

Entwicklung und Vergleich von Methoden zur Charakterisierung von Fruktanen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt
von
Ulrich Breit
Kiel 2008

Referent:

Prof. Dr. W. Blaschek

Korreferent:

PD Dr. B. Classen

Tage der mündlichen Prüfungen:

4.11.; 10.11. und 11.11.2008

Zum Druck genehmigt:

12.11.2008

Prof. Dr. Lutz Kipp

(Dekan)

m.F.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	1
1.1	Struktur von Fruktanen	1
1.2	Synthese und Gewinnung von Fruktanen	2
1.2.1	Biosynthese und physiologische Funktion in Pflanzen	2
1.2.2	Synthese in Bakterien, Pilzen, und mit rekombinant hergestellten Enzymen	3
1.2.3	Gewinnung von Fruktanen mit definiertem DP-Bereich	3
1.3	Anwendung und Eigenschaften von Fruktanen im menschlichen Organismus	4
1.3.1	Fruktanmetabolismus im menschlichen Körper	4
1.3.2	Einfluss von Fruktanen auf die Darmflora	5
1.3.3	Laxierender Effekt von Inulinen	5
1.3.4	Einfluss von Inulinen auf die Mineralstoff-Absorption	6
1.3.5	Einfluss von Inulinen auf den Blutzuckerspiegel	6
1.3.6	Einfluss von Inulinen auf den Fettstoffwechsel	6
1.3.7	Einfluss von Inulinen auf die Entstehung von Dickdarmkrebs	7
1.4	Anwendung und Eigenschaften von Fruktanen im Lebensmittel-Bereich	7
1.5	Analytik von Fruktanen	8
1.5.1	High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)	8
1.5.1.1	Grundlagen der HPLC	8
1.5.1.2	Anwendung der HPLC in der Fruktananalytik	9
1.5.2	Hochleistungs-Ionenausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer-Detektion (HPAEC-PAD) Dionex® Analytik	9
1.5.2.1	Grundlagen der HPAEC-PAD-Methode	9
1.5.2.2	Anwendung der HPAEC-PAD-Methode	10
1.5.3	Gel-Permeations-Chromatographie (GPC/SEC)	11
1.5.3.1	Grundlagen der GPC	11

1.5.3.2	Anwendung der GPC in der Fruktananalytik	11
1.5.4	Gaschromatographie (GC)	11
1.5.4.1	Grundlagen der GC	11
1.5.4.2	Anwendungen der GC in der Fruktananalytik	12
1.5.5	Dünnschichtchromatographie (DC/TLC)	12
1.5.5.1	Grundlagen der DC	12
1.5.5.2	Anwendungen der DC in der Fruktananalytik	13
1.5.6	Nuclear-magnetic-resonance (NMR) Spektroskopie	13
1.5.6.1	Grundlagen der NMR Spektroskopie	13
1.5.6.2	Anwendungen der NMR Spektroskopie in der Fruktananalytik	14
1.5.7	AOAC-Methode	14
1.5.7.1	Grundlagen der AOAC-Methode	14
1.5.7.2	Anwendungen der AOAC-Methode in der Fruktananalytik	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Colorimetrische Gesamtfruktanbestimmung	16
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial	16
2.1.2	Geräte	16
2.1.3	Kalibrierung	17
2.1.4	Wiederfindung, Bestimmungsgrenze und Negativkontrolle	17
2.1.5	Extraktion von <i>Echinaceae purpureae radix</i>	17
2.1.6	Gerbstoffentfernung	18
2.1.6.1	Gerbstofffällung mit Bleiacetatlösung	18
2.1.6.2	Gerbstoffentfernung mit Aktivkohle	18
2.1.6.3	Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen	18
2.1.7	Ethanol-fällung	19
2.1.8	Colorimetrie	19
2.2	Fraktionieren von Fruktangemischen	20
2.2.1	Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial	20
2.2.2	Geräte	20
2.2.3	Fraktionierung durch unterschiedliche Löslichkeit	21
2.2.4	Fragmentierung durch Hitzespaltung	22

2.3	Bestimmung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades mittels GC-Analytik	22
2.3.1	Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial	22
2.3.2	Geräte	22
2.3.3	Derivatisierung	23
2.3.3.1	Hydrolyse	23
2.3.3.2	Oxim-Bildung	23
2.3.3.3	Silylierung	23
2.3.4	GC-Anlage	24
2.4	HPLC-Analytik	24
2.4.1	Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial	24
2.4.2	Geräte	25
2.4.3	HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane	26
2.4.3.1	HPLC-Anlage	26
2.4.3.2	Probenvorbereitung	26
2.4.3.3	Bestimmung der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Glukose und Fruktose	27
2.4.4	HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane	27
2.4.4.1	HPLC-Analytik mit vorheriger Acetylierung der Proben	27
2.4.4.2	HPLC-Analytik mit FITC Vorsäulenderivatisierung	27
2.4.4.2.1	HPLC-Anlage	27
2.4.4.2.2	Derivatisierung	28
2.4.4.3	HPLC-Analytik mit Guanidin Nachsäulenderivatisierung	30
2.4.4.3.1	Vorversuche mit Plattenreader	30
2.4.4.3.2	HPLC Anlage	30
2.4.4.3.3	Probenvorbereitung	32
2.5	HPAEC-PAD (Dionex®) Analytik	32
2.5.1	HPAEC-PAD Anlage	32
2.5.2	Stabilitätsuntersuchungen	33
2.5.2.1	Auswahl der Drogen, Lagerungsbedingungen und Untersuchungsintervalle	33
2.5.2.2	Probenvorbereitung	34
2.6	GPC-Analytik	35
2.6.1	Chemikalien	35
2.6.2	Geräte	35
2.6.3	GPC-Anlage	35
2.6.4	Probenvorbereitung	36

3.	Ergebnisse	37
3.1	Colorimetrische Gesamfruktanbestimmung	37
3.1.1	Kalibrierung	38
3.1.2	Nachweisgrenze von Fruktose in Inulin (<i>Dahlia</i>)	39
3.1.3	Überprüfung der Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	40
3.1.3.1	Vierfachbestimmung der Inulinkonzentration 15 µg/100 µl	41
3.1.3.2	Messung über fünf Tage	41
3.1.3.3	Negativkontrolle mit Arabinose	42
3.1.4	Extraktion von <i>Echinaceae purpureae radix</i> und Ermittlung des Fruktangehaltes in der Probe	42
3.1.4.1	Colorimetrische Vermessung der Fruktanprobe aus <i>Echinaceae purpureae radix</i> nach Gerbstofffällung mit Bleiacetat	42
3.1.4.2	Berechnung der Ausbeute und des Fruktangehaltes in der Droge	43
3.1.5	Colorimetrische Vermessung von Inulin (<i>Dahlia</i>) nach Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen	44
3.2	Fraktionieren von Fruktangemischen	45
3.2.1	Fraktionieren durch Lösen in unterschiedlichen Ethanol-Wasser-Gemischen	45
3.2.1.1	Versuchsreihe 1: Ethanolfraktionen zwischen 96 % und 0 %	45
3.2.1.1.1	Einwaagen und Ausbeute	45
3.2.1.1.2	DP-Bestimmung	45
3.2.1.2	Versuchsreihe 2: Feinere, sequentielle Lösung der Fruktane, durch kleinere Ethanolkonzentrationsunterschiede zwischen 40 % und 0 %	47
3.2.1.2.1	Einwaagen und Ausbeute	47
3.2.1.2.2	DP-Bestimmung	47
3.2.1.3	Versuchsreihe 3: Fraktioniertes Lösen von reinem Inulin 5000 mit Ethanolfraktionen zwischen 80 % und 0 %	48
3.2.1.3.1	Einwaagen und Ausbeute	48
3.2.1.3.2	DP-Bestimmung	49
3.2.2	Fraktionieren durch Lösen in unterschiedlichen Isopropanol-Wasser-Gemischen	50
3.2.2.1	Einwaagen und Ausbeute	50
3.2.2.2	DP-Bestimmung	51
3.2.3	Fraktionieren durch Lösen in unterschiedlichen Aceton-Wasser-Gemischen	52
3.2.3.1	Einwaagen und Ausbeute	52
3.2.3.2	DP-Bestimmung	53
3.2.4	Fraktionieren durch Lösen in unterschiedlichen Acetonitril-Wasser-Gemischen	54
3.2.4.1	Einwaagen und Ausbeute der Versuchsreihe 1 und 2	54
3.2.4.2	DP-Bestimmung	55

3.3	HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane	58
3.3.1	Trennung von Fruktanen auf einer C-18-Säule mit PDA-Detektion	58
3.3.2	Trennung von Fruktanen auf einer Amino-Säule mit RI-Detektion	59
3.3.2.1	Bestimmung der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Glukose und Fruktose auf einer Phenomenex Luna Amino [®] -Säule	59
3.3.2.2	Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Glukose und Fruktose auf einer Phenomenex Luna Amino [®] -Säule	63
3.3.2.3	Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Inulin 5000 auf einer Phenomenex Luna Amino [®] -Säule	64
3.3.2.4	Zuordnung der Peaks zu ihrem Polymerisationsgrad	66
3.3.3	Inulin-Analytik mit zwei hintereinander geschalteten Phenomenex Luna Amino [®] -Säulen	70
3.3.4	Analytik von fraktionierten Fruktangemischen auf einer Phenomenex Luna Amino [®] -Säule	72
3.3.5	Analytik von fragmentierten Fruktangemischen auf einer Phenomenex Luna Amino [®] -Säule	76
3.3.6	Vergleich von zwei Säulen mit Aminophasen von unterschiedlichen Herstellern	78
3.4	HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane	80
3.4.1	Trennung von Fruktanen auf einer C-18-Säule mit PDA-Detektion nach vorheriger Acetylierung der Proben	80
3.4.1.1	Isokratische HPLC-Methode	80
3.4.1.2	Gradienten HPLC-Methode	82
3.4.1.2.1	Trennung von Maltooligosacchariden	82
3.4.1.2.2	Trennung von Inulin (<i>Dahlia</i>)	84
3.4.2	Trennung von Fruktanen über eine Luna Amino [®] -Säule mit Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Markierung mit FITC	86
3.4.3	Trennung von Fruktanen über eine C-18-RP-Säule mit Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Markierung mit FITC	89
3.4.3.1	Isokratische Acetonitril/Wasser Mischungen als mobile Phase	89
3.4.3.2	Isokratische Methanol/Wasser Mischungen als mobile Phase	91
3.4.3.3	Methanol/Wasser Gradient als mobile Phase	94
3.4.4	Trennung von Fruktanen über eine Luna Amino [®] -Säule mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion	97
3.4.4.1	Vorversuche mit Plattenreader	97
3.4.4.1.1	Konzentrationsabhängigkeit	97
3.4.4.1.2	Temperaturabhängigkeit	98
3.4.4.1.3	Zeitabhängigkeit	99
3.4.4.2	Vermessung von Fruktanen auf einer HPLC-Anlage mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung auf einer Luna Amino [®] -Säule	100
3.4.4.2.1	Überprüfung der HPLC-Methode mit Glukose	100

3.4.4.2.2	Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Inulin 5000 mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung auf Luna Amino [®] -Säule	102
3.4.4.2.3	Vermessung von fraktionierten Fruktangemischen auf einer Luna Amino [®] -Säule mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung	103
3.5	HPAEC-PAD (Dionex[®]) Analytik	108
3.6	GPC-Analytik	116
3.7	Stabilitätsuntersuchungen	119
4.	Diskussion	122
4.1	Diskussion der colorimetrischen Untersuchungen	122
4.2	Diskussion der Fraktionierung von Fruktangemischen	124
4.3	Diskussion der HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane	127
4.4	Diskussion der HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane	132
4.5	Diskussion der GPC-Analytik	136
4.6	Abschließende Betrachtung der Möglichkeiten der Fruktananalytik	137
5.	Zusammenfassung und Ausblick	140
A.	Literaturverzeichnis	144
B.	Abkürzungsverzeichnis	150
C.	Danksagung	153

1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Struktur von Fruktanen

Fruktane sind Polysaccharide, die aus unterschiedlich langen Fruktosemolekülketten bestehen. Meistens befindet sich an einem Molekülende eine Glukose, da die Biosynthese der Fruktankette mit einer Saccharose startet. In Abbildung 1.1 ist der grundsätzliche Aufbau dargestellt.

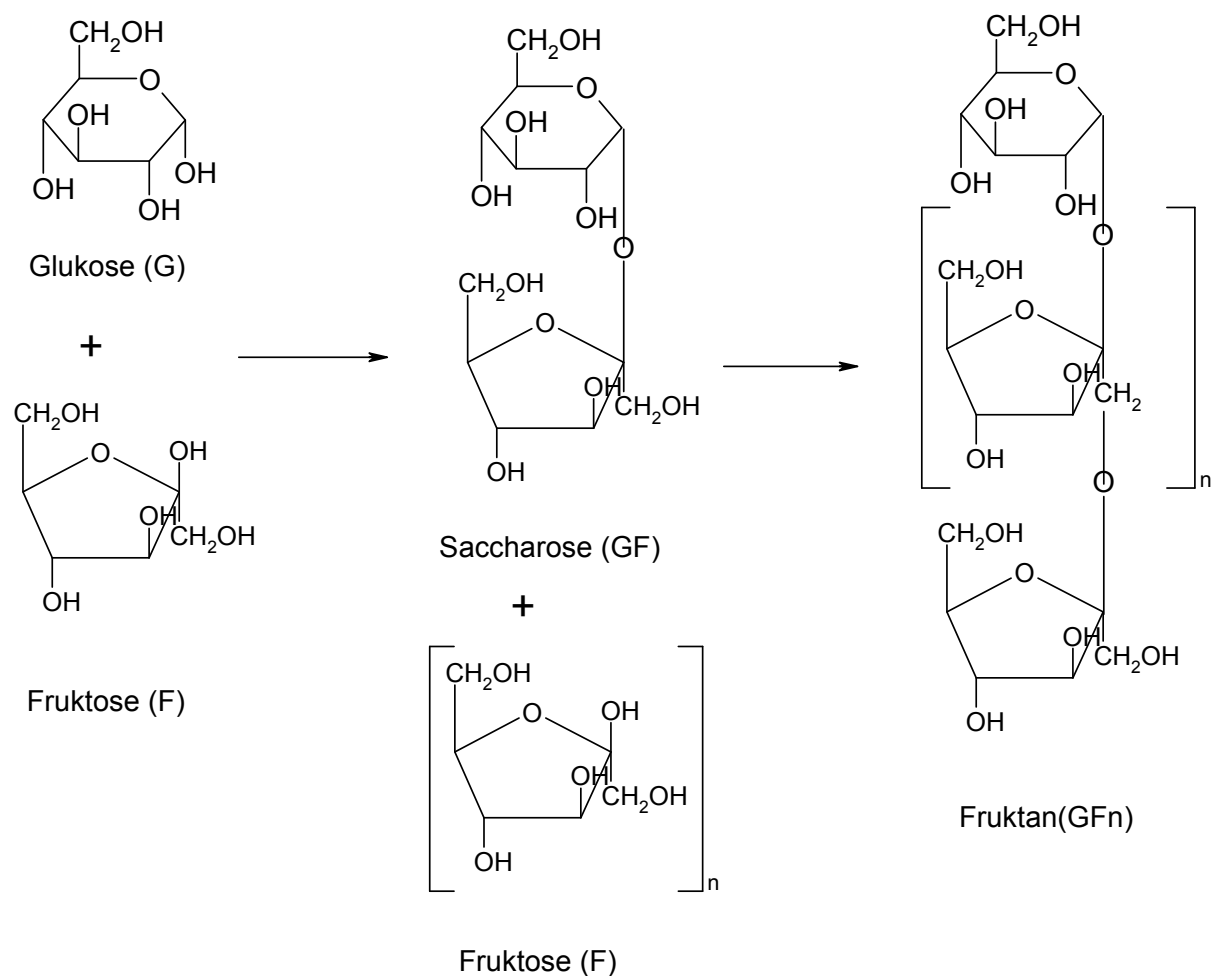


Abbildung 1.1 Darstellung des grundsätzlichen molekularen Aufbaus von Fruktanen

Fruktane im Oligosaccharid-Bereich (zwischen zwei und neun Monomeren) werden oft als Fruktooligosaccharide (FOS) bezeichnet.

Fruktane, die im Polysaccharidbereich liegen (ab 10 Monomere), werden als Inuline [Crittenden und Playne, 1996b] bezeichnet, sie sind linear β -2,1-verknüpft und scheinen eine helikale Struktur zu haben [Beck und Praznik, 1986]. Inuline sind z. B.

bei Korbblütlern (*Asteraceae*) weit verbreitet. Es gibt auch noch β -2,6-verknüpfte Fruktanketten, welche als Levane bezeichnet werden [Kaur und Gupta, 2002] und häufig in Gräsern (*Poaceae*) vorkommen.

Befinden sich bei den Inulinen und Levanen noch Glukosemoleküle zwischen den Fruktofuranosylketten, werden diese als „Inulin-Neoserie“ bzw. „Levan-Neoserie“ bezeichnet. Inulin-Neoserie Fruktane sind häufig in Knoblauch und Spargel zu finden. Levan-Neoserie Fruktane findet man z. B. im Hafer. Fruktanpolymere, die β -2,6- und β -2,1-Verknüpfungen in etwa gleichem Verhältnis aufweisen, werden als Graminan Typ bezeichnet und sind im Weizen zu finden [Manicilla-Margalli und Lopez, 2006]. Das Vorkommen von verzweigt-kettigen Fruktan wird diskutiert.

1.2 Synthese und Gewinnung von Fruktanen

1.2.1 Biosynthese und physiologische Funktion in Pflanzen

Pflanzen speichern Fruktane als lösliche Polysaccharide in ihren Vakuolen. Im Gegensatz dazu wird z. B. Stärke als unlösliches Polysaccharid in den Amyloplasten gespeichert. Die Menge an gespeichertem Inulin in der Pflanze kann bis zu 20 % des Gewichts der Frischpflanze, z. B. bei Chicory-Arten, ausmachen. Zur Synthese der Fruktanketten verwendet die Pflanze zwei Enzym-Systeme [Van Laere und Van den Ende, 2002]. Hierbei wird, als Starterreaktion, aus zwei Saccharosemolekülen (GF) mit Hilfe des Enzyms Saccharose:Saccharose 1-Fructosyltransferase ein Trisaccharid, bestehend aus einer Glukoseeinheit (G) und 2 Fruktoseeinheiten (F), und ein Glukosemolekül gewonnen. Das Trisaccharid (GFF) wird dann zur Kettenverlängerung mit einem weiteren Saccharosemolekül und dem Enzym Fruktose:Fruktose 1-Fructosyltransferase um eine Fruktoseeinheit verlängert. Dabei entstehen ein Tetrasaccharid (GFFF) und eine weitere Glukose. Auf diese Weise werden immer weitere Fruktoseeinheiten angehängt bis Inulin (GF_n) entsteht. Die genauen physiologischen Funktionen von Fruktanen in der Pflanze sind noch weitgehend ungeklärt. Sicher ist die Nutzung als Reservepolysaccharid. Jedoch werden auch die Funktion als Gefrierschutz und die Regulierung des osmotischen Drucks diskutiert.

1.2.2 Synthese in Bakterien, Pilzen, und mit rekombinant hergestellten Enzymen

Einige Bakterienstämme wie z. B. *Weissella cibaria* und *Lactobacillus plantarum* [Di cagno *et al.*, 2006] oder *Lactobacillus reuteri* [van Hijum *et al.*, 2002] können Fruktane produzieren. Dabei können FOS, Inuline, Levane usw. produziert werden. Die Bakterien synthetisieren Fruktane meist als Exopolysaccharide (EPS), die Teile ihrer Zelloberfläche darstellen und die sie unter anderem vor Austrocknung und Phagozytose schützen. Die beteiligten Enzyme werden allgemein als Fruktosyltransferasen bezeichnet und je nachdem, welches Fruktan aufgebaut wird, noch einmal in Inulinasen und Levanasen unterschieden.

Es gibt auch eine ganze Reihe von Pilzen, z. B. verschiedene Aspergillusarten wie *Aspergillus japonicus*, die in der Lage sind, Fruktosyltransferasen zu produzieren. Auch hier ist die Struktur-Variabilität der synthetisierten Fruktane sehr groß.

Man versucht, diese Bakterien- und Pilzenzyme rekombinant herzustellen, um so noch gezielter ganz bestimmte Fruktantypen mit definierten DP's produzieren zu können [Trujillo *et al.*, 2001].

1.2.3 Gewinnung von Fruktanen mit definiertem DP-Bereichen

Für viele Anwendungen ist es wichtig, Fruktane mit einem bestimmten DP zu erhalten. Dazu gibt es die im Folgenden aufgelisteten Möglichkeiten:

- 1.) eine gezielte Synthese von Fruktanen (s. Kap. 1.2.2)
- 2.) die Herstellung von Fruktanen mit einem bestimmten DP über einen gezielten Abbau von hochmolekularen Fruktanen. Dies wird z. B. durch die Behandlung von hochmolekularen Fruktanen mit Hitze erreicht [Böhm *et al.*, 2004], (s. auch Kap 2.3.5.)
- 3.) der Einsatz von Inulinasen für eine kontrollierte enzymatische Hydrolyse [Crittenden und Playne, 1996] von Inulinen
- 4.) Chromatographische Verfahren wie z. B. die GPC zur präparativen Gewinnung von Fruktanen mit definierten DP-Bereichen [Finke *et al.*, 2002]

- 5.) die Fällung von Fruktanfraktionen aus Fruktangemischen mit z.B. Ethanol/Wasser Mischungen [Ku *et al.*, 2003]
- 6.) fraktioniertes Lösen von Inulinen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, eine Methode die in dieser Arbeit erstmalig etabliert wurde (s. Kap. 3.2)

1.3 Anwendung und Eigenschaften von Fruktanen im menschlichen Organismus

Die Anwendungsgebiete von Fruktanen sind sehr vielfältig. Sie werden in der Lebensmittelindustrie und als Arzneimittel eingesetzt. Nachfolgend soll auf einige wichtige Eigenschaften und Anwendungsgebiete eingegangen werden.

1.3.1 Fruktanmetabolismus im menschlichen Körper

Fruktane sind für den Menschen unverdauliche Polysaccharide. Ähnlich wie dem Menschen die β -Amylase fehlt, um die β -1,4-Verbindungen zwischen den Glukose-Monomeren der Cellulose zu spalten, fehlt auch das Enzymbesteck, um die β -2,1- oder β -2,6-Verbindungen zwischen den Fruktose-Monomeren zu spalten. Damit können Fruktane auch nicht in den oberen Darmabschnitten resorbiert werden. Jedoch können die Bakterien im menschlichen Colon, wie z. B. *Bifidobakterien* oder *Lactobacillus*-Arten, Fruktane spalten und zu kurzkettigen Fettsäuren umwandeln [Durieux *et al.*, 2001]. Bei Fruktan-Einnahmen von 5 bis 15 g/Tag können keine Fruktane im Stuhl nachgewiesen werden, d. h. sie werden vollständig fermentiert. Da die Fruktane in den oberen Darmabschnitten nicht verdaut werden können, haben sie einen deutlich niedrigeren physiologischen Brennwert als z. B. Stärke mit ca. 4 kcal/g. Jedoch liefern kurzkettigen Fettsäuren, entstanden durch die Fermentierung im Dickdarm, Energie, die allerdings mit ca. 1 kcal/g deutlich geringer als die der Stärke ist.

1.3.2 Einfluss von Fruktanen auf die Darmflora

Die Darmflora des Menschen besteht aus vielen Bakterien, die für eine optimale Funktion des Darmes verantwortlich sind. Dabei sollte man nicht nur an die Verdauung denken, sondern z. B. auch an den Schutz vor Infektionen, Schutz vor Krebs, Absorption von Nährstoffen, Stimulierung der Immunabwehr und vieles mehr. Stoffe, die nicht verdaulich sind, welche aber die natürliche Darmflora unterstützen und das Wachstum pathogener Bakterien unterdrücken, werden allgemein als Prebiotika bezeichnet. Inuline eignen sich sehr gut als Prebiotika, deren positive Effekte in der Literatur viel beschrieben sind [Kollida *et al.*, 2002]. In einer doppelt verblindeten, randomisierten, Placebo kontrollierten Studie konnte die Zunahme an den wohl wichtigsten Darmbakterien des Menschen, den *Bifidobakterien*, durch die Gabe von zweimal täglich 2,5 g Inulin klar nachgewiesen werden [Bouhnik *et al.*, 2007]. Die Bedeutung des DP der Inuline ist zwar umstritten, FOS mit einem DP ≤ 10 scheinen jedoch den besten Effekt auf die *Bifidobakterien* zu haben [Robefroid und Delzenne, 1998]. Ein weiterer positiver Effekt ist die Erniedrigung des pH-Wertes durch kurzkettige Fettsäuren wie z. B. Essig- oder Propionsäure, die bei der Fermentation von Inulin durch die Darmbakterien [Durieux *et al.*, 2001] entstehen. Kurzkettige Fettsäuren werden auch für eine mögliche Schutzwirkung vor Darmkrebs verantwortlich gemacht.

1.3.3 Laxierender Effekt von Inulinen

Inulin wird in dem Arzneimittel Laxatan[®], ein Laxans, eingesetzt. Hier soll es neben Macrogol, Magnesium- und Calciumcitrat sowie Kaliumchlorid zur Gesamtwirkung beitragen. Inulin kann pro aufgenommenes Gramm Fruktan das Stuhlgewicht um 2 g erhöhen. Dies liegt im Bereich dessen, was andere lösliche Ballaststoffe wie z. B. Pektine ebenfalls erreichen. Unlösliche Ballaststoffe wie z. B. Kleie können das Stuhlgewicht über fünf Gramm pro aufgenommenes Gramm Ballaststoff erhöhen. Die Stuhlzunahme wird über eine erhöhte Bakterienmasse (s. Kap. 1.3.2) und einen erhöhten Wasseranteil im Stuhl erreicht. Dadurch ergibt sich auch ein weicherer Stuhl. Im Arzneimittel Laxatan[®] dient Inulin allerdings hauptsächlich zur Verbesserung der Darmflora, da die laxierende Wirkung recht gering ist.

1.3.4 Einfluss von Inulinen auf die Mineralstoff-Absorption

Inuline sind in der Lage, die Aufnahme von Mineralstoffen in den Körper zu verbessern. Speziell die Calcium-Absorption wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, da sie für einen gesunden Knochen sehr wichtig ist [Weaver, 2005]. Man nimmt an, dass es durch das Herabsenken des pH-Wertes bei der Fermentation von Inulinen zu einer besseren Löslichkeit der Mineralstoffe kommt und die Mineralstoffe damit im Dickdarm besser absorbiert werden können. So werden Inulin und FOS für die Behandlung der Osteoporose eingesetzt, da sie die Calciumaufnahme um bis zu 20 % steigern und damit für eine deutlich bessere Mineralisierung des Knochens sorgen können [Bosscher *et al.*, 2006].

1.3.5 Einfluss von Inulinen auf den Blutzuckerspiegel

Die genauen Effekte von Inulin auf den Blutzuckerspiegel sind noch nicht bekannt. Es werden unterschiedliche Ansätze diskutiert. Zum einen könnten Inuline die Aufnahme von Kohlenhydraten behindern, indem sie die Transitzeit durch den Gastrointestinaltrakt (GIT) verändern. Bei Ratten konnte solch eine Veränderung im Tierexperiment festgestellt werden [Kaur und Gupta, 2002]. Zum anderen wird auch eine Beeinflussung des hepatischen Glukose-Metabolismus diskutiert. Da Fruktane nicht zu einer glykämischen oder insulinämischen Reaktion beitragen - schließlich entstehen aus ihnen weder Glukose, Fruktose noch Saccharose - können sie in Diabetikerprodukten bedenkenlos eingesetzt werden.

1.3.6 Einfluss von Inulinen auf den Fettstoffwechsel

Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass Inuline den Serumtriglyceridspiegel senken. Es wird vermutet, dass Inuline die *de novo* Synthese von Lipiden in der Leber herabsetzen [Fiordaliso *et al.*, 1995]. Allerdings konnten neuere Langzeituntersuchungen beim Menschen keine signifikanten fettreduzierenden Effekte belegen [Forcheron und Beylot, 2007].

1.3.7 Einfluss von Inulinen auf die Entstehung von Dickdarmkrebs

Die Dickdarmkrebsprotektive Wirkung von Inulinen wird hauptsächlich dadurch erklärt, dass Inuline als Prebiotikum eine gute Wirkung auf die natürliche Darmflora haben. Sie können in hohen Dosen rein physikalisch Kanzerogene binden und mit dem Fäces ausscheiden. Eine sehr wichtige Rolle scheint auch Butyrat zu spielen, eine bei der Fruktanfermentation entstehende kurzkettige Fettsäure [Poole-Zobel, 2005]. Butyrat ist für die Funktion des Darmepithels wichtig und hat über verschiedene Mechanismen eine chemoprotektive Wirkung, die *in vitro* an Darmkrebszelllinien nachgewiesen werden konnte. Allgemein scheinen kurzkettige Fettsäuren einen sehr positiven Einfluss auf die Unterdrückung von Darmkrebs zu haben. Bei Versuchen mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass langkettige Fruktane hingegen einen besseren Einfluss auf die Unterdrückung der Entstehung von Adenomen haben [Poulsen *et al.*, 2002], die Vorstufen von Karzinomen darstellen können.

1.4 Anwendung und Eigenschaften von Fruktanen im Lebensmittel-Bereich

Inuline werden sehr vielfältig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Zum einen wegen ihrer positiven gesundheitlichen Eigenschaften als Nahrungsergänzungsmittel, aber auch wegen ihrer technologischen Eigenschaften. So werden Inuline unter anderem wie folgt eingesetzt:

- o in Backprodukten als Feuchthalter
- o als löslicher Ballaststoff in Getränken
- o als Fettersatzstoff in „low-fat“ Produkten (z. B. Käse, Wurst, Joghurt etc.) indem sie dafür sorgen, dass ein gutes „mouthfeel“ und eine gute Konsistenz auch ohne Fett erhalten bleibt
- o bei Gefrierprodukten sorgt Inulin für eine gute Textur des Produktes, auch im gefrorenen Zustand

- o vor allem langkettige Fruktane haben gute Gelierkraft, so dass sie in manchen Produkten Gelatine ersetzen können
- o in Kombination mit Süßstoffen werden sie als niederkaloriger Zuckeraustauschstoff eingesetzt

Je nach Zweck wird Inulin in Konzentrationen von ca. 2 % bis 75 % verwendet.

1.5 Analytik von Fruktanen

Ein Vergleich der einzelnen Analyseverfahren wird in Kap. 4 diskutiert. Im Folgenden werden die einzelnen Analyseverfahren kurz vorgestellt und erklärt.

1.5.1 High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

1.5.1.1 Grundlagen der HPLC

Die HPLC dient zur Trennung von Substanzgemischen, sowie deren qualitativen und quantitativen Analytik. Hierbei werden die Moleküle aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase getrennt. Die mobile Phase, in welcher der Analyt gelöst wird, wird mit Druck durch eine Säule gepresst. Als stationäre Phase können unterschiedlichste Materialien gewählt werden; entscheidend ist eine möglichst spezifische Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase. Diese können z. B. chirale Wechselwirkungen, Adsorptionsvorgänge, Verteilungsvorgänge u.v.m. sein. Je höher die Affinität eines Analyten zu seiner stationären Phase, und je niedriger sie zu seiner mobilen Phase ist, desto stärker wird er auf der Säule zurückgehalten und desto später wird er eluiert. Über einen Gradienten in der mobilen Phase kann somit die Elution des Analyten beeinflusst werden. [Rücker *et al.*, 2001]. Eine Besonderheit stellt die Ionenaustauschchromatographie dar. Diese wird in Kap. 1.5.2. genauer vorgestellt.

1.5.1.2 Anwendungen der HPLC in der Fruktananalytik

Die HPLC-Analytik wird zur Trennung, Qualifizierung und Quantifizierung von Fruktanen eingesetzt. Bei der HPLC-Analytik wird hauptsächlich die Ionenaustauschchromatographie, hier speziell Dionex[®]-Anlagen, angewendet (s. Kap. 1.5.2). In der HPLC-Analytik wird mit unterschiedlichen stationären Phasen gearbeitet, z. B. C-18-RP-Phasen; Amino-Phasen; gebundenen β -Cyclodextrine.

1.5.2 Hochleistungs-Ionenausch-Chromatographie mit gepulster- amperometrischer-Detektion (HPAEC-PAD) Dionex[®]-Analytik

1.5.2.1 Grundlagen der HPAEC-PAD-Methode

Bei der Ionenaustauschchromatographie wird als stationäre Phase eine mit Kationen- oder Anionentauschern besetzte unlösliche Matrix verwendet. Die Ionen sind salzartig gebunden, so dass sie mit dem Analyten ausgetauscht werden können. In Abb. 1.2 ist dieser Vorgang bei einem Anionentauscher exemplarisch dargestellt.

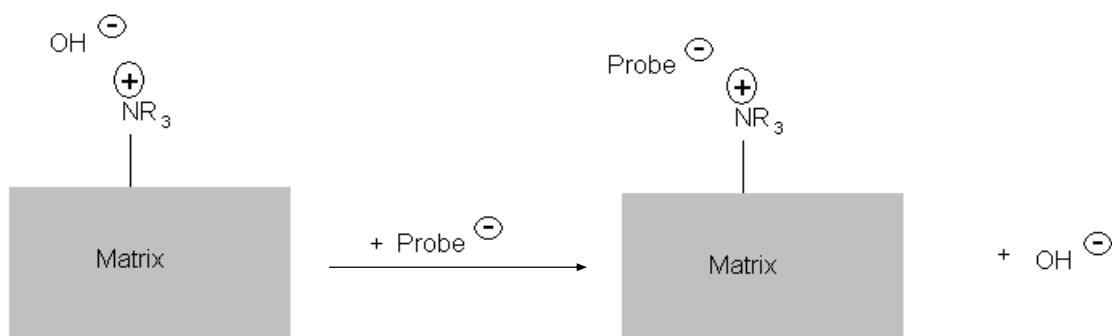


Abbildung 1.2 Darstellung eines Anionentauschers

Der Analyt tritt in Abhängigkeit von Ionenladung und -größe mit dem Hydroxydion in Konkurrenz um die Bindungsstelle. Ionen mit starker Selektivität für den Ionentauscher werden stärker zurückgehalten und eluieren später. Das Gleichgewicht zwischen Analyt und Austauschion kann durch den pH-Wert und die Ionenstärke der mobilen Phase beeinflusst werden; d. h. mit zunehmender Ionen-

stärke in der mobilen Phase wird der Analyt wieder stärker von der Matrix verdrängt und eluiert [Rücker *et al.*, 2001].

Zur Detektion wird im Prinzip ein amperometrisches Messverfahren angewendet. Bei der Amperometrie wird eine feste Zellspannung im Diffusionsgrenzstrombereich angelegt. Normalerweise befindet sich um eine in eine Lösung eingetauchte Elektrode eine Schicht geladener Teilchen des sich an der Elektrode umsetzenden Stoffes. Durch Anlegen einer Spannung werden diese geladenen Teilchen aus der „Diffusionszone“ abgesaugt, wodurch es zu einem Stromfluss kommt. Mit zunehmender Spannung verarmt die Diffusionszone an geladenen Teilchen, da nicht mehr genügend Teilchen schnell genug aus der Lösung nachdiffundieren können, d. h. bei einer weiteren Spannungserhöhung kommt es zu keiner weiteren Erhöhung des Stromflusses. Den Spannungsbereich dazwischen nennt man Diffusionsgrenzstrombereich. Bei gleichbleibender Spannung ändert sich der Diffusionsgrenzstrom in Abhängigkeit der vorhandenen geladenen Teilchen. Dieser Zusammenhang wird nun ausgenutzt, um bei der PAD-Detektion die an der Elektrode oxidierenden Fruktane zu messen. Dabei entstehen an der Elektrode Ablagerungen der Oxidationsprodukte, die die Messung stören. Dies wird durch eine wiederholte Sequenz unterschiedlicher Spannungsimpulse verhindert, die für die Messung des Analyten, die Reinigung und die Reaktivierung der Elektrode geeignet ist. Dieser Vorgang wird als gepulste amperometrische Detektion bezeichnet [Rücker *et al.*, 2001; Strasser, 2002].

1.5.2.2 Anwendungen der HPAEC-PAD-Methode

Diese Methode wird zur Trennung, Qualifizierung und Quantifizierung von Sacchariden jeglicher Art eingesetzt.

1.5.3 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC/SEC)

1.5.3.1 Grundlagen der GPC

Mit Hilfe der GPC (engl. SEC) kann eine Molekulargewichtsbestimmung von Inulingemischen durchgeführt werden. Bei der GPC erfolgt die Trennung nicht wie sonst bei flüssigchromatographischen Verfahren üblich über Wechselwirkungen der Moleküle zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Bei der GPC werden die Moleküle über ihre unterschiedliche Eindringtiefe und -dauer in die Poren der Matrix getrennt. Da bei diesem Verfahren das Molekül mit seiner Hydrathülle gemessen wird, spricht man vom so genannten hydrodynamischen Volumen einer Substanz. Moleküle, die nicht in Poren eindringen können, werden ausgeschlossen und treten als erstes wieder aus der Säule aus. Sie markieren das Ausschlussvolumen. Alle Moleküle, die kleiner als das Ausschlussvolumen sind, können in die Poren eindringen, werden damit aus dem Eluentenstrom entfernt und retinieren erst bei größeren Elutionsvolumina. Je kleiner das Molekül ist, desto tiefer dringt es in die Poren ein und desto später eluiert es [Rücker *et al.*, 2001].

1.5.3.2 Anwendungen der GPC in der Fruktananalytik

Die GPC-Analytik wird hauptsächlich zur Bestimmung des durchschnittlichen Molekulargewichtes und zur Fraktionierung eingesetzt.

1.5.4 Gaschromatographie (GC)

1.5.4.1 Grundlagen der GC

Bei der Gaschromatographie werden Substanzgemische ähnlich wie bei der HPLC qualitativ und quantitativ analysiert. Hierbei werden die Moleküle aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase getrennt. Der Hauptunterschied besteht darin, dass die mobile Phase ein Gas darstellt. Potentielle Analyten müssen darum in der Gasphase vorliegen. Als stationäre Phase können

unterschiedlichste Materialien gewählt werden, entscheidend ist eine möglichst spezifische Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase. Man unterscheidet bei der GC zwischen Festphasenchromatographie, bei der es zwischen Analyt und stationärer Phase zu Adsorptionsvorgängen kommt und Flüssigphasenchromatographie, bei der es zwischen Analyt und stationärer Phase zu Verteilungsvorgängen kommt. Für die GC sind underivatisierte Zucker nicht zugänglich, da sich diese nicht in die Gasphase überführen lassen. Darum muss bei der GC-Analytik von Zuckern immer eine Derivatisierung, z. B. eine Silylierung der OH-Gruppen erfolgen [Wack und Blaschek, 2006].

1.5.4.2 Anwendungen der GC in der Fruktananalytik

Die GC-Analytik wird hauptsächlich zur DP-Bestimmung und Strukturaufklärung von Fruktanen eingesetzt.

1.5.5 Dünnschichtchromatographie (DC/TLC)

1.5.5.1 Grundlagen der DC

Die physikochemischen Grundlagen der DC sind die gleichen wie bei der HPLC. Im Unterschied zur HPLC wird bei der DC kein Druck bei der Entwicklung aufgebaut. Die stationäre Phase wird als dünne Schicht auf einen Träger (DC-Platte) aufgebracht. Die Platten werden dann in eine Kammer mit der mobilen Phase gebracht und entweder aufsteigend oder horizontal entwickelt. Im Gegensatz zu HPLC- oder GC-Verfahren werden die Substanzen nicht aus dem System entfernt, sondern verbleiben nach der Trennung auf der Platte, auf der sie dann detektiert werden. Bei der DC von Kohlenhydraten kann nach der Entwicklung derivatisiert werden z. B. mit Diphenylanilin-phosphorsäure. Danach kann die Platte bei 370 nm qualitativ und quantitativ ausgewertet werden [Reiffova *et al.*, 2003].

1.5.5.2 Anwendungen der DC in der Fruktananalytik

Die DC-Analytik wird zur Trennung, Qualifizierung und Quantifizierung von FOS bis zu einem DP von etwa 8 eingesetzt.

1.5.6 Nuclear-magnetic-resonance (NMR) Spektroskopie

1.5.6.1 Grundlagen der NMR Spektroskopie

Bei der NMR wird das Verhalten von Atomkernen in Magnetfeldern beobachtet. Hauptsächlich werden Wasserstoff- (^1H -NMR) und Kohlenstoff-Kerne (^{13}C -NMR) spektroskopiert. Atome mit ungerader Ordnungs- oder Massezahl besitzen einen Kernspin, d. h. ihre Atomkerne produzieren ein Magnetfeld. Werden diese Kerne in ein starkes, äußeres Magnetfeld (B_0) gebracht, spaltet sich das um die eigene Achse rotierende Magnetfeld in zwei Richtungen auf: mit dem Magnetfeld oder gegen das Magnetfeld gerichtet, wobei die gegen das Magnetfeld gerichteten Kerne in einem energiereicheren Zustand sind. Durch diesen Besetzungsunterschied der Energieniveaus kommt es zu einem nach außen wirksamen Magnetfeld (B_i) im äußeren Magnetfeld B_0 , welches dem äußeren Magnetfeld gleichgerichtet ist. Das Magnetfeld B_i wird nun durch einen für den jeweiligen Kern spezifischen Impuls (Radiowelle) zu 90° aus dem Feld B_0 ausgelenkt und relaxiert nach dem Impuls in seine Ausgangslage zurück. Ein spezieller Empfänger kann die Relaxation der Kerne messen und über mathematische Gleichungen daraus ein Signal produzieren. Nachbaratome haben einen Einfluss auf die Resonanzfrequenz der Kerne. Sie können diese durch Abschirmungseffekte oder Entschirmungseffekte des äußeren Feldes B_0 verschieben. Des Weiteren kann es auch durch Spin-Kopplungen mit benachbarten Protonen zu einer spezifischen Aufspaltung des Signals kommen. Aus diesen Informationen kann man aus dem NMR-Spektrum Informationen über die Struktur des Analyten bekommen.

1.5.6.2 Anwendungen der NMR-Spektroskopie in der Fruktananalytik

Die NMR-Spektroskopie wird in der Fruktananalytik hauptsächlich zur Strukturaufklärung eingesetzt. Über das Verhältnis der Signalintensitäten der relevanten Kohlenstoffatome des ^{13}C -NMR kann auch der DP einer Probe bestimmt werden [Wack und Blaschek, 2006].

1.5.7 AOAC-Methoden

1.5.7.1 Grundlagen der AOAC-Methode

Die AOAC (Association of Official Analytical Chemists) hat unter der Nummer 997.08 eine offizielle Methode zur Bestimmung von Inulin und FOS erarbeitet. Sie beruht auf einer Spaltung der Polysaccharide mit Inulinasen und anschließender Bestimmung der einzelnen Zucker. Die Fruktane werden mit kochendem Wasser extrahiert und der Extrakt anschließend in drei Teile aliquotiert. Teil Eins des Extraktes wird dann mit Amyloglucosidasen (dienen zum Stärke- und Dextrinabbau) behandelt. Teil Zwei des Extraktes wird mit Inulinasen behandelt. Teil Drei wird nicht behandelt, in ihm wird eine Bestimmung der genuin in der Pflanze vorkommenden Glukose, Fruktose und Saccharose durchgeführt. In Teil Eins wird der Gesamtgehalt an freier Glukose und die Glukose aus Stärke und Maltodextrinen bestimmt. In Teil Drei wird schließlich der Gesamtanteil an Glukose und Fruktose aus der Probe ermittelt [Prosky und Hoebregs, 1999]. Somit kann man den Glukose- und Fruktosegehalt des Fruktans berechnen. Zur Fruktose-Bestimmung zieht man von der Gesamtfruktosebestimmung aus Teil Drei die Fruktose aus Teil Eins (nicht die Fruktose aus der Saccharose vergessen!) ab und erhält damit die Fruktosemenge aus dem Inulin. Zur Glukose-Bestimmung im Inulin zieht man von der Gesamtglukosemenge aus Teil Drei die Glukosemenge aus Teil Zwei ab. Die Differenz ergibt die Glukosemenge aus dem Inulin.

1.5.7.2 Anwendungen der AOAC-Methode

Die AOAC-Methode dient zur Inulinbestimmung neben anderen Zuckerbestandteilen z. B. in Lebensmitteln. Wie nach den einzelnen enzymatischen Hydrolyseprozessen der Glukose-, Fruktose- und Saccharoseanteil bestimmt wird, ist nicht vorgeschrieben. Am häufigsten werden hier HPLC-Methoden verwendet. Enzymatische Hydrolysen von Fruktanen werden häufig angewendet, wenn z. B. über das Glukose/Fruktoseverhältnis der DP einer Probe bestimmt werden soll.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Fruktane sind eine immer mehr an Bedeutung gewinnende Gruppe der Polysaccharide. Während Stärke und Cellulose weit bekannte Gruppen der Polysaccharide repräsentieren, sind Fruktane, zumindest in der Allgemeinbevölkerung, noch weitgehend unbekannt. Dabei werden sie schon heute in großem Maße in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, da sie wie kaum ein anderer Stoff positive technologische Effekte mit einem herausragenden gesundheitlichen Benefit in sich vereinen. In der Arzneimittelindustrie werden sie hauptsächlich aufgrund ihrer prebiotischen Eigenschaften bei arzneilichen Nahrungsergänzungsmitteln, Immunstimulantien und Laxantien eingesetzt. Beispiele hierfür sind: Madaus Immun[®], muco Zink[®], Pascossan Vital[®] oder Laxatan[®].

Die Möglichkeiten, Fruktane zu analysieren, sind äußerst vielfältig, haben aber oft das Problem, dass speziell im Polysaccharidbereich entsprechende Standards fehlen.

Ziel dieser Arbeit ist es, einfache, kostengünstige HPLC-Methoden für Fruktan-Analytik zu entwickeln, mit denen eine Charakterisierung verschiedener Fruktanchargen möglich ist. Des Weiteren sollen Möglichkeiten erarbeitet werden, um Fruktangemische in einzelne Fraktionen mit definiertem DP zu trennen. Abschließend sollen in dieser Arbeit die unterschiedlichen Analysemethoden hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten verglichen und beurteilt werden. Ebenso werden in dieser Arbeit Stabilitätsuntersuchungen von verschiedenen fruktanhaltigen Pflanzen durchgeführt. Dabei wird eine innovative HPAEC-PAD Methode zur Untersuchung von Fruktan Fingerprints eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Colorimetrische Gesamtfruktanbestimmung

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial

- o Aktivkohle (Merck, Darmstadt)
- o Arabinose (Sigma, Steinheim)
- o Bleiacetatlösung, 9,48 g $\text{Pb}((\text{CH}_3\text{COO})_2) \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Wasser gelöst (Merck, Darmstadt)
- o Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- o *Echinaceae purpureae Radix tot.*, Ch./Lot 60000 (Galke, Gittelde)
- o Ethanol 98 % (J.T. Baker, USA)
- o Fruktose (Merck, Darmstadt)
- o Inulin aus *Dahlia* Knollen (Sigma, Steinheim)
- o Methanol (J.T. Baker, USA)
- o konzentrierte Salzsäure (J.T. Baker, USA)
- o Tryptaminreagenz, 10 mM (Tryptaminhydrochlorid, Fluka/Sigma–Aldrich, Steinheim) in einer 0,1 M HCl-Lösung (Merck, Darmstadt) gelöst

2.1.2 Geräte

- o Borsilikatröhrchen Pyrex[®] (Corning, USA)
- o Laborwaage Sartorius handy (Sartorius)
- o Magnetrührer (IKA-Labortechnik)
- o Zentrifuge 3K 30 (Sigma)
- o Rotationsverdampfer Laborota 4000 (Heidolph)
- o Spectrophotometer Hitachi U1100 (Hitachi)
- o Chromabond PA (Macherey-Nagel)
- o Gefriertrocknungsanlage CHRIST BETA 1-8K (Christ)

2.1.3 Kalibrierung

Als Standard wurde Fruktose verwendet. Die wässrige Lösung sollte im Konzentrationsbereich von 5 bis 25 µg/100 µl liegen.

2.1.4 Wiederfindung, Bestimmungsgrenze und Negativkontrolle

Zur Verifizierung der Wiederfindungsrate und der Bestimmungsgrenze wurden wässrige Inulinlösungen von *Dahlia* Knollen Konzentrationen von 5 bis 25 µg/100 µl verwendet. Zur Negativkontrolle wurde eine wässrige Arabinoselösung der Konzentration 50 µg/100 µl verwendet, da diese vom Testsystem nicht erfasst werden sollte.

2.1.5 Extraktion von *Echinaceae purpureae Radix*

10,0 g Drogenmaterial von *Echinaceae purpureae Radix* tot. wurden zu 100 ml 90-95°C heißen destillierten Wassers gegeben und unter Rühren auf einem beheizbaren Magnetrührer auf 100°C erwärmt. Bei pH ≤ 7 erfolgte gegebenenfalls die Zugabe von Natriumcarbonat/bicarbonat, bis ein pH-Wert um 8 erreicht wurde. Die Suspension wurde 10 Minuten unter Rühren gekocht, drei Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt und anschließend bei 20000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 50 ml Wasser versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur nachextrahiert. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, der entstandene Rohextrakt auf 100 ml eingengt und der Gerbstofffällung zugeführt.

2.1.6 Gerbstoffentfernung

2.1.6.1 Gerbstofffällung mit Bleiacetatlösung

50 ml Rohextrakt wurden unter Rühren mit 5 ml gesättigter Bleiacetatlösung versetzt. Zum Prüfen auf Vollständigkeit der Fällung wurden nach dem Absetzen des Niederschlags einige Tropfen der Bleiacetatlösung zugegeben. Wenn sich an der Eintropfstelle kein neuer Niederschlag bildet, ist die Fällung vollständig. Der Niederschlag wurde bei 5000g 10 Minuten abzentrifugiert, mit 20 ml Wasser versetzt, 10 Minuten unter Rühren auf 50°C erwärmt und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden zur Fällung überschüssiger Blei Ionen mit 20 ml zweiprozentiger (m/V) Oxalsäurelösung versetzt. Zum Prüfen der Vollständigkeit der Fällung wurden nach dem Absetzen des Niederschlags einige Tropfen der Oxalsäurelösung zugegeben. Wenn sich an der Eintropfstelle kein neuer Niederschlag bildet, ist die Fällung vollständig. Das gefällte Bleioxalat wurde bei 4000g zwei Minuten abzentrifugiert und der Überstand erneut durch Zugabe einiger Tropfen Oxalsäure auf Vollständigkeit der Fällung geprüft. Der Überstand wurde zum Schluss an einem Rotationsverdampfer auf 25 ml eingeeengt. Mit der eingeeengten Lösung wurde anschließend eine Ethanol-fällung (s. 2.1.7) durchgeführt.

2.1.6.2 Gerbstoffentfernung mit Aktivkohle

Zu 1 ml Rohextrakt wurden 0,5; 0,1 und 0,01 g Aktivkohle gegeben. Die Aktivkohle wurde abgenutscht und der Durchlauf für eine Ethanol-fällung (s. 2.1.7) weiterverwendet.

2.1.6.3 Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen

Es wurden 10 ml Spritzen bis zur 3 ml Markierung mit Chromabond PA beladen. Chromabond PA ist eine Polyamidmatrix mit einer Partikelgröße von 40 bis 80 µm. Die Säulen wurden mit destilliertem Wasser konditioniert. Danach wurde 2 ml

Probelösung aufgetragen. Zur Ermittlung einer geeigneten Vorgehensweise bezüglich des Waschens wurde die Säule in verschiedenen Versuchsreihen mit Inulin beladen und dann mit verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser, Methanol, Wasser/Methanol-Mischungen und Aceton) gewaschen. Die Eluate der einzelnen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und die jeweilige Inulinmenge bestimmt. So konnte der Waschvorgang folgendermaßen standardisiert werden. Die Säulen wurden erst mit 4 ml destilliertem Wasser, dann mit 4 ml einer Methanol-Wasser Mischungen (50 %, m/m) und zum Schluss mit 4 ml 100 % Methanol gewaschen. Das Eluat wurde dann am Rotationsverdampfer auf 2 ml eingeeengt und wie im Kap. 2.1.7 beschrieben, mit Ethanol gefällt.

2.1.7 Ethanolfällung

Nachdem die Gerbstoffe entfernt worden waren (s. 2.1.6), wurden die Fruktanlösungen mit eiskaltem 98 % Ethanol bis zur Konzentration von 80 % zur Ausfällung der Fruktane versetzt und für mindestens 12 Stunden bei 4°C belassen. Der Niederschlag wurde jeweils bei 20000g 30 Minuten lang abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit kaltem Ethanol und Dichlormethan gewaschen, kurz luftgetrocknet und anschließend gefriergetrocknet. Nach der Gefrierd Trocknung wurde das Trockengewicht bestimmt. Das Lyophilisat wurde, wie im Kap. 2.1.8 beschrieben, hinsichtlich des Gesamtfruktangehaltes untersucht.

2.1.8 Colorimetrie

Das Tryptaminreagenz wurde täglich frisch hergestellt. Die Fruktose Stammlösung für die Kalibriergerade ist dagegen auch über 2 bis 3 Wochen bei 2-8°C stabil. Auf Verunreinigungen ist zu achten. Zur Erstellung der Kalibriergerade wurden 100 µl Fruktoselösung im Konzentrationsbereich von 5 bis 25 µg/100 µl, 100 µl Tryptaminreagenz und 3 ml konzentrierte Salzsäure in 16 x 150 mm Pyrex® Borsilikatröhrchen gegeben. Die Mischung wurde 15 Minuten bei 60°C in einem Wasserbad (Inkubationswasserbad GFL, Burgwedel) inkubiert. Danach wurde auf

Raumtemperatur abgekühlt und innerhalb von maximal 40 Minuten vermessen. Die Messung erfolgte bei 518 nm gegen einen Leerwert, bei dem statt Fruktoselösung 100 µl destilliertes Wasser zu der Tryptaminlösung gegeben wurde. Dann wurden die zu vermessenden Proben ebenfalls in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 25 µg/100 µl gelöst und mit 100 µl Tryptaminreagenz und 3 ml konzentrierter Salzsäure in 16 x 150 mm Pyrex[®] Borsilikatröhrchen gegeben. Die Mischung wurde wiederum 15 Minuten bei 60°C in einem Wasserbad inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und innerhalb von 40 Minuten gegen einen Leerwert bei 518 nm vermessen.

2.2 Fraktionieren von Fruktangemischen

2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial

- o Aceton (Merck, Darmstadt)
- o Acetonitril (J.T. Baker, USA)
- o Ethanol (J.T. Baker, USA)
- o Fibrulose F97 (Coscura, Belgien)
- o Fibruline XL (Coscura, Belgien)
- o Inulin 5000 (MP Biochemicals)
- o Inulin aus *Dahlia* Knollen (Sigma, Steinheim)
- o Isopropanol (Merck, Darmstadt)

2.2.2 Geräte

- o Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Christ)
- o Rotationsverdampfer Laborota 4000 (Heidolph)
- o Schüttler Vortex Genie 2 (Bender & Hobein)
- o Zentrifuge 3K 30 (Sigma)
- o Zentrifuge Mikro 22R (Hettich)

2.2.3 Fraktionieren durch unterschiedliche Löslichkeit

Dieses Kapitel beschreibt das Erarbeiten einer Methode, mit welcher man eine Fruktanmischung mit unterschiedlichen Kettenlängen in einzelne Fraktionen aufteilen kann. Zur sequentiellen Fällung von Fruktanen [Wack und Blaschek, 2006] werden große Mengen an Lösungsmittel benötigt. Es wurde deshalb versucht, genau gegenteilig vorzugehen, indem nicht fraktioniert gefällt, sondern die Fruktane fraktioniert gelöst wurden. Es wurde mit einer hohen Konzentration an unpolarem Lösungsmittel (Ethanol, Isopropanol, Aceton und Acetonitril) begonnen und dann sequentiell die polare Komponente im Lösungsmittel gesteigert.

