

**Optimierung und Anwendung ^1H - ^{13}C -korrelierter
Experimente der Kernspinresonanzspektroskopie zur
Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und
Oligosaccharide**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

VON

M. Sc. Lea Fels

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
2. Referent: Prof. Dr. Thomas Kuballa
Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2021

„Sich verwirrt zu fühlen, ist der Anfang des Wissens.“

- Khalil Gibran

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 08.06.2021

Lea Fels

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Lebensmittelrelevante Kohlenhydrate	2
1.1.1 Monosaccharide	3
1.1.2 Oligosaccharide	6
1.1.2.1 Disaccharide	6
1.1.2.2 Weitere Oligosaccharide	7
1.1.3 Kohlenhydratmetabolismus	9
1.1.3.1 Stoffwechselstörungen	13
1.1.3.2 Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf den Blutglucosespiegel	15
1.1.3.3 Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf die Entstehung von Karies	17
1.2 Untersuchte Produktgruppen	18
1.2.1 Milch und Milchprodukte	18
1.2.2 Produkte zur Sportlerernährung und Gewichtsreduktion	19
1.2.3 Hülsenfrüchte	20
1.3 Übersicht bereits eingesetzter NMR-spektroskopischer Methoden zur Bestimmung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide	20
1.3.1 Eindimensionale Experimente	20
1.3.2 2D-Experimente	23
2 Zielsetzung	28
3 Material und Methoden	30
3.1 Probenmaterial	30
3.2 Probenaufarbeitung	30
3.3 Bestehende Referenz- und Vergleichsmethoden zur Quantifizierung von Mono- und Oligosacchariden	33
3.3.1 Enzymatische Methoden	33
3.3.2 Flüssigchromatographische Methoden	35
3.3.3 Gaschromatographische Methoden	37
3.4 NMR-spektroskopische Methoden	38
3.4.1 Relaxation in der NMR-Spektroskopie	40
3.4.2 ¹ H-NMR-Experimente	42
3.4.3 2D-NMR-Experimente	45
3.4.3.1 Verwendete Methoden zur Messzeitbeschleunigung	47
3.4.3.1.1 ASAP-HSQC	47
3.4.3.1.2 Non-uniform Sampling	50
3.4.4 Prozessierung von NMR-Spektren	51
3.5 Validierung und Statistik	52

4 Ergebnisse und Diskussion	55
4.1 Optimierung und Anwendung messzeitreduzierter NMR-Methoden zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide	55
4.1.1 ¹ H-NMR-Methoden.....	59
4.1.2 HSQC-Methoden.....	64
4.1.2.1 Optimierung der Aufnahmeparameter	64
4.1.2.2 Optimierung der Prozessierungsparameter.....	70
4.1.3 ASAP-HSQC-Methoden	72
4.1.4 Zusammenfassung der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden	73
4.1.5 Methodvalidierung anhand einer erweiterten Grundkalibrierung	74
4.1.5.1 Präzisionsmessungen	75
4.1.5.2 Stabilität der Messlösungen	76
4.1.5.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	77
4.1.6 Anwendung der optimierten Methoden auf verschiedene Lebensmittelmatrices	79
4.1.6.1 Milch und Milchprodukte.....	79
4.1.6.1.1 Probenaufarbeitung	79
4.1.6.1.2 Methodenvergleich	84
4.1.6.2 Mit Isomaltulose gesüßte Produkte	99
4.1.6.2.1 Probenaufarbeitung	99
4.1.6.2.2 Methodvalidierung und Methodenvergleich	100
4.2 Entwicklung und Anwendung auflösungsoptimierter HSQC-Methoden zur Quantifizierung von Oligosacchariden der Raffinose-Familie	107
4.2.1 Optimierung der Aufnahmeparameter und Methodvalidierung.....	107
4.2.2 Anwendung der optimierten Methoden auf Leguminosen	114
4.3 Zusammenfassende Diskussion.....	123
5 Zusammenfassung	131
6 Literaturverzeichnis	134
7 Chemikalien und Instrumente	144
8 Arbeitsvorschriften	147
9 Anhang	160
10 Publikationsliste	222

Abkürzungsverzeichnis

¹H-NMR-Experimente	Protonen-NMR-Experimente
2D	Zweidimensional
1D	Eindimensional
Allose	D-Allose
ALSOFAST	Engl. <i>Alternate Band Selective Optimized Flip-Angle Short Transient</i>
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of Variance</i>)
AOAC	Engl. <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASAP	Engl. <i>Acceleration by Sharing Adjacent Polarization</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bestimmungsgrenze
Cost	Engl. <i>Cooling Overall Spin Temperature</i>
COSY	Engl. <i>Correlated Spectroscopy</i>
EFSA	Engl. <i>European Food Safety Agency</i>
ERETIC	Engl. <i>Electronic Reference to Access in vivo Concentrations</i>
Fructose	D-Fructose
Galactose	D-Galactose
GC	Gaschromatographie
GC-FID	GC-System gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor
Glucose	D-Glucose
GLUT	Transporterproteine für Glucose (engl. <i>Glucose Transport Proteins</i>)
GI	Glykämischer Index
GL	Glykämische Last
GOS	Galactooligosaccharide
H2BC	Engl. <i>Heteronuclear 2-bond Correlation</i>

HMBC	Engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPAEC-PAD	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (engl. <i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	Engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
INEPT	Engl. <i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>
IRLS	Engl. <i>Iterative Re-Weighted Least Squares</i>
IST	Engl. <i>Iterative Soft Thresholding</i>
IUPAC	Engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J-res	Auftrennung nach Kopplungskonstante (engl. <i>J-resolved</i>)
MilchErV	Milcherzeugnisverordnung
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NG	Nachweisgrenze
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	Engl. <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NUS	Engl. <i>Non-Uniform Sampling</i>
PULCON	Engl. <i>Pulse Length Based Concentration Determination</i>
Q-HSQC	Quantitative HSQC
QUIPU-HSQC	Engl. <i>Quantitative, Perfected and Pure Shifted HSQC</i>
RFO	Oligosaccharide der Raffinose-Familie (engl. <i>Raffinose Family Oligosaccharides</i>)
Rhamnose	L-Rhamnose
RI	Brechungsindex (engl. <i>Refractive Index</i>)

S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. <i>Signal-to-Noise-Ratio</i>)
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (engl. <i>Short-Chain Fatty Acid</i>)
SGLT	Engl. <i>Sodium Glucose Transporter</i>
TMS	Tetramethylsilan
TMSO	Trimethylsilyloxime
TOCSY	Engl. <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UF	Engl. <i>Ultrafast</i>
WEFT	Engl. <i>Water Eiminated Fourier Transform</i>
WHO	Engl. <i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

Kohlenhydrate gehören neben Proteinen und Fetten zu den Hauptnährstoffen in Lebensmitteln und spielen eine große Rolle in der menschlichen Ernährung. Hohe Gehalte kommen sowohl in pflanzlichen Lebensmitteln wie Getreide, Obst und Gemüse als auch in tierischen Produkten wie Milch und Milchprodukten vor. Kohlenhydrate können als Monomere sowie vielfältig zu Oligomeren und Polymeren verknüpft in Lebensmitteln enthalten sein. Neben natürlich vorkommenden Kohlenhydraten werden einzelne Substanzen der Stoffklasse auch während der Lebensmittelproduktion beispielsweise als Gelbildner oder zum Süßen der Produkte zugesetzt. Ernährungsphysiologisch spielen sie als Energielieferant (z.B. Stärke) sowie als Ballaststoffe eine wichtige Rolle.

Nicht-Stärke Polysaccharide werden durch den Verzehr pflanzlicher Lebensmittel zwar aufgenommen, aber im menschlichen Dünndarm nicht gespalten. Die Aufnahme dieser sogenannten Ballaststoffe wird häufig mit gesundheitsfördernden Eigenschaften wie beispielsweise der Regulation des Blutzuckerspiegels korreliert. Der übermäßige Konsum von Mono- und Disacchariden steht mit einigen negativen metabolischen Effekten und Krankheiten wie Übergewicht, Diabetes oder Karies in Verbindung. Der Verzehr einzelner Kohlenhydrate kann zudem bei Patienten mit Störungen im Enzymhaushalt der Kohlenhydratverdauung zu unterschiedlich schweren Krankheitsbildern führen. Eine weltweit häufig verbreitete Stoffwechselstörung von Kohlenhydraten stellt z.B. die Lactoseintoleranz dar.

Die strukturelle Diversität von Kohlenhydraten erschwert ihre analytische Differenzierung und Quantifizierung. Aufgrund der großen ernährungsphysiologischen Relevanz sind die quantitative Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts sowie die Bestimmung einzelner Verbindungen von großem Interesse. Da der übermäßige Verzehr bestimmter Kohlenhydrate ein Gesundheitsrisiko für einzelne Bevölkerungsgruppen darstellen kann, werden vermehrt Methoden eingesetzt, die eine möglichst große Anzahl an Kohlenhydraten gleichzeitig sowie spezifisch quantifizieren können. Zum Screening werden bevorzugt Methoden mit einer geringen Analysendauer und einer einfachen Probenaufarbeitung eingesetzt. Da zurzeit erst wenige Analysemethoden diese Voraussetzungen erfüllen, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Erweiterung des möglichen Methodenspektrums um Anwendungen der ein- und zweidimensionalen Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR)-Spektroskopie. Protonen-NMR-spektroskopische Methoden zeichnen sich durch kurze Messzeiten von nur wenigen Minuten aus und sind in der Lage Analyten spezifisch zu quantifizieren. Der limitierende Faktor zur Anwendung dieser Methode ist ihre geringe Auflösung, da bei der Analyse von Gemischen viele Signale überlagert vorliegen. Hier können zweidimensionale (2D) NMR-Experimente aufgrund ihrer verbesserten Auflösung eine Alternative bieten. Die deutlich längeren Messzeiten von 2D-NMR-Experimenten können über verschiedene Ansätze zur Messzeitbeschleunigung reduziert werden.

1.1 Lebensmittelrelevante Kohlenhydrate

Kohlenhydrate werden von der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) als Verbindungen aus Kohlenstoff und Wasser definiert, die stöchiometrisch als $C_n(H_2O)_m$ vorliegen (IUPAC, 1995). Bei Monosacchariden liegen Kohlenstoff und Wasser in gleichen Anteilen vor. Sie können als Aldosen und Ketosen vorkommen. Über glykosidische Bindungen können Monosaccharide miteinander verknüpft sein und länger-kettige Verbindungen bilden. Kohlenhydrate werden deshalb nach ihrer Anzahl an Einheiten in Monosaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide eingeteilt. Oligosaccharide bestehen nach IUPAC aus zwei bis zehn Einheiten. Da Oligosaccharide aus zwei Monomereinheiten, sogenannte Disaccharide, in der Nahrung einen großen Stellenwert einnehmen, werden sie im Verlauf dieser Arbeit gesondert dargestellt. Alle größeren Moleküle mit mehr als zehn Monomereinheiten werden als Polysaccharide bezeichnet. Zu den Kohlenhydraten zählen auch Verbindungen, die eine Amino- oder Thiolgruppe aufweisen (IUPAC, 1995). Diese Stoffgruppen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht weiter betrachtet. Neben der chemischen Definition spielt in der Lebensmittelchemie auch die rechtliche Betrachtung eine große Rolle. Gemäß Art. 2 Abs. 4 i.V. mit Anhang I VO (EU) Nr. 1169/2011 werden Kohlenhydrate als alle im Stoffwechsel des menschlichen Körpers verwertbaren Kohlenhydrate definiert. Dabei sind mehrwertige Alkohole explizit eingeschlossen.

Zu den wichtigsten in der Nahrung vorkommenden Kohlenhydraten zählen neben den Monosacchariden D-Glucose (Glucose), D-Fructose (Fructose) und D-Galactose (Galactose) auch Disaccharide wie Saccharose, Lactose und Maltose. Oligosaccharide ab drei Monomereinheiten können in Lebensmitteln enthalten sein oder diesen zugesetzt werden, wie beispielsweise Galactooligosaccharide (GOS) in Milchprodukten, Fructooligosaccharide in Gemüse oder Oligosaccharide der Raffinose-Familie (*Raffinose Family Oligosaccharides*, RFO) in Leguminosen.

Mono- und Disaccharide werden gemäß Art. 2 Abs. 4 i.V. mit Anhang I VO (EU) Nr. 1169/2011 als „Zucker“ definiert und dementsprechend innerhalb der Gruppe der Kohlenhydrate hervorgehoben. Hoher Zuckerkonsum steht beim Menschen in Verbindung mit Gewichtszunahme, einem erhöhten Risiko an Typ-2 Diabetes zu erkranken und der Evidenz dentaler Krankheiten, weshalb eine gesonderte Kennzeichnungspflicht zum Vorkommen und der Anwendung in der Nahrung wichtig erscheint. Die *World Health Organization* (WHO) empfiehlt nicht mehr als 10 % des Gesamtenergiebedarfs durch freie Zucker zu decken. Als freie Zucker werden Mono- und Disaccharide definiert, die während des Verarbeitungsprozesses von Hersteller oder Verbraucher zugesetzt werden sowie natürlich vorkommender Zucker in Honig, Sirup und Fruchtsaft (WHO, 2015). In Deutschland wird diese Empfehlung schon seit Jahrzehnten überschritten. Im Jahr 2016 nahmen erwachsene Männer durchschnittlich 13 % und Frauen 14 % ihres täglichen Energiebedarfs über freie Zucker zu sich. Dabei werden 35–37 % über Süßwaren, 25–28 % über Fruchtsäfte, 8–17 % über Limonaden und 13–15 % über Backwaren aufgenommen (MRI, 2016). Bei Kindern liegt der Anteil am Gesamtenergiebedarf, der durch freie Zucker

aus der Nahrung gedeckt wird, durchschnittlich zwischen 10 % und 14 % des täglichen Energiebedarfs (Perrar *et al.*, 2020). Zur Reduktion des Zuckerkonsums gibt es vielseitige Bestrebungen wie zum einen den Zuckergehalt in Lebensmitteln zu senken als auch das Bewusstsein des Verbrauchers zu stärken und über die Folgen aufzuklären.

1.1.1 Monosaccharide

Monosaccharide können als Aldosen und Ketosen vorkommen. Aldosen sind dabei Polyhydroxyaldehyde ausgehend von Glycerinaldehyd und Ketosen die Polyhydroxyketone ausgehend von Dihydroxyaceton (IUPAC, 1995; Belitz *et al.*, 2008). Die lebensmittelrelevanten Aldosen und Ketosen werden entsprechend ihrer Kettenlänge als Pentosen und Hexosen bzw. Pentulosen und Hexulosen bezeichnet. Monosaccharide können in D- und L-Konfiguration auftreten. Die Nomenklatur ergibt sich aus der Stellung der Hydroxylgruppe am Chiralitätszentrum des Glycerinaldehyds. Ist die Hydroxylgruppe in der Fischer-Projektion nach rechts orientiert, handelt es sich um D-Glycerinaldehyd. Eine entsprechende Orientierung nach links, führt zu L-Glycerinaldehyd. Diese Nomenklatur wird auch für alle weiteren Monosaccharide größerer Kettenlänge beibehalten, wobei für die D/L-Klassifizierung die Stereochemie am chiralen Zentrum, das am weitesten von der Carbonylgruppe entfernt ist, betrachtet wird. In der Natur kommen freie Monosaccharide überwiegend in D-Konfiguration vor. Die verschiedenen Monosaccharide unterscheiden sich dabei lediglich in der Stellung ihrer Hydroxylgruppen. Besteht die unterschiedliche Stellung dabei nur an einem Chiralitätszentrum, dann werden die Strukturen als Epimere bezeichnet. Die Nummerierung des sich unterscheidenden chiralen Zentrums kann dabei auch zur Nomenklatur genutzt werden. So sind Glucose und Galactose beispielsweise C4-Epimere, Glucose und D-Allose (Allose) C3-Epimere (siehe Abbildung 1-1). Monosaccharide bilden intramolekulare Halbacetale. Bei der Cyclisierung können sechsgliedrige Ringe (Pyranosen) und fünfgliedrige Ringe (Furanosen) entstehen. Bei der Lactolbildung entsteht ein weiteres Chiralitätszentrum. Die diastereomeren Formen werden Anomere genannt. Dabei wird am Beispiel der D-Glucose in 4C_1 -Konformation (Reeves-Projektion) die axiale Stellung der Hydroxylgruppe als α -Anomer und die äquatoriale Stellung als β -Anomer bezeichnet. Es können also zusammen mit der offenkettigen Form bis zu fünf verschiedene Isomere vorliegen, die miteinander im Gleichgewicht stehen und über die offenkettige Form ineinander übergehen können (Belitz *et al.*, 2008). Eine Übersicht der Verteilung der einzelnen Formen im Gleichgewicht ausgewählter Monosaccharide wird in Tabelle 1-1 dargestellt.

Die wichtigsten in der Nahrung frei vorkommenden Monosaccharide sind Glucose, Galactose und Fructose. Ihre Strukturen sind u.a. in Abbildung 1-1 dargestellt. Glucose und Fructose kommen sowohl in Honig als auch in vielen Obstsorten in annähernd gleichen Verhältnissen vor. Besonders reich an Glucose und Fructose sind Beeren, Kiwis, Trauben, Kirschen, Äpfel und Pfirsiche. Auch in vielen Gemüsesorten wie Karotte, Tomate, Paprika, Zucchini oder Brokkoli finden sich hohe Gehalte an

Glucose und Fructose. Zudem werden beide Monosaccharide einzeln oder auch als Gemische zum Süßen von Lebensmitteln eingesetzt (Souci *et al.*, 2011; Plaza-Diaz *et al.*, 2013).

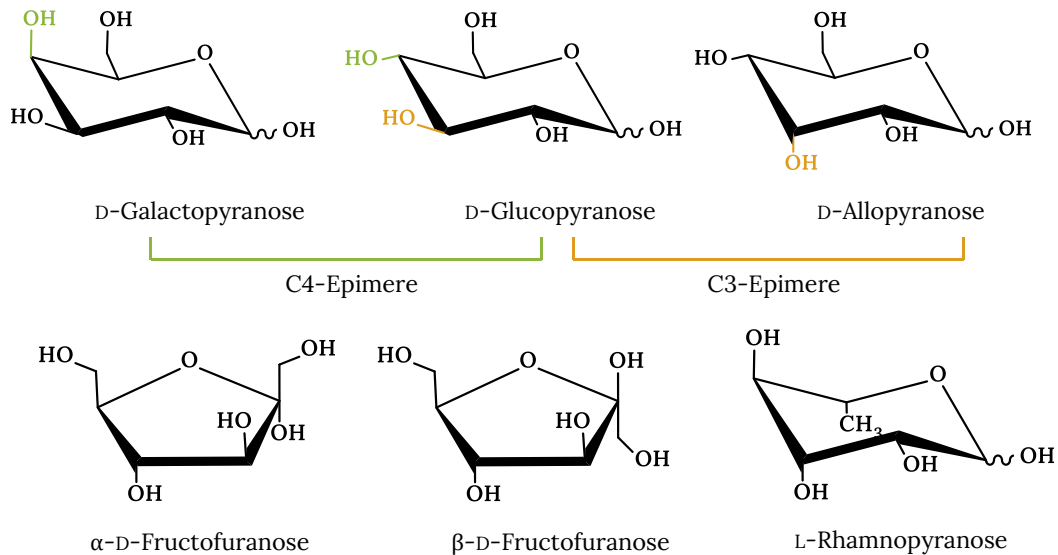


Abbildung 1-1: Strukturformeln der Monosaccharide D-Galactose, D-Glucose, D-Allose und L-Rhamnose in der Reeves-Schreibweise als Pyranoseform. Die Hexulose D-Fructose wird in der Haworth-Projektion dargestellt.

Galactose ist insbesondere in Milch und Milchprodukten enthalten. Dabei ist zu beachten, dass Galactose nicht nur als Bestandteil von Lactose, sondern auch von Caseinen zu finden ist. In lactose-freien Milchprodukten wird Lactose enzymatisch in Glucose und Galactose gespalten, weshalb der Anteil beider Monosaccharide in diesen Produkten besonders groß ist. Auch bei der Verstoffwechslung der Lactose während des Herstellungsprozesses von beispielsweise Hartkäsen sind große Galactosegehalte nachweisbar. Galactose kommt des Weiteren auch in verschiedenen Obstsorten wie Papaya, Persimone, Wassermelone, Dattel, Kiwi und Apfel vor sowie in einigen Gemüsesorten (z.B. Tomate und Kürbis). Kleinere Mengen sind auch in Getreide, Nüssen, Samen und Leguminosen zu finden (Gross & Acosta, 1991; Acosta & Gross, 1995).

Allose wird für einige Analysenmethoden als interne Standardsubstanz genutzt (siehe Kapitel 3), da es natürlich nur in kleinen Konzentrationen in seltenen Pflanzen wie den afrikanischen Zuckerbüschen, dem Faden-Ehrenpreis (*Veronica filiformis* SM), dem Katzenschwänzchen (*Acalypha hispida* BURM. F.) oder in den Blättern der Kartoffelpflanze vorkommt (Chen *et al.*, 2018). Allose könnte als Alternative zu Saccharose zum Süßen von Lebensmitteln angewandt werden, da es 80 % der Süßkraft von Saccharose aufweist, aber metabolisch nur schlecht verstoffwechselt wird. Dadurch werden kaum Kalorien durch die Einnahme von Allose zugeführt. Dennoch ist der Einsatz von Allose zum Süßen zurzeit noch nicht in der Europäischen Union zugelassen.

Der Desoxyzucker L-Rhamnose (Rhamnose) kommt überwiegend in Pflanzen als Bestandteil ihrer Zellwände oder konjugiert an spezialisierte Metaboliten vor. In der pflanzlichen Zellwand wird Rhamnose als Baustein für die Synthese von Pektinen oder Zellwandglykoproteinen verwendet. Die Konjugation an spezialisierte Metaboliten erfolgt oft über die Bildung glykosidischer Bindungen wie beispielsweise im Anthocyan Lobelinin oder dem Flavonol Rutin. Freie Rhamnose kommt äußerst selten vor (Jiang *et al.*, 2021), wodurch die Möglichkeit zum Einsatz als interne Standardsubstanz besteht.

Tabelle 1-1: Gleichgewichtsverteilung ausgewählter Aldosen und Ketosen in wässriger Lösung (modifiziert nach Angyal, 1969; Belitz *et al.*, 2008)

Monosaccharid	Temperatur [°C]	α -Pyranose [%]	β -Pyranose [%]	α -Furanose [%]	β -Furanose [%]
D-Glucose	20	36	64	-	-
D-Galactose	20	32	64	1	3
D-Fructose	20	-	76	4	20
D-Allose	40	18	70	5	7

Bei Raumtemperatur und unter moderaten pH-Verhältnissen zwischen pH 3 und pH 7 sind Monosaccharide relativ stabil. Sie können außerhalb dieser Bedingungen aufgrund ihrer funktionellen Gruppen an einer Vielzahl von Reaktionen teilnehmen. Unter alkalischen Bedingungen dominieren Enolisierungen mit Kettenbrüchen, während unter sauren Bedingungen vor allem Enolisierungen und Wasserabspaltungen bei Erhalt der Kohlenstoffkette stattfinden. Durch diese Reaktionen können Farb- und Aromastoffe entstehen, die charakteristisch für bestimmte Lebensmittel sind. So kann beispielsweise Zuckerkulour durch Erhitzen von Saccharose unter sauren Bedingungen hergestellt werden (Belitz *et al.*, 2008). Auch während der Maillardreaktion spielen Monosaccharide eine entscheidende Rolle. So kann deren Carbonylfunktion mit Aminogruppen reagieren, und über die Ausbildung Schiff'scher Basen entstehen Amadori- und Heyns-Produkte. Dabei können alle reduzierenden Zucker als Edukt der Reaktionen genutzt werden. Durch den Abbau zu Desoxyosonen können aufgrund der hohen Reaktivität Letzterer eine Vielzahl möglicher Folgereaktionen ablaufen. Dadurch entstehen u.a. weitere für Lebensmittel charakteristische Aromakomponenten sowie braun gefärbte Melanoidine, deren Strukturen noch nicht eindeutig geklärt werden konnten (Murata, 2020).

1.1.2 Oligosaccharide

1.1.2.1 Disaccharide

Bei einer Beteiligung der halbacetalischen Hydroxylgruppen an Position C1 (bei Aldosen), den sogenannten Lactolgruppen, beider Monosaccharide an der glykosidischen Bindung werden sogenannte nicht-reduzierende Zucker gebildet. Der wichtigste Vertreter ist Saccharose, die aus einer α -Glucose-Einheit und einer β -Fructose-Einheit besteht, die über eine α,β -1,2-glykosidische Bindung verknüpft sind (siehe Abbildung 1-2).

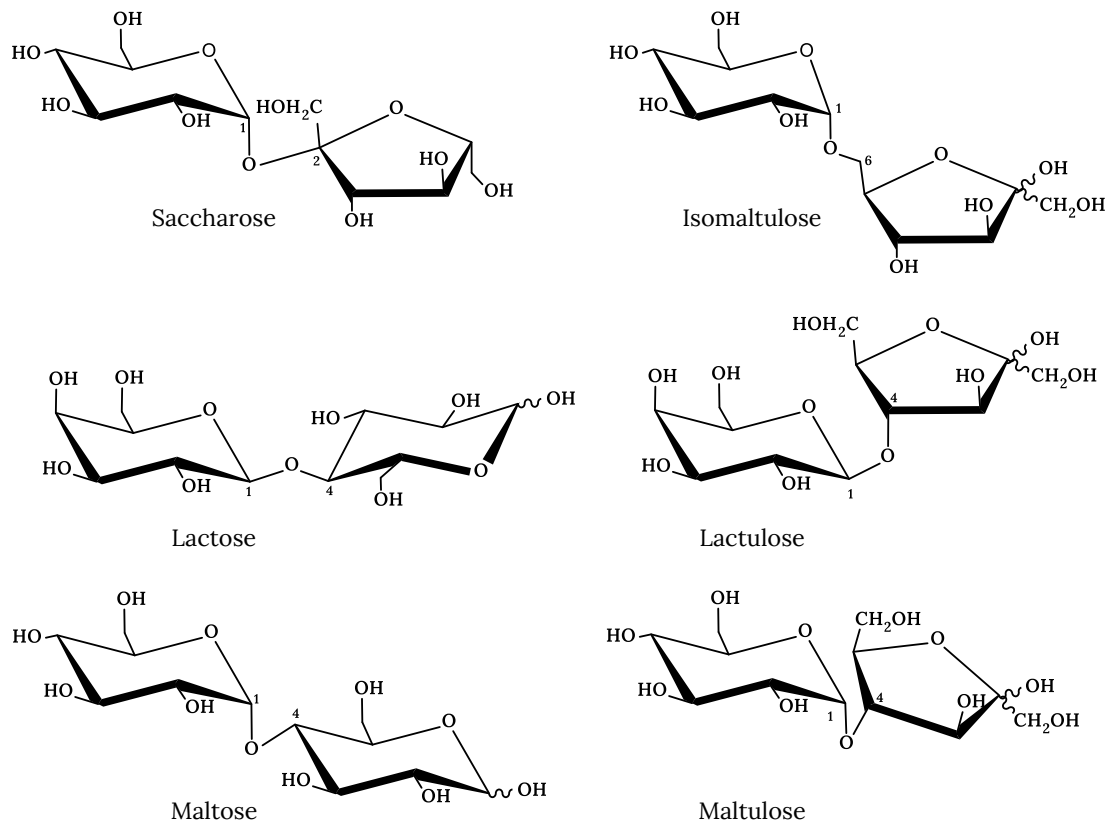


Abbildung 1-2: Strukturformeln ausgewählter Disaccharide

Eine Lactolgruppe kann auch mit einer anderen Hydroxylgruppe eine glykosidische Bindung eingehen. Dabei bleibt eine Lactolgruppe intakt und reaktiv, sodass reduzierende Strukturen entstehen. In Lebensmitteln häufig vorkommende Vertreter reduzierender Disaccharide sind Lactose und Maltose. Im Disaccharid Lactose ist Galactose β -1,4-glykosidisch mit Glucose verknüpft. Maltose besteht aus zwei Glucoseeinheiten, die α -1,4-glykosidisch verbunden sind (siehe Abbildung 1-2). Isomaltulose wird vermehrt in Lebensmitteln als Saccharoseersatz eingesetzt und unterscheidet sich von Saccharose lediglich in der Stellung der glykosidischen Bindung (α -1,6-glykosidische Bindung, siehe Abbildung

1-2). Somit bleibt eine Lactolgruppe intakt und auch Isomaltulose zählt zu den reduzierenden Zuckern.

Saccharose wird zum Süßen in allen Lebensmittelgruppen eingesetzt. Natürlich kommt das Disaccharid bevorzugt in Obst und Gemüse vor. Saccharosereiche Obstsorten sind beispielsweise Banane, Mandarine oder Mango. Unter den Gemüsesorten weisen vor allem Mais, Meerrettich, rote Beete, Süßkartoffel und Zwiebel hohe Saccharosekonzentrationen auf. Glykosidische Bindungen sind säurelabil und werden unter sauren Bedingungen hydrolysiert. Das äquimolare Gemisch aus Glucose und Fructose, das bei der Hydrolyse von Saccharose entsteht, wird als Invertzucker bezeichnet und ebenfalls zum Süßen von Lebensmitteln eingesetzt. Lactose kommt fast ausschließlich in Milch und Milchprodukten vor (Souci *et al.*, 2011; Plaza-Diaz *et al.*, 2013). In erhitzten Milchprodukten kann über die Lobry-de-Bruyn-Alberda-van Ekenstein-Umlagerung auch Lactulose entstehen. Dabei wird die Glucoseeinheit in Fructose isomerisiert. Eine genauere Beschreibung der Reaktion erfolgt unter 1.2.1. Das Disaccharid Maltose ist nativ vor allem in Honig enthalten. Auch in Getreiden und einigen Obst- und Gemüsesorten kann Maltose durch vorherigen Stärkeabbau frei vorkommen (Plaza-Diaz *et al.*, 2013). Maltulose kann bei der Isomerisierung der reduzierenden Glucoseeinheit von Maltose zu einer Fructoseeinheit entstehen und kommt überwiegend in Honig, Bier und Hartweizengrieß vor (Belitz *et al.*, 2008; Cavazza *et al.*, 2013). In Produkten wie Nudeln oder auch Sondennahrung wird das Verhältnis zwischen Maltose und Maltulose als Indikator für die Hitzebehandlung der Produkte verwendet, da die Isomerisierung aus Maltose überwiegend bei hohen Temperaturen abläuft (García-Baños *et al.*, 2002; Cavazza *et al.*, 2013). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Isomaltulose wird Maltulose in einigen Matrices als interne Standardsubstanz verwendet. Das reduzierende Disaccharid Isomaltulose kommt nativ nur in geringen Mengen in Honig und Zuckerrohr vor. Zum Einsatz in Lebensmitteln ist Isomaltulose seit 2005 in der Europäischen Union als *Novel Food* zugelassen (Kommission, 2005). Häufig wird Isomaltulose unter dem Markennamen „Palatinose“ vertrieben. Gemäß VO (EG) Nr. 1924/2006 und VO (EU) Nr. 432/2012 dürfen auch gesundheitsbezogene Aussagen zur glykämischen Antwort und Erhaltung der Zahnmineralisierung durch den Verzehr von Isomaltulose getroffen werden. Die positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Isomaltulose werden in 1.1.3.2 näher beschrieben.

1.1.2.2 Weitere Oligosaccharide

In Lebensmitteln vorkommende Oligosaccharide größerer Kettenlänge bauen meist auf Mono- und Disacchariden auf, die im Lebensmittel in hohen Konzentrationen enthalten sind. Sie werden häufig in Reihen oder Familien eingeteilt, die sich lediglich durch die Kettenlänge unterscheiden. Auf Saccharose basieren eine Vielzahl an Oligosaccharidfamilien wie beispielsweise Fructane. Ausgehend von Saccharose kann eine β -Fructoseeinheit an Position O2 oder O6 der Fructoseeinheit oder an Position O6 der Glucoseeinheit gebunden werden. Es entstehen die Trisaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und Neokestose, die die Basis dreier Familien von Oligofructosen bilden (Eggleston & Cote, 2003). An

1-Kestose werden weitere Fructoseeinheiten über β -2,1-glykosidische Bindungen gebunden. Diese Oligofructosereihe kommt auch über die Kettenlänge von acht Einheiten hinaus in Pflanzen vor und wird ab 20 Einheiten als Inulin bezeichnet. Oligofructosen ausgehend von 1-Kestose kommen nativ in einigen Gemüsesorten wie Zwiebel, Knoblauch und Lauch vor (van Loo *et al.*, 1995). Eine Kettenverlängerung an 6-Kestose erfolgt über β -2,6-glykosidische Bindungen. Die Glucoseeinheit in Neokes-tose ist an O1 und O6 jeweils mit einer β -Fructoseeinheit verknüpft. Eine Kettenverlängerung kann dementsprechend an beiden Fructoseeinheiten erfolgen. Diese Gruppe an Oligomeren ist daher nicht linear aufgebaut und es existieren viele verschiedene Strukturen. Die beiden Familien basierend auf 6-Kestose und Neokestose spielen in der Ernährung eine eher untergeordnete Rolle (Eggleston & Cote, 2003).

Eine weitere Oligosaccharidfamilie, die auf Saccharose basiert, stellt die RFO dar. Durch die α -1,6-Bindung von Galactose an die Glucoseeinheit von Saccharose entsteht das Trisaccharid Raffinose. Ausgehend von Raffinose werden weitere Galactoseeinheiten angehängt. Die Strukturen der Mitglieder der RFO sind in Abbildung 1-3 zusammengefasst dargestellt. RFO kommen überwiegend in Leguminosen wie Lupinen, Linsen, Erbsen und Bohnen vor (Xiaoli *et al.*, 2008; Kotha *et al.*, 2020). Die Oligosaccharide werden im Samen der Pflanze über eine enzymatisch katalysierte Reaktion synthetisiert, bei der durch *myo*-Inositol-Galactosyl-Transferase die Galactoseeinheit von Galactinol (1-O- α -D-Galactosyl-D-*myo*-Inositol) übertragen wird (Peterbauer & Richter, 2001). Sie dienen als Speicherkohlenhydrate im Samen und werden insbesondere bei der Keimung als Energiequelle genutzt. Die einzelnen Vertreter der RFO sind in den verschiedenen Leguminosenarten in unterschiedlichen Gehalten vorhanden. Raffinose und Stachyose kommen dabei in größeren Gehalten von bis zu 40 mg/g vor. Verbascose kann mit bis zu 15 mg/g enthalten sein, während Ajugose meist nur in Spuren zu finden ist (Peterbauer & Richter, 2001; Xiaoli *et al.*, 2008; Kotha *et al.*, 2020).

Eine weitere wichtige Gruppe von Oligosacchariden, die nicht auf Saccharose, sondern auf dem Disaccharid Lactose beruht, sind GOS. Sie entstehen durch eine Nebenaktivität zur Transgalactosylierung von β -Galactosidasen, indem Galactose auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Als Akzeptormoleküle können Lactose oder GOS selbst fungieren, wodurch eine Vielzahl an möglichen Verbindungen entsteht. GOS haben präbiotische Eigenschaften ähnlich den Oligosacchariden in Muttermilch, weshalb sie oft in Säuglingsnahrung eingesetzt werden. Durch ihre hohe pH- und Temperaturstabilität können sie auch zu anderen Produktgruppen wie Fruchtsäften, Backwaren oder Süßwaren hinzugefügt werden. In einigen Milch- und Proteinprodukten wie beispielsweise Joghurts werden GOS bereits intrinsisch im Lebensmittel durch den Zusatz geeigneter Enzyme oder Bakterienstämme produziert. GOS kommen in allen fermentierten Milchprodukten nativ vor. Besonders lactosefreie Milch und Milchprodukte zeigen erhöhte GOS-Gehalte, da diese Lebensmittel zum Abbau von Lactose mit β -Galactosidasen behandelt werden. In Joghurt, Buttermilch und Milchpulver konnten GOS ebenfalls nachgewiesen werden (Fischer & Kleinschmidt, 2018).

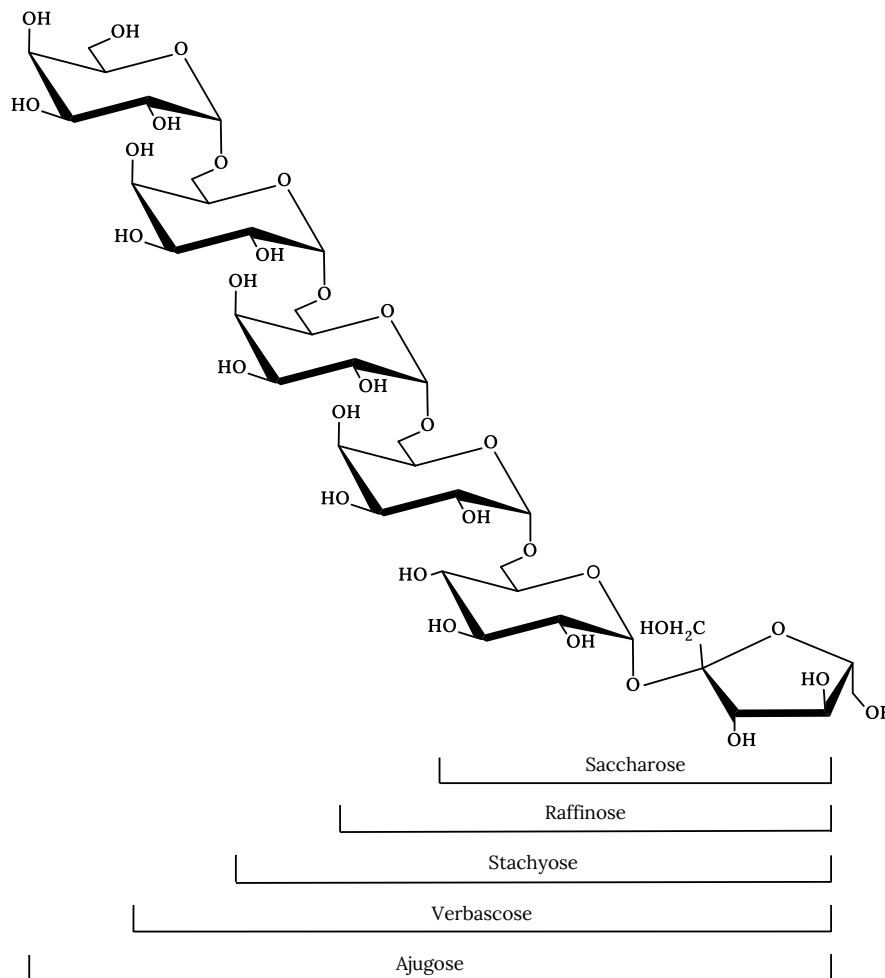


Abbildung 1-3: Übersicht der Oligosaccharidstrukturen der Raffinose-Familie

1.1.3 Kohlenhydratmetabolismus

Der Verdau von Kohlenhydraten beginnt bereits bei der Nahrungsaufnahme im Mund. Im Speichel enthaltene α -Amylase (Ptyalin) hydrolysiert im zerkauten Nahrungsbrei Glucose-basierte α -1,4-Bindungen wie sie beispielsweise in Stärke zu finden sind (Dashty, 2013). Im Dünndarm spalten pankreatische α -Amylasen polymere Strukturen, wenn möglich, sodass nur noch Di- und Trisaccharide vorhanden sind. Eine Reihe membrangebundener, hydrolytisch spaltender Enzyme zersetzen diese oligomeren Strukturen in Monosaccharideinheiten. Dazu zählen beispielsweise Maltasen und Maltaseglucoamylasen, aber auch Lactasen und Sucrasen.

α -Amylasen spalten α -1,4-Bindungen und zerlegen Stärke und Glykogen in Maltose, Maltotriose und Grendextrine. Grendextrine bestehen meist aus fünf bis neun Glucoseeinheiten um eine α -1,6-Bindung, die durch Amylasen nicht gespalten wird. Glucosidasen der Bürstensaummembran haben sowohl eine Aktivität zur Spaltung von α -1,4-Bindungen als auch von α -1,6-Bindungen, wodurch auch diese Strukturen hydrolysiert werden. Maltase spaltet spezifisch Maltose und Maltooligosaccharide. Dabei werden aufgrund ihrer Glycoamylase-Aktivität Glucoseeinheiten vom nicht-reduzierenden

Ende her abgespalten. Ein weiteres Enzym der Bürstensaummembran ist der Sucrase-Isomaltase-Komplex. Isomaltase spaltet α -1,6-Bindungen wie z.B. in Grenzdextrinen oder auch Isomaltulose. Saccharose wird sowohl vom Sucrase-Isomaltase-Komplex als auch von einzelnen Sucrasen gespalten. Trehalase ist die dritte vorkommende α -Glucosidase der Bürstensaummembran. Sie kann Trehalose, ein α , α -1,1-glykosidisch verknüpftes Disaccharid aus zwei Glucoseeinheiten in ihre monomeren Einheiten spalten. Trehalose kommt überwiegend in Pilzen und Insekten vor. Lactase gehört zur Gruppe der β -Galactosidasen und spaltet u.a. Lactose in Glucose und Galactose (Gudmand-Høyer & Skovbjerg, 1996; Norén & Sjöström, 2001; Dashty, 2013).

Während der intestinalen Verdauung von Kohlenhydraten entstehen überwiegend die Monosaccharide Glucose, Galactose und Fructose, die absorbiert und verstoffwechselt werden. Generell können Pentosen über die intestinale Zellwand diffundieren, während Hexosen durch aktive und passive Transportwege in die Epithelzellen der Darmschleimhaut aufgenommen werden (Dashty, 2013; Großkopf & Simm, 2020). Glucose kann dabei über die aktiven *Sodium Glucose Transporter* (SGLT), die an den Transport von Na^+ gekoppelt sind, in die Zelle geschleust werden. Sogenannte Symporter transportieren zwei verschiedene Molekülspezies in gleicher Richtung, indem eine Spezies mit ihrem elektrochemischen Gradienten, im Falle der SGLT Na^+ , transportiert wird. Die dadurch freiwerdende Energie wird dazu verwendet, die zweite Spezies, wie hier beispielsweise Glucose, entgegen ihres Gefälles zu befördern (Cura & Carruthers, 2012). Darüber hinaus kann Glucose auch durch *Glucose Transport Proteins* (GLUT) über eine erleichterte Diffusion in Richtung eines Gradienten transportiert werden. Bisher konnten 14 verschiedene GLUTs identifiziert werden. GLUT1 kommt in vielen verschiedenen Geweben vor und kann neben Glucose auch Galactose transportieren. Auch GLUT3 hat eine ausgeprägte Affinität zum Transport von Galactose. Dieses Protein kommt häufig in Neuronen vor, wurde aber auch schon in anderen Geweben identifiziert. Auch GLUT4 kann Glucose und Galactose befördern. Hierbei findet ein Insulin abhängiger Transport überwiegend in Herz, Skelettmuskeln und Adipozyten statt. Bei Insulinausschüttung werden bis zu zwölf Mal mehr Transporter in die Membran eingebettet, um hohe Blutglucosekonzentrationen schnell abzutransportieren. GLUT2 und GLUT5 wurden zum Transport von Fructose beschrieben. Dabei kommt GLUT5 in fast allen Zellarten vor, während GLUT 2 speziell in pankreatischen β -Zellen, der hepatischen Portalvene sowie in Leber und Niere zu finden ist (Cura & Carruthers, 2012).

Nach der Resorption gelangen die Monosaccharide über die Pfortader zur Leber. Glucose kann in vielen Geweben zur Energiebereitstellung oder Speicherung genutzt werden. Zudem kommt Glucose im Blut gelöst vor. Der menschliche Körper hat dabei einen konstanten Blutglucosespiegel, der individuell zwischen 3,5 mM und 8 mM liegen kann. Nach einer Mahlzeit steigt der Blutglucosespiegel rasch an, da vermehrt Glucose aufgenommen wird. Der Wert sinkt nach Verstoffwechslung der Mahlzeit auch wieder auf seinen Basiswert ab. Das Hormon Insulin steuert die postprandiale Glucosehomöostase. Bei einer hohen Blutglucosekonzentration wird die Aufnahme von Glucose in

Muskeln und Fettgewebe durch vermehrte Bildung von GLUT4 erhöht. Die Synthese von Fettsäuren und Speicherung im Fettgewebe sowie die Translation von Proteinen und der Aminosäureaufbau werden induziert. Während Fastenzeiten wird der Blutglucosespiegel ebenfalls konstant gehalten. Die Hormone Glucagon, Epinephrin, Norepinephrin und einige Wachstumshormone induzieren eine Glucoseproduktion durch die Gluconeogenese oder durch den Abbau von Speichermolekülen wie Glykogen. Darüber hinaus hemmen diese Hormone alle anabolen Prozesse (Coss-Bu *et al.*, 2009; Güemes *et al.*, 2016).

Einen bedeutenden Prozess in der physiologischen Energiebereitstellung stellt die Glykolyse dar. Glucose wird dabei in Pyruvat umgewandelt, wodurch zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) gebildet werden. Unter aeroben Bedingungen wird das erzeugte Pyruvat über den Zitratzyklus und die Atmungskette in Kohlenstoffdioxid und Wasser umgewandelt. Dabei entstehen 36 Moleküle ATP. Unter anaeroben Bedingungen, wie beispielsweise unter großer körperlicher Belastung, wird Pyruvat in Lactat umgewandelt. Lactat wird über den Cori-Zyklus in der Leber wieder zu Glucose umgewandelt.

Fructose kann in einer Hexokinase katalysierten Reaktion zu Fructose-6-phosphat phosphoryliert und dann in der Glykolyse zur Energiebereitstellung genutzt werden. In der Leber kommen Fructokinasen vor, die an der Phosphorylierung von Fructose zu Fructose-1-phosphat beteiligt sind (siehe Abbildung 1-4). Fructokinasen sind deutlich affiner zu Fructose als zu Glucose, weshalb ein Großteil der durch die Nahrung aufgenommenen Fructose in der Leber verstoffwechselt wird. Fructose-1-phosphat wird durch weitere enzymkatalysierte Reaktionen in Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat gespalten, die zur Energiebereitstellung oder zur Speicherung genutzt werden können. Glycerinaldehyd kann nach Phosphorylierung zusammen mit Dihydroxyacetonphosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat umgewandelt werden, welches zu Fructose-6-phosphat und dann über Glucose-6-phosphat der Glykolyse zugeführt werden kann. Der Fructosemetabolismus durch Fructokinase wird nicht durch die Energieaufnahme reguliert. Es werden vermehrt auch hepatische Triglyceride zur Speicherung produziert, wodurch der Verzehr von Fructose einen großen Einfluss auf die Fetteinlagerung in der Leber hat. Hohe Fructoseeinnahmen können mitunter zu einer sogenannten nicht alkoholischen Fettleber führen (Dashty, 2013; Qi & Tester, 2020). Werden Glucose und Fructose gleichzeitig aufgenommen, scheint ein Großteil der Fructose als Glykogen in der Leber gespeichert zu werden (Coss-Bu *et al.*, 2009).

Galactose wird nach der Resorption durch Phosphorylierung zu Galactose-1-phosphat metabolisiert. Nach Aktivierung durch Übertragung auf Uridindiphosphat (UDP) wird die Galactoseeinheit zu Glucose epimerisiert (siehe Abbildung 1-4). Die entstehende UDP-Glucose kann in Glucose-1-phosphat umgewandelt werden, die zur Synthese von Speichermolekülen wie beispielsweise Glykogen oder zur Energiebereitstellung genutzt werden kann (Dashty, 2013).

Isomaltulose wird im Dünndarm fast vollständig gespalten, und die Monosaccharideinheiten werden zu 93-96 % aufgenommen (Holub *et al.*, 2010). Die Hydrolyse erfolgt aufgrund der α -1,6-Bindung

deutlich langsamer als bei Saccharose, wodurch sich der Blutglucosespiegel langsamer erhöht als beim Verzehr von großen Mengen Saccharose. Eine genauere Erklärung dieses Effekts wird in 1.1.3.2 gegeben. Isomaltulose hat durch seine vollständige Aufnahme den gleichen Anteil an der Kalorienbilanz wie Saccharose von 17 kJ/g. In klinischen Studien wurde eine gute intestinale Verträglichkeit von Isomaltulose festgestellt. Dabei traten keine Beschwerden wie Flatulenz, Erhöhung des Stuhlvolumens oder Diarrhöe auf wie sie von manchen Zuckerersatzstoffen verursacht werden (Lina et al., 2002).

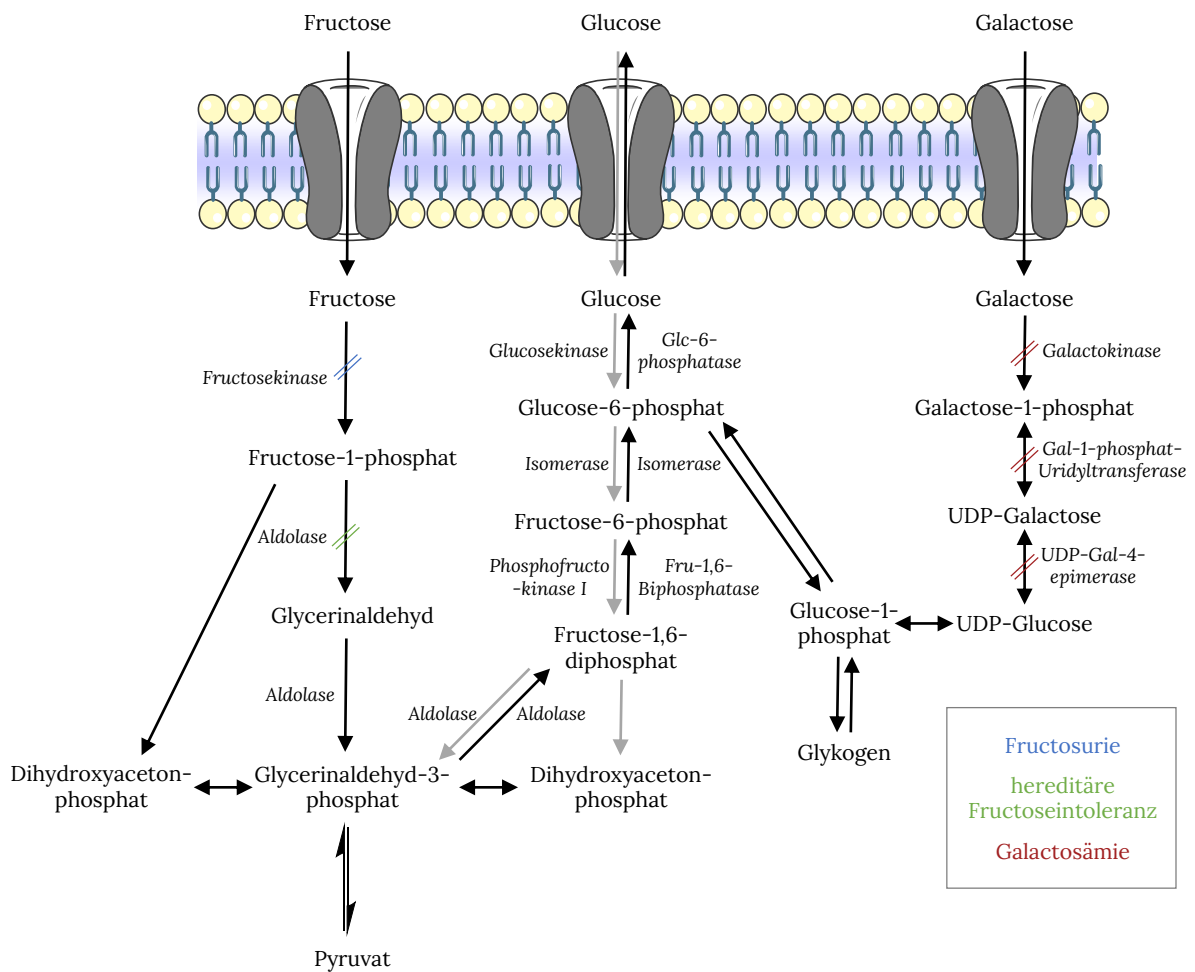


Abbildung 1-4: Metabolismus von D-Fructose (Fructose oder Fru), D-Glucose (Glucose oder Glc) und D-Galactose (Galactose oder Gal) in Leberzellen. Glucose wird nur zu einem geringen Anteil in Leberzellen aufgenommen (graue Pfeile). Der Großteil der hepatisch gebildeten Glucose wird extrahepatisch verwendet. Ein Mangel oder Defekt einzelner Enzyme kann zu Stoffwechselerkrankungen führen, die an der jeweiligen Stelle markiert und in 1.1.3.1 erklärt werden. UDP: Uridindiphosphat (modifiziert nach Tappy & Lê, 2010; Dashty, 2013; Qi & Tester, 2019)

RFO können im Dünndarm nicht gespalten werden und erreichen zu annähernd 100 % das terminale Ileum. Es ist somit davon auszugehen, dass sie vollständig in den Dickdarm gelangen und erst dort verstoffwechselt werden (Shimaya et al., 2009). Sie gehören daher zur Gruppe der Ballaststoffe, die

gemäß Art. 2 Abs. 4 i.V. mit Anhang I VO (EU) Nr. 1169/2011 als Kohlenhydratpolymere mit drei oder mehr Monomereinheiten definiert werden, die im Dünndarm nicht verdaut werden. Im Dickdarm werden alle unverdaulichen Bestandteile der Nahrung durch die Darmmikrobiota fermentiert. In der Darmmikrobiota können Vertreter vieler anaerober Bakterienfamilien wie beispielsweise *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* und *Ruminococcaceae* vorkommen. Die genaue Zusammensetzung ist individuell und kann sich sowohl in den verschiedenen Lebensphasen als auch durch exogene Faktoren wie Ernährung, körperliche Bewegung oder Medikation ändern. Zudem ändert sich der pH-Wert des Dickdarms von 5,5 im proximalen Teil bis zu einem Wert von 8,0 im distalen Kolon, was die Zusammensetzung des Mikrobioms ebenfalls beeinflusst. Die Hauptprodukte der Fermentation sind kurzkettige Fettsäuren (*Short-Chain Fatty Acids*, SCFAs), die von den Kolonozyten über Monocarboxylat-Transporter (zum Teil auch Natrium gekoppelt) aufgenommen werden und ihnen als Hauptenergiequelle dienen. SCFAs können mit intestinalen Immunzellen interagieren und dadurch die Immunantwort und die Homöostase des Darms beeinflussen (Pope *et al.*, 2020). RFO werden von einigen Bakterienstämmen unter erheblicher Gasbildung fermentiert, was Flatulenz verursacht (Myhara *et al.*, 1988).

1.1.3.1 Stoffwechselstörungen

Hoher Zuckerkonsum steht in Verbindung mit dem Auftreten einiger Krankheitsbilder, wobei die Evidenz vieler metabolischer Effekte noch nicht abschließend bewiesen ist. Übermäßiger Zuckerkonsum wird mit Gewichtszunahme korreliert (van Dam & Seidell, 2007). Darüber hinaus kommt es bei dem Verzehr großer Zuckermengen zum Nachlassen kognitiver Eigenschaften und Hyperaktivität (Qi & Tester, 2020). Für den postulierten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und erhöhter Zuckereinnahme konnte bislang kein Zusammenhang festgestellt werden. Allerdings erhöht sich die Sterblichkeit während kardiovaskulärer Ereignisse ab einer mittleren Gesamtzuckeraufnahme von 26 % des Gesamtenergiebedarfs signifikant (Khan *et al.*, 2019). Nahrungszucker wie Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose und Maltose können Karies verursachen (Touger-Decker & van Loveren, 2003). Dabei wird durch hohen Zuckerkonsum das mikrobielle Gleichgewicht in der Mundflora gestört. Es kommt zur Überbesiedlung mit pathogenen Mikroorganismen wie beispielsweise *Streptococcus mutans*, die durch erhöhte Säureproduktion den Zahnschmelz angreifen und Zahnfäule verursachen können (Qi & Tester, 2019; Qi & Tester, 2020). In 1.1.3.3 wird der Einfluss verschiedener Nahrungszucker auf die Entstehung von Karies näher erläutert.

Diabetes ist eine Stoffwechselerkrankung bei der der Blutglucosespiegel infolge unzureichender Insulinsekretion dauerhaft erhöht ist (Qi & Tester, 2019). Beim Typ 1 der Krankheit liegt ein Mangel der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas vor. Die Krankheit hat eher autoimmunologischen Charakter und ist angeboren. Diabetes Typ 2 entsteht erst im Laufe des Lebens und wird auf Insulinresistenz in den Geweben und vermutlich auch verminderte Insulinproduktion zurückgeführt. Ob nur die Aufnahme einzelner Zucker oder allgemein hoher Zuckerkonsum und damit auch ein exzessiver

Kalorienkonsum einen Einfluss hat, ist noch nicht abschließend geklärt (Qi & Tester, 2020). Durch einen erhöhten Zuckerkonsum steigt der Blutglucosespiegel rasch an, der bei Diabeteskranken durch die geringere Insulinmenge nicht ausreichend schnell wieder abgebaut wird. Beim Verzehr hoch glykämischer Lebensmittel kommt es zu einer chronischen Überzuckerung, die zu vielerlei schwerwiegenden Symptomen wie Sehstörungen, Schlaganfall, Nierenschäden bis hin zum Koma führen kann. Betroffene können durch die Zugabe von Insulin in Kombination mit niedrig glykämischer Kost behandelt werden (Großkopf & Simm, 2020). Auch können mit Isomaltulose gesüßte Produkte dabei helfen den Blutzuckerspiegel konstant zu halten (siehe 1.1.3.2).

Eine gestörte Resorption von Zuckern führt zu einer durch die fehlende Aufnahme der Nährstoffe im Dünndarm zu Unterernährung und zum anderen durch das Auftreten von Monosacchariden und nicht hydrolysierten Disacchariden im Dickdarm zur Fermentation dieser. Dabei entstehen Gase wie Wasserstoff, Methan oder Kohlenstoffdioxid, die Blähungen verursachen (Qi & Tester, 2020). Ein Beispiel für eine Resorptionsstörung ist die sogenannte Fructosemalabsorption, die bis zu 50 % der Weltbevölkerung betrifft. Hohe Fructosegehalte können bei Betroffenen durch GLUT2 und GLUT5 nicht aufgenommen werden, was zu Blähungen und Diarrhöe führen kann. Durch den Verzicht großer Fructosemengen wie beispielsweise in Smoothies können die Beschwerden erfolgreich vermieden werden. Weitere Beispiele sind auftretende Genmutationen in SGLT1, die zu einer verschlechterten Aufnahme von Glucose und Galactose im Darm führen können. Eine lactose-, galactose- und glucosearme Ernährung kann die auftretenden Symptome wie Diarrhöe lindern (Qi & Tester, 2019).

Weitere Krankheitsbilder im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratmetabolismus beruhen meist auf der Fehlfunktion oder dem Mangel an spezifischen kohlenhydratabbauenden Enzymen. Störungen des Glucosemetabolismus sind aufgrund der hohen Relevanz von Glucose als Speichermolekül meist sehr schwer behandelbar. Es können Mängel der Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und Pyruvatkinase auftreten. Diese Enzyme sind alle an der Glykolyse beteiligt und beeinflussen somit die Energiebereitstellung (Qi & Tester, 2019).

Fructosurie, ein angeborener Mangel des Enzyms Fructokinase, kommt nur circa bei einer von 130.000 Geburten vor. Es erfolgt eine vermehrte Fructoseausscheidung im Blut, die keine weiteren Beschwerden verursacht. Die hereditäre Fructoseintoleranz kommt bei 0,03-0,06 % der Neugeborenen vor. Der Mangel an Aldolase führt zur Anreicherung von Fructose-1-phosphat, welches die Gluconeogenese und Glykogenolyse stoppt. Es erfolgt eine chronische Unterzuckerung. Betroffene müssen alle Fructosequellen in der Ernährung konsequent meiden, um schwerwiegende Nierenschädigungen sowie weitere Symptome wie Übelkeit, Lethargie oder Muskelzuckungen zu vermeiden. Ihre Ernährung sollte zudem arm an Saccharose und Sorbitol sein (Qi & Tester, 2019).

Während Fructose in der Ernährung relativ gut vermieden werden kann, können insbesondere Säuglinge und Kleinkinder mit angeborener Galactosämie Galactose kaum aus ihrer Ernährung ausschließen. Galactose kommt als Bestandteil von Lactose in vielen Milchsorten und insbesondere der

Muttermilch vor. Die klassische Galactosämie mit einem Defekt der Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase tritt bei einem von 30.000 bis 60.000 Neugeborenen auf. Es kommt zur Anreicherung von Galactose und Galactose-1-phosphat in den Zellen, was zu schweren Leber-, Nieren- und Gehirnschäden führen kann. Eine lactose- und galactosearme Ernährung muss hier lebenslang angewandt werden. Gleiches gilt für Menschen mit angeborenen Defekten der Enzyme Galactokinase und Uridindiphosphat-galactose-4-Epimerase, wobei sich ein Mangel an Galactokinase meist durch mildere Krankheitsverläufe auszeichnet (Qi & Tester, 2019).

Lactoseintoleranz bezeichnet ein Krankheitsbild, bei dem Lactose aus der Nahrung aufgrund eines Defizits an Lactase nicht gespalten werden kann. Lactose gelangt dadurch in den Dickdarm, was zu Blähungen, Durchfall und Bauchschmerzen führen kann. Ein angeborener Lactasemangel ist sehr selten und kommt nur bei rund einem von 60.000 Neugeborenen vor. Primärer Lactasemangel entwickelt sich meistens, aber nicht ausschließlich, in der Kindheit. Sekundäre Lactoseintoleranz entsteht durch Verletzungen oder Krankheitsbilder, die den Dünndarm betreffen und dadurch das Vorkommen oder Aktivität der Lactase der Bürstensaummembran beeinflussen können. Im Erwachsenenalter leidet bis zu 70 % der Weltbevölkerung unter Lactoseintoleranz. Dabei sind die Ausprägungen der Krankheit sehr verschieden und individuell. In allen Fällen kann durch einen Verzicht auf Lactose eine gute Lebensqualität geschaffen werden (Qi & Tester, 2020).

Eine Maltase-Glucoamylase-Defizienz betreffen ca. 2 % der Weltbevölkerung und äußert sich in chronischer Diarrhøe. Durch den Verzicht auf Stärke können die Beschwerden gelindert werden. Auch ein Defekt des Enzyms Saccharose-Isomaltase führt zu gastrointestinalen Beschwerden, die durch Verzicht von Saccharose und Stärke verhindert werden können. Mit einer Inzidenz von 0,05 - 0,2 % der Lebendgeburten kommt diese Stoffwechselstörung relativ häufig vor (Qi & Tester, 2020).

1.1.3.2 Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf den Blutglucosespiegel

In Abbildung 1-5 (links) sind die Kurvenverläufe des Blutzuckerspiegels nach Verzehr von Glucose, Saccharose und Isomaltulose dargestellt. Nach dem Verzehr von Isomaltulose steigt der Blutglucosespiegel deutlich geringer an als beim Verzehr vergleichbarer Mengen Glucose oder Saccharose. Durch die konstante Energiebereitstellung wird der Blutzuckerspiegel somit nach einer Mahlzeit mit Isomaltulose für längere Zeit relativ konstant gehalten.

Lebensmittel können durch den glykämischen Index (GI) miteinander verglichen werden. Dieser ist als die Fläche unter der Blutglucosekurve nach einem Verzehr von 50 g des Lebensmittels definiert. Der GI wird als Prozentsatz zu einem Standardwert (meistens von Glucose) angegeben. Eine Ergänzung zum ernährungsphysiologischen Vergleich von Lebensmitteln stellt die glykämische Last (GL) dar. Dabei wird der GI mit dem Kohlenhydratgehalt des Lebensmittels multipliziert, um dadurch einen

besseren Überblick über den realen Einfluss auf den Anstieg des Blutglucosegehalts zu liefern (Wolever, 2003). GI und GL einiger Analyten sind in Tabelle 1-2 einzusehen.

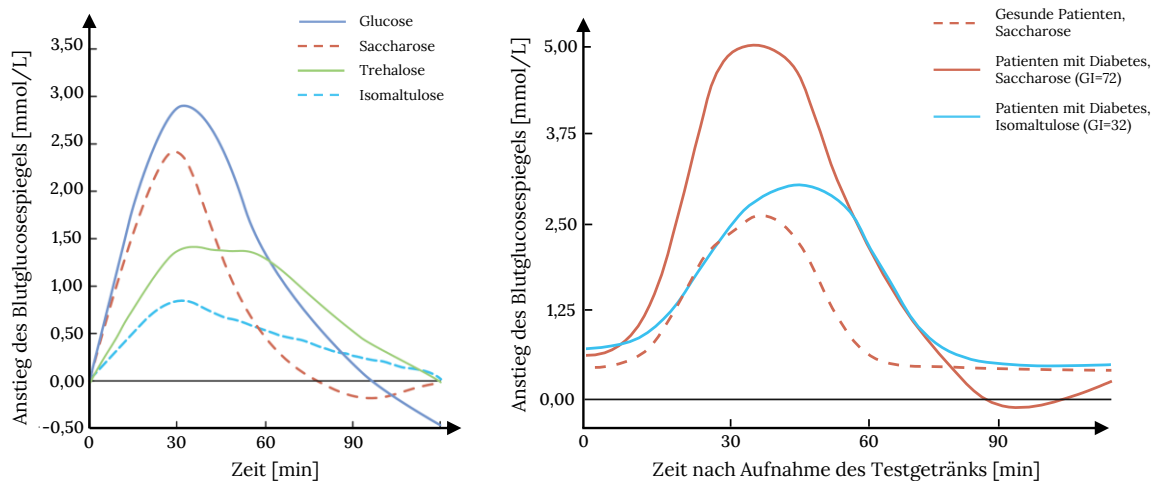


Abbildung 1-5: Links: Verlauf des Blutglucosespiegels nach Verzehr von jeweils 50 g D-Glucose (Glucose, blau), Saccharose (rot), Trehalose (grün) und Isomaltulose (türkis). Nach dem Verzehr von Isomaltulose steigt die Kurve deutlich geringer an und braucht länger, um wieder auf den Ausgangswert abzusinken (modifiziert nach Livesey, 2012).

Rechts: Einfluss des Verzehrs von 50 g Isomaltulose oder Saccharose auf den Blutglucosespiegel von Patienten mit Diabetes mellitus. Die Kurve nach Verzehr von Isomaltulose (türkis) zeigt deutlich verringerte Blutglucosewerte im Maximum verglichen zur Kurve nach Verzehr von Saccharose (rot). Zudem verschiebt sich die Kurve nach Verzehr von Isomaltulose zu späteren Zeiten, was auf eine längere Energiebereitstellung bei Diabetespatienten schließen lässt. GI: Glykämischer Index (modifiziert nach Atkinson et al., 2008; Maresch et al., 2017)

Die Plasmainsulinkonzentrationen sind nach dem Verzehr von Isomaltulose 30-50 % niedriger im Vergleich zum Verzehr einer gleichwertigen Menge Saccharose. Zudem wird Glucose bis zu einer Stunde länger bereitgestellt als beim Verzehr von Saccharose (siehe Abbildung 1-5 rechts). Diese beiden Effekte helfen besonders Diabetespatienten ihren Blutglucosespiegel konstant zu halten. Bei der Einnahme von Isomaltulose unmittelbar vor oder während körperlicher Bewegung konnte eine erhöhte Leistungsfähigkeit sowie eine verbesserte Regeneration beobachtet werden (Maresch et al., 2017). Der Verzehr von Isomaltulose steht darüber hinaus im Zusammenhang mit einer erhöhten Fettoxidation von bis zu 60 %. Eine Ernährung, die auf einen niedrigen GI und GL ausgelegt ist, sowie der Verzehr von Isomaltulose anstatt Saccharose kann bei der Gewichtsreduktion und der nachhaltigen Gewichtserhaltung helfen. Verschiedene Studien an Schulkindern konnten einen Einfluss zwischen Isomaltuloseverzehr und der Verbesserung kognitiver Fähigkeiten zeigen. Kinder konnten nach einem Isomaltulose angereicherten Frühstück Gedächtnisaufgaben besser lösen und waren länger leistungsfähig als ihre Mitschüler aus der Kontrollgruppe (Maresch et al., 2017). Mit der gesundheitsbezogenen Aussage, dass nach dem Verzehr von Isomaltulose der Blutzuckerspiegel weniger

stark ansteigt als nach dem Verzehr von Saccharose, darf gemäß Art.1 Abs.1 und Abs.2 VO (EU) Nr. 432/2012 in der Europäischen Union geworben werden.

Tabelle 1-2: Angabe des glykämischen Index (GI) und der glykämischen Last (GL) ausgesuchter Mono- und Disaccharide (modifiziert nach Atkinson *et al.*, 2008)

Kohlenhydrat	GI (D-Glucose = 100)	GL (pro 10 g)
D-Fructose	23	2
Saccharose	65	7
Lactose	46	5
Maltose	105	11
Isomaltulose	32	3

1.1.3.3 Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf die Entstehung von Karies

Karies ist eine weit verbreitete Zahnerkrankung und beschreibt das Auflösen der Zähne durch Säureangriff. Säuren können von Mikroorganismen des dentalen Plaques produziert werden, die häufig Zucker aus der Nahrung als Ausgangsstoff nutzen. Der durch die Säureproduktion entstehende pH-Wert-Abfall führt zu Demineralisierungsprozessen der Zähne. Sinkt der pH-Wert in der Mundhöhle unter 5,5 und damit unter den kritischen Wert, der zur Stabilisierung des Zahnschmelzes erforderlich ist, reichert sich der Speichel infolge der Demineralisierungsprozesse mit Calcium und Phosphat an. Steigt der pH-Wert wieder über den Wert von 5,5, kommt es zur Remineralisierung des Zahnschmelzes. Um einer dauerhaften Auflösung des Zahnschmelzes und dadurch auch der Entstehung von Karies vorzubeugen, sollte die Dauer der Remineralisierung die der Demineralisierung überschreiten. Die in der Nahrung häufig vorkommenden Mono- und Disaccharide Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose und Maltose ebenso wie Stärke, die durch Ptyalin hydrolysiert wird, können zur Entstehung von Karies beitragen, da sie von den Mikroorganismen in der Mundhöhle verstoffwechselt werden können (Touger-Decker & van Loveren, 2003). Isomaltulose kann von *Streptococcus mutans*-Stämmen nicht verstoffwechselt werden, die durch ihre Säureproduktion hauptsächlich zur Entstehung von Karies beitragen (Ooshima *et al.*, 1983; Minami *et al.*, 1990). In neueren Studien wurde gezeigt, dass Isomaltulose aber von 33 % der Mikroorganismen des dentalen Plaques wie *Actinomyces*-Arten verstoffwechselt wird. Die Säureproduktion ist allerdings deutlich geringer als bei *Streptococci*-Stämmen, weshalb die Kariogenität von Isomaltulose als deutlich geringer eingestuft wird als von Saccharose (Matsuyama *et al.*, 2003). Die *European Food Safety Agency* (EFSA) stuft Isomaltulose als eine Substanz ein, die in der Lage ist den pH-Wert 30 min nach einer Mahlzeit nicht unter den Wert von

5,7 abzusenken. Somit wird die Remineralisation der Zähne gewährleistet (EFSA, 2011). Deshalb darf gemäß Art. 1 Abs. 1 und Abs. 2 VO (EU) Nr. 432/2012 ebenfalls mit der gesundheitsbezogenen Angabe geworben werden, dass Isomaltulose zur Erhaltung der Zahnmineralisierung beiträgt.

1.2 Untersuchte Produktgruppen

1.2.1 Milch und Milchprodukte

Gemäß Art. 78 Abs. 4 i.V. mit Anhang VII VO (EU) Nr. 1308/2013 bezeichnet der Begriff „Milch“ in der Europäischen Union ausschließlich Kuhmilch. Handelt es sich nicht um Kuhmilch, muss die Tierart des Ursprungs angegeben werden. Da im deutschen Sprachgebrauch mit dem Begriff Milch ebenfalls meistens Kuhmilch assoziiert wird, werden diese beiden Begriffe im Verlauf dieser Arbeit synonym verwendet.

Die Hauptbestandteile von Milch sind in absteigender Reihenfolge Wasser, Lactose, Fett, Proteine und Mineralstoffe. Die Matrix liegt als Fett-in-Wasser-Emulsion vor, wobei in der wässrigen Phase Proteine, Mineralstoffe und Lactose gelöst sind. Die im Handel erhältlichen Milchsorten können u.a. anhand ihres Fettgehaltes unterschieden werden. Gemäß Art. 78 Abs. 4 i.V. mit Anhang VII Teil IV VO (EU) Nr. 1308/2013 enthält standardisierte Vollmilch mindestens 3,5 % Fett, während teilentrahmte Milch 1,5 % und entrahmte Milch höchstens 0,5 % Fett aufweist. Der Lactosegehalt hängt zum Teil von der Tierhaltung und der Fütterung ab, beträgt aber im Durchschnitt über alle Fettstufen 4,8 g/100 mL (Souci *et al.*, 2011). Da ein Vertrieb von Rohmilch aufgrund der potentiell hohen Keimbelastung nach §17 Abs. 2 der Tierischen Lebensmittelhygieneverordnung nur in spezifischen Ausnahmefällen erlaubt ist, sind alle im Lebensmitteleinzelhandel erhältlichen Milchsorten gemäß Art. 1 Abs. 1 i.V. mit Anhang II VO (EG) Nr. 1662/2006 wärmebehandelt. Frische Milch wird bei 72 °C für mindestens 15 s behandelt. Ultrahoherhitze Milch, die im Handel als H-Milch vertrieben wird, wird für einige Sekunden auf 135 °C erhitzt. Kondensmilch wird sogar für mehrere Minuten bei über 100 °C behandelt. Durch die Hitzebehandlung kann Milch in ihrer Zusammensetzung verändert werden. So wird beispielsweise beim Erhitzen von Milch und Milchprodukten Lactulose aus Lactose gebildet, indem eine Isomerisierung der Glucoseeinheit zu einer Fructoseeinheit über eine 1,2-Enolisierung stattfindet. Die ablaufende Reaktion wird als Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Alberda Reaktion bezeichnet. Der Prozess findet bei hohen Temperaturen sowie unter alkalischen Bedingungen beschleunigt statt. In Milch herrscht ein pH-Wert von 6-7. Da die Reaktion somit nicht an ihrem pH-Optimum abläuft, entstehen relativ kleine Mengen an Reaktionsprodukten, deren Mengen mit steigender Hitzebehandlung zunehmen (Schuster-Wolff-Bühning *et al.*, 2010). Dementsprechend werden in sterilisierter Milch mit bis zu 1200 mg/L die höchsten Lactulosegehalte ermittelt. Pasteurisierte Milch kann bis zu 80 mg/L Lactulose enthalten, eine Ultrahoherhitzung kann die Konzentration auf bis zu 420 mg/L ansteigen lassen (Marconi *et al.*, 2004). Neben Lactulose kann auch Epilactose im Zuge der Lobry-de-Bruyn-van Ekenstein-Alberda Umlagerung entstehen. Aus dem 1,2-Endiol der Glucoseeinheit der

Lactose wird dabei eine D-Mannoseeinheit gebildet (Schuster-Wolff-Bühning *et al.*, 2010; Sitanggang *et al.*, 2016).

Da Lactoseintoleranz und Lactoseunverträglichkeit in Deutschland verbreitete Krankheitsbilder darstellen (siehe 1.1.3.1), werden Milch und Milchprodukte immer öfter in lactosefreien Varianten angeboten. Lactosefreie Milch wird dabei durch den Einsatz von Lactasen hergestellt, die Lactose in Glucose und Galactose spalten. Die verwendeten Lactasen sind dabei immobilisiert an unlöslichen Trägern angebracht, über die die Milch geleitet wird. Wie schon in 1.1.2.2 beschrieben, können β -Galactosidasen wie Lactase auch Transglykosylierungsprodukte bilden. Dabei entstehen neben GOS auch weitere Dimere wie Allolactose (β -1,6-D-Galactosyl-D-glucose) oder β -1,6-D-Galactosyl-D-galactose (Fischer & Kleinschmidt, 2018; Mangan *et al.*, 2019). Die Vielzahl der möglichen, strukturell sehr ähnlichen Verbindungen kann den analytischen Nachweis einzelner Kohlenhydratbestandteile erschweren. Der Maximalgehalt an Lactose in lactosereduzierten Produkten darf gemäß §4 Abs. 2 der Milcherzeugnisverordnung (MilchErzV) 0,1 g/100 g nicht übersteigen. Für lactosefreie Babynahrung ist zum Schutz vor lactoseintoleranten oder an Galactosämie erkrankten Neugeborenen ein strengerer Maximalgehalt von 2,5 mg Lactose/ 100 kJ gemäß Art. 9 VO (EU) Nr. 2016/127 geregelt.

Rohmilch wird in einem Separator zur Reinigung und Entrahmung zentrifugiert. Durch die geringere Dichte des Milchlalles steigt der fettreiche Rahm nach oben und der fettarme, wässrige Milchteil wird nach außen hin abgeschieden. Der abgeschöpfte Rahm kann zur Einstellung der Fettstufe der Milch wieder zugeführt oder als Sahne vermarktet werden. Sahne enthält durchschnittlich 3,3 g/100 g Lactose (Souci *et al.*, 2011; Gille *et al.*, 2018). Durch eine Ansäuerung des Rahms wird saure Sahne produziert. Während des Butterungsprozesses erfolgt eine Phasenumkehr der Milchemulsion zu einer Wasser-in-Öl-Emulsion. Hierfür wird Rahm zunächst im sogenannten Reifungsprozess angesäuert und unter verschiedenen Temperaturen gelagert. Während der Butterung werden die Membranen der Fetttropfen aufgrund der starken mechanischen Beanspruchung aufgebrochen, und es entsteht eine kontinuierliche Fettphase. Die übrigen Rahmbestandteile werden als Buttermilch abgetrennt (Belitz *et al.*, 2008). Der Großteil der enthaltenen Mono- und Disaccharide verbleibt während der Butterung in der Buttermilch. Diese enthält durchschnittlich 3,6-4,0 g/100 g Lactose sowie 36 mg/100 g Galactose und 6 mg/100 g Glucose (Souci *et al.*, 2011; Gebreselassie *et al.*, 2016).

1.2.2 Produkte zur Sportlerernährung und Gewichtsreduktion

Geschmack und Textur von Isomaltulose sind Saccharose sehr ähnlich, wobei Isomaltulose lediglich die Hälfte der Süßkraft von Saccharose besitzt. Isomaltulose ist unter sauren Bedingungen deutlich stabiler als Saccharose (Lina *et al.*, 2002). Durch seine langfristige Energiefreisetzung und die diskutierten positiven Eigenschaften auf Leitungsfähigkeit und Regeneration (siehe 1.1.3.2) wird Isomaltulose bevorzugt in Sportlernahrung und Sportgetränken eingesetzt. In diesen Getränken mit

meist niedrigeren pH-Werten wird Isomaltulose zudem deutlich langsamer hydrolysiert. Eine Studie zur Stabilität von Isomaltulose in Cola-Getränken mit einem pH-Wert von 2,3 zeigte nach dreimonatiger Lagerung eine 98 %ige Hydrolyse der enthaltenen Saccharose, während Isomaltulose fast vollständig intakt blieb (ECR, 2003).

Viele Produkte zur Gewichtsreduktion wie Instantdrinks werden mit Isomaltulose gesüßt. Durch die geringere GL der Lebensmittel werden die Gewichtsreduktion sowie die anschließende Gewichtserhaltung vereinfacht. Nach einer Gewichtsabnahme hat Fettgewebe eine höhere Insulinaffinität als die Muskelzellen. Dadurch wird bei hoch glykämischer Ernährung nach einer Diät vermehrt Glucose zur Einlagerung von Triglyceriden im Fettgewebe verwendet und dadurch der Fettanteil im Körper wieder erhöht. Eine Ernährung mit niedrig glykämischen Lebensmitteln sowie sportliche Betätigung können diesen Effekt abmildern und dadurch eine Gewichtserhaltung ermöglichen (Maresch et al., 2017).

1.2.3 Hülsenfrüchte

Hülsenfrüchte sind reich an Ballaststoffen sowie an pflanzlichem Protein, weshalb sie in der vegetarischen und veganen Ernährung immer mehr an Bedeutung gewinnen. Für den menschlichen Verzehr spielen vor allem Erbsen, Bohnen, Linsen und Lupinen eine wichtige Rolle. Der Verzehr von Hülsenfrüchten kann cholesterin- und blutdrucksenkend wirken (Ha et al., 2014; Jayalath et al., 2014). Die Ballaststoffe von Hülsenfrüchten haben präbiotische Eigenschaften. Sie fördern das Wachstum probiotischer Mikroorganismen im Darm wie beispielsweise von Bifidobakterien. In Hülsenfrüchten kommen neben RFO viele weitere Ballaststoffe wie Pektine oder Hemicellulosen vor (Brummer et al., 2015). Hülsenfrüchte haben einen geringen glykämischen Index (Brummer et al., 2015). Ihre blähende Wirkung ist sehr individuell und kann durch Einweichen reduziert werden. Dabei werden bis zu einem Zehntel der enthaltenen Menge an RFO aus dem Ausgangsmaterial herausgelöst (Brummer et al., 2015).

