-Dinatrium-EDTA:

Chen et al. (2003) untersuchen den Gehalt an Uronsäuren mittels HPLC in grünem Tee, da Kohlenhydrate positiv auf den menschlichen Organismus wirken. Aus den Tee-Konjugaten wird die AIS gelöst, fraktioniert, filtriert (0,45 µm) und jeweils 20 µl injiziert. Zuvor wird die Kalibration mit einem externen Standard mit Konzentrationen von 100 bis 4000 µg/ml durchgeführt. Die Anlage besteht unter anderem aus einer Sugar-Pak I-Säule (6,5 x 300 mm) von Waters und einem RID. Die mobile Phase setzt sich aus 1 mM Calcium-Dinatrium-EDTA und Wasser zusammen. Bei einer Flussrate von 0,6 ml/min wird Galakturonsäure isokratisch bei 90 °C getrennt. Es wird in den Tee-Konjugaten ein Gehalt von 50 % an Galakturonsäure ermittelt. Chen et al. (2003) haben mit ihren Untersuchungen in Erfahrung gebracht, dass die Uronsäure direkt und mit einer hohen Ausbeute mit diesem Verfahren bestimmt werden kann.

Methode HPAEC-FLD - isokratisch mit Borsäure:

Burana-osot et al. (2010) analysieren Galakturonsäure in Pomelopektin. Bei der Probenvorbereitung wird aus dem Pomelopektin erst die AIS hergestellt und dann mit TFA bei 100 °C für sechs Stunden hydrolysiert. Die Analyse, basierend auf Ausarbeitungen von Toyoda et al. (1988), nutzt die HPAEC mit Nachsäulenderivatisierung in Verbindung mit dem Fluoreszenzdetektor. Es wird die TSK gel Sugar AXI – Säule (4,6 x 150 mm) von Tosoh auf 70 °C temperiert und 0,5 M Borsäure als Fließmittel bei einer Flussrate von 0,5 ml/min geführt. Die Kalibration erfolgt mit einem externen Standard mit Konzentrationen zwischen 5 und 100 µg/ml. Für die Nachsäulenderivatisierung werden 1 M Natronlauge und 0,5 %iges 2-Cyanoacetamid bei einer Flussrate von 0,33 ml/min und einer Temperatur von 120 °C eingesetzt. Die Fluoreszenz der Reaktionsprodukte wird bei einer Wellenlänge von 331 nm bestimmt.

Methode HPAEC-PAD - linearer Gradient mit Natronlauge und Natriumacetat:

Eine weitere Analyse von Burana-osot et al. (2010) verwendet die HPAEC mit dem PAD (ED-3000). Es wird die Probe filtriert (0,2 µm) und 10 µl in die Carbopac PA1-Vorsäule (4 x 25 mm) mit einer Carbopac PA1-Anionentauschersäule (4 x 100 mm) von Dionex injiziert. Die sauren Monosaccharide werden mit einem linearen Gradienten von 0-150 mM Natriumacetat in 100 mM Natronlauge innerhalb von 20 min eluiert. Die Flussrate liegt bei 1 ml/min. Es wird mit einem externen Standard mit Konzentrationen zwischen 50 und 300 µg/ml kalibriert. Burana-osot et al. (2010) haben beide Methoden verglichen und festgestellt, dass die HPAEC mit dem FLD eine um 13 % höhere Ausbeute an Galakturonsäure erzielt als die HPAEC-PAD.

Methode HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natronlauge und Natriumacetat:

Eine weitere Methode ist die nach Coenen (2007). Er untersucht Apfelpektin mit HPAEC-PAD, wobei die Bedingungen auf De Ruiter (1992) basieren. Die Proben werden durch eine Hydrolyse mit 2 M Salzsäure für 16 Stunden bei 80 °C und anschließend mit TFA für eine Stunde bei 121 °C vorbehandelt. Es kommen unter anderem die Carbopac PA1-Hauptsäule (4 x 250 mm) mit der Carbopac PA1-Vorsäule (4 x 25 mm) von Dionex und der PAD (ED-40) zum Einsatz. Das Fließmittel wird mit einem tertiären Gradienten bei einer Flussrate von 1 ml/min geführt. In der Zeit von 0-15 min wird 30mM Natronlauge geführt, von 15-16 min läuft 30-100 mM Natronlauge und von 16-55 min wird 0-500 Natriumacetat in 0,1 M Natronlauge als mobile Phase eingesetzt. Letztendlich hat Coenen (2007) herausgefunden, dass in Apfelpektin 42 mol% Galakturonsäure vorkommen.

Methode HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natronlauge und Natriumacetat:

Koswig et al. (1997) untersuchen mit HPAEC-PAD Dickungsmittel in Fruchtsäften. Neben dem natürlich vorkommenden Pektin in Früchten, wird zu Fruchtsäften oftmals Pektin hinzugegeben, was nicht erlaubt ist (Koswig et al., 1997). Um dies nachzuweisen, muss der natürliche Gehalt ermittelt werden. Die Methode beruht auf Garleb et al. (1989), bei der zunächst die AIS hergestellt und dann die Hydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure bei 120 °C für 90 min erfolgt. Diese Bedingungen werden durch verschiedene Überprüfungen als optimal angesehen. Das Hydrolysat wird filtriert (0,2 µm) und mit einem Volumen von 50 µl eingespritzt. Hier verwendet man eine Carbopac PA100-Vorsäule (4 x 50 mm) und eine Carbopac PA100-Hauptsäule (4 x 250 mm) von Dionex, sowie den PAD mit einer Gold-Elektrode. Das Fließmittel wird bei einer Flussrate von 0,7 ml/min im Stufengradienten geführt. Dabei werden destilliertes Wasser, 1 M Natronlauge, 0,5 M Natriumacetat und 0,1 M Natronlauge eingesetzt. Die

Kalibration erfolgt mit einem extern bezogenen Galakturonsäure-Standard (3,3 µg/ml). Koswig et al. (1997) beschreiben diese Methode als wirkungsvoll. Sie konnten Galakturonsäure in Traganth mit 8,3 % und Apfelpektin mit 31,9 % nachweisen.

Methode HPAEC-PAD - Stufengradient mit Kaliumoxalat:

Hotchkiss et al. (1996) bestimmen Galakturonsäure in Pfirsichen mit unterschiedlichem Reifegrad mittels HPAEC-PAD. Das Zellwandmaterial wird isoliert, extrahiert und mit 0,1 M Salzsäure hydrolysiert (pH 4). Anschließend wird mit Kaliumhydroxid ein pH-Wert von 6 eingestellt und die Lösung für zehn Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Vor der Einspritzung wird die Probe filtriert (0,45 µm). Auch hier kommen die CarboPac PA1-Säule (4 x 250 mm) mit der CarboPac PA1-Vorsäule (3 x 25 mm) der Firma Dionex und der PAD mit einer Gold-Elektrode zum Einsatz. Der Detektor ist auf „Integrierte Amperometrie“ gestellt. Die mobile Phase wird mit 25 – 500 mM Kaliumoxalat über 100 min im Stufengradienten geführt. Hotchkiss et al. (1996) stellen fest, dass der Gehalt an Galakturonsäure bei Pfirsichen in den verschiedenen Reifestadien unterschiedlich ist, sodass die Methode für diese Art von Untersuchungen repräsentative Ergebnisse liefert.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendetes Untersuchungsmaterial

Es wird das Zellwandmaterial von „Original Spreewälder Gurken“ (MHD 15.12.2012) der Carl Kühne KG untersucht. Die verschiedenen Chargen weisen eine unterschiedliche Textur auf. Diese und weitere Angaben befinden sich in Tabelle 1. Um das Probenmaterial über einen längeren Zeitraum verwenden zu können, wurde es teilweise gefriergetrocknet und mit einer Mühle pulverisiert.

Tabelle 1: Angaben zu den Gurkenchargen der Carl Kühne KG

Charge	Texturbewertung* Kühne	Texturbewertung* Hochschule Neubrandenburg	Gefriertrocknung	AIS Einwaage [g]	AIS Auswaage [g]
ZG 15 08:50	3-4	2-3	Nein	-	-
ZG 15 09:24	2	3	Nein	-	-
ZG 15 13:58	2	2	Ja	30,008	6,034
ZG 16 08:27	4	4	Nein	-	-
ZG 16 13:37	2	3-4	Ja	30,440	5,415
ZG 21 15:41	4	4-5	Ja	30,022	8,170

* Notenvergabe: 1 = sehr weich, 5 = sehr fest

3.2. Probenvorbereitung

Zunächst wird die AIS hergestellt. Das Gesamtpektin ist alkohol-unlöslich und ergibt die polymere Galakturonsäure. Alle weiteren Bestandteile des Untersuchungsmaterials sind alkohol-löslich und werden demnach abgeschieden. Die Durchführung basiert auf den Entwicklungen von Krause und Bock (1973).

Geräte

- Wasserbad
- Heizpilz
- Siedesteinchen
- Keramikfilter
- Papierfilter
- Trockenschrank
- diverse Kleinteile

Reagenzien

- 80 %iges Ethanol
- Aceton

Durchführung

Es werden 15 g des Untersuchungsmaterials mit der zehnfachen Menge an 80 %igem Ethanol angereichert. Das Gemisch wird im Rundkolben mit Hilfe eines Heizpilzes zum Sieden gebracht und 45 min in diesem Zustand gehalten. Anschließend wird die Lösung durch einen Keramikfilter mit zusätzlichem Papierfilter unter Vakuum filtriert. Der verbleibende feste Rückstand wird nochmals mit der zehnfachen Menge an 80 %igem Ethanol versetzt und wieder für 45 min auf Siedetemperatur gebracht. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Durchgang wird der feste Rückstand mit der zehnfachen Menge an Aceton gespült, um Lipide, Chlorophyll, Ethanol und Wasser zu entfernen, und im Trockenschrank bei 40 °C für drei Stunden getrocknet.

