

HPLC-Bestimmung der Nahrungsfaser-Neutralzuckerbausteine als N-p-Methoxyphenyl-glycosylamine mittels automatisierter Vorsäulenderivatisierung = Determination of the neutral sugar constituents of dietary fibre as N-p-methoxyphenyl-glycosylamines by HPLC ...

Autor(en): Zürcher, Ulrich / Mühlemann, Clarisse / Amadò, Renato

Objekttyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **85 (1994)**

Heft 1

PDF erstellt am: **23.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982745>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ulrich Zürcher, Clarisse Mühlemann und Renato Amadò, Eidg. Technische Hochschule Zürich, Institut für Lebensmittelwissenschaft, Laboratorium für Humanernährung, Rüslikon

HPLC-Bestimmung der Nahrungsfaser-Neutralzuckerbausteine als N-*p*-Methoxyphenyl-glycosylamine mittels automatisierter Vorsäulenderivatisierung

Determination of the Neutral Sugar Constituents of Dietary Fibre as N-*p*-methoxyphenyl-glycosylamines by HPLC with Automated Precolumn Derivatization

Key words: Neutral sugar, Dietary fibre, HPLC, Derivatization, N-*p*-methoxyphenyl-glycosylamine

Einleitung

Die Nahrungsfasern sind im Lauf der letzten 20 Jahre ins Blickfeld der aktuellen Ernährungsforschung bei Mensch und monogastrischem Tier gerückt. Die Definition von *Trowell* et al. (1), wonach unter Nahrungsfasern (dietary fibre) alle pflanzlichen Polysaccharide und Lignin zu verstehen sind, welche von den endogenen Verdauungsenzymen des Menschen nicht gespalten werden können, findet breite Anerkennung und bildet die Grundlage für die meisten neueren enzymatisch-gravimetrischen Bestimmungsmethoden (2, 3).

Diese Analysenverfahren liefern einen Globalwert für die Nahrungsfasern, führen bei Bedarf zu einer Unterscheidung in unlösliche (UNF) und lösliche (LNF) Nahrungsfasern, sagen aber sonst nichts über den chemischen Aufbau und die quantitative Verteilung der einzelnen Nahrungsfaserpolysaccharide aus. Sie sind daher in erster Linie für die Produktedeklaration und Produktkontrolle geeignet.

Im Zusammenhang mit physiologischen Untersuchungen sind aber differenziertere chemische Kenntnisse über die eingesetzten Nahrungsfaserträger unerlässlich. Ein wesentlicher Charakterisierungsschritt besteht in der Bestimmung des Neutralzuckermusters der Nahrungsfasern. Zu diesem Zweck werden die Analysefraktionen (UNF, LNF) der Nahrungsfasern einer sauren Hydrolyse unterwor-

fen und die freigesetzten Neutralzucker (L-Arabinose, L-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, L-Rhamnose, D-Xylose) mittels GLC (4–6) oder HPLC (7–9) quantifiziert.

Hohe Selektivität, niedrige Nachweisgrenzen, Gradientenelution und apolarere Trenneigenschaften der Neutralzucker können in der HPLC durch Vorsäulenderivatisierung erreicht werden, indem chromophore oder fluorophore Gruppen an die einzelnen Zuckermoleküle gekoppelt werden. Diesbezüglich sind noch kaum Anwendungen an Nahrungsfaserhydrolysaten publiziert worden. Von einzelnen Nahrungsfaser-Neutralzuckern wurden aber schon verschiedene Derivate hergestellt, z. B. Aminobenzoate (10), Benzoate (11), Hydrazone (12) und Phenyl Iso-cyanate (13). Den meisten dieser Verfahren ist gemeinsam, dass sie entweder mehrere Isomere pro Zucker ergeben und/oder die Derivate sehr aufwendig herzustellen sind.

Diese Nachteile sind bei der Vorsäulenderivatisierungsmethode von *Batley et al.* (14) nicht vorhanden: In Wasser gelöste Neutralzucker werden dabei mit *p*-Anisidin (4-Methoxyanilin) bei 60 °C während 80 min zu den entsprechenden *N-p*-Methoxyphenyl-glycosylaminen (Abb. 1) umgesetzt, das überschüssige Reagenz mit Diethylether extrahiert, die Derivate in Phosphatpuffer stabilisiert und nach Trennung auf einer reversed-phase Säule im UV nachgewiesen. Die Herstellung der Derivate wurde wesentlich vereinfacht und die chromatographischen Bedingungen optimiert (15). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Derivatisierungsverfahren weiter verkürzt und erstmals mit einem Autosampler automatisiert.