Um ein möglichst breite DP-Verteilung zu bekommen, wurden Mischungen aus langkettigem Inulin aus *Dahlia* Knollen und kurzkettigem Inulin 5000 hergestellt. Langkettiges Inulin aus *Dahlia* Knollen und kurzkettiges Inulin 5000 wurden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 20 ml eines unpolaren Lösungsmittels versetzt. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 15000g 15 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einen 25 ml Spitzkolben überführt. Das Pellet wurde mit einer 80 % (m/m) Mischung aus unpolarem Lösungsmittel mit Wasser aufgenommen und eine Minute auf einem Vortex Schüttler geschüttelt. Dann wurde erneut zentrifugiert, der Überstand wieder abgenommen und das Pellet mit einer 60 % (m/m) Lösungsmittelmischung erneut gelöst. Dieser Vorgang wurde dann noch mit einer 40 % (m/m), 20 % (m/m) und 10 % (m/m) Lösungsmittelmischung und destilliertem Wasser wiederholt. Sollte sich mit 100 % Wasser nicht alles gelöst haben, wurde als letzter Schritt destilliertes Wasser zugegeben und fünf Minuten bei 60°C erhitzt, um das verbliebene Pellet zu lösen und ebenfalls in einen Spitzkolben zu überführen. Die gelösten Überstände wurden nun zur Entfernung des Lösungsmittels bis zur Trockenen am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 35°C einrotiert. Danach wurden die Rückstände mit 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen und in Lösung gebracht. Die einzelnen Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Nach der Gefrier Trocknung wurden die Proben für die im Folgenden beschriebenen Analyseverfahren unterschiedlich aufgearbeitet. Hierauf wird in den entsprechenden Kapiteln der einzelnen Methoden eingegangen.

2.2.4 Fragmentierung durch Hitzespaltung

Die Proben wurden bei 150°C über unterschiedliche Zeit trocken im Ofen erhitzt. Die Proben wurden nach der Hitzebehandlung in der HPLC, wie im Kap. 2.4 beschrieben, vermessen. Dazu wurden sie in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen und durch Zugabe von 600 µl destilliertem Wasser gelöst. Dann wurden 400 µl Acetonitril zugegeben. Eventuell nicht gelöste Bestandteile wurden fünf Minuten bei 10000 U/min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann auf die HPLC-Säule aufgetragen.

2.3 Bestimmung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades (DP) mittels GC-Analytik

2.3.1 Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial

- o Fibrulose F97 (Coscura, Belgien)
- o Fibruline XL (Coscura, Belgien)
- o Hydroxylamin-HCl (J.T. Baker, USA)
- o Inulin 5000 (MP Biochemicals)
- o Inulin aus *Dahlia* Knollen (Sigma, Steinheim)
- o Pyridin (Merck, Darmstadt)
- o N-(Trimethylsilyl)-imidazol (Merck, Darmstadt)
- o Trifluoressigsäure (Merck, Darmstadt)

2.3.2 Geräte

- o Bioblock Scientific (Thermolyne)
- o Cooling Trap CT 110 mit rotierendem Probenraum (Heto Lab Equipment)
- o V-Vials (Wheaton)
- o Ultraschallbad Sonorex Super 10P (Sonorex)

2.3.3 Derivatisierung

2.3.3.1 Hydrolyse

Eine Säure-Hydrolyse wird durchgeführt, um Oligo- und Polysaccharide in Monosaccharide zu überführen. Dazu wurden 2 bis 5 mg Polysaccharid in verschraubbaren 5 ml V-Vials mit 500 µl 0,2 M Trifluoressigsäure versetzt. Danach wurden die geschlossenen Vials 30 Minuten bei 80°C in einem Bioblock inkubiert. Nach 30 Minuten wurde das Hydrolysat sofort unter kaltem Wasser abgekühlt und mit einer Pasteurpipette in kleine Zentrifugengläser überführt. Die Proben wurden über Nacht in einer Cooling Trap mit rotierendem Probenraum vakuumgetrocknet.

2.3.3.2 Oxim-Bildung

Nach der Trocknung wurden 200 µl Oxim-Reagenz, hergestellt aus 1,25 g Hydroxylamin-HCl in 50 g Pyridin, zugegeben. Damit sich die Proben vollständig lösen, wurden sie drei Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurden die Proben in neue 5 ml V-Vials überführt und 30 Minuten bei 70-75°C im Bioblock unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

2.3.3.3 Silylierung

Nach dem Abkühlen der Proben aus der Oxim-Bildung (s. 2.3.2.2) wurden 780 µl Pyridin und 220 µl N-(Trimethylsilyl)-imidazol zugegeben und erneut für 30 Minuten bei 70-75°C im Bioblock unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt war, konnte es direkt zur Injektion für die Gaschromatographie (s. 2.3.4) verwendet werden oder für maximal zwei Monate bei -20°C gelagert werden.

2.3.4 GC-Anlage

In der GC-Analytik wird das Verhältnis silylierter Glukosemonomere zu silylierten Fruktosemonomeren über die Peakfläche bestimmt. Der Quotient Fruktose/Glukose entspricht dem DP.

GC	HP5890 Series II und HP 6890 (Hewlett Packard)
Software	HP GC ChemStation (Hewlett Packard)
Säule	Fused Silica Kapillarsäule SPB™-1, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm (Supleco)
Injektor	270°C, Split 1:30
Detektor	FID, 320°C
Trägergas	Helium
Temperaturprogramm	Start bei 170°C für eine Minute. Aufheizen mit 2°C pro Minute auf 250°C. Dann mit 10°C auf 300°C. Diese Temperatur wurde für 10 Minuten bis zum Ende des Laufes gehalten.
Injektionsvolumen	1,5 - 2 µl

2.4 HPLC-Analytik

Da für die Entwicklung der HPLC-Analytik sehr oft die Parameter wie Laufzeit, Fließmittelzusammensetzung, Flussrate, Injektionsvolumen etc. geändert wurden, wird darauf im Ergebnisteil (s. Kap. 3) genauer eingegangen.

2.4.1 Chemikalien, Reagenzien und Pflanzenmaterial

- o Acetanhydrid (Merck, Darmstadt)
- o Aceton (J.T. Baker, USA)
- o Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- o Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- o Diethylether (Merck, Darmstadt)

- o Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)
- o Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt)
- o Ethanol (J.T. Baker, USA)
- o FITC (Sigma, Steinheim)
- o FITC-Inulin (Sigma, Steinheim)
- o Fruktose (Merck, Darmstadt)
- o Glukose (Fluka, Steinheim)
- o Guanidiniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- o Inulin 5000 (MP Biochemicals)
- o Inulin aus *Dahlia* Knollen (Sigma, Steinheim)
- o Maltooligosaccharid-Gemisch (Merck, Darmstadt)
- o Methanol (J.T. Baker, USA)
- o 1-Methylimidazol (Merck, Darmstadt)
- o Natriumhydrid in Öl, 60-prozentige Suspension (Riedel-de Haën, Seelze)
- o Nystose (Fluka, Steinheim)
- o NaOH Lösung, 2 M (Merck, Darmstadt)

2.4.2 Geräte

- o Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Christ)
- o Magnetrührer, thermostatisiert, Retebasik (IKA Labortechnik, Staufen)
- o Platten (NUNC, DK)
- o Plattenreader (POLARstar Optima der Firma BMG Labotech, Offenburg)
- o Rotationsverdampfer Laborota 4000 (Heidolph)
- o Schüttler (GFL 3017, Burgwedel)
- o Zentrifugenröhrchen (Nalgene, USA)
- o Zentrifuge 3K 30 (Sigma)
- o Zentrifuge Mikro 22R (Firma Hettich, Tuttlingen)

2.4.3 HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane

2.4.3.1 HPLC Anlage

Degasser	Waters In- Line Degasser AF (Waters, USA)
HPLC Pumpen	Waters 600 und Waters 501 (Waters, USA)
Controller	Waters 600 (Waters, USA)
Autosampler	Waters 717 plus (Waters, USA)
Säulenofen	Waters Jetstream 2 plus (Waters, USA)
Detektoren	Waters 2996 Photodiodenarray-Detektor (Waters, USA) Waters 2410 Brechungsindex-Detektor (Waters, USA)
Software	Waters Empower (Waters, USA)
Stationäre Phasen	Luna Amino [®] 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm mit Vorsäule SecurityGuard Amino 4 mm x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg) Pursuit C18 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm mit integrierter Vorsäule (Varian, Darmstadt)
Mobile Phasen	destilliertes, im Ultraschallbad entgastes und filtriertes Wasser (Sartorius Filtrationseinheit mit Durapore Membran Filters Porendurchmesser 0,1 µm der Firma Millipore, USA)

2.4.3.2 Probenvorbereitungen

Fruktanproben wurden in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen und in unterschiedlich zusammengesetzten Mischungen der mobilen Phase gelöst. Eventuell nicht gelöste Bestandteile wurden fünf Minuten bei 10000 U/min abzentrifugiert (Mikro 22R Zentrifuge der Firma Hettich, Tuttlingen). Der klare Überstand wurde dann auf die HPLC-Säule aufgetragen.

2.4.3.3 Bestimmungen der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Glukose und Fruktose

Es wurden Glukose und Fruktoselösungen im Konzentrationsbereich von 20 mg/ml bis 0,1 mg/ml hergestellt. Die Proben wurden in einer 60 % Acetonitril/Wassermischung gelöst und jeweils 20 µl dieser Lösungen auf die Säule aufgetragen. Als stationäre Phase wurde eine Luna Amino[®] Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines RI-Detektors. Als mobile Phase wurde eine 62 % Acetonitril/Wassermischung verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

2.4.4 HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane

2.4.4.1 HPLC-Analytik mit vorheriger Acetylierung der Proben

10 bis 50 mg Probe wurden in 1 ml DMSO gelöst. Nachdem sich die Probe komplett gelöst hatte, wurden 200 µl 1-Methylimidazol und 2 ml Acetanhydrid zugegeben. Danach wurde die Mischung 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 20 Minuten wurden 10 ml destilliertes Wasser zugegeben und die Probe abkühlen gelassen. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und vorsichtig die untere Phase abpipettiert. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt und danach die abpipettierten Dichlormethanphasen vereinigt und unter Stickstoff bis zur Trockne abgeblasen. Danach wurde die acetylierten Probe mit Methanol aufgenommen und zur weiteren HPLC-Analytik verwendet.

2.4.4.2 HPLC-Analytik mit FITC Vorsäulenderivatisierung

2.4.4.2.1 HPLC-Anlage

Degasser	Waters In-Line Degasser AF (Waters, USA)
HPLC Pumpen	Waters 600 und Waters 501 (Waters, USA)
Controller	Waters 600 (Waters, USA)
Autosampler	Waters 717 plus (Waters, USA)

Säulenofen	Waters Jetstream 2 plus (Waters, USA)
Detektoren	Waters 2475 Multiwellenlängen Fluoreszenz-Detektor (Waters, USA)
Software	Waters Empower (Waters, USA)
Stationäre Phasen	Luna Amino [®] 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm mit Vorsäule SecurityGuard Amino 4 mm x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg) Pursuit [®] C18 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm mit integrierter Vorsäule (Varian, Darmstadt) Nucleosil [®] C18 250 mm x 4,6 mm (Macherey-Nagel, Düren)
Mobile Phasen	destilliertes, im Ultraschallbad entgastes und filtriertes Wasser (Sartorius Filtrationseinheit mit Durapore Membran Filters Porendurchmesser 0,1 µm der Firma Millipore, USA) Acetonitril HPLC-grade (J.T. Baker, USA)

2.4.4.2.2 Derivatisierung

Die Methode ist an ein Verfahren zur Markierung von Sinistrin (s. Abb. 2.1) mit FITC angelehnt an die Patentschrift Patentsschrift PCT/EP01/05172. Bei Sinistrin handelt es sich um ein stark verzweigtes Fruktan aus *Urginea maritima*. [Baumgartner *et al.*, 2000].

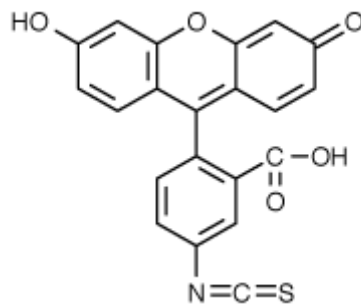


Abbildung 2.1 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

500,5 mg Inulin 5000 wurden in ein 100 ml Becherglas mit Magnettisch gegeben. Unter Stickstoff-Atmosphäre wurden 17 ml trockenes Dimethylformamid zugegeben und 15 Minuten bei 40-43°C auf einem thermostatisiertem Magnetrührer gerührt. Es

wurde im Eisbad abgekühlt und mit 500 mg einer 60-prozentigen Suspension Natriumhydrid in Öl versetzt. Anschließend wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur und 30 Minuten bei 40-45°C gerührt, wobei die Reaktionsmischung zunehmend viskos wurde. Danach wurden 352,1 mg FITC zugegeben, wobei die Viskosität der Reaktionsmischung sofort wieder sank. Es wurde 18 Stunden bei 40-45°C weitergerührt und danach vorsichtig mit 10 ml einer 13 mM Ammoniumchloridlösung versetzt. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde die trübe Lösung zum Entfernen des Weißöls der Natriumhydridsuspension zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde in einen Rundkolben überführt, um das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40°C weitgehend zu entfernen. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet. FITC-Inulin löst sich gut in Wasser, schlecht in Wasser/Ethanol-Mischungen mit zunehmender Ethanolkonzentration und praktisch gar nicht in Aceton. Reines FITC löst sich hingegen in Aceton und Wasser. So konnte versucht werden, nicht umgesetztes FITC von FITC-Inulin über gezielte Fällungen abzutrennen [Pill *et al.*, 2005b]. Dazu wurde das gefriergetrocknete Produkt in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Dann wurden 100 ml Aceton zugegeben und über Nacht auf einem Schüttler geschüttelt. Danach wurde die Acetonlösung verworfen und das Produkt mit 30 ml Wasser aufgenommen, eine Stunde geschüttelt und komplett gelöst. Die Lösung wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden 50 ml Ethanol zugegeben, worauf ein milchig helloranger Niederschlag ausfiel. Dieser wurde, nachdem er sich abgesetzt hatte, bei 5000g für 10 Minuten abzentrifugiert. Zu dem orangen Überstand wurden erneut 100 ml Aceton gegeben. Dabei fällt ein flockiger gelb-oranger Niederschlag aus, der erneut abzentrifugiert wurde. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, bis keine Fällung mehr zu beobachten war. Die gesammelten Niederschläge wurden in Wasser gelöst, in einen Rundkolben überführt und bei einer Badtemperatur von 40°C am Rotationsverdampfer zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde erneut mit 30 ml Wasser aufgenommen und in ein 2000 ml Becherglas überführt. Dann wurden 300 ml Ethanol zugegeben, anschließend mit Aceton auf 1000 ml aufgefüllt und über Nacht stehen gelassen, damit das FITC-Inulin ausfallen konnte. Der orange Überstand wurde so weit wie möglich abdekantiert. Der Rest wurde wieder in Zentrifugenröhrchen überführt und bei geringer *g*-Zahl abzentrifugiert. Der Rückstand wurde erst luftgetrocknet, dann mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die

Fluoreszenz des Produktes wurde mit einer einfachen UV-Lampe überprüft. Im Idealfall sollte es sich hierbei zum größten Teil um FITC-Inulin und eventuell nicht umgesetztes Inulin handeln, da reines, nicht umgesetztes FITC im ebenfalls fluoreszierenden Acetonüberstand verblieben ist. Das Produkt wurde zur weiteren HPLC-Analytik verwendet.

2.4.4.3 HPLC-Analytik mit Guanidin Nachsäulenderivatisierung

2.4.4.3.1 Vorversuche mit Plattenreader

Basierend auf zwei Veröffentlichungen [Yamauchi *et al.*, 1993a; Yamauchi *et al.*, 1993b] wurde versucht, das Derivatisierungsverfahren mit Guanidiniumchlorid für eine Nachsäulenderivatisierung von Inulinen anzupassen. Vor einem dazu notwendigen aufwändigen Umbau der HPLC-Anlage wurde die Durchführbarkeit des Derivatisierungsverfahrens mit einem Plattenreader überprüft. Dazu wurden 25 ml einer 110 mM Guanidiniumchlorid und 450 mM NaOH Lösung als Reaktionslösung hergestellt. Als Probenlösung wurden verschiedene wässrige Inulin 5000 Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 300 mM hergestellt. Zur Messung wurden die unterschiedlich konzentrierten Inulinlösungen zu der Reaktionslösung gegeben und bei 100°C 30 Minuten lang inkubiert. Dann wurden jeweils 200 µl in die Wells der Platten pipettiert und bei einer Anregungswellenlänge von 314 nm und einer Messwellenlänge von 433 nm vermessen.

Es wurden Nachweisgrenze und Linearität bestimmt, sowie die Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationszeit untersucht. (s. 3.4.4.1)

2.4.4.3.2 HPLC Anlage

Degasser	Waters In- Line Degasser AF (Waters, USA)
HPLC Pumpen	Waters 600 und Waters 501 (Waters, USA)
Controller	Waters 600 (Waters, USA)
Autosampler	Waters 717 plus (Waters, USA)
Säulenofen	Waters Jetstream 2 plus (Waters, USA)
Wasserbad	Inkubationswasserbad (GFL, Burgwedel)

Detektoren	Waters 2475 Multiwellenlängen Fluoreszenz-Detektor (Waters, USA) Anregungswellenlänge: 314 nm Messwellenlänge: 433 nm
Software	Waters Empower (Waters, USA)
Stationäre Phasen	Luna Amino [®] 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm mit Vorsäule SecurityGuard Amino 4 mm x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Reaktionskapillare	10 m Reaktionsschleife
Nachkapillare	Kapillaren mit unterschiedlichen Längen und Durchmessern
Mobile Phasen	destilliertes, im Ultraschallbad entgastes und filtriertes (Sartorius Filtrationseinheit mit Durapore Membran Filters Porendurchmesser 0,1 µm der Firma Millipore, USA) Wasser und Acetonitril J.T. Baker, USA
Reaktionslösung	110 mM Guanidiniumchloridlösung in einer 450 mM NaOH-Lösung, Flussrate 0,3 ml/min

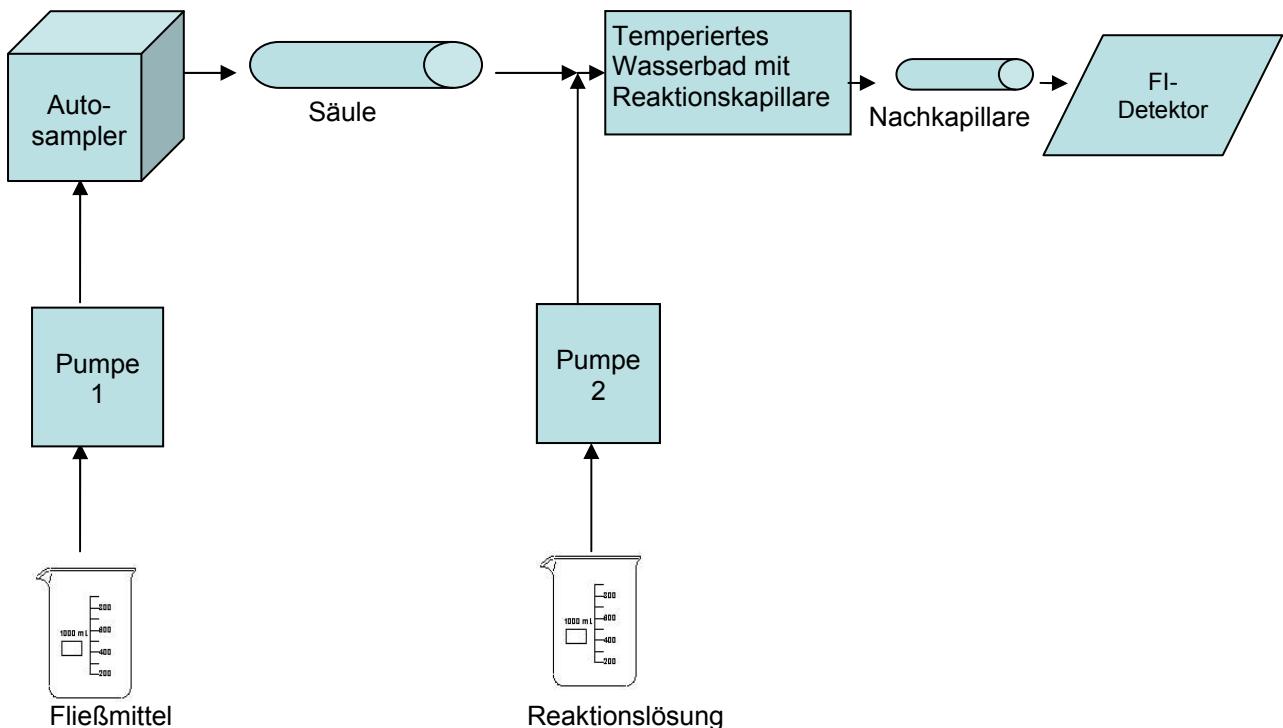


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage zur Nachsäulen-derivatisierung

Da für die Entwicklung der HPLC-Analytik die Parameter wie Laufzeit, Fließmittelzusammensetzung, Flussrate, Injektionsvolumen etc. häufig geändert wurden, wird darauf im Ergebnisteil genauer eingegangen (s. Kap. 3.4.4.2).

2.4.4.3.3 Probenvorbereitung

Die Proben wurden in 2 ml Eppendorfgläser eingewogen und in unterschiedlich zusammengesetzten Mischungen der mobilen Phase gelöst. Eventuell nicht gelöste Bestandteile wurden fünf Minuten bei 10000 U/min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann auf die HPLC-Säule aufgetragen.

2.5 HPAEC-PAD (Dionex®) Analytik

Die Proben wurden durch fraktioniertes Lösen (s. 2.2.3) hergestellt und dann zur Vermessung auf einer Dionex® Anlage zu unserem Forschungspartner (Firma Phytos Labor für Analytik von Arzneimitteln GmbH & Co. KG, Leibnizstr. 9, 89231 Neu-Ulm) versandt. Bei der HPAEC-PAD-Analytik handelt es sich um eine Ionenaustauschchromatographie mit einem elektrochemischen Detektionsverfahren.

2.5.1 HPAEC-PAD Anlage

Hardware	Integriertes Dionex® System
Software	Dionex Chromeleon Version 6.70
Säule	Dionex Carbo pack PA – 100
Injektionsvolumen	30 µl
Flussrate	0,25 ml/min
Mobile Phase	A: 0,1 M NaOH B: 0,1 M NaOH und 0,5 M NaAc

Gradient	Zeit (min)	A(%)	B(%)
	0	0	100
	8	0	100
	25	30	70
	50	55	45
	90	80	20
	95	100	0
	102	0	100

2.5.2 Stabilitätsuntersuchungen

Es wurden Stabilitätsuntersuchungen mit unterschiedlichen Pflanzen bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen über verschiedene Zeiträume durchgeführt. Als Marker zur Stabilitätsbestimmung wurde das Fruktanmuster als sogenannter Fingerprint mit der HPAEC-PAD Anlage gemessen, sowie qualitativ und quantitativ untersucht. Die Einlagerungen und Messungen wurden von unserem Forschungspartner (Firma Phytos Labor für Analytik von Arzneimitteln GmbH & Co. KG, Leibnizstr. 9, 89231 Neu-Ulm) durchgeführt.

2.5.2.1 Auswahl der Drogen, Lagerbedingungen und Untersuchungsintervalle

1.) Es wurden folgende Drogen zur Stabilitätsuntersuchung ausgewählt:

- o Sonnenhutwurzel (*Echinacea pallida*) - Hauptversuch
- o Sonnenhutwurzel (*Echinacea purpurea*) - Hauptversuch
- o Eibischwurzel (*Althea officinalis*) - Hauptversuch
- o Artischockenkraut (*Cynara scolymus*) - dient zur Information, ob die Methode auch bei Drogen mit geringen Fruktanmengen aussagekräftige Daten liefert

2.) Es wurden folgende Lagerungsbedingungen zur Stabilitätsuntersuchung ausgewählt:

- o Kühlschrank (5 °C)
- o 25°C und 60% relative Luftfeuchte (ICH-Guidline)
- o 40°C und 75% relative Luftfeuchte (ICH-Guidline)
- o Raumtemperatur (22 ± 2°C)

3.) Es wurden folgende Untersuchungsintervalle zur Stabilitätsuntersuchung ausgewählt:

Alle Muster wurden nach 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Monaten untersucht.

2.5.2.2 Probenvorbereitungen

Zur Langzeitstabilitätsprüfung wurden je 1 kg zertifizierte, gemahlene Drogen der Firma Galke bezogen. Die Muster wurden in 10 g Mengen in Aluminiumbeutel verschweißt und bei den entsprechenden Temperaturen und relativen Luftfeuchten gelagert. Nach der vorgesehen Lagerdauer wurde je ein Beutel entnommen und bei -20°C bis zur Analyse zwischengelagert.

2.6 GPC-Analytik

Die GPC (Gelpermeationschromatographie) trennt Makromoleküle aufgrund ihrer Molekülgröße.

2.6.1 Chemikalien

- o Dextrane mit definierten Molekulargewichten von 2,5, 150, 670 und 1.400 kDa (Fluka, Schweiz)
- o Glukose (Fluka, Schweiz)
- o Maltooligosaccharid-Gemisch (Merck, Darmstadt)
- o Maltopentaose (Supleco, USA)
- o Nystose (Fluka, Schweiz)
- o Saccharose (Merck, Darmstadt)
- o Inulin 5000 (MP Biochemicals)
- o Inulin aus *Dahlia* Knollen (Sigma, Steinheim)

2.6.2 Geräte

- o Celluloseacetat-Spritzenfilter, Porendurchmesser 0,45 µm (Nalgene)

2.6.3 GPC-Anlage

GPC System	Pumpe, Probeneinlass mit 100 µl Probenschleife, Inline Entgaser, PL Datastream Software zur Datenverarbeitung (Polymer Laboratories, USA)
Erster Detektor	Brechungsindexdetektor, auf 40°C beheizt und im GPC System integriert

Zweiter Detektor	mini Dawn multi angle laser light scattering Detector, MALLS (Wyatt Technology, USA)
Software	Astra for Windows Version 4.73.04 (Wyatt Technology, USA)
Säulen	PLaquagel-OH Mixed 8 μm Säulen für höhermolekulare Polymere und PLaquagel-OH 20 5 μm Säulen für niedermolekulare Polymere (Polymer Laboratories, USA). Die Säulen haben jeweils eine Länge von 300 mm und einen Innendurchmesser von 7,5 mm.
Eluent	destilliertes, im Ultraschallbad entgastes und filtriertes Wasser (Sartorius Filtrationseinheit mit Durapore Membran Filters Porendurchmesser 0,1 μm der Firma Millipore, USA) verwendet. Teilweise wurden Läufe in 0,1 M NaH_2PO_4 Puffer Lösung durchgeführt.

2.6.4 Probenvorbereitung

Es wurde zwischen 1,5 mg und 5 mg der Fruktanproben bzw. Dextranstandard in 1 ml der mobilen Phase, gegebenenfalls unter Erwärmen auf 50-60°C für fünf Minuten, gelöst. Danach wurde die Lösung filtriert und je 100 μl auf die Säule aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Colorimetrische Gesamfruktanbestimmung

Bei diesem Verfahren wird die Fruktanmenge indirekt über die Fruktosekonzentration bestimmt. Durch die konzentrierte Salzsäure kommt es zu einer Spaltung der Fruktankette in ein Glukosemonomer und n Fruktosemonomere (s. Abb. 3.1). Durch die Ethanol-fällung des Extraktes wurden die Glukose- und Fruktosemonomere, welche genuin in der Probe enthalten waren, abgetrennt, da diese im Überstand der Probe verblieben, während die Fruktanoligo- und -polymere ausgefällt wurden. Somit konnte eine Verfälschung des Ergebnisses, verursacht durch genuin im Extrakt vorhandene Monosaccharide ausgeschlossen werden. Bestimmt wird letztendlich die freie Fruktose. Dadurch unterscheidet sich die Wiederfindung einzelner Inulinproben je nach DP. Inuline mit einem niedrigen DP haben aufgrund ihrer im Verhältnis zur Fruktosekonzentration höheren Glukosekonzentration eine geringere Wiederfindung. In der Literatur [Kimberley, 1994] findet man z. B. eine Fruktosewiederfindung von 95 % für *Artischocken*-Inulin und 98 % für *Dahlia*-Inulin.

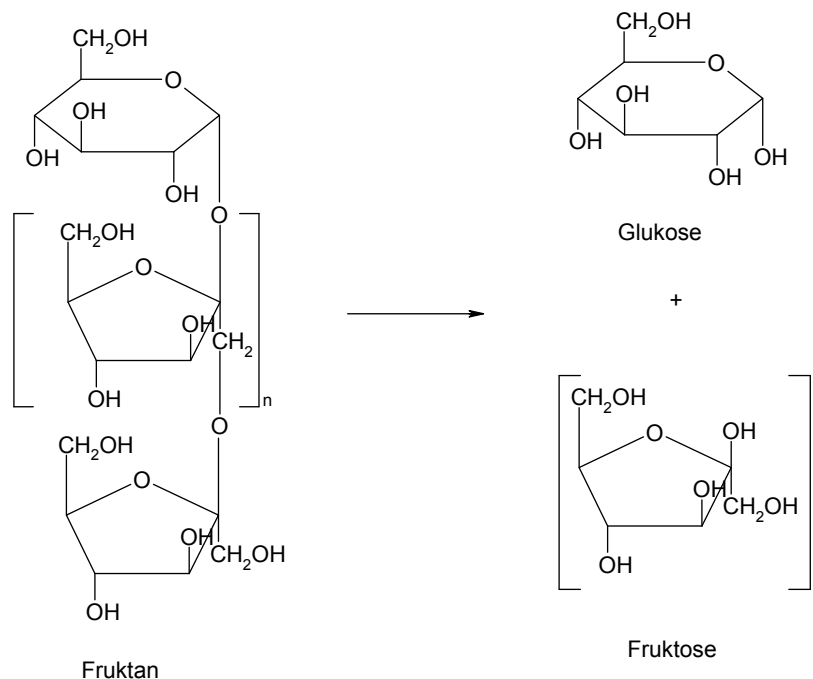


Abbildung 3.1 Spaltung eines Fruktanmoleküls in Glukose und Fruktose

3.1.1 Kalibrierung

Mehrere Kalibrierreihen (n=14) wurden an verschiedenen Tagen aus verschiedenen Ansätzen (Tab. 3.1) generiert. Für alle Kalibrierreihen konnte eine lineare Korrelation zwischen Fruktoseeinwaage und Absorption gezeigt werden ($r^2=0,99996$).

Tabelle 3.1 Einwaagen für die Kalibrierreihe

Einwaage Fruktose ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)	Mittelwert der Absorption aus n=14	Standard- abweichung	Rel. Standard- abweichung (%)
5	0,2837	0,0565	19,7
10	0,5460	0,0881	16,0
15	0,8013	0,1077	13,5
20	1,0538	0,1453	13,8
25	1,3144	0,1263	9,5

In Abbildung 3.2 und 3.3 sind sowohl die einzelnen Kalibrierungen als auch die daraus resultierende Gesamtkalibriergerade dargestellt.

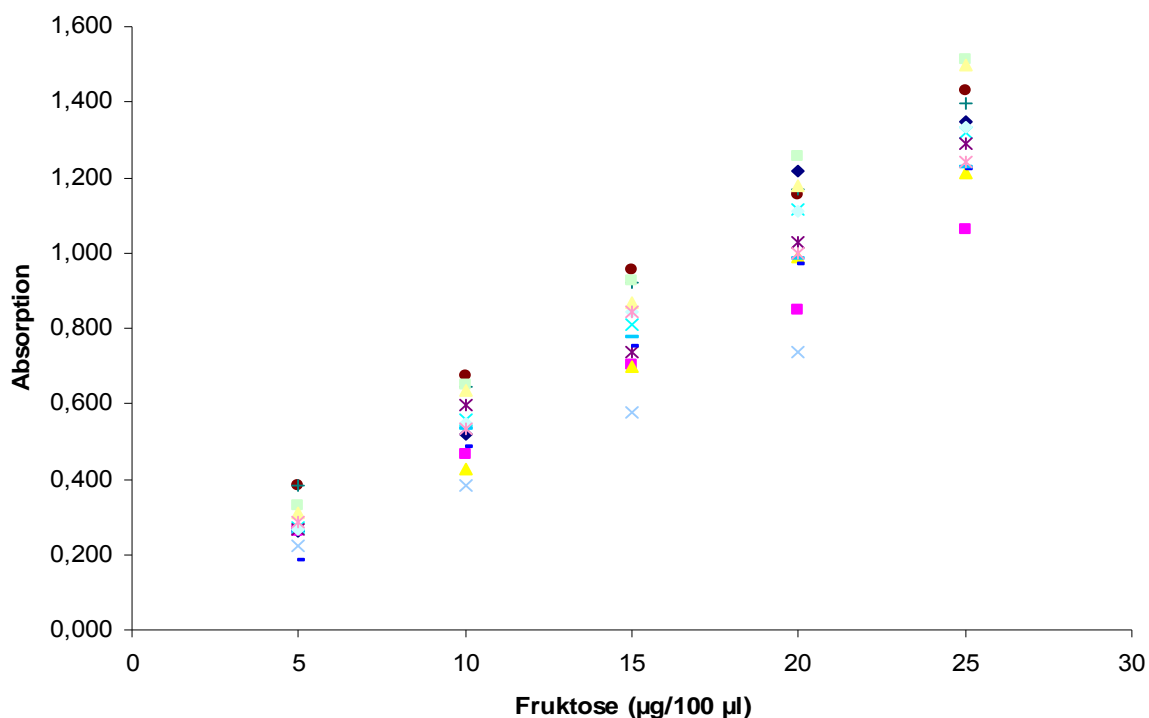


Abbildung 3.2 Darstellung aller Messwerte der einzelnen Kalibrierungen

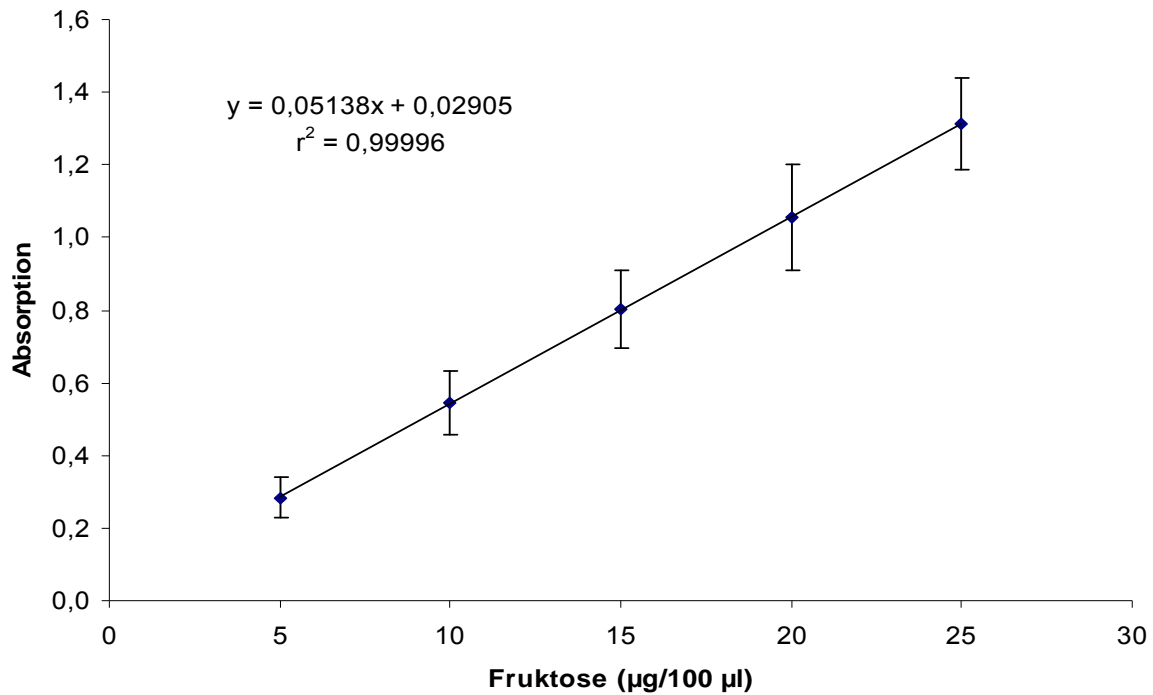


Abbildung 3.3 Darstellung der Mittelwerte von n=14 Kalibrierungen, $r^2=0,99996$

3.1.2 Nachweisgrenze von Fruktose in Inulin (*Dahlia*)

Die Untergrenze für die Inulin-Bestimmung wird durch das Lambert-Beersche Gesetz mit einer Absorption von 0,2 festgelegt, so dass die Nachweisgrenze bei 5 µg/100 µl liegt. Allerdings zeigt die Kalibrierreihe auch darunter - bis 0,1 µg/100 µl - noch eine gute Linearität (s. Tab. 3.2, Abb. 3.4).

Tabelle 3.2 Einwaagen für die Absorption und die Bestimmung der Nachweisgrenze von Inulin (*Dahlia*)

Einwaage Inulin (µg/100 µl)	Absorption
0,1	0,031
1,0	0,080
5,0	0,301
10,0	0,579
20,0	1,096

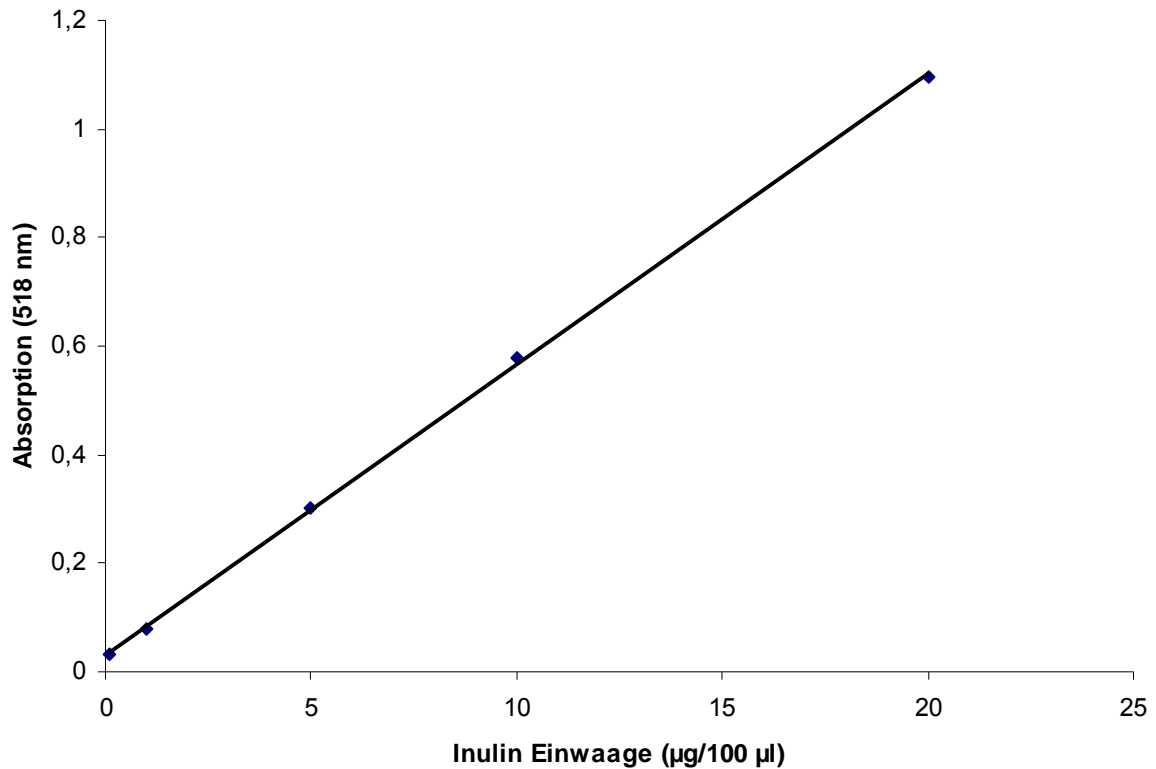


Abbildung 3.4 Kalibrierreihe zur Bestimmung der Nachweisgrenze, $r^2=0,9997$

3.1.3 Überprüfung der Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Als Testsubstanz wurde Inulin (*Dahlia*) verwendet. In der Literatur [Kimberley, 1994] ist eine Wiederfindung von 98 % angegeben. Die Messreihe wurde über fünf Tage angelegt (s. Tab. 3.4). Es wurden jeweils drei unterschiedliche Probenkonzentrationen im Bereich von 5, 15 und 25 µg/100 µl vermessen. Am ersten Tag wurde außerdem von der 15 µg/100 µl Konzentration eine Vierfachbestimmung durchgeführt, um die interday-Reproduzierbarkeit zu bestimmen (s. Tab. 3.3).

3.1.3.1 Vierfachbestimmung der Inulin Konzentration 15 µg/100 µl

Tabelle 3.3 Vierfachbestimmung der Inulin Konzentration 15 µg/100 µl zur Ermittlung der interday-Reproduzierbarkeit

Messung	Soll-Fruktose (µg/100 µl)	Ist-Fruktose (µg/100 µl)	Wiederfindung (%)
1	15,36	14,99	97,6
2	15,36	15,62	101,7
3	15,36	14,55	94,7
4	15,36	15,01	97,7

Durchschnittliche Wiederfindung: 97,9 %

Standardabweichung: 2,9 %

Relative Standardabweichung: 2,9 %

3.1.3.2 Messung über fünf Tage

Tabelle 3.4 Messung von verschiedenen Inulin-Konzentrationen über fünf Tage

Tag	Soll-Fruktose (µg/100 µl)	Ist-Fruktose (µg/100 µl)	Wiederfindung (%)
1	25,60	25,80	100,8
	15,36	14,99	97,6
	5,12	6,08	118,8
2	25,00	23,29	92,8
	15,00	14,46	96,4
	5,00	0,40	96,0
3	25,00	22,25	89,0
	15,00	13,86	92,4
	5,00	4,35	87,0
4	25,00	22,76	91,0
	15,00	13,54	90,3
	5,00	5,38	107,6
5	25,00	22,42	97,6
	15,00	13,39	89,3
	5,00	5,02	100,4

Durchschnittliche Wiederfindung:	96,5 %
Standardabweichung:	8,3 %
Relative Standardabweichung:	8,6 %

Die Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen, dass die Fruktose reproduzierbar bestimmt werden kann. Die Inulinwiederfindung konnte ebenfalls den Literaturwert von 98 % weitgehend bestätigen.

3.1.3.3 Negativkontrollen mit Arabinose

Als Negativkontrolle wurde Arabinose verwendet, ein Monosaccharid, welches von dem Testsystem nicht erfasst werden kann. Eine Messung mit Arabinose darf folglich keine Absorption zeigen. Dies wurde überprüft, indem eine Arabinoselösung mit einer Konzentration von 50 µg/100 µl dreimal vermessen wurde. Die Messungen lagen alle im Absorptionsbereich unter 0,1. Die Negativkontrolle ist somit als positiv zu bewerten, da die Werte unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

3.1.4 Extraktion von *Echinaceae purpureae radix* und Ermittlung des Fruktangehaltes in der Probe

3.1.4.1 Colorimetrische Vermessung der Fruktanprobe aus *Echinaceae purpureae radix pulv.* nach Gerbstofffällung mit Bleiacetat

Es wurden 5,069 g *Echinaceae purpureae radix pulv.* mit 50 ml Wasser, wie in 2.1.5 beschrieben, extrahiert. Nach der Extraktion wurden 10 ml des Extraktes abgenommen und mit den restlichen 40 ml eine Gerbstofffällung mit Bleiacetat, wie in Kap. 2.1.6.1 beschrieben, durchgeführt. Nach der Gerbstofffällung wurden von dem auf 25 ml eingengten Überstand erneut 10 ml abgenommen und mit den restlichen 15 ml eine Ethanol-fällung durchgeführt, wie in Kap. 2.1.7 beschrieben. Die Ausbeute nach der Ethanol-fällung betrug 0,442 g fällbare Substanz.

Es wurden 10,4 mg ethanolgefälltes Material in 20 ml Wasser dem. gelöst, entsprechend einer Konzentration von 52 µg/100 µl. Dann wurden je zwei Messungen mit den Konzentrationen von 5,2; 26 und 52 µg/100 µl durchgeführt und die Fruktanmenge bestimmt (s. Tab. 3.5).

Tabelle 3.5 Bestimmung des Fruktangehaltes in *Echinaceae purpureae radix pulv.*

Probenkonzentration (µg/100 µl)	Absorption	Fruktangehalt (%)
52	1,629	108,2
26	0,843	110,4
5,2	0,176	102,9

Durchschnittlicher Fruktangehalt: 107 %

3.1.4.2 Berechnungen der Ausbeute und des Fruktangehaltes in der Droge

Von 5,069 g *Echinaceae purpureae radix pulv.* wurden nach der Extraktion 20 % des Drogenmaterials abgetrennt, so dass umgerechnet mit Extrakt aus 4,055 g Droge die Gerbstofffällung durchgeführt wurde. Nach der Gerbstofffällung wurden erneut umgerechnet 40 % des Drogenmaterials abgetrennt. Folglich waren vor der Ethanol-fällung noch umgerechnet 2,433 g Droge vorhanden. Aus diesen 2,433 g Drogenmaterial wurden 0,442 g Ethanol unlösliches Material ausgefällt, was einem prozentualen Anteil von 18,17 % entspricht. In den 0,442 g gefälltem Material findet man 107 % Fruktose. Was bedeutet, dass das Fällungsprodukt aus 100 % Fruktan besteht. Das entspricht einem prozentualen Fruktangehalt in der Droge von 18,17 %.

3.1.5 Colorimetrische Vermessung von Inulin (*Dahlia*) nach Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen

Zur Überprüfung der Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen wurde folgender Versuch durchgeführt: Die Polyamidsäulen wurden mit 2 ml eines dunkelbraunen *Echinaceae purpureae radix* Extrakt belastet. Das fast klare Eluat wurde verworfen. Dann wurde eine wässrige Lösung mit einer Inulin-(*Dahlia*)-Konzentration von ca. 15 µg/ 100 µl über die Säule gegeben und die Säule wie im Kap. 2.1.6.3 beschrieben, gewaschen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 wiedergegeben. Diese zeigen, dass Inulin (*Dahlia*) praktisch nicht an Polyamidsäulen gebunden wird.

Tabelle 3.6 Wiederfindung von Inulin (*Dahlia*) nach Polyamid-Säulen-Chromatographie

Soll-Fruktose (µg/100 µl)	Absorption	Ist-Fruktose (µg/100 µl)	Wiederfindung (%)
15,36	0,800	15,00	97,66
15,36	0,773	14,48	94,27
15,36	0,800	15,00	97,66
15,84	0,786	14,73	92,99
15,84	0,854	16,05	101,33
15,84	0,831	15,61	98,55
15,84	0,837	15,72	99,24
15,84	0,803	15,06	95,08
15,84	0,856	16,09	101,58
15,38	0,719	13,43	87,32
15,38	0,725	13,54	88,04
15,38	0,743	13,89	90,31

Durchschnittliche Wiederfindung:	95,3 %
Standardabweichung:	4,9 %
Relative Standardabweichung:	5,1 %

3.2 Fraktionieren von Fruktangemischen

3.2.1 Fraktionierungen durch Lösen in unterschiedlichen Ethanol-Wasser-Gemischen

3.2.1.1 Versuchsreihe 1: Ethanolfraktionen zwischen 96 % und 0 %

3.2.1.1.1 Einwaagen und Ausbeuten

Es wurde eine Mischung von 300,21 mg Inulin (*Dahlia*) und 200,46 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 397,4 mg. Dies entspricht 79,4 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000.

Tabelle 3.7 Inulinausbeuten nach Fraktionierung mit Ethanol

Ethanolfraktion (%)	96	80	60	40	20	0
Masse (mg)	1,9	36,2	44,3	74,6	107,8	100,1
Ausbeute (%)	0,52	9,91	12,13	20,43	29,52	27,41

3.2.1.1.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Für jede Fraktion wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Mittelwerte des DP sind in Tabelle 3.8 dargestellt. Für die Fraktion, welche in 96 % Ethanol gelöst wurde, war zu wenig Material für eine DP Bestimmung vorhanden.

Tabelle 3.8 DP der Fruktane in den Ethanolfraktionen (GC-Bestimmung)

Ethanolfraktion (%)	80	60	40	20	0
DP (n = 4)	2,4	7,0	6,8	10,4	24,4
Standardabweichung	0,2	0,1	0,1	0,8	1,6
RSD (%)	6,4	0,8	0,9	8,1	6,4

In Abbildung 3.5 sind noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

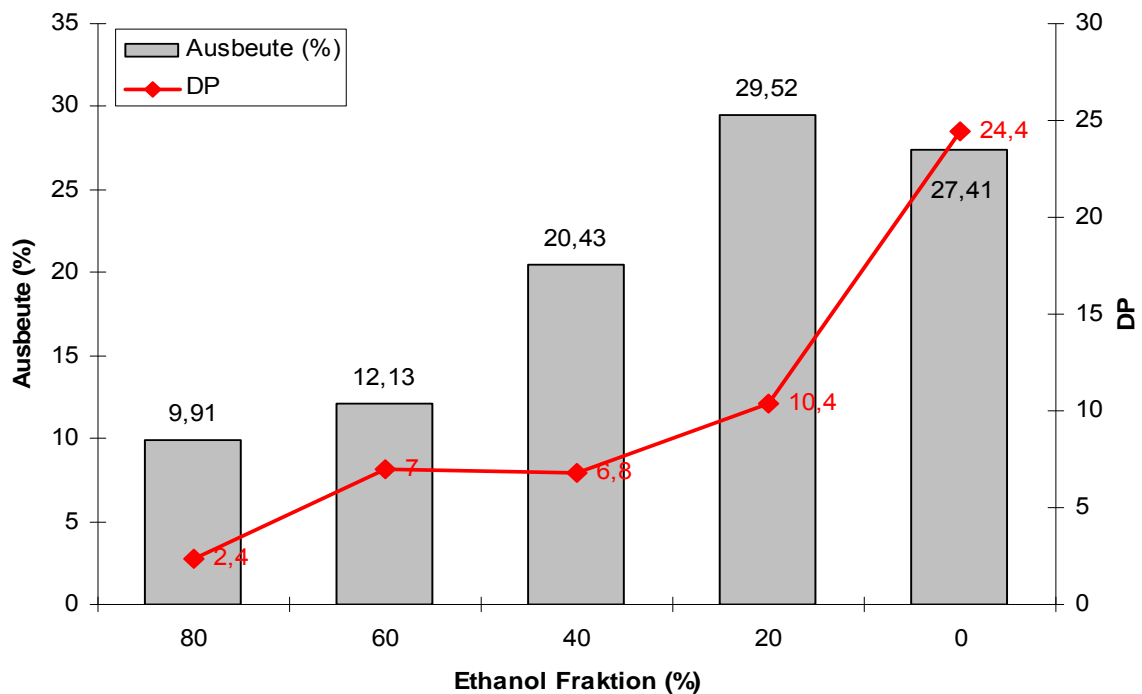


Abbildung 3.5 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen

Die Ausbeuten nehmen mit abnehmendem Ethanolgehalt der Fraktionen zu. Die Hälfte des Fruktanmaterials löst sich in den beiden letzten Fraktionen. Der DP der Fruktane nimmt im Allgemeinen mit abnehmendem Ethanolgehalt in den Fraktionen zu. Es ist zu beobachten, dass sich die 40 % und 60 % Ethanolfraktion kaum im DP der Fruktane unterscheiden, und dass der DP zwischen der 20 % und 0 % Ethanolfraktion sehr stark ansteigt.

3.2.1.2 Versuchsreihe 2: Feinere, sequentielle Lösung der Fruktane, durch kleinere Ethanol-Konzentrationsunterschiede der Ethanolfraktionen zwischen 40 % und 0 %

Versuchsreihe 2 wurde durchgeführt, um im Konzentrationsbereich zwischen 40 % und 0 % Ethanolkonzentration eine feinere Fraktionierung zu erreichen.

3.2.1.2.1 Einwaagen und Ausbeuten

Es wurde eine Mischung von 201,26 mg Inulin (*Dahlia*) und 200,24 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 322,7 mg. Dies entspricht 80,4 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000.

Tabelle 3.9 Inulinausbeuten nach Fraktionierung mit Ethanol

Ethanolfraktion (%)	40	20	15	10	5	0
Masse (mg)	204,0	55,5	20,7	1,9	20,4	20,2
Ausbeute (%)	63,2	17,2	6,4	0,6	20,4	20,2

3.2.1.2.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Die Mittelwerte des DP sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Für die Fraktion, welche in 10 % Ethanol gelöst wurde, war zu wenig Material für eine DP Bestimmung vorhanden.

Tabelle 3.10 DP der Fruktane in den Ethanolfraktionen (GC-Bestimmung)

Ethanolfraktion (%)	40	20	15	5	0
DP (n = 2)	6,6	18,1	23,8	20,2	29,3

In Abbildung 3.6 sind noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

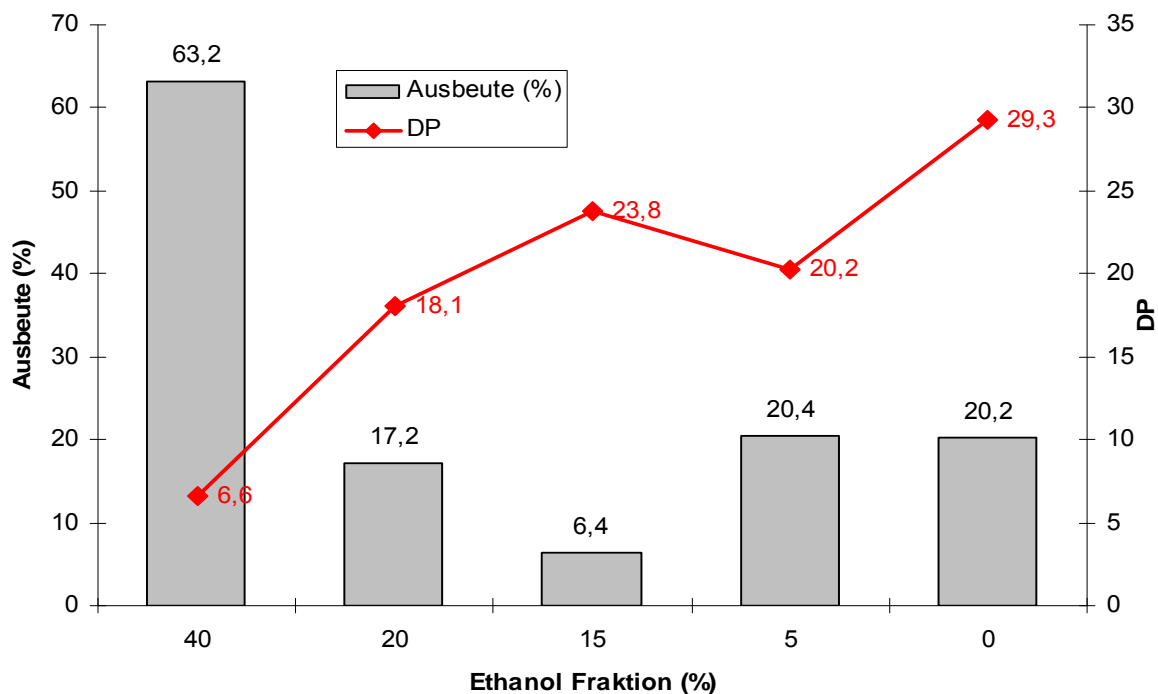


Abbildung 3.6 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen

Die 40 % Ethanolfraktion zeigt die größte Ausbeute, weil hier alle Fruktane der Ethanolkonzentrationen von 96 % bis 40 % kumulieren. Der DP der Fruktane nimmt folglich auch von der 40 % Ethanolfraktion zur 20 % Ethanolfraktion am stärksten zu.

3.2.1.3 Versuchsreihe 3: Fraktioniertes Lösen von reinem Inulin 5000 mit Ethanolfraktionen zwischen 80 % bis 0 %

3.2.1.3.1 Einwaagen und Ausbeuten

Es wurde eine Mischung von 201,67 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.11 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 156,18 mg. Dies entspricht 77,4 % der Einwaage von Inulin 5000.

Tabelle 3.11 Inulinausbeuten nach Fraktionierung mit Ethanol

Ethanolfraktion (%)	80	60	40	20	10	0
Masse (mg)	78,8	49,3	28,1	0	0	0
Ausbeute (%)	50,4	31,6	18,0	0	0	0

3.2.1.3.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Die Mittelwerte des DP sind in Tabelle 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12 DP der Fruktane in den Ethanolfraktionen (GC-Bestimmung)

Ethanolfraktion (%)	80	60	40
DP (n = 2)	1,8	6,6	6,9

In Abbildung 3.7 sind noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

Die Ausbeuten nehmen mit abnehmendem Ethanolgehalt der Fraktionen ab. Die Hälfte des Fruktanmaterials fällt in den ersten Fraktionen aus. Der DP der Fruktane nimmt im Allgemeinen mit abnehmendem Ethanolgehalt in den Fraktionen zu, wobei die Zunahmen des DP der Inulin 5000 Fraktionen hauptsächlich zwischen 80 % und 60 % Ethanolgehalt der Fraktionen zu beobachten sind.