3.3 Probenuntersuchung mittels HPLC

Die Untersuchung der Probe mittels HPLC wird nach den Angaben von Kressmann (2001) durchgeführt, wobei die Apparatur nach den Gegebenheiten der Hochschule Neubrandenburg ausgerichtet ist.

Geräte

- Steuereinheit: LC-CaDi 22-14, Bischoff
- Pumpe: HPLC Compact Pump, Bischoff

- Auto Sampler: HITACHI AS-2000, Merck
- Degasser: DG-1310, Bischoff
- Säule: RCX-30 Anionenaustausch, Hamilton
- Detektor PAD: Bio Quant PAM 2-MU, Bischoff

Durchführung

Zunächst wird das Fließmittel hergestellt, dessen einwandfreie Zusammensetzung eine große Bedeutung für die Empfindlichkeit des Detektors hat. Das Reinstwasser muss vor der Verwendung mit einem Membranfilter (0,45 µm) filtriert und anschließend für 10 min im Ultraschallbad entgast werden. Danach werden 400 mM 50 %ige Natronlauge und 1 mM Bariumhydroxid hinzugegeben, um die Bildung von Carbonaten zu verhindern. Vor der Untersuchung der Proben wird die Anlage vollständig mit dem Fließmittel gespült.

Anschließend folgt die Herstellung der Standardlösung für die Kalibration. Dabei wird aus dem externen Standard eine Lösung mit der entsprechenden Galakturonsäure-Konzentration angesetzt, mit Reinstwasser aufgefüllt und im Ultraschallbad entgast. Versuchsweise erfolgt die Lösung des Standards in Fließmittel an Stelle von Reinstwasser. Die Anlage wird durch mehrmaliges Einspritzen der Standardlösung konditioniert und auf konstante Retentionszeiten und Signalstärken hin überprüft.

Bevor eine Probe mit einem Volumen von 20 µl in die HPLC eingespritzt werden kann, wird die AIS mit konzentrierter Schwefelsäure hydrolysiert. Dafür werden 50 mg der AIS in ein 20 ml Becherglas eingewogen, 2 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und dies vorsichtig in einem Eisbad verrührt. Dann werden 0,5 ml destilliertes Wasser tropfenweise hinzugegeben und die Lösung für 5 min gerührt, um das Zellwandmaterial zu lösen. Nun werden nochmals 0,5 ml destilliertes Wasser dazu getropft und so lange gerührt bis das Zellwandmaterial vollständig gelöst und die Lösung homogen ist. Dies wird anschließend in ein 10 ml Messkolben überführt und bis zum bezeichneten Volumen aufgefüllt. Auf Grund der zugeführten Schwefelsäure ist der pH-Wert der Probelösung zu gering für die Trennung mittels HPLC. Daher wird eine Neutralisierung auf pH 7 – 9 mit Natronlauge vorgenommen. Zusätzlich wird die Probe entgast, um gelösten Sauerstoff zu entfernen.

Der Detektor ist auf die Betriebsart: “Integrierende Amperometrie“ und mit dem Programm aus Tabelle 2 eingestellt.

Tabelle 2: Detektorprogramm

t [s]	E [V]
0,5	+ 0,10
0,1	+ 0,60
0,1	- 0,60
Sample Time: 60 ms	

Galakturonsäure wird isokratisch mit 400 mM Natronlauge bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 30 °C getrennt.

Auswertung

Die in den Chromatogrammen enthaltenen Peaks werden auf Höhe und Fläche überprüft. Die Retentionszeiten einer Komponente sollten stets gleich bleiben. Des Weiteren sollte das Grundrauschen gering sein und über den Trennvorgang hinweg ein konstanter Druck herrschen.

3.4 Referenzmethode

Es wird die photometrische Methode von Ahmed und Labavitch (1977) zur Bestimmung von Uroniden in der pflanzlichen Zellwand eingesetzt.

Geräte

- Photometer
- Rührer und Rührfisch
- Heizplatte

Reagenzien

- 0,15 %ige meta-Hydroxydiphenyl-Lösung
- 0,5 %ige Natronlauge
- 12,5 mM Natriumtetraborat
- konzentrierte Schwefelsäure
- destilliertes Wasser
- Monogalakturonsäure

Materialien

- Bechergläser
- Reagenzgläser
- Messkolben
- Küvetten

Durchführung

Zunächst wird die meta-Hydroxydiphenyl-Lösung hergestellt. Dabei werden 150 mg meta-Hydroxydiphenyl in 0,5 %iger Natronlauge gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Der Messkolben wird mit Alufolie umwickelt, um die Zufuhr von Licht auszuschließen. Bei der Schwefelsäure/Natriumtetraborat-Lösung werden 23,8 mg Natriumtetraborat in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und auf 50 ml aufgefüllt, sodass eine 12,5 mM Lösung entsteht.

Es werden 5 mg der AIS in ein 20 ml Becherglas eingewogen, 2 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und dies vorsichtig in einem Eisbad verrührt. Dann werden 0,5 ml destilliertes Wasser tropfenweise hinzugegeben und die Lösung für 5 min gerührt, um das Zellwandmaterial zu lösen. Nun werden nochmals 0,5 ml destilliertes Wasser dazu getropft und so lange gerührt bis das Zellwandmaterial vollständig gelöst und die Lösung homogen ist. Dies wird anschließend in ein 10 ml Messkolben überführt und bis zum bezeichneten Volumen aufgefüllt.

Für die Untersuchung von Galakturonsäure werden 0,6 ml der zuvor hergestellten Lösung mit 3,6 ml der Schwefelsäure/Natriumtetraborat-Lösung in einem Reagenzglas vermischt. Dies wird für 5 min in kochendem Wasser erhitzt und anschließend mit Leitungswasser abgekühlt. Zuletzt kommen 60 µl der meta-Hydroxydiphenyl-Lösung hinzu. Hierbei reagieren aber nur die Uronsäuren, andere Zucker nicht. Es erfolgt eine Doppelbestimmung, bei der die Extinktion bei 520 nm gemessen wird.

Um den Gehalt an Galakturonsäure erhalten zu können, wird eine Standardfunktion mit Monogalakturonsäure erstellt. Dabei werden 100, 500 und 1000 µg/ml Monogalakturonsäure in destilliertem Wasser gelöst und wie die Probe weiterbehandelt. Aus den Extinktionen wird eine Funktion mit der Form

$$y = mx + n \tag{1}$$

erstellt, um den Gehalt an Galakturonsäure in der Probe zu ermitteln.

Auswertung

Zunächst wird der Extinktionswert in die ermittelte Kalibrierfunktion eingesetzt, um den gemessenen Galakturonsäuregehalt zu erhalten. Das Ergebnis bezieht man mit folgender Formel auf die AIS.

$$GalA = \frac{GalA_{gemessen}}{AIS} \quad (2)$$

GalA ... gesuchte Menge an GalA [$\mu\text{g}/\text{mg}$]

GalA_{gemessen} ... Menge an GalA, die mit der Kalibrierfunktion ermittelt wurde [$\mu\text{g}/\text{mg}$]

AIS ... Einwaage an AIS: hier 5 mg

Das Ergebnis wird anschließend mit nachstehender Formel auf frische Gurken bezogen.

$$GalA_{gesamt} = \frac{GalA \cdot AIS}{Gurken} \quad (3)$$

GalA_{gesamt} ... Menge an GalA in frischer Gurke [$\mu\text{g}/\text{g}$]

GalA ... mit Formel (2) ermittelte Menge [$\mu\text{g}/\text{mg}$]

AIS ... Einwaage AIS der frischen Gurken [mg]

Gurken ... Einwaage der frischen Gurken [g]

4 Ergebnisse

4.1 Methodenvergleich

Alle Methoden, die in Abschnitt 2.5 beschrieben sind, beziehen sich auf die Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC. Der Vergleich wird anhand verschiedener Kriterien durchgeführt.

Untersuchungsmaterial

Die vorgestellten Methoden beziehen sich auf die Untersuchung von Obst beziehungsweise Fruchtsäften oder Tee. Es konnte keine Methode gefunden werden, die speziell Galakturonsäure in Gurken analysiert, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wird. Dennoch ist das pflanzliche Zellwandmaterial dieser Untersuchungsmaterialien grundsätzlich vergleichbar, sodass die Analysemethoden auch für die Untersuchung des Zellwandmaterials von Gurken eingesetzt werden können.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung variiert zwischen den in der Literatur gefundenen Methoden. Aus dem Probenmaterial wird zunächst die AIS hergestellt. Dies wird bei allen, außer den Methoden HPLC-RID und HPAEC-PAD mit Kaliumoxalat, durchgeführt. Die Vorteile liegen darin, dass die AIS die polymere Galakturonsäure darstellt und alle weiteren, eventuell störenden Probenbestandteile, bereits abgeschieden werden. Dadurch wird die Genauigkeit der Analyse stark erhöht.

In jedem Fall wird eine Hydrolyse in konzentrierter Säure durchgeführt, um die polymere Galakturonsäure in ihre Monomere zu spalten. Die Bedingungen dafür schwanken stark, da das Probenmaterial eine unterschiedliche Hydrolysierbarkeit aufweist. Kressmann (2001) zählt die Kolloide der schwarzen Johannisbeeren zu den schwer hydrolysierbaren Polysacchariden und optimiert deshalb die Vorgaben bei seiner Methode HPLC-PAD. Auch bei der Methode HPAEC-PAD mit Stufengradient nach Koswig et al. (1997) wird eine Optimierung durchgeführt, um die Bedingungen genau auf das Untersuchungsmaterial abzustimmen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Polysaccharide ausreichend gespalten, aber auf der anderen Seite die vorhandenen Monosaccharide nicht zerstört werden. Koswig et al. (1997) fanden heraus, dass in Untersuchungsmaterial, welches mit konzentrierter Schwefelsäure hydrolysiert wird, ein höherer Gehalt an Uronsäuren nachgewiesen werden kann. Aber auch die anderen Analysemethoden, die mit Salzsäure oder TFA gearbeitet haben, erzielen repräsentative Ergebnisse.