1.3 Übersicht bereits eingesetzter NMR-spektroskopischer Methoden zur Bestimmung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide

1.3.1 Eindimensionale Experimente

Die meisten bereits publizierten Methoden beruhen auf eindimensionalen (1D) Protonenexperimenten (¹H-NMR-Experimente). Nähere Erklärungen zum Messprinzip und den Pulssequenzen der ¹H-NMR-Spektroskopie werden in 3.4 gegeben. Ein entscheidender Faktor zur richtigen Quantifizierung ist ein ausreichender D_1 -Delay, der zusammen mit der Akquisitionszeit die Erholzeit beschreibt. Die Erholzeit zwischen zwei Scans sollte ausreichend lange sein, um eine vollständige Rückkehr aller

enthaltenen Spins in den Ausgangszustand zu gewährleisten. Nur bei vollständiger Relaxation aller Spins kann eine maximale Signalintensität und somit auch eine korrekte Quantifizierung erfolgen. Da die Akquisitionszeit von der spektralen Breite abhängt und daher nicht flexibel eingestellt werden kann, kann über die Einstellung des D_1 -Delays vollständige Relaxation erreicht werden. Bei einem D_1 -Delay von fünf Mal der longitudinale Relaxationszeit ist davon auszugehen, dass 99 % der Kerne in den Ausgangszustand zurückgekehrt sind (Claridge, 2016; Li & Hu, 2017). Der D_1 -Delay trägt bei der Aufnahme mehrerer Scans den Hauptteil zur Dauer eines NMR-Experiments bei. Aus diesem Grund sind Anwender bemüht die Wartezeit zwischen zwei Scans zu minimieren und dadurch die Experimentdauer zu verkürzen (siehe 3.4.2). Ein limitierender Faktor zur Anwendung von ^1H -NMR-Experimenten ist eine ausreichende Signalauflösung und die Identifizierung nicht überlappender Signale für die jeweiligen Analyten.

Quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie wird häufig im Bereich von *Metabolomics* Analysen eingesetzt. Die Analyse vorhandener Metaboliten in komplexen biologischen Matrices wird meist mit multivariaten Auswertungsstrategien gekoppelt (Li & Hu, 2017). Dabei werden die Experimente oft zur Bestimmung der Authentizität, der geographischen Herkunft oder von Qualitätsmerkmalen zur Erkennung von Verfälschungen z.B. von Honig, Olivenöl oder Wein verwendet. Zur absoluten Quantifizierung lebensmittelrelevanter Kohlenhydrate sind die Methoden aufgrund überlagerter Signale nur bedingt geeignet. Mithilfe von mathematischen Prozessierungsmethoden wie *deconvolution* und *line fitting* gibt es Bestrebungen überlappende Signale für die Auswertung zugänglich zu machen. Die Anwendung solcher Prozessierungsmethoden ist allerdings nur begrenzt möglich, sodass die größten Nachteile der ^1H -NMR-Spektroskopie die geringe Auflösung und das Auftreten vieler Signalüberlappungen bleiben. Die Möglichkeit zur direkten Quantifizierung ohne die Aufnahme von Kalibrierkurven stellt einen großen Vorteil der ^1H -NMR-Spektroskopie dar. Die Quantifizierung erfolgt meist durch Zugabe einer internen Standardsubstanz bekannter Konzentration. Über das Flächenverhältnis zum Analytsignal kann die Analytkonzentration bestimmt werden. Die Auswahl eines internen Standards kann sich als schwierig erweisen, da er strukturelle und chemische Ähnlichkeiten wie beispielsweise ähnliches Verhalten im verwendeten Lösungsmittel zum Analyten aufweisen sollte. Gleichzeitig sollte die interne Standardsubstanz keine Signalüberlappungen mit den Analytsignalen oder Interaktionen mit der Matrix zeigen. Durch den Einsatz interner Standardsubstanzen kann zudem der Einfluss der Probenaufarbeitung untersucht werden. Erfolgen Analytverluste durch das durchgeführte *Clean-up*, können diese durch eine Betrachtung der internen Standardsubstanz eingeschätzt werden. Bei der Untersuchung von Analytgemischen kann die Auswahl der internen Standardsubstanz zudem aufgrund der gleichzeitigen Detektion vieler verschiedener Analyten schwierig sein. Deshalb werden häufig externe Quantifizierungsmöglichkeiten angewandt. Das *Pulse Length Based Concentration Determination* (PULCON)-Verfahren, macht sich das Prinzip der Reziprozität zu Nutze, wobei die Länge des 90° -Pulses umgekehrt proportional zur Sensitivität ist. Dadurch können gerätespezifische Parameter von der Messung der externen Standardsubstanz auf die Proben übertragen werden (Dreier &

Wider, 2006). Das Prinzip kann mit der *Electronic Reference to Access in vivo Concentrations* (ERETIC)-Methode gekoppelt werden, bei der ein elektronisch erzeugtes Signal zur absoluten Quantifizierung der Analyten genutzt wird (Akoka *et al.*, 1999). Das PULCON-Verfahren wurde beispielsweise zur Quantifizierung von Inhaltsstoffen aus Erfrischungsgetränken genutzt. Dabei wurde eine ^1H -NMR-Pulssequenz mit Wasserunterdrückung, das 1D-*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY)-Experiment verwendet. Die Funktionsweise des Pulsprogramms wird in 3.4.2 näher erklärt. Die Quantifizierung erfolgte über einen externen Standard. Von 36 möglichen Inhaltsstoffen konnten nur elf, u.a. Glucose und Fructose, quantifiziert werden (Ackermann *et al.*, 2017).

Ein ^1H -NMR-Experiment mit einer Impulsanregung von 90° wurde verwendet, um den Lactosegehalt in Milch zu bestimmen. Dabei wurde die Probe ohne Vorbehandlung mit einem D_1 -Delay von 5,0 s analysiert. Die Methode konnte einen Lactosegehalt von 4,7 g/100 mL quantifizieren, was von den Autoren aufgrund guter Übereinstimmung mit Literaturwerten als richtig angesehen wurde. Die Präzision der Messung wurde mit einer Standardabweichung der Messungen von 2 % ebenfalls als ausreichend bewertet (Hu *et al.*, 2007). Das gleiche ^1H -NMR-Experiment wurde auch zur Quantifizierung geringer Lactosekonzentrationen in lactosereduzierter Milch angewandt. Die Proteinfraction der Milch wurde durch Zugabe von Säure präzipitiert und der klare Überstand zur Analyse verwendet. Die Experimente wurden mit einem D_1 -Delay von 30 s durchgeführt. Die Empfindlichkeit der Methode war jedoch nicht ausreichend, um Lactosegehalte kleiner 0,1 % zu quantifizieren (Churakova *et al.*, 2019).

Zur Analyse von Milch und Milchprodukten werden häufig Pulsprogramme mit Lösungsmittelunterdrückung eingesetzt, da mit einer großen Wasserbande zu rechnen ist (Scano *et al.*, 2019). Monakhova und Kollegen (2012) nutzten beispielsweise das 1D-NOESY-Experiment, um über einen *non-targeted* Ansatz mit chemometrischer Auswertung Milchtypen und Milchsubstituenten voneinander zu unterscheiden (Monakhova *et al.*, 2012). Kuhmilch, lactosefreie Kuhmilch, Soja-, Hafer- und Reismilch wurden durch diesen Ansatz erfolgreich der jeweiligen Sorte zugeordnet. Zur Quantifizierung von Lactose war das Experiment nicht geeignet (Monakhova *et al.*, 2012). Ein ^1H -NMR-Experiment mit Wasserunterdrückung wurde auch zur Quantifizierung von Lactose in lactosefreier Milch angewandt. Ein Aliquot der Probe wurde ohne Aufarbeitung oder Zusatz von weiteren Substanzen mithilfe eines Coaxialröhrchens gemessen, das mit dem internen Standard und dem deuterierten Lösungsmittel gefüllt wurde. Die Messung wurde mit 64 Scans und einem D_1 -Delay von 28 s, was einer Messzeit von ca. 35 min entspricht, durchgeführt. Die Methode zeigte ausreichende Präzision, Richtigkeit und Robustheit. Mit einer Bestimmungsgrenze der Methode von 41 mg/100 mL konnten auch geringe Lactosekonzentrationen quantifiziert werden (da Cunha *et al.*, 2020). Die Methode ist somit in der Lage die in Deutschland festgelegte Maximalkonzentration von 0,1 g/100 g Lactose in lactosefreier Milch und lactosefreien Milchprodukten zu überprüfen.

Im Bereich der *Metabolomics*-Untersuchungen in Milch und Milchprodukten hat sich ebenfalls die Verwendung der 1D-NOESY-Pulssequenz durchgesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgt je nach individueller Aufgabenstellung. Ultrazentrifugation, Zentrifugation mit integrierter Größentrennung und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln finden dabei häufig Anwendung. Es konnten bis zu 60 Metabolite in Milch identifiziert und z.T. auch quantifiziert werden (Foroutan *et al.*, 2019). Anhand verschiedener Milchmetaboliten kann zudem eine Unterscheidung der Herkunft, der Saison und der Fütterungsart erfolgen (Tenori *et al.*, 2018).

Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie konnten Mono- und Disaccharide in der Matrix Milch erfolgreich quantifiziert werden. Um das Spektrum enthaltener Analyten zu vergrößern, wurden die bestehenden Methoden zur Quantifizierung von Kohlenhydraten in Honig beurteilt. Honig enthält eine Vielzahl verschiedener Mono- und Disaccharide und gilt daher in der Kohlenhydratanalytik als komplexe Matrix. Mit dem Einsatz einer 1D-NOESY-Pulssequenz gekoppelt mit chemometrischen Auswertungen konnten verschiedene Honigproben anhand ihres Metabolitenprofils nach ihrer Herkunft unterschieden werden. Eine quantitative Auswertung konnte aufgrund der enormen Signalüberlappungen nur für Glucose, Fructose und L-Arabinose erreicht werden (Ohmenhäuser *et al.*, 2013).

1.3.2 2D-Experimente

Um Signalüberlappungen zu vermeiden, können zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Kohlenhydrate 2D-NMR-Experimente eingesetzt werden. Durch die Einführung einer zweiten Dimension wird die Auflösung erhöht und Signalüberlappungen werden reduziert. Da Saccharide große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, zeigen sich oft lediglich kleine Unterschiede in ihren chemischen Verschiebungen. Besonders bei Oligosacchariden, die sich teilweise in nur einer Monosaccharideinheit unterscheiden, können herkömmliche 2D-NMR-Experimente keine geeignete Auflösung bieten, und es müssen auflösungsoptimierte Pulssequenzen verwendet werden. Nachteilig bei der Aufnahme von 2D-NMR-Spektren sind die zum Teil langen Experimentdauern sowie die Notwendigkeit zur Aufnahme von Kalibrierkurven. Die zweite Dimension wird durch den Einsatz von Kohärenztransfers oder Kodierung der chemischen Verschiebung erzeugt. Dadurch wird die Signalintensität allerdings auch durch einen sogenannten Abschwächungsfaktor verändert, wodurch keine direkte Quantifizierung mehr möglich ist. Der Abschwächungsfaktor ist u.a. von der Resonanz abhängig. Dabei spielen viele Faktoren wie die Relaxation über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, die Anisotropie der chemischen Verschiebung, *off-resonance* Effekte oder unvollständige Übertragungen eine Rolle. Auch probenspezifische Parameter wie Viskosität, Temperatur und Salzkonzentrationen sind von Bedeutung. In der Praxis ist es schwierig all diese Parameter und damit den Abschwächungsfaktor mit einem angemessenen Fehler zu bestimmen, sodass häufig Kalibrierfunktionen zur Quantifizierung verwendet werden müssen.

Das *time-zero Heteronuclear Single Quantum Coherence*-NMR-Experiment ist eine Möglichkeit Analyten ohne Kalibrierkurve in 2D-NMR-Spektren zu quantifizieren. Der Ansatz macht sich die Annahme zu Nutze, dass der Abschwächungsfaktor eine Funktion der Wiederholungen der Pulssequenz ist. Über die Aufnahme mehrerer Wiederholungen kann dann auf den Zeitpunkt Null zurückgerechnet und dadurch der Abschwächungsfaktor bestimmt werden. Die Quantifizierung erfolgt anschließend wie in ^1H -NMR-Experimenten über interne Standardsubstanzen oder externe Möglichkeiten wie PULCON (Hu *et al.*, 2011). Aufgrund der langen Experimentdauer hat sich dieser Ansatz in der Praxis aber nicht durchgesetzt.

Typischerweise werden im Bereich der Lebensmittelanalytik und von *Metabolomics*-Untersuchungen Experimente, die nach der Kopplungskonstante auftrennen (engl. *J-resolved*, *J-res*), homonukleare 2D-Experimente wie *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) und *Correlated Spectroscopy* (COSY) oder heteronukleare 2D-Experimente wie das *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment eingesetzt. Keines der genannten Experimente eignet sich im Allgemeinen besser zur Quantifizierung. Die Auswahl des Experiments hängt dabei u.a. von den zu bestimmenden Analyten ab. Heteronukleare Experimente sind aufgrund der natürlichen Häufigkeit der Heterokerne weniger empfindlich als homonukleare Experimente. Zudem wird die Experimentdauer bei der Aufnahme heteronuklearer Experimente größer, da ein größerer Resonanzbereich aufgenommen werden muss. *J-res*-Experimente können schneller gemessen werden als COSY-Experimente, die entsprechend auch deutlich kürzer als HSQC-Experimente ablaufen können. Durch die Aufnahme heteronuklearer Kopplungen z.B. im HSQC-Experiment können allerdings überlappende Signale deutlich effizienter getrennt werden (Giraudeau, 2014).

Ein 2D *J-res*-Experiment konnte dazu genutzt werden den Lactosegehalt in Milch und lactosefreien Alternativen zu quantifizieren. Dieses Experiment trennt die Komponenten anhand der chemischen Verschiebung in einer Dimension und anhand der Kopplungskonstanten in der zweiten Dimension. Der Vergleich mit einer enzymatischen Referenzmethode zeigte, dass die entwickelte Methode vergleichbare Ergebnisse liefert und mit einer Experimentdauer von 12 min schnell durchzuführen ist (Monakhova *et al.*, 2012). Das gleiche Experiment wurde auch zur Quantifizierung von Saccharose in Erfrischungsgetränken genutzt, da das zur Quantifizierung verwendete Signal im 1D-NOESY-Spektrum überlagert vorlag (Ackermann *et al.*, 2017).

Bei der Untersuchung komplexer Mischungen werden häufig HSQC-Experimente eingesetzt (Giraudeau, 2014). So konnten beispielsweise Fettbestandteile wie Tributyrin, Triolein oder Lecithin sowie Natriumcitrat in Milch ohne Vorbehandlung im HSQC-Spektrum quantifiziert werden. Das Experiment wurde mit 1024 Datenpunkten in der ^1H -Dimension, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch als F_2 -Dimension bezeichnet werden kann, und 256 Datenpunkten in der ^{13}C -Dimension (F_1 -Dimension) zusammen mit einem D_1 -Delay von 2,0 s aufgenommen. Der D_1 -Delay konnte erst durch die Zugabe von Chrom(III)acetylacetonat und dessen paramagnetischer Wirkung auf 2,0 s reduziert

werden. Trotz dieser Verkürzung dauerte eine einzelne Messung zehn Stunden (Hu *et al.*, 2007). Quantitative HSQC-Messungen können auch dazu genutzt werden, die Monosaccharidzusammensetzung von Polysacchariden nach Säurehydrolyse zu bestimmen. Am Beispiel von Glucanen wurde innerhalb einer Stunde Messzeit pro Probe eine ähnliche Zusammensetzung der Monosaccharide verglichen zu den Ergebnissen einer gaschromatographischen Analyse gewonnen. Innerhalb dieser relativ kurzen Messzeit konnten nur Monosaccharide bestimmt werden, die die Hauptanteile der Zusammensetzung im mM-Bereich ausmachen. Zur Bestimmung von Monosacchariden in kleineren Anteilen müsste die Anzahl an durchgeführten Scans und dadurch die Messzeit erhöht werden (Sasaki *et al.*, 2014).

Zur Verkürzung der Gesamtanalysendauer bei der Anwendung von 2D-NMR-spektroskopischen Methoden und der schnellen Quantifizierung von Metaboliten kann die sogenannte *fast metabolite quantification* Technik eingesetzt werden. Dabei werden HSQC-Experimente mit vier Scans aufgenommen und über externe Kalibrierkurven die Konzentrationen der Analyten bestimmt. Eine Messung wurde in 12 min aufgenommen. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit konnten lediglich Analyten mit einer ausreichenden Konzentration von mindestens 2 mM quantifiziert werden. In Pflanzenmaterialien wurden daher nur eine kleine Anzahl an zuvor bekannten Metaboliten wie Saccharose, Glutamin und Asparagin bestimmt (Lewis *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Messzeit von 2D-NMR-Experimenten ist die *Ultrafast* (UF)-Methode. Der Ansatz beruht auf der räumlichen Kodierung der Probe durch die Kombination bestimmter Pulse mit Magnetfeldgradienten (Rouger *et al.*, 2016). Die Technik ist schon so ausgereift, dass sie vermehrt im Bereich der *Metabolomics*-Untersuchungen eingesetzt wird. Jézéquel und Mitarbeiter konnten eine UF-COSY-Pulssequenz anwenden, um polare Metaboliten wie Glucose, Fructose, Saccharose, Citronensäure oder Glutamin im Fruchtfleisch von Tomaten in einer Experimentdauer von fünf Minuten zu quantifizieren. Die Methode konnten dabei in einem Konzentrationsbereich der einzelnen Metaboliten von 2 g/L bis 20 g/L durchgeführt werden (Jézéquel *et al.*, 2015).

Durch den Einsatz von *Non-Uniform Sampling* (NUS) wird lediglich ein Teil der Datenpunkte während der Messung aufgenommen. Die restlichen Datenpunkte werden nach der Aufnahme durch geeignete Rekonstruktionsalgorithmen generiert. Eine detailliertere Beschreibung des Prinzips von NUS ist in 3.4.3.1 zu finden. Der NUS-Ansatz kann mit herkömmlichen Pulssequenzen verschiedener Experimente wie HSQC, COSY oder TOCSY relativ einfach kombiniert werden. Mit NUS gekoppelte Experimente liefern zudem Spektren, die zur quantitativen Auswertung geeignet sind. Am Beispiel der Quantifizierung von Humanmetaboliten in Urin wurde ein mit NUS gekoppeltes HSQC-Experiment angewandt. Dabei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen den erhaltenen Volumenintegralen und der Konzentration der Metaboliten festgestellt werden. Kleine Signale zeigten jedoch zum einen eine große Streuung in ihren Integralen und konnten zum anderen von zusätzlich gebildeten Artefaktsignalen in NUS-Spektren schwer abgegrenzt werden. Deshalb erscheint es sinnvoll einen

Schwellenwert der Signalfläche festzulegen, um die Generierung reproduzierbarer Ergebnisse zu garantieren. Die ermittelten Bestimmungsgrenzen (BG) der einzelnen Metaboliten lagen zwischen 50 μM und 90 μM . Mit NUS gekoppelte HSQC-Messungen zeigten zudem keine Abweichung der Signalintensität bei der Durchführung von Messreihen an verschiedenen Tagen (Zhang *et al.*, 2020).

Neben den beschriebenen Methoden zur Messzeitreduktion kann auch durch die Optimierung von Pulswinkeln der D_1 -Delay und dadurch die Messzeit minimiert werden. Dieses Konzept wird u.a. im *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-Ansatz verwendet, der in 3.4.3.1.1 näher erläutert wird. Durch die Anwendung der Ernst-Winkel-Anregung gepaart mit der Bildung eines Magnetisierungsreservoirs und der Übertragung der Magnetisierung zwischen dem Reservoir und ^{13}C -gebundenen Protonen können HSQC-Spektren in wenigen Sekunden erzeugt werden. Das Experiment lieferte für eine 2 mM Saccharoselösung ein ausreichend aufgelöstes HSQC-Spektrum in lediglich 15 s (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Der ASAP-Ansatz kann auch zur Verbesserung der Auflösung genutzt werden. In gleicher Messzeit ist es möglich mehr Inkremente in der indirekten ^{13}C -Dimension aufzunehmen und dadurch die Auflösung zu erhöhen. So konnte in Kombination mit NUS ein HSQC-Spektrum von Maltose mit einer Auflösung von 0,54 Hz in der ^{13}C -Dimension in drei Stunden aufgenommen werden (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Zum Vergleich müsste eine konventionelle HSQC-Pulssequenz zur Generierung einer vergleichbaren Auflösung mit einer Messzeit von über 16 h durchgeführt werden.

Petersen und Mitarbeiter konnten in einem auflösungsoptimierten Ansatz für 83 verschiedene Mono- und Oligosaccharide ausreichend getrennte Signale anhand ihrer ^{13}C -Verschiebung in einem HSQC-Experiment aufnehmen. Dabei wurde ein kleiner spektraler Bereich von 15 ppm mit 3072 Inkrementen in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Durch diese Anwendung konnten Kohlenhydratbestandteile in verschiedenen Honigsorten identifiziert und mithilfe entsprechender Kalibrierfunktionen auch quantifiziert werden (Petersen *et al.*, 2014). Die gleiche Vorgehensweise konnte auch genutzt werden, um isolierte Signale einzelner Maltooligosaccharide in Bier zu finden. Die Auflösung war hierbei ausreichend, um eine Quantifizierung der Oligosaccharide durchführen zu können. Die ermittelten Gehalte der Oligosaccharide stimmten mit den Gehalten überein, die über eine flüssigkeitschromatographische Vergleichsmethode erhalten wurden. Die Aufnahme der Spektren erfolgte innerhalb von 15 min (Bøjstrup *et al.*, 2013). Limitierender Faktor der Anwendung ist die zur Verfügung stehende Geräteausstattung. Die Arbeitsgruppen arbeiteten mit 800 MHz Spektrometern und leistungsfähigen Kryoprobebenköpfen, die zur Messung hoher Akquisitionszeiten geeignet sind.

Mithilfe des *Quantitative, Perfected and Pure Shifted HSQC (QUIPU-HSQC)*-Experiments können gering konzentrierte Analyten mittels NMR-spektroskopischer Methoden quantifiziert werden. Dafür kombinierten Heikkinen und Kollegen das quantitative HSQC (Q-HSQC)-Experiment mit einem *pure-shift* Ansatz. Im konventionellen HSQC-Experiment hängt die Signalintensität von der Transferzeit des Polarisationstransfers ab. Diese Zeit wird meistens für einen Mittelwert der geminalen

Kopplungskonstanten zwischen ^1H und ^{13}C $^1J_{\text{CH}}$ optimiert. Die Signalintensität ist daher nur für einen kleinen Bereich von $^1J_{\text{CH}}$ maximal. Im Q-HSQC-Experiment wird die Transferzeit über einen Phasenzyklus für mehrere $^1J_{\text{CH}}$ -Werte optimiert und daher über einen größeren Bereich maximal gehalten. So kann die Signalintensität kleiner Signale gesteigert werden (Heikkinen *et al.*, 2003). Mauve und Mitarbeiter kombinierten diese Methode mit einer Entkopplung homonuklearer Kopplungen zwischen Protonen, dem sogenannten *pure-shift* Ansatz. Durch die verhinderte Protonenaufspaltung wird die Signalintensität sowie die Empfindlichkeit gesteigert. Im Vergleich zum Q-HSQC-Experiment konnte die Empfindlichkeit im QUIPU-HSQC-Spektrum um bis zu 160 % gesteigert und Analyten bis in den einstelligen μM -Bereich quantifiziert werden (Mauve *et al.*, 2016).

2 Zielsetzung

Die Vielfalt von Kohlenhydraten sowie die zum Teil sehr komplexe Matrix von Lebensmitteln erschweren den Einsatz analytischer Methoden zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Kohlenhydrate. Um eine richtige und präzise Quantifizierung einzelner Substanzen dieser Stoffklasse gewährleisten zu können, muss eine ausreichende analytische Differenzierung der strukturell zum Teil sehr ähnlichen Substanzen erfolgen. Die gemäß §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs etablierten enzymatischen Methoden sind sehr zeitaufwändig und können maximal drei Analyten gleichzeitig quantifizieren. Publierte Methoden der Anionenaustauschchromatographie können aufgrund ihrer hohen Auflösung eine Vielzahl monomerer und oligomerer Kohlenhydrate nebeneinander quantifizieren. Die zum Teil langen Analysenzeiten sind vor allem bei großem Probendurchsatz als nachteilig zu bewerten. Anwendungen der ^1H -NMR-Spektroskopie können in kurzen Analysenzeiten ohne aufwändige Probenaufarbeitung einzelne Kohlenhydrate quantifizieren. Aufgrund der großen Anzahl an Signalüberlappungen im ^1H -NMR-Spektrum können allerdings nur wenige Analyten gleichzeitig quantifiziert werden.

Unter besonderer Berücksichtigung von 2D-NMR-Experimenten, insbesondere des HSQC-Experiments, werden im Rahmen dieser Arbeit alternative Methoden zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Kohlenhydrate entwickelt. Durch die verbesserte Auflösung des HSQC-Experiments im Vergleich zum ^1H -NMR-Experiment besteht die Möglichkeit eine größere Anzahl an Kohlenhydraten gleichzeitig zu quantifizieren. Die Aufnahme der zweiten Frequenzdimension verlängert die Messzeiten von HSQC-Experimenten im Vergleich zu ^1H -NMR-Experimenten drastisch. Durch die Kopplung des HSQC-Experiments mit dem NUS-Ansatz kann eine deutliche Messzeitverkürzung erfolgen, weshalb der Einfluss von NUS auf die Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide untersucht wird. Zudem ist es Ziel dieser Arbeit einige ASAP-HSQC-Pulssequenzen auf ihre Anwendbarkeit zur Quantifizierung von Kohlenhydraten zu testen. ASAP-Pulssequenzen können dazu genutzt werden die Messzeit von HSQC-Experimenten zu verkürzen oder ihre Auflösung zu erhöhen. Die optimierten und in ihrer Messzeit beschleunigten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden sollten für die Untersuchung spezieller Warengruppen validiert werden. Dabei steht die Quantifizierung häufig vorkommender Mono- und Disaccharide wie Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose sowie von Isomaltulose, die häufig als Ersatz für Saccharose verwendet wird, im Fokus. Die Anwendbarkeit der Methoden auf verschiedene Lebensmittelmatrices aus den Produktgruppen Milch und Milchprodukten, Sportlerernährung sowie Produkte zur Gewichtsreduktion soll somit sichergestellt werden

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von Oligosacchariden ist ihre analytische Trennung erschwert. Bei der Durchführung konventioneller HSQC-Experimente ist die Auflösung nicht ausreichend, um geeignete Signale quantifizieren zu können. Durch die Erhöhung der Anzahl an aufgenommenen Datenpunkten in der indirekten Dimension kann die Auflösung zwar erhöht, aber die

Experimente nicht mehr in praktikablen Messzeiten von wenigen Stunden generiert werden. ASAP-HSQC-Pulssequenzen sollen daher auflösungsoptimiert mit dem Ziel durchgeführt werden extrahierte RFO aus verschiedenen Leguminosen zu quantifizieren. Dabei sollen neben den Mitgliedern der RFO Raffinose, Stachyose und Verbascose auch häufig in den Matrices vorkommende Analyten wie Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose in die quantitativen Methoden integriert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Die verwendeten Probenmaterialien wurden in lokalen Lebensmittelgeschäften oder im Internethandel erworben. Alle Proben auf Milchbasis wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb des Mindesthaltbarkeitsdatums analysiert. Dazu zählen eine haltbare Vollmilch und eine haltbare lactosefreie Vollmilch mit jeweils 3,8 % Fettanteil sowie eine saure Sahne mit einem Fettanteil von 10 %. Zudem wurden eine reine Buttermilch und eine Fruchtbuttermilch in der Geschmacksrichtung Mango analysiert. Als Beispiele für weitere Milchprodukte wurden ein Kakaogetränk, ein lactosefreies Kakaogetränk und ein Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack ausgewählt. Alle vorhandenen Informationen zu den einzelnen Produkten sind in Tabelle 9-1 zusammengefasst. Vorversuche zur Behandlung einzelner Matrices wurden im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian durchgeführt (Merdian, 2019).

Zur Quantifizierung von Isomaltulose wurden Testlebensmittel unterschiedlicher Konsistenzen verwendet. Das Nahrungsergänzungsmittel „Palatinose“ stellt dabei die einfachste Matrix dar, da lediglich Isomaltulose als Reinsubstanz in Pulverform enthalten ist. Zudem wird ein weiteres pulvriges Nahrungsergänzungsmittel („Energize Lemon“) verwendet, das neben Isomaltulose Aminosäuren und einige Zusatzstoffe enthält. Aus dem Bereich der Sportlerernährung wurde das Produkt „Multicarbo-gel“ ausgesucht, ein Kohlenhydratgel, das zur schnellen Energieversorgung während langen Wettkämpfen eingesetzt werden kann. Darüber hinaus werden auch einige Produkte, die zum Ersatz von Mahlzeiten verwendet werden, mit Isomaltulose gesüßt. Dazu zählt das „Next Level Meal“-Pulver, das in den Geschmacksrichtungen Erdbeere und Schokolade analysiert wurde, sowie ein Produkt auf Milchbasis („Liquid Meal“) in der Geschmacksrichtung Vanille. Um eine möglichst große Diversität der Matrices zu garantieren, wurde ein Riegel aus Buffalowürmern, der sogenannte „Bug Break“, ausgewählt, der ebenfalls mit Isomaltulose gesüßt wurde. Eine Übersicht der vorliegenden Produktinformationen wird in Tabelle 9-2 gegeben. Einige der vorgestellten Matrices wurden im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf analysiert (Ruf, 2020). Dargestellte Daten werden entsprechend gekennzeichnet.

Die RFO wurden aus verschiedenen Mitgliedern der Familie L. Leguminosen (*Fabaceae*) extrahiert. Die verwendeten blauen Lupinensamen (*Lupinus angustifolius*) der Sorte Sonet stammen aus Österreich vom Ökohof Kamerleithner. Sowohl die verwendeten roten Linsen (*Lens culinaris* MEDIK.) als auch die Kidneybohnen (*Phaseolus vulgaris* L.) wurden in einem lokalen Supermarkt erworben. Alle Proben wurden gemahlen, getrocknet und entfettet.

3.2 Probenaufarbeitung

Durch eine geeignete Probenaufarbeitung wird sichergestellt, dass Matrixbestandteile, die die Quantifizierung der Analyten stören können, abgetrennt werden. Optimalerweise wird die gleiche

Aufarbeitung für alle im Methodenvergleich verwendeten Analysenmethoden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit verwendet.

In milchbasierten Matrices müssen Proteine und Fette abgetrennt werden. Ansonsten kann es während der chromatographischen Auftrennung zu Überlagerungen der Analytsignale mit Matrixsignalen kommen, oder die Messmethode kann durch Proteinpräzipitation sowie die Bildung von Lipidphasen gestört werden. Auch bei der Durchführung enzymatischer und NMR-spektroskopischer Methoden können Matrixeffekte die Quantifizierung der Analyten beeinflussen. Die Carrez-Klärung stellt eine häufig eingesetzte Methode zur Behandlung vieler Matrices dar. Dabei können sowohl Proteine ausgefällt als auch Emulsionen aufgebrochen und Trübungen entfernt werden. Die sogenannten Carrez-Salze, Kaliumhexacyanoferrat(II) und Zinksulfat, werden dabei gelöst zur Probe gegeben. Es bildet sich der schwerlösliche Niederschlag Kalium-Zink-Hexacyanoferrat(II), der Proteine und Fette adsorbieren bzw. mitreißen kann. Durch Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 bis 8,0 werden überschüssige Zinkionen als Zinkhydroxid ausgefällt. Durch Zentrifugation oder Filtration können die entstandenen Niederschläge abgetrennt und das Filtrat zur Analyse verwendet werden (Belitz & Schormüller, 1965). Die Carrez-Klärung wird in vielen §64-Methoden empfohlen. In Deutschland gilt die Amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und zur Untersuchung auf Grundlage des §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs, die auch schlicht als §64-Methoden bezeichnet wird, als eine Sammlung aller standardisierter Methoden, die von der Lebensmittelüberwachung eingesetzt wird (BVL, 2020). In diesen Methoden werden für die Abtrennung milchbasierter Matrices verschiedene Konzentrationen der Carrez-Lösungen verwendet. Aus diesem Grund wurde eine wässrige Standardlösung, die die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Alloose, Saccharose, Lactose und Maltose enthält, mit den in Tabelle 3-1 aufgeführten Carrez-Konzentrationen geklärt. Über eine Verhältnisbildung zum bekannten Gehalt der Analyten kann der Einfluss der Konzentrationen der Carrez-Salze auf Analytverluste beurteilt werden. Die Konzentrationen der Lösungen der Carrez-Salze orientieren sich dabei an den Empfehlungen einzelner §64-Methoden, die in Tabelle 3-1 angegeben sind. Der pH-Wert wird für alle Methoden auf einen Wert von 7,0 eingestellt. Besonders für die zu entwickelnden NMR-Methoden ist ein konstanter pH-Wert wichtig, um Signalverschiebungen zu vermeiden. Die detaillierten Arbeitsvorschriften zur Durchführung der Carrez-Klärungen sind in 8.2 einzusehen.

Die sogenannten AOAC-Methoden, die von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International) herausgegeben werden, stellen das amerikanische Pendant zu den deutschen §64-Methoden dar. Die von der AOAC empfohlene Methode zur Bestimmung des Zuckerprofils in Lebensmitteln wurde von Vennard und Mitarbeitern veröffentlicht und verwendet zur Abtrennung von Matrixbestandteilen in proteinreichen Proben eine Carrez-Klärung, an die zusätzlich eine Ethanolextraktion angeschlossen ist (Vennard et al., 2020). Um die Probenaufarbeitung für die zu entwickelnden Methoden so zeit- und kostensparend wie möglich zu gestalten, wurde im Verlauf

dieser Arbeit bei ausreichender Klärung der Proben durch die Carrez-Behandlung auf eine weitere Ethanolextraktion verzichtet.

Im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian wurde neben der Carrez-Klärung eine alternative Probenaufarbeitung zur Abtrennung von Matrixkomponenten in Milch und Milchprodukten getestet. Die enthaltenen Proteine wurden dabei zunächst mit Ethanol ausgefällt. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols schloss sich eine zweifache Extraktion des Rückstandes mit *n*-Hexan zur Abtrennung der Fettkomponenten an (Merdian, 2019).

Tabelle 3-1: Getestete Konzentrationen (c) der Carrezlösungen. ASU: Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden

Bezeichnung	c(Kaliumhexacyanoferrat(II)) [g/L]	c(Zinksulfat ²) [g/L]	Zugrundeliegende §64-Methode
Carrez-Klärung I	1,5	3,0	ASU 01.00.17, 1983
Carrez-Klärung II	3,0	6,0	ASU 01.00.90, 2014
Carrez-Klärung III	6,0	12,0	-

¹ Angabe als Trihydrat; ² Angabe als Heptahydrat

Die mit Isomaltulose gesüßten Proben „Palatinose“, „Energize Lemon“ und „Multicarbogel“ wurden zur Aufarbeitung in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit einem voreingestellten pH-Wert von 7,0 gelöst. Die restlichen Proben wurden der beschriebenen Carrez-Klärung unterzogen.

Die Extraktion der RFO aus den getrockneten Proben erfolgte über eine dreifache Extraktion mit 50 %iger Ethanollösung. Wasser oder niedrigere Konzentrationen an Ethanol sind in der Theorie besser geeignet, um niedermolekulare Kohlenhydrate zu extrahieren. Allerdings extrahieren diese Lösungsmittel auch andere Kohlenhydrate und Proteine (Xiaoli *et al.*, 2008). Im Ausgangsmaterial vorkommende α -Galactosidasen werden in niedrig konzentrierten Ethanollösungen nicht denaturiert und können durch den Abbau von Strukturen nach der Extraktion das Ergebnis verfälschen. Höhere Ethanolkonzentrationen über 50 % hingegen denaturieren vermehrt enthaltene Proteinstrukturen, die präzipitieren und die Extraktion sterisch hindern können. Die Extraktion wurde bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt. Höhere Temperaturen können ebenfalls enthaltene Proteinstrukturen denaturieren. Xiaoli und Mitarbeiter führten eine Extraktion von α -Galactooligosacchariden aus Kichererbsenmehl mit 50 %igem Ethanol durch und erreichten bei einer Extraktionstemperatur von 50 °C maximale Ausbeuten. Die Arbeitsgruppe untersuchte außerdem die optimale Extraktionsdauer, die mit 30 min angegeben wird. Längere Extraktionszeiten zeigen keinen signifikanten Anstieg in der extrahierten Ausbeute, sodass eine Dauer von 30 min auch im Verlauf dieser Arbeit angewendet wurde (Xiaoli *et al.*, 2008). Eine detaillierte Arbeitsvorschrift ist in 8.2 zu finden.

3.3 Bestehende Referenz- und Vergleichsmethoden zur Quantifizierung von Mono- und Oligosacchariden

3.3.1 Enzymatische Methoden

Die enzymatische Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide beruht auf der Umsetzung der Analyten unter gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) zu reduziertem Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). Bei einer Wellenlänge von 340 nm zeigt NADPH eine charakteristische Absorptionsbande und kann daher spektralphotometrisch nachgewiesen werden (Kleyn, 1985). Enzymatische Methoden sind robust, leicht durchführbar und benötigen weder große Investitionen noch spezifisch geschultes Personal. Sie laufen sowohl spezifisch als auch empfindlich ab und sind daher auch für den Nachweis kleiner Konzentrationen geeignet. Allerdings ist kein Screening unbekannter Substanzen möglich und die gleichzeitige Analyse mehrerer Analyten ist nur begrenzt einsetzbar. Gegenüber chromatographischen Methoden sind spektralphotometrische Methoden weniger anfällig bei der Anwesenheit von Matrixbestandteilen, die entweder Säulen verstopfen oder die vollständige Verdampfung der Probe verhindern (Galant *et al.*, 2015). Ungelöste Partikel allerdings können das eingestrahlte UV-Licht streuen und dadurch die Messungen beeinträchtigen.

Enzymatische Methoden wurden schon in den 1960er und 1970er Jahren entwickelt und besitzen daher eine hohe Akzeptanz in der Lebensmittelanalytik. In den §64-Methoden sind über 15 Methoden beschrieben, die Mono- und Disaccharide mittels spezifischer enzymatisch photometrischer Bestimmungsmethoden quantifizieren. Durch die Kombination geeigneter Reaktionen können einige Mono- und Disaccharide nebeneinander quantifiziert werden. Im Allgemeinen beruhen diese Methoden auf der Spaltung eines Disaccharides in seine monomeren Bestandteile, die dann ebenfalls durch ein geeignetes Enzym umgesetzt werden. Durch Differenzbildung kann dann sowohl die Konzentration der Monosaccharide als auch die der Disaccharide berechnet werden. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, das die Proportionalität der Extinktion einer hinreichend verdünnten Probe zum Produkt aus dem Absorptionskoeffizienten, der Konzentration und der Schichtdicke der Küvette beschreibt (Matissek *et al.*, 2018). Eine Übersicht der überwiegend verwendeten Testsysteme, in denen verschiedene Reaktionen zur Bestimmung von Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose kombiniert werden, ist in Abbildung 3-1 dargestellt (Arbeitsvorschriften siehe 8.3). Zur Bestimmung von Isomaltulose ist zurzeit keine enzymatische Methode etabliert.

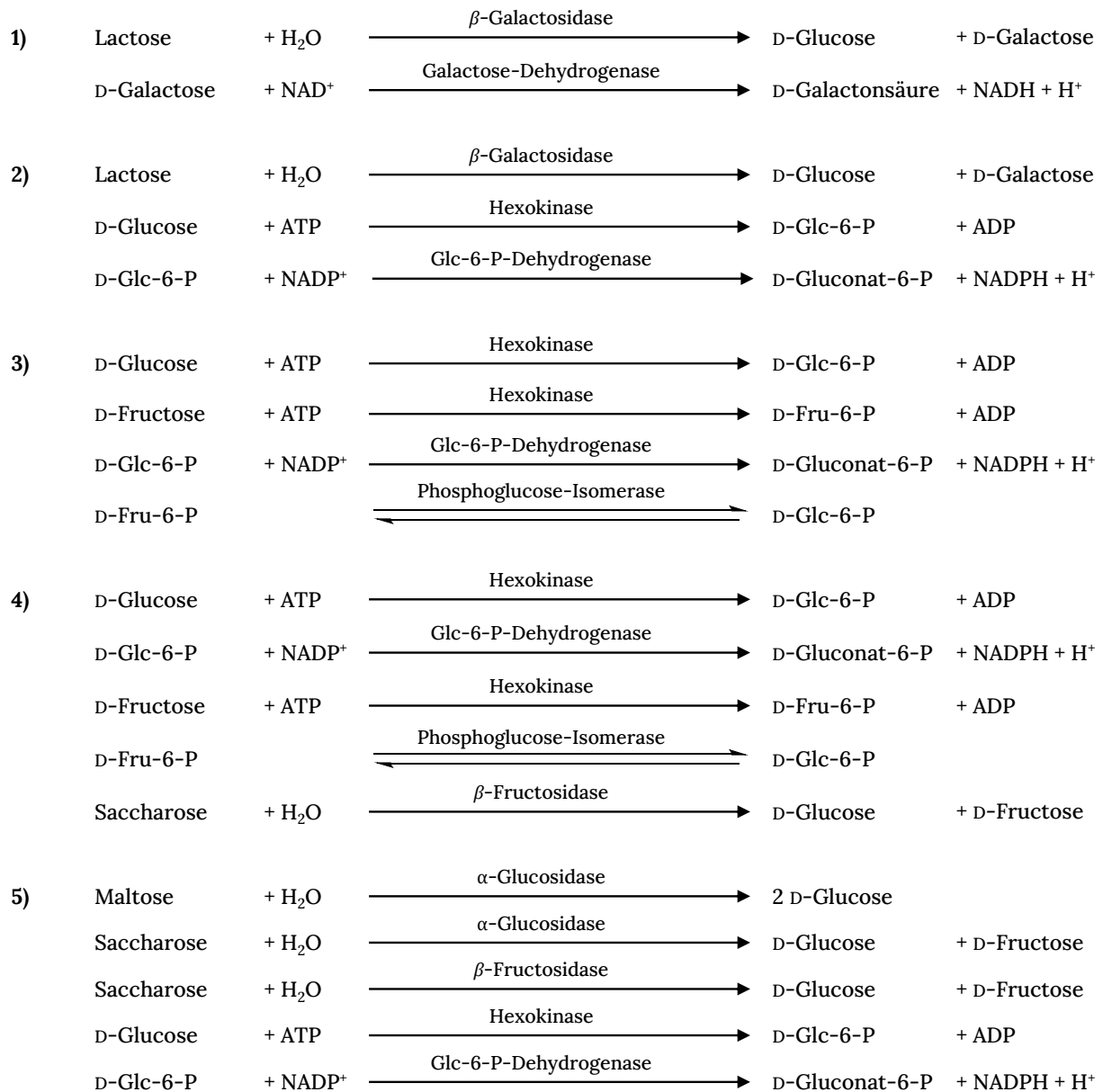


Abbildung 3-1: Übersicht der enzymatischen Reaktionen, die folgende Analyten quantifizieren: 1) Lactose, D-Galactose (Kleyn, 1985); 2) Lactose, D-Glucose (Coffey & Reithel, 1969; Bahl, 1972); 3) D-Glucose, D-Fructose (Schmidt, 1961); 4) D-Glucose, D-Fructose, Saccharose (Gorin, 1970); 5) Maltose, Saccharose, D-Glucose. Glc: D-Glucose; Fru: D-Fructose; P: Phosphat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; NAD(P)⁺: Nicotinamidadeninucleotid(phosphat); NAD(P)H: reduziertes Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)

Wie in 1.2.1 beschrieben, darf gemäß §4 Abs 2 MilchErzV erst ab einem Lactosegehalt kleiner 0,1 g/100 g eine Kennzeichnung als „lactosefrei“ verwendet werden. Die in den §64-Methoden beschriebene Standardmethode zur „Bestimmung des Lactosegehaltes in lactosereduzierter Milch und lactosereduzierten Milchprodukten“ stellt eine enzymatische Lactosebestimmung unter Anwesenheit von Glucose dar und beschreibt eine mittlere Bestimmungsgrenze von 0,03 g/100 g. Somit ist die enzymatische Bestimmung geeignet die Voraussetzung für die Kennzeichnung „lactosefrei“ zu überprüfen (ASU 01.00.90, 2014). Für Säuglingsanfangs- und Folgenahrung wird für die Kennzeichnung

„lactosefrei“ gemäß Art. 9 VO (EU) Nr. 2016/127 ein noch niedrigerer Grenzwert von 2,5 mg/100 kJ Lactose festgelegt. Bei durchschnittlichen Nährwerten von Säuglings- und Folgenahrungen von 60–70 kJ/100 mL müssen Gehalte kleiner 1,5 mg/100 mL nachgewiesen werden. Diese Bestimmung ist mit herkömmlichen enzymatischen Methoden nicht mehr möglich.

3.3.2 Flüssigchromatographische Methoden

In der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) werden zur Trennung von Sacchariden häufig Aminophasen verwendet, die mit Brechungsindexdetektoren (engl. *Refractive Index*, RI-Detektor) oder Lichtstreuendetektoren gekoppelt werden können. Zur Elution wird wässriges Acetonitril verwendet (Ghernati *et al.*, 1982). Die Trennung erfolgt aufgrund der Verteilung zwischen mobiler und der mit Wasser angereicherten stationären Phase sowie über hydrophile Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Je hydrophiler daher eine Substanz ist, desto stärker ist auch ihre Retention (Bernal *et al.*, 2011). Für die Quantifizierung von Isomaltulose in Lebensmitteln wurde 2013 eine §64-Methode veröffentlicht, die auf einem HPLC-RI-System beruht. Die Methode kann für viele verschiedene Lebensmittelmatrices eingesetzt werden und erzielt präzise und richtige Ergebnisse (ASU 00.00.143, 2013). Im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf wurde die Methode an den laborinternen, vorrätigen Aminophasen durchgeführt. Jedoch konnte mit keiner der vorrätigen Säulen eine ausreichende Trennung erzielt werden. Da alternative Systeme und Analysemethoden zur Verfügung standen, wurde auf die Durchführung einer HPLC-RI-Methode im weiteren Verlauf verzichtet (Ruf, 2020).

Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*, HPAEC-PAD) stellt eine leistungsstarke Methode zur Analyse von Kohlenhydraten dar. Unter alkalischen Bedingungen werden die vorhandenen Hydroxylgruppen zu Oxyanionen transformiert, sodass diese an Anionenaustauschersäulen getrennt werden können. Die verwendeten Säulen basieren auf quervernetztem Polystyrol, das mit positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen besetzt ist. Als mobile Phase wird Natronlauge verwendet. Die Auftrennung erfolgt im Wesentlichen nach der Säurestärke der Oxyanionen. Während der PAD werden die Analyten an einer Goldelektrode oxidiert, der dabei freiwerdende Strom ist proportional zur Konzentration der Analyten. Da die Oxidationsprodukte an der Elektrodenoberfläche adsorbieren, verschmutzt die Elektrode und ihre Empfindlichkeit nimmt stark ab. Deshalb wird ein gepulstes Verfahren verwendet, bei dem das Potential nach der Messung zuerst stark erhöht wird, um organische Substanzen zu oxidieren, und anschließend drastisch verringert wird, um die Oxide wieder in ihre metallische Form zu reduzieren (Lee, 1990; Corradini *et al.*, 2012). HPAEC-PAD gilt als sensitive und spezifische Methode, die keine Derivatisierung benötigt und die durch ihre große Auswahl an chromatographischen Säulen für Kohlenhydrate verschiedener Kettenlänge geeignet ist (Vennard *et al.*, 2020).

In komplexen Lebensmittelmatrices kommt eine Vielzahl strukturell sehr ähnlicher Kohlenhydrate vor. Eine ausreichende chromatographische Trennung ist daher entscheidend, um eine Überbestimmung durch Koelution zu minimieren. Besonders bei der Quantifizierung kleiner Gehalte wie beispielsweise der Bestimmung von Lactose in lactosefreien Milchprodukten spielt ausreichende chromatographische Trennung eine entscheidende Rolle (van Scheppingen *et al.*, 2017). Die Säulentypen CarboPac PA1, PA10, PA20, PA100 und PA200 (Thermo Fisher Scientific) sind geeignet lebensmittelrelevante Mono- und Oligosaccharide aufzutrennen. Sie unterscheiden sich in der Größe und dem Anteil an quartären Ammoniumgruppen (Corradini *et al.*, 2012). Eine PA20-Säule konnte von anderen Arbeitsgruppen u.a. zur simultanen Quantifizierung von Lactose, Galactose und Glucose in Hartkäsen sowie zur Auftrennung von Glucose, Galactose, Lactose, Fructose, Saccharose, Maltose, Lactulose und Galactooligosacchariden eingesetzt werden (Monti *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Auch eine AOAC-Methode schlägt zur Auftrennung von Glucose, Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose und Isomaltulose eine PA20-Säule vor (Vennard *et al.*, 2020). Da sich im Verlauf dieser Arbeit keine ausreichende Auftrennung von Maltose und Isomaltulose auf der PA20-Säule zeigte, wurden diese Analyten an einer PA200-Säule getrennt. Die Mitglieder der RFO Raffinose, Stachyose und Verbascose konnten von Kotha und Mitarbeitern mittels HPAEC-PAD auf einer PA20-Säule quantifiziert werden (Kotha *et al.*, 2020). Da auch für diese Analyten keine ausreichende Trennung auf der empfohlenen Säule während eigener Messungen erzielt werden konnte, wurde auch zur Quantifizierung der RFO mittels HPAEC-PAD eine PA200-Säule verwendet.

Zur Quantifizierung der lebensmittelrelevanten Mono- und Disaccharide Glucose, Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose und Isomaltulose wurden daher in dieser Arbeit HPAEC-Methoden an den beiden Säulen PA20 und PA200 verwendet. Der Kalibrierbereich liegt zwischen 1 mg/L und 15 mg/L. Als interne Standardsubstanz wurden Allose oder L-Arabinose verwendet (Sanders *et al.*, 2017; Vennard *et al.*, 2020). Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibrierung anhand der Flächenverhältnisse zwischen dem Analyten und der jeweiligen internen Standardsubstanz. Die detaillierten Arbeitsvorschriften sowie die Gradientenprogramme der HPAEC-PAD-Messungen sind in 8.3 einzusehen. Die ermittelten BG (siehe 3.5) der verwendeten Methoden sind in Tabelle 9-3 zusammengefasst. Sie liegen für Lactose bei beiden Methoden mit 0,003 mg/100 mL (0,03 µg/mL) und 0,06 mg/100 mL (0,06 µg/mL) deutlich unterhalb der festgelegten Grenze zur Überprüfung der Kennzeichnung „lactosefrei“. Zur Quantifizierung der Mono- und Oligosaccharide in Hülsenfrüchten wurden ebenfalls Messungen an beiden Säulen vorgenommen (Gradientenprogramme siehe 8.3). Dabei wurde auf die Verwendung eines internen Standards verzichtet und die Konzentrationen der Analyten wurden direkt über externe Kalibrierungen bestimmt. Die ermittelten BG sind in Tabelle 9-4 zusammengefasst.

3.3.3 Gaschromatographische Methoden

Alternativ zu flüssigchromatographischen Methoden kann auch die Gaschromatographie (GC) zur Quantifizierung von Kohlenhydraten eingesetzt werden. Aufgrund der geringen Flüchtigkeit von Mono- und Disacchariden ist eine der Analyse vorangehende Derivatisierung zwingend erforderlich. Eine Möglichkeit besteht in der Umsetzung zu Alditolacetaten. Dabei werden die Analyten in Alditole überführt und anschließend acetyliert. Werden Aldosen analysiert, wird im Chromatogramm nur ein Signal pro Analyt erzeugt, was vorteilhaft für Analytgemische mit vielen Mono- und Disacchariden ist. Gleichzeitig geht dadurch die Möglichkeit zur Unterscheidung bestimmter Ketosen und Aldosen verloren, was z.B. bei der gleichzeitigen Bestimmung von Glucose, Mannose und Fructose von Bedeutung ist. Zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Monosaccharide ist diese Möglichkeit der Derivatisierung auch deshalb weniger geeignet, da z.B. nicht mehr zwischen Glucose, Fructose und vorkommendem Sorbitol bzw. Mannitol unterschieden werden kann (Ruiz-Matute *et al.*, 2011; Galant *et al.*, 2015).

Eine zur Quantifizierung von Zuckern in Lebensmitteln besser geeignete Derivatisierungsmethode besteht in der Oximierung der Analyten mit anschließender Derivatisierung zu Trimethylsilylethern. Dabei entstehen für jeden reduzierenden Zucker zwei Signale, die *syn*- und *anti*-Form, und für nicht reduzierende Analyten entsprechend ein Signal im Chromatogramm (Shaw & Moss, 1969; Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Alle Derivatisierungsmöglichkeiten sind mit einem hohen Zeitaufwand in der Durchführung verbunden. Zudem sollte die Verwendung toxischer Reagenzien aus Gründen der Arbeitssicherheit und Ökologie vermieden werden. Deshalb wurde die GC-Analyse im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich zur Quantifizierung von Isomaltulose angewandt. Für die Bestimmung von Isomaltulose konnte bisher keine enzymatische Methode etabliert werden. HPLC-Methoden gelten als spezifisch zum Nachweis von Isomaltulose, konnten aber wie in 3.3.2 beschrieben nicht im eigenen Labor etabliert werden. Um neben der verwendeten HPAEC-PAD-Methode eine zusätzliche Vergleichsmethode zur Quantifizierung von Isomaltulose verwenden zu können, wurde eine GC-Methode gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (GC-FID) durchgeführt. Die Methode wurde von der Südzucker AG zur Verfügung gestellt und für alle Matrices im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf durchgeführt. Die Analyten wurden zunächst mithilfe von Hydroxylammoniumchlorid oximiert, wobei reduzierende Zucker in der offenkettigen Form fixiert werden. Die anschließende Silylierung mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) und Chlortrimethylsilan erzeugte leicht flüchtige Trimethylsilyloxime (TMSO), die mithilfe des GC-FID Systems getrennt und detektiert wurden. Als interne Standardsubstanz wurde Phenyl- β -D-glucoopyranosid verwendet. Für alle reduzierenden Analyten wurde bei ausreichender chromatographischer Trennung die Summe aus beiden TMSO-Isomeren zur Quantifizierung herangezogen. Dabei wurden die Konzentrationsverhältnisse und Flächenverhältnisse von Analyt zur internen Standardsubstanz verwendet (Ruf, 2020).

3.4 NMR-spektroskopische Methoden

Das Prinzip der NMR-Spektroskopie beruht auf der quantenmechanischen Annahme, dass viele Atomkerne einen Kernspin haben, der zu einem kleinen magnetischen Dipolmoment führt. Die Beziehung zwischen dem intrinsischen magnetischen Dipolmoment und dem Kernspin wird als gyromagnetisches Moment γ bezeichnet, das eine konstante Größe für verschiedene Atomkerne darstellt. Die Kernspinquantenzahl I ist für einige Atomkerne gleich Null. Sie besitzen keinen Kernspin und können somit auch nicht mittels NMR-Spektroskopie detektiert werden. Der Atomkern ^{12}C ist beispielsweise NMR-inaktiv, wodurch die Messung organischer Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie erschwert wird. Für NMR-aktive Kerne ist I ein Vielfaches von $\frac{1}{2}$. Das ^{13}C -Isotop ist im Vergleich zu ^{12}C NMR-aktiv, kommt aber mit einer natürlichen Häufigkeit von 1,1 % relativ selten vor, wodurch die Empfindlichkeit der Messung stark herabgesetzt wird. Protonen hingegen sind häufig vorkommende NMR-aktive Kerne, sodass ihre Messung von großer Bedeutung ist.

Im statischen Magnetfeld der Stärke B_0 können $2I+1$ mögliche Spinzustände eingenommen werden. Bei Atomkernen mit $I=\frac{1}{2}$ sind daher zwei Zustände möglich, die als α - und β -Zustand beschrieben werden (siehe Abbildung 3-2). Dabei stehen die Spins entweder parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld. Es herrscht ein kleiner Überschuss an Spins im energieärmeren α -Zustand, sodass eine makroskopische Magnetisierung entsteht. Die Energiedifferenz der beiden Niveaus ist definiert als:

$$\Delta E = h\nu_0 = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (1)$$

Das äußere Magnetfeld wirkt ein Drehmoment auf das magnetische Moment aus, sodass Letzteres anfängt zu präzessieren. Die Frequenz der Präzession wird als Larmorfrequenz ω_0 bezeichnet und stellt eine wichtige Größe der NMR-Spektroskopie dar.

$$\omega_0 = -\gamma B_0 [\text{rad} * \text{s}^{-1}] \quad (2)$$

Durch die Absorption von Energie können die Kerne ihren Energiezustand ändern. Diese Energie wird als elektromagnetische Strahlung eingebracht, deren Frequenz ν_0 mit der Larmorfrequenz übereinstimmen muss, damit die Resonanzbedingung erfüllt ist (siehe Formel (1)).

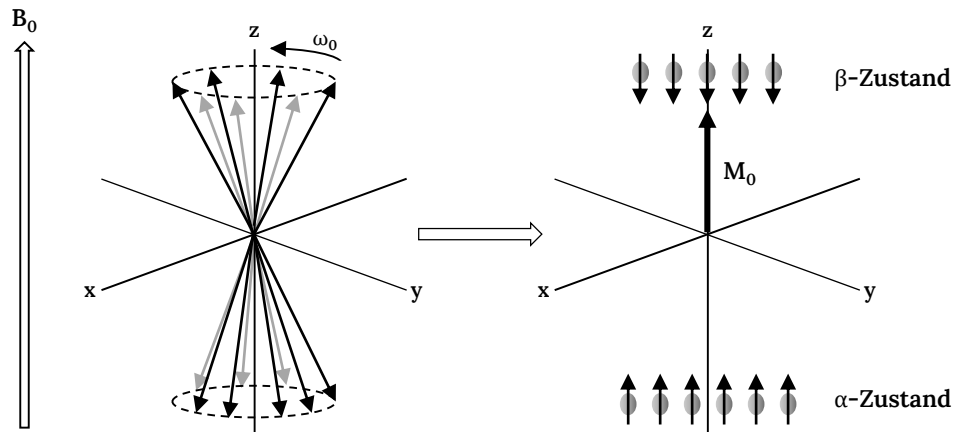


Abbildung 3-2: Spinausrichtung im statischen Magnetfeld der Stärke B_0 . Es herrscht ein Überschuss an Spins im energieärmeren α -Zustand, die parallel zu B_0 stehen, wodurch die makroskopische Magnetisierung M_0 entsteht. Die magnetischen Momente der einzelnen Spins präzessieren um die Achse von B_0 mit der Larmorfrequenz ω_0 (modifiziert nach Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

Der im statischen Magnetfeld erzeugte thermische Gleichgewichtszustand wird während NMR-spektroskopischer Messungen durch das Einbringen von Radiofrequenzpulsen gestört. Durch einen 90° -Puls wird die Magnetisierung in die xy -Ebene ausgelenkt (siehe Abbildung 3-3). Die Präzession der Magnetisierung in der Ebene z induziert dabei ein oszillierendes Signal in der Detektorspule, den *free induction decay* (FID). Durch Relaxationsprozesse, die in 3.4.1 erklärt werden, nimmt das Signal des FIDs ab. Die im FID aufgenommene Zeitdomäne wird durch eine Fourier-Transformation mathematisch in die Frequenzdomäne umgewandelt und liefert schließlich ein NMR-Spektrum (Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

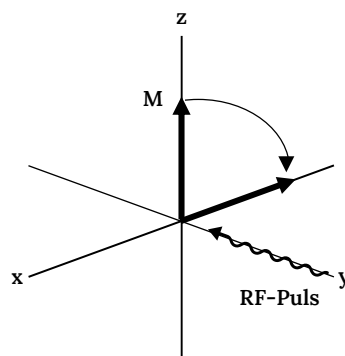


Abbildung 3-3: Einfluss eines 90° -Radiofrequenzpulses (RF-Puls) auf die makroskopische Magnetisierung M , die in die xy -Ebene ausgelenkt wird (modifiziert nach Zerbe & Jurt, 2014).

Alle NMR-spektroskopischen Messungen wurden an einem 500 MHz-Gerät, ausgestattet mit einem *Prodigy*-Kryoprobekopf, durchgeführt. *Prodigy*-Kryoprobeköpfe verfügen gemäß Hersteller über stickstoffgekühlte Spulen und Vorverstärker, wodurch eine Sensitivitätserhöhung gegenüber ungekühlten Probeköpfen erreicht werden kann. Neben der verbesserten Sensitivität von *Prodigy*-

Kryoprobenköpfen zeigte sich bei ihrer Verwendung im Vergleich zu ungekühlten Probenköpfen oder heliumgekühlten Kryoprobenköpfen jedoch auch eine geringere Auflösung des Tetramethylsilan (TMS)-Signals und seiner Silicium-Satelliten sowie größere Abweichungen in der Symmetrie der Signale (Monakhova & Diehl, 2019). Die Halbwertsbreite des TMS-Signals bei der Verwendung des *Prodigy*-Kryoprobenkopfs war zudem deutlich größer verglichen zu den ermittelten Halbwertsbreiten der Signale, die mithilfe eines ungekühlten Probenkopfs oder eines heliumgekühlten Kryoprobenkopfs gemessen wurden. Ein Effekt auf die Auflösung des Saccharose-Dubletts bei 5,4 ppm in Spektren, die mithilfe eines *Prodigy*-Probenkopfs gemessen wurden, konnten Monakhova und Kollegen im Vergleich zu den Spektren, die an einem ungekühlten Probenkopf gemessen wurden, nicht feststellen. Trotz der verschlechterten Auflösung des TMS-Signals bei Verwendung eines *Prodigy*-Probenkopfes wurden die Parameter als ausreichend zur Durchführung quantitativer ^1H -NMR-Messungen beurteilt. Zudem wurden die Messungen mithilfe des *Prodigy*-Probenkopfes über zehn Monate als stabil bewertet (Monakhova & Diehl, 2019). *Prodigy*-Probenköpfe können somit durchaus bei der NMR-spektroskopischen Quantifizierung von Analyten verwendet werden. Bei der Verwendung dieser Art von Kryoprobenköpfen können allerdings Beeinflussungen der Auflösung von Signalen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Ob die verminderte Auflösung des *Prodigy*-Probenkopfes einen Einfluss auf die Quantifizierung von Analyten haben kann, wurde untersucht, indem eine Messreihe ebenfalls an einem 400 MHz-Gerät mit einem ungekühlten Breitbandprobenkopf gemessen wurde.

Die verwendeten NMR-Experimente werden im Folgenden näher dargestellt. Eine Übersicht der Probenvorbereitung für die NMR-spektroskopische Messungen sowie der verwendeten Messparameter ist in 8.4 ersichtlich.

3.4.1 Relaxation in der NMR-Spektroskopie

Als Relaxation wird der Prozess beschrieben, durch den die Spins nach Störung des thermischen Gleichgewichts wieder in den Ausgangszustand zurückkehren. Dabei werden entsprechend der mathematischen Behandlung zwei verschiedene Relaxationsarten unterschieden. Die longitudinale Relaxation bezeichnet die Wiederherstellung der Boltzmann-Verteilung der α - und β -Zustände und wird über die T_1 -Relaxationszeit charakterisiert. Die makroskopische Magnetisierung wird am Beispiel in Abbildung 3-3 wieder in +z-Richtung gebracht. Wie in 1.3.1 beschrieben, bestimmt die Länge der longitudinalen Relaxationszeit auch die Länge des D_1 -Delays und somit maßgeblich die Experimentdauer (Zerbe & Jurt, 2014). Transversale Relaxation, charakterisiert über T_2 , beschreibt die Dephasierung der Spins und den Verlust der Phasenkohärenz. Die transversale Relaxation beeinflusst vor allem die Linienbreite, weshalb Moleküle mit kleinen transversalen Relaxationszeiten breite Signale zeigen. Transversale Relaxation wird durch Magnetfeldunterschiede erzeugt, die im Wesentlichen zwei verschiedene Ursachen haben können. Zum einen werden sie durch Inhomogenitäten des statischen Magnetfelds über das Probevolumen erzeugt, was durch das sogenannte Shimmen des

Magnetfelds für jede Probe minimiert werden kann. Zum anderen wird die Relaxation durch lokale Magnetfelder beeinflusst, die durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen erzeugt werden.

Die Relaxation von Molekülen kann u.a. durch Molekülbewegungen beeinflusst werden. Aus diesem Grund sinken die Relaxationszeiten vor allem bei abnehmender Beweglichkeit der Moleküle beispielsweise durch eine zunehmende Molekülgröße oder bei der Messung in Lösungsmitteln mit hoher Viskosität sowie bei niedrigen Temperaturen. Im Vergleich zur optischen Spektroskopie laufen die Relaxationsprozesse in der NMR-Spektroskopie relativ langsam ab. Dadurch kann die Phasenkohärenz gemessen und zur Differenzierung genutzt werden (Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

Die Bestimmung genauer Relaxationzeiten ist für die korrekte Ausführung quantitativer NMR-Messungen essentiell. Longitudinalen Relaxationszeiten können durch das *inversion recovery*-Experiment gemessen werden, dessen Pulssequenz in Abbildung 3-4 dargestellt ist. Durch den 180°-Puls wird die Magnetisierung invertiert und kehrt dann während der Wartezeit τ durch longitudinale Relaxation in den Gleichgewichtszustand zurück. Der anschließende 90°-Puls lenkt die Magnetisierung in die transversale Ebene zur Messung des FIDs aus. Durch Inkrementierung von τ kann die longitudinale Relaxationszeit bestimmt werden. Die Wiederherstellung der Magnetisierung wird durch folgende exponentielle Gleichung mit der Signalintensität I beschrieben:

$$I_z(\tau) = I_0 * (1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}}) \quad (3)$$

Die Auswertung des *inversion recovery*-Experiments liefert durch graphische Darstellung der Wiederherstellungsfunktion $I_z(\tau)$ die longitudinale Relaxationszeit am Nullpunkt der Funktion (siehe Abbildung 3-4).

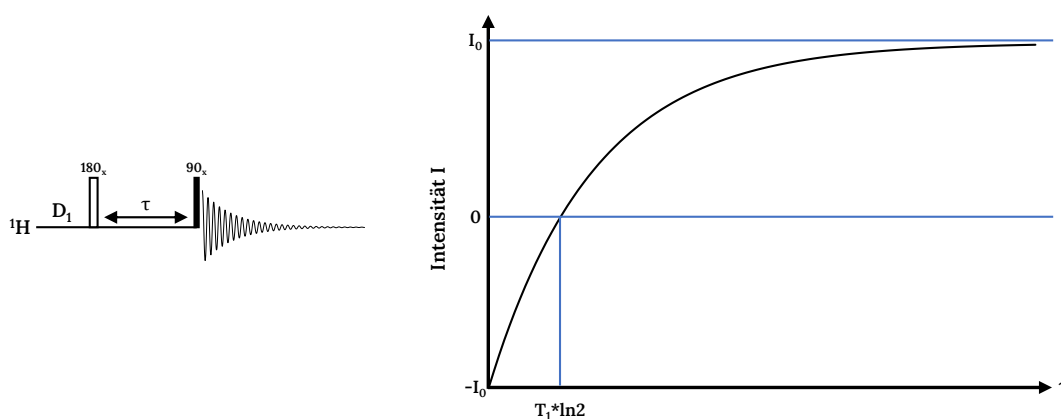


Abbildung 3-4: Links: Pulssequenz des *inversion recovery*-Experiments. D_1 : Wartezeit zwischen den Scans, τ : Wartezeit zwischen den Pulsen zur Relaxation der Spins (modifiziert nach Zerbe & Jurt, 2014)

Rechts: Verlauf der Signalintensität des *inversion recovery*-Experiments, beschrieben nach Formel (3). Über die graphische Auftragung kann die longitudinale Relaxationszeit T_1 bestimmt werden (modifiziert nach Li & Hu, 2017).

Die transversale Relaxationszeit kann mithilfe eines *spin echo*-Experiments bestimmt werden. Allgemein wird das *spin echo*-Experiment dazu verwendet, um Magnetfeldinhomogenitäten auszugleichen. Das Experiment beginnt mit einem 90°-Puls (siehe Abbildung 3-5), durch den die Magnetisierung ausgelenkt wird. Während der Wartezeit τ dephasiert die Magnetisierung entsprechend der Verteilung der Feldinhomogenitäten. Der folgende 180°-Puls spiegelt die Aufspaltung der Magnetisierung an der y-Achse. In der zweiten Wartezeit τ rotiert jeder Vektor um den gleichen Winkel wie in der ersten Wartezeit, sodass am Ende der zweiten Wartezeit alle Spins auf der y-Achse refokussiert werden. Neben dem Ausgleichen von Magnetfeldinhomogenitäten kann auch eine Refokussierung der chemischen Verschiebung erfolgen. Über ein *spin-echo*-Experiment kann somit die transversale Relaxation ermittelt werden, die durch molekulare Wechselwirkungen und nicht durch Magnetfeldinhomogenitäten erzeugt wird. Zusätzlich können allerdings Diffusion und Konvektion in der Probe die Messung beeinflussen (Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

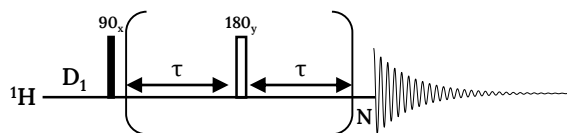


Abbildung 3-5: Pulssequenz des *spin echo*-Experiments ($N=1$). D_1 : Wartezeit zwischen den Scans, τ : Wartezeit. Bei $N>1$ wird das Experiment als Carr-Purcell-Meiboo-Gill-Sequenz bezeichnet (modifiziert nach Zerbe & Jurt, 2014).

Zur Minimierung der Effekte von Diffusion und Konvektion wird das *spin echo*-Experiment mit einer Wiederholung an 180°-Pulsen durchgeführt. Der in Klammern gesetzte Baustein der Pulssequenz (siehe Abbildung 3-5) wird mehrfach ausgeführt, um eine genaue Refokussierung und dadurch eine exakte Bestimmung der transversalen Relaxationszeit zu ermöglichen. Das Experiment wird als Carr-Purcell-Meiboo-Gill-Sequenz bezeichnet. Der Verlauf der Signalintensität wird durch Formel (4) beschrieben und entsprechend der Vorgehensweise des *inversion recovery*-Experiments ausgewertet (Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

$$I_z(\tau) = I_0 * e^{-\frac{\tau}{T_2}} \quad (4)$$

Die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten der zu quantifizierenden Analyten wurden mithilfe der beschriebenen Experimente bestimmt (siehe auch Tabelle 9-5).

3.4.2 ¹H-NMR-Experimente

Das einfachste ¹H-NMR-Experiment besteht aus einem 90°-Puls, der die Magnetisierung in die xy-Ebene rotiert. Zur Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (*Signal-to-Noise-Ratio*, S/N) wird das Pulsprogramm wiederholt, und die FIDs werden akkumuliert, wobei die Steigerung von S/N

mathematisch als Wurzel der Scanzahl beschrieben werden kann (Zerbe & Jurt, 2014). Durch den Einbau des D_1 -Delays in die Pulssequenz wird die vollständige Relaxation aller Spins gewährleistet. Wie in 1.3.1 erklärt, kann bei einem D_1 -Delay der fünffachen Länge der longitudinalen Relaxationszeit eine vollständige Rückkehr der Spins in den Grundzustand angenommen werden. Durch Verringerung des D_1 -Delays kann eine effiziente Verkleinerung der Experimentdauer erreicht werden. Allerdings ist bei nicht ausreichender Wartezeit die Relaxation noch nicht abgeschlossen, wodurch im folgenden Scan nicht die maximale Magnetisierung aufgenommen wird. Durch die Verringerung des Anregungswinkels des eingestrahlten Pulses wird zwar ein kleinerer Teil der Magnetisierung angeregt, durch eine geeignete Wiederholrate t_R der Pulssequenz kann dennoch die maximale Signallintensität erreicht werden. Dieser Zusammenhang wurde von Ernst und Anderson (1966) beschrieben (siehe (5)). Der optimierte Rotationswinkel des Anregungspulses wird als Ernst-Winkel α_E bezeichnet (Ernst & Anderson, 1966; Claridge, 2016).

$$\cos \alpha_E = e^{-\frac{t_R}{T_1}} \quad (5)$$

In der ^1H -NMR-Spektroskopie wird häufig eine Impulsanregung mit einem 30° -Puls eingesetzt. Durch die Auslenkung um lediglich 30° benötigen die Spins deutlich weniger Zeit, um in den Ausgangszustand zurückzukehren. Der D_1 -Delay kann daher reduziert werden (siehe Abbildung 3-6 links). Da die Experimentdauern in der ^1H -NMR-Spektroskopie generell kurz sind, wird dennoch bei quantitativen Messungen häufig mit einem immer noch langen D_1 -Delay der dreifachen Länge der longitudinalen Relaxationszeit gearbeitet. Bei schnell relaxierenden Spins muss bei der Reduktion des Pulswinkels auch mit einer Verringerung von S/N um bis zu 50 % gerechnet werden (siehe Abbildung 3-6 rechts).

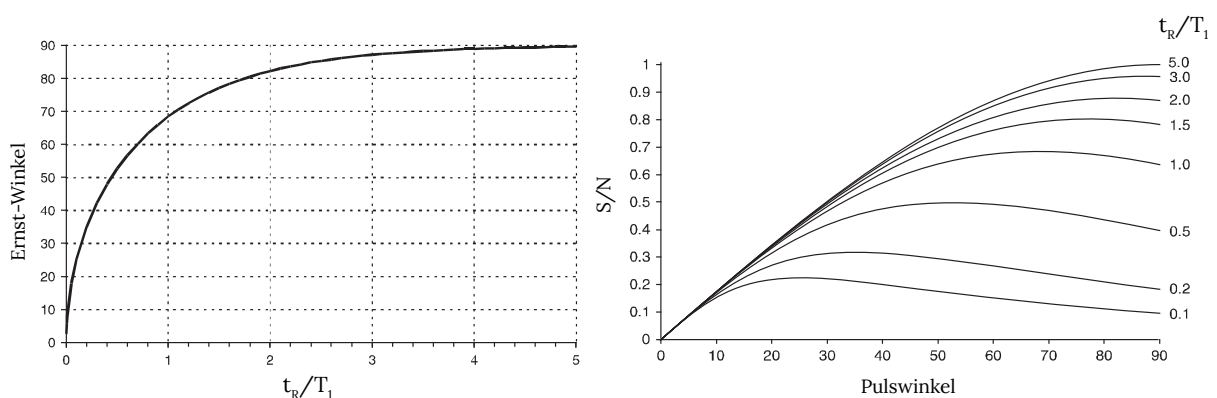


Abbildung 3-6: Links: Ernst-Winkel für verschiedene Wiederholzeiten, die von der Wiederholrate der Pulssequenz t_R und der longitudinalen Relaxationszeit T_1 bestimmt werden (modifiziert nach Claridge, 2016).

Rechts: Abhängigkeit des Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) von den verschiedenen Pulswinkeln unterschiedlicher Wiederholzeiten (t_R/T_1) (modifiziert nach Becker et al., 1979; Claridge, 2016).

Da Lebensmittelproben oft in wässriger Matrix vorliegen, werden vermehrt ^1H -NMR-Pulssequenzen mit Lösungsmittelunterdrückung eingesetzt. Unter den Möglichkeiten zur Lösungsmittelunterdrückung hat sich eine Kombination aus Vorsättigung und der *Water Eliminated Fourier Transform* (WEFT)-Sequenz durchgesetzt. Diese beiden Prinzipien werden in der 1D-NOESY-Pulssequenz vereint, die in Abbildung 3-7 dargestellt ist.

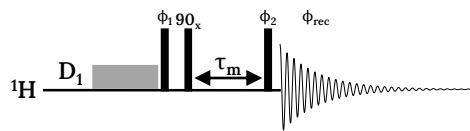


Abbildung 3-7: ^1H -Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY)-Pulssequenz. D_1 : Wartezeit zwischen zwei Scans, τ_m : Mischzeit, graues Rechteck: langer Sättigungspuls niedriger Leistung. Folgende Phasenzyklen werden verwendet: ϕ_1 : x, -x; ϕ_2 : x, x,-x, -x ,y, y, -y, -y, ϕ_{rec} : x, -x, -x, x, y, -y, -y, y (modifiziert nach McKay, 2011; Zerbe & Jurt, 2014).

Der erste Puls der Sequenz wird als Sättigungspuls verwendet. Die lange Einstrahldauer bei sehr geringer Leistung hat sich zur selektiven Sättigung der Lösungsmittelresonanz bewährt, besonders wenn noch weitere zur Auswertung interessante Resonanzen in der Nähe des Lösungsmittelsignals einer geringen Beeinflussung ausgesetzt werden sollen (McKay, 2011). Durch die Verwendung von Sättigungspulsen kommt es häufig zu breiten Restsignalen des Lösungsmittels im Spektrum. Das Restsignal wird vielmals von Spins erzeugt, die außerhalb des von der Hochfrequenzspule eingeschlossenen Volumens liegen. Dadurch wird das Magnetfeld inhomogen und die Resonanzen stimmen nicht mit dem Sättigungspuls überein. In diesem Bereich sind allerdings auch die Pulswinkel kleiner, sodass es durch den eingestrahlten Phasenzyklus zur Auslöschung der störenden Resonanzen kommt. Während der Mischperiode kann das System relaxieren, wobei ein Kompromiss zwischen der optimalen Relaxationszeit für die Analyten und der des zu unterdrückenden Lösungsmittels gefunden werden muss. Daher kann es in 1D-NOESY-Experimenten auch zu abgeschwächten Signalen kommen, die die direkte Quantifizierung gegebenenfalls erschweren können (McKay, 2011).

Neben der möglichen Quantifizierung in ^1H -NMR-Experimenten kann bei ausreichender Trennung der Signale die Konfiguration am anomeren Kohlenstoff von Monosacchariden bestimmt werden. Die anomeren Signale zeigen häufig eine deutliche Tieffeldverschiebung, weshalb die Auswertung ihrer vicinalen Kopplung auch in komplexen Gemischen häufig möglich ist. Die Größe der vicinalen Kopplungskonstante ist abhängig vom Diederwinkel. Eine Kopplungskonstante von ca. 4 Hz deutet bei äquatorialer Stellung des Protons an C2 auf die α -Konfiguration hin. Monosaccharide in β -Konfiguration weisen bei äquatorialer Stellung des Protons an C2 eine Kopplungskonstante von ca. 8 Hz auf (Karplus, 1963).

3.4.3 2D-NMR-Experimente

In 2D-NMR-Spektren wird eine zweite Frequenzdimension aufgenommen, sodass jeder Datenpunkt im Spektrum eine Intensität und zwei Frequenzkomponenten besitzt. Durch das Einbringen der zweiten Frequenz erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung, die meistens eine skalare Kopplung zwischen den betrachteten Kernen zeigt. Unabhängig von der jeweils detektierten Kopplung zeigen alle 2D-NMR-Pulssequenzen den gleichen Aufbau, der in die folgenden vier Schritte eingeteilt werden kann: Präparation, Evolution, Mischphase und Detektion (siehe Abbildung 3-8).

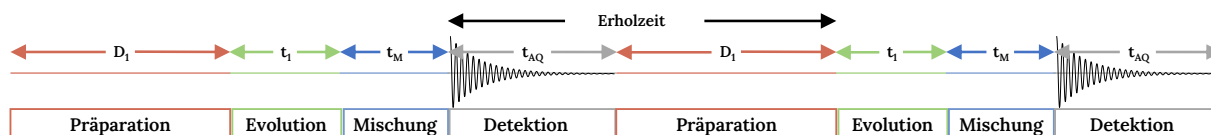


Abbildung 3-8: Aufbau eines zweidimensionalen Experiments der Kernspinresonanzspektroskopie mit zwei Scans. D_1 : Wartezeit zwischen zwei Scans, t_1 : Inkrementierungszeit, t_M : Mischzeit, t_{AQ} : Akquisitionszeit (modifiziert nach Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016)

In der Evolutionsphase erfolgt die Inkrementierung, die die zweite Dimension erzeugt. Die Wartezeit t_1 wird dabei schrittweise erhöht und nach jedem Schritt ein FID aufgenommen. Die Auflösung in 2D-NMR-Experimenten kann über die Anzahl an Inkrementen beeinflusst werden. Mit steigender Inkrementanzahl steigt die digitale Auflösung in der zweiten Dimension, aber auch die Messzeit, da mehr Wiederholungen der Pulssequenz durchgeführt werden müssen. Bei der Aufnahme mehrerer Scans muss die Erholzeit ebenso wie bei 1D-Experimenten (siehe 1.3.1) ausreichend lang sein, sodass vollständige Relaxation gewährleistet ist. Hierbei hat die Wahl eines ausreichend langen D_1 -Delays auch in 2D-Experimenten einen großen Einfluss auf die Experimentdauer (Claridge, 2016).

