

Diese Arbeit wurde am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie unter der Betreuung von O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Hemit Viernstein, Studienprogrammleiter der Fachrichtung Pharmazie und Vorstand des Departments durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch fachliche oder persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank Herrn O.Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit der Arbeit am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, sowie für die abschließende Lektüre und Beurteilung.

Herrn Hon. Prof. Frank M. Unger, dem Betreuer während meiner praktischen Arbeit, danke ich für seine hilfreichen Denkanstöße und wissenschaftlichen Ratschläge, sein Interesse am Fortschreiten der Arbeit und für die abschließende Korrektur.

Herrn Ing. Bernhard Pertl danke ich für die Hilfe und Geduld bei der High Performance Anion Exchange Chromatography.

Frau Dr. Sharareh Salar-Behzadi und Frau Dr. Diana Berner möchte ich besonders herzlich für ihre Unterstützung bei der Lösung der im Diplomarbeitsalltag auftauchenden kleinen Probleme und Schwierigkeiten danken.

Herrn Dr. Bernhard Bär danke ich für Hilfe in Computerangelegenheiten.

Mag. Borjana Lubura und Mag. Sabine Bogner danke ich für ihr Lektorat.

Allen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Viernstein danke ich für die freundliche und motivierende Atmosphäre.

Ganz besonderen Dank an meine Eltern, meine Familie und an Frau Dr. Bettina Marcus.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Zielsetzung	5
1.2 Gewinnung der alkalilöslichen Fraktion	5
1.3 Anionen-Austausch-Chromatographie mit Dionex ICS3000	5
1.4 HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)	6
1.5 Pulsed Amperometric Detection (PAD)	6
1.6 Einfluss der Temperatur auf die Retentionszeit	6
1.7 Mikrowellenunterstützte partielle Hydrolyse	7
1.8 Reduktion der Uronsäurereste	7
1.9 Smith-Abbau	7
1.10 Photometrische Uronsäuregehaltsbestimmung	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Ausgangsmaterial	9
2.2 Gewinnung der alkalilöslichen und der alkaliunlöslichen Polysaccharidfraktion	9
2.2.1 Extraktion der alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (bezeichnet als Gesamtes Polysaccharid / GPS)	10
2.2.2 Zentrifugation	10
2.2.3 Neutralisation des Überstandes	10
2.2.4 Dialyse	11
2.2.5 Lyophilisation	11
2.3 Hydrolyse der alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (GPS)	13
2.4 Dünnschichtchromatographie	14
2.5 HPAEC-PAD mit dem Dionex ICS3000	
Ionen Chromatographie System	15
2.5.1 CarboPac PA20 Daten	15
2.5.2 Verwendete Programmparameter	16
2.5.3 Herstellung der Standards für HPAEC-PAD	17
2.5.4 Probenvorbereitung für HPAEC-PAD	18

2.6 Trennung der gesamten alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (GPS)	18
2.7 Mikrowellenunterstützte partielle Hydrolyse	20
2.8 Reduktion der Uronsäurereste des sauren Polysaccharids	21
2.9 Smith-Abbau	21
2.10 Chromatographisches Verhalten von 4-O-Methyl-Glukuronsäure	22
2.10.1 4-O-Methyl-Glukuronsäure-Dünnschichtchromatogramm	22
2.10.2 4-O-Methyl-Glukuronsäure HPAEC-PAD-Chromatogramm	22
2.11 Photometrische Uronsäurebestimmung	23
3. Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie	25
3.1.1 Chromatographie der Monosaccharidstandards	25
3.1.2 Hydrolyseprodukte der drei Polysaccharidfraktionen (GPS und der daraus erhaltenen Fraktionen NPS und SPS)	26
3.1.3 Verbesserung der Trennung durch Mehrfachentwicklung	28
3.1.4 Variation der Hydrolysebedingungen und Vergleich Einfach- versus Mehrfachentwicklung	29
3.1.4.1 Dünnschichtvergleich Gesamtes Polysaccharid	30
3.1.4.2 Dünnschichtvergleich Neutrales Polysaccharid	31
3.1.4.3 Dünnschichtvergleich Saures Polysaccharid	32
3.2. Ergebnisse HPAEC-PAD	33
3.2.1 Eluentenzusammensetzung zur Trennung der neutralen Monosaccharide	33
3.2.2 Gesamtes Polysaccharid	35
3.2.3 Neutrales Polysaccharid	37
3.2.4 Saures Polysaccharid	38
3.3 Ergebnisse der Mikrowellenunterstützten Hydrolyse	39
3.3.1 Der erste Versuch mit der Mikrowellenapparatur	39
3.3.2 Mikrowellenhydrolyse des gesamten alkalilöslichen PS	40
3.3.3 Mikrowellenhydrolyse von NPS, SPS und SPSreduziert	41
3.4 Reduktion der Uronsäurereste des sauren Polysaccharids	46
3.5 Smith-Abbau des sauren Polysaccharids	48
3.6 Smith-Abbau des neutralen Polysaccharids	49
3.7 Der Nachweis von 4-O-Methyl-Glukuronsäure	50

3.7.1 Dünnschichtchromatographie von SPS und Uronsäurestandards	50
3.7.2 Trennung von Uronsäurestandards mit der HPAEC-PAD	51
3.8 Photometrische Uronsäuregehaltsbestimmung	53
3.9 Trennung von Zuckeralkoholen mit der HPAEC-PAD	54
4. Zusammenfassung	55
Summary	56
Abkürzungsverzeichnis	57
Literaturverzeichnis	59
Abbildungsverzeichnis	60
Tabellenverzeichnis	62

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, aufbauend auf den Arbeiten meiner VorgängerInnen, die alkalilösliche Fraktion des aus *Ocimum basilicum* Linn var. *citratum* gewonnenen Polysaccharidgemisches über Anionen-Austausch-Säulen-chromatographie vollständig in ihre neutrale und saure Fraktion aufzutrennen und diese über Dünnschicht- und Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie auf ihre Monosaccharidzusammensetzung zu analysieren [1].

Eine partielle Trennung der neutralen und sauren Fraktionen mit nachfolgender Monosaccharidanalyse ist bereits durch Herrn Prof. Praznik und Frau Prof. Löppert an der Universität für Bodenkultur durchgeführt worden.

1.2 Gewinnung der alkalilöslichen Fraktion

Die Schleimstoffe der Samen von *Ocimum basilicum* besitzen ein enormes Quellvermögen in Wasser, und können durch eine Behandlung mit Alkali aufgeschlossen werden. Die höchste Ausbeute lässt sich mit 4 M Natronlauge erzielen. Man erhält eine wasserlösliche Fraktion welche ca. 45% (w/w) der Ausgangsmenge ausmacht und eine wasserunlösliche Fraktion mit 23 %igem Anteil (w/w) an der Ausgangsmenge. Die restlichen 32% (w/w) gehen verloren [2,3].

1.3 Anionen-Austausch-Chromatographie mit Dionex ICS3000

Zur Analyse von Monosacchariden eignet sich das High Performance Anion Exchange Chromatography-System [4, 5].

1.4 HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)

In wässriger alkalischer Lösung verhalten sich Zuckermoleküle wie schwache Säuren und liegen als Anionen vor. Diese Eigenschaft kann seit der Einführung von Chromatographiesäulen mit polymerbasierter stationärer Phase, die über einen weiten pH-Bereich stabil sind, zur Trennung von Monosacchariden und ähnlichen Molekülen (wie zum Beispiel Zuckeralkoholen) genutzt werden [6,7].

1.5 Pulsed Amperometric Detection (PAD)

Gepulste amperometrische Detektion erlaubt die Bestimmung von Monosacchariden mit gutem Signal-/Rauschverhältnis ohne Notwendigkeit einer Derivatisierung. Das Elektrodenpotential folgt dabei einem genau definierten Muster. An einer Goldelektrode werden die Kohlenhydratmoleküle oxidiert und der Strom zu einem bestimmten Zeitintervall des Potentialzyklus gemessen. Die dabei entstehenden Oxidationsprodukte überziehen die Goldelektrodenoberfläche und würden die Messwerte weiterer Messungen verfälschen. Um die Elektrodenoberfläche zwischen den einzelnen Messzyklen zu reinigen, werden die Oxidationsprodukte durch eine Potentialänderung von der Oberfläche abgelöst und die Oberfläche dabei oxidiert. Im nächsten Schritt wird das Potential abgesenkt und die Elektrodenoberfläche reduziert. Somit steht im nächsten Messzyklus wieder die gereinigte Goldelektrodenoberfläche zur Verfügung [8,9].

1.6 Einfluss der Temperatur auf die Retentionszeit

Erhöhte Temperatur verringert die Retentionszeit und Temperaturänderungen können eine Umkehrung der Elutionsreihenfolge bewirken [10,11].

Um die optimale Trennung von Zuckern zu erzielen, ist die Kontrolle und Standardisierung der Temperatur ein wertvolles Werkzeug [12,13].

1.7 Mikrowellenunterstützte partielle Hydrolyse

Mithilfe einer handelsüblichen Mikrowellenapparatur können unter Zusatz sehr verdünnter Säure (0,00625 N Schwefelsäure) Hydrolysen in erstaunlich kurzer Zeit durchgeführt werden [14].

1.8 Reduktion der Uronsäurereste

Polysaccharide, die Uronsäuren enthalten, sind schwierig zu hydrolysieren, weil Uronsäuren dazu neigen zu decarboxylieren, oder sich nicht als Monomere, sondern als Dimere mit ihrem benachbarten Zucker als Aldo-Biuronsäuren abspalten. Das kann verhindert werden, wenn vor der Hydrolyse die Carboxylgruppe reduziert wird. Durch Aktivierung der Carboxylgruppe mit 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid und nach folgender Reduktion mit Natriumborhydrid ist eine selektive Reduktion der Uronsäuren zu ihrem korrespondierenden Monosaccharid möglich [15].

1.9 Smith-Abbau

Der Smith-Abbau wird zur Strukturaufklärung eingesetzt. Perjodat spaltet dabei die Kohlenstoffbindung benachbarter freier Hydroxylgruppen oxidativ. Als Reaktionsprodukte entstehen aus den Polysacchariden charakteristische Aldehyde und Ameisensäure. Ist eine Polysaccharidkette mit Seitenketten substituiert, und gibt es keine freien vicinalen OH-Gruppen, ist keine Spaltung möglich; das entsprechende Monosaccharid bleibt intakt und ist nach der Hydrolyse nachweisbar [16].

1.10 Photometrische Uronsäuregehaltsbestimmung

Uronsäuren können durch eine Farbreaktion mit Carbazol in konzentrierter Schwefelsäure photometrisch bestimmt werden. Die Verwendung von meta-Hydroxydiphenyl-Reagenz anstelle von Carbazol verbessert die Bestimmung von Uronsäuren in Anwesenheit neutraler Kohlenhydrate entscheidend. Der

störende Effekt kommt hauptsächlich durch Bräunung während des ersten Erhitzens vor dem Zusatz des Diphenylreagenz zustande. Sulfamatzusatz verhindert diese erste Bräunung und macht eine Uronsäurebestimmung in Gegenwart von 20fachem Überschuss an neutralen Zuckern möglich [17].

Aus den Kohlenhydraten entstehen durch Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure verschiedene Furanderivate wie zum Beispiel Furfural, Hydroxymethylfurfural, 2-Furancarbonsäure und 5-Formyl-2-Furancarbonsäure. Die Bildung dieser Metabolite aus Galakturonsäure und 4-O-Methylglukuronsäure, sowohl bei Monomeren, als auch in Polysacchariden ist so ähnlich, dass Galakturonsäure als Kalibriersubstanz für 4-O-Methylglukuronsäure in Xylanen verwendet werden kann [18].

2 Material und Methoden

2.1 Ausgangsmaterial

Das Polysaccharidgemisch aus den Samenschalen einer in Thailand heimischen Ocimumart (*Ocimum basilicum* Linn var. *citratum*) wird durch Extraktion mit Wasser unter mechanischem Rühren gewonnen, filtriert, getrocknet, pulverisiert und steht so als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen zur Verfügung.

2.2 Gewinnung der alkalilöslichen und der alkaliunlöslichen Polysaccharidfraktion

Material

4 M wässrige NaOH (hergestellt aus NaOH-Pellets 97+%, A.C.S Reagenz, Sigma-Aldrich)

Plastikbecherglas 200 ml

Parafilm® (VWR)

Rührmagnet

Magnetrührer mit Heizplatte und Thermostat (Heidolph MR 3001 K)

Aqua dest.

Eis

HCl 25% (Acidum hydrochloricum min. 25% puriss. p.a., Riedel-de Häen)

pH-Meter (Microprocessor pH 539 WTW Bartelt)

Zentrifuge Hermle Z 323 K

Zentrifugenröhrchen

Dialyseschlauch (Cellulosemembran, Grösse 43x27 mm, Sigma-Aldrich)

Verschlussklammern für den Dialyseschlauch

Plastikbecherglas 5 l

Aqua demineralisata

Petrischalen oder Schliffrundkolben

Lyophilisator Beta 1-8 K, Christ GmbH bzw Heto Power Dry LL3000

Tiefkühlschrank: -18°C

Oder alternativ:

Methanol/Trockeneis (Merck, Linde)

Dewargefäß

Rotavapor Heidolph WB 2001

2.2.1 Extraktion der alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (bezeichnet als Gesamtes Polysaccharid / GPS)

1 g des rohen Polysaccharidgemisches wird in 60 ml 4 M NaOH-Lösung in einem Erlenmeyerkolben suspendiert, mit einem Rührmagnet bestückt, mit Parafilm abgedeckt und per Magnetrührer über Nacht bei 60°C (Thermostat) gerührt.

2.2.2 Zentrifugation

Die viskose Suspension in 4 M NaOH wird mit 30 ml Aqua dest. verdünnt und bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig pipetiert und der Rückstand mit 20-30 ml 2 M NaOH-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wird wiederholt. Der Rückstand nach dreimaliger Zentrifugation kann zur weiteren Analyse verwendet werden.

Die jeweiligen Überstände werden vereinigt und weiterverarbeitet.

2.2.3 Neutralisation des Überstandes

Das Becherglas mit den gesammelten und vereinigten Überständen nach der Zentrifugation wird in einem Eiswasserbad gekühlt. Unter pH-Kontrolle mit dem

pH-Meter und ständigem Rühren mit dem Magnetrührer wird mit einer Pipette langsam und vorsichtig 25%ige HCl zugetropft bis die Lösung neutral ist. Das Endvolumen beträgt ca. 120-150 ml.

2.2.4 Dialyse

Entsprechende Stücke des Dialyseschlauches (zur Berechnung der nötigen Schlauchlänge: ungefähr 0,5 cm pro ml neutralisierter Lösung; der gefüllte Schlauch sollte nur zu 2/3 gefüllt sein, sonst platzt er eventuell während der Dialyse) werden für 20 min in destilliertem Wasser gekocht zur Reinigung und Öffnung der Poren. Eine Seite wird mit geeigneten Verschlussklammern verschlossen, die neutralisierte Lösung eingefüllt, die zweite Seite verschlossen, und in einem mit Aqua demineralisata gefüllten 5 Liter Plastikbecherglas unter Rühren mit einem Magnetrührer dialysiert. Es empfiehlt sich dabei pro Seite zwei Verschlussklammern in gegensätzlicher Orientierung der geschlossenen Klammerseite zu verwenden um ein Lecken und Auslaufen des Dialysates zu vermeiden. In den ersten 3 Stunden wird stündlich das Wasser gewechselt und dann über Nacht weiterdialysiert.

2.2.5 Lyophilisation

Je nach zur Verfügung stehendem Lyophilisator gibt es zwei Möglichkeiten:

Gerät Christ Beta 1-8 K

Überführen des Dialysates in Kunststoff-Petrischalen, die pro Schale mit 50-60 ml Dialysat gefüllt werden können, Abdecken mit Parafilm und Verschliessen mit dem jeweiligen Deckel, Einfrieren der Schalen bei -18°C , Entdeckeln, Durchlöchern des Parafilms mit einem spitzen Gegenstand zum Entweichen des Wasserdampfs beim Lyophilisieren. Die so vorbereiteten Petrischalen

werden in den vorgekühlten Lyophilisator verbracht und je nach Gesamtfüllungszustand des Lyophilisators 18-24 Std. lyophilisiert.

Gerät Heto Power Dry LL3000

Überführen des Dialysates in 100 ml Schliffgrundkolben mit für den zweiten Lyophilisator passenden Schliffen. Dabei sollten ca. 30-40 ml pro Kolben eingebracht werden. Diese Kolben werden mit dem Rotavapor bewegt und mit einem Methanol/Trockeneis-Kältebad in einem Dewargefäss zum Gefrieren abgekühlt, sodass ein möglichst grosser Bereich der inneren Kolbenoberfläche mit einer möglichst gleichmässigen und nicht zu dicken Schicht aus Dialysateis überzogen ist, um optimale Lyophilisation zu gewährleisten. Dann werden die so vorbereiteten Kolben an den vorgekühlten Lyophilisator verbracht und über Nacht lyophilisiert.

Wenn das Lyophilisieren ohne zwischenzeitliches Auftauen verlaufen ist, erhält man ein luftiges weisses bis weisslich-gelbes Polysaccharidfliess mit einer watteähnlichen Konsistenz.

2.3 Hydrolyse der alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (GPS)

Um die erhaltene Polysaccharidfraktion auf ihre Monosaccharid-zusammensetzung zu analysieren, muss sie hydrolysiert werden. Trifluoressigsäure ist für diesen Zweck sehr gut geeignet. Sie ist flüchtig, und kann nach der Hydrolyse leicht durch Abdampfen entfernt werden. Sie muss somit weder neutralisiert werden, noch besteht die Notwendigkeit bei der Neutralisation entstehende Salze, die die weitere Analyse stören würden, zu entfernen.

Material

V-Gläser 3,0 ml (Wheaton, Millville, USA)

Micropipetten (Blaubrand, 2 μ l)

Trifluoressigsäure, (99%, Sigma-Aldrich)

Aqua dest.

Methanol (Chromasolv, VWR)

Stickstoffgasflasche mit Reduzierventil, Schlauch und Glaspipette

Trockenschrank (Heraeus Type UT6060)

Wasserbad

Methode

Die Proben (1mg) werden in Aqua dest. gelöst, mit einer unterschiedlichen Menge Trifluoressigsäure (TFA) in einem V-Glas versetzt, das Glas mit Stickstoff gespült und im Trockenschrank erhitzt. Wenn nicht anders angegeben sind die Standardbedingungen 2 M TFA, 120 °C und 2 Stunden Hydrolysezeit.