Trennsäulen und Eluenten

Bei den Analyseverfahren werden unterschiedliche Trennsäulen eingesetzt. Herausragend ist, dass fünf der Methoden die Carbopac PA-Säulen (Dionex) einsetzen und nur jeweils einmal die TSK gel Sugar AXI (Tosoh) und die Sugar-Pak I (Waters) benutzt werden. In Tabelle 3 ist an verschiedenen Parametern ein Vergleich dieser Säulen aufgezeichnet.

Tabelle 3: Vergleich der verwendeten Trennsäulen

	TSK gel Sugar AXI*	Carbopac PA1*	Carbopac PA100*	Sugar-Pak I*
Anwendung	Mono- und Disaccharide, Zuckeralkohole	Mono- und Disaccharide	Oligosaccharide	Mono- und Disaccharide, Polyole und Alkohole
Abmessung	4,6 x 150 mm	4 x 250 mm	4 x 250 mm	6,5 x 300
Säulenmaterial	PS-DVB mit Trimethylammonium	PS-DVB mit Ammoniumlatex	Ethylvinylbenzol/DVB mit Ammoniumlatex	SDVB mit Calcium
Korngröße	8 µm	10 µm	8,5 µm	8 µm
Austauschkapazität	> 1,2 meq/ml	100 µeq/Säule	90 µeq/Säule	n.a.
Porengröße	$6 \cdot 10^{-6}$ mm	2 mm	2 mm	n.a.
Eluent	Borsäure	Acetat, Hydroxid	Natriumhydroxid, Natriumacetat	Wasser mit Calcium-EDTA
Temperaturbereich	25 – 80 °C	4 – 55 °C	4 – 60 °C	max. 85 °C
Maximaldruck	450 psi	4000 psi	4000 psi	600 psi
Kompatibilität der mobilen Phase	pH 1 – 14	pH 0 – 14, 2 % mit allgemein verwendeten Lösemitteln	pH 0 – 14, 100 % mit allgemein verwendeten Lösemitteln	pH 7

* Angaben des Herstellers

Die verwendeten Säulen sind alle speziell für Kohlenhydrate entwickelt worden. Da Galakturonsäure zu den Monosacchariden zählt, ist die Carbopac PA100 (Dionex), die für Oligosaccharide eingesetzt wird, weniger zweckmäßig. Andererseits ist die Säulenwahl abhängig von der Probenmatrix. Wenn viele Oligosaccharide in der Probe enthalten sind, kann die Verwendung der Carbopac PA100 (Dionex) vorteilhaft sein (Rattmann, 2011). Da aber in diesem Fall die AIS hydrolysiert wird, ist der Gehalt an Oligosacchariden relativ gering. Demzufolge sind alle, außer die Carbopac PA100-Säule (Dionex), für die Bestimmung von Galakturonsäure in Gurken geeignet. Das Säulenmaterial besteht aus polymerisiertem Polystyrol und Divinylbenzol, siehe Abbildung 5, beziehungsweise Ethylvinylbenzol und Divinylbenzol, siehe Abbildung 6, als Matrix.

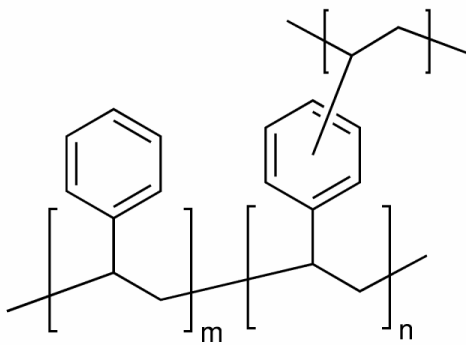


Abbildung 5: Strukturformel von PS-DVB (Sigma-Aldrich, 2011)

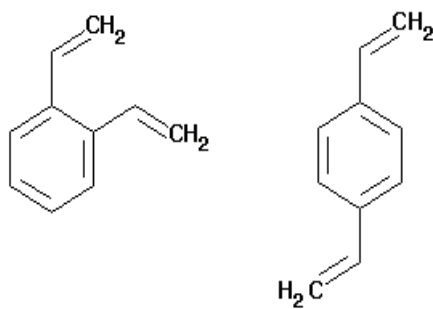


Abbildung 6: Strukturformel von DVB (Merck, 2011)

Die Ionentauscher sind bei der TSK gel Sugar AXI (Tosoh), der Carbopac PA1 und der Carbopac PA100 (Dionex) Ammonium-Verbindungen, während die Sugar-Pak I (Waters) Calcium enthält. Grundsätzlich sind beide Verbindungen für den Ionenaustausch möglich. Die Korngröße des Säulenmaterials liegt bei 8 μm , außer bei der Carbopac PA1 (Dionex), das 10 μm aufweist. Die Porengröße der TSK gel Sugar AXI (Tosoh) beträgt $6 \cdot 10^{-6}$ mm, während die

Carbopac PA-Säulen (Dionex) 2 mm aufweisen. Generell verhält es sich so, dass mit sinkender Porengröße der Gegendruck steigt, aber die Trennleistung verbessert wird (Corradini, 2010). Die Carbopac PA-Säulen (Dionex), die mit einer Porengröße von 2 mm einem Druck von 4000 psi standhalten können, erbringen damit die höchste Leistung. Bei den eingesetzten Eluenten tritt hervor, dass mit Säure, Lauge und neutralem Lösungsmittel gearbeitet wird. Es ist jedoch bewiesen, dass eine Trennung bei hohen pH-Werten mit nach geschaltetem PAD am besten eintritt (Lee, 1996). Demzufolge werden die Carbopac PA-Säulen (Dionex) hier in Betracht gezogen.

Letztendlich ist mit Hilfe dieses Vergleichs die Carbopac PA1 (Dionex) für die Bestimmung von Galakturonsäure am geeignetsten. Die für Mono- und Disaccharide zur Verfügung stehende Trennsäule hat die höchste Austauschkapazität, hält einem hohen Gegendruck stand, ist bei Normaltemperaturen einsetzbar und mit Säuren oder Laugen kompatibel. Der einzige Nachteil ist, dass diese Säule nicht lösemittelstabil ist. Da hier nicht mit Lösemitteln gearbeitet wird, stellt dies kein Problem dar.

Temperaturen

Die Methoden legen dar, dass verschiedene Temperaturen bei der Trennung von Galakturonsäure möglich sind. Die Methode HPLC-PAD nach Kressmann (2001) führt dies bei 20 °C durch, da die hier verwendete Trennsäule hohe Leistungen erzielt und das Fließmittel eine geringe Viskosität aufweist. Bei der Methode HPAEC-FLD wird bei 70 °C getrennt. Dies ist notwendig, da Borsäure als Fließmittel mit einigen Kohlenhydraten Gele bilden kann (Kliegel, 1980). Dadurch erhöht sich die Viskosität und der Trennvorgang wird negativ beeinflusst. Um dies zu verhindern werden höhere Temperaturen gewählt, bei denen die Viskosität sinkt. Die Methode HPLC-RID nach Chen et al. (2003) analysiert bei 90 °C, um die Trennleistung zu stark zu erhöhen. Im Allgemeinen sind alle Temperaturen für Galakturonsäure geeignet, wobei Anpassungen an die vorliegenden Bedingungen ausgearbeitet werden müssen.

Gradientensysteme

Es ist auffällig, dass sowohl isokratisch als auch mit Gradientensystemen analysiert wird. Wenn ein Gradientensystem eingesetzt wird, tritt die Trennung schneller ein. Das ist bei den Methoden HPAEC-PAD - linearer Gradient mit Natronlauge und Natriumacetat nach Burana-osot et al. (2010), HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natronlauge und Natriumacetat nach Coenen (2007), HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natronlauge und Natriumacetat nach Koswig et al. (1997) und HPAEC-PAD - Stufengradient mit Kaliumoxalat nach Hotchkiss et al. (1996) der Fall. Der

zeitliche und apparative Aufwand ist jedoch viel höher, da mehrere Fließmittel hergestellt werden, sowie mehrere Pumpen zur Verfügung stehen müssen. Hierbei muss je nach Gegebenheit entschieden werden. Am günstigsten ist es, wenn isokratisch eine hohe Trennleistung erzielt werden kann.

Detektoren

In Bezug auf die Detektoren zeigen die Methoden, dass der PAD in fünf von sieben Fällen für die Untersuchung von Galakturonsäure repräsentative Ergebnisse liefert. In der Tabelle 4 sind die verwendeten Detektoren vergleichend dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der eingesetzten Detektoren

	PAD	FLD	RID
Messung	elektrochemische Aktivität	Emission	Brechungsindex
Detektion	selektiv	selektiv	universell
Empfindlichkeit	sehr hoch	hoch	geringer als PAD, FLD
Abhängigkeit von	Temperatur	Temperatur	Temperatur und Druck
Gradient	geeignet	geeignet	nicht geeignet
Reproduzierbarkeit	gut	sehr gut	gut

Wie schon in Punkt 2.4 beschrieben, enthält der PAD eine Elektrode aus Gold, nutzt die elektrochemische Aktivität der Substanzen aus und ist damit genau auf Kohlenhydrate abgestimmt. Im Vergleich zu den anderen Detektoren ist die Robustheit und die Selektivität höher sowie die Detektionsgrenzen geringer. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Trennsäule in den Detektor integriert werden kann. Er ist beheizbar, sodass ein Säulenofen nicht benötigt wird. Beim FLD, der nach der Methode HPAEC-FLD von Burana-osot et al. (2010) verwendet wird, ist eine Nachsäulenderivatisierung notwendig. Diese erhöht zwar die Sensitivität beziehungsweise die Selektivität des Detektors, stellt aber einen zusätzlichen apparativen und zeitlichen Aufwand dar. Auch der RID, der von Chen et al. (2003) bei der Methode HPLC-RID eingesetzt wird, zeigt sich als ungeeignet. Er ist universell einsetzbar, weist aber eine geringere Empfindlichkeit auf, wodurch die Nachweisgrenze sinkt. Darüber hinaus ist der RID für Gradientensysteme ungeeignet und durch seine zusätzliche Druckabhängigkeit gegenüber den anderen Detektoren benachteiligt.

