

Zusammenfassender Übersichtsbericht

Analytik der als Lebensmittelzusatzstoffe verwendeten Polysaccharide

Heimo Scherz und Eugen Mergenthaler

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, D-8046 Garching bei München, Bundesrepublik Deutschland

Analytical Determination of Polysaccharide Thickening Agents for Foods – A Review

Summary. In this report, the analytical methodology, as developed by the authors for polysaccharides, used as thickening agents in foods is reviewed and summarized. Present additive regulations increase actuality and need for this subject. The analytical methodology consists of the following steps:

a) isolation of the polysaccharides from the food samples, b) purification of the polysaccharide, c) determination of the monomeric compounds by thin layer chromatography or by gas chromatography, d) separation into neutral and into acid compounds by ion exchange chromatography on DEAE-Cellulose and e) determination of the types of linkages between monomeric compounds by permethylation.

Zusammenfassung. Im Rahmen dieser Arbeit werden die von den Autoren bisher durchgeführten Untersuchungen über die analytische Erfassung der polysaccharidhaltigen Dickungsmittel in Lebensmitteln zusammenfassend dargestellt. Dieses Thema gewinnt durch die neue Zusatzstoffzulassungsverordnung zunehmend praktische Aktualität. Der hierfür entwickelte Analysengang umfaßt die folgenden Abschnitte a) Isolierung des Polysaccharids aus den Lebensmittelproben, b) Reinigung des isolierten Polysaccharids, c) Einzelbausteinanalyse durch Dünnschicht- und Gaschromatographie, d) Trennung in neutrale und in saure Verbindungsgruppen und e) Bestimmung der Verknüpfungsart der Einzelbausteine durch die Methylierungsanalyse.

Durch die neue Zusatzstoffzulassungsverordnung für Lebensmittel [1], nach welcher auch die Verwendung

Tabelle 1. Zusammenstellung der in der Praxis als Dickungsmittel verwendeten Polysaccharide

Polysaccharid	Bausteine und deren molaren Konzentrationsverhältnisse
Stärke	Glucose
Guar	Mannose, Galaktose 2:1
Johannisbrotkernmehl	Mannose, Galaktose 4:1
Agar	Galaktose, 3,6-Anhydrogalaktose ~ 1:1
Pectin	Galakturonsäure; (eventl geringe Mengen an Galaktose, Glucose, Arabinose, Rhamnose)
Algin	Mannuronsäure, Gularonsäure 1:0,48 bis 1:1,85
Carrageen	Galaktose, 3,6-Anhydrogalaktose, Galaktose-sulfat ^a
Gummi arabicum	Glucuronsäure, Rhamnose, Arabinose, Galaktose ^a
Traganth	Galakturonsäure, Galaktose, Glucose, Arabinose, Xylose, Fucose Rhamnose ^a

^a Verhältnisse stark wechselnd

von Dickungsmitteln Einschränkungen unterworfen ist, gewinnt die analytische Bestimmung dieser Stoffe zur amtlichen Lebensmittelüberwachung zunehmend praktische Aktualität.

Die derzeit in der Praxis verwendeten Stoffe, mit Ausnahme von Gelatine, in ihrem chemischen Aufbau durchwegs Polysaccharide, sind in nachstehender Tabelle 1 zusammengestellt.

Für diese Verbindungen sind bereits eine größere Anzahl von analytischen Verfahren entwickelt worden. Die meisten dieser Methoden beschränken sich aber entweder nur auf die Unterscheidung von Verbindungsgruppen mit spezifischen Farb- oder Fällungsreaktionen, oder es handelt sich um Verfahren für ganz spezielle Dickungsmittel, oftmals beschränkt auf bestimmte Lebensmittel oder Lebensmittelgruppen (vgl. Literaturübersicht [2]). Zur Unterscheidung der einzel-