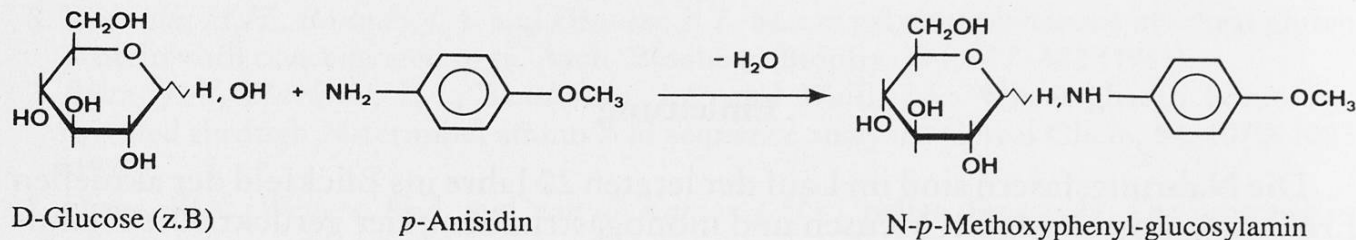


Abb. 1. Bildung eines *N-p*-Methoxyphenyl-glycosylamins

Experimenteller Teil

Geräte

- Buchler Vortex Evaporator Typ 432-2000 (Buchler Instruments; Lenexa, USA)
- Ganzglas-Filtrationsgerät (Millipore Corp.; Bedford, USA)
- Heraeus Zentrifuge Typ Omnifuge 2.0 RS (Heraeus Sepatech; Osterode, D)
- Kontron Zentrifuge Typ Centrikon H-401 (Kontron Instruments; Zürich, CH)
- Lauda Kältethermostat RCS 6 (Lauda Dr. R. Wobser; Lauda – Königshofen, D)
- Magnetrührer mit Heizplatte Typ MR 2002 (Heidolph-Elektro; Kelheim, D)
- Membranpumpe Typ MZ2C / 2.4 (Vacuubrand; Wertheim, D)

- pH-Meter 720A und pH-Elektrode 91-03 (Orion; Boston, USA)
- Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring Module Typ 18971 (Pierce; Rockford, Illinois, USA)
- Wasserbäder: Julabo U3 und Julabo UC (Julabo-Labortechnik; Seelbach, D)
- *HPLC-System:*
- Gradientenpumpe Typ L-6200 (Merck; Darmstadt, D)
- Säulenthermostat (Henggeler Analytik; Riehen, CH)
- Autosampler Typ AS-4000 (Merck; Darmstadt, D)
- 2 thermostatisierbare Probenracks Typ 30, Nr. B49460 (Gilson Medical Electronics, Inc. Middleton, USA)
- Konische 1,1 ml Autosamplerfläschchen (Chromacol 1,1-STVG) mit Schraubverschluss (Chromacol 8-SCJ) und zentrisch geschlitzter Teflon-Silikon-Dichtung (8004-Hi-SI/Te; alles von Infochroma AG, Zug, CH)
- Einspritzventil Typ 7000 mit 100 µl Probenschleife (Rheodyne; Cotati, USA)
- UV/VIS – Diode Array Detektor Typ L-4500 (Merck; Darmstadt, D)
- Chromatography data station software Typ D-6500 (Merck; Darmstadt, D)

Reagenzien

- Anionentauscher (Carbonatform), Serdolit Blau Mikro (Serva; Heidelberg, D)
- *p*-Anisidin, Grade I (Sigma Chemicals Co.; St. Louis, USA)
- Essigsäure 100% (Eisessig), reinst (Merck; Darmstadt, D)
- Natriumacetat, wasserfrei, z.A. (Merck; Darmstadt, D)
- Schwefelsäure 98%, zur Stickstoffbestimmung (Merck; Darmstadt, D)
- Methanol, HPLC Grade (Chromasolv, Riedel-de-Haën; Seelze, D)
- Acetonitril, HPLC Grade (Chromasolv, Riedel-de-Haën; Seelze, D)
- Zuckerstandards, alle in der höchstmöglichen Reinheit von:
Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA): L-Arabinose (Ara), D-Galactose (Gal), D-Glucose (Glc), D-Mannose (Man), L-Rhamnose (Rha), D-Xylose (Xyl)
Fluka AG (Buchs, Schweiz): L-Fucose (Fuc)
Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, USA): 2-Desoxy-D-glucose
- *p*-Anisidinlösung, 25% (*w/v*) in Methanol: 0,25 g *p*-Anisidin in 1 ml Methanol lösen und durch ein 0,45-µm-Chromafil-Einwegfilter (Typ O-45/25, Macherey & Nagel; Düren, D) in ein braunes 2-ml-Autosamplerfläschchen (12 · 32 mm) mit Schraubdeckel filtrieren. Lösung täglich frisch herstellen.
- *Acetatpuffer, 28 mM, pH 3,80:*
 28 mM Essigsäurelösung (1): 0,168 g Essigsäure 100% in einen 100-ml-Messkolben einwiegen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
 28 mM Natriumacetatlösung (2): 0,23 g Natriumacetat in einen 100-ml-Messkolben einwiegen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
 Lösung (1) mit Lösung (2) auf pH 3,80 ± 0,03 einstellen und Puffer durch ein 0,45-µm-Chromafil-Einwegfilter (Typ A-45/25, Macherey & Nagel; Düren, D) filtrieren.

- *Acetatpuffer, 9 mM, pH 3,80:*
9 mM Essigsäurelösung (3): 0,54 g Essigsäure 100% in einen 1-l-Messkolben einwiegen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
9 mM Natriumacetatlösung (4): 0,738 g Natriumacetat in einen 1-l-Messkolben einwiegen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
Lösung (3) mit Lösung (4) auf pH 3,80 ± 0,03 einstellen und Puffer durch ein 0,45-µm-FP-450-Vericel-Membranfilter (Gelman Sciences; Ann Arbor, USA) am Ganzglas-Filtrationsgerät filtrieren.
- *Acetatpuffer, 9 mM, pH 6,00:*
Lösung (4) mit Lösung (3) auf pH 6,00 ± 0,03 einstellen und Puffer durch ein 0,45 µm FP-450 Vericel Membranfilter (Gelman Sciences; Ann Arbor, USA) am Ganzglas-Filtrationsgerät filtrieren.
- *Schwefelsäure, 72% (w/w):* 108,226 g Wasser in einem Becherglas vorlegen, im Eis-Kochsalz-Bad abkühlen und unter Rühren vorsichtig 300,25 g Schwefelsäure (98%) zugeben.

Vergleichslösungen

Interner Standard

2-Desoxy-D-glucose-Lösung (2,92 mM): 47,9 mg 2-Desoxy-D-glucose auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen, in frischem Wasser lösen, bis zur Marke auffüllen und durch ein 0,45-µm-Chromafil-Einwegfilter (Typ A-45/25, Macherey & Nagel; Düren, D) filtrieren. Lösung im Kühlschrank aufbewahren.