Auswahl

Letztendlich sollte die Probenvorbereitung die Herstellung einer AIS aus dem Untersuchungsmaterial und dessen Hydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure beinhalten, um im ersten Schritt die polymere Galakturonsäure zu erhalten und im zweiten Schritt diese in ihre Monomere zu spalten. Für die Trennung dieser vorbehandelten Probe eignet sich die Carbopac PA1-Säule (Dionex) am besten, die mit dem PAD verknüpft ist. Die Säule ist genau auf diese Art von Untersuchung angepasst. Das Arbeiten mit Natronlauge als Fließmittel erhöht die Selektivität des Detektors und benötigt eine relativ geringe Temperatur von 20 °C bis 30 °C. Durch die isokratische Trennung ist nur eine Pumpe notwendig, sodass der apparative Aufwand gering gehalten wird. Es wird nach diesen Feststellungen die Methode HPLC-PAD nach Kressmann (2001) empfohlen, die zusätzlich alle relevanten Untersuchungsbedingungen enthält.

4.2 Laborversuch

4.2.1 Untersuchungen mit HPLC

Es wird die HPLC-Anlage mit dem hergestellten Fließmittel gespült. Dies geschieht für mehrere Stunden bei einer Flussrate von 1 ml/min, um die Anlage zu reinigen und einen einwandfreien Fluss zu gewährleisten. Zur Kontrolle wird das Fließmittel als Probe eingespritzt. Das Chromatogramm dazu befindet sich in Anlage 2, Abbildung 9. Es sind drei Peaks darin erkennbar, wobei der erste der Einspritzpeak ist und nicht gewertet wird. Die beiden anderen Peaks unterscheiden sich in Höhe und Fläche sehr stark, sind jedoch nicht identifizierbar. Es könnten Verunreinigungen in der Anlage sein.

Anschließend werden die Standardsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen eingespritzt und die Chromatogramme ausgewertet. Die Angaben dazu befinden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Versuchsplan mit der RCX-30-Säule (Hamilton)

	Standardlösung in	Konzentration des Standards	Temperatur [°C]	Druck [MPa]
1. Versuch	Reinstwasser	50 µg/ml	31	6,6
2. Versuch	Reinstwasser	5 µg/ml	31	6,6
3. Versuch	Fließmittel	5 µg/ml	31	6,9

Beim ersten Versuch ist der Standard mit einer Konzentration von 50 µg/ml in Reinstwasser

gelöst. Diese Konzentration erweist sich jedoch als viel zu hoch, denn die Säule ist zu Beginn der Messung überladen. Nach dem verhältnismäßig hohen Einspritzpeak folgen zwei weitere kleine Peaks, was in Abbildung 10, Anlage 2 veranschaulicht ist. Nach 50 min wird ein kleiner, sehr breiter Peak aufgenommen, welcher der Standard sein könnte.

Beim zweiten Versuch wird auf Grund dieser Erkenntnisse eine geringere Konzentration des Standards von 5 µg/ml gewählt. Doch auch hier ist die Säule nach der Einspritzung überladen. Das Chromatogramm ähnelt dem des ersten Versuchs. Da der Einspritzpeak wieder sehr hoch ist, liegt nahe, dass zu viel Wasser in der Probe enthalten ist und deshalb wird die Standardsubstanz nun im Fließmittel gelöst. Die Konzentration bleibt gleich. Alle weiteren vorhandenen Peaks können nicht identifiziert werden und werden demzufolge als Verunreinigungen angesehen.

Der dritte Versuch ähnelt den ersten beiden, was die Abbildung 11 in Anlage 2 zeigt. Die Trennsäule ist zu Beginn überladen und es entsteht nach 7 min ein sehr kleiner Peak, der mit dem bei der Messung des Fließmittels vergleichbar ist. Die Vermutung, dass die Probe zu viel Wasser enthält, bestätigt sich demnach nicht. Nun liegt es sehr nahe, dass die Standardsubstanz bereits mit dem Einspritzpeak detektiert wird. Dabei kann die Galakturonsäure nicht von der stationären Phase zurückgehalten werden. Eine weitere Vermutung ist, dass die Substanzen zu lange an der stationären Phase anhaften und dadurch Retentionszeiten von 50 min entstehen. In jedem Fall wird die verwendete Trennsäule als ungeeignet angesehen.

Der Einspritzpeak ist bei allen Versuchen sehr hoch, was ungewöhnlich ist. Da beim dritten Versuch bestätigt wird, dass dies nicht am Wasser liegt, kann darauf geschlossen werden, dass die Probe zu viel Sauerstoff enthält. Deshalb sollte auch die Probe vor der Einspritzung entgast werden.

Die Trennsäule RCX-30 von Hamilton wird auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als ungeeignet angesehen. Bei den vorgestellten Methoden wird am häufigsten die Carbopac PA1 (Dionex) verwendet, die im Vergleich in Abschnitt 4.1 positiv bewertet wurde. Um die Differenzen herauszufinden, wird in Tabelle 6 ein Vergleich zwischen diesen Säulen aufgestellt.

Tabelle 6: Vergleich der Trennsäulen RCX-30 (Hamilton) und Carbobac PA1 (Dionex)

	RCX-30*	Carbobac PA1*
Anwendung	Mono-, Di- und Polysaccharide	Mono- und Disaccharide
Abmessung	4,6 x 250 mm	4 x 250 mm
Säulenmaterial	PS-DVB mit Trimethylammoniumtauscher	PS-DVB mit Ammoniumlatex
Korngröße	7 µm	10 µm
Austauschkapazität	1,6 meq/Säule	0,1 meq/Säule
Porengröße	10 ⁻⁵ mm	2 mm
Eluent	Hydroxid	Acetat, Hydroxid
Temperaturbereich	pH 1 - 7,9 → 5 – 60 °C pH 8 - 13 → 5 – 30 °C	4 – 55 °C
Maximaldruck	5000 psi	4000 psi
Kompatibilität der mobilen Phase	pH 1 – 13, 100 % mit wässrigen, organischen Lösemitteln	pH 0 – 14, 2 % mit allgemeinen HPLC- Lösemitteln
Detektor	PAD, RID	PAD
Pumpe	n.a.	metallfrei

* Angaben des Herstellers

Die RCX-30 (Hamilton) ist für die Untersuchung von Mono-, Di- und Polysacchariden bestimmt. Da das Probenmaterial hydrolysiert wird, liegen vorwiegend Mono- und Disaccharide vor, sodass beide Säulen dafür geeignet sind. Das Säulenmaterial ist dasselbe, wobei sich die Korngröße um 3 µm unterscheidet. Da die Porengröße der RCX-30 (Hamilton) bei 10⁻⁵ mm liegt, ist eine sehr enge Packung der Säule daraus zu schließen. Dadurch ist die Anhaftung der Substanzen an die stationäre Phase zwar gegeben, jedoch kann dies zu lange andauern und der Gegendruck stark ansteigen. Damit wäre die Retentionszeit von 50 min bei den bisherigen Versuchen zu erklären. Die Carbobac PA1 (Dionex) hat eine Porengröße von 2 mm, sodass die Substanzen schneller durch das Trennsystem geleitet werden können. Im Hinblick auf die Austauschkapazität ist die RCX-30 (Hamilton) vorteilhafter, da diese mit 1,6 meq/Säule etwas höher ist. Beide Säulen sind für das verwendete Fließmittel geeignet, können einem sehr hohen Gegendruck standhalten und sind mit dem PAD einsetzbar. Ein Nachteil der Carbobac PA1 (Dionex) ist, dass sie nicht lösemittelstabil ist. Da hier nicht mit Lösemitteln gearbeitet wird, ist dies jedoch zu vernachlässigen.

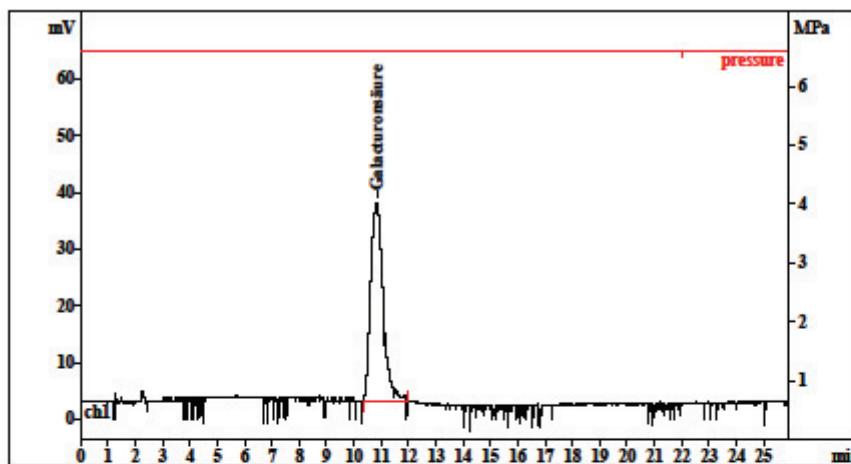
Letztendlich ist auf Grund dieses Vergleichs und einer Empfehlung von Rattmann (2011) der Herstellerfirma Dionex die Carbopac PA1 für die Bestimmung von Galakturonsäure zu bevorzugen.

Die Carbopac PA1 (Dionex) wurde bezogen und nach denselben Bedingungen wie mit der RCX-30 (Hamilton) überprüft. In Tabelle 7 sind diese kurz zusammengefasst.

