

Abschlussbericht Forschungsprojekt

Ausführende Stelle:

Staatliche Milchwirtschaftliche Lehr- und Versuchsanstalt
- Dr.-Oskar-Farny-Institut -
Am Maierhof 7
88239 Wangen im Allgäu

Forschungsprojekt Nr.: 06HS012

Thema: **Herabsetzen der Nachweisgrenze bei der Bestimmung von Laktose und Galaktose in laktosefreien Milcherzeugnissen**

Laufzeit: März 2007 – August 2008

Berichtszeitraum: März 2007 – August 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	3
1.1	Planung und Ablauf des Projekts	3
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	5
2	Material und Methoden	9
3	Ergebnisse	13
3.1	Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	13
3.1.1	HPLC nach reduktiver Aminierung	13
3.1.1.1	Ionenpaarchromatographie	13
3.1.1.1.1	Gradientenelution mit Phosphat-Puffer/Methanol.....	13
3.1.1.1.2	Gradientenelution mit Phosphat-Puffer/Acetonitril.....	15
3.1.1.1.3	Isokratische Elution mit Phosphat-Puffer/Methanol, Phosphat-Puffer/Acetonitril und rein wässrigem Eluenten.....	16
3.1.1.2	Reversed-Phase-Chromatographie.....	17
3.1.1.2.1	Methodenentwicklung/-optimierung mit Phosphat-Puffer/Acetonitril und Phosphat-Puffer/Methanol.....	17
3.1.1.2.2	Versuche zur Probenaufbereitung und erste Messung realer Proben.	20
3.1.1.2.3	Modifizierungen der bestehenden Derivatisierungsmethode zur Reaktions- und Trennungsoptimierung.....	21
3.1.1.2.4	Kalibration der entwickelten Methode und Übersichtsmessung einer realen Probe.....	24
3.1.1.2.5	Entwicklung einer Reversed Phase Methode mit ungepufferten Eluenten	27
3.1.1.2.6	Weitere Versuche zur Derivatisierungs- und Trennungsoptimierung ...	29
3.1.1.3	Vorversuche für die Gaschromatographie	31
3.1.1.3.1	Derivatisierung mit Aminopyridin	31
3.1.1.3.2	Derivatisierung mit Benzylamin und Aufreinigung über SPE	32
3.1.1.3.3	Derivatisierung mit vorhergehendem enzymatischen Abbau der Glucose und Aufreinigung über SPE	32
3.1.1.3.4	Derivatisierung mit Natriumcyanoborhydrid und Natriumtriacetoxyborhydrid und nachfolgender Extraktion mit THF	33
3.1.1.3.5	Derivatisierung mit p-Ambaethylester und Aufreinigung über SPE	34
3.1.2	Ligandenaustauschchromatographie (Kationenaustauscher-Säule) mit Fluoreszenzdetektion	35
3.1.3	Versuche mittels enzymatischer Bestimmung	36
3.1.3.1	Vorgehensweise/theoretischer Ansatz.....	36
3.1.3.2	Orientierende Anfangsmessungen	38
3.1.3.3	Versuche mit angepasstem pH-Wert	40
3.1.3.4	Versuche mit erhöhter Enzymkonzentration	42
3.1.3.5	Ergänzende Versuche zur enzymatischen Bestimmung	43

3.1.4	Gaschromatographie	45
3.1.4.1	Ermittlung des optimalen Silylierungsreagenz.....	45
3.1.4.2	Versuche über reduktive Aminierung mit p-Ambaethylester	46
3.1.4.3	Versuche mit Aldoximbildung.....	47
3.1.4.3.1	Versuche zur Trennungsoptimierung.....	48
3.1.4.3.2	Modifizierung des Derivatisierungsprotokolls zur Erhöhung der NWG	49
3.1.4.3.3	Versuche zur Probenaufreinigung	50
3.1.4.3.4	Versuche mit erhöhtem Injektionsvolumen/anderem Injektionsmodus	54
3.1.5	HPLC-Versuche mit elektrochemischer Detektion und Kationenaustauschersäule.....	55
3.1.6	Ionenchromatographie mit Anionenaustauschersäule und gepulst amperometrischem Detektor (IC/PAD)	56
3.1.6.1	Messungen Fa. Dionex.....	56
3.1.6.2	Messungen Fa. Metrohm	64
3.1.7	Ergänzende Versuche mit Lichtstredetektion (ELSD).....	77
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	79
3.2.1	HPLC nach reduktiver Aminierung von Lactose und Galactose mit p-Aminobenzoessäure und p-Aminobenzoessäureestern:	79
3.2.2	Enzymatik.....	79
3.2.3	Gaschromatographie	79
3.2.4	Ionenchromatographie mit Anionenaustauschersäule und gepulst amperometrischem Detektor	80
3.2.5	Versuche mit Lichtstredetektion.....	81
4	Zusammenfassung.....	81
5	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen/Hinweise auf weiterführende Fragestellungen..	82
6	Verwendete Literatur:.....	83

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Gesamtprojektziel war die Entwicklung eines Analysenverfahrens zum Nachweis von Laktose und Galaktose in Milch und Milchprodukten mit einer Nachweisgrenze von jeweils deutlich weniger als 0,1 Massen-%.

Das Gesamtziel war gegliedert in folgende Arbeitsziele/Aufgabenstellungen:

- a) Literaturstudien zur Feststellung des derzeitigen Standes der Wissenschaft zu diesem Thema
- b) Erprobung verschiedener Derivatisierungsmethoden von Zuckern
- c) Versuche mit neuartigen Detektoren
- d) Optimierung der Probenvorbereitung
- e) Versuche mit realen Proben (Milchprodukte mit unterschiedlichem Verarbeitungsgrad)
- f) Methodvalidierung mit Ermittlung der zugehörigen Präzisionsdaten

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Projektplan

- 1.) Meilenstein: Einarbeitungsphase: ca. 6 Wochen KW 10 bis 15
- 2.) Meilenstein: Literaturrecherche/-studie: ca. 3 Wochen KW 16 bis 18
- 3.) Meilenstein: Derivatisierungsversuche von Zuckerstandards unter Anwendung verschiedener Derivatisierungsreagenzien und Messung mittels HPLC und GC: ca. 4 Wochen KW 19 bis 22

HPLC:

- reduktive Aminierung mit p-Aminobenzoesäure+Natriumcyanoborhydrid
- reduktive Aminierung mit p-Aminobenzoesäurepropylester +Natriumcyanoborhydrid

GC:

- Silylierung mit MSTFA
- Acetylierung mit TFA
- Variation der Derivatisierungsbedingungen Temperatur und Zeit zur Reaktionsoptimierung
- Überprüfung von Messinterferenzen mit anderen eventuell im Produkt vorkommenden Zuckern (Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose)

Veranschlagte Zahl von Messungen: ca. 100

- 4.) Meilenstein: Anwendung der aus 3.) gewonnenen Erkenntnisse auf verschiedene Probenmatrices/Untersuchung realer Proben: ca. 6 - 8 Wochen KW 23 bis 30

Prüfung auf matrixbedingte Störungen; eventuelle Abänderung und Optimierung der Probenaufbereitung und/oder der chromatographischen Parameter

Untersuchung von 10-12 verschiedenen Produkttypen, jeweils Dreifachbestimmung

Veranschlagte Zahl von Messungen: mind. 50

- 5.) Meilenstein: Erprobung neuer HPLC-Detektoren (CAD oder PAD) in Kombination mit verschiedenen stationären und mobilen Phasen:
ca. 6 Wochen KW 31 bis 36

Einarbeitung, Tests mit 2 verschiedenen stationären und 3 - 4 mobilen Phasen, Versuche mit Zuckerstandards (Lactose, Galactose, Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose)

Veranschlagte Zahl von Messungen: ca. 100

- 6.) Meilenstein: Anwendung der aus 5.) gewonnenen Erkenntnisse auf reale Proben, wie z. B. Milch, Milchpudding, Schlagsahne, Quark, Käse, etc. Überprüfung des Einflusses der Probenmatrix auf die chromatographische Trennung.
ca. 6-8 Wochen KW 37 bis 44

Bei auftretenden, matrixbedingten Störungen eventuelle Abänderung der Probenaufbereitung erforderlich oder Modifikation einer bestehenden Methode hinsichtlich der verschiedenen chromatographischen Parameter (mobile u. stationäre Phase, Temperatur, Fluß, etc.).

Bei ca. 10-12 verschiedenen Probenmatrices jeweils durchzuführende Dreifachbestimmung.

Auf Grund von notwendigen Optimierungen veranschlagte Zahl von Messungen: ca. 50

- 7.) Meilenstein: Validierung der Methoden und Ermittlung der dazugehörigen Präzisionsdaten.
ca. 6 Wochen KW 43 bis 49

Veranschlagte Anzahl von Messungen:

- Ermittlung von NWG und BG von Laktose und Galaktose: ca. 20
- Ermittlung der Wiederfindungsraten von Laktose und Galaktose durch Untersuchung dotierter Proben: ca. 40
- Überprüfung der Linearität: ca. 20
- Ermittlung der Standardabweichung: ca. 20

- 8.) Meilenstein: Zusammenfassende Auswertung der Daten. Evtl. Durchführung von Nachuntersuchungen, Erstellen des Abschlußberichtes
ca. 6 Wochen KW 50 bis 52
und KW 1 bis 6

Projekttablauf

- 1.) Einarbeitungsphase
- 2.) Literaturstudium zur allgemeinen Zuckeranalytik und speziell über Ionenpaarchromatographie mit ersten begleitenden Untersuchungen
- 3.) Versuche zur Bestimmung von Lactose und Galactose mittels HPLC nach reduktiver Aminierung mit p-Aminobenzoesäure und p-Aminobenzoesäureestern über
 - Ionenpaarchromatographie
 - Reversed-Phase-Chromatographie
 - Kationenaustauschersäule
- 4.) Versuche zur Bestimmung von Lactose nach enzymatischen Verfahren
- 5.) HPLC-Vorversuche zur Anreicherungs- und Aufreinigungsoptimierung für die GC und weitere Versuche mit alternativen Reduktionsmitteln und Reagenzien
- 6.) Versuche zur Derivatisierung von Laktose und Galaktose als Probenvorbereitung für die Gaschromatographie:
 - Optimierung der Reaktion durch Variation von Reagenzien und Reaktionsbedingungen
 - Optimierung der Trennung
 - Optimierung des Injektionsvolumens
- 7.) Erprobung neuer HPLC-Detektoren:
 - Versuche mit Kationenaustauschersäule und Elektrochemischer Detektion
 - Versuche mit Lichtstredetektor im Applikationslabor der Fa. Techlab
- 8.) Versuche mit Ionenchromatographie und Elektrochemischer Detektion:
 - im Applikationslabor der Fa. Dionex
 - mit Leihgerät der Fa. Metrohm
- 9.) Erstellen des Abschlussberichts

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Als Ausgangspunkt für die vorliegenden Versuche/Arbeiten dienten die Veröffentlichungen [1][2][3] und im ersten Halbjahr 2006 durchgeführte Vorversuche und Literaturrecherchen [50][52][53][72][74][75][77][79][80][82]-[88]

Die Literaturrecherchen ergaben im Überblick folgenden Stand zur Zuckeranalytik:

Bestimmung mit HPLC/IC:

Chromatographische Trennung underivatisierter Zucker:

- (1) NP-(HILIC)-Chromatographie mit Aminophase und isokratischem Wasser/ACN-Eluent mit Zusammensetzung zwischen 15/85 und 30/70 → Nachteil: schlechte Auftrennung der Monosaccharide (Galactose, Glucose); keine großen Optimierungsmöglichkeiten für Trennung; verkürzte Lebensdauer der Aminosäule durch Schiff'sche Basenbildung [46] - [51]
- (2) Ligandenaustauschchromatographie mit Kationenaustauschersäule (Calcium- oder Blei-Form) auf Polymerbasis mit rein wässrigem Eluenten bei höherer Temperatur (60-85°C); gemischter Mechanismus liegt vor (Ligandenaustausch; Größenausschluß; hydrophobe Wechselwirkungen mit Trägermaterial; Ionenausschluß)
→ Nachteil: regelmäßige Regenerierung notwendig; keine großen Optimierungsmöglichkeiten für Trennung [76] - [78]
- (3) Anionenaustauschersäule mit stark alkalischem Eluenten (NaOH; NaCH₃COO ; c = 0,1-0,5 M)
→ Nachteil: Anlage muß für hohe Salzkonzentrationen kompatibel sein (Ionenchromatographie-Gerät (IC) mit Komponenten ausschließlich aus PEEK-Material); Umlagerungsreaktionen von labilen Zuckern bereits auf der Trennsäule möglich [52] - [71], [73]
- (4) Anionenaustauschersäule in Verbindung mit Borat-Puffergradienten (Bildung von Zucker-Borat-Komplexen; neutral-schwach alkalischer Ionenaustausch)
→ Nachteil: Anlage muß für hohe Salzkonzentrationen kompatibel sein (IC-Gerät s.o.); sehr lange Analysenzeiten (ca. 2h) [91]
- (5) LC/MS-Kopplung; massenspektrometrische Detektion durch Elektro-sprayionisation (ESI) mit Alkalisalzadditiven oder mit Nachsäulenaddition von Salzsäure oder mit vorhergehender Derivatisierung [87]
→ Detektionssystem ist anfällig gegenüber Verschmutzungen; kleinerer linear-dynamischer Bereich als z.B. Fluoreszenzdetektor; nur kompatibel mit flüchtigen Puffern (Ausnahme: zwischen Säule und Massenspektrometer zwischengeschaltetes Kationenaustauschersystem → IC/MS-Kopplung möglich, Fa. Dionex) [72][87]

Chromatographische Trennung derivatisierter Zucker

- (6) Vorsäulenderivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit p-Aminobenzoesäure oder p-Aminobenzoesäureestern und Natriumcyanoborhydrid; Auftrennung der Zuckerderivate über Ionenpaarchromatographie (Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumhydrogensulfat TBAHSO₄) mit Gradientenelution Wasser/MeOH [1] - [4]
- (7) Vorsäulenderivatisierung mit FMOC-Hydrazin; Auftrennung der Zuckerderivate über RP-Chromatographie mit ACN/Wasser/CH₃COOH-Eluent [18]

- (8) Vorsäulenderivatisierung mit 2-Aminobenzamid; Auftrennung der Zucker über Anionenaustauschchromatographie
→ Nachteil: lange Analysenzeiten [73]

Detektion underivatisierter Zucker

- (A) UV/VIS-Detektion zwischen 195 und 215 nm möglich
→ Nachteil: unspezifisch; zahlreiche Interferenzen möglich; nur geringe Empfindlichkeit [91]
- (B) Brechungsindex (RI)
→ Nachteil: unspezifisch; stör anfällig (Temperaturkonstanz); zahlreiche Interferenzen möglich; lange Anlaufzeit (ca. 24 h); geringe Empfindlichkeit; keine Gradientenelution möglich
- (C) Gepulst Amperometrische Detektion (PAD) mit Gold-Elektrode
Nachteil: stör anfällig (Verschmutzungen der Elektrode; elektromagnetische Felder; Spannungsschwankungen); nicht etabliert ; regelmäßiger Austausch der Pt-Referenzelektrode notwendig (ca. halbjährlich); sehr reine Lösungsmittel/Puffer notwendig [52] - [71], [74][75]
- (D) Lichtstreuendetektor (ELSD) oder (CAD)
→ Nachteil: unspezifisch, keine/schlechte Detektion von kleinen und leichtflüchtigen Molekülen ($M < 250$ g/mol) möglich, sehr reine Lösungsmittel notwendig, nicht-flüchtige Puffer nicht verwendbar; anfällig gegenüber Schwankungen der Umgebung (Druck, Temperatur), nicht etabliert, keine lineare Kalibrationsfunktion; weniger empfindlich als PAD [79] - [81]
- (E) Massenspektrometer (MS)
→ Nachteil: hohe Anschaffungskosten; höherer Wartungsbedarf; geringere Robustheit wie UV/VIS oder Fluoreszenz-Detektor

Detektion derivatisierter Zucker

- (F) Bicinchoninmethode; Nachsäulenderivatisierung mit Kupfersulfat, Asparagin- und Bicinchoninsäure; Absorptionsmaximum bei 570 nm [91]
- (G) Vorsäulenderivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit p-Aminobenzoesäure oder p-Aminobenzoesäureestern und Natriumcyanoborhydrid; Fluoreszenzdetektion möglich [1] - [11]
- (H) Vorsäulenderivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit PA (2-Aminopyridin) und Natriumcyanoborhydrid oder mit 2-Aminobenzamid und Boran; Fluoreszenzdetektion möglich [21][71]
- (I) Vorsäulenderivatisierung mit FMOC-Hydrazin (9-Fluorenylmethylchloroformiat); Fluoreszenzdetektion möglich
→ Nachteil: Herstellung von Derivatisierungsreagenz notwendig [18]

- (J) Vorsäulenderivatisierung mit PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) oder PMPMP (1-methoxy)-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone); Absorption bei 245 oder 249 nm [19][20]

Um die geforderte Nachweisgrenze von deutlich kleiner 0,1 Massen-% zu erreichen sind nur die Detektionstechniken Massenspektrometrie, Fluoreszenz, ELSD und PAD geeignet bzw. vielversprechend.

Bestimmung mit GC

Für die Analyse ist eine Derivatisierung (Silylierung, Acetylierung, Methylierung) notwendig um eine ausreichende Flüchtigkeit der Zucker zu erreichen. Die Detektion kann entweder mit Flammenionisation (FID) oder mit der selektiven und empfindlicheren Massenspektrometrie (MS) erfolgen.

→ Nachteil: Im Chromatogramm ergeben sich bei Einsatz der Kapillar-GC auf Grund der Mutarotationsgleichgewichte der Zucker mehrere Peaks pro Zucker; bei Gemischen mehrerer Zucker ist deshalb die Zuordnung der einzelnen Peaks und die Quantifizierung schwierig; eine Verminderung der Peakzahl ist durch die Aldoximethode möglich, diese ist aber mit einem weiteren Derivatisierungsschritt verbunden [22] - [45], [91]

Enzymatische Bestimmungsmethode

Von der Fa. Boehringer entwickelter Test-Kit; ermöglicht in Verbindung mit Automatisierung (Gerät Konelab, Fa. Thermo Electron GmbH) eine NWG von 0,1 Massen-%.

→ Nachteil: hoher Preis der Testkits; weitere Senkung der NWG mit derzeit erhältlichen Testkits nicht möglich [89][90]

Folgende Vorversuche wurden durchgeführt:

- (I) HPLC-Bestimmung mittels Kombination Aminophase (1) und ELSD (D)
→ gewünschte NWG wurde nicht erreicht; laut dem Detektor-Hersteller Fa ERC ist dies auf das starke Säulenbluten der verwendeten Säule (Hersteller Fa. Phenomenex) zurückzuführen
- (II) Bestimmung über Gefrierpunktserniedrigung (Kryoskopie)
→ Verfahren nicht geeignet, da Ermittlung eines zuverlässigen Ausgangswerts nicht möglich
- (III) HPLC-Bestimmung mittels Ionenpaarchromatographie (5) in Verbindung mit reduktiver Aminierung als Vorsäulenderivatisierung (G).

Als Grundlage für diese Versuche dienten die Veröffentlichungen [1][2][3] aus dem Bereich der Abwasseranalytik. Die beschriebenen Methoden wurden mit Ausnahme der Probenaufbereitung unverändert übernommen. Als Probenaufbereitung wurde die Carrez-Fällung eingesetzt. Der niedrigste gemessene Laktose-Standard von 1 µg/ml (\equiv 0,01 % Laktose in der Probe) ergab mit Fluoreszenz-Detektion ein deutliches Signal für Lactose und Galactose. In den Chromatogrammen von Standards und Proben (Einwaage 1 g) waren jedoch bei dieser Analytkonzentration mehrere naheliegende Störpeaks zu sehen und der Lactosepeak war auf das Tailing des vorher eluierenden, großen Reagenzpeaks aufgesetzt, wodurch die Quantifizierung der Lactose im gewünschten Konzentrationsbereich stark fehlerbehaftet ist.

2 Material und Methoden

Verwendete Geräte

HPLC-Anlage; Fa. Shimadzu

- System Controller SCL-AVP
- Autoinjektor SIL-10ADVP
- Pumpe LC-10ATVP
- Ventilschaltung FCV-10ALVP
- Degasser DGU-14A
- CTO-10ACVP
- UV/VIS-Detektor SPD-10AVP
- Fluoreszenzdetektor RF-10AXL
- Class-VP Agent Software, Vers. 5.0

Leihgerät IC-Anlage; Fa. Metrohm

- IC-Dialysesystem 833
- Autosampler 858
- PAD-Detektor mit integriertem Säulenofen 871 Advanced Bioscan
- IC-Eluent-Degasser 837
- IC-Pumpe 818 mit Pulsationsdämpfer
- IC-Interface 771
- MagIC Net 1.1 Software für Datenaufnahme und -bearbeitung
- IC Net 2.3 Software für Hardwareansteuerung

Leihgerät: Elektrochemischer Detektor ESA Coulochem III; Fa. ERC

Fluoreszenzdetektor Waters 470

GC-Anlage

- Gaschromatograph HP 6890 Serie mit Flammenionisationsdetektor und Split/Splitless-Injektionssystem; Fa. Agilent
- KAS 3-Injektionssystem und MPS 2-Autosampler, Fa. Gerstel
- GC-ChemStation HP H4005A Software

Spektrophotometer U-2000, Hitachi

Rotationsverdampfer Büchi Vakuum System B-179
mit Rotavapor RE 111 und Wasserbad 461

Abdampfapparatur VLM 1VIS; 635.360.220

Waage Mettler Toledo PG 503

Analysenwaage Mettler AX 504

Ultraschallbad Elma Transsonic TP 670H 230V

Vakuumentrockenschrank Heraeus Instruments VTR 5036
mit Öldrehschieberpumpe AEG AMEB90S4R3

Zentrifuge Hettich Rotixa 50 RS

IKA MS2 Minischüttelgerät

Reinstwasseranlage ELGA Purelab Ultra

Gilson pipetman, 20-100 µl Kolbenhubpipette
 Gilson pipetman, 200-1000 µl Kolbenhubpipette
 Gilson pipetman, 20 µl Kolbenhubpipette
 Eppendorf Reference, 2,5 ml Kolbenhubpipette
 Eppendorf Reference, 1000 µl Kolbenhubpipette
 Eppendorf Reference, 200 µl Kolbenhubpipette
 Eppendorf Reference, 100 µl Kolbenhubpipette
 Eppendorf Reference, 50 µl Kolbenhubpipette
 Fortuna Optifix Universal Dispensette 10 ml

Verwendete Chemikalien und VerbrauchsmaterialienChemikalien

- Acetonitril, optigrade für die HPLC, Promochem
- 1-Aminopyren, purum, ≥ 98,0 %, Fluka
- 4-Aminobenzoessäure, ≥ 99 %, Fluka

- 4-Aminobenzoessäurebutylester, purum, $\geq 98,0$ %, Fluka
- 4-Aminobenzoessäureethylester, purum, $\geq 99,0$ %, Fluka
- 4-Aminobenzoessäuremethylester, purum, ≥ 98 %, Fluka
- 4-Aminobenzoessäurepropylester, 98 %, ABCR GmbH & Co. KG
- 2-Aminopyridin, purum, $\geq 98,0$ %, Fluka
- Ammoniumhydroxid-Lösung ca. 25 %, puriss. p.a., Fluka
- Benzylamin, puriss. p.a., Fluka
- tert.-Butylmethylether, LiChrosolv, Merck
- Chlortrimethylsilan für die GC, Merck
- Dichlormethan, nanograde, Mallinckrodt
- Dimethylsulfoxid, p.a., Merck
- Dimethylsulfoxid, Chromasolv, Sigma-Aldrich
- Enzymatiktestkit Lactose/D-Glucose, R-Biopharm
- Essigsäure, reinst, 96 %, Merck
- Essigsäure 99,5 %, Fluka
- Ethanol, p.a., Merck
- D(-)-Fructose, ultra, $\geq 99,5$ %, Fluka
- D(+)-Galactose, ultra, $\geq 99,5$ %, Fluka
- D(+)-Glucose, wasserfrei, ultra, $\geq 99,5$ %, Fluka
- Glucoseoxidase rec. Iyo. 20 KU/643 mg Iyo.; Roche Diagnostics
- n-Heptan, picograde für die Rückstandsanalyse, Promochem
- Hexamethyldisilazan, puriss. p.a. für GC, Fluka
- Hydroxylaminhydrochlorid, puriss. p.a. ACS, ≥ 99 %, Fluka
- Kaliumhexacyanoferrat(II)trihydrat, puriss. p.a., RdH
- Kaliumdihydrogenphosphat, p.a., Merck
- di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, reinst, Merck
- Katalase-Suspension, Roche Diagnostics
- D(+)-Lactose-Monohydrat, ultra, $\geq 99,5$ %, Fluka
- Lactulose, purum, ≥ 98 %, Fluka
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p.a., Merck
- D(+)-Maltose-Monohydrat, ≥ 99 %, Fluka
- D(+)-Mannose für Mikrobiologie, Fluka
- Methanol für Luminiszenz, Fluka
- Methanol, optigrade für die HPLC, Promochem
- N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorbutyramid, techn., ≥ 90 %, Fluka
- N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid, Macherey-Nagel
- Natriumchlorid, puriss. p.a., RdH
- Natriumcyanoborhydrid, purum, $\geq 95,0$ %, Fluka
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.a., Merck
- Natriumhydroxid-Lösung, 50 %, puriss. p.a. für HPLC, Fluka
- Natriumhydroxid-Plätzchen, p.a., Merck
- Natriumtriacetoxyborhydrid 95 %, Aldrich
- Octanol-1, rein, Dinkelberg
- Petroleumbenzin Siedebereich 40-60°C, suprasolv, Merck
- ortho-Phosphorsäure, 85 %, puriss. p.a., Fluka
- Phosphorwolframsäure-Hydrat, puriss, p.a., Fluka
- 2-Propanol, p.a., Merck
- Pyridin, getrocknet, p.a., Merck
- Pyridin, puriss., über Molekularsieb, Fluka
- Reinstwasser

- Saccharose, ultra, Fluka
- Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung, puriss., 1,0 M in Wasser, Fluka
- Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung, purum, ~ 55 % in Wasser; Fluka
- Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung, purum, ~ 40 % in Wasser, Fluka
- Tetrahydrofuran, puriss. p.a., stabilisiert, RdH
- Toluol zur Rückstandsanalyse, Promochem
- Triethanolaminhydrochlorid, kristallisiert, Boehringer Mannheim
- Triethylamin, Ultra, Fluka
- Trifluoressigsäure für UV-Spektroskopie, ≥ 99,0 %, Fluka
- n-Trimethylsilylimidazol, 99,5 %, Supelco
- Wasserstoffperoxid, p.a., 30 %, Merck
- Xylose, Microselect, ≥ 99 %, Fluka
- Zinksulfat-Heptahydrat, p.a., RdH

Verbrauchsmaterial

- Sartorius Sartolon Polyamid-Membranfilter, 0,2 µm
- Whatman, Schleicher&Schuell Polycarbonat-Membranfilter, 0,2 µm
- Whatman Celtron 30, Cellulose-Spritzenvorsatzfilter mit Glasfaservorfilter, 0,2 µm
- Millipore Millex GV₄ PVDF-Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm
- Sartorius Centrisart 132 29 (5 kDa; Cellulosetriacetat) Ultrafiltrations-einheiten
- Sartorius Vivaspin 2 Ultrafiltration (5 kDa; Polyethersulfon) Ultrafiltrations-einheiten
- BD Discardit II Einwegspritzen, 10 ml
- Macherey-Nagel 615¹/₄, 185 mm Faltenfilter
- Macherey-Nagel 651¹/₄, 185 mm Faltenfilter
- Ratiolab Makro Einmalküvetten (10 x 10 x 45 mm)
- R-Biopharm Rührstäbchen
- Eppendorf epT.I.P.S. Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl und 2500 µl
- Plastibrand Einmalpasteurpipetten 1ml
- Merck Indikatorteststäbchen Acilit, Neutralit; Alkalit
- SPE-Säulen: Strata-X 30 mg/1 ml
 - Strata-X 100 mg/6 ml
 - Strata-X 200 mg/3 ml
 - Strata-X LC 200 mg/3 ml
 - Strata-X-C 30 mg/1 ml
 - Strata-X-C 200 mg/3 ml
 - Strata-X-C 500 mg/3 ml
 - Strata NH2 500 mg/3 ml
 - Separtis Isolute SCX2 500 mg/3 ml
 - Separtis Isolute SAX 500 mg/3 ml

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 HPLC nach reduktiver Aminierung

3.1.1.1 Ionenpaarchromatographie

3.1.1.1.1 Gradientenelution mit Phosphat-Puffer/Methanol

Als Grundlage für die Derivatisierungsversuche und die HPLC dienten drei 2001 und 2003 erschienene Veröffentlichungen [1][2][3]. Die Derivatisierungsmethode wurde daraus übernommen und erfolgte mit p-Aminobenzoesäure (p-Amba) durch reduktive Aminierung.

Derivatisierungsprotokoll:

1 ml Standard-/Probelösung
+ 2,5 ml Reagenzlösung (p-Amba) 0,35 M in DMSO/Essigsäure, konz. (70/30)
gelöst
+ ca. 10 mg Natriumcyanoborhydrid

Umsetzung bei 60°C 15 Minuten

Für die Trennungsoptimierung der HPLC-Methode wurden höher konzentrierte Standardlösungen von Lactose, Galactose und Glucose verwendet.

Die in [1][2][3] beschriebene HPLC-Methode wurde bezüglich mehrerer Parameter modifiziert.

Der pH-Wert wurde abweichend von den Veröffentlichungen auf 6,5 eingestellt, da die Carboxylgruppe der p-Amba dissoziiert vorliegen muß, um mit dem verwendeten kationischen Ionenpaarreagenz einen Ionenpaarmechanismus eingehen zu können; die Einstellung auf pH 2,0 in der Originalliteratur ist nicht plausibel. Die pK_s -Werte der N-alkylierten p-Ambaderivate liegen bei ca. 2,6-2,7 und 5,0-5,1. Um das Dissoziationsgleichgewicht der Säure möglichst vollständig zu Gunsten der deprotonierten Form zu verschieben und eine stabile, reproduzierbare Retention zu erhalten, ist ein pH-Wert von mindestens 1,5 oder besser 2 Einheiten über dem pK_s -Wert der Säure einzustellen. Gleichzeitig muß die Aminogruppe ungeladen sein, um eine ausreichende Retention der derivatisierten Zucker zu erreichen.

Da Angaben zur Pufferkonzentration in den genannten Veröffentlichungen fehlen, dienten die in der allgemeinen HPLC-Literatur für die Ionenpaarchromatographie empfohlenen Mindestkonzentrationen als Orientierung.

Methodenparameter:

Säule: Synergi Hydro (Fa. Phenomenex); 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min.

Temperatur: 35°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Phosphat-Puffer 30 mM; pH 6,5, 20 mM TBAHSO₄

Eluent B: 50 % Phosphat-Puffer 60 mM, pH 6,5 + 50 % Methanol; 20 mM TBAHSO₄

Gradientenprogramm: Start: 0 % B, 1 Minute isokratisch
anschließend mit 1 % B/min auf 100 % B
anschließend 0 % B, 20 min isokratisch (Equilibrieren)

Detektion: Fluoreszenz λ_{ex} : 313 nm, λ_{em} : 358 nm
UV: λ : 303 nm

Die ersten Versuche mit o.g. Eluentenmischung erbrachten im Vergleich zu der beschriebenen Elutionsreihenfolge p-Amba, Lactose, Glucose, Galactose eine Elutionsumkehr in der Reihenfolge Lactose, Glucose, Galactose und p-Amba-Reagenz mit einem Retentionszeitunterschied zwischen Lactose und Glucose von über 3 Minuten und einer annähernden Basislinientrennung des Glucose- und Galactosepeaks (Abbildung 1). Diese Auftrennung erwies sich jedoch als nicht reproduzierbar. Bei Ansetzen frischer Eluenten, unter Beibehaltung aller Parameter, traten größere Retentionszeitschwankungen (zwischen 1-2 min) auf.

Daraufhin wurden verschiedene Einflußgrößen variiert (pH-Wert, Temperatur, Gradient, Ionenpaarkonzentration, org. Lösungsmittel). Die Herstellung der verschiedenen Eluenten erfolgte stets in der gleichen Weise unter Berücksichtigung gleicher Ionenpaar- und Phosphatpufferkonzentrationen in beiden Eluenten.

Die TBAHSO₄-Konzentration wurde auf Grund von Angaben in der allgemeinen HPLC-Literatur auf 10 mM herabgesetzt. Eine vergleichbare Retention und Auftrennung, wie bei 20mM TBAHSO₄-Lösung, konnte mit dieser Konzentration nur bei deutlich niedrigerer Temperatur von 25°C erreicht werden.

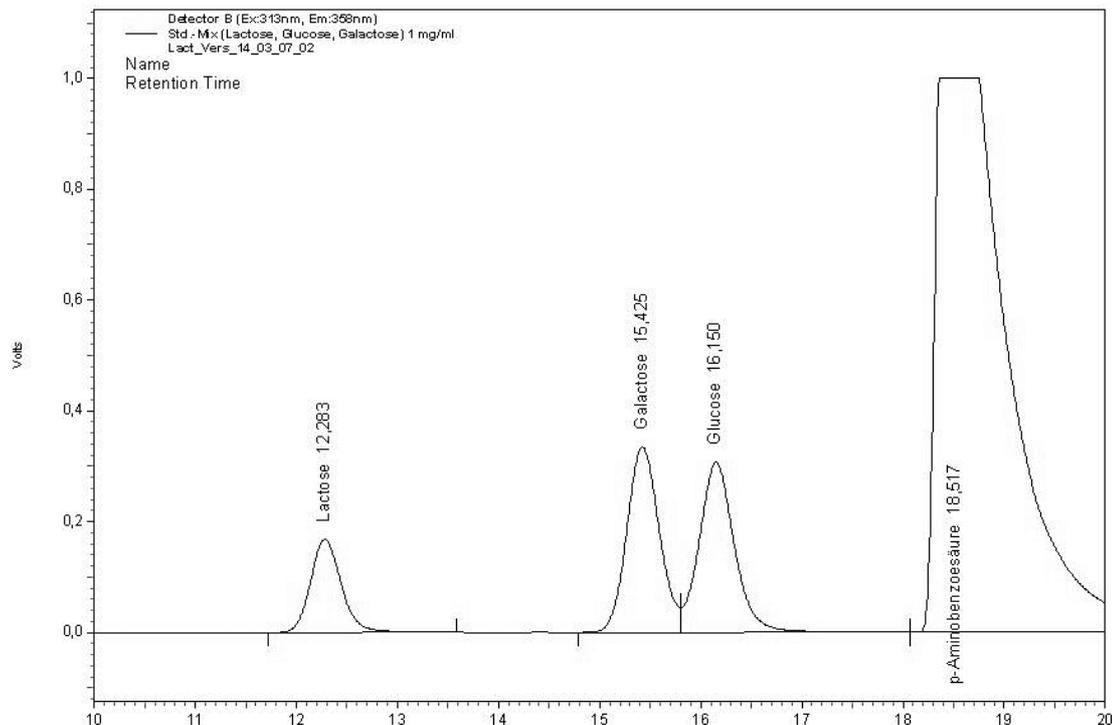


Abbildung 1: Ionenpaarchromatographie einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml, mit Phosphat-Puffer/Methanol-Gradient

3.1.1.1.2 Gradientenelution mit Phosphat-Puffer/Acetonitril

Da Acetonitril gegenüber Methanol den Vorteil einer geringeren pH-Wert-Verschiebung mit Mischungen aus Wasser und einer stärkeren Elutionskraft besitzt und damit die Einstellung eines höheren pH-Wertes und die Verwendung höherer Pufferkonzentrationen erlaubt, wurden Versuche mit verschiedenen Acetonitril/Phosphatpuffermischungen durchgeführt. Trotz der wesentlich geringeren Konzentration an org. Lösungsmittel eluieren die Substanzen deutlich früher als mit Methanol, die Selektivität ist stark herabgesetzt, der Retentionszeitabstand zwischen Lactose und Glucose beträgt weniger als eine Minute, die Glucose und Galactose-Peaks sind nur angetrennt oder fallen zusammen (Abbildung 2). Änderungen in der Temperatur zeigen kaum Unterschiede im Retentionsverhalten.

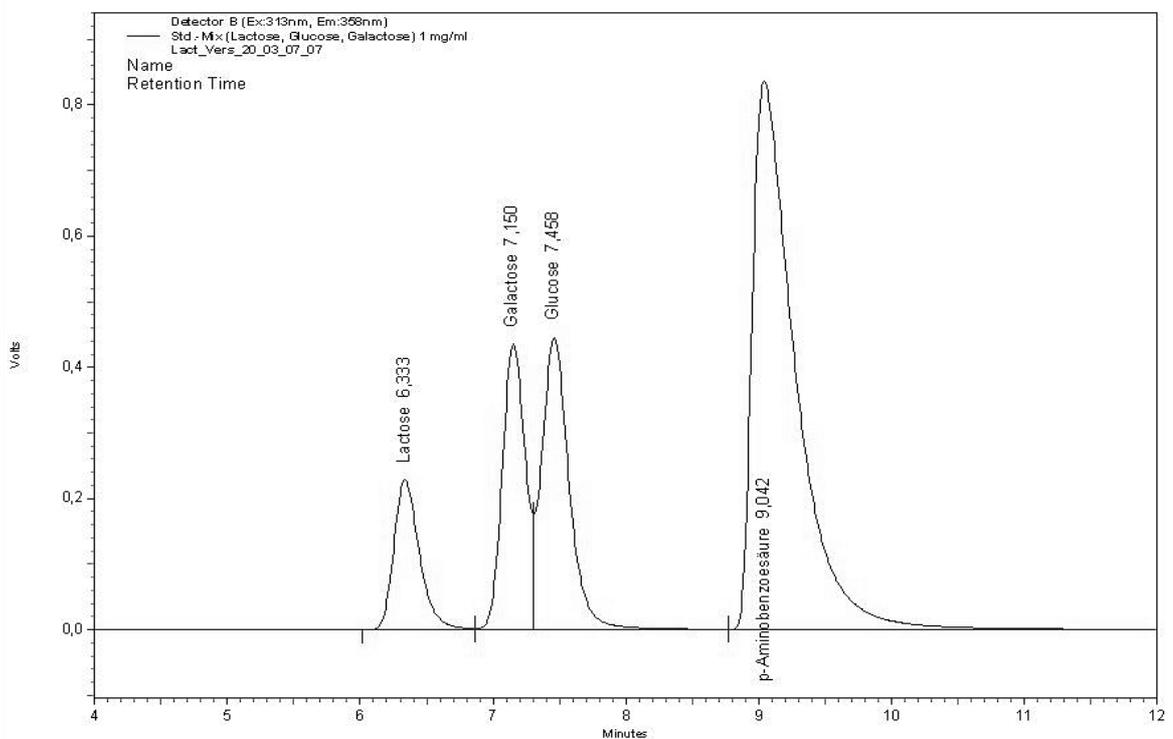


Abbildung 2: Ionenpaarchromatographie einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml, mit Phosphat-Puffer/Acetonitril-Gradient

3.1.1.1.3 Isokratische Elution mit Phosphat-Puffer/Methanol, Phosphat-Puffer/Acetonitril und rein wässrigem Eluenten

Es wurden mehrere Versuche mit isokratischem Laufmittel mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten durchgeführt.