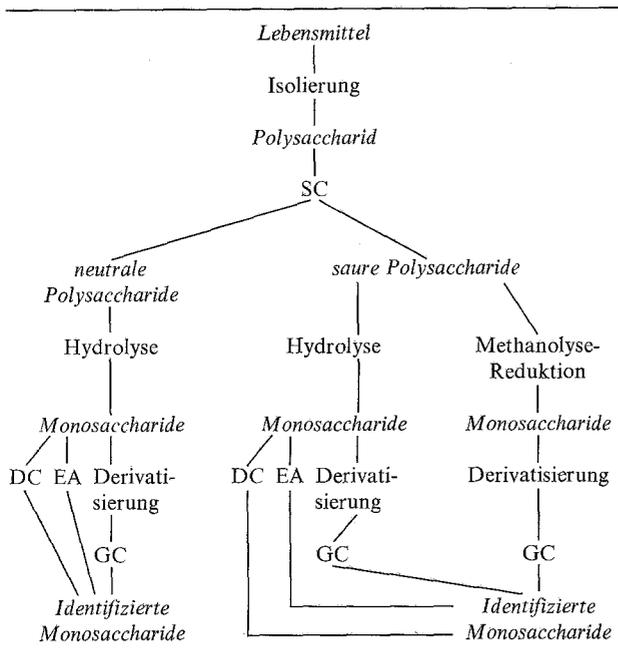


Abb. 1. Schema des Analysenganges zur Bestimmung der polysaccharidhaltigen Dickungsmittel in Lebensmitteln. – SC=Säulenchromatographie, DC=Dünnschichtchromatographie, EA=Enzymatische Analyse, GC=Gaschromatographie

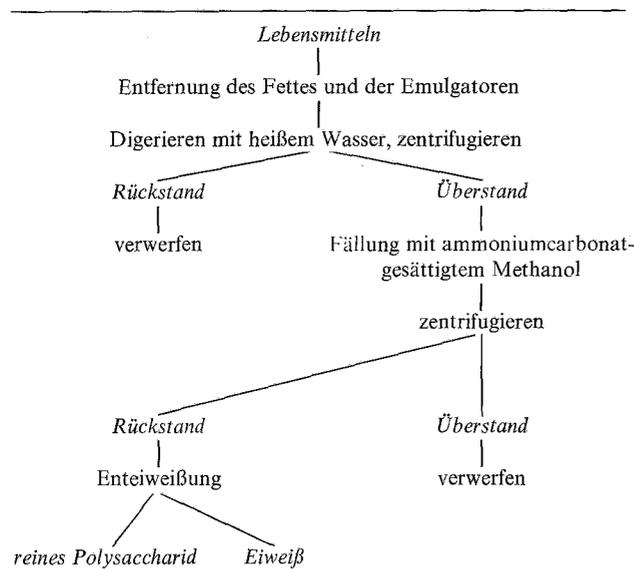


Abb. 2. Schema der Methodik zur Isolierung der Polysaccharide aus den Lebensmitteln

nen, in Tabelle 1 angegebenen Dickungsmittel, ist ein Analysengang ausgearbeitet worden, der auf den Unterschieden in den Fällungseigenschaften der einzelnen Polysaccharide mit Hg, Cu, Pb, und quartären Ammoniumionen basiert [3]. Dieses Verfahren erwies sich in der Praxis als umständlich und in seinen Aussagen als unsicher.

Seit etwa fünf Jahren beschäftigen wir uns mit der Ausarbeitung einer Methode zum Nachweis der in der Praxis verwendeten polysaccharidhaltigen Dickungsmittel, die ohne große Variation der Vorschrift auf möglichst viele Lebensmittelgruppen angewendet werden kann. Teilergebnisse hierzu sind bereits publiziert worden [4–6] und diese sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusammenfassend diskutiert werden.

In Abb. 1 ist einleitend das Prinzip dieser Methode dargestellt. Für die einzelnen Analysenschritte sind im Anhang die exakten Arbeitsvorschriften angegeben.

Isolierung des Polysaccharids aus den Lebensmitteln

Die einzelnen Arbeitsschritte sind schematisch in Abb. 2 dargestellt. Zuerst werden die Proben entfettet. Danach erfolgt die Extraktion der Dickungsmittel aus den entfetteten Untersuchungsmaterialien mit heißem Wasser. Aus den Lösungen werden die Polysaccharide mit einem Überschuß an Methanol, welches mit Ammoniumcarbonat gesättigt ist, ausgefällt.

Enthalten Lebensmittel – wie Marmeladen, Fruchtsäfte oder Trockensuppen – nur wenig Protein, so ist das erhaltene Polysaccharid für die darauffolgenden Identifizierungsreaktionen genügend rein.