Zur Strukturaufklärung der zur Quantifizierung verwendeten Analyten wurden eine Reihe an 2D-NMR-Experimenten verwendet und eine Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden strukturellen Einheiten durchgeführt. Die dadurch ermittelten chemischen Verschiebungen der verwendeten Signale sind in 9.3.2 und 9.4 dargestellt. Durch Interpretation des HSQC-Spektrums werden die direkt an Kohlenstoff gebundenen Protonen identifiziert. Zur Unterscheidung von CH/CH₃- und CH₂-Gruppen kann ein phasensensitives Experiment aufgenommen werden. Durch die Tieffeldverschiebung vieler anomerer Protonen und die Bestimmung der anomeren Konfiguration im ¹H-NMR-Spektrum können erste Signale zugeordnet werden. Die Aufnahme eines HSQC-TOCSY-Spektrums ermöglicht die Zuordnung der einzelnen HSQC-Signale zu verschiedenen Spinsystemen. Da im Falle von Oligosacchariden jede Monosaccharideinheit ein geschlossenes Spinsystem darstellt, können die Signale den einzelnen Monosaccharideinheiten zugeordnet werden. Durch Interpretation der COSY-Spektren der Analyten werden Kopplungen zwischen benachbarten Protonen identifiziert. Das verwendete *Heteronuclear 2-bond Correlation* (H2BC)-Experiment zeigt Korrelationen von Protonen und protonentragenden Kohlenstoffen, die durch zwei kovalente Bindungen getrennt sind. Durch den

Einsatz dieses Experiments können direkte Nachbarn in den Strukturen identifiziert werden. Durch Zuhilfenahme von *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experimenten, in deren Spektren ^1H - ^{13}C -Korrelationen über zwei bis maximal vier kovalente Bindungen sichtbar werden, kann z.B. die Position der glykosidischen Bindung identifiziert werden (Bubb, 2003; Petersen *et al.*, 2006).

Zur Quantifizierung der Analyten wird u.a. ein Standard-HSQC-Experiment genutzt, dessen Pulssequenz in Abbildung 3-9 dargestellt ist. Durch den angewandten *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer* (INEPT) -Schritt wird Polarisation zwischen Kernen übertragen. Da Protonen ein großes gyromagnetisches Verhältnis und daher auch eine große NMR-Empfindlichkeit besitzen, wird ihre Polarisation auf die unempfindlicheren ^{13}C -Kerne übertragen. Der erste 90° -Puls erzeugt transversale Protonenmagnetisierung. Während der anschließenden Wartezeiten Δ entwickeln sich die chemische Verschiebung und die heteronukleare Kopplung. Der mittig platzierte 180° -Puls in ^1H refokussiert die Entwicklung der chemischen Verschiebung während der zweiten Wartezeit Δ . Der gleichzeitig eingestrahlte 180° -Puls in ^{13}C gewährleistet, dass sich die heteronukleare Kopplung weiterentwickelt, indem die Präzessionsrichtung der Protonenvektoren umgekehrt werden. Durch die beiden gleichzeitig eingestrahlten 90° -Pulse wird die Antiphase magnetisierung schließlich vom empfindlichen auf den unempfindlichen Kern übertragen. In der folgenden Inkrementierungszeit t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung der indirekten Dimension und wird durch den 180° -Puls refokussiert. Die während des INEPT-Schrittes nicht auf ^{13}C übertragene Protonenmagnetisierung wird durch den folgenden Gradienten dephasiert. Es folgt der INEPT-Rücktransfer, der Magnetisierung wieder zurück auf die Protonen überträgt. Phasenempfindliche Detektion wird durch den abschließenden Gradienten als Bestandteil der *Echo-/Antiecho-Methode* angewandt (Zerbe & Jurt, 2014; Claridge, 2016).

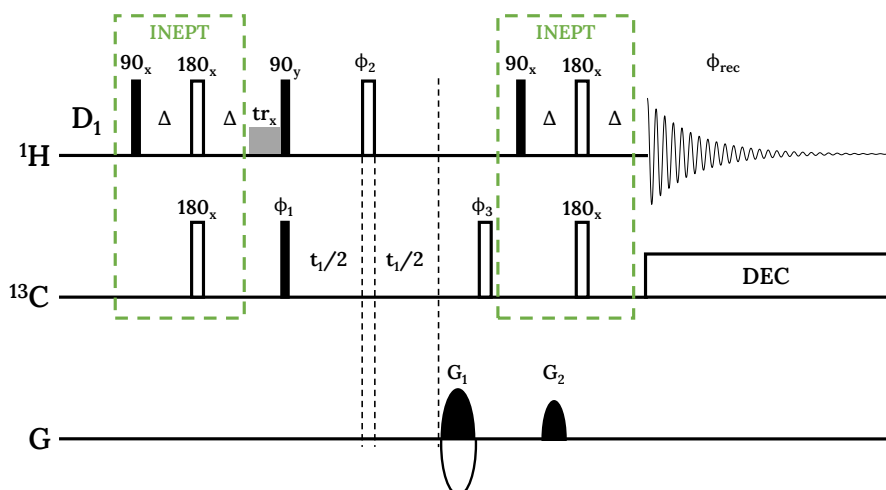


Abbildung 3-9: Pulssequenz „hsqcetgp“ der Firma Bruker Corporation. D₁: Wartezeit zwischen zwei Scans, INEPT: *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*, tr: trim-Puls, DEC: Entkopplung. Folgende Phasenzyklen werden verwendet: $\Phi_1 = x, y$, $\Phi_2 = 2(x), 2(-x)$, $\Phi_3 = 4(x), 4(-x)$, $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. Der INEPT-Schritt wird mit der Wartezeit $\Delta = 1/4 J_{\text{CH}}$ durchgeführt. Folgende Gradientenverhältnisse werden verwendet: $G_1 = 80\%, -80\%$, $G_2 = 20,1\%, 20,1\%$.

Während der Optimierung der HSQC-Methode wurde zudem das Pulsprogramm „hsqcetgppsp“ verwendet, das sich von der dargestellten Pulssequenz durch Verwendung adiabatischer 180° -Pulse während der INEPT-Schritte in der ^{13}C -Dimension unterscheidet. Adiabatische Pulse zeigen in der Theorie eine effizientere Inversion über einen weiteren Frequenzbereich und sind unempfindlicher gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten und Fehlanpassungen der Pulsleistung (Claridge, 2016). Das zusätzlich durchgeführte Experiment „hsqcedetgp“ liefert Spektren, in denen zwischen CH-Multiplizitäten durch ihr Phasenvorzeichen unterschieden werden kann. Die Multiplizitätseditierung wird durch eine zusätzliche Wartezeit mit einem Refokussierungspuls in beiden Dimensionen erreicht. Im erhaltenen Spektrum können CH- und CH_3 -Gruppen dann durch ihr Vorzeichen von CH_2 -Gruppen unterschieden werden (Claridge, 2016).

Die Integration in HSQC-Spektren erfolgt über Volumenintegrale, deren Grenzen in der Praxis häufig schwer abgegrenzt werden können. Eine geeignete Signalauswahl von schmalen Signalen mit großem S/N ist daher besonders wichtig.

3.4.3.1 Verwendete Methoden zur Messzeitbeschleunigung

Die Akquisitionszeiten eines ^1H -NMR-Experiments sind deutlich länger als die Akquisitionszeiten eines HSQC-Experiments. Daher findet während der langen Akquisitionszeit im ^1H -NMR-Experiment schon ein Großteil der Relaxation statt. Während eines HSQC-Experiments muss der D_1 -Delay dementsprechend ausreichend lange eingestellt werden, um auch eine vollständige Relaxation bei kleinen Akquisitionszeiten gewährleisten zu können. Zudem sind die Messzeiten von HSQC-Experimenten aufgrund der Inkrementierung zum Teil sehr lange, sodass bei einer übermäßig langen Einstellung des D_1 -Delays die absolute Messzeit mehrere Stunden dauern kann. Die Größe des D_1 -Delays wird im Laufe der Methodenoptimierung variiert, um den Einfluss auf die Quantifizierung beurteilen und eine geeignete Wartezeit definieren zu können. Durch die Einstellung eines geeigneten D_1 -Delays kann somit die Messzeit von HSQC-Experimenten optimiert werden. Aufgrund des INEPT-Schritts im HSQC-Experiment kann eine Ernst-Winkel-Anregung nicht einfach implementiert werden. Durch weitere Optimierungen konnte der Ansatz schließlich in der ASAP-HSQC-Pulssequenz eingesetzt werden.

3.4.3.1.1 ASAP-HSQC

Die verwendeten ASAP-HSQC-Pulsprogramme wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Burkhard Luy (Karlsruher Institut für Technologie) zur Verfügung gestellt. Das ASAP-HSQC-Experiment zeichnet sich durch ein modifiziertes Gradientenschema im Vergleich zum konventionellen HSQC-Experiment aus. Dadurch wird die Magnetisierung der an ^{12}C -gebundenen Protonen nicht dephasiert, sondern verbleibt in einem sogenannten Reservoir. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit der Kohlenstoffisotope liegen deutlich mehr Protonen an ^{12}C gebunden und demzufolge auch ein großes Reservoir vor. Der größte Unterschied der ASAP-HSQC-Pulssequenz

zum konventionellen HSQC-Experiment stellt die Lage des 90° -Pulses des INEPT-Rücktransferschrittes in der Protonendimension dar. Dieser wird im ASAP-HSQC-Experiment vor dem Gradienten ausgeführt (siehe Abbildung 3-10). Dadurch wird das Polarisationsreservoir an der z-Achse gespiegelt und von den Gradienten der Kohärenzselektion und der *Echo-/Antiecho*-Detektion nicht beeinflusst. Zusätzlich wird der INEPT-Transfer durch eine Verkürzung der Wartezeit optimiert. Aufgrund der kleinen Kopplung zwischen ^{12}C -gebundenen Protonen und den ^{13}C -Kernen wird die Magnetisierung der an ^{12}C -gebundenen Protonen im INEPT-Schritt kaum übertragen, sodass ihre Magnetisierung zurückbleibt. Die Magnetisierung wird durch die eingestrahlten Pulse angeregt und liegt dann wie die nicht übertragene Magnetisierung aus der Ernst-Winkel-Anregung entlang der y-Achse vor. Während der Mischzeit wird die Magnetisierung des Reservoirs auf die an ^{13}C -gebundenen Protonen übertragen. Nach einer mittleren Mischdauer von 40 ms ist die Intensität der Magnetisierung soweit übertragen, dass ein weiterer Scan durchgeführt werden kann (Kupče & Freeman, 2007; Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2014; Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Wird die Mischsequenz durch einen konventionellen D_1 -Delay ersetzt, wird dieses Experiment als *Alternate Band Selective Optimized Flip-Angle Short Transient* (ALSOFAST) -HSQC-Experiment bezeichnet. Am Beispiel von Menthol konnte im Vergleich beider Pulssequenzen gezeigt werden, dass der ASAP-Ansatz für kleine Moleküle durch die Steigerung der Empfindlichkeit besser geeignet ist. Für große Moleküle könnte der ALSOFAST-Ansatz besser anwendbar sein, da für große Moleküle mit kleinen transversalen Relaxationszeiten geringere Relaxationsverluste als bei der Anwendung des Mischschrittes auftreten. Bei der Anwendung der ASAP-HSQC-Pulssequenz auf Menthol konnte bei gleichbleibender spektraler Qualität die Experimentdauer stark reduziert oder bei gleichbleibender Messzeit die Sensitivität im Vergleich zum konventionellen HSQC-Experiment gesteigert werden. Zudem besteht die Möglichkeit einer Kopplung mit dem NUS-Ansatz (siehe 3.4.3.1.2), wodurch die Experimentdauer weiter reduziert werden kann (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Durch die beschleunigte Pulssequenz ist es somit möglich die Messzeit bei gleichbleibender spektraler Qualität zu reduzieren oder durch die Aufnahme einer größeren Anzahl an Inkrementen sowie mehreren Scans Auflösung und/ oder Empfindlichkeit bei gleichbleibender Messzeit zu verbessern (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2014).

Neben der ASAP-HSQC-Pulssequenz wurde auch eine ASAP-HSQC-Sequenz mit optimierter Wasserunterdrückung von den Autoren entwickelt (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Durch zusätzliche Gradienten wird die starke Protonenmagnetisierung der Wassermoleküle in der xy-Ebene mehrfach dephasiert. Zusätzlich wird durch Anwendung bipolarer Gradienten während der Inkrementierungszeit das Auftreten von *radiation damping* reduziert (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). *Radiation damping* entsteht dadurch, dass die Magnetisierung der Probe selbst einen Strom in den verschiedenen Spulen erzeugt, die dann wie ein weiteres Magnetfeld auf die Probe einwirkt. Dadurch kann die Signalform und die Aufspaltung beeinflusst werden, was eine exakte Integration der Signalfäche erschweren kann. Durch den Effekt wird somit die quantitative Auswertung von NMR-

Experimenten erschwert (Bayle *et al.*, 2015). Die Pulssequenz verwendet harte Pulse anstatt Breitbandimpulse, die zwar die Signalintensität über einen weiteren Bereich der chemischen Verschiebung, aber auch das Auftreten von *radiation damping* reduzieren. Die Pulssequenz konnte bei der Messung einer 100 mM wässrigen Saccharoselösung bei einer Messzeit von 7 s ausreichend aufgelöste Spektren ohne Wassersignal und mit einer ausreichenden Empfindlichkeit erzeugen. Bei geringer Saccharosekonzentration von 2 mM konnte keine ausreichende Wasserunterdrückung mehr beobachtet werden (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Ob eine Anwendung der ASAP-HSQC-Pulssequenz mit Wasserunterdrückung möglich ist, hängt somit von der Konzentration der Analyten ab.

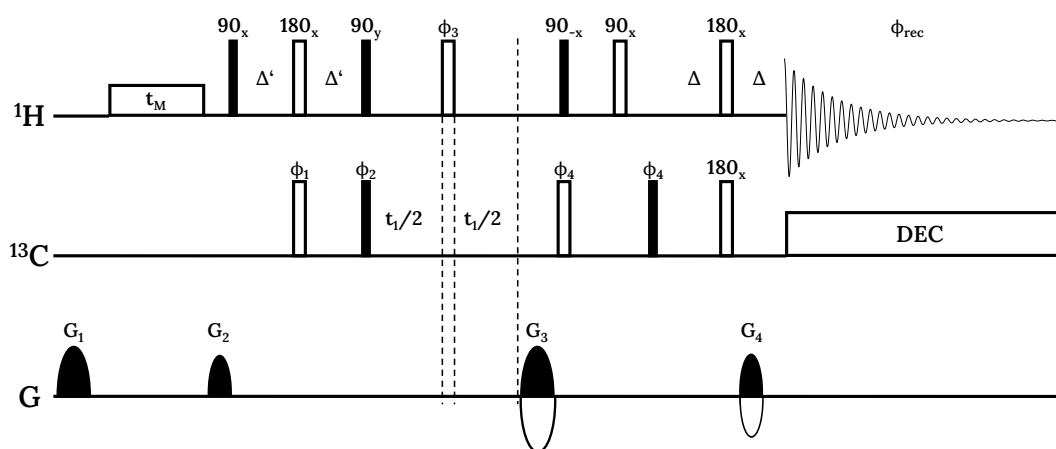


Abbildung 3-10: Pulssequenz des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments. Auf die Darstellung verwendeter Breitbandimpulse wird verzichtet. Folgende Phasenzyklen werden verwendet: $\Phi_1 = x$, $\Phi_2 = x, -x$, $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$, $\Phi_4 = 4(-x), 4(x)$, $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, x, -x, x$. Zudem wurde eine Wartezeit von $\Delta' = 50$ ms verwendet. Folgende Gradientenverhältnisse werden verwendet: $G_1 = 43\%$, $G_2 = 33\%$, $G_3 = 63,9\%$, 80% , $G_4 = 80\%$, $59,9\%$ (modifiziert nach Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2014).

Bei Anwendung der ASAP-HSQC-Pulssequenz befindet sich das Magnetisierungsreservoir während der Inkrementierungszeit in der xy -Ebene, wodurch es zur Entwicklung von homonuklearer Kopplung kommen kann. Insbesondere bei großen Akquisitionszeiten spielt die daraus resultierende Verkleinerung des Magnetisierungsreservoirs eine nicht unerhebliche Rolle. Im entwickelten *low-Cooling Overall Spin Temperature (Cost)*-ASAP-HSQC-Experiment wird das Reservoir durch einen optimierten Transferschritt entlang der z -Achse rotiert, wodurch es nicht zur Ausbildung von homonuklearer Kopplung kommt. Zudem wird ein empfindlichkeitserhöhter Rücktransferschritt eingesetzt. Allerdings kann keine Ernst-Winkel-Anregung angewandt werden. Das ASAP-HSQC-Experiment zeichnet sich im Vergleich zum *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment durch eine geringere Anzahl an eingestrahlenen Pulsen und kürzere Magnetisierungstransfers aus. Zusätzlich können durch die Anwendung der Ernst-Winkel-Anregung höhere Wiederholraten der ASAP-HSQC-Pulssequenz

durchgeführt und dadurch die Empfindlichkeit gesteigert werden. Die mithilfe der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz aufgenommenen Spektren zeigen durch das variierte Sequenzdesign eine größere Auflösung in der ^{13}C -Dimension. Bei der Aufnahme vieler Datenpunkte in der indirekten Dimension stellen die kürzeren Magnetisierungsansfers im ASAP-HSQC-Experiment lediglich einen kleinen Anteil der Experimentdauer dar, während die Inkrementierungsphase den Hauptteil an der Experimentdauer einnimmt. Der Verlust des Magnetisierungsreservoirs während des ASAP-HSQC-Experiments wird durch die verlängerte Inkrementierungszeit gesteigert. Durch das geänderte Design der Pulssequenz kann in diesen Fällen das *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment eine höhere Auflösung in den aufgenommenen Spektren erzeugen. Am Beispiel von Borneol konnte gezeigt werden, dass die ASAP-HSQC-Pulssequenz bei kurzen Experimentzeiten eine höhere Empfindlichkeit besitzt. Mit steigender Anzahl an Inkrementen in der ^{13}C -Dimension zeigte das *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment ein höheres S/N für die meisten Signale. Allerdings wurde auch eine Reduzierung der Intensität einiger Analytsignale beobachtet (Schulze-Sünninghausen, 2016).

In den durchgeführten Untersuchungen wurde eine symmetrisierte Version der in Abbildung 3-10 dargestellten ASAP-HSQC Pulssequenz verwendet. Die verwendeten Breitbandpulse wurden in Abbildung 3-10 zur übersichtlicheren Darstellung der Pulssequenz nicht abgebildet. Durch die messtechnischen Anpassungen wurden die Empfindlichkeit und die Robustheit des Experiments erhöht sowie das Auftreten von Artefakten minimiert (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Zusätzlich wurden die ASAP-HSQC-Pulssequenz mit Wasserunterdrückung und das *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment auf ihre Anwendbarkeit zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide getestet.

3.4.3.1.2 Non-uniform Sampling

Als NUS wird die Aufnahme eines zufällig verteilten Prozentsatzes der regulären Datenpunkte eines NMR-Spektrums bezeichnet. Die fehlenden Datenpunkte werden nach der Aufnahme durch Rekonstruktionsalgorithmen hinzugefügt. Durch den Einsatz von NUS und die dadurch geringere Anzahl an aufgenommenen Datenpunkten kann zum einen die Messzeit bei gleichbleibender Auflösung verkürzt werden. Zum anderen können durch die Verwendung des NUS-Ansatzes mehr Datenpunkte in gleichbleibender Messzeit aufgenommen bzw. rekonstruiert und dadurch die Auflösung erhöht werden (Hyberts *et al.*, 2012). Die Anwendung von NUS ist für alle NMR-Experimente möglich und kann durch Implementierung in die Aufnahmesoftware leicht durchgeführt werden. Die minimal notwendige Anzahl an Datenpunkten wird durch das Nyquist-Theorem bestimmt. Die *Sampling*-Frequenz muss doppelt so groß wie die Signalfrequenz sein, damit es nicht zu spektralen Fehlern wie Artefakten oder Faltungen kommt (Claridge, 2016). Für die Auswahl der Datenpunkte, im weiteren Verlauf auch als *Sampling*-Methode bezeichnet, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Die einfachste Methode stellt eine zufällige Verteilung dar, die über die gesamte Zeitachse gleichmäßig verteilt ist, sodass kein Teil des FIDs gewichtet wird. Durch den Einsatz von exponentiellen Wahrscheinlichkeitsfunktionen zur

Signalauswahl werden meist mehr Datenpunkte im Bereich kurzer Evolutionszeiten aufgenommen, sodass der vordere Teil des FIDs stärker gewichtet wird. Durch die Einstellung der Stärke der Exponentialfunktion kann der Bereich der Gewichtung eingestellt werden. Weitere Funktionen wie die Mischung aus NUS und *uniform sampling* sowie die Verwendung von Poisson-Verteilungen zur Signalauswahl können ebenfalls angewandt werden (Hyberts *et al.*, 2012; Robson *et al.*, 2019). Neben einer großen Bandbreite an *Sampling*-Methoden sind auch einige Ansätze zur Rekonstruktion der Datenpunkte postuliert. NUS-Datensätze werden im Verlauf dieser Arbeit mit dem *compressed sensing* Ansatz rekonstruiert. Durch den Einsatz von NUS werden Spektren gleicher Auflösung und verbessertem S/N aufgenommen, da weniger reale Datenpunkte und dadurch statistisch auch weniger Rauschen aufgenommen wird (Hyberts *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2015). Der Anteil an real aufgenommenen Datenpunkten wird als NUS-Anteil in Prozent angegeben. Ein NUS-Anteil von 60 % gibt an, dass 60 % der Datenpunkte eines uniform aufgenommenen Spektrums während der Messung aufgenommen und 40 % durch Rekonstruktion hinzugefügt werden. Der optimale NUS-Anteil wird durch die Messung von NUS-Anteilen zwischen 10 % und 90 % und den Vergleich der Integralgröße bestimmt. Die Datenpunkte werden durch den Algorithmus *Iterative Soft Thresholding* (IST) hinzugefügt. Es konnte kein Unterschied in der Rekonstruktionsgüte zwischen einem IST und *Iterative Reweighted Least Squares* (IRLS)-Algorithmus festgestellt werden. Aufgrund der kürzeren Prozessierungsdauer wird IST zur Rekonstruktion der Datenpunkte verwendet. Die imaginären Datenpunkte werden durch die Anwendung einer Hilbert-Transformation nachträglich rekonstruiert, um eine Phasenkorrektur in der indirekten Dimension zu ermöglichen.

3.4.4 Prozessierung von NMR-Spektren

Nach Aufnahme der Datenpunkte können verschiedene Methoden angewandt werden, um Spektren weiter zu prozessieren. Dabei können die vorgestellten Ansätze sowohl auf 1D- als auch auf 2D-Spektren angewendet werden.

Die digitale Auflösung DR in NMR-Spektren ist von der spektralen Breite SW und der Anzahl der Datenpunkte N abhängig. Es kann gemäß (6) auch ein Zusammenhang zur Akquisitionszeit t_{AQ} hergestellt werden.

$$DR = \frac{SW}{N} = \frac{1}{t_{AQ}} [Hz] \quad (6)$$

Die digitale Auflösung gibt an, bis zu welcher Linienbreite Signale getrennt werden können. Sie kann nur durch die Erhöhung der Aufnahmepunkte gesteigert werden. Hierbei sollte möglichst ein Kompromiss zwischen ausreichender Auflösung und Experimentdauer gefunden werden. Durch die Erhöhung der Akquisitionszeit wird die Auflösung in der Praxis meist nicht gesteigert, da bei längeren Aufnahmezeiten meist nur noch Rauschen und kaum noch Information aufgenommen wird (Zerbe & Jurt, 2014).

Bei der Anwendung von *zero filling* wird der FID durch künstliche Datenpunkte ohne Informationsgehalt verlängert. Dadurch kann die spektrale Auflösung der Spektren und somit die Darstellung der Feinstruktur von Signalen verbessert werden, ohne dass es zu einem Informationsgewinn kommt (Claridge, 2016). Durch das Hinzufügen der Datenpunkte ohne Informationsgehalt verringert sich zudem das Rauschen, sodass S/N bei der Verwendung von *zero filling* sinkt (Ebel *et al.*, 2006).

Linear prediction wird häufig zur Verlängerung von FIDs verwendet, deren Funktion in der Akquisitionszeit nicht auf null abgeklungen ist. Die fehlenden Datenpunkte werden dabei aus den bereits aufgenommenen vorhergesagt, indem ihr Wert aus einer Linearkombination der vorangehenden Werte geschätzt wird. Aus diesem Grund sollte die Anzahl der Komponenten im Spektrum zur möglichst exakten Bestimmung der Anzahl der Elemente der Linearkombination angegeben werden (Claridge, 2016). Durch die Anwendung von *linear prediction* können Artefakte im Spektrum erfolgreich reduziert werden. Die Methode kann im HSQC-Experiment für beide Dimensionen angewandt werden. Optimale Ergebnisse wurden mit einer Verdoppelung und Vervierfachung der aufgenommenen Datenpunkte erzielt. Bei Anwendung in der indirekten Dimension kann es aber unter Umständen zur Verringerung der spektralen Auflösung kommen (Reynolds *et al.*, 1997).

Über die Einstellung mathematischer Gewichtungsfunktionen, den sogenannten *window functions*, können unterschiedliche Bereiche des FIDs durch die Multiplikation mit der entsprechenden Funktion gewichtet werden. Dabei können die Empfindlichkeit oder die spektrale Auflösung, nie aber beides gleichzeitig, verbessert werden. Durch eine starke Gewichtung des Anfangsteils eines FIDs wie beispielsweise durch die Multiplikation mit Exponentialfunktionen wird die Empfindlichkeit gesteigert, aber auch Linienverbreiterung verstärkt. Die spektrale Auflösung kann durch Verstärkung des hinteren Teils des FIDs verbessert werden, indem Glockenfunktionen oder Lorentz-Gauß-Funktionen angewendet werden. Beide Funktionen können durch die Einstellung des Startpunkts bzw. der Einstellung des Maximums individuell auf den jeweiligen FID angepasst werden (Becker *et al.*, 1979; Claridge, 2016). In der Praxis kommen beide Ansätze bei der Prozessierung von HSQC-Spektren zum Einsatz, wobei auch unterschiedliche Gewichtungsfunktionen in den beiden Dimensionen möglich sind (Bøjstrup *et al.*, 2013).

Für alle aufgenommenen 1D- und 2D-NMR-Spektren wurden eine manuelle Phasenkorrektur sowie eine automatische Basislinienkorrektur durchgeführt. Als Referenzsubstanz diente Aceton mit einer chemischen Verschiebung in D₂O von 2,22 ppm für ¹H und 30,89 ppm in der ¹³C-Dimension (Gottlieb *et al.*, 1997). Der Einfluss von *zero filling*, *linear prediction* und unterschiedlichen *window functions* auf die optimierten Methoden wird in 4.1.2.2 beschrieben.

3.5 Validierung und Statistik

Die optimierten Methoden wurden mithilfe verschiedener Validierungsparameter bewertet, wobei Normalverteilung und Varianzenhomogenität jeweils angenommen wurde. Zur Überprüfung der

Linearität der Kalibrierung wurde ein Linearitätstest nach Mandel durchgeführt. Die Güte der Kalibrierfunktion wurde u.a. über die Betrachtung des Korrelationskoeffizienten bewertet. Er gibt ein Maß für die Güte der verwendeten Anpassungsfunktion an. Ein Wert von 1,0000 zeigt an, dass das gewählte mathematische Modell optimal zu den experimentell ermittelten Werten passt. Zur Beurteilung der Güte einer Kalibrierung reicht dieser Parameter allerdings nicht aus, da auch durch eine zufällige Verteilung der Messwerte Korrelationskoeffizienten nahe 1,0000 erreicht werden können. Die relative Verfahrensstandardabweichung oder Verfahrensvariationskoeffizient gibt die Streuung der Messwerte um die Anpassungsfunktion, normiert auf die Mitte des Arbeits- und Konzentrationsbereichs, in Prozent an. Der Parameter kann zur Beurteilung der Präzision der Messreihe genutzt werden. Zusätzlich wurde die absolute Steigung der Kalibrierfunktionen betrachtet. Ihre Größe gilt als Maß für die Empfindlichkeit einer Messung. Die Güte vorliegender Kalibrierfunktionen wurde durch die Betrachtung der Parameter Korrelationskoeffizient, Steigung und relative Verfahrensstandardabweichung in Kombination beurteilt.

Die Messungen zur Bestimmung der Präzision erfolgten exemplarisch an einer 1D-NOESY-Methode, an einer HSQC-Methode (zwei Scans, 1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen, D_1 -Delay von 1,5 s und 50 % NUS), an einer ASAP-HSQC-Methode (zwei Scans, 1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen, 50 % NUS) sowie an den in 4.2.1. optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden. Zur Überprüfung der Messpräzision wurde die gleiche Kalibrierreihe in Dreifachbestimmung direkt hintereinander am identischen Spektrometer gemessen und der Variationskoeffizient der Integrale ermittelt. Zur Beurteilung der Stabilität der Messungen wurden diese Dreifachmessungen mit Aliquoten einer gleich konzentrierten, frisch hergestellten Messlösung im Abstand von ein bis zwei Wochen wiederholt. Für die 1D-NOESY-Methode sowie die HSQC-Methode wurde aus sechs Messreihen und für die ASAP-HSQC-Methoden aus drei Messreihen die zeitliche Stabilität der Messmethode als arithmetisches Mittel der einzelnen Messpräzisionen bestimmt.

Zur Überprüfung der Stabilität der Kalibrierlösungen im Zuge der Validierung zeitoptimierter Methoden wurde eine Kalibrierreihe fünfzehn Tage jeden zweiten Tag mit einer HSQC-Methode vermessen. Nach fünfzehn Tagen erfolgten Messungen noch zusätzlich an Tag 22 und Tag 36 nach Herstellung der Lösungen. Die Lösungen wurden zwischen den Messungen bei 4 °C gelagert. Bei der Betrachtung der Stabilität der Kalibrierlösungen unter Anwendung auflösungsoptimierter Methoden wurden die Lösungen nach einer dreitägigen Lagerung bei 4 °C erneut analysiert.

Für alle Methoden wurden Nachweisgrenzen (NG) und BG gemäß der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 bestimmt. Hierbei wurde eine Kalibriergerade in Nähe der NG und BG durchgeführt und dadurch auf die Unsicherheit des Leerwerts geschlossen. Diese Methode wird verwendet, wenn keine geeignete Leermatrix vorhanden ist. Dadurch kann die NG als kleinste nachweisbare Analytkonzentration und die BG als kleinste quantifizierbare Analytkonzentration bestimmt werden (DIN 32645, 2008).

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden die Ergebnisse der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden u.a. den Ergebnissen validierter Referenzmethoden sowie von Vergleichsmethoden aus der Literatur gegenübergestellt. Dazu zählen die in 3.3 beschriebenen Methoden Enzymatik, HPAEC-PAD und GC-FID. Alle auf einer Milchmatrix basierenden Proben sowie die Proben zur Analyse der RFO wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Die mit Isomaltulose gesüßten Produkte, die im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf bearbeitet wurden, wurden mit den jeweils möglichen Vergleichsmethoden in Doppelbestimmung durchgeführt. Alle NMR-spektroskopischen Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Zur statistischen Beurteilung der Messwerte, die mit den verschiedenen Methoden generiert wurden, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) in Verbindung mit einem *post-hoc* Tukey-Test in OriginPro 2019 angewandt.

Zur weiteren Überprüfung der Methoden und der Probenaufarbeitung auf Richtigkeit wurden Aufstockungsversuche mit den entsprechenden Analyten durchgeführt. Dabei wurde die Hälfte der Probeneinwaage verwendet und die in der Matrix enthaltenen Analyten so aufgestockt, dass ihre Konzentration wieder dem Gehalt der gesamten Probeneinwaage entspricht. Nicht in der Matrix enthaltene Analyten des Analytgemischs 1 wurden so hinzugefügt, dass ihre Konzentrationen in der Mitte des Arbeitsbereichs der Methoden liegen (siehe 8.2). Die Wiederfindung durch Aufstockung wurde dabei in Prozent als Verhältnis zwischen analysiertem und theoretisch vorkommendem Gehalt berechnet. Für die Analyten, die in der zu untersuchenden Matrix enthalten sind, wurde der Analytgehalt aus der Probe anhand der bestimmten Gehalte mit der jeweiligen Methode zum hinzugefügten Gehalt während der Aufstockung aufaddiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Optimierung und Anwendung messzeitreduzierter NMR-Methoden zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide

Für die Etablierung messzeitreduzierter NMR-spektroskopischer Methoden wurde die Optimierung der Methoden an einem Gemisch lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide durchgeführt. Zu den enthaltenen Analyten gehören die Monosaccharide Glucose, Galactose und Fructose sowie die Disaccharide Saccharose, Lactose und Maltose. Die Mischung der genannten Analyten wird im Verlauf dieser Arbeit als Analytgemisch 1 bezeichnet. Als interne Standardsubstanz wurde das Monosaccharid Allose verwendet. Allose zeigt einige Signale im HSQC-Spektrum, die isoliert vorliegen und zur Quantifizierung genutzt werden können. Das Monosaccharid zeigt ein ähnliches physikochemisches Verhalten wie die Analyten und könnte deshalb zur Überprüfung der verwendeten Probenaufbereitungsmethoden geeignet sein. Aufgrund der Anwendung der Methoden auf Milch und Milchprodukte werden für alle Analyten Signale ausgewählt, die nicht mit den Signalen von Lactulose überlagern. Da Lactulose in geringen Mengen in wärmebehandelter Milch und wärmebehandelten Milchprodukten enthalten sein kann, wird durch die Auswahl Lactulose-unabhängiger Signale einer Beeinflussung der Quantifizierung vorgebeugt. Dies ist vor allem bei der Quantifizierung von Lactose entscheidend, da viele NMR-Signale von Lactose und Lactulose aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit überlappen oder benachbart vorliegen. Proben des Analytgemischs 1 werden im Konzentrationsbereich von 1,0 g/L bis 10,0 g/L in fünf Konzentrationsschritten (1,0 g/L, 2,5 g/L, 5,0 g/L, 7,5 g/L und 10,0 g/L) analysiert. Die Konzentration 1,0 g/L wurde als minimale Konzentration des Arbeitsbereichs ausgewählt, da im Rahmen von Vorversuchen in den Spektren niedriger konzentrierter Proben einige Analytsignale nicht mehr detektiert wurden.

Abbildung 4-1 zeigt ^1H -NMR-Beispielspektren der Analyten Glucose, Galactose, Allose, Saccharose und Lactose. Die chemischen Verschiebungen der ausgewählten Signale im ^1H -NMR-Spektrum sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Für Galactose wurde ein isoliertes Signal bei 5,25 ppm (Gal-1) identifiziert. Saccharose weist unter Abwesenheit von Maltulose und Isomaltulose ein getrenntes Signal bei 4,20 ppm (Sacc-1) auf. Das in Abbildung 4-1 zudem isoliert vorliegende Signal bei 5,40 ppm wird durch ein Maltosesignal überlagert, das im Beispielspektrum nicht dargestellt ist. Daher kann dieses Signal (5,40 ppm) nicht zur Auswertung verwendet werden, wenn Maltose in dem zu analysierenden Lebensmittel vermutet wird. Lactose zeigt im ^1H -NMR-Spektrum zwei potentiell auszuwertende Signale (3,28 ppm und 4,45 ppm, siehe Abbildung 4-1). Das Signal mit einer chemischen Verschiebung von 3,28 ppm (Signal Lac-1a) überlagert zum Teil mit dem benachbarten Glucosesignal (siehe Abbildung 4-1) sowie unter Anwesenheit von Maltose mit einem seiner Signale. Der entstehende Fehler durch die teilweise Überlagerung von Lac-1a mit dem benachbarten Glucosesignal kann bewertet und die

beiden Signale zur Quantifizierung von Lactose bzw. Glucose in maltosefreien Matrices genutzt werden. Das zweite Lactosesignal Lac-1b zeigt keine ausreichende Trennung zu Signalen von Lactulose. Bei der Quantifizierung von Lactose über dieses Signal muss daher mit einer Beeinflussung durch den möglichen Lactulosegehalt in Milch und Milchprodukten gerechnet werden, insbesondere wenn diese stark erhitzt wurden. Bei der Verwendung von Allose als interne Standardsubstanz eignet sich das Signal All-1 mit der chemischen Verschiebung von 5,14 ppm aufgrund seiner isolierten Lage im Spektrum. Für Fructose und Maltose wurde kein ausreichend isoliert vorliegendes Signal im ^1H -NMR-Spektrum identifiziert.

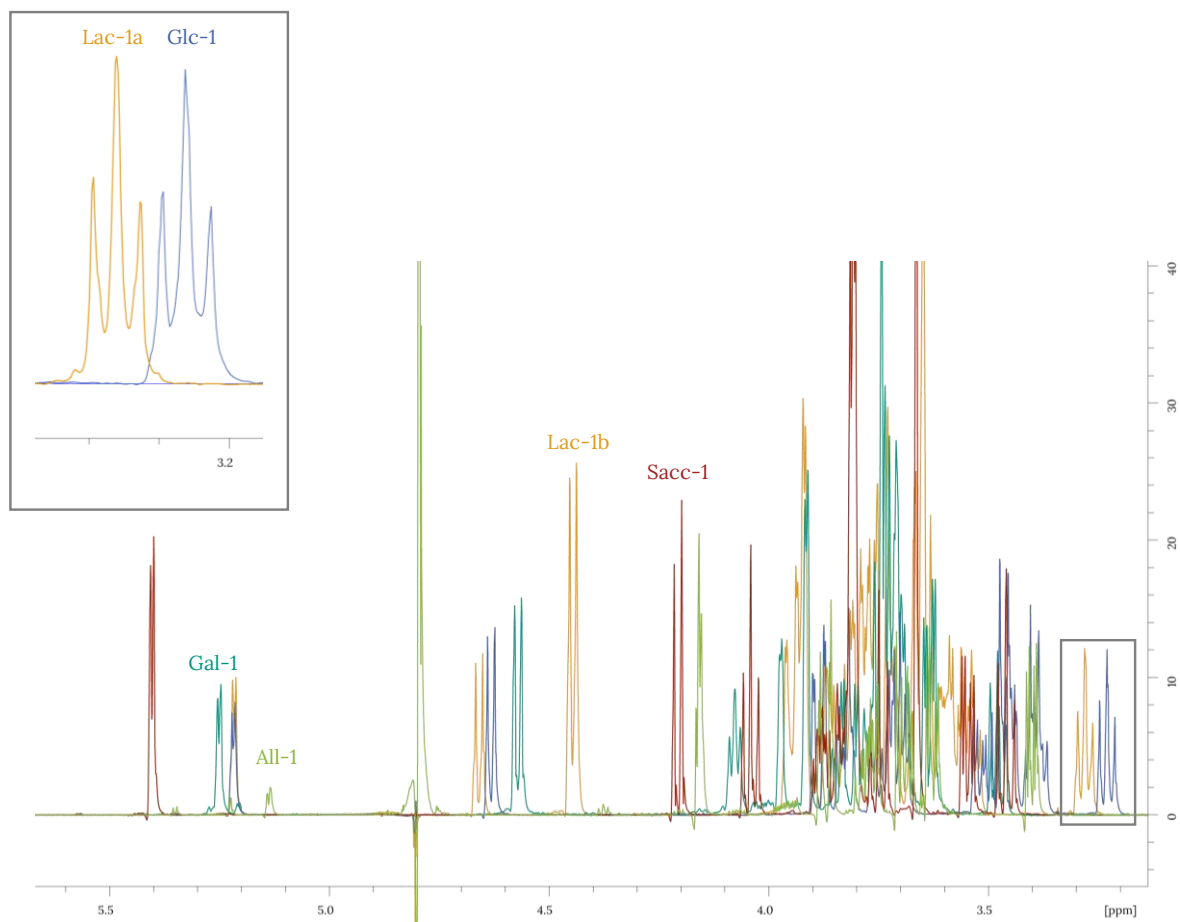


Abbildung 4-1: Protonenspektren der Kernspinresonanzspektroskopie wässriger Lösungen der Kohlenhydrate D-Glucose (Glc, dunkelblau), D-Galactose (Gal, türkis), D-Allose (All, grün), Saccharose (Sacc, rot) und Lactose (Lac, orange), die überlagert dargestellt sind. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen sind in Tabelle 4-1 einzusehen.

Im HSQC-Spektrum wurde für alle ausgewählten Analyten mindestens ein isoliertes Signal identifiziert (siehe Tabelle 4-1 sowie Abbildung 4-2). Während für Lactose und Glucose nur jeweils ein isoliertes Signal ausgewählt werden konnte, zeigten die übrigen Analyten mehrere ausreichend aufgelöste Signale. Zur Vereinfachung der Auswertung wurde bei mehreren, möglichen Signalen für einen Analyten nur ein spezifisches Signal ausgewählt. Bei der Signalauswahl von Monosacchariden wurden

isoliert vorliegende Signale des in wässriger Lösung vorliegenden Hauptanomers aufgrund der höheren Signalintensitäten bevorzugt. Auch bei der Betrachtung potentieller Signale von Disacchariden wurden bevorzugt Signale hoher Intensitäten ausgewählt.

Tabelle 4-1: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im eindimensionalen Protonenspektrum ($^1\text{H-NMR}$ -Methode) sowie in einem Spektrum eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments für die Durchführung der Methodenoptimierung sowie für die Quantifizierung der Analyten in Milch und Milchprodukten. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monosaccharideinheit gegeben. Bei Disacchariden wird zusätzlich die Monomereinheit genannt. Die angegebene Signalbezeichnung wird zur Beschreibung der Signale im Verlauf dieser Arbeit verwendet. Die genauen Positionen der Signale sind zusätzlich in Tabelle 9-6 und Tabelle 9-7 einzusehen. Glc: D-Glucose, Gal: D-Galactose, Fru: D-Fructose, All: D-Allose; Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, r: reduzierend

Analyt	$^1\text{H-NMR}$ -Methode		HSQC-Methode		
	Signalbezeichnung	δ ^1H [ppm]	Signalbezeichnung	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
D-Glucose	Glc-1: H2 $_{\beta}$ (p)	3,23	Glc-2: C3H3 $_{\beta}$ (p)	3,47	76,47
D-Galactose	Gal-1: H1 $_{\alpha}$ (p)	5,25	Gal-2: C1H1 $_{\beta}$ (p)	4,58	97,14
D-Fructose	-	-	Fru-2: C3H3 $_{\beta}$ (f)	4,10	75,05
D-Allose	All-1: H1 $_{\alpha}$ (p)	5,14	All-2: C4H4 $_{\beta}$ (p)	3,63	67,52
Saccharose	Sacc-1: Fru-H3	4,20	Sacc-2: Glc-C1H1	5,40	92,78
Lactose	Lac-1a: Glc-H2 $_{\beta}$	3,28	Lac-2: Glc-C5H5	3,65	78,90
	Lac-1b: Gal-H1	4,45			
Maltose	-	-	Mal-2: Glc $_r$ -C1H1 $_{\alpha}$	5,39	100,14

Zur Anwendung der Methoden auf mit Isomaltulose gesüßte Produkte wurde das Analytspektrum von Analytmisch 1 zusätzlich um Isomaltulose und die beiden internen Standardsubstanzen Rhamnose und Maltulose erweitert. Der Kalibrierbereich wurde im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf für diese Mischung aus Analyten festgelegt und liegt bei dieser Anwendung zwischen 1,0 g/L und 15,0 g/L mit der Analyse von sechs gleichmäßig über den Bereich verteilten Konzentrationen (Ruf, 2020). Die Basis der Signale sowie die Signalintegrale in den Spektren nehmen entsprechend der Konzentration deutlich zu, können aber aufgrund der Auswahl isolierter Signale bis zu einer Konzentration von 20 g/L pro Analyten problemlos integriert werden. Die Wahl der oberen Grenze des Arbeitsbereichs wurde vor allem durch die Viskosität der Lösung bestimmt. Je nach Anzahl der zu quantifizierenden Analyten sind die Lösungen sehr viskos und dadurch schlechter während der Aufarbeitung zu handhaben.

In einem ^1H -NMR-Spektrum wurde für die Analyten Glucose, Galactose, Rhamnose, Lactose, Isomaltulose und Maltulose charakteristische Signale im ^1H -NMR-Spektrum identifiziert (siehe Tabelle 4-2 und Abbildung 9-1). Das Saccharosesignal Sacc-3 kann nur verwendet werden, wenn die zu untersuchende Matrix keine Maltose enthält, da Sacc-3 von einem Maltosesignal überlagert wird. Im HSQC-Spektrum wurden für Glucose, Galactose und Maltose identische Signale zur HSQC-Anwendung, die zur Quantifizierung der Analyten in Milch und Milchprodukten optimiert wird, ausgewählt. Für die Analyten Fructose, Saccharose und Lactose wurden abweichende Signale identifiziert (siehe Abbildung 4-2 und Tabelle 4-2). Im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf wurde der Einfluss der Auswertung verschiedener Isomaltulosesignale auf die Quantifizierung beurteilt (Ruf, 2020).

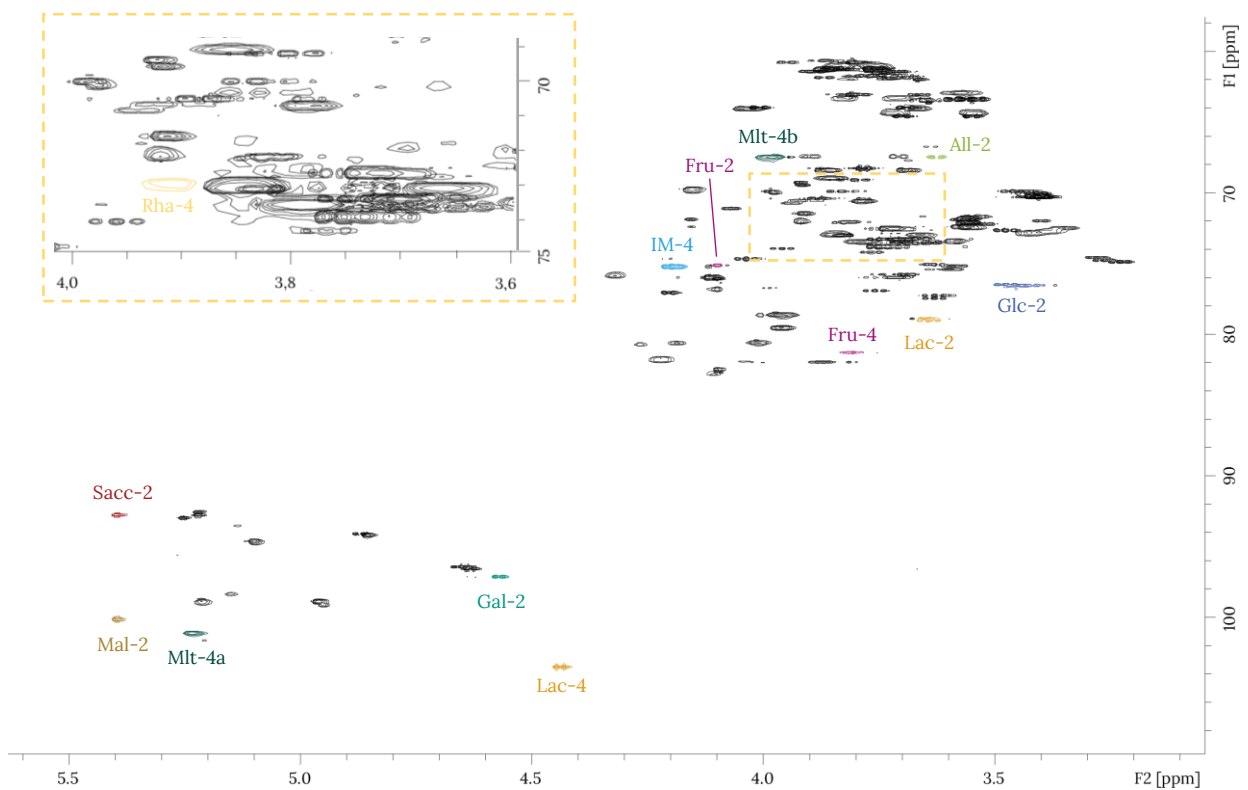


Abbildung 4-2: Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektrum (Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 , $D_1=1,5$ s) einer wässrigen Lösung der Kohlenhydrate D-Glucose (Glc, dunkelblau), D-Galactose (Gal, türkis), D-Fructose (Fru, violett), D-Allose (All, grün), L-Rhamnose (Rha, gelb), Saccharose (Sacc, rot), Lactose (Lac, orange), Isomaltulose (IM, hellblau) und Maltulose (Mlt, dunkelgrün). Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen sind in Tabelle 4-2 einzusehen.

Tabelle 4-2: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im eindimensionalen Protonenspektrum ($^1\text{H-NMR-Methode}$) sowie in einem Spektrum eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Experiments für die Quantifizierung der Analyten in mit Isomaltulose gesüßten Produkten. Zudem werden Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monosaccharideinheit gegeben. Bei Disacchariden wird zusätzlich die Monomereinheit genannt. Die angegebene Signalbezeichnung wird zur Beschreibung der Signale im Verlauf dieser Arbeit verwendet. Die genauen Positionen der Signale sind zusätzlich in Tabelle 9-8 und Tabelle 9-9 einzusehen. Glc: D-Glucose, Gal: D-Galactose, Fru: D-Fructose, Rha: L-Rhamnose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, IM: Isomaltulose, Mlt: Maltulose, r: reduzierend

Analyt	$^1\text{H-NMR-Methode}$		HSQC-Methode		
	Signalbezeichnung	δ ^1H [ppm]	Signalbezeichnung	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
D-Glucose	Glc-1: H2 $_{\beta}$ (p)	3,23	Glc-2: C3H3 $_{\beta}$ (p)	3,47	76,47
D-Galactose	Gal-3: H1 $_{\beta}$ (p)	4,58	Gal-2: C1H1 $_{\beta}$ (p)	4,58	97,14
D-Fructose	-	-	Fru-4: C5H5 $_{\beta}$ (f)	3,81	81,26
L-Rhamnose	Rha-3: H1 $_{\alpha}$ (p)	5,10	Rha-4: C2H2 $_{\beta}$ (p)	3,92	71,99
Saccharose	Sacc-3: Glc-H1	5,40	Sacc-2: Glc-C1H1	5,40	92,78
Lactose	Lac-1b: Gal-H1	4,45	Lac-4: Gal-C1H1	4,45	103,62
Maltose	-	-	Mal-2: Glc $_{\gamma}$ -C1H1 $_{\alpha}$	5,39	100,14
Isomaltulose	IM-3: Glc-H1 $_{\alpha\beta}$	4,96	IM-4: Fru-C4H4 $_{\beta}$	4,20	75,17
Maltulose	Mlt-3: Fru-H3 $_{\beta}$ (f)	4,32	Mlt-4a: Glc-C1H1 (Fru $_{\beta}$ (p))	5,23	101,11
			Mlt-4b: Fru-C3H3 $_{\beta}$ (p)	3,98	67,46

4.1.1 $^1\text{H-NMR-Methoden}$

Aufgrund der geringen Messzeiten von $^1\text{H-NMR-Experimenten}$ können 64 Scans in einer praktikablen Analysenzeit von wenigen Minuten aufgenommen werden, wodurch eine ausreichende Empfindlichkeit der Methode erreicht wird. Im Rahmen der Optimierung wurden zwei verschiedene Pulssequenzen auf ihre Anwendbarkeit getestet: zum einen ein durch Verringerung des Anregungswinkels auf 30° beschleunigtes $^1\text{H-NMR-Experiment}$ (zg30) und zum anderen eine 1D-NOESY-Pulssequenz mit entsprechender Wasserunterdrückung. Die große Wasserbande im Spektrum des zg30-Experiments beeinflusste die Integration benachbarter Signale, sodass lediglich eine Quantifizierung der Signale Lac-1a und Glc-1 möglich war. Da diese Signale zudem leicht miteinander überlappen, scheint die Anwendung des Experiments zur Quantifizierung einer großen Anzahl an Mono- und Disacchariden nicht sinnvoll und wurde aus diesem Grund nicht weiterverwendet.

Die 1D-NOESY-Pulssequenz zeigt durch den verwendeten Sättigungspuls eine Unterdrückung des Wassersignals bei ca. 4,70 ppm. Während der Messungen wurde jedoch eine Verschiebung des Wassersignals in den Spektren beobachtet, sodass keine vollständig reproduzierbare Wasserunterdrückung durchgeführt wurde. Somit besteht die Möglichkeit einer Beeinflussung von Signalen in der Umgebung des Wassersignals, was im weiteren Verlauf der Optimierung genauer gezeigt und berücksichtigt wurde.

Um quantitative Messungen möglichst beschleunigt durchführen zu können, wurde der Einfluss der Länge des D_1 -Delays auf die Integrale der Analytsignale untersucht. Hierfür wurden 1D-NOESY-Messungen von Analytgemisch 1 mit D_1 -Delays der Längen 2,0 s, 4,0 s, 6,0 s und 8,0 s in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die ermittelten longitudinalen Relaxationszeiten der Analyten in Analytgemisch 1 liegen zwischen 1,0 s (Saccharose) und 2,1 s (Glucose, siehe Tabelle 9-5). Der längste D_1 -Delay von 8,0 s orientiert sich an der vierfachen Länge der Relaxationszeit von Glucose, die in dem Gemisch den am langsamsten relaxierenden Kern darstellt. Die Mittelwerte der Integrale, die bei der Durchführung von 1D-NOESY-Experimenten mit unterschiedlichen D_1 -Delays in Dreifachbestimmung ermittelt wurden, wurden mithilfe einer ANOVA ($\alpha=0,05$, *post-hoc* Tukey-Test) statistisch bewertet (siehe Tabelle 9-10).

Die Mittelwerte der Integrale der Signale Lac-1a, Lac-1b und Gal-1 sind für alle Konzentrationen statistisch gleichwertig unabhängig von der Länge des D_1 -Delays (siehe Abbildung 9-2 und Tabelle 9-10). Die Kalibrierfunktionen unter Verwendung von Lac-1a weisen Korrelationskoeffizienten größer 0,9982, relative Verfahrensstandardabweichungen kleiner 5,6 % und einen Variationskoeffizient der Steigungen von 5,0 % über alle Messungen der Dreifachbestimmung (siehe Tabelle 9-11) auf. Die Parameter der Anpassungsfunktionen des Signals Lac-1b weisen auf eine schlechtere Güte der Kalibrierfunktionen, insbesondere mit relativen Verfahrensstandardabweichungen von bis zu 12,3 %, hin (siehe Tabelle 9-12). Lactose kann somit mit einem kürzeren D_1 -Delay von 2,0 s analysiert werden. Ob das Signal Lac-1a aufgrund der höheren Güte der Anpassungsfunktionen bei der Quantifizierung von Lactose in Matrix verwendet wird, sollte im Einzelfall entschieden werden. Durch die Überlappung von Lac-1a mit Glc-1 kann die Quantifizierung besonders bei hohen Glucosegehalten beeinflusst werden. Bei der Verwendung von Lac-1b hingegen kann es zur Beeinflussung der quantifizierten Lactosegehalte aufgrund der Überlagerung des Signals Lac-1b mit Lactulosesignalen kommen.

Die Standardabweichungen der Integrale des Signals Gal-1 weisen hohe Werte auf (siehe Abbildung 9-2), was auf eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Messungen hindeuten könnte. Bei Betrachtung der Kalibrierfunktionen liefern einige Messreihen Funktionen mit zufriedenstellenden Ergebnissen, während die Fitfunktionen anderer Messreihen mit Korrelationskoeffizienten von 0,2365, negativen Steigungen und relativen Verfahrensstandardabweichungen von über 280 % zur Quantifizierung nicht geeignet sind (siehe Tabelle 9-13). Der Einfluss des D_1 -Delays auf die Integralgröße des Signals

Gal-1 kann daher nicht untersucht werden. Die nicht reproduzierbare Wasserunterdrückung könnte die Signale beeinflussen und somit auch für die schwankenden Integrale verantwortlich sein.

Die Mittelwerte der Integrale des Signals Glc-1, die durch 1D-NOESY-Experimente mit einem D_1 -Delay von 2,0 s ermittelt wurden, weichen in der Probe der Konzentration 2,5 g/L signifikant zu den Mittelwerten der Integrale ab, die bei der Durchführung von Experimenten mit den höheren D_1 -Delays von 4,0 s, 6,0 s und 8,0 s erhalten wurden (siehe Tabelle 9-10). In der Probe der Konzentration 5,0 g/L wurden signifikante Abweichungen zwischen den Ergebnissen ermittelt, die in 1D-NOESY-Experimenten mit $D_1=2,0$ s und den längeren D_1 -Delays von 6,0 s und 8,0 s bestimmt wurden. Die Integrale der restlichen Proben zeigen gleichwertige Mittelwerte unabhängig von der Länge des D_1 -Delays (siehe Tabelle 9-10 und Abbildung 4-3). In der Güte der Kalibrierfunktionen wurden keine Unterschiede zwischen den Messreihen beobachtet. Die Fitfunktionen zeigen ausreichende Korrelationskoeffizienten größer 0,9987 sowie relative Verfahrensstandardabweichungen kleiner als 5,0 % (siehe Tabelle 9-14). Aufgrund der Bestimmung statistisch kleinerer Integrale durch das 1D-NOESY-Experiment mit einem D_1 -Delay von 2,0 s auf zwei Konzentrationsniveaus der Kalibrierung, sollte die Quantifizierung von Glucose mit einem D_1 -Delay von mindestens 4,0 s durchgeführt werden.

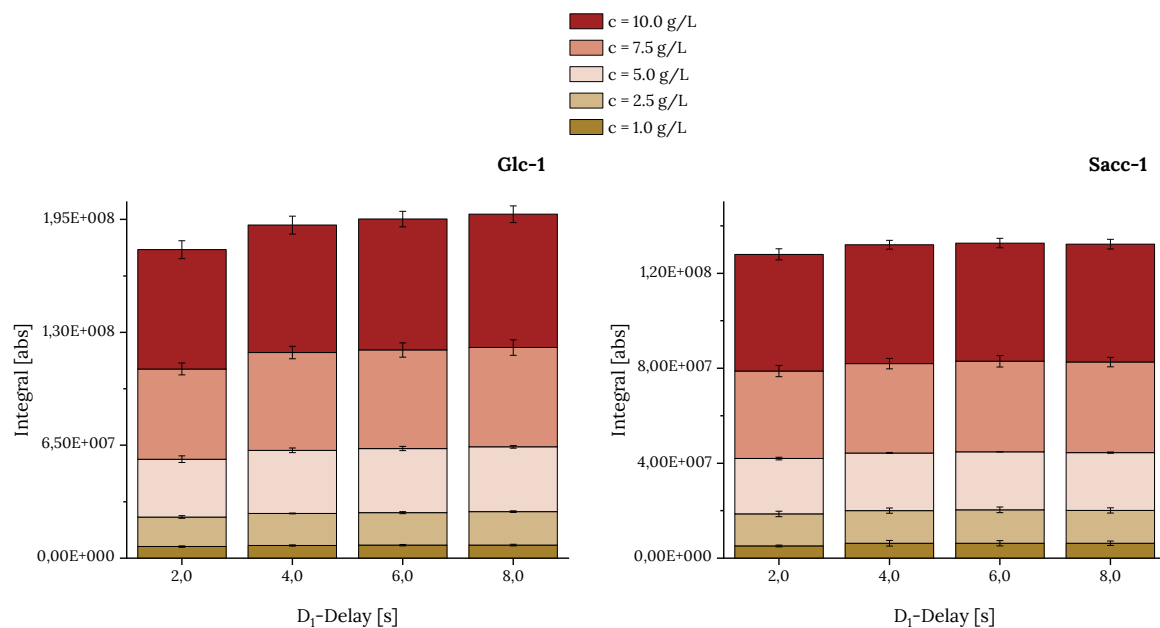


Abbildung 4-3: Einfluss der Länge des D_1 -Delays auf die Integrale der Analyten D-Glucose (Glc) und Saccharose (Sacc) bei der Durchführung eines eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiments mit der Pulssequenz „noesygppr1d“ und 64 Scans. Die Messungen wurden für jede Konzentration (c) in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben. Details zu den verwendeten Signalen Glc-1 und Sacc-1 können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Bei der Durchführung des 1D-NOESY-Experiments und einem D_1 -Delay von 2,0 s anhand der Probe der Konzentration 5,0 g/L wurde ein statistisch kleinerer Mittelwert der Integrale des Signals Sacc-1, verglichen zu den Mittelwerten der Experimente mit den höheren D_1 -Delays von 4,0 s, 6,0 s und 8,0 s, ermittelt. Für die übrigen Konzentrationsniveaus wurden keine statistischen Abweichungen der Mittelwerte beobachtet, die durch Experimente mit unterschiedlichen D_1 -Delays ermittelt wurden. Die Güte der Kalibrierfunktionen wurde für die Experimente aller getesteten D_1 -Delays als ausreichend bewertet (Korrelationskoeffizienten größer 0,9967, relative Verfahrensstandardabweichungen kleiner 7,8 %, siehe Tabelle 9-15). Da statistisch abweichende Integrale lediglich auf einem Konzentrationsniveau ermittelt wurden, wird die mögliche Quantifizierung von Saccharose mithilfe von 1D-NOESY-Experimenten mit einem D_1 -Delay von 2,0 s nicht gänzlich ausgeschlossen. Die Anwendbarkeit der Methode für die Quantifizierung von Saccharose wurde während des Methodenvergleichs weiter untersucht.

Um die Anwendbarkeit von Alloose als interne Standardsubstanz bei der Durchführung von 1D-NOESY-Experimenten mit verkürzten D_1 -Delays zu überprüfen, wurde der Einfluss der Verwendung dieser verkürzten Experimente auf die Integrale des Allosesignals All-1 untersucht. Alloose wurde zu jeder Kalibrierlösung in gleicher Konzentration ($c=5,0$ g/L) zugegeben, sodass für alle Kalibrierlösungen Integrale gleicher Größe ermittelt werden sollten. Die Mittelwerte der Integrale, die mithilfe der 1D-NOESY-Experimente mit verschiedenen D_1 -Delays ermittelt wurden, sind gemäß den Ergebnissen der ANOVA statistisch gleichwertig (siehe Tabelle 4-3). Die Variationskoeffizienten der Mittelwerte, besonders die von Kalibrierlösung 1 und Kalibrierlösung 2, weisen allerdings sehr hohe Werte von bis zu 147 % auf. Bei genauer Betrachtung der Spektren, deren Integrale sich innerhalb der Dreifachbestimmung deutlich von den anderen unterscheiden und daher die hohen Variationskoeffizienten verursachen, zeigen sich unzureichende Wasserunterdrückungen, wie in Abbildung 4-4 links beispielhaft gezeigt. Auch in manchen Einzelspektren von Kalibrierlösung 4 sowie von Kalibrierlösung 5 lässt sich eine nicht reproduzierbare Wasserunterdrückung erkennen, deren Restwassersignal allerdings deutlich kleiner als bei der unzureichenden Unterdrückung in Kalibrierlösung 1 oder Kalibrierlösung 2 ist (siehe Abbildung 4-4 rechts). Die unvollständige Wasserunterdrückung in den Spektren von Lösung 4 und Lösung 5 könnte eine Ursache für die Variationskoeffizienten der Mittelwerte sein, die Werte zwischen 11,7 % und 35,0 % aufweisen (siehe Tabelle 4-3). Da All-1 in unmittelbarer Nachbarschaft zum unterdrückten Wassersignal liegt, wird das Integral von All-1 durch eine nicht reproduzierbare Wasserunterdrückung unabhängig von der Größe des Restwassersignals vermutlich beeinflusst. Die nicht reproduzierbare Wasserunterdrückung tritt unabhängig von der Länge des D_1 -Delays auf. In den Spektren von Kalibrierlösung 1 (Gal: $c=1,0$ g/L) und Kalibrierlösung 2 (Gal: $c=2,5$ g/L) zeigen zudem die Integrale des Signals Gal-1 hohe Variationskoeffizienten (siehe Abbildung 9-2). Der Einfluss auf die Integrale von Gal-1 scheint geringer zu sein als der Einfluss auf die Integrale von All-1, was durch die größere Entfernung zum Wassersignal erklärt werden kann. Aufgrund der Lage des Signals All-1 und in Ermangelung eines isoliert vorliegenden Alternativsignals kann Alloose nicht als interne

Standardsubstanz bei der Durchführung der 1D-NOESY-Methode verwendet werden. Nicht reproduzierbare Wasserunterdrückungen in 1D-NOESY-Spektren beeinflussen zudem, wie oben beschrieben, das Signal Gal-1, sodass eine Quantifizierung von Galactose mithilfe der Methode nicht sinnvoll erscheint.

Bei der Erweiterung des Analytenspektrums um Isomaltulose wurden Rhamnose und Maltulose als weitere mögliche interne Standardsubstanzen identifiziert. Das Rhamnosesignal Rha-3 würde aufgrund seiner Lage bei 5,10 ppm vermutlich auch durch eine nicht reproduzierbare Wasserunterdrückung beeinflusst werden. Das isoliert vorliegende Maltulosesignal Mlt-3 (4,32 ppm) könnte vermutlich verwendet werden. Das Signal Mlt-3 befindet sich im Spektrum nahe der Signale Lac-1b und Sacc-1, die durch die unzureichenden Wasserunterdrückungen nicht beeinflusst wurden. Zudem wird keines der zur Auswertung ausgewählten Analytsignale durch Maltulosesignale überlagert. Da Maltulose jedoch erst nach Beendigung des größten Teils der Messungen als geeignete interne Standardsubstanz identifiziert wurde, wurden die quantitativen Bestimmungen mithilfe der 1D-NOESY-Methode im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter Anwendung einer externen Kalibrierung und ohne die Verwendung einer internen Standardsubstanz durchgeführt.

Tabelle 4-3: Mittelwerte (MW) der Integrale des Analyten D-Allose (Signal All-1, siehe Tabelle 4-1), die bei der Durchführung von eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experimenten mit der Pulssequenz „noesygprr1d“, 64 Scans und verschiedenen D_1 -Delays ermittelt wurden. Die D-Allosekonzentration der Kalibrierlösungen K1 bis K6 beträgt jeweils 5,0 g/L. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Beurteilung der Präzision werden die Variationskoeffizienten der Mittelwerte angegeben. Zudem wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) für die Mittelwerte der Integrale durchgeführt. Die Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (hier nicht vorkommend).

Probe		$D_1=2,0$ s	$D_1=4,0$ s	$D_1=6,0$ s	$D_1=8,0$ s
K1	MW	10826682 ^A	13979894 ^A	25095913 ^A	25933478 ^A
	VK [%]	120,1	127,6	146,8	147,1
K2	MW	6090558 ^A	7214680 ^A	7406951 ^A	7398183 ^A
	VK [%]	71,1	77,8	75,4	75,0
K3	MW	3514916 ^A	3724157 ^A	4091582 ^A	4144130 ^A
	VK [%]	8,8	9,1	7,7	8,7
K4	MW	4120303 ^A	4334937 ^A	4779804 ^A	4846551 ^A
	VK [%]	19,8	18,3	14,3	11,7
K5	MW	4578187 ^A	4722394 ^A	4954065 ^A	4571900 ^A
	VK [%]	28,7	27,3	33,2	35,0

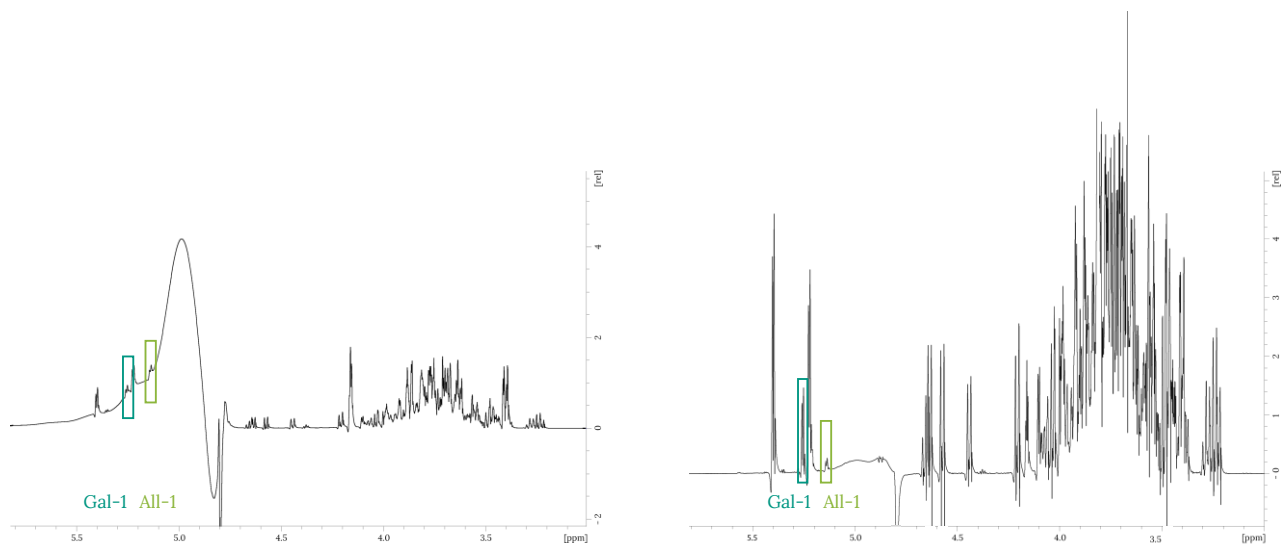


Abbildung 4-4: Beispielspektren von eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experimenten (Pulssequenzen „noesygppr1d“, 64 Scans, $D_1=2,0$ s). Dabei wird der Einfluss einer nicht reproduzierbaren Wasserunterdrückung auf die Signale der Analyten D-Galactose (Gal-1) und D-Allose (All-1) verdeutlicht (Signalauswahl siehe Tabelle 4-1). Links ist ein Spektrum von Kalibrierlösung 1 (Gal: $c=1,0$ g/L, All: 5,0 g/L) mit einem großen Restwassersignal (4,7-5,5 ppm) zu sehen. Rechts wird ein Spektrum mit kleinerem Restwassersignal von Kalibrierlösung 5 (Gal: $c=10,0$ g/L, All: 5,0 g/L) abgebildet.

4.1.2 HSQC-Methoden

4.1.2.1 Optimierung der Aufnahmeparameter

Zur Auswahl einer geeigneten HSQC-Pulssequenz für die Quantifizierung der Analyten in Analytgemisch 1 wurden drei Standardpulssequenzen verglichen, die in 3.4.3 näher beschrieben sind. In ihrer Experimentdauer unterscheiden sich die drei Pulssequenzen nicht voneinander. Im direkten Vergleich der Pulssequenzen zeigen sich für das Glucose- und das Fructosesignal kaum unterschiedliche Kalibrierfunktionen (siehe Abbildung 4-5). Die Steigungen der Anpassungsfunktionen für die mit der Pulssequenz „hsqcedetgp“ gemessenen Signale von Galactose, Saccharose und Maltose sind deutlich niedriger als die Steigungen der Anpassungsfunktionen für die Signale, die mit den beiden anderen Pulssequenzen gemessen wurden. Daher kann für die Messung von Galactose, Saccharose und Maltose mit der Pulssequenz „hsqcedetgp“ von einer verringerten Empfindlichkeit ausgegangen werden. Lediglich für das ausgewählte Lactosesignal ist die Steigung der Funktion, deren experimentelle Werte mit dem Pulsprogramm „hsqcedetgp“ gemessen wurden, maximal. Da die Empfindlichkeit der multiplizitätseditierten Pulssequenz „hsqcedetgp“ für einige Analyten somit geringer ist als bei der Verwendung der anderen Experimente, wird die Pulssequenz „hsqcedetgp“ nicht weiterverwendet.

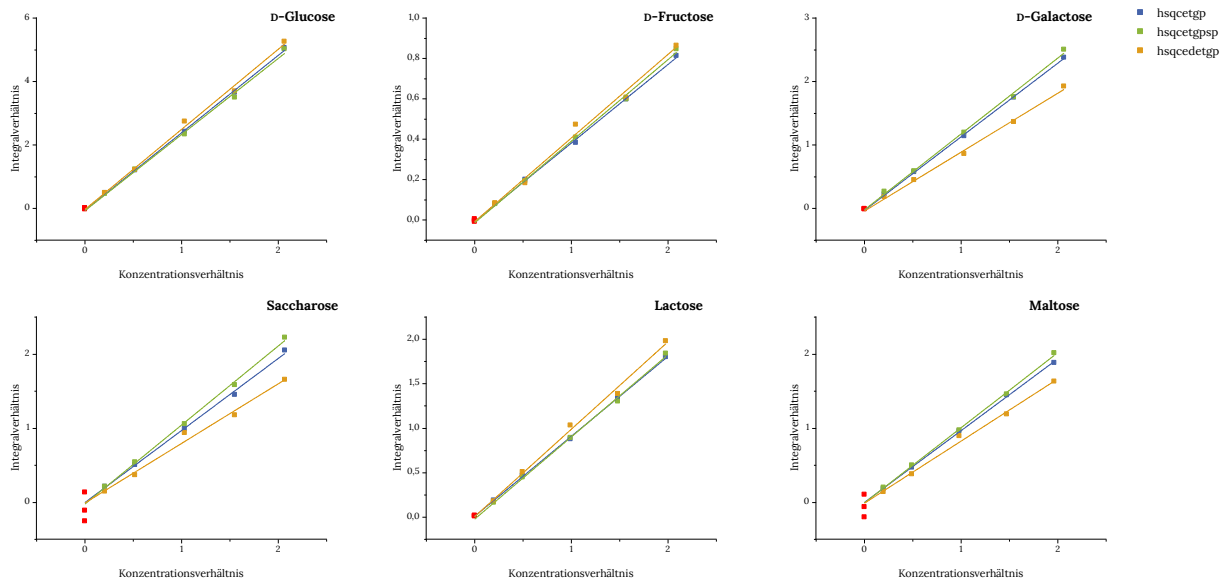


Abbildung 4-5: Vergleich der Kalibrierfunktionen der Analyten aus Analytgemisch 1, die mit folgenden *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Pulssequenzen analysiert wurden: „hsqcetgp“ (blau), „hsqcetgpp“ (grün) und „hsqcedetgp“ (orange). Die Auswertung erfolgte über Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messungen wurden mit zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 sowie einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Anhand des graphischen Vergleichs der Fitfunktionen zeigen sich zunächst nur geringe Unterschiede zwischen den ermittelten Funktionen der Pulssequenzen „hsqcetgp“ und „hsqcetgpp“. Werden die numerischen Daten der Kalibrierfunktionen (siehe Tabelle 4-4) verglichen, liegen die Steigungen der Funktionen, die aus „hsqcetgpp“-Experimenten und aus „hsqcetgp“-Experimenten erhalten wurden, in der gleichen Größenordnung. Die Korrelationskoeffizienten aller Messungen zeigen eine ausreichende Anpassung über die gewählte lineare Anpassungsfunktion. Auch die zufällige Verteilung der Residuen lässt die Anwendung einer linearen Anpassung geeignet erscheinen. Die relativen Verfahrensstandardabweichungen sind für alle Analyten bei den mittels „hsqcetgpp“-Experimenten gemessenen Kalibrierfunktionen deutlich größer und zeigen somit eine größere Streuung der Messwerte als unter Verwendung der Pulssequenz „hsqcetgp“ an. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Pulssequenz „hsqcetgp“ verwendet und als HSQC-Experiment bezeichnet.

Tabelle 4-4: Parameter zur Bewertung der Güte der Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der beiden *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Pulssequenzen „hsqcetgp“ und „hsqcetgpsp“ (zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 , $D_1=1,5$ s) erzeugt wurden. Die Auswertung erfolgte über Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2, Mal-2 und All-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung

Analyt	Pulssequenz	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
D-Glucose	hsqcetgp	2,44	0,9995	3,1
	hsqcetgpsp	2,40	0,9982	5,7
D-Fructose	hsqcetgp	0,39	0,9994	3,3
	hsqcetgpsp	0,40	0,9990	4,2
D-Galactose	hsqcetgp	1,16	0,9998	1,9
	hsqcetgpsp	1,19	0,9985	5,2
Saccharose	hsqcetgp	0,97	0,9989	4,3
	hsqcetgpsp	1,07	0,9991	4,1
Lactose	hsqcetgp	0,90	0,9997	2,2
	hsqcetgpsp	0,92	0,9990	4,2
Maltose	hsqcetgp	0,97	0,9998	2,1
	hsqcetgpsp	1,01	0,9995	2,9

Durch die Erhöhung der Inkrementanzahl in der indirekten Dimension wird die digitale Auflösung, aber auch die Messzeit von HSQC-Experimenten erhöht. Eine ausreichende digitale Auflösung ist essentiell, um Signale voneinander getrennt abbilden zu können. Bei einer Inkrementanzahl von 256 oder 512 Datenpunkten in der ^{13}C -Dimension werden die in Abbildung 4-6 gezeigten anomeren Signale in einem HSQC-Spektrum des Analytgemischs 1 nicht ausreichend aufgelöst. Erst bei der weiteren Verdopplung der Datenpunkte in F_1 auf 1024 werden die beiden Signale ausreichend voneinander abgegrenzt. Die Vervierfachung der Inkrementanzahl geht auch mit einer Vervierfachung der Experimentdauer einher. Die digitale Auflösung verbessert sich ebenfalls um das Vierfache von 98,3 Hz auf 24,6 Hz (siehe Tabelle 9-16). Um eine ausreichende digitale Auflösung in den HSQC-Messungen von Analytgemisch 1 zu gewährleisten, wird eine Inkrementanzahl in der indirekten Dimension von 1024 Datenpunkten verwendet, wobei die erhöhte Messzeit akzeptiert wird.

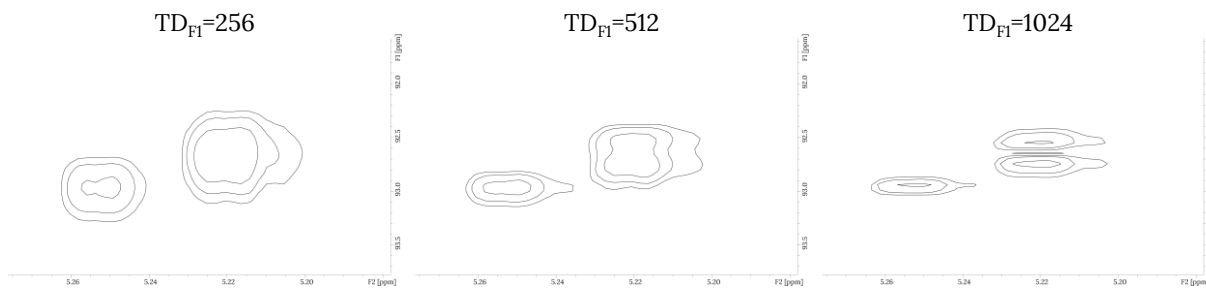


Abbildung 4-6: Ausschnitte aus Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektren mit verschiedener Inkrementanzahl in der ^{13}C -Dimension (TD_{F1}). Die Ausschnitte zeigen die anomeren Signale in α -Konfiguration von D-Glucose, D-Galactose und der Glucoseeinheit von Lactose. Die Messungen wurden anhand einer Probe des Analytgemischs 1 der Konzentration 10,0 g/L mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt.

Neben der digitalen Auflösung spielt die Empfindlichkeit der Methode bei der Quantifizierung eine wichtige Rolle. Eine Vergrößerung der Anzahl an Scans verhält sich proportional zur Verlängerung der Messzeit der HSQC-Experimente (siehe Tabelle 9-17). Aufgrund der langen Messzeiten von HSQC-Experimenten ist die Durchführung einer möglichst geringen Scanzahl eine erste Möglichkeit die Messmethode zu beschleunigen. Hierzu wurde überprüft, ob die ermittelten S/N von Analyten mit der kleinsten Konzentration des Arbeitsbereichs von 1,0 g/L zur Quantifizierung ausreichend sind. Die theoretische Steigerung von S/N um die Wurzel der Scanzahl wurde für alle Analyten des Analytgemischs 1 auch experimentell bestätigt (siehe Abbildung 9-3). Zudem sind alle S/N der ausgewählten Signale in den HSQC-Spektren, die mit zwei Scans aufgenommen wurden, größer als bzw. gleich S/N=10 (siehe Tabelle 9-17). Um die Messzeit somit auch nicht unverhältnismäßig zu erhöhen, wurden die folgenden Experimente mit zwei Scans durchgeführt. Bei der Weiterentwicklung der Methode auf zusätzliche Analyten geringer Konzentrationen kann die Scanzahl aber durchaus erhöht werden.

Die Anwendbarkeit von NUS wurde anhand von Lösungen im Konzentrationsbereich von 1,0 g/L bis 10,0 g/L des Analytgemischs 1 untersucht. Ein ungewichtetes *Sampling* wurde mit zwei gewichteten *Sampling*-Methoden verglichen, wobei bei allen Experimenten mit einem NUS-Anteil von 50 % gearbeitet wurde. Die gewichteten Methoden verwenden Exponentialfunktionen der Basis 0,3 und 0,01. Bei Verwendung eines gewichteten *Samplings* mit der Exponentialfunktion der Basis 0,3 wurden Kalibrierfunktionen erhalten, die eine gleichwertige Steigung, aber kleinere Korrelationskoeffizienten als die Fitfunktionen aufweisen, die bei der Anwendung eines ungewichteten *Samplings* bestimmt wurden (siehe Tabelle 9-18). Bei der Verwendung der zweiten exponentiellen *Sampling*-Funktion weisen die Kalibrierfunktionen für alle Analyten kleinere Steigungen verglichen zur Anwendung des ungewichteten *Samplings* auf (siehe Tabelle 9-18). Durch die Anwendung einer exponentiellen *Sampling*-Funktion kann daher keine Verbesserung in der Güte der Kalibrierfunktionen erreicht werden. Von Schlippenbach und Kollegen zeigten, dass sich TOCSY-Spektren, die mit ungewichtetem und

exponentiell gewichtetem *Sampling* aufgenommen wurden, nicht in ihrer Präzision unterscheiden. Signale von gering konzentrierten Analyten im Bereich von 0,02 mg/L konnten mithilfe des ungewichteten *Samplings* allerdings nicht rekonstruiert werden. Bei der Verwendung einer Poisson-Gewichtung wurden im Vergleich zum ungewichteten *Sampling* deutlich mehr Signale rekonstruiert, bei denen es sich aber durchaus auch um Artefaktsignale oder Geisterpeaks handeln könnte (Schlippenbach *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Wahl der geeigneten *Sampling*-Methode individuell angepasst werden sollte. Bei der Betrachtung der in dieser Arbeit ausgewählten Analyten wurden bessere Kalibrierfunktionen bei der Verwendung eines ungewichteten *Samplings* als bei der Verwendung von zwei exponentiell gewichteten *Sampling*-Methoden erhalten. Alternative *Sampling*-Methoden könnten bei der Bestimmung von Analyten in kleineren Konzentrationen in Betracht gezogen werden.

