

Über Nebenprodukte von D-Galactose in Abhängigkeit von ihrer Herstellung

vorgelegt von
Lebensmittelchemikerin Sabine Baumgart
aus Berlin

Fakultät für Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. D. Knorr
Berichter:	Prof. Dr. rer. nat. W. Baltes
Berichter:	Prof. Dr. rer. nat. L. W. Kroh

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.12.2000

Berlin 2001

D 83

Abstract

BAUMGART, Sabine; Über Nebenprodukte von D-Galactose in Abhängigkeit von ihrer Herstellung

Galactose kann verschiedene Verunreinigungen aus ihrem Herstellungsgang enthalten. Sechs Chargen von pharmazeutischer Qualität (A-F) wurden auf Spuren niedermolekularer und nichtflüchtiger Verunreinigungen untersucht. Einige Nebenprodukte, die in bereits bekannten Abbaureaktionen beschrieben worden waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit in einigen vorhandenen Zwischenprodukten der Hersteller A-C nachgewiesen. Das Hauptanliegen dieser Arbeit war aber, nach Auffindung von Leitsubstanzen deren Bildungswege zu diskutieren und so Rückschlüsse auf technologische Teilprozesse innerhalb der jeweiligen Herstellungsverfahren für Galactose zu ziehen. Die Bedeutendsten wurden dazu einführend beschrieben. Da nach der Galactose-Gehaltsbestimmung mit Hilfe eines HPLC- und eines enzymatischen Verfahrens nur höchstens ein Gewichtsprozent an Verunreinigungen zu erwarten war, wurden geeignete Analysemethoden bzw. Probenaufarbeitungstechniken ausgewählt und weiterentwickelt, die einen Nachweis von Verunreinigungen im Spurenbereich zulassen

Für den Nachweis von Kohlenhydraten kam neben der MALDI-TOF-MS, DC, HPLC/RI vor allem die HPAEC/PED als Analyseverfahren zum Einsatz. Dabei wurden neben 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose, die als Transgalactosylprodukt der β -Galactosidase und damit als Leitsubstanz für die enzymatische Lactosehydrolyse beschrieben wurde (A und B), fünf Verunreinigungen (1-5) in spezifischen Mengenverhältnissen in vier Galactosen beobachtet. Für die Strukturuntersuchung dieser nichtflüchtigen Verbindungen wurde nach deren dünnschichtchromatographischer Isolierung ihre reduktive Spaltung und Messung mittels GC/MS eingesetzt. Die Strukturuntersuchungen ergaben jeweils überlagerte Disaccharide aus Glucose- und Galactosemonomeren in folgenden Mengenverhältnissen: Gal-Gal : Gal-Glu : Glu-Gal = 1 : 1,2 : 1,4. Die Auftretshäufigkeiten und Differenzierungen der Bindungspositionen konnte durch folgende Reihenfolge angegeben werden: 6 Gal (*Pyr* + *Fur*; 47 %) > 6 Glu (*Pyr* + *Fur*; 23 %) > 2 Gal (*Pyr*; 9 %) > 3 Gal (*Pyr*; 9 %) > 4 Glu (*Pyr*; 6 %) > 2 Glu (*Pyr*; 5 %) > 4 Gal (*Pyr*; 1 %). Diese als Reversionszucker diskutierten Verbindungen waren zusammen mit dem Nachweis von 5-Hydroxymethyl-2-furfural, das mit Hilfe von HPAEC/UV bestimmt wurde, und 1,6-Anhydro- β -D-galacto- und -glucopyranose charakteristisch für die Durchführung einer säurekatalysierten Lactosehydrolyse in den Chargen C, D und F. Organische Säuren wurden mit Hilfe der HPICE und HPIC mit Leitfähigkeitsdetektion und einer geeigneten Suppressortechnik bestimmt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde in ausgewählten Fällen die spezifische enzymatische Analyse durchgeführt und ihre Ergebnisse diskutiert. Zur Ergänzung wurde die GC/MS und RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung in ausgesuchten Fällen herangezogen. Aus dieser Substanzklasse sind vor allem Zitronen-, L-Äpfel- und Bernsteinsäure zu nennen, die als Intermediate des Zitratzyklus zusammen mit Glycerin als Nebenprodukt und Phosphat als Hauptmineralstoff der Hefe einen Hinweis auf die Glucosevergärung während des Galactoseherstellungsprozesses in den Chargen A, B, C und D gaben. Das Retentionsverhalten der vorkommenden anorganischen Anionen und aliphatischen Carbonsäuren war auf den Anionenaustauschern sehr ähnlich, so dass diese miterfaßt wurden. Ausgewählte Kationen wurden mit Hilfe der Flammenphotometrie und AAS bestimmt.

Es gelang, jeweils anhand weniger charakteristischer Substanzen den Werdegang der angewandten Galactoseherstellungsverfahren zu rekonstruieren. Daneben wurde der Mechanismus der Entstehung der Nebenprodukte diskutiert.

meinen

Eltern

zum

Dank

gewidmet

Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand bei der Firma Schering AG in Berlin unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Baltes vom Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin und meines Mentors, Herrn Dr. Eck, von der Schering AG Vorort zwischen November 1994 und Juli 1998. Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Baltes und bei Herrn Dr. Eck für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Themas, für die fachliche Betreuung und stets gute Zusammenarbeit im Verlauf der Arbeit. Großer Dank geht an die Firma Schering AG, insbesondere an die Abteilung Corporate Quality Control - Analytische Entwicklung 1 unter der Leitung von Herrn Dr. Mützel, die mich während dieser Zeit finanziell unterstützt hat.

Mein Dank gilt ferner

Herrn Dr. Werra, Herrn Dr. Rau, Herrn Dr. Freyholdt, Herrn Dr. Stein, Herrn Dr. Oberdieck und Herrn Dr. Büche von der Schering AG, die mir die Einarbeitung in das Themengebiet erleichtert haben.

Herrn Scholz und Herrn Baude von der Schering AG für die technische und apparative Hilfe bei GC-, MALDI-TOF-MS- und GC/MS-Messungen.

Herrn Varelmann, Herrn Lungfiel, Herrn Nass von der Schering AG für die Unterstützung bei den flammenphotometrischen und atomabsorptionsspektrometrischen Messungen.

Frau Kapfer von der Schering AG für die Unterstützung bei der automatischen Aminosäure-Analyse.

Herrn Seidel von der Technischen Universität Berlin für die technische und apparative Hilfe bei GC/MS-Messungen.

allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung CQC - Analytische Entwicklung 1 der Firma Schering AG, insbesondere den unmittelbaren Kollegen im Labor für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin, die mir die Bearbeitung des Themas erleichtert haben, insbesondere Herrn Dr. Menzel.

allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Firma Dionex, die mir bei ionenchromatographischen Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Martin, der mich stets unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.1.1	Vorkommen von Galactose.....	1
1.1.2	Bedeutung von Galactose.....	1
1.1.3	Stoffwechsel der Galactose.....	2
1.1.4	Galactosämie.....	3
1.2	Problemstellung und Ziele.....	4
	Theoretischer Teil.....	5
2	Herstellung von Galactose.....	5
2.1	Einsatz von Mikroorganismen-Mutanten.....	9
2.2	Lactosehydrolyse.....	9
2.3	Oxidation der Lactose zu Lactobionsäure und anschließende Hydrolyse.....	12
2.4	Fermentation der Glucose.....	14
2.5	Oxidation der Glucose zu Gluconsäure.....	15
2.6	Trennung der Galactose von Glucose bzw. von Gluconsäure.....	17
2.7	Kristallisation aus der Fermentationskultur.....	18
2.8	Spezielle Aufreinigungsschritte.....	18
2.9	Gewinnung von Galactose aus der Mutterlauge bei der Lactulose-Herstellung.....	18
3	Nebenreaktionen bei der Herstellung von Galactose und weitere Zersetzungsreaktionen.....	21
3.1	Nebenprodukte der enzymatischen Lactosehydrolyse.....	22
3.2	Nebenprodukte der säurekatalysierten Lactosehydrolyse.....	26
3.3	Nebenreaktionen bei der Lactulose-Herstellung.....	28
3.4	Weitere Reaktionen im basischen Milieu.....	31
3.5	Nebenprodukte bei der Glucoseoxidation.....	32
3.6	Weitere Reaktionen unter oxidativen Bedingungen.....	33
3.7	Bildung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural durch Karamelisierung und dessen weiterer Abbau.....	33
3.8	Weitere Reaktionen unter Karamelisierungsbedingungen.....	35
	Experimenteller Teil.....	37
4	Material und Methoden.....	37
4.1	Proben.....	37
4.2	Versuchsbeschreibungen.....	38
4.2.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	38

4.2.1.1	Einsatz von Kationenaustauschern.....	38
4.2.1.1.1	Bestimmung des Galactose-Gehaltes.....	38
4.2.1.1.2	Quantitative Bestimmung von 1,6-Anhydrozuckern neben organischen Säuren..	40
4.2.1.2	Einsatz von Anionenaustauschern.....	40
4.2.1.2.1	Quantitative Bestimmung von Lactose und 1,6-Anhydrozuckern.....	40
4.2.1.2.2	Quantitative Bestimmung von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose.....	42
4.2.1.2.3	Bestimmung der Oxidationsprodukte von Galactose, Glucose und Lactose.....	43
4.2.1.2.4	Bestimmung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF).....	44
4.2.1.2.5	Bestimmung von Tricarbonsäuren neben Phosphat.....	45
4.2.1.2.6	Bestimmung von anorganischen Anionen neben Dicarbonsäuren.....	46
4.2.1.3	Umkehrphasen.....	48
4.2.1.3.1	Bestimmung von 2-Ketocarbonsäuren nach Derivatisierung.....	48
4.2.1.4	Ionenausschlußchromatographie.....	50
4.2.1.4.1	Bestimmung von Glycerin.....	50
4.2.1.4.2	Bestimmung von aliphatischen Carbonsäuren.....	51
4.2.2	Gaschromatographie.....	53
4.2.2.1	Bestimmung des Ethanol-Gehaltes.....	53
4.2.3	Gaschromatographie/Massenspektrometrie.....	54
4.2.3.1	GC/MS-Untersuchungen von aliphatischen Carbonsäuren.....	54
4.2.3.2	GC/MS-Untersuchungen von Kohlenhydrat-Verunreinigungen.....	55
4.2.3.3	Elektronenstoßionisation.....	55
4.2.3.4	Positive Chemische Ionisation.....	55
4.2.3.4.1	Chemische Ionisation mit Methan.....	56
4.2.3.4.2	Chemische Ionisation mit Ammoniak.....	57
4.2.4	Dünnschichtchromatographie.....	57
4.2.5	Enzymatische Bestimmungen.....	59
4.2.5.1	Galactose-Gehalt.....	59
4.2.5.2	Organische Säuren.....	59
4.2.6	Matrix assoziierte Laserdesorptionsionisation – Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).....	61
4.2.7	Karl-Fischer-Titration.....	62
4.2.8	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
4.2.9	Photometrische Bestimmung.....	64
4.2.10	Automatische Aminosäureanalyse.....	65
4.2.11	Atomabsorptionsspektrometrie.....	65
4.2.12	Flammenphotometrie.....	66
4.3	Spezielle Probenvorbereitungen.....	66
4.3.1	Lactosehydrolyse.....	66
4.3.2	Isolierung von Verunreinigungen durch Dünnschichtchromatographie.....	67
4.3.2.1	für MALDI-TOF-MS-Analyse.....	67

4.3.2.2	für die ionenchromatographische Untersuchung vor und nach einer Säurehydrolyse.....	67
4.3.2.3	Derivatisierung der Kohlenhydrate für die GC/FID- und GC/MS-Analyse.....	68
4.3.3	Derivatisierung der Carbonsäuren.....	69
4.3.3.1	Derivatisierung mit Bortrifluorid/Methanol und anschließende Acetylierung.....	69
4.3.3.2	Derivatisierung mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB).....	70
5	Ergebnisse und Diskussion von Analysenverfahren.....	71
5.1	<u>Kohlenhydrate</u>	71
5.1.1	Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte.....	73
5.1.2	Galactose-Gehalte in den Endprodukten.....	76
5.1.3	Charakterisierung der Mutterlaugen mittels MALDI-TOF-MS.....	76
5.1.4	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mittels Dünnschichtchromatographie.....	78
5.1.4.1	Charakterisierung des dünn-schichtchromatographischen Systems.....	78
5.1.4.2	Qualitative Ergebnisse.....	78
5.1.5	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Kationenaustauschersäule.....	79
5.1.5.1	Charakterisierung des Analysenverfahrens.....	79
5.1.5.2	Ergebnisse und Diskussion.....	80
5.1.6	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mit Hilfe der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie.(HPAEC).....	82
5.1.6.1	Charakterisierung des Analysenverfahrens.....	82
5.1.6.2	Ergebnisse und Diskussion.....	83
5.1.7	Strukturuntersuchungen von Kohlenhydrat-Verunreinigungen.....	87
5.1.7.1	Lactosehydrolyse.....	87
5.1.7.2	Behandlung von Galactose und Glucose unter säurehydrolytischen Bedingungen.....	87
5.1.7.3	Isolierung von Kohlenhydrat-Verunreinigungen.....	88
5.1.7.4	Säurehydrolyse der Verunreinigungen.....	88
5.1.7.5	GC/FID und GC/MS-Untersuchungen von Verunreinigungen.....	89
5.1.7.5.1	Derivatisierungsmethoden.....	89
5.1.7.5.2	Auswertung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten permethylierter Verunreinigungen.....	90
5.1.7.5.3	CH ₄ -CI-Spektren der permethylierten Verunreinigungen.....	92
5.1.7.5.4	Auswertung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten der permethylierten, reduktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen.....	96
5.1.7.5.5	NH ₃ -CI-Spektren der permethylierten, reduktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen.....	97
5.1.7.5.6	EI-Spektren von permethylierten, reduktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen.....	97
5.1.7.5.7	Interpretation der Ergebnisse.....	99

5.2	<u>Organische Säuren</u>	102
5.2.1	Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte.....	104
5.2.2	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mit Hilfe eines Ionenausschlußverfahrens (HPICE).....	107
5.2.2.1	Charakterisierung des Analysenverfahrens.....	107
5.2.2.2	Ergebnisse.....	109
5.2.3	GC/FID und GC/MS-Untersuchungen.....	110
5.2.3.1	Derivatisierung.....	110
5.2.3.2	CH ₄ -CI-Spektren von methylierten und acetylierten organischen Säuren.....	111
5.2.3.3	EI-Spektren von methylierten und acetylierten organischen Säuren.....	111
5.2.3.4	Auswertung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten der methylierten und acetylierten organischen Säuren.....	119
5.2.4	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Ionenaustauschersäule von mittlerer bis niedriger Hydrophobizität.....	120
5.2.4.1	Charakterisierung des Ionenaustauschverfahrens (HPIC).....	120
5.2.4.2	Ergebnisse.....	121
5.2.5	Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Ionenaustauschersäule von sehr niedriger Hydrophobizität.....	122
5.2.5.1	Charakterisierung des Ionenaustauschverfahrens.(HPIC).....	122
5.2.5.2	Ergebnisse.....	123
5.2.6	Enzymatische Bestimmungsverfahren ausgewählter organischer Säuren.....	123
5.2.7	RP-HPLC-Verfahren zur Bestimmung von α -Ketosäuren in den Mutterlaugen.....	124
5.2.7.1	Derivatisierung.....	124
5.2.7.2	Ergebnisse.....	125
5.2.8	Bestimmung von Zuckersäuren.....	126
5.2.9	Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse von organischen Säuren und deren Diskussion.....	127
5.3	<u>Kationen und Anionen</u>	136
5.3.1	Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte.....	136
5.3.2	Bestimmung von Phosphat mittels Ionenaustauschchromatographie.....	143
5.4	<u>Proteine und Aminosäuren</u>	144
5.5	<u>Glycerin</u>	146
5.5.1	Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte.....	146
5.6	<u>5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)</u>	148

5.7	<u>Ethanol und Wasser</u>	149
6	Analysengestützte Hinweise auf die Herstellungsverfahren	150
6.1	Betrachtung der 1. Mutterlaugen aus den Galactose-Herstellungen C und A.....	150
6.1.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der 1. Mutterlaugen nach A und C.....	157
6.2	Beurteilung der Endprodukte der Galactose-Herstellungen C, A, B, D, F, E.....	159
7	Zusammenfassung der Ergebnisse	167
8	Anhang	170
	Abkürzungsverzeichnis.....	170
	Anhang 0 Kohlenhydratanalytik.....	173
	Anhang I Analytik der organischen Säuren.....	175
	Anhang II Analytik der Kationen und Anionen.....	184
	Anhang III Analytik von Aminosäuren.....	186
	Anhang IV Analytik von Glycerin.....	186
	Anhang V Analytik von HMF.....	187
	Anhang VI pH-Wert.....	187
	Anhang VII Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten.....	188
9	Literaturverzeichnis	189
10	Lebenslauf	197

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Vorkommen von Galactose

Das Monosaccharid D-Galactose tritt in der Natur nicht in freier Form auf, sondern nur gebunden in verschiedenen Oligo- und Polysacchariden, aber auch in Lipiden und Proteinen. Die D-Galactose kommt hauptsächlich im Disaccharid Lactose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucopyranose) vor, die in tierischer Milch zwischen 4 - 5 % enthalten ist. Daneben findet man D-Galactose im Trisaccharid Raffinose (Galp (α 1 \rightarrow 6) Glcp (α 1 \rightarrow 2 β) Fru), die in Sorghum (Mohrenhirse) und Weizen (ganzes Korn) zu ca. 0,2 % und in der Zuckerrübe in noch kleineren Mengen vorkommt. Im Tetrasaccharid Stachyose (Galp (α 1 \rightarrow 6) Galp (α 1 \rightarrow 6) Glcp (α 1 \rightarrow 2 β) Fru) sind zwei Moleküle Galactose gebunden, welches wiederum in größeren Mengen in Leguminosen-Samen vorhanden ist. D-Galactane sind Polysaccharide, in denen D-Galactose als Zuckereinheit dominiert. Derartige Hemicellulosen sind als Gerüstsubstanz am Aufbau der pflanzlichen Zelle beteiligt. In anderen Polysacchariden, beispielsweise den Pflanzengummis, sind D-Galactosebausteine mit anderen Zuckereinheiten unterschiedlich verknüpft. Zu dieser Gruppe gehören Gummiarabicum, Agar Agar, Carrageenan, Guarmehl, Johannisbrotkernmehl u. a. (Richter 1988), (Baltes 2000).

1.1.2 Bedeutung von Galactose

Die Einsatzmöglichkeit von D-Galactose als Süßungsmittel hat lebensmitteltechnologisch nur eine geringe Bedeutung, da der relative Süßwert einer 10%igen Lösung nur bei 63, bezogen auf Saccharose 100, liegt. Im Vergleich dazu beträgt der relative Süßwert einer gleichwertigen Lösung von D-Glucose 69 und von D-Fructose 114 (Belitz und Grosch 1992).

Die orale Zufuhr von Galactose hat einen schnellen Anstieg des Blutzuckerspiegels und Insulinsekretion zur Folge, da Galactose sehr schnell in Glucose überführt wird und diese direkt in den insulinabhängigen Energiestoffwechsel geht (siehe Abb. 1-1). Galactose und Lactose sind daher aus ernährungsphysiologischer Sicht für Diabetiker-Produkte nicht geeignet (Belitz und Grosch 1992).

Eine indirekte Bedeutung gewinnt D-Galactose mit der Stoffwechselstörung vieler Menschen, besonders in Afrika, Asien (85 - 100 %) und den Mittelmeerländern, Lactose zu metabolisieren (Krämer 1992). Diese Lactoseintoleranz beruht auf das Fehlen bzw. einen Mangel an Aktivität der in der Darmmucosa lokalisierten β -D-Galactosidase, die Lactose in ihre Monosaccharide zerlegt. Demzufolge wird Lactose nicht resorbiert, sondern teilweise mit dem Stuhl ausgeschieden oder von den im Dickdarm angesiedelten Mikroorganismen umgesetzt, was wiederum zu Verdauungsstörungen führt. Die Lactoseintoleranz ist meist erblich bedingt, kann aber auch durch die Erkenntnis der Geriatrie erst im fortgeschrittenen Alter auftreten. Im Säuglingsalter ist sie sogar lebensgefährlich, da Lactose als einziges Nahrungskohlenhydrat in der Muttermilch enthalten ist (Ketz und Baum 1986). International wird deshalb durch enzymatische

Vorbehandlung Galactose enthaltene Milch bzw. Milchpulver angeboten, die von den Personen, die an dieser enzymatischen Defizienz leiden, vollständig verwertet werden können. Ein weiterer Grund für die Anwendung der Lactosehydrolyse ist die geringe Löslichkeit der Lactose, die sich in Magermilchkonzentraten, bei Eiskrem und Süßwaren mit hohem Milchanteil wegen der sandigen Textur störend bemerkbar machen kann (Zarate und Lopez-Leiva 1990).

Während Galactose in der Lebensmittelindustrie eher eine geringe Bedeutung besitzt, wird dieser Zucker auf dem pharmazeutischen Sektor zunehmend zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Da 90 - 95 % der Galactose in der Leber metabolisiert werden, wird Galactose zur Überprüfung der Leberfunktion in größeren Mengen peroral oder intravenös (0,5 g/kg KG) verabfolgt. Im Gegensatz zu Gesunden erscheint Galactose bei Personen mit Leberschäden im Harn oder bleibt längere Zeit im Blut (Yoa-Pu Hu, Hu et al. 1995).

Daneben ist Galactose als arzneilich wirksamer Bestandteil in Ultraschallkontrastmitteln enthalten, die für die Sterilitätsdiagnostik, vor allem zur Überprüfung der Durchgängigkeit der Eileiter, und für die Diagnostik von Herzerkrankungen zugelassen sind. Für die letztere Untersuchung wird das D-Galactose-Granulat, das ein Aggregat aus feinen D-Galactosemikropartikeln von charakteristischer Oberflächenstruktur darstellt, unmittelbar vor der intravenösen Indikation mit Wasser oder mit einer 20%igen Galactose-Lösung suspendiert. Das Suspensionsmedium enthält noch nicht vollständig aufgelöste Galactose-Mikropartikel (kleiner als menschliche Erythrozyten) mit einer großen Oberfläche, die adhärent gebundene, feinste Luftbläschen tragen (Speck 1991). Diese wiederum bewirken eine Signalverstärkung bei dopplersonographischen Untersuchungen, die auf dem Prinzip der Frequenzverschiebung rückgestrahlter Schallwellen an den Erythrozyten gegenüber eingestrahltten Wellen beruht.

1.1.3 Stoffwechsel der Galactose

Der Stoffwechsel der Galactose beim Menschen wird durch den aktiven Transport über einen Natrium-unabhängigen Träger durch die Zellmembran eingeleitet. Die Phosphorylierung zu Galactose-1-Phosphat erfolgt unter Einwirkung von Galactokinase und in Anwesenheit von ATP und Magnesium-Ionen vorwiegend in der Leber (siehe Abb. 1-1). Im nächsten Schritt, der von der Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase katalysiert wird, wird der Uridinmonophosphat-Rest von UDP-Glucose auf Galactose-1-Phosphat übertragen. Die neben Glucose-1-Phosphat entstandene UDP-Galactose kann durch die UDP-Galactose-4-Epimerase wieder in UDP-Glucose umgewandelt werden. Durch die Kombination der Galactokinase, UMP-Transferase und 4-Epimerase wird Galactose zu Glucose-1-Phosphat phosphoryliert, das wiederum enzymatisch mit UTP zu UDP-Glucose reagieren kann. Glucose-1-Phosphat kann aber auch über die Glucose-Phosphat-Mutase zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt werden. Galactose findet somit über Glucose-6-Phosphat Anschluß an die Glycolyse und Gluconeogenese, über UDP-Glucose an die Glycogen-Synthese (Karlson 1988).

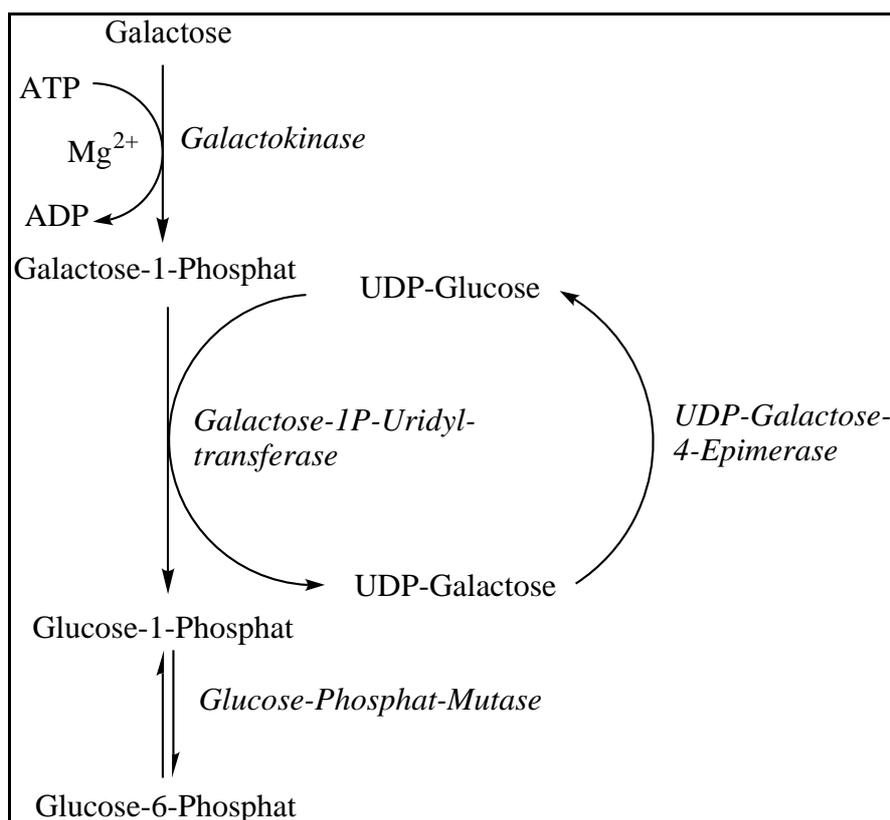


Abb. 1-1: Galactosestoffwechsel

1.1.4 Galactosämie

Unter dem Begriff Galactosämie werden unterschiedliche autosomal rezessiv vererbliche Galactosestoffwechselstörungen zusammengefaßt, die durch verschiedene Enzymdefekte verursacht werden. Bei der "klassischen Galactosämie" ist keine Aktivität des Enzyms Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase meßbar. Im Blut sind daher die Werte von Galactose und Galactose-1-Phosphat und im Urin von Galactose stark erhöht. Die Häufigkeit dieser Stoffwechselkrankheit liegt zwischen 1:30.000 und 1:60.000. Wesentlich seltener wird der Galactokinase-Defekt festgestellt, deren Häufigkeit zwischen 1:37.000 und 1:100.000 und weniger schwankt. Dabei kann Galactose nicht phosphoryliert werden. Demzufolge werden im Urin etwa 80 % Galactose und Dulcitol ausgeschieden. Beim noch seltener auftretenden UDP-Galactose-4-Epimerase-Mangel wird ebenfalls Galactose-1-Phosphat angehäuft. Der Enzymdefekt ist in den Erythrozyten nachweisbar. Galactose-1-Phosphat wirkt inhibierend auf andere Stoffwechselwege und hemmt wahrscheinlich die Enzyme Glucose-Phosphat-Mutase, Pyrophosphorylase und andere Phosphorylasen, so dass gefürchtete Hypoglykämien entstehen können. Es treten meist irreversible Schäden vor allem in der Leber, im Gehirn, in der Niere und Augenlinse auf. In besonders schweren Fällen kann der Tod in den ersten Lebenswochen nach der Geburt eintreten. Sowohl beim Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase- als auch beim Galactokinase-Defekt kann das Enzymmolekül immunologisch nachgewiesen werden. Es unterscheidet sich jedoch vom aktiven Enzym durch geringfügige Mutationen (Hornborstel, Kaufmann et al. 1992).

1.2 Problemstellung und Ziele

Galactose ist als arzneilich wirksamer Bestandteil im Fertigpräparat enthalten oder wird als Rohstoff für die Produktion diagnostizierender Mittel eingesetzt.

Rohstoffe müssen in der Eingangskontrolle spezifizierte Qualitätsanforderungen erfüllen. Neben der Prüfung der Identität und der Bestimmung des Rohstoff-Gehaltes ist das Wissen über verbleibende Verunreinigungen, die herstellungsbedingt sind, notwendig, da sie Störungen in der weiteren Verarbeitung hervorrufen können. Allgemein können Verunreinigungen aus dem Rohstoff selbst, durch den Eintrag von Hilfsstoffen während des Herstellungsprozesses, durch ihre Bildung in Nebenreaktionen bzw. durch Abbau- und Zersetzungsreaktionen während der Herstellung und Sterilisierung und/ oder Lagerung im Fertigpräparat enthalten sein. Dabei wird zwischen den unbekanntem oder bekannten organischen Verunreinigungen und den meist aus dem Herstellungsprozess ableitbaren anorganischen Verunreinigungen und Lösungsmitteln unterschieden.

Bei der Zulassung von Arzneimitteln muß der Nachweis der Qualität, der Wirksamkeit und der Unbedenklichkeit erbracht werden. Daneben haben pharmazeutische Hersteller eine gleichbleibende Qualität ihrer Produkte aller Herstellungschargen sicherzustellen, so dass der Qualitätsendkontrolle eine besondere Bedeutung zukommt. Um eine gleichbleibende Qualität der Fertigpräparate zu garantieren, werden während der Entwicklungsphase Spezifikationsgrenzwerte für den Wirkstoff und für Verunreinigungen unter Berücksichtigung der Stabilitätsstudien und technologischer Faktoren festgelegt, die stets eingehalten werden müssen. Die Bestimmung von Verunreinigungen im Fertigpräparat ist jedoch limitiert durch die dem neuesten Stand der Wissenschaft und Technik angepaßten analytischen Untersuchungsmethoden.

In dieser Arbeit sollen zunächst alle technologisch und wirtschaftlich wichtigen Galactose-Herstellungsprozesse zusammenfassend dargestellt werden. Anhand der Verfahrensschritte und der bisherigen Kenntnisse über Zuckerabbau und Umlagerungsreaktionen sollen theoretisch mögliche, vorwiegend nichtflüchtige, Verunreinigungen in der Galactose pharmazeutischer Qualität verschiedener Hersteller analytisch bis in den Spurenbereich durch Methodenentwicklung und -optimierung präziser und robuster Verfahren untersucht werden. Für jede Herstellung soll ein Verunreinigungsmuster der Endprodukte erstellt und unter dem qualitativen und quantitativen Aspekt miteinander verglichen werden. Ziel der Arbeit ist es, charakteristische Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Verunreinigungsmuster der Galactosen der verschiedenen Hersteller gegenüberzustellen. Dabei stellt sich die Frage, ob es innerhalb eines Herstellprozesses Leitsubstanzen gibt, die Rückschlüsse auf bestimmte technologische Schritte zulassen. Aufbauend darauf soll diskutiert werden, ob und inwieweit eine Unterscheidung der jeweiligen Galactose-Herstellungsprozesse anhand der Verunreinigungsmuster mehrerer vorliegender Galactose-Endprodukte möglich ist.

Ein weiterer Anspruch der Arbeit besteht darin, die Herkunft bzw. den Bildungsweg einzelner Verunreinigungen aufzudecken bzw. zu postulieren. Es soll dabei geklärt werden, inwieweit chemische Prozesse, insbesondere Umlagerungsreaktionen u. ä., eine Rolle spielen. Dafür stehen Zwischenprodukte einiger Herstellungsprozesse zur Verfügung, deren zu identifizierende Verunreinigungen einen unterstützenden Hinweis auf die jeweilige Herstellungsart liefern und gleichzeitig den Einfluß der einzelnen Herstellungsschritte auf die Qualität des Endproduktes zeigen sollen.

Theoretischer Teil

2 Herstellung von Galactose

Ausgangsstoff für die Herstellung von Galactose ist hauptsächlich Molke, die neben Proteinen und Mineralstoffen Lactose zwischen 3 und 5 % enthält. Molke ist ein in erheblichen Mengen anfallendes Abfallprodukt bei der Käseherstellung und ein nicht unbeträchtlicher Verschmutzungsfaktor für die Umwelt, wenn sie in Vorflutern von Molkereien abgegeben wird (Galzy und J. 1975; Dahlgren und Ake 1978). Bislang wurde Molke als praktisch unverwertbares Nebenprodukt angesehen. In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend daran gearbeitet, aus Molke interessante und unmittelbar marktfähige Produkte zu erzeugen. Daneben gibt es aber auch Bemühungen Galactose aus pflanzlichen Rohstoffen wie Caschewnußschalen, ebenfalls ein Abfallprodukt, und aus *Aegle marmelos*-Früchten herzustellen (Banerji und Das Asist 1978)]. Für die Herstellung von Galactose pharmazeutischer Qualität sollte jedoch Lactose mit gleicher Qualität als Ausgangsprodukt eingesetzt werden, die ihrerseits ebenfalls aus Molke gewonnen wird (Heiss 1991).

Wie in den Abbildungen 2-1 und 2-2 dargestellt, kann die Galactose-Herstellung allgemein in zwei Teilprozesse gegliedert werden. Im ersten Abschnitt wird das Disaccharid Lactose durch Anwendung verschiedener Verfahren in seine Monomere überführt. Nach einer säure- oder enzymkatalysierten Hydrolyse liegen D-Galactose und D-Glucose nebeneinander vor (siehe Punkt 2.2). Lactose kann aber auch über Lactobionsäure als Zwischenstufe zu D-Glucose in Form ihrer Aldonsäure und D-Galactose umgesetzt werden (siehe Punkt 2.3). Das vorrangig auftretende Nebenprodukt wird somit in eine Form gebracht, die im zweiten Abschnitt der Galactose-Herstellung durch verschiedene Möglichkeiten effektiv von der Galactose abgetrennt werden kann. Das älteste technologische Verfahren, um D-Glucose aus einem Prozess zu entfernen, besteht in der Vergärung zu Ethanol und Kohlendioxid (siehe Punkt 2.4). Es gibt jedoch inzwischen Ansätze zur Trennung von Galactose und Glucose durch Kristallisation und Chromatographie (siehe Punkt 2.6). Glucose kann aber auch zu Gluconsäure oxidiert werden, wobei der Vorteil in einer verbesserten Abtrennung von Galactose aus einer derartigen Mischung liegt (siehe Punkt 2.5 und 2.6). Durch integrierte oder nachfolgende Aufreinigungsschritte wie Anionen- und Kationenaustauscher-, Aktivkohlebehandlung, Destillation, Ultra- und Sterilfiltration wird letztendlich eine Galactose von pharmazeutischer Qualität erzielt (siehe Punkt 2.8).

Bei einem mikrobiellen Verfahren, das auf dem Einsatz von Mikroorganismenmutanten basiert, wird neben Galactose kein weiteres Produkt aus Lactose gebildet (siehe Punkt 2.1). Somit könnten je nach Ausgangsstoff erhebliche Kosten, die durch aufwendige Verfahren zur Beseitigung eines Nebenproduktes verursacht werden, eingespart werden.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Galactose aus der Mutterlauge bei der Lactulose-Herstellung zu gewinnen (siehe Punkt 2.9). Die Epimerisierung der Lactose zu Lactulose findet meist im alkalischen Milieu mit Hilfe von verschiedenen Katalysatoren statt. Die dabei ablaufenden Neben- und Zersetzungsreaktionen führen zu 3 - 14 Gew.% Galactose im Lactulosesirup. Diese kann möglicherweise nach Kristallisation der Lactulose oder der Lactose chromatographisch von anderen Kohlenhydraten abgetrennt werden (siehe Abb. 2-3).

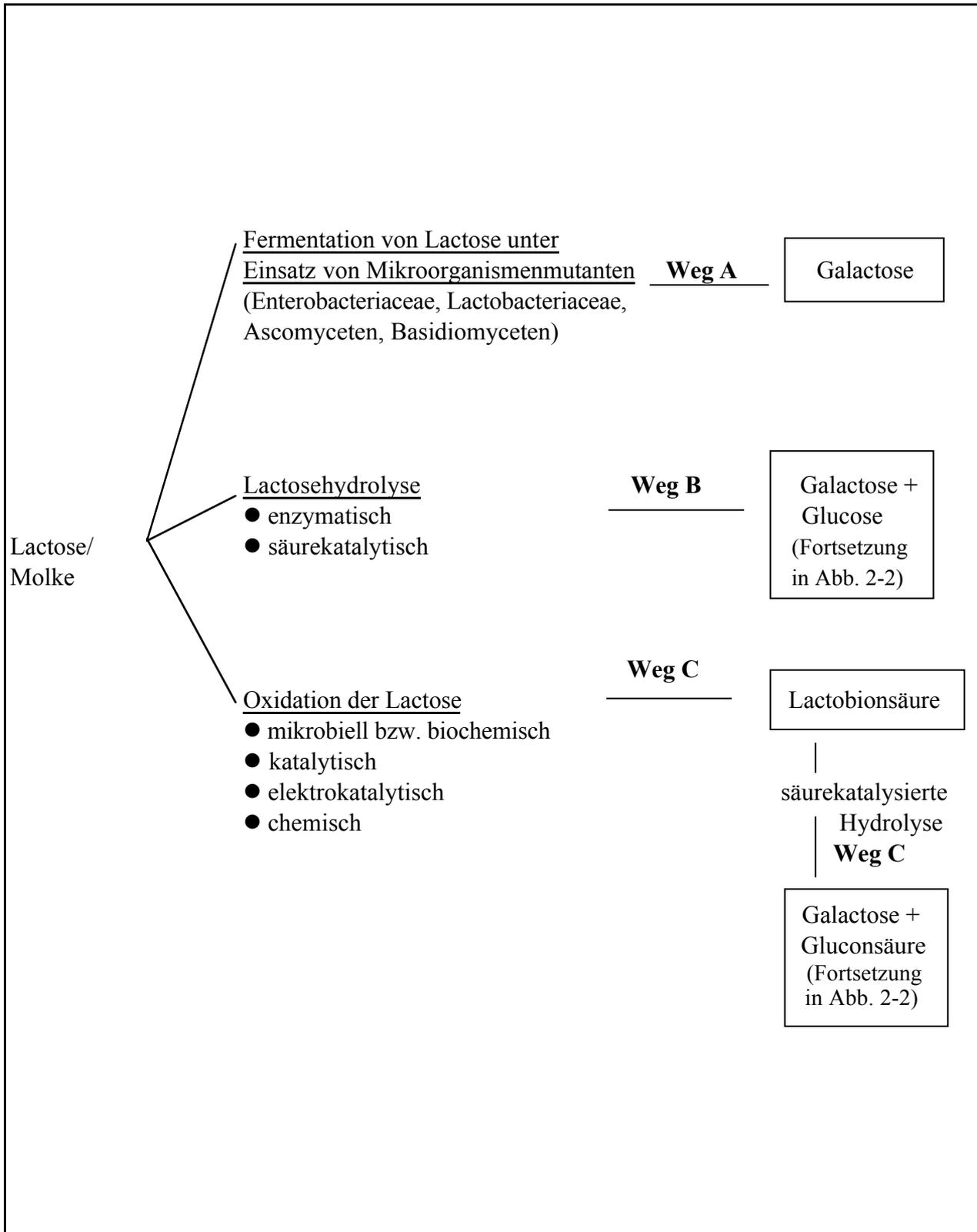


Abb. 2-1: Übersicht über Herstellungsprozesse von Galactose - Teil 1

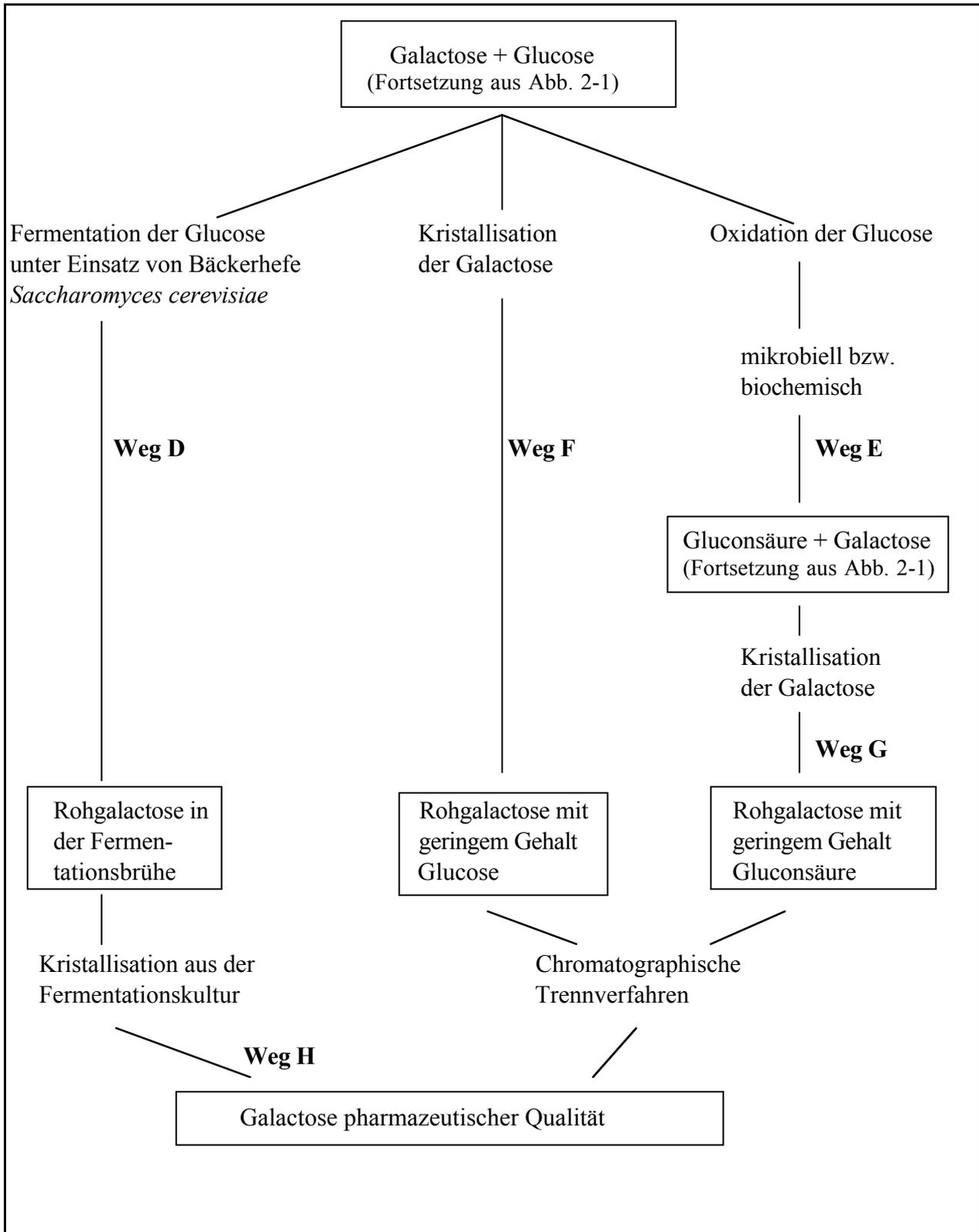


Abb. 2-2: Übersicht über Herstellungsprozesse von Galactose - Teil 2

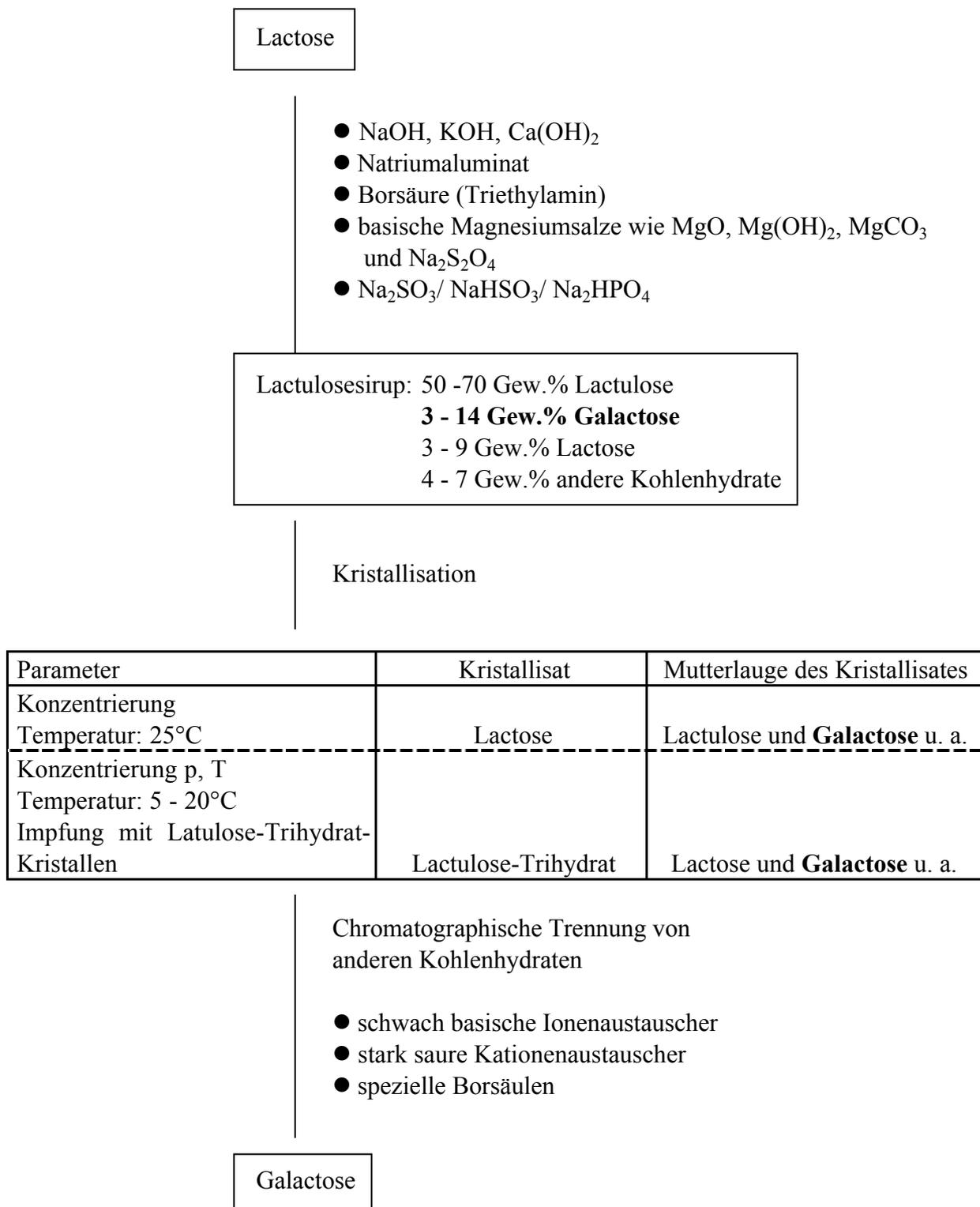


Abb. 2-3: Mögliche Gewinnung von Galactose bei der Lactulose-Herstellung

2.1 Einsatz von Mikroorganismen-Mutanten (Weg A in Abb. 2-1)

Durch gezielte Mutation und Selektion von bestimmten Mikroorganismen entfällt die aufwendige Abtrennung von Glucose als Nebenprodukt aus dem Lactosehydrolysat. Im allgemeinen sind Mikroorganismen mit einer β -Galactosidase-Aktivität auch enzymatisch zur Umwandlung der Galactose ausgerüstet. Nach Penetration der Galactose durch eine Permease wird Galactose bei den Mikroorganismen, in gleicher Weise wie beim Menschen in der Leber, metabolisiert (siehe Abb. 1-1). Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die verschiedenen Etappen bis zur Bildung von Glucose-1-Phosphat durch ein einziges Gen kontrolliert werden. Durch gezielte Mutation dieses Genes, die die Uridyl-Transferase-Aktivität unterbindet, wird ein Mikroorganismus-Stamm erhalten, der über eine β -Galactosidase verfügt, aber keine Galactose verwerten kann (Galzy und J. 1975).

Verfahren beschreiben die Vergärung lactosehaltiger Lösungen wie Milch oder Molke mit nicht pathogenen Mikroorganismus-Mutanten, beispielsweise Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae oder der Lactobacteriaceae und einigen Hefen wie Ascomyceten oder Basidiomyceten. Bei der Verwendung von Hefen und bei starker Belüftung des Gärmediums wurden dabei im Vergleich zur Fermentation mit Bakterien keine Nebenprodukte nachgewiesen. Nach der Fermentation wird lediglich die Mikroorganismen-Masse von der galactosehaltigen Lösung abgetrennt (Galzy und J. 1975).

2.2 Lactosehydrolyse (Weg B in Abb. 2-1)

Die Hydrolyse von Lactose erfolgt entweder mit Hilfe von Enzymen oder durch Mineralsäuren.

● *Enzymatische Lactosehydrolyse*

β -Galactosidase spaltet Lactose spezifisch an der Stelle, an der die β -glycosidische Hydroxyl-Gruppe der D-Galactose mit der alkoholischen Gruppe am C-Atom 4 der D-Glucose verknüpft ist. Glycosidasen katalysieren neben der Hydrolyse auch Transferreaktionen (siehe Abb. 2-4). Die Hydrolysereaktion erfolgt nach dem SN_2 -Mechanismus. Die β -Galactosidase hat zwei funktionelle Gruppen auf der aktiven Seite. Das Stickstoff-Atom mit seinem freien Elektronenpaar greift nucleophil das C-Atom 1 der Galactosyl-Gruppe an, um diese zu binden. Die Sulfhydryl-Gruppe agiert als Säure und protoniert das galactosydisch gebundene Sauerstoffatom. Es wird vorübergehend ein Enzym-Galactose-Komplex gebildet. Das Sulfhydryl-Anion kann nun als agierende Base ein Proton vom Wasser aufnehmen und erleichtert somit den Angriff der Hydroxyl-Gruppe auf das C-Atom 1 der Galactosyl-Gruppe. Wird dagegen ein Proton einer Hydroxylgruppe eines Zuckerrestes aufgenommen, so können neben Galactose Di- oder höhere Oligosaccharide gebildet werden (Zarate und Lopez-Leiva 1990).

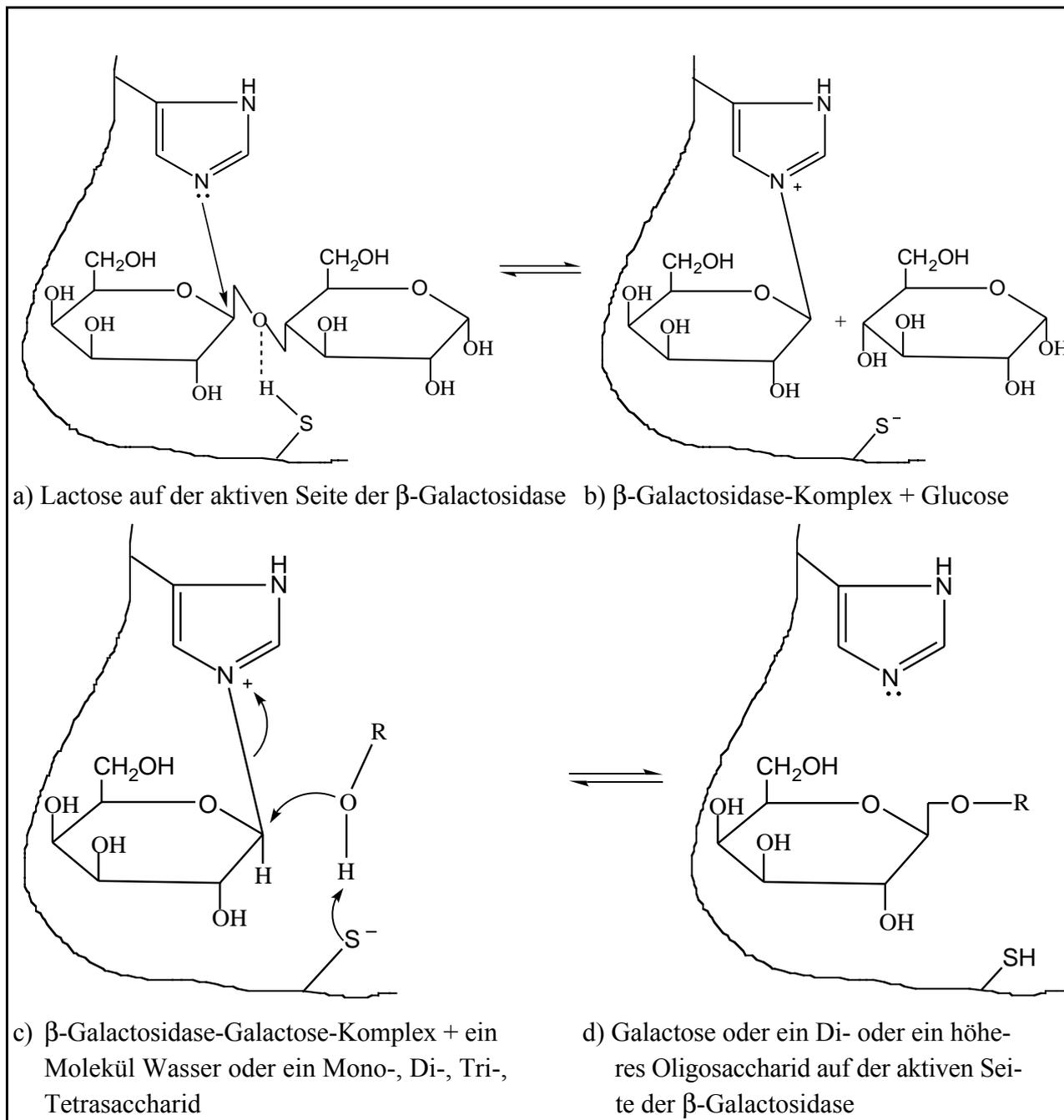


Abb. 2-4: Vorgeschlagener Mechanismus der Lactosehydrolyse mit Hilfe von β -Galactosidase von (Shukla 1975) aus (Zarate und Lopez-Leiva 1990)

Die Kinetik der Lactosehydrolyse ist ausreichend untersucht. Das Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produkthemmung durch Galactose ist das am meisten in der Literatur Beschriebene (Yang and Okos 1989). Daneben wird ein reversibles Reaktionsmodell vorgeschlagen, das die Mutarotation von β -Galactose zu α -Galactose berücksichtigt (Flaschel, Raetz et al. 1982). Weiterhin wird ein kinetisches Modell für die simultan ablaufenden Reaktionen der Lactosehydrolyse und der Oligosaccharid-Bildung vorgestellt (Yang und Tang 1988).

Das für die Lactosehydrolyse verantwortliche Enzym, die β -Galactosidase, kann aus zahlreichen Mikroorganismen wie *Streptococcus thermophilus* (Smart 1991), *Aspergillus niger* (Yang und Okos 1989), (Flaschel, Raetz et al. 1982), *Aspergillus oryzae* (Yang und Okos 1989), *Candida pseudotropicalis* (Jeon und Mantha 1985), *Kluyveromyces lactis* (Jeon und Mantha 1985), *Bacillus circulans* (Mozaffar, Nakanishi et al. 1985), *Escherichia coli* (Zarate und Lopez-Leiva 1990) u. a. isoliert werden. Bei der Auswahl der geeigneten β -Galactosidase sind einige Faktoren wie Enzymaktivität, pH- und Temperaturoptimum, Substratkonzentration sowie die Bildung von Oligosacchariden durch Transferase-Reaktionen zu beachten.

In der Literatur ist die Lactosehydrolyse mit verschiedenen Enzymquellen, Ausgangsmedien wie Milch, Magermilch, Sauermolke und Lactose-Pufferlösungen (4 - 50%ig) bei einem pH-Wert von ca. 6 und Temperaturen zwischen 30 und 40°C beschrieben (Zarate und Lopez-Leiva 1990). Dabei sind die Lactasen von *Aspergillus niger* und - *oryzae* aufgrund ihres sauren pH-Optimums (3,5 - 4,5) und ihrer relativ hohen Temperaturstabilität (55°C) von großem Interesse (Yang und Okos 1989).

● Säurekatalytische Lactosehydrolyse

Eine glycosidische Bindung wie sie in der Lactose vorliegt, kann mit Hilfe von Mineralsäuren hydrolytisch gespalten werden. Die Ausnutzung dieser Reaktion im technischen Maßstab ist im Vergleich zur enzymatischen Methode wesentlich kostengünstiger.

Die Säurehydrolyse der Glycoside kann in drei Reaktionsschritten beschrieben werden. Dabei bildet sich zunächst die konjugierte Säure, wobei das Katalysatorproton mit dem glycosidischen Sauerstoff oder mit dem Ringsauerstoff der Glycosylgruppe in Wechselwirkung tritt. Im zweiten Schritt wird die C-O-Bindung gespalten, es bildet sich ein Carbeniumkation (Reaktionsweg A, B, D in Abb. 2-5) bzw. das Oxoniumkation (Reaktionsweg C in Abb. 2-5). Nach dem Reaktionsweg A wird ein Aglykonylkation gebildet. Die Reaktion ist bereits im monomolekularen Schritt beendet. Der Reaktionsweg B beschreibt hingegen die Spaltung der Glycosidbindung, wobei ein zyklisches Carbeniumkation und der Aglykonalkohol gebildet wird. Wird hingegen zuerst der Ringsauerstoffs protoniert, so kann es nach dem Reaktionsweg C zur Bildung eines zyklischen Oxoniumkations kommen. Erfolgt die Spaltung nach dem Reaktionsweg D, so entsteht ein offenkettiges Carbeniumkation, wobei die glycosidische Bindung noch nicht gespalten wird. Im letzten Schritt verursacht das Carbeniumkation eine Heterolyse eines Wassermoleküls, und es bildet sich das Endprodukt (Szejtli 1976).

Von entscheidender Bedeutung ist die Wahl der einzusetzenden Säure, meistens Salz- oder Schwefelsäure, da ihre katalytische Wirkung bei der Hydrolyse aufgrund der unterschiedlichen Ladungsverhältnisse der Ionen differiert. Daneben ist die Aktivität des Katalysators von äußeren Reaktionsbedingungen wie Temperatur und seiner Konzentration abhängig. Bei der mit verdünnten Säuren durchgeführten Hydrolyse ist die Reaktionsgeschwindigkeit in einem engen Intervall der Säurekonzentration annähernd proportional. Im Fall höherer Säurekonzentrationen ist dagegen eine erhebliche Abweichung von der Linearität festgestellt worden. Diese Beobachtung wird durch das Vorliegen undissoziierter Säuremoleküle in konzentrierten wäßrigen Lösungen begründet (Szejtli 1976).

Im Gegensatz zu dem enzymatischen Verfahren können abweichend von der Hauptreaktion, der Hydrolyse, viele Nebenreaktionen im sauren Medium ablaufen (siehe Abschnitt 3). Durch

Variation der Säurekonzentration, Temperatur und Reaktionsdauer können jedoch optimale Bedingungen eingestellt werden, bei denen die Wirkung von Nebenreaktionen im Vergleich zur Hydrolysegeschwindigkeit am geringsten ist (Szejtli 1976).

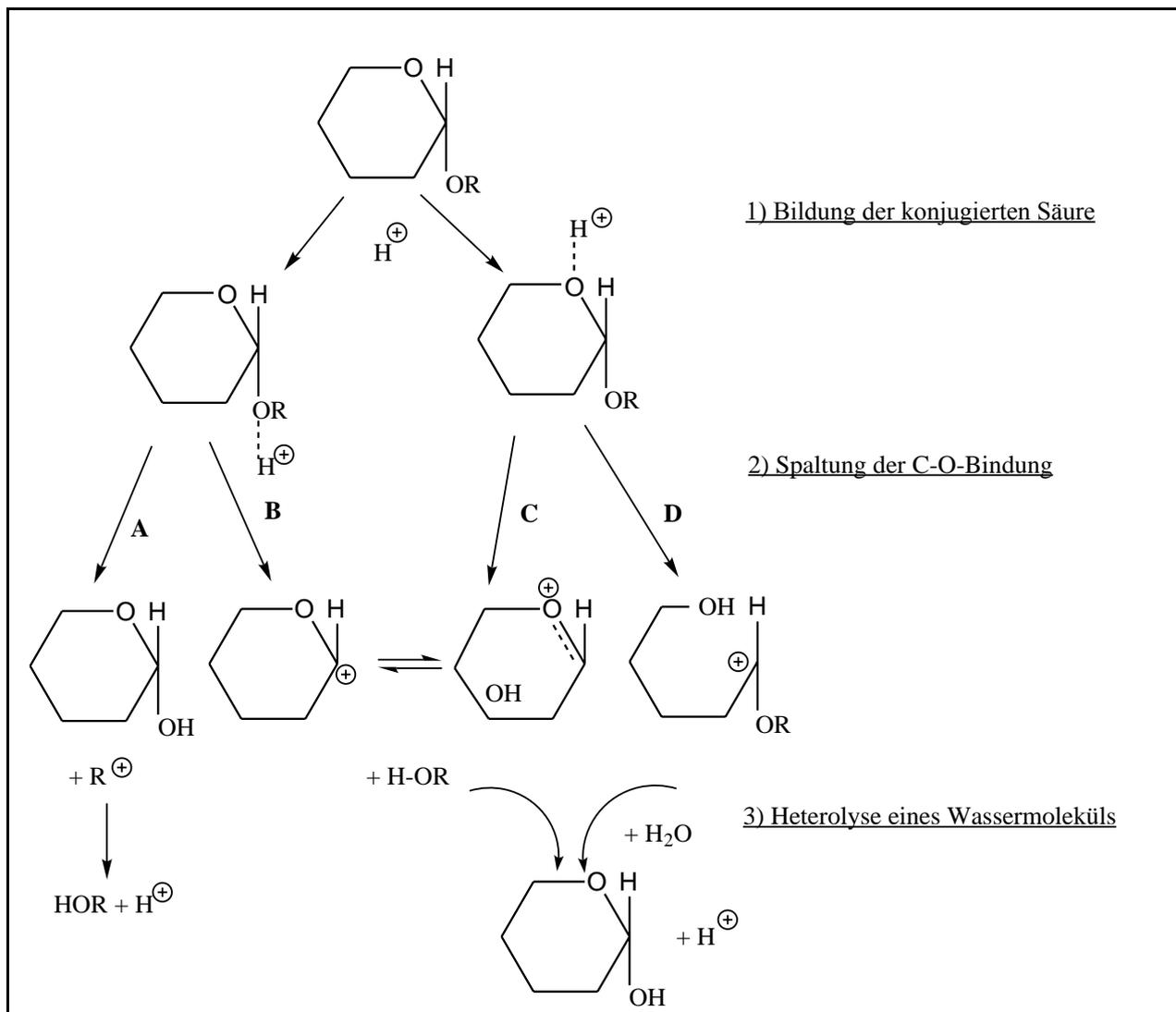


Abb. 2-5: Möglicher Mechanismus bei der säurekatalytischen Spaltung einer glycosidischen Bindung (Szejtli 1976)

2.3 Oxidation der Lactose zu Lactobionsäure und anschließende Hydrolyse (Weg C in Abb. 2-1)

Die indirekte Variante, Glucose als Nebenprodukt in Gluconsäure zu überführen, besteht darin, das Ausgangsprodukt Lactose in seine oxidierte Form zu überführen und anschließend hydrolytisch, vorrangig durch den Einsatz von Säuren, in Gluconsäure und Galactose zu spalten. Die Oxidation wird katalytisch, chemisch, elektrokatalytisch, biochemisch oder mit Hilfe von Mikroorganismen ausgeführt.

● *Katalytische Oxidation der Lactose*

Bei der katalytischen Oxidation wird Lactose durch molekularen Sauerstoff im alkalischen Medium zu Lactobionsäure oxidiert. Die Zugabe von Bismuth in situ zu einem Palladium-Kohlenstoff-Katalysator resultiert in der vollständigen Umsetzung von Lactose in Lactobionsäure ohne Nebenreaktionen. Optimale Bedingungen sind ein pH-Bereich zwischen 7 und 10, eine Temperatur bis 333 K und ein bestimmtes molares Bi-Pd-Verhältnis von 0,50 - 0,67 (Hendriks 1990).

● *Elektrokatalytische Oxidation der Lactose*

Ein Verfahren beschreibt den Einsatz einer bleimodifizierten Platinelektrode im gepulsten Potential-Modus in einem Natriumcarbonat-Natriumhydrogencarbonat-Medium. Bei einer eingesetzten 0,01 molaren Lactoselösung beträgt die Ausbeute von Lactobionsäure nach 3 h 90 %. Dabei wird das als Zwischenstufe gebildete Lacton hydrolysiert (Drulionle, Kokoh et al. 1995).

● *Biochemische bzw. mikrobielle Oxidation der Lactose*

Eine andere Möglichkeit Lactobionsäure in Form ihres Salzes herzustellen, besteht darin, Lactose enzymatisch mit Hilfe von Lactose-Dehydrogenase zu oxidieren. Besonders zweckmäßig ist die Einwirkung von Stämmen der *Pseudomonas*-Gattung wie *Pseudomonas graveolens* (Sato, Miyake et al. 1971), (Hayashibara Co. 1973) und *Pseudomonas cepacia* (Meiberg, Bernardus et al. 1991) unter Belüftung, Rühren und Zugabe einer Stickstoffquelle, wie beispielsweise gequollener Maisextrakt oder Harnstoff, und kleiner Mengen anorganischer Salze. Die Fermentation wird bevorzugt im Temperaturbereich von 20°C - 50°C und einem pH-Bereich von 5 - 8 durchgeführt. Bei einer eingesetzten 10%igen Lactoselösung dauert die Umsetzung 20 - 50 h. Zur Vermeidung des pH-Wert-Abfalls während der Reaktion wird Calciumcarbonat o. a. dazugegeben. Überschüssige Calcium-Ionen werden anschließend mittels stark saurer Austauschharze entfernt und die Mikroorganismenzellen durch Zentrifugation abgetrennt.

● *Chemische Oxidation der Lactose*

Ausgehend von einer lactosehaltigen Lösung kann Lactobionsäure auch als Zwischenprodukt bei der oxidativen Hydrolyse im sauren Milieu gebildet werden. Auch hier werden letztendlich Galactose und Gluconsäure gebildet (Dahlgren und Ake 1978). Die Oxidation der Lactose in wäßriger Lösung erfolgt unter milden oxidativen Bedingungen und kann beispielsweise mit Brom, Wasserstoffperoxid, verdünnter Salpetersäure, Peressigsäure oder dergleichen durchgeführt werden. Bei der Verwendung von Brom sind danach zusätzliche Verfahrensschritte, wie die Entfernung des überschüssigen Broms mit Silbersulfatlösung und des restlichen Silbers mit schwefliger Säure, notwendig (Sato, Miyake et al. 1971). Die Oxidation läuft bei maximal 75°C ab. Oberhalb dieser Temperatur kommt es zu unerwünschten Zersetzungsreaktionen der Kohlenhydrate. Als Zwischenprodukt wird Lactobionsäure gebildet, die in einem schwach sauren Milieu hydrolysiert. Dabei werden verdünnte Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure oder organische Säuren wie Carbonsäuren eingesetzt (Dahlgren und Ake 1978).

2.4 Fermentation der Glucose (Weg D in Abb. 2-2)

Das wahrscheinlich älteste Verfahren, um Glucose als Nebenprodukt aus einem Prozess zu entfernen, ist die Vergärung. Damit möglichst wenig Nebenprodukte gebildet werden, müssen Mikroorganismen verwendet werden, die eine starke Tendenz zur alkoholischen Gärung zeigen, da Ethanol als Nebenprodukt bei der Galactose-Herstellung leicht aus dem Produkt eliminiert werden kann. Die Hauptproduzenten von Alkohol sind Hefen, vor allem Stämme der Gattung *Saccharomyces*.

Hefen sind fakultativ Anaerobier, die den Sauerstoff der Luft zum Wachstum benötigen. Unter Sauerstoffabschluß stellt die Hefe die Atmungsprozesse ein und als alternativer Stoffwechselprozess setzt die Gärung ein (Pasteur-Effekt). Da unter anaeroben Bedingungen der Sauerstoff als Wasserstoff-(Elektronen)-Endakzeptor fehlt, wird der Wasserstoff des NADH_2 nach Decarboxylierung des Pyruvates auf Acetaldehyd abgeladen und Ethanol gebildet. Bei der Glucosevergärung werden aus dem Abbau eines Mols Glucose nur zwei Mol Adenosintriphosphat (ATP) im Gegensatz zu der Veratmung zu CO_2 38 Mol ATP generiert, daher ist das Wachstum gärender Hefe wegen dieser geringen Energieausnutzung des Substrates nur schwach.

Durch eine hohe Zuckerkonzentration werden die Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus und der Atmungskette reprimiert, so dass die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* trotz Gegenwart von Sauerstoff nur noch zu gären vermag (Crabtree-Effekt) (Weusthuis, Visser et al. 1994). Nach dem sogenannten Kluyvereffekt können einige Hefen Disaccharide unter aeroben, aber nicht unter anaeroben Bedingungen nutzen, obwohl sie die jeweiligen Hexosen unter anaeroben Bedingungen verwerten können (Weusthuis, Visser et al. 1994). Aus der Literatur ist bekannt, dass *Saccharomyces cerevisiae* Kluyver-negativ für Lactose ist (Sims und Barnett 1991). Um eine hohe Ausbeute an Rohgalactose zu erzielen, sollte Galactose selbst kein fermentierbarer Zucker für die verwendete Hefe sein. Ein Mikroorganismus wird, wiederum in der Ökonomie des Stoffwechsels begründet, aus einer Auswahl von mehreren verwertbaren Substraten dasjenige nutzen, dessen Verwertung mit dem geringsten Aufwand an Enzymsynthese verbunden ist. Solange das günstigere Substrat, die Glucose, zur Verfügung steht, wird dieses die Synthese der für den Abbau der Galactose benötigten Enzyme blockieren (Wartenberg 1989).

Saccharomyces cerevisiae hat eine hohe Säuretoleranz und kann noch gut zwischen pH 2,3 und 8,6 wachsen. Das Temperaturoptimum liegt im engen Bereich zwischen 15 - 25°C (Krämer 1992). Für den Stoffwechsel der Hefe, das heißt für den Aufbau von körpereigenen Substanzen und den Energiegewinn, werden Mineralien (Phosphor, Kalium, Schwefel), Spurenelemente (Eisen, Kupfer, Zink, Mangan und Bor), Vitamine (Thiamin, Biotin; Panthothensäure, Nikotinsäureamid), anaerobe Wachstumsfaktoren (Ergosterol, Tween 80) benötigt. Als Stickstoffquelle werden anorganische N-Verbindungen, insbesondere Ammoniumsalze, seltener jedoch Nitrat, sowie verschiedene organische N-Verbindungen wie Amide (Harnstoff, Glutamin, Asparagin), Oligopeptide, Purine und Pyrimidine verwendet (Weusthuis, Visser et al. 1994), (Weber 1982), (Kunze 1979).

2.5 Oxidation der Glucose zu Gluconsäure (Weg E in Abb. 2-2)

Nach vorausgegangener Lactosehydrolyse kann das Nebenprodukt Glucose in einem weiteren Verfahrensschritt in seine Aldonsäure überführt werden, die aus einer Mischung mit Galactose leichter abgetrennt werden kann. Bei der technischen Glucoseoxidation wird vorrangig das mikrobielle oder enzymatische Verfahren angewendet. Ein wirtschaftlich entscheidender Grund für den Einsatz von Glucoseoxidase in immobilisierter Form ist der hohe Preis für das native Enzym. Daneben gibt es Bemühungen, das Enzym nach der Oxidation durch Elektrodialyse aus der Reaktionslösung zurückzugewinnen und wiederholt einzusetzen (Walon 1970). Gluconsäure kann aber auch durch direkte Fermentation mit Bakterien (z. B. *Pseudomonas ovalis*, *Gluconobacter oxydans*) oder Schimmelpilzen (z. B. *Aspergillus niger*) hergestellt werden. Die Fermentation mit intakten Zellen hat jedoch den Nachteil, dass Teile des Substrates in zelleigene Substanzen und zu anderen unerwünschten Stoffwechselprodukten umgewandelt werden.

Das Enzym aus *Aspergillus niger* ist ein Dimer mit zwei nicht kovalent gebundenen Flavin-adenin-dinucleotid-Molekülen, die Riboflavin (Vitamin B2) enthalten. FAD fungiert als prosthetische Gruppe und wird bei der Glucoseoxidation wahrscheinlich über zwei Ein-Elektronen-Schritte zu FADH₂ reduziert (siehe Abb. 2-6). Der Wasserstoff wird weiterhin von FADH₂ auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid übertragen, das in der meist gekoppelt ablaufenden Katalase-Reaktion in 1/2 Sauerstoff und Wasser gespalten wird.

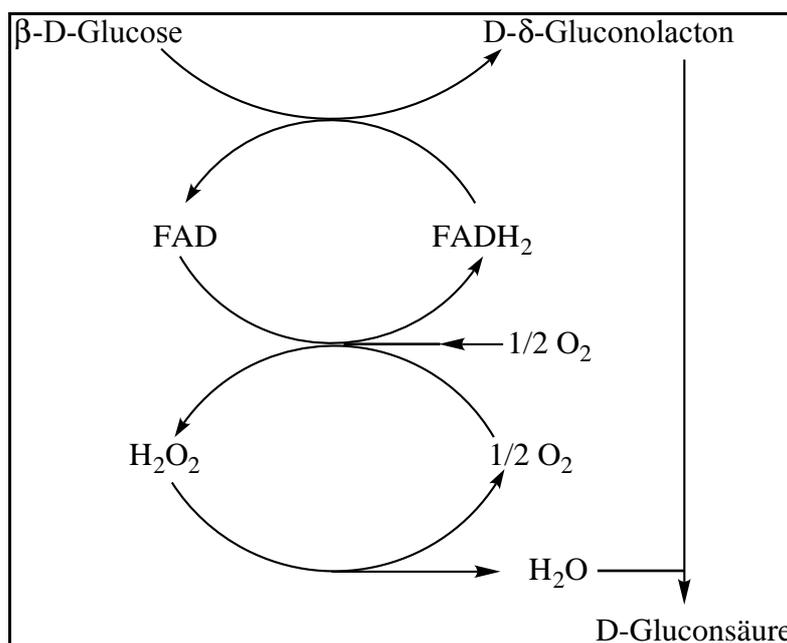


Abb. 2-6: Reaktionsmechanismus des Glucoseoxidase-Katalase-Systems (Hartmeier 1981)

Die Glucoseoxidase katalysiert spezifisch die Oxidation von β -D-Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff zu δ -D-Gluconolacton, die in wässriger Lösung spontan oder katalysiert durch Lactonase in Gluconsäure übergeht (Belitz und Grosch 1992), (Hartmeier 1981). Durch

Mutarotation kann jedoch auch das α -Anomer umgesetzt werden, wobei die relative Oxidationsrate nur bei 0,64 % liegt. Untersuchungen zur Spezifität der Glucoseoxidase haben gezeigt, dass auch andere Kohlenhydrate minimal enzymatisch oxidiert werden. Für D-Galactose wird eine relative Oxidationsrate von 0,50 % angegeben (Valentova, Marek et al. 1983).

Andere Technologien, die auf der Basis einer katalytischen (Deller, Krause et al. 1990), elektrokatalytischen (Kokoh, Leger et al. 1992) oder chemischen (Beisecker 1989) Glucoseoxidation in ähnlicher Weise wie die Bildung der Lactobionsäure aus Lactose ablaufen (siehe Punkt 2.3), sind höchstwahrscheinlich nicht spezifisch genug für Glucose und würden Galactose in einer Mischung simultan oxidieren.

• *Biochemische Glucoseoxidation*

Die Glucoseoxidase kann durch kovalente Bindung an aktivierte organische Polymere oder an chemisch modifizierte anorganische Materialien durch Ionenaustausch oder Adsorption immobilisiert werden. Um die Arbeitsstabilität der Glucoseoxidase zu verbessern, kann Katalase in molekülnachbarlicher Anordnung auf einem geeigneten Träger mitfixiert werden (Kirstein, Kuehn et al. 1982), (Bergmeyer und Jaworek 1974). Bei der Isolierung, Reinigung und Immobilisierung der intrazellulären Pilzenzyme treten große Aktivitätsverluste auf. Eine Möglichkeit besteht darin, durch Waschen des Myzels mit geeigneten Lösungsmitteln oder schonende Trocknung und anschließendes Waschen, ein Präparat mit immobilisierter Glucoseoxidase und Katalase zu erhalten. Ein großer Vorteil dabei ist, dass in diesem permeabilisierten Myzel rund 75 % der im Ausgangsmyzel enthaltenen Glucoseoxidaseaktivität verbleiben und störende Aktivitäten begleitender Enzyme ausgeschaltet sind, da diese nicht in immobilisierter Form vorliegen (Hartmeier und Doepfner 1984).

Ein Problem des Glucoseoxidase-Katalase-Systems ist seine geringe Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid. Bei der Glucoseoxidation muß daher Sauerstoff, kontinuierlich oder periodisch, zur Aufrechterhaltung des Reaktionsablaufes eingebracht werden (Onken, Traeger et al. 1991). Je besser der Massentransfer im Reaktor gestaltet wird, um so höhere Umsatzraten werden erreicht. Der optimale Wirkungsbereich des Glucoseoxidase-Katalase-Systems liegt bei Temperaturen zwischen 10°C und 60°C und einem pH-Wert von 5 und 6. Der pH-Wert wird während der Reaktion durch automatische Titration beispielsweise mit Natronlauge o. a. konstant gehalten, da die Glucoseoxidaseaktivität in stark saurer Lösung drastisch zurückgeht (Hartmeier 1981).

• *Mikrobielle Glucoseoxidation*

Bei der mikrobiellen Glucoseoxidation läßt sich der Gärverlauf in drei unterschiedliche Phasen teilen: eine typische lag-Phase, eine Akzelerationsphase mit annähernd logarithmischer Zunahme der Glucoseoxidaseaktivität und zunehmender Gärgeschwindigkeit. Nach Erreichung eines Maximums folgt eine stationäre Phase mit konstanter Enzymaktivität und geringer Abnahme der Gärgeschwindigkeit. Danach setzt langsam Autolyse ein. Aus Beobachtungen spezifischer

Enzymaktivitäten von *Aspergillus niger* konnten Schlußfolgerungen auf die Aktivitäten verschiedener katabolischer Stoffwechselwege während der Gluconsäuregärung gezogen werden: In der Akzelerationsphase nahm die Aktivität aller Zuckerabbauwege zu. Neben der dominierenden Gluconsäurebildung war der glycolytische Abbau nach Embden-Meyerhof relativ stark und der Hexosemonophosphat-Abbau sowie der Tricarbonsäure-Zyklus weniger deutlich ausgeprägt. In der stationären Phase nimmt die Aktivität der Glycolyse offenbar steil ab, während der Hexosemonophosphat-Abbau und der Tricarbonsäure-Zyklus gegen Ende der stationären Phase zunehmend stärker in Funktion treten (Drews und Smalla 1969).

Die Konzipierung eines kontinuierlich ablaufenden Fermentationsprozesses wird angestrebt, da der Nachteil eines diskontinuierlichen Verfahrens in der begrenzten Stabilität und Betriebsdauer liegt. Die Ursache dafür sind Denaturierung und Abbauprozesse nicht vermehrungsfähiger Zellen. Dieses Problem kann durch eine periodische oder kontinuierliche Zugabe katalytisch aktiver Biomasse, die in einem externen Fermenter erzeugt wird, während der Produktbildung begegnet werden. Zur Erhöhung der Produktivität kann eine Produktabtrennung erfolgen, bei dem ein Strom aus dem Fermenter ausgekreist und über stark basische Anionenaustauschersäulen geleitet wird. Die dabei retardierte Gluconsäure wird anschließend mit Natriumhydrogencarbonat eluiert und in Form ihres Salzes gewonnen (Einicke, Mauersberger et al. 1995). Eine andere Möglichkeit besteht in der chemostatischen Kultivierung beispielsweise von Stämmen der Art *Acetobacter methanolicus* auf einem einzigen Substrat, wobei das Verhältnis zwischen Assimilation und Produktbildung über die Durchflußrate und dem pH-Wert gesteuert wird (Babel, Mueller et al. 1988).

2.6 Trennung der Galactose von Glucose (Weg F in Abb. 2-2) bzw. von Gluconsäure (Weg G in Abb. 2-2)

Es gibt Ansätze zur chromatographischen Trennung von Aldosen. Dazu wird zunächst das Gemisch konzentriert oder mit organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Aceton oder Essigsäure versetzt und stehengelassen. Im Fall eines Gemisches von Glucose und Galactose, wie es durch Hydrolyse von Lactose erhalten wird, kristallisiert Galactose leichter als Glucose. Eine derartige Vorbehandlung ist für die weitere Abtrennung von Glucose mit Hilfe eines chromatographischen Trennverfahrens vorteilhaft. Dazu kann eine Anionenaustauschersäule in Hydrogensulfit-Form verwendet werden. Unter Ausnutzung der Reaktivitätsunterschiede zwischen der Hydrogensulfitgruppe des Anionenaustauschers und den jeweiligen Kohlenhydraten oberhalb einer bestimmten Temperatur können diese äußerst wirksam aufgetrennt werden (Takasaki 1972). Die Trennung von Galactose und Gluconsäure kann in ähnlicher Weise durchgeführt werden. Die Gewinnung von Galactose erfolgt durch Eindampfen der Lösung im Vakuum, wobei die Galactose in Form weißer Kristalle ausfällt und Gluconsäure in der Lösung verbleibt (Dahlgren und Ake 1978). Höchstwahrscheinlich kann auch ein chromatographisches Verfahren, möglicherweise mit Hilfe stark basischer Anionenaustauschersäulen, für die Trennung der Aldose und Aldonsäure angewendet werden.

2.7 Kristallisation aus Fermentationskulturen (Weg H in Abb. 2-2)

Nach einer Fermentation ist es notwendig, die Biomasse abzutrennen. Das kann durch einfache mechanische Verfahren wie Zentrifugation oder Filtration oder durch Wärmeeinwirkung bis 200°C in einem zeitaufwendigen Mehrstufenprozess erfolgen. Möglichkeiten, die Koagulation der Biomasse herbeizuführen bzw. die Filtrierbarkeit der Fermentationslösung zu verbessern, bestehen in dem Zusatz von Stoffen wie Alkalien, Alkalisilikate, Trichloressigsäure, Metallchloride oder Alkohol. Bei einem Einsatz derartiger Hilfsstoffe wird die Fermentationskultur beträchtlich verunreinigt. Dadurch werden erhöhte Aufwendungen für die Reinigung der zu gewinnenden Substanz notwendig. Die wenigsten Probleme hinsichtlich möglicherweise ablaufender Nebenreaktionen bereitet der Zusatz des gleichen Volumenanteils eines Alkohols, üblicherweise Ethanol oder Methanol, zur Kulturlösung (Dueresch, Richter et al. 1989). Nach Abtrennung der Biomasse, Konzentrierung der Lösung und Änderung der Temperatur wird kristalline Rohgalactose gewonnen. Zur Erzielung eines Produktes mit großer Reinheit wird das Kristallinat mehrmals gewaschen und abgeschieden. Danach wird die Galactose durch Zerstäubung oder nach dem Wirbelschichtverfahren bei Temperaturen unter 50°C getrocknet und anschließend gemahlen.