Mit rein wässrigem Eluenten wurde eine Retentionszeitdifferenz Lactose/Glucose von max. 0,6-0,7 min erreicht und eine unterschiedlich starke Aufspaltung der Glucose-/Galactose-Peaks. Bei Zugabe von organischem Lösungsmittel nimmt die Retention und Auflösung drastisch ab. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration und des pH-Werts verschlechtert ebenfalls die Selektivität und Retention, wobei bezüglich des pH-Wertes nach der Theorie der entgegengesetzte Effekt eintreten müsste.

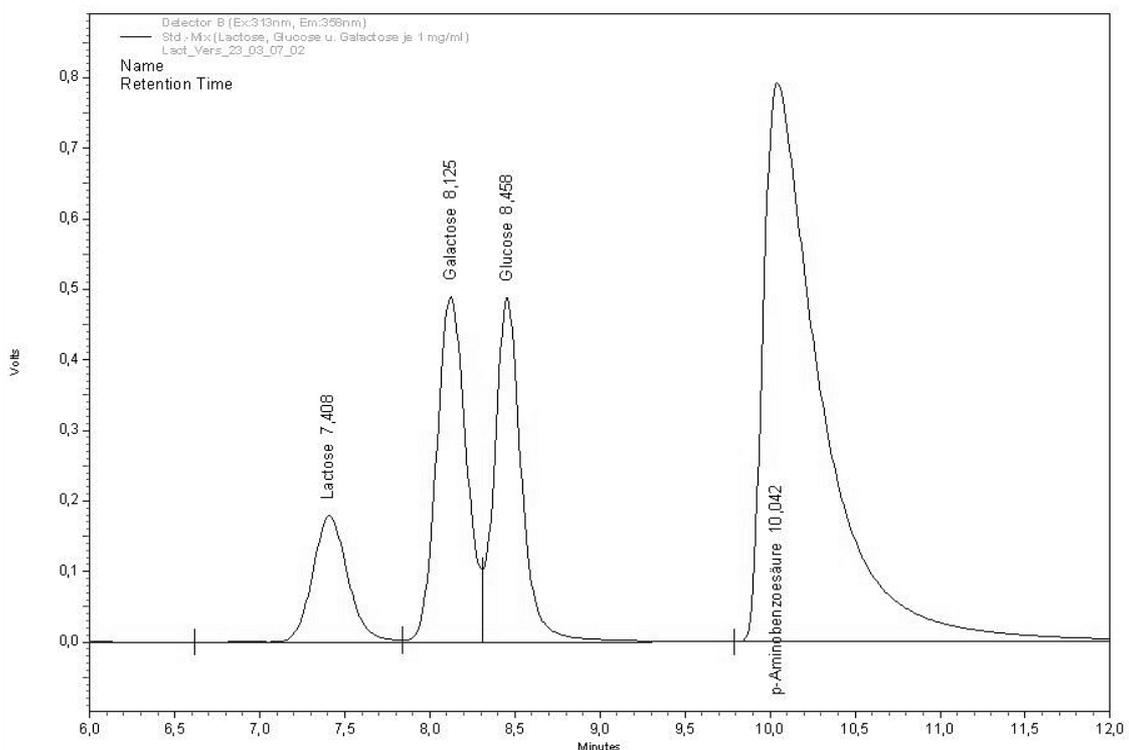


Abbildung 3: Ionenpaarchromatographie einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml, isokratische Elution mit Phosphat-Puffer

Zusammenfassend konnte nach 3.1.1.1 bis 3.1.1.3 keine Methode mit zufriedenstellender Robustheit und Auftrennung entwickelt werden. Es war nicht möglich, reproduzierbare Läufe mit stabilen Retentionszeiten zu erhalten. Die Ionenpaarchromatographie wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Wie sich in späteren, ergänzenden Versuchen zeigte, ist dieses Phänomen sehr wahrscheinlich auf adsorbierte, stark hydrophobe Proteine in der verwendeten HPLC-Anlage zurückzuführen. Diese unerwünschten Rückstände ließen sich auch durch intensives Spülen und Passivieren der HPLC-Anlage nicht vollständig beseitigen.

3.1.1.2 Reversed-Phase-Chromatographie

3.1.1.2.1 Methodenentwicklung/-optimierung mit Phosphat-Puffer/Acetonitril und Phosphat-Puffer/Methanol

Die Derivatisierung der Zucker erfolgte zuerst über reduktive Aminierung mit p-Aminobenzoesäurepropylester in Anlehnung an die in der Literatur [1][2] beschriebenen optimierten Reaktionsbedingungen.

Derivatisierungsprotokoll:

- 1 ml Standard-/Probelösung
- + 2,5 ml Reagenzlösung (p-Aminobenzoesäurepropylester) 0,1 M in DMSO/
Essigsäure konz., (70/30) gelöst
- + ca. 10 mg Natriumcyanoborhydrid

Umsetzung bei 90°C, 75 Minuten

Versuche mit der Synergi Hydro Säule:

Erste Versuche über RP-Chromatographie mit isokratischer Elution wurden mit einer Säule Synergi Hydro (250 x 4,6 mm, 4 µm) der Fa. Phenomenex durchgeführt. Diese C18-Säule verfügt über ein hydrophiles Endcapping und weist im Vergleich zu anderen Säulen eine erhöhte Stabilität beim Betrieb mit stark oder rein wässrigen Eluenten auf. Laut Herstellerangaben ist sie besonders geeignet für die Auftrennung von stark polaren Verbindungen in 100 % wässriger mobiler Phase. Auf Grund ihres hydrophilen Endcappings besitzt sie eine gesteigerte Selektivität bezüglich hydrophiler Analyten.

Zunächst wurde als mobile Phase ein rein wässriges System mit 20 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 gewählt. Damit konnte keine Elution der Substanzen innerhalb von 30 min erreicht werden.

Die isokratische Elution mit 25% Acetonitrilanteil im Laufmittel ergab für die derivatisierten Zucker Elutionszeiten von 6-9 Minuten und eine Retentionszeitdifferenz Lactose/Glucose+Galactose von über 2 Minuten mit zusammenfallendem Galactose- und Glucose-Peak.

Versuche mit der Synergi Fusion Säule:

Anschließend wurde eine Synergi Fusion-RP-Säule (250 x 4,6 mm, 4 µm), Fa. Phenomenex verwendet. Es handelt sich hierbei um eine polar eingebettete C18-Phase mit mäßiger Hydrophobizität, die im Gegensatz zur Synergi Hydro-Säule den Vorteil einer höheren pH-Wert-Stabilität besitzt.

Das Eluentenprogramm wurde entsprechend abgeändert.

Die Elutionszeiten für die Zuckerderivate betragen zwischen 10-14, für das überschüssige Reagenz knapp 23 Minuten; mit einer Differenz von Lactose/Galactose +Glucose von über 2,5 Minuten; eine Auftrennung der Galactose und Glucose gelang nicht. Die Retentionszeitdifferenzen zwischen Läufen mit neu hergestellten Eluenten lagen unter 0,5 min.

Um die Retentionszeiten zu verkürzen, wurde diese Methode weiter abgeändert. Der Retentionszeitunterschied zwischen Lactose/Galactose+Glucose betrug weiterhin mehr als 2,5 min.

Versuche mit p-Aminobenzoesäure anstelle von p-Aminobenzoesäurepropylester als Derivatisierungsreagenz zeigten einen Retentionseinbruch und Auftrennungsverlust auf Grund der geladenen Carboxylgruppenfunktion.

Die weiteren Versuche zur Methodenoptimierung wurden deshalb wieder mit p-Aminobenzoesäurepropylesterderivaten durchgeführt. Statt bei den aus den Veröffentlichungen übernommenen Detektionswellenlängen wurde bei den bei der Elution gemessenen Absorptions-/Anregungsmaxima (UV/VIS: λ : 306 nm; Fluoreszenz: λ_{ex} : 311 nm λ_{em} : 358 nm) detektiert, um die Empfindlichkeit, Auflösung und Reproduzierbarkeit zu verbessern.

Mehrere Chromatogramme einer Standardmischung mit für lactosefreie Milch realistischen Konzentrationsverhältnissen (Lactose 1 $\mu\text{g/ml}$ \equiv 0,01% Lactose i.d. Probe, Galactose u. Glucose je 250 $\mu\text{g/ml}$ \equiv je 2,5% i.d. Probe) ergaben für den UV/VIS-Detektor einen Lactose-Peak an der Nachweisgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis \approx 3) und für den Fluoreszenzdetektor mit niedriger Empfindlichkeitseinstellung einen Lactose-Peak an der Bestimmungsgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis \approx 10). Ein unter gleichen Bedingungen gemessener Blindwert zeigt beim UV/VIS-Detektor kein über das Basislinienrauschen hinausgehendes Signal; beim Fluoreszenzdetektor ist im Retentionszeitbereich von Lactose ein Signal mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von ca. 2 erkennbar.

Bei einer späteren Derivatisierung mit derselben Standardlösung tauchten zwei weitere Peaks im Retentionszeitbereich von Lactose in der Größenordnung des Lactose-Peaks auf. Diese wurden zunächst auf Verunreinigungen bzw. Nebenreaktionsprodukte auf Grund der Verwendung von Reagenzien geringerer Reinheit (z.B. Essigsäure reinst, ältere Zuckerstandards) und nicht optimierter Derivatisierungsbedingungen (evtl. zu hohe Umsetzungstemperatur) zurückgeführt. Zusätzlich sind größere Retentionszeitschwankungen zu beobachten.

Anschließend wurden Einzelstandards aller in Milchprodukten vorkommenden Zucker (Lactose, Lactulose, Saccharose, Galactose, Glucose, Fructose je 1 mg/ml), derivatisiert. Auf die Untersuchung von Maltose wurde verzichtet, da für Milchprodukte Maltose als Süßungsmittel unüblich ist. Der Blindwert, der in dieser Sequenz mituntersucht wurde, zeigt im UV/VIS keinen, aber beim Fluoreszenzdetektor einen Peak im Retentionszeitbereich von Lactose mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 4-5, und ist für den eingesetzten Konzentrationsbereich der Standards von 1 mg/ml vernachlässigbar. Für vergleichende Flächen-%-Berechnungen wurden die Werte der UV/VIS-Detektion verwendet.

Lactose scheint bei den o.g. Derivatisierungsbedingungen stabil zu sein; im Retentionsbereich von Galactose/Glucose sind nur sehr kleine Peaks sichtbar, die auf Nebenprodukte oder Verunreinigungen des Zuckerstandards zurückgeführt wurden, da sie im Blindwert größtenteils nicht zu sehen waren. Der Lactose-Peak besitzt knapp 54- Flächen-% des Galactose- bzw. Glucose-Peaks, was ungefähr dem nach der Stöchiometrie zu erwartenden Wert entspricht.

Im Chromatogramm von Lactulose erscheint ein Peak an der Stelle von Lactose der ungefähr 2 Flächen-% des Lactose-Peaks beträgt. Die zu den reduzierenden Zuckern gehörende Lactulose die mit ihrer Fructose-Einheit diese Reaktion eingehen könnte, scheint damit eine wesentlich geringere Reaktivität als Lactose zu besitzen. Unter Berücksichtigung des i.d. R. sehr geringen Gehalts an Lactulose, ist der durch diese Peaküberlappung bei der Lactosebestimmung entstehende Fehler vernachlässigbar.

Das Saccharose-Chromatogramm zeigt einen Peak im Retentionsbereich von Galactose/Glucose mit ca. 12 Flächen-% des Galactose- bzw. Glucose-Peaks; im Bereich der Lactose ist kein Peak sichtbar. Die Saccharose wird demnach unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu einem deutlichen Teil bereits gespalten.

Die Glucose und Galactose-Peaks besitzen annähernd gleiche Flächenwerte (ca. 0,3 % Abweichung).

Im Chromatogramm von Fructose ist ein Doppel-Peak zu sehen der ca. 0,6- 0,7 Minuten nach Lactose eluiert und ca. 1 Flächen-% des Galactose-/Glucose-Peaks besitzt. Weder im Blindwert noch in den anderen Standards erscheint dieser Peak. Ketosen scheinen somit unter den genannten Reaktionsbedingungen eine wesentlich geringere Umsetzungsrate zu haben als Aldosen. Der Doppelpeak ist nicht schlüssig zu erklären.

Eine zur Überprüfung injizierte Mischung aller verwendeten Einzel-Standards zeigt keinerlei Aufspaltung der Lactose/Lactulose- und des Galactose/Glucose-Peaks.

Methodenparameter des optimierten Programms:

Säule: Synergi Fusion (Fa. Phenomenex); 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min, ab 12 Minuten 1,5 ml/min

Temperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Phosphat-Puffer 30 mM; pH 6,8

Eluent B: 50 % Phosphat-Puffer 60 mM, pH 6,8+ 50 % Acetonitril

Gradientenprogramm: Start: 50 % B, 1 Minute isokratisch

anschließend mit 2 % B/min auf 70 % B

anschließend mit 7,5 % B/min auf 100 % B, 10 Minuten isokratisch

anschließend 50 % B, 15 min isokratisch (Equilibrieren)

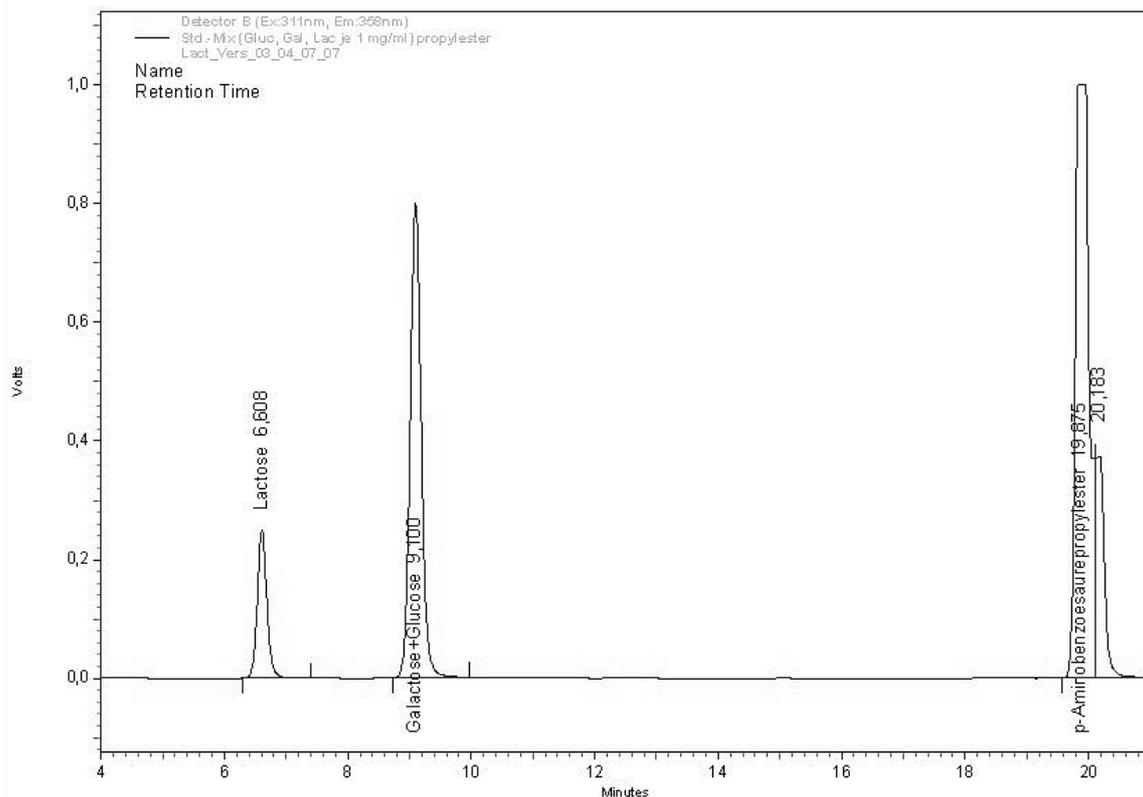


Abbildung 4: RP-Chromatogramm einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml, derivatisiert mit p-Aminobenzoesäurepropylester

3.1.1.2.2 Versuche zur Probenaufbereitung und erste Messung realer Proben

Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung einer lactosefreien Milch und einer lactosehaltigen Milch durchgeführt. Versuche zur Probenaufbereitung/Eiweißfällung wurde zunächst mit 50%igen Ethanol durchgeführt. Bei der Frischmilch war im Vergleich zur UHT-Milch eine deutlich stärkere Fällung zu beobachten. Beim Ausschütteln eines Aliquots des klaren Überstands mit Petrolether bildete sich bei beiden Proben eine gelartige Schicht, die bei der UHT-Milch deutlich stärker ausgeprägt war und auf nicht mitgefällte Peptide zurückzuführen ist. Daraufhin wurde eine Eiweißfällung mittels Lösens in 100%igen Methanol nach [38][40] versucht. Nach mehrstündiger Aufbewahrung der zentrifugierten Lösungen bei 4°C erfolgte jedoch eine Nachfällung. Da eine vollständige Proteinfällung mit dieser Methode auch nach der Reduzierung der Probeneinwaage nicht gewährleistet war, wurde die Probenaufbereitung mittels Carrezlösungen folgendermaßen durchgeführt.

Probenaufbereitungsvorschrift:

- ca. 1 g Probe (Milch) in 100 ml-Meßkolben einwiegen und mit etwas H₂O verdünnen
- je 0,2 ml Carrez-Lösung I (15 g K₄[Fe(CN)₆] x 3 H₂O auf 100 ml H₂O) und Carrez-Lösung II (30 g ZnSO₄ x H₂O auf 100 ml H₂O) hinzugeben und jeweils nach Zugabe gut schütteln und auf 100 ml auffüllen
- bei 3000 U/min zentrifugieren
- 1 ml Aliquot des klaren Überstandes für Derivatisierung verwenden

Auch nach Lagerung der zentrifugierten Lösungen bei 4°C über Nacht war keine Nachfällung erkennbar. Aus dem klaren Überstand wurde 1 ml Aliquot für die Derivatisierung (3.1.1.2.1) eingesetzt.

Ein Blindwert und ein Standard mit Lactose, Galactose und Glucose wurden mitangesetzt.

Für vergleichende Flächen-%-Berechnungen wurden die Werte des Fluoreszenz-Chromatogramms verwendet.

Sowohl im UV/VIS- als auch im Fluoreszenzchromatogramm des Blindwerts sind Peaks im Bereich der Lactose und des Galactose-/Glucosepeaks in folgender Größenordnung sichtbar:

UV/VIS: Lactose: S/N \approx 2

Galactose/Glucose: S/N \approx 15

Fluoreszenz: Lactose: S/N \approx 2 \rightarrow ca. 7 Flächen-% des Lactosepeaks der lactosefreien Milch

Galactose/Glucose: S/N \approx 4-5 \rightarrow ca. 35 Flächen-% des Galactose-/Glucose-Peaks der lactosehaltigen Milch

S/N = Signal-Rausch-Verhältnis

Verhältnis Lactose zu Galactose-/Glucose in lactosefreier Milch: ca. 1:150

Verhältnis Lactose zu Galactose-/Glucose in lactosehaltiger Milch: ca. 100:1

Im Chromatogramm der lactosefreien Milch überlappt der Lactose-Peak mit einer weiteren Substanz; in beiden Chromatogrammen ist eine Schulter sichtbar. Da eine genaue Zuordnung nicht möglich war wurde der Peak nicht gesplittet und für die Berechnungen die Gesamtfläche verwendet. Analog wurde mit dem Galactose-/Glucosepeak der lactosehaltigen Milch verfahren.

3.1.1.2.3 Modifizierungen der bestehenden Derivatisierungsmethode zur Reaktions- und Trennungsoptimierung

Angestrebt waren der Ersatz von DMSO als Lösungsmittel und möglichst milde Reaktionsbedingungen für die Derivatisierung um:

- die Angleichung des Reaktionslösungsmittels mit dem verwendeten Elutionsmittel in der HPLC zu erreichen, und so mögliche Störeinflüsse des chromatographischen Gleichgewichts durch das starke Lösungsmittel DMSO auszuschalten
- eine Ausbeuteerhöhung zu erreichen
- evtl. Nebenreaktionen (s. Punkt 3.1.1.2.1 und 3.1.1.2.2) und eine Spaltung der Lactose während der Reaktion vollständig auszuschließen.
- eine einheitliche Probenaufarbeitung für die HPLC und GC zu erhalten

Als Ersatz für DMSO wurde das in der Literatur [4] - [15], [21] für die reduktive Aminierung von Aldehyden und Ketonen mit Natriumcyanoborhydrid am häufigsten eingesetzte Methanol gewählt. Die Reagenzkonzentration wurde erhöht, um eine maximale Umsetzung zu erzielen. Die Derivatisierungstemperatur wurde herabgesetzt, um milde Reaktionsbedingungen zu erhalten und mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden. Zum Ausgleich wurde die Umsetzungsdauer erhöht. Eine neue Derivatisierungsvorschrift wurde erstellt.

Neues Derivatisierungsprotokoll:

1 ml Standard-/Probelösung
+ 3,5 ml methanolische 0,5 M Reagenzlösung (p-Aminobenzoessäureethylester)
+ 0,5 ml Essigsäure, konz.
+ ca. 10 mg Natriumcyanoborhydrid

Umsetzung zwei Stunden bei 50°C

Als Derivatisierungsreagenz wurden p-Ambamethyl-, ethyl-, propyl- und butylester eingesetzt und ihre Zuckerderivate bezüglich ihres Retentionsverhaltens und ihrer Auftrennung miteinander verglichen. Da das überschüssige Reagenz bei der Verdünnung mit Eluens ausfiel, musste das Reagenz allerdings durch vorheriges Ausschütteln entfernt werden. Als Extraktionsmittel wurden jeweils Petrolether, Toluol, MTBE und CH_2Cl_2 für die vier verschiedenen Derivatisierungsreagenzien getestet. Jeder Versuch wurde als Doppelbestimmung angesetzt.

Zunächst wurden alle Ansätze bis auf die Methylesterderivate mit der unter 3.1.1.2.1 beschriebenen Gradientenmethode analysiert, um die Retentionszeiten miteinander zu vergleichen und eine geeignete isokratische Methode für alle Derivate zu entwickeln. Für Methylester wurde auf Grund der zu erwartenden wesentlich geringeren Retention ein anderes Gradientenprogramm verwendet.

Um die Ausbeuten der einzelnen Zuckerderivate, kombiniert mit den unterschiedlichen Extraktionen, quantitativ direkt miteinander vergleichen zu können und um die lösungsmittelabhängige Verschiebung der Absorptionswellenlänge aususchalten, wurde anschließend für alle Derivate dieselbe isokratische Methode verwendet.

Petrolether erwies sich als Extraktionsmittel ungeeignet; von keinem der vier Derivatisierungsmittel wurden nennenswerte Mengen in Petrolether gelöst. Bei allen anderen Extraktionsmitteln verbesserte sich mit zunehmender Kettenlänge des Esters die Extraktion des Reagenzüberschusses deutlich. Als bestes Extraktionsmittel für alle Reagenzien erwies sich Dichlormethan. Bei den mit Dichlormethan ausgeschüttelten Butylesteransätzen wurden nur noch sehr geringe Mengen an Reagenz gefunden. Toluol und MTBE zeigten bei den verschiedenen Estern ungefähr gleiche Mengen an verbliebenem Reagenz.

Beim Lactose-Peak zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen.

In den Chromatogrammen erscheinen sowohl die Peaks der Derivate als auch der Derivatisierungsmittel teilweise als Doppelpicks, was vermutlich mit der unzurei-

chenden Pufferung /Neutralisation der injizierten Lösungen zusammenhängt, da bei späteren Versuchen mit ausreichender Pufferung dieser Effekt nicht mehr beobachtet wurde.

Dichlormethan stellte sich als das geeignetste Extraktionsmittel heraus. In Kombination mit der Derivatisierung als p-Ambapropylester wären die besten Ausbeuten an Zuckerderivaten zu erwarten.

Toluol besitzt den Nachteil in der praktischen Handhabung, dass sich auch nach Zentrifugation zunächst keine vollständige Phasentrennung einstellt. Die erhaltenen Lösungen waren stets trüb und wurden erst nach Stehenlassen über Nacht klar, was auf eine Emulsionsbildung schließen lässt.

Bei MTBE ist eine Verschiebung der Phasengrenze zu beobachten, die wahrscheinlich auf das Herausschleppen von Methanol zurückzuführen ist.

Auf Grund seiner negativen Umwelteigenschaften wurde trotz seiner eindeutigen Vorteile auf Dichlormethan verzichtet und MTBE für die weiteren Versuche eingesetzt, da es gegenüber Toluol den Vorteil einer raschen Phasentrennung bietet, leichtflüchtig ist und damit gut abtrennbar.

Als Derivatisierungsreagenz wurde p-Ambabutylester gewählt, da die entsprechenden Zuckerderivate mit Abstand die höchste Retention aufweisen, somit die größte Selektivität erreicht wird und der Reagenzüberschuß am leichtesten zu entfernen ist.

Zum Vergleich der beiden Derivatisierungsmethoden wurde eine Fructose-Standard (1 mg/ml) mit dem aus der Literatur [1][2] übernommenen Derivatisierungsprotokoll (siehe 3.1.1.2.1) und mit der neuentwickelten Methode jeweils als Doppelbestimmung umgesetzt. Die Derivatisierung erfolgte mit p-Ambabutylester, als HPLC-Methode wurde die für Propylesterderivate optimierte Methode verwendet (3.1.1.2.1). Mit der neuen Methode wurde ein ca. vierfach höherer Umsatz erzielt, die Fructosederivate erschienen ebenfalls als Doppelpeak im Chromatogramm.

Um ein Ausfällen des Reagenz und die damit erforderliche Extraktion zu vermeiden, wurde bei den weiteren Versuchen statt einer 0,5 M eine 0,1 M p-Ambabutylesterlösung eingesetzt und die Reaktionslösung nach der Umsetzung direkt mit einer 50/50-Mischung aus Eluent A und Eluent B verdünnt und injiziert. Die HPLC-Methode wurde zur Verkürzung der Analysenzeiten weiter abgeändert:

Methodenparameter des optimierten Programms:

Säule: Synergi Fusion (Fa. Phenomenex); 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min

Temperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Phosphat-Puffer 30 mM; pH 6,8

Eluent B: 50 % Phosphat-Puffer pH 6,8 + 50 % Acetonitril

Gradientenprogramm: Start: 60 % B, 1 Minute isokratisch

anschließend mit 2 % B/min auf 80 % B

anschließend mit 10 % B/min auf 100 % B, 7 Minuten isokratisch

anschließend 60 % B, 16 min isokratisch (Equilibrieren)

Ein Standard mit 1 µg/ml Lactose (\equiv 0,01 % in der Probe) und je 500 µg/ml Galactose und Glucose (\equiv 5 % in der Probe) wurde unter Annahme der als maximal zu erwartenden ungünstigsten Konzentrationsverhältnisse angesetzt und untersucht. Auf Grund der in den Derivatisierungsversuchen gemessenen Retentionszeiten wurde ein Retentionszeitunterschied von Lactose und Galactose/Glucose zwischen 2-2,5 Minuten erwartet. In der Doppelbestimmung eluierten im Retentionszeitbereich von Lactose mehrere Peaks in der Größenordnung des Lactosepeaks, so dass eine genaue Zuordnung des Lactospeaks nicht möglich war. Es wurde vermutet, dass diese aus der Verunreinigung der verwendeten Chemikalien (Verunreinigung des Derivatisierungsreagenzes mit o-, m-Isomeren oder mit Propyl-/Pentylester) stammen könnten.

3.1.1.2.4 Kalibration der entwickelten Methode und Übersichtsmessung einer realen Probe

Da die verwendete Phenomenex Synergi Fusion-Säule durch ausgefallenen Phosphat-Puffer unbrauchbar geworden war, mußte für die nachfolgenden HPLC-Versuche auf die Phenomenex Synergi Hydro-Säule ausgewichen werden. Die unter 3.1.1.2.3 optimierte HPLC-Methode wurde für die Synergi Hydro-Säule angepasst, indem mit 40 % statt 60 % Eluent B gestartet wurde.

Methodenparameter des angepaßten Programms:

Säule: Synergi Hydro (Fa. Phenomenex); 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min

Temperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Phosphat-Puffer 30 mM; pH 6,8

Eluent B: 50 % Phosphat-Puffer pH 6,8 + 50 % Acetonitril

Gradientenprogramm: Start: 40 % B, 1 Minute isokratisch

anschließend mit 2 % B/min auf 80 % B

anschließend mit 10 % B/min auf 100 % B, 7 Minuten isokratisch

anschließend 60 % B, 16 min isokratisch (Equilibrieren)

Es wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung mit externen Standards und eine Blindwertmessung durchgeführt.

Der Lactosegehalt einer Frischmilchprobe (3,8% Fett) wurde in einer Doppelbestimmung ermittelt.

Standards, Proben und Blindwert wurden nach 3.1.1.2.3 mit 0,1M anstatt 0,5 M methanolischer p-Aminobenzoessäurebutylesterlösung bei 50°C 2 Stunden derivatisiert.

Standardkonzentrationen: 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml Lactose mit jeweils 500 µg/ml Glucose und Galactose angesetzt

Berechneter Korrelationskoeffizient: mit erzwungenem Nullpunkt: 0,999893
ohne erzwungenem Nullpunkt: 0,999964

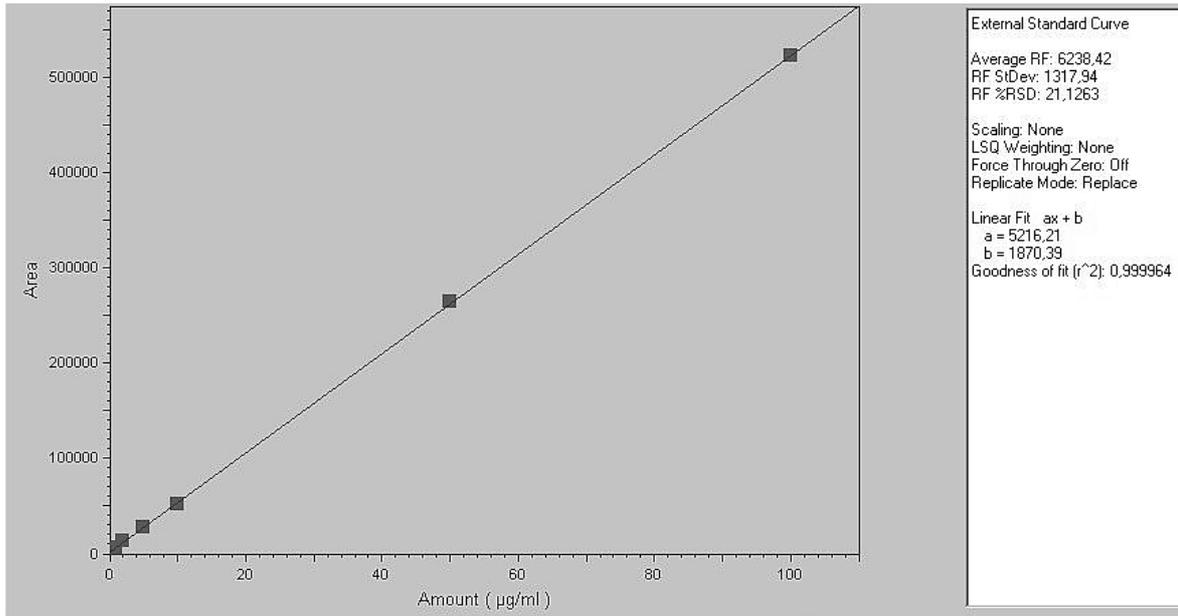


Abbildung 5: Kalibriergerade Lactose ohne erzwungenen Nullpunkt

Die Probenaufbereitung erfolgte nach der unter 3.1.1.2.2 beschriebenen Methode mittels Carrez-Fällung. Die angesetzten Standard- und Blindwertlösungen wurden analog zur Probelösung ebenfalls mit Carrez-Lösung behandelt. Für die Derivatisierung wurde jeweils 1 ml Aliquot der zentrifugierten Lösung eingesetzt. Die derivatisierte Probelösung wurde für die Analyse 1:50 mit Eluent verdünnt.

Ermittelter Lactose-Gehalt der Probe in Doppelbestimmung: a) 4,70%
 b) 4,46%

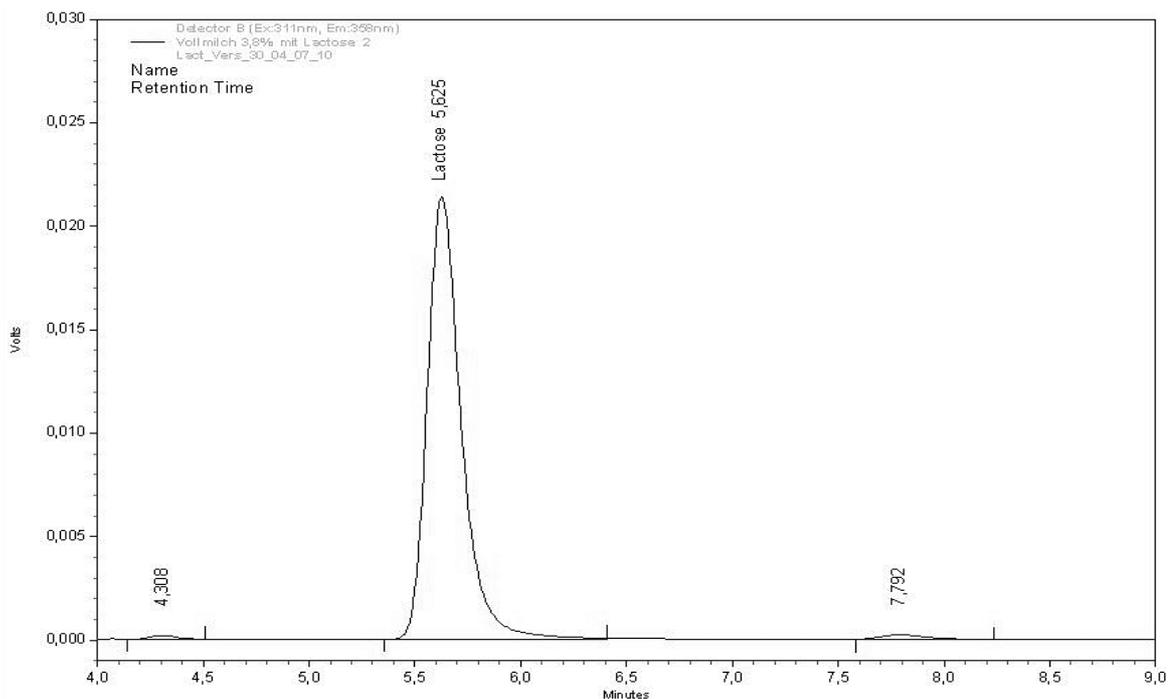


Abbildung 6: RP-Chromatogramm einer Vollmilchprobe 3,8%, past., homog., Derivatisierung mit p-Amba-butylester

Die relativ starke Abweichung der Doppelbestimmung ist auf eine ungenaue Probeneinwaage/-aufbereitung (Probeneinwaage erfolgte nicht auf einer Analysenwaage; Verdünnungsfehler) zurückzuführen.

Im Blindwertchromatogramm (Abbildung 7) tauchen im Bereich des Lactosepeaks keine weiteren Peaks auf. Dies zeigt, dass auch nach Proben mit hohen Lactosegehalten (z.B. Vollmilch) nichts verschleppt wird (sauberer Blindwert).

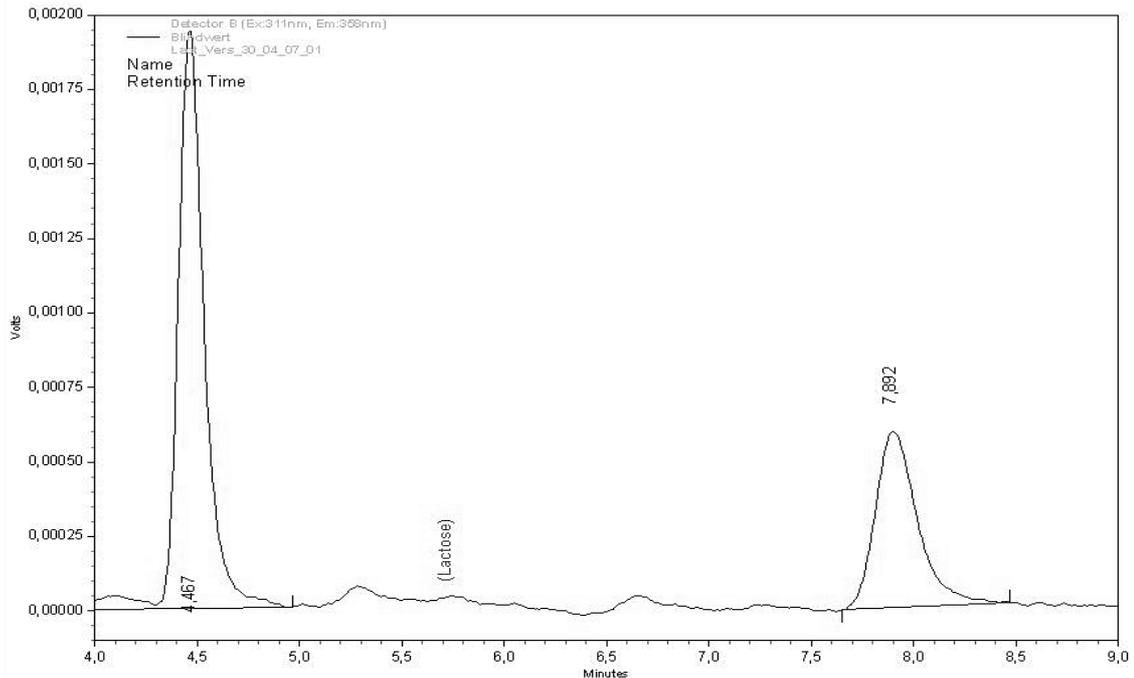


Abbildung 7: RP-Chromatogramm des Blindwerts, Derivatisierung mit p-Amba-butylester

In den Standards hingegen sind links und rechts des Lactosepeaks zwei weitere Peaks in der Größenordnung des niedrigsten Standards (0,5 µg/ml) zu sehen. Der Response dieser Peaks bleibt jedoch bei den verschiedenen Standardchromatogrammen konstant, was gegen eine Verunreinigung mit Isomeren als Ursache spricht.