Als Variation kommen zum Beispiel auch 1 M TFA oder 1 Stunde Hydrolysezeit zur Anwendung. Dann wird bei 60 Grad am Wasserbad unter dem Abzug unter sanfter Stickstoffspülung die Trifluoressigsäure abgedampft. Wenn das Flüssigkeitsvolumen schon stark reduziert ist, wird 1 ml Methanol zugesetzt und weiter abgedampft. Der Methanolzusatz wird noch zweimal wiederholt und dann zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird zur weiteren Analyse (DC oder HPAEC-PAD) in Aqua dest. aufgenommen.

2.4 Dünnschichtchromatographie

Material

Monosaccharide für Standards:

D-Arabinose , (Glykon)

D(+)-Xylose, (Sigma-Aldrich)

L-Rhamnose Monohydrat, (Sigma-Aldrich)

D(+)-Glukose Monohydrat, (Sigma-Aldrich)

D(+)- Galaktose, (Sigma-Aldrich)

D(+)- Mannose, (Sigma-Aldrich)

D-Glukuronsäure, (Sigma-Aldrich)

D(+)- Galacturonsäure Monohydrat, (Fluka)

DC-Alufolien (5x10 oder 20x10 cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck)

Thymolsprühreagenz (0,5 g Thymol, 99,5% Sigma-Aldrich; 5 ml Schwefelsäure, 95-98% A.C.S. Reagenz, Sigma-Aldrich; 95 ml Ethanol 96%, AustrAlco

Alkoholhandels GmbH)

Micropipetten (2µl, Blaubrand)

DC-Kammer

Trockenföhn

Trockenschrank

Methode

Die DC-Alufolien werden entsprechend der Anzahl der aufzutragenden Bahnen zurechtgeschnitten, Startlinie und Auftragstellen mit Bleistift markiert. Die Probenlösungen werden mit Micropipetten aufgetragen und mit dem Föhn getrocknet. Als Standard kommen Lösungen mit 5 µmol/ml Monosaccharidkonzentration zur Anwendung, die nach Bedarf weiterverdünnt werden können. (Bei Rhamnose, Glukuronsäure und Galacturonsäure 10 µmol/ml)

Die getrocknete DC-Folie wird in einem DC-Trog in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch 17:3 entwickelt, mit dem Föhn getrocknet und mit Thymol-Sprühreagenz (als Standardsprühreagenz) besprüht. Im Trockenschrank bei

120 °C für 10 Minuten findet die Farbreaktion statt. Die fertigen DC-Platten werden zur Dokumentation fotografiert oder eingescannt. Zur besseren Trennung der Monosaccharide kommt meistens eine Mehrfachentwicklung zur Anwendung, das heisst nach einer Entwicklung wird die DC-Folie trockengeföhnt und erneut entwickelt. Eine drei- oder vierfache Entwicklung bewirkt eine gute Trennung. Das Acetonitril-Wasser-Gemisch läuft sehr rasch, sodass die benötigte Zeit auch bei Mehrfachentwicklung in einem praktikablen Rahmen bleibt.

Alternativ und vorzugsweise können die Lösungen mit einem Camag Linomat IV DC-Auftragesystem auf die Kieselgelalufolien aufgebracht werden. Dabei lassen sich alle Auftrageparameter, wie zum Beispiel Anzahl der Banden, Länge (4-5 mm), Abstände (4 mm), Auftragsmenge (2-6 µl) definieren, und es entstehen schmalere und schärfer abgegrenzte Banden als es mittels manuellem Auftrag möglich ist.

Mehr als 2 µl werden portionsweise in Vielfachen von 2 µl und zwischenzeitlichem Trockenföhnen der Bahn aufgetragen.

2.5 HPAEC-PAD mit dem Dionex ICS3000 Ionen Chromatographie System

Das Dionex ICS3000 Ionen Chromatographie System wird mit einer CarboPac PA20 Säule und dem elektrochemischen Detektor ED40 verwendet und läuft unter der Software Chromeleon. Es werden die von der Software vorgeschlagenen Detektoreinstellungen für Monosaccharidanalyse verwendet.

2.5.1 CarboPac PA20 Säule

Säulendaten:

Anionenaustauschkapazität: 65 µeq/Säule 3x150mm

Betriebsdruck. 200-2850 psi

Flussrate: 0,4 ml/min

pH-Bereich: 10-13

2.5.2 Verwendete Programmparameter

Temperatur

Die Kompartimenttemperatur beträgt 20°C wenn nicht anders angegeben.

Eluenten:

Für das ICS3000 System wird prinzipiell Aqua bidest. zur Herstellung der benötigten Lösungen verwendet.

Als Eluent wird 200 mM carbonatarmer Natronlauge verwendet, hergestellt nach dem Herstellungsprotokoll von Dionex aus 50% NaOH Stammlösung.

Bei einigen Proben kommt als zusätzlich zugemischter 2. Eluent 1 M Natriumacetatlösung zum Einsatz. Zur Herstellung der Natriumacetatlösung wird speziell für diesen Einsatz von Dionex vertriebenes carbonatarmes Natriumacetat verwendet.

Eluentzusammensetzung:

Die jeweilige im Analysenprogramm definierte Eluentzusammensetzung wird vom System online aus Eluentvorratslösung plus Aqua bidest ad 100% (v/v) gemischt. Nach jedem Lauf wird die Säule mit 200 mM NaOH-Lösung gespült und dann mit der im Programm verwendeten Eluentkonzentration äquilibriert.

Zur Monosaccharidanalyse:

3 mM NaOH (1,5% der 200 mM NaOH-Eluentvorratslösung)

bzw.

10 mM NaOH (5,0% der 200 mM NaOH- Eluentvorratslösung)

Für die Uronsäuretrennung:

Eluent 1: 3 mM NaOH (1,5% der 200 mM NaOH- Eluentvorratslösung)

Eluent 2: 50-100mM Natriumacetatlösung (5-10% einer 1 M Vorratslösung)

2.5.3 Herstellung der Standards für HPAEC-PAD

Zunächst werden Standard-Stammlösungen mit einer Monosaccharidkonzentration von 2500 nm/ml hergestellt. Tabelle 1 gibt die dafür erforderliche Einwaage an.

Standard	Molekulargewicht	Einwaage/ 500ml
D(+)-Xylose	150,10 g/mol	0,188 g
L-Rhamnose Monohydrat	182,20 g/mol	0,228 g
D(+)-Galaktose	180,20 g/mol	0,225 g
D(+)-Glukose Monohydrat	198,17 g/mol	0,247 g
D(+)-Mannose	180,20 g/mol	0,225 g
D-Arabinose	150,10 g/mol	0,188 g

Tabelle 1: Standard-Stammlösungen für HPAEC-PAD

Aus dieser jeweiligen Stammlösung können Einzel- oder Mischstandards angefertigt werden. Die folgende Tabelle 2 zeigt die verwendeten Standardkonzentrationen.

	Konzentration	Herstellung des Mischstandards
Standardlösung 1	25 nmol/ml	1,0 ml der Stammlösung in 100ml H ₂ O
Standardlösung 2	50 nmol/ml	2,0 ml der Stammlösung in 100ml H ₂ O
Standardlösung 3	75 nmol/ml	3,0 ml der Stammlösung in 100ml H ₂ O
Standardlösung 4	100 nmol/ml	4,0 ml der Stammlösung in 100ml H ₂ O

Tabelle 2: Standardkonzentrationen für HPAEC-PAD

2.5.4 Probenvorbereitung für HPAEC-PAD

Die Proben werden nach dem Hydrolysieren in Aqua bidest. gelöst, verdünnt (die Monosaccharidkonzentration soll 50-100nmol/ml betragen) und vor dem Befüllen der Glasschraubgefäße mit Millipore Filtern 0,2 µm (Herba-Chemosan) filtriert.

Die Proben werden mit dem Autosampler aufgebracht, das Injektionsvolumen beträgt 10 µl.

2.6 Trennung der alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (GPS)

Die Trennung der gesamten alkalilöslichen Polysaccharidfraktion (GPS) in saures Polysaccharid (SPS) und neutrales Polysaccharid (NPS) erfolgt mittels Ionenaustauschsäulenchromatographie (DEAE-Cellulose-Batchmethode)

Material

DEAE-Cellulose (Express-Ion exchange D free base, Sigma Aldrich)
2000 ml 0,1 M TRIS-Puffer/HCl pH 7,5 (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck mit Salzsäure min. 25% puriss. p.a., Riedel-de-Haen eingestellt auf pH 7,5)
500 ml 0,5 M NaCl-Lösung (Natriumchlorid, Fluka)
0,01 M Zitronensäurelösung (Zitronensäure, Jungbunzlauer Austria AG)
Aqua dest.
Messzylinder
Bechergläser
Nutsche
Vakuumflasche
Rührmagnet
Econo-Säule (Chromatography Column 2,5x20cm Bio-Rad)
pH-Meter (Microprocessor pH 539 WTW Bartelt)
Magnetrührer (Heidolph MR 3001 K)

Methode

12,8 g DEAE-Cellulose werden in einem Becherglas mit 30 ml Aqua dest. versetzt, anschliessend in einer Nutsche zuerst mit 500 ml Aqua dest. unter Vakuum gewaschen, dann zweimal mit je 30 ml TRIS-Pufferlösung (pH 7,5). Das Gel wird in einem Becherglas in 30 ml TRIS-Puffer aufgenommen, der pH-Wert überprüft und wenn nötig mit 0,01 M Zitronensäurelösung auf pH 7,5 eingestellt. 100 mg der gesamten alkalilöslichen Polysaccharidfraktion, gelöst in 20 ml TRIS-Puffer, werden zugesetzt und 40 Minuten am Magnetrührer gerührt.

Die Säule wird mit dem DEAE-Cellulosegel-Polysaccharidgemisch gefüllt und mit TRIS-Puffer bei einer Flussrate von 1ml pro Minute eluiert. Es werden jeweils 10 ml-Fractionen des neutralen Polysaccharids in Reagenzgläsern gesammelt und mittels Farbreaktion mit Thymol-Sprühreagenz auf Vorhandensein von Polysaccharid überprüft (siehe unter Dünnschichtchromatographie).

Wenn die gesammelten Fractionen frei von neutralem Polysaccharid sind, wird das bis dahin an der Säule gebundene saure Polysaccharid mit 0,5 M NaCl-Lösung eluiert bis erneut kein Polysaccharid in der gesammelten Fraction nachweisbar ist.

Die jeweiligen Fractionen von saurem und neutralem Polysaccharid werden vereinigt und wie oben beschrieben (siehe gesamtes Polysaccharid) über Nacht dialysiert und anschliessend lyophilisiert.

2.7 Mikrowellenunterstützte partielle Hydrolyse

Material

Schraubeprouvetten

Mikrowellenapparatur 800 Watt (Whirlpool)

Keramikgefäß

Eisbad

Methode

1-2 mg Probe werden in einer Schraubeprouvette in 2 ml Aqua dest. gelöst und mit 4 µl TFA (die Probe enthält dann ca. 0,05 M TFA) versetzt.

Die Probe wird zusammen mit einem mit kaltem Wasser gefüllten Keramikgefäß in der Mikrowellenapparatur platziert. Dabei dient ein Becherglas als Halterung für die Epruvette. Das Kaltwassergefäß dient als Wärmekapazitätsgefäß um eine extreme Erhitzung der Probe zu vermeiden, und wird vor jedem Erhitzungsvorgang mit frischem kaltem Wasser befüllt.

Die Probe wird eine, höchstens jedoch zwei Minuten bei 800 Watt erwärmt. Nach einer kurzen Abkühlzeit wird sie in einem Eisbad weiter abgekühlt und anschliessend wird auf eine DC-Folie die jeweilige Bande aufgetragen.

Danach beginnt der Erhitzungs-, Abkühlungs-, und Auftragezyklus erneut. Abschliessend wird die DC-Folie entwickelt und mit Thymol-Sprühreagenz gefärbt.

2.8 Reduktion der Uronsäurereste des sauren Polysaccharids

Material

1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid, (Sigma-Aldrich)

Natriumborhydrid, (Sigma-Aldrich)

HCl, (Sigma-Aldrich)

pH-Meter, (Microprocessor pH 539 WTW Bartelt)

Methode

Zu 10 ml einer Lösung die 100 μ equiv Uronsäure enthält wird 1 mmol 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid (CMC) zugesetzt. Der pH-Wert soll bei 4,75 liegen und kann mit 0,1 M HCl korrigiert werden. Nach 2 Stunden wird eine 2 M Natriumborhydridlösung langsam zugesetzt, die einen raschen pH-Anstieg bewirkt. Der pH-Wert soll bei 7,0 gehalten werden, und kann durch Zugabe von 4 M HCl eingestellt werden. 15-25 ml Natriumborhydridlösung sind für eine komplette Reduktion nötig, die ungefähr 60 min dauert. Das reduzierte Polysaccharid wird durch Dialyse gereinigt und danach lyophilisiert.

Für diese Reaktion werden 20 mg SPS und 300 mg CMC verwendet.

Eine Probe wird in Folge unter Standardbedingungen (2 M TFA 120°C 2 Std.) hydrolysiert und per DC und HPAEC-PAD weiter ausgewertet.

2.9 Smith-Abbau

Material

Natriumperjodat, (Sigma-Aldrich)

Ethylenglykol, (Sigma-Aldrich)

Methode

20 mg saures Polysaccharid werden in einem Erlenmeyerkolben in einer kleinen Menge Wasser gelöst und mit 50 ml 0,02 M Natriumperjodatlösung versetzt.

Der Kolben wird mit Alufolie gegen Lichteinfluss abgeschirmt und über Nacht im Kühlraum bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wird die Reaktion durch Zusatz von einigen ml Ethylenglykol beendet, wodurch der Perjodatüberschuss zerstört wird. Die Probe wird durch Dialyse und Lyophilisation weiteraufbereitet. Anschliessend folgen Hydrolyse und Dünnschichtchromatographie bzw HPAEC zur Auswertung.

2.10 Chromatographisches Verhalten von 4-O-Methyl-Glukuronsäure

Es steht eine sehr kleine Menge von 4-O-Methyl-Glukuronsäure zur Verfügung. Diese Substanz ist im Chemikalienhandel nicht erhältlich; sie ist an der Universität für Bodenkultur synthetisiert worden und wird freundlicherweise von Herrn Univ.Prof Dr. Paul Kosma zur Verfügung gestellt.

2.10.1 4-O-Methyl Glukuronsäure-Dünnschichtchromatogramm

Zur Darstellung des Laufverhaltens von 4-O-Methyl-Glukuronsäure in der Dünnschichtchromatographie wurden folgende Bahnen aufgetragen: Mischstandard, Galakturonsäure, Glukuronsäure, 4-O-Methyl-Glukuronsäure, SPS bei 120°C hydrolysiert, SPS bei 95°C hydrolysiert und Mischstandard

2.10.2 4-O-Methyl Glukuronsäure HPAEC-PAD-Chromatogramm

Um die Bedingungen für eine gute Trennung von Galakturonsäure, Glukuronsäure und 4-O-Methyl-Glukuronsäure zu ermitteln, kommt eine 1 M Natriumacetatlösung als zusätzlicher Eluent mit einem Anteil von 5%; 7,5% und 10% am Eluentensystem zum Einsatz.

2.11 Photometrische Uronsäurebestimmung:

Material

Schraubreagenzgläser

Gesättigte Kalilauge, (Merck)

Amidosulfonsäure, (Merck)

96 % Schwefelsäure (Sigma-Aldrich)

Eisbad

Photometer (U-1100 Hitachi)

Quarzküvetten

Trockenschrank

Eisbad

Methode

Zur Herstellung der 4 M Amidosulfonsäure / Kaliumsulfamat-Lösung wird die Amidosulfonsäure im halben Endvolumen Wasser suspendiert. Gesättigte Kalilauge wird tropfenweise zugesetzt bis die Amidosulfonsäure gelöst ist. Nach dem Abkühlen wird auf das Endvolumen aufgefüllt.

Eine Standardreihe von Galakturonsäure mit 1, 5, 10, 20, 50 und 100 µg/ml und Probenlösungen des SPS mit 100 µg/ml werden hergestellt.

0,4 ml der wässrigen Proben- bzw .Standardlösung werden mit 40 µl 4 M Amidosulfonsäure / Kaliumsulfamatlösung versetzt und gemischt. Dann werden 2,4 ml 96%ige Schwefelsäure zugesetzt und gemischt. Die Lösung wird für 20 min im Trockenschrank auf 100°C erhitzt und dann im Eisbad abgekühlt. Nach dem Abkühlen werden 80 µl einer 0,15% (w/v) m-Hydroxydiphenyllösung in 0,5% (w/v) NaOH zugesetzt und gemischt. Innerhalb von 5 bis 10 Minuten entwickelt sich ein roter Farbton. Die Absorption wird bei 525 nm bestimmt.

3. Ergebnisse und Diskussion

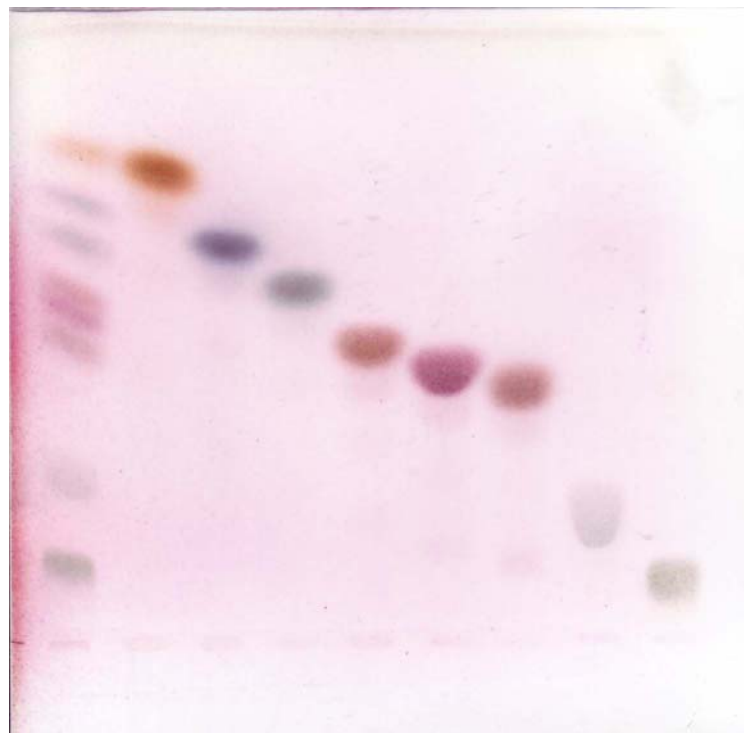
3.1 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

3.1.1 Chromatographie der Monosaccharidstandards

In der Tabelle 3 sind die Monosaccharide nach ihrem abnehmenden Rf-Wert geordnet.