Kalibrierungslösung 1

Äquimolarer Neutralzucker-Standard (28 mM/Aldose): von Ara, Fuc, Gal, Glc, Man, Rha und Xyl je 0,56 mMol auf 0,1 mg genau in einen 20-ml-Messkolben einwiegen, in frischem Wasser lösen, bis zur Marke auffüllen und durch ein 0,45-µm-Chromafil-Einwegfilter (Typ A-45/25, Macherey & Nagel; Düren, D) filtrieren. Lösung im Kühlschrank aufbewahren.

Kalibrierungslösung 2

Äquimolarer Neutralzucker-Standard (0,93 mM/Aldose): 1,667 ml der Kalibrierungslösung 1 mit Wasser auf 50 ml Wasser auffüllen und durch ein 0,45-µm-Chromafil-Einwegfilter (Typ A-45/25, Macherey & Nagel; Düren, D) filtrieren. Lösung im Kühlschrank aufbewahren.

Vor der Derivatisierung werden Kalibrierungslösung 1 und 2 je zweifach mit 2 M Schwefelsäure verdünnt, mit internem Standard im Verhältnis 2:3 versetzt und wie die Nahrungsfaserhydrolysate über den Anionentauscher aufgearbeitet (15).

Ausführung

Isolierung der unlöslichen Nahrungsfasern (UNF)

Die Isolierung der unlöslichen Nahrungsfasern aus Hirseschalen (*Panicum miliaceum*; E. Zwicky AG, Müllheim-Wigoltingen, CH) und aus Sojabohnenschalen (*Glycine max*; E. Zwicky AG, Müllheim-Wigoltingen, CH) wurde gemäss Methode 8.1 des *Schweizerischen Lebensmittelbuches* (16) mit folgender Abänderung durchgeführt: Die Abtrennung der unlöslichen Analysenfraktion erfolgte nicht mittels Filtration, sondern durch Zentrifugation (10 min, 16 000 g).

Herstellung und Aufarbeitung der UNF-Hydrolysate

Ca. 20 mg UNF auf 0,1 mg genau in ein verschraubbares 16 · 100 mm Pyrex-Reagenzglas einwiegen, ein Magnetrührstäbchen und 350 µl 72% H₂SO₄ hinzufügen und während 2 h im Wasserbad (25 °C) auf dem Magnetrührer rühren. Anschliessend 3,850 ml Wasser zugeben (ergibt 1 M H₂SO₄) und unter Rühren 3 h bei 100 °C im Reacti-Therm-Gerät erhitzen, danach die Hydrolysatproben kurz unter dem kalten Wasser abkühlen, 10 min bei 6200 g (15 °C) zentrifugieren (Omnifuge 2.0 RS), je 200 µl der klaren Überstände mit 300 µl internem Standard versetzen und vom Gemisch ein 50 µl Aliquot über das Anionentauscherharz gemäss Arbeitsvorschrift von Zürcher (15) aufarbeiten. Die Eluate werden mit dem Buchler-Vortex-Evaporator bei ca. 45 °C bis zur Trockne eingedampft, die Rückstände in je 100 µl Wasser aufgenommen und für die automatisierte Derivatisierung in konische 1,1-ml-Autosamplerfläschchen überführt.

Automatisierte Vorsäulenderivatisierung mit dem Autosampler AS 4000

1. Pipettiervorgänge (Abb. 2) zur Herstellung der *N-p*-Methoxyphenyl-glycosylamine

Vom Autosampler werden in der Reihenfolge 10 µl Luft, 80 µl Probe- oder Standardlösung, 5 µl Luft, 16 µl Acetatpuffer (28 mM, pH 3,80), 5 µl Luft und 16 µl *p*-Anisidinlösung (25% in Methanol) aufgezogen und in ein konisches 1,1-ml-Autosamplerfläschchen des auf 90 °C thermostatisierten Probenracks ausgestossen. Die «Luftpolster» werden eingefügt, um eine Durchmischung der verschiedenen Lösungen in der Verbindungskapillare von der Einspritznadel zur Dosierspritze zu verhindern. Die Reaktionslösung wird genau 10 min bei 90 °C gehalten und innerhalb dieser Zeit durch dreimaliges Durchblasen von je 400 µl Luft gemischt. Vom noch heissen Reaktionsgemisch werden anschliessend 70 µl mit der Dilutorspritze aufgezogen, davon 10 µl in die Probenschleife dosiert und über ein 6-Wege-Ventil auf die HPLC-Säule eingespritzt.

2. Technische Ergänzungen

Zur Durchführung der in Abbildung 2 dargestellten Vorsäulenderivatisierung wurden zwei thermostatisierbare Probenracks (Typ 30, Gilson) eingesetzt und an die Rackhalterung des AS 4000 angepasst. Das eine Rack, welches zur Aufnahme