Mit der Standardkonzentration 0,5 µg/ml wird bei der niedrigsten Empfindlichkeits-einstellung des Fluoreszenzdetektors bereits die Bestimmungsgrenze erreicht.

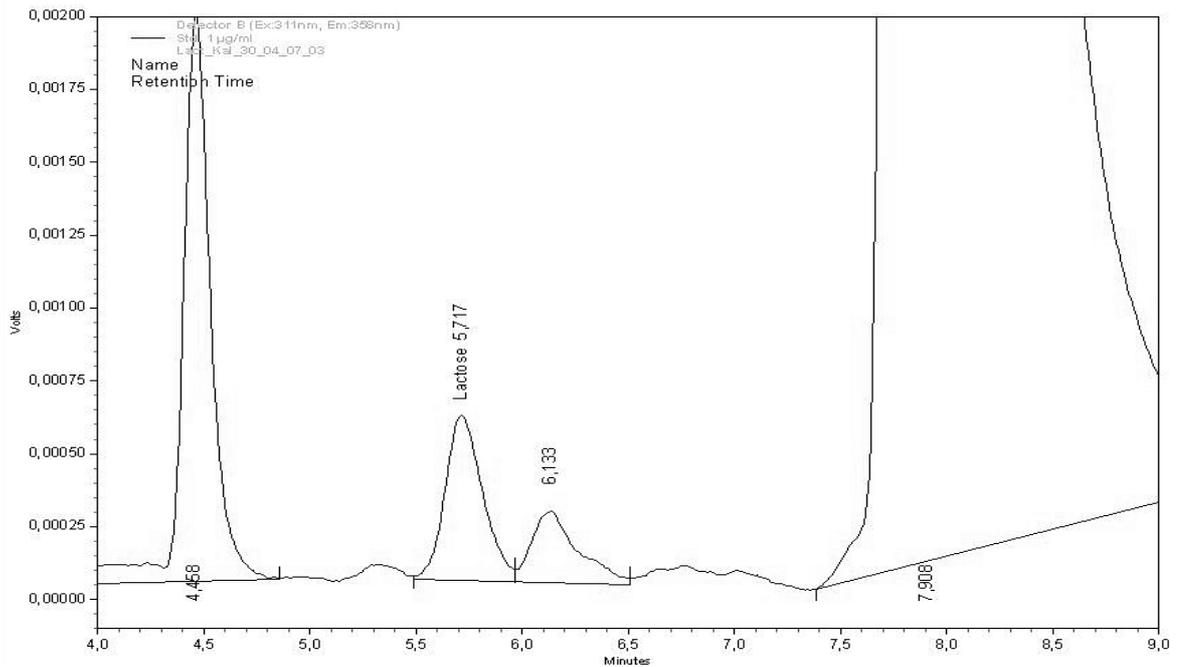


Abbildung 8: RP-Chromatogramm einer Standardlösung Lactose 1 µg/ml, Galactose 500 µg/ml, Glucose 500 µg/ml, Derivatisierung mit p-Amba-butylester

3.1.1.2.5 Entwicklung einer Reversed Phase Methode mit ungepufferten Eluenten

Da durch Zugabe von Puffer die Selektivität des Trennsystems herabgesetzt wird und die Gefahr der Ausfällung auf der Säule bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen besteht, wurde versucht eine Methode mit ungepufferten Eluenten zu entwickeln.

Erste Versuche wurden mit der Synergi Hydro RP-Säule durchgeführt:

Dazu wurden mit der unter 3.1.1.2.3 genannten, optimierten Derivatisierungsmethode jeweils Butylester- und Methylesterderivate einer Standardmischung aus Lactose, Galactose und Glucose (je 1mg/ml) hergestellt. Die Reaktionslösungen wurden nach Umsetzung mit 25%iger Ammoniaklösung neutralisiert.

Für die HPLC-Methodenentwicklung wurden pro Derivat drei verschiedene isokratische Methoden mit unterschiedlicher H₂O/ACN-Zusammensetzung (ACN/H₂O-Verhältnis 80/20; 70/30; 50/50) bei ansonsten gleichen Bedingungen getestet.

Die Methylesterderivate wurden in reinem Wasser, die Butylesterderivate in einer 75/25-H₂O/ACN-Mischung 1:10 verdünnt.

Für die Butylesterderivate ergab sich für eine 70/30-H₂O/ACN-Zusammensetzung eine Retentionszeitdifferenz Lactose/Galactose+Glucose von knapp 3 Minuten.

Für die Methylesterderivate hingegen wurden bei einer 80/20-H₂O/ACN-Mischung der Lactose- und Galactose-/Glucosepeak nur mit knapp 0,9 min Differenz aufgetrennt.

Die weitere Methodenentwicklung wurde auf einer neuen Phenomenex Synergi Fusion-Säule fortgeführt:

Es wurde jeweils eine Methode für p-Ambabutyl- und ethylesterderivate entwickelt. p-Ambaethylester bietet den Vorteil von allen vier Estern der mit Abstand preiswerteste und in höherer Reinheit als der Butylester erhältlich zu sein. Auf Grund des Verzichts auf Pufferzusatz konnte auch mit p-Ambaethylesterderivatisierungen in Verbindung mit isokratischer Arbeitsweise eine ausreichende Selektivität auf der Synergi Fusion-Säule mit gleichzeitig guter Retentionszeitstabilität erreicht werden.

Methode für Ethylesterderivate:

Säule: Synergi Fusion (Fa. Phenomenex), 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min

Temperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Wasser

Eluent B: Acetonitril

Gradientenprogramm: Start: 30 % B, 10 Minuten isokratisch
anschließend mit 13 % B/min auf 95 % B, 5 min
isokratisch
anschließend 30 % B, 20 min isokratisch (Equilibrieren)

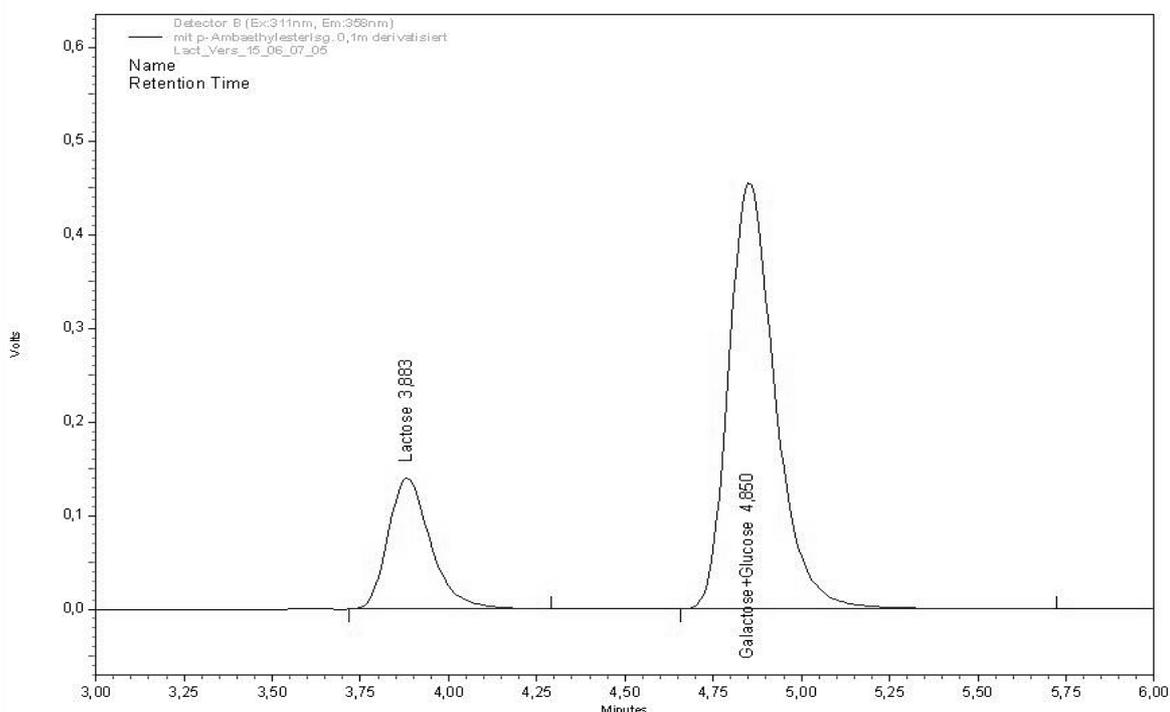


Abbildung 9: RP-Chromatogramm einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml; mit p-Ambaethylester derivatisiert; HPLC-Methode mit ungepufferten Eluenten

Methode für Butylesterderivate:

Säule: Synergi Fusion (Fa. Phenomenex), 250 x 4,6 mm, 4 µm

Fluß: Start: 1 ml/min

Temperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Wasser

Eluent B: Acetonitril

Gradientenprogramm: Start: 50 % B, 10 Minuten isokratisch
anschließend mit 9 % B/min auf 95 % B, 5 min
isokratisch
anschließend 50 % B, 20 min isokratisch (Equilibrieren)

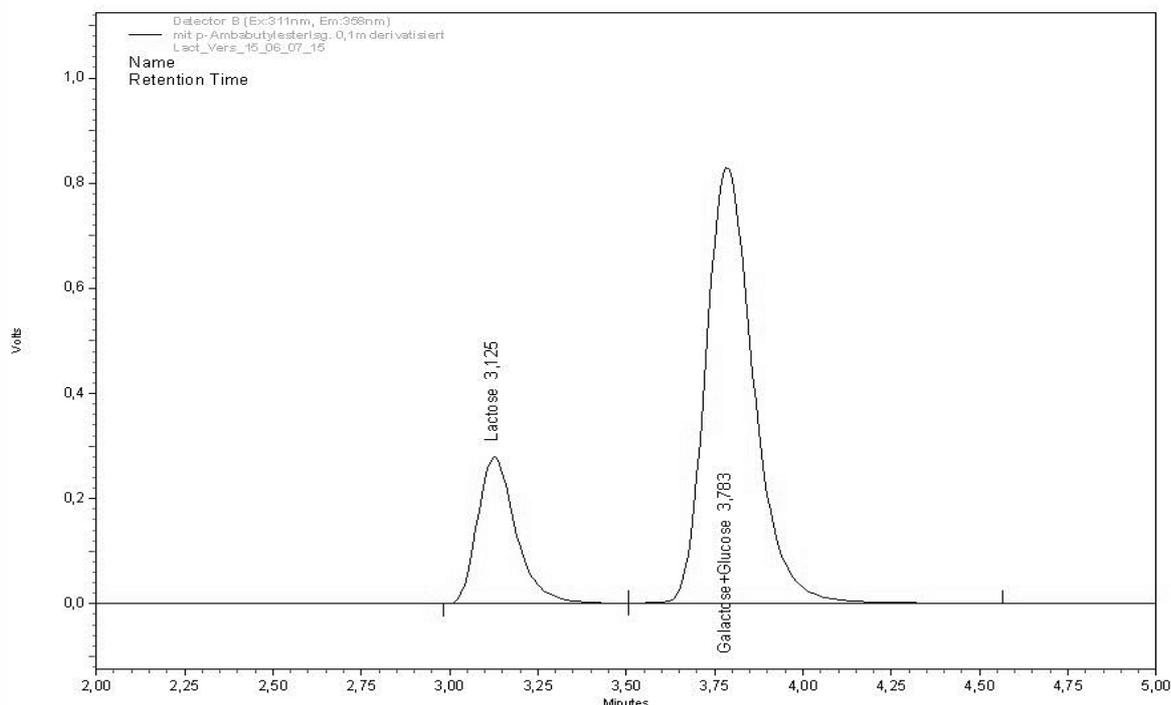


Abbildung 10: RP-Chromatogramm einer Standardlösung Lactose, Galactose, Glucose, Konzentration je 1 mg/ml; mit p-Ambabutylester derivatisiert; HPLC-Methode mit ungepufferten Eluenten

3.1.1.2.6 Weitere Versuche zur Derivatisierungs- und Trennungsoptimierung

Versuche mit Aminopyren:

Ergänzende Versuche zur Derivatisierung wurden mit 1-Aminopyren durchgeführt. Durch Einbringen dieses Chromophors wäre nochmals eine deutliche Absenkung der Nachweisgrenze möglich.

Die Derivatisierung einer Zuckerstandardmischung (Lactose, Galactose, Glucose je 1mg/ml) wurde wie unter 3.1.1.2.3 beschrieben mit 0,1 molarer 1-Aminopyrenlösung durchgeführt. Nach Umsetzung wurde mit 7 ml 2,5%-iger Ammoniaklösung neutralisiert und auf Grund der Wasserunlöslichkeit des Reagenz mit MTBE ausgeschüttelt.

Im Chromatogramm besitzen der Galactose-/Glucose- und Lactosepeak annähernd gleiche Flächen-%-Werte.

Dies zeigt, dass die Galactose-/Glucosederivate im Verhältnis zu den Lactosederivaten auf Grund der geringeren Hydroxylgruppenzahl verstärkt in die organische Phase übergehen. Im Retentionsbereich der Zuckerderivate zeigen sich zusätzlich ebenfalls mehrere kleinere Peaks.

Versuche mit nicht gepuffertem Eluent:

Weiterhin wurde überprüft, ob mit p-Ambamethylesterderivaten in Kombination mit einem ungepufferten Methanol/Wasser-Eluenten auf der Synergi Fusion-Säule eine Antrennung des Galactose- und Glucosepeaks möglich ist, da Methanol gegenüber Acetonitril als Laufmittel eine höhere Selektivität aufweist und, wie unter 3.1.1.2.5 beschrieben, durch Weglassen des Puffers ebenfalls eine Selektivitätserhöhung erreicht wird. Im erhaltenen Chromatogramm zeigte sich jedoch keine Antrennung des Galactose-/Glucosepeaks.

Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Derivatisierungsreagenz:

Ausgehend von den unter 3.1.1.2.3 genannten Derivatisierungsbedingungen (50°C, 2h, Verhältnis Probe-/Reagenzlösung/Essigsäure) wurden zunächst unter Verwendung zweier verschiedener Derivatisierungsreagenzien (p-Ambaethyl- und butylester) mehrere Versuchsreihen mit Zuckerstandardmischungen von Lactose, Glucose und Galactose mit unterschiedlichen Reagenzkonzentrationen (0,01M; 0,05M; 0,1M; 0,15M; 0,2M) angesetzt. Die Bestimmungen erfolgten einmal mit der Phenomenex Synergi Hydro und der Synergi Fusion-Säule. Die Auswertung erfolgte über die gemessenen Flächenprozent (Fluoreszenzdetektion bzw. UV-Detektion) des Lactose- und des Galactose-/Glucose-Peaks.

Für beide Reagenzien und Zucker ergibt sich, wie theoretisch zu erwarten, als Verlauf eine Sättigungskurve, bei der bei allen übereinstimmend ab einer 0,1 molaren Reagenzkonzentration keine weitere nennenswerte Ausbeuteerhöhung zu verzeichnen ist.

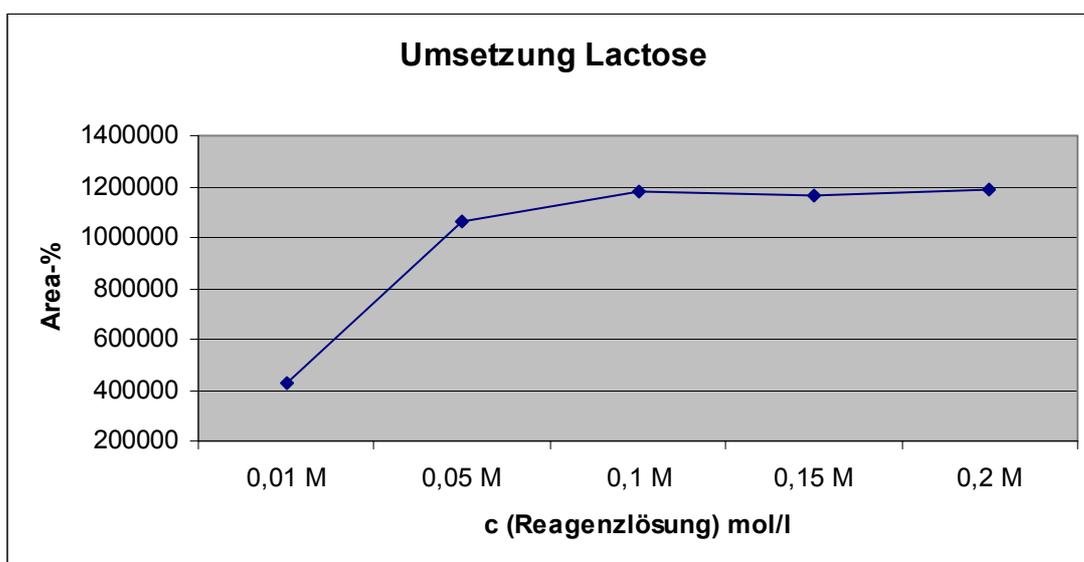


Abbildung 11: Umsetzungsgrad von Lactose mit p-Amba-ethylester in Abhängigkeit von der Reagenzkonzentration

Versuche mit unterschiedlichen Reaktionszeiten:

Anschließend wurden mehrere Versuchsreihen mit ansteigenden Reaktionszeiten bei jeweils 50°C (in 30 min Abständen gemessen) und 80°C (in 15 min und in 5 min Abständen gemessen) unter Verwendung von 0,1 molarer Reagenzlösung (p-Ambaethyl- oder butylester) durchgeführt.

Sowohl für Lactose als auch für Galactose/Glucose ergaben sich nicht reproduzierbare, widersprüchliche Kurvenverläufe.

Fazit:

Die Ergebnisse mit reduktiver Aminierung und anschließender RP-Chromatographie waren nicht zufriedenstellend.

Im Verlauf der Messungen wurden immer wieder Störpeaks beobachtet, die mit fortschreitender Zahl der Injektionen an Größe zunahmten, verbunden mit einer drastischen Verschlechterung der Nachweisgrenze.

Bei einer Überprüfung der Fluoreszenz-Detektionswellenlängen wurde außerdem ein starkes Untergrundspektrum gemessen.

Auf Grund der stabilen Retentionszeiten der Störpeaks musste von einer Kontamination des Probenaufgabesystems und/oder der Leitungen vor der Säule ausgegangen werden. Mehrere Reinigungsläufe/Spülschritte mit verschiedenen Lösungsmitteln brachten keinen Erfolg. Deshalb wurde zunächst von einer Inkompatibilität von Verbindungsstück-/Leitungsmaterial der HPLC-Anlage und des aufgegebenen Reaktionsgemisches im Routinebetrieb/Dauereinsatz ausgegangen. In späteren Versuchen stellten sich allerdings durch die Analytik von eiweißreichen Proben im Injektionssystem adsorbierte, extrem hydrophobe Proteine, die durch die Fluoreszenz-Reagenz wieder gelöst wurden, als Ursache für diese Störungen heraus.

3.1.1.3 Vorversuche für die Gaschromatographie

Die geplanten Versuche mit GC mussten auf Grund eines diagnostizierten Gerätedefekts im September 2007 abgebrochen werden. Die bis dahin erhaltenen Ergebnisse konnten wegen der bereits vorher eingeschränkten Funktionsfähigkeit des GC und der dadurch bedingten Fehlerbehaftung bzw. eingeschränkten Aussagekraft nicht verwertet werden.

Deshalb wurden weitere Versuchsansätze zur Optimierung der Probenderivatisierung mittels reduktiver Aminierung und der für die GC-Analytik erforderlichen nachfolgenden Aufreinigung und Analytanreicherung mit HPLC untersucht. Hierbei war auf die Überführung der Zuckerderivate in für die GC-Analyse geeignete Lösungsmittel zu achten.

Für die Optimierungsversuche wurden sowohl höherkonzentrierte Standards ($c = 1 \text{ mg/ml}$) als auch Proben lactosehaltiger und lactosefreier Milch verwendet.

3.1.1.3.1 Derivatisierung mit Aminopyridin

Da für eine gute Auftrennung der derivatisierten Zucker ein möglichst kleiner anzukoppelnder Molekülrest anzustreben ist, wurden Derivatisierungsversuche mittels reduktiver Aminierung mit 2-Aminopyridin [21] anstelle von p-Aminobenzoe-

säureestern durchgeführt. Die weiteren Derivatisierungsbedingungen wurden aus den vorangegangenen, optimierten Reaktionsansätzen mit p-Ambaestern unverändert übernommen. In den Chromatogrammen waren bis auf den Reagenzpeak keine weiteren Peaks zu erkennen. Das Fehlschlagen der Umsetzung ist wahrscheinlich auf die deutlich höhere Basizität von 2-Aminopyridin im Vergleich zu den p-Ambaestern zurückzuführen.

3.1.1.3.2 Derivatisierung mit Benzylamin und Aufreinigung über SPE

Ein weiterer Versuch mit einem alternativen, möglichst niedermolekularen Reagenz wurde mit Benzylamin durchgeführt. Die unter 3.1.1.2.3 genannten Derivatisierungsbedingungen wurden auf Grund der nachfolgend vorgenommenen Aufreinigung bezüglich der Reagenzienverhältnisse leicht modifiziert. Nach erfolgter Umsetzung wurden die wässrig-methanolischen Reaktionslösungen mit einem kleinem Volumen methanolischer Ammoniaklösung neutralisiert und mit Tetrahydrofuran verdünnt, um eine Retention der Zuckerderivate auf einer polaren Amino-SPE-Phase zu ermöglichen. Die erhaltenen Lösungen wurden über Amino-Silica-SPE-Säulen aufgereinigt und mit Methanol eluiert. Die erhaltenen Eluate wurden mit Wasser verdünnt injiziert. Die Injektionsmenge wurde wegen der fehlenden Fluoreszenz des Benzylamins erhöht, um eine ausreichende Empfindlichkeit für die UV-Detektion zu gewährleisten. Die Detektion erfolgte bei 205 und 254 nm.

In den Chromatogrammen der Proben als auch des Blindwerts war nur ein kleiner Peak mit starkem Fronting sichtbar. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass entweder die Umsetzung auf Grund der höheren Basizität des Benzylamins nicht stattgefunden hatte oder dass keine ausreichende Retention der Zuckerderivate auf der Amino-SPE-Säule vorlag.

3.1.1.3.3 Derivatisierung mit vorhergehendem enzymatischen Abbau der Glucose und Aufreinigung über SPE

Als Alternative zur GC-Analyse wurde die Kombination des vorherigen Glucoseabbaus mit Hilfe eines Enzym-Testkits und der anschließenden reduktiven Aminierung der in der Lösung verbliebenen Zucker (Lactose, Galactose) untersucht. Die vorgeschaltete Abbaureaktion der Glucose würde neben der Laktosebestimmung auch die Bestimmung der Galaktose über einfache RP-Chromatographie mit der beschriebenen Synergi Fusion-Säule ermöglichen. Die Derivatisierung erfolgte mit p-Ambamethylester mit den unter 3.1.1.2.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen. Der enzymatische Abbau und die Derivatisierungsreaktion können idealerweise in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Da vermutet wurde, dass das verwendete Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid eine Kontamination der HPLC-Anlage verursacht und um evtl. Verunreinigungen der Säule durch die verwendeten Enzyme zu vermeiden, wurde vor Injektion eine Aufreinigung der umgesetzten Reaktionslösungen mittels Anionenaustauscher-SPE-Säulen auf Kieselgelbasis mit vorhergehender Verdünnung, Alkalisierung auf pH 12-13 zur Ionisation der Zuckerderivate und nachfolgender Elution mit verdünnter, methanolischer Essigsäure durchgeführt. Die Eluate wurden anschließend neutralisiert und mit HPLC analysiert.

In den Eluaten waren keine Zuckerderivate nachweisbar. Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich die für eine Retention an Anionenaustauschern nicht ausreichende Ionisation der Hydroxylgruppen der Zuckerderivate.

3.1.1.3.4 Derivatisierung mit Natriumcyanoborhydrid und Natriumtriacetoxyborhydrid und nachfolgender Extraktion mit THF

Da die Aufreinigungsversuche mittels SPE nicht erfolgreich waren, wurden Versuche zur Abtrennung/Aufreinigung der Reaktionsprodukte mittels einfacher Lösungsmittelextraktion durchgeführt. Hierzu wurde für die Umsetzung Methanol durch das aprotische Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel ersetzt. Verschiedene Derivatisierungsansätze mit Benzylamin oder p-Ambamethylester als Derivatisierungsreagenz und Natriumcyanoborhydrid oder Natriumacetoxyborhydrid als Reduktionsmittel (Abdel-Magid et al., Beshore et al.) [16][17] wurden ausprobiert. Natriumtriacetoxyborhydrid unterscheidet sich von Natriumcyanoborhydrid dadurch, dass es in wässrigen Lösungen nicht stabil ist und sich schnell zersetzt. Dadurch wäre eine Abtrennung des Reduktionsmittels für die HPLC-Analyse nicht mehr erforderlich. Die Derivatisierung wurde, bedingt durch die wässrige Probelösung in einem Lösungsmittelgemisch THF/Wasser 4/1 durchgeführt. Für die Umsetzung mit Natriumtriacetoxyborhydrid wurde wegen der schnellen Zersetzung desselbigen außerdem die zugesetzte Menge an Essigsäure herabgesetzt. Nach der Umsetzung wurde die Lösung mit Triethylamin neutralisiert und zur Abtrennung von THF/Triethylamin und Wasser und zur Anreicherung der Zuckerderivate mit Kochsalz gesättigt. Für die HPLC wurde die organische Phase mit Wasser verdünnt. Keiner der Ansätze zeigte im Chromatogramm außer dem Reagenzpeak weitere Peaks.

Deshalb wurde vermutet, dass die Verteilungskoeffizienten für die Benzylamin- und p-Ambamethylesterderivate für die Anreicherung in der THF/Triethylamin-Phase zu ungünstig sind. Daraufhin wurden Versuche mit dem hydrophoberen p-Ambaethylester als Derivatisierungsreagenz durchgeführt. Zusätzlich wurden die Lösungsmittelzusammensetzung THF/H₂O und die zugebene Menge Essigsäure sowie die für die Neutralisation erforderliche Menge Triethylamin variiert. Für Natriumtriacetoxyborhydrid mussten die Lösungsmittelverhältnisse beibehalten werden, da bei höherem Wasseranteil bereits visuell eine starke Zersetzung erkennbar war. Für das Lösungsmittelverhältnis THF/H₂O 50/50 wurden, bei gleichzeitiger Herabsetzung der zugefügten Essigsäure- und Triethylaminmenge, die besten Extraktionsergebnisse erzielt. Bei allen Ansätzen mit Natriumcyanoborhydrid zeigt sich jedoch erwartungsgemäß eine deutlich bessere Anreicherung der Monosaccharidderivate als der hydrophileren Lactosederivate in der organischen Phase. In den Chromatogrammen der Versuche mit Natriumtriacetoxyborhydrid waren keine Peaks sichtbar. Natriumtriacetoxyborhydrid scheint sich somit auch bei Lösungen mit geringerem Anteil an protischem Lösungsmittel sofort vollständig zu zersetzen und ist somit ungeeignet.

Zur weiteren Extraktionsoptimierung wurde statt Triethylamin Natronlauge für die Neutralisation der Reaktionslösungen verwendet. Mit Natronlauge konnte bezüglich der Lactosederivate eine Erhöhung der Extraktionsausbeute um ca. Faktor 2 erreicht werden.

Optimiertes Derivatisierungs-/Anreicherungs-/Aufreinigungsprotokoll:

2,5 ml wässrige Probelösung
+ 2,5 ml p-Ambaethylesterlösung 0,16 M in THF
+ 0,1 ml Essigsäure, konz.
+ ca. 10 mg Natriumcyanoborhydrid

bei 50°C zwei Stunden umgesetzt

Reaktionslösung mit Natronlauge ca. 10 M neutralisiert;
mit Kochsalz gesättigt;
obere organische Phase für HPLC mit Wasser verdünnt

3.1.1.3.5 Derivatisierung mit p-Ambaethylester und Aufreinigung über SPE

Alternativ zur Flüssig-/Flüssigextraktion THF/H₂O wurden weitere Versuche mit reinen SPE-Polymerphasen und SPE-Kationenaustauschersäulen auf Polymer oder Kieselgelbasis durchgeführt. Für die Aufreinigung mittels dieser Phasen war jedoch eine vorherige Entfernung des großen Reagenzüberschusses an p-Ambaethylester notwendig, da auf Grund der geringen Kapazität der SPE-Säulen und der höheren Affinität des Reagenz zu diesen Phasen eine Sättigung der SPE-Säulen mit Reagenz eingetreten wäre und somit eine Adsorption der Zuckerderivate verhindert hätte.

Die umgesetzten Reaktionslösungen wurden mit Natronlauge neutralisiert und verdünnt. Die verdünnten Lösungen wurden anschließend mit tert.-Butyl-methyl-ether (MTBE) ausgeschüttelt. Auf eine vorherige Sättigung der wässrigen Phase mit Kochsalz wurde hierbei verzichtet, um eine teilweise Mitextraktion der Zuckerderivate möglichst gering zu halten. Durch die Extraktion mit MTBE konnten der Reagenzüberschuß größtenteils entfernt werden. Die abgetrennten wässrigen Phasen wurden anschließend direkt über die SPE-Polymer-Säulen gegeben, mit einem Methanol/Wasser-Gemisch gewaschen und mit Pyridin eluiert.

Für die Aufreinigung über die SPE-Kationenaustauschersäulen wurde die isolierte wässrige Phase vor Aufgabe über die SPE mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 eingestellt, um eine Protonierung der Aminfunktion zu erreichen. Nach Waschen mit verdünnter Salzsäure wurde ebenfalls mit Pyridin eluiert.

Die beste Anreicherung der Zuckerderivate konnte durch die SPE-Kationenaustauschersäulen auf Polymerbasis erzielt werden. Die deutlich schlechteste Anreicherung war über die Kationenaustauschersäule auf Kieselgelbasis zu beobachten.

Die Retention der p-Ambaethylesterzuckerderivate wird somit sowohl durch die ionische Wechselwirkung der protonierten Aminfunktion als auch durch die hydrophoben und Π - Π -Wechselwirkungen mit dem Polymerträgermaterial (Polystyrol-divinylbenzol) bewirkt.

Die angereicherte Menge an Lactosederivat war jedoch im Vergleich zu den optimierten Extraktionsversuchen mit THF um ca. Faktor 2 niedriger, was vermutlich auf die teilweise Mitextraktion der Zuckerderivate durch MTBE, als auch auf die Adsorption des verbleibenden Reagenz auf der SPE-Phase zurückzuführen ist. Um eine stärkere Anreicherung der Zuckerderivate zu erzielen, wäre somit

eine deutlich größeres Sorbensvolumen notwendig, was jedoch mit deutlich höherem Kosten- und Zeitaufwand für die Aufreinigung verbunden gewesen wäre.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die GC-Analytik das optimierte Anreicherungs-/Aufreinigungsverfahren mittels THF-Extraktion weitergeführt, da dieses wesentlich schneller und kostengünstiger durchzuführen war.

3.1.2 Ligandenaustauschchromatographie (Kationenaustauscher-Säule) mit Fluoreszenzdetektion

Weitere Versuche wurden mit einer Phenomenex Rezex Säule durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine speziell für die Zuckeranalytik entwickelte Kationenaustauschersäule, die ausschließlich mit einem rein wässrigen Eluenten verwendet wird. Laut Herstellerangaben ist damit eine Auftrennung zwischen Lactose, Galactose und Glucose mit einem Retentionszeitabstand von 1,3 –2,7 Minuten möglich. Alle anderen für die Probenmatrix relevanten Zucker (Lactulose; Fructose) mit Ausnahme von Saccharose können ebenfalls ausreichend von Lactose und Galactose abgetrennt werden. Für das Peakpaar Lactose/Saccharose kann mit ca. 0,3 Minuten Retentionszeitabstand nur eine Antrennung erreicht werden. Da für die Detektion nur ein UV/VIS- und Fluoreszenzdetektor zur Verfügung standen, musste jedoch wieder eine Derivatisierung durchgeführt werden; die Eignung der Säule für derivatisierte Zucker konnte der Hersteller nicht garantieren. Auf Grund der Derivatisierung können Saccharose, Lactulose und Fructose nicht im Chromatogramm erscheinen (siehe Versuche 3.1.1.2.1).

Die Derivatisierung erfolgte analog zu 3.1.1.2.3, allerdings mit p-Ambamethylester.

Ein erster Versuch mit einem derivatisierten Lactose-Standard (1mg/ml) wurde, ohne vorhergehende Neutralisation der Reaktionslösung, 1:10 mit Wasser verdünnt injiziert. Im Chromatogramm sind im Bereich von 12-22 min nur mehrere kleinere negative und positive Peaks zu sehen.

Da eine Störung des chromatographischen Gleichgewichts auf der Säule (Störung der Donan-Membran; der Ligandenaustauschreaktion oder hydrophoben Wechselwirkungen) auf Grund der stark sauren Reaktionslösung und des aufgegebenen Reagenzüberschusses angenommen wurde, wurde bei den nachfolgenden Versuchen die Reaktionslösung mit Ammoniaklösung neutralisiert und mit MTBE ausgeschüttelt. Die daraus resultierende Lösung wurde 1:5 mit Wasser verdünnt injiziert.

Bei allen drei Einzelstandards (Lactose, Galactose, Glucose) sind übereinstimmend im Chromatogramm im Bereich von 9-15 min zwei kleinere Peaks mit einem dazwischen liegenden negativen Peak zu sehen, ein Unterschied zwischen den Chromatogrammen der Einzelstandards ist nicht zu erkennen.

Als Ursache für diese Ergebnisse wird eine Störung der Gleichgewichtseinstellung auf der Säule, hervorgerufen durch das mitinjizierte Natriumcyanoborhydrid und Ammoniumacetat vermutet. Eine Aussage über die grundsätzliche Eignung der Säule für Zuckerderivate konnte deshalb nicht gemacht werden.

3.1.3 Versuche mittels enzymatischer Bestimmung

Die enzymatische Lactosebestimmung ist die bis dato am häufigsten angewandte und gerätetechnisch/apparativ am wenigsten aufwendige/anspruchsvolle Methode für die Laktosebestimmung. Allerdings ist das Verfahren mit einer Bestimmungsgrenze von 0,1 % nicht für den Laktosenachweis im Spurenbereich geeignet.

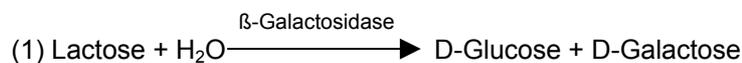
Zur Überbrückung von gerätebedingten Ausfallzeiten in der HPLC wurden zusätzlich zum Projektplan enzymatische Versuche eingeschoben. Durch Abänderung der bestehenden enzymatischen Methode sollte eine Erniedrigung der Nachweisgrenze erreicht werden.

3.1.3.1 Vorgehensweise/theoretischer Ansatz

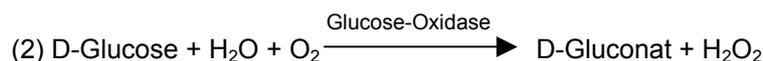
Die enzymatische Bestimmung der Lactose erfolgt indirekt wahlweise über den Gehalt an Galactose oder Glucose nach vorangegangener enzymatischer Spaltung der Lactose in Galactose und Glucose mittels β -Galactosidase. Der Gehalt an Lactose in der Probe errechnet sich aus der Differenz zweier Testansätze der Probe jeweils mit und ohne vorherige Zugabe von β -Galactosidase. Durch den Testansatz ohne β -Galactosidase wird der eigentliche, ursprüngliche Galactose- bzw. Glucosegehalt der Probe ermittelt. Der Testansatz mit β -Galactosidase gibt den Gesamtgehalt an Galactose bzw. Glucose nach erfolgter Lactosespaltung an. Auf Grund des hohen Anfangsgehalts an Galactose bzw. Glucose in lactosefreien Milchprodukten ist die resultierende Extinktionsdifferenz aus den beiden Messwerten sehr gering und für eine sichere Bestimmung von Lactosegehalten um 0,01% nicht ausreichend. Es wurde daher versucht eine Bestimmungsmethode mit vorheriger Entfernung der Glucose zu entwickeln.

Als Grundlage für die Entwicklung der Bestimmungsmethode diene eine Kombination der Lactulose- und Lactose/D-Glucose-Bestimmungsvorschriften der Fa. Boehringer Mannheim/R-BIOPHARM [89].

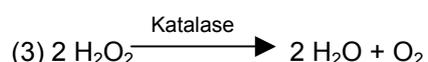
Bei der Lactulosebestimmung als auch bei der Lactosebestimmung über Glucose wird Lactose mit β -Galactosidase bei pH 6,6 in Glucose und Galactose gespalten:



Die aus dieser Reaktion entstandene Glucose wird bei der Lactulosebestimmung mit Glucoseoxidase (GOD) zu D-Gluconat oxidiert:

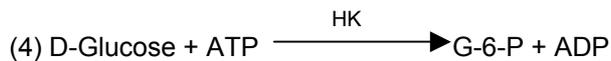


Das überschüssige Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zerstört.