Monosaccharid	Farbe
Rhamnose	gelbbraun
Xylose	blau
Arabinose	graublau
Mannose	rotbraun
Glukose	magenta
Galaktose	rotbraun
Glukuronsäure	grau
Galakturonsäure	grau

Tabelle 3: Monosaccharide nach abnehmendem Rf-Wert



Mstd, Rha, Xyl, Ara, Man, Glc, Gal, GlcUA, GalUA

Abb. 1: DC einzelner Monosaccharide, Linomat, 4x entwickelt

Abbildung 1 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm zur Charakterisierung des Laufverhaltens von Referenzmonosacchariden. Ein Monosaccharidmischstandard und die jeweiligen Komponenten als Einzelstandards werden in der Reihenfolge ihres erwarteten Laufverhaltens mit dem Linomat IV aufgetragen, 4 mal entwickelt und mit Thymolsprühreagenz gefärbt. Man erkennt die individuelle Färbung als zusätzliches Charakteristikum zum Laufverhalten.

3.1.2 Hydrolyseprodukte der drei Polysaccharidfraktionen (GPS und der daraus erhaltenen Fraktionen NPS und SPS)



Abb. 2: Hydrolyse der drei Polysaccharidfraktionen (GPS NPS, SPS) mit 2M TFA 2Std. 120 °C, 1x entwickelt, manuell aufgetragen

Abbildung 2 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der drei hydrolysierten Polysaccharidfraktionen: GPS (das gesamte alkalilösliche Polysaccharid) und

die daraus gewonnenen Teilfraktionen NPS (neutrales Polysaccharid) und SPS (saures Polysaccharid) im Vergleich zu dem links und rechts aussen aufgetragenen Mischstandard. Die Bahnen wurden manuell aufgetragen und die Folie nur einmal entwickelt. Daraus resultiert eine relativ schlechte Trennung der Monosaccharide, speziell die rotbraunen Banden von Mannose, Glukose und Galaktose sind kaum zu differenzieren. Es ist trotzdem zu erkennen, dass das neutrale Polysaccharid intensive rotbraune Banden entsprechend Glukose, Galaktose, Mannose zeigt, die beim sauren Polysaccharid kaum vorhanden sind. Das saure Polysaccharid hat zwei intensive Banden: eine gelbe entsprechend Rhamnose und eine blaue entsprechend Xylose. Daneben finden sich eine schwächere blaue bei Arabinose und zwei deutliche blaugraue Banden im Bereich der beiden Uronsäuren des Vergleichstandards und knapp darüber. Das gesamte Polysaccharid (GPS) zeigt das Bild der überlagerten Banden von NPS und SPS. Man erkennt ausserdem einige rötliche Banden in der oberen Hälfte der Polysaccharidbahnen. Diese entsprechen vermutlich Abbauprodukten, welche bei der Hydrolyse gebildet werden. Man kann auch in diesem Bereich einen Unterschied zwischen NPS und GPS erkennen.

3.1.3 Verbesserung der Trennung durch Mehrfachentwicklung

Durch standardisierten Auftrag mit dem Linomat IV und Vierfachentwicklung der DC-Folien können auch die in ihren Rf-Werten sehr ähnlichen Monosaccharide wie Mannose, Glukose und Galaktose differenziert werden.

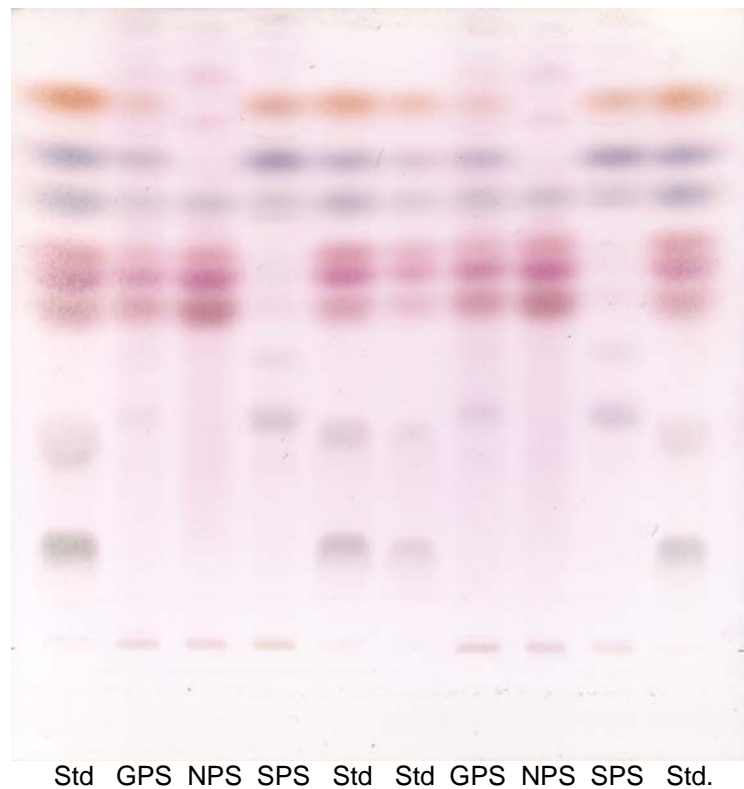


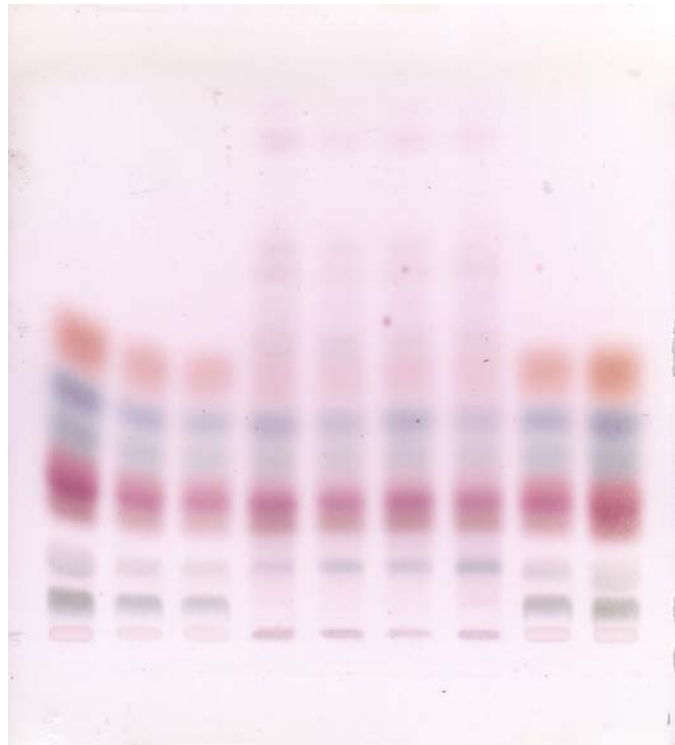
Abb. 3: DC Hydrolysat GPS, NPS, SPS, Linomat, 4x entwickelt

Abbildung 3 zeigt eine deutlich sichtbare Verbesserung der Trennung auch im Bereich der Uronsäuren. Die Banden von links: Std.; GPS; NPS; SPS; Std.; Std.; Std., GPS; NPS; SPS; Std.

3.1.4 Variation der Hydrolysebedingungen und Vergleich Einfach- versus Mehrfachentwicklung

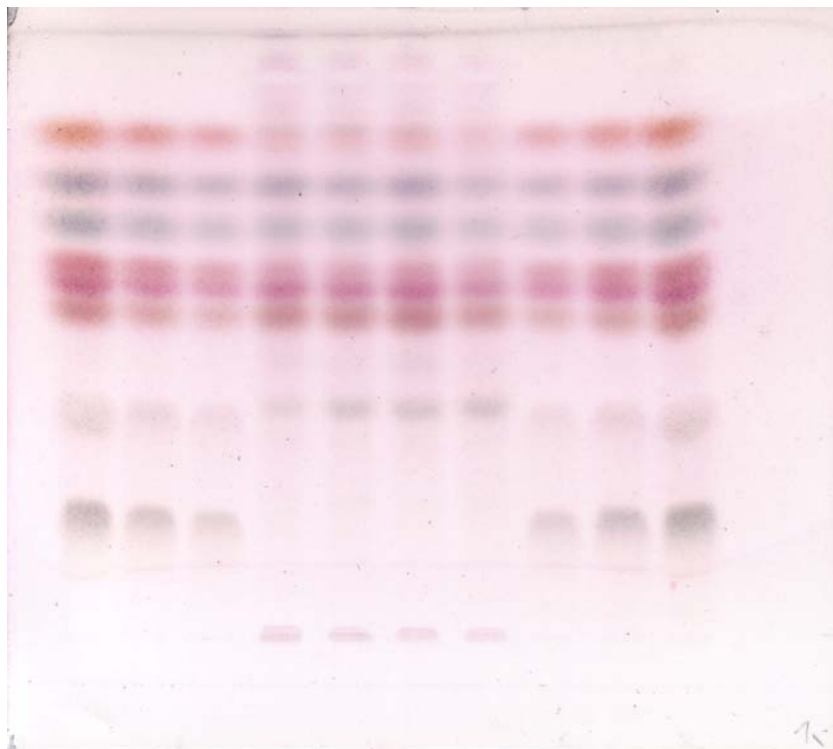
Bei den folgenden Dünnschichtchromatogrammen der Abbildungen 4-9 sind die Standards jeweils links und rechts aussen in den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 aufgetragen. Die jeweils 4 Proben in der Mitte der Platte wurden mit 2 M TFA je 2 Stunden und 1 Stunde und mit 1 M TFA je 2 Stunden und 1 Stunde hydrolysiert. Speziell bei den Dünnschichtchromatogrammen des sauren Polysaccharids kann man im Bereich der Uronsäuren Unterschiede zwischen diesen vier Variationen der Hydrolysebedingungen erkennen.

3.1.4.1 Dünnschichtvergleich Gesamtes Polysaccharid



Std Std Std GPS GPS GPS GPS Std Std

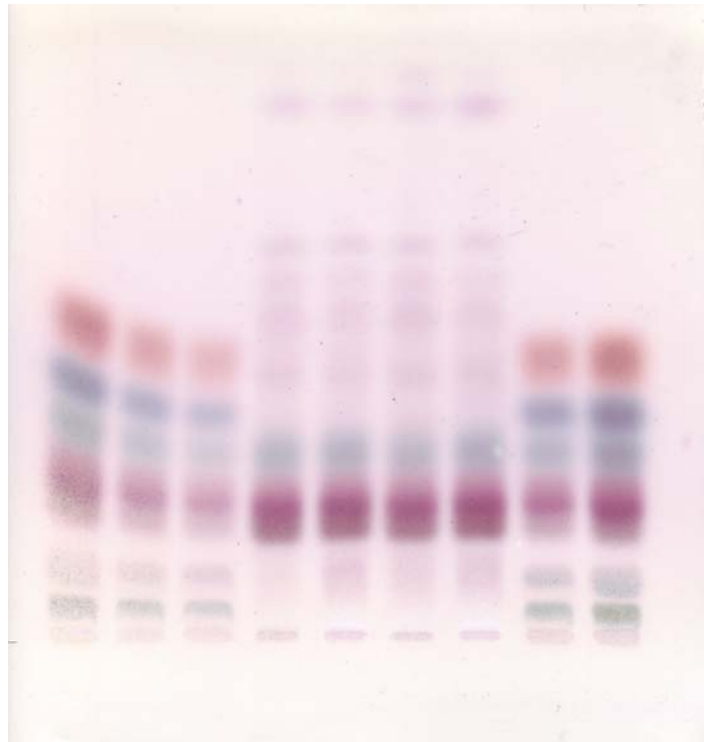
Abb. 4: DC Hydrolysat GPS 1x entwickelt



Std Std Std GPS GPS GPS GPS Std Std Std

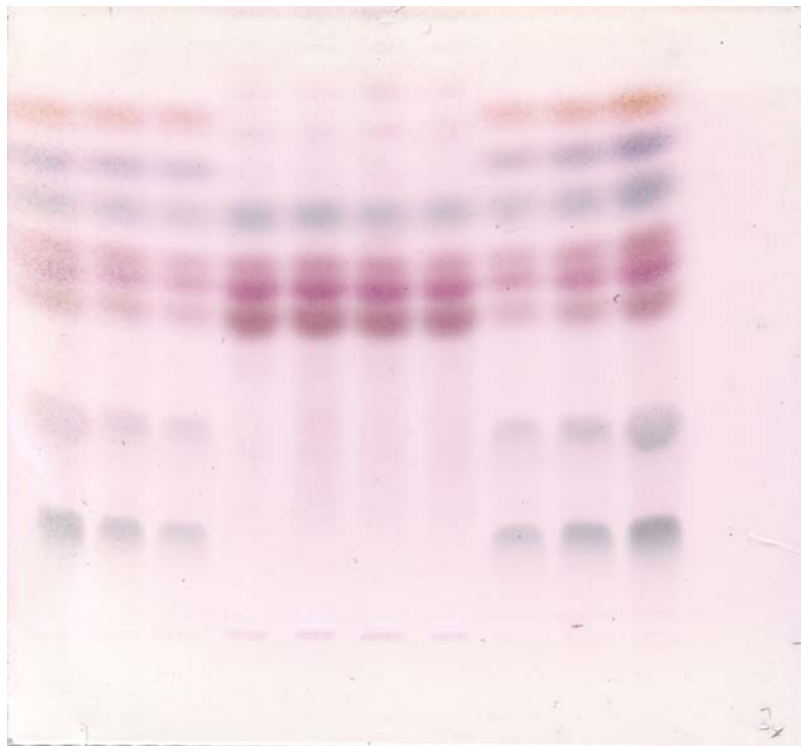
Abb. 5: DC Hydrolysat GPS 4x entwickelt

3.1.4.2 Dünnschichtvergleich Neutrales Polysaccharid



Std Std Std NPS NPS NPS NPS Std Std

Abb. 6: DC Hydrolysat NPS 1x entwickelt



Std Std Std NPS NPS NPS NPS Std Std Std

Abb. 7: DC Hydrolysat NPS 4x entwickelt

3.1.4.3 Dünnschichtvergleich Saures Polysaccharid

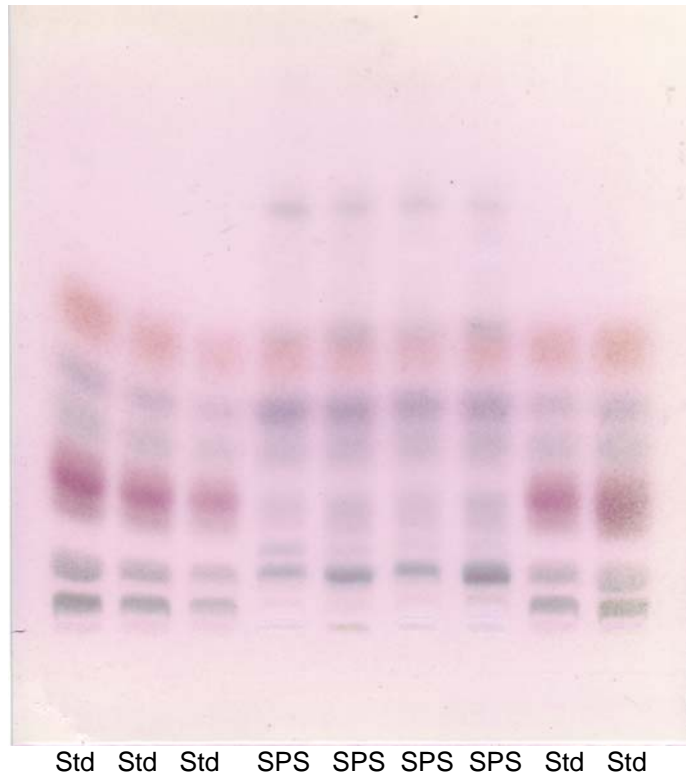


Abb. 8: DC Hydrolysate SPS 1x entwickelt

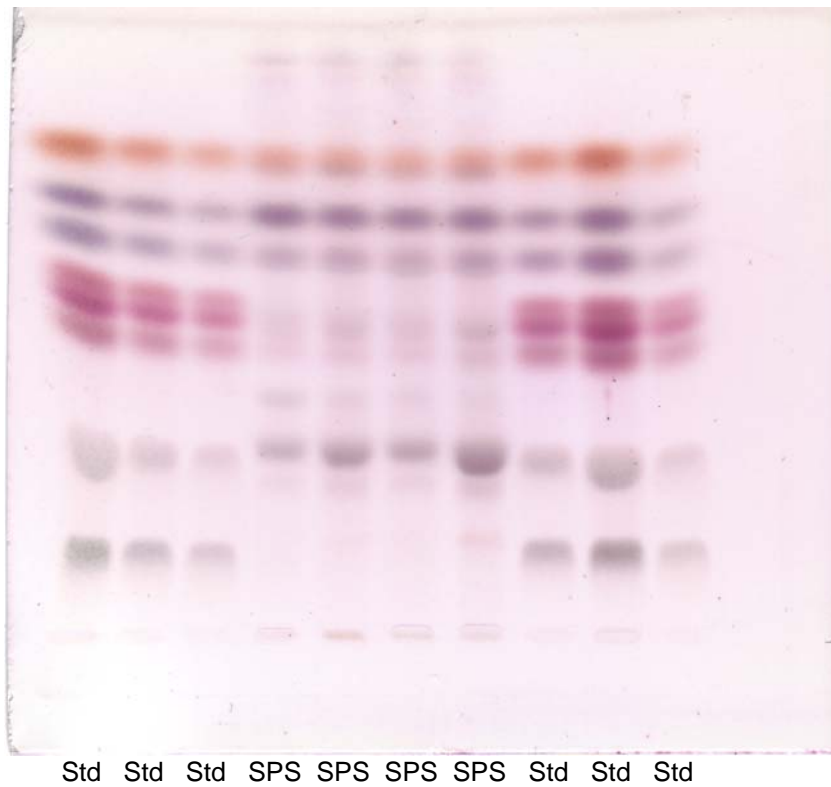


Abb. 9: DC Hydrolysate SPS 4x entwickelt

3.2. Ergebnisse HPAEC-PAD

3.2.1 Eluentenzusammensetzung zur Trennung der neutralen Monosaccharide

Abbildung 10 zeigt ein Chromatogramm eines Monosaccharidmischstandards mit 10 mM NaOH als Eluent.