2.8 Spezielle Aufreinigungsschritte

Je nach Wahl des Verfahrens sind spezielle Aufreinigungsschritte notwendig. So ist vor allem nach einer Säurehydrolyse, aber auch nach Fermentationsprozessen, eine Behandlung mit Aktivkohle erforderlich, die eine entfärbende Wirkung hat (Galzy und J. 1975). Flüchtige Verbindungen werden durch Destillation aus dem Produkt eliminiert. Anionen- und Kationenaustauschprozesse sind vor allem dann nötig, wenn eine Fermentation durchgeführt oder der pH-Wert mit Alkalimetallhydroxiden oder Mineralsäuren eingestellt wurde. Durch eine Ultrafiltration können Enzyme oder Zellen aus Lösungen entfernt werden. Für eine pharmazeutische Qualität ist es besonders wichtig, das Produkt durch eine Sterilfiltration pyrogenfrei zu machen. Exogene Pyrogene sind als Lipopolysaccharide Bestandteil von Membranen gramnegativer Bakterien und können in hochgereinigter Form, in einer Menge von 0,001 - 0,003 µg/kg KG verabreicht, Fieber auslösen (Forth, Henschler et al. 1996).

2.9 Gewinnung von Galactose aus der Mutterlauge bei der Lactulose-Herstellung (Abb. 2-3)

● *Epimerisierung von Lactose zu Lactulose*

Lactulose (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose) wird durch Epimerisierung aus Lactose gewonnen. Dabei findet die Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein-Umlagerung statt. Anfängliche Verfahren basierten auf dem Zusatz starker alkalischer Verbindungen wie Ca(OH)₂, KOH oder NaOH. Die Epimerisierung wurde durch beträchtliche Zersetzungsreaktionen begleitet. Bei der Verwendung von organischen Basen wie Ammoniak, primären oder sekundären Aminen laufen beispielsweise Nebenreaktionen unter Bildung von Glycosylaminen und Amadori-Produkten ab (Hicks und Parrash 1980).

Es wurden modernere Methoden mit komplexen Reagenzien wie Natriumaluminat oder Tetraborat entwickelt. Diese verschieben das Pseudo-Gleichgewicht der basenkatalysierten Isomerisierung in Richtung des Ketodisaccharides. Dabei werden Ausbeuten zwischen 70 und 80 % erreicht. Die Reaktion findet bei einer Temperatur zwischen 50°C und 70°C statt. Anschließend wird der pH-Wert auf 6 - 7 mit einer schwefelsauren Lösung eingestellt, wobei das Aluminiumhydroxid-Präzipitat aus der vorliegenden Suspension leicht abfiltriert und nach Aufarbeitung wieder in den Prozess eingebracht werden kann (Carobbi und Innocenti 1989).

Bei Verwendung von wäßriger Lactose-Borsäure-Lösung im äquivalenten molaren Verhältnis unter Zusatz von Triethylamin, einer Reaktionstemperatur von 70°C und einem pH-Wert von 11 wird eine noch höhere Ausbeute erreicht. Durch anschließende Zugabe von Methanol wird Borat in Methylborat umgewandelt, das aufgrund seiner Flüchtigkeit neben Triethylamin durch Destillation abgetrennt werden kann (Hicks und Parrash 1980).

Eine andere Möglichkeit, Lactulose in einem industriellen Maßstab mit hoher Ausbeute herzustellen, besteht in dem Zusatz äquivalenter Teile eines basischen Magnesiumsalzes wie Magnesiumoxid, -hydroxid oder -carbonat und Natriumdithionit. Die beiden Salze werden jeweils in einem Überschuß zwischen 0,05 und 0,2 Gew.%, bezogen auf die Lactosemenge, eingesetzt. Eine 60 - 70%ige Lactoselösung epimerisiert danach bei 100°C innerhalb von 10 min zu Lactulose. Anschließend kristallisiert die restliche Lactose durch Abkühlung der Lösung aus und kann abfiltriert werden. Die Magnesium-, Natrium-Ionen und Anionen werden in starken Kationenaustauscher- und schwachen Anionenaustauschersäulen eliminiert (Carobbi, Miletti et al. 1985).

Es ist bekannt, dass während der Epimerisierung in Gegenwart von Natriumsulfit, Natriumhydrogensulfit und Dinatriumhydrogenphosphit weniger braungefärbte Nebenprodukte gebildet werden. Die wäßrige Lactoselösung wird in Gegenwart eines schwach alkalisch reagierenden Salzes, im Fall von Dinatriumhydrogenphosphit in einer Menge von 2,1 - 8,6 %, bezogen auf das Gewicht von Lactose-Monohydrat, am Rückfluß erhitzt. Die nicht umgesetzte Lactose wird anschließend durch Abkühlen ausgefällt und abgetrennt. Um das vorhandene Alkaliphosphit und die gebildeten organischen Säuren zu eliminieren, wird das Filtrat auf ein stark saures, Sulphonsäuregruppen-enthaltendes Kationenaustauscherharz und danach auf ein schwach basisches Polystyrol-Polyamin-Anionenaustauscherharz gegeben (Gasparotti 1980).

Kommerziell erhältliche Lactulosesirupe sind generell nicht rein. Sie enthalten mehr oder weniger große Anteile an Kohlenhydraten, vor allem Galactose und Lactose. Die typische Zusammensetzung ist folgende: 50 - 70 Gew.% Lactulose, 3 - 14 Gew.% Galactose, 3 - 9 Gew.% Lactose und 4 - 7 Gew.% andere Kohlenhydrate u. a. Tagatose, Glucose und Epilactose (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-mannopyranose) (Bimbi 1994).

● *Mögliche Gewinnung von Galactose aus der Mutterlauge bei der Kristallisation*

Diejenigen Verfahren, die auf der Kristallisation von Lactulose aus alkoholischen Lösungen basieren, sind mit hohen Kosten verbunden. Ein Verfahren beschreibt den Zusatz von Ethanol im Verhältnis 1 : 15 zur festen Lactulose-Menge. Die Mischung wird anschließend unter Rückfluß

erhitzt bis die Masse gelöst ist. Durch Kühlung auf 15 - 20°C fällt vorrangig Lactose und andere Zucker wie Galactose, neben geringer Mengen Lactulose aus, wobei im klaren Filtrat Lactulose in Lösung verbleibt. Das Kristallinat wird abgetrennt und kann zur Galactose-Gewinnung, gegebenenfalls durch Anwendung chromatographischer Verfahren, weiter aufbereitet werden (Carobbi, Miletti et al. 1985). Lactose kristallisiert auch dann, wenn der Lactulosesirup auf einen Zuckergehalt von mind. 70 % eingeengt und anschließend über Nacht bei 25°C stehen gelassen wird. Im Überstand verbleiben 50 - 80 Gew.% Lactulose, Monosaccharide und gefärbte Substanzen (Deya, Takahashi et al. 1990).

Wird dagegen der Lactulosesirup unter Temperatur- und Druckeinwirkung auf einen bestimmten Zuckergehalt eingeengt und mit Lactulose-Trihydrat in kristalliner Form mit einem Gehalt von 5 - 30 Gew.% von der gesamten Lactulose-Menge beimpft, so fällt bei 5 - 20°C nach 20 - 120 h Lactulose in trihydratisierter Form aus. Der Überstand des Kristallinates, die Mutterlauge, enthält neben Lactose noch alle anderen Kohlenhydrate, die zu Beginn des Verfahrens im Lactulosesirup präsent waren. Die Mutterlauge wird über Anionen- oder Kationenaustauschersäulen gegeben, um Lactose von den restlichen Kohlenhydraten zu trennen, so dass diese wieder in das Verfahren eingebracht werden kann (Bimbi 1994). Möglicherweise kann Galactose bei diesem oder einem anderen chromatographischen Trennverfahren in reiner Form isoliert und anschließend konzentriert werden.

● *Chromatographische Trennverfahren*

Es gibt verschiedene Verfahren, um Lactulose und gegebenenfalls auch Galactose aus Lactulosesirupen zu gewinnen. Um hochreine Produkte zu erhalten, wäre eine Kristallisation als Vorreinigungsstufe vorteilhaft. Eine Möglichkeit besteht darin, den Lactulosesirup bei 30 - 60°C über schwach basische Ionenaustauschersäulen mit Wasser als Eluent zu geben. Dadurch wird nicht nur Lactulose, sondern auch Galactose aus der Mischung verschiedener Reaktionsprodukte abgetrennt (Dorscheid und Krumbholz 1990).

Werden dagegen stark saure Kationenaustauschersäulen in der Natrium-, Calcium- oder Magnesium-Form, gegebenenfalls nach vorheriger Kristallisation von Lactose, eingesetzt, so gelingt die Trennung von Lactulose, den Monosacchariden und gefärbten Stoffen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und den unterschiedlichen Affinitäten der Kohlenhydrate zur stationären Phase. Die Säulen bestehen aus einem Copolymer von Styrol und Divinylbenzol mit Sulfonsäuregruppen als Austauschfunktion. Die Größe der Partikel reicht von 0,2 - 0,4 mm und der Vernetzungsgrad liegt zwischen 0,4 und 0,8 % (Deya, Takahashi et al. 1990).

Eine andere Möglichkeit, um Galactose neben Lactulose zu gewinnen, besteht in einer geeigneten Kombination zweier spezieller Borsäulen. Diejenige, die auf einer Polyacrylmatrix basiert, kann selektiv Lactulose zurückhalten. Dabei eluieren Lactose und Galactose zunächst mit einer wäßrigen mobilen Phase und später Lactulose mit einer 1 N Salzsäure. Die zweite Säule basiert auf einer Polystyrolmatrix, auf der selektiv Galactose retardiert (Filippini 1986).

3 Nebenreaktionen bei der Herstellung von Galactose und weitere Zersetzungsreaktionen

Gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit, vor allem nicht flüchtige Verunreinigungen in der Galactose analytisch nachzuweisen, sind umfangreiche Kenntnisse über den Ablauf möglicher Neben- und Zersetzungsreaktionen der einzelnen technologischen Herstellungsprozesse erforderlich. Nachfolgende Abschnitte stellen eine Literaturübersicht über diese Problematik dar. Daraus wird deutlich, dass einige Teilprozesse der Galactose-Herstellung, die im Abschnitt 2 ausführlich beschrieben wurden, hinsichtlich ihrer Bildung von Nebenprodukten bereits untersucht worden sind. Dazu gehören die Lactosehydrolyse (enzym- und säurekatalysiert), die Epimerisierung der Lactose bei der Lactuloseherstellung und die Glucoseoxidation zu Gluconsäure (siehe Abb. 2-1 bis 2-3). Dagegen wurden die Fermentation mit Hilfe von Mikroorganismus-Mutanten, die Lactoseoxidation zu Lactobionsäure und deren anschließende Säurehydrolyse sowie sekundäre Verfahrensschritte, die der Aufreinigung und Konzentrierung der Galactose dienen und somit für die Qualität des Endproduktes maßgebend sind, bisher im Einzelnen nicht betrachtet (siehe Abb. 2-1 und 2-2).

Die wichtigsten Nebenreaktionen sind die Transgalactosylierung durch die β -Galactosidase bei der enzymatischen Lactosehydrolyse (siehe Punkt 3.1), die Bildung von inter- und intramolekularen Reversionszuckern bei der säurekatalysierten Lactosehydrolyse (siehe Punkt 3.2) und die Entstehung von epimeren Zuckern durch Isomerisierungsreaktionen von Mono- und Disacchariden (Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein-Umlagerung) vor allem im alkalischen Milieu (siehe Punkt 3.3) bei der Lactulose-Herstellung. Die Nebenprodukte dieser genannten Reaktionen gehören der Substanzklasse der Kohlenhydrate an (Anhydrozucker, Monosaccharide, Di- und höhere Oligosaccharide).

Desweiteren kommt es zu Zersetzungsreaktionen von Kohlenhydraten, die vorwiegend unter alkalischen und oxidativen Bedingungen zu verschiedenen organischen Säuren führen (siehe Punkt 3.3 - 3.6). Bei einem Einsatz von Mikroorganismen kann neben der gewünschten Reaktion wie der Glucosevergärung auch der Atmungsprozess ablaufen. Die Glucoseveratmung erfolgt zunächst über die Glycolyse (= Fructosebiphosphat-Weg), die Pyruvat-Dehydrogenierung und dem Tricarbonsäure-Zyklus. Anschließend wird sämtlicher Wasserstoff über die Atmungskette zu Wasser verbrannt. Dabei kann der Tricarbonsäure-Zyklus, in dem verschiedene organische Säuren gebildet werden, eine potentielle Quelle für akkumulierte Verbindungen dieser Substanzklasse im Endprodukt darstellen.

Im sauren Milieu werden Kohlenhydrate durch Reaktionen der Karamelisierung zu überwiegend flüchtigen Aromastoffen wie verschiedene Furane, Furanone, Pyranone u. a. abgebaut (siehe Punkt 3.8). Aus dieser Vielzahl an Verbindungen soll das besondere Augenmerk auf 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) gerichtet werden, da es als Erhitzungsindikator kohlenhydrathaltiger Matrices fungiert (siehe Punkt 3.7). Daneben wird HMF auch im Laufe der Maillard Reaktion in Gegenwart von Aminoverbindungen wie Aminosäuren oder Proteinen gebildet.

Wie aus dem Abschnitt 2 der Galactose-Herstellung hervorgeht, ist eine pH-Einstellung durch Säuren, Laugen oder Pufferlösungen bei verschiedenen Teilprozessen bzw. bei deren Kopplung notwendig. Desweiteren sind bei einem Einsatz von Mikroorganismen Mineralstoffe für deren Stoffwechselfvorgänge essentiell.

Aus der Kenntnis über technologische Herstellungsprozesse der Galactose und den damit verbundenen Neben- und Zersetzungsreaktionen kristallisieren sich einzelne Stoffklassen heraus, die als Verunreinigungen in Frage kommen und somit zu untersuchen sind:

- Kohlenhydrate
- organische Säuren
- 5-Hydroxymethyl-2-furfural und ähnliche Abbauprodukte
- Aminoverbindungen, speziell Aminosäuren und Proteine
- Kationen und Anionen von Hilfsstoffen

3.1 Nebenprodukte der enzymatischen Lactosehydrolyse

Es ist bekannt, dass Glycosidasen neben der Hydrolyse auch Transferreaktionen katalysieren. Dabei wird der Zuckerrest auf entweder Wasser oder einem anderen Hydroxyl-Acceptor wie beispielsweise ein anderer Zucker übertragen (siehe Abb. 2-4). Bei Transgalactosylreaktionen der β -Galactosidase werden verschiedene Oligosaccharide während der Lactosehydrolyse gebildet. Der Gehalt und die Struktur sind dabei abhängig von der Quelle und dem Typ des Enzyms, der Konzentration und Art des Substrates, den Reaktionsparametern wie Temperatur, pH-Wert und Salze, dem Grad der Lactoseumsetzung.

● *Einfluß der Konzentration und Art des Substrates*

Bei der Hydrolyse mit β -Galactosidase, isoliert von *Aspergillus niger*, wurde bei konstant gehaltenen 50°C und variierenden Lactosekonzentrationen von 2,5 - 25 % (w/v) neben Disacchariden hauptsächlich ein strukturell nicht untersuchtes Trisaccharid beobachtet, wobei der Gehalt äquivalent mit der Ausgangskonzentration der Lactose von 2,2 - 10,5 % ansteigt. Nur bei Ausgangskonzentrationen, die höher als 20 % (w/v) waren, wurde auch ein Tetrasaccharid beobachtet (Yang und Tang 1988). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Hydrolyse von einer Lactose-Pufferlösung bei 50°C mit β -Galactosidase von *Streptococcus thermophilus* erzielt. Bei Lactosekonzentrationen von weniger als 7,5 % w/v wurden lediglich Spuren von Trisacchariden neben dominant auftretenden Disacchariden beobachtet. Dagegen war bei einer Ausgangskonzentration von 70 % Lactose nach 40 %iger Umsetzung der größte Trisaccharid-Gehalt von ca. 15 % der gesamten Zuckerkonzentration zu verzeichnen. Bei allen Konzentrationen wurden Disaccharide im späten Verlauf der Reaktion angehäuft, während

Trisaccharide bei geringeren Lactoseumsetzungsraten auftraten und bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion wieder hydrolysiert wurden (Smart 1991).

Um den Einfluß der Inhaltsstoffe in verschiedenen Substraten zu überprüfen, wurden die Enzymaktivitäten verschiedener Bakterien in Lactose-Pufferlösung, Magermilch, Milch und Lactose mit einer Proteinfraction gemischt untersucht. Die hydrolysierende Aktivität der β -Galactosidase von *Bacillus circulans* lag in Gegenwart von Milchproteinen etwas höher als in der Lactose-Pufferlösung. Dagegen war die Enzymaktivität von *Escherichia coli* und *Kluyveromyces lactis* in allen Substraten im Vergleich zur Lactose-Pufferlösung deutlich erniedrigt. Es wurde vermutet, dass die lactosehydrolysierende Aktivität umgekehrt proportional zur Oligosaccharid-Bildung ist, da bei geringer Enzymaktivität die gebildeten Oligosaccharide im Verlauf der Reaktion vermindert rehydrolysiert werden und somit im Endprodukt enthalten sind (Mozaffar, Nakanishi et al. 1985).

● *Einfluß des Typs und der Quelle des Enzymes*

Bei der Verwendung immobilisierter Enzyme wurden weniger Oligosaccharide gebildet, was auf den limitierenden Faktor des Massentransfers größerer Zuckermoleküle bei niedriger Temperaturführung zurückgeführt werden kann. Dagegen wurden bei höheren Temperaturen und einer Lactosekonzentration von 15 % mehr Oligosaccharide gebildet (Yang und Tang 1988).

Nach Trennung und Reinigung zwei verschiedener Formen der β -Galactosidase von *Bacillus circulans* stellte sich heraus, dass β -Galactosidase-2 einen hohen Oligosaccharid-Gehalt (Di- bis Pentasaccharide) von 41 % gegenüber β -Galactosidase-1 von nur 6 % der gesamten Zuckerkonzentration während der Lactosehydrolyse in Pufferlösung produziert (Zarate und Lopez-Leiva 1990).

Eine Studie mit dem lactosespaltenden Enzym von verschiedenen Bakterienstämmen ergab nach der Hydrolyse in Milch mit verschiedenen Lactoseausgangskonzentrationen einen wesentlich geringeren Oligosaccharid-Gehalt in Gegenwart der β -Galactosidase von *Bacillus circulans* im Vergleich zu der von *Escherichia coli* und *Kluyveromyces lactis*. Die Ursache dafür liegt einerseits in den unterschiedlichen Enzymaktivitäten. Daneben wird der Oligosaccharid-Gehalt durch den Grad der Lactoseumsetzung bestimmt (Mozaffar, Nakanishi et al. 1985).

● *Einfluß des Grades der Lactoseumsetzung*

Die maximale Bildung von Oligosacchariden erfolgt je nach Prozessführung bei ca. > 40 % der Lactoseumsetzung. Im allgemeinen nimmt die Oligosaccharidkonzentration im Verlauf der Reaktion wieder ab, so dass bei vollständiger Umsetzung wenig oder keine Oligosaccharide im Hydrolysat nachgewiesen werden (Mozaffar, Nakanishi et al. 1985).

● *Einfluß der Reaktionsparameter*

Bei 8 - 50°C und der Verwendung freier Enzyme war kein besonderer Effekt hinsichtlich der Oligosaccharid-Bildung zu beobachten (Yang und Tang 1988).

Salze, vor allem Kationen beeinflussen die Aktivität von β -Galactosidase. Die Enzymaktivität von *Bacillus circulans* stieg in Gegenwart von Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Calciumchlorid einer Lactose-Pufferlösung leicht an. Dagegen fiel die Enzymaktivität von *Escherichia coli* und *Kluyveromyces lactis* in Gegenwart von einer 25 mM Natriumchlorid-Lösung wie sie in Milch vorliegt, um 86 % und 24 % ab und von einer 15 mM Calciumchlorid-Lösung um 47 % und 86 % ab (Mozaffar, Nakanishi et al. 1985).

● *Reaktionsprodukte der Transgalactosylreaktion der β -Galactosidase*

Die Strukturen von Oligosacchariden, die während der enzymatischen Lactosehydrolyse entstehen, wurden bereits mehrfach beschrieben:

Bei der Hydrolyse mit β -Galactosidase von *Penicillium chrysogenum* wurde die bevorzugte Knüpfung der β -1,6-galactosidischen Bindung gegenüber anderen Bindungsmöglichkeiten beobachtet. Als Transgalactosylprodukte wurden dabei hauptsächlich die Disaccharide Allolactose (6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucose) und Galactobiose (6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose) charakterisiert (Ballio und Russi 1960).

Bei der Lactosehydrolyse mit β -Galactosidase von *Kluyveromyces lactis* und *Candida pseudotropicalis* erschienen fünf Oligosaccharide, vermutlich vier Disaccharide und ein Trisaccharid, im Chromatogramm. Für diese Verbindungen wurden die bereits in der Literatur veröffentlichten und in Tabelle 3-1 aufgeführten Strukturen diskutiert (Jeon und Mantha 1985).

Desweiteren wurden im Lactosehydrolysat einer β -Galactosidase von *Aspergillus oryzae* nach Methylierung mit Hilfe der Massenspektrometrie und ^{13}C -NMR Strukturuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden insgesamt zwanzig Oligosaccharide, davon Di-, Tri-, Tetra- und Pentasaccharide, identifiziert (siehe Tabelle 3-1) (Toba, Yokota et al. 1985). Ähnliche Strukturuntersuchungen wurden an Transgalactosylprodukten durchgeführt, die von *Trichoderma harzianum* während des Wachstums auf ein lactoseenthaltendes Medium gebildet wurden (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989).

Tabelle 3-1: Strukturen von Oligosacchariden, isoliert aus dem Lactosehydrolysat mit β -Galactosidase (* Postulat)

Oligosaccharid	Struktur	Literatur
Pentasaccharid	β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu	(Toba, Yokota et al. 1985)
Tetrasaccharid	β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-3)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu β -D-Gal(1-3)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu	(Toba, Yokota et al. 1985), (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989) (Toba, Yokota et al. 1985) (Toba, Yokota et al. 1985)
Trisaccharid	β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu β -D-Gal(1-3)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal(1-6)- β -D-Glu β -D-Gal(1-4)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glu β -D-Gal(1-6) D-Glu β -D-Gal(1-4)	(Toba, Yokota et al. 1985), (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989) (Toba, Yokota et al. 1985), (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989) (Asp, Burvall et al. 1980)* (Pazur, Tipton et al. 1958) (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989) (Sai-Prakash, Suyama et al. 1989)
Disaccharid	β -D-Gal(1-6)- β -D-Gal β -D-Gal(1-6)- β -D-Glu β -D-Gal(1-3)- β -D-Glu β -D-Gal(1-3)- β -D-Gal β -D-Gal(1-2)- β -D-Gal	(Pazur, Tipton et al. 1958), (Asp, Burvall et al. 1980), (Toba und Adachi 1978) (Pazur, Tipton et al. 1958), (Asp, Burvall et al. 1980) (Pazur, Tipton et al. 1958), (Toba und Adachi 1978) (Toba und Adachi 1978) (Toba und Adachi 1978)

3.2 Nebenprodukte der säurekatalysierten Lactosehydrolyse

Während der Lactosehydrolyse im sauren Milieu oder durch Verwendung stark saurer Kationenaustauscherharze werden wie bei der enzymatisch katalysierten Reaktion Di- und höhere Oligosaccharide gebildet. Der Unterschied besteht jedoch in den verschiedenen Konfigurationen. Während bei der enzymatischen Lactosehydrolyse nur β -glycosidische Bindungen gebildet werden, treten bei der säurekatalysierten Lactosehydrolyse α - und β -glycosidische Verknüpfungen auf, wobei auch hier die 1,6-Bindung charakteristisch ist. Neben diesen intermolekular gebildeten Reversionszuckern können aber auch Anhydrozucker entstehen, die aus einer intramolekularen Glycosidbildung hervorgehen. Der Gehalt und der Typ von auftretenden Reversionszuckern ist dabei abhängig von der Art und Konzentration der Säure, der Konzentration des Substrates und von Reaktionsparametern wie z. B. die Temperatur.

● *Einfluß der Art und Konzentration der Säure*

Bei einer Erhöhung der Säurekonzentration auf den zweifachen Wert, verdoppeln sich die Werte der Geschwindigkeitskonstanten von Hydrolyse und Reversionsreaktion. Die Gleichgewichtskonstante ($K = k_1/k_2$) bleibt dabei unverändert, d. h. eine Erhöhung der Säurekonzentration beeinflusst nicht die Lage des Gleichgewichts, sondern verkürzt die zu seiner Erreichung notwendige Zeit. Es wurde beobachtet, dass die Menge an Reversionsprodukten bei Anwendung erhöhter Säurekonzentrationen zunimmt (Szejtli 1976).

Die Aktivität von Schwefelsäure ist beispielsweise gegenüber Salzsäure sowie bei der Hydrolyse als auch bei der Reversionsreaktion um die Hälfte vermindert (Szejtli 1976).

● *Einfluß der Konzentration des Substrates*

Die Hydrolysegeschwindigkeit ist zu Beginn der Reaktion am größten und sinkt dann mit fortschreitender Reaktionsdauer entsprechend der Konzentrationsabnahme des Substrates. Als Funktion des Hydrolysegrades nimmt die entgegengesetzt ablaufende Reversionsreaktion zu. Das Gleichgewicht beider Reaktionen stellt sich um so schneller ein, je niedriger die Ausgangskonzentration des Substrates ist (Szejtli 1976). D. h. bei identischen Reaktionsparametern werden im Hydrolysat der verdünnteren Lactoselösung die Reversionsprodukte viel zeitiger beobachtet (Huh, Toba et al. 1990).

● *Einfluß der Reaktionsparameter*

Die Wahl der Temperatur hat einen entscheidenden Einfluß auf die Bildung von Reversionszuckern, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen viel größer ist. Verbindungen mit höherer Mobilität als Glucose in der Papierchromatographie, vermutlich Anhydrozucker, wurden im Vergleich zu den Oligosacchariden im etwas späteren Verlauf der

Hydrolyse beobachtet. Beide Arten der Reversionszucker akkumulieren je vollständiger die Lactose umgesetzt wurde (Huh, Toba et al. 1990).

● *Reaktionsprodukte der Reversionsreaktionen*

Ausgehend von einer 30%igen Lactoselösung in 2 M Salzsäure und 100°C wurden nach 16 h im Hydrolysat Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasaccharide papier- bzw. gaschromatographisch nach Derivatisierung nachgewiesen. Ungefähr 22 % des gesamten Zuckergehaltes waren Oligosaccharide. Die isolierten Banden aus dem Oligosaccharidbereich wurden nicht vollständig durch α -Galactosidase, β -Galactosidase, α -Glucosidase und β -Glucosidase in ihre Monomere hydrolysiert, so dass vermutet wurde, dass jede Bande eine Mischung aus mehreren Oligosacchariden mit verschiedenen Konfigurationen ist. Daneben wurden sechs Banden mit höherem Rf-Wert als Galactose und Glucose beobachtet, wobei Strukturen, die der Anhydrozucker identisch sind, vermutet wurden (Huh, Toba et al. 1990).

Bei weiteren Versuchen unter gleichen Reaktionsbedingungen wurden im Lactosehydrolysat mindestens 17 Disaccharide und vier Anhydrozucker festgestellt. Dabei wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie, ^{13}C -NMR, Dünnschichtchromatographie und enzymatischer Analyse folgende Strukturen aufgeklärt, die in nachfolgender Tabelle 3-2 zusammengefaßt sind (Huh, Toba et al. 1991).

Tabelle 3-2: Strukturen von Reversionszuckern, isoliert aus dem Lactosehydrolysat mit Salzsäure (* Postulat), (Huh, Toba et al. 1991)

Reversionszucker	Struktur
Disaccharid	4-O- β -D-Glu-D-Gal 3-O- β -D-Glu-D-Gal 6-O- β -D-Glu-D-Gal 6-O- α -D-Glu-D-Gal 2-O- α -D-Gal-D-Glu 6-O- α -D-Gal-D-Glu (Melibiose) 6-O- α -D-Glu-D-Glu (Isomaltose) 6-O- β -D-Glu-D-Glu (Gentiobiose) α -D-Gal-(1-1)- α -D-Gal 6-O- α -D-Gal-D-Gal 6-O- β -D-Gal-D-Gal (Galactobiose)
Anhydrozucker	1,6-Anhydro- β -Galpyr (Levogalactosan) 1,6-Anhydro- α -Galfur* 1,6-Anhydro- β -Glufur* 1,6-Anhydro- β -Glupyr*

3.3 Nebenreaktionen bei der Lactulose-Herstellung

Lactulose wird aus Lactose in Gegenwart basischer Katalysatoren hergestellt. Nach der bereits erwähnten Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein-Umlagerung werden im basischen Milieu sowohl Aldosen als auch Ketosen sehr leicht enolisiert. Über das 1,2-Endiol stehen Glucose, Mannose und Fructose im Gleichgewicht, wobei Fructose weiterführend über die 2,3-Enolisierung in geringem Umfang zu Psicose isomerisiert. Wie in Abb. 3-1 dargestellt, treten im Fall der Galactose Talose, Tagatose und Sorbose im Gleichgewichtsgemisch auf (siehe auch Abb. 3-5).

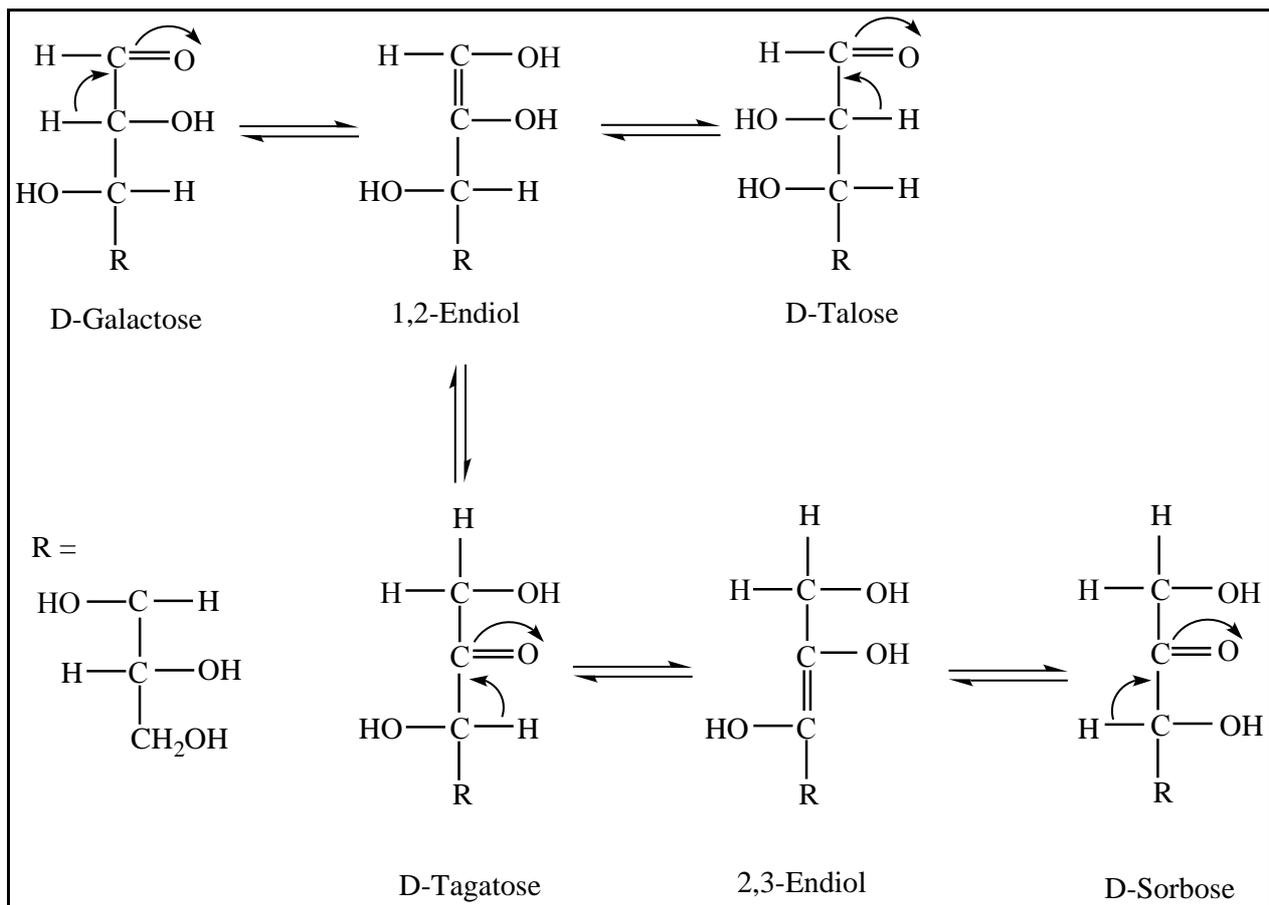


Abb. 3-1: Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein-Umlagerung ausgehend von Galactose

Bei der industriellen Lactulose-Herstellung (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-fructose) ausgehend von Lactose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucose) wird diese Isomerisierung auch auf Disaccharide angewendet. Die Fructose liegt in der Lactulose überwiegend in der Pyranose-Form, aber auch als Furanose vor. In Abhängigkeit vom Katalysator treten bei der Isomerisierung von 5%iger Lactose in Lactulose unterschiedliche Mengen (0,3 - 6,5 %) von Epilactose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-mannose) als Nebenprodukt auf, die sowohl aus Lactose als auch aus Lactulose hervorgehen kann (Olano und Martinez-Castro 1981) (siehe Abb. 3-5). Daneben wurde die Bildung von Epilactose während der Sterilisation von Milch (120°C, 20-30 min) und beim Erhitzen von Lactose nahe dem Schmelzpunkt beobachtet (Olano, Calvo et al. 1989).

Die Isomerisierung von Lactose in Lactulose wird durch eine schnelle Zersetzung von Lactulose in Galactose und Isosaccharinsäure begleitet. In geringen Mengen wurde auch das Isomerisierungsprodukt der Galactose, nämlich Tagatose, nachgewiesen (Olano und Martinez-Castro 1981), (Dendene, Guihard et al. 1994). Wie in Abb. 3-2 dargestellt, könnte mechanistisch die Bildung von Isosaccharinsäure als Diastereomerenpaar durch eine beginnende 2,3-Enolisierung im Fructose-Molekül der Lactulose, einer folgenden Spaltung der glycosidischen Bindung in C4-Position, ähnlich einer Wassereliminierung, unter Bildung der 4-Desoxy-2,3-hexodiulose mit anschließender Benzilsäure-Umlagerung erklärt werden (siehe auch Abb. 3-5).

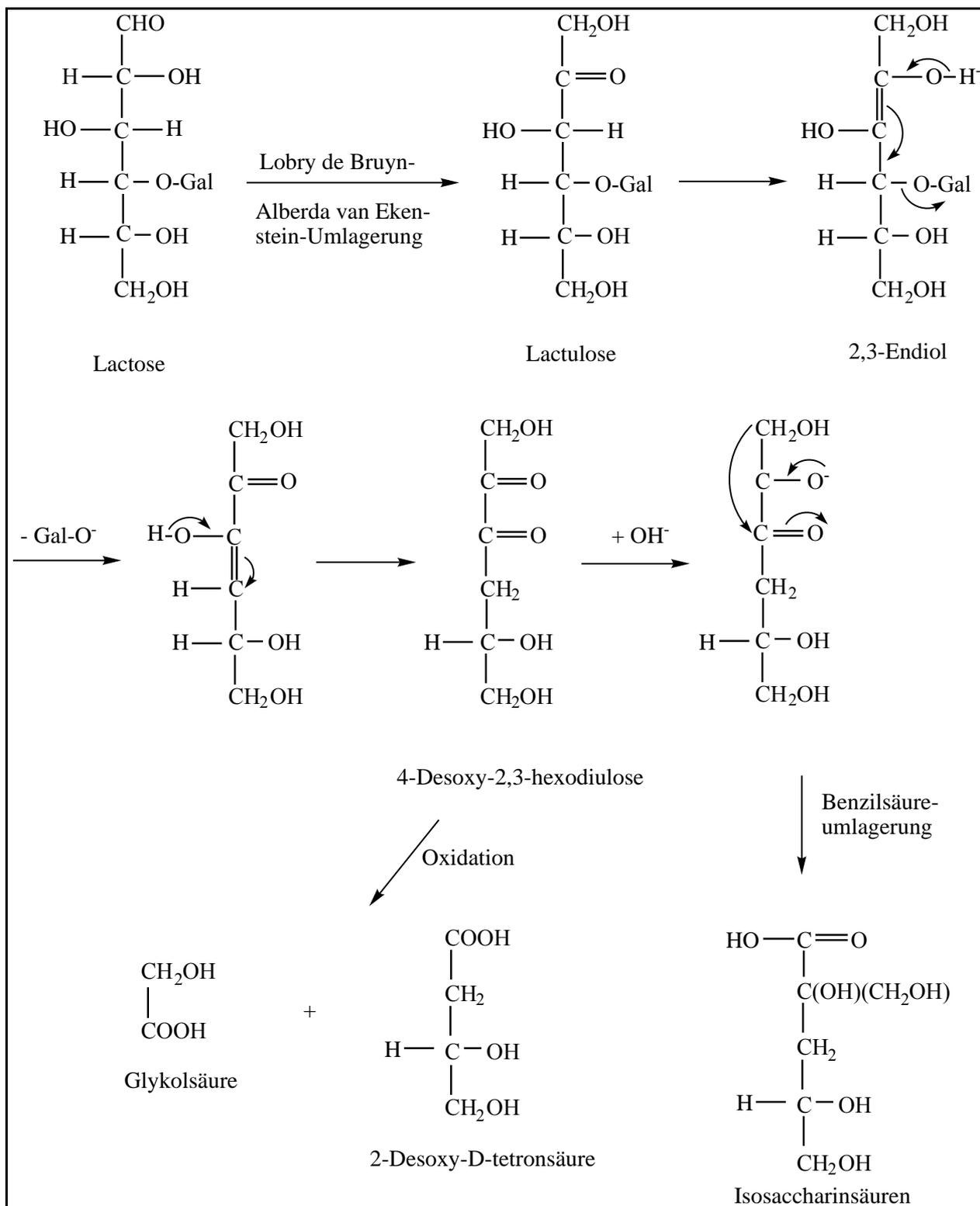


Abb. 3-2: Zersetzung der Lactulose zu Galactose und α , β -Isosaccharinsäure im alkalischen Milieu und oxidative Spaltung der intermediär gebildeten Dicarbonylverbindung 4-Desoxy-2,3-hexodiulose

3.4 Weitere Reaktionen im basischen Milieu

Neben der Isosaccharinsäure-Bildung ist bekannt, dass sich Monosaccharide in starkem Alkali, ebenfalls durch Benzilsäure-Umlagerung, aus den 1,2- bzw. 2,3-Dicarbonylverbindungen auch noch zu Metasaccharinsäuren und Saccharinsäuren zersetzen (Belitz und Grosch 1992), (Baltes 2000).

In erhitzten Lactoselösungen, die annähernd auf den Neutralpunkt oder auf einen schwach alkalischen Bereich gepuffert waren, wurden folgende Verbindungen nachgewiesen: HMF, Furfurylalkohol, Acetol, ferner Milch-, Ameisen- und Essigsäure. Möglicherweise können daneben auch noch Levulinsäure, Brenztraubensäure, Zuckersäure, Methylglyoxal, Acetaldehyd und Formaldehyd gebildet werden. Aus den vorhandenen Erkenntnissen über den Zerfall reduzierender Zuckerarten wurde ein Schema für kleinere Lactosebruchstücke abgeleitet (siehe Abb. 3-3) (Jennes und Patton 1967).

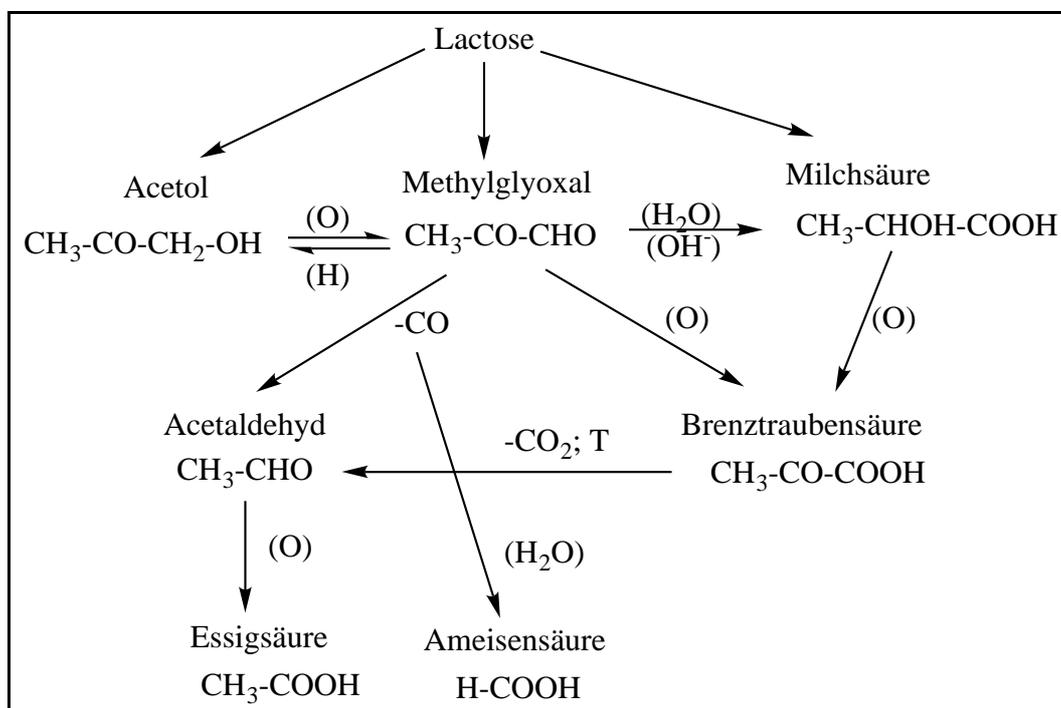


Abb. 3-3: Lactoseabbau im alkalischen Milieu; abgewandelt nach (Jennes und Patton 1967)

Unter nicht oxidativen Bedingungen kommt es zum Kettenbruch an der Doppelbindung der intermediär gebildeten Endiole unter Bildung von Hydroxyaldehyden und Hydroxyketonen. Da die Enolisierung durch das gesamte Molekül laufen kann und eine Vielzahl an Möglichkeiten besteht Wasser abzuspalten, treten viele reaktionsfähige Zwischenprodukte auf. Diese können dann in verschiedenen Reaktionen zu flüchtigen Verbindungen wie Cyclopentenone, Furane, Furanone und Butanone weiterreagieren (Belitz und Grosch 1992), (Baltes 2000).

Die alkalisch oxidative Zersetzung von Lactose führt zu verschiedenen Produkten wie β -D-Galactopyranosyl-(1-3)-D-arabinose und Ameisensäure im äquimolaren Verhältnis (Verhaar, Hendriks et al. 1991). Zudem kann die aus Lactose hervorgegangene D-Galactose sich zu D-

Lyxonsäure und Ameisensäure zersetzen, da in Gegenwart von Oxidationsmitteln die Doppelbindung des Endiols sehr leicht in zwei entsprechende Carbonsäuren gespalten wird (siehe Abb. 3-4). Da D-Tagatose als Ketose auch das 2,3-Endiol bilden kann, entstehen hierbei Glykolsäure und D-Threonsäure (siehe Abb. 3-4). Bei Dicarbonylverbindungen, die beim Zuckerabbau gebildet werden, wird unter oxidativen Bedingungen sehr leicht die C-C-Bindung zwischen den Carbonylfunktionen unter Bildung der entsprechenden Carbonsäuren gespalten. So entsteht beispielsweise aus 4-Desoxy-2,3-hexodiulose Glykolsäure und 2-Desoxy-D-tetronsäure (siehe Abb. 3-2) (Verhaar, Hendriks et al. 1991).

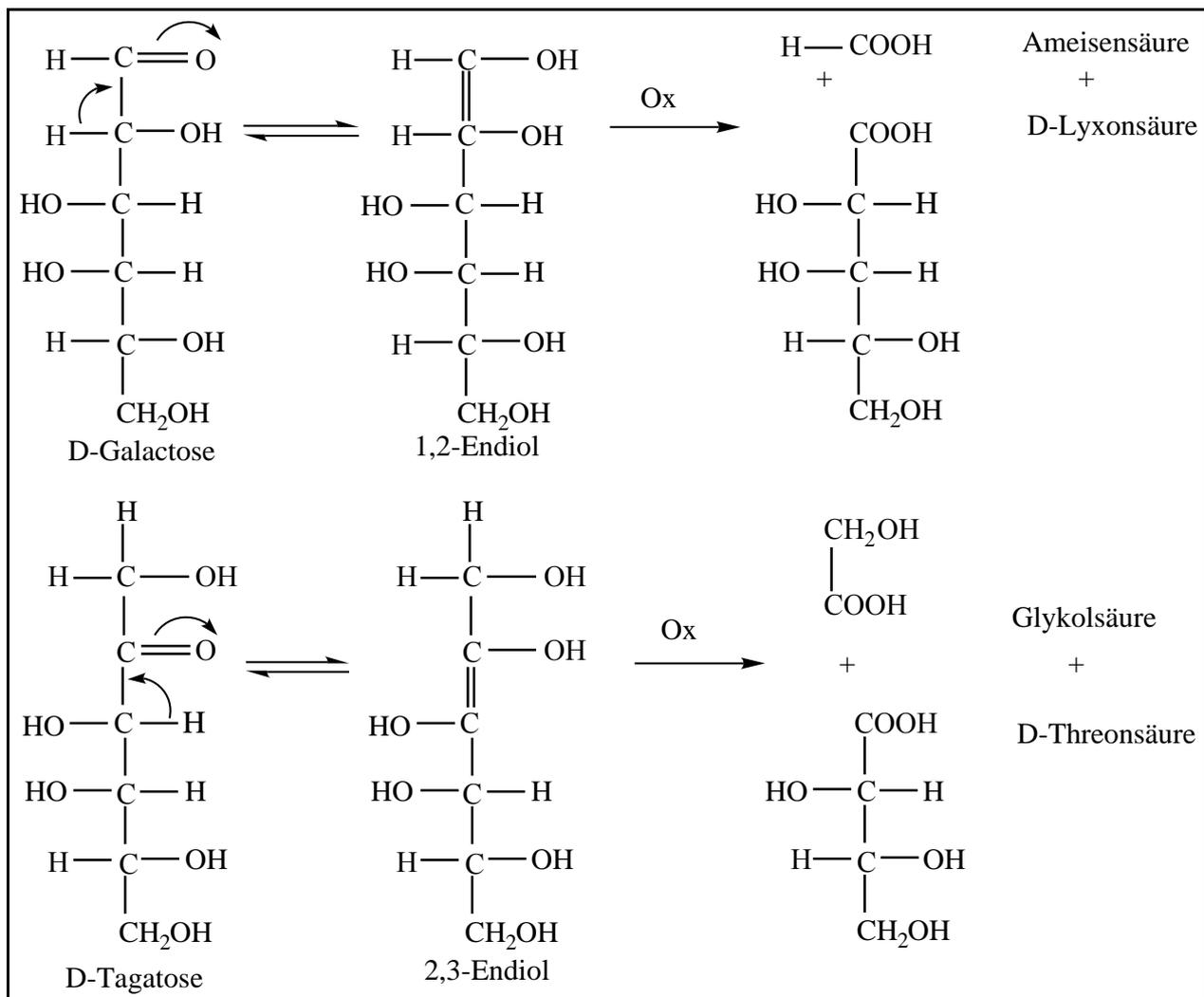


Abb. 3-4: Oxidativer Abbau von D-Galactose und D-Tagatose

3.5 Nebenprodukte bei der Glucoseoxidation

Bei der mikrobiellen Glucoseoxidation zu Gluconsäure werden Nebenprodukte wie 2-Keto- und 5-Ketogluconsäure gebildet. Das Auftreten sowie der Anteil dieser Nebenprodukte am gesamten

Oxidationsprodukt ist abhängig vom eingesetzten Mikroorganismus-Stamm (Anastassiadis, Aivasidis et al. 1994), (Babel, Mueller et al. 1987)

Bei der elektrokatalytischen Oxidation von Glucose im alkalischen Medium unter Verwendung verschiedener reiner und modifizierter Edelmetallelektroden wurden neben Glucon- und Glucarsäure verschiedene Carbonsäuren wie 2-Keto-, 5-Ketoglucon-, 2-Ketoglucarsäure sowie Tartar-, Glycerin-, Hydroxymalon-, Mesooxalin-, Glykol-, Glyoxyl-, Oxal- und Ameisensäure gebildet (Kokoh, Leger et al. 1992). Bei einem katalytischen Verfahren, in dem Glucose mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigem Gas in einer wäßrigen alkalischen Lösung an einem Platin/Palladium und Bismut enthaltenen Katalysator mit Aktivkohle als Träger zu Glucosäure umgesetzt wurde, wurden bei längerem Kontakt der Produktlösung mit dem Katalysator unerwünschte Nebenprodukte wie Glucar-, Wein-, Tartron- und Oxalsäure gebildet. Jedoch konnte keine Glucoseisomerisierung und auch keine nennenswerte Bildung von 2-Ketogluconsäure beobachtet werden (Deller, Krause et al. 1990).

3.6 Weitere Reaktionen unter oxidativen Bedingungen

Durch milde Bedingungen wird die Aldehydgruppe bei Aldosen oxidiert. Dabei entstehen aus Glucose und Galactose Glucosäure und Galactonsäure, die häufig Lactone bilden. Eine Oxidation der OH-Gruppe am C6-Atom unter Erhaltung der Aldehydfunktion ist nur durch geeignete Blockierung der Carbonylgruppe möglich. Die dabei gebildeten Säuren aus den hier zu betrachtenden Monosacchariden wären Glucuron- und Galacturonsäure. Stärkere Oxidationsmittel wie Salpetersäure greifen nicht nur die Carbonylfunktion, sondern auch die primäre Alkohol-Gruppe am endständigen C-Atom an. Dabei entsteht aus Glucose Glucarsäure und aus Galactose Galactar- oder Schleimsäure.

3.7 Bildung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural durch Karamelisierung und dessen weiterer Abbau

5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) wird sowohl als Zwischenprodukt bei der Maillard-Reaktion als auch bei der Karamelisierung gebildet. Während die Maillard-Reaktion durch die Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminen oder Proteinen eingeleitet wird, umfaßt die Karamelisierung Reaktionen, die auf dem Erhitzen von Zuckern ($> 120^{\circ}\text{C}$) oder auf eine pH-Wert-Änderung ($9 < \text{pH} < 3$) ohne Einwirkung von Aminoverbindungen beruhen. Beide nichtenzymatische Bräunungsreaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Farb-, Geruchs- und Geschmacksstoffen.

Bereits beim Erhitzen von Aldosen wie Glucose, Galactose oder Ketosen in schwachsaurer Lösung treten nach langsam verlaufender 1,2-Enolisierung sehr leicht protonenkatalysierte β -Eliminierungen von Wasser ein, die über die reaktive Zwischenstufe der 3-Desoxyhexosulose zu HMF führen. Auf dem gleichen Weg wird Furfural aus Pentosen gebildet. HMF zersetzt sich beim weiteren Erhitzen in verschiedenen sauren Lösungen im äquimolaren Verhältnis zu Levulinsäure (4-Oxopentansäure) und Ameisensäure (Teunissen 1930) (siehe Abb. 3-5).

Für die Lebensmittelchemie ist die Bildung von HMF wichtig, da der Nachweis dieser Verbindung ein wichtiges Indiz für die Erhitzung kohlenhydrathaltiger Lebensmittel ist (z. B. bei der Pasteurisierung von Fruchtsäften, der Herstellung von Fruchtsaftkonzentraten, Honig, Bier u. s. w.). Bei der Herstellung pharmazeutischer Produkte ist die Sterilisierung durch Autoklavieren eine gängige Methode. Die Zersetzung von Glucose unter derartigen Streßbedingungen und während der Lagerung ist ein Hauptproblem in der Qualitätskontrolle von parenteralen Arzneimitteln. In neutralen Glucoselösungen wurde unter Autoklavierbedingungen in einem Temperaturbereich von 106 - 127°C eine Senkung des pH-Wertes bis pH 4 - 5 beobachtet. Aus kinetischen Studien ging hervor, dass sich Glucose über ein Zwischenprodukt zu HMF zersetzt. Da sich zu Beginn der Zersetzungsreaktion, in dem im Vergleich zum HMF relativ hohe Gehalte des Zwischenproduktes vorlagen, schon eine pH-Wert-Absenkung zu beobachten war, wurde vermutet, dass die Bildung von Levulinsäure und Ameisensäure aus HMF nicht die Ursache für diesen Effekt sein konnten (Taylor, Jappy et al. 1971). In einer späteren Arbeit wurde dann als pH-Wert absenkende Verbindung Metasaccharinsäure, die aus dem 3-Desoxyosons hervorgeht, vorgeschlagen (Taylor und Sood 1978). Daneben wurde ein anderer Abbauweg im Zusammenhang mit der zu beobachtenden Gelbfärbung zersetzter Glucose-Lösungen in Betracht gezogen. Dieser beinhaltete die Öffnung des Furanringes mit nachfolgender Decarboxylierung und Oxidation zu Acetylacrylsäure (Tahir und Cates 1974). In einem anderen Versuch konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Jedoch wurden während des Autoklavierens von 5%iger Glucoselösung zwei Säuren, 5-Hydroxymethylfuronsäure und Furan-2,5-dicarbonensäure, die durch Oxidation aus HMF entstehen, identifiziert (Durham, Hung et al. 1982) (siehe Abb. 3-5). HMF ist Vorläufer für die Bildung verschiedener Furane. Unter Curie-Punkt-Pyrolyse-Bedingungen bei 300°C zersetzt sich Glucose über HMF zu 2,5-Furandialdehyd, 5-Methylfurfural und Furfural (Schrödter 1992) (siehe Abb. 3-5).

Die Bildung von HMF erfolgt sowohl aus erhitzten Lösungen von Monosacchariden als auch aus Disacchariden, bevorzugt unter sauren und neutralen Bedingungen (Yaylayan und Mandeville 1994). Die Zersetzung von Galactose unter Autoklavierbedingungen steigt mit zunehmender Ausgangskonzentration und Konzentration der Pufferlösung. In einer 30%igen wäßrigen Galactoselösung wurden nach 30minütiger Temperaturbehandlung bei 121°C 2,8 mg/ 100 ml HMF nachgewiesen. Desweiteren wurde eine höhere Zersetzung von Galactose in Acetatpuffer als in Phosphatpuffer bei pH-Werten von 4, 5 und 6 beobachtet (Bhargava, Rahman et al. 1989). In Gegenwart von schwachen Basen wie Salze von organischen Säuren isomerisiert Glucose während des Autoklavierens (121°C, 15 min) zu Fructose und kleineren Gehalten von Psicose, wobei der HMF-Gehalt im Vergleich dazu relativ gering bleibt. Da Ketosen sich schneller als Aldosen zersetzen, wurde Fructose als Vorläufer für die HMF-Bildung vorgeschlagen (Buxton, Jähnke et al. 1994). Bei der thermisch induzierten Karamelisierung (200°C) wurde die HMF-Bildung auch aus Trisacchariden wie Maltotriose beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte eine intramolekulare Bildung von Osulosen am reduzierenden Ende eines Oligosaccharides sein, in dem die glycosidische Bindung in C4-Position ähnlich der Eliminierung von Wasser aus Glucose anschließend gespalten wird (Kroh 1994).

Während der Karamelisierung tritt eine gelbliche bis braune Färbung auf, die möglicherweise durch Bildung braun gefärbter unlöslicher Polymere verursacht wird (siehe Abb. 3-5). HMF, Furfural und 2-Hydroxyacetyl-furan (HAF) wurden als Vorläufer für solche regelmäßigen Polymere in die Betrachtung einbezogen (Tomasik, Palasinski et al. 1989). Daneben wurden aber auch Osulosen, die viel reaktiver sind, dafür vorgeschlagen (Kroh 1994).

3.8 Weitere Reaktionen unter Karamelisierungsbedingungen

Bei der D-Glucose-Zersetzung im sauren Milieu werden auch Ketosen gebildet, die sich schneller zersetzen, da der Ring leichter geöffnet wird. Die Isomerisierung wird zwar vor allem durch Alkalien katalysiert (Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein-Umlagerung), aber auch Säuren und alle ionisierenden Verbindungen üben eine starke Wirkung aus (Szejtli 1976), (Buxton, Jähne et al. 1994). Desweiteren wurde die Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein-Umlagerung als erster Schritt der Karamelisierung diskutiert (Kroh 1994). Da Ketosen neben dem vorherrschenden 1,2-Endiol auch das 2,3-Endiol bilden können, wird das Spektrum der Zersetzungsprodukte noch breiter (siehe Abb. 3-5). Nachfolgende β -Eliminierungen von Wasser führen über 1- und 4-Desoxydiulose und weiteren Zyklisierungen und β -Eliminierungen zu vorwiegend verschiedenen flüchtigen Verbindungen, die für das Karamelaroma verantwortlich sind: Furanone wie 2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3-furanon (Diacetylformosin = DDF), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanon (HDF), Furane wie 2-Acetyl-3-hydroxy-furan (Isomaltol), 2-Hydroxyacetyl-furan (HAF). Unter neutral-basischen Bedingungen wird bevorzugt 3-Hydroxy-2-methyl-pyran-4-on (Maltol) aus Disacchariden mit freier OH-Gruppe in C6-Position des reduzierenden Zuckers und 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on aus Monosacchariden gebildet (Yaylayan und Mandeville 1994), (Kroh 1994). Daneben ist 3,5-Dihydroxy-2-methyl-pyran-4-on (Hydroxymaltol) ebenfalls ein typisches Zersetzungsprodukt von Monosacchariden (Ledl 1987) (siehe Abb. 3-5). Alle diese Verbindungen sind auch Produkte der Maillard-Reaktion.

Experimenteller Teil

4 Material und Methoden

4.1 Proben

Zur Bearbeitung des Themas standen Proben von sechs verschiedenen Galactose-Herstellern zur Verfügung. Wie bereits im Abschnitt 2 ausführlich erläutert, werden bei der Herstellung von Galactose mehrere Teilprozesse durchlaufen. Dabei spielt die Kristallisation zur Abtrennung von Nebenprodukten und weiteren Aufreinigung der Rohgalactose (siehe Abb. 2-2) eine wesentliche Rolle. Von einigen Herstellern lagen Zwischenprodukte des Kristallisationsprozesses vor. Im Einzelnen handelte es sich um Kristallisate und deren flüssige Überstände, den Mutterlaugen. Bei einem wiederholt durchgeführten Kristallisationsprozess waren somit mehrere Kristallisate und Mutterlaugen in einem Herstellungsgang zu untersuchen. Das Endprodukt wird im folgenden mit "Galactose" bezeichnet. Von den Herstellern B und C lag jedoch nur das Kristallisat der letzten Stufe vor. Es unterscheidet sich im allgemeinen zum Endprodukt lediglich durch einen höheren Wasser- oder Lösungsmittelgehalt, da der Trocknungsprozess noch nicht vollständig durchlaufen wurde. Im nachfolgenden sind die einzelnen Hersteller mit den dazugehörigen Proben aufgelistet.

- ① **Hersteller A**
 Mutterlauge des 1. - 3. Kristallisates
 1. - 3. Kristallisat
 Galactose
- ② **Hersteller B**
 1. und 2. Kristallisat
- ③ **Hersteller C**
 Mutterlauge des 1. und 2. Kristallisates
 1. und 2. Kristallisat
- ④ **Hersteller D**
 Galactose
- ⑤ **Hersteller E**
 Galactose
- ⑥ **Hersteller F**
 Galactose

Die Mutterlaugen 1-3 der Herstellung A waren klare ungefärbte Flüssigkeiten mit abnehmendem honigartigen und zunehmendem alkohlartigen Geruch. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Mutterlauge 1 der Herstellung C durch eine gelbe bis bräunliche Färbung und einer intensiveren Honignote. Wie bei der 1. Mutterlauge war auch im klaren ungefärbten Überstand des 2. Kristallisates der Herstellung C keine Alkoholnote geruchlich zu bemerken. Bei allen anderen

Proben handelte es sich um weiße pulverförmige Substanzen. Lediglich beim 1. Kristallinat der Herstellung B und bei der Galactose der Herstellung D war visuell im Vergleich zu den anderen Proben eine etwas schmutzigere Färbung zu beobachten und die Kristallisate 1-3 der Herstellung A rochen nach Alkohol.

4.2 Versuchsbeschreibungen

4.2.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

4.2.1.1 Einsatz von Kationenaustauschern

4.2.1.1.1 Bestimmung des Galactose-Gehaltes

Chromatographisches System

Gerät	Quaternäre Pumpe G 1311A, Degaser G 1322A, Autosampler G 1313A, Probenschleife 10µl; (Serie 1100, Fa. Hewlett Packard)
Säule	SUGAR-PAK I, Ionenaustauscher in Ca-Form Länge: 2x 300 mm x ID Ø 6,5 mm (Fa. Waters)
Temperatur	70°C
Eluent	46,8mg CaSO ₄ x 2 H ₂ O; 39,7mg Titriplex II, 0,2g Natriumazid /11 H ₂ O, mit 20%iger H ₂ SO ₄ auf pH 2,0 eingestellt
isokratische Elution	Laufzeit: 55 min Flow: 0,4 ml/min; 10% Referenzzelle RI, gesamt 0,44 ml/min
Detektor	Brechungsindex RI-Detektor 7511 (Fa. ERC)

PC-Auswerteprogramme

"Vespa" = Versuchsauswertung Spurenanalyse, Version 2.11, Copyright by Schering AG 1993; (ZI - Angewandte Mathematik), Reflection 4 (Access Chrom); Perkin Elmer

Vergleichssubstanz

Arbeitsstandard Galactose: # AS1363, Gehalt 99% i.T., H₂O-Gehalt 0,63%

Durchführung

Die quantitative Bestimmung von Galactose in den Proben erfolgte über eine Einpunktkalibrierung, wobei jeweils zwei hergestellte Standardlösungen und zwei Aufarbeitungen pro Probe doppelt injiziert wurden.

Standardlösung

Ca. 500 mg Galactose-Arbeitsstandard wurden in einem 5ml-Meßkolben eingewogen und mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) zur Marke aufgefüllt.

Probenvorbereitung

Kristallisate und Galactosen

Von den vorliegenden Proben wurden ca. 500 mg in einem 5 ml-Meßkolben eingewogen und mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) zur Marke aufgefüllt. Von der Galactose, Hersteller D, wurden ca. 100 mg in einem 1ml-Meßkolben eingewogen.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 5 ml-Meßkolben, der mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) zur Marke aufgefüllt wurde: 50 mg Mula1/C, 360 mg Mula2/C, 260 mg Mula1/A, 600 mg Mula2/A, 550 mg Mula3/A.

Berechnung

Aus jeder Einwaage des Galactose-Arbeitsstandards, m [mg], wurde die effektive Einwaage, m_{eff} [mg], berechnet (Gleichung 1). Danach wurde der jeweilige Quotient aus der erhaltenen Peakfläche der Standardlösung und der effektiven Einwaage berechnet (CF [FE/mg]). Aus allen Quotienten wurde der Mittelwert gebildet, der bei der Berechnung des Galactose-Gehaltes, bezogen auf die wasserfreie Probe berücksichtigt wurde (Gleichung 2). Die jeweiligen Wasser-Gehalte wurden aus der Karl-Fischer-Titration herangezogen (Versuchsbeschreibung unter Punkt 4.2.7).

Gleichung 1:

$$m_{\text{eff}}[St] = \frac{m[St] \cdot G \cdot (100 - W[St])}{10000}$$

$m_{\text{eff}}[St]$	effektive Einwaage des Galactose-Arbeitsstandards [mg]
$m[St]$	Einwaage des Galactose-Arbeitsstandards [mg]
G	Gehalt Galactose des Arbeitsstandards [%]
$W[St]$	Wassergehalt des Galactose-Arbeitsstandards [%]

Gleichung 2:

$$\text{Galactose [\%]} \text{ (bezogen auf die wasserfreie Probe)} = \frac{PF[P] \cdot 100}{\overline{CF}[St] \cdot m_{\text{eff}}[P]}$$

$$m_{\text{eff}}[P] = \frac{m[P] \cdot (100 - W[P])}{100}$$

$PF[P]$	Peakfläche der Probe [FE]
$PF[St]$	Peakfläche des Galactose-Arbeitsstandards [FE]
$m[P]$	Einwaage der Probe [mg]
$W[P]$	Wassergehalt der Probe [%], zuzüglich Gehalt anderer Lösungsmittel
$\overline{CF}[St]$	Mittelwert einzelner Faktoren: $CF[St] = PF[St]/m[St]$

4.2.1.1.2 Quantitative Bestimmung von 1,6-Anhydrozucker neben organischen Säuren

Chromatographisches System und PC-Auswerteprogramme -siehe Punkt 4.2.1.1.1

Vergleichssubstanzen

L (-)-Äpfelsäure (Fa. Fluka), Bernsteinsäure (Fa. Riedel de Haen), 1,6-Anhydro- β -D-Glucopyranose (Fa. Sigma), 1,6-Anhydro- β -D-Galactopyranose (Fa. Sigma), siehe auch Punkt 4.2.4

Durchführung

Durch Erstellung von Kalibriergeraden wurde die Linearität des Detektors für L(-)-Äpfelsäure, Bernsteinsäure, 1,6-Anhydro- β -D-glucose und -galactose überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches erfolgte die quantitative Bestimmung dieser Substanzen über eine Einpunktkalibrierung, wobei jeweils zwei hergestellte Standardlösungsgemische und zwei Aufarbeitungen pro Probe alternierend doppelt injiziert wurden.

Stammlösungen der Standardsubstanzen

Es wurden ca. 20 mg Bernsteinsäure, L(-)-Äpfelsäure, 1,6-Anhydro- β -D-Glucose, 1,6-Anhydro- β -D-Galactose in je einem 2 ml Meßkolben eingewogen und mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) zur Marke aufgefüllt.

Standardlösungsgemisch

Von jeder Stammlösung wurden 0,5 ml in einen einen 20 ml Meßkolben pipettiert, der bis zur Marke mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) aufgefüllt.

Die Konzentration der jeweiligen Standards betrug somit absolut ca. 2,55 μ g/10 μ l Injektionsvolumen oder ca. 255 mg/l.

Probenvorbereitung

Kristallisate und Galactosen

Von den vorliegenden Proben wurden jeweils ca. 500 mg in einem 5 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) aufgefüllt.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 5 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit mobiler Phase (ohne Schwefelsäure 20%) aufgefüllt wurde: Mutterlauge 1/A ca. 250 mg, Mutterlauge 2/A ca. 600 mg, Mutterlauge 3/A ca. 3000 mg und Mutterlauge 1/C ca. 100 mg.

4.2.1.2 Einsatz von Anionenaustauschern

4.2.1.2.1 Quantitative Bestimmung von Lactose und 1,6-Anhydrozucker

Chromatographisches System

Gerät	Gradientenpumpe (GP 40), Chromatographisches Modul (LC 020), Helium-Entgasung, Injektionsventil); Probenschleife 50 μ l (Serie DX 500, Fa. Dionex)
-------	--

Detektor Elektrochemischer Detektor (ED 40) mit Goldelektrode (Fa. Dionex)

Detektoreinstellung:

t (s) E (V) Integrationsperiode: 0.20s - 0.40s
 0.00 0,05
 0.20 0,05
 0.40 0,05
 0.41 0,75
 0.60 0,75
 0.61 -0,15
 1.00 -0,15

Säule Carbo Pak Guard PA1 25 x 3 mm I.D. (Fa. Dionex)
 Carbo Pak PA1 250 x 4 mm I.D. (Fa. Dionex)

Temperatur Raumtemperatur

Eluent A: 200 mM NaOH (aus 50%iger NaOH hergestellt),
 Natriumhydroxid-Plätzchen, p.a. (Fa. Merck)
 B: Millipore-Q plus - Wasser

Gradientenelution Laufzeit: 80 min inklusive Säulenreinigung und Konditionierung

Zeit [min]	% A	% B	Flußrate [ml/min]
0.00	4	96	0,50
40.00	4	96	1,00
60.00	100	0	1,00
70.00	100	0	1,00
70.10	4	96	1,00
80.00	4	96	1,00

isokratische Elution Laufzeit: 95 min inklusive Säulenreinigung und Konditionierung

Zeit [min]	% A	% B	Flußrate [ml/min]
0.00	6	94	1,00
40.00	6	94	1,00
40,10	100	0	1,00
85,00	100	0	1,00
85,10	6	94	1,00
95,00	6	94	1,00

Datensystem Peak Net, Version 4.30 (Fa. Dionex)
 Versuchsauswertung Spurenanalyse, Version 2.11 (Fa. Schering)

Vergleichssubstanzen

β -Lactose (Fa. Sigma), 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose (Fa. Sigma), siehe auch Pkt. 4.2.1.1.2

Durchführung

Die Bestimmung von Lactose und der Anhydrozucker wurde durch den Einsatz der o. g. Gradientenelution durchgeführt. Durch die Erstellung von Kalibriergeraden wurde die Linearität des Detektors für Lactose, 1,6- β -D-Anhydrogalactose, 1,6- β -D-Anhydroglucose und 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches wurde zur quantitativen Bestimmung der Lactose und Anhydrozucker eine Einpunktkalibrierung mit jeweils zwei Standardlösungen durchgeführt. Die vorliegenden Proben wurden dreifach aufgearbeitet und doppelt injiziert.

Standardlösungen Lactose

V1/2) 28,0 (28,2) mg /50ml//1ml/10ml//0,4ml/25ml	→	44,80 (45,12) ng/50 μ l	(Mula1/A)
V3/4) 28,0 (28,2) mg /50ml//1ml/10ml//0,25ml/25ml	→	28,0 (28,2) ng/50 μ l	(Mula2/A)
V5/6) 28,0 (28,2) mg /50ml//1ml/10ml//2ml/25ml	→	224,0 (225,6) ng/50 μ l	(Mula1/C)
V7/8) 28,0 (28,2) mg /50ml//1ml/10ml//0,125ml/25ml	→	14,0 (14,1) ng/50 μ l	(Gal/D)
V9/10) 28,0 (28,2)mg /50ml//1ml/10ml//0,125ml/25ml	→	14,0 (14,1) ng/50 μ l	(1.Kris/A)

Standardlösungen 1,6- β -D-Anhydro-Galactopyranose

V1/2) 10,1 (10,1) mg /50ml//2ml/10ml//2ml/25ml	→	161,6 (16,6) ng/50 μ l	(Mula1/C)
V3/4) 10,1 (10,1) mg /50ml//1ml/10ml//0,14ml/25ml	→	5,656 (5,656) ng/50 μ l	(Gal/F; Gal/D)

Standardlösungen 1,6- β -D-Anhydro-Glucopyranose

V1/2) 22,4 (20,1) mg/20ml//1ml/50ml//0,2ml/50ml	→	4,48 (4,02) ng/50 μ l	(Gal/D; Gal/F)
V3/4) 22,4 (20,1) mg/20ml//1ml/50ml//0,5ml/50ml	→	11,20 (10,05) ng/50 μ l	(Mula2/C)
V5/6) 20,5 (19,3) mg/20ml//1ml/50ml//0,5ml/50ml	→	10,25 (9,65) ng/50 μ l	(Mula1/C)

*Probenvorbereitung**Kristallisate und Galactosen*

Es wurden jeweils ca. 25 mg in einem 25 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 100 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: für die Lactose-Bestimmung ca. 80 mg Mutterlauge 1/A, ca. 240 mg Mutterlauge 2/A, ca. 25 mg Mutterlauge 1/C; für die 1,6- β -D-Anhydrogalactose-Bestimmung ca. 25 mg Mutterlauge 1/C; für die 1,6- β -D-Anhydroglucose-Bestimmung ca. 200 mg Mutterlauge 2/C, ca. 25 mg Mutterlauge 1/C.

4.2.1.2.2 Quantitative Bestimmung der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose

Chromatographisches System siehe unter Punkt 4.2.1.2.1, Gradientenelution

Vergleichssubstanzen siehe unter Punkt 4.2.1.2.1

Durchführung

Nach Festlegung des Arbeitsbereiches durch Kalibrierung (siehe unter Pkt. 4.2.1.2.1) wurde eine Zweipunktkalibrierung mit zwei Standardlösungen 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose durchgeführt. Durch Regressionsanalyse wurde der Gehalt in den Proben berechnet.

Standardlösungen 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose

V1) 5mg/10ml//1/10ml//0,25ml/20ml//50ml \rightarrow 31,25 ng/50 μ l

V2) 5mg/10ml//1/10ml//4,00ml/20ml//50ml \rightarrow 500,00 ng/50 μ l

Probenvorbereitung

Kristallisate und Galactosen

Alle Einwaagen erfolgten in einem 25 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: ca. 70 mg 1.Kris/C, ca. 20 mg Gal/D, ca. 50 mg alle anderen vorliegenden Proben. Danach wurde eine 1:2 Verdünnung bei dem 1.-2.Kris/C, 3.Kris/A, 1.-2.Kris/B, der Gal/A, Gal/E, Gal/F, eine 1:4 Verdünnung beim 1.-2.Kris/A vorgenommen.

Mutterlaugen

Alle Einwaagen erfolgten in einem 100 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: ca. 80 mg Mula1/A, ca. 240 mg Mula2/A, ca. 800 mg Mula3/A, ca. 22 mg Mula1/C und ca. 160 mg Mula2/C.

4.2.1.2.3 Bestimmung der Oxidationsprodukte von Galactose, Glucose und Lactose

Chromatographisches System

Eluent

Siehe Punkt 4.2.1.2.1

A: 200 mM NaOH (aus 50%iger NaOH hergestellt)

B: Millipore Q Plus-Wasser

C: 0,5 M Natriumacetat-Lösung

Gradientenelution

Laufzeit: 80 min, inklusive Konditionierung

Zeit [min]	% A	% B	% C	Flußrate [ml/min]
0.00	40	60	0	0,50
62.50	40	40	20	0,50
72.50	40	40	20	0,50
72.60	40	60		0,50
82.60	40	60		0,50

Vergleichssubstanzen

D-Galactonsäure-Hemicalciumsalz (Fa. Sigma), Gluconsäure-Natriumsalz (Fa. Merck), Lactobionsäure (Fa. Sigma), D-Galacturonsäure-Monohydrat (Fa. Sigma), D-Glucuronsäure (Fa. Fluka), 4-O-(4-O-[6-O- α -D-Glucopyranosyl- α -D-Glucopyranosyl]- α -D-Glucopyranosyl)-D-Glucopyranose (Fa. Sigma)

Durchführung

Erstellung der Kalibriergeraden

Stammlösungen

119,98 mg D-Galactonsäure-Hemicalciumsalz	entspricht 109,36 mg Galactonsäure /25 ml
120,60 mg Gluconsäure-Natriumsalz	entspricht 108,45 mg Gluconsäure /25 ml
120,29 mg D-Galacturonsäure-Monohydrat	entspricht 110,05 mg Galacturonsäure /25 ml
	120,60 mg Lactobionsäure /25 ml
	120,00 mg Glucuronsäure /25 ml

Standardlösungen

Von den Stammlösungen wurden je 0,060; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000; 2,000 ml in einen 50 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

*Probenvorbereitung:**Kristallisate und Galactosen*

Es wurden jeweils ca. 70 mg in einem 25 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 100 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: ca. 100 mg Mutterlauge 1/A, ca. 25 mg Mutterlauge 1/C, ca. 100 mg Mutterlauge 2/C.

Die Berechnung der Galacton-, Glucon- und Lactobionsäure-Gehalte erfolgte über die externe Kalibrierung.

4.2.1.2.4 Bestimmung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)

Chromatographisches System

Gerät	Gradientenpumpe, Chromatographisches Modul, Helium-Entgasung, Injektionsventil; Probenschleife 50µl (Serie 4000i; Fa. Dionex)	
Detektor 1	gepulster elektrochemischer Detektor (PED) mit Goldelektrode (Fa. Dionex); Range = 100 nC Detektoreinstellung (Document No. 034329, Fa. Dionex):	
	<u>t (s)</u>	<u>E (V)</u> Integrationsperiode: 0,30s - 0,50s
	0,00	0,10
	0,50	0,10
	0,51	0,60
	0,59	0,60
	0,60	- 0,60
	0,65	- 0,60
Detektor 2	Variabler Wellenlängendetektor, Serie 1050 (Fa. Hewlett Packardt) Detektoreinstellung: $\lambda = 283$ nm, Range = 2 AU	

Säule, Temperatur, Eluent, Gradientenelution siehe Punkt 4.2.1.2.1

Vergleichssubstanz

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF); 99 %, (Fa. Sigma)

Durchführung

Durch Erstellung einer HMF-Kalibriergeraden wurde die Linearität des UV-Detektors überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches wurde zur quantitativen Bestimmung von HMF eine Einpunktkalibrierung durchgeführt.

Standardlösungen

20,0 mg/25ml//1ml/10ml//1ml/50ml//0,3ml/10ml → 2,4 ng/50µl (Mula1/A, 1.Kris/A, 1./2.Kris/C)

20,2 mg/25ml//1ml/20ml//0,27ml/20ml → 27,3 ng/50µl (Mula1/2/C)

20,0 mg/25ml//1ml/10ml//1ml/10ml//0,23ml/10ml → 9,2 ng/50µl (Gal/D/F)

Probenvorbereitung*Kristallisate und Galactosen*

Von den vorliegenden Proben wurden jeweils ca. 1g in einem 10 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 20 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: Mula1/A 10ml; Mula1/C 100 µl; Mula 2/C 8ml.

4.2.1.2.5 Bestimmung von Tricarbonsäuren neben Phosphat

Chromatographisches System

Gerät, Eluent siehe Punkt 4.2.1.2.1

Detektor Leitfähigkeitsdetektor CD 20 (Fa. Dionex)

Säule Ion Pac AG11 Guard (4 x 50 mm) + Ion Pac AS11, 4 x 250 mm I.D. (Fa. Dionex) siehe Punkt 4.2.1.2.6

Temperatur Raumtemperatur

Gradientenelution Laufzeit: 30 min

Zeit [min]	% A	% B	Flußrate [ml/min]
0.00	10	90	1,00
20.00	15	85	1,00
20.01	10	90	1,00
30.00	10	90	1,00

Suppressor Anionen-selbst-regenerierender Suppressor ASRS-I, 4mm; 100 mA; Auto Suppression Recycle Mode

Vergleichssubstanzen

Tri-Natriumphosphat 12-Hydrat (Fa. Merck), Zitronensäure- Monohydrat (Fa. Riedel de Haen), Iso-Zitronensäure-Tri-Natriumsalz (Fa. Sigma), trans-Aconitsäure (Fa. Sigma), cis-Aconitsäure (Fa. Sigma)

Durchführung

Durch die Erstellung von Kalibriergeraden wurde die Linearität des Detektors für Phosphat, Zitronen-, Isozitronen-, trans-Aconit- und cis-Aconitsäure überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches erfolgte die Bestimmung der Substanzen über die externe Kalibrierung.

Stammlösungen

50,96 mg Tri-Natriumphosphat	entspricht 12,73 mg Phosphat /200 ml
21,39 mg Zitronensäure-Monohydrat	entspricht 19,56 mg Zitronensäure /200 ml
21,42 mg Iso-Zitronensäure-Tri-Natriumsalz	entspricht 15,95 mg Iso-Zitronensäure /200 ml
	12,70 mg cis-Aconitsäure /200 ml
	12,50 mg trans-Aconitsäure /200 ml

Standardlösungen

Von den Stammlösungen wurden je 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 ml in einen 250 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Probenvorbereitungen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 10 ml Meßkolben, der mit Wasser, Millipore Q plus, bis zur Marke aufgefüllt wurde: Mula1/A: 50 und 200µl; Mula2/A: 50, 100, 500, 2000µl; Mula3/A: 50µl; 1.Kris/A: 12, 266 und 1000 mg; 2.Kris/A: 24, 100, 1000 mg; 3.Kris/A: 1000mg; Gal/A: 1000 mg; 1.Kris/B, 100mg (1:25 verdünnt), 1000mg; 2.Kris/B: 250, 1000mg; Gal/D: 300 und 500 mg; 1.Kris/C: 1000mg. Abweichend davon wurden 50, 100 und 200µl der Mutterlauge1/C in einem 25 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt.

4.2.1.2.6 Bestimmung von anorganischen Anionen neben Dicarbonsäuren

Chromatographisches System

Gerät, Detektor, Suppressor siehe Punkt 4.2.1.2.5

Säule	Ion Pac AG4A-SC Guard (4 x 50 mm) + Ion Pac AS4A-SC Analytical (4 x 250 mm) + Ion Pac AS4 Analytical (4 x 250 mm), (Fa. Dionex)*
Temperatur	Raumtemperatur
Eluent	1,7 mM NaHCO ₃ /1,8 mM Na ₂ CO ₃
isokratische Elution	Flow: 2,0 ml/min Laufzeit: 30 min

* Strukturell-technische Eigenschaften von verschiedenen Latex-Anionenaustauschern nach Spezifikationen der Fa. Dionex:

analytische Säule	Partikel Ø	Substrat- VG**	Latex- teilchen	Latex-teilchen VG**	Hydropho- bilität
	[µm]	[%]	Ø [nm]	[%]	
Ion Pac					
AS4	15	2	75	3,5	mittel
AS4A-SC	13	55	160	0,5	mittel-niedrig
AS11	13	55	85	6,0	sehr niedrig

** Vernetzungsgrad

Latex-Anionenaustauscher bestehen aus einem oberflächensulfoierten Substrat auf der Basis von Polystyrol/Divinylbenzol mit einem definierten Teilchendurchmesser und porösen, total aminierten Latex-Teilchen hoher Kapazität, die die eigentliche Austauschfunktion tragen (Weiß 1991).

Vergleichssubstanzen

Natriumnitrat, Suprapur, mind 99 % (Fa. Merck), Natriumsulfat, mind. 99 % (Fa. Riedel de Haen), Natriumchlorid, mind. 99 % (Fa. Merck), Oxalsäure-2-Hydrat (Fa. Riedel de Haen), 2-Ketoglutar säure (Fa. Fluka), Schleimsäure (Fa. Fluka), siehe Punkt 4.2.1.1.2, 4.2.1.2.5

Chemikalien

Na₂CO₃-10hydrat (Fa. Riedel de Haen, p.a.)

NaHCO₃ (Fa. Fluka, p.a.)

Materialien

Plastikgefäße: 25 ml Meßkolben

Durchführung

Durch die Erstellung von Kalibriergeraden wurde die Linearität des Detektors für Chlorid, Sulfat, Nitrat, Phosphat, Schleimsäure, Oxalsäure, 2-Ketoglutar säure überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches wurde zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen eine Einpunkt- bzw. Zweipunktkalibrierung mit jeweils zwei Standardlösungen durchgeführt. Die vorliegenden Proben wurden zweifach aufgearbeitet und doppelt injiziert.