Bei beiden Verfahren wird evtl. nicht abgebaute Glucose (Lactulosebestimmung) bzw. die in der Probe ursprünglich enthaltene oder aus der Lactosespaltung entstandene Glucose (Lactosebestimmung) bei pH 7,6 durch Hexokinase(HK) und

Adenosin-5`-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5-diphosphat (ADP) phosphoryliert:



In Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) zu d-Gluconat-6-phosphat oxidiert:



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Glucose-Menge äquivalent und wird photometrisch bestimmt.

Um den bei der Lactosebestimmung störenden hohen Anfangsgehalt an Glucose zu beseitigen, wurden Reaktion (2) und (3) aus der Lactulosevorschrift dem Lactosebestimmungsansatz vorgeschaltet.

Probenaufbereitung:

Die Probenaufbereitung wurde mit Ausnahme der Zugabe von β -Galactosidase-suspension zunächst unverändert aus der bestehenden Lactulosevorschrift übernommen:

Ca. 50 g Probe einwiegen und auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.

- davon 10 ml Aliquot entnehmen
+ je 1,75 ml Carrez I- und Carrez II-Lösung
+ 6,5 ml Na-Phosphatpuffer pH 7,5 hinzufügen
- Gesamtvolumen = 20 ml
- erhaltene Lösung filtrieren
- 5 ml Aliquot des Filtrats in 10 ml-Meßkolben pipettieren
+ 2,0 ml Triethanolamin-Puffer pH 7,6
+ 0,1 ml GOD-Lösung
+ 1 Tropfen Octanol-1
+ 0,500 ml NaOH (0,33 mol/l)
+ 0,050 ml H₂O₂-Lösung (30%ig)
+ 0,100 ml Katalase-Suspension
- nach jeder Zugabe mischen und 3 h bei 40°C inkubieren; anschließend auf 10 ml mit dest. H₂O auffüllen u. filtrieren

Für den Testansatz Lactose/D-Glucose wurden 0,5 ml dieser Lösung verwendet, was dem maximal im Ansatz einsetzbaren Probevolumen entspricht. Daraus ergibt sich im Ansatz eine Probenmenge von:

$$50 \text{ g} \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ ml}/100 \text{ ml} = 62,5 \text{ mg}$$

bei einem Lactosegehalt von 0,01% in der Probe sind somit im Ansatz 6,25 µg Lactose enthalten.

Die Lactosekonzentration der nach Inkubation erhaltenen Lösung beträgt bei 0,01% Lactosegehalt in der Probe:

$$50\text{g} \times 0,5 \times 0,5 \times 0,01 / (100\text{ml} \times 100) = 12,5 \text{ mg/L}$$

Laut Angaben Fa. Boehringer liegt der Linearitätsbereich der Bestimmung für das größtmöglich einsetzbare Probevolumen von 0,5 ml zwischen 4 µg Lactose+D-Glucose/Ansatz und 200 µg Lactose+D-Glucose/Ansatz; die Nachweisgrenze wird mit 7 mg/L Lactose entsprechend einer Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) angegeben.

Die geringste unterscheidbare Extinktionsdifferenz des Verfahrens beträgt 0,005 Extinktionseinheiten.

Bei einer Doppelbestimmung ist mit Extinktionsdifferenzen zwischen 0,010 bis 0,015 zu rechnen.

Eine Herabsetzung des Probevolumens war auf Grund des Linearitätsbereiches und der NWG somit nicht möglich.

3.1.3.2 Orientierende Anfangsmessungen

Es wurden eine Standardansatz entsprechend einer Lactosekonzentration von 0,01% und einer Galactose- und Glucosekonzentration von je 2,5%, ein Standardansatz entsprechend einer Lactosekonzentration von 0,1% und einer Galactose- und Glucosekonzentration von 2,5% und eine Probe lactosefreie Milch gemessen.

Abweichend von der Vorschrift wurde nach der Inkubation mit GOD nicht filtriert, da die erhaltenen Lösungen bereits klar waren.

Das Pipettierschema nach Boehringer wurde mit Ausnahme der Zugabe von Citrat-Puffer beim Ansatz D-Glucose und Leerwert D-Glucose und der Verwendung von 0,5 ml Probelösung statt 0,1 ml beibehalten; eine Anpassung des Küvettenvolumens mit Wasser wegen des höheren Probevolumens wurde nicht vorgenommen.

Berechnung/Vorgehensweise für Standardansatz:

Nach Lactulosevorschrift Fa. Boehringer [89]:

50 g Probe auf 100 ml verdünnen
→ davon 10 ml Aliquot für Carrez-Fällung einsetzen

bei Lactosegehalt von 0,01% und je 2,5% Glucose und Galactosegehalt in der Probe:

50g x 0,01 x 0,1/100 = 0,5 mg Lactose
50g x 2,5 x 0,1/100 = je 125 mg Galactose und Glucose im Ansatz für Carrez-Fällung

bei Lactosegehalt von 0,1% in der Probe:

$$50\text{g} \times 0,1 \times 0,1/100 = 5 \text{ mg Lactose}$$

Für 0,01% Lactosegehalt:

- 50 µl Lactose-Stammlösung c = 10mg/ml
- + 5 ml Glucose-/Galactose-Stammlösung c = je 25mg/ml Galactose und Glucose
- + 4,95 ml H₂O
- + 1,75 ml Carrez I-Lösung
- + 1,75 ml Carrez II-Lösung
- + 6,5 ml Na-Phosphatpuffer pH 7,5

→ filtriert und 5 ml Aliquot für Inkubation eingesetzt

→ nach Inkubation auf 10 ml aufgefüllt

Für 0,1% Lactosegehalt:

Analog zu Ansatz mit 0,01% Lactosegehalt, nur statt 50 µl, 0,5 ml Lactose-Stammlösung und 4,5 ml H₂O eingesetzt

Die Versuche ohne pH-Wertanpassung zeigten für den Standardansatz mit 0,01% Lactosegehalt und für die Probe unter Berücksichtigung der unter 3.1.3.1 genannten Messwertstreuung keine signifikante bzw. nur eine minimale Extinktionsänderung zwischen den Messwerten vor und nach Zugabe von Hexokinase und G6P-DH-Suspension, der Standardansatz mit 0,1% Lactosegehalt zeigt hingegen einen deutliche Extinktionsänderung, die aber nicht mit der hinzugefügten Menge an Lactose korreliert.

Die Versuche wurden mit Standards entsprechend 0,01% und 0,1% Lactosegehalt wiederholt.

Die inkubierten Lösungen wurden filtriert, um mögliche Störungen bei der Messung durch Streulichteffekte auszuschließen, auf die Zugabe von Citratpuffer zum Ansatz D-Glucose und Leerwert D-Glucose wurde verzichtet und eine Küvettenvolumenanpassung mit H₂O durchgeführt.

Die Messergebnisse ergaben bei beiden Standards keine signifikanten, außerhalb der von Boehringer angegebenen Streubreite des Verfahrens liegenden Extinktionsdifferenzen.

Tabelle 1: Pipettierschema (Küvettenvolumen gesamt: 3,67 ml)

	LW Lactose	Probe Lactose	LW Glucose	Probe Glucose
Lösung 1	0,200 ml	0,200 ml	--	--
Suspension 2	0,050 ml	0,050 ml	--	--
Probeflösung	--	0,500 ml	--	0,500 ml
Mischen und 20 min. bei Raumtemperatur stehen lassen				
Lösung 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Wasser	2,400 ml	1,900 ml	2,650 ml	2,150 ml
Mischen, nach ca. 2 min. E ₁ messen				
Suspension 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen und 15 min. bei Raumtemperatur stehen lassen; E ₂ messen				

Anmerkung:

Lösungen/Suspensionen enthalten:

Lösung 1: Citrat-Puffer, Stabilisatoren

Suspension 2: β -Galactosidase

Lösung 3: Triethanolaminpuffer pH 7,6, NADP, ATP, Magnesiumsulfat, Stabilisatoren

Suspension 4: Hexokinase-, G6P-DH

3.1.3.3 Versuche mit angepasstem pH-Wert

Die Ergebnisse aus 3.1.3.2 ließen vermuten, dass die Pufferkapazität des für die Lactosespaltung vorgelegten Citratpuffers von pH 6,6 wegen der Erhöhung des Probevolumens auf 0,5 ml nicht mehr ausreichend war. Deshalb wurde die aus der Zusammenmischung von 0,5 ml Probelösung (Inkubationslösung nach Auffüllen auf 10 ml) und 0,2 ml Citratpuffer pH 6,6 resultierende Lösung in einem 20-fach größer dimensionierten Ansatz nachgestellt und der pH-Wert dieser Lösung mit einer pH-Elektrode gemessen. Der ermittelte pH-Wert lag bei ca. 8,0 und damit deutlich über den für die Lactosespaltung mittels β -Galactosidase erforderlichen pH-Wert von 6,6.

Deshalb wurde die erforderliche Menge an H_2SO_4 die notwendig ist, um den gewünschten pH-Wert neu einzustellen, ermittelt.

Zusammenstellung der Prüflösung:

81,25 μ l x 20	Na-Phosphatpuffer pH 7,5	→ 1,625 ml
100 μ l x 20	Triethanolaminpuffer pH 7,6	→ 2,0 ml
25 μ l x 20	NaOH c = 0,33mol/L	→ 0,5 ml
200 μ l x 20	Citratpuffer pH 6,6	→ 4,0 ml
293,75 μ l x 20	Wasser bidest.	→ 5,875 ml

Für die Einstellung auf pH 6,6 sind im Testansatz in der Küvette 30 μ l 0,5 M H_2SO_4 erforderlich.

Der pH-Wert, der aus der Zugabe von Lösung 3 (Triethanolaminpuffer pH 7,6), nach durchgeführter Lactosespaltung, zu dieser vorgelegten Lösung resultiert, wurde ebenfalls gemessen. Dieser lag bei 7,45. Die ermittelte, erforderliche Menge NaOH um den für die Glucoseumsetzung optimalen pH-Wert von 7,6 einzustellen betrug 50 μ l 0,5 M NaOH. Deshalb wurde ein neues Pipettierschema (Küvettenvolumen gesamt 3,85 ml) erstellt:

Tabelle 2: modifiziertes Pipettierschema (Küvettenvolumen gesamt 3,85 ml)

	LW Lactose	Probe Lactose	LW Glucose	Probe Glucose
Lösung 1	0,200 ml	0,200 ml	--	--
H_2SO_4 , 0,5 M	0,030 ml	0,030 ml	--	--
Suspension 2	0,050 ml	0,050 ml	--	--
Probelösung	--	0,500 ml	--	0,500 ml
Mischen und 20 min. bei Raumtemperatur stehen lassen				
Lösung 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Wasser	2,500 ml	2,000 ml	2,830 ml	2,330 ml
NaOH, 0,5 M	0,050 ml	0,050 ml	--	--
Mischen, nach ca. 2 min. E_1 messen				
Suspension 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml

Mischen und 15 min. bei Raumtemperatur stehen lassen, E_2 messen

Zwei Testansätze mit Standards mit 0,01% Lactosegehalt und 0,1% Lactosegehalt wurden nach diesem Pipettierschema durchgeführt. Abweichend von der Lactulosevorschrift nach Boehringer, die eine 3-stündige Inkubation bei 40°C vorsieht, wurden die Standardlösungen bei 25°C 24 Stunden inkubiert, da nach Angaben im Beipack des GOD-Lieferanten Fa. Roche die Stabilität des Enzyms bei 25°C nur für 3 Stunden bei pH 8,0 garantiert ist, und somit eine ausreichende Enzymaktivität bei den Bedingungen des Glucoseabbaus nach der Lactulosevorschrift möglicherweise nicht gewährleistet ist.

Beim 0,01% igen Lactose-Standard (mit je 2,5% Galactose und Glucose) wurde eine Extinktionsdifferenz von 0,013 ermittelt, was innerhalb der angegebenen Streubreite liegt; beim 0,1% igen Lactose-Standard (mit je 2,5% Galactose und Glucose) wurde eine Extinktionsdifferenz von 0,136 ermittelt.

Nach folgenden Berechnungsformeln ergeben sich für den 0,01%igen Lactose-Standard:

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}} \quad \text{jeweils für Lactose- und Glucoseprobeansatz berechnet}$$

$$\Delta E_{\text{Lactose}} = \Delta E_{\text{Lactose+Glucose}} - \Delta E_{\text{Glucose}}$$

$$\Delta E_{\text{Lactose+Glucose}} = (0,119 - 0,106) - (0,090 - 0,088) = 0,011$$

$$\Delta E_{\text{Glucose}} = (0,082 - 0,081) - (0,068 - 0,065) = -0,002$$

$$\Delta E_{\text{Lactose+Glucose}} - \Delta E_{\text{Glucose}} = 0,013$$

$$\rightarrow c = 3,85\text{ml} \times 342,3\text{mg/mmol} \times 0,013 / (6,3\text{L/mmol} \times \text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,5\text{ml} \times 1.000) = 5,439 \text{ mg/L Lactose}$$

Bei einem Verdünnungsfaktor von 2 (5ml Filtrat auf 10ml aufgefüllt) ergibt sich eine Lactosekonzentration von 10,878 mg/L in der Probelösung.

In 20 ml Probelösung sind somit 0,22 mg Lactose enthalten; 0,5 mg Lactose wurden im oben beschriebenen Standardansatz hinzugefügt, daraus errechnet sich eine Wiederfindung von:

$$Wf = 0,22 \text{ mg} \times 100 / 0,50 \text{ mg} = 44\%$$

Für den 0,1%igen Lactose-Standard ergeben sich:

$$\Delta E_{\text{Lactose+Glucose}} = (0,243 - 0,104) - (0,090 - 0,088) = 0,137$$

$$\Delta E_{\text{Glucose}} = (0,083 - 0,081) - (0,066 - 0,065) = 0,001$$

$$\Delta E_{\text{Lactose+Glucose}} - \Delta E_{\text{Glucose}} = 0,136$$

$$\rightarrow c = 3,85\text{ml} \times 342,3\text{mg/mmol} \times 0,136 / (6,3\text{L/mmol} \times \text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,5\text{ml} \times 1.000) = 56,90 \text{ mg/L Lactose}$$

→ mit Verdünnungsfaktor 2 eingerechnet: 113,8 mg/L Lactose in der Probelösung
In 20 ml sind somit 2,3 mg Lactose enthalten, mit den im Standardansatz hinzugefügten 5 mg Lactose ergibt sich eine Wiederfindung von:

$$Wf = 2,3 \text{ mg} \times 100 / 5 \text{ mg} = 46\%$$

Für beide Standardkonzentrationen beträgt die Wiederfindungsrate übereinstimmend nur knapp 45%; wobei für den niedrigeren Standard eine starke Streuung der Ergebnisse anzunehmen ist.

Die schlechte Wiederfindungsrate ist wahrscheinlich auf die deutlich höhere Ionenstärke und/oder auf die mangelnde Pufferwirkung der im Küvettenansatz verwendeten Pufferlösungen des modifizierten Testansatzes im Vergleich zum ursprünglichen Lactose/D-Glucose-Testansatz zurückzuführen. Die erhöhte Ionenstärke oder ein falsch eingestellter/instabiler pH-Wert kann eine Herabsetzung der Aktivität der im Testansatz eingesetzten Enzyme bewirken.

3.1.3.4 Versuche mit erhöhter Enzymkonzentration

Auf Grund der Ergebnisse aus 3.1.3.3 wurde ein weiterer Testansatz mit einer bei 40°C, 3h lang inkubierten 0,1%igen Lactose-Standardlösung unter Hinzugabe der 2,5 fachen Menge an Suspension 4 (enthält Hexokinase + Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt, um eine eventuelle Aktivitätsherabsetzung durch eine erhöhte Enzymkonzentration auszugleichen.

Es konnte im Vergleich zu 3.1.3.3 keine signifikante, außerhalb der Streubreite liegende Extinktionsänderung festgestellt werden.

Anschließend wurden zwei weitere Testansätze mit einer 0,01%igen Lactose-Standardlösung (neu inkubierte Standardlösung, 40°C, 3h) unter Verwendung der dreifachen Menge an Suspension 2 (enthält β -Galactosidase) durchgeführt.

Da im ersten Testansatz keine Zunahme der Extinktion feststellbar war, wurden im zweiten Testansatz bei der Lactosespaltung bereits 2 ml Wasser hinzugegeben, um die Ionenstärke der Lösung in der Küvette herabzusetzen. Auch hiermit konnte keine Verbesserung erzielt werden.

Bei beiden Ansätzen wurde zur Überprüfung auf Vorliegen einer Schleichreaktion die Extinktion E_2 nach 15 min in weiteren 5 minütigen Abständen gemessen. Es konnte keine Schleichreaktion festgestellt werden.

Die verschiedenen Inkubationsbedingungen scheinen keinen Einfluß auf die Glucoseabbaureaktion zu haben, wie der Vergleich der Meßwerte der Ansätze Leerwert Glucose und Probe Glucose zwischen 3.1.3.3 und 3.1.3.4 zeigt.

Tabelle 3: Abgeändertes Pipettierschema (Küvettenvolumen gesamt 3,95 ml):

	LW Lactose	Probe Lactose	LW Glucose	Probe Glucose
Lösung 1	0,200 ml	0,200 ml	--	--
H ₂ SO ₄ , 0,5 M	0,030 ml	0,030 ml	--	--
Suspension 2	0,150 ml	0,150 ml	--	--
Probelösung	--	0,500 ml	--	0,500 ml
Mischen und 20 min. bei Raumtemperatur stehen lassen				
Lösung 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Wasser	2,500 ml	2,000 ml	2,930 ml	2,430 ml
NaOH, 0,5 M	0,050 ml	0,050 ml	--	--
Mischen, nach ca. 2 min. E_1 messen				
Suspension 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml

Mischen und 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen, E_2 messen; in 5 min-Abständen weiter messen

3.1.3.5 Ergänzende Versuche zur enzymatischen Bestimmung

Versuche zur Abklärung der geringen Wiederfindungsrate in 3.1.3.3:

Eine verbliebene Restaktivität der Glucoseoxidase und Katalase könnte einen Teil der bei der anschließenden Lactosespaltung entstehenden Glucose bereits vor deren Bestimmung mittels der Folgereaktionen (Phosphorylierung zu G-6-P und Oxidation zu D-Gluconat-6-phosphat) abbauen und zu einem Minderbefund an Lactose führen.

Deshalb wurden nochmals mehrere Bestimmungsversuche mit Standardlösungen nach dem unter 3.1.3.3 beschriebenen, modifizierten Pipettierschema (Tabelle 2) durchgeführt. Hierbei wurden jedoch nach erfolgtem dreistündigem Glucoseabbau die inkubierten Standardlösungen vor Verwendung im Bestimmungsansatz für 15 Minuten in ein Wasserbad mit 100°C gestellt, um eine vollständige Zerstörung der für den Glucoseabbau verwendeten Enzyme sicherzustellen.

Folgende Standardlösungen wurden zur Überprüfung angesetzt und untersucht:

- 0,05 % Lactosegehalt
- 0,10 % Lactosegehalt
- 0,05 % Lactose- und je 2,5 % Galactose- und Glucosegehalt
- 0,10 % Lactose- und je 2,5 % Galactose- und Glucosegehalt

Für die Standardlösungen wurden Wiederfindungsraten zwischen ca. 5 und 35 % ermittelt. Da die Extinktionen E_2 der Küvettenansätze „Probe Glucose“ (siehe Pipettierschema Tabelle 2, Küvettenansatz mit Probelösung ohne Zusatz von β -Galactosidasesuspension) der beiden Standardmischungen (Gemisch aus Lactose, Galactose, Glucose) keine signifikanten Unterschiede zu den Extinktionswerten E_2 „Probe Glucose“ der Einzelstandards (nur Laktose) aufwiesen, kann von einem vollständigem Abbau der Glucose durch die Inkubation mit Glucoseoxidase ausgegangen werden.

Für die schlechten Wiederfindungsraten kann somit auf Grund der neuen Versuche die vorhergehende Glucoseabbauprozedur als Ursache ausgeschlossen werden. Für die Minderbefunde sind Störungen im Bestimmungsansatz selbst verantwortlich, die wahrscheinlich durch die bereits unter 3.1.3.3 genannten Gründe hervorgerufen werden.

Versuche zur Abklärung erhöhter Laktosebefunde bei laktosefreien Milchprodukten:

Da im Zeitraum/Verlauf des Projekts eine starke Zunahme von erhöhten Lactosebefunden bei der enzymatischen Routineuntersuchung von laktosefreien Milchprodukten zu verzeichnen war, wurden zur Abklärung der Ursachen mehrere Milchpulverproben, bei denen erhöhte Gehalte an Lactose gemessen wurden, zu Vergleichszwecken mit der Original Lactose-/Glucose-Testkitvorschrift der Fa. R-BIOPHARM (ohne vorherigen Glucoseabbau) [89] untersucht. Die enzymatische Lactosebestimmung in der Milchwirtschaft erfolgt hingegen standardmäßig über Galactose wegen der besseren Interpretierbarkeit.

Wie unter 3.1.3.1 beschrieben, erfolgt auch bei der Lactosebestimmung über den Galactosegehalt der Probe zunächst die Spaltung der Lactose mittels β -Galactosidase in Glucose und Galactose. Im Gegensatz zur Bestimmung über Glucose läuft bei der Bestimmung über Galactose nur eine Folgereaktion mit β -Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) bei pH 8,6 ab:



Die während dieser Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Galactose-Menge äquivalent und wird ebenfalls photometrisch bestimmt.

Auf Grund der teilweise sehr hohen, im Prozentbereich liegenden Lactosewerte, der über den Galactosegehalt bestimmten Proben wurde eine Querempfindlichkeit der Bestimmung auf andere in der Probe enthaltene Saccharide angenommen. Dabei handelt es sich vermutlich nach [99] um Oligosaccharide.

Bei Vorliegen von Querempfindlichkeiten bei der Bestimmungsmethode über Galactose, könnten diese bei der Bestimmung über Glucose, bedingt durch die unterschiedlichen Reaktionen der beiden Methoden, unter Umständen nicht auftreten.

Vier verschiedene Milchpulverproben wurden mit beiden Methoden untersucht:

Tabelle 4: Vergleich der über Galactose und Glucose enzymatisch ermittelten Lactosegehalte

Interne Proben-Nr.	Lactosegehalt [%] über Galactose ermittelt	Lactosegehalt [%] über Glucose ermittelt
F2008/3315-01	1,11	0,53
F2008/3315-02	0,46	1,57
A2008/493-01	3,11	1,31
F2008/2316-01	3,13	1,40

Auch bei der Bestimmung über Glucose wurden erhöhte Lactosegehalte ermittelt. Die Ergebnisse sind allerdings stark abweichend von den über Galactose bestimmten Lactosegehalten, wobei eine stärkere Fehlerbehaftung der über Glucose erhaltenen Werte wegen der geringeren eingesetzten Probeneinwaage (0,1 g) und der nicht-automatisierten Pipettierung gegeben ist.

Die Mehrbefunde an Lactose werden demnach vor allem durch die Spaltung von weiteren in den Proben befindlichen Di- und Oligosacchariden in Glucose/ Galactose und/oder andere Monosaccharide verursacht.

3.1.4 Gaschromatographie

3.1.4.1 Ermittlung des optimalen Silylierungsreagenz

Um eine größtmögliche Umsetzungsrate bei der Silylierung der Zucker zu erreichen, wurden verschiedene Silylierungsmittel erprobt. Folgende vier Silylierungsmittel wurden miteinander verglichen:

- *Trimethylsilylimidazol (TMSI)*: ist nach Van Look, et al. [24] das beste Silylierungsmittel für Hydroxylgruppen und ein gebräuchliches Derivatisierungsreagenz für die GC-Analytik von Kohlenhydraten [29][30][36]-[40][91]; Vorteil: wasserlösliches Zerfallsprodukt
- *Hexamethyldisilazan (HMDS)/Chlortrimethylsilan (TMCS)*: HMDS ist ebenfalls ein in der Literatur häufig verwendetes, sehr kostengünstiges Derivatisierungsreagenz für Zucker [24][26][31]-[34][43][45][91]. TMCS dient dabei als Aktivator für HMDS. Anstelle von TMCS kann auch Trifluoressigsäure (TFA) verwendet werden, insbesondere bei Proben mit größeren Spuren von Wasser [28][41][45]; Vorteil: im Vergleich zu TMSI leichter flüchtig und somit frühelueierend; Nachteil: mit TMCS Bildung eines Ammoniumchloridniederschlags der bei der Injektion stören kann
- *N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)*: ist ein häufig eingesetztes, universelles, für die meisten Verbindungsklassen geeignetes Silylierungsreagenz; Vorteil ist das leichtflüchtige Abbauprodukt, das zu keinen Interferenzen im Chromatogramm und Kontaminationen des FID-Detektors führt [24]
- *N-Methyl-N-Trimethylsilyl-heptafluorbutyramid (MSHFBA) / Chlortrimethylsilan (TMCS)*: diese Silylierungsmittelkombination wird in der im Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB) 2006 [22][23] beschriebenen Zuckerbestimmungsmethode, die mit als Vorlage für die nachfolgenden Versuche diente, verwendet. Das nur schwache Silylierungsmittel TMCS dient dabei als Aktivator für das MSHFBA.

Die Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt:

Es wurden jeweils 0,5 g an Glucose-, Galactose- und Lactosereinsubstanz einzeln eingewogen und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, ein Aliquot von 0,1 ml dieser Lösung wurde im Vakuum-Trockenschrank bei 80°C, 0,2 bar eingedampft und nach [22] zunächst mit 0,3 ml Stox-Reagenz (Hydroxylamin-hydrochlorid in Pyridin gelöst) zu Aldoximen umgesetzt (Derivatisierung bei 80°C, 30 Minuten). Die erhaltenen Aldoxime wurden anschließend unter jeweils gleichen Bedingungen (Derivatisierungstemperatur 80°C/-dauer 30 Minuten) mit gleichen Mengen (0,3 ml Silylierungsmittel; bei HMDS und MSHFBA mit zusätzlich 0,1 ml TMCS) des jeweiligen Silylierungsreagenzes silyliert:

Für die GC-Analyse wurde eine Optima 225 (30m x 0,32 mm x 0,25 µm, Fa. Macherey-Nagel), eine polare Kapillarsäule, verwendet und mit einem Splitverhältnis von 1:10 gearbeitet.

Für alle drei Zucker konnten keine signifikanten Unterschiede im Silylierungsgrad zwischen den einzelnen Silylierungsmitteln festgestellt werden.

Für die nachfolgenden Versuche wurde deshalb nur noch wahlweise TMSI oder HMDS/TMCS verwendet, da sie in der Literatur die am häufigsten eingesetzten Derivatisierungsreagenzien für Kohlenhydrate sind.

Für Glucose und Galactose wurden jeweils zwei Peaks mit einem Größenverhältnis von ca. 1:3,5 und 1:3 im Chromatogramm, für Lactose ein einzelner breiter, tailender Peak, der auf eine Überlagerung mit einem kleineren Peak schließen ließ, erhalten. Dies stand im Gegensatz zu den in [22] beschriebenen Chromatogrammen. Weiteres Literaturstudium ergab, dass nur auf einer gepackten OV-17-Säule ein einzelner Peak für die cis-,trans-Isomere der gebildeten Zuckeraldoxime der Monosaccharide erhalten wird. Bei Kapillarsäulen hingegen werden stets zwei Peaks entsprechend dem Verhältnis der cis-, trans-Isomere beobachtet.

Da eine OV-17-Säule nicht zur Verfügung stand und Kapillarsäulen auf Grund ihrer erheblich größeren Trennkraft im Gegensatz zu gepackten Säulen die Möglichkeit bieten, etwaige störende Verunreinigungen und andere Probenbestandteile von den Analyten abzutrennen, wurde weiterhin mit Kapillarsäulen gearbeitet.

3.1.4.2 Versuche über reduktive Aminierung mit p-Ambaethylester

Ausgehend von den mit HPLC durchgeführten Vorversuchen wurden zunächst mittels reduktiver Aminierung derivatisierte Zuckerstandards mit einer Konzentration von 1 mg/ml (\equiv 10 % in der Probe) untersucht. Die Derivatisierung erfolgte nach dem unter 3.1.1.3.4 beschriebenen, optimierten Verfahren mit Natriumcyanoborhydrid in einem 50/50-Gemisch THF/Wasser. Nach Derivatisierung wurden die Reaktionslösungen mit Natronlauge neutralisiert und zur Phasentrennung und Anreicherung der Zucker in der organischen Phase mit Kochsalz gesättigt. Die obere, vorwiegend aus THF bestehende Phase wurde möglichst vollständig abgenommen und im Heizblock bei 40°C mit Stickstoff bis annähernd zur Trockne abgeblasen. Der Rückstand aus überschüssigem Reagenz und Analyten wurde in 1 ml Pyridin gelöst. Die anschließende Silylierung wurde nach dem Protokoll von Brobst et al. [24][27] für Zuckerproben mit höherem Wassergehalt mit einem 9/1 Gemisch von HMDS/TFA (450 μ l/50 μ l) durchgeführt. Die erhaltenen Derivate wurden über eine Optima 225-Säule sowohl im Splitmodus (Splitverhältnis 1:10; d.h. ein Zehntel der injizierten Probe gelangt auf die Säule) als auch im Splitless-Modus (d.h. gesamte injizierte Probe gelangt auf die Säule) analysiert. Wie bei den HPLC-Vorversuchen bereits festgestellt, war eine deutlich bessere Anreicherung der Monosaccharide (Galactose, Glucose, interner Standard: Mannose) im Vergleich zu den Disacchariden (Lactose, Lactulose, interner Standard: Maltose) in der organischen Phase zu beobachten. Ein Lactosestandard mit 1 mg/ml Konzentration lieferte im Splitmodus zwar noch einen deutlichen, quantifizierbaren Peak (Signal/Rausch-Verhältnis ca.75/:1), bei der Splitless-Injektion eines Lactose-Standards mit einer Konzentration von 100 μ g/ml war jedoch nur noch ein Peak an der NWG sichtbar. Zudem war eine schlechte Reproduzierbarkeit der Peakflächen zu verzeichnen.

Dies ist auf das erhöhte Basislinienrauschen auf Grund von immer noch in der Probe enthaltenen Wasserspuren zurückzuführen, die bei der Splitless-Injektion im Gegensatz zur Split-Injektion vollständig auf die Säule gelangen und ein starkes Säulenbluten verursachen. Der Wassergehalt des derivatisierten Rückstandes konnte auch durch längeres Abblasen bei höheren Temperaturen bzw. durch Trocknen im Vakuumtrockenschrank nicht verringert werden, gelegentlich wurde

auch eine Phasentrennung nach erfolgter Silylierung auf Grund der noch verbliebenen Wasserspuren beobachtet. Der Einsatz von mehr Silylierungsreagenz (HMDS) erschien nicht ratsam, da höhere Gehalte an Silylierungsmittel in der zu injizierenden Lösung zu einem Verkleben der GC-Spritze und zu verstärkten Silikat-Ablagerungen auf dem Detektor führen. Auf die Verwendung des wasserlöslichen, aber deutlich teureren TMSI anstelle von HMDS wurde aus Kostengründen verzichtet, da für die Silylierung des hohen Wassergehaltes ein sehr hoher Überschuß dieses Reagenzes hätte verwendet werden müssen.

Weitere Versuche mit Aufreinigung der Reaktionslösungen nach erfolgter Derivatisierung mittels Polymer-Kationenaustauschersäule, wie unter 3.1.1.3.5 beschrieben, brachten ebenfalls keine Verbesserung, da die SPE-Säulen nicht vollständig trocken gesaugt werden konnten und mit Pyridin das auf den SPE-Säulen verbliebene Wasser mit eluiert wurde, was zu Störungen in der GC führte.

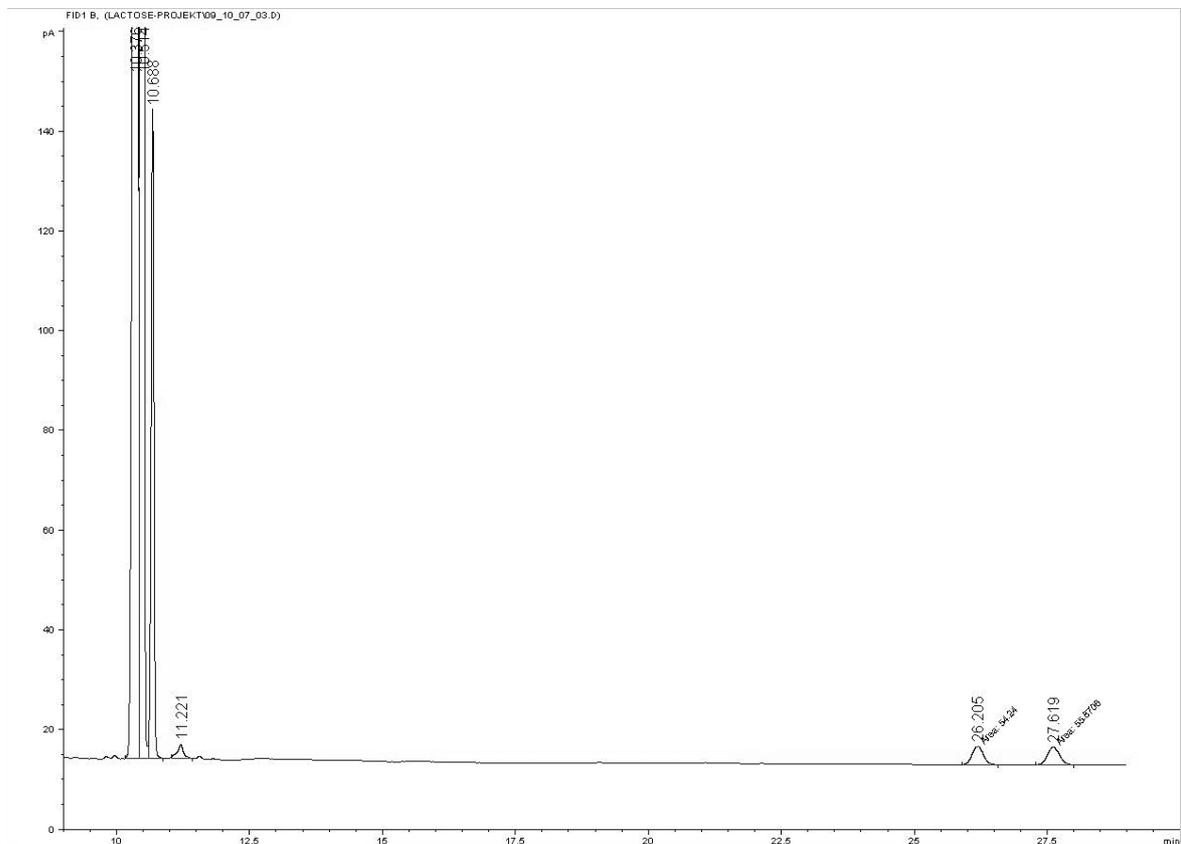


Abbildung 12: GC-Chromatogramm einer Standardlösung Galactose, Glucose, Mannose, Lactose, Lactulose, Maltose; Konzentration je 1 mg/ml (\equiv 10 % in der Probe); Splitverhältnis 1:10; Injektionsvolumen 1 μ l; Retentionsbereich 10-11 Minuten: Monosaccharide; Retentionsbereich ab 26 Minuten: Disaccharide. Wegen der wesentlich geringeren Umsetzungsrate von Lactulose bei der reduktiven Aminierung (siehe 3.1.3.1.) erscheinen im Retentionsbereich der Disaccharide nur die Peaks der Lactose und Maltose

3.1.4.3 Versuche mit Aldoximbildung

Als Ausgangspunkt/Grundlage für die Versuche zur gaschromatographischen Bestimmung über Aldoximbildung dienten die in [91] beschriebenen Arbeitsvorschriften.

3.1.4.3.1 Versuche zur Trennungsoptimierung

Um im Chromatogramm eine vollständige Auftrennung aller für Milchprodukte relevanten Zucker (Lactose, Galactose, Glucose, Lactulose, Saccharose, Fructose) zu erreichen, wurden verschiedene stationäre Phasen unterschiedlicher Selektivität/ Polarität getestet und das Temperaturprogramm variiert.

Folgende Säulen standen zur Verfügung:

- ZB-5; Phenomenex	25m x 0,32mm x 0,25 µm	unpolar
- DB 1701; J&W	60m x 0,32mm x 0,25 µm	mittelpolar
- Optima 225; MN	30m x 0,32mm x 0,25 µm	polar
- DB 210; J&W	30m x 0,32mm x 0,25 µm	polar
- FFAP, J&W	30m x 0,32mm x 0,25 µm	polar

Zur Trennungsoptimierung wurden höherkonzentrierte Standardmischungen und Einzelstandards der sechs relevanten Saccharide verwendet. Die Silylierung erfolgte mit HMDS/TFA die Injektion erfolgte mit einem Split von 1:10 und splitlos mit jeweils 1 µl Injektionsvolumen. Wie oben beschrieben werden für alle reduzierenden Zucker auf Grund der cis-, trans-Isomerenbildung bei der Aldoximreaktion zwei Peaks erhalten. Saccharose kann diese Reaktion nicht eingehen und erscheint als einzelner Peak im Chromatogramm. Die besten Trennergebnisse wurden mit der 60 m DB 1701 erzielt. Im Fall der Glucose und Galactose war nur die Auftrennung der beiden größeren Peaks dieser Zucker möglich, die kleineren Peaks der beiden Zucker fielen, wie bei Li et al. [45] bereits beschrieben, unabhängig von der verwendeten Trennsäule und des Temperaturprogramms immer zusammen. Am schwierigsten erwies sich die Trennung von Lactose und Lactulose. Das cis-, trans-Isomerenverhältnis der beiden Lactulosepeaks beträgt 1:1,5 während für Lactose ein cis-, trans-Verhältnis von 1:3,5 besteht. Der später eluierende der beiden Lactulosepeaks fällt dabei mit dem zuerst eluierenden, größeren der beiden Lactosepeaks je nach verwendeter Säule und Temperaturprogramm entweder vollständig oder teilweise zusammen. Auch mit einem verlängerten Temperaturprogramm (45 min) bzw. einer extrem langsamen Aufheizrate im Bereich der beiden Zucker in Verbindung mit der DB 1701-Säule konnte keine für die Quantifizierung ausreichende Antrennung dieser beiden Peaks erreicht werden. Dies bedeutete eine Verschlechterung der Nachweisgrenze für Lactose, da für die Quantifizierung nur der kleinere Lactosepeak verwendet werden konnte.