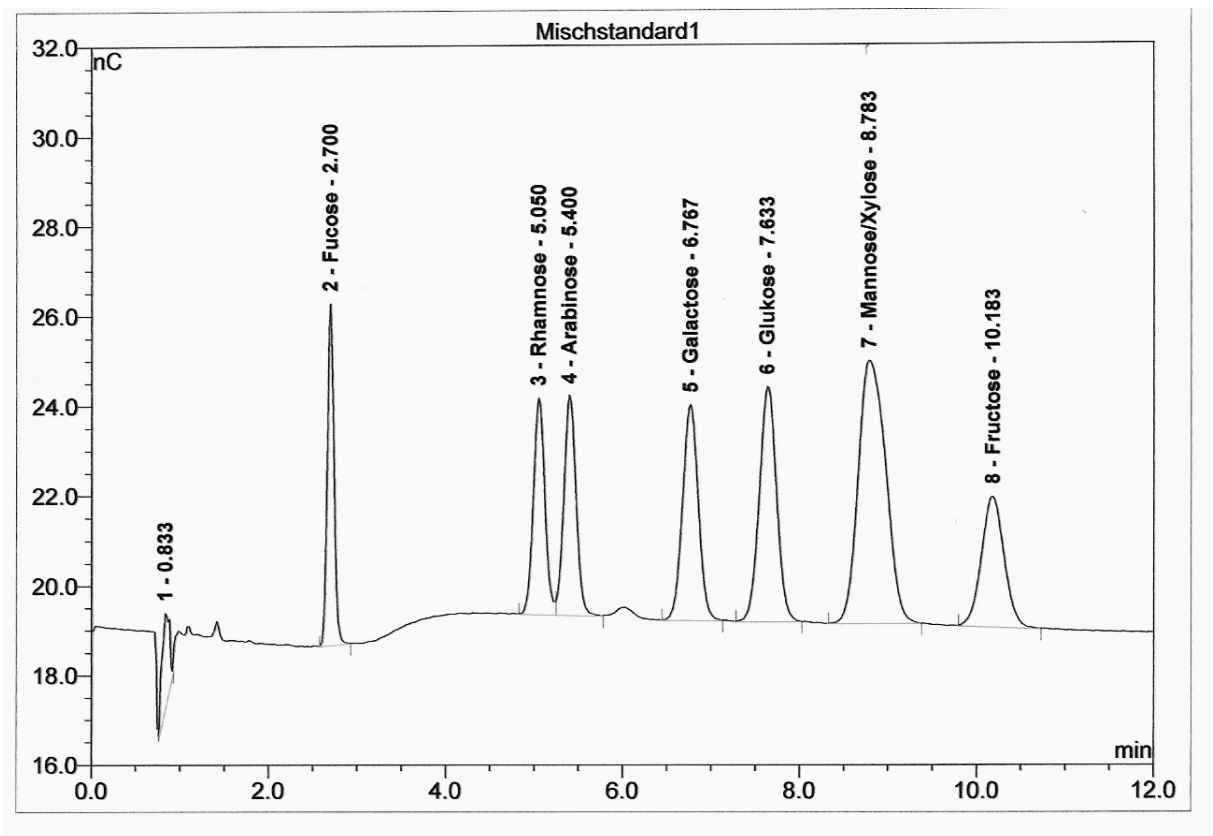


Abb. 10: HPAEC-PAD Chromatogramm Mischstandard gesamt (Eluent 10 mM NaOH)

Die Schwierigkeiten liegen in der Trennung der zwei Monosaccharidpaare Mannose/Xylose und Rhamnose/Arabinose. Die Trennung von Mannose und Xylose mit 10 mM NaOH ist ungenügend. Verwendet man 3mM NaOH als Eluent ist die Trennung von Mannose/Xylose möglich, dafür trennen sich Rhamnose/Arabinose nicht mehr auf (siehe 3.2.2).

Die beiden folgenden Abbildungen 11 und 12 zeigen Mischstandards, die die beiden kritischen Monosaccharidpaare vermeiden und so gute Standardkurvenbestimmungen ermöglichen.

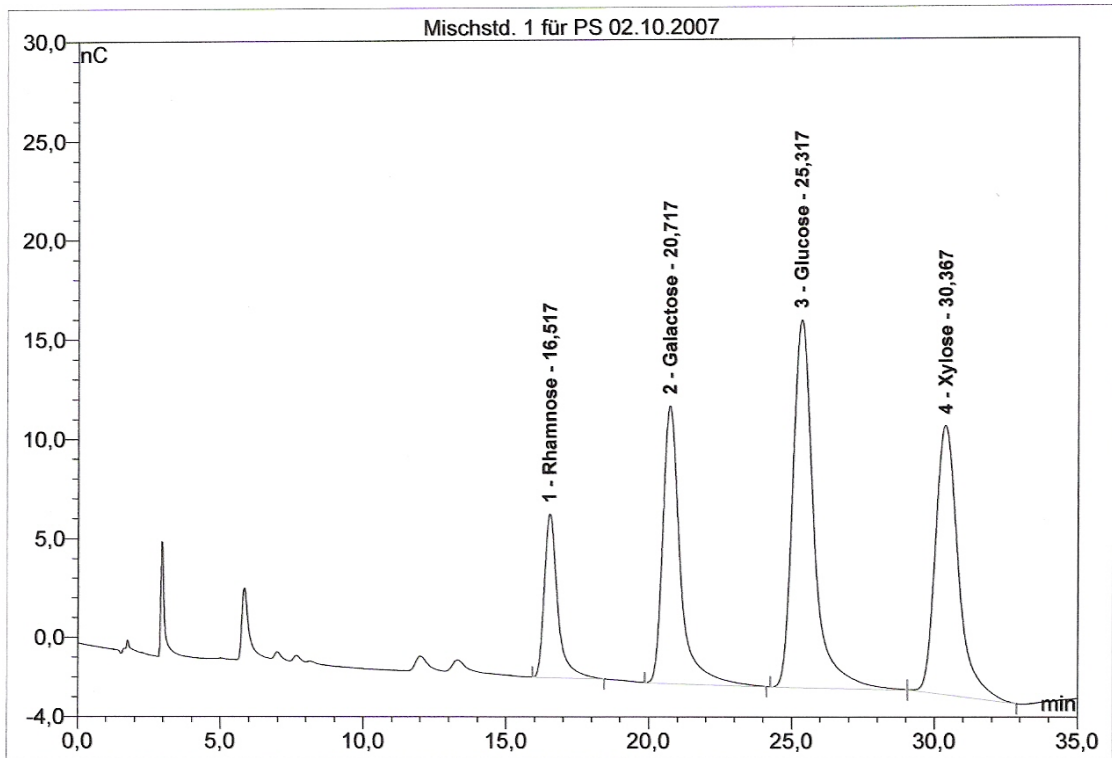


Abb. 11: HPAEC-PAD Chromatogramm Mischstandard 1 aus Rhamnose, Galaktose, Glukose, Xylose; [10 nmol/ml], (Eluent 10 mM NaOH)

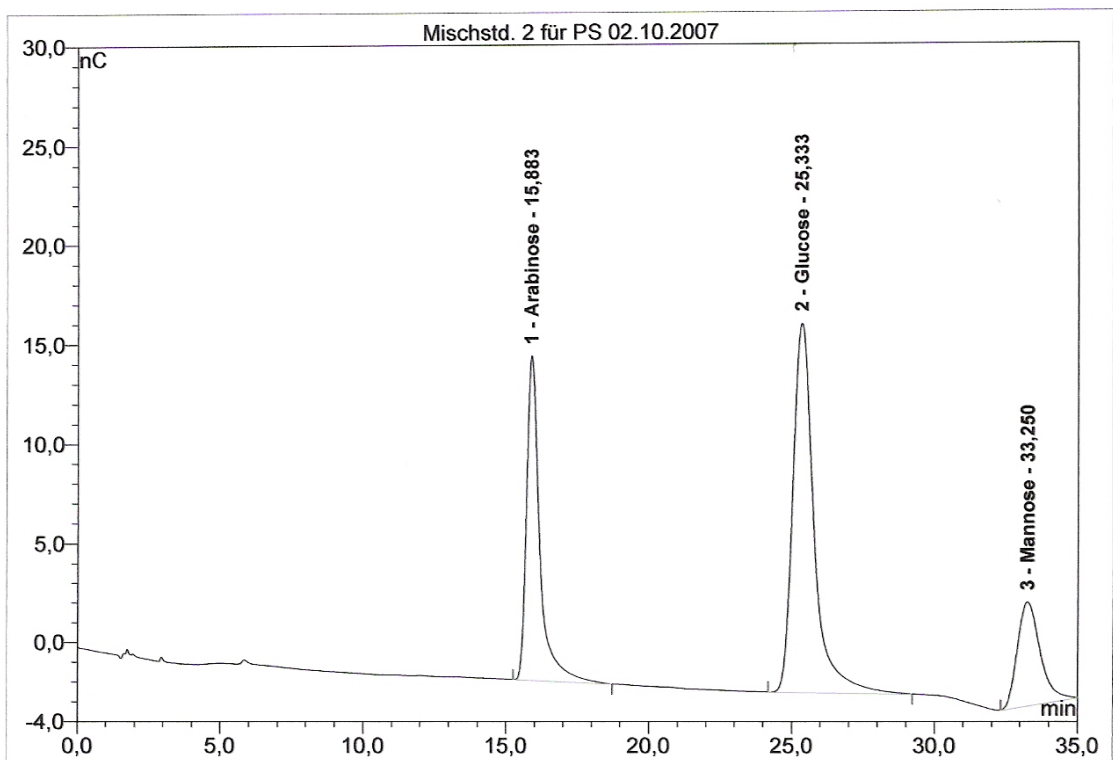


Abb. 12: HPAEC-PAD Chromatogramm Mischstandard 2 aus Arabinose, Glukose, Mannose; [10 nmol/ml], (Eluent 10 mM NaOH)

3.2.2 Gesamtes Polysaccharid

Wie aus den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie bekannt und erwartet, finden sich nach der Hydrolyse die sechs neutralen Monosaccharide Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Glukose, Mannose und Xylose als Bestandteile des gesamten alkalilöslichen Polysaccharids bei der HPAEC-PAD. Es zeigt sich aber das schon aus den Messungen der Standards bekannte Problem der Auftrennung von Mannose/Xylose und Rhamnose/Arabinose.

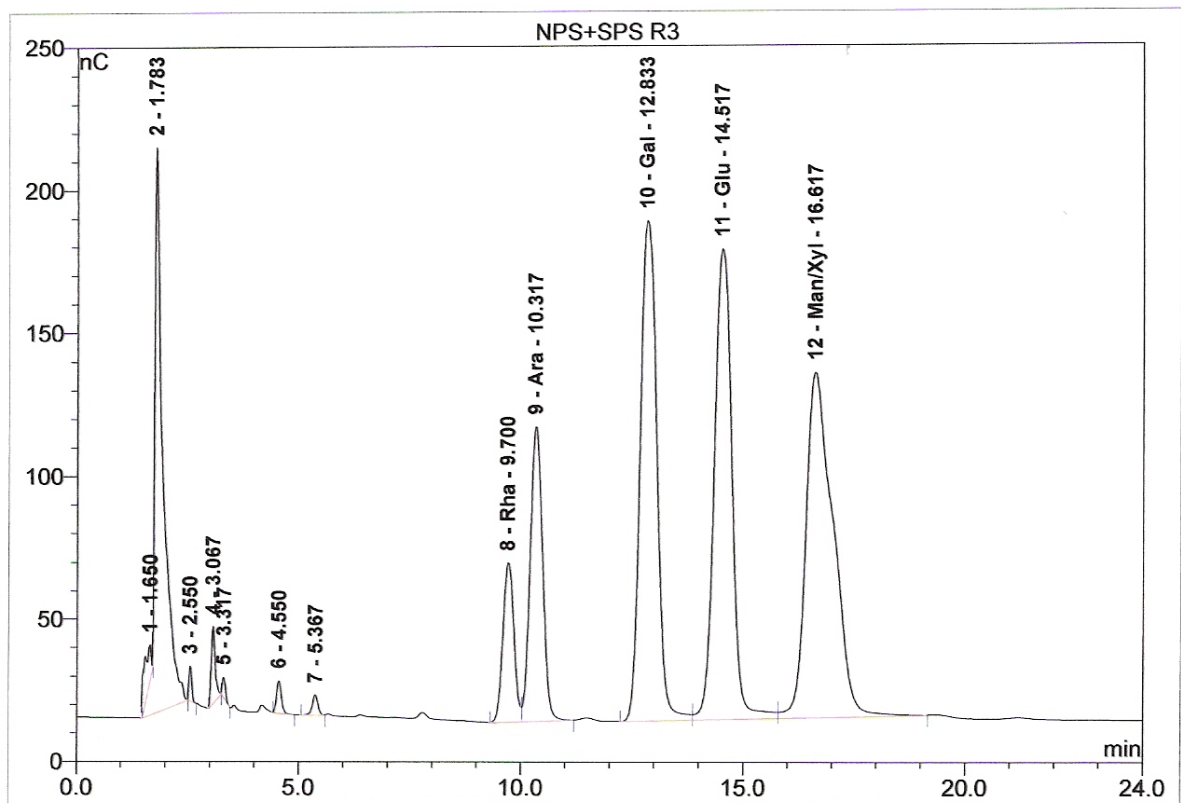


Abb. 13: HPAEC-PAD Chromatogramm des GPS-Hydrolysates (Eluent 10mM NaOH)

Das Chromatogramm aus Abbildung 13 zeigt dass man mit 10 mM Natronlauge die Monosaccharide Xylose und Mannose nicht trennen kann, während Rhamnose und Arabinose relativ gut, aber nicht vollständig trennbar sind.

Abbildung 14 zeigt eine Probe des hydrolysierten GPS bei der 3mM NaOH als Eluent verwendet wird. Unter diesen Bedingungen lassen sich Mannose und Xylose gut trennen. Dafür lassen sich unter diesen Bedingungen Arabinose und

Rhamnose nur ungenügend auftrennen. Bemerkenswert ist, dass sich die Elutionsreihenfolge von Arabinose und Rhamnose beim Wechsel zwischen 10 mM NaOH und 3mM NaOH umkehrt.

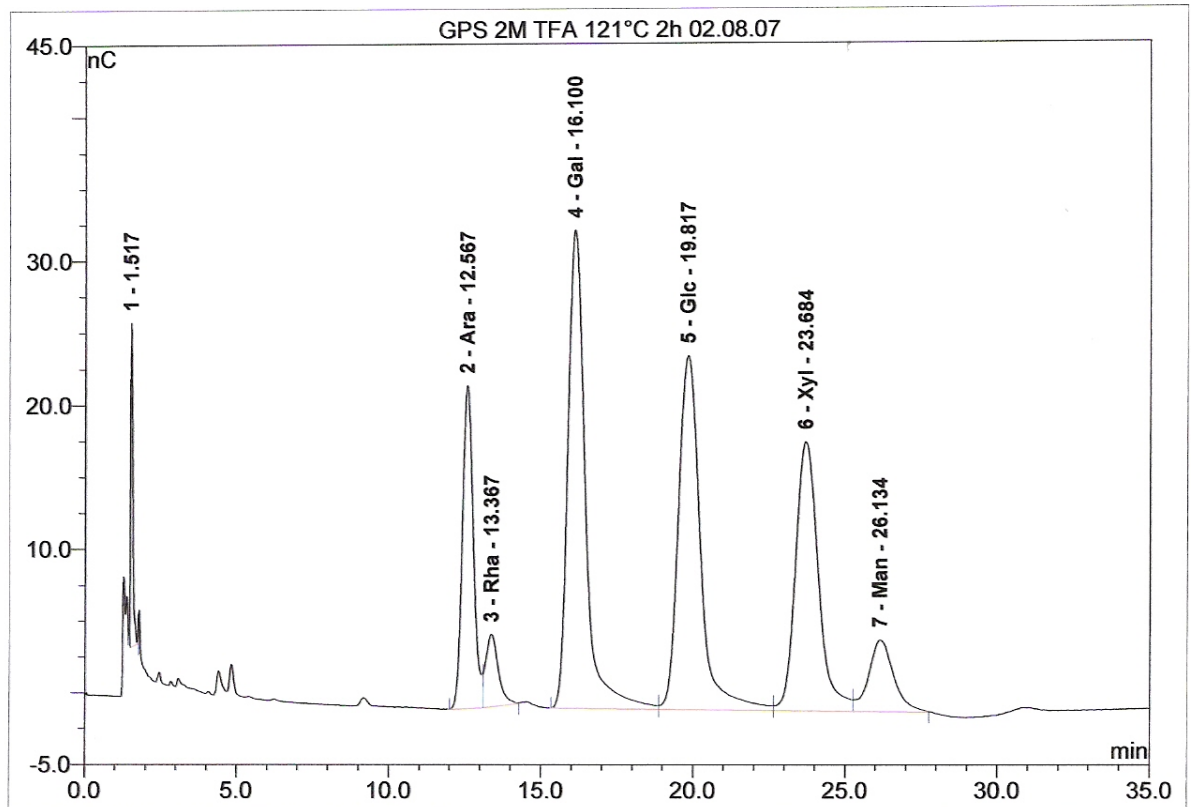


Abb. 14: HPAEC-PAD-Chromatogramm des GPS-Hydrolysates (Eluent 3mM NaOH)

Es gelang somit nicht Trennungsbedingungen zu finden die eine gleichzeitige Trennung aller sechs neutralen Monosaccharidkomponenten erlauben.