Ergebnisse

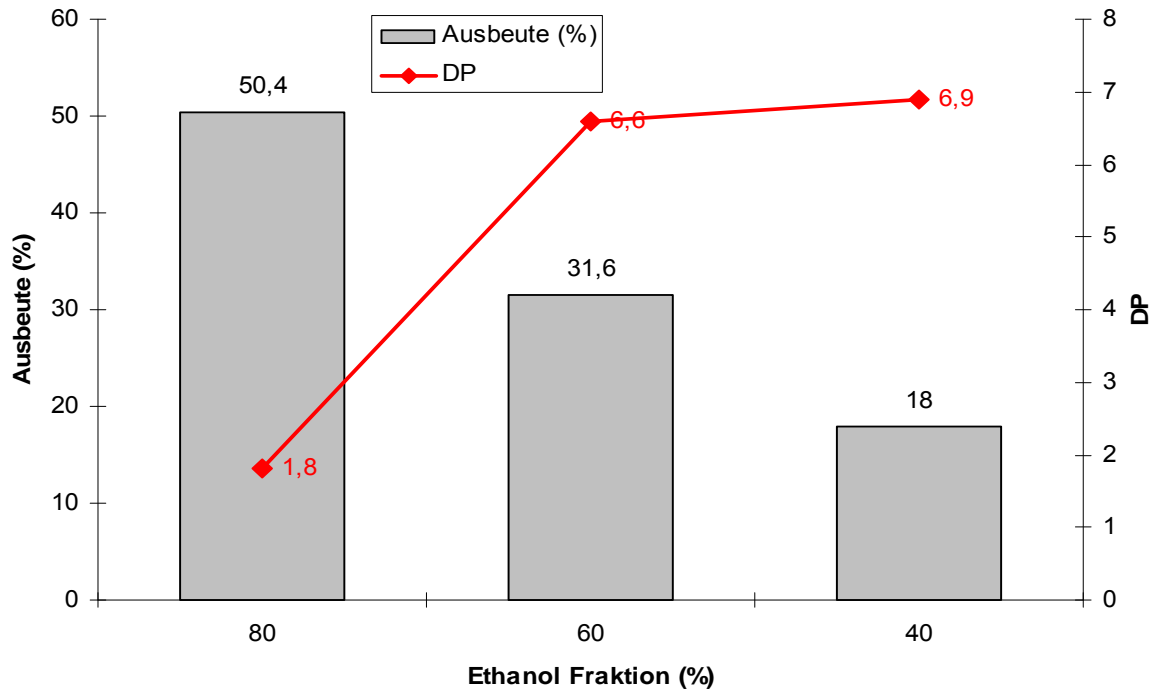


Abbildung 3.7 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen

3.2.2 Fraktionierungen durch Lösen in unterschiedlichen Isopropanol-Wasser-Gemischen

3.2.2.1 Einwaagen und Ausbeuten

Es wurde eine Mischung von 297,8 mg Inulin (*Dahlia*) und 202,0 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.13 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 347 mg. Dies entspricht 69,4 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000. Die mit Wasser bei Zimmertemperatur gewonnene Isopropanolfraktion wird im Folgenden als „0K“ bezeichnet, und die nach Erwärmen gewonnenen Isopropanolfraktion wird als „0W“ bezeichnet.

Tabelle 3.13 Inulinausbeuten nach Fraktionierung mit Isopropanol. *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Isopropanolfraktion (%)	100	80	60	40	20	10	OK	OW
Masse (mg)	11,5	4,1	0	27,0	81,1	17,4	30,4	175,5
Ausbeute (%)	3,3	1,2	0	7,8	23,4	5,0	8,8	50,6

3.2.2.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Die Mittelwerte des DP sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Die Fraktionen, die mit 100 % bis 60 % Isopropanol gelöst wurden, konnten mangels Masse nicht bestimmt werden. Sie stellen mengenmäßig nur 4,6 % der gelösten Fraktionen dar und werden darum nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.14 DP der Fruktane in den Isopropanolfractionen (GC-Bestimmung). *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Isopropanolfraktion (%)	40	20	10	OK	OW
DP (n = 2)	10,1	11,6	15	18,6	22,9

In Abbildung 3.8 werden noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

Es ist ein gleichmäßiger Anstieg des DP von 10 bis 23 in den Fraktionen, bei abnehmendem Isopropanolgehalt, zu beobachten. Der größte Teil der Fruktane löst sich in der Wasserfraktion nach Erwärmen.

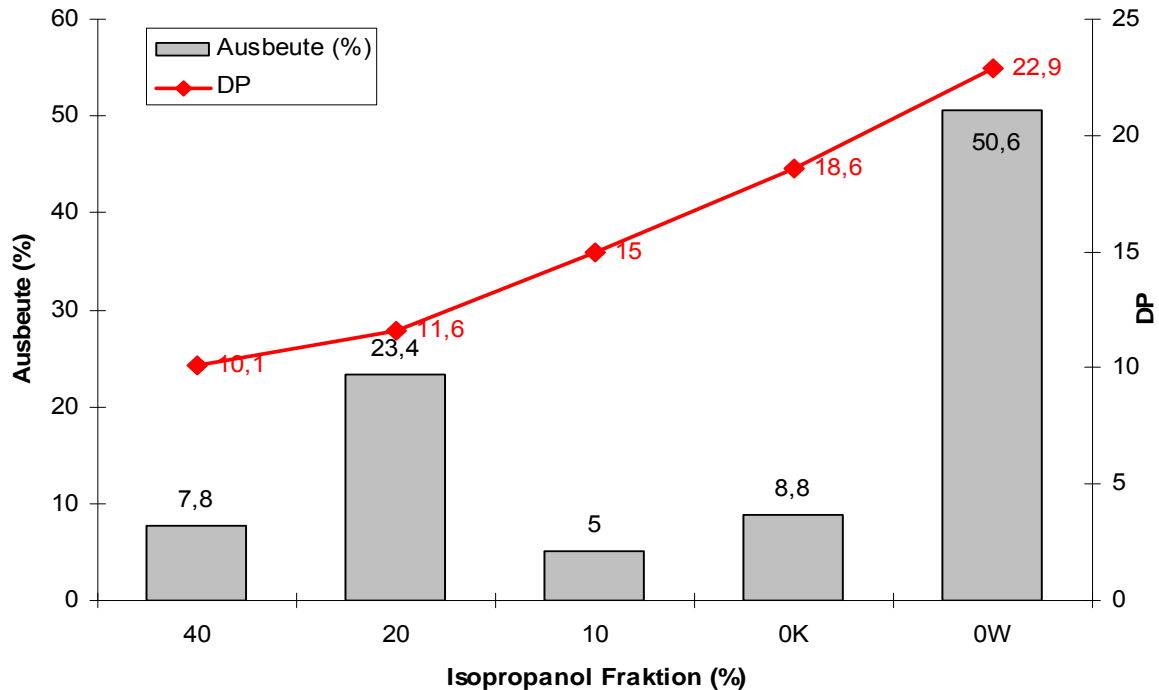


Abbildung 3.8 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen. *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

3.2.3 Fraktionierungen durch Lösen in unterschiedlichen Aceton-Wasser-Gemischen

3.2.3.1 Einwaagen und Ausbeuten

Es wurde eine Mischung von 302,0 mg Inulin (*Dahlia*) und 222,1 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.15 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 439,5 mg. Dies entspricht 84 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000. Die mit Wasser bei Zimmertemperatur gewonnene Fraktion wird als „OK“ bezeichnet, und die in Wasser nach Erwärmen gewonnene Fraktion wird als „OW“ bezeichnet.

Tabelle 3.15 Inulinausbeuten nach Fraktionierung mit Aceton. *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Acetonfraktion (%)	100	80	60	40	20	10	OK	OW
Masse (mg)	3,3	6,2	38,2	23,4	76,8	32,5	33,1	226,0
Ausbeute (%)	0,8	1,4	8,7	5,3	17,5	7,4	7,5	51,4

3.2.3.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Die Mittelwerte des DP sind in Tabelle 3.16 dargestellt. Die Fraktionen, welche mit 100 % und 80 % Aceton gelöst wurden, konnten mangels Masse nicht bestimmt werden. Sie stellen mengenmäßig nur 2,2 % der gelösten Fraktionen dar und werden darum nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.16 DP der Fruktane in den Acetonfraktionen (GC-Bestimmung). *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Acetonfraktion (%)	60	40	20	10	OK	OW
DP (n = 2)	3,9	5,6	7,1	9,2	10,7	15,3

In Abbildung 3.9 werden noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

Es ist ein gleichmäßiger Anstieg des DP von 4 bis 15,3 in den Fraktionen, bei abnehmendem Isopropanolgehalt, zu beobachten. Der größte Teil der Fruktane löst sich in der Wasserfraktion nach Erwärmen.

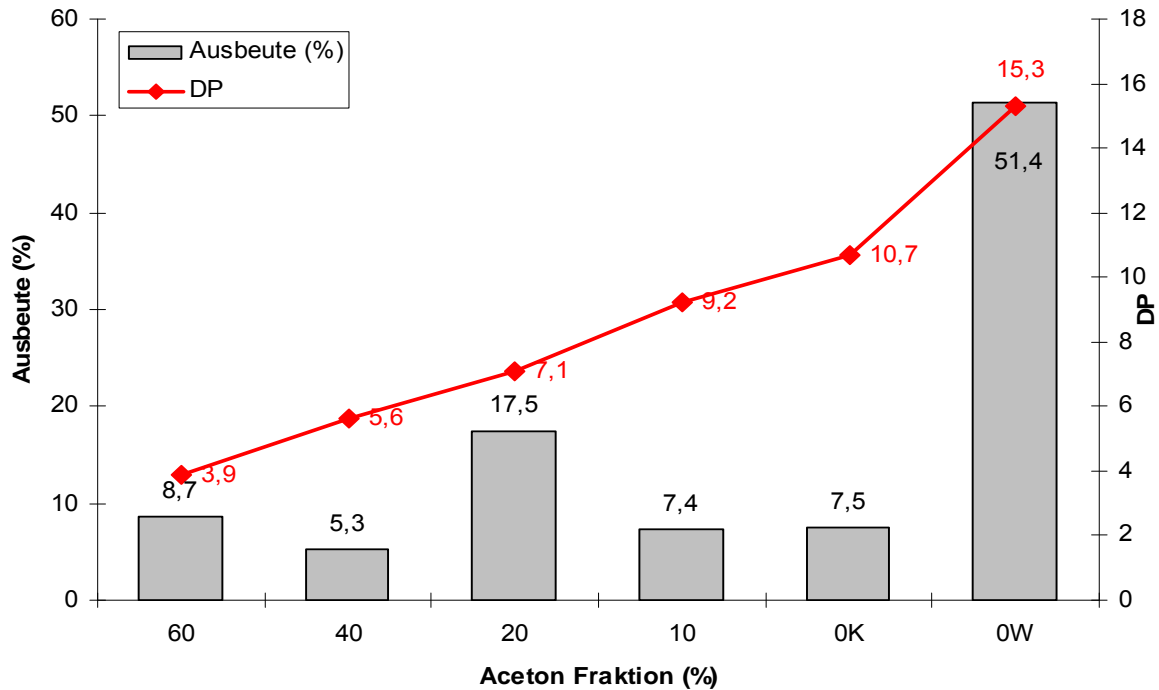


Abbildung 3.9 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen. *0K: in Wasser ohne Wärme gelöst, 0W: in Wasser mit Wärme gelöst*

3.2.4 Fraktionierungen durch Lösen in unterschiedlichen Acetonitril-Wasser-Gemischen

3.2.4.1 Einwaagen und Ausbeuten Versuchsreihe 1 und 2

Es wurde für Versuchsreihe 1 eine Mischung von 601,1 mg Inulin (*Dahlia*) und 502,1 mg Inulin 5000 eingewogen. Für Versuchsreihe 2 wurde etwa die Hälfte eingewogen: 301,2 mg Inulin (*Dahlia*) und 264,5 mg Inulin 5000. Die Fraktionen wurden, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3.17 und 3.18 dargestellt. Die Gesamtausbeute bei Versuchsreihe 1 betrug 862,8 mg. Dies entspricht 78,2 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000. Die Gesamtausbeute bei Versuchsreihe 2 betrug 435,6 mg. Dies entspricht 77,0 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000. Die mit Wasser bei Zimmertemperatur gewonnene Fraktion wird als „0K“ bezeichnet, und die in Wasser nach Erwärmen gewonnene Acetonitrilfraktion wird als „0W“ bezeichnet.

Tabelle 3.17 Inulinausbeuten Versuchsreihe 1 nach Fraktionierung mit Acetonitril.
OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst

Acetonitrilfraktion (%)	100	80	60	40	20	10	OK	OW
Masse (mg)	0,6	7,9	79,8	53,1	129,3	91,5	83,2	417,4
Ausbeute (%)	0	0,9	9,3	6,2	15,0	10,7	9,6	48,4

Tabelle 3.18 Inulinausbeuten Versuchsreihe 2 nach Fraktionierung mit Acetonitril.
OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst

Acetonitrilfraktion (%)	100	80	60	40	20	10	OK	OW
Masse (mg)	0	6,1	25,8	27,2	82,1	48,9	21,2	224,4
Ausbeute (%)	0	1,4	5,9	6,2	18,9	11,2	4,8	51,5

3.2.4.2 DP-Bestimmung

Von den einzelnen Fraktionen wurde, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, durch GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses der durchschnittliche Polymerisationsgrad der Fruktane bestimmt. Die Mittelwerte der DP sind in Tabelle 3.19 und 3.20 dargestellt. Die Fraktionen, welche mit 100 % und 80 % Acetonitril gelöst wurden, konnten mangels Masse nicht bestimmt werden. Sie stellen mengenmäßig nur 0,9 bzw. 1,4 % der gelösten Fraktionen dar und werden darum nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.19 DP der Fruktane in den Acetonitrilfraktionen der Versuchsreihe 1 (GC-Bestimmung). *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Acetonitrilfraktion (%)	60	40	20	10	OK	OW
DP (n = 2)	2,2	3,6	7,0	8,8	9,9	11,9

Ergebnisse

Tabelle 3.20 DP der Fruktane in den Acetonitrilfraktionen der Versuchsreihe 2 (GC-Bestimmung). *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Acetonitrilfraktion (%)	60	40	20	10	OK	OW
DP (n = 2)	1,1	4,0	6,7	6,5	8,0	10,7

In Abbildung 3.10 und 3.11 werden noch einmal die Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen der beiden Versuchsreihen dargestellt.

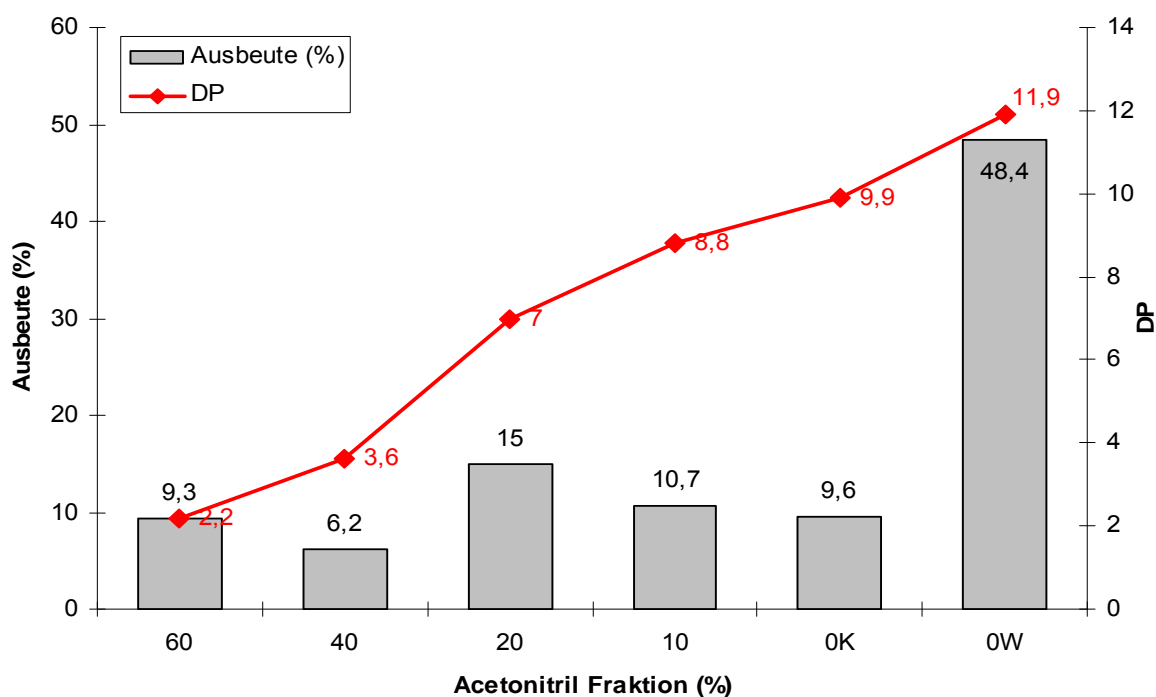


Abbildung 3.10 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen der Versuchsreihe 1. *OK: in Wasser ohne Wärme gelöst, OW: in Wasser mit Wärme gelöst*

Ergebnisse

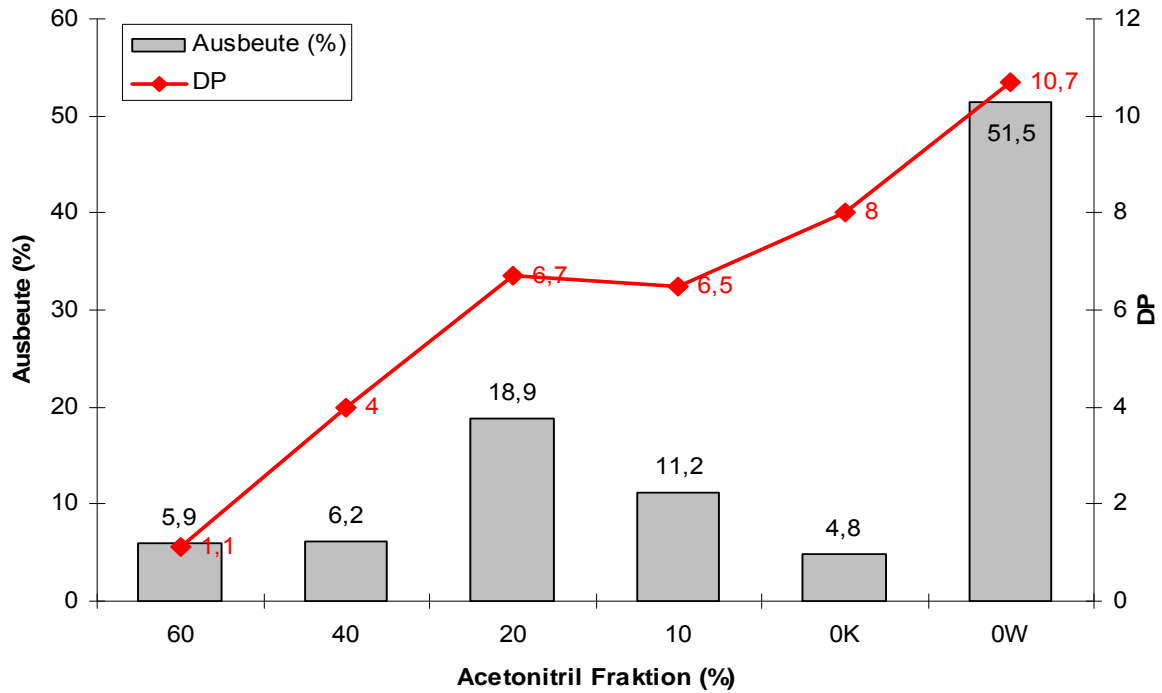


Abbildung 3.11 Darstellung der Ausbeuten an Fruktanen und ihr DP in den einzelnen Fraktionen der Versuchsreihe 2. *0K: in Wasser ohne Wärme gelöst, 0W: in Wasser mit Wärme gelöst*

Die Löslichkeit der Fruktane ist in Acetonitril allgemein schlecht, da erst ab einem Acetonitrilanteil von etwa 60 % die Fruktane in Lösung gehen. Zwischen 60 % und 0 % Acetonitrilanteil lassen sich die Fruktane kontinuierlich, mit fallendem Acetonitrilanteil, in Fraktionen mit DP's zwischen 2 und 11, lösen.

3.3 HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane

3.3.1 Trennung von Fruktanen auf einer C-18-Säule mit PDA-Detektion

Es wurden 4,2 mg Glukose und 3,8 mg Fruktose in jeweils 10 ml Wasser gelöst. Von diesen Lösungen wurden jeweils 10 µl auf die Säule aufgetragen (s. Kap. 2.4.3) und die maximale Absorption zwischen 190 nm und 220 nm im Chromatogramm dargestellt. Als mobile Phase wurde Wasser verwendet, die Flussrate betrug 1 ml/min. Die einzelnen Chromatogramme sind in Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 dargestellt. Bei dem ersten Peak bei ca. 1,5 Minuten handelt es sich um den Injektionspeak. Eine Trennung beider Analyten war nicht möglich, sowohl die Glukose als auch die Fruktose eluierten nach ca. 2,5 Minuten. Die Detektorresponse war bei Fruktose deutlich besser als bei Glukose. Der Responsefaktor, welcher den Quotienten aus den Flächen von Fruktose und Glukose darstellt, betrug 3,24. Es wurden ebenfalls Versuche mit Saccharose und Maltooligosacchariden durchgeführt, wobei jedoch kein befriedigendes Trennergebnis erzielt werden konnte.

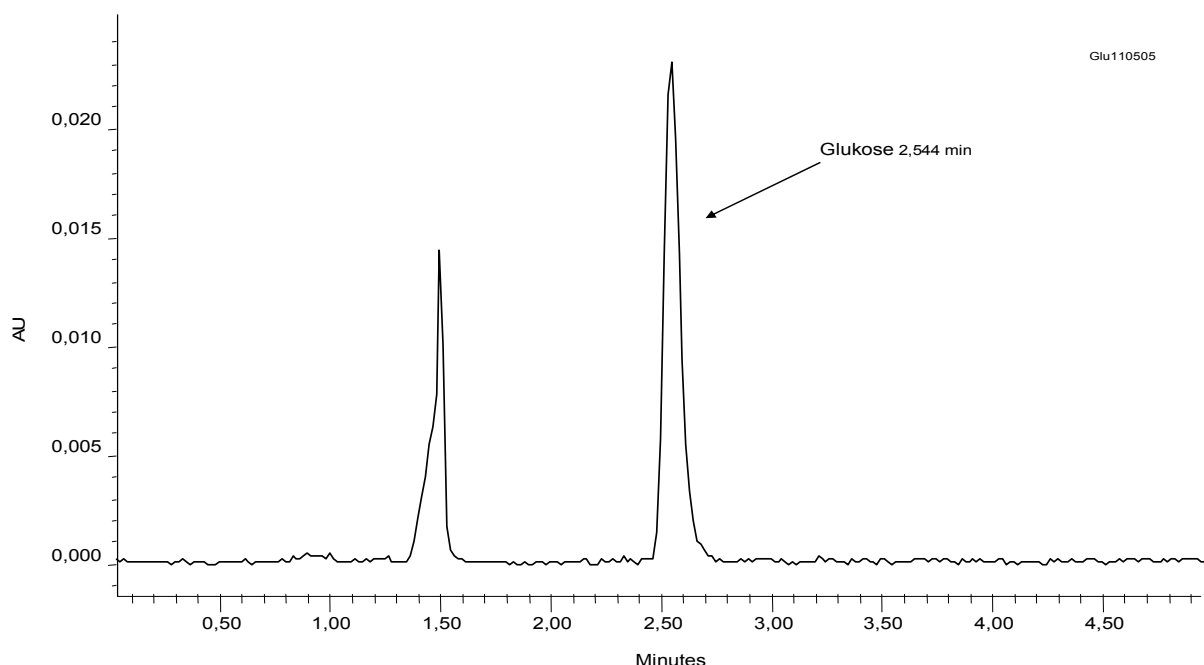


Abbildung 3.12 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von 10 µl Glukose

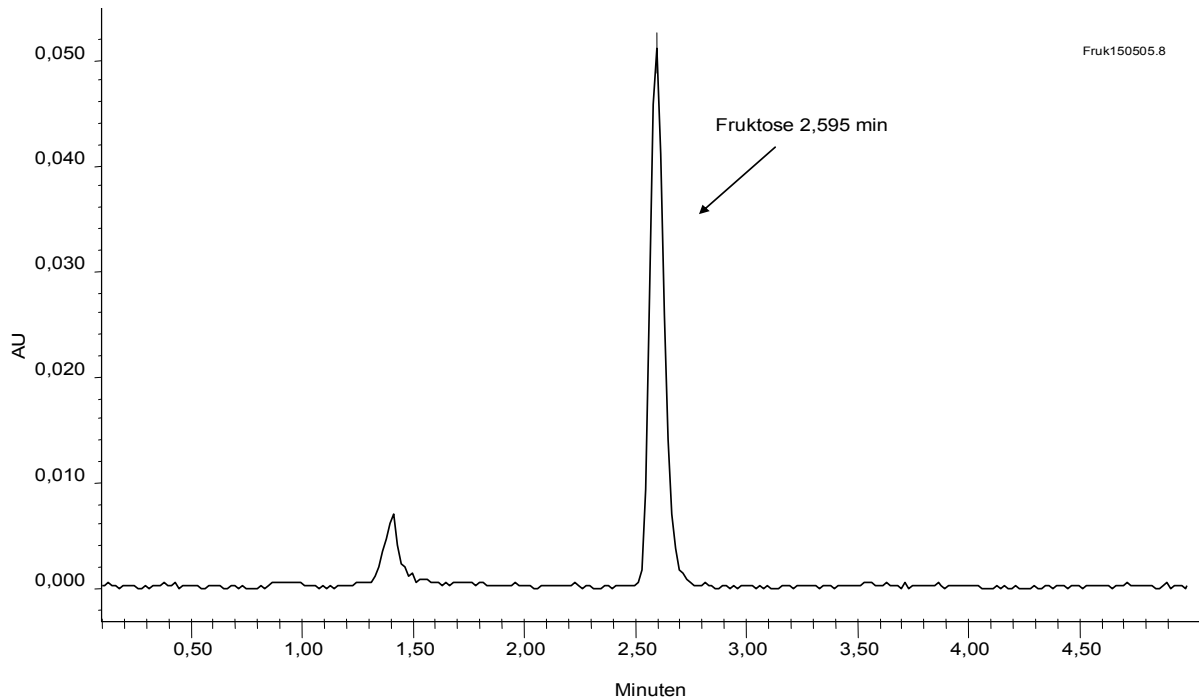


Abbildung 3.13 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von 10 µl Fruktose

3.3.2 Trennung von Fruktanen auf einer Amino-Säule mit RI-Detektion

3.3.2.1 Bestimmung der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Glukose und Fruktose auf einer Phenomenex Luna Amino[®]-Säule

Die Vermessung der Proben erfolgte wie im Kapitel 2.4.3 beschrieben. Die Messdaten sind in Tabelle 3.21 und 3.22 dargestellt. Glukose und Fruktose wurden jeweils einzeln vermessen.

Tabelle 3.21 Messdaten zur Bestimmung der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Glukose

Einwaage Glukose (mg)	Fläche Glukose (n=3)	Standard- abweichung	RSD (%)
20,38	2147066	14599	0,7
9,94	964312	70563	7,3
7,68	658299	37505	5,7
5,07	468077	25930	5,5
2,82	240080	5689	2,4
1,18	97870	11959	12,2
0,15	13902	503	3,6

Tabelle 3.22 Messdaten zur Bestimmung der Linearität, Nachweisgrenze und Response für Fruktose

Einwaage Fruktose (mg)	Fläche Fruktose (n=3)	Standard- abweichung	RSD (%)
20,32	2513100	60606	2,4
10,29	1115088	14039	1,3
7,37	732040	32962	4,5
4,89	526821	21225	4,0
2,53	230514	20604	8,8
1,15	100618	4932	4,9
0,29	24816	1919	7,7

Der Responsefaktor für die Fruktose wird ermittelt, indem man jeweils die gegen die Einwaage relativierten Flächen der Glukose- und Fruktosepeaks dividiert. Dies wurde für jede Einwaage gemacht, so dass im Mittel ein Fruktose-Responsefaktor von 0,92 angegeben werden kann.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wird als untere Grenze des Messbereiches ein Signal:Rauschverhältnis von 2,5:1 angenommen. In Abbildung 3.13 und 3.14 wurden

die Werte für die Konzentrationen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml (entspricht einer 5,6 μM Glukoselösung) dargestellt. Es ist zu sehen, dass bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml das Signal:Rauschverhältnis unter 2,5:1 liegt. Deshalb wird eine Glukosekonzentration von 1 mg/ml als Nachweisgrenze angesehen. Da 20 μl injiziert wurden und die Lösung eine Konzentration von 1,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hatte, liegt die **Nachweisgrenze für Glukose bei 23,6 μg** . Das Chromatogramm für die Fruktose ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Hier wurden ebenfalls 20 μl einer Fruktoselösung mit einer Konzentration von 1,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingespritzt, so dass die **Nachweisgrenze für Fruktose bei 23 μg** liegt.

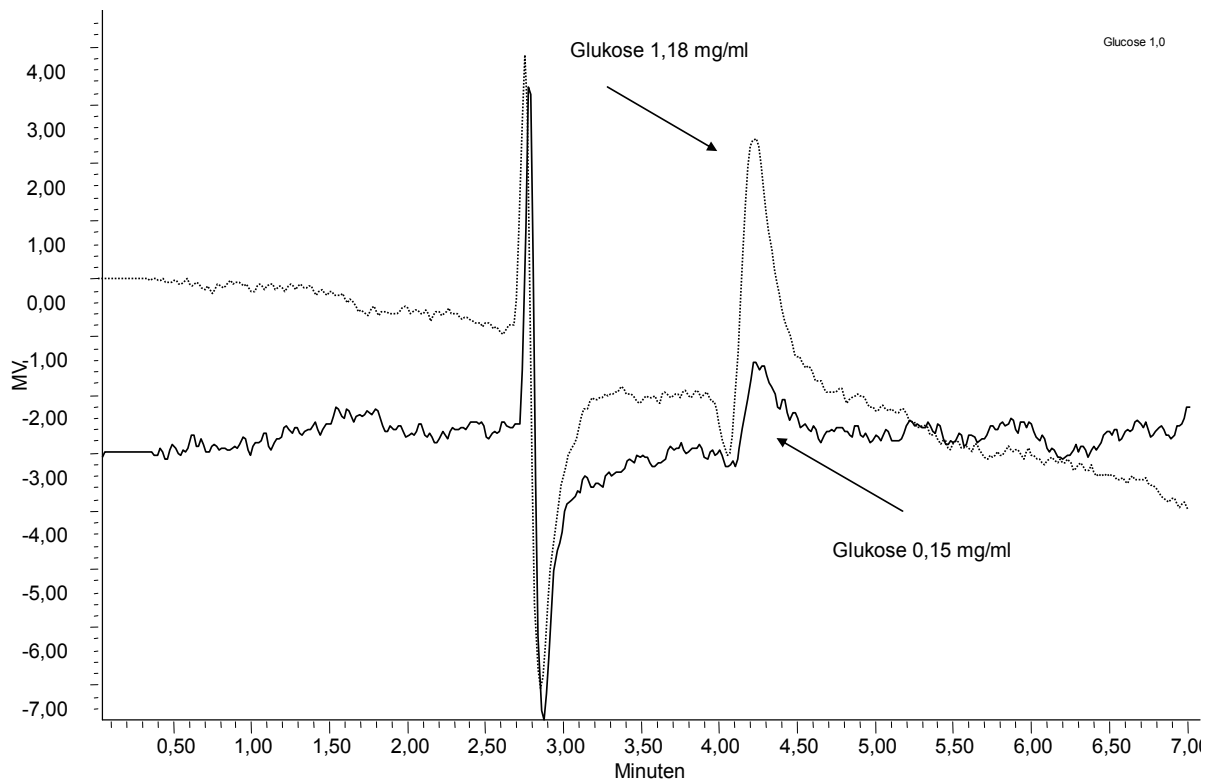


Abbildung 3.13 Overlay der Glukoseinjektionen der Konzentrationen 1,18 mg/ml und 0,15 mg/ml

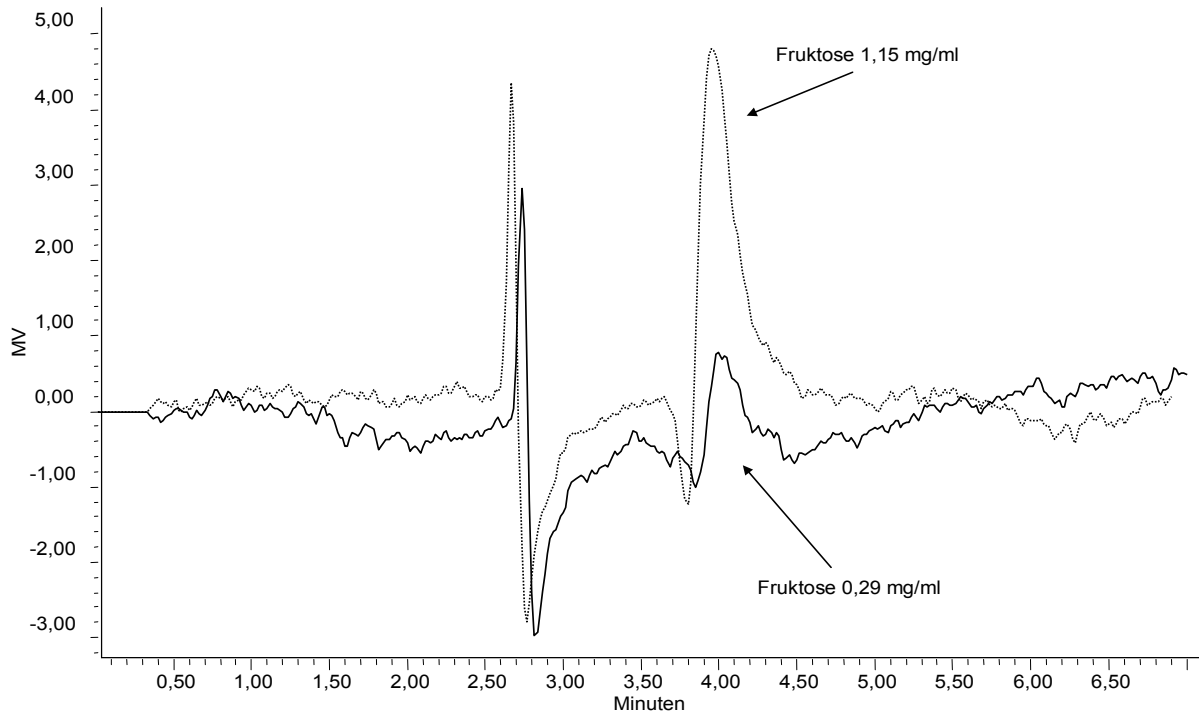


Abbildung 3.14 Overlay der Fruktoseinjektionen der Konzentrationen 1,15 mg/ml und 0,29 mg/ml

Zur Ermittlung der Linearität wurden die Einwaagen von Glukose und Fruktose gegen das Detektorsignal aufgetragen (s. Abb. 3.15), um einen Linearitätsfaktor zu ermitteln. Die Werte wurden den Tabellen 3.21 und 3.22 entnommen. Der Wert unterhalb der Nachweisgrenze wurde nicht berücksichtigt. Die Methode zeigt eine befriedigende Linearität, wiedergegeben durch den Korrelationsfaktor $r^2=0,9955$ für Glukose und $r^2=0,9944$ für Fruktose.

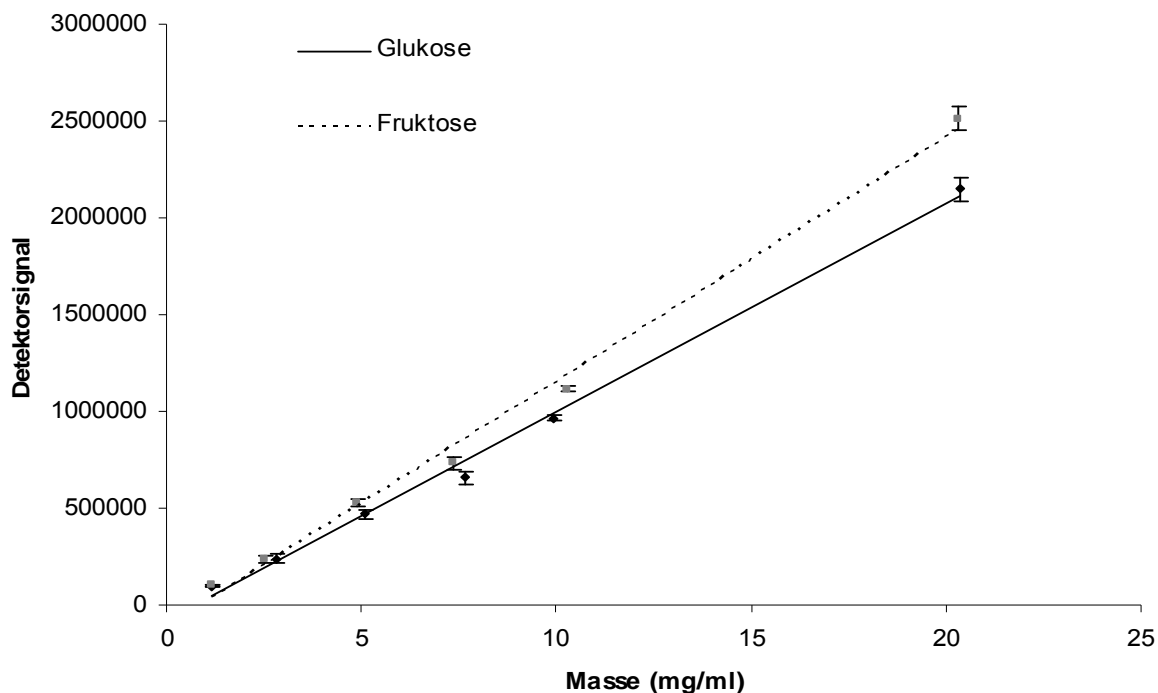


Abbildung 3.15 Darstellung der Mittelwerte der Kalibrierung von Glukose (n=3) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9955$ und von Fruktose (n=3) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9944$

3.3.2.2 Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Glukose und Fruktose auf einer Phenomenex Luna Amino[®]-Säule

Es wurden verschiedene Acetonitril/Wasser-Mischungen untersucht, um Glukose und Fruktose auf der Amino-Säule zu trennen. Dazu wurden 5,58 mg/ml Glukose und 5,21 mg/ml Fruktose zusammen in der mobilen Phase gelöst und 20 µl dieser Lösung auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min. Ein Mischungsverhältnis von 82 % Acetonitril und 18 % Wasser stellte sich als Optimum heraus, bei welchem eine vollständige Peaktrennung vorliegt. Es konnte eine Auflösung von 1,91 (s. Formel 3.1) ermittelt werden, welche einer Basislinientrennung (Definition Rücker *et al.*, 2001 ab $\geq 1,4$) entspricht. Das Chromatogramm ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Auflösung wurde nach der Formel 3.1 berechnet. Bei höheren Acetonitrilanteilen wurden die Peaks breiter und flacher, was aber zu keiner Verbesserung der Ergebnisse führte.

Formel 3.1 Berechnung der Auflösung [Rücker *et al.*, 2004]

$$\text{Auflösung} = 1,18 * \frac{\text{Retentionszeit Glukose} - \text{Retentionszeit Fruktose}}{\text{Halbwertsbreite Glukose} + \text{Halbwertsbreite Fruktose}}$$

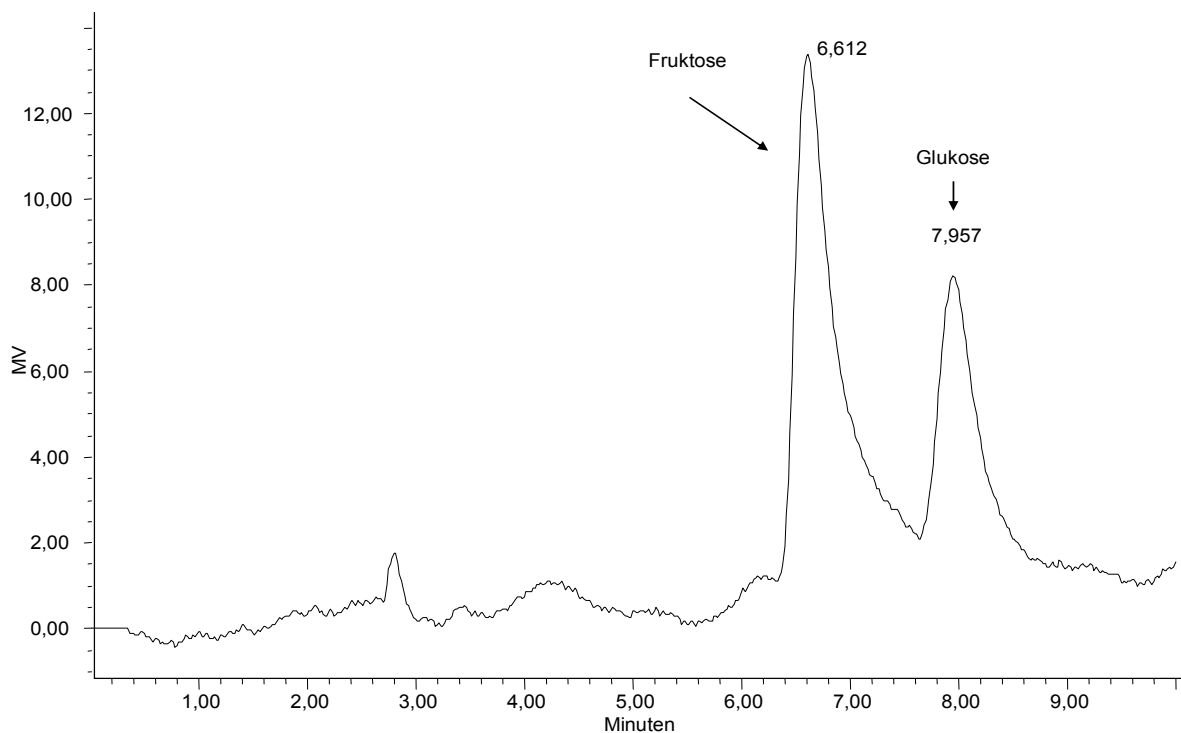


Abbildung 3.16 Trennung von Fruktose (5,21 mg/ml) und Glukose (5,58 mg/ml) auf der Amino-Säule mit einer 82 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung

3.3.2.3 Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Inulin 5000 auf einer Phenomenex Luna Amino[®]-Säule

Es wurden verschiedene Acetonitril/Wasser-Mischungen untersucht, um Inulin 5000 auf der Amino Säule zu trennen. Ein Mischungsverhältnis der mobilen Phase von 62 % Acetonitril und 38 % Wasser bei einer Flussrate von 1,0 ml/min stellten sich als Optimum heraus. Abbildung 3.17 zeigt das Chromatogramm einer Injektion von 20 µl Inulin 5000, wobei 43,68 mg/ml eingewogen wurden und die Probe, wie in 2.4.3.2 beschrieben, vorbereitet wurde. Als Lösungsmittel wurde aber nicht die mobile Phase

verwendet, sondern eine 60 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung, welche bei den weiteren Versuchen mit Inulin als Standardlösungsmittel verwendet wurde.

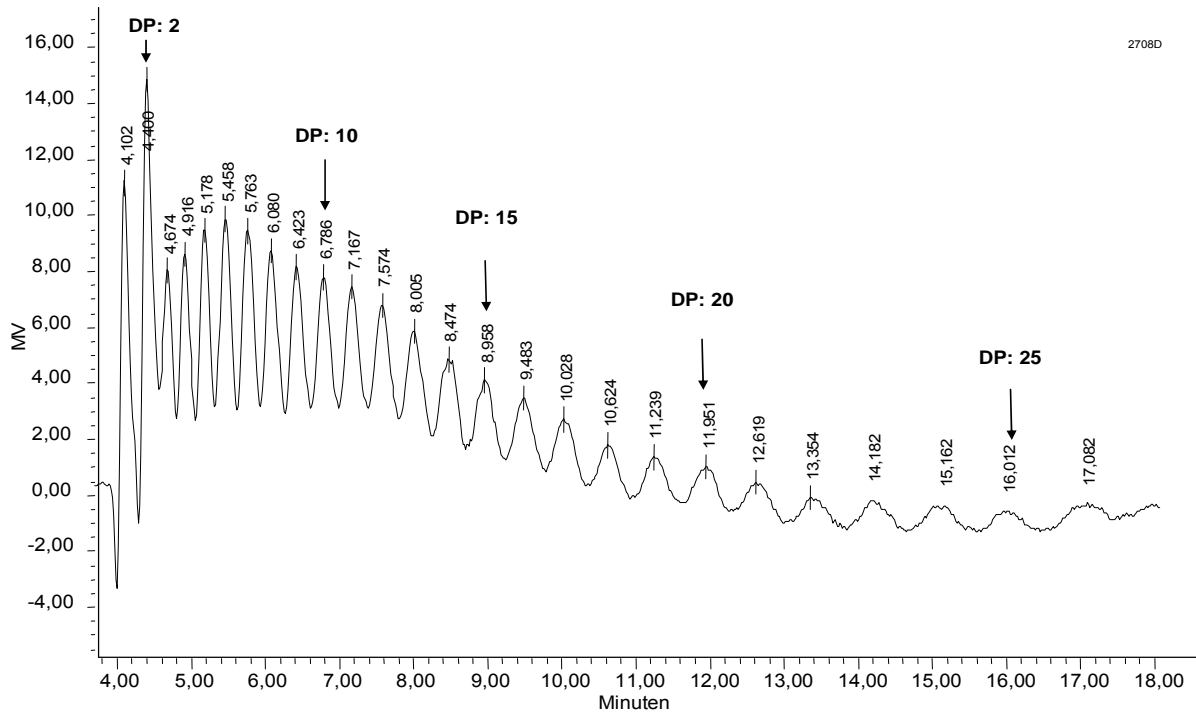


Abbildung 3.17 Inulin 5000 Probe auf einer Amino Säule mit einer 62 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase unter Angabe der Polymerisationsgrade (DP)

Wie man in Abbildung 3.17 sieht, werden die Peaks mit der Zeit bzw. mit zunehmendem DP der Fruktane immer flacher. Das liegt zum einen daran, dass die Response mit zunehmendem DP abnimmt. Zum anderen ist dies mit der Probenvorbereitung zu erklären. Da länger-kettige Fruktane sich immer schlechter in Acetonitril lösen, fallen diese bei der Probenvorbereitung aus und werden beim Zentrifugieren abgetrennt. Damit nimmt die Fruktanmenge in der Probenlösung mit zunehmenden Polymerationsgrad ab.

3.3.2.4 Zuordnung der Peaks zu ihrem Polymerisationsgrad

Zur Überprüfung des Polymerisationsgrades der Zucker der Inulin 5000 Probe wurden definierte Zucker bei gleichen Bedingungen wie in Kap. 3.3.2.3 beschrieben, vermessen und mit den Retentionszeiten der Inulin 5000 Probe verglichen. Als definierte Zucker wurden eingesetzt: Glukose (Monosaccharid), Saccharose (Disaccharid), Nystose (Tetrasaccharid) und Maltooligosaccharide (Oligosaccharid). Die Proben wurden in einer 60 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung gelöst und, wie in Kap. 2.4.3.2 beschrieben, vorbereitet. Zur besseren Übersichtlichkeit werden in Abb. 3.18 Chromatogramme von Glukose und Nystose und in Abb. 3.19 Chromatogramme von Saccharose und Maltooligosaccharide dargestellt. In Abb. 3.20 werden Inulin 5000, Saccharose und Nystose übereinander gelegt und in Abb. 3.21 der Oligosaccharidbereich noch einmal hervorgehoben. Inulin ist immer eine Mischung aus Fruktanen unterschiedlicher Kettenlänge, wobei die kleinsten Einheiten Glukose und Saccharose sind. Aus Abb. 3.21 ist zu erkennen, wie der Saccharosepeak genau über dem zweiten Peak der Inulin 5000 Probe liegt. Die Nystose als Vierfachzucker liegt in Abb. 3.20 zwischen dem Peak drei und vier der Inulinprobe. Die Maltooligosaccharide in Abb. 3.21 liegen im Bereich der Peaks vier bis acht der Inulin 5000 Probe. Aus diesem Grund ist es nun möglich, bei der reinen Inulin 5000 Probe in Abb. 3.17 die Peaks abzuzählen und somit auf den Polymerisationsgrad der einzelnen FOS-Peaks zu schließen.

Ergebnisse

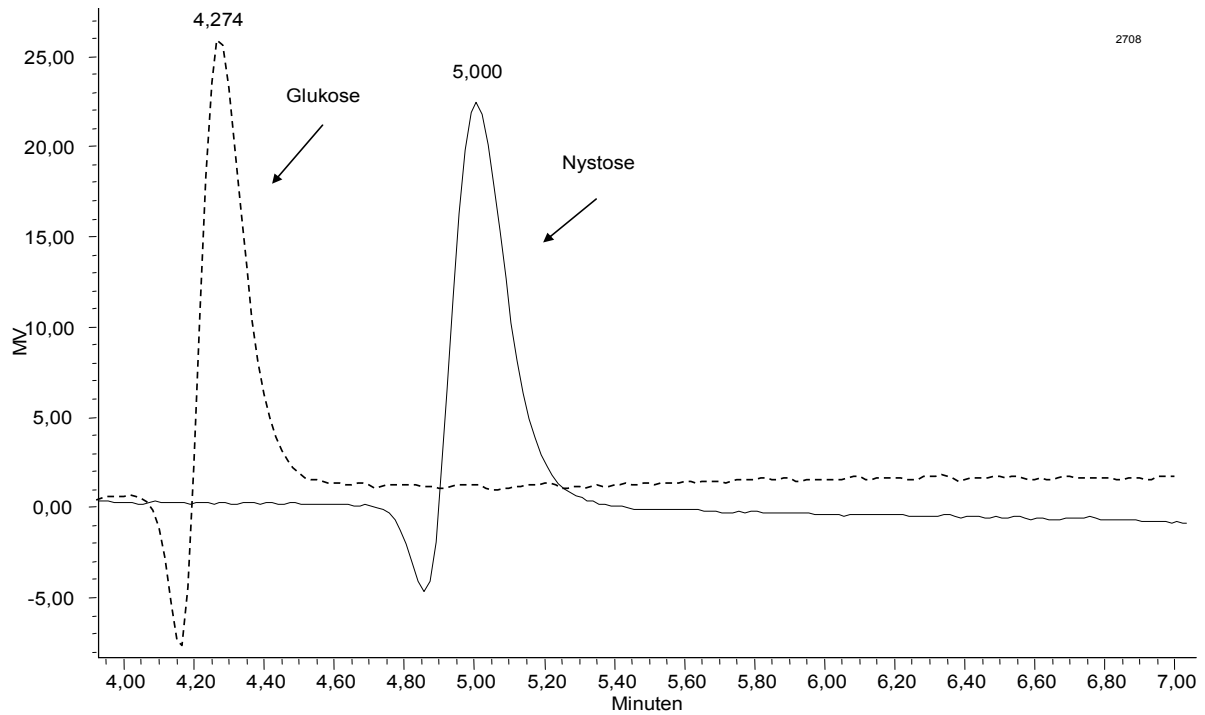


Abbildung 3.18 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Glukose und Nystose

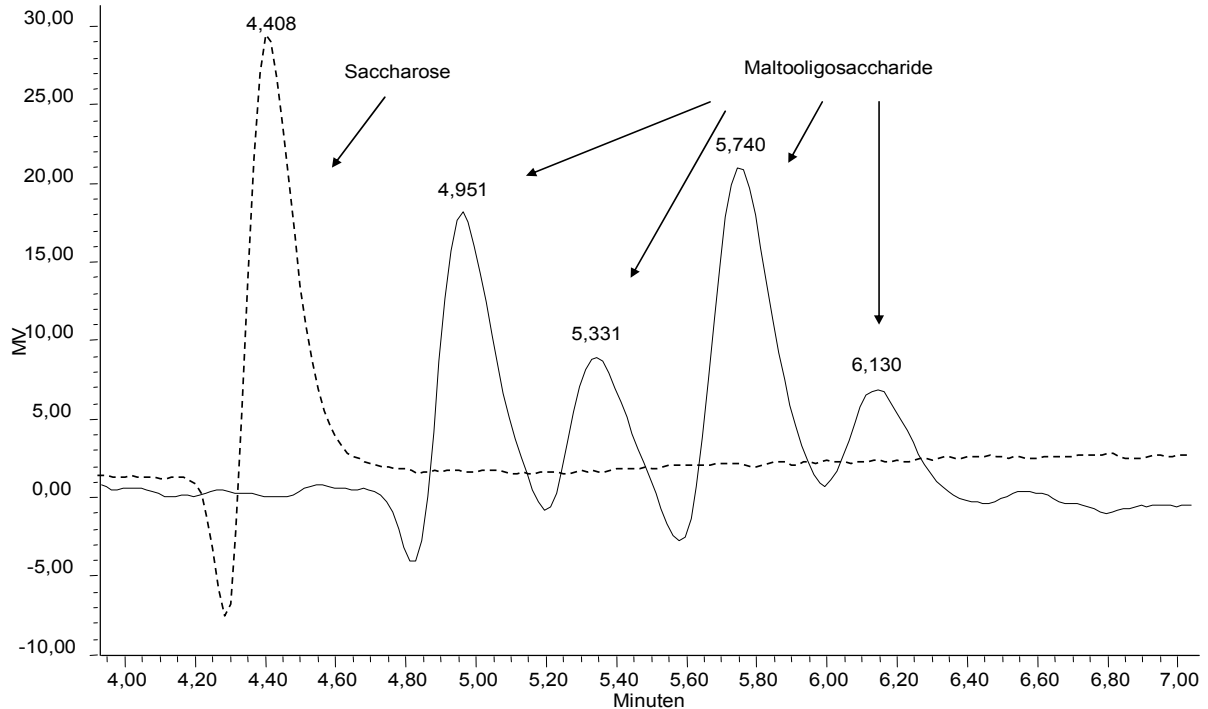


Abbildung 3.19 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Saccharose und Maltooligosacchariden

Ergebnisse

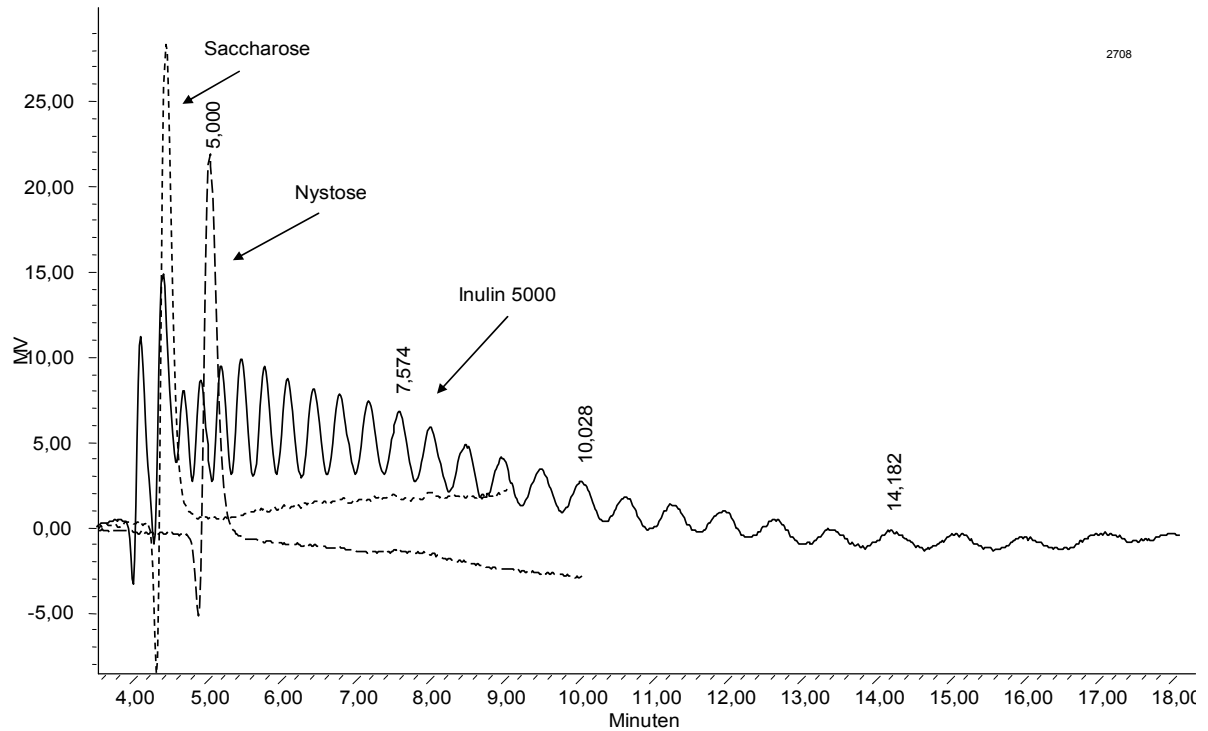


Abbildung 3.20 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Saccharose, Nystose und Inulin 5000

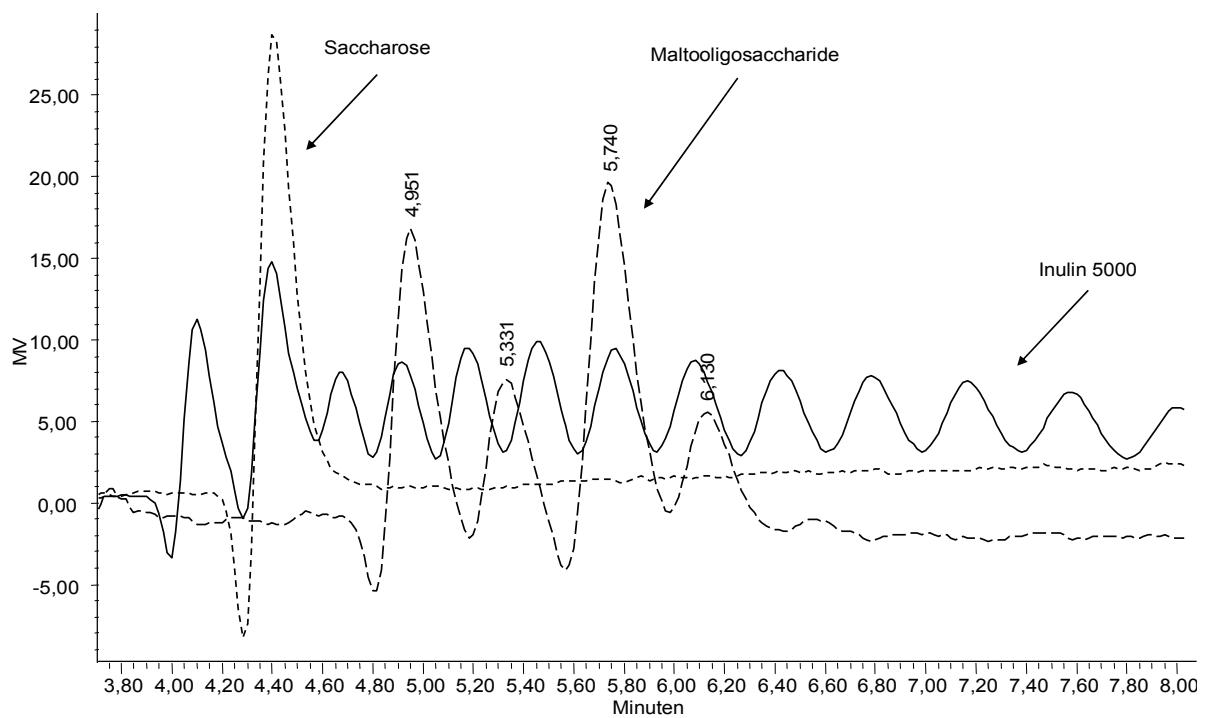


Abbildung 3.21 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Saccharose, Maltooligosacchariden und Inulin 5000

Zur Veranschaulichung, welchen Einfluss die Zusammensetzung der mobilen Phase und die Flussrate auf das Ergebnis haben, ist in Abb. 3.22 ein HPLC-Lauf mit einer auf 0,3 ml/min reduzierten Flussrate und in Abb. 3.23 ein HPLC-Lauf mit einem erhöhten Anteil von 68 % Acetonitril in der mobilen Phase dargestellt. Es ist zu sehen, wie schon kleine Änderungen, speziell die Zusammensetzung der mobilen Phase, große Auswirkungen auf das Ergebnis des HPLC-Laufes haben. In beiden Fällen werden die Retentionszeiten länger und speziell bei der Erhöhung der Acetonitrilkonzentration auch die Peaktrennung besser. Für eine qualitative Aussage über die Zuckerzusammensetzung wird die Methode mit 62 % Acetonitrilanteil (s. Abb. 3.17) im Weiteren als Standardmethode verwendet.