Stammlösungen

5,2 mg Natriumchlorid

entspricht 3,15 mg Chlorid /25 ml

5,0 mg Natriumnitrat

entspricht 3,65 mg Nitrat /25 ml

103,5 mg Trinatriumphosphat-12-hydrat

entspricht 25,86 mg Phosphat /25 ml

5,0 mg Natriumsulfat

entspricht 3,38 mg Sulfat /25ml

10,0 mg Oxalsäure-2-Hydrat

entspricht 7,44 mg Oxalsäure /25ml

13,3 mg Schleimsäure /25 ml

21,6 mg 2-Ketoglutar säure /25ml

Standardlösungen

Von den Stammlösungen wurden je 0,2 ml zusammen in einen 25 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Für die Einpunktkalibrierung (für 3.Kris/A; Gal/A; 2.Kris/C; 2.Kris/B; Gal/D; Gal/E, Gal/F) wurden 10,0 ml und für die Zweipunktkalibrierung (für Mula 1-

3/A; 1.-2. Kris/A; Mula 1-2/C; 1.Kris/C; 1.Kris/B) 10,0 ml und 20,0 ml in einen 25 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Probenvorbereitungen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 25 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: Mula1/A: ca. 130 mg, 430 mg, 1,3 g; Mula2/A: ca. 450 mg, 1,1 g; Mula3/A: ca. 1,5 g, 3,1 g; 1.-2.Kris/A: ca. 1,3 g, 2,6 g; Mula1/C: ca. 240 mg (1:100 verdünnt), 80 mg, 300 mg, 1,5 g; Mula2/C: ca. 410 mg, 2,8 g; 1.Kris/C: ca. 1,9 g, 2,5 g; 1.Kris/B: ca. 160 mg, 1,0 g; Gal/D: ca. 500 mg; 3.Kris/A, Gal/A, 2.Kris/C, 2.Kris/B, Gal/E, Gal/F: ca. 2,5 g.

4.2.1.3 Umkehrphasen

4.2.1.3.1 Bestimmung von 2-Ketocarbonsäuren nach Derivatisierung

Chromatographische Parameter

Säule	Resolve RP C18; 3,9 x 300 mm; 90 Å; 5µm; Fa. Waters
Pumpe	Fa. Waters 510
Detektor	Fluoreszenzdetektor RF-530; Fa. Shimadzu
Autosampler	712 Wisp; Fa. Waters
Eluent	Methanol (Chromasolv für HPLC; Fa. Riedel de Haen), Wasser (1:1)
Flow	0,2 ml/min
Injektionsvolumen	10µl

PC-Auswerteprogramme siehe 4.2.1.1.1

Vergleichssubstanzen

2-Ketoglutar säure (Fa. Fluka), MG = 146,10 g/mol; Natrium-Pyruvat (Fa. Sigma), MG = 110,00 g/mol; Glyoxylsäure (Fa. Sigma), MG = 92,05 g/mol; 2-Ketobuttersäure (Fa. Sigma), MG = 102,10 g/mol, Oxalessigsäure (Fa. Sigma),

Durchführung

Derivatisierung siehe Punkt 4.3.3.2

Herstellung der Stammlösungen

Es wurden jeweils ca. 20 mg 2-Ketoglutar-, Glyoxylsäure, Na-Pyruvat und ca. 30 mg 2-Ketobuttersäure in einem 50 ml Meßkolben eingewogen, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt wurde. 2-Ketobuttersäure wurde als interner Standard eingesetzt.

Herstellung der Standardlösung für die Ermittlung des stoffspezifischen Faktors

Von der 2-Ketoglutar säure-Stammlösung wurden 0,5 ml, von der Glyoxylsäure-Stammlösung 0,3 ml, von der Na-Pyruvat-Stammlösung 0,4 ml und von der 2-Ketobuttersäure-Stammlösung in einen 100 ml Meßkolben pipettiert, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt wurde. Davon wurden 0,5 ml für die Derivatisierung eingesetzt.

Probenvorbereitungen

Von der Mutterlauge 1/A wurde 1 ml auf 10 ml mit Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurde 1 ml (bzw. 0,7 ml) in einen 100 ml Meßkolben pipettiert, gewogen, 1 ml der 2-Ketobuttersäure-Stammlösung dazugegeben und mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt. Davon wurden 0,5 ml für die Derivatisierung eingesetzt.

Von der Mutterlauge 2/A wurde 1 ml (bzw. 0,7 ml) in einen 100 ml Meßkolben pipettiert, gewogen, 1 ml der 2-Ketobuttersäure-Stammlösung dazugegeben und mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt. Davon wurden 0,5 ml für die Derivatisierung eingesetzt.

Die Mutterlauge 3/A wurde direkt für die Derivatisierung eingesetzt. Dazu wurden 250 µl (bzw. 350 µl) in ein Reaktionsvial pipettiert, gewogen, 100 µl einer 1:20 verdünnten 2-Ketobuttersäure-Stammlösung dazugegeben und auf insgesamt 0,5 ml mit Wasser, Millipore Q plus, entsprechend aufgefüllt.

Die Mutterlauge 1/C wurde analog der Mutterlauge 2/A vorbereitet.

Von der Mutterlauge 2/C wurde 1 ml (bzw. 0,7 ml) in einen 10 ml Meßkolben pipettiert, gewogen, 1 ml einer 1:10 verdünnten 2-Ketobuttersäure-Stammlösung dazugegeben und mit Wasser, Millipore Q plus, bis zur Marke aufgefüllt. Davon wurden ebenfalls 0,5 ml für die Derivatisierung eingesetzt.

Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des internen Standards.

Aus mindestens sechs Derivatisierungsansätzen der Standardlösung wurde zunächst für jede der zu bestimmenden 2-Ketosäuren der stoffspezifische Faktor berechnet, der dann in der Berechnung der Analyten in den Proben berücksichtigt wurde. Die Derivatisierung der Probelösungen wurde mindestens sechs mal wiederholt.

Berechnung des stoffspezifischen Faktors:

$$f = \frac{m[St] \cdot PF[int.St.]}{m[int.St.] \cdot PF[St]}$$

PF [int.St.] Peakfläche des internen Standards [FE]

PF [St] Peakfläche des Analyten im Standardgemisch [FE]

m [int.St.] Einwaage des internen Standards [mg]

m [St] Einwaage des Analyten im Standardgemisch [mg]

Gehalt, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe:

$$m [mg/100g] = \frac{f \cdot PF[P] \cdot m[int.St.] \cdot Verdünnungsfaktor \cdot 100}{PF[int.St.] \cdot 1000 \cdot m_{eff}[P] \cdot 1000}$$

PF [P] Peakfläche des Analyten in der Probe [FE]

m_{eff} [P] effektive Einwaage der Probe [mg] (siehe Punkt 4.2.1.1.1)

4.2.1.4 Ionenausschlußchromatographie

4.2.1.4.1 Bestimmung von Glycerin

Chromatographisches System

Gerät	Gradientenpumpe 600 (Fa. Waters), Inline Degasser (Fa. Waters), Autosampler 717 plus (Fa. Waters), Säulenofen (Fa. Optilab), Injektionsvolumen 50 µl
Säule	Ion Pac ICE AS1, 9 x 250 mm I.D. (Fa. Dionex)
Temperatur	25°C
Eluent	Millipore Q Plus Wasser
isokratische Elution	Laufzeit: 30 min, Flow: 0,5ml/min (168 PSI)
Detektor	Brechungsindex RI-Detektor 7515A (Fa. ERC)
<u>Vergleichssubstanzen</u>	Glycerin 99%, Fa. Sigma

Durchführung

Nach Erstellung einer Kalibriergerade zur Überprüfung der Linearität des Detektors für Glycerin wurde diese Substanz in den Proben quantitativ bestimmt.

Stammlösungen

Es wurden jeweils ca. 45 mg Glycerin in einem 50 ml Meßkolben eingewogen und mit Wasser, Millipore Q Plus, bis zur Marke aufgefüllt.

Standardlösungen

Von den Stammlösungen wurden jeweils 0,1; 1,0; 10,0 ml in einen 20 ml Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Probenvorbereitung

Kristallisate und Galactosen

Von den vorliegenden Proben wurden jeweils ca. 250 mg in einem 5 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt.

Mutterlaugen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 10 ml Meßkolben, der bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q Plus, aufgefüllt wurde: Mutterlauge 1/A ca. 40 mg, Mutterlauge 2/A ca. 530 mg, Mutterlauge 3/A ca. 4200 mg, Mutterlauge 1/C ca. 55 mg, Mutterlauge 2/C ca. 2800 mg.

4.2.1.4.2 Bestimmung von aliphatischen Carbonsäuren

Chromatographisches System

Gerät	siehe Punkt 4.2.1.2.4
Detektor	siehe Punkt 4.2.1.2.5
Säule	Ion Pac ICE-AS1, 9 x 250 mm I.D. (Fa. Dionex)
Temperatur	Raumtemperatur
Eluent	je 2 mmol Octan- und Pentansulfonsäure (1:1), Fa. Fluka, isokratische Elution
Flow	0,3 ml/min
Suppressor	Anionen-Mikromembran-Suppressor AMMS-ICE (Fa. Dionex)
Regenerentlösung	10 mmol Tetrabutylammoniumhydroxidlösung (Fa. Fluka)
Detektor	Leitfähigkeitsdetektor (Fa. Dionex)

Vergleichssubstanzen

Dinatriumtartrat (Fa. Merck), Natrium-DL-Lactat (Fa. Fluka), Natriumformiat (Fa. Riedel de Haen), Natriumacetat (Fa. Merck), Levulinsäure (Fa. Fluka), Fumarsäure (Fa. Merck), Tartronsäure (Fa. Sigma), L-Threonsäure Calciumsalz (Fa. Aldrich), L (-)-Glycerinsäure Hemicalciumsalz (Fa. Sigma), Glykolsäure (Fa. Sigma), siehe Punkt 4.2.1.2.3, 4.2.1.2.5, 4.2.1.2.6, 4.2.1.3.1

Durchführung

Durch die Erstellung von Kalibriergeraden wurde die Linearität des Detektors für die Vergleichssubstanzen überprüft. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches wurde zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen eine Einpunktkalibrierung durchgeführt. Die vorliegenden Proben wurden zwei- bis dreifach aufgearbeitet und injiziert.

Standardlösungsgemisch 1

20,4 mg Oxalsäure-2-hydrat	entspricht 14,6 mg Oxalsäure/25ml
21,6 mg Zitronensäure-1-hydrat	entspricht 19,8 mg Zitronensäure/25ml
77,2 mg Di-Natrium-tartrat	entspricht 62,4 mg Weinsäure/25ml
99,0 mg Natrium-DL-lactat	entspricht 79,6 mg Milchsäure/25ml
25,6 mg Natriumformiat	entspricht 17,3 mg Ameisensäure/25ml
43,9 mg Natriumacetat	entspricht 32,1 mg Essigsäure/25ml
	40,5 mg Fumarsäure/25ml
	45,6 mg 2-Ketoglutarinsäure/25ml
	27,6 mg L-(-)-Äpfelsäure/25ml

Von diesen Stammlösungen wird je 1ml in einen 25ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Standardlösungsgemisch 2

61,07 mg L-Threonsäure Calciumsalz	entspricht 53,38 mg L-Threonsäure/25ml
22,68 mg Glycerinsäure Hemicalciumsalz	entspricht 19,24 mg Glycerinsäure/25ml
	10,75 mg Tartronsäure/25ml
	15,20 mg Schleimsäure/25ml
	101,15mg Galacturonsäure/25ml
	15,64mg Bernsteinsäure/25ml

Von der Glycerinsäure-Stammlösung werden 2ml, von der Schleimsäure-Stammlösung werden 5ml und von den restlichen Stammlösungen wird je 1ml in einen 25ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Standardlösungsgemisch 3

149,41 mg D-Galactonsäure Hemicalciumsalz	entspricht 136,21 mg D-Galactonsäure/25ml
	102,66 mg Lactobionsäure/25ml
	30,48 mg Glyoxylsäure/25ml
	32,10 mg trans-Aconitsäure/25ml
	33,23mg Glykolsäure/25ml

Von diesen Stammlösungen wird je 1ml in einen 25ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Standardlösungsgemisch 4

36,59mg Gluconsäure Natriumsalz	entspricht 32,90mg Gluconsäure/25ml
38,10mg Propionsäure Natriumsalz	entspricht 29,38mg Propionsäure/25ml
	39,01mg Glucuronsäure/25ml
	22,47mg Brenztraubensäure/25ml
	70,80mg Levulinsäure/25ml

Von diesen Stammlösungen wird je 1ml in einen 25ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Probenvorbereitungen

Von der Mutterlauge 1/A und 1/C wurden 1 ml in einen 20 ml-, 50 ml- und 100 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser, Millipore Q plus, aufgefüllt. Von der Mutterlauge 2/A wurde jeweils 1 ml in einen 10 ml-, 20 ml- und 50 ml-Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Von der Mutterlauge 3/A wurde 1 ml in einen 10 ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Daneben wurde die Mutterlauge 2/C zusätzlich 1: 5 verdünnt. Vom 1. Kristalliat/A wurden 0,2 -0,3 g in einem 10 ml-Meßkolben eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Vom 1. Kristalliat/B wurde eine 10 %ige Lösung hergestellt und anschließend 1:10; 1:20 und 1:40 verdünnt. Ca. 1g der folgenden Proben wurde in einem 10 ml-Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt: 2.-3.Kris/A, 2.Kris/B, 1.-2.Kris/C, Gal D, Gal E und Gal F.

4.2.2 Gaschromatographie

4.2.2.1 Bestimmung des Ethanol-Gehaltes

Gerät	Gaschromatograph 5890 Serie II Plus, Fa. Hewlett Packart
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Detektor-Temperatur	250°C
Injektor	septum purged packed column port
Retention Gap	fused silica, Länge 2,5 m, Ø 0,53 mm
Säule	fused silica, Länge 25 m, innerer Ø 0,53 mm
Stationäre Phase	CP-SIL 19 CB
Filmdicke	2 µm
Trägergas	Helium: 33 cm/s
Make up Gas	30 ml/min
Wasserstoff > 99,95 Vol%	30 ml/min
Synthetische Luft (30 % O ₂ , 70 % N ₂)	400 ml/min
Septum purge	1,5 ml/min
Injektortemperatur	150°C
Ofentemperatur	45°C isotherm
Injektionsvolumen	0,5µl

Chemikalien Ethanol > 99,5 Vol%, Wasser (Millipore Q Plus)

Durchführung

Standardlösungen

Es wurden ca. 20 mg Ethanol in einem 200 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser gefüllt [V1, V2, V3]. Weiterhin wurden ca. 50 mg in einem 200 ml Meßkolben eingewogen, bis zur Marke mit Wasser gefüllt. Davon wurden dann 1:10 [V4, V5] und 1:20 [V6, V7] Verdünnungen hergestellt.

Probenvorbereitungen

Folgende Einwaagen erfolgten in einem 200 ml Meßkolben, der mit Wasser bis zur Marke gefüllt wurde: Mula1/A und Mula2/A: ca. 50 mg; Mula3/A: ca. 35 mg; 1.Kris/A: ca. 200 mg; 2.Kris/A: ca. 100 mg; Mula1/C: 1300 mg; Mula2/C: 430 mg. Von dem 3. Kris/A wurden ca. 20 mg in einem 50 ml Meßkolben eingewogen, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Daraus wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Von dem 1. und 2. Kris/C wurden ca. 1 g in einem 10 ml Meßkolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Berechnung

Aus den Flächen der Vergleichslösungen $F[V_x]$ und den jeweiligen Einwaagen $m[V_x]$ wurden die Umrechnungsfaktoren $CF[x]$ berechnet. Aus den einzelnen Umrechnungsfaktoren ergab sich der Mittelwert, der für die Berechnung des Ethanol-Gehaltes herangezogen wurde.

$$CF[x] = \frac{F[Vx]}{m[Vx]}$$

$$Ethanol[\%] = \frac{F[P] \cdot VF[P] \cdot ml[P] \cdot 100[\%]}{m[P] \cdot \overline{CF} \cdot VF[Vx] \cdot ml[Vx]}$$

F[P]	Fläche der Probe
VF[P]	Verdünnungsfaktor der Probe
m[P]	Einwaage der Probe
VF[Vx]	Verdünnungsfaktor der Vergleichslösung
ml[P]	Endvolumen der Probenlösung
ml[Vx]	Endvolumen der Vergleichslösung

4.2.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

4.2.3.1 GC/MS-Untersuchungen von aliphatischen Carbonsäuren

Chromatographisches System

Gaschromatograph 1	6890 Series II Plus, Fa. Hewlett Packard
Trägergas	Helium 1 ml/min
Vordruck	100 kPa
Temperaturprogramm	40°C-10min//5°C/min//280°C-1min//5°C/min//300°C/min-5min
Splitless	Split: 100 ml/min
Injektor	280°C
Detektor	FID, 300°C, Brenngase: Luft 400ml/min, Wasserstoff 30ml/min
Makeupgas	Helium 30ml/min
Injektionsvolumen	1 µl (10µl Hamilton Spritze)

Trennphase	CP-Sil-8 CB 25 m * 0,25 mm i. D., Filmdicke 1,31 µm mit 2,5 m Retentiongap (Fa. Chrompack)
------------	--

Gaschromatograph 2	Finnigan GCQ™ Gaschromatograph
Detektor	Quadrupole ion trap mass analyzer

EI

Ionisierungsenergie	70eV
Massenbereich	35-400 amu
Ionenquelle	150°C
Transferline	275°C
Quellendruck	60 mTorr
Injektortemperatur	280°C

CI

Reaktandgas	Methan
Reaktandgasdruck	0,3 Torr

4.2.3.2 GC/MS Untersuchung von Kohlenhydrat-Verunreinigungen

Chromatographisches System

Gaschromatograph 1	6890 Series, Fa. Hewlett Packard
Trägergas	Helium 1 ml/min
Temperaturprogramm	100°C-10min//2°C/min//250°C//15°C/min//300°C/min-10min
Splitless	60 s, Split: 100 ml/min
Injektor	250°C
Septumpurge	2 ml/min
Detektor	FID, 300°C, Brenngase: Luft 400ml/min, Wasserstoff 30ml/min
Makeupgas	Helium 30ml/min
Injektionsvolumen	1 µl (10µl Hamilton Spritze)
Spüllösung	Acetonitril
Trennphase	HP-5 30 m * 0,32 mm i. D., Filmdicke 0,25 µm mit 2,5 m Retentiongap
Gaschromatograph 2	6890 Series, Fa. Hewlett Packard
Detektor	Quadrupole ion trap mass analyzer

EI

Ionisierungsenergie	70eV
Massenbereich	40-350 amu
Ionenquelle	120°C
Transferline	280°C
Quellendruck	10 ⁻⁶ Torr
Injektortemperatur	250°C

CI

Reaktandgas	Methan
Reaktandgas	Ammoniak
Reaktandgasdruck	ca. 10 ⁻³ Torr

4.2.3.3 Elektronenstoßionisation

In der Ionenquelle des Massenspektrometers werden die Probenmoleküle mit thermisch erzeugten Elektronen (70 eV) angeregt und ionisiert. Durch nachfolgende Fragmentierungen ergeben sich substanzspezifische Massenspektren, auf deren Basis Aussagen über die Struktur der jeweiligen Probe getroffen werden können. Zur Identifizierung einer Substanz werden datengestützte Bibliotheken oder Literaturspektren herangezogen.

4.2.3.4 Positive Chemische Ionisation

Die Probe wird mit einem Partialdruck von $< 10^{-4}$ Pa zusammen mit einem großen Überschuss eines neutralen Reaktandgases (10-100 Pa) in einer besonderen Ionenquelle einen Elektronenstoß

von 50-100 eV ausgesetzt. Mit dem primär ionisierten Reaktandgas (CI-Plasma) erfolgt durch Ionen-Molekül-Reaktionen sekundär die Ionisierung der Probenmoleküle.

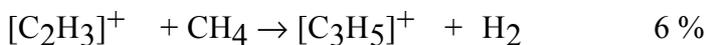
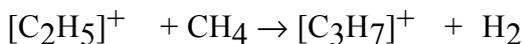
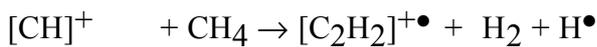
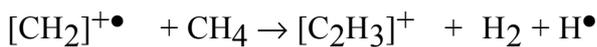
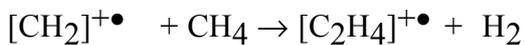
4.2.3.4.1 Chemische Ionisation mit Methan

Methan ist aufgrund seiner niedrigen Protonenaffinität von 536 kJ/Mol ein universelles Protonierungsreagenz.

Molekül- und Fragment-Ionenbildung am Beispiel von Methan:

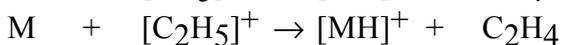
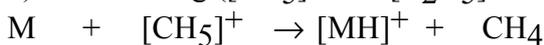


Diese reagieren in schnellen Ionen-Molekül-Reaktionen weiter, wobei bestimmte Konzentrationen von Sekundär- und Tertiär-Ionen aufgebaut werden.



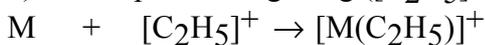
Durch Ionen-Molekül-Reaktionen zwischen Probenmolekül und den gebildeten Ionen des Reaktandgases entstehen die Quasimolekülionen $[\text{MH}]^+$ und $[\text{M}(\text{C}_2\text{H}_5)]^+$:

1) Protonierung ($[\text{CH}_5]^+$ und $[\text{C}_2\text{H}_5]^+$ fungieren als Brönsted-Säure gegenüber M)



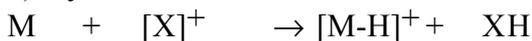
Protonenaffinität M > Protonenaffinität CH_4

2) Elektrophile Anlagerung ($[\text{C}_2\text{H}_5]^+$ fungiert als Lewis-Säure gegenüber M)



Protonenaffinität M < Protonenaffinität CH_4

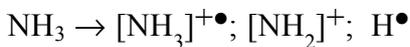
3) Hydridabstraktion



4.2.3.4.2 Chemische Ionisation mit Ammoniak

Ammoniak wirkt aufgrund seiner hohen Protonenaffinität von 847 kJ/Mol als selektives Protonierungsreagenz.

Molekül- und Fragment-Ionenbildung am Beispiel von Ammoniak (Westmore und Alauddin 1986):

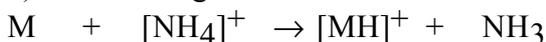


Diese reagieren in schnellen Ionen-Molekül-Reaktionen weiter.



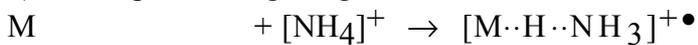
Durch Ionen-Molekül-Reaktionen zwischen Probenmolekül und den gebildeten Ionen des Reaktandgases entstehen die Quasimolekülonen $[\text{MH}]^+$ und $[\text{M}(\text{NH}_4)]^+$:

1) Protonierung



Protonenaffinität M > Protonenaffinität NH₃

2) Elektrophile Anlagerung



Protonenaffinität M < Protonenaffinität NH₃

3) Sekundärreaktionen



4.2.4 Dünnschichtchromatographie

Versuchsparameter

System I

DC-Platte: Kieselgel 60 F₂₅₄ oder Kieselgel 60 (Fa. Merck)

Fließmittel: Ethylacetat/Aceton/Wasser (40+50+10 Vol.Tle.)

Laufstrecke: 15 cm

Tauchlösung: Lösung I: 2%ige Blei(IV)-acetat-Lösung in Eisessig

Lösung II: 0,2 g 2',7'-Dichlorfluorescein in 100 ml Ethanol

Vor Gebrauch wurden jeweils 5 ml Lösung I und II gemischt und mit Toluol auf 200 ml aufgefüllt.

Detektion nach 10 min bei 100°C und 30 min bei 100°C

- Sprühreagenz I: 2 g Diphenylamin und 2 ml Anilin wurden in 80 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 10 ml Phosphorsäure wurde mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.
- Sprühreagenz II: 0,2 % Naphtoresorcin in Ethanol 96 %ig /Schwefelsäure 20 %ig (1+1 Vol.Tle.), Detektion nach 10 min bei 110°C

System II

- DC-Platte: Kieselgel 60 F₂₅₄ oder Kieselgel 60 (Fa. Merck)
- Fließmittel: Acetonitril /Ethanol 96 %ig /Wasser /Ammoniak (35+25+35+5 Vol.Tle.)
- Laufstrecke: 15 cm
- Sprühreagenz I; II: siehe System I

Vergleichssubstanzen

Stachyose; 4-O-(4-O-[6-O- α -D-Glucopyranosyl- α -D-Glucopyranosyl]- α -D-Glucopyranosyl)-D-Glucopyranose; (4-O-(4-O- β -D-Galactopyranosyl- β -D-galactopyranosyl)-D-glucopyranose); 4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactose; Lactulose; Lactitol; 4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-mannose; Galactosamin; Glucosamin; D-Galactose; D-Glucose; Talose, Psicose; Mannose; Fructose; Sorbose; Tagatose; Maltol; 5-Hydroxymethyl-2-furfural; L-Galactonsäure- γ -Lacton; Melibiose; Maltose; Cellobiose; Saccharose; Nigerose; Gentiobiose; Trehalose; Melizitose, Palatinose (alle Fa. Sigma); siehe auch Punkt 4.2.1.2.1, 4.2.1.2.3

Chemikalien unter Versuchsparameter von Fa. Merck

Durchführung

Vergleichssubstanzen

Es wurden jeweils ca. 1mg/ml Wasser gelöst und davon 1 μ l aufgetragen.

Standardlösungsgemisch

250 mg Galactose, 2 mg 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose, 1 mg Glucose, 1 mg Lactose in einem 5 ml Meßkolben mit Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt, davon wurden 1, 2, oder 4 μ l aufgetragen

Probenvorbereitungen

Galactosen und Kristallisate

Es wurden ca. 0,1 mg in 1 ml Wasser gelöst und davon 1 und 2 μ l aufgetragen.

Mutterlaugen

Mutterlauge 1 und 2/A: 1:5 und 1:2 verdünnt; Mutterlauge 3/A: unverdünnt; Mutterlauge 1/C: 1:10 und 1:20 verdünnt; 1:5 und 1:10 verdünnt

4.2.5 Enzymatische Bestimmungen

4.2.5.1 Galactose-Gehalt

Versuchsparameter

Gerät	UV/VIS Spectrophotometer Lamda 5, Fa. Perkin Elmer
Küvette	Einmal-Küvette, Fa. Brand
Temperatur	Raumtemperatur
Testvolumen	3,30 ml
Wellenlänge	340 nm
Messung gegen	Luft (im Strahlengang keine Küvette)

Reagenzien

Testkombination Lactose/D-Galactose (Bestellnr.176 303), Fa. Boehringer Mannheim
 Wasser, bidest.
 Galactose-Arbeitsstandard: # AS1363 Gehalt 98,4 %, Wasser 0,59 %; # AS1363 Gehalt 99,0 %, Wasser 0,52 %

Durchführung

siehe Arbeitsanleitung der Testkombination!

Probenvorbereitungen

Es wurden ca. 2,5 mg Probe bzw. Galactose-Arbeitsstandard in einem 100 ml-Kolben eingewogen und bis zur Marke mit bidest. Wasser aufgefüllt. Davon wurden jeweils 1,00 ml oder 2,00 ml Probe- bzw. Standardlösung für den enzymatischen Test eingesetzt.

Berechnung

$$\text{Galactose [\%]} \text{ (bezogen auf die wasserfreie Probe)} = \frac{E[P] \cdot (m[V] \cdot (100 - W[V])) \cdot G \cdot 100 \cdot 100}{E[V] \cdot m[P] \cdot 100 \cdot (100 - W[P]) \cdot 100}$$

E [P]	Extinktion Probelösung
E [V]	Extinktion der Galactose Arbeitsstandardlösung
m [P]	Einwaage Probe [mg]
m [V]	Einwaage Arbeitsstandard Galactose [mg]
G	Gehalt Galactose Arbeitsstandard [%]
W [P]	Wassergehalt der Probe [%]
W [V]	Wassergehalt des Galactose Arbeitsstandards [%]

4.2.5.2 Organische Säuren

Versuchsparameter

Gerät	UV/VIS Spectrophotometer Lamda 5, Fa. Perkin Elmer
Küvette	Einmal-Küvette, Fa. Brand, 1 cm
Temperatur	Raumtemperatur
Wellenlänge	340 nm
Messung gegen	Luft (im Strahlengang keine Küvette)

Reagenzien

Testkombination L-Milchsäure (Bestellnr. 139 084), Fa. Boehringer Mannheim
 Testkombination L-Äpfelsäure (Bestellnr. 139 068), Fa. Boehringer Mannheim
 Testkombination Bernsteinsäure (Bestellnr. 176 281), Fa. Boehringer Mannheim
 Testkombination Zitronensäure (Bestellnr. 139 076), Fa. Boehringer Mannheim
 Triethanolamin-Hydrochlorid, Fa. Boehringer Mannheim
 Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA-Na₂H₂ * 2H₂O, Fa. Merck, p. a.
 Natronlauge 5 mol/l, hergestellt aus Natronlauge-Plätzchen, Fa. Merck, p. a.
 Dinatriumnicotinamid-adenin-dinucleotid, NADH-Na₂, Fa. Boehringer Mannheim
 Natriumhydrogencarbonat, Fa. Fluka, p. a.
 L-Lactatdehydrogenase, Fa. Boehringer Mannheim
 Brenztraubensäure Na-Salz, Fa. Sigma
 Wasser, bidest.

Durchführung

siehe Arbeitsanleitung der Testkombination zur Bestimmung von L-Milch-, L-Äpfel-, Bernstein- und Zitronensäure! Die Arbeitsanleitung zur Bestimmung von Brenztraubensäure wurde von der Fa. Boehringer Mannheim bezogen und wird im folgenden näher erläutert.

Vorbereitung der Lösungen

1. Puffer
14,0 g Triethanolamin-Hydrochlorid und 0,28 g EDTA-Na₂H₂ * 2H₂O wurden in ca. 80 Wasser, bidest, gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit der Natronlauge (5 mol/l) auf 7,6 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
2. NADH
30 mg NADH-Na₂ und 60 mg Natriumhydrogencarbonat wurden in 6 ml Wasser, bidest., gelöst.
3. L-Lactatdehydrogenase
Die Suspension wurde unverdünnt eingesetzt.
4. Vergleichslösung
63 mg Natriumpyruvat wurden in 100 ml Meßkolben eingewogen und mit Wasser, bidest., bis zur Marke aufgefüllt.

Prüf-, Vergleichs- und Blindlösung wurden gleichzeitig bearbeitet:

Für den Bestimmungsansatz konnte das Prüfvolumen zwischen 0,1 und 2,0 ml variiert werden. Es wurden jeweils 1,0 ml Puffer, 0,10 ml NADH, 0,10 ml Prüf- bzw. Vergleichslösung, 1,90 ml Wasser in eine Küvette pipettiert, gemischt und die Extinktion (E1) gemessen. Für den Blindwert wurde anstatt der Prüf- bzw. Vergleichslösung 0,10 ml Wasser eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02 ml Lactatdehydrogenase gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 6 min) wurde die Extinktion (E2) gemessen.

Berechnung

Zunächst wurde die Extinktionsdifferenz ($\Delta E = E_1 - E_2$) gebildet und die berechnete Extinktionsdifferenz des Blindwertes von der Extinktionsdifferenz der Prüf- bzw. Vergleichslösung subtrahiert. Die Konzentration von Brenztraubensäure in der Probe berechnet sich nach folgender Formel:

$$c[g/l] = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

- V Endvolumen (entspricht 3,12 ml)
 MW Molgewicht von Brenztraubensäure (88,1 g/mol)
 ϵ Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ($6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 d Schichtdicke (1 cm)
 v Prüfvolumen (variabel zwischen 0,1 und 2,0 ml)

Gehalt, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe:

$$\text{Gehalt Brenztraubensäure}[g/100g] = \frac{c_{\text{Brenztraubensäure}}[g/l]}{c_{\text{effP}}[g/l]} \cdot 100$$

c_{effP} bezogen auf die effektive Einwaage der Probe (siehe Punkt 4.2.1.1.1)

4.2.6 Matrix assoziierte Laserdesorptionsionisation - Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die MALDI-TOF-MS wurde ursprünglich zur Molgewichtsbestimmung von Peptiden und Proteinen entwickelt und später auch für neutrale underivatisierte Oligosaccharide eingesetzt. Mit der Nachquellen-Zerfallsanalyse in Kopplung mit einem magnetischen Sektorfeld können durch die Bildung von Fragment-Ionen auch Informationen über die Sequenz von Oligosacchariden erhalten werden.

Die Probelösung wird vor der Messung mit einem großen Überschuss (Faktor 5000) einer geeigneten Matrixlösung versetzt. Diese Mischung läßt man auskristallisieren. Die früher verwendete Matrix für Oligosaccharide war 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure, die von 2,5-Dihydroxybenzoesäure aufgrund einer besseren Signalausbeute abgelöst wurde. Mit dieser Matrix werden für die neutrale Oligosaccharide Nachweisgrenzen von 50-100 fmol erreicht (Papac, Wong, et al. 1996).

Durch Bestrahlung mit dem Laser wird die zu analysierende Probe/Matrix-Mischung auf der Oberfläche eines Metallplättchens verdampft. Der Matrix wird eine aktive Rolle bei der Ionisierung der Probe zugeschrieben, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Die Photoionisation, bei der energiereiche Photonen die notwendige Ionisationsenergie zur Bildung von Molekül- und Fragmentionen liefern, ist der Initialschritt für weitere Reaktionen. Durch Protonierung entsteht das Quasimolekülion $[MH]^+$. Daneben werden aber auch Adduktionen beispielsweise durch Anlagerung von Alkali-Ionen wie $([M+Na]^+ \text{ oder } [M+K]^+)$ aus der Matrix beobachtet (Karas, Bahr et al. 1991), (Stahl, Steup et al. 1991).

Versuchsparameter

Gerät	Tofspec Fa. VG Analytical/Fisons/Micromass
Stickstoff-Laser	337 nm; 4,68 J/m ² ; Pulsation: 4 ns
Beschleunigungsspannung	21 kV
Reflektron Modus	23 kV
Detektor	Micro Channel Plate, 250 MHz
Flugbahn	ca. 1m
Datensystem	VAX 4000-60; VMS 5.5; OPUS

Durchführung

Die gegebenenfalls verdünnte Probelösung wurde mit einem großen Überschuss einer geeigneten Matrixsubstanzlösung gemischt. Aufgrund der besseren Signalausbeute wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure gegenüber 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure für Oligosaccharide eingesetzt (10 mg/ml, gelöst in Ethanol oder Acetonitril/Wasser 1:1 (v/v)). Auf ein Metallplättchen wurden jeweils 1 µl der Probelösung und der Matrixsubstanzlösung appliziert. Nach Kristallisation wurde das Metallplättchen auf einer Schubstange befestigt, die vorschriftsmäßig zur Analyse in das Gerät eingeführt wurde.

4.2.7 Karl-Fischer-Titration

Titrationparameter

Gerät	Karl-Fischer Titrationsapparatur, Titrino 701, Fa. Methrom
Maßlösung	Hydranal-Composite 5 K verdünnt mit Diethylenglykolmonomethylether im Verhältnis ((1+3) Vol. Tle.)
Bürette	10 ml-Bürette
Titrationgeschwindigkeit	mittlere Einstellung
Titrationseende	nach ≥ 5 min oder bis zum Erreichen der Gerätedrift (60µl/min)

Chemikalien

Hydranal-Arbeitsmedium (Fa. Riedel de Haen), Hydranal-Composite 5 K (Fa. Riedel de Haen)
 Diethylenglykolmonomethylether (Fa. Riedel de Haen), Formamid p.a. (Fa. Merck),
 Natriumtartrat-2-hydrat (Fa. Riedel de Haen)

Durchführung

20ml Formamid und 10ml Hydranal-Arbeitsmedium K wurden in das auf 50°C temperierte Titrationsgefäß gegeben und unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß austitriert. Danach wurde die eingewogene zu untersuchende Probe in dieses Titrationsgefäß gegeben und ebenfalls austitriert. Die Vorlage wurde nach max. 3 Messungen gewechselt.

Die Titerbestimmung erfolgte mit ca. 50mg Natriumtartrat-2-hydrat und wurde unter den o. g. Prüfbedingungen durchgeführt.

Berechnung

V	Verbrauch Maßlösung [ml]	$\text{Wasser [\%]} = \frac{V \cdot T \cdot 100}{m}$
T	Titer [mg/ml]	
m	Einwaage Probe [mg]	

4.2.8 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Geräte und Materialien

Speed Vac Concentrator (Fa. Bachofer, SAVANT), Centricon-Zentrifugierkonzentratoren 10 und 3 - cut off: 10000 und 3000 Dalton (Fa. Amicon), Zentrifuge RC5C Sorvall® Instrument DuPont De Nemours GmbH (4°C, 6000 RPM Speed), Elektrophoresekammer für Gele 17 x 18cm mit Netzgerät, Fa. Renner; Elektrophoresezubehör: Spacer (Dicke 1mm), Klammern, Glasplatten, Ohrenplatten

Chemikalien

40%ige Acrylamid/ Bis-Acrylamid-Lösung (Fa. Amesco), Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris) (Fa. Serva), konz. Hcl (Fa. Merck), Wasser (Millipore Q Plus), Glycin (Fa. Serva), Glycerin (Fa. Merck), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Fa. Merck), Bromphenolblau (Fa. Merck), β -Mercaptoethanol (Fa. Fluka), 1-Butanol (Fa. Merck), N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) (Fa. Serva), Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Fa. Serva), Silver Stain Plus-Kit (Fa. BioRad)

Vergleichssubstanzen

Dalton-Marker VII-L (14200-66000 Dalton), Bovinserumalbumin (66000 Dalton), β -Galactosidase (116000 Dalton) (alles Fa. Sigma)

Durchführung*Probenvorbereitungen*

Jeweils 2 ml der Mula 1/A wurden in fünf Eppendorf-Vials pipettiert, eingefroren und in den Speed Vac Concentrator gestellt. Nach Einengung wurden die Rückstände zweier Vials in ein Centricon-Röhrchen 10 und die Rückstände von drei Vials in ein Centricon-Röhrchen 3 mit Wasser überführt und ultrazentrifugiert. Von der Mula 1/C wurden 2 ml direkt in ein Centricon-Röhrchen 10 pipettiert und ebenfalls ultrazentrifugiert. Zu den jeweiligen Rückständen von ca. 150 μ l wurden 150 μ l Probenpuffer gegeben und kurz aufgekocht. Davon wurden jeweils 30 μ l auf das Gel aufgetragen.

Trenngelpuffer (4fach konzentriert)

9,0855 g Tris ad 50 ml Wasser, mit konz. Hcl auf pH 8,8 einstellen

Sammelgelpuffer (4fach konzentriert)

3,0285 g Tris ad 50 ml Wasser, mit konz. Hcl auf 6,8 einstellen

Elektrodenpuffer (10fach konzentriert)

15,15 g Tris, 72,05 g Glycin und 5 g SDS ad 500 ml Wasser, mit Tris oder Glycin auf pH 8,3 einstellen

Probenpuffer (2fach konzentriert)

0,757 g Tris, 2 g SDS, 10 g Glycerin, 5 ml Mercaptoethanol und Spatelspitze Bromphenolblau ad 50 ml Wasser, mit verdünnter Hcl auf pH 6,8 einstellen

Ansätze für SDS-Page unter Verwendung einer 40%igen Acrylamid-Stammlösung:

a) für 30 ml Trenngel:

Konzentration [% T]	10	15
Trenngel-Puffer (x4) [ml]	7,5	7,5
40% Acrylamid/ Bis-AA [ml]	7,5	360
SDS (10% in Wasser) [ml]	0,3	0,3
Wasser [ml]	14,7	10,9
TEMED [ml]	90	90
APS (10% in Wasser) [ml]	360	360

b) für Sammelgel mit 5% T:

Gelvolumen [ml]	5
Sammelgel-Puffer (x4) [ml]	1,25
40% Acrylamid/ Bis-AA [ml]	0,6
SDS (10% in Wasser) [ml]	0,05
Wasser [ml]	3,1
TEMED [ml]	15
APS (10% in Wasser) [ml]	45

4.2.9 Photometrische Bestimmung des Aminostickstoff-Gehaltes

Versuchsparameter

Gerät, Küvette, Temperatur siehe Punkt 4.2.5.2

Wellenlänge 440 nm, 570 nm

Messung gegen Blindlösung

Chemikalien

Zitronensäure-Monohydrat, Ninhydrin, Kaliumcyanid, Ethylenglykolmonomethylether, 1 N Natronlauge (alles Fa. Merck), Glycin und Prolin (Fa. Sigma)

Durchführung

Die Durchführung der photometrischen Bestimmung mit Ninhydrin erfolgte nach (Pohloudek-Fabini und Beyrich 1975).

Erstellung einer Kalibriergerade mit Glycin bzw. Prolin - Messung bei 570 nm bzw. 440 nm

29,6 mg Glycin bzw. 29,1 mg Prolin wurden in einem 100 ml Meßkolben eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Davon wurden jeweils 0,5; 1; 2; 4; 10; 20 und 40 ml in einem 200 ml Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.2.10 Aminosäureanalysator

Chromatographisches System

Gerät	LC 3000 Aminosäureanalysator (Fa. Biotronik, Eppendorf)
stationäre Phase	Ionenaustauscher auf der Basis eines sulfonierten PS/DVB-Copolymers-Natrium-Form
Nachsäulenderivatisierung	mit Ninhydrin, Reaktionstemperatur 130°C
UV-Detektor	Detektion bei 570 nm und 440 nm
Eluent	Puffer A pH = 3,30 (Fa. Biotronik, Eppendorf) Puffer B pH = 3,60 (Fa. Biotronik, Eppendorf) Puffer C pH = 4,50 (Fa. Biotronik, Eppendorf) Puffer D pH = 11,0 (Fa. Biotronik, Eppendorf) Puffer E entspricht 0,1 N NaOH
Flow	0,2 ml/min
<u>Chemikalien</u>	Probenverdünnungspuffer (Hydrolysat), (Fa. Biotronik, Eppendorf)

4.2.11 Atomabsorptionsspektrometrie

Versuchsparameter

Gerät	Atomabsorptionsspektrometer 4100 (Fa. Perkin Elmer)
Lichtquelle	Hohlkathodenlampe
Wellenlänge	$\lambda_{\text{Mg}} = 285,2 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Ca}} = 422,7 \text{ nm}$
Technik	Flamme
Brennertyp	Mg: Luftbrenner; Ca: Lachgasbrenner
Brenngas	Acetylen; Mg: ca. 2,5 ml/min; Ca: ca. 6,0 ml/min
Oxydans	Mg: Luft ca. 8,0 ml/min; Ca: N ₂ O ca. 6,1 ml/min
Schlitz	Mg: 0,70; Ca: 0,20
Detektor	Photomultiplier
<u>Chemikalien</u>	Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Stammlösung (1g/l); Fa. Merck

Durchführung

Zur quantitativen Bestimmung von Calcium und Magnesium in den Galactosen und Kristallisaten wurde eine externe Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurden ca. 1 g der jeweiligen Probe bei 800°C verascht. Der Rückstand wurde mit 0,1 %iger Salzsäure aufgenommen und in einen 20 ml Meßkolben überführt und bis zur Marke aufgenommen. Gegebenenfalls wurde eine Verdünnung vorgenommen. Die Extinktionswerte der Probenmeßlösungen wurden neben dem entsprechenden Blindwert und den Kalibrierlösungen (Mg-Standardlösung: 0,1; 0,3; 0,6 mg/l; Ca-Standardlösung: 0,4; 2,0; 4,0 mg/l) gemessen.

Die quantitative Bestimmung von Calcium und Magnesium in den Mutterlaugen erfolgte über das Standardadditionsverfahren. Dazu wurden 5 ml der jeweiligen Proben auf 10 ml mit Wasser, bidest., verdünnt. Die Calcium- und Magnesium-Stammlösung wurden jeweils 1:100 verdünnt. Von der Calcium-Standardlösung (10 mg/l) wurden 0,50; 0,75 und 1,00 ml in einem 10 ml

Meßkolben (entspricht 0,50; 0,75; 1,00 mg/l) vorgelegt, 5 ml der jeweiligen Probe zudotiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Von der Magnesium-Standardlösung (10 mg/l) wurden 2,0; 3,0 und 4,0 ml in einem 10 ml Meßkolben (entspricht 2,0; 3,0 und 4,0 mg/l) vorgelegt, 5 ml der jeweiligen Probe zudotiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die verdünnten Probe- und Standardlösungen wurden neben einer Blindlösung gemessen.

4.2.12 Flammenphotometrie

Versuchsparameter

Gerät	Flammenphotometer ELEX 6361 (Fa. Eppendorf)
Brenngas	Propan/Luftgemisch
Flammentemperatur	2400°C
Interferenzfilter	für Na, K
Flammenemmission	Natrium: 589 nm; Kalium: 767 nm
Zerstäuber	Indirektzerstäuber mit Pallacit-Kanüle

Chemikalien

Lithium-Stammlösung (500 mmol/l; 0,2% Netzmittel; Fa. Eppendorf); 1:10 verdünnt mit Wasser
 Netzmittellösung (enthält 0,7% Netzmittel, Fa. Eppendorf)

Durchführung

Blindlösung

50 ml Lithium-Stammlösung und 2 ml Netzmittellösung wurden auf 1 l mit Wasser verdünnt.

Probenvorbereitung

Es wurden ca. 2,5 - 3,0 g Mutterlauge und ca. 500 mg Kristallnat und Galactose in einen 100 ml Meßkolben eingewogen, 5ml Lithium-Verdünnungslösung und 0,2 ml Netzmittellösung dazugegeben und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Gegebenenfalls wurden Verdünnungen vorgenommen.

Der Nullpunkt des Flammenphotometers wurde mit der Blindlösung eingestellt. Die Extinktionswerte der Probenmeßlösungen wurden neben den Kalibrierlösungen (Natrium- und Kalium-Standardlösung: 10 und 25 mg/l) gemessen. Zur Verhinderung der teilweisen Ionisation, welche die Lichtemission inhibiert, wurden der Blind-, Proben- und Kalibrierlösung eine Lithium-Lösung zugegeben.

4.3 Spezielle Probenvorbereitungen

4.3.1 Lactosehydrolyse

100 mg Lactose (bzw. Galactose, Glucose) wurden in einem Reaktionsvial eingewogen, mit 333 ml (entspricht einer 30 %igen Lösung) 2 M HCl versetzt und 1 Stunde bei 100°C im Heizblock temperiert. Nach Abkühlung wurde die Lösung in einen 20 ml Meßkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt und danach mit Wasser 1:10 verdünnt.

4.3.2 Isolierung von Verunreinigungen durch Dünnschichtchromatographie

Chromatographisches System: siehe unter Punkt 4.2.4, System II

Die Mutterlauge 2, Hersteller C, wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Auf einer 20 x 20 cm Kieselgel 60 DC-Platte wurden 80 µl auf 18 cm aufgetragen. Nach der chromatographischen Trennung wurde die Platte getrocknet und ca. 5 cm vom linken oder rechten Rand mit einem Glasschneider abgetrennt. Das kleinere abgeteilte Stück der Platte wurde mit dem Sprühreagenz II (siehe Punkt 4.2.4) behandelt. Nach Detektion der Banden bei 110°C, 10 min wurden die Banden des unbehandelten Teils der Platte abgekratzt und gesammelt. Es wurden jeweils 10 DC-Platten angefertigt.

4.3.2.1. für MALDI-TOF-MS-Analyse

20 mg der jeweiligen zu untersuchenden Banden wurden mit 100 µl Wasser und 50 µl Methanol gemischt und ca. 24 h stehen gelassen. 1 µl der überstehenden Lösung und mit 1 µl 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung (10 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1) wurden auf ein Metallplättchen appliziert. Nach der Rekristallisation wurde die Messung durchgeführt (siehe Punkt 4.2.6).

4.3.2.2 für die ionenchromatographische Untersuchung vor und nach der Säurehydrolyse

Ionenchromatographische Untersuchung vor der Säurehydrolyse

Von 10 DC-Platten wurde die jeweilige zu untersuchende Bande isoliert. Die an den Kieselgelpartikeln haftenden Saccharide wurden mit 3-4 ml Wasser gelöst. Nach Zentrifugation der Suspension wurden 0,5 ml des Überstandes für die Ionenchromatographie (Chromatographisches System: siehe unter Punkt 4.2.1.2.1) und ca. 1 ml für die Säurehydrolyse eingesetzt. Daneben wurde ein Blindwert aufgearbeitet.

Als Vergleich wurden 200 µl der Mutterlauge 2/C in einen 25 ml-Meßkolben pipettiert und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Säurehydrolyse

1 ml des Überstandes vom Zentrifugat der jeweiligen aufgearbeiteten Bande aus der Dünnschichtchromatographie wurden in ein Reaktionsvial pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 32 %igen HCl wurde die Lösung im geschlossenen Gefäß 30 min bei 100°C gerührt.

Ionenchromatographische Untersuchung nach der Säurehydrolyse

Nach Abkühlung des Säurehydrolysates wurden 80 µl einer 40 %igen NaOH-Lösung dazupipettiert und mit einer 0,1 n HCl auf den pH-Wert $11,76 \pm 0,03$ des Eluenten eingestellt und sofort für die Ionenchromatographie eingesetzt.

Das Standardlösungsmittelgemisch und der Blindwert wurden wie die Probe auf den pH-Wert des Eluenten eingestellt, da geringe Unterschiede im pH-Wert und der Chlorid-Ionen Konzentration eine gravierendere Änderung der Retentionszeiten bewirkten.

Das Standardlösungsmittelgemisch setzte sich aus folgenden Konzentrationen vor der pH-Wert Einstellung zusammen: je 15 -20 mg/l 1,6-D-Anhydro- β -D-galactopyranose, 1,6-Anhydro- β -D-glucopyranose, 5-Hydroxymethyl-2-furfural, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, 40 mg/l Talose, je 60 mg/l Tagatose und Psicose.

4.3.2.3 Derivatisierung der Kohlenhydrate für GC/FID und GC/MS-Analyse

Chemikalien und Reagenzien

Chloroform (LiChrosolv, Fa. Merck), Dichlormethan (p. a., Fa. Merck, getrocknet), Methanol (LiChrosolv, Fa. Merck, getrocknet), Dimethylsulfoxid (p. a., Fa. Merck), Iodmethan (p. a., Fa. Merck), Triethylsilan (Fa. Merck), Trimethylsilylmethansulfonat (Fa. Fluka), Bortrifluorid-Ethylether (Fa. Merck), Essigsäureanhydrid (p. a., Fa. Riedel de Haen), 1-Methylimidazol (Fa. Merck), Natriumhydroxid-Pulver aus vermahlenden Natriumhydroxid-Plätzchen (Fa. Merck), Natriumsulfat (Fa. Merck, gegläht), Natriumhydrogencarbonat (Fa. Merck), gemischter Ionenaustauscher aus gleichen Anteilen Dowex 50WX8, Gegendion H^+ (Fa. Serva) und Lewatit MP64, Gegendion OH^- (Fa. Bayer, Leverkusen)

Vergleichssubstanzen

Maltose, Sophorose, 4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactopyranose, Melibiose, Nigerose, 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose (alle Fa. Sigma)

Es wurden je 10 mg D(+)-Galactose (Fa. Sigma) und α -D-Glucose (Fa. Serva) einzeln und je 5 mg Galactose und Glucose zusammen bei 160°C, 4 h im geschlossenen Reaktionsvial gestreift.

Durchführung

Methylierung der Vergleichssubstanzen (Ciucanu und Kerek 1984)

5 mg getrocknetes Kohlenhydrat in 0,3-0,5 ml Dimethylsulfoxid lösen. 20 mg Natriumhydroxid-Pulver und 0,1 ml Iodmethan zugeben und 6 min rühren. Reaktion durch Zugabe von 2 ml Wasser stoppen. 3 ml Chloroform im Lidex-Mixxor-Extraktionssystem (Elias GmbH, Freiburg) vorlegen, Probe überführen und 3x mit 10ml Wasser waschen. Chloroformphase über Na_2SO_4 trocknen und in 25 ml Spitzkolben überführen, bei 40°C am Rotationsverdampfer vorsichtig einengen. Im Stickstoffstrom bis zur Trockene abblasen. Als interner Standard wird methylierte Saccharose in Dichlormethan zudotiert.

Bei Einsatz von 10 mg Kohlenhydrat wurde der doppelte Ansatz der Derivatisierungsreagenzien verwendet.

Reduktive Spaltung der Vergleichssubstanzen (Jun und Gray 1987)

Getrocknetes methyliertes Kohlenhydrat in 0,25-0,4 ml Dichlormethan lösen. Nacheinander 25 μ l Triethylsilan, 25 μ l Trimethylsilylmethansulfonat und 5 μ l Bortrifluorid-Ethylether zugeben und 1 h bei Raumtemperatur rühren. Ionenaustauschermaterialien mischen, in Methanol vorquellen und in Extraktionshülsen (5 ml Plastikspritze, 6 cm, 1,2 cm i. D. mit Glaswolle) ca. 3 cm hoch einfüllen. Probe auf die Anionenaustauschersäule geben, mit 5 ml Methanol eluieren, am Rotationsverdampfer einengen und im Stickstoffstrom vollständig trocknen.

Bei Einsatz von 10 mg Kohlenhydrat wurde der doppelte Ansatz der Derivatisierungsreagenzien verwendet.

Acetylierung der Vergleichssubstanzen (Jun und Gray 1987)

Den getrockneten Rückstand in 0,2-0,4 ml Dichlormethan aufnehmen. 30 min nach Zugabe von 15 µl Essigsäureanhydrid und 1 µl 1-Methylimidazol die Reaktion mit 0,5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung beenden. Dichlormethanphase im Mixxor-Extraktionssystem 2x mit 10 ml Wasser waschen, anschließend mit Stickstoff zur Trockene abblasen und in 1ml Dichlormethan aufnehmen. Als interner Standard wird methyliertes Sorbitol in Dichlormethan zudotiert.

Bei Einsatz von 10 mg Kohlenhydrat wurde der doppelte Ansatz der Derivatisierungsreagenzien verwendet.

Methylierung, Reduktive Spaltung und Acetylierung der Probe und des Blindwertes

Von 10 DC-Platten wurde die zu untersuchende Bande 2 und der Blindwert isoliert (entsprach ca. 2,4 g Kieselgel mit bzw. ohne anhaftenden Disacchariden, siehe Punkt 4.3.2 und 5.1.7.3.) und jeweils in 50 ml Dimethylsulfoxid gelöst. 100 mg Natriumhydroxid-Pulver und 47 ml Iodmethan zugeben und 6 min rühren. Reaktion durch Zugabe von 100 ml Wasser abstoppen. In einen Schütteltrichter 100 ml Chloroform vorlegen, Probe überführen und 3-4 x mit 100 ml Wasser waschen. Chloroformphase über Na₂SO₄ trocknen und in einen 100 ml Rundkolben überführen, am Rotationsverdampfer einengen und im Stickstoffstrom bis zur Trockene abblasen.

Die reduktive Spaltung und Acetylierung erfolgte mit doppeltem Ansatz der Derivatisierungsreagenzien wie unter den Vergleichssubstanzen beschrieben.

4.3.3 Derivatisierung der Carbonsäuren

4.3.3.1 Derivatisierung mit Bortrifluorid/Methanol und anschließende Acetylierung

Herstellung des Standardgemischs

Vergleichssubstanzen siehe Punkt 4.2.1.4.2

Ca. 20 mg Brenztrauben-, Levulin-, 2-Ketoglutar-, Glyoxyl-, Bernstein-, Milch-, Oxal-, trans-Aconit-, Fumar-, Sorbinsäure (interner Standard) und ca. 200 mg L-Äpfel- und Zitronensäure wurden in ein Reaktionsvial eingewogen, mit 1 ml BF₃/Methanol-Lösung (Fa. Fluka) versetzt. Das geschlossene Gefäß wurde 15 min bei 100°C temperiert. Nach Abkühlung wurden 2 ml gesättigte NaCl-Lösung und 2 ml Chloroform (Fa. Merck, p. a.) dazugegeben und geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurden die Chloroform-Phase über Natriumsulfat (Fa. Merck. p. a.) getrocknet. Zur Acetylierung wurden in Anlehnung an Punkt 4.3.2.3 30 µl Essigsäureanhydrid und 2 µl Methylimidazol dazugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt. Die Chloroformphase wurde im Mixxor-Extraktionssystem 2 mal mit 10 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Gleiche Aliquote wurden vermisch und das Standardgemisch wurde gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht.

Probenvorbereitungen

500 µl Mutterlauge 1/A, 1 ml Mutterlauge 2/A, 5 ml Mutterlauge 3/A, 250 µl Mutterlauge 1/C und 5 ml Mutterlauge 2/C wurden am Rotationsverdampfer so weit wie möglich eingengt, mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Sorbinsäure-Lösung (ca. 20 mg in BF₃/MeOH) versetzt, anschließend mit BF₃/Methanol derivatisiert und acetyliert (siehe unter Standardgemisch). Von den Kristallisaten und Galactosen wurden ca. 100 mg eingewogen, mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Sorbinsäure-Lösung (ca. 20 mg in BF₃/MeOH) versetzt, anschließend mit BF₃/Methanol derivatisiert und acetyliert (siehe unter Standardgemisch).

4.3.3.2 Derivatisierung mit 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylendiamine (DMB)

Chemikalien, Vergleichssubstanzen und Derivatisierungsmittel

0,1mol HCl (1:10 verdünnt aus einer 1mol HCl-Titrisol-Lösung), Fa. Merck

1mol NaOH aus NaOH-Plätzchen, Fa. Merck, hergestellt

bideist. Wasser

Methanol Chromasolv für HPLC; Fa. Riedel de Haen

DMB = 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylendiamine (Fa. Fluka), MG = 225,07 g/mol

Stabilisierungsreagenzien für DMB: Mercaptoethanol (Fa. Fluka), Natriumdithionit (Fa. Fluka)

Materialien

Membranfilter (0,4µm)

Reaktionsvials aus hitzebeständigem Glas und Heizblock; Fa. Pierce

Durchführung (Singh und Tecle 1994)*Herstellung des Derivatisierungsmittels*

244 mg Natriumdithionit und 4 ml Mercaptoethanol wurden in 50 ml 0,1 mol HCl gelöst. Da die Lösung trübe wurde, wurde sie membranfiltriert. Es wurden ca. 2,5 mg DMB in 20 ml dieser Lösung gelöst.

Derivatisierung

Von der Standardlösung bzw. von den vorbereiteten Probelösungen wurden jeweils 0,5 ml für die Derivatisierung eingesetzt. Diese wurden zusammen mit 0,5 ml Derivatisierungsmittel (Überschuß entspricht dem Faktor 5) in ein hitzebeständiges Reaktionsvial pipettiert und bei 100°C 50 min inkubiert. Danach wurde rasch auf Raumtemperatur abgekühlt und das Derivatisierungsgemisch in einem 10 ml Meßkolben überführt, 40µl 1N NaOH dazugegeben und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wurde unter den oben angegebenen chromatographischen Parametern analysiert, wobei das Injektionsvolumen 10µl betrug.

5 Ergebnisse und Diskussion von Analysenverfahren

5.1 Kohlenhydrate

Ausgehend von den theoretischen Überlegungen in den vorangegangenen Kapiteln 2 und 3 wurden in den Endprodukten der Galactose-Herstellung Verunreinigungen vermutet, die im Spurenbereich zu finden sind. Dies wurde durch eine Galactose-Gehaltsbestimmung in den Endprodukten (siehe Punkt 5.1.2) bestätigt, wobei die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Analysenverfahren (HPLC und enzymatische Bestimmung) miteinander verglichen wurden. Danach waren in allen Endprodukten ca. 1 Gew.% Verunreinigungen enthalten.

Im folgenden Abschnitt 5.1 wurden die Ergebnisse der Kohlenhydrat-Analytik näher beschrieben. Zunächst wurden möglichst einfache und schnelle Analysenmethoden angewendet, die einen Überblick über Kohlenhydrat-Verunreinigungen liefern sollten. Danach wurden die ersten Mutterlaugen der Herstellung A und C (siehe Punkt 4.1), in denen mengenmäßig die meisten Verunreinigungen vermutet wurden, einer MALDI-TOF-MS-Analyse zur Molgewichtsbestimmung unterzogen (siehe Punkt 5.1.3). Diese Analysenmethode war sehr vielversprechend, da für neutrale Oligosaccharide mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrixsubstanz Nachweisgrenzen im Bereich von 50 - 100 fmol beschrieben wurden (Papac, Wong et al. 1996). Danach wurden in der Mutterlauge 1/ A Substanzen mit Molgewichten gefunden, die Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden zugeordnet werden konnten. In der Mutterlauge 1/C wurden zusätzlich noch Pentasaccharide nachgewiesen.

Da mit der MALDI-TOF-MS-Methode nicht geklärt werden konnte, ob es sich um eine oder mehrere Substanzen handelt, wurde als zweiter Schritt die Dünnschichtchromatographie (siehe Punkt 5.1.4) angewendet. Mit einem spezifischen Sprühreagenz zur Detektion von Zuckern wurden in allen Proben neben Galactose zusätzliche Banden beobachtet, die anhand von Vergleichssubstanzen Sacchariden mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad zugeordnet werden konnten. Außerdem wurden in der Mutterlauge der Herstellung C Banden mit höherem Rf-Wert als Galactose, ähnlich der Anhydrozucker, beobachtet. Entsprechend der Aufreinigungsschritte waren die Verunreinigungen in weiteren Zwischenprodukten bis hin zum Endprodukt abgereichert. In allen Endprodukten wurden jedoch eine bzw. zwei Banden im Disaccharid-Bereich beobachtet, wobei 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose als mögliche Verunreinigung in den Vordergrund rückte. Zusätzlich wurde bei der Galactose/F bei Zudotierung von 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose eine Fleckenvergrößerung beobachtet. Der Monosaccharid-Bereich konnte aufgrund der geringen Selektivität der getesteten dünn-schichtchromatographischen Systeme nur unzureichend ausgewertet werden.

Nachfolgend angewendete verschiedene HPLC-Methoden sollten der Untersuchung qualitativer und quantitativer Aspekte dienen. Dabei wurde die Kationenaustauschersäule Sugar Pak I (Fa. Waters) eingesetzt (siehe Punkt 5.1.5), um neben den Kohlenhydraten auch andere Substanzklassen wie Säuren, Alkohole und Polyole zu erfassen. In einigen Proben gab es qualitative Hinweise auf Glycerin und Ethanol. Zusätzlich wurden L-(-)-Äpfelsäure,

Bernsteinsäure, 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und 1,6-Anhydro- β -D-glucopyranose in den Zwischenprodukten quantifiziert.

Mit Hilfe der stark basischen Anionenaustauschersäule Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) konnte nach Optimierung eines Gradientensystems neben der überschüssig vorliegenden Galactose eine relativ gute Trennung von Kohlenhydrat-Verunreinigungen erzielt werden (siehe Punkt 5.1.6). Neben Lactose und 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose wurden auch mit diesem System 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und 1,6-Anhydro- β -D-glucopyranose bestimmt. Dabei zeigte die hier eingesetzte amperometrische gegenüber der refraktometrischen Detektion im Zusammenhang mit der Sugar Pak I bei letzteren Verbindungen eine um ca. 150 fach bessere Empfindlichkeit. Als interessantes qualitatives Ergebnis dieser Untersuchung sind die Verunreinigungsmuster im Disaccharid-Bereich aller Proben hervorzuheben. Dadurch konnten die Hersteller zunächst in zwei Gruppen gegliedert werden: Bei den Herstellern A und B war die Verunreinigung 2 zu beobachten, die als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose quantifiziert wurde, deren Retentionszeit aber auch mit Melibiose übereinstimmte. Die Hersteller C, D, E und F enthielten neben dieser Verunreinigung auch noch die Verunreinigungen 1, 3, 4 und 5, deren Gehalte mit 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose als Standardsubstanz berechnet wurden (siehe Punkt 5.1.1). Die Verunreinigungen 1, 3, 4 und 5 konnten mit Hilfe vorliegender kommerziell erhältlicher und theoretisch möglicher Vergleichssubstanzen mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Aufgrund ihrer gleichen relativen Retentionszeiten in allen Proben, wurde angenommen, dass es sich hierbei um strukturell identische Verbindungen handelt. Deshalb wurde die Mutterlauge 2/C mit hohen Werten an diesen Verunreinigungen, einem relativ geringen Galactose-Gehalt und wenigen anderen Verunreinigungen im Disaccharid-Bereich zur Strukturuntersuchung dieser Verbindungen herangezogen.

Der Punkt 5.1.7 beschäftigt sich ausschließlich mit der Thematik Strukturaufklärung. Um möglichst umfangreiche Kenntnisse über die Herkunft und Struktur der Verunreinigungen 1-5 zu erhalten, waren einige Voruntersuchungen notwendig. Mit Hilfe der Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) wurde ionenchromatographisch das Verunreinigungsmuster des Lactosesäurehydrolysates, das große Ähnlichkeit mit dem der Mutterlauge 1/C aufwies, mit den Chromatogrammen von einer unter säurehydrolytischen Bedingungen gestreßten Galactose, einer Glucose und einer Mischung von beiden Monosacchariden verglichen (siehe Punkt 5.1.7.1 und 5.1.7.2). Dabei wurde festgestellt, dass es sich bei den Verunreinigungen 1, 2 und 4 um jeweils ein Disaccharid bestehend aus Galactose und /oder Galactose und Glucose, bei der Verunreinigung 3 um ein heterogen zusammengesetztes Disaccharid aus Galactose und Glucose und bei der Verunreinigung 5 um ein Disaccharid bestehend aus Galactose und/oder Glucose und/oder Galactose und Glucose handelt.

Um die Verunreinigungen 1-5 weiteren Strukturuntersuchungen unterziehen zu können, war deren Isolierung von anderen Substanzen notwendig. Dabei erwies sich die dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließender Isolierung und Extraktion vom Kieselgel zwar als geeignet (siehe Punkt 5.1.7.3), eine selektive Auftrennung der Banden konnte allerdings in der Dünnschichtchromatographie im Vergleich zur Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit Hilfe der Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) nicht erreicht werden. Somit entsprach die Bande 2 in der Dünnschichtchromatographie allen

Verunreinigungen 1-5 bei der Ionenchromatographie. Die Bande 2 wurde einesteils einer MALDI-TOF-MS-Analyse unterzogen, wobei ein Molgewicht, das einem Disaccharid entsprach, festgestellt und damit der Hinweis auf Disaccharide aus den ionenchromatographischen Untersuchungen unterstützend bestätigt wurde. Andererseits wurde die Bande 2 unter säurehydrolytischen Bedingungen behandelt (siehe Punkt 5.1.7.4). Die anschließende ionenchromatographische Untersuchung ergab anhand der Peakflächen ein Monomeren-Verhältnis von Galactose zu Glucose von 2:1.

Weiterhin wurden die zu erwartenden Disaccharide in der Bande 2 für die GC/FID- bzw. für die GC/MS-Analyse derivatisiert (siehe Punkt 5.1.7.5.1). Nach der ersten Stufe der Derivatisierung wurden die GC-Chromatogramme und Massenspektren der permethylierten Derivate mit einer temperaturgestreßten Galactose und Glucose sowie mit kommerziell erhältlichen und ebenfalls permethylierten Vergleichssubstanzen verglichen (siehe Punkt 5.1.7.5.2 und 5.1.7.5.3). Dabei konnten diverse Glucobiosen, Melibiose und Lactose als Disaccharide ausgeschlossen werden. Anschließend erfolgte die reduktive Spaltung und Acetylierung zur Bildung partiell permethylierter Alditolacetate. Somit lieferten die GC-Retentionszeiten und EI-Massenspektren einen Hinweis auf die Position der Acetylgruppe und damit auf die Verknüpfung der glycosidischen Bindung innerhalb der Saccharide (5.1.7.5.4). Die mittels chemischer Ionisation bestimmten Molekulargewichte der entstandenen Anhydroalditol-Derivate gaben einen Hinweis auf den Acetylierungsgrad, und damit auf die Zahl der Verknüpfungen eines Saccharid-Monomeren (siehe Punkt 5.1.7.5.5). Unter Punkt 5.1.7.5.7 wurden die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen interpretiert. Das bereits ionenchromatographisch ermittelte Monomeren-Verhältnis von Galactose zu Glucose von 2:1 wurde hiermit bestätigt. Weiterhin handelte es sich bei den Verunreinigungen 1-5 um Disaccharide, von denen die mit 1,6-glycosidischen Bindungen mit einem Anteil von 70 % im Vergleich zu den 1,2-; 1,3- und 1,4-geknüpften Disacchariden dominierten. Die Auftrittshäufigkeit der Bindungspositionen differenzierter acetylierter O-Methylether konnte durch folgende Reihe angegeben werden: 6 Gal (*pyr + fur*) > 6 Glu (*pyr + fur*) > 2 Gal (*pyr*) > 3 Gal (*pyr*) > 4 Glu (*pyr*) > 2 Glu (*pyr*) > 4 Gal (*pyr*). Unter der Vernachlässigung 1,1- verknüpfter Glucobiosen könnten die möglichen Disaccharide mit folgender Häufigkeit auftreten: Glu-Gal (36 %) > Gal-Glu (32 %) > Gal-Gal (26 %) > 1,1 Gal-Gal (6 %). Die Zuordnung der 1,1- verknüpften Galactobiosen zu den Verunreinigungen 1-5 wurde jedoch ausgeschlossen, da die relativen Retentionszeiten von nicht reduzierenden Disacchariden im Ionenchromatogramm der Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) sehr klein sind und im Bereich der Anhydrozucker liegen. Somit handelte es sich bei den Verunreinigungen 1-5 vorwiegend um heterogen zusammengesetzte Disaccharide aus Glucose- und Galactose-Bausteinen neben Galactobiosen.

5.1.1 Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

Wie bereits in der Einführung des Abschnittes 5.1 erwähnt, konnten die Galactose-Hersteller anhand ihrer identifizierten Kohlenhydratverunreinigungen in den Zwischen- und Endprodukten in zwei Gruppen gegliedert werden: Die Produkte der Hersteller A und B enthielten 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose als Verunreinigung und in den Produkten der Hersteller C, D, E und F waren neben dieser Verbindung noch vier weitere Signale im Ionenchromatogramm zu

beobachten, deren Gehalte als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet wurden. Nach der Strukturuntersuchung konnte nicht ganz ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um keine reinen Disaccharide handelt, sondern Überlagerungen durchaus möglich sind.

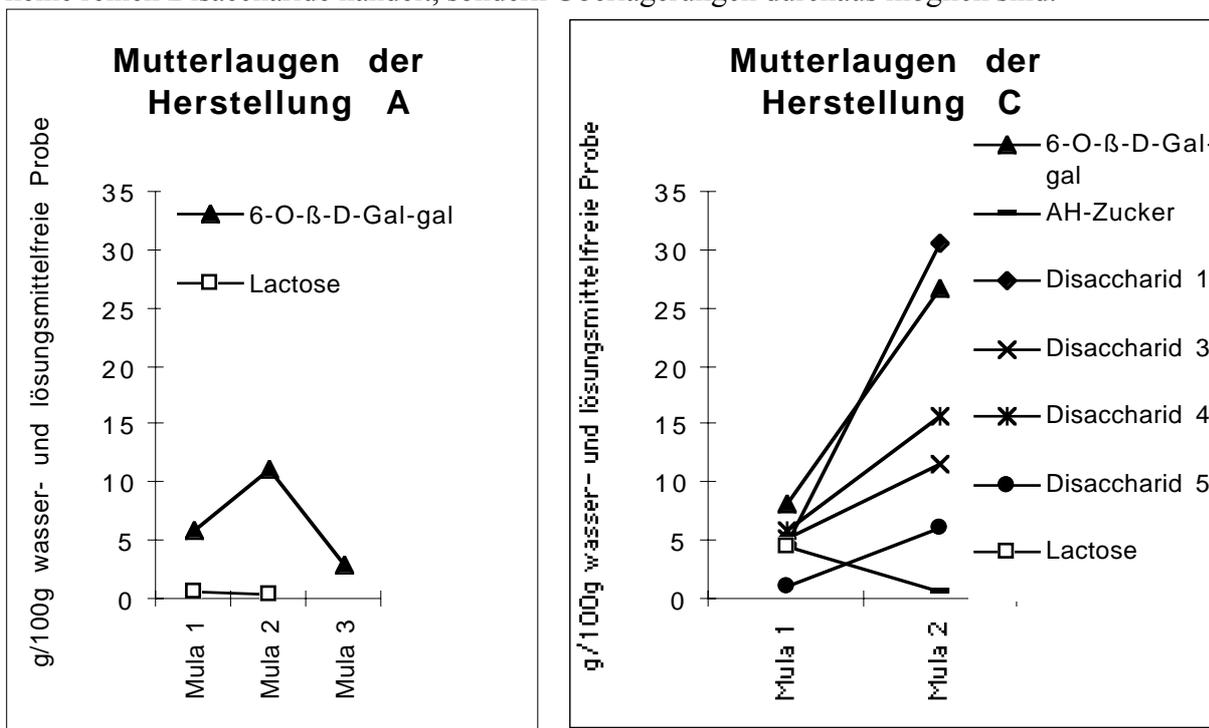


Abb. 5-1: Kohlenhydrate in den Mutterlaugen der Herstellung A (a) und C (b)

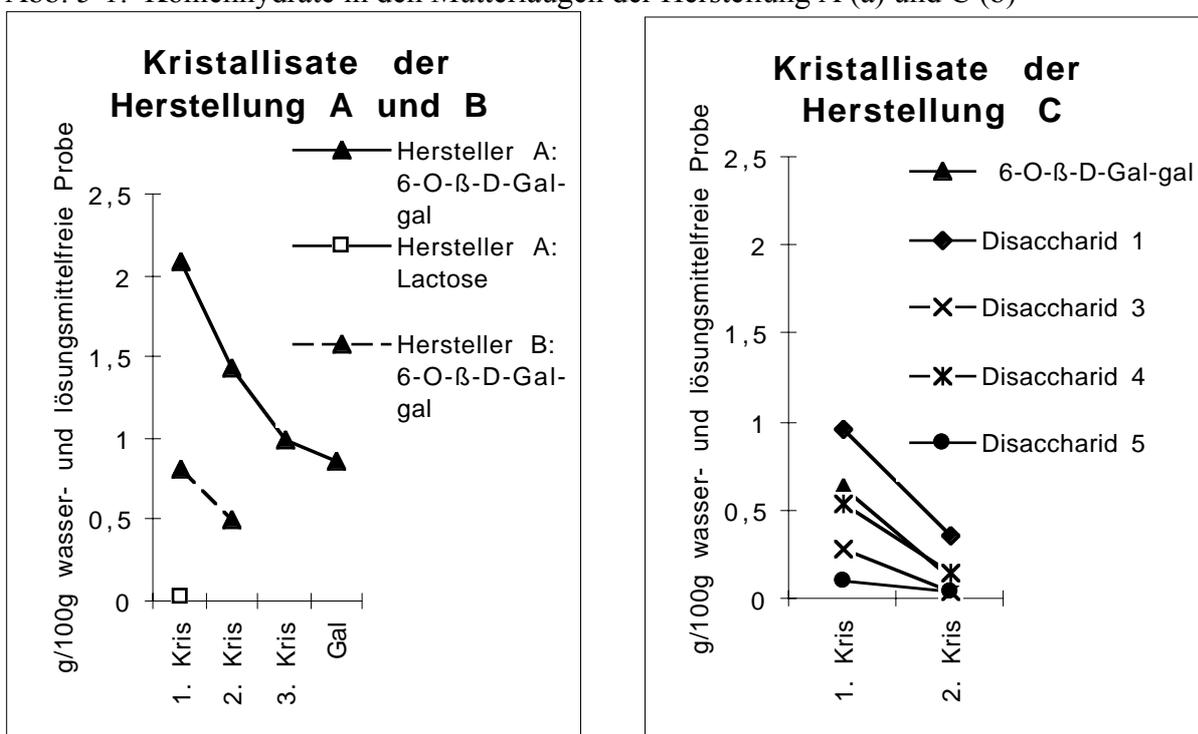


Abb. 5-2: Kohlenhydrate in den Kristallisaten der Herstellung A und B (a) und C (b)

Bei der Herstellung A zeigte sich zunächst eine effektive Anreicherung der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose im Überstand des 2. Kristallisates, die im folgenden Kristallisationsschritt wieder abnahm (siehe Abb. 5-1a). In den dazugehörigen Kristallisaten konnte eine kontinuierliche Abreicherung von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose festgestellt werden, wobei die gleiche Tendenz auch beim Hersteller B zu beobachten war (siehe Abb. 5-2a). Bei der Herstellung C, die im Gegensatz zur Herstellung A nur zwei Kristallisationsschritte beinhaltet, wurden die Kohlenhydratverunreinigungen in den Mutterlaugen zunehmend angereichert und entsprechend in den dazugehörigen Kristallisaten abgereichert (siehe Abb. 5-1b und 5-2b).

Einen anderen Verlauf zeigten jedoch die Anhydrozucker (1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und 1,6-Anhydro- β -D-glucofuranose), die nur in den Mutterlaugen/C und nicht in den Kristallisaten/C nachgewiesen wurden (siehe Abb. 5-1b).

In den ersten Mutterlaugen der Herstellung A und C wurde Lactose als nicht vollständig umgesetztes Edukt bei der Galactose-Herstellung identifiziert. Der Lactose-Gehalt im 1. Kristallisat/A lag bereits unter der Bestimmungsgrenze von 0,03 g/100 g.

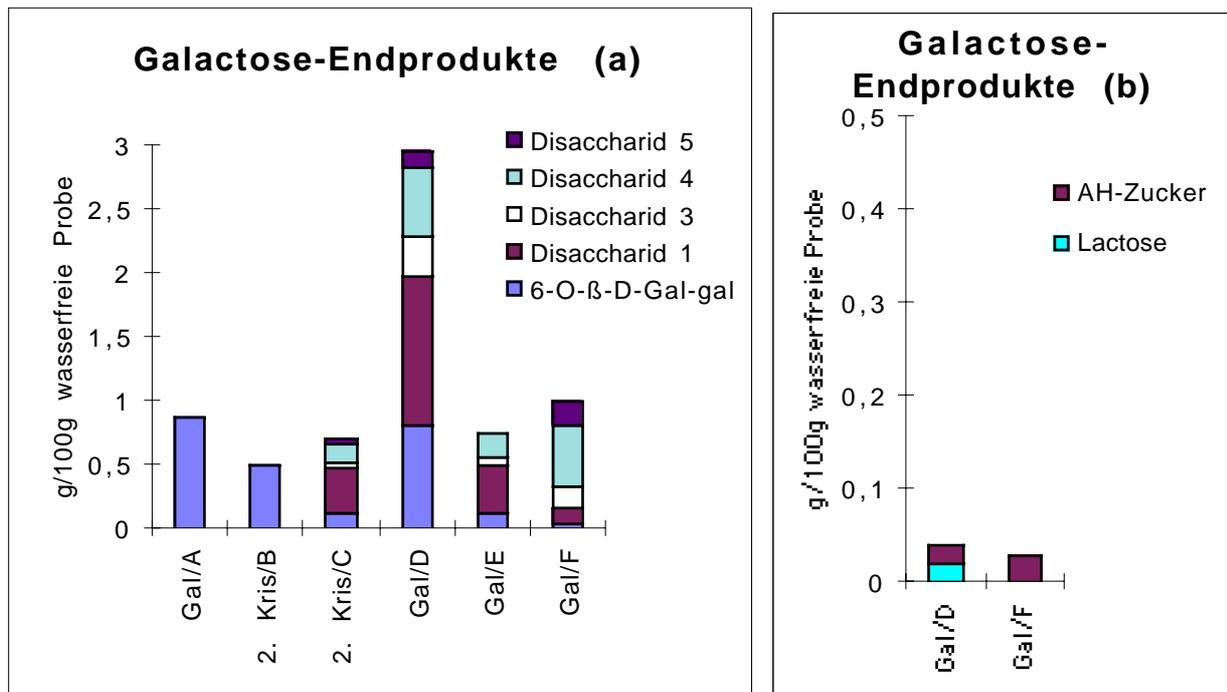


Abb. 5-3 a und b: Kohlenhydrate in den Galactose-Endprodukten

In den Galactose-Endprodukten der verschiedenen Hersteller konnten vorwiegend nur Disaccharide nachgewiesen werden (siehe Abb. 5-3 a). Zusätzlich wurden bei den Herstellern D und F Anhydrozucker (1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und 1,6-Anhydro- β -D-glucofuranose) bestimmt, deren Gehalte allerdings bei der Galactose/D jeweils unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,009 g/100 g lagen. Spuren von Lactose in der Galactose/D (kleiner als Bestimmungsgrenze

von 0,02 g/100 g) könnten auf Lactose als Edukt auch bei dieser Herstellung hinweisen (siehe Abb. 5-3 b).

5.1.2 Galactose-Gehalte in den Endprodukten

Die Gehaltsbestimmung von Galactose in den Endprodukten erfolgte durch zwei unterschiedliche Verfahren, durch HPLC und einer enzymatischen Bestimmung (Versuchsbeschreibung siehe Punkt 4.2.1.1.1 und 4.2.5.1). Die HPLC-Methode unter Verwendung der Kationenaustauschersäule Sugar Pak I (Fa. Waters) wurde unter Punkt 5.1.5.1 näher charakterisiert. Bei der enzymatischen Bestimmung wird D-Galactose durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms β -Galactose-Dehydrogenase zu Galactonsäure oxidiert. Die dabei gebildete NADH-Menge ist der Galactose-Menge äquivalent. Somit kann die während der Reaktion geänderte Absorption photometrisch gemessen werden.

Wie aus Tab. 5-1 ersichtlich, korrelierten die Ergebnisse beider Verfahren. In allen Endprodukten lag der Galactose-Gehalt, bezogen auf die wasserfreie Probe, um 99,0 %. Schlußfolgernd daraus, waren in allen Endprodukten ca. 1 % Verunreinigungen zu erwarten. Eine Ausnahme stellte die Probe Galactose/D dar, die eine Tendenz zu größeren Mengen an Verunreinigungen zeigte.

Tab. 5-1: Galactose-Gehalt in den Endprodukten

Probe	Gehalt Galactose in %, bezogen auf die wasserfreie Probe*	
	HPLC	enzymatische Bestimmung
Galactose/A	99,4 ± 0,5	99,0 ± 0,5
2. Kristallinat/B	99,2 ± 0,1	98,6 ± 0,2
2. Kristallinat/C	99,6 ± 0,8	98,3 ± 0,8
Galactose/D	95,7 ± 0,4	97,0 ± 0,5
Galactose/E	99,1 ± 0,1	98,8 ± 0,3
Galactose/F	99,5 ± 0,2	98,6 ± 0,3

* siehe Tab. 5-26

5.1.3 Charakterisierung der Mutterlaugen mittels MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS ist ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung von Molgewichten großer Moleküle wie Proteine, Glycolipide und neutrale underivatisierte Oligosaccharide. Für den Nachweis von Kohlenhydrat-Verunreinigungen wurden die Mutterlaugen 1 der Herstellung A und C mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Analyse untersucht. Als Matrixsubstanz wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Ethanol verwendet. Die Applikation der Probe erfolgte wie bereits unter Punkt 4.2.6 beschrieben.