Nach der Auftrennung des GPS in seine beiden Fraktionen neutrales Polysaccharid und saures Polysaccharid durch Anionen-Austausch-Chromatographie auf DEAE-Cellulose konnten diese hydrolysiert und chromatographiert werden.

3.2.3 Neutrales Polysaccharid

Auch hier wird der Vorbefund aus dem Dünnschichtchromatogramm bestätigt.

Das neutrale Polysaccharid zeigt nach Hydrolyse und HPAEC-PAD die vier Bestandteile Arabinose, Galaktose, Glukose und Mannose. Diese vier Monosaccharide lassen sich gut trennen wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist.

Das molare Verhältnis beträgt: Ara : Man: Glc : Gal
1 : 1,3 : 1,7 : 2,9.

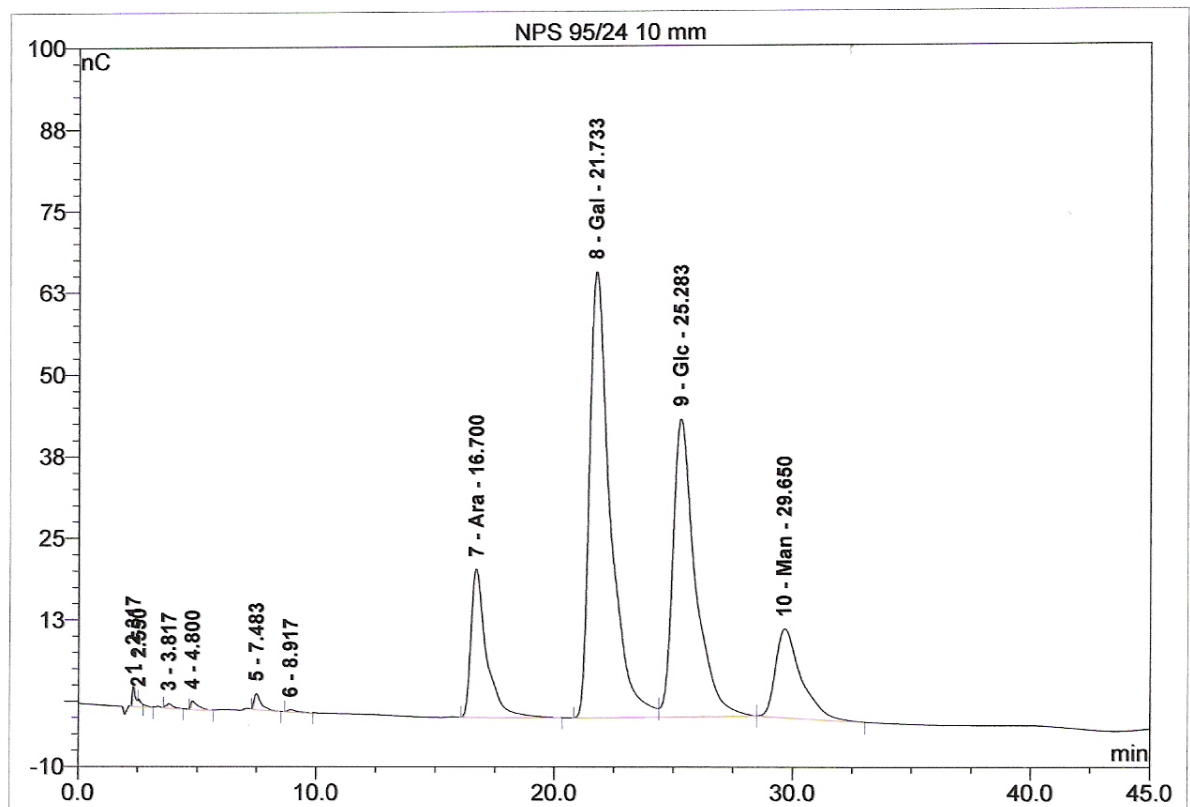


Abb. 15: HPAEC-PAD Chromatogramm des NPS-Hydrolysates (Eluent 10 mM NaOH)

3.2.4 Saures Polysaccharid

Das Chromatogramm des Hydrolysates des sauren Polysaccharids in Abbildung 16 zeigt die Bestandteile Rhamnose, Arabinose, Glukose, Galaktose und Xylose. Sie sind mit 10 mM NaOH als Eluent relativ gut trennbar.

Das molare Verhältnis beträgt: Rha : Ara : Xyl : Gal : Glc
1 : 1,5 : 2,5 : 0,2 : 0,5.

Der geringe Glukose- und Galaktoseanteil ist hier deutlicher auszumachen als in den Dünnschichtchromatogrammen.

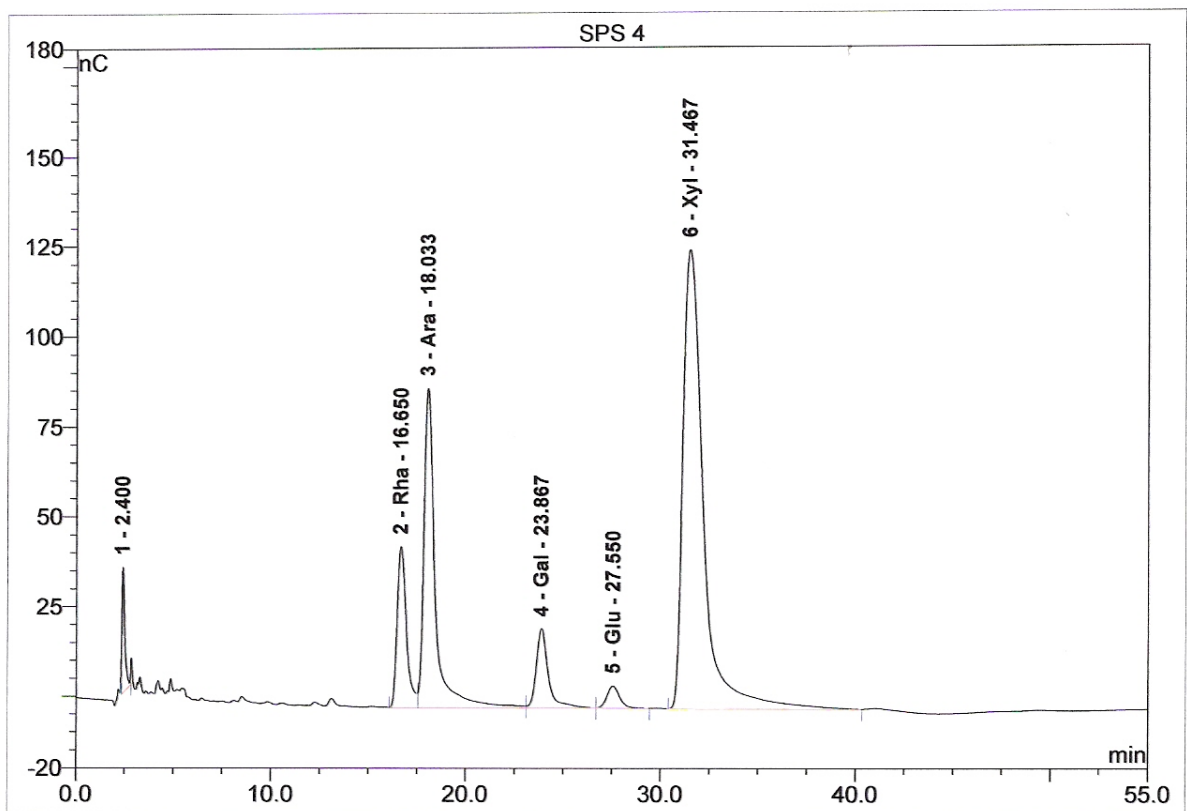


Abb. 16: HPAEC-PAD-Chromatogramm des SPS-Hydrolysates (Eluent 10 mM NaOH)

Bei der Analyse des sauren Polysaccharids mit HPAEC-PAD trifft man auf die Schwierigkeit, dass die sauren Komponenten so stark an die Säule gebunden werden, dass sie unter den normalen Analysenbedingungen für die Trennung von neutralen Monosacchariden nicht eluiert werden. Erst beim Spülen und Reinigen der Säule mit 200 mM NaOH zwischen den einzelnen Proben werden sie eluiert. Um sie im Chromatogramm zu erfassen kann man Natriumacetatlösung als Koeluenten einsetzen und so die Ionenstärke erhöhen um die Uronsäurekomponenten zu trennen. (Kap. 2.10.2)

3.3 Ergebnisse der Mikrowellenunterstützten Hydrolyse

3.3.1 Der erste Versuch mit der Mikrowellenapparatur

Der erste Versuch einer Hydrolyse mit Hilfe kurzzeitigen Erhitzens der Probenlösungen in der Mikrowellenapparatur ist in Abbildung 17 zu sehen. Aussen sind Standards aufgetragen. Die zweite Bahn zeigt ein teilweise hydrolysiertes GPS. Diese Probe enthält 0,05 M TFA. und wird einmalig für 2 min bei 800 Watt Mikrowellenleistung erhitzt. Bahn 3 und 4 zeigen Proben, die ohne Säurezusatz erhitzt wurde, mit fünf beziehungsweise 10 Zyklen von Erhitzen und Auskühlen. Bei Bahn 2 hat der im Vergleich zu den sonstigen Hydrolysebedingungen (2 M TFA unter Standardbedingungen) geringe Säurezusatz und die relativ kurze Mikrowelleneinwirkungszeit schon zu einer deutlich sichtbaren teilweisen Hydrolyse geführt, während bei Bahn 3 und 4 das 10 bzw. 20 minütige Erhitzen allein zu keinem sichtbaren Hydrolyseeffekt geführt hat.

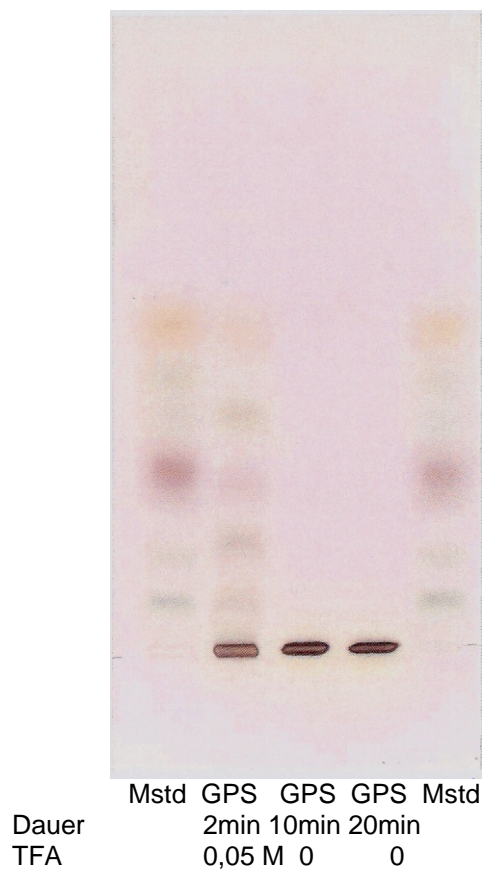
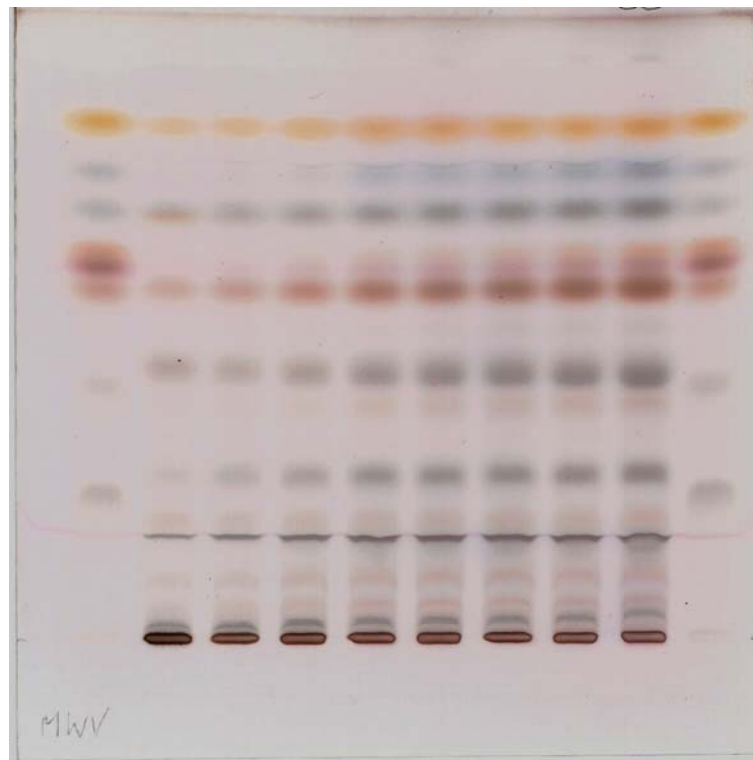


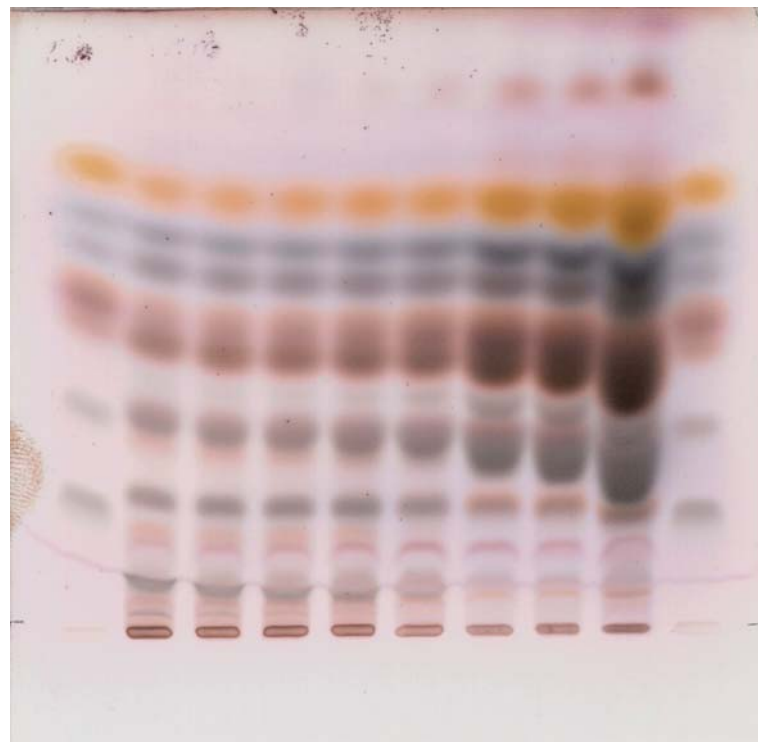
Abb. 17: DC Mikrowellenhydrolyse GPS

3.3.2 Mikrowellenhydrolyse des gesamten alkalilöslichen PS



Mstd GPS GPS GPS GPS GPS GPS GPS GPS Mstd
Minute 1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 18: DC Mikrowellenhydrolyse GPS Teil 1 (Minute 1 bis 8)



Mstd GPS GPS GPS GPS GPS GPS GPS GPS Mstd
Minute 8 9 10 11 12 13 14 15

Abb. 19: DC Mikrowellenhydrolyse GPS Teil 2 (Minute 8 bis 15)

Der nächste Versuch das GPS mit Hilfe der Mikrowelle zu hydrolysieren, ersichtlich in den Abbildungen 18 und 19, ist eine Hydrolyseserie einer Probe über 30 min in 15 zweiminütigen Intervallen. Die Bahn acht ist gleichsam als Übertrag auf der nächsten Folie wieder aufgetragen. Jeweils aussen befinden sich die Mischstandards.

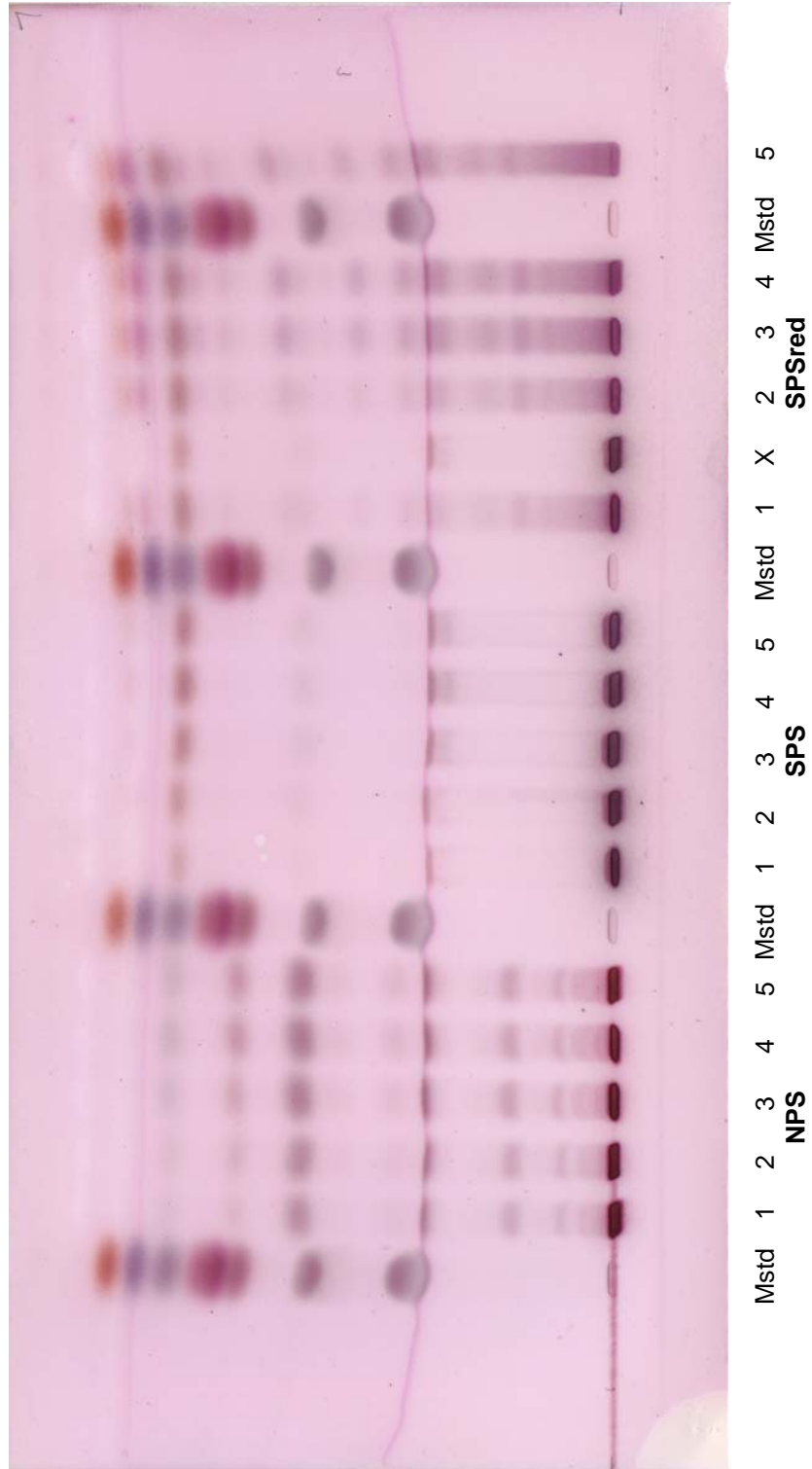
Man kann durch Farbzunahme und Abschwächung und dem Auftauchen von neuen Banden die Dynamik im Verlauf der Hydrolyse erkennen.