Sind die Lebensmittel dagegen eiweißreich, so enthält der Polysaccharidniederschlag beträchtliche Mengen an mitgerissenem Protein. Bei der Identifizierung treten dann Störungen auf, da es bei der Hydrolyse infolge Bildung von Maillardprodukten zu beträchtlichen Substanzverlusten kommt. Eine Enteiweißung ist daher notwendig, wofür folgende zwei Methoden allgemein angewendet werden können. Bei dem Ameisensäure-Alkoholverfahren wird das Protein durch 90%ige Ameisensäure bei erhöhter Temperatur durch Formylierung solubilisiert und bleibt bei der anschließenden Zugabe von Alkohol in Lösung, während die Polysaccharide ausgefällt werden. Die in der Literatur angegebene Vorschrift [7] führt nach unserer Untersuchung zu einem teilweisen Abbau des Polysaccharids und damit zu Substanzverlusten (z. B. Wiederfindungsrate für Guar: 54%, für Alginate: 50% der eingesetzten Menge). Durch Modifizierung der Vorschrift konnte dieser nachteilige Effekt weitgehend ausgeschaltet werden [8].

Das zweite Verfahren ist der enzymatische Abbau des mitgefällten Proteins. Nach der von uns ausgearbeiteten Methodik [8] wird das Polysaccharid in wäßriger Pufferlösung mit Pronase E inkubiert und nach einer bestimmten Zeit wieder mit Methanol, das mit Ammoniumcarbonat gesättigt ist, gefällt. Das Enzym baut die Proteine soweit ab, daß sie bei der Polysaccharidfällung nicht mehr mitgerissen werden. Die Behandlung mit einer Kombination von vier Enzymen (Pepsin, Pro-

nase, Amino-peptidase und Prolidase), wie es in der Literatur [9] für die Bestimmung von Polysacchariden in Käse vorgeschlagen wurde, erscheint hier nicht notwendig.

Das sonst allgemein verwendete Verfahren, Proteine durch konzentrierte wässrige Trichloressigsäure [10] auszufällen, funktioniert nur bei Vorliegen von neutralen Polysacchariden. Saure Polysaccharide werden teilweise mitgefällt und gehen dadurch der Analyse verloren. Daher scheidet diese Methode aus, da man bei Proben mit unbekannter Dickungsmittelzusammensetzung fast immer mit der Anwesenheit saurer Polysaccharide rechnen muß.

Das nach einer dieser Prozeduren erhaltene Polysaccharid ist für die darauffolgende Identifizierung genügend rein.

Identifizierung

Als erster Schritt erfolgt eine Zerlegung des Polysaccharids in die Einzelbausteine, welche durch Dünnschichtchromatographie oder durch Gaschromatographie getrennt und identifiziert werden.

1. Einzelbausteinanalyse

Die Spaltung des Polysaccharids geschieht durch wässrige oder methanolische Säurelösungen.

Die Hydrolyse in wässrigem Medium erfolgt entweder mit n-Schwefelsäure oder mit 2 n-Trifluoressigsäure. Hier sind die Verluste durch Nebenreaktionen am geringsten.

Trifluoressigsäure besitzt den Vorteil, daß sie durch einfaches Abdampfen bei 50 °C im Vakuum nach Beendigung der Reaktion aus der Lösung entfernt werden kann, während bei Schwefelsäure eine Fällungsreaktion mit Ba(OH)₂-Lösung und eine Ionentauscherbehandlung durchgeführt werden muß. Bei neutralen Polysacchariden und bei solchen mit niedrigem Uronsäuregehalt ist die Zersetzungsrate in wässrigem Medium niedrig. Hingegen werden Polysaccharide, die einen großen Anteil an Uronsäuren enthalten (z. B. Algin, Pectin) oder teilweise aus 3,6-Anhydrogalactosebausteinen aufgebaut sind (Agar, Carrageen) stark zersetzt. Hier empfiehlt es sich, die Methanolyse durchzuführen, die zu besseren Ausbeuten führt. Als Umsetzungsprodukte entstehen 1-O-Methylglykoside bzw. 1-O-Methyluronsäuremethylester. Bei Agar und bei Carrageen ist der Anhydrogalactoseanteil als 3,6-Anhydrogalactosedimethylacetal erfaßbar [11].

In Tabelle 2 sind an einigen Beispielen die Wiederfindungsraten nach der Säurehydrolyse bzw. Methanolyse angegeben.