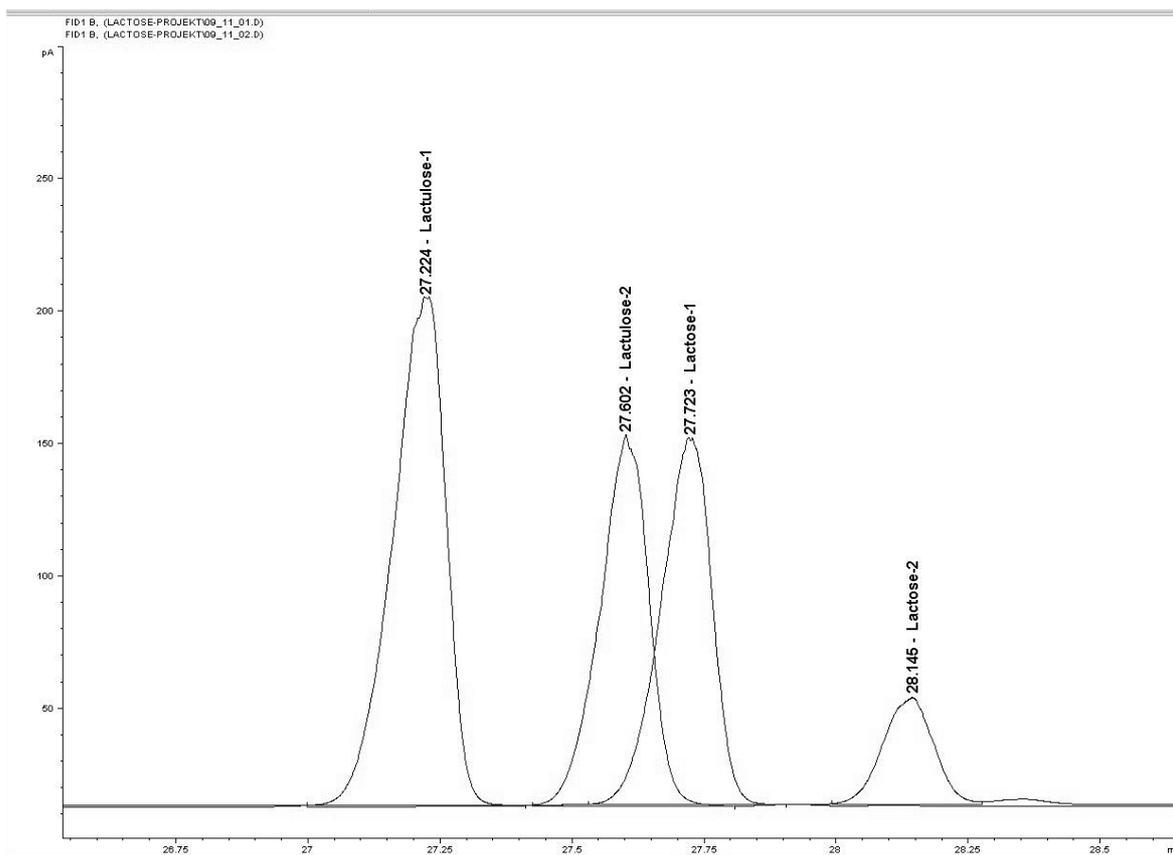


Abbildung 13: Übereinandergelegte GC-Chromatogramme zweier Standardlösungen Lactose und Lactulose; Konzentration je 100 µg/ml (≡ 1 % in der Probe); Splitverhältnis 1:10; Injektionsvolumen 1 µl; Analyse mit modifiziertem Derivatisierungsprotokoll (siehe 3.1.4.3.2)

3.1.4.3.2 Modifizierung des Derivatisierungsprotokolls zur Erhöhung der NWG

Bei den Versuchen zur Trennungsoptimierung wurde bereits ersichtlich, dass mit dem bisherigen Derivatisierungsprotokoll (Eindampfen von 0,1 ml Standard- bzw. Probelösung im Vakuumtrockenschrank bei 80°C; 0,1-0,2 bar; Aldoximbildung mit 0,5 ml Stox-Reagenz, Silylierung mit 450 µl HMDS/50 ml TFA) in Verbindung mit Splitlessinjektion (Injektionsvolumen 1 µl) nur eine Nachweisgrenze für Lactose von ca. 100 µg/ml (≡ 1 % Laktose in der Probe) erreicht werden konnte. Deshalb wurde die Derivatisierung in mehreren Punkten abgeändert, um eine deutliche Aufkonzentrierung der Analyten in der resultierenden Injektionslösung zu erzielen. Das einzudampfende Probenlösungsaliquot wurde auf 0,2 ml erhöht und die eingesetzte Stox-Reagenzmenge wieder auf 0,3 ml reduziert. Nach erfolgter Aldoximbildung wurde statt mit HMDS/TFA mit 0,2 ml TMSI silyliert und nach Silylierung die erhaltene Lösung in 3 ml Wasser aufgenommen, zur besseren Phasentrennung und Analytanreicherung in der organischen Phase mit Kochsalz gesättigt und die gesättigte Lösung mit 0,2 ml Heptan extrahiert und 1 µl des Heptanextrakts injiziert. Eine weitere Erhöhung des einzudampfenden Probevolumens erwies sich als nicht praktikabel, da auf Grund der verstärkten Siedeverzugsgefahr bei niedrigerer Temperatur und/oder bei höherem Druck eingedampft werden musste, was unverhältnismäßig viel Zeit beanspruchte und außerdem bei Eindampfung vieler Proben zu einer Überlastung des Vakuumtrockenschanks geführt hätte.

Die Eindampfung der wässrigen Probelösung über einen Rotationsverdampfer mit Zusatz von Methanol bzw. Isopropanol erwies sich als ebenfalls zu aufwendig. Mit der beschriebenen modifizierten Derivatisierungsmethode konnte eine Absenkung der Nachweisgrenze auf ca. 10 µg/ml (\equiv 0,1 % Laktose in der Probe) (Splitless-Injektion 1 µl) erreicht werden.

3.1.4.3.3 Versuche zur Probenaufreinigung

Da mit der oben beschriebenen Methode nur eine Nachweis-/Bestimmungsgrenze von ca. 10 µg/ml erreicht werden konnte; musste die Probeneinwaage von 1 g auf 10 g/100 ml Lösung erhöht werden. Die höhere Probeneinwaage erforderte jedoch für die Matrixabtrennung ebenfalls eine erheblich größere Menge an Carrez-Fällungsreagenz, was zu stark viskosen Probelösungen führte, die nur ungenau aufgefüllt werden konnten und zum anderen nach Abzentrifugation und Eindampfung eines Aliquots des klaren Überstandes zu starken Salzurückständen in den Probenials führten. Durch diese hohen Salzurückstände, die durch die zugebene Stox-Lösung nur benetzt, aber nicht gelöst werden können, ist eine nur teilweise/unvollständige Freisetzung der darin eingeschlossenen, im Spurenbereich vorhandenen Zucker möglich.

Deshalb wurde versucht das Carrezfällungsreagenz teilweise durch den Zusatz von Ethanol, Methanol oder Essigsäure als Fällungsmittel zu ersetzen. Die größte Einsparung an Carrezreagenz wurde durch die Verwendung von 50%igem Ethanol erreicht, eine weitere Erhöhung des Ethanolanteils war auf Grund der Gewährleistung einer ausreichenden Analytlöslichkeit nicht möglich. Diese Probenaufbereitung wurde bei einer lactosefreien Milch und einem lactosehaltigen Schmelzkäse bei einer Probeneinwaage von jeweils 10 g getestet. Beide Proben wurden mit 50 ml Ethanol und mit gleichen Teilen Carrezlösung 1 und 2 (Milch je 2 ml; Schmelzkäse je 3 ml Carrez 1 und 2) versetzt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und geschüttelt. Von dem nach Abzentrifugation erhaltenen klaren Überstand wurden 0,2 ml im Vakuumtrockenschrank eingedampft und mit der unter 3.1.4.3.2 beschriebenen Methode derivatisiert. 1 µl des erhaltenen Heptanextrakts wurden im Splitlessmodus injiziert.

Bei beiden Proben waren eine große Anzahl mitelulierender Peaks im Chromatogramm vorhanden, die eine genaue Zuordnung und Quantifizierung der Analyten Lactose und Galactose bei niedrigeren Gehalten unmöglich macht. Bei den Störsubstanzen handelt es sich wahrscheinlich um mitsilylierte Lipide (Lecithine), Aminosäuren und kurzkettige Peptide, die durch die Fällung nicht erfasst wurden.

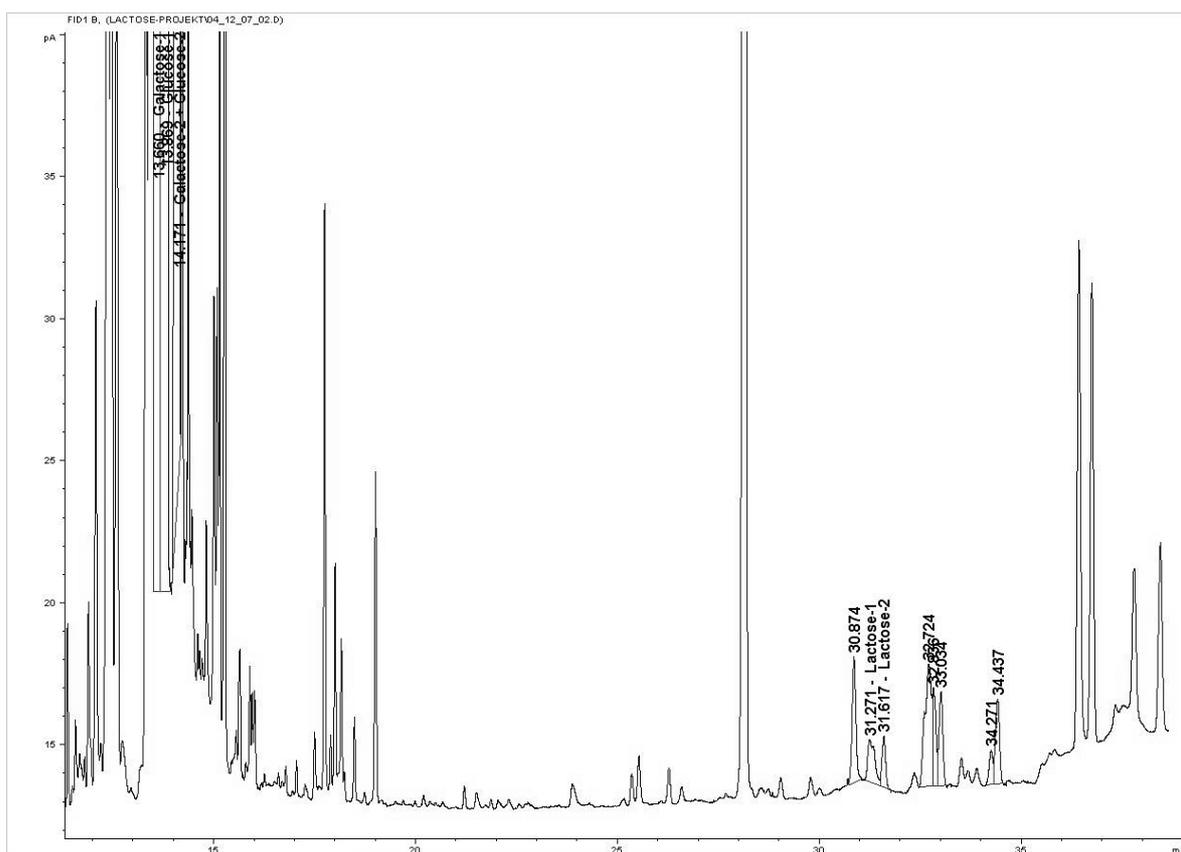


Abbildung 14: GC-Chromatogramm einer lactosefreien Milch; Probeneinwaage 10 g/100 ml; mit Carrezlösung und 50 % Ethanol gefällt, 0,2 ml Probenaliquot eingedampft; Splitlessinjektion; Injektionsvolumen: 1 µl

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde versucht den nach der Fällung und Abzentrifugation resultierenden Überstand weiter aufzureinigen bzw. die Carrez-/Ethanol-fällung durch alternative Probenaufbereitungsstechniken zu ersetzen.

Zunächst wurde die Aufreinigung des Überstandes über klassische Säulenchromatographie erprobt. Als Säulenmaterial wurde Celite 545 verwendet, ein Kieselgurmaterial das u.a. zur Fettabtrennung eingesetzt wird; 8 cm-Säulen wurden mit ca. 3,5 g Celite befüllt und mit einigen ml neutralgestellter Probelösung vorgewaschen/konditioniert. Die Neutralstellung der Probelösung war wegen der säurelöslichen Celiteanteile notwendig. Das Eluat einer Schmelzkäseprobe zeigte nach Eindampfung von 0,2 ml Aliquot jedoch größere Salzurückstände, die größtenteils aus dem Säulenmaterial stammten; zusätzlich waren fettige Schlieren an der Glaswandung zu beobachten, die auf größere organische Rückstände schliessen ließen. Auf eine Untersuchung mit GC wurde deshalb verzichtet.

Alternativ zur Matrixabtrennung mittels Carrezfällung wurde die Fällung mit Biggs-Szijarto-Reagenz (Phosphorwolframsäure/Zinkacetat) getestet. Die Fällung mit Biggs-Szijarto-Reagenz stellte jedoch keine Verbesserung dar, da bei einer Probeneinwaage von 10 g wesentlich mehr an Fällungsreagenz als bei der Carrezfällung eingesetzt werden musste.

Als eine weitere Möglichkeit zur Matrixabtrennung ohne Zusatz von anorganischen, nichtflüchtigen Fällungsreagenzien wurde die Ultrafiltration erprobt.

Folgende Materialien (Fa. Sartorius) wurden verwendet:

- Centrisart 132 29 (5 kDa Ausschlussgrenze; Membranmaterial Cellulosetriacetat)
- Vivaspin 2 (5 kDa Ausschlussgrenze; Membranmaterial Polyethersulfon)

Einstellungen Zentrifuge: 2.000 g bis 3000 g

Die Zentrifugation einer 1:10 mit Wasser verdünnten Milchprobe führte binnen kürzester Zeit zur Verstopfung der UF-Membran; das für die Derivatisierung erforderliche Probevolumen von 0,2 ml Filtrat wurde bei einmaliger Filtration nicht erhalten.

Aus dem Überstand einer mit 100 % Methanol gefällten Milchprobe und einer mit 50% igen Ethanol gefällten Schmelzkäseprobe konnte zwar durch Ultrafiltration das notwendige Probevolumen für die Derivatisierung gewonnen werden, nach Einengung/Verdampfung des Filtrats wurde jedoch ein fettiger, öliges Rückstand erhalten. Auf die Analyse dieses Rückstands wurde verzichtet, da mit einer Kontamination des GC-Injektors bzw. mit zahlreichen Interferenzen im Chromatogramm auf Grund der gelösten Lipide zu rechnen war.

Die Aufreinigung über Ultrafiltration wurde daraufhin aufgegeben, da sie für die Routine bei Einsatz von mehreren Filtern bzw. von Filtereinheiten größerer Kapazität zu teuer gewesen wäre und auf Grund der Ausschlussgrenze von 5 kDa noch zahlreiche andere Komponenten mit den Zuckern die Membran passieren können.

Weiterhin wurde in Verbindung mit den unter 3.1.4.3.4 beschriebenen modifizierten GC-Injektionsbedingungen, die ein höheres Injektionsvolumen erlaubten, eine Aufreinigung über SPE zur Entfernung von Lecithinen und Peptiden versucht. Die Probeneinwaage wurde deshalb wieder auf 1 g und damit einhergehend die Carrezlösungsmenge reduziert.

Für die SPE-Versuche wurden 1 g einer lactosehaltigen Milchprobe und einer lactosehaltigen Schmelzkäseprobe in etwas Wasser gelöst und mit je 2 ml Carrezlösung 1 und 2 gefällt. Für die Aufreinigung über die SPE-Kationenaustauschersäule wurde zusätzlich mit 0,1 ml 32%-iger Salzsäure auf pH 2 gestellt und mit Wasser aufgefüllt und anschließend die Probelösung abzentrifugiert. 1 ml des klaren Überstandes wurden jeweils über eine vorher konditionierte Strata XC (30 mg/1 ml; Kationenaustauscher auf Polymermaterial) und eine Strata X (30 mg/1 ml; Polymermaterial) von Phenomenex gereinigt. Die ersten ca. 0,5 ml des Eluats wurden verworfen. Zum Vergleich wurde die Probelösung parallel nur über einen Millex GV-4 (Porendurchmesser 0,22 µm; hydrophiles PVDF-Material) Millipore-Spritzenfilter filtriert. Je 0,3 ml des Eluats/Filtrats wurden für die Derivatisierung eingesetzt.

Der eingedampfte Rückstand wurde in 0,3 ml Pyridin aufgenommen und mit 200 µl HMDS/ 100 µl TMCS direkt ohne vorherige Aldoximbildung silyliert. Nach erfolgter Silylierung (15 min. bei 80°C) wurde mit weiteren 0,4 ml Pyridin verdünnt, der gebildete Ammoniumchlorid-Niederschlag abzentrifugiert und 1 µl des Überstandes splitless injiziert.

Die Derivatisierung erfolgte abweichend zu 3.1.4.3.1 und 3.1.4.3.2 ohne Aldoximreaktion, um andere eventuelle Störeinflüsse, wie z. B. Störungen bei der Aldoximbildung oder ungleichmäßige Extraktion in Heptan, hervorgerufen durch unterschiedliche Matrixbestandteile, auszuschließen. Für die Peakidentifizierung wurden ebenfalls Standardlösungen direkt silyliert. Dabei zeigte sich bei Monosaccha-

riden nicht nur die Problematik von insgesamt vier korrespondierenden Peaks, sondern auch, dass für Lactulose ein einzelner schmaler Peak und ein breiter, tailender Peak erhalten wurde, der mit einem der beiden Lactosepeaks überlappte. Nach Montilla et al. [40] handelt es sich dabei um nicht-aufgelöste Anomere der Lactulose.

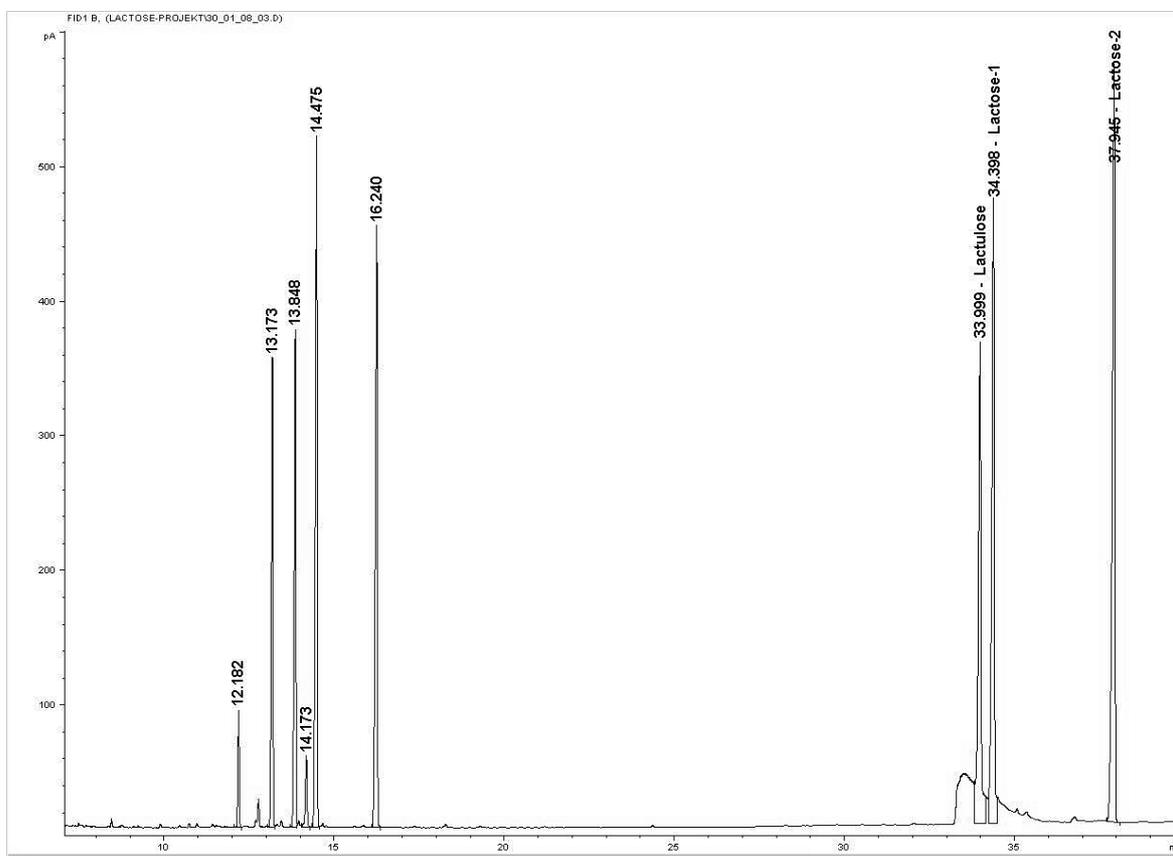


Abbildung 15: GC-Chromatogramm eines direkt silylierten Standards Lactose, Galactose; Konzentration je 1 mg/ml; Splitless-Injektion; Injektionsvolumen 1 µl; Galactose-Peaks im Retentionsbereich 12 - 16,5 Minuten

Sowohl bei der Milchprobe als auch bei der Schmelzkäseprobe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Aufreinigungsmethoden hinsichtlich störender Interferenzen im Chromatogramm festgestellt werden.

Übereinstimmend zeigte sich jedoch bei beiden Proben eine Abnahme der beiden Lactose-Peaks in der Reihenfolge der Probenaufbereitung Millex-GV-4-Filter, Strata X- und Strata XC-Säule. Im Vergleich zum GV-4-Filtrat wurden bei den über Strata X gereinigten Probelösungen nur zwischen 64 (Schmelzkäse) und 73 % (Milch), und bei den über Strata XC gereinigten Lösungen nur ca. 42 % bzw. 44 % Lactose gefunden.

Eine schlüssige Erklärung für diese Effekte konnte nicht gefunden werden. Mögliche Probenverdünnungseffekte auf Grund der vorherigen Konditionierung der SPE-Säulen sollten wegen des Vorlaufs von 0,5 ml Eluat ausgeschlossen sein. Eventuell sind auf den SPE-Säulen retardierte Matrixbestandteile wie Peptide für eine teilweise Adsorption der Zucker verantwortlich.

3.1.4.3.4 Versuche mit erhöhtem Injektionsvolumen/anderem Injektionsmodus

Um die Zahl der durch nicht abgetrennte Matrixbestandteile verursachten Interferenzpeaks im Chromatogramm möglichst gering zu halten und gleichzeitig eine ausreichende Analytmenge für die Detektion auf die GC-Säule aufzubringen, wurde versucht, mit einer geringeren Probeneinwaage in Kombination mit einem höherem Injektionsvolumen zu arbeiten.

Dazu musste der verwendeten DB 1701-Säule eine unbelegte Vorsäule ohne stationäre Phase (Retention Gap) vorgeschaltet, ein anderer Liner/Insert (Double Gooseneck) eingesetzt und mit erhöhtem Säulenvordruck (Pulsed Splitless Modus) und verringerter Injektionsgeschwindigkeit (1 -5 $\mu\text{l}/\text{sec.}$) injiziert werden.

Das Injektionsvolumen konnte durch diese Maßnahmen von 1 auf 5 μl erhöht werden. In Verbindung mit einer Probeneinwaage von 1-2 g hätte mit dem modifizierten Derivatisierungsprotokoll von 3.1.4.3.2 eine Nachweisgrenze von 1 -2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht werden müssen. Durch die starke Erhöhung des Injektionsvolumens und den veränderten Injektionsmodus reicherten sich allerdings nun auch sämtliche mitsilylierten und schwererflüchtigen Verunreinigungen aus den verwendeten Reagenzien in der Vorsäule an. Auch durch Variation der Splitless-Zeit, des Säulenvordrucks und des Silylierungsmittels konnte keine Verringerung des störenden Untergrunds erreicht werden. Somit konnte auch mit dem veränderten Injektionsmodus keine Verbesserung der Nachweisgrenze erzielt werden.

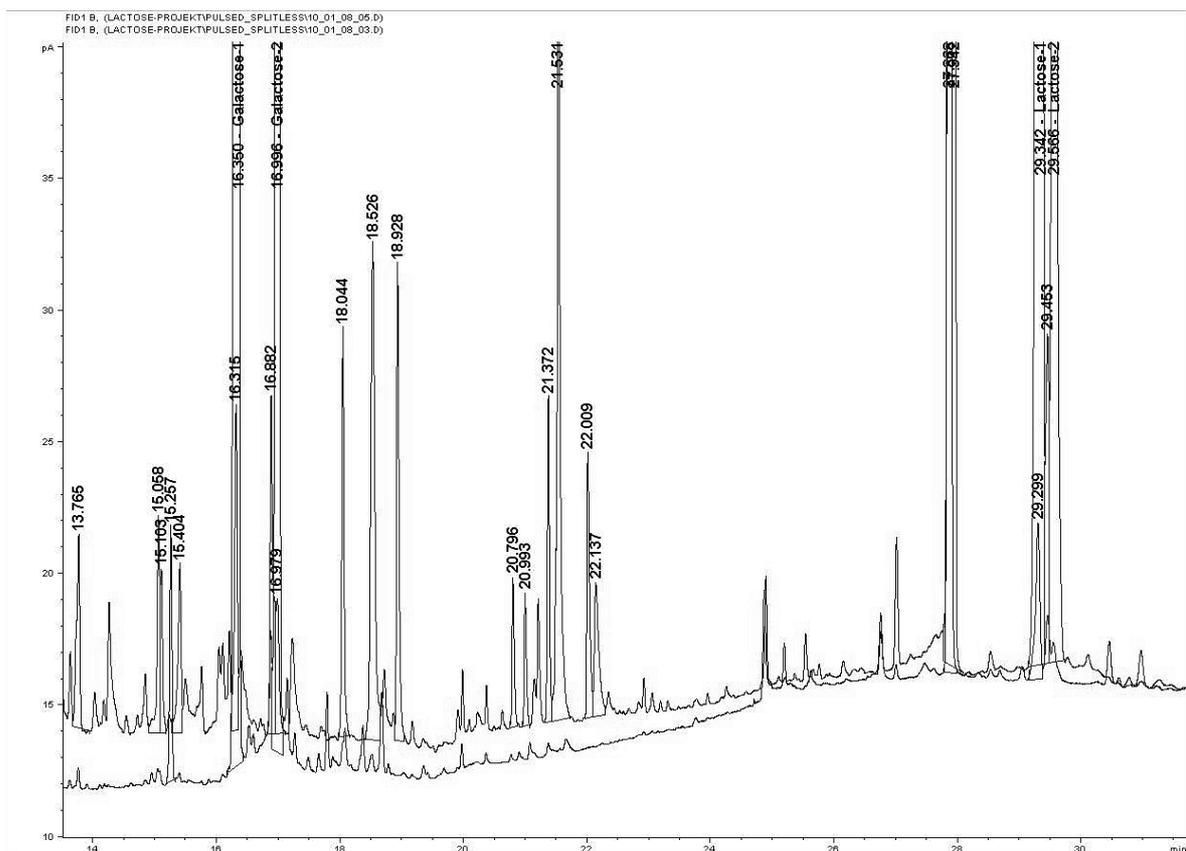


Abbildung 16: Überinandergelagerte GC-Chromatogramme einer Standardlösung Lactose, Galactose, Konzentration je 1 mg/ml (eingedampftes Aliquot 0,1 ml; Heptanextrakt 1:10 für Injektion verdünnt) und einer Standardlösung Lactose, Galactose, Konzentration je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (eingedampftes Aliquot 0,4 ml; Heptanextrakt unverdünnt injiziert); Pulsed Splitless-Injektion mit Retentiongap; Injektionsvolumen je 5 μl
 Obere Spur: Standardlösung mit c = 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, untere Spur: Standardlösung mit c = 1 mg/ml

3.1.5 HPLC-Versuche mit elektrochemischer Detektion und Kationenaustauschersäule

Die gepulst-amperometrische Detektion (PAD) ist nach der Fluoreszenzdetektion derivatisierter Zucker die empfindlichste Nachweismethode. Zudem wird durch Einstellung der entsprechenden Redoxpotentiale der Zucker selektiv detektiert. Die Überlegung war, dass in Verbindung mit einer Kationenaustauschersäule, underivatisierte Zucker im Bereich der geforderten Nachweisgrenze bestimmbar wären. In der vorliegenden Literatur waren für Zuckerbestimmungen nur die Kombinationen Anionenaustauschersäule/PAD oder MS, Kationenaustauschersäule/RI oder ELSD und Kapillarelektrophorese/PAD beschrieben. Für die Anionenaustauschchromatographie ist wegen der erforderlichen hohen Natronlaugenkonzentrationen eine Ionenchromatographie-Anlage (IC) erforderlich. Diese stand jedoch nicht zur Verfügung. Die Trennung über eine Polymer-Kationenaustauschersäule ist hingegen auf Grund des gemischten Trennmechanismus (Ionenausschluss, Größenausschluss, Ligandenaustausch, Hydrophobe Wechselwirkungen) mit rein wässrigen Eluten oder mit geringem Salz- (< 5%) oder organischem Anteil (< 10%) möglich und somit eine herkömmliche HPLC-Anlage einsetzbar.

Als Kationenaustauschersäule wurde die Rezex RCM-Säule (Calcium-Form) Fa. Phenomenex, die bereits für die Versuche mit derivatisierten Zuckern verwendet wurde, eingesetzt.

Als PAD-Gerät stand ein ESA-Coulochem III-Detektor mit einer 5040-Zelle mit Goldelektrode der Fa. ERC zur Verfügung.

Auf Grund unzureichender bzw. fehlerhafter Informationen der Fa. ERC und fehlender Literatur zu diesem Thema (Kopplung Kationenaustauschersäule/PAD) war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt, dass für die gepulst-amperometrische Detektion in Verbindung mit einer Goldelektrode Zucker nur bei sehr hohen pH- Werten (pH 13) gemessen werden können. Diese Information wurde erst nachträglich von der Fa. ERC erhalten. Deshalb musste zusätzlich eine Pumpe zur Nachsäulenderivatisierung der eluierenden Zucker (Zudosierung von 0,4 M - 0,5 M Natronlauge in den Eluentenstrom) angemietet werden. Die Fa. ERC stellte über einen ihrer Kooperationspartner eine Leihpumpe zur Verfügung. Entgegen der ausdrücklichen Versicherung der Fa. ERC erwies sich diese als nicht inert gegenüber der geförderten Natronlauge und lieferte bedingt dadurch ein sehr hohes Untergrundsignal, was eine Messung niedriger Konzentrationen unmöglich machte. Auf Nachfrage wurde daraufhin auf Anraten der Fa. ERC ein Austausch der Pumpendichtungen und eine Passivierung der Pumpe vorgenommen. Diese Maßnahmen bewirkten jedoch nur eine geringfügige Absenkung des Untergrundsignals.

Erkundigungen bei den beiden Konkurrenzfirmen Fa. Dionex und Fa. Metrohm ergaben übereinstimmend, dass nur absolut metallfreie Pumpen für eine Förderung von alkalischen Medien geeignet sind. Die von beiden Firmen angebotenen IC-Systeme sind komplett aus PEEK (Polyetheretherketon)-Material anstelle von Edelstahl gefertigt. Dies war bei der Leihpumpe der Fa. ERC jedoch nicht gegeben.

Versuche mit dieser Gerätekonstellation wurden deshalb nur mit höherkonzentrierten Standards (0,5 mg - 1mg/ml) durchgeführt, um zumindest die chromato-

graphischen Parameter zu untersuchen. Wegen der notwendigen Zudosierung von Natronlauge in den Eluentenstrom nach der Säule war mit einer Peakverbreiterung durch Diffusions- und Strömungseffekte zu rechnen. Außerdem führt auch die große injizierte Analytmenge zu einer Peakverbreiterung. Dies wurde durch die Untersuchungen bestätigt, dennoch war noch eine zufriedenstellende Auftrennung (annähernde Basislinientrennung) zwischen Lactose, Lactulose, Galactose und Glucose zu beobachten. Eine Standardmischung aus Lactose, Lactulose, Saccharose, Maltose, Galaktose, Glucose und Fructose zeigte allerdings eine starke Überlagerung des Lactose-, Lactulose-, Saccharose-, Maltose- und Glucosepeaks. Die Calcium-Form der Rezex-Säule ist somit in der Kombination mit Nachsäulenaddition nur für die Analyse ungezuckerter Milchprodukte geeignet. Die Bleiform des gleichen Säulentyps hingegen ist höchstwahrscheinlich (nach Auflösungs-/Retentionszeitangaben im Säulen-Hersteller katalog) auch für die Analyse gezuckerter Milchprodukte geeignet.

Nachdem sich die o.g. Versuchsanordnung nicht bewährt hatte, wurde versucht die Natronlauge für die Nachsäulenaddition durch Druckbeaufschlagung anstelle einer Pumpe zu fördern. Die Druckbeaufschlagung besitzt neben der Umgehung von Metallioneneintrag zusätzlich den Vorteil der pulsationsfreien Förderung was zu einer Verringerung des Rauschens und zu einer stabileren Basislinie führt.

Für die Druckbeaufschlagung wurde ein druckfeste Flasche mit Spezialventil eingesetzt. Die Beaufschlagung erfolgte mit 1 atm Stickstoff. Auf Grund des erzeugten Gegendrucks des HPLC-Laufmittels in den miteinander verbundenen PEEK-Kapillaren konnte jedoch nicht in ausreichendem Maß die für die Detektion erforderliche Menge Natronlauge zudosiert werden. Bedingt durch das Drucklimit der Flasche konnten keine höheren Drücke zur Förderung eingesetzt werden.

3.1.6 Ionenchromatographie mit Anionenaustauschersäule und gepulst amperometrischem Detektor (IC/PAD)

Auf Grund der negativen Ergebnisse wurden die beiden Firmen Dionex und Metrohm kontaktiert. Beide Firmen ermöglichten die Messung von mehreren Standards bzw. Proben zu Testzwecken in ihren Applikationslaboren. Verschiedene Applikationsbeispiele zur Zuckerbestimmung wurden vorgelegt [68] - [74]. Die Fa. Metrohm stellte für mehrere Wochen ein Leihgerät zur Verfügung.

3.1.6.1 Messungen Fa. Dionex

Folgende Standardlösungen/Proben wurden zunächst im Applikationslabor der Fa. Dionex in Idstein untersucht:

- I) Standardlösung mit 1 µg/ml Lactose
250 µg/ml Galactose
250 µg/ml Glucose

Diese Lösung entspricht in etwa der Saccharidzusammensetzung lactosefreier Milch mit jeweils 2,5% Galactose und Glucose und der geforderten Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze von 0,01% Lactose in der Probe, bei einer Probeneinwaage von 1g auf 100 ml Lösung.

- II) Standardlösung mit 1 µg/ml Lactose
 4 µg/ml Lactulose
 1 µg/ml Galactose
 1 µg/ml Glucose

Diese Lösung enthält Lactose, Galactose und Glucose entsprechend einem Gehalt von 0,01% in der Probe und 0,04% Lactulose.

- III) Standardlösung mit 1 µg/ml Lactose
 4 µg/ml Lactulose
 1 µg/ml Galactose
 200 µg/ml Glucose
 200 µg/ml Saccharose
 200 µg/ml Fructose

Zusätzlich zu obiger Lösung II wurden Glucose, Saccharose und Fructose in für gezuckerte Produkte zu erwartenden Konzentrationen zugesetzt.

- IV) Probelösung einer UHT-Milch 3,5 % Fett (Probeneinwaage 1,001 g/100 ml),
 Ergebnis der im Haus durchgeführten enzymatischen Bestimmung: 0,12 %
 Lactose-Monohydrat bzw. 0,11 % Lactose (interne Proben-Nr: A08/402-2)

Die Standardlösungen wurden durch Verdünnung aus den genau eingewogenen Einzelstandard-Stammlösungen hergestellt.

Mit Ausnahme der Lactose, bei der das Lactose-Monohydrat zur Herstellung der Standard-Stammlösung verwendet wurde, wurden die Stammlösungen mit einer Einwaage von 0,1000 \pm 0,0001 g pro 100 ml hergestellt.

$C_{\text{Lactose-Monohydrat-Stamm-Lsg.}} = 0,1052 \text{ g/100 ml}$ (entspricht 0,09994 g/100 ml Lactose)

Entsprechende Aliquote dieser Stammlösungen wurden in 100 ml Meßkolben abpipettiert und analog zur Probe mit je 2 ml Carrez-Reagenz I und II versetzt und auf 100 ml aufgefüllt.

Sowohl die Probe- als auch die Standardlösungen wurden durch einen 0,22 µm Spritzenfilter aus Celluloseacetat filtriert. Diese Probenaufbereitung wird ebenfalls, mit Ausnahme der Verwendung eines Filters größerer Porenweite, bei der enzymatischen Bestimmung eingesetzt.

Im Applikationslabor der Fa. Dionex in Idstein wurden insgesamt 38 Analysenläufe für die Methodenentwicklung ausgeführt. Ein Virtual-Column-Programm, ein datenbankbasiertes IC-Methodenoptimierungsprogramm von Dionex, wurde auf das gegebene Trennproblem angewendet.

Für die Bestimmungen wurde eine Dionex CarboPac PA20-Säule verwendet, eine Anionenaustauschersäule auf Polymerbasis, die für die Trennung von Mono- und Disacchariden spezifiziert ist. Um eine ausreichende Auflösung sämtlicher Zucker, auch dem am schwierigsten zu trennenden Paar Lactose und Lactulose, auch bei sehr großen Konzentrationsunterschieden der Analyten, wie in Standard I und Probelösung IV gegeben, zu erreichen, musste ein Gradientenprogramm gefahren werden. Als Laufmittel wurden 200 mM Natronlauge und 100 mM bis 1 M Natrium-

acetatlösung verwendet. Mit diesem Trennsystem gelingt die Auftrennung aller sechs Zucker in der Elutionsreihenfolge Galactose, Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose und Lactulose (Abbildung 17). Galactose kann auch in Gegenwart eines hohen Überschusses an Glucose, bedingt durch die frühere Elution, quantitativ im Spurenbereich bestimmt werden.