Die Spektren in Abb. 5-4 sind Mittelwerte von ca. 20 einzeln aufgenommenen Spektren. Das Spektrum des Blindwertes zeigt ausschließlich Ionen der Matrix in Abwesenheit des Analyten im unteren Massenbereich (< 500 Da). Diese behindern zwar die Zuordnung von Signalen der Analyten, jedoch konnten durch den Vergleich der Probenspektren mit dem Blindwertspektrum

Mononatrium- und Monokalium-Addukte von Sacchariden identifiziert werden, die in der Tabelle 5-2 zusammengefaßt sind. Die Trennung der jeweiligen $(M+Na)^+$ - und $(M+K)^+$ -Ionen wurde durch Messung im Reflektron-Modus erzielt.

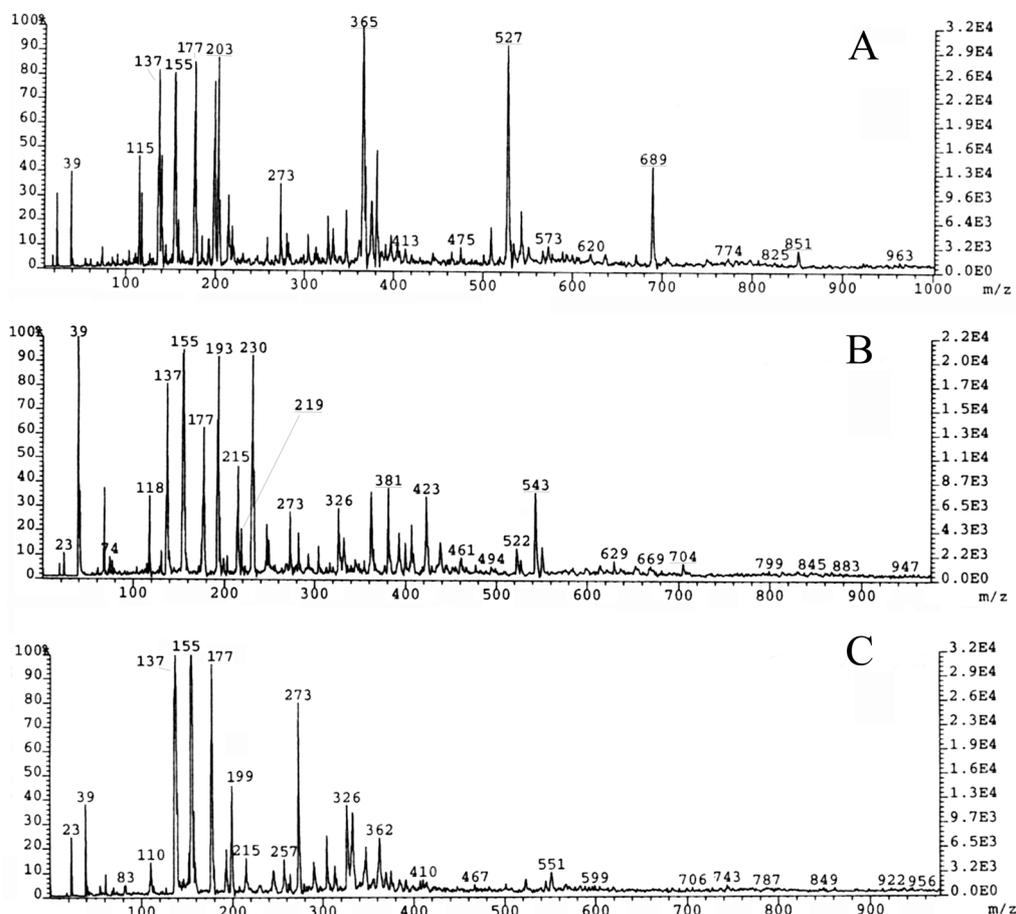


Abb. 5-4: MALDI-TOF-MS-Spektren von A) der Mutterlauge 1/C; B) der Mutterlauge 1/A und C) vom Blindwert (Proben wurden vor Applikation 1:100 verdünnt.)

In beiden Probenspektren in Abb. 5-4 ist ein deutlicher Unterschied in der Intensitätsverteilung der $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$ -Ionen zu erkennen. Im Gegensatz zur Mutterlauge 1/C überwiegen in der Mutterlauge 1/A die $(M+K)^+$ -Ionen. Diese Effekte wurden auf die unterschiedlichen Kalium- und Natrium-Gehalte in den Proben selbst zurückgeführt. In der jeweiligen wasser- und lösungsmittelfreien Probe wurde in der Mutterlauge 1/A ein Kalium-Gehalt von 3,8 g/100 g gegenüber nur 0,1 g/100 g in der Mutterlauge 1/C bestimmt. Dagegen lag der Natrium-Gehalt in der Mutterlauge 1/A bei 0,06 g/100 g im Vergleich zu 1,0 g/100 g in der Mutterlauge 1/C (siehe auch Punkt 5.3). In der Literatur wurden neben vorwiegend gebildeten Natrium- auch Kaliumaddukte beschrieben, deren Intensitäten jedoch geringer waren. Es wurde aber auch der Einfluß von Alkalimetall-Ionen in der Matrix auf die gebildeten Alkalimetall-Addukte untersucht (Stahl, Steup et al. 1991). Bei Zugabe von Lithiumchlorid zu Maltoheptaose beispielsweise wurde die Bildung eines dritten Molekül-Ions, dem Monolithium-Oligosaccharid-Addukt beobachtet.

Tab. 5-2: Identifizierung von Sacchariden in den Mutterlaugen 1/A und C anhand der Alkalimetall-Addukt-Ionen der MALDI-TOF-MS-Analyse

Mutterlauge 1 1:100 verdünnt		Mutterlauge 1 1:100 verdünnt		zugeordnete Substanzen
Hersteller A (M+Na) ⁺ [m/z]	(M+K) ⁺ [m/z]	Hersteller C (M+Na) ⁺ [m/z]	(M+K) ⁺ [m/z]	
-	(219)	203	-	Monosaccharid
(365)	381	365	(381)	Disaccharid
(527)	543	527	(543)	Trisaccharid
-	(704)	689	-	Tetrasaccharid
		(851)	-	Pentasaccharid

5.1.4 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mittels Dünnschichtchromatographie

5.1.4.1 Charakterisierung des dünn-schichtchromatographischen Systems

Nach Optimierung des dünn-schichtchromatographischen Systems anhand vorliegender Vergleichssubstanzen, die sich vorwiegend auf den Bereich der Disaccharide konzentrierte, wurden alle Zwischen- und Endprodukte untersucht (siehe Punkt 4.2.4; System II). Detektiert wurde mit dem Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz, das spezifisch für Aldo-hexosen, Keto-hexosen, Pentosen, Di- und Oligosaccharide ist. Reduzierende Zucker ließen sich im Gegensatz zu den nicht reduzierenden Sacchariden anfärben. Die Reaktion beruht auf der Entstehung von Furfural aus Aldo-hexosen beim Erhitzen in Gegenwart starker Säuren, das mit Aminen unter Bildung farbiger Schiff-scher Basen weiterreagiert. Aus Keto-hexosen entsteht unter diesen Bedingungen HMF, das mit Diphenylamin unter gleichzeitiger Oxidation zu farbigen Produkten kondensiert (Jork, Funk et al. 1989). Alle Banden in den Proben konnten sowohl mit dem Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz, als auch mit dem Naphtoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz detektiert werden, wobei die Empfindlichkeit der letzteren Sprühlösung höher war.

Anhand der R_f-Werte von Vergleichssubstanzen wurden die Saccharidbereiche nach ihrer Anzahl an Monosaccharid-Bausteinen definiert (siehe Anhang 0): Tetra- und Trisaccharide hatten demnach die niedrigsten R_f-Werte. Der Disaccharid-Bereich erstreckte sich von R_f = 0,23 bis R_f = 0,37. Die Selektivität des Monosaccharid-Bereiches (R_f = 0,39 bis R_f = 0,50) wurde dagegen als unzureichend eingeschätzt. Daneben wurden auch Überlappungen aus dem Disaccharid-Bereich beobachtet. Höhere R_f-Werte als die der Monosaccharide konnten den Anhydrozuckern zugeordnet werden.

5.1.4.2 Qualitative Ergebnisse

In den Mutterlaugen 1 der Herstellung A und C wurden unterhalb der Galactose (R_f = 0,39) mindestens vier weitere Banden beobachtet, deren R_f-Werte teilweise gleich und teilweise verschieden voneinander waren, so dass in beiden Mutterlaugen auf mehrere Disaccharide

geschlossen wurde. Bei der Mutterlauge 1/C wurden drei kräftige Banden mit höheren Rf-Werten als die der Monosaccharide beobachtet, wobei zwei davon der 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und der 1,6-Anhydro- β -D-glucoopyranose zugeordnet werden konnten. Die ursprünglich bei der Mutterlauge 1/A als 1,6-Anhydro- β -D-glucoopyranose identifizierte Bande konnte mit einem anderen dünnenschichtchromatographischen System (siehe Punkt 4.2.4; System I) nicht bestätigt werden. Im Verlauf der Herstellungsprozesse wurden die Verunreinigungen in den nachfolgenden Zwischenprodukten in abgereicherter Form beobachtet. Bei allen Endprodukten waren jedoch neben Galactose noch eine bzw. zwei zusätzliche Banden im Disaccharid-Bereich zu erkennen. In der Galactose/A und im 2. Kristallisat/B wurde die eine Bande als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose identifiziert. Im 2. Kristallisat/C, sowie in der Galactose D und E wurden zwei Banden zwischen 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose ($R_f = 0,25$) und Lactose ($R_f = 0,30$) beobachtet. Nach Zudotierung von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose zu diesen Proben konnte dieses Disaccharid als Verunreinigung nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine schwache Bande bei $R_f = 0,68$ in der Galactose/F wurde nach Zudotierung als 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose identifiziert.

5.1.5 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Kationenaustauschersäule

5.1.5.1 Charakterisierung des Analysenverfahrens

Um einen Überblick auf verschiedene Substanzklassen zu erhalten, wurde die Kationenaustauschersäule Sugar Pak I (Fa. Waters) eingesetzt. Solche Calcium beladenen Austauscherharze werden sowohl für Trennungen im Bereich der Mono- und Disaccharide als auch für Zuckeralkohole, Zuckersäuren, Polyole und Alkohole herangezogen. Um die Trennleistung von zwei in Reihe geschalteten Sugar Pak I-Säulen zu überprüfen, wurden zunächst Vergleichssubstanzen injiziert (siehe Punkt 4.2.1.1.2). Unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen eluierten die Kohlenhydrate mit abnehmender Reihenfolge ihres Molekulargewichtes, wobei auch Überlappungen in der Elutionsreihenfolge beobachtet wurden. Der Bereich der Tri- bzw. Disaccharide wurde bis $RRT = 0,82$ ($RT = 22,14$ min) definiert (siehe Abb. 5-5). Anhydrozucker und Ethanol eluierten im weiten Bereich der Monosaccharide. Tagatose und Glycerin hatten die gleiche Retentionszeit. Talose und Psicose war ebenfalls ein kritisches Paar. Im Vergleich zu den am häufigsten verwendeten Polymerphasen in H^+ -Form zeigten organische Säuren und Zuckersäuren auch auf der Sugar Pak I in Verbindung mit refraktometrischer Detektion ein Signal. Durch die Einbeziehung der theoretisch enthaltenen Komponenten dieser Substanzklasse war der Nachweis von Glucose nicht möglich, da in diesem Bereich Brenztrauben-, Zitronen-, Galacturon-, Lactobionsäure und Lactulose eluierten. Im Bereich des Ethanol eluierten Glycol-, Milch- und Levulinsäure. So konnte mit diesem System lediglich eine selektive Trennung von L-(-)-Äpfelsäure, Bernsteinsäure, 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und -glucoopyranose erzielt werden (siehe Abb.5-5). Je nach Galactosegehalt der zu untersuchenden Probe wurde der Nachweis von Sorbose, Mannose, Lactitol, aber auch von L-(-)-Äpfelsäure und Bernsteinsäure gestört.

5.1.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Quantitative Bestimmung

In der wasser- und lösungsmittelfreien Mutterlauge 1/C wurden 1,89 g/100 g ($s = 0,10$ g/ 100 g VK = 5,3 %) 1,6-Anhydro- β -D-glucopyranose und 1,87 g/100 g ($s = 0,17$ g/ 100 g; VK = 9,3 %) 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose nachgewiesen. Der 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose-Gehalt der Galactose/F lag unterhalb der Bestimmungsgrenze ($< 0,062$ g/ 100 g wasserfreie Probe) (siehe auch Punkt 5.1.6.2 und Anhang 0).

Der L-(-)-Äpfelsäure-Gehalt von folgenden wasser- und lösungsmittelfreien Proben lag unterhalb der Bestimmungsgrenze: Mutterlauge 1/A $< 0,90$ g/ 100 g, Mutterlauge 2/A $< 1,47$ g/ 100 g. Durch den erhöhten Galactose-Gehalt im 1.Kristallisat/A wurde die L-(-)-Äpfelsäure und Bernsteinsäure von der Galactose überlagert und konnte nicht quantifiziert werden. Die Bernsteinsäure-Gehalte einiger Zwischenprodukte sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 5-3: Bernsteinsäure-Gehalt in verschiedenen Zwischenprodukten

Probe	Bernsteinsäure [g/ 100 g, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe - siehe Tab. 5-26]	VK [%]
Mutterlauge 1/A	$4,59 \pm 0,09$	2,0
Mutterlauge 2/A	$3,05 \pm 0,21$	7,0
Mutterlauge 3/A	$< 0,43^*$	
Mutterlauge 1/C	$1,44 \pm 0,01$	0,9

* $<$ Bestimmungsgrenze (siehe Anhang 0)

Qualitative Bestimmung

In allen Proben des Herstellers A (in der Galactose/A nur in Spuren) und in der Mutterlauge 2 des Herstellers C wurde qualitativ Ethanol nachgewiesen, das gaschromatographisch quantifiziert wurde (siehe Punkt 5.7).

Zur RRT von 1,35 wurde bei folgenden Proben ein Peak detektiert, der der Tagatose und/oder Glycerin zugeordnet wurde: Mutterlauge 1-3/A, 1. und 2. Kristallisat/A, 1. Kristallisat B, Mutterlauge 1-2/C, 1. Kristallisat/C, Galactose/D und F, in Spuren auch in Galactose/E.

Im definierten Tri- bzw. Disaccharid-Bereich (siehe Punkt 5.1.5.1) wurden in allen Proben Peaks beobachtet, wobei der Fingerprint bei den Endprodukten der Hersteller A, B und bei den Herstellern C, D, E und F ähnlich war.

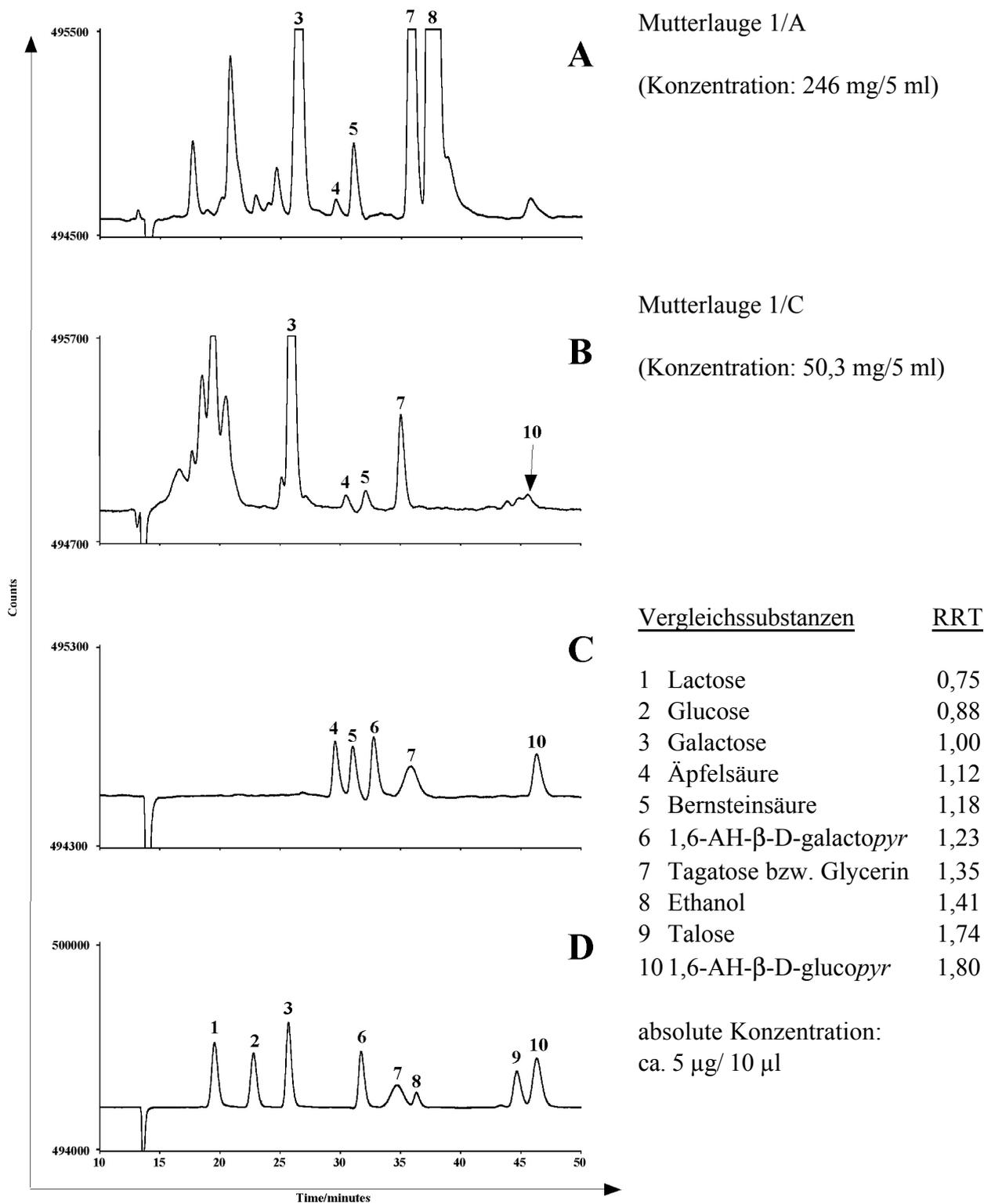


Abb. 5-5: Chromatogramme Sugar Pak I (Fa. Waters) **A**: Mutterlauge 1/A; **B**: Mutterlauge 1/C; **C**: und **D**: Standardlösungsmittelgemische (chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.1.2)

5.1.6 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mit Hilfe der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC)

5.1.6.1 Charakterisierung des Analysenverfahrens

Zur Charakterisierung von Kohlenhydrat-Verunreinigungen in einem Überschuß Galactose wurde eine Elution mit NaOH auf einer Carbo Pac PA 1 dahingehend optimiert, Anhydrozucker und Monosaccharide in einer beginnenden isokratischen Elution mit 8 mmol NaOH chromatographisch voneinander zu trennen und danach in einem linearen Gradientenschritt bis 200 mmol NaOH noch Di- und Trisaccharide zu erfassen (siehe Punkt 4.2.1.2.1).

Kohlenhydrate sind schwache Säuren und werden als Anionen in alkalischer Lösung adsorbiert, wobei die Elutionsreihenfolge mit sinkendem pka-Wert und steigendem Molgewicht korreliert. Jedoch gibt es einige Ausnahmen: z. B. eluiert die Trehalose, bei der die azideste OH-Gruppe am C1-Atom durch glycosidische Bindung blockiert ist, noch vor der 1,6-Anhydro- β -D-Galactopyranose. Saccharose hat einen höheren pka-Wert als Glucose. Trotzdem besitzt dieses Disaccharid eine höhere Affinität zur stationären Phase. Obwohl Galactose und Glucose den gleichen pka-Wert haben, eluiert Galactose vor Glucose. Der Grund dafür könnte die bevorzugte Bildung des Oxyanions an der äquatorial ständigen OH-Gruppe am C4-Atom der Glucose sein, da diese im Gegensatz zu der axial ständigen OH-Gruppe in der Galactose geringere Wechselwirkungen mit dem Dipolvektor des Ringsauerstoffs eingeht (Lee 1990).

Tab. 5-4: Dissoziationskonstanten (pka-Werte) von einigen Zuckern

Substanz	pka (Lee et al. 1989), (Ye, Zhao et al. 1998)
Saccharose	12,51
Glucose	12,35
Galactose	12,35
Mannose	12,08
Fructose	12,03
Lactose	11,98
Maltose	11,94
Talose	11,39

Die Monosaccharide eluierten unter isokratischen Bedingungen mit einer 12 mmol NaOH in folgender Reihenfolge: Talose > Psicose > Mannose > Fructose = Sorbose > Tagatose > Glucose > Galactose. Um Glucose in einem Überschuß von Galactose abzutrennen, konnte nur mit einer 8 mmol NaOH gearbeitet werden (chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.2.1; isokratische Elution mit anschließender Regenerierung der Säule). Die Elution änderte sich in der Reihenfolge Talose > Psicose > Tagatose > Fructose = Sorbose > Mannose > Glucose > Galactose. Die bei der Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein-Umlagerung aus der Glucose und Galactose entstehenden Ketosen Tagatose und Psicose konnten hierbei nicht als auswertbare Peaks erfaßt werden. Die Dissoziationskonstanten (pka-Wert) dieser Verbindungen sind unbekannt. Da aber

die Dissoziation bei einer 8 mmol NaOH unvollständiger sein muß, wurde vermutet, dass die Affinität dieser beiden Ketosen im Gegensatz zur Fructose und Sorbose aufgrund sterischer Effekte zur stationären Phase noch größer ist und die Elutionskraft einer 8 mmol NaOH nicht ausreichend war bzw. der Beginn des Gradienten, um zusätzlich höhere Saccharide nachzuweisen, zu spät gewählt wurde.

Bei Anwendung der Gradiententechnik sind Vorhersagen des Retentionsverhaltens der Kohlenhydrate schwierig. Einerseits bewirkt die Erhöhung der Elutionen-Konzentration und die damit verbundene Zunahme der Ionenstärke eine Verringerung der Retentionszeit von Kohlenhydraten. Andererseits nimmt mit steigendem pH-Wert die Dissoziation der Kohlenhydrate und damit ihre Affinität zur stationären Phase zu, was sich wiederum in höheren Retentionszeiten auswirkt (Weiß 1991).

Es wurde die Elutionsreihenfolge der Glucobiosen auf einer mit der Carbo Pac PA1 vergleichbaren analytischen Säule, der HPIC-AS6, mit einer 200 mmol NaOH als Eluent wie folgt beschrieben (Koizumi, Kubota et al. 1992): β -1,2 (Sophorose) > β -1,3 (Laminaribiose) > α -1,4 (Maltose) > α -1,3 (Nigerose) > β -1,4 (Cellobiose) > β -1,6 (Gentiobiose) > α -1,2 (Kojibiose) > α -1,6 (Isomaltose). Mit dem in vorliegender Untersuchung gewählten Gradientensystem konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Es wurde jedoch eine bessere Auflösung zwischen β -1,6 und β -1,4 erreicht. Dagegen überlagerten sich β -1,2 und β -1,3. Ausgehend davon konnten keine Rückschlüsse auf die Elutionsreihenfolge der Galactobiosen gezogen werden, da α -1,4 beispielsweise vor β -1,6 eluierte. Wie sich schon innerhalb der Glucobiosen abzeichnete, haben neben der Azidität der OH-Gruppen auch andere Faktoren, wie Unterschiede in der Konformation und der Hydrophobizität, einen entscheidenden Einfluß auf die Trennung auf einer starken Anionenaustauschersäule. Obwohl die Azidität der OH-Gruppe am C2-Atom neben der am C1-Atom am höchsten ist und diese sowohl in der Kojibiose als auch in der Sophorose durch glycosidische Bindung maskiert ist, eluiert Kojibiose mit einer relativ kurzen Retentionszeit gegenüber Sophorose, die die höchste Retentionszeit von den Glucobiosen überhaupt aufweist. Mit Ausnahme der 1,4-Isomeren (Maltose und Cellobiose), eluiert das α - generell vor dem β - Isomer wie beispielsweise Isomaltose vor Gentiobiose (Koizumi, Kubota et al. 1992).

5.1.6.2 Ergebnisse und Diskussion

Quantitative Bestimmung

Die bereits aus der dünnschichtchromatographischen Untersuchung vorliegenden Ergebnisse des qualitativen Nachweises von Anhydrozucker in einigen Proben wurden durch Zudotierung der entsprechenden Vergleichssubstanzen mit der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie bestätigt (siehe Punkt 5.1.4.2). Aufgrund der niedrigen Anhydrozucker-Gehalte in der Galactose/D und des geringen 1,6-Anhydro- β -D-glucopyr-Gehaltes in der Galactose/F konnten diese jedoch dünnschichtchromatographisch nicht detektiert werden.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von 1,6-Anhydrozucker zeigten bei der amperometrischen gegenüber der refraktometrischen Detektion eine um ca. 150 fach bessere Empfindlichkeit (siehe auch Punkt 5.1.5.2 und Anhang 0). In Tabelle 5-5 sind die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Detektionssysteme gegenübergestellt.

Tab. 5-5: Gehalt von 1,6-Anhydro- β -D-galpyr und 1,6-Anhydro- β -D-glupyrr

Probe/Hersteller	1,6-Anhydro- β -D-galpyr		1,6-Anhydro- β -D-glupyrr	
	[mg/100 g wasser- und lösungsmittelfreie Probe]*			
	Sugar Pak I	Carbo Pac PA1	Sugar Pak I	Carbo Pac PA1
Mutterlauge1/C	1867	1899	1894	1887
Mutterlauge2/C	-	-	< 1156**	558
Galactose/D	< 20**	< 9,4***	< 23**	< 9,4***
Galactose/F	< 63***	16,6	< 23**	9,8

* siehe Tab. 5-26; ** < Nachweisgrenze; *** < Bestimmungsgrenze (siehe Anhang 0)

Da eine gute Trennleistung im Bereich der Disaccharide auf dem stark basischen Anionenaustauscher erzielt wurde, konnte Lactose in einigen Proben nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Folgende Angaben beziehen sich auf die jeweilige wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26): Mutterlauge 1/A (614 mg/100 g; VK = 3,8 %), Mutterlauge 2/A (424 mg/100 g; VK = 3,9 %), Mutterlauge 1/C (4643 mg/100 g; VK = 3,6 %). Der Lactose-Gehalt lag in der Galactose D (< 20,4 mg/100 g) und im 1. Kristallisat/A (< 27,1 mg/100 g) unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Die Retentionszeit der Verunreinigung 2 entsprach der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-Galactose bzw. der Melibiose. Sie wurde in allen vorliegenden Proben nachgewiesen. Daneben traten in den Zwischenprodukten der Herstellung C und in den Endprodukten der Hersteller C, D, E und F Verunreinigungen mit folgenden relativen Retentionszeiten auf:

Verunreinigung 1	0,92
Verunreinigung 2	1,00
Verunreinigung 3	1,02
Verunreinigung 4	1,14
Verunreinigung 5	1,32

Bei der Zudotierung von Nigeroase coeluierte diese zusammen mit der Verunreinigung 5.

Die Mutterlauge 2/C wurde stellvertretend für alle anderen Proben für Strukturuntersuchungen dieser Verunreinigungen 1-5 herangezogen wurde (siehe 5.1.7). Durch die MALDI-TOF-MS-Analyse (siehe Punkt 5.1.7.3 und 5.1.7.4) wurden sie den Disacchariden zugeordnet. Aufgrund der gleichen Retentionszeiten dieser Disaccharide in den verschiedenen Proben, wurden strukturell identische Verbindungen vermutet. Eine konkrete Disaccharid-Zuordnung, wie unter Punkt 5.1.7.5.7 beschrieben, war jedoch nicht möglich, da eine Überlagerung mit mehreren Substanzen nicht auszuschließen war und die theoretisch möglichen Disaccharide kommerziell nicht erhältlich

waren, so dass weitere ionenchromatographische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Aufgrund eines zu erwartenden ähnlichen Responseverhaltens verschiedener Disaccharide wurden die Verunreinigungen 1-5 mit Hilfe der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose-Kalibrierung berechnet, damit ein Vergleich der quantitativen Ergebnisse vorgenommen werden konnte.

Tab. 5-6: Disaccharid-Verunreinigungen 1-5 als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet

Verunreinigung	1	2	3	4	5
	[mg / 100 g wasser- und lösungsmittelfreie Probe*]				
Mutterlauge1/A	-	5838	-	-	-
Mutterlauge2/A	-	11229	-	-	-
Mutterlauge3/A	-	2957	-	-	-
1.Kristallinat/A	-	2093	-	-	-
2.Kristallinat/A	-	1427	-	-	-
3.Kristallinat/A	-	1003	-	-	-
Galactose/A	-	873	-	-	-
1.Kristallinat/B	-	820	-	-	-
2.Kristallinat/B	-	496	-	-	-
Mutterlauge1/C	4867	8146	5306	5916	1076
Mutterlauge2/C	30658	26668	11638	15864	6141
1.Kristallinat/C	1178	640	346	622	120
2.Kristallinat/C	493	118	47	207	59
Galactose/D	1153	820	325	539	124
Galactose/E	384	128	51	183	22
Galactose/F	118	41	18	48	17

* siehe Tab. 5-26

Qualitative Bestimmung

Beim Vergleich der Mutterlauge 1/A und C wurde ein Unterschied im Disaccharid-Bereich beobachtet, der sich sowohl durch den Nachweis der Verunreinigungen 1, 3, 4, 5, als auch von Isomaltose, Gentiobiose und Cellobiose in der Mutterlauge 1/C auszeichnete. Die Chromatogramme der Mutterlauge 1/A und des 1. Kristallinates/B in Abb. 5-6 zeigen dagegen Ähnlichkeiten.

In der Galactose/D konnte durch Zudotierung auch Isomaltose, Gentiobiose und Lactose in Spuren nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde Glucose als Verunreinigung in der Mutterlauge 1 und 2/A, Mutterlauge 1/C und in der Galactose/D identifiziert (siehe Abb. 5-6). Fructose coeluierte zusammen mit Saccharose und 4-O- α -D-Galactopyranosyl-galactose, so dass Peak 14 in der Mutterlauge 1/C nicht zugeordnet werden konnte. Die Dotierung von Talose zur Mutterlauge 1/A und zum 1. Kristallinat/B ergab eine Peakvergrößerung, konnte jedoch durch ein anderes analytisches Verfahren nicht bestätigt werden.

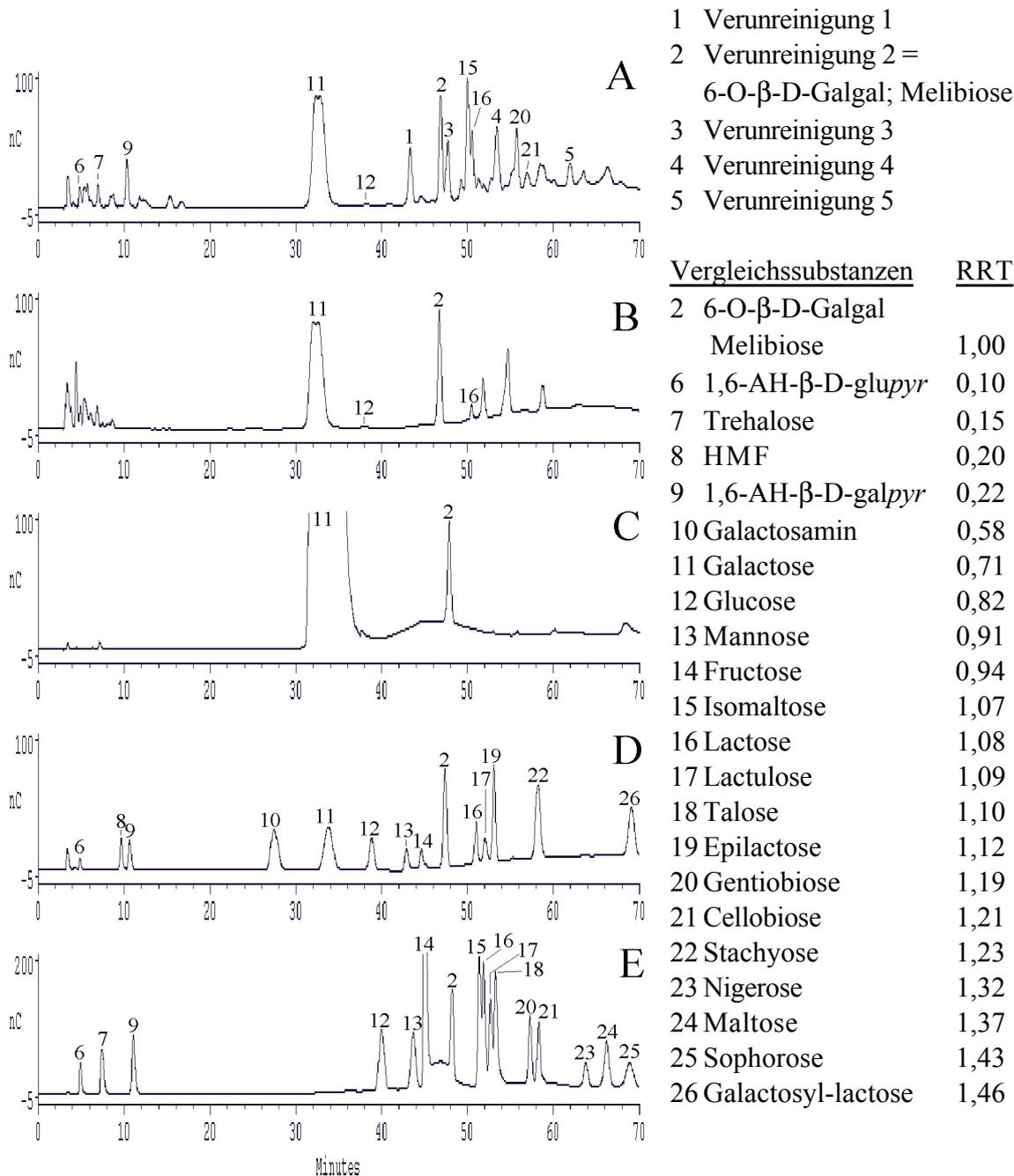


Abb. 5-6: **A:** Mutterlauge 1/C (25µl/100ml); **B:** Mutterlauge 1/A (50µl/100ml); **C:** 1. Kristallisat/B (54,96mg/25ml//5ml/10ml); **D:** Standardlösung 1: 6 (0,10µg/50µl), 8 (0,17µg/50µl), 9 (0,08µg/50µl), 10 (0,24µg/50µl), 11 (0,35µg/50µl), 12 (0,20µg/50µl), 13 (0,17µg/50µl), 14 (0,22µg/50µl), 2 (1,00µg/50µl), 16 (0,27µg/50µl), 17 (0,27µg/50µl), 19 (0,80µg/50µl), 22 (1,02µg/50µl), 26 (1,00µg/50µl); **E:** Standardlösung 2: 6 (0,56µg/50µl), 7 (0,72µg/50µl), 9 (0,79µg/50µl), 12 (0,68µg/50µl), 13 (0,66µg/50µl), 14 (3,44µg/50µl), 2 (0,80µg/50µl), 15 (1,21µg/50µl), 16 (1,15µg/50µl), 17 (1,08µg/50µl), 18 (0,78µg/50µl), 20 (0,61µg/50µl), 21 (0,71µg/50µl), 23 (0,49µg/50µl), 24 (0,89µg/50µl), 25 (0,46µg/50µl)
 chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.2.2

5.1.7 Strukturuntersuchungen von Verunreinigungen

5.1.7.1 Lactose-Säurehydrolyse

Es wurde eine Lactose-Säurehydrolyse mit einer 2 M HCl bei 1h, 100°C durchgeführt (siehe Punkt 4.3.1). Das Hydrolysat wurde ionenchromatographisch untersucht (siehe Punkt 5.1.6.1 und 4.2.1.2.1, isokratische Elution). Im Hydrolysat konnten qualitativ die Verunreinigungen 1-5 (siehe Punkt 5.1.6.2), Isomaltose (RRT = 1,07) und Gentiobiose (RRT = 1,20) nachgewiesen werden. Die Hydrolyse war vollständig abgelaufen, da keine Lactose zu beobachten war.

5.1.7.2 Behandlung von Galactose und Glucose unter säurehydrolytischen Bedingungen

Neben der Lactose-Säurehydrolyse wurde jeweils Galactose und Glucose unter gleichen Hydrolysebedingungen behandelt (siehe Punkt 4.3.1) und ionenchromatographisch untersucht (siehe Punkt 5.1.6.1 und 4.2.1.2.1, isokratische Elution). Bei der Säurebehandlung von Glucose wurden vorwiegend die Reversionszucker Isomaltose (α -1,6; RRT = 1,07) und Gentiobiose (β -1,6; RRT = 1,20) im Verhältnis 1,6 : 1 neben Cellobiose und Nigerose gebildet. Die RRT = 1,32 der Verunreinigung 5 (siehe Punkt 5.1.6.2) entsprach der Nigerose.

Das Chromatogramm der säurebehandelten Galactose waren ebenfalls zwei größere Peaks auffällig, wobei der eine Peak der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-galactose zugeordnet werden konnte. Der andere Peak mit der RRT = 0,92 entsprach der Verunreinigung 1 (siehe Punkt 5.1.6.2). Das Verhältnis von Verunreinigung 1/ 6-O- β -D-Galactopyranosyl-galactose entsprach dabei 1,3 : 1. Ausgehend davon, dass bei der säurebehandelten Glucose vorwiegend α -1,6- neben β -1,6-Glu-Glu gebildet wurde und unter der Berücksichtigung, dass die jeweilige α - vor der β -Form eluiert (siehe 5.1.6.1), könnte es sich bei der Verunreinigung 1 möglicherweise um 6-O- α -D-Galactopyranosyl-galactose handeln. Daneben war auch hier ein Peak mit der RRT = 1,32 (Verunreinigung 5; siehe Punkt 5.1.6.2) zu beobachten. Aufgrund der eingesetzten Galactose konnte dieser Peak hierbei nicht der Nigerose zugeordnet werden.

Die zusammenfassende Betrachtung der Lactose-Säurehydrolyse und der säurebehandelten Galactose und Glucose ergab strukturelle Hinweise auf die Verunreinigungen 1-5 (siehe Punkt 5.1.6.2). Die Verunreinigungen 1, 2 und 4 wurden im Lactosesäurehydrolysat und in der säurebehandelten Galactose zu beobachten. Folglich konnte es sich hierbei jeweils um ein Disaccharid bestehend aus Galactose (1 = 6-O- α -D-Gal-Gal; 2 = 6-O- β -D-Gal-Gal) und/oder Galactose und Glucose handeln, wobei 6-O- β -D-Gal-Gal mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Vergleichssubstanz bestätigt werden konnte. Die Verunreinigung 3 konnte als heterogenes Disaccharid bestehend aus Galactose und Glucose gedeutet werden, da diese nur im Lactose-Säurehydrolysat zu beobachten war. Da die Verunreinigung 5 sowohl im Lactose-Säurehydrolysat als auch in der jeweils säurebehandelten Galactose und Glucose vertreten war, konnte es sich hierbei um ein Disaccharid bestehend aus Galactose und/oder Glucose (Nigerose) und/oder Galactose und Glucose handeln.

5.1.7.3 Isolierung von Verunreinigungen

Die Verunreinigungen 1-5 (siehe Punkt 5.1.6.2) wurden aus der Mutterlauge 2/C isoliert, da diese im Vergleich zu den Endprodukten von C, D, E, F nur 25,8 % Galactose enthielt. Im Gegensatz zu der beschriebenen direkten Kopplungstechnik zwischen Dünnschichtchromatographie und MALDI-TOF-MS (Cserhati und Forgacs 1997) wurden die Banden nach der dünnschichtchromatographischen Trennung zunächst isoliert (siehe Punkt 4.3.2). Um den störenden Einfluß des Sorptions- und der Bindemittel zu minimieren, wurden die Analyten anschließend vom Kieselgel extrahiert und dann der MALDI-TOF-MS-Analyse unterzogen (siehe Punkt 4.3.2.1). Als Matrixsubstanz für die Laserdesorption/ionisation wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 5-7: Charakterisierung der isolierten dünnschichtchromatographischen Banden mittels MALDI-TOF-MS-Analyse

Dünnschichtchromatographie			MALDI-TOF-MS	
Bande	hRf-Wert	Farbe	(M+Na) ⁺ [m/z]	zugeordnete Substanzen
1	13-20	hell violett	527	Trisaccharid
2.1	22-26	grau-violett		
2.2	26-32	rot-violett	365	Disaccharid
3	37-45	dunkel violett	203	Monosaccharid
4	47-54	hell violett	203	Monosaccharid
5 (Blindwert)	58-74	keine Detektion		

Nach ionenchromatographischer Trennung auf der Carbo Pac PA1 (siehe Punkt 4.2.1.2.1, Gradientelution und Punkt 4.3.2.2) waren in der dünnschichtchromatographischen Bande 2 der Mutterlauge 2/C hauptsächlich die Verunreinigungen 1-5 enthalten, die bezüglich der relativen Retentionszeit mit den Verunreinigungen in den Endprodukten der Hersteller C, D, E, F übereinstimmten (siehe Punkt 5.1.6.2). Bei einer Aufspaltung der Bande 2 wurden die Verunreinigungen 1 und 2 in beiden Banden, in 2.1 und 2.2, beobachtet. Dagegen waren die Verunreinigungen 3, 4 und 5 lediglich in Bande 2.2 vertreten. Eine bessere Auflösung der Banden konnte durch Optimierungsvorversuche nicht erreicht werden.

5.1.7.4 Säurehydrolyse der Verunreinigungen

Die ionenchromatographische Untersuchung des Säurehydrolysates der dünnschichtchromatographischen Bande 2 von der Mutterlauge 2/C (siehe Punkt 4.2.1.2.1, isokratische Elution, Punkt 4.3.2.2 und 5.1.7.3) lieferte Hinweise auf die Zusammensetzung der Disaccharide 1-5. Aus den Peakflächen wurde ein Monomeren-Verhältnis von Galactose/Glucose = 2 : 1 berechnet. Dieses Ergebnis wurde einestells bei der Untersuchung der gesamten Bande 2 erzielt, ergab sich jedoch auch aus der Addition der übereinstimmenden Peaks der separat betrachteten Banden 2.1 und 2.2 (siehe Tab. 5-8).

Die sehr unterschiedlichen Galactose-Glucose-Verhältnisse der beiden Banden 2.1 und 2.2 von 8,0 und 1,2:1 könnten zunächst darauf deuten, dass trotz der hohen Beladung der Dünnschichtplatte

mit der Probe nur geringfügige Diffusionserscheinungen der Banden auftraten. Der hohe Galactose-Anteil im Säurehydrolysat von der Verunreinigung 1 und 2 weist auf homogene Disaccharide, Galactobiosen, hin. Aus dem beinahe ausgeglichenen Monomerenverhältnis im Säurehydrolysat der Bande 2.2 könnte vermutet werden, dass die Verunreinigungen 1 und 2 keine reinen Substanzen sind. Damit müßten sich die möglicherweise überlagerten Substanzen der Verunreinigungen 1 und 2 und die Verunreinigungen 3 - 5 überwiegend aus heterogenen Disacchariden, aus Galactose- und Glucosebausteinen, zusammensetzen. Dieses Ergebnis zeigte eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der durchgeführten Lactose-Säurehydrolyse und der Behandlung von Galactose und Glucose unter säurehydrolytischen Bedingungen (siehe Punkt 5.1.7.2).

Tab. 5-8: Monomeren-Verhältnisse nach der Säurehydrolyse von der isolierten dünnschichtchromatographischen Banden von der Mutterlauge 2/C

	Bande 1	Bande 2	Bande 2.1	Bande 2.2
Verhältnis der Peakflächen			8,0:1	1,2:1
Galactose/Glucose	5,9:1	2,1:1	1,9:1	

5.1.7.5 GC/FID und GC/MS-Untersuchungen von Verunreinigungen

5.1.7.5.1 Derivatisierungsmethoden

Um die in der dünnschichtchromatographisch isolierten Bande 2 von der Mutterlauge 2/C erwarteten Disaccharide (siehe Punkt 5.1.7.3) einer GC/FID- bzw. einer GC-MS-Analyse unterziehen zu können, war es nötig, diese in flüchtige Derivate umzuwandeln.

Zur Charakterisierung der Disaccharide wurde die Permethylierung mit Natriumhydroxidpulver und Methyljodid in DMSO durchgeführt (Ciucanu und Kerek 1984). Bei der Alkylierung bleibt die Ringstruktur des Zuckers erhalten und es entstehen mehrere Produkte. Neben der Pyranose- wird auch die Furanoseform mit den jeweiligen Anomeren gebildet. Die anschließende ionische Hydrierung wurde mit Triethylsilan und Katalysatoren durchgeführt. Die Spaltung der glycosidischen Bindung und die Reduktion zu Anhydroalditol-Derivaten mit intakter Ringstruktur fand dabei in einem Reaktionsschritt statt (Jun und Gray 1987). Durch die Aufeinanderfolge der Per-O-Methylierung, der reduktiven Spaltung und einer anschließenden Acetylierung werden Saccharide zu partiell acetylierten Anhydroalditol-O-methylethern umgesetzt, wobei die Stellung der Acetylgruppe die Position der Verknüpfung anzeigt (siehe Abb. 5-7).

Da die Extraktion der am Kieselgel adsorbierten Disaccharide mit Wasser mit Verlusten verbunden war, wurde die gesamte dünnschichtchromatographisch isolierte Bande 2 für die 3-stufige Derivatisierung eingesetzt (siehe Punkt 4.3.2.3). Die entstandenen Monomeren-Derivate wurden durch Gegenüberstellung der gaschromatographisch ermittelten Retentionszeiten und massenspektrometrischen Daten von aufgearbeiteten Vergleichssubstanzen identifiziert. Da im Gegensatz zu den Glucobiosen nicht alle Vergleichssubstanzen der Galactobiosen kommerziell erhältlich waren, wurde als Vergleichssubstanz eine temperaturgestreßte Galactose und Glucose eingesetzt (siehe Punkt 4.3.2.3) (Häselner und Kroh 1998). Daneben standen EI-Massenspektren der partiell methylierten und acetylierten Isomeren von 1,5-Anhydro-D-galactit und -glucit aus der Literatur zur Verfügung (Elvebak und Gray 1995), (Elvebak, Abbott et al. 1995).

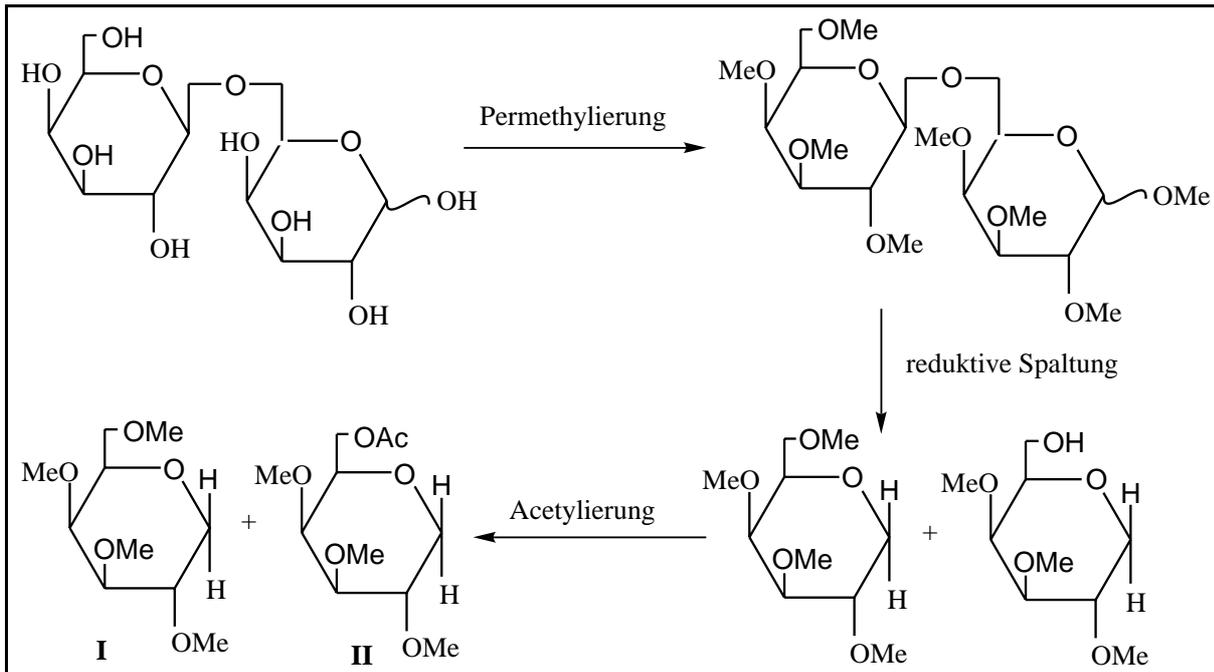


Abb. 5-7: Prinzip der Methylierung, reduktiven Spaltung und Acetylierung am Beispiel der 6-O-β-D-Galactopyranosyl-D-galactose (**I** - 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galactit; **II** - 6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-galactit)

5.1.7.5.2 Auswertung von gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten der permethylierten Verunreinigungen

In den GC-Chromatogrammen von permethylierten Disaccharid-Derivaten waren jeweils zwei intensitätsstarke Peaks (Peak A und Peak B) markant, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die jeweiligen α- und β-Pyranosen handelt. Das Intensitätsverhältnis von Peak A mit der jeweils niedrigeren Retentionszeit zu Peak B lag bei 2,0 - 4,0 : 1 und wurde in Verbindung mit den relativen Retentionszeiten für die Zuordnung von Signalen in der Probe und in den temperaturgestreßten Verbindungen (siehe Punkt 5.1.7.5.1) herangezogen.

Demzufolge entsprach im GC-Chromatogramm der **temperaturgestreßten Glucose** (siehe Abb. 5-8) **Peak 1** (RRT = 1,060) Peak A der permethylierten Derivate von Isomaltose, Laminaribiose und Cellobiose und **Peak 2** (RRT = 1,090) Peak A der permethylierten Derivate von Maltose, Gentiobiose, Sophorose, Nigerose, Peak B der permethylierten Derivate von Isomaltose und der Cellobiose, **Peak 9** Peak B der permethylierten Derivate von Laminaribiose, Maltose, Sophorose und Nigerose. Da **Peak 8** dem Peak B lediglich der permethylierten Gentiobiose zugeordnet wurde, konnte Gentiobiose als Thermolyseprodukt der Glucose identifiziert werden.

Peak 1, 2, 9 und 8 wurden auch im GC-Chromatogramm der **temperaturgestreßten Mischung, bestehend aus Galactose und Glucose** (siehe Abb. 5-8), beobachtet.

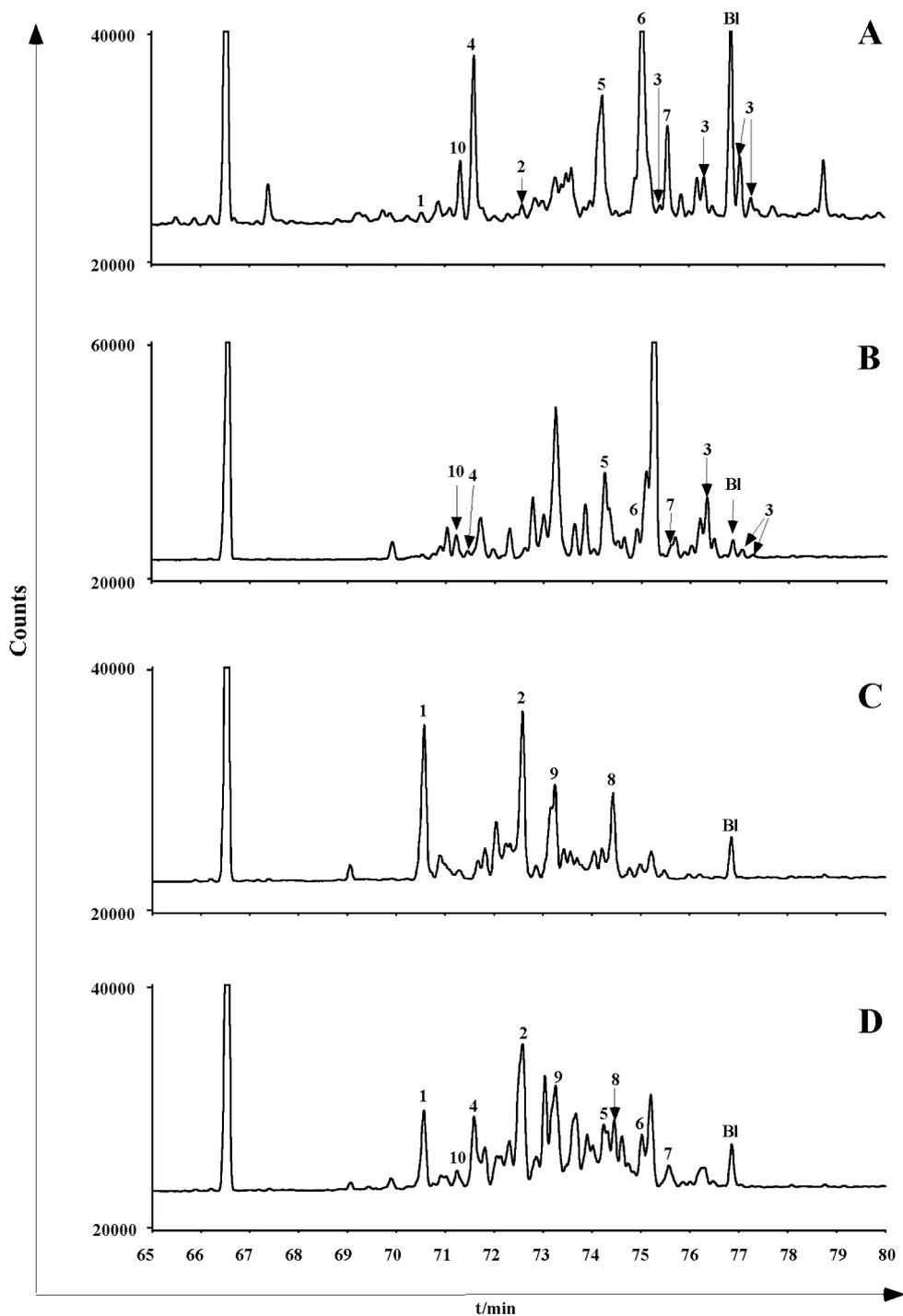


Abb. 5-8: GC-Chromatogramme **A**: der permethylierten Probe (dünn-schichtchromatographische Bande 2 von der Mula 2/C siehe Punkt 5.1.7.5.1) und Vergleichssubstanzen (**B**: temperaturgestreßte Galactose, **C**: temperaturgestreßte Glucose, **D**: temperaturgestreßte Mischung aus Galactose und Glucose; jeweils 160°C, 3 h)
Bl = Peak aus dem Blindwert

Peak 1 und 2, die jeweils Überlagerungen von den intensitätsstarken Peaks A einiger Glucobiosen darstellen, waren im GC-Chromatogramm der **Probe** (siehe Abb. 5-8) nur in Spuren enthalten waren. Anhand der Peakzuordnungen in der temperaturgestreßten Glucose konnten somit folgende Glucobiosen als Verunreinigung in der Probe ausgeschlossen werden: Isomaltose, Laminaribiose, Cellobiose, Maltose, Gentiobiose, Sophorose, Nigerose. Das Gleiche trifft für die heterogen zusammengesetzten Disaccharide Melibiose und Lactose zu, da Peak A der jeweiligen permethylierten Pyranoseform (**Peak 2**) auch nur in Spuren enthalten war. Mit Ausnahme der 1,6-verknüpften Glucobiosen, Melibiose und Lactose lagen die Rf-Werte von den anderen Verbindungen und von Trehalose außerhalb des Bereiches der isolierten dünnenschichtchromatographischen Bande 2 (siehe Punkt 5.1.7.3 und Tab. A-0-1) und waren demzufolge in der Probe nicht zu erwarten.

Durch Zudotierung der permethylierten 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose konnte dieses Disaccharid in der **temperaturgestreßten Galactose** und in der **Probe** identifiziert werden (siehe **Peak 3** in Abb. 5-8).

In der **Probe** wurden vier weitere größere Signale mit folgenden RRT beobachtet (siehe Abb. 5-8): **Peak 4** = 1,076; **Peak 5** = 1,115; **Peak 6** = 1,128; **Peak 7** = 1,136. **Peak 4** entsprach dem Peak B des permethylierten Derivates von 4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactopyranose. Das andere Anomer (Peak A) fehlte dagegen im Chromatogramm. Aufgrund des ungünstigen Verhältnisses zwischen den beiden Anomeren (Peak A und B), konnte diese Verbindung als Verunreinigung in der Probe ebenfalls ausgeschlossen werden. Offenbar wurde es auch nicht bei der Thermolyse der Galactose gebildet. **Peak 4** trat jedoch im GC-Chromatogramm der **temperaturgestreßten Mischung aus Galactose und Glucose** auf und könnte somit einen Hinweis auf ein Disaccharid liefern, das aus den Monomeren Glucose und Galactose aufgebaut ist. **Peak 5, 6 und 7** wurden sowohl in der **temperaturgestreßten Galactose** als auch in der **temperaturgestreßten Mischung aus Galactose und Glucose** beobachtet. Folglich könnte es sich in der **Probe** überwiegend um homogene Disaccharide aus Galactosebausteinen oder heterogene Disaccharide aus Galactose- und Glucosebausteinen handeln. Dieses Ergebnis war konform mit dem der ionenchromatographischen Untersuchungen (siehe Punkt 5.1.7.4).

5.1.7.5.3 CH₄-CI-Spektren von permethylierten Verunreinigungen

Die chemische Ionisation wird nicht nur zur Molmassenbestimmung eingesetzt, sondern auch um Fragmente von einem Molekül zu erhalten, deren Bildung durch die Wahl des Reaktandgases beeinflusst wird. Voraussetzung dafür, ist die größere Protonenaffinität der Probe gegenüber des verwendeten Reaktandgases. Es wurden bereits verschiedene Permethylderivate von Disacchariden durch chemische Ionisation mit Methan untersucht (De Jong, Heerma et al. 1979). Danach konnte anhand von Intensitätsverhältnissen bestimmter Ionen die glycosidische Bindung in einem Disaccharid charakterisiert werden (siehe Abb. 5-9). Desweiteren wurde eine Unterscheidung der Stereoisomeren im Fall der 1,4- und 1,6-verknüpften Disaccharide erreicht. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die vorliegende permethylierte Probe (siehe Punkt 5.1.7.5.1) untersucht, um einen strukturellen Hinweis auf die Verknüpfung innerhalb der darin nachgewiesenen Disaccharide zu erhalten. Durch Anwendung des Schemas in Abb. 5-9 (De Jong,

Heerma et al. 1979) konnte die Art der Verknüpfung in den untersuchten Vergleichssubstanzen (siehe Punkt 4.3.2.3) zugeordnet werden. Dagegen waren die Ionenverhältnisse, die zur Aussage über die Stereoisomerie führen sollten, nicht charakteristisch genug.

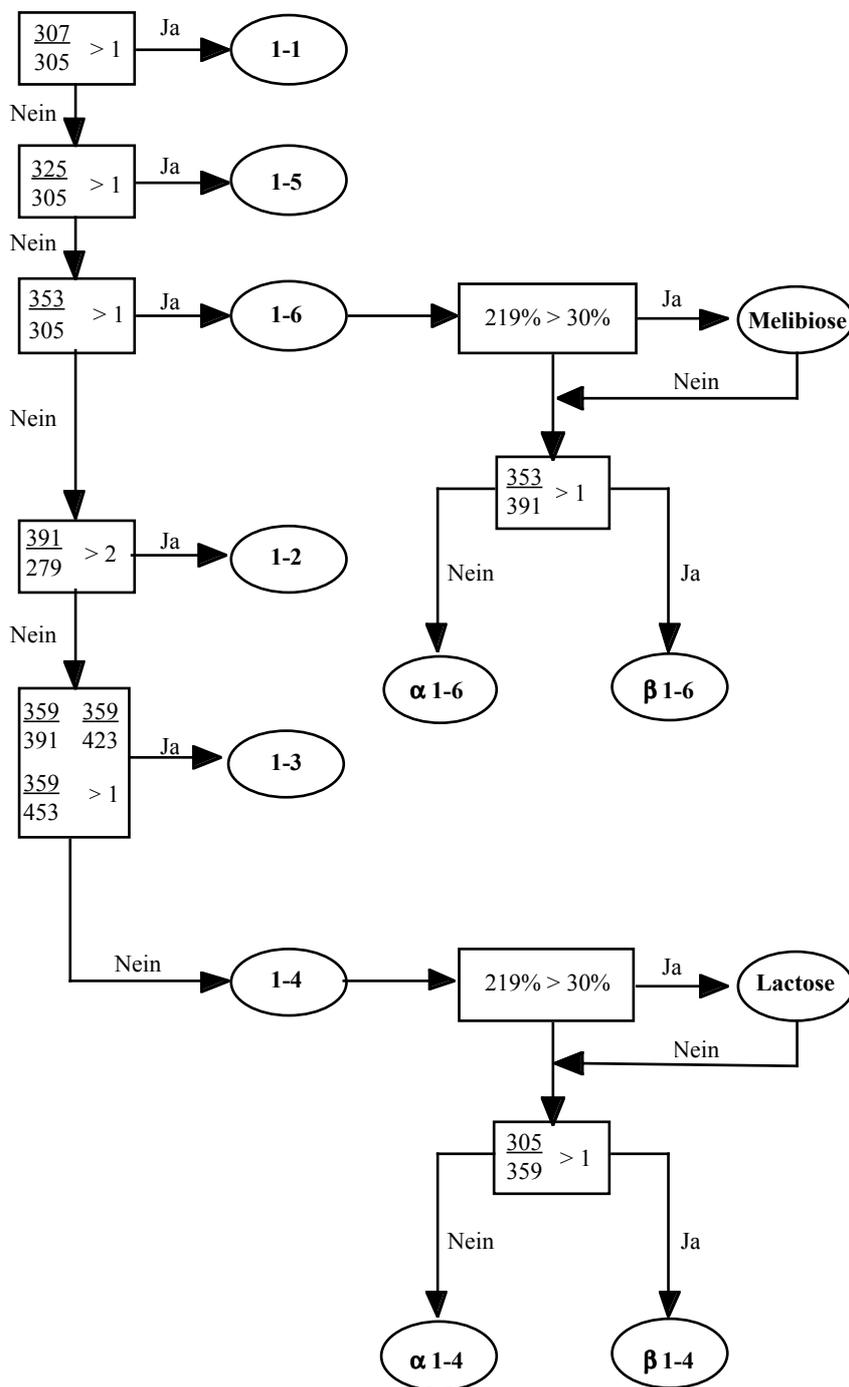


Abb. 5-9: Schema zur Unterscheidung permethylierter Disaccharide aus $\text{CH}_4\text{-Cl}$ Spektren nach De Jong, Heerma et al. 1979

Die $\text{CH}_4\text{-CI}$ -Spektren permethylierter Disaccharide zeigten einen Basepeak bei m/z 187 und Fragmentationen im höheren Massenbereich mit 1 - 4 %, relativ zum Basepeak. Die Ionen m/z 423/421, 391/389 und 359 werden durch hintereinander folgende Methanol-Abspaltungen vom Molekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 455) und $[\text{M}-\text{H}]^+$ (m/z 453) gebildet. Weitere charakteristische Ionen wie m/z 279 werden vom reduzierenden Ring, m/z 187 und m/z 155 hauptsächlich vom nicht reduzierenden Ring und m/z 101 von beiden Ringen gebildet (De Jong, Heerma et al. 1979). Das Fragmentation m/z 219 wird von allen Disacchariden einesteils durch Spaltung der glycosidischen Bindung vom nicht reduzierenden Ring, aber hauptsächlich durch Abspaltung eines neutralen Moleküls, Methylformat, vom Fragmentation m/z 279 gebildet (siehe Abb. 5-10).

Es ist bekannt, dass die Intensität von m/z 279 auf 60 - 80 %, relativ zum Basepeak, steigt, wenn das Disaccharid Galactose enthält (De Jong, Heerma et al. 1979). In den untersuchten permethylierten Derivaten der Melibiose, Lactose, 6-O- β - und 4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactose betrug die Intensität von m/z 219 30 - 60 %, relativ zum Basepeak, dagegen < 20 % in allen anderen permethylierten Glucobiosen.

Die Spektren der im Ionenchromatogramm m/z 187 dargestellten Peaks 3-7 der untersuchten Probe (siehe Punkt 5.1.7.5.2 und Abb. 5-8) enthielten alle das Fragment m/z 219 mit einer Intensität zwischen 40 - 80 %, relativ zum Basepeak, die Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Disaccharide zulässt.

Aufgrund zu geringer Konzentration oder Überlagerungen mehrerer Substanzen waren die Spektren der untersuchten Probe (siehe Punkt 5.1.7.5.2) im höheren Massenbereich (> 300 amu) unübersichtlich. Auffällig war jedoch das Fragment m/z 353 bei den Peaks 3-7 von der untersuchten Probe (siehe Abb. 5-8). Dieses Ion wird von allen Disacchariden gebildet. Durch gezielte Deuterierungen wurde jedoch bereits nachgewiesen, dass 1,6-verknüpfte Disaccharide das Ion m/z 353 zu 80 % durch Abspaltung von 101 amu vom reduzierenden Ring bilden, welches wesentlich stabiler ist als die Bildung dieses Ions vom nicht reduzierenden Ring (siehe Abb. 5-10) (De Jong, Heerma et al. 1979). Da alle anderen Disaccharide m/z 353 hauptsächlich vom nicht reduzierenden Ring bilden, das schnell zu m/z 279 und m/z 219 zerfällt (De Jong, Heerma et al. 1979), ist das Ion m/z 353 charakteristisch für 1,6-verknüpfte Disaccharide. Dies konnte praktisch durch Vergleichssubstanzen bestätigt werden. Demzufolge wurden die Hauptpeaks der Probe 3-7 (siehe Abb. 5-8) den 1,6-verknüpften Disacchariden, die Galactose als Monomer enthalten, zugeordnet, wobei Überlagerungen mit anderen Komponenten nicht ausgeschlossen werden konnten.

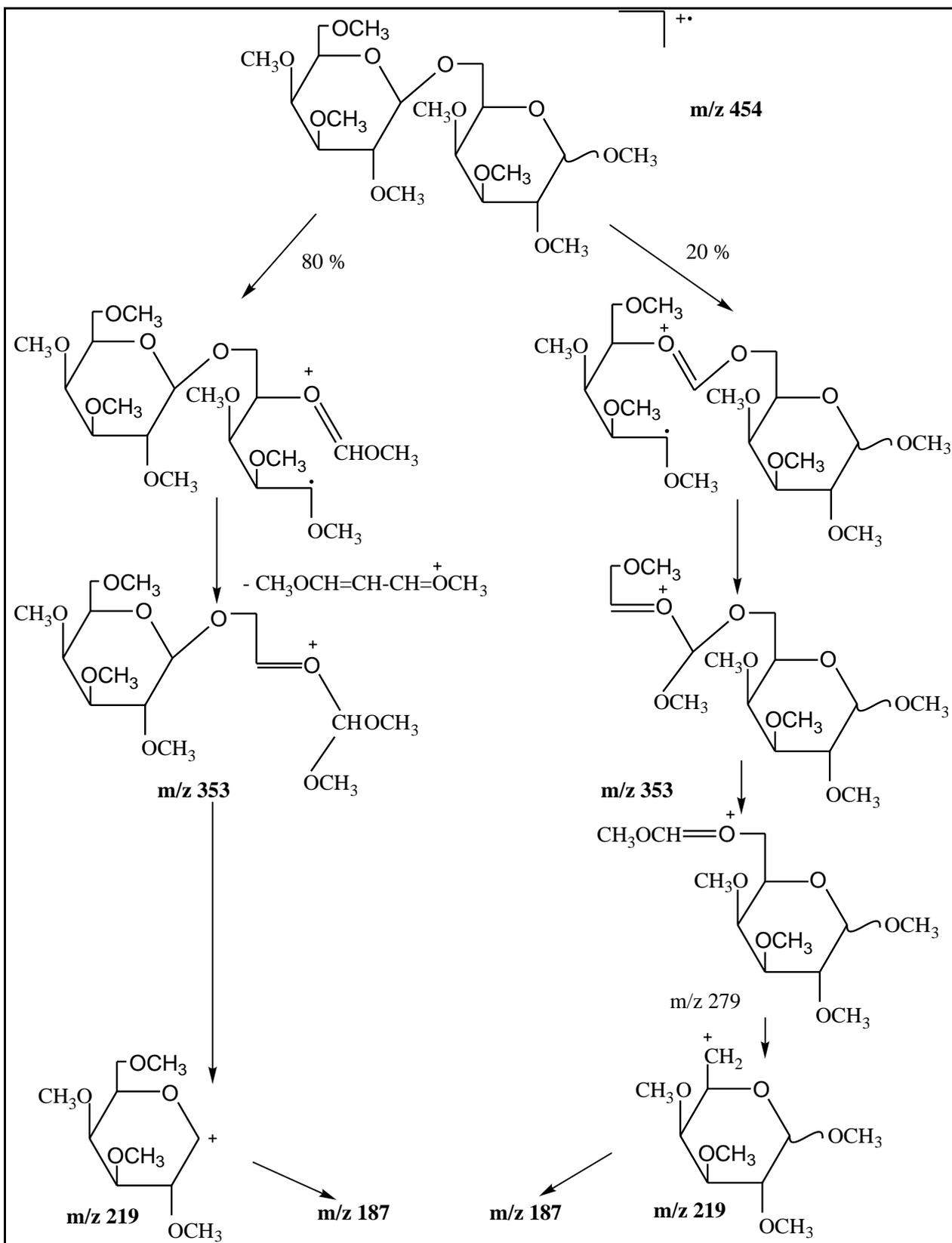


Abb. 5-10: Fragmentierungsschema 1,6-verknüpfter Disaccharide bei chemischer Ionisation mit Methan

5.1.7.5.4 Auswertung von gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten der permethylierten, reduktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen

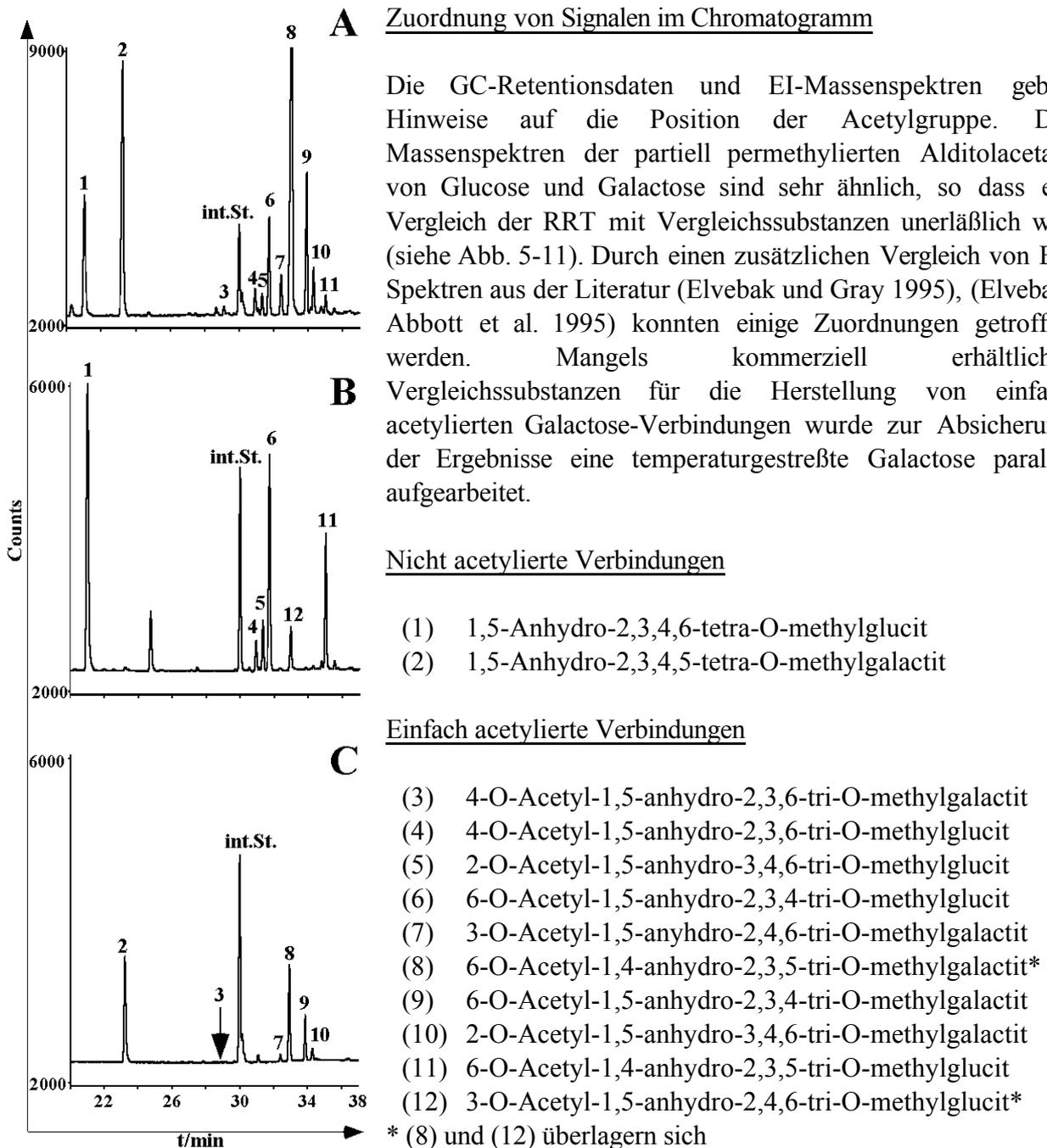


Abb. 5-11: GC-Chromatogramme partiell permethylierter Alditolacetate - **A**: Mula 2/C-Bande 2 (siehe Punkt 5.1.7.5.1); **B**: temperaturgestreßte Glucose; **C**: temperaturgestreßte Galactose, jeweils 160°C, 3 h)

In Bande 2 der Mutterlauge/C wurden lediglich Disaccharide mittels MALDI-TOF-MS-Analyse nachgewiesen. Demzufolge resultieren die nicht acetylierten Verbindungen 1 und 2 in Abb. 5-11

(MG = 220) aus dem jeweiligen Monomer, das am nicht reduzierenden Ende eines Saccharides gebunden ist. Alle anderen identifizierten acetylierten Anhydroalditole (MG = 248) entstehen aus dem jeweiligen Monomer des reduzierenden Ringes eines Disaccharides.

5.1.7.5.5 NH₃-CI-Spektren von permethylierten, reaktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen

Das mittels chemischer Ionisation bestimmte Molekulargewicht der entstandenen Anhydroalditol-derivate gab bereits einen Hinweis auf den Acetylierungsgrad, und damit auf die Zahl der Verknüpfungen eines Saccharid-Monomeren.

Durch chemische Ionisierung mit Ammoniak (NH₃-CI) entstehen bei den untersuchten Kohlenhydrat-Derivaten vorrangig die Quasimolekülonen [M+H]⁺ und [M+NH₄]⁺.

Das Auftreten der Molekülonen M+1 und M+18 (m/z 221 und 238 für nicht acetylierte Verbindungen; m/z 249 und 266 für einfach acetylierte Verbindungen) in den CI-Spektren von Peak 1 bis 11 der Probe in Abb. 5-11 läßt auf eine ähnliche Protonenaffinität der Probenmoleküle wie die des Reaktandgases Ammoniak schließen.

Zusätzlich wurde bei Peak 7 in Abb. 5-11, belegt durch das Auftreten der M+1 und M+18 Quasimolekülonen neben einer einfach acetylierten Verbindung das Molekulargewicht einer anderen Verbindung von 165 amu bestimmt. Das CI-Spektrum von Peak 9 in Abb. 5-11 zeigt neben den Quasimolekülonen einer einfach acetylierten Verbindung das Ion m/z 189 in hoher Intensität. Letzteres kann nicht genau interpretiert werden, da das zweite Quasimolekülion fehlt, was auf einen Unterschied der Protonenaffinität des Probenmoleküls und des Reaktandgases zurückzuführen ist. Es könnte sich daher um eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von 188 oder 206 handeln. Peak 9 und 7 in Abb. 5-11 sind somit keine reinen einfach acetylierten Verbindungen.

5.1.7.5.6 EI-Spektren von permethylierten, reaktiv gespaltenen und acetylierten Verunreinigungen

Grundlegende Mechanismen zur Fragmentierung von methylierten und acetylierten Monosaccharid-Derivaten wurden bereits untersucht Kochetkov et al. (1963), (Heyns, Grützmaier et al. 1966), (Radford und De Jongh 1972), (Björndal, Hellerqvist et al. 1970).

Eine ausführliche Interpretation der EI-Spektren von methylierten und acetylierten Anhydroalditol-Derivaten erfolgte durch (Stumm 1993). Die Aufstellung dieser postulierten Zerfallsabfolgen wurde von einem Fragmentierungsschema eines permethylierten Monosaccharid-Derivates abgeleitet. Die Bildungswege der wichtigsten Ionen werden danach im nachfolgenden erläutert.

Als Basepeak von partiell methylierten Alditolacetaten wurde in der Literatur m/z 43 ([CH₃CO]⁺) beschrieben (Stumm 1993). Abweichend davon zeigten die in der Literatur präsentierten EI-Spektren (Elvebak und Gray 1995), (Elvebak, Abbott et al. 1995) und die zahlreichen aufgenommenen Spektren von Vergleichssubstanzen nicht immer das Ion m/z 43 als Basepeak.

Diskussion zu Peak 1 und 2 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

Ein Unterschied der beiden Spektren war nicht erkennbar. Anhand der ermittelten relativen Retentionszeiten von 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactit (0,775) und -D-glucit (0,701) von Vergleichssubstanzen ließen sich die beiden Peaks den Verbindungen zuordnen. Der Basepeak bei methylierten Anhydroalditol-Derivaten war m/z 101. Der wichtigste Bildungsweg dieses Ions $[\text{CH}_3\text{-O-CH=CH-CH=O-CH}_3]^+$ beginnt mit der α -Spaltung der C1 und C2-Bindung und nachfolgendem Bruch der C4-C5-Bindung. Sekundärreaktionen wie die Abspaltung von Formaldehyd bzw. Umlagerung und anschließender Abspaltung führen zu den intensiven Ionen m/z 71 und m/z 45. Durch sukzessive Substituentenabspaltung können die Ionen m/z 175, m/z 143 und m/z 111 unter Erhalt der Ringstruktur entstehen. Diese werden jedoch auch bei den in C6-Position acetylierten permethylierten Anhydroalditolen beobachtet.

Diskussion zu Peak 3 und 4 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

Ein Unterschied der beiden Spektren war qualitativ nicht erkennbar. Mit Hilfe der ermittelten relativen Retentionszeiten von 4-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-galactit (0,971) und -glucit (1,031) von Vergleichssubstanzen ließen sich die beiden Peaks den Verbindungen zuordnen. Wie die in C2- und C3-Position acetylierten Derivate kann primär durch den Bruch der C5-C6-Bindung das Ion m/z 203 und sekundär durch Eliminierung von Methanol und anschließend Essigsäure oder durch Eliminierung von Essigsäure und anschließend Methanol die Ionen m/z 171, m/z 143 und m/z 111 gebildet werden. Analog der Bildung von m/z 101 bei den methylierten Anhydroalditol-Derivaten zeigt das EI-Spektrum das Ion m/z 129, aus dem bevorzugt ein Keten ($\text{H}_2\text{C=C=O}$) abgespalten wird, was zu m/z 87 führt.

Diskussion zu Peak 5 und 10 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

Durch die parallel aufgearbeitete Sophorose konnte 2-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-glucit der RRT von 1,044 zugeordnet werden. Die Identifizierung der dementsprechenden Verbindung der Galactose (RRT=1,143) erfolgte mit Hilfe des EI-Spektrums aus der Literatur. Die Abgrenzung zu anderen einfach acetylierten Verbindungen ist durch das Auftreten des Ions m/z 102 gegeben. Das charakteristische Ion kann durch den Bruch der C3-C4-Bindung erklärt werden. Im Gegensatz zu den in C4-Position acetylierten Verbindungen ist die Abspaltung von Essigsäure vom Ion m/z 203 nach Bruch der C5-C6-Bindung günstiger als eine Methanol-Eliminierung in C3- oder C4-Position. Weiterhin zeigt das EI-Spektrum das Ion m/z 71 in relativ hoher Intensität, das durch Formaldehydabspaltung aus m/z 101 gebildet wird.

Diskussion zu Peak 7 und 12 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

In der temperaturgestreßten Glucose konnte 3-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-glucit (RRT=1,099) durch die parallel aufgearbeitete Nigerose nachgewiesen werden. Für die Identifizierung der entsprechenden Verbindung von Galactose war keine Vergleichssubstanz kommerziell erhältlich. Die EI-Spektren von Peak VII (RRT=1,081) und XII unterschieden sich qualitativ nicht. Charakteristische Ionen die in C3-Position acetylierten Verbindungen sind m/z

71, 74, 75, 101, 143, 171, 203, deren Bildungswege bereits beschrieben wurden. Die Abgrenzung zu den in C6-Position acetylierten Verbindungen erfolgt durch das Fehlen von m/z 175 und m/z 130. Das charakteristische Ion m/z 102 für die in C2-Position acetylierten Verbindungen tritt ebenfalls nicht auf. Im Gegensatz zu den in C4-Position acetylierten Verbindungen erscheint das Ion m/z 101 in hoher Intensität.

Diskussion zu Peak 6 und 9 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

Mit Hilfe der ermittelten relativen Retentionszeiten von 6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,6-tri-O-methyl-glucit (1,058) bzw. von -galactit (1,130) von Vergleichssubstanzen ließen sich die beiden Peaks diesen Verbindungen zuordnen. Die EI-Spektren der in C6-Position acetylierten Verbindungen können durch das charakteristische Ion m/z 130 leicht von anderen einfach acetylierten Verbindungen unterschieden werden, das analog zum Fragmentation m/z 102 durch den Bruch der C3-C4-Bindung gebildet wird. Daneben treten durch Eliminierung von Essigsäure die Ionen m/z 188 und m/z 156 auf. Wie bei den nicht acetylierten Verbindungen können durch Spaltung der Bindung zwischen C5 und C6 und nachfolgenden Methanolabspaltungen die Ionen m/z 175, m/z 143 und m/z 111 gebildet werden.