Dünnschichtchromatographie. Zur Orientierung ist es zweckmäßig, die im Hydrolysat vorliegenden Einzel-

Tabelle 2. Wiederfindungsrate einiger neutraler und saurer Polysaccharide nach der Hydrolyse mit 2 n-Trifluoressigsäure bzw. nach der Methanolyse

Verbindung	Wiederfindungsrate ^a auf Reinsubstanz in %	
	2 n-Trifluoressigsäure	Methanolyse und Reduktion
Guar	91	—
Johannisbrotkernmehl	93	—
Agar	40	—
Gummi arabicum	74	80
Traganth	68	78
Alginsäure	—	22 ^b
Pectinsäure	—	6 ^b
Pectin (hochverestert)	—	42 ^b

^a Ermittelt durch gaschromatographische Bestimmung der Einzelbestandteile nach der Aldonitrilacetatmethode

^b Nur semiquantitative Angaben (vgl. Gaschromatogr.)

bausteine zunächst dünn-schichtchromatographisch aufzutrennen. In einzelnen Fällen genügt dies bereits für eine eindeutige Identifizierung des Polysaccharids.

Die genauen Trennvorschriften findet man im Anhang II, 2.

Gaschromatographie. Eine gaschromatographische Bestimmung wird sich daran meistens anschließen, denn mit dieser Methode wird einerseits eine schärfere Trennung der Monosaccharide erreicht und andererseits lassen sich quantitative Bestimmungen ohne großen Zeitaufwand durchführen.

Zu diesem Zweck müssen die Zucker in flüchtige Verbindungen überführt werden. Die bislang gebräuchlichste Derivatisierung zu O-Trimethylsilylverbindungen [12] hat den Nachteil, daß das einzelne Monosaccharid infolge seiner verschiedenen anomeren Formen im Gaschromatogramm fast immer in mehreren Peaks erscheint. Eine Verbesserung bedeutet die Überführung in die Aldonitrilacetate, da diese Derivate pro Zucker jeweils nur einen Peak im Gaschromatogramm liefern. Alle in Frage kommenden Monosaccharide können einwandfrei getrennt werden [5]. Die Uronsäuren lassen sich nach Überführung in die 1-O-Methyluronsäuremethylester, Reduktion mit Borhydrid zu den entsprechenden 1-O-Methylglykosiden und Spaltung in die entsprechenden Monosaccharide in gleicher Weise gaschromatographisch auftrennen [6]. Die Gaschromatogramme der Monosaccharide sind quantitativ auswertbar. Bei den Uronsäuren erhält man hingegen stark streuende Werte, da noch nicht Bedingungen gefunden wurden, unter denen die Methanolyse-Borhydridreduktion mit reproduzierbaren Ausbeuten verläuft.

Tabelle 3. Möglichkeiten von Polysaccharidkombination bei gegebener Einzelbausteinzusammensetzung

Einzelbausteine	Polysaccharide
Glucose	Stärke
Galaktose	Agar, Carrageen
Glucose, Galaktose	Stärke + Agar o. Carrageen
Galaktose, Mannose	Guar o. Johannisbrotkernmehl Guar o. Johannisbrotkernmehl + Agar
Glucose, Galaktose, Mannose	Stärke + Guar o. Johannisbrotkernmehl Stärke + Agar o. Carrageen + Guar o. Johannisbrotkernmehl
Galakturonsäure (evtl. in geringen Mengen Galaktose, Arabinose, Glucose, Rhamnose)	Pectin
Mannuronsäure, Guluronsäure	Algin
Rhamnose, Arabinose Galaktose, Glucuronsäure	Gummi arabicum Gummi arabicum + Agar o. Carrageen
Arabinose, Rhamnose, Galaktose, Mannose Glucuronsäure	Gummi arabicum + Guar o. Johannisbrotkernmehl Gummi arabicum + Guar o. Johannisbrotkernmehl + Agar o. Carrageen
Arabinose, Rhamnose, Galaktose, Glucose Mannose, Glucuronsäure	Gummi arabicum + Guar o. Johannisbrotkernmehl + Stärke Gummi arabicum + Guar o. Johannisbrotkernmehl + Stärke + Agar o. Carrageen
Arabinose, Xylose Rhamnose, Fucose Galaktose, Glucose Galakturonsäure	Traganth Traganth + Agar o. Carrageen Traganth + Stärke Traganth + Pectin
Arabinose, Xylose, Rhamnose, Fucose Galaktose, Glucose, Mannose, Galakturonsäure	Traganth + Guar o. Johannisbrotkernmehl Traganth + Guar o. Johannisbrotkernmehl Traganth + Guar o. Johannisbrotkernmehl + Agar Traganth + Stärke + Guar + Johannisbrotkernmehl Traganth + Pectin Traganth + Stärke + Pectin
Arabinose, Xylose Rhamnose, Fucose Galaktose, Glucose Gluconsäure, Galakturonsäure	Traganth + Gummi arabicum Traganth + Gummi arabicum + Pectin Traganth + Stärke + Gummi arabicum etc.
Mannuronsäure, Guluronsäure, Galakturonsäure	Algin + Pectin