Neben der *Sampling*-Methode wurde auch der Einfluss des NUS-Anteils auf die Integralgröße sowie die Güte der Kalibrierfunktion untersucht. Der NUS-Anteil gibt die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte als Anteil der ursprünglichen Anzahl an Datenpunkten an. Ein NUS-Anteil von 50 % der ursprünglichen Anzahl an Datenpunkten von 1024 in F_1 sagt somit aus, dass 512 Datenpunkte in F_1 gemessen wurden. In einer Messreihe wurden HSQC-Experimente mit NUS-Anteilen von 10 % bis 90 % in Einfachbestimmung gemessen. Dabei lässt sich kein Einfluss des NUS-Anteils auf die Integralgröße feststellen. Das S/N in NUS-Spektren ist im Vergleich zur Aufnahme von Spektren ohne NUS-Kopplung stets erhöht, wie bereits von Palmer und Kollegen postuliert (Palmer *et al.*, 2015). Mit sinkendem NUS-Anteil nimmt S/N zu (siehe Abbildung 9-5), da bei der Aufnahme weniger Datenpunkte statistisch gesehen auch weniger Rauschen aufgenommen wird (Palmer *et al.*, 2015). Diese Tendenz konnte für alle Analytsignale gezeigt werden. Bei der Betrachtung der Einzelspektren wurde eine deutliche Zunahme von Artefaktsignalen ab einem NUS-Anteil von 40 % beobachtet (siehe Abbildung 9-4). Da die Bildung spektraler Artefakte auch in der Nähe der zu quantifizierenden Signale auftritt und eine Beeinflussung der Quantifizierung nicht ausgeschlossen werden kann, wird ein minimaler NUS-Anteil von 50 % verwendet.

Durch die Untersuchung des Einflusses des D_1 -Delays auf die Integralgröße kann ein optimaler D_1 -Delay ermittelt werden, der eine korrekte Quantifizierung durch ausreichende Relaxation der Kerne und gleichzeitig eine möglichst geringe Experimentdauer kombinieren kann. Dafür wurden HSQC-Experimente der fünf Konzentrationen von Analytgemisch 1 mit D_1 -Delays von 1,0 s, 1,5 s, 3,0 s, 4,5 s, 6,0 s, 7,5 s und 9,0 s gemessen. Die Messreihen wurden in Dreifachbestimmung aufgenommen und Abweichungen der Volumenintegrale in Abhängigkeit von der Länge des D_1 -Delays über eine ANOVA-Analyse (*post-hoc* Tukey-Test, $\alpha=0,05$) bestimmt. Die longitudinalen Relaxationszeiten der Analyten liegen zwischen 1,0 s und 2,1 s. Es ist demnach anzunehmen, dass D_1 -Delays von 1,0 s und 1,5 s nicht zur vollständigen Relaxation ausreichen. Bei Messungen mit einem D_1 -Delay größer 7,0 s müssten maximale Integrale aufgrund der Rückkehr aller Spins in den Grundzustand beobachtet werden. Die

experimentell gewonnenen Daten (siehe Abbildung 9-6 und Tabelle 9-19) zeigten jedoch für die ausgewählten Signale von Lactose und Maltose keine signifikanten Unterschiede zwischen den Integralen der Messreihen, die mit den verschiedenen D_1 -Delays aufgenommen wurden. Bei Betrachtung der Probe mit der Konzentration 7,5 g/L weichen die Saccharoseintegrale, die bei der Durchführung des HSQC-Experiments mit $D_1=1,5$ s bestimmt wurden, signifikant zu den Integralen ab, die mithilfe eines HSQC-Experiments mit $D_1=9,0$ s ermittelt wurden.

Die Integrale der Signale der Monosaccharide Glucose, Fructose, Galactose und Allose, die mit einem HSQC-Experiment und einem D_1 -Delay von 1,0 s ermittelt wurden, sind signifikant kleiner als die Integrale, die mit HSQC-Experimenten mit höheren D_1 -Delays von 1,5 s bis 9,0 s bestimmt wurden (siehe Abbildung 4-7). Fructose und Glucose zeigen diese Abweichungen ebenfalls auf dem Konzentrationsniveau von 2,5 g/L (siehe Tabelle 9-19). Die Fructoseintegrale, die bei der Durchführung eines HSQC-Experiments mit einem D_1 -Delay von 1,5 s erhalten wurden, weichen statistisch von den Integralen ab, die mit einem Experiment mit $D_1=7,5$ s ermittelt wurden. Für Allose wurden mithilfe des Experiments mit $D_1=1,5$ s signifikant abweichende Integrale zu den Ergebnissen des Experiments mit $D_1=4,5$ s erhalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein D_1 -Delay von 1,0 s aufgrund der signifikant niedrigeren Integrale verglichen zu den Ergebnissen von HSQC-Experimenten mit höheren D_1 -Delays nicht zur Quantifizierung von Glucose, Fructose, Galactose und Allose verwendet werden kann. HSQC-Experimente mit einem D_1 -Delay von 1,5 s lieferten für die Analyten Fructose, Allose und Saccharose vereinzelt statistisch abweichende Ergebnisse zu den Ergebnissen der Experimente mit größeren D_1 -Delays. Da die Abweichungen jeweils auf lediglich einem Konzentrationsniveau ermittelt wurden, werden dennoch auch HSQC-Experimente mit einem D_1 -Delay von 1,5 s im Methodenvergleich verwendet. Die Integrale der HSQC-Messreihe mit $D_1=3,0$ s zeigten für keinen Analyten und keine Konzentration des Arbeitsbereichs signifikante Abweichungen zu den Messgrößen, aufgenommen mit einem größeren D_1 -Delay. Das HSQC-Experiment mit $D_1=3,0$ s ist somit geeignet die ausgewählten Analyten zu quantifizieren. Durch die Optimierung des D_1 -Delays von 9,0 s auf 3,0 s wird eine Verkürzung der Messzeit auf ein Drittel erreicht. Beim Einsatz der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s wird die Messzeit im Vergleich zum Experiment mit einem D_1 -Delay von 3,0 s nochmals halbiert.

Im Verlauf des Vergleichs der Methoden anhand verschiedener Beispielmatrixen (siehe 4.1.6) werden sowohl das HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s als auch das Experiment mit $D_1=3,0$ s getestet. Bei der Verwendung eines D_1 -Delays von 1,5 s können Signalverluste durch unvollständige Relaxation nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen der Referenzmethoden sowie mit den Ergebnissen eines HSQC-Experiments, das mit einem ausreichend langen D_1 -Delay von 3,0 s durchgeführt wurde, kann weitere Informationen über die Anwendbarkeit von HSQC-Experimenten mit einem verkürzten D_1 -Delay von 1,5 s liefern.

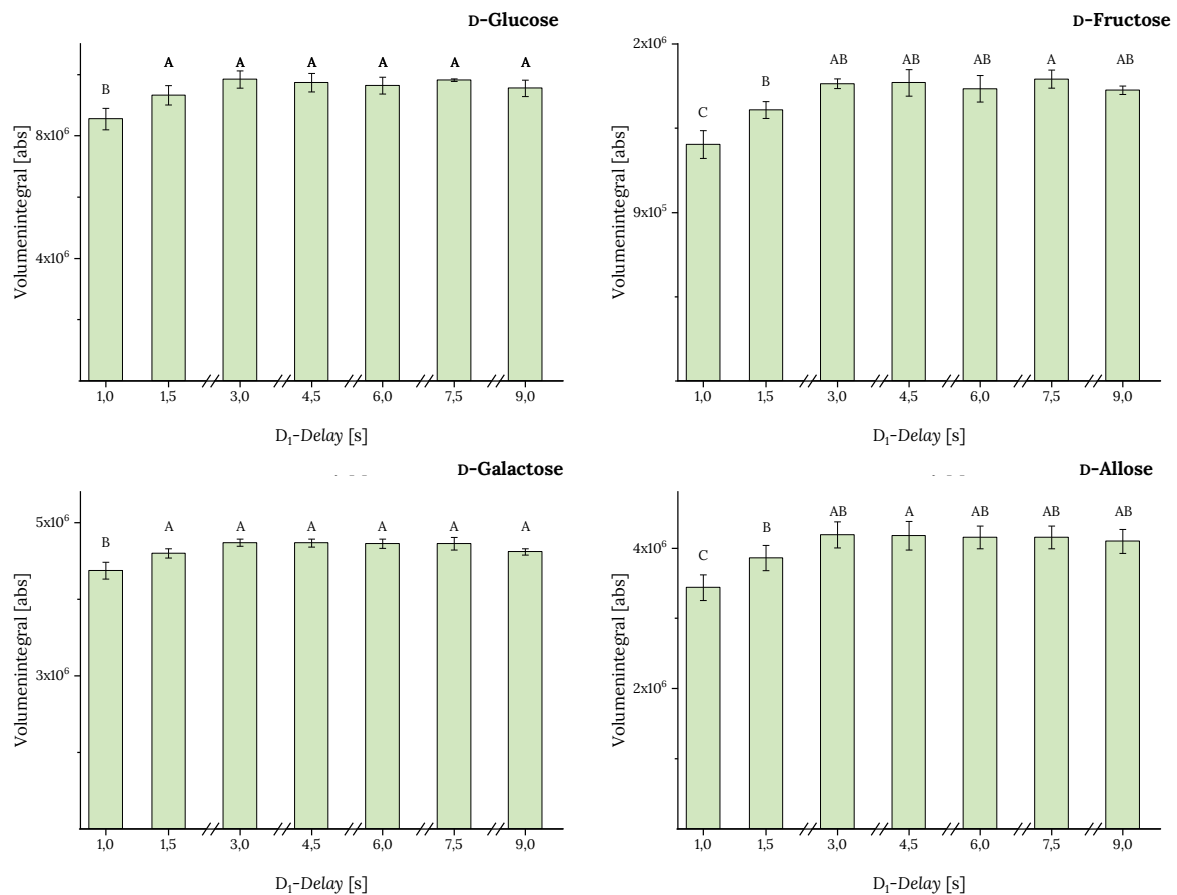


Abbildung 4-7: Einfluss der Länge des D₁-Delays auf die Integralgröße ausgewählter Analyten bei der Aufnahme von Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experimenten. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben. Zudem wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) durchgeführt. Die Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F₂ und F₁ sowie mit einem Non-Uniform Sampling-Anteil von 50 % durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2 und All-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden.

4.1.2.2 Optimierung der Prozessierungsparameter

Die aufgenommenen Spektren des Analytgemischs 1 wurden durch *linear prediction* um 1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen erweitert. Ein negativer Einfluss auf die spektrale Auflösung in beiden Dimensionen kann dabei nicht beobachtet werden.

Die im Folgenden angegebene Anzahl an Datenpunkten durch *zero filling* bezieht sich auf die zusätzliche Vergrößerung der Datenpunktmenge ausgehend von der Datenpunktmenge nach der Durchführung von *linear prediction*. Die aufgenommenen Datenpunkte eines HSQC-Experiments wurden mithilfe von *zero filling* verdoppelt (2048 Datenpunkte), vervierfacht (4096 Datenpunkte) und verachtacht (8192 Datenpunkte). Bei der Betrachtung der Anpassungsfunktionen der Kalibrierproben, die mit den verschiedenen Anteilen an *zero filling* prozessiert wurden, konnten keine Unterschiede in den Güteparameter beobachtet werden (siehe Abbildung 9-7). Auch im visuellen Vergleich der Spektren ist kein Unterschied in der Auflösung der Signale zu erkennen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit

wurde daher mit einer Verdoppelung der Datenpunkte durch *zero filling* in den HSQC-Experimenten gearbeitet. Eine Vervierfachung oder Verachtfachung der Datenpunkte wurde nicht verwendet, da keine Verbesserung spektraler Güteparameter beobachtet wurde und zudem eine verlängerte Prozessierung aufgrund der erhöhten Rechenleistung benötigt wird. Die Spektren wurden zudem, wie oben beschrieben, mit einer Verdopplung der Datenpunkte durch *linear prediction* prozessiert. Eine verringerte Auflösung durch Anwendung von *linear prediction* und *zero filling* in der indirekten Dimension, wie von Reynolds und Kollegen beschrieben (Reynolds et al., 1997), kann in den Spektren der Proben mit Konzentrationen im gewählten Arbeitsbereich nicht festgestellt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von verschiedenen *window functions* untersucht. Unter den Glockenfunktionen wurden eine Sinusglockenfunktion, eine Kosinusglockenfunktion und eine gemischte Sinus-Kosinusform getestet. Die Anwendung einer Sinusglockenfunktion als *window function* ist zur Prozessierung der HSQC-Spektren des Analytgemischs 1 nicht geeignet, da diese Funktion den Anfang des FIDs nahezu gar nicht gewichtet. Bei der Aufnahme von HSQC-Spektren wird der Hauptteil der Signalinformation allerdings gleich zu Beginn aufgenommen und somit werden bei der Gewichtung durch eine Sinusglockenfunktion nahezu keine Signale in den Spektren detektiert. Eine Kosinusglockenfunktion sowie die Mischform können als Gewichtungsfunktionen auf die gemessenen HSQC-Daten angewandt werden. Die Fitfunktionen, die bei Prozessierung mit einer Kosinusglockenfunktion sowie der gemischten Sinus-Kosinusform erhalten werden, zeigen ähnliche Korrelationskoeffizienten sowie eine ähnliche Steigung (siehe Tabelle 9-20). Die numerischen Daten zeigen allerdings keine Tendenz, die die Anwendung einer der beiden *window functions* empfehlen würde. Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit von Lorentz-Gauß-Funktionen als *window functions* getestet. Über die Einstellung der Lage des Funktionsmaximums erfolgt eine unterschiedliche Gewichtung der FID-Bereiche. Dabei wurden die Gewichtung des Anfangsteils des FIDs und des mittleren Teils miteinander verglichen. Die Kalibrierfunktionen, die durch die Prozessierung mit den unterschiedlichen Lorentz-Gauß-Gewichtungsfunktionen gewonnen wurden, unterscheiden sich kaum in ihrer Güte (siehe Tabelle 9-20). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Prozessierung mit einer Kosinusglockenfunktion sowie einer gemischten Sinus-Kosinusform wurden keine Unterschiede in den Korrelationskoeffizienten und den Steigungen der Fitfunktionen festgestellt. Im Folgenden wurde bei der Prozessierung von HSQC-Spektren als *window function* eine Kosinusglockenfunktion verwendet.

Zusammenfassend wurde somit zur Prozessierung von HSQC-Spektren im Rahmen dieser Arbeit bei der Aufnahme von 1024 Datenpunkten die gleiche Anzahl an Datenpunkten durch *linear prediction* hinzugefügt, eine weitere Verdopplung um 2048 Datenpunkte erfolgte durch *zero filling*. Als Gewichtungsfunktion wurde eine Kosinusglockenfunktion in beiden Dimensionen genutzt.

4.1.3 ASAP-HSQC-Methoden

Die Anwendbarkeit der symmetrisierten ASAP-HSQC-Pulssequenz, der ASAP-HSQC-Pulssequenz mit Wasserunterdrückung und des *lowCost*-ASAP-HSQC-Experimentes (siehe 3.4.3.1.1) wurden am Beispiel von Analytgemisch 1 getestet. Dabei wurden die gleichen Signale wie im HSQC-Experiment zur Analyse ausgewählt (siehe Tabelle 4-1). Die Pulssequenz mit Wasserunterdrückung ist nicht geeignet, da eine Beeinflussung des Signals Gal-2 ($\delta(^1\text{H})$: 4,58 ppm; $\delta(^{13}\text{C})$: 97,14 ppm) beobachtet wurde. Der Vergleich der Kalibrierreihen von Analytgemisch 1, die mit der ASAP-HSQC-Pulssequenz und der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz aufgenommen wurden, zeigt keinen Unterschied in der Güte der Fitfunktionen, beurteilt anhand der Parameter Korrelationskoeffizient, Steigung und relative Verfahrensstandardabweichung (siehe Tabelle 9-21). In einer Probe des Analytgemischs 1 der Konzentration 1,0 g/L (bzw. Allose mit 5,0 g/L) wurden die S/N in den Spektren beider Pulssequenzen (zwei Scans, 50 % NUS) bestimmt (siehe Tabelle 4-5). Für die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Allose, Saccharose und Maltose kann ein zur Quantifizierung ausreichendes S/N größer zehn gewährleistet werden. Das S/N des Lactosesignals ist bei der Durchführung beider Pulssequenzen kleiner als zehn, sodass eine Beeinflussung der Quantifizierung von Lactosegehalten im Bereich der Konzentration von 1,0 g/L nicht ausgeschlossen werden kann. Durch die Verwendung von *zero filling* kann S/N gesteigert werden, sodass auch Lactose durch die ASAP-HSQC-Methode quantifiziert werden kann. Da die *lowCost*-ASAP-Pulssequenz keine Vorteile gegenüber der ASAP-HSQC-Pulssequenz in Bezug auf Güte der Kalibrierung oder S/N liefert, wurde mit der ASAP-HSQC-Pulssequenz gearbeitet. Somit wurde die Pulssequenz mit der geringeren Anzahl an Magnetisierungstransfers ausgewählt, um mögliche Fehler in der Magnetisierungsübertragung, die zu fehlerhaften Quantifizierungen führen könnten, zu minimieren. Zudem kann bei Verwendung der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz keine Verbesserung der spektralen Auflösung in der ^{13}C -Dimension unter den verwendeten Parametern beobachtet werden. Bei der Aufnahme von 1024 Datenpunkten in der indirekten Dimension scheinen die Vorteile der ASAP-HSQC-Pulssequenz, die in 3.4.3.1.1 beschrieben wurden, gegenüber der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz noch zu überwiegen. Zur Prozessierung der Spektren wurden die in 4.1.2.2 optimierten Parameter verwendet.

Die verwendete ASAP-HSQC-Pulssequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit mit NUS gekoppelt. Eine generelle Möglichkeit zur NUS-Kopplung wurde schon von Schulze-Sünninghausen und Mitarbeitern gezeigt, die die ASAP-HSQC-Pulssequenz zur Bestimmung der Konfiguration von Maltose mit einem NUS-Anteil von 15 % kombinierten (Schulze-Sünninghausen *et al.*, 2017). Da auch bei der Aufnahme von ASAP-HSQC-Spektren mit geringen NUS-Anteilen eine vermehrte Artefaktbildung und daher auch eine Beeinflussung der Quantifizierung nicht ausgeschlossen werden kann, wird ein minimaler NUS-Anteil von 50 % entsprechend der Aufnahme der herkömmlichen HSQC-Spektren festgelegt. Um eine mögliche, systematische Beeinflussung der Quantifizierungsergebnisse durch die NUS-Kopplung auszuschließen, wurde bei der Anwendung der ASAP-HSQC-Methode auf mögliche

Matrices sowohl ein ASAP-HSQC-Experiment ohne die Verwendung von NUS mit einer Experimentdauer von 12 min als auch ein ASAP-HSQC-Experiment mit NUS-Kopplung (Messzeit von 6 min) verwendet.

Tabelle 4-5: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N) unter Anwendung der beiden *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Pulssequenzen „*asap_hsqc_sp_bruker*“ (ASAP-HSQC) und „*asap_hsqc_sp_bruker_12cinz_5*“ (*lowCost-ASAP-HSQC*) für eine Mischung der dargestellten Analyten (Konzentration 1,0 g/L bzw. Allosekonzentration 5 g/L). S/N der einzelnen Signale wurden mithilfe von MestReNova bestimmt. Die Messungen wurden mit zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 sowie einem *Non-Uniform Sampling*-Anteil von 50 % durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2, Mal-2 und All-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*

Analyt	S/N	
	ASAP-HSQC	lowCost-ASAP-HSQC
D-Glucose	15	24
D-Fructose	14	10
D-Galactose	20	28
Saccharose	21	33
Lactose	7	6
Maltose	10	23
D-Allose	51	76

4.1.4 Zusammenfassung der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden

In Tabelle 4-6 werden die im Rahmen der Methodenoptimierung entwickelten NMR-spektroskopischen Methoden zur Übersicht zusammengefasst. Dabei werden die Analyten, die mithilfe der einzelnen Methoden quantifiziert werden können, sowie die jeweilige Experimentdauer der Methode angegeben. Zum Vergleich weisen HPAEC-PAD-Messungen eine Analysendauer zwischen 60 min und 75 min auf. Die Dauer der manuellen Durchführung enzymatischer Bestimmungen ist von der Anzahl an Analyten in der Matrix abhängig. Bei der Bestimmung aller in Analytgemisch 1 getesteten Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose muss mit einer Analysendauer von mind. 120 min gerechnet werden. Somit wird die Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide bei der Anwendung aller NMR-spektroskopischer Methoden im Vergleich zu den enzymatischen Bestimmungen beschleunigt. Lediglich die Durchführung der HSQC-Methode mit $D_1=3,0$ s und NUS-Kopplung dauert länger als eine HPAEC-PAD-Messung. Alle anderen

NMR-spektroskopischen Methoden weisen ebenfalls eine kürzere Messzeit als die HPAEC-PAD-Methode auf.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der optimierten Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-spektroskopischen Methoden mit ihren Messparametern und den zu quantifizierenden Analyten. Die eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experimente wurden ohne die Verwendung einer internen Standardsubstanz durchgeführt, während bei der Durchführung der Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)- und Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experimente D-Allose als interne Standardsubstanz verwendet wurde. Details zu den verwendeten Signalen sind in Tabelle 4-1 einzusehen. Zur Charakterisierung der Methoden werden u.a. die Anzahl der Scans (NS), die Anzahl an Datenpunkten (TD) in der jeweiligen Dimension (F_2/F_1), der Anteil an Non-Uniform Sampling (NUS) sowie die Experimentdauer (t_{Exp}) angegeben.

Methodenbezeichnung	Pulssequenz	NS	TD (F_2/F_1)	D_1 -Delay [s]	NUS-Anteil [%]	t_{Exp} [min]	Analyten
1D-NOESY, $D_1=2,0$ s	noesygppld	64	32768	2,0	-	4	Sacc, Lac
1D-NOESY, $D_1=4,0$ s	noesygppld	64	32768	3,0	-	5	Glc, Sacc, Lac
HSQC, $D_1=1,5$ s	hsqcetgp	2	1024/1024	1,5	-	53	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	hsqcetgp	2	1024/1024	1,5	50	27	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal
HSQC, $D_1=3,0$ s	hsqcetgp	2	1024/1024	3,0	-	104	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	hsqcetgp	2	1024/1024	3,0	50	53	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal
ASAP-HSQC	asap_hsqc_sp_bruker	2	1024/1024	0,05	-	12	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal
ASAP-HSQC, 50 % NUS	asap_hsqc_sp_bruker	2	1024/1024	0,05	50	6	Glc, Fru, Gal, Sacc, Lac, Mal

4.1.5 Methodvalidierung anhand einer erweiterten Grundkalibrierung

Die Methodvalidierung erfolgte an Proben des Analytgemischs 1 nach Carrez-Klärung (siehe hierzu auch 4.1.6.1.1) im Arbeitsbereich von 1,0 g/L bis 10,0 g/L je Analyten. Für die verwendeten Datensätze wurde Normalverteilung und Varianzenhomogenität angenommen. Die Verteilung der Messwerte deuten visuell auf einen linearen Zusammenhang zwischen den 1D-NOESY-Integralen sowie den HSQC-Volumenintegralen und der Konzentration hin. Mithilfe des Linearitätstests nach Mandel wurde überprüft, ob eine lineare oder eine quadratische Anpassung den mathematischen

Zusammenhang korrekter beschreiben. Für die verwendeten 1D-NOESY-, HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden ist die lineare Anpassung besser zur Beschreibung des mathematischen Zusammenhangs geeignet als die quadratische Anpassung. Dies konnte für alle Analyten inklusive der internen Standardsubstanzen bestätigt werden, sodass auch bei der Auswertung durch Verhältnisbildung zu den internen Standardsubstanzen lineare Anpassungsfunktionen verwendet werden konnten.

4.1.5.1 Präzisionsmessungen

Präzisionsmessungen wurden beispielhaft anhand der 1D-NOESY-Methode mit $D_1=2,0$ s, der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s und NUS-Kopplung sowie der ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung (siehe auch Tabelle 4-6) durchgeführt. Dabei wurde jede Kalibrierlösung in Dreifachbestimmung analysiert und diese Messreihe für die 1D-NOESY- und HSQC-Methode insgesamt sechsfach bzw. für die ASAP-HSQC-Methode dreifach wiederholt. Die Variationskoeffizienten der Integrale innerhalb einer Messreihe geben die Messpräzision an, während durch die Variationskoeffizienten der Integrale über alle Zeitpunkte die zeitliche Stabilität und die Reproduzierbarkeit der Messmethode eingeschätzt werden kann.

Die 1D-NOESY-Methode wurde mit einem D_1 -Delay von 2,0 s durchgeführt, obwohl für Glc-1 und Sacc-1 ein D_1 -Delay von 4,0 s optimiert wurde. Die Integrale der Signale Glc-1 und Sacc-1 sind somit bei der Verwendung von $D_1=2,0$ s nicht maximal, ein Einfluss auf die Präzision der Messungen wurde allerdings nicht vermutet. Für Glc-1, Lac-1a und Lac-1b wurden präzise Werte mit Variationskoeffizienten von maximal 1,6 % für die einzelnen Konzentrationen über alle sechs Messreihen mithilfe der 1D-NOESY-Methode ermittelt (siehe Tabelle 9-22 und Tabelle 9-23). Somit sind auch die Variationskoeffizienten, die über alle Messreihen gemittelt wurden, kleiner bzw. gleich 2,7 % und bestätigen, dass die verwendete 1D-NOESY-Methode über einen Zeitraum von mehreren Wochen stabile Integrale der Signale Glc-1, Lac-1a und Lac-1b bestimmt. Bei Betrachtung der Variationskoeffizienten der Saccharoseintegrale der einzelnen Messreihen zeigen sich zwei höhere Werte von 6,3 % ($c=10,0$ g/L, Messreihe 1) und 12,1 % ($c=1,0$ g/L, Messreihe 5), während die anderen Werte zwischen 0,8 % und 3,2 % liegen (siehe Tabelle 9-22). Da die Mehrzahl der Variationskoeffizienten Werte kleiner 5,0 % aufweisen und auch die über alle Messreihen gemittelten Werte kleiner bzw. gleich 3,9 % sind, werden die 1D-NOESY-Messungen für Saccharose als präzise und reproduzierbar bewertet.

Bei Betrachtung der Messpräzision der HSQC-Methode (siehe Tabelle 9-24 bis Tabelle 9-26) ist erkennbar, dass die Werte für die kleinste Konzentration von 1,0 g/L mit bis zu 12,7 % deutlich höher sind als für die größeren Konzentrationen (max. 5,0 %). Auch die über alle sechs Messreihen gemittelten Variationskoeffizienten sind für das Konzentrationsniveau von 1,0 g/L bei der Betrachtung aller Analyten maximal mit Werten von bis zu 9,4 %. Die anderen Konzentrationsniveaus zeigen Abweichungen von maximal 5,3 %. Somit können mithilfe der HSQC-Methode präzise und reproduzierbare Messungen im Arbeitsbereich durchgeführt werden, wobei zu beachten ist, dass bei der kleinsten

Konzentration von 1,0 g/L mit einer geringeren Präzision als bei den höheren Konzentrationen gemessen wird.

Bei der Durchführung der Präzisionsmessungen der ASAP-HSQC-Methode zeigen sich erhebliche Abweichungen in den ermittelten Integralen in den einzelnen Messreihen von bis zu 55,7 % bei einem Konzentrationsniveau von 1,0 g/L (siehe Tabelle 9-27 und Tabelle 9-28). Die Variationskoeffizienten der anderen Konzentrationen liegen für die einzelnen Messreihen zwischen 1,1 % und 11,6 %. Ebenfalls werden bei einem Konzentrationsniveau von 1,0 g/L keine reproduzierbaren Ergebnisse ermittelt (Variationskoeffizienten von bis zu 41,6 %, siehe Tabelle 9-27 und Tabelle 9-28). Für die höheren Konzentrationsniveaus (2,5 g/L bis 10,0 g/L) werden Variationskoeffizienten zwischen 4,0 % und 11,9 % bestimmt. Die ASAP-HSQC-Methode ermittelt somit weniger präzise Messwerte als die durchgeführten 1D-NOESY- und HSQC-Methoden. Im Konzentrationsbereich von 2,5 g/L bis 10,0 g/L werden die Messpräzision sowie die zeitliche Stabilität und Reproduzierbarkeit der Methode dennoch als ausreichend bewertet. Besonders im unteren Teil des Arbeitsbereichs kann allerdings nicht mehr mit präzisen Messungen gerechnet werden.

Anhand der durchgeführten Präzisionsmessungen kann festgestellt werden, dass die 1D-NOESY-Methode präzise Messungen über den gesamten Arbeitsbereich ermittelt. Die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden messen auf dem Konzentrationsniveau von 1,0 g/L weniger präzise als im oberen Teil des Arbeitsbereichs, wobei die ASAP-HSQC-Messungen generell weniger präzise als die HSQC-Messungen sind.

4.1.5.2 Stabilität der Messlösungen

Zur Beurteilung der Stabilität der Kalibrierlösungen unter Anwendung der 1D-NOESY-Methode mit $D_1=2,0$ s und der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s und NUS-Kopplung (siehe auch Tabelle 4-6) wurde die gleiche Messreihe zwei Woche lang jeden zweiten Tag gemessen und dann nochmals an Tag 22 und Tag 36. Zwischen den Messungen wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Zur Beurteilung, ob eine Lagerung der Kalibrierlösungen möglich ist, wurden die Verhältnisse zwischen den Integralen an Tag 7, Tag 15 und Tag 36 jeweils zum Integral an Tag 1 gebildet und in Prozent angegeben. Somit gibt ein Wert von 100 % an, dass die Integrale beider Messungen gleichwertig sind und kein Analytverlust durch die Lagerung der Kalibrierlösungen zu erwarten ist. Da die Kalibrierung aller Analyten in einer Lösung erfolgt, wird lediglich der größte Analytverlust bei der Lagerung, unabhängig vom jeweiligen Analyten, betrachtet.

Die 1D-NOESY-Messungen wurden mit einem D_1 -Delay von 2,0 s durchgeführt, wodurch es zu Beeinflussungen der Integrale von Glucose und Saccharose aufgrund des verkürzten D_1 -Delays kommen kann. Bei der Betrachtung der Integralverhältnisse zwischen Tag 36 und Tag 1 der Lagerung wurde davon ausgegangen, dass die Integrale an den unterschiedlichen Messtagen eine gleiche Beeinflussung durch den verkürzten D_1 -Delay erfahren und die Beurteilung des Integralverhältnis somit

trotzdem möglich ist. Bei Betrachtung der Integralverhältnisse aller ausgewählten Signale im 1D-NOESY-Spektrum (Glc-1, Sacc-1, Lac-1a und Lac-1b) wurde ein Integralverhältnis zwischen Tag 36 und Tag 1 von minimal 89,6 % ermittelt (siehe Tabelle 9-29). Somit muss mit einem Analytverlust von bis zu 10,4 % bei einer Lagerung der Kalibrierlösungen über 36 Tagen gerechnet werden. Bei einer Lagerung über 15 Tagen werden lediglich Analytverluste von 7,7 % und bei einer Lagerdauer von sieben Tagen von 3,7 % (siehe Tabelle 9-29) nachgewiesen.

Bei der Durchführung der HSQC-Methode wird bei der Lagerung über 36 Tage ein minimales prozentuales Integralverhältnis von 84,3 % (siehe Tabelle 9-30) ermittelt, was einem Analytverlust von 15,7 % entspricht. Bei einer Lagerung über 15 Tage wird sogar ein Analytverlust von bis zu 23,9 % (siehe Tabelle 9-30) ermittelt. Daher kann bei der Durchführung der HSQC-Methode keine Lagerung der Kalibrierlösungen von zwei Wochen oder länger empfohlen werden. Das minimale prozentuale Integralverhältnis, das bei einer Lagerung von sieben Tagen ermittelt wurde, hat einen Wert von 93,8 % und zeigt, dass geringere Analytverluste von lediglich bis zu 6,1 % nach einer Lagerung von sieben Tagen als bei längerer Lagerung zu erwarten sind.

Bei der Durchführung beider NMR-spektroskopischer Methoden wird eine Lagerung der Kalibrierlösungen von nicht länger als sieben Tagen empfohlen, um die Analytverluste durch die Lagerung so gering wie möglich zu halten. Bei der Lagerung über sieben Tage wurden bei der Durchführung der 1D-NOESY-Methode Analytverluste von 3,7 % und bei der Anwendung der HSQC-Methode von 6,1 % ermittelt. Die aufgearbeiteten Proben wurden dementsprechend ebenfalls nicht länger als sieben Tage gelagert.

4.1.5.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für die 1D-NOESY-Methode mit einem D_1 -Delay von 2,0 s wurde im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian eine BG für Lactose von 0,17 g/100 mL ermittelt. Die Methode ist somit nicht in der Lage die Kennzeichnung „lactosefrei“ gemäß §4 Abs. 2 der MilchErzV (Lactosegehalt kleiner 0,1 g/100 g) zu überprüfen (Merdian, 2019). Monakhova und Kollegen konnten mithilfe einer 1D-NOESY-Methode Lactose bis zu einer Konzentration von 0,05 g/100 mL in lactosefreier Milch nachweisen. Allerdings war aufgrund eines kleinen S/N keine verlässliche Integration und daher auch keine verlässliche Quantifizierung möglich (Monakhova *et al.*, 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte eine BG für Lactose in Milch von 0,04 g/100 mL bei Durchführung einer ^1H -Pulssequenz mit Vorsättigung und somit eine erfolgreiche Quantifizierung von Lactose in lactosefreien Produkten vorweisen. Hierbei wurden die Messungen in Coaxialröhrchen durchgeführt, die mit deuteriertem Natriumtrimethylsilylpropionat als interne Standardsubstanz gefüllt wurden (da Cunha *et al.*, 2020). Es besteht daher durchaus die Möglichkeit der Anwendung von 1D-NMR-Pulssequenzen zur Quantifizierung von Lactose in lactosefreien Produkten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode erfüllt die Voraussetzungen zur Quantifizierung von Lactose in lactosefreien Produkten allerdings nicht und müsste für diese spezielle Anwendung gesondert optimiert werden.

Die ermittelten NG und BG aller optimierten Methoden sind in Tabelle 9-31 und Tabelle 4-7 zusammengefasst. Die BG sind für die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose und Lactose mit maximal 0,38 g/L deutlich kleiner als die niedrigste Konzentration des Kalibrierbereichs. Für Maltose werden BG größer als 1,0 g/L für die HSQC-Methode mit $D_1=3,0$ s und den beiden ASAP-HSQC-Methoden beobachtet. Eine Quantifizierung von Maltose ist demnach mit diesen Methoden erst ab einer Konzentration von 1,5 g/L zu empfehlen.

Mithilfe der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s ohne NUS-Kopplung wurden für die meisten Analyten die höchsten BG ermittelt, während die BG der NUS-gekoppelten HSQC-Methode bei gleichem D_1 -Delay wesentlich geringer sind. Dies kann auf das erhöhte S/N bei der Anwendung von NUS zurückgeführt werden. Bei der Verwendung der HSQC-Methode mit $D_1= 3,0$ s und NUS-Kopplung sind die BG der Analyten Saccharose und Lactose geringer als bei der Durchführung des HSQC-Experiments mit gleichem D_1 -Delay ohne NUS-Kopplung. Hierbei ist der Einfluss der NUS-Kopplung auf die Größe der BG deutlich geringer als bei den Experimenten mit einem D_1 -Delay von 1,5 s. Bei den ASAP-HSQC-Methoden kann keine Verringerung der BG durch eine NUS-Kopplung beobachtet werden. Die BG der HSQC-Methode mit $D_1=3,0$ s sind für die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose und Lactose deutlich geringer als bei der Verwendung des kürzeren D_1 -Delays von 1,5 s. Dies könnte durch die teilweise unvollständige Relaxation bei der Verwendung des kürzeren D_1 -Delays und die dadurch bedingte Abnahme der Signalintegrale erklärt werden. Demzufolge sollte bei der Quantifizierung von Analyten geringer Konzentrationen nahe der BG ein D_1 -Delay von 3,0 s verwendet werden.

Tabelle 4-7: Bestimmungsgrenzen, die bei der Verwendung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Experimenten sowie von *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-HSQC-Experimenten ermittelt wurden. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, NUS: *Non-Uniform Sampling*

[g/L]	Glc-2	Fru-2	Gal-2	Sacc-2	Lac-2	Mal-2
HSQC, $D_1=1,5$ s	0,16	0,38	0,32	0,28	0,11	0,36
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	0,06	0,05	0,11	0,05	0,02	0,62
HSQC, $D_1=3,0$ s	0,04	0,03	0,02	0,11	0,03	1,59
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	0,04	0,07	0,02	0,03	0,07	0,24
ASAP-HSQC	0,09	0,19	0,12	0,10	0,06	1,03
ASAP-HSQC, 50 % NUS	0,05	0,22	0,27	0,06	0,08	1,01

Die in Tabelle 4-7 dargestellten BG beziehen sich auf die Konzentrationen, die bei den verwendeten NMR-spektroskopischen Messungen quantifiziert werden können. Verdünnungsschritte während der Probenaufarbeitung müssen hierbei berücksichtigt werden. Ob die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden zur Überprüfung der Deklaration „lactosefrei“ gemäß §4 Abs. 2 der MilchErzV geeignet sind, wird im Verlauf des Methodenvergleichs unter Berücksichtigung der individuellen Probenaufarbeitung von lactosefreier Milch und lactosefreier Fruchtbuttermilch diskutiert.

In der Masterarbeit von Franziska Ruf wurden die NG und BG einer HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s unter Verwendung eines Analytgemischs in Pufferlösung bestimmt (siehe Tabelle 9-32). Die BG in Pufferlösung zeigen für einige Analyten leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Carrez-Matrix an, sind aber dennoch ausreichend, um alle Analyten mit einer Konzentration größer 1,0 g/L quantifizieren zu können (Ruf, 2020).

4.1.6 Anwendung der optimierten Methoden auf verschiedene Lebensmittelmatrixen

4.1.6.1 Milch und Milchprodukte

4.1.6.1.1 Probenaufarbeitung

Im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian wurde eine Proteinfällung mit Ethanol und anschließender Fettextraktion mit *n*-Hexan zur Abtrennung der Matrixbestandteile in Milch und Milchprodukten verwendet. Im Vergleich mit einer Carrez-Klärung wurden bei der Anwendung der Ethanol-Hexan-Behandlung deutliche Analytverluste beobachtet (Merdian, 2019). Der Einfluss der verschiedenen Aufarbeitungen wurden für die Quantifizierung von Lactose in Vollmilch, fettarmer Milch und Buttermilch sowie der Bestimmung von Glucose und Galactose in lactosefreier Milch verglichen. Die nach Ethanol-Hexan-Aufarbeitung und mittels enzymatischer Methoden ermittelten Gehalte sind signifikant geringer als die nach Carrez-Klärung enzymatisch bestimmten Gehalte (siehe Tabelle 4-8). Die Wiederfindungsrate von Lactose in Vollmilch, die mithilfe der Ethanol-Hexan-Aufarbeitung behandelt wurde, beträgt bei Anwendung der enzymatischen Methode 89,4 % und bestätigt die Vermutung, dass Analytverluste durch die Aufarbeitung zu erwarten sind. Um zu überprüfen, ob die ermittelten Verluste auch in Abhängigkeit zu der eingesetzten Analysenmethode stehen oder methodenunabhängig auftreten, wurden die Proben zusätzlich mithilfe der HPAEC-PAD-Methode gemessen. Dabei wurden signifikante Unterschiede in den Lactosegehalten in Vollmilch ermittelt, die mit den beiden Aufarbeitungsmethoden behandelt wurden (siehe Tabelle 4-8). Die bestimmte Wiederfindungsrate von 70 % für Lactose in Vollmilch bei Verwendung der Ethanol-Hexan-Vorbehandlung und anschließender HPAEC-PAD-Messung verdeutlicht den möglichen Analytverlust durch die Ethanol-Hexan-Behandlung. Auch die quantifizierten Glucose- und Galactosegehalte bei Verwendung der Ethanol-Hexan-Behandlung sind signifikant kleiner als die Gehalte, bei der eine Carrez-Klärung eingesetzt wurde (siehe Tabelle 4-8). Generell wurden Lactose, Glucose und Galactose

mithilfe der HPAEC-PAD-Methode in den eingesetzten Matrices vergleichbar präzise wie mit den enzymatischen Methoden quantifiziert. Da allerdings bei der Verwendung der Ethanol-Hexan-Aufarbeitung Analytverluste möglich sind, wurde die Carrez-Klärung im weiteren Verlauf der Arbeit zur Abtrennung von Matrixbestandteilen in Milch und Milchprodukten verwendet.

Tabelle 4-8: Ergebnisse des Vergleichs der beiden Probenaufarbeitungsmethoden Carrez-Klärung sowie Ethanol-fällung und Fettextraktion mittels *n*-Hexan (EtOH-Hexan). Die Gehalte der Analyten in den beschriebenen Matrices wurden mittels enzymatischer Methoden und Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) jeweils in Dreifachbestimmung unter Angabe des Variationskoeffizienten (VK) als Präzisionsmaß analysiert. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurden mittels einer einfaktoriel- len Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) bestimmt und mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben gekennzeichnet. Lac: Lactose, Glc: D-Glucose Gal: D-Galactose

Matrix	Analyt	Enzymatische Methoden		HPAEC-PAD	
		Carrez	EtOH-Hexan	Carrez	EtOH-Hexan
		[g/ 100 g]	[g/ 100 g]	[g/ 100 g]	[g/ 100 g]
		VK [%]	VK [%]	VK [%]	VK [%]
Vollmilch	Lac	4,58 ^{AC}	3,74 ^{BC}	4,79 ^A	4,15 ^{BC}
		2,4	7,6	1,4	8,2
Fettarme Milch	Lac	4,56 ^A	3,89 ^A	4,63 ^A	4,55 ^A
		8,2	6,3	8,0	7,0
Buttermilch	Lac	3,82 ^A	3,25 ^B	3,84 ^A	3,81 ^A
		0,8	1,7	3,0	2,8
Lactosefreie Milch	Glc	2,49 ^{AC}	1,95 ^B	2,47 ^C	2,31 ^D
		0,9	2,0	1,6	4,0
	Gal	2,44 ^{AC}	1,96 ^B	2,43 ^C	2,26 ^D
		2,4	2,6	2,1	3,6

Da die Carrez-Klärung im weiteren Verlauf dieser Arbeit als bevorzugte Aufarbeitungsmethode eingesetzt wird, wurde ihr Einfluss auf die Quantifizierung der Analyten untersucht. Bei Verwendung der Carrez-Klärung ist mit einer großen Salzlaster in den Proben zu rechnen, was einen Einfluss auf die Bestimmung mittels NMR-basierter Methoden haben kann. Sowohl bei der Datenaufnahme durch veränderte Relaxationszeiten als auch bei der Verwendung von NUS könnten durch die Salze Beeinflussungen auftreten, die sich unter Umständen in spektralen Fehlern zeigen könnten. Deshalb wurden Messreihen des Analytgemischs 1 mit und ohne Carrez-Klärung aufgearbeitet und mit einer NUS gekoppelten HSQC-Methode gemessen. Dabei kann visuell kein Unterschied zwischen den

Anpassungsfunktionen erkannt werden (siehe Abbildung 9-8). Auch ein Vergleich der Parameter der Fitfunktionen (siehe Tabelle 9-33) zeigt keine Tendenz in Abhängigkeit zur Durchführung der Carrez-Klärung.

Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen an Carrez-Salzen (siehe Tabelle 3-1) auf die quantitativen Ergebnisse untersucht (siehe Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Proben des Analytgemischs 1, die mit unterschiedlichen Carrez-Konzentrationen behandelt wurden, wurden sowohl mit den Referenzmethoden Enzymatik und HPAEC-PAD als auch mit den optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden (siehe Tabelle 4-6) ohne die Verwendung der internen Standardsubstanz Allose untersucht. Allose wurde vielmehr ebenfalls mit den Methoden untersucht, um den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Carrez-Reagenzien auf seine Quantifizierung zu untersuchen. Somit wird überprüft, ob Allose als interne Standardsubstanz bei der Anwendung der Carrez-Klärung geeignet ist. Die ermittelten Wiederfindungen Carrez-geklärter Proben sollten optimalerweise im gleichen Bereich wie die Wiederfindungen der unbehandelten Proben liegen. Die Wiederfindungen der unbehandelten Proben, die bei der Durchführung der HPAEC-PAD- und HSQC-Methoden ermittelt wurden, liegen für alle Analyten nicht bei 100 %, sodass eine systematische Beeinflussung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann. Die Ursache der Unterbestimmung konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden.

Bei der Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie der HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden konnten statistisch gleichwertige Wiederfindungsraten unabhängig von der eingesetzten Konzentration an Carrez-Salzen für Glucose, Fructose (Ausnahme: ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung und Carrez-Klärung II), Galactose und Allose ermittelt werden. Bei der visuellen Beurteilung der ermittelten Ergebnisse werden Analytverluste bei dem Einsatz hochkonzentrierter Carrez-Reagenzien im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II und Carrez-Klärung III bei der Durchführung aller Methoden beobachtet. Die enzymatisch bestimmten Wiederfindungen der unbehandelten Proben zeigen für Glucose, Fructose und Galactose signifikante Abweichungen zu den Wiederfindungen der Proben, die mit Carrez-Klärung II behandelt wurden. Die enzymatisch ermittelten Wiederfindungen von Galactose weisen zusätzlich statistische Abweichungen zu den Wiederfindungen, die nach Carrez-Klärung III erhalten wurden, auf. Somit ist es möglich, dass höhere Konzentrationen an Carrez-Salzen (Carrez-Klärung II oder Carrez-Klärung III) einen Einfluss auf die Quantifizierung von Glucose, Fructose und Galactose mittels enzymatischer Methoden haben. Die Ergebnisse der HPAEC-PAD-Methode dagegen werden durch die unterschiedlichen Konzentrationen an Carrez-Salzen weniger stark beeinflusst, sodass beim Einsatz höherer Konzentrationen an Carrez-Salzen die HPAEC-PAD als Referenzmethode besser geeignet ist. Die Quantifizierung von Allose wird durch die Verwendung von Carrez-Reagenzien ähnlich beeinflusst wie die Quantifizierung der anderen Monosaccharide, sodass seine Verwendung als interne Standardsubstanz während der Carrez-Behandlung keine Rückschlüsse auf die Höhe der Analytverluste zulässt.

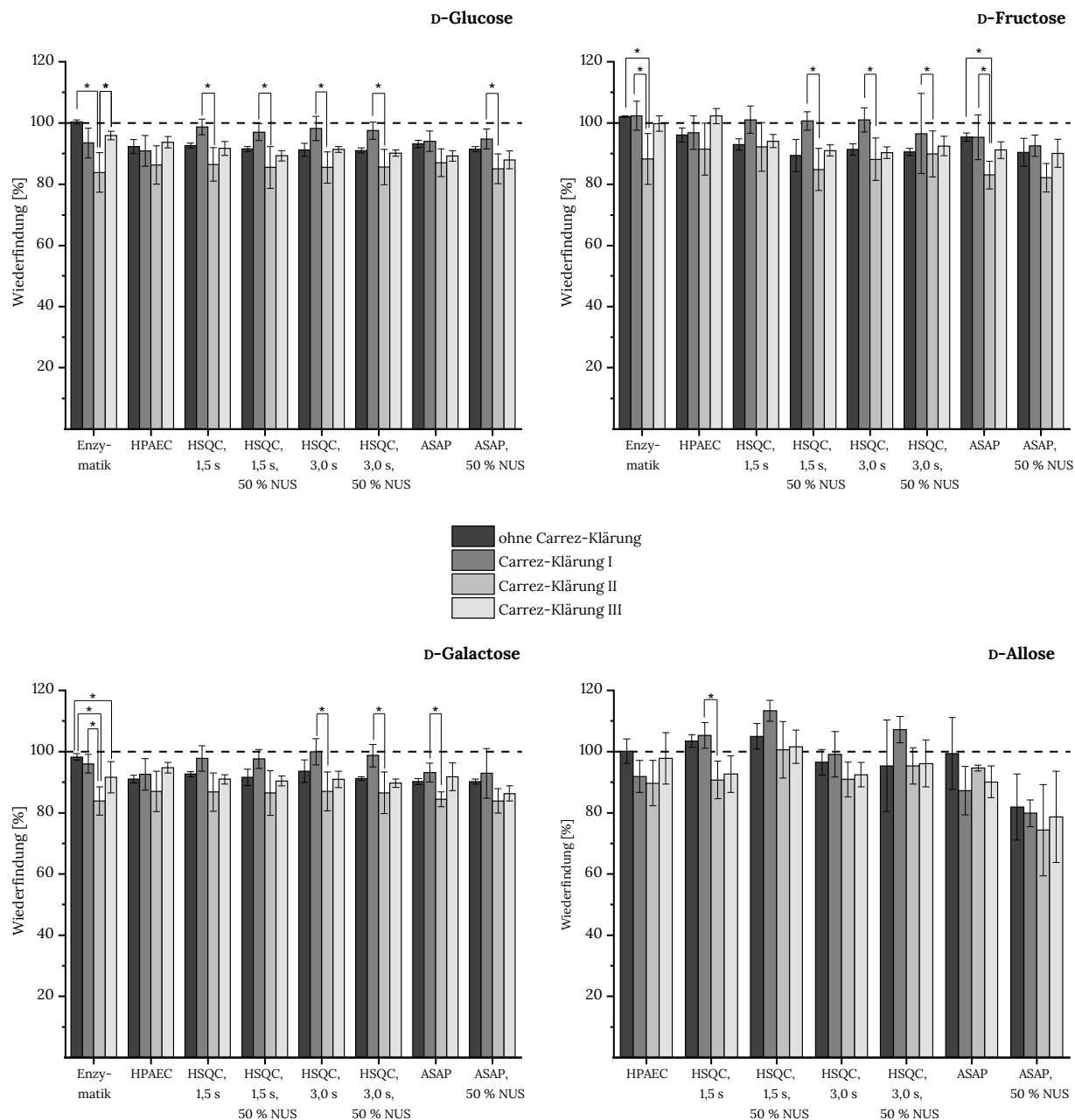


Abbildung 4-8: Einfluss der Carrez-Klärung auf die Wiederfindungsrate der Monosaccharide D-Glucose, D-Galactose, D-Fructose und D-Allose. Zum Vergleich wurden Proben ohne vorherige Carrez-Behandlung genutzt. Zudem wurden drei verschiedene Konzentrationen an Carrez-Salzen zur Probenaufarbeitung (siehe Tabelle 3-1) getestet. Die Probenaufarbeitung sowie die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, sodass als Präzisionsmaß die Standardabweichung angegeben wird. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, *post-hoc* Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2 und All-2 und den Messparametern können Tabelle 4-1 und Tabelle 4-6 entnommen werden. HPAEC: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence mit Angabe des entsprechenden D_1 -Delays, ASAP: Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiment, NUS: Non-Uniform Sampling

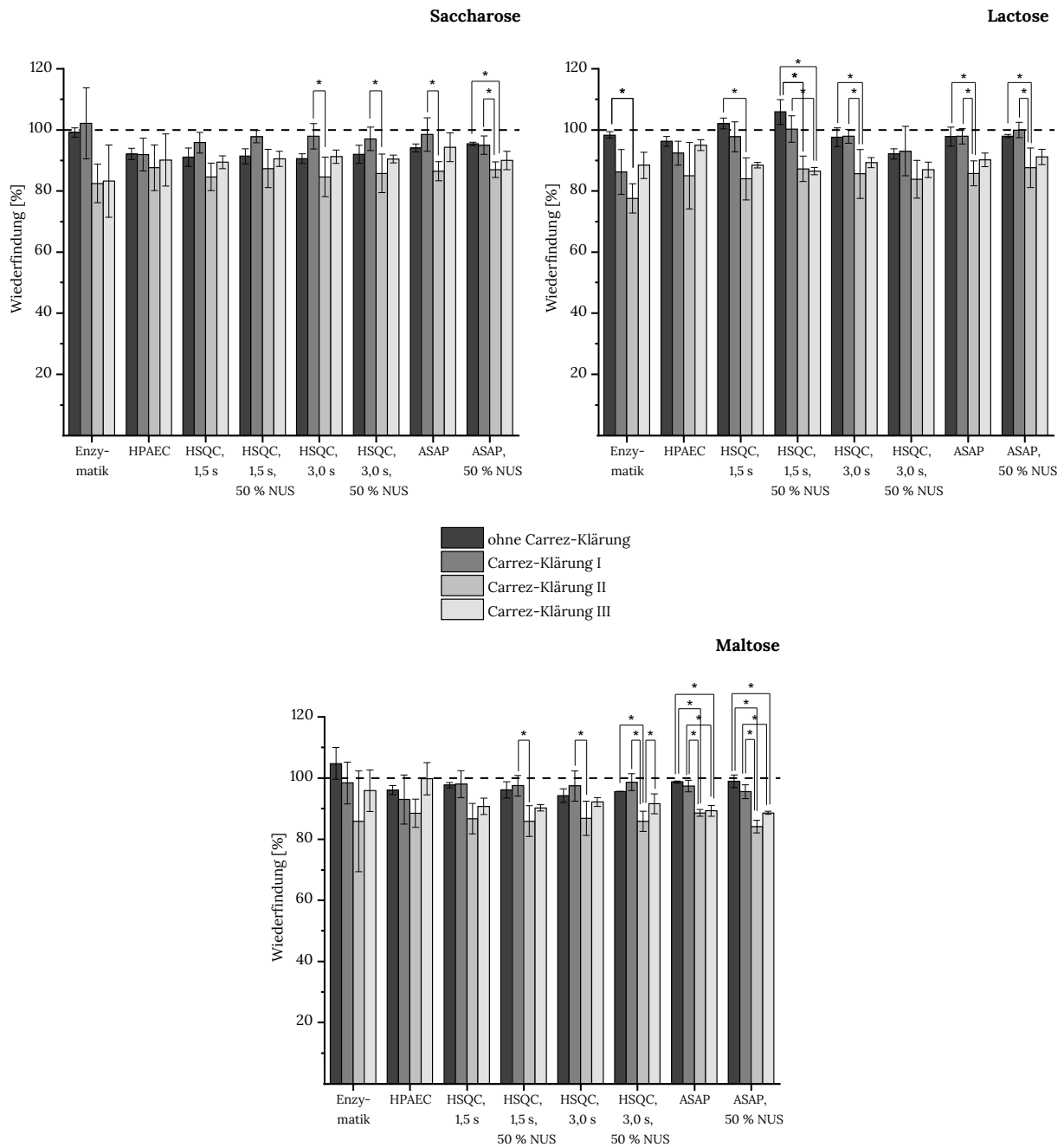


Abbildung 4-9: Einfluss der Carrez-Klärung auf die Wiederfindungsrate der Disaccharide Saccharose, Lactose und Maltose. Zum Vergleich wurden Proben ohne vorherige Carrez-Behandlung genutzt. Zudem wurden drei verschiedene Konzentrationen an Carrez-Salzen zur Probenaufarbeitung (siehe Tabelle 3-1) getestet. Die Probenaufarbeitung sowie die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, sodass als Präzisionsmaß die Standardabweichung angegeben wird. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 und den Messparametern können Tabelle 4-1 und Tabelle 4-6 entnommen werden. HPAEC: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence mit Angabe des entsprechenden D_1 -Delays, ASAP: Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiment, NUS: Non-Uniform Sampling

Bei der Analyse der Disaccharide (siehe Abbildung 4-9) wurden keine statistischen Unterschiede zwischen den Wiederfindungsraten der unbehandelten Proben und den Ergebnissen aller Carrez-geklärten Proben bei der Bestimmung durch HPAEC-PAD beobachtet. Zudem zeigen die Wiederfindungen der Proben, die durch Carrez-Klärung I behandelt wurden, keine signifikanten Abweichungen zu den Wiederfindungen der unbehandelten Proben, unabhängig von der verwendeten Analysenmethode. Auffallend ist zudem, dass besonders die Wiederfindungen, die mithilfe der HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden ermittelt wurden, durch erhöhte Konzentrationen an Carrez-Salzen (Carrez-Klärung II und Carrez-Klärung III) statistisch beeinflusst werden. Die Ergebnisse der ASAP-HSQC-Methoden scheinen dabei stärker durch höhere Salzkonzentrationen beeinträchtigt zu werden als die Ergebnisse der HSQC-Methoden. Visuell können auch bei der Betrachtung der Wiederfindungen der Disaccharide größere Analytverluste bei der Verwendung höher konzentrierter Carrez-Salze im Bereich von Carrez-Klärung II und Carrez-Klärung III festgestellt werden, unabhängig davon welche Methode zur Quantifizierung verwendet wurde. Im Vergleich zwischen Mono- und Disacchariden zeigte sich zudem, dass die Bestimmung von Disacchariden mittels ASAP-HSQC-Methoden stärker durch verschiedene Konzentrationen an Carrez-Salzen beeinflusst wurde als die Analyse von Monosacchariden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass besonders die enzymatischen Methoden und die ASAP-HSQC-Methoden zum Teil stark von der Konzentration an Carrez-Salzen beeinflusst werden. HSQC-Methoden werden durch die Verwendung hoher Konzentrationen der Carrez-Reagenzien vermutlich ebenfalls in ihrer Quantifizierung beeinflusst. Die Wiederfindungen der Proben, die mit niedrigen Konzentrationen an Carrez-Reagenzien behandelt wurden (Carrez-Klärung I), zeigen für alle Methoden und Analyten keine signifikanten Abweichungen zu den unbehandelten Proben und weisen somit auf geringe Analytverluste durch die Aufarbeitung mit gering konzentrierten Carrez-Reagenzien hin. Aus diesem Grund sollte mit einer möglichst geringen Konzentration an Carrez-Reagenzien gearbeitet werden. Allerdings hat bei der Probenaufarbeitung eine vollständige Abtrennung aller störenden Matrixbestandteile Priorität, da Trübungen und Schwebstoffe die analytischen Methoden ebenfalls beeinflussen können. Ist die Verwendung höherer Konzentrationen an Carrez-Reagenzien zur Probenaufarbeitung notwendig, empfiehlt sich die Verwendung der HPAEC-PAD-Methode als Referenzmethode, da diese weniger stark durch hohe Salzkonzentrationen beeinflusst wird. Ob eine systematische Beeinflussung der Ergebnisse bei der Anwendung der HPAEC-PAD-Methode erfolgt, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.1.6.1.2 Methodenvergleich

Die 1D-NOESY-Pulssequenz wurde zur Bestimmung von Lactose in Vollmilch, fettarmer Milch, Buttermilch und saurer Sahne sowie zur Quantifizierung von Glucose in lactosefreier Milch im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian eingesetzt (siehe Abbildung 4-10 links). Die Proben wurden dabei einer Carrez-Klärung mit Salzkonzentrationen im Bereich von Carrez-Klärung I (siehe

4.1.6.1.1) unterzogen (Meridian, 2019), die, wie in 4.1.6.1.1 beschrieben, lediglich einen geringen Einfluss auf die Quantifizierung aufweist. Die 1D-NOESY-Methode wurde zunächst an einem 500 MHz-Gerät durchgeführt, das mit einem *Prodigy*-Probenkopf ausgestattet ist. Die mit der 1D-NOESY-Methode ermittelten Gehalte an Lactose bei der Verwendung des Signals Lac-1b zeigen keine statistisch signifikanten Abweichungen zu den Ergebnissen der beiden durchgeführten Referenzmethoden (enzymatische Bestimmung und HPAEC-PAD) in allen Matrices. Da das ausgewählte Signal durch Lactulose-signale beeinflusst werden kann (siehe 4.1), wird das Ergebnis (Lac-1b: 4,74 g/100 mL \pm 0,15 g/100 mL) zur Beurteilung der Richtigkeit mit dem Lactosegehalt in Vollmilch unter Zuhilfenahme des Signals Lac-1a (4,60 g/100 mL \pm 0,19 g/100 mL) verglichen. Die beiden Gehalte sind statistisch gleichwertig, sodass die Quantifizierung von Lactose bei Verwendung des Signals Lac-1b vermutlich nicht durch enthaltene Lactulose in Vollmilch beeinflusst wird. Lactulose ist in Vollmilch allerdings lediglich in geringen Mengen mit durchschnittlich 420 mg/L (Marconi *et al.*, 2004) enthalten. Bei der Untersuchung von Milchprodukten, die einer höheren Hitzebehandlung während der Produktion ausgesetzt werden (z.B. Kondensmilch) und demnach auch deutlich höhere Lactulosegehalte aufweisen, sollte Signal Lac-1a trotz der Überlagerung mit Glucose zur Quantifizierung ausgewählt werden. Durch Aufstockung von Lactose in Vollmilch wurde zudem die Wiederfindungsrate bestimmt. Bei der Auswertung beider Signale im 1D-NOESY-Spektrum werden Wiederfindungsraten im Bereich von 100 % bestimmt (Lac-1a: 100,3 % \pm 4,2 % und Lac-1b: 102,4 % \pm 6,1 %), sodass nicht von einer Beeinflussung der Ergebnisse durch die Carrez-Behandlung zu rechnen ist.

Der mithilfe der 1D-NOESY-Methode quantifizierte Gehalt von Glucose in lactosefreier Milch weicht signifikant von den mithilfe von Enzymatik und HPAEC-PAD ermittelten Gehalten ab. Die Unterbestimmung von Glucose wird aufgrund der Lage des Signals Glc-1 vermutlich nicht durch die fehlerhafte Wasserunterdrückung der 1D-NOESY-Messungen verursacht. Im Verlauf der Methodenoptimierung wurde ein zur vollständigen Relaxation notwendiger D_1 -Delay von 4,0 s ermittelt. Die Unterbestimmung von Glucose durch die 1D-NOESY-Methode mit $D_1=3,0$ s könnte somit auf die nicht vollständige Relaxation der Kerne zurückzuführen sein, die zu verminderten Signalen und entsprechend auch Integralen führen kann. Eine genauere Untersuchung des Einflusses der Länge des D_1 -Delays auf die Quantifizierung von Glucose in lactosefreier Milch wird im weiteren Verlauf der Arbeit gegeben. Die Unterbestimmung könnte allerdings auch durch die Art des Probenkopfes beeinflusst werden (siehe unten). Alle ermittelten Glucosegehalte werden in ausreichender Präzision bestimmt (siehe Tabelle 9-34).

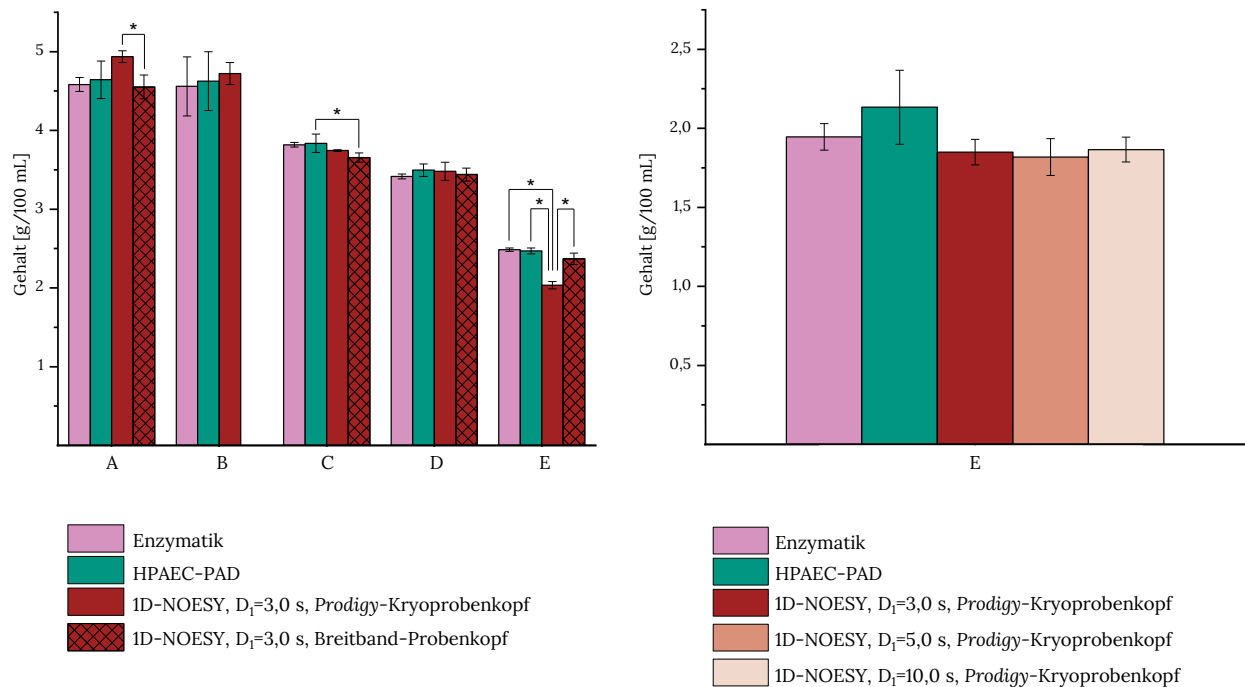


Abbildung 4-10: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Lactose in Vollmilch (A), Lactose in fettarmer Milch (B), Lactose in Buttermilch (C), Lactose in saurer Sahne (D) und D-Glucose in lactosefreier Milch (E). Die verwendete lactosefreie Milch der verschiedenen Messreihen stammen aus unterschiedlichen Chargen. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung analysiert, sodass die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben wird. Neben den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) wurde ein eindimensionales Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiment mit verschiedenen D₁-Delays verwendet (weitere Messparameter siehe Tabelle 4-6). Bei der Durchführung der 1D-NOESY-Methode wurden die Signale Lac-1b und Glc-1 (siehe Tabelle 4-1) genutzt. Die Messungen wurden zum einen an einem 500 MHz-Gerät, das mit einem Prodigy-Kryoprobenkopf ausgestattet ist, und zum anderen an einem 400 MHz-Gerät mit Breitband-Probenkopf durchgeführt. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Die Daten im Schaubild links wurden im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian erhalten (Merdian, 2019).

Die Proben der Matrices Vollmilch, Buttermilch, saure Sahne und lactosefreie Milch, die zur Bestimmung von Lactose und Glucose analysiert wurden, wurden zudem an einem 400 MHz-NMR-Gerät gemessen, das mit einem ungekühlten Breitband-Probenkopf ausgestattet ist (siehe Abbildung 4-10, Merdian, 2019). Dabei wird ein signifikant geringerer Lactosegehalt in Vollmilch, verglichen zum Lactosegehalt, der an dem 500 MHz-Gerät mit Prodigy-Kryoprobenkopf bestimmt wurde, quantifiziert. Die Lactosegehalte in Buttermilch und saurer Sahne, die an den verschiedenen Geräten ermittelt wurden, sind statistisch gleichwertig. Der Glucosegehalt in lactosefreier Milch unter Verwendung des ungekühlten Probenkopfes ist signifikant höher als der Glucosegehalt, der am Gerät mit Kryoprobenkopf ermittelt wurde und entspricht den Gehalten der Referenzmethoden. Monakhova und Kollegen stellten fest, dass die spektrale Auflösung in ¹H-NMR-Spektren bei der Verwendung eines Prodigy-Probenkopfes vermindert ist im Vergleich zu den Spektren, die an einem Gerät mit ungekühltem Probenkopf gemessen wurden (Monakhova & Diehl, 2019). Dies kann im Vergleich der

Spektren, die an den verschiedenen Geräten gemessen wurden, nicht festgestellt werden. Allerdings werden bei der Verwendung der unterschiedlichen Geräte in Vollmilch und in lactosefreier Milch signifikant unterschiedliche Gehalte an Lactose und Glucose ermittelt. Die mithilfe des Breitbandprobenkopfs ermittelten Gehalte sind dabei zu den Gehalten der Referenzmethoden gleichwertig. Ein negativer Einfluss auf die Quantifizierung der Analyten bei der Verwendung eines *Prodigy*-Probenkopfes kann somit nicht ausgeschlossen werden.

In einer zweiten Messreihe wurde die 1D-NOESY-Pulssequenz mit verschiedenen D_1 -Delays von 3,0 s, 5,0 s und 10,0 s verwendet (siehe Abbildung 4-10 rechts), um zu überprüfen, inwiefern die Unterbestimmung von Glucose in lactosefreier Milch durch den verringerten D_1 -Delay verursacht wird. Die Probe stammt vom gleichen Hersteller, aber aus einer unterschiedlichen Charge, sodass die Gehalte der verschiedenen Messreihen voneinander abweichen können. Die Probe musste zur ausreichenden Ausfällung aller Trübstoffe mit höheren Konzentrationen an Carrez-Salzen im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II (siehe Tabelle 3-1) behandelt werden. Hohe Konzentrationen an Carrez-Salzen können besonders die enzymatische Bestimmung von Glucose beeinflussen, worauf im folgenden Methodenvergleich geachtet werden sollte. Sowohl beide Referenzmethoden als auch die 1D-NOESY-Experimente mit verschiedenen D_1 -Delays quantifizieren statistisch gleichwertige Gehalte. Zudem ermitteln alle Methoden präzise Messergebnisse. Die durch Aufstockung ermittelten Wiederfindungsraten liegen zwischen 85,5 % und 93,8 % (siehe Tabelle 9-35). Die Wiederfindungen deuten auf eine systematische Unterbestimmung von Glucose hin, die vermutlich durch die verwendete Carrez-Behandlung verursacht wird. Dennoch kann ein 1D-NOESY-Experiment mit einem D_1 -Delay von 3,0 s verwendet werden, um Glucose in lactosefreier Milch gleichwertig zu den Referenzmethoden zu quantifizieren. Der statistisch niedrigere Glucosegehalt, der in der ersten Messreihe (siehe Abbildung 4-10 links) bestimmt wurde, ist somit vermutlich nicht auf den verkürzten D_1 -Delay zurückzuführen. Der in 4.1.1 zur Quantifizierung von Glucose optimierte D_1 -Delay von 4,0 s kann demzufolge auf 3,0 s reduziert und eine weitere Verkürzung der Messzeit ermöglicht werden.

Die optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden (siehe Tabelle 4-6) wurden auch zur Bestimmung von Lactose in Vollmilch sowie von Glucose in lactosefreier Milch eingesetzt. Zusätzlich ist bei der Verwendung von 2D-NMR-Experimenten die Quantifizierung von Galactose in lactosefreier Milch möglich. Die Proben, die aus unterschiedlichen Chargen wie die mithilfe der 1D-NOESY-Methoden analysierten Proben stammen, mussten mit Carrez-Reagenzien im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II behandelt werden. Die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden wurden ohne die Verwendung einer internen Standardsubstanz durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Verwendung einer internen Standardsubstanz zur Quantifizierung der Analyten in Matrix überhaupt notwendig ist. Der Zusatz bedeutet einen zusätzlichen Arbeitsschritt, der gegebenenfalls entfallen könnte.

Die mithilfe aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden quantifizierten Lactosegehalte sind signifikant kleiner als der enzymatisch bestimmte Gehalt (siehe Abbildung 4-11). Die Ergebnisse des HSQC-

Experiments mit $D_1=1,5$ s und NUS-Kopplung sowie der ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung sind zum Ergebnis der HPAEC-PAD-Methode statistisch gleichwertig, sodass diese Methoden zur Quantifizierung von Lactose in Vollmilch verwendet werden könnten. Alle durchgeführten Methoden sind als ausreichend präzise mit Variationskoeffizienten zwischen 0,9 % und 3,6 % zu bewerten (Tabelle 9-36). Die ermittelten Wiederfindungen aller Methoden liegen im gleichen Bereich von 89,2 % bis 97,5 % (siehe Tabelle 9-35). Lediglich die HSQC-Methode mit einem D_1 -Delay von 1,5 s und NUS-Kopplung sowie die ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung quantifizieren somit Lactose in Vollmilch gleichwertig zur HPAEC-PAD-Methode. Alle anderen HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden bestimmen signifikant kleinere Lactosegehalte.

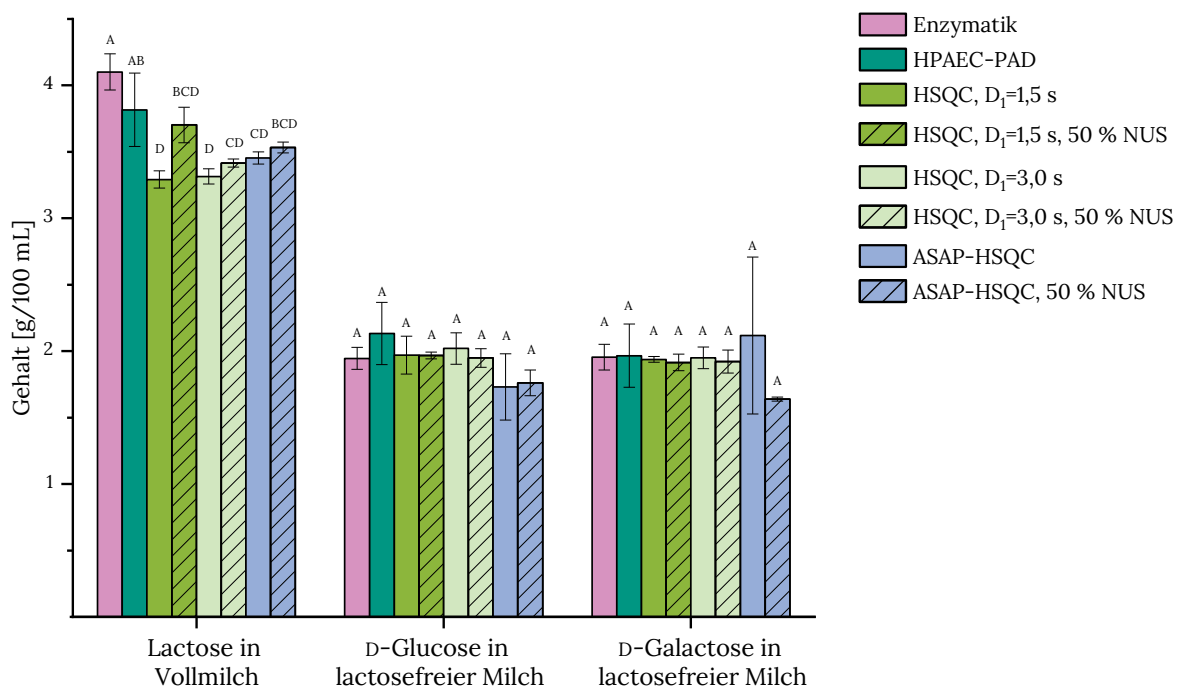


Abbildung 4-11: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Lactose in Vollmilch sowie von D-Glucose und D-Galactose in lactosefreier Milch. Beide Matrices wurden in Dreifachbestimmung analysiert, sodass die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben wird. Die Proben wurden mithilfe der Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Die HSQC-Experimente wurden mit verschiedenen D_1 -Delays durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Lac-2, Glc-2 und Gal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und durch verschiedene hochgestellten Buchstaben gekennzeichnet. NUS: Non-Uniform Sampling

Die Glucose- und Galactosegehalte, die bei der Durchführung der optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden bestimmt wurden, sind zu den Gehalten, die mithilfe beider Referenzmethoden quantifiziert wurden, statistisch gleichwertig (siehe Abbildung 4-11). Die Ergebnisse der ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung zeigen keine ausreichende Präzision mit Variationskoeffizienten von

bis zu 27,9 %. Bei der Anwendung der weiteren 2D-NMR-spektroskopischen Methoden konnten Ergebnisse mit Variationskoeffizienten kleiner 5,5 % ermittelt werden (Tabelle 9-36), was als ausreichend präzise betrachtet wird. Bei der Aufstockung von Glucose und Galactose in lactosefreier Milch wurden mit den Referenzmethoden lediglich Wiederfindungsraten von 90,2 % bis 93,8 % ermittelt. Diese systematischen Analytverluste von bis zu 9,8 % könnten, wie in 4.1.5 beschrieben, durch die Carrez-Klärung verursacht werden. Die Wiederfindungsraten für Glucose, die mithilfe der HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden bestimmt wurden, liegen zwischen 79,3 % und 89,5 %, die für Galactose zwischen 79,7 % und 89,6 % (siehe Tabelle 9-35). Die Werte verdeutlichen, dass die Analyten mit allen Methoden vermutlich systematisch unterbestimmt werden. Die größten Verluste mit bis zu 20,7 % werden bei der Durchführung der ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung ermittelt. Die optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden können somit zur Quantifizierung von Glucose und Galactose in lactosefreier Milch verwendet werden. Sie quantifizieren die Analyten in gleicher Richtigkeit wie die Referenzmethoden, wobei die Analyten vermutlich bei der Verwendung aller Methoden unterbestimmt werden. Die Unterbestimmungen sind vermutlich nicht auf die Messmethoden, sondern die Probenaufarbeitung zurückzuführen. Die Präzision der verwendeten HSQC-Methoden wird als ausreichend beurteilt, während die ASAP-HSQC-Methoden weniger präzise Messwerte ermitteln.

HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden scheinen generell geeignet zu sein, um Mono- und Disaccharide in Milch zu quantifizieren. Um die Methodenperformance weiter zu verbessern, erfolgt die Quantifizierung bei der Durchführung von 2D-NMR-spektroskopischen Methoden im Folgenden durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz Alloose. Dabei wurde die interne Standardsubstanz nicht zur Überprüfung der Carrez-Behandlung, sondern zur Überprüfung der Messmethode eingesetzt und daher erst nach Carrez-Behandlung zugegeben.

Kakaogetränk auf Milchbasis

Die in Tabelle 4-6 vorgestellten NMR-spektroskopischen Methoden wurden zur Quantifizierung von Lactose und Saccharose in einem Kakaogetränk auf Milchbasis verwendet (siehe Abbildung 4-12 links). Hierbei musste die Probe zur vollständigen Entfernung aller Trübstoffe mit hohen Konzentrationen an Carrez-Reagenzien entsprechend der Salzkonzentrationen von Carrez-Klärung III (siehe 4.1.6.1.1 sowie Tabelle 3-1) behandelt werden, wodurch mit Analytverluste bei der Quantifizierung zu rechnen ist (siehe 4.1.6.1.1).

Die Ergebnisse, die mithilfe aller NMR-spektroskopischen Methoden bei der Quantifizierung von Lactose und Saccharose in dem Kakaogetränk bestimmt wurden, sind statistisch äquivalent zu den Ergebnissen beider Referenzmethoden. Die Lactoseergebnisse aller Methoden zeigen Variationskoeffizienten kleiner 12,7 %, wodurch die Messungen als ausreichend bis mäßig präzise

bewertet werden. Die Saccharosegehalte, die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode sowie des 1D-NOESY-Experiments bestimmt wurden, weisen Variationskoeffizienten von 16,4 % bzw. 23,8 % auf (siehe Tabelle 9-39). Die Ergebnisse können daher nicht als präzise beurteilt werden.

Die durch Aufstockungsversuche ermittelten Wiederfindungsraten der Analyten Lactose und Saccharose im Kakaotränk sind in Tabelle 4-9 dargestellt. Für Lactose wurde schon mit den Referenzmethoden lediglich eine Wiederfindungsrate von $88,5 \% \pm 7,1 \%$ (enzymatische Bestimmung) bzw. $88,1 \% \pm 5,9 \%$ (HPAEC-PAD) ermittelt, sodass vermutlich systematische Analytverluste von bis zu 11,5 %, verursacht durch die Carrez-Behandlung, auftreten. Die Saccharoseverluste werden als geringer eingeschätzt, da eine Wiederfindungsrate von $100 \% \pm 7,2 \%$ mit der enzymatischen Methode bestimmt wurde. Die mittels 1D-NOESY-Methode bestimmte Wiederfindungsrate von Lactose (78,4 %, siehe Tabelle 4-9) zeigt eine deutliche Unterbestimmung von Lactose an. Die Wiederfindungsraten, die bei der Durchführung aller anderen NMR-spektroskopischen Methoden (86,8 % bis 95,6 %) ermittelt wurden, liegen im gleichen Bereich wie die durch die Referenzmethoden bestimmten Wiederfindungen. Bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten von Saccharose kann festgestellt werden, dass alle Werte im gleichen Bereich von 84,7 % bis 95,5 % liegen und auch keine deutliche Abweichung zu den Referenzwerten erkennbar ist.