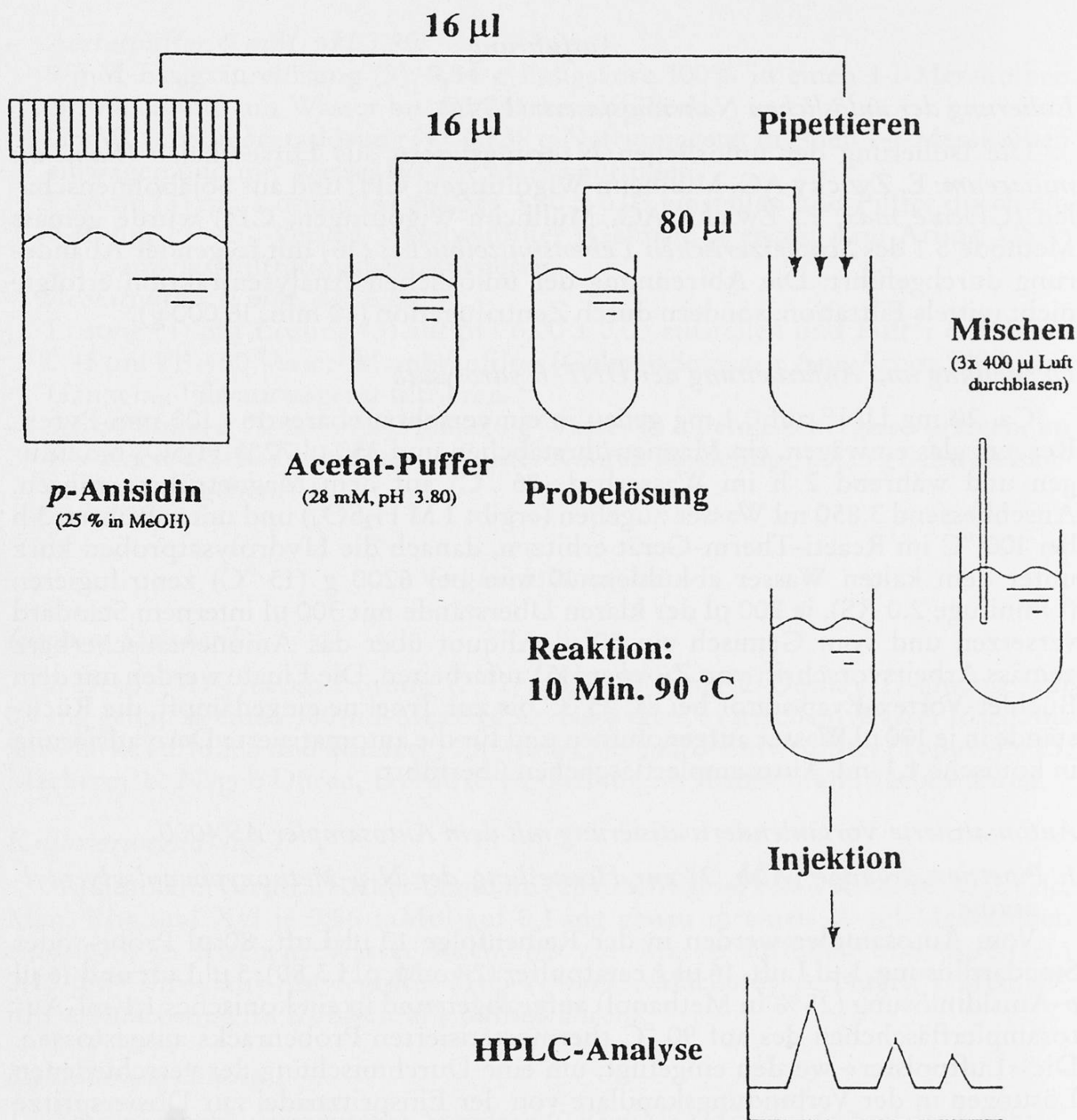


Abb. 2. Schema des Vorsäulenderivatisierungsverfahrens

der Reagenzien und Proben diente, wurde mit dem Kältethermostat auf eine Temperatur von 18 °C eingestellt. Die Temperierung des anderen Racks (90 °C) erfolgte mit einem Wasserbad. Um bei diesem Rack einen schnellen Wärmeübergang bei der Verwendung von konischen Autosamplerfläschchen zu gewährleisten, wurde ein wenig Heizbadflüssigkeit (Labofur GmbH, Basel, CH) in die zylinderförmigen Ausbohrungen eingefüllt.

3. Programmierung des Autosamplers AS 4000

Zur Automatisierung des Vorsäulenderivatisierungsverfahrens müssen dem AS 4000 folgende Programmschritte eingegeben werden:

- | | | |
|----------------------|----------------------|--------------------|
| 1. HOME | 26. ASP 1 5.0 3 | 51. ASP 1 70.0 2 |
| 2. TIMER 0.0 | 27. WAIT 1.0 | 52. WAIT 2.0 |
| 3. OUT 1 0 | 28. TUBE 0 0 | 53. HEIGHT 0.0 2 |
| 4. OUT 2 0 | 29. TUBE 10 36 | 54. ASP 1 5.0 3 |
| 5. OUT 3 0 | 30. ASP 1 16.0 3 | 55. VALVE 0 |
| 6. WASH | 31. WAIT 1.0 | 56. TUBE 0 0 |
| 7. DO 1 1 1.0 1.0 | 32. TUBE 0 0 | 57. TUBE 0 1 |
| 8. TUBE 0 0 | 33. TUBE 11 I1 | 58. DISP 1 49.0 3 |
| 9. DISP 1 500.0 5 | 34. DISP 1 127.0 3 | 59. WAIT 2.0 |
| 10. SVALVE 1 0 | 35. TIMER 600.0 | 60. VALVE 1 |
| 11. SYRINGE 1 14.9 5 | 36. DO 3 2 1.0 1.0 | 61. DISP 1 10.0 3 |
| 12. HEIGHT 0.0 2 | 37. HEIGHT 0.0 2 | 62. WAIT 2.0 |
| 13. ASP 1 10.0 3 | 38. ASP 1 400.0 3 | 63. VALVE 0 |
| 14. WAIT 1.0 | 39. HEIGHT 41.0 2 | 64. OUT 1 1 |
| 15. TUBE 10 I1 | 40. DISP 1 400.0 3 | 65. OUT 2 1 |
| 16. ASP 1 80.0 3 | 41. LOOP | 66. WAIT 1.0 |
| 17. WAIT 2.0 | 42. TUBE 0 0 | 67. TIMER 220.0 |
| 18. HEIGHT 0.0 2 | 43. DISP 1 500.0 5 | 68. OUT 1 0 |
| 19. ASP 1 5.0 3 | 44. WASH | 69. OUT 2 0 |
| 20. WAIT 1.0 | 45. SVALVE 1 0 | 70. DISP 1 500.0 5 |
| 21. TUBE 0 0 | 46. SYRINGE 1 14.9 5 | 71. TUBE 0 0 |
| 22. TUBE 10 35 | 47. HEIGHT 0.0 2 | 72. DISP 1 500.0 5 |
| 23. ASP 1 16.0 3 | 48. ASP 1 5.0 3 | 73. WAITTIMER |
| 24. WAIT 1.0 | 49. WAITTIMER | 74. LOOP |
| 25. HEIGHT 0.0 2 | 50. TUBE 11 I1 | 75. HOME |