Enzymatische Methoden. Diese Methoden sind nur beschränkt anwendbar, da in den meisten Fällen das Polysaccharidhydrolysat aus einem Gemisch von mehreren Monosacchariden besteht und nur für wenige von ihnen die zur Analyse notwendigen spezifischen Enzyme allgemein erhältlich sind. Ein praktikables Beispiel

hierfür ist die quantitative Bestimmung von Glucose, Mannose und Galaktose nebeneinander in dem Hydrolysat eines Gemisches von Stärke und Galaktomannan [13].

Die Ergebnisse der qualitativen und der quantitativen Bestimmung der Einzelbausteine geben einen Aufschluß über die Art des vorliegenden Polysaccharids. Hierzu sind in Tabelle 3 Kombinationen von Polysacchariden zusammengestellt, die bei gegebener Einzelbausteinzusammensetzung vorliegen könnten. Die Tabelle erhebt allerdings keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2. Trennung der isolierten Polysaccharide in neutrale und in saure Verbindungen

Wenn sich durch die Einzelbausteinzusammensetzung das Polysaccharid nicht eindeutig identifizieren läßt, wird man als nächsten Schritt eine Trennung in neutrale und in saure Verbindungsgruppen durchführen. Dies geschieht mittels Passage der gepufferten neutralen wässrigen Lösung des Polysaccharids durch eine Säule, die mit DEAE-Celluloseionentauscher gefüllt ist. Dann wird mit neutraler Phosphatlösung eluiert. Im Eluat befinden sich die neutralen Verbindungen Stärke, Guar, Johannisbrotkernmehl und Agar. Die sauren Verbindungen Algin, Pectin, Gummi arabicum, Carrageen werden am Ionentauscher festgehalten und danach mit 0,1 n-NaOH von dem Träger eluiert. Von den Substanzen in beiden Fraktionen werden dann die Einzelbausteine qualitativ und quantitativ bestimmt (Anhang, Abschn. II.4).

Wird der Analysengang bis zu diesem Punkt durchgeführt, so lassen sich bereits viele der in der Praxis vorkommenden Dickungsmittel eindeutig identifizieren. Hierzu sind in Tabelle 4 wieder sowohl für die Gruppe der neutralen wie auch der sauren Polysaccharide Kombinationen angegeben, welche bei vorgegebener Einzelbausteinzusammensetzung möglich sein könnten.

3. Methylierungsanalyse

Es gibt in der Praxis Fälle, wo auch die vorstehende Gruppentrennung nicht für eine eindeutige Identifizierung der Polysaccharide ausreicht. Als ein weiteres Unterscheidungskriterium bietet sich an, durch eine Methylierungsanalyse die Art der Verknüpfung der Monosaccharidbausteine untereinander festzustellen.

Hierzu werden die freien Hydroxylgruppen des Polysaccharids methyliert, das methylierte Polysaccharid mit Säure hydrolysiert und die entsprechenden O-Methylzucker durch Dünnschicht- oder Gaschromatographie getrennt und identifiziert (vgl. Anhang Abschn. II.5.).

Tabelle 4. Möglichkeiten der Polysaccharidkombination bei gegebener Einzelbausteinzusammensetzung nach der Trennung in saure und neutrale Polysaccharide

Einzelbausteine	Polysaccharide
Neutrale Fraktion	
Glucose	Stärke
Galaktose	Agar
Galaktose, Mannose	Guar o. Johannisbrotkernmehl Guar o. Johannisbrotkernmehl + Agar
Glucose, Galaktose, Mannose	Stärke + Guar o. Johannisbrot- kernmehl Stärke + Guar o. Johannisbrotkern- mehl + Agar
Saure Fraktion	
Galaktose	Carrageen
Galakturonsäure (eventl. geringe Mengen Arabinose, Rhamnose, Galaktose, Glucose)	Pectin
Galaktose, Galakturonsäure	Carrageen + Pectin
Rhamnose, Arabinose	Gummi arabicum
Galaktose, Glucuronsäure	Gummi arabicum + Carrageen
Rhamnose, Arabinose	Gummi arabicum + Pectin
Galaktose, Glucuronsäure	Gummi arabicum + Pectin + Carrageen
Arabinose, Xylose	Traganth
Rhamnose, Fucose, Glucose, Galaktose, Galakturonsäure	Traganth + Carrageen Traganth + Pectin Traganth + Pectin + Carrageen
Arabinose, Xylose, Rhamnose, Fucose, Glucose, Galaktose, Glucuronsäure, Galakturonsäure	Traganth + Gummi arabicum Traganth + Gummi arabicum + Pectin Traganth + Carrageen + Pectin + Gummi arabicum
Mannuronsäure Guluronsäure	Algin
Mannuronsäure Guluronsäure Galakturonsäure etc.	Algin + Pectin