Tabelle 7: Untersuchungsbedingungen mit der Carbopac PA1 (Dionex)

Eluent	Flussrate	Temperatur	Einspritzvolumen	Druck
400 mM NaOH	1 ml/min	30 °C	20 µl	6,6 mPa

Der Standard wird nun mit einer Konzentration von 200 µg/ml in die HPLC-Anlage eingespritzt. Dabei hat sich das Chromatogramm in Abbildung 7 ergeben. Weitere Angaben befinden sich im Chromatogramm in Anlage 2, Abbildung 12.



This report has been created by McDACq32 Control Center
BISCHOFF Chromatography GmbH

Abbildung 7: Chromatogramm der Standardeinspritzung (200 µg/ml)

Für den Galakturonsäure-Standard hat sich eine Retentionszeit von 10,83 min ergeben. Das teilweise sehr hohe Grundrauschen ist auf die hohe Empfindlichkeit des Detektors zurückzuführen. Der konstante Druck von 6,6 MPa zeigt eine regelmäßige Fließmittelförderung und dass keine Lecks vorhanden sind. Es ist zu schlussfolgern, dass die Carbopac PA1 (Dionex) sehr gut für die Bestimmung von Galakturonsäure aus Zellwandmaterial geeignet ist.

4.2.2 Referenzmethode

Die Referenzmethode wird mit der AIS der Gurkencharge ZG 21 15:41 durchgeführt. Alle Angaben des Untersuchungsmaterials befinden sich in Tabelle 11 der Anlage 3.

Die Kalibration mit Monogalakturonsäure in verschiedenen Konzentrationen ergibt eine Funktion, die in Abbildung 8 dargestellt ist. Die Daten dazu und die Extinktionen der Proben befinden sich in Anlage 3, Tabelle 12 und 13.

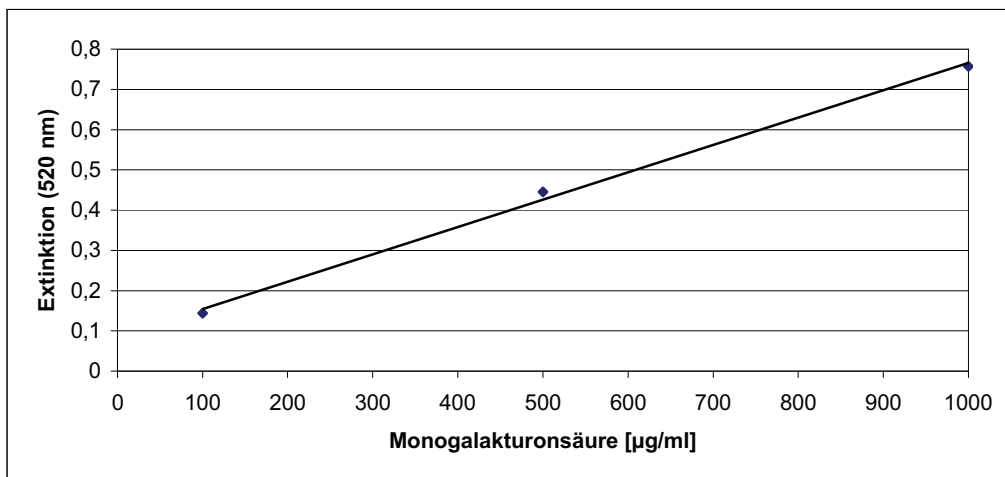


Abbildung 8: Kalibrierfunktion mit Monogalakturonsäure

Daraus ergibt sich folgende Regressionsgerade

$$y = 0,007x + 0,0867 \quad (4)$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9985. Es kann damit der Gehalt an Galakturonsäure im Probenmaterial ermittelt werden.

Tabelle 8: Gehalt an Galakturonsäure im Untersuchungsmaterial

	gemessene GalA [µg/5 mg AIS]	GalA/AIS [µg/mg]	GalA/Gurke [µg/g]
ZG 21_1	27,07	5,41	138,93
ZG 21_2	31,79	6,36	163,21
			$\bar{x} = 151,07$

Der Gehalt an Galakturonsäure in der AIS liegt bei rund 6 µg/mg, wie Tabelle 8 zu entnehmen ist. Bezogen auf ein Gramm Gurke sind dies circa 151 µg.

5 Diskussion

Es wurden sieben HPLC-Analysenmethoden bei der Literaturrecherche gefunden und verglichen. Allgemein ist die HPLC nach allen Methoden für die Bestimmung von Galakturonsäure einsetzbar. Es ergeben sich in jedem Fall repräsentative Ergebnisse. Probleme treten jedoch häufig bei der Zusammensetzung des Fließmittels auf. Es muss ohne jegliche Verunreinigung und sauerstofffrei sein. Auch die Temperatur muss konstant gehalten werden, um gleiche Retentionszeiten zu erhalten. Diese und weitere Gegebenheiten könnten dazu beitragen, diese Untersuchungsmethode nicht in die Routineanalytik einzuführen.

Bei dem Vergleich stellte sich heraus, dass die Methode HPLC-PAD - isokratisch mit Natronlauge nach Kressmann (2001) für die Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial für die Durchführung an der Hochschule Neubrandenburg am zweckmäßigsten ist.

Die Probenvorbereitung beinhaltet das Herauslösen der AIS aus dem Untersuchungsmaterial, sowie dessen Hydrolyse. Die AIS muss zwar über mehrere Schritte aus den gefriergetrockneten Gurken gelöst werden, jedoch stellte sich dies als sehr einfach und reproduzierbar heraus. Außerdem werden dadurch Bestandteile der Probe entfernt, die die Untersuchung stören beziehungsweise beeinflussen könnten. Demzufolge sollte in jedem Fall diese Vorbehandlung stattfinden. Anschließend wird eine Hydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt, die nach Koswig et al. (1997) den höchsten Gehalt an Uronsäuren ergibt. Dies ist jedoch abhängig von der Hydrolysierbarkeit des Untersuchungsmaterials. Kressmann (2001) führt die zweistufige Hydrolyse nach Saeman (1954) durch. Durch die zwei Schritte, bei denen hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten einzuhalten sind, wird ein hoher apparativer und zeitlicher Aufwand benötigt. Daher wird die Hydrolyse der Referenzmethode mit konzentrierter Schwefelsäure bevorzugt. Hier sind keine hohen Temperaturen und nur kurze Reaktionszeiten notwendig. Praktisch konnte dies nicht überprüft werden. Da in der AIS der Gurken hauptsächlich Mono- und Disaccharide vorliegen, müsste theoretisch die Spaltung damit gegeben sein.

Die Methode HPLC-PAD analysiert mit der Carbowac PA100-Säule (Dionex) in Verbindung mit dem PAD, die auf Grund ihrer Eigenschaften eine präzise Bestimmung von Galakturonsäure aus Zellwandmaterial voraussetzt. Natronlauge als Fließmittel erzielt mit dem hohen pH-Wert eine präzise Trennung und eine hohe Selektivität des Detektors. Bei der Überprüfung der Methode wird die RCX-30 (Hamilton) eingesetzt. Doch damit sind bereits beim Konditionieren der HPLC-Anlage Probleme aufgetreten. Die Säule ist nach der Einspritzung überladen, der Druck

schwankt und erst nach 50 Minuten konnte ein Peak aufgezeichnet werden. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass diese Säule zu eng gepackt und die Anhaftung der Probe an die stationäre Phase zu lange eingetreten ist. Es wurde die Carbopac PA1 (Dionex) bezogen und unter denselben Bedingungen überprüft. Bei der Standardeinspritzung ergab sich für Galakturonsäure eine Retentionszeit von 10,83 min. Bei Kressmann (2001) kann Galakturonsäure nach 10,5 min detektiert werden, sodass diese Übereinstimmung für den Einsatz der Carbopac PA1 (Dionex) spricht. Mit dieser Erkenntnis wird die positive Bewertung der Säule (siehe 4.1) bestätigt.

Eine weitere Abweichung zu den Angaben der gewählten Methode ist die Temperatur. Die vorgegebenen 20 °C konnten nicht eingehalten werden, da die Raumtemperatur höher und der Säulenofen nicht kühlbar ist. Deshalb wurde eine Säulentemperatur von 30 °C gewählt, die sich als positiv herausstellte. Der Trennvorgang wurde dadurch nicht beeinflusst, kann sogar verbessert worden sein. Die isokratische Bestimmung hält den zeitlichen und apparativen Aufwand gering, da nur ein Fließmittel und eine Pumpe benötigt werden. Jedoch könnte in weiteren Untersuchungen überprüft werden, ob die Trennung mit einem Gradientensystem schneller eintreten würde.

Des Weiteren erfolgt die Bestimmung mittels HPLC-PAD direkt, sodass keine weiteren Schritte, wie eine Nachsäulenderivatisierung bei der Verwendung des FLD, erfolgen müssen. Der PAD zeigte eine hohe Selektivität bei den Versuchen. Nachteilig ist die hohe Empfindlichkeit dieses Detektors, die sich im hohen Grundrauschen widerspiegelt. Nur durch eine einwandfreie Zusammensetzung des Fließmittels und einen konstanten Druck kann dies gering gehalten werden.