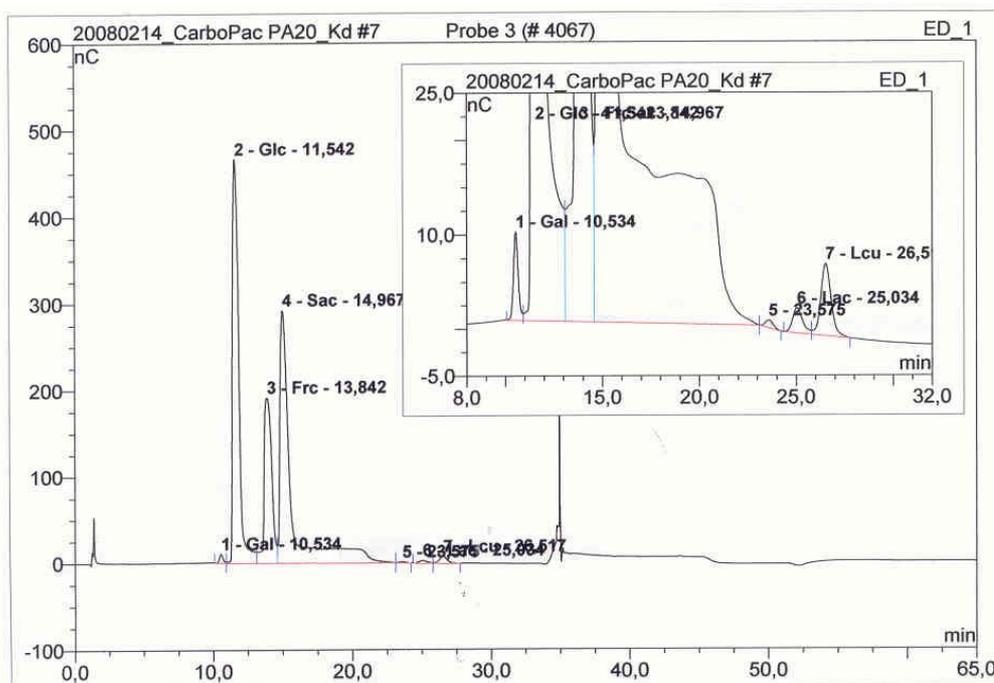


Abbildung 17: IC-Chromatogramm Probe III (Standardlösung mit 6 Einzelzuckern)

Die erforderliche Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze von 1 µg/ml wird erreicht und kann noch unterschritten werden.

Die Analysendauer beträgt bei niedrigen Analytgehalten und bei nicht ganz basisliniengetrennten Lactose-/Lactulose-Peak ca. 30 Minuten. Bei hohen Zuckerkonzentrationen im Prozentbereich, wie z.B. Galactose/Glucose in lactosefreier Milch oder Saccharose /Fructose/Glucose in gesüßten Produkten, ist durch die Überladung der Säule und für die notwendige, längere Regeneration der Goldelektrode des Detektors eine zusätzliche Spülprozedur erforderlich und damit einhergehend die Verlängerung eines Analysenlaufs auf 60 Minuten. Bei einer längeren Analysenzeit ist ebenfalls eine vollständige Auftrennung des Lactulose- und Lactose-peaks ($R_s = 1,64$) möglich. Die Variation der Injektionsvolumina zwischen 10 und 20 µl ergab vergleichbare Werte, was Memory-Effekte im IC/PAD-Systems ausschließt.

Für die Quantifizierung wurde eine Zweipunktkalibration mit erzwungenem Nullpunkt mit Standardkonzentrationen von jeweils 10 µg/ml und 20 µg/ml pro Zucker verwendet. Die Korrelationskoeffizienten lagen dabei zwischen 99,5 und 99,9%.

Die Wiederfindungsraten lagen bei der Konzentration von 1 µg/ml für Lactose zwischen 88% und 106%; für Galactose zwischen 127 und 136%. Die relativ schlechten Wiederfindungsraten für Galactose sind vermutlich auf die nicht im Kalibrationsbereich der Proben/Standards liegenden Kalibrationspunkte zurückzuführen. Der Gehalt der Probelösung der lactosefreien Milch wurde mit 0,361 µg/ml gemessen, was einem Gehalt von 0,0036 % Lactose in der Probe entspricht.

In den Chromatogrammen der Standardlösungen I und III und der Probelösung IV mit hohen Gehalten an Galactose, Glucose bzw. Saccharose und Fructose ist ein starkes Tailing dieser Peaks auf Grund von Überladungseffekten zu beobachten (Abbildung 17). Zusätzlich erscheinen kleinere Peaks vor Lactose im Chromatogramm der Standardlösungen, die möglicherweise auf Umlagerungsprozesse der Zucker oder auf Verunreinigungen in den verwendeten Standardsubstanzen zurückzuführen sind.

Nicht zugeordnet werden konnten im Chromatogramm der UHT-Milch (Abbildung 18) zwei vor Lactose eluierende größere Peaks von denen einer nur knapp basisliniengetrennt zur Lactose ist. Eine gewisse Querempfindlichkeit von Glycoproteinen bei dem eingestellten Messpotential kann nach Auskunft der Fa. Dionex nicht ganz ausgeschlossen werden [97]. Dies könnte durch Vorschaltung einer speziellen Vorsäule (Aminotrap) jedoch ausgeschaltet werden. Koelutionen könnten außerdem durch einen Cyclovoltametrie Scan festgestellt werden.

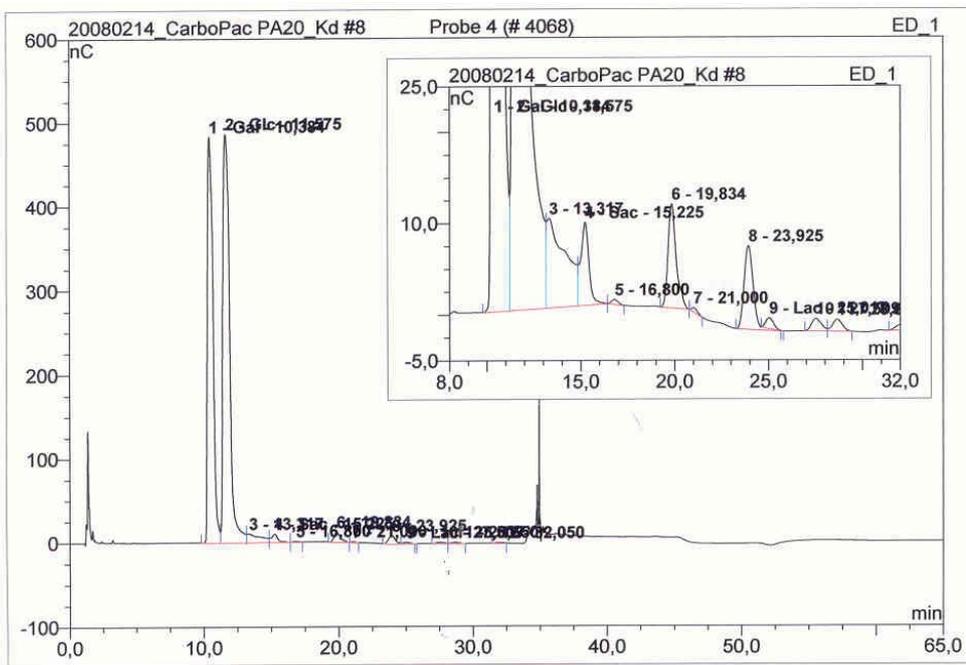


Abbildung 18: IC-Chromatogramm Probe IV (UHT-Milch, 3,5 % Fett), Lactose = Peak 9

Methodenparameter:

Säule: CarboPac PA20 (3 x 150 mm)

Elution: Gradient

Eluent A: 0,2 M Natronlauge (mit Helium beaufschlagt)

Eluent B: 0,1 M - 1 M Natriumacetatlösung (mit Helium beaufschlagt)

Fluß: 0,4 ml/min.

Temperatur: 30°C

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: gepulst amperometrisch

Die exakten Angaben zu den Methodenparametern (Art des Gradienten, etc.) wurden von der Fa. Dionex nicht mitgeteilt.

Die Kombination einer Kationenaustauschersäule mit einer inerten Pumpe für die Nachsäulenaddition von Natronlauge und einem PAD-Detektor sind nicht geeignet. Bedingt durch den Kationenaustrag der Säule (Ca- oder Pb-Ionen) führt diese Kopplung zu Störungen/Verschmutzungen auf dem elektrochemischen Detektor [97].

Eine kurzzeitige Ausleihe einer Dionex-IC-Anlage war nicht möglich, da mit der hohen Störanfälligkeit und den notwendigen entsprechend langen Stabilisierungszeiten des Detektors von Seiten der Firma argumentiert wurde.

Die Fa. Dionex erklärte sich aber bereit, folgende weitere Proben in ihrem Applikationslabor in Olten, CH zu messen:

Aufstockversuche mit Lactose im Bereich der geforderten Bestimmungsgrenze von 0,01% Lactose in verschiedenen Matrices zu Überprüfung der Richtigkeit der Analytik:

V.) Süßrahmbutter, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1247-08)

Probe A: Einwaage: 1,0019 g/100 ml

Probe B: Einwaage: 1,0194 g/100 ml + 80 µl Lactose-Standardlösung

VI.) Joghurtzubereit. Straciatella, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1247-11)

Probe A: Einwaage: 1,0296 g/100 ml

Probe B: Einwaage: 1,0415 g/100 ml + 150 µl Lactose-Standardlösung

VII.) Weichkäse, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1403-01)

Probe A: Einwaage: 1,0237 g/100 ml

Probe B: Einwaage: 1,0123 g/100 ml + 100 µl Lactose-Standardlösung

VIII.) Schmelzkäse, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1514-01)

Probe A: Einwaage: 1,0019 g/100 ml

Probe B: Einwaage: 1,0466 g/100 ml + 150 µl Lactose-Standardlösung

Der Lactosegehalt der Proben wurde im Vorfeld enzymatisch bestimmt und lag bei allen Proben unter 0,1 %. Die Konzentration der für die Aufstockversuche verwendeten Lactose-Standardlösung betrug 0,9928 mg/ml.

Zur weiteren Überprüfung der Richtigkeit wurde zusätzlich eine lactosehaltige Milchprobe untersucht:

IX.) Milch (3,5 % Fett, pasteurisiert, homogenisiert, Einwaage: 1,0048 g/100 ml).
Der enzymatisch bestimmte Lactosegehalt dieser Probe betrug 4,92 % Lactose-Monohydrat (\equiv 4,67 % Lactose).

Die Probenaufbereitung erfolgte nach durchgeführter Aufstockung auf die eingewogene Probe analog zur ersten Proben-/Standardserie.

Folgende Lactosegehalte wurden ermittelt:

Tabelle 5: Lactosegehalt in realen Proben

Probe	Lactosegehalt im Produkt [%]	Lactosegehalt in der Probelösung [$\mu\text{g/ml}$]
Süßrahmbutter	n.n.	n.n.
Joghurtzubereitung	< 0,005 ^{*)}	< 0,5 ^{*)}
Weichkäse	n.n.	n.n.
Schmelzkäse	0,0152	1,52
Vollmilch	4,54	456

n.n.: nicht nachgewiesen

^{*)} genauere Angabe auf Grund eines überlappenden Nachbarpeaks im Chromatogramm nicht möglich

Tabelle 6: Lactosegehalt in aufgestockten Proben

Probe	Lactosegehalt in der Probelösung [$\mu\text{g/ml}$]	Wiederfindung [%]
Süßrahmbutter	0,89	112
Joghurtzubereitung	1,61	108 ^{*)}
Weichkäse	1,08	109
Schmelzkäse	2,90	93 ^{**)}

^{*)} ohne Berücksichtigung des Untergrunds < 0,5 $\mu\text{g/ml}$

^{**)} 93 % ohne Einwaagekorrektur bzw. 88 % mit Einwaagekorrektur

Unter Berücksichtigung der sehr anspruchsvollen, stark eiweiß- und fetthaltigen Matrices bei denen, bedingt durch Schaumbildung und starke Inhomogenitäten, die Probelösungen nicht exakt auf 100 ml aufgefüllt werden konnten und somit durch die Probenaufbereitung bereits mit Fehlern bei der Wiederfindung im Prozentbereich zu rechnen ist, sind die erhaltenen Ergebnisse als sehr gut zu bewerten.

Der für die lactosehaltige Vollmilch erhaltene Wert stimmt mit dem enzymatisch ermittelten Wert (4,67 %) und den Herstellerangaben (üblicher Gehalt für Vollmilch: 4,8% Lactose-Monohydrat entsprechend 4,6% Lactose) gut überein.

Der oben erwähnte Spülschritt mit Natriumacetat erwies sich bei diesen Proben auch zur Vermeidung von Geisterpeaks, Memoryeffekten und Retentionszeit-schwankungen, hervorgerufen durch stärker retardierte Substanzen, wie z.B. Oligosacchariden oder Phosphaten, als notwendig.

Für die Messungen wurde eine Fünfpunktkalibration über drei Dimensionen (Standardkonzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$) ohne er-

zwungenem Nullpunkt durchgeführt. Wegen des großen Kalibrationsbereiches wurde eine leicht quadratische Kalibrationsfunktion (Korrelationskoeffizient für Lactose 0,99997) erhalten.

Auf Grund der beobachteten zusätzlichen Peaks im Chromatogramm der lactosefreien UHT-Milch (Probe IV) und späterer Untersuchungen von lactosefreien Produkten mittels HPLC-Ionenpaarchromatographie und dem IC-PAD-Leihgerät der Fa. Metrohm, die ebenfalls mehrere unerwartete, nicht zuordenbare Peaks in den Chromatogrammen zeigten, wurde die Fa. Dionex zur Bestätigung dieser Ergebnisse um die zusätzliche Messung nachfolgender Proben mit der bestehenden Methode in ihrem Applikationslabor in Olten, CH gebeten:

- X.) Vollmilchpulver, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/493-01)
Einwaage: 0,1299 g/100 ml; enzymatisch bestimmter Lactosegehalt: 3,27 %
Lactose-Monohydrat bzw. 3,11 % Lactose
- XI.) UHT-Milch, 1,8 % Fett, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1847-02)
Einwaage: 1,0228 g/100 ml; enzymatisch bestimmter Lactosegehalt: 0,13 %
Lactose-Monohydrat bzw. 0,12 % Lactose
- XII.) UHT-Milch, 1,5 % Fett, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/1801-01)
Einwaage: 1,0558 g/100 ml; enzymatisch bestimmter Lactosegehalt < 0,1 %

Diese Proben wurden sowohl original als auch jeweils aufgestockt mit 1 µg/ml Lactose gemessen, um die Identifizierung des Lactosepeaks abzusichern. Die Chromatogramme aller drei Proben weisen die bei Probe IV bereits beobachteten zwei zusätzlichen Peaks auf, wobei der zweite Peak bei diesen Messungen nicht vollständig basisliniengetrennt zum Lactosepeak eluiert (Abbildung 19)

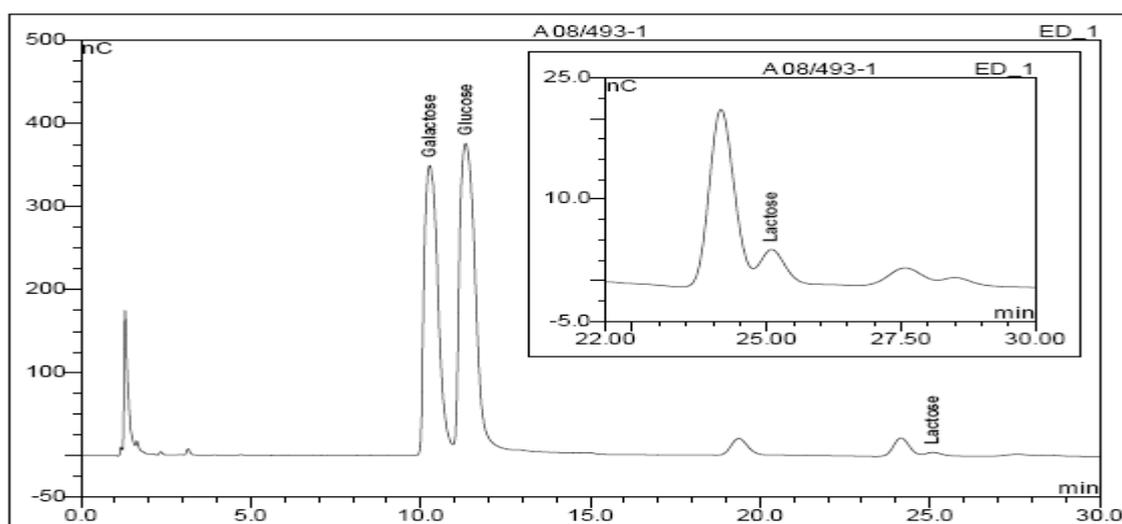


Abbildung 19: IC-Chromatogramm einer lactosefreien Vollmilchpulverprobe (Probe X)

Die Trennung ist jedoch für eine genaue Quantifizierung der Lactose ausreichend. Eine Verbesserung der Auftrennung der beiden Peaks könnte lt. Dionex möglicherweise durch eine Variation des Gradientenprogramms erreicht werden, da die

entwickelte Methode nur hinsichtlich der Auftrennung der Lactose-/Lactulosepeaks optimiert wurde.

Die Peaks der beiden zusätzlichen Komponenten im Chromatogramm sind in der Milchpulverprobe trotz der um ca. Faktor 10 niedrigeren Probeneinwaage deutlich größer als in den beiden Milchproben.

Die Retentionszeitstabilität wurde mit einer Übereinanderlegung der Chromatogramme zweier im Abstand von ca. 24 Stunden gemessener Standardlösungen belegt.

Weiterhin wurde mit einer Milchprobe ein Versuch bei erhöhter Flussrate (0,6 ml/min statt 0,4 ml/min) durchgeführt, um eine Verkürzung der Analysendauer von 60 min auf ca. 45 min zu erreichen. Die Auflösung des Lactosepeaks und des unbekanntenen Komponentenpeaks verschlechterte sich dadurch nur geringfügig und wäre für eine genaue Quantifizierung ebenfalls noch ausreichend gewesen.

Für die nicht aufgestockten Proben wurden folgende Lactosegehalte ermittelt:

Tabelle 7: Lactosegehalte der nicht aufgestockten Proben (Milch und Milchpulver)

	Gehalt i.d. Probe [%]	Gehalt i.d. Probelösung [$\mu\text{g/ml}$]
X.) Vollmilchpulver	0,21	2,73
XI.) UHT-Milch, 1,8 % Fett	0,007	0,68
XII.) UHT-Milch, 1,5 % Fett	0,004	0,39

Die in den aufgestockten Proben ermittelten Lactosegehalte ergaben folgende Wiederfindungsraten:

Tabelle 8: Lactosegehalte der aufgestockten Probelösungen und Wiederfindung

	Gehalt i.d. Probelösung [$\mu\text{g/ml}$]	Wiederfindung [%]
X.) Vollmilchpulver	4,40	167
XI.) UHT-Milch, 1,8 % Fett	1,87	119
XII.) UHT-Milch, 1,5 % Fett	1,48	109

Für diese Messungen wurde eine Vierpunktkalibration (Standardkonzentrationen 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$) ohne erzwungenem Nullpunkt durchgeführt. Eine lineare Kalibrationskurve mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99936 wurde erhalten.

Die Ursache für die zu hohe Wiederfindungsrate der Milchpulverprobe ist wahrscheinlich die außerhalb des Kalibrationsbereichs liegende Lactosekonzentration der Probe.

Insgesamt besteht für diese Proben eine starke Diskrepanz zwischen den enzymatisch und den mittels Ionenchromatographie gemessenen Lactosewerten, die auf eine Störung/Querempfindlichkeit bei der enzymatischen Bestimmung schließen lässt.

3.1.6.2 Messungen Fa. Metrohm

Im Demonstrations-/Vorführlabor der Fa. Metrohm wurden folgende Proben untersucht:

- Trinkjoghurt, mit Fruchtzubereitung, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/532-03)
- Bircher Müsli Joghurt, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/993-01)
- Schmelzkäse, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/957-01)
- Vollmilch, lactosehaltig (interne Proben-Nr. A2008/890-01)
- Vollmilch, lactosefrei (interne Proben-Nr. A2008/890-02)

Das IC-System mit PAD-Detektion der Fa. Metrohm ist zusätzlich mit einem Dialysessystem ausgestattet. Dieses im Autosampler integrierte, dynamische Dialysesystem im Stopped-Flow-Verfahren mit ruhender Akzeptorlösung ermöglicht laut Hersteller eine Inline-Probenaufbereitung ohne vorhergehende Eiweiß- und Fettabtrennung durch Carrez-Fällung.

Ein Probenaliquot von ca. 1 g wurde auf 100 ml verdünnt/aufgelöst. Von dieser Lösung wurde ein entsprechendes Aliquot abgefüllt und durch das Inline-Dialysesystem aufbereitet. Nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung wurden von der erhaltenen Akzeptorlösung 20 µl injiziert.

Methodenparameter:

Säule:	Metrosep Carb 1 (Anionenaustauscher auf Polymerbasis) 4,6 x 250 mm; 5 µm
Vorsäule:	Metrosep Carb 1 Guard
Eluent:	100 mM NaOH; isokratisch
Fluß:	1,0 ml/min
Druck:	9 MPa
Temperatur:	32°C
Injektionsvolumen:	20 µl
Arbeitsbereich:	20 µA
Grundstrom:	450 nA
Dialysefilter:	0,22 µm Celluloseacetat

Laut Herstellerangaben liegt die Nachweisgrenze für Disaccharide mit dem verwendeten System im oberen ppb-Bereich (100 ppb). Die Analysendauer betrug 30 Minuten. Galactose und Glucose konnten mit dem obigen System zwar deutlich an-/aufgetrennt aber nicht basisliniengetrennt werden. Im Gegensatz zum Dionex-System eluiert hier Glucose vor Galactose. Bei ungünstigen Konzentrationsverhältnissen von Glucose und Galactose, wie bei dem von der Fa. Dionex untersuchten Standard III nachgestellt, könnten somit Probleme bei der Quantifizierung der Galactose auftreten. Eine Verbesserung der Trennung zwischen Galactose und Glucose kann lt. Metrohm durch Verwendung einer zusätzlichen Vorsäule erzielt werden. Diese wird für den Routinebetrieb von Milchprodukten generell auch zur weiteren Matrixabtrennung empfohlen. Zusätzliche Peaks im Chromatogramm, wahrscheinlich Zuckeralkohole, sind nur im vorderen Bereich zu sehen; aber nicht im Bereich der Analyten.

Eine Auftrennung von Lactose und Lactulose konnte vor Ort im Applikationslabor nicht überprüft werden. Nach Aussagen der Fa. Metrohm wäre dies mit dem ein-

gesetzten System ebenfalls in den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen möglich; alternativ könnten auch Gradiententechnik, Nachsäulenderivatisierung oder eine andere Trennsäule zur Verbesserung der Trennung eingesetzt werden. Störungen/Querempfindlichkeiten der Zuckerbestimmung durch Aminosäuren und Peptide können, nach Herstellerangaben, auf Grund des Trennsystems ausgeschlossen werden. Zum Beleg wurden jeweils eine Firmen-Applikation für die Bestimmung von Lactulose in Gegenwart von Lactose und für die Bestimmung von Zuckern in Aminosäurelösungen vorgelegt.

Von den gemessenen Proben wurde allerdings nur das Chromatogramm einer Probe (Joghurt-Müsli-Zubereitung) zugesandt, da der bei den Messungen benutzte Rechner lt. Metrohm nicht mehr verfügbar war. Laut Chromatogramm /Sequenz Ausdruck erfolgte eine Zweipunktkalibrierung mit einem Standard mit 1 ppm (1,000) und 50 (49,935 ppm) ppm Lactose und 1 ppm (1,000) und 50 ppm (49,996) Galactose. Nach der Sequenztabelle wurde für die Joghurtzubereitung ein Gehalt von 240,142 ppm Lactose und 475,852 ppm Galactose und für den Trinkjoghurt 835,962 bzw. 765,119 ppm Lactose und 313,520 bzw. 296,960 ppm Galactose in Doppelbestimmung ermittelt. Die ermittelten Gehalte und die Größenverhältnisse der Zucker im Chromatogramm sind nicht nachvollziehbar.

Nach Rücksprache/Diskussion bezüglich dieser Ergebnisse wurden von der Fa. Metrohm selbst ausgewählte Proben gemessen. Bei einem Termin am 24.04.2008 an der MLF legte Herr Dr. Huth, Fa. Metrohm Untersuchungsergebnisse folgender von der Fa. Metrohm exemplarisch ausgewählter Milchproben (lactosehaltige Milch, lactosefreie Milch, Joghurt, fettarme Milch mit Fruchtzubereitung) vor:

Tabelle 9: Zuckergehalt verschiedener Milchprodukte lt. Inhaltsangaben der Hersteller

	Lactose [g/L]	Saccharose [g/L]	Galactose [g/L]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Zucker gesamt [g/L]
Alpenmilch	--	--	--	--	--	49
MüllermilchBanane	63	25	--	28	1	117
Joghurt Landliebe	--	--	--	--	--	53
Minus-L-Milch	< 1	--	--	--	--	47

Tabelle 10: Zuckergehalt verschiedener Milchprodukte lt. Analyse Metrohm

	Lactose [g/L]	Saccharose [g/L]	Galactose [g/L]	Glucose [g/L]	Fructose [g/L]	Zucker gesamt [g/L]
Alpenmilch	53	--	--	--	--	53
MüllermilchBanane	70,1	40,6	--	21,1	n.n.	131,8
Joghurt Landliebe	35,1	--	8,46	1,6	--	45,16
Minus-L-Milch	n.n.	--	22,8	17,7	--	40,5

n.n.: nicht nachgewiesen

Für die Quantifizierung wurde eine Vierpunktkalibration (Standardkonzentrationen 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml) durchgeführt. Die Kalibrationsfunktion war für alle Zucker linear. Der Korrelationskoeffizient für Lactose betrug 0,999670. Die Proben wurden wahlweise 1:100 oder 1:1000 verdünnt. Die Gehalte der injizierten

Probenverdünnungen lagen alle innerhalb des Kalibrationsbereiches Die Analysergebnisse sämtlicher Proben liegen zwar in einem realistischen Größenbereich, weisen allerdings stärkere Abweichungen von den Herstellerangaben auf. Dies darf aber nicht überbewertet werden, da keine Vergleichsmessungen vorliegen. Das Chromatogramm einer 1:100-Verdünnung der lactosefreien Milch zeigt im Elutionsbereich der Lactose drei weitere nicht zuzuordnende Komponenten, von denen eine fälschlicherweise als Lactose identifiziert wurde (Abbildung 21).

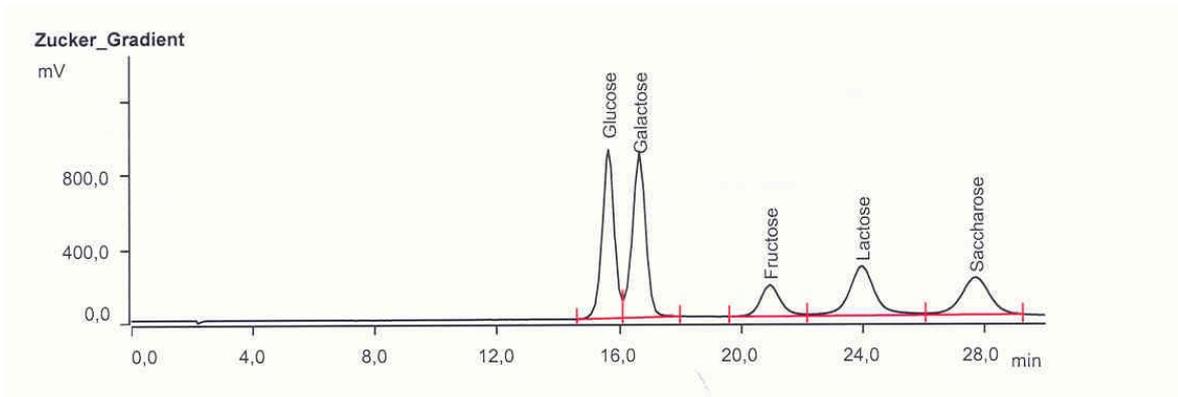


Abbildung 20: IC-Chromatogramm Zuckerstandards 60 µg/ml, Metrohm-Gerät

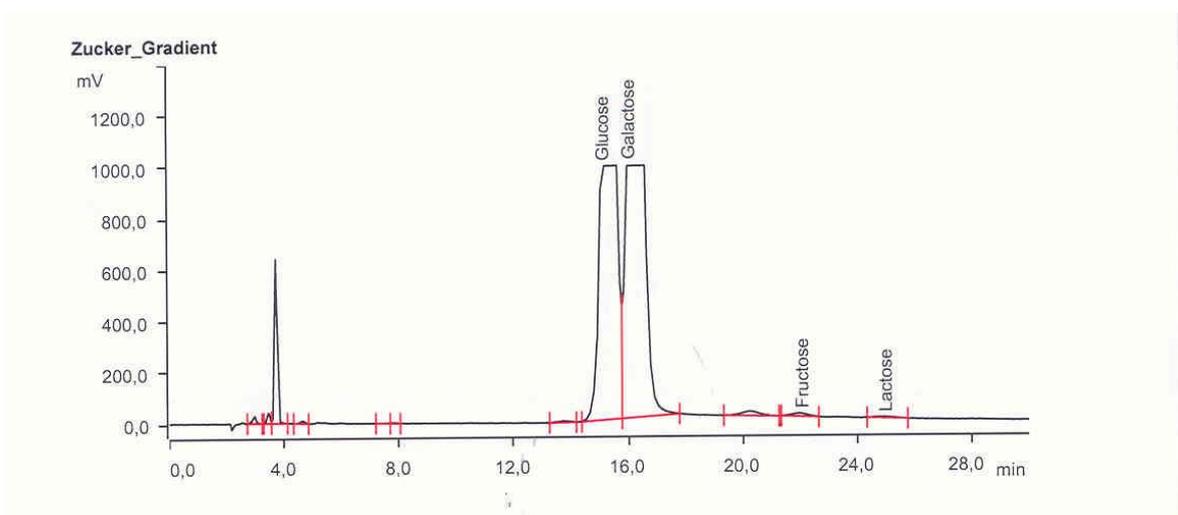


Abbildung 21: IC-Chromatogramm, lactosefreie Milch, 1:100 verdünnt, Metrohm-Gerät

Eine 1:1000-Verdünnung dieser Probe, bei der die störenden, zusätzlichen Peaks nicht mehr erscheinen, wurde jeweils mit 3 ppm Lactose, Fructose und Saccharose aufgestockt (Abbildung 22). Die Wiederfindung für Lactose betrug hierbei 89,8%, für Saccharose 126% und für Fructose 88,6%.

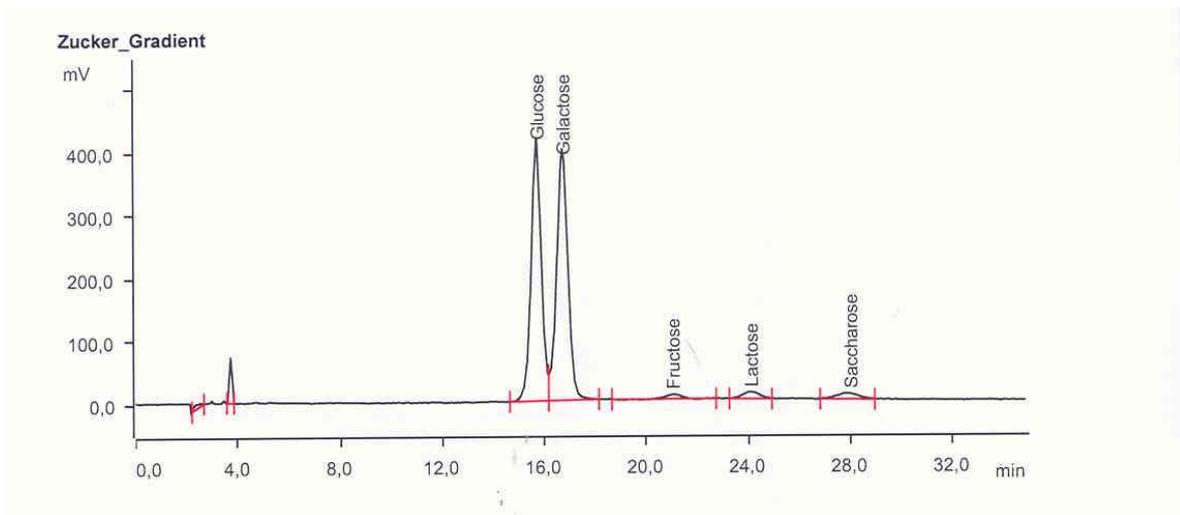


Abbildung 22: Chromatogramm, laktosefreie Milch, 1:1000 verdünnt, aufgestockt mit 3 ppm Fructose, Lactose und Saccharose, Metrohm-Gerät

Auf Grund dieser Resultate bot die Fa. Metrohm für die weitere Methodenentwicklung/-optimierung eine mehrwöchige, kostenlose Testphase mit ihrem IC-System an.

Die zur Verfügung gestellte Anlage war für einen rein isokratischen Betrieb ausgelegt und mit einem Dialysesystem zur Probenaufbereitung ausgestattet.

Folgende Methodenparameter wurden angewandt:

Säule: Metrosep Carb 1; 4,6 x 250 mm; 5 µm
 Vorsäule: Metrosep Carb 1 Guard
 Eluent: 100 mM NaOH; isokratisch
 Fluss: 1,2 ml/min
 Druck: ca. 11 MPa
 Temperatur: 32°C
 Injektionsvolumen: 20 µl
 PAD-Programm: Potential E1: + 0,05 V; 0,40 sec
 Potential E2: + 0,75 V; 0,20 sec
 Potential E3: - 0,15 V; 0,40 sec
 Datenaufnahmezeit während Potential E1: 100 msec
 Meßbereich: 10 µA
 Datenaufnahmerate: 1Hz
 Filter: ohne Glättung
 Dialyse: Dialysefilter: 0,22 µm Celluloseacetat
 Dialysedauer: 10 min

Der Eluent wurde nach Angaben von Metrohm und Dionex aus 50% iger Natronlauge p.a. und aus entgastem Reinstwasser hergestellt. Bei der Eluentenherstellung muß ein Kohlendioxideintrag vermieden werden, da das Carbonat-Ion eine höhere Affinität zur Anionenaustauscherfunktion besitzt als das Hydroxid-Ion und somit die Chromatographie stört. Die 50% ige Natronlauge wurde verwendet, da sie im Gegensatz zu niedriger konzentrierter Natronlauge oder Natriumhydroxid-

plätzchen kein Kohlendioxid bindet; die Entgasung und Filtration des Reinstwassers erfolgte über einen 0,2 µm Membranfilter aus Polyamid bei 50 mbar.

Als Probenaufbereitung wurden für die Meßserien der ersten zwei Wochen statt der Carrez-Fällung das integrierte, automatische Dialysesystem eingesetzt. Verschiedene Probenmatrices (Milch, Vollmilchpulver, Sauermolke, Hartkäse) wurden mit diesem System aufbereitet und gemessen. 1 g bzw. 0,1g (Milchpulver) des Probenmaterials wurden in einem 100 ml Meßkolben direkt verdünnt (Milch, Sauermolke) oder zunächst mit ca. 50 ml Wasser aufgeschlämmt, 15 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt und anschließend auf 100 ml aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Die erhaltene Probenemulsion oder -suspension wurde direkt in die Autosamplervials abgefüllt. Das Dialysesystem erwies sich nur für homogene Probenmatrices mit niedrigem Eiweiß- und Fettgehalt, wie z.B. Milch, geeignet. Milchpulver- und Käseproben führten aufgrund des hohen Anteils an nicht gelösten Probenbestandteilen in kurzer Zeit zu einer Verstopfung und Kontamination des Injektionssystems und der Dialyseleitungen. Ein Austausch der ersten wässrigen Spüllösung für das Injektions- und Dialysesystem gegen das von Metrohm vorgeschlagene Acetonitril erwies sich als nicht praktikabel/durchführbar, da die Dialysemembran aus Celluloseacetat nicht beständig gegen Acetonitril war und sich durch die Spülprozedur langsam auflöste.

Bei den weiteren untersuchten Proben wurde deshalb als Probenaufbereitung, wie bei den von Dionex gemessenen Proben, die Carrezfällung in Kombination mit einer Filtration über einen 0,22 µm Spritzenfilter verwendet. Die daraus erhaltenen Probenlösungen wurden direkt, unter Überbrückung des Dialysesystems, injiziert. Mit beiden Probenaufbereitungsmethoden wurden jedoch bei einem Chromatogrammlauf von 30 Minuten bei der Analyse von Käse- oder Joghurtproben Verschleppungen und Geisterpeaks in nachfolgenden Chromatogrammen beobachtet (Abbildung 23).