Durch die Methylierungsanalyse war es u. a. möglich, die Gemische Agar-Guar und Traganth-Gummi arabicum einwandfrei zu identifizieren [14].

Der Zeitbedarf ist für die in der Praxis verwendeten Methoden ein sehr wichtiger Faktor. Für das vorliegende Verfahren sind auf Grund unserer bisherigen experimentellen Erfahrungen diesbezügliche Richtwerte für die einzelnen Analysenschritte in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Für eine komplette Analyse der polysaccharidhaltigen Dickungsmittel in Lebensmitteln (ohne Permethylierung oder enzymatischen Eiweißabbau) werden durchschnittlich 16–24 Std benötigt, was etwa 2–3 Arbeitstagen entspricht.

Tabelle 5. Ungefährender Zeitbedarf für die einzelnen Schritte des Analysenganges

Analysenschritt	Zeit in Std
Isolierung des Polysaccharids aus den Lebensmitteln (Entfettung, Extraktion mit H ₂ O, Füllung mit methanolischer Ammoncarbonatlösung)	5
Entfernung des mitgefällten Proteins:	
Ameisensäuremethode	4
Enzymatische Methode	30
Bestimmung der Einzelbausteine	
Saure Hydrolyse	2–4
Methanolyse und Borhydridreduktion	8
Enzymatische Analyse	4
Dünnschichtchromatographie	2
Gaschromatographie	2
Trennung in neutrale und in saure Produkte (DEAE-Zelluloseionenaustauscher)	8
Methylierungsanalyse	16

Tabelle 6. Beispiele für die praktische Anwendung der Analysenmethode

Lebensmittelprobe	Bausteinanalyse	Identifiziertes Dickungsmittel
Eispulvermischung	Galaktose	Johannisbrotkernmehl
	Mannose	
	Mannuronsäure Guluronsäure	Alginate
Calorienvermind. Trockensuppe	Glucose	Stärke
	Galaktose	Johannisbrotkernmehl
	Mannose	
Kutterhilfsmittel	Mannuronsäure Guluronsäure	Alginate
	Glucose	Stärke
	Galaktose	Johannisbrotkernmehl
Joghurt	Mannose	
	Galaktose	
	Mannuronsäure Guluronsäure	Alginate
Butterkäse	Galaktose	Carrageen
	Mannose	
	Galaktose	Guar
Doppelrahmkäse	Galaktose	
	Mannose	
	Galaktose	Johannisbrotkernmehl
Calorienarme Erdbeermarmelade	Mannuronsäure Guluronsäure	Alginate
	Galakturonsäure	Pectin
	Glucose, Mannose	natürlich
Instant Kakaopulver	Galaktose, Xylose	vorkommende
	Galakturonsäure, Rhamnose, Fucose	Polysaccharide
	Arabinose	

Die Analysenmethode wurde an einer Reihe von Lebensmitteln erfolgreich erprobt. Eine Zusammenstellung hierüber ist in der Tabelle 6 angegeben. Schwierigkeiten sind nur dort aufgetreten, wo die dickungsmittelfreien Lebensmittel außer Stärke noch andere wasserlösliche Polysaccharide enthalten (z. B. Kakaoverzeugnisse). Diese können dann bei entsprechender Bausteinzusammensetzung die Anwesenheit von Dickungsmitteln vortäuschen.

Anhang

Abschnitt I: Isolierung des Polysaccharids aus den Lebensmittelproben

1. Extraktion

Probe mit Petroläther vollständig entfetten; sind größere Mengen an Emulgatoren vorhanden, eine weitere Extraktion mit Chloroform anschließen (z. B. bei Mayonnaisen oder Speiseeispulver); 10–50 g des trockenen und entfetteten Materials mit 100–250 ml destilliertem Wasser 3 Std lang im siedenden Wasserbad digerieren; zentrifugieren; klare Lösung im Vakuum auf etwa 50 ml einengen; mit der 15-fachen Menge ammoniumcarbonatgesättigtem Methanol fällen; zentrifugieren; Rückstand mit 80%igem Methanol waschen.