Da für das verwendete Untersuchungsmaterial keine Angaben zum Galakturonsäuregehalt vorliegen, wurde eine Referenzmethode durchgeführt. Die photometrische Bestimmung stellte sich als sehr einfach heraus. Für die Charge ZG 21 15:41 ergibt sich ein Galakturonsäuregehalt von 151 µg/g frische Gurken. Jarvis (1982) ermittelte einen Gehalt von 27 mg/g in Gurken, während Bock und Krause (1968) 2 – 3 mg/g Pektin als Gesamt-Anhydrogalakturonsäure in Gurken mit unterschiedlichem Reifegrad nachweisen konnten. Im Vergleich zu den in den Methoden ermittelten Gehalten an Galakturonsäure ist der in Gurken mit unter einem Prozent sehr gering. Beispielsweise sind in Apfelpektin 32 % (Koswig et al., 1997), in schwarzen Johannisbeeren 26 Gew% (Kressmann, 2001) oder in Pomelopektin 77 Gew% (Burana-osot et al., 2010) Galakturonsäure enthalten. Diese hohe Abweichung kann zum einen daran liegen, dass die Einwaage von 5 mg zu gering ist. Das bedeutet, dass die Waage in diesem Messbereich zu

ungenau ist und die Einwaage dadurch stark abweicht. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Hydrolyse der AIS nicht vollständig eingetreten ist, sodass nur ein Teil der Polymere gespalten worden ist. Auf Grund dieser Aussagen sollte in weiteren Untersuchungen die Probeneinwaage auf den Messbereich der Waage angepasst werden und eine Optimierung der Hydrolysebedingungen erfolgen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine HPLC-Analysenmethode zur Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial zu etablieren. Dazu gehörten die Recherche und der Vergleich geeigneter Methoden, sowie die Überprüfung einer gewählten Methode im Labor der Hochschule Neubrandenburg.

Es werden sieben Methoden anhand verschiedener Kriterien verglichen und daraus die Methode HPLC-PAD nach Kressmann (2001) gewählt. Dabei wird zunächst die alkohol-unlösliche Substanz aus dem Untersuchungsmaterial gelöst und anschließend mit konzentrierter Schwefelsäure zweistufig hydrolysiert. Es werden 25 µl der vorbehandelten Probe in die HPLC-Anlage injiziert, die unter anderem aus einer Carbopac PA100-Säule mit Vorsäule (Dionex) und einem PAD bestehen. Als Fließmittel wird 400 mM Natronlauge eingesetzt, die isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 20 °C geführt wird.

Diese Methode wird mit den Möglichkeiten der Hochschule Neubrandenburg überprüft. Die einzige Abweichung ist der Einsatz einer RCX 30-Säule (Hamilton), die auf 30 °C temperiert wird. Hierbei haben sich bereits beim Konditionieren der Anlage Probleme ergeben. Der externe Standard wird in verschiedenen Konzentrationen eingespritzt, doch die Säule ist zu Beginn stets überladen und erst nach 50 Minuten konnte ein kleiner, relativ breiter Peak aufgezeichnet werden. Anhand eines Vergleichs dieser Säule und der Carbopac PA1 (Dionex) konnte festgestellt werden, dass die Säulenpackung sehr eng ist und dadurch die Probleme aufgetreten sind. Demzufolge wird die Carbopac PA1 für diese Art von Untersuchung bevorzugt und von der Herstellerfirma Dionex bezogen. Deren Überprüfung erfolgt nach denselben Bedingungen wie mit der RCX-30 (Hamilton). Die Einspritzung des Standards mit einer Konzentration von 200 µg/ml hat ergeben, dass Galakturonsäure bereits nach 10,83 min detektiert werden konnte. Das Chromatogramm und der konstante Druck haben gezeigt, dass diese Säule für die Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial sehr gut geeignet ist. Aus zeitlichen Gründen muss das Einspritzen einer Probe vernachlässigt werden. Dies erfolgt jedoch in weiteren Untersuchungen.

Darüber hinaus wird mit Hilfe einer Referenzmethode der Galakturonsäuregehalt in eingelegten Gurken der Carl Kühne KG ermittelt, da dazu keine Angaben vorliegen. Für die Untersuchung wird die zuvor hergestellte AIS in Schwefelsäure/Natriumtetraborat-Lösung und destilliertem Wasser gelöst und erhitzt. Vor der photometrischen Bestimmung bei 520 nm wird eine meta-

Hydroxydiphenyl-Lösung hinzugegeben. Mit Hilfe einer Standardfunktion kann ein Galakturonsäuregehalt von 151 µg/g frische eingelegte Gurken festgestellt werden.

Abschließend konnte das Ziel dieser Arbeit nicht vollständig erreicht werden. Die Recherche und Auswahl einer HPLC-Analysenmethode zur Bestimmung von Galakturonsäure aus pflanzlichem Zellwandmaterial war erfolgreich. Die Überprüfung konnte nur durch die Standardeinspritzung stattfinden. Die Einspritzung von Proben und damit die vollständige Überprüfung der Methode werden in weiteren Forschungsarbeiten erfolgen.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed, A.e.R.; Labavitch, J.M.: A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry* (1977), Nr. 1, S. 361-365

Binner, S.; Jardine, W.G.; Renard, C.M.C.G.; Jarvis, M.C.: Cell wall modifications during cooking of potatoes and sweet potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2000), Nr. 80, S. 216-218

Belcheva, D.: Theoretische und experimentelle Studie der Gradienten-Gegenstromchromatographie unter linearen Bedingungen. Otto-von-Guericke-Universität. Magdeburg: Dissertation, 2004

Bock, W.; Krause, M.: Untersuchung der Pektin- und Eiweißkomponente sowie der Cuticula in Gurken. *Die Nahrung* (1968), Nr. 12, S. 665-677

Burana-osot, J.; Soonthornchareonnon, N.; Chaidedgumjorn, A.; Hosoyama, S.; Toida, T.: Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. *Elsevier: Carbohydrate Polymers* (2010), Nr. 81, S. 461-465

Chen, H.; Zhang, M.; Xie, B.: Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties. *Huazhong Agricultural University. Wuhan: 2003*

Coenen, G.J.: Structural characterization of native pectins. Wageningen Universität. Wageningen: Dissertation, 2007

Corradini, D.: *Handbook of HPLC*. 2. Auflage. Boca Raton: CRC Press, 2010

Dionex Corporation: *Product Manual for Carbopac MA1, PA1, PA10, PA100*. Mai 2010
<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4375-Man-031824-08-CarboPac-Combined-May10.pdf>.
21.01.2011

Hamilton Company: HPLC Columns: RCX 30 Anion Exchange HPLC Columns.
<http://www.hamiltoncompany.com/downloads/Hamilton%20HPLC%20Columns%20and%20Bulk%20Resins.pdf>. 12.01.2011

Haußler, K.: Ökologischer Lehrgarten: Schwarze Johannisbeere. Pädagogische Hochschule Karlsruhe.
http://www.natwiss.ph-karlsruhe.de/GARTEN/material/steckbrief/Sortenvielfalt/Schwarze_Johannisbeere.pdf.
17.01.2011

Herbstreith & Fox KG: Pektin. www.herbstreith-fox.de/de/pektine.html. 1997. 05.01.2010

Hess, D.: Pflanzenphysiologie: molekulare und biochemisch-physiologische Grundlagen von Stoffwechsel, Entwicklung und Ökologie. 9. Auflage. Stuttgart: Ulmer, 1991

Hilz, H.: Characterisation of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. Wageningen Universität. Wageningen: Dissertation, 2007

Hoff, P.; Jaenicke, J.; Miram, W.: Biologie heute 2G. 1. Auflage. Hannover: Schroedel, 1994

Hotchkiss, A.T.; el-Bahtimy, K.; Fishman, M.L.: Analysis of Pectin Structure by HPAEC-PAD. Modern Methods of Plant Cell Analysis (1996), Nr.17, S. 129-142

IPPA International Pectin Producers Association: What is Pectin?
www.ippa.info/what_is_pectin.htm. 2001. 05.01.2010

Jarvis, M.C.: The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta* (1982), Nr. 154, S. 344-346

Kliegel, W.: Bor in Biologie, Medizin und Pharmazie. 1. Auflage. Berlin: Springer, 1980

Koswig, S.; Fuchs, G.; Hotsommer, H.J.: The use of HPAE-PAD for the analysis of thickening agents in fruit juice and food analysis. *Seminars in Food Analysis* (1997), Nr. 2, S. 71-83

Krause, M., Bock, W.: Zur Bestimmung und Charakterisierung der Pektinstoffe in Obst und Gemüse. *Ernährungsforschung* (1973), S. 111-123

Kressmann, R.: Die chemische Zusammensetzung der löslichen Kolloide im Saft von schwarzen Johannisbeeren und deren Auswirkung auf die Verarbeitungstechnologie. Justus-Liebig-Universität. Gießen: Dissertation, 2001

Kunzek, H.; Kabbert, R.; Gloyna, D.: Aspects of material science in food processing: changing of plant cell walls of fruit and vegetables. *Zeitung für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung* (1999), S. 233-250

Lawther, J.M.; Sun, R.; Banks, W.B.: Extraction, Fractionation, and Characterization of Structural Polysaccharides from Wheat Straw. *Journal of Agriculture Food Chemistry* (1995), Nr. 3, Vol. 43, S. 667-675

Lebensmittellexikon: Gurke. <http://www.lebensmittellexikon.de/s0000120.php>. 17.01.2011

Lee, Y.C.: Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography* (1996), Nr. 27, S. 137-149

Library4Science: The Refractive Index Detector. 2008. <http://www.chromatography-online.org/HPLC/Refractive-Index/rs34.html>. 12.01.2011

Lindsay, S.: Einführung in die HPLC. 1. Aufl. Braunschweig/ Wiesbaden: vieweg, 1996

Linskens, H. F.; Jackson, J. F.: *Modern Methods of Plant Analysis: Plant Cell Wall Analysis*. 17. Auflage. Berlin: Springer, 1996

McCann, M.C.; Roberts, K.R.: The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. *Journal of Cell Science* (1991), S. 126

McFeeters, R.F.; Armstrong, S.A.: Measurement of Pectin Methylation in Plant Cell Walls. *Analytical Biochemistry* (1984), Nr. 139, S. 212-217

Merck KGaA: Divinylbenzol. www.merck-chemicals.com/germany/divinylbenzol/MDA_CHEM-803598/p_vK.b.s1LaPcAAAeWeOefVhTl. 04.02.2011

Meyer, V.R.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 8. Aufl. Frankfurt/ Main: Salle & Sauerländer, 1999

Muralikrishna, G.; Tharanathan, R.N.: Characterization of pectic polysaccharides from pulse husks. *Food Chemistry* (1994), Nr. 50, S. 87-89

Paulus, C.: Isolation and quantification of cell wall components in cucumber cultivars for the purpose of food processing. Hochschule Neubrandenburg. Neubrandenburg: Masterprojekt, 2010

Pektowin: Gospodarcza, O.W.: Niederveresterte amidierete Pektine: Einführung. www.pektowin.com.pl/images/nisko5.gif. 11.01.2010

Rattmann, C.: Säulenwahl zur Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial: Telefonat. Idstein/Neubrandenburg, 19.01.2011

Ridley, B.L.; O'Neill, M.A.; Mohnen, D.: Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry* (2001), Nr. 57, S. 929-967

Schols, H.A.; Visser, R.G.F.; Voragen, A.G.J.: Pectins and Pectinases. 1. Auflage. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2009

Scientific Instruments Manufacturer GmbH: Temperierbarer Fluoreszenzdetektor. 11.01.2010
http://www.sim-gmbh.de/index.php?option=com_content&task=view&id=66&Itemid=513.