Die nicht in der Matrix enthaltenen Analyten wurden ebenfalls im Zuge von Aufstockungsversuchen dem Kakaotränk auf Milchbasis zugesetzt, und die Wiederfindungsraten wurden bestimmt (siehe Tabelle 9-37). Die Wiederfindungsraten von Glucose (78,4 % bis 86,3 %), Fructose (67,4 % bis 81,1 %) und Galactose (79,3 % bis 87,2 %) liegen unabhängig von der durchgeführten Methode im gleichen Bereich und zeigen systematische Unterbestimmungen der Analyten von bis zu 32,6 %. Da auch bei der Verwendung der Referenzmethoden Wiederfindungsraten um 88 % ermittelt werden, scheint die Unterbestimmung nicht von der verwendeten Methode, sondern eher von der durchgeführten Carrez-Klärung verursacht zu werden. Auch in 4.1.6.1.1 wurden Analytverluste bei der Behandlung mit hohen Konzentrationen an Carrez-Reagenzien vermutet. Die bei der Durchführung der HPAEC-PAD-Methode ermittelte Wiederfindung von Maltose liegt bei 98,2 % und zeigt daher keine Unterbestimmung an. Zu diesem Ergebnis im Kontrast steht die enzymatisch bestimmte Wiederfindung von 71,2 %. Die ermittelten Wiederfindungen von Maltose, die bei der Durchführung aller 2D-NMR-spektroskopischen Methoden bestimmt wurden, liegen in einem Bereich von 80,1 % bis 85,5 % und lassen somit eher auf eine Unterbestimmung entsprechend der enzymatischen Referenzmethode schließen.

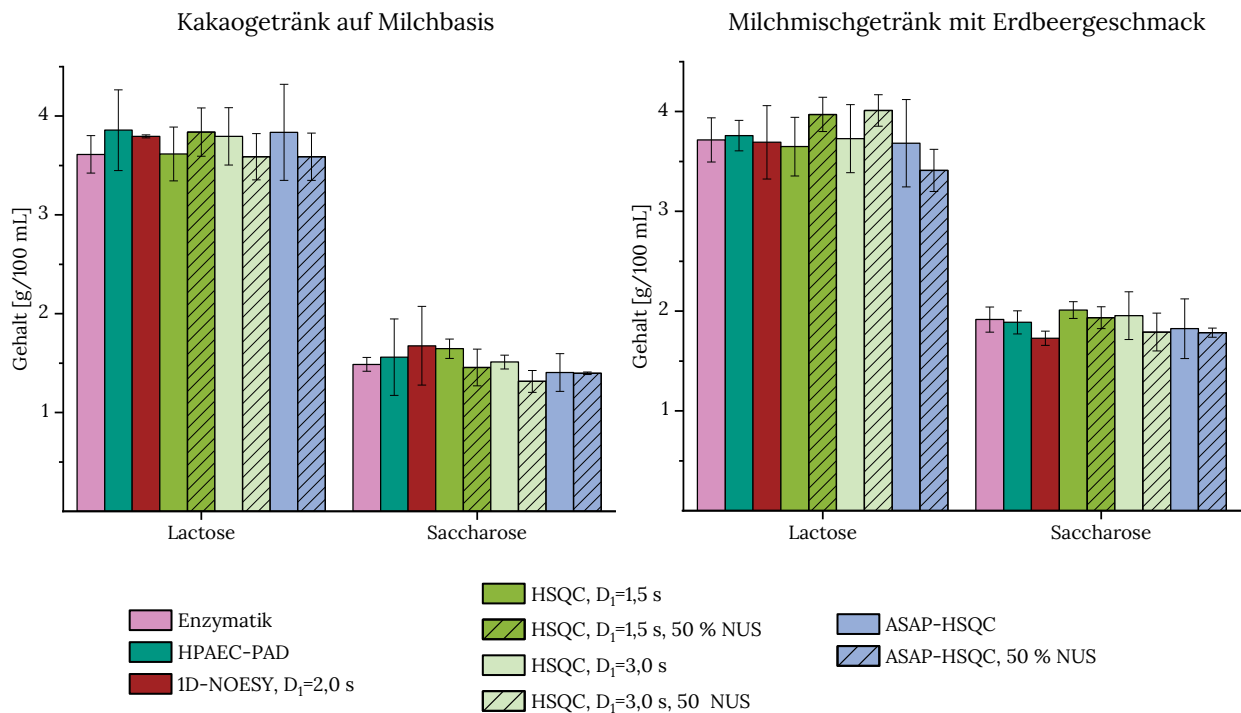


Abbildung 4-12: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Lactose und Saccharose in einem Kakaogetränk auf Milchbasis (links) und einem Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack (rechts). Beide Matrices wurden in Dreifachbestimmung analysiert, sodass die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben wird. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik sowie Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit einem eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signale Lac-1b und Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert. Zudem wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments angewandt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2 und Sacc-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei den HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mithilfe einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet (hier nicht vorkommend). NUS: Non-Uniform Sampling

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Lactose und Saccharose mit allen NMR-spektroskopischen Methoden quantifiziert werden können. Für Lactose wurde mit der 1D-NOESY-Methode eine geringere Wiederfindungsrate als mit den anderen Methoden ermittelt. Alle 2D-NMR-spektroskopischen Methoden quantifizieren Lactose gleichwertig zu den Referenzmethoden, wobei eine systematische Unterbestimmung der Analyten in Folge der Carrez-Behandlung vermutet wird. Die Präzision aller Methoden wird als ausreichend bei der Quantifizierung von Lactose bewertet. Bei der Quantifizierung von Saccharose wurden mithilfe der 1D-NOESY-Methode weniger präzise Messungen durchgeführt, was bei der möglichen Anwendbarkeit der Methode berücksichtigt werden sollte. Die zu testenden Methoden quantifizierten Saccharose vergleichbar zu den verwendeten Referenzmethoden, wobei auch hier Saccharose vermutlich mit allen Methoden aufgrund der verwendeten Carrez-Behandlung unterbestimmt wird. Glucose, Fructose, Galactose und Maltose

konnten mit allen Methoden präzise bestimmt werden. Auch bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten dieser Analyten sind deutliche Verluste erkennbar, unabhängig von der eingesetzten Messmethode.

Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack

Die optimierten NMR-spektroskopischen Methoden wurden genutzt, um Lactose und Saccharose in einem Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack zu quantifizieren. Die Probe wurde wie das Kakaogetränk auf Milchbasis mit Konzentrationen der Carrez-Reagenzien entsprechend Carrez-Klärung III behandelt (siehe 4.1.6.1.1 sowie Tabelle 3-1). Im Vergleich aller Methoden werden statistisch äquivalente Gehalte von Lactose und Saccharose (siehe Abbildung 4-12 rechts) bestimmt. Die Variationskoeffizienten der Ergebnisse, die mit einigen HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden bestimmt wurden, zeigen Werte von bis zu 16,4 % an (siehe Tabelle 9-36), wodurch einige Messungen als unpräzise bewertet werden.

Die durch Aufstockung ermittelten Wiederfindungsraten aller Methoden liegen sowohl für Lactose (79,9% bis 89,2 %) als auch für Saccharose (76,4 % bis 91,5 %) in einem ähnlichen Bereich (siehe Tabelle 4-9). Zusätzlich wurden die Analyten Glucose, Fructose, Galactose und Maltose dem Milchmischgetränk zugesetzt und die Wiederfindungsraten bestimmt (siehe Tabelle 9-38). Auch die Wiederfindungsraten von Glucose, Fructose und Galactose liegen unabhängig von der durchgeführten Messmethode im gleichen Bereich. Bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten von Maltose ist, wie schon in der Matrix des Kakaogetränks, auffällig, dass mithilfe der HPAEC-PAD-Methode eine deutlich höhere Wiederfindungsrate von 99,9 % als bei der Durchführung der enzymatischen Bestimmung (67,0 %) und der 2D-NMR-spektroskopischen Methoden (71,4 % bis 80,4 %) ermittelt wird. Dennoch weisen die Wiederfindungsraten aller Analyten auch in der Matrix des Milchmischgetränks mit Erdbeergeschmack auf deutliche Analytverluste unabhängig von der durchgeführten Analysenmethode hin, die vermutlich durch die verwendete Carrez-Klärung verursacht wurden.

Die optimierten NMR-spektroskopischen Methoden sind somit auch in der Lage Lactose und Saccharose in einem Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack zu quantifizieren. Die entwickelten Methoden quantifizieren dabei äquivalente Gehalte zu den verwendeten Referenzmethoden, wobei eine systematische Unterbestimmung durch die bestimmten Wiederfindungsraten angezeigt wird. Einige HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden quantifizieren die Analyten zudem nicht ausreichend präzise.

Tabelle 4-9: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Lactose und Saccharose durch Aufstockung eines Kakaogetränks auf Milchbasis sowie eines Milchmischgetränks mit Erdbeergeschmack ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie einem eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiment analysiert (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signale Lac-1b und Sacc-1 siehe Tabelle 4-1). Des Weiteren wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2 und Sacc-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: Non-Uniform Sampling

	Kakaogetränk auf Milchbasis		Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack	
	WF [%] ± SW [%]		WF [%] ± SW [%]	
	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose
Enzymatik	88,5 ± 7,1	100,0 ± 7,2	80,7 ± 7,8	82,9 ± 6,9
HPAEC-PAD	88,1 ± 5,9	88,4 ± 6,0	84,5 ± 11,4	82,2 ± 6,1
1D-NOESY, D₁=2,0 s	78,4 ± 2,2	86,7 ± 6,8	79,9 ± 1,1	89,9 ± 6,3
HSQC, D₁=1,5 s	89,3 ± 6,2	84,7 ± 7,0	82,6 ± 12,5	81,0 ± 9,1
HSQC, D₁=1,5 s, 50 % NUS	91,8 ± 0,3	93,6 ± 2,4	87,5 ± 14,9	91,5 ± 8,1
HSQC, D₁=3,0 s	86,8 ± 2,6	85,9 ± 1,1	89,2 ± 15,4	84,2 ± 14,4
HSQC, D₁=3,0 s, 50 % NUS	94,3 ± 0,5	94,3 ± 0,5	87,4 ± 12,0	87,4 ± 11,9
ASAP-HSQC	94,8 ± 3,2	89,3 ± 1,6	82,5 ± 13,7	76,4 ± 14,5
ASAP-HSQC, 50 % NUS	95,6 ± 3,7	95,5 ± 2,3	81,4 ± 11,9	83,5 ± 9,0

Um die Anwendbarkeit der Methoden auf weitere Analyten zu überprüfen, wurde in der folgenden Messreihe ein lactosefreies Kakaogetränk analysiert, das statt Lactose entsprechend Glucose und Galactose enthält. Die Proben wurden mit Salzkonzentrationen äquivalent zur Carrez-Klärung III behandelt. Die zudem analysierte Fruchtbuttermilch in der Geschmacksrichtung Mango enthält ebenfalls keine Lactose, sondern entsprechend Glucose und Galactose. Die enthaltene Saccharose wird zum Süßen des Produktes eingesetzt. Zusätzlich konnte Fructose identifiziert werden, die vermutlich aus dem zugesetzten Mangopüree und Mangosaft (siehe Tabelle 9-1) stammt. Bei der Behandlung der Fruchtbuttermilchproben reichten geringere Konzentrationen der Carrez-Salze im Bereich von Carrez-Klärung II zur vollständigen Klärung der Proben aus. Die Proben zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden mit höheren Konzentrationen der Carrez-Reagenzien (entsprechend Carrez-Klärung III) behandelt.

Lactosefreies Kakaogetränk auf Milchbasis

Die im lactosefreien Kakaogetränk enthaltenen Analyten Saccharose, Glucose und Galactose können mit allen verwendeten Methoden statistisch gleichwertig quantifiziert werden (siehe Abbildung 4-13 links). Bei der Durchführung der enzymatischen Bestimmung von Saccharose wurden keine präzisen Ergebnisse ermittelt (Variationskoeffizient von 20,4 %, siehe Tabelle 9-42). Die Ergebnisse der Saccharosebestimmung beider ASAP-HSQC-Methoden können mit Variationskoeffizienten von 29,6 % bzw. 32,0 % ebenfalls nicht als präzise bewertet werden. Die ermittelten Glucose- und Galactosegehalte wurden mithilfe aller Methoden mäßig präzise mit Variationskoeffizienten kleiner 12,6 % bestimmt. Weder die verwendete HPAEC-PAD-Methode noch die NMR-spektroskopischen Methoden konnten Lactose in dem lactosefreien Milchprodukt nachweisen. Selbst bei der HPAEC-PAD-Analyse aufkonzentrierter Proben konnte Lactose nicht bestimmt werden.

Bei Betrachtung der enzymatisch bestimmten Wiederfindungsraten von Saccharose, Glucose und Galactose ist auffallend, dass lediglich Analytverluste zwischen 2,6 % und 6,9 % ermittelt werden, während bei der Analyse der anderen Milchmischgetränke bisher höhere Analytverluste beobachtet wurden. Die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode bestimmten Wiederfindungen sind geringer als die enzymatisch bestimmten Wiederfindungsraten (siehe Tabelle 4-10). Für Glucose und Galactose liegen die Wiederfindungsraten, die durch die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden ermittelt wurden im Bereich der Wiederfindungsraten unter Verwendung der HPAEC-PAD-Methode. Für Saccharose sind die Wiederfindungen einiger NMR-spektroskopischer Methoden höher als die unter Anwendung der HPAEC-PAD bestimmten Raten. Eine Korrelation zwischen der Bestimmung einer besseren Wiederfindung und einzelnen NMR-spektroskopischen Methoden kann dabei allerdings nicht festgestellt werden. Da die Proben mit Carrez-Konzentrationen im Bereich von Carrez-Klärung III behandelt wurden, wird eine Beeinflussung der Quantifizierung durch die vorangehende Carrez-Behandlung vermutet (siehe dazu auch 4.1.6.1.1).

Die nicht in der Matrix enthaltenen Analyten Lactose, Fructose und Maltose wurden der Probe zugegeben, sodass ebenfalls Wiederfindungsraten ermittelt werden konnten (siehe Tabelle 9-40). Die enzymatisch bestimmten Wiederfindungen zeigen mit Werten von 75,7 % (Fructose), 85,9 % (Lactose) und 70,3 % (Maltose) eine systematische Unterbestimmung dieser Analyten von 15-30 % an. Auffallend ist zudem, dass die Wiederfindungsraten der in der Matrix enthaltenen Analyten Saccharose (97,4 %), Glucose (94,3 %) und Galactose (93,1 %) lediglich geringe Unterbestimmungen vermuten lassen. Die Wiederfindungsraten, die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode sowie der NMR-spektroskopischen Methoden für Fructose und Lactose bestimmt wurden, liegen im gleichen Bereich wie die enzymatisch bestimmten Wiederfindungsraten (siehe Tabelle 9-40). Wie auch schon bei den anderen Milchmischgetränken, wird Maltose unter Verwendung der HPAEC-PAD-Methode mit einer Wiederfindungsrate von 96,5 % bestimmt, während enzymatisch lediglich ein Wert von 70,3 % ermittelt wird (siehe Tabelle 9-40). Die Wiederfindungsraten, die bei der Durchführung der HSQC-

und ASAP-HSQC-Methoden bestimmt wurden (77,4 % bis 84,1 %), weisen ebenfalls auf erhebliche Analytverluste hin.

Die optimierten HSQC-Methoden ermitteln äquivalente Gehalte zu den durchgeführten Referenzmethoden und können daher zur Quantifizierung von Saccharose, Glucose und Galactose in einem lactosefreien Milchmodertränk genutzt werden. Auch in dieser Matrix können Analytverluste durch die verwendete Carrez-Klärung nicht ausgeschlossen werden. Besonders die durchgeführten ASAP-HSQC-Methoden zeigen zudem teilweise unpräzise Messungen.

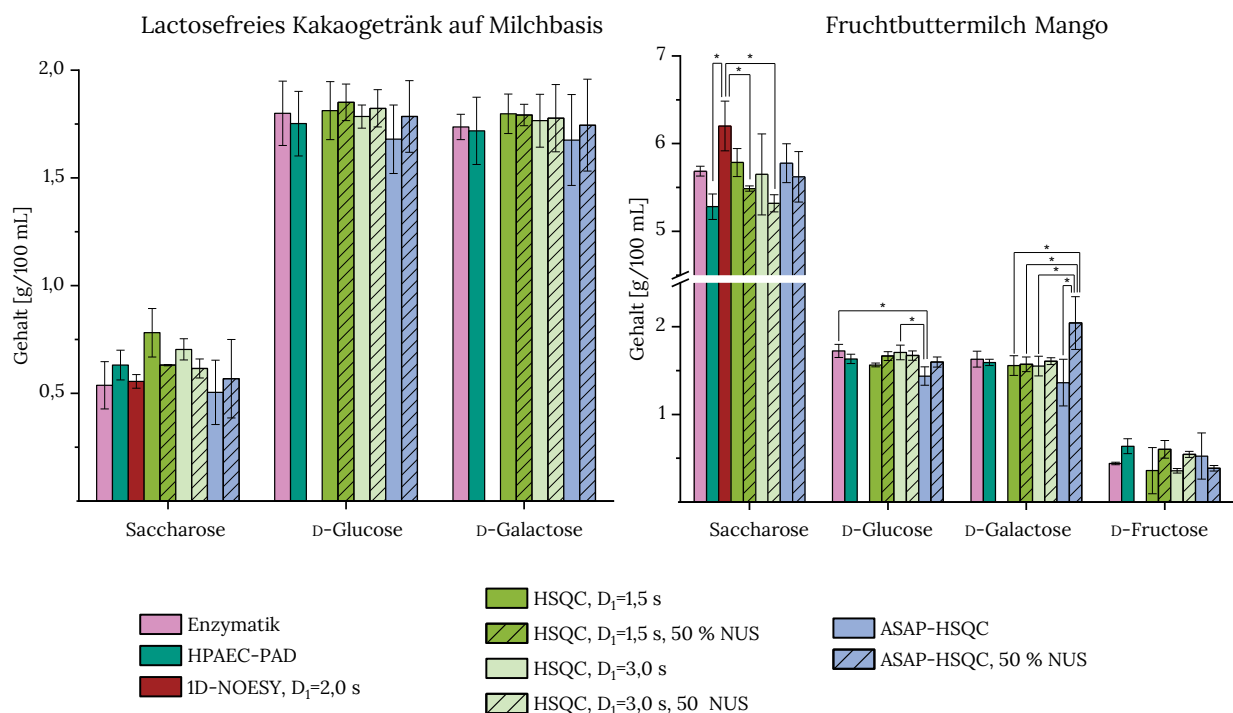


Abbildung 4-13: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Saccharose, D-Glucose und D-Galactose in einem lactosefreien Kakaotränk auf Milchbasis (links) sowie von Saccharose, D-Glucose, D-Galactose und D-Fructose in einer Fruchtbuttermilch Mango (rechts). Beide Matrices wurden in Dreifachbestimmung analysiert, sodass die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben wird. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit einem eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert. Zudem wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments angewandt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Sacc-2, Glc-2, Gal-2 und Fru-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung bei den HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden erfolgte durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, *post-hoc* Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. NUS: Non-Uniform Sampling

Fruchtbuttermilch Mango

Die Anwendbarkeit der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden wurde zur Quantifizierung von Saccharose, Glucose, Galactose und Fructose in Fruchtbuttermilch getestet. Im Vergleich der Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Methoden mit den Ergebnissen der Referenzmethoden Enzymatik und HPAEC-PAD werden lediglich statistisch gleichwertige Fructosegehalte ermittelt (siehe Abbildung 4-12 rechts). Die Fructosegehalte, die bei Anwendung der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s ohne NUS-Kopplung sowie der ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung bestimmt wurden, zeigen große Variationskoeffizienten von 73,4 % und 49,9 %, die auch maßgeblich die Ergebnisse der ANOVA beeinflussen. Diese großen Messungenauigkeiten könnten auf die kleinen Fructosegehalte von ca. 0,44 g/100 mL im unteren Bereich des Arbeitsbereichs zurückzuführen sein.

Die mithilfe aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden quantifizierten Saccharosegehalte sind zu den Ergebnissen der Referenzmethoden statistisch gleichwertig. Bei Verwendung der 1D-NOESY-Methode wird ein signifikant höherer Gehalt im Vergleich zum Ergebnis der HPAEC-PAD-Methode ermittelt. Der enzymatisch bestimmte Referenzgehalt von Glucose in Fruchtbuttermilch (1,73 g/100 mL \pm 0,03 g/100 mL) ist signifikant höher als der mittels der ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung bestimmte Gehalt von 1,44 g/100 mL. Da die Probe mit Carrez-Reagenzien im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II behandelt wurde, kann der enzymatisch bestimmte Referenzwert auch durch die Carrez-Behandlung beeinflusst worden sein (siehe Abbildung 4-8 sowie 4.1.6.1.1). Der mittels HPAEC-PAD bestimmte Glucosegehalt von 1,60 g/100 mL weicht zum Ergebnis der ASAP-HSQC-Methode nicht signifikant ab, sodass eine Unterbestimmung von Glucose bei Anwendung der ASAP-HSQC-Methode nicht mit Sicherheit bestätigt werden kann. Bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten (siehe Tabelle 4-10) kann keine Unterbestimmung bei der Durchführung der ASAP-HSQC-Methode im Vergleich zu den Referenzmethoden festgestellt werden. Alle getesteten HSQC-Methoden sowie die ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung quantifizieren Glucosegehalte, die zu den Ergebnissen, die bei der Verwendung der Referenzmethoden ermittelt wurden, statistisch gleichwertig sind. Die Glucoseergebnisse aller Methoden zeigen eine ausreichende Präzision mit Variationskoeffizienten kleiner 7,4 % (siehe Tabelle 9-42). Bei der Quantifizierung von Galactose ist der im Vergleich zu den anderen Methoden erhöhte Galactosegehalt, der durch die ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung gemessen wurde, auffällig. Der Gehalt weicht jedoch zu den Gehalten der Referenzmethoden nicht statistisch ab. Die mithilfe der ASAP-HSQC-Methode (50 % NUS) bestimmte Wiederfindungsrate von 78,1 % \pm 14,1 % zeigt keine Überbestimmung von Galactose an. Die durch beide ASAP-HSQC-Methoden ermittelten Galactosegehalte weisen hohe Variationskoeffizienten von 14,8 % und 19,5 % auf (siehe Tabelle 9-42), was auf eine schlechte Präzision bei der Durchführung der Methoden hindeutet.

Die Wiederfindungsraten von Saccharose, die im Rahmen der durchgeführten Aufstockungsversuche sowohl mithilfe der Referenzmethoden als auch mit den NMR-spektroskopischen Methoden

bestimmt wurden, liegen zwischen 92,7 % und 101,9 % und weisen somit auf lediglich geringe Analytverluste hin (siehe Tabelle 4-10). Die enzymatisch bestimmte Wiederfindungsrate von Galactose liegt bei 103,9 %, wohingegen sowohl mit der HPAEC-PAD-Methode als auch den 2D-NMR-spektroskopischen Methoden geringere Wiederfindungen (78,1 % bis 92,9 %) bestimmt werden. Die Wiederfindungen von Glucose liegen für alle Methoden im gleichen Bereich zwischen 84,2 % und 95,1 %. Bei der Bestimmung der Wiederfindungsraten von Fructose werden Werte in einem großen Bereich ermittelt (75,1 % bis 95,7 %), die allerdings keine Tendenz zur Unterbestimmung mithilfe einer bestimmten Methoden erkennen lassen. Für die nicht in der Matrix enthaltenen Analyten Lactose und Maltose wurden ebenfalls Aufstockungsversuche durchgeführt. Die ermittelten Wiederfindungsraten deuten auf Analytverluste von bis zu 26,7 % hin (siehe Tabelle 9-41).

Die optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden können zur richtigen und präzisen Quantifizierung von Saccharose in der Matrix Fruchtbuttermilch genutzt werden. Die 1D-NOESY-Methode hingegen bestimmt Saccharose in der betrachteten Matrix vermutlich über. Glucose und Galactose können mithilfe der HSQC-Methoden zu den Referenzmethoden gleichwertig quantifiziert werden. Die Verwendung der ASAP-HSQC-Methoden kann aufgrund wenig präziser Messungen sowie der deutlich abweichenden Gehalte für Glucose und Galactose nur bedingt empfohlen werden. Analytverluste treten bei der Analyse der Fruchtbuttermilch in geringerer Höhe als bei den anderen, getesteten Matrices auf. Fructose kann mithilfe der 2D-NMR-spektroskopischen Methoden vermutlich aufgrund seines geringen Gehalts nicht präzise quantifiziert werden.

Für die Quantifizierung relevanter Mono- und Disaccharide in Milch und Milchprodukten konnte das 1D-NOESY-Experiment zur Bestimmung von Saccharose und Lactose genutzt werden. Lediglich in der Matrix Fruchtbuttermilch wird die Verwendung der 1D-NMR-spektroskopischen Methode aufgrund möglicher Überbestimmung von Saccharose nicht empfohlen. Alle verwendeten HSQC- und ASAP-HSQC-Experimente sind in der Lage die Analyten Lactose, Saccharose, Glucose und Galactose in Milchlischgetränken vergleichbar zu den Referenzmethoden zu quantifizieren. In der Matrix Fruchtbuttermilch konnten die verwendeten ASAP-HSQC-Experimente nicht zuverlässig zur Quantifizierung eingesetzt werden. Zudem ist die Durchführung der ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung in allen Matrices mit einer geringen Präzision gekennzeichnet. Die ermittelten Wiederfindungsraten deuten in den meisten Matrices auf systematische Unterbestimmungen der Analyten hin. Da diese meist unabhängig von der verwendeten Messmethode auftreten, wird eine Beeinflussung der Richtigkeit bei der Verwendung einer Carrez-Klärung vermutet. Zur individuellen Beurteilung der Richtigkeit sollte stets eine Aufstockungsprobe in der Messreihe mitgeführt werden.

Tabelle 4-10: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Saccharose (Sacc), D-Glucose (Glc) und D-Galactose (Gal) durch Aufstockung eines lactosefreien Kakaotranks auf Milchbasis sowie von Sacc, Glc, Gal und D-Fructose (Fru) durch Aufstockung einer Fruchtbuttermilch der Geschmacksrichtung Mango ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie einem eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert. Des Weiteren wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Sacc-2, Glc-2, Gal-2 und Fru-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: *Non-Uniform Sampling*

	Lactosefreies Kakaotränk			Fruchtbuttermilch Mango			
	WF [%] ± SW [%]			WF [%] ± SW [%]			
	Sacc	Glc	Gal	Sacc	Glc	Gal	Fru
Enzymatik	97,4 ± 2,3	94,3 ± 3,0	93,1 ± 1,8	95,7 ± 2,5	90,7 ± 1,1	103,9 ± 1,3	85,4 ± 1,5
HPAEC-PAD	89,9 ± 6,1	81,3 ± 6,8	80,1 ± 5,5	92,7 ± 9,7	84,2 ± 7,3	83,9 ± 8,2	75,1 ± 3,7
1D-NOESY, D_i=2,0 s	95,4 ± 8,1	-	-	93,8 ± 2,5	-	-	-
HSQC, D_i=1,5 s	84,0 ± 1,6	79,9 ± 2,8	80,2 ± 1,4	100,7 ± 2,8	95,1 ± 2,5	92,9 ± 1,3	95,7 ± 7,2
HSQC, D_i=1,5 s, 50 % NUS	90,4 ± 1,3	82,5 ± 3,6	86,7 ± 5,6	93,3 ± 2,8	89,2 ± 3,0	86,5 ± 4,7	80,9 ± 6,6
HSQC, D_i=3,0 s	87,9 ± 4,0	82,7 ± 4,2	85,0 ± 3,4	97,6 ± 1,8	89,3 ± 1,3	88,1 ± 2,4	87,4 ± 2,5
HSQC, D_i=3,0 s, 50 % NUS	82,9 ± 6,0	80,1 ± 4,3	84,0 ± 3,4	95,6 ± 2,0	88,7 ± 2,6	85,5 ± 3,6	82,4 ± 3,8
ASAP-HSQC	92,9 ± 4,5	83,3 ± 1,1	86,9 ± 0,5	96,9 ± 4,9	92,0 ± 2,2	90,8 ± 7,1	81,4 ± 4,4
ASAP-HSQC, 50 % NUS	97,7 ± 9,1	85,0 ± 2,3	79,4 ± 5,6	101,9 ± 3,9	94,7 ± 1,5	78,1 ± 14,1	84,2 ± 3,1

4.1.6.2 Mit Isomaltulose gesüßte Produkte

4.1.6.2.1 Probenaufarbeitung

Die mit Isomaltulose gesüßten Proben (siehe 3.1) wurden zum Teil in Phosphatpuffer gelöst und zum Teil einer Carrez-Klärung unterzogen. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Aufarbeitungsmethoden für die Quantifizierung von Isomaltulose geeignet sind, wurden die Wiederfindungsraten ermittelt. Wiederfindungsraten, die vom Idealwert von 100 % abweichen, können einen Hinweis auf eine systematische Beeinflussung des Isomaltulosegehalts durch die Aufarbeitung geben. Die aufgestockten Proben wurden mit den beiden Vergleichsmethoden GC-FID und HPAEC-PAD sowie einer HSQC-Methode mit einem D_1 -Delay von 1,5 s analysiert.

Für die in Puffer gelösten Proben wurden Wiederfindungsraten von Isomaltulose zwischen 96,2 % und 111,7 % ermittelt. Die verwendeten Vergleichsmethoden bestimmen Wiederfindungsraten im Bereich von 96,2 % bis 105,2 %, wodurch die Richtigkeit der Methoden als ausreichend bewertet werden kann (Ruf, 2020). Mittels der durchgeführten HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s scheint eine leichte Überbestimmung zu erfolgen (Wiederfindungen von 108,7 % bzw. 111,7 %, siehe Tabelle 4-11).

„Bug Break“, „Liquid Meal Vanilla“ und beide „Next Level Meal“-Proben wurden zur Abtrennung von Matrixkomponenten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Carrez-Salzen behandelt. Die Probe „Bug Break“ wurde mit Carrez-Reagenzien im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II versetzt (siehe Tabelle 3-1). Zur vollständigen Abtrennung aller Störbestandteile waren bei der Aufarbeitung der Probe „Liquid Meal Vanilla“ Carrez-Reagenzien der Konzentrationen 4,5 g/L (Kaliumhexacyanoferrat(II)) und 9,0 g/L (Zinksulfat) notwendig, die im Konzentrationsbereich zwischen Carrez-Klärung II und Carrez-Klärung III liegen (siehe Tabelle 3-1). Die beiden „Next Level Meal“ Proben wurden mit einer Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung der Konzentration 15 g/L und einer Zinksulfatlösung der Konzentration 30 g/L behandelt (Ruf, 2020). Die Konzentrationen der Carrez-Reagenzien sind deutlich größer als die höchsten getesteten Konzentrationen von Carrez-Klärung III (siehe Tabelle 3-1 und 4.1.6.1.1). Die Wiederfindungsraten von Isomaltulose liegen bei Betrachtung der Carrez-geklärten Proben zwischen 95,1 % und 105,8 %, unabhängig von der verwendeten Analysenmethode. Für die Carrez-behandelten Proben werden somit keine systematischen Analytverluste ermittelt.

Die Wiederfindungsraten für beide Probenvorbereitungen in Kombination mit drei verschiedenen Messmethoden liegen in einem akzeptablen Bereich zwischen 95,1 % und 111,7 %. Zusätzlich wurde keine Beeinflussung der Wiederfindungsraten durch die Carrez-Behandlung der Proben festgestellt. Beide Aufarbeitungsmethoden können somit für die Quantifizierung von Isomaltulose angewandt werden.

Tabelle 4-11: Wiederfindungsraten (WF) von Isomaltulose, die nach Aufstockung der Proben „Palatinose“, „Energize Lemon“, „Multicarbogel“, „Next Level Meal Schoko“, „Next Level Meal Erdbeere“, „Liquid Meal Vanilla“ und „Bug Break“ ermittelt wurden. Die Proben wurden mit den Vergleichsmethoden Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) in Einfachbestimmung (n=1) analysiert. Zusätzlich wurde ein *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment (Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 , $D_1=1,5$ s) in Doppelbestimmung (n=2) durchgeführt (Signal IM-4, siehe Tabelle 4-2). Bei den in Puffer gelösten Proben wurde bei der Durchführung der HPAEC-PAD- und der HSQC-Methode Maltulose als interne Standardsubstanz verwendet und bei den Carrez-geklärten Proben L-Rhamnose. Im Verlauf der GC-FID-Methode wurde Phenyl- β -D-glucopyranosid als interne Standardsubstanz eingesetzt. Als Präzisionsmaß wird, soweit möglich, die halbe Spannweite zwischen den beiden Messwerten ($R/2$) angegeben. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf ermittelt (Ruf, 2020).

	GC-FID (n=1)	HPAEC-PAD (n=1)	HSQC, $D_1=1,5$ s (n=2)
In Puffer gelöste Proben	WF [%]		WF [%] \pm R/2 [%]
„Palatinose“	96,2	100,1	108,7 \pm 1,4
„Energize Lemon“	100,5	104,4	101,2 \pm 0,8
„Multicarbogel“	104,7	105,2	111,7 \pm 1,1
Carrez-geklärte Proben	WF [%]		WF [%] \pm R/2 [%]
„Next Level Meal Schoko“	100,2	102,7	95,1 \pm 2,1
„Next Level Meal Erdbeere“	99,6	105,8	98,9 \pm 3,3
„Liquid Meal Vanilla“	100,4	94,6	101,9 \pm 0,9
„Bug Break“	96,4	98,5	100,7 \pm 1,8

4.1.6.2.2 Methodenvalidierung und Methodenvergleich

Die im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf analysierten Proben wurden mit einer GC-FID- und einer HPAEC-PAD-Methode sowie mithilfe eines HSQC-Experiments mit einem D_1 -Delay von 1,5 s analysiert. Die 1D-NOESY-Methode kann zur Quantifizierung von Isomaltulose nicht angewendet werden. Das isoliert vorliegende Signal IM-3 (siehe Abbildung 9-1) kann nicht zur Quantifizierung genutzt werden, da seine unmittelbare Nähe zum Wassersignal und der Wasserunterdrückung im 1D-NOESY-Spektrum eine erhebliche Beeinflussung des Signals zur Folge hat. HSQC-Methoden können hingegen zur gleichzeitigen Analyse von Isomaltulose, Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose eingesetzt werden. Der Arbeitsbereich der HSQC-Methoden wurde auf einen Bereich zwischen 1,0 g/L und 15 g/L festgelegt, wobei eine lineare Anpassungsfunktion zur Beschreibung des mathematischen Zusammenhangs der Kalibrierdaten verwendet wurde (Ruf, 2020). Zudem wurde aus den zur Verfügung stehenden Maltulosesignalen das Signal Mlt-4b (siehe Tabelle 4-2) zur Auswertung ausgewählt (Ruf, 2020).

Die mithilfe der Vergleichsmethoden quantifizierten Isomaltulosegehalte der Proben „Palatinose“, „Energize Lemon“ und „Multicarbogel“ sind zu den ermittelten Isomaltulosegehalten, die durch Anwendung der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s bestimmt wurden, gleichwertig (siehe Abbildung 4-14). Die Variationskoeffizienten der Isomaltulosegehalte, die durch die HSQC-Methode ermittelt wurden, liegen zwischen 1,3 % und 2,1 %, was als präzise beurteilt wird. Bei der Bestimmung von Glucose und Fructose in der Probe „Multicarbogel“ wurden ebenfalls ausreichend präzise Ergebnisse mit Variationskoeffizienten von 4,3 % und 2,7 % ermittelt (siehe Tabelle 9-44). Die „Multicarbogel“-Proben wurden zusätzlich mit einem HSQC-Experiment analysiert, das mit einem verlängertem D_1 -Delay von 6,0 s durchgeführt wurde. Durch den Vergleich der Ergebnisse wird überprüft, ob die Verkürzung des D_1 -Delays auf 1,5 s einen Einfluss auf die Quantifizierung von Isomaltulose hat. Für Isomaltulose wurde eine longitudinale Relaxationszeit von 0,9 s bestimmt (siehe Tabelle 9-5). Da in der Probe „Multicarbogel“ auch Glucose und Fructose quantifiziert werden, wurde ein ausreichender D_1 -Delay der dreifachen Länge der longitudinalen Relaxationszeit des Kernes ausgewählt, der am langsamsten in den Grundzustand zurückkehrt (Glucose mit $T_1=2,1$ s, siehe Tabelle 9-5). Die Isomaltulose- und Fructosegehalte, die mithilfe der HSQC-Methode mit $D_1=6,0$ s ermittelt wurden, unterscheiden sich nicht zu den Gehalten der Vergleichsmethoden. Zudem werden die Messungen als ausreichend präzise bewertet. Bei der Verwendung eines Mittelwert-t-Tests ($\alpha=0,05$) werden keine statistischen Abweichungen zwischen den Ergebnissen der beiden HSQC-Methoden sowohl für die ermittelten Isomaltulosegehalte als auch für die ermittelten Fructosegehalte gezeigt. Glucose musste aufgrund seiner geringen Konzentration in einer zweiten, aufkonzentrierten Probe bestimmt werden. Aus Zeitgründen konnten diese Proben nicht mit dem HSQC-Experiment mit $D_1=6,0$ s analysiert werden. Da die Ergebnisse der Bestimmung von Isomaltulose und Fructose beider HSQC-Methoden statistisch gleichwertig sind, kann das HSQC-Experiment mit einem verkürzten D_1 -Delay von 1,5 s somit zur Quantifizierung von Isomaltulose und Fructose genutzt werden. Durch Aufstockung der Proben mit Isomaltulose wurde die Richtigkeit der Methoden überprüft (siehe Tabelle 4-11). Die erhöhten Wiederfindungsraten in den Proben „Palatinose“ und „Multicarbogel“ bei der Durchführung der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s könnten Hinweis auf eine Überbestimmung sein, die allerdings im Vergleich der absoluten Isomaltulosegehalte nicht bestätigt werden kann.

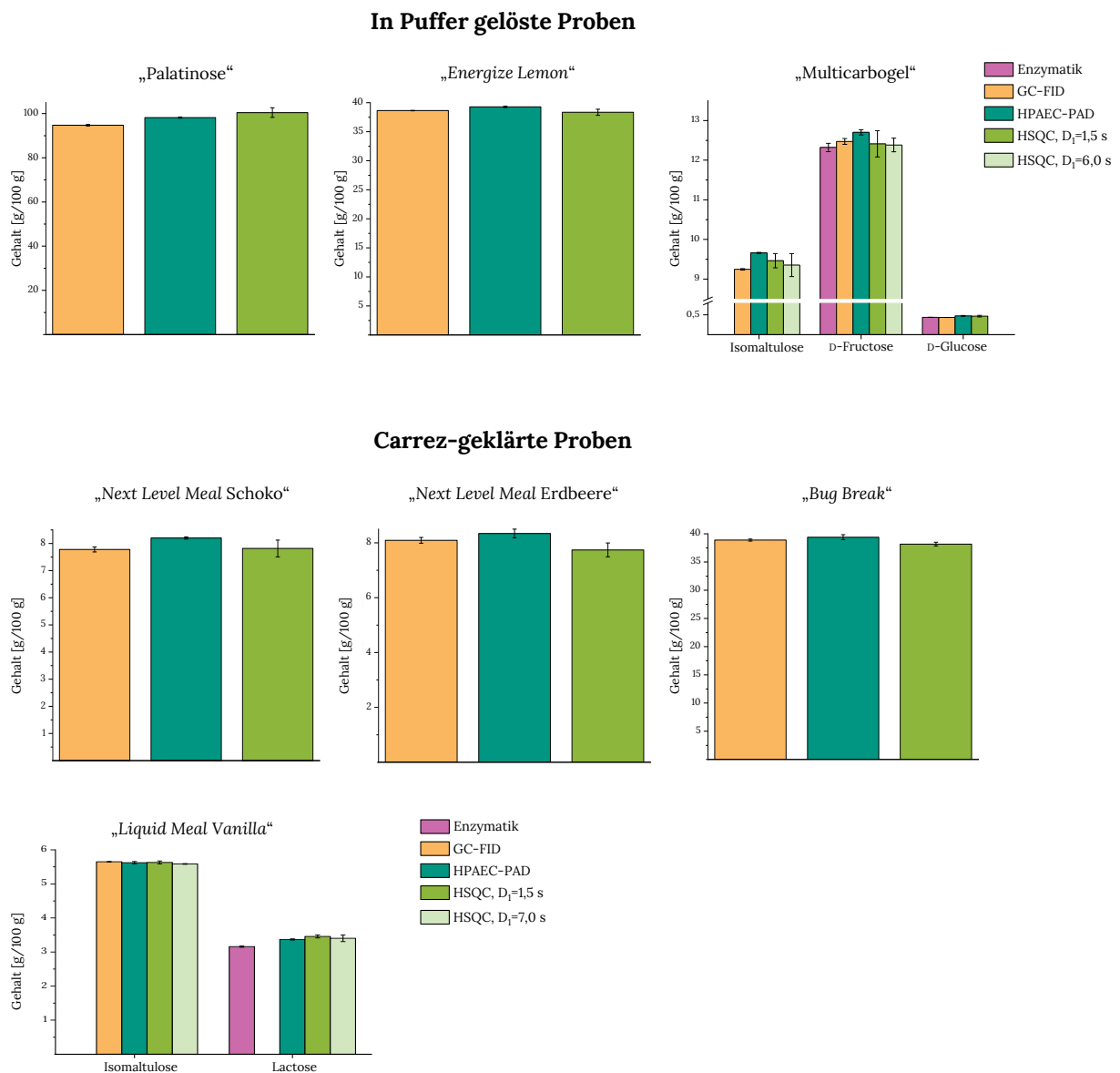


Abbildung 4-14: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Isomaltulose in den in Puffer gelösten Proben „Palatinose“, „Energize Lemon“ und „Multicarbogel“. In der Probe „Multicarbogel“ wurden zusätzlich die Analyten D-Fructose und D-Glucose bestimmt. Zusätzlich werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs der Carrez-geklärten Proben „Next Level Meal Schoko“, „Next Level Meal Erdbeere“, „Bug Break“ sowie „Liquid Meal Vanilla“ dargestellt. In der Probe „Liquid Meal Vanilla“ wurde zusätzlich Lactose bestimmt. Neben enzymatischer Methoden wird Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID), Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experimente (Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1) mit verschiedenen D_1 -Delays verwendet (Signale IM-4, Glc-2, Fru-4, Lac-4 siehe Tabelle 4-2). Die Messungen der Enzymatik, GC-FID und HPAEC-PAD erfolgten in Doppelbestimmung mit Angabe der halben Spannweite zwischen den beiden Messwerten (Range/2) zur Beurteilung der Präzision. Die HSQC-Messungen wurden in Dreifachbestimmung unter Angabe der Standardabweichung durchgeführt. Als interne Standardsubstanz wurde bei der HPAEC-PAD-Methode L-Arabinose, bei der GC-FID-Methode Phenyl- β -D-glucopyranosid und bei den NMR-spektroskopischen Methoden Maltulose (Signal Mlt-4b, Tabelle 4-2) verwendet. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf erhalten (Ruf, 2020).

Die Bestimmung der Isomaltulosegehalte in allen Carrez-geklärten Proben mithilfe der HSQC-Methode (siehe Abbildung 4-14) resultiert ebenfalls in präzisen Messwerten mit

Variationskoeffizienten von maximal 4,0 %. Zudem quantifizieren alle Methoden äquivalente Isomaltulosegehalte in den beiden „Next Level Meal“-Proben, dem „Bug Break“-Riegel sowie der Probe „Liquid Meal Vanilla“. Die durch Aufstockung ermittelten Wiederfindungsraten von Isomaltulose liegen zwischen 94,6 % und 105,8 % und sind somit für alle getesteten Methoden in einem akzeptablen Rahmen (siehe Tabelle 4-11). Die Probe „Liquid Meal Vanilla“ wurde zusätzlich mit einem HSQC-Experiment mit verlängertem D_1 -Delay von 7,0 s analysiert (Ruf, 2020). Die Ergebnisse der beiden HSQC-Experimente sind statistisch gleichwertig. Der enzymatisch bestimmte Lactosegehalt ist wesentlich geringer als die mittels der HPAEC-PAD-Methode und den HSQC-Experimenten bestimmten Gehalte. In 4.1.6.1.1 wurde gezeigt, dass eine Carrez-Behandlung im Konzentrationsbereich von Carrez-Klärung II einen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Bestimmung von Lactose haben kann (siehe Abbildung 4-9). Da die Probe „Liquid Meal Vanilla“ mit Carrez-Reagenzien im Konzentrationsbereich zwischen Carrez-Klärung II und Carrez-Klärung III behandelt wurde, kann eine Beeinflussung der enzymatischen Bestimmung nicht ausgeschlossen werden. Da die Ergebnisse der HPAEC-PAD-Methode weniger von den verschiedenen Konzentrationen der Carrez-Salze beeinflusst wurden, wird der mittels HPAEC-PAD ermittelte Gehalt als Vergleichswert verwendet. Der durch die HPAEC-PAD-Methode ermittelte Lactosegehalt liegt im gleichen Bereich wie der Gehalt, der bei Verwendung der HSQC-Methode mit $D_1=1,5$ s ermittelt wurde. Das Experiment mit dem verlängertem D_1 -Delay von 7,0 s quantifiziert keinen signifikant höheren Lactosegehalt im Vergleich zu dem HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s. Somit kann auch zur Quantifizierung von Lactose in einem Proteingetränk auf Milchbasis ein beschleunigtes HSQC-Experiment mit verringertem D_1 -Delay eingesetzt werden.

Die Anwendbarkeit der mit NUS gekoppelten HSQC-Experimente sowie der ASAP-HSQC-Experimente wurde anhand einer Beispielmatrix, die Isomaltulose enthält, getestet. Die Probe „Multicarbogel“ wurde ausgewählt, da bis zu diesem Zeitpunkt lediglich wässrige oder Carrez-geklärte Proben mit NUS-gekoppelten HSQC-Methoden oder ASAP-HSQC-Experimenten getestet wurden. Zudem enthält die Probe neben Isomaltulose die Analyten Fructose und Glucose, sodass die Anwendbarkeit der Methoden auf die Quantifizierung von Isomaltulose unter Anwesenheit weiterer lebensmittelrelevanter Monosaccharide getestet werden kann. Im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf wurde für die HSQC-Methoden ein Arbeitsbereich von 1,0 g/L bis 15,0 g/L festgelegt (Ruf, 2020). Die bei Verwendung der HSQC-Methoden ermittelten S/N der Probe mit der kleinsten Konzentration von 1,0 g/L sind für alle Analyten zur Quantifizierung ausreichend (siehe Tabelle 9-43). Bei der Durchführung der ASAP-HSQC-Methoden wurde der Arbeitsbereich aufgrund zu geringer S/N in der Probe mit der Konzentration 1,0 g/L auf einen Bereich von 4,0 g/L bis 15,0 g/L verkleinert. Zudem wurde das Maltulosesignal Mlt-4a zur Auswertung verwendet. Die S/N beider Maltulosesignale Mlt-4a und Mlt-4b sind zwar ausreichend groß, allerdings liegt S/N im ASAP-HSQC-Spektrum, das mit NUS-Kopplung aufgenommen wurde, bei der Betrachtung des Signals Mlt-4b an

der unteren Grenze ($S/N=9$, siehe Tabelle 9-43). Da ein Alternativsignal (Mlt-4a) mit ausreichenden S/N zur Verfügung steht, wird dieses zur Auswertung herangezogen.

Alle verwendeten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden quantifizieren Gehalte an Isomaltulose, Fructose und Glucose, die statistisch nicht von den Ergebnissen der durchgeführten HPAEC-PAD-Methode abweichen (siehe Abbildung 4-15). Die Ergebnisse beider ASAP-HSQC-Methoden sind bei der Isomaltulosebestimmung durch höhere Variationskoeffizienten von 10,8 % bzw. 12,5 % als die Ergebnisse der HPAEC-PAD-Methode mit 4,5 % oder der HSQC-Experimente mit Werten zwischen 0,2 % bis 8,0 % gekennzeichnet (siehe Tabelle 9-44). Die mithilfe der ASAP-HSQC-Methode ohne NUS-Kopplung ermittelten Fructose- und Glucosewerte zeigen hohe Variationskoeffizienten (28,9 % bzw. 15,6 %), während die Messwerte der anderen Methoden geringere Variationskoeffizienten von maximal 12,5 % aufweisen.

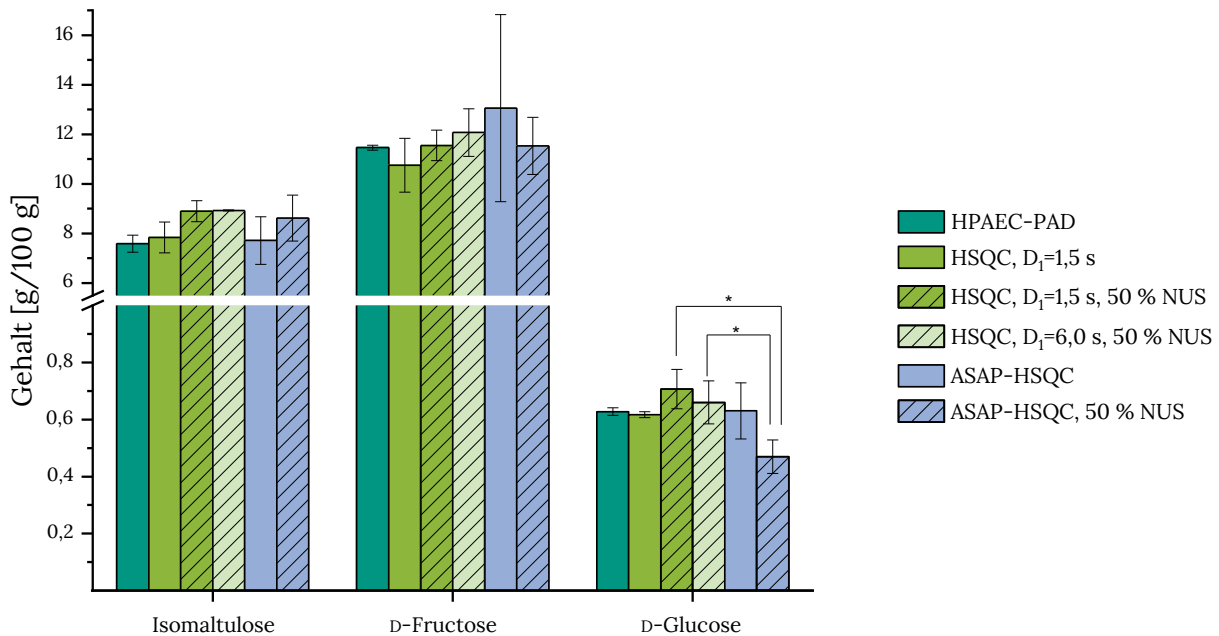


Abbildung 4-15: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Isomaltulose, D-Fructose und D-Glucose in der Probe „Multicarbogel“. Die Proben wurden mit Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) und mit Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experimenten mit verschiedenen D_1 -Delays sowie Kopplung mit Non-Uniform Sampling (NUS) analysiert. Zudem wurden Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experimente (Messparameter siehe Tabelle 4-6) eingesetzt. Details zu den verwendeten Signalen IM-4, Fru-4 und Glc-2 können Tabelle 4-2 entnommen werden. Die Messungen wurden für alle Methoden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben. Als interne Standardsubstanz wurde bei der HPAEC-PAD-Methode L-Arabinose und bei den NMR-spektroskopischen Methoden Maltulose (HSQC-Methoden: Signal Mlt-4b, ASAP-HSQC-Methoden: Signal Mlt-4a, siehe Tabelle 4-2) verwendet. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet.

Die ermittelten Wiederfindungsraten der in der Probe enthaltenen Analyten Isomaltulose, Fructose und Glucose sowie weiterer lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide wie Galactose, Saccharose und Lactose sind in Tabelle 4-12 aufgeführt. Die Wiederfindungsraten von Isomaltulose, Fructose, Glucose, Galactose und Saccharose liegen für alle verwendeten Methoden im Bereich von 100 %, wobei besonders die mithilfe der ASAP-HSQC-Methoden ermittelten Messwerte hohe Standardabweichungen aufweisen. Die Wiederfindungsrate von Lactose, die bei der Anwendung der HSQC-Methoden mit $D_1=1,5$ s ermittelt wurde, ist mit einem Wert von 124,6 % deutlich erhöht. Beide ASAP-HSQC-Methoden zeigen mit Wiederfindungsraten von 86,9 % und 73,0 % eher eine Unterbestimmung an.

Tabelle 4-12: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Isomaltulose, D-Fructose, D-Glucose, D-Galactose, Saccharose und Lactose durch Aufstockung der Probe „Multicarbogel“ ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Der jeweilige D_1 -Delay ist bei der entsprechenden HSQC-Methode angegeben. Zudem werden die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden mit Non-Uniform Sampling (NUS) gekoppelt durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Als interne Standardsubstanz wurde bei der HPAEC-PAD-Methode L-Arabinose und bei den NMR-spektroskopischen Methoden Maltulose verwendet. Details zu den verwendeten Signalen IM-4, Fru-4, Glc-2, Gal-2, Sacc-2 und Lac-4 können Tabelle 4-2 entnommen werden.

	WF [%] ± SW [%]					
	Isomaltulose	D-Fructose	D-Glucose	D-Galactose	Saccharose	Lactose
HPAEC-PAD	105,8 ± 1,6	95,7 ± 6,7	99,2 ± 6,5	100,9 ± 6,2	98,0 ± 4,8	109,4 ± 5,7
HSQC, $D_1=1,5$ s	105,3 ± 6,9	101,2 ± 3,6	102,6 ± 5,4	101,3 ± 5,6	100,2 ± 6,4	124,6 ± 8,8
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	98,5 ± 2,7	103,8 ± 7,8	97,7 ± 3,0	103,7 ± 5,0	108,9 ± 6,1	103,5 ± 2,5
HSQC, $D_1=6,0$ s 50 % NUS	100,8 ± 2,9	98,9 ± 4,9	100,3 ± 7,2	100,9 ± 4,2	109,2 ± 4,7	108,9 ± 2,0
ASAP-HSQC	102,3 ± 24,8	77,1 ± 19,8	108,9 ± 30,6	114,3 ± 14,7	96,7 ± 15,4	86,9 ± 20,6
ASAP-HSQC, 50 % NUS	105,6 ± 22,4	85,1 ± 13,5	101,8 ± 9,7	86,6 ± 12,3	97,2 ± 11,4	73,0 ± 27,2

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die HSQC-Methode mit einem verkürzten D_1 -Delay von 1,5 s Isomaltulose in den getesteten Matrices richtig und präzise quantifizieren kann. Neben Isomaltulose konnten auch Glucose, Fructose und Lactose äquivalent zu den Vergleichsmethoden bestimmt werden (Ruf, 2020). Die Anwendbarkeit der NUS-gekoppelten HSQC-Methoden sowie der ASAP-HSQC-Methoden wurde anhand der Probe „Multicarbogel“ getestet. Dabei waren alle

Methoden zur Quantifizierung von Isomaltulose, Fructose und Glucose geeignet. Die Ergebnisse der verwendeten ASAP-Methoden weisen allerdings hohe Variationskoeffizienten auf, sodass keine präzisen Messungen durchgeführt wurden. Die geringe Präzision der ASAP-HSQC-Methoden wurde vermutlich durch bestehende Hardwareprobleme verursacht. Der hohe Energieeintrag während der ASAP-HSQC-Messungen kann zu kurzzeitigen Überspannungen und dadurch auch zur fehlerhaften Detektion der FIDs führen. Treten Probleme bei der Messung von ASAP-HSQC-Spektren auf, kann auf das HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s und NUS-Kopplung zurückgegriffen werden. Weder die Verkürzung des D_1 -Delays noch die Kopplung mit NUS beeinflussen die Quantifizierung in Präzision oder Richtigkeit, sodass die beschleunigte HSQC-Methode eine adäquate Alternativmethode darstellt.

4.2 Entwicklung und Anwendung auflösungsoptimierter HSQC-Methoden zur Quantifizierung von Oligosacchariden der Raffinose-Familie

4.2.1 Optimierung der Aufnahmeparameter und Methodenvalidierung

Im HSQC-Spektrum werden die Signale von Oligosacchariden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Kohlenhydratkomponenten und der größeren Anzahl an Signalen oft nicht ausreichend aufgelöst, um diese quantitativ auswerten zu können. Durch den Einsatz der ASAP-HSQC-Pulssequenz können neben der Verkürzung der Messzeit auch mehr Inkremente in kürzerer Zeit aufgenommen und dadurch die Auflösung gesteigert werden. In Abbildung 4-16 sind die anomeren Signale von Raffinose, Stachyose und Verbascose im HSQC-Spektrum gezeigt. Die Pulssequenz ist grundsätzlich geeignet diese Signale aufzulösen und daher eine Quantifizierung der Mitglieder der RFO zu ermöglichen. Ob die Auflösung ausreichend ist, um die Signale unabhängig von den in der Nähe befindlichen Signalen richtig und präzise zu quantifizieren, wird in der folgenden Methodenoptimierung näher untersucht.

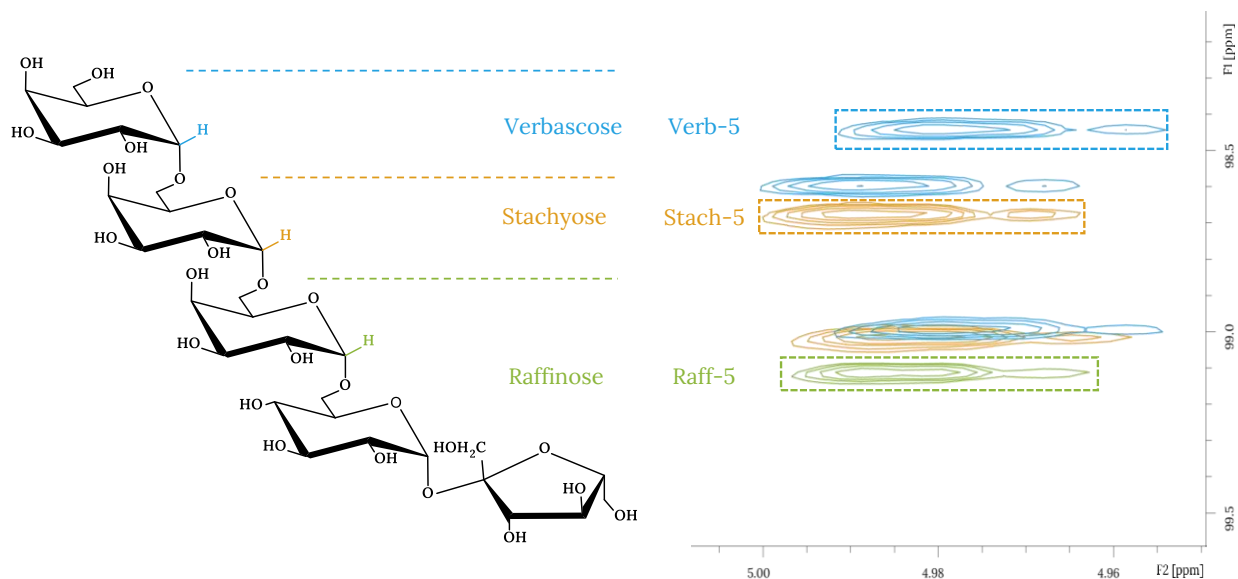


Abbildung 4-16: Ausschnitt aus einem Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektrum mit den zur Quantifizierung ausgewählten Signalen der Analyten Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb). Die genauen chemischen Verschiebungen der Signale sind in Tabelle 4-13 einzusehen. Die Messungen wurden mit zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und 4096 Datenpunkten in F_1 sowie einem Non-Uniform Sampling-Anteil von 50 % durchgeführt. Die Spektren wurden u.a. mithilfe von linear prediction (F_2 : 1024 Datenpunkte; F_1 : 4096 Datenpunkte) und zero filling (F_2 : 2048 Datenpunkte; F_1 : 8192 Datenpunkte) prozessiert.

Neben den Mitgliedern der RFO wurden auch weitere in den Matrices zu erwartende Analyten wie Saccharose, Glucose, Galactose und Fructose in die Methode integriert. In einem Gemisch aller Analyten wurde mindestens ein isoliertes Signal pro Analyt charakterisiert (siehe Tabelle 4-13). Bei der Charakterisierung mehrerer isolierter Signale, wie es beispielsweise bei den Analyten Glucose,

Fructose und Saccharose der Fall ist, wurde die Auswahl zunächst auf zwei potentielle Signale eingeschränkt (siehe Tabelle 4-13). Das Glucosesignal der Korrelation C5H5 β (*p*) liegt hierbei nicht ausreichend getrennt von dem Signal der Korrelation C3H3 β (*p*) vor, sodass beide Signale zusammen integriert werden. Die beiden ausgewählten Fructosesignale der CH₂-Gruppe an Position 1 werden sowohl einzeln als auch als Summe zur Auswertung herangezogen.

Tabelle 4-13: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ in einem *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Spektrum. Die Signale wurden für die Durchführung der Methodenoptimierung sowie für die Quantifizierung der Oligosaccharide der Raffinose-Familie Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb) sowie ihrer Bestandteile D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), D-Fructose (Fru) und Saccharose (Sacc) verwendet. Zusätzlich werden Angaben zur Position im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (*p*=Pyranose, *f*=Furanose) gegeben. Bei der Beschreibung von Oligosacchariden wird zusätzlich die Monomereinheit genannt. Die angegebene Signalbezeichnung wird zur Beschreibung der Signale im Verlauf dieser Arbeit verwendet. Die genauen Positionen der Signale sind zusätzlich in Abbildung 4-16 und Tabelle 9-45 einzusehen.

Analyt	Signalbezeichnung	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
D-Glucose	Glc-5a: C5H5 β (<i>p</i>)	3,45	76,57
	Glc-5a: C3H3 β (<i>p</i>)	3,47	76,39
	Glc-5b: C1H1 α (<i>p</i>)	5,22	92,72
D-Galactose	Gal-5: C5H5 β (<i>p</i>)	3,69	75,79
D-Fructose	Fru-5a: C1H1 α (<i>f</i>)	3,54	64,51
	Fru-5b: C1H1 α (<i>f</i>)	3,69	64,51
Saccharose	Sacc-5a: Glc-C4H4	3,46	69,827
	Sacc-5b: Glc-C5H5	3,83	73,01
Raffinose	Raff-5: Gal-C1H1	4,98	99,10
Stachyose	Stach-5: Gal2-C1H1	4,99	98,65
Verbascose	Verb-5: Gal3-C1H1	4,98	98,41

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass eine Inkrementanzahl von 4096 Datenpunkten in der ¹³C-Dimension des HSQC-Experiments zur ausreichenden Auflösung der Signale notwendig ist. Diese Anzahl an Datenpunkten kann in verschiedenen HSQC-Pulssequenzen eingesetzt werden. Um eine möglichst maximale Auflösung in geringer Experimentdauer zu erhalten, wurde die Anwendbarkeit verschiedener, zum Teil auch beschleunigter Pulssequenzen getestet. Die HSQC-Pulssequenz „hsqcetgp“ wurde bereits während der Methodenoptimierung zur Bereitstellung einer zeitoptimierten HSQC-Methode getestet und überzeugte gegenüber den Pulssequenzen „hsqcedetgp“ und „hsqcetgpsp“ in Empfindlichkeit und Präzision. Während des Methodenvergleichs in 4.1.6 konnte

gezeigt werden, dass HSQC-Methoden mit einem D_1 -Delay von 1,5 s gleichwertige Ergebnisse zu Experimenten mit einem höheren D_1 -Delay von 3,0 s am Beispiel der Milchprodukte oder der Länge 6,0 s bzw. 7,0 s am Beispiel der mit Isomaltulose gesüßten Produkte lieferten. Da die longitudinalen Relaxationszeiten der Analyten der RFO mit je 0,9 s (siehe Tabelle 9-5) in der gleichen Größenordnung zu den Zeiten der Mono- und Disaccharide liegen, wird davon ausgegangen, dass auch die Mitglieder der RFO mit einem D_1 -Delay von 1,5 s im HSQC-Experiment quantifiziert werden können. Zusätzlich wurde eine Kopplung mit NUS zur Verkürzung der Messzeit getestet.

Neben der schon in 4.1 verwendeten ASAP-HSQC-Pulssequenz wurde zusätzlich die Anwendbarkeit des lowCost-ASAP-HSQC-Experiments getestet. Die verbesserte Auflösung in der ^{13}C -Dimension des lowCost-ASAP-HSQC-Experiments (Schulze-Sünninghausen, 2016) könnte zur Verbesserung der Auflösung der zur Quantifizierung benötigten Signale beitragen. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen werden mit dem NUS-Ansatz gekoppelt, da eine NUS-Kopplung bereits im Verlauf der Methodenentwicklung zeitoptimierter Methoden die Quantifizierung von Analyten nicht negativ beeinflusste. In Abbildung 4-17 sind Ausschnitte der Spektren dargestellt, die mit den verschiedenen Pulssequenzen aufgenommen wurden.

Die in 4.1.2.2 optimierten Prozessierungsparameter wurden auch für die auflösungsoptimierten Methoden übernommen. Dabei wurde *linear prediction* mit 2048 Datenpunkten in F_2 und 4096 Datenpunkten in F_1 durchgeführt. Zusätzlich wurde mit *zero filling* (F_2 : 2048 Datenpunkte; F_1 : 8196 Datenpunkte) und einer Kosinusglockenfunktion als *window function* gearbeitet.

Aufgrund der Verwendung gleicher Aufnahmeparameter (Anzahl an Datenpunkten, Größe des spektralen Bereichs) ist die digitale Auflösung aller Experimente gleich und beträgt in der ^{13}C -Dimension 6,14 Hz. Dennoch ist in Abbildung 4-17 erkennbar, dass sich die spektrale Auflösung zwischen den verwendeten Experimenten unterscheidet. Das aufgenommene Spektrum der Pulssequenz „hsqcetgp“ ohne NUS-Kopplung (siehe Abbildung 4-17 oben links) zeigt für das Signal Raff-5 keine optimale Auflösung. Es könnte zu Überschneidungen mit dem benachbarten anomeren Signal (Gal1-C1H1 der Stachyose und Verbascose) kommen, insbesondere bei der Analyse von Proben mit höheren Konzentrationen als die getestete Konzentration von 4,0 g/L je Analyten. Bei der Kopplung der HSQC-Methode mit NUS lässt sich eine verbesserte Auflösung des Signals Raff-5 sowie des Signals Stach-5 von den benachbarten Signalen erkennen (siehe Abbildung 9-9). Es wurde keine Optimierung des NUS-Anteils vorgenommen, da die verwendeten Methoden mit einem NUS-Anteil von 50 % in 4.1 bereits artefaktarme Spektren sowie reproduzierbare, präzise und zu den Referenzmethoden vergleichbare Ergebnisse lieferten. Zusätzlich wurde die „hsqcetgp“-Pulssequenz mit vier Scans und NUS-Kopplung getestet (siehe Abbildung 4-17 oben rechts). Die Signale liegen trotz verbesserter Empfindlichkeit und somit auch größeren Volumina ausreichend getrennt vor, sodass zur Quantifizierung kleiner Konzentrationen auch mit einer größeren Scanzahl gearbeitet werden kann. Auf die Verwendung des HSQC-Experiments mit zwei Scans und NUS-Kopplung wurde im weiteren

Verlauf dieser Arbeit verzichtet. Die zu untersuchenden Analyten sind zum Großteil in kleinen Konzentrationen im Bereich von 1 mg/100 g bis 3 g/100 g in den Matrices enthalten, sodass die Verwendung der empfindlicheren Methode mit vier Scans sinnvoller erscheint. Zudem wurde das HSQC-Experiment mit zwei Scans ohne NUS-Kopplung verwendet, damit eine mögliche systematische Beeinflussung durch die Anwendung des NUS-Ansatzes erkennbar bleibt. Sollten beide HSQC-Methoden im Methodenvergleich zur Quantifizierung der Analyten geeignet sein, kann für die Quantifizierung von Hauptkomponenten auch die HSQC-Methode mit zwei Scans und NUS-Kopplung verwendet werden.

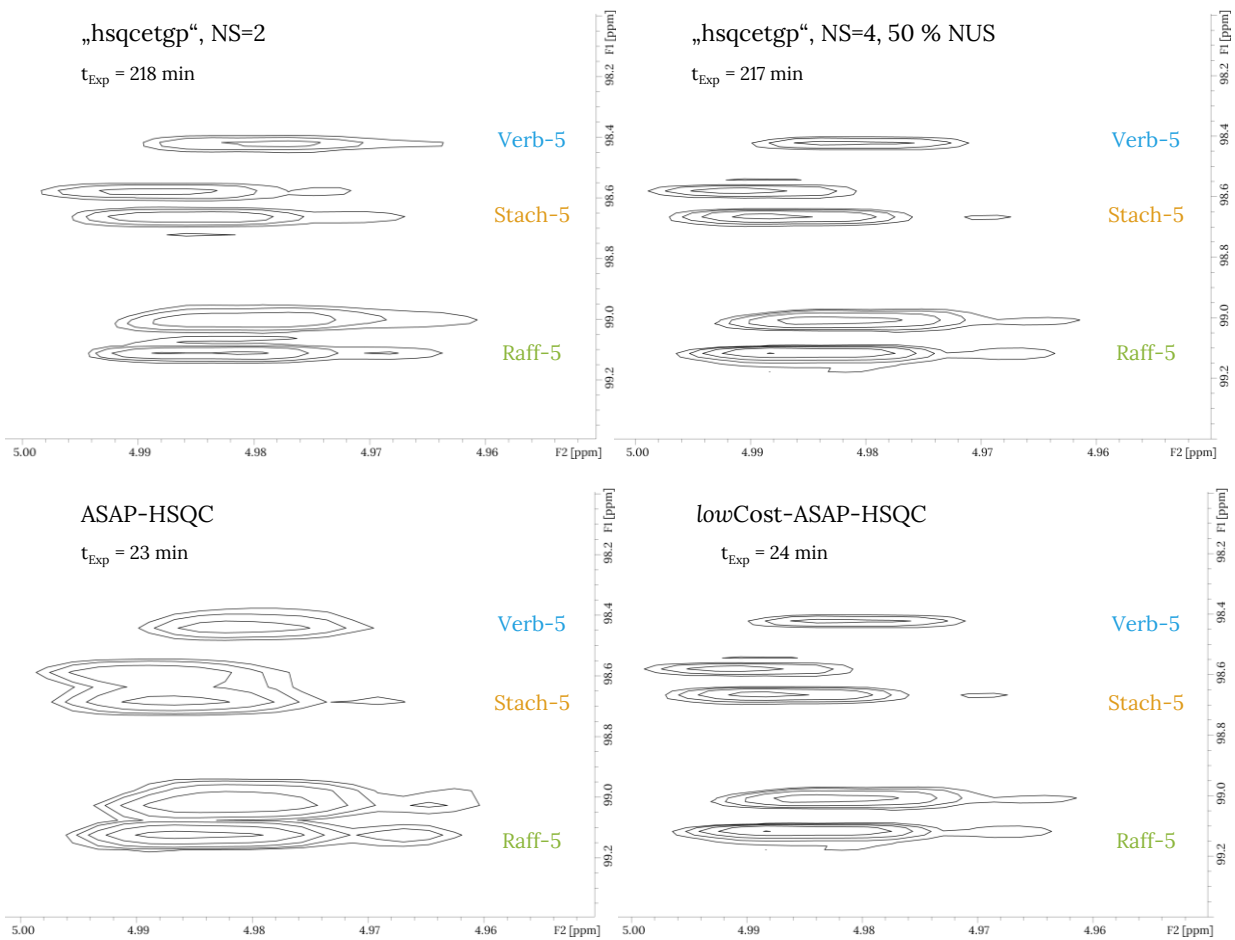


Abbildung 4-17: Ausschnitte aus den Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektren und Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Spektren, die Signale der Analyten Raffinose (Raff-5), Stachyose (Stach-5) und Verbascose (Verb-5) gemäß der Signalauswahl in Tabelle 4-13 zeigen. Alle Experimente (Pulssequenzen „hsqcetgp“, „asap_hsqc_sp_brucker“ (ASAP-HSQC) und „asap_hsqc_sp_brucker_12cinz_5“ (lowCost-ASAP-HSQC)) wurden ohne gegenteiligen Angabe mit zwei Scans sowie 1024 Datenpunkten in F_2 und 4096 Datenpunkten in F_1 durchgeführt. Beide ASAP-HSQC-Experimente wurden mit einem Non-Uniform Sampling (NUS)-Anteil von 50 % aufgenommen. Die Spektren wurden u.a. mithilfe von *linear prediction* (F_2 : 1024 Datenpunkte; F_1 : 4096 Datenpunkte) und *zero filling* (F_2 : 2048 Datenpunkte; F_1 : 8192 Datenpunkte) prozessiert. Zusätzlich wird die Dauer des Experiments (t_{Exp}) angegeben. Als Probe wurde eine in Deuteriumoxid gelöste Mischung aller zur Analyse verwendeten Mono- und Oligosaccharide der Konzentration 4,0 g/L je Analyt verwendet. NS: Anzahl der Scans; Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Bei Verwendung der ASAP-HSQC-Pulssequenz (siehe Abbildung 4-17 unten links) sind die Signale Raff-5 und Stach-5 im Spektrum deutlich weniger von ihren Nachbarsignalen getrennt als bei der Verwendung der anderen Pulssequenzen. Die verwendete *lowCost*-ASAP-Pulssequenz (siehe Abbildung 4-17 unten rechts) zeigt eine verbesserte Auflösung in der ^{13}C -Dimension, was die Entwickler bislang lediglich an dem Beispielmolekül Borneol zeigen konnten (Schulze-Sünninghausen, 2016). Bei der Aufnahme von 1024 Datenpunkten in der ^{13}C -Dimension im Verlauf der Zeitoptimierung der Methoden (siehe 4.1.3) konnte keine Verbesserung in der Auflösung zwischen dem ASAP-HSQC-Experiment und dem *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment beobachtet werden. Bei der Steigerung der Datenpunkte auf eine Anzahl von 4096 scheint die während der Inkrementierungszeit gebildete homonukleare Kopplung und die dadurch bedingte Verkleinerung des Magnetisierungsreservoirs Einfluss auf die spektrale Auflösung in der ^{13}C -Dimension zu nehmen. Durch die Anwendung der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz kann dieser Nachteil der ASAP-HSQC-Pulssequenz umgangen werden. Schulze-Sünninghausen berichtete von einer Reduzierung der Signalintensitäten bei der Verwendung des *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiments (Schulze-Sünninghausen, 2016). Ob dieser Effekt Einfluss auf die Quantifizierung von Analyten bei der Verwendung der Pulssequenz hat, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht und beurteilt. Zusammenfassend ist die spektrale Auflösung aller ausgewählten Signale bei der Verwendung des *lowCost*-ASAP-Experiments im Vergleich aller Methoden am größten, wodurch sich diese Pulssequenz vermutlich besonders zur Quantifizierung der RFO eignet.

Der Arbeitsbereich der HSQC-Methoden wurde auf einen Bereich von 1,0 g/L bis 7,5 g/L festgelegt. In dem Spektrum der Probe der kleinsten Konzentration von 1,0 g/L werden zur Quantifizierung ausreichende S/N für alle Signale ermittelt (siehe Tabelle 9-46). Der Arbeitsbereich beider ASAP-HSQC-Methoden wurde zwischen 3,1 g/L und 7,5 g/L festgelegt, da S/N in niedriger konzentrierten Proben zu gering sind, um eine verlässliche Quantifizierung zu gewährleisten. Durch die Aufnahme einer höheren Scanzahl könnte die untere Grenze des Arbeitsbereichs weiter abgesenkt werden. Bei der Festlegung der oberen Grenze fungierten die Analytkonzentrationen in realen Proben als Orientierung. Der Arbeitsbereich könnte bei der Verwendung der Methoden in Verbindung mit anderen Matrices aber auch vergrößert werden. Der durchgeführte Anpassungstest nach Mandel zeigt für alle Analyten und Signale in den festgelegten Arbeitsbereichen, dass eine lineare Anpassung gegenüber einer quadratischen Fitfunktion vorzuziehen ist. Bei Vergrößerung des Arbeitsbereichs müsste eine erneute Beurteilung der Linearität der Anpassungsfunktionen erfolgen.

Zur Beurteilung der zeitlichen Stabilität und Reproduzierbarkeit der Messmethoden wurden jeweils frisch hergestellte Proben der Kalibrierlösungen in drei unabhängigen Messreihen im Abstand von jeweils zwei Wochen mit den verschiedenen Methoden analysiert. Die Variationskoeffizienten der Integrale der einzelnen Konzentrationen geben einen Hinweis darauf, ob die Methoden reproduzierbar durchgeführt werden können. Bei der Betrachtung der Integrale der HSQC-Methoden mit zwei

Scans ist auffällig, dass die Integrale der Proben der kleinsten Konzentration von 1,1 g/L um bis zu 114,2 % vom Mittelwert abweichen, während die Variationskoeffizienten der restlichen Konzentrationsstufen lediglich zwischen 1,8 % und 19,7 % liegen (siehe Tabelle 9-47). Die Variationskoeffizienten für die Bestimmung der Proben mit Konzentrationen im oberen Teil des Arbeitsbereichs sind bei der Messung der Verbascoesignale im Vergleich zu den anderen Analyten maximal. Die Messwerte der zweiten verwendeten HSQC-Methode, die mit vier Scans und einer NUS-Kopplung durchgeführt wurde, zeigen kleinere Variationskoeffizienten (maximal 46,1 %) der Proben mit 1,1 g/L verglichen zu den Variationskoeffizienten der HSQC-Methode, die mit zwei Scans durchgeführt wurde (siehe Tabelle 9-47). Die Variationskoeffizienten der restlichen Konzentrationsstufen weisen bei der Betrachtung aller Analyten kleinere Werte im Vergleich zur anderen HSQC-Methode (zwei Scans, ohne NUS-Kopplung) auf. Bei der Durchführung beider ASAP-HSQC-Methoden zeigen sich erhebliche Abweichungen der Volumenintegrale zwischen den Messreihen auf allen Konzentrationsstufen und bei Betrachtung aller Analyten (siehe Tabelle 9-47), sodass die Durchführung beider Pulssequenzen nicht als reproduzierbar eingestuft werden kann. Bei der Methodvalidierung der zeitoptimierten ASAP-Methoden zeigte sich hierzu passend ebenfalls eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verglichen mit den Ergebnissen der entsprechenden HSQC-Methode (siehe 4.1.5.1). Besonders Messungen am unteren Ende des Arbeitsbereichs können somit bei der Durchführung der HSQC-Methoden nicht als reproduzierbar bewertet werden. Im oberen Teil des Arbeitsbereichs laufen HSQC-Messungen reproduzierbarer ab als ASAP-HSQC-Messungen. Im Vergleich der beiden HSQC-Methoden liefert die HSQC-Methode mit vier Scans und NUS-Kopplung reproduzierbarere Messungen. Da die Kalibrierfunktionen der einzelnen Messreihen ausreichende Güteparameter aufweisen, können alle Methoden bei zeitnahen Messungen von Kalibrierfunktionen und Proben durchaus zur Quantifizierung genutzt werden. Die Verwendung von Kalibrierungen, die nicht am gleichen Tag gemessen wurden, wird aufgrund der geringen zeitlichen Stabilität aller Methoden nicht empfohlen.

Die Variationskoeffizienten der Messwerte, die bei der Auswertung der verschiedenen Glucose-, Fructose- und Saccharosesignalen ermittelt wurden, zeigen keine Unterschiede, sodass dieser Parameter nicht ausschlaggebend zur Signalauswahl beitragen kann. Anhand der Güteparameter der Kalibrierfunktionen einer Messreihe (siehe Tabelle 9-48) wurde versucht, die Signalauswahl näher einzugrenzen. Dabei sind die Unterschiede in den Güteparametern der Kalibrierfunktionen nicht ausreichend, um die Signalauswahl auf lediglich ein charakteristisches Signal einzuschränken. Bei der Anwendung der optimierten Methoden auf verschiedene Matrices wird weitergehend untersucht, ob ein spezifisches Signal besser geeignet ist oder beide Signale gleichwertig zur Quantifizierung verwendet werden können.

Zur Überprüfung der Stabilität der Kalibrierlösungen wurden identische Probelösungen einer Mischung der Analyten (Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose, Stachyose und

Verbasose) in Deuteriumoxid im Abstand von drei Tagen gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Das Integralverhältnis zwischen Tag 3 und Tag 1 wird in Prozent angegeben und kann somit zur Beurteilung der Lagerstabilität der Kalibrierlösungen genutzt werden. Ein optimaler Wert von 100 % zeigt an, dass beide Integrale gleichwertig sind und somit kein Analytverlust während der Lagerung festgestellt wird. Bei der Durchführung der HSQC-Methoden zeigen sich Analytverluste in der Probe mit der Konzentration von 1,1 g/L von bis zu 100 %, wobei auch hier die schlechte Präzision der Messungen eine Rolle spielen könnte. Bei Betrachtung der höher konzentrierten Proben werden allerdings ebenfalls hohe Analytverluste durch die dreitägige Lagerung von bis zu 24,7 % ermittelt (siehe Tabelle 9-49). Nach der dreitägigen Lagerung werden unter Verwendung der ASAP-HSQC-Methoden Analytverluste von bis zu 65,6 % festgestellt (siehe Tabelle 9-49). Somit kann keine Lagerung der Kalibrierlösungen oder der aufgearbeiteten Proben empfohlen werden.

Die analysierten BG sind in Tabelle 9-4 und Tabelle 9-50 einzusehen. Mittels HPAEC-PAD können Analyten im Bereich weniger µg/100 mL analysiert werden. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit NMR-spektroskopischer Methoden liegen ihre BG im mittleren mg/100 mL Bereich.

Die in Tabelle 4-14 zusammengefassten Methoden wurden somit zur Quantifizierung von Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbasose optimiert und im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf verschiedene Matrices angewendet. Als Vergleichsmethode wurde eine HPAEC-PAD-Methode eingesetzt.