2. Entfernung des mitgefällten Eiweißes

a) *Mit Ameisensäure.* Etwa 200 mg Rohpolysaccharid in 10 ml 90%iger Ameisensäure suspendieren und unter Rühren 30 min lang im Thermostaten bei 50 °C erwärmen; abkühlen; 90 ml Methanol, 0,5% Ammoniumchlorid enthaltend, hinzufügen; Niederschlag abzentrifugieren und mit 80%igem Methanol waschen.

b) *Durch enzymatischen Abbau.* 200 mg des Rohpolysaccharids in 10 ml 0,5 m-Trispuffer pH 7,5 lösen, mit 10 mg Pronase E versetzen und 24 Std lang bei 40 °C inkubieren. Danach die Lösung mit ammoniumcarbonatgesättigtem Methanol fällen, Niederschlag abzentrifugieren, mit Methanol waschen.

Abschnitt II: Identifizierung

1. Zerlegung der Polysaccharide

a) *Hydrolyse mit 2 n-Trifluoressigsäure.* 10 mg Polysaccharid in einem Derivatisierungsröhrchen mit 2 ml 2 n-Trifluoressigsäure 1 Std lang bei 120 °C erhitzen. Anschließend nach der Abkühlung die Lösung bei 50 °C im Rotationsverdampfer zur Trockene eindampfen.

b) *Hydrolyse mit n-Schwefelsäure.* 10 mg Polysaccharid in 10 ml n-Schwefelsäure 3 Std lang unter Rückflußkühlung kochen; die Lösung abkühlen; mit etwa 10 ml dest. Wasser verdünnen; zu der Lösung solange 0,5 n-Ba(OH)₂ zutropfen lassen, bis kein Niederschlag mehr entsteht; abfiltrieren; überschüssige Ba-Ionen mittels Passage durch einen Kationentauscher entfernen; Eluat im Vakuum bei 50 °C zur Trockene eindampfen (H⁺-Form).

c) *Methanolyse.* 20 mg uronsäurehaltiges Polysaccharid in einem Derivatisierungsrohr mit 3 ml methanolischer 2 n-HCl 4 Std lang auf 120 °C erhitzen; nach dem Abkühlen Reaktionsmischung im Rotationsverdampfer zur Trockene eindampfen und den Rückstand dreimal mit Methanol abdampfen.

2. Dünnschichtchromatographie

Vorschrift a). Schichtmaterial: Hochreine Cellulose. Laufmittel: n-Butanol/Pyridin/Wasser 3+2+1,5 v/v; doppelter Lauf; Sprühreagens: Anilinthalal

Vorschrift b). Schichtmaterial: Kieselgel (Fertigplatten). Laufmittel: Äthylacetat/Methanol/Wasser 68+23+9 v/v (Durchlaufverfahren); Sprühreagens Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure

3. Gaschromatographie

a) *Monosaccharide.* Aliquoten Teil des Hydrolysats (ungefähr 10 mg Gesamtzucker enthaltend) vollständig zur Trockene eindampfen; trockenen Rückstand mehrmals mit einem Gemisch Äthanol/Benzol abdampfen, um das Wasser vollständig zu entfernen; Rückstand in 0,5 ml Pyridin mit 10 mg Hydroxylaminhydrochlorid aufnehmen, Mischung 30 min lang auf 90 °C erhitzen; nach dem Abkühlen 1,5 ml Essigsäureanhydrid hinzufügen; wiederum 30 min lang auf 90 °C erhitzen; nach dem Abkühlen überschüssiges Reaktionsgemisch im Vakuum abdampfen und den Rückstand in Chloroform aufnehmen.

b) *Uronsäuren.* Rückstand der Methanolyse (II.1.c) in 5 ml dest. Wasser aufnehmen, Lösung mit Ammoniumhydroxyd auf pH 8 einstellen; 100 mg NaBH₄ unter Rühren hinzufügen; 2 Std bei Zimmertemperatur rühren; danach zu der Lösung solange Kationentauscher geben (H⁺-Form), bis keine Gasentwicklung mehr eintritt, anschließend die Lösung noch auf eine kleine Kationentauschersäule geben und mit 50 ml dest. Wasser eluieren; Eluat im Vakuum zur Trockene eindampfen und den Rückstand dreimal mit absolutem Methanol abdampfen, um die Borsäure zu verflüchtigen.