Diskussion zu Peak 8 und 11 (siehe Pkt. 5.1.7.5.4)

Die EI-Spektren der einfach acetylierten Verbindungen zeigten neben dem Basepeak m/z 117 das Ion m/z 131. Unter der Voraussetzung der Acetylfunktion in C6-Position können diese seltenen Ionen durch Spaltung der C4-C5-Bindung einer furanoiden Struktur von Glucose oder Galactose gebildet werden. Theoretisch wäre auch die Acetylfunktion in C5-Position denkbar. Jedoch fehlte im dargestellten EI-Spektrum von 5-O-Acetyl-1,4-anhydro-2,3,6-O-tri-O-methylglucit das Ion m/z 117 gänzlich (Langenhove und Reinhold 1985). Peak 8 wurde sowohl bei der parallel aufgearbeiteten 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactopyranose als auch in der temperaturgestreßten Galactose beobachtet. Somit könnte es sich auch um ein Artefakt der 1,6-verknüpften Verbindungen handeln.

Nach Ermittlung der Retentionszeiten könnte sich Peak 8 mit 3-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,4,6-tri-O-methylglucit überlagern. Im EI-Spektrum von Peak 8 fehlen jedoch die charakteristischen Ionen für die in C3-Position acetylierten Verbindungen m/z 203, 171, 143 und die Intensität von m/z 101 ist geringer. Demzufolge konnte 3-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,4,6-tri-O-methylglucit in der aufgearbeiteten Probe ausgeschlossen werden.

5.1.7.5.7 Interpretation der Ergebnisse

Abschätzung des Verhältnisses von Galactose und Glucose

Die Anteile der gebildeten, unterschiedlich acetylierten Glucose- und Galactose-Derivate von Verunreinigungen der Mutterlauge 2/C (siehe Punkt 5.1.7.5.1), die als Disaccharide identifiziert wurden (siehe Punkt 5.1.7.3), wurden durch Auswertung mehrerer Derivatisierungsansätze abgeschätzt. Dazu wurden die Peakflächen der FID-Signale von den einfach acetylierten Derivaten, Peak 4-6, 11 und 7-10 in Abb. 5-11, nach der Methode des effektiven

Kohlenstoffresponses (effective carbon response (ECR) korrigiert (Sweet, Shapiro et al. 1975) und anschließend mit den Peakflächen der entsprechenden nicht acetylierten Derivate, Peak 1 und 2 in Abb. 5-11, als jeweilige Summe zusammengefaßt. Bei der Korrektur wird der höhere FID-Response der acetylierten Methylhexite gegenüber den permethylierten Hexiten (Responsefaktor = 1,00) berücksichtigt. Die ECR-Korrekturfaktoren betragen für einfach acetylierte Verbindungen 1,10 (Rolf und Gray 1986). Bei der parallel aufgearbeiteten 6-O- β -Galactopyranosyl-D-galactose wurden jedoch gravierend abweichende Responsefaktoren von 3,6 für das gebildete 6-O-Acetyl-1,4-anhydro-2,3,5-tri-O-methylgalactit (Peak 8 in Abb. 5-11) und 2,2 für 6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3,4-tri-O-methylgalactit (Peak 9 in Abb. 5-11) ermittelt, die bei der Berechnung berücksichtigt wurden. Danach betrug das Verhältnis der vom nicht und vom reduzierenden Ende gebildeten Glucose und Galactose jeweils 1:2. Dieses stimmte mit dem Ergebnis der Säurehydrolyse überein (siehe Punkt 5.1.7.4).

Häufigkeit der Bindungspositionen identifizierter Monomere

Um festzustellen, ob innerhalb der vorliegenden Disaccharide bestimmte glycosidische Bindungen bevorzugt gebildet wurden, wurden die Peakflächenverhältnisse im GC-Chromatogramm der einfach acetylierten Derivate gesondert betrachtet. Da eine furanoide Struktur der in 6 Position acetylierten Verbindung in der parallel aufgearbeiteten 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose beobachtet wurde und diese möglicherweise ein Artefakt war, wurden die identifizierten Furanosen und Pyranosen der jeweiligen Verbindungen zusammenfassend betrachtet. Da das Peakflächenverhältnis von der Summe der gebildeten nicht acetylierten und acetylierten Anhydroalditol-Derivate 1,1 : 1 betrug, wurde davon ausgegangen, dass 1,1-verknüpfte Disaccharide nur in vernachlässigbar geringen Mengen vorliegen konnten.

Danach dominierten 1,6-verknüpfte Disaccharide mit einem Anteil von 70 % im Vergleich zu den 1,2- (14 %), 1,3- (9 %) und 1,4-verknüpften Disacchariden (7 %). Die Auftrittshäufigkeiten der Bindungspositionen differenzierter acetylierter O-Methylether konnte durch folgende Reihenfolge angegeben werden:

6 Gal (Pyranose + Furanose; 47 %) > 6 Glu (Pyranose + Furanose; 23 %) > 2 Gal (Pyranose; 9 %) > 3 Gal (Pyranose; 9 %) > 4 Glu (Pyranose; 6 %) > 2 Glu (Pyranose; 5 %) > 4 Gal (Pyranose; 1 %)

Mit Ausnahme der in 4 Position acetylierten O-Methylether überwogen die jeweiligen acetylierten Verbindungen der Galactose gegenüber den der Glucose.

Strukturvorschläge der Verunreinigungen

Um festzustellen, welche Monomere glycosidisch miteinander gebunden waren, wurden die Peakflächenverhältnisse der nicht acetylierten Anhydroalditol-Derivate (18 % Glucose-Derivate und 35 % Galactose-Derivate) und die jeweiligen Summen der acetylierten Derivate von der Galactose (31 %) und Glucose (16 %) betrachtet. Folgende Konstellationen waren möglich: Gal-Gal-, Glu-Glu-, Gal-Glu-, Glu-Gal-Saccharide, wobei Glucobiosen nach Untersuchung der permethylierten Derivate ausgeschlossen wurden (siehe Punkt 5.1.7.5.3). Unter zusätzlicher

Vernachlässigung möglicher 1-1-verknüpfter Glucobiosen könnte 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylglucit theoretisch nur noch mit den identifizierten acetylierten Verbindungen der Galactose verknüpft sein (Glu-Gal). Danach entspricht der prozentuale Flächenanteil der 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylglucit von 18 % der Auftrittshäufigkeit der Glu-Gal-Saccharide. Es verbleiben somit 13 % einfach acetylierte Galactose-Derivate, die wiederum ausschließlich mit 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactit verknüpft sein könnten (Gal-Gal). Danach verbleibt ein restlicher Anteil von 22 % 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactit. Die einfach acetylierten Glucose-Derivate mit einem Anteil von 16 % könnten lediglich mit 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactit verknüpft sein, welcher der Auftrittshäufigkeit von Gal-Glu-Sacchariden entspricht. Der restlicher Anteil von 6 % 1,5-Anhydro-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactit könnte möglicherweise mit der Auftrittshäufigkeit von 1-1-verknüpften Galactobiosen korrelieren.

Die Verhältnisse möglicherweise auftretender Disaccharide in der isolierten dünn-schichtchromatographischen Bande 2 der Mutterlauge 2/C könnten wie folgt angegeben werden:

1 (1-1 Gal-Gal) : 4,3 (Gal-Gal) : 5,3 (Gal-Glu) : 6,0 (Glu-Gal)

Eine Aufspaltung der Bindungspositionen war somit nur innerhalb der Gruppe der Gal-Glu-Saccharide möglich. Im Folgenden werden alle theoretisch möglichen gebildeten Disaccharide dargestellt, wobei die hervorgehobenen Verbindungen bei der Lactose-Säurehydrolyse gebildet wurden (siehe Punkt 3.2). Zur Vereinfachung wurden die anomeren Formen nicht dargestellt.

1-1 Gal-Gal (6 %)	—————	α-1,1 und β-1,1
Gal-Gal (26 %)	—————	α-1,6 und β-1,6
	—————	α -1,4 und β-1,4
	—————	α -1,3 und β-1,3
	—————	α -1,2 und β-1,2
	—————	
Gal-Glu (32 %)	—————	α-1,6* und β-1,6 (22 %)
	—————	α -1,4 und β-1,4 (5 %)
	—————	α-1,2 und β-1,2 (5 %)
Glu-Gal (36 %)	—————	α-1,6 und β-1,6
	—————	α -1,4 und β-1,4
	—————	α -1,3 und β-1,3
	—————	α -1,2 und β-1,2

Abb. 5-12: Übersicht über alle theoretisch möglichen Disaccharide in Mula 2/C, basierend auf den Ergebnissen der Strukturanalyse (fettgedruckte Verbindungen wurden im Lactose-Säurehydrolysat nachgewiesen siehe Pkt. 3.2)

* wurde bei der Permethylierungsanalyse ausgeschlossen

5.2 Organische Säuren

Ausgehend von den theoretischen Überlegungen in den vorangegangenen Abschnitten 2 und 3 wurden in den Produkten der Galactose-Herstellungen organische Säuren als Verunreinigungen vermutet. Aliphatische Carbonsäuren können aus dem Kohlenhydrat-Abbau und aus Nebenreaktionen bei der Galactose-Herstellung hervorgehen. Eine weitere potentielle Quelle für die Bildung von organischen Säuren ist die alkoholische Gärung von Glucose mit Hilfe von Hefestämmen (siehe Punkt 2.4). Da Glucose auch veratmet werden kann und es bereits einige Hinweise auf organische Säuren, möglicherweise aus dem Tricarbonsäure-Zyklus, gab (siehe Punkt 5.1.5.2), wurden die Intermediate daraus zusätzlich bei der analytischen Methodenentwicklung einbezogen. Es handelt sich somit innerhalb dieser Substanzgruppe, der aliphatischen organischen Säuren, um Verbindungen mit sehr ähnlichen Strukturen wie kurzkettige Fettsäuren, Hydroxy-, α -Keto-, Di-, Tricarbon- und Zuckersäuren. Daher steht für die Trennung dieser Vielzahl von für die Untersuchung relevanten aliphatischen Carbonsäuren kein einheitliches Analysenverfahren zur Verfügung.

Im folgenden Abschnitt 5.2 wurden die Ergebnisse der Analytik von organischen Säuren näher beschrieben. Zunächst wurde die Ionenausschlußchromatographie (HPICE) mit Leitfähigkeitsdetektion und Suppression angewendet, die einen ersten Überblick über das Vorkommen von organischen Säuren als Verunreinigungen liefern sollte. Im speziellen wurde die Ion Pac AS1 (Fa. Dionex) hinsichtlich ihrer Selektivität relevanter aliphatischer Carbonsäuren überprüft, die bevorzugt für die Trennung von Monocarbonsäuren eingesetzt wird (siehe Punkt 5.2.2.1). Die Nachteile waren zahlreiche Überlagerungen von Vergleichssubstanzen (siehe Anhang I). Dennoch konnten durch Zudotierung einzelner Carbonsäuren zu den Proben einige Verbindungen als Verunreinigung ausgeschlossen werden. In den Zwischenprodukten der Hersteller A, B und C wurden folgende Carbonsäuren mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen bestimmt: 2-Ketoglutar-, Brenztrauben-, Zitronen- bzw. Isozitronen-, Glyoxyl-, L-(-)-Äpfel-, trans- bzw. cis-Aconit-, Glycerin-, Bernstein-, Levulin-, Essig- und Fumarsäure. In allen Endprodukten mit Ausnahme der Galactose/D konnten keine organischen Säuren mehr nachgewiesen werden, was einesteils mit der Empfindlichkeit des Verfahrens und anderenteils durch störende Matrixeinflüsse begründet werden konnte (siehe Punkt 5.2.2.2 und Anhang I). Die HPICE wurde vorrangig unter dem qualitativen Aspekt eingesetzt. Die quantitativen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen anderer analytischer Verfahren unter Punkt 5.2.9 verglichen und diskutiert.

Durch ein gaschromatographisches Verfahren wurden einige der bereits mittels HPICE identifizierten Carbonsäuren wie Brenztrauben-, Levulin-, Fumar-, Bernstein-, 2-Ketoglutar-, L-(-)-Äpfel-, trans- und cis-Aconit-, Zitronen- und Isozitronensäure qualitativ abgesichert (siehe Punkt 5.2.3). Nach Derivatisierung mit Bortrifluorid-Methanol und folgender Acetylierung wurden die Signale der Proben im Chromatogramm anhand ihres Retentionsverhaltens und entsprechend bekannter Substanzen identifiziert. Die Kopplung mit einem Massenspektrometer führte über die chemische Ionisation zur Molgewichtsbestimmung. Die aufgenommenen EI-Spektren der Proben wurden mit denen von Vergleichssubstanzen bzw. Literaturspektren verglichen und unter Punkt 5.2.3.4 diskutiert.

Aufgrund der hohen Verluste bei der Probenaufarbeitung war die Methode für den empfindlichen Nachweis von Carbonsäuren im Spurenbereich vor allem in den Endprodukten der Galactose-Herstellungen nicht geeignet. Deshalb wurde auf eine quantitative Bestimmung verzichtet.

Basierend auf den Ergebnissen der HPICE und der GC/MS wurde nun in weiteren Schritten das Ziel verfolgt, die bereits identifizierten organischen Säuren mit Hilfe anderer analytischer Verfahren vor allem in quantitativer Hinsicht zu bestimmen. Da sich mit konventionellen Anionenaustauschern eine Vielzahl von aliphatischen Carbonsäuren trennen lassen, deren Retentionsverhalten dem der anorganischen Anionen sehr ähnlich ist, wurden zwei chromatographische Trennverfahren hinsichtlich ihrer Selektivität überprüft. Nach Optimierung der chromatographischen Parameter eigneten sich diese Ionenaustauschverfahren mit Leitfähigkeitsdetektion vor allem zur Trennung von aliphatischen Di- und Tricarbonensäuren, die an Ionenausschlußphasen nur unzureichend getrennt werden. An den in Reihe geschalteten chromatographischen Säulen Ion Pac AS4A-SC und Ion Pac AS4 (Fa. Dionex) konnten mit einem $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Eluenten Schleim-, Oxal- und 2-Ketoglutarsäure neben relevanten anorganischen Anionen (siehe Punkt 5.2.4.1) und an der Ion Pac AS11 konnten mit einem NaOH-Gradienten Zitronen-, Isozitronen-, trans- und cis-Aconitsäure neben Phosphat (siehe Punkt 5.2.5.1) selektiv voneinander getrennt und anschließend in den vorliegenden Proben identifiziert und quantifiziert werden. Durch die verbesserte Selektivität und teilweise höhere Empfindlichkeit (siehe Anhang I) konnten Verunreinigungen auch noch in einigen Endprodukten nachgewiesen werden.

Zur Absicherung quantitativer Ergebnisse wurde die enzymatische Bestimmungsmethode für Zitronen-, L-Äpfel-, L-Milch-, Bernstein- und Brenztraubensäure herangezogen. Besonders die Bestimmung von Bernsteinsäure und Brenztraubensäure bereiteten bei den bislang eingesetzten chromatographischen Methoden durch Überlagerungen anderer Carbonsäuren Schwierigkeiten. Desweiteren sind derartige Enzymreaktionen substratspezifisch und die Probenvorbereitungen kaum zeitaufwendig (siehe Punkt 5.2.6).

Innerhalb der Substanzgruppe der organischen Säuren wurden die α -Ketosäuren gesondert untersucht, da in einigen Proben 2-Ketoglutarsäure und Brenztraubensäure in relativ hohen Mengen vorkamen. Durch ein weiteres Verfahren wurde die Absicherung der bis dahin vorliegenden Ergebnisse angestrebt. Als selektives Derivatisierungsreagenz für α -Ketosäuren wurde 1,2-Diamino-4,5-methyldioxybenzol (DMB) eingesetzt (siehe Punkt 5.2.7.1). Die gebildeten Quinoxalinon-Derivate wurden mittels RP-HPLC chromatographisch getrennt und fluoreszenzdetektiert. Die Bestimmung von 2-Ketoglutar-, Brenztrauben- und Glyoxylsäure erfolgte mit diesem hochempfindlichen Verfahren, jedoch nur in den jeweiligen Kristallisationsüberständen (siehe Punkt 5.2.7.2). Die Festphasenextraktion konnte für die Kristallisate und Galactosen nicht als Probenaufarbeitungsmethode integriert werden.

Durch Veränderungen von Parametern in der Ionenaustauschchromatographie zur Bestimmung von Kohlenhydratverunreinigungen wurden die Proben auf Zuckersäuren untersucht (siehe Punkt 5.2.8). Die quantitativen Ergebnisse wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie überprüft. Die Ergebnisse aller Methoden wurden unter Punkt 5.2.9 zusammenfassend diskutiert.

5.2.1 Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

Bei einem Vergleich der Mutterlaugen der Hersteller A und C wurden sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Verteilung von aliphatischen Carbonsäuren als Verunreinigungen festgestellt.

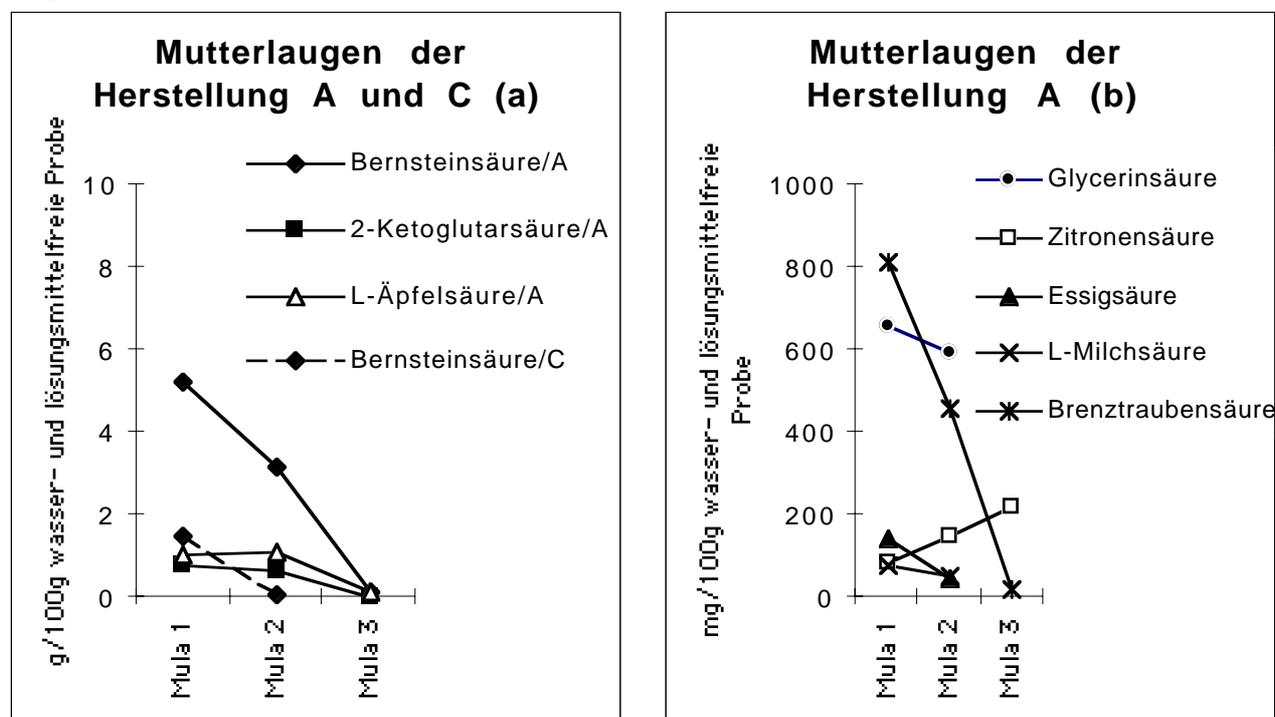


Abb. 5-13: Aliphatische Carbonsäuren in a) den Mutterlaugen der Herstellung A und C, b) der Mutterlauge der Herstellung C

Im Gegensatz zur Mutterlauge 1/C wurden in der Mutterlauge 1/A Fumarsäure (69,6 mg/100g), sowie trans-Aconitsäure (4,9 mg/100g) und cis-Aconitsäure (2,2 mg/100g) (siehe Abb. 5-13 c) nachgewiesen. Dagegen wurde in der Mutterlauge 1/C Levulinsäure mit einem Gehalt von 98,8 mg/100g bestimmt. Der Oxalsäure-Gehalt in der Mutterlauge 1/A lag bereits unterhalb der Bestimmungsgrenze von 5,7 mg/100g. Folgende, in den Abb. 5-13 nicht dargestellte Carbonsäuren wurden in der Mutterlauge 1/C identifiziert und quantitativ bestimmt: 2-Ketoglutarinsäure (84,0 mg/100g), Glycerinsäure (74,8 mg/100g), Essigsäure (123,3 mg/100g), Zitronensäure (15,1 mg/100g) und Isozitronensäure (1,6 mg/100g). Durch effektive Aufreinigungsschritte waren diese im folgenden Kristallisationsüberstand nicht mehr nachweisbar. Im 1. und 2. Kristallisat der Herstellung C wurde zwar Brenztraubensäure enzymatisch nachgewiesen (siehe Abb. 5-14 d), die Gehalte lagen jedoch außerhalb des Arbeitsbereiches (siehe Punkt 5.2.9).

Auffällig waren die hohen Gehalte von allen gemeinsam vorkommenden Carbonsäuren mit Ausnahme von Essig- und L-Milchsäure in der wasser- und lösungsmittelfreien Mutterlauge 1/A. Gegenüber der entsprechenden Mutterlauge 1/C lagen die Faktoren zwischen 3 und 59. Im Speziellen waren die Mengen von 2-Ketoglutar-, Isozitronen-, Brenztrauben- und L-Äpfelsäure

besonders hoch. In beiden Mutterlaugen 1 der Herstellung A und C war Bernsteinsäure diejenige Carbonsäure mit dem höchsten Gehalt.

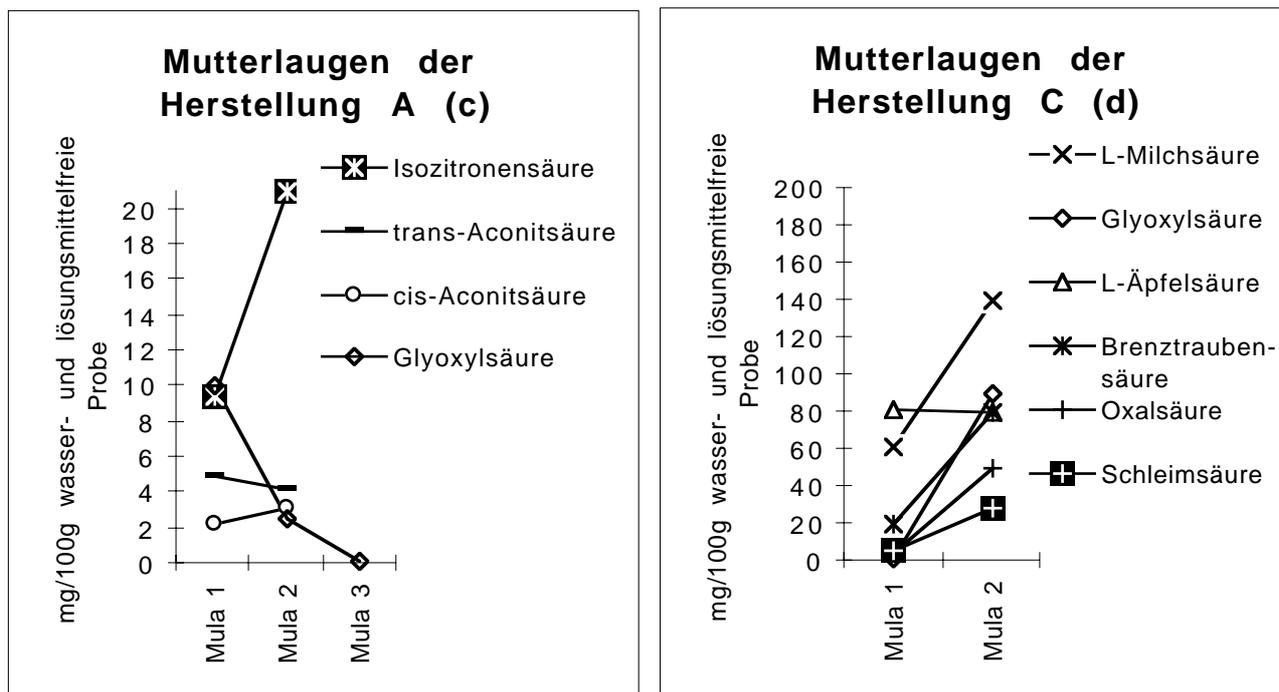


Abb. 5-13: Aliphatische Carbonsäuren in c) der Mutterlauge der Herstellung A und d) der Mutterlauge der Herstellung C

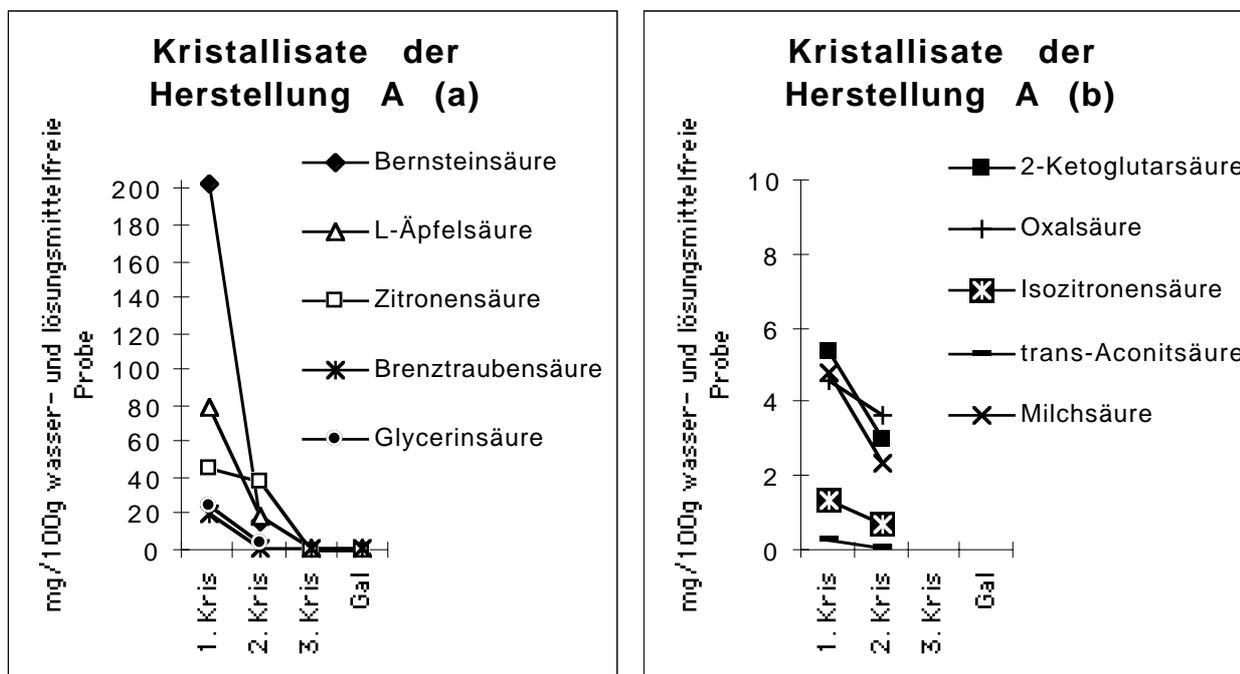


Abb.: 5-14: Carbonsäuren in den a) und b) Kristallisaten der Herstellung A

Bis auf Zitronen- und Isozitronensäure, die in den Mutterlaugen von A akkumuliert vorkamen, war bei allen anderen Carbonsäuren sowohl in den Kristallisationsüberständen als auch in den Kristallisaten eine Abreicherung zu beobachten (siehe Abb. 5-13 a-c und 5-14 a und b).

Cis-Aconit-, Fumar-, Essig- und Glyoxylsäure wurden nur in den Mutterlaugen der Herstellung A nachgewiesen, jedoch nicht in den jeweiligen Kristallisaten. Der Essigsäure-Gehalt lag im 1. Kristallisat/A unterhalb der Bestimmungsgrenze von 3,9 mg/100g. Die Aufreinigung der Rohgalactose bei der Herstellung A hatte zur Folge, dass die meisten Carbonsäuren im 3. Kristallisat und im Endprodukt mit den eingesetzten Analysemethoden nicht mehr nachzuweisen waren. Der L-Milchsäure-Gehalt lag bereits beim 2. Kristallisat/A unterhalb der Bestimmungsgrenze von 2,4 mg/100g. Die enzymatisch bestimmten Brenztraubensäure-Gehalte im 3. Kristallisat/A und in der Galactose/A lagen außerhalb des Arbeitsbereiches (siehe Punkt 5.2.9).

Im Gegensatz zur Herstellung A wurden die identifizierten aliphatischen Carbonsäuren bei der Herstellung C in den Mutterlaugen überwiegend angereichert (siehe Abb. 5-13 a und d). In den jeweiligen Kristallisationsüberständen war lediglich Brenztraubensäure als Verunreinigung aus dieser Substanzklasse nachweisbar (siehe Abb. 5-15 b).

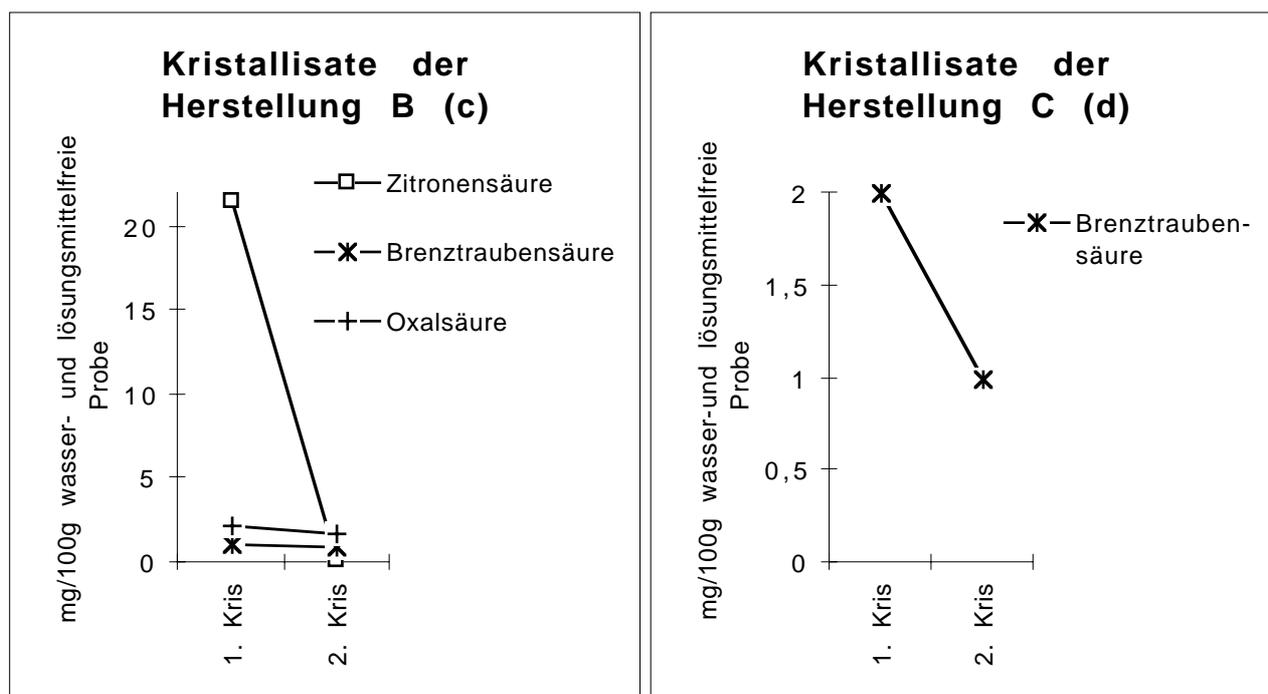


Abb. 5-15: Carbonsäuren in den Kristallisaten der a) Herstellung B, b) Herstellung C

Bei allen Carbonsäuren, die in den Zwischenprodukten der Herstellung B bestimmt wurden, war eine Abreicherung der Verunreinigungen zu beobachten (siehe Abb. 5-15 a). Folgende organische Säuren wurden lediglich im 1. Kristallisat der Herstellung B identifiziert und quantifiziert: Isozitronensäure (0,58 mg/100g), trans-Aconitsäure (0,10 mg/100g), cis-Aconitsäure (0,08 mg/100g), L-Äpfelsäure (3,0 mg/100g), Bernsteinsäure (22,3 mg/100g), L-Milchsäure (8,5 mg/100g), 2-Ketoglutarinsäure (< Bestimmungsgrenze von 3,5 mg/100g). Die enzymatisch

bestimmten Brenztraubensäure-Gehalte lagen im 1. und 2. Kristallisat/B außerhalb des Arbeitsbereiches (siehe Punkt 5.2.9).

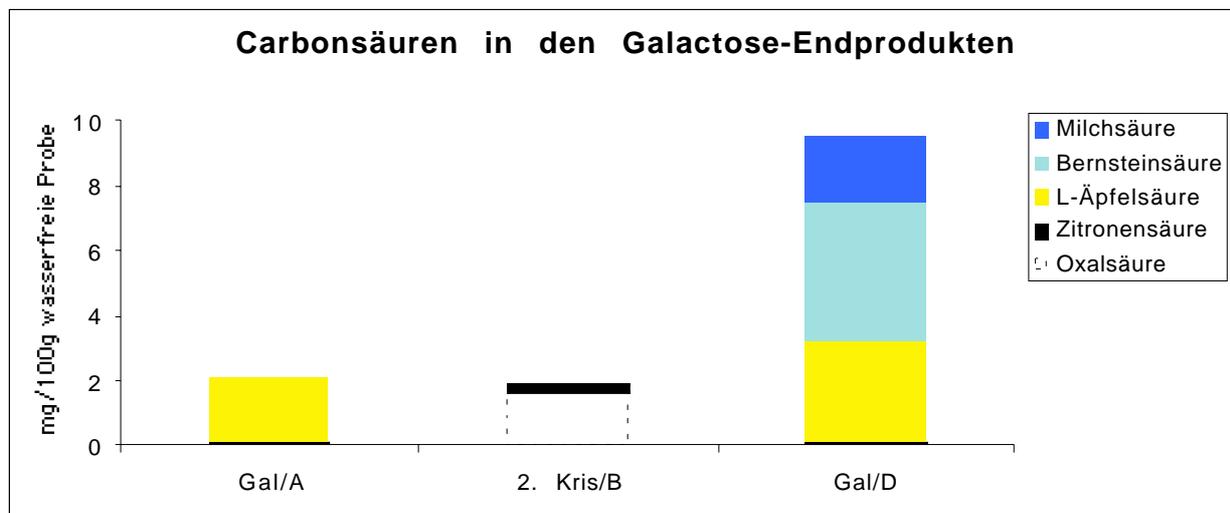


Abb. 5-16: Carbonsäuren in den Galactose-Endprodukten

In den Endprodukten der Galactose-Herstellung A, B und D wurden Carbonsäuren als Verunreinigungen nachgewiesen (siehe Abb. 5-16 und Punkt 5.2.9). Zwischen den verschiedenen Herstellungen zeigten sich qualitative Unterschiede. Während in allen Endprodukten der Herstellung A, B und D Zitronensäure (A = 0,18 mg/100g; B = 0,23 mg/100g; D < Bestimmungsgrenze von 0,15 mg/100g) identifiziert wurde, wurden zusätzlich in der Galactose/A L-Äpfelsäure (1,9 mg/100g), im 2. Kristallisat/B Oxalsäure (1,7 mg/100g) und in der Galactose/D L-Äpfelsäure (3,0 mg/100g), Bernsteinsäure (4,3 mg/100g) und L-Milchsäure (2,1 mg/100g) bestimmt. In vorliegenden Endprodukten der verschiedenen Galactose-Hersteller (Gal/A, 2. Kris/B und C, Gal D,E und F) wurde enzymatisch Brenztraubensäure nachgewiesen, wobei der Gehalt außerhalb des Arbeitsbereiches lag und mit kleiner 1,0 mg/100g angegeben wurde.

5.2.2 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte mit Hilfe eines Ionenausschlußverfahrens (HPICE)

5.2.2.1 Charakterisierung des Analysenverfahrens

Als stationäre Phase der eingesetzten Ion Pac AS1 (Fa. Dionex) dient ein total sulfonierter Kationenaustauscher hoher Kapazität auf der Basis von Polystyrol/Divinylbenzol.

Der an dieser Phase ablaufende Trennmechanismus wird durch den Donnan-Ausschluß, sterischen Ausschluß und Adsorption bestimmt. Der Donnan-Ausschluß basiert auf der Bildung einer Hydrathülle um die Sulfonsäuregruppen, die durch eine negativ geladene Schicht analog der Donnan-Membran begrenzt wird. Da diese Schicht nur für undissoziierte Verbindungen durchlässig ist, werden total dissoziierte Säuren von der stationären Phase ausgeschlossen. Die Ion Pac AS1 (Fa. Dionex) wird bevorzugt für die Trennung von aliphatischen Monocarbonsäuren eingesetzt. Hierbei wird der Trennmechanismus durch Donnan-Ausschluß und Adsorption

bestimmt. Bei Di- und Tricarbonsäuren ist der dominierende Trennmechanismus neben dem Donnan-Ausschluß vor allem der sterische Ausschluß. Das Eindringen von Molekülen in das Innere der stationären Phase wird durch ihre Größe und vom Vernetzungsgrad des Harzes (8 %, ausgedrückt durch den prozentualen Anteil an Divinylbenzol) limitiert (Weiß 1991).

Eine Optimierung der Trennung ist durch Änderung des pH-Wertes möglich, da dieser den Dissoziationsgrad und somit die Retentionszeit der Analyten beeinflusst. Eine höhere Auflösung wird somit mit zunehmender Säurekonzentration beobachtet. Zur Erzielung guter Trennergebnisse wurde ein Elutionsgemisch, bestehend aus je 2 mmol Octan- und Pentansulfonsäure, eingesetzt. Für die Leitfähigkeitsdetektion wurde die Grundleitfähigkeit des als Eluens fungierenden Säuregemisches mit Hilfe eines Mikromembransuppressors auf chemischem Weg verringert, der nach dem Prinzip der kontinuierlichen Regenerierung arbeitet. Im regenerierten Zustand liegt die Suppressormembran dabei in der Tetrabutylammonium-Form vor. Während der Suppressorreaktion werden die Wasserstoff-Ionen des Säuregemisches der mobilen Phase durch Tetrabutylammonium-Ionen ausgetauscht. Das dabei gebildete Salz besitzt eine erheblich geringere Leitfähigkeit als die entsprechende Säureform. Die Wasserstoff-Ionen reagieren hingegen in einer Neutralisation mit Hydroxid-Ionen zum Suppressorprodukt Wasser, das mit dem überschüssigen Tetrabutylammoniumhydroxid im Ablauf des Regeneriermittels verbleibt (Weiß 1991).

Die Ion Pac AS1, Fa. Dionex, wurde hinsichtlich ihrer Selektivität mit Hilfe von Vergleichssubstanzen überprüft. Danach unterliegt das Retentionsverhalten von schwachen organischen Säuren einigen Regeln (siehe Anhang I):

So wurde sowohl innerhalb der homologen Reihe von Monocarbonsäuren als auch von Dicarbonsäuren eine Zunahme der Retentionszeit mit wachsender Alkylkettenlänge der Säuren beobachtet: Ameisensäure < Essigsäure < Propionsäure bzw. Oxalsäure < Bernsteinsäure. Daneben korrelierte die Elutionsreihenfolge einer homologen Reihe auch mit abnehmender Säurestärke und Wasserlöslichkeit.

Generell eluieren zweibasige Säuren vor den entsprechenden einbasigen Säuren, da sie im polaren Eluens besser löslich sind: Oxalsäure < Essigsäure oder 2-Ketoglutarinsäure < Levulinsäure oder Schleimsäure < Galacton- bzw. Galacturonsäure.

Aus dem gleichen Grund hatten Hydroxycarbonsäuren kürzere Retentionszeiten als ihre entsprechenden Carbonsäuren, unabhängig davon ob es sich um Mono- oder Dicarbonsäuren handelte: L-(-)-Äpfelsäure < Bernsteinsäure oder Glycolsäure < Essigsäure oder Milchsäure < Propionsäure.

Bei Einbeziehung von Säuren mit höheren Oxidationsstufen konnte bei kurzkettigen und bei höherkettigen Säuren eine entgegengesetzte Abhängigkeit der Retentionszeit von der Oxidationsstufe beobachtet werden: Dicarbonsäure < Aldehydcarbonsäure < Hydroxycarbonsäure < Monocarbonsäure (z. B. Oxalsäure < Glyoxylsäure < Glycolsäure < Essigsäure) bzw. α -Ketocarbonsäure < α -Hydroxycarbonsäure < Monocarbonsäure (z. B. Brenztraubensäure < Milchsäure < Propionsäure).

Durch π - π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Ringen des Polymers eluierte Fumarsäure mit seiner Doppelbindung im Kohlenwasserstoff-Gerüst erst nach der Bernsteinsäure (siehe Anhang I).

5.2.2.2 Ergebnisse

Die Beurteilung der Chromatogramme von Standardlösungsgemischen der vielen Vergleichssubstanzen ergab eine selektive Bestimmung von L-(-)-Äpfelsäure, Glykolsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Fumarsäure, Levulinsäure und Propionsäure (siehe Anhang I). Unterschiedliche Konzentrationen von einzelnen Analyten in den Proben bzw. störende Matrixeffekte verursachten dabei eine veränderte Selektivität. Die qualitative Bestimmung einzelner Carbonsäuren in den Proben erfolgte deshalb durch Zudotierung der jeweiligen Vergleichssubstanzen.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen typische HPICE-Chromatogramme der Ion Pac AS 1 von Zwischenprodukten und Endprodukten der Galactose-Herstellungen. Nachfolgend wurden die qualitativen Ergebnisse erläutert. Bei den Proben, deren Chromatogramm nicht dargestellt wurde, wurde eine äquivalente Peakbezeichnung in der Diskussion der quantitativen Ergebnisse unter 5.2.9 verwendet. Zur quantitativen Bestimmung der organischen Säuren wurden Kalibrierfaktoren ermittelt (siehe Anhang I). Daneben wurde die Produktcharakterisierung der verschiedenen Verfahrensschritte einzelner Galactose-Herstellungen bereits unter Punkt 5.2.1 behandelt.

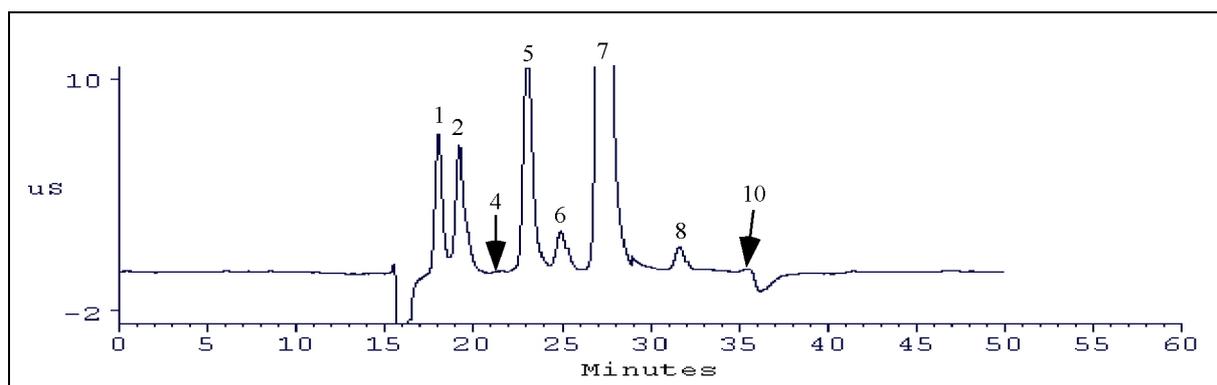


Abb. 5-17: HPICE-Chromatogramm der Mutterlauge 1/A (1 ml/ 20 ml); chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.4.2

Die Zudotierung von Vergleichssubstanzen zur Mula 1/A ergab: **Peak 1:** 2-Ketoglutar-, Glucon-, Lactobionsäure; **Peak 2:** Brenztrauben-, Schleimsäure, angetrennt wurden Zitronen-, Glucon- und Galactonsäure; **Peak 4:** Glyoxylsäure; **Peak 5:** L-Äpfelsäure; **Peak 6:** Glycerinsäure; **Peak 7:** Bernstein-, Milch-, Glykolsäure; **Peak 8:** Essigsäure; **Peak 10:** Fumarsäure

Der Nachweis von Oxalsäure wurde durch den negativen Injektionspeak gestört. In diesem Bereich zeigten auch anorganische Anionen Signale. Geringe Mengen von Ethanol in der Probe verursachten einen weiteren negativen Peak bei ca. 36.5 min. Zitronensäure und ihre Iso-Form sowie trans- und cis-Aconitsäure hatten die gleiche Retentionszeit (siehe Anhang I).

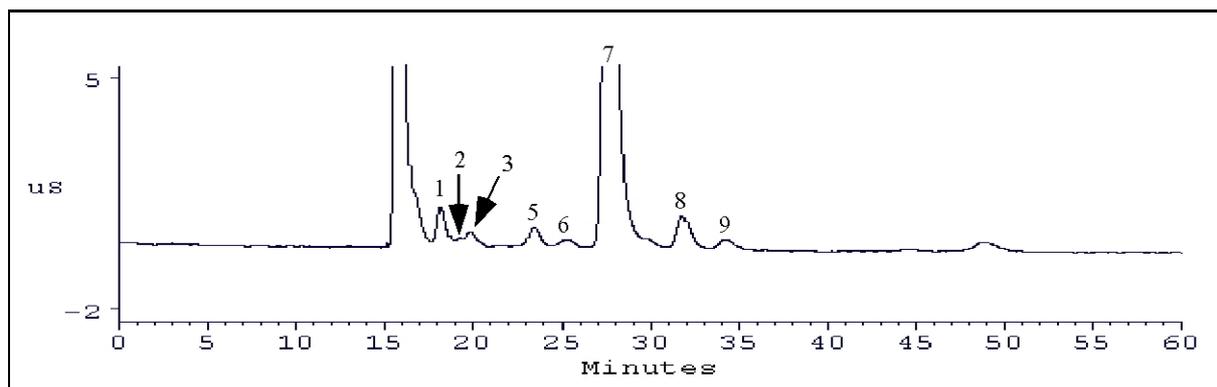


Abb. 5-18: HPICE-Chromatogramm der Mutterlauge 1/C (1 ml/ 100 ml), chromatographisches System siehe Abb. 5-17

Die Zudotierung von Vergleichssubstanzen zur Mula 1/C ergab: **Peak 1**: Lactobionsäure, 2-Ketoglutaräure; **Peak 2**: Brenztraubensäure, Schleimsäure; **Peak 3**: Zitronensäure, Galactonsäure, angetrennt Gluconsäure, **Peak 5**: L-Äpfelsäure, **Peak 6**: Glycerinsäure; **Peak 7**: Bernsteinsäure, Glycolsäure, angetrennt Ameisensäure; **Peak 8**: Essigsäure; **Peak 9**: Levulinsäure. Die zudotierte trans- bzw. cis-Aconitsäure eluierte zwischen L-Äpfelsäure und Glycerinsäure.

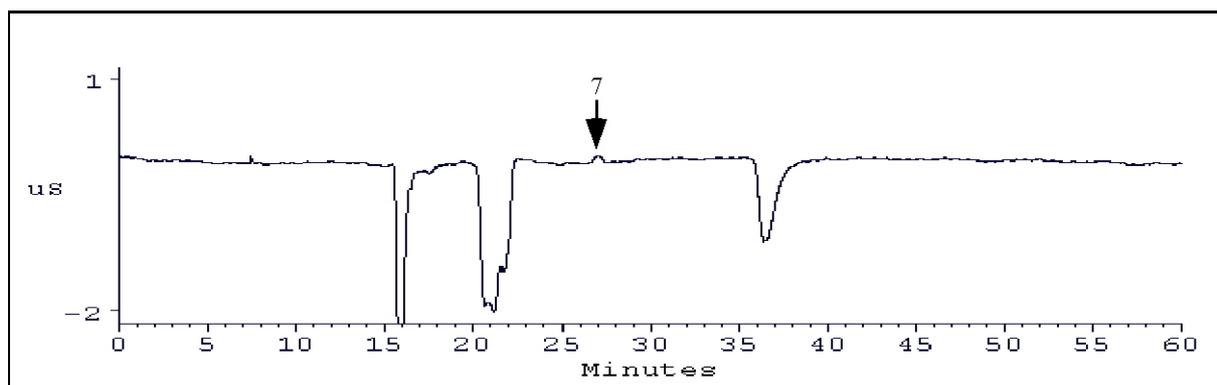


Abb. 5-19: HPICE-Chromatogramm des 3. Kristallisates/A (1,0220 g/ 10 ml), chromatographisches System siehe Abb. 5-18

Abb. 5-19 zeigt ein typisches Chromatogramm der Ion Pac AS 1 einer 10 %ige Galactose-Lösung in Wasser mit Spuren von **Peak 7** (siehe Abb. 5-17). Durch das Auftreten von negativen Peaks (Injektionspeak (15.5 -16.5 min), Galactose (20,3 -22,3 min), Ethanol (35.9 -37.7 min)) war ein Nachweis von Oxal-, Zitronen-, Glyoxyl-, L-Äpfel-, Glucon-, Fumar- und Propionsäure in den Endprodukten der Galactose-Hersteller mit dieser Methode nicht möglich.

5.2.3 GC/FID und GC/MS-Untersuchungen

5.2.3.1 Derivatisierung

Um den Response von Hydroxycarbonsäuren in der Gaschromatographie zu verbessern, wurde eine zweistufige Derivatisierung durchgeführt (siehe Punkt 4.3.3.1). Für die Derivatisierung mit Bortrifluorid-Methanol wurden die Mutterlaugen zunächst im Trockenrohr unter Vakuum

getrocknet. Die festen Proben dagegen wurden direkt zur Derivatisierung eingesetzt. Während der zweiten Stufe der Derivatisierung wurde die Hydroxyl-Gruppe der gewonnenen Methylesterderivate von Hydroxycarbonsäuren in Anlehnung an die Methode zur Acetylierung von permethylierten Anhydroalditol-Derivaten acetyliert (Jun und Gray 1987).

Auf eine aufwendige saure Fraktionierung, die zunächst eine Ether-Extraktion im alkalischen und anschließend im sauren Milieu einschließt, wurde verzichtet. Gründe dafür waren die ineffektive Abtrennung von nicht sauren, niedermolekularen Substanzen wie Kohlenhydrate, die nach Zusatz von Salzsäure schnell zu HMF abgebaut wurden, was sich in der vermehrten Bildung von Levulinsäure, dem Abbauprodukt von HMF, bemerkbar machte. Zudem wurden keinen qualitativen Unterschiede in den Chromatogrammen der derivatisierten Proben mit bzw. ohne Extraktion festgestellt.

5.2.3.2 CH₄-CI-Spektren von methylierten und anschließend acetylierten organischen Säuren

Durch chemische Ionisation mit Methan (CH₄-CI) wurden bei den untersuchten Carbonsäuren vorrangig die Quasimolekülonen [M+H]⁺ und [M+C₂H₅]⁺ beobachtet (siehe Punkt 4.2.3.4.1). Aus beiden CI-Spektren der 2-Ketoglutarat-Signale wurde das Molekulargewicht von 174 abgeleitet.

5.2.3.3 EI-Spektren von methylierten und anschließend acetylierten organischen Säuren

Vorbemerkungen zur Interpretation der aufgenommenen Massenspektren:

Wenn kein anderer Hinweis erfolgt, sind alle nachfolgenden Zerfallsabfolgen, die aus den erhaltenen EI-Spektren abgeleitet wurden, Postulate, die sich aus der Interpretation der Spektren und bekannten Fragmentierungsschemata ergaben.

Bernsteinsäure-dimethylester

EI: 55 (48); 59 (10); 87 (74); 114 (22); **115 (100)** (vgl. auch (Wilkins, Lu et al. 1995))

Da das Molekül (m/z 146) symmetrisch ist, führt die bekannte α -Spaltung an beiden Carbonylgruppen zu identischen Fragmenten (McLafferty und Turecek 1995). Dabei entstehen der Basepeak m/z 115 (= M-31)⁺ und die charakteristischen m/z 59⁺-Ionen (siehe Abb. 5-20). Das intensive Ion m/z 87 kann ferner durch die konsekutive Abspaltung von Kohlenmonoxid aus m/z 115 gebildet werden (McLafferty und Turecek 1995) und unter Abspaltung von Methanol zu m/z 55 zerfallen. Der zweistufige Zerfall zu m/z 87 kann auch in einer einstufigen Reaktion zum gleichen Produkt erfolgen, da bei der Carbonylgruppe die Anziehung eines Elektronenpaares zum Ladungsort zu einer kanonischen Resonanzstruktur führt, deren Ladungsverteilung eine induktive Spaltung ermöglicht (McLafferty und Turecek 1995). Das Ion m/z 114 entspricht dem Verlust von Methanol aus dem Molekülion, dem vermutlich der Transfer eines H-Atoms aus der zentralen Ethyleneinheit auf die Methoxygruppe vorausgeht. Durch nachfolgende α -Spaltung und Kohlenmonoxid-Eliminierung an der verbleibenden Carbonylgruppe bzw. induktive Abspaltung des Alkylradikals (-COOCH₃) kann auch hier das Fragmention m/z 55 entstehen. Wie in

Abb. 5-13 dargestellt, könnte somit das Fragment m/z 55 durch verschiedene isomere Strukturen beschrieben werden.

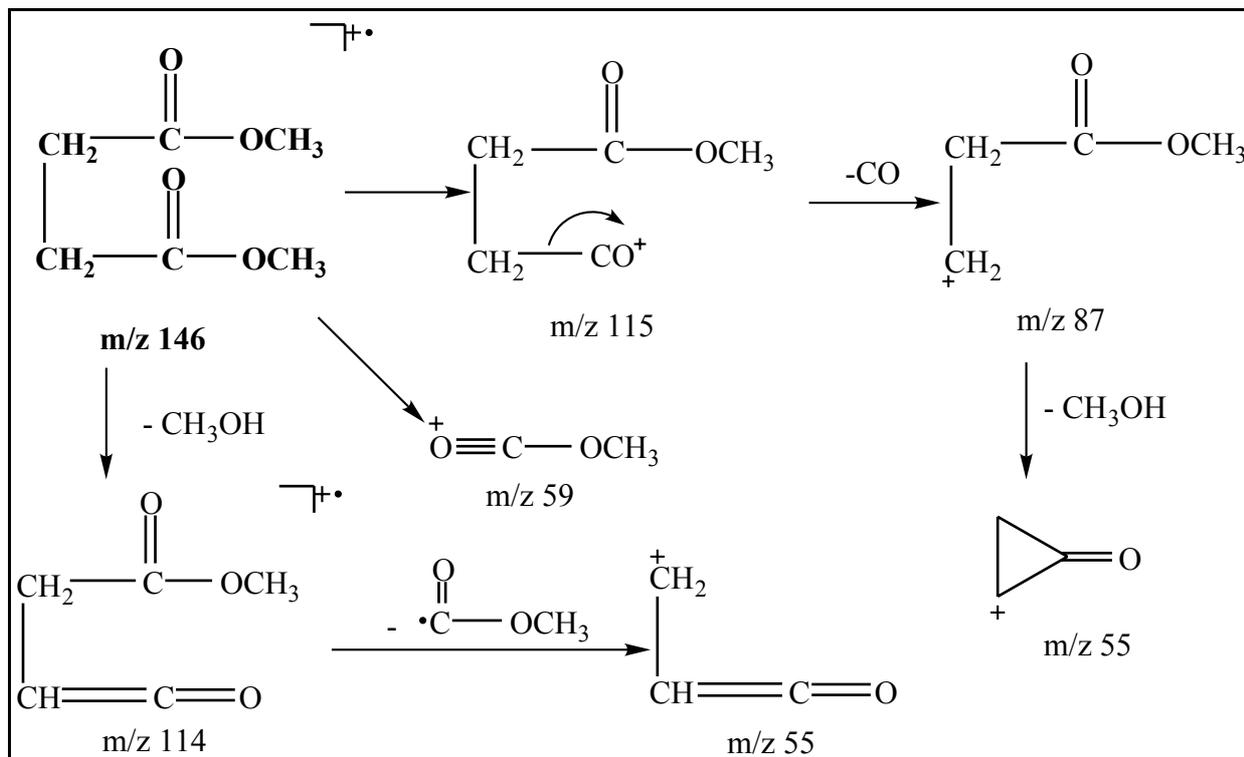


Abb. 5-20: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für Bernsteinsäure-dimethylester

Fumarsäure-dimethylester

EI: 53 (17); 59 (3); **85 (100)**; 113 (50)

Da sich Fumarsäure hinsichtlich ihrer Struktur von Bernsteinsäure lediglich durch eine Doppelbindung zwischen den beiden Kohlenstoffatomen im Grundgerüst unterscheidet, sind die Zerfallsreaktionen sehr ähnlich. Die α -Spaltung an der Carbonylgruppe von Fumarsäure-dimethylester (m/z 144) und nachfolgende Abspaltung von Kohlenmonoxid führt schrittweise über m/z 113 zu dem intensiven m/z 85-Ion, welches auch durch induktive Spaltung an der Carbonylgruppe entstehen kann (McLafferty und Turecek 1995). Wie bereits beim Methylesterderivat der Bernsteinsäure vorgeschlagen, kann auch hier durch folgende Abspaltung von Methanol m/z 85 zu m/z 53 zerfallen. Im Gegensatz zum Bernsteinsäure-dimethylester ist jedoch die direkte Abspaltung von Methanol im Fumarsäure-dimethylester weniger prominent, da der Transfer eines vinylischen H-Atoms thermodynamisch ungünstiger ist. Somit kann hier nicht analog dem vorgeschlagenen Zerfallsweg bei Bernsteinsäure-dimethylester das Fragment m/z 53 durch direkte Abspaltung von Methanol aus dem Molekülion und anschließende α -Spaltung und Kohlenmonoxid-Eliminierung bzw. induktive Spaltung an der Carbonylgruppe entstehen.

γ -Levulinsäure-methylester

EI: **43 (100)**; 55 (48); 57 (18); 59 (10), 71 (42); 83 (5); 87 (46); 98 (66); 99 (36); **115 (100)**

Durch α -Spaltung an der Carbonylgruppe der Esterfunktion im MolekÜlion (m/z 130) entstehen m/z 59 und m/z 99, wobei das letztere Ion unter Abspaltung von Kohlenmonoxid zu m/z 71 zerfällt (siehe Abb. 5-21). Das Alkyl-Ion ($M-59$)⁺ wird aber auch durch induktive Spaltung an der Carbonylgruppe gebildet (McLafferty und Turecek 1995). Die Abspaltung von $\cdot\text{CH}_3$ von der γ -ständigen Carbonylfunktion führt zum intensiven m/z 115, das analog dem Bernsteinsäure-dimethylester durch folgende Abspaltung von Kohlenmonoxid und Methanol in m/z 87 und m/z 55 übergehen kann. Die zweite mögliche α -Spaltung an der γ -ständigen Carbonylfunktion führt zu dem ebenso intensiven Acetylion m/z 43 (McLafferty und Turecek 1995). Auch hier ist Abspaltung von Methanol aus dem MolekÜlion nach vorhergehendem H-Transfer unter Bildung von m/z 98 ausgeprägt. Durch anschließende α -Spaltung und nachfolgende Kohlenmonoxid-Eliminierung bzw. durch induktive Spaltung an der ursprünglich γ -ständigen Carbonylfunktion könnte das Alkyl-Ion m/z 55 entstehen. Desweiteren geht das Fragment-Ion m/z 57 aus der Spaltung der σ -Bindung zwischen den sekundären Kohlenstoffatomen hervor (McLafferty und Turecek 1995).

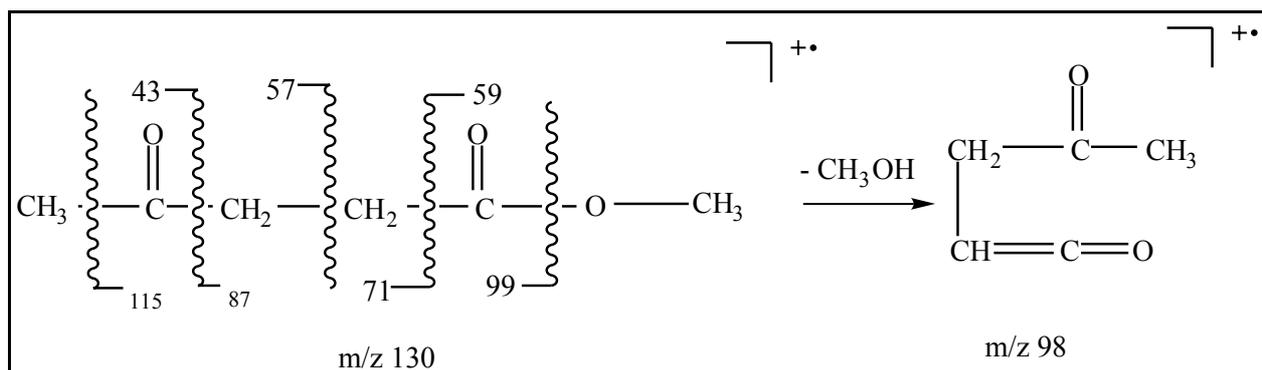


Abb. 5-21: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema γ -Levulinsäure-methylester

2-Ketoglutar säure-dimethylester

Peak 1 \Rightarrow EI: 55 (43); 59 (23); 87 (82); 103 (3); **115 (100)**

Die EI-Spektren von 2-Ketoglutar säure-methylester und Bernsteinsäure-dimethylester weisen eine große Ähnlichkeit auf. Ein kleiner Unterschied besteht jedoch darin, dass die bereits vorgeschlagene H-Wanderung mit folgender Methanol-Abspaltung aus dem MolekÜlion (m/z 174) hier nicht zu erkennen ist. Ein Grund dafür könnte der schnelle Bruch der Bindung zwischen den benachbarten Carbonylgruppen sein, die neben dem m/z 59-Ion zum Basepeak m/z 115 führt (siehe Abb. 5-22). Bei weiterer Abspaltung von Kohlenmonoxid und Methanol könnten dann, wie bei Bernsteinsäure-dimethylester diskutiert, die Ionen m/z 87 und m/z 55 entstehen. Ein weiterer Hinweis für diesen bevorzugten Zerfallsweg könnte das Fehlen von m/z 143 sein, das durch α -

Spaltung an der γ -ständigen Carbonylgruppe entstehen würde. Damit wäre die Bildung von m/z 115 aus der folgenden Kohlenmonoxid-Eliminierung bzw. aus der induktiven Spaltung an der γ -ständigen Carbonylgruppe eher unwahrscheinlich.

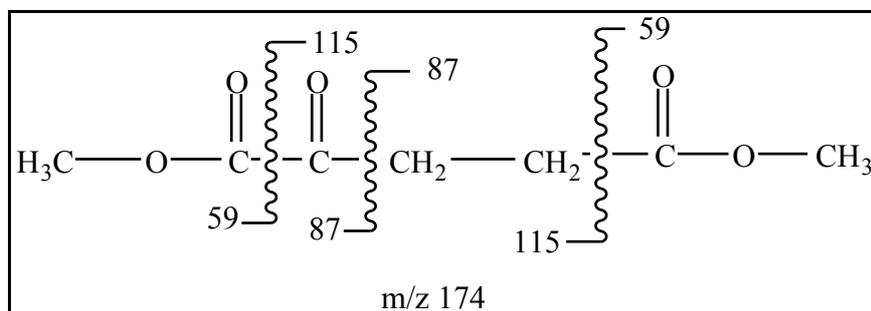


Abb. 5-22: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für 2-Ketoglutar säure-dimethylester

Peak 2 \Rightarrow 55 (30); 87 (3); **101 (100)**; 115 (3); 129 (63); 157 (20); 161 (98)

Abweichend von den diskutierten und vorgeschlagenen Zerfallswegen des ersten Peaks von 2-Ketoglutar säure-dimethylester kann die Bildung der Fragmentionen des zweiten Peaks zur Zeit nicht erklärt werden.

trans- bzw. cis- Aconitsäure-trimethylester

EI: 83 (3); 98 (6); 113 (8), 125 (26); 141 (13); 152 (64); **156 (100)**; 157 (16); 184 (29)

Aufgrund bekannter Fragmentierungsschemata wird für die Entstehung von m/z 157 folgender Mechanismus (Tajima et al., 1987 aus (McLafferty und Turecek 1995)), indem eine ursprünglich vinylische Bindung im Molekülion (m/z 216) gespalten wird, vorgeschlagen (siehe Abb. 5-23). Dabei wird nach intramolekularer Wasserstoffwanderung das Methylesterradikal unter Bildung des zyklischen Fragment-Ions m/z 157 abgespalten. Die nachfolgende Entstehung von m/z 113 gibt möglicherweise einen weiteren Hinweis auf eine derartige Lacton-Struktur, da Lactone typische Fragmente durch Abspaltung von Kohlendioxid aufweisen (McLafferty und Turecek 1995). Wird dagegen Methanol abgespalten, so wird das Fragment-Ion m/z 125 gebildet.

Die schrittweise Eliminierung von zwei Molekülen Methanol aus dem Molekülion könnte die Bildung der Fragmente m/z 184 und m/z 152 erklären. Das Fragment m/z 156, der Basepeak, könnte aus der Abspaltung von Essigsäure hervorgehen, die derzeit nicht erklärt werden kann, da das Derivat keine Acetylfunktion enthält.

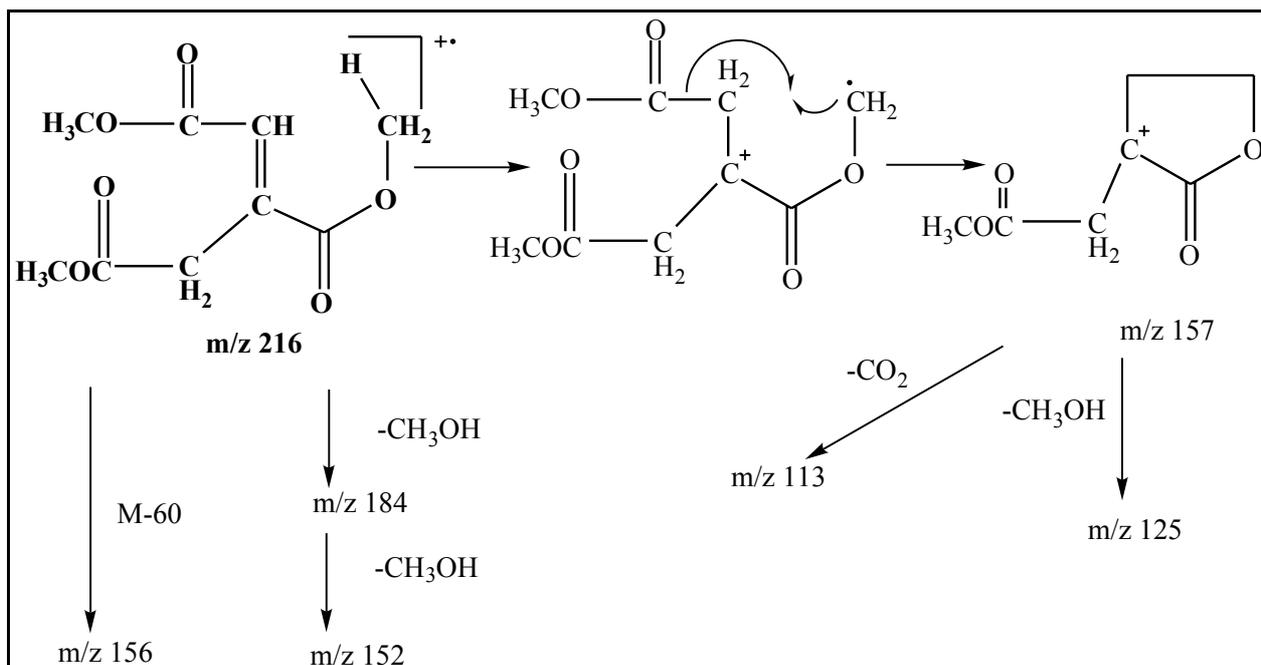


Abb. 5-23: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für trans- bzw. cis-Aconitsäure-trimethylester

2-O-Acetyl-äpfelsäure-dimethylester

EI: 43 (90); 61 (17); 71 (12); 85 (49); **103 (100)**; 113 (34); 130 (12); 145 (2); 162 (12); 173 (4)

Eine α -Spaltung an der Carbonylfunktion der Acetylgruppe im Molekülion m/z 204 führt zum intensiven m/z 43 (McLafferty und Turecek 1995) (siehe Abb. 5-24). Der Basepeak m/z 103 könnte durch sukzessive Abspaltung eines Ketens ($\text{O}=\text{C}=\text{CH}_2$) zu m/z 162 und eines Methylesterradikals aus dem Molekülion erklärt werden. Wird anstelle des Methylesterradikals das neutrale Molekül Methanol eliminiert, so entsteht das weniger intensive Fragment m/z 130. Die typischen Fragmentierungen an einer der beiden im Molekülion vorhandenen Carbonylgruppen der Esterfunktionen, die beispielsweise bei Bernsteinsäure-dimethylester ausführlich beschrieben wurden, führen zunächst zu m/z 145. Die sekundäre Abspaltung eines Ketens wäre eine weitere Möglichkeit für die Entstehung des Basepeaks. Die Essigsäure-Eliminierung oder die sukzessive Abspaltung von neutralen Molekülen wie Methanol und eines Ketens aus m/z 145 könnte dagegen die Bildung der Fragmentionen m/z 85, m/z 113 und m/z 71 erklären.

Nach Mc Lafferty wird zunächst in einem energetisch günstigen sechsgliedrigen Übergangszustand das γ -Wasserstoffatom zur Radikalstelle der ionisierten, ungesättigten funktionellen Gruppe transferiert. Anschließend folgt eine α -Spaltung in Bezug auf das neu ausgebildete Radikalzentrum, wobei im vorliegenden Fall Essigsäure abgespalten wird und das Fragment m/z 144 entsteht. Bei weiterer α -Spaltung und folgender Abspaltung von Kohlenmonoxid bzw. induktiver Spaltung an einer der beiden verbliebenen Carbonylgruppen der Esterfunktionen werden die Ionen m/z 113 und m/z 85 gebildet. Die Übertragung eines zweiten

Wasserstoffs führt dagegen zu einem resonanzstabilisierten Ion m/z 61 (McLafferty und Turecek 1995).

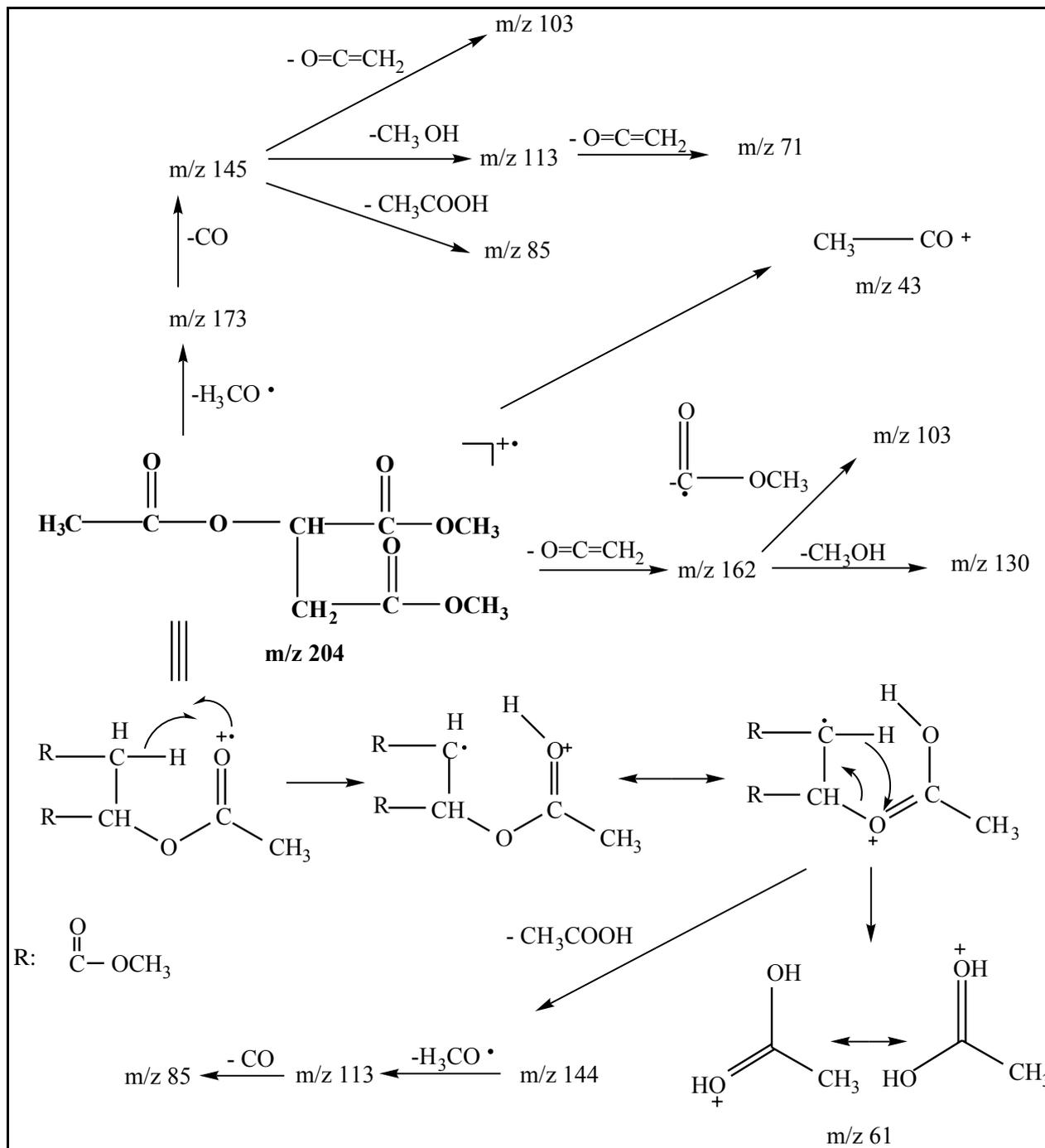


Abb. 5-24: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für 2-O-Acetyl-äpfelsäure-dimethylester

3-O-Acetyl-zitronensäure-trimethylester

EI: 43 (4); 69 (8); 84 (< 1); 101 (36); 125 (1); **143 (100)**; 185 (1); 203 (< 1)

Möglicherweise findet nach intramolekularem Wasserstofftransfer im Molekülion m/z 276 und nachfolgender Abspaltung von Methanol eine Zyklisierung des Moleküls statt (siehe Abb. 5-25), wobei jedoch das entstehende Fragment m/z 244 nicht im EI-Spektrum auftritt. Die weitere α -Spaltung an der Carbonylfunktion der Esterfunktion am C2-Atom würde aber die Bildung von m/z 185 erklären. Aus diesem Fragmentation kann einerseits Essigsäure abgespalten werden, was zu m/z 125 führen würde und andererseits wäre die Abspaltung von zwei Ketenen und einem Molekül Methanol denkbar, wobei die Ionen m/z 143, m/z 101 und m/z 69 gebildet werden. Bei einem Bruch der Bindung zwischen C2 und C3 bzw. zwischen C4 und C5 entsteht das Ion m/z 203, das durch Abspaltung von Essigsäure zum Basepeak m/z 143 fragmentieren könnte.

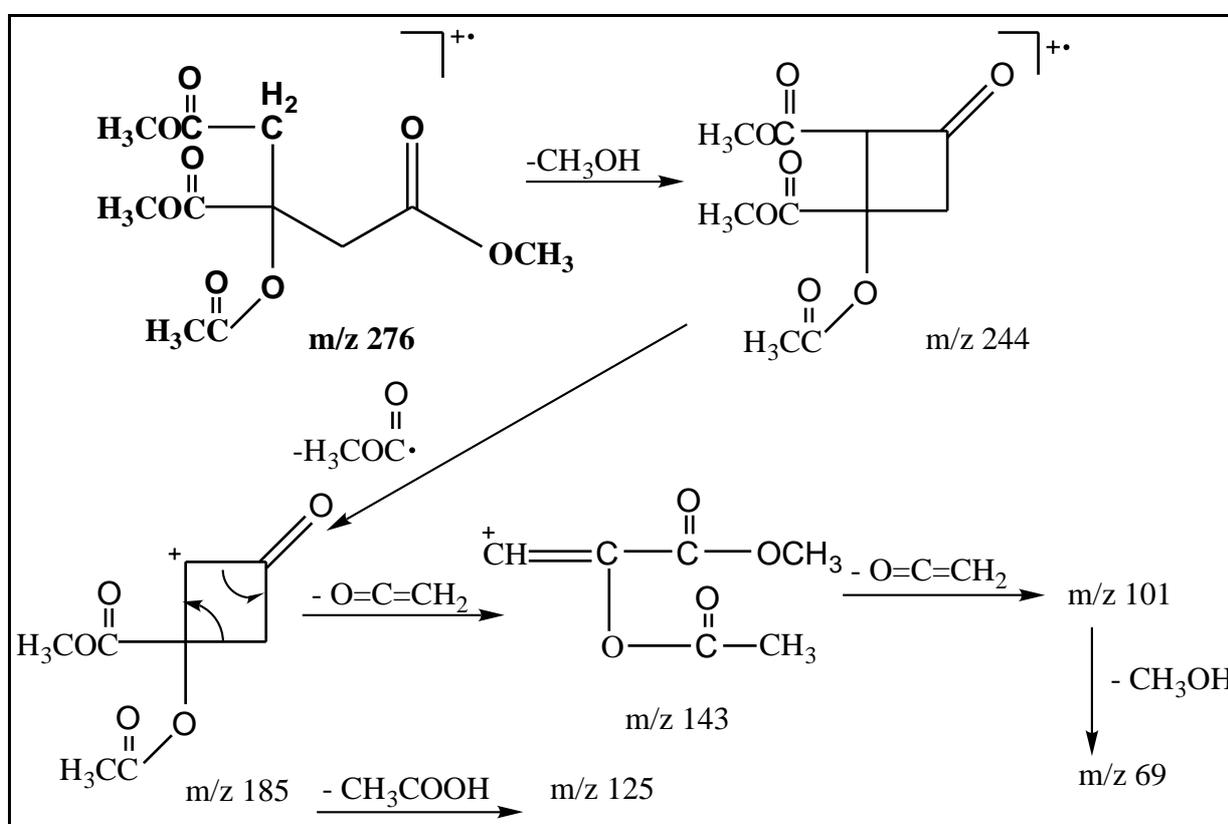


Abb. 5-25: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für 3-O-Acetyl-zitronensäure-trimethylester

2-O-Acetyl-isozitronensäure-trimethylester

EI: 43 (20); 83 (34); **115 (100)**; 143 (78); 157 (21); 175 (58); 185 (31); 202 (26); 203 (39); 217 (10); 234 (24); 245 (2)

Aufgrund der unsymmetrischen Anordnung der funktionellen Gruppen im Iso-Zitronensäure-Derivat im Vergleich zum entsprechenden Zitronensäure-Derivat sind mehr Fragmentierungen

möglich. Die α -Spaltung an der Carbonylgruppe der Acetylfunktion ergibt das dafür typische Ion m/z 43 (siehe Abb. 5-26). Die Zerfallswege vom Iso-Zitronensäure- und Äpfelsäure-Derivat sind sehr ähnlich. Analog dazu könnte aus dem Molekülion m/z 276 nach einem Wasserstoff-Transfer ein Keten und Methanol abgespalten werden, wobei die Ionen m/z 234 und m/z 202 entstehen. Die anschließende α -Spaltung und Kohlenmonoxid-Eliminierung bzw. die induktive Spaltung an der Carbonylgruppe einer Esterfunktion führt zu dem intensiven Ion m/z 143. Letzteres könnte auch durch den Bruch zwischen C3 und C4 (m/z 203) und anschließender Essigsäure-Abspaltung oder durch die α -Spaltung an der Carbonylgruppe einer Esterfunktion (m/z 245) und anschließender Abspaltung eines Ketens (m/z 203) und Essigsäure oder durch die alternative α -Spaltung an der Carbonylgruppe einer Esterfunktion und anschließender Abspaltung von Methanol und eines Ketens (m/z 217; m/z 185) erklärt werden. Das Ion m/z 217 könnte einerseits durch Abspaltung von Essigsäure (Mc Lafferty-Umlagerung) zu m/z 157 oder andererseits durch nachfolgende Abspaltung eines Ketens, von Essigsäure durch Mc Lafferty-Umlagerung und Methanol zu m/z 175, dem Basepeak m/z 115 und m/z 83 fragmentieren. Das Ion m/z 175 als Vorläufer des Basepeaks, könnte auch durch die primäre Abspaltung eines Ketens aus dem Molekülion und einer sekundären induktiven Spaltung an der Carbonylgruppe einer Esterfunktion gebildet werden.

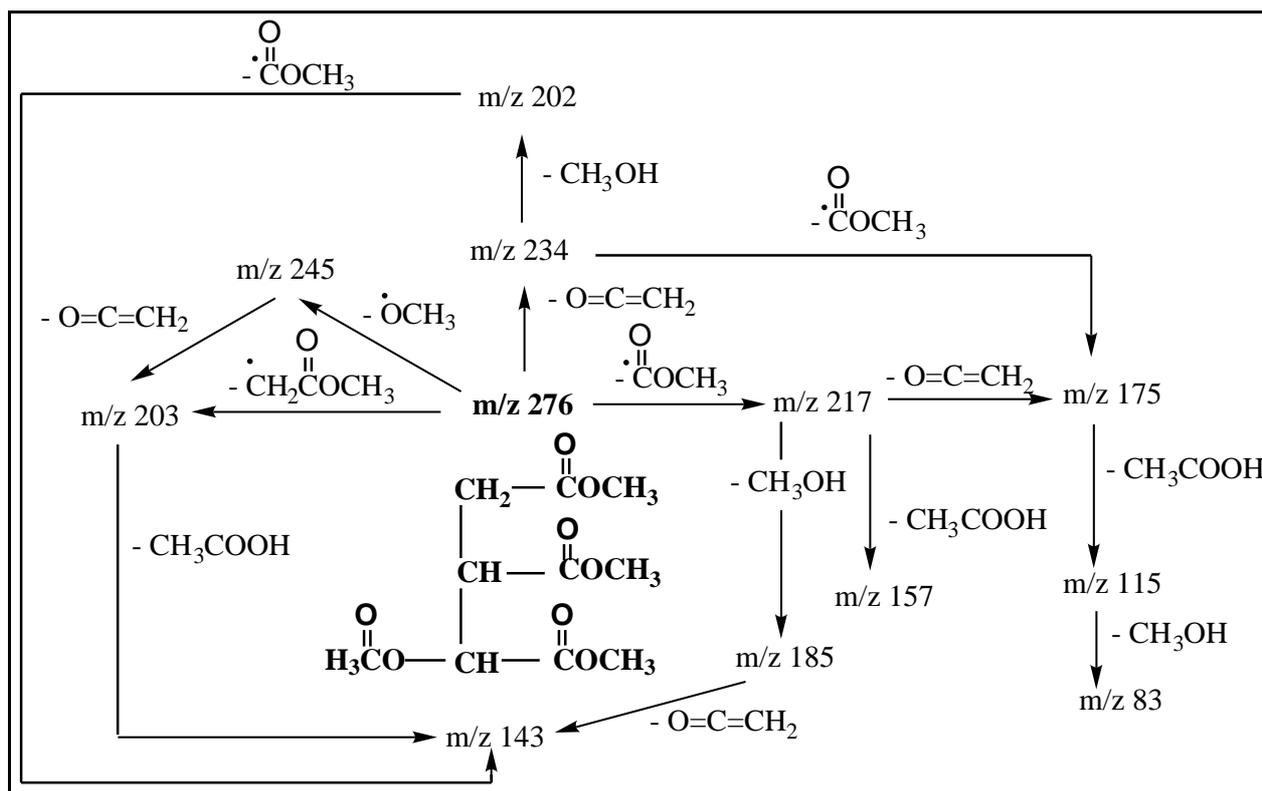


Abb. 5-26: Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema für 2-O-Acetyl-isozitronensäure-trimethylester

5.2.3.4 Auswertung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten der methylierten und anschließend acetylierten organischen Säuren

Die gewonnenen Methylesterderivate von einigen Carbonsäuren bzw. die acetylierten Methylesterderivate von einigen Hydroxycarbonsäuren wurden gaschromatographisch getrennt (siehe Abb. 5-27). Dabei zeigte die 2-Ketoglutarsäure nach der beschriebenen Derivatisierung zwei Peaks. Durch den Vergleich der relativen Retentionszeiten, bezogen auf Sorbinsäure als internen Standard, und der Massenspektren mit bekannten Substanzen wurden organische Säuren in einigen Zwischenprodukten der Galactose-Herstellungen identifiziert (siehe Tab. 5-9). Cis- bzw. trans-Aconitsäure und Isozitronensäure konnte in keiner der vorliegenden Proben nachgewiesen werden.