Tabelle 4-14: Übersicht der auflösungsoptimierten Methoden, die zur Quantifizierung der Analyten D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose, Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbasose verwendet wurden. Hierbei wurden *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Experimente sowie *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-HSQC-Experimente durchgeführt. Zur Charakterisierung der Methoden werden die Anzahl der Scans (NS), die Anzahl an Datenpunkten (TD) in der jeweiligen Dimension (F_2/F_1), der Anteil an *Non-Uniform Sampling (NUS)* sowie die Experimentdauer (t_{Exp}) angegeben. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*

Methode	Pulssequenz	NS	TD (F_2/F_1)	D_1 -Delay [s]	NUS-Anteil [%]	t_{Exp} [min]
HSQC, NS=2	hsqcetgp	2	1024/4096	1,5	-	218
HSQC, NS=4, 50 % NUS	hsqcetgp	4	1024/4096	1,5	50	217
ASAP-HSQC	asap_hsqc_sp_bruker	2	1024/4096	0,05	50	23
lowCost-ASAP-HSQC	asap_hsqc_sp_bruker_12cinz_5	2	1024/4096	0,05	50	24

4.2.2 Anwendung der optimierten Methoden auf Leguminosen

Die in Tabelle 4-14 aufgeführten Methoden wurden verwendet, um die Mono- und Oligosaccharidgehalte in den Leguminosen blaue Lupinen, rote Linsen und Kidneybohnen nach ethanolischer Extraktion zu quantifizieren (siehe 3.2). Das Hexamer Ajugose konnte mithilfe der HPAEC-PAD-Methode in keiner Probe nachgewiesen werden.

Blaue Lupinensamen

In blauen Lupinensamen sind die Analyten Glucose, Fructose, Galactose Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose in Gehalten zu finden, die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode quantifiziert werden können. Als Hauptkomponenten wurden Saccharose (1,3 g/100 g), Raffinose (0,8 g/100 g), Stachyose (3,0 g/100 g) und Verbascose (1,65 g/100 g) ermittelt. Die Hauptkomponenten wurden dabei ausreichend präzise mit Variationskoeffizienten kleiner 10,0 % bestimmt. Glucose, Fructose und Galactose sind nur in geringen Konzentrationen von 8,9 mg/100 g, 5,5 mg/100 g und 30,9 mg/100 g enthalten. Die Variationskoeffizienten der Glucose- und Fructosebestimmungen zeigen Werte von 18,5 % bzw. 20,2 % und somit keine präzisen Messungen der HPAEC-PAD-Methode an. Galactose hingegen wird präzise bestimmt (Variationskoeffizient von 2,3 %).

Die durch Aufstockungsversuche bestimmten Wiederfindungsraten zeigen für die Hauptkomponenten Saccharose, Raffinose und Stachyose (siehe Tabelle 4-15) sowie für die Nebenkomponten Glucose ($99,4 \% \pm 5,4 \%$), Fructose ($103,7 \% \pm 4,5 \%$) und Galactose ($97,9 \% \pm 5,9 \%$) Werte im Bereich von 100 % an, wodurch die Richtigkeit der HPAEC-PAD-Methode als ausreichend bewertet wird. Für Verbascose allerdings wurde eine Wiederfindungsrate von lediglich 43,4 % ermittelt, was auf eine Unterbestimmung von Verbascose mittels HPAEC-PAD hindeutet. Die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode ermittelten Gehalte aller Analyten stimmen mit den Gehalten der Analyten überein, die im Rahmen der Masterarbeit von Sven Peko Marmit mittels einer HPAEC-PAD-Methode und identischem Probenmaterial bestimmt wurden. Im Rahmen der genannten Arbeit wurde Verbascose sogar mit einem noch geringeren Gehalt von 1,47 g/100 g analysiert (Marmit, 2020). Gdala und Kollegen quantifizierten Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose aus blauen Lupinensamen nach ethanolischer Extraktion mithilfe einer GC-FID-Methode als TMS-Derivate. Die ermittelten Gehalte von Saccharose, Raffinose und Stachyose stehen in guter Näherung zu den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Gehalten. Für Verbascose wird ein niedrigerer Gehalt von durchschnittlich 0,80 g/100 g quantifiziert (Gdala & Buraczewska, 1996). Eine weitere Arbeit nutzte eine HPLC-Methode zur Quantifizierung der Mitglieder der RFO in blauen Lupinensamen. Die publizierten Gehalte von Raffinose und Verbascose stimmen mit den erhaltenen HPAEC-PAD-Ergebnissen überein, während abweichende Gehalte für Saccharose und Stachyose ermittelt wurden (Martínez-Villaluenga et

al., 2005). Die bestimmten HPAEC-PAD-Ergebnisse sind somit zu ausgewählten Literaturdaten, die mithilfe alternativer Methoden ermittelt wurden, vergleichbar, sodass diese Ergebnisse als Vergleichswerte verwendet wurden.

Die Nebenkomponten Glucose, Fructose und Galactose können aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der NMR-Methoden mit keiner weiteren Methode als der HPAEC-PAD quantifiziert werden. Fructose und Galactose konnten allerdings mit allen NMR-spektroskopischen Methoden qualitativ nachgewiesen werden. Eine Übersicht der Ergebnisse des Methodenvergleichs, bei dem die Gehalte der Hauptkomponenten in blauen Lupinensamen ermittelt wurden, ist in Abbildung 4-18 dargestellt.

Im Zuge der Methodenoptimierung wurden zwei potentielle Saccharosesignale identifiziert, die im Rahmen des Methodenvergleichs beide zur Auswertung herangezogen wurden. Der mittels HPAEC-PAD ermittelte Saccharosegehalt weicht zum Messwert, der mithilfe des ASAP-HSQC-Experiments und dem Signal Sacc-5a bestimmt wurde, signifikant ab. Die Überbestimmung von Saccharose im ASAP-HSQC-Experiment wird durch eine erhöhte Wiederfindungsrate von 130,4 % bestätigt. Bei der Auswertung des Signals Sacc-5b werden statistisch gleichwertige Saccharosegehalte mit allen Methoden ermittelt. Die Saccharosegehalte, die bei der Auswertung der unterschiedlichen Signale Sacc-5a und Sacc-5b bestimmt wurden, zeigen keine Unterschiede in der Präzision ihrer Ergebnisse. Die Ergebnisse beider HSQC-Methoden und der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode weichen um weniger als 8,5 % ab. Die mittels ASAP-HSQC ermittelten Messwerte werden weniger präzise (Variationskoeffizienten 15,5 %, siehe Tabelle 9-52) bestimmt. Die Wiederfindungsrate von Saccharose, die mittels HPAEC-PAD ermittelt wurde (siehe Tabelle 4-15), liegt bei 94,5 % und zeigt eine ausreichende Richtigkeit der Methode an. Die Wiederfindungsraten von Saccharose, die mithilfe der HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden unter Verwendung des Signals Sacc-5b bestimmt wurden, liegen zwischen 89,4 % und 103,7 %. Aus diesen Gründen wird das Saccharosesignal Sacc-5b zur Quantifizierung verwendet.

Die mit den optimierten 2D-NMR-spektroskopischen Methoden bestimmten Gehalte von Raffinose, Stachyose und Verbascose zeigen keine signifikanten Abweichungen zueinander sowie zu den mittels HPAEC-PAD bestimmten Vergleichswerten (siehe Abbildung 4-18). Die Raffinosegehalte, die bei Verwendung der ASAP-HSQC-Methode ermittelt wurden, weisen die größten Variationskoeffizienten von bis zu 64,9 % auf (siehe Tabelle 9-52), weshalb die Präzision der Methode als nicht genügend bewertet wird. Die Präzision der bestimmten *lowCost*-ASAP-HSQC-Messwerte von Raffinose, Stachyose und Verbascose werden mit Variationskoeffizienten kleiner 11,0 % als ausreichend beurteilt. Die bestimmten Verbascosegehalte, die mithilfe der HSQC-Methode mit zwei Scans ermittelt wurden, zeigen einen Variationskoeffizienten von 20,4 %. Die HSQC-Methode mit vier Scans und NUS-Kopplung ermittelt ebenfalls Messwerte mit einer mäßigen Präzision (Variationskoeffizient von 17,4 % für Raffinose). Dies deutet darauf hin, dass beide HSQC-Methoden lediglich mäßig präzise Ergebnisse ermitteln.

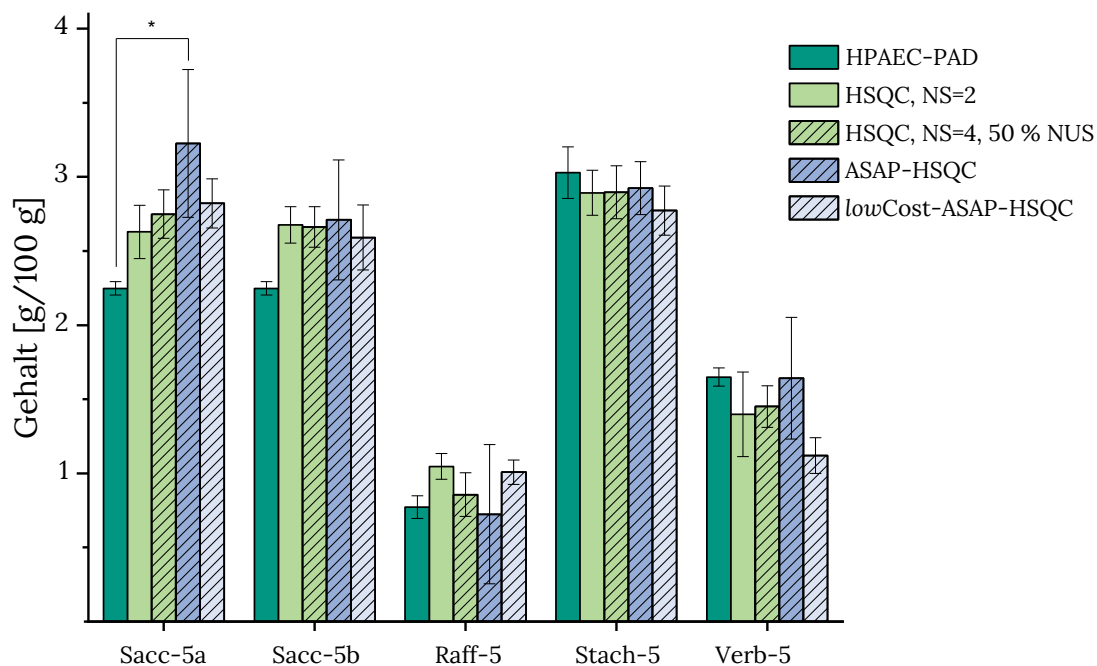


Abbildung 4-18: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Saccarose (Sacc), Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb) in blauen Lupinensamen. Die Proben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-5a, Sacc-5b, Raff-5, Stach-5 und Verb-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Die Proben der blauen Lupinensamen werden mit Raffinose, Stachyose und Verbascose aufgestockt, um über die ermittelten Wiederfindungen Hinweise auf die Richtigkeit der optimierten 2D-NMR-spektroskopischen Methoden zu erhalten. Alle Wiederfindungsraten der Analyten Raffinose und Stachyose liegen in einem ähnlichen Bereich (siehe Tabelle 4-15). Die getesteten NMR-spektroskopischen Methoden quantifizieren diese Analyten somit in gleicher Richtigkeit wie die Vergleichsmethode. Verbascose wird schon bei der Verwendung der Vergleichsmethode vermutlich unterbestimmt (Wiederfindungsrate von 43,4 %, siehe Tabelle 4-15). Die Wiederfindungsraten von Verbascose, die mithilfe der HSQC-Methoden ermittelt wurden, deuten ebenfalls eher auf eine Unterbestimmung hin. Lediglich mithilfe der ASAP-HSQC-Methode wird eine akzeptable Wiederfindungsrate von 92,1 % ermittelt.

Alle getesteten Methoden sind somit geeignet die Analyten Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose in blauen Lupinensamen zu quantifizieren. Das Signal Sacc-5b wird zur Quantifizierung

bei der Verwendung NMR-spektroskopischer Methoden empfohlen. Während Saccharose, Raffinose und Stachyose mit allen Methoden vermutlich richtig quantifiziert werden, kann keine abschließende Aussage über die Richtigkeit der Verbascosebestimmung getroffen werden. Bei der Durchführung der ASAP-HSQC-Methode muss mit einer schlechten Präzision der Messwerte gerechnet werden.

Tabelle 4-15: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Saccharose (Sacc), Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb) durch Aufstockung von blauen Lupinensamen ermittelt wurden. Die Aufstockungsproben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung (SW) wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-5a, Sacc-5b, Raff-5, Stach-5 und Verb-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Methode	WF [%] ± SW [%]				
	Sacc-5a	Sacc-5b	Raff-5	Stach-5	Verb-5
HPAEC-PAD	94,5 ± 12,4		89,0 ± 3,9	95,9 ± 3,2	43,4 ± 3,1
HSQC, NS=2	90,3 ± 17,6	89,4 ± 15,9	84,6 ± 18,0	82,7 ± 8,2	84,2 ± 4,7
HSQC, NS=4, 50 % NUS	82,2 ± 20,5	84,4 ± 15,0	107,5 ± 3,7	80,7 ± 10,1	72,6 ± 12,0
ASAP-HSQC	130,4 ± 25,0	90,2 ± 11,5	105,7 ± 14,8	95,4 ± 24,2	92,1 ± 5,2
lowCost-ASAP-HSQC	110,6 ± 17,7	103,7 ± 24,4	95,3 ± 16,0	113,9 ± 14,0	127,5 ± 29,5

Rote Linsen

Alle in der Methode integrierten Analyten konnten mittels der HPAEC-PAD in roten Linsen quantifiziert werden (siehe Tabelle 9-51). Die Messungen zeigen Variationskoeffizienten zwischen 10,5 % und 29,9 % an und sind daher als mäßig präzise bis unpräzise zu bewerten. Die Wiederfindungsraten, die mithilfe der HPAEC-PAD-Methode ermittelt wurden (siehe Tabelle 9-51), zeigen für Glucose (99,1 % ± 6,2 %), Galactose (100,3 % ± 8,0 %) und Raffinose (108,1 % ± 11,9 %) ausreichend richtige Ergebnisse an. Bei der Bestimmung von Fructose, Saccharose und Verbascose wurden Wiederfindungsraten zwischen 64,2 % und 77,6 % erreicht, was auf eine Unterbestimmung dieser Analyten mit der HPAEC-PAD-Methode hindeutet. Stachyose wird vermutlich aufgrund der ermittelten Wiederfindungsrate von 118,9 % überbestimmt. Die Hauptkomponenten in roten Linsen sind Saccharose mit einem Gehalt von 0,84 g/100 g und Stachyose mit 1,91 g/100 g.

Saccharose und Stachyose können auch mit allen HSQC-Methoden in den Proben quantifiziert werden. Bei der Auswertung der beiden Saccharosesignale werden mithilfe der HSQC-Methoden

gleiche Saccharosegehalte ermittelt (siehe Abbildung 4-19). Der Saccharosegehalt, der bei der Auswertung des Signals Sacc-5a unter Verwendung der ASAP-HSQC-Methode bestimmt wurde, ist signifikant höher als der Vergleichswert. Die mithilfe der ASAP-HSQC-Methode (Signal Sacc-5a) ermittelte Wiederfindungsrate mit einem Wert von 159,1 % bestätigt die vermutete Überbestimmung. Aus diesem Grund wird, wie bei den blauen Lupinensamen, bei der Analyse von roten Linsen die Auswertung des Signals Sacc-5b bevorzugt. Der Gehalt, der unter Verwendung des Signals Sacc-5b und der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode bestimmt wurde, ist signifikant höher als der Vergleichswert, wobei die ermittelte Wiederfindungsrate von 90,4 % keinen Hinweis auf eine mögliche Überbestimmung gibt. Die Saccharosebestimmungen aller Methoden wurden präzise mit Variationskoeffizienten kleiner 12,1 % durchgeführt (siehe Tabelle 9-52). Stachyose wird lediglich bei der Anwendung der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode mäßig präzise (Variationskoeffizient 17,1 %) bestimmt. Die restlichen Methoden zeigen bei der Bestimmung von Stachyose Variationskoeffizienten kleiner 10,5 %.

Die Wiederfindungsrate von Saccharose, die bei der Durchführung der HPAEC-PAD-Methode bestimmt wurde, zeigt einen Analytverlust von 22,4 % an (siehe Abbildung 4-19). Stachyose könnte aufgrund der Rate von 118,9 % mithilfe der HPAEC-PAD-Methode überbestimmt werden. Die mithilfe der NMR-spektroskopischen Methoden bestimmten Wiederfindungsraten von Saccharose liegen im Bereich zwischen 90,4 % und 97,4 % und quantifizieren Saccharose somit mit einer höheren Richtigkeit als die Vergleichsmethode. Die ermittelten Wiederfindungsraten des Analyten Stachyose liegen bei Verwendung der HSQC-Methode mit vier Scans und NUS-Kopplung sowie der ASAP-HSQC-Methode mit Werten von 101,6 % und 100,9 % nahe am optimalen Wert von 100 %. Die niedrigeren Wiederfindungsraten bei der Durchführung der HSQC-Methode mit zwei Scans (72,8 %) und der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode (85,9 %) deuten darauf hin, dass Stachyose bei der Verwendung dieser Methoden eher unterbestimmt wird.

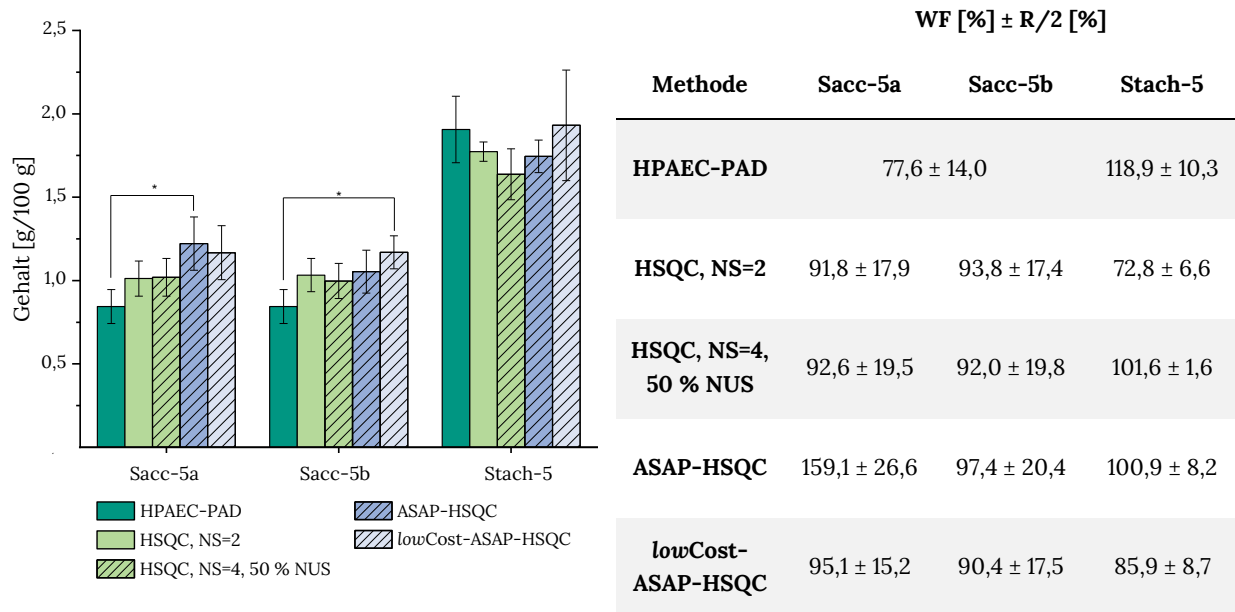


Abbildung 4-19: Links: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Saccharose (Sacc) und Stachyose (Stach) in roten Linsen. Die Proben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-5a, Sacc-5b und Stach-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Rechts: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Saccharose (Sacc) und Stachyose (Stach) durch Aufstockung von roten Linsen ermittelt wurden. Die Aufstockungsproben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Doppelbestimmung analysiert, sodass als Präzisionsmaß die halbe Spannweite zwischen den beiden Messwerten (R/2) angegeben wird.

Glucose, Fructose und Galactose konnten mit keiner NMR-spektroskopischen Methode in roten Linsen quantifiziert werden. Die durch die HPAEC-PAD-Methode bestimmten Gehalte liegen nach Einberechnung der möglichen Verdünnung durch die Aufarbeitung unterhalb der BG der NMR-spektroskopischen Methoden. Mithilfe der lowCost-ASAP-HSQC-Methode konnten Raffinose und Verbascose ebenfalls nicht quantifiziert werden. Die Bestimmung von Raffinose und Verbascose ist allerdings mit beiden HSQC-Methoden möglich. Verbascose kann zudem unter Verwendung des ASAP-HSQC-Experiments quantifiziert werden. Der Raffinosegehalt, der mithilfe der HSQC-Methode mit zwei Scans quantifiziert wurde, ist zum Gehalt der HPAEC-PAD-Methode statistisch gleichwertig, während ein signifikant höherer Gehalt mit der NUS-gekoppelten HSQC-Methode bestimmt wird (siehe Abbildung 9-10). Die vermutete Überbestimmung wird auch durch die erhöhte Wiederfindungsrate von 117,7 % bestätigt. Sowohl die Vergleichsmethode als auch die beiden eingesetzten HSQC-Methoden quantifizieren unpräzise mit Variationskoeffizienten zwischen 13,8 % und 33,9 % (siehe Tabelle 9-52). Zur Quantifizierung von Verbascose scheint lediglich die durchgeführte

ASAP-HSQC-Methode geeignet zu sein (siehe Abbildung 9-10). Mit allen verwendeten Methoden werden allerdings lediglich Wiederfindungsraten für Verbascose zwischen 60 % und 70 % erreicht, sodass von einer systematischen Unterbestimmung ausgegangen werden muss. Bei der Probenaufarbeitung könnten beispielsweise Analytverluste beim Abrotieren des Lösungsmittels erfolgen oder Verbascose könnte nicht ausreichend extrahiert werden. Diese Unterbestimmung wurde bisher nur für Verbascose beobachtet.

Auch Kotha und Mitarbeiter bestimmten Saccharose und Stachyose als Hauptkomponenten in roten Linsen. Die Arbeitsgruppe ermittelte die Mono- und Oligosaccharidverteilung von roten Linsen nach wässriger Extraktion unter Ultraschallbehandlung mithilfe einer HPAEC-PAD-Methode. Die Autoren quantifizierten zudem Verbascose, Raffinose und Galactose in absteigender Reihenfolge, was ebenfalls in Einklang zu den ermittelten Ergebnissen steht (Kotha *et al.*, 2020).

Kidneybohnen

Die optimierten Methoden (siehe Tabelle 4-14) wurden verwendet, um die Mono- und Oligosaccharidgehalte in Kidneybohnen zu quantifizieren. Zunächst wurde die HPAEC-PAD-Methode als Vergleichsmethode durchgeführt, mit welcher die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose in Kidneybohnen nach ethanolischer Extraktion quantifiziert werden konnten. Die ermittelten Gehalte zeigen dabei eine mäßige Präzision mit Variationskoeffizienten zwischen 13,4 % und 22,6 %. Die bestimmten Wiederfindungsraten können für die Analyten Fructose (103,0 %) und Stachyose (95,6 %) als ausreichend bewertet werden. Bei der Bestimmung von Glucose, Galactose, Saccharose, Raffinose und Verbascose wurden Wiederfindungsraten zwischen 75,4 % und 90,0 % ermittelt, die auf eine Unterbestimmung der Analyten hindeuten (siehe Tabelle 9-51). Die ermittelten Gehalte stehen in guter Näherung zu Literaturwerten, die Saccharose und Stachyose als Hauptkomponenten in Kidneybohnen quantifizieren (Kotha *et al.*, 2020). Auch die Gehalte der Nebenkomponten sind zu den publizierten Ergebnissen vergleichbar.

Die in niedrigen Konzentrationen enthaltenen Analyten Glucose, Fructose, Galactose und Verbascose können mit den NMR-spektroskopischen Methoden nicht quantifiziert werden. Trotz Messung eines aufkonzentrierten Extraktionsansatzes liegen die Gehalte unterhalb der BG und können daher lediglich qualitativ nachgewiesen werden. Die Hauptkomponenten Saccharose und Stachyose hingegen können mit allen NMR-spektroskopischen Methoden bestimmt werden (siehe Abbildung 4-20). Hierbei zeigt sich lediglich zwischen dem mithilfe der HPAEC-PAD-Methode bestimmten Vergleichswert von Saccharose und dem durch die Anwendung der ASAP-HSQC-Methode ermittelten Saccharosegehalt unter Verwendung des Signals Sacc-5a ein signifikanter Unterschied. Die deutliche Saccharoseüberbestimmung mittels der durchgeführten ASAP-HSQC-Methode wurde durch eine erhöhte Wiederfindungsrate von 119 % bestätigt. Wie auch schon für die Matrices blaue Lupinen und

rote Linsen zeigen die Ergebnisse der Auswertung des Signals Sacc-5b äquivalente Ergebnisse zur Vergleichsmethode, weshalb das Signal Sacc-5b zur Quantifizierung verwendet wird. Saccharose wird sowohl mit der Vergleichsmethode als auch mit beiden HSQC-Methoden sowie der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode mäßig präzise mit Variationskoeffizienten zwischen 10,8 % und 20,3 % bestimmt (siehe Tabelle 9-52). Die Messwerte der durchgeführten ASAP-HSQC-Methode zeigen hohe Variationskoeffizienten von bis zu 42,5 % und sind daher als nicht präzise zu beurteilen. Die mithilfe der NMR-spektroskopischen Methoden ermittelten Stachyosegehalte sind zum Vergleichswert gleichwertig (siehe Abbildung 4-20). Stachyose kann mithilfe aller NMR-spektroskopischen Methoden äquivalent zur HPAEC-PAD analysiert werden. Die Ergebnisse aller Methoden weisen Variationskoeffizienten zwischen 3,6 % und 13,4 % auf, sodass die Messungen als ausreichend präzise bewertet werden. Die bestimmten Wiederfindungsraten (96,4 % bis 104,3 %, siehe Abbildung 4-20) zeigen für die HSQC-Methoden sowie die ASAP-HSQC-Methode eine ausreichende Richtigkeit.

Raffinose kann als einzige Nebenkomponente mithilfe der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden quantifiziert werden, wobei die ermittelten Gehalte alle signifikant höher sind als der mittels HPAEC-PAD bestimmte Raffinosegehalt (siehe Abbildung 9-11). Sowohl die Vergleichsmethode als auch die HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden ermitteln Messwerte mit zum Teil hohen Variationskoeffizienten (siehe Tabelle 9-52). Die bestimmten Wiederfindungsraten liegen für alle Methoden im gleichen Bereich (siehe Abbildung 9-11) und zeigen für die HPAEC-PAD-Methode keine Unterbestimmung an, was bei den geringen Gehalten vermutet wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse kann keine verlässliche Aussage über die Anwendbarkeit der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden zur Quantifizierung von Raffinose in roten Linsen getroffen werden. Die Durchführung der Bestimmung im unteren Teil des Arbeitsbereichs könnte hierbei Einfluss auf Richtigkeit und Präzision haben.

In Kidneybohnen können somit lediglich die Analyten Saccharose und Stachyose mithilfe der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden in ausreichender Präzision bestimmt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verwendete HPAEC-PAD-Methode geeignet ist Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose und Stachyose in Leguminosen zu quantifizieren. Da zum Teil niedrige Wiederfindungsraten für Verbascose ermittelt wurden, kann eine Beeinflussung der Quantifizierung von Verbascose nicht ausgeschlossen werden. Allerdings scheint es wahrscheinlich, dass die verwendete ethanolische Extraktion einen größeren Einfluss auf die Quantifizierung hat als die HPAEC-PAD-Messung. Als Vertreter der botanischen Familie der Leguminosen wurden blaue Lupinensamen, rote Linsen und Kidneybohnen analysiert. Die getesteten 2D-NMR-spektroskopischen Methoden sind geeignet, Analyten, die in hohen Konzentrationen in den Matrices enthalten sind, zu quantifizieren. Die verwendeten HSQC-Methoden weisen Messzeiten von 3,5 h auf. Die HSQC-Methode mit zwei Scans könnte zudem mit NUS gekoppelt werden, was die Messzeit auf 1,75 h reduziert. Die Durchführung der HSQC-Methoden dauert dennoch deutlich länger

als eine HPAEC-PAD-Messung, die in einer Stunde Ergebnisse liefern kann. Die getesteten ASAP-HSQC-Methoden können in weniger als einer halben Stunde aufgenommen werden. Besonders die verwendete ASAP-HSQC-Methode ermittelt allerdings zum Teil Ergebnisse mit hohen Variationskoeffizienten und misst daher nicht immer ausreichend präzise. Die Durchführung des *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment hingegen ist durch eine deutlich bessere Präzision gekennzeichnet, weshalb dieses Experiment bevorzugt zur Quantifizierung von Oligosacchariden einzusetzen ist. Die Bestimmung von NebenkompONENTEN mit Gehalten kleiner 0,5 g/100 g erfolgt nicht verlässlich mithilfe der optimierten NMR-spektroskopischen Methoden, weshalb zur Bestimmung dieser Komponenten die HPAEC-PAD-Methode vorzuziehen ist. Zur Quantifizierung gering konzentrierter Komponenten könnte in weiterführenden Studien die Scanzahl und dadurch die Empfindlichkeit im *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment erhöht werden.

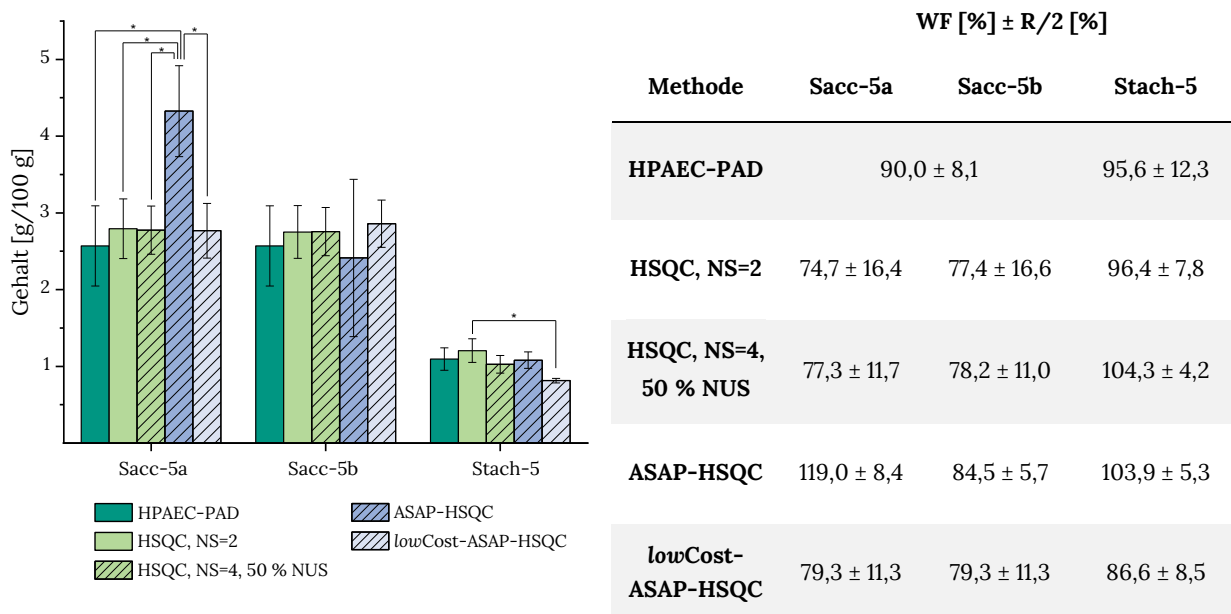


Abbildung 4-20: Links: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Saccharose (Sacc) und Stachyose (Stach) in Kidneybohnen. Die Proben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-5a, Sacc-5b und Stach-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurde mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und mit „*“ gekennzeichnet. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Rechts: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Saccharose (Sacc) und Stachyose (Stach) durch Aufstockung von Kidneybohnen ermittelt wurden. Die Aufstockungsversuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, sodass als Präzisionsmaß die halbe Spannweite zwischen den beiden Messwerten (R/2) angegeben wird.

4.3 Zusammenfassende Diskussion

Die NMR-Spektroskopie zählt in der modernen Analytik zu den wichtigsten Methoden für die Strukturaufklärung von Molekülen. Aufgrund der einfachen Anwendung ohne große Probenvorbereitung oder Derivatisierung werden besonders 1D-NMR-Experimente immer häufiger zur Quantifizierung der Komponenten in einfachen Gemischen genutzt. Aufgrund der großen Anzahl an Signalen in komplexen Analytgemischen reicht die Auflösung von 1D-NMR-Experimenten jedoch oft nicht aus, sodass auf 2D-Experimente zurückgegriffen werden muss. Neben der zusätzlichen Strukturinformation durch die Messung von Korrelationen zwischen Kernen in 2D-Experimenten, verfügen sie durch das Einbringen einer zweiten Dimension über eine verbesserte Auflösung, die zur Quantifizierung einzelner Analyten in komplexen Gemischen genutzt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide optimiert und ihre Anwendbarkeit anhand verschiedener Beispielmatrixen aus dem Lebensmittelbereich getestet.

Um die gewonnenen Ergebnisse einordnen zu können, wurden sie mit den Ergebnissen bereits etablierter Referenzmethoden verglichen. Zu den Referenzmethoden zählen unter anderem enzymatische Methoden, die als amtlich etablierte §64-Methoden zur Quantifizierung von Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose verwendet werden. Die HPAEC-PAD wird von der AOAC bereits als Referenzmethode empfohlen. In Deutschland ist die Methode bislang noch nicht in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden integriert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HPAEC-PAD-Methoden zeigten gleichwertige Ergebnisse in Bezug auf Richtigkeit und Präzision verglichen mit den enzymatischen Methoden. Zudem sind die HPAEC-PAD-Methoden bei vorhandener Geräteausstattung einfach und schnell durchzuführen mit einer Messzeit von 60 min bis 75 min pro Probe. Während die enzymatischen Methoden manuellen Arbeitsaufwand erfordern, kann die HPAEC-PAD-Methode nach der Probenaufarbeitung vollautomatisiert ablaufen.

Bei der Analyse vieler Produktgruppen wird häufig eine Carrez-Klärung zur Probenaufarbeitung verwendet. Erhöhte Konzentrationen der Reagenzien können vor allem enzymatisch bestimmte Ergebnisse beeinflussen, sodass insbesondere bei der Verwendung der enzymatischen Methode auf die eingesetzten Konzentrationen an Carrez-Reagenzien geachtet werden sollte. Geringe Konzentrationen der Carrez-Reagenzien beeinflussen die Quantifizierung dagegen in der Regel weniger. Die HPAEC-PAD-Methode zeigt eine wesentlich geringere Beeinflussung durch verschiedene Salzkonzentrationen, sodass die Methode im Vergleich zur enzymatischen Methode als robuster bewertet werden kann. Insgesamt betrachtet, analysiert die durchgeführte HPAEC-PAD-Methode gleichwertige Ergebnisse zu den enzymatischen Methoden in Richtigkeit und Präzision. Zudem zeichnet sich die Methode durch eine höhere Stabilität der Messungen bei der Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen sowie durch eine deutlich schnellere und einfachere Durchführung, insbesondere bei der Quantifizierung einer großen Anzahl an Mono- und Disacchariden, aus.

Aufgrund der aufgezeigten Vorteile der HPAEC-PAD-Methode gegenüber den enzymatischen Methoden sollte in Zukunft über deren Integration in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nachgedacht werden.

Für den Analyten Isomaltulose ist keine geeignete enzymatische Methode etabliert. Als §64-Methode wird die Durchführung einer HPLC-RI-Methode empfohlen, die aber im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf keine ausreichende Trennung der Analyten zeigte. Zur Quantifizierung von Isomaltulose wurden deshalb alternative Analysemethoden wie HPAEC-PAD und GC-FID verwendet und als Bezugsmethode für die NMR-Methoden eingesetzt. Die GC-FID-Methode liefert vergleichbar präzise und richtige Ergebnisse wie die der etablierten HPAEC-PAD-Methode. Allerdings ist die Bestimmung von Isomaltulose sowie weiterer Mono- und Disaccharide mittels GC-FID nur nach vorheriger Derivatisierung möglich. Durch den zusätzlichen Arbeitsschritt dauert die Durchführung der Methode deutlich länger und zusätzlich kommen gesundheitsschädliche und umwelttoxische Reagenzien bei der Derivatisierung zum Einsatz. Aufgrund der schnelleren Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie der ökologischen Belastung und dem erhöhten Gesundheitsrisiko bei der Verwendung der GC-FID-Methode, sollte die HPAEC-PAD-Methode bevorzugt eingesetzt werden.

¹H-NMR-Methoden sind einfach und schnell durchzuführen und werden deshalb bevorzugt in der Lebensmittelanalytik eingesetzt. Bei der Optimierung der Methode auf die Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide hat sich die Verwendung der 1D-NOESY-Pulssequenz aufgrund ihrer Wasserunterdrückung für die Analyse vieler wässrigen Proben als vorteilhaft herausgestellt. In den wasserunterdrückten Spektren können allerdings Signale, die im Frequenzbereich des Unterdrückungspulses liegen, beeinflusst werden. Aufgrund der geringen Messzeiten von 1D-Spektren kann mit einer hohen Anzahl an Scans zur Steigerung der Empfindlichkeit der Methode gearbeitet werden. Um die Einzelmessungen möglichst zeitoptimiert durchzuführen, wurde der Einfluss der Länge des D_1 -Delays auf die Signalflächen untersucht. Die Experimente sollten demzufolge mindestens mit einem D_1 -Delay von 3,0 s durchgeführt werden. Bei der Aufnahme von 64 Scans dauert eine Messung unter diesen Bedingungen knapp vier Minuten. Im Zuge der Optimierung der Länge des D_1 -Delays wurden bei der Verwendung von Experimenten mit $D_1=2,0$ s für Lactose keine verminderten Signale und für Saccharose kleinere Signale lediglich auf einem Konzentrationsniveau im Vergleich zu den Signalen der Experimente mit höheren D_1 -Delays ermittelt. Zur Quantifizierung von Saccharose und Lactose konnten demzufolge 1D-NOESY-Experimente mit einem D_1 -Delay von 2,0 s verwendet werden. Dadurch kann die Messzeit der Methode auf 3,5 min verkürzt werden.

Bei Anwendung der 1D-NOESY-Methode auf Matrices der Produktgruppe Milch und Milchprodukte nach Carrez-Klärung eignete sich die Methode mit einem D_1 -Delay von 3,0 s zur Quantifizierung von Lactose in Vollmilch, in haltbarer Milch, in Buttermilch und in saurer Sahne sowie von Glucose in lactosefreier Milch. In Milchmischgetränken quantifizierte die 1D-NOESY-Methode mit einem D_1 -Delay von 2,0 s Saccharose und Lactose präzise. Die Messungen wurden ohne die Verwendung

einer internen Standardsubstanz durchgeführt. Durch den Einsatz einer internen Standardsubstanz wie beispielsweise Maltulose könnte die Methodenperformance weiter verbessert werden. Für Proben, die Fructose, Maltose oder Isomaltulose enthalten, ist die 1D-NOESY-Methode jedoch aufgrund der geringen Auflösung nicht geeignet. Die Methode kann daher nicht zur direkten Quantifizierung vieler verschiedener Mono- und Disaccharide in einer Probe eingesetzt werden. Ob eine alternative Art der Wasserunterdrückung geeignet ist, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Auch könnte eine multivariate Auswertung der Ergebnisse angewandt werden.

Durch die Etablierung von 2D-NMR-Methoden und der dadurch erhöhten Auflösung der Spektren ist es möglich weitere lebensmittelrelevante Analyten zu quantifizieren, die mithilfe der 1D-NOESY-Methode nicht ausreichend aufgelöst wurden. Da 2D-NMR-Experimente mit deutlich höheren Messzeiten als 1D-Experimente einhergehen, ist die Optimierung der Experimentdauer ein wichtiger Faktor bei der Etablierung neuer Methoden. Durch die Aufnahme heteronuklearer Kopplungen wird die Auflösung zusätzlich erhöht, sodass bevorzugt HSQC-Pulssequenzen verwendet wurden. Die im HSQC-Experiment aufgenommenen ^1H - ^{13}C -Korrelationssignale bieten sich zur Quantifizierung von Sacchariden an. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden verschiedene Ansätze zur Messzeitoptimierung herangezogen. Neben der Verkürzung des D_1 -Delays wurde die Anwendbarkeit des NUS-Ansatzes getestet. Zudem wurden messzeitoptimierte Pulssequenzen wie das ASAP-HSQC-Experiment und das *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment erprobt.

Bei der Verwendung von HSQC-Pulssequenzen war ein D_1 -Delay von 3,0 s zur Quantifizierung aller Analyten ausreichend. Die gleiche Wartezeit wurde bereits bei der Verwendung der 1D-NOESY-Pulssequenz für einige Matrices verwendet. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass schon ein um eine Sekunde längerer D_1 -Delay als die longitudinale Relaxationszeit des am langsamsten relaxierenden Kerns (Glucose mit $T_1=2,1$ s) zur Quantifizierung ausreicht und nicht mit langen D_1 -Delays gearbeitet werden muss. Ein HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 3,0 s (zwei Scans, 1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen) wird in 104 min aufgenommen, was verglichen zu den Referenzmethoden eher einer Messzeiterhöhung als -reduktion entspricht. Für die Mehrzahl der Analyten zeigten die ermittelten Integrale des HSQC-Experiments mit einem D_1 -Delay von 1,5 s keine signifikante Abweichung zu den Integralen der Experimente mit höheren D_1 -Delays. Daher wurde im durchgeführten Methodenvergleich ebenfalls ein HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s verwendet, das in 53 min aufgenommen wird. Die HSQC-Methoden mit verkürzten D_1 -Delays können die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose in verschiedenen Milchmischgetränken und einer Buttermilchprobe präzise quantifizieren. Die Ergebnisse der HSQC-Methoden zeigten keine Unterschiede zu den Ergebnissen der getesteten Referenzmethoden. Das zeitoptimierte Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s ist zudem geeignet Isomaltulose in verschiedenen Matrices zu quantifizieren.

Die Messzeit von 53 min des HSQC-Experiments mit $D_1=1,5$ s entspricht in etwa der Messzeit der HPAEC-PAD-Methode, sodass keine wesentliche Zeitoptimierung zur Referenzmethode erfolgte. Für beide Methoden wird eine identische Probenaufarbeitung durchgeführt, sodass die Messzeit der entscheidende Faktor zur Beschleunigung der Analysendauer darstellt. Zur weiteren Beschleunigung wurden die optimierten HSQC-Methoden zusätzlich mit dem NUS-Ansatz gekoppelt. Dabei stellten sich ein ungewichtetes *Sampling* sowie ein NUS-Anteil von 50 % als am besten geeignet heraus. Bei der Verwendung eines NUS-Anteils von 50 % werden die Messzeiten der Methoden um die Hälfte auf 27 min ($D_1=1,5$ s) bzw. 53 min ($D_1=3,0$ s) reduziert. NUS-gekoppelte HSQC-Methoden konnten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Isomaltulose in den getesteten Milchprodukten sowie in der Probe „Multicarbogel“ vergleichbar zu den HSQC-Experimenten ohne NUS-Kopplung sowie zu den Referenzmethoden quantifizieren. Zudem wurde durch die NUS-Kopplung kein Einfluss auf die Präzision der Ergebnisse festgestellt. Zum Teil wurde durch den Einsatz von NUS sogar das S/N einiger Analyten verbessert. Die Ergebnisse verdeutlichen die mögliche Kopplung von HSQC-Methoden mit einem NUS-Anteil von 50 %, wodurch die Quantifizierung nicht negativ beeinflusst und die Messzeit halbiert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Messzeitreduktion stellt die Verwendung von ASAP-HSQC-Pulssequenzen dar. Zur Auflösung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide ist die Aufnahme von 1024 Datenpunkten in der ^{13}C -Dimension ausreichend. Bei dieser Inkrementanzahl zeigt die *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz keine verbesserte Auflösung im Vergleich zur ASAP-HSQC-Methode, sodass die ASAP-HSQC-Pulssequenz verwendet wurde. ASAP-HSQC-Messungen können in 12 min ohne NUS-Kopplung bzw. in 6 min mit einem NUS-Anteil von 50 % durchgeführt werden. In den getesteten Milchmoden sowie der Probe „Multicarbogel“ wurden durch Anwendung beider ASAP-HSQC-Methoden vergleichbare Ergebnisse zu den HSQC-Methoden sowie zu den Referenzmethoden ermittelt. In der verwendeten Buttermilchprobe waren ASAP-HSQC-Experimente allerdings nicht zur Quantifizierung von Glucose und Galactose geeignet. Die Präzision der ASAP-HSQC-Messungen ohne NUS-Kopplung ist im Vergleich zu den HSQC-Methoden und den Referenzmethoden deutlich herabgesetzt. Die Ergebnisse der ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung hingegen zeigten ähnlich Präzisionsdaten wie die Ergebnisse der verwendeten HSQC-Methoden. Somit wird die ASAP-HSQC-Methode mit NUS-Kopplung zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Disaccharide empfohlen, da sie sowohl präzisere Ergebnisse liefert als auch schneller durchzuführen ist als die ASAP-HSQC-Pulssequenz ohne NUS-Kopplung.

Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass bei der Durchführung der optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden vor allem die Quantifizierung von Maltose problematisch ist. In den durchgeführten Aufstockungsversuchen zeigten sich schon bei der Verwendung der Referenzmethoden verminderte Wiederfindungsraten für Maltose. Die Beeinflussung der Quantifizierung könnte bereits durch die Carrez-Klärung erfolgen. Maltose kommt in Milch und Milchprodukten nativ nicht vor und wird in

diesen Produkten industriell auch nicht zugesetzt. Zur Beurteilung der Anwendbarkeit der Methoden müsste zusätzlich eine Matrix, die Maltose enthält, analysiert werden. Die Probe „Multicarbogel“ enthält zwar Maltose, aber auch Maltodextrine, die weder NMR-spektroskopisch noch mithilfe der Vergleichsmethoden voneinander unterschieden werden konnten.

Die Carrez-Klärung gilt als etablierte Methode zur Entfernung von Matrixbestandteilen, besonders bei der Analyse von Milch und Milchprodukten. Diese Aufarbeitungsmethode wird aber auch für andere Produktgruppen häufig eingesetzt. Die Konzentrationen an zugesetzten Carrez-Salzen haben, wie schon berichtet, besonderen Einfluss auf die Quantifizierung der Analyten mithilfe enzymatischer Methoden. Hierbei könnten die hohen Salzkonzentrationen die Tertiärstrukturen der Enzyme und somit ihre Aktivität negativ beeinflussen. Doch auch bei der Durchführung NMR-spektroskopischer Methoden kann eine negative Wirkung hoher Konzentrationen an Carrez-Salzen nicht ausgeschlossen werden. Welche Parameter von der hohen Salzfracht beeinträchtigt werden könnten, müsste hierbei in weiterführenden Studien untersucht werden. Bei der Analyse einiger Milchprodukte wurden Analytverluste, die vermutlich durch die Carrez-Klärung verursacht wurden, unabhängig von der durchgeführten Messmethode festgestellt. Die Analyten könnten dabei zusammen mit Protein- und Fettbestandteilen aus der Matrix in den schwerlöslichen Kalium-Zink-Hexacyanoferrat(II)-Niederschlag eingeschlossen werden. Dazu im Kontrast stehen allerdings die bei der Analyse der mit Isomaltulose gesüßten Produkte bestimmten Ergebnisse, bei denen eine wesentlich geringere Beeinflussung durch die Carrez-Klärung ermittelt wurde. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit möglichst geringen Konzentrationen an Carrez-Reagenzien bei der Probenaufarbeitung gearbeitet werden sollte, um mögliche Beeinflussungen der Messmethoden durch hohe Salzkonzentrationen zu vermeiden. Die optimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden konnten somit zur Quantifizierung von Analyten in wässriger und Carrez-geklärter Matrix sowie in Pufferlösungen eingesetzt werden. In allen Matrices wurden vergleichbare Ergebnisse zu den Ergebnissen der Referenzmethoden erhalten.

Neben der möglichen Messzeitoptimierung von HSQC-Experimenten können diese auch auflösungsoptimiert durchgeführt werden. Eine vergrößerte Auflösung kann bei der Quantifizierung von strukturell ähnlichen Analyten wie beispielsweise Oligosacchariden von Vorteil sein. Am Beispiel der Quantifizierung von Mitgliedern der RFO wie Raffinose, Stachyose und Verbascose in verschiedenen Leguminosenarten wurde die Anwendbarkeit auflösungsoptimierter Methoden getestet. Als Vergleichsmethode wurde für diese Anwendung eine HPAEC-PAD-Methode verwendet. Die HPAEC-PAD-Methode überzeugt allgemein durch eine hohe Empfindlichkeit und wird in der Literatur oft zur Bestimmung der RFO eingesetzt. Bei der Messung roter Linsen und von Kidneybohnen wurden allerdings lediglich mäßig präzise Messungen erreicht. Mithilfe der HPAEC-PAD-Methode wurden zum Teil geringe Wiederfindungsraten ermittelt, wobei eher eine Beeinflussung der Richtigkeit durch die verwendete ethanolische Extraktion als durch die HPAEC-PAD-Messung vermutet wird. Durch die

Verwendung einer internen Standardsubstanz könnten Präzision und Richtigkeit der Methode gegebenenfalls verbessert werden.

Generell können alle HSQC-Methoden durch eine Vergrößerung der Inkrementanzahl in der ^{13}C -Dimension auflösungsoptimiert durchgeführt werden. Zur ausreichenden Trennung charakteristischer Signale der RFO muss mit einer Anzahl von 4096 Datenpunkten gearbeitet werden. Durch die Vergrößerung der Anzahl an Datenpunkten erhöht sich auch die Messzeit von HSQC-Experimenten auf über 3,5 h pro Messung. Trotz dieser langen Messzeiten können Nebenkomponenten kleiner 0,5 g/100 g in den Leguminosen nicht verlässlich quantifiziert werden. Enthaltene Hauptkomponenten der Proben wurden in gleicher Richtigkeit und Präzision verglichen zur HPAEC-PAD-Methode analysiert. Da die HPAEC-PAD-Methode allerdings in deutlich kürzeren Messzeiten empfindlichere Ergebnisse liefern kann, stellen die optimierten HSQC-Methoden, auch bei der Kopplung mit NUS, keine vielversprechende Alternative dar. Neben HSQC-Experimenten wurden zudem eine ASAP-HSQC-Methode sowie das *lowCost*-ASAP-HSQC-Experiment getestet. Beide Pulssequenzen wurden mit dem NUS-Ansatz gekoppelt. Die aufgenommenen *lowCost*-ASAP-HSQC-Spektren zeigen im Vergleich beider ASAP-HSQC-Experimente eine verbesserte spektrale Auflösung in der ^{13}C -Dimension (4096 Datenpunkte). Im Methodenvergleich zur Bestimmung der Analyten in Leguminosen wiesen die Ergebnisse beider ASAP-HSQC-Pulssequenzen jedoch höhere Variationskoeffizienten verglichen zur HPAEC-PAD auf. Die Präzision ist bei der Durchführung der ASAP-HSQC-Methode am geringsten, während bei Verwendung der *lowCost*-ASAP-HSQC-Pulssequenz akzeptabel präzise Messungen durchgeführt wurden. Die ermittelten Wiederfindungsraten der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode lagen im gleichen Bereich wie die Wiederfindungsraten der Vergleichsmethode. Somit stellt die optimierte *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode eine vielversprechende Alternative zur HPAEC-PAD dar, die in einer Messzeit von lediglich 24 min die Oligosaccharide der RFO sowie weitere relevante Mono- und Disaccharide wie Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose in Leguminosen präzise und vergleichbar zur HPAEC-PAD quantifiziert. Limitiert wird der Einsatz der optimierten *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode durch ihre geringere Empfindlichkeit im Vergleich zur HPAEC-PAD, wobei zur Vergrößerung der Empfindlichkeit mit einer größeren Scanzahl gemessen werden könnte. Bei der Aufnahme von vier Scans verlängert sich die Messzeit der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode auf 48 min, was noch immer einer Messzeitverkürzung im Vergleich zur HPAEC-PAD-Methode entspricht.

Zusammenfassend dargestellt können HSQC-Methoden als Alternative zu etablierten Methoden für die Quantifizierung von Mono- und Oligosacchariden in Lebensmitteln verwendet werden. Bei der Durchführung von HSQC-Methoden zur Bestimmung von Mono- und Disacchariden zeichnen sich NUS-gekoppelte HSQC- sowie ASAP-HSQC-Methoden durch reduzierte Messzeiten verglichen zu Enzymatik, HPAEC-PAD und GC-FID aus. Eine Kopplung mit dem NUS-Ansatz führt zu keiner verschlechterten Quantifizierung. Bei Verwendung von NUS in Kombination mit der ASAP-HSQC-

Pulssequenz kann die Präzision der Methode sogar verbessert werden. ASAP-HSQC-Messungen mit NUS-Kopplung können somit ausreichend präzise und zu den Referenzmethoden vergleichbare Ergebnisse in wenigen Minuten generieren, was die Möglichkeit zur Etablierung einer Screeningmethode eröffnet. In wesentlich kürzeren Analysenzeiten, als von den Referenz- und Vergleichsmethoden benötigt, kann somit eine größere Anzahl an Proben zur Bestimmung der Analyten in Milch und Milchprodukten sowie in Produkten, die mit Isomaltulose gesüßt werden, erfolgen. Hierbei könnte der Fokus auf der Überprüfung der Deklaration liegen, wobei die zeitaufwändigen Referenzmethoden lediglich bei abweichenden Gehalten zur Deklaration verwendet werden müssten. Eine korrekte Deklaration von Lebensmitteln ist ein wichtiger Aspekt für viele Bevölkerungsgruppen, da sie beispielsweise für Menschen mit Stoffwechselerkrankungen die Grundlage einer sicheren Ernährung darstellt. Zudem kann mithilfe der optimierten Methoden der Zusatz gegebenenfalls kostengünstigerer Bestandteile wie Saccharose anstatt Isomaltulose und somit eine Verbrauchertäuschung überprüft werden. Die Anwendung der Methoden könnte zudem auf weitere zuckerreiche Lebensmittel wie Erfrischungsgetränke, Speiseeis oder Marmelade bei vorheriger Etablierung geeigneter Probenaufarbeitungsmethoden übertragen werden. Neben der Bestimmung freier Mono- und Disaccharide in Lebensmitteln besteht zudem die Möglichkeit Polysaccharidbestandteile nach enzymatischer oder hydrolytischer Spaltung zu quantifizieren.

ASAP-HSQC-Methoden können allerdings zurzeit noch nicht vollautomatisiert ablaufen, da eine Überwachung des Energieeintrags in das System zum Schutz des Spektrometers erfolgen sollte. Durch die Etablierung geeigneter Sicherheitssysteme, die eine automatische Abschaltung des Systems bei zu hohem Energieeinsatz gewährleisten, könnte die Methode in Zukunft automatisiert werden. Die etablierten HSQC-Methoden können heute schon vollautomatisiert verwendet und zudem leicht an jedem handelsüblichen Spektrometer etabliert werden. Durch ihre leichte Übertragbarkeit auf andere Systeme, ihre vollautomatisierte Durchführung sowie die verringerten Messzeiten zu den Referenzmethoden bieten sich auch NUS-gekoppelte HSQC-Methoden als Alternativmethoden zur Quantifizierung von Mono- und Disacchariden an.

Zur Generierung einer hohen Auflösung in der ^{13}C -Dimension wird bevorzugt die *lowCost*-ASAP-Pulssequenz eingesetzt, die hochaufgelöste Spektren in Messzeiten kleiner 30 min erzeugen kann. In diesen Spektren können strukturell ähnliche Analyten ausreichend aufgelöst und quantifiziert werden. Verglichen mit der bereits etablierten HPAEC-PAD-Methode bietet die *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode eine deutlich reduzierte Messzeit und somit auch eine verkürzte Gesamtanalysendauer. Ein großer Nachteil ist die geringere Empfindlichkeit der *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode im Gegensatz zur HPAEC-PAD-Methode, die durch eine zusätzliche Aufkonzentrierung während der Aufarbeitung oder der Messung einer höheren Scanzahl verbessert werden könnte. Am Beispiel der RFO konnten Oligosaccharide, die sich lediglich in einer Monomereinheit unterscheiden bei gleicher Präzision und Richtigkeit wie bei der Verwendung der HPAEC-PAD-Methode quantifiziert werden.

Die Anwendung der *lowCost-ASAP-HSQC*-Methode kann in Zukunft auf weitere RFO-haltige Proben sowie auf weitere Oligosaccharidfamilien wie beispielsweise GOS ausgeweitet werden. Neben der Quantifizierung von Analyten besteht durch die Anwendung auflösungsoptimierter Methoden zudem die Möglichkeit detaillierte Informationen zur Strukturaufklärung bei reduzierten Messzeiten zu erhalten und dadurch die Strukturaufklärung von Naturstoffen praktikabler zu gestalten.

5 Zusammenfassung

Kohlenhydrate zählen zu den Hauptnährstoffen der menschlichen Ernährung, die sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln in großen Mengen enthalten sind. Kohlenhydrate können als freie Monosaccharide, aber auch als Oligo- und Polysaccharide vorkommen. Neben der Energiebereitstellung spielen sie als Ballaststoffe eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung. Stärkepolysaccharide sowie freie Disaccharide können im Dünndarm zum Teil enzymatisch gespalten und die Monosaccharide resorbiert werden. Bei Menschen mit Störungen im Enzymhaushalt der Kohlenhydratverdauung können schwerwiegende Krankheitsbilder die Folge derartiger Anomalien sein. Daher ist die korrekte Bestimmung von Kohlenhydraten in Lebensmitteln von besonderer Bedeutung, um beispielsweise die Deklaration von zusammengesetzten Lebensmitteln überprüfen zu können.

Die Kohlenhydrate D-Glucose (Glucose), D-Fructose (Fructose), D-Galactose (Galactose), Saccharose, Lactose und Maltose zählen zu den wichtigsten Mono- und Disacchariden, die in Lebensmitteln frei vorkommen. Glucose, Fructose und Saccharose werden zudem häufig zum Süßen von Lebensmitteln verwendet. Da ein übermäßiger Konsum dieser Kohlenhydrate mit einigen Krankheiten wie Übergewicht, Diabetes oder Karies korreliert wird, werden immer häufiger Alternativstoffe zum Süßen von Lebensmitteln wie beispielsweise Isomaltulose eingesetzt. Der Verzehr von Isomaltulose hat einen geringeren Einfluss auf den Blutglucosespiegel als die Einnahme von Saccharose, zudem ist das Kohlenhydrat nicht kariogen. Neben Mono- und Disacchariden können auch freie Oligosaccharide in Lebensmitteln enthalten sein. Eine wichtige Gruppe entsprechender Oligosaccharide stellt die Raffinose-Familie dar, die bevorzugt in Leguminosen vorkommt.

Die analytische Differenzierung von Mono- und Oligosacchariden wird durch ihre strukturellen Ähnlichkeiten erschwert. Zur Quantifizierung freier Mono- und Disaccharide sind enzymatische Bestimmungen etablierte Methoden gemäß §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs. Enzymatische Methoden sind allerdings relativ zeitaufwändig und arbeitsintensiv in ihrer Durchführung. Ziel dieser Arbeit war es daher, alternative Analysemethoden zu entwickeln, die geeignet sind, ernährungsphysiologisch relevante Mono- und Oligosaccharide in möglichst kurzer Zeit richtig und präzise zu quantifizieren. Eine bereits von der US-amerikanischen *Association of Official Analytical Chemists* etablierte Alternativmethode stellt die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*, HPAEC-PAD) dar. Bei Anwendung dieser Methode auf verschiedene Matrices aus dem Bereich der Milch und Milchprodukte sowie auf Produkte, die mit Isomaltulose gesüßt wurden, wurden richtige Gehalte bei ausreichender bzw. guter Präzision quantifiziert. Ein großer Vorteil der HPAEC-PAD-Methode ist ihre Robustheit gegenüber hohen Salzkonzentrationen, welche nach der Probenaufarbeitung mithilfe einer Carrez-Klärung beispielsweise häufig zu finden sind. Zudem können mithilfe einer HPAEC-PAD-Analyse alle ernährungsphysiologisch relevanten Mono- und Disaccharide automatisiert und gleichzeitig bestimmt werden, während die

enzymatischen Methoden auf die manuelle Bestimmung von maximal drei Analyten gleichzeitig beschränkt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem Methoden der Kernspinresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR-Spektroskopie) zur Quantifizierung von Mono- und Disacchariden getestet, die sich zum Teil durch erheblich kürzere Analysenzeiten als die HPAEC-PAD-Methode auszeichnen. Eindimensionale NMR-Experimente wurden für die Quantifizierung von Glucose, Saccharose und Lactose optimiert und mit einem D_1 -Delay von 3,0 s (Glucose) und 2,0 s (Saccharose, Lactose) in nur wenigen Minuten durchgeführt. Ein ausreichend langer D_1 -Delay ist für die korrekte Quantifizierung von Analyten mithilfe von NMR-spektroskopischen Methoden essentiell. Da der D_1 -Delay allerdings auch einen großen Anteil an der Dauer eines NMR-Experiments hat, ist seine Optimierung wichtig, um Experimente in möglichst geringer Messzeit durchführen zu können. Das optimierte ^1H -NMR-Experiment mit Wasserunterdrückung ist in der Lage Lactose und Saccharose in Milch und Milchprodukten präzise und zum Teil vergleichbar zu den Referenzmethoden zu quantifizieren. Allerdings ist die Auflösung der Spektren nicht ausreichend, um noch weitere Mono- und Disaccharide wie Fructose, Maltose oder Isomaltulose zu quantifizieren.

Aus diesem Grund wurde zudem das zweidimensionale *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-NMR-Experiment eingesetzt. Das Einbringen einer zweiten Dimension erhöht die Auflösung, und eine größere Anzahl an Analyten kann potentiell quantifiziert werden. Ein im Rahmen dieser Arbeit optimiertes HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 3,0 s ist in der Lage die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose und Lactose in Milchprodukten präzise und zu den Referenzmethoden vergleichbar zu quantifizieren. Die Messzeit dieses Experiments liegt bei 104 min und ist somit deutlich länger als die Messzeit, die bei der Durchführung der HPAEC-PAD-Methode benötigt wird. Zur Beschleunigung von HSQC-Experimenten wurden mehrere Methoden zur Messzeitreduktion angewandt. Zum einen wurde der optimierte D_1 -Delay nochmals reduziert ($D_1=1,5$ s) und dadurch die Messzeit des HSQC-Experiments halbiert. Zum anderen wurden die möglichen HSQC-Experimente mit *Non-Uniform Sampling* (NUS) gekoppelt, wodurch die Messzeiten ein weiteres Mal halbiert werden konnten. Die Ergebnisse der NUS-gekoppelten HSQC-Experimente unterscheiden sich weder in ihrer Richtigkeit noch in ihrer Präzision von den Ergebnissen, die mithilfe etablierter Referenzmethoden wie Enzymatik oder HPAEC-PAD bestimmt wurden. Das HSQC-Experiment mit einem D_1 -Delay von 1,5 s und NUS-Kopplung konnte somit in einer Messzeit von 27 min die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Isomaltulose in den untersuchten Matrices quantifizieren. Zu den untersuchten Matrices zählen Milch und Milchprodukte wie Vollmilch, lactosefreie Milch, verschiedene Milchmischgetränke und Fruchtbuttermilch sowie Produkte der Sportlerernährung und zur Gewichtserhaltung, die mit Isomaltulose gesüßt werden.

Eine weitere Methode zur Reduktion der Messzeit NMR-spektroskopischer Methoden ist der *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-Ansatz, der sich neben der Ernst-Winkel-Anregung die

Übertragung von Magnetisierung aus einem Reservoir auf die zu untersuchenden Kerne zu Nutze macht. Dadurch kann nach einem verkürzten D_1 -Delay von wenigen Millisekunden ein neuer Scan durchgeführt und somit auch die Messzeit stark reduziert werden. Die ASAP-HSQC-Methode, die zur weiteren Verkürzung der Messzeit mit NUS gekoppelt wurde, bestimmte alle ernährungsphysiologisch relevanten Mono- und Disaccharide in den oben beschriebenen Produkten bei ausreichender Präzision und vergleichbar zu den Referenzmethoden in einer Messzeit von lediglich 6 min.

Der ASAP-Ansatz kann allerdings nicht nur zur Verringerung der Messzeit eingesetzt werden. Durch die beschleunigte Durchführung können auch höhere Mengen an Datenpunkten bei gleichbleibender Messzeit aufgenommen und somit die Auflösung erhöht werden. Da besonders Signale von Oligosacchariden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten dieser Kohlenhydrate NMR-spektroskopisch schwer aufgelöst werden können, wurde ein auflösungsoptimierter ASAP-Ansatz zur Quantifizierung von Oligosacchariden der Raffinose-Familie entwickelt. Das *low-Cooling Overall Spin Temperature* (COST)-ASAP-Experiment zeichnet sich durch eine erhöhte Auflösung in der indirekten Dimension verglichen zum ASAP-HSQC-Experiment aus und eignete sich aus diesem Grund besonders zur Quantifizierung von Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose in Leguminosen nach ethanolischer Extraktion. Die *lowCost*-ASAP-HSQC-Methode erreichte jedoch eine schlechtere Präzision als konventionelle HSQC-Methoden oder die entsprechend angepasste HPAEC-PAD-Methode. Zudem konnten Analyten geringer Konzentrationen (kleiner 0,5 g/100 g) durch die NMR-spektroskopischen Methoden nicht quantifiziert werden, während die HPAEC-PAD-Methode alle Analyten sowie weitere Kohlenhydrate präzise quantifizierte. Bei der Durchführung der HPAEC-PAD-Methode auftretende Analytverluste wurden vermutlich durch die verwendete ethanolische Extraktion verursacht und können unter Umständen durch Optimierung der Probenaufarbeitung sowie den Einsatz einer internen Standardsubstanz in weiterführenden Studien reduziert werden. Durch die Verwendung einer internen Standardsubstanz könnte zudem die Performance der entsprechenden NMR-spektroskopischen Methoden weiter verbessert werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die entwickelten zeitoptimierten HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden zur Quantifizierung ernährungsphysiologisch relevanter Mono- und Disaccharide geeignet sind. Die optimierten NMR-spektroskopischen Methoden zeichnen sich im Vergleich zu klassischen Methoden durch eine verkürzte Analysendauer aus. Neben der Anwendung zeitoptimierter HSQC-Methoden konnten auch auflösungsoptimierte ASAP-HSQC-Methoden zur Quantifizierung von Oligosacchariden verwendet werden. Die optimierten Methoden können somit in nur wenigen Minuten eine große Anzahl verschiedener Kohlenhydrate quantifizieren und daher auch in vielen Bereichen der Lebensmittelanalytik eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- ACKERMANN S. M., DOLSOPHON K., MONAKHOVA Y. B., KUBALLA T., REUSCH H., THONGPANCHANG T., BUNZEL M. & LACHENMEIER D. W., (2017), Automated multicomponent analysis of soft drinks using 1D ^1H and 2D ^1H - ^1H J-resolved NMR spectroscopy, *Food Analytical Methods*, 10: 827-836.
- ACOSTA P. B. & GROSS K. C., (1995), Hidden sources of galactose in the environment, *European Journal of Pediatrics*, 154: 87-92.
- AKOKA S., BARANTIN L. & TRIERWEILER M., (1999), Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method, *Analytical Chemistry*, 71: 2554-2557.
- ANGYAL S. J., (1969), The composition and conformation of sugars in solution, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 8: 157-166.
- ASU 00.00.143, (2013), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung des Gehaltes an Isomaltulose in Lebensmitteln, HPLC-Verfahren, Stand der Fassung: Januar 2013.
- ASU 01.00.17, (1983), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMGB (ASU), Untersuchung von Lebensmittel, Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts in Milch und Milchprodukten, Enzymatisches Verfahren, Stand der Fassung: Mai 1983.
- ASU 01.00.90, (2014), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (ASU), Untersuchung von Lebensmittel, Bestimmung des Lactosegehaltes in lactosereduzierter Milch und lactosereduzierten Milchprodukten in Gegenwart von Glucose, Enzymatisches Verfahren, Stand der Fassung: Februar 2014.
- ATKINSON F. S., FOSTER-POWELL K. & BRAND-MILLER J. C., (2008), International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008, *Diabetes Care*, 31: 2281-2283.
- BAHL R. K., (1972), An enzymic method for the determination of skimmed milk powder in soup and sauce mixes, *The Analyst*, 97: 213-215.
- BAYLE K., JULIEN M., REMAUD G. S. & AKOKA S., (2015), Suppression of radiation damping for high precision quantitative NMR, *Journal of Magnetic Resonance*, 259: 121-125.
- BECKER E. D., FERRETTI J. A. & GAMBHIR P. N., (1979), Selection of optimum parameters for pulse Fourier transform nuclear magnetic resonance, *Analytical Chemistry*, 51: 1413-1420.
- BELITZ H.-D., GROSCH W. & SCHIEBERLE P., (2008), Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- BELITZ H.-D. & SCHORMÜLLER J., (1965), Analytik der Lebensmittel, Physikalische und Physikalisch-Chemische Untersuchungsmethoden, In HANDBUCH DER LEBENSMITTELCHEMIE, 1. Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- BERNAL J., ARES A. M., PÓL J. & WIEDMER S. K., (2011), Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 1218: 7438-7452.
- BØJSTRUP M., PETERSEN B. O., BEEREN S. R., HINDSGAUL O. & MEIER S., (2013), Fast and accurate quantitation of glucans in complex mixtures by optimized heteronuclear NMR spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 85: 8802-8808.

- BRUMMER Y., KAVIANI M. & TOSH S. M., (2015), Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas, *Food Research International*, 67: 117-125.
- BUBB W. A., (2003), NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity, *Concepts in Magnetic Resonance*, 19A: 1-19.
- BVL, BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, (2020), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, Berlin.
- CAVAZZA A., CORRADINI C., RINALDI M., SALVADEO P., BORROMEI C. & MASSINI R., (2013), Evaluation of pasta thermal treatment by determination of carbohydrates, furosine, and color indices, *Food and Bioprocess Technology*, 6: 2721-2731.
- CHEN Z. W., CHEN J. J., ZHANG W. L., ZHANG T., GUANG C. & MU W. M., (2018), Recent research on the physiological functions, applications, and biotechnological production of D-allose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 4269-4278.
- CHURAKOVA E., PERI K., VIS J. S., SMITH D. W., BEAM J. M., VIJVERBERG M. P., STOR M. C. & WINTER R. T., (2019), Accurate analysis of residual lactose in low-lactose milk: Comparing a variety of analytical techniques, *International Dairy Journal*, 96: 126-131.
- CLARIDGE T. D. W., (2016), High-resolution NMR techniques in organic chemistry, 2. Auflage, Amsterdam, London, Elsevier.
- COFFEY R. G. & REITHEL F. J., (1969), An enzymic determination of lactose, *Analytical Biochemistry*, 32: 229-232.
- CORRADINI C., CAVAZZA A. & BIGNARDI C., (2012), High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012: 1-13.
- COSS-BU J. A., SUNCHAG A. L. & HAYMOND M. W., (2009), Contribution of galactose and fructose to glucose homeostasis, *Metabolism Clinical and Experimental*, 58: 1050-1058.
- CURA A. J. & CARRUTHERS A., (2012), Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis, *Comprehensive Physiology*, 2: 863-914.
- DA CUNHA D. A., VALIM T. C., FILGUEIRAS P. R., VALDEMAR J. & NETO A. C., (2020), Lactose quantification in bovine milk by nuclear magnetic resonance without deuterated solvent (No-D qNMR), *Analytical Methods*, 12: 4892-4898.
- DASHTY M., (2013), A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism, *Clinical Biochemistry*, 46: 1339-1352.
- DIN 32645, NORMENAUSSCHUSS MATERIALPRÜFUNG, (2008), Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, Stand der Fassung: 11.2016.
- DREIER L. & WIDER G., (2006), Concentration measurements by PULCON using X-filtered or 2D NMR spectra, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44: 206-212.
- EBEL A., DREHER W. & LEIBFRITZ D., (2006), Effects of zero-filling and apodization on spectral integrals in discrete Fourier-transform spectroscopy of noisy data, *Journal of Magnetic Resonance*, 182: 330-338.

- ECR, EUROPEAN COMMISSION REPRESENTATION, (2003), Application for the approval of isomaltulose; Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27th January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.
- EFSA, EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS NUTRITION AND ALLERGIES, (2011), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the sugar replacers xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, lactitol, isomalt, erythritol, D-tagatose, isomaltulose, sucralose and polydextrose and maintenance of tooth mineralisation by decreasing tooth demineralisation (ID 463, 464, 563, 618, 647, 1182, 1591, 2907, 2921, 4300), and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 617, 619, 669, 1590, 1762, 2903, 2908, 2920) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.
- EGGLESTON G. & COTE G. L., (2003), Oligosaccharides in food and agriculture, *American Chemical Society*, 849: 1-14.
- ERNST R. R. & ANDERSON W. A., (1966), Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance, *Review of Scientific Instruments*, 37: 93-102.
- FISCHER C. & KLEINSCHMIDT T., (2018), Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: A review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 678-697.
- FOROUTAN A., GUO A. C., VAZQUEZ-FRESNO R., LIPFERT M., ZHANG L., ZHENG J. M., BADRAN H., BUDINSKI Z., MANDAL R., AMETAJ B. N. & WISHART D. S., (2019), Chemical Composition of Commercial Cow's Milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 4897-4914.
- GALANT A. L., KAUFMAN R. C. & WILSON J. D., (2015), Glucose: Detection and analysis, *Food Chemistry*, 188: 149-160.
- GARCÍA-BAÑOS J. L., OLANO A. & CORZO N., (2002), Changes in the carbohydrate fraction during manufacture and storage of enteral formulas, *Journal of Food Science*, 67: 3232-3235.
- GDALA J. & BURACZEWSKA L., (1996), Chemical composition and carbohydrate content of seeds from several lupin species, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 5: 403-416.
- GEBRESELASSIE N., ABRAHAMSEN R. K., BEYENE F., ABAY F. & NARVHUS J. A., (2016), Chemical composition of naturally fermented buttermilk, *International Journal of Dairy Technology*, 69: 200-208.
- GHERNATI H. M., ABDEDDAIM K. & GUERMOUCHE M. H., (1982), Rapid HPLC methods for the separation and quantitation of a monosaccharides, disaccharides and trisaccharides mixture and applications, *Journal of Liquid Chromatography*, 5: 1725-1748.
- GILLE D., WALTHER B., BADERTSCHER R., BOSSHART A., BRÜGGER C., BRÜHLHART M., GAUCH R., NOTH P., VERGÈRES G. & EGGER L., (2018), Detection of lactose in products with low lactose content, *International Dairy Journal*, 83: 17-19.
- GIRAUDEAU P., (2014), Quantitative 2D liquid- state NMR, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52: 259-272.
- GORIN N., (1970), Enzymatic analysis of glucose, fructose and sucrose, *Annual Report of the Sprenger Institute*: 86-89.
- GOTTLIEB H. E., KOTLYAR V. & NUDELMAN A., (1997), NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities, *Journal of Organic Chemistry*, 62: 7512-7515.

- GROSS K. C. & ACOSTA P. B., (1991), Fruits and vegetables are a source of galactose - implications in planning the diets of patients with galactosemia, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14: 253-258.
- GROßKOPF A. & SIMM A., (2020), Carbohydrates in nutrition: friend or foe?, *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 53: 290-294.
- GUDMAND-HØYER E. & SKOVBJERG H., (1996), Disaccharide digestion and maldigestion, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31: 111-121.
- GÜEMES M., RAHMAN S. A. & HUSSAIN K., (2016), What is a normal blood glucose?, *Archives of Disease in Childhood*, 101: 569-574.
- HA V., SIEVENPIPER J. L., DE SOUZA R. J., JAYALATH V. H., MIRRAHIMI A., AGARWAL A., CHIAVAROLI L., MEJIA S. B., SACKS F. M., DI BUONO M., BERNSTEIN A. M., LEITER L. A., KRIS-ETHERTON P. M., VUKSAN V., BAZINET R. P., JOSSE R. G., BEYENE J., KENDALL C. W. C. & JENKINS D. J. A., (2014), Effect of dietary pulse intake on established therapeutic lipid targets for cardiovascular risk reduction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Canadian Medical Association Journal*, 186: 252-262.
- HEIKKINEN S., TOIKKA M. M., KARHUNEN P. T. & KILPELAINEN I. A., (2003), Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via suppression of J-dependence of polarization transfer in NMR spectroscopy: Application to wood lignin, *Journal of the American Chemical Society*, 125: 4362-4367.
- HOLUB I., GOSTNER A., THEIS S., NOSEK L., KUDLICH T., MELCHER R. & SCHEPPACH W., (2010), Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose), *The British journal of nutrition*, 103: 1730-1737.
- HU F., FURIHATA K., KATO Y. & TANOKURA M., (2007), Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4307-4311.
- HU K., WESTLER W. M. & MARKLEY J. L., (2011), Simultaneous quantification and identification of individual chemicals in metabolite mixtures by two-dimensional extrapolated time-zero (1)H-(13)C HSQC (HSQC(0)), *Journal of the American Chemical Society*, 133: 1662-1665.
- HYBERTS S. G., ARTHANARI H. & WAGNER G., (2012), Applications of non-uniform sampling and processing, *Topics in current chemistry*, 316: 125-148.
- HYBERTS S. G., ROBSON S. A. & WAGNER G., (2013), Exploring signal-to-noise ratio and sensitivity in non-uniformly sampled multi-dimensional NMR spectra, *Journal of Biomolecular NMR*, 55: 167-178.
- IUPAC, (1995), Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995), *Pure and Applied Chemistry*, 67: 1307-1375.
- JAYALATH V. H., SOUZA R. J., SIEVENPIPER J. L., HA V., CHIAVAROLI L., MIRRAHIMI A., DI BUONO M., BERNSTEIN A. M., LEITER L. A., KRIS-ETHERTON P. M., VUKSAN V., BEYENE J., KENDALL C. W. & JENKINS D. J., (2014), Effect of dietary pulses on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials, *American Journal of Hypertension*, 27: 56-64.
- JÉZÉQUEL T., DEBORDE C., MAUCOURT M., ZHENDRE V., MOING A. & GIRAUDEAU P., (2015), Absolute quantification of metabolites in tomato fruit extracts by fast 2D NMR, *Metabolomics*, 11: 1231-1242.
- JIANG N., DILLON F. M., SILVA A., GOMEZ-CANO L. & GROTEWOLD E., (2021), Rhamnose in plants - from biosynthesis to diverse functions, *Plant Science*, 302: 1-11.

- KARPLUS M., (1963), Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *Journal of the American Chemical Society*, 85: 2870-2871.
- KHAN T. A., TAYYIBA M., AGARWAL A., MEJIA S. B., DE SOUZA R. J., WOLEVER T. M. S., LEITER L. A., KENDALL C. W. C., JENKINS D. J. A. & SIEVENPIPER J. L., (2019), Relation of Total Sugars, Sucrose, Fructose, and Added Sugars With the Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Prospective Cohort Studies, *Mayo Clinic Proceedings*, 94: 2399-2414.
- KLEYN D. H., (1985), Determination of lactose by an enzymatic method, *Journal of Dairy Science*, 68: 2791-2798.
- KOMMISSION, (2005), Entscheidung der Kommission vom 25. Juli 2005 zur Genehmigung des Inverkehrbringens von Isomaltulose als neuartiges Lebensmittel oder neuartige Lebensmittelzutat gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates, Stand der Fassung; 25.07.2005.
- KOTHA R. R., FINLEY J. W. & LUTHRIA D. L., (2020), Determination of soluble mono, di, and oligosaccharide content in 23 dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68: 6412-6419.
- KUPČE E. & FREEMAN R., (2007), Fast multidimensional NMR by polarization sharing, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45: 2-4.
- LEE Y. C., (1990), High-performance anion exchange chromatography for carbohydrate analysis, *Analytical Biochemistry*, 189: 151-162.
- LEWIS I. A., SCHOMMER S. C., HODIS B., ROBB K. A., TONELLI M., WESTLER W. M., SUISSMAN M. R. & MARKLEY J. L., (2007), Fast and accurate method for determining molar concentrations of metabolites in complex solutions from two-dimensional ^1H - ^{13}C NMR spectra, *Analytical Chemistry*, 79: 9385-9390.
- LI X. & HU K., (2017), Quantitative NMR Studies of Multiple Compound Mixtures, In ANNUAL REPORTS ON NMR SPECTROSCOPY, 90, Elsevier Academic Press Inc: 85-143.
- LIN H., LI S. X., XU C. X., PANG M. L. & WANG S. L., (2018), Simultaneous determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharides in galactooligosaccharides raw materials by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Food Chemistry*, 263: 29-36.
- LINA B. A. R., JONKER D. & KOZIANOWSKI G., (2002), Isomaltulose (Palatinose®): A review of biological and toxicological studies, *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1375-1381.
- LIVESEY G., (2012), Glycaemic responses and toleration, In SWEETENERS AND SUGAR ALTERNATIVES IN FOOD TECHNOLOGY, John Wiley & Sons, Ltd: 1-26.
- MANGAN D., MCCLEARY B. V., CULLETON H., CORNAGGIA C., IVORY R., MCKIE V. A., DELANEY E. & KARGELIS T., (2019), A novel enzymatic method for the measurement of lactose in lactose-free products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 947-956.
- MARCONI E., MESSIA M. C., AMINE A., MOSCONE D., VERNAZZA F., STOCCHI F. & PALLESCHI G., (2004), Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay, *Food Chemistry*, 84: 447-450.
- MARESCH C. C., PETRY S. F., THEIS S., BOSY-WESTPHAL A. & LINN T., (2017), Low Glycemic Index Prototype Isomaltulose-Update of Clinical Trials, *Nutrients*, 9: 1-12.