Durch Konzentrationseffekte in der Probe beim Erhitzen ist die zweite Folie gegen Ende der Serie völlig überladen.

3.3.3 Mikrowellenhydrolyse von NPS, SPS und SPSreduziert

Für den nächsten Versuch stehen schon das neutrale, das saure und das in Bezug auf die Uronsäurereste reduzierte saure Polysaccharid (SPSred) zur Verfügung. Diese drei Proben werden parallel hydrolysiert und jeweils durch Standardgemisch getrennt in Blöcken von je fünf Bahnen aufgetragen. Um Feinheiten in der Dynamik der Hydrolyse zu erfassen wird jeweils nur eine Minute pro Zyklus erhitzt. Ein Probenblock entspricht somit einem Hydrolyseintervall von 5 Minuten zwischen erster und letzter Bahn des jeweiligen Blocks. Die Reihenfolge der Blöcke ist NPS, SPS und SPSred. Zum Zeitpunkt der Durchführung stellt sich auch die Frage der Möglichkeit zur Bildung von Oligosacchariden. Die Abbildungen 20 bis 23 zeigen somit eine zwanzigminütige Hydrolysesequenz in Minutenintervallen.

Es ist ersichtlich, dass vor allem bei den Proben des neutralen und des reduzierten sauren Polysaccharids im Verlauf der Hydrolyse Di- und Trisaccharide entstehen, deren Banden unterhalb der Uronsäurebanden des Mischstandards zu erkennen sind.



X im letzten Block ist falsch aufgetragene Probe SPS

Abb. 20: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 1 (Minute 1 bis 5)

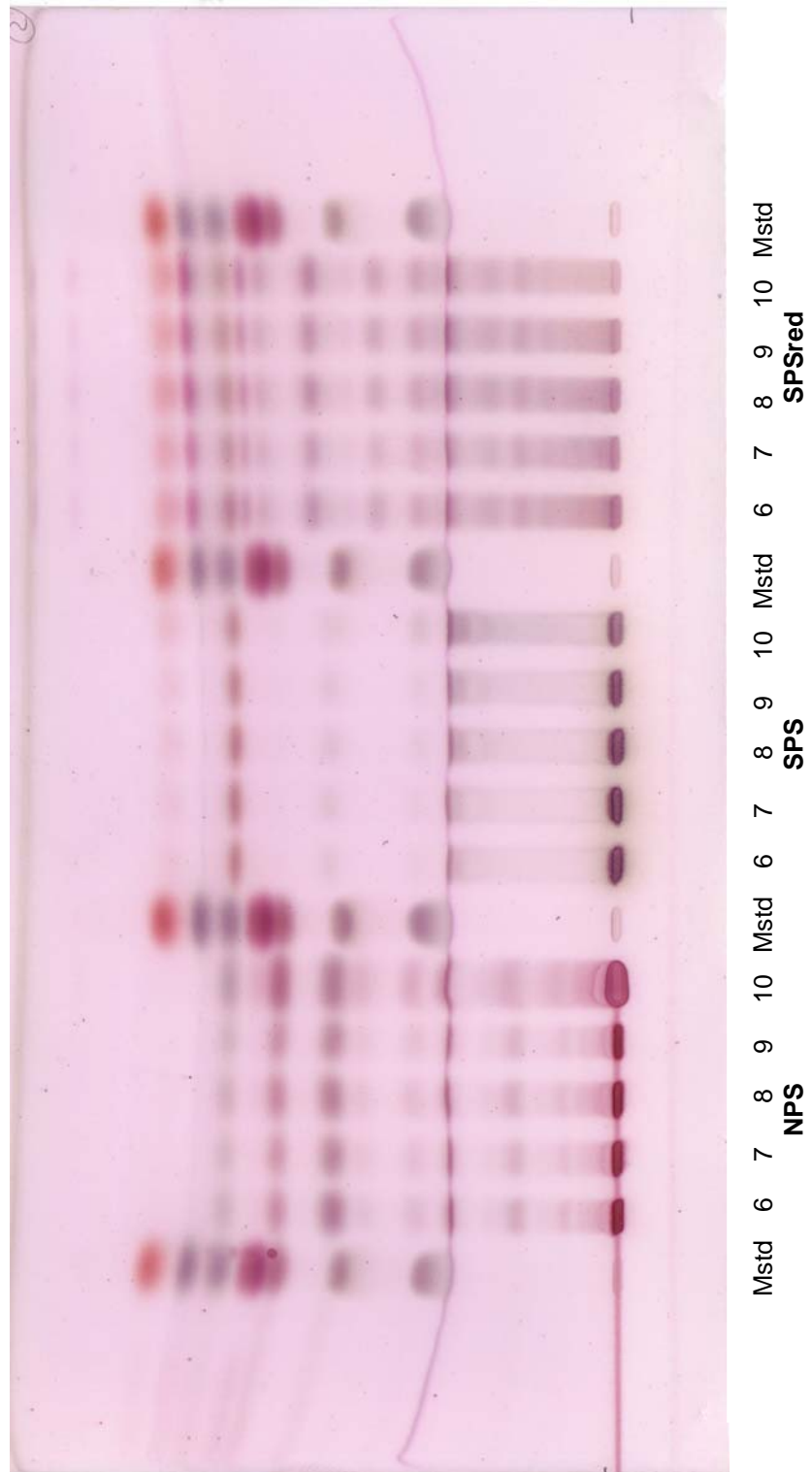


Abb. 21: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 2 (Minute 6 bis 10)

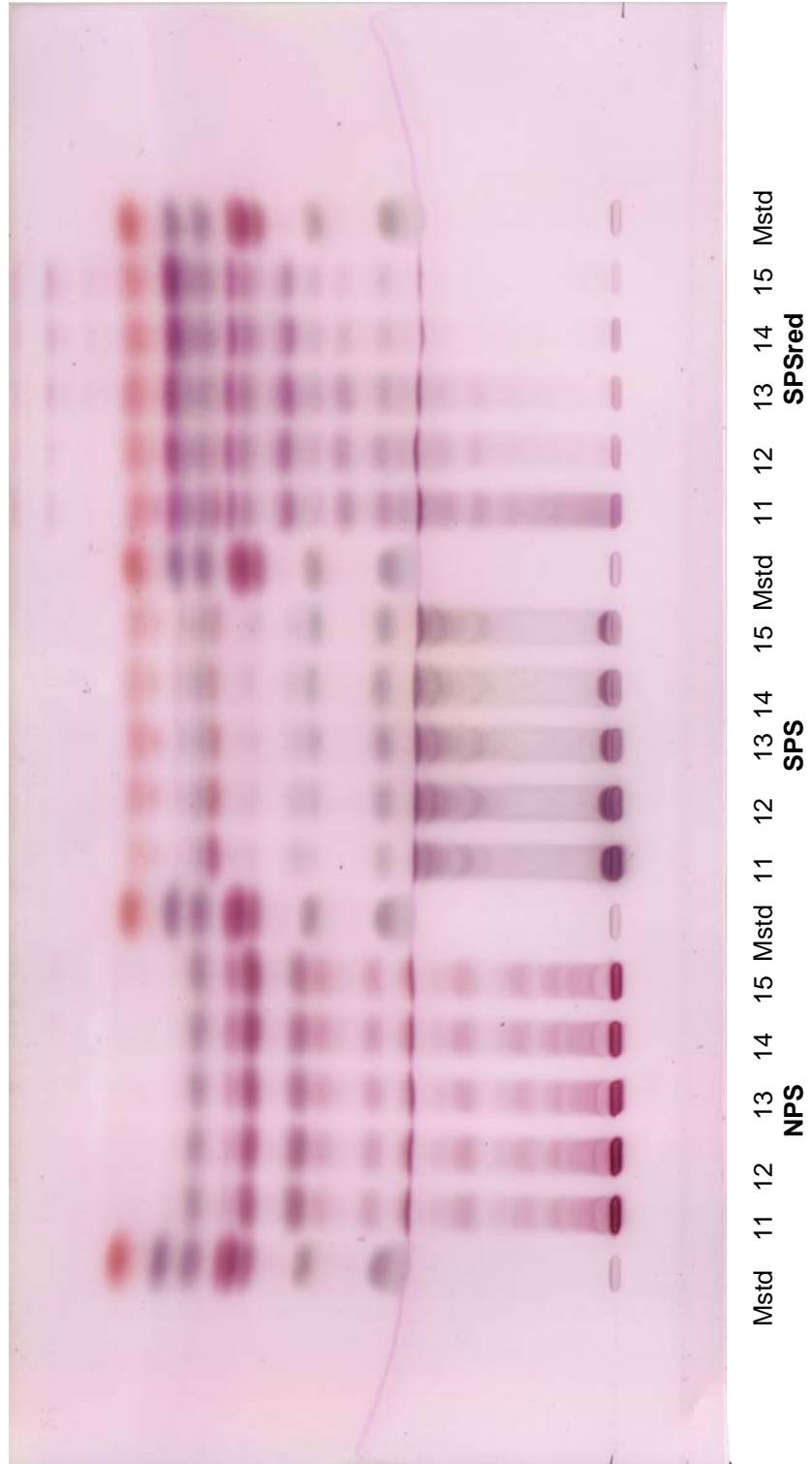


Abb. 22: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 3 (Minute 11 bis 15)

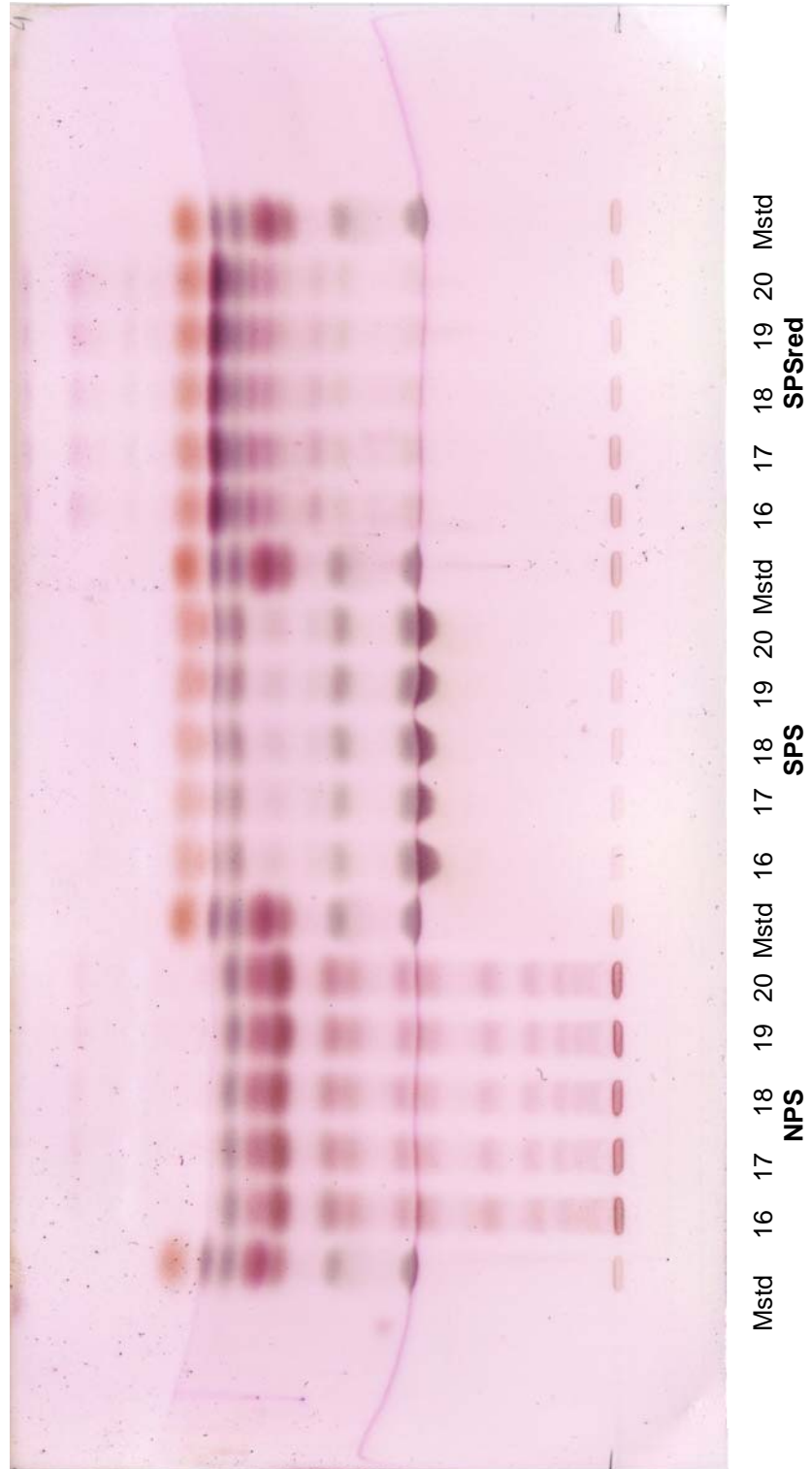


Abb. 23: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 4 (Minute 16 bis 20)

3.4 Reduktion der Uronsäurereste des sauren Polysaccharids



Abb. 24: DC Hydrolysat reduziertes SPS (SPSr); SPS nach Smith-Abbau (SPSs); Mischstandard (Mstd)

Auf der ersten Bahn der DC-Platte in Abbildung 24 wird das Hydrolysat des reduzierten sauren Polysaccharids aufgetragen.

Man erkennt eine neuentstandene, bei keiner bisherigen Probe vorhandene rotviolette Bande am oberen Ende der blauen Xylose-Bande. Die neue Bande könnte der durch Reduktion entstanden 4-O-Methyl-Glukose entsprechen.

Diese Hypothese kann mangels einer Standardsubstanz nicht überprüft werden.

Im Bereich der Uronsäure-Banden ist nur eine schwache Bande oberhalb der Glukuronsäure zu erkennen.

Abbildung 25 zeigt ein HPAEC-PAD-Chromatogramm des reduzierten sauren Polysaccharids. Zusätzlich zur bekannten Zusammensetzung aus Arabinose, Rhamnose, Galaktose und Glukose findet sich ein neuer Peak bei 11 min Laufzeit. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um 4-O-Methyl-Glukose handelt. Diese Hypothese kann aber aus dem schon erwähnten Grund nicht überprüft werden.

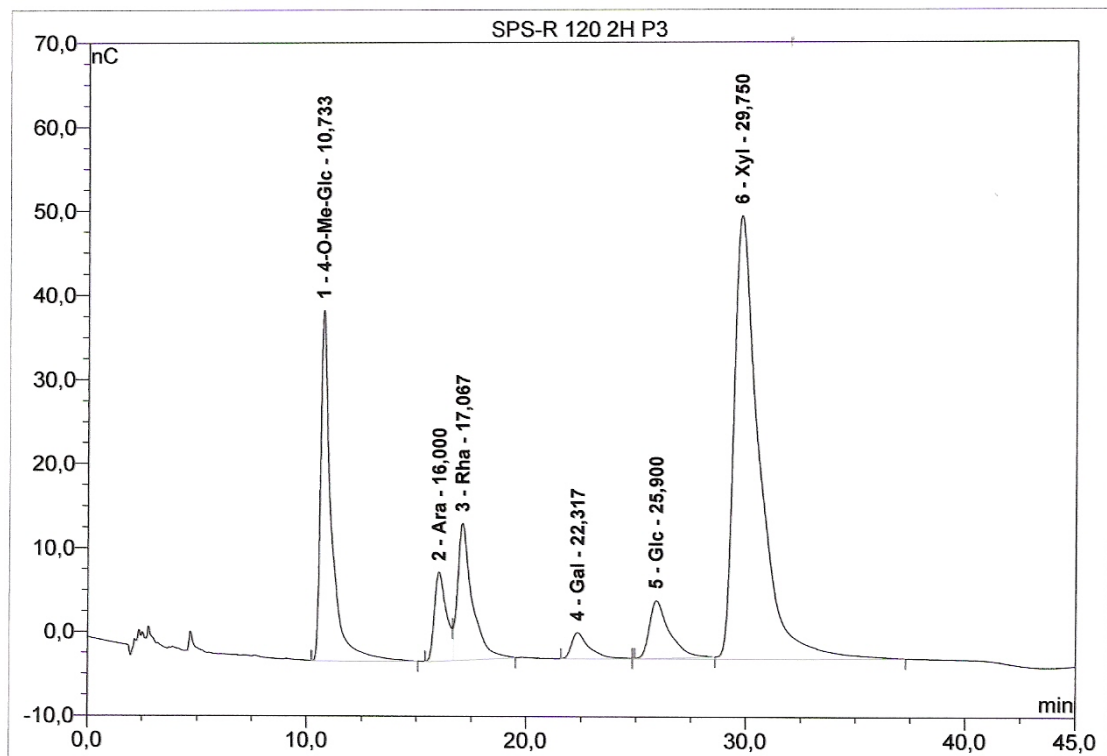


Abb. 25: HPAEC-PAD-Chromatogramm reduziertes SPS (Eluent 10 mM NaOH)

3.5 Smith-Abbau des sauren Polysaccharids

Auf der zweiten Bahn in Abb 24 (Kapitel 3.4) wird das Hydrolysat des dem Smith-Abbau unterworfenen sauren Polysaccharids aufgetragen. Man erkennt eine intensive Xylosebande und eine schwächere Bande auf Höhe der Arabinose. Die sonst beim SPS vorhandenen Rhamnose- und Uronsäurebanden fehlen. Das spricht für eine durch Rhamnose- und Uronsäurereste substituierte Xylan- oder Arabinoxylankette.