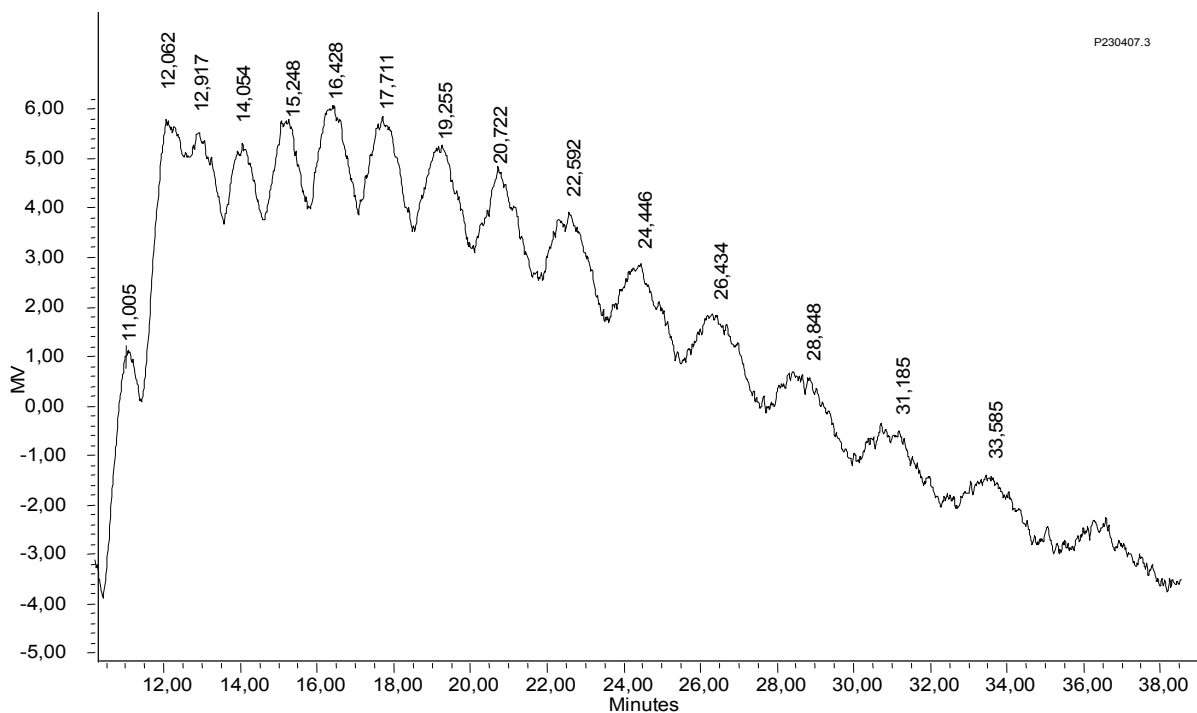


Abbildung 3.22 HPLC-Lauf mit einer auf 0,3 ml/min reduzierter Flussrate bei einem Acetonitrilanteil von 62 % in der mobilen Phase

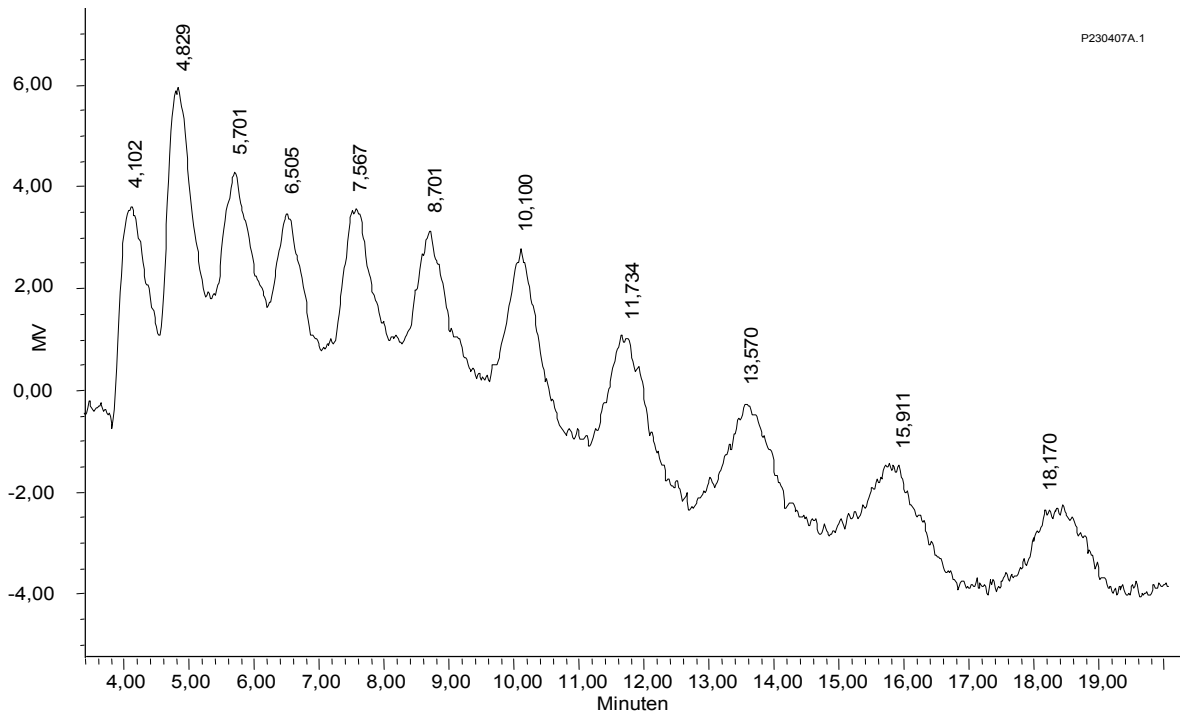


Abbildung 3.23 HPLC-Lauf mit einem erhöhten Acetonitrilanteil von 68 % in der mobilen Phase bei einer Flussrate von 1,0 ml/min

3.3.3 Inulin-Analytik mit zwei hintereinander geschalteten Phenomenex Luna Amino[®]-Säulen

Es wurden zwei Luna Amino[®] 250 mm x 4,6 mm Säulen hintereinander geschaltet, um das Trennergebnis zu verbessern. Dazu wurden 77,2 mg Inulin 5000 eingewogen und die Proben, wie in Kap. 2.4.3.2 beschrieben, vorbereitet. In Abb. 3.24 ist ein Lauf unter den gleichen Bedingungen wie denen der Abb. 3.17 dargestellt. Beide Läufe wurden zum direkten Vergleich in Abb. 3.25 übereinander gelegt. Als mobile Phase wurde eine 62 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung bei einer Flussrate von 1,0 ml/min verwendet. Es wurde jeweils 20 µl auf die Säule aufgetragen. In Abb. 3.26 ist ein für zwei Säulen optimierter Lauf gezeigt. Hier wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase auf eine 64 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung bei einer Flussrate von 1,2 ml/min abgeändert. Man kann deutlich erkennen, dass die Peaktrennung mit zwei Säulen im Bereich bis ca. DP 12 (bei 21 Minuten) deutlich besser wurde. Im höhermolekularen Bereich werden die Peakform dann wieder schlechter und die Analysenzeiten sehr lang.

Ergebnisse

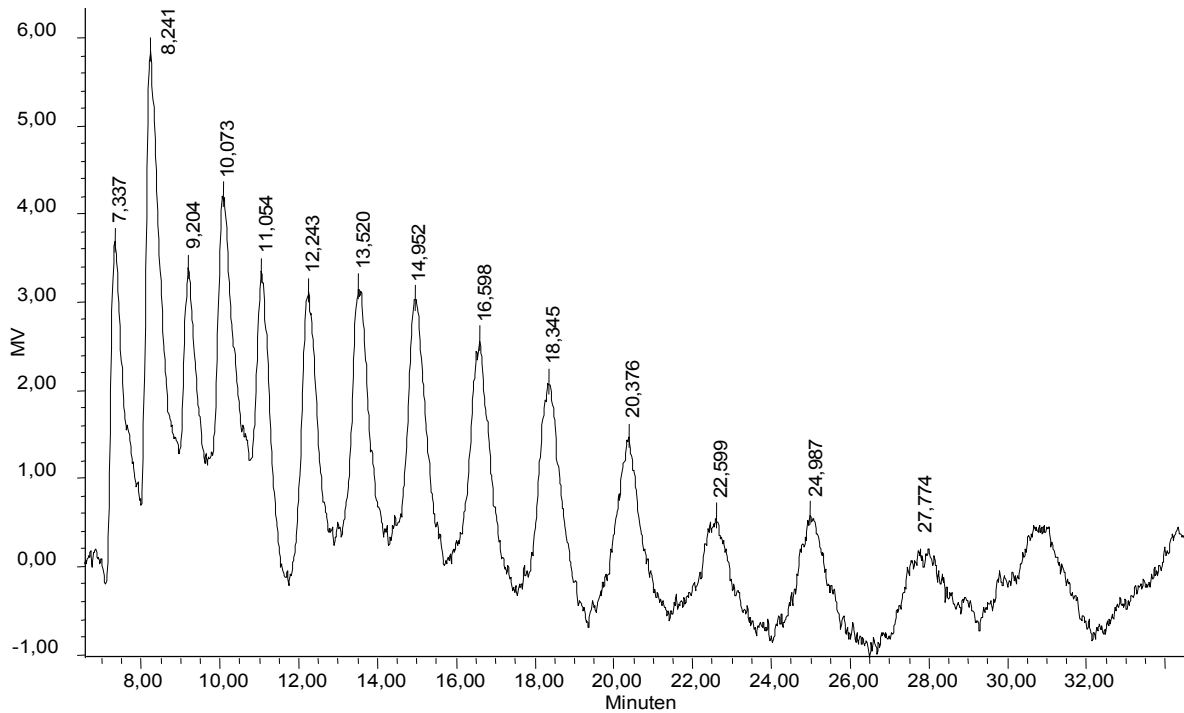


Abbildung 3.24 HPLC-Chromatogramm nach Trennung einer Inulin 5000 Probe auf zwei Amino-Säulen (*mobile Phase: 62 % Acetonitril/Wasser; Flussrate: 1,0 ml/min*)

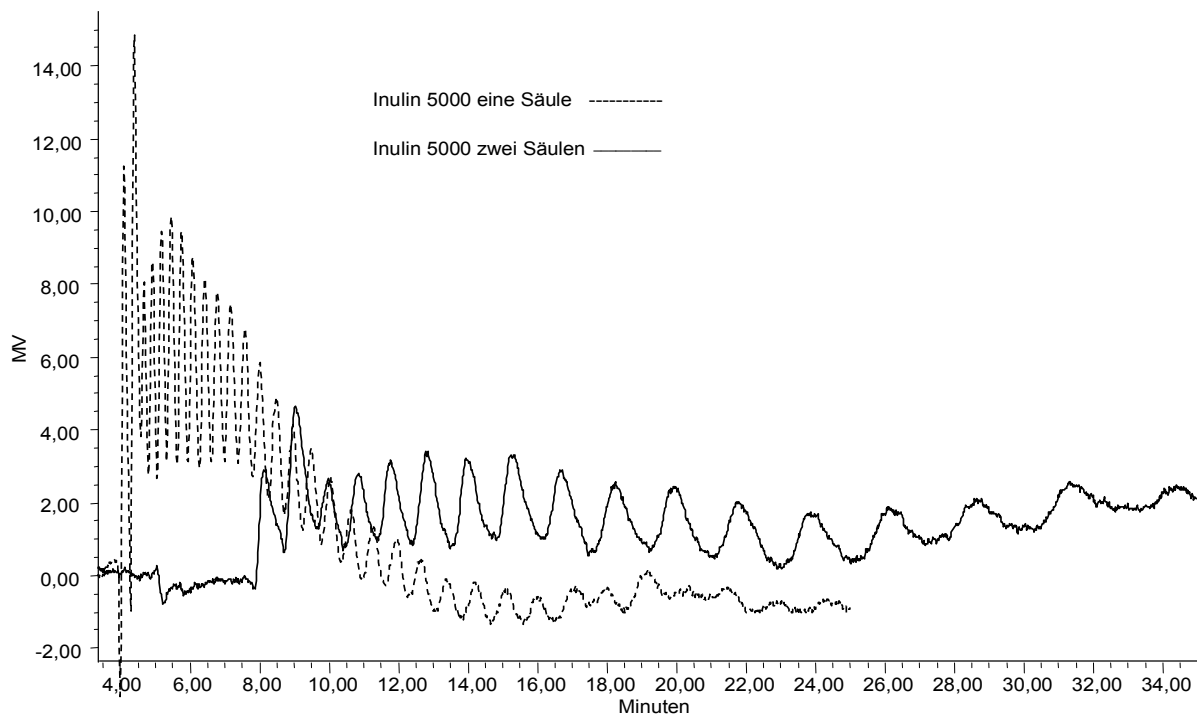


Abbildung 3.25 Overlay der Chromatogramme nach Trennung von Inulin 5000 auf einer und auf zwei Amino-Säulen

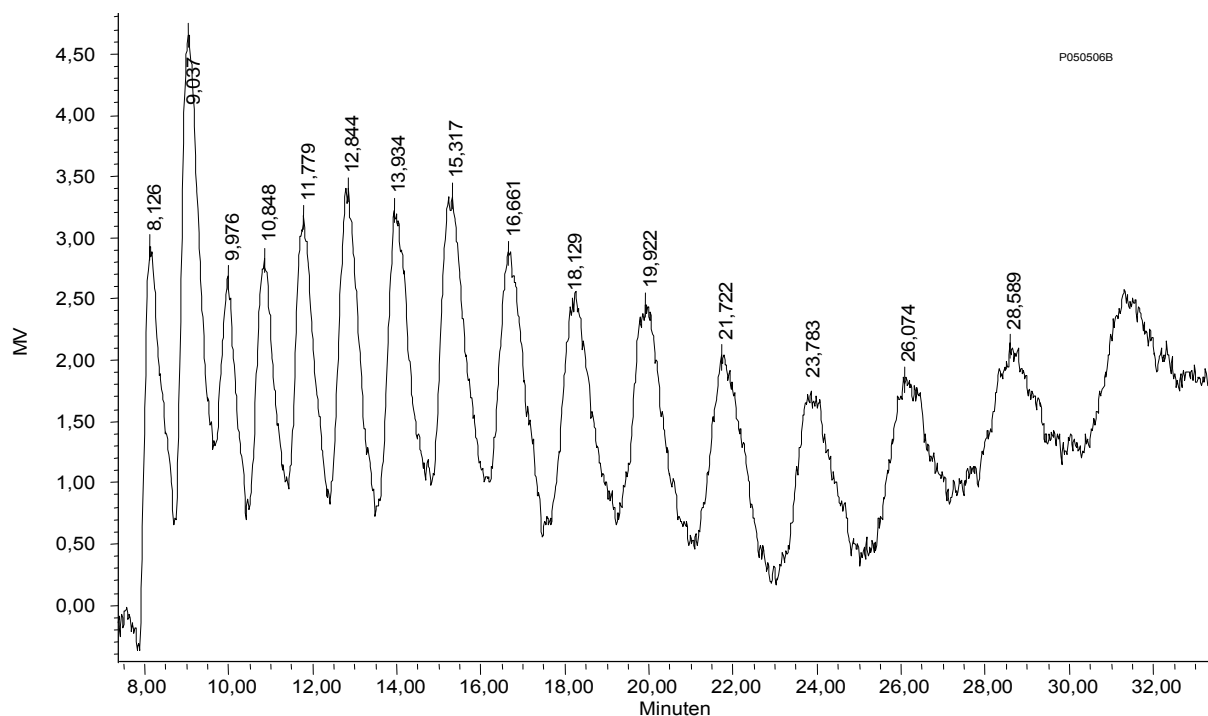


Abbildung 3.26 HPLC-Chromatogramm nach Trennung einer Inulin 5000 Probe auf zwei Amino-Säulen (*mobile Phase: 64 % Acetonitril/Wasser; Flussrate: 1,2 ml/min*)

3.3.4 Analytik von fraktionierten Fruktangemischen auf einer Phenomenex Luna Amino[®]-Säule

Es wurden, wie in Kap. 2.2.3 und 3.2 beschrieben, Fruktanfraktionen durch fraktioniertes Lösen einer Inulin (*Dahlia*) /Inulin 5000 Mischung hergestellt und mit der für Inulin 5000 optimierten HPLC Methode aus Kap. 3.3.2.3 analysiert. Es wurde eine Mischung von 302,4 mg Inulin (*Dahlia*) und 205,2 mg Inulin 5000 eingewogen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tab. 3.23 dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug 414,21 mg. Dies entspricht 81,6 % der Einwaage von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000. Als Lösungsmittel wurden unterschiedliche Ethanol/Wasser Mischungen verwendet.

Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils die in Tab. 3.23 gezeigten Mengen für den HPLC-Lauf eingewogen und wie in Kap. 3.3.2.3 in einer 60 %ige Acetonitril/Wasser Mischung gelöst. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und von dem Überstand jeweils 20 µl auf die Säule aufgetragen. Die

96 % Fraktion wurde aufgrund ihrer zu geringen Ausbeute nicht vermessen. Die Chromatogramme der einzelnen Fraktionen sind in den Abb. 3.27 bis 3.31 dargestellt, jedes Mal mit einem Overlay der reinen Inulin 5000 Probe aus Abb. 3.17 zur besseren Orientierung. Zur ebenfalls besseren Übersichtlichkeit wurden die Peaks nicht integriert. Die Chromatogramme zeigen sehr schön, wie mit abnehmender Ethanolkonzentration der Polymerisationsgrad der Fruktane ansteigt. So sieht man bei der 80 % Ethanolfraktion in Abb. 3.27 im Vergleich zur Inulin 5000 Probe eine höhere Fruktankonzentration im Bereich der Oligosaccharide bis zu einer Retentionszeit von acht Minuten. Bei der 60 % Ethanolfraktion in Abb. 3.28 nimmt die Konzentration der Oligosaccharide im Vergleich zur Inulin 5000 Probe deutlich ab. In Abb. 3.29 sind die Peaks deutlich in den Retentionsbereich 8 bis 18 Minuten verschoben, was einem DP von 13 bis 26 Einheiten entspricht (s. Abb. 3.17). Bei der 0 % Ethanolfraktion in Abb. 3.31, also der reinen Wasserfraktion sind praktisch keine niedermolekularen Fruktane mehr vorhanden. Zu beachten ist bei allen Abbildungen dass, wie schon erwähnt, die Response mit steigendem DP abnimmt, die Peaks der höhermolekularen Fruktane also im Vergleich zu den niedermolekularen Peaks zu klein erscheinen.

Tabelle 3.23 Inulinausbeuten und Einwaagen für die HPLC-Läufe nach Fraktionierung von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000 mit Ethanol

Ethanolfraktion (%)	96	80	60	40	20	0
Masse (mg)	2,51	55,94	37,22	72,40	70,15	175,99
Ausbeute (%)	0,61	13,51	9,00	17,48	16,94	42,49
Einwaage für HPLC-Lauf (mg)	0	55,9	36,5	50,8	68,5	66,2

Ergebnisse

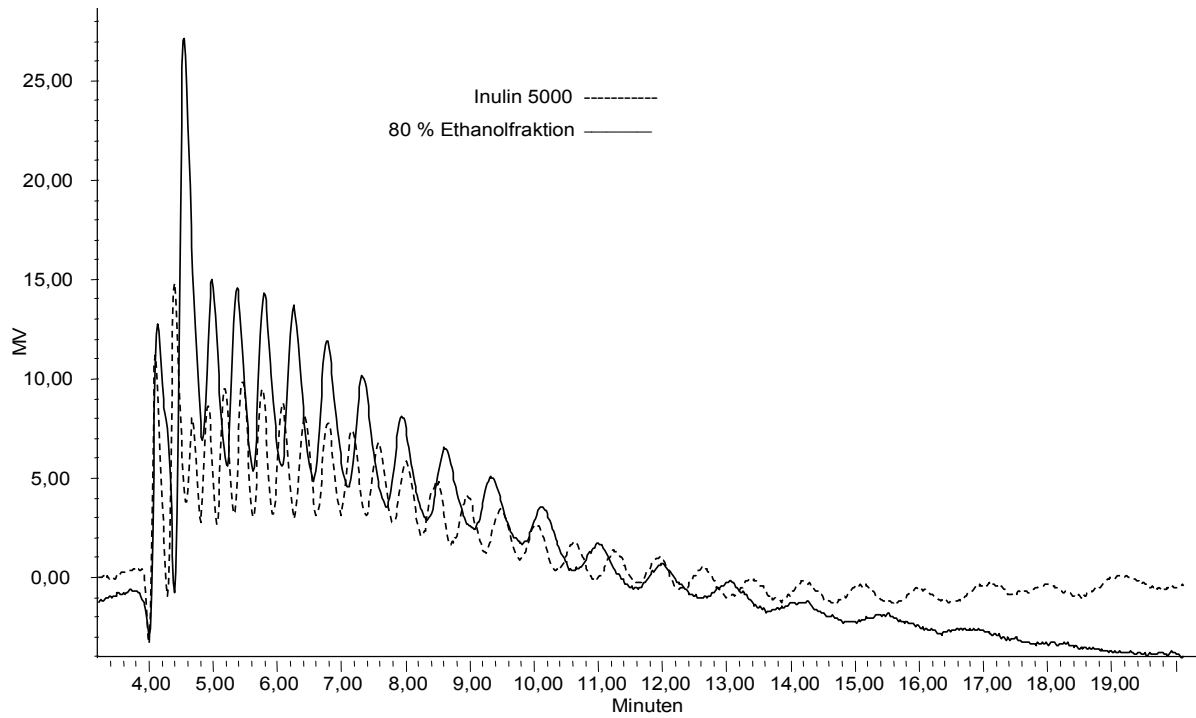


Abbildung 3.27 Overlay der Chromatogramme nach Injektion der 80 % Ethanolfraktion Inulin 5000

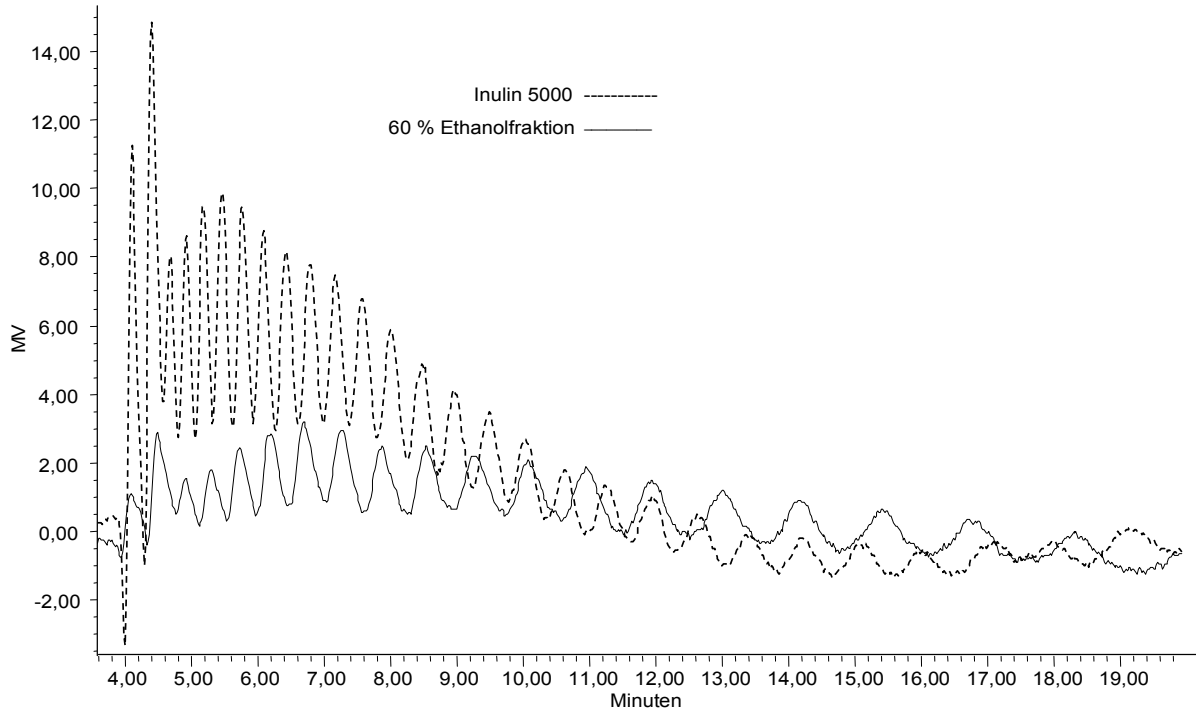


Abbildung 3.28 Overlay der Chromatogramme nach Injektion der 60 % Ethanolfraktion Inulin 5000

Ergebnisse

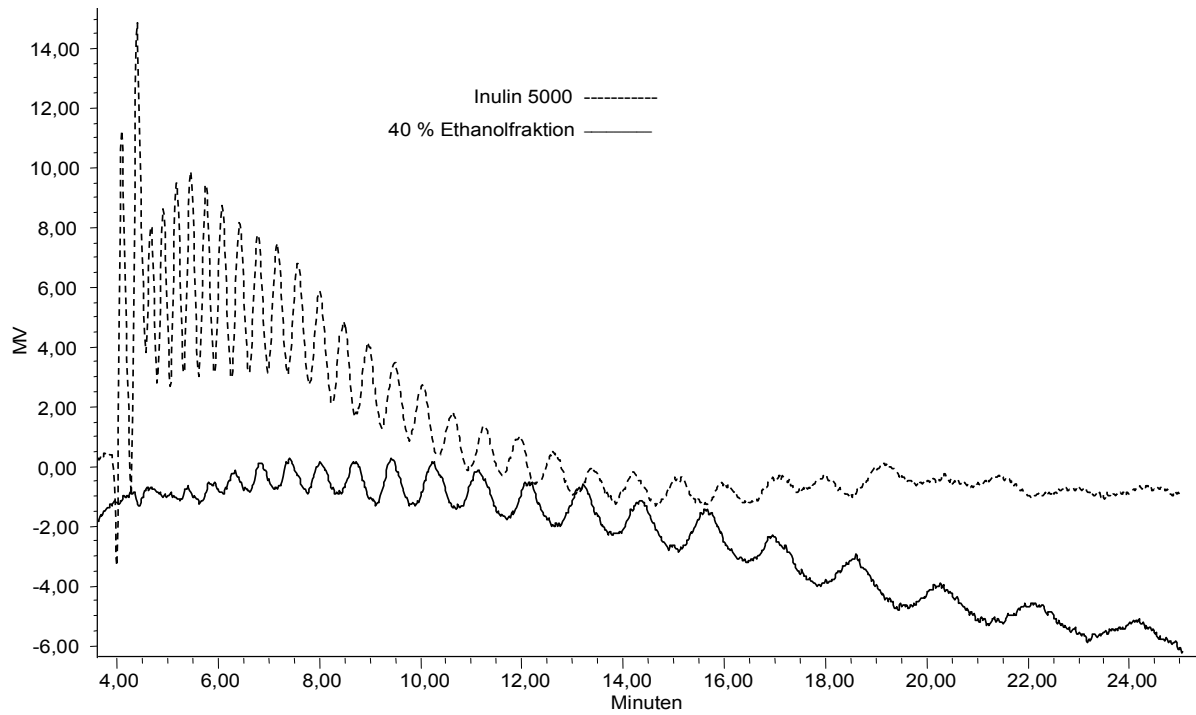


Abbildung 3.29 Overlay der Chromatogramme nach Injektion der 40 % Ethanolfraktion Inulin 5000

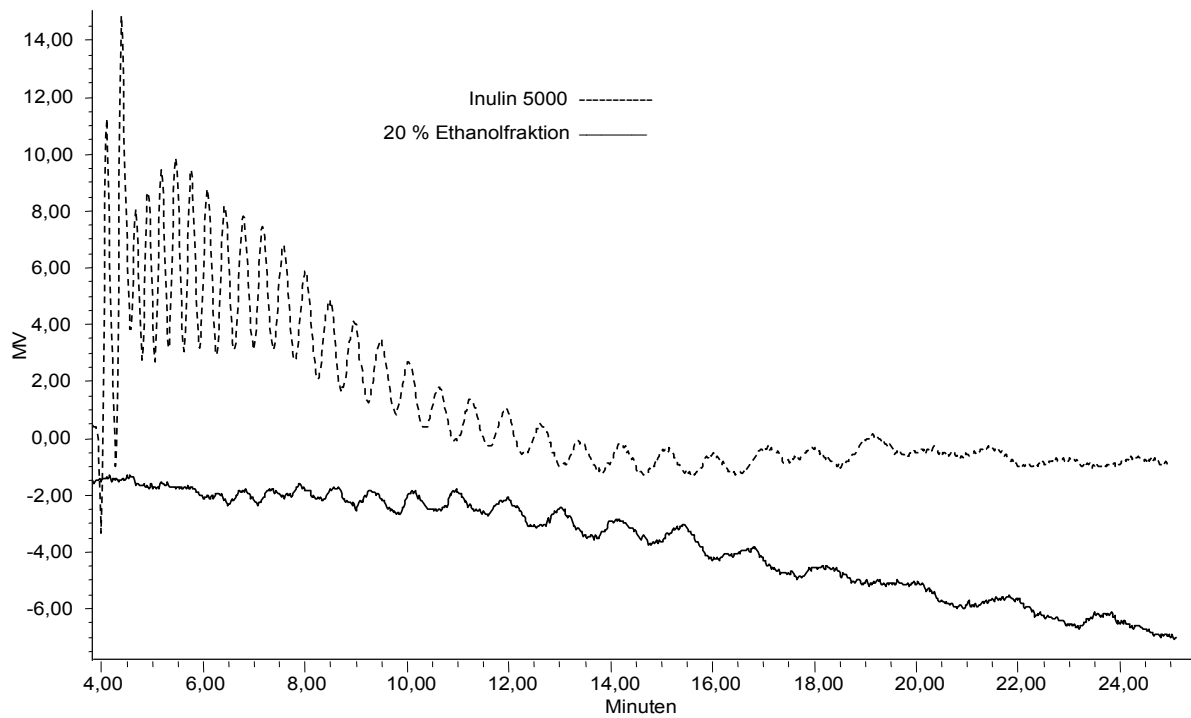


Abbildung 3.30 Overlay der Chromatogramme nach Injektion der 20 % Ethanolfraktion Inulin 5000

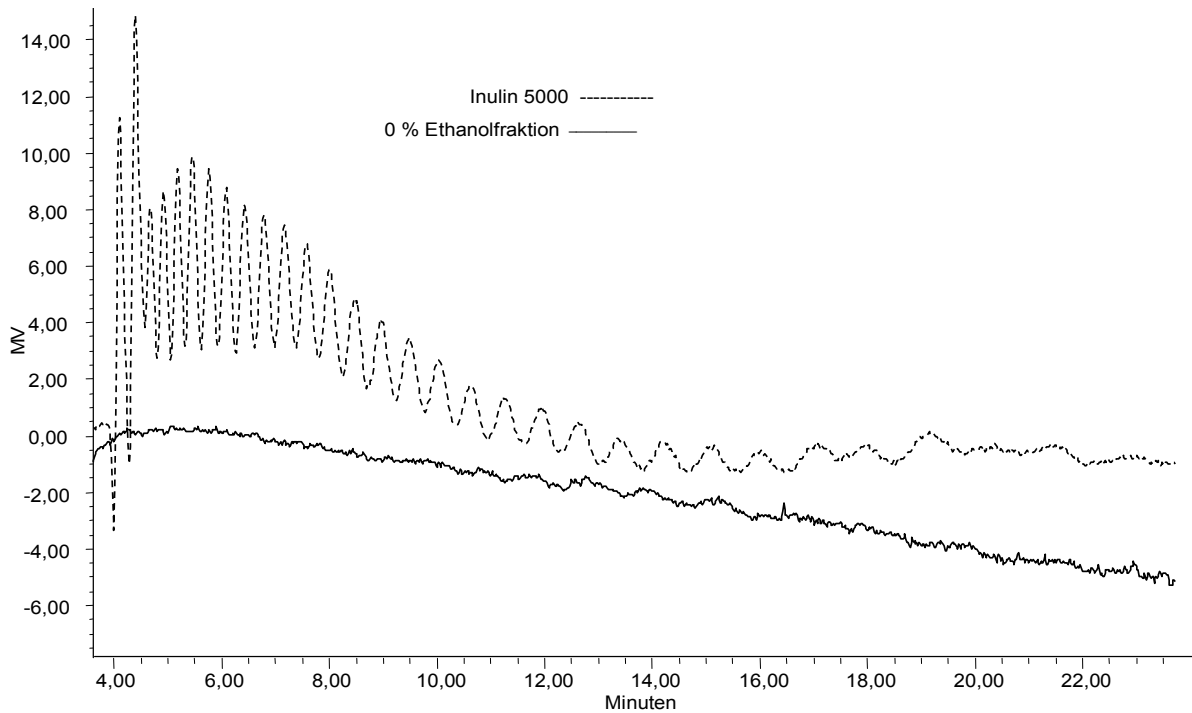


Abbildung 3.31 Overlay der Chromatogramme nach Injektion der 0 % Ethanolfraktion Inulin 5000

3.3.5 Analytik von fragmentierten Fruktangemischen auf einer Phenomenex Luna Amino[®]-Säule

Wenn man Inulin (*Dahlia*) auf die Säule aufträgt, sind wie in Abb. 3.32 gezeigt, nur sehr wenige Fruktane im Bereich hoher DP, etwa 17 bis über 25, zu sehen (vgl. Abb. 3.17). Der Lauf wurde mit einer Amino-Säule bei Standardbedingungen (s. Kap. 3.3.2.3) durchgeführt und soll hier als Vergleich dienen, da keine Fragmentierung durchgeführt wurde. Für die fragmentierten Proben, dargestellt in Abb. 3.33, wurden 107,7 mg Inulin (*Dahlia*) eingewogen und von dem Überstand nach der Probenvorbereitung (s. Kap. 3.3.2.3) 20 µl auf die Säule aufgetragen. Wenn man die Inulin (*Dahlia*) Probe, wie in Kap. 2.2.4 beschrieben, mit trockener Hitze behandelt, so ist zu erwarten, dass die Fruktanketten brechen und man im HPLC-Chromatogramm Fruktane mit kleinerem DP erkennen kann. In Abb. 3.33 sind zwei HPLC Läufe mit zwei Amino Säulen gezeigt, um den unteren DP Bereich besser darstellen zu können. Die Probe wurde jeweils bei 150°C im Trockenofen behandelt und, wie in Kap. 2.2.4 beschrieben, vorbereitet. Es wurden 102,6 mg und 149,9 mg

Inulin (*Dahlia*) eingewogen, welche im Anschluss für 30 bzw. 60 Minuten trockener Hitze ausgesetzt wurden. Zu erwarten ist, dass mit zunehmender Dauer der Hitze einwirkung mehr kurzkettige Fruktanfragmente entstehen. Diese Vermutung konnte in Abb. 3.33 eindrucksvoll bestätigt werden. Konnte man bei der in Abb. 3.32 zum Vergleich dargestellten, nicht fragmentierten Inulin (*Dahlia*) Probe keine Fruktanmolekül mit niedrigem DP erkennen, waren bereits nach 30 Minuten Hitzebehandlung deutliche Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Nach 60 Minuten Hitze einwirkung nahm die Intensität der Peaks zu, was auf eine weitere Erhöhung niedermolekularer Fruktanfragmente schließen lässt.

Die Beispiele aus den Kapiteln 3.3.4 und 3.3.5 zeigen, dass mit der entwickelten HPLC-Methode qualitative Aussagen über die Zusammensetzung eine Inulinprobe zu machen sind.

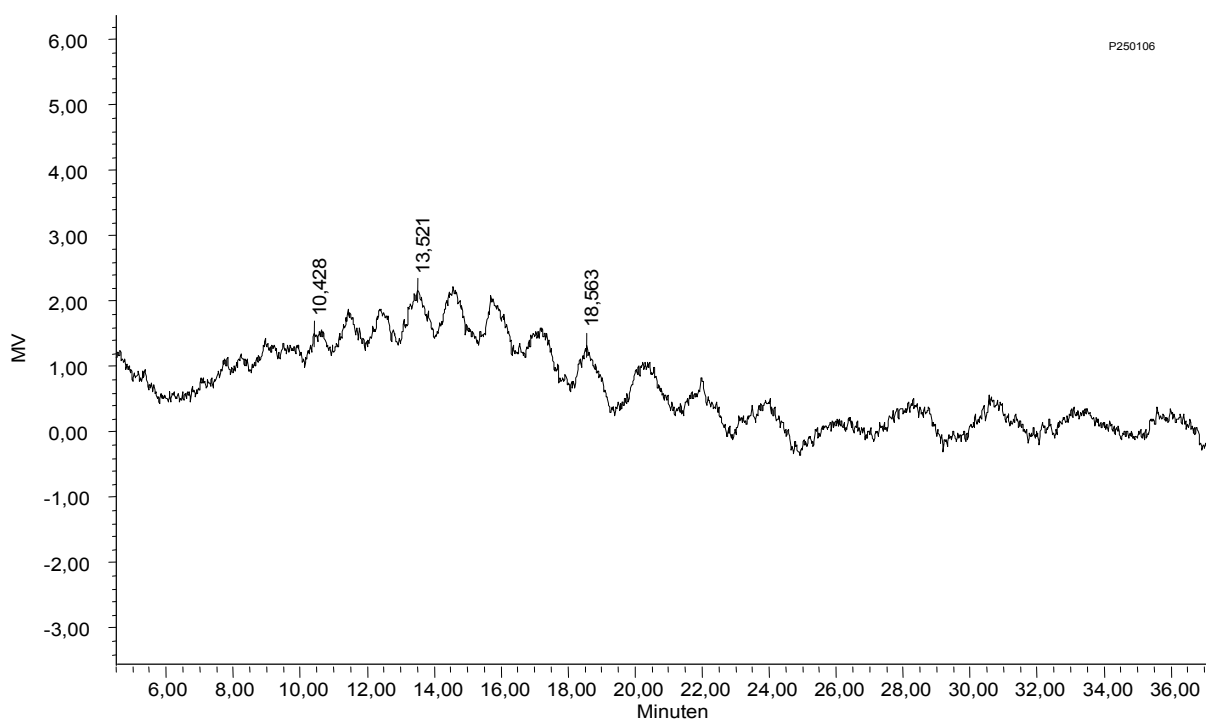


Abbildung 3.32 Chromatogramm von Inulin (*Dahlia*) bei Standardbedingungen (eine Amino-Säule)

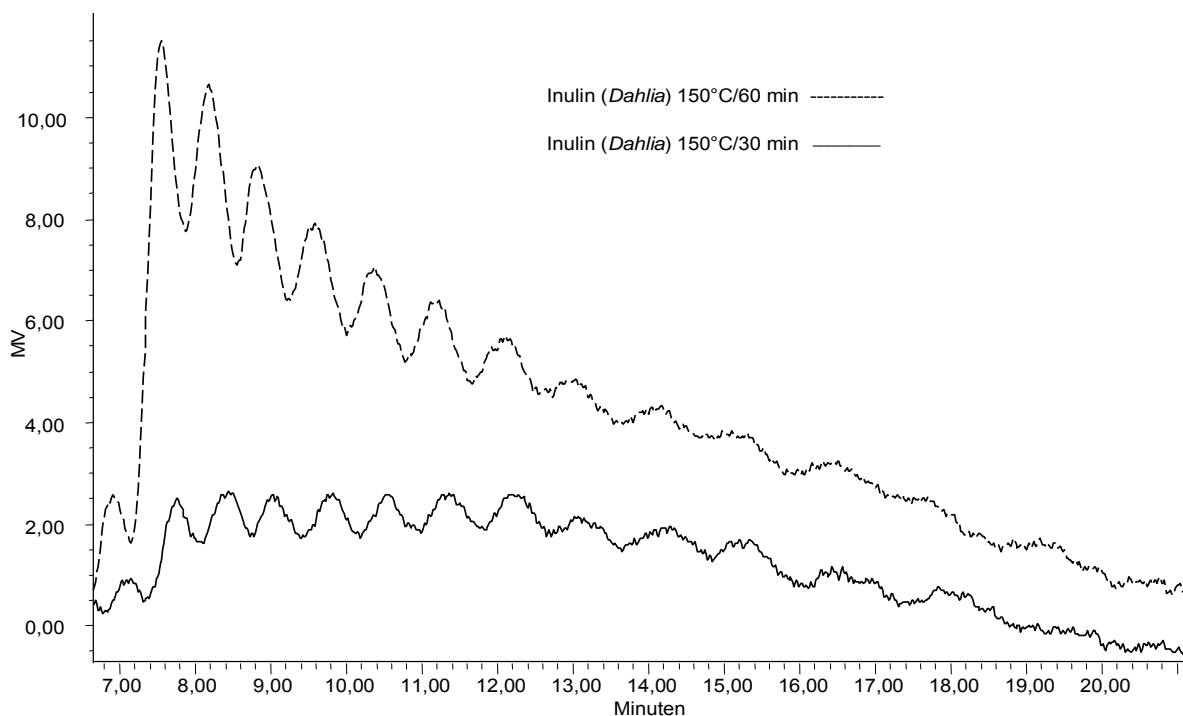


Abbildung 3.33 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Inulin (*Dahlia*) Proben, die für 30 bzw. 60 Minuten bei jeweils 150°C in trockener Hitze behandelt wurden (zwei Amino-Säulen)

3.3.6 Vergleich von zwei Säulen mit Aminophasen von unterschiedlichen Herstellern

Es wurden die Trennsäulen Luna Amino[®] der Firma Phenomenex und Microsorb Amino[®] der Firma Varian verglichen. Für den Lauf in Abb. 3.34 wurden 50,21 mg Inulin 5000 eingewogen und unter den gleichen Bedingungen wie die Inulin 5000 Probe in Kap. 3.3.2.3 auf der Varian-Säule vermessen. Um den direkten Vergleich der Säulen beider Hersteller zu sehen, wurde in Abb. 3.34 die Inulin 5000 Probe auf der Säule der Firma Varian gezeigt, mit einem ein Overlay der Abb. 3.17, welche ebenfalls eine Inulin 5000 Probe auf einer Phenomenex-Säule darstellt. Beide Proben wurden identisch vorbereitet und unter zunächst identischen HPLC-Bedingungen (20 µl Injektionsvolumen, Flussrate 1 ml/min) vermessen. Da das Chromatogramm der Varian-Säule sich sehr stark von dem der Phenomenex-Säule unterscheidet, wurde der Acetonitrilanteil der mobilen Phase auf 50 % erniedrigt, um ein mit der Phenomenex Säule vergleichbares Chromatogramm zu erhalten,

dargestellt in Abb. 3.35. Die Varian Microsorb Amino[®] Säule scheint theoretisch das bessere Trennergebnis für FOS zu erzielen, da sie bei gleichen Acetonitrilanteilen in der mobilen Phase eine starke Retention der Fruktane bewirkt (s. Abb. 3.34), und mit abnehmendem Acetonitrilanteil in der mobilen Phase weiterhin eine Trennung der FOS leistet (s. Abb. 3.35). Die Phenomenex-Säule zeigt die ruhigere Basislinie und die über einen weiteren DP-Bereich homogenere Trennleistung (vgl. Abb. 3.17).

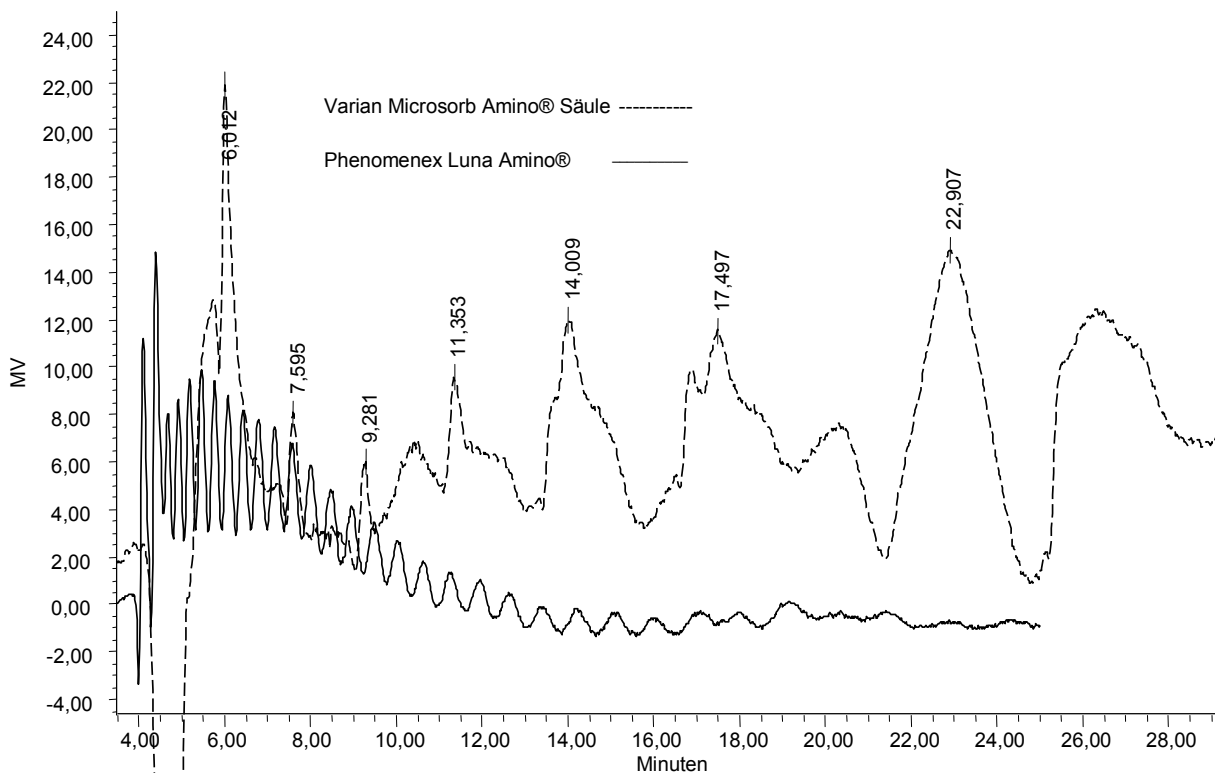


Abbildung 3.34 Overlay der Chromatogramme nach Injektion von Inulin 5000 auf eine Phenomenex Luna Amino[®] Säule und eine Varian Microsorb Amino[®] Säule (62 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase)

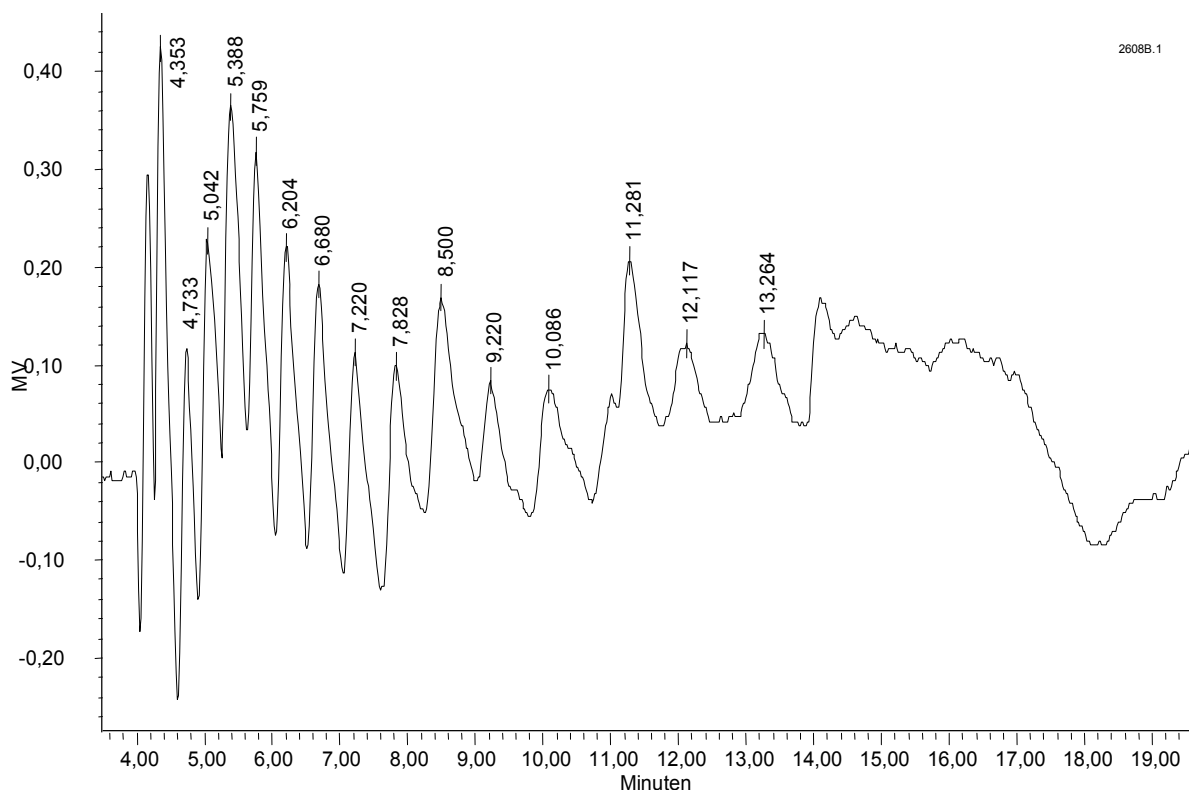


Abbildung 3.35 Chromatogramm einer Inulin 5000 Probe auf einer Varian Microsorb Amino[®]-Säule. Als mobile Phase wurde eine 50 % Acetonitril/Wasser Mischung verwendet.

3.4 HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane

3.4.1 Trennung von Fruktanen über eine C-18-Säule mit PDA-Detektion nach vorheriger Acetylierung der Proben

3.4.1.1 Isokratische HPLC-Methode

Nachdem versucht wurde, underivatisierte Fruktane auf der C-18-Säule zu trennen (vgl. Kap. 3.3.1), wurde nun versucht, über eine Acetylierung der Zucker deren Lipophilie zu erhöhen, um so eine bessere Trennung zu erreichen. Gleichzeitig wurde als mobile Phase eine Acetonitril/Wasser Mischung verwendet. Für die in Abb. 3.36 dargestellte Probe wurden 14,96 mg Fruktose, 15,05 mg Glukose und 15,57 mg Saccharose eingewogen und, wie im Kapitel 2.4.4.1 beschrieben, acetyliert. Nachdem die acetylierte Probe in 1 ml Methanol aufgenommen worden war, wurden

10 µl dieser Lösung auf die Säule aufgetragen und die maximale Absorption bei 215 nm ermittelt (Abb. 3.37). Als mobile Phase wurde eine 40 %ige Acetonitril-Wasser Mischung verwendet, wobei die Flussrate 1 ml/min betrug. Die weiteren, im Chromatogramm zu sehenden Peaks stellen Nebenprodukte der Acetylierungsreaktion dar.

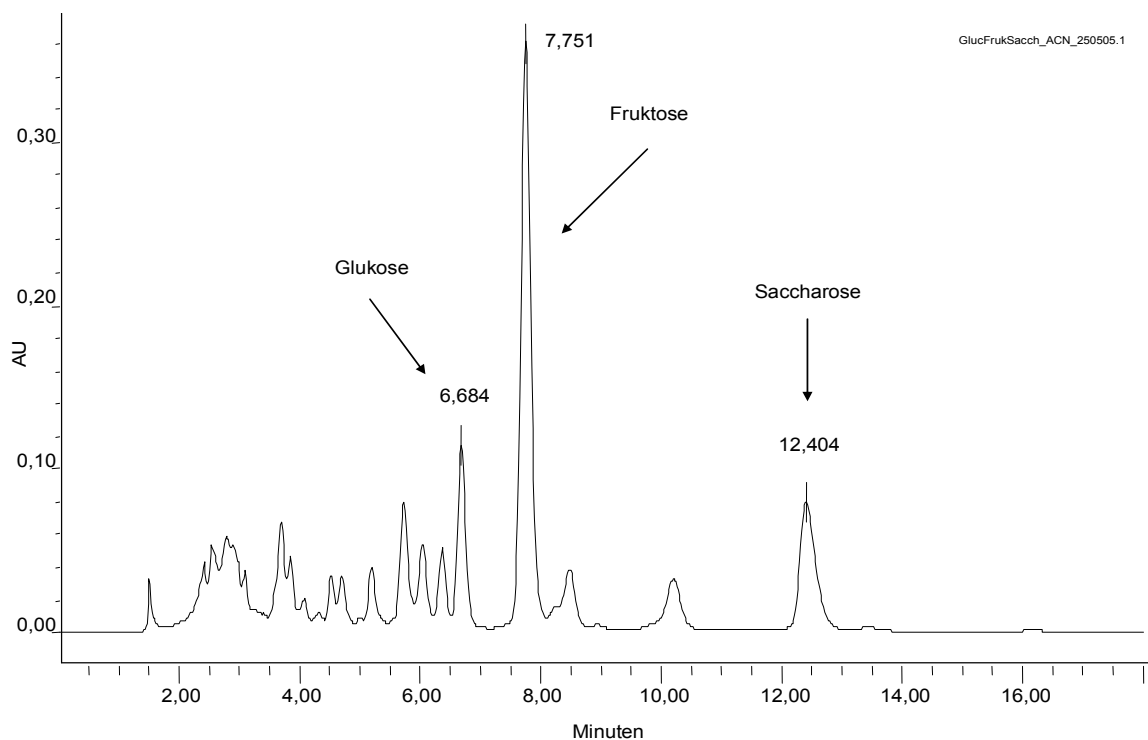


Abbildung 3.36 HPLC-Chromatogramm von Glukose, Fruktose und Saccharose nach Acetylierung, aufgenommen bei 215 nm

Die Zuordnung der einzelnen Zuckerpeaks erfolgte, nachdem bei identischen Laufbedingungen die Zucker Fruktose, Glukose und Saccharose einzeln vermessen wurden. Dadurch konnten die Retentionszeiten der jeweiligen Zucker genau bestimmt werden.