Chromatographische Bedingungen

Säule: 250 mm • 4,6 mm Novogrom-Säule (Stagroma AG, Wallisellen, CH), gepackt mit Hypersil ODS, 5 µm (Shandon Scientific Ltd., Runcorn, GB)

Fluss: 1,3 ml/min, max. 120 bar

Säulentemperatur: 25 °C

Elutionsprogramm: Eluent A: Acetonitril
 Eluent B: 9 mM Acetatpuffer, pH 6,00 ± 0,03
 Eluent C: 9 mM Acetatpuffer, pH 3,80 ± 0,03

Elutionsprogramm:

	Zeit (min)	%A	%B	%C
Linearer Gradient	0,0	16	0	84
	4,5	16	0	84
	5,5	40	60	0

Linearer Gradient $\begin{cases} 7,5 & 40 & 60 & 0 \\ 9,5 & 16 & 0 & 84 \\ 15,0 & 16 & 0 & 84 \end{cases}$
 Detektion: UV, 240 nm
 Kalibrierung: 2-Punkt-Kalibrierung, mit internem Standard

Resultate und Diskussion

Die Chromatogramme (Abb. 3–5) zeigen die hohe Selektivität, welche durch die Vorsäulenderivatisierung der Nahrungsfaser-Neutralzucker erreicht wird. Die Peaks der N-*p*-Methoxyphenyl-glycosylamine sind scharf, symmetrisch und mehrheitlich bis zur Basislinie aufgelöst. Weder am auf- noch absteigenden Ast sind bei den einzelnen Peaks irgendwelche Schultern erkennbar, welche auf die Anwesenheit nicht aufgetrennter anomerer Derivatformen deuten könnten (14).

Auch das überschüssige Derivatisierungsreagenz (*p*-Anisidin), auf dessen Extraktion der Einfachheit halber verzichtet wurde, lässt sich unter den optimierten chromatographischen Bedingungen sauber von den Derivaten abtrennen. Um eine rasche, tailingfreie Elution des aromatischen Amins zu ermöglichen, müssen nach 4,5 min der Acetonitrilanteil linear von 16% auf 40% und das pH der mobilen Phase von ca. 4,0 auf ca. 6,0 innerhalb einer Minute erhöht werden. Dank dieser Massnahme kann die Dauer des Elutionsprogramms (inklusive Reäquilibrierungsphase) auf 15 min gesenkt werden.

Tabelle 1. Reproduzierbarkeit des automatisierten Vorsäulenderivatisierungsverfahrens

Neutralzucker	NZ-Std. 2,8 mM/Aldose		NZ-Std. 0,093 mM/Aldose	
	relative molare Peakhöhe*		relative molare Peakhöhe*	
	$\bar{x}_n = 5$ (%)	VK (%)	$\bar{x}_n = 5$ (%)	VK (%)
Galactose	1492,7	1,0	47,1	0,9
Glucose	1870,9	1,5	61,2	2,7
Mannose	1490,3	1,0	48,6	1,2
Arabinose	510,8	0,6	16,9	2,2
Xylose	894,9	1,4	28,8	2,9
Fucose	872,7	1,7	31,4	2,7
Rhamnose	1158,4	1,6	40,1	2,1

* bezüglich der molaren Peakhöhe des 2-Desoxy-glucose-Derivats (= 100%)

NZ-Std. Neutralzucker-Standard

\bar{x} arithmetisches Mittel

VK Variationskoeffizient = $s/\bar{x} \cdot 100$

- Gal = D-Galactose
- Glc = D-Glucose
- Man = D-Mannose
- Ara = L-Arabinose
- De-glc = 2-Desoxy-D-glucose (IS)
- Xyl = D-Xylose
- Fuc = L-Fucose
- Rha = L-Rhamnose