Abbildung 25 bestätigt die Ergebnisse der DC-Auswertung aus Abbildung 24 durch Anionenaustauschchromatographie. Als Hauptanteil findet sich Xylose neben einer kleinen Menge Arabinose. Die Monosaccharide Rhamnose, Galaktose und Glukose kommen nur in Spuren vor.

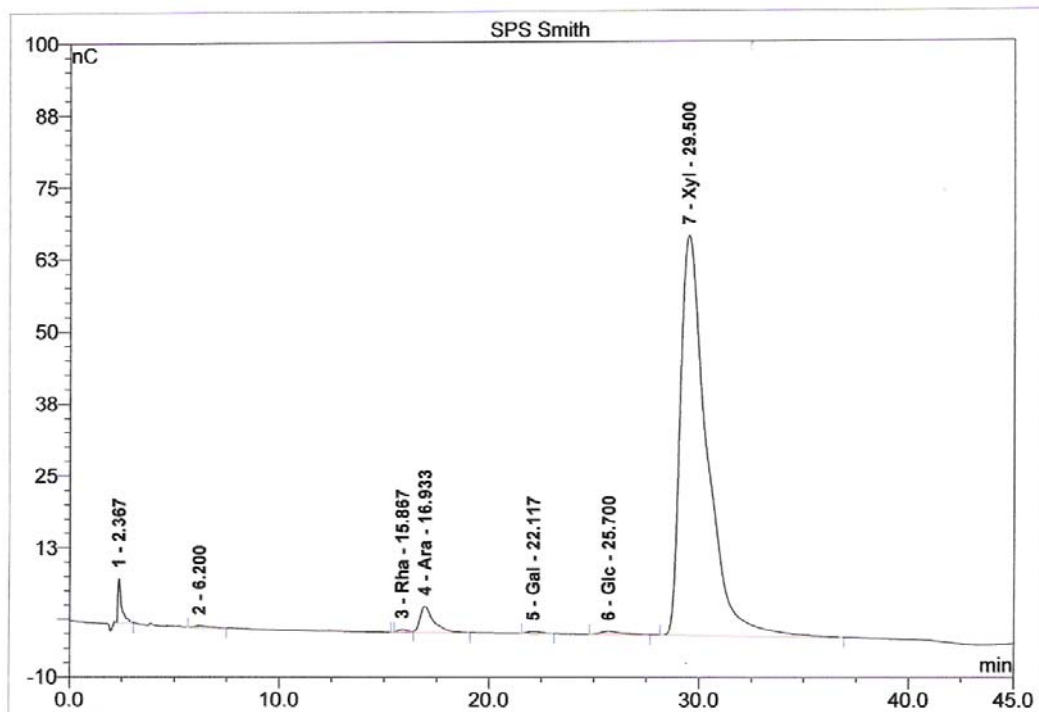


Abb. 26: HPAEC-PAD-Chromatogramm SPS nach Smith-Abbau (Eluent 10 mM NaOH)

3.6 Smith-Abbau des neutralen Polysaccharids

Das neutrale Polysaccharid zeigt nach dem Smith-Abbau keine so eindruckliche Veränderung wie das SPS. Es sind noch alle Monosaccharide vorhanden aber in veränderter Menge. Arabinose und Glukose führen gefolgt von Galaktose und Mannose. (Abb.27)

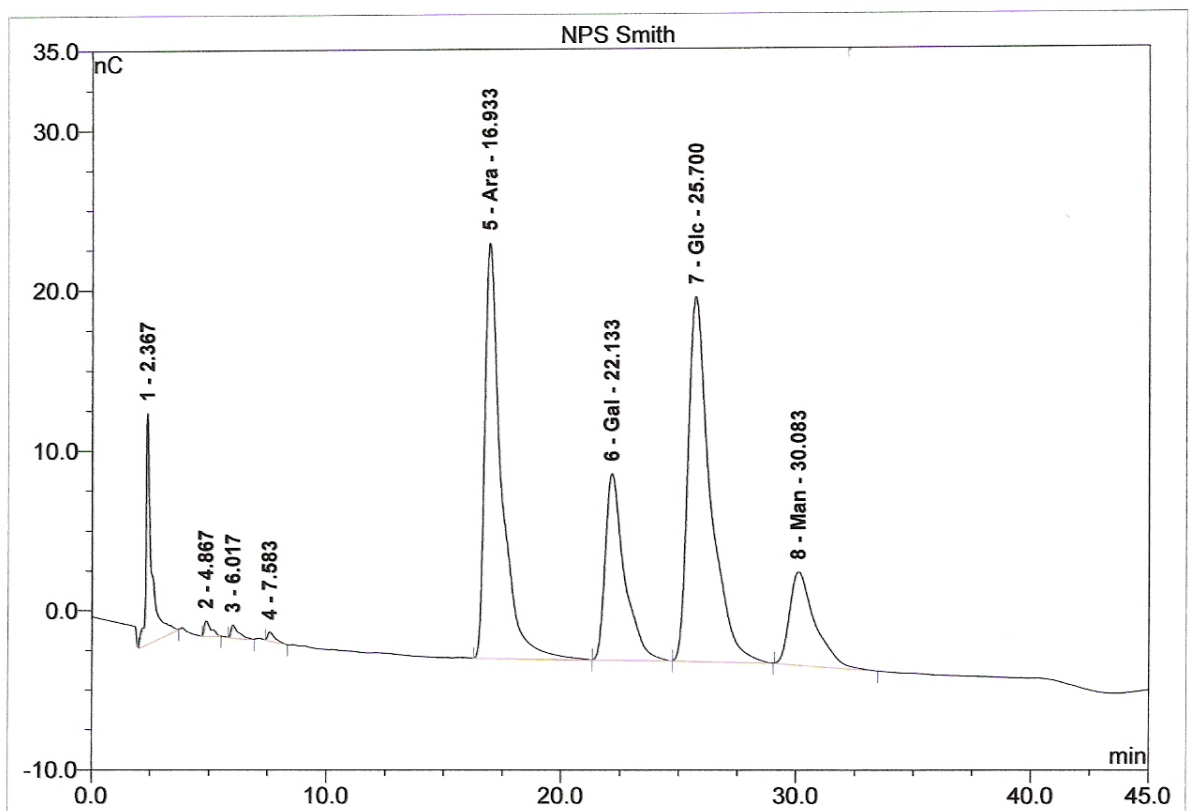


Abb. 27: HPAEC-PAD-Chromatogramm NPS nach Smith-Abbau (Eluent 10 mM NaOH)

3.7 Der Nachweis von 4-O-Methyl-Glukuronsäure

3.7.1 Dünnschichtchromatographie von SPS und Uronsäurestandards

In Abbildung 28 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm, dass die obere der beiden Uronsäurebanden des SPS von Bahn 5 und 6 im Laufverhalten und der Färbung dem auf Bahn 4 aufgetragenen 4-O-Methyl-Glukuronsäurestandard gleicht. Die untere graue Bande, die zwischen Glukuronsäure (siehe Bahn 3) und 4-O-Methyl-Glukuronsäure liegt, ist eine noch unbekannte Komponente. Es könnte sich um eine bei der Hydrolyse entstehende Aldo-Biuronsäure handeln.

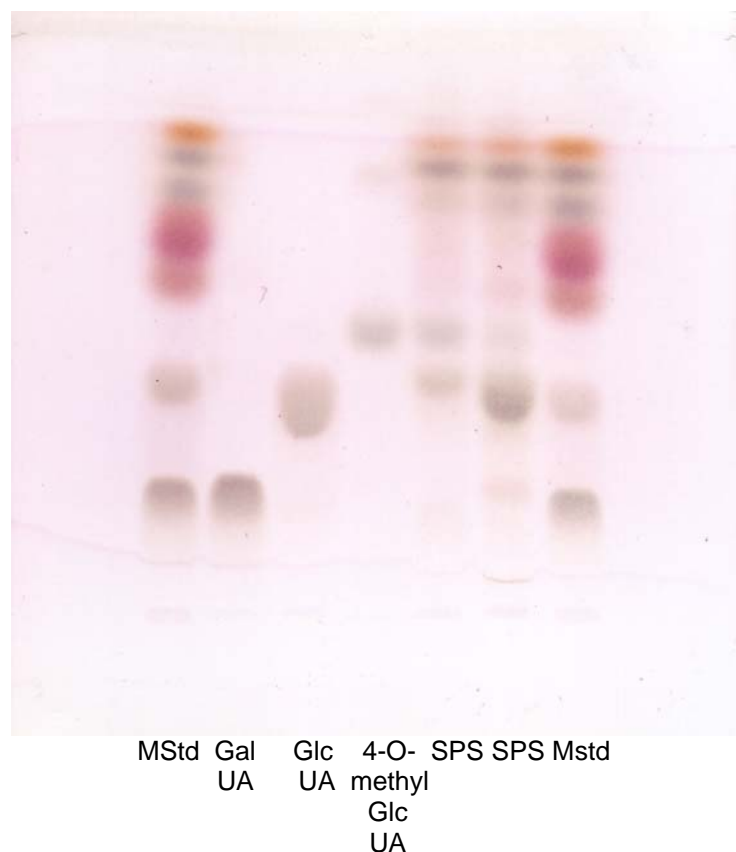


Abb. 28: DC mit GalUA , GlcUA, 4-O-Methyl-GlcUA, SPS und Mstd.

3.7.2 Trennung von Uronsäurestandards mit der HPAEC-PAD

Die folgenden Abbildungen 29 bis 31 zeigen das Laufverhalten der drei als Standards zur Verfügung stehenden Uronsäuren in der Anionenaustauschchromatographie: Galakturonsäure, Glukuronsäure und 4-O-Methylglukuronsäure. Zur Auftrennung der Uronsäuren ist ein zusätzlicher Natriumacetat-Eluent notwendig. Das beste Trennergebnis lässt sich mit 5%igem Anteil einer 1 M Natriumacetatlösung am Eluent (entspricht 50 mM Natriumacetatkonzentration) erzielen. Mit 7,5%iger Natriumacetat-Beimischung (entspricht 75 mM Natriumacetatkonzentration) ist noch eine gute Trennung der drei Komponenten möglich. Mit 10%igem Natriumacetatzusatz (100 mM Natriumacetatkonzentration) kommt es zur Überschneidung des 4-O-Methylglukuronsäurepeaks mit dem Galakturonsäurepeak.

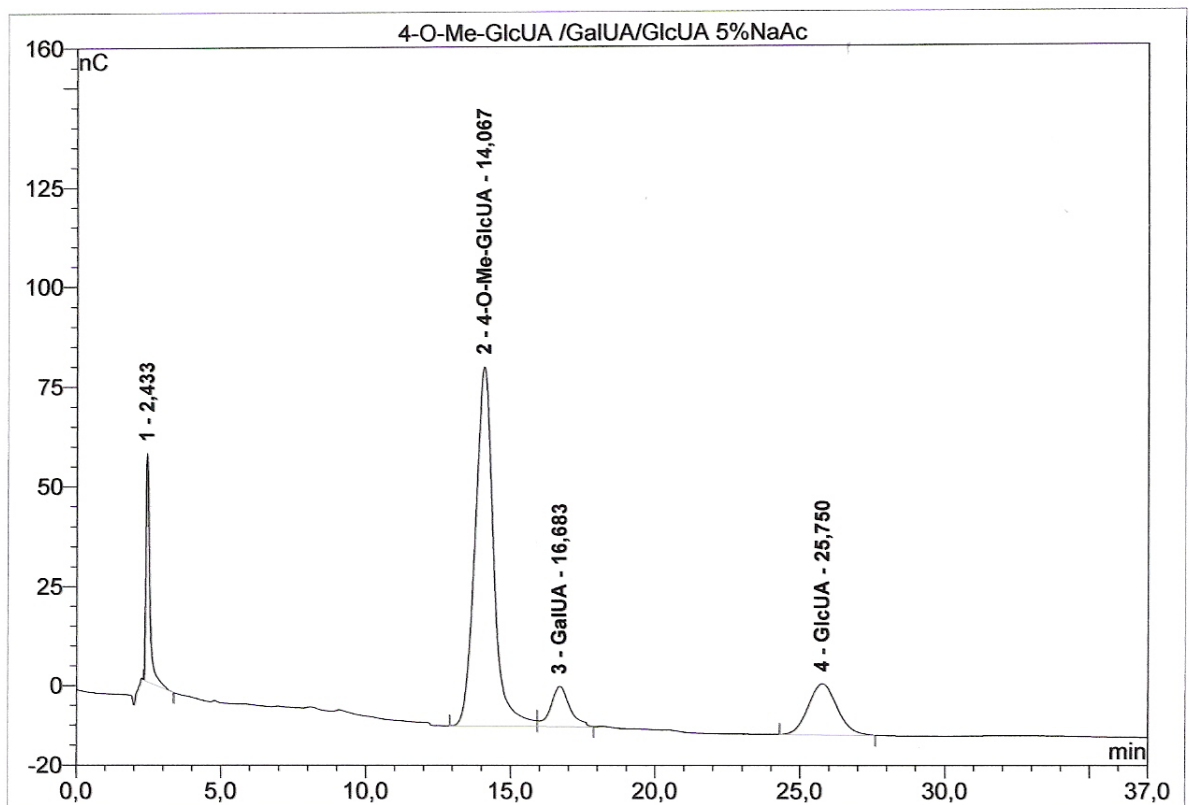


Abb. 29: HPAEC-PAD-Chromatogramm Glukuronsäurestandards;
(Uronsäureprogramm mit 5%iger Natriumacetatbeimischung)

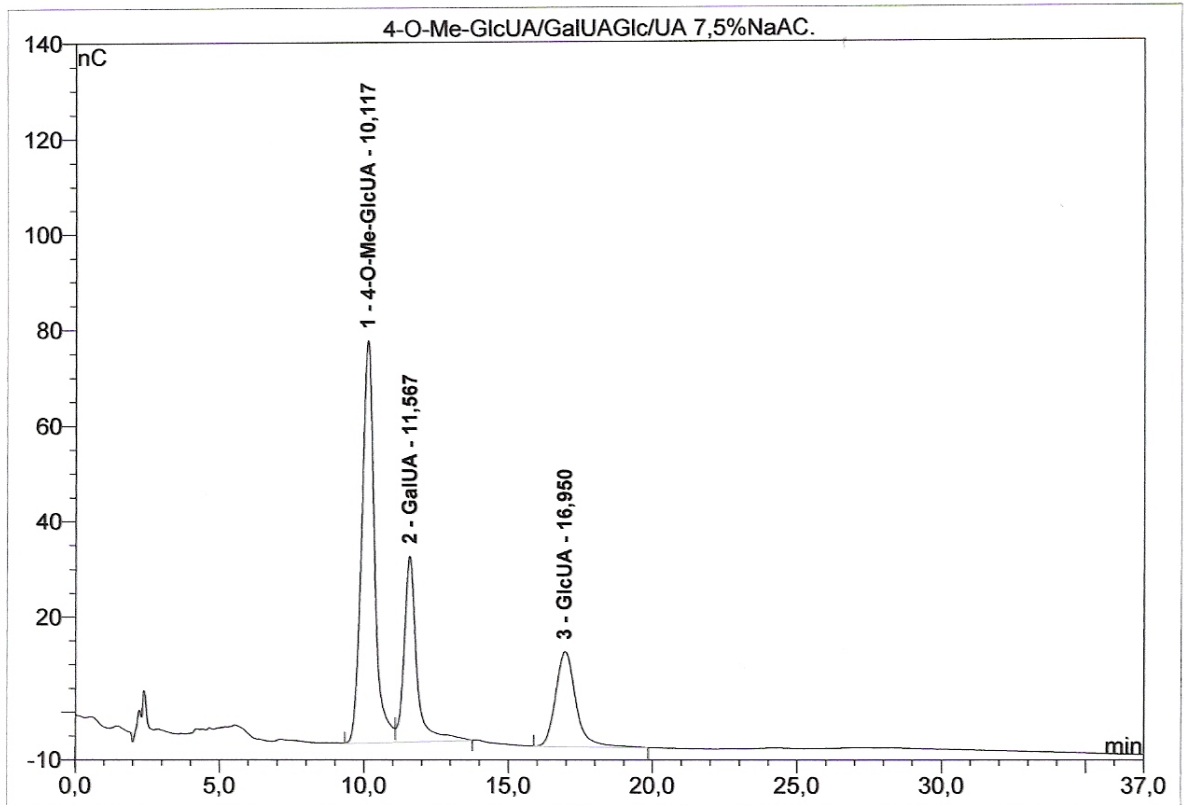


Abb. 30: HPAEC-PAD-Chromatogramm Glukuronsäurestandards;
(Uronsäureprogramm mit 7,5%iger Natriumacetatbeimischung)

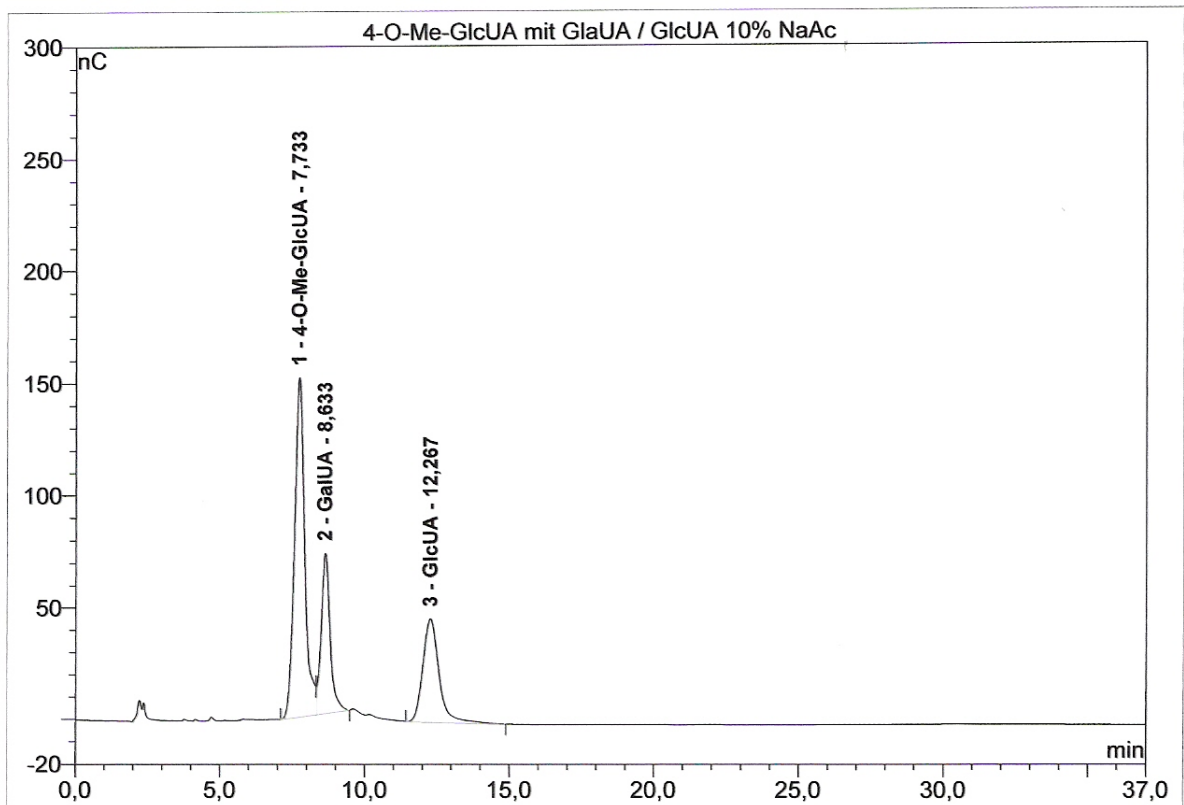


Abb. 31: HPAEC-PAD-Chromatogramm Glukuronsäurestandards;
(Uronsäureprogramm mit 10%iger Natriumacetatbeimischung)

3.8 Photometrische Uronsäuregehaltsbestimmung

Die photometrische Bestimmung des Uronsäuregehalts mit Galakturonsäure als Vergleichsstandard (Tabelle 4, Abbildung 32) wird mit vier Proben des sauren Polysaccharids durchgeführt, zwei davon mit 100% der Ausgangskonzentration von 100 µg/ml und zwei mit 50% um in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen zu messen.