- MARMIT S. P., (2020), Charakterisierung der Ballaststoffzusammensetzung verschiedener Lupinenarten, Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Keller J. & Bunzel M.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA C., FRÍAS J. & VIDAL-VALVERDE C., (2005), Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars, *Food Chemistry*, 91: 645-649.
- MATISSEK R., FISCHER M. & STEINER G., (2018), *Lebensmittelanalytik*, 6. Auflage, Berlin, Springer Spektrum.
- MATSUYAMA J., SATO T., HOSHINO E., NODA T. & TAKAHASHI N., (2003), Fermentation of five sucrose isomers by human dental plaque bacteria, *Caries Research*, 37: 410-415.
- MAUVE C., KHLIFI S., GILARD F., MOUILLE G. & FARJON J., (2016), Sensitive, highly resolved, and quantitative ^1H - ^{13}C NMR data in one go for tracking metabolites in vegetal extracts, *Chemical Communications*, 52: 6142-6145.
- MCKAY R. T., (2011), How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution, *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 38: 197-220.
- MERDIAN V., (2019), Bestimmung von Mono- und Disacchariden in Milch und Milchprodukten - Methodenvergleich und -validierung, Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie* Fels L. & Bunzel M.
- MILCHERZV, (1970), Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung - MilchErzV), Stand der Fassung: 5.7.2017.
- MINAMI T., FUJIWARA T., OOSHIMA T., NAKAJIMA Y. & HAMADA S., (1990), Interactions of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glycosyltransferases from *mutans streptococci*, *Oral Microbiology and Immunology*, 5: 189-194.
- MONAKHOVA Y. B. & DIEHL B. W. K., (2019), Monitoring daily routine performance in quantitative NMR (qNMR) spectroscopy: Is the system suitability test necessary?, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57: 110-117.
- MONAKHOVA Y. B., KUBALLA T., LEITZ J., ANDLAUER C. & LACHENMEIER D. W., (2012), NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains, *Dairy Science & Technology*, 92: 109-120.
- MONTI L., NEGRI S., MEUCCI A., STROPPA A., GALLI A. & CONTARINI G., (2017), Lactose, galactose and glucose determination in naturally "lactose free" hard cheese: HPAEC-PAD method validation, *Food Chemistry*, 220: 18-24.
- MRI, MAX RUBNER INSTITUT, (2016), Reformulierung von verarbeiteten Lebensmitteln - Bewertungen und Empfehlungen zur Reduktion des Zuckergehalts, Karlsruhe.
- MURATA M., (2020), Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction, *Glycoconjugate Journal*: 1-10.
- MYHARA R. M., NILSSON K., SKURA B. J., BOWMER E. J. & CRUICKSHANK P. K., (1988), Gas-production from melibiose, raffinose and white bean extracts by bacteria of human fecal origin, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21: 245-250.

- NORÉN O. & SJÖSTRÖM H., (2001), Structure, biosynthesis and regulation of lactase-phlorizin hydrolase, *Näringsforskning*, 45: 156-160.
- OHMENHÄUSER M., MONAKHOVA Y. B., KUBALLA T. & LACHENMEIER D. W., (2013), Qualitative and quantitative control of honeys using NMR spectroscopy and chemometrics, *ISRN Analytical Chemistry*, 2013: 1-9.
- OOSHIMA T., IZUMITANI A., SOBUE S., OKAHASHI N. & HAMADA S., (1983), Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats, *Infection and Immunity*, 39: 43-49.
- PALMER M. R., SUITER C. L., HENRY G. E., ROVNYAK J., HOCH J. C., POLENOVA T. & ROVNYAK D., (2015), Sensitivity of Nonuniform Sampling NMR, *Journal of Physical Chemistry B*, 119: 6502-6515.
- PERRAR I., SCHMITTING S., DELLA CORTE K. W., BUYKEN A. E. & ALEXU U., (2020), Age and time trends in sugar intake among children and adolescents: results from the DONALD study, *European Journal of Nutrition*, 59: 1043-1054.
- PETERBAUER T. & RICHTER A., (2001), Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds, *Seed Science Research*, 11: 185-197.
- PETERSEN B. O., HINDSGAUL O. & MEIER S., (2014), Profiling of carbohydrate mixtures at unprecedented resolution using high-precision ^1H - ^{13}C chemical shift measurements and a reference library, *The Analyst*, 139: 401-406.
- PETERSEN B. O., VINOGRADOV E., KAY W., WÜRTZ P., NYBERG N. T., DUUS J. Ø. & SØRENSEN O. W., (2006), H2BC: a new technique for NMR analysis of complex carbohydrates, *Carbohydrate Research*, 341: 550-556.
- PLAZA-DIAZ J., AUGUSTIN O. M. & HERNANDEZ A. G., (2013), Food as sources of mono and disaccharides: biochemical and metabolic aspects, *Nutricion Hospitalaria*, 28: 5-16.
- POPPE J., VAN BAARLE L., MATTEOLI G. & VERBEKE K., (2020), How microbial food fermentation supports a tolerant gut, *Molecular Nutrition & Food Research*: 1-12.
- QI X. & TESTER R. F., (2019), Fructose, galactose and glucose – In health and disease, *Clinical Nutrition ESPEN*, 33: 18-28.
- QI X. & TESTER R. F., (2020), Lactose, maltose, and sucrose in health and disease, *Molecular Nutrition & Food Research*, 64: 1-9.
- REYNOLDS W. F., YU M., ENRIQUEZ R. G. & LEON I., (1997), Investigation of the advantages and limitations of forward linear prediction for processing 2D data sets, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35: 505-519.
- ROBSON S., ARTHANARI H., HYBERTS S. G. & WAGNER G., (2019), Nonuniform sampling for NMR spectroscopy, In *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 614, Academic Press: 263-291.
- ROUGER L., GOUILLEUX B., POURCHET-GELLEZ M., DUMEZ J. N. & GIRAUDEAU P., (2016), Ultrafast double-quantum NMR spectroscopy with optimized sensitivity for the analysis of mixtures, *The Analyst*, 141: 1686-1692.
- RUF F., (2020), Methodenentwicklung und Methodenvergleich zur Quantifizierung von Isomaltulose in verschiedenen Lebensmittelmatrices, Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Fels L. & Bunzel M.

- RUIZ-MATUTE A. I., HERNANDEZ-HERNANDEZ O., RODRIGUEZ-SANCHEZ S., SANZ M. L. & MARTINEZ-CASTRO I., (2011), Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses, *Journal of Chromatography B*, 879: 1226-1240.
- SANDERS P., ERNSTE-NOTA V., VISSER K., VAN SOEST J. & BRUNT K., (2017), The determination of sugars in dairy products: development of a new standard method for the International Dairy Federation and the Internal Organization for Standardization, *Journal of AOAC International*, 100: 1577-1581.
- SASSAKI G. L., GUERRINI M., SERRATO R. V., SANTANA FILHO A. P., CARLOTTO J., SIMAS-TOSIN F., CIPRIANI T. R., IACOMINI M., TORRI G. & GORIN P. A., (2014), Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR, *Carbohydrate Polymers*, 104: 34-41.
- SCANO P., CUSANO E., CABONI P. & CONSONNI R., (2019), NMR metabolite profiles of dairy: A review, *International Dairy Journal*, 90: 56-67.
- SCHLIPPENBACH T. V., OEFNER P. J. & GRONWALD W., (2018), Systematic Evaluation of Non-Uniform Sampling Parameters in the Targeted Analysis of Urine Metabolites by (1)H,(1)H 2D NMR Spectroscopy, *Scientific reports*, 8: 4249-4249.
- SCHMIDT F. H., (1961), Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, *Klinische Wochenschrift*, 39: 1244-1247.
- SCHULZE-SÜNNINGHAUSEN D., (2016), Entwicklung und Optimierung schneller mehrdimensionaler NMR-Experimente, Dissertation: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie*, Luy B.
- SCHULZE-SÜNNINGHAUSEN D., BECKER J., KOOS M. R. M. & LUY B., (2017), Improvements, extensions, and practical aspects of rapid ASAP-HSQC and ALSOFAST-HSQC pulse sequences for studying small molecules at natural abundance, *Journal of Magnetic Resonance*, 281: 151-161.
- SCHULZE-SÜNNINGHAUSEN D., BECKER J. & LUY B., (2014), Rapid heteronuclear single quantum correlation NMR spectra at natural abundance, *Journal of the American Chemical Society*, 136: 1242-1245.
- SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING R., FISCHER L. & HINRICHS J., (2010), Production and physiological action of the disaccharide lactulose, *International Dairy Journal*, 20: 731-741.
- SHAW D. H. & MOSS G. W., (1969), Quantitative estimation of neutral sugars by gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 41: 350-357.
- SHIMAYA S., SHIMOYAMA T., FUKUDA S., MATSUZAKA M., TAKAHASHI I., UMEDA T., CHINDA D., SAITO D., SAKAMOTO J., NAGURA T., DANJO K. & NAKAJI S., (2009), The recovery rate at the human terminal ileum of an orally administered non-digestive oligosaccharide (raffinose), *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60: 344-351.
- SITANGGANG A. B., DREWS A. & KRAUME M., (2016), Recent advances on prebiotic lactulose production, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32: 10.
- SOUCI S. W., FACHMANN W. & KRAUT H., (2011), *Der kleine Souci/Fachmann/Kraut - Lebensmitteltabelle für die Praxis.*, 5. Auflage, Stuttgart, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*.
- TAPPY L. & LÊ K. A., (2010), Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity, *Physiological Reviews*, 90: 23-46.





- TENORI L., SANTUCCI C., MEONI G., MORROCCHI V., MATTEUCCI G. & LUCHINAT C., (2018), NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms, *Food Research International*, 113: 131-139.
- TIER-LMHV, (2007), Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung - Tier-LMHV), Stand der Fassung: 11.1.2021.
- TOUGER-DECKER R. & VAN LOVEREN C., (2003), Sugars and dental caries, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 881-892.
- VAN DAM R. M. & SEIDELL J. C., (2007), Carbohydrate intake and obesity, *European Journal of Clinical Nutrition*, 61: 75-99.
- VAN LOO J., COUSSEMENT P., DELEENHEER L., HOEBREGS H. & SMITS G., (1995), On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 525-552.
- VAN SCHEPPINGEN W. B., VAN HILTEN P. H., VIJVERBERG M. P. & DUCHATEAU A. L. L., (2017), Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD, *Journal of Chromatography B*, 1060: 395-399.
- VENNARD T. R., RUOSCH A. J., WEJROWSKI S. M. & ELLINGSON D. J., (2020), Sugar profile method by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection in food, dietary supplements, pet food, and animal feeds: first action 2018.16, *Journal of AOAC International*, 103: 89-102.
- VO (EG) 1662/2006, (2006), Verordnung (EG) Nr. 1662/2006 der Kommission vom 6. November 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, Stand der Fassung: 25.11.2006.
- VO (EG) 1924/2006, (2006), Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel, Stand der Fassung: 13.12.2014.
- VO (EU) 432/2012, (2012), Verordnung (EU) Nr. 432/2012 der Kommission vom 16. Mai 2012 zur Festlegung einer Liste zulässiger anderer gesundheitsbezogener Angaben über Lebensmittel als Angaben über die Reduzierung eines Krankheitsrisikos sowie die Entwicklung und die Gesundheit von Kindern, Stand der Fassung: 22.08.2017.
- VO (EU) 1169/2011, (2011), Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission, Stand der Fassung: 01.01.2018.
- VO (EU) 1308/2013, (2013), Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 922/72, (EWG) Nr. 234/79, (EG) Nr. 1037/2001 und (EG) Nr. 1234/2007, Stand der Fassung: 29.12.2020.

- VO (EU) 2016/127, **(2015)**, Delegierte Verordnung (EU) 2016/127 der Kommission vom 25. September 2015 zur Ergänzung der Verordnung (EU) Nr. 609/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf die besonderen Zusammensetzungs- und Informationsanforderungen für Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung und hinsichtlich der Informationen, die bezüglich der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern bereitzustellen sind, Stand der Fassung: 12.6.2019.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANISATION, **(2015)**, Guideline: Sugars intake for adults and children, Geneva.
- WOLEVER T. M. S., **(2003)**, Carbohydrate and the regulation of blood glucose and metabolism, *Nutrition Reviews*, 61: 40-48.
- XIAOLI X., LIYI Y., SHUANG H., WEI L., YI S., HAO M., JUSONG Z. & XIAOXIONG Z., **(2008)**, Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 111: 215-219.
- ZERBE O. & JURTS., **(2014)**, Applied NMR spectroscopy for chemists and life scientists, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- ZHANG B., POWERS R. & O'DAY E. M., **(2020)**, Evaluation of Non-Uniform Sampling 2D ¹H-¹³C HSQC Spectra for Semi-Quantitative Metabolomics, *Metabolites*, 10: 1-13.

7 Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Reinheit	GHS- Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	VWR, ≥ 99,8 %	02, 07	225, 319, 336	210, 243, 280, 304+340, 305+351+338, 312, 403 +235
D-Allose	Carbosynth, > 99,0 %	-	-	-
L-(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %	-	-	-
Deuteriumoxid	Deutero, 99,9 %	-	-	-
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %	-	-	-
Ethanol	VWR, 99,5 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
D-(-)-Fructose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %	-	-	-
D-(+)-Galactose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %	-	-	-
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %	-	-	-
Isomaltulose Hydrat	Acros Organics, 98,0 %	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, ≥ 99,0 %	-	-	-
Kaliumhexacanoferat(II)- Trihydrat	Carl Roth, ≥ 99,0 %	-	412	220, 273
D-Lactose Monohydrat	Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %	-	-	-
D-Maltose Monohydrat	Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %	-	-	-
Maltulose Monohydrat	Carbosynth, ≥ 98,0 %	-	-	-
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, > 97,0 %	-	-	-
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310

D-Raffinose-Pentahydrat	Alfa Aesar, 99,0 %	-	-	-
Saccharose	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-
Stachyose	Carbosynth, 98,0 %	-	-	-
Verbascose	Megazyme, > 95 %	-	-	-
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, ≥ 97,0 %	02, 07, 09	302, 318, 410	270, 273, 280, 305+351+338, 308+310
GHS02	GHS05	GHS07	GHS09	
				
Entzündlich	Ätzend	Gesundheitsschädlich	Umweltgefährlich	

7.2 Reagenzien und Enzyme

I. Carrez-Reagenzien

- Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat: 7,5 g | 50 mL
- Zinksulfat-Heptahydrat: 14,8 g | 50 mL

II. Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)

- Trocknung der Salze (110 °C) bis zur Gewichtskonstanz
- Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung: 1,4 g | 0,1 L Reinstwasser
- Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung: 4,4 g | 0,25 L Reinstwasser
- Ein Aliquot der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung mit der 1,5-fachen Menge an Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung mischen und den pH-Wert auf 7,0 einstellen.

III. Enzymkits

- D-Glucose/ D-Fructose: R-Biopharm AG, Roche Diagnostics, Art. 10139106035
- Saccharose/ D-Glucose/ D-Fructose: R-Biopharm AG, Roche Diagnostics, Art. 10716260035
- Maltose/ Saccharose/ D-Glucose: R-Biopharm AG, Roche Diagnostics, Art. 1113950035
- Lactose/ D-Galactose: R-Biopharm AG, Roche Diagnostics, Art. 10176303035
- Lactose/ D-Glucose: R-Biopharm AG, Roche Diagnostics, Art. 10986119035

7.3 Instrumente

I. HPAEC-PAD-1

Hersteller:	Thermo Scientific
Pumpe:	Dionex ICS-5000-DP
Autosampler:	Dionex AS-AP
Detektoren (PAD, CD):	CS-5000 DC, Electrochemical & Conductivity Detector

II. HPAEC-PAD-2

Hersteller:	Thermo Scientific
Pumpe:	Dionex ICS-6000-SP
Autosampler:	Dionex AS-AP
Detektoren (PAD):	CS-6000 DC, 2 x Electrochemical Detector

III. NMR-Spektrometer 500 MHz

Hersteller:	Bruker Corporation
Gerätetyp:	Ascend 500
Feldstärke:	500 MHz
Probenkopf:	<i>Prodigy</i> , Kryoprobenkopf

IV. NMR-Spektrometer 400 MHz

Hersteller:	Bruker Corporation
Gerätetyp:	Ascend 400
Feldstärke:	400 MHz
Probenkopf:	Breitband-Inverse (BBI)

V. Photometer

Hersteller:	Jasco
Bezeichnung:	V-550, UV/Vis-Spektrophotometer

8 Arbeitsvorschriften

Alle wässrigen Lösungen wurden unter der Verwendung von Reinstwasser hergestellt.

8.1 Proben zur Methodenoptimierung und Methodenvalidierung

Zur Optimierung und Validierung der zeitoptimierten Methoden wurde wässrige Lösungen der Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose und Maltose verwendet. Der Arbeitsbereich der NMR-spektroskopischen Methoden wurde auf 1,0 g/L bis 10,0 g/L festgelegt, sodass ein Mischstandard aller Analyten der Konzentration 40 g/L je Analyt entsprechend verdünnt wurde. Den NMR-Proben wurde Allose in der Konzentration 5,0 g/L zugesetzt. Folgende Konzentrationsverhältnisse (Analyt/Allose) wurden gemessen: 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0. Zudem wurden wässrige Lösungen der Analyten Carrez-geklärt (siehe 8.2) und im gleichen Konzentrationsbereich (Konzentrationsverhältnisse von 0,2 bis 2,0) gemessen. Allose wurde dabei nach der Carrez-Klärung zugesetzt. Die Vorbereitung zur NMR-spektroskopischen Messung und die angewandten Messparameter sind in 8.4 einzusehen. Die Proben wurden für die Messungen mithilfe der HPAEC-PAD-Methode (siehe 8.3) 1:1000 verdünnt.

Zur Optimierung und Validierung der auflösungsoptimierten Proben wurden Lösungen der Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose und Stachyose der Konzentration 100 g/L sowie Verbascose der Konzentration 30 g/L entsprechend verdünnt, dass die NMR-spektroskopischen Methoden im Arbeitsbereich zwischen 1,0 g/L und 7,5 g/L durchgeführt wurden. Dabei wurde fünf Kalibrierlösungen der Konzentrationen 1,1 g/L, 3,0 g/L, 4,5 g/L, 6,0 g/L und 7,5 g/L je Analyten hergestellt. Die Vorbereitung zur NMR-spektroskopischen Messung und die angewandten Messparameter sind in 8.4 einzusehen. Die Proben wurden für die Messungen mithilfe der HPAEC-PAD-Methode (siehe 8.3) 1:1000 verdünnt.

8.2 Probenaufarbeitung

I. Carrez-Klärung

- Aliquot der Probe mit der entsprechenden Menge an Carrez-Reagenzien versetzen.
- pH-Wert auf 7,0 mit Natronlauge einstellen.
- Zentrifugieren (10000 U/min, 10 min)
- Überstand abnehmen und Rückstand mit Wasser waschen.
- Erneut zentrifugieren, Überstände vereinen und auf gewünschtes Volumen auffüllen.
- Vor der Messung Aliquot durch einen Spritzenfilter (0,45 µm, Teflon) filtrieren.

Die Carrez-Klärung der Standardlösungen (40 g/L, Analytgemisch 1) wurde in einem Mikroansatz durchgeführt. Dafür wurden 0,5 mL Standardlösung mit je 35 µL der beiden Carrez-Reagenzien

versetzt, quantitativ der pH-Wert auf 7,0 eingestellt (0,25 M Natronlauge) und mit einer definierten Menge an Wasser versetzt. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot der Lösung 1:2 verdünnt und daraus die entsprechenden Verdünnungen der Kalibrierung hergestellt.

Carrez-Behandlung der Proben aus der Produktgruppe Milch und Milchprodukte

Tabelle 8-1: Details zur Carrez-Behandlung der Proben aus der Produktgruppe Milch und Milchprodukte. Die genaue Durchführung der Carrez-Behandlung ist auf Seite 147 detailliert beschrieben.

Probenbezeichnung	Probenaliquot [mL]	Zugabe je Carrez-Reagenz [mL]	Endvolumen [mL]
Vollmilch	7,5	1	50
Lactosefreie Milch	15	2	100
Kakaogetränk auf Milchbasis	15	4	50
Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack	15	4	50
Lactosefreies Kakaogetränk auf Milchbasis	25	4	50
Fruchtbuttermilch Mango	12	2	100

Die Aufstockungsversuche der Proben Vollmilch, lactosefreie Milch, Kakaogetränk auf Milchbasis, Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack und lactosefreies Kakaogetränk auf Milchbasis wurden mit dem halben Probenaliquot und einem Zusatz der entsprechenden Menge an Analyt in gelöster Form durchgeführt, sodass die Analytkonzentration wieder dem zuvor bestimmten Gehalt entspricht. Zusätzlich wurden alle nicht in der Matrix enthaltenen Analyten so zugesetzt, dass sie in der Mitte des Arbeitsbereichs der NMR-Methoden (5,0 g/L) liegen. Die Aufstockungsversuche der Probe Fruchtbuttermilch Mango wurden nach Carrez-Klärung auf 50 mL aufgefüllt.

Einfluss der Carrez-Klärung auf die Quantifizierung von Analyten:

- Vergleichsproben ohne Carrez-Klärung: Lösungen der Analyten (Glucose, Fructose, Galactose, Allose, Saccharose, Lactose und Maltose) der Konzentration je Analyten von 6,5 g/L bis 7,0 g/L wurden mit den entsprechenden Methoden analysiert.
- Proben mit Carrez-Klärung: 5 mL der Lösungen der Analyten (s.o.) der Konzentration je Analyten von 40 g/L wurden mit je 2 mL der Carrez-Reagenzien versetzt und entsprechend der Vorschrift zur Carrez-Klärung behandelt (Endvolumen: 25 mL).
- Weitere Verdünnungen der Carrez-Reagenzien:
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat: 7,5 g | 50 mL || 12,5 mL | 25 mL
Zinksulfat-Heptahydrat: 14,8 g | 50 mL || 5 mL | 50 mL

Die erste Verdünnung wird als Lösung a und die zweite als Lösung b bezeichnet.

- Carrez-Klärung I: 5 mL der Lösung (40 g/L je Analyten) wurden mit 0,5 mL Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat-Lösung b und 2,5 mL Zinksulfat-Heptahydrat-Lösung b versetzt und entsprechend der Vorschrift zur Carrez-Klärung behandelt (Endvolumen 25 mL).
- Carrez-Klärung II: 5 mL der Lösung (40 g/L je Analyten) wurden mit 1,0 mL Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat-Lösung b und 0,5 mL Zinksulfat-Heptahydrat-Lösung a versetzt und entsprechend der Vorschrift zur Carrez-Klärung behandelt (Endvolumen 25 mL).
- Carrez-Klärung III: 5 mL der Lösung (40 g/L je Analyten) wurden mit 2 mL Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat-Lösung b und 1,0 mL Zinksulfat-Heptahydrat-Lösung b versetzt und entsprechend der Vorschrift zur Carrez-Klärung behandelt (Endvolumen 25 mL).

Die Proben der Ethanol-Hexan-Behandlung wurden im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian aufgearbeitet (Merdian, 2019).

II. **Behandlung mit Kaliumphosphatpuffer am Beispiel „Multicarbogel“**

- 4,0 g der Probe wurden mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer auf 10 mL aufgefüllt.
- Die Aufstockungsversuche wurden mit 2,0 g Probe durchgeführt und die Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Lactose, Maltose und Isomaltulose zugesetzt (5 mL einer 20 g/L konzentrierten Lösung aller Analyten). Die Aufstockungsproben wurden ebenfalls mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer auf 10 mL aufgefüllt.

III. **Ethanol-Extraktion der Proben blaue Lupinensamen, rote Linsen und Kidneybohnen**

- Jeweils 0,5 g blaue Lupinensamen, 1,5 g rote Linsen und 2,5 g Kidneybohnen wurden mit 5 mL Ethanol (50 %) versetzt.
- Die Extraktion wurde bei 50 °C für 30 min durchgeführt.
- Zentrifugieren (5000 U/min, 5 min) und den Überstand abnehmen.
- Die Ethanolbehandlung zweifach wiederholen und die Überstände vereinigen.
- Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Überstand in 2 mL Deuteriumoxid aufgenommen.
- Die Aufstockungsversuche wurden mit der halben Einwaage der Proben durchgeführt. Zu den Proben wurden wässrige Lösungen der Analyten Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Raffinose, Stachyose und Verbascose hinzugefügt, sodass die Konzentrationen der doppelten Einwaage entsprechen. Die Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

8.3 Referenz- und Vergleichsmethoden

Alle GC-FID-Messungen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf durchgeführt (Ruf, 2020).

I. Enzymatische Methoden

Alle Proben wurden zunächst mithilfe der Carrez-Klärung (siehe 8.2) behandelt und anschließend anhand der Herstellerangaben bearbeitet.

II. HPAEC-PAD-Methoden

- 450 µL aller Carrez-geklärten Proben wurden mit 50 µL einer Alloselösung (50 g/L) versetzt und nochmals 1:1000 verdünnt.
- Von der Probe „Multicarbogel“ wurden zwei Verdünnungen erstellt (1:800 und 1:3200). Anschließend wurden 900 µL Probenaliquot mit 100 µL einer Arabinoselösung (75 mg/L) versetzt.
- Alle Carrez-geklärten Proben sowie die Probe „Multicarbogel“ wurden an den Säulen CarboPac PA20 zur Bestimmung von Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose sowie an der Säule CarboPac PA200 zur Bestimmung von Lactose, Maltose und Isomaltulose analysiert.
- Zur Bestimmung der RFO wurden die Proben nach Ethanolextraktion 1:50 sowie 1:1000 verdünnt und an der CarboPac PA20-Säule zur Bestimmung von Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose sowie an der CarboPac PA200 zur Bestimmung von Raffinose, Stachyose und Verbascose analysiert.

HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung von Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose

Säule:	Carbo Pac PA20 (Partikelgröße: 6 µm, 150 mm x 3,0 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min (Gradienten siehe Tabelle 8-2)
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	Gepulst amperometrisch (PAD), an einer AgCl-Elektrode
Kalibrierung:	Wässrige oder Carrez-geklärte Lösungen der Analyten Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose (1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 7,5 mg/L, 10,0 mg/L) mit der internen Standardsubstanz Allose (5,0 mg/L) für Carrez-geklärte Proben. Zudem wurden die Analyten der Probe „Multicarbogel“ im Konzentrationsbereich 1,0 mg/L bis 15,0 mg/L unter Verwendung der internen Standardsubstanz Arabinose (7,5 mg/L) analysiert. Bei der Analyse der Leguminosen wurde ohne interne Standardsubstanz gearbeitet. Die Auswertung erfolgte bei Verwendung einer internen Standardsubstanz durch Verhältnisbildung und in allen Fällen über eine quadratische Anpassung.

Tabelle 8-2: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) zur Analyse von Glucose, Fructose, Galactose und Saccharose. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge mit 0,2 M Natriumacetatlösung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0,0	100,0	0,0
-9,9	96,5	3,5	0,0
0,0	96,5	3,5	0,0
0,5	98,0	2,0	0,0
24,0	98,0	2,0	0,0
28,0	60,0	40,0	0,0
30,0	60,0	40,0	0,0
37,0	0,0	100,0	0,0
40,0	0,0	100,0	0,0
42,0	0,0	0,0	100,0
Ende der Aufnahme bei 53,0 min			

HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung von Lactose, Maltose und Isomaltulose

Säule:	Carbo Pac PA200 (Partikelgröße: 6 µm, 250 mm x 3,0 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min (Gradienten siehe Tabelle 8-3)
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	Gepulst amperometrisch (PAD), an einer AgCl-Elektrode
Kalibrierung:	Wässrige oder Carrez-geklärte Lösungen der Disaccharide Lactose und Maltose (1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 7,5 mg/L, 10,0 mg/L) mit der internen Standardsubstanz Allose (5,0 mg/L) für Carrez-geklärte Proben. Zudem wurde Isomaltulose im Konzentrationsbereich 1,0 mg/L bis 15,0 mg/L unter Verwendung der internen Standardsubstanz Arabinose (7,5 mg/L) für die Probe „Multicarbogel“ analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz mit quadratischer Anpassung.

Tabelle 8-3: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) zur Analyse von Lactose, Maltose und Isomaltulose. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge mit 0,5 M Natriumacetatlösung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-10,0	0,0	100,0	0,0
-4,1	90,0	10,0	0,0
0,1	90,0	10,0	0,0
1,5	97,0	3,0	0,0
8,0	97,0	3,0	0,0
8,1	99,0	1,0	0,0
22,0	99,0	1,0	0,0
32,0	0,0	100,0	0,0
36,0	0,0	100,0	0,0
36,1	0,0	30,0	70,0
40,0	0,0	30,0	70,0
40,1	0,0	0,0	100,0
Ende der Aufnahme bei 50,1 min			

HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung von Raffinose, Stachyose und Verbascose

Säule:	Carbo Pac PA200 (Partikelgröße: 6 µm, 250 mm x 3,0 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min (Gradienten siehe Tabelle 8-4)
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	Gepulst amperometrisch (PAD), an einer AgCl-Elektrode
Kalibrierung:	Wässrige Lösungen der Analyten Raffinose, Stachyose und Verbascose im Konzentrationsbereich 1,0 mg/L bis 7,5 mg/L. Die Auswertung erfolgte über eine quadratische Anpassung.

Tabelle 8-4: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) zur Analyse von Raffinose, Stachyose und Verbascose. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge mit 0,5 M Natriumacetatlösung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0,0	100,0	0,0
-9,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
1,5	97,0	3,0	0,0
24,0	97,0	3,0	0,0
28,0	60,0	40,0	0,0
30,0	60,0	40,0	0,0
37,0	0,0	100,0	0,0
40,0	0,0	100,0	0,0
42,0	0,0	60,0	40,0
Ende der Aufnahme bei 47,0 min			

8.4 NMR-spektroskopische Methoden

I. Probenvorbereitung

- 500 µL aller wässriger Proben (Standards zur Optimierung und Validierung der zeitoptimierten Methoden, Milch und Milchprodukte, „Multicarbogel“) wurden mit 10 % Deuteriumoxid sowie 0,5 µL Aceton versetzt und in NMR-Röhrchen zur Messung überführt.
- Standards zur Bestimmung der Relaxationszeiten, zur Optimierung der auflösungsoptimierten Methoden sowie die Proben der untersuchten Leguminosen wurden in Deuteriumoxid gelöst. 500 µL der Proben wurden mit 0,5 µL Aceton versetzt und in NMR-Röhrchen zur Messung überführt.

II. Messparameter zur Bestimmung der Relaxationszeiten

Tabelle 8-5: Messparameter zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit (T_1) und der transversalen Relaxationszeit (T_2)

Parameter	Bestimmung T_1	Bestimmung T_2
Pulsprogramme	tlir	cpmg
Anzahl der Scans	16	16
Anzahl an <i>dummy scans</i>	2	16
Spektrale Breite [ppm]	19,9947	19,9947
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	16384	65536
Akquisitionszeit [s]	0,819	3,277
	t1-Delays [s]	t2-Delays [ms]
	0,001, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,8, 1,5, 3,0, 5,0	2, 20, 50, 100, 200, 300,400, 500, 750, 1000

III. Messparameter der ¹H-NMR-Methoden

Tabelle 8-6: Messparameter der durchgeführten ¹H-NMR-Methoden

Parameter	Pulsprogramme	
Pulsprogramme	zg30	noesygppr1d
Anzahl der Scans	64	64
Anzahl an <i>dummy scans</i>	2	4
Spektrale Breite [ppm]	19,9947	15,9958
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	65536	32768
Akquisitionszeit [s]	3,277	2,048 s
D ₁ -Delay [s]	Siehe Anwendung	Siehe Anwendung

IV. Messparameter der HSQC-Methoden im Rahmen der Zeitoptimierung

Tabelle 8-7: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden mit unterschiedlichen HSQC-Pulssequenzen

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramme		hsqcetgp hsqcetgpsp hsqcedetgp
Anzahl der Scans		2
Anzahl an <i>dummy scans</i>		16
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	1024
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,041
D ₁ -Delay [s]		1,5

Tabelle 8-8: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden mit unterschiedlicher Anzahl an F₁-Datenpunkten

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramm		hsqcetgp
Anzahl der Scans		2
Anzahl an <i>dummy scans</i>		16
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
		1024
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	512
		256
		0,041
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,020
		0,010
D₁-Delay [s]		1,5

Die in Tabelle 8-8 beschriebene Methode der Pulssequenz „hsqcetgp“ wurde mit D₁-Delays der Länge 1,0 s, 1,5 s, 3,0 s, 4,5 s, 6,0 s, 7,5 s und 9,0 s durchgeführt.

Tabelle 8-9: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden mit unterschiedlichen *Non-Uniform Sampling (NUS)*-Gewichtungen, die über die T₂-Relaxation (NUST₂) eingestellt werden.

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramm		hsqcetgp
Anzahl der Scans		2
Anzahl an <i>dummy scans</i>		16
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	1024
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,041
D₁-Delay [s]		1,5
NUS-Anteil [%]		50
NUS-T₂ [s]	-	1,0, 0,3, 0,01

Tabelle 8-10: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden mit unterschiedlichen *Non-Uniform Sampling (NUS)*-Anteilen

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramm		hsqcetgp
Anzahl der Scans		2
Anzahl an <i>dummy scans</i>		16
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	1024
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,041
D₁-Delay [s]		1,5
NUS-Anteil [%]	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90	

Tabelle 8-11: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methode, die zur Betrachtung der Prozessierungsparameter und im Rahmen der Methodvalidierung verwendet wurde. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramm		hsqcetgp
Anzahl der Scans		2
Anzahl an <i>dummy scans</i>		16
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	1024
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,041
D₁-Delay [s]		1,5
NUS-Anteil [%]	50	

V. Messparameter der ASAP-HSQC-Methoden im Rahmen der Zeitoptimierung

Tabelle 8-12: Messparameter der durchgeführten *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-*Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden, die zur Betrachtung unterschiedlicher Pulsprogramme durchgeführt wurden. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramme	asap_hsqc_sp Bruker asap_hsqc_hp Bruker_ws asap_hsqc_sp Bruker_12cinq_5	
Anzahl der Scans	2	
Anzahl an dummy scans	16	
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	1024
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,041
D₁-Delay [s]	0,05	
NUS-Anteil [%]	50	

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurde die in Tabelle 8-12 beschriebene Methode der Pulssequenz „asap_hsqc_sp Bruker“ mit und ohne NUS-Kopplung verwendet.

VI. Messparameter der HSQC-Methoden im Rahmen der Auflösungsoptimierung

Tabelle 8-13: Messparameter der durchgeführten *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methoden, die im Rahmen der Auflösungsoptimierung verwendet wurden. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramme	hsqcetgp		hsqcetgp	
Anzahl der Scans	2		4	
Anzahl an <i>dummy scans</i>	16		16	
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	4096	1024	4096
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,163	0,227	0,163
D ₁ -Delay [s]	1,5		1,5	
NUS-Anteil [%]	-		50	

VII. Messparameter der ASAP-HSQC-Methoden im Rahmen der Auflösungsoptimierung

Tabelle 8-14: Messparameter der durchgeführten *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-*Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methode, die im Rahmen der Auflösungsoptimierung verwendet wurden. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Parameter	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension	F ₂ -Dimension	F ₁ -Dimension
Pulsprogramme	asap_hsqc_sp_brucker		asap_hsqc_sp_brucker_12cinz_5	
Anzahl der Scans	2		4	
Anzahl an <i>dummy scans</i>	16		16	
Spektrale Breite [ppm]	4,5006	100,0005	4,5006	100,0005
Senderfrequenz-Offset [ppm]	3,7500	70,0000	3,7500	70,0000
Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten	1024	4096	1024	4096
Akquisitionszeit [s]	0,227	0,163	0,227	0,163
D ₁ -Delay [s]	0,05		0,05	
NUS-Anteil [%]	50		50	

9 Anhang

9.1 Probenmaterial

Tabelle 9-1: Informationen zu den verwendeten Milchprodukten

Produkt	Marke	Verarbeitung	Fettgehalt [%]	Zuckergehalt [g/100 mL]
Haltbare Vollmilch	Sternenfair	Homogenisiert, ultrahoherhitzt	3,8	4,8
Zutaten: Vollmilch				
Haltbare lactosefreie Vollmilch	Minus L	Homogenisiert, ultrahoherhitzt	3,8	4,8
Zutaten: Vollmilch, Lactase				
Buttermilch	Müller	-	0,6	4,2
Zutaten: Buttermilch				
Saure Sahne	Milbona	-	10,0	3,3
Zutaten: Saure Sahne				
Kakaogetränk auf Milchbasis	Münsterland	sterilisiert	< 0,5	6,7
Zutaten: Magermilch, eiweißreduzierte Magermilch (2,5 % Eiweiß im Milchanteil), Zucker, fettarmes Kakaopulver, Speisesalz, Süßungsmittel (Natriumcyclamat, Acesulfam-K, Saccharin), Stabilisator: Carrageen				
Kakaogetränk auf Milchbasis, lactosefrei	Münsterland	sterilisiert	< 0,5	5,7
Zutaten: Magermilch, eiweißreduzierte Magermilch (2,5 % Eiweiß im Milchanteil), Zucker, fettarmes Kakaopulver, Speisesalz, Süßungsmittel (Natriumcyclamat, Acesulfam-K, Saccharin), Stabilisator: Carrageen				
Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack	Münsterland	sterilisiert	< 0,5	7,2
Zutaten: Magermilch, eiweißreduzierte Magermilch (2,5 % Eiweiß im Milchanteil), Zucker, 0,1 % Erdbeersaft aus Erdbeerkonzentrat, Aroma, Süßungsmittel (Natriumcyclamat, Acesulfam-K, Saccharin), Stabilisatoren (Carrageen, Guarkernmehl), Farbstoff: Echtes Carmin				
Fruchtbuttermilch Mango	Müller	-	0,5	10,5
Zutaten: Buttermilch, Zucker, Mango aus Mangopüreekonzentrat, Mangosaft aus Mangosaftkonzentrat, färbende Pflanzenkonzentrate (Saflor, Karotte), natürliches Aroma, Laktase				

Tabelle 9-2: Informationen zu den verwendeten, mit Isomaltulose gesüßten, Produkten

Produkt	Marke	Zuckergehalt [g/100 g]
„Palatinose“	Blackskull	0,0
Zutaten: Palatinose (Isomaltulose)		
„Energize Lemon“	Ahead-nutrition	0,0 Isomaltulose: 30,0
Zutaten: Isomaltulose (Palatinose), L-Citrullin, Kreatin-Monohydrat (Creapure), L-Arginin-Alpha-Ketoglutarat, L-Arginin, N-Acetyl-L-Carnitin Hydrochlorid, Aroma (natürliches Aroma), Säuerungsmittel (Citronensäure), Zitronenfruchtpulver, Grüntee-Extrakt, L-Tyrosin, Ginseng-Extrakt (20 % Ginsenoside), Koffein, Süßungsmittel Sucralose (Steviolglycoside), Ingwer-Extrakt, Trennmittel (Siliciumdioxid), Pyridoxal-5-Phosphat (P5P), Methylcobalamin		
„Multicarbogel“	Multipower	25,0
Zutaten: Maltodextrin, Wasser, Fructose, Isomaltulose (10 %), Säureregulatoren (Kaliumcitrat, Natriumcitrat), Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Säuerungsmittel (Citronensäure), Aroma, Konservierungsstoffe (Kaliumsorbat, Natriumbenzoat)		
„Next Level Meal Schokolade“	Runtime	10,0
Zutaten: Hafermehl (41 %), Maltodextrin (21 %), Molkenproteinkonzentrat (16 %), Isomaltulose (8 %), Sonnenblumenölpulver (8 %), BCAA (L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin; Emulgator: Sonnenblumenlecithin), Kakaopulver stark entölt, Natriumhydrogencarbonat, Kaliumcitrat, Calciumcarbonat, Magnesiumcarbonat, Zinkgluconat, Kaliumiodid, Natriumselenit, Natriummolybdat, Kupfergluconat, Chrompicolinat, Aroma, L-Ascorbinsäure (Vitamin C), Nicotinamid (Vitamin B3), Calcium-D-pantothenat (Vitamin B5), DL-alpha-Tocopherylacetat (Vitamin E), Phytomenadion (Vitamin K), Riboflavin (Vitamin B2), Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B6), Thiaminmononitrat (Vitamin B1), Retinylacetat (Vitamin A), Pteroylmonoglutaminsäure (Vitamin B9), D-Biotin, Cyanocobalamin (Vitamin B12), Cholecalciferol (Vitamin D3), Süßungsmittel: Sucralose		
„Next Level Meal Erdbeere“	Runtime	11,0
Zutaten: Hafermehl (41 %), Maltodextrin (21 %), Molkenproteinkonzentrat (16 %), Isomaltulose (8 %), Sonnenblumenölpulver (8 %), BCAA (L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin; Emulgator: Sonnenblumenlecithin), Natriumhydrogencarbonat, Kaliumcitrat, Calciumcarbonat, Magnesiumcarbonat, Zinkgluconat, Kaliumiodid, Natriumselenit, Natriummolybdat, Kupfergluconat, Chrompicolinat, gefriergetrocknete Erdbeerstücke (0,6 %), Aroma, Säuerungsmittel: Citronensäure, Rote Beete Extrakt, L-Ascorbinsäure (Vitamin C), Nicotinamid (Vitamin B3), Calcium-D-pantothenat (Vitamin B5), DL-alpha-Tocopherylacetat (Vitamin E), Phytomenadion (Vitamin K), Riboflavin (Vitamin B2), Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B6), Thiaminmononitrat (Vitamin B1), Retinylacetat (Vitamin A), Pteroylmonoglutaminsäure (Vitamin B9), D-Biotin, Cyanocobalamin (Vitamin B12), Cholecalciferol (Vitamin D3), Joghurtpulver, Süßungsmittel: Sucralose		
„Liquid Meal Vanilla“	Runtime	9,9
Zutaten: fettarme Milch (1,7 % Fett), Wasser, Milcheiweiß, Isomaltulose, Maiskeimöl, Inulin, Stabilisator: Polyphosphate, Cellulosegel, Cellulosegummi, Carrageen, L-Leucin, Magnesiumcitrat, Kaliumcitrat, Ascorbinsäure (Vitamin C), Eisensulfat, DL-alpha-Tocopherylacetat (Vitamin E), Retinylacetat, (Vitamin A), Zinksulfat, Nicotinamid (Vitamin B3), Calcium-D-Pantothenat (Vitamin B5), Kupfergluconat, Mangansulfat, D-Biotin, Natriumselenit, Cholecalciferol (Vitamin D3), Cyanocobalamin (Vitamin B12), Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B6), Phyllochinon (Vitamin K), Kaliumiodid, Thiaminmononitrat (Vitamin B1), Riboflavin (Vitamin B2), Pteroylmonoglutaminsäure (Vitamin B9), Aroma, L-Isoleucin, L-Valin, Vanilleextrakt (0,01 %), Antioxidationsmittel: L-Ascorbylpalmitat.		
„Bug Break“	Bug-break	38,5
Zutaten: Isomaltulose, Sesam: 38 %, Mandeln gewürfelt, Buffalowürmer (<i>Alphitobius diaperinus</i>) gefriergetrocknet: 10 %.		

9.2 Weiterführende Angaben zu den Referenz- und Vergleichsmethoden

Tabelle 9-3: Bestimmungsgrenzen (BG) der verwendeten Methoden der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion zur Quantifizierung der Analyten in Milch und Milchprodukten sowie den mit Isomaltulose gesüßten Produkten., die im Rahmen von zwei Masterarbeiten durchgeführt wurden (Meridian, 2019; Ruf, 2020).

	PA20-Säule (Meridian, 2019) BG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	PA200-Säule (Ruf, 2020) BG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
D-Glucose	0,27	0,02
D-Galactose	0,06	0,02
D-Fructose	-	0,07
Saccharose	-	0,07
Lactose	0,03	0,06
Maltose	-	0,02
Isomaltulose	-	0,02

Tabelle 9-4: Bestimmungsgrenzen (BG) der verwendeten Methoden der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, die zur Quantifizierung der Leguminosenproben verwendet wurden.

	PA20-Säule BG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	PA200-Säule BG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
D-Glucose	1,00	-
D-Fructose	4,35	-
D-Galactose	0,65	-
Saccharose	3,56	-
Raffinose	-	2,91
Stachyose	-	0,09
Verbascose	-	0,95

9.3 Weiterführende Angaben zu den messzeitoptimierten NMR-spektroskopischen Methoden

9.3.1 Relaxationszeiten

Tabelle 9-5: Relaxationszeiten der zur Quantifizierung verwendeten Analyten. T₁: longitudinale Relaxationszeit. T₂: transversale Relaxationszeit

Analyt	T ₁ [s]	T ₂ [s]
D-Glucose	2,1	0,6 * 10 ⁻³
D-Fructose	1,6	1,2 * 10 ⁻³
D-Galactose	1,8	0,7 * 10 ⁻³
D-Allose	2,0	0,7 * 10 ⁻³
L-Rhamnose	2,0	0,7 * 10 ⁻³
Saccharose	1,0	0,7 * 10 ⁻³
Lactose	1,3	0,6 * 10 ⁻³
Maltose	1,2	0,5 * 10 ⁻³
Isomaltulose	0,9	0,7 * 10 ⁻³
Maltulose	0,9	1,0 * 10 ⁻³
Raffinose	0,9	0,8 * 10 ⁻³
Stachyose	0,9	0,9 * 10 ⁻³
Verbascose	0,9	-

9.3.2 Signalauswahl

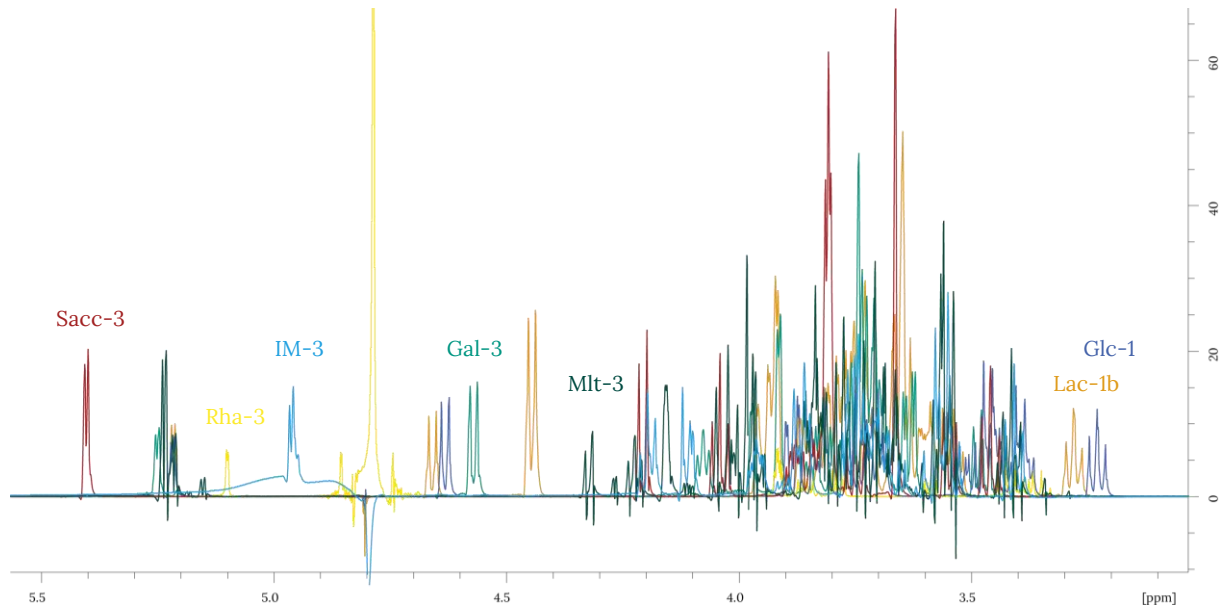


Abbildung 9-1: Protonenspektren der Kernspinresonanzspektroskopie wässriger Lösungen der Kohlenhydrate D-Glucose (Glc, dunkelblau), D-Galactose (Gal, türkis), L-Rhamnose (Rha, gelb), Saccharose (Sacc, rot), Lactose (Lac, orange), Isomaltulose (IM, hellblau) und Maltulose (Mlt, dunkelgrün), die überlagert dargestellt sind. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen sind in Tabelle 4-2 einzusehen.

Tabelle 9-6: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im eindimensionalen Protonenspektrum ($^1\text{H-NMR}$) und der Kennzeichnung in der jeweiligen Struktur. Die Signale wurden bei der Durchführung der Methodvalidierung sowie der Quantifizierung der Analyten in Milch und Milchprodukten genutzt (siehe Tabelle 4-1). Fructose wird in der Haworth-Projektion angegeben, alle weiteren Strukturen in der Reeves-Schreibweise. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monosaccharideinheit gegeben. NMR: Nuclear Magnetic Resonance

 $^1\text{H-NMR}$ -Methoden

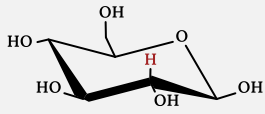
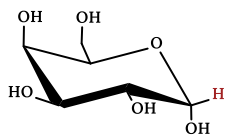
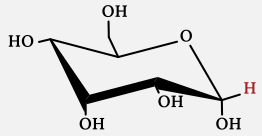
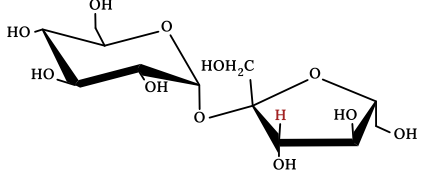
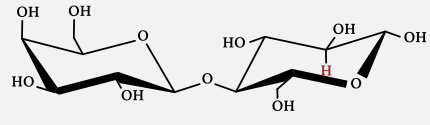
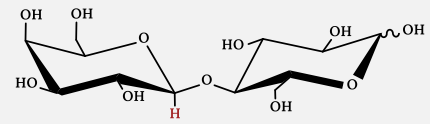
Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung	Struktur
		δ ^1H [ppm]	
D-Glucose	Glc-1	$\text{H}_{2\beta}$ (p)	
		3,23	
D-Galactose	Gal-1	$\text{H}_{1\alpha}$ (p)	
		5,25	
D-Allose	All-1	$\text{H}_{1\alpha}$ (p)	
		5,14	
Saccharose	Sacc-1	Fru-H3	
		4,20	
Lactose	Lac-1a	Glc- $\text{H}_{2\beta}$	
	3,28		
	Lac-1b	Gal-H1	
		4,45	

Tabelle 9-7: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektrum und der Kennzeichnung in der jeweiligen Struktur. Die Signale wurden bei der Durchführung der Methodenvalidierung sowie der Quantifizierung der Analyten in Milch und Milchprodukten genutzt (siehe Tabelle 4-1). Fructose wird in der Haworth-Projektion angegeben, alle weiteren Strukturen in der Reeves-Schreibweise. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monomereinheit gegeben. r: reduzierend

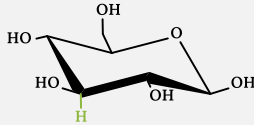
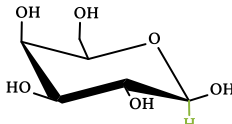
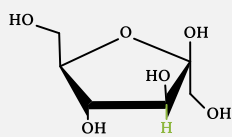
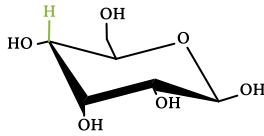
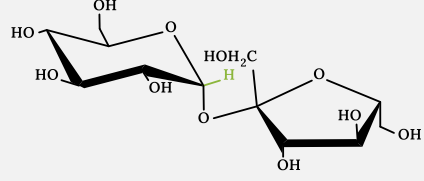
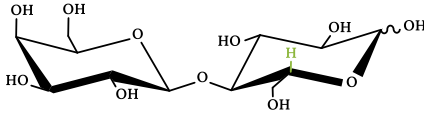
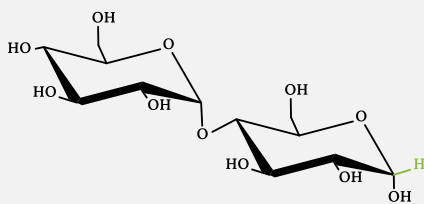
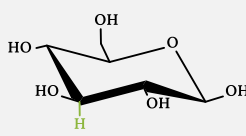
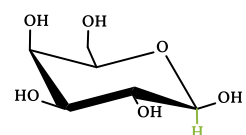
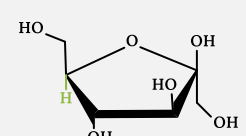
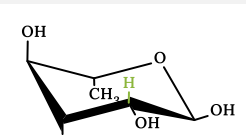
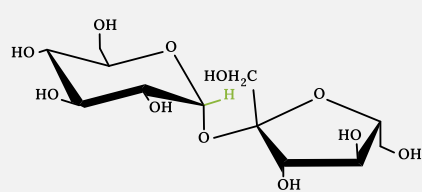
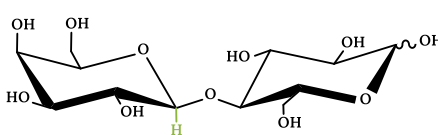
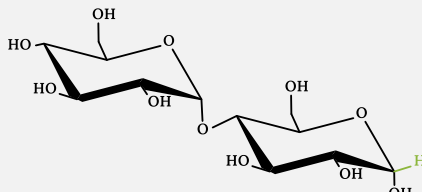
HSQC-Methoden				
Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung		Struktur
		δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	
D-Glucose	Glc-2	C3H _{3β} (p)	76,47	
		3,47		
D-Galactose	Gal-2	C1H _{1β} (p)	97,14	
		4,58		
D-Fructose	Fru-2	C3H _{3β} (f)	75,05	
		4,10		
D-Allose	All-2	C4H _{4β} (p)	67,52	
		3,63		
Saccharose	Sacc-2	Glc-C1H ₁	92,78	
		5,40		
Lactose	Lac-2	Glc-C5H ₅	78,90	
		3,65		
Maltose	Mal-2	Glc _r -C1H _{1α}	100,14	
		5,39		

Tabelle 9-8: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im eindimensionalen Protonenspektrum ($^1\text{H-NMR}$) und der Kennzeichnung in der jeweiligen Struktur. Die Signale wurden bei der Quantifizierung der Analyten in Produkten genutzt, die mit Isomaltulose gesüßt wurden (siehe Tabelle 4-2). Fructose wird zum Teil in der Haworth-Projektion und zum Teil in der Reeves-Schreibweise angegeben, alle weiteren Strukturen ausschließlich in der Reeves-Schreibweise. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monosaccharideinheit gegeben. Bei Disacchariden wird zusätzlich die Monomereinheit genannt. NMR: Nuclear Magnetic Resonance

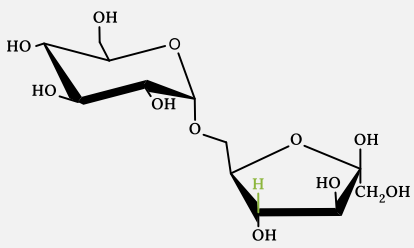
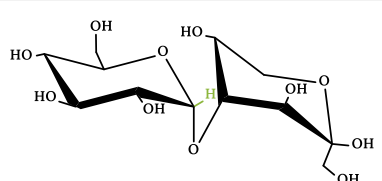
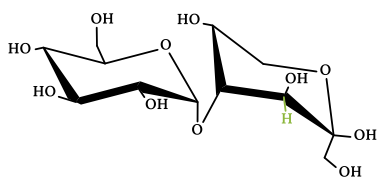
 $^1\text{H-NMR}$ -Methoden

Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung	Struktur
		δ ^1H [ppm]	
D-Glucose	Glc-1	H2 $_{\beta}$ (p) 3,23	
D-Galactose	Gal-3	H1 $_{\beta}$ (p) 4,58	
L-Rhamnose	Rha-3	H1 $_{\alpha}$ (p) 5,10	
Saccharose	Sacc-3	Glc-H1 5,40	
Lactose	Lac-1b	Gal-H1 4,45	
Isomaltulose	IM-3	Glc-H1 $_{\alpha+\beta}$ 4,96	
Maltulose	Mlt-3	Fru-H3 $_{\beta}$ (f) 4,32	

Tabelle 9-9: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektrum und der Kennzeichnung in der jeweiligen Struktur. Die Signale wurden bei der Quantifizierung der Analyten in Produkten genutzt, die mit Isomaltulose gesüßt wurden (siehe Tabelle 4-2). Fructose wird zum Teil in der Haworth-Projektion und zum Teil in der Reeves-Schreibweise angegeben, alle weiteren Strukturen ausschließlich in der Reeves-Schreibweise. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p =Pyranose, f =Furanose) der entsprechenden Monomereinheit gegeben. r: reduzierend

HSQC-Methoden				
Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung		Struktur
		δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	
D-Glucose	Glc-2	C3H ₃ β (p)	3,47	
			76,47	
D-Galactose	Gal-2	C1H1 β (p)	4,58	
			97,14	
D-Fructose	Fru-4	C5H5 β (f)	3,81	
			81,26	
L-Rhamnose	Rha-4	C2H2 β (p)	3,92	
			71,99	
Saccharose	Sacc-2	Glc-C1H1	5,40	
			92,78	
Lactose	Lac-2	Gal-C1H1	4,45	
			106,62	
Maltose	Mal-2	Glc _r -C1H1 α	5,39	
			100,14	

Fortsetzung von Tabelle 9-9

Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung		Struktur
		δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	
Isomaltulose	IM-4	Fru-C4H4 β		
			4,20	
Maltulose	Mlt-4a	Glc-C1H1 (Fru β (p))		
			5,23	
Maltulose	Mlt-4b	Fru-C3H3 β (p)		
			3,98	

9.3.3 Optimierung der ^1H -NMR-Methoden

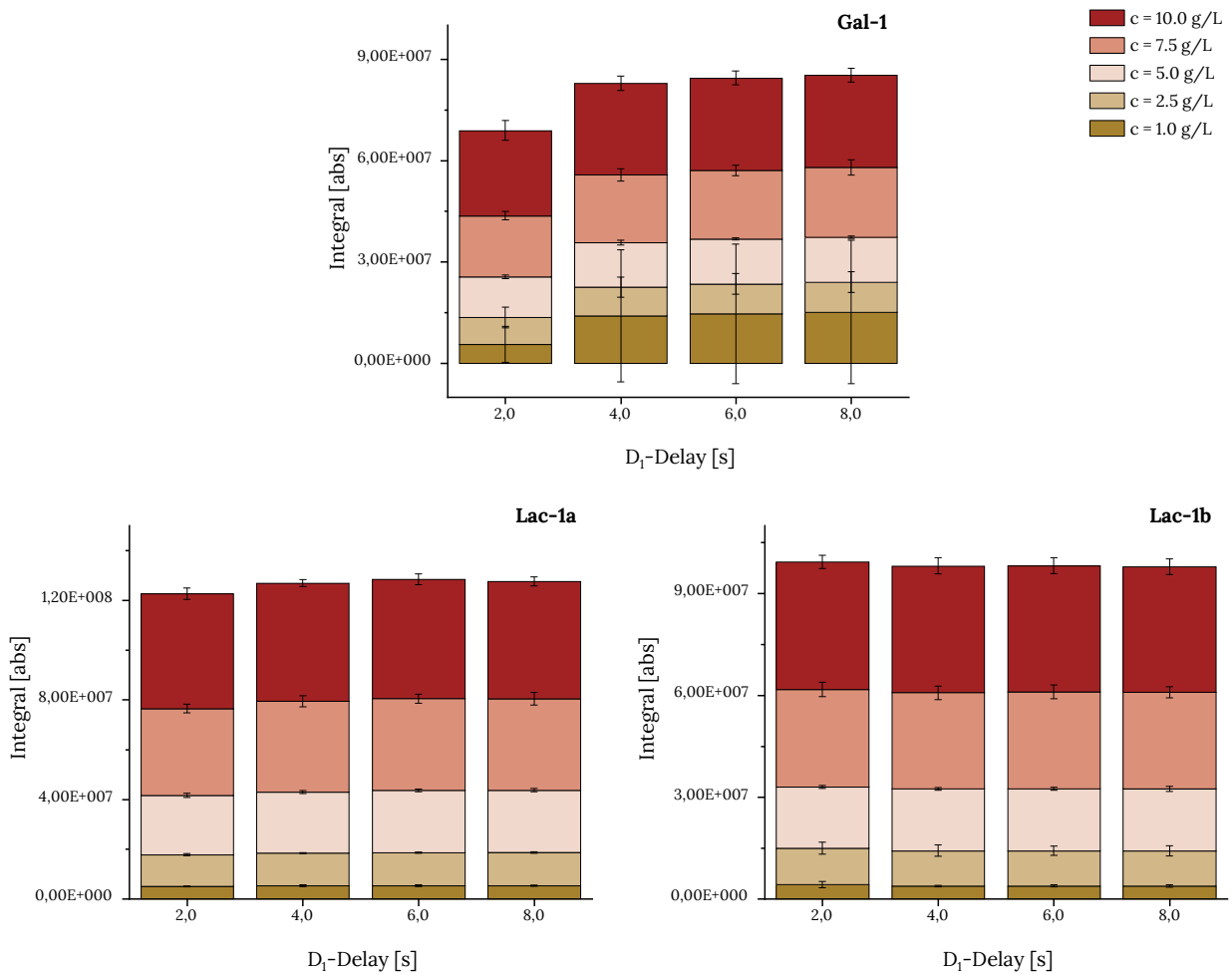


Abbildung 9-2: Einfluss der Länge des D₁-Delays auf die Integrale der Analyten D-Galactose (Gal) und Lactose (Lac) bei der Durchführung eines eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiments mit der Pulssequenz „noesygppr1d“ und 64 Scans. Die Messungen wurden für jede Konzentration (c) in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung als Präzisionsmaß angegeben. Details zu den verwendeten Signalen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Tabelle 9-10: Mittelwerte der Integrale des Glucosesignals Glc-1, des Galactosesignals Gal-1, des Saccharosesignals Sacc-1 und der Lactosesignale Lac-1a und Lac-1b (siehe Tabelle 4-1) der Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Messungen (Pulssequenz „noesygppr1d“) mit verschiedenen D_1 -Delay (jeweils in Dreifachbestimmung) unter Angabe der Ergebnisse einer einfaktoriellen Varianzanalyse ($\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test). Die Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb der gleichen Zeile unterscheiden sich signifikant.

	Probenkonzentration [g/L]	$D_1=2,0$ s	$D_1=4,0$ s	$D_1=6,0$ s	$D_1=8,0$ s
Glc-1	1,0	6702609 ^A	7297581 ^A	7489380 ^A	7564273 ^A
	2,6	16985043 ^B	18461646 ^A	18743863 ^A	19230526 ^A
	5,2	33295267 ^B	36302613 ^{AB}	36875915 ^A	37278639 ^A
	7,8	51926425 ^A	56302740 ^A	56775443 ^A	57157548 ^A
	10,4	68689058 ^A	73388658 ^A	75336967 ^A	76792858 ^A
Gal-1	1,0	5571031 ^A	14012431 ^A	14633294 ^A	15143253 ^A
	2,6	7949346 ^A	8489111 ^A	8854679 ^A	8875645 ^A
	5,2	12044175 ^A	13168292 ^A	13304673 ^A	13309733 ^A
	7,8	18049132 ^A	20039882 ^A	20252450 ^A	20597751 ^A
	10,4	25304790 ^A	27111492 ^A	27427520 ^A	27302838 ^A
Sacc-1	1,0	5140579 ^A	6280898 ^A	6291456 ^A	6294475 ^A
	2,6	13511017 ^A	13737817 ^A	14072750 ^A	13791027 ^A
	5,2	23314573 ^B	24284616 ^A	24464519 ^A	24373311 ^A
	7,9	36882324 ^A	37653865 ^A	38104286 ^A	38147559 ^A
	10,5	49130040 ^A	50057590 ^A	49787084 ^A	49659990 ^A
Lac-1a	1,0	5058529 ^A	5335987 ^A	5328907 ^A	5349432 ^A
	2,5	12728200 ^A	13122700 ^A	13293100 ^A	13383700 ^A
	5,0	23827800 ^A	24535800 ^A	25018600 ^A	24988200 ^A
	7,4	34932300 ^A	36493000 ^A	36860200 ^A	36712900 ^A
	9,9	46104300 ^A	47443800 ^A	47977800 ^A	47225300 ^A

Fortsetzung von Tabelle 9-10

	Probenkonzentration [g/L]	D ₁ =2,0 s	D ₁ =4,0 s	D ₁ =6,0 s	D ₁ =8,0 s
Lac-1b	1,0	4245709 ^A	3778387 ^A	3863947 ^A	3821934 ^A
	2,5	10735574 ^A	10476496 ^A	10373490 ^A	10344704 ^A
	5,0	18035529 ^A	18135995 ^A	18201400 ^A	18309883 ^A
	7,4	28734579 ^A	28365300 ^A	28555036 ^A	28464009 ^A
	9,9	37607101 ^A	37433725 ^A	37237648 ^A	36980313 ^A

Tabelle 9-11: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Pulssequenz „noesygppr1d“ mit 64 Scans und verschiedenen D₁-Delays für Lactose (Signal Lac-1a siehe Tabelle 4-1) erzeugt wurden. v_{so}: relative Verfahrensstandardabweichung, SW: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Lac-1a	D ₁ -Delay [s]	Steigung	Korrelationskoeffizient	v _{so} [%]
Messung 1	2,0	4344972	0,9990	4,1
Messung 2	2,0	4876812	0,9998	1,9
Messung 3	2,0	4490337	0,9990	4,2
Messung 1	4,0	4537872	0,9993	3,5
Messung 2	4,0	4946343	0,9987	4,9
Messung 3	4,0	4662526	0,9996	2,6
Messung 1	6,0	4550065	0,9989	4,4
Messung 2	6,0	5056039	0,9995	3,0
Messung 3	6,0	4704345	0,9993	3,5
Messung 1	8,0	4558449	0,9991	3,9
Messung 2	8,0	5001523	0,9983	5,5
Messung 3	8,0	4507502	0,9982	5,6
Mittelwert ± SW		4686399 ± 230551		
VK [%]		4,9		

Tabelle 9-12: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Pulssequenz „noesygppr1d“ mit 64 Scans und verschiedenen D_1 -Delays für Lactose (Signal Lac-1b siehe Tabelle 4-1) erzeugt wurden. v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung, SW: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Lac-1b	D_1 -Delay [s]	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
Messung 1	2,0	3398069	0,9915	12,3
Messung 2	2,0	3938278	0,9969	7,4
Messung 3	2,0	3813204	0,9992	3,7
Messung 1	4,0	3330442	0,9925	11,6
Messung 2	4,0	4041918	0,9988	4,5
Messung 3	4,0	3831787	0,9997	2,2
Messung 1	6,0	3374421	0,9944	9,9
Messung 2	6,0	4054175	0,9985	5,2
Messung 3	6,0	3741503	0,9998	1,8
Messung 1	8,0	3356709	0,9937	10,6
Messung 2	8,0	3994658	0,9993	3,6
Messung 3	8,0	3749843	0,9997	2,3
Mittelwert \pm SW		3718750 \pm 280860		
VK [%]		7,6		

Tabelle 9-13: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Pulssequenz „noesygppr1d“ mit 64 Scans und verschiedenen D_1 -Delays für D-Galactose (Signal Gal-1 siehe Tabelle 4-1) erzeugt wurden. v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung, SW: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Gal-1	D_1 -Delay [s]	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
Messung 1	2,0	1862868	0,9034	36,9
Messung 2	2,0	1393886	0,7697	64,5
Messung 3	2,0	2204247	0,9983	4,5
Messung 1	4,0	2043052	0,9190	33,4
Messung 2	4,0	-1134702	0,2635	-284,8
Messung 3	4,0	2437364	0,9987	4,1
Messung 1	6,0	2076603	0,9152	34,2
Messung 2	6,0	-1386500	0,3057	-242,2
Messung 3	6,0	2476165	0,9997	2,0
Messung 1	8,0	2072020	0,9154	34,2
Messung 2	8,0	-1355474	0,2854	-261,1
Messung 3	8,0	2408955	0,9996	2,3
Mittelwert \pm SW		1258207 \pm 1566029		
VK [%]		124,5		

Tabelle 9-14: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Pulssequenz „noesygppr1d“ mit 64 Scans und verschiedenen D_1 -Delays für D-Glucose (Signal Glc-1 siehe Tabelle 4-1) erzeugt wurden. v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung, SW: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Glc-1	D_1 -Delay [s]	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
Messung 1	2,0	6006798	0,9993	3,5
Messung 2	2,0	7139078	0,9986	5,0
Messung 3	2,0	6741146	0,9998	2,0
Messung 1	4,0	6500932	0,9992	3,7
Messung 2	4,0	7646481	0,9987	4,7
Messung 3	4,0	7117863	1,0000	0,8
Messung 1	6,0	6660322	0,9996	2,5
Messung 2	6,0	7693345	0,9988	4,5
Messung 3	6,0	7384237	0,9999	1,3
Messung 1	8,0	6720740	0,9993	3,6
Messung 2	8,0	7860203	0,9989	4,4
Messung 3	8,0	7489322	0,9998	1,8
Mittelwert \pm SW		7080039 \pm 5622961		
VK [%]		7,9		

Tabelle 9-15: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Pulssequenz „noesygppr1d“ mit 64 Scans und verschiedenen D_1 -Delays für Saccharose (Signal Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) erzeugt wurden. v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung, SW: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

Sacc-1	D_1 -Delay [s]	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
Messung 1	2,0	4327078	0,9980	6,0
Messung 2	2,0	5031534	0,9986	5,0
Messung 3	2,0	4468906	0,9987	4,8
Messung 1	4,0	4414613	0,9981	5,8
Messung 2	4,0	4833038	0,9967	7,7
Messung 3	4,0	4613699	0,9998	1,7
Messung 1	6,0	4385962	0,9982	5,7
Messung 2	6,0	4867149	0,9966	7,8
Messung 3	6,0	4541381	0,9994	3,2
Messung 1	8,0	4400041	0,9983	5,5
Messung 2	8,0	4855092	0,9970	7,2
Messung 3	8,0	4553067	0,9999	1,6
Mittelwert \pm SW		4607630 \pm 232366		
VK [%]		5,0		

9.3.4 Optimierung der HSQC-NMR-Methoden

Tabelle 9-16: Einfluss der Anzahl an Inkrementen in der ^{13}C -Dimension (TD_{F1}) eines Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments auf die Experimentdauer, die Akquisitionszeit (AQ) sowie die digitale Auflösung (DR). Zur Umrechnung der digitalen Auflösung von Hertz in ppm wird von einem 500 MHz-Spektrometer ausgegangen. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt.

TD_{F1}	Experimentdauer [min]	AQ_{F1} [ms]	DR [Hz]	DR [ppm]
256	13	10,178	98,3	0,197
512	26	20,355	49,1	0,098
1024	53	40,710	24,6	0,049

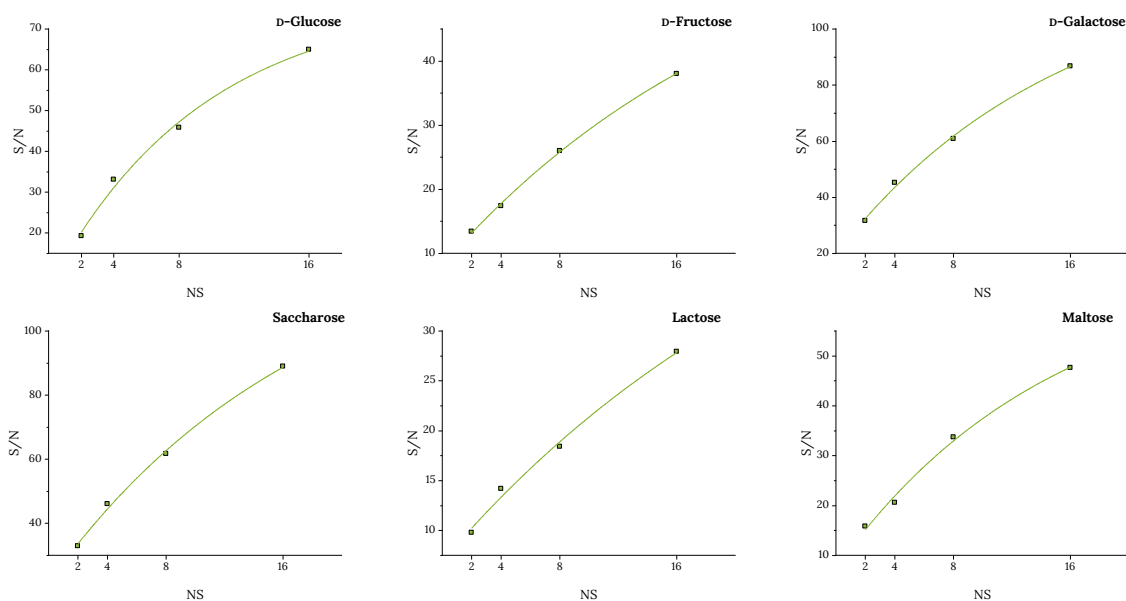


Abbildung 9-3: Einfluss der Erhöhung der Scananzahl (NS) auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) für die Analyten aus Analytgemisch 1. S/N der einzelnen Signale wurden mithilfe von MestReNova bestimmt. Als Probe wurde die Kalibrierlösung mit der geringsten Konzentration des Arbeitsbereichs von $c=1,0\text{ g/L}$ verwendet. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 9-17: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N) der Analyten aus Analytgemisch 1 in *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Spektren unterschiedlicher Scanzahl (NS). S/N der einzelnen Signale wurden mithilfe von MestReNova bestimmt. Zur Analyse wurde die Probe mit der geringsten Konzentration des Arbeitsbereichs mit einer Konzentration von $c=1,0$ g/L ausgewählt. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Analyt (Signalbezeichnung)	NS	Experimentdauer	S/N $c=1,0$ g/L
D-Glucose (Glc-2)	2	53 min	19
	4	1 h 45 min	33
	8	3 h 29 min	46
	16	6 h 58 min	65
D-Fructose (Fru-2)	2	53 min	13
D-Galactose (Gal-2)	2	53 min	32
Saccharose (Sacc-2)	2	53 min	33
Lactose (Lac-2)	2	53 min	10
Maltose (Mal-2)	2	53 min	16
D-Allose (All-2)	2	53 min	$c=5,0$ g/L
			67

Tabelle 9-18: Einfluss der *Non-Uniform Sampling* Methode auf die Güte der Kalibrierfunktion von Analytgemisch 1. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie einem NUS-Anteil von 50 % durchgeführt. Zur Auswertung wurden das Konzentrations- und Integralverhältnis zum D-Allosesignal verwendet. Details zu den verwendeten Signalen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, R-Wert: Korrelationskoeffizient, v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung

		Ungewichtetes Sampling	Gewichtetes Sampling 0,3 ^x	Gewichtetes Sampling 0,01 ^x
Glc-2	Steigung	2,51	2,54	2,37
	R-Wert	0,9998	0,9989	0,9999
	v_{xo} [%]	1,8	4,3	1,6
Fru-2	Steigung	0,41	0,41	0,37
	R-Wert	0,9984	0,9959	0,9993
	v_{xo} [%]	5,4	8,5	3,5
Gal-2	Steigung	1,16	1,17	1,05
	R-Wert	0,9990	0,9981	0,9995
	v_{xo} [%]	4,1	5,9	3,0
Sacc-2	Steigung	1,06	1,05	0,97
	R-Wert	0,9993	0,9987	0,9988
	v_{xo} [%]	3,5	4,8	4,5
Lac-2	Steigung	0,93	0,97	0,89
	R-Wert	0,9997	0,9962	0,9998
	v_{xo} [%]	2,2	8,2	1,9
Mal-2	Steigung	1,01	1,02	0,96
	R-Wert	0,9995	0,9981	0,9997
	v_{xo} [%]	3,0	5,7	2,5

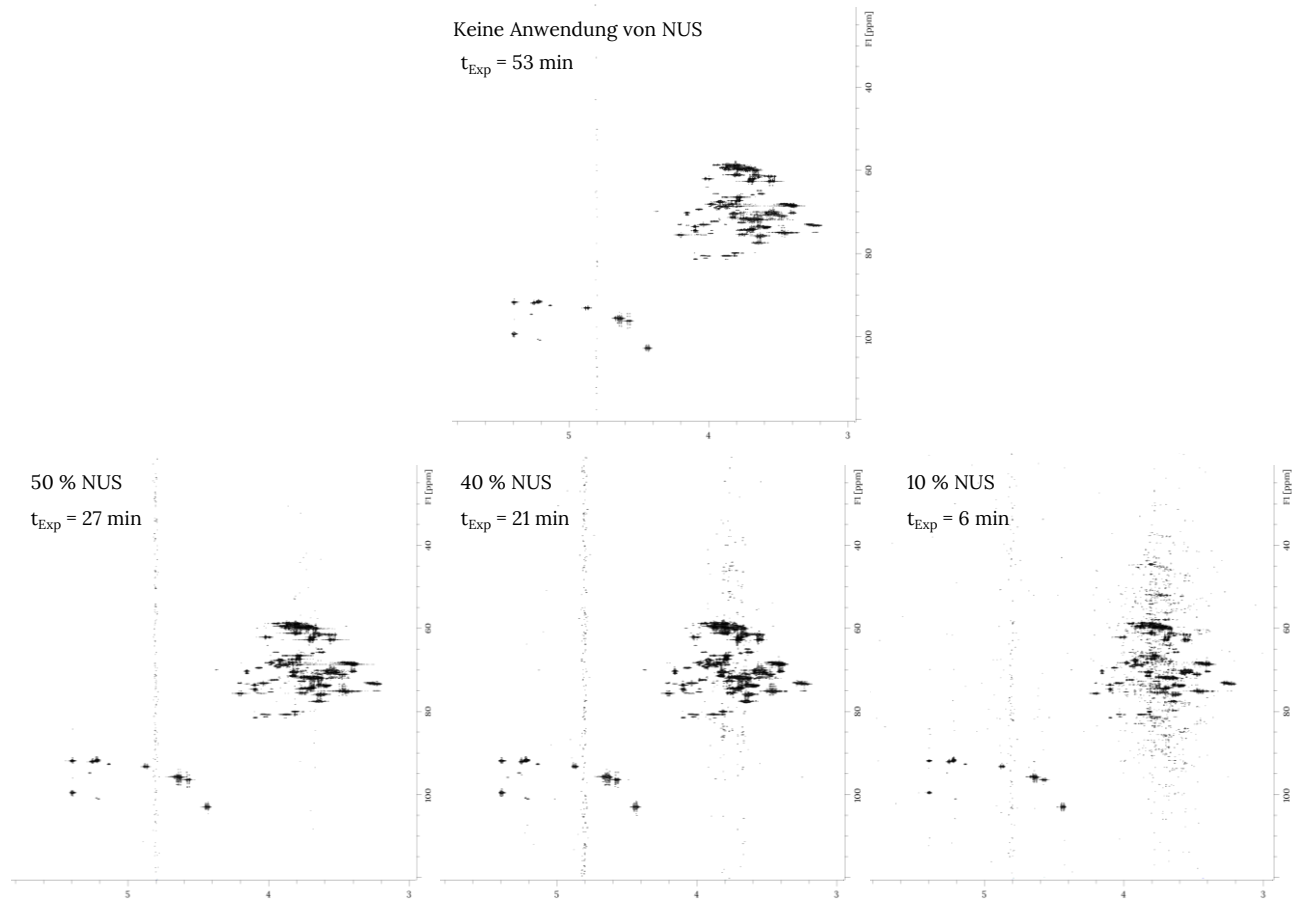


Abbildung 9-4: Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektren mit unterschiedlichen Anteilen an Non-Uniform Sampling (NUS) verglichen mit einem HSQC-Spektrum, das ohne die Anwendung von NUS gemessen wurde. Als Sampling-Methode wurde bei den NUS-gekoppelten Experimenten ein ungewichtetes Sampling verwendet. Zusätzlich wird die Dauer der Experimente (t_{Exp}) angegeben. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt.

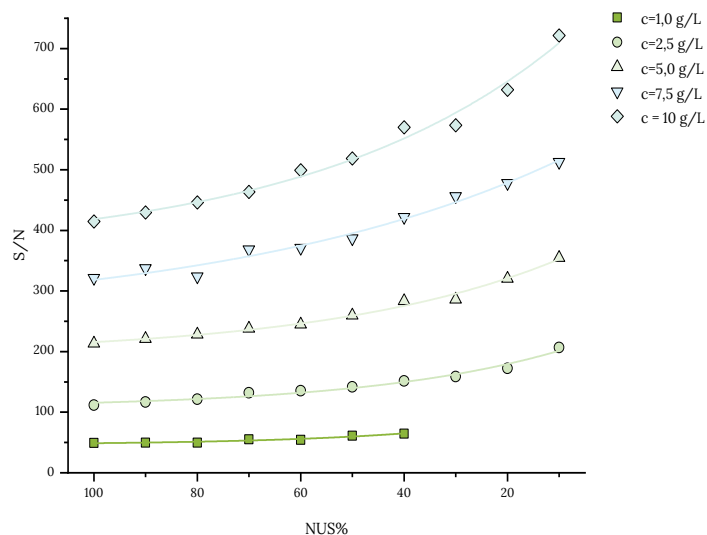


Abbildung 9-5: Signal-zu Rausch-Verhältnisse (S/N) in Abhängigkeit des Anteils an Non-Uniform Sampling (NUS%) für die verschiedenen Konzentrationen (c) von Analytgemisch 1. Beispielhaft werden die Ergebnisse der Auswertung des Galactosesignal Gal-2 (siehe Tabelle 4-1) gezeigt. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqctgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt.