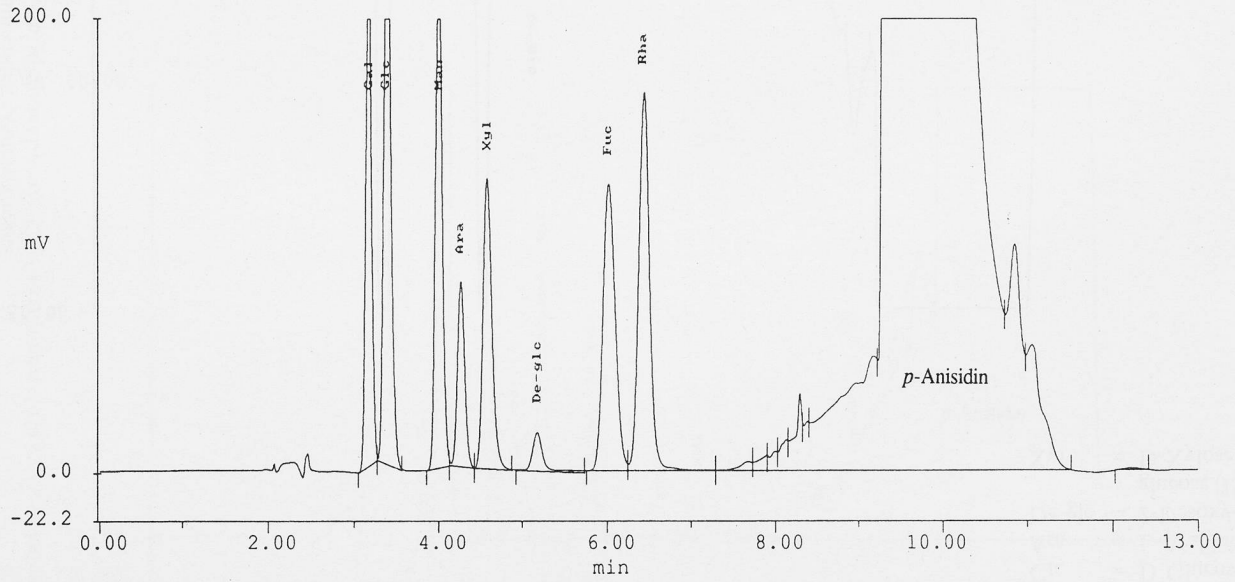


Abb. 3. Chromatogramm der N-*p*-Methoxyphenyl-glycosylamine eines äquimolaren Neutralzuckerstandards (2,80 mM/Aldose)

Gal = D-Galactose
 Glc = D-Glucose
 Ara = L-Arabinose
 De-glc = 2-Desoxy-D-glucose (IS)
 Xyl = D-Xylose

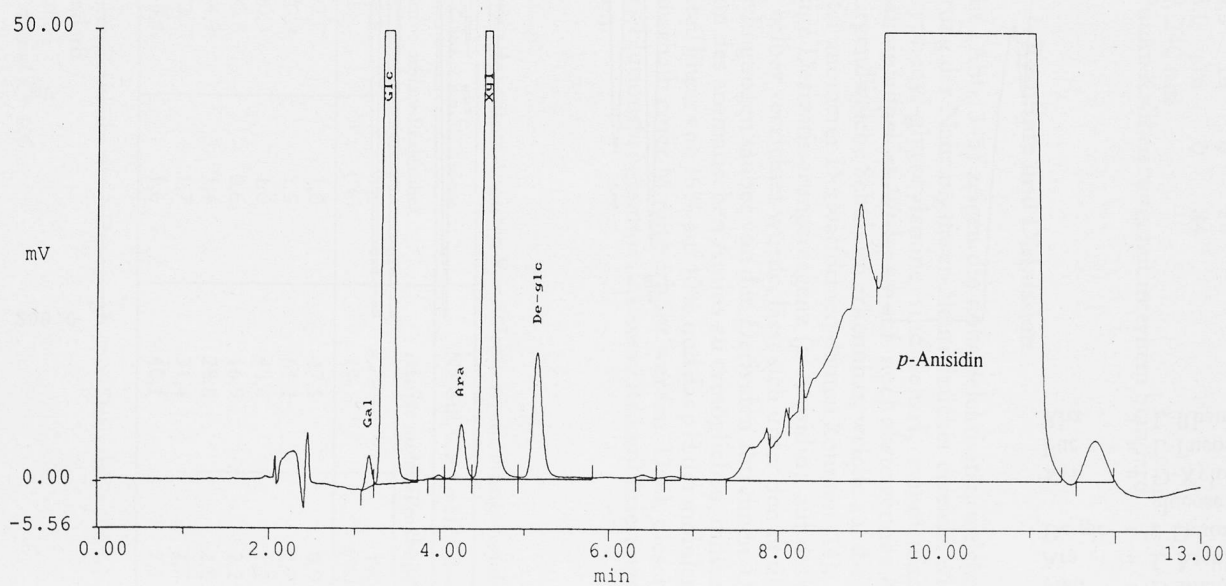


Abb. 4. Chromatogramm der N-*p*-Methoxyphenyl-glycosylamine der im UNF-Hydrolysat von Hirseschalen vorkommenden Neutralzucker

- Gal = D-Galactose
- Glc = D-Glucose
- Man = D-Mannose
- Ara = L-Arabinose
- De-glc = 2-Desoxy-D-glucose (IS)
- Xyl = D-Xylose
- Fuc = L-Fucose
- Rha = L-Rhamnose