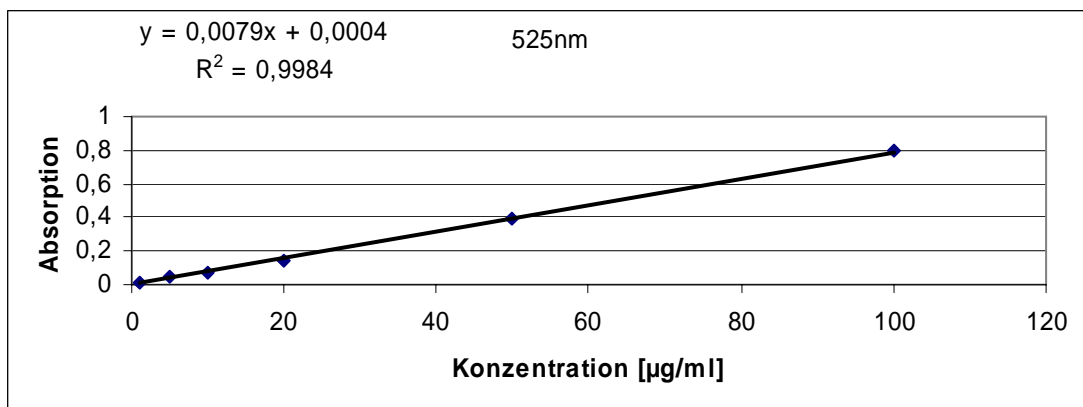


Abb. 32: Standardgerade der Galakturonsäure (photometrisch)

Standardkonzentration GalUA [µg/ml]	Absorption 525 nm
1	0,017
5	0,052
10	0,077
20	0,137
50	0,395
100	0,796

Tabelle 4: Photometrische Messwerte der Galakturonsäurestandards

SPS [100µg/ml]	Absorption 525nm	Berechnete Konzentration Ausgangslösung [µg/ml]
Probe1 100%	0,239	32,37
Probe2 100%	0,273	36,99
Probe3 50%	0,131	35,44
Probe4 50%	0,137	37,07
Mittelwert:		35,47

Tabelle 5: Photometrische Messwerte der SPS-Proben

Der Mittelwert ergibt einen Uronsäureanteil am sauren Polysaccharid von 35,47% (w/w) als 4-O-Methyl-Glukuronsäure berechnet (Tabelle 5).

3.9 Trennung von Zuckeralkoholen mit HPAEC-PAD

Abbildung 33 zeigt ein HPAEC-PAD-Chromatogramm von Zuckeralkoholstandards.

Sie eluieren in der Reihenfolge Xylitol, Rhamnitol, Arabinitol, Dulcitol, Sorbitol und Mannitol. Die Bestimmung der Einzelsubstanzen ist gut möglich. Es ist aber zu erkennen, dass die Peaks von Xylitol, Rhamnitol, Arabinitol so knapp beieinander liegen dass ihre Bestimmung im Gemisch sehr schwierig erscheint.

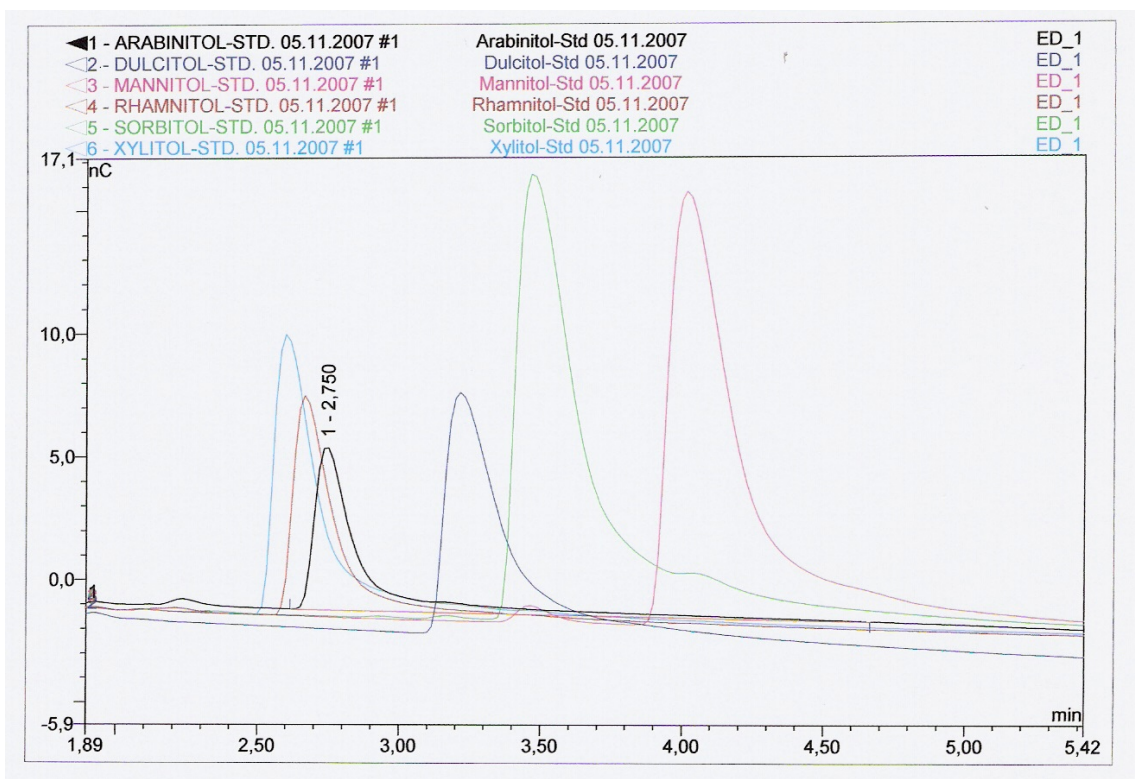


Abb. 33 HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckeralkohole

4. Zusammenfassung

Aus den Samenschalen von *Ocimum basilicum* kann durch Heisswasserextraktion und anschliessende Trocknung ein Polysaccharidgemisch gewonnen werden. Mit Natronlauge kann man aus diesem Gemisch eine alkalilösliche und eine alkaliunlösliche Polysaccharidfraktion gewinnen. Die alkalilösliche Polysaccharidfraktion enthält neutrale und saure Polysaccharide. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Isolierung der jeweils neutralen und sauren Polysaccharidfraktion mit Hilfe der Anionen-Austausch-Chromatographie von DEAE-Cellulose. Die so gewonnenen Fraktionen wurden parallel durch Dünnschichtchromatographie und Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie (HPAEC) auf ihre Monosaccharidzusammensetzung untersucht.

Für das neutrale Polysaccharid konnten Glukose, Galaktose, Mannose und Arabinose als Bestandteile bestimmt werden.

Das saure Polysaccharid enthält Xylose, Rhamnose, Arabinose, Spuren von Glukose und Galaktose und eine Uronsäure.

Durch photometrische Messung wurde der Gesamturonsäuregehalt des sauren Polysaccharids bestimmt.

Weiters wurde durch partielle Hydrolyse der Polysaccharide die Möglichkeit der Gewinnung von Oligosacchariden exploriert.

Summary

A polysaccharide mixture is recovered from the pericarp of *Ocimum basilicum* seeds by hot water extraction and subsequent air drying.

With sodium hydroxide solution it is possible to isolate an alkaline soluble and an alkaline insoluble polysaccharide fraction from this mixture. The alkaline soluble polysaccharide fraction consists of neutral and acidic polysaccharides.

The focus of this work was the separation and the isolation of the neutral and acidic polysaccharide fractions by the means of anion exchange chromatography on DEAE-cellulose. These fractions were analyzed by thin layer chromatography and high performance anion exchange chromatography regarding their monosaccharide composition.

The neutral polysaccharide consists of glucose, galactose, mannose and arabinose. The acidic polysaccharide consists of xylose, rhamnose, arabinose, traces of glucose and galactose and an uronic acid component which could be identified as 4-O-methyl-glucuronic acid.

The total content of uronic acid was measured by photometry.

In addition the possibility to recover oligosaccharides by partial hydrolysis of the polysaccharides has been explored.

Abkürzungsverzeichnis

4-O-Methyl-GlcUA	4-O-Methyl-Glukuronsäure
Ara	Arabinose
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-Cellulose	Diethyl-amino-ethyl-cellulose
Gal	Galaktose
GalUA	Galakturonsäure
Glc	Glukose
GlcUA	Glukuronsäure
GPS	Gesamtes Polysaccharid (= alkalilösliche Fraktion)
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
Man	Mannose
Mstd	Mischstandard
NPS	Neutrales Polysaccharid (= neutrale Fraktion des GPS)
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PS	Polysaccharid
Rha	Rhamnose
SPS	Saures Polysaccharid (= saure Fraktion des GPS)
SPSs	SPS nach Smith-Abbau
Std	Standard
TFA	Trifluoressigsäure
Xyl	Xylose

Literaturverzeichnis

- [1] Anjaneyalu, Y. V.; Gowda, D.C. (1979) Structural studies of an acidic polysaccharide from *Ocimum basilicum* seeds. Carbohydrate Research 75: 251-256
- [2] Tschenett, R. (2006), Präbiotische Polysaccharide aus *Ocimum basilicum*: Charakterisierung der Monosaccharidzusammensetzung der alkalilöslichen Fraktion, mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen Dünnschichtchromatographie, Diplomarbeit an der Universität Wien
- [3] Zottl, M. (2004), Zuckerszusammensetzungen pflanzlicher Quellstoffe: Methoden zur Qualitätskontrolle & Stabilitätsprüfung, Diplomarbeit an der Universität Wien
- [4] www.dionex.com, Juni 2007
- [5] De Ruiter, G.A.; Schols, H. A.; et al, (1992); Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. Analytical Biochemistry 207: 176-185
- [6] Cataldi, T.R.I.; Campa, C.; De Benedetto, G.E.,(2000), Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. Fresenius J Anal Chem 368: 739-758
- [7] Panagiotopoulos, Ch.; Sempere, R. et al, (2001) Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography. J Chrom A 1128: 90-96
- [8] Scherz, H. (1998) Analytical chemistry of carbohydrates, Thieme, New York, 186-187

[9] Ref. [8], pp.186-204

[10] Currie, H. ; Perry,C.C, (2006) Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography: J Chrom A , 1128: 90-96

[11] Landberg, E; Lundblad, P.(1998) Temperature effects in high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. J Chrom A 814: 97-104

[12] Yu, H. ; Mou, S-F.(2006) Effect of temperature on the retention of amino-acids and carbohydrates in high-performance anion-exchange chromatography. J Chrom A 1118: 118-124

[13]Panagiotopoulos, Ch.; Sempere, R. et al, (2001) Sub-ambient temperature effects on the separation of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection, application to marine chemistry.
J Chrom A 920: 13-22

[14] Singh, V.; Sethi, R.; Tewari, A.:(2003) Hydrolysis of plant seed gums by microwave irradiation. Carbohydrate Polymers 54: 523-525

[15] Ref. [8], pp.60-61

[16] Ref. [8], pp. 46-48

[17] Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C. (1991); Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry , 197: 157-162

[18] Li, J.; Danielsson, S.; (2007); An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. Carbohydrate Research 342: 1442-1449

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: DC einzelner Monosaccharide, Linomat, 4x entwickelt	25
Abb. 2: DC Hydrolyse der drei Polysaccharidfraktionen (GPS, NPS, SPS) mit 2M TFA 2Std. 120 °C	26
Abb. 3: DC Hydrolysat GPS, NPS, SPS, Linomat, 4x entwickelt	28
Abb. 4: DC Hydrolysat GPS, 1x entwickelt	30
Abb. 5: DC Hydrolysat GPS, 4x entwickelt	30
Abb. 6: DC Hydrolysat NPS, 1x entwickelt	31
Abb. 7: DC Hydrolysat NPS, 4x entwickelt	31
Abb. 8: DC Hydrolysat SPS, 1x entwickelt	32
Abb. 9: DC Hydrolysat SPS, 4x entwickelt	32
Abb. 10: HPAEC-PAD-Chromatogramm Mischstandard gesamt (Eluent 10 mmol NaOH)	33
Abb. 11: HPAEC-PAD-Chromatogramm Mischstandard 1 aus Rhamnose, Galaktose, Glukose, Xylose; [10 nmol/ml] (Eluent 10 mmol NaOH)	34
Abb. 12: HPAEC-PAD-Chromatogramm Mischstandard 2 aus Arabinose, Galaktose, Glukose, Mannose; [10 nmol/ml] (Eluent 10 mmol NaOH)	34
Abb. 13: HPAEC-PAD-Chromatogramm des GPS-Hydrolysates (Eluent 10 mmol NaOH)	35
Abb. 14: HPAEC-PAD Chromatogramm des GPS-Hydrolysates (Eluent 3 mmol NaOH)	36
Abb. 15: HPAEC-PAD-Chromatogramm des NPS-Hydrolysates (Eluent 10 mmol NaOH)	37
Abb. 16: HPAEC-PAD-Chromatogramm des SPS-Hydrolysates (Eluent 10 mmol NaOH)	38
Abb. 17: DC Mikrowellenhydrolyse GPS	39
Abb. 18: DC Mikrowellenhydrolyse GPS Teil1 (Minute 1 bis 8)	40
Abb. 19: DC Mikrowellenhydrolyse GPS Teil2 (Minute 8 bis 15)	40

Abb. 20: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 1 (Minute 1 bis 5)	42
Abb. 21: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 2 (Minute 6 bis 10)	43
Abb. 22: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 3 (Minute 11 bis 15)	44
Abb. 23: DC Mikrowellenhydrolyse NPS, SPS und SPSred Teil 4 (Minute 16 bis 20)	45
Abb. 24: DC Hydrolysat reduziertes SPS (SPSr); SPS nach Smith-Abbau (SPSs); Mischstandard (Mstd)	46
Abb. 25: HPAEC-PAD-Chromatogramm reduziertes SPS (Eluent 10 mM NaOH)	47
Abb. 26: HPAEC-PAD-Chromatogramm SPS nach Smith-Abbau (Eluent 10 mM NaOH)	48
Abb. 27: HPAEC-PAD-Chromatogramm NPS nach Smith-Abbau (Eluent 10 mM NaOH)	49
Abb. 28: DC mit GalUA , GlcUA, 4-O-Methyl-GlcUA, SPS und Mstd.	50
Abb. 29: HPAEC-PAD-Chromatogramm Glukuronsäurestandards; (Uronsäureprogramm mit 5% Natriumacetatbeimischung)	51
Abb. 30: HPAEC-PAD Chromatogramm Glukuronsäurestandards; (Uronsäureprogramm mit 7,5% Natriumacetatbeimischung)	52
Abb. 31: HPAEC-PAD Chromatogramm Glukuronsäurestandards; (Uronsäureprogramm mit 10% Natriumacetatbeimischung)	52
Abb. 32: Standardgerade der Galakturonsäure (photometrisch)	53
Abb. 33 HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckeralkohole	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standard-Stammlösungen für HPAEC-PAD	17
Tabelle 2: Standardkonzentrationen für HPAEC-PAD	17
Tabelle 3: Monosaccharide nach abnehmendem Rf-Wert	25
Tabelle 4: Photometrische Messwerte der Galakturonsäurestandards	53
Tabelle 5: Photometrische Messwerte der SPS-Proben	53

Lebenslauf

Laurenz Wenig

geboren am 17.9.1966 in Wien

von 1972 bis 1976 Besuch der Piaristen-Volksschule, 1080 Wien

von 1976 bis zur Matura 1984 Besuch des BG VIII, 1080 Wien

WS 1984 Beginn des Pharmaziestudiums an der Uni Wien

WS93, SS94 Tutorium in den Pharmakognostischen Übungen II

1986 bis 1997 Anstellung in der Mr. J.W.Wenig GesmbH, 1080 Wien

1989 Beginn des Medizinstudiums

WS1997 bis SS 2000 Tutor am histologischen Institut , Med. Uni Wien

1996 Zivildienst bei der Johanniter Unfallhilfe

2006 Promotion zum Dr. med.