Außerdem kann mit dem PDA-Detektor ein dreidimensionales Chromatogramm, dargestellt in Abb. 3.37, entwickelt werden. Hier wird auf der dritten Achse der gesamte Messwellenlängenbereich dargestellt. Da die Absorption über den angegebenen Wellenlängenbereich für jeden Stoff charakteristisch ist, ist folglich auch das Absorptionsspektrum im dreidimensionalen Chromatogramm für jeden Stoff charakteristisch und kann somit als Charakterisierungs- und Unterscheidungsmerkmal dienen.

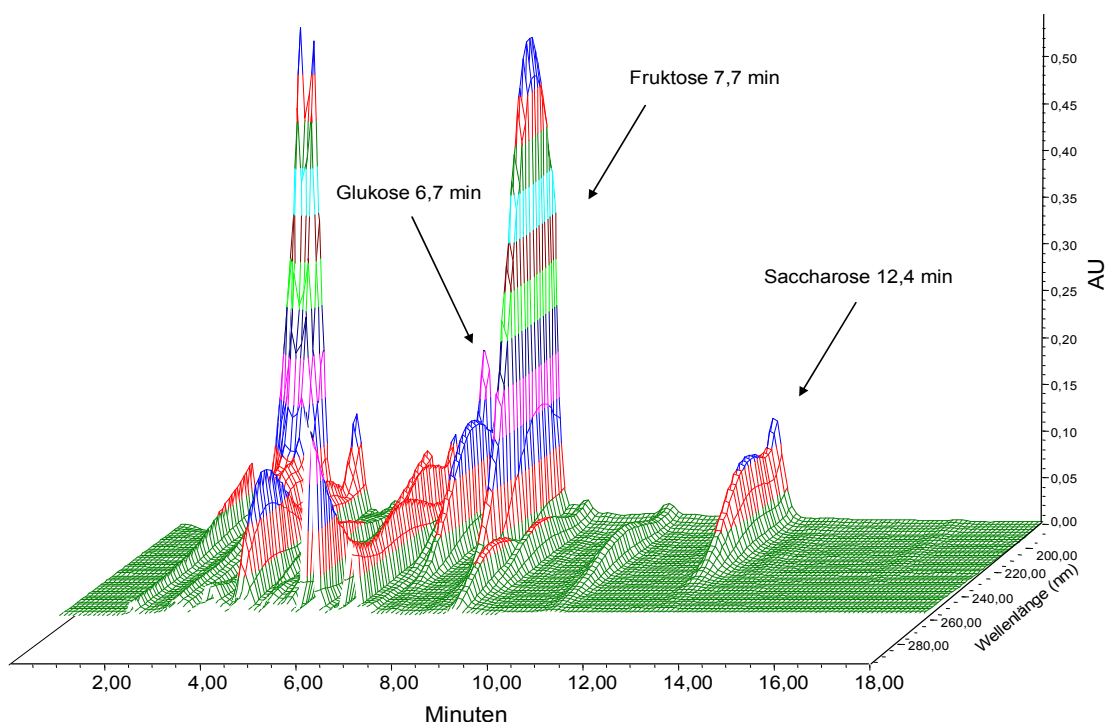


Abbildung 3.37 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von Glukose, Fruktose und Saccharose nach Acetylierung in dreidimensionaler Ansicht

Wie die Abb. 3.36 und 3.37 zeigen, lassen sich Glukose, Fruktose und Saccharose nach vorausgehender Acetylierung auf einer C18-RP-Säule gut trennen. Die Trennung von Maltooligosacchariden nach dieser Methode wurde ebenfalls versucht. Hier konnten bei isokratischen Laufbedingungen keine befriedigenden Trennungen erreicht werden.

3.4.1.2 Gradienten HPLC-Methode

3.4.1.2.1 Trennung von Maltooligosacchariden

Um eine bessere Trennung von Oligosacchariden zu erreichen, wurden verschiedene Acetonitril/Wasser-Gradienten der mobilen Phasen ausprobiert und der in Abb. 3.38 dargestellte Gradient als optimal ermittelt.

Für die in Abb. 3.39 dargestellte Probe wurden 40 mg Maltooligosaccharide eingewogen und, wie im Kap. 2.4.4.1 beschrieben, acetyliert. Nach der Acetylierung

wurde die Probe in 1 ml einer 70 %igen Acetonitril/Wasser Mischung aufgenommen. 5 µl dieser Lösung wurden auf die Säule aufgetragen und bei 215 nm detektiert.

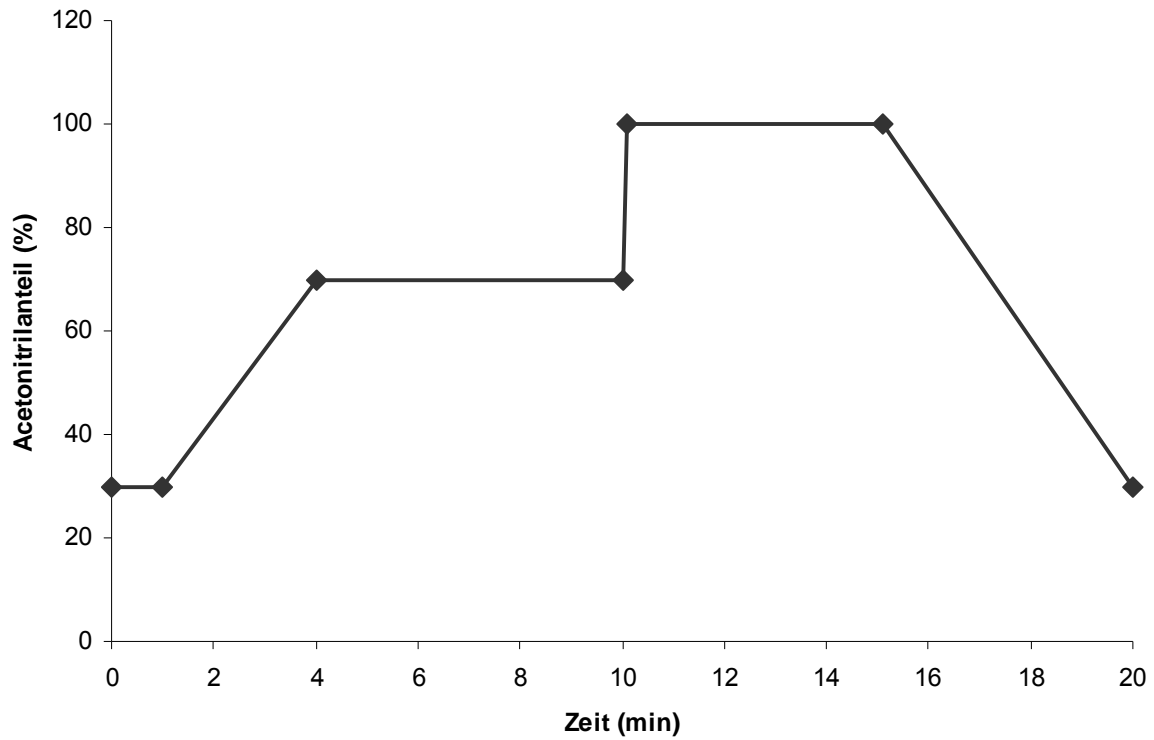


Abbildung 3.38 Acetonitril/Wasser-Gradient zur Trennung von acetylierten Oligosacchariden auf C18-RP-Säulen

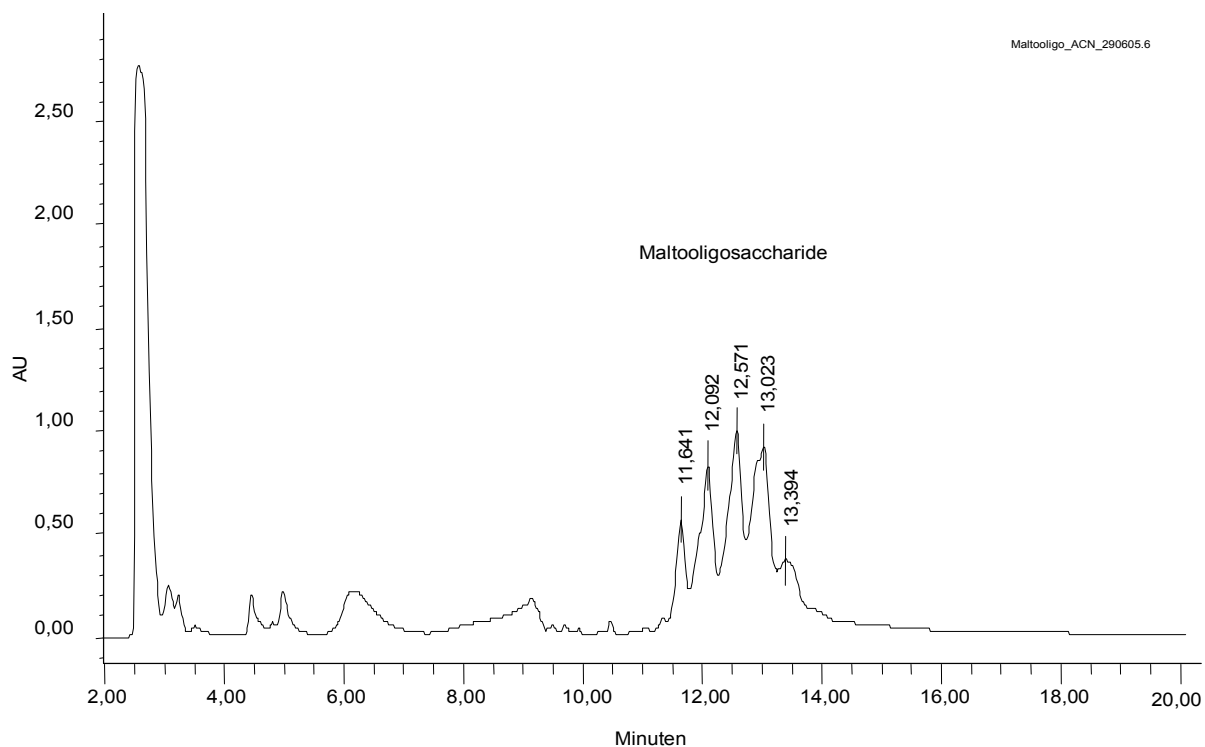


Abbildung 3.39 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von Maltooligosacchariden nach deren Acetylierung. Detektiert bei 215 nm mit Acetonitril/Wasser-Gradient (s. Abb. 3.38)

Eine Erhöhung des Acetonitrilanteils im Gradienten bewirkte keine bessere Trennung der Peaks. Die Retentionszeiten der Maltooligosaccharide liegen zwar weiter auseinander, jedoch werden die Peaks dabei auch flacher und breiter, so dass die tatsächliche Peaktrennung nicht besser wird und sich die Laufzeit verlängert.

3.4.1.2.2 Trennung von Inulin (*Dahlia*)

Für das in Abb. 3.40 dargestellte Chromatogramm wurden 32,7 mg Inulin (*Dahlia*) eingewogen und, wie im Kap. 2.4.4.1 beschrieben, acetyliert. Nach der Acetylierung wurde die Probe in 1 ml einer 70 %igen Acetonitril/Wasser Mischung aufgenommen. Dabei konnte ein Teil der Mischung nicht in Lösung gebracht werden. Dieser wurde, wie im Kap. 2.4.3.2 beschrieben, abzentrifugiert. 10 µl des Überstands wurden auf die Säule aufgetragen und die maximale Absorption bei 215 nm gemessen. Als mobile Phase wurde der in Abb. 3.38 beschriebene Acetonitril/Wasser-Gradient verwendet.

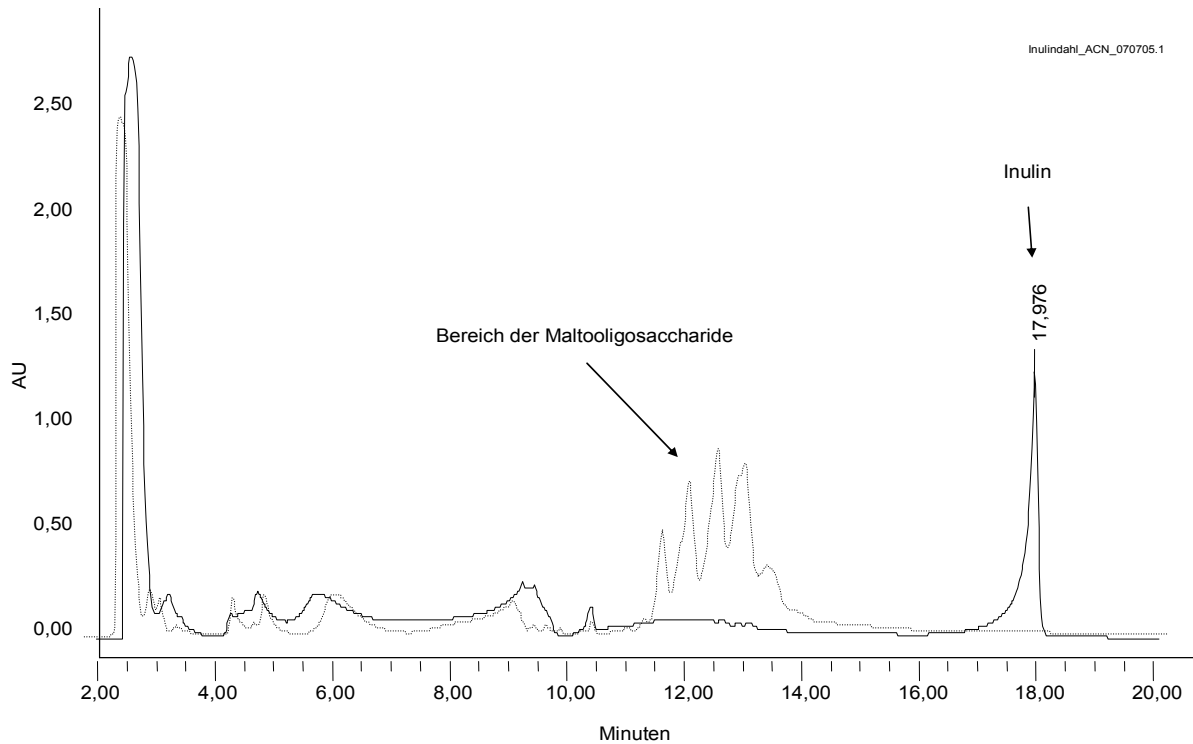


Abbildung 3.40 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von Inulin (*Dahlia*) nach Acetylierung, mit Overlay der Maltooligosaccharide, gemessen wurde die maximale Absorption bei 215 nm

Inulin (*Dahlia*) lässt sich mit dieser Methode nicht in einzelne Peaks auftrennen. Allerdings lässt sich bereits eine Aussage über die qualitative Zusammensetzung der Probe machen. Da in dem Bereich, in welchem die Maltooligosaccharide eluieren, bei der Inulinprobe keine Peaks zu erkennen sind, scheint die Inulinprobe eher aus langkettigen Fruktanen zu bestehen. Weiterhin auffallend ist, dass die Fläche des Inulinpeaks bei 17,9 Minuten mit $19,3 \times 10^6$ Flächeneinheiten um den Faktor 3,4 kleiner ist als die gesamte Fläche unter der Maltooligosaccharidkurve mit $66,2 \times 10^6$ Flächeneinheiten, obwohl die Einwaagen sehr ähnlich sind. Dies ist durch die Form der Probenaufbereitung (s. Kap. 2.4.3.2) zu erklären. Da sich die höher-molekularen Proben nicht in der 70 %igen Acetonitril/Wasser Mischung lösen, werden diese beim Zentrifugieren während der Probenvorbereitung abgetrennt und können somit nicht mehr erfasst werden.

3.4.2 Trennung von Fruktanen über eine Luna Amino[®] Säule mit Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Markierung mit FITC

Es wurde versucht, die Empfindlichkeit der Detektion mit Hilfe einer Markierung der Fruktane mit einem Fluorophor zu verbessern. Dazu wurde eine 1 mM Lösung von gekauftem FITC-Inulin hergestellt. Die Probe wurde in einer 62 %igen Acetonitril/Wasser Mischung gelöst und, wie in Kap. 2.4.3.2 beschrieben, vorbereitet. Beim Zentrifugieren bildete sich ein großes Pellet aus. Von dem Überstand wurden 20 µl auf die Säule aufgetragen und, unter den in Kap. 3.3.2.3 beschriebenen HPLC-Bedingungen, vermessen. Die Anregungswellenlänge lag jeweils bei 494 nm und die Messwellenlänge bei 518 nm. Das Chromatogramm dieses Laufes ist in Abbildung 3.41 dargestellt. Weder der Fluoreszenzdetektor noch der Brechungsindexdetektor zeigen Signale. Das bedeutet, dass FITC-Inulin in einer 62 %igen Acetonitril/Wasser Mischung nicht löslich ist.

Aus diesem Grund wurden die Proben in 100 % Wasser gelöst und in unterschiedlich zusammengesetzten mobilen Phasen mit abnehmendem Wasseranteil untersucht. Zwischen den einzelnen HPLC-Läufen wurde die Anlage mit 100 % Wasser gespült, um eventuell auf der Säule ausgefallene Probenbestandteile auszuwaschen. Abb. 3.42 zeigt das Chromatogramm mit dem Overlay einer FITC-Inulin Probe, die in drei unterschiedlichen mobilen Phasen mit Acetonitrilkonzentrationen von 10 %, 20 % und 50 % vermessen wurde. Hierbei fällt auf, dass die Peakfläche von $32,7 \times 10^6$ Flächeneinheiten bei der Erhöhung des Acetonitrilanteils auf $76,1 \times 10^6$ Flächeneinheiten wächst und der Peak breiter wird. Bei der weiteren Erhöhung des Acetonitrilanteils auf 50 % verkleinert sich die Peakfläche auf $63,3 \times 10^6$ Flächeneinheiten und der Peak wird noch breiter. Zusätzlich ist bei etwa 2,5 Minuten, im Gegensatz zu den beiden anderen Proben, ein kleinerer zweiter Peak zu erkennen. Durch das Lösen der Probe in 100 % Wasser kann man sie zwar auf die Säule auftragen, jedoch kommt es zu keiner Trennung in unterschiedliche DP-Fractionen der Fruktane. Mit zunehmendem Acetonitrilanteil in der mobilen Phase „schmier“ die Fruktane über einen längeren Zeitraum über die Säule, ohne dass es zu einer nennenswerten Auftrennung, wie z. B. in Abb. 3.17, kommt. Bei den Spülungen der Säule zwischen den Läufen konnte jedes Mal FITC-Inulin gefunden werden. Darum

sollte man bei in 100 % Wasser gelösten Proben sehr vorsichtig sein, um die Säule nicht zu beschädigen, da hier FITC-Inulin unlöslich auf der Säule zurückbleiben kann. Aus diesem Grunde wurde die Probe des selbst synthetisierten FITC-Inulin (s. Kap. 2.4.4.2) nun wieder in der mobilen Phase mit einem erhöhten Wasseranteil in Lösung gebracht. Das Chromatogramm der selbst synthetisierten FITC-Inulin Probe ist in Abb. 3.43 dargestellt. Hier wurde eine etwa 10 mM FITC-Inulin Lösung in der mobilen Phase, einer 45 % Acetonitril/Wasser Mischung, wie in Kap. 2.4.3.2 beschrieben, gelöst. Aus dem Überstand wurden 40 µl auf die Säule aufgetragen. Diese Zusammensetzung der mobilen Phase wurde gewählt, weil sie den besten Kompromiss aus einer noch in Lösung gehenden detektierbaren FITC-Inulin Menge und einem noch nicht zu breit werdenden Peak, darstellt. Das Chromatogramm zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die gekaufte FITC-Inulin Probe in der mobilen Phase mit 50 % Acetonitrilanteil (s. Abb. 3.42, 50 % Acetonitril). Es sind ebenfalls zwei Peaks bei 2,5 und 5,5 Minuten zu erkennen. Der Peak bei 5,5 Minuten besitzt eine ausgeprägte Schulter. Dass die Peakmaxima in Abb. 3.43 deutlich kleiner sind, liegt daran, dass die Probe nicht in 100 % Wasser, sondern in der mobilen Phase gelöst wurde, in der die Probe mit zunehmenden Acetonitrilanteil schwerer löslich ist. Es lässt sich somit sagen, dass die FITC-Inulinsynthese erfolgreich war, da das Produkt qualitativ über die HPLC zu identifizieren ist. Eine Auftrennung FITC markierter Fruktane nach ihrem Polymerisationsgrad, wie es in Abb. 3.17 gezeigt ist, ist allerdings mit Hilfe der Amino-Säule nicht möglich. Versuche, die Fruktane über einen Acetonitril/Wasser Gradienten zu trennen, waren nicht erfolgreich.

Ergebnisse

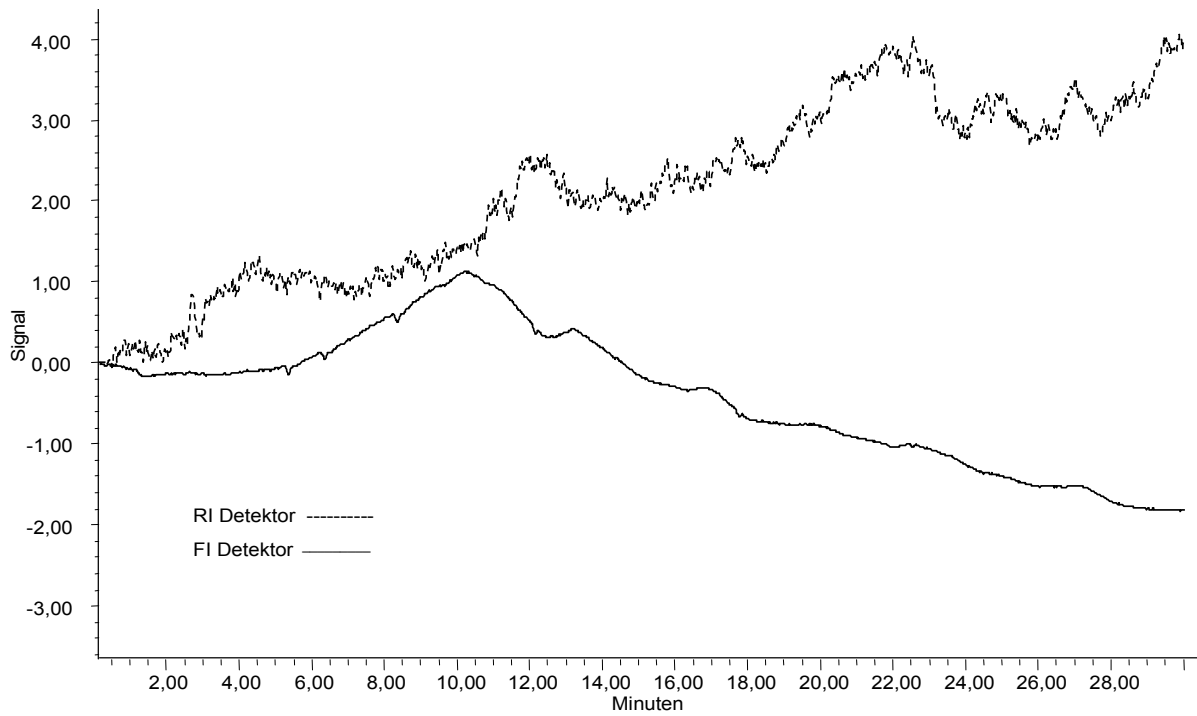


Abbildung 3.41 Overlay der Chromatogramm einer FITC-Inulin Probe, welche vom RI Detektor und vom FI Detektor aufgenommen wurden

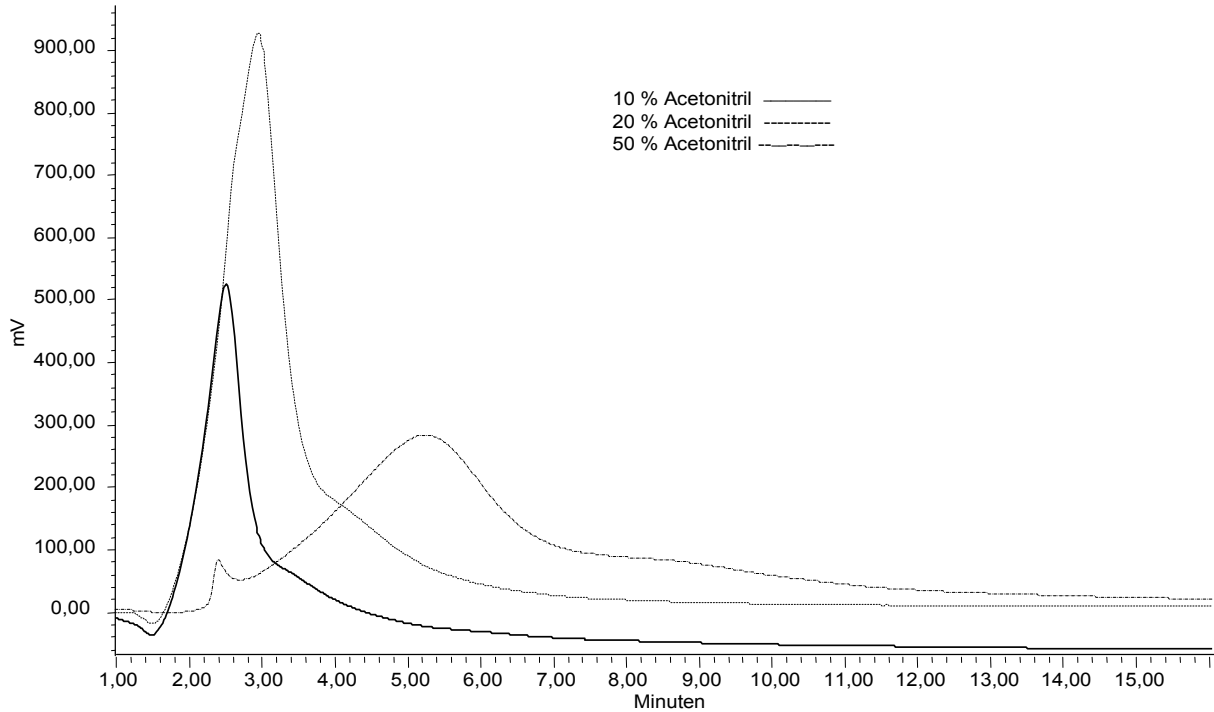


Abbildung 3.42 Overlay einer FITC-Inulin Probe, vermessen mit drei unterschiedlichen mobilen Phasen auf einer Amino Säule

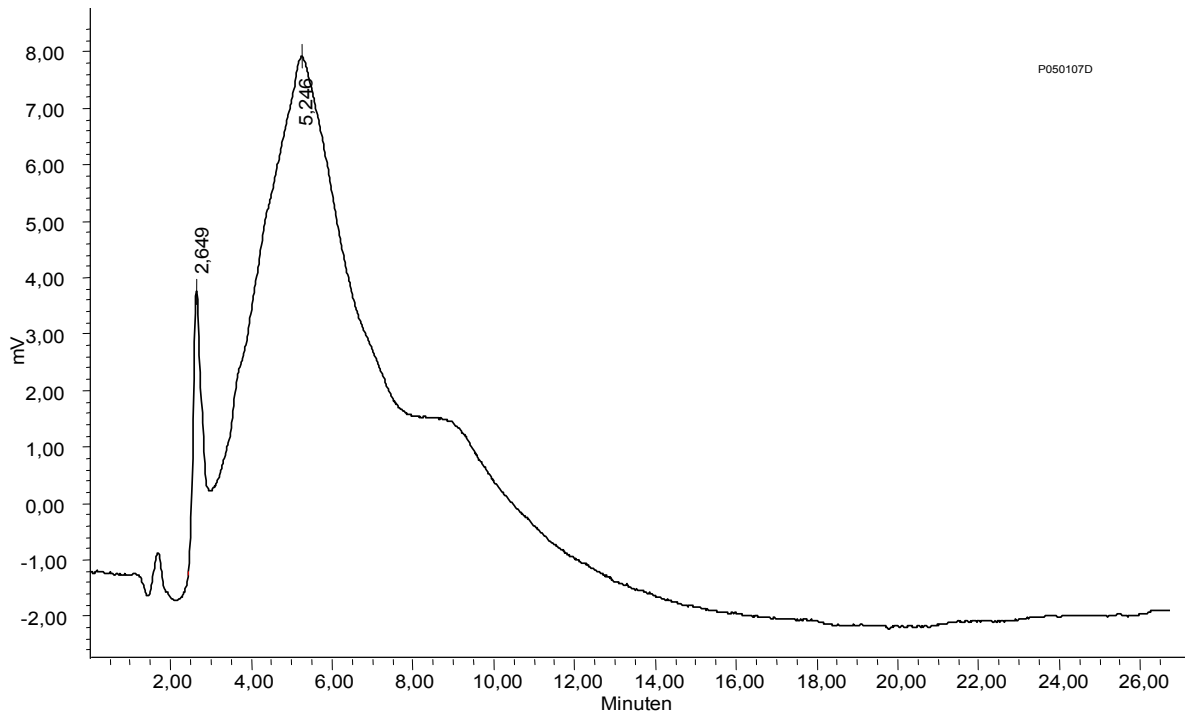


Abbildung 3.43 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer selbst synthetisierten FITC-Inulin Probe, gelöst in der mobilen Phase (45 % Acetonitril/Wasser) auf einer Amino Säule

3.4.3 Trennung von Fruktanen über eine C-18-RP-Säule mit Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Fruktan-Markierung mit FITC

3.4.3.1 Isokratische Acetonitril/Wasser Mischungen als mobile Phase

Wie man in Kap. 3.4.2 erkennt, haben sich die Eigenschaften der Fruktanmoleküle durch die Derivatisierung so stark verändert, dass sich die guten Trennergebnisse der nicht derivatisierten Fruktane (s. Kap. 3.3.2.3), auf einer Amino Säule nicht mehr darstellen lassen. Es wurde daher versucht, die mit FITC derivatisierten Fruktane über eine C-18-RP-Säule der Firma Macherey-Nagel aufzutrennen. Hierzu wurde eine 10 µM wässrige FITC-Inulin Lösung hergestellt und 20 µl auf die Säule aufgetragen. Als mobile Phase wurde eine 50 %ige Acetonitril/Wasser Mischung verwendet. Das Chromatogramm ist in Abb. 3.44 dargestellt. Das Fruktanderivat wird

kaum durch die Säule retiniert und eluiert sehr früh in einem großen Peak mit Schulter und zwei kleineren Peaks. Daraufhin wurde in der mobilen Phase schrittweise der Acetonitrilanteil erhöht. Das beste Ergebnis konnte bei einem Acetonitrilanteil von 82 % erzielt werden (s. Abb. 3.45). Bei höheren Acetonitrilanteilen zogen sich die Peaks weiter auseinander, ohne dass die Trennung verbessert werden konnte. Demnach ist keine befriedigende Trennung zu erreichen.

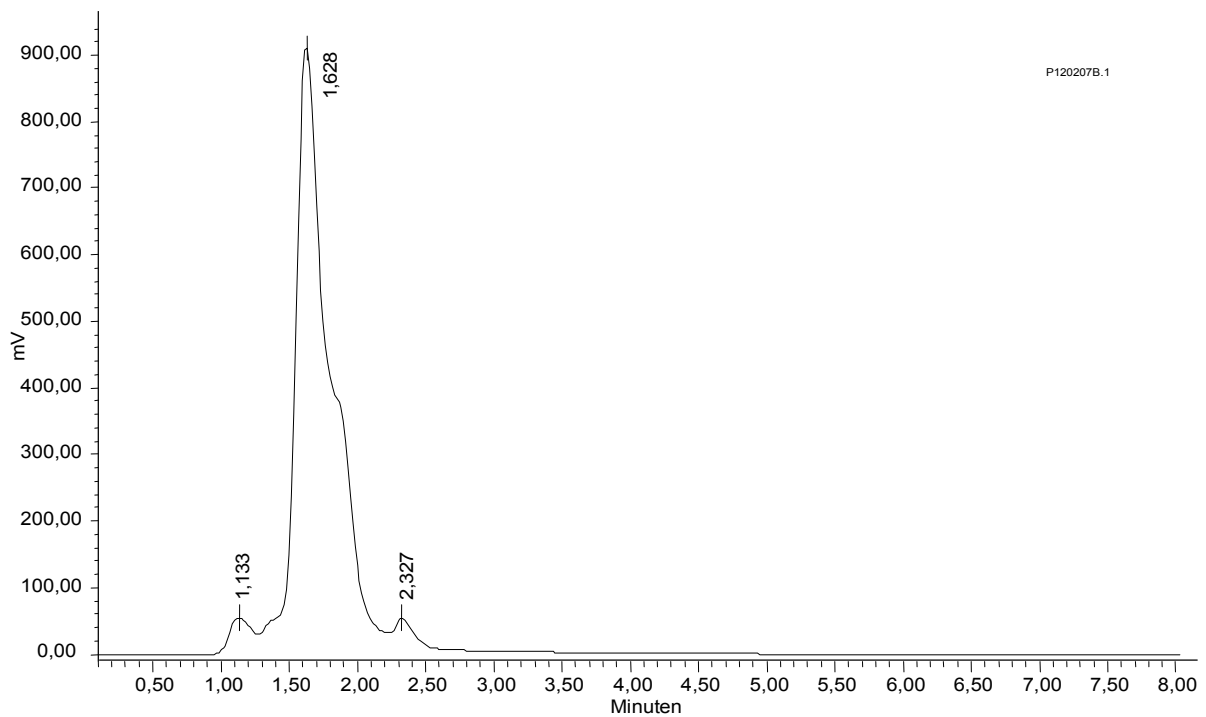


Abbildung 3.44 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer FITC-Inulin Probe in einer 50 % Acetonitril/Wasser Mischung als mobile Phase auf C-18-RP-Säule

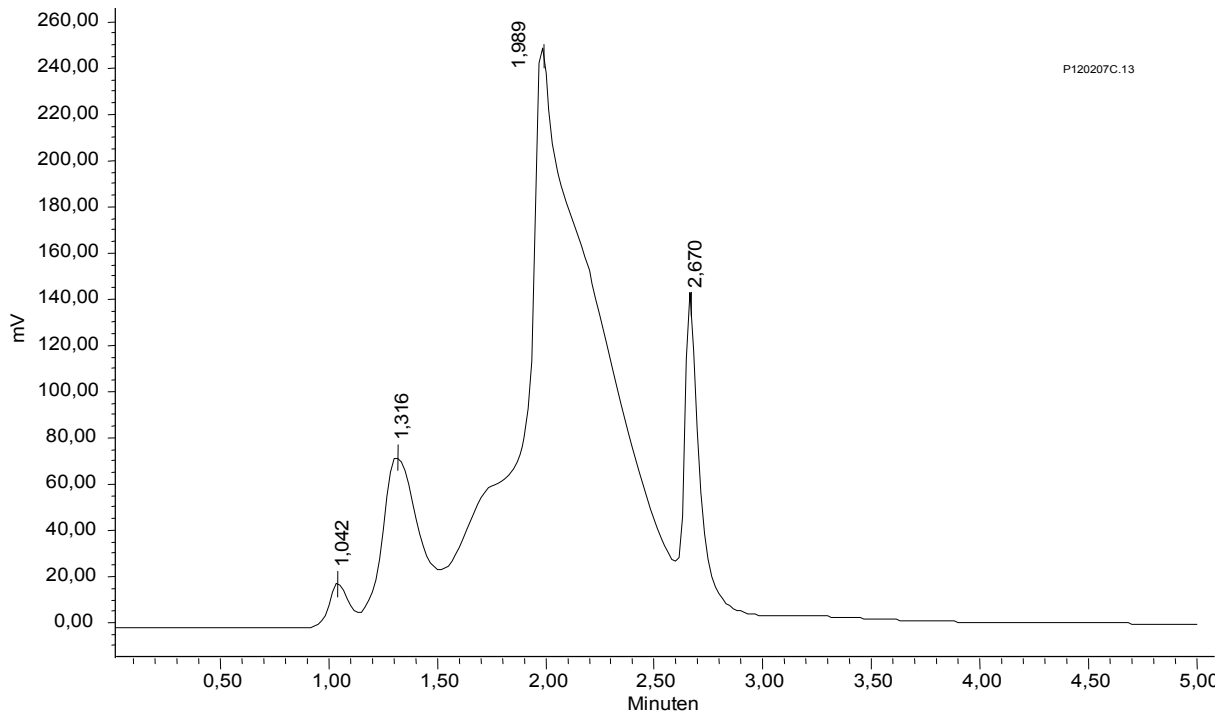


Abbildung 3.45 HPLC-Chromatogramm nach Injektion von 40 μ l einer 1 μ M FITC-Inulin Lösung in 82 % Acetonitril/Wasser Mischung als mobile Phase auf C-18-RP-Säule

3.4.3.2 Isokratische Methanol/Wasser Mischungen als mobile Phase

Es wurden verschiedene Methanol/Wasser Mischungen untersucht, um die Trennung von mit FITC derivatisierten Fruktanen mit unterschiedlichem DP auf einer C-18-RP Säule zu verbessern. Hier konnten mit abnehmender Methanolkonzentration Veränderungen der Chromatogramme beobachtet werden. Dazu wurde eine wässrige 1 μ M FITC-Inulinlösung hergestellt. In Abbildung 3.46 ist ein Lauf mit einer 40 %igen Methanol/Wasser Mischung als mobile Phase und einer Flußrate von 0,7 ml/min abgebildet. Es sind fünf Peaks bei 1,6; 1,9; 2,2; 2,6 und 3,5 Minuten zu sehen. In Abb. 3.47 ist ein Lauf mit einer 35 %igen Methanol/Wasser Mischung als mobile Phase und einer Flußrate von 0,7 ml/min abgebildet. Die fünf Peaks sind weiter zu erkennen und die Zeitabstände der Peakmaxima haben sich ein wenig verschoben. Auffallend ist, dass sich die Signalintensität des 2,6 Minuten Peaks (hier bei 2,8 Minuten zu sehen) deutlich verstärkt hat. Bei dem Lauf in Abb. 3.48 wurde der Methanolgehalt auf 30 % reduziert. Der Peak bei 2,2 Minuten ist nur noch als

Schulter des Peaks bei 2,6 Minuten zu sehen, der weiter enorm an Signalintensität zugenommen hat. Bei dem Lauf in Abb. 3.49 wurde der Methanolgehalt weiter auf 20 % reduziert. Das Signal des 2,6 Minuten Peaks (hier 2,8 Minuten zu sehen) hat wieder abgenommen, dafür hat der Peak bei 3,5 Minuten an Intensität zugelegt. Dieser Trend setzte sich mit weiter abnehmendem Methanolanteil in der mobilen Phase fort. Es ist zu erkennen, dass mit abnehmendem Methanolgehalt in der mobilen Phase die Peaks der später eluierenden Probenbestandteile deutlich an Intensität zunehmen. Methanol ist die bessere mobile Phase.

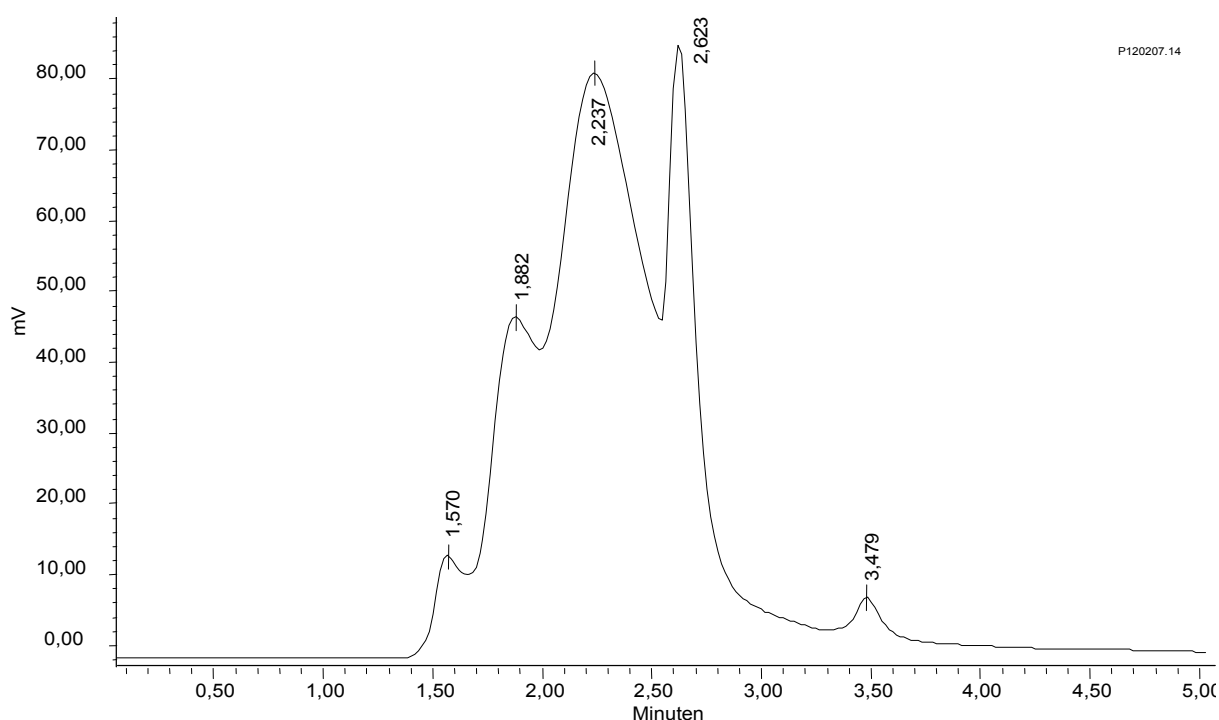


Abbildung 3.46 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer 1 μ M FITC-Inulin Lösung; mobile Phase: 40 %ige Methanol/Wasser Mischung

Ergebnisse

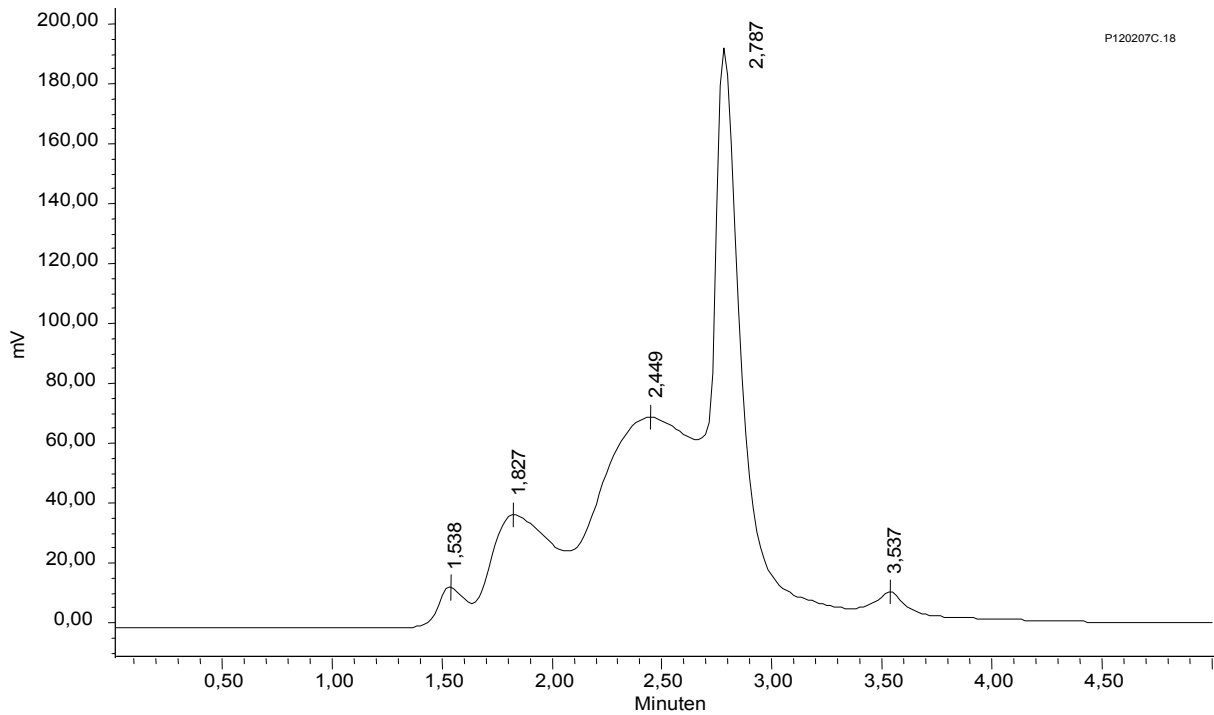


Abbildung 3.47 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer 1 μ M FITC-Inulin Lösung; *mobile Phase: 35 %ige Methanol/Wasser Mischung*

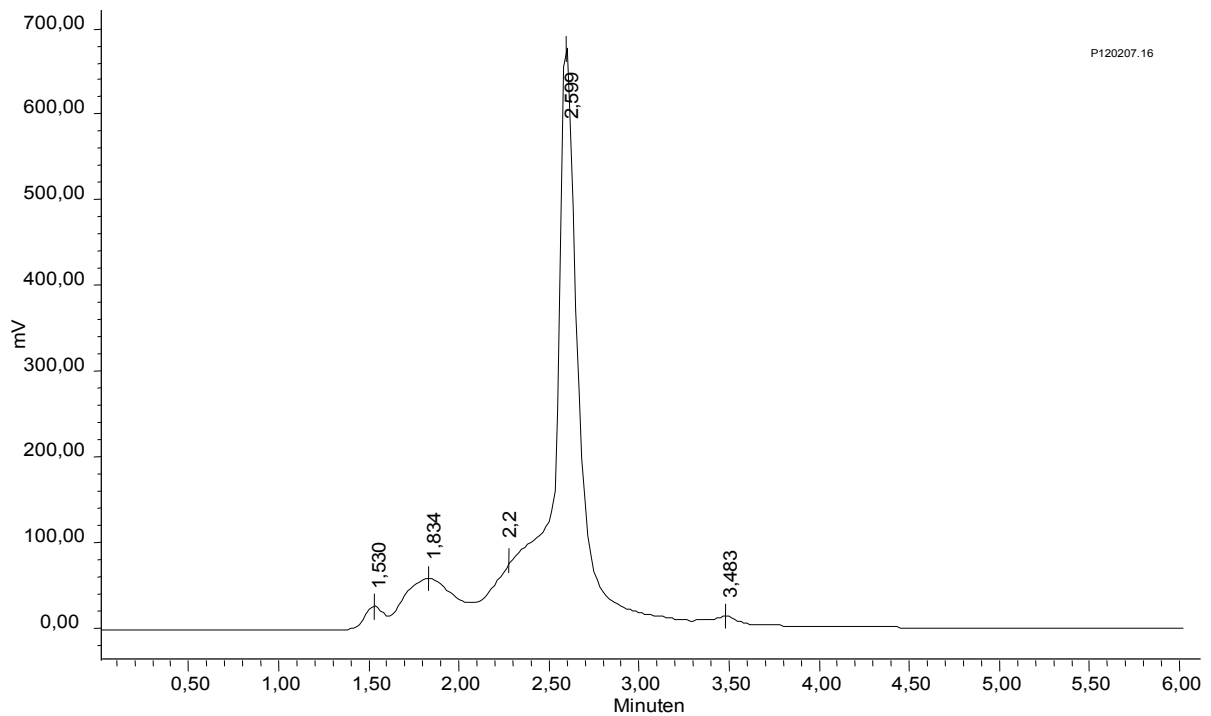


Abbildung 3.48 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer 1 μ M FITC-Inulin Lösung; *mobile Phase: 30 %ige Methanol/Wasser Mischung*

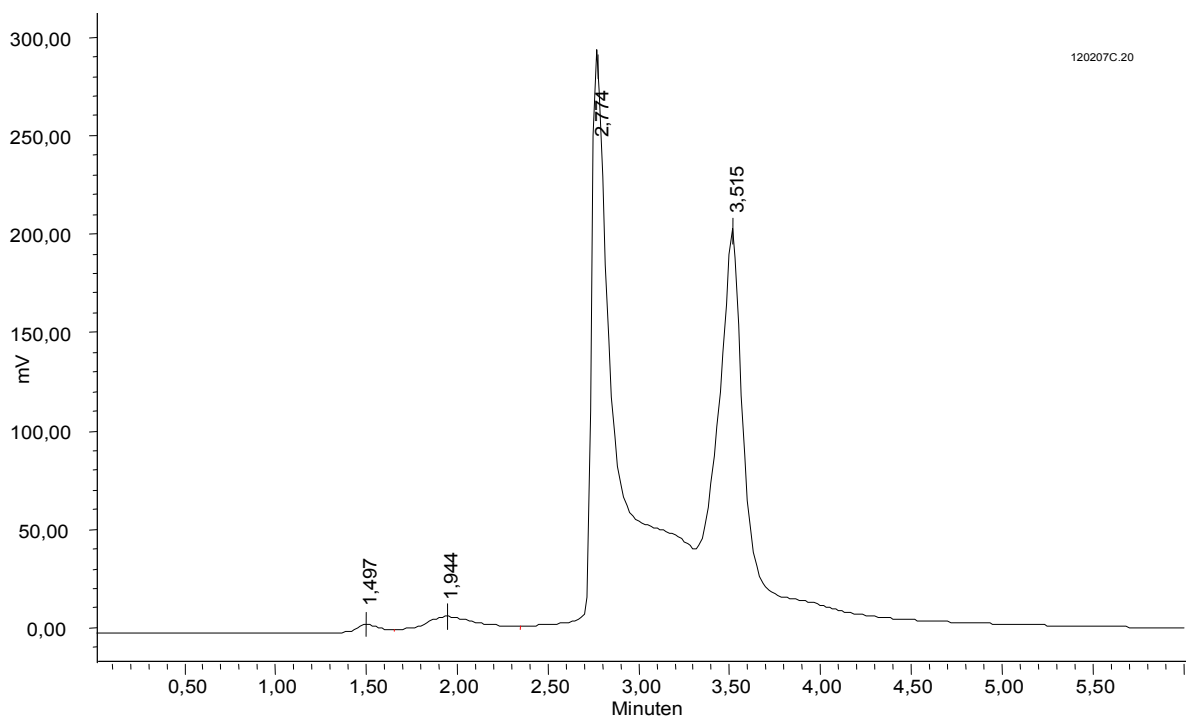


Abbildung 3.49 HPLC-Chromatogramm nach Injektion einer 1 µM FITC-Inulin Lösung; *mobile Phase: 20 %ige Methanol/Wasser Mischung*

3.4.3.3 Methanol/Wasser Gradient als mobile Phase

Zur Optimierung der Trennleistung wurde versucht, einen Methanol/Wasser Gradienten als mobile Phase zu verwenden. Exemplarisch ist in Abb. 3.50 der Overlay von zwei Chromatogrammen mit zwei verschiedenen Gradienten dargestellt. Es wurde eine wässrige 10 µM FITC-Inulin Lösung hergestellt, die mit den in den Tab. 3.24 und 3.25 beschriebenen Gradienten vermessen wurde. Es wurden jeweils 2 µl auf die Säule aufgetragen. Abb. 3.51 zeigt den Overlay einer gekauften FITC-Inulin (Sigma) Probe und einer selbst synthetisierten FITC-Inulin Probe. In beiden Fällen wurde eine wässrige 10 µM FITC-Inulin Lösung hergestellt, welche mit Hilfe des in Tab. 3.24 beschriebenen Methanol/Wasser Gradienten vermessen wurde. Es wurden jeweils 20 µl auf die Säule aufgetragen. Bei diesen Bedingungen eluiert reines FITC nach vier Minuten. Beim Vergleich der selbst synthetisierten FITC-Inulin Probe mit der gekauften FITC-Inulin Probe (s. Abb. 3.51) fällt auf, dass diese Peaks bei der selbst synthetisierten Probe deutlich größer sind. Bei der Probenvorbereitung war die 10 µM FITC-Inulin Lösung der selbst synthetisierten Probe auch stärker

orange gefärbt als die gekaufte. Dies lässt darauf schließen, dass sich in der selbst synthetisierten Probe geringe Mengen nicht umgesetztes FITC befand. In der gekauften Ware, scheint auch noch eine Restmenge nicht umgesetztes FITC vorhanden zu sein. Die Löslichkeit von FITC in 80 % Methanollösung ist deutlich besser als die von FITC markiertem Inulin, was die schnelle Elution erklärt. Bei den Peaks bei etwa 80 Minuten scheint es sich um FITC-Inulin zu handeln. Leider wurde auch mit dieser Methode keine Trennung der FITC markierten Inuline nach ihren DP erreicht. Abb. 3.51 zeigt jedoch ebenfalls, dass die FITC-Inulin Synthese erfolgreich war, da das Produkt auch hier qualitativ nachgewiesen werden konnte. Die Abtrennung des nicht umgesetzten FITC ist allerdings noch optimierbar.

Tabelle 3.24 Gradient 1 zur Trennung von FITC markierten Inulin auf C18-RP-Säulen Die Flussrate wurde stufenweise geändert, der Gradient kontinuierlich.

Retentionszeit (min)	Flussrate (ml/min)	Wasser (%)	Methanol (%)
0	0,4	20	80
63	0,7	100	0
73	0,5	20	80

Tabelle 3.25 Gradient 2 zur Trennung von FITC markierten Inulin auf C18-RP-Säulen Die Flussrate wurde stufenweise geändert, der Gradient kontinuierlich.

Retentionszeit (min)	Flussrate (ml/min)	Wasser (%)	Methanol (%)
0	0,4	20	80
30	0,7	100	0
43	0,5	20	80

Ergebnisse

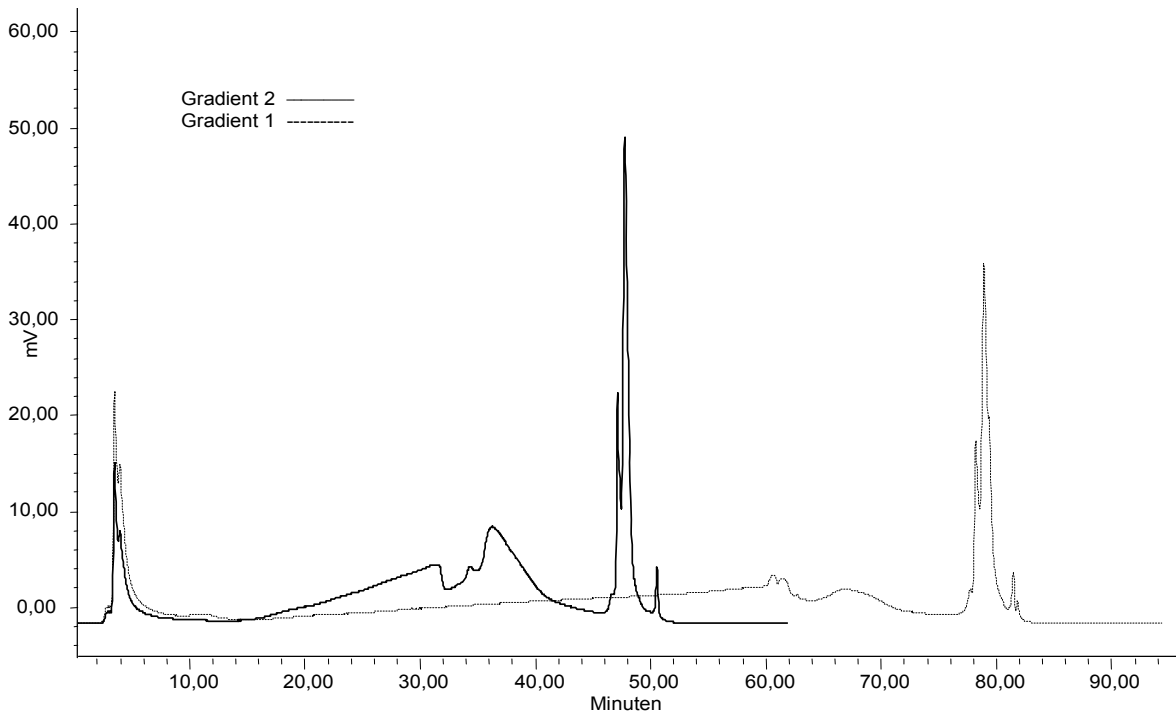


Abbildung 3.50 Overlay der FITC-Inulin Injektionen mit den unterschiedlichen Gradienten 1 und 2 der mobilen Phase (s. Tab. 3.24 und 3.25)

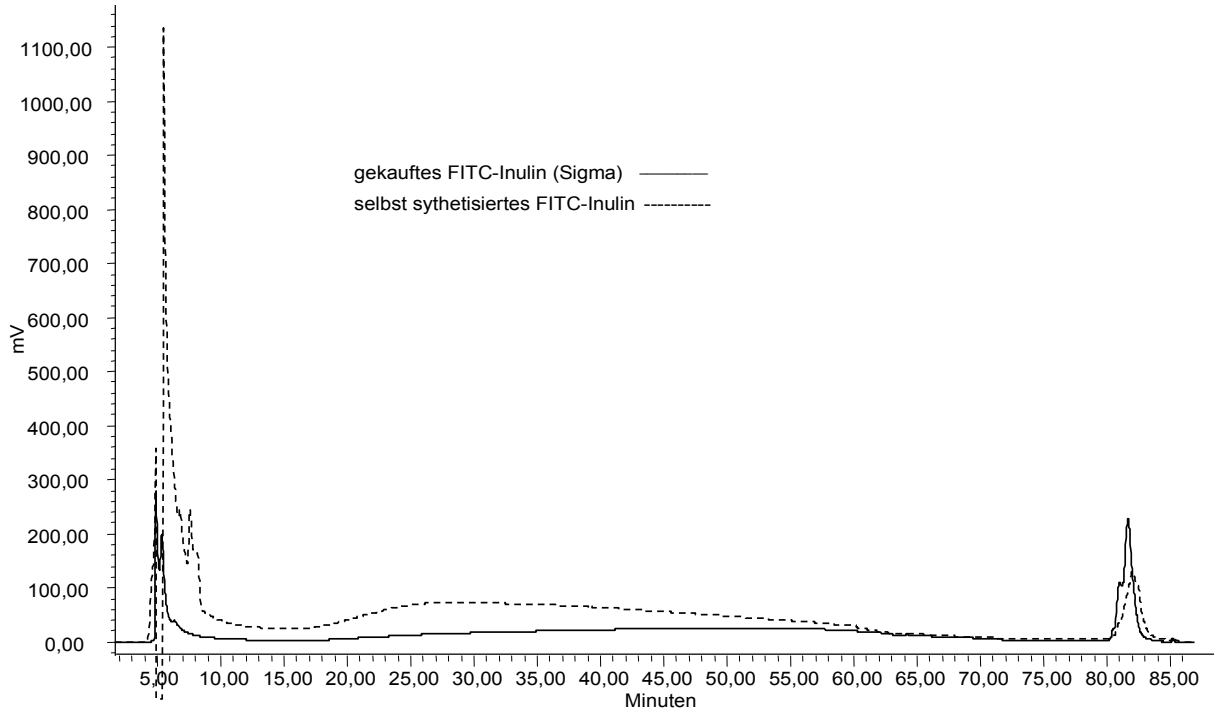


Abbildung 3.51 Overlay der Injektionen von selbst synthetisiertem und gekauftem FITC-Inulin

3.4.4 Trennung von Fruktanen über eine Luna Amino[®]-Säule mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion

3.4.4.1 Vorversuche mit Plattenreader

Die Proben wurden, wie in Kap. 2.4.4.3.1 beschrieben, vorbereitet und das Funktionieren der Derivatisierungsmethode überprüft. Außerdem wurden die im Folgenden beschriebenen Abhängigkeiten von Konzentration, Reaktionszeit und Temperatur der Reaktionskapillare untersucht. Die Anregungswellenlänge betrug 314 nm und die Messwellenlänge 433 nm.