Rückstand mit 2 n-Trifluoressigsäure 1 Std auf 100 °C im geschlossenen Derivatisierungsröhrchen erhitzen, um die Methylglykoside zu spalten. Anschließend die erhaltenen Monosaccharide in die Aldonitrilacetate überführen.

Gaschromatographische Trennbedingungen

Säule: Stahlsäule 2 m; 3% Neopentylglykolpolysuccinat auf Chromosorb WAW; 100–120 mesh. – Trägergas: He, 30 ml/min. – Temperatur: 190–230 °C, 2 °C/min

4. Gruppentrennung

in neutrale und in saure Polysaccharide

Etwa 20–50 mg isoliertes Polysaccharid in wenig 0,067 m-Phosphatpuffer (pH 7,2) lösen, die Lösung durch eine Säule, gefüllt mit DEAE-Celluloseionentauscher (PO₄-Form) passieren lassen; mit 0,067 m-Phosphatpuffer eluieren; Eluat enthält die neutralen Polysaccharide Stärke, Johannisbrotkernmehl, Guar und Agar; anschließend Elution mit 0,1 n-NaOH. Eluat enthält die sauren Polysaccharide Algin, Pectin, Gummi Arabicum, Traganth und Carrageen.

Das alkalische Eluat wird sofort neutralisiert. Beide Eluate werden dann durch Ultrafiltration von den anorganischen Ionen befreit (Amicon Filter UM 10). Die jeweils in der Ultrafiltrationszelle zurückbleibenden Lösungen werden im Vakuum eingedampft, die darin enthaltenen Polysaccharide nach II.1. in die Einzelbausteine zerlegt und nach II.1. und II.2. identifiziert.

5. Methylierungsanalyse [Vorschrift nach Hakomori (15)]

50 mg Polysaccharid in 20 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid in einem verschlossenen Schliffkolben bei Raumtemperatur 24 Std rühren (Magnetrührer), dann 200 mg frisches Natriumhydrid im Verlauf von 2 Std in kleinen Portionen zugeben; danach 1 ml Methyljodid zufließen lassen und solange rühren, bis eine klare Lösung entsteht; diese über Nacht gegen fließendes Wasser dialysieren; dialysierte Lösung im Vakuum eindampfen und den Rückstand über P₂O₅ im Vakuum trocknen. Gegebenenfalls die Prozedur wiederholen, um sicher zu sein, daß die Methylierung vollständig ist.

Trockenen Rückstand mit n-Schwefelsäure nach II.1. hydrolysieren, die entstehenden Methylzucker in die Aldonitrilacetate überführen und diese gaschromatographisch trennen. Hierzu sind bereits Capillarsäulen notwendig.

Trennbedingungen

Säule: SCOT-Dünnschichtsäule, Stahl 15 m beschichtet mit Neopentylglykolpolysuccinat, Splitverhältnis 1:10. – Temperatur: 175–200 °C, 1 °C/min. – Trägergas: He, 3 ml/min

Literatur

1. Zusatzstoffzulassungsverordnung vom 20. 12. 1977. Bundesgesetzblatt I Seite 2711
2. Schmolck, W., Mergenthaler, E.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **152**, 87 (1973)
3. Morley, R.G., Phillips, G.O., Power, M.D., Morgan, R.E.: Analyst **97**, 315 (1972)
4. Mergenthaler, E., Schmolck, W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **155**, 193 (1974)
5. Mergenthaler, E., Scherz, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **162**, 25 (1976)
6. Mergenthaler, E., Scherz, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **162**, 159 (1976)
7. Johnson, R.H.: J. Ass. Offic. Agr. Chemists **39**, 286 (1956)
8. Mergenthaler, E., Scherz, H.: In Vorbereitung
9. Klostermeier, H., Popp, U., Schmitz, I.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **158**, 31 (1975)
10. AOAC – Methods 11th Edition, p. 275 (1970)
11. Schmolck, W., Mergenthaler, E.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **152**, 263 (1973)
12. Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W.: J. Am. Chem. Soc. **85**, 2497 (1963)
13. Mergenthaler, E., Schmidt, I., Scherz, H.: Unveröffentlicht
14. Mergenthaler, E., Scherz, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **166**, 225 (1978)
15. Hakomori, S.J.: J. Biochem. **55**, 205 (1964)

Eingegangen am 18. Oktober 1979