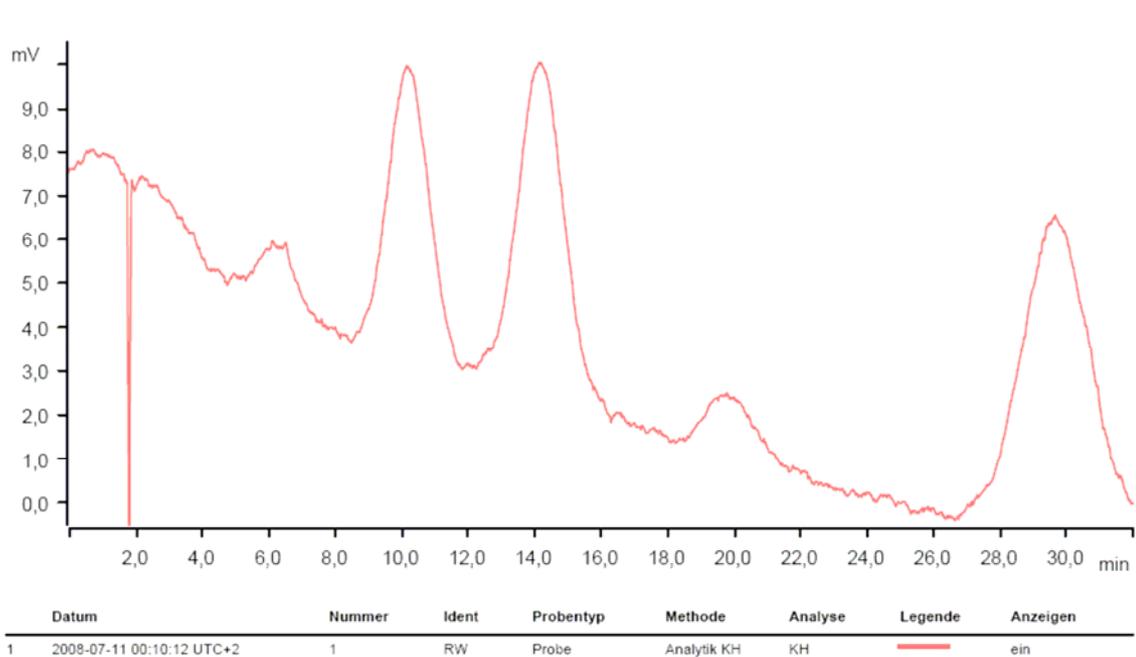


Abbildung 23: IC-Chromatogramm einer Reinstwasserprobe nach vorhergehenden Analysenläufen von fünf Proben (Weichkäse, Fruchtojoghurt, Milch), Metrohm-Gerät

Zudem erwiesen sich die Retentionszeiten als nicht stabil (Abbildung 24), sondern verkürzten sich mit steigender Zahl der Analysenläufe, was vermutlich auf einen Kohlendioxideintrag [61] bei der Herstellung bzw. beim Betrieb der mobilen Phase zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum Dionex-System wird die mobile Phase nicht durch ständige Heliumbeaufschlagung (konstanter Druck durch Nachregulierung) sondern nur durch ein vorgeschaltetes Adsorberrohr von der Umgebungsluft abgeschirmt. Damit einhergehend verschlechterte sich auch die Auflösung zwischen den einzelnen Zuckern. Beide Effekte erschwerten die Identifizierung der Analyten erheblich. Die Zuordnung der Peaks war nur durch häufige Zwischenschaltung von Kontrollstandards in der Sequenz möglich. Eine zusätzliche Begasung der frisch hergestellten, mobilen Phase mit Stickstoff brachte ebenfalls keine wesentliche Verminderung des Retentionszeiteinbruches.

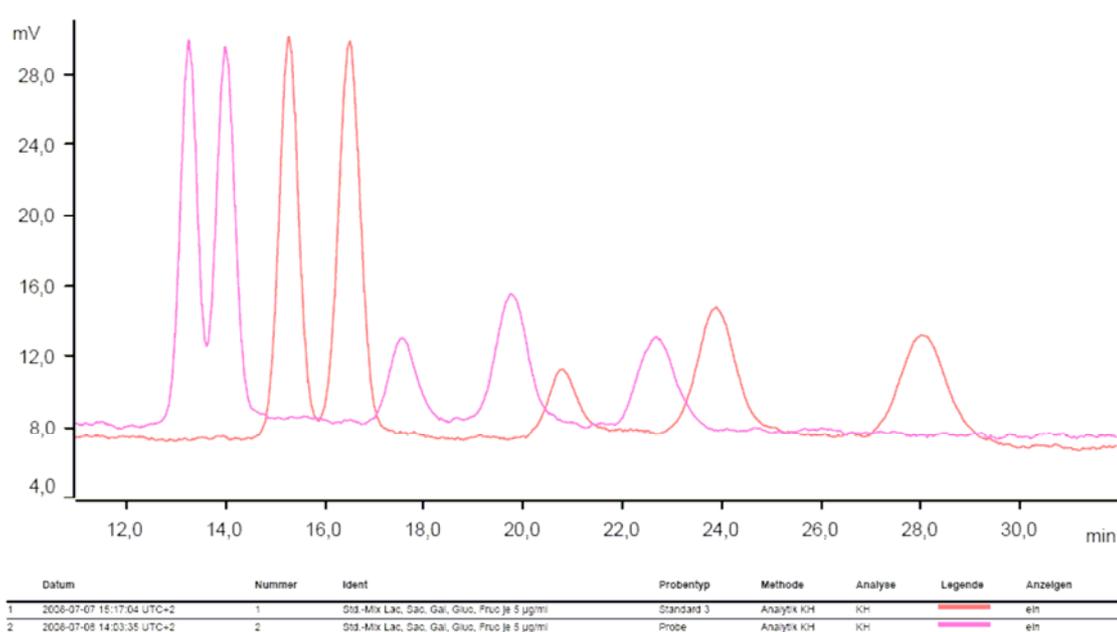


Abbildung 24: IC-Chromatogramme einer Standardlösung (Glucose, Galactose, Fructose, Lactose, Saccharose; Elution in der genannten Reihenfolge; Konzentration je 5 µg/ml) im Abstand von ca. 23 Stunden gemessen, Metrohm-Gerät

Das Signal-Rausch-Verhältnis in Standardlösungen betrug für einen 1 ppm-Lactosestandard bei frisch polierter Goldelektrode des PAD in Verbindung mit 20 µl Injektionsvolumen knapp 10 zu 1, was gerade noch der Bestimmungsgrenze entsprach.

Eine Erhöhung des Injektionsvolumens auf 100 µl zur Absenkung der Bestimmungsgrenze erwies sich als nicht praktikabel, da wegen des großen Überschusses an Glucose und Galactose und von Nebenkomponenten in realen lactosefreien Proben eine starke Überladung der Säule verursacht wurde, die eine Zuordnung von Peaks unmöglich machte.

Die anfängliche Auflösung zwischen dem Lactose- und dem Lactulose-Peak in einer Standardlösung von je 10 µg/ml Galactose, Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose und Lactulose und in einer Standardlösung von 1 µg/ml Lactose und 4 µg/ml Lactulose war für eine quantitative Auswertung grenzwertig (Abbildung 25 und Abbildung 26). Im Vergleich zur Dionex-Methode eluierten die Komponenten

in der Reihenfolge Glucose, Galactose, Fructose, Lactose, Lactulose und Saccharose.

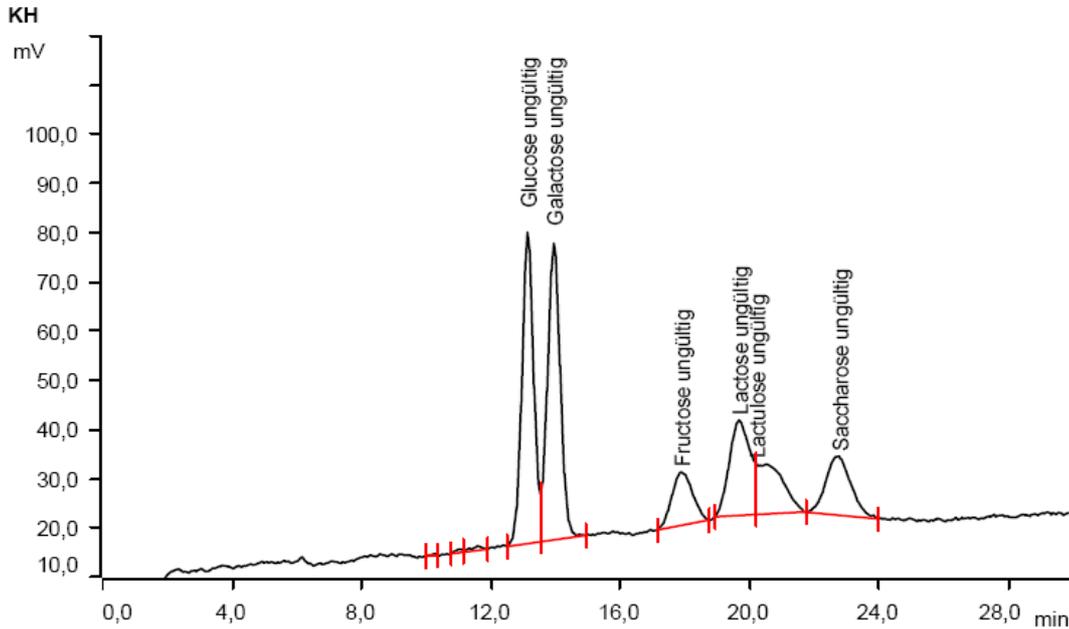


Abbildung 25: IC-Chromatogramm einer Standardlösung (Lactose, Lactulose, Saccharose, Galactose, Glucose, Fructose; Konzentration je 10 µg/ml), Metrohm-Gerät^{*)}

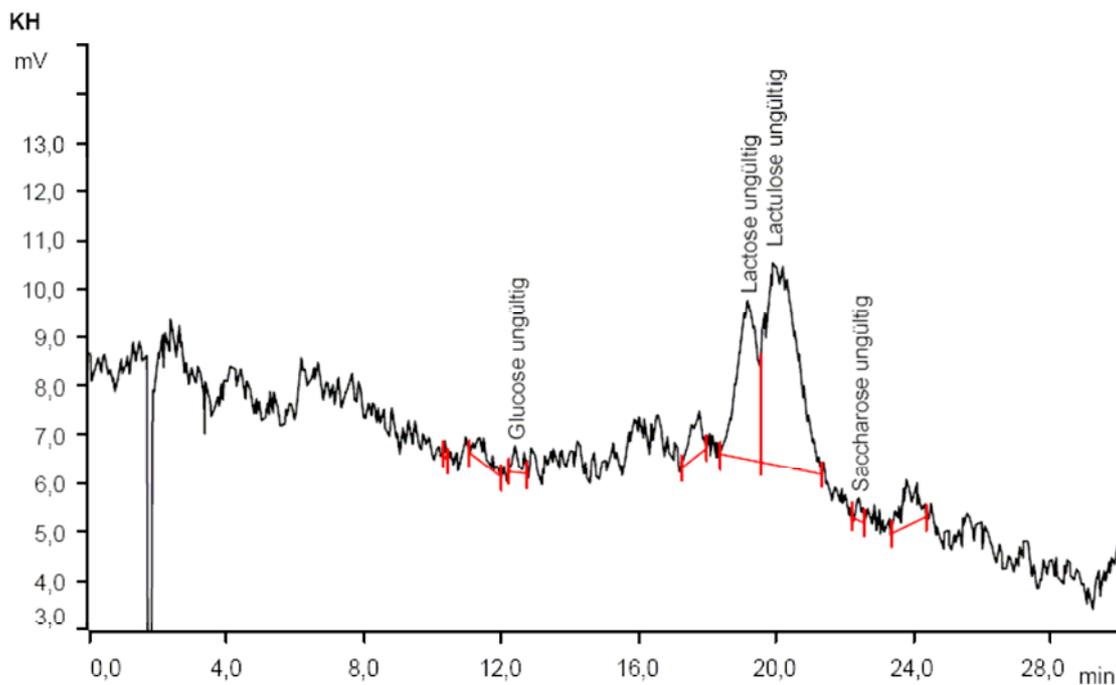


Abbildung 26: IC-Chromatogramm einer Standardlösung (Lactose; Konzentration 1 µg/ml; Lactulose Konzentration 4 µg/ml), Metrohm-Gerät

^{*)} **Anmerkung:** Auf Grund der beschriebenen Retentionszeitverschiebungen fielen die Komponenten aus den Retentionszeitfenstern der verwendeten Methode, deshalb erscheint die Peakbezeichnung „ungültig“ im Chromatogramm, die Zuordnung der einzelnen Zucker wurde durch Einzelstandards überprüft

Nach einer Spülprozedur der Säule mit einer Lösung aus 0,1 M Natronlauge und 0,5 M Natriumacetat wurden bei anschließenden Messungen von Standardlösungen eine Koinzidenz des Lactose- und Lactulosepeaks beobachtet. Eine Variation der mobilen Phase durch einen Zusatz von 0,01 M Natriumacetatlösung führte zwar zu deutlich schmälere Peaks, aber auf Grund der gleichzeitig herabgesetzten Selektivität wurde keine Verbesserung der Auftrennung von Lactose und Lactulose erreicht.

Spätere Messungen von mit Lactose und Lactulose dotierten Proben zeigten jedoch wieder die vorhergehende Antrennung der beiden Peaks mit 0,1 M Natronlauge als mobiler Phase. Somit scheinen die auf der Säule angereicherten, stärker retardierten Probenmatrixbestandteile eine Selektivitätsänderung des Trennsystems zu bewirken.

Weiterhin erwies sich die Identifizierung und Quantifizierung der Lactose in der geforderten Konzentration von 1 ppm in lactosefreien Milch- und Milchpulverproben durch das starke Tailing der vorher eluierenden Glucose- und Galactosepeaks und durch zusätzliche Peaks von mindestens drei unbekannten Komponenten im Elutionsbereich der Lactose als sehr schwierig (Abbildung 27).

Eine Quantifizierung der Lactose in den ebenfalls von der Fa. Dionex untersuchten Proben **X**, **XI** und **XII** (interne Proben-Nr. A2008/493-01, A2008/1847-02, A2008/1801-01) war nicht möglich.

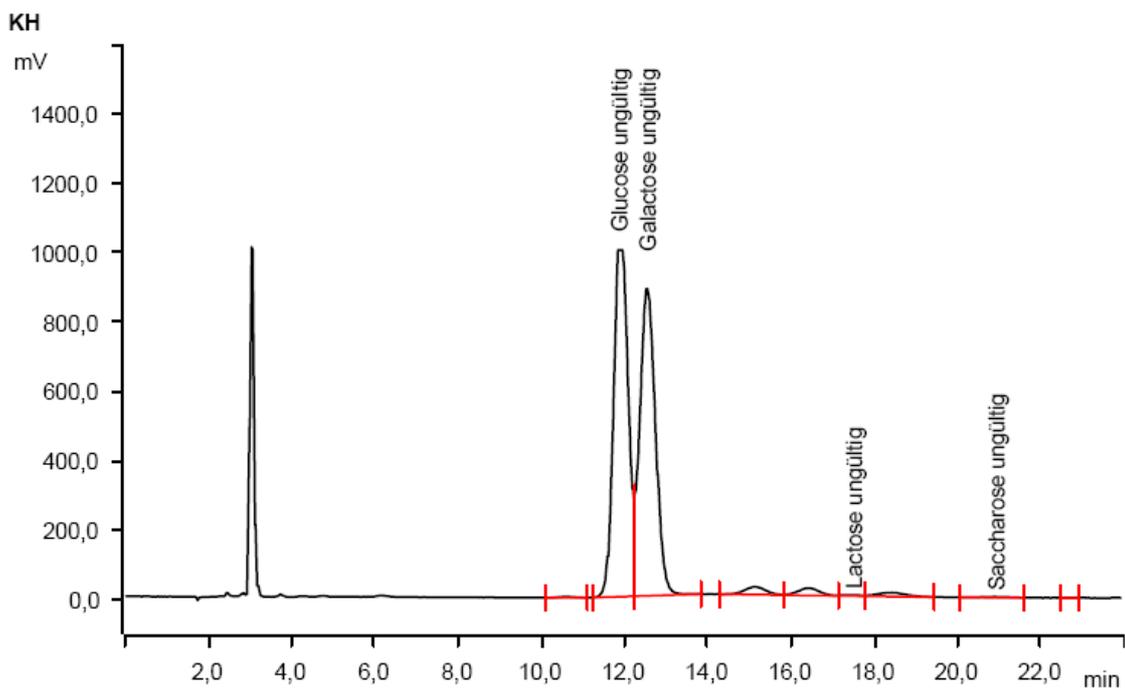


Abbildung 27: IC-Chromatogramm einer lactosefreien Vollmilchpulverprobe (siehe 3.1.6.1, Abbildung 19, Probe X), Metrohm-Gerät

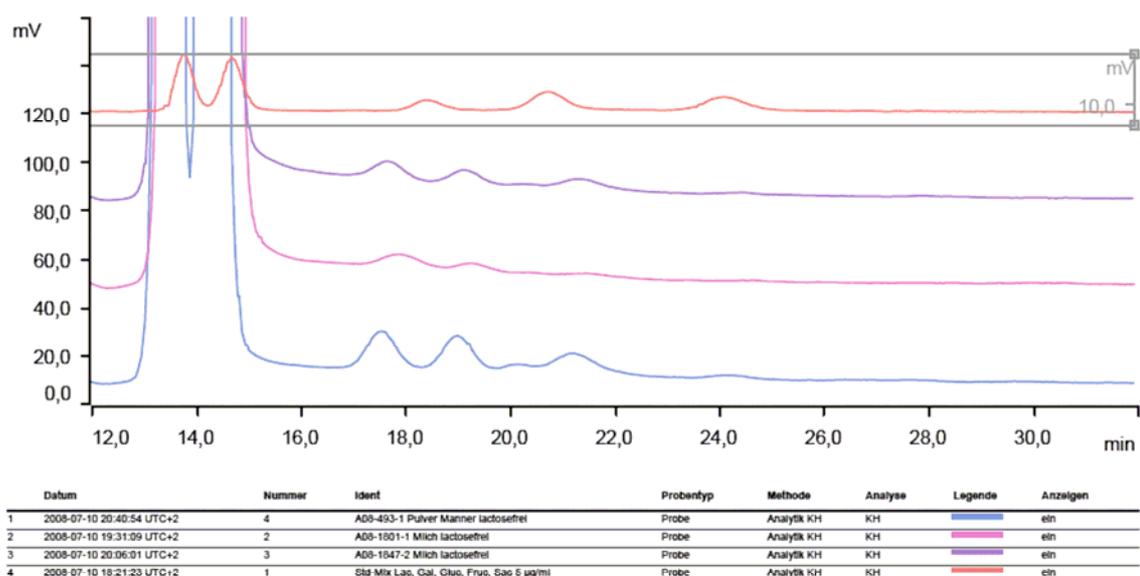


Abbildung 28: Chromatogramme einer lactosefreien Vollmilchpulverprobe (1. Spur von oben), zweier lactosefreier UHT-Milchproben (2. und 3. Spur von oben) und einer Standardlösung mit $c = 5 \mu\text{g/ml}$ (4. Spur von oben)

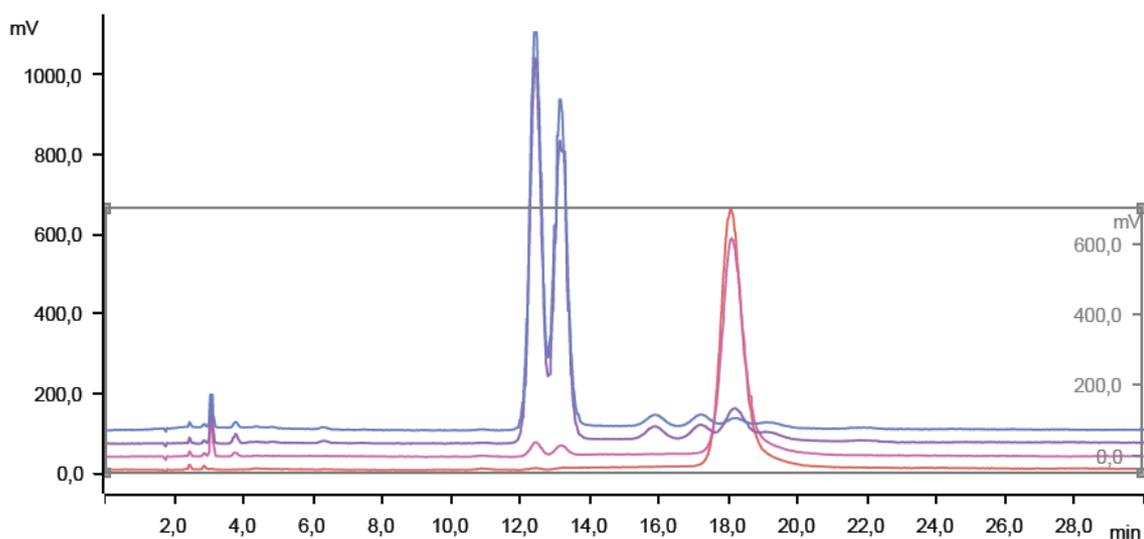
Elutionsreihenfolge: Glucose, Galactose, Fructose, Lactose, Saccharose zum Vergleich siehe auch Proben X, XI und XII; Messungen Fa. Dionex, 3.1.6.1

Zur Abklärung der Herkunft und Art dieser zusätzlichen Komponenten wurden Lactoseabbauversuche mit zwei Lactase-Enzymmischungen (Optilactase LX 2, Fa. Optiferm, Kempten und Maxilact LAG 1000, Fa. DSM Food Specialities, Düsseldorf) durchgeführt. 100 ml einer pasteurisierten, lactosehaltigen Vollmilch wurden in ein 100 ml-Schraubglas abgemessen und mit jeweils 80 µl der jeweiligen Enzymmischung versetzt, vorsichtig geschwenkt und eine vorgegebene Zeit inkubiert. Der erste Abbauversuch erfolgte bei Raumtemperatur. Ein 1ml-Aliquot des Ansatzes wurde nach Ablauf der vorgegebenen Reaktionszeit entnommen, verdünnt, durch Zugabe von Carrez-Fällungsreagenz die Abbaureaktion unterbrochen und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Ein Abbauansatz wurde sofort nach Zugabe des Enzyms gestoppt, zwei weitere Ansätze wurden nach jeweils zwei und drei Stunden Inkubation unterbrochen; zum Vergleich wurde ebenfalls die unbehandelte Probe gemessen.

Im Chromatogramm der unbehandelten Probe und des nach Enzymzusatz sofort gestoppten Abbauansatzes sind keine Nebenkomponenten im Elutionsbereich der Lactose zu sehen. Der sofort gestoppte Ansatz zeigt im Vergleich zur Originalprobe im vorderen Bereich des Chromatogramms bei drei bis vier Minuten nur zwei weitere, kleinere Peaks, die Zuckeralkoholen zuzuordnen sind.

Beim zwei- und dreistündigen Abbauansatz mit der Optilactase LX2-Enzymmischung sind deutlich der fortschreitende Lactoseabbau und die während diesen Abbaus entstehenden Nebenkomponenten zu erkennen. Mit der Maxilact LAG 1000-Enzymmischung ist ein deutlich langsamerer Abbau zu beobachten; bei dem dreistündigen Abbauansatz sind jedoch auch bereits deutlich die zusätzlichen Peaks zu erkennen.

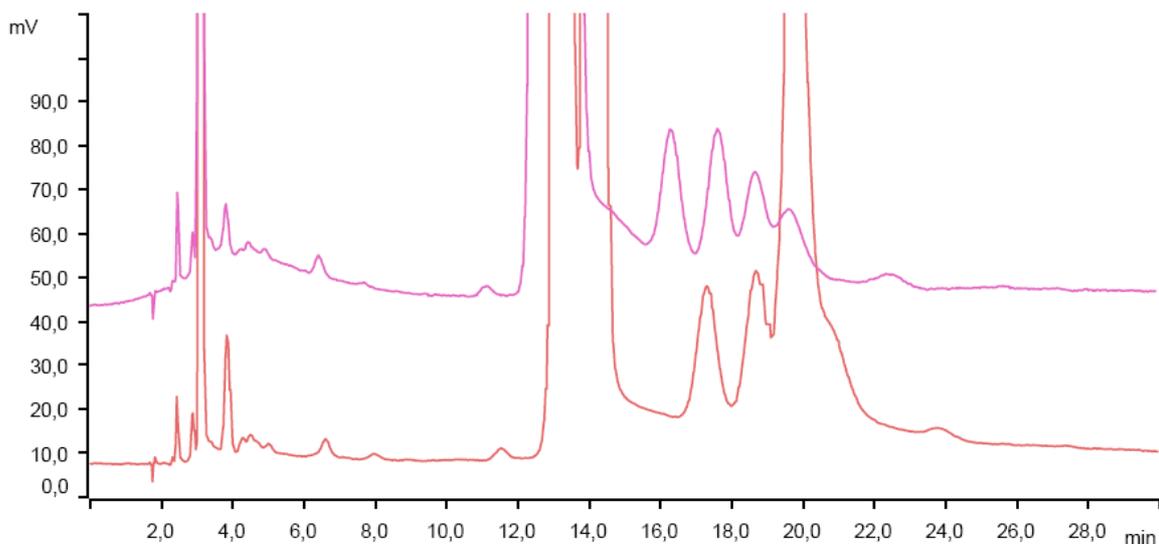
Trotz unterschiedlicher Enzymaktivitäten der beiden Enzymmischungen erkennt man bei beiden dieselben Peakmuster im Chromatogramm der inkubierten Probenansätze. Mindestens drei zusätzliche Komponenten entstehen während des enzymatischen Abbaus, davon eluieren zwei vor und eine nach Lactose. Messungen von mit Lactulose dotierten Proben lassen darauf schließen, daß es sich bei dem nach Lactose eluierenden Peak um Lactulose handelt. Die beiden anderen unbekanntenen Peaks konnten nicht identifiziert werden. Das Peakmuster stimmt mit der von Metrohm gemessenen lactosefreien Milchprobe und den eigenen gemessenen Milch- und Milchpulverproben überein. Weitere in geringerer Konzentration möglicherweise vorhandene Komponenten könnten noch durch das Tailing des Glucose-/Galactosepeaks verdeckt sein. Der zeitliche Verlauf des Abbaus läßt sich gut an der Abnahme des Lactosepeaks und der gleichzeitigen Zunahme des Galactose-/Glucosedoppelpeaks erkennen (Abbildung 29).



Datum	Nummer	Ident
1 2008-06-03 13:01:41 UTC+2	1	Milch 3,8%, past., homog.; Carrez-gefällt
2 2008-06-03 13:44:33 UTC+2	2	Milch 3,8%, past., homog.; + optilactase LX2; Carrez-gefällt
3 2008-06-03 14:27:31 UTC+2	3	Milch 3,8%, past., homog.; + optilactase LX2 + 2 h Umsetzung; Carrez-gefällt
4 2008-06-03 15:10:23 UTC+2	4	Milch 3,8%, past., homog.; + optilactase LX2 + 3 h Umsetzung; Carrez-gefällt

Abbildung 29: IC-Chromatogramme des Abbauversuchs mit der Optilactase LX2-Enzymmischung (Spuren von unten nach oben: Originalprobe, sofort gestoppter Ansatz, zwei-stündiger Abbau, dreistündiger Abbau)

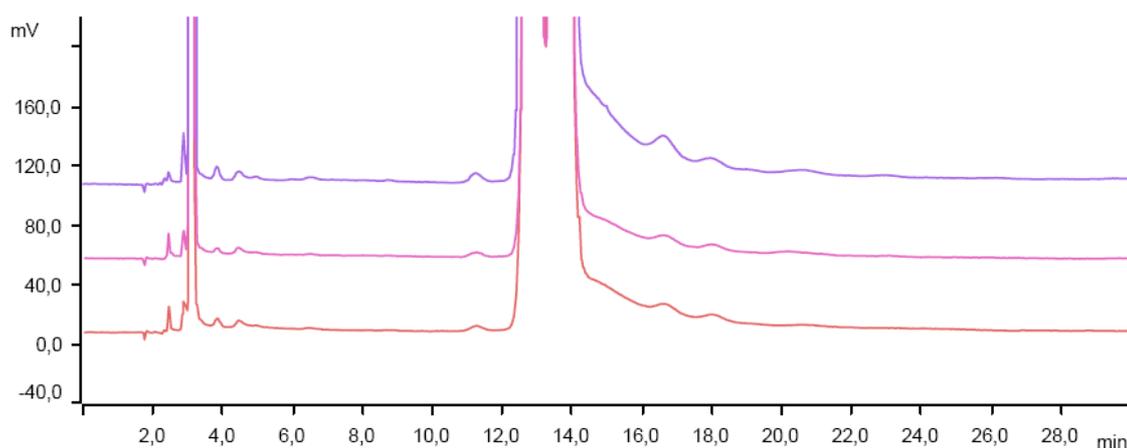
Ein zweiter Abbauversuch mit beiden Enzymmischungen erfolgte bei 10°C jeweils 24 und 48 Stunden lang. Auf Grund der erwähnten Retentionszeitverschiebungen und Auflösungsver schlechterung konnten keine deckungsgleichen Chromatogramme über diesen längeren Zeitraum erhalten werden, trotzdem sind auch hier dieselben Peakmuster beim Abbau zu erkennen. Die Maxilact LAG 1000-Enzymmischung zeigt wiederum eine geringere Abbaugeschwindigkeit; gleichzeitig sind die Nebenkomponenten in wesentlich größeren Mengen entstanden als bei der Optilactase LX2-Enzymmischung (Abbildung 30).



Datum	Nummer	Ident	Probentyp	Methode	Analyse	Legende	Anzeigen
2008-06-25 22:08:14 UTC+2	1	Vollmilch past., homog., mind. 3,8 % mit maxilact LAG 1000	Probe	Analytik KH	KH	—	ein
2008-06-27 18:06:27 UTC+2	2	Vollmilch: past., homog., mind. 3,8% mit maxilact LAG 1000	Probe	Analytik KH	KH	—	ein

Abbildung 30: IC-Chromatogramme des Abbauversuchs mit der Maxilact LAG 1000-Enzymmischung (24-stündiger Abbau (unten) und 48- stündiger Abbau(oben)); vergrößerter Chromatogrammausschnitt

Weitere Messungen verschiedener lactosefreier Produkte (H-Vollmilch, fettarme H-Milch, Milchpulver, Schlagsahne, Sauerrahm, Speisequark, Süßrahmbutter, Vollmilchjoghurt, Fruchtjoghurt, Weichkäse, Schmelzkäse, Hartkäse) wurden durchgeführt. Im Chromatogramm der untersuchten Joghurt-, Sauerrahm- und Speisequarkprobe eines Herstellers sind ebenfalls die beschriebenen Nebenkompone nten in niedrigem Konzentrationsbereich zu erkennen (Abbildung 31).



Datum	Nummer	Ident	Probentyp	Methode	Analyse	Legende	Anzeigen
2008-06-26 20:58:36 UTC+2	1	2116-4	Probe	Analytik KH	KH	—	ein
2008-06-26 21:31:39 UTC+2	2	2116-5	Probe	Analytik KH	KH	—	ein
2008-06-26 22:37:41 UTC+2	3	2116-7	Probe	Analytik KH	KH	—	ein

Abbildung 31: Chromatogramme von lactosefreien Joghurt-, Speisequark- und Sauerrahmproben (von oben nach unten); vergrößerter Chromatogrammausschnitt

Zur Quantifizierung wurden im Verlauf der Untersuchungen drei Siebenpunktkalibrationen mit Lactose-, Saccharose-, Fructose-, Glucose- und Galactosestandards (1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) gemacht. Die Kalibrationen erfolgten in unterschiedlichen Zeitabständen zu einer vorausgegangen Säulenspülung und wiesen z.B. für Lactose Retentionszeitunterschiede von über 2 Minuten auf. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten betragen für Lactose 0,998964 / 0,999789 / 0,998311 ohne erzwungenem Nullpunkt; für die anderen Zucker wurden ähnliche Werte ermittelt.

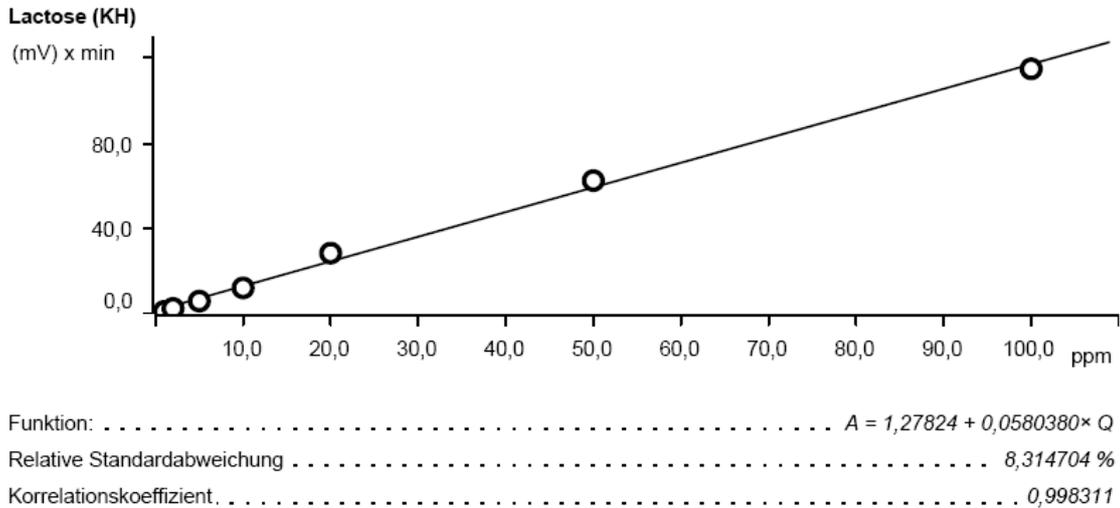


Abbildung 32: Kalibriergerade für Lactose

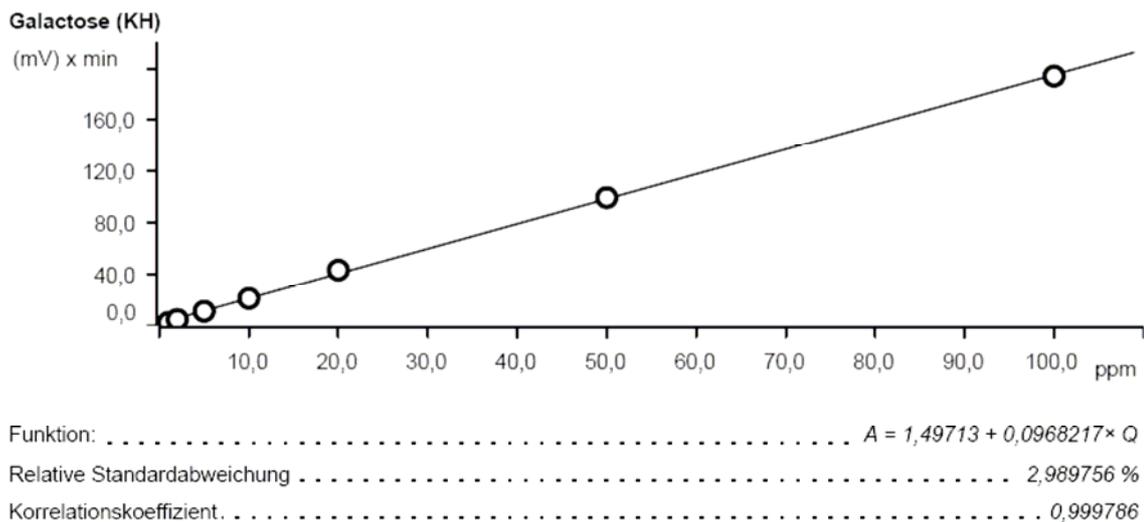


Abbildung 33: Kalibriergerade für Galactose

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde für die von der Fa. Dionex ebenfalls gemessene Probe **IX** (Milch 3,5 % Fett, pasteurisiert, homogenisiert) ein Lactosegehalt von 3,72 % in der Probe ermittelt. Dieser Wert weicht deutlich von den enzymatisch und von der Fa. Dionex gemessenen Werten ab (4,67 % bzw. 4,54 %), und kann nur mit einem drastischen Empfindlichkeitsverlust des Detektors auf Grund zweier vorher gemessener Proben erklärt werden. Insgesamt war eine sehr

rasche Verschmutzung des Detektorsystems im Verlauf der Messungen zu beobachten, die eine mehrmalige Reinigung der Goldelektrode notwendig machte.

Weitere Messungen erfolgten zur Ermittlung der Retentionszeitstabilität und Wiederfindung. Die Aufstockversuche zur Ermittlung der Wiederfindung mußten wegen der o.g. Probleme der Quantifizierung durch Peak tailing und Nebenprodukte mit höheren Standardkonzentrationen (10 µg/ml und 20 µg/ml Lactose) durchgeführt werden. Für die Aufstockung wurden 0,1 ml Lactose-Standardstammlösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$ bzw. 2 mg/ml) mit dem Carrezfiltrat einer lactosefreien UHT-Milch in einem Meßkolben auf 10 ml aufgefüllt. Für den 10 µg/ml-Standard wurde je nach Integration eine Wiederfindung zwischen 47,1 und 58,8 % und für den 20 µg/ml-Standard eine Wiederfindung zwischen 11,6 und 12,4 % ermittelt (jeweils Vierfachmessung).

Die Retentionszeit des Lactosepeaks nahm nach einer vorgenommenen Säulenspülung innerhalb von sechs Tagen von 21,8 Minuten auf ca. 18,5 Minuten ab und stabilisierte sich in diesem Bereich.

**Tabelle 11: Messungen zur Retentionszeitstabilität
Kalibrierung vom 10.07.2008**

Werte für den Kalibrierstandard Nr. 4 Std-Mix Lac, Gal, Gluc, Fruc, Sac 10 µg/ml

Standard Lauf Nr.	$t_R(\text{Glucose})$ [min]	$t_R(\text{Galactose})$ [min]	$t_R(\text{Fructose})$ [min]	$t_R(\text{Lactose})$ [min]	$t_R(\text{Saccharose})$ [min]
1	14,273	15,298	19,198	21,783	25,488

Messungen vom 16.07.2008

Milch: V07-500-1c lactosefreie H-Milch, Carrez-gefälltes Filtrat

Standard Lauf Nr.	$t_R(\text{Glucose})$ [min]	$t_R(\text{Galactose})$ [min]	$t_R(\text{Fructose})$ [min]	$t_R(\text{Lactose})$ [min]	$t_R(\text{Saccharose})$ [min]
1	12,71	13,36	16,91	18,62	21,30
2	12,67	13,34	16,93	18,55	21,14
3	12,67	13,34	17,02	18,55	21,15

Mittelwert:	12,68	13,35	16,95	18,57	21,20
Standardabw.:	0,0189	0,0094	0,0478	0,0330	0,0732
$\Delta X (X_{\max} - X_{\min})$:	0,04	0,02	0,11	0,07	0,16
proz. Abw. v. MW:	0,32	0,15	0,65	0,38	0,75

Zusammenfassend konnte mit der IC-Anlage von Metrohm keine robuste Methode zur Bestimmung von Lactosegehalten von 0,01% in Milchprodukten entwickelt werden.

3.1.7 Ergänzende Versuche mit Lichtstreuendetektion (ELSD)

Zur Absicherung/Bestätigung der Vorversuche mit Lichtstreuendetektion (Leihgerät Fa. ERC) wurden ein weiterer Anbieter von Lichtstreuendetektoren kontaktiert und um Probemessungen gebeten. Die Firma Techlab, D-38173 Erkerode, vertreibt Lichtstreuendetektoren der Marke Sedex und erklärte sich bereit, Probemessungen von Lactose- und Galactosestandardlösungen mit dem Lichtstreuendetektor Modell Sedex 75 in Verbindung mit einer firmeneigenen Aminophasensäule (Hersteller Fa. Showa Denko) und der unter 3.1.8. verwendeten Kationenaustauschersäule (Hersteller Fa. Phenomenex) in ihrem Applikationslabor durchzuführen.