Sigma-Aldrich, Inc: StratoSpheres™ PL-PS/DVB resin.
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=547581|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPECi. 04.02.2011

Sila, D.N.: Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part II – Structure-Functions Relationship. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2009), Nr. 8, S. 86-104

Smith, A.; Ng, A.; Waldron, K.W.: Effect of tissue type and variety on cell wall chemistry of onion. *Food Chemistry* (1998), Nr. 1, Vol. 63, S. 17-24

Strasser, M.: Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysesysteme. Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Basel: Dissertation, 2002

Surmann, P.: Elektrochemische Detektoren in der HPLC. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* (1983), Nr. 316, S. 373-381

Tosoh Bioscience LLC: Ion Exchange Chromatography: TSK gel Sugar AXI. <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/HPLCColumns/IonExchange/AnionExchange/TSKgelSugarAXI.htm>. 21.01.2011

Unger, K.K.: *Handbuch der HPLC Teil 1*. 1. Aufl. Darmstadt: GIT, 1989

Van Buren, J.P.: The Chemistry of Texture in Fruits and Vegetables. *Journal of Texture Studies* (1979), Nr. 10, S. 1-23

Waters Corporation: Sugar-Pak I Column: Care and Use Manual. Mai 2008. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat085454.pdf>. 21.01.2011

Weber, A.R.: Säulenwahl zur Bestimmung von Galakturonsäure in pflanzlichem Zellwandmaterial: E-Mail. Bonaduz/Neubrandenburg, 20.01.2011

Willats, W.G.T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J.P.: Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* (2001), Nr. 47, S. 9-27

Wittenburg, H.; Jentsch, W.: Zur Bestimmung von Pektin in Futtermitteln, Kot- und Chymusproben und zur Verdaulichkeit von Pektin. *Die Nahrung* (1990), Nr. 34, S- 289- 291

Wood, W.A.; Kellogg, S.T.: *Methods in Enzymology: Biomass Lignin, Pectin, Chitin*. 161. Aufl. San Diego: Academic Press, 1988

8 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau der pflanzlichen Zellwand.....	5
Abbildung 2: Aufbau des Pektins.....	6
Abbildung 3: Strukturformel von Galakturonsäure	7
Abbildung 4: Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	9
Abbildung 5: Strukturformel von PS-DVB.....	23
Abbildung 6: Strukturformel von DVB	23
Abbildung 7: Chromatogramm der Standardeinspritzung (200 µg/ml).....	29
Abbildung 8: Kalibrierfunktion mit Monogalakturonsäure	30
Abbildung 9: Chromatogramm vom Fließmittel.....	47
Abbildung 10: Chromatogramm von GalA in Reinstwasser (50 µg/ml).....	48
Abbildung 11: Chromatogramm von GalA in Fließmittel (5 µg/ml).....	49
Abbildung 12: Chromatogramm von GalA (200 µg/ml) mit Carbopac PA1.....	50

9 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Angaben zu den Gurkenchargen der Carl Kühne KG.....	15
Tabelle 2: Detektorprogramm	18
Tabelle 3: Vergleich der verwendeten Trennsäulen.....	22
Tabelle 4: Vergleich der eingesetzten Detektoren	25
Tabelle 5: Versuchsplan mit der RCX-30-Säule (Hamilton).....	26
Tabelle 6: Vergleich der Trennsäulen RCX-30 (Hamilton) und Carbopac PA1 (Dionex).....	28
Tabelle 7: Untersuchungsbedingungen mit der Carbopac PA1 (Dionex).....	29
Tabelle 8: Gehalt an Galakturonsäure im Untersuchungsmaterial.....	30
Tabelle 9: Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC im Überblick	44
Tabelle 10: Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC im Überblick - Erweiterung	45
Tabelle 11: Angaben zum Untersuchungsmaterial der Charge ZG 21 15:41	51
Tabelle 12: Extinktionen der Standardlösungen	51
Tabelle 13: Extinktionen der Probe.....	51

10 Verzeichnis der Gleichungen

Gleichung 1: allgemeine Form der Standardfunktion.....	19
Gleichung 2: Berechnung der GalA pro AIS	20
Gleichung 3: Berechnung der GalA pro Gurke.....	20
Gleichung 4: Standardfunktion.....	30

12 Anlagen

Anlage 1 Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC

Tabelle 9: Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC im Überblick

	HPLC-PAD - isokratisch mit Natronlauge	HPLC-RID - isokratisch mit Calcium-Dinatrium- EDTA	HPAEC-FLD - isokratisch mit Borsäure
Verfasser	Kressmann (2001)	Chen et al. (2003)	Burana-osot et al. (2010)
Basisuntersuchung	Patz et al. (1993)	n.a.	Toyoda et al. (1988)
Probenmaterial	schwarze Johannisbeeren	grüner Tee	Pomelopektin
Probenvorbereitung	AIS und Saeman- Hydrolyse	AIS, Fraktionierung und Hydrolyse mit Schwefelsäure	AIS und Hydrolyse mit TFA
Analyse	HPLC	HPLC	HPAEC mit Nachsäulenderivatisie- rung
Injektionsvolumen	25 µl	20 µl	n.a.
Säule	Carbopac PA100 mit Vorsäule	Sugar-Pak I	TSK gel Sugar AXI
Detektor	PAD	RID	FLD (331 nm)
Säulenofen	20 °C	90 °C	70 °C
Eluent	400 mM NaOH	1 mM Calcium- Dinatrium-EDTA	0,5 M Borsäure
Quantifizierung	externer Standard (30 – 40 µg/ml)	externer Standard (100 - 4000 µg/ml)	externer Standard (5 – 100 µg/ml)
Trennung	isokratisch	isokratisch	isokratisch
Flussrate	1 ml/ min	0,6 ml/min	0,5 ml/ min
Retentionszeit GalA	10,5 min	4 min	35 min
Anteil an GalA im Probenmaterial	26 Gew%	50 %	76,9 Gew%

Tabelle 10: Methoden zur Bestimmung von Galakturonsäure mittels HPLC im Überblick - Erweiterung

	HPAEC-PAD - linearer Gradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Kaliumoxalat
Verfasser	Burana-osot et al. (2010)	Coenen (2007)	Koswig et al. (1997)	Hotchkiss et al. (1996)
Basisuntersuchung	n.a.	De Ruiter (1992)	Garleb et al. (1989)	n.a.
Probenmaterial	Pomelopektin	Apfelpektin	Dickungsmittel in Fruchtsaft	Pfirsichpektin
Probenvorbereitung	AIS und Hydrolyse mit TFA	Hydrolyse mit Salzsäure und TFA	AIS und Hydrolyse mit Schwefelsäure	Hydrolyse mit Salzsäure
Analyse	HPAEC-PAD	HPAEC	HPAEC-PAD	HPAEC-PAD
Injektionsvolumen	10 µl	n.a.	50 µl	n.a.
Säule	Carbopac PA1 mit Vorsäule	Carbopac PA1 mit Vorsäule	2 x Carbopac PA100 mit Vorsäule	Carbopac PA1 mit Vorsäule
Detektor	PAD	PAD	PAD	PAD
Säulenofen	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Eluent	0-150 mM NaAc in 100 mM NaOH	A 30 mM NaOH B 30-100 mM NaOH C 0-500 mM NaAc in 0,1 M NaOH	A dest. Wasser B 1 M NaOH C 0,5 M NaAc D 0,1 M NaOH	25-500 mM Kaliumoxalat

	HPAEC-PAD - linearer Gradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Natriumacetat und Natronlauge	HPAEC-PAD - Stufengradient mit Kaliumoxalat
Quantifizierung	externer Standard (50 – 300 µg/ml)	n.a.	externer Standard (3,3 µg/ml)	n.a.
Trennung	linearer Gradient	Stufengradient	Stufengradient	Stufengradient
Flussrate	1 ml/ min	1 ml/min	0,7 ml/ min	n.a.
Retentionszeit GalA	n.a.	15 min	60 min	n.a.
Anteil an GalA im Probenmaterial	63,6 Gew%	42 mol%	31,9 % in Apfelpektin; 8,3 % in Traganth	n.a.