3.4.4.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Hierzu wurden fünf wässrige Verdünnungen von Inulin 5000 mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 545 µg/ml; 273 µg/ml; 109 µg/ml; 55 µg/ml und 11 µg/ml. Diese wurden, wie in Kap. 2.4.4.3.1 beschrieben, vermessen. Die Ergebnisse der Mittelwerte (n = 3) sind in Abb. 3.52 dargestellt.

Es ist eine sehr gute Linearität ($r^2=0,9995$) im Bereich zwischen 11 und 545 µg/ml zu beobachten. Die Nachweisgrenze liegt zwischen 55 und 11 µg/ml Inulin 5000.

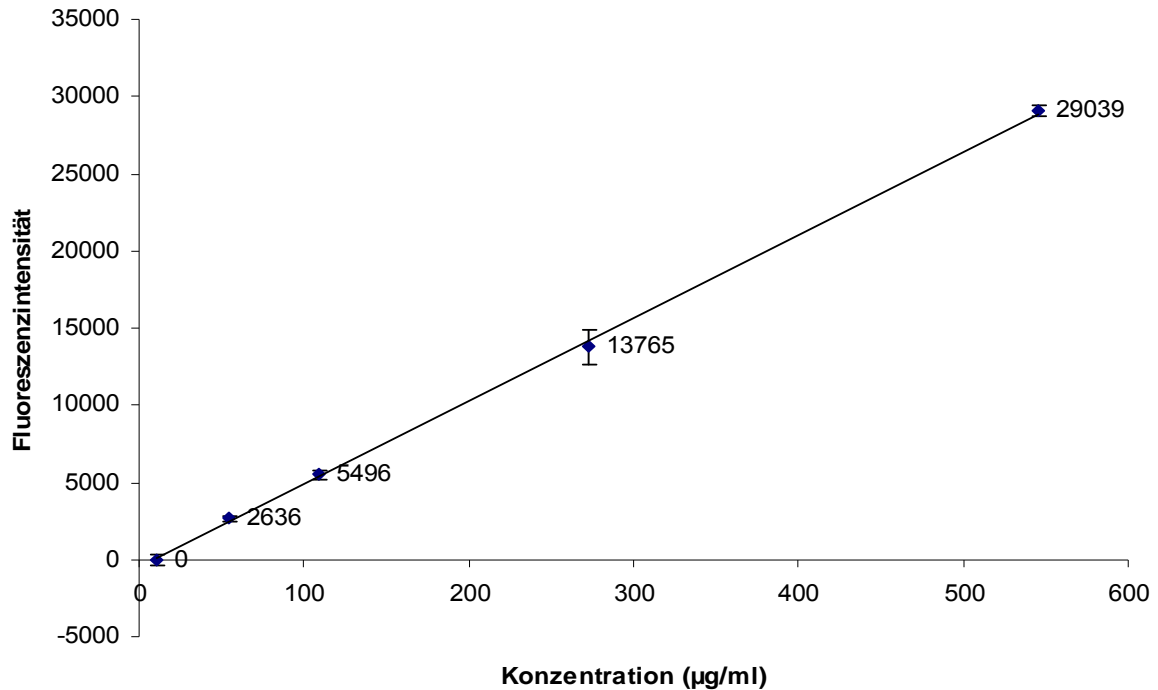


Abbildung 3.52 Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Inulin 5000 Konzentrationen (n = 3) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9995$.

3.4.4.1.2 Temperaturabhängigkeit

Es sollte die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität zur Temperatur während der Inkubation (s. Kap. 2.4.4.3.1) bestimmt werden. Hierzu wurde eine Inulin 5000 Lösung mit einer Konzentration von 310 µg/ml hergestellt und bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen vermessen. Die Ergebnisse der Mittelwerte (n = 3) sind in Abb. 3.53 dargestellt.

Es ist zu sehen, dass ab einer Temperatur von 100°C die Fluoreszenzintensität wieder abnimmt. Somit ist für die HPLC-Läufe (s. Kap. 3.4.4.2) eine Inkubationstemperatur der Reaktionskapillare von 100°C zu wählen.

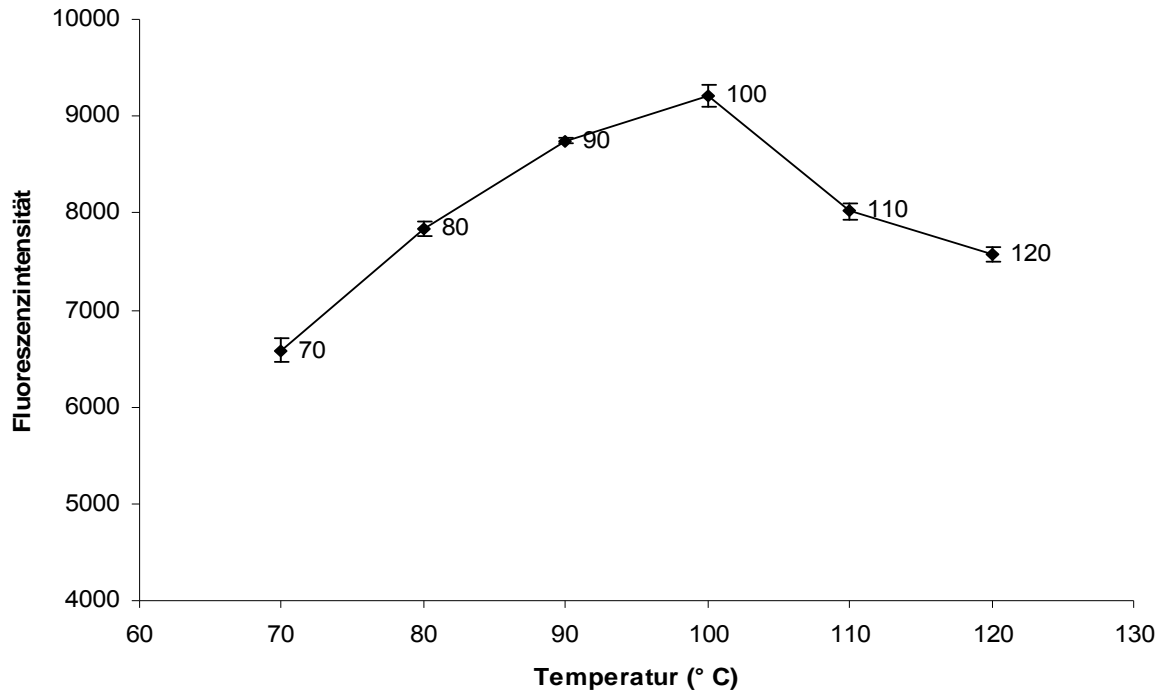


Abbildung 3.53 Darstellung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bei der Inkubation mit verschiedenen Temperaturen (n = 3)

3.4.4.1.3 Zeitabhängigkeit

Es sollte die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit während der Inkubation (s. Kap. 2.4.4.3.1) bestimmt werden. Hierzu wurde eine Inulin 5000 Lösung mit einer Konzentration von 465 µg/ml hergestellt und bei unterschiedlichen Inkubationszeiten vermessen. Die Ergebnisse der Mittelwerte (n = 3) sind in Abb. 3.54 dargestellt. Bis zu einer Inkubationszeit von 20 Minuten nimmt die Fluoreszenz zu.

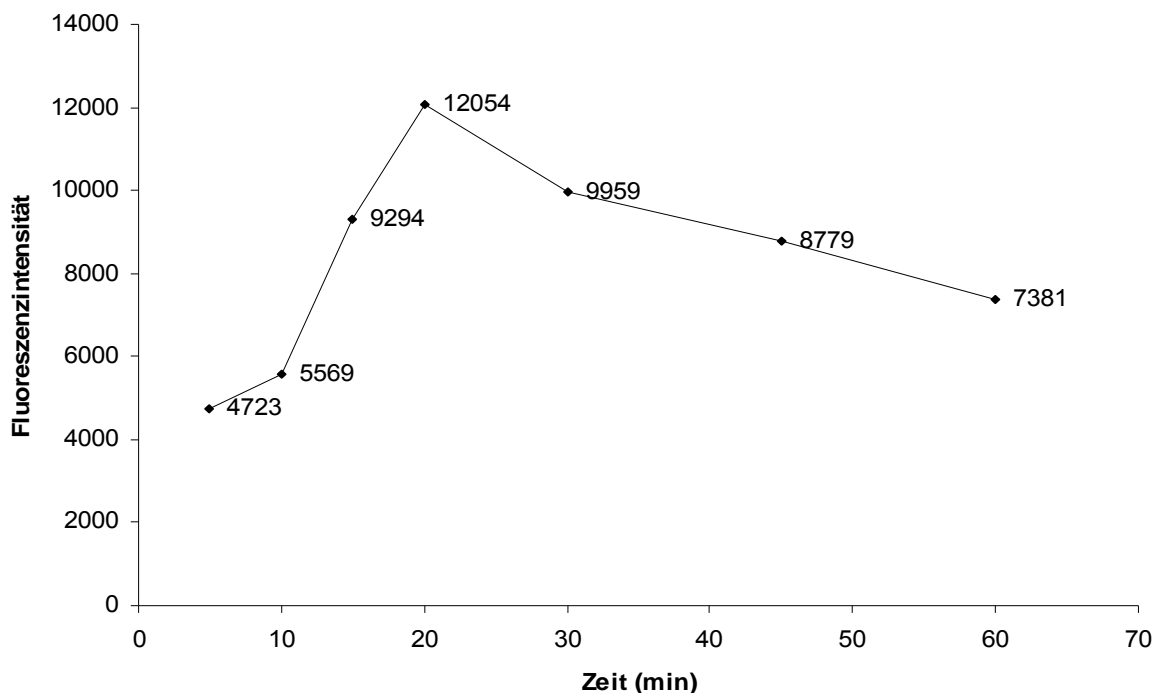


Abbildung 3.54 Darstellung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bei der Inkubation mit verschiedenen Inkubationszeiten (n = 3)

Die Vorversuche zeigten, dass die Umsetzung von Fruktanen mit Guanidiniumchlorid funktioniert. Im Kap. 3.4.4.2 wird die Methode zur Nachsäulenderivatisierung von Fruktanen an der HPLC angewendet.

3.4.4.2 Fruktananalytik auf einer HPLC-Anlage mit einer Luna Amino[®]-Säule und Guanidinium-chlorid Nachsäulenderivatisierung

3.4.4.2.1 Überprüfung der HPLC Methode mit Glukose

Es wurde eine Verdünnungsreihe aus einer 111 mM (0,2 mg/ml) wässrigen Glukoselösung mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 2,22 mM; 1,11 mM; 550 μ M, 275 μ M und 220 μ M (0,4 μ g/ml). Die Proben wurden, wie in Kap. 2.4.4.3.3 beschrieben, vorbereitet und, wie in Kap. 2.4.4.3.2 beschrieben, vermessen. Die Mittelwerte der Flächen (n = 2) sind in Abb. 3.55 dargestellt. Die Läufe wurden mit einer 62 %igen Acetonitril/Wasser Mischung als mobile Phase bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. In Abb. 3.56 ist ein Overlay der Chromatogramme der

Ergebnisse

verschiedenen Glukose Verdünnungen dargestellt. Die Verdünnungsreihe der Glukose ergibt eine hinreichend befriedigende Linearität.

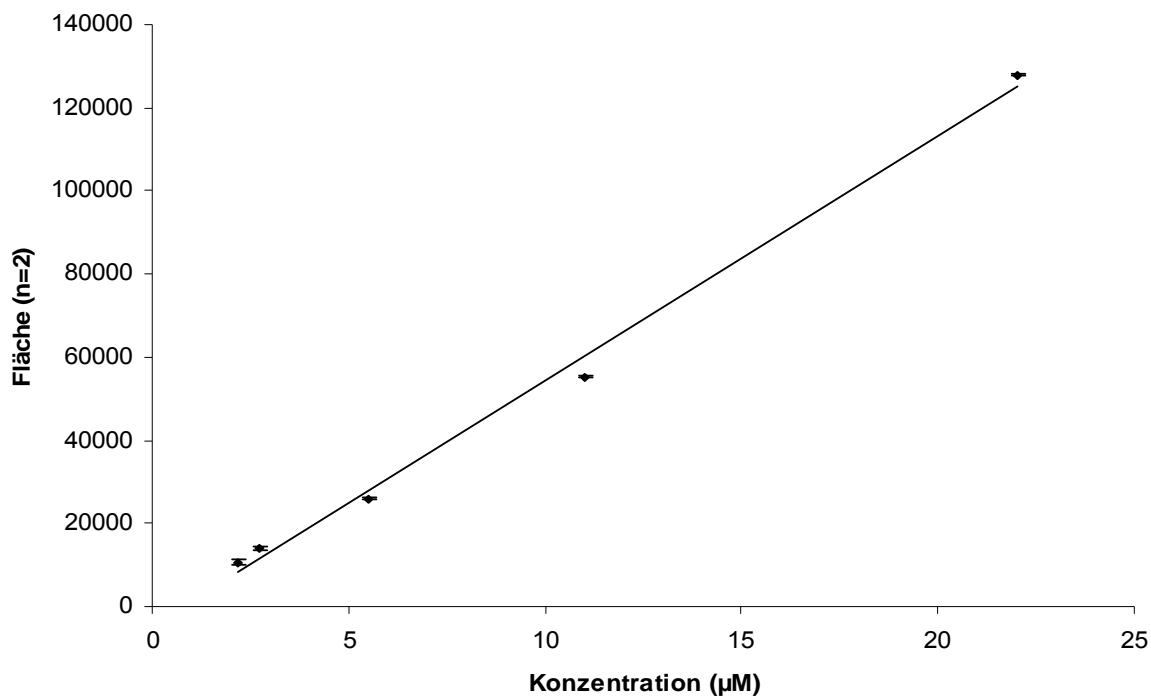


Abbildung 3.55 Darstellung der Mittelwerte der Flächen bei unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen (n = 2, $r^2=0,9951$)

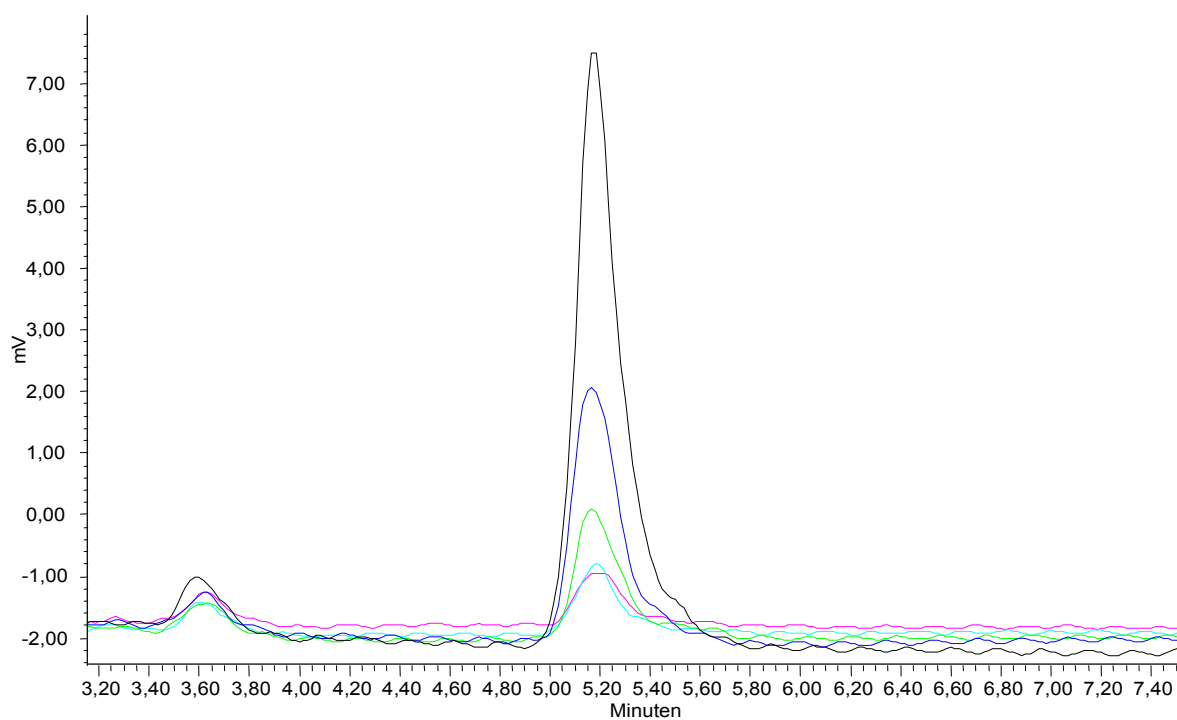


Abbildung 3.56 Overlay der Chromatogramme der unterschiedlich konzentrierten Glukoselösungen zur Überprüfung der HPLC Methode

3.4.4.2.2 Optimierung der mobilen Phase zur Trennung von Inulin 5000 mit einer Luna Amino[®]-Säule und Guanidiniumchlorid-Nachsäulenderivatisierung

Zunächst wurde ein Lauf unter den gleichen Bedingungen wie in Kap. 3.3.2.3 durchgeführt. Dazu wurden 5,1 mg Inulin 5000 auf 1 ml einer 60 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung eingewogen und, wie in Kap. 2.4.4.3.3 beschrieben, vorbereitet. Das Chromatogramm einer 10 µl Probe ist in Abb. 3.57 zu sehen. Der Peak bei 4,8 Minuten ist deutlich größer als die restlichen Peaks des Chromatogramms und deshalb nicht vollständig dargestellt.

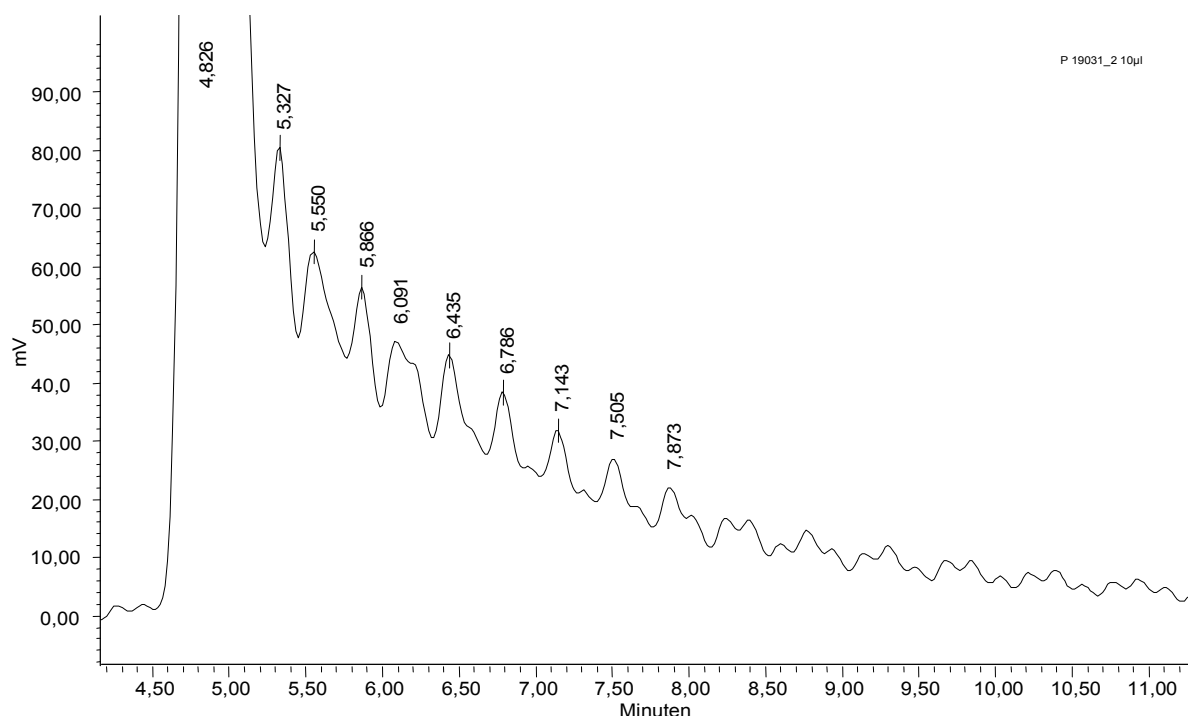


Abbildung 3.57 Chromatogramm einer Inulin 5000 Probe mit Guanidiniumchlorid-Nachsäulenderivatisierung (*Amino Säule mit einer 62 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase*)

Zur Optimierung der Trennleistung wurde die Standardmethode aus Kap. 3.3.2.3 abgeändert. Der Acetonitrilanteil der mobilen Phase wurde bei gleichbleibender Flussrate auf 64 % gesteigert. Es wurden 5 µl einer Inulin 5000 Probe untersucht (5,15 mg auf 1 ml einer 60 % Acetonitril/Wasser-Mischung, wie in Kap. 2.4.4.3.3 vorbereitet). Das Chromatogramm ist in Abb. 3.58 dargestellt. Wie in Abb. 3.57 ist

der Peak bei 4,9 Minuten deutlich größer als die restlichen Peaks des Chromatogramms und deshalb nicht vollständig dargestellt.

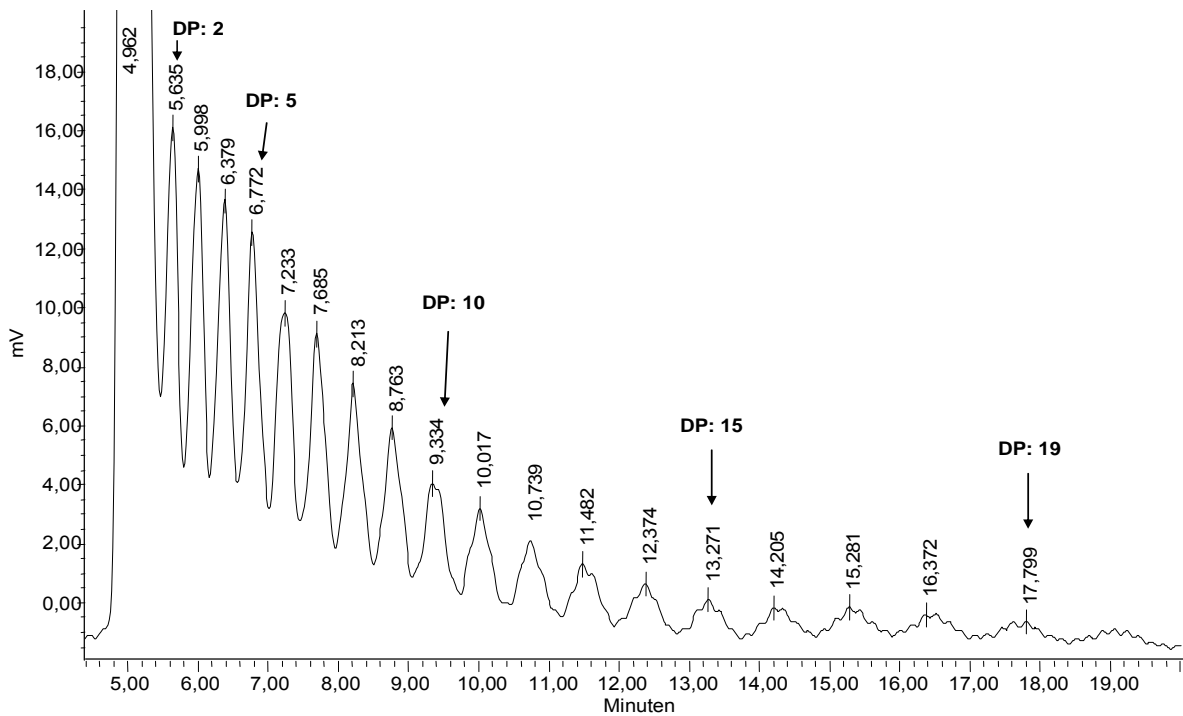


Abbildung 3.58 Chromatogramm einer Inulin 5000 Probe mit Guanidiniumchlorid Nachsäulenderivatisierung (*Amino Säule mit einer 64 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase*)

Eine Erniedrigung der Acetonitrilkonzentration in der mobilen Phase führt einerseits zu einer besseren Trennung der einzelnen Peaks im unteren DP-Bereich, andererseits werden die später eluierenden Peaks breiter und flacher, und die Analysenzeit wird sehr lang.

3.4.4.2.3 Analyse von fraktionierten Fruktangemischen auf einer Phenomenex Luna Amino[®] Säule mit Guanidiniumchlorid-Nachsäulenderivatisierung

Wie in Kap. 2.2.3 beschrieben wurden Inulinfractionen durch Lösen in unterschiedlichen Acetonitril/Wasser-Mischungen hergestellt. Von den einzelnen

Fraktionen wurden jeweils die in Tabelle 3.26 gezeigten Mengen für die Herstellung einer wässrigen Inulin-Lösung eingewogen.

Tabelle 3.26 Inulineinwaage der einzelnen Ethanolfraktionen für die HPLC-Läufe

Acetonitrilfraktion (%)	80	60	40	20	10	0
Einwaage für HPLC-Lauf (mg/ml)	5,7	5,2	5,3	5,0	4,9	4,5

In den Abb. 3.59 bis 3.64 sind die Chromatogramme der einzelnen Läufe dargestellt. Als mobile Phase wurde eine 64 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung verwendet; die Flussrate lag bei 1 ml/min. Die Reaktionslösung wurde mit einer Flussrate von 0,3 ml/min zugegeben (s. Kap. 2.4.4.3.2).

Die HPLC-Läufe können zeigen, dass, wie bereits in Kap. 3.2.4 durch Bestimmung des DP über GC-Bestimmung des Glukose-Fruktose-Verhältnisses gezeigt wurde, der DP der Fruktane in den Fraktionen mit sinkendem Acetonitrilgehalt zunimmt. Dies ist daran zu erkennen, dass die Peaks zu späteren Zeiten eluieren. Die Form der Peaks und die Auflösung sind etwas schlechter als bei den HPLC-Läufen ohne Nachsäulenderivatisierung.

Ergebnisse

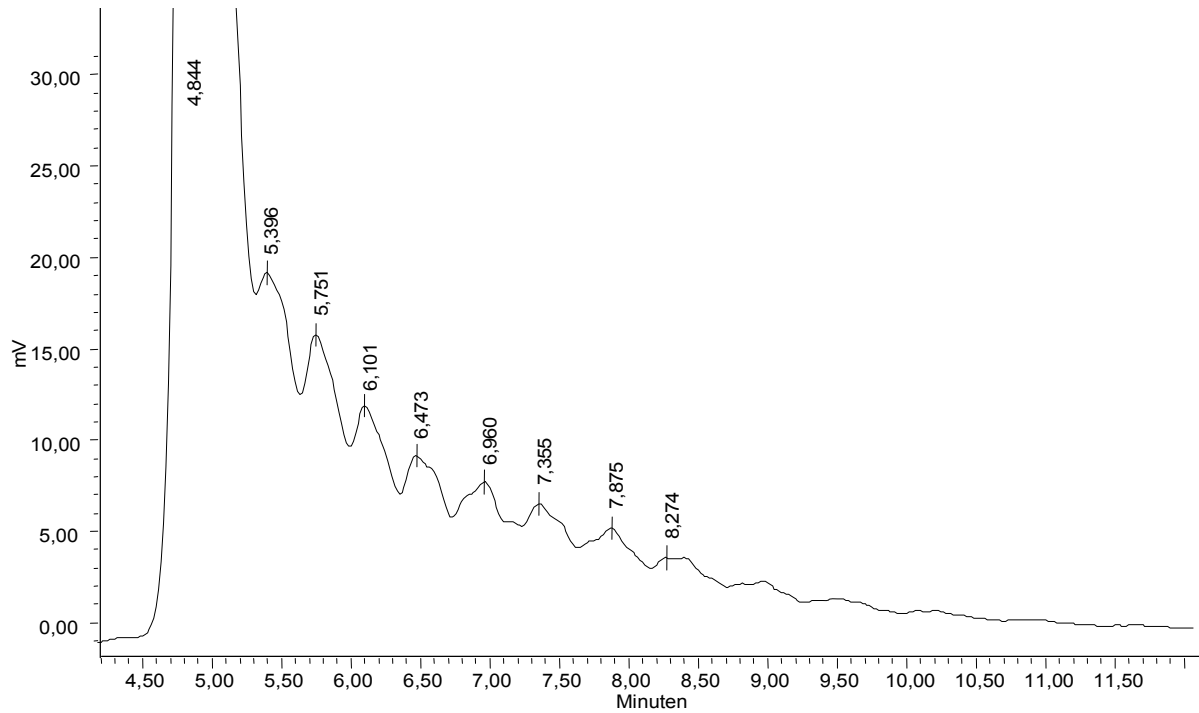


Abbildung 3.59 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 80 %igen Acetonitrilfraktion

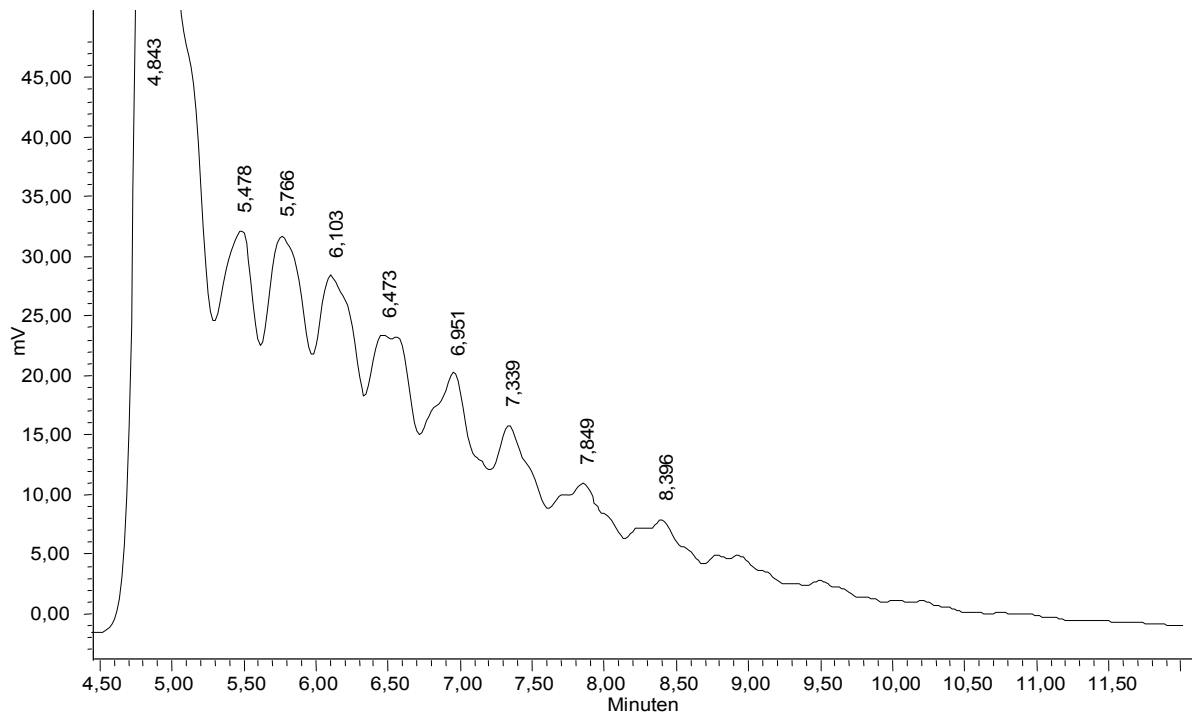


Abbildung 3.60 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 60 %igen Acetonitrilfraktion

Ergebnisse

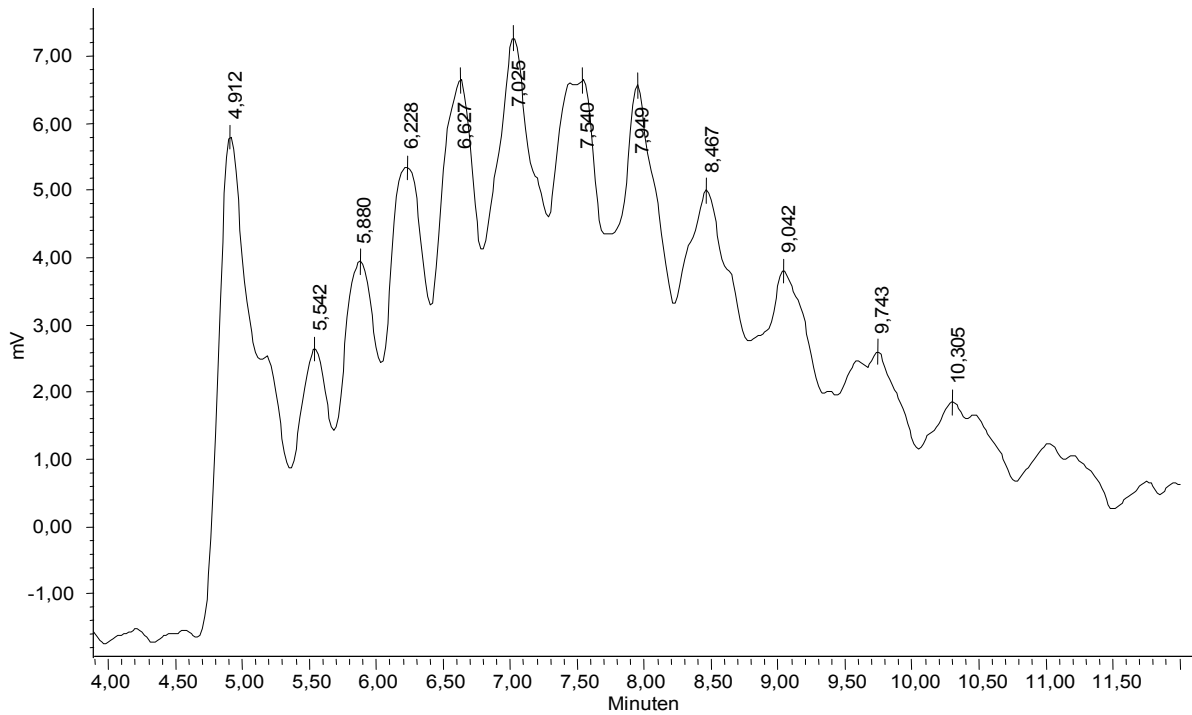


Abbildung 3.61 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 40 %igen Acetonitrilfraktion

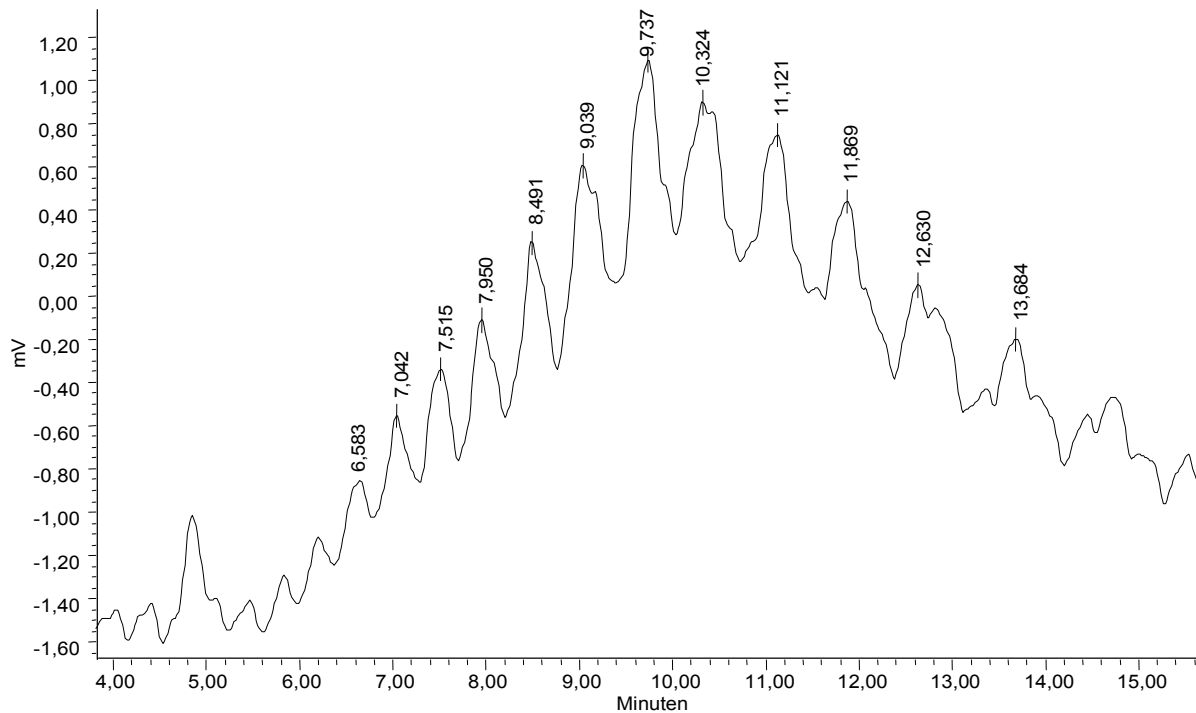


Abbildung 3.62 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 20 %igen Acetonitrilfraktion

Ergebnisse

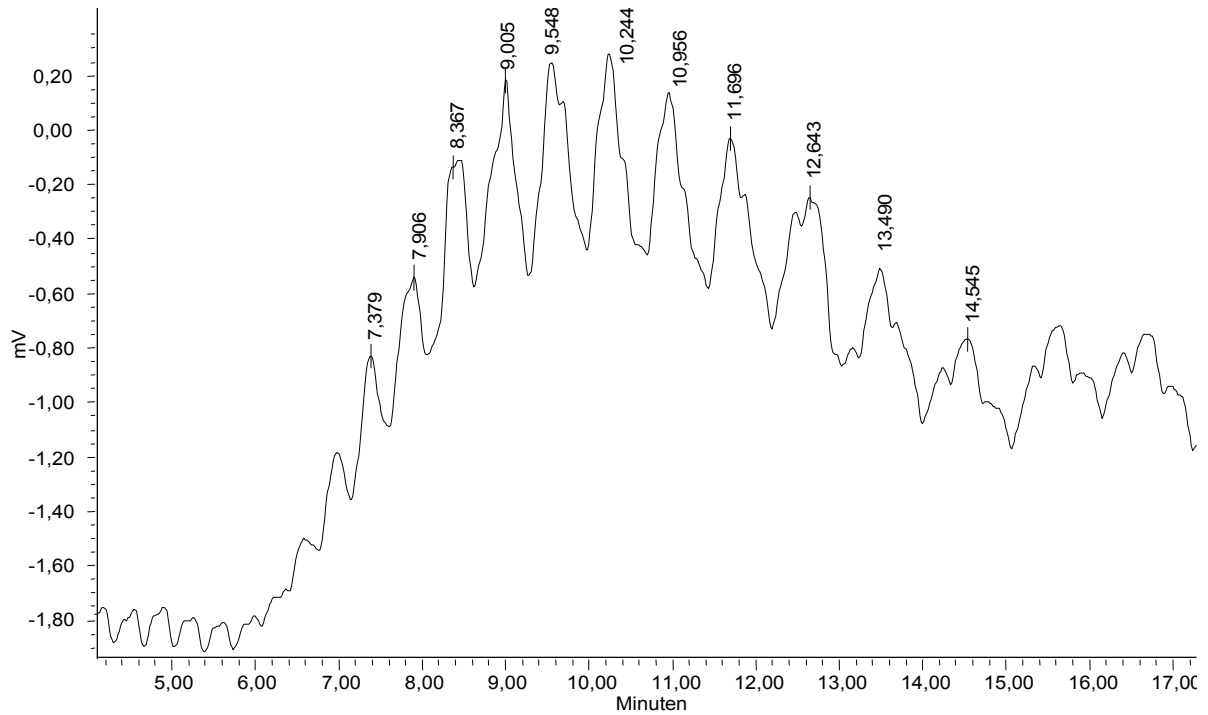


Abbildung 3.63 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 10 %igen Acetonitrilfraktion

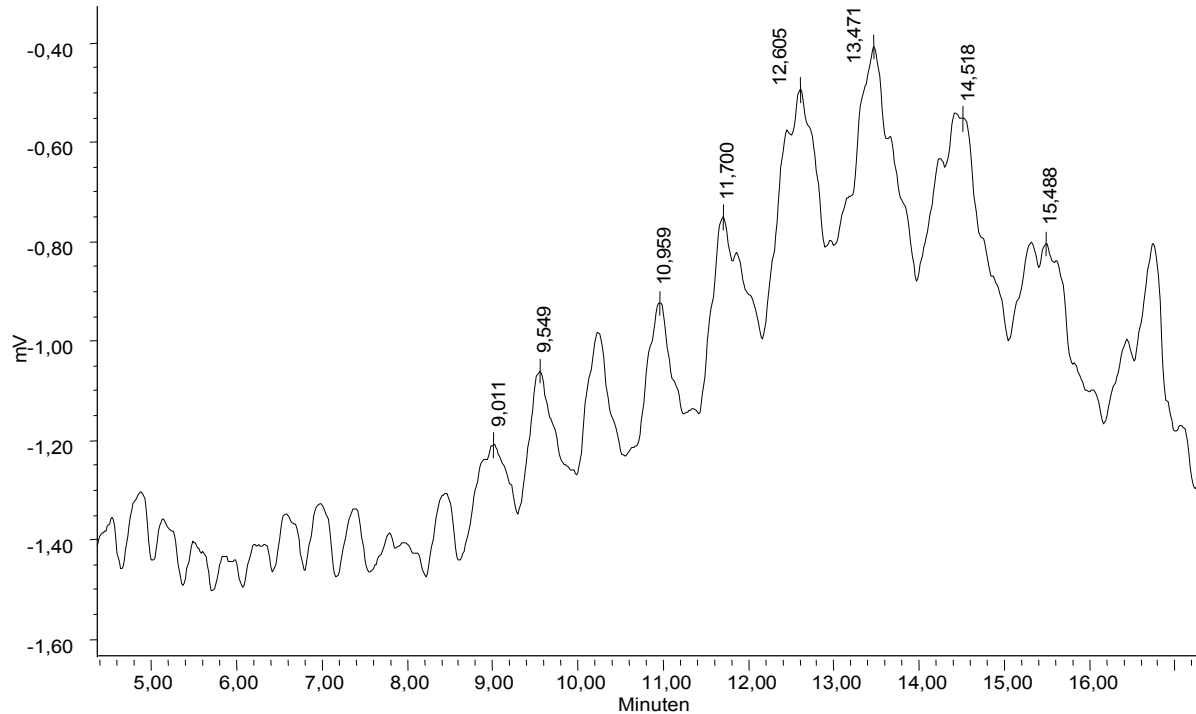


Abbildung 3.64 Darstellung des HPLC-Chromatogramms nach Injektion der 0 %igen Acetonitrilfraktion

3.5 HPAEC-PAD (Dionex[®]) Analytik

Es wurden drei Ansätze mit Mischungen aus Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, durch fraktioniertes Lösen in unterschiedlichen Ethanol/Wasser Gemischen hergestellt. Dabei wurden die folgenden in den Tab. 3.27 bis 3.29 beschriebenen Mengen eingewogen und Ausbeuten erzielt. In den Tabellen ist der Wert für die gelöste Fraktion gleich dem Ethanolgehalt des Lösungsmittels, z. B. Fraktion 96 bedeutet, dass die Fruktane in dieser Fraktion mit einer 96 % Ethanollösung gelöst wurden.

Allgemein ist zu sagen, dass sich die 80 % Fraktion bei allen drei Ansätzen in ihrer Konsistenz nach der Gefriertrocknung deutlich von den anderen Fraktionen unterschied. Die 80 % Fraktion war nach der Gefriertrocknung von sehr fester, glasiger Konsistenz. Die anderen Fraktionen charakterisierten sich dagegen als flockig weiße Pulver.

Ergebnisse

Tabelle 3.27 Einwaagen und Ausbeuten **Ansatz 1**

Einwaagen:	Inulin (<i>Dahlia</i>):	305,24 mg
	Inulin 5000:	203,32 mg
Gesamtausbeute:		406,2 mg = 79,9 %

Ethanolfraktion (%)	96	80	60	40	20	0
Masse (mg)	2,0	33,2	39,5	66,2	54,7	210,6
Gesamtausbeute (%)	0,5	8,2	9,7	16,3	13,5	51,9

Tabelle 3.28 Einwaagen und Ausbeuten **Ansatz 2**

Einwaagen:	Inulin (<i>Dahlia</i>):	303,64 mg
	Inulin 5000:	252,06 mg
Gesamtausbeute:		457,3 mg = 82,3 %

Ethanolfraktion (%)	96	80	60	40	20	0
Masse (mg)	1,0	53,2	38,5	73,0	58,8	232,3
Gesamtausbeute (%)	0,2	11,7	8,4	16,0	12,9	50,8

Tabelle 3.29 Einwaagen und Ausbeuten **Ansatz 3**

Einwaagen:	Inulin (<i>Dahlia</i>):	302,64 mg
	Inulin 5000:	207,33 mg
Gesamtausbeute:		363,0 mg = 71,2 %

Ethanolfraktion (%)	96	80	60	40	20	0
Masse (mg)	0,0	49,1	33,5	46,7	55,6	178,1
Gesamtausbeute (%)	0,0	13,5	9,2	12,9	15,3	49,1

Die einzelnen Fraktionen der drei Ansätze wurden auf einer Dionex[®]-Anlage der Firma Phytos, wie in Kap. 2.5 beschrieben, vermessen. Die Abb. 3.66 bis 3.71 zeigen von jeder Fraktion ein typisches Chromatogramm. Es ist sehr gut zu sehen, wie der DP der Fruktane von der 96 % Fraktion bis hin zur 0 % Fraktion kontinuierlich zunimmt. Die durchschnittliche Peakverteilung im Chromatogramm verschiebt sich

immer weiter nach rechts. Zu beachten ist bei allen Abbildungen, dass die Response mit steigendem DP abnimmt, die Peaks der höhermolekularen Fruktane also im Vergleich zu den niedermolekularen Peaks zu klein erscheinen. Zur Identifizierung der Peaks wurden (s. Abb. 3.65) definierte Zucker mit einer Kettenlänge von 1 (Fruktose und Glukose) bis 7 (Maltoheptaose) injiziert. Ein weiteres hier nicht dargestelltes Chromatogramm zeigt, dass DP 15 bei 40 Minuten eluiert.