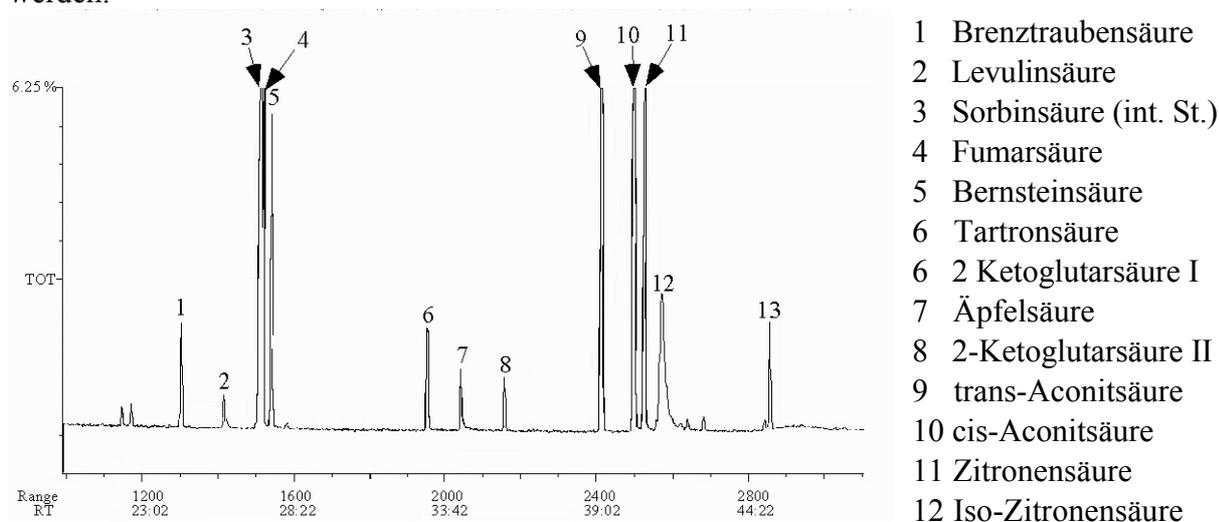


Abb. 5-27: GC-MS Chromatogrammausschnitt von einer Mischung von Vergleichssubstanzen

Tab. 5-9: Identifizierte aliphatische Carbonsäuren in einigen Zwischenprodukten der Galactose-Herstellungen (BrS - Brenztraubensäure; LS - Levulinsäure; FS - Fumarsäure; BS - Bernsteinsäure; 2-KG - 2-Ketoglutarsäure; ÄS - Äpfelsäure; ZS - Zitronensäure)

Probe	BrS	LS	FS	BS	2-KG1	2-KG2	ÄS	ZS
Mula 1/A	+	-	+	+	+	+	+	+
Mula 2/A	+	-	-	+	+	+	+	+
Mula 3/A	+	-	-	+	-	+	+	+
1. Kris/A	+	-	-	+	-	+	+	-
2. Kris/A	+	-	-	+	-	+	-	-
1. Kris/B	-	-	-	+	-	-	-	-
Mula 1/C	+	+	-	+	+	+	-	+
Mula 2/C	-	-	-	+	-	-	-	-
1. Kris/C	-	-	-	+	-	-	-	-

5.2.4 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Ionenaustauschersäule von mittlerer bis niedriger Hydrophobizität

5.2.4.1 Charakterisierung des Ionenaustauschverfahrens (HPIC)

Das ionenchromatographische Verfahren, das als stationäre Phase die Ion Pac AG4A-SC als Vorsäule und zwei hintereinander geschaltete analytische Säulen, die Ion Pac AS4A-SC und die Ion Pac AS4 (Fa. Dionex) (Beschreibung siehe Punkt 4.2.1.2.6), verwendet, wird vorrangig zum Nachweis und zur Bestimmung von Anionen eingesetzt. Erweiternd dazu wurde das chromatographische System mit Leitfähigkeitsdetektion hinsichtlich der Erfassung relevanter organischer Säuren näher untersucht. Die Bestimmung von Anionen in den Zwischen- und Endprodukten der Galactose-Herstellung beschränkte sich auf die wesentlichen Elemente wie Chlorid, Nitrat, Sulfat und Phosphat.

Bei der Verwendung der Anionenaustauschersäule AS4-SC (Fa. Dionex), gekoppelt mit der entsprechenden Vorsäule und 1,8 mM Na_2CO_3 + 1,7 mM NaHCO_3 als Eluent (Flußrate 1,0 ml/min) wurden folgende Anionen mit zunehmender Elutionsreihenfolge selektiv voneinander getrennt: Chlorid < Nitrat < Sulfat. Der wesentliche Nachteil war, dass Phosphat nicht detektiert wurde. Die Überprüfung des Retentionsverhaltens von organischen Säuren, die als Verunreinigungen in den Zwischenprodukten der Galactose-Herstellungen bereits identifiziert wurden, ergab eine Überlagerung des Sulfat-Peaks mit Bernsteinsäure und L-(-)-Äpfelsäure. Monocarbonsäuren wie Essig-, Ameisen-, Brenztrauben-, Propion-, Glycerin-, Milch-, Glyoxyl-, Levulin-, Glykol-, Galacton-, Glucon-, Galacturon- und Glucuronsäure wurden zusammen mit Fluorid vor dem Chlorid-Peak beobachtet und überlagerten sich. Neben L-(-)-Äpfel- und Bernsteinsäure wurden weitere Dicarbonsäuren wie Oxal-, Schleim-, Wein-, Tartron- und 2-Ketoglutaronsäure beobachtet, die nach den monovalenten Anionen eluierten. Fumarsäure, die eine ungesättigte Doppelbindung enthält, wurde am stärksten retardiert. Durch nachfolgende Kopplung einer weiteren analytischen Trennsäule, der AS 4 (Fa. Dionex) und einer Erhöhung der Flußrate auf 2 ml/min (siehe Punkt 4.2.1.2.6) konnte Phosphat neben Chlorid, Nitrat und Sulfat detektiert werden. Sulfat wurde dabei selektiv von Bernstein- und L-(-)-Äpfelsäure abgetrennt, wobei sich diese beiden organischen Säuren weiterhin überlagerten. Daneben wurden mit diesem Verfahren einige Dicarbonsäuren wie Schleim-, Oxal- und 2-Ketoglutaronsäure erfaßt (siehe Abb. 5-28).

Fumarsäure und die Tricarbonsäuren trans- bzw. cis-Aconit- und Zitronensäure wurden innerhalb der Laufzeit von 30 min nicht beobachtet. Zwischen Sulfat und Oxalsäure könnten Wein- und Tartronsäure zusätzlich selektiv voneinander getrennt werden.

Der Einsatz eines Suppressors verbessert die Nachweisempfindlichkeit der Leitfähigkeitsdetektion. Bei der Anionenaustauschchromatographie erfolgt der Kationenaustausch sowohl für den Eluenten als auch für die nachzuweisenden Anionen im selbstregenerierenden Suppressor unmittelbar vor Eintritt in die Leitfähigkeitsmeßzelle. Bei der Suppressorreaktion entstehen dabei aus den Anionen korrespondierende, stark leitende Säuren (HCl , H_2SO_4 ..) in Gegenwart von Wasser. Die Grundleitfähigkeit sinkt und die größeren Analytsignale führen zusätzlich zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Die für die kontinuierliche

Regenerierung benötigten Hydronium- bzw. Hydroxid-Ionen werden durch Elektrolyse von Wasser an den Elektroden in den Regeneriermittelkanälen des Suppressors erzeugt.

Für die anorganischen Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat konnten Nachweisgrenzen erreicht werden, die unter 1 ng/50µl Injektionsvolumen lagen. Der deformierte Phosphat-Peak zeigte ein starkes Tailing, das einen negativen Einfluß auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenze hatte und Schwierigkeiten bei der Integration bereitete. Die Nachweisgrenzen der organischen Säuren lagen unter 20 ng/50µl Injektionsvolumen, so dass ein Vorteil hinsichtlich der Empfindlichkeit von Ionenaustauschersystemen gegenüber Ionenausschlußsystemem jeweils mit Suppression zur Leitfähigkeitsdetektion festgestellt werden konnte (siehe Anhang I und II).

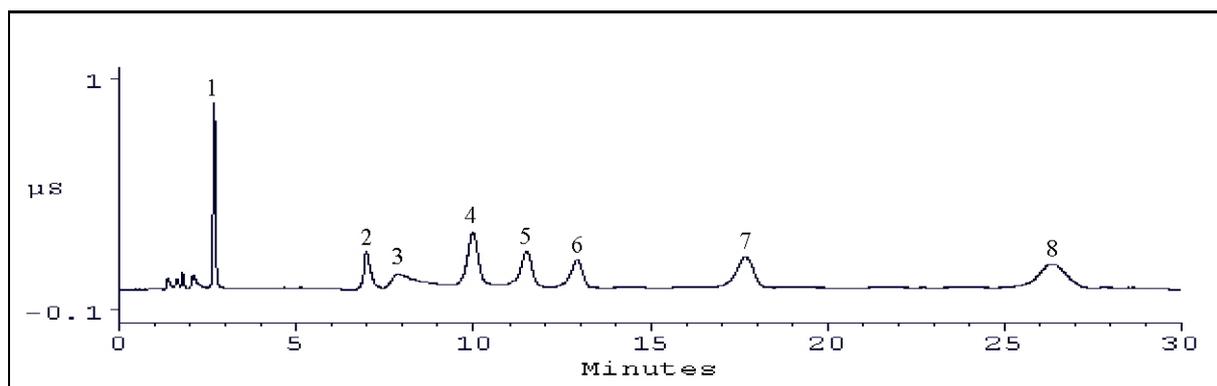


Abb. 5-28: Ionenchromatogramm von Vergleichssubstanzen, chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.2.6

1) Chlorid (2.70 min, 20,16 ng/50µl); **2) Nitrat** (7.00 min, 23,36 ng/50µl); **3) Phosphat** (7,82 min, 165,50 ng/50µl); **4) Schleimsäure** (9,77 min, 170,24 ng/50µl); **5) Äpfelsäure** (11,22 min, 87,68 ng/50µl) **coeluiert mit Bernsteinsäure**; **6) Sulfat** (12,63 min, 21,63 ng/50µl); **7) Oxalsäure** (17.28 min), 47,62 ng/50µl); **8) 2-Ketoglutar Säure** (25.77 min, 138,24 ng/50µl)

5.2.4.2 Ergebnisse

In den Zwischenprodukten der Hersteller A, C und B wurde 2-Ketoglutar Säure, Oxalsäure und Schleimsäure nachgewiesen. Innerhalb der Endprodukte konnte lediglich im 2. Kristallisat der Herstellung B Oxalsäure identifiziert werden. In folgenden Proben wurde ein Peak beobachtet, der hinsichtlich seiner Retentionszeit mit L-(-) Äpfelsäure und/oder Bernsteinsäure korrelierte: Mula 1-3/A, 1.-3. Kris/A, Gal/A, Mula 1-2/C, 1.Kris/C, 1.Kris/B und Gal/D.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von 2-Ketoglutar-, Oxal-, Schleimsäure in den Proben, die mit diesem Ionenaustauschverfahren erzielt wurden, wurden unter 5.2.9 zusammen mit den Ergebnissen von anderen analytischen Verfahren betrachtet und diskutiert. Daneben wurde die Produktcharakterisierung verschiedener Verfahrensschritte bereits unter Punkt 5.2.1 behandelt.

Die Ergebnisse der Anionenbestimmung (Chlorid, Sulfat, Nitrat, Phosphat) wurden unter Punkt 5.3.1 diskutiert und im Anhang II tabellarisch aufgeführt.

5.2.5 Charakterisierung von Galactose und deren Zwischenprodukte unter Einsatz einer Ionenaustauschersäule von sehr niedriger Hydrophobizität

5.2.5.1 Charakterisierung des Ionenaustauschverfahrens (HPIC)

Die Anionenaustauschersäule Ion Pac AS 11 (Fa. Dionex) (Beschreibung siehe Punkt 4.2.1.2.6) kann theoretisch für die Bestimmung von anorganischen Anionen eingesetzt werden. Das Arbeiten im Spurenbereich bereitete jedoch Schwierigkeiten, da der Blindwert bereits die zu bestimmenden Ionen Chlorid und Sulfat enthielt. Zusätzlich wurde ein Systempeak beobachtet, der eventuell auf eine nicht carbonatfreie Natronlauge als Eluent hindeuten könnte. Bei einem isokratischen Lauf mit einer 20 mmol NaOH und einer Flußrate von 1 ml/min eluierten alle Mono- und Dicarbonsäuren (siehe Punkt 4.2.1.2.5) im Bereich der mono- und divalenten anorganischen Anionen, wobei eine Überlagerung von Sulfat und 2-Ketoglutaratsäure bei 3.27 min auftrat. Bei 3.72 min war ein weiteres kritisches Pärchen, Fumar- und Oxalsäure, zu beobachten. Somit wäre zur Sulfat-Bestimmung in den vorliegenden Proben, in denen 2-Ketoglutaratsäure als Verunreinigung vorkam (siehe Punkt 5.2.4.2), eine umfangreiche Probenaufarbeitung zur Abtrennung der organischen Säuren, möglich durch eine Veraschung der Proben, notwendig gewesen. Phosphat, trans- und cis-Aconitsäure sowie Zitronen- und Isozitronensäure wurden selektiv voneinander bei höheren Retentionszeiten getrennt. Daher wurde die Ion Pac AS 11 zur Bestimmung des trivalenten Anions Phosphat und der Tricarbonensäuren als geeignet angesehen (siehe Abb. 5-29). Durch Anwendung der Gradiententechnik, bei der die Konzentration der Natronlauge innerhalb von 20 min von einer 20 mmol auf eine 30 mmol Lösung erhöht wurde, konnte die Laufzeit auf 30 min gesenkt werden (siehe Punkt 4.2.1.2.5).

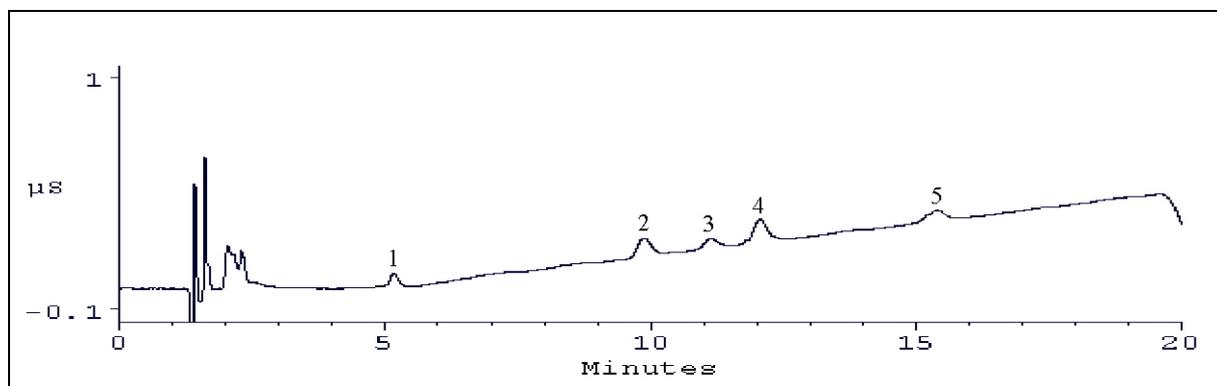


Abb. 5-29: Ionenchromatogramm von Vergleichssubstanzen, chromatographisches System siehe Punkt 4.2.1.2.5

1) Phosphat (5,17 min, 12,73 ng/50µl); **2) Isozitronensäure** (9,88 min, 15,95 ng/50µl); **3) trans-Aconitsäure** (11,15 min, 12,50 ng/50µl); **4) cis-Aconitsäure** (12,07 min, 12,70 ng/50µl); **5) Zitronensäure** (15,38 min, 19,56 ng/50µl)

Durch den Einsatz eines Anionen selbst-regenerierenden Suppressors zur Leitfähigkeitsdetektion wurden für Phosphat und den hier zu betrachtenden Tricarbonensäuren Nachweisgrenzen erreicht, die unter 1,5 ng/50 µl Injektionsvolumen lagen. Aus der verbesserten Peakform des Phosphates im

Vergleich zu dem angewendeten chromatographischen System unter Punkt 5.2.4 resultiert eine Bestimmungsgrenze, die um den Faktor 40 empfindlicher war (siehe Anhang II).

5.2.5.2 Ergebnisse

In den Zwischen- und Endprodukten der Hersteller A, B und C wurde Zitronen- und Isozitronensäure bestimmt. Nur im Endprodukt der Hersteller A und B konnte noch Zitronensäure nachgewiesen werden. Bei der Galactose der Herstellung D lag der Zitronensäure-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,15 mg/100 g. Geringe Mengen cis- und trans-Aconitsäure wurden in den Zwischenprodukten der Hersteller A und B, wobei der Gehalt von trans-Aconitsäure gegenüber der entsprechenden cis-Form jeweils höher lag.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Zitronen-, Isozitronen-, cis-Aconit- und trans-Aconitsäure in den Proben, die mit diesem Ionenaustauschverfahren erzielt wurden, wurden unter 5.2.9 zusammen mit den Ergebnissen von anderen analytischen Verfahren betrachtet und diskutiert. Daneben wurde die Produktcharakterisierung der verschiedenen Verfahrensschritte einzelner Galactose-Herstellungen bereits unter Punkt 5.2.1 behandelt.

Zusammen mit den bereits vorliegenden Ergebnissen der HPICE (siehe Punkt 5.2.2.2), der GC-MS (siehe Punkt 5.2.3.4) und der HPIC (siehe Punkt 5.2.4.2) gab es erste Hinweise auf den Zitratzyklus, da sowohl 2-Ketoglutarensäure als auch Bernstein-, L-(-)-Äpfelsäure als auch Zitronen-, Isozitronen- und cis-Aconitsäure Zwischenprodukte dieses Zyklus darstellen. Letztere organische Säure ist dabei jedoch an das Enzym *Aconitase* gebunden, die die Umwandlung der Zitronensäure in Isozitronensäure über ihr gemeinsames Anhydrid, die cis-Aconitsäure, katalysiert. Die freie Säure lagert sich beim Erwärmen leicht in die trans-Form um.

Die Ergebnisse der Phosphatbestimmung wurden unter Punkt 5.3.1 diskutiert und im Anhang II tabellarisch aufgeführt.

5.2.6 Enzymatische Bestimmungsverfahren ausgewählter organischer Säuren

Es wurden folgende organische Säuren in den Proben enzymatisch bestimmt: L-Milchsäure, L-Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure (siehe Punkt 4.2.5).

Zur Erkennung von Störungen durch Inhaltsstoffe der Probe wurde aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Probenvolumina durchgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sollten dem Probenvolumina proportional sein.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung und der Wiederfindung wurden im Anhang I dargestellt und unter 5.2.9 zusammen mit den Ergebnissen von anderen analytischen Verfahren betrachtet und diskutiert. Daneben wurde die Produktcharakterisierung der verschiedenen Verfahrensschritte einzelner Galactose-Herstellungen bereits unter Punkt 5.2.1 behandelt.

5.2.7 RP-HPLC-Verfahren zur Bestimmung von α -Ketosäuren in den Mutterlaugen

5.2.7.1 Derivatisierung

Als selektives Derivatisierungsmittel für α -Ketosäuren wurde 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB) verwendet (siehe Punkt 4.3.3.2) (Nakamura und Hara 1987). Das Reagenz reagiert mit 2-Ketosäuren im sauren Milieu unter Bildung von Quinoxalinon-Derivaten, deren Fluoreszenz im neutralen Medium am intensivsten ist.

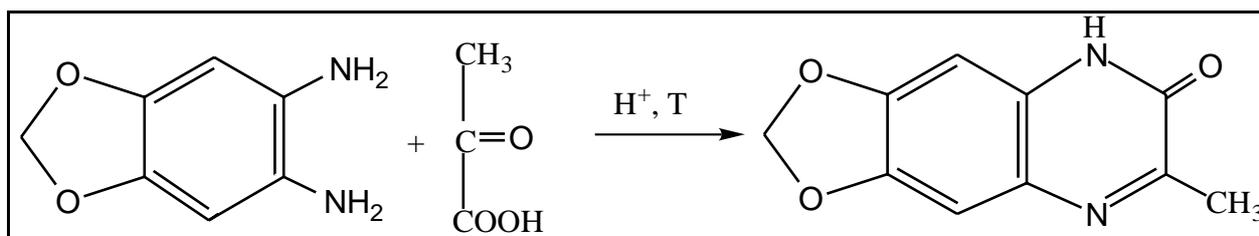


Abb. 5-30: Bildung von Quinoxalinon-Derivaten am Beispiel der Reaktion von 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB) mit Brenztraubensäure

Die Derivate von fünf 2-Ketosäuren (Oxalessig-, Glyoxyl-, 2-Ketoglutar-, Brenztrauben- und 2-Ketobuttersäure) konnten innerhalb von 30 min durch RP-HPLC und isokratischer Elution mit einem Methanol-Wasser-Gemisch getrennt werden (siehe Punkt 4.2.1.3.1).

Durch fluorimetrische Voruntersuchungen der Derivate wurden die Parameter für die Fluoreszenzdetektion festgelegt (Anregung: 366 nm; Emission: 446 nm).

Es wurde eine 0,5 mM DMB-Lösung in einer 0,1 M Salzsäure hergestellt, die Mercaptoethanol (1,0 M) und Natriumdithionit (28 mM) zur Stabilisierung enthielt. Das optimale molare Verhältnis von DMB zur Summe der 2-Ketosäuren in der Standardmischung war 5:1. Die Derivatisierung wurde bei 100°C und 50 min durchgeführt, wobei sich bereits nach 10 min Oxalessigsäure vollständig durch Abspaltung der β -ständigen Carboxylgruppe als Kohlendioxid zu Brenztraubensäure umgesetzt hatte. Auch bei einer niedrigeren Säurekonzentration von 0,05 M wurde bei 100°C und 50 min keine Oxalessigsäure mehr beobachtet. Weitere Untersuchungen, wobei die Derivatisierung bei Raumtemperatur unter Rühren im geschlossenen System durchgeführt und die Zeit als variabler Parameter gewählt wurde, zeigten zwar nach 30 min Reaktionszeit einen leichten Anstieg der Peakfläche von Oxalessigsäure, diese war jedoch bereits kleiner als die der Brenztraubensäure (siehe Abb 5-24).

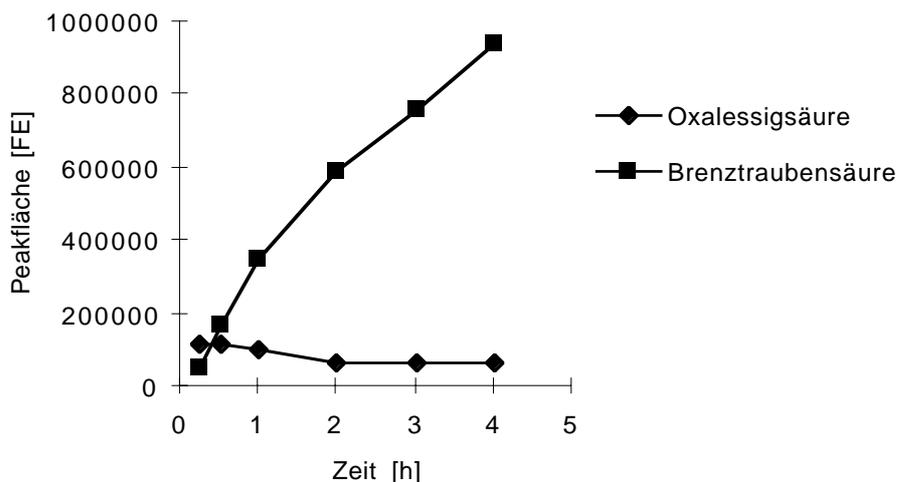


Abb. 5-31: Abbau der Oxalacetat zu Malat während der Derivatisierung bei Raumtemperatur im geschlossenen System mit 0,1 M Salzsäure in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen zur Bestimmung von Glyoxyl-, Malat- und 2-Ketoglutarat ließ sich Oxalacetat lediglich als ihr Abbauprodukt Malat nachweisen. Es ist zu vermuten, dass Oxalacetat, die ebenso als Zwischenprodukt im Zitratzyklus vorkommt, den gleichen Abbauprozess wie Oxalacetat unterliegt, wobei 2-Ketoglutarat entsteht (siehe auch Punkt 5.2.4.2).

5.2.7.2 Ergebnisse

Die Derivatisierung mit DMB ist ein hoch empfindliches Verfahren und erlaubt Fluoreszenzmessungen im Femtomol-Bereich. Es wurde für Glyoxylsäure und Malat eine Nachweisgrenze ($S/N=3$) von 0,006 ng und für 2-Ketoglutarat 0,02 ng in 10 μ l Injektionsvolumen erreicht. Die Bestimmungsgrenze ($S/N=10$) lag für Glyoxyl- und Malat bei 0,02 ng und für 2-Ketoglutarat bei 0,05 ng/10 μ l.

Die Quantifizierung der 2-Ketosäuren in den Mutterlaugen erfolgte mit Hilfe von 2-Ketobuttersäure als internen Standard. Zunächst wurde der stoffspezifische Faktor f_x für die jeweiligen Analyten ermittelt (siehe Anhang I), der bei der Berechnung berücksichtigt wurde (siehe Punkt 4.2.1.3.1). Für die Derivatisierung wurden zwei verschiedene Probenvolumina eingesetzt. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen sind im Anhang I dargestellt.

Die graphische Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionszeit gegen die Zahl der Kohlenstoffatome von aliphatischen 2-Ketosäuren mit einer Carboxylgruppe ließ eine lineare Beziehung erkennen. Das Chromatogramm der Mutterlauge 3/A und Mutterlauge 2/C enthielt einen unbekanntem Peak, der durch Extrapolation der Geraden als 2-Ketopentansäure identifiziert werden könnte (siehe Abb. 5-32).

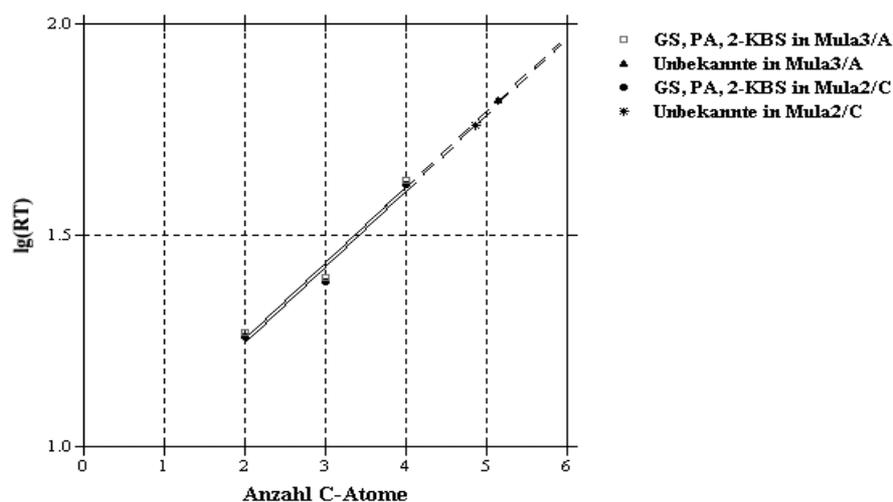


Abb. 5-32: Darstellung der Beziehung zwischen der Anzahl der Kohlenstoff-Atome von unverzweigten α -Ketocarbonsäuren und dem dekadischen Logarithmus ihrer Retentionszeiten-Extrapolation der linearen Beziehung auf unbekannte Signale im HPLC-Chromatogramm

5.2.8 Bestimmung von Zuckersäuren

Tri- und höhere Oligosaccharide (bis DP 70) können neben Zuckersäuren unter den unter Punkt 5.1.6.1 beschriebenen chromatographischen Bedingungen mit der Carbo Pak Pa 1 (Fa. Dionex) als stationäre Phase getrennt werden, wenn in Analogie zur Trennung von Mono- und Disacchariden dem Elutionsmittel Natriumacetat zugefügt wird. Im Vergleich zu Hydroxylionen verkürzen Acetationen die Retentionszeit von Kohlenhydraten wegen ihrer höheren Ionenstärke.

Mit Hilfe eines linearen Gradienten konnte eine selektive Trennung von Glucon-, Galacton-, Glucuron- und Galacturonsäure erzielt werden (siehe Punkt 4.2.1.2.3). In keiner der vorliegenden Proben wurden die entsprechenden Uronsäuren identifiziert. Glucon- und Galactonsäure konnten in folgenden Proben nachgewiesen werden: Mula 1/A, Mula 1-2/C, 1. und 2. Kris/C, Gal/D und E. Die einzelnen Werte der quantitativen Bestimmung waren im Vergleich zu anderen Verunreinigungen relativ hoch, so dass eine halbquantitative Abschätzung mittels Dünnschichtchromatographie vorgenommen wurde (siehe Punkt 4.2.4; System II und Tauchlösung). Folgende Angaben beziehen sich auf die Summe der -onsäuren, da eine selektive Trennung von Galacton- und Gluconsäure nicht erreicht werden konnte: $\ll 0,5\%$ (w; w) in Gal D und E; $\ll 0,2\%$ (w; w) in Mula 1/A und $\ll 1,0\%$ (w; w) in Mula 1/C. Im Vergleich dazu wurden mit dem Ionenaustauschverfahren 3 - 10 fach höhere Werte ermittelt. Es wird vermutet, dass Überlagerungen mit höheren Sacchariden, die bisher nicht identifiziert wurden, dafür verantwortlich waren. Beispielsweise eluierten Lactobionsäure und 4-O-(4-O-[6-O- α -D-Glucopyranosyl]- α -D-Glucopyranosyl]- α -D-Glucopyranosyl)-D-Glucopyranose zur gleichen Retentionszeit. Ein Peak mit dieser Retentionszeit wurde nur in der Mutterlauge 1/ C beobachtet. Der mittels HPIC berechnete Gehalt konnte dünn-schichtchromatographisch ebenfalls nicht bestätigt werden.

5.2.9 Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse von organischen Säuren und deren Diskussion

In den folgenden Tabellen wurden für jede vorliegende Probe die quantitativen Ergebnisse der organischen Säuren verschiedener analytischer Methoden zusammengestellt und diskutiert. Alle Gehaltsangaben beziehen sich jeweils auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26). Unter Punkt 5.2.1 wurden die jeweiligen Produkte hinsichtlich ihrer Verfahrensschritte charakterisiert.

• Mutterlauge 1/ Herstellung A

Tab. 5-10: Gehalte von organischen Säuren in der Mutterlauge 1 der Herstellung A

Mutterlauge 1/ A	AS 1 [mg/100g]	AS4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	RP-HPLC [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	< 5,7**	-	-	-
2-Ketoglutarensäure	734 ± 25	667 ± 24	-	743 ± 7	-
Schleimsäure	NG = 28,4	22,3 ± 0,7	-	-	-
Brenztraubensäure	1516 ± 64	-	-	858 ± 8	811 ± 18
Zitronensäure	611 ± 26	-	84,0 ± 0,7	-	89,2 ± 2,7
Isozitronensäure	BG = 6,8	-	9,4 ± 0,7	-	-
Glyoxylsäure	< 5,4*	-	-	10,1 ± 2,7	-
L-Äpfelsäure	1076 ± 7	+	-	-	1006 ± 26
trans-Aconitsäure	NG = 4,4	-	4,9 ± 0,3	-	-
cis-Aconitsäure	NG = 4,4	-	2,2 ± 0,1	-	-
Glycerinsäure	661 ± 14	-	-	-	-
Bernsteinsäure	6051 ± 73	+	-	-	5208 ± 25
L-Milchsäure	BG = 75,7	-	-	-	76,4 ± 4,1
Essigsäure	142 ± 4	-	-	-	-
Fumarsäure	69,6 ± 0,7	-	-	-	-

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** < Bestimmungsgrenze (siehe Anhang I)

Zitronensäure und ihre Iso-Form sowie trans-Aconitsäure und ihre cis-Form eluierten auf der Ion Pac AS1 jeweils zur gleichen Retentionszeit. Außerdem wurde Peak 2 im HPICE-Chromatogramm der Mutterlauge 1/A (siehe Abb. 5-17) einesteils als Brenztraubensäure und anderenteils als Zitronensäure aufgrund ihres sehr ähnlichen Retentionsverhaltens berechnet. Beide Gehalte zeigten keine Übereinstimmung mit den Werten anderer analytischer Verfahren, so dass sich dieser Peak aus mehreren Verunreinigungen zusammensetzen muß. Die Überlagerung von Schleimsäure mit Brenztraubensäure auf der Ion Pac AS 1 war dabei aufgrund des niedrigen Schleimsäure-Gehaltes für die Berechnung des Brenztraubensäure-Gehaltes unbedeutend. Auch die ermittelten Bernsteinsäure-Gehalte der HPICE und des substanzspezifischen enzymatischen

Verfahrens zeigten starke Abweichungen. Der höher berechnete Bernsteinsäure-Gehalt könnte mit der Überlagerung von Bernsteinsäure mit Milchsäure und möglicherweise mit Glykolsäure auf der Ion Pac AS 1 begründet werden. L-Milchsäure wurde enzymatisch nachgewiesen und der dabei ermittelte Gehalt war mit der Bestimmungsgrenze für L-Milchsäure auf der Ion Pac AS1 konform, so dass L-Milchsäure bei der Berechnung des Bernsteinsäure-Gehaltes einen Einfluß hatte.

• *Mutterlauge 2/ Herstellung A*

Tab. 5-11: Gehalte von organischen Säuren in der Mutterlauge 2 der Herstellung A

Mutterlauge 2/ A	AS 1 [mg/100g]	AS4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	RP-HPLC [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
2-Ketoglutarensäure	618 ± 5	645 ± 53	-	647 ± 8	-
Schleimsäure	NG = 57,9	21,6 ± 1,6	-	-	-
Brenztraubensäure	608 ± 32	-	-	476 ± 3	458 ± 21
Zitronensäure	266 ± 8	-	147 ± 8	-	171 ± 3
Isozitronensäure	BG = 14,2	-	21,0 ± 0,5	-	-
Glyoxylsäure	< 10,5*	-	-	2,6 ± 0,3	-
L-Äpfelsäure	1179 ± 16	+	-	-	1113 ± 24
trans-Aconitsäure	NG = 8,9	-	4,2 ± 0,3	-	-
cis-Aconitsäure	NG = 8,9	-	3,2 ± 0,5	-	-
Glycerinsäure	595 ± 39	-	-	-	-
Bernsteinsäure	3971 ± 16	+	-	-	3147 ± 24
L-Milchsäure	NG = 31,6	-	-	-	50,0 ± 2,6
Essigsäure	42,1 ± 2,6	-	-	-	-

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

Im HPICE-Chromatogramm der Ion Pac AS 1 der Mutterlauge 2/A war eine Aufspaltung des bei der Mutterlauge 1/A bezeichneten Peaks 2 in Abb. 5-17 erkennbar, so dass eine bessere Auswertung erfolgen konnte. Trotzdem zeigten der Brenztraubensäure- und Zitronensäure-Gehalt zu den Ergebnissen der anderen analytischen Verfahren noch Abweichungen. Der höhere Zitronensäure-Gehalt könnte durch die Überlagerung mit Isozitronensäure begründet werden, die mit Hilfe der HPIC nachgewiesen wurde und der Gehalt über der Bestimmungsgrenze auf der Ion Pac AS 1 lag. Die Überlagerung der Schleimsäure und der Brenztraubensäure auf der Ion Pac AS 1 war dagegen auch bei dieser Probe aufgrund des niedrigen Schleimsäure-Gehaltes für die Berechnung des Brenztraubensäure-Gehaltes unbedeutend. Wie bei der Mutterlauge 1/A gab es auch bei dieser Probe Abweichungen der Bernsteinsäure-Gehalte. Der höhere Wert, der mittels HPICE erhalten wurde, läßt möglicherweise Rückschlüsse auf eine Überlagerung mit Milch- und eventuell mit Glykolsäure zu. L-Milchsäure wurde enzymatisch nachgewiesen und der ermittelte Gehalt lag über der Nachweisgrenze für L-Milchsäure auf der Ion Pac AS 1.

- Mutterlauge 3/ Herstellung A

Tab. 5-12: Gehalte von organischen Säuren in der Mutterlauge 3 der Herstellung A

Mutterlauge 3/ A	AS 1 [mg/100g]	AS4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	RP-HPLC [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
2-Ketoglutarensäure	20,3 ± 0,3	< 18,0*	-	15,0 ± 0,3	-
Schleimsäure	NG = 76,7	36,7 ± 3,3	-	-	-
Brenztraubensäure	600 ± 3	-	-	17,3 ± 0,7	-
Zitronensäure	243 ± 3	-	217 ± 3	-	253 ± 3
Glyoxylsäure	< 14,0*	-	-	0,18 ± 0,01	-
L-Äpfelsäure	143 ± 3	+	-	-	143 ± 3
Bernsteinsäure	193 ± 3	+	-	-	160 ± 3

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

Aus den Berechnungen in Tab. 5-12 ging hervor, dass Peak 2 im HPICE-Chromatogramm der Ion Pac AS 1 der Mutterlauge 3/A im Gegensatz zur Mutterlauge 2/A nicht aufgesplittet war (siehe Abb. 5-17), überwiegend der Zitronensäure und weniger der Brenztraubensäure zugeordnet werden kann. Der etwas erhöhte Bernsteinsäure-Gehalt, der mittels HPICE ermittelt wurde, könnte auf eine Überlagerung mit Glykol- und/ oder L-Milchsäure hindeuten. Letztere sowie Brenztraubensäure konnten mit dem jeweiligen enzymatischen Verfahren aufgrund des notwendigen hohen Probeneinsatzes nicht bestimmt werden, da Trübungen vermutlich durch den höheren Ethanol-Gehalt im Testansatz auftraten.

- 1. Kristalliat/ Herstellung A

Die Berechnungen in Tab. 5-13 ergaben, dass Peak 2 im HPICE-Chromatogramm der Ion Pac AS 1 vom 1. Kristalliat/A (siehe Abb. 5-17) überwiegend der Zitronensäure zugeordnet werden kann. Isozitronensäure sowie Brenztraubensäure, die ein ähnliches Retentionsverhalten wie Zitronensäure hatten, konnten mit anderen analytischen Verfahren nachgewiesen werden. Der durch HPIC ermittelte niedrige Schleimsäure-Gehalt, der auf der Ion Pac AS 1 unterhalb der Nachweisgrenze lag, spielte somit keine Rolle bei der Berechnung des Zitronensäure-Gehaltes. Der abweichende 2-Ketoglutarensäure- und Bernsteinsäure-Gehalt, der durch HPICE ermittelt wurde, läßt möglicherweise Rückschlüsse auf eine Überlagerung mit anderen noch unbekanntem Verbindungen, Glykol- und L-Milchsäure zu. Letztere wurde enzymatisch nachgewiesen, der Gehalt lag jedoch auf der Ion Pac AS 1 unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Tab. 5-13: Gehalte von organischen Säuren im 1. Kristallinat der Herstellung A

1. Kristallinat/ A	AS 1 [mg/100g]	AS 4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	4,6 ± 0,1	-	-
2-Ketoglutarinsäure	20,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	-	-
Schleimsäure	NG = 7,9	1,8 ± 0,1	-	-
Brenztraubensäure	145 ± 1	-	-	21,0 ± 0,1
Zitronensäure	58,3 ± 0,2	-	45,6 ± 0,6	45,9 ± 1,5
Isozitronensäure	NG = 0,5	-	1,4 ± 0,1	-
trans-Aconitsäure	< 1,2*	-	0,34 ± 0,02	-
L-Äpfelsäure	61,5 ± 1,2	+	-	79,0 ± 0,3
Glycerinsäure	24,9 ± 0,6	-	-	-
Bernsteinsäure	222 ± 7	+	-	204 ± 10
L-Milchsäure	BG = 5,6	-	-	4,8 ± 0,1
Essigsäure	< 3,9**	-	-	-

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** < Bestimmungsgrenze (siehe Anhang I)

• 2. Kristallinat/ Herstellung A

Tab. 5-14: Gehalte von organischen Säuren im 2. Kristallinat der Herstellung A

2. Kristallinat/ A	AS 1 [mg/100g]	AS 4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	3,7 ± 0,1	-	-
2-Ketoglutarinsäure	3,7 ± 0,3	3,0 ± 0,1	-	-
Brenztraubensäure	BG = 1,4	-	-	1,4 ± 0,1
Zitronensäure	41,2 ± 0,3	-	38,4 ± 0,1	43,9 ± 0,1
Isozitronensäure	BG = 0,61	-	0,66 ± 0,03	-
trans-Aconitsäure	< 0,38*	-	0,07 ± 0,01	-
L-Äpfelsäure	17,4 ± 0,1	+	-	19,2 ± 0,3
Glycerinsäure	4,5 ± 0,5	-	-	-
Bernsteinsäure	14,4 ± 0,1	+	-	15,9 ± 0,1
L-Milchsäure	BG = 1,4	-	-	< 2,4**

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag außerhalb des Arbeitsbereiches.

Die Ergebnisse von den organischen Säuren der verschiedenen analytischen Verfahren in Tab. 5-14 zeigen gute Übereinstimmungen.

• 3. Kristallinat und Galactose/ Herstellung A

Tab. 5-15: Gehalte von organischen Säuren im 3. Kristallinat, in der Galactose der Herstellung A

organische Säuren	3. Kristallinat/ A			Galactose/ A		
	AS 1 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]	AS 1 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Brenztraubensäure	-	-	< 0,1**	-	-	< 0,1**
Zitronensäure	-	0,07 ± 0,01	< 0,5**	-	0,18 ± 0,01	< 0,4**
L-Äpfelsäure	-	-	1,9 ± 0,1	-	-	1,9 ± 0,1
Bernsteinsäure	< 0,77*	-	-	< 0,66*	-	-
L-Milchsäure	< 0,25*	-	< 2,1**	< 0,21*	-	< 1,8**

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag außerhalb des Arbeitsbereiches.

Im 3. Kristallinat/A und im Endprodukt der Herstellung A konnten mittels Ion Pac AS1 keine organischen Säuren mehr nachgewiesen werden. Ferner zeigte die Galactose in den Proben im HPICE-Chromatogramm einen negativen Peak, der die Bestimmung von Brenztrauben-, Zitronen- und L-Äpfelsäure störte (siehe Abb. 5-19). Die im Anhang I angegebenen Bestimmungsgrenzen für diese organischen Säuren auf der Ion Pac AS 1 wurden mit Vergleichssubstanzen ohne Probenmatrix ermittelt, so dass diese auf Proben mit einem sehr hohen Galactose-Anteil nicht übertragbar sind.

• 1. Kristallinat/ Herstellung B

Tab. 5-16: Gehalte von organischen Säuren im 1. Kristallinat der Herstellung B

1. Kristallinat/ B	AS 1 [mg/100g]	AS 4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	2,2 ± 0,1	-	-
2-Ketoglutarinsäure	BG = 5,2	< 3,5**	-	-
Brenztraubensäure	NG = 4,3	-	-	< 1,1**
Zitronensäure	20,1 ± 0,1	-	21,7 ± 0,1	18,5 ± 0,1
Iso-Zitronensäure	NG = 1,2	-	0,58 ± 0,02	-
trans-Aconitinsäure	< 3,0*	-	0,10 ± 0,01	-
cis-Aconitinsäure	< 3,0*	-	0,08 ± 0,01	-
L-Äpfelsäure	2,2 ± 0,1	+	-	3,0 ± 0,1
Bernsteinsäure	25,1 ± 0,9	+	-	22,4 ± 0,6
L-Milchsäure	BG = 10,2	-	-	8,5 ± 0,1

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag unterhalb der Bestimmungsgrenze (siehe Anhang I) bzw. beim enzymatischen Verfahren außerhalb des Arbeitsbereiches.

Peak 1 konnte im HPICE-Chromatogramm der Ion Pac AS 1 vom 1. Kristallisat der Herstellung B nach Zudotierung als 2-Ketoglutarinsäure identifiziert werden (siehe Abb. 5-17). Da Oxalsäure und anorganische Anionen (siehe Punkt 5.3) ein ähnliches Retentionsverhalten zeigten, war eine Auswertung nicht möglich. Die quantitativen Ergebnisse von anderen identifizierten organischen Säuren der verschiedenen analytischen Verfahren in Tab. 5-16 zeigen eine gute Übereinstimmung.

• 2. Kristallisat/ Herstellung B

Tab. 5-17: Gehalte von organischen Säuren im 2. Kristallisat der Herstellung B

2. Kristallisat/ B	AS 1 [mg/100g]	AS 4ASC+ AS 4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	1,7 ± 0,1	-	-
Brenztraubensäure	-	-	-	< 1,0**
Zitronensäure	-	-	0,23 ± 0,01	< 0,4**
L-Äpfelsäure	-	-	-	2,1 ± 0,1
Bernsteinsäure	< 0,66*	-	-	-
L-Milchsäure	< 0,21*	-	-	< 1,9**

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag außerhalb des Arbeitsbereiches.

Im Endprodukt der Herstellung B konnten keine organischen Säuren mit Hilfe der Ion Pac AS1 nachgewiesen werden (siehe Tab. 5-17). Die Matrix der Probe bereitete Probleme bei der Bestimmung von Brenztrauben-, Zitronen- und L-Äpfelsäure mittels Ionenausschlußchromatographie (siehe Abb. 5-19 und auch Bemerkung am Ende).

• Mutterlauge 1/ Herstellung C

Im HPICE-Chromatogramm der Mutterlauge 1/C waren Peak 1-3 in Abb. 5-18 nicht grundliniengetreunt. Dadurch bereitete die quantitative Auswertung Schwierigkeiten. Während der 2-Ketoglutarinsäure-Gehalt (Peak 1) mit den Werten anderer analytischer Verfahren korrelierte, wurden Peak 2 und 3 zwar nach Zudotierung als Brenztraubensäure und Zitronensäure identifiziert, wobei Überlagerungen mit anderen Substanzen jedoch nicht ausgeschlossen werden können (siehe Tab. 5-18). Aufgrund des mittels HPICE berechneten und vergleichsweise erhöhten Bernsteinsäure-Gehaltes (Peak 7) könnten Rückschlüsse auf eine Überlagerung mit Milch- und eventuell mit Glykolsäure gezogen werden. L-Milchsäure wurde enzymatisch bestimmt. Der dabei berechnete L-Milchsäure-Gehalt lag oberhalb der Bestimmungsgrenze auf der Ion Pac AS 1.

Tab. 5-18: Gehalte von organischen Säuren in der Mutterlauge 1 der Herstellung C

Mutterlauge 1/ C	AS 1 [mg/100g]	AS4ASC+ AS4 [mg/100g]	AS 11 [mg/100g]	RP-HPLC [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	4,7 ± 0,2	-	-	-
2-Ketoglutarinsäure	92,9 ± 0,7	84,0 ± 2,2	-	92,9 ± 1,2	-
Schleimsäure	NG = 38,9	5,4 ± 0,2	-	-	-
Brenztraubensäure	ca. 36	-	-	23,3 ± 0,2	20,0 ± 0,7
Zitronensäure	ca. 31	-	15,1 ± 0,2	-	16,1 ± 1,5
Isozitronensäure	BG = 1,9	-	1,63 ± 0,05	-	-
Glyoxylsäure	< 1,44*	-	-	1,58 ± 0,30	-
L-Äpfelsäure	66,1 ± 7,7	+	-	-	81,7 ± 0,7
Glycerinsäure	74,8 ± 8,9	-	-	-	-
Bernsteinsäure	1626 ± 20	+	-	-	1508 ± 45
L-Milchsäure	BG = 4,2	-	-	-	60,9 ± 2,7
Essigsäure	123 ± 3	-	-	-	-
Levulinsäure	98,8 ± 7,8	-	-	-	-

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

• *Mutterlauge 2/ Herstellung C*

Tab. 5-19: Gehalte von organischen Säuren in der Mutterlauge 2 der Herstellung C

Mutterlauge 2/ C	AS 1 [mg/100g]	AS 4ASC+ AS 4 [mg/100g]	RP-HPLC [mg/100g]	enzymatisch [mg/100g]
Oxalsäure	-	49,7 ± 1,0	-	-
Brenztraubensäure	-	-	8,0 ± 0,5	80,4 ± 5,0
Schleimsäure	-	28,6 ± 0,5	-	-
Glyoxylsäure	-	-	90,4 ± 5,0	-
L-Äpfelsäure	-	+	-	80,4 ± 5,0
Bernsteinsäure	186 ± 5	+	-	90,4 ± 15,1
L-Milchsäure	BG = 95,5	-	-	141 ± 25

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

Durch Matrixeffekte bereitete die Bestimmung von Brenztrauben-, Schleim-, Glyoxyl- und L-Äpfelsäure mittels HPICE (Ion Pac AS 1) Schwierigkeiten (siehe Abb. 5-19). Der enzymatisch bestimmte und im Gegensatz zu den ionenaustauschchromatographischen Verfahren erhöhte Brenztraubensäure-Gehalt der Mutterlauge 2/C, läßt sich möglicherweise auf die gleichzeitige Erfassung von Glyoxylsäure bei der enzymatischen Reaktion zurückführen. Die Umsetzung von Glyoxylsäure mit Lactat-Dehydrogenase soll nach Anleitung der Testkombination mit der gleichen Rate wie mit Brenztraubensäure stattfinden. Der durch HPICE ermittelte erhöhte

Bernsteinsäure-Gehalt läßt Rückschlüsse auf eine Überlagerung mit Milch- und eventuell mit Glykolsäure zu. L-Milchsäure wurde enzymatisch bestimmt. Der dabei berechnete L-Milchsäure-Gehalt lag oberhalb der Bestimmungsgrenze auf der Ion Pac AS 1 (siehe Tab. 5-19).

• 1. und 2. Kristallinat/ Herstellung C

Tab. 5-20: Gehalte von organischen Säuren im 1. und 2. Kristallinat der Herstellung C

organische Säuren	1. Kristallinat/ C			2. Kristallinat/ C		
	AS 1	AS 11	enzymatisch	AS 1	AS 11	enzymatisch
	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]
Brenztraubens.	-	-	< 2,0**	-	-	< 1,0**
Zitronensäure	-	< 0,009*	< 0,5**	-	< 0,009*	< 0,4**
L-Äpfelsäure	-	-	1,7 ± 0,4	-	-	1,8 ± 0,1
Bernsteinsäure	< 0,66*	-	0,83 ± 0,38	< 0,66*	-	-
L-Milchsäure	< 0,18*	-	2,3 ± 0,2	< 0,18*	-	< 1,9**

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag außerhalb des Arbeitsbereiches.

Im 1. und 2. Kristallinat der Herstellung C konnten durch den Einsatz der Ion Pac AS1 keine organischen Säuren mehr nachgewiesen werden (siehe Tab. 5-20). Der Nachweis von Brenztrauben-, Zitronen- und L-Äpfelsäure war durch den negativen Galactose-Peak im HPICE-Chromatogramm gestört (siehe Abb. 5-19). Bei der HPIC mittels AS 4SC und AS 4 als stationäre Phase wurde im 1. Kristallinat ein Peak beobachtet, der hinsichtlich der Retentionszeit L-Äpfelsäure und/oder Bernsteinsäure zugeordnet werden konnte. Im 2. Kristallinat wurde dieser Peak nicht beobachtet (siehe Bemerkung am Ende)..

• Galactose/ Herstellung D

Tab. 5-21: Gehalte von organischen Säuren in der Galactose der Herstellung D

Galactose/ D	AS 1	AS 4ASC+ AS 4	enzymatisch
	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]
Brenztraubensäure	-	-	< 1,0**
Zitronensäure	-	< 0,15**	< 0,5**
L-Äpfelsäure	-	+	3,0 ± 0,1
Bernsteinsäure	4,6 ± 0,2	+	4,3 ± 0,1
L-Milchsäure	BG = 1,0	-	2,1 ± 0,2

** Der Gehalt lag unterhalb der Bestimmungsgrenze (siehe Anhang I) bzw. außerhalb des Arbeitsbereiches.

Im Endprodukt der Herstellung D konnte mittels HPICE-Verfahren nur noch Bernsteinsäure nachgewiesen werden, die sich mit L-Milchsäure überlagerte. Der Nachweis von Brenztrauben-, Zitronen- und L-Äpfelsäure war durch den negativen Galactose-Peak im HPICE-Chromatogramm der Ion Pac AS 1 gestört (siehe Abb. 5-19).

• *Galactose/ Herstellung E und F*

Tab. 5-22: Gehalte von organischen Säuren in den Galactosen der Herstellung E und F

organische Säuren	Galactose/ E		Galactose/ F	
	AS 1	enzymatisch	AS 1	enzymatisch
	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]	[mg/100g]
Brenztraubensäure	-	< 1,0**	-	< 1,0**
L-Äpfelsäure	-	1,8 ± 0,1	-	2,2 ± 0,1
Bernsteinsäure	< 0,64*	-	< 0,63*	-
L-Milchsäure	< 0,20*	2,6 ± 0,4	< 0,20*	2,0 ± 0,1

* < Nachweisgrenze (siehe Anhang I)

** Der Gehalt lag außerhalb des Arbeitsbereiches.

Durch den Einsatz der Ion Pac AS1 konnten in den Endprodukten der Hersteller E und F keine organischen Säuren nachgewiesen werden. Der Nachweis von Brenztrauben- und L-Äpfelsäure war hierbei durch den negativen Galactose-Peak im HPICE-Chromatogramm gestört (siehe Abb. 5-19 und Bemerkung).

Bemerkung:

In folgenden Proben wurde mit dem Ionenaustauschverfahren, das die AS4SC und AS4 als stationäre Phasen verwendete, kein Peak beobachtet, der hinsichtlich seiner Retentionszeit der L-Äpfelsäure und/oder Bernsteinsäure zugeordnet werden konnte: 2. Kris/B und C, Gal E und F. Zudem wurde in diesen Proben enzymatisch keine Bernsteinsäure nachgewiesen (siehe Tab. 5-17, -20, -22). Somit wäre der L-Äpfelsäure-Gehalt nach dem HPIC-Verfahren für diese Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 0,08 mg/ 100 g anzugeben. Dies steht im Widerspruch zu den jeweilig ermittelten Werten aus der enzymatischen Analyse, die viel höher lagen. Die dabei parallel durchgeführte Bestimmung der Wiederfindung zeigte keine Auffälligkeiten. Jedoch wurde die kleinste geforderte Extinktionsdifferenz von 0,100 unterschritten, so dass möglicherweise kein ausreichend präzises Ergebnis erzielt wurde und für diese Proben als überhöht einzustufen ist. Diese Beobachtung wurde nicht nur bei anderen Proben, sondern auch bei anderen enzymatischen Bestimmungsmethoden gemacht (siehe Anhang I), so dass diese Gehaltsangaben für eine umfassende Beurteilung mit anderen Analysenmethoden abzusichern wären.

Unstimmigkeiten, die bei den Gehaltsangaben für L-Milchsäure im 1. Kris/C und in den Gal E und F auftraten (siehe Tab. 5-20, -22), könnten möglicherweise ebenso begründet werden (siehe Anhang I). Aufgrund der fehlenden bzw. niedrigen Bernsteinsäure-Werte aus dem enzymatischen Verfahren und dem fehlenden Peak beim HPICE-Verfahren, der hinsichtlich seiner Retentionszeit der Bernsteinsäure und /oder L-Milchsäure zugeordnet werden würde, waren die überhöhten L-Milchsäure-Gehalte aus der enzymatischen Analyse gegenüber der Nachweisgrenze für L-Milchsäure beim HPICE-Verfahren für diese Proben auffällig.

5.3 Kationen und Anionen

Die Bestimmung von Kationen und Anionen in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactose-Hersteller beschränkte sich auf die wesentlichen Elemente wie Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Chlorid, Sulfat, Nitrat und Phosphat. Diese gehen aus Hilfsstoffen, die bei der Galactose-Herstellung eingesetzt werden, hervor (siehe Abschnitt 2 und 3).

Die Methoden der Flammenphotometrie und Atomabsorptionsspektrometrie wurden aufgrund ihrer Spezifität für Alkali- und Erdalkalimetalle gewählt, so dass eine Trennung der verschiedenen Elemente vor der Analyse nicht erforderlich war. Der Natrium- und Kaliumgehalt wurde nach Auflösung bzw. nach Verdünnung im geeigneten Medium durch externe Kalibrierung flammenphotometrisch bestimmt. Die Bestimmung von Calcium und Magnesium erfolgte bei den festen Proben aus dem Glührückstand und bei den flüssigen Proben nach Verdünnung. Für die Quantifizierung von Calcium und Magnesium in den festen Proben wurde eine externe Kalibrierung durchgeführt. Zur Eliminierung von Matrixstöreinflüssen in den Mutterlaugen wurde dagegen nach der Standardadditions-Methode gearbeitet (siehe Punkt 4.2.11 und 4.2.12).

Zur Bestimmung der Anionen Chlorid, Sulfat, Nitrat und Phosphat wurde die Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion angewendet. Dadurch waren zeitaufwendige Probenaufarbeitungen überflüssig. Weiterhin konnte die Nachweisempfindlichkeit der Leitfähigkeitsdetektion durch den Einsatz eines Suppressors wesentlich verbessert werden (siehe Anhang II). Die genannten Anionen wurden neben einigen relevanten Dicarbonsäuren durch Kopplung zweier analytischer Trennsäulen und einem $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Eluenten chromatographisch getrennt (siehe Punkt 4.2.1.2.6 und 5.2.4). Da der Phosphat-Peak ein starkes Tailing aufwies und dadurch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für dieses Ion unzureichend war (siehe Punkt 5.3.2 und Anhang II), wurde Phosphat in einem weiteren ionenchromatographischen Verfahren neben Tricarbonsäuren bestimmt (siehe Punkt 4.2.1.2.5 und 5.2.5). Die Werte beider Verfahren wurden miteinander verglichen (siehe Punkt 5.3.2).

Die Gehalte der Anionen Chlorid, Nitrat, Sulfat und der Kationen in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactosehersteller sind im Anhang II tabellarisch zusammengefaßt.

5.3.1 Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab.5-26).

Bei einem Vergleich der Mutterlaugen 1 der Hersteller A und C wurden deutliche Unterschiede in der Verteilung der Kationen, vor allem von Natrium und Kalium, festgestellt (siehe Abb. 5-33 a, b und 5-34 a, b). In der Mutterlauge 1/A dominierte Kalium mit einem Gehalt von 3,84 g/100 g. Die Mutterlauge 1 der Herstellung C hingegen enthielt nur 0,11 g/100 g. Der umgekehrte Effekt war bei der Betrachtung der Natrium-Ionen zu verzeichnen. Die Mutterlauge 1/C enthielt 0,95 g/100 g. In der Mutterlauge 1/A wurden nur 0,06 g Natrium in 100 g bestimmt.

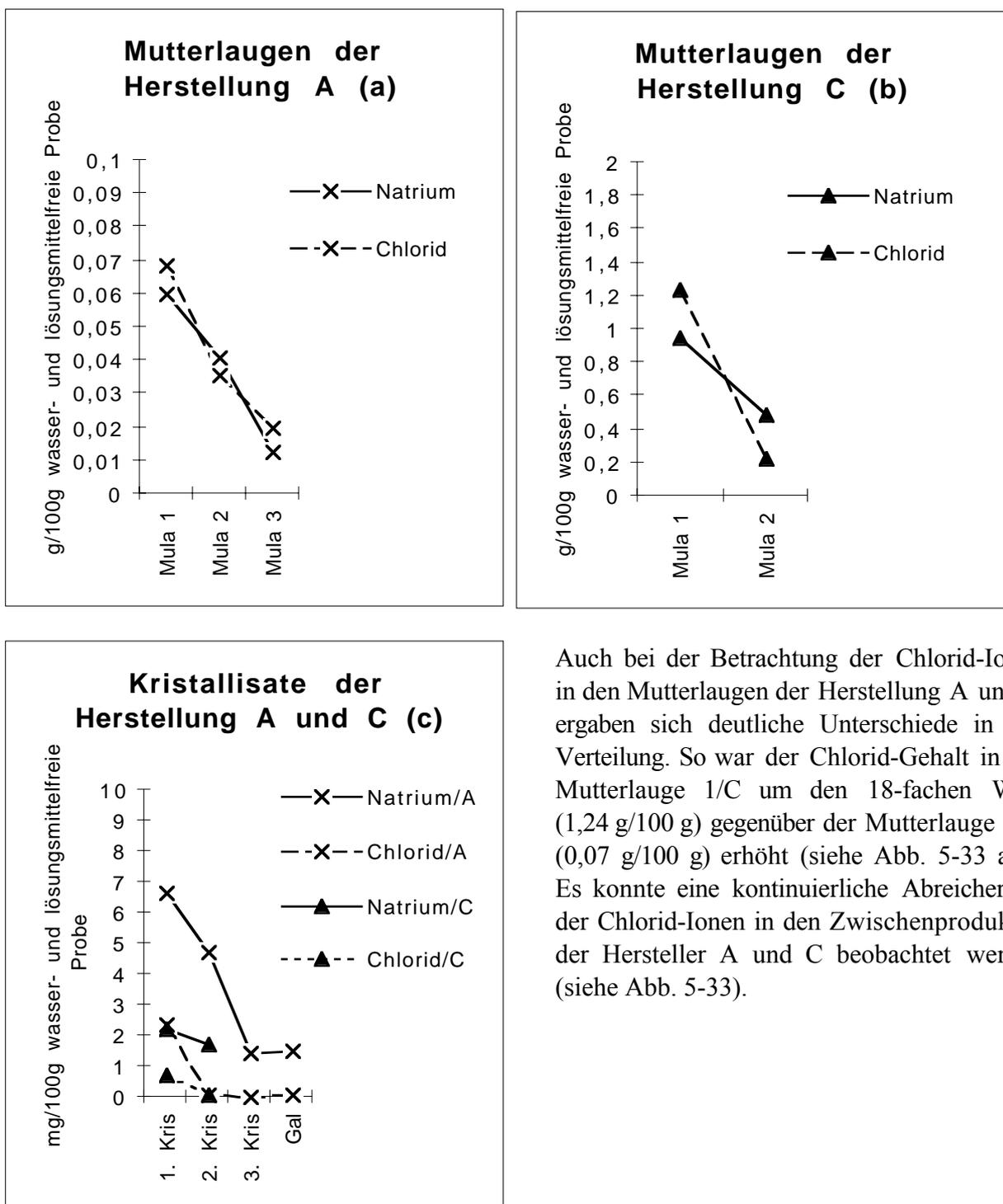


Abb. 5-33: Natrium- und Chlorid-Ionen in den a) Mutterlaugen der Herstellung A, b) Mutterlaugen der Herstellung C und c) Kristallisaten der Herstellung A und C

Auch bei der Betrachtung der Chlorid-Ionen in den Mutterlaugen der Herstellung A und C ergaben sich deutliche Unterschiede in der Verteilung. So war der Chlorid-Gehalt in der Mutterlauge 1/C um den 18-fachen Wert (1,24 g/100 g) gegenüber der Mutterlauge 1/A (0,07 g/100 g) erhöht (siehe Abb. 5-33 a,b). Es konnte eine kontinuierliche Abreicherung der Chlorid-Ionen in den Zwischenprodukten der Hersteller A und C beobachtet werden (siehe Abb. 5-33).

In allen Zwischenprodukten der Hersteller A und C, sowohl in den Kristallisaten als auch in deren Überständen, war eine Abreicherung der Natrium- und Kalium-Ionen erkennbar (siehe Abb. 5-33 und 5-34). Jedoch wurde bei der Galactose/A eine geringfügige Erhöhung der Natrium- und Kalium-Ionen gegenüber dem 3. Kristallisat beobachtet (siehe Abb. 5-33 c). Der gleiche Effekt trat auch bei den Kristallisaten der Herstellung C bei den Kalium-Ionen auf (siehe Abb. 5-34 d).

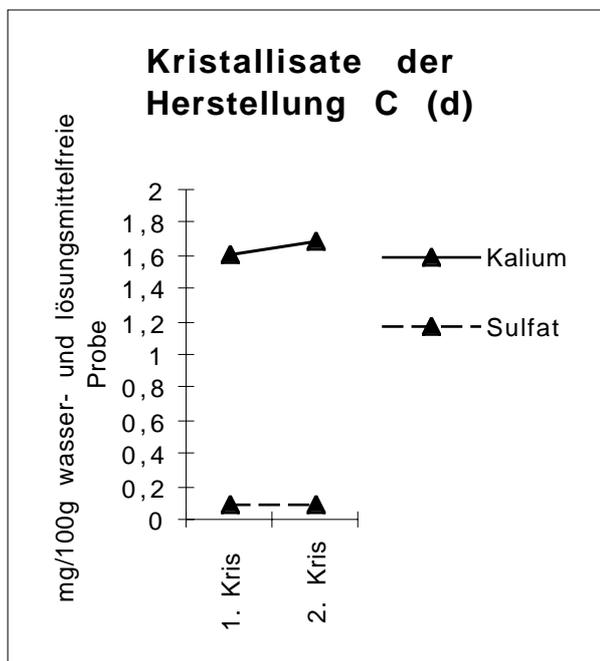
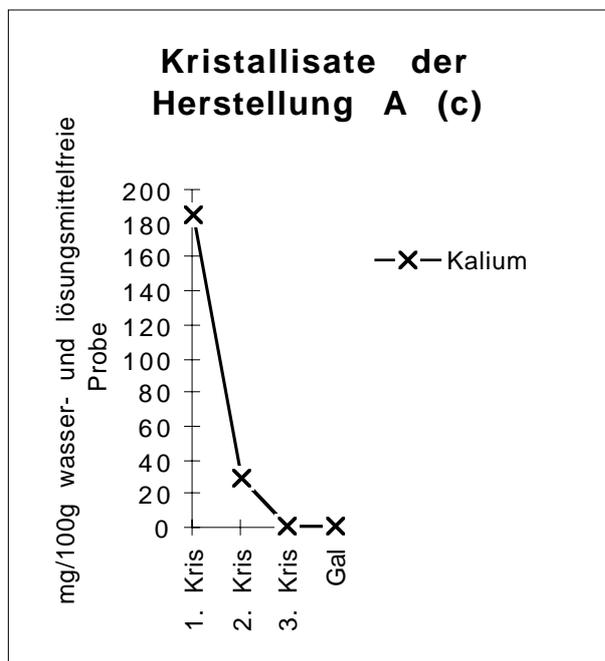
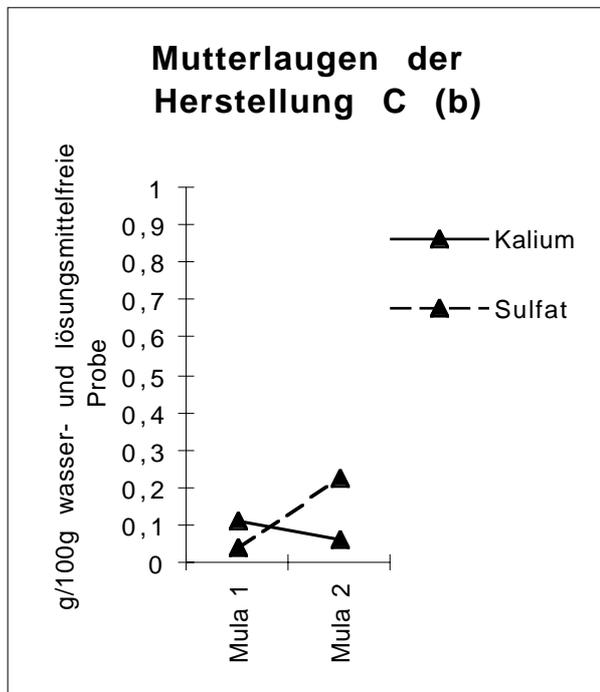
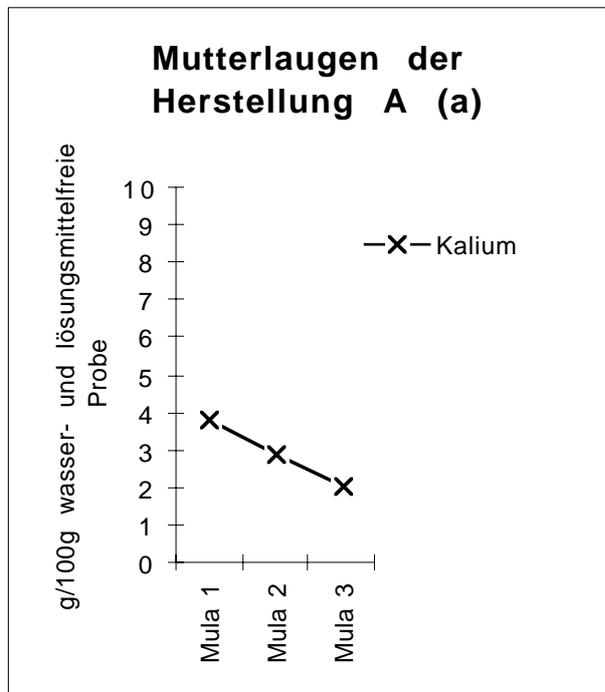


Abb. 5-34: Kalium-Ionen in den a) Mutterlaugen der Herstellung A, c) Kristallisaten der Herstellung A; Kalium- und Sulfat-Ionen in den b) Mutterlaugen der Herstellung C, d) Kristallisaten der Herstellung C (Sulfat-Ionen in den Zwischenprodukten der Herstellung A siehe Abb. 5-35)

Im Gegensatz zu den Kalium-, Natrium- und Chlorid-Ionen-Verläufen innerhalb der Zwischenprodukte der Herstellung A und C, wurden die Sulfat-Ionen in den Kristallisationsüberständen akkumuliert (siehe Abb. 5-34 b und 5-35 a). Dabei erhöhte sich der Sulfat-Gehalt in den Mutterlaugen/C viel stärker (um das 5-fache) als in den Mutterlaugen/A (< 2-fache). In den entsprechenden Kristallisaten der Herstellung A wurde jedoch eine kontinuierliche Abreicherung festgestellt (siehe Abb. 5-35 b). Im 3. Kris/A, Gal/A und dem 2. Kris/C lag der Sulfat-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,10 mg/100 g wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Abb. 5-34 d und 5-35 b).

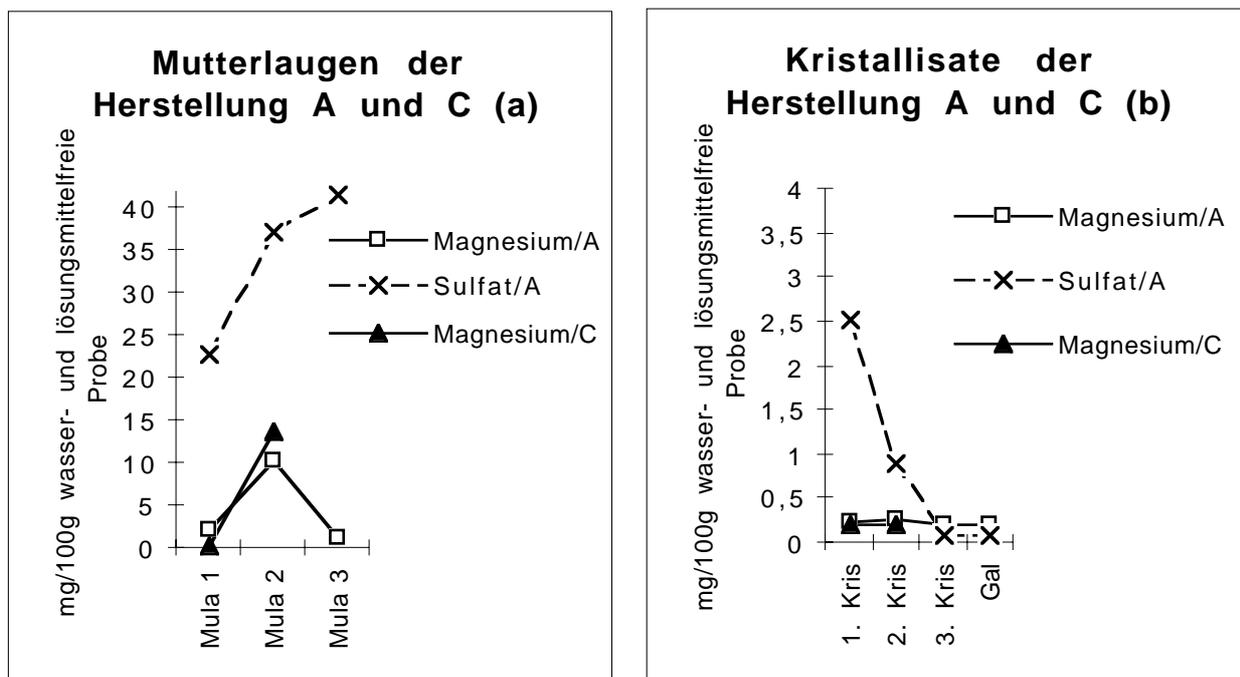
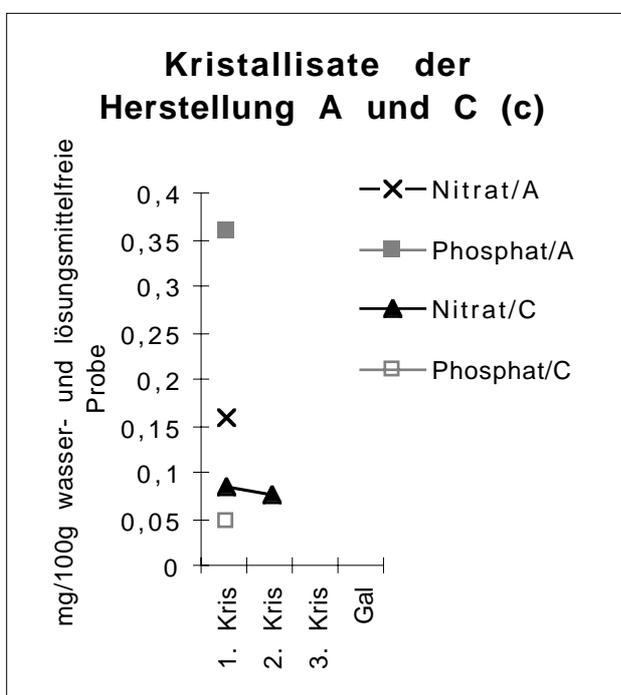
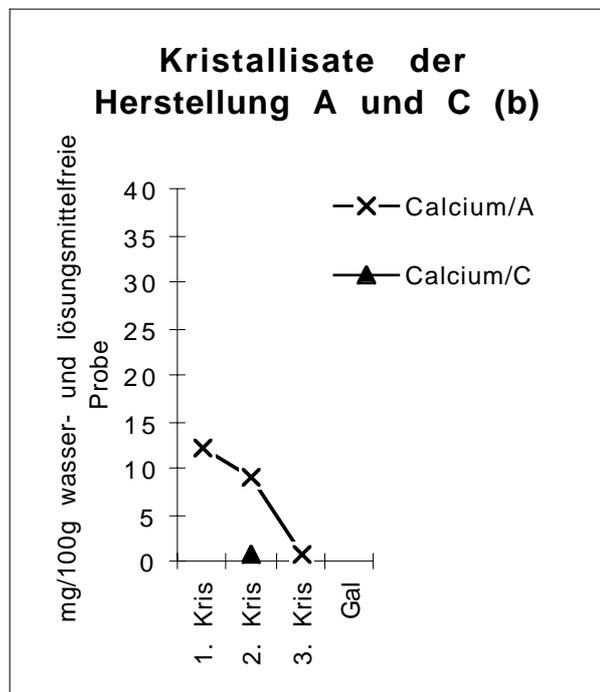
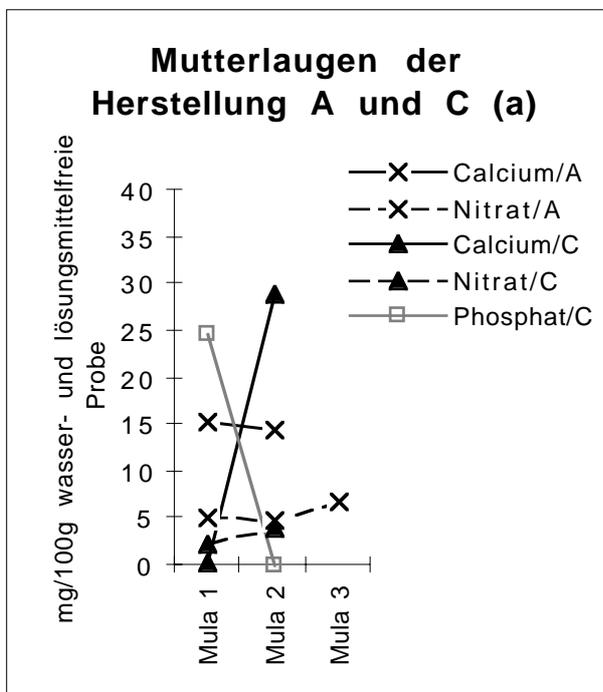


Abb. 5-35: Magnesium- und Sulfat-Ionen in den a) Mutterlaugen der Herstellung A und C, b) Kristallisaten der Herstellung A und C

Da die Magnesium- und Calcium-Werte der Zwischenprodukte deutlich niedriger als die der Natrium- und Kalium-Ionen waren, wurden diese im mg-Bereich angegeben. Der Calcium-Gehalt in der Mutterlauge 1/A (15,5 mg/100 g) war höher als der Magnesium-Gehalt (2,0 mg/100 g) (siehe Abb. 5-35 a und 5-36 a). Im Vergleich zur Mutterlauge 1/A wurden in der Mutterlauge 1/C um das 56-fache niedrigere Calcium-Werte (0,28 mg/100 g) und um das 13-fache geringere Magnesium-Werte (0,16 mg/100 g) bestimmt (siehe Abb. 5-35 a und 5-36 a).

Weiterhin unterschieden sich die Verläufe der beiden Ionen während des Galactose-Herstellungsprozesses bei den Herstellungen A und C. Während bei der Herstellung C die Magnesium- und Calcium-Ionen ähnlich der Sulfat-Ionen in den Überständen akkumuliert und in den entsprechenden Kristallisaten gleichbleibend gering nachweisbar waren, wurde bei der Herstellung A eine kontinuierliche Abreicherung der Calcium-Ionen, sowohl in den Überständen als auch in den Kristallisaten beobachtet (siehe Abb. 5-35 und 5-36 a, b). Die Magnesium-Ionen wurden jedoch zunächst im folgenden Verfahrensschritt in der Mutterlauge und dem Kristallisat angehäuft und erst im weiteren Herstellungsprozess abgereichert (siehe Abb. 5-35).

Der Magnesium-Gehalt von Gal/A, dem 3. Kris/A und 2. Kris/C und der Calcium-Gehalt vom 3. Kris/A und 2. Kris/C lag unter dem 1. Kalibrierpunkt (Magnesium: 0,1 mg/l; Calcium: 0,4 mg/l). Es ergab sich somit für diese Proben ein Magnesium-Gehalt von kleiner als 0,20 mg/100 g und ein Calcium-Gehalt von weniger als 0,80 mg/100 g.



Der Nitrat-Gehalt lag in der Mutterlauge 1 der Herstellung A (5,14 mg/100 g) etwas höher als bei der Herstellung C (2,23 mg/100 g) (siehe Abb. 5-36 a).

Bei beiden Herstellern stieg die Nitrat-Menge in den Kristallisationsüberständen leicht an. Dagegen wurde in den jeweiligen Kristallisaten eine abnehmende Tendenz beobachtet (siehe Abb. 5-36 a und c). Im 2. Kristallisat/A konnte kein Nitrat mehr nachgewiesen werden.

Im 2. Kris/C lag der Nitrat-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,08 mg/100 g.

Abb. 5-36: Calcium-, Nitrat- und Phosphat-Ionen in den a) Mutterlaugen der Herstellung A und C; b) Calcium-Ionen in den Kristallisaten der Herstellung A und C; c) Nitrat- und Phosphat-Ionen in den Kristallisaten der Herstellung A und C

Phosphat-Ionen wurden nur in den Mutterlaugen der Herstellung C nachgewiesen (siehe Abb. 5-36 a), wobei die Menge im Laufe der Herstellung sank. Im 1. Kristallinat der Herstellung C lag der Phosphat-Gehalt bereits unter der Bestimmungsgrenze von 0,05 mg/100 g. Innerhalb der Zwischenprodukte der Herstellung A konnte Phosphat nur im 1. Kristallinat mit einem Gehalt von 0,36 mg/100 g bestimmt werden (siehe Abb. 5-36 c). Bei den Mutterlaugen wurde der Nachweis dieses Ions durch die Matrix gestört, so dass nur eine geringe Probenmenge eingesetzt werden konnte. Daher sind Phosphat-Ionen in den Kristallisationsüberständen nicht auszuschließen.