Anlage 2 Chromatogramme zu den Versuchen

Report date: 17.01.2011 13:26:55
 Printed by: Admin

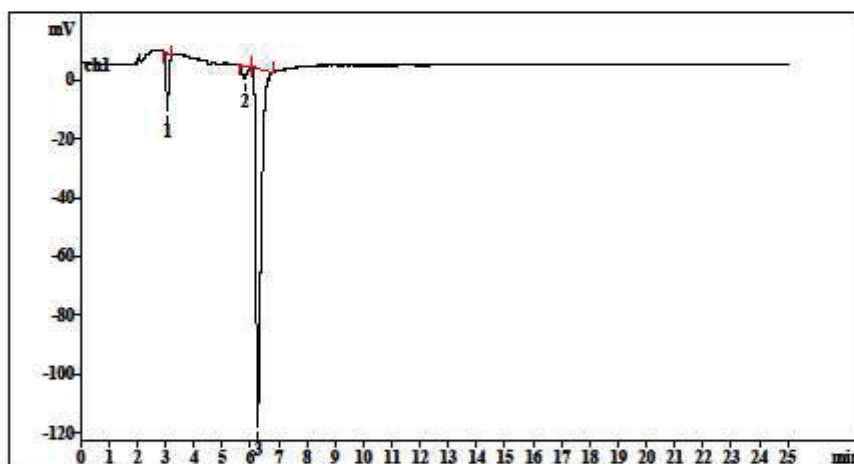
Ident: Bioquant
 Analysis from: 13.01.2011 09:03:35
 File: 110113090335
 Last save: 13.01.2011 09:50:06

Manual peaks:
 Method: bioquant.mtw
 Run operator: Admin
 Last save: 12.01.2011 14:46:05
 Analysis number: 773

SAMPLE:
 Vial number: 3
 Volume: 10.0 µl
 Dilution: 1.00
 Amount: 1.0000

COLUMN:
 Size: 2.0 x 60 mm
 Number:
 Part.size: 5.0 µm

ELUENT:
 Flow: 1.00 mL/min
 Temperature: 20.0°C
 Pressure: 6.6 MPa



Quantitation method: Custom

No	Retention min	Height mV	Area mV*sec	Conc.	Name
1	3.06	-19.10	-121.164	12.12	Peak1
2	5.80	-4.21	-48.208	4.82	Peak2
3	6.27	-122.03	-1448.694	144.87	Peak3
3	25.00	145.34	1618.065	161.81	

This report has been created by McDACq32 Control Center
 BISCHOPF Chromatography GmbH

Abbildung 9: Chromatogramm vom Fließmittel

Report date: 17.01.2011 13:24:15
 Printed by: Admin

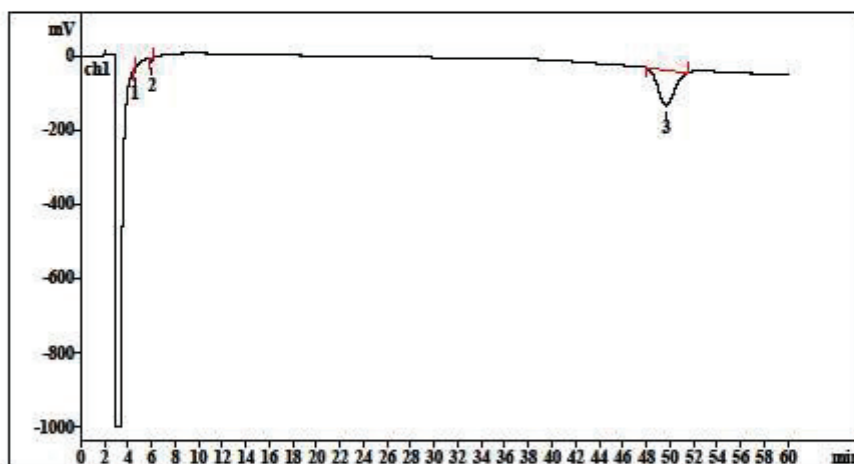
Ident: Galacturonsäure
 Analysis from: 13.01.2011 14:02:23
 File: 110113140223 Last save: 13.01.2011 16:02:11

Manual peaks:
 Method: bioquant.mtw Last save: 13.01.2011 09:50:11
 Run operator: Admin
 Analysis number: 775

SAMPLE:
 Vial number: 3
 Volume: 10.0 µl
 Dilution: 1.00
 Amount: 1.0000

COLUMN:
 Size: 2.0 x 60 mm
 Number:
 Part.size: 5.0 µm

ELUENT:
 Flow: 1.00 mL/min
 Temperature: 20.0°C
 Pressure: 6.6 MPa



Quantitation method: Custom

No	Retention min	Height mV	Area mV*sec	Conc.	Name
1	4.54	-7.05	-55.380	0.00	
2	6.05	-10.18	-110.524	11.05	Peak2
3	49.68	-95.93	-9077.198	0.00	
3	60.00	113.15	9243.102	11.05	

This report has been created by McDACq32 Control Center
 BISCHOPF Chromatography GmbH

Abbildung 10: Chromatogramm von GalA in Reinstwasser (50 µg/ml)

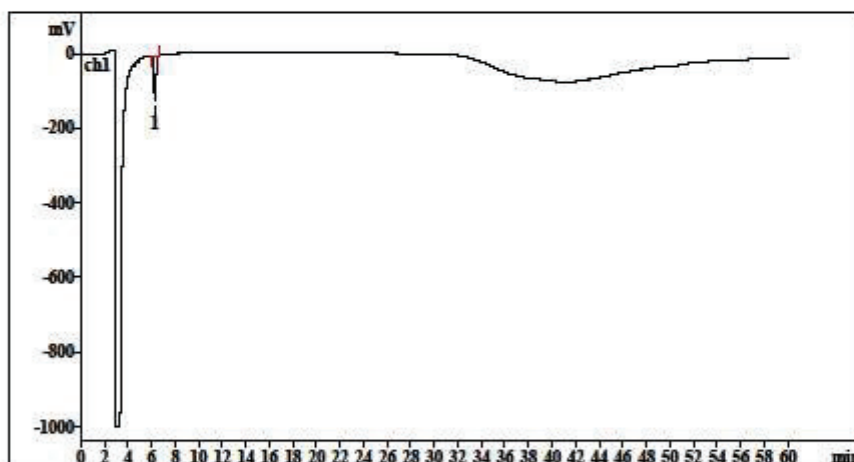
Report date: 17.01.2011 13:25:22
 Printed by: Admin

Ident: Galacturonsäure 5mg in NaOH
 Analysis from: 14.01.2011 10:57:12
 File: 110114105712 Last save: 14.01.2011 11:59:21
 Manual peaks:
 Method: bioquant.mtw Last save: 13.01.2011 16:07:16
 Run operator: Admin
 Analysis number: 779

SAMPLE:
 Vial number: 5
 Volume: 20.0 µl
 Dilution: 1.00
 Amount: 1.0000

COLUMN:
 Size: 2.0 x 60 mm
 Number:
 Part.size: 5.0 µm

ELUENT:
 Flow: 1.00 mL/min
 Temperature: 20.0°C
 Pressure: 6.9 MPa



Quantitation method: Custom

No	Retention min	Height mV	Area mV*sec	Conc.	Name
1	6.29	-118.70	-1348.221	67.41	Peak3

This report has been created by McDACq32 Control Center
 BISCHOPF Chromatography GmbH

Abbildung 11: Chromatogramm von GalA in Fließmittel (5 µg/ml)

Report date: 11.02.2011 10:37:50
 Printed by: Admin

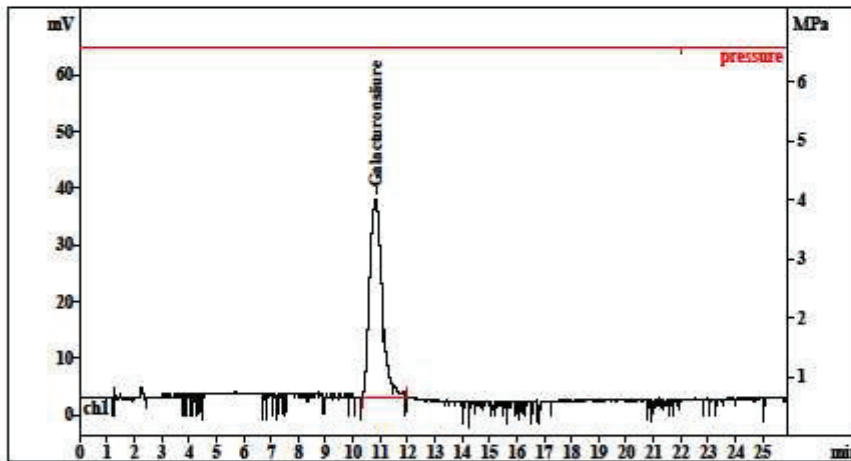
Ident: BQ Galacturonsäure 200 mg/l
 Analysis from: 10.02.2011 15:34:10
 File: 110210153410 Last save: 10.02.2011 16:00:04
 Modified: Manual peaks!
 Method: bioquant.mtw Last save: 10.02.2011 12:54:09
 Run operator: Admin
 Analysis number: 938

SAMPLE: FM 400mM NaOH 1ml/min
 : 30°C BQ
 Vial number: 5
 Volume: 20.0 µl
 Dilution: 1.00
 Amount: 1.0000

COLUMN:
 Size: 2.0 x 60 mm
 Number:
 Part.size: 5.0 µm

ELUENT:

Flow: 1.00 mL/min
 Temperature: 20.0°C
 Pressure: 6.6 MPa



Quantitation method: Custom

No	Retention min	Height mV	Area mV*sec	Conc. mg/l	Name
1	10.83	34.78	1108.656	55.43	Galacturonsäure

This report has been created by McDACq32 Control Center
 BISCHOPF Chromatography GmbH

Abbildung 12: Chromatogramm von GalA (200 µg/ml) mit CarboPac PA1

Anlage 3 Ergebnisse der Referenzmethode

Tabelle 11: Angaben zum Untersuchungsmaterial der Charge ZG 21 15:41

Einwaage frische Gurken [g]	TS [%]	Einwaage AIS [g]	Auswaage AIS [g]
318,37	9,43	30,022	8,17

Tabelle 12: Extinktionen der Standardlösungen

Konzentration des Standards	Extinktion
100 µg/ml	0,144
500 µg/ml	0,445
1000 µg/ml	0,757

Tabelle 13: Extinktionen der Probe

	Einwaage AIS [mg]	Extinktion
ZG 21_1	4,6	0,261
ZG 21_2	5,4	0,327

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Sabine Kranzow