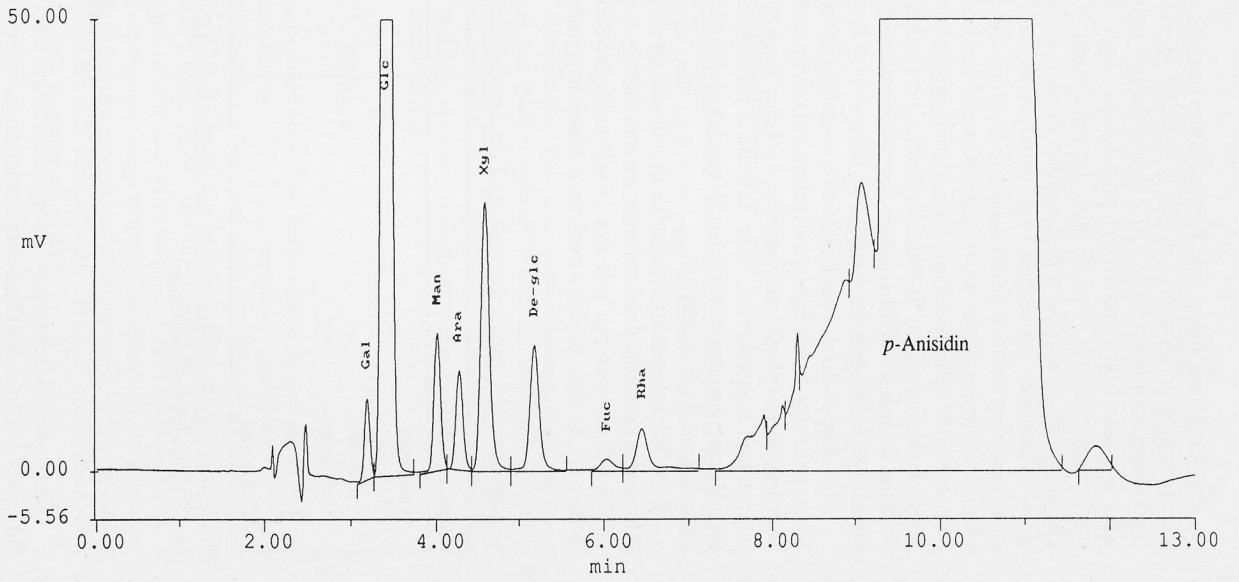


Abb. 5. Chromatogramm der N-p-Methoxyphenyl-glycosylamine der im UNF-Hydrolysat von Sojaschalen vorkommenden Neutralzucker

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des automatisierten Vorsäulenderivatisierungsverfahrens (Tabelle 1) wurden zwei unterschiedlich konzentrierte Neutralzuckerstandards in je 1 M Schwefelsäure gelöst, mit internem Standard versetzt und wie die Nahrungsfaserhydrolysate über den Anionentauscher aufgearbeitet und derivatisiert. Obwohl sich die einzelnen Neutralzucker in sehr unterschiedlichem Ausmass mit dem *p*-Anisidin zu den entsprechenden *N-p*-Methoxyphenylglycosylaminen umsetzen (vgl. mittlere molare Peakhöhen) und die Reaktionslösung noch im heissen Zustand ohne zusätzliche Stabilisierung der darin enthaltenen Derivate eingespritzt wird, sind sowohl im höheren als auch tieferen Konzentrationsbereich sehr niedrige Variationskoeffizienten für die mittleren relativen (bezüglich des internen Standards) molaren Peakhöhen festzustellen.

Die Wiederfindungsraten der Neutralzucker nach der Anionentauscher-Behandlung betragen 96,4–103,3% (15).

Die Reproduzierbarkeitsuntersuchungen wurden auch im Hinblick auf die Linearität der Beziehung zwischen relativer molarer Peakhöhe der einzelnen *N-p*-Methoxyphenyl-glycosylamine und der Konzentration der entsprechenden Neutralzucker ausgewertet. Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, verhalten sich Peakhöhe und Zuckerkonzentration im Bereich von 93 µM bis 2,8 mM / Neutralzucker völlig proportional ($R \geq 0,9996$).

Die Nachweisempfindlichkeit für einen Neutralzucker ist hoch und liegt in Abhängigkeit von der Umsatzrate mit dem *p*-Anisidin im Bereich von 3–13 ng bzw. 17–84 pMol, was gut mit der Nachweisgrenze von 5 ng (17) eines FID-Detektors in der GLC von Kohlenhydraten übereinstimmt.

Tabelle 2. Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungskurven #

Neutralzucker	<i>R</i>
Galactose	0,9999
Glucose	0,9996
Mannose	0,9999
Arabinose	0,9998
Xylose	0,9999
Fucose	0,9998
Rhamnose	1,0000

Konzentrationsbereich eines Neutralzuckers: 0,093 mM–2,8 mM

R = Korrelationskoeffizient

Schlussfolgerungen

Bezüglich Selektivität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit stellt die vorliegende HPLC-Methode mit automatisierter Vorsäulenderivatisierung eine Alternative zu den herkömmlichen GLC- und HPLC-Verfahren zur Bestimmung der Nahrungsfaser-Neutralzucker dar. Die Derivatisierung ist sehr einfach und daher

gut automatisierbar. Die Methode erlaubt einen hohen Probendurchsatz: Innerhalb von 24 h können 95 aufgearbeitete Hydrolysate chromatographiert werden, da das Derivatisierungs- und Elutionsprogramm parallel ablaufen und je innerhalb von 15 min abgeschlossen sind. Im Vergleich dazu benötigen die neusten HPLC-Verfahren auf der Basis von Anionentauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion allein für die Trennung der underivatisierten Nahrungsfaser-Neutralzucker mindestens 35 min (8, 9).

Dank

Herrn *Bruno Jörg* vom Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich sei an dieser Stelle für die sorgfältige Ausführung der mechanischen Arbeiten am Autosampler und an den Probenracks gedankt.

Zusammenfassung

Es wird eine neue HPLC-Methode mit automatisierter Vorsäulenderivatisierung zur Bestimmung des Neutralzuckermusters an isolierten Nahrungsfasern beschrieben. Die durch saure Hydrolyse freigesetzten Neutralzucker (Arabinose, Fucose, Galactose, Glucose, Mannose, Rhamnose, Xylose) werden über einen Anionentauscher aufgearbeitet, mit *p*-Anisidin unter Säurekatalyse zu den entsprechenden *N-p*-Methoxyphenyl-glycosylaminen umgesetzt, auf einer Umkehrphase mit hoher Auflösung getrennt und bei 240 nm spezifisch nachgewiesen. Bezüglich Selektivität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit stellt das entwickelte Verfahren zur Bestimmung der Nahrungsfaser-Neutralzucker eine attraktive Alternative zu den herkömmlichen GLC- und HPLC-Methoden dar. Als wesentlicher Vorteil ist der hohe Probendurchsatz zu nennen: Innerhalb von 24 h können 95 aufgearbeitete Nahrungsfaserhydrolysate analysiert werden, da das Derivatisierungs- und Elutionsprogramm parallel ablaufen und nur je 15 min benötigen.