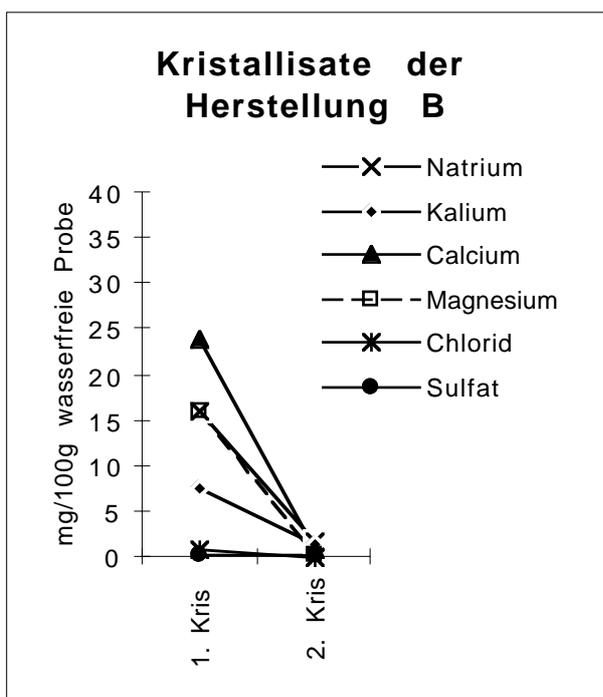


Abb. 5-37: Kationen und Anionen in den Kristallinaten der Herstellung B

Desweiteren wurde im 1. Kristallinat/B ein Phosphat-Gehalt von 81,4 mg/100 g bestimmt, der sich im 2. Kristallinat auf 1,30 mg/100 g reduzierte (graphisch nicht dargestellt).

In allen Endprodukten wurden die Kationen Magnesium, Calcium, Natrium und Kalium quantitativ bestimmt (siehe Abb. 5-38). In der Galactose der Herstellung A war jedoch kein Calcium mehr nachweisbar. Der Magnesium-Gehalt von Gal/A, dem 2. Kris/C und Gal/E und der Calcium-Gehalt vom 2. Kris/C, der Gal/E und Gal/F lag unter dem 1. Kalibrierpunkt (Magnesium: 0,1 mg/l; Calcium: 0,4 mg/l). Es ergab sich somit für diese Proben ein Magnesium-Gehalt von kleiner als 0,20 mg/100 g und ein Calcium-Gehalt von weniger als 0,80 mg/100 g. Im 2. Kristallinat/B wurden 0,84 mg Calcium und 0,40 mg Magnesium in 100 g bestimmt. Durch entsprechende Aufreinigungsschritte wurde in allen Endprodukten ein Natrium- und Kalium-Gehalt erreicht, der zwischen 1,40 und 1,80 mg/100 g lag.

Bei allen untersuchten Kationen und Anionen wurde in den Zwischenprodukten der Herstellung B eine Abreicherung beobachtet (siehe Abb. 5-37). Im 1. Kristallinat lagen ähnliche Natrium-Kalium-Verhältnisse wie bei der Herstellung C vor. Es wurden 16,2 mg/100 g Natrium und 7,7 mg/100 g Kalium bestimmt.

Im Vergleich zu den Herstellungen A und C war auch bei dieser Herstellung der Calcium-Gehalt (24,1 mg/100 g) höher als der Magnesium-Gehalt (16,0 mg/100 g).

Eine Besonderheit gegenüber den Herstellern A und C war der höhere Wert von Calcium gegenüber Natrium und Kalium und der relativ hohe Magnesium-Gehalt, der mit dem der Natrium fast identisch war.

Kationen in den Galactose-Endprodukten

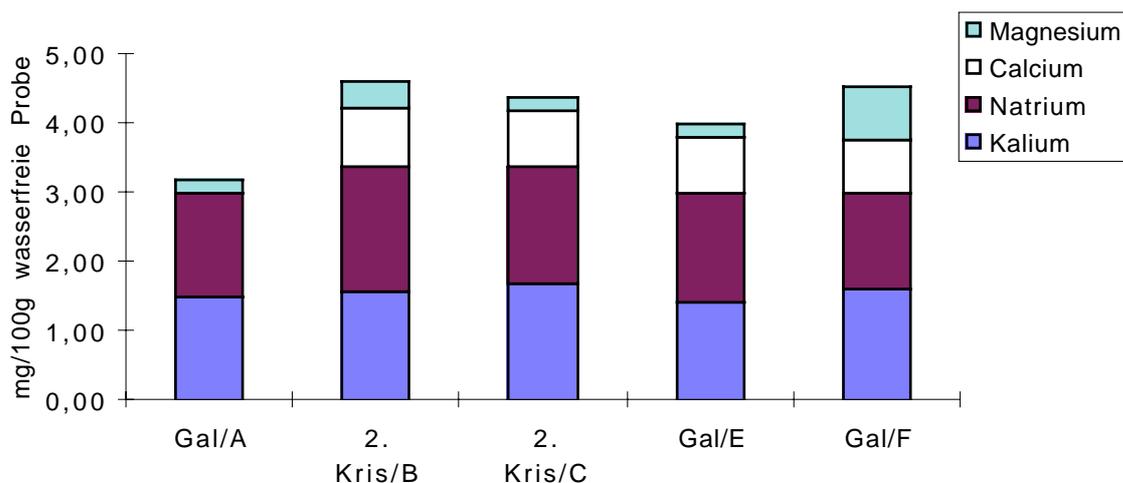


Abb. 5-38: Kationen in den Galactose-Endprodukten

Anionen in den Galactose-Endprodukten

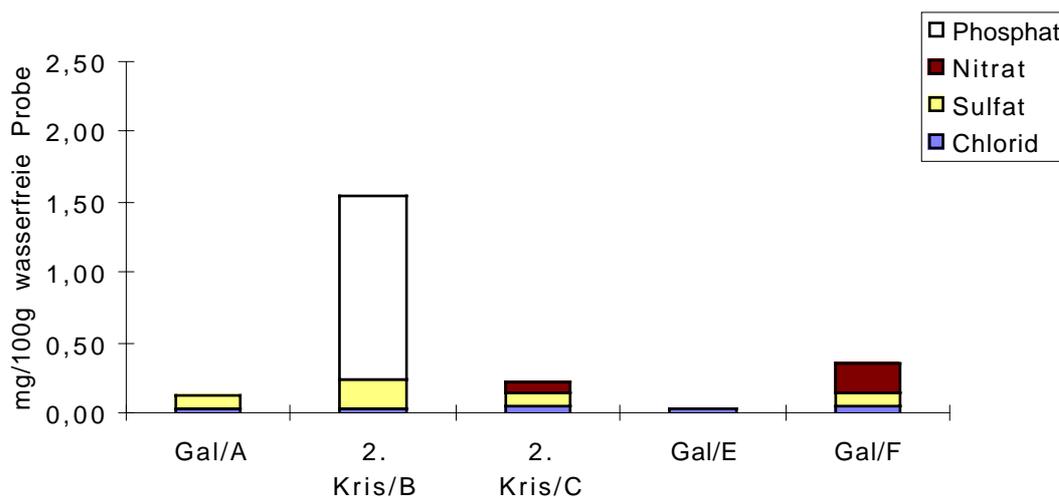


Abb. 5-39: Anionen in den Galactose-Endprodukten

In allen Endprodukten wurde Chlorid nachgewiesen (siehe Abb. 5-39), wobei die Gehalte zwischen 0,04 und 0,06 mg/100 g lagen. Ein etwas höherer Sulfat-Gehalt von 0,21 mg/100 g wurde im 2. Kristalliat/B bestimmt. In den anderen Proben, mit Ausnahme der Galactose/E, in der kein Sulfat nachweisbar war, lag der Sulfat-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,10 mg/100 g. Nitrat-Ionen konnten nur im 2. Kristalliat/C und in der Galactose/F bestimmt werden. Während der Nitrat-Gehalt im 2. Kristalliat/C unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,08 mg/100 g lag, betrug er in der Galactose/F 0,21 mg/100 g. Nur im 2. Kristalliat/B wurde freies Phosphat (1,30 mg/100 g) nachgewiesen.

Aufgrund der unzureichend vorliegenden Probenmenge von Galactose der Herstellung D wurde auf die Bestimmung der Kationen verzichtet. Jedoch wurde ein Chlorid-Gehalt von 5,26 mg/ 100 g bestimmt, der deutlich höher als in allen anderen vorliegenden Endprodukten war. Durch den geringeren Probeneinsatz wurde ein Sulfat-Gehalt von weniger als 0,45 mg/100 g berechnet, der unter der Bestimmungsgrenze lag. Neben dem 2. Kristallisat/B wurden in diesem Endprodukt geringe Mengen freies Phosphat bestimmt (1,60 mg/100 g).

5.3.2 Bestimmung von Phosphat mittels Ionenaustauschchromatographie

Freies Phosphat wurde in den Zwischenprodukten der Hersteller A, B und C und in den Endprodukten der Hersteller B und D nachgewiesen (siehe Tab. 5-23). Beim 1. Kristallisat/C lag der Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,05 mg/100 g der wasser- und lösungsmittelfreien Probe. Die Ergebnisse der Phosphatbestimmung wurden im Zusammenhang mit anderen Anionen unter Punkt 5.3.1 diskutiert.

Trotz der unter Punkt 5.3 beschriebenen Probleme bei der ionenchromatographischen Phosphat-Bestimmung mit Hilfe der Ion Pac AG 4A-SC Guard + Ion Pac AS 4A-SC Analytical + Ion Pac AS 4 Analytical (Fa. Dionex) zeigten die Ergebnisse der beiden angewendet ionenchromatographischen Verfahren eine gute Übereinstimmung. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit der ionenchromatographischen Methode mit der Ion Pac AS 11 (Fa. Dionex) als stationäre Phase, wurden geringe Mengen Phosphat zusätzlich in der Mutterlauge 2/C, im 2. Kristallisat/B, 1. Kristallisat/C und in der Galactose/D nachgewiesen (siehe Tab. 5-23).

Tab. 5-23: Phosphat-Gehalt, ermittelt durch Ionenaustauschchromatographie (Ion Pac AG 4A-SC Guard + Ion Pac AS 4A-SC Analytical + Ion Pac AS 4 Analytical (Fa. Dionex) und Ion Pac AS 11 (Fa. Dionex))

Probe	Phosphat			
	Ion Pac AG4A-SC Guard + Ion Pac AS4A-SC Analytical + Ion Pac AS4 Analytical (Fa. Dionex)		Ion Pac AS11 (Fa. Dionex)	
	[mg/100g*]	VK [%]	[mg/100g*]	VK [%]
1. Kris/A	< 2,19**		0,36 ± 0,02	6,8
1. Kris/B	88,4 ± 3,5	3,9	81,4 ± 3,4	4,2
2. Kris/B	n.n.		1,30 ± 0,01	0,4
Mula 1/C	23,5 ± 0,7	3,0	24,7 ± 0,3	1,4
Mula 2/C	n.n.		0,13 ± 0,01	1,1
1. Kris/C	n.n.		< 0,05**	
Gal/D	n.n.		1,60 ± 0,01	0,7

* Alle Angaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

** < Bestimmungsgrenze (siehe Anhang II).

n. n.- nicht nachweisbar

5.4 Proteine und Aminosäuren

• *Proteine*

Die ersten Mutterlaugen der Herstellung A und C wurden hinsichtlich ihrer Proteinbestandteile mit Hilfe des Gelsystems nach Laemmli analysiert (siehe Punkt 4.2.8). Um eine Anreicherung des Proteins bzw. eine ausreichende Beladung des Geles zu erzielen, wurden die Mutterlaugen mittels niedrig adsorbierender, hydrophiler Membranfilter mit einer Durchlässigkeit für Verbindungen bis 10 000 Dalton aufkonzentriert. Der Faktor lag bei 27 für die Mutterlauge 1/A und 13 für die Mutterlauge 1/C. Nach der Trennung wurde eine Silberfärbung aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber einer Coomassie-Färbung durchgeführt. Die Nachweisgrenze variierte zwischen 4 ng für Bovinserumalbumin und 60 ng pro Gelbande für β -Galactosidase. Es zeigte sich, dass im Trennbereich zwischen 66 000 und 116 000 Dalton kein Protein in beiden Mutterlaugen nachweisbar war. Wird die höhere Nachweisgrenze der beiden Vergleichsproteine zugrunde gelegt, so sind in der Mutterlauge 1/A weniger als 11 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (bzw. 73 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ wasser- und lösungsmittelfreie Probe) und in der Mutterlauge 1/C weniger als 24 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (bzw. 59 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ wasser- und lösungsmittelfreie Probe) Protein, bezogen auf β -Galactosidase, enthalten.

Bei längerer Silberfärbung des 15%igen Geles waren an der Startlinie zum Trenngel bei beiden Proben, jedoch bei der Mutterlauge 1 der Herstellung C etwas stärker, eine Bande zu erkennen. Um festzustellen, ob es sich um ein höhermolekulares Protein handelt, wurde eine Elektrophorese in einem 10%igen Gel durchgeführt. Jedoch wurde auch hierbei bei der Mutterlauge 1/C eine Bande an dieser Stelle beobachtet. Dies führte zur Annahme, dass es sich um eine oder mehrere Verbindungen mit reduzierenden Eigenschaften wie Saccharide handelt, die die Silber-Ionen zu Silber reduzieren, da bei der Aufkonzentrierung auch nach 24 stündiger Zentrifugation die Proben nicht vollständig filtriert waren.

Der Molekularbereich unter 3000 Dalton ist durch übliche Geltechniken nur schwer zu erfassen. Zudem sind Fällungs- und Konzentrierungsmethoden in diesem Bereich nicht verlässlich. Aus den Elektrophorese-Gelen nach Silberfärbung gab es jedoch in den nicht aufkonzentrierten Proben keinen Hinweis auf nennenswerte niedermolekulare Anteile, da sich zumindest in der Lauffront eine erhöhte Untergrundfärbung gezeigt hätte.

• *Aminosäuren*

Die Mutterlaugen der Herstellung A und C wurden auf das Vorkommen von Aminosäuren getestet. Da der Proteingehalt in den ersten Kristallisationsüberständen beider Hersteller vernachlässigbar gering war, wurde auf die Untersuchung von Aminosäuren nach einer Säurehydrolyse verzichtet und es wurden nur die freien Aminosäuren betrachtet. Dazu wurde in einer Voruntersuchung, der photometrischen Bestimmung mit Ninhydrin, allgemein die Aminostickstoff-Menge ermittelt. Dabei reagiert Ninhydrin im schwach sauren Milieu und unter Temperatureinwirkung mit allen aliphatischen α -Aminosäuren, die eine primär gebundene Aminogruppe enthalten, unter Bildung einer Schiff'schen Base zu einem rötlichen bis blauen Kondensationsprodukt, das bei 570 nm photometrisch gemessen wird. Aminosäuren wie Prolin

mit einer sekundär gebundenen Aminogruppe zeigen eine Gelbfärbung, deren Extinktion bei 440 nm liegt. Der Aminostickstoff in den jeweiligen Proben wurde über eine externe Kalibrierung mit Glycin und Prolin bestimmt (siehe Anhang III). Die Ergebnisse wurden in Tab. 5-24 aufgeführt.

Tab. 5-24: Aminostickstoff-Menge in den Mutterlaugen der Herstellung A und C, bezogen auf die jeweilige wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26)

Probe	Aminostickstoff [$\mu\text{mol}/100\text{g}$] 570 nm	Aminostickstoff [$\mu\text{mol}/100\text{g}$] 440 nm
Mutterlauge 1/A	19,6	118,9
Mutterlauge 2/A	21,0	89,5
Mutterlauge 3/A	3,3	< 3,3
Mutterlauge 1/C	$20,6 \pm 3,7$	$29,7 \pm 5,9$
Mutterlauge 2/C	5,0	35,2

Die quantitative Bestimmung von freien Aminosäuren in den ersten Kristallisationsüberständen der Herstellung A und C erfolgte durch eine automatische Aminosäure-Analyse. Durch langsames Ansteigen des pH-Wertes des Laufmittels werden hierbei die Aminosäuren entsprechend ihrer pKa-Werte nacheinander deprotoniert und somit von der Ionenaustauschersäule eluiert. Die Aminosäuren wurden wie bei der Voruntersuchung bei 440 nm und 570 nm nach Reaktion mit Ninhydrin detektiert.

Die Untersuchung zeigte freie Aminosäuren in der 1. Mutterlauge der Herstellung C, deren einzelne Gehalte in Tab. 5-25 aufgeführt sind. Danach wurden insgesamt 50,9 mg freie Aminosäuren in 100 g der wasser- und lösungsmittelfreien Probe bestimmt. Prolin, Alanin, Histidin, Arginin und Glutaminsäure waren dabei die Majoraminosäuren. Die Umrechnung ergab 24,3 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ Aminostickstoff von Aminosäuren mit primär gebundener Aminogruppe und 23,8 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ Aminostickstoff von der Aminosäure Prolin mit sekundär gebundener Aminogruppe. Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der photometrischen Aminostickstoff-Bestimmung unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

Tab. 5-25: Gehalt von Aminosäuren in der Mutterlauge 1 der Herstellung C, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26)

Prolin	22,6 mg/100g	Valin	1,16 mg/100g
Alanin	6,9 mg/100g	Glycin	1,06 mg/100g
Histidin	4,9 mg/100g	Threonin	0,94 mg/100g
Arginin	3,2 mg/100g	Asparaginsäure	0,84 mg/100g
Glutaminsäure	2,7 mg/100g	Leucin	0,84 mg/100g
Lysin	1,96 mg/100g	Tyrosin	0,72 mg/100g
Phenylalanin	1,44 mg/100g	Isoleucin	0,44 mg/100g
Serin	1,29 mg/100g		

In der 2. Mutterlauge der Herstellung C und in den Mutterlaugen der Herstellung A waren nur Spuren von Aminosäuren zu erkennen. In der 1. und 2. Mutterlauge der Herstellung A und C wurde am Anfang des Chromatogramms eine stärkere Absorption bei 440 nm beobachtet. Dieser Peak konnte keiner Aminosäure zugeordnet werden. Theoretisch könnte es sich um eine oder mehrere Verbindungen handeln, die eine sekundäre Aminogruppe besitzen und einen sauren Charakter haben. Die erhöhte Aminostickstoff-Menge der Mutterlauge 1/A, die bei 440 nm photometrisch ermittelt wurde, konnte durch das Vorkommen von Aminosäuren mit einer sekundär gebundenen Aminogruppe nicht geklärt werden.

5.5 Glycerin

Die qualitative Bestimmung und halbquantitative Abschätzung von Glycerin in den vorliegenden Proben erfolgte mit Hilfe der Vergleichssubstanz dünnschichtchromatographisch (siehe Punkt 4.2.4.; System I). Nach chromatographischer Entwicklung wurden die Platten in Blei(IV)-acetat-Dichlorfluorescein-Reagenzlösung getaucht und anschließend erwärmt. Die dabei ablaufende Reaktion basiert auf der oxidativen Spaltung vicinaler Diolgruppen durch Blei(IV)-acetat. Die gelbgrüne Fluoreszenz zeigte sich bei 366 nm in den Zonen, in denen das Blei(IV)-acetat für die Glycolspaltung verbraucht wurde. Dagegen reagierte unverbrauchtes Blei(IV)-acetat mit Dichlorfluorescein zu einem nicht fluoreszierenden Oxidationsprodukt. Nach Ansprühen mit dem Naphtoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz färbte sich die Glycerin-Bande je nach Konzentration von schwach gelb bis gelb. Mit einem R_f -Wert von 28 konnte Glycerin zwischen dem Di-/Monosaccharid- und Anhydrozucker-Bereich detektiert werden.

Total sulfonierte Kationenaustauscher werden nicht nur wie unter Punkt 5.2.2.1 beschrieben zur Trennung von organischen Säuren herangezogen. Sie eignen sich auch zur Analyse von ein- und mehrwertigen Alkoholen (Weiß 1991). Mit der Ion Pac AS1 (Fa. Dionex) und Wasser als Laufmittel gelang der chromatographische Nachweis von Glycerin in den Galactosen und den Zwischenprodukten der Galactoseherstellungen über die Messung der Brechungsindex-Änderung (siehe Punkt 4.2.1.4.1). Dabei wurde folgende Elutionsreihenfolge beobachtet: Lactose < Galactose < 1,6-Anhydrogalactopyr = Glycerinaldehyd < Glycerin < Ethanol. Der qualitative Nachweis von Glycerin erfolgte durch Übereinstimmung der Retentionszeiten des Signals in den Proben mit einer Vergleichssubstanz bzw. nach Zudotierung der Vergleichssubstanz zu den Proben. Quantitativ wurde Glycerin in den Proben durch externe Kalibrierung bestimmt (siehe Anhang IV). Die Ergebnisse der halbquantitativen Abschätzung aus der Dünnschichtchromatographie und der Hochleistungschromatographie korrelierten dabei miteinander.

5.5.1 Produktcharakterisierung einzelner Verfahrensschritte

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

Glycerin wurde in allen zur Verfügung stehenden Mutterlaugen der Herstellung A und C nachgewiesen (siehe Abb. 5-40 a). Bei der Herstellung A nahm der Gehalt in den dreistufigen

Kristallisationsüberständen von 27,5 g/ 100 g über 14,9 g/ 100 g auf 0,81 g/ 100 g ab. Der Glycerin-Gehalt der Mutterlauge 1/C lag mit 11,2 g/ 100 g im Vergleich zur Mutterlauge 1/A um das 2,5-fache niedriger und reichte sich im folgenden Verfahrensschritt auf 0,33 g/ 100 g ab.

Nur in den Kristallisaten der allerersten Kristallisationsstufen von den Herstellungen A, B und C konnte Glycerin quantitativ bestimmt werden (siehe Abb. 5-40 b). Die Glycerin-Werte von den Kristallisaten der Herstellung A und C waren wesentlich niedriger als in den jeweiligen Kristallisationsüberständen (siehe Anhang IV).

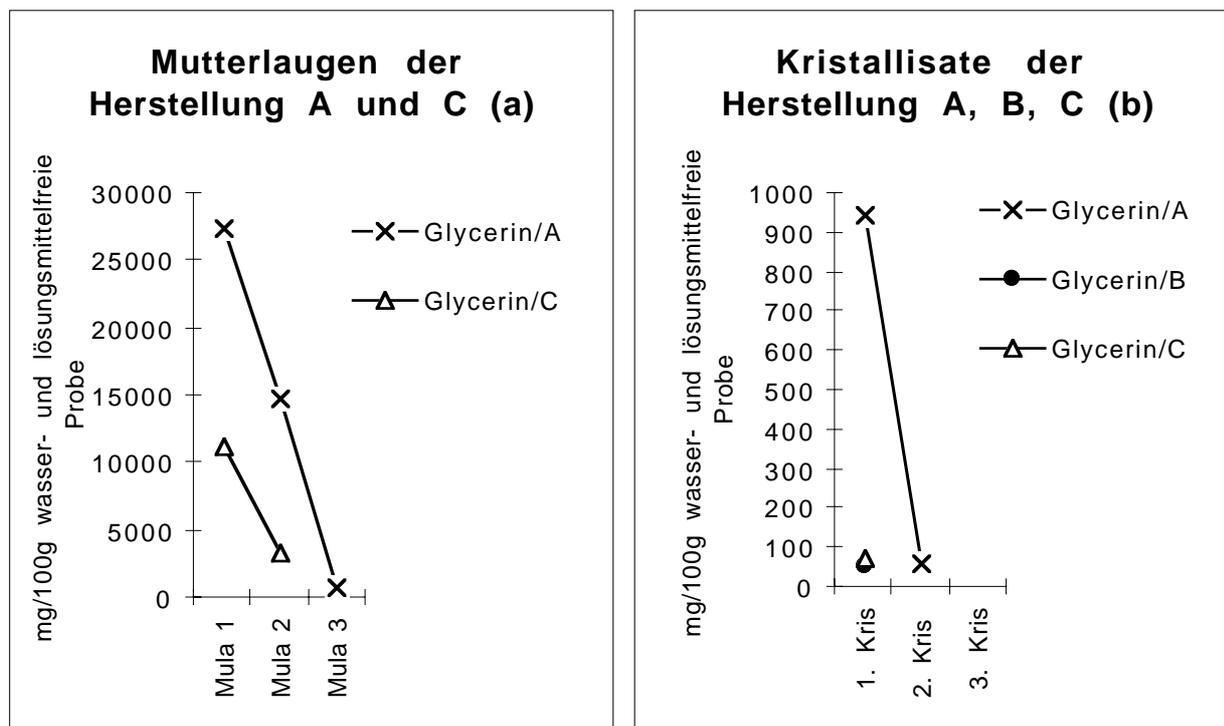


Abb. 5-40: Glycerin in den a) Mutterlaugen der Herstellung A und C; b) Kristallisaten der Herstellung A, B und C

Glycerin in den Galactose-Endprodukten

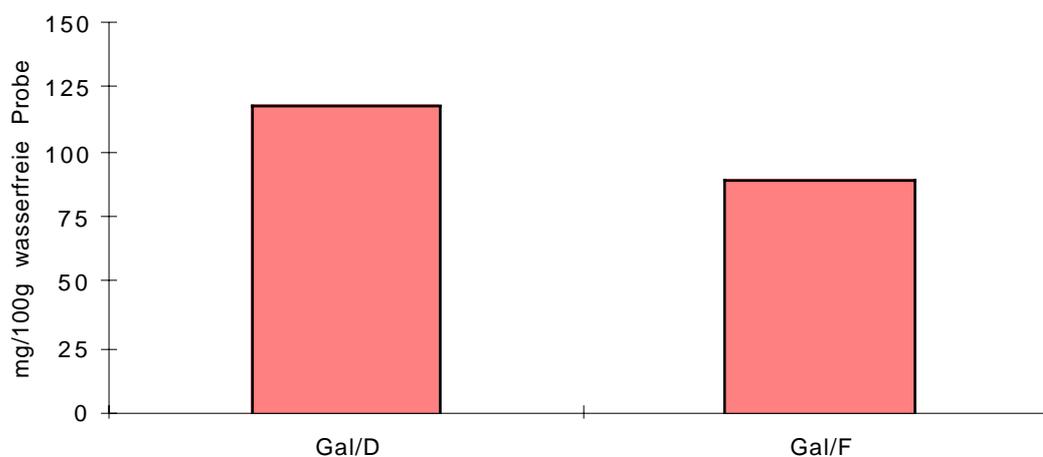


Abb. 5-41: Glycerin in den Galactose-Endprodukten

In den Endprodukten der Galactosehersteller D (118,3 mg/ 100 g) und F (89,0 mg/ 100 g) war Glycerin noch nachweisbar (siehe Abb. 5-41).

Alle Proben, in denen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der Ionenausschlußsäule Ion Pac AS 1 (Fa. Dionex) Glycerin bestimmt wurde, zeigten bei der Kationenaustauschersäule Sugar Pak I (Fa. Waters) ein Signal, das Glycerin zugeordnet werden konnte, sich aber mit Tagatose überlappte (siehe Punkt 5.1.5).

5.6 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)

Der Nachweis des Kohlenhydrat-Abbauproduktes HMF konnte bei der ionenchromatographischen Kohlenhydrat-Analytik mit Hilfe der Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) integriert werden (siehe Punkt 5.1.6). HMF wurde elektrochemisch zusammen mit anderen unbekanntem Verbindungen in den vorliegenden Proben am Anfang des Chromatogramms (RT = 9,2 min) detektiert. Der selektive Nachweis von HMF erfolgte deshalb im Absorptionsmaximum ($\lambda = 283 \text{ nm}$) durch einen entsprechenden in Reihe geschalteten UV-Detektors. Die quantitative Bestimmung wurde mit Hilfe einer externen Kalibrierung durchgeführt (siehe Anhang V).

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

Bei einem Vergleich der Zwischenprodukte der Herstellung A und C zeigten sich quantitative Unterschiede. Bei der Herstellung A wurden nur sehr geringe HMF-Werte in den Produkten der ersten Kristallisationsstufe nachgewiesen (0,09 mg/ 100 g in der Mutterlauge 1; 0,06 mg/ 100 g im 1. Kristallisat). Dagegen reicherte sich HMF bei der Herstellung C von 29,1 mg/ 100 g in der ersten Mutterlauge zur nächsten Verfahrensstufe auf 4,8 mg/ 100 g ab. In den entsprechenden Kristallisaten lag der HMF-Gehalt bei 0,05 mg/ 100 g bzw. 0,04 mg/ 100g.

HMF in den Galactose-Endprodukten

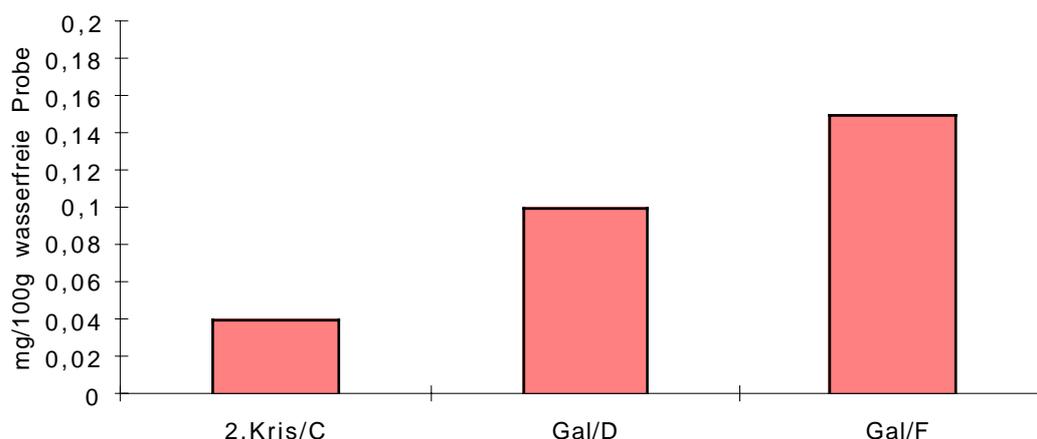


Abb. 5-42: HMF in den Galactose-Endprodukten

In weiteren Galactose-Endprodukten wurde HMF in der Galactose D (0,10 mg/ 100 g) und F (0,15 mg/ 100 g) nachgewiesen (siehe Abb. 5-42).

5.7 Ethanol und Wasser

Die Zwischenprodukte der Herstellung A waren durch ihren starken alkoholartigen Geruch sehr auffällig. Mit Hilfe der HPLC (Sugar Pak I, Fa. Waters) wurden die ersten qualitativen Hinweise auf Lösungsmittel wie Ethanol in allen vorliegenden Proben des Herstellers A und in der 2. Mutterlauge der Herstellung C geliefert (siehe Punkt 5.1.5). Die mittels Gaschromatographie gewonnenen quantitativen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5-26 aufgeführt (siehe Punkt 4.2.2.1). Daneben wurde der Gehalt von Wasser als weiteres Lösungsmittel bzw. Restlösungsmittel mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration bestimmt (siehe Punkt 4.2.7).

Tab. 5-26: Wasser- und Ethanol-Gehalt in den Zwischen- und Endprodukten

Probe/Hersteller	Ethanol-Gehalt [Gew.%]	Wasser-Gehalt [Gew.%]
Mutterlauge 1/A	51,9 ± 4,2	33,3 ± 2,6
Mutterlauge 2/A	56,2 ± 3,4	40,0 ± 1,1
Mutterlauge 3/A	84,8 ± 11,5	23,7 ± 1,4
1. Kristallisat/A	14,0 ± 0,4	4,92 ± 0,12
2. Kristallisat/A	23,2 ± 1,2	3,05 ± 0,03
3. Kristallisat/A	13,5 ± 0,6	1,21 ± 0,02
Galactose/A	-	0,41 ± 0,01
1. Kristallisat/B	-	0,34 ± 0,01
2. Kristallisat/B	-	0,28 ± 0,02
Mutterlauge 1/C	0,12 ± 0,01	59,5 ± 3,0
Mutterlauge 2/C	0,51 ± 0,02	96,5 ± 2,0
1. Kristallisat/C	0,012 ± 0,001	0,51 ± 0,01
2. Kristallisat/C	0,012 ± 0,001	0,56 ± 0,02
Galactose/D	*	*
Galactose/E	-	0,28 ± 0,02
Galactose/F	-	0,19 ± 0,01

* Aufgrund der geringen Probenmenge wurde auf die Ethanol- und Wasser-Bestimmung verzichtet. Im Vergleich zu den Endprodukten der anderen Hersteller wurden die entsprechenden Gehalte als vernachlässigbar gering eingeschätzt.

Bei einem Vergleich der Mutterlaugen der Herstellung A zeigte sich zunächst ein beinahe ausgewogenes Ethanol-Wasser-Verhältnis, wobei sich der Ethanol-Anteil zur dritten Kristallisationsstufe weiter erhöhte. In den Kristallisationsüberständen der Herstellung C wurde Ethanol in Spuren nachgewiesen. Es zeigte sich, dass in der Aufreinigungsstufe dieser Galactose-Herstellung überwiegend Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Der Restwasser-Gehalt in den vorliegenden Endprodukten lag bei $\leq 0,5$ Gew.%.

6 Analysengestützte Hinweise auf die Herstellung

6.1 Betrachtung der 1. Mutterlaugen aus den Galactose-Herstellungen C und A

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe (siehe Tab. 5-26).

Mutterlauge 1 der Herstellung C

Im Zwischenprodukt der Herstellung C, der Mutterlauge 1, wurde Lactose mit Hilfe der HPIC mit einem Gehalt von 4643 mg/100 g bestimmt. Lactose kann als Bestandteil von Molke und/oder in reiner Form als Ausgangsstoff für die Galactose-Herstellung eingesetzt werden.

Durch den Einsatz der HPIC wurde neben Galactose ein weiteres Monosaccharid, Glucose, identifiziert, das bei der Hydrolyse von Lactose zwangsläufig gebildet wird. Glucose ist somit als Zwischenprodukt ein wichtiger Hinweis dafür, dass das vorliegende Verfahren nicht über den Weg der Lactobionsäure aus Lactose mit anschließender Hydrolyse zur Galactose-Gewinnung geführt wurde (siehe Abb. 2-1).

Durch Anwendung eines HPIC-Verfahrens mit Hilfe der Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex) als stationäre Phase und eines im integrierenden Amperometrie-Modus arbeitenden elektrochemischen Detektors wurde mit einem optimierten Natronlauge-Gradienten eine Trennung der Inhaltsstoffe der Mutterlauge 1 erzielt, die in qualitativer Hinsicht eine große Übereinstimmung mit dem Ionenchromatogramm des Lactose-Säurehydrolysates zeigte.

In der Mutterlauge 1 konnten ionenchromatographisch Isomaltose (6-O- α -D-Glu-D-Glu) und Gentiobiose (6-O- β -D-Glu-D-Glu) qualitativ bestimmt werden. Diese Disaccharide werden unter säurekatalysierten Hydrolysebedingungen aus Lactose und Glucose gebildet (siehe Punkt 5.1.7.1 und 5.1.7.2). Da diese beiden Substanzen in der Mutterlauge 1 vorliegen, dienen die intermolekular gebildeten Reversionszucker Isomaltose und Gentiobiose als Indikatoren für den Einsatz von Säuren während des Galactose-Herstellungsprozesses.

Der ionenchromatographisch ermittelte Chlorid-Gehalt von 1240 mg/100 g der Probe war im Vergleich zu Sulfat (44,8 mg/100 g) und Nitrat (2,2 mg/100 g) deutlich erhöht. Er wird somit neben den Reversionszuckern als ein weiterer Hinweis auf den Einsatz von Säure, hier speziell Salzsäure, für die Lactosehydrolyse gewertet.

In der Mutterlauge 1 wurden dünnschichtchromatographisch 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und -gluco-pyranose identifiziert. Daneben wurde eine weitere, zur Zeit nicht bekannte Bande mit einem noch höheren Rf-Wert beobachtet, die möglicherweise einem weiteren Anhydrozucker zugeordnet werden kann (siehe Tab. 3-2). Die quantitative Bestimmung mittels eingesetzter Ionenchromatographie ergab 1899 mg/100 g 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und 1887 mg/100 g 1,6-Anhydro- β -D-gluco-pyranose. Beim trockenen Erhitzen entstehen aus Mono- und Disacchariden Anhydrozucker. Dabei wurde neben einer intramolekularen Kondensation im Sinne des SN₂-Mechanismus bei Disacchariden auch die heterolytische Glycosidspaltung unter Ausbildung eines intermediären noch nicht nachgewiesenen Carbonium-Ions diskutiert.

Unterschiedliche Mengen intramolekular gebildeter Reversionszucker werden auch durch Säureeinwirkung gebildet (siehe Punkt 3.2).

In der vorliegenden Mutterlauge 1 wurde ionenchromatographisch ein 5-Hydroxymethyl-2-furfural-Gehalt (HMF-) von 29,1 mg/100 g bestimmt. Zusätzlich konnte Levulinsäure (98,8 mg/100 g) nachgewiesen werden. HMF wird beim Erhitzen in schwachsaurem Medium aus Hexosen gebildet und wird als Indikator für erhitzte Zuckergemische angesehen. Die Entstehung von HMF kann aber auch durch den Ablauf der Maillard-Reaktion erklärt werden. Im sauren Milieu kann HMF weiter zu Ameisensäure und 4-Oxopentansäure (Levulinsäure) abgebaut werden (siehe Punkt 3.7).

Die Messung des pH-Wertes der vorliegenden Probe ergab 3,35. Der flammenphotometrisch ermittelte Natrium-Gehalt von 953,8 mg/100 g war im Vergleich zu Kalium (112,7 mg/100 g) deutlich höher. Das Natrium-Kalium-Verhältnis in Molke beträgt ca. 1 : 2-3. Somit entspricht das ermittelte Verhältnis von 1 : 0,12 in der vorliegenden Probe nicht dem zu erwartenden Verhältnis für Proben aus tierischen Bezugsquellen wie Molke. Da eine Säurehydrolyse im stark sauren Medium (pH=1) durchgeführt wird, könnte der erhöhte Natrium-Gehalt der Probe durch einen folgenden Neutralisierungsschritt mit Hilfe von Natronlauge erklärt werden.

In der vorliegenden Probe lag der Proteingehalt, berechnet als β -Galactosidase, unter 0,06 mg/100 g. Proteine können als Verunreinigung durch Verwendung von Hilfsstoffen wie Mikroorganismen, Enzyme oder Hefe in den Prozess eingebracht werden.

Für die Abtrennung der Glucose als Zwischenprodukt bei der Galactose-Herstellung stehen mehrere Verfahren zur Auswahl (siehe Abb. 2-2). Auf der einen Seite könnte Glucose durch den Einsatz eines Hefestammes vergoren oder durch ein mikrobielles bzw. biochemisches Verfahren zu Gluconsäure oxidiert werden, welche nachfolgend durch Kristallisation oder Chromatographie eliminiert wird. Somit könnten Proteine als Verunreinigung durch Hefezellen eingebracht werden, die ca. 50 % Protein in der Trockenmasse enthalten oder durch das Enzym Glucoseoxidase, meist gekoppelt mit Katalase, bzw. entsprechenden Mikroorganismen, die diese Enzyme enthalten. Daneben ist der Einsatz von proteinhaltiger Molke als Ausgangsstoff für die Galactose-Herstellung möglich, wobei der Proteingehalt von Molke lediglich bei ca. 1 Gew.% liegt.

Mittels automatischer Aminosäureanalyse wurden in der Mutterlauge 1 insgesamt 50,9 mg/100 g freie Aminosäuren nachgewiesen. Davon war Prolin (22,6 mg/100 g) mengenmäßig am stärksten und als einzige aus der Gruppe der Aminosäuren mit sekundär gebundener Aminogruppe vertreten. Aus der Gruppe der Aminosäuren mit primär gebundener Aminogruppe wurden Alanin (6,9 mg/100 g), Histidin (4,9 mg/100 g), Arginin (3,2 mg/100 g) und Glutaminsäure (2,7 mg/100 g) u. a. nachgewiesen. Durch Autolyse von Mikroorganismen oder Hefezellen können freigeordnete Proteasen beim Eiweißabbau beteiligt sein. Daneben werden Proteine durch Säureeinwirkung in ihre Bausteine zerlegt, die dann auch weiteren Reaktionen wie der Maillard-Reaktion zur Verfügung stehen. Ferner hat sich gezeigt, dass Glutaminsäure im Aminosäurestoffwechsel der Hefe als Aminogruppen-Überträger bei Transaminierungsreaktionen eine Schlüsselfunktion einnimmt. Hefe nimmt nicht nur Stickstoffverbindungen auf, sondern gibt im Verlauf der Gärung auch körpereigene Eiweißstoffe in Form von Aminosäuren und Peptiden ab.

In der Mutterlauge 1 wurde Glycerin dünnschichtchromatographisch identifiziert und mittels HPLC quantitativ bestimmt. Dabei wurden beträchtliche Mengen ermittelt (11,2 g/100 g). Glycerin ist ein wichtiges Gärungsnebenprodukt und entsteht bei Zusatz von Alkali (NaHCO_3 , Na_2HPO_4) zum Gäransatz, da Acetaldehyd zu Ethanol und Essigsäure dismutiert (3. NEUBERGSche Vergärungsform). Das Vorliegen von Essigsäure in der Probe (123 mg/100 g) könnte sich somit ebenfalls erklären. Kann Acetaldehyd seine Funktion als H-Acceptor nicht erfüllen, wird der bei der Triosephosphat-Dehydrogenierung anfallende Wasserstoff von NADH_2 auf Dihydroxyacetonphosphat übertragen. Nach Abspaltung von Phosphat liegt dann Glycerin vor (2. NEUBERGSche Vergärungsform) (Schlegel 1992). Die Bildung von Glycerin wird durch technologische Parameter wie der jeweils eingesetzte Hefestamm innerhalb der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, der Inoculatmenge, Belüftung, Temperaturführung, Zucker- und Sulfidgehalt des jeweiligen Nährsubstrates beeinflusst. Die Konzentration dieses Stoffes variiert beispielsweise in Wein zwischen einem und zehn Gramm pro Liter (Gardner, Rodrigue et al. 1993).

Neben Glycerin wurden 74,8 mg Glycerinsäure in 100 g der wasser- und lösungsmittelfreien Probe ermittelt. Während der Glycolyse findet eine enzymatische Gleichgewichtseinstellung zwischen dem gebildeten Dihydroxyacetonphosphat und dem D-Glycerinaldehyd-3-phosphat statt, da nachfolgende Reaktionen nur das Aldotriosephosphat verwerten können. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch Triosephosphat-Dehydrogenase zu 3-Phosphoglycerinsäure oxidiert, wobei die frei werdende Energie in Form einer energiereichen Phosphatbindung konserviert wird. Durch Phosphoglyceromutase wird 3-Phosphoglycerinsäure in 2-Phosphoglycerinsäure umgewandelt. Möglicherweise kann durch Abspaltung der jeweiligen Phosphatgruppe Glycerinsäure gebildet werden.

Brenztraubensäure wurde sowohl enzymatisch (20,0 mg/100 g) als auch mittels RP-HPLC (23,3 mg/100 g) quantitativ bestimmt. Bei der Vergärung wird Glucose zunächst über die Reaktionen der Glycolyse in zwei Moleküle Pyruvat zerlegt. Diese werden anschließend unter anaerobe Bedingungen enzymatisch über Kohlendioxid-Abspaltung in Acetaldehyd umgewandelt. Die Reduktion zu Ethanol wird von der NAD-spezifischen Alkoholdehydrogenase katalysiert. Brenztraubensäure ist somit ein Endprodukt der Glycolyse. Sie kann aber auch im bereits angedeuteten Aminosäurestoffwechsel der Hefe durch Transaminierungsreaktionen aus Alanin oder anderen Desaminierungsreaktionen gebildet werden.

Es wurden in der Mutterlauge 1 weitere organische Säuren bestimmt: Bernsteinsäure: 1508 mg/100 g (enzymatisch), 2-Ketoglutarinsäure: 84,0 mg/100 g (HPIC) und 92,9 mg/100 g (RP-HPLC), Zitronensäure: 16,1 mg/100 g (enzymatisch) und 15,1 mg/100 g (HPIC), Iso-Zitronensäure: 1,63 mg/100 g (HPIC), L-Äpfelsäure 81,7 mg/100 g (enzymatisch). Hefezellen sind als fakultative Anaerobier in der Lage bei Aufhebung des Sauerstoffmangels, Glucose aerob zu Kohlendioxid und Wasser abzubauen. Durch einen Multienzym-Komplex, der Pyruvat-Dehydrogenase, wird das bei der Glycolyse anfallende Pyruvat oxidativ decarboxyliert und das gebildete Acetat sofort energiereich an einen gruppenübertragenden Metaboliten, das Coenzym A, gebunden. Nach dem Prinzip der Aldol-Addition wird das energiereiche Acetyl-CoA auf Oxalacetat übertragen. Der somit entstandene C6-Körper, die Zitronensäure, wird wieder über

eine Reihe von Zwischenstufen zu einer C4-Verbindung regeneriert. Da hierbei organische Säuren wie Zitronen-, Iso-Zitronen-, 2-Oxoglutar-, Bernstein-, Fumar-, Äpfel-, Oxalessigsäure und enzymgebundenen Säuren wie cis-Aconit- und Oxalbernsteinsäure gebildet werden, die als Verunreinigungen in den Zwischenprodukten der Galactose-Herstellungen und in den Endprodukten gefunden wurden, nimmt der Zitratzyklus eine bedeutende Stellung ein. Bedingt durch technologische Parameter könnten sie als Intermediate des Zitratzyklus einen Hinweis auf ablaufende Atmungsprozesse von Mikroorganismen allgemein liefern. Somit könnte jedoch das biochemische Verfahren unter dem Einsatz nativer oder immobilisierter Glucoseoxidase/Katalase ausgeschlossen werden (siehe Abb. 2-2).

Die Bildung von 2-Ketoglutarat könnte ebenso wie Brenztraubensäure auf Reaktionen im Aminosäurestoffwechsel der Hefe oder anderen Mikroorganismen zurückgeführt werden. Sie geht dabei aus Glutaminsäure hervor.

Mit Hilfe einer selektiven Derivatisierung von 2-Ketosäuren und eines chromatographischen Trennverfahrens wurden 1,58 mg/100 g Glyoxylsäure bestimmt. Der Zitratzyklus stellt für die Biosynthese zahlreiche Vorstufen zur Verfügung (α -Ketoglutarat, Oxalessigsäure, Bernsteinsäure). Die Entziehung dieser Säuren würde zu einem Mangel an Oxalacetat als Acceptor für Acetyl-CoA führen und den Zitratzyklus zum Erliegen bringen. Für den Ausgleich dieses Verlustes an Intermediärprodukten des Zitratzyklus sorgen in einer anaplerotischen Sequenz zwei Enzyme. Die Isozitrat-Lyase spaltet Isozitronensäure zu Bernsteinsäure und Glyoxylsäure. Zur Letzteren wird Acetyl-Coenzym A durch Malat-Synthase addiert, wobei Äpfelsäure entsteht. Das Vorkommen von Glyoxylsäure in der Probe könnte somit durch eine solche Auffüllreaktion erklärt werden.

Ionenchromatographisch wurde freies Phosphat mit einem Anteil von 24,7 mg/100 g bestimmt. Mehr als die Hälfte der Mineralstoffe in der Hefe bestehen aus Phosphaten und liegen in sowohl organischer als auch in anorganischer Bindung vor. Phosphate sind an der Gärung und Atmung beteiligt und können der Fermentationskultur in Form ihrer Salze zugesetzt werden. Somit könnte Phosphat ein weiterer Indikator für den Einsatz von Hefe oder anderen Mikroorganismen sein und/oder durch den Einsatz von Molke als Ausgangsstoff in den Herstellungsprozess eingebracht worden sein.

Mittels Atomabsorptionsspektrometrie wurden 0,28 mg Calcium und 0,16 mg Magnesium in 100 g der wasser- und lösungsmittelfreien Mutterlauge 1 der Herstellung C nachgewiesen. Magnesium-Ionen spielen als Co-Faktor bei Enzymreaktionen eine wichtige Rolle. Sie aktivieren phosphatübertragende Enzyme und üben damit eine wichtige Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe aus. Calcium-Ionen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zitratzyklus. Sie aktivieren die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase, die wiederum den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zur Produktion von Acetyl-CoA aktiviert. Daneben aktivieren Calcium-Ionen sowohl Isozitrat- als auch α -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Calcium, Magnesium, Kalium und Natrium können ebenso wie Phosphat der Fermentationskultur in Form ihrer Salze zugesetzt werden.

Desweiteren wurden folgende organische Säuren nachgewiesen: Milchsäure: 60,9 mg/100 g (enzymatisch), Oxalsäure: 4,7 mg/100 g (HPIC), Schleimsäure: 5,4 mg/100 g (HPIC).

Innerhalb der Stoffklasse der organischen Säuren sind Milch- und Zitronensäure Hauptkomponenten in Molke. Milchsäure und Essigsäure werden als Abbauprodukte der Lactose beschrieben (siehe Abb. 3-3). Essigsäure, wie bereits erwähnt, kann auch ein Gärungsnebenprodukt sein. Schleimsäure geht als Oxidationsprodukt aus der Galactose hervor. Oxalsäure könnte unter oxidativen Bedingungen bei Kohlenhydratabbauprozessen gebildet werden oder als Verunreinigung in Hilfsstoffen mit in den Herstellungsprozess eingebracht worden sein.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse der Mutterlauge 1 ergab neben Mono- und Disacchariden ein oder mehrere Tri- und in Spuren Tetra- und Pentasaccharide. Sie sind wie die bereits erwähnte Isomaltose und Gentiobiose als Reversionszucker zu werten. Die Isolierung einer dünn-schichtchromatographisch getrennten Bande vom Kristallisationsüberstand der folgenden Aufreinigungsstufe, der Mutterlauge 2, und nachfolgende MALDI-TOF-MS-Analyse führte zu dem Molgewicht, das einem Trisaccharid entspricht. Hierbei läßt sich nicht klären, ob es sich um eine Verbindung oder um mehrere unterschiedliche oder um unterschiedliche Konformationen eines Trisaccharides handelt. Die säurehydrolytische und anschließende ionenchromatographische Untersuchung dieser Bande ergab ein Peakflächenverhältnis von Galactose/Glucose von 5,9:1. Dieses Verhältnis weist auf das Vorliegen mehrerer Trisaccharide hin. Es könnte sich dabei um ein homogen zusammengesetztes Trisaccharid, bestehend aus Galactose-Monomeren, und ein heterogen zusammengesetztes Trisaccharid, möglicherweise Gal-Gal-Glu, handeln.

Die geringen Mengen Ethanol in der Mutterlauge 1 (0,12 Gew. %) und der Mutterlauge 2 (0,51 Gew. %) lassen keine Rückschlüsse auf eine Glucosevergärung bzw. den Einsatz als Hilfsmittel zur Ausfällung von Galactose zu (siehe Punkt 2.6). Das Vorliegen von Mutterlaugen und Kristallisaten der Herstellung C gibt bereits einen Hinweis auf Kristallisationsschritte zur weiteren Aufreinigung der Rohgalactose aus dem Gärprozess oder zur Abtrennung von Gluconsäure, die in Lösung bleiben würde (siehe Punkt 2.6). Dabei wurden offenbar keine anderen Lösungsmittel als Wasser (59,5 %) in größeren Mengen eingesetzt.

Mutterlauge 1 der Herstellung A

Im Zwischenprodukt, der Mutterlauge 1, Herstellung A, wurde Lactose ionenchromatographisch mit einem Gehalt von 614 mg/100 g bestimmt. Wie bei der Herstellung C wurde neben Galactose auch Glucose qualitativ nachgewiesen. Daher kann auch bei dieser Galactose-Herstellung ein Verfahren über Lactobionsäure als Zwischenprodukt und nachfolgender Hydrolyse nicht verfolgt worden sein (siehe Abb. 2-1). Lactose kann als Bestandteil von Molke und/oder in reiner Form als Ausgangsstoff für die Galactose-Herstellung eingesetzt werden.

Isomaltose (6-O- β -Glu-Glu) und Gentiobiose (6-O- α -Glu-Glu) konnten im Zusammenhang mit Anhydrozucker als Indikatoren für säurekatalysierte Hydrolysebedingungen nicht identifiziert werden. HMF und Anhydrozucker werden als Indikatoren für erhitzte Zuckergemische angesehen. Die geringe Bildung von HMF (0,09 mg/100 g) als Zuckerabbauprodukt könnte auf

eine gemäßigte Temperaturführung, gegebenenfalls im schwachsauren Milieu, hinweisen. Da in der vorliegenden Probe keine freien Aminosäuren nachgewiesen wurden, könnte die HMF-Bildung nicht über die Maillard-Reaktion, sondern durch thermisch- und säureinduzierte Zuckerabbaureaktionen erklärt werden. Das HMF-Abbauprodukt, die Levulinsäure, konnte im Gegensatz zur Herstellung C nicht nachgewiesen werden.

Der flammenphotometrisch bestimmte Kalium-Gehalt der Probe (3836 mg/100 g) ist im Vergleich zum Natrium- (59,6 mg/100 g), Calcium- (15,5 mg/100 g) und Magnesium-Gehalt (2,0 mg/100 g) deutlich höher. Das Natrium-Kalium-Verhältnis in Molke wurde bereits bei der Herstellung C diskutiert. Da es in der Probe zwar über 1 : 2-3 liegt, kann trotzdem der Einsatz von Molke als Ausgangsstoff nicht ganz ausgeschlossen werden. Zusammen mit den nachgewiesenen Anionen, die nachfolgend aufgeführt werden, könnten diese Alkali- und Erdalkali-Elemente in Form ihrer Salze für den optimalen Ablauf von enzymatischen Vorgängen zugesetzt worden sein.

In der Mutterlauge 1 wurden nur geringe Mengen Chlorid (68,4 mg/100 g), Sulfat (22,8 mg/100 g) und Nitrat (5,14 mg/100 g) nachgewiesen. Daher könnte die Verwendung von Mineralsäuren bei dieser Herstellung ausgeschlossen werden. Der pH-Wert von 6,07 und der hohe Kalium-Gehalt der Probe lassen Überlegungen zu, die möglicherweise zu einem Abschnitt im Herstellungsverfahren führen, der eine pH-Absenkung zur Folge hat und daher eine pH-Korrektur mit Hilfe von Kalilauge notwendig werden läßt.

Durch Anwendung der HPIC (Carbo Pac PA1, Fa. Dionex), gekoppelt mit einem amperometrischen Detektor, wurde mit Hilfe eines optimierten Natronlauge-Gradienten ein Chromatogramm der Mutterlauge 1 erzielt, das hinsichtlich des Peakmusters keine Übereinstimmung mit dem der Mutterlauge 1/C zeigte. Auffällig war jedoch der Peak, der mit der Retentionszeit von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose korrelierte. Bei der Überprüfung der Selektivität mit Hilfe von Vergleichssubstanzen wurde eine Überlagerung von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose mit 6-O- α -D-Galactopyranosyl-D-glucose (Melibiose) festgestellt. Die Änderung des NaOH-Gradienten-Verlaufes führte zu keiner besseren Trennung dieses kritischen Pärchens.

Es erfolgten Strukturuntersuchungen wie bereits unter Punkt 5.1.7.3 und 5.1.7.4 anhand der Mutterlauge 2/C beschrieben wurde. Die ionenchromatographische Untersuchung von isolierten dünn-schichtchromatographisch getrennten Banden der Mutterlauge 1/A ließ Rückschlüsse auf eine höchstwahrscheinliche Überlagerung der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose mit einer anderen Substanz zu. Nach der MALDI-TOF-MS-Analyse handelt es sich hierbei um ein Disaccharid. In der Bande, in der sich die überlagerte Verbindung befand, wurden vier weitere Disaccharide beobachtet. Wird der durch Säurehydrolyse der betreffenden Bande freigesetzte Glucoseanteil betrachtet, so scheint die Glucose einzig aus der identifizierten Lactose zu stammen, so dass die anderen Disaccharide aus Galactoseeinheiten aufgebaut zu sein scheinen.

Es ist bekannt, dass β -Galactosidase Transgalactosyl-Reaktionen katalysiert. Bei der enzymatischen Lactosehydrolyse durch Lactase von *Aspergillus niger* werden hauptsächlich 1,6-verknüpfte Disaccharide mit homogener und heterogener Monomer-Zusammensetzung (Galactose, Glucose) gebildet. β -Galactosidase wirkt gruppenspezifisch und setzt neben einer β -glycosidischen Verknüpfung ein Galactose-Molekül im nicht reduzierenden Ring eines

Oligosaccharides voraus. Es wäre also denkbar, dass diese Forderungen nicht nur von einer zu hydrolysierenden Verbindung erfüllt sein müssen, sondern auch die resultierenden Transglycosyl-Produkte diese Struktureigenschaften besitzen. Würde es sich bei der Herstellung A um ein biochemisches Verfahren handeln, bei dem Lactose mit Hilfe von β -Galactosidase gespalten wird, so könnte 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose ein Transgalactosyl-Produkt sein. Eine Überlagerung dieser Verbindung im angewendeten ionenchromatographischen Analysenverfahren mit Melibiose könnte dabei dann ausgeschlossen werden, da diese α -glycosidisch verknüpft ist. Daneben sind vier weitere β -glycosidisch verknüpfte Disaccharide als Transgalactosyl-Produkte mit 1-2-, 1-3-, 1-4-Bindungen denkbar, wobei wahrscheinlich eins davon das Überlagerungsprodukt der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose im analytischen Trennverfahren ist. In der Mutterlauge 1 wurden 5838 mg/100 g als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse der Mutterlauge 1 ergab neben Mono- und Disacchariden ein oder mehrere Tri- und in Spuren Tetrasaccharide. Sie wurden ebenso als Transglycosyl-Produkte der β -Galactosidase gedeutet. Die Molgewichtsbestimmung mittels MALDI-TOF-MS-Analyse ergab in zwei isolierten dünn-schichtchromatographisch getrennten Banden ein Molgewicht, das einem Trisaccharid entsprach. Das Ergebnis der Säurehydrolyse und anschließenden ionenchromatographischen Untersuchung von der Bande mit dem niedrigeren Rf-Wert ergab ein Peakflächenverhältnis von Galactose/Glucose von 1,6 : 1. Das identifizierte Trisaccharid der anderen dünn-schichtchromatographisch getrennten Bande lag im Bereich der Nachweisgrenze.

Zur Gewinnung von Galactose ist nach einer enzymatischen Lactosehydrolyse die Eliminierung von Glucose notwendig. Wie bei der Herstellung C bereits diskutiert wurde, könnte Glucose zu Ethanol und Kohlendioxid vergoren oder zu Gluconsäure oxidiert werden, die als Aldonsäure leicht von Galactose abgetrennt werden kann (siehe Abb.2-2).

Wie in der Mutterlauge 1/C wurden in der Mutterlauge 1/A erhebliche Mengen (27,5 g/100 g) Glycerin und (661 mg/100 g) Glycerinsäure quantifiziert, deren Herkunft und Bildung bei der Herstellung C diskutiert wurde. Glycerin und Glycerinsäure könnten auch bei dieser Herstellung einen wichtigen Hinweis auf den Ablauf der Glucosevergärung geben. Unterstützt wird dies durch die enzymatische (811 mg/100 g) und chromatographische (858 mg/100 g) Bestimmung von Brenztraubensäure, die als Endprodukt der Glycolyse und Produkt des Aminosäurestoffwechsels der Hefe bereits diskutiert wurde. Offensichtlich wurde auch bei dieser Prozessführung Glucose veratmet, da Zwischenstufen des Zitratzyklus nachgewiesen wurden: Bernsteinsäure (enzymatisch: 5208 mg/100 g), 2-Ketoglutarinsäure (HPIC: 667 mg/100 g; RP-HPLC: 743 mg/100 g), Zitronensäure (enzymatisch: 89,2 mg/100 g; HPIC: 84,0 mg/100 g), Iso-Zitronensäure (HPIC: 9,4 mg/100 g) und L-Äpfelsäure (enzymatisch: 1006 mg/100 g; HPICE: 1076 mg/100 g). Im Vergleich zur Herstellung C konnten weiterhin Fumarsäure (HPICE: 69,6 mg/100 g) und cis-Aconitsäure (HPIC: 2,2 mg/100 g) bestimmt werden. Durch den Nachweis von Glycerin, als wichtigstes Gärungsnebenprodukt, Glycerin- und Brenztraubensäure, den organischen Säuren aus dem Zitratzyklus und Glyoxlsäure (10,1 mg/100 g) aus der anaplerotischen Sequenz (siehe Herstellung C) könnte ein biochemisches Verfahren zur Gewinnung der Gluconsäure ausgeschlossen werden, da hierbei nur die zu erwartende enzymatische Reaktion abläuft (siehe

Abb. 2-2). Ob bei einem mikrobiellen Verfahren zur Herstellung von Gluconsäure als Zwischenprodukt ähnliche Atmungsprozesse stattfinden könnten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Im Gegensatz zur Herstellung C konnte in dieser Probe ionenchromatographisch kein freies Phosphat nachgewiesen werden. Da Phosphate in Hefe und anderen Mikroorganismen auch in organischer Bindung vorliegen, könnten hier möglicherweise nicht identifizierte phosphatierte Verbindungen, z. B. Zuckerphosphate, in der Mutterlauge vorliegen. Selbst die in pharmazeutischer Qualität hergestellte Lactose aus Molke der Käseherstellung enthält phosphatierte Lactose, wobei die Phosphatgruppen gewöhnlich am Galactose-Molekül gebunden sind (Bernabe, Di Martino et al. 1997).

Es wurden in der Mutterlauge 1 weitere organische Säuren nachgewiesen: Essigsäure: 142 mg/100 g (HPICE), Milchsäure: 76,4 mg/100 g (enzymatisch), Schleimsäure: 22,3 mg/100 g (HPIC), trans-Aconitsäure: 4,9 mg/100 g (HPIC), Oxalsäure: < 5,7 mg/100 g. Die Herkunft bzw. Bildung von Essig-, Milch-, Schleim- und Oxalsäure wurde bereits bei der Herstellung C diskutiert. Das Milchsäure-Essigsäure-Verhältnis betrug wie bei der Mutterlauge 1 der Herstellung C ca. 1:2. Prozessbedingt, durch thermische Behandlung, könnte trans-Aconitsäure als Umwandlungsprodukt der ebenfalls bestimmten cis-Aconitsäure angesehen werden.

Die Mutterlaugen und Kristallisate 1-3 weisen auf aufreinigende Schritte der Rohgalactose nach einem Vergärungsprozess durch Umkristallisation hin. Es könnte jedoch auch eine Kristallisation zur Abtrennung von Gluconsäure nach einer bereits diskutierten mikrobiellen Oxidation der Glucose als Zwischenprodukt durchgeführt worden sein. Ein Hinweis darauf, wäre der gaschromatographisch nachgewiesene höhere Anteil von Ethanol in den Kristallisationsüberständen, der die Ausfällung von Galactose fördert (Mutterlauge 1: 51,9 Gew. %; Mutterlauge 2: 56,2 Gew. %; Mutterlauge 3: 84,8 Gew. %). Im Gegensatz zur Herstellung C wurden bei diesem Verfahren zur Kristallisation der Galactose Ethanol/Wasser-Gemische eingesetzt. Der Wassergehalt der Mutterlauge 1 lag bei 33,3 Gew. %.

6.1.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der 1. Mutterlaugen von A und C

Zusammenfassend werden nun die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Herstellungsverfahren, A und C, herausgearbeitet:

In beiden Mutterlaugen wurde Lactose identifiziert. Somit wurde Lactose direkt oder indirekt in Form von Molke als Ausgangsstoff eingesetzt. Weiterhin ist durch den Nachweis von Glucose eine Herstellung von Galactose mit beginnender Oxidation zu Lactobionsäure aus Lactose bei quantitativer Umsetzung in beiden Fällen nicht zu erklären (siehe Abb. 2-1, Weg C).

Neben Galactose ist Glucose als Hydrolyseprodukt der Lactose anzusehen. Industriell findet die Lactosehydrolyse entweder in einem chemischen oder biochemischen Verfahren ihre Anwendung. Die in der Mutterlauge nach C identifizierten Verbindungen Glucose, Isomaltose, Gentiobiose, 1,6-Anhydro- β -D-galactopyranose und -glucopyranose, HMF und das HMF-Abbauprodukt, Levulinsäure, geben zusammen mit dem erhöhten Chlorid-Gehalt einen Hinweis auf

säurekatalysierte Hydrolysebedingungen der Lactose mit Hilfe von Salzsäure. Dabei wurde Lactose nicht quantitativ umgesetzt.

Im Gegensatz zur Herstellung C, der chemischen Lactosehydrolyse, zeichnete sich die Mutterlauge nach A durch das Fehlen von Isomaltose, Gentiobiose und den Anhydrokohlenhydraten aus, die dort als Indikatoren für säurekatalysierte Hydrolysebedingungen diskutiert wurden. Die geringe Bildung von HMF (0,09 mg/100 g, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe) könnte möglicherweise auf eine thermische Behandlung, möglicherweise im schwach sauren Milieu, des vorliegenden Kohlenhydratgemisches zurückgeführt werden. Die enzymatische Lactosehydrolyse mittels β -Galactosidase wird beispielsweise meist bei pH-Werten von 3,5 - 4,5 und einem Temperaturbereich von 30 - 40°C durchgeführt (siehe Punkt 2.2). Ein höherer HMF-Gehalt von 29,1 mg/100 g, bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe, wurde dagegen im ersten Kristallisationsüberstand der Herstellung C quantifiziert. HMF könnte somit nicht nur als Indikator für erhitzte Zuckergemische, sondern auch für Säurebedingungen angesehen werden. Dies wird durch den Nachweis von Levulinsäure als HMF-Abbauprodukt unter solchen Bedingungen gestützt. Daneben kann HMF hierbei aber auch durch den Nachweis der freien Aminosäuren als Produkt der Maillard-Reaktion gewertet werden, wobei weitere Produkte dieser Reaktion im Rahmen dieser Untersuchungen nicht identifiziert wurden. Zudem läßt die braune Färbung des Zwischenproduktes von der Herstellung C Rückschlüsse auf die Bildung von Melanoidinen durch Zersetzungsprodukte im Rahmen der Karamelisierung und/oder der Maillard-Reaktion zu.

Bei der Herstellung A wird ein biochemisches Verfahren zur Lactosehydrolyse und der Einsatz von β -Galactosidase durch deren Transgalactosyl-Produkte wie den mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifizierten Tri- und Tetrasacchariden, vor allem aber durch den ionenchromatographischen Nachweis von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose gestützt. Es ist bekannt, dass solche Reversionszucker auch in Nebenreaktionen, der Transglycosylierung, bei der Lactose-Säurehydrolyse gebildet werden. In der Mutterlauge nach C wurden Mono- bis Pentasaccharide nachgewiesen.

In beiden Fällen ist ein Verfahren zur Oxidation der Glucose nach Weg E in Abbildung 2-2 nach der diskutierten Lactosehydrolyse aufgrund der abschätzungsweise relativ niedrigen Gluconsäure-Gehalte von weniger als 1,0 g neben 40,4 g Galactose in 100 g des wasser- und lösungsmittelfreien Kristallisationsüberstandes nach C und weniger als 0,2 g neben 24,3 g Galactose in 100 g des wasser- und lösungsmittelfreien Kristallisationsüberstandes nach A nicht zu erklären, da bei der Kristallisation eines solchen Gemisches Galactose ausfallen und Gluconsäure in Lösung verbleiben sollte (siehe Punkt 2.6).

Glycerin, das in beiden Mutterlauen sowohl dünnschichtchromatographisch als auch mit der HPLC nachgewiesen wurde, gibt als wichtigstes Gärungsnebenprodukt neben Brenztraubensäure einen Hinweis auf eine Fermentation, bevorzugt mit einem Hefestamm. Bei dieser Prozessführung wurde Glucose nicht vollständig umgesetzt, da dieses Monosaccharid in den ersten Kristallisationsüberständen noch nachweisbar war. Außerdem konnte durch den Nachweis von organischen Säuren des Zitratzyklus wie 2-Ketoglutar-, Zitronen-, Isozitronen-, L-Äpfel- und vor allem Bernsteinsäure neben der Vergärung von Glucose zu Ethanol auf Atmungsprozesse der Hefe geschlossen werden.

Der hohe Anteil der gebildeten organischen Säuren hat höchstwahrscheinlich einen Einfluß auf den pH-Wert der Fermentationskultur. Hefestämme der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* weisen eine hohe Säuretoleranz auf. Für die weitere Aufreinigung von Rohgalactose ist allerdings eine Korrektur des pH-Wertes nach der Fermentation unerlässlich, wobei hier möglicherweise aufgrund des hohen Kalium-Gehaltes von 3,8 g/100 g wasser- und lösungsmittelfreier Mutterlauge 1 der Herstellung A Kalilauge verwendet wurde. Bei einem simultanen Ablauf der Lactosehydrolyse mit Hilfe von β -Galactosidase und der Glucosevergärung in einem Fermenter müßte die pH-Korrektur während des Prozesses erfolgen, da das pH-Optimum von Lactasen beispielsweise von *Aspergillus niger* und *-oryzae* im kleinen Bereich von pH 3,5 - 4,5 liegt (siehe Punkt 2.2).

Für den Abbruch der säurekatalysierten Lactosehydrolyse nach C und für die Einstellung des optimalen pH-Bereiches der Glucosevergärung wurde vermutlich, bedingt durch den erhöhten Natrium-Gehalt von 0,95 g/100 g wasser- und lösungsmittelfreie Mutterlauge, eine Neutralisierung mit Hilfe von Natronlauge durchgeführt.

Die geringen Proteingehalte beider Proben könnten durch einen Einsatz von immobilisierten Hefezellen oder durch eine Abzentrifugation oder Ultrafiltration von nativen Hefezellen erklärt werden.

Die Aufreinigung der Rohgalactose bei der Herstellung C erfolgte durch zwei Umkristallisationsschritte, wobei überwiegend Wasser als Hilfsmittel verwendet wurde. Beim Galactose-Herstellungsverfahren nach A wurde eine zusätzliche Kristallisation durchgeführt. Bei allen Umkristallisationsschritten wurden Ethanol/Wasser-Gemische eingesetzt.

Da die 2. Mutterlauge der Herstellung C keine Färbung aufwies, wurde vermutet, dass zwischen der ersten und zweiten Kristallisationsstufe eine Aktivkohlebehandlung zur Entfärbung vorgenommen wurde.

6.2 Beurteilung der Endprodukte der Galactose-Herstellungen C, A, B, D, F und E

In Galactosen pharmazeutischer Qualität wurden, bedingt durch den jeweiligen Herstellungsprozess, chemische Verunreinigungen nachgewiesen (siehe Anhang VII). Im Nachfolgenden werden sechs verschiedene Galactose-Endprodukte anhand ihrer Verunreinigungen beurteilt, wobei Rückschlüsse auf die jeweilige Herstellungsart gezogen bzw. diskutiert werden. Dabei werden Erkenntnisse aus der Herstellung A und C herangezogen, die aus dem ersten Zwischenprodukt, der Mutterlauge 1, gewonnen wurden. Diese werden zunächst hinsichtlich ihrer Verwendung auf die Endprodukte dieser beiden Herstellungen überprüft und auf die anderen Herstellungsarten B, D, E und F übertragen, bei denen, ausgenommen der Herstellung B, nur die Galactose-Endprodukte zur Verfügung standen. In Abb. 5-45 sind alle gewonnenen Erkenntnisse zusammenfassend graphisch dargestellt. Es zeigt ein Fließschema zur Herleitung eines Galactose-Herstellungsverfahrens anhand nachgewiesener Leitsubstanzen.

Herstellung C

Die durch Umkristallisationsschritte bedingte Aufreinigung der Rohgalactose konnte durch Untersuchungen des 1. Kristallisates und der 2. Mutterlauge verfolgt werden (siehe

Produktcharakterisierungen). Im 2. Kristallinat der Herstellung C, das dem Endprodukt entspricht traten daher im Vergleich zur 1. Mutterlauge andere Verbindungen hervor, die durch geeignete Maßnahmen nicht entfernt werden konnten und maßgebend für die Herstellungsart sein können.

Im 2. Kristallinat konnten ionenchromatographisch Lactose, Glucose und die für säurehydrolytische Hydrolysebedingungen angesehenen Indikatoren wie Isomaltose, Gentiobiose und Anhydrozucker nicht nachgewiesen werden. Lediglich Spuren einer HMF-Bildung (0,04 mg/100 g) deuten auf einen temperatur- und/oder säurebedingten Zuckerabbau oder den möglichen Ablauf der Maillard-Reaktion hin.

Der Chlorid-Gehalt der Probe von 0,05 mg/100 g war im Vergleich zu Sulfat (< 0,10 mg/100 g) und Nitrat (< 0,08 mg/100 g) nicht mehr so dominant wie im ersten Kristallisationsüberstand, obwohl der Sulfat- und Nitrat-Gehalt bereits unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Somit konnte der Einsatz von Salzsäure während der Lactosehydrolyse nicht diskutiert werden.

Der übereinstimmende Natrium- und Kalium-Gehalt von 1,7 mg/100 g läßt keine Rückschlüsse auf die höchstwahrscheinlich durchgeführte pH-Einstellung mit Hilfe der Natronlauge zu. In der vorliegenden Probe wurden weniger als 0,80 mg/100 g Calcium (< BG) und weniger als 0,20 mg/100 g Magnesium (< BG) nachgewiesen. Calcium-Ionen haben einen regulatorischen Einfluß auf enzymatische Reaktionsfolgen. Magnesium-Ionen spielen als Co-Faktor eine wichtige Rolle bei Enzymreaktionen. Durch das Fehlen von Glycerin, Brenztraubensäure, den organischen Säuren des Zitratzyclus und den Aldonsäuren könnten Calcium und Magnesium allein als Hinweis auf enzymatische Vorgänge und damit auf den bereits diskutierten Vergärungsprozess der Glucose, vorzugsweise mit Hefe, zu deuten sein.

Durch Anwendung der HPIC (Carbo Pac PA1, Fa. Dionex), gekoppelt mit einem amperometrischen Detektor, wurde mit Hilfe eines optimierten Natronlauge-Gradienten ein Chromatogramm des 2. Kristallinates erhalten, das fünf Peaks erkennen ließ, die in nachfolgenden Diskussionen als Verunreinigungen 1-5 bezeichnet werden. Dieses Peakmuster war in allen Zwischenprodukten erkennbar. Für Strukturuntersuchungen dieser Verunreinigungen wurde jedoch die Mutterlauge 2 dieser Herstellung ausgewählt, da sie im Vergleich zu den Kristallinaten weniger Galactose enthielt, die in hohen Anteilen störend wirkt. In der Mutterlauge 1 waren zusätzlich zu viele anderen Verunreinigungen enthalten, so dass diese Probe dafür ebenfalls nicht geeignet erschien. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass es sich bei den Verunreinigungen 1-5 um Disaccharide, bestehend aus Gal-Gal-, Gal-Glu- und Glu-Gal-Verknüpfungen handelt (siehe Punkt 5.1.7.5.7). Trotz Vernachlässigung anomerer Formen, die sich unter den HPIC-Bedingungen chromatographisch nicht zu trennen sind, verblieb eine Vielzahl von Möglichkeiten hinsichtlich der Bindungsposition und -art, so dass aufgrund kommerziell nicht erhältlicher Vergleichssubstanzen keine gesicherte Aussage über die Identität der Peaks im HPIC-Chromatogramm (vgl. Abb. 5-6 A) getroffen werden konnte. Die ionenchromatographische Untersuchung von isolierten dünn-schichtchromatographisch getrennten Banden der Mutterlauge 2 ließ Rückschlüsse auf Überlagerungen von Peak 1 und 2 zu, die nach der MALDI-TOF-MS-Analyse den Disacchariden zugeordnet werden konnten. Die säurehydrolytische und nachfolgende ionenchromatographische Untersuchung ergab für die Bande (Bande 2.1), die Peak 1 und 2 enthielt, ein Galactose/Glucose-Flächenverhältnis von 8,0 : 1 und für die andere Bande (Bande

2.2), die Peak 1-5 enthielt, 1,2 : 1. Zusammen mit der Beobachtung, wobei Peak 2 mit der Retentionszeit von 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose korrelierte und der Diskussion über die Bildung von 6-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactose unter säurekatalysierte Hydrolysebedingungen aus der Galactose, die mit der Retentionszeit von Peak 1 übereinstimmen würde, könnte das ermittelte Galactose/Glucose-Verhältnis von Bande 2.1 das Vorliegen dieser Verbindungen stützen. Das ermittelte Peakflächenverhältnis von Galactose/Glucose der Bande 2.2 spricht hingegen für das überwiegende Vorliegen von heterogen zusammengesetzten Disacchariden, bestehend aus einem Galactose- und Glucose-Monomer, so dass die Verunreinigungen 3-5 und die überlagerten Verbindungen von Peak 1 und 2 wahrscheinlich diesen Mischsacchariden zugeordnet werden könnten.

Da die Mutterlauge 2 der Überstand des zweiten, hier als Endprodukt vorliegenden Kristallisates ist, dürften die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen der Mutterlauge 2 übertragbar auf das Endprodukt sein. Die Verunreinigungen 1-5 können als Reversionszucker durch die bei der Mutterlauge 1 diskutierten säurekatalysierten Hydrolysebedingungen aus Lactose bzw. den Hydrolyseprodukten Galactose und Glucose erklärt werden. Die Verunreinigungen 1-5 (V 1-5) wurden als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet: V 1: 493 mg/100g, V 2: 118 mg/100g, V3: 47 mg/100g, V4: 207 mg/100g, V5: 59 mg/100g.

Herstellung A

Die Abreicherung von Verunreinigungen durch Umkristallisationsschritte und anderen Maßnahmen konnte durch Untersuchungen der Zwischenprodukte von der Herstellung A bereits verfolgt werden (siehe Produktcharakterisierungen).

Im Endprodukt der vorliegenden Galactose-Herstellung wurden Lactose und Glucose nicht mehr nachgewiesen, die einen Hinweis auf eine Lactosehydrolyse geben würden. Jedoch konnte 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose mit einem Gehalt von 873 mg/100 g bestimmt werden. Als Transgalactosyl-Produkt der β -Galactosidase gibt diese Verbindung einen Hinweis auf das bereits bei der Mutterlauge 1 diskutierte biochemische Verfahren zur Lactosehydrolyse. Das dabei durch Strukturuntersuchungen festgestellte Disaccharid als überlagerte Verbindung der 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose könnte somit im Endprodukt dieser Herstellung noch vorliegen (siehe Punkt 6.1). Alle vorliegenden Zwischenprodukte und das Endprodukt dieser Herstellung zeichneten sich durch das Fehlen der Verunreinigungen 1, 3, 4 und 5 aus, die bei der Herstellung C diskutiert wurden (siehe Punkt 6.2). Die vorgeschlagene Verbindung 6-O- α -D-Galactopyranosyl-D-galactose als Verunreinigung 1 bei der Herstellung C wäre hier, nach der Diskussion, die bei der Mutterlauge 1 dieser Herstellung unter 6.1 geführt wurde, nicht zu erwarten.

Die nachgewiesenen Anionen Chlorid (0,04 mg/100 g), Sulfat (< BG von 0,10 mg/100 g) und Kationen Natrium (1,5 mg/100 g), Kalium (1,5 mg/100 g) und Magnesium (< BG von 0,20 mg/100 g) deuten auf den Zusatz von anorganischen Salzen für einen optimalen Ablauf enzymatischer Vorgänge hin.

In 100 g der vorliegenden Probe wurden 0,18 mg Zitronensäure und 1,9 mg Äpfelsäure nachgewiesen. Bei der Mutterlauge 1 dieser Herstellung wurden neben der Glucosevergärung auch Atmungsprozesse der Hefe diskutiert. Zitronensäure könnte somit neben L-Äpfelsäure aus dem organischen Säure-Pool des Zitratzyklus hervorgehen.

Herstellung B

Im 2. Kristallinat der Herstellung B, das weitestgehend dem Endprodukt entspricht wurden 496 mg/100 g 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose nachgewiesen. Die Probe zeichnete sich durch das Fehlen der Verunreinigungen 1, 3-5 aus und zeigte somit große Übereinstimmung mit dem Endprodukt der Herstellung A. Somit könnte 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose als Transgalactosylprodukt der β -Galactosidase gewertet werden. Da derzeit ein großtechnischer Einsatz von β -Galactosidase zur Hydrolyse von Lactobionsäure oder Lactulose nicht bekannt und damit zu erwarten ist, wird vermutet, dass für diese Galactose-Herstellung wie gewöhnlich Lactose als Ausgangsprodukt vorgelegen hat.

Neben dem flammenphotometrisch ermittelten Natrium (1,80 mg/100 g) und Kalium (1,59 mg/100 g) -Gehalt wurde mit Hilfe der AAS Calcium 0,84 mg /100 g und Magnesium 0,40 mg/100 g nachgewiesen. Außerdem wurden ionenchromatographisch folgenden Anionen quantifiziert: freies Phosphat (1,30 mg/100 g), Chlorid (0,04 mg/100 g) und Sulfat (0,21 mg/100 g). Anorganische Salze können für einen optimalen Ablauf von Enzymreaktionen Fermentationskulturen zugesetzt werden. Da die hier diskutierte Lactosehydrolyse mit Hilfe von β -Galactosidase bereits ein enzymatischer Vorgang ist, gibt es keinen gesicherten Hinweis auf weitere Enzymreaktionen mit Hilfe von nativen oder immobilisierten Enzymen oder Mikroorganismen.

In der vorliegenden Probe wurden 0,23 mg/100 g Zitronensäure (HPIC) und 2,1 mg/100 g L-Äpfelsäure (enzymatisch) nachgewiesen. Zitronensäure als Verunreinigung im Endprodukt könnte durch den bereits diskutierten Ablauf des Zitratzyklus bei Atmungsvorgängen von Mikroorganismen erklärt werden. Daneben wurden in 100 g des 2. Kristallinates 1,7 mg Oxalsäure (HPIC) bestimmt. Diese organische Säure trat auch in Zwischenprodukten der Herstellung A und C auf. Für ihre Herkunft bzw. Bildung während des Herstellungsverfahrens liegen keine gesicherten Hinweise vor. Sie könnte jedoch aus oxidativen Kohlenhydratabbauprozessen hervorgehen.

Das Vorliegen des 1. Kristallinates als Zwischenprodukt der Herstellung B gibt einen Hinweis auf eine durchgeführte Umkristallisation zur Aufreinigung der Galactose. Charakteristisch für diese Variante der Galactose-Herstellung war der relativ hohe Phosphat-Anteil im Zwischenprodukt von 81,4 mg/100 g, der im Endprodukt noch in Spuren nachzuweisen war.

Herstellung D

Die vorliegende Probe enthielt im Vergleich zu den anderen Endprodukten viele nachweisbare Verunreinigungen, wobei das Verunreinigungsmuster in qualitativer Hinsicht eine große Übereinstimmung mit dem der Herstellung C hatte.

In der vorliegenden Galactose konnte ionenchromatographisch Glucose qualitativ nachgewiesen werden. Die Zudotierung von Isomaltose, Gentiobiose und Lactose ergab eine Vergrößerung der in Spuren vorliegenden Peaks. Somit wurde mit großer Wahrscheinlichkeit eine Lactosehydrolyse durchgeführt, die zwangsläufig zu den Produkten Galactose und Glucose führt. Isomaltose und Gentiobiose geben somit zusammen mit den nachgewiesenen, aber unter der Bestimmungsgrenze von jeweils 9,4 mg/100 g liegenden Anhydrozuckern, 1,6-β-D-Anhydrogalactopyranose und -glucopyranose, und HMF (0,10 mg/100 g) einen Hinweis auf säurekatalysierte Hydrolysebedingungen.