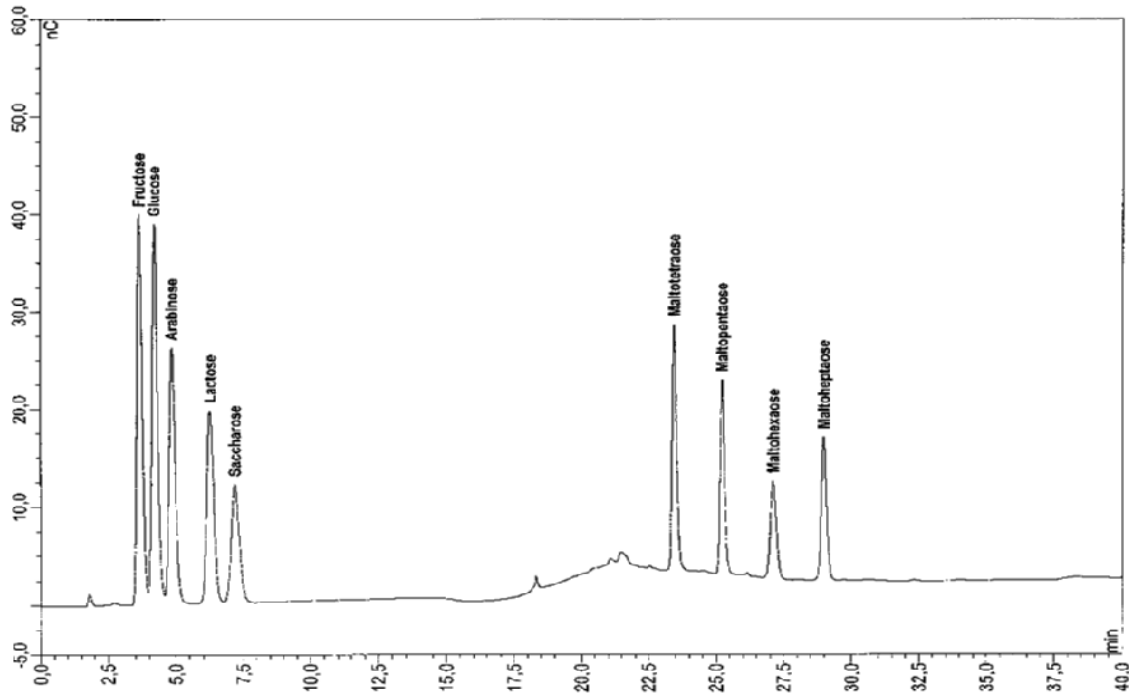


Abbildung 3.65 Dionex[®] Chromatogramm von definierten Oligosacchariden

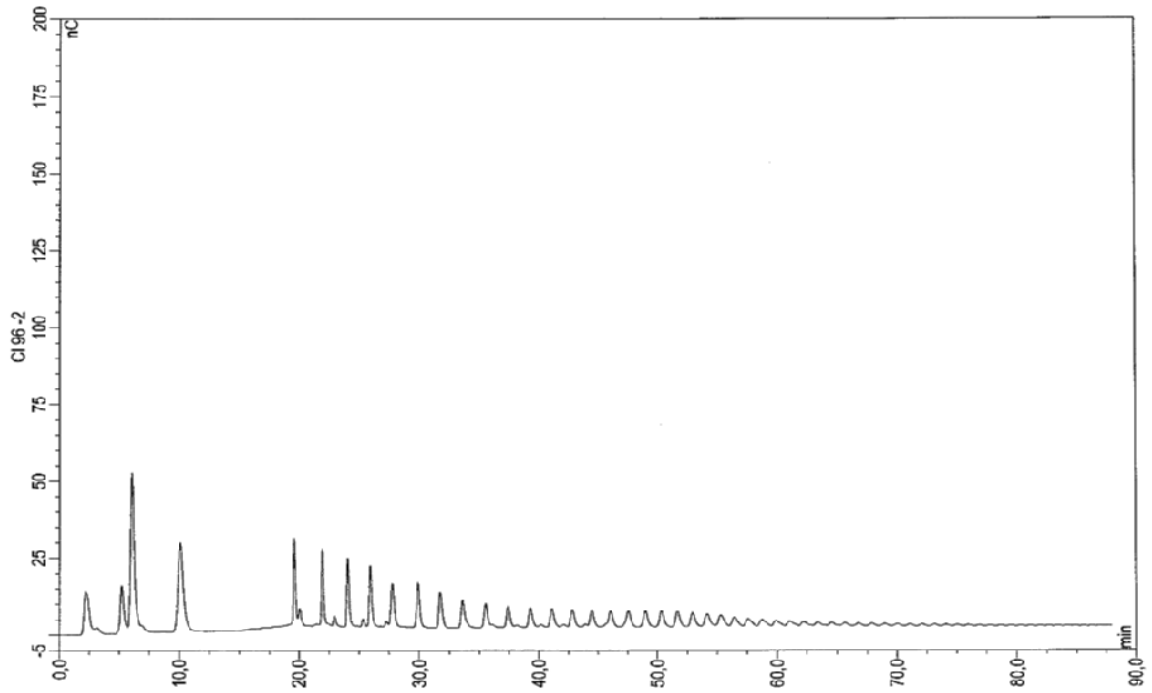


Abbildung 3.66 Dionex[®] Chromatogramm einer 96 % Ethanolfraction

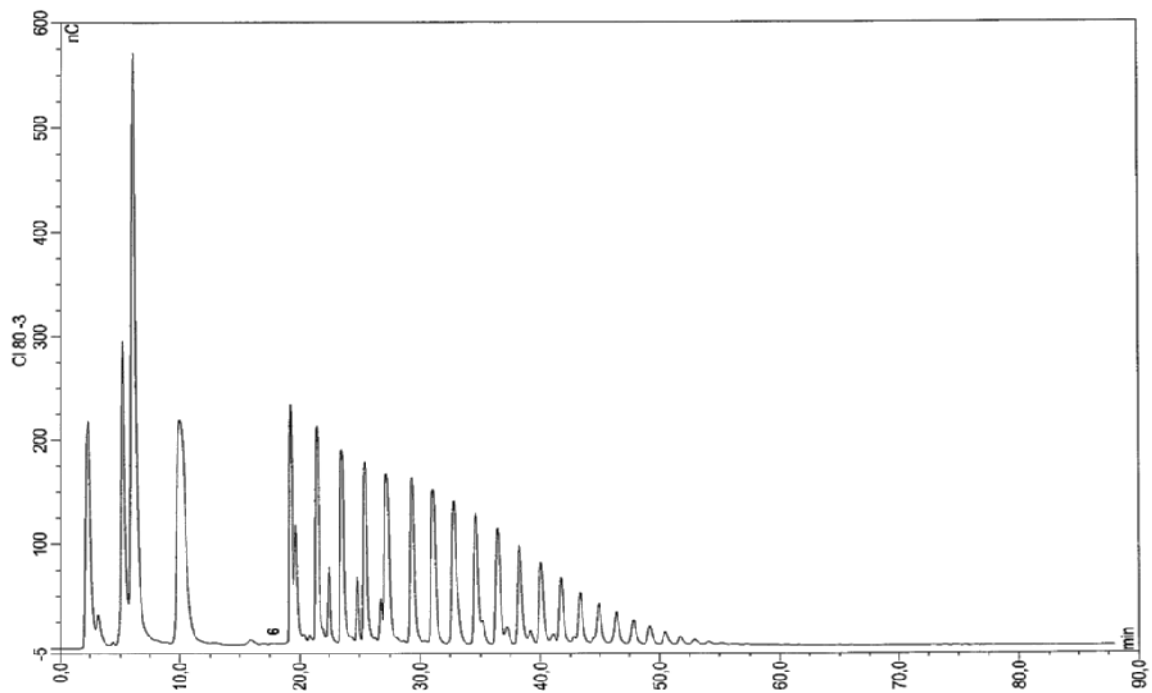


Abbildung 3.67 Dionex[®] Chromatogramm einer 80 % Ethanolfraction

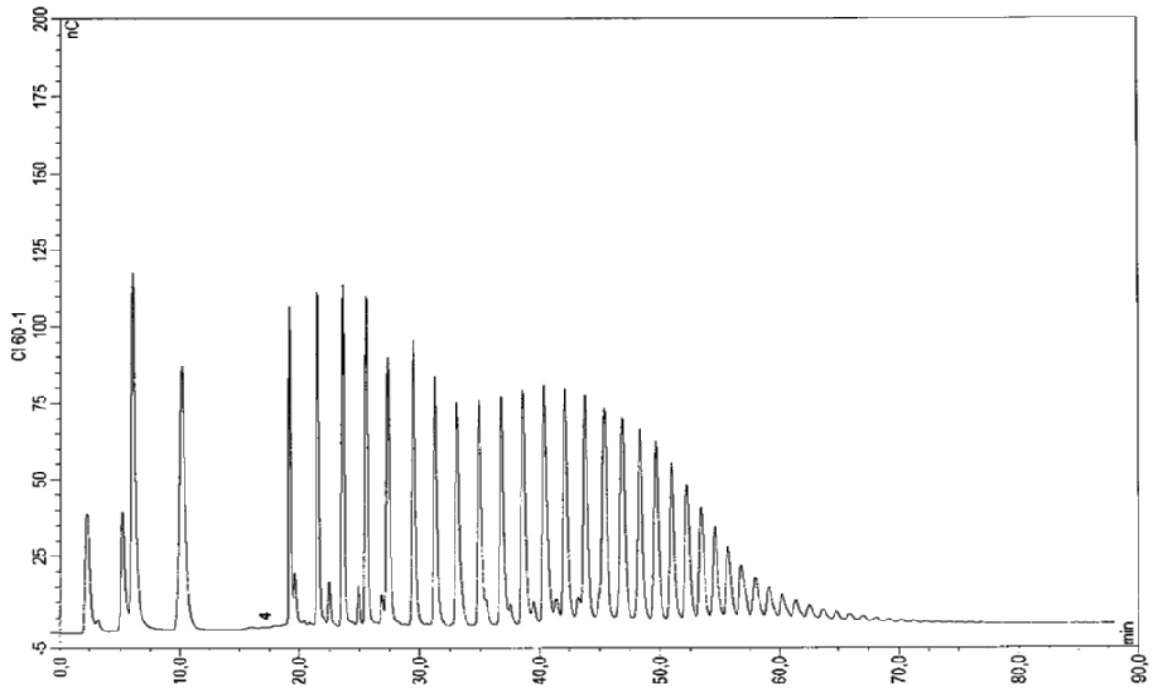


Abbildung 3.68 Dionex[®] Chromatogramm einer 60 % Ethanolfraction

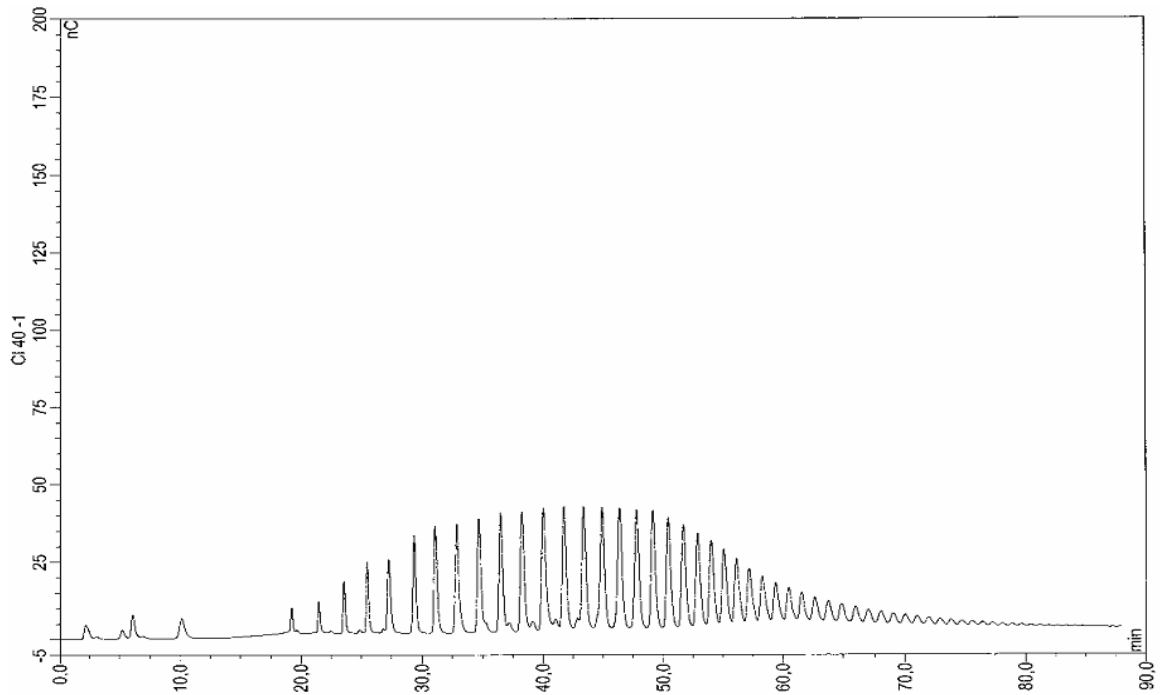


Abbildung 3.69 Dionex[®] Chromatogramm einer 40 % Ethanolfraction

Ergebnisse

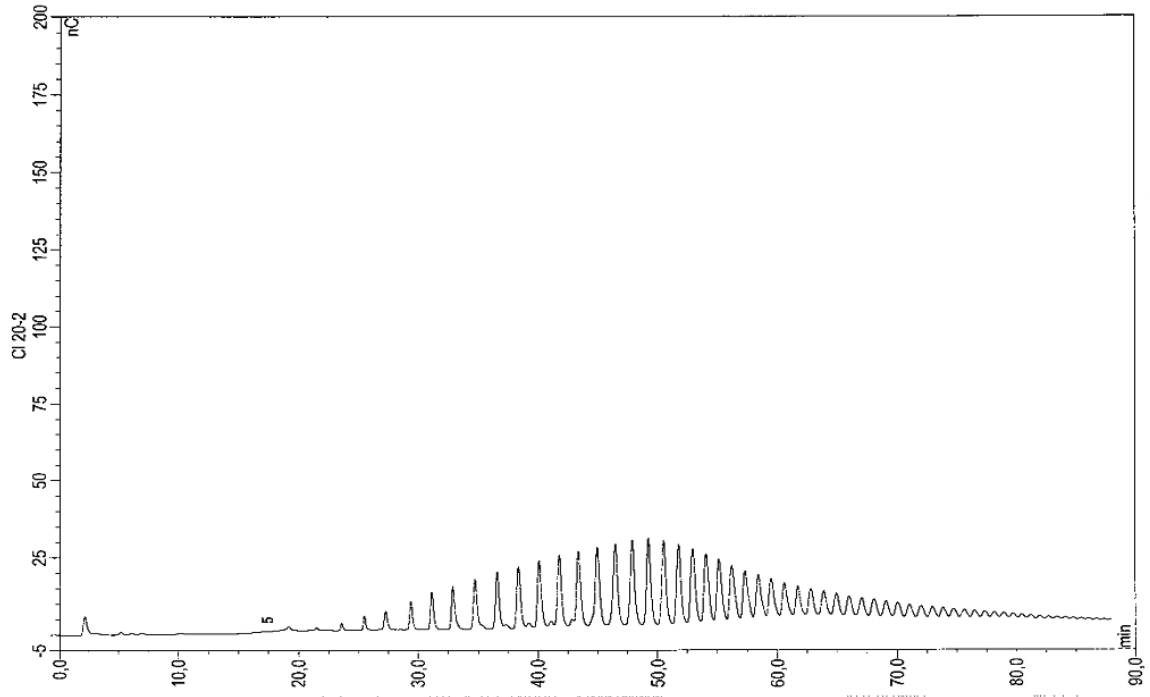


Abbildung 3.70 Dionex[®] Chromatogramm einer 20 % Ethanolfraction

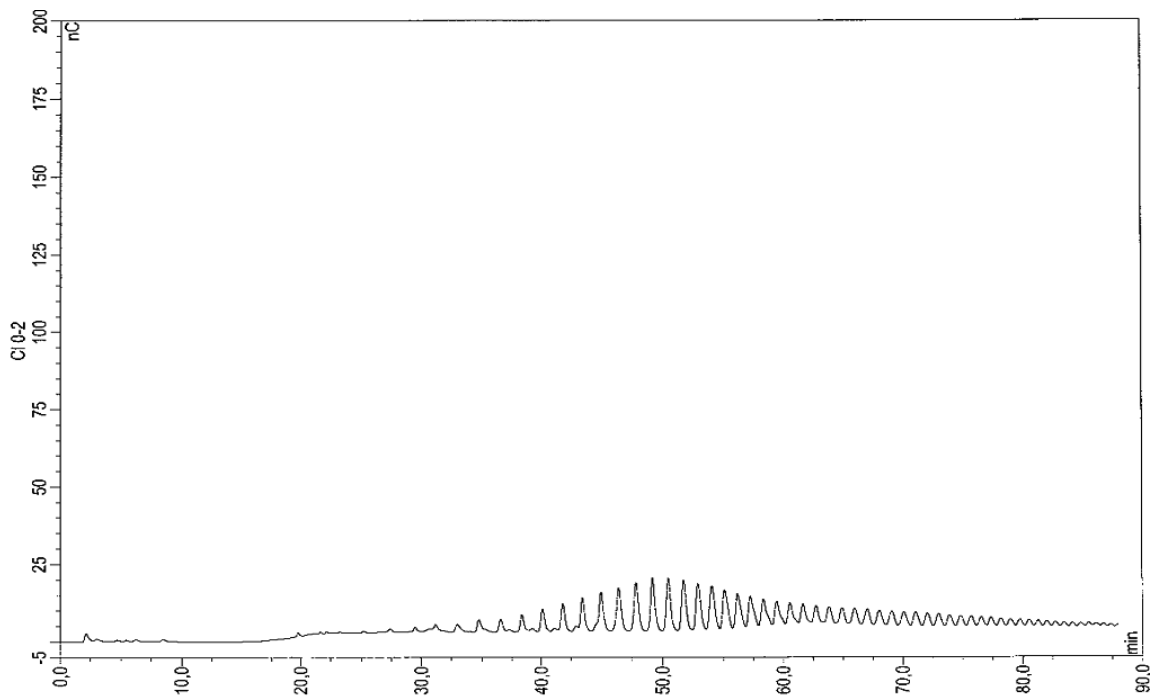


Abbildung 3.71 Dionex[®] Chromatogramm einer 0 % Ethanolfraction

Es wurden außerdem Proben von reinem Inulin (*Dahlia*), reinem Inulin 5000 und einer 1:1 Mischung beider Inuline analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abb. 3.72 bis 3.74 dargestellt. Man kann gut den qualitativen Unterschied der beiden Inuline erkennen. So sind bei Inulin 5000 die meisten Peaks im Bereich von 20 bis 40 Minuten zu sehen. Bei Inulin (*Dahlia*) hingegen eluieren die ersten Peaks erst nach 40 Minuten. Bei der Mischung beider Inuline sieht man noch einmal sehr gut die abnehmende Response. Obwohl beide Inuline in ähnlicher Konzentration vorliegen, ist der Inulin 5000 Anteil mit den kleineren DP im Chromatogramm deutlich dominanter.

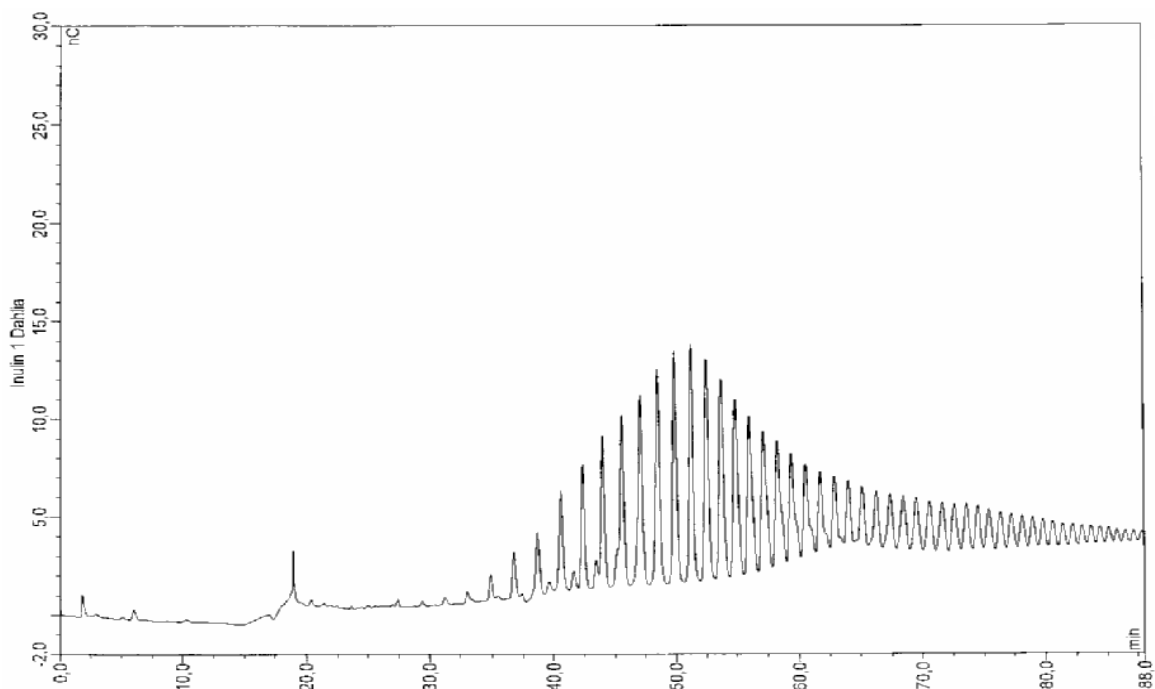


Abbildung 3.72 Dionex® Chromatogramm von reinem Inulin (*Dahlia*)

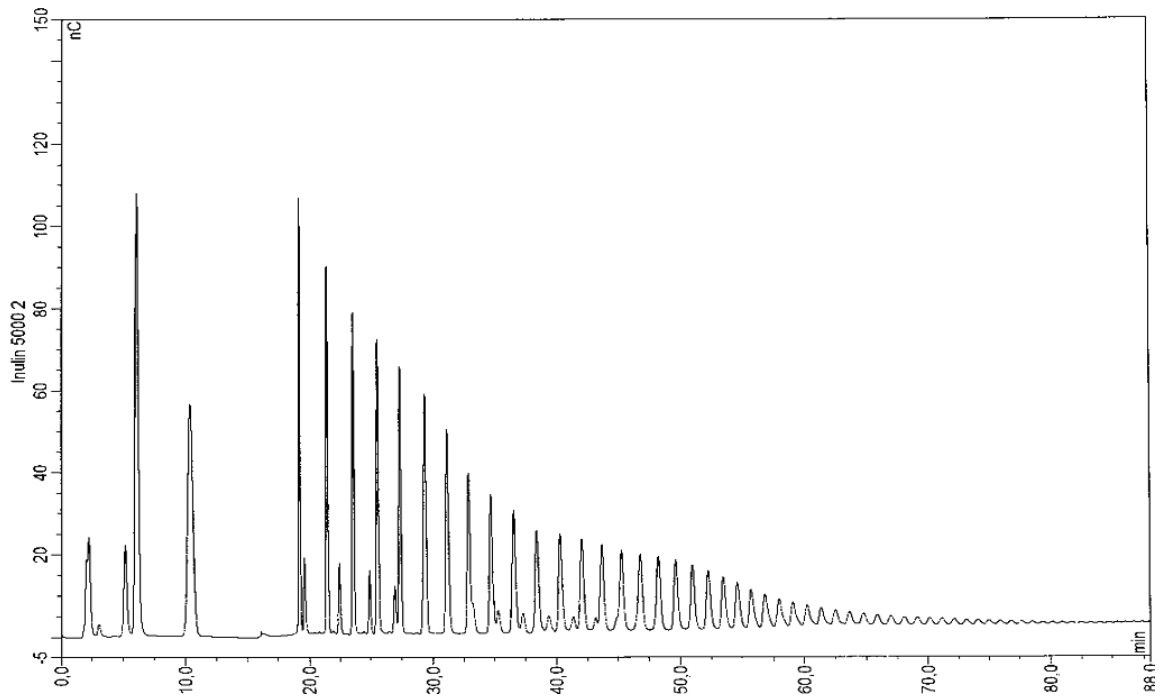


Abbildung 3.73 Dionex[®] Chromatogramm von reinem Inulin 5000

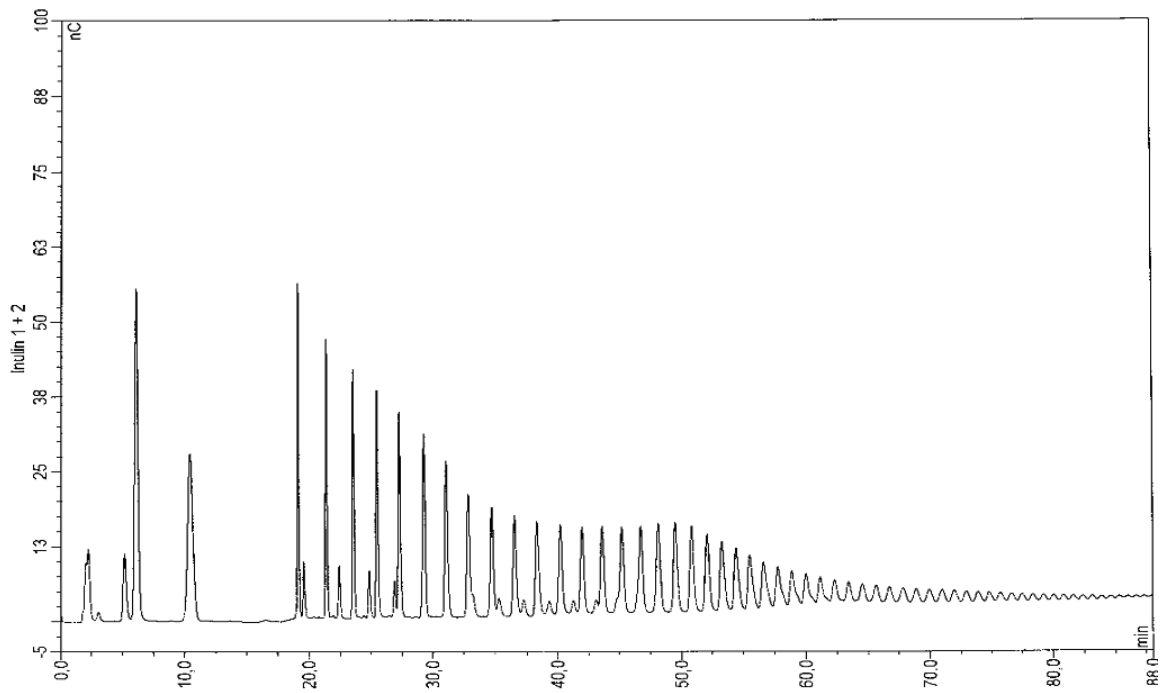


Abbildung 3.74 Dionex[®] Chromatogramm einer 1:1 Mischung von Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000

3.6. GPC-Analytik

Es wurden Dextrane mit einem definierten Molekulargewicht von 2,5; 150; 670 und 1400 kDa eingewogen, wie in Kap. 2.6.4 vorbereitet und mit der GPC-Anlage vermessen. Es wurden jeweils 100 µl auf die Säule aufgetragen. In Abb. 3.75 ist das Beispiel einer Messung von einem Dextran mit 670 kDa und Inulin 5000 dargestellt. Das obere Chromatogramm der Abbildung wurde jeweils vom MALLS-Detektor, das untere hingegen von einem RI-Detektor aufgenommen. Der dritte Peak, welcher im RI-Chromatogramm zu sehen ist, stellt den Salzpeak des Puffers dar, in welchem die Probe gelöst wurde, bzw. welcher als mobile Phase verwendet wurde (s. Kap. 2.6.3).

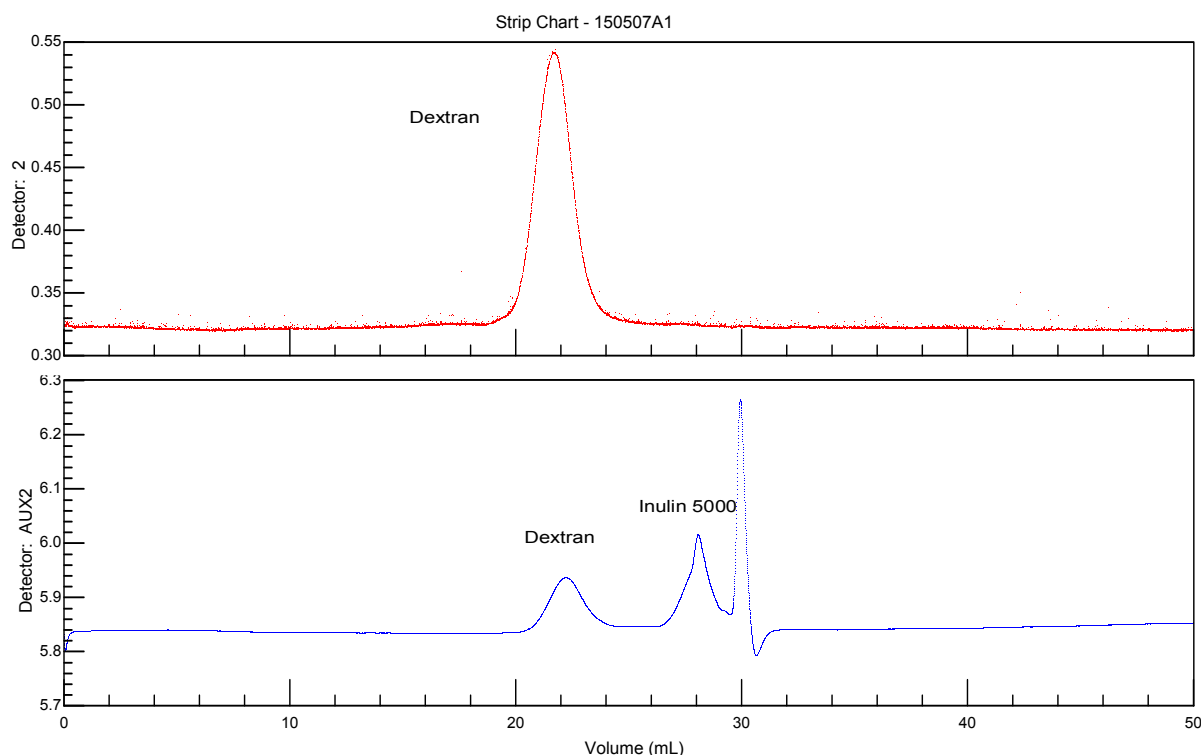


Abbildung 3.75 GPC-Chromatogramm einer Injektion von 100 µl Dextran 670 kDa und Inulin 5000. (Detektor 2 = MALLS; Detektor AUX2 = RI)

Es wurde eine Kalibriergerade erstellt, in welcher die gemessenen Werte gegen die wahren Werte der Proben aufgetragen wurden. Die Kalibriergerade ist in Abb. 3.76 dargestellt.

Zur Vermessung unterschiedlicher Inuline wurden, wie in Kap. 2.2 und Kap. 3.2.1 beschrieben, Ethanolfraktionen einer Mischung aus Inulin (*Dahlia*) und Inulin 5000 hergestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden dann mittels GPC vermessen.

Exemplarisch sind in Abb. 3.77 und Abb. 3.78 eine 20 %ige und eine 80 %ige Ethanolfraktion dargestellt.

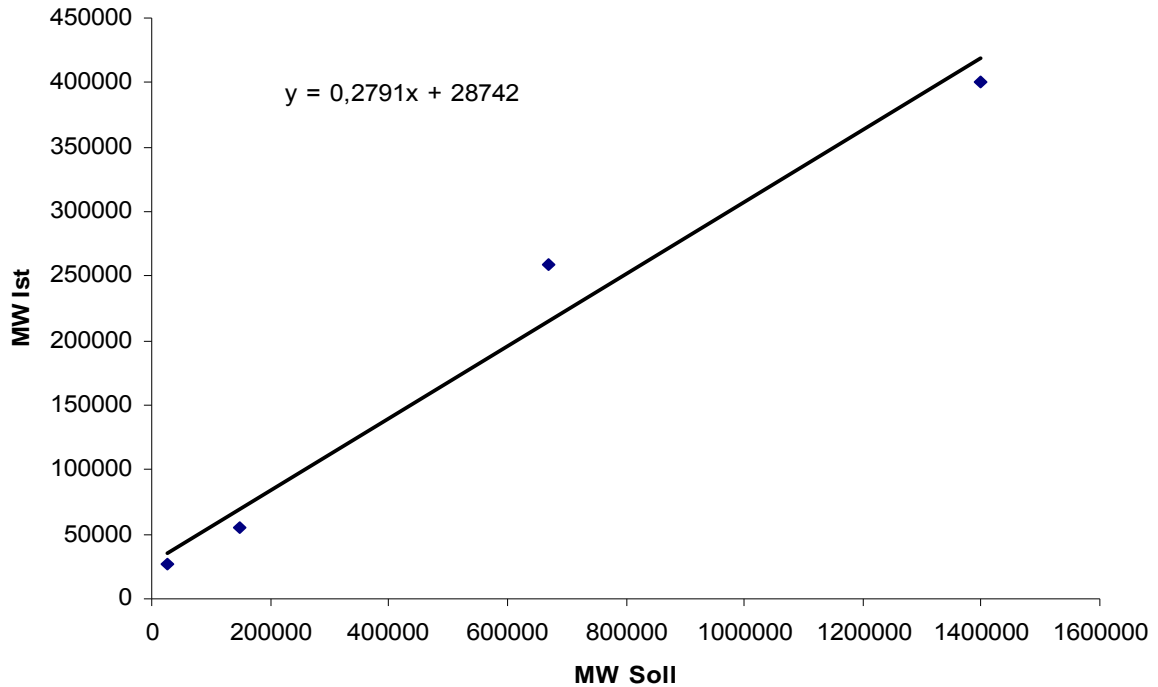


Abbildung 3.76 Kalibrierung von Dextranen nach Vermessung mit der GPC, $r^2=0,987$

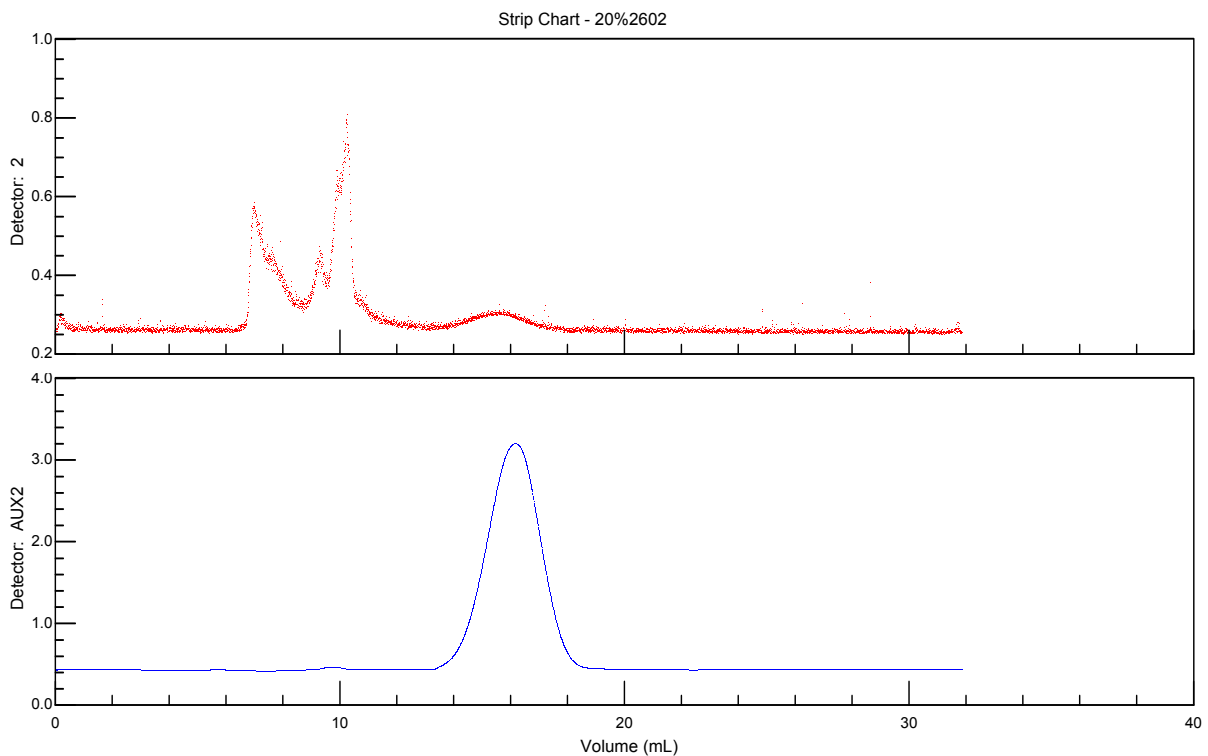


Abbildung 3.77 GPC-Chromatogramm der 20 % Ethanolfraktion
(Detektor 2 = MALLS; Detektor AUX2 = RI)

Ergebnisse

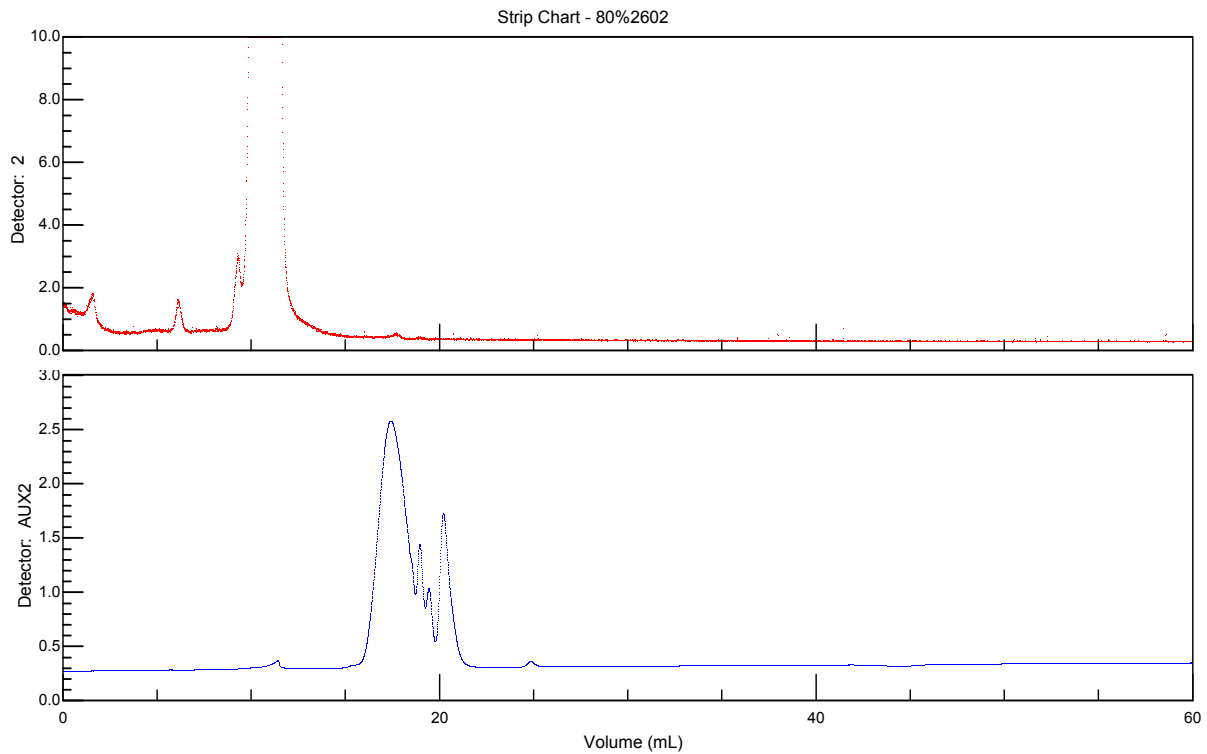


Abbildung 3.78 GPC-Chromatogramm der 80 % Ethanolfraktion (Detektor 2 = MALLS; Detektor AUX2 = RI)

Die Inulinfraktionen können nicht bestimmt werden, da sie außerhalb der Kalibriergeraden liegen. Anhand der Kalibriergeraden in Abb. 3.76 würden alle Werte ≤ 28742 negative Molekülgrößen ergeben. Unsere Fraktionen liegen meist unter diesem Wert. Darum ist eine direkte Massenbestimmung der Fraktionen nicht möglich.

3.7 Stabilitätsuntersuchungen

Mit Hilfe der HPAEC-PAD-Analytik (s. Kap. 3.5) wurde von den eingelagerten Proben nach den vorgeschriebenen Untersuchungsintervallen (s. Kap. 2.5.2) ein Fingerprintchromatogramm erstellt. Über die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde jeweils die Fruktanmenge bestimmt. Die Gesamtfläche nach 0 Tagen wird jeweils als 100 % angesehen. Alle anderen Messungen beziehen sich jeweils auf diese Gesamtfläche nach 0 Tagen. In den Tab. 3.30 bis 3.33 sind die Messwerte für einzelne Drogen und Lagerungsbedingungen dargestellt.

Tabelle 3.30 Gefundene Menge an Fruktanen in *Echinaceae purpureae radix* bei verschiedenen Lagerbedingungen über 24 Monate

Prüfzeitpunkt (Monate)	Kühlschrank (5°C)	Raumtempe- ratur (22°C)	25°C; 60% rel. Feuchte	40°C; 75% rel. Feuchte
0	100,00	100,00	100,00	100,00
3	97,78	100,20	96,48	97,30
6	91,37	103,44	94,76	107,18
9	89,40	101,90	96,99	102,57
12	85,95	101,90	95,04	102,06
15	99,43	101,10	96,44	102,34
18	103,26	103,31	104,04	103,31
21	105,80	102,94	106,25	102,94
24	105,81	103,31	101,10	101,84

Tabelle 3.31 Gefundene Menge an Fruktanen in *Echinaceae pallida radix* bei verschiedenen Lagerbedingungen über 24 Monate

Prüfzeitpunkt (Monate)	Kühlschrank (5°C)	Raumtempe- ratur (22°C)	25°C; 60% rel. Feuchte	40°C; 75% rel. Feuchte
0	100,00	100,00	100,00	100,00
3	93,59	105,60	94,42	96,98
6	94,03	105,66	94,79	95,44
9	95,03	102,11	94,89	91,14
12	94,34	103,53	95,59	95,37
15	93,10	103,04	95,51	92,74
18	98,80	98,71	98,28	95,49
21	100,61	97,64	98,28	100,43
24	98,11	98,50	97,42	93,56

Tabelle 3.32 Gefundene Menge an Fruktanen in *Althaeae radix* bei verschiedenen Lagerbedingungen über 24 Monate

Prüfzeitpunkt (Monate)	Kühlschrank (5°C)	Raumtempe- ratur (22°C)	25°C; 60% rel. Feuchte	40°C; 75% rel. Feuchte
0	100,00	100,00	100,00	100,00
3	99,12	105,75	96,05	70,14
6	96,31	103,86	99,39	73,18
9	86,93	98,62	105,50	48,26
12	93,89	97,59	100,04	56,96
15	98,49	103,75	98,42	66,54
18	110,19	104,67	109,37	52,97
21	76,97	91,02	98,40	51,58
24	96,60	93,33	90,91	40,71

Tabelle 3.33 Gefundene Menge an Fruktanen in *Cynarae herba* bei verschiedenen Lagerbedingungen über 24 Monate

Prüfzeitpunkt (Monate)	Kühlschrank (5°C)	Raumtemperatur (22°C)	25°C; 60% rel. Feuchte	40°C; 75% rel. Feuchte
0	100,00	100,00	100,00	100,00
3	97,36	99,19	99,33	97,20
6	96,13	98,66	96,15	96,66
9	99,01	97,75	96,19	97,80
12	98,77	100,84	97,32	98,22
15	100,47	103,77	98,17	97,72
18	102,99	98,69	99,83	108,60
21	99,12	96,77	98,76	107,58
24	95,91	100,93	99,33	110,19

Man sieht, dass der Fruktangehalt der Drogen *Echinaceae purpureae radix*, *Echinaceae pallida radix* und *Cynarae herba* bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen über die gesamte Lagerzeit weitgehend stabil ist. Nur bei der Eibischwurzel zeigt bereits bei Lagerungsbedingungen mit 25°C/ 60 % rel. Luftfeuchte nach 24 Monaten ein Verlust an Fruktanen um circa 10 % (s. Tab. 3.32). Bei den Lagerungsbedingungen mit 40°C/ 75 % rel. Luftfeuchte ist ein noch deutlicherer Verlust an Fruktanen festzustellen, wobei der Fruktangehalt bereits nach 18 Monaten Lagerzeit um die Hälfte und nach 24 Monaten um 60 % reduziert ist.

4. Diskussion

Fruktane besitzen interessante pharmazeutische-, ernährungs- und lebensmitteltechnologische Eigenschaften. Es gibt viele Möglichkeiten, Fruktane qualitativ und quantitativ zu analysieren, wobei die Bereitstellung von geeigneten Standards nieder- und höhermolekularer Fruktane ein allgemeines Problem in der Fruktananalytik darstellt. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, einfache Methoden zur Analytik von Fruktanen zu entwickeln, Fruktangemische zu fraktionieren und unterschiedliche Analysenmethoden hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten zu beurteilen. Zusätzlich wurde mit Hilfe der HPAEC-PAD Methode ein neues Verfahren zur Untersuchung der Lagerungsstabilität von inulinhaltigen Pflanzen entwickelt.

4.1 Diskussion der colorimetrischen Untersuchungen

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, mit einem colorimetrischen „Schnelltest“ die Fruktanmenge in pflanzlichen Extrakten zu bestimmen. Dazu wurde mit einem colorimetrischen Fruktoseassay [Kimberley, 1994] die Fruktosemenge nach der Hydrolyse von Inulin bestimmt. Da in wässrigen Pflanzenextrakten auch Fruktose als Monosaccharid gelöst vorkommt, muss diese zunächst von dem Inulin abgetrennt werden. Dazu wurden die ethanolunlöslichen Inuline mit Ethanol ausgefällt und abgetrennt. Zuvor wurden die Gerbstoffe entfernt, da diese die colorimetrische Messung stören könnten. Zur Konzentrationsbestimmung der Fruktane wurde eine Kalibrierreihe mit Fruktose erstellt und die Messwerte der Fruktanbestimmungen über die Kalibriergerade in Konzentrationsangaben überführt. Kimberley [1994] gab für sein untersuchtes Inulin (*Dahlia*) eine Fruktosewiederfindung von 98 % an. Die restlichen 2 % entsprechen dem nicht erfassten Glukoseanteil des Fruktans. Da der Glukoseanteil eines Fruktans von seinem durchschnittlichen DP abhängt, kann die Wiederfindung von Fruktan zu Fruktan unterschiedlich sein. Angenommen das Molekül hätte einen durchschnittlichen DP von 10, so bedeutet dies, dass es aus einem Glukosemolekül und neun Fruktosemolekülen aufgebaut ist. Die Wiederfindung müsste somit bei 90 % liegen, da nur die neun Fruktosemoleküle von dem Test erfasst werden.

Problematisch wird demnach die Bestimmung, wenn sich ein hoher Anteil an FOS in der Probe befinden, da hier aufgrund der, relativ zur Glukose, geringen Fruktosekonzentration die gemessene Fruktanmenge zu niedrig erscheint. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Inulin (*Dahlia*) Probe lag die durchschnittliche Wiederfindung bei 97,9 %. Damit konnte der Literaturwert für Inulin (*Dahlia*) weitgehend bestätigt werden. Bei Messungen der Inulinprobe über fünf Tage zeigte sich, dass die einzelnen Messergebnisse ganz beträchtlich zwischen 118,8 % und 87,0 % streuen, der Durchschnitt über fünf Tage jedoch bei 96,5 % lag. Zur Absicherung von falsch positiven Ergebnissen wurde eine Testreihe mit Arabinose als Negativkontrolle durchgeführt. Arabinose ist im Gegensatz zu Fruktose ein aus fünf Kohlenstoffatomen bestehender Zucker (Pentose) und soll laut Kimberley [1994] keine Reaktion zeigen. Dies konnte in den Tests mit Arabinose bestätigt werden, da keine Absorption zu messen war (s. Kap. 3.1.3).

In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, um eine Inulin-Bestimmung in *Echinaceae purpureae radix* durchzuführen. Dazu wurde ein *Echinaceae purpureae radix*-Extrakt hergestellt, die Gerbstoffe über eine Fällung mit Bleiacetat entfernt und die Fruktane mit Ethanol ausgefällt (s. Kap. 3.1.4). Es konnte ein Inulinanteil von 18,2 % in *Echinaceae purpureae radix* bestimmt werden. Leider gibt es keine exakten Untersuchungen über den Inulingehalt von *Echinaceae purpureae radix*, es wird aber von bis zu 20 % Inulin in der Wurzel [Duke, 1994] und 5 % bis 9 % in der gesamten Pflanze berichtet. Damit entspricht der gefundene Wert von 18,2 % den Erwartungen. Zu beachten ist, dass die durchschnittliche Fruktosewiederfindung bei der Analytik mit 107 % etwas zu hoch ausfällt, aber durchaus im Rahmen der normalen Streuung liegt.

Da die Gerbstoffentfernung über Fällung mit Bleiacetat umständlich ist, wurde versucht, mit Hilfe von Aktivkohle und Polyamidsäulen das Verfahren zu vereinfachen. Die Entfernung mit Aktivkohle erwies sich dabei ebenfalls als aufwändig, stellte somit keinen Fortschritt dar und wurde nicht weiter verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Gerbstoffentfernung mit Polyamidsäulen möglich ist, da Inulin keine Affinität zu dem Säulenmaterial aufweist und die Gerbstoffe gleichzeitig weitgehend abgetrennt werden konnten (s. Kap. 3.1.5).

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass eine colorimetrische Inulinbestimmung aus mit heißem Wasser extrahiertem Pflanzenmaterial nach der Methode von Kimberley [1994] möglich ist. Die Präzision des Verfahrens ist

allerdings nicht optimal aufgrund einer hohen Streuung. Zur Absicherung eines richtigen Ergebnisses ist daher eine größere Zahl an Messungen nötig. Die Hauptschwäche des Verfahrens besteht darin, dass, wie bereits erwähnt, kurzkettige Fruktane (FOS) die Fruktosewiederfindung stark negativ beeinflussen und damit zu einer falsch negativen Gesamtfruktanwiederfindung führen. Da die Messungen im Gegensatz zur AOAC-Methode (s. Kap. 1.5.7) ohne „teure“ Enzyme auskommen, schnell, unkompliziert und ohne hohen apparativen Aufwand durchzuführen sind, eignet sich die Methode gut für eine ungefähre Abschätzung der Inulinmenge in pflanzlichen Extrakten.

Aufgrund der Problematik mit den FOS sollte im Rahmen weiterer Untersuchungen die Ethanol-fällung mit einer niedrigeren Ethanolkonzentration durchgeführt werden. Dadurch bleiben die FOS in Lösung und können abgetrennt werden, so dass eine reine Inulinbestimmung möglich ist. Auf Basis der Forschungsergebnisse aus Kap. 3.2.1 sollte eine Ethanolkonzentration zwischen 20 % und 40 % verwendet werden.

4.2 Diskussion der Fraktionierung von Fruktangemischen

Die Möglichkeit, Fruktane mit Ethanol aus wässrigen Lösungen auszufällen, ist bekannt und wird z. B. zur Abtrennung von Fruktanen aus pflanzlichen Extrakten eingesetzt [Livingston, 1990]. Prozessparameter wie Temperatur, Ausgangskonzentration und Ethanolkonzentration wurden von Paseephol *et al.* [2006] ausführlich untersucht. Es konnte unter anderem festgestellt werden, dass, wie erwartet, der durchschnittliche DP der erhaltenen Fraktionen mit zunehmendem Ethanolanteil ansteigt. Zur Fraktionierung von Fruktanen nach DP-Klassen wurde deshalb versucht, die mit zunehmender Ethanolkonzentration schlechter werdende Löslichkeit auszunutzen und Fruktane über eine sequentielle Fällung in einzelne Fraktionen mit unterschiedlichem DP zu fraktionieren. Dazu wird der jeweilige wässrige Extrakt mit 98 % Ethanol bis zur gewünschten Endkonzentration versetzt. Angefangen mit niedrigen Ethanol-Endkonzentrationen, z. B. 20 %, wird diese schrittweise gesteigert. Der jeweils ausgefallene Anteil wird abgenutscht. Der Überstand wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, bevor dieser

mit einem definierten Volumen an Wasser aufgenommen und mit der nächst höheren Ethanolendkonzentration gefällt wird. Zu beachten ist hierbei, dass das Endvolumen immer gleich groß sein sollte, damit die einzelnen Fraktionen quantitativ vergleichbar sind. Dabei müssen große Mengen an Ethanol verbraucht werden, für 25 ml wässrigen Extrakt benötigt man 125 ml Ethanol (98 %), um auf eine Ethanolendkonzentration von 80 % zu gelangen. Das Verfahren ist darüber hinaus sehr zeitaufwendig, da das Produkt, welches weiterverarbeitet werden soll, erst abrotiert werden muss und damit nach dem Fraktionierungsschritt nicht direkt weiterverarbeitet werden kann.

In dieser Arbeit wurde ein deutlich vereinfachtes Fraktionierungsverfahren als das oben beschriebene entwickelt. Dazu wurde genau umgekehrt vorgegangen. Es wurde nicht versucht, Fruktane sequentiell zu Fällern, sondern sequentiell zu lösen. Was sich trivial anhört und sich im ersten Moment nach einer Frage der Definition von „Lösen“ und „Fällen“ anhört, bringt in der Praxis handfeste Vorteile. Die Vorgehensweise beim fraktionierten Lösen ist in Kap. 2.2.3 genau beschrieben. Der Vorteil gegenüber der Fällung liegt zum einen im geringeren Verbrauch an Lösungsmittel und zum anderen in der einfacheren und schnelleren Durchführung. Im Gegensatz zur fraktionierten Fällung wird hier nicht der Rückstand, sondern der Überstand weiterverarbeitet. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, kann mit dem Rückstand direkt der nächste „Lösungs-Schritt“ durchgeführt werden, während die Überstände parallel abrotiert werden. Der Vorgang des Abrotierens stellt damit beim fraktionierten Lösen, im Gegensatz zum fraktionierten Fällen, keinen zeitraubenden Schritt im Gesamtprozess dar.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die fraktionierte Lösung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (Ethanol, Isopropanol, Aceton, Acetonitril) untersucht (s. Kap. 3.2). Dabei wurden jeweils die Unterschiede der Ausbeuten und des durchschnittlichen DP der einzelnen Fraktionen untersucht. Bei allen Lösungsmitteln nimmt der DP der Fraktionen mit fallendem Anteil des unpolaren Lösungsmittels zu. Dies entspricht den Erwartungen, da bei Fruktanen mit zunehmender Kettenlänge die Löslichkeit abnimmt. Mit steigendem Wasseranteil während des sequentiellen Lösens können darum immer höhermolekulare Fruktane in Lösung gehen. Damit steigt der durchschnittliche DP in den einzelnen Fraktionen. Es gibt jedoch Unterschiede

zwischen den Ergebnissen der einzelnen anorganischen Fällungs-Komponenten. Die sequentielle Ethanollösung (s. Kap. 3.2.1.1) zeigt einen Anstieg des DP von 2,4 in der 80 % Fraktion auf 24,4 in der 0 % Fraktion. Allerdings ändert sich zwischen der 60 % Fraktion (\bar{M}_w DP 7) und der 20 % Fraktion (\bar{M}_w DP 10,4) kaum etwas am durchschnittlichen DP. Erst der letzte Lösungsschritt zur 0 % Fraktion bewirkt einen starken Anstieg des DP auf einen durchschnittlichen DP von 24,4. Daraufhin wurde eine feinere Abstufung (s. Kap. 3.2.1.2) der Ethanolfraktionen zwischen 40 % und 20 % vorgenommen. Dabei kommt es zu einem gleichmäßigeren Anstieg des DP. Es ist zu beobachten, dass der DP der 0 % Fraktion nun höher ausfällt (\bar{M}_w DP 29,3). Das ist dadurch zu erklären, dass bei dieser feineren Fraktionierung sich niedriger molekulare Fruktane in den 15 % und 5 % Ethanolfraktionen bereits lösen konnten und deshalb den durchschnittlichen DP der 0 % Fraktion nicht absenkten. Der niedrige durchschnittliche DP in der 40 % Ethanolfraktion der feineren Abstufung bestätigt die Ergebnisse aus Kap. 3.2.1.1, dass sich zwischen der 80 % Ethanolfraktion und der 40 % Ethanolfraktion der durchschnittliche Polymerisationsgrad nicht sehr stark verändert.

Bei den mit Isopropanol/Wasser-Gemischen fraktionierten Fruktanen (s. Kap. 3.2.2) ist eine deutlich schlechtere allgemeine Löslichkeit der Fruktane zu beobachten. Der größte Teil der Fruktane (50,6 %) kann sogar erst unter Erwärmen der reinen Wasserfraktion gelöst werden. Dies lässt darauf schließen, dass sich in der Wasserfraktion vor dem Erwärmen (Fraktion „0K“) viele langkettige Fruktane befinden. Es stellt sich allerdings die Frage, warum die Wasserfraktion der Ethanolfraktion mit einem durchschnittlichen DP von 24,4 in Lösung geht, und die Wasserfraktion der Isopropanolfraktion mit einem durchschnittlichen DP von 18,6 nicht. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass der durchschnittliche DP keine Aussagekraft in Bezug auf die tatsächliche Verteilung der Fruktane hat. Erläutert an einem Beispiel bedeutet dies, dass eine Mischung aus drei Fruktanen mit einem DP von 10, 20 und 30 einen durchschnittlichen DP von 20 hat, eine Mischung aus drei Fruktanen mit einem DP von 19, 20 und 21 hat ebenfalls einen durchschnittlichen DP von 20, obwohl hier die tatsächliche Verteilung der Fruktane eine ganz andere ist. Dieses Phänomen, dass Fruktane mit einem niedrigen durchschnittlichen DP in kaltem Wasser nicht löslich sind, zeigt sich auch bei den anderen untersuchten Lösungsmitteln wie Aceton (Kap. 3.2.3) und Acetonitril (Kap. 3.2.4). Die gleichmäßigste Verteilung des durchschnittlichen DP erhält man bei der

Fraktionierung mit Acetonitril (Kap. 3.2.4). Die beiden Versuchsreihen mit Acetonitril/Wasser-Gemischen zeigen beim Vergleich untereinander die gute Reproduzierbarkeit der sequentiellen Lösungsmethode, da sowohl der durchschnittliche DP, wie auch die Ausbeuten sehr ähnlich sind. Wie die Ergebnisse zeigen, kann man je nach Wahl der anorganischen Komponente im Lösungsmittel die Fraktionierung stark beeinflussen. Wenn fraktionierte Fruktane in Lebensmitteln oder Arzneimitteln weiterverarbeitet sollen, empfiehlt es sich, möglichst unbedenkliche Lösungsmittel zu verwenden. Hier wird man am ehesten mit Ethanol arbeiten. Deshalb wurden weitere Fraktionen in dieser Arbeit durch Lösen in Ethanol/Wasser-Gemischen hergestellt.

4.3 Diskussion der HPLC-Analytik ohne Derivatisierung der Fruktane

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche HPLC-Konditionen untersucht, um Fruktane aufzutrennen, ohne diese zu derivatisieren. Eine Trennung von Fruktanen auf einer C-18-RP-Säule ist nur begrenzt möglich. In einer Arbeit von Barthomeuf *et al.* [1997] konnten Saccharide bis zu einem DP von 4 aufgetrennt werden. Eine Trennung von Glukose und Fruktose war jedoch nicht möglich. Diese Beobachtungen konnten bei den Versuchen in dieser Arbeit bestätigt werden (Kap. 3.3.1). Aus diesem Grund ist diese Methode auch nicht für die durchschnittliche DP-Bestimmung über das Glukose-Fruktose-Verhältnis nach Hydrolyse von Fruktanen geeignet. Der Einsatz von C-18-RP-Säulen in der Inulin-Analytik beschränkt sich auf ein Gebiet der medizinischen Diagnostik. Hier wird Inulin zur Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) verwendet. In den Untersuchungslösungen Urin und Blut wird Inulin hydrolysiert und die entstandene Fruktose in Hydroxymethylfurfural (HMF) umgewandelt. HMF ist eine Furanverbindung, die bei der thermischen Zersetzung von Fruktose entsteht. HMF wird mittels HPLC nachgewiesen [Dall'Amico *et al.*, 1995; Pastore *et al.*, 2001].

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich Fingerprint-Chromatogramme von Fruktanen über die Trennung auf Amino-Säulen mit RI-

Detektion erstellen lassen (s. Kap. 3.3.2). Praznik und Beck [1984] konnten über die Aminierung von Silika-Phasen Fruktanmischungen auftrennen. Es wurde aufbauend auf dieser Methode versucht, eine modernere, schlankere, auf neuester Aminophasentechnologie basierte Anwendung zu entwickeln. Hierbei wurde vor allem darauf geachtet, die Handhabung so einfach wie möglich zu gestalten. Aminophasen werden in der HPLC-Analytik von Fruktanen zur Identifizierung von Fruktanhydrolyseprodukten eingesetzt [Oh *et al.*, 2004].

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Trennung von Glukose und Fruktose und damit eine Parallelbestimmung beider Zucker möglich ist (s. Kap. 3.3.2.2). Die Trennung von Fruktanmischungen, um Fruktan-Fingerprint-Chromatogramme zu erhalten, wurde ebenfalls erreicht (s. Kap. 3.3.2.3). Für eine gute Analytik erwies sich eine 62 %ige Acetonitril/Wasser-Mischung als optimal. Werden Fruktanproben in Wasser gelöst und dann auf die Säule aufgetragen, fallen sie aus und führen, wie bereits bei Praznik und Beck [1984] erwähnt, zur irreversiblen Verstopfung der Säule. Dies ist ein Zielkonflikt, in dem sich die Fruktananalytik auf Amino-Säulen befindet. Einerseits werden hohe Acetonitrilanteile in der mobilen Phase benötigt, um eine gute Trennung zu erreichen, andererseits sinkt die Löslichkeit höhermolekularer Fruktane mit zunehmender Acetonitrilkonzentration, was zum Ausfallen der Fruktane auf der Säule führt. Deshalb wurden die Fruktanproben in dieser Arbeit vor der Messung mit einer 60 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung gefällt, um den hochmolekularen Anteil der Probe abzutrennen. Da die Response des RI-Detektors mit zunehmender Kettenlänge abnimmt und damit eine Detektion der Fruktane mit einem DP \geq 25-30 sehr problematisch wird, kann nach der Fällung mit einer 60 %igen Acetonitril/Wasser-Mischung eine Trennung der Fruktane bis DP 25-30 erfolgen, ohne dass die Säule langfristig beschädigt wird (s. Kap. 3.3.2.3). Eine Zuordnung der Peaks zu dem jeweiligen DP konnte mit geeigneten, definierten Mono- und Oligosacchariden gemacht werden, so dass der DP durch einfaches Abzählen der Peaks bestimmt werden kann (s. Kap. 3.3.2.4). Es wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich die Trennung durch den Einsatz von zwei hintereinandergeschalteten Amino-Säulen optimieren lässt (s. Kap. 3.3.3). Die Trennung konnte dadurch, speziell im Bereich bis ca. DP 12, nochmals verbessert werden. Als kleiner Nachteil ergibt sich eine durch die längere Säulenstrecke bedingte verzögerte Elution der Fruktane. Glukose

eluiert dabei erst nach etwa 8,1 Minuten. Damit verlängert sich automatisch die gesamte Analysenzeit.

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob Amino-Säulen unterschiedlicher Hersteller vergleichbare Ergebnisse liefern (s. Kap. 3.3.6). Hier konnte festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse stark voneinander unterscheiden. Es wurde die in dieser Arbeit verwendete Standard-Amino-Säule, Luna Amino[®] der Firma Phenomenex mit einer Microsorb Amino[®] der Firma Varian verglichen. Unter identischen HPLC-Bedingungen ergaben sich dabei ganz unterschiedliche Chromatogramme (s. Abb. 3.34). Erst nach einer deutlichen Anpassung der mobilen Phase - der Acetonitrilgehalt wurde auf 50 % gesenkt - konnten vergleichbare Chromatogramme erhalten werden (s. Abb. 3.35). In diesem untersuchten Fall wurde festgestellt, dass die Varian-Säule besser für FOS geeignet scheint und die Phenomenex-Säule besser für Inulin. Damit lässt sich sagen, dass Amino-Phase nicht gleich Amino-Phase ist, sondern dass es durchaus Unterschiede zwischen den Säulen einzelner Hersteller gibt.

Zur Überprüfung, ob sich die HPLC-Methode auch für Fingerprint-Chromatogramme eignet, mit welchen eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung einer Fruktanprobe im Bereich bis DP 25 zu machen ist, wurden verschiedene Fruktanfraktionen auf der Luna Amino[®]-Säule analysiert (s. Kap. 3.3.4). Die Fraktionen wurden durch fraktioniertes Lösen einer Inulinmischung in unterschiedlichen Ethanol/Wasser-Mischungen hergestellt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden weitere, identisch hergestellte Fruktanfraktionen mit der HPAEC-PAD (Dionex[®]) Methode (s. Kap. 3.5) vermessen. In der 80 % Ethanolfraktion sollten sich vor allem kurzkettige Fruktane befinden. In Abb. 3.27 sind deutliche Peaks im Bereich von Fruktanen mit DP 1 bis 15 (4 bis 10 Minuten) zu erkennen. Gleichzeitig zeigt das Dionex[®]-Chromatogramm (Abb. 3.67) ebenfalls FOS bis DP 15. Hier ist außerdem gut zu erkennen, dass Mono-, Di- und Trisaccharide einen sehr hohen Anteil an der Mischung ausmachen. Damit lässt sich auch der relativ geringe durchschnittliche DP der 80 % Ethanolfraktion erklären (s. Kap. 3.2). In der 60 % Ethanolfraktion (Abb. 3.28) nimmt die Menge der FOS deutlich ab (unter Berücksichtigung der geringeren Einwaage). Gleichzeitig steigt der DP an (s. Kap. 3.2). Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der mit steigender Kettenlänge schlechter werdenden Detektorresponse die Konzentration der Peaks im Bereich bis DP 20

(13 Minuten) schon deutlich höher einzuschätzen ist, als scheinbar im Chromatogramm ersichtlich. Auch hier kann das Dionex[®]-Chromatogramm (Abb. 3.68) die Ergebnisse bestätigen. Zwar sind noch FOS und sogar Mono-, Di- und Trisaccharide zu erkennen, im Verhältnis zu den länger-kettigen Inulinen ist ihr Anteil jedoch stark zurückgegangen. In der 40 % Ethanolfraktion (Abb. 3.29) sind im Bereich der Mono-, Di- und Trisaccharide mit einem $DP \leq 3-4$ (5 Minuten) keine Peaks mehr zu sehen, hier sind also nur noch Inuline mit einem $DP \geq 4$ zu detektieren. Auch dieses Ergebnis wird durch das Dionex[®]-Chromatogramm (Abb. 3.69) vollkommen bestätigt, da keine kurz-kettigen Fruktane (≤ 20 Minuten) im Gegensatz zur 60 % Ethanolfraktion detektierbar sind. Ebenfalls deckt sich bei beiden Analysemethoden die Beobachtung, dass die Menge an Fruktanen im Bereich von $DP 5$ bis 15 stark abgenommen hat. In der 20 % Ethanolfraktion sind im Amino-Phasen-Chromatogramm nur noch Fruktane im Bereich von $DP 8$ bis 25 zu erkennen. Hier fällt eine quantitative Aussage zunehmend schwerer, da die Peaks nur noch schwach zu erkennen sind. Nichtsdestotrotz ist eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung weiterhin möglich. Dieses Ergebnis wird wiederum mit dem Dionex[®]-Chromatogramm bestätigt. Auch hier sind Fruktane erst ab $DP 8$ zu erkennen (s. Abb. 3.70). Es zeigt sich, dass die Dionex[®]-Analytik im hohen DP Bereich jedoch von Vorteil ist. Speziell beim Betrachten der 0 % Fraktion wird dies deutlich. Hier kann mit der Amino-Säulen-Analytik (Abb. 3.31) kein Fruktan mehr detektiert werden, wohingegen die Dionex[®]-Analytik (Abb. 3.71) eine nochmalige Verschiebung der Fruktane in den höhermolekularen Bereich zeigen kann. Dieser Unterschied lässt sich zum einen mit dem empfindlicheren PAD-Detektor der Dionex[®]-Analytik, aber auch mit der unterschiedlichen Probenaufarbeitung erklären. Der Fällungsschritt bei der Probenaufarbeitung mit 60 % Acetonitril fällt diesen hochmolekularen Fruktanbereich aus, so dass dieser aus der gemessenen Probe entfernt und mit der Aminophasen-HPLC nicht mehr erfasst wird.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Fingerprint-Analytik von Fruktanen auf Aminophasen-HPLC mit dem „Goldstandard“ der Fruktananalytik, der HPAEC-PAD (Dionex[®]) Analytik, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminophasen-HPLC als Fingerprint-Analytik für Fruktane bis zu einem DP von 25 eingesetzt werden kann, ohne dass es dabei zu Problemen mit der Haltbarkeit der Aminophasen-Säule kommt.

In Kap. 3.3.5 wurde die Fruktan-Fingerprint-Analytik auf Amino-Säulen eingesetzt, um die Fragmentierung von Inulinen unter Hitzeeinwirkung zu beobachten. Nicht fragmentiertes Inulin (*Dahlia*) besteht aus hochpolymeren Fruktanen. Im Amino-Phasen-Chromatogramm (s. Abb. 3.32) sind nur schwache Peaks ab ca. 10 Minuten detektierbar, was einem DP von 15-17 entspricht. FOS sind hingegen nicht vorhanden. Dieses Ergebnis kann wiederum von einem Dionex[®]-Chromatogramm (s. Abb. 3.72) bestätigt werden. Auch hier sind keine FOS zu sehen. Erst ab 35-40 Minuten, was einem DP von ≥ 15 entspricht, sind Fruktanpeaks im Chromatogramm zu erkennen. Werden die Inulin (*Dahlia*) Proben mit Hitze behandelt (s. Kap. 3.3.5), kommt es zu „Brüchen“ der Fruktanketten. Damit entstehen kurzkettige Fruktane und deren Umwandlungsprodukte wie z. B. HMF. Diese Zunahme an kurzkettigen Fruktanen kann mit der Fingerprint-Analytik auf Aminophasen eindrucksvoll gezeigt werden. Bereits nach 30 Minuten in trockener Hitze sind in der Probe die FOS deutlich zu erkennen. Nach 60 Minuten zeigt sich ein nochmals deutlicher Konzentrationsanstieg der FOS im HPLC-Chromatogramm (s. Abb. 3.33). Damit konnte eine, im Gegensatz zur HPAEC-PAD (Dionex[®]) Analytik, deutlich billigere und einfachere Methode für die Fruktan-Fingerprint-Analytik etabliert werden, die auf jedem Standard-HPLC-System eingesetzt werden kann.

Die HPAEC-PAD (Dionex[®]) Analytik wurde in dieser Arbeit auch für Stabilitätsuntersuchungen von pflanzlichen Drogen eingesetzt (s. Kap. 3.7). Dabei wurde untersucht, inwieweit sich der Fruktan-Fingerprint mit der Zeit verändert. Dabei wurde auch eine quantitative Auswertung gemacht, indem die Fruktan-Gesamtmenge gegen eine definierte Laktosemenge vermessen und der Quotient des Mengenverhältnisses gebildet wurde. Dieser wurde für die Messung am Tag 0 als 100 % angesehen und alle weiteren Messungen darauf bezogen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Drogen bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen weitgehend stabil sind. Nur die Eibischwurzel (*Althaeae radix*) zeigt bereits bei Lagerungsbedingungen mit 25°C/60 % rel. Luftfeuchte nach 24 Monaten einen Verlust an Fruktanen (s. Tab. 3.32). Unter den Lagerungsbedingungen mit 40°C/75 % rel. Luftfeuchte ist bei der Eibischwurzel ein deutlicher Verlust an Fruktanen festzustellen. Dies könnte an dem höheren Schleimgehalt und der, dadurch bedingten, höheren Restfeuchte liegen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fruktan-Fingerprints als Qualitätsmarker für pflanzliche Drogen

eingesetzt werden können, da eine durch Lagerungs- oder auch verschiedene Extraktionsprozesse bedingte Änderung des Fruktanmusters zuverlässig bestimmt werden kann. Fruktane gelten im Allgemeinen als hydrolyseempfindliche Polysaccharide. Wie in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, sind sie bei korrekter Lagerung sehr stabil und eignen sich damit besonders gut, als empfindlicher Indikator für eine falsche „Behandlung“ der Pflanze während der Lagerung.

4.4 Diskussion der HPLC-Analytik mit Derivatisierung der Fruktane

Wie in Kap. 3.3.1 gezeigt, ist es nicht möglich, Glukose und Fruktose auf C-18-Säulen zu trennen. Es wurde daher versucht, über eine Acetylierung der Zucker die Lipophilie zu erhöhen, um bessere Trennergebnisse auf C-18-Säulen zu erreichen. Wie in Kap. 3.4.1 gezeigt wurde, ist eine gute Auftrennung von Glukose, Fruktose und Saccharose (s. Abb. 3.36) mit dieser Methode möglich. Bei der Verwendung eines Acetonitril/Wasser-Gradienten ist auch die Auftrennung von Maltooligosacchariden (s. Abb. 3.39) zu erreichen. Eine Trennung von Inulin ist mit dieser Methode nicht möglich (s. Abb. 3.40). Sie eignet sich damit ausschließlich für eine Bestimmung des durchschnittlichen DP über das Glukose-Fruktose-Verhältnis nach einer Hydrolyse der Fruktane. Im Gegensatz zur Trennung auf Amino-Phasen ist das Arbeiten mit C-18-Säulen deutlich umständlicher, da vor der Messung ein Derivatisierungsschritt gemacht werden muss. Abschließend lässt sich sagen, dass C-18-Säulen weniger für die Fruktananalytik geeignet sind. Sie können zur Bestimmung einfacher Zucker verwendet werden, für komplexere Oligo- und Polysaccharide ist die Amino-Säule deutlich besser geeignet (s. Kap. 3.3.4).

Wie bereits beschrieben, ist die Empfindlichkeit des RI-Detektors nicht optimal. Zwar lassen sich bei den Monosacchariden geringe Konzentrationen von ≤ 1 mg/ml nachweisen (s. Kap. 3.3.2), und damit die Literaturwerte von 0,15 bis 0,2 mg/ml [Chavez-Servin *et al.*, 2004, Ferreira *et al.*, 1997] erreichen, aber mit wachsender Kettenlänge nimmt die Empfindlichkeit sehr stark ab. Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene Derivatisierungs-Methoden (Vorsäulenderivatisierung mit FITC und

Nachsäulenderivatisierung mit Guanidin) untersucht, um die Empfindlichkeit der Detektion zu verbessern. Wie bereits erwähnt, wird Inulin in der medizinischen Diagnostik zur Messung der GFR eingesetzt. Dabei wurde eine Methode entwickelt, Sinistrin, ein kurzkettiges Fruktan mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 3500 Dalton, mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zu markieren, mit dem Vorteil, es direkt, ohne vorherige Hydrolyse, photometrisch im Urin bestimmen zu können [Pill *et al.*, 2005a]. Dabei wird das in Abb. 4.1 dargestellte Reaktionsschema diskutiert. Der Derivatisierungsgrad soll bei ca. 0,7 % liegen [Pill *et al.*, 2005a].

In dieser Arbeit wurde nun versucht, Inulin 5000 mit FITC zu derivatisieren (s. Kap. 2.4.4.2.2), um mit Hilfe eines Fluoreszenz-Detektors Fruktane bei geringeren Konzentrationen detektieren zu können.

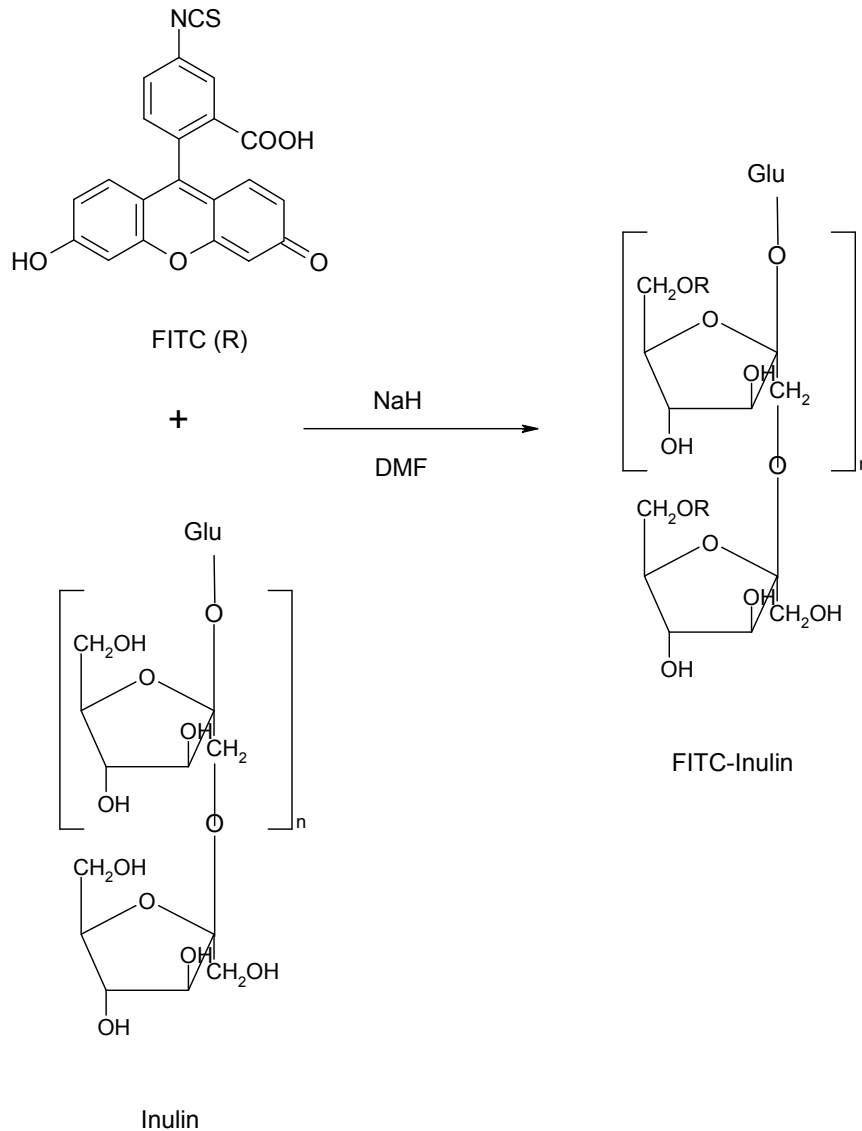


Abb. 4.1 Schema der FITC Inulinsynthese [Pill *et al.*, 2005a]

Die Derivatisierung von Inulin 5000 wurde wie in Kap. 2.4.4.2 beschrieben durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde über Amino- und C-18-Säulen mit unterschiedlichen mobilen Phasen, wie in Kap. 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben, analysiert. Es konnte keine befriedigende Auftrennung der mit FITC markierten Inuline erreicht werden. Obwohl wahrscheinlich nur 0,7 % [Pill *et al.*, 2005a] der OH-Gruppen am C-6-Atom der Fruktose mit FITC umgesetzt wurden, haben sich die physiko-chemischen Eigenschaften der FITC markierten Fruktane so stark geändert, dass eine feine Auftrennung mit den hier angewendeten HPLC-Methoden weder bei dem selbstsynthetisierten FITC-Inulin noch bei der Referenzsubstanz (FITC-Inulin, Sigma) möglich ist (s. Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Mit der Gradientenmethode aus Kap. 3.4.3.3 ist jedoch zumindest eine Trennung von reinem FITC (Peak bei ca. 5 Minuten) und FITC markiertem Fruktan (Peak bei ca. 82 Minuten) möglich (s. Abb. 3.51). Es ist interessant zu sehen, dass sich sowohl in der selbstsynthetisierten als auch in der gekauften FITC-Inulin-Probe noch freies FITC befindet, wobei die Menge des detektierten FITC in der kommerziellen Probe kleiner ist. Das liegt daran, dass bei dem in dieser Arbeit selbstsynthetisierten FITC-Inulin das freie FITC ausschließlich über Fällungsreaktionen abgetrennt wurde. Die Firma Roche Diagnostics GmbH, die das FITC-Sinistrin für Pill *et al.* [2005a, b] hergestellt hat, verwendete ein säulenchromatographisches Verfahren zur weiteren Aufreinigung des Produktes. Die Chromatogramme dieser Arbeit zeigen, dass zwar die Synthese funktioniert hat, da im Vergleich zur Referenzsubstanz die gleichen Peaks im Chromatogramm zu sehen sind (s. Abb. 3.51), aber die Eignung zu HPLC-Analytik nicht gegeben ist.

Da sich eine Vorsäulenderivatisierung mit FITC als problematisch in Bezug auf die physikochemischen Eigenschaften des Fruktans und damit auf die Trennung herausgestellt hatte, wurde eine Nachsäulenderivatisierung der Fruktane mit Guanidin untersucht (Kap. 3.44). Da die Fruktane erst nach dem Trennvorgang auf der Aminosäule derivatisiert werden, sollte weiterhin eine gute Trennung bei gleichzeitig empfindlicherer Nachweisgrenze möglich sein. Basierend auf einer Methode zur Fluoreszenzdetektion von nicht reduzierenden Zuckern [Yamauchi *et al.*, 1993] wurde eine Nachsäulenderivatisierung der Fruktane, wie in Kap. 2.4.4.3 beschrieben, durchgeführt. Zuvor wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Plattenreaders wässrige Inulin 5000 Lösungen untersucht, um herauszufinden, welchen Einfluss die Fruktankonzentration, die Reaktionszeit und die Temperatur auf die Derivatisierungs-

reaktion haben, um die für die HPLC-Läufe optimalen Bedingungen zu ermitteln (Kap. 3.4.4.1). Im Bereichen von 11 µg/ml bis 545 µg/ml kann mit sehr guter Linearität ($r^2 = 0,9995$) gemessen werden, wobei die Nachweisgrenze zwischen 11 und 55 µg/ml liegt. Die Temperatur für die Reaktion erreicht ihr Optimum bei 100°C; dies deckt sich mit den Messungen von Xiao *et al.* [2005]. Die optimale Reaktionszeit liegt bei 20 Minuten. Für die HPLC-Läufe konnte die Temperatur mit einem siedenden Wasserbad auf ca. 100°C eingestellt werden. Die Reaktionszeit lag mit ca. 0,7 Minuten weit unter den beschriebenen 20 Minuten. Die Reaktionszeit wird durch das Volumen der Reaktionskapillare sowie die Fließgeschwindigkeit beeinflusst. Die Reaktionszeit kann aber nicht beliebig vergrößert werden, weil dann durch Diffusionsprozesse die gute Trennung der Fruktane auf der Aminosäule wieder aufgehoben wird. Deshalb muss für eine Fingerprint-Analytik die Reaktionskapillare so dünn und kurz wie möglich gehalten werden. Für die HPLC-Methode wurden Linearität und Nachweisgrenze mit Glukose bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich von 2,2 mM bis 220 µM (0,4 µg/ml) eine gute Linearität ($r^2 = 0,9951$) existiert. Damit konnte die Nachweisgrenze deutlich von ≤ 1 mg/ml beim RI-Detektor auf 0,4 µg/ml durch Derivatisierung und FI-Detektion abgesenkt werden. Es wurde erstmalig in dieser Arbeit untersucht, ob eine Fruktan-Fingerprint-Analytik auf Amino-Säulen mit Guanidin Nachsäulenderivatisierung möglich ist (Kap. 3.4.4.2). Dazu wurden Fruktanfraktionen über fraktioniertes Lösen in Acetonitril/Wasser-Mischungen hergestellt und analysiert (s. Kap. 3.4.2.3). Auch hier konnte gezeigt werden, wie sich die DP-Verteilung der Fruktane mit abnehmender Acetonitrilkonzentration im Fließmittel in Richtung höherer DP's verschiebt. Bei der 80 %igen Acetonitrilfraktion (s. Abb. 3.59) sind nur Fruktane bis DP 8 (8,2 Minuten) zu erkennen. Der erste, im Chromatogramm nicht vollständig dargestellte Peak bei 4,8 Minuten ist sehr dominant, d. h. hier werden hauptsächlich Mono- und Disaccharide gefunden. Dieser erste Peak nimmt, was man im Chromatogramm leider ebenfalls nicht sehen kann, bei der 60 %igen Acetonitrilfraktion (s. Abb. 3.60) bereits deutlich ab. In der 40 %igen Acetonitrilfraktion (s. Abb. 3.61) ist eine deutliche Verschiebung der DP's in den höhermolekularen Bereich zu sehen. Der erste Peak ist nun größtmäßig von den anderen nicht mehr zu unterscheiden. Zwischen der 40 %igen und 20 %igen Acetonitrilfraktion (s. Abb. 3.62) verschwinden, ähnlich wie zwischen der 60 %igen und 40 %igen Ethanolfraktion (s. Kap. 3.3.4), Mono-, Di- und Trisaccharide komplett

aus der Fraktion. In der 0 %igen Acetonitrilfraktion (s. Abb. 3.64) erscheinen die Peaks im Chromatogramm erst bei 9 Minuten (ca. DP 10), d. h. hier wurden die FOS mehr oder weniger aus der Mischung entfernt. Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Schlüsse ziehen: Zum einen ist es trotz der geringen Reaktionszeit mit dem Derivatisierungsreagenz möglich, eine im Gegensatz zur Detektion mit RI-Detektor empfindlichere Fingerprint-Analytik von Fruktanen durchzuführen. Zum anderen können durch die fraktionierte Lösung von Fruktangemischen in Acetonitril/Wasser-Mischungen sehr homogene Fraktionen im durchschnittlichen DP-Bereich zwischen 2,2 und 11,9 gewonnen werden (s. auch Kap. 3.2.4). Die bereits weiter oben diskutierten ethanolfraktionierten Fruktanmischungen zeigen den größeren durchschnittlichen DP-Bereich, bilden aber auch die inhomogeneren Fraktionen. Zudem scheint Ethanol als Lösungsmittel die beste Wahl für die Fraktionierung im oberen und Acetonitril im unteren DP-Bereich zu sein. Das wäre insofern nachvollziehbar, als dass die Löslichkeit von Fruktanen in Ethanol besser als in Acetonitril ist und damit die Lösungskapazitäten für hohe DP einfach besser ist. Xiao *et al.* [2005] haben das Verfahren der Nachsäulenderivatisierung eingesetzt, um nach einer Fruktanhydrolyse die Produkte mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität im Blut bzw. Plasma nachzuweisen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten nichtreduzierende Zucker bis zu einem DP von 7 (β -Cyclodextrin) nachgewiesen werden. Demgegenüber stellt die in dieser Arbeit vorgestellte Methode eine deutliche Verbesserung dar, da hier Fingerprint-Chromatogramme bis zu einem DP von 20 möglich sind.

4.5 Diskussion der GPC-Analytik

In dieser Arbeit wurde versucht, eine Fraktionierung von Fruktanen über GPC-Säulen zu erreichen. Eine Fingerprint-Analytik ist mit der GPC nicht möglich. So ist eine Aussage hinsichtlich des DP der 80 % Ethanolfraktion (s. Abb. 3.78), sowie ein Vergleich mit den Chromatogrammen der Aminphasen-HPLC nicht möglich.

Die große Stärke der GPC-Analytik liegt in der Molekulargewichtsbestimmung und groben Fraktionierung von Fruktanen. So wurde beispielsweise bei Spollen und Nelson [1988] eine Auftrennung von Fruktanen in hohe DP, niedrige DP und FOS

durchgeführt, um die gewonnenen Fraktionen danach mittels TLC-Analytik weiter zu charakterisieren. Baumgartner *et al.* [2000] nutzten die GPC-Analytik, um Fruktanextrakte zu fraktionieren. Doch auch hier konnte mit dieser Technik „nur“ zwischen Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden unterschieden werden. Bei höherem DP wurden ebenfalls nur noch in niedermolekulare- und hochmolekulare Fruktane unterschieden. Di Cagno *et al.* [2006] verwendeten die GPC-Analytik zu Bestimmung der durchschnittlichen molekularen Masse von Glukanen und Fruktanen.

Bei den in der Literatur beschriebenen Anwendungen der GPC in der Fruktananalytik wurden keine Fingerprint-Chromatogramme erstellt. Die GPC eignet sich lediglich zur Separation in einzelnen DP-Fraktionen im unteren DP Bereich (Mono-, Di-, Tri-, Tetrasaccharide). Für die Molekulargewichtsbestimmung ist es wichtig, geeignete Substanzen für eine gute Kalibrierung einzusetzen. Es gibt hier so genannte „calibration kits“ von verschiedenen Herstellern zu kaufen. Diese bestehen meist aus Dextranen, Pullulanen und anderen Polymeren mit einem definierten Molekulargewicht.

4.6 Abschließende Betrachtung der Möglichkeiten zur Fruktananalytik

Analytik von Fruktanen ist ein, wie aus dieser Arbeit ersichtlich, sehr komplexes Thema. Man muss dabei prinzipiell zwei verschiedene Vorgehensweisen unterscheiden. Zum einen, die Ermittlung des durchschnittlichen DP von Fruktanen, indem man Fruktane hydrolysiert und dann das Verhältnis zwischen Fruktose und Glukose bestimmt. Zum anderen der Versuch, Fruktane bis zu einem möglichst hohen DP aufzutrennen, um die tatsächliche Verteilung der unterschiedlich langen Fruktanketten bestimmen zu können. Für die erstgenannte Vorgehensweise, der Bestimmung des durchschnittlichen DP, gibt es heute eine ganze Reihe unterschiedlicher, gut etablierter Verfahren. So hat man die Möglichkeit, Fruktane mit Hilfe einer milden sauren Hydrolyse mit z. B. TFA [Wack und Blaschek, 2006] oder HCl [Raessler *et al.*, 2008] zu spalten. Eine andere Möglichkeit Fruktane zu spalten, ist der Einsatz von Enzymen (s. Kap. 1.2.3). Um Inuline komplett in ihre Monomere zu zerlegen, ist der Einsatz von Exo- und Endo-Inulinasen zu empfehlen [Korakli *et*

al., 2003]. Werden reine Endo-Inulinasen eingesetzt, entstehen meist unterschiedlich große Bruchstücke mit einem DP bis zu etwa 4 [Ronkart *et al.*, 2007]. Zur Analyse dieser kleinen Oligosaccharide stehen dann wiederum mehrere Möglichkeiten zur Verfügung: z. B. GPC, HPLC [Van der Meulen *et al.*, 2004], HPLC mit Aminophasen, HPAEC-PAD [Huynh *et al.*, 2008], GC [Wack und Blaschek, 2006] colorimetrische Methoden [Korakli *et al.*, 2003] u.s.w. Für die Analytik von einfachen Zuckern bis DP 4 eignen sich alle Methoden. Bei der DP-Bestimmung über die Glukose- und Fruktosekonzentration liegt die Herausforderung darin, andere genuin im Extrakt vorhandene Zucker, wie z. B. freie Glukose, Stärke, Saccharose u.s.w. soweit „unschädlich“ zu machen, dass sie bei der Messung der Fruktane nicht stören. Jedoch kann auf diese Weise nur der durchschnittliche DP der Fruktane in der Probe ermittelt werden. Es ist also keine Aussage über die wahre DP-Verteilung von Fruktanen in der Probe möglich. Somit eignen sich diese Methoden nicht, um z. B. eine genaue Aussage über die Veränderung der Fruktane während der Lagerung zu machen. Hier sollte, um ein genaues Bild zu bekommen, die genaue Verteilung der Fruktane ermittelt werden können. Hierzu eignet sich die HPAEC-PAD (Dionex®) Analytik am besten, da ein exakter Fruktan-Fingerprint ermittelt werden kann (s. Kap. 3.7). So kann beispielsweise die Degradation von Inulin über Bakterien mit dieser Methode sehr anschaulich dargestellt werden [Durieux *et al.*, 2001], oder auch der direkte Vergleich der Fruktanzusammensetzung unterschiedlicher Pflanzen [Sims *et al.*, 2001]. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass es sich dabei um keine „Standard HPLC-Methode“ handelt und damit das Equipment vergleichsweise teuer ist. In dieser Arbeit konnte im Gegensatz dazu eine sehr einfache, billige und schnell durchzuführende Fingerprint-Analytik auf einer „Standard HPLC-Anlage“ bis zu einem DP von etwa 25 entwickelt werden (s. Kap. 3.3.2; 3.4.4 und 4.4).

Möchte man wissen, wie genau ein Fruktan aufgebaut ist, also ob es sich um ein Inulin oder um ein Levan (s. Kap. 1.1) handelt, wird oft auch die sehr aufwendige und teure NMR-Technologie eingesetzt [Cérantola *et al.*, 2004]. Hier kann ohne vorherige Hydrolyse oder Derivatisierung direkt aus den Chromatogrammen über die chemische Verschiebung der Signale eine Aussage über den Aufbau der Fruktane gemacht werden. Über die Signalintensität kann auch eine Bestimmung des durchschnittlichen DP erfolgen. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie ist, dass relativ hohe Probenmengen für eine Messung erforderlich sind (5 bis 12 mg). Im Gegensatz dazu benötigt die Analytik mittels GC deutlich weniger Material (0,1 bis 1 mg);

nachteilig sind hier wiederum die notwendigen Hydrolyse- oder Derivatisierungsschritte. Ansonsten sind die beiden Analysemethoden vom erzielten Ergebnis her vergleichbar [Wack und Blaschek, 2006].

Je nach Problemstellung gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, Fruktane zu analysieren. Eine allumfassende Methode für die Analytik von Fruktanen gibt es nicht. Darum ist es unumgänglich, für eine spezifische Charakterisierung von Fruktanen auf mehrere Methoden zurückzugreifen. Für eine schnelle quantitative Bestimmung ist die einfache und günstige colorimetrische Analytik von Fruktanen (s. Kap. 3.1) geeignet. Für die Bestimmung des durchschnittlichen DP gibt es, wie in diesem Kapitel beschrieben, eine Vielzahl von Möglichkeiten, welche vom erzielbaren Ergebnis vergleichbar sind. Hier werden wohl die bereits vorhandene Ausstattung eines Labors oder die analytischen Vorlieben des Versuchsdurchführenden den Ausschlag zu einer oder zur anderen Methode geben. Für spezielle Untersuchungen bezüglich der wahren DP-Verteilung der Fruktane gilt die HPAEC-PAD (Dionex®) Analytik heute als Goldstandard. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass als Alternative zur Dionex®-Anlage mit einer relativ einfachen und kostengünstigen HPLC-Methode ebenfalls sehr gute Ergebnisse bis zu einem DP der Fruktane von 25 erreicht werden können. Für eine exakte Strukturaufklärung sind sicherlich mehrere verschiedene analytische Methoden, speziell die NMR-Spektroskopie, einzusetzen, um dann aus den erhaltenen Informationen ein möglichst realistisches Gesamtbild zusammensetzen. Ein bleibendes Problem ist das Fehlen von Fruktan-Standards im DP-Bereich oberhalb der FOS.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Fruktane sind Polysaccharide, die meist an einem Ende der Polysaccharidkette ein Glukosemolekül haben und n Fruktosemoleküle. Sie können untereinander β -2,1- oder β -2,6-verknüpft vorliegen, wobei der β -2,1-verknüpfte Typ als Inulin und der β -2,6 verknüpfte Typ als Levan bezeichnet wird. Daneben unterscheidet man noch den β -2,1- und β -2,6-gemischten Graminan Typ und Inulin-Neoserie bzw. Levan-Neoserie Typen, bei denen sich in der Kette weitere Glukoseeinheiten befinden können. Fruktane mit Kettenlängen ≤ 10 Zuckereinheiten werden nicht als Inuline etc., sondern als Fruktooligosaccharide (FOS) bezeichnet. Aufgrund der β -Verknüpfungen können Inuline vom menschlichen Organismus nicht gespalten werden und gelangen darum mehr oder weniger unverändert in den Dickdarm. Eine mögliche Spaltung in den oberen Darmabschnitten wird diskutiert. Im Dickdarm werden Fruktane von den Darmbakterien wie z. B. *Bifidobakterien* fermentiert. Dabei entstehen kurzkettige Fettsäuren, welchen man günstige physiologische Effekte zuordnet. Fruktane, speziell Inulin, werden deshalb hauptsächlich als Prebiotikum mit günstigen Eigenschaften auf die Immunabwehr, Mineralstoff-Absorption und die Vorbeugung von Darmkrebs eingesetzt. Ein positiver Nebeneffekt der Fruktane sind hervorragende lebensmitteltechnologische Eigenschaften wie gute Gelierkraft, positiver Einfluss auf die Textur, guter Fettersatzstoff bei angenehmem „mouthfeel“, Einsatz als löslicher Ballaststoff u. a.. Fruktane können zum einen durch die Extraktion aus Pflanzen, welche Fruktane als lösliches Reservepolysaccharid in den Vakuolen speichern, gewonnen werden. Zum anderen ist die Synthese mit Bakterien- und Pilzenzymen, sowie rekombinant hergestellten Enzymen möglich.

Für die Charakterisierung von Fruktanen stehen eine ganze Reihe von analytischen Methoden zur Verfügung. Die wichtigsten sind die HPAEC-PAD (Dionex®), HPLC, GPC, GC, TLC und NMR-Spektroskopie. Dabei unterscheidet man, ob man den durchschnittlichen DP (Polymerisationsgrad), die exakte Struktur, oder die Verteilung der Fruktankettenlängen (Fruktan-Fingerprint) aufklären will. Für die Bestimmung des durchschnittlichen DP von Inulinen werden die Fruktanketten entweder mit Säure oder enzymatisch hydrolysiert, und anschließend mit einer geeigneten Methode das Verhältnis Glukose zu Fruktose bestimmt. Für die Strukturaufklärung sind weitere Informationen über die Bindungen und den Verknüpfungsgrad notwendig. Dafür

werden GC und NMR-spektroskopische Verfahren eingesetzt. Für die Fruktan-Fingerprint-Analytik ist eine Auftrennung des Fruktangemisches in die unterschiedlichen Kettenlängen notwendig. Hierfür eignet sich am besten HPAEC-PAD (Dionex®) Analytik. Damit ist man in der Lage, Fruktane nach steigendem DP, bis über 60 [Finke *et al.*, 2002], aufzutrennen. Man muss dabei allerdings beachten, dass die Detektor-Response und die Auflösung mit zunehmendem DP abnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine weitere analytische Methode, Fruktane bis zu einem DP von 25 zuverlässig zu trennen, entwickelt werden. Zuvor wurde die Methode der fraktionierten Fällung von Fruktanen entwickelt, mit der man Fruktangemische elegant fraktionieren kann. Fruktane lösen sich in Wasser. Mit zunehmendem Anteil an „organischen“ Lösungsmitteln (es wurden Versuche mit Ethanol, Isopropanol, Aceton und Acetonitril durchgeführt) und mit zunehmender Kettenlänge der Fruktane wird die Löslichkeit schlechter. Dieses Verhalten ausnützend wurde eine Fruktanmischung zweier Inuline mit niedrigerem und mit höherem durchschnittlichem DP in reinem „organischen“ Lösungsmittel „gelöst“ und der Überstand als Fraktion abgenommen. Dann wurde das verbliebene Pellet mit den nicht in Lösung gegangenen Fruktanen jeweils mit Lösungsmitteln, bei denen schrittweise der Wasseranteil erhöht wurde, aufgenommen und jeweils der Überstand als Fraktion abgenommen. Von den einzelnen Fraktionen wurden dann mittels GC-Analytik der durchschnittliche DP bestimmt. Diese Fraktionen wurden auch mit der hier der entwickelten HPLC-Methode untersucht. Ziel der Arbeit war es, eine im Gegensatz zur HPAEC-PAD (Dionex®) Methode einfachere, auf „Standard“ HPLC-Anlagen laufende und damit kostengünstige HPLC-Methode zu entwickeln. Dafür wurden eine HPLC-Anlage der Firma Waters, eine Aminophasen-Säule (Luna Amino® der Firma Phenomenex) als stationäre Phase und eine Acetonitril/Wasser Mischung als mobile Phase verwendet. Die Methode wurde für die Trennung von Fruktanen bis zu einem DP von 25 optimiert. Der limitierende Faktor, was den maximal zu bestimmenden DP angeht, ist die mobile Phase. Für die Methode wird eine 62 %ige Acetonitril/Wasser Mischung verwendet, um ein Fruktan-Fingerprint zu erhalten. Bei einem so hohen Acetonitrilanteil ist die Löslichkeit von Fruktanen schlecht. Deshalb muß die Probe vor dem Auftrag auf die Säule mit einer 60 %igen Acetonitril/Wasser Mischung gefällt werden, damit keine in der mobilen Phase unlöslichen Bestandteile auf die Säule gelangen. Dies würde sonst langfristig zum Ausfall der Säule führen. Gleichzeitig werden durch das Fällern aber auch die

höhermolekularen Bestandteile abgetrennt, so dass sie nicht mehr erfasst werden. Trotz dieser Probleme konnte die Methode so weit verfeinert werden, dass eine Fingerprint-Analytik der Fruktanfraktionen möglich ist. So konnten die unterschiedlichen Zusammensetzungen der gewonnenen Fruktanfraktionen sehr schön gezeigt werden. Abgesichert wurden diese Ergebnisse durch eine Analyse der identisch hergestellten Fruktanfraktionen auf einer HPAEC-PAD (Dionex®)-Anlage, die die Ergebnisse bestätigen.

Ein Problem der Analytik besteht in der relativ schlechten Response des RI-Detektors, speziell bei höhermolekularen Fruktanen. Um dieses Problem zu lösen, wurden Versuche durchgeführt, Fruktane mit einem Fluorophor zu markieren. Dabei stellte sich heraus, dass eine Vorabderivatisierung nicht funktioniert, da sich die derivatisierten Fruktane nicht mehr wie gewünscht auftrennen ließen. Daraufhin wurde eine Nachsäulenderivatisierung mit Guanidiniumchlorid untersucht, mit der die gewünschten Ergebnisse realisiert werden konnten. So konnte die Nachweisgrenze für Fruktane von 1 mg/ml auf 0,4 µg/ml abgesenkt werden. Durch den Einbau einer Reaktions- und einer Nachkapillare wurde die Peaktrennung etwas verschlechtert, jedoch kann auch hier eine Fingerprint-Analytik bis zu einem DP von 20 durchgeführt werden.

Die HPAEC-PAD (Dionex®)-Analytik konnte erfolgreich zur Überprüfung der Lagerungsstabilität von fruktanhaltigen Proben eingesetzt werden. Es wurden verschiedene fruktanhaltige Pflanzen unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert. Vor der Einlagerung am Tag 0 wurde von jeder Droge ein Fruktan-Chromatogramm aufgenommen. Nach den festgelegten Lagerungszeiten wurden von den Drogen erneut Proben entnommen und analysiert. Dabei wurde jeweils der Gesamtfruktangehalt bestimmt und prozentual auf den Gehalt am Tag 0 bezogen. Zur Bestimmung des Gehalts wurde Lactose als Standard eingesetzt. Hier konnte zum einen gezeigt werden, wie gut sich das Verfahren zur Untersuchung von Veränderungen der Fruktanzusammensetzung eignet, zum andern, dass die meisten Proben über den Lagerungszeitraum stabil waren. So kann die Überprüfung des Fruktan-Fingerprints einer Droge in Zukunft eventuell zu Qualitätssicherung angewendet werden. Da Fruktane in einer Pflanze im Verlauf ihrer Vegetationsperiode in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, wäre es vorstellbar, mit der Fingerprint-Analytik Aussagen über Erntezeitpunkt und/oder

Nährstoffangebot zu machen. Hierzu sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Fruktane, speziell die Inuline, sind ein stetig an Bedeutung gewinnendes Polysaccharid, welches sich fast unbemerkt in der Nahrungs- und Arzneimittelindustrie etabliert hat. Oftmals fehlen aber noch genaue Erkenntnisse darüber, welcher DP für die gewünschte Wirkung des Inulins ideal bzw. verantwortlich ist. Darum wurden in dieser Arbeit einfache, leicht durchzuführende, kostengünstige Verfahren zur Charakterisierung von Fruktanen erforscht und somit ein weiterer Baustein zum Bau des Hauses einer kompletten Fruktananalytik hinzugefügt.

A. Literaturverzeichnis

Barthomeuf, C.; Grizard, D.; Teulade, J.C. "Assay and structural determination of fructo-oligosaccharides synthesized by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*". *Biotechnology Techniques* **1997**, 11(11): 845-848

Baumgartner, S.; Dax, T., G.; Praznik, W.; Falk, H. "Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.)". *Carbohydrate Research* **2000**, 328(2): 177-183

Beck, R. H. F.; Praznik, W. "Molecular characterization of fructans by high-performance gel chromatography". *Journal of Chromatography* **1986**, 369: 208-212

Böhm, A.; Kaiser, I.; Trebstein, A.; Henle, T. "Heat-Induced degradation of inulin". *Eur Food Res Technol* **2004**, 220: 466-471

Bosscher, D.; Van Loo, J.; Franck, A. "Inulin and oligofructose in lowering the risk of osteoporosis: a major concern for women's health". *Agro Food Industry Hi-Tech* **2006**, 17(1): 10-12

Bouhnik, Y.; Raskine, L.; Champion, K.; Andrieux, C.; Penven, S.; Jacobs, H.; Simoneau, G. "Prolonged administration of low-dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans." *Nutrition Research* **2007**, 27: 187-193

Cérantola, S.; Kervarec, N.; Pichon, R.; Magné, C.; Bessieres, M. A.; Deslandes, E. "NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.)". *Carbohydr Res* **2004**, 339, 2445-2449.

Crittenden, R.G.; Playne, M.J. "Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides". *Trends in food Science & Technology* **1996**, 7, 353-361.

Dall'Amico, R.; Montini, G.; Pisanello, L.; Piovesan, G.; Bottaro, S.; Cracco, A. T.; Zacchello, G.; Zacchello, F. "Determination of inulin in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr B Biomed Appl* **1995**, 672, 155-159.

Di Cagno, R.; De Angelis, M.; Limitone, A.; Minervini, F.; Carnevali, P.; Corsetti, A.; Gaenzle, M.; Ciati, R.; Gobbetti, M. "Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*". *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 9873-9881.

Duke, J. A. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. Boca Raton: 1992.

Durieux, A.; Fougines, C.; Jacobs, H.; Simon, J. P. "Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria". *Biotechnology Letters* **2001**, 23, 1523-1527.

Finke, B.; Stahl, B.; Pritschet, M.; Facius, D.; Wolfgang, J.; Boehm, G. "Preparative continuous annular chromatography (P-CAC) enables the large-scale fractionation of fructans". *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 4743-4748.

Fiordaliso, M.; Kok, N.; Desager, J. P.; Goethals, F.; Deboyser, D.; Roberfroid, M.; Delzenne, N. "Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats". *Lipids* **1995**, 30, 163-167.

Forcheron, F.; Beylot, M. "Long-term administration of inulin-type fructans has no significant lipid-lowering effect in normolipidemic humans". *Metabolism* **2007**, 56, 1093-1098.

Huynh, B.-L.; Palmer, L.; Mather, D. E.; Wallwork, H.; Graham, R. D.; Welch, R. M.; Stangoulis, J. C. R. "Genotypic variation in wheat grain fructan content revealed by a simplified HPLC method". *Journal of Cereal Science* **2008**, 48, 369-378.

Kaur, N.; Gupta, A. "Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition". *J. Biosci.* **2002**, 27, 703-714.

Kimberley, T. A. C. C. "A Colorimetric Fructose Assay". *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1994**, 53, 215-227.

Kitamura, S.; Hirano, T.; Takeo, K.; Mimura, M.; Kajiwara, K.; Stokke, B. T.; Harada, T. "Conformation of (2-->1)-beta-D-fructan in aqueous solution". *Int J Biol Macromol* **1994**, 16, 313-7.

Kolida, S.; Tuohy, K.; Gibson, G. R. "Prebiotic effects of inulin and oligofructose". *Br J Nutr* **2002**, 87 Suppl 2, S193-7.

Korakli, M.; Hinrichs, C.; Ehrmann, M. A.; Vogel, R. F. "Enzymatic determination of Inulin and fructooligosaccharides in food". *Eur Food Res Technol* **2003**, 217, 530-534.

Ku, Y.; Jansen, O.; Oles, C. J.; Lazar, E. Z.; Rader, J. I. "Precipitation of Inulins and oligoglucose by ethanol and other solvents". *Food Chemistry* **2002**, 81, 125-132.

Livingston, D. P. "Fructan Precipitation from a Water/Ethanol Extract of Oats and Barley". *Plant Physiol* **1990**, 92, 767-769.

Mancilla-Margalli, N. A.; Lopez, M. G. "Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species". *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 7832-7839.

Oh; Yoo, S.-H.; Bae, I. Y.; Cha, J.; Lee, H. G. "Effects of *Microbacterium laevaniformans* Levans Molecular Weight on Cytotoxicity". *J. Microbiol. Biotechnol* **2004**, 14, 985-990.

Paseephol, T.; Small, D.; Sherkat, F. "Process optimisation for fractionating *Jerusalem artichoke* fructans with ethanol using response surface methodology". *Food Chemistry* **2006**, 104, 73-80.

Pastore, A.; Bernardini, S.; Dello Strologo, L.; Rizzoni, G.; Cortese, C.; Federici, G. "Simultaneous determination of inulin and p-aminohippuric acid in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2001**, 751, 187-91.

Patentsschrift. *PCT/EP01/05172*.

Pill, J.; Kloetzer, H. M.; Issaeva, O.; Kraenzlin, B.; Deus, C.; Kraemer, U.; Sadick, M.; Fiedler, F.; Gretz, N. "Direct fluorometric analysis of a newly synthesised fluorescein-labelled marker for glomerular filtration rate". *Anal Bioanal Chem* **2005b**, 382, 59-64.

Pill, J.; Kraenzlin, B.; Jander, J.; Sattelkau, T.; Sadick, M.; Kloetzer, H. M.; Deus, C.; Kraemer, U.; Gretz, N. "Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate". *Eur J Med Chem* **2005a**, 40, 1056-61.

Pool-Zobel, B. L. "Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data". *Br J Nutr* **2005**, 93 Suppl 1, S73-90.

Poulsen, M.; Molck, A. M.; Jacobsen, B. L. "Different effects of short- and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats". *Nutr Cancer* **2002**, 42, 194-205.

Praznik, W.; Beck, R. H. F. "Determination of fructan oligomers of degree of polymerization 2-30 by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography* **1984**, 303, 417-421.

Praznik, W.; Beck, R. H. F. "Application Of Gel Permeation Chromatographic Systems To The Determination Of The Molecular Weight Of Inulin". *Journal of Chromatography* **1985**, 348, 187-197.

Prosky, L.; Hoebregs, H. "Methods to determine food inulin and oligofructose". *J Nutr* **1999**, 129, 1418S-23S.

Raessler, M.; Wissuwa, B.; Breul, A.; Unger, W.; Grimm, T. "Determination of water-extractable nonstructural carbohydrates, including inulin, in grass samples with high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection". *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 7649-54.

Reiffova, K.; Podolonovicova, J.; Orinak, A.; Florian, K.; Gondova, T. "Preliminary TLC analysis of fructooligosaccharides as feed additives". *Journal of Planar Chromatography--Modern TLC* **2003**, 16, 52-57.

Roberfroid, M. B.; Delzenne, N. M. "Dietary fructans". *Annu Rev Nutr* **1998**, 18, 117-43.

Ronkart, S. N.; C., B. S.; Fourmanoir, H.; Fougnes, C.; Deroanne, C.; van Herck, J.-C.; Paquot, M. "Isolation and identification of inulinooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis". *Analytica Chimica* **2007**, 604, 81-87.

Rücker; Neugebauer; Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 2001.

Sims, I. M.; Cairns, A. J.; Furneaux, R. H. "Structure of fructans from excised leaves of New Zealand flax". *Phytochemistry* **2001**, 57, 661-8.

Spollen, W. G.; Nelson, C. J. "Characterization of Fructan from Mature Leaf Blades and Elongation Zones of Developing Leaf Blades of Wheat, Tall Fescue, and Timothy". *Plant Physiol* **1988**, 88, 1349-1353.

Strasser, M. „Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysensysteme“. Dissertation 2002.

Trujillo, L. E.; Arrieta, J. G.; Dafhnis, F.; Garcia, J.; Valdes, J.; Tambara, Y.; Perez, M.; Hernandez, L. „Fructo-oligosaccharides production by the Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*“. *Enzyme Microb Technol* **2001**, 28, 139-144.

Van der Meulen, R.; Avonts, L.; De Vuyst, L. "Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010". *Appl Environ Microbiol* **2004**, 70, 1923-30.

van Hijum, S. A. F. T.; van Geel-Schutten, G. H.; Rahaoui, H.; van der Maarel, M. J. E. C.; Dijkhuizen, L. "Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides". *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, 68, 4390-4398.

Van Laere, A.; van Den Ende, W. "Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system". *Plant, Cell and Environment* **2002**, 25, 803-813.

Wack, M.; Blaschek, W. "Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from *Echinacea purpurea* roots". *Carbohydr Res* **2006**, 341, 1147-53.

Weaver, C. M. "Inulin, oligofructose and bone health: experimental approaches and mechanisms". *Br J Nutr* **2005**, 93 Suppl 1, S99-103.

Xiao, L.; De-Sheng, X.; Yi, F.; Lan, S. "Determination of *Ophiopogon japonicus* polysaccharide in plasma by HPLC with modified postcolumn fluorescence derivatization". *Analytical Biochemistry* **2005**, 342, 179-185.

Yamauchi, S.; Nakai, C.; Nimura, N.; Kinoshita, T.; Hanai, T. "Development of a Highly Sensitive Fluorescence Reaction Detection System for Liquid Chromatographic Analysis of Reducing Carbohydrates". *Analyst* **1993a**, 118, 773-776.

Yamauchi, S.; Nakai, C.; Nimura, N.; Kinoshita, T.; Hanai, T. "Highly Sensitive Detection of Non-reducing Carbohydrates by Liquid Chromatography". *Analyst* **1993b**, 118, 769-771.

B. Abkürzungsverzeichnis

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Durchschnittlicher Polymerisationsgrad
EPS	Exopolysaccharide
F	Fruktose
FID	Flammenionisationsdetektor
FI-Detektor	Fluoreszenzdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOS	Fruktoseoligosaccharide
G	Glukose
GC	Gaschromatographie
GF	Saccharose
GF _n	Fruktan
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ICH	International conference of harmonisation
m.F.	meiner Familie
MALLS-Detektor	Multi Angle Laser Light Scattering Detector
n	Stichprobenumfang
NMR	Nuclear magnetic resonance
OK	in Wasser ohne Wärme gelöst
OW	in Wasser mit Wärme gelöst
r ²	Korrelationskoeffizient
RI-Detektor	Brechungsindexdetektor
RP	Reversed phase, Umkehrphase

Abkürzungsverzeichnis

RSD	Relative Standardabweichung
SEC	Size Exclusion Chromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Thin Layer Chromatography

C. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

Prof. Dr. W. Blaschek

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Blaschek, danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, Überlassen des interessanten Themas sowie die stets offene Türe für Anregungen und Diskussionen. Ich werde mich immer gerne an die familiäre Atmosphäre, die Herr Prof. Blaschek und seine Frau **Heidi Blaschek** in den Arbeitskreis hereingetragen haben, die fröhlichen Abende auf Exkursionen die famosen Gansessen und Feste bei Familie Blaschek erinnern. Ein wahrer Doktorvater und „Doktormutter“, die auch über den wissenschaftlichen Tellerrand weit hinausblicken können.

Frau **PD Dr. Birgit Classen** möchte ich herzlich für die freundschaftliche Unterstützung meiner Arbeit und die fröhlichen Exkursionen auf Rügen bedanken. Frau **Dr. Maren Wack** danke ich für die ausführliche Einführung in mein Thema, welche mir den Start in mein „Promotionsleben“ deutlich vereinfacht hat.

Besonders herzlich möchte ich mich bei **Sven Wichmann** bedanken, der mir bei allen Fragen der HPLC-Technik (und da gab's ne Menge) immer und unermüdlich mit Wissen und Material weitergeholfen hat.

Danken möchte ich auch meinen lieben Kollegen, **Andreas, Inken, Bernadette, Niels, Marie, Susanne** und **Jana** für die gute Stimmung im Arbeitskreis, die erhellenden Gespräche in der Teeküche und die gute Zusammenarbeit in den Praktika. In diesen Dank möchte ich auch unsere Technischen Mitarbeiter **Kalle** und **Kirsten** (am Anfang hatten wir ja noch ne schöne Raucherrunde...) **Frauke, Susanne, Helle, Dana, Claudia** und die Gärtner **Carsten, Dietrich** und **Henning**, die einen fantastischen Job machen, der leider von den Studenten viel zu selten

gewürdigt wird und **Marion**, mit einbeziehen. Herrn **PD Dr. Rainer Volk** danke ich für den selbst gemachten Cointreau (hatte oft schlimme Folgen...).

Detlef Rödiger und **Arne Herzog** danke ich für die lebenswichtige IT-Unterstützung. Herzlichen Dank auch an **Moni Ihlow** und **Susanne Voss** für den Papierkrieg im Geschäftszimmer und alle Professoren, Mitarbeiter und Kollegen für die schöne Zeit am Institut.

Danken möchte ich auch **Sanja, Niels, Helen, Ulrike** und **Inken** für unsere heitere „Mensarunde“.

Anja, Dirk, Hendrik, Axel, Frank, Conny, Dana, Lutz, Juliane... kurz, der gesamten Studius Runde, möchte ich für die schönen Freitagabende und ihre Freundschaft danken.

Zuletzt möchte ich meiner **Familie** von ganzem Herzen danken, für ihre Unterstützung, derer ich mir immer sicher sein kann. Besonders danke ich meiner **Anja**, dass sie immer für mich da ist.

Persönliche Daten:

Vor- und Familienname	Ulrich Breit
Geburtsdatum	14. November 1975
Geburtsort	Schwäbisch Hall
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1982 – 1986	Grundschule Schwäbisch Hall
1986 – 1987	Realschule Schwäbisch Hall
1987 – 1995	Gymnasium Schwäbisch Hall

Zivildienst:

1996 –1997	DRK Unfallrettungsdienst Schwäbisch Hall
------------	--

Hochschulausbildung:

1997	Pharmaziestudium an der Christian Albrechts Universität Kiel
2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2003	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2004	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker

Promotion

seit 09/2004	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. W. Blaschek
--------------	---

Erklärung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, im September 2008

Ulrich Breit

Fruktane, unverdauliche Polysaccharide bestehend aus einer Glukoseeinheit und einer mehr oder weniger großen Anzahl an Fruktoseeinheiten, werden hauptsächlich aufgrund ihrer prebiotischen und günstigen lebensmitteltechnologischen Eigenschaften in der Arzneimittel- und Lebensmittelindustrie eingesetzt. Um Fruktane zu charakterisieren, gibt es unterschiedliche analytische Ansätze. So lässt sich z. B. der durchschnittliche Polymerisationsgrad, der molekulare Aufbau oder ein „Fingerprint“, d. h. die Verteilung der Fruktane bezüglich ihrer Kettenlänge (DP) bestimmen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über eine sequentielle Lösung von Fruktanen in unterschiedlichen Lösungsmitteln eine gute und schnell durchzuführende Fraktionierung von Fruktanen nach ihrem DP möglich ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass mit einer HPLC-Analytik mit Amino-Phasen eine Fingerprint-Analytik bis zu einem DP von 25 erreicht werden kann. Über eine Nachsäulenderivatisierung der Fruktane mit Guanidiniumchlorid und Fluoreszenz-Detektion konnte die Nachweisgrenze von Fruktanen deutlich gesenkt und eine Fingerprintanalytik bis zu einem DP von 20 durchgeführt werden. Die Ergebnisse konnten über eine bereits etablierte HPAEC-PAD- und GC-Analytik bestätigt werden. Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden wurden mit anderen Analyseverfahren (GPC, NMR u.a.) verglichen, um die jeweiligen Stärken und Schwächen der einzelnen Methoden beurteilen zu können. In dieser Arbeit konnten erfolgreich einfache und kostengünstige Routineverfahren zur Trennung und DP-Bestimmung von Fruktanen entwickelt werden.

Fructans are indigestible polysaccharides consisting of one monomer of glucose and a differing number of fructose molecules. They are mainly used by the pharmaceutical and food industry due to their beneficial prebiotic and technological properties. For characterization of fructans several analytical methods are available. So it is possible to determine the average degree of polymerization, the molecular structure or a fingerprint analysis of the fructan composition. Fingerprint analyses are performed to determine the degree of polymerization (DP) of fructans.

In this study a fast and reliable method, to fractionate fructans according to their DP was developed, namely the sequential solution of fructans with different solvents. Furthermore a HPLC analysis using amino phases was established, which allows fingerprint analysis up to a DP of 25. The detection limit of fructans was considerably lowered by post-column derivatisation with guanidinium chloride and fluorescence detection. Thus fingerprint analysis of fructans could be performed up to a DP of 20. The obtained results could be confirmed by HPAEC-PAD and GC analysis and were additionally compared with established analytical methods (e.g. SEC, NMR) used for the analysis of fructans. Strength and weakness of each method are discussed. In summary a simple and cheap analytical method was developed, which can routinely be used for the separation of fructans and the determination of their DP.