Die zugeschickten Standardlösungen enthielten jeweils 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Lactose und Galactose und wurden analog zu der üblichen Probenaufbereitung mit Carrezfällungsreagenz behandelt und über einen 0,2 µm-Spritzenfilter filtriert.

Die Kationenaustauschersäule erwies sich in der Kombination mit Lichtstreuendetektion als ungeeignet, da der Peak des Carrezfällungsreagenz mit dem Lactosepeak überlappte. Nur durch Erniedrigung der vom Säulen-Hersteller empfohlenen Betriebstemperatur konnte eine leichte Abtrennung des Lactosepeaks erreicht werden. (Abbildung 34)

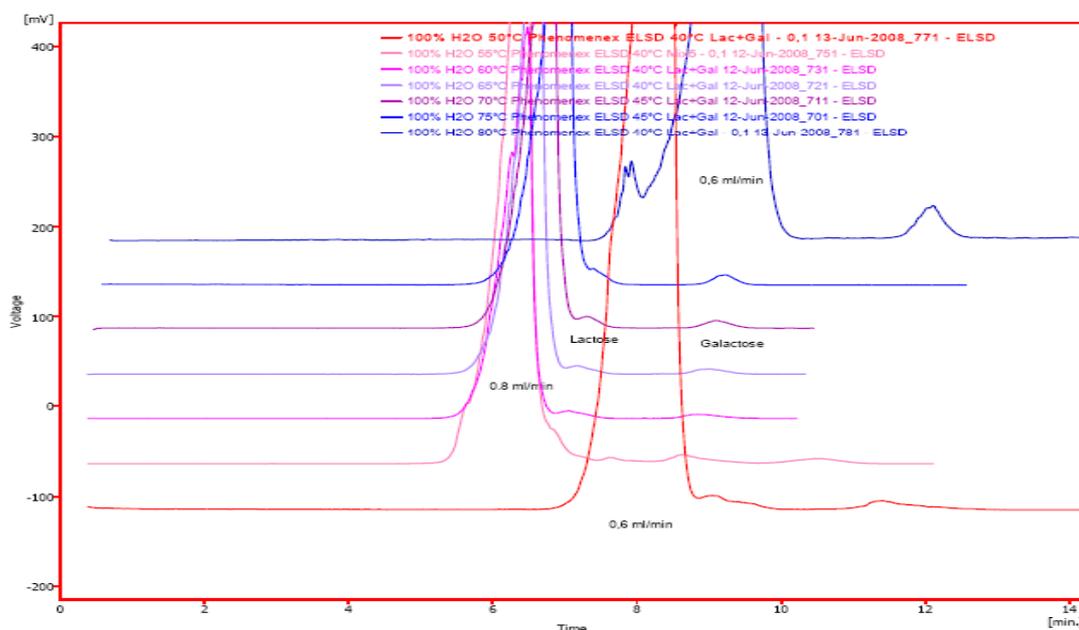


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme einer Standardlösung (Lactose, Galactose, c = 0,1 g/l) bei unterschiedlichen Betriebsbedingungen (Temperatur, Fluß) unter Verwendung von Kationenaustauschersäule und Lichtstreuendetektor

Anhand des Galactosepeaks der 100 µg/ml-Standardlösung ist außerdem zu erkennen, daß die geforderte Bestimmungsgrenze für Lactose nicht erreicht werden kann. Deshalb wurde auf die Erprobung anderer, alternativer Fällungsreagenzien wie der Biggs-Szijarto-Lösung verzichtet, zudem sich diese bereits bei den GC-Versuchen als weniger effektiv als die Carrezfällung erwiesen hatte und vermutlich nur für die Fällung von Milch- und Milchpulverproben geeignet ist.

Mit der Aminophase konnte mit dem Sedex 75-Lichtstreuendetektor-Detektor bei variierten Messbedingungen (Säulentemperatur, Acetonitrilgehalt der mobilen Phase, Meßsignalverstärkung des Detektors) nur knapp die Bestimmungsgrenze von 10 µg/ml (= 0,01g/l) Lactose und Galactose erreicht werden (Abbildung 35). Galactose und Glucose konnten nur angetrennt werden.

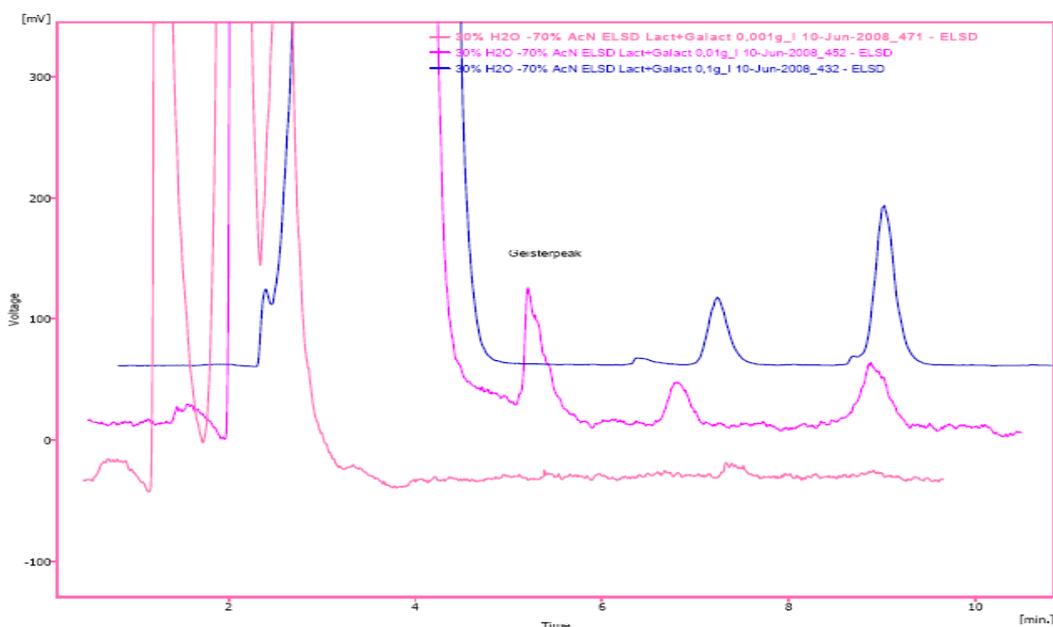


Abbildung 35: Chromatogramme Standardlösungen Lactose und Galactose, c = 1, 10 und 100 µg/ml (von unten nach oben), mit Aminophase analysiert, Detektion: Lichtstreuendetektor

Methodenparameter:

Säule: Shodex Asahipak NH2P-50 4E
 Eluent: 70 % ACN/30 % H₂O und 75 % ACN/25 % H₂O
 Säulentemperatur: Raumtemperatur
 Detektortemperatur: 40°C
 Meßsignalverstärkung: 4 bis 12

Nach Auskunft der Firma Techlab [98] wäre das verbesserte, bereits auf dem Markt erhältliche ELSD-Nachfolgemodell Sedex 85 nur um ca. Faktor 5 empfindlicher und somit auch nicht geeignet zur Bestimmung der Lactose im gewünschten Konzentrationsbereich. Außerdem müßten für die Lichtstreuendetektion hochreine Lösungsmittel (mit geringstem abdampfbareren Rückstand) als Eluenten eingesetzt werden, um die angegebenen Nachweisgrenzen zu erreichen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

3.2.1 HPLC nach reduktiver Aminierung von Lactose und Galactose mit p-Aminobenzoesäure und p-Aminobenzoesäureestern:

Es konnte keine HPLC-Methode zum Nachweis von Lactose und Galactose im Spurenbereich in Milch und Milchprodukten entwickelt werden.

Mit der Ionenpaarchromatographie war es nicht möglich, reproduzierbare Läufe mit stabilen Retentionszeiten der Analyten zu erhalten. Die Versuche wurden deshalb ergebnislos abgebrochen. Als Ursache wurde in späteren Versuchen eine Kontamination der verwendeten HPLC-Anlage mit stark hydrophoben Proteinen aus der Eiweißanalytik ermittelt, die zu Störpeaks im Chromatogramm und schwankenden Retentionszeiten der Analyten führten. Selbst durch intensives Spülen und Passivieren der Anlage mit 6N HNO₃ konnte die Anlage nicht ausreichend gereinigt werden.

Auch bei der RP-Chromatographie waren Störpeaks aufgrund Kontamination der Anlage zu beobachten. Zudem weist die RP-Methode gegenüber der Ionenpaarchromatographie eine geringere Selektivität auf. Mit RP-Chromatographie war es weder möglich, Galactose und Glucose aufzutrennen, noch konnte Lactose von den beim enzymatischen Lactoseabbau entstehenden Nebenprodukten abgetrennt werden.

3.2.2 Enzymatik

Versuche mit einer modifizierten enzymatischen Bestimmung lieferten nur sehr schlechte Wiederfindungsraten an Lactose. Die Ursachen hierfür sind, nach der Ausschaltung weiterer eventueller Einflußfaktoren, in einer für die eingesetzten Enzyme ungeeigneten Ionenstärke und fehlenden Pufferkapazität der veränderten Testansätze zu suchen. Die der Bestimmung vorgeschaltete Glucoseabbau-prozedur der ursprünglich in der Probe enthaltenen Glucose wurde aus einer bestehenden, etablierten Lactulose-Bestimmungsvorschrift der Fa. Boehringer entnommen. Die Vollständigkeit des Glucoseabbaus konnte durch Vergleich von Extinktionswerten verschiedener Standardlösungsansätze belegt werden. Eine weitere Methodenoptimierung erfordert eine langwierige Feinabstimmung der entsprechenden Ionen- und Pufferkonzentrationen und wäre im Rahmen dieses Projektes zu komplex und zeitaufwendig gewesen.

Grundsätzlich ist ein Erreichen der angestrebten Bestimmungs-/Nachweisgrenze für Lactose von 0,01 % in der Probe auch mit einer modifizierten enzymatischen Bestimmung auf Grund der verfahrensbedingten Streuung nicht möglich.

3.2.3 Gaschromatographie

Eine Routinemethode zur Bestimmung von Lactose und Galactose in der Größenordnung von 0,01 % Gehalt in Milchprodukten mittels Gaschromatographie ist nicht möglich. Die Probenaufbereitung ist langwierig, teuer und stark fehlerbehaftet.

tet. Bei der Detektion mit FID kann die gewünschte Bestimmungsgrenze mit einem GC/FID-System mit Split/Splitless-Injektor auch bei starker Probenaufkonzentrierung und erhöhtem Injektionsvolumen auf Grund gleichzeitig angereicherter Probenmatrixbestandteile, die das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtern, nicht erreicht werden. Zudem ist die Auswertung schwierig, da auch bei Anwendung der etablierten Aldoximmethode zwei Peaks pro Saccharid (mit Ausnahme von nicht-reduzierenden Zuckern) im Chromatogramm erhalten werden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Probenmatrixkomponenten und zusätzlicher Zucker, wie die durch den Erhitzungsprozeß bei UHT-Milch entstehende Lactulose oder die beim enzymatischen Abbau gebildeten Umlagerungsprodukte der Lactose, ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich.

Bei der alternativen Derivatisierung mit p-Aminobenzoessäureethylester mittels reduktiver Aminierung und anschließender Silylierung wird zwar im Gegensatz zur Aldoximmethode nur ein Peak pro Zucker erhalten, diese Derivatisierungsmethode ist jedoch ebenfalls wegen unzureichender Aufkonzentrierungs- und Aufreinigungsmöglichkeiten ungeeignet für eine GC-Bestimmung der Lactose und Galactose im Spurenbereich.

3.2.4 Ionenchromatographie mit Anionenaustauschersäule und gepulst amperometrischem Detektor

Durch die Untersuchung von insgesamt zwölf verschiedenen Standard- und Probelösungen mit mehreren Wiederfindungs- und Aufstockversuchen in verschiedenen, teils extrem eiweiß- und fetthaltigen Proben belegte die Fa. Dionex die grundsätzliche Eignung ihres IC/PAD-Systems für die Quantifizierung von Lactose im gewünschten Konzentrationsbereich auch in Gegenwart der zusätzlichen Di-/Oligosaccharide. Auf Grund der Gradientenbetriebsweise besteht bei der Dionex-Anlage im Gegensatz zur Metrohm-Anlage eine Einflußgröße zur Verbesserung /Veränderung der Trennung. Außerdem ist die Dionexanlage bezüglich Nachweisempfindlichkeit, Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Auflösung der Metrohm-Anlage überlegen. Nachteilig bei der Dionex-Methode ist allerdings die lange Analysendauer von sechzig Minuten.

Die geforderte Bestimmungsgrenze für Lactose konnte bei der Metrohm-Anlage bei frisch gereinigter Goldelektrode gerade noch erreicht werden, zudem tauchten Probleme beim Betrieb hinsichtlich einer relativ schnellen Verschmutzung der Goldelektrode und der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Auflösung auf.

Der allgemeine Vorteil der Lactose-/Galactosebestimmung mittels Ionenchromatographie/PAD besteht in der minimalen und sehr kostengünstigen Probenvorbereitung und dem billigen, weil rein wässrigen Eluenten. Nachteil ist die regelmäßig erforderliche Reinigung einer permanenten Goldelektrode bzw. der regelmäßige Austausch einer auswechselbaren Goldfolienelektrode (ca. jeweils nach 14 Tagen im Dauermeßbetrieb).

Im Rahmen dieser Versuche konnte außerdem gezeigt werden, dass bei der Herstellung lactosefreier Milch und Milchprodukte durch den enzymatischen Lactoseabbau nicht nur Glucose und Galactose, sondern auch weitere Nebenprodukte, wahrscheinlich Di- und Oligosaccharide, entstehen. Diese besitzen offenbar eine Querempfindlichkeit zum enzymatischen Lactosenachweis

und sind deshalb vermutlich Ursache für teilweise falsch hohe Laktosebefunde nach diesem Verfahren. Mit einer wachsenden Anzahl an laktosefreien Produkten wird diese Problematik künftig noch zunehmen.

3.2.5 Versuche mit Lichtstreuungsdetektion

Die in Zusammenarbeit mit der Fa. Techlab durchgeführten Versuche mit Lichtstreuungsdetektion bestätigen die aus den Vorversuchen mit einem Gerät der Fa. ERC gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der nicht ausreichenden Nachweisempfindlichkeit dieser Detektionsart. Da sich das Signal/Rauschverhältnis des Detektors bei anorganischen Anteilen in der mobilen Phase verschlechtert, ist der Betrieb nur mit hochreinen, teuren Lösungsmitteln möglich. Zudem ist durch diese hohe Störanfälligkeit/Querempfindlichkeit des Detektors die Zahl der damit kombinierbaren Probenaufbereitungstechniken und einsetzbaren stationären und mobilen Phasen stark eingeschränkt. Die Entwicklung einer chromatographischen Methode zur Abtrennung der Lactoseumlagerungsprodukte ist damit praktisch nicht möglich.

4 Zusammenfassung

Projektziel war die Entwicklung eines Analysenverfahrens zum Nachweis von Laktose und Galaktose in Milch und Milchprodukten mit einer Nachweisgrenze von jeweils deutlich weniger als 0,1 Massen-%.

Als Richtwert diente der von Lebensmittelchemischen Gesellschaft empfohlene Wert von 0,01 g / 100 g verzehrfertiges Lebensmittel für die Deklaration als lactosesfreies Produkt.

Folgende Methoden/Verfahren wurden zur Lösung dieser Aufgabenstellung erprobt:

- Ionenaenchromatographie mit Fluoreszenzdetektion HPLC/FD mit Vorsäulen-Derivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit p-Aminobenzoessäure
- RP-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion HPLC/FD mit Vorsäulen-derivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit verschiedenen p-Aminobenzoessäureestern
- Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion GC/FID und vorhergehender Derivatisierung mittels reduktiver Aminierung mit p-Aminobenzoessäureethylester und Silylierung
- Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion GC/FID mit vorhergehender Aldoximbildung und Silylierung
- enzymatischer Nachweis über $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ mit photometrischer Bestimmung
- Ligandenaustauschchromatographie mit Kationenaustauschersäule und gepulst-amperometrischer Detektion HPLC/IC/PAD
- Ionenchromatographie mit Anionenaustauschersäule und gepulst-amperometrischer Detektion IC/PAD
- Ligandenaustauschchromatographie mit Kationenaustauschersäule und Lichtstreuungsdetektion HPLC/IC/ELSD
- Normalphasenchromatographie mit Lichtstreuungsdetektion HPLC/ELSD

In Verbindung mit den allgemeinen Anforderungen an eine Analysenmethode (Richtigkeit, Reproduzierbarkeit) und den zusätzlichen Anforderungen an eine Routinemethode (niedrige Analysenkosten, schnelle Analytik/hoher Probendurchsatz, Robustheit) ist, nach den gewonnen Erkenntnissen, nur das Ionenchromatographie/PAD-System der Fa. Dionex für diese Problemstellung geeignet. Abstriche müssen hierbei beim Probendurchsatz auf Grund der notwendigen Analysendauer von einer Stunde gemacht werden.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen/Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Das angestrebte Ziel war die Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Lactose und Galactose in Milchprodukten in einer Konzentration von deutlich kleiner als 0,1 Massen-%. Dieses Ziel konnte mittels Ionenchromatographie/PAD erreicht werden.

Vorgesehen im Projektplan waren:

- Literaturstudium
- Versuche mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit reduktiver Aminierung der Analyten mit p-Aminobenzoesäure und p-Aminobenzoesäure-propylester
- Versuche mittels GC/FID in Verbindung mit Silylierung mit MSTFA und Acetylierung mit TFAA
- Erprobung alternativer, neuer oder wenig etablierter HPLC-Detektoren (wahlweise Lichtstreuendetektor ELSD/CAD oder gepulst-amperometrischer Detektor PAD)
- Optimierung der Probenvorbereitung
- Bei erfolgreicher Entwicklung einer geeigneten Methode Untersuchung von verschiedenen Milchprodukten
- Validierung dieser Methode(n); Ermittlung von Präzisionsdaten

Vom Projektplan mußte wegen verschiedener Gründe, wie z.B. neuer Informationen aus dem Literaturstudium, neuer aus den Versuchen gewonnener Erkenntnisse und aufgetretener Gerätedefekte/-kontaminationen abgewichen werden. Der Versuchsplan wurde hinsichtlich des vorgesehenen instrumentiellen Methodenspektrums erweitert; außerdem wurden deutlich mehr Derivatisierungs- und Probenaufbereitungstechniken angewandt und erprobt als geplant. Die vorgesehene Anzahl an Messungen von realen Milchprodukten konnte mit dem IC/PAD-System der Fa. Metrohm durchgeführt werden. Mit dem IC/PAD-System der Fa. Dionex wurden neben Standardlösungen neun reale Proben untersucht und dadurch Aussagen zur Wiederfindung und damit Richtigkeit der Methode in Verbindung mit verschiedenen Matrices erhalten. Da die Fa. Dionex das benötigte Gerät jedoch nicht ausleiht, konnte bisher keine umfangreiche Validierung der Methode durchgeführt werden.

6 Verwendete Literatur:

Reduktive Aminierung/Ionenpaarchromatographie mit Fluoreszenzdetektion

- [1] Meyer A., Raba Ch., Fischer K.: Ion-Pair RP-HPLC Determination of Sugars, Amino Sugars, and Uronic Acids after Derivatization with p-Aminobenzoic Acid. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2377-2382
- [2] Fischer K., Wacht M., Meyer A.: Simultaneous and Sensitive HPLC Determination of Mono- and Disaccharides, Uronic Acids, and Amino Sugars after Derivatization by Reductive Amination. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* **31**, (2003) 2, 134-144
- [3] Fischer K., Wacht M., Meyer A.: Chromatographische Bestimmung von Mono- und Disacchariden, Uronsäuren und Aminozuckern nach Derivatisierung mit p-Aminobenzoessäure-Alkylestern. www.uni-trier.de/uni/fb6/umweltchemie/LEVEL_1/LEHRE/V-Angebot/Poster2.pdf
- [4] Anumula, K.: Quantitative Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by High-Performance Liquid Chromatography with Highly Sensitive Fluorescence Detection. *Analytical Biochemistry* **220**, (1994), 275-283

Reduktive Aminierung/weitere Trennsysteme und Detektionsarten

- [5] Sato, K., Sato Ki., Okubo, A., Yamazaki, S.: Determination of Monosaccharides Derivatized with 2-Aminobenzoic Acid by Capillary Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **251**, (1997), 119-121
- [6] Nguyen, D.T., Lerch. H., Zemann A., Bonn G.: Separation of Derivatized Carbohydrates by Co-electroosmotic Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* **46**, No. 3 /4 (1997), 113-121
- [7] Grill, E., Huber, C., Oefner, P., Vorndran, A., Bonn, G.: Capillary Zone electrophoresis of p-aminobenzoic derivatives of aldoses, ketoses and uronic acids. *Electrophoresis* **14**, (1993), 1004-1010
- [8] Schwaiger, H., Oefner, P., Huber, C., Grill, E., Bonn, G.: Capillary Zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography of 4-amino-benzonitrile carbohydrate derivatives. *Electrophoresis* **15**, (1994), 941-952
- [9] Oefner, P., Vorndran, A., Grill, E., Huber, C., Bonn, G.: Capillary Zone Electrophoretic Analysis of Carbohydrates by Direct and Indirect UV-Detection. *Chromatographia* **34**, No. 5-8, (1992), 308-316
- [10] Kratschmar, D., Wallner, S., Florenski, M., Schmid, D., Kuhn, R.: Analysis of Oligosaccharides with Aminobenzoic Alkyl Esters as Derivatization Agents. *Chromatographia* **50**, No. 9 /10, (1999), 596-600
- [11] Bigge, J., Patel, T., Bruce, J., Goulding, P., Charles, S., Parekh, R.: Nonselective and Efficient Fluorescent Labeling of Glycans Using 2-Amino Benzamide and Anthranilic Acid. *Analytical Biochemistry* **230**, (1995), 229-238

Reduktive Aminierung, allgemein

- [12] Manescalchi, F., Nardi, A., Savoia, D.: Reductive Amination of 1,4- and 1,5-Dicarbonyl Compounds with (S)-Valine Methyl Ester. *Synthesis of (S)-2-*

- Phenylpyrrolidine and (S)-2-Phenylpiperidine. *Tetrahedron Letters* **35**, No. 17, 2775-2778
- [13] Borch, R., Reductive Amination with Sodium Cyanoborohydride: N,N-Dimethylcyclohexylamine. *Organic Syntheses* **52**, 124-127
- [14] Borch, R., Bernstein, M., Dupont Durst, H.: The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *Journal of the American Chemical Society*, (1971), 2897-2904
- [15] Hutchins, R., Natale, N.: Cyanoborohydride Utility and Applications in Organic Synthesis. A Review. *Organic Preparations and Procedures Int.* **11(5)**, (1979), 201-246
- [16] Abdel-Magid, A., Carson, K., Harris, B., Maryanoff, C., Shah, R.: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *Journal of Organic Chemistry* **61**, (1996), 3849-3862
- [17] Beshore, D., Dinsmore, C.: Preparation of Substituted Piperazinones via Tandem Reductive Amination-(N,N'-Acyl-Transfer)-Cyclization. *Organic Letters* **4**, No. 7, (2002), 1201-1204

Weitere Derivatisierungsmethoden mit und ohne HPLC

- [18] Zhang, R., Cao, Y., Hearn, M.: Synthesis and Application of Fmoc-Hydrazine for the Quantitative Determination of Saccharides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in the Low and Subpicomole Range. *Analytical Biochemistry* **195**, (1991), 160-167
- [19] Honda, S., Togashi, K., Taga, A.: Unusual Separation of 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of aldoses by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **791**, (1997), 307-311
- [20] Strydom, D.: Chromatographic Separation of 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic aldoses. *Journal of Chromatography A* **678**, (1994), 17-23

Reduktive Aminierung/GC

- [21] Hase, S., Hara, S., Matsushima, Y.: Tagging of Sugars with a Fluorescent Compound, 2-Aminopyridine. *J. Biochem.* **85**, No. 1, (1979), 217-220

Silylierung/Aldoximreaktion/GC

- [22] Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB), 2A Getränke auf Milch- und Milchproduktebasis; Untersuchungsmethode 8: Bestimmung von Zuckerarten (Hinweis), gaschromatographisch, (1980), 1 /2- 2 /2
- [23] Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB), 24 A Zuckerwaren; Untersuchungsmethode 5: Zuckerbestimmung, gaschromatographisch, (2006), 1 /1-6 /6
- [24] Van Look, G., Simchen, G., Heberle, J.: Silylating Agents. Fluka Chemie AG, (1995), Buchs
- [25] Ugrinovits, M.: Zuckeranalyse mit GC, HPLC, DC und enzymatisch – Ein Vergleich der Methoden. *Chromatographia* **13**, No. 7, (1980), 386-394

- [26] Sweeley, C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.: Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. **85**, (1963), 2497-2507
- [27] Brobst, K., Lott, C.: Determination of some Components in Corn Syrup by Gas-Liquid-Chromatography of the Trimethylsilyl Derivatives. **43**, (1966), 35-43
- [28] Nikolov, Z., Reilly, P.: Isothermal Capillary Gas Column Chromatography of Trimethylsilyl disaccharides. *Chrom.* **15**, 316, (1982), 157-162
- [29] Cahour, A., Hartmann, L.: Study of neutral and Aminomonosaccharides by Gas-Liquid-Differential Chromatography: Application to three Reference Glycoproteins. *Journal of Chromatography* **152**, (1978), 475-486
- [30] Gianetto A., Berruti F., Kempton A.: Lactose Analysis in Dilute Solutions by Gas Chromatography Using Silylation. *Biotechnology and bioengineering* XXXVIII, (1986), 1119-1121
- [31] Jurenitsch, J., Kopp, B., Gabler-Kolacsek, I., Kubelka, W.: Gaschromatographische Erfassung von 6-Desoxyhexosen, Pentosen und Hexosen aus herzwirksamen Glykosiden. *Journal of Chromatography* **210**, (1981), 337-341
- [32] Novina, R.: Analysis of Technical Grade Sorbose by Gas Chromatography-Massspectrometry of the Trimethylsilyl Derivatives. *Chromatographia* **17**, No. 8, (1983), 441-444
- [33] Novina, R.: Analysis of Trimethylsilyl-Isopropylidene Derivatives of Sorbose by Combined Gas Chromatography and Mass-Spectrometry. *Chromatographia* **15**, No. 11, (1982), 704-706
- [34] Novina, R.: Gas-Liquid Chromatography of Isopropylidene-Glucose and Glucose as their Trimethylsilyl Derivatives. *Chromatographia* **18**, No. 1, (1984), 21-22
- [35] Rubino, F.: Silylaldonitrile Derivatives for the Determination of Sugars by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography* **473**, (1989), 125-133
- [36] Paez, M., Martinez-Castro, I., Sanz, J., Olano, A., Garcia-Raso, A., Saura-Calixto, F.: Identification of the Components of Aldoses in a Tautomeric Equilibrium Mixture as Their Trimethylsilyl Ethers by Capillary Gas Chromatography. *Chromatographia* **23**, No. 1, (1987), 43-46
- [37] Martinez-Castro, I., Calvo, M.M., Olano, A.: Chromatographic Determination of Lactulose. *Chromatographia* **23**, No. 2, (1987), 132-136
- [38] Olano A., Calvo M., Reglero G.: Analysis of Free Carbohydrates in Milk Using Micropacked Columns. *Chromatographia* **21**, No. 9; (1986), 538-540
- [39] Martinez-Castro, I., Calvo M., Olano A.: Chromatographic Determination of Lactulose. *Chromatographia* **23**, No. 2, (1987), 132-136
- [40] Montilla A., Moreno F., Olano A.: A Reliable Gas Capillary Chromatographic Determination of Lactulose in Dairy Samples. *Chromatographia* **62**, No. 5/6, (2005), 311-314
- [41] Garcia Banos, J., Olano, A., Corzo, N.: Determination of Mono- and Disaccharide Content of Enteral Formulations by Gas Chromatography. *Chromatographia* **52**, (2000), 221-224
- [42] Fox, A.: Capillary Gas Chromatographic Analysis of Alditol Acetates of Neutral and Amino Sugars in Bacterial Cell Walls. *Journal of Chromatography* **256**, (1983), 429-438
- [43] Laker, M.: Estimation of Disaccharides in Plasma and Urine by Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography* **163**, (1979), 9-18

- [44] Englmaier, P.: Identification and Quantitative Estimation of Plant Cyclitols and Polyols by Gas Chromatography. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **324**, (1986), 338-339
- [45] Li, B., Andrews, K.: Separation of Trimethylsilylated Oximes of Monosaccharides by Capillary Gas-liquid Chromatography. *Chromatographia* **21**, No. 10, (1986), 596-598

NP-(HILIC)-Chromatographie mit Aminophasen

- [46] Alpert, A.: Hydrophilic Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and other Polar Compounds. *Journal of Chromatography* **499**, (1990), 177-196
- [47] Brons, C., Olieman, C.: Study of the High Performance Liquid Chromatographic Separation of Reducing Sugars, Applied to the Determination of Lactose in Milk. *Journal of Chromatography* **259**, (1983), 79-86
- [48] Lawson, M., Russell, G.: Trace Level Analysis of Reducing Sugars by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science* **45**, (1980), 1256-1258
- [49] Snyder, L., Kirkland, J., Glajch, J.: *Practical HPLC Method Development*; Second Edition, Chapter 6, (1997), John Wiley & Sons, Inc. New York
- [50] Fa. Shodex: Technical Notebook No. 2
- [51] Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB), 23A Honig Untersuchungsmethode 8.1: Bestimmung von Zuckerarten mittels HPLC (Refraktionsindexdetektion), (1995), 26-29

Anionenaustauschchromatographie mit PAD

- [52] Wenkel N.: Gepulste Amperometrische Detektion. *GIT Separation* **2/2001**, 68-69
- [53] Cataldi T., Angelotti M., D'Erchia L., Altieri G., Di Renzo G.: Ionexchange chromatographic analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey. *Eur Food Res Technol* (2003), **216**, 75-82
- [54] Mannino, S., Martignoni, E.: Sugar Determination in Musts and Wines with a Flow System and Amperometric Detection at Constant Potential with a Chemically Modified Electrode. *Ital. J. Food Sci.*, No. 1, (1993), 37-41
- [55] LaCourse, W., Mead, D., Jr., Johnson, D.: Anion-Exchange Separation of Carbohydrates with Pulsed Amperometric Detection using a pH-Selective Reference Electrode. *Analytical Chemistry* **62**, No. 2, (1990), 220-224
- [56] Johnson, D., Lacourse, W.: Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection at Gold and Platinum Electrodes. *Analytical Chemistry* **62**, No. 10, (1990), 589A-597A
- [57] Welch, L., Mead, D., Jr., Johnson, D.: A Comparison of Pulsed Amperometric Detection and Conductivity Detection for Carbohydrates. *Analytica Chimica Acta* **204**, (1988), 323-327
- [58] Martens, D., Frankenberger, W., Jr.: Determination of Saccharides by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Chromatographia* **29**, No. 1 /2, (1990), 7-12

- [59] Kerhevé, P., Charrière, B., Gadel, F.: Determination of Marine Mono-saccharides by High-pH Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Journal of Chromatography A*, **718**, (1995), 283-289
- [60] Weiß, J.: Ionenchromatographie, zweite, erw. Auflage, Kapitel 3, VCH, (1991), Weinheim
- [61] Grimm, A.: Entwicklung stationärer Phasen für die Ionenchromatographie zur Trennung von Kohlenhydraten. Diss. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, Marburg/Lahn 2006
- [62] Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB), 23A Honig, Untersuchungsmethode 11: Bestimmung von Zuckerarten mittels IC und PAD-Detektoren, (2004), 43-45
- [63] Mopper, K., Schultz, Ch., Chevolut, L., Germain, C., Revuelta, R., Dawson, R.: Determination of Sugars in Unconcentrated Seawater and Other Natural Waters by Liquid Chromatography and Pulsed Amperometric Detection. *Environ. Sci. Technol.* **26**, (1992), 133-138
- [64] Jahnel, J., Ilieva, P., Frimmel, F.: HPAE-PAD – a sensitive Method for the Determination of Carbohydrates. *Fresenius J. Anal. Chem.* **360**, (1998), 827-829
- [65] Dionex Corporation: Technical Note 20: Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), (2000)
- [66] Dionex Corporation: Application Note 147: Determination of Polydextrose in Foods by AOAC Method 2000.11, (2003)
- [67] Dionex Corporation: Application Note 155: Determination of Trans-Galactooligosaccharides in Foods by AOAC Method 2001.02; (2003)
- [68] Dionex Corporation: Application Note 122: The Determination of Carbohydrates, Alcohols and Glycols in Fermentation Broths, (2004)
- [69] Deutsche Metrohm GmbH & Co.: IC Applikation AW DE 8-0571-122004: Bestimmung von Xylit, Sorbit, Glucose, Fructose, Lactose und Saccharose in verschiedenen Lebensmittelextrakten
- [70] Deutsche Metrohm GmbH & Co.: IC Application Note No. P-5: Seven Carbohydrates in Milk after Sample Preparation by In-Line Dialysis
- [71] Metrohm AG: Wille, A., Schäfer, H., Terzer, W.: Sugar Determination in Dairy Products

Anionenaustauschchromatographie/weitere Detektionsarten

- [72] Höfler F., Bruggink C., Cavalli S., Maurer R., Herrmann H.: Verfälschung oder Verifizierung. Analyse von Kohlenhydraten in Lebensmitteln mit LC/MS. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 1/2006, 15-17
- [73] Kotani, N., Takasaki, S.: Analysis of 2-Aminobenzamide-Labeled Oligosaccharides by High-pH Anion Exchange Chromatography with Fluorometric Detection. *Analytical Biochemistry* **264**, (1998), 66-73

Andere Trennsysteme/PAD

- [74] Zhang X., Cao Y., Ye J.: Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry* **72**, (2001), 385-388

- [75] Adányi N., Szabó E., Váradi M.: Multi-enzyme biosensors with ampero-metric detection for determination of lactose in milk and dairy products. Eur Food Res technol (1999), 209,: 220-226

Ligandenaustauschromatographie (Kationenaustauschersäule)

- [76] ISO 11868, IDF 147: Heat-treated milk – Determination of lactulose content – Method using high-performance liquid chromatography. Second Edition, 2007
- [77] ISO/FDIS 22662, IDF 198: Milk and milk products – Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method), 2007
- [78] Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB), 36C Schokolade, Untersuchungsmethode 4.3: Bestimmung der Polydextrose und von mehrwertigen Alkoholen mittels HPLC, (1999), 1 /10 -10 /10

HPLC/ELSD

- [79] Fa. ESA: Application Note: Simple carbohydrates by HPLC-ELSD
- [80] Teutenberg T., Türk J., Holzhauser M., Kiffmeyer T, Paschlau J.: Vergleich eines UV- und CAD-Detektors in der pharmazeutischen Analytik. GIT Labor-Fachzeitschrift 9/2005, 718-721
- [81] Paschlau J.: Corona Charged Aerosol Detektor - eine neue Detektionsmethode für die HPLC am Beispiel einer Zuckeranalytik. GIT Labor-Fachzeitschrift 8/2007, 650-651

HPLC mit MS/RI/UV-VIS/Fluoreszenz

- [82] Yuh Y.-S., Chen J.-L., Chiang C.-H.: Determination of blood sugars by high pressure liquid chromatography with fluorescent detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 16, (1998), 1059-1066
- [83] St-Gelais D., Doyon G., Rolland J.R., Goulet J.: Sugar and organic acid concentrations during ripening of Cheddar cheese-like products. Milch-wissenschaft 46, (5), 1991, 288-291
- [84] Izco J.M., Tormo M., Jiménez-Flores R.: Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. J. Dairy Sci.85, 2122-2129
- [85] Luzzana M., Agnellini D., Cremonesi P., Caramenti G., De Viat S.: Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. Lait 83, (2003), 409-416
- [86] § 35 LMBG L 01.00.17: Bestimmung des Laktose- und Galaktosegehalts von Milch und Milchprodukten
- [87] Shen X., Perreault, H.: Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass-spectrometry: Journal of Chromatography A (1998), 811, 47-59

- [88] Chavez-Servin J., Castellote A., Lopez-Sabater C.: Analysis of mono and disaccharides in milk-based formulae by high performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A* (2004), 1043,2, 211-215

Enzymatische Bestimmung

- [89] Boehringer Mannheim GmbH: Methoden der enzymatischen BioAnalytik und Lebensmittelanalytik, (1995)
[90] VDLUFA Methodenbuch, Band VI

Sonstige Literatur

- [91] Geckeler, E., Eckstein, H. (Hrsg.): Bioanalytische und biochemische Labormethoden, Vieweg-Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1998)
[92] Lehmann, J.: Kohlenhydrate, zweite Neubearb. u. erw. Auflage, (1996), Georg Thieme Verlag, Stuttgart
[93] Czermak, P., Ebrahimi, M., Grau, K., Netz, S., Sawatzki, G.: Enzymatisch katalysierte Synthese von Galactosyl-Oligosacchariden in einem kontinuierlichen Membranreaktorsystem. *Chemie Ingenieur Technik* **75**, 1 – 2, (2003), 136-139
[94] Mahoney, R.: Galactosyl-oligosaccharide Formation during Lactose Hydrolysis: A Review. *Food Chemistry* **63**, No. 2, (1998), 147-154
[95] Bakken, A., Hill, C., Jr.: Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized β -Galactosidase (*Bacillus Circulans*). *Biotechnology and Bioengineering* **39**, (1992), 408-417
[96] Zhou, Z. Q., Chen, X. D., Li, X.: Kinetics of Lactose Hydrolysis by β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* Immobilized on Cotton Fabric. *Biotechnology and Bioengineering* **81**, No. 2, (2003), 127-133
[97] persönliche Mitteilung, Rudolf Hillmann, Fa. Dionex, Juni 2008
[98] persönliche Mitteilung, Frau Blümel, Fa. Techlab, Asseblick 4, D-38174 Erkerode, Juni 2008
[99] persönliche Mitteilung, Stefan Ertl, Fa. Manner & Comp. AG, Wilhelminenstraße 6, A-1171 Wien, Januar 2008