Der Chlorid-Gehalt von 5,26 mg/100 g war deutlich höher als der ermittelte Sulfat-Gehalt (< BG von 0,45 mg/100 g) und könnte somit einen Hinweis auf den Einsatz von Salzsäure während der Lactosehydrolyse geben.

Desweiteren wurden die bereits im Endprodukt der Herstellung C diskutierten Verunreinigungen 1-5 im HPIC-Chromatogramm mit gleicher Retentionszeit beobachtet und als 6-O-β-D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet: V 1: 1153 mg/100 g; V 2: 820 mg/100 g; V 3: 325 mg/100 g; V 4: 539 mg/100 g; V 5: 124 mg/100 g. Beim Vergleich der prozentualen Anteile der einzelnen Verunreinigungen (siehe Abb. 5-43) der Galactose dieser Herstellung mit dem 1. Kristallinat der Herstellung C wurden große Übereinstimmungen festgestellt. Es ist zu vermuten, dass die Verunreinigungen 1-5 in dieser Probe ähnliche strukturelle Eigenschaften, wie sie unter Punkt 6.2 im 2. Kristallinat/C beschrieben wurden, besitzen und als Reversionszucker gewertet werden können.

Desweiteren wurde ionenchromatographisch freies Phosphat mit einem Gehalt von 1,6 mg/100 g und folgende organische Säure bestimmt: Bernsteinsäure: 4,3 mg/100 g (enzymatisch); L-Äpfelsäure: 3,0 mg/100 g (enzymatisch); Zitronensäure: < BG von 0,15 mg/100 g (HPIC). Diese organischen Säuren, die als Intermediate im Zitronensäurezyklus gebildet werden und dieser im Atmungsprozess von Mikroorganismen integriert ist, könnten einen Hinweis auf eine Glucose-Fermentation mit Hefe liefern. Gestützt wird dies durch den Nachweis von Phosphat, das als Hauptkomponente im Mineralstoffwechsel der Hefe vorkommt. Desweiteren wurde Glycerin (118,3 mg/100 g) als wichtigstes Gärungsnebenprodukt mit Hilfe der HPLC nachgewiesen.

Es wurden 0,80 mg/100 g Milchsäure enzymatisch bestimmt. Sie wurde unter Punkt 6.1 im Zusammenhang mit Zitronensäure als Hauptkomponente von Molke als Ausgangsstoff und als Abbauprodukt von Lactose diskutiert.

Aus Fermentationskulturen wird das Produkt meist durch Kristallisation nach Ausfällung mit Ethanol oder Methanol gewonnen. Möglicherweise wurde auch bei diesem Herstellungsverfahren eine Kristallisation durchgeführt.

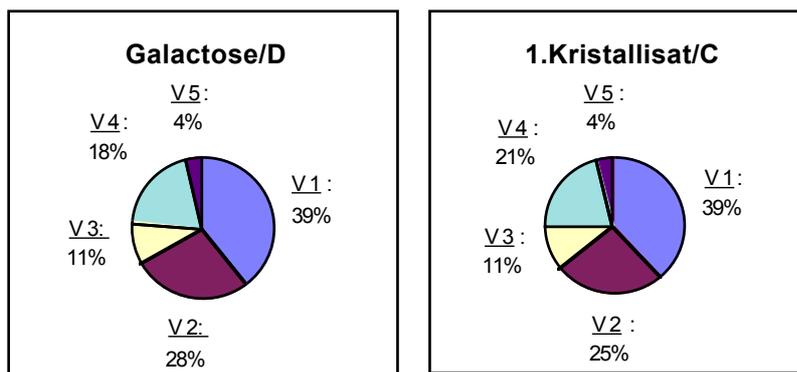


Abb. 5-43: Prozentuale Verteilung der Verunreinigungen 1-5 in verschiedenen Produkten

Herstellung F

Im vorliegenden Endprodukt der Herstellung F wurden ionenchromatographisch 16,6 mg/100 g 1,6- β -D-Anhyrdo-galactopyranose und 9,8 mg/100 g 1,6- β -D-Anhyro-glucopyranose nachgewiesen. Da diese Reversionszucker durch intramolekulare Kondensation gebildet werden, muß Glucose als Zwischenprodukt neben Galactose vorgelegen haben. Glucose und Galactose sind somit als Hydrolyseprodukte der Lactose anzusehen. Zusammen mit dem ermittelten HMF-Gehalt von 0,15 mg/100 g, den unter Punkt 6.1 im 2. Kristallisat/C diskutierten und hier im Ionenchromatogramm mit gleicher Retentionszeit beobachteten Verunreinigungen 1-5 (berechnet als 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose; V 1: 118 mg/100 g; V 2: 41 mg/100 g; V 3: 18 mg/100 g; V 4: 48 mg/100 g; V 5: 17 mg/100 g) geben sie als Hitze- und Säureindikatoren einen Hinweis auf saure Hydrolysebedingungen mit Lactose als Ausgangsstoff.

Der im Vergleich zu den anderen Endprodukten leicht erhöhte Nitrat-Gehalt von 0,21 mg/100 g gegenüber Chlorid (0,06 mg/100 g) und Sulfat (< BG von 0,01 mg/100 g) könnte möglicherweise Rückschlüsse auf die Verwendung von Salpetersäure zulassen. Zusammen mit dem nachgewiesenen Magnesium (0,77 mg/100 g), Calcium (< BG von 0,80 mg/100 g), Natrium (1,4 mg/100 g) und Kalium (1,6 mg/100 g) wurden die Anionen jedoch als Zusatz von Salzen für einen optimalen Fermentationsvorgang gedeutet. Als anorganische Stickstoffquelle könnte Nitrat für Mikroorganismen unentbehrlich sein. Nitrat wird zu Ammoniumstickstoff reduziert, welcher sofort an Glutamat gebunden wird. Das entstehende Glutamin dient als Amino-Donator für die Aminosäure-Synthese. Der Ablauf einer Fermentation wird durch die Identifizierung von Glycerin gestützt, das mit einem Gehalt von 89,0 mg/100 g bestimmt wurde. Glycerin weist auf einen enzymatischen Kohlenhydratabbau (Glycolyse) hin oder kann aus dem Fettstoffwechsel von Mikroorganismen hervorgehen. Dabei kann nicht geklärt werden, ob das gebildete Zwischenprodukt, Glucose, mit einem Hefestamm vergoren oder durch ein mikrobielles Verfahren zu Gluconsäure oxidiert wurde.

Herstellung E

Im Ionenchromatogramm des vorliegenden Endproduktes wurden die Verunreinigungen 1-5 mit gleicher Retentionszeit wie im 2. Kristallisat/C und als 6-0- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose berechnet: V1: 384 mg/100 g; V2: 128 mg/100 g; V3: 51 mg/100 g; V4: 183 mg/100 g; V5: 22 mg/100 g. Die Bildung dieser Reversionszucker wurde bei der Herstellung C diskutiert, bei der eine säurekatalysierte Lactosehydrolyse durchgeführt wurde. Weitere Indikatoren wie HMF oder Anhydrozucker, die auf einen säure- und/oder hitzeinduzierten Zuckerabbau zurückzuführen wären, wurden im Endprodukt dieser Herstellung nicht nachgewiesen.

Der zur Galactose/A vergleichbare sehr geringe Chlorid-Gehalt von 0,04 mg/100 g könnte wie beim Herstellungsverfahren A möglicherweise auf einen Einsatz von Salzsäure zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu allen anderen Herstellern konnten keine anderen Anionen wie Sulfat, Nitrat oder Phosphat nachgewiesen werden. In der Galactose der Herstellung E wurden Natrium (1,59 mg/100 g) und Kalium (1,40 mg/100 g) bestimmt. Der Calcium- und Magnesium-Gehalt lag bereits unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,80 bzw. 0,20 mg/100 g. Demnach liegt hier ein mit den Endprodukten A und C vergleichbares Kationenmuster vor. Im Gegensatz zu dem dort diskutierten Einsatz von Salzen zum Fermentationsprozess der Glucose, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der Mutterlauge, könnte bei dieser Herstellung aufgrund der fehlenden Anionen ein anderes Herstellungsverfahren diskutiert werden:

Die Aufreinigung von Lactulose-Sirup zur Gewinnung von Lactulose kann durch Anwendung eines chromatographischen Verfahrens erfolgen. Dabei kommen spezielle Borharze zum Einsatz, die Lactulose oder Lactose und Monosaccharide, vor allem Galactose, retardieren. Mit Wasser und Salzsäure werden diese eluiert, wobei Lactulose-reiche und Lactose/Galactose-reiche Fraktionen gewonnen werden, die in mehreren Zyklen aufgereinigt werden können (Carobbi und Innocenti 1991), (Filippini 1986). Damit könnten bei der Aufreinigung ähnliche Bedingungen wie bei der Lactosehydrolyse geschaffen werden, die möglicherweise zur Bildung ähnlicher Reversionszucker führen. Bei einem Vergleich der prozentualen Anteile der Verunreinigungen 1-5 der verschiedenen Hersteller wurden quantitativ keine gravierenden Abweichungen festgestellt (siehe Abb. 5-44). Die nachgewiesenen Calcium-Ionen könnten im Zusammenhang mit der gewonnenen Galactose aus dem eigentlichen Lactulose-Herstellungsprozess auf den Einsatz von basischen Calcium- und Magnesiumsalzen zur Epimerisierung der Lactose zurückgeführt werden (siehe Punkt 2.9).

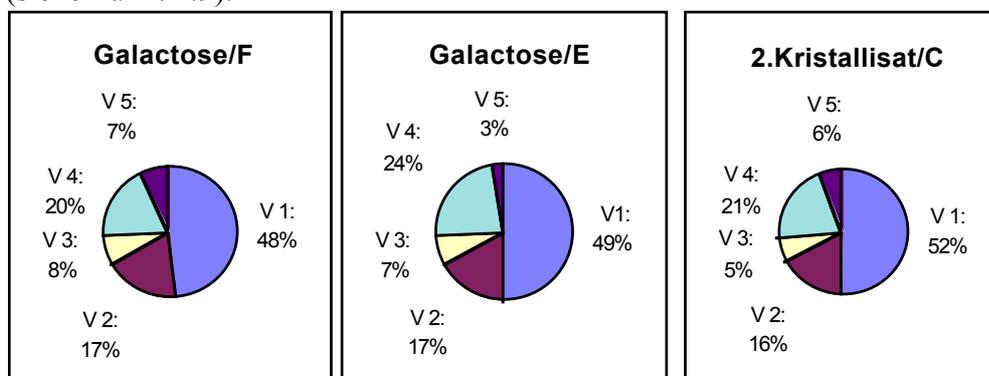


Abb. 5-44: Prozentuale Verteilung der Verunreinigungen 1-5 in verschiedenen Produkten

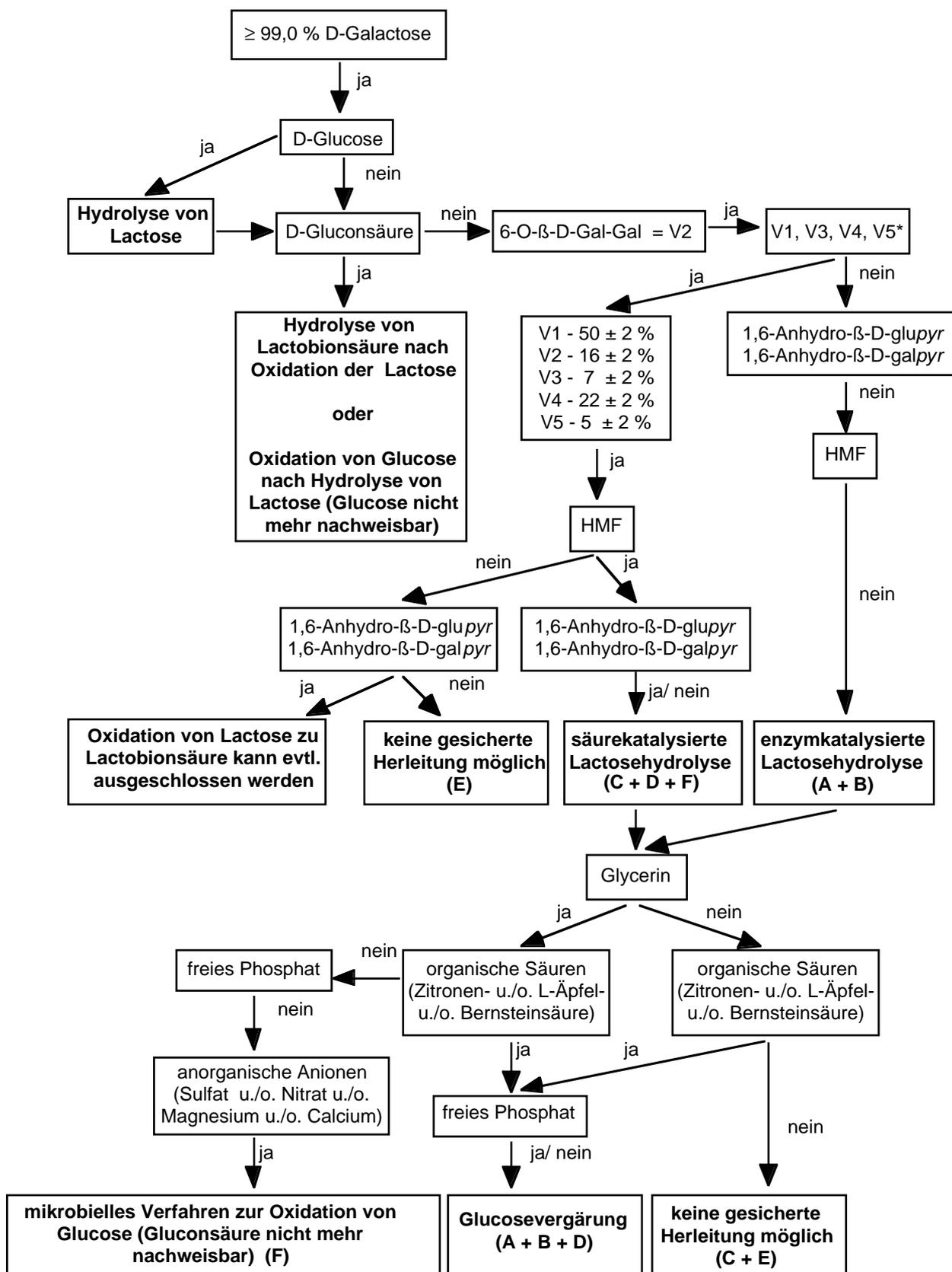


Abb. 5-45: Fließschema zur Herleitung der Galactose-Herstellungsverfahren A, B, C, D, E und F anhand des Nachweises von Leitsubstanzen in den Endprodukten (* siehe Punkt 5.1.6.2)

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der Untersuchung von vorwiegend nicht flüchtigen Nebenprodukten in Galactose pharmazeutischer Qualität wurden sechs Herstellungsverfahren (A-F) näher betrachtet. Um Leitsubstanzen aufzudecken, die einesteils charakteristisch für bestimmte Teilprozesse sind, und um deren Effizienz der Aufreinigung besser verfolgen zu können, standen von drei Herstellungsverfahren (A-C) zusätzlich Zwischenprodukte zur Verfügung. Danach lagen den zur Verfügung stehenden Galactose-Mustern wahrscheinlich folgende Herstellungsverfahren zu Grunde:

A und B - enzymkatalysierte Lactosehydrolyse und Fermentation von Glucose

C und D - säurekatalysierte Lactosehydrolyse und Fermentation von Glucose

E - zu wenig Leitsubstanzen für eine gesicherte Herleitung noch nachweisbar, chromatographisches Verfahren zur Aufreinigung der Rohgalactose denkbar

F - säurekatalysierte Lactosehydrolyse und mikrobiologisches Verfahren zur Oxidation von Glucose

Ein zentraler Gesichtspunkt war die Erstellung von Verunreinigungsmustern in den Endprodukten, um auf dieser Grundlage die jeweilige Herstellungsart herleiten bzw. diskutieren zu können. Dazu wurden zunächst die großtechnisch wichtigsten Galactose-Herstellungsverfahren zusammenfassend dargestellt und anhand von Literaturdaten näher beschrieben. Auf der Basis von theoretisch möglichen Nebenreaktionen, die dabei ablaufen können und teilweise bereits näher untersucht worden waren, wurde ein Analysenkonzept zur Bestimmung von Verunreinigungen aus der Substanzklasse der Kohlenhydrate, der organischen Säuren, der anorganischen Bestandteile und Proteine erarbeitet. Es wurden robuste Analysenverfahren entwickelt, Methoden und Techniken gezielt eingesetzt, die den Nachweis von Verunreinigungen auch im Spurenbereich in Gegenwart von im Überschuß vorliegender Galactose zulassen.

Die Verunreinigungen im Kohlenhydrat-Bereich wurden sowohl dünnschichtchromatographisch als auch mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie (Sugar Pak) mit refraktometrischer Detektion und der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (Carbo Pac PA1) und gepulster amperometrischer Detektion untersucht.

Beim Vergleich aller vorliegenden Endprodukte wurde im Kohlenhydrat-Bereich ein großes Unterscheidungsmerkmal festgestellt. Die Endprodukte vom Hersteller A und B enthielten lediglich 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose (= Verunreinigung 2) und zeichneten sich durch das Fehlen der im Ionenchromatogramm definierten Verunreinigungen 1, 3, 4 und 5 aus, die jedoch neben 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose bei den Herstellern C, D, E und F auftraten. Umfangreiche Strukturuntersuchungen an den dünnschichtchromatographisch isolierten Verunreinigungen 1 - 5 ergaben jeweils überlagerte Disaccharide aus Glucose- und Galactosemonomeren mit folgenden Verhältnissen: Gal-Gal : Gal-Glu : Glu-Gal = 1 : 1,2 : 1,4. Die Auftretshäufigkeiten und Differenzierungen der Bindungspositionen konnte durch folgende Reihenfolge angegeben werden: 6 Gal (*Pyr* + *Fur*; 47 %) > 6 Glu (*Pyr* + *Fur*; 23 %) > 2 Gal (*Pyr*; 9 %) > 3 Gal (*Pyr*; 9 %) > 4 Glu (*Pyr*; 6 %) > 2 Glu (*Pyr*; 5 %) > 4 Gal (*Pyr*; 1 %). Während 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose bei der Herstellung A als Transgalactosyl-produkt der β -

Galactosidase im Zusammenhang mit der enzymatischen Lactosehydrolyse diskutiert wurde, wurden die Verunreinigungen 1 - 5 bei der Herstellung C als Reversionszucker in Verbindung mit säurekatalysierten Lactosehydrolysebedingungen gewertet.

In der Galactose nach D wurde Glucose neben Spuren von Isomaltose und Gentiobiose, die unter säurekatalysierten Hydrolysebedingungen aus Glucose oder Lactose entstehen, identifiziert. Daneben wurde HMF als Zuckerabbauprodukt und die Anhydrozucker 1,6-Anhydro- β -D-gluco- und -galactopyranose quantitativ bestimmt, die Indikatoren für erhitzte Kohlenhydratgemische darstellen und vermehrt unter sauren Bedingungen gebildet werden. Im Vergleich zu den anderen Endprodukten war ein höherer Chlorid-Gehalt zu beobachten. Das Verunreinigungsmuster im Kohlenhydrat-Bereich im Endprodukt der Herstellung D zeigte große Übereinstimmung mit dem Verunreinigungsmuster der Zwischenprodukte der Herstellung C und gab somit Rückschlüsse auf eine Lactosehydrolyse unter sauren Reaktionsbedingungen. Dabei könnte Salzsäure verwendet worden sein. Im Endprodukt der Herstellung C konnte dagegen nur noch HMF nachgewiesen werden, obwohl Anhydrozucker auch in den Zwischenprodukten dieser Herstellung auftraten. In der Galactose F wurde neben HMF auch noch 1,6-Anhydro- β -D-gluco- und -galactopyranose nachgewiesen. Letztere können aus Galactose und Glucose hervorgehen. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde bei diesem Galactose-Herstellungsverfahren auch eine Lactosehydrolyse unter sauren Bedingungen durchgeführt. Gestützt wird diese Aussage auch durch das Fehlen von Anhydrozuckern beim diskutierten enzymatischen Lactosehydrolyseverfahren der Herstellung A.

Die Verunreinigungen im Bereich der organischen Säuren wurden mit Hilfe der Ionenausschluß- und Ionenaustauschchromatographie in Verbindung mit einer entsprechenden Suppressionstechnik zur verbesserten Leitfähigkeitsdetektion untersucht. Die anorganischen Anionen zeigten ein ähnliches Retentionsverhalten und wurden gleichzeitig miterfaßt. Zur Absicherung von quantitativen Ergebnissen wurden einige ausgewählte organische Säuren auch enzymatisch bestimmt. Die Analyse von Kationen erfolgte flammenphotometrisch und atomabsorptionsspektrometrisch aus den veraschten Proben.

In der Galactose D wurden L-Äpfel-, Bernstein- und Zitronensäure nachgewiesen, die als Intermediate aus dem Zitronensäurezyklus des Atmungsprozesses einen Hinweis auf eine Glucosevergärung mit Hilfe eines Hefestammes geben könnten. Daneben wurde Glycerin dünn-schichtchromatographisch und mit Hilfe der HPLC und einer refraktometrischen Detektion bestimmt. Es wurde als wichtigstes Nebenprodukt bei der alkoholischen Gärung diskutiert. Freies Phosphat wurde in geringen Mengen quantifiziert. Es zählt zu den Hauptkomponenten innerhalb der Mineralstoffe in der Hefe. Freies Phosphat trat auch in den Zwischenprodukten der Herstellung A, B und C auf und wurde dort im Zusammenhang mit organischen Säuren aus dem Zitratzyklus und Glycerin als Hinweis auf eine Glucosevergärung gedeutet.

Ein ähnliches Verunreinigungsmuster lag im Endprodukt der Herstellung B vor. Neben geringen Mengen von ungebundenem Phosphat wurde lediglich Zitronensäure nachgewiesen. Oxalsäure, die ebenfalls in den Zwischenprodukten der Herstellung A, B und C zu beobachten war, gibt möglicherweise einen Hinweis auf einen oxidativen Kohlenhydratabbau während des Herstellungsprozesses. Im Vergleich zu den anderen Endprodukten war der Magnesium-, Calcium- und Sulfat-Gehalt leicht erhöht und läßt möglicherweise Rückschlüsse auf den Zusatz von anorganischen Salzen beim Fermentationsvorgang zu.

Beim Herstellungsverfahren nach A konnte im Endprodukt neben 6-O- β -D-Galactopyranosyl-D-galactose nur noch L-Äpfelsäure und Zitronensäure als Zwischenprodukte des Zitratzyklus nachgewiesen werden.

Die Analyse der Galactose F ergab Glycerin und einen im Vergleich zu den anderen Endprodukten leicht erhöhten Magnesium-Gehalt. Als einzige qualitative Besonderheit wurde der Nachweis von geringen Mengen Nitrat registriert. Bisher wurde Glycerin als Nebenprodukt bei der alkoholischen Gärung und Magnesium als wichtiger Cofaktor bei enzymatischen Reaktionen beschrieben. Da weder freies Phosphat, noch organische Säuren aus dem Zitratzyklus identifiziert wurden, wäre bei dieser Galactose-Herstellung ein mikrobiologisches Verfahren zur Glucoseoxidation im Rahmen der Aufreinigung von Rohgalactose zu überdenken. Möglicherweise wird bei diesem technologischen Prozess ebenfalls Glycerin als Nebenprodukt gebildet oder als Hilfsstoff eingesetzt. Eine sichere Aussage über die Herkunft von Glycerin könnte nur im Rahmen einer Analyse von Zwischenprodukten aus dem Herstellungsprozess getroffen werden, die nicht zur Verfügung standen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass grundlegende Erkenntnisse über die Nebenprodukte in Galactose in Abhängigkeit von ihrer Herstellung durch die chemische Analyse der Zwischenprodukte von den Herstellern A, B und C erworben wurden. Auf dieser Basis konnten die qualitativen und quantitativen Ergebnisse von Verunreinigungen in den Endprodukten der vorliegenden Hersteller A-E interpretiert und diskutiert werden. Die aufgeführten Nebenprodukte aus dem Kohlenhydratbereich und 5-Hydroxymethyl-2-furfural als Kohlenhydratabbauprodukt lieferten entscheidende Hinweise auf durchgeführte Verfahren bzw. auf bestimmte technologische Parameter zur Spaltung von Lactose in ihre monomeren Bestandteile. Der zweite Abschnitt in den Galactose-Herstellungsverfahren, der sich mit der Aufreinigung der Rohgalactose beschäftigt, bietet verschiedene technologische Möglichkeiten, die anhand von wenigen Leitsubstanzen nur mit ungesicherten Aussagen abzuleiten sind. Eine hohe Effizienz von Aufreinigungsschritten, wie sie beispielsweise bei der Herstellung E beobachtet und in diesem Fall möglicherweise durch den Einsatz der Chromatographie erzielt wurde, erschwert die Herleitung einer Herstellungsvariante zusätzlich.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
1,6-AH- β -D-....	1,6-Anhydro- β -D-....
CI	Chemische Ionisation
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol
ED	Elektrochemischer Detektor
EI	Elektronenstoßionisation
fur	Furanose
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GC/FID	Gaschromatographie/Flammenionisationsdetektor
Glu	Glucose
HMF	5-Hydroxymethyl-2-furfural
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
HPICE	Ionenausschlußchromatographie
HPIC	Ionenaustauschchromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Int. St.	Interner Standard
Kris	Kristallisat
MALDI-TOF-MS	Matrixassoziierte Laserdesorptionsionisation-Flugzeitmassenspektrometrie
MG	Molgewicht
Mula	Mutterlauge (Kristallisationsüberstand)
m/z	Masse/Elementarladungsverhältnis
p.a.	analysenrein
PED	gepulster elektrochemischer Detektor
pyr	Pyranose
RI	Brechungsindex
RP	Reversed phase
S	Standardabweichung
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis
Tab.	Tabelle
VK	Variationskoeffizient

- Anhang 0 - Kohlenhydratanalytik
- Anhang I - Analytik der organischen Säuren
- Anhang II - Analytik der Anionen und Kationen
- Anhang III - Analytik von Aminosäuren
- Anhang IV - Analytik von Glycerin
- Anhang V - Analytik von HMF
- Anhang VI - Dichte und pH-Wert
- Anhang VII - Übersicht über die Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten

Anhang 0 - Kohlenhydratanalytik

- Tab. A-0-1 Rf-Werte von Vergleichssubstanzen (dünnschichtchromatographisches System II siehe Punkt 4.2.4)
- Tab. A-0-2 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Sugar Pak I (Fa. Waters)
- Tab. A-0-3 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)

Anhang I - Analytik der organischen Säuren

- Tab. A-I-1 Retentionszeiten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AS1 (Fa. Dionex)
- Tab. A-I-2 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren - Ion Pac AS1 (Fa. Dionex)
- Tab. A-I-3 Enzymatische Bestimmung von L-Milchsäure
- Tab. A-I-4 Enzymatische Bestimmung von L-Äpfelsäure
- Tab. A-I-5 Enzymatische Bestimmung von Bernsteinsäure
- Tab. A-I-6 Enzymatische Bestimmung von Brenztraubensäure
- Tab. A-I-7 Enzymatische Bestimmung von Zitronensäure
- Tab. A-I-8 Gehalte von α -Ketocarbonsäuren, ermittelt durch RP-HPLC nach Derivatisierung
- Tab. A-I-9 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)
- Tab. A-I-10 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AG4A-SC Guard + Ion Pac AS4A-SC Analytical + Ion Pac AS4 Analytical (Fa. Dionex) - organische Säuren
- Tab. A-I-11 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AS11 (Fa. Dionex)

Anhang II - Analytik der Anionen und Kationen

- Tab. A-II-1 Kationen (a) und Anionen (b) in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactoseherstellungen
- Tab. A-II-2 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AG4A-SC Guard + Ion Pac AS4A-SC Analytical + Ion Pac AS4 Analytical (Fa. Dionex) - anorganische Anionen

Anhang III - Analytik von Aminosäuren

Tab. A-III-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren von Glycin und Prolin bei der photometrischen Bestimmung der Aminostickstoff-Menge

Anhang IV - Analytik von Glycerin

Tab. A-IV-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Ion Pac AS 1 (Fa. Dionex)

Tab. A-IV-2 Glycerin-Gehalt in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactoseherstellungen

Anhang V - Analytik von HMF

Tab. A-V-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)

Anhang VI - pH-Wert

Tab. A-VI-1 pH-Wert von den Mutterlaugen der Herstellung A und C

Anhang VII - Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten

Tab. A-VII-1 Übersicht über die Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten

Anhang 0 Kohlenhydratanalytik

Tab. A-0-1 Rf-Werte von Vergleichsstubstanzen (dünnschichtchromatographisches System II siehe Punkt 4.2.4)

Vergleichssubstanzen	Rf-Wert	Farbe (Sprühreagenz II siehe Punkt 4.2.4)
Stachyose	0,18	lila
Galactosyl-lactose	0,22	lila-grau
6-O- β -D-Gal-gal	0,23	lila
4-O- α D-Gal-gal	0,27	lila
Lactulose	0,27	lila (mit Schweif)
Melibiose	0,27	lila
Lactitol	0,29	grau-braun
Gentiobiose	0,30	lila
Lactose	0,30	lila
Isomaltose	0,30	lila
4-O- β -D-Gal-man	0,32	lila-grau
Galactosamin	0,33	schwach grünlich
Trehalose	0,35	lila
Sophorose	0,36	lila
Lactobionsäure	0,37	lila-grau
Maltose	0,38	lila
Nigerose	0,39	lila
Cellobiose	0,39	lila
D-Glucosamin	0,39	schwach grünlich
Galactose	0,39	lila
Saccharose	0,43	rötlich
Glucose	0,43	lila
Galacturonsäure	0,44	blau
Talose	0,44	lila-grau
Psicose	0,44	rosa (mit Schweif)
Mannose	0,45	grau
Fructose	0,46	rötlich (mit Schweif)
Sorbose	0,50	rötlich (mit Schweif)
Tagatose	0,50	lila (mit Schweif)
Glucuronsäure	0,57	blau-grau
Maltol	0,62	weiß bei 366 nm
1,6-AH- β -D glucopyr	0,66	rosa
1,6 -AH- β -D-galactopyr	0,74	lila
HMF	0,93	lila mit rotem Kern

Folgende Substanzen wurden nicht detektiert:

Schleimsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, D-Galactonsäure Hemicalciumsalz, Zitronensäure, Äpfelsäure, Gluconsäure, L-Galactonsäure γ -Lacton, Dulcitol

Tab. A-0-2: Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Sugar Pak I (Fa. Waters)

Parameter	L-(-)-Äpfelsäure	Bernstein- säure	1,6-Anhydro-β- D-galactopyr	1,6-Anhydro-β- D- glucopyr
unterer Konzentrationsbereich	0,21 µg/10µl	0,21 µg/10µl	0,20 µg/10µl	0,21 µg/10µl
oberer Konzentrationsbereich	21,2 µg/10µl	21,0 µg/10µl	20,4 µg/10µl	21,2 µg/10µl
Steigung (b)	3487,9	3465,4	4318,6	4527,0
Konfidenzbereich (T _b)	200,21	193,77	24,628	45,716
Achsenabschnitt (a)	661,07	-598,81	50,393	176,82
Konfidenzbereich (T _a)	1851,1	1660,1	204,97	422,68
Korrelationskoeffizient	0,9959	0,9953	1,000	0,9999
Nachweisgrenze (S/N = 3)	0,22 µg/10µl	0,27 µg/10µl	0,21 µg/10µl	0,24 µg/10µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	0,70 µg/10µl	0,82 µg/10µl	0,66 µg/10µl	0,80 µg/10µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.1.2)

Tab. A-0-3: Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)

Parameter	1,6-β-D- Anhydro- Glucose	1,6-β-D- Anhydro- Galactose	6-O-β-D- Galactopyrano- syl-D-Galactose	Lactose
unterer Konzentrationsbereich	2,5 ng/50µl	5,6 ng/50µl	12,5 ng/50µl	15,4 ng/50µl
oberer Konzentrationsbereich	50,0 ng/50µl	446,0 ng/50µl	500,0 ng/10µl	614,0 ng/50µl
Steigung (b)	778,20	595,35	336,31	356,10
Konfidenzbereich (T _b)	16,325	32,997	29,481	13,814
Achsenabschnitt (a)	-770,02	8299,9	-137,81	-723,95
Konfidenzbereich (T _a)	420,20	6421,6	694,69	3997,3
Korrelationskoeffizient	0,9997	0,9961	0,9923	0,9985
Nachweisgrenze (S/N = 3)	1,4 ng/50µl	1,6 ng/50µl	5,8 ng/50µl	3,9 ng/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	4,9 ng/50µl	5,3 ng/50µl	14,8 ng/50µl	11,5 ng/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.1 und 4.2.1.2.2)

Anhang I - Analytik der organischen Säuren

Tab. A-I-1 Retentionszeiten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AS1 (Fa. Dionex)

Organische Säure	Retentionszeit [min]	Nachweisgrenze S/N=3 [ng/50µl]	Bestimmungsgrenze S/N=10 [ng/50µl]
Oxalsäure	16.12	4,6	11,3
Lactobionsäure	16.81	231,9	1140,2
2-Ketoglutarinsäure	18.09	8,3	26,5
D-Glucuronsäure	18.37	41,1	131,6
Schleimsäure	18.47	98,0	340,3
Brenztraubensäure	19.17	22,3	52,2
Zitronensäure	19.45	6,2	24,2
D-Galactonsäure	19.84	103,6	349,8
D-Galacturonsäure	20.05	145,1	497,3
D-Gluconsäure	20.36	43,9	176,4
Glyoxylsäure	21.67	18,0	59,7
L-(-)-Äpfelsäure	22.85	8,7	29,4
trans-Aconitsäure	24.15	15,2	44,9
Glycerinsäure	24.22	82,8	258,9
Bernsteinsäure	26.91	33,5	111,2
Milchsäure	27.16	10,8	52,3
Glykolsäure	28.22	16,7	59,4
Ameisensäure	29.62	9,9	29,3
Essigsäure	31.61	15,9	48,2
Levulinsäure	34.7	63,3	222,0
Fumarsäure	35.48	14,6	42,5
Propionsäure	36.55	34,9	84,2

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.4.3)

Tab. A-I-2 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren - Ion Pac AS1 (Fa. Dionex)

Parameter	untere Konz.	obere Konz.	Steigung	Konfidenz - bereich	Achsen- abschnitt	Konfidenz - bereich	KF
Substanz	[ng/50µl]	[ng/50µl]	(b)	(T _b)	(a)	(T _a)	
Oxalsäure	2,9	1168	3432	64,8	28683	27497	0,9993
2-Ketoglutar.	9,1	3648	1757	7,1	2792	9394	1,000
Zitronens.	4,0	1584	2417	11,0	-33,8	6350	1,000
Weinsäure	12,5	4992	1476	5,1	-1826	9241	1,000
L-(-)-Äpfelsäure	5,5	22,08	1972	12,2	-8449	9780	0,9999
Milchsäure	15,9	6368	1055	4,0	2309	9204	1,000
Ameisensäure	6,9	1385	2698	16,4	-17548	8701	0,9999
Essigsäure	12,8	2568	1742	18,5	-18567	18186	0,9998
Fumarsäure	16,2	3240	2207	8,7	4562	10837	1,000
Tartronsäure	17,2	860	2220	12,9	-4711	481	1,000
Schleimsäure	121,6	6080	504	4,2	8603	11204	1,000
D-Galacturons.	161,8	8092	372	5,0	3558	17725	0,9999
L-Threonsäure	85,4	4270	577	10,6	-5714	19757	0,9999
Glycerinsäure	61,6	3078	745	18,8	-9605	25120	0,9998
Bernsteinsäure	25,0	1251	2142	29,6	-19632	16111	0,9999
Lactobionsäure	16,4	8213	59,1	3,0	-14555	10895	0,9966
D-Galactonsäure	54,5	10894	20,5	3,0	3182	12647	0,9996
Glyoxylsäure	12,2	2438	1077	10,5	1724	9794	0,9998
trans-Aconits.	12,8	2568	2382	27,2	2766	26786	0,9998
Glykolsäure	6,6	1329	1400	39,7	-12314	19920	0,9986
D-Glucuronsäure	31,2	3121	366,6	4,8	-5338	5897	0,9997
Brenztraubens.	36,0	1798	1000	14,2	-14548	11115	0,9997
D-Gluconsäure	52,6	2632	316,3	7,7	-5876	8777	0,9993
Levulinsäure	56,6	5664	376,4	8,6	-13851	19689	0,9992
Propionsäure	47,0	2350	1253	32,4	-47776	33076	0,9992

(Lineare Regression: $y = a + b * x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.4.3)

Tab. A-I-3 Enzymatische Bestimmung von L-Milchsäure

Probe	Verdünnung bzw. Einwaage	Proben- volumina	Gehalt L-Milch- säure [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]	WF [%]
Mula1/A	1:2	100 µl				99,8 ± 4,4
	-	100 µl	11,3	0,6	5,7	102,0 ± 0,2
Mula2/A	-	250 µl	1,92	0,02	1,3	100,6 ± 0,4
Mula3/A	-	1000 µl	trübe			
1.Kris/A	1 g/10 ml	1000 µl	3,9	0,1	2,6	103,6 ± 0,6
2.Kris/A	1 g/10 ml	1000 µl	< 1,81*	0,02	1,0	105,7 ± 0,5
3.Kris/A	1 g/10 ml	500 µl				-
	1 g/10 ml	1000 µl	< 1,84*	0,29	22,6	100,5 ± 0,3
Gal/A	1 g/10 ml	500 µl				-
	1 g/10 ml	1000 µl	< 1,85*	0,35	22,5	102,1 ± 0,6
1.Kris/B	1 g/10 ml	500 µl				97,0 ± 0,8
	1 g/10ml	1000 µl	8,5	0,1	1,3	103,7
2.Kris/B	1 g/10 ml	1000 µl	< 1,91*	0,06	3,3	104,5 ± 0,5
Mula1/C	1:5	100 µl				102,3 ± 1,4
	1:5	250 µl	24,6	1,1	4,4	100,6 ± 1,4
Mula2/C	-	125 µl				108,0 ± 0,7
	-	250 µl	2,8	0,5	16,9	100,9 ± 0,7
1.Kris/C	1 g /10 ml	500 µl				100,4 ± 0,6
	1 g/10 ml	1000 µl	2,3	0,2	9,8	103,8 ± 1,6
2.Kris/C	1 g/10 ml	1000 µl	< 1,86*	0,02	1,4	102,4 ± 0,2
Gal/D	1 g/10 ml	500 µl				-
	1 g/10 ml	1000 µl	2,1	0,2	9,2	101,8 ± 0,5
Gal/E	1 g/10 ml	500 µl				-
	1 g/10 ml	1000 µl	2,6	0,4	15,2	67,0 ± 3,0
Gal/F	1 g/10 ml	1000 µl	2,0	0,1	4,8	102,5 ± 0,6

* Der Bestimmungsansatz enthielt weniger als 2 µg L-Milchsäure in der Küvette. Der Arbeitsbereich lag zwischen 2 µg und 35 µg L-Milchsäure in der Küvette (0,1 -1,0 ml).

Die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Exinktionseinheiten betragen. Dieser Wert wurde bei folgenden Proben unterschritten: 2.-3.Kris/A, Gal/A, 2.Kris/B, 2. Kris/C, Gal/D-F.

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.5)

Tab. A-I-4 Enzymatische Bestimmung von L-Äpfelsäure

Probe	Verdünnung bzw. Einwaage	Proben- volumina	Gehalt L-Äpfel- säure [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]	WF [%]
Mula1/A	1:10	100 µl				101,2 ± 1,6
	1:20	100 µl	148,9	3,9	2,6	99,3 ± 1,0
Mula2/A	1:5	100 µl				100,7 ± 0,9
	1:2	100 µl	42,3	0,9	2,1	102,3 ± 5,1
Mula3/A	-	250 µl				97,4 ± 1,2
	-	500 µl	4,2	0,1	2,6	95,0
1.Kris/A	1 g/10 ml	100 µl				99,0 ± 0,2
	1 g/10 ml	200 µl	64,1	0,3	0,5	99,3 ± 0,2
2.Kris/A	1 g/10 ml	500 µl				100,0 ± 0,9
	1 g/10 ml	1000 µl	14,2	0,2	1,4	98,8 ± 0,4
3.Kris/A	1 g/10 ml	1000 µl	1,59	0,08	5,1	100,2 ± 0,0
Gal/A	1 g/10 ml	1000 µl	1,93	0,02	1,0	99,6 ± 0,4
1.Kris/B	1 g/10 ml	1000 µl	3,0	0,1	1,6	112,5 ± 7,3
2.Kris/B	1 g/10 ml	1000 µl	2,1	0,1	2,2	102,8 ± 0,2
Mula1/C	1:5	100 µl				97,9 ± 0,5
	1:2	100 µl	33,0	0,5	1,4	96,2 ± 1,4
Mula2/C	1:2	100 µl				95,5 ± 0,7
	-	100 µl	1,56	0,06	4,5	96,6 ± 1,0
1.Kris/C	1 g /10 ml	1000 µl	1,69	0,36	21,2	100,0 ± 0,9
2.Kris/C	1 g/10 ml	1000 µl	1,77	0,02	1,1	102,6 ± 1,2
Gal/D	1 g/10 ml	1000 µl	3,0	0,1	1,6	101,8 ± 1,0
Gal/E	1 g/10 ml	1000 µl	1,85	0,05	2,9	100,0 ± 0,2
Gal/F	1 g/10 ml	1000 µl	2,2	0,1	3,9	100,5 ± 0,0

Die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Exinktionseinheiten betragen. Dieser Wert wurde bei folgenden Proben unterschritten: 3.Kris/A, Gal/A, 1.-2.Kris/B, Mula2/C, 1.-2. Kris/C, Gal/D-F.

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.5)

Tab. A-I-5 Enzymatische Bestimmung von Bernsteinsäure

Probe	Verdünnung bzw. Einwaage	Proben- volumina	Gehalt Bernstein- säure [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]	WF [%]
Mula1/A	1:100	100 µl				99,4 ± 0,8
	1:50	100 µl	770,8	3,7	0,5	-
Mula2/A	1:10	100 µl				96,7 ± 0,6
	1:5	100 µl	119,6	0,9	0,8	98,0 ± 1,4
Mula3/A	-	200 µl				103,0 ± 1,8
	-	200 µl	4,8	0,1	2,4	96,0 ± 2,0
1.Kris/A	0,5 g/10 ml	100 µl				106,6 ± 0,6
	1 g/10 ml	100 µl	165,4	8,0	4,8	103,3 ± 3,6
2.Kris/A	1 g/10 ml	1000 µl				101,2 ± 0,3
	1 g/10 ml	2000 µl	11,7	0,1	0,7	99,4 ± 0,6
3.Kris/A	1 g/10 ml	2000 µl	< NG*			100,5 ± 0,0
Gal/A	1 g/10 ml	2000 µl	< NG	0,04	8,0	96,5 ± 2,5
1.Kris/B	1 g/10 ml	1000 µl				102,0 ± 3,2
	1 g/10 ml	2000 µl	22,3	0,6	2,8	103,4 ± 0,6
2.Kris/B	1 g/10 ml	2000 µl	< NG*	0,11	21,6	101,8 ± 1,2
Mula1/C	1:100	100 µl				99,2 ± 1,4
	1:50	100 µl	608,8	18,1	3,0	104,3 ± 0,3
Mula2/C	-	200 µl				90,8 ± 3,0
	-	500 µl	1,75	0,26	15,0	85,1 ± 3,3
1.Kris/C	1 g /10 ml	2000 µl	0,83	0,38	45,8	93,2 ± 3,0
2.Kris/C	1 g/10 ml	2000 µl	< NG*			96,2 ± 1,5
Gal/D	1 g/10 ml	1000 µl				94,7 ± 0,8
	1 g/10 ml	2000 µl	4,3	0,1	3,0	97,2 ± 1,1
Gal/E	1 g/10 ml	2000 µl	< NG*			100,8 ± 0,8
Gal/F	1 g/10 ml	2000 µl	< NG*			101,2 ± 3,4

* In einem Liter der Probelösung waren weniger als 0,6 mg Bernsteinsäure enthalten. Die Nachweisgrenze ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen von 2,0 ml. Der Arbeitsbereich lag zwischen 1 µg und 40 µg Bernsteinsäure in der Küvette (0,1 - 2,0 ml).

Die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Exinktionseinheiten betragen. Dieser Wert wurde bei folgenden Proben unterschritten: 3.Kris/A, Gal/A, 2.Kris/B, 1.-2. Kris/C, Gal/E-F.

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.5)

Tab. A-I-6 Enzymatische Bestimmung von Brenztraubensäure

Probe	Verdünnung bzw. Einwaage	Proben- volumina	Gehalt Brenztrau- bensäure [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]	WF [%]
Mula1/A	1:10	100 µl				100,4 ± 0,4
	1:5	100 µl	120,1	2,7	2,2	101,8 ± 0,4
Mula2/A	-	100 µl				100,2 ± 1,4
	-	200 µl	17,4	0,8	4,6	99,4 ± 2,2
Mula3/A	-	2000 µl	trübe			
1.Kris/A	1 g/10 ml	500 µl				100,1 ± 0,7
	1 g/10 ml	1000 µl	17,0	0,3	1,7	101,8 ± 0,6
2.Kris/A	1 g/10 ml	2000 µl	1,02	0,04	3,9	99,3 ± 0,3
3.Kris/A	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,91*			95,7 ± 0,6
Gal/A	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,98*			97,8 ± 0,2
1.Kris/B	0,5 g/10 ml	2000 µl	< 1,06*			101,5 ± 1,2
2.Kris/B	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,96*			100,4 ± 0,4
Mula1/C	1:2	100 µl				101,2 ± 0,2
	1:5	100 µl	8,1	0,3	4,0	99,4 ± 0,8
Mula2/C	-	1000 µl				97,8 ± 2,4
	-	2000 µl	1,57	0,01	0,8	115,0 ± 16,0
1.Kris/C	1 g /10 ml	1000 µl	< 1,98*			96,8 ± 0,6
2.Kris/C	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,99*			101,0 ± 0,2
Gal/D	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,96*			98,5 ± 0,0
Gal/E	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,94*			89,6 ± 1,4
Gal/F	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,97*			97,1 ± 0,3

* Der Bestimmungsansatz enthielt weniger als 2 µg Brenztraubensäure in der Küvette. Der Arbeitsbereich lag zwischen 2 µg und 50 µg Brenztraubensäure in der Küvette (0,1 - 2,0 ml).

Die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Exinktionseinheiten betragen. Dieser Wert wurde bei folgenden Proben unterschritten: 2.-3.Kris/A, Gal/A, 1.-2.Kris/B, 1.-2. Kris/C, Gal/D-F.

(Vorschrift siehe 4.2.5)

Tab. A-I-7 Enzymatische Bestimmung von Zitronensäure

Probe	Verdünnung bzw. Einwaage	Proben- volumina	Gehalt Zitronen- säure [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]	WF [%]
Mula1/A	-	200 µl	13,2	0,4	2,8	101,6 ± 8,0
Mula2/A	-	200 µl	6,5	0,1	0,8	98,6 ± 0,8
Mula3/A	-	200 µl	7,6	0,1	0,4	98,7 ± 0,2
1.Kris/A	1 g/10 ml	200 µl	37,2	1,2	3,1	101,3 ± 0,2
2.Kris/A	1 g/10 ml	2000 µl	32,4	0,1	0,2	99,0 ± 1,2
3.Kris/A	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,42*			101,8 ± 0,0
Gal/A	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,45*			102,2 ± 0,2
1.Kris/B	1 g/10 ml	2000 µl	18,4	0,1	0,3	101,2 ± 0,2
2.Kris/B	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,45*			100,1 ± 0,0
Mula1/C	1:10	200 µl				-
	-	1000 µl	6,5	0,6	9,5	112,4
Mula2/C	-	200 µl	n.n.			99,8 ± 1,0
1.Kris/C	1 g /10 ml	2000 µl	< 0,50*			101,3 ± 0,1
2.Kris/C	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,44*			100,8 ± 0,4
Gal/D	1 g/10 ml	2000 µl	< 0,48*			102,6 ± 0,1
Gal/E	1 g/10 ml	2000 µl	n.n.			102,6 ± 0,2
Gal/F	1 g/10 ml	2000 µl	n.n.			106,0 ± 1,2

* Der Bestimmungsansatz enthielt weniger als 1 µg Zitronensäure in der Küvette. Der Arbeitsbereich lag zwischen 1 µg und 80 µg Brenztraubensäure in der Küvette (0,2 - 2,0 ml).

Die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Exinktionseinheiten betragen. Dieser Wert wurde bei folgenden Proben unterschritten: 3.Kris/A, Gal/A, 2.Kris/B, 1.-2. Kris/C, Gal/D. Bei Mula2/C, Gal/E-F war die Extinktionsdifferenz gleich Null.
(Vorschrift siehe 4.2.5)

Tab. A-I-8 Gehalte von α -Ketocarbonsäuren, ermittelt durch RP-HPLC nach Derivatisierung

Probe Volumen Anzahl der Messungen	$f_{2\text{-KG}}$	f_{GS}	f_{PA}	2-KG [mg/100g]	GS [mg/100g]	PA [mg/100g]
	Anzahl der Messungen	Anzahl der Messungen	Anzahl der Messungen	VK	VK	VK
Mula 1/A 1 ml n=6	0,543 n=6	0,322 n=6	0,430 n=6	109,8 \pm 1,0 1,0 %	1,09 \pm 0,07 6,7 %	126,2 \pm 1,2 1,0 %
Mula 1/A 0,7 ml n=6	0,543 n=6	0,322 n=6	0,430 n=6	110,1 \pm 1,2 1,1 %	1,90 \pm 0,24 12,4 %	127,8 \pm 1,2 1,0 %
Mula 2/A 1 ml n=6	0,549 n=9	0,317 n=9	0,425 n=9	24,7 \pm 0,3 1,2 %	0,09 \pm 0,01 6,7 %	18,2 \pm 0,1 0,4 %
Mula 2/A 0,7 ml n=6	0,549 n=9	0,317 n=9	0,425 n=9	24,4 \pm 0,3 1,1 %	0,11 \pm 0,02 11,8 %	18,0 \pm 0,1 0,4 %
Mula 3/A 350 μ l n=10	0,476 n=6	0,257 n=6	0,385 n=6	0,44 \pm 0,01 2,4 %	0,0051 \pm 0,0002 4,6 %	0,53 \pm 0,02 3,1 %
Mula 3/A 250 μ l n=10	0,450 n=6	0,248 n=6	0,369 n=6	0,46 \pm 0,01 1,8 %	0,0055 \pm 0,0004 6,1 %	0,51 \pm 0,01 2,5 %
Mula 1/C 1 ml n=6	0,500 n=6	0,266 n=6	0,404 n=6	36,9 \pm 0,5 1,3 %	0,53 \pm 0,02 3,4 %	9,3 \pm 0,1 1,1 %
Mula 1/C 0,7 ml n=6	0,547 n=6	0,299 n=6	0,436 n=6	38,1 \pm 0,5 1,3 %	0,76 \pm 0,09 11,3 %	9,6 \pm 0,1 1,0 %
Mula 2/C 1 ml n=6	0,500 n=6	0,266 n=6	0,404 n=6	n.n.	1,68 \pm 0,04 2,6 %	0,15 \pm 0,01 2,9 %
Mula 2/C 0,7 ml n=6	0,540 n=6	0,303 n=6	0,437 n=6	n.n.	1,87 \pm 0,09 4,6 %	0,16 \pm 0,01 6,7 %

(Vorschrift siehe 4.3.3.2 und 4.2.1.3.1)

Tab. A-I-9 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)

Parameter	Galacton- säure	Glucon- säure	Lactobion- säure	Galacturon- säure	Glucuron- säure
unterer Konzentrationsbereich	0,55 µg/50µl	0,54 µg/50µl	0,60 µg/50µl	0,55 µg/50µl	0,28 µg/50µl
oberer Konzentrationsbereich	8,7 µg/50µl	8,7 µg/50µl	9,6 µg/50µl	8,8 µg/50µl	9,6 µg/50µl
Steigung (b)	581070	840350	319650	548560	854640
Konfidenzbereich (T _b)	18154	30628	3228	21815	8753
Achsenabschnitt (a)	-28322	-59930	-103795	77649	-43324
Konfidenzbereich (T _a)	82109	137210	16075	99084	43370
Korrelationskoeffizient	0,9986	0,9982	0,9999	0,9978	0,9999
Nachweisgrenze (S/N = 3)	0,61 µg/50µl	0,53 µg/50µl	1,83 µg/50µl	0,52 µg/50µl	0,19 µg/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 6)	1,05 µg/50µl	0,91 µg/50µl	4,06 µg/50µl	1,29 µg/50µl	0,39 µg/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.3)

Tab. A-I-10 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AG4A-SC Guard + Ion Pac AS4A-SC Analytical + Ion Pac AS4 Analytical (Fa. Dionex) - organische Säuren

Parameter	Schleimsäure	Oxalsäure	2-Ketoglutar säure
unterer Konzentrationsbereich	8,51 ng/50µl	4,76 ng/50µl	13,82 ng/50µl
oberer Konzentrationsbereich	340,48 ng/50µl	95,23 ng/50µl	276,48 ng/50µl
Steigung (b)	336,06	1029,2	405,16
Konfidenzbereich (T _b)	15,56	35,79	22,00
Achsenabschnitt (a)	-2273,5	-1515,4	-4398,6
Konfidenzbereich (T _a)	2964,2	2088,8	3727,7
Korrelationskoeffizient	0,9978	0,9991	0,9978
Nachweisgrenze (S/N = 3)	7,90 ng/50µl	7,79 ng/50µl	16,58 ng/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	21,99 ng/50µl	21,74 ng/50µl	76,40 ng/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.6)

Tab. A-I-11 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AS11 (Fa. Dionex)

Parameter	Phosphat	Zitronensäure	Iso-Zitronensäure	cis-Aconitensäure	trans-Aconitensäure
unterer Konzentrationsbereich	1,27 ng/50µl	1,79 ng/50µl	1,19 ng/50µl	1,27 ng/50µl	1,25 ng/50µl
oberer Konzentrationsbereich	25,46 ng/50µl	35,76 ng/50µl	23,76 ng/50µl	25,4 ng/50µl	25,0 ng/50µl
Steigung (b)	1421,2	1681,3	1598,6	1689,2	1799,8
Konfidenzbereich (T _b)	48,199	27,040	59,275	29,282	29,578
Achsenabschnitt (a)	-1039,0	-567,10	-692,03	-609,16	-686,34
Konfidenzbereich (T _a)	63,17	497,77	725,02	382,88	380,65
Korrelationskoeffizient	0,9991	0,9998	0,9990	0,9998	0,9998
Nachweisgrenze (S/N = 3)	1,32 ng/50µl	0,49 ng/50µl	0,88 ng/50µl	0,95 ng/50µl	0,49 ng/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	2,70 ng/50µl	2,25 ng/50µl	2,62 ng/50µl	2,67 ng/50µl	1,53 ng/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.5)

Anhang II - Analytik der Anionen und Kationen

Tab. A-II-1 (a) Kationen in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactoseherstellungen, bezogen auf wasser- und lösungsmittelfreie Probe

Probe/Hersteller	Natrium [mg/100g]	Kalium [mg/100g]	Calcium [mg/100g]	Magnesium [mg/100g]
Mutterlauge 1/A	59,6	3836	15,5	2,05
Mutterlauge 2/A	40,8	2914	14,4	10,5
Mutterlauge 3/A	12,3	2050	-	1,26
1. Kristallisat/A	6,64	185,2	12,3	0,23
2. Kristallisat/A	4,73	29,3	9,27	0,27
3. Kristallisat/A	1,41	0,94	< 0,80**	< 0,20**
Galactose/A	1,50	1,50	n.n.	< 0,20**
1. Kristallisat/B	16,2	7,67	24,1	16,0
2. Kristallisat/B	1,80	1,59	0,84	0,40
Mutterlauge 1/C	953,8	112,7	0,28	0,16
Mutterlauge 2/C	487,9	64,3	28,9	13,74
1. Kristallisat/C	2,21	1,61	-	0,20
2. Kristallisat/C	1,70	1,69	< 0,80**	< 0,20**
Galactose/D	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Galactose/E	1,59	1,40	< 0,80**	< 0,20**
Galactose/F	1,40	1,60	< 0,80**	0,77

Tab. A-II-1 (b) Anionen in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactoseherstellungen, bezogen auf wasser- und lösungsmittelfreie Probe

Probe/Hersteller	Chlorid [mg/100g]	Nitrat [mg/100g]	Phosphat [mg/100g]	Sulfat [mg/100g]
Mutterlauge 1/A	68,4	5,14	-	22,8
Mutterlauge 2/A	35,5	4,74	-	37,4
Mutterlauge 3/A	19,7	6,67	-	41,7
1. Kristallisat/A	2,37	0,16	0,36	2,52
2. Kristallisat/A	0,10	-	-	0,89
3. Kristallisat/A	0,02	-	-	< 0,10**
Galactose/A	0,04	-	-	< 0,10**
1. Kristallisat/B	0,93	-	81,4	0,24
2. Kristallisat/B	0,04	-	1,30	0,21
Mutterlauge 1/C	1240	2,23	24,7	44,8
Mutterlauge 2/C	218,6	3,92	0,13	229,6
1. Kristallisat/C	0,68	0,09	< 0,05**	0,10
2. Kristallisat/C	0,05	< 0,08**	-	< 0,10**
Galactose/D	5,26	-	1,60	< 0,45**
Galactose/E	0,04	-	-	n.n.
Galactose/F	0,06	0,21	-	< 0,10**

** < Bestimmungsgrenze; n. b. - nicht bestimmt

Tab. A-II-2 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen - Ion Pac AG4A-SC Guard + Ion Pac AS4A-SC Analytical + Ion Pac AS4 Analytical (Fa. Dionex) - anorganische Anionen

Parameter	Chlorid	Nitrat	Phosphat	Sulfat
unterer Konzentrationsbereich	1,01 ng/50µl	1,17 ng/50µl	82,75 ng/50µl	2,16 ng/50µl
oberer Konzentrationsbereich	40,32 ng/50µl	46,72 ng/50µl	331,01 ng/50µl	43,26 ng/50µl
Steigung (b)	2027,8	999,51	276,77	1493,9
Konfidenzbereich (T _b)	41,51	8,33	48,50	51,66
Achsenabschnitt (a)	1100,3	153,41	-17488	1083,6
Konfidenzbereich (T _a)	936,4	217,71	10990	1369,5
Korrelationskoeffizient	0,9996	0,9999	0,9850	0,9991
Nachweisgrenze (S/N = 3)	0,12 ng/50µl	0,95 ng/50µl	34,98 ng/50µl	0,88 ng/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	0,40 ng/50µl	4,11 ng/50µl	111,24 ng/50µl	4,93 ng/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.6)

Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Phosphat - Ion Pac AS11 (Fa. Dionex) siehe Tab. A-I-11

Anhang III - Analytik von Aminosäuren

Tab. A-III-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren von Glycin und Prolin bei der photometrischen Bestimmung der Aminostickstoff-Menge

Parameter	Glycin	Prolin
Konzentrationsbereich	0,74 µg/10ml - 59,2 µg/10ml	0,73 µg/10ml - 58,2 µg/10ml
Steigung (b)	0,1273	0,0319
Achsenabschnitt (a)	0,0110	0,0183
Korrelationskoeffizient	0,9998	0,9990

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$); (Vorschrift siehe Punkt 4.2.10)

Anhang IV - Analytik von Glycerin

Tab. A-IV-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Ion Pac AS 1 (Fa. Dionex)

Parameter	Glycerin
Konzentrationsbereich	0,116 µg/50µl - 46,332 µg/50µl
Steigung (b)	48653 ± 201,19
Achsenabschnitt (a)	-9338,7 ± 3547,2
Korrelationskoeffizient	1,000
Nachweisgrenze (S/N = 3)	0,03 µg/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	0,11 µg/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b \cdot x$); (Vorschrift siehe Punkt 4.2.14.1)

Tab. A-IV-2 Glycerin-Gehalt in den Zwischen- und Endprodukten der verschiedenen Galactoseherstellungen (n = 6), bezogen auf die wasser- und lösungsmittelfreie Probe

Probe	Gehalt Glycerin [mg/100g]	s [mg/100g]	VK [%]
Mutterlauge 1/A	27516,9	124,9	0,4
Mutterlauge 2/A	14860,5	27,6	0,2
Mutterlauge 3/A	810,0	4,6	0,6
1. Kristallisat/A	948,0	36,4	3,8
2. Kristallisat/A	61,0	3,8	6,2
1. Kristallisat/B	52,0	5,2	10,0
Mutterlauge 1/C	11252,5	76,6	0,7
Mutterlauge 2/C	3336,7	127,5	3,8
1. Kristallisat/C	75,2	7,7	10,2
Galactose/D	118,3	8,6	7,2
Galactose/F	89,0	6,5	8,3

Anhang V - Analytik von HMF

Tab. A-V-1 Linearer Bereich, Kalibrierfaktoren, Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Carbo Pac PA1 (Fa. Dionex)

Parameter	IEC-UV ₂₈₃
Konzentrationsbereich	2,0 -200 ng/50 µl
Steigung (b)	8571,5
Konfidenzbereich (T _b)	333,2
Achsenabschnitt (a)	-12921
Konfidenzbereich (T _a)	32089
Korrelationskoeffizient	0,9983
Nachweisgrenze (S/N = 3)	0,3 ng/50µl
Bestimmungsgrenze (S/N = 10)	0,8 ng/50µl

(Lineare Regression: $y = a + b * c$)

(Vorschrift siehe Punkt 4.2.1.2.4)

Anhang VI - pH-Wert

Tab. A-VI-1 pH-Wert von den Mutterlaugen der Herstellung A und C

Probe/Hersteller	pH-Wert
Mutterlauge 1/A	6,07
Mutterlauge 2/A	6,60
Mutterlauge 3/A	3,93
Mutterlauge 1/C	3,35
Mutterlauge 2/C	4,45

pH-Elektrode

Anhang VII - Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten

Tab. A-VII-1 Übersicht über die Verunreinigungsmuster von den Galactose-Endprodukten

	Gal A [mg/100g]	2. Kris B [mg/100g]	2. Kris C [mg/100g]	Gal D [mg/100g]	Gal E [mg/100g]	Gal F [mg/100g]
Oxalsäure	-	1,7	-	-	-	-
Zitronensäure	0,18	0,23	-	< 0,15	-	-
L-Äpfelsäure	1,9	-	-	3,0	-	-
Bernsteinsäure	-	-	-	4,3	-	-
Milchsäure	-	-	-	0,80	-	-
Glycerin	-	-	-	118	-	89
Glucose	-	-	-	+	-	-
1,6-Anhydro- β-D-glucopyr	-	-	-	< 9,4	-	16,6
1,6-Anhydro- β-D-galpyr	-	-	-	< 9,4	-	9,8
6-O-β-D- Galgal = V 2	873	496	118	820	128	41
V 1, 3, 4, 5	-	-	+	+	+	+
HMF	-	-	0,04	0,10	-	0,15
Chlorid	0,04	0,04	0,05	5,3	0,04	0,06
Nitrat	-	-	< 0,08	-	-	0,21
Sulfat	< 0,10	0,21	< 0,10	< 0,45	-	< 0,10
Phosphat	-	1,3	-	1,6	-	-
Natrium	1,5	1,8	1,7		1,6	1,4
Kalium	1,5	1,6	1,7		1,4	1,6
Calcium	-	0,84	< 0,80		< 0,80	< 0,80
Magnesium	< 0,20	0,40	< 0,20		< 0,20	0,77

8 Literaturverzeichnis

Anastassiadis, S.; Aivasidis, A. et al. (1994). Fermentative manufacture of gluconic acid. PI: DE4317488 A1.

Asp, N. G.; Burvall, A. et al. (1980). "Oligosaccharides formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact). Part 2: Oligosaccharide structures." Food Chem 5: 147-153.

Babel, W.; Mueller, R. et al. (1987). Production of gluconic acid by bacteria. PI: DD-238067 A1.

Babel, W.; Mueller, R. et al. (1988). Continuous microbiell synthesis of products of incomplete oxidation, such as gluconic acid. PI: DD-253836 A1.

Ballio, A.; Russi, S. (1960). "The structure of galactosyl-lactose - a trisaccharid produced from lactose by *Penicillium chrysogenum*." Tetrahedron 9: 125-129.

Baltes, W. (2000) Lebensmittelchemie - 5. Auflage- Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer .

Banerji, K.; Das Asist, K. (1978). A process for the preparation of pure D-Galactose from green *Aegle marmelos* fruit-gum. PI: IN-158940 A.

Beisecker, D. (1989). Preparation of aldonic acids and their salts. PI: DE3704166 A1.

Belitz, H.-D.; Grosch, W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie - 4.Auflage- Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer.

Bergmeyer, H. U.; Jaworek, D. (1974). Gluconic acid. PI: DE2214442.

Bernabe, P.; Di Martino, P. et al. (1997). "An attempt at explaining the variability of the compression capacity of lactose." Pharm Technol 5: 66-78.

Bhargava, V. O., Rahman, S. et al. (1989). "Stability of galactose in aqueous solutions." Am J Hosp Pharm 46: 104-108.

Bimbi, G. (1994). Process for the preparation of crystalline lactulose from commercial syrups. PI: EP-0622374 A1.

Björndal, H.; Hellerqvist, C. G. et al. (1970). "Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides." Angew Chem Int Ed 9: 610-619.

Buxton, C.; Jähnke, R. W. et al. (1994). "Degradation of glucose in the presence of electrolytes during heat sterilisation." Eur J Pharm Biopharm 40: 172-175.

Carobbi, R.; Innocenti, F. (1989). Process for preparing lactulose from epimerization with sodium aluminate. PI: EP-320670 A1.

Carobbi, R.; Miletto, S. et al. (1985). Lactulose from lactose, in the form of a syrup or a crystalline product. PI: US4536221 A1.

Carobbi, R.; Innocenti, F. (1991). Boron resins as highly selective absorbents for purification of lactulose. PI: US-5002613 A.

Ciucanu, I.; Kerek, F. (1984). "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates." Carbohydr Res 131: 209-217.

Cserhati, T.; Forgacs, E. (1997). "Trends in Thin-Layer Chromatography: 1997." J Chromatogr Sci 35: 383-391.

Dahlgren; Ake, S. (1978). Conversion of lactose in useful monosaccharides. PI: DE2712873.

De Jong, E. G.; Heerma, W. et al. (1979). "Electron Impact mass spectrometry of permethylated disaccharides." Biomed Mass Spectrom 6: 72-77.

De Jong, E. G.; Heerma, W. et al. (1979). "Discrimination of permethylated disaccharides by their chemical ionization spectra." Biomed Mass Spectrom 6: 242-248.

Deller, K.; Krause, H. et al. (1990). Catalytic oxidation of glucose to gluconic acid. PI: DE3823301 C1.

Dendene, K.; Guihard, L. et al. (1994). "Kinetics of lactose isomerisation to lactulose in an alkaline medium." J Chem Technol Biotechnol 61: 37-42.

Deya, E.; Takahashi, K. et al. (1990). Production of high-purity lactulose syrup. PI: EP-357068 A2.

Dorscheid, M.; Krumbholz, R. (1990). Preparation of lactulose by isomerization of lactose in the presence of borax. PI: EP-375046 A1.

Drews, B.; Smalla, H. (1969). "Glucoseoxidase and gluconic acid fermentation in *Aspergillus niger*." Branntweinwirtschaft 109: 21-27.

Druliolle, H.; Kokoh, K. B. et al. (1995). "Selective oxidation of lactose to lactobionic acid on lead-adatoms modified platinum electrodes in Na₂CO₃-NaHCO₃ buffered medium." J Electroanal Chem 385: 77-83.

Dueresch, R.; Richter, H. P. et al. (1989). Isolation of gluconates from fermentation broths by crystallisation. PI: DD-258340 A3.

Durham, D. G.; Hung, C. T. et al. (1982). "Identification of some acids produced during autoclaving of D-glucose solutions using HPLC." Int J Pharm 12: 31-40.

Einicke, W.-D.; Mauersberger, P. et al. (1995). "In situ recovery of fermentation products by selective adsorption and ion exchange." Chem Tech (Leipzig) 47: 261-268.

Elvebak, L. E.; Abbott, C. et al. (1995). "Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-galactitol." Carbohydr Res 269: 1-15.

Elvebak, L. E.; Gray, G. R. (1995). "Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-glucitol." Carbohydr Res 274: 85-97.

Filippini, A. (1986). Lactulose purification. PI: EP-158148 A1.

Flaschel, E.; Raetz, E. et al. (1982). "The kinetics of lactose hydrolysis for the beta-Galactosidase from *Aspergillus niger*." Biotechnol and Bioeng 24: 2499-2518.

Forth, W., D. Henschler, et al. (1996). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie - 7. Auflage- Wien, Zürich, Bibliographisches Institut-Wissenschaftsverlag.

Galzy, P. et al. (1975). Galactose and drinks based on its solution. PI: DE 2434874.

Gardner, N.; Rodrigue, N. et al. (1993). "Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Environ Microbiol 59: 2922-2028.

Gasparotti, F. A. (1980). Lactulose from lactose. PI: DE 2937680.

Hartmeier, W. (1981). "New findings in the oxidation of glucose by immobilized glucose oxidase." Stärke 33: 97-102.

Hartmeier, W.; Doeppner, T. (1984). Permeabilized fungus with intact immobilized glucoseoxidase-catalase system and its use. PI: DE 33301992 A1.

Häseler, J.; Kroh, L. W. (1998). "Nonvolatile reaction products of heat-induced degradation of alpha-glucans; Part II: Analysis of short chain by gas chromatography/mass spectrometry." Z Lebensm Unters Forsch A 207: 44-49.

Hayashibara Co., L. (1973). Aldobionic acids and their salts. PI: GB1316971.

Heiss, R. (1991). Lebensmitteltechnologie: Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung -2. Auflage- Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer.

Hendriks, H. E. J. (1990). "The effect of bismuth on the selective oxidation of lactose on supported palladium catalyst." Carbohydr Res 204: 121-129.

Heyns, K.; Grützmacher, H. F. et al. (1966). "Massenspektrometrische Strukturanalysen von Kohlenhydraten." Fortschr Chem Forsch 5: 448-490.

Hicks, K. B.; Parrash, F. W. (1980). "A new method for the preparation of lactulose from lactose." Carbohydr Res 82: 393-397.

Hornborstel, H.; Kaufmann, W. et al. (1992). Innere Medizin in Praxis und Klinik, Band IV: Verdauungstrakt, Ernährungsstörungen, Stoffwechsel, Vergiftungen -4. Auflage- Stuttgart, New York: Georg Thieme.

Huh, K. T.; Toba, T. et al. (1990). "Oligosaccharide formation during the hydrolysis of lactose with hydrochloric acid and cation exchange resin." Food Chem 38: 305-314.

Huh, K. T.; Toba, T. et al. (1991). "Oligosaccharide structures formed during acid hydrolysis of lactose." Food Chem 39: 39-49.

Jeon, I. J.; Mantha, V. R. (1985). "High performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides formed during beta-Galactosidase action on Lactose." J Dairy Sci 68: 581-588.

Jork, H.; Funk, W. et al. (1989). Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden Band 1a, 1b. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: Verlag Chemie.

Jun, J.-G.; Gray, G. R. (1987). "A new catalyst for reductive cleavage of methylated glycans." Carbohydr Res 163: 247-261.

Karas, M.; Bahr, U. et al. (1991). "Matrix - assisted laser desorption ionization mass spectrometry." Mass Spectrom Rev 10: 335-357.

Karlson, P. et al. (1988). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler -13. Auflage- Stuttgart, New York: Springer.

Ketz, H.-A.; Baum, F. (1986). Ernährungslexikon -1. Auflage- Leipzig: VEB Fachbuchverlag.

Kirstein, D.; Kuehn, W. et al. (1982). "Use of immobilized glucose oxidase in enzyme reactors." Lebensmittelindustrie 28: 444-446.

Koizumi, K.; Kubota, Y. et al. (1992). "Analysis of isomeric mono-O-methyl-D-glucoses, D-glucobioses and D-glucose monophosphates by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection." J Chromatogr 595: 340-345.

Kokoh, K. B.; Leger, J.-M. et al. (1992). "'On-line" chromatographic analysis of the products resulting from the electrocatalytic oxidation of D-Glucose on pure and adatoms modified Pt and Au electrodes- Part II. alkaline medium." Electrochim Acta 37: 1909-1918.

Krämer, J. (1992). Lebensmittelmikrobiologie -2. Auflage- Stuttgart: Eugen Ulmer.

Kroh, L. (1994). "Caramelisation in food and beverages." Food Chem 51: 373-379.

Kunze, W. (1979). Technologie der Brauer und Mälzer -5. Auflage- Leipzig: VEB Fachbuchverlag.

- Langenhove, v. A.; Reinhold, V. N. (1985). "Determination of polysaccharide linkage and branching by reductive depolymerization. gas-liquid-chromatography and gas-liquid-chromatography mass spectrometry reference data." Carbohydr Res 143: 1-20.
- Ledl, F. (1987). "Analytik flüchtiger Zuckerabbauprodukte." Lebensmittelchem Gerichthl Chem 41: 83-87.
- Lee, D. P. et al. (1989). "Carbohydrate analysis by ion chromatography." J Chromatogr Sci 27: 496-503.
- Lee, Y. C. (1990). "High-performance anion-exchange chromatographys for carbohydrate analysis." Anal Biochem 189: 151-162.
- McLafferty, F. W.; Turecek, F. (1995). Interpretation von Massenspektren -3. Auflage-Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Meiberg, J.; Bernardus, M. et al. (1991). Aldobionic acids manufacture with *Pseudomonas cepacia* from reducing disaccharides. PI: EP-384534 A1.
- Mozaffar, Z.; Nakanishi, K. et al. (1985). "Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using beta-Galactosidase from *Bacillus circulans*." J Food Sci 50: 1602-1606.
- Nakamura, M.; Hara, S. et al. (1987). "1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -Keto acids." Chem Pharm Bull 35: 687-692
- Olano, A.; Calvo, M. M. et al. (1989). "Changes in the carbohydrate fraction of milk during heating processes." Food Chem 31: 259-265.
- Olano, A.; Martinez-Castro, I. (1981). "Formation of lactulose and epilactose from lactose in basic media. A quantitative study." Milchwissenschaft 36: 533-536.
- Onken, U.; Traeger, M. et al. (1991). Increased efficiency of manufacture of gluconic acid and glucose oxidase with *Aspergillus niger*. PI: DE3914136 C1.
- Papac, D. I.; Wong, A. et al. (1996). "Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Anal Chem 68: 3215-3223.
- Pazur, H. J.; Tipton, L. C. et al. (1958). "Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of lactose." J Biol Chem 208: 439-444.
- Pohloudek-Fabini, R.; Beyrich, T. (1975). Organische Analyse unter besonderer Berücksichtigung von Arzneistoffen -2. Auflage- Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
- Radford, T.; De Jongh, D.-C. (1972). Carbohydrates in WALLER GR (Hrsg.) Wiley, London: Biochemical applications of mass spectrometry: 313-350.

- Richter, G. (1988). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen -5. Auflage- Stuttgart, New York: Georg Thieme.
- Rolf, D.; Gray G.-R. (1986). "Quantitative analysis of linkage positions in an complex D-Glucan by the reductive-cleavage method." Carbohydr Res 152: 343-349.
- Sai-Prakash, B.; Suyama, K. et al. (1989). "Structure elucidation of major galacto oligosaccharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*." J Agric Food Chem 37: 334-337.
- Sato, Y.; Miyake, T. et al. (1971). Lactulose and lactobionic acid from lactose. PI: DE 2038230.
- Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie -7. Auflage- Stuttgart: Georg Thieme.
- Schrödter, R. (1992). "Modelluntersuchungen zur Strukturaufklärung von Modell-melanoidinen mittels Hochfrequenzpyrolyse." Dissertation, Technische Universität Berlin.
- Shukla, R. T. (1975). "Beta-galactosidase technology: A solution to the latose problem. CRC Critical Reviews." Food Technol 1: 325-356.
- Sims, A. P.; Barnett, J. A. (1991). "Levels of activity of enzymes involved in anaerobic utilization of sugars by six yeast spesies: Observations towards understandig the Kluyver effect." FEMS Microbiol Lett 77: 295-298.
- Singh, B.; Tecle, B. et al. (1994). "Determination of 2-Keto acids and Amino acids in plant extracts." J Liq Chromatogr 17 (20): 4469-4477.
- Smart, J. B. (1991). "Transferase reactions of the beta-Galactosidase from *Streptococcus thermophilus*." Appl Microbiol Biotechnol 34: 495-501.
- Speck, U. (1991). Kontrastmittel-Übersicht, Anwendung, pharmazeutische Aspekte. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer.
- Stahl, B.; Steup, M. et al. (1991). "Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal Chem 63: 1463-1466.
- Stumm, I. (1994). "Polydextrose-Untersuchungen zur Bestimmung in Lebensmitteln und zur Zusammensetzung." Dissertation, Technische Universität Berlin.
- Sweet, D. P.; Shapiro, R. H. et al. (1975). "Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and parially ethylated alditol acetates." Carbohydr Res 40: 217-225.
- Szejtli, J. (1976). Säurehydrolyse glykosidischer Bindungen -1. Auflage- Leipzig, Budapest: VEB Fachbuchverlag und Akademiai Kiado.

Tahir, A. M.; Cates, D. M. (1974). "A spectrophotometric investigation of the yellow colour that accompanies the formation of furan derivatives in degraded sugar solutions." Carbohydr Res 34: 249-261.

Takasaki, Y. (1972). Separation of carbohydrates on anionexchange columns. PI: DE 2160919

Taylor, R. B.; Jappy, B. M. et al. (1971). "Kinetics of dextrose degradation under autoclaving conditions." J Pharm Pharmacol 23: 121-129.

Taylor, R. B.; Sood, V. C. (1978). "An h.p.l.c. study of the initial stages of dextrose decomposition in neutral solution." J Pharm Pharmacol 30: 510-511.

Teunissen, H. P. (1930). "Velocity measurements on the opening of the furan ring in hydroxymethylfurfuraldehyd." Rec Trav Chim 49: 784-826.

Toba, T.; Adachi, S. (1978). "Hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidases. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O-beta-D-galactopyranosyl-D-glucose." J Dairy Sci 61: 33-38.

Toba, T.; Yokota, A. et al. (1985). "Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase." Food Chem 16: 147-162.

Tomasik, P.; Palasinski, M. et al. (1989). "The thermal decomposition of carbohydrates Part I: The decomposition of mono-, di- and oligosaccharides." Adv Carbohydr Chem Biochem 47: 203-270.

Valentova, O.; Marek, M. et al. (1983). "Enzymatic determination of glucose in foodstuffs." J Sci Food Agric 34: 748-754.

Verhaar, L. A. T.; Hendriks, H. E. J. et al. (1991). "High performance liquid chromatography of reaction mixtures from the oxidation and degradation of lactose." J Chromatogr 549: 113-125.

Walon, R. (1970). Enzymic manufacture of gluconic acid. PI: DE 2003732.

Wartenberg, A. (1989). Einführung in die Biotechnology -2. Auflage- Stuttgart: Gustav Fischer.

Weber, H. (1982). Zellbiologie und Genetik der Hefen -2. Auflage- Berlin: Akademie-Verlag.

Weiß, J. (1991). Ionenchromatographie -2. Auflage- Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH.

Westmore, J. B.; Alauddin M. M. (1986). "Ammonia chemical ionization mass spectrometry." Mass Spectrom Rev 5: 381-465.

Weusthuis, R. A.; Visser, W. et al. (1994). "Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect." Microbiol (G. B.) 140: 703-715.

- Wilkins, A. L.; Lu, Y. et al. (1995). "Extractives from New Zealand Honeys 5. Aliphatic dicarboxylic acids." J Agric Food Chem 43: 3021-3025.
- Yang, S.-T.; Okos, M. R. (1989). "Effects of temperature on lactose hydrolysis by immobilized beta-Galactosidase in Plug-Flow-Reactor." Biotechnol and Bioeng 33: 873-885.
- Yang, S.-T.; Tang, I.-C. (1988) "Lactose hydrolysis and oligosaccharide formation catalyzed by beta-Galactosidase." Ann N Y Acad Sci (5): 418-422.
- Yaylayan, A.; Mandeville, S. (1994). "Stereochemical control of maltol formation in Maillard reaction." J Agric Food Chem 42: 771-775.
- Ye, J.; Zhao, X. et al. (1998). "Capillary Electrophoresis as a method for determining dissociation constants of aldohexose isomers." Mikrochim Acta 128: 119-123.
- Yoa-Pu Hu, O.; Hu, T.-M. et al. (1995). "Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: Comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction." J Pharma Sci 84: 231-235.
- Zarate, S.; Lopez-Leiva, M.-H. (1990). "Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review." J Food Prot 53: 262-268.

10 Lebenslauf

Name: Sabine Baumgart, geb. Raedel
 geboren: 17.04.1967 in Berlin
 Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung:

1973 bis 1983 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Ost-Berlin
 1983 bis 1985 Erweiterte Oberschule in Ost-Berlin

Ausbildung:

Sept. 1985 bis Sept. 1986 Erhalt eines Studienplatzes in der Fachrichtung Lebensmitteltechnologie, deshalb Vorpraktikum im ehemaligen VEB Getränkekombinat Berlin (Ost)/Stammbetrieb Kindl

Dez. 1986 bis Okt. 1987 Abbruch des Studiums aufgrund eines Ausreiseantrages aus der damaligen DDR, Übersiedlung nach Berlin-West am 05.02.1987, Bewerbung um einen Studienplatz bei der ZVS

Okt. 1987 bis Nov. 1994 Studium in der Fachrichtung Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Berlin

Juli 1992 Staatsexamen Teil A für Lebensmittelchemiker

Sept. 1993 bis Febr. 1994 Praktikum an der Technischen Universität Berlin
 Thema: Analytik neuer, zum Teil nicht zugelassener Süßstoffe

März 1994 bis Aug. 1994 Praktikum im Landesuntersuchungsinstitut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin

Nov. 1994 Staatsexamen Teil B für Lebensmittelchemiker

Berufstätigkeit:

Sept. 1986 bis Dez. 1986 Produktionsarbeiterin im ehemaligen VEB Getränkekombinat Berlin (Ost)/Stammbetrieb Kindl

Okt. 1992 bis Aug. 1993 Labortätigkeit in der Abteilung Qualitätssicherung/ Analytische Entwicklung der Firma Schering AG

Nov. 1994 bis Juli 1998 Doktorandin der Lebensmittelchemie in der Abteilung Qualitätssicherung Entwicklung der Firma Schering AG
 Thema: Über Verunreinigungen der Galactose in Abhängigkeit ihrer Herstellung

Aug. 1998 bis April 2000 Zusammenschreiben der Doktorarbeit, Erziehungsurlaub

Mai 2000 bis Juni 2000 Hospitation am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Mikrodialyse

ab Juni 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Mikrodialyse