Résumé

Une nouvelle méthode par HPLC avec dérivatisation automatisée en pré-colonne a été développée pour le dosage des oses neutres dans les fibres alimentaires. Les dérivés *N-p*-methoxyphenyl-glycosylamines sont obtenus après hydrolyse acide des fibres isolées, purification sur cartouche à échange d'anions, puis traitement à la *p*-anisidine en présence d'un catalyseur acide. Ces dérivés sont séparés à haute résolution sur une colonne à phase inverse et détectés spécifiquement à 240 nm. En ce qui concerne la sélectivité, la sensibilité et la reproductibilité, le procédé développé représente une alternative intéressante aux méthodes traditionnelles par GLC et HPLC. La possibilité d'une cadence d'analyse élevée est l'avantage essentiel de cette méthode; comme le programme de dérivatisation et celui d'élution ne durent que 15 min, il est possible d'effectuer jusqu'à 95 analyses en 24 h.

Summary

A new method for the determination of the neutral sugars of dietary fibre using HPLC with automated precolumn derivatization has been developed. The neutral sugar constituents (arabinose, fucose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose) are released from the isolated dietary fibre fractions by acid hydrolysis, cleaned-up on an anion-exchange resin and derivatized with *p*-anisidine under acid catalysis to their corresponding *N-p*-methoxyphenyl-glycosylamines. The derivatives are then separated with high resolution on a reversed-phase column and detected specifically at 240 nm. In terms of selectivity, sensitivity and reproducibility, the new method offers an attractive alternative to the common GLC and HPLC procedures used for the measurement of the constituent sugars of dietary fibre polysaccharides. It provides a very high sample through-put: 95 neutralized hydrolyzates can be analysed within 24 h as the derivatization programme and the chromatographic run are proceeding in parallel and need only 15 min each.

Literatur

1. Trowell, H., Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A. and Jenkins, D.J.A.: Dietary fibre redefined. *Lancet* **1**, 967 (1976).
2. Asp, N.-G., Schweizer, T.F., Southgate, D.A.T. and Theander, O.: In: Schweizer, T.F. and Edwards, C.A. (eds.), *Dietary fibre – A component of food*, pp. 57–101. Springer-Verlag, Berlin 1992.
3. Schweizer, T.F.: Dietary fibre analysis. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* **22**, 54–59 (1989).
4. Englyst, H.N., Quigley, M.E., Hudson, G.J. and Cummings, J.H.: Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst* **117**, 1707–1714 (1992).
5. Hoebler, C., Barry, J.L., David, A. and Delort-Laval, J.: Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 360–367 (1989).
6. Neeser, J.-R. and Schweizer, T.F.: A Quantitative determination by capillary gas-liquid chromatography of neutral and amino sugars (as *O*-methyloxime acetates), and a study on hydrolytic conditions for glycoproteins and polysaccharides in order to increase sugar recoveries. *Anal. Biochem.* **142**, 58–67 (1984).
7. Slavin, J.L. and Marlett, J.A.: Evaluation of high-performance liquid chromatography for measurement of the neutral saccharides in neutral detergent fiber. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 467–471 (1983).
8. Garleb, K.A., Bourquin, L.D. and Fahey (Jr.), G.C.: Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: A comparison of hydrolytic procedures and use of anion-exchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1287–1293 (1989).
9. Quigley, M.E. and Englyst, H.N.: Determination of neutral sugars and hexosamines by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Analyst* **117**, 1715–1718 (1992).
10. Akiyama, T.: Separation of neutral mono- and oligosaccharides derivatized with ethyl *p*-aminobenzoate by high-performance liquid chromatography on an amine-bonded vinyl alcohol copolymer column. *J. Chromatogr.* **588**, 53–59 (1991).

11. *Galensa, R.*: Hochleistungs-flüssigchromatographische Bestimmung von Kohlenhydraten mit UV-Detektion im ppm-Bereich in Lebensmitteln II. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **178**, 199–202 (1984).
12. *Muramoto, K., Goto, R. and Kamiya, H.*: Analysis of reducing sugars as their chromophoric hydrazones by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. **162**, 435–442 (1987).
13. *Björkqvist, B.*: Separation and determination of phenyl isocyanate-derivatized carbohydrates and sugar alcohols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. **218**, 65–71 (1981).
14. *Batley, M., Redmond, J.W. and Tseng, A.*: Sensitive analysis of aldose sugars by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **253**, 124–128 (1982).
15. *Zürcher, U.*: Quantitative Bestimmung des mikrobiellen Abbaus verschiedenartiger Nahrungsfasern im Verdauungstrakt des Schweins. Dissertation ETH Zürich, Nr. 9760 (1992).
16. *Schweizerisches Lebensmittelbuch*: Bestimmung der Gesamtnahrungsfasern. Kapitel 22, Methode 8.1. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1991.
17. *Biermann, C.J.*: Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: Biermann, C.J. and McGinnis, G.D. (eds.), Analysis of carbohydrates by GLC and MS, p. 27–41. CRC Press, Boca Raton (USA) 1989.

Dr. Ulrich Zürcher
Clarisse Mühlemann
Prof. Dr. Renato Amadò
Institut für Lebensmittelwissenschaft der
ETH Zürich
Laboratorium für Humanernährung
Seestrasse 72 / Postfach 474
CH-8803 Rüschlikon