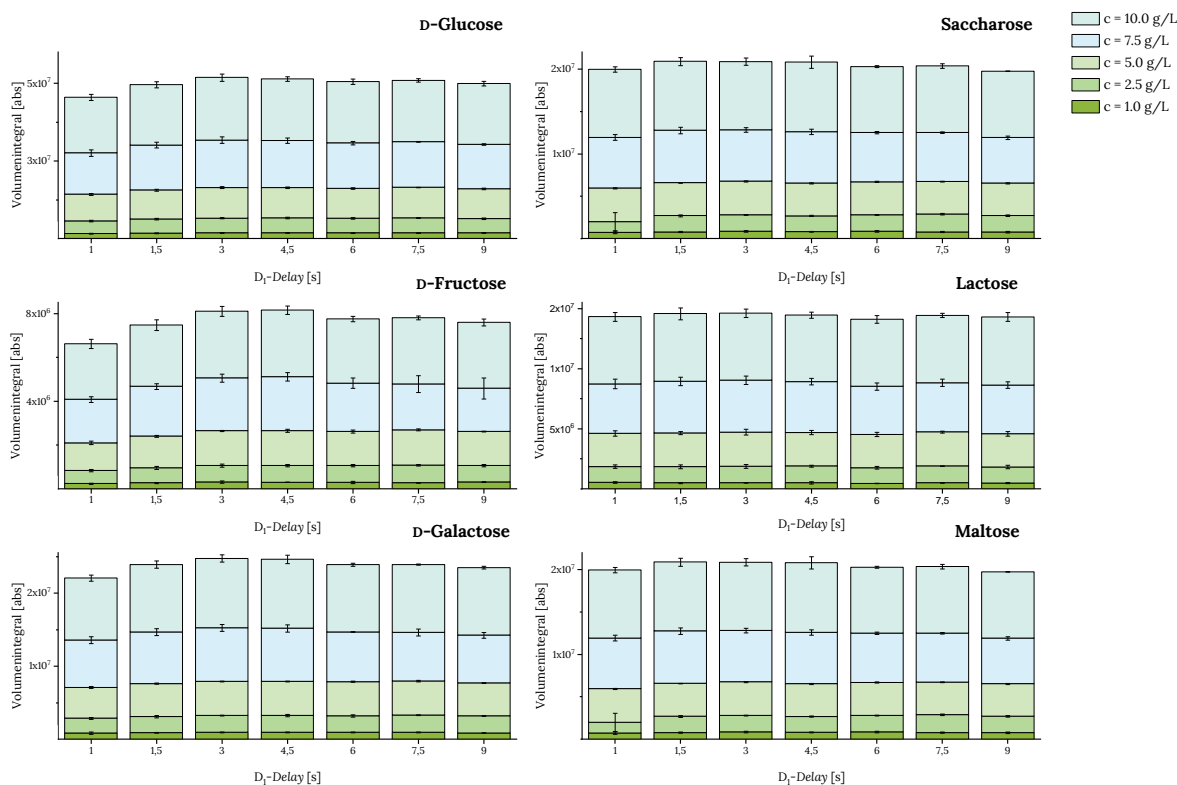


Abbildung 9-6: Einfluss der Länge des D_1 -Delays auf die Integralgröße der Analyten in Analytgemisch 1 bei der Durchführung von Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experimenten. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung unter Angabe der Standardabweichung als Präzisionsmaß mit der Pulssequenz „hsqctgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_1 und F_2 sowie einem Non-Uniform Sampling-Anteil von 50 % durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 9-19: Mittelwerte (MW) der Integrale der aufgeführten Analyten, die bei der Durchführung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten mit verschiedenen D_1 -Delays (jeweils in Dreifachbestimmung) ermittelt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen wurden mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ($\alpha=0,05$, *post-hoc* Tukey-Test) ermittelt und mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb der gleichen Zeile gekennzeichnet. Die HSQC-Messungen wurden mit der Pulssequenz „*hsqcetgp*“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 sowie einem *Non-Uniform Sampling*-Anteil von 50 % durchgeführt. Als Proben wurden Aliquote von Analytgemisch 1 in den angegebenen Konzentrationen (c) verwendet. Details zu den ausgewählten Signalen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, All: D-Allose

	c [g/L]	$D_1=1,0$ s	$D_1=1,5$ s	$D_1=3,0$ s	$D_1=4,5$ s	$D_1=6,0$ s	$D_1=7,5$ s	$D_1=9,0$ s
Glc-2	1,0	1597433 ^A	1730000 ^A	1855000 ^A	1855500 ^A	1813667 ^A	1801467 ^A	1788833 ^A
	2,6	4095967 ^A	4548700 ^{AB}	4722367 ^{AB}	4798200 ^{AB}	4691667 ^{AB}	4859000 ^{AB}	4659000 ^{AB}
	5,2	8549567 ^B	9325200 ^A	9840600 ^A	9736467 ^A	9640133 ^A	9820300 ^A	9551200 ^A
	7,8	13300000 ^A	14512000 ^A	15261667 ^A	15150000 ^A	14598333 ^A	14687000 ^A	14292667 ^A
	10,4	17902667 ^A	19417667 ^A	20143000 ^A	19847333 ^A	19744000 ^A	19752667 ^A	19588667 ^A
Fru-2	1,0	236357 ^A	271410 ^A	312353 ^A	302647 ^A	289533 ^A	281593 ^A	315103 ^A
	2,6	602807 ^B	688240 ^{AB}	750013 ^{AB}	763060 ^{AB}	771007 ^A	801027 ^A	752693 ^{AB}
	5,2	1263300 ^C	1447833 ^B	1587533 ^{AB}	1592767 ^{AB}	1560467 ^{AB}	1612267 ^A	1553000 ^{AB}
	7,8	1975433 ^A	2262467 ^A	2407167 ^A	2454300 ^A	2204967 ^A	2088733 ^A	1967267 ^A
	10,4	2536167 ^A	2802433 ^A	3039133 ^A	3043067 ^A	2925867 ^A	3014633 ^A	3004200 ^A
Gal-2	1,0	842407 ^A	879043 ^A	935573 ^A	944050 ^A	939387 ^A	942470 ^A	856233 ^A
	2,6	2019900 ^A	2222200 ^A	2318800 ^A	2298467 ^A	2262167 ^A	2348033 ^A	2322333 ^A
	5,2	4217367 ^B	4494700 ^A	4671133 ^A	4667867 ^A	4655167 ^A	4654767 ^A	4521667 ^A
	7,8	6467633 ^A	7068933 ^A	7296767 ^A	7270167 ^A	6814533 ^A	6671400 ^A	6524367 ^A
	10,4	8494767 ^A	9228800 ^A	9512433 ^A	9418033 ^A	9215467 ^A	9282333 ^A	9255567 ^A
Sacc-2	1,0	730550 ^A	779103 ^A	851163 ^A	808187 ^A	855877 ^A	787210 ^A	768637 ^A
	2,6	1907400 ^{AB}	1912800 ^{AB}	1954400 ^{AB}	1879667 ^B	1952367 ^{AB}	2103733 ^A	1941400 ^{AB}
	5,2	3960367 ^A	3885667 ^A	3963300 ^A	3859233 ^A	3894933 ^A	3836100 ^A	3826967 ^A
	7,9	5993367 ^{AB}	6193167 ^A	6055600 ^{AB}	6051233 ^{AB}	5811667 ^{AB}	5792767 ^{AB}	5381467 ^B
	10,5	8022600 ^A	8125000 ^A	8049667 ^A	8237967 ^A	7789833 ^A	7845933 ^A	7832267 ^A

Fortsetzung zu Tabelle 9-19

	c [g/L]	D _t =1,0 s	D _t =1,5 s	D _t =3,0 s	D _t =4,5 s	D _t =6,0 s	D _t =7,5 s	D _t =9,0 s
Lac-2	1,0	546817 ^A	498307 ^A	507307 ^A	517983 ^A	455957 ^A	518987 ^A	491073 ^A
	2,5	1314433 ^A	1348933 ^A	1368967 ^A	1380000 ^A	1300500 ^A	1383667 ^A	1332467 ^A
	5,0	2756767 ^A	2791667 ^A	2845800 ^A	2785500 ^A	2778833 ^A	2833167 ^A	2765833 ^A
	7,4	4110000 ^A	4309133 ^A	4325433 ^A	4239567 ^A	3983467 ^A	4086800 ^A	4044733 ^A
	9,9	5589967 ^A	5615100 ^A	5558533 ^A	5528900 ^A	5589000 ^A	5606467 ^A	5670833 ^A
Mal-2	1,0	684703 ^A	704707 ^A	653497 ^A	666977 ^A	646500 ^A	657227 ^A	614213 ^A
	2,5	1736267 ^A	1781067 ^A	1710733 ^A	1680267 ^A	1667900 ^A	1769033 ^A	1673100 ^A
	5,0	3558067 ^A	3560633 ^A	3496100 ^A	3488333 ^A	3479233 ^A	3503700 ^A	3473033 ^A
	7,5	5489167 ^A	5537933 ^A	5440533 ^A	5339967 ^A	5097967 ^A	4899600 ^A	4639733 ^A
	10,0	7102100 ^A	7155300 ^A	7033067 ^A	6896333 ^A	6891833 ^A	6861800 ^A	6803533 ^A
All-2	5,0	3475333 ^B	3845133 ^{AB}	4167600 ^A	4233933 ^A	4195900 ^A	4195067 ^A	4163167 ^A
	5,0	3381267 ^B	3860433 ^A	4188133 ^A	4165967 ^A	4134733 ^A	4217300 ^A	4045100 ^A
	5,0	3388700 ^C	3802433 ^B	4116567 ^{AB}	4138400 ^A	4044433 ^{AB}	4094000 ^{AB}	4063833 ^{AB}
	5,0	3462367 ^B	3967200 ^{AB}	4283833 ^A	4232167 ^A	4140533 ^A	3944967 ^{AB}	3951367 ^{AB}
	5,0	3499567 ^B	3792100 ^{AB}	4068967 ^A	3983933 ^A	4122100 ^A	4079467 ^A	4050867 ^A

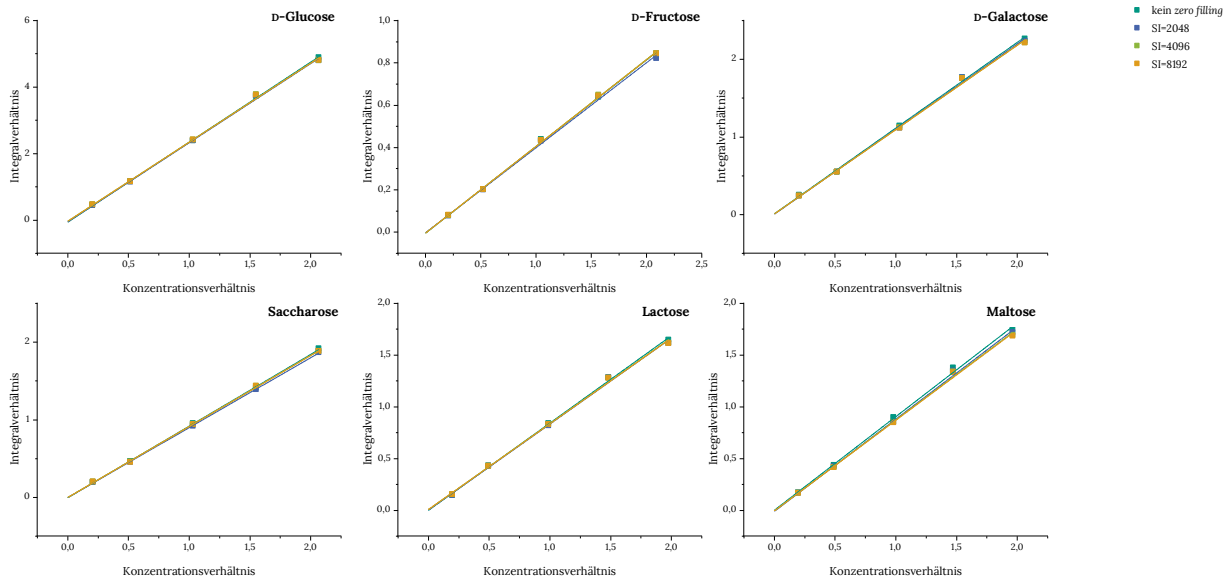


Abbildung 9-7: Kalibrierfunktionen der Proben von Analytgemisch 1 im Konzentrationsbereich 1,0 g/L bis 10 g/L, die mit verschiedenen Anteilen an *zero filling* prozessiert wurden. Die Datenpunkte in beiden Dimensionen wurden durch die Verwendung von *zero filling* verdoppelt (SI=2048, blau), vervierfacht (SI=4096, grün), verachtfacht (SI=8192, orange) oder es wurde kein *zero filling* durchgeführt (türkis). Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqctetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 3,0 s durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 9-20: Einfluss der Art der *window function* auf die Güte der Kalibrierfunktion von Analyten aus Analytgemisch 1. Bei der Funktion der Bezeichnung GB 0,1 liegt das Maximum der Lorentz-Gauß-Funktion (GB) am Anfang des FIDs, bei der Bezeichnung GB 0,5 in der Mitte. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F₂ und F₁ und einem D₁-Delay von 3,0 s durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. Details zu den ausgewählten Signalen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose. R-Wert: Korrelationskoeffizient, v_{xo}: relative Verfahrensstandardabweichung

		Kosinus- glocke	Gemischte Sinus- Kosinusglocke	Lorentz-Gauß, GB 0,1	Lorentz-Gauß, GB 0,5
Glc-2	Steigung	2,38	2,37	2,37	2,37
	R-Wert	0,9994	0,9992	0,9994	0,9993
	v _{xo} [%]	3,2	3,8	3,2	3,5
Fru-2	Steigung	0,40	0,41	0,42	0,42
	R-Wert	0,9991	0,9994	0,9997	0,9997
	v _{xo} [%]	4,1	3,3	2,3	2,1
Gal-2	Steigung	1,10	1,10	1,06	1,05
	R-Wert	0,9989	0,9990	0,9992	0,9992
	v _{xo} [%]	4,3	4,2	3,8	3,7
Sacc-2	Steigung	0,90	0,90	0,91	0,91
	R-Wert	0,9999	0,9999	1,0000	1,0000
	v _{xo} [%]	1,3	1,3	1,0	0,9
Lac-2	Steigung	0,90	0,90	0,91	0,91
	R-Wert	0,9985	0,9989	0,9989	0,9991
	v _{xo} [%]	5,2	4,3	4,4	4,0
Mal-2	Steigung	0,89	0,88	0,87	0,88
	R-Wert	0,9992	0,9990	0,9992	0,9990
	v _{xo} [%]	3,7	4,3	3,8	4,1

9.3.5 Optimierung der ASAP-HSQC-NMR-Methoden

Tabelle 9-21: Parameter zur Bewertung der Güte der Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung der beiden *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-*Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Pulssequenzen „*asap_hsqc_sp_bruker*“ (ASAP-HSQC) und „*asap_hsqc_sp_bruker_12cinz_5*“ (lowCost-ASAP-HSQC) erzeugt wurden. Die Auswertung erfolgte durch Verhältnisbildung mit den Messwerten der internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messungen wurden mit zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 sowie einem *Non-Uniform Sampling*-Anteil von 50 % durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*, v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung

Analyt	Pulssequenz	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
D-Glucose	ASAP-HSQC	2,28	0,9996	2,70
	lowCost-ASAP-HSQC	2,42	0,9995	2,88
D-Fructose	ASAP-HSQC	0,35	0,9961	8,25
	lowCost-ASAP-HSQC	0,37	0,9986	4,50
D-Galactose	ASAP-HSQC	1,20	0,9981	5,76
	lowCost-ASAP-HSQC	1,50	0,9958	8,57
Saccharose	ASAP-HSQC	1,22	0,9974	6,74
	lowCost-ASAP-HSQC	1,31	0,9988	4,65
Lactose	ASAP-HSQC	1,047	0,9978	6,19
	lowCost-ASAP-HSQC	1,02	0,9978	6,30
Maltose	ASAP-HSQC	1,14	0,9990	4,22
	lowCost-ASAP-HSQC	1,13	0,9985	5,18

9.3.6 Methodenvalidierung anhand einer erweiterten Grundkalibrierung

Tabelle 9-22: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des D-Glucosesignals Glc-1 und des Saccharosesignals Sacc-1, die mithilfe eines eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiments (Pulssequenz „noesygppr1d“, 64 Scans, $D_1=2,0$ s) bestimmt wurden. Die Messreihe wurde an sechs verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle sechs Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Glc-1	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	0,7	2,2	0,9	1,6	3,3
Messreihe 2	0,7	1,1	0,8	0,7	3,4
Messreihe 3	1,0	1,6	3,1	2,6	0,2
Messreihe 4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,5
Messreihe 5	2,1	1,4	2,7	2,6	1,2
Messreihe 6	0,3	1,8	0,3	0,5	0,2
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	0,9	1,4	1,3	1,4	1,5
Sacc-1					
Messreihe 1	2,6	2,6	0,8	0,6	6,3
Messreihe 2	2,6	1,8	0,7	0,9	2,2
Messreihe 3	3,2	1,5	4,5	0,9	0,1
Messreihe 4	0,5	0,4	0,1	0,1	0,3
Messreihe 5	12,1	1,5	1,5	1,6	0,8
Messreihe 6	2,5	2,9	0,1	0,4	1,1
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	3,9	1,8	1,3	0,8	1,8

Tabelle 9-23: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale der Lactosesignale Lac-1a und Lac-1b, die mithilfe eines eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiments (Pulssequenz „noesygppr1d“, 64 Scans, $D_1=2,0$ s) bestimmt wurden. Die Messreihe wurde an sechs verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle sechs Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Lac-1a	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	0,9	1,6	0,8	1,2	2,6
Messreihe 2	0,6	0,3	1,7	1,5	1,4
Messreihe 3	1,7	1,4	2,3	0,4	1,7
Messreihe 4	1,0	0,3	0,4	0,1	0,7
Messreihe 5	2,8	1,0	1,6	1,0	0,6
Messreihe 6	1,0	1,2	0,2	0,2	0,3
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	1,3	1,0	1,2	0,7	1,2
Lac-1b					
Messreihe 1	1,1	0,6	1,6	0,5	7,9
Messreihe 2	1,6	0,2	1,6	1,2	2,2
Messreihe 3	0,6	3,8	1,4	2,4	0,1
Messreihe 4	0,9	0,4	0,4	0,4	0,3
Messreihe 5	10,7	0,6	2,8	1,7	0,8
Messreihe 6	1,0	0,4	0,5	0,4	1,4
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	2,7	1,0	1,4	1,1	2,1

Tabelle 9-24: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des D-Glucosesignals Glc-2 und des D-Fructosesignals Fru-2 bei der Verwendung eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment, das mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F₂ und F₁, einem D₁-Delay von 1,5 s sowie einem *Non-Uniform Sampling* Anteil von 50 % durchgeführt wurde. Die Bestimmung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messreihe wurde an sechs verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle sechs Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Glc-2	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	0,1	1,2	0,6	1,1	2,8
Messreihe 2	0,7	1,5	1,9	3,0	1,5
Messreihe 3	3,0	3,4	0,2	0,4	2,7
Messreihe 4	3,0	1,5	1,1	0,6	2,8
Messreihe 5	4,1	1,2	0,4	1,8	1,4
Messreihe 6	3,8	2,5	2,6	0,8	0,8
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	4,4	2,2	3,9	4,8	3,5
Fru-2					
Messreihe 1	11,6	1,9	2,8	2,3	3,0
Messreihe 2	4,0	4,5	0,8	3,7	1,1
Messreihe 3	12,7	4,0	0,8	1,5	5,5
Messreihe 4	1,9	0,7	2,1	1,4	3,7
Messreihe 5	4,3	2,3	2,3	1,0	1,3
Messreihe 6	5,5	2,4	2,2	1,2	2,0
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	9,4	3,7	4,9	4,6	5,0

Tabelle 9-25: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des D-Galactosesignals Gal-2 und des Saccharosesignals Sacc-2 bei der Verwendung eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments, das mit der Pulssequenz „hsqetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie einem *Non-Uniform Sampling* Anteil von 50 % durchgeführt wurde. Die Bestimmung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messreihe wurde an sechs verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle sechs Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Gal-2	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	3,3	2,2	0,5	1,2	2,7
Messreihe 2	6,2	1,9	1,4	2,5	1,4
Messreihe 3	9,0	1,9	0,5	1,5	1,9
Messreihe 4	3,3	3,5	1,4	0,1	2,6
Messreihe 5	4,5	2,7	1,0	1,8	0,9
Messreihe 6	2,9	3,6	2,3	1,0	1,3
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	6,6	2,8	3,7	4,9	3,8
Sacc-2					
Messreihe 1	7,7	2,1	3,2	1,9	2,6
Messreihe 2	9,3	4,9	1,2	2,2	0,3
Messreihe 3	9,9	5,0	1,9	2,1	2,0
Messreihe 4	3,8	1,7	0,5	1,3	2,7
Messreihe 5	8,2	2,0	2,7	2,0	1,0
Messreihe 6	8,9	1,3	4,1	1,4	1,3
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	8,6	3,9	4,4	5,2	3,0

Tabelle 9-26: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des Lactosesignals Lac-2 und des Maltosesignals Mal-2 bei der Verwendung eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments, das mit der Pulssequenz „hsqetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie einem *Non-Uniform Sampling* Anteil von 50 % durchgeführt wurde. Die Bestimmung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messreihe wurde an sechs verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle sechs Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Lac-2	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	8,0	2,8	2,5	0,9	1,7
Messreihe 2	3,4	4,9	0,8	3,1	1,7
Messreihe 3	5,7	1,6	4,1	2,5	2,4
Messreihe 4	5,7	2,6	1,5	1,4	2,7
Messreihe 5	5,6	4,3	2,7	2,2	1,9
Messreihe 6	1,4	4,8	2,0	0,0	2,3
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	6,2	5,3	3,3	4,6	2,5
Mal-2					
Messreihe 1	3,7	4,3	4,1	2,0	2,9
Messreihe 2	0,9	2,7	0,6	2,0	2,7
Messreihe 3	3,6	3,9	1,0	1,6	1,1
Messreihe 4	2,3	2,1	0,7	0,9	3,4
Messreihe 5	10,0	0,6	2,3	1,5	0,9
Messreihe 6	4,5	1,6	2,5	1,4	0,5
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	6,5	3,5	4,2	4,6	3,5

Tabelle 9-27: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des D-Glucosesignals Glc-2, des D-Fructosesignals Fru-2 und des D-Galactosesignals Gal-2, die mithilfe der *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methode ermittelt wurden. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „*asap_hsqc_sp_bruker*“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 sowie einem *Non-Uniform Sampling*-Anteil von 50 % durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messreihe wurde an drei verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle drei Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Glc-2	Messpräzision [%]				
	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	9,3	5,2	2,2	3,7	3,7
Messreihe 2	11,0	6,0	5,0	2,6	3,0
Messreihe 3	9,7	2,1	1,6	6,4	3,8
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	8,9	6,8	4,0	6,0	4,8
Fru-2					
Messreihe 1	18,3	10,5	6,8	2,5	4,0
Messreihe 2	14,5	7,1	8,3	2,9	3,3
Messreihe 3	54,4	4,1	4,9	11,6	7,5
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	40,1	11,9	10,1	8,2	4,9
Gal-2					
Messreihe 1	15,6	11,0	3,1	4,3	2,4
Messreihe 2	28,1	4,1	7,4	2,8	1,7
Messreihe 3	4,4	2,8	1,6	6,1	1,7
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	23,1	8,8	6,0	5,4	4,9

Tabelle 9-28: Angabe der Messpräzision und der zeitlichen Stabilität der Messmethode der Integrale des Saccharosesignals Sacc-2, des Lactosesignals Lac-2 und des Maltosesignals Mal-2, die mithilfe der *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Methode ermittelt wurden. Die Messungen wurden mit der Pulssequenz „*asap_hsqc_sp_bruker*“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 sowie einem *Non-Uniform Sampling*-Anteil von 50 % durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte durch Verhältnisbildung zur internen Standardsubstanz D-Allose. Die Messreihe wurde an drei verschiedenen Tagen in Dreifachbestimmung für jede Einzelkonzentration (c) durchgeführt. Aus den einzelnen Messreihen wurde die Messpräzision als Variationskoeffizient der Integrale bestimmt. Alle drei Messreihen wurden zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Messmethode verwendet, die als Variationskoeffizient der Integrale aller Messreihen bestimmt wurde. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Messpräzision [%]					
Sacc-2	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
Messreihe 1	13,9	4,8	1,3	6,3	1,8
Messreihe 2	8,7	7,3	2,8	2,9	3,2
Messreihe 3	55,7	2,4	0,5	3,9	3,3
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	41,6	4,7	4,2	5,0	4,0
Lac-2					
Messreihe 1	5,5	8,4	7,7	6,3	2,7
Messreihe 2	12,3	3,3	4,0	3,2	4,4
Messreihe 3	7,5	7,3	8,8	8,2	6,7
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	11,4	6,9	7,0	9,3	5,4
Mal-2					
Messreihe 1	18,4	6,5	5,2	3,8	1,1
Messreihe 2	7,9	7,0	1,6	3,9	4,2
Messreihe 3	37,5	7,1	4,0	3,3	4,1
Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]	27,3	6,4	4,0	3,6	4,7

Tabelle 9-29: Integralverhältnisse der jeweiligen Analyten bei Lagerung der Kalibrierlösungen über 36 Tage. Zur Beurteilung wurden die Verhältnisse zwischen den ermittelten Integralen an Tag 7 (I_7/I_1), Tag 15 (I_{15}/I_1) und Tag 36 (I_{36}/I_1) jeweils zum Integral an Tag 1 gebildet. Die Messungen wurden mit dem eindimensionalen Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)-Experiment „noesygppr1d“ mit 64 Scans und $D_1=2,0$ s anhand von Carrez-geklärten Kalibrierlösungen des Analytgemischs 1 der angegebenen Einzelkonzentrationen (c) durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Glc-1	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
I_7/I_1 [%]	94,7	97,7	96,3	89,0	98,2
I_{15}/I_1 [%]	98,3	103,2	101,6	92,3	105,4
I_{36}/I_1 [%]	91,7	94,5	98,0	89,6	101,5
Sacc-1					
I_7/I_1 [%]	119,7	102,3	103,6	105,1	101,5
I_{15}/I_1 [%]	120,4	99,8	103,8	111,5	108,7
I_{36}/I_1 [%]	107,3	102,4	99,4	102,7	96,1
Lac-1a					
I_7/I_1 [%]	97,8	97,7	100,3	101,9	99,6
I_{15}/I_1 [%]	103,7	102,3	104,3	106,8	106,6
I_{36}/I_1 [%]	99,8	100,9	101,5	103,0	104,5
Lac-1b					
I_7/I_1 [%]	97,0	98,6	96,6	102,4	97,0
I_{15}/I_1 [%]	107,3	107,0	107,6	113,8	104,6
I_{36}/I_1 [%]	106,3	101,9	104,6	107,5	103,1

Tabelle 9-30: Integralverhältnisse der jeweiligen Analyten bei Lagerung der Kalibrierlösungen über 36 Tage. Zur Beurteilung wurden die Verhältnisse zwischen den ermittelten Integralen an Tag 7 (I_7/I_1), Tag 15 (I_{15}/I_1) und Tag 36 (I_{36}/I_1) jeweils zum Integral an Tag 1 gebildet. Die Messungen wurden mit einem *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkte in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie einem *Non-Uniform Sampling* Anteil von 50 % anhand von Carrez-geklärten Kalibrierlösungen des Analytgemischs 1 der angegebenen Einzelkonzentrationen (c) durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Glc-2	c = 1,0 g/L	c = 2,5 g/L	c = 5,0 g/L	c = 7,5 g/L	c = 10,0 g/L
I_7/I_1 [%]	102,8	98,8	97,8	99,1	99,7
I_{15}/I_1 [%]	99,0	95,2	93,3	97,4	100,3
I_{36}/I_1 [%]	101,0	98,7	95,8	100,4	99,0
Fru-2					
I_7/I_1 [%]	114,5	99,1	96,5	103,6	101,3
I_{15}/I_1 [%]	104,3	101,6	93,3	100,9	102,5
I_{36}/I_1 [%]	100,3	99,5	95,7	103,4	102,3
Gal-2					
I_7/I_1 [%]	103,6	93,8	97,6	96,0	99,7
I_{15}/I_1 [%]	100,5	90,4	95,0	95,3	99,7
I_{36}/I_1 [%]	94,9	90,1	96,0	98,5	98,6
Sacc-2					
I_7/I_1 [%]	97,4	102,6	94,5	97,1	95,5
I_{15}/I_1 [%]	76,1	98,9	96,6	92,8	95,6
I_{36}/I_1 [%]	84,3	108,6	94,8	97,1	94,1
Lac-2					
I_7/I_1 [%]	105,7	103,8	101,0	100,3	106,4
I_{15}/I_1 [%]	103,5	102,5	100,9	105,2	107,1
I_{36}/I_1 [%]	102,1	106,6	97,5	105,3	105,8
Mal-2					
I_7/I_1 [%]	106,8	103,1	96,5	98,6	99,8
I_{15}/I_1 [%]	91,6	97,4	93,1	96,3	99,6
I_{36}/I_1 [%]	97,1	101,1	94,9	98,7	97,6

Tabelle 9-31: Nachweisgrenzen, die bei der Verwendung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten und *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-(HSQC)-Experimenten ermittelt wurden (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Die Messungen wurden anhand von Carrez-geklärten Kalibrierlösungen des Analytgemischs 1 durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-1 entnommen werden. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, NUS: *Non-Uniform Sampling*

	Nachweisgrenze [mg/L]					
	Glc-2	Fru-2	Gal-2	Sacc-2	Lac-2	Mal-2
HSQC, $D_1=1,5$ s	66,9	43,4	72,6	68,8	61,5	87,5
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	15,5	11,7	27,1	12,6	4,2	148,9
HSQC, $D_1=3,0$ s	9,6	7,6	5,0	27,0	8,3	383,6
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	9,2	17,1	4,3	7,5	17,5	58,3
ASAP-HSQC	21,6	45,6	30,1	23,0	15,6	247,4
ASAP-HSQC, 50 % NUS	13,1	51,9	243,0	15,6	20,4	263,3

Tabelle 9-32: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der Verwendung des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments, das mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 und einem D_1 -Delay von 1,5 s durchgeführt wurde. Die Analyten liegen in Pufferlösung vor. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-2 entnommen werden. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Ruf generiert und neu ausgewertet (Ruf, 2020). Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, IM: Isomaltulose

	Nachweisgrenze [mg/L]						
	Glc-2	Fru-4	Gal-2	Sacc-2	Lac-4	Mal-2	IM-4
HSQC, $D_1=1,5$ s	95,0	207,2	126,0	140,8	172,0	53,4	116,9
Bestimmungsgrenze [g/L]							
HSQC, $D_1=1,5$ s	0,37	0,81	0,49	0,55	0,67	0,21	0,46

9.3.7 Methodenvergleich

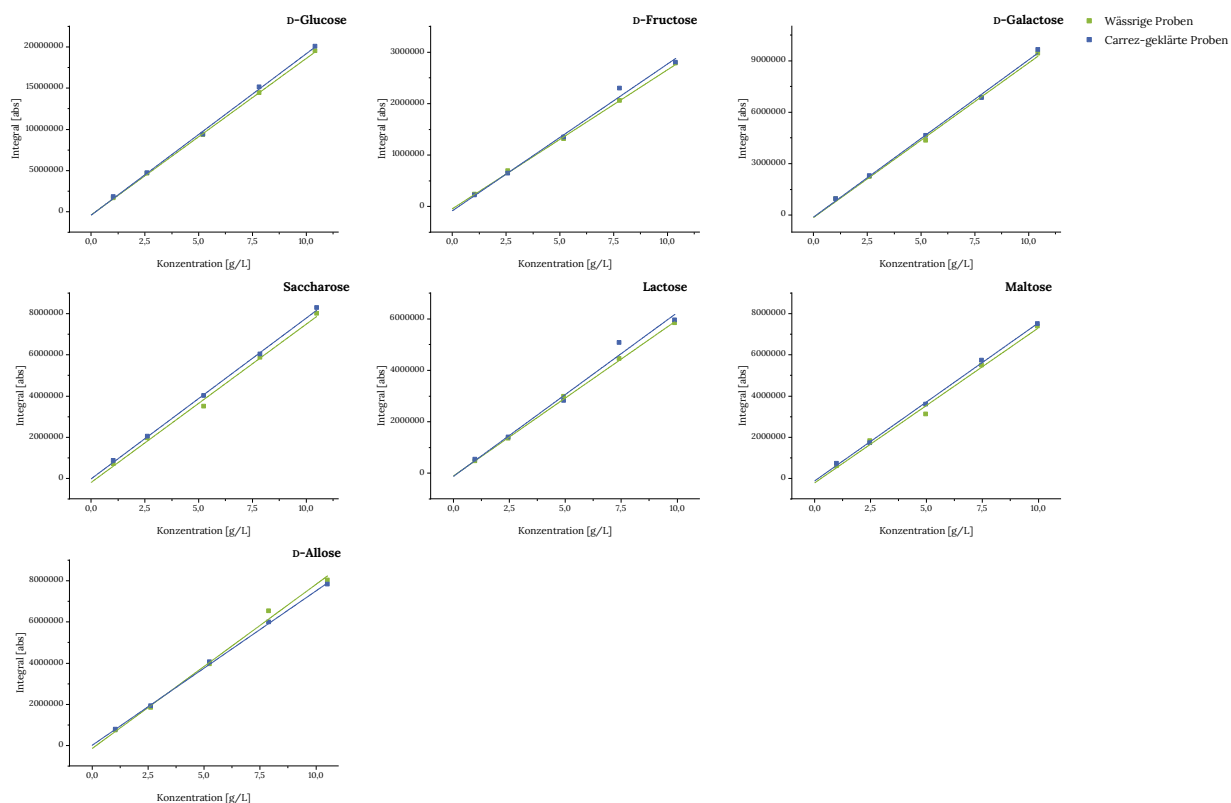


Abbildung 9-8: Vergleich der Ergebnisse zweier Messreihen, die mit (Carrez-geklärte Proben, blau) und ohne Carrez-Klärung (Wässrige Proben, grün) behandelt wurden. Die Messungen wurden mit einem *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment der Pulssequenz „*hsqcetgp*“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie einem *Non-Uniform Sampling* (NUS) Anteil von 50 % durchgeführt. Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2, Sacc-2, Lac-2 und Mal-2 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 9-33: Vergleich der Güte der Anpassungsfunktionen der Messungen von Analytgemisch 1 ohne Carrez-Klärung und mit durchgeführter Carrez-Klärung. Die Proben wurden mithilfe eines *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Experiments mit der Pulssequenz „*hsqcetgp*“, zwei Scans, 1024 Datenpunkten in F_2 und F_1 , einem D_1 -Delay von 1,5 s sowie 50 % *Non-Uniform Sampling*-Anteil gemessen. Details zu den verwendeten Signalen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. R-Wert: Korrelationskoeffizient, v_{xo} : relative Verfahrensstandardabweichung, Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, All: D-Allose

	Aufarbeitung ohne Carrez-Klärung			Aufarbeitung mit Carrez-Klärung		
	Steigung	R-Wert	v_{xo} [%]	Steigung	R-Wert	v_{xo} [%]
Glc-2	1899885	0,9999	1,5	1959242	0,9995	3,1
Fru-2	269917	0,9995	2,9	285001	0,9962	8,2
Gal-2	900626	0,9990	4,2	915532	0,9991	4,1
Sacc-2	768382	0,9978	6,3	780399	0,9996	2,7
Lac-2	606376	0,9996	2,8	636684	0,9926	11,4
Mal-2	753398	0,9964	8,0	768168	0,9994	3,3
All-2	828721	0,9971	7,2	750355	0,9996	2,6

Tabelle 9-34: Angabe der Präzision nach Dreifachbestimmung als Variationskoeffizient von Lactose in Vollmilch (A), Lactose in fettarmer Milch (B), Lactose in Buttermilch (C), Lactose in saurer Sahne (D) und D-Glucose in lactosefreier Milch (E). Neben den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) wurde ein eindimensionales *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (1D-NOESY)*-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signale Lac-1b und Glc-1 siehe Tabelle 4-1) verwendet. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Victoria Merdian erhalten (Merdian, 2019) und neu ausgewertet.

Methode	Variationskoeffizient [%]				
	A	B	C	D	E
Enzymatik	1,9	8,2	0,8	0,9	0,9
HPAEC-PAD	3,1	8,1	3,0	2,3	1,6
1D-NOESY, $D_1=3,0$ s	5,0	3,0	0,3	3,4	2,4

Tabelle 9-35: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Lactose durch Aufstockung einer Vollmilch sowie für die Analyse von D-Glucose und D-Galactose durch Aufstockung einer lactosefreien Milch ermittelt wurden. Im oberen Abschnitt der Tabelle sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs dargestellt, bei dem die Proben mithilfe der Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experimenten mit verschiedenen D_1 -Delays (weitere Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Glc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert wurden.

Im unteren Abschnitt der Tabelle sind die Ergebnisse dargestellt, die mithilfe der Referenzmethoden Enzymatik und HPAEC-PAD sowie Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert wurden (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2, Glc-2 und Gal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden.

Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben.

Methode	WF [%] ± SW [%]		
	Lactose in Vollmilch	D-Glucose in lactosefreier Milch	D-Galactose in lactosefreier Milch
Enzymatik	-	93,2 ± 1,0	-
HPAEC-PAD	-	93,8 ± 11,5	-
1D-NOESY, $D_1=3,0$ s	-	85,5 ± 2,9	-
1D-NOESY, $D_1=5,0$ s	-	85,7 ± 3,2	-
1D-NOESY, $D_1=10,0$ s	-	85,5 ± 3,1	-
Enzymatik	97,1 ± 9,7	93,2 ± 1,0	93,2 ± 6,5
HPAEC-PAD	97,7 ± 10,9	93,8 ± 11,5	90,2 ± 11,7
HSQC, $D_1=1,5$ s	89,2 ± 7,0	86,8 ± 1,9	86,1 ± 3,6
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	92,9 ± 0,5	87,8 ± 2,0	87,0 ± 2,2
HSQC, $D_1=3,0$ s	93,5 ^A ± 3,5	89,0 ± 2,8	87,8 ± 4,8
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	91,1 ± 4,9	89,5 ± 1,7	89,6 ± 4,0
ASAP-HSQC	97,5 ± 2,6	84,8 ± 3,6	86,1 ± 12,7
ASAP-HSQC, 50 % NUS	93,9 ± 3,7	79,3 ± 4,4	79,7 ± 4,5

Tabelle 9-36: Angabe der Präzision nach Dreifachbestimmung als Variationskoeffizient von Lactose in Vollmilch, D-Glucose in lactosefreier Milch und D-Galactose in lactosefreier Milch Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie einem eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment mit verschiedenen D_1 -Delays (weitere Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Glc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert. Zudem wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2, Glc-2 und Gal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Methode	Variationskoeffizient [%]		
	Lactose in Vollmilch	D-Galactose in lactosefreier Milch	D-Glucose in lactosefreier Milch
Enzymatik	3,3	4,9	4,3
HPAEC-PAD	7,2	12,2	10,9
1D-NOESY, $D_1=3,0$ s	-	-	4,4
1D-NOESY, $D_1=5,0$ s	-	-	6,4
1D-NOESY, $D_1=10,0$ s	-	-	4,2
HSQC, $D_1=1,5$ s	1,9	1,1	7,2
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	3,6	3,3	1,3
HSQC, $D_1=3,0$ s	1,7	4,2	5,9
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	0,9	4,5	3,6
ASAP-HSQC	1,3	27,9	14,4
ASAP-HSQC, 50 % NUS	1,2	5,5	5,5

Tabelle 9-37: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose und Maltose durch Aufstockung eines Kakaogetränks auf Milchbasis ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) analysiert. Zudem wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments verwendet (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2 und Mal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: Non-Uniform Sampling

Kakaogetränk auf Milchbasis				
WF [%] ± SW [%]				
	D-Glucose	D-Fructose	D-Galactose	Maltose
Enzymatik	84,8 ± 3,7	72,9 ± 3,3	83,2 ± 1,5	71,2 ± 4,1
HPAEC-PAD	78,4 ± 5,3	67,4 ± 3,8	79,3 ± 5,0	98,2 ± 6,4
HSQC, D_i=1,5 s	85,2 ± 4,6	80,0 ± 5,2	84,2 ± 5,2	84,1 ± 7,9
HSQC, D_i=1,5 s, 50 % NUS	84,1 ± 3,7	76,5 ± 1,4	83,2 ± 3,9	85,5 ± 2,2
HSQC, D_i=3,0 s	83,1 ± 5,0	80,1 ± 3,0	84,5 ± 1,3	80,4 ± 0,6
HSQC, D_i=3,0 s, 50 % NUS	82,6 ± 5,5	77,9 ± 4,0	84,5 ± 3,2	80,1 ± 1,9
ASAP-HSQC	86,3 ± 6,2	78,5 ± 6,6	87,2 ± 2,3	84,9 ± 1,9
ASAP-HSQC, 50 % NUS	86,0 ± 1,9	81,1 ± 9,9	80,5 ± 4,9	80,1 ± 5,0

Tabelle 9-38: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose und Maltose durch Aufstockung eines Milchmodiggetränk mit Erdbeergeschmack ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) analysiert. Zudem wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments verwendet (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Glc-2, Fru-2, Gal-2 und Mal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: Non-Uniform Sampling

Milchmischgetränk mit Erdbeergeschmack				
WF [%] ± SW [%]				
	D-Glucose	D-Fructose	D-Galactose	Maltose
Enzymatik	84,8 ± 16,7	89,2 ± 18,0	77,1 ± 13,8	67,0 ± 18,7
HPAEC-PAD	84,7 ± 9,2	73,8 ± 9,3	82,1 ± 4,3	99,9 ± 12,7
HSQC, D_i=1,5 s	77,8 ± 15,2	72,2 ± 13,4	75,8 ± 10,9	71,4 ± 10,8
HSQC, D_i=1,5 s, 50 % NUS	83,0 ± 3,1	77,6 ± 6,3	80,8 ± 2,3	80,4 ± 6,0
HSQC, D_i=3,0 s	87,5 ± 5,4	86,3 ± 8,0	85,9 ± 4,9	80,4 ± 6,6
HSQC, D_i=3,0 s, 50 % NUS	86,9 ± 6,0	77,1 ± 2,6	84,1 ± 6,6	80,2 ± 4,3
ASAP-HSQC	78,7 ± 15,4	64,7 ± 14,3	78,0 ± 11,3	74,5 ± 9,3
ASAP-HSQC, 50 % NUS	81,6 ± 16,5	79,5 ± 25,3	67,9 ± 12,8	72,3 ± 18,2

Tabelle 9-39: Angabe der Präzision nach Dreifachbestimmung als Variationskoeffizient von Lactose und Saccharose in einem Kakaotrunk auf Milchbasis und einem Milchkochgetränk mit Erdbeergeschmack. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie einem eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signale Lac-1b und Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) analysiert. Des Weiteren wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2 und Sacc-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Methode	Variationskoeffizient [%] Kakaotrunk auf Milchbasis		Variationskoeffizient [%] Milchkochgetränk mit Erdbeergeschmack	
	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose
Enzymatik	5,3	4,7	5,9	6,6
HPAEC-PAD	10,4	16,4	4,1	6,1
1D-NOESY, $D_1=3,0$ s	3,2	23,8	9,9	4,1
HSQC, $D_1=1,5$ s	7,5	6,0	8,0	4,2
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	6,4	12,8	4,3	5,6
HSQC, $D_1=3,0$ s	7,7	4,6	9,1	12,3
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	6,5	8,4	3,9	10,6
ASAP-HSQC	12,7	13,6	11,9	16,4
ASAP-HSQC, 50 % NUS	6,7	0,8	6,2	2,6

Tabelle 9-40: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von D-Fructose, Lactose und Maltose durch Aufstockung eines lactosefreien Kakaotrinks auf Milchbasis ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit einem eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Lac-1b siehe Tabelle 4-1) analysiert. Zudem wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments verwendet (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Fru-2, Lac-2 und Mal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Kakaotrunk auf Milchbasis, lactosefrei

WF [%] ± SW [%]

	D-Fructose	Lactose	Maltose
Enzymatik	75,7 ± 5,7	85,9 ± 4,5	70,3 ± 3,5
HPAEC-PAD	77,5 ± 7,1	76,2 ± 3,8	96,5 ± 2,2
1D-NOESY, D₁=2,0 s	-	93,0 ± 2,5	-
HSQC, D₁=1,5 s	85,3 ± 3,5	84,2 ± 1,8	83,9 ± 3,4
HSQC, D₁=1,5 s, 50 % NUS	76,8 ± 7,5	84,1 ± 8,6	82,4 ± 2,2
HSQC, D₁=3,0 s	89,1 ± 11,7	78,5 ± 1,3	80,2 ± 5,2
HSQC, D₁=3,0 s, 50 % NUS	83,8 ± 7,9	71,3 ± 3,4	77,4 ± 6,3
ASAP-HSQC	76,0 ± 2,7	85,1 ± 5,8	78,8 ± 6,3
ASAP-HSQC, 50 % NUS	85,8 ± 5,8	92,5 ± 0,7	84,1 ± 2,5

Tabelle 9-41: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Lactose und Maltose durch Aufstockung einer Fruchtbuttermilch in der Geschmacksrichtung Mango ermittelt wurden. Nach Dreifachbestimmung wird die Standardabweichung (SW) als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit einem eindimensionalen *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Lac-1b siehe Tabelle 4-1) analysiert. Zudem wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Lac-2 und Mal-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: *Non-Uniform Sampling*

	Fruchtbuttermilch	
	WF [%] ± SW [%]	
	Lactose	Maltose
Enzymatik	90,0 ± 4,7	80,9 ± 4,2
HPAEC-PAD	74,6 ± 6,6	96,5 ± 14,7
1D-NOESY, D ₁ =2,0 s	80,7 ± 1,8	-
HSQC, D ₁ =1,5	83,3 ± 8,1	87,6 ± 3,0
HSQC, D ₁ =1,5 s, 50 % NUS	73,9 ± 6,8	83,7 ± 3,5
HSQC, D ₁ =3,0 s	78,7 ± 9,8	88,4 ± 2,4
HSQC, D ₁ =3,0 s, 50 % NUS	77,3 ± 11,4	85,1 ± 1,6
ASAP-HSQC	74,6 ± 2,9	73,3 ± 4,1
ASAP-HSQC, 50 % NUS	86,8 ± 11,5	86,5 ± 8,5

Tabelle 9-42: Angabe der Präzision nach Dreifachbestimmung als Variationskoeffizient von Saccharose (Sacc), D-Glucose (Glc) und D-Galactose (Gal) in einem lactosefreien Kakaotränk auf Milchbasis sowie von Sacc, Glc, Gal und D-Fructose (Fru) in einer Fruchtbuttermilch der Geschmacksrichtung Mango. Neben den Referenzmethoden Enzymatik und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) wurde ein eindimensionales *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)-Experiment (Messparameter siehe Tabelle 4-6, Signal Sacc-1 siehe Tabelle 4-1) verwendet. Zudem wurden Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments und des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen Sacc-2, Glc-2, Gal-2 und Fru-2 können Tabelle 4-1 entnommen werden. Die Quantifizierung erfolgte bei Durchführung der HPAEC-PAD-Methode sowie aller HSQC- und ASAP-HSQC-Methoden durch Verhältnisbildung mit der internen Standardsubstanz D-Allose. NUS: *Non-Uniform Sampling*

Methode	Variationskoeffizient [%] Lactosefreies Kakaotränk auf Milchbasis			Variationskoeffizient [%] Fruchtbuttermilch Mango			
	Sacc	Glc	Gal	Sacc	Glc	Gal	Fru
Enzymatik	20,4	8,3	3,4	1,0	4,3	5,5	3,6
HPAEC-PAD	10,9	8,5	9,1	2,7	1,8	2,2	13,4
1D-NOESY, $D_1=3,0$ s	5,7	-	-	4,6	-	-	-
HSQC, $D_1=1,5$ s	14,4	7,4	5,1	2,8	1,3	7,2	73,4
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	0,4	4,6	2,8	0,6	3,0	5,4	16,9
HSQC, $D_1=3,0$ s	7,0	3,0	6,9	8,2	1,3	7,3	7,2
HSQC, $D_1=3,0$ s, 50 % NUS	7,1	4,7	8,8	1,8	3,0	2,5	6,5
ASAP-HSQC	29,6	9,5	12,6	3,8	4,9	19,5	49,9
ASAP-HSQC, 50 % NUS	32,0	9,3	12,2	5,1	3,2	14,8	7,9

Tabelle 9-43: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N) ausgewählter Signale (siehe Tabelle 4-2) bei der Anwendung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten mit verschiedenen D_1 -Delays sowie Kopplung mit *Non-Uniform Sampling* (NUS) und *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experimenten (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Die Messungen wurden an Proben mit der kleinsten Konzentration (c) des festgelegten Arbeitsbereichs durchgeführt. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, IM: Isomaltulose, Mlt: Maltulose

S/N		c= 1,0 g/L			c=4,0 g/L	
Analyt	Signal	HSQC, $D_1=1,5$ s	HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	HSQC, $D_1=6,0$ s, 50 % NUS	ASAP-HSQC	ASAP-HSQC, 50 % NUS
D-Glucose	Glc-2	25	29	33	24	15
D-Fructose	Fru-4	9	8	10	11	10
D-Galactose	Gal-2	32	33	35	31	23
Saccharose	Sacc-2	29	30	32	33	26
Lactose	Lac-4	9	11	10	10	9
Maltose	Mal-2	17	18	19	24	18
Isomaltulose	IM-4	19	21	22	10	13
Maltulose	Mlt-4a	80	89	97	26	16
	Mlt-4b	120	140	142	24	9

Tabelle 9-44: Angabe der Präzision als Variationskoeffizient der beiden Messreihen zur Bestimmung von Isomaltulose (IM), D-Glucose (Glc) und D-Fruktose (Fru) in der Probe „Multicarbogel“. Alle Messungen wurden, falls nicht gesondert gekennzeichnet, in Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Referenz- und Vergleichsmethoden wurden Enzymatik, Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) und Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) verwendet. Zudem wurden Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedenen D_1 -Delays sowie Kopplung mit Non-Uniform Sampling (NUS) und des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments durchgeführt (Messparameter siehe Tabelle 4-6). Details zu den verwendeten Signalen IM-4, Glc-2 und Fru-4 können Tabelle 4-2 entnommen werden. Als interne Standardsubstanz wurde bei der HPAEC-PAD-Methode L-Arabinose, bei der GC-FID-Methode Phenyl- β -D-glucopyranosid und bei den NMR-spektroskopischen Methoden Maltulose (HSQC-Methoden: Signal Mlt-4b, ASAP-HSQC-Methoden: Signal Mlt-4a, siehe Tabelle 4-2) verwendet. Die Messungen „Multicarbogel“ (Datensatz Franziska Ruf) wurden im Rahmen einer Masterarbeit erhalten (Ruf, 2020).

Methode	Variationskoeffizient [%] „Multicarbogel“ (Datensatz Franziska Ruf)			Variationskoeffizient [%] „Multicarbogel“		
	IM	Glc	Fru	IM	Glc	Fru
Enzymatik	-	0,01 [‡]	0,9 [‡]	-	-	-
GC-FID	0,2 [‡]	0,2 [‡]	0,6 [‡]	-	-	-
HPAEC-PAD	0,2 [‡]	2,3 [‡]	0,5 [‡]	4,5	2,1	0,8
HSQC, $D_1=1,5$ s	1,9	4,3	2,7	8,0	10,2	1,6
HSQC, $D_1=1,5$ s, 50 % NUS	-	-	-	4,7	5,3	9,8
HSQC, $D_1=6,0$ s	3,1	1,4	-	-	-	-
HSQC, $D_1=6,0$ s, 50 % NUS	-	-	-	0,2	8,0	11,4
ASAP-HSQC	-	-	-	12,5	15,6	28,9
ASAP-HSQC, 50 % NUS	-	-	-	10,8	12,5	10,7

[‡]: Angabe der halben Spannweite zweier Messwerte, da die Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

9.4 Weiterführende Angaben zu den auflösungsoptimierten NMR-spektroskopischen Methoden

Tabelle 9-45: Übersicht der zur Quantifizierung verwendeten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen δ im *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment und der Kennzeichnung in der jeweiligen Struktur. Die Signale wurden bei der Durchführung der Methodvalidierung sowie der Quantifizierung der Oligosaccharide der Raffinose-Familie in Leguminosen verwendet (siehe Tabelle 4-13). Fructose wird in der Haworth-Projektion angegeben, alle weiteren Strukturen in der Reeves-Schreibweise. Es werden zudem Angaben zur Position des betrachteten Kerns im Analyten, der Konfiguration (α, β) sowie der Ringgröße (p=Pyranose, f=Furanose) der entsprechenden Monosaccharideinheit gegeben.

Analyt	Signalbezeichnung	Signalzuordnung		Struktur
		δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	
D-Glucose	Glc-5a	C5H5 $_{\beta}$ (p) + C3H3 $_{\beta}$ (p)	3,45 / 3,47 76,57 / 76,39	
	Glc-5b	C1H1 $_{\alpha}$ (p)	5,22 92,72	
D-Galactose	Gal-5	C5H5 $_{\beta}$ (p)	3,69 75,79	
D-Fructose	Fru-5a	C1H1 $_{\alpha}$ (f)	3,54 64,51	
	Fru-5b	C1H1 $_{\alpha}$ (f)	3,69 64,51	
Saccharose	Sacc-5a	Glc-C4H4	3,46 69,83	
	Sacc-5b	Glc-C5H5	3,83 73,01	

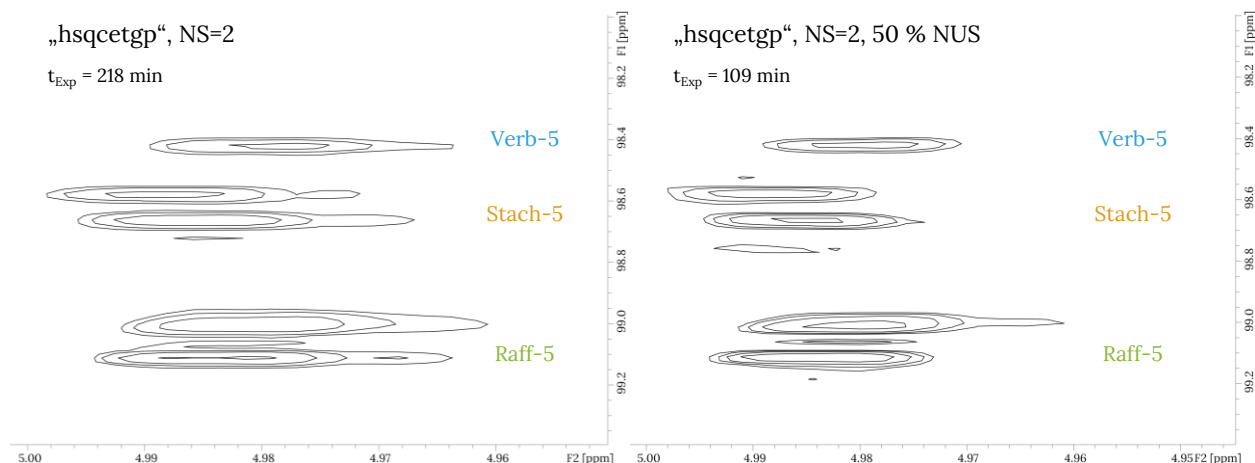


Abbildung 9-9: Ausschnitte der Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektren, die die Signale der Analyten Raffinose (Raff-5), Stachyose (Stach-5) und Verbasose (Verb-5) gemäß der Signalauswahl in Tabelle 4-13 zeigen. Alle Experimente wurden mit der Pulssequenz „hsqcetgp“, zwei Scans (NS=2) sowie und 1024 Datenpunkten in F_2 und 4096 Datenpunkten in F_1 durchgeführt. Zusätzlich wird bei Verwendung von *Non-Uniform Sampling* (NUS) der NUS-Anteil sowie die Dauer des Experiments (t_{Exp}) angegeben. Als Probe wurde eine in Deuteriumoxid gelöste Mischung aller zur Analyse verwendeten Mono- und Oligosaccharide der Konzentration 4,0 g/L verwendet.

Tabelle 9-46: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N) ausgewählter Signale (siehe Tabelle 4-13) bei der Anwendung von Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experimenten mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling* (NUS)-Kopplung sowie *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experimenten. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen wurden ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % verwendet. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Die Messungen wurden an in Deuteriumoxid gelösten Mischungen der Analyten mit der angegebenen Konzentration (c) durchgeführt. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*; Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Raff: Raffinose, Stach: Stachyose, Verb: Verbasose

S/N	Analyt	Signal	c= 1,0 g/L		c=3,1 g/L	
			HSQC, NS=2	HSQC, NS=4, 50 % NUS	ASAP-HSQC	lowCost-ASAP- HSQC
D-Glucose		Glc-5a	39	74	12	11
		Glc-5b	60	99	23	26
D-Fructose		Fru-4a	95	172	35	35
		Fru-5b	91	198	35	37
D-Galactose		Gal-5	32	62	11	11
Saccharose		Sacc-5a	39	68	15	12
		Sacc-5a	27	52	19	12
Raffinose		Raff-5	34	63	23	21
Stachyose		Stach-5	29	55	19	19
Verbasose		Verb-5	18	33	11	11

Tabelle 9-47: Angabe der zeitlichen Stabilität der Messmethode als Variationskoeffizienten der Integrale, die in drei unabhängigen Messreihen ermittelt wurden. Dabei wurden die Integrale der D-Glucosesignale (Glc-5a, Glc-5b), der D-Fructosesignale (Fru-5a, Fru-5b sowie ihre Summe), des D-Galactosesignals (Gal-5), der Saccharosesignale (Sacc-5a, Sacc-5b), des Raffinosesignals (Raff-5), des Stachyosesignals (Stach-5) und des Verbascosesignals (Verb-5) verwendet (Signalauswahl siehe Tabelle 4-13). Die Proben der angegebenen Konzentration (c) je Analyt wurden mit *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling* (NUS)-Kopplung sowie *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experimenten analysiert. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen wurden ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % verwendet. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*

		Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]				
		c = 1,1 g/L	c = 3,1 g/L	c = 4,7 g/L	c = 6,2 g/L	c = 7,8 g/L
Glc-5a	HSQC, NS=2	79,4	5,5	8,3	4,4	3,3
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	8,3	2,4	7,8	5,4	3,5
	ASAP-HSQC	-	44,4	38,8	25,6	23,4
	lowCost-ASAP	-	12,2	17,1	8,1	5,3
Glc-5b	HSQC, NS=2	89,2	4,4	5,1	3,2	3,9
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	7,6	1,7	5,0	3,3	2,3
	ASAP-HSQC	-	106,1	18,6	13,8	9,3
	lowCost-ASAP	-	4,5	4,9	13,1	6,5
Fru-5a	HSQC, NS=2	80,3	3,4	5,3	2,8	2,3
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	13,2	2,3	6,1	4,4	1,6
	ASAP-HSQC	-	20,8	19,3	19,3	11,9
	lowCost-ASAP	-	27,8	13,1	1,9	9,8
Fru-5b	HSQC, NS=2	79,8	4,0	7,9	4,7	2,4
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	11,5	2,3	7,7	4,3	2,8
	ASAP-HSQC	-	30,9	17,0	23,0	18,1
	lowCost-ASAP	-	43,6	26,9	35,9	34,8
Fru-5a + Fru-5b	HSQC, NS=2	79,8	3,7	6,6	3,7	2,2
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	12,3	1,7	6,8	4,3	2,2
	ASAP-HSQC	-	25,6	16,3	21,0	14,9
	lowCost-ASAP	-	23,9	12,1	19,6	17,0

Fortsetzung zu Tabelle 9-47

		Zeitliche Stabilität der Messmethode [%]				
		c = 1,1 g/L	c = 3,1 g/L	c = 4,7 g/L	c = 6,2 g/L	c = 7,8 g/L
Gal-5	HSQC, NS=2	79,9	4,9	7,1	4,6	1,8
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	9,9	2,3	7,2	5,6	2,5
	ASAP-HSQC	-	18,5	29,0	43,4	21,3
	lowCost-ASAP	-	14,4	4,9	6,0	17,5
Sacc-5a	HSQC, NS=2	80,1	3,9	7,1	4,6	3,6
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	7,0	1,5	5,9	4,3	1,7
	ASAP-HSQC	-	29,6	21,5	45,3	29,7
	lowCost-ASAP	-	23,8	14,8	8,3	5,8
Sacc-5b	HSQC, NS=2	82,2	4,1	6,5	3,5	2,3
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	13,5	3,2	7,4	3,9	3,1
	ASAP-HSQC	-	37,4	22,9	23,8	26,6
	lowCost-ASAP	-	14,0	21,2	5,7	9,5
Raff-5	HSQC, NS=2	83,0	9,5	3,8	6,9	10,8
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	20,0	3,5	4,7	1,1	7,9
	ASAP-HSQC	-	15,9	17,1	22,7	18,1
	lowCost-ASAP	-	8,9	10,1	1,8	5,4
Stach-5	HSQC, NS=2	82,7	1,8	4,5	3,5	5,4
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	14,6	4,8	8,3	2,0	6,5
	ASAP-HSQC	-	20,6	19,2	31,4	23,5
	lowCost-ASAP	-	6,0	9,6	9,6	9,2
Verb-5	HSQC, NS=2	114,2	19,7	15,2	12,6	14,8
	HSQC, NS=4, 50 %NUS	46,1	9,8	24,7	6,8	13,7
	ASAP-HSQC	-	15,1	31,7	41,4	22,1
	lowCost-ASAP	-	39,1	8,8	22,8	43,4

Tabelle 9-48: Parameter zur Bewertung der Güte der durchgeführten Kalibrierfunktionen der Daten, die unter Verwendung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling* (NUS)-Kopplung sowie *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experimenten ermittelt wurden. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Zur Auswertung wurden die D-Glucosesignale (Glc-5a, Glc-5b), die D-Fructosesignale (Fru-5a, Fru-5b sowie ihre Summe), und die Saccharosesignale (Sacc-5a, Sacc-5b) betrachtet (Signalauswahl siehe Tabelle 4-13). Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*, v_{so} : relative Verfahrensstandardabweichung

Pulssequenz	Signal	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{so} [%]
HSQC, NS=2	Glc-5a	7405254	0,9910	12,2
	Glc-5b	2153984	0,9931	10,6
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Glc-5a	12890600	0,9981	5,6
	Glc-5b	3637338	0,9984	5,1
ASAP-HSQC	Glc-5a	1560265	0,9785	19,0
	Glc-5b	629300	0,9311	35,3
lowCost-ASAP	Glc-5a	1869124	0,9824	17,1
	Glc-5b	907990	0,9821	17,3
HSQC, NS=2	Fru-5a	4521103	0,9930	10,7
	Fru-5b	4391046	0,9906	12,5
	Fru-5a + Fru-5b	8912149	0,9920	11,5
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Fru-5a	8068545	0,9979	5,8
	Fru-5b	7931519	0,9981	5,6
	Fru-5a + Fru-5b	16000100	0,9980	5,7
ASAP-HSQC	Fru-5a	1828002	0,9970	7,0
	Fru-5b	1621449	0,9989	4,2
	Fru-5a + Fru-5b	3449450	0,9994	3,2
lowCost-ASAP	Fru-5a	1817940	0,9788	18,9
	Fru-5b	1738399	0,9933	10,5
	Fru-5a + Fru-5b	3491844	0,9948	9,2

Fortsetzung zu Tabelle 9-48

Pulssequenz	Signal	Steigung	Korrelationskoeffizient	v_{xo} [%]
HSQC, NS=2	Sacc-5a	3504053	0,9925	11,1
	Sacc-5b	3491765	0,9914	11,9
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Sacc-5a	5892194	0,9984	5,1
	Sacc-5b	6317864	0,9981	5,5
ASAP-HSQC	Sacc-5a	621206	0,9731	21,4
	Sacc-5b	1138467	0,9907	12,4
lowCost-ASAP	Sacc-5a	1363952	0,9663	24,0
	Sacc-5b	1692501	0,9725	11,8

Tabelle 9-49: Integralverhältnisse bei Lagerung der Kalibrierlösungen über drei Tage. Zur Beurteilung wurden die Verhältnisse zwischen den ermittelten Integralen an Tag 3 (I_3/I_1) zum Integral an Tag 1 gebildet. Die Messungen wurden mit *Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)*-Experimenten mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling (NUS)*-Kopplung sowie *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)*-HSQC-Experimenten durchgeführt. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen (Glc-5a, Glc-5b, Fru-5a, Fru-5b, Gal-5, Sacc-5a, Sacc-5b, Raff-5, Stach-5 und Verb-5) können Tabelle 4-13 entnommen werden. Die Messungen wurden anhand eines Analytgemischs (in Deuteriumoxid) aller Analyten der angegebenen Einzelkonzentrationen (c) durchgeführt. Glc: D-Glucose, Fru: D-Fructose, Gal: D-Galactose, Sacc: Saccharose, Stach: Stachyose, Verb: Verbasose

Methode	Signal	I_3/I_1 [%]				
		c = 1,1 g/L	c = 3,1 g/L	c = 4,6 g/L	c = 6,0 g/L	c = 7,5 g/L
HSQC, NS=2	Glc-5a	3,8	94,4	91,0	92,2	91,7
	Glc-5b	-1,6	96,1	89,0	92,1	94,8
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Glc-5a	87,1	91,6	90,5	92,4	92,3
	Glc-5b	58,2	95,5	90,5	92,2	94,3
ASAP-HSQC	Glc-5a	-	46,9	62,3	82,1	55,4
	Glc-5b	-	39,9	92,8	90,3	112,3
lowCost-ASAP	Glc-5a	-	132,9	68,2	91,2	105,6
	Glc-5b	-	140,0	107,8	97,9	88,8
HSQC, NS=2	Fru-5a	1,3	95,6	92,0	92,3	94,1
	Fru-5b	3,3	97,0	93,8	91,7	90,4
	Fru-5a + Fru-5b	2,2	96,3	92,9	92,0	92,2
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Fru-5a	81,8	93,0	93,7	91,0	93,1
	Fru-5b	92,1	91,2	90,9	93,6	93,4
	Fru-5a + Fru-5b	86,8	92,1	92,3	92,3	93,2
ASAP-HSQC	Fru-5a	-	80,1	65,7	60,8	91,0
	Fru-5b	-	64,4	56,6	66,4	61,7
	Fru-5a + Fru-5b	-	72,3	61,2	63,6	76,4
lowCost-ASAP	Fru-5a	-	145,1	84,7	101,2	89,3
	Fru-5b	-	40,2	58,2	45,5	46,5
	Fru-5a + Fru-5b	-	68,7	67,9	64,7	61,4

Fortsetzung von Tabelle 9-49

Methode	Signal	I_2/I_1 [%]				
		c = 1,1 g/L	c = 3,1 g/L	c = 4,6 g/L	c = 6,0 g/L	c = 7,5 g/L
HSQC, NS=2	Gal-5	3,4	97,2	92,5	92,3	92,9
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Gal-5	75,3	94,3	95,7	91,6	92,6
ASAP-HSQC	Gal-5	-	96,0	52,2	72,8	91,9
lowCost-ASAP	Gal-5	-	71,0	96,4	113,8	107,8
HSQC, NS=2	Sacc-5a	2,9	99,2	89,9	89,5	94,7
	Sacc-5b	3,7	97,8	93,2	93,5	93,9
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Sacc-5a	69,3	92,9	91,6	94,9	94,5
	Sacc-5b	89,9	91,5	95,8	93,6	93,3
ASAP-HSQC	Sacc-5a	-	61,5	82,5	60,8	71,5
	Sacc-5b	-	131,4	50,3	58,7	70,0
lowCost-ASAP	Sacc-5a	-	93,7	108,6	97,4	96,6
	Sacc-5b	-	96,3	135,4	105,7	84,1
HSQC, NS=2	Raff-5	1,8	91,5	100,4	98,3	89,5
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Raff-5	67,7	98,2	103,5	90,7	89,8
ASAP-HSQC	Raff-5	-	74,4	58,2	63,9	61,5
lowCost-ASAP	Raff-5	-	100,8	83,2	99,4	91,1
HSQC, NS=2	Stach-5	4,1	97,6	94,2	93,4	86,6
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Stach-5	72,9	92,1	91,0	87,4	88,6
ASAP-HSQC	Stach-5	-	72,9	65,4	70,4	76,5
lowCost-ASAP	Stach-5	-	116,1	93,3	98,5	92,0
HSQC, NS=2	Verb-5	12,1	95,5	75,3	79,6	95,2
HSQC, NS=4, 50 %NUS	Verb-5	61,9	91,2	79,1	84,6	85,6
ASAP-HSQC	Verb-5	-	56,3	56,2	53,0	52,8
lowCost-ASAP	Verb-5	-	34,4	111,6	115,2	124,9

Tabelle 9-50: Bestimmungsgrenzen der Analyten D-Glucose (Glc), D-Fructose (Fru), D-Galactose (Gal), Saccharose (Sacc), Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb) bei Verwendung von *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimenten mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling* (NUS)-Kopplung sowie Methoden des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Ansatzes. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalbezeichnungen können Tabelle 4-13 entnommen werden. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*

Analyt	Signal	Bestimmungsgrenze [g/L]			
		HSQC, NS=2	HSQC, NS=4, 50 %NUS	ASAP-HSQC	lowCost-ASAP
D-Glucose	Glc-5a	35,5	64,7	982,8	781,2
	Glc-5b	66,4	106,6	-	700,2
D-Fructose	Fru-5a	192,9	71,7	871,1	612,8
	Fru-5b	64,1	42,9	252,6	614,8
	Fru-5a + Fru-5b	88,3	53,3	466,6	565,3
D-Galactose	Gal-5	122,2	69,2	214,3	643,8
Saccharose	Sacc-5a	149,1	70,1	899,2	1014,4
	Sacc-5b	189,3	66,5	82,5	1822,6
Raffinose	Raff-5	243,8	176,7	556,0	420,2
Stachyose	Stach-5	50,1	27,5	128,3	255,4
Verbascose	Verb-5	246,4	124,5	210,3	1629,5

Tabelle 9-51: Ergebnisse der Durchführung der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion zur Bestimmung von Mono- und Oligosacchariden in roten Linsen und Kidneybohnen. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert(Gehalt) angegeben. Als Präzisionsmaß wird der Variationskoeffizient (VK) aufgeführt. Zusätzlich wird die durch Aufstockungsversuche bestimmte Wiederfindung (WF) angegeben. Da die Wiederfindungsversuche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, wird als Präzisionsmaß die halbe Spannweite zwischen den beiden Messwerten (R/2) aufgeführt.

	Rote Linsen			Kidneybohnen		
	Gehalt [g/100 g]	VK [%]	WF ± R/2 [%]	Gehalt [mg/100 g]	VK [%]	WF ± R/2 [%]
D-Glucose	1,8*10 ⁻³	29,9	99,1 ± 6,2	0,08	17,3	85,1 ± 9,1
D-Fructose	4,0*10 ⁻³	14,6	64,7 ± 10,4	0,08	14,6	103,0 ± 6,9
D-Galactose	60,0*10 ⁻³	11,2	100,3 ± 8,0	0,02	19,9	81,2 ± 8,9
Saccharose	0,84	12,1	77,6 ± 14,0	2,57	20,3	90,0 ± 8,1
Raffinose	0,20	13,8	108,1 ± 11,9	0,12	22,6	89,4 ± 10,2
Stachyose	1,91	10,5	118,9 ± 10,3	1,10	13,4	95,6 ± 12,3
Verbascose	0,39	10,6	64,2 ± 4,1	0,09	19,3	75,4 ± 8,4

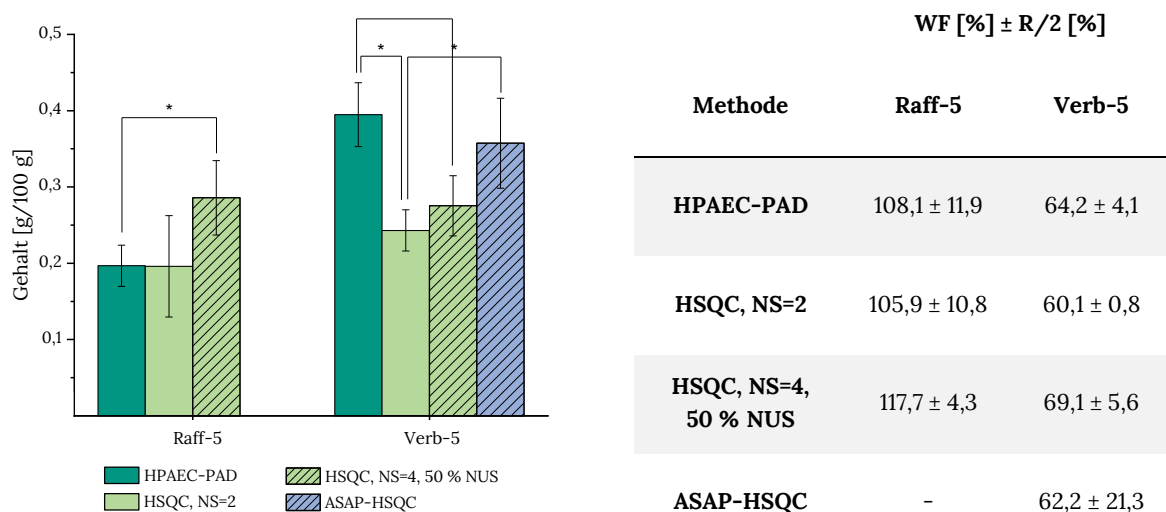


Abbildung 9-10: Links: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Raffinose (Raff) und Verbascose (Verb) in roten Linsen. Die Proben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Raff-5 und Verb-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und durch „*“ gekennzeichnet. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Rechts: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Raffinose (Raff) und Verbascose (Verb) durch Aufstockung von roten Linsen ermittelt wurden. Die Aufstockungsproben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli et al., 2008) und in Doppelbestimmung durchgeführt, sodass als Präzisionsmaß die halbe Abweichung zwischen den beiden Messwerten (R/2) angegeben wird.

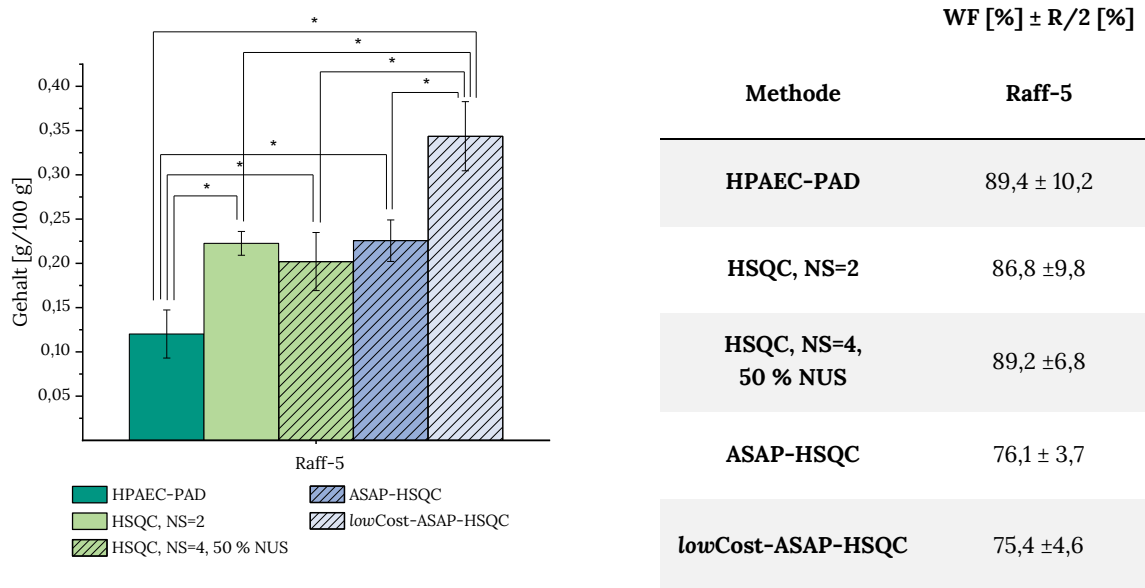


Abbildung 9-11: Links: Ergebnisse des Methodenvergleichs zur Quantifizierung von Raffinose (Raff) in Kidneybohnen. Die Proben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli *et al.*, 2008) und in Dreifachbestimmung analysiert. Die Standardabweichung wird als Präzisionsmaß angegeben. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie Methoden des Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und Non-Uniform Sampling (NUS)-Kopplung sowie des Acceleration by Sharing Adjacent Polarization (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zum verwendeten Signal Raff-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Messwerten wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, $\alpha=0,05$, post-hoc Tukey-Test) ermittelt und durch „*“ gekennzeichnet. Cost: Cooling Overall Spin Temperature

Rechts: Wiederfindungsraten (WF), die für die Analyse von Raffinose (Raff) durch Aufstockung von Kidneybohnen ermittelt wurden. Die Aufstockungsproben wurden ethanolisch extrahiert (Xiaoli *et al.*, 2008) und in Doppelbestimmung durchgeführt, sodass als Präzisionsmaß die halbe Abweichung zwischen den beiden Messwerten ($R/2$) angegeben wird.

Tabelle 9-52: Präzision der Messungen nach Dreifachbestimmung, angegeben als Variationskoeffizient, von D-Glucose (Glc), D-Fructose (Fru), D-Galactose (Gal), Saccharose (Sacc), Raffinose (Raff), Stachyose (Stach) und Verbascose (Verb) in blauen Lupinensamen, roten Linsen und Kidneybohnen. Die Proben wurden mit der Vergleichsmethode Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sowie mit Methoden des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments mit verschiedener Scanzahl (NS) und *Non-Uniform Sampling* (NUS)-Kopplung sowie des *Acceleration by Sharing Adjacent Polarization* (ASAP)-HSQC-Experiments analysiert. Beide ASAP-HSQC-Pulssequenzen sind ebenfalls mit einem NUS-Anteil von 50 % gekoppelt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Signalen Sacc-5b, Raff-5, Stach-5 und Verb-5 können Tabelle 4-13 entnommen werden. Cost: *Cooling Overall Spin Temperature*

Methode	Variationskoeffizient [%]						
	Glc	Fru	Gal	Sacc-5b	Raff-5	Stach-5	Verb-5
Blaue Lupinensamen							
HPAEC-PAD	18,5	20,2	2,3	2,0	9,9	5,8	3,7
HSQC, NS=2	-	-	-	4,6	8,3	5,3	20,4
HSQC, NS=4, 50 % NUS	-	-	-	5,1	17,3	6,1	9,6
ASAP-HSQC	-	-	-	15,0	64,9	6,1	25,0
lowCost-ASAP-HSQC	-	-	-	8,5	8,1	6,0	10,8
Rote Linsen							
HPAEC-PAD	29,9	14,6	11,2	12,1	13,8	10,5	10,6
HSQC, NS=2	-	-	-	6,1	33,9	3,3	11,1
HSQC, NS=4, 50 % NUS	-	-	-	9,5	17,0	9,3	14,4
ASAP-HSQC	-	-	-	5,6	-	5,6	16,5
lowCost-ASAP-HSQC	-	-	-	5,8	-	17,1	-
Kidneybohnen							
HPAEC-PAD	17,3	14,6	-	20,3	22,6	13,4	19,3
HSQC, NS=2	--	-	-	12,5	6,0	12,7	-
HSQC, NS=4, 50 % NUS	-	-	-	11,4	16,2	11,3f	-
ASAP-HSQC	-	-	-	42,5	10,4	9,9	-
lowCost-ASAP-HSQC	-	-	-	10,8	11,4	3,6	-

10 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

FELS, L., MERDIAN, V., DECKER, C., BUNZEL, M., (2021), Optimierung und Vergleich von Methoden zur Quantifizierung von Mono- und Disacchariden in Milch und Milchprodukten, *Lebensmittelchemie*, 75: 84.

XU, D., FELS, L., WEFERS, D., BEHR, J., JAKOB, F., VOGEL, R., (2018), *Lactobacillus hordei* dextrans induce *Saccharomyces cerevisiae* aggregation and network formation on hydrophilic surfaces, *International Journal of Biological Macromolecules*, 115: 236-242.

FELS, L., JAKOB, F., VOGEL, R., WEFERS, D., (2018), Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir, *Carbohydrate Polymers*, 189: 296-303.

Vorträge auf Fachtagungen

FELS, L., MERDIAN, V., BUNZEL, M., (2021), Optimierung und Vergleich von Methoden zur Quantifizierung von Mono- und Disacchariden in Milch und Milchprodukten, *Regionalverbandstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft 2021, digital*

FELS, L., RUF, F., BUNZEL, M., (2021), Optimierung und Anwendung ^1H - ^{13}C -korrelierter Experimente der Kernspinresonanzspektroskopie zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide, 49. *Deutscher Lebensmittelchemikertag, digital*

Posterbeiträge auf Fachtagungen

FELS, L., MERDIAN, V., DECKER, C., BUNZEL, M., (2019), Methodenvergleich zur Quantifizierung von Mono- und Disacchariden in Milch und Milchprodukten, 48. *Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden*