

Evaluierung kolorimetrischer Verfahren und Entwicklung einer stabilisotopenbasierten Alternative zur Quantifizierung von Uronsäuren in komplexen Polysaccharidmatrices

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. Johanna Braun

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
 2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
- Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2026

„Der, die, das. Wer, wie, was? Wieso, weshalb, warum? Wer nicht fragt, bleibt dumm.“

- Sesamstraße

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 11.03.2026

Johanna Braun

Hinweis zu bereits veröffentlichten Teilen der Arbeit

Teile der in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse wurden bereits in folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

1. Braun, J.; Bunzel, M., Quantification of galacturonic acid in pectin-containing samples using a stable isotope dilution approach and LC-MS. *Carbohydrate Polymers* **2025**, vol. 365, 123816, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123816>
2. Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M., Structural and mechanistic insights into the formation of xanthylum chromophores in uronic acid quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2026**, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c17509>

Die betreffenden Abschnitte wurden für die vorliegende Arbeit in angepasster oder erweiterter Form übernommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Uronsäuren.....	2
1.2 Die Zellwand von Pflanzen und ausgewählten Algen	3
1.2.1 Landpflanzen (<i>Embryophyta</i>).....	4
1.2.1.1 Aufbau der Zellwand von Landpflanzen	4
1.2.1.2 Strukturen gängiger Zellwandpolysaccharide	5
1.2.2 Algen (<i>Algae</i>).....	7
1.2.2.1 Aufbau der Zellwand von Algen	8
1.2.2.2 Strukturen gängiger Zellwandpolysaccharide von Braunalgen	9
1.3 Uronsäurehaltige Polysaccharide	10
1.3.1 Zellwandassoziierte Polysaccharide	10
1.3.1.1 Pektin.....	10
1.3.1.2 Glucuronoxylan	13
1.3.1.3 Alginat.....	14
1.3.2 Ausgewählte Hydrokolloide	16
1.3.2.1 Xanthan.....	16
1.3.2.2 Karayagummi	17
1.3.2.3 Gummi arabicum.....	18
1.4 Kolorimetrische Analysen in der Uronsäureanalytik.....	19
1.4.1 Schwefelsäure als Reaktionsmedium.....	19
1.4.2 Übergeordnetes Reaktionsprinzip zur Ausbildung chromophorer Verbindungen	20
1.4.2.1 Abbau von Kohlenhydraten unter sauren Bedingungen.....	20
1.4.2.1.1 Decarboxylierung von Uronsäuren	21
1.4.2.1.2 Dehydratisierung von Uronsäuren	23
1.4.2.1.3 Folgereaktionen der Abbauprodukte	25
1.4.2.2 Kondensation von Aldehyden und phenolischen Verbindungen.....	28
1.4.3 Verwendete Chromogene zur Quantifizierung von Uronsäuren.....	29
2. Zielsetzung.....	31

3. Material und Methoden	33
3.1 Uronsäurehaltiges Probenmaterial.....	33
3.2 Charakterisierung des uronsäurehaltigen Probenmaterials.....	34
3.2.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	34
3.2.2 Bestimmung des Veresterungsgrades pektinhaltiger Proben.....	37
3.3 Isolierung uronsäurehaltiger Oligosaccharide.....	38
3.3.1 Homogalacturonsäureoligosaccharide.....	39
3.3.2 Alginatoligosaccharide.....	40
3.3.3 Glucuronoxylanoligosaccharide.....	40
3.4 Photometrische Analyse des Uronsäuregehalts.....	42
3.4.1 Analysenprinzip.....	42
3.4.2 Analyse des Einflusses verschiedener Reaktionsparameter.....	43
3.4.3 Analyse des Einflusses von Borat.....	46
3.4.3.1 Selektivität und Sensitivität der Analyse.....	46
3.4.3.2 Beeinflussung der Lactonisierung von Uronsäuren.....	47
3.5 Charakterisierung der im kolorimetrischen Assay entstehenden (chromophoren) Strukturen.....	50
3.5.1 Synthese und Charakterisierung von Triarylmethanfarbstoffen.....	51
3.5.2 Anwendung quantenchemischer Methoden zur Strukturaufklärung.....	53
3.6 Entwicklung einer chromatographiebasierten Quantifizierung des Uronsäuregehalts.....	54
3.6.1 Optimierung und Analyse des Abbauverhaltens verschiedener Uronsäuren in konzentrierter Schwefelsäure.....	54
3.6.2 Stabilisotopenverdünnungsanalyse.....	55
3.6.3 Validierung und Anwendung der Methode.....	57
4. Ergebnisse und Diskussion	59
4.1 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung uronsäurehaltiger Proben.....	59
4.1.1 Pektinhaltige Materialien.....	59
4.1.2 Hölzer.....	61
4.1.3 Hydrokolloide.....	62
4.1.4 Alginathaltige Materialien.....	63

4.2	Charakterisierung chromophorer Strukturen der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts	65
4.2.1	Analyse chromophorer Reaktionsprodukte von 5-Formyl-2-furancarbonsäure und 3-Phenylphenol	65
4.2.1.1	Charakteristika des Chromophors	65
4.2.1.2	Extraktion aromatischer Reaktionsprodukte	67
4.2.1.3	Synthese und Charakterisierung einer Triarylmethan-Farbvorstufe.....	70
4.2.1.4	Theoretische Berechnungsansätze zur Ausbildung der chromophoren Struktur	73
4.2.2	4-Carboxybenzaldehyd und 3-Phenylphenol basierte Chromophore als Modellsystem	76
4.2.2.1	Synthese und Charakterisierung eines entstandenen Chromophors.....	76
4.2.2.2	Weiterführende Verifizierung der chromophoren Struktur	79
4.2.2.3	Ausbildung chromophorer Strukturen aus der Triarylmethan-Farbvorstufe.....	81
4.2.3	Identifizierung xanthenbasierter Strukturen im Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay	83
4.3	Einfluss von Borat auf die photometrische Analyse des Gesamturonsäuregehalts	86
4.3.1	Identifizierung des Einflusses von Borat.....	86
4.3.1.1	Einfluss von Borat auf Ebene der Gesamtreaktion	86
4.3.1.2	Einfluss von Borat auf den Abbau der Uronsäure	88
4.3.1.3	Einfluss von Borat auf die Bildung des Chromophors	89
4.3.2	Beeinflussung der Lactonisierung von Uronsäuren.....	91
4.3.3	Beeinflussung der Stabilität des Chromophors.....	95
4.4	Interferenzen mit Reaktionsprodukten aus Neutralzuckern in der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts.....	99
4.5	Methodenentwicklung zur Gesamturonsäurebestimmung mittels LC-MS.....	103
4.5.1	Entwicklung des grundlegenden Prinzips.....	103
4.5.2	Optimierung der Extraktion von 5-Formyl-2-furancarbonsäure.....	105
4.5.3	Optimierung der Erhitzungszeit und -temperatur.....	106
4.5.4	Entwicklung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse	110
4.6	Evaluierung struktureller Einflussfaktoren in der Stabilisotopenverdünnungsanalyse ..	112
4.6.1	Einfluss des Polymerisationsgrades uronsäurehaltiger Oligosaccharide	112
4.6.1.1	Isolierung von Oligouronsäuren	112

4.6.1.2 Analyse der Oligouronsäuren.....	115
4.6.2 Einfluss ester- und ethergebundener Substituenten.....	116
4.6.3 Einfluss der Aldobiuronsäurebindung.....	117
4.6.3.1 Isolierung von Glucuronoxylanoligosacchariden	117
4.6.3.2 Analyse der Glucuronoxylanoligosaccharide mittels Stabilisotopenverdünnungs- analyse	121
4.7 Photometrische und massenspektrometrische Uronsäurebestimmung im Vergleich	122
4.7.1 Validierung beider Methoden.....	122
4.7.2 Analyseergebnisse für uronsäurehaltige Probenmaterialien.....	127
4.8 Zusammenfassende Diskussion	130
5. Zusammenfassung	141
6. Literatur	143
7. Chemikalien und Instrumente.....	159
8. Arbeitsvorschriften	169
9. Anhang	197
10. Publikationsliste	217

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3DMAP	3-Dimethylaminophenol
3PP	3-Phenylphenol
4CBA	4-Carboxybenzaldehyd
4-O-Me-GlcA	4-O-Methyl-Glucuronsäure
5FFA	5-Formyl-2-furancarbonsäure
5MF	5-Methylfurfural
AOS	Alginatoligosaccharide
Ara	Arabinose
BS	Ballaststoffe
COSY	engl. <i>Correlation Spectroscopy</i>
DAc	Acetylierungsgrad (engl. <i>Degree of Acetylation</i>)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCM	Dichlormethan
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DM	Methylveresterungsgrad (engl. <i>Degree of Methylation</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOE	engl. <i>Design of Experiment</i>
DP	Polymerisationsgrad (engl. <i>Degree of Polymerization</i>)
ELSD	Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (engl. <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
f	Furanoseform
F2A	Furan-2-carbonsäure
FA	Formaldehyd
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
GH	Glykosylhydrolase
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GuLA	Guluronsäure
GX	Glucuronoxylan
GXOS	Glucuronoxylanoligosaccharide
H2BC	engl. <i>Heteronuclear 2 Bond Correlation</i>
HG	Homogalacturonan

HGO	Homogalacturonsäureoligosaccharide
HILIC	hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie (engl. <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HMBC	engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (engl. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (engl. <i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i>)
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMT	Isomaltotriose
LBS	lösliche Ballaststoffe
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>Liquid Chromatography</i>)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
M/G	Mannuronsäure-zu-Guluronsäure-Verhältnis
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
m-3PP	3-Methoxybiphenol
Man	Mannose
ManA	Mannuronsäure
ML	Methanolyse/Trifluoressigsäurehydrolyse
MS	Massenspektrometrie
NaOAc	Natriumacetat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
p	Pyranoseform
PAD	gepulste amperometrische Detektion (engl. <i>Pulsed Amperometric Detection</i>)
PFP	Pentafluorphenyl
Q	Quadrupol
R²	Korrelationskoeffizient
R/2	engl. <i>Range/2</i>
RG	Rhamnogalacturonan
Rha	Rhamnose
RT	Retentionszeit
SH	Schwefelsäurehydrolyse
SIM	engl. <i>Selected Ion Monitoring</i>
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Festphasenextraktion (engl. <i>Solid Phase Extraction</i>)
TDDFT	zeitabhängige (engl. <i>time-dependent</i>) Dichtefunktionaltheorie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	engl. <i>Total Ion Current</i>

TMSP- <i>d</i>₄	3-(Trimethylsilyl)propionat- <i>d</i> ₄
TOCSY	engl. <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tr	Triarylmethan
UBS	unlösliche Ballaststoffe
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
US	Uronsäuren
vis	sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums (engl. <i>visible</i>)
WDF	Wiederfindungsrate
XG	Xylogalacturonan
XOS	Xylooligosaccharide
Xyl	Xylose

1. Einleitung

Uronsäuren (US) stellen eine zentrale Gruppe von Monosacchariden dar, die in zahlreichen biologischen Systemen weit verbreitet sind. Sie sind integrale Bestandteile vieler pflanzlicher Polysaccharide und tragen wesentlich zu deren strukturbildenden und funktionellen Eigenschaften bei. Pektin, das den zentralen Bestandteil der Mittellamelle und der Primärzellwandmatrix dikotyler Landpflanzen darstellt, zeichnet sich durch ein Galacturonsäure (GalA)-dominiertes Rückgrat aus. Das lineare Polymer Alginat, bestehend aus blockweisen angeordneten Einheiten von Mannuronsäure (ManA) und Guluronsäure (GulA), ist charakteristisch für die Zellwände mariner Braunalgen. In lignocellulosehaltiger Biomasse treten zudem mit Glucuronsäure (GlcA) modifizierte Xylane, die Glucuronoxylane (GX), auf. Darüber hinaus finden sich in Hydrokolloiden wie Xanthan, Gummi arabicum und Karayagummi unterschiedliche Anteile an GalA und/oder GlcA, die deren funktionelle Eigenschaften maßgeblich mitbestimmen. Diese Polysaccharide erfüllen in der Natur zentrale strukturbildende und funktionelle Aufgaben. Zugleich besitzen sie eine große technologische Bedeutung und sind aus der modernen Industrie kaum wegzudenken. Aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit in Kombination mit weiteren Eigenschaften wie Gelbildungsfähigkeit, Amphiphilie und unterschiedlich ausgeprägter Viskosität in wässriger Lösung werden sie in Abhängigkeit ihrer Struktur als Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Emulgatoren wie etwa in Joghurts, Dressings oder Getränken eingesetzt. Des Weiteren dienen sie der Mikroverkapselung von Aromen, Nährstoffen und Wirkstoffen, finden Anwendung in pharmazeutischen Formulierungen mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung und spielen auch in der Medizin, beispielsweise in der Wundheilung oder als bioaktive Coatings, eine zunehmend wichtige Rolle. Insbesondere Alginat und Pektin zeichnen sich teils durch die Fähigkeit aus, in Gegenwart divalenter Kationen stabile Gele auszubilden, worauf ihr Einsatz in Hydrogelen beruht.

Die Analyse dieser uronsäurehaltigen Biopolymere ist in Anbetracht ihrer gestiegenen Relevanz sowie dem steigenden Interesse in Forschung und Anwendung ein wichtiger Bestandteil der Kohlenhydratanalytik. Grundlegend ist dabei die Quantifizierung des Gesamturonsäuregehalts als summenparametrische Angabe, da dieser einerseits der Charakterisierung der Struktur und der damit verbundenen Eigenschaften des Polymers dient und andererseits die Überprüfung regulatorischer Vorgaben ermöglicht. So ist beispielsweise gemäß Verordnung (EU) Nr. 231/2012 ein Mindesturonsäuregehalt von 65 % für den Lebensmittelzusatzstoff Pektin einzuhalten.

Die ersten Versuche zur Quantifizierung von US gehen auf Mann und Tollens (1896) zurück, die den durch Decarboxylierung der US freigesetzten CO₂-Gehalt zur Bestimmung verwendeten. Im Hinblick auf unspezifische Reaktionen weiterer Matrixbestandteile erwies sich diese Methode jedoch als ungeeignet. Daraufhin setzten sich kolorimetrische Verfahren durch, allen voran der von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) entwickelte Assay, der bis heute mit über 6500 Zitationen die weltweit am häufigsten genutzte Methode zur Gesamturonsäurebestimmung darstellt. Dieser verwendet den Abbau der US in konzentrierter Schwefelsäure und die Reaktion entstandener Produkte, die mit dem Chromogen 3-Phenylphenol (3PP) ein strukturell unbekanntes, intensiv

magentafarbenes Chromophor ausbilden, das spektrophotometrisch erfasst wird. Zwar ist die Durchführung dieses Ansatzes simpel und kostengünstig, jedoch weist das Verfahren nennenswerte Einschränkungen auf: Proteine und vor allem andere Neutralzucker stören die Reaktion und führen zu einer eingeschränkten Richtigkeit. Mangelnde Robustheit des Assays kann zudem die Präzision negativ beeinflussen. Hinzu kommt, dass das zugrunde liegende Chromophor der Reaktion bislang unbekannt blieb und die Methode daher primär empirisch hinsichtlich verschiedener Reaktionsparameter optimiert wurde.

Diese Arbeit widmet sich daher zwei zentralen Fragestellungen. Erstens soll der Bildungsmechanismus sowie die Struktur des Chromophors des Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays aufgeklärt und die Wirkung von Zusätzen wie Borat auf molekularer Ebene verstanden werden. Zweitens soll eine alternative, chromatographiebasierte Methode zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts entwickelt werden. Dabei wird das Abbauverhalten einzelner US systematisch untersucht und die gewonnenen Erkenntnisse für eine verbesserte Analytik genutzt.

1.1 Uronsäuren

US stellen eine Klasse der Zuckersäuren dar, die durch die Oxidation der primären Hydroxygruppe am endständigen Kohlenstoff von Monosacchariden entstehen. Ihre Benennung folgt dem jeweiligen Neutralzuckerstamm, an den die Endung „-uronsäure“ angefügt wird. In wässriger Lösung liegen US in einem dynamischen Gleichgewicht vor, das die offenkettige Form sowie pyranosidische und furanosidische Ringformen umfasst (Abbildung 1) (Belitz *et al.* 2012).

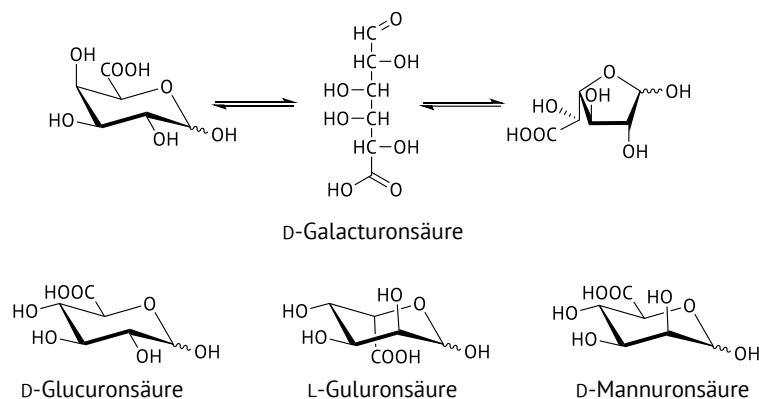


Abbildung 1: Struktur der in dieser Arbeit relevanten Uronsäuren. Diese können in wässriger Lösung sowohl in offener Form (Mitte) als auch als Pyranose (links) oder Furanose (rechts) vorliegen.

Zu den in der Natur am häufigsten vorkommenden US zählen GalA und GlcA (Abbildung 1). Sie sind Bausteine pflanzlicher Polymere und insbesondere in Zellwandpolysacchariden sowie in verschiedenen Hydrokolloiden zu finden, auf die in den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit näher eingegangen wird (Belitz *et al.* 2012). Im tierischen Organismus kommt vor allem GlcA eine zentrale physiologische Bedeutung zu. Einerseits ist sie struktureller Bestandteil verschiedener Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Heparin und Chondroitinsulfat, andererseits spielt GlcA eine Schlüsselrolle in der Phase-II-Reaktion des Xenobiotikastoffwechsels, bei der sie zur Konjugation schwerlöslicher Fremdstoffe beiträgt (Chakrabarti und Park 1980; Yang *et al.* 2017).

In marinen Lebensräumen finden sich zudem ManA und GulA (Abbildung 1) als wichtige Bestandteile der Zellwände von Braunalgen. Einige Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sind ebenfalls in der Lage, Alginat zu synthetisieren, haben allerdings bislang keine industrielle Relevanz erlangt (Abka-khajouei *et al.* 2022).

Aufgrund ihrer freien Carboxygruppe besitzen US die Fähigkeit zur intramolekularen Bildung von Estern (Lactonen). Diese Lactonisierung verläuft in wässrig-saurer Umgebung bei Raumtemperatur nur in geringem Ausmaß ab, nimmt jedoch mit steigender Temperatur und zunehmender Säurekonzentration deutlich zu (Cheetham und Sirimanne 1983; Fatouros *et al.* 2021). Untersuchungen zur Lactonbildung von GlcA zeigten die Entstehung zweier Konstitutionsisomere (Abbildung 2): D-Glucofuranosidurono-6,3-lacton und D-Glucopyranosidurono-6,3-lacton, wobei die Furanoseform deutlich bevorzugt gebildet wurde (Cheetham und Sirimanne 1983).

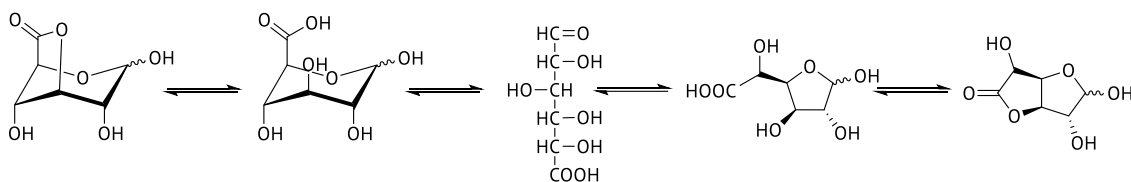


Abbildung 2: Lactonisierung der Glucuronsäure. Hierbei entstehen sowohl das D-Glucofuranosidurono-6,3-lacton (rechts) als auch das D-Glucopyranosidurono-6,3-lacton (links).

GalA ist aufgrund der relativen Konfiguration ihrer Hydroxygruppen an den Kohlenstoffatomen C3 und C4 nicht zur Lactonbildung fähig, da hieraus ein energetisch ungünstiger, verdrehter Bicyclus resultieren würde (Fatouros *et al.* 2021). Im Gegensatz dazu ist bei ManA und GulA durch die *erythro*-Stellung der Hydroxygruppen, analog zur GlcA, die Ausbildung eines stabilen 6,3-Lactons möglich (Scott 1979).

1.2 Die Zellwand von Pflanzen und ausgewählten Algen

Landpflanzen (*Embryophyta*) bilden eine monophyletische Gruppe innerhalb des Pflanzenreichs und zeichnen sich durch die Entwicklung vielzelliger Embryonen sowie spezifischer Anpassungen an das Landleben aus. Im Gegensatz dazu bezeichnet der Begriff „Algen“ keine systematisch einheitliche Gruppe, sondern umfasst eine Vielzahl aquatischer, photosynthetisch aktiver Organismen aus unterschiedlichen eukaryotischen Linien, darunter auch Vertreter außerhalb des Pflanzenreichs, wie die Braunalgen (Delwiche und Cooper 2015).

Die Zellwände von Algen und Landpflanzen unterscheiden sich sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung als auch in bestimmten funktionellen Aspekten, zeigen jedoch auch grundlegende Gemeinsamkeiten. In beiden Fällen stellen sie ein mechanisches Stützsystem dar, das dem Turgordruck standhält, die Zelle gegen physikalische und biotische Umweltfaktoren schützt, an der osmotischen Regulation beteiligt ist und Prozesse wie Zellwachstum und Zell-Zell-Kommunikation unterstützt (Caffall und Mohnen 2009; Carpita und Gibeaut 1993; Deniaud-Bouet *et al.* 2014; Hentati *et al.* 2020). Im Gegensatz zur Zellwand der Landpflanzen, die eine deutlich höhere Festigkeit aufweist, um dem Einfluss der Schwerkraft sowie der Forcierung des Wassertransports gerecht zu

werden, steht bei Algen die Osmoregulation im Vordergrund. Hierzu tragen eine hohe Ionenaustauschkapazität durch geladene Zellwandkomponenten sowie ein hoher Anteil an gelbildenden Polysacchariden bei, die Wasser binden und so vor Dehydratation schützen (Hentati *et al.* 2020).

Die genannten Funktionen werden durch ein komplexes, dreidimensionales Zellwandnetzwerk ermöglicht, das aus strukturell und funktionell unterschiedlichen Komponenten wie Polysacchariden, Strukturproteinen und phenolischen Verbindungen besteht. Die genaue Zusammensetzung dieser Matrix variiert stark in Abhängigkeit von Art, Gewebe, Entwicklungsstadium und Umweltbedingungen, weshalb pflanzliche und algele Zellwände als stark heterogene Systeme gelten (Caffall und Mohnen 2009).

1.2.1 Landpflanzen (*Embryophyta*)

Die Gruppe der *Embryophyta* umfasst verschiedene Moose, Farne, Gymnospermen und Angiospermen. Sie unterscheiden sich von Algen durch die Entwicklung eines vielzelligen Gewebes (den Samen) im Muttergewebe und sind durch spezielle Strukturen an das Leben an Land angepasst. Die Gruppe der Angiospermen lassen sich systematisch in Monokotyledonen (Einkeimblättrige) und Dikotyledonen (Zweikeimblättrige) unterteilen, deren Zellwände im Folgenden näher thematisiert werden (Donoghue *et al.* 2021).

1.2.1.1 Aufbau der Zellwand von Landpflanzen

Die Zellwand von Landpflanzen ist ein hochkomplexes, multikomponentes System, das aus einem bis zu dreischichtigen Netzwerk besteht. Von außen nach innen setzt sie sich aus der Mittellamelle, die die Zellen miteinander verbindet, der Primärzellwand und je nach Zell- und Gewebetyp einer Sekundärzellwand zusammen (McDougall *et al.* 1996). Die Mittellamelle, auf der die Primärzellwand aufgelagert ist, stellt eine dünne Schicht dar, die überwiegend aus Pektinen besteht. Sie ermöglicht die Adhäsion benachbarter Zellen, spielt eine zentrale Rolle bei entwicklungs- sowie umweltbedingten Zelltrennungsprozessen und ist wesentlich an der Verteilung mechanischer Belastungen sowie an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt (Zamil und Geitmann 2017). Die Primärzellwand besteht aus Cellulosemikrofibrillen, die für die Stabilität der Zelle sorgen und bis zu 30 % der Trockenmasse ausmachen. Diese sind in ein komplexes Matrixsystem eingebettet, das aus verschiedenen Hemicellulosen, Pektin sowie nicht-Polysacchariden-Bestandteilen, insbesondere Strukturproteinen, besteht (Abbildung 3) (Vogel 2008).

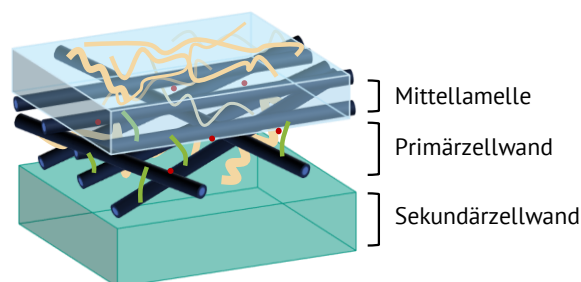


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zellwand von Landpflanzen (dunkelblau: Cellulosemikrofibrillen, orange: Pektin, grün: Hemicellulosen, rot: zellwandassoziierte Polyphenole und Proteine)

Der Aufbau der Primärzellwand variiert in Abhängigkeit der Pflanze und wird in zwei Haupttypen unterteilt. Zellwände des Typs I finden sich bei Dikotyledonen und nicht-commeliniden Monokotyledonen. Hierzu zählen unter anderem die in dieser Arbeit näher untersuchten Karotten und Zitronen sowie diverse Hölzer von Laubbäumen. Dieser Zellwandtyp zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Pektin und Xyloglucan, sowie geringe Mengen an (Hetero)xylanen und (Hetero)mannanen aus (Harris und Smith 2006). Die Primärzellwände commelinider monokotyler Pflanzen werden dem Typ II zugeordnet. Im Gegensatz zu Typ I-Zellwänden enthalten diese wenig Pektin, aber entsprechend größere Mengen an Hemicellulosen wie (Glucuronoarabino)xylane und charakteristische *mixed-linked*- β -Glucane. Zudem finden sich erhöhte Anteile an hydroxyzimtsäuresubstituierten Strukturen. Zu den populären Vertretern zählen Gräser der Familie *Poaceae*. In der vorliegenden Arbeit werden diese Polysaccharidstrukturen nicht behandelt, weshalb auf eine detaillierte Erläuterung in den nachfolgenden Kapiteln verzichtet wird (Harris und Smith 2006; Vogel 2008).

Die Sekundärzellwand ist nicht in allen Zelltypen ausgebildet, spielt jedoch insbesondere in verholzten Geweben eine entscheidende Rolle. In den Zellwänden dikotyler Pflanzen besteht sie hauptsächlich aus dem Cellulosegerüst und (Hetero)xylanen, wie dem für Harthölzer typischen 4-*O*-Methyl-GX, sowie geringen Mengen an Glucomannanen. Die Einlagerung von Lignin, einem komplexen, polymeren überwiegend aus Hydroxyzimtsäurealkoholen bestehenden Netzwerk, erhöht die mechanische Festigkeit und chemische Resistenz der Zellwand (Harris und Smith 2006). Weitere phenolische Verbindungen wie Suberin, Cutin oder Tannine können zudem mit der Zellwand assoziiert vorliegen (McDougall *et al.* 1996).

1.2.1.2 Strukturen gängiger Zellwandpolysaccharide

Die komplexen Strukturen der Zellwandpolysaccharide pflanzlicher Zellwände werden im Wesentlichen durch zehn verschiedene Monosaccharidbausteine gebildet. Hierzu zählen: Apiose, Arabinose (Ara), Fucose (Fuc), Galactose (Gal), GalA, Glucose (Glc), GlcA, Mannose (Man), Rhamnose (Rha) und Xylose (Xyl). Die Zucker können je nach Polymer sowohl in D- oder L- sowie in Abhängigkeit der Stellung der Hydroxygruppe am anomeren Kohlenstoffatom des Zuckers in α - oder β -Konfiguration vorliegen. Durch Ausbildung halbacetaler Strukturen werden Zucker in der Pyranoseform (*p*, Sechsring) oder als Furanose (*f*, Fünfring) über glycosidische Bindungen verknüpft in Polysaccharide eingebaut (McDougall *et al.* 1996). Relevante Polysaccharide dikotyler Pflanzen werden nachfolgend näher thematisiert sowie in Abbildung 4 dargestellt.

Cellulose ist ein unverzweigtes Homopolymer aus β -1,4-gebundener D-Glcp, das einen Anteil von bis zu 30 % der Zellwand ausmacht. In angiospermen Holzzellwänden, wie in Buche und Eukalyptus, kann sich der Celluloseanteil auch bis auf 50 % belaufen (Timwell 1967). Aufgrund der 180°-Rotation jeder Glc-Einheit relativ zur nächsten, ergibt sich Cellobiose als die kleinste sich wiederholende Untereinheit. Es erfolgt die Bildung von Polymeren mit einem Polymerisationsgrad (DP, engl. *degree of polymerization*) von bis zu 15.000. Die Cellulosepolymere assoziieren über Wasserstoffbrücken zu kordelartigen Aggregaten, aus deren Zusammenschluss von bis zu 100 Einheiten die Cellulosemikrofibrillen gebildet werden. Die Kristallinität dieser Mikrofibrillen variiert in Abhängigkeit vom

Zellwandtyp. Dabei enthalten Sekundärzellwände typischerweise einen höheren Anteil kristalliner Cellulose als Primärzellwände (McDougall *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2021).

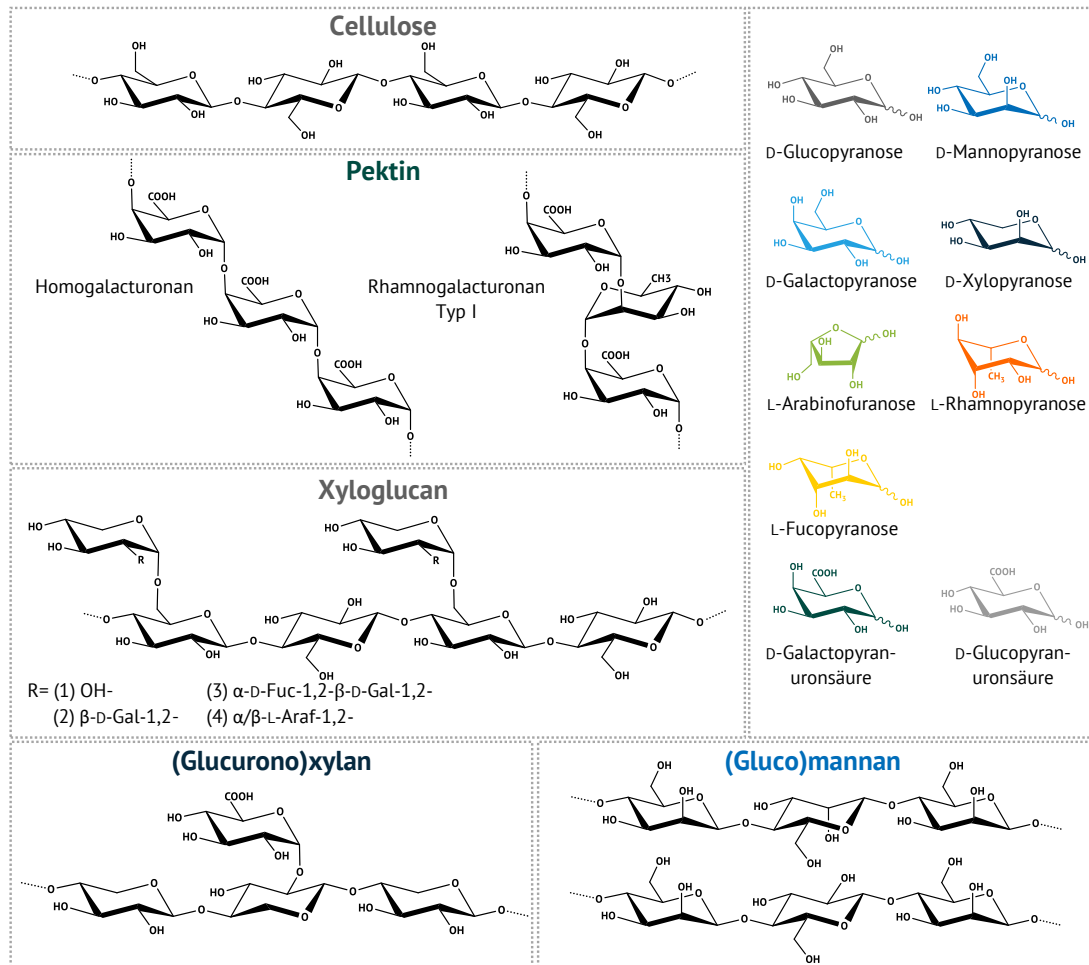


Abbildung 4: Ausschnitte der (Rückgrat)strukturen der Zellwandpolysaccharide dikotyler Pflanzen sowie darin enthaltene Monosaccharide (rechts)

Pektin stellt einen essenziellen Bestandteil von Pflanzen dar, der sich mit einem Anteil von 30 – 35 % in Zellwänden dikotyler Pflanzen, insbesondere in Zellwänden von Obst und Gemüse, wiederfindet. Die vorliegende Polysaccharidstruktur ist komplex und besteht überwiegend aus Homogalacturonan (HG)- sowie Rhamnogalacturonan (RG) Typ I-basierten Einheiten (Yapo 2011). In der vorliegenden Arbeit nimmt das uronsäurereiche Zellwandpolysaccharid Pektin eine zentrale Rolle ein. Eine detaillierte Darstellung erfolgt deshalb in Kapitel 1.3.1.1.

Zur Gruppe der Hemicellulosen zählen Zellwandpolysaccharide mit einem Rückgrat aus β -1,4-verknüpften Glc-, Xyl- oder Man-Einheiten (Zhang *et al.* 2021).

Xyloglucan stellt mit bis zu 25 % die mengenmäßig am häufigsten vertretene Hemicellulose der primären Zellwand dikotyler und nicht-commelinider Pflanzen dar (Zhang *et al.* 2021). Interaktionen mit den Cellulosemikrofibrillen über Wasserstoffbrücken und weitere nicht-kovalente Wechselwirkungen führen zur Bildung eines Netzwerkes, das zur Stabilität der Zellwand beiträgt (Pena *et al.* 2012). Das lineare Rückgrat besteht aus β -1,4-glycosidisch verknüpfter D-Glcp mit einem DP 6

von 500 – 3.500. Es ist über die O6-Position mit einem Substitutionsgrad von bis zu 75 % mit Seitenketten aus Xyl und teilweise Gal, Ara und Fuc substituiert (Scheller und Ulvskov 2010). Typische Seitenketten umfassen hierbei (1) α -D-Xylp-1,6-Glcp, (2) β -D-Galp-1,2- α -D-Xylp-1,6-Glcp, (3) α -L-Fucp-1,2- β -D-Galp-1,2- α -D-Xylp-1,6-Glcp, (4) α/β -L-Araf-1,2- α -D-Xylp-1,6-Glcp. In Wurzelhaaren wurden zudem Strukturen gefunden, die anstelle von Gal die entsprechende US GalA enthalten (Pena *et al.* 2012). Darüber hinaus kann Gal an den Positionen O3, O4 und/oder O6 acetyliert vorliegen (Scheller und Ulvskov 2010).

Die strukturell heterogene Gruppe der **Xylane** umfasst Polysaccharide mit einem Rückgrat aus β -1,4-glycosidisch gebundenen Xyl-Einheiten. In dikotylen Pflanzen stellen Xylane die Haupthemicellulose der sekundären Zellwand dar, während ihr Anteil in der Primärzellwand gering bleibt (Vogel 2008). Sie interagieren nicht-kovalent mit Cellulose und Lignin, wobei bei letzterem auch kovalente Bindungen diskutiert werden (Bromley *et al.* 2013). Charakteristisch für Xylane dikotyler Pflanzen ist die Substitution an Position O2 mit GlcA oder deren 4-O-methyliertem Derivat (Scheller und Ulvskov 2010). Eine detaillierte Betrachtung der Struktur, Eigenschaften und Verbreitung des GX erfolgt in Kapitel 1.3.1.2. Substitutionen mit Araf, wie sie in Gräsern typisch sind, treten in dikotylen Pflanzen nur sporadisch, hauptsächlich an Position O2, auf (Scheller und Ulvskov 2010).

(Gluco)mannane sind in der Primärzellwand dikotyler Pflanzen mit bis zu 10 % und in der Sekundärzellwand mit bis zu 5 % vertreten (Vogel 2008). Zwei Rückgratstrukturen sind bekannt: Das Rückgrat von Mannanen weist ausschließlich β -1,4 verknüpfte D-Manp auf, wohingegen Glucomannane nicht wiederholenden Einheiten aus D-Glcp und D-Manp enthalten (Maeda *et al.* 2000; Scheller und Ulvskov 2010). Ist das Rückgrat mit α -1,6-verknüpften Gal-Resten substituiert, wird es Galactomannan bzw. Galactoglucomannan genannt (Maeda *et al.* 2000). Mannanhaltige Polysaccharide dienen in den Samen einiger Leguminosen und Palmen als Speicherkohlenhydrate (Buckeridge 2000). Obwohl Galactoglucomannane nur in geringen Mengen vorkommen, sind sie weit verbreitet in pflanzlichen Zellwänden nachweisbar. Ihre biologische Funktion ist bislang jedoch nicht abschließend geklärt (Schröder 2001).

1.2.2 Algen (*Algae*)

Algen bilden eine hoch komplexe polyphyletische Gruppe an Organismen, die überwiegend in aquatischen Lebensräumen vorkommen. Sie reichen von mikroskopisch kleinen Mikroalgen bis hin zu großen Makroalgen und stellen die Hauptbiomasse in Küstenbereichen dar (Zhou *et al.* 2024).

Im Gegensatz zu den meisten terrestrischen Pflanzen gelten Algen als schnellwachsend (Huang *et al.* 2022). Sie lassen sich gemäß der Färbung des Thallus in mehrere Gruppen unterteilen, zu denen zum Beispiel die Braunalgen (*Phaeophyceae*), die Rotalgen (*Rhodophyta*) sowie die Grünalgen (*Chlorophyta*) zählen. Diese Gruppen unterscheiden sich in ihrer Zellwandstruktur, in ihren Speicherstoffen sowie in Vorkommen und Herkunft (Holdt und Kraan 2011).

Algen spielen eine zentrale Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf und stellen durch ihre hohe Photosyntheseleistung einen bedeutenden Teil der marinen Primärproduktion dar. Darüber hinaus

gewinnen sie zunehmend in Bereichen wie der Biotechnologie, Pharmazie, Ernährung und Materialwissenschaft an Bedeutung (Borowitzka 2013).

Aufgrund der Relevanz in dieser Arbeit liegt in folgenden Kapiteln der Fokus auf den Braunalgen. Zu diesen ausschließlich im Salzwasser wachsenden Makroalgen lassen sich ca. 250 Gattungen und 1.500 – 2.000 Spezies zuordnen. Zu den am häufigsten vertretenen bzw. überwiegend verwendeten Braunalgen zählen solche der Gattung *Saccharina*, *Undaria*, *Sargassum* und *Ascophyllum* (Zhou *et al.* 2024). Nachfolgend werden sowohl der Zellwandaufbau der Alge sowie die darin relevanten Polysaccharide näher thematisiert.

1.2.2.1 Aufbau der Zellwand von Algen

Ein zentrales Unterscheidungsmerkmal zwischen den Zellwänden von Algen und terrestrischen Pflanzen ist der hohe Anteil an polyanionischen Matrixbestandteilen, insbesondere sulfatierten Polysaccharidstrukturen. Diese dienen neben der mechanischen ebenfalls der osmotischen und ionischen Zellregulation (Hentati *et al.* 2020; Mabeau und Kloareg 1987). Die besonderen Eigenschaften werden durch die Bindung von Kationen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Na^+ gefördert, was eine erhöhte Resistenz der Algen gegenüber Dehydrieren ermöglicht (Hentati *et al.* 2020).

Das am weitesten verbreitete Modell zur Beschreibung des Zellwandaufbaus von Algen ist ein Zwei-Phasen-Modell, das die Zellwände in zwei strukturelle Komponenten unterteilt: Die „kristalline Phase“ bildet das Skelett der Zellwand, dieses ist in eine amorphe „Matrix“ eingelagert (Abbildung 5) (Kloareg und Quatrano 1988). Bei Braunalgen besteht die kristalline Phase dabei ausschließlich aus Cellulose, welche, im Vergleich zu Landpflanzen, mit nur etwa 1 – 8 % einen geringen Anteil an den Gesamtzellwandpolysacchariden einnimmt (Deniaud-Bouet *et al.* 2014). Der überwiegende Teil (über 80 %) der Zellwand besteht aus wasserlöslichen Matrixkomponenten, darunter vor allem das uronsäurereiche Alginat sowie das sulfatierte Polysaccharid Fucoïdan, die gemäß Kloareg und Quatrano (1988) bis zu 45 % der Algengesamt-trockenmasse ausmachen (Mabeau und Kloareg 1987). Die Strukturen dieser Polymere werden in den folgenden Kapiteln näher thematisiert.

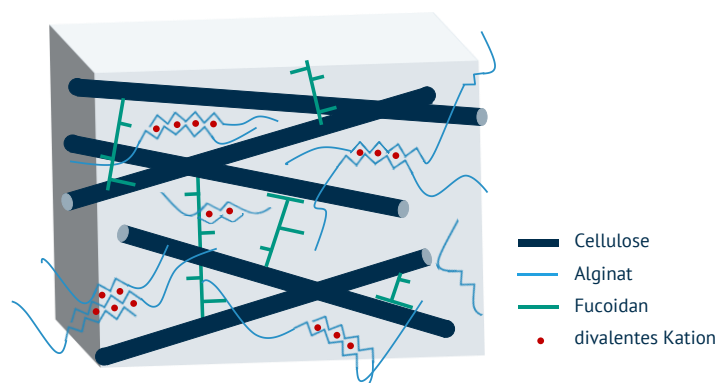


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Zellwand der Braunalgen nach Kloareg und Quatrano (1988). Diese besteht aus einer „kristallinen“ cellulosereichen Phase sowie aus einer amorphen „Matrix“ aus Fucoïdan und Alginat.

Ein weiteres, detaillierteres Zellwandmodell speziell für Braunalgen wurde durch Deniaud-Bouet *et al.* (2014) vorgestellt. Dieses beschreibt die Zellwand als ein komplexes duales Netzwerk. Einerseits ein Netzwerk aus Cellulosemikrofibrillen, die durch Fucoidan umgeben und miteinander vernetzt sind, andererseits ein Netzwerk, das aus Alginat, halogenierten und/oder sulfatierten Polyphenolen (Phlorotannine) sowie zellwandassoziierten Proteinen gebildet wird. Ergänzend konnten Awanthi *et al.* (2023) zudem kurzkettige Hemicellulosen wie β -1,4 und -1,3-Glucane sowie Arabinoxylanproteine in den Zellwänden der Braunalge identifizieren. Während die chemische Zusammensetzung der einzelnen Zellwandkomponenten in der Literatur gut beschrieben ist, bleibt die Frage nach der genauen Interaktion der Polymere und der räumlichen Organisation der Netzwerke bislang weitgehend unbeantwortet (Deniaud-Bouet *et al.* 2014).

1.2.2.2 Strukturen gängiger Zellwandpolysaccharide von Braunalgen

Die Polysaccharide der Zellwände mariner Algen gelten im Vergleich zu jenen aus terrestrischen Pflanzen als deutlich weniger erforscht. Dennoch konnten bereits vielfältige Strukturen identifiziert werden, die sich im Wesentlichen drei zentralen Polysaccharidklassen zuordnen lassen. Im Folgenden werden die Grundstruktur sowie charakteristische Modifikationen der für diese Arbeit relevanten Zellwandpolysaccharide von Braunalgen dargestellt (Abbildung 6).

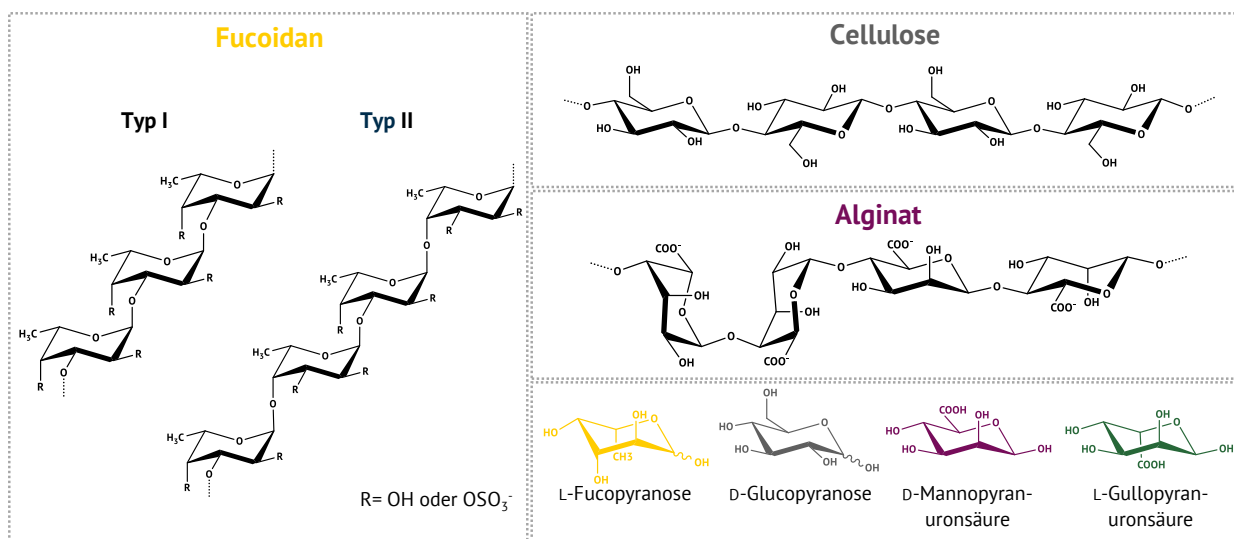


Abbildung 6: Grundstruktur relevanter Zellwandpolysaccharide von Braunalgen sowie die Strukturen der darin enthaltenen Monosaccharidbausteine

Die strukturelle Integrität der Braunalgenzellwand beruht auf einem Gerüst aus **Cellulose**. Diese besteht, analog zu der Cellulose in Landpflanzen, aus β -1,4-glycosidisch verknüpfter Glc_p (Abbildung 6). Die linearen Polymerketten bilden durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Glc-Einheiten hochgeordnete Mikrofibrillen, die maßgeblich zur mechanischen Stabilität der Zellwand beitragen. Im Gegensatz zu der aus Landpflanzen bekannten Cellulose handelt es sich bei mariner Cellulose jedoch häufig nicht um ein ausschließliches β -1,4-Glucan. Vielmehr können weitere Monosaccharide eingebaut sein. Ein Beispiel hierfür liefert die Rotalge

Rhodymenia palmata, bei der neben Glc auch β -1,4-verknüpfte Xylp-Einheiten nachgewiesen wurden (Kloareg und Quatrano 1988).

Eine weitere bedeutende Klasse von Zellwandpolysacchariden stellen die **Fucoidane** dar. Gemäß der Definition der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) handelt es sich dabei um Polysaccharide, die überwiegend aus sulfatierter L-Fucp bestehen und weniger als 10 % andere Monosaccharide enthalten (Berteau und Mulloy 2003). Die strukturelle Charakterisierung von Fucoidanen erfolgte zunächst anhand von Isolaten aus *Fucus vesiculosus*. Dabei wurde ein lineares Rückgrat aus α -1,3-glykosidisch verknüpften L-Fucp-Einheiten identifiziert (Typ I, Abbildung 6), wobei eine Sulfatierung typischerweise an der C4- und oder C2-Position erfolgt (Patankar *et al.* 1993). Spätere Untersuchungen durch Chevolut *et al.* (2001) beschreiben jedoch auch alternative Rückgratstrukturen, etwa mit alternierend α -1,3- und α -1,4-verknüpften Fucp-Einheiten (Typ II, Abbildung 6). Darüber hinaus konnten Sulfatierungen an den Positionen C2, C3 und C4 nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2022). Neben diesen linearen Strukturelementen weisen Fucoidane häufig verzweigte Seitenketten aus α -1,2-verknüpften L-Fucp-4-sulfat-Einheiten sowie geringe Mengen an Xyl, Gal, Man und GlcA auf (Berteau und Mulloy 2003; Huang *et al.* 2022). Die strukturelle Komplexität der bislang charakterisierten Fucoidane variiert dabei erheblich in Abhängigkeit von der untersuchten Braunalgenart sowie den eingesetzten Extraktionsbedingungen (Hentati *et al.* 2020).

Unter dem Sammelbegriff **Alginat** wird die Alginsäure und deren Salze zusammengefasst. Das lineare Polysaccharid zählt zur Gruppe der Polyuronsäuren und besteht aus D-ManpA und L-GulpA (Huang *et al.* 2022). Aufgrund der hohen Relevanz dieses Biopolymers für die vorliegende Arbeit, wird dessen chemische Struktur und Eigenschaften ausführlich in Kapitel 1.3.1.3 behandelt.

1.3 Uronsäurehaltige Polysaccharide

1.3.1 Zellwandassoziierte Polysaccharide

1.3.1.1 Pektin

Etwa 90 % der in pflanzlichen Zellwänden vorkommenden US stammen aus Pektin (Caffall und Mohnen 2009). Dieses ist ein strukturell bedeutendes Polysaccharid pflanzlicher Zellwände und kommt vor allem in der Mittellamelle und der primären Zellwand, in geringerem Umfang auch in der Sekundärzellwand, vor. Es übernimmt eine Vielzahl biologischer Funktionen, insbesondere die Regulation der Zellwandfestigkeit und -stabilität sowie den Zell-Zell-Zusammenhalt unter Wahrung dynamischer Zellstrukturen. Darüber hinaus beeinflusst Pektin Eigenschaften wie Porosität, Oberflächenladung, pH-Wert und den Ionenaustausch, wodurch es wesentlich zum Ionentransport innerhalb der Zellwand beiträgt (Voragen *et al.* 2009).

Pektine stellen eine komplexe und heterogene Gruppe von Polysacchariden dar, die in drei Hauptklassen unterteilt wird: HG, RG I und RG II (Caffall und Mohnen 2009). Das lineare unverzweigte HG wird, wie bereits in Abbildung 4 beschrieben, aus α -1,4-verknüpften D-GalpA-Einheiten gebildet und kann bis zu 60 % der Pektinstruktur ausmachen. Üblich sind DP zwischen 72 und 100, wobei in grünen Tomaten auch Ketten mit einem DP von bis zu 320 beschrieben wurden (Caffall und

Mohnen 2009; Round *et al.* 2010). Die GalA-Einheiten können an Position O2 und/oder O3 acetyliert vorliegen sowie eine mit Methanol veresterte Carboxygruppe aufweisen. Der Veresterungsgrad ist stark von der pflanzlichen Quelle, dem Reifegrad des pflanzlichen Gewebes und der Extraktionsmethode abhängig und hat einen wesentlichen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften des Polymers (Caffall und Mohnen 2009; Yapo 2011). Liegt der Veresterungsgrad der Carboxygruppen über 50 %, wird von hoch-methylverestertem Pektin gesprochen. Bei einem niedrigeren Veresterungsgrad handelt es sich demnach um niedrig-methylverestertes Pektin. Einen Einfluss nimmt dieses Charakteristikum des HGs vor allem auf die zur Gelbildung des Pektins benötigten Bedingungen (Voragen *et al.* 1995).

Bei niedrigverestertem Pektin erfolgt die Gelbildung durch Interaktion der freien Carboxygruppen des HGs mit Calciumionen. Voraussetzung für stabile Gelstrukturen ist das Vorliegen von mindestens zehn konsekutiven, nicht methylierten GalA-Einheiten (Liners *et al.* 1989). Kernspinresonanzspektroskopische (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) Analysen zeigten an Pektin aus Orangenschalen eine doppel-helikale Struktur der interagierenden HG-Einheiten im Gel, was in Übereinstimmung mit der häufig genutzten Beschreibung der „Egg-Box“ Gelstruktur steht (Jarvis und Apperley 1995).

Xylogalacturonan (XG) ist eine HG-basierte Struktur, die jedoch mit β -1,3-gebundener D-Xylp an O3 der GalA substituiert ist. Die Xyl-Seitenkette ist oft zu einem Disaccharid verlängert, indem eine zweite β -D-Xylp über eine 1,2-Bindung an die erste Xyl gebunden ist. Der Substitutionsgrad ist stark abhängig vom Ursprung des XGs und variiert zwischen 25 % und 75 %. Zudem konnten auch hier Acetylgruppen sowie Veresterungen mit Methanol der GalA identifiziert werden (Caffall und Mohnen 2009; Schols 1995a). XG ist überwiegend in Frucht- und Samengewebe lokalisiert, konnte aber auch in Exsudaten von Bäumen, wie Tragant, identifiziert werden (Aspinall und Baillie 1963; Voragen *et al.* 2009).

Das Rückgrat von RG I besteht aus repetitiven Disaccharideinheiten der Form $[-\alpha$ -D-GalpA-1,2- α -L-Rhap-1,4-] $_{n>1}$ (Abbildung 4). Die GalA kann zudem mit Acetylgruppen an Position O2 und/oder O3 substituiert vorliegen (Voragen *et al.* 2009). Über eine glycosidische Bindung zur Rha an O4 sind Seitenketten, wie Arabinan, Galactan oder Arabinogalactan, an das Rückgrat gebunden (Caffall und Mohnen 2009; Yapo 2011). Der Substitutionsgrad variiert abhängig von Spezies und Extraktionsbedingungen zwischen 20 % und 80 %, wobei der DP typischerweise unter 50 liegt (De Vries 1982; Yapo 2011).

Die Seitenkettenstruktur ist durch eine hohe Heterogenität gekennzeichnet. Arabinane setzen sich aus α -1,5-verknüpften L-Araf-Einheiten zusammen, die an O2 und/oder O3 mit weiteren mono- oder oligomeren Araf-Resten substituiert sein können. (Arabino)Galactane weisen ein Galactanrückgrat auf. Die daraus resultierenden Arabinogalactane lassen sich in Typ I und Typ II differenzieren. Typ I, häufiger vertreten und kovalent mit RG I assoziiert, zeichnet sich durch eine β -1,4-verknüpfte Galactankette mit terminalen α -1,4-L-Arap- und eingestreuten α -1,5-L-Araf-Resten aus. Die Galactan-Hauptkette kann, wenngleich selten, zudem an O3 und O6 mit Gal oder Ara sowie mit kurzen

oligomeren α -1,4-L-Arap-Einheiten substituiert vorliegen (Caffall und Mohnen 2009; Voragen *et al.* 2009).

Sowohl Arabinane als auch (Arabino)galactane des Typ I aus Zellwänden der Familie *Amaranthaceae* können an O2 und O5 der Arabinose- bzw. am O6 der Galactoseeinheiten des Rückgrats mit Ferulasäure verestert sein (Bunzel *et al.* 2005; Ishii und Tobita 1993; Wefers *et al.* 2014). Diese so modifizierten Arabinane bzw. Galactane können durch radikalische Prozesse zu kovalenten Vernetzungen der Pektinmatrix führen (Caffall und Mohnen 2009; Dobberstein und Bunzel 2010). Inwiefern bzw. ob das strukturell abweichende Arabinogalactan Typ II mit RG I interagiert, ist zurzeit nicht abschließend geklärt, weshalb die Struktur hier nicht näher beschrieben wird.

RG II repräsentiert eine komplexe, hochkonservierte Struktur. Es besteht aus einem HG-Rückgrat aus sieben bis neun, teils methylveresterten, GalA-Einheiten und ist mit 4 – 8 % ubiquitär in Primärzellwänden vorhanden (O'Neill *et al.* 2004; Voragen *et al.* 2009). Vier charakterisierte Seitenketten mit insgesamt zwölf verschiedenen Monosaccharideinheiten, darunter auch seltene Zucker wie 2-O-Methyl-Xyl, 2-O-Methyl-Fuc, Acerinsäure, 2-Keto-3-desoxy-D-lyxo-heptulosarinsäure und 2-Keto-3-desoxy-D-manno-octulosonsäure, sind an das Rückgrat gebunden (Caffall und Mohnen 2009). Mittels ¹¹B-NMR-Spektroskopie wiesen Ishii und Matsunaga (1996) die Dimerbildung durch Borsäurediester zwischen RG II-Molekülen nach. Diese spielen vermutlich eine essenzielle Rolle in der pflanzlichen Entwicklung (O'Neill *et al.* 2004).

Die räumliche Anordnung sowie mögliche kovalente Verknüpfungen der Pektinfraktionen HG, RG I und RG II sind Gegenstand aktueller Diskussionen. In Sojabohnen konnte eine kovalente Bindung zwischen HG und RG I nach enzymatischer Hydrolyse nachgewiesen werden (Nakamura *et al.* 2002). Durch Untersuchung mittels enzymatischer Freisetzung mit verschiedenen Polygalacturonasen konnten Ishii und Matsunaga (1996) RG II Strukturen identifizieren, wodurch auf eine kovalente Bindung zu RG I bzw. HG haltigen Strukturen geschlossen wurde. Diese Interaktion ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Yapo 2011). Ein etabliertes Strukturmodell von Pektin geht auf De Vries *et al.* (1982) zurück. Dies beschreibt Pektin als eine Kombination aus verzweigten, blockweise angeordneten „*hairy regions*“, dargestellt durch das RG I, und den unverzweigten „*smooth regions*“ des HG (Abbildung 7). Alternativ wurde das sogenannte „*RG I-backbone*“-Modell vorgeschlagen, dem zufolge RG I das zentrale Rückgrat bildet, an welches HG sowie weitere Seitenketten gebunden sind. Die genaue strukturelle Organisation ist bislang nicht abschließend geklärt (Yapo 2011).

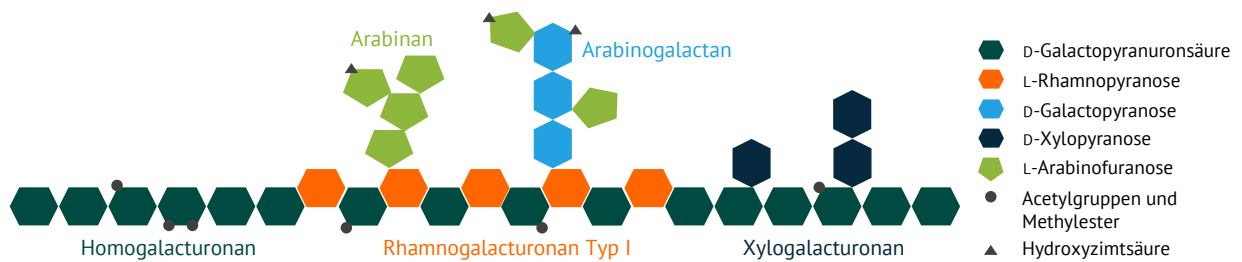


Abbildung 7: Struktur von Pektin gemäß dem von De Vries *et al.* (1982) aufgestellten Modell. Hierbei stellen die Homogalacturonaneinheiten die „smooth regions“ und das Rhamnogalactouronan Typ I die „hairy regions“ dar.

Pektin wird in der Lebensmittelindustrie als Gelier-, Stabilisierungs- und Verdickungsmittel verwendet, beispielsweise in Konfitüren oder Milchmodergetränken (Laurent und Boulenguer 2003; Schmidt *et al.* 2015). Gemäß der Verordnung (EU) Nr. 231/2012 muss Pektin bei einem Einsatz als Zusatzstoff einen Anteil von mindestens 65 % GaIA aufweisen. Es stammt meist aus Zitrus- oder Apfelprester und besteht, harschen Extraktionsbedingungen geschuldet, vorwiegend aus HG und unsubstituiertem RG I (Voragen *et al.* 2009). Pektinen aus Zuckerrüben werden zudem gute emulgierende Eigenschaften zugesprochen, wobei hier ein weitgehender Erhalt der Arabinane notwendig zu sein scheint (Bindereif *et al.* 2021; Yapo *et al.* 2007).

1.3.1.2 Glucuronoxylan

Die vorwiegend in der Sekundärzellwand lokalisierten Xylane zeichnen sich durch ein lineares Rückgrat aus β -1,4-verknüpfter D-Xylp aus, das in Abhängigkeit der Pflanzenart unterschiedliche Substituenten tragen kann. Bei Harthölzern wie Kastanie, Birke oder Eukalyptus stellt GX mit einem Massenanteil von 12 – 30 % der Trockenmasse die dominierende Xylan-Spezies dar (Barbat *et al.* 2010; Westbye *et al.* 2008; Willför *et al.* 2005). Hier ist das Rückgrat teils über α -1,2-glycosidische Bindungen mit 4-O-Me-GlcpA substituiert, wobei im Mittel auf zehn Xyl-Einheiten eine solche Seitenkette entfällt (Ebringerová *et al.* 2005). Zudem können bis zu 70 % der Xyl an Position O2 und/oder O3 acetyliert vorliegen, was entscheidend die Konformation des Polymers, dessen Löslichkeit und dessen Interaktionen mit anderen Zellwandkomponenten bestimmt (Biely *et al.* 2016). Ein weiteres strukturelles Merkmal von GX ist sein konserviertes Pentasaccharid-Motiv am reduzierenden Ende, bestehend aus β -D-Xylp-1,4- β -D-Xylp-1,3- α -L-Rhap-1,2- α -D-GalAp-1,4-D-Xylp (Scheller und Ulvskov 2010). Ausschließlich in Eukalyptus ist zudem ein Drittel der 4-O-Me-GlcA an Position O2 mit Galp oder Glcp substituiert (Evtuguin *et al.* 2003). Während GX die dominierende Form in Harthölzern darstellt, sind in Weichhölzern und Monokotyledonen überwiegend Glucuronarabinoxylane zu finden, die zusätzlich in Position O3 α -L-Araf-Seitenketten tragen und mit un-methylierter GlcA substituiert sind (Ebringerová *et al.* 2005).

Die strukturelle Organisation von GX wird durch die Verteilung von Glucuronosyl- und Acetylgruppen geprägt. Entsprechend wird zwischen einer Hauptdomäne mit relativ gleichmäßig verteilten Substituenten und einer Nebendomäne, die durch unregelmäßigere Substitutionsmuster und einem hohen Substitutionsgrad gekennzeichnet ist, unterschieden. Beide Domänen können innerhalb

desselben Moleküls auftreten und entstehen durch die Aktivität unterschiedlicher Xylanglucuronosyl- und Acetyltransferasen (Bromley *et al.* 2013; Grantham *et al.* 2017).

Die Hauptdomäne von GX zeigt in Gegenwart von Cellulose eine zweifach helikale Struktur, in der die D-Xylp-Einheiten um 180° zueinander versetzt angeordnet sind (Busse-Wicher *et al.* 2014). Substituenten wie 4-O-Me-GlcA-Seitenketten befinden sich dabei bevorzugt auf einer Seite der Helix (Bromley *et al.* 2013; Busse-Wicher *et al.* 2014). Diese räumliche Anordnung ermöglicht eine ausgeprägte Interaktion der unsubstituierten Rückgratseite mit Cellulosemikrofibrillen über Wasserstoffbrückenbindungen (Busse-Wicher *et al.* 2014). Gleichzeitig schaffen die einseitig ausgerichteten Acetylgruppen Bereiche mit erhöhter Hydrophobizität, welche die Interaktion mit Lignin begünstigen (Busse-Wicher *et al.* 2014; Simmons *et al.* 2016). Darüber hinaus können die Carboxygruppen der 4-O-Me-GlcA-Reste über kovalente Esterbindungen mit Hydroxylgruppen des Lignins verknüpft sein, wodurch stabile Polysaccharid-Lignin-Netzwerke entstehen (Takahashi und Koshijima 1988). Molekulardynamische Simulationen weisen zudem darauf hin, dass die 4-O-Me-GlcA-Einheiten mit Calcium-Ionen wechselwirken und intermolekulare Quervernetzungen zwischen verschiedenen GX-Ketten vermitteln können (Pereira *et al.* 2017).

Während die Hauptdomäne bevorzugt mit Cellulose assoziiert, wendet sich die Nebendomäne unter Annahme einer dreifach helikalen Struktur von der Cellulose ab. Aufgrund ihres höheren Substitutionsgrades interagieren diese Domänen gemäß Kang *et al.* (2019) besonders stark mit Lignin und tragen zur Ausbildung eines komplexen, heterogenen Zellwandverbunds bei. Inwiefern die Methylierung der US im Xylan einen Einfluss auf dessen Funktion im pflanzlichen Gewebe, wie etwa die Interaktion mit weiteren Zellwandbestandteilen, nimmt, ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt.

1.3.1.3 Alginat

Das Zellwandpolysaccharid Alginat bzw. Alginsäure ist ein bedeutender Bestandteil der Zellwände von Braunalgen. Es macht etwa 15 – 45 % der Algen-Trockenmasse aus und kann einen Anteil von bis zu 65 % der Zellwandpolysaccharide einnehmen (Deniaud-Bouet *et al.* 2014; Mabeau und Kloareg 1987; Zhou *et al.* 2024). Alginat liegt in einem breiten Molekulargewichtsbereich zwischen 60 und 700 kDa vor, wobei der DP stark von der Algenart, der geographischen Herkunft sowie den Extraktionsbedingungen abhängt (Ching *et al.* 2015). Alginat ist ein lineares Copolymer, das aus β -D-ManpA und α -L-GulpA besteht, die in variierenden Anteilen 1,4-glycosidisch verknüpft auftreten. Die Monomere sind in Blockstrukturen organisiert, d. h. in Form von (poly)ManA-reichen M-Blöcken, (poly)GulA-reichen G-Blöcken sowie MG- bzw. GM-Heteroblöcken (Abbildung 8). Die Blockzusammensetzung und -verteilung variiert in Abhängigkeit von Art und Standort der Alge (Hentati *et al.* 2020).

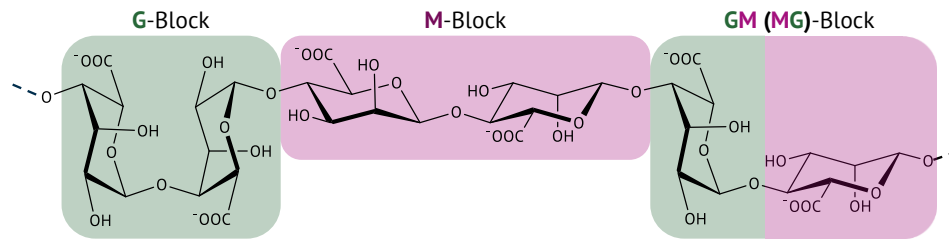


Abbildung 8: Strukturausschnitt eines Alginats mit guluronsäurehaltigen G-Blöcken, mannuronsäurehaltigen M-Blöcken sowie Heteroblöcken (MG bzw. GM) aus Mannuron- und Guluronsäure

Eine der wichtigsten funktionellen Eigenschaften des Alginats ist die Fähigkeit zur Gelbildung. Es lassen sich zwei grundlegende Mechanismen der Gelbildung unterscheiden: Zum einen kann die Gelbildung ionisch, zum anderen säureinduziert verlaufen. Die ionische Gelbildung erfolgt über die G-Blöcke, welche durch Koordination mit zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} , Sr^{2+} oder Ba^{2+} dreidimensionale Netzwerke ausbilden. Dabei interagieren jeweils zwei Carboxygruppen mit einem Kation, wie es im „Egg-Box“-Modell beschrieben ist (Abbildung 9) (Ching *et al.* 2015). Der Anteil an G-Blöcken ist dabei maßgeblich für die Ionenselektivität und die Festigkeit des Gels verantwortlich. Die Affinität zur Kationenbindung nimmt in der Reihenfolge $\text{Mg} < \text{Ca} < \text{Sr} < \text{Ba}$ zu, wird aber auch stark durch den Zustand und die Zusammensetzung des bereits gebildeten Gels beeinflusst. Der Anteil und die Verteilung der G-Blöcke führt zu vielfältigen Strukturen mit unterschiedlichen Molekulargewichten und rheologischen Eigenschaften (Ching *et al.* 2015; Grant *et al.* 2002; Skjåk-Bræk *et al.* 1989).

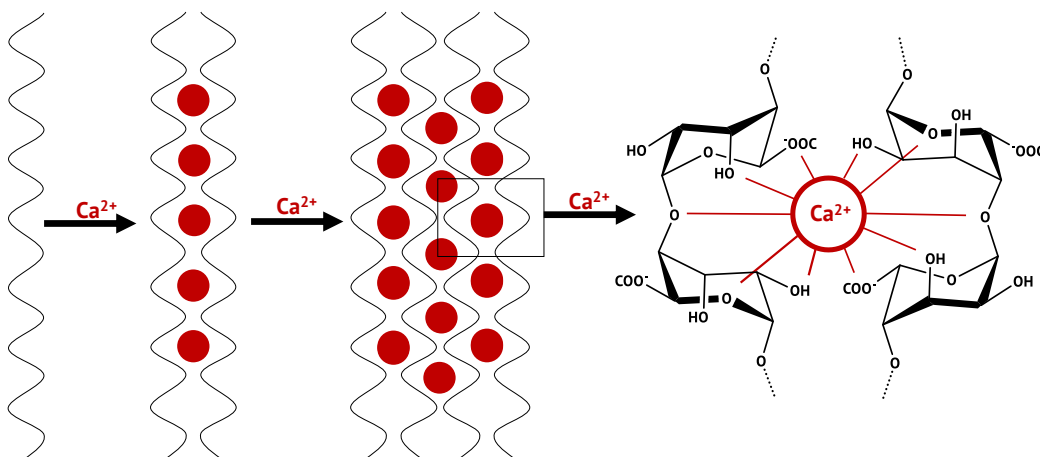


Abbildung 9: Durch Calciumkationen (rot) induzierte Gelbildung von Alginat (schwarz). Die entstehende Netzwerkstruktur kann durch das „Egg-Box“-Modell beschrieben werden, in dem stets vier Guluronsäurereste mit einem Calciumion interagieren.

Säureinduzierte Gele entstehen durch Absenkung des pH-Wertes unterhalb des pK_s -Wertes des Alginats (3,4 – 3,7). Während ein rascher pH-Abfall zur Ausfällung von Aggregaten führt, begünstigt ein langsamer Abfall die Ausbildung eines homogenen Gels. Aufgrund ihrer geringen technischen Relevanz sind saure Gele bislang nur unzureichend untersucht (Ching *et al.* 2015).

Die physikalisch-rheologischen Eigenschaften des Alginats werden maßgeblich durch das Mannuronsäure-zu-Guluronsäure-Verhältnis (M/G) bestimmt. M-Block-reiche Polymere ($\text{M/G} > 1$)

erzeugen Gele mit hoher Viskosität und elastischer Struktur, während ein hoher Anteil an G-Blöcken mit der Ausbildung stabiler, jedoch spröder Gele assoziiert ist (Hentati *et al.* 2020). Die von Zhou *et al.* (2024) zusammengefassten M/G-Verhältnisse verschiedener Braunalgen zeigen eine Spannweite von 7 – 13. Im Vergleich dazu berichten Mizuno *et al.* (1983) für Alginat aus der Gattung *Sargassum* deutlich niedrigere Werte von 0,3 – 1,8, sodass hier mit abweichenden rheologischen Eigenschaften zu rechnen ist.

Aufgrund seiner gelbildenden Eigenschaften wird Alginat vielfach industriell eingesetzt, insbesondere in der Lebensmittelindustrie, der Pharmazie sowie in der Medizin (Puscaselu *et al.* 2020). Typische Anwendungen umfassen Produkte zur Wundheilung sowie Verkapselungen von Wirkstoffen, Fetten oder Polyphenolen (Abubakr *et al.* 2009; Chan 2011; Ching *et al.* 2015). In der Praxis wird dabei überwiegend Calcium als Vernetzungsjon verwendet, da es toxikologisch unbedenklich und kostengünstig verfügbar ist (Ching *et al.*, 2015).

1.3.2 Ausgewählte Hydrokolloide

Wasserlösliche, meist pflanzlich gewonnene Polysaccharide mit breiter Anwendung in der Lebensmittelindustrie, gehören der Gruppe der Hydrokolloide an, die zudem auch Proteine umfassen kann. Aufgrund ihrer gelbildenden, viskositätserhöhenden und stabilisierenden Eigenschaften werden sie als Stabilisator, Geliermittel und Emulgator sowie für Beschichtungen und biobasierte Verpackungen eingesetzt. Der Begriff „Gummi“ bezeichnet dabei eine Untergruppe natürlich vorkommender Polysaccharide mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften (Mirhosseini und Amid 2012). Im Folgenden werden ausgewählte, für diese Arbeit relevante Hydrokolloide vorgestellt.

1.3.2.1 Xanthan

Xanthan ist ein bakterielles Exopolysaccharid, das von Bakterien der Gattung *Xanthomonas spp.* sezerniert wird. Für industrielle Anwendungen wird vor allem *Xanthomonas campestris* genutzt (García-Ochoa *et al.* 2000). Xanthan weist eine klar definierte Struktur auf und besteht aus den Monosacchariden Glc, Man und GlcA im molaren Verhältnis von etwa 2:2:1 (Valent *et al.* 1980). Das Polysaccharidrückgrat ähnelt strukturell der Cellulose und setzt sich aus β -1,4-gebundenen D-Glcp-Einheiten zusammen. Diese sind an jeder zweiten Einheit an Position O3 der Glc mit trisacchariden Seitenketten der Form [D-Manp- β -1,4-D-GlcpA- β -1,2-D-Manp- α -1,3-] substituiert (Kool *et al.* 2013). Im Mittel sind etwa 50 % der terminalen Man-Einheiten mit Pyruvat modifiziert, das als Ketal über die Positionen O4 und O6 an den Zucker gebunden ist (García-Ochoa *et al.* 2000). Das exakte Substitutionsmuster hängt maßgeblich von den verwendeten Fermentationsbedingungen sowie vom eingesetzten *Xanthomonas*-Stamm ab (Kool *et al.* 2013). Kool *et al.* (2013) analysierten die Acetyl- und Pyruvatgehalte in Xanthanen, die von verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen produziert wurden. Dabei ergaben sich durchschnittlich 1,15 Acetyl- und 0,56 Pyruvatgruppen pro Seitenkette. Diese Ergebnisse deuten auf eine teilweise Mehrfachacetylierung der Seitenketten hin. Massenspektrometrische Fragmentierungsanalysen bestätigten zudem, dass Acetylgruppen nicht nur an der an das Polysaccharidrückgrat gebundenen Mannose, sondern auch zu etwa 5 – 21 % an den terminalen Man-Einheiten am O6-Atom vorkommen. Durch die Substituenten resultiert ein negativ

geladenes Polysaccharid mit einer Molekulargewichtsverteilung von ca. 2×10^6 bis 20×10^6 Da (García-Ochoa *et al.* 2000).

Xanthan zeichnet sich durch eine hohe Wasserlöslichkeit und die Fähigkeit aus, bereits in niedrigen Konzentrationen hochviskose Lösungen zu bilden. Die Viskosität ist über weite Temperaturbereiche hinweg stabil, das Molekül liegt jedoch temperaturabhängig entweder in einer helikalen oder einer *random-coil*-Struktur vor (Milas und Rinaudo 1979).

Aufgrund dieser Eigenschaften findet Xanthan breite industrielle Anwendung. Besonders in der Lebensmittelindustrie wird es als Verdickungs- und Stabilisierungsmittel z. B. in Saucen, Dressings, Getränken und Milchprodukten, meist in Konzentrationen zwischen 0,03 % und 1 %, eingesetzt. Darüber hinaus wird es in zahlreichen weiteren Bereichen verwendet, wie etwa in der Medizin und Pharmazie, in kosmetischen Formulierungen sowie in Produkten der Farb-, Agrar- und Keramikindustrie (García-Ochoa *et al.* 2000).

1.3.2.2 Karayagummi

Das getrocknete Exsudat des indischen Baumes *Sterculia urens*, bekannt unter der Bezeichnung Karayagummi, stellt ein natürliches Polysaccharid mit vielfältigen industriellen Anwendungen dar. Hauptsächlich stammt das Rohmaterial aus Zentral- und Nordindien. Die kommerzielle Gewinnung erfolgt durch gezielte Einschnitte in Stamm und Äste des Baumes, wobei die Exsudatmenge stark von Faktoren wie dem Alter des Baumes, der Jahreszeit und den lokalen Umweltbedingungen abhängt (Prasad *et al.* 2022). Karayagummi ist ein hochmolekulares Polysaccharid mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 9.000 bis 16.000 kDa. Es setzt sich zu etwa 55 – 60 % aus Neutralzuckern, 37 – 40 % aus US sowie rund 8 % aus Acetylgruppen zusammen. Die prozentualen Verhältnisse der Monosaccharide GalA, Rha, GlcA und Gal variieren in Abhängigkeit von der botanischen Herkunft und den Umweltfaktoren (Mirhosseini und Amid 2012).

Das auf RG I basierte Rückgrat setzt sich aus wiederholenden Einheiten von $[-\alpha\text{-L-Rhap-1,4-}\alpha\text{-D-GalpA-1,2-}]$ zusammen und liegt meist als Calcium oder Magnesiumsalz vor (Mirhosseini und Amid 2012). Zwei rückgratgebundene Substituenten werden in der Literatur beschrieben: $\beta\text{-D-GlcA}$ -Reste, die über eine 1,3-Bindung an GalA gebunden sind, sowie $\beta\text{-D-Gal}$ -Einheiten, die entweder über eine 1,4-Bindung an Rha oder eine 1,2-Bindung an GalA angebonden sind. Darüber hinaus weist Karayagummi Acetylierungen auf, deren genaue Positionierung innerhalb der Polymerstruktur bislang nicht vollständig geklärt ist (Prasad *et al.* 2022). Neben den Zuckerbausteinen konnten auch geringe Mengen an Protein (ca. 1 %) und Fett (ca. 2 %) nachgewiesen werden. Die darin enthaltenen Aminosäuren umfassen unter anderem Asparagin- und Glutaminsäure sowie Prolin, während die identifizierten Fettsäuren unter anderem Stearin-, Palmitin-, Palmitolein- und Laurinsäure einschließen (Vinod *et al.* 2010).

Eine der charakteristischen physikochemischen Eigenschaften von Karayagummi ist seine sehr geringe Wasserlöslichkeit. In kaltem Wasser beträgt die Löslichkeit weniger als 0,02 %, und selbst bei erhöhten Temperaturen steigt diese lediglich auf etwa 0,06 % an (Phillips und Williams 2020). Die geringe Löslichkeit wird maßgeblich durch den Gehalt an Acetylgruppen beeinflusst. Durch eine

alkalische Behandlung, bei der es zur Deacetylierung kommt, kann die Wasserlöslichkeit des Gummis signifikant auf bis zu 90 % erhöht werden (Postulkova *et al.* 2017).

Karayagummi wird aufgrund seiner vielseitigen funktionellen Eigenschaften in zahlreichen Industriezweigen eingesetzt. In der Pharmaindustrie dient es als Hilfsstoff für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung, in der Lebensmitteltechnologie als Verdickungsmittel, Emulgator, Stabilisator und Ölbindemittel, insbesondere in Backwaren und Milchprodukten. Hier spielt es durch seine hohe Wasseraufnahmefähigkeit (Quellen) insbesondere eine Rolle bei der Haltbarkeitsverlängerung. Weitere Anwendungen finden sich in der Lederverarbeitung sowie in der Textil- und Druckindustrie (Phillips und Williams 2020).

1.3.2.3 Gummi arabicum

Eines der am häufigsten verwendeten Hydrokolloide stellt Gummi arabicum dar. Das polysaccharidreiche Exsudat wird aus *Acacia senegal* oder *Acacia seya* gewonnen, welche vorwiegend in Afrika südlich der Sahara angepflanzt werden (Phillips und Williams 2020). Die Polymere des Gummi arabicums erstrecken sich über einen weiten Molekulargewichtsbereich von 433 – 2.300 kDa (Kersten *et al.* 2025). Die stark heterogene Struktur setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: einem Polysaccharidanteil, der 90 % des Gummi arabicums ausmacht, einer Arabinogalactanprotein-Komponente von ca. 10 % sowie einem kleinen Anteil an Glycoprotein. Die beiden Letzteren unterscheiden sich vor allem durch das Protein-Kohlenhydrat-Verhältnis, das bei der Glycoproteinkomponente deutlich höher ausfällt (Dror *et al.* 2006).

Das hoch verzweigte Polysaccharid liegt als Calcium-, Kalium- oder Magnesiumsalz vor (Kersten *et al.* 2025). Kersten *et al.* (2025) analysierten die Monosaccharidzusammensetzung von 20 Gummi arabicum-Proben und konnten im Mittel 42 % Gal, 27 % Ara, 10 % Rha sowie 9 % GlcA und kleine Mengen an 4-O-Me-GlcA nachweisen. Die Polysaccharidkomponente ist aus einem Rückgrat aus 1,3-glycosidisch gebundenen β -D-Galp-Einheiten aufgebaut, die stark substituiert sind. Ein hoher Anteil an durch Methylierungsanalyse identifizierten terminalen Monosaccharideinheiten bestätigt den stark verzweigten Charakter. Verzweigungen finden sich hauptsächlich an Position O6, seltener auch an den Positionen O2 und/oder O4 der Gal. Die Seitenketten sind sehr heterogen und bestehen aus den zuvor genannten Monosacchariden in unterschiedlichen Verhältnissen und glycosidischen Verknüpfungen. Der Kohlenhydratanteil und der Proteinanteil sind über O-glycosidische Bindungen über Hydroxyprolin oder Serin verbunden (Nie *et al.* 2013).

Gummi arabicum ist sehr gut wasserlöslich und bildet erst ab Konzentrationen über 30 % viskose Lösungen. Das *Core-Shell* Modell begründet diese Eigenschaft mit der Anordnung der unterschiedlichen Bestandteile. So wird postuliert, dass sich das Arabinogalactan aus einem „Kern“ aus Protein mit einer „Hülle“ aus darum angeordneten Kohlenhydratbestandteilen zusammensetzt. Hieraus resultieren kompakte Moleküle mit vergleichsweise geringem hydrodynamischen Volumen (Phillips und Williams 2020). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten zudem die Aggregatbildung zwischen Gummi arabicum-Polymeren bei niedrigen pH-Werten, was auf eine Interaktion der Carboxygruppen der US mit den Aminogruppen des Proteins zurückzuführen sein könnte (Gashua *et al.* 2016).

Gummi arabicum findet eine vielfältige Anwendung, insbesondere in der Lebensmittelindustrie. Aufgrund seines amphiphilen Charakters und seiner hervorragenden Wasserlöslichkeit wird es häufig zur Stabilisierung und Emulgierung von ätherischen Ölen und Aromen in der Getränkeherstellung eingesetzt (Dickinson *et al.* 1988). Gummi arabicum ist dabei ein zentraler Bestandteil bei der Herstellung von Sirupen und Aromakonzentraten, die für alkoholfreie Erfrischungsgetränke verwendet werden. In teils deutlich höheren Konzentrationen (> 10 %) dient das Hydrokolloid in der Süßwarenindustrie, beispielsweise in Gummibärchen, Marshmallows oder Toffees, der Texturgebung und als Aromaträger. Bei der Sprühtrocknung Gummi arabicum-haltiger Aromaemulsionen entstehen pulverförmige, mikroverkapselte Aromastoffe, die eine verlängerte Haltbarkeit sowie eine kontrollierte Aromafreisetzung ermöglichen. Diese Form der Mikroverkapselung wird vielfach zur aromaschonenden Verarbeitung in diversen Lebensmitteln verwendet (Phillips und Williams 2020).

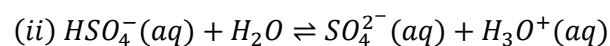
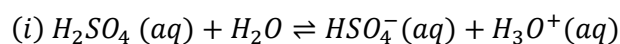
1.4 Kolorimetrische Analysen in der Uronsäureanalytik

Kolorimetrische Verfahren zur Analyse von Kohlenhydraten sind häufig eingesetzte Methoden in der Kohlenhydratchemie. Sie sind einfach durchführbar, schnell, kostengünstig und erfordern in der Regel keine aufwendige Probenvorbereitung sowie komplexe Apparaturen. Sowohl qualitative als auch quantitative Auswertungen sind möglich. Die Verfahren beruhen auf der Ausbildung von Chromophoren, die durch Reaktion mit spezifischen aromatischen Reagenzien entstehen. Diese Farbreaktion erfolgt typischerweise nach Vorbehandlung der kohlenhydrathaltigen Probe mit konzentrierter Schwefelsäure, die ebenfalls als Reaktionsmedium dient.

Für die Analyse von US wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte eine Vielzahl verschiedener Reaktionen veröffentlicht bzw. weiterentwickelt, die sich vorrangig in der Verwendung des zur Farbe führenden Chromogens unterscheiden (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973; Dische 1947; Yapo 2012).

1.4.1 Schwefelsäure als Reaktionsmedium

Schwefelsäure ist eine starke, zweiprotonige Säure die demnach in wässriger Lösung in zwei Stufen wie folgt dissoziiert (Holleman *et al.* 2017):



Die erste Dissoziationsstufe (i) verläuft in verdünnter wässriger Lösung nahezu vollständig, wodurch HSO_4^- als dominierende Spezies vorliegt. Die zweite Dissoziation (ii) ist hingegen deutlich weniger ausgeprägt und erfolgt in einer 1 M Lösung lediglich zu etwa 1,3 %. Aufgrund ihrer stark hygroskopischen Natur weist Schwefelsäure eine geringe Wasseraktivität auf (Holleman *et al.* 2017).

Bei hohen Konzentrationen ab etwa 14 M nimmt die Anzahl frei verfügbarer Wassermoleküle signifikant ab, wodurch auch undissoziierte H_2SO_4 -Moleküle in messbarem Umfang vorhanden sind (Margarella *et al.* 2013). Die Zusammensetzung der verschiedenen Spezies ist dabei stark abhängig

von der genauen Konzentration sowie der Temperatur. Margarella *et al.* (2013) untersuchten mithilfe der Photoelektronenspektroskopie die ionische Zusammensetzung von Schwefelsäurelösungen im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 14 M. Während bei Konzentrationen unterhalb von 5 M ein schneller Protonenaustausch zwischen Schwefelsäure und Wasser zu beobachten war, verändert sich die Dynamik bei höheren Konzentrationen hin zu einer stärker geordneten Struktur der Lösung. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Bazak *et al.* (2021) unter Anwendung der ^1H -, ^{17}O - und ^{33}S -NMR-Spektroskopie erzielt.

Neben ihrer stark wasserziehenden Eigenschaft wird konzentrierte Schwefelsäure häufig als oxidierendes Medium beschrieben, wobei diese Eigenschaft mit steigender Konzentration und Temperatur deutlich zunimmt (Holleman *et al.* 2017). Der in der Oxidationsstufe +VI vorliegende Schwefel wird dabei unter Elektronenaufnahme zu Schwefeldioxid reduziert. Die oxidierenden Eigenschaften konzentrierter Schwefelsäure finden insbesondere im Zusammenhang mit Metallen häufig Erwähnung (Baskerville 1895; Holleman *et al.* 2017).

1.4.2 Übergeordnetes Reaktionsprinzip zur Ausbildung chromophorer Verbindungen

1.4.2.1 Abbau von Kohlenhydraten unter sauren Bedingungen

Beim Erhitzen von Zuckern in Mineralsäuren tritt nach einer gewissen Zeit eine charakteristische Braunfärbung der Lösung sowie die Bildung eines braunen Niederschlags auf. Der Grad dieser Bräunung ist dabei stark abhängig von der Art der verwendeten Säure, deren Konzentration sowie des eingesetzten Zuckers (Scott *et al.* 1967). Besonders auffällig ist die intensive Bräunung von US, die laut Literatur deutlich ausgeprägter und schneller erfolgt als bei vergleichbaren Konzentrationen von Neutralzuckern (Fatouros *et al.* 2021; Scott *et al.* 1967; Seaver und Kertesz 1946).

Die zugrunde liegenden Reaktionen sind hochkomplex und resultieren in einer Vielzahl an niedermolekularen Zwischen- und Endprodukten, die ihrerseits zu farbigen, polymeren Kondensaten weiterreagieren können. Diese Produkte werden häufig unter dem Begriff „Humine“ zusammengefasst (Feather und Harris 1966). Zu den beschriebenen Abbauprodukten der US zählen Furfural (**2**), 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) (**3**), Furan-2-carbonsäure (F2A) (**4**), Reduktinsäure (**8**), 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (**7**), 2,3-Dihydroxyacetophenon (**6**) sowie 3,8-Dihydroxy-2-methylchromon (**5**) (Abbildung 10) (Ahmad *et al.* 1993; Bornik und Kroh 2013; Reichstein und Oppenauer 1934; Teleman *et al.* 1996).

Im Folgenden werden die Abbauege der US in saurer Umgebung erläutert. Dabei wird zwischen Decarboxylierung und Dehydratisierung sowie den daraus entstehenden Folgeprodukten unterschieden.

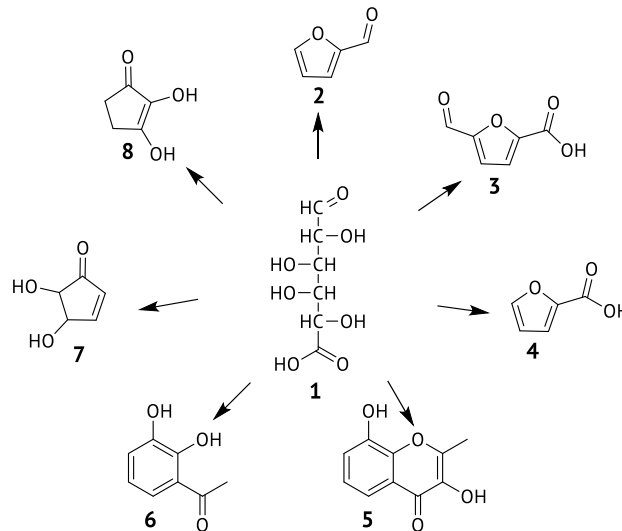


Abbildung 10: Abbauprodukte der Galacturonsäure (1) in (verdünnter) Mineralsäure. Nachgewiesen wurden Furfural (2), 5-Formyl-2-furancarbonsäure (3), Furan-2-carbonsäure (4), 3,8-Dihydroxy-2-methylchromon (5), 2,3-Dihydroxyacetophenon (6), 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (7) und Reduktinsäure (8) (Ahmad *et al.* 1993a; Bornik und Kroh 2013; Reichstein und Oppenauer 1934; Teleman *et al.* 1996).

1.4.2.1.1 Decarboxylierung von Uronsäuren

Bereits im 19. Jahrhundert beobachteten Wissenschaftler, dass beim Erhitzen von US in Mineralsäuren CO_2 freigesetzt wird (Conrad 1931; Mann und Tollens 1896; Tollens 1908). Feather und Harris (1966) wiesen unter Verwendung einer C^{14} -gelabelten US in verdünnter Mineralsäure nach, dass das freigesetzte CO_2 tatsächlich aus der Carboxygruppe stammt. Zum genauen Ablauf der Decarboxylierung werden mehrere Mechanismen diskutiert.

Huber und Deuel (1951) postulierten einen $\text{S}_{\text{E}1}$ -Mechanismus (Abbildung 11). Durch die Protonierung des O-Atoms am Halbacetal (**1a**) wird eine Stabilisierung des benachbarten α -C-Atoms erreicht. Dies wiederum senkt die Bindungsenergie zwischen C_5 und C_6 , wodurch CO_2 unter Einbringung von Energie erleichtert abgespalten werden kann. Anschließend erfolgt die eigentliche Substitution. Durch Anlagerung eines Protons entsteht eine Pentose, im Beispiel der GalA ist dies die Ara (**11**). Geschwindigkeitsbestimmend bei dieser Reaktion ist gemäß den Autoren die Ausbildung des Übergangszustands unter Abspaltung des CO_2 . Da ein Nachweis der Ara nicht möglich war bzw. nur zu sehr kleinen Anteilen erfolgen konnte, wird auf eine rasche Weiterreaktion dieser geschlossen (Conrad 1931; Huber und Deuel 1951; Stutz und Deuel 1958). Vor diesem Hintergrund postulierten Bornik und Kroh (2013) für GalA einen weiteren Mechanismus, der die Bildung der Ara umgeht und ebenfalls in Abbildung 11 dargestellt ist. GalA ist demnach durch die Position der Hydroxygruppe an C4 in der Lage, in einem konzertierten Mechanismus bei gleichzeitiger Abspaltung von CO_2 und Wasser eine 4-Desoxypentose (**9**) auszubilden. Fatouros *et al.* (2021) bestätigten diesen Mechanismus. Sie untersuchten das Abbauverhalten von GalA im Vergleich zu Ara in Wasser bei 60 °C. Nach 72 h wurde noch 92 % der Ara wiedergefunden, wohingegen 65 % der GalA unter CO_2 -Freisetzung bereits abgebaut war. Ara konnte im Abbauersuch der GalA nicht nachgewiesen werden. Durch massenspektrometrische Untersuchungen gelang es zudem, neben dem Verlust von CO_2

(-44 u) den gleichzeitigen Massenverlust von $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (-62 u) zu identifizieren, welcher dominierte.

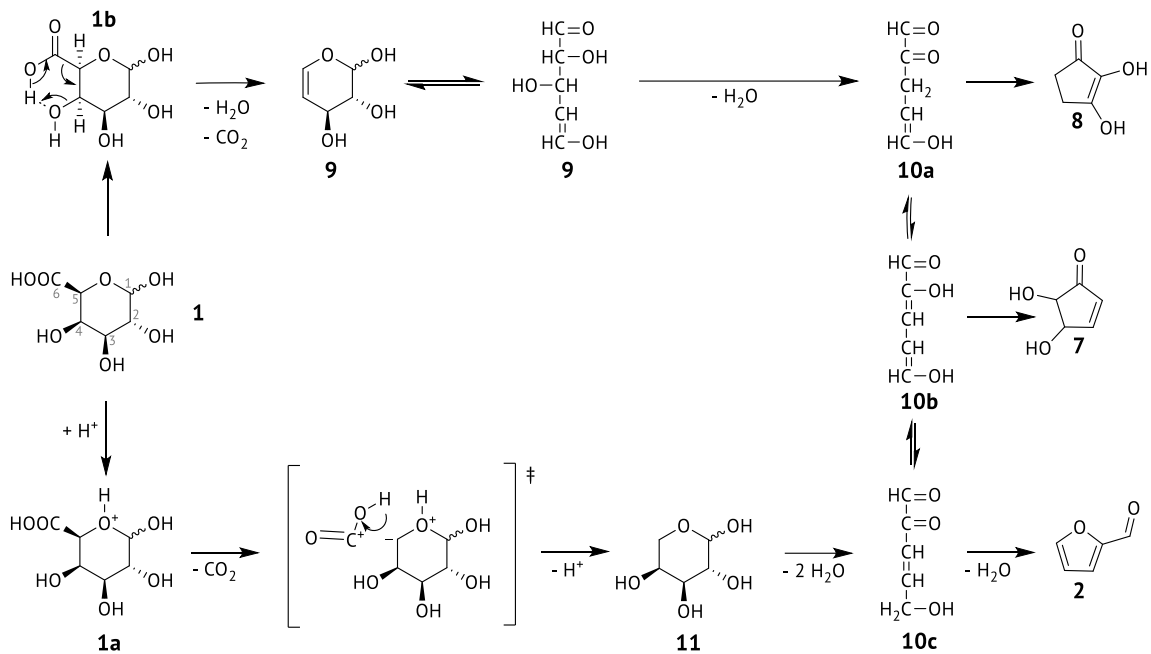


Abbildung 11: Mechanismus der Decarboxylierung von Galacturonsäure (1) nach Huber und Deuel (1951) und Bornik und Kroh (2013). Diese kann durch Protonierung des Halbacetals (1a) über Arabinose (11) führen sowie über einen zyklischen Prozess (1b) über die 4-Desoxy-pentose (9). Durch Abspaltung von Wasser entsteht der reaktive α -Ketoglutaraldehyd (10a – c) sowie final Furfural (2), 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (7) und Reduktinsäure (8).

Sowohl Ara (**11**) als auch das labile Zwischenprodukt (**9**) der konzertierten Eliminierung bilden unter Verlust von Wasser α -Ketoglutaraldehyd (**10a – c**). Je nach vorliegendem Tautomer entstehen Furfural (**2**), Reduktinsäure (**8**) oder 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (**7**). Die Rolle von α -Ketoglutaraldehyd als Zwischenprodukt konnte durch Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als stabiles Tris(2,4-dinitrophenylhydrazon)-Derivat mittels Flüssigkeitschromatographie (LC, engl. *liquid chromatography*) und Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden (Bornik und Kroh 2013). Ahmad *et al.* (1993) beschäftigten sich darüber hinaus mit dem Bildungsmechanismus der als 2,3-Dihydroxyacetophenon (**6**) und 3,8-Dihydroxy-2-methylchromon (**5**) identifizierten Produkte. Demnach entstehen diese säurekatalysiert aus Pentosen bzw. aus der Decarboxylierung von US durch Michael-Addition mit anschließender Aldolkondensation mit einem Endiol.

Der Prozess der Decarboxylierung ist stark abhängig von der Säurekonzentration sowie der verwendeten Mineralsäure. Bereits Conrad (1931) zeigte, dass US in verdünnter Salzsäure deutlich schneller decarboxyliert werden, als in entsprechend konzentrierter Schwefelsäure. Hierbei nimmt die Decarboxylierungsgeschwindigkeit mit steigender Säurekonzentration zu (Huber und Deuel 1951). Fatouros *et al.* (2021) beobachteten eine deutlich langsamere Decarboxylierung der GlcA im Vergleich zur GalA. Dies lässt sich durch die potenzielle Ausbildung eines γ -Lactons (vgl. Abbildung 2) der GlcA erklären, wodurch die konzertierte Eliminierung behindert ist.

Wird mit wasserfreien bzw. wasserarmen starken Säuren, wie es konzentrierte Schwefelsäure darstellt, gearbeitet, nimmt die Tendenz zur Decarboxylierung der US wieder ab. Durch den stark wasserziehenden Effekt dieser Säuren erfolgt die initiale Abspaltung von Wasser deutlich schneller als der Verlust von CO₂, was zu einer Dehydratisierung der US führt (Noyce *et al.* 1965).

1.4.2.1.2 Dehydratisierung von Uronsäuren

Die ausschließliche Dehydratisierung von US läuft ebenfalls in saurer Umgebung ab. Wie Anderson und Garbutt (1963) sowie Bowness (1958) berichten, ist 5FFA (**3**) das Hauptprodukt bei der Behandlung von GalA in konzentrierter Schwefelsäure und entsteht durch den Verlust von drei Wassermolekülen. Hierzu wurden verschiedene Bildungsmechanismen postuliert und diskutiert.

Aktuelle Studien befassen sich vorrangig mit der Dehydratisierung der GlcA meist im Kontext der Papierherstellung. Hier führt allerdings eine alkalische Vorbehandlung der glucuronoxylanhaltigen Faser zu einer β -Eliminierung an der US, wodurch das Ausgangsprodukt der hier beschriebenen weiteren Abbaumechanismen in saurer Umgebung eine 4,5-ungesättigte Hexenuronsäure darstellt. Da diese ungesättigte Verbindung jedoch ausschließlich unter stark basischen Bedingungen entsteht, sind die in diesem Zusammenhang beschriebenen Reaktionsmechanismen nicht direkt auf rein saure Systeme übertragbar (Li *et al.* 2007; Rosenau *et al.* 2017; Teleman *et al.* 1996). In wässriger Umgebung liegt die US (**1**) im Gleichgewicht mit ihrem entsprechenden 1,2-Endiol (**1e**) vor (Abbildung 12). Durch Protonierung und anschließendem Verlust eines Wassermoleküls (**12-15**) wird das cyclische Furfuralderivat 5FFA (**3**) gebildet. Durch eine weitere formale Abspaltung von CO entsteht F2A (**4**) (Abbildung 12) (Anderson und Garbutt 1963; Teleman *et al.* 1996). Die in der Literatur diskutierten Mechanismen unterscheiden sich häufig in der Position der initialen Abspaltung von Wasser, wobei in vielen Fällen eine fundierte Begründung oder experimentelle Absicherung dieser Unterschiede fehlt (Anderson und Garbutt 1963; Isbell 1944).

Wegener *et al.* (2015) postulierten zudem eine Reaktion ausgehend von der furanosidischen Form (**1f₄**). Gemäß den Autoren liegt GalA bevorzugt in dieser Konstitution vor. NMR-spektroskopische Untersuchungen durch Luisa *et al.* (1996) zeigen jedoch, dass bei erhöhter Temperatur und niedrigen pH-Werten von 2, GalpA mit 85 % dominiert.

Einen retrosynthetischen Ansatz zur Bildung von 5FFA aus GalA bzw. deren Methylester verfolgten van der Klis *et al.* (2017). Sie gehen davon aus, dass 5FFA, analog zu der Bildung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) aus Fructose (Fru), aus Tagaturonsäure (**16**, 5-*keto*-GalA) hervorgeht (Abbildung 13). In der entsprechenden Studie zeigte sich, dass die Ausbeute an 5FFA durch gezielte Bildung der Ketofuranose (**1f₅**) unter Einsatz von Calcium deutlich gesteigert werden konnte. Durch die räumliche Nähe der Hydroxygruppen kann die Abspaltung von Wasser in einem cyclischen Dehydrierungsprozess erfolgen. Hinweise dafür, dass dieses Isomer der GalA natürlicherweise in saurer Umgebung vorhanden ist, konnten jedoch nicht erbracht werden (Luisa *et al.* 1996; van der Klis *et al.* 2017). Somit bleibt offen, ob dieser Mechanismus auch unter nicht-modifizierten Reaktionsbedingungen eine relevante Rolle spielt.

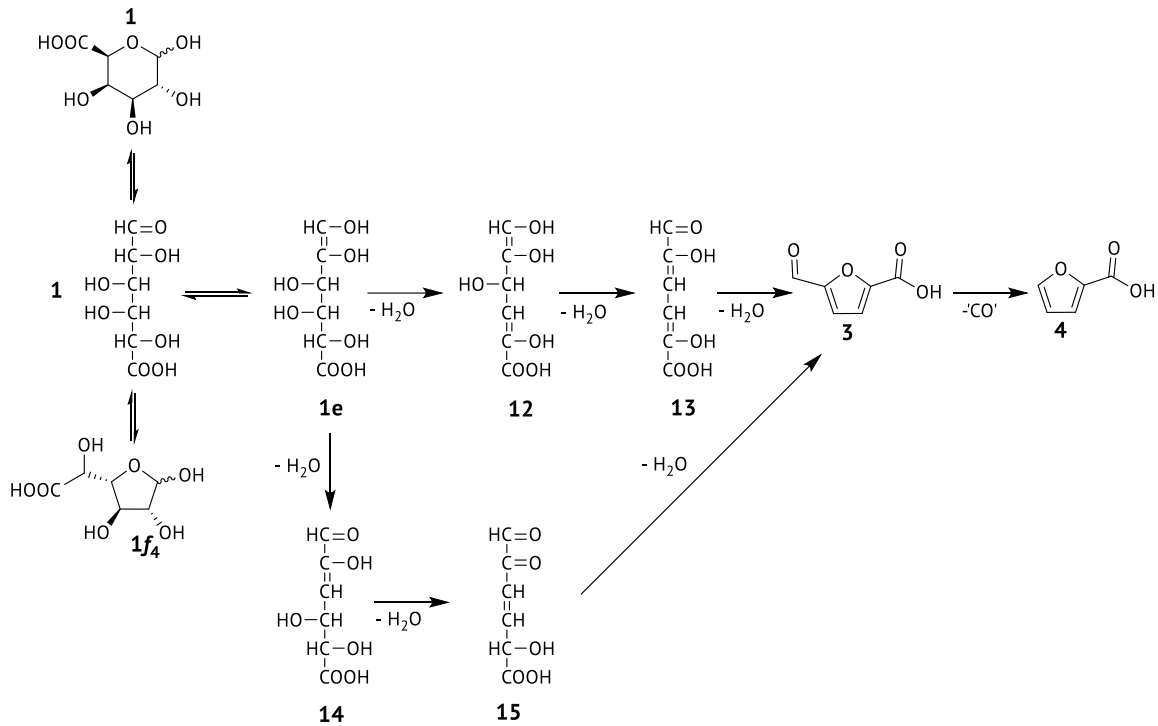


Abbildung 12: Mechanismus der Dehydratisierung der Galacturonsäure (1, 1f₄). Ausgehend von dem 1,2-Enediol (1e) entstehen durch Abspaltung von Wasser an unterschiedlichen Positionen ungesättigte reaktive Zwischenstufen (12-15) die zur 5-Formyl-2-furancarbonsäure (3) cyclisieren. Durch den formalen Verlust von CO entsteht die Formyl-2-furancarbonsäure (4) (Anderson und Garbutt 1963; Isbell 1944; Teleman *et al.* 1996).

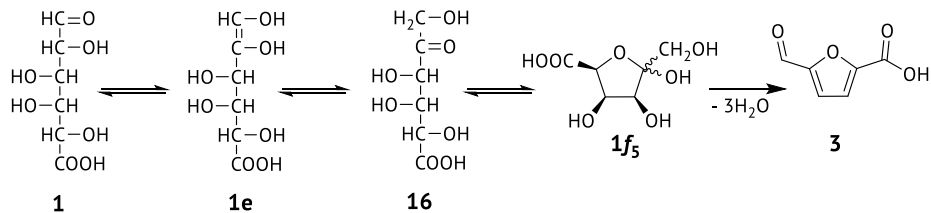


Abbildung 13: Dehydratisierung der Galacturonsäure (1) nach van der Klis *et al.* (2017). Nach Isomerisierung zur Tagaturonsäure (16) erfolgt eine cyclische Dehydratisierung ausgehend von der furanosidischen Form, die der 5-keto-Galacturonsäure (1f₅) entspricht.

Hicks und Feather (1977) zeigten, dass bei der thermischen Behandlung von US in saurer Umgebung eine Dehydratisierung mit dem Endprodukt Furfural abläuft. Daraus lässt sich ableiten, dass auf eine anfängliche Dehydratisierung der US auch eine Decarboxylierung zum α -Ketoglutaraldehyd erfolgen kann. Einen entsprechenden Mechanismus postulierte bereits Isbell (1944). Auch hier wird α -Ketoglutaraldehyd als reaktive Zwischenstufe gebildet und führt zu den bereits beschriebenen Produkten Furfural (2), 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (7) und Reduktinsäure (8) (Bornik und Kroh 2013). Zur weiteren Aufklärung dieses Reaktionsweges untersuchten Hicks und Feather (1977) die Reaktion von GlcA in deuteriertem bzw. tritiiertem angesäuertem Wasser. Durch Austauschuntersuchungen konnten sie die Positionen von Deuterium bzw. Tritium im resultierenden Furanring analysieren. Dabei zeigten sich Markierungen an den Positionen H3 und H4, was auf die Beteiligung eines enolischen Übergangszustands hinweist, der über ein entsprechendes 3,4-Enol verläuft.

Hieraus wurde auf einen cyclischen Übergangszustand (**15**), wie ihn Abbildung 14 zeigt, geschlossen. Dieser Übergangszustand ermöglicht eine intramolekulare Umlagerung, die sowohl die Wasserabspaltung als auch die Decarboxylierung mechanistisch vereint.

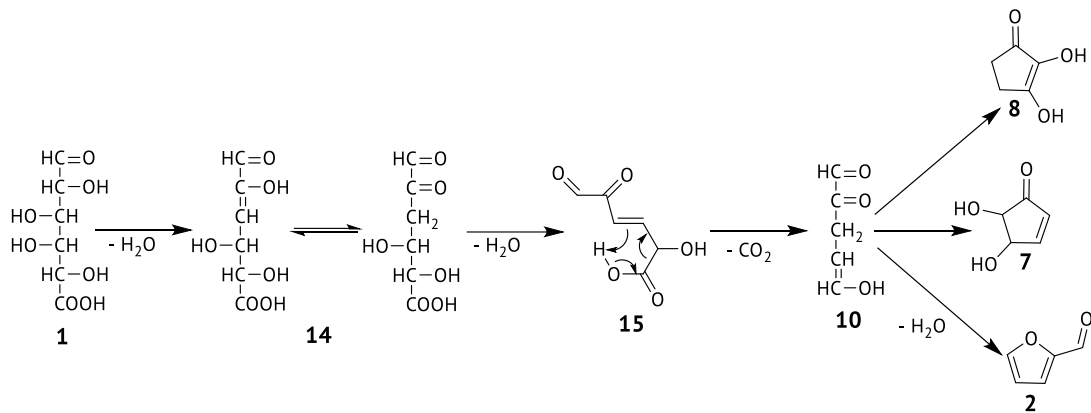


Abbildung 14: Dehydratisierung mit anschließender Decarboxylierung der Galacturonsäure (1) zu α -Keto-glutaraldehyd (10) gemäß dem cyclischen Mechanismus postuliert durch Hicks und Feather (1977). Daraus entstehen Furfural (2), 4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (7) und Reduktinsäure (8).

Die Frage, unter welchen Bedingungen eine vollständige Dehydratisierung zu 5FFA erfolgt und wann zusätzlich eine Decarboxylierung eintritt, wird in der Literatur bislang nicht abschließend behandelt, da die zugrunde liegende Thematik sehr komplex ist. Als einflussnehmende Faktoren gelten insbesondere die Struktur des Substrats, die Reaktionstemperatur, die Art der eingesetzten Säure sowie deren Konzentration (Anderson und Garbutt 1963; Conrad 1931; Hicks und Feather 1977).

1.4.2.1.3 Folgereaktionen der Abbauprodukte

Die während einer Säurebehandlung entstehenden Abbauprodukte der US sind nahezu in keinem Fall als finale Produkte aufzufassen. Durch ihren teils reaktiven Charakter reagieren sie in einer Vielzahl, häufig noch unzulänglich erforschter Reaktionen, weiter zu hoch komplexen Strukturen. Diese werden nachfolgend näher beschrieben.

Feather und Harris (1966) untersuchten die Umwandlung der in verdünnter Mineralsäure entstandenen Furanerivate 5FFA, Furfural und Reduktinsäure ineinander, was jedoch erfolglos blieb. 5FFA zeigte in 12 %iger Salzsäure keine signifikante Veränderung und wurde nur in geringem Ausmaß decarboxyliert, Furfural hingegen bildete eine braune Färbung aus.

Die im Reaktionsverlauf entstehenden braun gefärbten Strukturen werden oftmals unter dem Sammelbegriff „Humine“ subsumiert, wobei es sich um kondensierte, furanreiche Makromoleküle handelt. Die Bildung dieser chromophoren Aggregate setzt eine säurekatalysierte Öffnung des Furanrings voraus (Shi *et al.* 2019). Die Ringstabilität ist dabei abhängig von den Substituenten am Ring: Furane mit elektronenziehenden Substituenten sind stabiler, wohingegen Furane mit elektronenschiebenden Substituenten stark zur Ringöffnung neigen (Dunlop 1948). Die Tendenz zur Öffnung in wässrig sauren Medien nimmt dabei mit steigender Temperatur zu (Liang *et al.* 2017).

Eine Vielzahl verschiedener Mechanismen zur Ringöffnung wurden bereits diskutiert, die alle in reaktiven α -Dicarbonylen resultieren (Horvat *et al.* 1985; Liang *et al.* 2017). Shi *et al.* (2019) griffen den von Horvat *et al.* (1985) postulierten Mechanismus der hydrolytischen Ringöffnung des HMFs auf, der von einer Protonierung des Ringsauerstoffs ausgeht und für das Beispiel Furfural das 2-Oxopentandial liefert. Entgegen der bisherigen Annahmen einer Protonierung am β -Kohlenstoff oder Ringsauerstoff zeigten Liang *et al.* (2017) durch Berechnungen am unsubstituierten Furan, dass eine Protonierung bevorzugt in α -Position stattfindet. Als Hauptprodukt beschreiben die Autoren das 4-Hydroxy-2-butenal. Die Ringöffnung des Furfurals (**2**) analog zu dem von Liang *et al.* (2017) beschriebenen Mechanismus ist in Abbildung 15 dargestellt und führt demnach zum 5-Hydroxy-2-oxopent-3-enal (**17**).

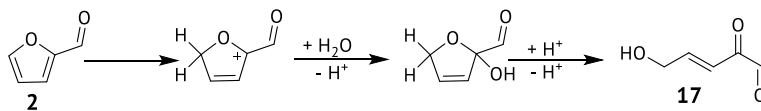


Abbildung 15: Mechanismus der hydrolytischen Öffnung des Furanrings am Beispiel des Furfurals (2) zu 5-Hydroxy-2-oxopent-5-enal (17) (in Anlehnung an Liang *et al.* 2017)

Die entstandenen α -Dicarbonylverbindungen nehmen an weiteren Reaktionen teil. Zum einen können sie innerhalb einer Cannizaro-Reaktion zu den entsprechenden α -Oxo-Carbonsäuren reagieren, zum anderen bilden sie in einer Aldolkondensation die gefärbten Humine aus (Patil und Lund 2011; Shi *et al.* 2019). Shi *et al.* (2019) stellen den Ablauf einer Kondensation am α -Dicarbonyl Methylglyoxal (**18**) beispielhaft dar (Abbildung 16). Aufgrund des stark elektrophilen Charakters der beiden Carbonylgruppen weist das Wasserstoffatom am β -C-Atom eine hohe Reaktivität auf. Dies begünstigt die Aldolkondensation der Edukte, wodurch länger-kettige Verbindungen entstehen können. Diese Zwischenprodukte gehen anschließend intramolekulare Acetalcyclisierungen und Dehydratisierungsreaktionen ein, was zur Bildung polymerer, als Humine (**19**) bezeichneter Strukturen mit hohem Furanring-Anteil führt.

Weitere hoch reaktive Abbauprodukte der US, die ebenfalls an der Bildung von gefärbten Polymeren beteiligt sein können, sind die Reduktinsäure (**8**) sowie das 5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-on (**7**). Dies geschieht gemäß Bornik und Kroh (2013) ebenfalls durch eine Aldolkondensation, wobei der Fünfring laut den Autoren während der ganzen Reaktion intakt bleibt.

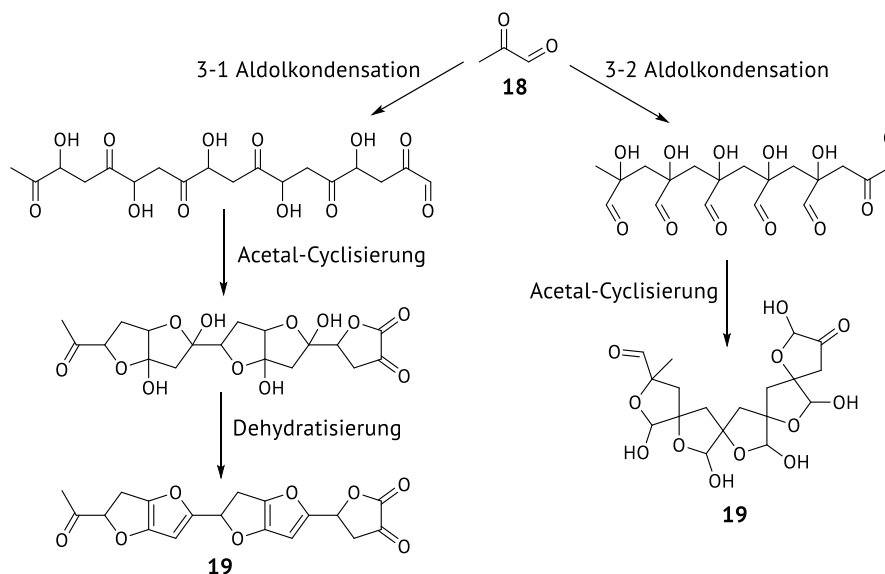


Abbildung 16: Postulierter Mechanismus der Huminbildung durch α -Dicarbonylverbindungen, gezeigt am Beispiel Methylglyoxal (18). Durch eine Aldolkondensation mit anschließender Cyclisierung sowie Dehydratisierung entstehen die furanreichen Humine (19) (Shi *et al.* 2019).

Rosenau *et al.* (2017) lieferten Hinweise auf eine „leiterartige“ Molekülstruktur bei der Untersuchung von Chromophoren, die aus Hexenuronsäuren entstehen. Diese werden dabei unter alkalischen Bedingungen gebildet, führen aber nach einem sauren Abbau ebenfalls zu den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Furanen (Teleman *et al.* 1996). Die Forscher zeigten, dass Furan-Verbindungen wie 5FFA, Furfural oder F2A sehr effektive Chromophore bilden und bereits in niedrigen Konzentrationen ab etwa 1 nM eine deutliche Färbung der Lösung verursachen können. Insgesamt konnten fünf solcher Verbindungen isoliert (**20** – **24**, Abbildung 17) und ihre Bildungsmechanismen mithilfe von gezielter ^{13}C -Isotopenmarkierung der US experimentell bestätigt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Carboxygruppe des 5FFAs an der Kondensationsreaktion beteiligt ist. Etwaige Säuregruppen, wie sie an Struktur **21** zu finden sind, entstehen demnach durch eine Autoxidation aus einem Aldehyd.

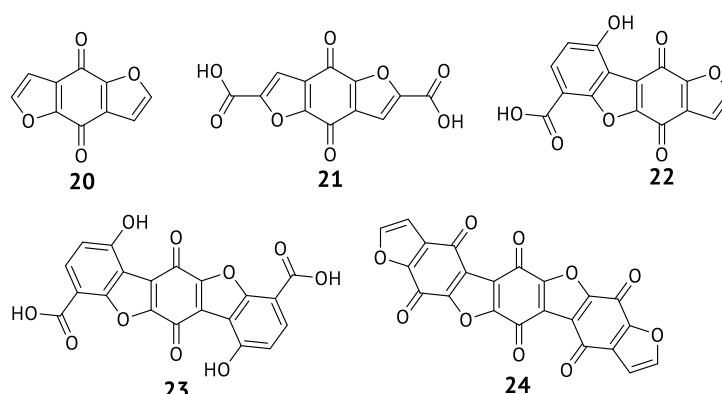


Abbildung 17: Strukturen der durch Rosenau *et al.* (2017) nachgewiesenen Chromophore aus 5-Formyl-2-furancarbonsäure und Furfural in konzentrierter Schwefelsäure

Die Diels-Alder-Reaktionen stellen einen weiteren möglichen Schritt innerhalb des Reaktionsweges dar. Hier fungiert der Furanring sowohl als Dien als auch als Dienophil und reagiert mit einem zweiten Furan in einer [4+2]-Cycloaddition zu einem Benzolderivat, wie sie in Struktur 22 und 23 zu finden sind (Abbildung 18). Nach aktuellem Stand der Forschung gilt als gesichert, dass verwandte Benzochinon-Furanoid-Chromophore, je nach Reaktionsbedingungen, etwa 50 – 70 % der Masse der bei der Umwandlung von Kohlenhydrat-Biomasse entstehenden Humine ausmachen (Rosenau et al. 2017; Sailer-Kronlachner et al. 2021).

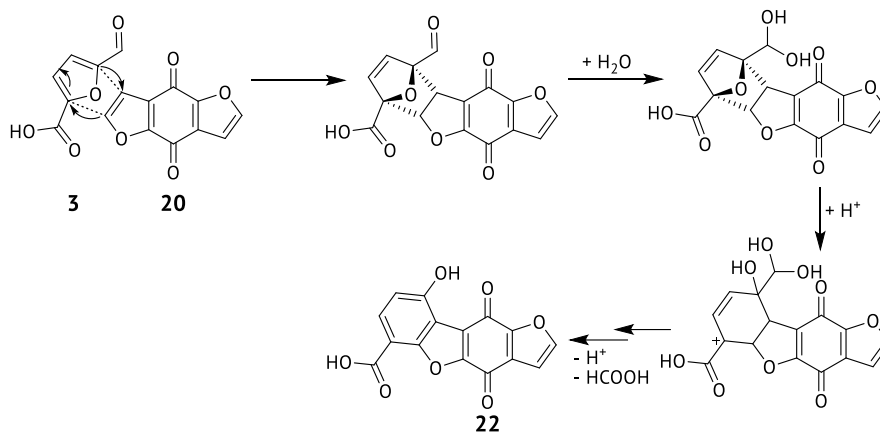


Abbildung 18: Diels-Alder Reaktion zwischen zwei Furanderivaten am Beispiel der von Rosenau *et al.* (2017) gezeigten chromophoren Strukturen aus 5-Formyl-2-furancarbonsäure (3) und Furfural. Der Furanring stellt hier sowohl das Dien als auch das Dienophil dar. Durch die Reaktion entstehen Benzolderivate (22).

1.4.2.2 Kondensation von Aldehyden und phenolischen Verbindungen

Bereits in der Kohlenhydratchemie des späten 19. Jahrhunderts wurden kolorimetrische Verfahren zum qualitativen Nachweis von Kohlenhydraten eingesetzt. Eine der ersten prominenten Beispiele stellt die von Molisch (1886) dargelegte Reaktion zum Nachweis von Hexosen und Pentosen dar. Ein ähnliches Prinzip nutzt die Seliwanoff-Probe, welche als selektiver Nachweis von Fru bzw. Ketosen entwickelt wurde. Durch Erhitzen der fructosehaltigen Proben in konzentrierter Salzsäure bildet sich nach Zugabe von Resorcinol eine rötliche Farbe aus (Ohta *et al.* 1985; Seliwanoff 1887). Ein zugegebenes aromatisches Reagenz, welches die Farbbildung mit Kohlenhydratabbauprodukten hervorruft, wird deshalb nachfolgend als Chromogen bezeichnet.

Als grundlegendes Reaktionsprinzip wurde bereits durch Seliwanoff (1887) eine Kondensation von Aldehyd und phenolischem Reagenz nach dem Vorbild der Baeyerreaktion vorgeschlagen. Adolf von Baeyer führte demnach 1872 erstmals eine Polykondensationsreaktion zwischen Formaldehyd und Phenol durch. Hierbei entstand das heute als Bakelit bekannte Polymer (Knop und Pilato 1985). Auf diesem Reaktionsprinzip baut zudem die Novolak-Reaktion auf, die unter Säurekatalyse ein lineares Polymer aus Phenol und Aldehyden erzeugt. Veränderte Molverhältnisse der Edukte sowie Variation der Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Zeit und Säurekonzentration führen zu veränderten Substitutionspositionen und Substitutionsgraden des Phenols (Koch *et al.* 1983). Koch und Pein (1985) inkludierten erstmals Zuckerabbauprodukte, wie HMF, zum teilweisen Ersatz des Formaldehyds in diese Polykondensationsreaktion.

Die Kondensation von aromatischen Reagenzien mit Aldehyden oder Ketonen in saurer Umgebung stellt heute eine gängige Reaktion innerhalb der Herstellung vieler, wenn auch nicht chromophorer, Feinchemikalien dar. Hierbei kondensieren überwiegend zwei Moleküle des aromatischen Reagenzes mit einem Molekül des Aldehyds oder Ketons (Abbildung 19). Der Mechanismus der Hydroxyalkylierung kann demnach als aromatische elektrophile Substitution aufgefasst werden, wobei als alkylierende Spezies das nach Protonierung des Ketosauerstoffs entstehende Carbeniumion fungiert. Die Reaktivität des Aldehyds hängt demnach vom Substituenten R ab. Eine hohe Reaktivität weisen aliphatische Substituenten sowie Formaldehyd auf. Aromatische Aldehyde sind weniger reaktiv als aliphatische, es sei denn, es sind ein oder mehrere elektronenziehende Substituenten am oder im Ring vorhanden (De Angelis *et al.* 2004).

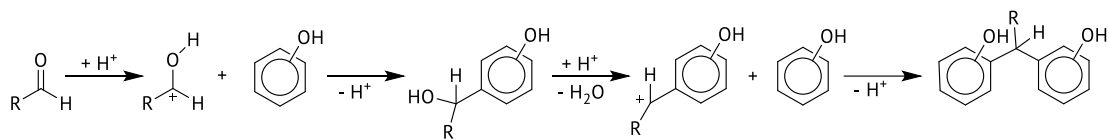


Abbildung 19: Reaktion zwischen einem Aldehyd (mit aliphatischem oder aromatischem Rest R) und einem phenolischen Reagenz unter sauren Bedingungen innerhalb einer elektrophilen aromatischen Substitution. Als alkylierendes Reagenz fungiert das während der Reaktion gebildete Carbeniumion.

1.4.3 Verwendete Chromogene zur Quantifizierung von Uronsäuren

Zur quantitativen Analyse (spezifischer) Kohlenhydratgehalte stehen verschiedene Farbreaktionen zur Verfügung. Die genauen Reaktionsmechanismen und Strukturen der gebildeten Chromophore sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Diese Reaktionen unterscheiden sich insbesondere in den verwendeten Chromogenen, welche in Abbildung 20 zusammengefasst werden. Eine photometrische Quantifizierung erfolgt anschließend über eine entsprechende Kalibrierung (Yapo 2012).

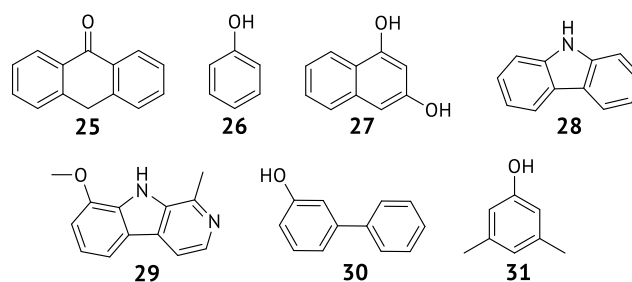


Abbildung 20: Struktur verschiedener Chromogene zur kolorimetrischen Analyse von Uronsäuren: Anthron (25), Phenol (26), Naphthoresorcinol (27), Carbazol (28), Harmin (29), 3-Phenylphenol (30) und 3,5-Dimethylphenol (31)

Eine der ersten quantitativen Reaktionen, die zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts einschließlich der US genutzt wurde, basiert auf der Reaktion säurebehandelter Kohlenhydrate mit Anthron, wobei eine blau-grüne Färbung entsteht (Dreywood 1946). Ein alternatives Verfahren nutzt konzentrierte Schwefelsäure in Kombination mit Phenol zur Entwicklung einer gelb-orangen Farbe. Im Vergleich zur Anthron-Methode ist Phenol als Chromogen kostengünstiger und bildet ein Chromophor mit höherer zeitlicher Stabilität. Allerdings erlaubt diese Methode keine selektive

Erfassung von US, da auch Abbauprodukte anderer Zucker im gleichen Wellenlängenbereich von 480 – 490 nm absorbieren (DuBois *et al.* 1956).

Erste Assays zur spezifischen kolorimetrischen Quantifizierung von US nutzten Naphthoresorcinol zum Umsatz der Säureabbauprodukte. Diese Reaktion erwies sich jedoch als wenig selektiv, da auch Abbauprodukte von Neutralzuckern ähnliche Farbentwicklungen zeigten (Dische 1947; Tollens 1908). Eine verbesserte Selektivität wurde durch die Verwendung von Carbazol erreicht, das mit US eine pink-rote Färbung erzeugt (Dische 1947). Spätere Studien identifizierten 5FFA als das zentrale Zwischenprodukt dieser Reaktion (Bowness 1958). Dennoch ist das Carbazol-Verfahren, insbesondere für GulA und ManA, weniger empfindlich, anfälliger für Interferenzen durch andere in der Probe enthaltene Neutralzucker und weist eine geringe Farbstabilität auf (Bitter und Muir 1962; Yapo 2012).

Diese Limitierungen führten zur Entwicklung neuer Methoden, unter anderem durch Verwendung der Chromogene Harmin und 3PP. Ersteres bildet nach Säureabbau der US, vergleichbar zu Carbazol, direkt eine pinke Farbe aus, wohingegen säurebehandelte Pentosen erst nach Zugabe von Cystein eine Färbung hervorrufen (Wardi *et al.* 1974). Das von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) etablierte Chromogen 3PP erwies sich im Vergleich zu Carbazol gemäß den Autoren als etwa zehnfach spezifischer gegenüber US und wird heute vielfach zur Quantifizierung dieser genutzt (Eichhofer *et al.* 2023; Kintner und Van Buren 1982; Manns *et al.* 2014; Yapo 2012).

Auch bei Verwendung von 3PP können jedoch andere in der Probe enthaltene Zucker zu fehlerhaften Messergebnissen führen. So zeigten Kintner und Van Buren (1982), dass z. B. Glc nach Säurebehandlung ebenfalls eine Reaktion mit 3PP eingeht, deren Produkt ein Farbsignal mit einem Absorptionsmaximum bei ebenfalls 520 nm erzeugt. Obwohl dieses Signal weniger intensiv ist, kann bei hohen Konzentrationen von Neutralzuckern (10 – 20-facher Überschuss zu US) eine signifikante Überbestimmung des Uronsäuregehalts auftreten (Yapo 2012).

Scott (1979) untersuchte den Einsatz verschiedener Chromogene zur Analyse von US in pflanzlichem Material und konnte zeigen, dass 3,5-Dimethylphenol eine höhere Selektivität gegenüber den Abbauprodukten der US besitzt als 3PP, letzteres jedoch eine höhere Sensitivität aufweist.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die experimentellen Rahmenbedingungen wie etwa Säurekonzentration, Temperatur, Erhitzungsdauer sowie die in den Proben enthaltenen US einen entscheidenden Einfluss auf die Farbreaktion und damit auf die Messgenauigkeit haben (Yapo 2010, 2012). Barazarte *et al.* (2007) stellten beispielsweise fest, dass in einem Bereich von 15 – 55 µg/mL GalA in pektinhaltigen Proben sowohl die Verwendung von Carbazol als auch 3PP in gleichen Werten resultieren. Auch 3PP und 3,5-Dimethylphenol lieferten demnach unter exakt kontrollierten Bedingungen durchaus vergleichbare Resultate (Yapo 2010; Yapo und Koffi 2006).

Einflüsse der Prozessparameter, des Probenmaterials, verschiedener Zusätze wie Borat sowie Daten zu der Identität der chromophoren Struktur werden in den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit anhand des Assays nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) eingehend vorgestellt und diskutiert.

2. Zielsetzung

US sind strukturell bedeutsame Bestandteile der Zellwände von Landpflanzen sowie Algen und stellen wesentliche Komponenten lebensmittelrelevanter Hydrokolloide wie Gummi arabicum und Xanthan dar. Die quantitative Erfassung des Gesamturonsäuregehalts, insbesondere von GalA, GlcA, ManA und GulA sowie daraus abgeleiteter Polysaccharide, spielt eine entscheidende Rolle in der Charakterisierung pflanzlicher Polysaccharide. Daten zu Uronsäuregehalten werden sowohl in der Forschung als auch in der industriellen Qualitätskontrolle sowie im regulatorischen Kontext (Verordnung (EU) Nr. 231/2012) erhoben.

Zur Bestimmung des Uronsäuregehalts werden seit Jahrzehnten kolorimetrische Verfahren eingesetzt, wobei insbesondere der von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) entwickelte Assay eine zentrale Rolle spielt. Diese Methode basiert auf dem säurekatalysierten Abbau der US zu Furanderivaten und zeichnet sich durch einfache Handhabung, geringen apparativen Aufwand und niedrige Kosten aus. Im Gegensatz zu chromatographischen Verfahren, die auf der Analyse von säurehydrolytisch freigesetzter Monosaccharidbausteine der Polysaccharide beruhen, sind hier unterschiedliche Hydrolyseeffizienzen gegenüber verschiedenen polymeren Strukturen von untergeordneter Bedeutung (De Ruiter *et al.* 1992; Yapo 2012). Trotz ihrer weiten Verbreitung zeigen Anwendungen an realen Proben jedoch signifikante Defizite hinsichtlich Selektivität, Präzision und Richtigkeit. Neben einer ausgeprägten Empfindlichkeitsdifferenz gegenüber verschiedenen US wurde in zahlreichen Studien – wie auch in langjährigen Arbeiten in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am Karlsruher Institut für Technologie – eine hohe Variabilität der Messergebnisse festgestellt. Als Einflussgrößen wurden unter anderem Matrixinterferenzen, variierende Probenvorbereitungen, Additive (z. B. Borat, Sulfamat), Schwefelsäurekonzentration sowie Temperatur und Reaktionsdauer identifiziert. Dennoch blieb die systematische Erforschung der zugrunde liegenden chemischen Reaktionsmechanismen bislang weitgehend aus (Yapo 2012).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht deshalb in der umfassenden Aufklärung des Reaktionsmechanismus der photometrischen Uronsäurebestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) sowie in der detaillierten Charakterisierung des gebildeten Chromophors. Auf dieser Grundlage soll die Eignung dieser Methode für die quantitative Analyse bewertet und eine mögliche methodische Alternative entwickelt werden. Um die genannten Ziele zu erreichen, soll der Abbau unterschiedlicher US in konzentrierter Schwefelsäure sowie der Einfluss von Additiven wie Borat mithilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren analysiert werden. Die Strukturaufklärung der gebildeten farbgebenden Substanz soll über gezielte Synthesen und entwickelte Isolierungsverfahren, ergänzt durch eindimensionale (1D)- und zweidimensionale (2D)-NMR-Experimente sowie quantenchemische Modellierungen, erfolgen.

Auf Basis dieser Erkenntnisse soll zudem die Entwicklung einer robusten, selektiven und reproduzierbaren Analysemethode zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts pflanzlicher Ballaststoffe (BS) ermöglicht werden. Als alternativer analytischer Ansatz zur kolorimetrischen Uronsäurebestimmung wird eine LC-MS-basierte Quantifizierung über das zentrale Abbauprodukt 5FFA angestrebt.

Somit soll diese Arbeit einen Beitrag zum vertieften Verständnis auf molekularer Ebene sowie zur Optimierung und Weiterentwicklung der kolorimetrischen Uronsäureanalytik leisten und alternative, validierungsfähige Verfahren für komplexe Probenmatrices pflanzlicher Rohstoffe und Lebensmittel vorstellen.

3. Material und Methoden

3.1 Uronsäurehaltiges Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene uronsäurehaltige, überwiegend pflanzliche Materialien sowie eine Lebensmittelprobe analysiert. Die Auswahl der Materialien erfolgte so, dass sowohl alle lebensmittelrelevanten US als auch deren natürlich vorkommende Kombinationen in pflanzen- und algenbasierten Matrices repräsentativ abgebildet werden konnten.

Zu den untersuchten GalA-haltigen Materialien gehörten insbesondere pektinreiche Nebenströme der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie, wie Karotten- und Apfeltrester, sowie die Schale der Zitrone. Zu den Materialien, die ausschließlich GlcA enthalten, zählen die beiden Hydrokolloide Gummi arabicum und Xanthan sowie die 4-O-Me-GlcA-haltigen Harthölzer Buche (*Fagus sylvatica*) und Eukalyptus (*Eucalyptus gunnii*). Zur Optimierung und Analyse GalA- und GlcA-haltiger Proben wurde Karayagummi herangezogen. Die US ManA und GulA wurden in kommerziell erhältlichem Pulver der Braunalge *Ascophyllum nodosum* (bioKontor) quantifiziert. Darüber hinaus wurden Bubble-Tea-Perlen (Typ Mango, Momo's Tea) untersucht, die gemäß Zutatenverzeichnis sowohl Alginat als auch Xanthan in unbekanntem Verhältnis enthalten (Anhang, Abbildung A1).

Alle Proben wurden gefriergetrocknet und in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des trockenen Materials zerkleinert. Pflanzliches Material wurde gemörsert, die Holzproben zu Sägespänen verarbeitet und auf eine Partikelgröße von < 0,5 mm gesiebt. Die Aufarbeitung und Untersuchung der Holzproben erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Maren Punke (2025).

Mit Ausnahme der Hölzer sowie der Hydrokolloide (Xanthan, Gummi arabicum, Karayagummi) wurde aus allen Materialien das entsprechende Ballaststoffmaterial präparativ gewonnen (Arbeitsvorschrift 8.1.1) und anschließend zur Analyse verwendet.

In der Europäischen Union werden BS gemäß der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 als Kohlenhydratpolymere mit drei oder mehr Monomereinheiten definiert, die im Dünndarm des Menschen weder verdaut noch absorbiert werden können. Hierzu zählen sowohl natürliche, in Lebensmitteln vorkommende Polymere als auch aus Lebensmitteln gewonnene oder synthetische Polymere, sofern sie eine positive physiologische Wirkung besitzen. Diese Definition, welche auch die Grundlage für entsprechende Methoden zur Isolierung von BS legt, orientiert sich an den im *Codex Alimentarius* (2009) festgelegten Richtlinien (McCleary *et al.* 2015). Die Gewinnung des BS-Materials erfolgte enzymatisch-gravimetrisch nach der von McCleary *et al.* (2015) optimierten Methode, die als *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) Methode 2017.16 anerkannt ist. Dabei werden Stärke und Proteine des getrockneten, pulverförmigen Probenmaterials durch eine Behandlung mit α -Amylase bzw. Amyloglucosidase und anschließend mit einer Protease bei physiologischem pH-Wert abgebaut. Der verbleibende, als wasserunlösliche Ballaststoffe (UBS) bezeichnete Rückstand, wird abgetrennt und durch mehrfaches Waschen von Enzymen, Puffersalzen und weiteren löslichen Hydrolyseprodukten gereinigt. Die wasserlöslichen Ballaststoffe (LBS) werden durch Zugabe von Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 78 % präzipitiert und ebenfalls gewaschen. In der Lösung

verbleiben Mono- und Disaccharide, Puffersalze sowie niedermolekulare lösliche BS (McCleary *et al.* 2015).

Da das getrocknete Bubble-Tea Material vollständig in Wasser löslich war und gemäß Zutatenverzeichnis keine nennenswerten Mengen an Protein oder Stärke enthielt, wurde hier auf einen Enzymverdau verzichtet und ausschließlich die LBS nach einer Ethanol-fällung gewonnen.

3.2 Charakterisierung des uronsäurehaltigen Probenmaterials

3.2.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Zur Charakterisierung des Probenmaterials, insbesondere hinsichtlich der Identifizierung enthaltener US, ist die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung unerlässlich. Im Fall von polymerem Probenmaterial, wie BS, ist zunächst eine Depolymerisierung erforderlich. Dazu werden in der Regel chemische Hydrolysemethoden mittels Säure und seltener auch enzymatische Verfahren herangezogen (Bemiller 1967; De Ruiter *et al.* 1992).

Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählen die zweistufige Hydrolyse mit Schwefelsäure nach Saeman *et al.* (1945), die mildere Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) (Albersheim *et al.* 1967) sowie die saure Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse (De Ruiter *et al.* 1992). Die Wahl der Methode richtet sich nach dem zu analysierenden Probenmaterial. Die Spaltbarkeit des Polysaccharids hängt dabei sowohl von der Polymerzugänglichkeit als auch von der Konstitution (*f* oder *p*), Konfiguration (α oder β) und Bindungsposition der glycosidischen Bindungen im Oligo- bzw. Polymer ab (Bemiller 1967). Die zu wählenden Hydrolysebedingungen orientieren sich an dem zu analysierenden Material, wobei die hydrolysierende Wirkung so angepasst werden sollte, dass das Probenmaterial möglichst vollständig hydrolysiert, ein Abbau bereits freigesetzter Monosaccharide jedoch minimiert wird. Durch die harscheren Bedingungen der Mineralsäure können stabile cellulosehaltige und/oder lignifizierte Strukturen erfolgreich hydrolysiert werden (Saeman *et al.* 1945). TFA-Hydrolyse und/oder vorgelagerte Methanolyse mit methanolischer Salzsäure bieten hingegen den Vorteil einer besseren Erhaltung labiler Monosaccharidstrukturen (v. a. zuvor in *f*-Ringform gebundener Pentosen) sowie einer vereinfachten Probenaufarbeitung infolge der Flüchtigkeit der Reagenzien (Albersheim *et al.* 1967; De Ruiter *et al.* 1992). Für spezifische Anwendungen bieten enzymatische Verfahren eine Alternative. Hierbei werden definierte Enzymmischungen eingesetzt, die allerdings eine genaue Kenntnis des Probenmaterials voraussetzen (Dahlman *et al.* 2000).

Die anschließende Analyse der freigesetzten Monosaccharide erfolgt überwiegend chromatographisch. Hierbei stellt die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC, engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography*) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD, engl. *Pulsed Amperometric Detection*) den etablierten Standard in der Kohlenhydratanalytik dar. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Monosaccharide im Gegensatz zu vielen anderen chromatographischen Verfahren underivatisiert analysiert werden können. Da Kohlenhydrate als schwache Säuren fungieren, liegen ihre Hydroxygruppen unter stark alkalischen Bedingungen (pH 12 – 13) partiell bzw. vollständig deprotoniert als Oxyanionen vor. Diese Eigenschaft wird gezielt für die chromatographische Trennung an einer starken Anionenaustauschersäule, modifiziert

mit quartären Ammoniumgruppen, ausgenutzt (Corradini *et al.* 2012). Zur Elution dient verdünnte Natronlauge, während zur Erhöhung der Ionenstärke ein Gradient mit Acetat eingesetzt wird, der die Elution der permanent negativ geladenen US ermöglicht (De Ruiter *et al.* 1992). Neben der Nettoladung der Analyten hängt die Elutionsreihenfolge auch von der Anzahl und Position der Hydroxygruppen ab. Die elektrochemische Detektion mittels PAD erfolgt ebenfalls im alkalischen Milieu. Gemessen wird ein Stromfluss, der sich aus der an der Arbeitselektrode (meist Gold) ablaufenden Oxidation der Analyten ergibt. Das Potential an der Arbeitselektrode wird durch Verwendung einer Referenzelektrode (z. B. Silber/Silberchlorid oder Palladium/Wasserstoff) festgelegt und der Strom über die Hilfselektrode abgeführt (Corradini *et al.* 2012). Um eine fortschreitende Kontamination der Goldelektrode durch Oxidationsprodukte der Analyten zu verhindern, erfolgt eine reduktive Reinigung mittels eines vierstufigen Pulsverfahrens, bekannt als *Quadruple-Potential-Waveform*. Anschließend wird ein kurzes positives Aktivierungspotential angelegt, bei dem sich Goldoxid bildet, das anschließend durch ein mild negatives Potential sofort wieder reduziert wird (Rocklin *et al.* 1998).

Alternativ kommt zur Analyse der Monosaccharide die Gaschromatographie (GC) mit Flammenionisationsdetektion zum Einsatz, wobei die Monosaccharide zuvor derivatisiert werden müssen, um ihre Flüchtigkeit zu erhöhen. Typischerweise erfolgt hierfür eine Silylierung oder Acetylierung der freien Hydroxygruppen (Albersheim *et al.* 1967; Churms 1990). Da freie Monosaccharide in Lösung in verschiedenen Ringformen (*p* oder *f*) und Konfigurationen (α oder β) vorliegen bzw. teilweise Lactone ausbilden (vgl. Abbildung 1), treten im Chromatogramm mehrere Signale pro Monosaccharid auf, was die Auswertung erheblich erschwert (De Ruiter *et al.* 1992; Lehrfeld 1981; Peterson 1974). Besonders bei uronsäurehaltigen Verbindungen wird von einer systematischen Unterbestimmung berichtet (Chong *et al.* 2013). Diesen Problemen kann teilweise durch Reduktion der Carbonyl- bzw. Carboxygruppen nach vorheriger Aktivierung begegnet werden. Durch die Bildung von Zuckeralkoholen wird der Ringschluss zum Halbacetal oder Lacton unterbunden. Allerdings bilden verschiedene Zucker, wie z. B. Glc und Fru, teils identische Reduktionsprodukte, wodurch eine Unterscheidung nicht mehr möglich ist. Darüber hinaus wird durch die Reduktion der Carboxygruppen der US der entsprechende Neutralzucker gebildet, wodurch eine getrennte Quantifizierung entfällt (De Ruiter *et al.* 1992). Eine alternative Möglichkeit zur Unterbindung des Ringschlusses besteht in der Bildung von Oximen, die die Anzahl der zu erwartenden Derivate pro Analyt auf die *syn*- und *anti*-Oxim-Formen beschränkt (Peterson 1974). Eine darauf aufbauende Derivatisierungsstrategie zur parallelen Analyse von Neutralzuckern und US wurde von Lehrfeld (1981) entwickelt. Nach der Reduktion des Aldehyds mit Natriumborhydrid unter Erhalt der Carboxygruppe erfolgt der Umsatz der Säure mit *N*-Propylamin. Eine anschließende Acetylierung der Hydroxygruppen liefert Alditolacetate der Neutralzucker sowie *N*-Propylaldonamidacetate der US.

Da die molare Detektorantwort in Abhängigkeit der verschiedenen Monosaccharide variiert, ist eine Quantifizierung innerhalb der beschriebenen Methoden ausschließlich unter Verwendung geeigneter Standardsubstanzen möglich (De Ruiter *et al.* 1992). Für kommerziell eingeschränkt verfügbare Standardsubstanzen, wie bestimmte modifizierte US (z. B. 4-*O*-Me-GlcA), können die Monosaccharidgehalte durch die Verwendung eines unpassenden Standards stark von der Realität abweichen,

was zu verfälschten Monosaccharidverhältnissen in der Gesamtanalyse führt (Chong *et al.* 2013; Lorenz *et al.* 2016; Manns *et al.* 2014).

Im Folgenden werden die verschiedenen Hydrolyseverfahren mit Hinblick auf ihrer Eignung zur Analyse uronsäurehaltiger BS-Materialien näher betrachtet und eingeordnet. Glycosidische Bindungen zwischen US gelten als besonders hydrolyseresistent. In diesem Kontext werden häufig Aldobiuronsäuren erwähnt. Die Disaccharide, bestehend aus einer US und einem Neutralzucker, wurden erstmals durch Challinor *et al.* (1931) definiert. Barrett und Northcote (1965) analysierten diese Struktur in Apfelpektin und konnten nach einer partiellen Hydrolyse Disaccharide, bestehend aus GalA in Kombination mit Xyl, Gal und Rha nachweisen. Sie resultieren demnach aus einer unvollständigen Hydrolyse des RG I bzw XG. Tenkanen *et al.* (1999) vergleichen die Hydrolysegeschwindigkeit der Aldobiuronsäure 4-O-Me- α -D-Glc ρ A-1,2- β -D-Xyl ρ aus methyliertem GX im Vergleich zur β -1,4-gebundenen Xylobiose aus dem Xylan-Rückgrat in verdünnter Mineralsäure. Das uronsäurehaltige Dimer wurde signifikant schlechter hydrolysiert, wodurch auf eine generelle Unterbestimmung uronsäurehaltiger Strukturen geschlossen wurde.

Die Stabilität der glycosidischen Bindung zu US wird auf den elektronenziehenden Effekt der Carboxygruppe in direkter Nachbarschaft zur Lactolgruppe zurückgeführt. Nach Anlagerung des Protons an den Sauerstoff der glycosidischen Bindung im ersten Schritt der Hydrolyse wird die Bindung heterolytisch gespalten, wodurch ein Oxoniumion am Ringsauerstoff des in die hydrolytische Bindung involvierten Zuckers entsteht. Durch den elektronenziehenden Effekt der Carboxygruppe ist dieser Zustand destabilisiert, wodurch die Zwischenstufe schlechter gebildet wird und die Hydrolyse langsamer verläuft (Jensen und Bols 2003).

Im Fall einer Schwefelsäurehydrolyse läuft die Spaltung der glycosidischen Bindungen in Abhängigkeit der Säurekonzentration deutlich langsamer ab als der Abbau der freigesetzten Zucker zu Furan-derivaten. Link und Niemann (1930) konnten zeigen, dass eine 1 %ige Schwefelsäure nicht zu einer effektiven Depolymerisierung führt, während bei höheren Konzentrationen der Zuckerabbau zunimmt, was an einer intensiven Braunfärbung erkennbar war. Die von De Ruiter *et al.* (1992) beobachtete geringe Ausbeute an dem 6-Desoxyzucker Rha lässt sich ebenfalls durch die Stabilität der GalA-Rha-Bindung im RG I erklären. Zusätzlich wurde eine Decarboxylierung von US unter diesen Hydrolysebedingungen beobachtet (Link und Niemann 1930). Ein Nachweis der entsprechend resultierenden Pentose wurde durch Leschinsky *et al.* (2009) erbracht, welche das Decarboxylierungsprodukt Xylose ausgehend von GlcA nachweisen konnten.

Die Hydrolyse mit 2 M TFA erfolgt unter deutlich milderen Bedingungen als die Schwefelsäurehydrolyse nach Saeman *et al.*, wodurch der Abbau freigesetzter US begrenzt wird. Allerdings ist die Hydrolyseleistung gegenüber stabilen uronsäurereichen Polymeren eingeschränkt, wie Manns *et al.* (2014) an Braunalgenmaterial und De Ruiter *et al.* (1992) an Citruspektin zeigen konnten. Eine vorgelagerte Methanolyse ermöglicht jedoch eine effektivere Spaltung uronsäurehaltiger Strukturen durch die Bildung von Methylglycosiden, was zu zuverlässigeren Ergebnissen führt. Diese Methode hat sich insbesondere bei Pektinen und Alginaten etabliert (Chong *et al.* 2013; Kersten *et al.* 2025; Willför *et al.* 2009). Schwierigkeiten bereiten jedoch Proben, die neben uronsäurehaltigen

Polymeren hohe Gehalte an Cellulose und Lignin aufweisen, da hier eingelagerte Strukturen eine schlechte Zugänglichkeit aufweisen können. Hier kommt es zu einer Unterbestimmung von US infolge deren Abbaus bei Schwefelsäurehydrolyse und der unzureichenden Depolymerisation im Methanolyse/TFA-Protokoll infolge eingeschränkter Zugänglichkeit (Sundheq *et al.* 1996; Tenkanen *et al.* 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Monosaccharidzusammensetzung aller für die Uronsäurebestimmung eingesetzten Materialien mittels HPAEC-PAD in Doppelbestimmung analysiert. Hierzu wurden sowohl die zuvor isolierten UBS als auch die gemahlene Holzproben einer Schwefelsäurehydrolyse unterzogen. Zusätzlich wurden mit den UBS sowie mit weiteren löslichen Materialien (z. B. Alginat, Buchenxylan, gewonnene LBS und Bubble-Tea-Perlen) eine Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse durchgeführt (Arbeitsvorschrift 8.1.2).

3.2.2 Bestimmung des Veresterungsgrades pektinhaltiger Proben

Eine verlässliche Quantifizierung der US stellt die Grundlage für die Bestimmung des Veresterungsgrades mit Methanol (DM, engl. *Degree of Methylation*) sowie mit Essigsäure (DAc, engl. *Degree of Acetylation*) von Pektinen dar. Beide Kennwerte werden in Relation zum Gesamtgehalt an US berechnet (Müller-Maatsch *et al.* 2014). Die genaue Bestimmung von DM und DAc ist unerlässlich, da beide Parameter die funktionellen Eigenschaften von Pektinen im biologischen wie auch im technologischen Kontext maßgeblich beeinflussen. So bilden niedrig methylveresterte Pektine in Gegenwart von Calciumionen charakteristische „Egg-Box“-Strukturen aus, während hoch methylveresterte Strukturen unter sauren Bedingungen und bei hohem Zuckergehalt gelieren (Yoo *et al.* 2006). Acetylgruppen wirken hingegen störend auf die Ausbildung geordneter Vernetzungszonen und führen zu einer Verminderung der Gelstärke (De Souza *et al.* 2014; Ralet *et al.* 2003). Des Weiteren liefern Variationen von DM und DAc wertvolle Hinweise sowohl auf physiologische Prozesse, wie etwa Fruchtreifung und Erweichung, als auch auf die Verarbeitungsprozesse pflanzlicher Rohstoffe (Brummell 2006).

Eine einfache, häufig industriell genutzte Methode zur Bestimmung des DM stellt eine Titration mit Natronlauge dar. Sie besitzt den Vorteil, dass hier keine separate Quantifizierung der US vorgenommen werden muss. Im Ersten Schritt wird die Konzentration freier Carboxygruppen durch die Titration mit der Base ermittelt. Nach anschließender Verseifung der Ester mit einem Überschuss an Natronlauge sowie der Zugabe einer äquivalenten Salzsäuremenge, wird eine Rücktitration mit verdünnter Lauge vorgenommen. Der Neutralpunkt wird hier anhand eines geeigneten Farbindikators ermittelt. Die Berechnung des DM erfolgt über den Basen-Verbrauch. Eine differenzierte Quantifizierung von Acetylgruppen ist in dieser Methode nicht gewährleistet und muss somit über andere Verfahren erfolgen (Gee *et al.* 1958; Voragen *et al.* 1986). Auf Kritik stößt dieses Verfahren insbesondere auf Grund der Notwendigkeit großer Probenmengen sowie möglicher Interferenzen mit anderen Probenbestandteilen wie z. B. Acetylgruppen, die zu einer Überbestimmung des DM führen (Levigne *et al.* 2002; Müller-Maatsch *et al.* 2014).

Alternative Methoden nutzen die Verseifung der Esterbindungen durch alkalische Behandlung mit Natronlauge und anschließender chromatographischer oder spektroskopischer Analyse des

freigesetzten Methanols und/oder Essigsäure. Gängige chromatographiebasierte Verfahren verseifen die Esterbindungen zunächst in einer Mischung aus Isopropanol und verdünnter Lauge und analysieren diese Lösung anschließend chromatographisch. Hierzu nutzten Voragen *et al.* (1986) eine Ionenaustauschersäule gekoppelt mit refraktometrischer Detektion zur Quantifizierung von Methanol und Essigsäure. Durch Verwendung von Äpfelsäure als interne Standardsubstanz sowie einer Umkehrphasenchromatographie an einer C18-Säule wurde die Analyse durch Levigne *et al.* (2002) optimiert. Savary und Nuñez (2003) stellten eine gaschromatographische Analyse von Methanol und Essigsäure vor. Hierbei erfolgt nach der basischen Hydrolyse der Estergruppen und anschließender Ansäuerung der Pektinproben eine *Headspace-Solid-Phase-Microextraction* mit einer Carboxen-Polydimethylsiloxan-Faser. Methanol und Essigsäure werden anschließend durch GC getrennt und nach Elektronenstoßionisation massenspektrometrisch im *Selected Ion Monitoring* (SIM) analysiert. Als interne Standardsubstanzen dienen die deuterierten Isotopomere Methanol- d_3 und Essigsäure- d_3 , die eine präzise absolute Quantifizierung der Analyten ermöglichen.

Weitere Methoden nutzen die NMR-Spektroskopie des intakten Pektins um über das Protonenverhältnis veresterter und nicht veresterter Carboxygruppen den DM zu bestimmen (Bédouet *et al.* 2003; Renarda und Jarvis 1999). Probleme bereiten hier die stark viskosen Pektinlösungen, die eine Messung bei hohen Temperaturen zwischen 60 – 90 °C erfordern und somit zu Empfindlichkeitsverlusten der Analyse führen (Müller-Maatsch *et al.* 2014). Müller-Maatsch *et al.* (2014) stellten eine alternative, schnelle kernspinresonanzspektroskopische Methode vor, die es ermöglicht, Methanol und Essigsäure nach deren Freisetzung durch Natriumhydroxid in Deuteriumoxid zu quantifizieren. Dabei wird 3-(Trimethylsilyl)propionat- d_4 (TMSP- d_4) als interne Standardsubstanz eingesetzt, so dass eine absolute Bestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ über die Korrelation der Signalfächen ohne vorherige Kalibrierung möglich ist. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, da die Signale der Methylgruppen von Methanol ($\delta_{\text{H}} = 3,36$ ppm) und Essigsäure ($\delta_{\text{H}} = 1,92$ ppm) isoliert im Spektrum vorliegen und somit leicht auswertbar sind.

Der DM bzw. DAC der Pektine wird anschließend prozentual ausgehend von dem bestimmten absoluten Gehalt der US angegeben. Dieser wird überwiegend photometrisch nach der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode gemäß Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) ermittelt (Levigne *et al.* 2002; Müller-Maatsch *et al.* 2014; Voragen *et al.* 1986).

In dieser Arbeit wurde der DM und DAC der pektinhaltigen Proben gemäß der Methode nach Müller-Maatsch *et al.* (2014) mittels quantitativer $^1\text{H-NMR}$ bestimmt (Arbeitsvorschrift 8.1.3). Die entsprechenden Uronsäuregehalte wurden sowohl photometrisch in Anlehnung an Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) (Arbeitsvorschrift 8.5.1) als auch mit der in dieser Arbeit entwickelten chromatographischen Analyse mit MS-Detektion (Kapitel 3.6, Arbeitsvorschrift 8.5.3) ermittelt.

3.3 Isolierung uronsäurehaltiger Oligosaccharide

Zur Optimierung der in Kapitel 3.6 beschriebenen massenspektrometrischen Quantifizierung von US wurden unterschiedliche uronsäurehaltige Oligosaccharide isoliert, da diese kommerziell nicht erhältlich waren. Hierzu zählen die gesättigten Homogalcturonsäureoligosaccharide (HGO), die

Alginat-oligosaccharide (AOS) sowie die mit GlcA bzw. 4-O-Me-GlcA substituierten Glucuronoxylanoligosaccharide (GXOS). Um eine selektive Gewinnung geeigneter Standards zu ermöglichen, erfolgte die Isolierung aus verschiedenen Standardpolysacchariden.

Die Depolymerisierung dieser Polysaccharide zur Generierung von Oligosacchariden unterschiedlicher Kettenlänge kann auf physikalischem, chemischem oder enzymatischem Weg erfolgen (Babbar *et al.* 2016). Ständen geeignete kommerziell erhältliche Enzyme zur Verfügung, wurde die enzymatische Hydrolyse aufgrund ihrer hohen Spezifität und der damit verbundenen Vermeidung von Nebenprodukten bevorzugt. In diesem Zusammenhang wurden die Wahl des Enzyms, das Enzym-Substrat-Verhältnis sowie die Hydrolysezeit hinsichtlich der gewünschten DP-Verteilung gezielt optimiert, während die Inkubationstemperatur den Angaben des jeweiligen Herstellers folgte.

Die Trennung der entstandenen Oligosaccharide erfolgte chromatographisch. Dabei ermöglichte der Einsatz (semi)präparativer Säulen durch die höhere Kapazität der Säulen in Kombination mit höheren Flussraten eine adäquate Trennleistung größerer Analytmengen in praktikablen Zeiten. Für die Auftrennung der Oligosaccharide erwies sich insbesondere die hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie (HILIC, engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) an einer Amidphase als geeignet. Hier können die Oligosaccharide durch einen Verteilungsmechanismus zwischen immobilisiertem Wasser und dem Eluenten sowie Interaktionen mit der stationären Phase nach ihrem DP getrennt eluiert und anschließend fraktioniert werden. Die Detektion erfolgte mithilfe eines Verdampfungslichtstredetektors (ELSD, engl. *Evaporative Light Scattering Detector*). Anschließend wurde die Reinheit der gefriergetrockneten Fraktionen chromatographisch bestimmt sowie die Struktur verzweigter Standards durch 1D- und 2D-NMR-Experimente analysiert. Im Folgenden wird die Isolierung der verschiedenen Oligosaccharide näher erläutert.

3.3.1 Homogalacturonsäureoligosaccharide

Zur Isolierung der gesättigten HGOs wurde ein unveresterter Polygalacturonsäurestandard als Substrat eingesetzt. Die Hydrolyse erfolgte enzymatisch durch eine *endo*-Polygalacturonase, welche selektiv die α -1,4-glycosidischen Bindungen des HGs an zufälligen Positionen spaltet (Jacob und Prema 2006) (Arbeitsvorschrift 8.2.1).

Das Enzym-Substrat-Verhältnis sowie die Inkubationszeit bei 35 °C wurden optimiert, um ein möglichst breites Spektrum an Oligosacchariden mit einem DP von 3 – 10 zu erhalten. Um eine entsprechend gleichmäßige Ausbeute der verschiedenen HGOs zu erreichen, wurden zwei Ansätze mit variierender Inkubationszeit vereinigt. Nach thermischer Inaktivierung des Enzyms (100 °C) wurde unvollständig hydrolysiertes Polymermaterial nach Leijdekkers *et al.* (2011) durch Fällung mit Acetonitril abgetrennt. Die Analyse der DP-Verteilung erfolgte mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- (UHPLC, engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) HILIC-MS (Leijdekkers *et al.* 2011). Alternativ ist die Anwendung der HPAEC-PAD möglich, welche jedoch aufgrund der hohen notwendigen Natriumacetatkonzentrationen zur Elution der HGO nur eingeschränkt mit der MS koppelbar ist, da Natrium im vorgeschalteten Suppressor durch ein Proton ausgetauscht wird und somit Essigsäure entsteht, welche im Vergleich zu Wasser schwerer flüchtig ist und korrosiv wirkt. Entsprechend erfolgt die Identifizierung der HGOs bei einem Einsatz der

HPAEC überwiegend durch den Vergleich mit Standardsubstanzen, welche jedoch nur eingeschränkt kommerziell verfügbar sind (Babbar *et al.* 2016; Combo *et al.* 2012).

Durch eine Fraktionierung nach HILIC-Trennung wurden nach DP-getrennte Fraktionen erhalten, deren Reinheit unter Annahme eines vergleichbaren molaren Detektorresponse aller HGO über die Peakflächen der jeweiligen SIM-Spuren mittels der in Arbeitsvorschrift 8.2.1 beschriebenen UHPLC-MS-Methode bestimmt wurden.

3.3.2 Alginatoligosaccharide

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der AOS wurde ein kommerziell verfügbares Natriumalginat verwendet, dessen M/G-Verhältnis zuvor durch die Monosaccharidanalyse gemäß Kapitel 3.2.1 nach Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse bestimmt wurde (Arbeitsvorschrift 8.1.2).

In zahlreichen Studien werden AOS durch enzymatische Hydrolyse mittels Alginat-Lyasen gewonnen (Jonathan *et al.* 2013; Kawada *et al.* 1997). Diese katalysieren eine Depolymerisierung von Alginat über β -Eliminierung, wodurch ungesättigte Oligosaccharide mit charakteristischer Doppelbindung am nichtreduzierenden Ende entstehen (Zhu und Yin 2015). Da im vorliegenden Kontext ausschließlich gesättigte Oligosaccharide von Interesse waren und geeignete Enzyme hierfür nicht kommerziell zur Verfügung standen, wurde eine milde Säurehydrolyse von Alginat in Anlehnung an Jonathan *et al.* (2013) durchgeführt. Die Variation des pH-Werts zwischen 3 – 5 sowie die Anpassung der Hydrolysezeit ermöglichte eine Optimierung des Produktspektrums (DP 3 – 10). Auch hier wurden zwei unterschiedlich lange inkubierte Ansätze vereinigt, um eine gleichmäßige Ausbeute der verschiedenen AOS zu erreichen. Abschließend erfolgte eine Abtrennung des verbliebenen nicht hydrolysierten polymeren Materials durch Präzipitation mit Ethanol sowie eine Charakterisierung des Hydrolysats mit einer im Vergleich zu der Isolierung der HGOs (Kapitel 3.3.1) leicht abgewandelten UHPLC-HILIC-MS-Analyse (Jonathan *et al.* 2013) (Arbeitsvorschrift 8.2.2).

Die präparative Isolierung der AOS (Arbeitsvorschrift 8.2.2) erfolgte ausschließlich nach dem DP, eine Trennung hinsichtlich der Anteile und Verteilung der Gula- und ManA-Einheiten innerhalb eines DP wurde nicht vorgenommen. Die Bestimmung der Reinheit der isolierten AOS wurde vergleichbar zur Isolierung der HGO (Kapitel 3.3.1) nach Arbeitsvorschrift 8.2.2 durchgeführt.

3.3.3 Glucuronoxylanoligosaccharide

Die Gewinnung der GXOS erfolgte durch enzymatische Hydrolyse eines deacetylierten Buchenxylans. Hierfür stehen *endo*- β -(1,4)-Xylanasen der Glykosylhydrolase (GH)-Familien GH10, GH11 und GH30 zur Verfügung, die sich durch unterschiedliche Spaltspezifitäten innerhalb des Xylanrückgrats auszeichnen. Je nach Anzahl und Position der GlcA- oder 4-O-Me-GlcA-Substituenten entstehen sowohl neutrale, unsubstituierte Xylooligosaccharide (XOS) als auch uronsäurehaltige GXOS (Biely *et al.* 2016). Die Oligosaccharide werden nachfolgend gemäß der durch Fauré *et al.* (2009) vorgeschlagenen Nomenklatur bezeichnet. Hierbei steht X, für eine Xyl-Einheit und U für eine mit GlcA substituierte Xyl. Hoch- bzw. tiefgestellte Zahlen geben die Anzahl aufeinanderfolgender Einheiten (tief) sowie die Position der Substitution (hoch) an. Die Substitution mit einer methylierten GlcA wird durch den hochgestellten Zusatz ,4m' kenntlich gemacht.

Xylanasen der Familie GH10 generieren in der Regel kürzere Oligosaccharide (DP 2 – 5) als GH11 zugehörige Enzyme ($3 < DP < 10$). GH10-Enzyme spalten glycosidische Bindungen, sobald im Rückgrat zwei aufeinanderfolgende unsubstituierte Xylp-Einheiten vorliegen. Damit werden unverzweigte Abschnitte der GX überwiegend in Xylobiose gespalten. GlcA-substituierte Einheiten führen zu GXOS, die die Verzweigung am nicht-reduzierenden Ende tragen. Hier überwiegt das Trisaccharid $U^{4m2}XX$ (Biely *et al.* 2016; Collins *et al.* 2005). Enzyme der GH11-Familie benötigen für eine erfolgreiche Depolymerisierung drei aufeinanderfolgende unsubstituierte Xyl-Einheiten. Das kürzeste dabei entstehende XOS ist X_3 . Substituierte Spaltprodukte besitzen zudem ein unsubstituiertes nicht-reduzierendes Ende aus X oder X_2 , sodass $XU^{4m2}XX$ als kleinstes substituiertes Oligosaccharid beschrieben wird (Biely *et al.* 2016). Die GH30 Xylanasen stellen eine substituentenspezifische Enzymfamilie dar und spalten nur an mit GlcA substituierten Positionen, während unsubstituierte Ketten intakt bleiben (Nordberg Karlsson *et al.* 2018). In der Literatur sind bislang nur wenige Informationen zur Struktur der durch GH30-Hydrolyse entstehenden GXOS verfügbar. Es wird jedoch berichtet, dass diese Oligosaccharide im Vergleich zu den Hydrolyseprodukten aus GH10- bzw. GH11-Behandlungen einen höheren DP aufweisen (Valls *et al.* 2018).

In dieser Arbeit wurde die Eignung einer GH10 und GH11 Xylanase zur Hydrolyse des Buchenxylans untersucht. Hierbei wurden sowohl das Enzym-Substrat-Verhältnis als auch die Inkubationszeit optimiert, und die Hydrolyseprodukte wurden mittels HPAEC-PAD/MS charakterisiert (Arbeitsvorschrift 8.2.3). Für die präparative Herstellung der Oligosaccharide wurde schließlich eine GH11-Xylanase unter optimierten Bedingungen eingesetzt. Nach Enzyminaktivierung und Präzipitation des Restpolymers mit Ethanol wurden neutrale XOS von sauren GXOS abgetrennt. Hierzu diente in Anlehnung an Miguez *et al.* (2022) eine Festphasenextraktion (SPE, engl. *Solid Phase Extraction*), die an einem Anionenaustauscher durchgeführt wurde. Da die Carboxygruppen der GXOS bei neutralem bis schwach saurem pH-Wert dissoziiert vorliegen, adsorbieren GXOS an mit quartären Ammoniumgruppen modifizierte Polymerharzmaterialien, während XOS mit entionisiertem Wasser eluiert werden. Die Elution der GXOS kann sowohl durch Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten unter Zugabe von Salzen wie Carbonate, Formiate oder Acetate sowie durch Erniedrigung des pH-Wertes unter den pK_s -Wert des Analyten erfolgen (Schmidt *et al.* 2014). Aufgrund der Flüchtigkeit und damit guten Vereinbarkeit mit nachfolgenden HPAEC-Analysen wurde in dieser Arbeit ein formiathaltiger Eluent bevorzugt (Arbeitsvorschrift 8.2.3).

Die nach SPE angereicherten GXOS wurden fraktioniert (Arbeitsvorschrift 8.2.3) und die Reinheit der erhaltenen GXOS-Fractionen unter Annahme eines vergleichbaren molaren Detektorresponses aller GXOS mittels HPAEC-PAD bestimmt. Die Positionen der 4-O-Me-GlcA-Substituenten innerhalb der Moleküle wurden im Rahmen der Masterarbeit von Maren Punke (2025) durch 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Arbeitsvorschrift 8.2.3).

3.4 Photometrische Analyse des Uronsäuregehalts

3.4.1 Analysenprinzip

Photometrische Assays gelten als einfache, kostengünstige und effiziente Analysemethoden, die bereits seit vielen Jahrzehnten zum etablierten Standard der Kohlenhydratanalytik zählen (vgl. Kapitel 1.4.2). Insbesondere US werden häufig gesondert zur chromatographischen Analyse der Monosaccharidzusammensetzung aufgrund der in Kapitel 3.2.1 dargelegten Hydrolyseproblematik photometrisch erfasst. Hierzu werden diese unter Einfluss von konzentrierter Schwefelsäure zu 5FFA abgebaut, welches durch Zugabe eines Chromogens ein Chromophor ausbildet, das photometrisch bestimmt wird. Erste Methoden nutzten die Chromogene Naphtoresorcinol (Tollens 1908) oder Carbazol (Dische 1947), welche jedoch aufgrund zu geringer Farbstabilität der Chromophore und mangelnder Selektivität durch den Assay von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) (vgl. Kapitel 1.4.3) weitestgehend abgelöst wurden. Dieser Assay wird in den folgenden Abschnitten detaillierter betrachtet.

Die quantitative photometrische Analyse des gebildeten Chromophors beruht auf der Absorption von Licht im UV- oder sichtbaren (vis)-Bereich unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * d$$

Dies verbindet die Absorption A mit der Probenkonzentration c , der Schichtdicke d der durchstrahlten Probe sowie dem molaren Extinktionskoeffizienten ε . Somit besteht (bei geringen Konzentrationen) ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption sowie der Konzentration der absorbierenden Spezies (Fleming und Williams 1966).

Die spektrophotometrische Analyse des Gesamturonsäuregehalts der in Kapitel 3.1. genannten Materialien bzw. BS erfolgt nach Abbau der uronsäurehaltigen Probe in natriumtetraborathaltiger konzentrierter Schwefelsäure durch Erhitzen bei den von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) festgelegten 95 °C für 5 min. Nach dem Erkalten wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe einer 3PP-haltigen Lösung angefärbt. Im Unterschied zu der von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) publizierten Methode, erfolgte die photometrische Messung der entwickelten Färbung aufgrund der erst nach dieser Zeit erreichten Stabilität der Absorption nach 20 min anstelle der vorgeschlagenen 5 min bei 520 nm. Die Quantifizierung wurde anhand einer Kalibrierung mit der entsprechenden US-Standardsubstanz vorgenommen. Hierbei wurde, gemäß der Empfehlung von Yapo (2012) die dominierende Spezies zur Kalibrierung verwendet. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert (Arbeitsvorschrift 8.5.1). Da der Abbau verschiedener US unter identischen Reaktionsbedingungen in unterschiedlichem Ausmaß verläuft, kann die Wahl einer nicht dominanten US zum Erstellen der Kalibrierung zu erheblichen systematischen Fehlern führen (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973; Knutson und Jeanes 1968; Li *et al.* 2007; Yapo 2012). Li *et al.* (2007) überprüften zudem die Verwendung des Säureabbauprodukts 5FFA als Kalibrierstandard. Allerdings zeigte sich hierbei eine etwa zweifach höhere Steigung der Kalibriergeraden im Vergleich zur Kalibrierung mit US, was die Autoren auf einen unvollständigen Umsatz der US zu 5FFA zurückführten.

Wasserlösliche Probenmaterialien, wie etwa isolierte LBS, können in wässriger Lösung direkt zur Analyse verwendet werden. Unlösliches Probenmaterial benötigt jedoch eine Vorbehandlung zur Freisetzung von US aus komplexen Zellwandmatrices. Dies erfolgt vorrangig durch saure Hydrolyse, wobei klassische Verfahren auf dem Saeman-Protokoll basieren (Saeman *et al.* 1945). Dieses zwei-stufige Verfahren zielt auf die vollständige Depolymerisierung uronsäurehaltiger Polymere in cel-lulosereichen Matrices ab. Alternativ wurden kürzere Hydrolysezeiten und mildere Hydrolysebedin-gungen eingesetzt, etwa 3 h bei Raumtemperatur (Selvendran *et al.* 1979), mit wasserfreiem Fluor-wasserstoff bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min (Zhang *et al.* 2007) oder mit 0,25 M Salzsäure bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 h (Jarvis *et al.* 1988), um nahezu alle Polyuronide zu lösen. Milde Säurehydrolysen mit verdünnter Salzsäure oder TFA führen hingegen häufig zu unvollständiger Depolymerisierung unter gleichzei-tig fortschreitendem Abbau der US, was zur Unterbestimmung dieser führen kann (De Ruiter *et al.* 1992). Erschwerend kommt hinzu, dass die Reaktivität von gebundenen und freien US-Resten in Abhängigkeit von der glycosidischen Bindung variiert. Dies beeinflusst die quantitative Bestim-mung mittels gängiger Farbreaktionen erheblich und kann zu inkonsistenten Ergebnissen führen (Garna *et al.* 2006; Gregory 1960; Matsushashi und Hatanaka 1992).

Eine weitere Vorbehandlung für Pektine wird durch McComb und McCready (1952) empfohlen. Durch das Lösen pektinhaltiger Proben in verdünnter Natronlauge werden etwaige Methylester der Carboxygruppe gespalten, wodurch höhere Uronsäuregehalte bestimmt werden. Scott (1979) be-stätigte dies innerhalb der kolorimetrischen Quantifizierung einer an C6 methylveresterten GalA im Vergleich zur nativen GalA. Erst nach alkalischer Behandlung der veresterten Probe konnte diese vergleichbar zur GalA bestimmt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Vorbehandlung unlöslicher Probenmaterialien an-hand der isolierten UBS des Karottentresters systematisch optimiert (Arbeitsvorschrift 8.5.1). Dabei wurden die Verweilzeiten in konzentrierter und anschließend verdünnter Schwefelsäure variiert. Ziel war es, den Gehalt an freigesetzten US zu maximieren und gleichzeitig den säureinduzierten Abbau zu 5FFA zu minimieren, um eine direkte Kondensatbildung dieses Abbauprodukts in der ver-dünnten Säure oder in der nachfolgenden Behandlung mit konzentrierter Säure zu minimieren. Zur Überwachung wurde die entwickelte chromatographische Methode zur Uronsäurebestimmung (Ar-beitsvorschrift 8.5.3) eingesetzt.

3.4.2 Analyse des Einflusses verschiedener Reaktionsparameter

In der Literatur wird wiederholt von uneinheitlichen Ergebnissen bei der Bestimmung des Uronsäu-regehaltes berichtet, selbst wenn identische oder sehr ähnliche Probenmaterialien untersucht wur-den und die zugrunde liegenden Methoden auf demselben chromogenen Reagenz beruhten (Filisetti-Cozzi und Carpita 1991; Kintner und Van Buren 1982; Yapo 2012).

Einen bedeutsamen Einfluss haben dabei vor allem Neutralzucker, wie Barazarte *et al.* (2007) zeigen konnten. Bei einer Konzentration von $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ GalA und einem Überschuss von $50 - 200\text{ }\mu\text{g/mL}$ verschiedener Neutralzucker (Ara, Gal, Glc, Fru) kam es zu Überbestimmungen der US, die bis zu 115 % betrugten. Auch Thibault (1979) beobachtete in einem automatisierten Assay bei bis zu 20-fachem Neutralzuckerüberschuss deutliche, wenn auch im Vergleich weniger ausgeprägte

Interferenzen. Ein direkter Vergleich der beiden Studien ist jedoch kaum möglich, da die jeweils eingesetzten Reaktionsbedingungen nicht in hinreichender Ausführlichkeit dokumentiert sind.

Proteine können ebenfalls Störungen im Assay hervorrufen (Yapo 2011). Dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter thematisiert, da die untersuchten Proben durch eine proteolytische Vorbehandlung frei von nennenswerten Proteinnengen vorlagen.

Die Vielzahl konsistenter Literaturdaten, welche die Interferenz von Neutralzuckern im Blumenkrantz- und Asboe-Hansen-Assay (1973) bestätigen, macht eine gesonderte experimentelle Verifizierung dieses Effektes im Rahmen dieser Arbeit entbehrlich. Es wird davon ausgegangen, dass die Interferenzen in erster Linie auf die Reaktivität der Abbauprodukte der Neutralzucker (insbesondere HMF, Furfural und 5-Methylfurfural (5MF)) mit dem eingesetzten Reagenz 3PP zurückzuführen sind, da diese strukturell analoge Eigenschaften zu 5FFA aufweisen (Li *et al.* 2007). Entsprechend wurde die Entstehung der Abbauprodukte aus verschiedenen Neutralzuckern quantifiziert sowie die Reaktivität von 3PP gegenüber dieser Furanderivate systematisch untersucht. Zur Analyse der Abbauprodukte wurden jeweils 1,3 μmol ausgewählter Monosaccharid-Standardsubstanzen in konzentrierter Schwefelsäure erhitzt und anschließend gemäß Arbeitsvorschrift 8.3 mittels HPLC-UV an einer Umkehrphase analysiert. Zur Untersuchung der Reaktivität gegenüber 3PP wurden zwei Ansätze durchgeführt. In beiden Ansätzen wurde jeweils eine Lösung mit 100 μM 5FFA, HMF und Furfural in konzentrierter Schwefelsäure mit einem dreifachen molaren Überschuss an 3PP umgesetzt, bezogen entweder auf die 5FFA-Konzentration (Ansatz 1) oder auf die Gesamtfuranmenge (Ansatz 2). Nach einer der photometrischen Analyse entsprechenden Reaktionszeit von 20 min wurden die verbleibenden Furane chromatographisch quantifiziert (Arbeitsvorschrift 8.3).

Die in der Literatur verdeutlichten Variationen der Messergebnisse zeigen zudem, dass nicht alleine Matrixeffekte, wie Interferenzen durch Neutralzucker, sondern insbesondere die konkreten Reaktionsbedingungen maßgeblich zur Beeinflussung des Assays beitragen. Wie Yapo (2012) gut zusammenfasst, üben Faktoren wie die Konzentration der Schwefelsäure, die Dauer des Erhitzungsschritts sowie die Temperaturführung einen entscheidenden Einfluss auf die Präzision und Richtigkeit der Methode aus.

Bereits im Rahmen der Carbazol-Reaktion konnte ein deutlicher Einfluss des Wassergehalts der Schwefelsäure auf die Farbintensität nachgewiesen werden. Schon geringe Schwankungen der Säurekonzentration zwischen 82 % und 91 % führten zu einer Halbierung des Messsignals, wobei die intensivste Färbung bei einer Konzentration von 87 % erreicht wurde (McComb und McCready 1952). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für den Blumenkrantz- und Asboe-Hansen-Assay beschrieben. Ben-Shalom *et al.* (1994) untersuchten den Effekt eines Wasseranteils von 1 – 10 % in natriumtetraborathaltiger Schwefelsäure und zeigten, dass die Signalintensität mit steigendem Wassergehalt kontinuierlich abnahm, sodass bei einem Wasseranteil von 10 % die Absorption bereits um rund 40 % reduziert war. Zudem stellten die Autoren fest, dass das eingesetzte schwefelsaure Reagenz mit der Zeit Wasser aus der Umgebungsluft aufnehmen kann, wodurch die Empfindlichkeit des Assays mit zunehmendem Alter dieses deutlich abnimmt. Eine Lagerung des Reagenzes

unter Stickstoffatmosphäre wurde als geeignete Maßnahme zur Vermeidung dieses Effekts beschrieben.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Wassergehalts auf die photometrische Bestimmung des Uronsäuregehalts untersucht. Dabei wurde sowohl der Effekt des variierenden Wassergehalts in konzentrierter Schwefelsäure (50 – 97 %) auf die Ausbildung der Färbung als auch der Einfluss einer gezielten Wasserzugabe nach der Chromophorbildung gemäß Arbeitsvorschrift 8.5.1 geprüft.

Neben der Schwefelsäurekonzentration beeinflussen insbesondere Temperatur und Dauer der thermischen Behandlung die Präzision und Richtigkeit der Uronsäureanalyse. Während im ursprünglichen Carbazol-Verfahren lange Erhitzungszeiten von 20 min bei 95 – 100 °C angewendet wurden, zeigte sich in späteren Studien, dass das für die Farbreaktion maßgebliche 5FFA bereits nach 5 min vollständig gebildet und über einen Zeitraum von mindestens 30 min stabil war (Dische 1947; McComb und McCready 1952). Für den Assay mit 3PP wurde daher ein kürzerer Erhitzungsschritt bei 95 °C für 5 min etabliert, ohne dass Einbußen in der Empfindlichkeit festgestellt wurden (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973). Spätere Modifikationen nutzten teilweise geringere Temperaturen und längere Inkubationszeiten (z. B. 80 °C, 20 min), um eine Balance zwischen vollständiger Umsetzung der US und Minimierung unspezifischer Nebenreaktionen zu erreichen (van Hoogen *et al.* 1998). Li *et al.* (2007) konnten zudem mittels HPLC-Monitorings des aus GalA gebildeten 5FFAs in der konzentrierten Schwefelsäure zeigen, dass die US bereits bei Raumtemperatur innerhalb von 10 min zu 60 % abgebaut vorlag. Dieser Wert blieb über 30 min hinweg konstant. Des Weiteren wurde die Stabilität eines 5FFA Standards in konzentrierter Säure bewertet. Hier konnte während einer Standzeit von 30 min nur eine geringe Abnahme der Konzentration von 5FFA von etwa 10 % beobachtet werden.

Frühere Untersuchungen verdeutlichen darüber hinaus, dass die erzielten Ergebnisse nicht alleine von den Reaktionsbedingungen, sondern auch von der Art der eingesetzten US abhängen. Von Berlepsch (1969) zeigte für GlcA, dass mit steigender Temperatur die Abbaurate der US zu 5FFA zunimmt, wohingegen bei GalA ein Anstieg des Signals nur im Bereich von 60 – 80 °C zu beobachten war, während bei 100 °C bereits eine Stagnation bzw. Abnahme auftrat (Taylor und Buchanan-Smith 1992; Thibault 1979). Für ManA und GulA wurde hingegen nachgewiesen, dass sie bereits bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen um 55 °C besonders empfindlich erfasst werden können (Knutson und Jeanes 1968).

Um die beschriebenen Effekte hinsichtlich der Empfindlichkeit der Analyse besser einordnen zu können, wurde das Abbauverhalten in konzentrierter Schwefelsäure der analysierten US GalA, GlcA, ManA und GulA chromatographisch mittels HPLC-UV an einer Umkehrphase untersucht. Hierzu wurden alle entstehenden Furanderivate anhand einer Kalibrierung mit entsprechenden Standardsubstanzen quantitativ erfasst (Arbeitsvorschrift 8.3).

3.4.3 Analyse des Einflusses von Borat

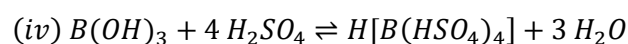
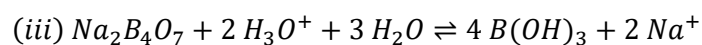
Zur Steigerung der Empfindlichkeit und zur Reduktion von Interferenzen im kolorimetrischen US-Assay, wurden in der Literatur verschiedene Additive vorgeschlagen. Besonders häufig untersucht wurden Sulfamat und Borat in Kombination mit konzentrierter Schwefelsäure. Sulfamat wurde erstmals von Galambos (1967) in die Carbazol-Methode eingeführt und später dessen Einsatz von Filisetti-Cozzi und Carpita (1991) für das Blumenkranz und Asboe-Hansen-Assay optimiert. Die Wirkung beruht im Wesentlichen auf der Unterdrückung störender Interferenzen durch Neutralzucker, wobei der Wirkmechanismus unbekannt ist. Allerdings konnte gleichzeitig eine, wenn auch deutlich geringere, Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber US beobachtet werden. Aus diesem Grund wird Sulfamat heute nur selten eingesetzt.

Demgegenüber hat sich die Verwendung von natriumtetraborathaltiger Schwefelsäure als Standard innerhalb der kolorimetrischen Uronsäureanalyse etabliert. Bereits Badin *et al.* (1953) erkannten den Vorteil des Boratzusatzes zur Steigerung der Selektivität in auf saurem Abbau von Kohlenhydraten basierenden Methoden. Darauf aufbauend führte Gregory (1960) diesen Zusatz im Carbazol-Assay ein, woran Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) in ihrer Analyse anknüpften. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Borat zu einer erhöhten Empfindlichkeit, einer verbesserten Präzision sowie einer gesteigerten Farbstabilität des gebildeten Chromophors führt (Bitter und Muir 1962; Gregory 1960; Scott 1979).

Daher stand auch die Charakterisierung des Einflusses von Borat auf die photometrische Quantifizierung von US im Fokus dieser Arbeit. Das Vorgehen wird in den folgenden Kapiteln ausführlich erläutert.

3.4.3.1 Selektivität und Sensitivität der Analyse

In konzentrierter Schwefelsäure wird Natriumtetraborat gemäß Reaktionsgleichung (iii) in Borsäure überführt, welche als reaktive Spezies gilt (Holleman *et al.* 2017; Scott 1979). Zudem wird in Literaturquellen eine mögliche Weiterreaktion der Borsäure zur Sulfato-Komplexverbindung Tetra(hydrogensulfato)borsäure (iv) dargestellt, die allerdings im Kontext mit der Uronsäureanalyse nicht erwähnt wird (Gillespie und Robinson 1962).



Bitter und Muir (1962) analysierten den Einfluss verschiedener Boratkonzentrationen auf die Absorption der photometrischen US-Quantifizierung und fanden ab einer Konzentration von 25 mM bis zur analysierten Konzentration von 100 mM zwischen 25 mM und 100 mM keine Unterschiede in der Effektstärke hinsichtlich einer gesteigerten Empfindlichkeit. Dagegen ermittelten Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973), dass bereits 12,5 mM Borat zu einer maximalen Sensitivität führen, während Filisetti-Cozzi und Carpita (1991) eine Konzentration von 75 mM verwendeten. Der Effekt wird allgemein als katalytischer Natur beschrieben, da ausschließlich eine Verstärkung der Absorption, jedoch keine Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet wurde. Weiterhin zeigte sich, dass eine Absorptionssteigerung nur dann auftritt, wenn Borat vor dem

Erhitzen zugesetzt wird, was auf eine Beeinflussung des Abbaus der US zu 5FFA schließen lässt (Gregory 1960; Yapo 2012). Uneinigkeit besteht hinsichtlich des Einflusses auf Interferenzen durch Neutralzucker. Während Galambos (1967) eine deutliche Reduktion beschrieb, berichtete Thibault (1979) von einer um 10 % gestiegenen Interferenz durch den Zusatz von Borat.

Vor diesem Hintergrund wurde innerhalb der Masterarbeit von Emily Friedmann (2024) der Einfluss von Borat auf die photometrische Uronsäurequantifizierung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen systematisch untersucht. Zum einen erfolgte eine Analyse der Farbstabilität über 90 min anhand der mittleren Kalibrierkonzentration (40 mg/L der jeweiligen untersuchten US) mit und ohne Boratzusatz nach Arbeitsvorschrift 8.5.1. Zum anderen wurden Kalibriergeraden für die US GalA und GlcA sowie das Abbauprodukt 5FFA gemäß derselben Arbeitsvorschrift (Tabelle 26) aufgenommen, wobei eine gesteigerte Empfindlichkeit mit einer höheren Steigung in Verbindung gebracht wird. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Borat auf die Farbbildung ausgehend von relevanten Furana-bbauprodukten (HMF, Furfural und 5FFA) photometrisch (Arbeitsvorschrift 8.5.1) untersucht.

3.4.3.2 Beeinflussung der Lactonisierung von Uronsäuren

Das Ausmaß der durch Borat erzielten Empfindlichkeitssteigerung in der Uronsäureanalyse und damit der Abbau zu 5FFA, ist stark abhängig von der jeweiligen US. Ohne Zusatz von Borat wird GalA am stärksten abgebaut, gefolgt von GlcA. ManA liefert hingegen ohne Boratzusatz nahezu kein messbares Signal im Assay. Wird Borat in die Analyse eingebracht, so wird ManA detektierbar, und die Sensitivität der GlcA-Analyse gleicht sich derjenigen von GalA an (Filisetti-Cozzi und Carpita 1991; Gregory 1960).

Die Geschwindigkeit und Ausbeute der 5FFA-Bildung in konzentrierter Schwefelsäure hängt nach Scott (1979) somit maßgeblich von der Konfiguration der eingesetzten US ab. GalA mit *erythro*-Konfiguration an den Positionen C3/C4 reagiert rasch und erreicht ihre maximale 5FFA-Ausbeute auch ohne Zusatz von Borat. Im Gegensatz dazu benötigen US mit *threo*-konfigurierten Hydroxygruppen an C3/C4 die Anwesenheit des Zusatzes, um eine maximale 5FFA-Ausbeute zu erreichen. Als ursächlicher Mechanismus wird die Ausbildung stabiler Furanurono-6,3-lactone unter stark sauren Bedingungen postuliert (vgl. Abbildung 2). Die Stabilität dieser Lactone wird somit als Ursache für die verlangsamte Umsetzung von GlcA sowie den beobachteten katalytischen Effekt von Borsäure gesehen. Diese Hypothese sowie weitere Einflussmechanismen von Borat wurden im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

Da lactonisierbare US in Lösung in einem Lacton-Säure-Gleichgewicht vorliegen, wurden NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt, um den Einfluss von Borat bzw. Borsäure auf dieses Gleichgewicht sowie mögliche molekulare Interaktionen zu untersuchen (Arbeitsvorschrift 8.4.1).

Die NMR-Spektroskopie stellt eine zentrale Methode der Strukturaufklärung organischer Moleküle dar, da sie die magnetischen Eigenschaften von Atomkernen nutzt, um detaillierte Informationen über deren chemische Umgebung zu generieren. Die meisten Atomkerne besitzen einen vom Kernspin I abhängigen Eigendrehimpuls $P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar$. Die rotierenden Kerne erzeugen so ein magnetisches Feld mit einem magnetischen Moment μ . Dieses ist über einen von der Kernsorte

abhängigen Proportionalitätsfaktor γ , dem gyromagnetischen Verhältnis, mit P verknüpft. Klassische, mittels NMR analysierbare Kerne sind neben Protonen (^1H), ^{13}C , ^{15}N oder ^{19}F . Kerne mit einem Kernspin $I = 0$ sind NMR-inaktiv. Wird eine Probe in ein starkes äußeres Magnetfeld B_0 gebracht, so spaltet sich der Grundzustand der NMR-aktiven Kerne in $2I+1$ sogenannte Zeeman-Niveaus auf. Im ^1H -Experiment werden ausschließlich Protonen betrachtet. Für diese sind demnach zwei Energiezustände möglich, welche parallel ($m = +1/2$, α -Spin) und entgegengesetzt ($m = -1/2$, β -Spin) zu B_0 ausgerichtet sein können. Durch das Einwirken des Magnetfeldes präzedieren die Kerndipole mit der Frequenz ν_L (Larmor-Frequenz) um eine Achse, wobei der energieärmere Zustand im thermischen Gleichgewicht minimal höher besetzt ist. Dieser Besetzungsüberschuss wird als makroskopische Magnetisierung (M) bezeichnet und ist entlang B_0 ausgerichtet (M_z). Durch das Einstrahlen eines magnetischen Wechselfelds B_1 im Radiowellenbereich mit der entsprechenden Larmor-Frequenz werden Übergänge zwischen den Energieniveaus der α - und β -Spins induziert. Je nach chemischer Umgebung der zu untersuchenden Kernsorte variieren die Resonanzfrequenzen minimal und machen die Kerne so unterscheidbar (Lambert *et al.* 2012).

Zur Aufnahme eines NMR-Spektrums wird heute das Impulsverfahren verwendet. Nach der Heisenberg'schen Unschärferelation wirkt ein hochfrequenter Impuls sehr kurzer Dauer effektiv polychromatisch, so können alle Kerne einer Sorte gleichzeitig angeregt werden. Bei Anwendung eines 90° Pulses wird M in die x' - y' -Ebene ausgelenkt (Verwendung eines rotierenden Koordinatensystems). Der Auslenkungswinkel θ ist jedoch variabel und abhängig von der Amplitude von B_1 und der Wirkungsdauer des Impulses τ_p ($\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau_p$). Eine in y -Richtung orientierte Empfängerspule registriert die Auslenkung von M , welche ein messbares Wechselspannungssignal induziert. Nach Abschalten von B_1 strebt die Magnetisierung $M_{x'-y'}$ wieder die Gleichgewichtslage an (Relaxation). Hierbei wird zwischen zwei Prozessen unterschieden: Die Spin-Gitter-Relaxation oder auch longitudinale Relaxation (T_1) beschreibt die Wiederherstellung der Besetzungszahlen der Spinzustände im Gleichgewicht, M_z wird somit wieder maximal. Die Spin-Spin-Relaxation oder transversale Relaxation (T_2) steht für die vollständige Aufhebung der Phasenkohärenz der Kernspins. Die Veränderung von M_y wird in Abhängigkeit der Zeit als *Free Induction Decay* (FID) aufgezeichnet und zur Darstellung in einem frequenzabhängigen Spektrum mittels Fouriertransformation umgewandelt. Ein entsprechendes Prozessieren der Spektren nach Aufnahme erhöht deren digitale Auflösung. Die Integration der Signale ermöglicht die Quantifizierung (Friebolin 2010).

Da Proben aufgrund gerätespezifischer Einschränkungen nicht direkt in konzentrierter Schwefelsäure mittels NMR gemessen werden konnten, wurde mit verdünnter deuterierter Schwefelsäure gearbeitet. Die relative Quantifizierung des Lactongehalts der US unter dem Einfluss von Borat sowie unterschiedlich konzentrierten Schwefelsäurelösungen wurde exemplarisch für GlcA anhand von ^1H -NMR-Spektren durchgeführt (Arbeitsvorschrift 8.4.1). Um den Einfluss von Borat auf den Abbau verschiedener US zu bestimmen, wurde ergänzend zur NMR eine chromatographische Analyse des während der Säurebehandlung entstehenden 5FFAs durchgeführt (Arbeitsvorschrift 8.5.2). Darüber hinaus wurde der Einfluss von Borat auf die Reagenzien 3PP und 5FFA mittels NMR-Spektroskopie und MS-gekoppelter Umkehrphasenchromatographie analysiert (Arbeitsvorschrift 8.4.2, die UHPLC-MS Analyse erfolgte gemäß Tabelle 33).

Die in dem vorangehenden Abschnitt beschriebenen NMR-Analysen beinhalteten den Abgleich mit aufgenommenen Spektren von Standardsubstanzen (US, US-Lacton, 3PP, 5FFA) sowie die Anwendung mehrdimensionaler Verfahren.

2D-NMR-Experimente erlauben eine weitergehende Strukturcharakterisierung, insbesondere bei komplexen ^1H -NMR-Spektren mit Signalüberlagerungen. Die 2D-NMR basierten Analysen umfassten folgende Experimente: Das *H,H-Correlation Spectroscopy* (COSY)-Experiment zielt auf die Analyse der Beziehung zwischen benachbarten Protonen, die über drei Bindungen hinweg Spin-Spin-Kopplungen ausbilden ($^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung), ab (Friebolin 2010). Für die Analyse von Kohlenhydraten ist insbesondere die Korrelation zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen von Bedeutung. Durch eine geringe natürliche Häufigkeit und ein kleines gyromagnetisches Verhältnis ist die Detektion der ^{13}C -Kerne im Vergleich zu ^1H -Kernen unempfindlicher und die Aufnahme von 1D- ^{13}C -NMR-Spektren sehr langwierig. Gleiches gilt für direkte heteronukleare 2D-Experimente, welche daher durch inverse Verfahren ersetzt werden. Eine *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer* (INEPT)-Pulsfolge überträgt hierbei die Magnetisierung der empfindlicheren ^1H -Kerne auf die unempfindlicheren ^{13}C -Kerne. Nach dem Polarisationstransfer und der Entwicklung der chemischen Verschiebung erfolgt der INEPT-Rücktransfer, welcher die Magnetisierung wieder zurück auf die Protonen überträgt, deren Resonanz gemessen wird (Claridge 2016). Innerhalb der Kohlenhydratanalytik wird das *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment als Standard verwendet. Es zeigt die skalare heteronukleare Kopplung zwischen ^1H - sowie ^{13}C -Kernen und ermöglicht die Zuordnung eines Kohlenstoffs zu den daran gebundenen Protonen. Ein phasensensitives HSQC erlaubt zudem die Unterscheidbarkeit zwischen CH/CH₃- und CH₂-Gruppen und ist insbesondere zur Identifizierung unbekannter Signale sinnvoll. Ebenfalls zu den inversen Verfahren zählt das *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experiment. Es gibt Aufschluss hinsichtlich der Nachbarschaft von Kohlenstoff und Proton über zwei oder drei Bindungen hinweg. Dementsprechend zeigt dieses Spektrum, bestehend aus einer ^{13}C - und einer ^1H -Dimension, Kreuzsignale der $^3J_{\text{H,C}}$ - bzw. $^2J_{\text{H,C}}$ -Kopplungen und ist innerhalb der Konstitutionsanalyse nützlich, wie beispielsweise der Positionsbestimmung der glycosidischen Bindung in Kohlenhydraten (Lambert *et al.* 2012). Das HSQC-*Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)-Experiment stellt Korrelationen zwischen Kernen in einem Spinsystem dar und eignet sich als Hilfsmittel zur Identifizierung der einzelnen Spinsystem-Signale innerhalb des HSQC-Spektrums. Die Kombination aus TOCSY- und HSQC-Experiment zeigt somit Signale eines Startkerns sowie sämtliche mit ihm korrelierende Protonen und daran gebundene ^{13}C -Kerne im selben Spinsystem (Friebolin 2010). Im Zusammenhang mit einem HSQC ermöglicht ein *Heteronuclear 2 Bond Correlation* (H2BC)-Experiment die Identifizierung benachbarter Kohlenstoffe. Das Experiment korreliert Protonen und protonierte ^{13}C -Kerne, die durch zwei kovalente Bindungen getrennt sind. Innerhalb einer überlagerten Darstellung mit dem entsprechenden HSQC-Spektrum zeigt die Kombination aus H2BC-Kreuzsignal und in direkter Linie liegender HSQC-Signale benachbarte Kohlenstoffe an (Petersen *et al.* 2006).

3.5 Charakterisierung der im kolorimetrischen Assay entstehenden (chromophoren) Strukturen

Der Begriff Chromophor bezeichnet funktionelle Gruppen innerhalb eines Moleküls, deren Elektronenanordnung für die Absorption elektromagnetischer Strahlung verantwortlich ist. Elektronenübergänge aus σ -Bindungen treten im Wellenlängenbereich von 120 – 150 nm auf und liegen damit im Vakuum-UV-Bereich, der aufgrund starker Absorption durch Luft experimentell schwer zugänglich ist und für strukturaufklärende Fragestellungen nur begrenzte Relevanz besitzt. Im Bereich oberhalb von 200 nm dominieren π - π^* -Übergänge, deren Lage maßgeblich durch den Konjugationsgrad bestimmt wird. Mit zunehmender Konjugation verringert sich der Energieabstand zwischen dem höchstbesetzten Molekülorbital (HOMO, engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), da das HOMO energetisch angehoben und das LUMO erniedrigt wird. Dies führt zu einer sukzessiven bathochromen Verschiebung der Absorption, und ist in Abbildung 21 am Beispiel von Ethan, Ethen und Butadien verdeutlicht. Grundsätzlich gilt somit, dass die Wellenlänge des Absorptionsmaximums mit zunehmender Länge des konjugierten Systems kontinuierlich zunimmt, da die energetische Differenz zwischen HOMO und LUMO entsprechend reduziert wird (Fleming und Williams 1966).

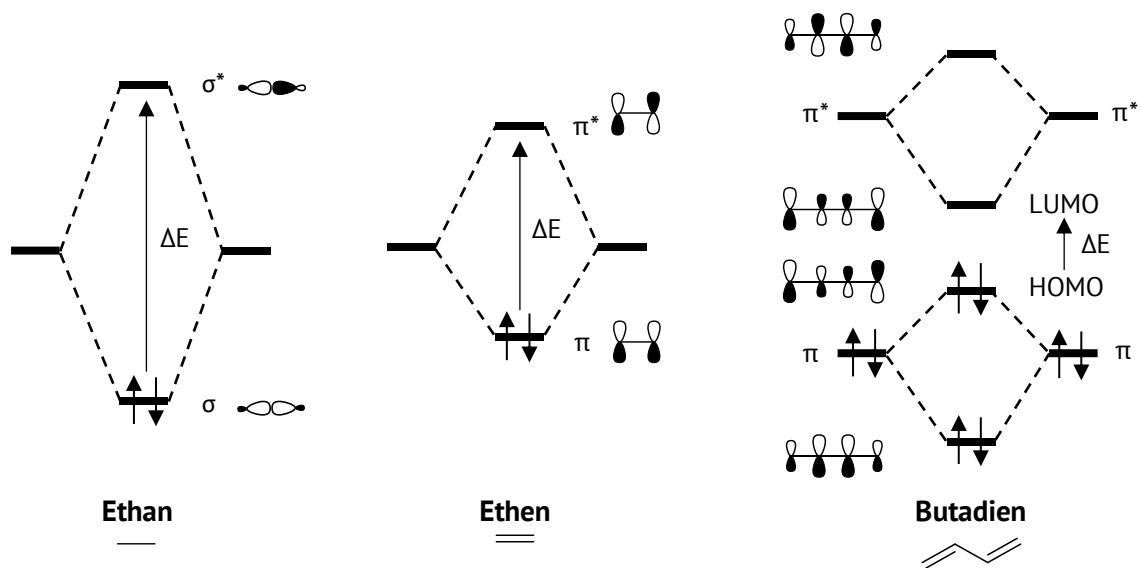


Abbildung 21: Molekülorbitaldiagramme für Ethan, Ethen und Butadien: Darstellung der bindenden- und antibindenden Orbitale (σ , σ^* , π , π^*) sowie der Energieaufspaltung bei konjugierten Systemen. Hier erfolgt der Energieübergang (ΔE) vom höchstbesetzten Molekülorbital (HOMO) zum niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO) (Abbildung erstellt in Anlehnung an Fleming und Williams (1966)).

Die aufgenommene Energie E eines Systems durch elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge λ bzw. Frequenz ν ist wie folgt definiert (h : Plancksches Wirkungsquantum, c : Lichtgeschwindigkeit):

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Die absorbierte Energie kann innerhalb der Aufnahme eines Absorptionsspektrums eines definierten Wellenlängenbereichs spektrophotometrisch aufgezeichnet werden und gilt als charakteristische Größe der organisch-chemischen Analytik (Fleming und Williams 1966; Latscha *et al.* 2016).

Im Rahmen des photometrischen Assays zur Analyse von US zeigen sich bei 520 nm absorbierende Chromophore. Diese Wellenlänge liegt im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, der sich von etwa 400 nm – 700 nm erstreckt. Das Chromophor absorbiert somit Licht im grünen Spektralbereich, wodurch es selbst in der komplementären Farbe, Magenta, erscheint (Verhoeven 2017).

Die Strukturaufklärung des bisher unbekanntes Chromophors erfolgte mittels analytischer, synthetischer und quantenchemischer Ansätze, die in dem folgenden Kapitel näher beschrieben werden. Dazu wurde sowohl die eigentliche Reaktion von 3PP und 5FFA in konzentrierter Schwefelsäure als auch eine entsprechende Reaktion in verdünnter Säure betrachtet und entstandene Reaktionsprodukte isoliert. In einem weiteren Modellsystem wurde 5FFA durch 4-Carboxybenzaldehyd (4CBA) ersetzt.

3.5.1 Synthese und Charakterisierung von Triarylmethanfarbstoffen

Organische Farbstoffe bilden eine Klasse zumeist aromatischer Verbindungen und lassen sich unter anderem anhand ihrer Chromophore systematisch einteilen. Eine bedeutende Farbstoffklasse stellen die Triarylmethanfarbstoffe (**32**, Abbildung 22) dar, zu denen unter anderem Phenolphthalein (**34**, Abbildung 22) und Kristallviolett zählen. Diese Verbindungen bestehen aus drei aromatischen Einheiten, die über ein zentrales Kohlenstoffatom miteinander verknüpft sind (Latscha *et al.* 2016). Eine Unterklasse bilden die stark fluoreszierenden Xanthenfarbstoffe, wie Fluorescein (**35**, Abbildung 22) und die Rhodamine. Das chromophore Element dieser Farbstoffe ist das planare Xanthengerüst (**33**, Abbildung 22), das einen zentralen Pyranring enthält (Kamino und Uchiyama 2023). Triarylmethanfarbstoffe gelten als sehr intensive Färbemittel, was sich in ihren hohen molaren Extinktionskoeffizienten widerspiegelt (Fluorescein bis 80.000 L/(mol×cm); Phenolphthalein bis 30.000 L/(mol×cm)) (Kachur *et al.* 2013; Sjöback *et al.* 1995). Der visuelle Farbeindruck wässriger Lösungen hängt dabei stark vom pH-Wert ab, da unterschiedliche Ladungszustände sowie die Bildung intramolekularer Lactone das aromatische System und somit die Absorption beeinflussen (Sjöback *et al.* 1995; Wittke 1983).

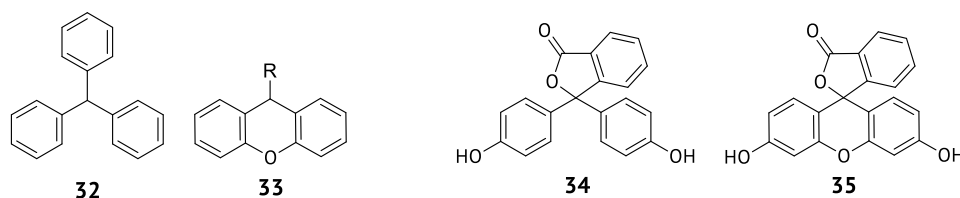


Abbildung 22: Struktur eines Triarylmethanfarbstoffs (**32**) sowie eines Xanthenfarbstoffs (**33**). Handelt es sich bei dem Rest R um einen weiteren aromatischen Ring, zählen diese auch zu den Triarylmethanfarbstoffen. Weitere Strukturen zeigen die prominenten Beispiele Phenolphthalein (**34**) und Fluorescein (**35**) bei neutralem pH-Wert.

Das innerhalb der photometrischen Analyse zu einem magentafarbenen Chromophor reagierende phenolische 3PP und der Aldehyd 5FFA legen die Bildung eines zu dieser Klasse zugehörigen Farbstoffs nahe. Zur Analyse der in konzentrierter Schwefelsäure gebildeten aromatischen Reaktionsprodukte aus dem Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) wurden verschiedene Isolierungsansätze verfolgt. Neben der Extraktion mit Dichlormethan (DCM) direkt aus der konzentrierten Säure und der Extraktion mit Ethylacetat nach Verdünnen mit einer Base in Anlehnung an Arbeitsvorschrift 8.5.3, erwies sich die Adsorption der aromatischen Reaktionsprodukte aus der wässrig verdünnten Lösung an Pentafluorophenyl-(PFP)-Material am effektivsten. Säurereste sowie Salze können dabei wässrig ausgewaschen werden. Organische Reaktionsprodukte konnten so salzfrei mit Acetonitril eluiert werden und wurden direkt zur Analyse mittels UHPLC, gekoppelt mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) sowie MS, verwendet (Arbeitsvorschrift 8.6.1 a).

Anstelle einer direkten Isolierung der chromophoren Struktur wurde die gezielte Synthese eines entsprechenden Xanthen-Derivats bzw. gezielter Triarylmethan-Vorläuferstrukturen für 5FFA und 3PP sowie für das Modellsystem 3PP und 4CBA vorgenommen. Die nicht oxidierten bzw. noch nicht zum Xanthen zyklisierten Triarylmethanderivate stellen wichtige Plattformchemikalien dar (De Angelis *et al.* 2004; Dinger und Scott 2000). Die Synthese dieser Verbindungen erfolgt überwiegend über die Kondensation von Phenolen mit Aldehyden in *ortho*- oder *para*-Position relativ zur phenolischen Hydroxygruppe (Grüttner *et al.* 1995). Standardverfahren nutzen die Reaktion der phenolischen Komponente mit dem Aldehyd in Eisessig als Reaktionsmedium. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Edukte werden hierbei jedoch häufig nur geringe Ausbeuten erzielt (Dinger und Scott 2000). Alternativ kann die Reaktion lösungsmittelfrei in der Schmelze bei 60 – 150 °C durchgeführt werden, wobei eine katalytische Menge Säure zugegeben wird, vorausgesetzt die Edukte besitzen einen geringen Schmelzpunkt (Grüttner *et al.* 1995). Ebenfalls beschrieben ist die Umsetzung der Edukte in methanolischer Lösung unter Einleitung von HCl-Gas, wodurch die Kondensation zum Triarylmethan erfolgt (Dinger und Scott 2000). Für Furan-Derivate, wie beispielsweise Furfural oder HMF, wurde eine Kondensation mit verschiedenen phenolischen Verbindungen wie Resorcinol oder Catechol in einer wässrigen 1 %igen Essigsäurelösung von Kreppenhofer *et al.* (2011) durchgeführt. Nach Erhitzen konnten die entsprechenden Triarylmethanverbindungen isoliert und charakterisiert werden. Darüber hinaus wurden auch Ansätze mittels Grignard-Reaktionen beschrieben, die jedoch in dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden, da hierfür modifizierte Edukte erforderlich sind, die von der untersuchten Fragestellung abweichen (Dinger und Scott 2000).

Entsprechende Triarylmethan-Farbvorläuferstrukturen wurden aus 3PP und 5FFA in Anlehnung an Kreppenhofer *et al.* (2011) synthetisiert. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden aus der Reaktionslösung mit DCM extrahiert, semipräparativ an einer Umkehrphase getrennt und anhand des UV/vis-Signals fraktioniert. Erhaltene Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Struktur mittels 1D- und 2D-NMR-Experimenten (vgl. Kapitel 3.4.3.2) charakterisiert (Arbeitsvorschrift 8.6.1 b) und 8.6.4). Zur Synthese der entsprechenden Komponenten aus 4CBA und 3PP wurde aufgrund geringer Ausbeuten im für 5FFA und 3PP beschriebenen Ansatz nach Kreppenhofer *et al.* (2011) eine Synthese durch Erhitzen der Edukte in Eisessig mit katalytischer Schwefelsäurezugabe in Anlehnung an Grüttner *et al.* (1995) durchgeführt (Arbeitsvorschrift 8.6.3). Eine lösungsmittelfreie Synthese aus der Schmelze

wurde ebenfalls getestet und lieferte eine geringfügig größere Ausbeute als die zuvor beschriebene Methode. Aufgrund der deutlich höheren Anzahl an Nebenprodukten wurde dieser Ansatz allerdings verworfen.

Die aufgereinigten Fraktionen der synthetisierten Triarylmethane wurden durch Säurezugabe in das Chromophor überführt und entsprechend des zuvor beschriebenen Vorgehens mittels PFP-SPE nach Arbeitsvorschrift 8.6.1 a isoliert und mittels NMR charakterisiert.

Für die Synthese von Xanthen-Derivaten wurden vielfältige Methoden entwickelt (Maia *et al.* 2021). Ein Standardverfahren nutzt die Kondensation von Phenolen mit Carbonylverbindungen, insbesondere mit Phthalsäureanhydrid (Lavis 2017). Andere Ansätze nutzen eine Friedels-Craft-Reaktion ausgehend von Benzochinonderivaten (Kamino und Uchiyama 2023). Unter sauren Bedingungen, etwa in Anwesenheit von Schwefelsäure, bildet sich zunächst die Leukoverbindung, eine farblose Zwischenstufe. Diese wird oxidiert, wodurch der charakteristische Xanthen-Heterozyklus entsteht und die gewünschte Farbigkeit realisiert wird (Maia *et al.* 2021). Romieu *et al.* (2018) verfolgten die Synthese von Pyronin ausgehend von Formaldehyd und 3-Aminophenol durch Erhitzen der Edukte in konzentrierter Schwefelsäure. Nach Zugabe von Wasser und Einstellen des pH-Werts mittels Natriumacetat erfolgte die chromatographische Aufreinigung an einer Umkehrphase mit TFA-haltigem Fließmittel. Anhand dieses Vorgehens wurde die Isolierung des Chromophors aus 4CBA und 3PP vorgenommen (Arbeitsvorschrift 8.6.2). Im Gegensatz zur Farbaus Bildung mit 5FFA entsteht die Magentafärbung erst durch Erhitzen bei 120 °C in konzentrierter Schwefelsäure. Die isolierten Fraktionen wurden mittels 1D- und 2D-NMR-Experimenten (vgl. Kapitel 3.4.3.2) in Kombination mit dem ermittelten Molekulargewicht charakterisiert (Arbeitsvorschrift 8.6.2 und 8.6.4).

3.5.2 Anwendung quantenchemischer Methoden zur Strukturaufklärung

Zum Vergleich verschiedener gemessener Absorptionsspektren der unbekanntesten Chromophorstrukturen wurden in Kooperation mit der Abteilung für Theoretische Chemie des Instituts für Physikalische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) UV/vis-Absorptionsspektren berechnet. Hierzu erfolgte nach einer Geometrieoptimierung der jeweiligen vorgeschlagenen Struktur die Berechnung der Oszillatorstärken und Extinktionskoeffizienten der Moleküle.

Die Geometrieoptimierung, die auf eine Minimierung der Grundzustandsenergie abzielt, wurde auf Basis der Dichtefunktionaltheorie (DFT) durchgeführt. Diese Methodik beruht auf den Hohenberg-Kohn-Theoremen, die besagen, dass die Energie eines Systems vollständig durch dessen Elektronendichte bestimmt wird. Die Minimierung des Energie-Funktional $E[\rho]$ über die Elektronendichte ρ eines Moleküls liefert somit die Grundzustandsenergie und die Grundzustandsdichte (Püschner 2017). Alle weiteren Berechnungen beruhen auf diesen energieoptimierten Strukturen.

Die Oszillatorstärke ist ein dimensionsloses Maß für die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs zwischen zwei Energiezuständen eines Moleküls oder Atoms bei Absorption oder Emission von Licht. Sie quantifiziert, wie stark ein Übergang mit elektromagnetischer Strahlung wechselwirkt (Hilborn 2002). Die Oszillatorstärken wurden im Rahmen der *time-dependent* Dichtefunktionaltheorie (TDDFT) berechnet, die im Gegensatz zur DFT gezielt angeregte Zustände beschreibt.

Lösungsmittelauswirkungen durch konzentrierte Schwefelsäure wurden über die Einbeziehung der spezifischen Dielektrizitätskonstante sowie des Brechungsindex berücksichtigt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den experimentellen Daten wurden die resultierenden Linienspektren mit Gaußfunktionen verbreitert (Linienbreite: 0,15 eV) und zu niedrigeren Energien verschoben, da die berechneten Anregungsenergien in der Regel überschätzt werden (ca. 0,03 eV). Die Verschiebung wurde durch den Vergleich der Absorptionsmaxima der simulierten Spektren mit den Maxima gemessener Spektren einer Reihe bekannter Farbstoffmoleküle bestimmt. Es wurden zwei Strukturtypen betrachtet: das Triarylmethan-Kation und das Xanthylium-Ion. Die Benchmark-Gruppe für das Triarylmethan-Motiv bestand aus den kationischen Farbstoffen Parafuchsin, Kristallviolett und Malachitgrün, für das Xanthylium-Motiv wurden die kationischen Rhodamin-Farbstoffe 123, 6G und B verwendet.

Zudem wurden zum Vergleich mit den experimentellen NMR-Daten chemischen Verschiebungen (^{13}C) der postulierten Moleküle sowohl mit der auf einer Wellenfunktionsmethode basierenden Møller-Plesset-Störungstheorie als auch mittels DFT berechnet, wobei Tetramethylsilan als Referenzmolekül verwendet wurde.

3.6 Entwicklung einer chromatographiebasierten Quantifizierung des Uronsäuregehalts

Zur Analyse des Gesamturonsäuregehalts wurde eine chromatographische Methode entwickelt, die ebenfalls auf dem Abbau der US in konzentrierter, natriumtetraborathaltiger Schwefelsäure basiert. Dabei entsteht 5FFA als Abbauprodukt. Das gebildete 5FFA wird aus der Reaktionslösung extrahiert und anschließend chromatographisch bestimmt. Die Quantifizierung der US erfolgt anschließend massenspektrometrisch über eine geeignete Kalibrierung unter Verwendung eines stabilisotopenbasierten internen Standards. Im Rahmen der Methodenentwicklung mussten verschiedene Prozesse bzw. Parameter wie die Entfernung des entstandenen 5FFAs aus der konzentrierten Säure sowie die Erhitzungszeit und -temperatur zur Maximierung der Sensitivität der Analyse angepasst werden.

3.6.1 Optimierung und Analyse des Abbauverhaltens verschiedener Uronsäuren in konzentrierter Schwefelsäure

Zur Quantifizierung des 5FFA-Gehalts ist die Selektierung dieses aus konzentrierter Schwefelsäure notwendig. Hierfür wurde die Extraktion einer definierten Menge an 5FFA aus der konzentrierten Säure hinsichtlich einer maximal möglichen Wiederfindung optimiert. Zur Extraktion wurden Ethylacetat und DCM getestet. Da Ethylacetat im Sauren teilweise zu Essigsäure gespalten wird, muss die Schwefelsäure vor der Extraktion mit einer Base verdünnt werden. Die Extraktion mit DCM hingegen konnte direkt aus der konzentrierten Säure erfolgen. 5FFA wurde anschließend mittels UH-PLC-DAD an einer Umkehrphase nach Arbeitsvorschrift 8.5.2 quantifiziert.

Zur Optimierung der Erhitzungszeit und -temperatur wurde die Ermittlung der maximalen 5FFA-Ausbeute aus dem Abbau der US unter Verwendung eines *Design of Experiment* (DOE) Ansatzes angestrebt. DOE ist eine statistische Methode, die in zahlreichen Industriebereichen zur Prozess- und

Produktoptimierung eingesetzt wird. Sie erlaubt die systematische Untersuchung von Faktor-Wirkungs-Beziehungen und berücksichtigt sowohl Haupteffekte als auch Wechselwirkungen mehrerer Faktoren. Die Durchführung eines DOE-Ansatzes besteht aus mehreren Schritten: 1. die Planung des Experimentes in Form eines Versuchsplans, 2. die Durchführung dieses Plans und 3. die Analyse der Ergebnisse mittels statistischer Modelle. Der Versuchsplan stellt dabei die systematische Erarbeitung der durchzuführenden Experimente dar, um den Einfluss mehrerer Faktoren auf eine Zielgröße zu ermitteln. Somit wird hier angegeben, welche Faktorgrößen in welcher Kombination wie oft analysiert werden (Jankovic *et al.* 2021). Ein faktorielles Experiment, dessen Versuchsplan alle möglichen Kombinationen der gewählten Faktoren und Stufen umfasst, wird als vollfaktorieller Versuchsplan bezeichnet. Somit werden hier alle Haupteffekte und Wechselwirkungen der Faktoren berücksichtigt (Farooq *et al.* 2016). Die Gesamtzahl notwendiger Versuche berechnet sich aus der Anzahl der Faktoren k und der Anzahl analysierter Faktorstufen n als n^k . Mit steigender Zahl an Faktoren und Stufen wächst die Anzahl der Versuche exponentiell, was bei klassischen Experimenten mit hohen Kosten und erheblichem Zeitaufwand verbunden ist. Aufgrund der großen Vielfalt an Kombinationen lässt sich jedoch die Varianz der Zielgröße vollständig erklären, zerlegen und den einzelnen Einflussgrößen zuordnen, wodurch eine nahezu realistische Abbildung des Prozesses möglich wird (Jankovic *et al.* 2021).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Variation der Faktoren Erhitzungstemperatur und Erhitzungszeit für den Abbau jeder untersuchten US. Zur Begrenzung der Versuchsanzahl kamen jeweils drei Faktorstufen zum Einsatz: 60 °C, 77,5 °C und 95 °C sowie 5 min, 10 min und 15 min. Die Erstellung des entsprechenden vollfaktoriellen Versuchsplans erfolgte mit *OriginPro 2024*. Die gebildeten 5FFA-Mengen wurden gemäß Arbeitsvorschrift 8.5.2 in Doppelbestimmung chromatographisch (UHPLC-DAD an einer Umkehrphase) quantifiziert und anschließend statistisch mit *OriginPro 2024* ausgewertet.

3.6.2 Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Durch Einführung eines internen Standards in eine quantitative Analyse können etwaige Einflüsse wie z. B. Probenverluste während der Aufarbeitung, Matrixeffekte oder Schwankungen bei der Detektion kompensiert werden. Voraussetzung ist, dass die verwendete Standardsubstanz vergleichbare strukturelle und physikochemische Eigenschaften zu dem untersuchten Analyten aufweist. Eine Auswertung erfolgt über die relativen Signalflächen der Standardsubstanz und des Analyten.

In Abhängigkeit von den strukturellen Abweichungen des Analyten vom gewählten Standard besteht insbesondere bei vielschichtigen Probenvorbereitungen, geringen Analytkonzentrationen und komplexen Matrices die Gefahr, dass sich Standard und Analyt in einzelnen Analyseschritten nicht identisch verhalten. Dadurch kann sich ihr Verhältnis verändern, was zu fehlerhaften Ergebnissen führt. Durch eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) (Abbildung 23) können solche Probleme weitgehend umgangen werden. Sie zeichnet sich durch die Verwendung von stabilisotopenmarkierten internen Standardsubstanzen aus. Hierzu werden Atome wie ^{12}C oder ^1H in einem entsprechenden Molekül durch ihre natürlicherweise in geringeren Mengen vorkommenden Isotope ^{13}C oder Deuterium teilweise oder vollständig ersetzt. Grundlage des Verfahrens ist die Zugabe einer

definierten Menge eines stabilisotopenmarkierten Analogs der Zielsubstanz zur Probe. Dieses Isotopolog weist identische chemische Eigenschaften auf, unterscheidet sich jedoch in seiner Masse, sodass es mittels massenspektrometrischer Methoden von der nicht markierten Zielsubstanz eindeutig unterschieden werden kann. Durch die Zugabe vor der eigentlichen Probenaufarbeitung kompensiert die isotopenmarkierte Substanz systematische Verluste und Matrixeffekte, da sie dieselben chemischen und physikalischen Transformationen wie das Analytmolekül durchläuft. Dennoch können Isotopeneffekte bei der Chromatographie, wie beispielsweise geringfügig unterschiedliche Retentionszeiten (RT) der gelabelten Substanz und des ungelabelten Analyten, auftreten (Rychlik und Asam 2009).

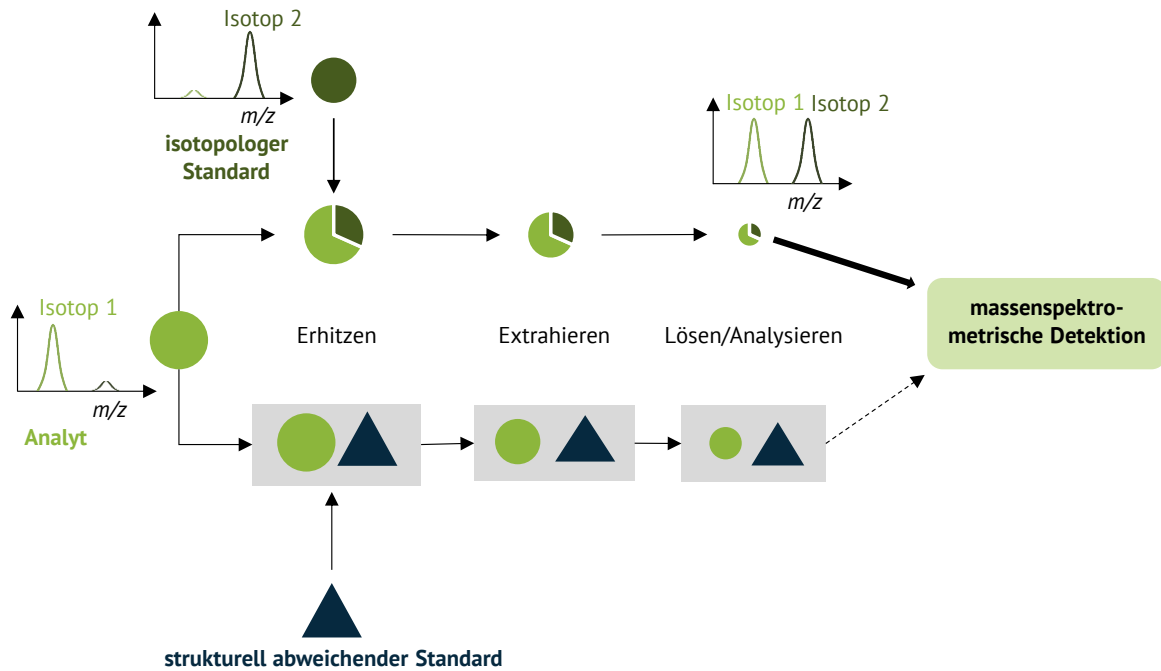


Abbildung 23: Darstellung des Prinzips einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (oben) im Vergleich zur Analyse mit einem strukturell abweichenden internen Standard (unten) (m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis). Die Stabilisotopenverdünnungsanalyse erfordert zwingend eine massenspektrometrische Detektion, wohingegen diese bei Verwendung eines strukturell abweichenden Standards nicht zwangsläufig notwendig ist.

Um insbesondere zufällige Abweichungen während der Probenvorbereitung auszugleichen, vor allem nichtsystematisch variierende Abbauraten der US zu 5FFA, wurde eine vollständig ^{13}C gelabelte US (D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]GalA oder D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]GlcA) als interne Standardsubstanz eingeführt. Diese wird zu Beginn der Analyse zur Probe gegeben und erfährt somit die gleichen Einflüsse wie der Analyt. Die Quantifizierung erfolgt nach chromatographischer Trennung (UHPLC) der Abbauprodukte an einer Umkehrphase und MS-Detektion anhand der relativen Flächen des im SIM-Modus detektierten 5FFAs sowie des ^{13}C -gelabelten Analogons. Eine Kalibrierung erfolgt mit der zu untersuchenden US und dem entsprechenden ^{13}C -markierten internen Standard (Arbeitsvorschrift 8.5.3, Tabelle 28).

Zur massenspektrometrischen Analyse wurde ein Orbitrap Massenanalysator verwendet, welcher hochauflösend ist und als besonders empfindlich gilt. Eine Orbitrap besteht im Wesentlichen aus drei Elektroden: der zentralen, spindelförmigen Elektrode, die von einer zweiteiligen Außenelektrode umgeben ist, sowie der Kompensationselektrode in einem Schlitz der Außenelektrode. Ionen

werden durch diesen Schlitz in das Vakuum zwischen Zentral- und Außenelektrode injiziert. Die Kompensationselektrode liegt auf einem definierten Potential und sorgt dafür, dass die Feldverzerrungen, die durch die Öffnung in der Außenelektrode entstehen würden, kompensiert werden. Zwischen Zentral- und Außenelektrode wird eine konstante Spannung angelegt, wobei die Polarität der Zentralelektrode entgegengesetzt zur Ladung der zu messenden Ionen ist. Vor der Injektion in die Orbitrap werden die Ionen, die durch Elektrosprayionisation (ESI) erzeugt wurden, zunächst durch einen Quadrupol geleitet, der optional eine Massenselektion ermöglicht. Anschließend werden die kontinuierlich eintreffenden Ionen in der C-Trap zu gebündelten Ionenpaketen geformt. Diese werden tangential in die Orbitrap injiziert. Das radiale elektrische Feld in der Orbitrap lenkt die Ionen in Richtung der Zentralelektrode, während die tangentielle Geschwindigkeit der Ionen eine Zentrifugalkraft erzeugt, die die Bahn stabilisiert. Dadurch beginnen die Ionen, harmonisch um die Spindelelektrode zu rotieren. Die konische Form der Zentralelektrode erzeugt zusätzlich ein axiales Potential, das die Ionen entlang der Achse oszillieren lässt. Die resultierenden spiralähnlichen Bahnen werden als Orbits bezeichnet. Die Außenelektrode dient als Empfänger für den Bildstrom, der durch die axiale Oszillation der Ionen induziert wird. Die Oszillationsfrequenz ist direkt abhängig vom Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der Ionen. Durch Fourier-Transformation des Zeitbereichssignals wird die Frequenz in ein Massenspektrum umgerechnet (Hu *et al.* 2005).

3.6.3 Validierung und Anwendung der Methode

Um die Eignung der entwickelten LC-MS Methode zur Quantifizierung des Uronsäuregehalts aus pflanzlichen und algenbasierten Matrices zu verifizieren, musste diese für die verschiedenen optimierten Varianten (Analyse von GalA, GlcA, GalA + GlcA, ManA + GulA, vgl. Kapitel 3.6.1) validiert werden. Zur Beurteilung der Linearität der Analyse wurden die Kalibrierkurven wie in Arbeitsvorschrift 8.5.3 beschrieben dreifach aufgenommen und die Ergebnisse der einzelnen Konzentrationen anschließend gemittelt und einer linearen Anpassung unterzogen. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten wurde ein Shapiro-Wilk-Test ($\alpha = 0,05$) anhand von zehn Injektionen des mittleren Kalibrierpunkts durchgeführt. Die Varianzenhomogenität zwischen zwei Probenkollektiven wurde mittels F-Test ($\alpha = 0,05$), basierend auf sechs Wiederholungsmessungen des höchsten und niedrigsten Kalibrierpunkts, überprüft (Kromidas 2011). Alle statistischen Tests wurden mithilfe von *Origin-Pro2024* durchgeführt.

Als Maß für die Wiederholbarkeit der LC-MS-Analyse wurden die instrumentellen Variationskoeffizienten aus zehn Wiederholungsinjektionen derselben Probenlösung bestimmt (d. h. unter Ausschluss der Variation durch Probenaufarbeitung wie saurer Hydrolyse und Extraktion). Die Verfahrensvariationskoeffizienten wurden hingegen aus sechs Wiederholungsanalysen der höchsten und niedrigsten Kalibrierpunkte berechnet und schließen damit die Variabilität der Probenvorbereitung ein. Die Variationskoeffizienten (in %) ergaben sich aus dem Quotienten von Standardabweichung und arithmetischem Mittel. Der Verfahrensvariationskoeffizient wurde anschließend als Mittelwert für den höchsten und den niedrigsten Kalibrierpunkt angegeben.

Die externe Wiederfindung resultiert aus der Wiederfindungsrate einer geeigneten US-Probe mit bekannter Konzentration. Zur Bewertung möglicher Matrixeffekte wurde zuvor analysiertes BS-

Material mit einer definierten Menge der jeweiligen US versetzt, woraufhin die Wiederfindungsrate in Matrix berechnet wurde.

Die Nachweisgrenze (NG) sowie die Bestimmungsgrenze (BG) wurden gemäß DIN 32645 ermittelt. Hierzu wurde eine Kalibrierung in Doppelbestimmung durchgeführt, die einen Konzentrationsbereich abdeckte, der die BG möglichst einschloss bzw. ihr nahekam (Verdünnung der ursprünglichen Kalibriergerade um Faktor 5). Die Berechnung erfolgte nach folgenden Gleichungen:

$$NG \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{s_y}{m} * t * \sqrt{\frac{1}{\hat{N}} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

$$BG \left[\frac{mg}{L} \right] = k * \frac{s_y}{m} * t * \sqrt{\frac{1}{\hat{N}} + \frac{1}{N} + \frac{(k * NG - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Dabei beschreibt s_y die Reststandardabweichung, m die Steigung der Kalibriergeraden, \hat{N} die Anzahl der Parallelmessungen, N die Anzahl der Kalibrierpunkte, \bar{x} die mittlere Konzentration des Kalibrierbereichs und x_i den Wert der Einzelmessungen. Der t-Wert wurde für ein 95 %-Konfidenzniveau mit Freiheitsgraden $f = N - 2$ gewählt. Für den kritischen Faktor k wurde drei angesetzt.

Zur Überprüfung der Eignung eines simpleren Single-Quadrupol Massenanalysators anstelle des verwendeten Orbitrap-Systems, wurden ausgewählte Parameter (NG, BG, Verfahrensvariationskoeffizient) für die Analyse von GalA nochmals an solch einem System validiert.

Um einen Vergleich zur photometrischen Methode zu schaffen, wurde diese (Arbeitsvorschrift 8.5.1) nach den zuvor erläuterten Prinzipien ebenfalls validiert. Zur Bestimmung der NG und BG wurden die in Arbeitsvorschrift 8.5.1 angegebenen Kalibrierkonzentrationen um Faktor zwei verdünnt zur Kalibrierung verwendet.

Um den möglichen Einfluss des DPs oligo- und polymerer US auf die Analyse beurteilen zu können, wurden die isolierten HGOs und AOS (vgl. Kapitel 3.3) mit einem DP von drei bis zehn in einer Konzentration von 1 mM US in Doppelbestimmung mit der in Arbeitsvorschrift 8.5.3 gezeigten, entsprechend optimierten Variante, analysiert. Die Ergebnisse wurden prozentual auf die Wiederfindung eines mitgeführten US-Monosaccharidstandards entsprechender Konzentration bezogen. Durch die Analyse der isolierten GXOS wurde zum einen der Einfluss der Länge des Xyl-Rückgrats, zum anderen der Einfluss der Aldobiuronsäurebindung 4-O-Me-d-GlcpA-1,2-d-Xylp beurteilt.

Analysiert wurden weiterhin alle in Kapitel 3.1 aufgeführten Materialien bzw. BS mittels photometrischer Methode sowie SIVA (Arbeitsvorschrift 8.5.1 und 8.5.3). Das unlösliche Probenmaterial wurde gemäß Arbeitsvorschrift 8.5.1 einer sauren Vorbehandlung unterzogen, die pektinhaltigen LBS des Karottentresters, des Apfeltresters und der Zitronenschale wurden zur vollständigen Spaltung der Methylveresterung der Carboxygruppe gemäß der Empfehlung durch McComb und McCready (1952) in 0,05 M Natronlauge anstelle von Wasser gelöst (Arbeitsvorschrift 8.5.3). Die Analyse aller Proben erfolgte in Doppelbestimmung.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung uronsäurehaltiger Proben

Zur Anwendung bestehender Verfahren sowie zur Entwicklung einer alternativen Methode zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts wurden unterschiedliche uronsäurehaltige Materialien ausgewählt. Die Auswahl erfolgte so, dass sämtliche in Pflanzen vorkommenden US sowie deren Kombinationen separat betrachtet werden konnten. Pflanzliche Rohstoffe wurden vor der Analyse einem gezielten Stärke- und Proteinverdau unterzogen, um sicherzustellen, dass ausschließlich BS-Material für die nachfolgenden Untersuchungen vorlag. Bei den Holzproben konnte auf eine derartige Vorbehandlung verzichtet werden, da der Stärkeanteil hier vernachlässigbar ist (vgl. Kapitel 3.1).

Wie in Kapitel 3.2.1 erläutert, hängt die Effizienz der vorangestellten Hydrolyse stark vom jeweiligen Probenmaterial sowie von der Struktur der darin enthaltenen Poly- und Oligomere ab. Wiederfindungsstudien von De Ruiter *et al.* (1992) verdeutlichen, dass eine vollständige Erfassung aller US kaum möglich ist. So liegt die Wiederfindungsrate bei Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Probe lediglich zwischen 63 – 71 % (w/w). Im Vergleich dazu werden für Neutralzucker deutlich höhere Werte von 83 – 94 % erreicht, wenn ein theoretischer Gesamtzuckergehalt von 100 % zugrunde gelegt wird. In Übereinstimmung mit diesen Literaturdaten wurde auch in dieser Arbeit die Wiederfindung experimentell am Beispiel der Monosaccharidverteilung des Braunalgenmaterials überprüft. Dabei ergaben sich nach Schwefelsäurehydrolyse ca. 50 % (w/w) wiedergefundene Zucker bezogen auf die Einwaage. Bei der Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse lag die Wiederfindung bei den UBS-Proben unter 20 % (w/w), während für die LBS-Proben ca. 60 % (w/w) erreicht wurden.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Quantifizierung anhand der Analyse der Monosaccharidzusammensetzung keine absolut-quantitative Bestimmung des Uronsäuregehalts darstellt. Die erhaltenen Daten erlauben jedoch eine verlässliche qualitative Aussage über das Vorkommen spezifischer US sowie eine Abschätzung des relativen Anteils weiterer Neutralzucker im untersuchten Material.

4.1.1 Pektinhaltige Materialien

Zur Untersuchung galacturonsäurereicher Materialien eignen sich insbesondere pektinhaltige Rohstoffe. Daher wurden die aus Zitronenschale, Apfel- und Karottentrestern isolierten UBS und LBS hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung analysiert. Die Analyse erfolgte nach Schwefelsäurehydrolyse der UBS sowie Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse der LBS (Abbildung 24). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Proben im Wesentlichen in den relativen Anteilen der einzelnen Monosaccharide unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass die enthaltenen Polysaccharidklassen in allen Proben vorhanden sind, sich aber in ihren Anteilen unterscheiden. GalA war in allen Proben die einzige quantifizierbare US. In den LBS der Zitronenschale konnten zusätzlich

4.1 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung uronsäurehaltiger Proben

Spuren von GlcA detektiert werden, die jedoch unterhalb des Kalibrierbereichs lagen und daher als vernachlässigbar angesehen wurden.

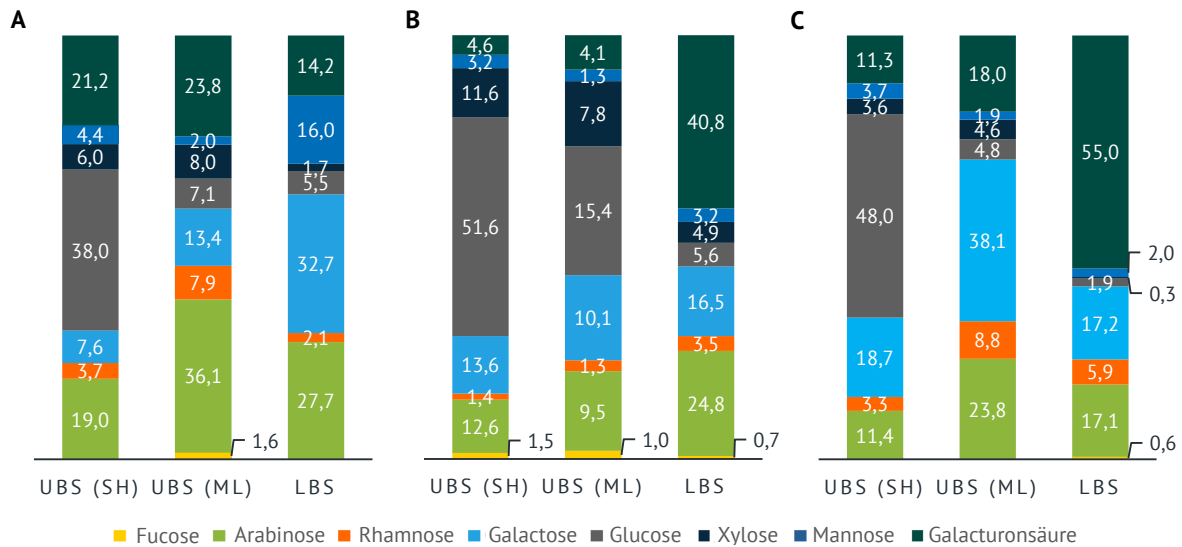


Abbildung 24: Monosaccharidzusammensetzung (mol%) der isolierten unlöslichen (UBS) und löslichen Ballaststoffe (LBS) der Zitronenschale (A), des Apfeltresters (B) und des Karottentresters (C). Die Analyse erfolgte bei den UBS sowohl nach Schwefelsäurehydrolyse (SH) als auch nach Methanolyse und anschließender Trifluoressigsäurehydrolyse (ML).

Im Einklang mit der Literatur lässt sich anhand der Monosaccharidzusammensetzung eindeutig auf Pektin als dominierendes Polysaccharid in allen drei untersuchten Materialien schließen (Akhter *et al.* 2024; Schmid *et al.* 2021; Trabert *et al.* 2022). Besonders in den LBS, mit Ausnahme der Zitronenschale, stellt GalA den Hauptbestandteil der Monosaccharide dar und erreicht im Karottentresters Werte von bis zu 55 mol%. Diese kann vorrangig den Rückgratpolysacchariden HG und RG I des Pektins zugeschrieben werden. In den UBS, die mittels Methanolyse und anschließender TFA-Hydrolyse behandelt wurden, zeigte sich ein höherer GalA-Anteil als in den Schwefelsäurehydrolysaten. Dies ist auf die höhere Effizienz dieser Methode bei der Depolymerisierung von US sowie den nicht vorhandenen Abbau kristalliner Cellulose zurückzuführen. Rha, die dem RG I-Rückgrat zugeordnet werden kann, lag in allen Proben unter 10 mol% vor. Das Verhältnis von GalA zu Rha erlaubt nach Broxterman *et al.* (2017) eine Abschätzung des HG:RG I-Verhältnisses. Während dieses Verhältnis in den UBS durchweg ≤ 1 betrug, wiesen die LBS deutlich höhere Werte auf (2,8 in der Zitronenschale bis 5,3 im Apfeltresters), was auf einen höheren Anteil linearer HG-Regionen in den LBS hinweist. Die Neutralzucker Ara und Gal, die den Seitenketten des RG I (Arabinane und Arabinogalactane) zugeordnet werden, stellten in allen Proben die dominierenden Neutralzucker dar. Fuc, aus dem RG II stammend, wurde lediglich in geringen Mengen zwischen 0,7 mol% und 1,6 mol% nachgewiesen. Auffällig ist, dass die LBS der Zitronenschale im Vergleich zu den LBS des Apfel- und Karottentresters den geringsten Anteil an Pektin zuordenbaren Monosacchariden enthalten. Dies steht in Übereinstimmung mit Extraktionsstudien, die auf die schlechte Zugänglichkeit des Pektins in der Zellwandmatrix von Zitrusfruchtschalen hinweisen (Akhter *et al.* 2024).

Die mit Schwefelsäure behandelten UBS zeigten hohe Glc-Gehalte (38 – 52 mol%), die überwiegend auf kristalline Cellulose zurückzuführen sind, welche erst unter harschen Hydrolysebedingungen depolymerisiert wird. Im Gegensatz dazu traten in den Methanolyse/TFA-Hydrolysaten nur geringe Glc-Anteile auf. Diese sind vor allem auf Hemicellulosen wie Xyloglucan, die für Apfel und Karotte beschrieben wurden, sowie auf trotz enzymatischem Stärkeabbau noch vorhandene Reststärke zurückzuführen (Schmid *et al.* 2021).

Die verbleibenden Zucker Man und Xyl können nach Trabert *et al.* (2022) insbesondere den Hemicellulosen Xyloglucan sowie Xylan und Mannan zugeordnet werden. Darüber hinaus kann Xyl auch als Substituent des HGs in Form von XG in Pektin eingebunden sein, wie Schols (1995b) in den *hairy regions* des Apfelpektins beschrieb. Dies korrespondiert mit den erhöhten Xyl-Anteilen in den Apfel-BS. Zusätzlich ist eine endständige Substitution von Arabinanen mit Xyl denkbar, wie u. a. von Schmidt (2025) nachgewiesen wurde. Eine eindeutige Herkunftszuordnung der Zucker ist jedoch allein anhand der Monosaccharidzusammensetzung nicht möglich. Hierfür wären weiterführende strukturelle Analysen, etwa eine Methylierungsanalyse, erforderlich. Da diese Fragestellung für die vorliegende Arbeit von untergeordneter Relevanz ist, wurde darauf verzichtet.

4.1.2 Hölzer

Die Monosaccharidzusammensetzung der analysierten Hartholzproben ist in Abbildung 25 dargestellt. Sowohl die Buchen- als auch die Eukalyptusprobe wurden nach Schwefelsäurehydrolyse ohne vorherige Gewinnung der BS untersucht, da davon ausgegangen wurde, dass die Proben überwiegend aus BS-haltigem Material bestehen. Dennoch werden in diesem Hydrolyseverfahren neben den Strukturpolysacchariden der pflanzlichen Zellwand auch weitere Komponenten wie Stärke, freie Monosaccharide, Saccharose oder Raffinose miterfasst (Giovannelli *et al.* 2011).

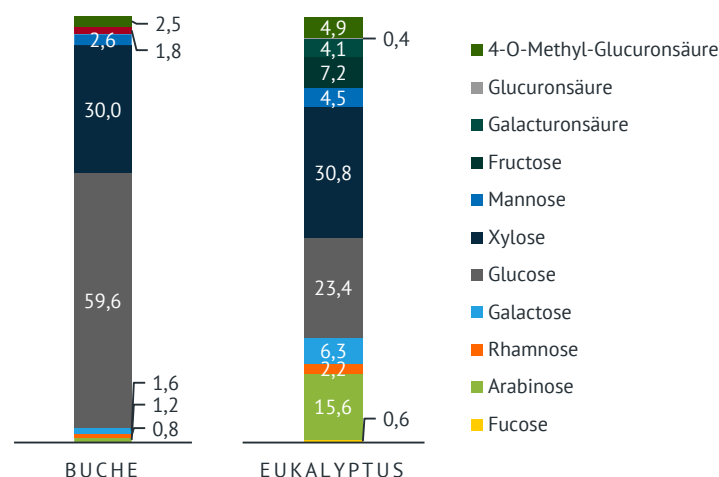


Abbildung 25: Monosaccharidzusammensetzung (mol%) der analysierten Harthölzer. Die Analyse erfolgte nach Schwefelsäurehydrolyse direkt an den gemahlten Holzproben.

In beiden Holzproben konnten Xyl und 4-O-Me-GlcA nachgewiesen werden, die vorrangig den Xylanen beziehungsweise dem GX zugeordnet werden können. Das Xyl:4-O-Me-GlcA-Verhältnis des Buchenholzes beträgt 6,5:1 und stimmt damit sehr gut mit den für extrahiertes Buchenxylan angegebenen Literaturwerten überein (Biely *et al.* 2016; Ebringerová *et al.* 2000). Das Eukalyptus-GX weist

mit einem Verhältnis von 6,3:1 eine geringfügig höhere 4-*O*-Me-GlcA-Substitution auf. Der Substitutionsgrad des Eukalyptus-GX ist jedoch stark speziesabhängig. In der Literatur werden Werte von 3,6:1 (Milagres 2011) bis zu einer geringeren Substitution von 14,3:1 (Heinonen *et al.* 2025) beschrieben.

Neben 4-*O*-Me-GlcA wurde in der Eukalyptusholzprobe zudem GalA in vergleichbarer Menge (4,1 mol%) nachgewiesen. Zusammen mit den ebenfalls bestimmten Rha, Ara, Gal sowie geringen Anteilen an Fuc lassen sich diese Monosaccharide dem Polymer Pektin zuordnen, das als Bestandteil der Zellwände dikotyler Harthölzer bekannt ist. Im Buchenholz konnten hingegen nur sehr geringe Mengen an pektintypischen Monosacchariden identifiziert werden. Dieser Unterschied lässt sich durch das Alter der Pflanzen erklären: Bei der untersuchten Eukalyptusprobe handelte es sich um das Holz eines jungen Baumes, dessen Zellwände noch zu einem hohen Anteil aus Primärzellwandmaterial bestehen, da die Verholzung der Zellen noch nicht oder nur unvollständig abgeschlossen ist (Goulao *et al.* 2011). Die Gal im Eukalyptus kann zudem ebenfalls aus dem GX stammen, welches an der US nochmals mit diesem Monosaccharid substituiert vorliegen kann (Pinto *et al.* 2005).

Die Anteile von 6,6 mol% (Buche) bzw. 4,5 mol% (Eukalyptus) Man können in Kombination mit der detektierten Glc der Hemicellulose Glucomannan zugeordnet werden, die typischerweise zu etwa 3 – 5 % in den Zellwänden von Harthölzern vorkommt (Timell 1967). Der erwartungsgemäß hohe Anteil an Glc von 25,4 mol% (Buche) bzw. 23,4 mol% (Eukalyptus) ist überwiegend der Cellulose zuzuschreiben. Der im Vergleich zur Xyl in beiden Proben etwas niedriger ausfallende Glc-Anteil, ist vermutlich auf eine unvollständige Hydrolyse der sehr stabilen Cellulose-Mikrofibrillen zurückzuführen. Die in beiden Proben nachgewiesene Fru deutet, wie bereits beschrieben, auf das Vorhandensein nichtstruktureller Saccharide wie Saccharose oder Raffinose hin.

Des Weiteren wurde die Monosaccharidzusammensetzung des für die Isolierung der GXOS verwendeten alkalisch extrahierten Buchenxylan Standards analysiert. Hier wurden 88,4 mol% Xyl und 9,6 mol% 4-*O*-Me-GlcA bestimmt, was in einem Xyl:4-*O*-Me-GlcA-Verhältnis von 9,3:1 resultiert und mit den durch den Hersteller (vgl. Kapitel 7.1) gemachten Angaben übereinstimmt.

4.1.3 Hydrokolloide

In dieser Arbeit wurden die drei Hydrokolloide Gummi arabicum, Xanthan und Karayagummi näher betrachtet. In diesen Proben konnte GlcA zwischen 6,1 und 11,4 mol% nachgewiesen werden. In Karayagummi stellt zudem GalA mit 20,1 mol% die dominierende US dar (Abbildung 26).

Gummi arabicum setzt sich neben GlcA noch aus den drei Monosacchariden Gal, Ara und Rha zusammen. Gal bildet die Hauptkette des komplexen Polysaccharidanteils von Gummi arabicum, wohingegen Ara, Rha und GlcA den stark verzweigten Seitenketten zuzuordnen sind. Die Zusammensetzung der Monosaccharide steht in sehr guter Übereinstimmung mit den von Kersten *et al.* (2025) angegebenen durchschnittlichen Monosaccharidanteilen von 18 analysierten Gummi arabicum Proben, die ebenfalls nach Methanolyse und anschließender Trifluoressigsäurehydrolyse chromatographisch analysiert wurden. Die Autoren betonen hier, dass in weiterer Literaturstellen häufig höhere

Gehalte an US bestimmt wurden. Dies lässt sich allerdings mit einer separaten Bestimmung der US, häufig mittels kolorimetrischer Methoden, erklären (Kersten *et al.* 2025; Randall *et al.* 1989).

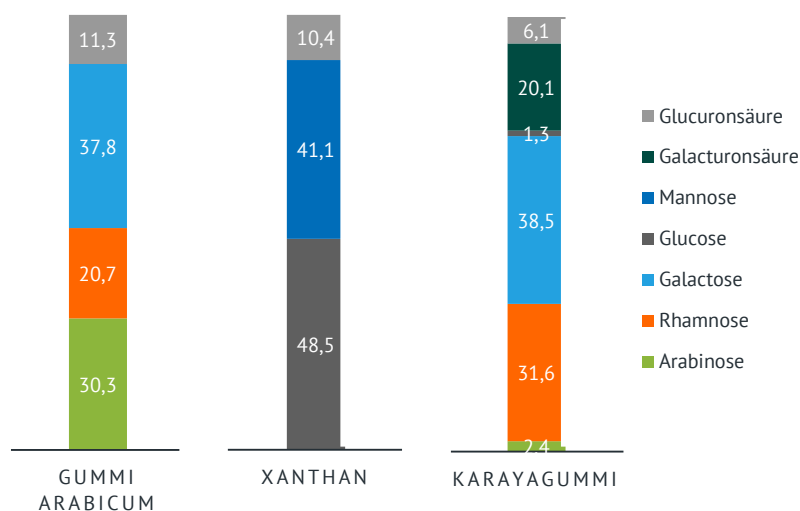


Abbildung 26: Monosaccharidzusammensetzung (mol%) der analysierten Hydrokolloide. Die Analyse erfolgte nach Methanolyse und anschließender Trifluoressigsäurehydrolyse.

Diese Werte sind zum einen schwierig mit den relativen Ergebnissen der Monosaccharidzusammensetzung in Einklang zu bringen, zum anderen führen photometrische Analysen, wie bereits diskutiert, durch einen Überschuss an Neutralzuckern häufig zu überbestimmten Ergebnissen.

Xanthan enthält GlcA, Man und Glc, die im Verhältnis 1:2:2 vorliegen, welches im Einklang mit der in Kapitel 1.3.2.1 beschriebenen Strukturen steht.

Neben den beiden US GalA und GlcA enthält Karayagummi zudem mit 31,6 mol% größere Mengen an Rha. Diese bilden zusammen mit der GalA das RG I-basierte Rückgrat des Polysaccharids. Gal und GlcA stammen gemäß Kapitel 1.3.2.2 aus den Seitenketten, die an das Rückgrat gebunden vorliegen. Die identifizierten Monosaccharide sind somit konsistent mit der beschriebenen Struktur. Die Verhältnisse dieser sind allerdings stark abhängig vom Ursprung des Gummis sowie der Trocknung und Weiterverarbeitung (Mortensen *et al.* 2016). Ein Literaturvergleich der Ergebnisse fällt deshalb schwer. Kleinste gefundene Mengen an Glc und Ara sind keine typischen dem Karayagummi zuordenbaren Monomere und stammen vermutlich aus Restpflanzenbestandteilen wie Pektin, Stärke oder Cellulose, die während der Gewinnung nicht vollständig abgetrennt wurden.

4.1.4 Alginathaltige Materialien

Bei der analysierten Algenprobe handelte es sich gemäß Hersteller um Bestandteile der Braunalge *Ascophyllum nodosum*. Charakteristisch für Braunalgen dominieren in dieser Probe die US ManA und GulA, wobei diese in den LBS einen Gesamtanteil von 81,1 mol% ausmachen (Abbildung 27). Das M/G-Verhältnis beläuft sich in den mittels Methanolyse und anschließender TFA-Hydrolyse analysierten UBS auf 2,8 und ist mit 3,2 in den LBS etwas größer. Dies spiegelt jeweils den deutlichen Überschuss der ManA wider. In den mittels Schwefelsäure hydrolysierten UBS findet sich ein deutlich höheres M/G und damit weniger GulA. Diese Beobachtung kann zum einen durch eine

4.1 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung uronsäurehaltiger Proben

schlechtere Hydrolyse der glycosidischen Bindungen zur GulA, zum anderen durch einen schnelleren Säureabbau der GulA bei der Hydrolyse im Vergleich zur ManA erklärt werden.

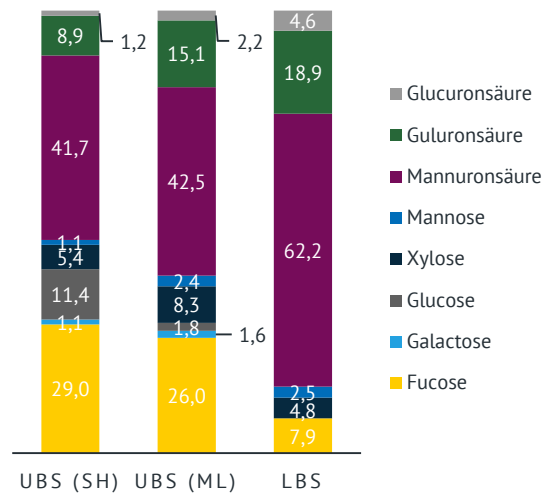


Abbildung 27: Monosaccharidzusammensetzung (mol%) der isolierten unlöslichen (UBS) und löslichen Ballaststoffe (LBS) der Braunalge *Ascophyllum nodosum*. Die Analyse erfolgte bei den UBS sowohl nach Schwefelsäurehydrolyse (SH) als auch nach Methanolyse/Trifluoressigsäurehydrolyse (ML).

Fuc stellt den dominierenden Neutralzucker in den Algen-BS dar, welcher auf die Gruppe der Fucoide (vgl. Kapitel 1.2.2.2) zurückzuführen ist. In Abhängigkeit der verwendeten Definition der Fucoide, zählen auch solche Polysaccharide zu diesen, die neben Fucose noch weitere Zucker enthalten. Ein für Algen der Gattung *Ascophyllum* spezifisches Polymer stellt hierbei das Ascophyllan (Xylofucoglycuronan) dar, das aus einer ManA-Hauptkette mit 3-O-D-Xylosyl-L-fucose-4-sulfat-Substituenten besteht (Nakayasu *et al.* 2009). Damit lässt sich das Vorkommen der Xyl-Anteile zwischen 4,8 und 8,3 mol% erklären. Berteau und Mulloy (2003) beschreiben zudem weitere Feinstrukturelemente verschiedener Fucoide. Diese sind stark abhängig von diversen Umwelteinflüssen sowie der jeweiligen Gattung der Alge. So wurden in Fucoide von *Laminaria japonica* neben Fuc auch Rha, GlcA und Ara identifizieren, in Algen der Gattung *Saccharina latissima* wurde zudem Gal und Man gefunden (Nguyen *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2019). Dementsprechend können die weiteren hier identifizierten Minoranteile von Gal, Man und GlcA zwischen 1,1 – 4,8 mol% den Fucoiden zugeordnet werden. Informationen über Modifikationen, wie etwa Sulfatierung der Monosaccharide, gehen aufgrund des alkalischen Milieus der HPAEC-Analyse verloren und müssen somit anderweitig erhalten werden.

Das Glc-basierte Polymer Laminarin ist das Speicherkohlenhydrat der Braunalge und kommt nicht in den Zellwänden vor. Es macht bei Algen der Gattung *Ascophyllum* nur etwa 5 % der Trockenmasse aus (Kadam *et al.* 2015). Laminarin wird, im Gegensatz zu Amylose und Amylopektin der Landpflanzen, während der BS-Isolierung aufgrund der vorherrschenden α -1,3-Bindung durch die eingesetzten Enzyme α -Amylase und Amyloglucosidase nicht gespalten und wird somit korrekt als BS miterfasst. Dies spiegelt die, wenn auch geringen Glc-Gehalte in den mittels Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse behandelten UBS wider. Der Glc-Gehalt der schwefelsauer hydrolysierten

Fraktion fällt mit 11,4 mol% etwas höher aus, was, wie auch bei den pektinhaltigen Materialien, auf die hier gespaltene Cellulose zurückzuführen ist.

Obwohl es sich bei dem Polysaccharid Alginat um ein sehr gut wasserlösliches Polymer handelt, konnte es sowohl in den UBS als auch in den LBS des Alginats gefunden werden. Dies ist vor allem den stark quellenden und gelbildenden Eigenschaften des Polymers zuzuschreiben. Schon geringe Mengen divalenter Kationen genügen zur Ausbildung von Gelnetzwerken, die bei der BS-Isolierung somit teilweise als unlöslicher Rückstand abgetrennt wurden. Innerhalb dieser Gele können zudem auch weitere lösliche Bestandteile eingeschlossen werden, die somit fälschlicherweise als UBS erfasst werden. Folglich sollte das Verfahren der BS-Isolierung zukünftiger Braunalgenproben noch einmal hinsichtlich dieser Problematik überarbeitet werden.

Für spätere Analysen (s. Kapitel 3.3.2) wurde das M/G-Verhältnis des verwendeten Alginat-Standards analysiert, welches sich auf 2,6 beläuft und somit ManA die dominierende US darstellt. Zudem wurden hier 9,5 mol% Glc identifiziert, die vermutlich aus verbleibendem Laminarin stammt.

Die aus der Lösung der Bubble-Tea Perlen gefällten Polysaccharide bestehen zu 80 mol% aus Glc, was sich der Zutat „modifizierte Stärke“ (Anhang, Abbildung A1) zusprechen lässt. Die übrigen 20 mol% entfallen auf GulA und ManA mit einem M/G-Verhältnis von 4,2. Als Minorbestandteile konnten GlcA, Fru, Man und Gal identifiziert, aber nicht quantifiziert werden. Der sehr geringe GlcA-Gehalt lässt auf eine ebenso geringe Menge des gemäß Zutatenliste enthaltenen Xanthans schließen, weshalb diese Probe nachfolgend (s. Kapitel 4.7.2) entsprechend einer alginathaltigen Probe behandelt wurde.

4.2 Charakterisierung chromophorer Strukturen der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts

Im Rahmen der photometrischen Bestimmung des Gesamtgehalts an US in organischem Probenmaterial erfolgt die Quantifizierung über die Bildung eines magentafarbenen Chromophors. Dieses entsteht aus dem Abbauprodukt 5FFA in Gegenwart von 3PP in konzentrierter natriumtetraborathaltiger Schwefelsäure (vgl. Kapitel 3.4.1). Da sowohl die genaue Struktur als auch die Zahl der hierbei gebildeten chromophoren Verbindungen bislang ungeklärt sind, verfolgten die nachfolgenden Untersuchungen das Ziel, die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen aufzuklären.

4.2.1 Analyse chromophorer Reaktionsprodukte von 5-Formyl-2-furancarbonsäure und 3-Phenylphenol

4.2.1.1 Charakteristika des Chromophors

Die photometrische Bestimmung des Uronsäuregehalts im Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) erfolgt nach Abbau der US in konzentrierter Schwefelsäure. Hierbei wird 5FFA als Hauptabbauprodukt der US beschrieben (Bowness 1958). Um dies zu verifizieren, wurden die Abbauprodukte am Beispiel der GalA direkt aus der konzentrierten Schwefelsäure chromatographisch identifiziert und quantifiziert (Abbildung 28).

Durch Aufstockungsanalysen mit entsprechenden Standardsubstanzen konnte das Vorhandensein von 5FFA und Furfural bestätigt werden, während F2A nicht nachweisbar war. Zu Beginn des Chromatogramms auftretende kleinere Signale konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Die quantitative Bestimmung der Abbauprodukte erfolgte mittels externer Kalibrierung. Hiernach wurde 28 % der eingesetzten GalA zu 5FFA umgesetzt, während 7 % als Furfural wiedergefunden werden konnten. Verluste der Abbauprodukte können durch Nebenreaktionen, wie etwaige durch Rosenau *et al.* (2017) beschriebene Prozesse, erklärt werden (vgl. Kapitel 1.4.2.1.3). Hinweise auf derartige Reaktionen ergaben sich auch durch die beobachtete Braunfärbung der Proben sowie die Bildung unlöslicher Niederschläge, die vor der Analyse abgetrennt wurden. Es ist darüber hinaus plausibel, dass lösliche Polymerfraktionen als breites Signal nach einer RT von etwa 20 min eluieren, wenngleich dies nicht abschließend nachgewiesen werden konnte.

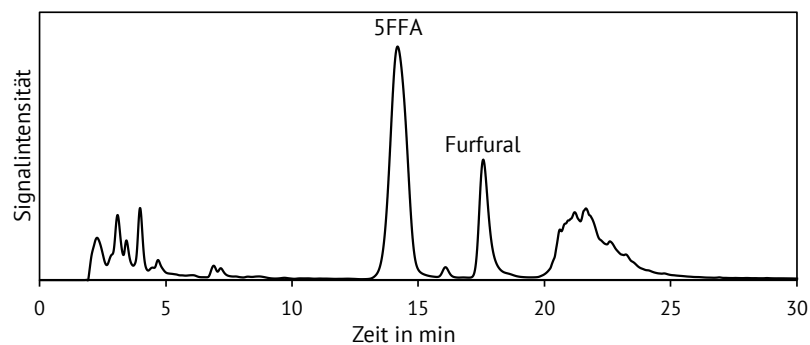


Abbildung 28: Chromatogramm (detektiert bei 260 nm) der Abbauprodukte von Galacturonsäure nach der Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure (5 min, 95 °C; 5FFA: 5-Formyl-2-furancarbonsäure)

Für diese Untersuchungen waren zur Quantifizierung der Furane aufgrund der notwendigen Verdünnung der konzentrierten Säure mit Wasser rund 100-fach höhere Konzentrationen an GalA erforderlich als in den etablierten Analysenbedingungen der photometrischen Analyse. Dies könnte zu einer verstärkten Polymerbildung geführt haben und schränkt die Vergleichbarkeit ein. Dennoch konnte 5FFA eindeutig als dominantes Abbauprodukt identifiziert werden.

In Gegenwart von 3PP und konzentrierter Schwefelsäure bilden sowohl US nach Erhitzen als auch 5FFA ohne Erhitzen eine Magentafärbung aus. Die beiden in Abbildung 29 A und B gezeigten Absorptionsbanden, resultierend aus 5FFA sowie aus der in konzentrierter Säure erhitzte GalA nach Reaktion mit 3PP in der konzentrierten Säure, sind nahezu identisch und zeigen ein Maximum bei 525 nm bzw. 522 nm. Dies bestätigt nochmals, dass an der Ausbildung der chromophoren Struktur das Abbauprodukt 5FFA beteiligt ist. Zur Vereinfachung der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Strukturaufklärung wurde folgend ausschließlich 5FFA als Edukt verwendet.

Die Stabilität der Farbe wurde durch Monitoring der Absorptionsabnahme in einem Zeitraum von 5 – 90 min evaluiert (Abbildung 29 C). Die Messung wurde hierzu gegen einen entsprechend behandelten Blindwert, der kein 3PP enthielt, durchgeführt. So konnte etwaige Absorption, die nicht durch das ausgebildete Chromophor zustande kommt, subtrahiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Absorption zu Beginn stark abfällt und erst nach etwa 20 min einen über den verbleibenden

Messzeitraum hinweg konstanten Wert annimmt. Dieser Absorptionsverlauf deutet auf das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes hin. Aus diesem Grund wurde die Standzeit vor der Absorptionsmessung im photometrischen Assay von den durch Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) empfohlenen 5 min auf 20 min erhöht.

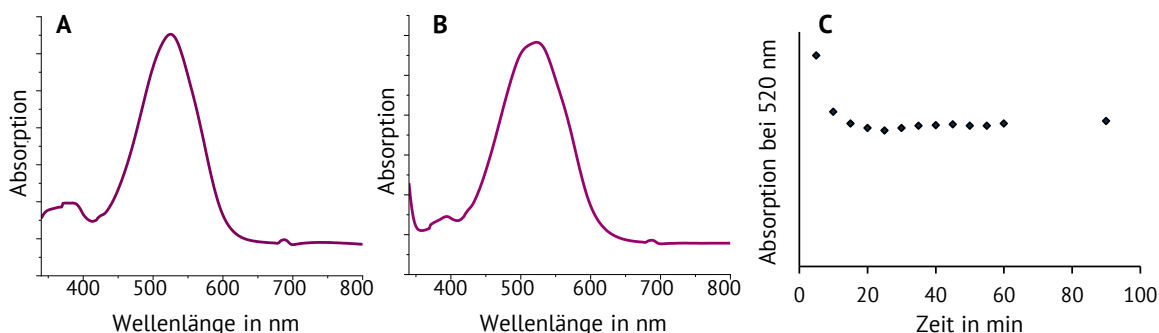


Abbildung 29: Absorptionsspektren des während des photometrischen Assays aus Galacturonsäure gebildeten Chromophors (A), des aus 5-Formyl-2-furancarbonsäure gebildeten Chromophors (B) sowie der zeitliche Verlauf der Absorption des aus Galacturonsäure gebildeten Chromophors bei 520 nm (C)

Studien von Ben-Shalom *et al.* (1994) zeigen, dass Wasser bzw. der Wassergehalt der eingesetzten Säure einen großen Einfluss auf die Färbung nimmt. Aus diesem Grund wurde sowohl der Zusatz von Wasser zum bereits ausgebildeten Chromophor als auch der Einfluss auf die Ausbildung des Chromophors untersucht. Die Zugabe von Wasser zu konzentrierter Schwefelsäure führte zu einem raschen Verlust der Färbung. Bei der Zugabe von 400 μL Wasser zu 1,2 mL verschwand die Farbe nach einer Standzeit von 10 min nahezu vollständig. Dies deutet darauf hin, dass das gebildete Chromophor nur in konzentrierter Säure stabil ist und dort eine sichtbare Absorption zeigt. Der Einfluss der Säurekonzentration auf die Ausbildung des Chromophors wurde daher systematisch untersucht, indem 5FFA mit 3PP in Schwefelsäure unterschiedlicher Konzentrationen (98 – 50 %) umgesetzt wurde. Mit zunehmendem Wassergehalt nahm die Absorption kontinuierlich ab, sodass in 70 %iger Schwefelsäure bei 520 nm keine signifikante Absorption mehr nachgewiesen werden konnte (Anhang, Abbildung A2). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Ben-Shalom *et al.* (1994).

Darüber hinaus wurde die Farbreaktion in TFA, Eisessig, konzentrierter Salzsäure sowie Methansulfonsäure getestet. Abgesehen von Methansulfonsäure konnte in diesen Medien keine Farbentwicklung festgestellt werden, was verdeutlicht, dass sowohl eine wasserarme Umgebung als auch eine hohe Acidität für die Ausbildung des Chromophors erforderlich sind.

4.2.1.2 Extraktion aromatischer Reaktionsprodukte

Erste Versuchsansätze zur Analyse der entstandenen chromophoren Reaktionsprodukte aus 5FFA und 3PP basierten auf der Durchführung des Assays in deuterierter Schwefelsäure. Diese Reaktionslösung sollte anschließend direkt NMR-spektroskopisch analysiert werden. Die Signale der resultierenden ^1H -NMR-Spektren zeigten eine sehr geringe Intensität sowie starke Überlagerungen. Aufgrund geringer Konzentrationen der Analyten konnten 2D-NMR Experimente zudem nicht erfolgen, was die Strukturaufklärung mittels NMR, direkt aus der Reaktionslösung unmöglich machte.

Die Abtrennung der aromatischen Reaktionsprodukte aus konzentrierter Schwefelsäure ermöglichte eine chromatographische Analyse mit MS-Detektion. Hierfür wurden verschiedene Extraktionsstrategien erprobt: eine direkte Flüssig-Flüssig-Extraktion aus der Säure mit DCM, eine Extraktion mit Ethylacetat sowie eine SPE mit einer PFP-Phase. Letztere beiden Methoden erforderten eine partielle Neutralisation der Reaktionslösung, die durch Zugabe von Wasser und anschließendes Einstellen eines pH-Werts von 4 – 5 mittels Natriumacetat realisiert wurde. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel dargestellt, führte dieser Schritt jedoch stets zu einer weitgehend vollständigen Entfärbung der Lösung. Es ist daher davon auszugehen, dass im Zuge dieser Probenvorbereitung nicht das eigentliche Chromophor, sondern eine Vorstufe oder ein Hydrolyseprodukt erfasst wird. Die Trennung der in den Extrakten enthaltenen Reaktionsprodukte erfolgte anschließend auf einer C18-Säule, wobei DAD- sowie MS-Detektion verwendet wurde.

Die direkte Extraktion mit DCM erwies sich als wenig effizient: Nur geringe Mengen an Reaktionsprodukten bzw. Resten der Edukte konnten aus der Säure überführt werden, während die Lösung weiterhin stark gefärbt blieb. Ein Transfer des Chromophors in die organische Phase gelang nicht, weshalb dieses Verfahren verworfen wurde. Deutlich höhere Ausbeuten sowie ein komplexeres Chromatogramm konnten hingegen nach Verdünnung der Säure durch die Extraktion mit Ethylacetat oder durch Verwendung der PFP-SPE erzielt werden. Insbesondere die Adsorption an PFP erwies sich als vorteilhaft, da durch direkte Elution der retardierten aromatischen Komponenten mit Acetonitril ein zusätzliches Einengen der Probe entfiel und gleichzeitig ein breiteres Produktspektrum zugänglich war. Diese Methode wurde daher als Standardverfahren für die weitere Analytik etabliert. In welchem Umfang die Extraktion quantitativ vollständig verlief, konnte jedoch nicht überprüft werden, da das anfallende Waschwasser einen stark sauren pH-Wert sowie eine hohe Salzfracht aufwies und damit nicht mit einer LC-MS-Analyse kompatibel war.

Die beschriebene Vorbehandlung wurde sowohl auf eine entsprechend dem Assay behandelte GalA-Probe als auch auf einen weiteren Reaktionsansatz, ausgehend von 5FFA angewendet. Die Chromatogramme sowie dazugehörige m/z sind in Abbildung 30 dargestellt.

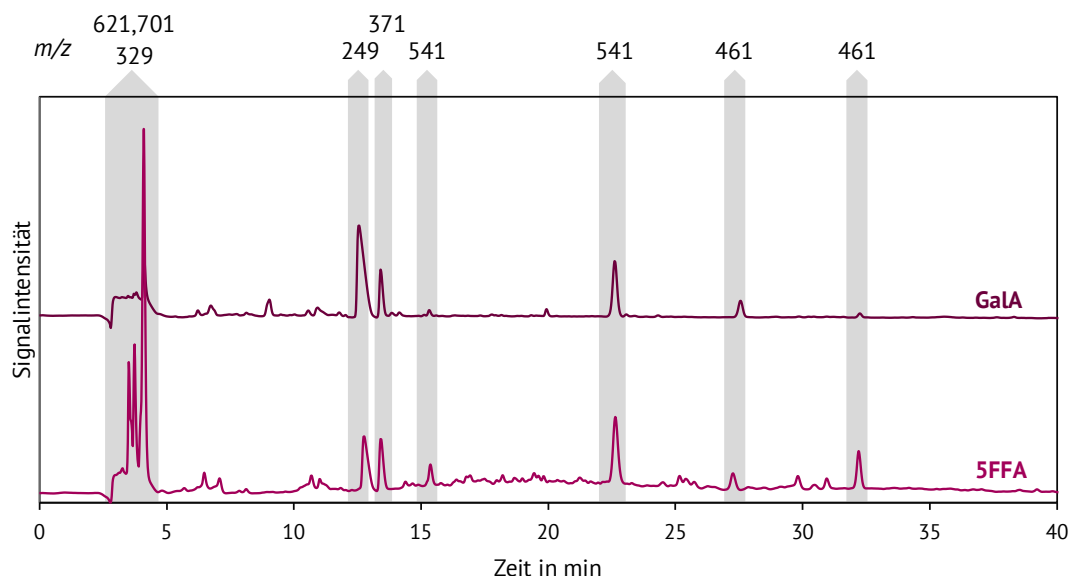


Abbildung 30: Chromatogramme (detektiert bei 265 nm) des organischen Eluats nach Festphasenextraktion des Reaktionsansatzes von Galacturonsäure (GalA, erhitzt bei 95 °C für 5 min) bzw. 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) nach der Reaktion mit 3-Phenylphenol in konzentrierter Schwefelsäure, sowie die entsprechenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) intensiver Signale, gemessen nach Elektro-Spray-Ionisation im negativen Modus

Die im organischen Extrakt, ausgehend von GalA, im zwischen 4 – 32 min detektierten Signale stimmen weitestgehend mit denen der entsprechenden Reaktion von 5FFA mit 3PP überein, wobei im letzteren teils deutlich intensivere Signale (RT: 4 min, 32 min) sowie zusätzliche kleine Peaks (RT: 28 – 31 min, 16 – 20 min) erhalten wurden. Dies ist allerdings auf die entsprechend höhere 5FFA-Konzentration im Ansatz ausgehend von dem Abbauprodukt zurückzuführen. Die detektierten Massen lassen sich über die Bildung von Kondensationsprodukten aus 3PP (170 g/mol) und 5FFA (140 g/mol) erklären, jeweils unter Abspaltung eines Wassermoleküls. So entsprechen die Signale bei m/z 461 (RT: 27,5 min, 32 min) einer isomeren Molekülzusammensetzung aus $2 \times 3PP$ und $1 \times 5FFA$ unter Verlust von Wasser ($M = 462$ g/mol). Die Massendifferenz zur nächstgrößeren Masse mit einem m/z von 541 (RT: 22,5 min, 15,2 min) beträgt 80 g/mol was auf eine Sulfonsäuresubstitution der Produkte hindeutet und im Einklang mit der durch Ma *et al.* (2019) beschriebenen elektrophilen aromatischen Substitution von Phenol in konzentrierter Schwefelsäure steht. Eine entsprechende Sulfonsäuresubstitution in einem vergleichbaren System wurde zudem bereits von Wittke (1983) für Phenolphthalein in konzentrierter Schwefelsäure beschrieben. Diese Substitutionen erklären die Signale bei einem m/z von 541, 621 und 701. Mit zunehmender Anzahl von Sulfonsäuregruppen steigt die Polarität der Verbindungen, was sich in einer früheren Elution widerspiegelt. Die Sulfonierung aromatischer Systeme in konzentrierter und verdünnter Schwefelsäure ist reversibel und steht im Gleichgewicht mit der Protodesulfonierung. Beide Prozesse verlaufen über denselben Übergangszustand und werden durch die Protonensolvatisierung des Mediums bestimmt. In verdünnter Säure, insbesondere unter Energiezufuhr, läuft die Desulfonierung bevorzugt ab (Kozlov *et al.* 2017). Die Möglichkeit einer Desulfonierung besteht somit auch während des Verdünnungsprozesses, wodurch die hier beobachtete Verteilung bzw. Anzahl der Sulfonsäuregruppen als nicht zwangsläufig repräsentativ für das Vorliegen der Moleküle in der konzentrierten Säure gesehen

werden kann. Weitere Signale bei einem m/z von 371, 249 und 329 (RT: 13,5 min, 12,8 min, 4 min) können den Reaktionsprodukten aus monosulfonytem 3PP und 5FFA, ebenfalls unter Verlust von Wasser, sowie dem einfach und zweifach sulfonierten Edukt 3PP zugeordnet werden.

Jeder Peak des in Abbildung 30 gezeigten Chromatogramms des Reaktionsansatzes von 5FFA wurde getrennt gesammelt, das Lösungsmittel vollständig entfernt und der Rückstand mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt. Vor der Zugabe der Säure war weder eine Absorption bei 520 nm noch eine rosa Färbung nachweisbar. Nach Zugabe der Säure zeigten alle Fraktionen, mit Ausnahme derjenigen, die bei 12,8 min (m/z 249) bzw. 13,5 min (m/z 371) eluieren, die charakteristische rosa Färbung. Demnach handelt es sich bei den detektierten Substanzen um Farbvorläufer, die unter Zusatz von konzentrierter Säure zum Chromophor reagieren. Für das Ion mit einer molaren Masse von 462 g/mol wurde eine Triarylmethan-Struktur postuliert. Solche Strukturen entstehen bekanntlich unter säurekatalysierten Bedingungen aus einem Aldehydmolekül und zwei Phenolmolekülen (vgl. Kapitel 1.4.2.2) (De Angelis *et al.* 2004). Da die direkte Isolierung der Verbindung aus dem oben gezeigten Reaktionsansatz nur eine geringe Ausbeute lieferte, wurde ein gezielter Syntheseansatz verfolgt, der im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

4.2.1.3 Synthese und Charakterisierung einer Triarylmethan-Farbstoffvorstufe

Für den im vorherigen Kapitel identifizierten Triarylmethan-Farbvorläufer wurde die in Abbildung 31 gezeigte Struktur **36** postuliert. Für solche Moleküle sind effiziente Synthesewege unter milderen Bedingungen beschrieben, die ein Triarylmethan ohne Sulfonsäuresubstitution liefern (vgl. Kapitel 3.5.1) (Dinger und Scott 2000; Grüttner *et al.* 1995; Kreppenhofer *et al.* 2011; Kurata *et al.* 2005). Das Erhitzen von 3PP mit 5FFA in wässrig-saurem Medium lieferte zwei dominierende Produkte, die bei der nachfolgenden Chromatographie nach 27 min und 32 min eluieren (Abbildung 31). Beide Fraktionen weisen eine identische molekulare Masse von 462 g/mol auf, weshalb es sich vermutlich um Isomere handelt. Die Signale bei 5 min und 22 min entsprechen hingegen den Edukten 5FFA bzw. 3PP.

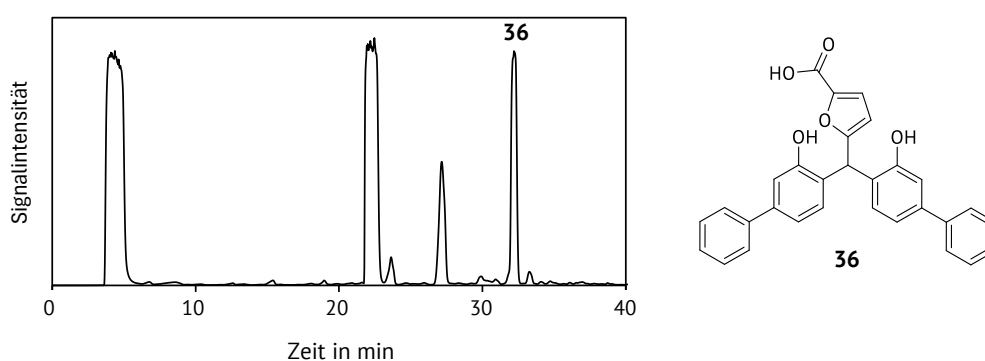


Abbildung 31: Chromatogramm (detektiert bei 265 nm) des Syntheseansatzes zur Isolierung einer Triarylmethanstruktur gemäß **36** aus der Reaktion von 3-Phenylphenol und 5-Formyl-2-furancarbonsäure in wässrig saurem Medium

Die nach 32 min eluierende Fraktion stimmt sowohl in ihrer RT als auch molekularen Masse mit dem Signal (RT: 32 min, Abbildung 30), bzw. der entsprechenden Substanz der Extraktion in Abbildung 30, überein, welche Struktur **36** zugeordnet wurde. Diese Fraktion wurde mittels

semipräparativer Chromatographie isoliert und anschließend durch Kombination aus den 1D- und 2D-NMR-Daten sowie der erhaltenen molaren Masse charakterisiert.

Die isolierte Substanz wurde als weißes bis beigefarbenes, pulverförmiges Material erhalten und wies ein Absorptionsmaximum bei 265 nm auf. Abgleich der 1D- und 2D-NMR-Daten mit in der Literatur beschriebenen Daten verwandter Strukturen, z. B. einer Vorstufe des Pyronins (Jakobsen *et al.* 1983) sowie den von Kreppenhofer *et al.* (2011) isolierten Strukturen aus Kaffee, bestätigten die strukturelle Zuordnung zu Verbindung **36**. Hierbei wurden die entsprechenden chemischen Verschiebungen der Protonen aus dem ^1H -NMR-Spektrum und der ^{13}C -Kerne aus dem HSQC- (Anhang, Abbildung A3) und HMBC-Spektrum entnommen (Abbildung 32).

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt acht deutliche Signale im Bereich von 5,9 – 7,9 ppm (Abbildung 32 A). Aufgrund der vergleichsweise geringen Zahl an Protonenresonanzen im Verhältnis zur hohen molaren Masse von 462 g/mol wurde auf eine symmetrische Molekülstruktur geschlossen. Die beiden Protonen des intakten Furanrings ($\delta_{\text{H},14} = 5,95$ ppm, $\delta_{\text{H},13} = 7,07$ ppm) können anhand ihrer, im Vergleich zu den übrigen aromatischen Protonen, kleinen Kopplungskonstanten von etwa 3 Hz identifiziert werden. Diese Zuordnung wird durch die homonukleare $^3\text{J}_{\text{HH}}$ -Kopplung zwischen *H*13 und *H*14 im COSY-Spektrum bestätigt (Abbildung 32 B). Zudem ist das Signal von *H*14 des Furanrings aufgrund seiner Nähe zur Carboxygruppe, die durch eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C},16} = 163$ ppm im HMBC-Spektrum (Abbildung 32 C) charakterisiert ist, im Vergleich zu den von Kreppenhofer *et al.* (2011) berichteten Werten tieffeldverschoben. Die heteronukleare $^3\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplung zwischen *H*14 und *C*16 ($\delta_{\text{H}14}/\delta_{\text{C}16} = 5,95/163$ ppm) liefert eine weitere Bestätigung der Protonenzuordnung (Abbildung 32 B).

Die Protonen *H*1, *H*2, *H*3, *H*6 sowie *H*9 und *H*10 werden, basierend auf charakteristischen Kopplungskonstanten von 7 – 8 Hz sowie den entsprechenden Integralverhältnissen, den vier äquivalenten phenolischen Substituenten zugeordnet. Aufgrund der Symmetrie der Struktur weisen je zwei Protonen die gleiche chemische Verschiebung auf. Der unsubstituierte aromatische Ring der beiden 3PP-Substituenten blieb während der Reaktion unverändert, was durch das Vorhandensein von zwei Triplets ($\delta_{\text{H},1} = 7,29$ ppm, $\delta_{\text{H},2} = 7,39$ ppm) und einem Dublett ($\delta_{\text{H},3} = 7,58$ ppm) im ^1H -NMR-Spektrum deutlich wird.

Somit erfolgt die Bindung des Furanrings an den OH-substituierten aromatischen Ring des 3PPs. Jakobsen *et al.* (1983) analysierten eine analoge Struktur, die aus Formaldehyd und 3-(Dimethylamino)phenol abgeleitet wurde, und zeigten hier eine Präferenz für die Reaktion *ortho* zum Hydroxy-Substituenten, die einhergeht mit dem entsprechenden *ortho/para*-dirigierenden +M bzw. -I Effekt der Hydroxygruppe sowie dem schwächeren +M Effekt des Phenylsubstituenten in Position 3 des 3PPs. Das Multiplett bei $\delta_{\text{H}} = 7,03$ ppm kann in ein Dublett und ein Singulett aufgelöst werden und wird im COSY der $^3\text{J}_{\text{HH}}$ -Kopplung des *H*10 mit *H*9 ($\delta_{\text{H},9} = 6,94$ ppm) zugeordnet. Das Singulett entspricht gemäß der im HMBC identifizierten heteronuklearen ^3J -Kopplungen des Protons zu *C*4, *C*8 und *C*10 ($\delta_{\text{C},4} = 143$ ppm, $\delta_{\text{C},8} = 142$ ppm, $\delta_{\text{C},10} = 118$ ppm), dem *H*6. Dieses Muster bestätigt die Substitution an Position 8 der beiden 3PP-Einheiten. Die drei aromatischen Struktureinheiten sind über ein tertiäres Kohlenstoffatom miteinander verbunden, das im ^1H -NMR-Spektrum ein Signal bei

4.2 Charakterisierung chromophorer Strukturen der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts

$\delta_H = 6,22$ ppm zeigt. Die dazugehörige ^{13}C -Verschiebung von $\delta_C = 38,6$ ppm kann durch die heteronukleare 1J -Kopplung im HSQC-Spektrum verifiziert werden und steht in guter Übereinstimmung mit den von Kreppenhofer *et al.* (2011) berichteten Werten.

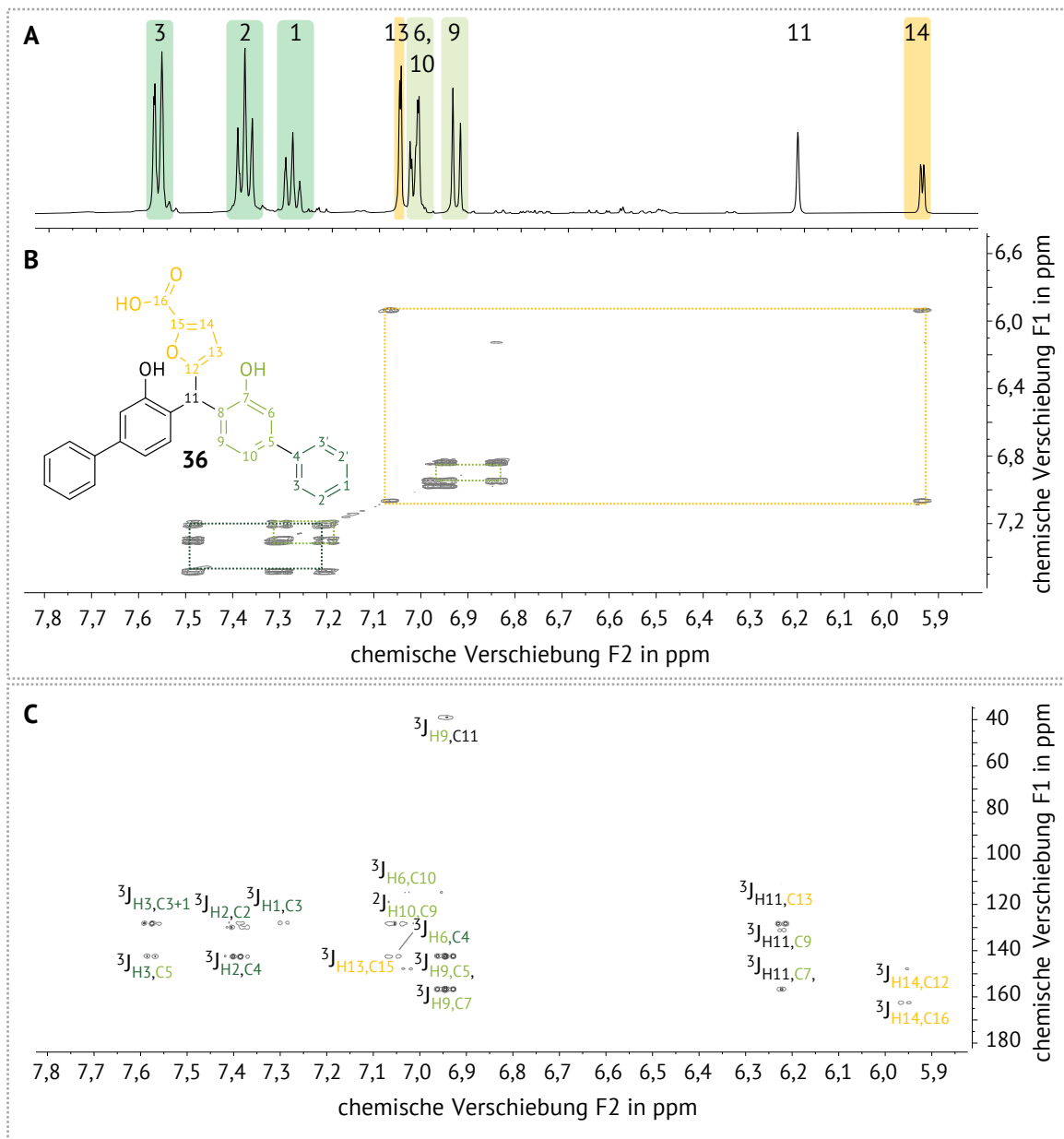


Abbildung 32: 1H -Kernspinresonanzspektrum (500 MHz) (A), *correlation spectroscopy*-Spektrum (B) und *heteronuclear multiple bond correlation*-Spektrum (C) des Triarylmethan-Farbvorläufers 36 aus der Reaktion von 3-Phenylphenol mit 5-Formyl-2-furancarbonsäure. Einzelne Signale sowie Kopplungsbeziehungen wurden entsprechend farbig hinterlegt. Alle Spektren wurde in Methanol- d_4 aufgenommen und auf das entsprechende Lösungsmittelsignal referenziert ($\delta_{H/C} = 3,30/49,00$ ppm). Die zugehörigen chemischen Verschiebung sind in Tabelle A1 im Anhang gelistet.

Unter Berücksichtigung aller spektroskopischer Daten konnte Verbindung **36** eindeutig als die Triarylmethan-Verbindung **5-(Bis(3-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)furan-2-carbonsäure** identifiziert werden.

30 mg dieser isolierten Verbindung wurden mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt, was zur Ausbildung einer intensiven Magentafärbung mit einem Absorptionsmaximum bei 525 nm führte. Versuche, dieses Chromophor mittels MS und NMR-Spektroskopie zu charakterisieren, blieben erfolglos. Wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, verschwand die Färbung nahezu vollständig bei Verdünnung mit Wasser. Die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsmischung nach Verdünnen mit Wasser zeigte neben dem verbleibenden Triarylmethan inklusive sulfonierter Spezies, zahlreiche niedermolekulare Analyten, die auf die Zersetzung der chromophoren Struktur hinweisen.

4.2.1.4 Theoretische Berechnungsansätze zur Ausbildung der chromophoren Struktur

Aufgrund der Instabilität des gebildeten Chromophors und der resultierenden Produktdiversität wurden quantenchemische Berechnungen in Kooperation mit der Abteilung für Theoretische Chemie des Instituts für Physikalische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt, um die Absorptionsspektren verschiedener, potenziell aus Struktur **36** abgeleiteter Chromophore vorherzusagen (vgl. Kapitel 3.5.2). Die vollständigen berechneten Werte, wie Wellenlänge des Absorptionsmaximums und Extinktionskoeffizienten verschiedener Strukturen, findet sich im Anhang in Tabelle A2. Diese berechneten Spektren wurden anschließend mit dem experimentell aufgenommenen UV/vis-Spektrum des Reaktionssystems verglichen.

Zur Ausbildung der Farbe muss ein durchgängiges π -Elektronensystem im Chromophor erreicht werden. Dieses wird im isolierten Triarylmethan der Struktur **36** durch das zentrale tertiäre Kohlenstoffatom verhindert. Wie bereits mehrfach für verwandte Systeme beschrieben, muss hier demnach eine Oxidation dieses Kohlenstoffs stattfinden (Abbildung 33) (Fagnani *et al.* 2003; Jakobsen *et al.* 1983; Romieu *et al.* 2018). Die hierbei formal erhaltene zentrale Hydroxygruppe (**36a**) wird in der konzentrierten Säure durch Protonierung sofort als Wasser abgespaltet, woraus das entsprechende mesomeriestabilisierte Triarylmethan-Kation (**36b**) entsteht (Wittke 1983). Potenzielle Oxidationsmittel in dieser Reaktion werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

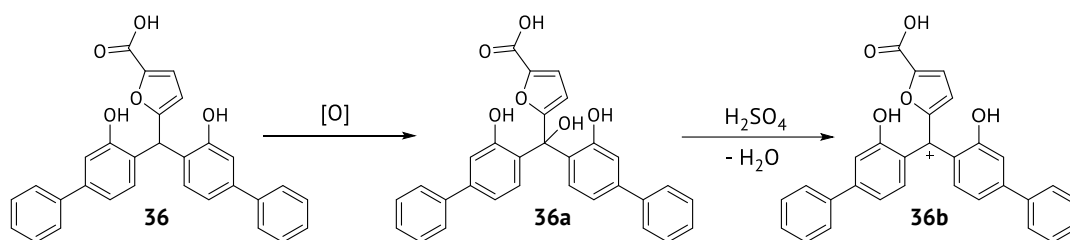


Abbildung 33: Ausbildung des chromophoren Triarylmethan-Kations (**36b**) aus der identifizierten Farbvorläuferstruktur (**36**) in konzentrierter Schwefelsäure durch Oxidation und Dehydratisierung von **36a** am zentralen Kohlenstoffatom

Durch die Hydroxygruppen in *ortho*-Position zur zentralen Methylengruppe der beiden 3PP-Bausteine besteht zudem die Möglichkeit der Ausbildung eines intramolekularen Ethers, wie es Romieu *et al.* (2018) am Beispiel der Pyroninsynthese darstellen. Das daraus analog zu Abbildung 33 erhaltenen Xanthylium-Motiv (**37**) (Abbildung 34) weist zudem einen planaren Grundkörper auf, was dieses Molekül energetisch besonders stabil macht.

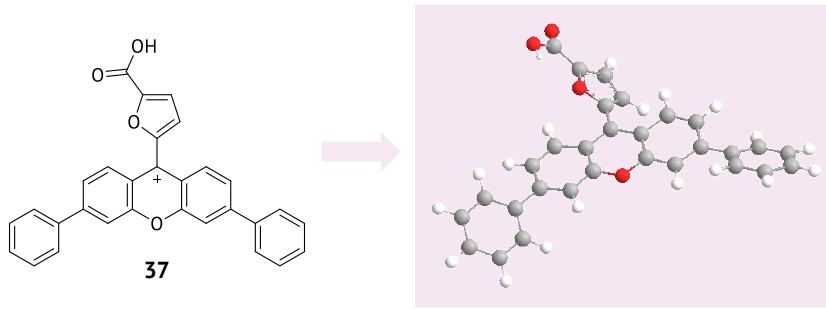


Abbildung 34: Postulierte Xanthylium-Ion basierte chromophore Struktur (37) gebildet aus der identifizierten Triarylmethan-Struktur (36). Dieses Strukturmotiv weist eine besonders hohe Stabilität durch sein zentrales planares Strukturelement auf (grau: Kohlenstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Wasserstoff).

Vor der Anwendung der entwickelten Benchmark-Berechnung auf die mit den Strukturen **36b** und **37** postulierten möglichen Chromophore, wurde die Methodik zunächst anhand von Phenolphthalein als Beispiel für ein Triarylmethan-Kation sowie Fluorescein als Xanthylium-Ion validiert. Die Ergebnisse wurden mit den literaturbekannten Absorptionsdaten dieser Verbindungen in konzentrierter Schwefelsäure verglichen. Die entsprechenden berechneten und experimentell aufgenommenen Absorptionsspektren sind in Abbildung 35 dargestellt, charakteristische Parameter wie Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten sind in der zugehörigen Tabelle 1 aufgeführt.

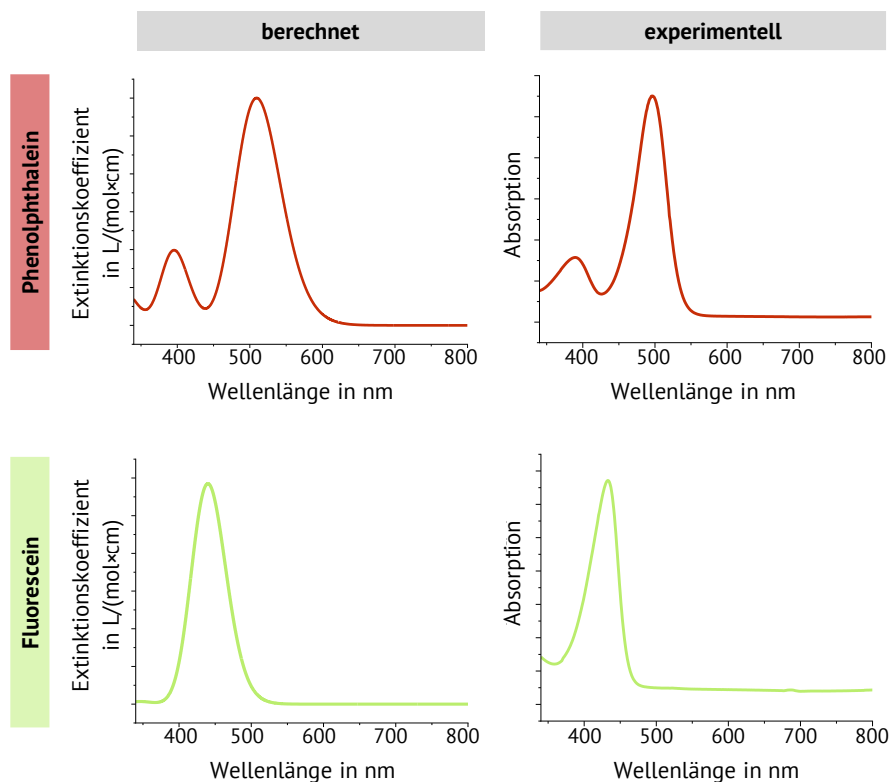


Abbildung 35: Berechnete und experimentell bestimmte Absorptionsspektren von Phenolphthalein und Fluorescein in konzentrierter Schwefelsäure

Tabelle 1: Berechnete und experimentell bestimmte Absorptionsmaxima λ und Extinktionskoeffizienten ϵ von Phenolphthalein und Fluorescein in konzentrierter Schwefelsäure

	berechnet		experimentell	
	λ_{\max} in nm	ϵ in L/(mol×cm)	λ_{\max} in nm	ϵ in L/(mol×cm)
Phenolphthalein	509	60000	497	42600 ¹
	396	19900	390	11600 ¹
Fluorescein	440	58500	437	53000 ²

¹Wert wurde aus Hopkinson und Wyatt (1970) entnommen

²Wert wurden aus Sjöback *et al.* (1995) entnommen

Die berechneten Absorptionsmaxima sowie die berechneten Absorptionsspektren zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Demnach kann die entwickelte Benchmarkmethode etwas erhöhte, aber dennoch zuverlässige Ergebnisse für die in Abbildung 33 und 34 postulierten Strukturen **36b** und **37** liefern. Die entsprechenden Spektren für das Triarylmethan-Kation sowie das Xanthylium-Ion sind in der nachfolgenden Abbildung 36 dargestellt.

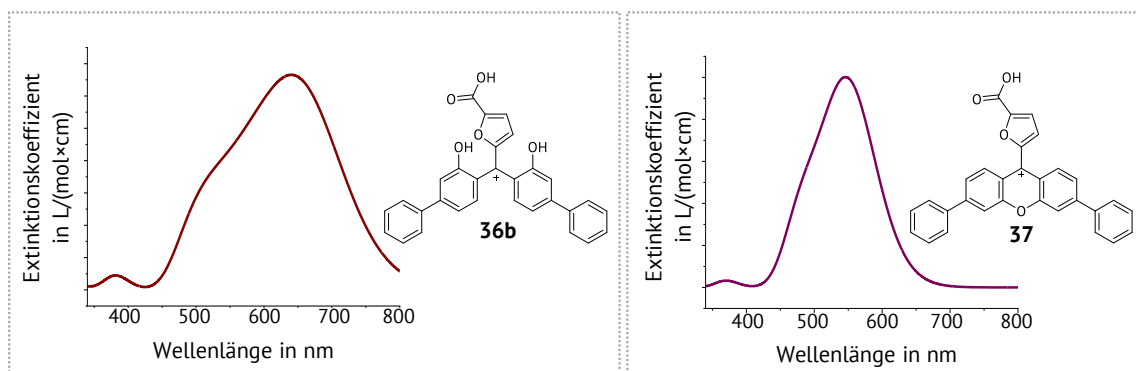


Abbildung 36: Berechnete Absorptionsspektren des Triarylmethan-Kations (**36b**) sowie des Xanthylium-Ions (**37**) ausgehend von 5-Formyl-2-furancarbonsäure und 3-Phenylphenol

Das berechnete Spektrum der Struktur **36b** zeigt mit einem Absorptionsmaximum von 640 nm eine deutliche Rotverschiebung im Vergleich zur erwarteten Absorption bei 525 nm, demnach wurde das Strukturmotiv des Triarylmethan-Kations ausgeschlossen. Die gute Übereinstimmung des berechneten Absorptionsspektrums der Struktur **37** (vgl. Abbildung 36) mit dem gemessenen Absorptionsspektrum (vgl. Abbildung 29 A B) legen nahe, dass es sich bei dem im Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay detektierten Chromophor um das **9-(5-Carboxyfuran-2-yl)-3,6-diphenyl-9H-xanthylium-9-ylum-ion (37)** handelt. Die entsprechenden berechneten Werte finden sich im Anhang in Tabelle A2.

Da ein experimenteller Nachweis dieser Struktur nicht gelang, wird die Isolierung einer vergleichbaren, jedoch stabileren Spezies innerhalb des im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Modellsystems näher untersucht.

4.2.2 4-Carboxybenzaldehyd und 3-Phenylphenol basierte Chromophore als Modellsystem

4.2.2.1 Synthese und Charakterisierung eines entstandenen Chromophors

Zur Stabilisierung des Chromophors gegenüber Weiterreaktion oder einem Abbau wurden die Edukte so angepasst, dass das entstehende Chromophor eine höhere Stabilität aufwies, während sein charakteristischer Farbeindruck weitgehend erhalten blieb. Bereits Ohta *et al.* (1985) zeigten im Rahmen ihrer Strukturaufklärung des in der Seliwanoff-Reaktion gebildeten Chromophors, die einen allgemeinen qualitativen Zuckernachweis über die Reaktion der Zuckerabbauprodukte mit Resorcinol ermöglicht, dass ein Austausch des Reaktionspartners die Stabilität des Chromophors zur Isolierung verbesserte, ohne dessen Farbe wesentlich zu verändern.

Durch den Ersatz von 5FFA durch 4CBA wurde ein stabileres Modellsystem geschaffen, das die Aufklärung einer verwandten chromophoren Struktur ermöglichte. Im Unterschied zu 5FFA zeigt das Benzolderivat 4CBA in konzentrierter Schwefelsäure eine deutlich geringere Reaktivität, da Abbau- und Kondensationsprozesse durch Ringöffnungen, wie sie für den Furanring charakteristisch sind, nicht mehr auftreten. Während im ursprünglichen Assay bei Zugabe von 3PP zur konzentrierten Schwefelsäure eine sofortige Farbbildung zu beobachten war, zeigte sich in diesem Fall zunächst keine Färbung. Analog zur von Romieu *et al.* (2018) beschriebenen Pyroninsynthese entstand die charakteristische Magentaefärbung erst unter harscheren Bedingungen, die eine Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 120 °C erforderten. Das gebildete Chromophor weist ein deutliches Absorptionsmaximum bei 525 nm sowie weitere Banden bei 400 nm und 624 nm auf (Abbildung 37 A). Diese weiteren Banden im UV/vis-Spektrum geben Hinweise auf die Bildung zusätzlicher chromophorer Spezies, wobei es sich bei der höherwelligen Bande gemäß den berechneten Werten aus Tabelle A2 im Anhang um das nicht zyklisierte Triarylmethan-Kation handeln könnte.

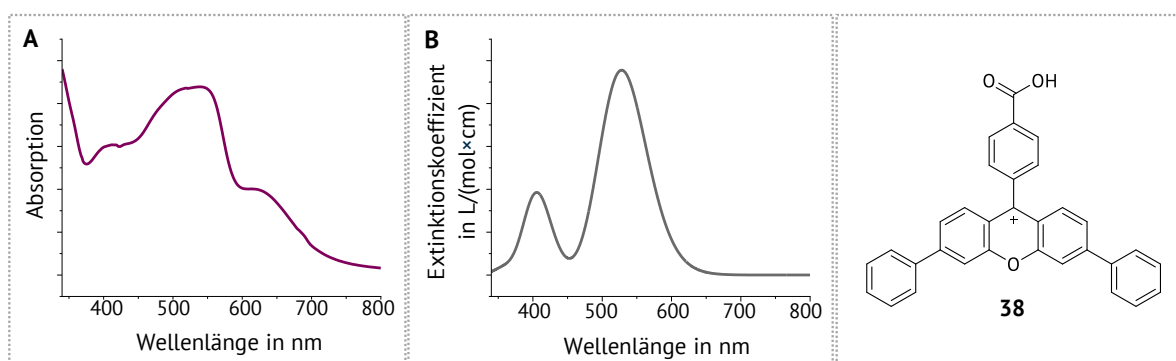


Abbildung 37: Experimentell aufgenommenes UV/vis-Spektrum des Reaktionsgemisches aus 4-Carboxybenzaldehyd und 3-Phenylphenol nach Erhitzen in konzentrierter Schwefelsäure (A) und berechnetes UV/vis-Spektrum von Molekül 38 (B) in konzentrierter Schwefelsäure

Die resultierende Farbe erwies sich gegenüber Verblässen während der Neutralisation als deutlich stabiler, zeigte jedoch eine partielle Entfärbung. Eine effiziente chromatographische Aufreinigung der organisch extrahierten Chromophore konnte ausschließlich durch Zugabe von TFA zur mobilen Phase erzielt werden, ohne diesen Zusatz blieb die Elution marginal. Dies legt nahe, dass starke ladungsbasierte Wechselwirkungen zwischen den Analyten bestehen, die vermutlich durch

Ionenpaarbildung mit TFA unterdrückt werden. Die Detektion bei 520 nm ergab drei eng benachbarte Fraktionen (Anhang, Abbildung A4), von denen lediglich die erste in ausreichender Menge und Reinheit als magentafarbenes Pulver isoliert werden konnte. Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wurden über 20 mg dieser Fraktion eingesetzt, dennoch zeigten die erhaltenen Signale eine geringe Intensität.

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 38 A) weist ausschließlich Resonanzen im aromatischen Tieffeld zwischen 7,1 und 8,0 ppm auf, was auf ein größeres aromatisches System im Vergleich zu Struktur **36** (Abbildung 32) schließen lässt. Die Protonen des 4CBA-Bausteins können mithilfe der im COSY-Spektrum visualisierten homonuklearen $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ -Kopplungen (Abbildung 38 B) bei $\delta_{\text{H13}} = 7,16$ ppm und $\delta_{\text{H14}} = 7,90$ ppm identifiziert werden. Letzteres Signal ist aufgrund der benachbarten Carboxygruppe stark tieffeldverschoben. Dessen Zuordnung wird durch eine $^3\text{J}_{\text{H,C}}$ -Kopplung zu C16 ($\delta_{\text{C16}} = 168$ ppm) im HMBC-Spektrum (Abbildung 38 C) bestätigt. Darüber hinaus lässt sich das charakteristische Muster des unsubstituierten Phenolring des 3PPs, zwei Triplets und ein Dublett mit Integralverhältnis 2:1:2, eindeutig nachweisen ($\delta_{\text{H1}} = 7,16$ ppm, $\delta_{\text{H2}} = 7,22$ ppm, $\delta_{\text{H3}} = 7,89$ ppm). Der Integralvergleich dieser Signale mit den Protonen des 4CBA bestätigt, dass das Molekül zwei 3PP-Einheiten enthält. Signale von H1 und H13 überlagern sich im Spektrum, können jedoch mithilfe der beiden zugehörigen ^{13}C -Verschiebungen ($\delta_{\text{C1}} = 127$ ppm, $\delta_{\text{C13}} = 129$ ppm; vgl. HSQC-Spektrum Anhang, Abbildung A5) in den 2D-Experimenten differenziert werden. Das breite Dublett des H3 ist im Vergleich zum Triarylmethan **36** (vgl. Abbildung 32) deutlich tieffeldverschoben, was auf eine veränderte chemische Umgebung bzw. einen veränderten Einfluss des substituierten 3PP-Rings hindeutet. Die für Struktur **36** charakteristische Hochfeld-Resonanz des zentralen Kohlenstoffatoms (C11) fehlt hier, was auf eine Oxidation dieses Zentrums hindeutet und im Einklang mit dem diskutierten Etherkation-Motiv **38** steht. Neben dem Carboxygruppen-Signal zeigt sich eine weitere ^{13}C -Resonanz bei 168 ppm, die über $^3\text{J}_{\text{H,C}}$ -Kopplungen mit H7 ($\delta_{\text{H7}} = 7,25$ ppm) und H13 dem zentralen Kohlenstoffatom (C11) zugeordnet werden konnte, das die Phenol- und Benzoessäureeinheiten verknüpft. Ein breites Singulett von H10 ($\delta_{\text{H10}} = 7,49$ ppm) sowie allgemein niedrige Signalintensitäten deuten auf eine schnelle T_2 -Relaxation hin, was die Annahme einer geladenen Spezies stützt und bereits von Jakobsen *et al.* (1983) für das Beispiel Pyronin beschrieben wurde.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die analysierte Struktur dem postulierten Xanthylium-Ion der Struktur **38** entspricht. Das massenspektrometrisch detektierte m/z von 515 stützt diese These. Da sich durch die deprotonierte Carboxygruppe von Struktur **38** ein nach außen neutrales Zwitterion ergibt, ist dieses nicht direkt per MS nachweisbar. Die beobachtete Masse lässt sich jedoch durch ein Formiataddukt der hydroxylierten Struktur **38a** erklären (Abbildung 39). In Übereinstimmung mit den in Kapitel 4.2.1.1 gemachten Beobachtungen erwies sich die postulierte Verbindung **38** als wasserlabil, wobei in wässrigem Medium gemäß Literaturberichten eine Hydroxylierung am zentralen Kohlenstoffatom erfolgen kann (Wittke 1983). Die Kombination aus vorgelagerter chromatographischer Trennung und den niedrigen injizierten Konzentrationen begünstigte daher die Entfärbung durch diesen Prozess.

4.2 Charakterisierung chromophorer Strukturen der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts

Eine abschließende Bestätigung dieses Strukturmotivs kann auf Grundlage des ermittelten Molekulargewichts sowie der dargestellten NMR-Daten nicht erbracht werden, da mögliche Kopplungsbeziehungen in Form einer $^4J_{H,C}$ -Kopplung zwischen den Positionen 6 und 7 über die Etherbrücke hinweg generell nur schwer im HMBC-Spektrum nachweisbar sind und in diesem Fall nicht beobachtet wurden.

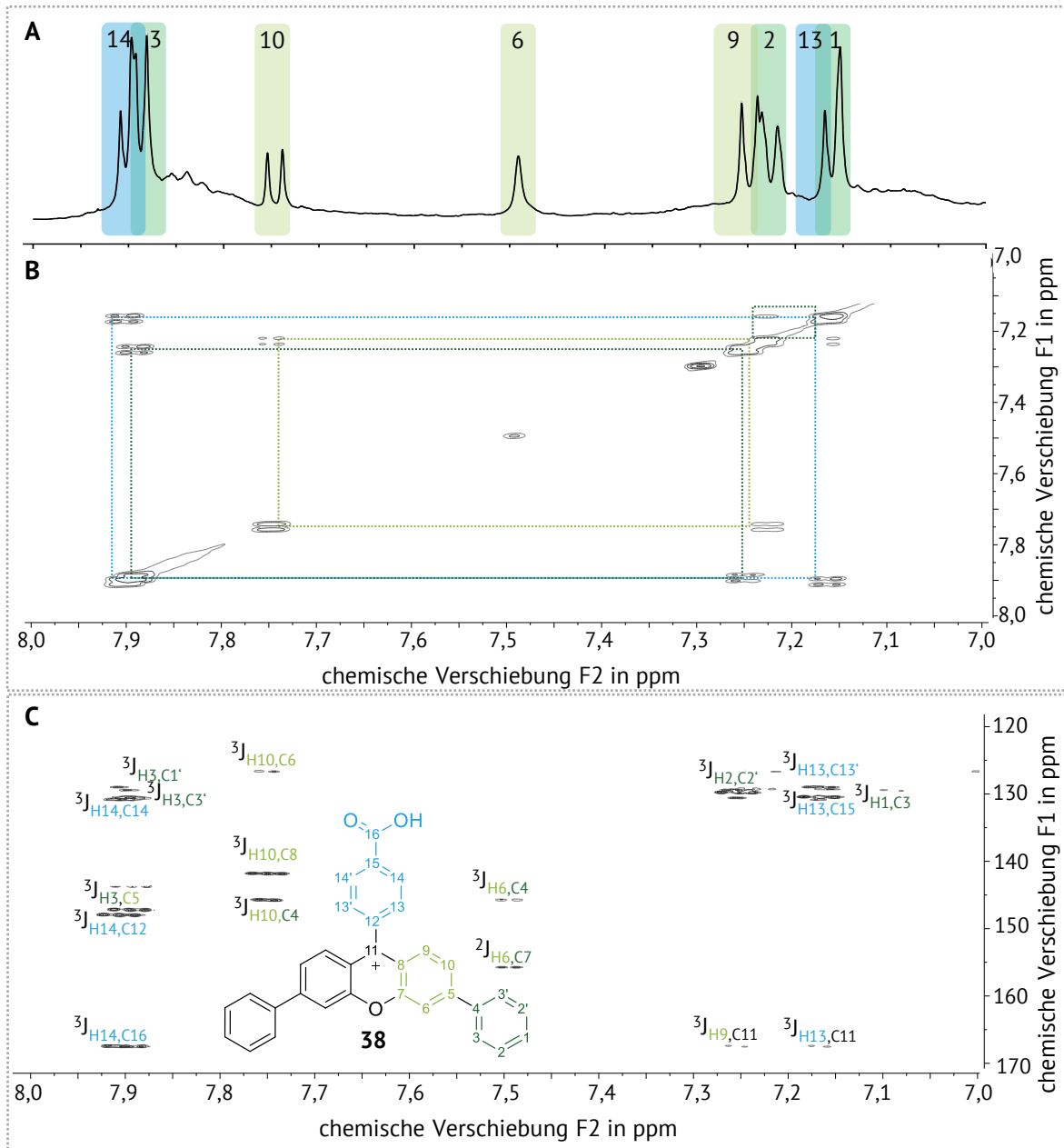


Abbildung 38: ^1H -Kernspinresonanzspektrum (500 MHz) (A), *correlation spectroscopy*-Spektrum (B) und *heteronuclear multiple bond correlation*-Spektrum (C) des Chromophors 38, entstanden aus der Reaktion von 3-Phenylphenol mit 4-Carboxybenzaldehyd. Einzelne Signale sowie Kopplungsbeziehungen wurden farbig hinterlegt. Alle Spektren wurde in Tetrahydrofuran- d_8 aufgenommen und auf das entsprechende Lösungsmittelsignal referenziert ($\delta_{H/C} = 3,58/67,57$ ppm). Die zugehörigen chemischen Verschiebungen sind in Tabelle A3 im Anhang gelistet.

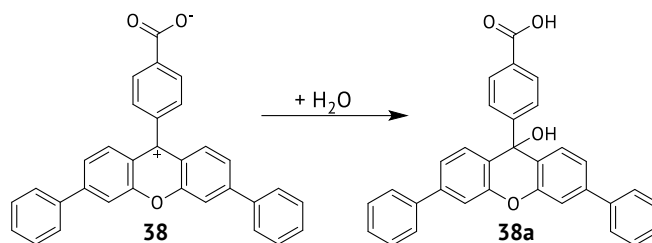


Abbildung 39: Postulierte Hydroxylierung des zwitterionischen Chromophors **38** in wässriger Umgebung

4.2.2.2 Weiterführende Verifizierung der chromophoren Struktur

Einzig durch die Strukturcharakterisierung anhand der NMR- und MS-Daten konnte die postulierte Struktur des Xanthyliumions aus der Reaktion von 4CBA mit 3PP nicht zweifelsfrei bestätigt werden. So blieb die Bestätigung eines Ringschlusses zum intramolekularen Ether in den dargelegten NMR-Experimenten offen. Daher wurde die Strukturbestimmung durch quantenchemische Berechnungen chemischer Verschiebungen gestützt, was in Kooperation mit der Abteilung für Theoretische Chemie des Instituts für Physikalische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie erfolgte.

Als diagnostisches Kriterium diente die chemische Verschiebung des zentralen C11-Atoms in der NMR-Spektroskopie. Zu diesem Zweck wurden Berechnungen für drei strukturell plausible Spezies durchgeführt, die sich aus den Triarylmethan-Vorläufern (**36** bzw. **39**) ableiten lassen: das Xanthylium-Ion (**37** und **38**), das nicht oxidierte Xanthen (**40** und **41**) sowie das Triarylmethan-Kation (**36b** und **39b**) (Tabelle 2). Die zugehörigen Strukturen sind in Abbildung A6 im Anhang zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 2: Berechnete und experimentell bestimmte chemische Verschiebungen δ_c des zentralen Kohlenstoffatoms (C11) für verschiedene Triarylmethan-Strukturen (Tr), Xanthenderivate, Triarylmethan-Kationen (Tr^+) und Xanthylium-Ionen (Xanthen $^+$) aus 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA), 4-Carboxybenzaldehyd (4CBA) oder Formaldehyd (FA) nach Reaktion mit 3-Phenylphenol (3PP) oder 3-Dimethylaminophenol (3DMAP). Alle hier genannten Strukturen werden in Abbildung A6 im Anhang aufgeführt.

	δ_c berechnet in ppm	δ_c experimentell in ppm
5FFA + 3PP Tr (36)	44,0	38,6
5FFA + 3PP Xanthen (40)	44,7	-
5FFA + 3PP Tr^+ (36b)	157,9	-
5FFA + 3PP Xanthen $^+$ (37)	147,7	-
4CBA + 3PP Tr (39)	50,2	44,3
4CBA + 3PP Xanthen (41)	50,5	-
4CBA + 3PP Tr^+ (39b)	183,3	-
4CBA + 3PP Xanthen $^+$ (38)	169,5	167,6
FA + 3DMAP Tr (42)	33,6	27,2 ¹
FA + 3DMAP Xanthen (43)	30,8	26,1 ¹
FA + 3DMAP Xanthen $^+$ (44)	145,0	146,1 ¹

¹Wert entnommen aus Jakobsen *et al.* (1983)

Die Oxidation des zentralen Kohlenstoffatoms führt zu einer deutlichen Tieffeldverschiebung der ^{13}C -Resonanz, wie der Vergleich zwischen dem neutralen Triarylmethan und dem entsprechenden Kation zeigt. Der anschließende Ringschluss zum intramolekularen Ether (Xanthylium-Ion) bewirkt eine moderate Hochfeldverschiebung, wodurch sich diese Spezies klar von den nicht oxidierten bzw. nicht zyklisierten Formen unterscheidet.

Der Vergleich der berechneten chemischen Verschiebungen mit den verfügbaren experimentellen NMR-Daten sowie mit Literaturwerten zu Pyronin Y und verwandten Strukturen (**42** – **44**, Abbildung A6) zeigt, dass die berechneten Werte im Allgemeinen leicht oberhalb der experimentell bestimmten Daten liegen. Besonders bemerkenswert ist die Übereinstimmung der berechneten Werte für das Xanthylium-Ion mit den beobachteten experimentellen Verschiebungen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Berichten zu analogen Systemen, wie der säurekatalysierten Kondensation von Formaldehyd mit 3-Dimethylaminophenol zur Bildung von Pyronin (**44**) (Jakobsen *et al.* 1983).

Die Ähnlichkeit zwischen berechneten und experimentellen Absorptionsmaxima, ergänzt durch konsistente NMR- und MS-Daten (vgl. Kapitel 4.2.2.1) sowie die berechnete chemische Verschiebung des zentralen Kohlenstoffatoms, erlaubt eine eindeutige Identifizierung der Verbindung als Xanthen-Derivat **9-(4-Carboxyphenyl)-3,6-diphenyl-9H-xanthen-9-ylum (38)**.

Im Einklang mit dem identifizierten Xanthylium-Strukturmotiv können auch die nachfolgend beschriebenen Eigenschaften des Chromophors erklärt werden. Hierzu zählt zum einen die in konzentrierter Schwefelsäure beobachtete Fluoreszenz des Chromophors **38**, die eine charakteristische physikalische Eigenschaft von Xanthenfarbstoffen darstellt (Kemnitz 1991; Sjöback *et al.* 1995). Zum anderen bestätigt das NMR-spektroskopische Verhalten des isolierten Chromophors **38** die Aggregationstendenzen, welche typisch für Xanthen-basierte Moleküle ist. Xanthylium-Ionen neigen trotz ihrer kationischen Natur aufgrund des planaren Molekülgerüsts zur Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen (Daré-Doyen *et al.* 2003). In der Literatur sind unterschiedliche Dimergeometrien beschrieben, darunter parallele Stapelanordnungen (H-Typ), *head-to-tail*-Anordnungen (J-Typ) sowie verschiedene intermediäre Strukturen (Kemnitz 1991; Valdes-Aguilera 1989). Im Einklang mit den Befunden von Daré-Doyen *et al.* (2003) für Pyronin Y und Rhodamin G6 zeigen die ^1H -NMR-Spektren des Chromophors **38** in Abhängigkeit von der Konzentration variierende chemische Verschiebungen der Protonen *H6* und *H10* im Xanthengerüst. Dieses Phänomen wird durch lösungsmittelabhängige ^1H -NMR-Verschiebungen gleicher Konzentrationen des Chromophors **38** bestätigt (Abbildung 40). Veränderungen in Polarität und Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeit beeinflussen die chemische Umgebung und stützen die Annahme einer Modulation des Dimer-Monomer-Gleichgewichts. Hier erfahren insbesondere die beiden Protonen des zentralen Xanthyliumgerüsts *H6* und *H10* die größte Beeinflussung, da dieses System maßgeblich an der Dimerisierung der Moleküle beteiligt ist.

Der Einfluss einer Dimerisierung wurde ebenfalls bei geringeren Chromophorkonzentrationen im Kalibrierbereich des untersuchten Assays nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (Arbeitsvorschrift 8.5.1) getestet. Hier wurden die Absorptionsspektren aller Kalibrierpunkte aufgenommen (Anhang,

Abbildung A7). Da die Maxima alle bei der gleichen Wellenlänge von 525 nm liegen und die Spektren dasselbe Profil aufweisen, wurde geschlussfolgert, dass in diesem Konzentrationsbereich die Dimerisierung keinen erheblichen Einfluss nimmt.

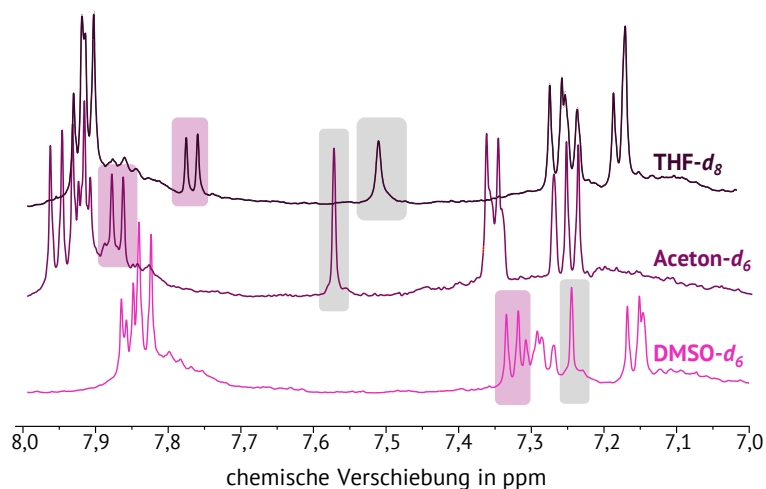


Abbildung 40: ^1H -Kernspinresonanzspektren (500 MHz) des isolierten Chromophors (38), gebildet in der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol, gelöst in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln in gleicher Konzentration. Die violett hinterlegten Signale kennzeichnen das Dublett des H_{10} , die hellgrau hinterlegten Singulets stehen für H_6 (DMSO: Dimethylsulfoxid, THF: Tetrahydrofuran). Alle Spektren wurden auf das entsprechende Lösungsmittelsignal referenziert. Die Nummerierung der Atome erfolgt gemäß Abbildung 38.

4.2.2.3 Ausbildung chromophorer Strukturen aus der Triarylmethan-Farbstoffvorstufe

Die in Kapitel 4.2.1.2 postulierte Reaktion, welche die Bildung des Xanthylium-Chromophors über eine Triarylmethan-Zwischenstufe vorsieht, sollte im Folgenden experimentell überprüft werden. Hierzu wurde ein zu Verbindung **36** analoges Triarylmethan durch Erhitzen von 4CBA und 3PP in Eisessig dargestellt. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte die gewünschte Verbindung **39** isoliert und mittels NMR- sowie MS-Analysen charakterisiert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 41) sowie die im Anhang in Abbildung A8 aufgeführten 2D-NMR-Spektren wurden analog zur Strukturaufklärung von Verbindung **36** ausgewertet. Sämtliche Resonanzen ließen sich über homo- und heteronukleare Kopplungen den jeweiligen Strukturelementen eindeutig zuordnen. Das bei 6,27 ppm beobachtete Singulett kann dabei dem Proton am tertiären Kohlenstoffatom im Molekülzentrum ($\delta_{\text{C}11} = 44,3$ ppm) zugewiesen werden. Die resultierende Verbindung weist eine symmetrische Molekülstruktur auf, was sowohl durch die relativen Integrale bezogen auf ein Proton des Signals 11, als auch durch die experimentell ermittelte molare Masse von 472 g/mol bestätigt wird.

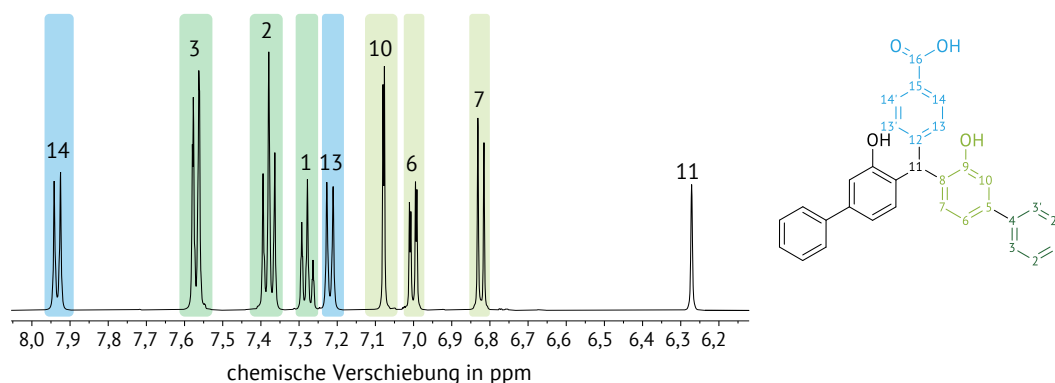


Abbildung 41: ^1H -Kernspinresonanzspektrum (500 MHz) des synthetisierten Triarylmethans (**39**) nach der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol, aufgenommen in Aceton- d_6 , und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta\text{H} = 2,09$ ppm). Die zugehörigen chemischen Verschiebungen sind in Tabelle A4 im Anhang gelistet.

Die isolierte Verbindung wurde anschließend in konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, wobei die Lösung eine ausgeprägte Magentafärbung ausbildete. Die hierbei entstandenen Reaktionsprodukte wurden anschließend abgetrennt und sowohl chromatographisch als auch mittels NMR-Spektroskopie vergleichend zur charakterisierten Xanthenstruktur **38** analysiert. Aufgrund der geringen erhaltenen Probenmenge nach der Säurebehandlung konnte lediglich ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen werden. Abbildung 42 A zeigt die Chromatogramme von Verbindung **39** vor und nach der Behandlung mit Schwefelsäure. Hier lässt sich eine vollständige Umsetzung der Triarylmethan-Vorstufe feststellen, wobei die detektierten Produkte im Vergleich zur Ausgangsverbindung zu deutlich früheren RT eluieren. Der erste detektierte Peak des säurebehandelten Isolats kann über das bekannte m/z 515 von Verbindung **38a** zugeordnet werden, welche während der Chromatographie im wasserreichen Eluenten aus Struktur **38** gebildet wird. Die nachfolgenden, weniger klar aufgelösten Signale sind den mono- bzw. disulfonylierten Derivaten der Verbindungen **38** und **39** zuzuschreiben. Diese sulfonylierten Strukturen werden folglich durch den Zusatz „s“ innerhalb einer Nummerierung zusammengefasst. Bemerkenswerterweise eluieren die sulfonylierten Ether-Kation-Strukturen trotz der durch die Sulfonylierung zu erwartenden höheren Polaritäten bei späteren RT als das nicht-sulfonylierte Analogon mit dem m/z von 515. Dieses auf den ersten Blick paradoxe Verhalten legt nahe, dass strukturelle Veränderungen, insbesondere eine veränderte Planarität sowie eine modifizierte intramolekulare Ladungsverteilung, die Wechselwirkungen mit der stationären Phase bzw. der Analytmoleküle untereinander, maßgeblich beeinflussen und dadurch die Elution stärker bestimmen als der reine Polaritätszuwachs.

Der Vergleich der ^1H -NMR-Daten des säurebehandelten Vorläufers **39** (ohne Fraktionierung) mit jenen der isolierten Verbindung **38** (Abbildung 42 B) bestätigt, dass Verbindung **39** in die bereits zuvor identifizierte Xanthylium-Ion-Struktur **38** überführt wurde. Zusätzliche Resonanzen im Spektrum des säurebehandelten Triarylmethans lassen sich verschiedenen sulfonylierten Spezies zuordnen. Die für das H_{10} -Singulett und das H_6 -Dublett beobachteten chemischen Verschiebungen sind hingegen auf Konzentrationsunterschiede der Proben und ein damit verändertes Aggregationsverhalten (vgl. Abbildung 40) zurückzuführen.

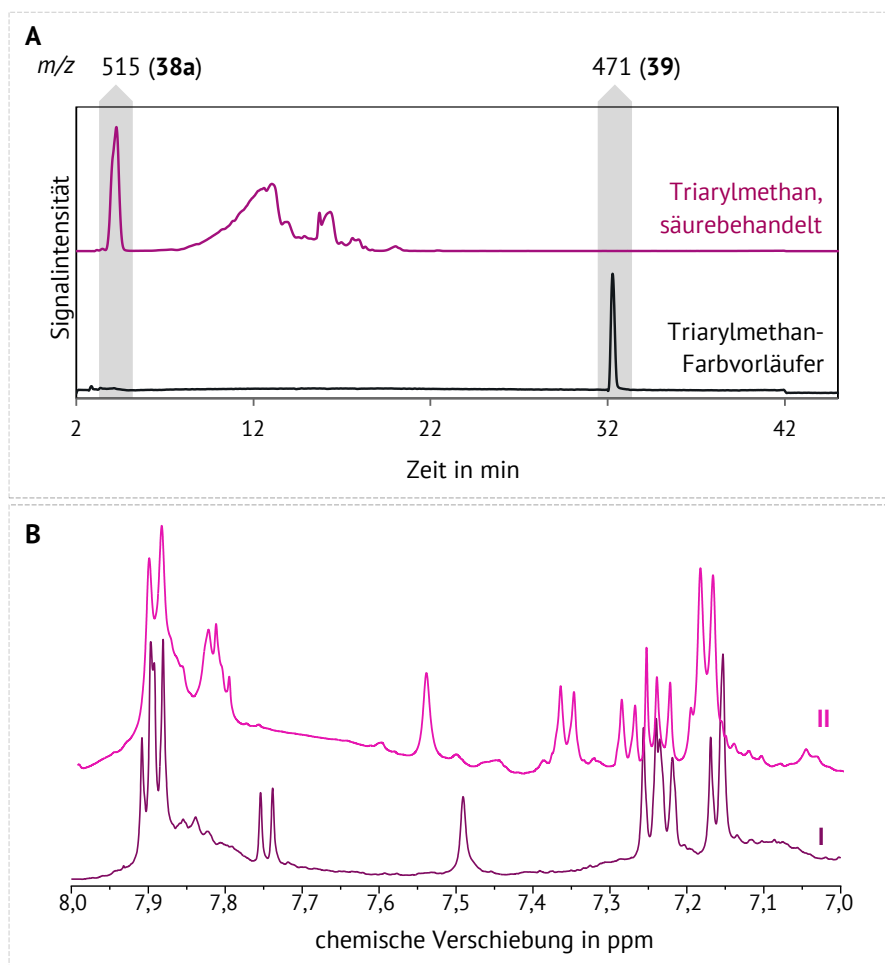


Abbildung 42: Vergleich der Chromatogramme (detektiert bei 265 nm) der isolierten Triarylmethan-Struktur (39), entstanden aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol vor und nach Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure sowie die relevanten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z). Demzufolge wurde 39 in 38a überführt (A). ^1H -Kernspinresonanzspektren (500 MHz) des charakterisierten Chromophors 38, entstanden aus der Reaktion von 4CBA mit 3PP (B I) im Vergleich zur säurebehandelten Triarylmethan-Vorstufe 39 (B II). Die Spektren wurden in Tetrahydrofuran- d_8 aufgenommen und auf das Lösungsmittelsignal referenziert ($\delta_{\text{H/C}} = 3,58/67,57$ ppm).

4.2.3 Identifizierung xanthenbasierter Strukturen im Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay

Im vorhergehenden Kapitel konnte ausgehend vom stabileren Modellsystem 4CBA und 3PP eine chromophore Struktur isoliert und das aufgrund quantenchemischer Berechnungen postulierte Xanthylium-Motiv bestätigt werden. Die sehr gute Übereinstimmung zwischen den für das Chromophor aus 5FFA und 3PP (37) berechneten Absorptionswerten mit dem experimentell aufgenommenen Absorptionsspektrum aus dem Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay (vgl. Abbildung 29 und Abbildung 36) legt nahe, dass es sich hierbei ebenfalls um das entsprechende Ether-Kation-Motiv **9-(5-Carboxyfuran-2-yl)-3,6-diphenyl-9H-xanthen-9-ylum-Ion (37)** handelt.

Auf Grundlage der für das säurebehandelte Derivat 39 ermittelten m/z wurden entsprechende Analysen für Verbindung 37, deren mit variierender Anzahl an Sulfonsäuren substituierten Analoga **s-37** sowie den Vorläufer **36/s-36** durchgeführt. Hierfür erfolgte ein gezieltes Screening der jeweiligen m/z in spezifischen SIM-Spuren (vgl. Arbeitsvorschrift 8.6.1, Tabelle 33) an entsalzten Proben.

Dabei konnten neben den Triarylmethanstrukturen auch mono-, di- und trisulfonierte Xanthylium-Strukturen (**s-37**) nachgewiesen werden. Ihre Elutionsreihenfolge erwies sich, wie bereits für das 4CBA-Analogon beobachtet, gegenüber den Triarylmethan-Vorstufen umgekehrt als erwartet. Zudem zeigte sich eine partielle Signalüberlappung zwischen Triarylmethan- und Xanthen-Spezies. Insgesamt traten die Xanthe in deutlich geringerer relativer Intensität auf als die entsprechenden Triarylmethan-Vorläufer (Abbildung 43). Dies lässt sich einerseits durch Verluste infolge der Wasserzugabe vor dem Entsalzungsschritt erklären. Andererseits ist bekannt, dass vergleichbare Xanthenfarbstoffe außergewöhnlich hohe molare Extinktionskoeffizienten besitzen, sodass bereits geringste Mengen eine intensive Färbung hervorrufen (Sjöback *et al.* 1995). Strukturen mit der für Verbindung **38a** entsprechenden Masse wurden nicht gezielt erfasst; ein partieller Farbverlust war jedoch sichtbar, weshalb von einer Wassersubstitution während des Entsalzungsprozesses auszugehen ist.

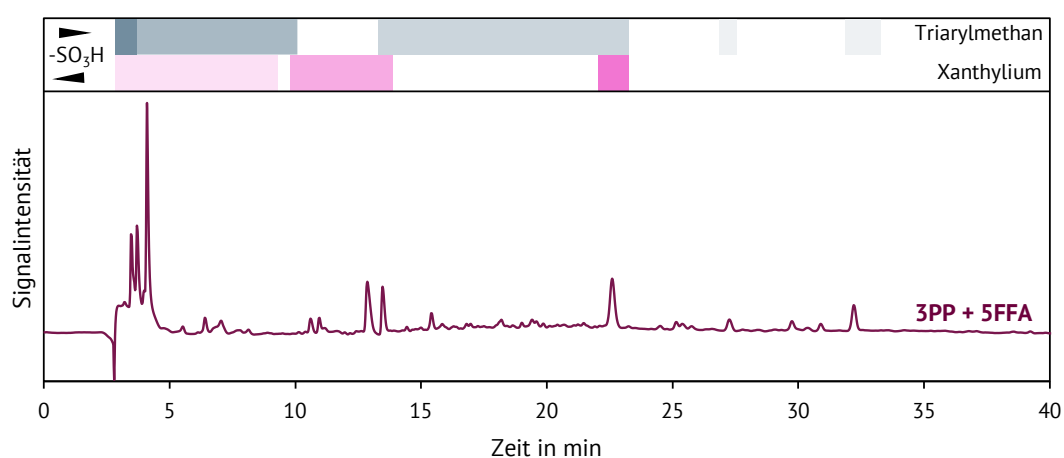


Abbildung 43: Chromatogramm der aromatischen Reaktionsprodukte (detektiert bei 265 nm) aus der Reaktion von 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) und 3-Phenylphenol (3PP) mit farbiger Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Triarylmethan-Farbvorstufen sowie zu den identifizierten Xanthen-Strukturen. Hierbei eluieren höher sulfonierte Triarylmethane früher, wohingegen Xanthyliumionen mit zunehmender Anzahl an Sulfonsäuresubstituenten später eluieren.

Abbildung 44 zeigt den aus den vorliegenden Ergebnissen abgeleiteten Reaktionsmechanismus. Demnach kondensieren zwei 3PP-Moleküle unter Säurekatalyse mit einem Molekül 5FFA im Rahmen einer elektrophilen aromatischen Substitution, bei der die Protonierung der Aldehydgruppe ein reaktives Carbeniumion als Zwischenstufe erzeugt. Die bevorzugte Substitution in *ortho*-Position relativ zur Hydroxylgruppe des 3PPs ermöglicht anschließend die intramolekulare Etherbildung, die durch die stark dehydratisierenden Eigenschaften konzentrierter Schwefelsäure zusätzlich gefördert wird (Feigl 1966). Parallel zur Zyklisierung verläuft vermutlich eine Oxidation, was sich in der sofortigen Farbentwicklung beim Zusatz des phenolischen Reagenzes widerspiegelt. Auch wenn konzentrierte Schwefelsäure in der Literatur nur selten als Oxidationsmittel beschrieben wird und dies zumeist im Zusammenhang mit metallischen Systemen erfolgt (Holleman *et al.* 2017), kann ihre Beteiligung hier nicht ausgeschlossen werden. Eine ähnliche mechanistische Interpretation findet sich in Ausführungen zum Chromotropsäure-Test auf Formaldehyd, bei dem Georghiou und Ho (1989) die Oxidation eines Xanthen-Intermediats durch Schwefelsäure unter

gleichzeitiger Reduktion zu schwefliger Säure postulierten, wenn auch ohne direkten experimentellen Nachweis (Fagnani *et al.* 2003; Georghiou und Ho 1989).

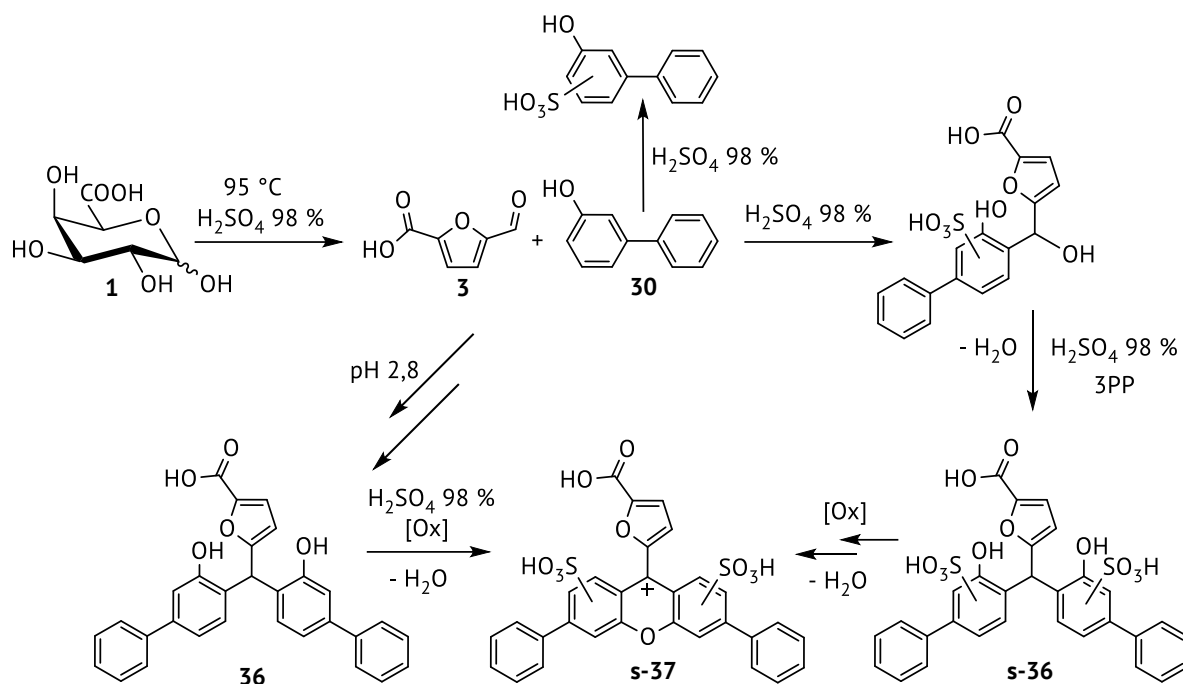


Abbildung 44: Postulierter Reaktionsmechanismus der Chromophorbildung innerhalb der photometrischen Urnsäureanalyse nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973). Nach Abbau der Urnsäure (hier Galacturonsäure, 1) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (3) kondensiert diese in konzentrierter Schwefelsäure mit zwei Molekülen 3-Phenylphenol (30, 3PP) zu einem Triarylmethan (36), welches sulfoniert (s) sein kann. Dieses reagiert unter Bildung eines intramolekularen Ethers sowie durch Oxidation zum finalen, partiell sulfonierten Chromophor (s-37). Durch die Substitution des 3PPs mit einer variierenden Anzahl an Sulfonsäuregruppen entstehen eine Vielzahl chromophorer Strukturen. Struktur 36 kann zudem auch in verdünnter Säure gebildet werden, eine Zyklisierung und Oxidation findet jedoch erst in der konzentrierten Schwefelsäure statt.

Der Einfluss von gelöstem Sauerstoff konnte im Einklang mit den für das Chromotrophsäure-Assay gemachten Beobachtungen durch Fagnani *et al.* (2003) ausgeschlossen werden, da unter Sättigung der Schwefelsäure mit N_2 identische Absorptionen erhalten wurden. Ebenso erscheint die Beteiligung weiterer oxidativ wirksamer Spezies unwahrscheinlich, da die isolierten Triarylmethan-Vorläufer bereits beim Zusatz von Säure unmittelbar eine Farbentwicklung zeigten. Insgesamt deuten alle Befunde darauf hin, dass die treibende Kraft für Oxidation und Ringschluss in der besonderen Stabilisierung durch die Ausbildung eines planaren, vollständig konjugierten aromatischen Xanthylium-Systems liegt. Darüber hinaus führt die mögliche Mehrfachsubstitution mit Sulfonsäuregruppen an unterschiedlichen Positionen des 3PPs zu einer Vielzahl struktureller Variationen. Berechnungen zufolge (vgl. Kapitel 3.5.2) unterscheiden sich diese Varianten jedoch in ihren Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten nicht signifikant vom unsubstituierten Chromophor und tragen daher gleichermaßen zu der bei 520 nm beobachteten charakteristischen Farbintensität bei (Anhang, Abbildung A9).

4.3 Einfluss von Borat auf die photometrische Analyse des Gesamturonsäuregehalts

4.3.1 Identifizierung des Einflusses von Borat

Borationen werden vielfach in der kolorimetrischen Analyse von US zur Steigerung der Sensitivität eingesetzt (Bitter und Muir 1962; Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973; Filisetti-Cozzi und Carpita 1991; Gregory 1960). Besonders bewährt hat sich hierbei der Einsatz einer schwefelsauren Lösung von Natriumtetraborat. Aufgrund der verwendeten starken Säure ist jedoch, wie bereits in Kapitel 3.4.3.1 dargestellt, davon auszugehen, dass nicht das Tetraborat selbst, sondern vielmehr Borsäure bzw. deren Sulfato-Komplexe die eigentlichen reaktiven Spezies darstellen. Zudem wird keine Änderung des Absorptionsmaximums wahrgenommen, was auf eine vermutlich katalytische Wirkung des Borats hinweist (Yapo 2012).

Im Folgenden wird der Einfluss von Borat auf die verschiedenen Schritte des Assays untersucht. Zu diesem Zweck wurden sowohl die Gesamtreaktion (Kapitel 4.3.1.1) als auch die einzelnen Schritte, einschließlich des Abbaus der US zu 5FFA (Kapitel 4.3.1.2) sowie der Chromophorbildung ausgehend von 5FFA und dem synthetisierten Triarylmethan-Vorläufer (vgl. Kapitel 4.2.1.3, Struktur **36**) (Kapitel 4.3.1.3), separat betrachtet.

4.3.1.1 Einfluss von Borat auf Ebene der Gesamtreaktion

Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt des Borats von der Struktur der jeweiligen US abhängt. Für zur Lactonbildung neigende US wurde hierbei eine deutlich stärkere Empfindlichkeitssteigerung beschrieben (Bitter und Muir 1962; Scott 1979). Ein Maß für die Empfindlichkeit einer photometrischen Analyse stellt die Steigung der unter Annahme des Lambert-Beerschen Gesetzes linearen Kalibriergeraden dar. In Abbildung 45 A sind exemplarisch die Kalibrierungen der in der Natur am häufigsten vorkommenden US, GalA und GlcA, gegenübergestellt. Im von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) vorgeschlagenen Konzentrationsbereich von 10 – 85 mg/L (\cong 0,051 – 0,44 mM) war ein Vergleich mit ManA und GulA nicht möglich, da für diese ohne Boratzusatz keine auswertbaren Kalibrierungen erhalten werden konnten.

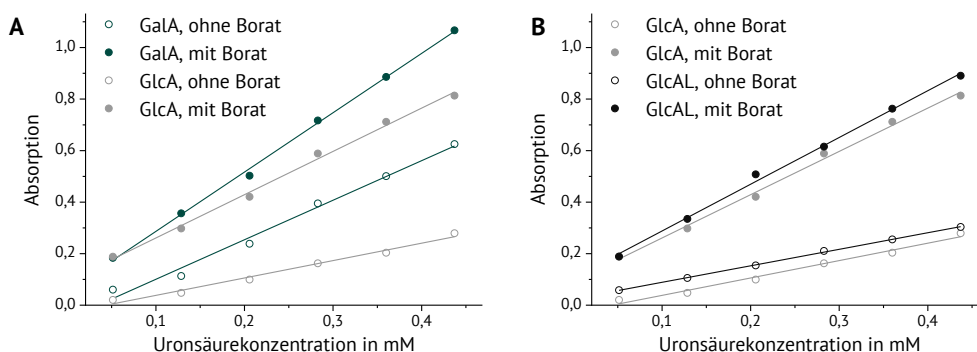


Abbildung 45: Vergleich der photometrisch erstellten Kalibriergeraden von Galacturonsäure (GalA) und Glucuronsäure (GlcA) (A) sowie GlcA und Glucuronsäure-6,3-lacton (GlcAL) (B), durchgeführt nach Arbeitsvorschrift 8.5.1 mit und ohne borathaltiger Schwefelsäure

Der Vergleich der Geradensteigungen in Abbildung 45 erlaubt eine Abschätzung der Effektstärke des Boratzusatzes. Dabei zeigt sich, dass GlcA mit einer Sensitivitätssteigerung von ca. 250 % deutlich stärker beeinflusst wird als GalA mit ca. 70 %. Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur, konnte somit auch für GalA eine signifikante, wenngleich geringere Empfindlichkeitssteigerung nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese Literaturdaten unter abgewandelten Reaktionsbedingungen, insbesondere unter Sulfamat-Zusatz, erzielt wurden (Filisetti-Cozzi und Carpita 1991). Obwohl der Boratzusatz die Empfindlichkeit der GalA- und GlcA-Analysen annähernd angleichen konnte, wurde eine vollständig vergleichbare Empfindlichkeit nicht erreicht.

Die beobachteten Unterschiede stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der stereochemischen Variation am C4 der US: Während GalA kein stabiles 6,3-Lacton ausbilden kann, ist dies bei GlcA möglich. Der Eingriff des Borats in das Lacton-Säure-Gleichgewicht liefert somit eine plausible Erklärung für die Unterschiede in der Stärke des Effekts (Scott 1979). Folglich wurde auch der Einfluss des Boratzusatzes auf den Assay, ausgehend vom GlcA-6,3-Lacton (GlcAL) untersucht (Abbildung 45 B). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Sensitivitätsunterschiede, sodass von einer identischen Gleichgewichtseinstellung zwischen Lacton und Säure auszugehen ist, die unabhängig von der Ausgangsform (GlcAL oder GlcA) erreicht wird. Dieser Aspekt wurde in Abhängigkeit der Säurekonzentration in Kapitel 4.3.2 näher beleuchtet.

Zusätzlich zur Beurteilung der gesteigerten Empfindlichkeit wurde die zeitliche Entwicklung der Absorption bei einer mittleren Kalibrierkonzentration (40 mg/L) für GalA und GlcA im Assay untersucht (Abbildung 46). Zur Bewertung der Signalstabilität wurde der Absorptionsabfall als prozentuale Änderung angegeben, jeweils bezogen auf die anfängliche Absorption nach 5 min sowie die Endabsorption nach 90 min (Tabelle 3).

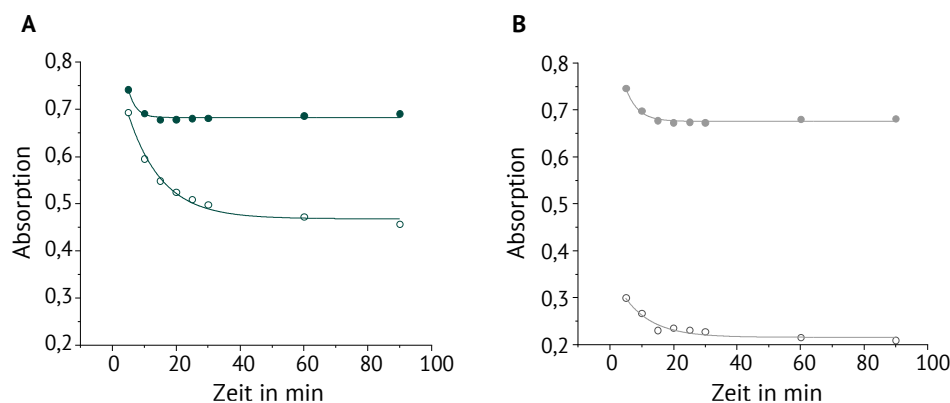


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der Absorption eines Galacturonsäure-Standards (0,26 mM) (A) sowie eines Glucuronsäure-Standards (0,26 mM) (B) mit (●) und ohne (○) Boratzusatz im kolorimetrischen Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973)

Tabelle 3: Prozentuale Absorptionsdifferenz (ΔA) zwischen 5 min und 90 min der in Abbildung 46, A gezeigten zeitlichen Absorptionsverläufe der Galacturonsäure (GalA) und Glucuronsäure (GlcA), analysiert mit borathaltiger (12,5 mM) sowie boratfreier konzentrierter Schwefelsäure

	ΔA mit Borat in %	ΔA ohne Borat in %
GalA	6,9	34,1
GlcA	10,9	30,3

Neben der Sensitivitätssteigerung wird in der Literatur auch ein Einfluss von Borat auf die Farbstabilität des gebildeten Chromophors beschrieben (Yapo 2012). Wie bereits in Abbildung 29 gezeigt, weist das im Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) gebildete Chromophor eine über 90 min anhaltende Farbstabilität auf, wobei die Absorption nach etwa 20 min einen konstanten Wert erreicht. Die anfänglichen Absorptionen ausgehend von GalA (Abbildung 46 A), gemessen nach 5 min, liegen, unabhängig vom Boratzusatz, bei vergleichbaren Werten. Dennoch fällt die Absorption ohne Borat deutlich stärker ab und erreicht erst nach 40 min einen konstanten Wert. Das Absorptionsprofil der GlcA (Abbildung 46 B) unterscheidet sich deutlich von demjenigen der GalA. In diesem Beispiel weichen die anfänglichen Absorptionswerte der untersuchten Proben bereits erheblich voneinander ab. Die in Gegenwart von Borat analysierte Probe weist nach 5 min eine deutlich höhere Absorption auf als die Probe gleicher GlcA-Konzentration, die mit boratfreier konzentrierter Schwefelsäure umgesetzt wurde. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass der Effekt des Borats abhängig von der eingesetzten US ist. Berücksichtigt man hingegen den prozentualen Absorptionsabfall (ΔA , Tabelle 3), so zeigen sowohl GalA als auch GlcA ein ähnliches Verhalten. Die Zugabe von Borat führt zu einem deutlich geringeren Absorptionsverlust von etwa 7 – 10 %, wohingegen in Abwesenheit von Borat nach 90 min eine Reduktion der Absorption um rund 30 % zu verzeichnen ist.

Diese Daten verdeutlichen, dass Borat im Zusammenspiel mehrerer, von der jeweiligen US abhängiger Effekte wirkt, deren relative Ausprägung variiert und somit in unterschiedlichem Maße zur Steigerung der Analysensensitivität beiträgt. Um diese Effekte voneinander abzugrenzen, wurde der Einfluss des Borats anschließend getrennt für die zwei zentralen Prozessschritte untersucht: die Umsetzung der US zu 5FFA in konzentrierter Schwefelsäure (Kapitel 4.3.1.2) sowie die Bildung des Xanthylium-Chromophors aus 5FFA und 3PP bzw. aus dem entsprechenden Triarylmethan-Vorläufer (**36**) (Kapitel 4.3.1.3).

4.3.1.2 Einfluss von Borat auf den Abbau der Uronsäure

Auf Basis der in Kapitel 4.3.1.1 präsentierten Ergebnisse, liegt die Vermutung nahe, dass eine durch Boration verstärkte Bildung von 5FFA einen maßgeblichen Beitrag zur beobachteten Sensitivitätssteigerung leistet. Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte eine chromatographische Quantifizierung der 5FFA-Gehalte, die infolge des Säureabbaus verschiedener US in Abhängigkeit vom Boratzusatz erhalten wurden (Abbildung 47). Dabei fanden auch ManA und GulA Berücksichtigung.

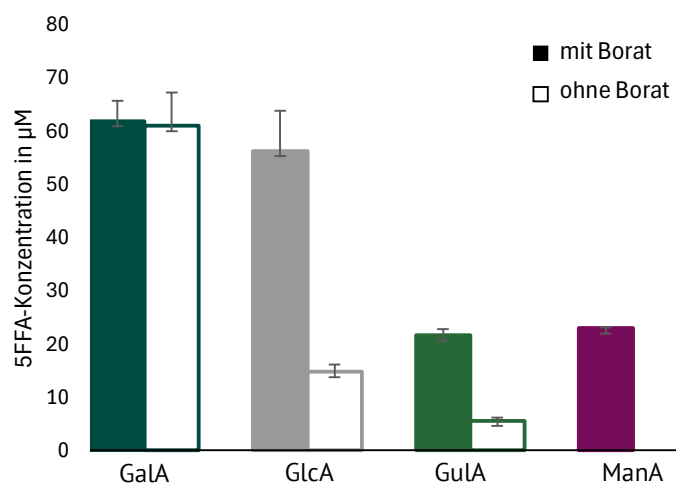


Abbildung 47: 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA)-Konzentrationen, die aus dem Abbau verschiedener Uronsäuren in borathaltiger und boratfreier konzentrierter Schwefelsäure resultierten (GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure, GulA: Guronsäure, ManA: Mannuronsäure)

Für GlcA und GulA führt die Zugabe von Borat zu einer um etwa 280 % gesteigerten 5FFA-Ausbeute. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieser Effekt bei ManA, die erst in Anwesenheit von Borat in nachweisbarem Umfang zu 5FFA abgebaut wird. Diese Befunde verdeutlichen, dass Borat die Bildung von 5FFA bei allen lactonisierbaren US signifikant fördert. Inwieweit hier ein Eingriff des Borats in das Lacton-Säure-Gleichgewicht eine Rolle spielt, wird in Kapitel 4.3.2 näher erörtert.

Im Gegensatz dazu lässt sich für GalA keine erhöhte 5FFA-Bildung feststellen. Die in Abbildung 45 A dokumentierte Sensitivitätssteigerung von 70 % durch einen Boratzusatz erscheint unter diesem Gesichtspunkt nicht durch eine verstärkte 5FFA-Generierung erklärbar. Vielmehr deutet dieses Ergebnis auf einen alternativen, von der 5FFA-Bildung unabhängigen Wirkmechanismus hin, welcher im folgenden Kapitel untersucht wird.

4.3.1.3 Einfluss von Borat auf die Bildung des Chromophors

Nach dem Abbau der US zu 5FFA reagiert dieses mit 3PP über die Bildung einer Triarylmethan-Zwischenstufe zur Ausbildung des Xanthylium-Chromophors (vgl. Kapitel 4.2). Um den Einfluss von Borat während dieses Reaktionsschritts zu untersuchen, wurde der Assay ausgehend von 5FFA durchgeführt. Zur Bewertung der Sensitivitätssteigerung wurden Kalibrierkurven für 5FFA sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Borat, analog zum Vorgehen in Abbildung 45, aufgenommen (Abbildung 48). Diese Kalibrierungen weisen deutlich höhere Steigungen auf als diejenigen, die ausgehend von den US nach Erhitzung erhalten wurden, was auf einen unvollständigen Abbau der US zu 5FFA hinweist. Gleichzeitig zeigte sich auch in diesem Ansatz eine signifikante Empfindlichkeitssteigerung durch Borat. Dies bestätigt, dass der empfindlichkeitssteigernde Effekt nicht ausschließlich auf eine verstärkte 5FFA-Bildung zurückzuführen ist, sondern zudem einen Einfluss auf die Bildung des Chromophors nimmt.

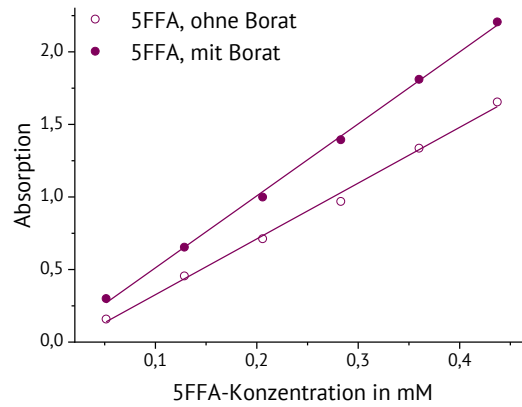


Abbildung 48: Vergleich der photometrisch erstellten Kalibriergeraden von 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA), durchgeführt nach Arbeitsvorschrift 8.5.1, mit und ohne borathaltiger Schwefelsäure.

Zum besseren Verständnis dieses weiteren Effekts wurden die zeitlichen Absorptionsprofile sowohl aus der Reaktion von 5FFA mit 3PP als auch aus der Umsetzung des isolierten Triarylmethan-Vorläufers (**36**) erfasst (Abbildung 49). Die prozentuale Abnahme der Absorption ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Aufgrund der schnellen Farbentwicklung erfolgte die erste Messung beim Vorläufer bereits nach 1 min.

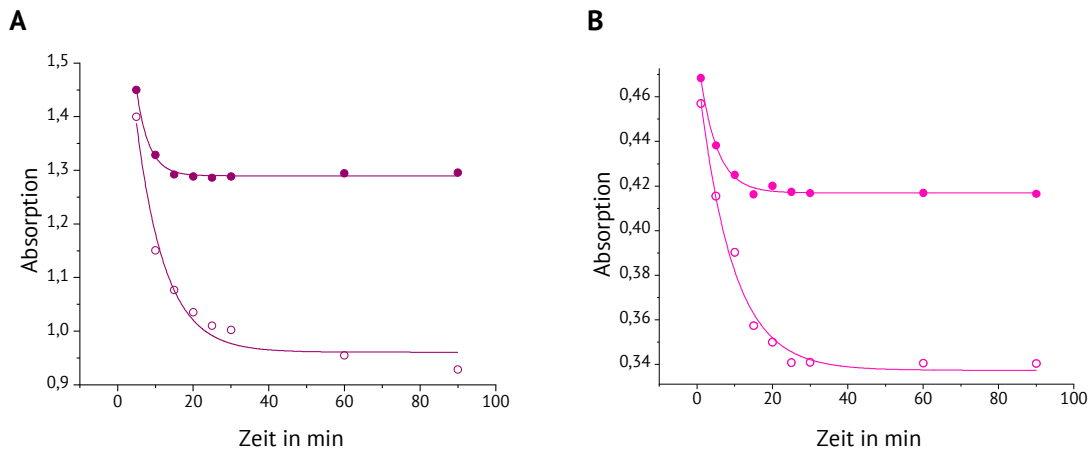


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der Absorption eines 5-Formyl-2-furancarbonsäure-Standards (0,26 mM) (A) sowie der synthetisierten Triarylmethan-Vorstufe (**36**) (Konzentration unbekannt) (B) mit (●) und ohne (○) Boratzusatz im kolorimetrischen Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973).

Tabelle 4: Prozentuale Absorptionsdifferenz (ΔA) zwischen 5 bzw. 1 min und 90 min der in Abbildung 49 gezeigten zeitlichen Absorptionsverläufe der 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) und des Triarylmethan-Vorläufers (**36**), analysiert mit borathaltiger (12,5 mM) sowie boratfreier konzentrierter Schwefelsäure

	ΔA mit Borat in %	ΔA ohne Borat in %
5FFA	10,6	27,6
Triarylmethan, 36	11,1	25,5

Die in Abbildung 49 dargestellten Absorptionsprofile verdeutlichen, dass Borat auch den Reaktionsschritt der Chromophorbildung maßgeblich beeinflusst. Die Ähnlichkeit zum Absorptionsprofil einer GalA-Probe aus Abbildung 46 A lässt vermuten, dass dieser Borat-Effekt vor allem für die in Abbildung 45 A beobachtete Sensitivitätssteigerung der GalA-Kalibriergeraden verantwortlich ist.

Die anfänglichen Absorptionswerte in den Abbildung 49 A und B liegen unabhängig von der Boratzugabe auf jeweils vergleichbarem Niveau. Im Verlauf der Messungen zeigt sich jedoch, dass die Absorptionen in Abwesenheit von Borat gleichermaßen stärker abnehmen und schließlich etwa 25 – 27 % niedriger ausfallen als bei Zugabe von Borat (Tabelle 4). Dies gilt sowohl für die Reaktion ausgehend von 5FFA als auch vom Vorläufer. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Borat insbesondere die Stabilisierung des Chromophors fördert und somit zu höheren Endkonzentrationen zum Messzeitpunkt führt, während die initiale Chromophorbildung weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Somit konnte neben dem in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen verstärkten Abbau der US ein weiterer Effekt von Borat identifiziert werden: die Steigerung der finalen Chromophorkonzentration nach der verwendeten Reaktionszeit von 20 min. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Stabilisierung werden in Abschnitt 4.3.3 eingehend erörtert.

4.3.2 Beeinflussung der Lactonisierung von Uronsäuren

Lactonisierbare US liegen in schwefelsaurer Umgebung in einem Gleichgewicht mit ihrer Lactonform vor (vgl. Abbildung 2). Inwieweit ein Boratzusatz einen Einfluss auf dieses Gleichgewicht nimmt, soll nachfolgend überprüft und diskutiert werden. Eine etwaige Komplexbildung von Borat bzw. Borsäure mit Kohlenhydraten sowie eine Ausbildung von Borsäureestern werden in diesem Zuge überprüft.

Die als Lewissäure fungierende Borsäure stellt aufgrund ihres leeren p-Orbitals ein starkes Elektrophil dar und geht bevorzugt Reaktionen mit nukleophilen Gruppen wie Diolen, α -Hydroxycarbonsäuren und Polyolen ein (Rietjens und Steenbergen 2005). Dabei entstehen Boratmono- und -diester, deren Natur maßgeblich vom pH-Wert bestimmt ist (Abbildung 50). Während für Diole eine verstärkte Komplexbildung im basischen Bereich durch Steigerung der Nukleophilie des deprotonierten Alkohols beschrieben wird, reagieren Hydroxycarbonsäuren bereits unter moderat sauren Bedingungen effektiv mit Borsäure unter Ausbildung zyklischer Strukturen (Bishop *et al.* 2004; Masada *et al.* 2021; van Duin *et al.* 1984). US wie die GlcA weisen sowohl Diolgruppen im Zuckergerüst als auch eine Carboxyfunktion auf, somit sind beide Motive zur Komplexbildung befähigt. In der Literatur wird überwiegend eine Boratesterbildung über die Diolgruppen postuliert (Takeuchi *et al.* 1997). Es existieren jedoch auch Hinweise auf eine Reaktivität der Carboxygruppe gegenüber Borsäure, insbesondere im neutralen Milieu (Gray und Houston 2002; Köse *et al.* 2010). Im stark sauren pH-Bereich kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Komplexbildung. Wie Pizer (2017) als auch Pappin *et al.* (2012) zeigen konnten, ist diese auf die Protonierung der Carboxygruppen zurückzuführen, wodurch die initiale Bildung von Boratmonoestern blockiert wird. Zugleich nimmt die Nukleophilie der Hydroxygruppen, im Vergleich zum alkalischen Milieu, ab. Für US, wie GlcA bedeutet dies, dass unterhalb eines pH-Werts von etwa drei keine nennenswerte Interaktion mehr über die Carboxyfunktion möglich ist (Badin *et al.* 1953).

4.3 Einfluss von Borat auf die photometrische Analyse des Gesamturonsäuregehalts

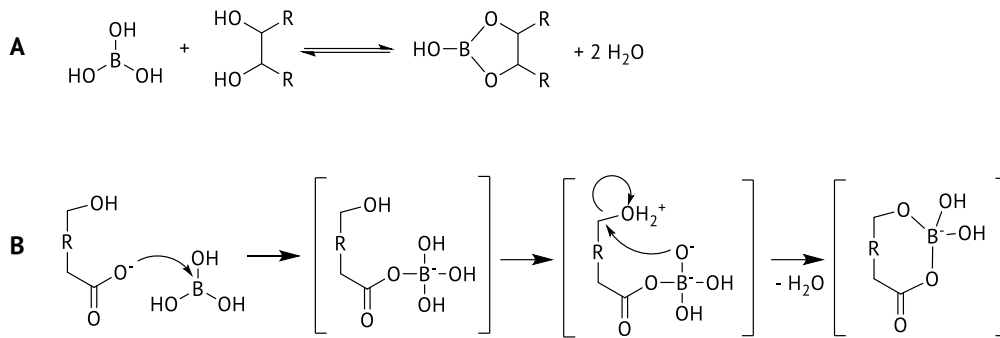


Abbildung 50: Ausbildung von Boratmono- und diestern im neutralen bis leicht sauren pH-Bereich mit Bor-säure und einem Diol (A) sowie einer α -Hydroxycarbonsäuren (B). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Pappin *et al.* (2012) sowie Köse *et al.* (2010) erstellt.

Das Gleichgewicht zwischen Lacton und freier Carboxygruppe in Abhängigkeit von Borat wurde am Beispiel der GlcA sowie des GlcAL mittels verschiedener NMR-Experimente untersucht. Abbildung 51 zeigt die ^1H -NMR-Spektren dieser beiden Spezies. Hierbei ist zu erkennen, dass die Lactonsig-nale im Vergleich zur Säure eine Tieffeldverschiebung erfahren und somit in einem Lacton/Säure-Gemisch gut unterscheidbar sind.

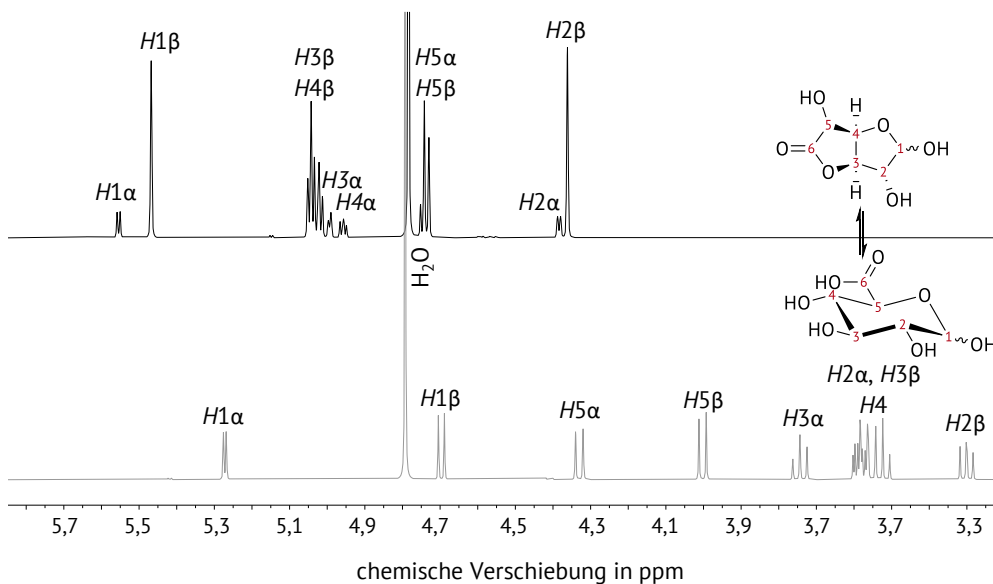


Abbildung 51: ^1H -Kernspinresonanzspektren (500 MHz) des Glucurono-6,3-lactons (oben) sowie der Glucuronsäure (unten), gemessen in Deuteriumoxid und referenziert auf das Signal von Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm)

Um möglichst identische Bedingungen der photometrischen Analyse im NMR-Maßstab zu simulieren, wurden verschiedene Lösungsmittelsysteme in Betracht gezogen. Eine zum Assay identische Umgebung stellt die Analyse in konzentrierter, deuterierter Schwefelsäure dar. Aufgrund messtechnischer Einschränkungen, sowie dem in dem Medium zügig stattfindenden Abbau der Zucker, wurde diese Möglichkeit verworfen. Die alternative Anwendung polarer aprotischer Lösungsmittel, wie deuteriertes Dimethylsulfoxid ($\text{DMSO}-d_6$) mit Zugabe katalytischer Säuremengen, zeigte sich aufgrund der schlechten Löslichkeit von Borat ebenfalls als ungeeignet. Aus diesem Grund wurde wässrige deuterierte Schwefelsäure als Lösungsmittel ausgewählt, um den Einfluss von Borat auf

die Lactonisierung zu untersuchen. Abbildung 52 zeigt die ^1H -NMR-Spektren der GlcA in unterschiedlich konzentrierter Säure und somit die pH-Abhängigkeit des GlcAL:GlcA-Verhältnisses.

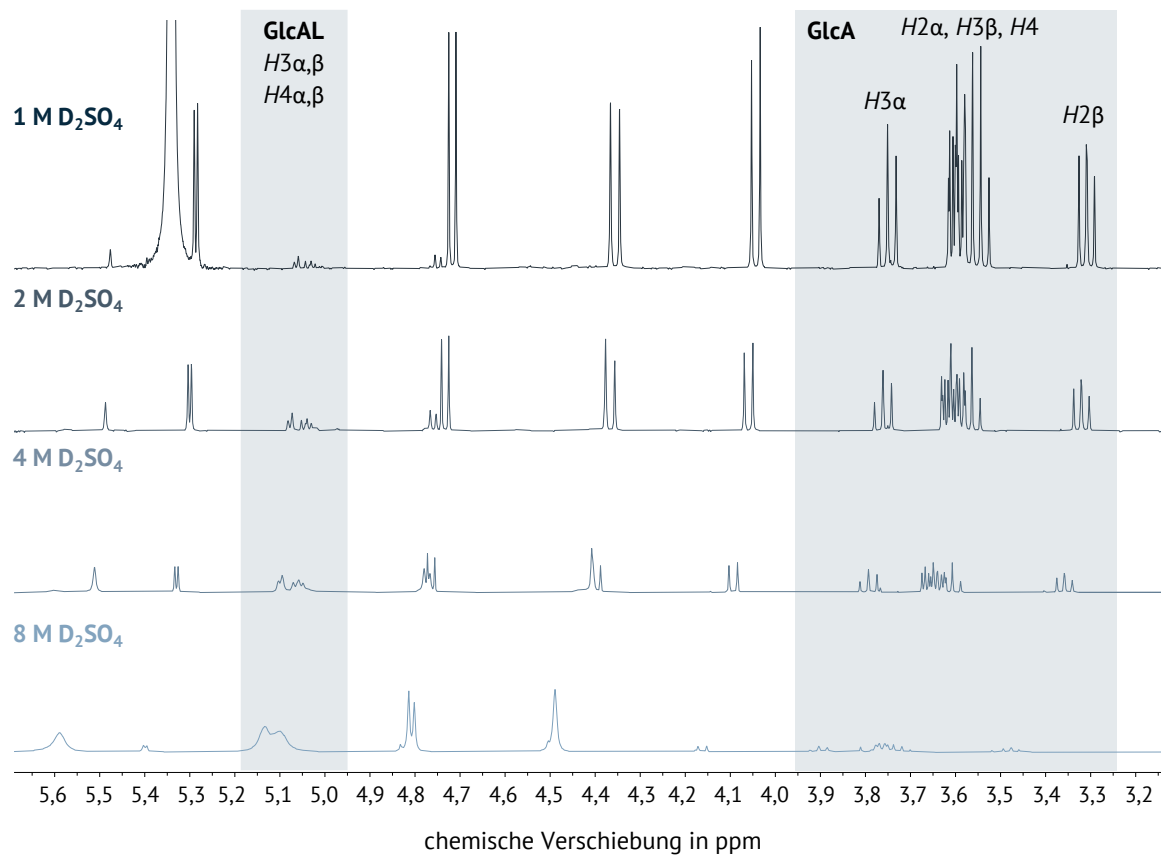


Abbildung 52: ^1H -Kernspinresonanzspektren (500 MHz) der Glucuronsäure (GlcA) unter Variation der Schwefelsäurekonzentration zur Beurteilung des Glucurono-6,3-lacton (GlcAL):GlcA-Verhältnisses. Zur Integration verwendete Signale wurden grau hinterlegt. Alle Spektren wurden auf die chemische Verschiebung des 2,2,3,3- d_4 -(Trimethylsilyl)propionsäure-Signals ($\delta_{\text{H}} = 0$ ppm) referenziert.

Mit zunehmender Säurekonzentration erfahren die Signale im Spektrum eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tieffeldverschiebung. Dies lässt sich auf einen entschirmenden Effekt der in der Lösung enthaltenen Sulfationen zurückführen, welcher durch Shoolery und Alder (1955) beschrieben wurde. Zudem ist eine Signalverbreiterung mit steigender Säurekonzentration erkennbar, welche auf eine kürzere T_2 -Zeit zurückgeführt werden kann. Zur Quantitativen Analyse wurde hier ein höherer Delay (35 s) gemäß Tabelle 24 gewählt. Durch das Flächenverhältnis ausgewählter Signale des Lactons sowie der Säure kann das GlcAL:GlcA-Verhältnis bestimmt werden. Hierzu wurden die charakteristischen Signale des Lactons von H_3 ($\delta_{\text{H}_{3,\alpha}} = 4,99$ ppm; $\delta_{\text{H}_{3,\beta}} = 5,04$ ppm) und H_4 ($\delta_{\text{H}_{4,\alpha}} = 4,96$ ppm; $\delta_{\text{H}_{4,\beta}} = 5,02$ ppm) sowie der Säure von $\text{H}_2 - 4$ ($\delta_{\text{H}_{2,\alpha}} = 3,59$ ppm; $\delta_{\text{H}_{2,\beta}} = 3,30$ ppm; $\delta_{\text{H}_{3,\alpha}} = 3,74$ ppm; $\delta_{\text{H}_{3,\beta}} = 3,55$ ppm; $\delta_{\text{H}_4} = 3,55$ ppm) ausgewählt und folgendermaßen verrechnet:

$$\text{GlcAL:GlcA} = \frac{3 \cdot A_{\text{GlcAL}}(\text{H}_3 + \text{H}_4)}{2 \cdot A_{\text{GlcA}}(\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4)} \quad \text{lactonisierte US in \%} = \frac{\text{GlcAL:GlcA}}{\text{GlcAL:GlcA} + 1} * 100$$

Dabei beschreibt A_{GlcAL} die Summe der Fläche von Proton 3 und 4 des Lactonsignals und A_{GlcA} die entsprechende Flächensumme aus Proton 2 – 4 der Säure. Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt

werden, dass das Gleichgewicht mit zunehmender Säurekonzentration hin zur Lactonform verschoben wird. So liegt in der 1 M Säure 12,2 % der GlcA als Lacton vor, in 2 M Säure steigt der Lactonanteil auf 22,5 % bis hin zur 8 M Säure mit einem Lactonanteil von 75 %. Hieraus lässt sich schließen, dass im Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) die Lactonform der GlcA in konzentrierter Säure dominiert.

Die Interaktion mit Borat wurde in gleicher Weise untersucht. Hierzu wurde Borat in einem Verhältnis von 1:1 zur GlcA sowohl in Wasser als auch bei einer Säurekonzentration von 8 M zugesetzt. Zur Einstellung des Gleichgewichts bzw. Forcierung einer möglichen Reaktion wurden die Proben analog zum Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay erhitzt. Hierbei ist zu beachten, dass im Gegensatz zur konzentrierten Schwefelsäure nicht ausschließlich von Borsäure als reaktiver Spezies ausgegangen werden kann. Diese Tatsache schränkt die Aussagekraft der in Abbildung 53 dargestellten Ergebnisse stark ein.

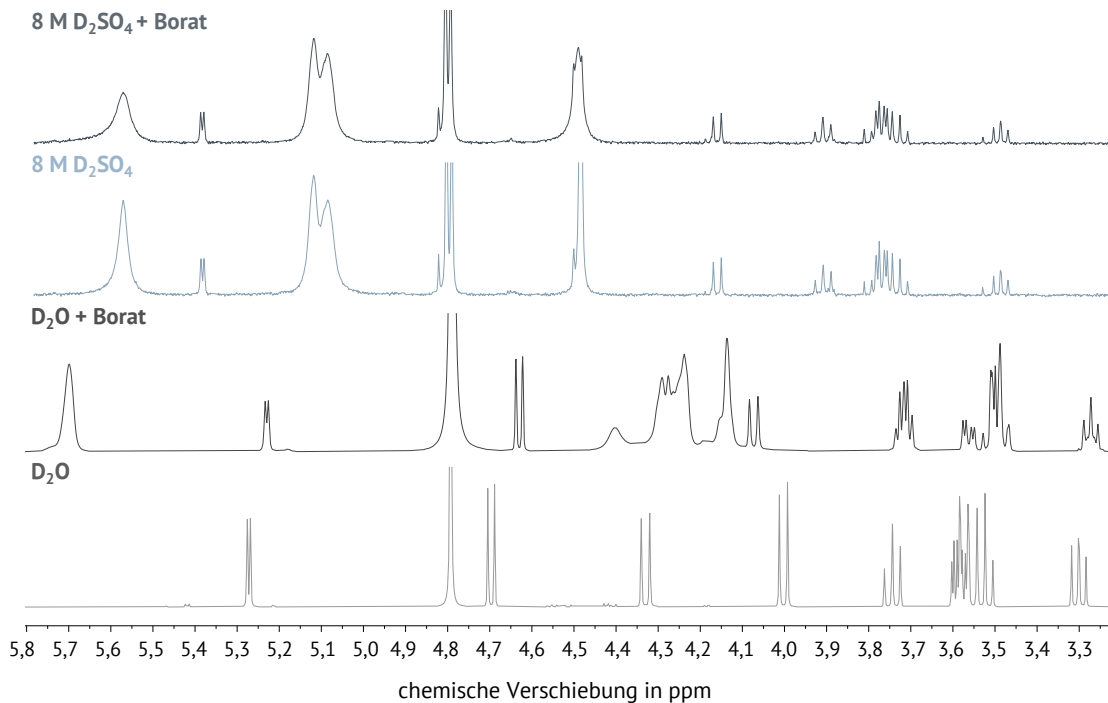


Abbildung 53: ^1H -Kernspinresonanzspektren (500 MHz) der Glucuronsäure in Deuteriumoxid und 8 M deuterierter Schwefelsäure mit und ohne Boratzusatz (Verhältnis 1:1 zur Uronsäure) nach Erhitzen für 5 min bei 95 °C. Alle Spektren wurden auf die chemische Verschiebung des 2,2,3,3- d_4 -(Trimethylsilyl)propionsäure-Signals ($\delta_{\text{H}} = 0$ ppm) referenziert.

Das Spektrum der GlcA zeigte sich nach Erhitzen bei 95 °C in D_2O unverändert zu dem in Abbildung 51 gezeigten Standardspektrum. Somit konnte eine Veränderung des Analyten, allein durch die Hitzeeinwirkung ausgeschlossen werden. Das Spektrum der GlcA weist in Gegenwart von Borat ohne Säurezugabe neben den bestehenden Signalen, im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 4 - 4,5$ ppm bzw. 5,7 ppm neue, teils stark verbreiterte Signale auf. Weitere Signale, wie die des H_2 und H_3 der US nehmen ab (Abbildung 53). Diese neuen Signale bilden innerhalb eines HSQC-TOCSY-Spektrums (Anhang, Abbildung A10) ein neues Spinsystem, welches sich von dem der GlcA abgrenzt. Somit kann bei einem neutralen pH-Wert eine Interaktion des Borats mit der US nachgewiesen werden. Aufgrund

der durch Borat negativ beeinflussten Auflösung ist eine konkrete Zuordnung dieser Signale jedoch nicht möglich, wodurch keine Aussage zur Art der Interaktion des Borates getroffen werden kann.

Wird eine entsprechende Analyse in 8 M Säure durchgeführt, verschwinden die beschriebenen zusätzlichen Signale. Der verringerte pH-Wert verhindert somit die kovalente Interaktion von Borat bzw. der hier vermehrt vorliegenden Borsäure mit der US, was im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Verhalten im stark Sauren steht (Badin *et al.* 1953; Pizer 2017). Die Berechnung des GlcAL:GlcA-Verhältnis ergab zudem im Vergleich zur entsprechenden Probe ohne Boratzusatz keinen Unterschied und lag weiterhin bei einem Lacton-Anteil von 75 %. Dies lässt den Schluss zu, dass der Zusatz von Borat innerhalb dieses experimentellen Designs keinen Einfluss auf das GlcAL:GlcA-Verhältnis hat und somit die in der Literatur durch Scott (1979) beschriebene Hypothese nicht bestätigt werden konnte. Wie bereits zu Beginn erwähnt, weichen die experimentellen Bedingungen insbesondere im Wassergehalt und pH-Wert von der eigentlichen Reaktionsumgebung der konzentrierten Schwefelsäure ab, wodurch die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse nicht gewährleistet sein muss. Dennoch ist davon auszugehen, dass Borsäure keine messbare kovalente Interaktion mit der US eingeht. Ob der beobachtete Effekt des verstärkten Abbaus der lactonisierbaren US auf andere Spezies, wie etwa Sulfato-Komplexverbindungen, oder nicht kovalente bzw. generell mittels NMR nicht nachweisbare Interaktionen der Borsäure zurückzuführen ist, bleibt offen.

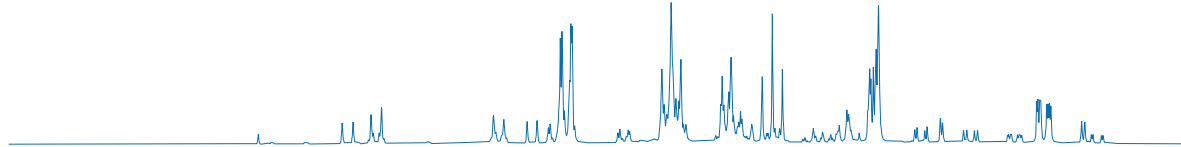
4.3.3 Beeinflussung der Stabilität des Chromophors

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 dargestellt, wird ein stabilisierender Effekt von Borat auf das gebildete Chromophor vermutet. In Anwesenheit von Borat zeigte sich eine höhere und über die Zeit stabilisierte Farbintensität, die im entsprechenden Vergleich zur Reaktion ohne Boratzusatz zu höheren Absorptionwerten führte (vgl. Abbildung 46)

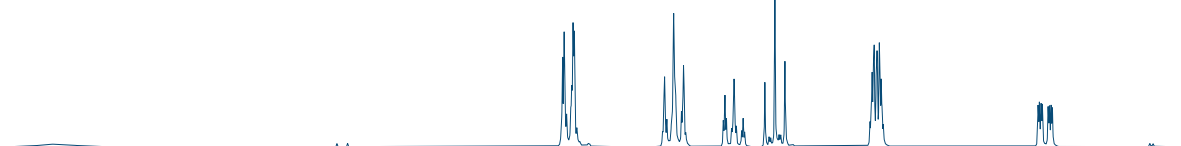
Zur Überprüfung der Stabilität der eingesetzten Reagenzien während der Erhitzung bzw. Standzeit in konzentrierter Schwefelsäure wurden NMR-Messungen durchgeführt. Hierbei zeigten sich in den Spektren des 3PP signifikante Veränderungen (Abbildung 54).

Insbesondere die Spektren des mit konzentrierter Schwefelsäure unter Boratzusatz behandelten 3PPs unterscheiden sich stark von dem des nativen 3PP. Mithilfe verschiedener 2D-Experimente sowie dem Vergleich der Integrale im ^1H -NMR-Spektrum konnten vier verschiedene Spezies, inklusive des 3PP-Standards, in der Schwefelsäure mit Boratzusatz identifiziert werden. In geringen Konzentrationen finden sich diese zusätzlichen Signale ebenfalls nach Standzeit in boratfreier Säure, sind allerdings in Abbildung 54 aufgrund ihrer geringen Intensität kaum erkennbar. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 im Rahmen der Strukturaufklärung des Chromophors beschrieben, konnten anhand des Molekulargewichts sulfonierte Spezies sowohl der Triarylmethan-Vorstufe als auch des 3PP nachgewiesen werden. Die entsprechenden Massen des einfach und zweifach sulfonierten 3PPs (250 g/mol und 330 g/mol) wurden auch hier mittels UHPLC-MS bestätigt (Anhang, Abbildung A11). Die Vielzahl teils breiter Signale weist darauf hin, dass mehrere sulfonierte Spezies parallel gebildet werden, was eine quantitative Erfassung des Sulfonierungsgrades erheblich erschwert.

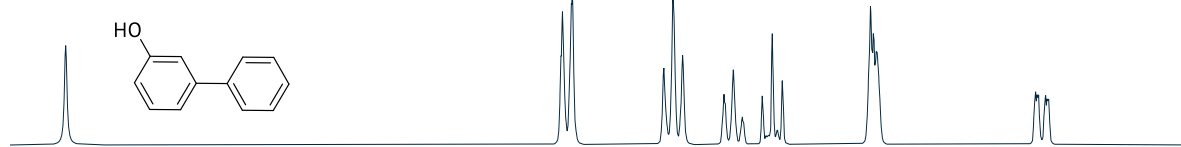
3PP in H₂SO₄ + Borat



3PP in H₂SO₄



3PP Standard



8,5 8,4 8,3 8,2 8,1 8,0 7,9 7,8 7,7 7,6 7,5 7,4 7,3 7,2 7,1 7,0 6,9 6,8 6,7

chemische Verschiebung in ppm

Abbildung 54: ¹H-Kernspinresonanzspektren (500 MHz) eines 3-Phenylphenol (3PP)-Standards, des mit konzentrierter Schwefelsäure behandelten und nach 20 min extrahierten 3PPs sowie des mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Natriumtetraborat (12,5 mM) behandelten und extrahierten 3PPs. Alle Spektren wurde in Aceton-*d*₆ aufgenommen und auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{\text{H}} = 2,09$ ppm) referenziert.

Wird anstelle von 3PP das 3-Methoxybiphenyl (m-3PP) eingesetzt, entsteht hingegen selektiv ein Sulfonierungsprodukt, die 5-Methoxybiphenyl-2-sulfonsäure (Abbildung 55). Die zur Charakterisierung herangezogenen 2D-NMR-Daten finden sich in Abbildung A12 im Anhang. Eine unzureichende Entsalzung und damit erhöhte Salzbelastung des NMR-Lösungsmittels führten hierbei zwar zu Signalverschiebungen im ¹H-NMR-Spektrum der in Schwefelsäure mit Boratzusatz erhitzten Probe, die Signale konnten jedoch eindeutig zugeordnet werden. Durch Flächenintegration der beiden charakteristischen Singulets der Methylgruppen des sulfonierten und nativen m-3PP bei $\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 3,70$ ppm ließ sich das Verhältnis der nicht-sulfonierten zur sulfonierten Spezies bestimmen. Dieses beträgt in boratfreier Schwefelsäure 1:2,87 und erhöht sich durch Boratzusatz signifikant auf 1:7,67. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Borat die Bildung sulfonierter Spezies des 3PPs entsprechend des m-3PPs steigert.

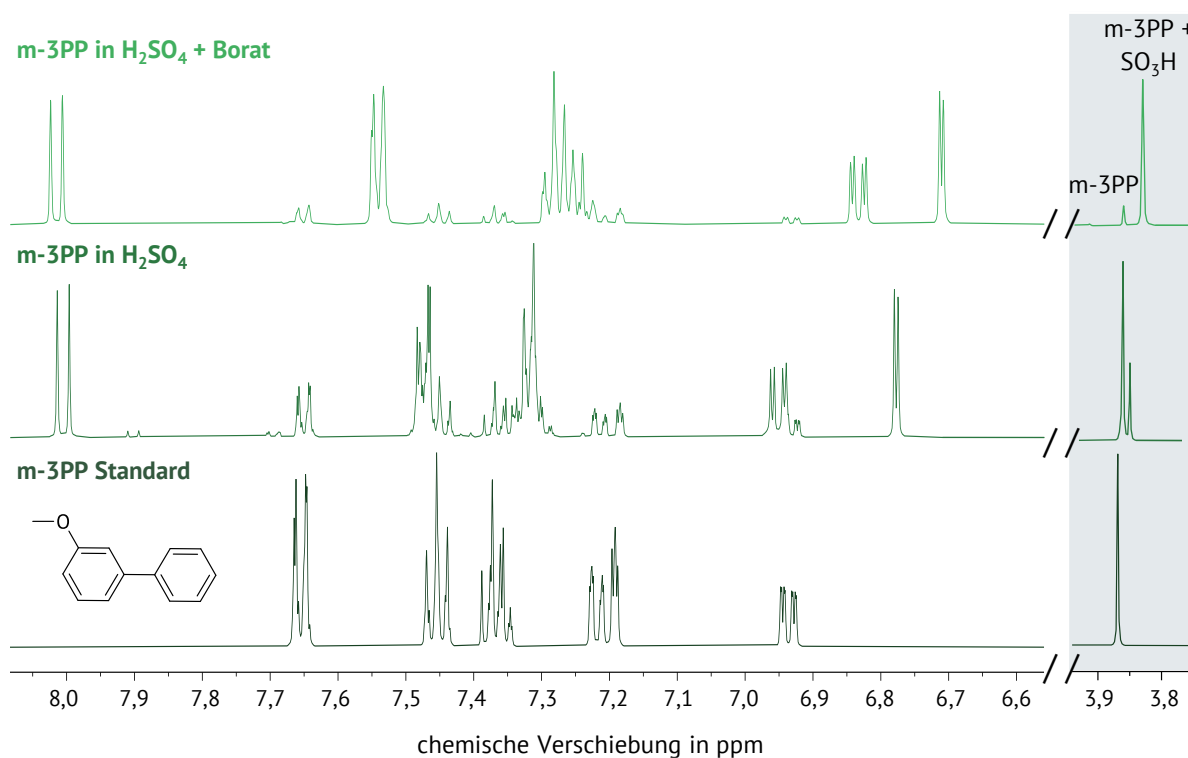


Abbildung 55: ¹H-Kernspinresonanzspektren (500 MHz) eines 3-Methoxybiphenyl (m-3PP)-Standards, des mit konzentrierter Schwefelsäure behandelten und nach 20 min extrahierten m-3PPs sowie des mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Natriumtetraborat (12,5 mM) behandelten und extrahierten m-3PPs. Die grau hinterlegten Singulettsignale können der Methylgruppe der m-3PP Spezies zugeordnet werden. Alle Spektren wurde in Aceton-*d*₆ aufgenommen und auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{\text{H}} = 2,09$ ppm) referenziert.

Zur beobachteten verstärkten Sulfonierung aromatischer Substrate in borathaltiger bzw. borsäurehaltiger konzentrierter Schwefelsäure konnte in der verfügbaren Literatur bislang keine direkte Erklärung gefunden werden. Daher wurden auf angrenzende Literaturbefunde basierende Hypothesen erarbeitet. Mehrere Quellen berichten, dass Borsäure unter stark wasserarmen Bedingungen nicht mehr in ihrem klassischen wässrigen Gleichgewicht zwischen B(OH)_3 und $[\text{B(OH)}_4]^-$ vorliegt, sondern zu dehydratisierten Polyboraten oder zu Sulfato-Bor-Komplexen, wie Tetra(hydrogensulfato)borsäure $\text{H}[\text{B(HSO}_4)_4]$, reagiert. Letztere Spezies werden in der Literatur als stark säureaktiv beschrieben und finden in superaciden Medien als effektive Brønsted- und Lewis-Säuren Anwendung, wo sie als Katalysatoren in unterschiedlichen organisch-chemischen Reaktionen wirken (Chhaperwal *et al.* 2025; Flowers *et al.* 1956; Gillespie und Robinson 1962). Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass die durch Bor-vermittelte Erhöhung der Säurestärke die Bildung des eigentlichen Sulfonierungselektrophils (SO_3 bzw. HSO_3^+) begünstigt und hierdurch die Geschwindigkeit wie auch der Umfang der elektrophilen Substitution gesteigert werden.

Zur Beurteilung des Einflusses von Borat in konzentrierter Schwefelsäure auf das Produktspektrum des photometrischen Assays wurde die Reaktion ausgehend von 5FFA und 3PP sowohl in boratfreier als auch in borathaltiger Schwefelsäure vergleichend durchgeführt. Die chromatographische Analyse erfolgte im SIM(-)-Modus, wobei wie bereits beschrieben, gezielt charakteristische Massen der Triarylmethan-Vorstufe sowie des gebildeten Chromophors erfasst wurden. Die entsprechenden *Total Ion Current* (TIC)-Chromatogramme sind in Abbildung 56 dargestellt.

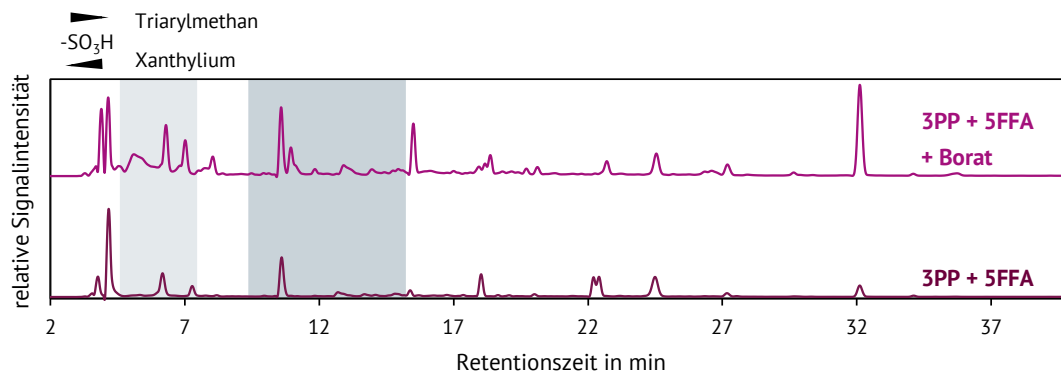


Abbildung 56: Selected Ion-Chromatogramme ausgewählter Masse-zu-Ladungsverhältnisse der (sulfonierten) Triarylmethan-Vorstufe sowie des (sulfonierten) Chromophors aus 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) und 3-Phenylphenol (3PP), gebildet in konzentrierter Schwefelsäure mit und ohne Zusatz von Natriumtetraborat (12,5 mM). Grau hinterlegt sind die Elutionbereiche des Chromophors, wobei der dunklere Farbton die Zunahme der Sulfonsäuresubstitution darstellt. Weitere Signale sind gemäß Abbildung 43 den Triarylmethanstrukturen **s-36** zuzuordnen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 erläutert, verhält sich die Elutionsreihenfolge mit zunehmender Sulfonierung des Triarylmethans sowie des Chromophors gegensätzlich. Zusätzlich eluieren Xanthylium-Spezies generell früher als die jeweiligen Triarylmethan-Vorstufen. Nach Behandlung in borathaltiger Schwefelsäure zeigen sich deutlich intensivere Signale im Frühbereich des Chromatogramms (< 17 min), die ein- bis dreifach sulfonierten Triarylmethan-Vorstufen sowie die ein- bis zweifach sulfonierten Xanthylium-Derivaten zugeordnet werden konnten. Diese Chromophore haben somit keine Hydratisierung während der chromatographischen Trennung analog zu Abbildung 39 erfahren. Eine genaue Unterscheidung der Spezies wird aufgrund von starker Koelution hier nicht getroffen. Nicht sulfonierte Xanthylium-Ionen **37**, analog zum Quasimolekülion $[M+H_2O+HCOO]^-$ des aus 4CBA und 3PP synthetisierten Chromophors (vgl. Kapitel 4.2.2, Struktur **38**), konnten nicht nachgewiesen werden. Die sulfonierten Xanthylium-Derivate traten infolge der Deprotonierung sowohl der Carboxy- als auch der Sulfonsäuregruppe als $[M-2H]^-$ -Ionen auf; ein $[M-3H]^{2-}$ -Ion der zweifach sulfonierten Spezies konnte dagegen nicht detektiert werden. Das Signal bei 32 min (Abbildung 56) entspricht der Triarylmethan-Vorstufe **36** (vgl. Kapitel 4.2.1.3), deren relative Intensität in Gegenwart von Borat deutlich höher ausfällt. Dies lässt sich sowohl durch eine verstärkte Bildung der Vorstufe als auch durch eine mögliche Rückreaktion stärker sulfonierter Spezies im Sinne einer reversiblen Desulfonierung erklären (vgl. Kapitel 4.2.1.2).

Die verstärkte Sulfonierung in Anwesenheit von Borat trägt, gemäß den durchgeführten Untersuchungen zur erhöhten Stabilität des gebildeten Chromophors bei. Anhand der relevanten pK_s -Werte ist ableitbar, dass sowohl konzentrierte Schwefelsäure ($pK_s = -3$) als auch typische Arylsulfonsäuren (z. B. *p*-Toluolsulfonsäure, $pK_s \approx -2,8$) starke Säuren darstellen (Holleman *et al.* 2017). Durch die positive Ladung des Xanthylium-Systems sowie den elektronenziehenden Effekt der Sulfonsubstituenten wird die Acidität der zuerst eingeführten Sulfonsäuregruppe weiter gesteigert. Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese Gruppe in konzentrierter Schwefelsäure deprotoniert vorliegt und somit die positive Ladung des Xanthylium-Ions kompensiert, sodass ein in Summe ungeladenes, energetisch stabileres Chromophor resultiert. Eine zusätzliche Deprotonierung weiterer

Sulfonsäuregruppen erscheint hingegen unwahrscheinlich, da deren Acidität mit steigender Zahl deprotonierter Substituenten deutlich abnimmt.

4.4 Interferenzen mit Reaktionsprodukten aus Neutralzuckern in der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts

Die Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts in pflanzlichen Zellwänden stellt aufgrund der komplexen Matrix eine analytische Herausforderung dar. Neben US sind zahlreiche Neutralzucker enthalten, die diese in der Regel mengenmäßig übertreffen (vgl. Kapitel 4.1). Entsprechend wurde in der Literatur wiederholt beschrieben, dass der Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) unter Interferenzen durch diese Neutralzucker leidet (Barazarte *et al.* 2007).

Analog zu den US werden auch weitere Monosaccharide während des Erhitzungsschrittes in der konzentrierten Schwefelsäure zu Furanderivaten abgebaut. Hexosen liefern hierbei primär HMF, Pentosen Furfural und 6-Deoxyhexosen 5MF (Belitz *et al.* 2012; Shi *et al.* 2019). Zur Bestätigung dieses Sachverhalts wurde das Abbauverhalten äquivalenter Mengen (1,3 μmol) verschiedener Zucker in konzentrierter, borathaltiger Schwefelsäure unter analogen Abbaubedingungen des Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays (5 min, 95 °C) chromatographisch quantifiziert und anteilig vom eingesetzten Monosaccharid in Abbildung 57 dargestellt.

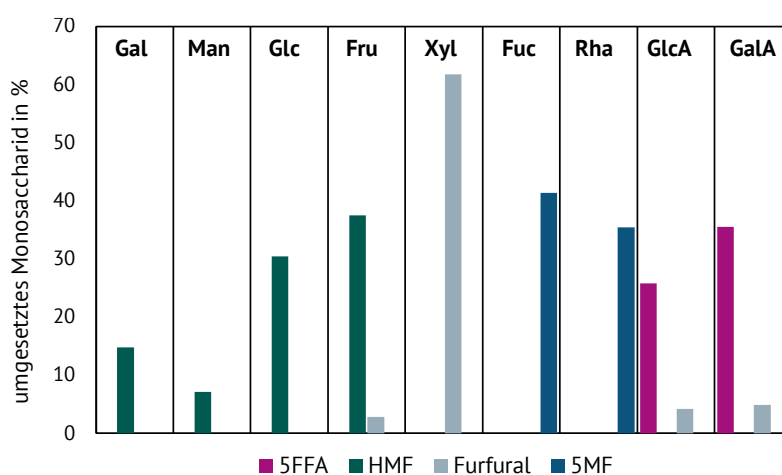


Abbildung 57: Anteil der zu Furanderivaten abgebauten Monosaccharide. Der Abbau wurde in borathaltiger konzentrierter Säure (12,5 mM) bei 95 °C für 5 min durchgeführt. Die Abbauprodukte wurde nach chromatographischer Trennung bei 280 nm quantifiziert (Gal: Galactose, Man: Mannose, Glc: Glucose, Fru: Fructose, Xyl: Xylose, Fuc: Fucose, Rha: Rhamnose, GlcA: Glucuronsäure, GalA: Galacturonsäure, 5FFA: 5-Formyl-2-furancarbonsäure, HMF: 5-Hydroxymethylfurfural, 5MF: 5-Methylfurfural).

Wie zuvor beschrieben, konnte bei den Hexosen Gal, Man, Glc und der Hexulose Fru, HMF quantitativ erfasst werden. Zudem wurde Furfural bei allen Hexosen nachgewiesen, war jedoch nur bei der Hexulose Fru quantifizierbar. Diese Ketose lieferte mit einem Anteil von 37 % die größte Menge an HMF was mit der höchsten beobachteten Interferenz von Hexosen durch Fru, beschrieben durch Barazarte *et al.* (2007), übereinstimmt. Der Abbau von Xyl zu Furfural liefert mit 62 % den größten Furangehalt. Der Abbau der Desoxyzucker Fuc und Rha zu 5MF bewegen sich zwischen 35 % und 41 %, wohingegen die beiden US GlcA und GalA nur zu 25 % bzw. 35 % abgebaut wurden. Im

Allgemeines ist zu beachten, dass die verschiedenen Monosaccharide trotz vergleichbarer Strukturen deutlich variierende Anteile an Abbauprodukten liefern.

Es werden zwei Arten der Interferenzen durch Neutralzucker unterschieden. Zum einen entstehen während des Erhitzens, insbesondere bei hohen Konzentrationen, nicht näher charakterisierte Bräunungsprodukte aus Kondensationsreaktionen der Furane und reaktiver α -Dicarbonylen (Rosenau *et al.* 2017; Shi *et al.* 2019). Diese lassen sich jedoch durch Subtraktion eines Blindwerts ohne 3PP weitgehend kompensieren (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973; van Hoogen *et al.* 1998). Zum anderen reagieren weitere Zuckerabbauprodukte mit 3PP gemäß Yapo (2012) zu zusätzlichen Chromophoren, die im gleichen Wellenlängenbereich absorbieren und so zu einer Überbestimmung des Uronsäuregehalts führen können (Yapo 2012). Qualitative Vorversuche bestätigten, dass alle untersuchten Furane mit 3PP eine Färbung bilden, wobei die Intensität bei 5MF am geringsten ausfiel. Daher wurden im Folgenden ausschließlich HMF und Furfural vergleichend zu 5FFA betrachtet.

Unter Verwendung gleicher molarer Konzentrationen der drei Analyten wurden zur Beurteilung der Empfindlichkeit Kalibriergeraden bei 520 nm aufgenommen (Abbildung 58). Dabei zeigt 5FFA sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Borat mit deutlichem Abstand die höchste Reaktivität bzw. Farbbildungsfähigkeit gegenüber 3PP. Dies spiegelt sich im Vergleich zu HMF und Furfural in deutlich erhöhten Absorptionen wider. Die aus der Reaktion von HMF mit 3PP gebildeten Chromophore zeigen ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption. Ein Boratzusatz führt, wie bereits für 5FFA in Kapitel 4.3 beschrieben, auch bei HMF zu einer Erhöhung der Absorption. Diese fällt mit 53 % bei HMF vergleichbar zur Steigerung bei 5FFA (48 %) aus (Anhang, Tabelle A5). Allerdings nimmt bei HMF die Steigung der Kalibriergeraden durch den Zusatz von Borat ab. Die Kalibriergeraden, erstellt mit Furfural, weisen hingegen, wie durch Korrelationskoeffizienten von $< 0,7$ belegt (Anhang, Tabelle A5), keinen eindeutigen linearen Zusammenhang auf und zeigen zudem eine geringere Steigung als die übrigen Kalibriergeraden. Die Absorptionen der Reaktionsprodukte aus Furfural liegen deutlich unter denen der aus der Reaktion mit 5FFA resultierenden Chromophore und sind bei Konzentrationen $> 0,2 \mu\text{M}$ auch geringer als die durch HMF erzielten Absorptionen. Folglich trägt Furfural nur bei sehr großem Überschuss zur Überbestimmung der US bei.

Im Folgenden wird diskutiert, ob die geringere Absorption der aus HMF und Furfural mit 3PP gebildeten Produkte bei 520 nm im Vergleich zum Xanthylium-Chromophor (**37**) aus 5FFA und 3PP auf Unterschiede im molaren Extinktionskoeffizienten oder auf eine reduzierte Bildung des Chromophors zurückzuführen ist.

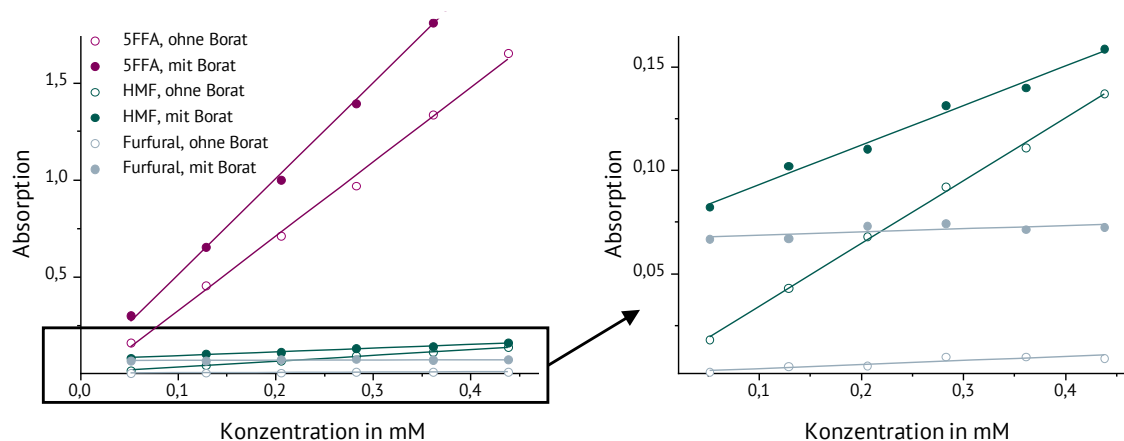


Abbildung 58: Kalibriergeraden der drei Furanderivate 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA), 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural (rechts als Vergrößerung dargestellt) nach Reaktion variierender Konzentrationen in konzentrierter borathaltiger und boratfreier Schwefelsäure mit 3-Phenylphenol. Die Absorption wurde photometrisch bei 520 nm aufgenommen. Ein Blindwert wurde subtrahiert.

Die Absorptionsspektren der farbigen Reaktionslösungen von HMF und Furfural zeigten mehrere eng benachbarte Banden zwischen 400 und 550 nm (Abbildung 59 A, B). Bei HMF fallen diese intensiver aus als bei Furfural, es finden sich jedoch in beiden Spektren Absorptionsmaxima bei rund 520 nm. Es wird somit davon ausgegangen, dass HMF und Furfural unter anderem ein zum Chromophor **s-37** vergleichbares Produkt ausbilden (vgl. Strukturen, dargestellt in Abbildung 59 A, B). Die zusätzlichen Banden deuten auf die Entstehung weiterer chromophorer Produkte hin. Die berechneten Absorptionsspektren dieser beiden Strukturen werden ebenfalls vergleichend in Abbildung 57, C und D dargestellt und zeigen entsprechende Absorptionsmaxima bei 521 nm und 525 nm. Durch die zudem vergleichbaren molaren Extinktionskoeffizienten der Chromophore aus HMF, Furfural und 5FFA ($124.198 \text{ L}/(\text{mol} \times \text{cm})$, $126.037 \text{ L}/(\text{mol} \times \text{cm})$ und $100.100 \text{ L}/(\text{mol} \times \text{cm})$) resultiert gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz (vgl. Kapitel 3.4.1) bei gleicher Konzentration und identischer Schichtdicke eine annähernd identische Absorption bei 520 nm. Die in Abbildung 58 dargestellten, deutlich geringeren Absorptionswerte für die Chromophorbildung aus HMF und Furfural können daher nicht auf Unterschiede im Absorptionsverhalten der Produkte zurückgeführt werden, sondern sind vielmehr durch eine geringere Reaktivität dieser Furanderivate gegenüber 3PP oder durch konkurrierende, bevorzugt ablaufende Kondensationsreaktionen zu erklären.

4.4 Interferenzen mit Reaktionsprodukten aus Neutralzuckern in der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts

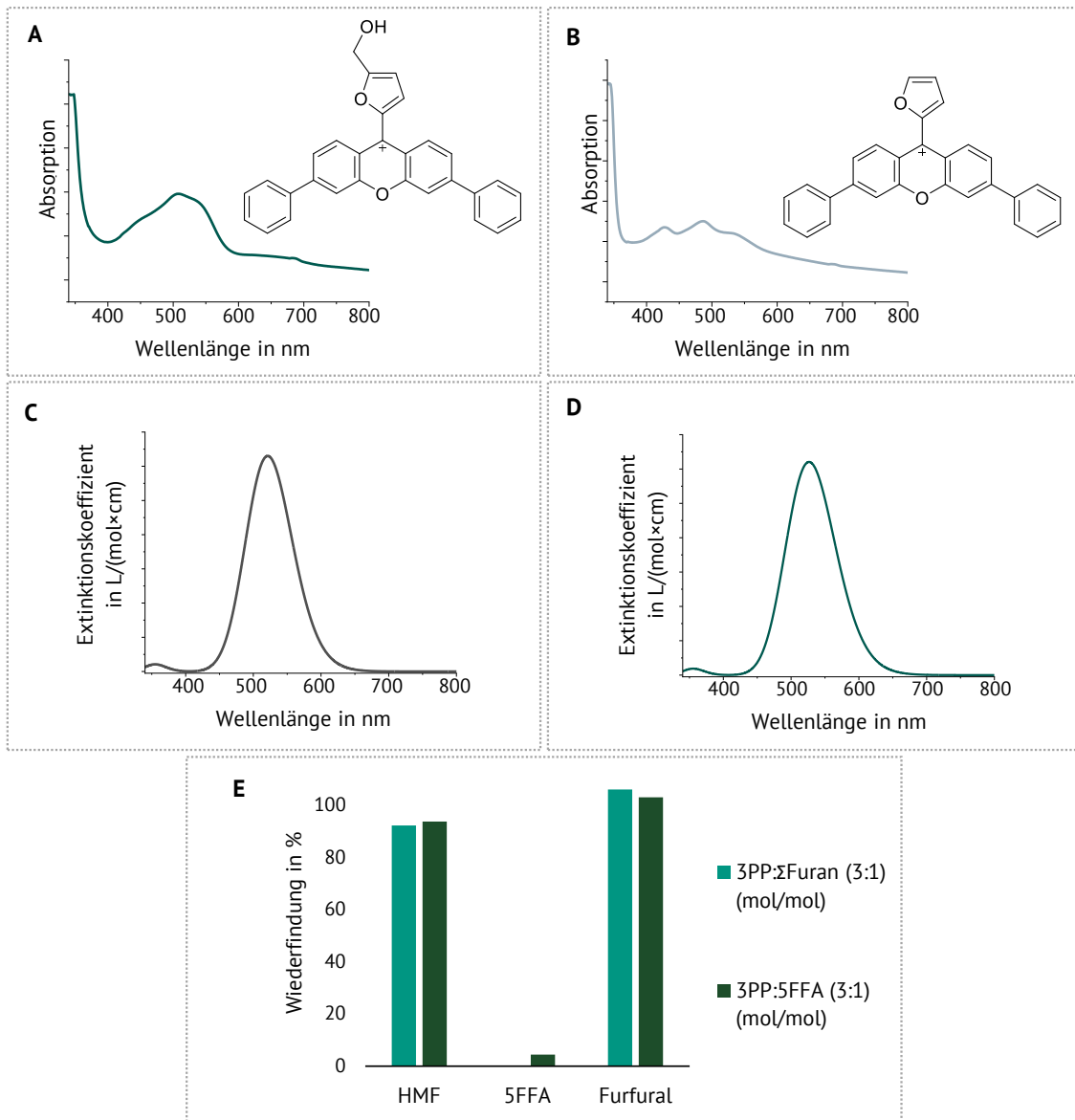


Abbildung 59: Experimentelle Absorptionsspektren des Chromophors aus der Reaktion von 3-Phenylphenol (3PP) und 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) (A) sowie Furfural (B) und die dazu postulierten Strukturen. Die entsprechenden berechneten Spektren finden sich für HMF in (C) und für Furfural in (D). Die Wiederfindungen dieser beiden Furanderivate sowie der 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) nach Reaktion mit dem dreifach molaren Überschuss zur Furangesamtmenge sowie zur 5FFA-Menge sind in (E) dargestellt. Die Werte wurden um einen 3PP-freien Blindwert korrigiert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Reaktivität von 3PP gegenüber verschiedener Furane chromatographisch analysiert. Hierzu wurden Mischungen in konzentrierter Säure untersucht, die jeweils die einzelnen Derivate in vergleichbarer Konzentration (100 mM) enthielten. Nach Zugabe von 3PP in einem dreifachen Überschuss, sowohl bezogen auf das jeweilige Einzelsubstrat als auch auf die Gesamtmenge der Furane, konnte die Umsetzung quantitativ bewertet werden. Sämtliche Ergebnisse wurden um eine Referenzprobe ohne 3PP-Zusatz korrigiert, sodass spontane Kondensationsreaktionen der Furane in Abwesenheit von 3PP berücksichtigt und kompensiert wurden (Abbildung 59 E). Hierbei zeigt sich, dass 3PP bevorzugt mit 5FFA reagiert. Bereits bei einem dreifach

molaren Überschuss von 3PP bezogen auf die 5FFA-Menge werden nur noch etwa 4 % des 5FFA wiedergefunden. Wird ein dreifach molarer Überschuss an 3PP bezogen auf die Gesamtmenge der Furane zugesetzt, ist 5FFA nicht mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu liegen die Wiederfindungen von HMF konstant bei etwa 95 %, während Furfural mit 103 – 106 % wiedergefunden wird. Die leichte Überschreitung von 100 % kann auf methodische Schwankungen oder eine partielle Decarboxylierung von 5FFA zurückgeführt werden.

Die beobachteten Unterschiede in der Ausbeute und Intensität der Farbstoffbildung lassen sich durch eine Kombination aus elektronischen Effekten sowie konkurrierenden Nebenreaktionen erklären. Die Carboxygruppe des 5FFAs wirkt stark elektronenziehend und erhöht dadurch die Elektrophilie des Furanrings. Dies führt zu einer deutlich gesteigerten Reaktivität gegenüber 3PP und erklärt die bevorzugte Bildung des Triarylmethans **36** aus 5FFA. Demgegenüber verfügen Furfural (-H) und HMF (-CH₂OH) über keine elektronenziehenden Substituenten. Die Hydroxymethylgruppe des HMF ist in stark saurem Medium leicht protonierbar und somit dehydratisierbar, was dessen Reaktivität in verschiedene konkurrierende Reaktionspfade lenkt. Unter dem Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure sind HMF und Furfural zudem anfällig für Kondensations- und Polymerisationsreaktionen, die zur Bildung von Nebenprodukten führen (Kreppenhofer *et al.* 2011; Rosenau *et al.* 2017). Diese Konkurrenzreaktionen mindern die effektive Umsetzung in das entsprechende Triarylmethan bzw. Xanthen und erklären die deutlich geringere Farbintensität der aus HMF und Furfural gebildeten Chromophore.

Die Ergebnisse belegen, dass die Interferenzen des Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays im Wesentlichen aus der Bildung von Furanderivaten aus Neutralzuckern resultieren, die ihrerseits Chromophore mit 3PP ausbilden können. Die deutlich höhere Reaktivität von 5FFA gegenüber 3PP erklärt, warum US im Assay trotz Interferenzen bei moderatem Überschuss der Neutralzucker spezifisch nachweisbar bleiben, während HMF und Furfural aufgrund ihrer geringen Reaktivität nur schwach zum Signal beitragen.

4.5 Methodenentwicklung zur Gesamturonsäurebestimmung mittels LC-MS

Zur Quantifizierung des Uronsäuregehalts in pflanzlichen (BS)-Proben wurde eine alternative Methode entwickelt. Analog zur photometrischen Bestimmung basiert diese auf dem säurekatalysierten Abbau der US zu 5FFA, das anschließend jedoch nicht photometrisch, sondern chromatographisch erfasst wird, um die teilweise unspezifische und interferenzanfällige Farbreaktion mit 3PP zu umgehen. Hierzu wurde die Analyse für die US GalA, GlcA, ManA und GulA sowie die Kombinationen GalA + GlcA sowie ManA + GulA optimiert.

4.5.1 Entwicklung des grundlegenden Prinzips

Die entwickelte chromatographische Analyse des Gesamturonsäuregehalts, schematisch dargestellt in Abbildung 60 A, basiert auf dem Säureabbau der US in einer gelösten BS-Probe zu 5FFA, welcher vergleichbar zur photometrischen Analyse nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) in konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt wurde. Der Zusatz von 12,5 mM Natriumtetraborat wurde zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für lactonisierbare US beibehalten (vgl. Kapitel 4.3).

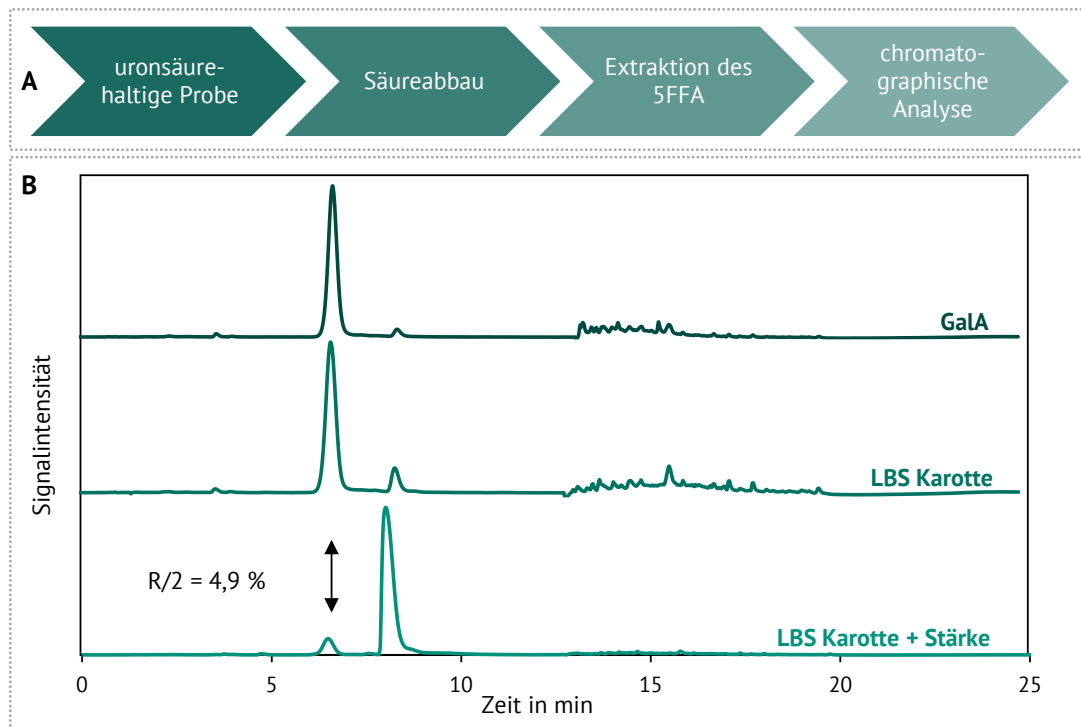


Abbildung 60: Schematische Darstellung des Ablaufs der chromatographischen Uronsäureanalyse nach Säureabbau dieser zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) (A) sowie das bei 280 nm detektierte Chromatogramm eines abgebauten Galacturonsäure (GalA)-Standards, der isolierten löslichen Ballaststoffe (LBS) einer Karottenprobe sowie der mit 60-fachem Stärkeüberschuss zur Uronsäure aufgestockten Karotten-LBS-Probe. 5FFA eluiert separiert von übrigen Bestandteilen nach 6,5 min ($R/2$: Range/2).

Eine chromatographische Analyse des 5FFAs direkt aus der konzentrierten Schwefelsäure ist durch die für das Analysesystem schädliche hohe Säurekonzentration nicht zu empfehlen. Um die Sensitivität und Spezifität der Methode zu erhöhen sowie eine Analyse des gebildeten 5FFAs zu ermöglichen, muss dieses aus der Säure entfernt werden. Hierzu wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet und optimiert (Kapitel 4.5.2).

Zur chromatographischen Analyse des 5FFAs wurde eine polare C18-Phase gewählt, da diese die Möglichkeit einer Retention und Elution des polaren Analyten bei Verwendung von 100 % Wasser als mobile Phase ermöglicht. Die Detektion des aromatischen Analyten erfolgt mittels DAD bei 280 nm. Abbildung 60 B zeigt exemplarisch drei UHPLC-Chromatogramme der extrahierten und analysierten Proben. Nach Abbau eines GalA-Standards sowie einer GalA-haltigen Karotten-LBS-Probe konnte 5FFA als gut aufgelöster Peak bei 6,5 min identifiziert werden. Zur weiteren Überprüfung der Methode wurde eine Karottenprobe analysiert, die mit einem 60-fachen Überschuss Stärke versetzt war. Trotz der komplexen Kohlenhydratmatrix unterschied sich die Peakfläche des aus reinen Karotten-LBS gebildeten 5FFAs nicht signifikant von derjenigen der stärkeversetzten Probe. Der GalA-Gehalt konnte demnach mit einer geringen relativen Standardabweichung von 4,9 % präzise bestimmt werden. Vergleichend dazu wurde die entsprechende Analyse photometrisch durchgeführt, hier zeigte sich eine Abweichung von + 27 % zwischen den bestimmten Uronsäuregehalten der LBS-Probe sowie der LBS-Probe mit Stärkeüberschuss. Abbauprodukte wie Furfural und HMF, die aus anderen Bestandteilen der Kohlenhydratmatrix stammen, wurden demnach eindeutig

abgetrennt und eluieren überwiegend nach 8 min. Die Quantifizierung der US erfolgt vergleichbar zur photometrischen Analyse anhand einer mit der US angefertigten externen Kalibrierung.

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln (Kapitel 4.3.1 und 4.4) gezeigt, unterscheiden sich die verschiedenen US hinsichtlich ihrer Abbauraten zur 5FFA maßgeblich. Durch die Optimierung der Erhitzungszeit und Temperatur soll demnach eine maximale Sensitivität, aber auch der Angleich der Abbauraten verschiedener US zur Analyse von Proben, die eine Kombination dieser enthalten, ermöglicht werden (vgl. Kapitel. 4.5.3).

4.5.2 Optimierung der Extraktion von 5-Formyl-2-furancarbonsäure

Zur Extraktion des 5FFAs aus der konzentrierten Säure wurden verschiedene Extraktionsmöglichkeiten getestet, wobei sich ausschließlich eine flüssig-flüssig Extraktion als vielversprechend erwies. Verschiedene Umkehrphasen-SPE-Materialien zeigten keine oder nur eine sehr schlechte Wechselwirkung mit 5FFA, weshalb diese Option verworfen wurde.

Die flüssig-flüssig Extraktion wurde hinsichtlich des eingesetzten Extraktionsmittel, der Anzahl der Extraktionsdurchläufe und Waschschriffe sowie der verwendeten Lösungsmittelvolumina systematisch untersucht. Zur Beurteilung der Extraktionsgüte diente hierbei die Wiederfindungsrate einer definierten Menge 5FFA (100 μM), welches direkt in die konzentrierte Säure eingebracht wurde. Zur Extraktion geeignete Lösungsmittel müssen gegenüber Schwefelsäure chemisch inert, nicht mit Wasser mischbar, zugleich aber ausreichend polar sein. Auf Grundlage dieser Kriterien wurden DCM und Ethylacetat getestet. DCM ist gegenüber konzentrierter Schwefelsäure inert und ermöglicht somit eine direkte Extraktion aus konzentrierter Säure, weist jedoch aufgrund seiner Toxizität deutliche Nachteile auf. Die Anwendung von Ethylacetat erforderte hingegen eine partielle Neutralisation der Säure, um eine Esterspaltung und Bildung von Essigsäure zu verhindern. Zur Entfernung verbleibender Säurereste aus der organischen Phase war ein Waschschriff notwendig. Da Ethylacetat eine partielle Wasserlöslichkeit besitzt, wurde zur Minimierung des Wassergehalts in der organischen Phase sowie zur besseren Phasentrennung eine gesättigte NaCl-Lösung verwendet.

Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft. Verbleibende NaCl-Rückstände wurden durch Lösen der trockenen Probe in Acetonitril minimiert. Da die Injektion des 5FFAs in 100 % Acetonitril die Peakform der chromatographischen Messung sowie die Retention des 5FFA-Peaks negativ beeinflussten, musste die Probe nach erneutem Trocknen in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch mit möglichst hohem wässrigem Anteil aufgenommen werden. Hierzu eignete sich 5 %iges wässriges Acetonitril am besten (Anhang, Abbildung A13), wohingegen in 100 % Wasser keine reproduzierbare Löslichkeit der Probe in angemessener Zeit erreicht werden konnte.

Die ein- und zweifache Extraktion mit unterschiedlichen DCM-Volumina von 1 – 5 mL direkt aus der konzentrierten Säure ergaben lediglich vernachlässigbare 5FFA-Wiederfindungsraten, ebenso zeigte eine Extraktion mit DCM aus verdünnter Säure niedrige Wiederfindungen des Analyten, womit das Lösungsmittel für diese Anwendung ausgeschlossen wurde. Im Gegensatz dazu lieferte die Extraktion mit Ethylacetat aus der verdünnten Säure die höchsten Wiederfindungsraten (75 %), wenn zwei aufeinanderfolgende Extraktionsschritte mit jeweils 3 mL des organischen

Lösungsmittels durchgeführt und anschließend zwei Waschschriffe mit jeweils 1,5 mL gesättigter NaCl-Lösung vorgenommen wurden. Weitere Wiederholungen der Extraktion führten zu keiner Verbesserung. Der Verlust von etwa 25 % des Analyten kann auf Kondensationsreaktionen der Furan-Derivate gemäß Rosenau *et al.* (2017) sowie auf die geringe, jedoch vorhandene Wasserlöslichkeit von Ethylacetat und auf die ebenfalls gute Löslichkeit des 5FFAs in Wasser zurückgeführt werden.

Die Reproduzierbarkeit des Extraktionsschrittes mit Ethylacetat konnte im relevanten Konzentrationsbereich von 50 µM bis 250 µM 5FFA bestätigt werden. Die Wiederfindungsraten, dargestellt in Tabelle 5, belegen eine gleichbleibend hohe Wiederfindung über diesen Konzentrationsbereich hinweg. Der konstante Verlust von etwa 25 % bei gleichzeitig guter Präzision bestätigt die Zuverlässigkeit des entwickelten Extraktionsverfahrens. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden sämtliche weitere Analysen mit dem optimierten Extraktionsprotokoll durchgeführt.

Tabelle 5: Wiederfindung und Range/2 der Ethylacetat-Extraktion verschiedener Konzentrationen an 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) aus konzentrierter Schwefelsäure nach Verdünnen mit Natronlauge. Die Analyse wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

5FFA-Konzentration in µM	Range/2 in %	Wiederfindung in %
50	0,43	76,1
150	0,93	75,4
250	1,17	75,6

Die Extraktion weiterer Zuckerabbauprodukte mit dieser Methode wurde zusätzlich getestet. Furfural und 5MF wurden nur zu sehr kleinen Anteilen bzw. gar nicht wiedergefunden. Dies lässt sich auf deren erhöhte Flüchtigkeit sowie verstärkte Kondensation zurückführen. Die Wiederfindung von HMF betrug < 50 %, war jedoch nicht reproduzierbar. Dementsprechend können weitere Zuckerabbauprodukte durch das Extraktionsverfahren teilweise oder vollständig eliminiert werden.

4.5.3 Optimierung der Erhitzungszeit und -temperatur

Zur Maximierung der Sensitivität bei der Analyse einzelner US sowie zur Anpassung der Empfindlichkeit bei der Bestimmung von US-Paaren wurden Erhitzungszeit und -temperatur der Proben in konzentrierter borathaltiger Schwefelsäure variiert. Optimiert wurde das Verfahren hierbei insbesondere für die in pflanzlichen und algenbasierten Proben relevanten US GalA, GlcA, ManA und GulA (vgl. Kapitel 1.2). Da in natürlichen Matrices vorrangig die Kombinationen GlcA + GalA sowie ManA + GulA auftreten, wurde für diese zusätzlich eine angegliche Abbaurrate angestrebt. Dabei sollten die Abbaubedingungen so gewählt werden, dass gleiche Konzentrationen der beiden US in gleichen 5FFA-Konzentrationen resultieren.

Bereits frühere photometrische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Abbaurrate von Zuckern zu Furanderivaten in konzentrierter Schwefelsäure stark von der Temperatur und Dauer des Erhitzungsschrittes abhängt. So werden GalA und GlcA bei Temperaturen > 80 °C nahezu vollständig umgesetzt, während ManA und GulA bei 55 °C die höchste Empfindlichkeit innerhalb der

photometrischen US-Quantifizierung zeigen (Filisetti-Cozzi und Carpita 1991; Knutson und Jeanes 1968; McComb und McCready 1952).

Zur systematischen Optimierung der Reaktionsparameter diente ein vollfaktorieller DOE-Ansatz. Auf diese Weise ließen sich Zeit-Temperatur-Kombinationen identifizieren, bei denen abhängig von der jeweiligen US die maximale 5FFA-Ausbeute und damit die höchste analytische Empfindlichkeit erreicht wird. Um die Anzahl erforderlicher Experimente zu begrenzen, wurden beide Faktoren jeweils auf drei Stufen variiert. Die Temperatur wurde auf 60, 77,5 und 95 °C festgelegt, die Reaktionszeit auf 5, 10 und 15 min. Für jede US ergaben sich somit neun Kombinationen, die jeweils in Doppelbestimmung hinsichtlich ihres 5FFA-Gehalts analysiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung sogenannter *Main Effects Plots*. Diese stellen für jede Faktorstufe den Mittelwert der 5FFA-Ausbeute dar, gemittelt über die Stufen des jeweils anderen Faktors. Auf diese Weise lassen sich die Haupteffekte von Temperatur und Zeit unabhängig voneinander bewerten. Flache Linien deuten auf geringe Effekte hin, steilere Verläufe auf ausgeprägte Haupteffekte. Die Maxima der Plots markieren die optimalen Parameterwerte (Montgomery 2022). Abbildung 61 zeigt die Plots für die Optimierung der einzelnen US. Die Profile der Plots sowie die erreichten 5FFA-Ausbeuten unterscheiden sich in Abhängigkeit der betrachteten US, es fällt jedoch auf, dass die Steigung der Optimierung der Temperatur stets größer ausfällt als die des zeitlichen Effekts. Daraus lässt sich schließen, dass der Abbau der US in konzentrierter Schwefelsäure sensitiver gegenüber Veränderungen der Erhitzungstemperatur als gegenüber der Reaktionszeit bei konstanter Temperatur reagiert. Die Optimierung des Abbaus der GulA und GlcA zeigt im Zeit-Plot eine größere Steigung verglichen zur GalA und ManA. Dies verdeutlicht nochmals, dass sich die Analyten auch in der Ausprägung der jeweiligen Einflussfaktoren unterscheiden. Insbesondere in den Plots der GalA und ManA zeigt der Rückgang der 5FFA-Konzentration bei erhöhter Temperatur, dass hier bereits ein weiterer Abbau bzw. Kondensation des gebildeten 5FFAs stattfindet, der der Neubildung überwiegt. Die anhand der Maxima in diesen Plots festgelegten optimierten Parameter für eine maximierte Ausbeute finden sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Optimierte Erhitzungszeit und -temperaturen für die verschiedenen Uronsäuren und Uronsäurekombinationen sowie erzielte Abbauraten (5FFA: 5-Formyl-2-furancarbonsäure, GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure, ManA: Mannuronsäure, GulA: Guluronsäure)

Uronsäuren in der Probe	Temperatur in °C	Zeit in min	zu 5FFA umgesetzte Uronsäure in %
GalA	77,5	5	33
GlcA	95	15	84
ManA	77,5	15	11
GulA	95	10	10
GalA + GlcA	77,5	15	30
ManA + GulA	60	15	9

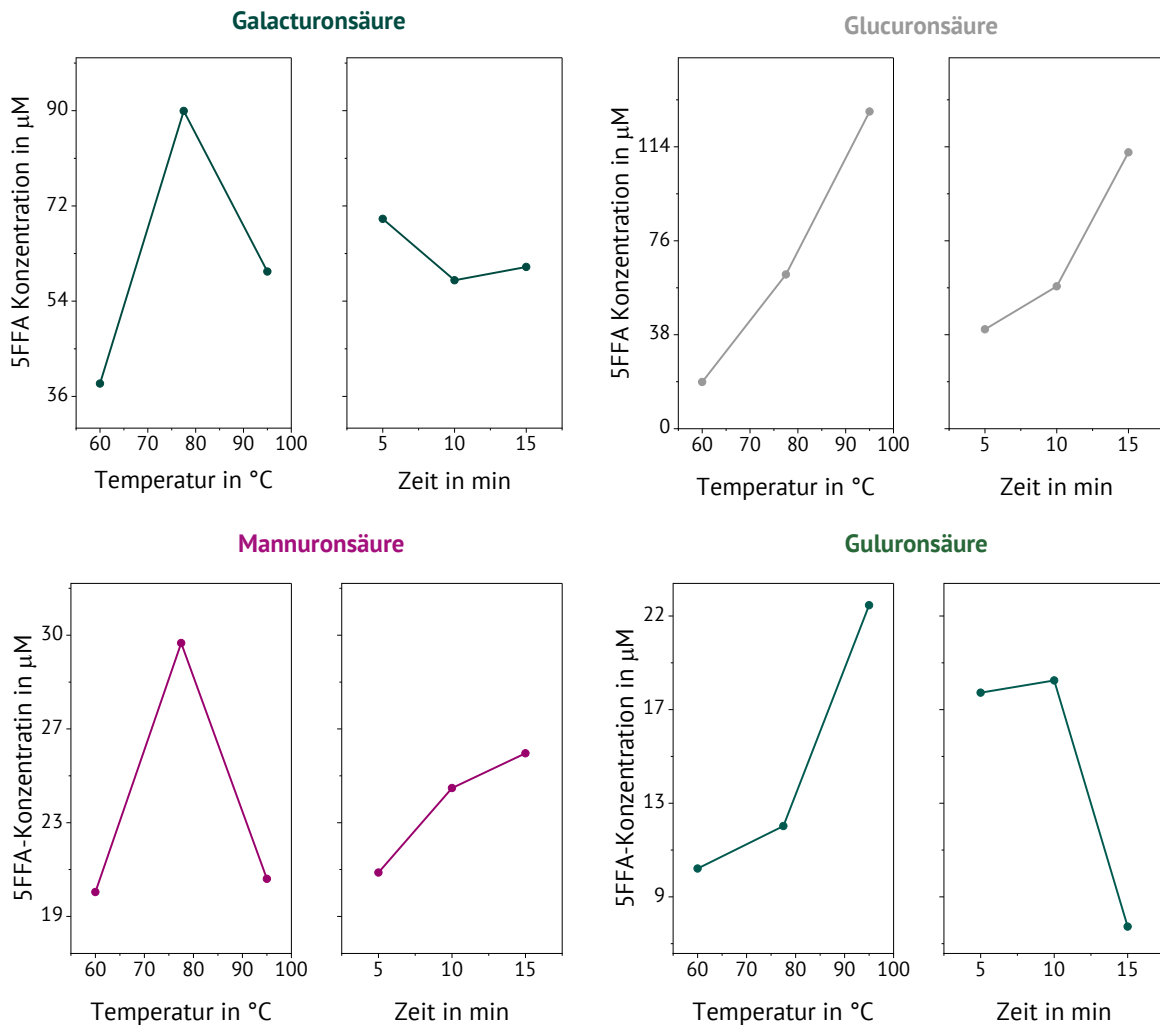


Abbildung 61: Main Effect Plots des Abbaus der verschiedenen Uronsäuren in konzentrierter, borathaltiger Schwefelsäure (12,5 mM). Hierbei wurden die Faktoren Temperatur und Reaktionszeit variiert und optimiert um eine maximale Konzentration an 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) zu erhalten. Eingesetzt wurde die Konzentration der Uronsäure analog einer mittleren Kalibrierkonzentration von 55 mg/L bzw. 283 μM .

Diese Parameter sind jedoch nur für Proben gültig, die jeweils eine einzelne US oder eine dominante US enthalten. Die Zusammensetzung der Monosaccharide sollte daher vorab bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.1). Bei Mischungen mehrerer US müssen die Bedingungen hinsichtlich einer angeglichenen Abbaurates optimiert werden, sodass gleiche Ausgangskonzentrationen der US zu vergleichbaren 5FFA-Mengen führen. Für pflanzliche und algenbasierte Proben sind insbesondere die Kombinationen GalA + GlcA (Landpflanzen) sowie ManA + GulA (Braunalgen) relevant. Die Optimierung erfolgte hier über dreidimensionale Flächendarstellungen (Dimensionen: Zeit, Temperatur, 5FFA-Konzentration) auf Basis der DOE-Ergebnisse (Abbildung 62). Die Schnittpunkte der Flächen identifizieren die Parameterpaare, bei denen beide US gleiche 5FFA-Konzentrationen liefern. Diese Schnittpunkte wurden graphisch ermittelt und zur Veranschaulichung zusätzlich in zweidimensionalen Projektionen dargestellt.

In der Flächendarstellung der GalA- und GlcA-Optimierung (Abbildung 62 A) lassen sich leicht mehrere Schnittpunkte erkennen. Die zweidimensionale graphische Auftragung zeigt eindeutig einen

Schnittpunkt des Temperaturverlaufs bei einer Erhitzungszeit von 15 min und 77,5 °C. Diese Bedingungen wurden nachfolgend für den Säureabbau von GalA- und GlcA-haltiger Proben verwendet. Die Schnittpunktidentifikation fällt bei der Betrachtung der Flächen des GalA und ManA-Abbaus schwerer. Die zweidimensionale Darstellung zeigt jedoch einen Schnittpunkt bei einer Erhitzung von 15 min und 60 °C (Abbildung 62 B).

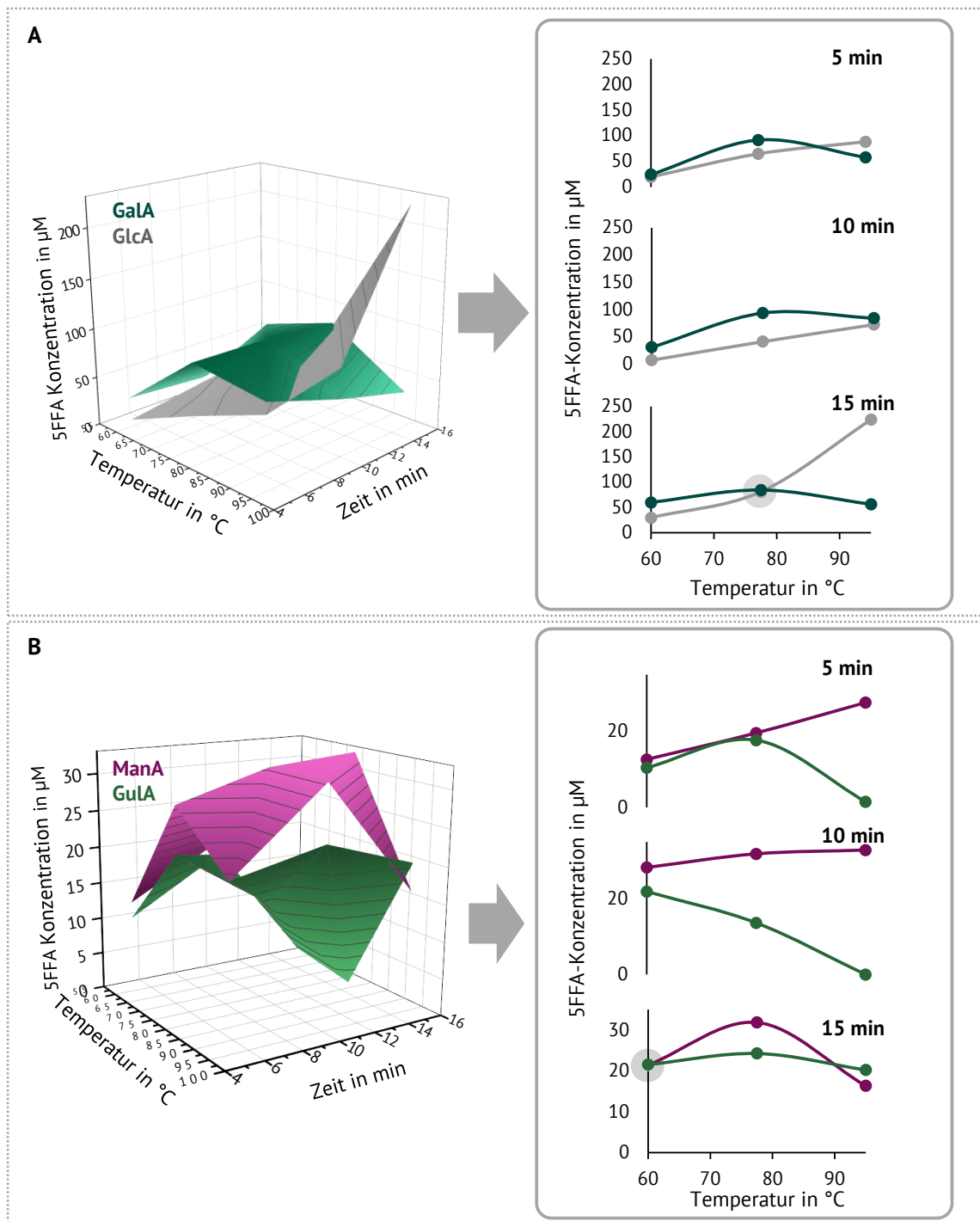


Abbildung 62: Flächenmodelle der Anpassung der Reaktionszeit und -temperatur in konzentrierter Schwefelsäure hinsichtlich eines angeglichenen Abbaus der Urnsäurepaare Galacturonsäure (GalA) und Glucuronsäure (GlcA) (A) sowie Mannuronsäure (ManA) und Guluronsäure (GuLA) (B) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA)

Eine vollständige Umsetzung bzw. Wiederfindung der eingesetzten US als 5FFA konnte dabei in keinem Fall erzielt werden (Tabelle 6). Die größte Wiederfindung als 5FFA wurde für den Abbau der GlcA mit 84 % erreicht. Deutlich niedriger fällt der Wert bei den restlichen US aus. Insbesondere aus dem Abbau der ManA und GulA resultieren nur etwa 10 % des zu Beginn eingesetzten US-Standards in analysierbarem 5FFA. Bei der gemeinsamen Bestimmung der beiden betrachteten Uronsäurekombinationen verringert sich die Wiederfindung nochmals, um eine angegliche Abbaurrate zu gewährleisten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich der Abbau der verschiedenen US trotz identischer Konstitution erheblich in der Reaktionskinetik unterscheidet. Insbesondere die räumliche Anordnung der Hydroxygruppen beeinflusst sowohl Abbaurrate als auch Abbaugeschwindigkeit maßgeblich. Ob der Anteil an nicht als 5FFA wiedergefundene US in der Schwefelsäure verblieb oder zu unbekanntem Produkten umgesetzt wurde, konnte im vorliegenden Ansatz nicht geklärt werden. Für eine abschließende Bewertung wäre ein ergänzender Workflow erforderlich, der eine Abtrennung und Anreicherung verbliebener US aus verdünnter oder konzentrierter Säure ermöglicht, um diese beispielsweise mittels HPAEC-PAD oder HPLC-ELSD zu quantifizieren.

4.5.4 Entwicklung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Die Präzision des gesamten Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von 5FFA mittels der UHPLC-UV-Methode erwies sich, basierend auf zehn Wiederholungsanalysen einer GalA-Standardlösung gemäß Abschnitt 3.6.1, als unzureichend. Der Variationskoeffizient des Verfahrens betrug 71 %. Nach Ausschluss von drei Ausreißern, die anhand des Dixon-Q-Tests ($\alpha = 0,05$) identifiziert wurden, verbesserte sich die Präzision auf einen Variationskoeffizienten von 30 %. Gleichwohl weist auch dieser Wert noch auf eine erhebliche Streuung hin. Angesichts der hohen Präzision sowohl des Extraktionsverfahrens (vgl. Tabelle 2) als auch der chromatographischen Analyse (vgl. Kapitel 4.5.1) ist davon auszugehen, dass die beobachtete Variabilität primär auf inkonsistente Abbauraten während der Erhitzungsphase zurückzuführen ist. Diese Problematik deckt sich mit den Befunden von Yapo (2012), der verschiedene Messergebnisse vergleichbarer Proben, die photometrisch in unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht wurden, zusammenfasst.

Zur Minimierung dieses Effekts wurde ein interner Standard in die Methode inkludiert, der Schwankungen während des Erhitzungsschrittes ausgleichen soll. Hierzu wurde eine Substanz mit chemischer Ähnlichkeit sowie vergleichbarem Abbauverhalten in konzentrierter Säure benötigt, die natürlicherweise nicht in den BS-Proben vorkommt. Diese Eigenschaften bringen nur Zucker mit sich. Wie im vorherigen Kapitel in Abbildung 55 gezeigt, variieren die Abbauraten der verschiedenen Monosaccharide jedoch stark. Zudem schränkte die Tatsache, dass der eingesetzte Standard nicht natürlicherweise in den analysierten Proben vorkommen darf, die Suche ein. Aus diesem Grund wurden isotope markierte Standardsubstanzen zur Analyse verwendet, sodass die finale Methode als SIVA verstanden werden kann.

Die vollständig ^{13}C -markierte GalA ($^{13}\text{C}_6$ -GalA) sowie GlcA ($^{13}\text{C}_6$ -GlcA) sind kommerziell erhältlich und wurden nachfolgend in einer mittleren Kalibrierkonzentration von 40 mg/L zu jeder Analyse

zugesetzt. Da entsprechende ManA- und GulA-Standards nicht erhältlich waren, wurde für die Analyse der Alginate-Proben ebenfalls der $^{13}\text{C}_6$ -GalA-Standard verwendet.

Da eine chromatographische Unterscheidung des 5FFAs sowie des aus dem Abbau des Standards resultierenden $^{13}\text{C}_6$ -5FFAs mittels UV-Detektion aufgrund von Koelution nicht möglich ist, wurde eine MS-Detektion eingeführt. Die Quantifizierung der US basiert dabei auf dem Flächenverhältnis der SIM-Spuren für das [M-H]⁻-Ion der beiden 5FFA-Spezies bei einem m/z von 139 bzw. 145. Abbildung 63 zeigt den Vergleich der für die vier analysierten US erhaltenen Kalibriergeraden ohne Verwendung der jeweiligen isotoopenmarkierten Standardsubstanz (A) und mit dieser (B). Hier wird deutlich, dass erst durch die Verwendung des internen Standards ein guter linearer Zusammenhang, gekennzeichnet durch einen Korrelationskoeffizienten $> 0,999$, erreicht werden kann. Insbesondere für die Analyse der GalA und GlcA haltigen Proben ist eine deutliche Verbesserung zu erkennen. Hier konnte ohne Standardsubstanz kein mathematischer Zusammenhang der Kalibrierpunkte hergestellt werden. Weitere Validierungsparameter dieser Methode werden in Kapitel 4.7.1 dargelegt.

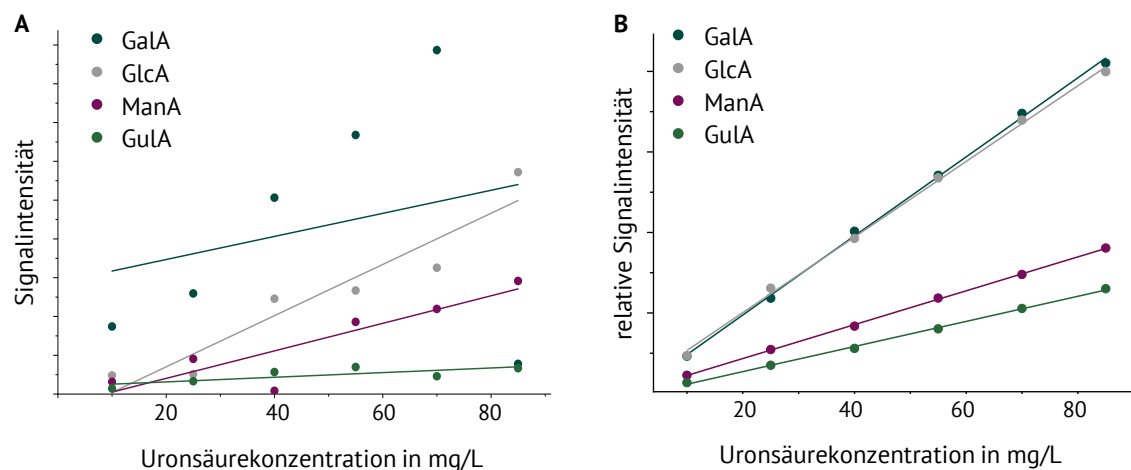


Abbildung 63: Kalibriergeraden der verschiedenen Uronsäuren im Bereich 10 – 85 mg/L, analysiert mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion ohne internen $^{13}\text{C}_6$ -markiertem Uronsäurestandard (A) und mit diesem (B) (GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure, ManA: Mannuronsäure, GulA: Guronsäure)

Auch die Kalibriergeraden, angefertigt unter den für die gemeinsame Uronsäurebestimmung optimierten Bedingungen der Analyse von GalA + GlcA sowie ManA + GulA stimmen gut bis sehr gut überein (Abbildung 64). Insbesondere die Kalibriergeraden für die der GalA und GlcA bei Anwendung der SIVA basierten Analyse sind nahezu identisch, was an den beiden Kalibrierfunktionen (Abbildung 64 A) erkennbar ist. Somit resultieren vergleichbare US-Analytkonzentrationen in den gleichen relativen Flächenverhältnissen und den gleichen berechneten Konzentrationen. Bei der Analyse der ManA und GulA (Abbildung 64 B) wurde auf Grund der geringeren Nachweisempfindlichkeit der Kalibrierbereich mit 25 – 100 mg/L US etwas höher angesetzt. Es konnten nicht vollständig deckungsgleiche Kalibriergeraden erreicht werden, jedoch zeigen diese eine ausreichende Ähnlichkeit, sodass keine nennenswerten Unterschiede in den quantifizierten US Mengen abhängig von der verwendeten Kalibrierung zu erwarten sind.

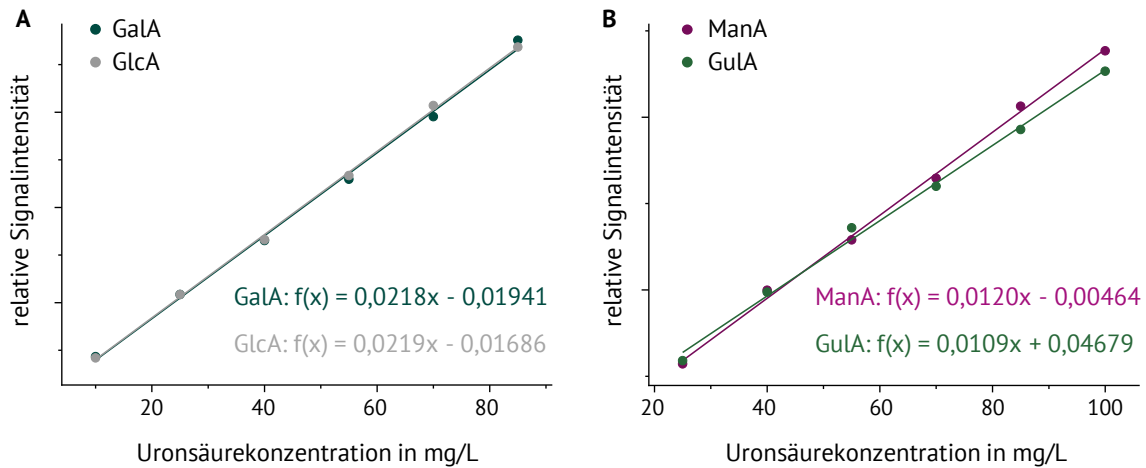


Abbildung 64: Kalibriergeraden sowie zugehörige Kalibrierfunktion für Galacturonsäure (GalA) und Glucuronsäure (GlcA) (A) sowie Mannuronsäure (ManA) und Guluronsäure (GulA) (B) analysiert unter optimierten Reaktionsbedingungen mittels der entwickelten Stabilisotopenverdünnungsanalyse

4.6 Evaluierung struktureller Einflussfaktoren in der Stabilisotopenverdünnungsanalyse

In der bisherigen Methodenentwicklung wurden lediglich US-Standard-Monosaccharide betrachtet. Jedoch liegen US in den in dieser Arbeit relevanten pflanzlichen und algenbasierten BS nicht in monomerer, sondern häufig eingebunden in polymeren Strukturen vor. Insbesondere bei Polyuronsäuren, wie es Alginat oder das HG des Pektins darstellen, muss der Einfluss des DP und somit die Vollständigkeit der Hydrolyse des Polymers in der konzentrierten Säure, untersucht werden. Zudem können US an verschiedenen Positionen mit Essigsäure oder Methanol verestert oder verethert vorliegen (vgl. Kapitel 1.3), was deren Abbauverhalten beeinflussen kann. Eine weitere wichtige Einflussgröße stellt die Bindungsstabilität der glycosidischen Bindung zu im Polymer eingebundenen US dar. Hier gelten die Aldobiuronsäurebindungen als besonders schwer hydrolysierbar (vgl. 3.2.1). Dieser Einfluss in der SIVA-basierten Uronsäureanalyse wird nachfolgend ebenfalls diskutiert.

4.6.1 Einfluss des Polymerisationsgrades uronsäurehaltiger Oligosaccharide

4.6.1.1 Isolierung von Oligouronsäuren

Zur Beurteilung des Einflusses des DP verschiedener US-Oligosaccharide wurden GalA haltige HGO (vgl. Kapitel 3.3.1) und ManA + GulA haltige AOS (vgl. Kapitel 3.3.2) aus Polygalacturonsäure bzw. Natriumalginat isoliert. Hierbei wurden Oligosaccharide eines DP von 3 bis 10 angestrebt.

Zur Herstellung der HGO wurde Polygalacturonsäure mittels einer *endo*-Polygalacturonase verdaut, welche die zufällige Spaltung von α -1,4-Bindungen zwischen den D-GalA-Einheiten katalysiert (Benen *et al.* 1999; Kant *et al.* 2013). In Abhängigkeit der eingesetzten Enzymmenge und Inkubationszeit wurde eine unterschiedliche Verteilung gebildeter HGO erreicht. In diesem Ansatz wurde sowohl die Enzymmenge von 4,5 – 18 U/g als auch die Inkubationszeit von 0,5 – 2 h variiert, um eine möglichst breite Oligosaccharidverteilung im gewünschten DP-Bereich zu erreichen. Die entsprechenden relativen Ausbeuten werden in Abbildung A14 im Anhang dargestellt. Durch das

Mischen zweier fermentierter Ansätze (18 U/g, 1,5 h und 9 U/g, 2 h) konnten alle gewünschten DPs in ausreichender Menge erhalten werden. Das Produktspektrum des finalen Fermentationsansatzes der Polygalacturonsäure zu den α -1,4 gebundenen HGO ist in Abbildung 65 A dargestellt. Mittels MS-Detektion konnten so Oligosaccharide bis zu einem DP von 18 nachgewiesen werden.

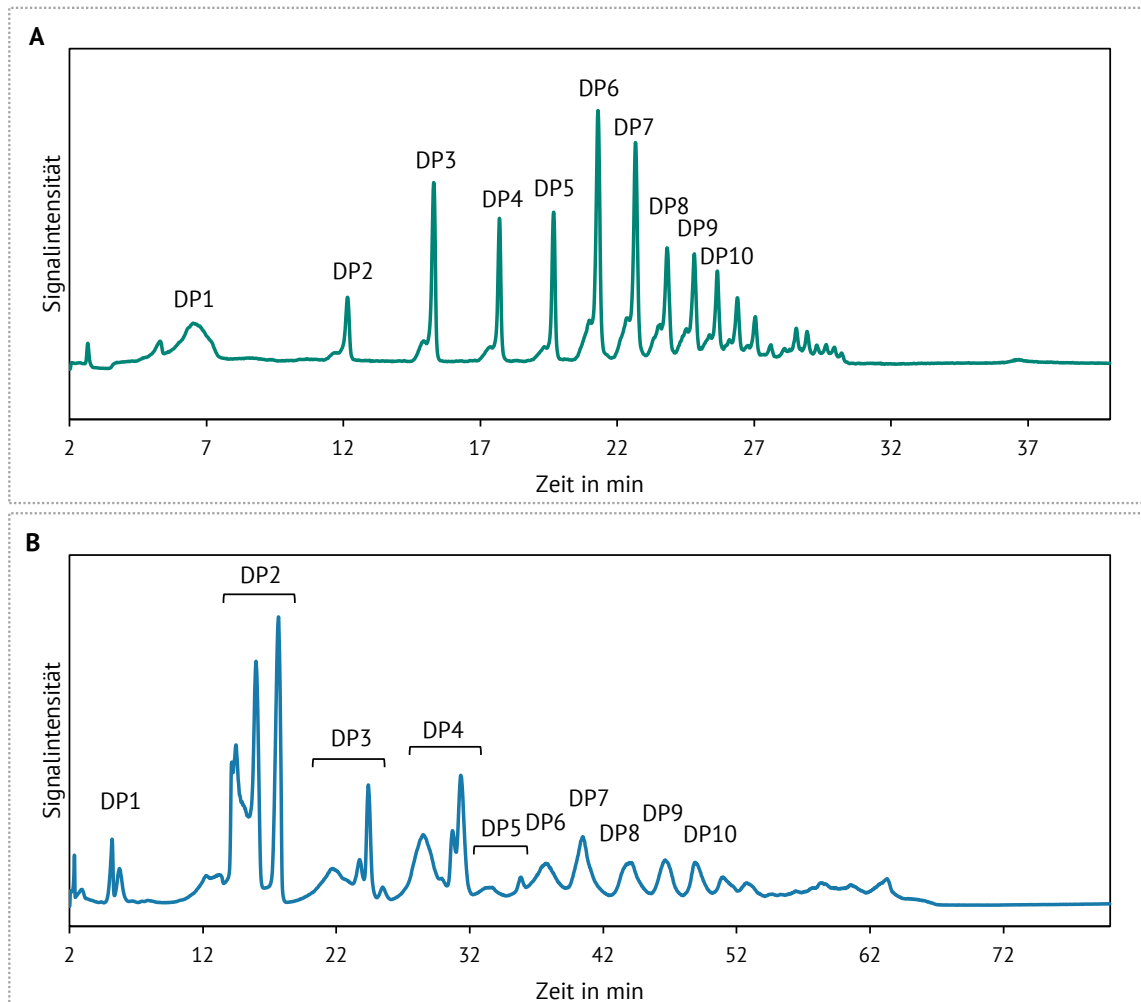


Abbildung 65: Selected Ion-Chromatogramm nach der Trennung mittels hydrophiler Interaktionschromatographie des Fermentationsansatzes der Polygalacturonsäure mittels *endo*-Polygalacturonanase zu gesättigten Homogalacturonan-Oligosacchariden (A) sowie des Hydrostats des Alginats zu Alginat-Oligosacchariden (B) mit variierenden Polymerisationsgraden (DP)

Die Gewinnung der HGO erfolgte nach einem *Upscale* der Fermentation mittels semipräparativer HILIC-ELSD (Anhang, Abbildung A15). Oligosaccharide mit einem DP von 3 bis 10 konnten jeweils in Mengen von über 10 mg isoliert werden. Durchgeführte MS-Analysen bestätigten die Identität der isolierten Oligosaccharide. Die Reinheit dieser wurden unter Voraussetzung eines vergleichbaren Detektorresponses gemäß den HILIC-MS-Peakflächen der jeweiligen Fraktionen bestimmt (Tabelle 7). Mit steigendem DP nahm die Reinheit der isolierten Fraktionen ab, von 100 % bei Oligosacchariden mit niedrigen DP zu 85 % bei höheren DP. Besonders herausfordernd gestaltete sich die semipräparative Isolierung des Oligosaccharids mit DP 8, dessen Fraktion lediglich eine

maximale Reinheit von 80 % erreichte. Um die Verlässlichkeit der folgenden Ergebnisse zu gewährleisten, wurde dieser Standard daher von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

Tabelle 7: Nach Trennung mittels hydrophiler Interaktionschromatographie und massenspektrometrischer Detektion berechnete Reinheit der isolierten gesättigten Homogalacturonsäureoligosaccharide (HGO) sowie Alginatoligosaccharide (AOS)

Polymerisationsgrad	HGO	AOS
	Reinheit in %	Reinheit in %
3	100	90
4	92	92
5	99	96
6	93	90
7	92	86
8	80	52
9	88	86
10	85	88

Die AOS wurden durch eine milde Säurehydrolyse des Alginat-Standards bei einem pH-Wert von 4 hergestellt. Auch hier wurden zwei Hydrolyseansätze einer Hydrolysezeit von zwei und drei Stunden vereinigt, um ein breiteres und ausgewogeneres Oligosaccharidprofil zu erhalten. Das resultierende Oligosaccharidprofil wurde ebenfalls mittels HILIC-MS ermittelt und ist in Abbildung 63 B dargestellt. Pro DP wurden hier mehrere Signale und mit zunehmender Größe der Oligosaccharide breitere Signale detektiert. Dies ist auf einen unterschiedlichen Aufbau der Oligosaccharide aus variierender Anzahl und Sequenz an Gula- und ManA-Einheiten zurückzuführen. Mit zunehmendem DP nimmt somit die Vielfalt der erhaltenen Oligosaccharide einer Kettenlänge zu. Die verschiedenen Oligosaccharide mit gleichem DP konnten hier chromatographisch nicht bzw. nur unzureichend getrennt werden und erscheinen als breite Signale. Da das Ziel der Analyse lediglich in der Bewertung des Einflusses des DP auf die SIVA-basierte Uronsäureanalyse liegt, wurde die Auftrennung der Oligosaccharide eines gleichen DP nicht weiterverfolgt. Wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, besteht das ausgewählte Alginat überwiegend aus ManA (M/G = 2,6), womit auch davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier um ManA-reiche Oligosaccharide handelt. Das Hydrolysat wurde vergleichbar zu den HGO semipräparativ fraktioniert (Anhang, Abbildung A16). Allerdings gestaltete sich die Gewinnung hochreiner Fraktionen aufgrund breiter und überlappender Signale im Vergleich zu den HGO deutlich schwieriger. Die Reinheit der teils zu sehr kleinen Mengen (2 – 3 mg) erhaltenen Oligosaccharidfraktionen ergab sich ebenfalls aus HILIC-MS Analysen und ist in Tabelle 7 zu finden. Das entsprechende AOS mit einem DP 8 konnte nur in einer nicht zufriedenstellenden Reinheit von 52 % erhalten werden. Aufgrund teils koeluerender Oligosaccharide mit höherem und niedrigerem DP ließ sich keine ausreichende Abtrennung erzielen, sodass dieser Standard für die nachfolgenden Analysen keine Verwendung fand.

4.6.1.2 Analyse der Oligouronsäuren

Zur Beurteilung des Einflusses des DP von Polyuronsäuren auf die entwickelte Uronsäureanalyse wurden die isolierten HGO- und AOS-Standards (Kapitel 4.6.1.1) mit der vorgestellten SIVA-basierenden Methode analysiert. Als Referenz diente dabei ein GalA- bzw. ManA-Monosaccharidstandard, dessen erhaltene relative Fläche als 100 % gesetzt wurde. Lösungen aller Oligosaccharidstandards wurden mit vergleichbaren Konzentrationen von 100 µM des entsprechenden Monosaccharidäquivalents analysiert. Für die Analyse der AOS wurde dabei die optimierte Methode der ManA + GulA-Bestimmung gewählt.

Bei der Analyse der HGO lagen die Wiederfindungsraten aller Oligosaccharidstandards im Bereich von 100 ± 7 % (Tabelle 8), und es konnte keine Korrelation zwischen der Zunahme des DP und dem bestimmten Uronsäuregehalt festgestellt werden. Die beobachteten Schwankungen in den Wiederfindungsraten sind vermutlich auf Unterschiede in der Reinheit der verwendeten Oligosaccharidstandards zurückzuführen.

Tabelle 8: Wiederfindung (WDF) von Galacturon- und Mannuron- bzw. Guluronsäure in Homogalacturonsäureoligosacchariden (HGO) und Alginatoligosaccharide (AOS) mit definiertem Polymerisationsgrad, analysiert mittels der entwickelten LC-MS-Methode. Der entsprechend analysierter Monosaccharidstandard wurde dabei als 100 % gesetzt.

Polymerisationsgrad	HGO	AOS
	WDF in % des Monosaccharids	WDF in % des Monosaccharids
3	99,39 ± 2,28	100,45 ± 0,45
4	93,05 ± 0,42	105,23 ± 0,59
5	105,01 ± 0,25	97,19 ± 1,45
6	100,48 ± 5,00	106,45 ± 0,52
7	99,31 ± 0,37	110,10 ± 3,66
9	105,57 ± 0,41	108,93 ± 2,55
10	97,29 ± 0,60	95,27 ± 3,20

Die Wiederfindungen für die analysierten AOS liegen im Bereich von 95 – 110 % und sind somit tendenziell etwas höher als die der HGO (Tabelle 8). Ob dies auf einen geringfügig verbesserten Abbau der gebundenen US bzw. eine verminderte Weiterreaktion des hier gebildeten 5FFAs zurückzuführen ist, kann nicht beurteilt werden. Dennoch bewegen sich alle Wiederfindungen um 100 % und auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen DP und Wiederfindung gefunden werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass lösliche oligo- und vermutlich auch polymere US wie pektinhaltige oder alginathaltige LBS ebenfalls mit der entwickelten SIVA-basierte Uronsäureanalyse, ohne Vorbehandlung des Probenmaterials, analysiert werden können. UBS hingegen erfordern aufgrund ihrer wasserunlöslichen Natur eine solubilisierende Säurevorbehandlung. Diese wurde anhand der Karotten UBS ausgehend von dem durch Saeman *et al.* (1945) vorgeschlagenen Verfahren für cellulosereiches, unlösliches Material optimiert. Allerdings wurden die Proben ausschließlich bei Raumtemperatur behandelt, um die vorzeitige Bildung von 5FFA zu vermeiden. Dabei wurde die Verweilzeit der Proben in der 12 M sowie in der verdünnten 1,6 M Schwefelsäure variiert und

die 5FFA-Bildung chromatographisch überwacht. Hier erwies sich die Kombination aus einer zwei-stündigen Behandlung mit der 12 M Säure und eine anschließende Verweilzeit von 10 min der Probe unter stetigem Schütteln in der verdünnten Säure als optimal, da so die größte US-Menge quantifiziert wurde. Ob somit tatsächlich eine vollständige quantitative Analyse der US möglich ist oder ein Teil dieser in dem bis zuletzt unlöslichen Material verblieb, bleibt offen und sollte zukünftig weiterverfolgt werden.

4.6.2 Einfluss ester- und ethergebundener Substituenten

Werden pflanzliche Proben analysiert, spielen Esterbindungen an der GalA des Pektinrückgrats eine wichtige Rolle. Hier können sowohl die Carboxygruppen methylverestert als auch die Hydroxygruppen acetylverestert vorliegen (vgl. Kapitel 1.3.1.1) (Caffall und Mohnen 2009). Die Ausbildung von Methylethern soll in dieser Arbeit vorrangig am Beispiel des GX diskutiert werden, welches insbesondere in Harthölzern 4-O-Me-GlcA enthält (vgl. Kapitel 1.3.1.2) (Ebringerová *et al.* 2005).

McComb und McCready (1952) untersuchten den Einfluss der Methylester der GalA unter Verwendung eines entsprechenden GalA-Monosaccharidstandards in einem photometrischen Assay. Sie konnten zeigen, dass eine kurzzeitige Erhitzung über 5 min in konzentrierter Schwefelsäure nicht ausreicht, um die Esterbindungen vollständig zu spalten. Nach einer alkalischen Vorbehandlung ließ sich die methylierte GalA hingegen vollständig wiederfinden.

Zur Bewertung des Einflusses des DM auf die GalA-Bestimmung wurden die LBS aus den drei Rohmaterialien Zitronenschale, Apfel- und Karottentrester jeweils in Wasser oder in 0,05 M Natronlauge gelöst und anschließend mittels SIVA analysiert. In allen Fällen führte die alkalische Vorbehandlung und die damit verbundene Hydrolyse der Esterbindung zu höheren GalA-Gehalten. Während der Anstieg bei den LBS aus Karotte mit 4,63 % nicht erheblich war, zeigten Apfeltrester- und Zitronenschalen-LBS Zunahmen von 27,71 % bzw. 11,24 %. Dies verdeutlicht, dass die Esterbindungen in konzentrierter Schwefelsäure nicht (vollständig) hydrolysiert werden die entsprechenden US sich so der MS-Bestimmung entziehen. Neben den Methylestern werden auch Acetylgruppen durch alkalische Behandlung abgespalten.

Für die UBS war eine alkalische Vorbehandlung nicht anwendbar, da für diese zunächst eine saure Vorhydrolyse zum Aufschluss des Materials erforderlich war, um eine GalA-haltige Lösung zu erhalten.

Methylether an Position O4 der GlcA im GX werden während des Abbaus zu 5FFA abgespalten. Diese Substitution spielt jedoch eine Rolle für die Abbaugeschwindigkeit der GlcA, da hier die Ausbildung des Lactons blockiert wird, sodass sich der Abbau gemäß verschiedenen Quellen dem der GalA angleicht (Li *et al.* 2007; Scott 1979). Dies wurde in dieser Arbeit anhand des in Kapitel 4.5.3 beschriebenen DOE-Ansatzes untersucht. Abbildung 66 A zeigt hierzu den *Main Effects Plot* des Abbaus der 4-O-Me-GlcA. Dieser unterscheidet sich deutlich vom Profil des in Abbildung 61 gezeigten *Plots* der GalA, was die durch Li *et al.* (2007) aufgestellte Hypothese der Vergleichbarkeit mit GalA widerlegt. Die Optimaltemperatur für eine besonders empfindliche Messung der 4-O-Me-GlcA liegt, vergleichbar zur GlcA, bei 95 °C, wobei die Erhitzungszeit nur einen minimalen Einfluss nimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Abbau der 4-O-Me-GlcA ebenfalls mit den für GlcA

ermittelten Parametern (95 °C und 15 min, vgl. Kapitel 4.5.3) durchgeführt. Die Kalibriergeraden der GlcA und der 4-O-Me-GlcA (Abbildung 66 B) zeigen, dass die Abbaubedingungen im Falle der verwendeten Monosaccharidstandardsubstanzen nicht identische, aber vergleichbare Ergebnisse liefern. Dies zeigt, dass auch 4-O-Me-GlcA-haltige Proben entsprechend der GlcA-haltigen Materialien behandelt werden können. Im oberen Kalibrierbereich kommt es zu geringfügig höheren Ergebnissen durch Anwendung der 4-O-Me-GlcA-Kalibrierung. Die US-Konzentrationen der untersuchten Harthölzer (Kapitel 4.7.2) wurden deshalb zum Vergleich basierend auf der GlcA- sowie der 4-O-Me-GlcA-Kalibriergerade berechnet.

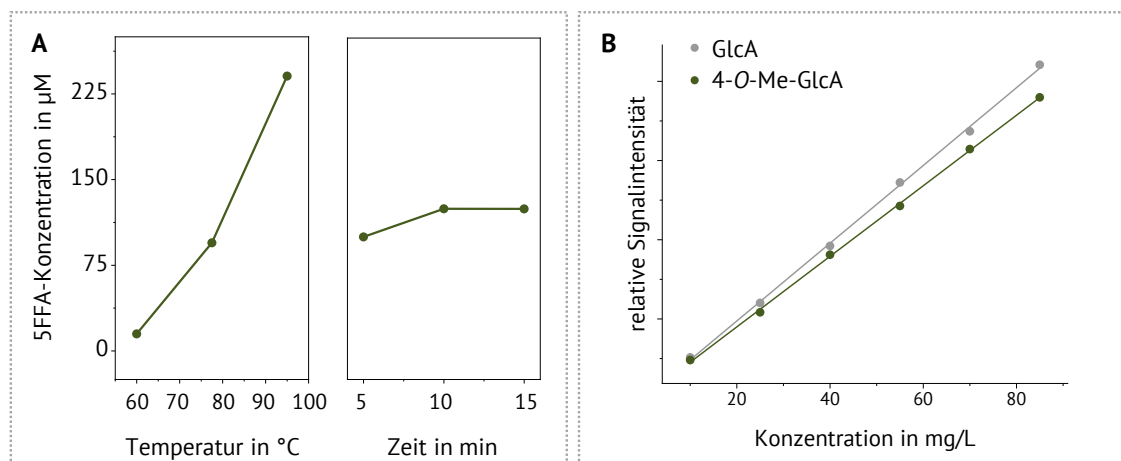


Abbildung 66: Main Effects Plots des Abbaus der 4-O-Methyl-Glucuronsäure (4-O-Me-GlcA) zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) (A) sowie die beiden Kalibriergeraden der Stabilisotopenverdünnungsanalyse von Glucuronsäure (GlcA) und 4-O-Me-GlcA nach Erhitzen bei 95 °C für 15 min

4.6.3 Einfluss der Aldobiuronsäurebindung

Die als Aldobiuronsäurebindung bezeichnete glycosidische Bindung zwischen einem Neutralzucker und einer US gelten als besonders stabil (vgl. Kapitel 3.2.1). Aus diesem Grund wurde die Freisetzung der US aus solch einer Bindung am Beispiel des GX überprüft. Hierzu wurden zunächst GXOS mit einem definierten DP und einer 4-O-Me-GlcA-Substitution aus einem Buchenxylan-Standard isoliert.

4.6.3.1 Isolierung von Glucuronoxylanoligosacchariden

Zur Gewinnung der GXOS wurde das Buchenxylan mittels *endo*-Xylanasen verdaut und die entstandenen Oligosaccharide separiert. Zur Hydrolyse des Xylans standen zwei Enzyme, eine GH10- und eine GH11-Xylanase, zur Verfügung. Diese beiden Enzyme wurden hinsichtlich ihrer Spaltmuster sowie der Ausbeute zur Gewinnung der GXOS beurteilt. Das vom Enzym abhängige Produktspektrum wird durch die beiden HPAEC-Chromatogramme in Abbildung 67 verdeutlicht. Im vorderen Bereich des Chromatogramms (bis 40 min) eluieren die neutralen, unsubstituierten XOS, im hinteren Bereich folgen die GXOS. Die entsprechenden Oligosaccharide wurden mittels MS-Detektion identifiziert. Hierbei folgt die Nomenklatur der durch Fauré *et al.* (2009) vorgeschlagenen Systematik (vgl. Kapitel 3.3.3).

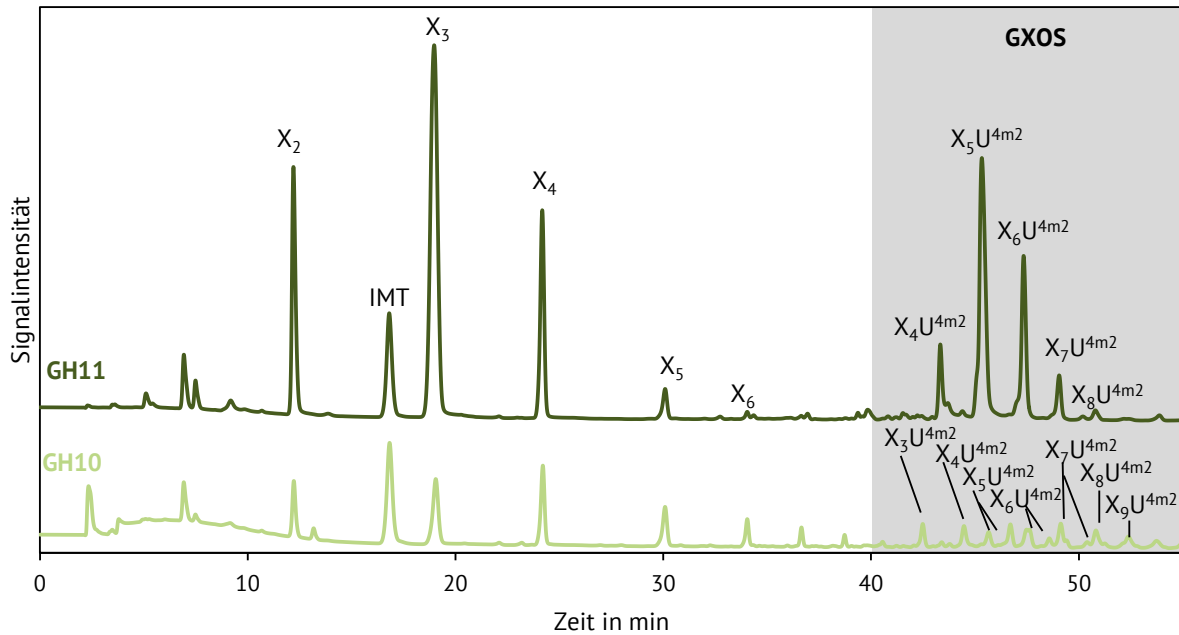


Abbildung 67: Chromatogramm, detektiert mit gepulst amperometrischer Detektion, der (optimierten) Fermentationen mittels Glycosidhydrolase (GH) 10 und 11 nach Trennung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie. Isomaltotriose (IMT) wurde hier als interner Standard zugesetzt. Die Benennung der detektierten Xylooligosaccharide und Glucuronoxylanoligosaccharide (GXOS) erfolgt nach Fauré *et al.* (2009).

Die GH10-Xylanase lieferte ein breiteres Produktspektrum an GXOS, wobei X_3U^{4m2} gemäß Biely *et al.* (2016) das kleinste Oligosaccharid darstellt. Da dieses Enzym im Vergleich zur GH11-Xylanase mehr Spaltmöglichkeiten besitzt, entstehen hier auch isomere Strukturen ($X_{5-7}U^{4m2}$) innerhalb eines DPs.

Die GH11-Xylanase erzeugt ein etwas übersichtlicheres GXOS-Spektrum mit X_4U^{4m2} als kleinstes Fragment. Gemäß der in Kapitel 3.3.3 vorgestellten enzymspezifischen Spaltpmuster handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um das Oligosaccharid $XU^{4m2}XX$ (Biely *et al.* 2016). Strukturisomere GXOS wurden durch das GH11-Enzym nicht generiert. Aufgrund des einfacheren Produktspektrums sowie der höheren erreichten Ausbeuten an GXOS, wurde der Enzymverdau ausschließlich mit der GH11-Xylanase für die nachfolgende semipräparative Gewinnung der Oligosaccharide optimiert. Hierzu wurden die Inkubationszeit sowie die Enzymmenge/-aktivität betrachtet, um eine möglichst hohe Ausbeute an GXOS sowie eine umfangreiches GXOS-Spektrum zu erhalten. Die Ausbeuten wurden jeweils relativ zur Fläche des internen Standards berechnet und sind in Abbildung A17 im Anhang vergleichend dargestellt. Als optimale Hydrolysebedingung für die GH11-vermittelte Fermentation wurde 0,25 U/mg Substrat bei 50 °C für 5 h identifiziert. Das erhaltene Produktspektrum ist in Abbildung 67 dargestellt.

Die neutralen XOS wurden mittels SPE aus dem Hydrolysat entfernt. Dabei erfolgte die Retention der bei neutralem pH-Wert negativ geladenen GXOS an einem starken Anionenaustauscher, wodurch eine effektive Trennung von den XOS durch einfaches Waschen mit Wasser ermöglicht wurde. Die anschließende HPAEC-Analyse des Eluats bestätigte die erfolgreiche Abtrennung der XOS (vgl. Anhang, Abbildung A18).

Zur vollständigen Elution der GXOS wurden verschiedene Elutionsmittel getestet, darunter Natriumacetat-, Ameisensäure- sowie ammoniumformiathaltige Lösungen. Die Natriumacetat-Eluat (100 mM) konnten direkt mittels HPAEC analysiert werden, führten jedoch aufgrund der erhöhten Salzkonzentration zu einer signifikanten Retentionszeitverschiebung und einem veränderten Trennverhalten der Analyten im Vergleich zum ursprünglichen Hydrolysat. Formiathaltige Eluenten zeigten bei gleicher Konzentration eine höhere Elutionskraft im Vergleich zu Acetat, wodurch geringere Volumina für die vollständige Elution erforderlich waren. Verbleibende Ameisensäure konnte durch wiederholtes Gefriertrocknen vor der Analyse aus dem Eluat entfernt werden. Im Gegensatz dazu erforderte die vollständige Entfernung von Ammoniumionen eine zusätzliche Kationenaustauscher-SPE sowie anschließendes Trocknen der Probe. Aufgrund dieses zusätzlichen Aufreinigungsschritts wurde für die Elution eine 100 μ M Ameisensäurelösung gewählt. Da eine verlängerte Verweilzeit der GXOS in der sauren Lösung eine nachträgliche Hydrolyse begünstigen kann, wurde das finale Eluat teilweise mit Natronlauge neutralisiert, um diesen Effekt zu minimieren.

Zur semipräparativen Isolierung wurden GXOS ausgehend von 3 g des Buchenxylan-Standards hergestellt. Die nach der SPE erhaltene Mischung ($X_{4-8}U^{4m2}$) wurde mittels HILIC semipräparativ fraktioniert (Anhang, Abbildung A18) und die erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPAEC-PAD auf ihre Reinheit untersucht. Hierbei konnten die Fraktionen ausschließlich in einer Reinheit < 90 % erhalten werden (Tabelle 9), da in jeder Fraktion immer ein nicht mittels HILIC abtrennbarer Oligosaccharidanteil des jeweils um eine Xyl-Einheit kleineren GXOS enthalten war.

Tabelle 9: Mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischer Detektion bestimmte Reinheit der isolierten Glucuronoxylanoligosaccharide, die Benennung der Strukturen erfolgt nach Fauré *et al.* (2009).

Struktur	Reinheit in %
X_4U^{4m2}	69
X_5U^{4m2}	86
X_6U^{4m2}	85
X_7U^{4m2}	83
X_8U^{4m2}	67

Die Fraktionen $X_{5-7}U^{4m2}$ wiesen mit > 80 % eine für die nachfolgend durchgeführte SIVA-basierte Uronsäureanalyse als ausreichend erachtete Reinheit auf. Die übrigen beiden Fraktionen wurden aufgrund zu geringer Reinheit von den weiteren Tests ausgeschlossen.

Zur letztendlichen Identifizierung der Position der 4-O-Me-GlcA-Substitution wurden verschiedene 2D-NMR-Experimente durchgeführt, welche nachfolgend am Beispiel des X_5U^{4m2} kurz erläutert werden. Bereits im 1H -NMR-Spektrum lassen sich das Singulett der Methylgruppe der US ($\delta_H = 3,48$ ppm) sowie die Signale der anomeren Protonen im Bereich 5,29 – 4,45 ppm identifizieren und durch ihre unterschiedlichen Kopplungskonstanten den α - und β -Anomeren der Zuckereinheiten zuordnen. Hierbei konnten die Signale des anomeren Protons der reduzierenden Xyl-Einheit mithilfe eines XOS-Standards zugeordnet werden. Die Kreuzsignale der $^2J_{C,H}$ -Kopplungen im HSQC-

Spektrum (Abbildung 68) wurden durch das HSQC-TOCSY-Spektrum in einzelne Spinsysteme und somit in die verschiedenen Bestandteile der terminalen-nichtreduzierenden Xyl, der substituierten Xyl, der reduzierenden Xyl sowie der unsubstituierten mittleren Xyl-Einheiten unterteilt. Entsprechende Nachbarschaftsbeziehungen der C/H-Kreuzsignale wurden durch das H2BC-Spektrum hergeleitet, woraus sich die Zuordnung zu C/H2-5 der Monosaccharidbestandteile ergab (Abbildung 68). Die vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen sowie die entsprechenden NMR-Spektren finden sich in Tabelle A6 bzw. A19 im Anhang.

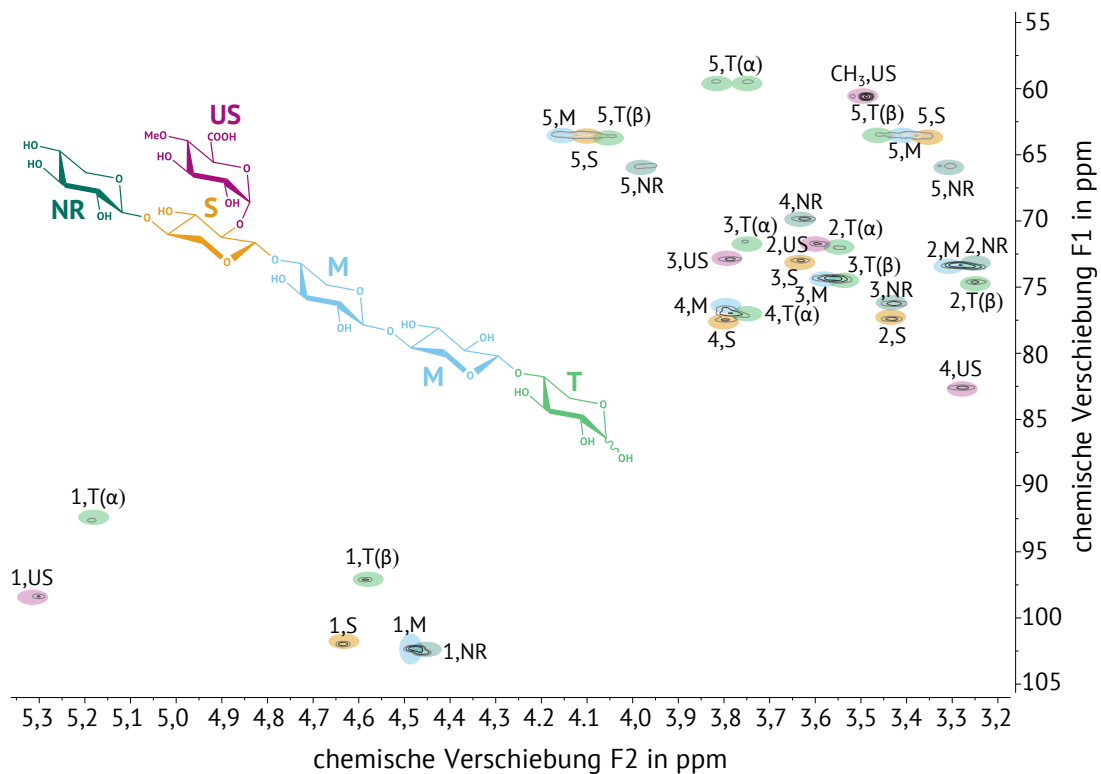


Abbildung 68: Hetero Single Quantum Coherence-Spektrum des isolierten $XU^{4m2}XXX$ -Standards, aufgenommen in Deuteriumoxid, referenziert auf Aceton ($\delta_{H/C} = 2,22$ ppm/30,89 ppm). Die Nomenklatur der Signale erfolgt gemäß der Position des zugeordneten C/H-Signals im Monosaccharid und der dazugehörigen Monomereinheit (NR: nicht reduzierend, M: mittig, S: substituiert, T: terminal, US: Uronsäuresubstituent) der gezeigten Struktur.

Das HMBC-Experiment (Anhang, Abbildung A20) erlaubte die Identifizierung der Bindungspositionen der einzelnen Monosaccharide. Hierbei konnte zudem die Methylierung an O4- der GlcA verifiziert werden. Die $^3J_{C,H}$ Kopplung ($\delta_{H,1} = 4,45$ ppm, $\delta_{C,4} = 77,5$ ppm) des anomeren Protons der nicht-reduzierenden Xyl mit dem C4 der substituierten Einheit zeigt, dass sich die Substitution mit 4-O-Me-GlcA im Fall des X_5U^{4m2} -Standards in Übereinstimmung mit der Literatur an der zweiten Xyl-Einheit, ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende, befindet. Eine entsprechende Kopplung, welche die Substitution an O2 dieser Einheit bestätigt, kann nicht gefunden werden, jedoch zeigt das HSQC-Signal des C/H2 eine deutliche Tieffeldverschiebung im Vergleich zu den übrigen C/H2-Kreuzsignalen anderer Einheiten. Demnach kann die Substitution an dieser Position der Xyl verifiziert und die Struktur $XU^{4m2}XXX$ bestätigt werden.

Die genaue Position der Substitution des XOS-Rückgrats der übrigen isolierten Standardsubstanzen konnte aufgrund zu geringer Probenmengen nicht vollständig bestimmt werden. Hier war einzig die Aussage möglich, dass sich die substituierte Xyl-Einheit weder am terminalen nicht-reduzierenden noch am reduzierenden Ende des Oligosaccharids befindet. Aufgrund des in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Spaltungsmusters der GH11-Xylanase wird jedoch von einer zu XU^{4m2}XXX vergleichbaren Struktur ausgegangen.

4.6.3.2 Analyse der Glucuronoxylanoligosaccharide mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Zur Beurteilung des Einflusses der Uronsäuresubstitution sowie des DP_n des Xyl-Rückgrats eines GXOS wurden die drei in ausreichender Reinheit isolierten Oligosaccharide in Lösungen mit vergleichbarem molarem Äquivalent der enthaltenen 4-O-Me-GlcA analysiert. Als Referenzwert von 100 % diente die Wiederfindung einer entsprechend konzentrierten 4-O-Me-GlcA-Monosaccharid-Standardlösung. Die erzielten Wiederfindungen der US in Abhängigkeit von den untersuchten Oligosacchariden sind in Tabelle 10 gelistet.

Tabelle 10: Wiederfindungen (WDF) der 4-O-Methyl-Glucuronsäure nach Analyse der isolierten Glucuronoxylanoligosaccharide. Die Benennung der Strukturen erfolgt gemäß Fauré *et al.* 2009.

Struktur	WDF in % des Monosaccharids
XU ^{4m2} XXX	73,93 ± 1,86
X ₆ U ^{4m2}	73,09 ± 0,47
X ₇ U ^{4m2}	64,33 ± 0,24

Dabei wird deutlich, dass die an der Aldobiuronsäurebindung beteiligte US nicht im gleichen Maße wiedergefunden wird, wie das entsprechende Monosaccharid. Die um bis zu 35 % niedrigeren Werte deuten auf eine erschwerte Freisetzung der an den Neutralzucker gebundenen US hin, was auf eine stabilere glycosidische Bindung zurückgeführt werden kann (Lorenz *et al.* 2016). Ein weiterer entscheidender Faktor für die geminderten Wiederfindungsraten könnte in der reaktiven Matrix des Xylanrückgrats liegen. Während die US aufgrund der stabilen Bindung nur verzögert freigesetzt wird, dehydratisieren die bereits abgespaltenen Xylose-Einheiten unter den drastischen Bedingungen der Schwefelsäurebehandlung rapide zu Furfural. Die daraus resultierende hohe Konzentration dieser reaktiven Abbauprodukte begünstigt Kondensationsreaktionen zwischen dem Furfural und den entstehenden Abbauprodukten der US. Diese Nebenreaktionen führen somit dazu, dass Teile des 5FFAs sowie des internen Standards, in nicht kontrollierbarem Verhältnis, dem Nachweis entzogen werden. Im Vergleich dazu fehlt dem mitgeführten Monosaccharid-Standard diese reaktive Matrix, was die dort beobachtete höhere Wiederfindung erklärt.

Ob der DP der Xyl hierbei einen Einfluss auf die Bestimmung ausübt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten jedoch nur eingeschränkt beurteilen. Die Wiederfindungen der US in XU^{4m2}XXX und X₆U^{4m2} sind unter Einbezug der Standardabweichung als sehr gut vergleichbar zu bewerten. Ein Einfluss der Anzahl der Xyl-Einheiten ist somit nicht erkennbar. Abweichend davon zeigt der Standard X₇U^{4m2} um etwa 9 % geringere Wiederfindungsraten. Ob sich hier durch die zusätzliche Xyl-

Einheit eine veränderte Freisetzungsdynamik widerspiegelt, bleibt offen. Zudem stellt sich die Frage, ob nicht die Position der substituierten Xyl-Einheit im Oligomer, und weniger deren Anzahl, ursächlich für die beobachteten Unterschiede ist. Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, konnte lediglich bei $XU^{4m2}XXX$ die Substitutionsposition vollständig aufgeklärt werden. Für die übrigen Standardsubstanzen wurde eine äquivalente Struktur angenommen, ohne dass diese abschließend bestätigt werden konnten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich die substituierte Einheit in X_7U^{4m2} nicht unmittelbar am nicht-reduzierenden Ende, sondern weiter im Zentrum des Oligomers befindet.

Inwiefern diese Ergebnisse auf Polysaccharide übertragbar sind, lässt sich derzeit nicht abschließend bewerten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch dort eine Unterbestimmung des Uronsäuregehalts um etwa 30 – 40 % erwartet werden kann. Variationen der Inkubationszeit in konzentrierter Schwefelsäure, sowohl längere als auch kürzere Zeiten, führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor liegt in der schwefelsauren Vorbehandlung der GX-haltigen Holzproben. Ob hierbei bereits Aldobiuronsäurebindungen partiell hydrolysiert werden, ist bislang ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Sollte dies der Fall sein, wäre eine Unterbestimmung vor allem bei löslichen Probenmaterialien relevant, während die vorbehandelten Hartholzproben hiervon voraussichtlich weniger betroffen sind. Für weiterführende Analysen sollten die hier vorgestellten Untersuchungen auch auf RG I-Oligosaccharide sowie Strukturen der verschiedenen Hydrokolloide ausgeweitet werden. Diese Polymere sind häufig in wasserlöslichen Fraktionen vorhanden und weisen demnach intakte Aldobiuronsäurebindungen auf.

4.7 Photometrische und massenspektrometrische Uronsäurebestimmung im Vergleich

4.7.1 Validierung beider Methoden

Die entwickelte SIVA-basierte Methode wurde gemäß den in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Validierungsparametern überprüft. Hierfür kamen die entsprechenden US-Monosaccharidstandards sowie die in Kapitel 4.5 ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen zur Anwendung. Die Analysen erfolgten an einer ESI-Orbitrap-MS. Obwohl reine GulA- oder ManA-haltige Proben primär im bakteriellen Kontext von Bedeutung sind, wurden diese US in die Validierung mit einbezogen. Die photometrischen Analysen wurden nach den von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) beschriebenen Bedingungen (95 °C, 5 min) durchgeführt. Die entsprechenden Validierungsparameter sind in Tabelle 11 (einzelne US) und Tabelle 12 (Uronsäurekombinationen) vergleichend dargestellt.

Die Kalibrierung der SIVA-basierte Uronsäureanalyse erfolgte im Konzentrationsbereich von 10 mg/L bis 85 mg/L. Für GulA bzw. GulA + ManA wurde der Bereich aufgrund der höheren NG und BG auf 25 mg/L bis 100 mg/L erweitert. Innerhalb der gewählten Bereiche zeigt die SIVA mit Korrelationskoeffizienten $> 0,999$ eine ausgezeichnete Linearität, während in der photometrischen Analyse lediglich Werte über 0,96 erreicht werden. Darüber hinaus zeigt die SIVA, beurteilt anhand der

Steigungen der Kalibriergeraden, eine etwa vierfach höhere Empfindlichkeit im Vergleich zur photometrischen Methode.

Tabelle 11: Vergleich der Validierungsdaten der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA), durchgeführt mit einem Orbitrap-Massenanalysator, mit der photometrischen Analyse in Anlehnung an Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) (Gala: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure, ManA: Mannuronsäure, GulA: Gulturonsäure, NG: Nachweislänge, BG: Bestimmungsgrenze, R²: Korrelationskoeffizient)

	SIVA				Photometrie			
	Gala	GlcA	ManA	GulA	Gala	GlcA	ManA	GulA
Kalibrierbereich in mg/L	10 - 85				10 - 85			
Kalibrierfunktion	$y=0,02456x - 0,00383$	$y=0,02348x + 0,03231$	$y=0,00647x + 0,01052$	$y=0,02035x - 0,02035$	$y= 0,00574x + 0,15771$	$y=0,00506x + 0,13604$	$y=0,00223x + 0,13581$	$y=0,00374x + 0,06965$
R²	0,9991	0,9991	0,9998	0,9992	0,9974	0,9976	0,9686	0,9906
NG in mg/L	1,38	1,83	2,60	2,93	7,30	6,30	16,29	9,72
BG in mg/L	4,75	6,11	8,82	9,83	24,96	23,81	60,11	36,16
Instrumenteller Variationskoeffizient in %	0,86				4,26			
Verfahrensvariationskoeffizient in %	1,93	2,17	2,14	1,56	10,58	11,20	12,52	9,22
Externe Wiederfindung in %	100,32 ± 1,47	100,02 ± 0,06	98,36 ± 1,08	98,31 ± 1,06	122,10 ± 3,27	113,16 ± 1,55	129,99 ± 3,53	80,76 ± 0,64
Wiederfindung in Matrix in %	101,80 ± 2,99 ¹	99,09 ± 0,07 ²	98,61 ± 0,96 ³	99,65 ± 1,16 ³	116,75 ± 5,03 ¹	110,53 ± 8,31 ²	43,83 ± 0,19 ³	38,82 ± 3,67 ³

¹ als Matrix wurden die Karottentester LBS genutzt

² als Matrix wurde das Buchenholz nach Vorbehandlung genutzt

³ als Matrix wurde eine Leermatrix gemäß der Monosaccharidzusammensetzung der Braunalgen-BS genutzt

Tabelle 12: Vergleich der Validierungsdaten der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA), durchgeführt mit einem Orbitrap-Massenanalysator, mit der photometrischen Analyse in Anlehnung an Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) für verschiedene Kombinationen der Uronsäuren (GalA: Galacturonsäure, GlcA: Gluronsäure, ManA: Mannuronsäure, GulA: Guronsäure, NG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze)

	SIVA		Photometrie	
	GalA + GlcA ¹	ManA + GulA ²	GalA + GlcA ¹	ManA + GulA ²
Kalibrierbereich in mg/L	10 - 85	25 - 100	10 - 85	25 - 100
Kalibrierfunktion	y=0,0218x - 0,01941	y=0,0120x - 0,00464		
R²	0,9986	0,9990	Werte orientieren sich an der	Werte orientieren sich an der
NG in mg/L	2,48	2,94	überwiegend	überwiegend
BG in mg/L	8,04	10,29	vertretenen	vertretenen
Instrumenteller Variationskoeffizient in %		0,86	Uronsäure (Daten vgl. Tabelle 11).	Uronsäure (Daten vgl. Tabelle 11).
Verfahrensvariationskoeffizient in %	2,56	3,94		
Externe Wiederfindung in %	102,12 ± 0,84	98,86 ± 0,42	63,79 ± 4,00	300,44 ± 6,32
Wiederfindung in Matrix in %	101,54 ± 0,52 ³	101,76 ± 0,77 ⁴	137,20 ± 14,54 ³	130,16 ± 6,39 ⁴

¹ zur Kalibrierung wurde GalA verwendet

² zur Kalibrierung wurde ManA verwendet

³ als Matrix wurde Karayagummi verwendet

⁴ als Matrix wurden die LBS der Braunalge verwendet

Die NG der SIVA liegen für die individuell optimierten US zwischen 1,38 mg/L (GalA) und 2,93 mg/L (ManA), die BG ist etwa um das Dreifache größer (Tabelle 11). Da die Analysen der Uronsäurekombinationen nicht auf maximale Empfindlichkeit optimiert wurden, fallen die ermittelten Grenzwerte hier erwartungsgemäß höher aus. Der Vergleich dieser Werte mit der NG und BG des gemessenen Analyten 5FFAs, welche mit 43,4 µg/L bzw. 144,7 µg/L kleiner sind, verdeutlichen nochmals, dass die Umwandlung der US zu 5FFA sowie die Extraktion unvollständig erfolgt.

Die photometrisch bestimmten NG sind im Durchschnitt etwa vierfach höher (Tabelle 11). Besonders auffällig ist dabei die ManA, welche erst ab 16,29 mg/L nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde die Kalibrierung hier, abweichend von der Originalliteratur, erst bei 25 mg/L begonnen. Insgesamt ist festzuhalten, dass alle photometrisch aufgenommenen Kalibriergeraden unterhalb der jeweiligen BG ansetzen. Messwerte in diesem Bereich sind daher ausschließlich qualitativ

interpretierbar und nicht für eine belastbare Quantifizierung geeignet. Dies schränkt die Validität der photometrischen Ergebnisse erheblich ein.

Der instrumentelle Variationskoeffizient bewertet die Präzision wiederholter Messungen derselben Probe ($n = 10$). Bei der MS bezieht er sich auf die Direktmessung des 5FFA, bei der Photometrie auf das entstehende Chromophor aus 5FFA und 3PP. Er wurde als Mittelwert der zehn Wiederholungsmessungen je US berechnet. Für die photometrische Methode liegt der Variationskoeffizient mit 4,26 % deutlich über dem der MS-Analyse (0,86 %) (Tabelle 11). Dies ist auf die geringere Robustheit, die höhere Störanfälligkeit und die eingeschränkte Spezifität der optischen Detektion zurückzuführen, welche auf kleine Veränderungen wie beispielsweise auf eine veränderte optische Dichte durch den wasserziehenden Charakter der Schwefelsäure während der Mehrfachmessung zurückgeführt werden kann. Der Verfahrensvariationskoeffizient beschreibt die Gesamtpräzision einschließlich Probenvorbereitung und wurde durch sechsfache Aufarbeitung einer identischen Probe bestimmt. Für die SIVA liegt dieser mit 1,56 – 2,17 % nur geringfügig über dem instrumentellen Wert. Bei der photometrischen Analyse sind die Werte mit 9,22 – 12,53 % hingegen deutlich höher, was auf eine größere methodische Unsicherheit und die starke Abhängigkeit des Ergebnisses vom Erhitzungsschritt hinweist.

Die Wiederfindungsraten dienen der Beurteilung der Richtigkeit der Methoden. Die externe Wiederfindung bewertet die analytische Genauigkeit bei der Messung von Standardlösungen ohne Matrixeinfluss, während die Wiederfindung in Matrix den Einfluss matrixbedingter Effekte erfasst, indem das jeweilige BS-Material mit bekannten Mengen der US versetzt wurde. Innerhalb der SIVA liegen hier alle Werte um 100 ± 2 %, ein Einfluss der nach der Extraktion verbleibenden Matrix kann hier nicht ausgemacht werden (Tabelle 11). Die externen Wiederfindungsraten der US, bestimmt mit dem Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays, zeigen, dass alle US, mit Ausnahme der Gula, deutlich überbestimmt werden. Da die Überbestimmung nicht auf die Ausbildung chromophorer Verbindungen durch Matrixkomponenten zurückgeführt werden kann, wird davon ausgegangen, dass der Abbau bzw. die Chromophorbildung nicht vergleichbar zur Anfertigung der Kalibrierung stattfand. Bereits kleinste Veränderungen im Ablauf oder innerhalb der Reaktionsparameter führen bereits zu nur schwer einschätzbaren Abweichungen und schränken die Präzision und somit auch die Richtigkeit der Analyseergebnisse stark ein. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass die Reaktion des 5FFAs zu dem gebildeten Chromophor nicht zwingend reproduzierbar und stöchiometrisch erfolgt. Zur genaueren Beurteilung dieses Sachverhalts sollten weitere kinetische Studien der Chromophorbildung angefertigt werden, die unter anderem den Einfluss der Konzentration der Analyten und Analytkondensate (Rosenau *et al.* 2017) sowie das Potential zur Chromophorausbildung dieser Kondensate, beurteilen.

Bei der photometrischen Analyse lässt sich ebenfalls ein moderater (für GalA bzw. Gula) bzw. deutlicher Einfluss der Matrix auf die Wiederfindungen der US ausmachen (Tabelle 11). Hier ist zu erkennen, dass die Wiederfindung entgegen den Erwartungen deutlich niedriger ausfällt und es zu einer Unterbestimmung der Analyten kommt. Es stellt sich die Frage, ob es im Fall des deutlichen Überschusses der Neutralzucker in der Probe zu einer raschen Kondensation übriger Furane oder

Ringöffnungsprodukte mit dem 5FFA kommt, sodass sich dieses der Analyse entzieht. Warum dieser Effekt insbesondere bei GalA und ManA ausgeprägt ist, bleibt bislang unklar.

Die photometrische Methode ist grundsätzlich nicht für die simultane Bestimmung mehrerer US in einer Probe geeignet. Dies wird durch die niedrige externe Wiederfindung für GalA + GlcA sowie die stark überhöhten Werte für ManA + GulA deutlich (Tabelle 12). Ursache hierfür sind die unterschiedlichen Abbauraten der einzelnen US, die in einer gemeinsamen Kalibrierung nicht adäquat erfasst werden können.

Die Analyse mittels Orbitrap-MS bringt insbesondere den Vorteil einer hohen Empfindlichkeit und vor allem einer hohen Genauigkeit der erfassten exakten Massen. Nichtsdestotrotz handelt es sich hierbei um ein Gerät mit sehr teuren Anschaffungskosten und ist aufgrund dessen nicht in jedem Routinelabor vorhanden. Da die Erfassung einer exakten Masse des 5FFAs nicht zwangsläufig notwendig für die SIVA ist, wurde die Analyse am Beispiel der GalA auf ein einfaches Single-Quadrupol-System übertragen. Ausgewählte Validierungsparameter sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Ausgewählte Validierungsparameter (NG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze) der Analyse von Galacturonsäure (GalA) für die entwickelte Gesamturonsäurebestimmung mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA), analysiert mittels eines Single-Quadrupol (Q) Massenspektrometers (MS)

		SIVA
		LC-Q-MS
NG in mg/L		1,71
BG in mg/L		5,74
Verfahrensvariationskoeffizient in %	niedrige Konzentration (10 mg/L GalA)	20,25
	hohe Konzentration (85 mg/L GalA)	1,43

Obwohl die NG und BG bei Verwendung eines Single-Quadrupol-Massenspektrometers geringfügig höher lagen, zeigte die Methode im SIM-Modus dennoch eine mit der LC-Orbitrap-MS vergleichbare Empfindlichkeit und übertraf die des kolorimetrischen Assays deutlich. Das Orbitrap-System wies jedoch eine höhere Präzision auf, insbesondere im unteren Konzentrationsbereich, in dem das Single-Quadrupol-System eine größere Streuung zeigte. Insgesamt kann die Methode ohne wesentliche Einbußen an Zuverlässigkeit auf ein Single-Quadrupol-MS-System übertragen werden, sofern der Kalibrierbereich an die geringere Präzision im niedrigen Konzentrationsbereich angepasst wird.

4.7.2 Analyseergebnisse für uronsäurehaltige Probenmaterialien

Die isolierten BS-Materialien sowie die übrigen gemahlten Proben wurden gemäß der optimierten Methodik sowohl mittels SIVA (vgl. Kapitel 4.5) als auch mit der photometrischen Methode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) analysiert. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 69 dargestellt.

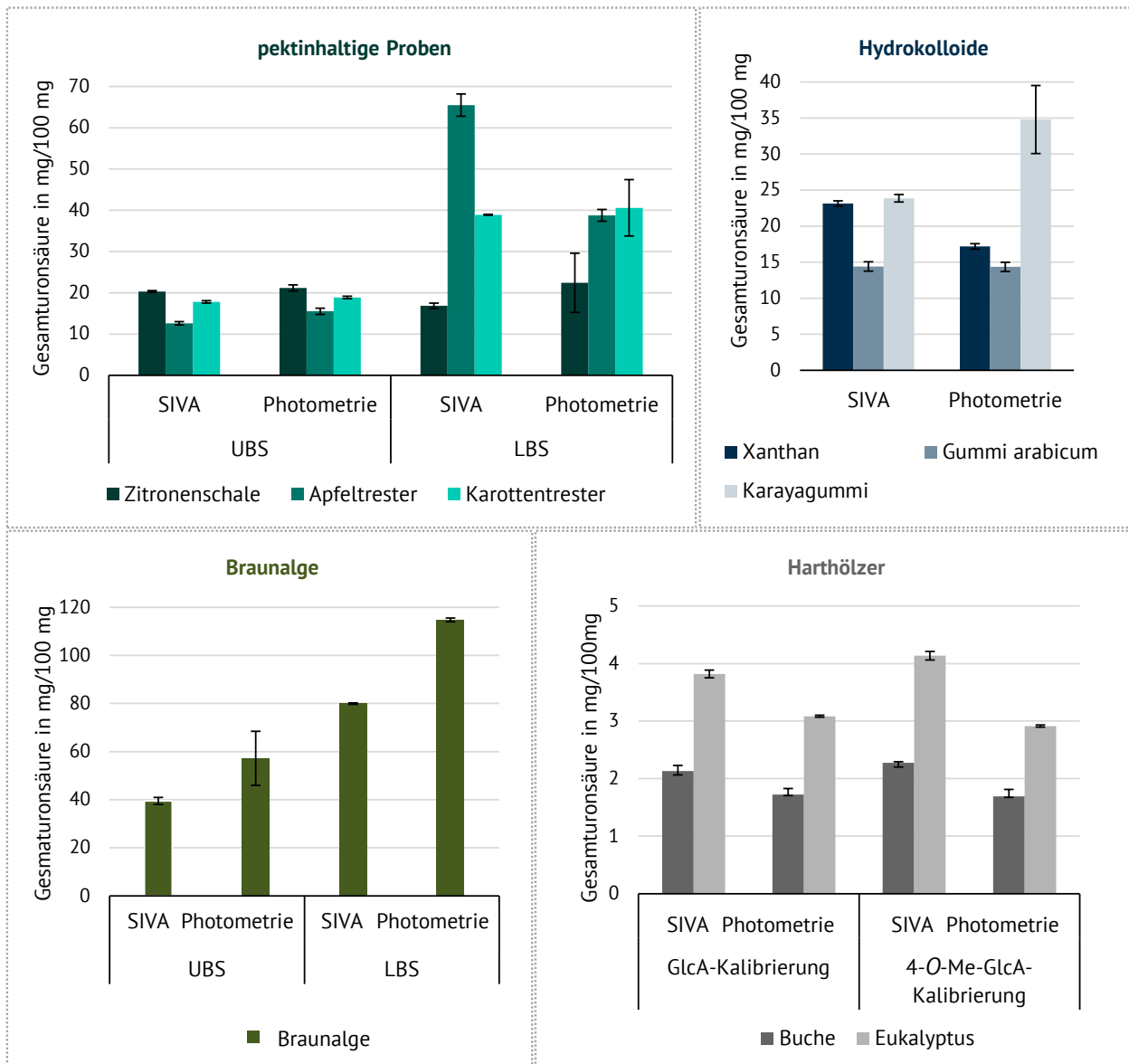


Abbildung 69: Vergleich der mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) und Photometrie bestimmten Uronsäuregehalte verschiedener Probenmaterialien (LBS: lösliche Ballaststoffe, UBS: unlösliche Ballaststoffe). Die Hartholzproben wurden sowohl mittels Glucuronsäure (GlcA)- als auch 4-O-Methyl-GlcA (4-O-Me-GlcA)-Kalibrierung quantifiziert.

Der Vergleich der beiden Verfahren zeigt teils deutliche Abweichungen zwischen den mittels SIVA- und den photometrisch ermittelten Uronsäuregehalten. Eine eindeutige Tendenz lässt sich dabei nicht erkennen: In einigen Fällen (z. B. Zitronen- und Karotten-LBS, Karayagummi, Braunalge) liefert die photometrische Methode signifikant höhere Werte, während bei den pektinhaltigen UBS weitgehend Übereinstimmung besteht und in anderen Proben niedrigere Werte bei Anwendung der Photometrie beobachtet werden. Die abweichenden Ergebnisse können auf Interferenzen mit Neutralzuckern sowie eventuell auf unerwünschte Reaktionen des 5FFAs mit weiteren Abbauprodukten zurückgeführt werden. Darüber hinaus ist die Messpräzision der photometrischen Methode im Vergleich zur SIVA deutlich geringer. Während die SIVA reproduzierbare Ergebnisse mit einer relativen Standardabweichung unter 2 % liefert, zeigt die photometrische Bestimmung eine wesentlich

höhere Streuung der Daaten. Diese Befunde müssen im Kontext der zuvor dargestellten Validierungsergebnisse (vgl. Kapitel 4.7.1) betrachtet werden. Bereits dort deutete sich insbesondere bei der Braunalge eine deutliche Überbestimmung der US durch die photometrische Methode an. Werte über 100 %, wie sie bei den LBS-Proben erhalten wurden, stellen die Zuverlässigkeit der photometrischen Quantifizierung zusätzlich infrage.

Die Hartholzproben wurden sowohl unter Anwendung der GlcA- als auch der 4-O-Me-GlcA-Kalibrierung quantifiziert. Die bei Anwendung der 4-O-Me-GlcA-basierten Kalibrierung ermittelten Werte fielen leicht höher aus, unterschieden sich jedoch unter Einbeziehung der Standardabweichung nicht signifikant von den GlcA-basierten Ergebnissen.

Bei den Hydrokolloiden sowie teilweise bei den Harthölzern ist, entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 4.6.3, von einer systematischen Unterbestimmung auszugehen. Diese betrifft jedoch beide Methoden gleichermaßen, da hier der unvollständige Abbau der Aldobiuronsäurebindungen in konzentrierter Schwefelsäure den limitierenden Faktor darstellt und weder durch Kalibrierung noch durch den Einsatz interner Standards kompensiert werden kann.

Ein zusätzlicher Unterschied besteht in der Vorbehandlung der pektinhaltigen LBS, bei denen im Rahmen der SIVA eine alkalische Behandlung durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 4.6.2). Diese kann die Abbaurrate beeinflussen und so zu methodisch bedingten Abweichungen führen. Da die Berechnung des DAc und DM pektinhaltiger Proben direkt auf den Ergebnissen der Uronsäurebestimmung basiert, führen unterschiedliche Uronsäuregehalte zwangsläufig zu abweichenden, experimentell bestimmten Veresterungsgraden. Hierbei wird der durch quantitative NMR-Spektroskopie bestimmte Essigsäure- bzw. Methanolgehalt nach Verseifung anteilig auf den Uronsäuregehalt bezogen (vgl. Kapitel 3.2.2) (Müller-Maatsch *et al.* 2014). Die sich daraus ergebenden Unterschiede in den mit SIVA und Photometrie bestimmten DAc- und DM-Werten (Tabelle 14) können somit einen entscheidenden Einfluss auf die Bewertung der technofunktionellen Eigenschaften der untersuchten Materialien nehmen.

Tabelle 14: Aus den photometrisch und mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) bestimmten Gesamturonsäuregehalten berechnete Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrade (DAc) der löslichen (LBS) und unlöslichen Ballaststoffe (UBS) der pektinhaltigen Proben

		SIVA		Photometrie	
		DM in %	DAc in %	DM in %	DAc in %
Zitronenschale	UBS	33,79	35,60	32,02	33,73
	LBS	42,87	4,44	41,08	4,24
Apfeltrester	UBS	54,42	73,80	50,57	68,58
	LBS	48,40	6,43	81,76	10,86
Karottentrester	UBS	59,45	19,28	57,04	18,50
	LBS	40,64	35,94	30,51	26,98

Abschließend wurde mit den Bubble-Tea-Perlen ein Lebensmittel untersucht, das neben ManA und GuLA aus Alginat auch den weiteren uronsäurehaltigen Bestandteil Xanthan enthält. Die bestimmte Monosaccharidverteilung der Polysaccharide in den Bubble-Tea-Proben zeigte lediglich sehr geringe Mengen an GlcA, sodass nicht von signifikanten Xanthan-Gehalten auszugehen ist (vgl. Kapitel 4.1). Da keine optimierten Abbaubedingungen identifiziert werden konnten, die einen gleichmäßigen Abbau aller drei US (ManA, GuLA, GlcA) ermöglichen, wurde der Einfluss variierender Xanthan-Konzentrationen auf die Bestimmung der US in einem Alginatstandard untersucht. Tabelle 15 zeigt die Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts (als ManA + GuLA) in Gegenwart unterschiedlicher Xanthanmengen. Dabei veränderte sich der Gesamtgehalt des reinen Alginatstandards, welcher korrekt als 100 % bestimmt wurde, durch Zugabe von Xanthan kaum. Dies bestätigt, dass die GlcA-Komponente des Xanthans aufgrund ihrer deutlich geringeren Abbaurrate bei 60 °C (vgl. Abbildung 61) kaum erfasst wird. Somit ermittelt die Analyse im Fall der Bubble-Tea-Probe ausschließlich den Anteil an ManA + GuLA, wodurch sie nicht als Gesamturonsäurebestimmung, sondern vielmehr als selektive Alginatbestimmung zu interpretieren ist. Dies verdeutlicht zwar eine methodische Einschränkung der SIVA in Hinblick auf ihr ursprüngliches Ziel, eröffnet jedoch gleichzeitig die Möglichkeit eines gezielten Einsatzes bei spezifischen Fragestellungen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu bestimmen, ab welchem Verhältnis anderer US eine selektive Quantifizierung von ManA + GuLA nicht mehr gewährleistet ist.

Tabelle 15: Als Mannuron- + Guluronsäure quantifizierter Uronsäuregehalt eines Alginatstandards mit variierenden Mengen Xanthan sowie des Bubble Tea Materials

	Uronsäure in mg/100 mg
Alginat	101,87 ± 2,35
Alginat + 2 % Xanthan	104,26 ± 0,16
Alginat + 10 % Xanthan	103,22 ± 0,64
Alginat + 50 % Xanthan	104,46 ± 1,50
Bubble Tea	33,26 ± 1,47

Zusammenfassend zeigen die vergleichenden Untersuchungen, dass die SIVA-Methode trotz des etwas höheren Aufwands der Probenvorbereitung, deutlich zuverlässigere, reproduzierbarere und spezifischere Ergebnisse liefert als die klassische photometrische Methode. Die Eliminierung des farbbasierten Reaktionsschritts reduziert systematische Fehlerquellen und minimiert Interferenzen mit nicht-uronsäurehaltigen Komponenten. Damit stellt die SIVA eine methodisch überlegene Alternative zur etablierten photometrischen Quantifizierung dar und bildet eine solide Grundlage für weiterführende strukturelle und quantitative Analysen komplexer Kohlenhydratproben.

4.8 Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurde die quantitative Analyse zur photometrischen Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts in komplexen polysaccharidbasierten pflanzlichen, algenbasierten und bakteriellen Matrizes kritisch untersucht. Dabei wurden in der Literatur beschriebene und experimentell

bestätigte Probleme, wie eine mangelnde Präzision und matrixabhängige Interferenzen, hinsichtlich deren Ursachen analysiert. Darauf aufbauend wurde eine alternative Methode zur chromatographischen Uronsäureanalytik entwickelt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit sowohl auf der Aufklärung der chemischen Mechanismen, worauf das etablierte photometrische Verfahren beruht, als auch auf dem Vergleich dieses mit der neu entwickelten analytischen Methodik.

Das photometrische Assay nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) stellt die am häufigsten eingesetzte Routinemethode zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts dar. Dabei wird die US in konzentrierter Schwefelsäure abgebaut und anschließend mit dem Chromogen 3PP zu einem magentafarbenen Chromophor umgesetzt, dessen Absorption bei 520 nm gemessen wird. Untersuchungen der bei erhöhter Temperatur in konzentrierter Schwefelsäure behandelten GalA zeigten, dass diese dabei überwiegend zum Furfuralderivat 5FFA und in geringem Umfang zu Furfural abgebaut wird (vgl. Kapitel 4.2.1.1). In ersten Versuchen konnten jedoch nur rund 35 % der US in Form von Furan-derivaten wiedergefunden werden. Ob diese Diskrepanz auf einen unvollständigen Abbau und/oder auf Kondensationsreaktionen der Abbauprodukte zu gefärbten Nebenprodukten zurückzuführen ist, ließ sich nicht abschließend klären.

Durch die Behandlung eines 5FFA-Standards mit konzentrierter Schwefelsäure konnte bestätigt werden, dass dieses Abbauprodukt, welches unspezifisch aus allen US unter den gewählten Bedingungen gebildet wird, hauptverantwortlich für die charakteristische Färbung mit 3PP ist (vgl. Kapitel 4.2.1.1). Für ein vertieftes Verständnis und eine korrekte Bewertung der photometrischen Methode ist die Kenntnis der Chromophorstruktur daher von zentraler Bedeutung. Eine entsprechende Strukturaufklärung wurde bislang jedoch in der Literatur nicht beschrieben.

Erste Versuche zur NMR-spektroskopischen Untersuchung der Reaktionsprodukte nach Durchführung der Reaktion in deuterierter konzentrierter Schwefelsäure scheiterten an zu geringen Konzentrationen sowie an einem unübersichtlichen, schlecht aufgelösten Spektrum, das auf ein komplexes Produktgemisch schließen ließ. In einem weiteren Ansatz wurde die Extraktion der Reaktionsprodukte aus der konzentrierten Säure erprobt. Eine Isolierung aromatischer Verbindungen gelang dabei ausschließlich nach partieller Neutralisation und anschließender Abtrennung mittels PFP-SPE (vgl. Kapitel 4.2.1.2). Die Verdünnung führte jedoch zur überwiegenden Entfärbung der Reaktionslösung, woraus geschlossen wurde, dass hierbei hauptsächlich farblose Hydrolyseprodukte beziehungsweise Farbvorläuferstrukturen extrahiert wurden. Die mittels UHPLC-MS detektierten Signale konnten anhand ihrer m/z verschiedenen Kondensationsprodukten aus zwei bis drei 3PP-Einheiten mit einem 5FFA-Molekül zugeordnet werden ($M = 462 \text{ g/mol}$). Eine Massendifferenz von 80 u zwischen verschiedenen Signalgruppen deutete zudem auf Sulfonsäuresubstitutionen der Ausgangsverbindungen hin, was im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Reaktionen phenolischer Verbindungen in konzentrierter Schwefelsäure steht (Ma *et al.* 2019; Wittke 1983). Alle entsprechenden Signale zeigten nach Fraktionierung und erneuter Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure die charakteristische Magentafärbung des Chromophors, was auf eine triarylmethanbasierte Farbvorläuferstruktur schließen lässt.

Bekannte Synthesewege für derartige Molekülstrukturen unter mild sauren Bedingungen in wässrigen Medien sind mehrfach beschrieben worden (Grüttner *et al.* 1995; Kreppenhofer *et al.* 2011). Die entsprechend postulierte Triarylmethanstruktur **36** konnte synthetisiert und nach Abgleich von Masse und RT eindeutig dem postulierten Produkt zugeordnet werden (vgl. Kapitel 4.2.1.3). Eine Strukturaufklärung mittels 1D- und 2D-NMR-Experimenten bestätigte, dass es sich um das Triarylmethan 5-(Bis(3-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)furan-2-carbonsäure handelt. Wird die anfänglich weiße, pulverförmige Substanz in konzentrierte Schwefelsäure gegeben, löst sie sich unter Ausbildung der intensiven Magenta-Färbung. Daraus lässt sich schließen, dass das finale Chromophor erst unter Säureeinfluss aus der Triarylmethan-Vorstufe entsteht. Während der Säurebehandlung muss demnach eine Oxidation des zentralen tertiären Kohlenstoffatoms stattfinden, wodurch das für eine Absorption im vis-Bereich notwendige erweiterte π -Elektronensystem gebildet wird.

Da auch die direkte Analyse des Chromophors nach Säureumsatz der isolierten Triarylmethan-Vorstufe an der geringen Stabilität des Chromophors scheiterte, wurden DFT- und TDDFT-basierte Benchmark-Rechnungen herangezogen, um die Absorptionsspektren möglicher chromophorer Strukturen zu berechnen (vgl. Kapitel 4.2.1.4). Dabei wurden das Triarylmethan-Kation der Struktur **36** (**36b**) sowie eine darauf basierende Xanthylium-Struktur **37** betrachtet, die durch die intramolekulare Ausbildung eines Ethers aus den Hydroxygruppen der beiden 3PP-Bausteine entsteht. Das berechnete Spektrum der Struktur **37** stimmte sehr gut mit dem experimentell aufgenommenen Absorptionsspektrum der photometrischen Reaktion überein. Diese ersten Ergebnisse legten nahe, dass das im Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assay detektierte Chromophor dem 9-(5-Carboxyfuran-2-yl)-3,6-diphenyl-9H-xanthen-9-ylion-Ion entspricht.

Zur experimentellen Verifizierung wurde das Reaktionssystem durch den Austausch des Reaktionspartners 5FFA gegen 4CBA stabilisiert, da hierbei Kondensationen, etwa durch Ringöffnungen des Furans, unterbunden werden konnten (vgl. Kapitel 4.2.2). Der visuelle Farbeindruck blieb dabei weitgehend unverändert. Das gebildete Chromophor zeigte neben weiteren Banden ein deutliches Absorptionsmaximum bei 525 nm und erwies sich bei partieller Neutralisation stabiler gegen Entfärbung. Nach chromatographischer Aufreinigung dieses Reaktionsansatzes wurde ein rötlich-violettes Pulver in ausreichender Menge und Reinheit erhalten, das mittels NMR-Spektroskopie und MS charakterisiert werden konnte.

Mithilfe der NMR-Spektroskopie konnten alle Signale der 4CBA-Einheit sowie der beiden 3PP-Einheiten identifiziert werden, die, vergleichbar zur zuvor charakterisierten Struktur **36** über ein zentrales Kohlenstoffatom der einstigen Carbonylgruppe des 4CBAs verbunden sind (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Aufgrund der signifikanten Tieffeldverschiebung des zentralen Kohlenstoffatoms und fehlender $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung konnte eine erfolgreiche Oxidation dieses Atoms angenommen werden, was mit der postulierten Struktur übereinstimmt. Eine endgültige Bestätigung des Ringschlusses und des damit verbundenen planaren Charakters des Moleküls mittels NMR war jedoch nicht möglich, da entsprechende HMBC-Signale fehlten. Deshalb wurden weitere theoretische und experimentelle Daten herangezogen.

Eine diagnostische Rolle spielt hierbei die chemische Verschiebung des zentralen Kohlenstoffatoms, das durch die Oxidation, wie bereits beschrieben, eine signifikante Tieffeldverschiebung erfährt. Berechnete Werte zeigten, dass diese Verschiebung durch den Ringschluss zum Ether verringert wird (vgl. Kapitel 4.2.2.2). Der Vergleich berechneter chemischer Verschiebungen des zentralen Kohlenstoffs der nicht oxidierten Triarylmethane (**36**, **39**), der oxidierten Triarylmethan-Kationen (**36b**, **39b**) sowie der Xanthylium-Strukturen (**37**, **38**) mit experimentellen Werten der Struktur **36** und des isolierten Chromophors **38** aus 3PP und 4CBA bestätigte die Identität des Chromophors als 9-(4-Carboxyphenyl)-3,6-diphenyl-9*H*-xanthen-9-ylum-Ion, welche in Übereinstimmung mit weiteren beobachteten Eigenschaften des Chromophors steht. So sind Xanthyliumderivate aufgrund ihres aromatischen und planaren Charakters fluoreszenzaktiv. Diese Eigenschaft wird jedoch durch die Ausbildung verschiedener Di- und Trimerstrukturen sowie durch Lösungsmittel- und Konzentrationseinflüsse moduliert (Daré-Doyen *et al.* 2003). In verschiedenen ¹H-NMR Experimenten wurde dieser Einfluss der Dimerbildung in verschiedenen Lösungsmitteln durch variierende Protonenshifts des Xanthylium-Grundkörpers bei äquivalenten Konzentrationen des isolierten Chromophors **38** sichtbar (vgl. Kapitel 4.2.2.2).

Zur Bestätigung des postulierten Reaktionswegs, der über die Ausbildung einer Triarylmethan-Vorstufe verläuft, wurde der Umsatz des aus 4CBA und 3PP synthetisierten Triarylmethan-Farbvorfäufers **39** in konzentrierter Schwefelsäure erprobt (vgl. Kapitel 4.2.2.3). NMR- sowie UHPLC-MS-Daten zeigten, dass das resultierende gefärbte Produkt mit der Struktur des isolierten Chromophors **38** übereinstimmt. Daneben konnten weitere sulfonierte Spezies (**s-38**, **s-39**) chromatographisch nachgewiesen werden.

Auf Grundlage der Erkenntnisse aus dem 4CBA-Modellsystem und den berechneten Absorptionsspektren wurden für die analogen Strukturen **37** sowie den Vorläufer **36**, die aus der eigentlichen untersuchten Assay-Reaktion stammen, gezielte Analysen durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2.3). Hierzu erfolgte ein SIM-MS-basiertes Screening des organischen Extraktes auf die entsprechenden *m/z*-Werte chromophor- bzw. triarylmethanbasierter Quasimoleküle. Dabei konnten sowohl Signale des (sulfonierten) Triarylmethans **s-36** als auch, wenn auch in geringerem Umfang, des sulfonierten Chromophors entsprechend der Struktur **s-37** detektiert werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein Reaktionsmechanismus für den Ablauf des Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays postuliert (vgl. Kapitel 4.2.3). Demnach reagiert das im Säureabbau gebildete 5FFA über eine elektrophile aromatische Substitution mit zwei 3PP-Molekülen zum Triarylmethan **s-36**. Dieses wird in konzentrierter Schwefelsäure unmittelbar oxidiert und zum Ether **s-37** zyklisiert. Diese Reaktion erfolgt ausschließlich in wasserfreier, stark saurer Umgebung und wird durch den hygroskopischen Charakter der konzentrierten Schwefelsäure begünstigt. Die in der Literatur berichtete hohe Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber Wasser ist auf die Anlagerung eines Wassermoleküls am zentralen Kohlenstoffatom zurückzuführen (vgl. Kapitel 4.2.1.1). Diese führt zur Zerstörung des delokalisierten π -Elektronensystems, was mittels MS nachgewiesen werden konnte. Der Vorgang ist reversibel, und das farbige Kation lässt sich durch Trocknung und erneute Zugabe von Säure regenerieren.

Die Farbreaktion zwischen 3PP und 5FFA wird in der Literatur häufig als selektiv gegenüber US beschrieben. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass auch Neutralzucker bzw. deren Abbauprodukte, insbesondere bei starkem Überschuss (10- bis 20-fach gegenüber US), die quantitative Aussagekraft der Analyse beeinträchtigen können. Furfural, das primär aus Pentosen entsteht, sowie HMF aus Hexosen reagieren ebenfalls mit 3PP unter Bildung gefärbter Produkte, die ein ähnliches Absorptionsmaximum bei etwa 520 nm zeigen, allerdings mit deutlich geringerer Intensität (vgl. Kapitel 4.4). Ob diese auf einen kleineren Extinktionskoeffizienten der aus diesen Furanen gebildeten Xanthylium-Strukturen (analog zu Struktur **37**) oder auf eine reduzierte Reaktivität gegenüber 3PP zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Berechnete Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Xanthylium-Ionen zeigten vergleichbare Werte zum Chromophor **37** aus 5FFA, was auf ähnliche Absorptionen bei gleicher Chromophorkonzentration hinweist. Weitere Experimente legten jedoch dar, dass 3PP bei gleichen Konzentrationen verschiedener Furanverbindungen (HMF, Furfural, 5FFA) eine deutliche Präferenz zur Reaktion mit 5FFA aufweist, was die in der Literatur beschriebene weitgehende Selektivität bestätigt (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973). Dennoch führten Uronsäureproben, die mit einem deutlichen Überschuss an Neutralzuckern versetzt wurden, zu einer Überbestimmung des Gehalts.

Eine Reduktion der Interferenzen durch Neutralzucker sowie eine Verbesserung der Signalstabilität und Empfindlichkeit kann gemäß Literatur durch den Zusatz von Natriumtetraborat in konzentrierter Schwefelsäure erreicht werden (Bitter und Muir 1962; Scott 1979). In dieser Arbeit konnten zwei wesentliche Effekte des Borats bzw. der daraus in konzentrierter Säure entstehenden Borsäure auf die Gesamtreaktion identifiziert werden: Zum einen beschleunigt Borat den Abbau der US zu 5FFA, besonders ausgeprägt bei den lactonisierbaren US GlcA, ManA und GulA (vgl. Kapitel 4.3.1.2), und zum anderen erhöht es bei gleichen 5FFA-Konzentrationen die Absorption bei 520 nm, was auf eine höhere Konzentration des gebildeten Chromophors schließen lässt (vgl. Kapitel 4.3.1.3).

Der erstgenannte Effekt wurde im Hinblick auf das Lactonisierungsverhalten am Beispiel der GlcA näher untersucht (vgl. Kapitel 4.3.2). NMR-Analysen zeigten, dass mit steigender Säurekonzentration das Gleichgewicht zunehmend zugunsten der Lactonform verschoben wird. In 8 M Schwefelsäure lag rund 75 % der GlcA als GlcAL vor. Es konnten jedoch weder Wechselwirkungen zwischen Borat beziehungsweise Borsäure und der US, noch ein Einfluss auf das GlcA/GlcAL-Gleichgewicht festgestellt werden. Die durch Scott (1979) aufgestellte Hypothese, Borat könne die Bildung stabiler Lactone verhindern, ließ sich somit nicht bestätigen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass das aus messtechnischen Gründen gewählte System (8 M Schwefelsäure) nicht vollständig mit den Bedingungen konzentrierter Schwefelsäure vergleichbar ist, insbesondere hinsichtlich des Einflusses der Säurekonzentration auf das Borat-Borsäure-Gleichgewicht. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion (kovalent oder im Komplex) zwischen Borsäure und US in konzentrierter Schwefelsäure besteht, welche einen Einfluss auf das Säure-Lacton-Gleichgewicht nimmt.

Trotz des geförderten Säureabbaus der lactonisierbaren US zu 5FFA konnte ein Angleich der Abbauraten zwischen den US bei der im photometrischen Assay verwendeten Temperatur von 95 °C

und einer Reaktionszeit von 5 min auch durch den Zusatz von Borat nicht erreicht werden (vgl. Kapitel 4.3.1.2). Unter diesen Bedingungen lieferte der Säureabbau von GalA die höchsten 5FFA-Konzentrationen, gefolgt von GlcA. GulA und ManA zeigten hingegen deutlich geringere Ausbeuten an 5FFA.

Der zweite identifizierte Effekt, der zu einer Absorptionssteigerung beitragen kann, steht im Zusammenhang mit der Stabilisierung des gebildeten Xanthylium-Ions. Eine getrennte Behandlung der beiden Edukte (3PP und 5FFA) in konzentrierter Schwefelsäure zeigte, dass 3PP dabei sulfonierte Spezies bildet (vgl. Kapitel 4.3.3). Durch Zusatz von Borat konnte die Konzentration dieser sulfonierten Verbindungen um rund 250 % erhöht werden, wie die Quantifizierung der aus 3-Methoxybiphenyl selektiv gebildeten 5-Methoxybiphenyl-2-sulfonsäure belegte. Eine direkte Erklärung für diesen Effekt konnte in der verfügbaren Literatur nicht gefunden werden. Mehrere Quellen beschreiben jedoch, dass Borsäure unter den stark wasserarmen Bedingungen der Schwefelsäure zu Sulfato-Bor-Komplexen, wie etwa Tetra(hydrogensulfato)borsäure, reagiert, welche als superacide Lewis- beziehungsweise Brønsted-Säuren die Sulfonierungsreaktionen effektiv fördern (Chhaperwal *et al.* 2025; Flowers *et al.* 1956; Gillespie und Robinson 1962). Die in Anwesenheit von Borat verstärkte Sulfonierung stabilisiert das Chromophor, da die durch die positive Ladung des Xanthylium-Systems stark acidifizierte (erstsubstituierte) Sulfonsäuregruppe in konzentrierter Schwefelsäure deprotoniert vorliegt. Dadurch wird die positive Ladung teilweise kompensiert, und es entsteht ein energetisch stabileres, nach außen neutrales Chromophor. Weitere Deprotonierungen sind aufgrund der sinkenden Acidität der Sulfonsäuregruppen bei Mehrfachsubstitution unwahrscheinlich.

Diese Ergebnisse belegen somit, dass Borat nicht die Selektivität der Analyse gegenüber der US bzw. 5FFA an sich, sondern vielmehr die Bildung und Stabilisierung der Xanthylium-Chromophore forciert, da eine gesteigerte interferierende Chromophorbildung durch Abbauprodukte der Neutralzucker nicht ausgeschlossen werden konnte.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit das Verständnis der chemischen Prozesse während der photometrischen Analyse des Gesamturonsäuregehalts wesentlich vertieft, zentrale Schwachstellen der photometrischen Methode aufgezeigt und zugrundeliegende Ursachen identifiziert werden (Abbildung 70). Diese bestehen insbesondere in den uronsäurespezifisch variierenden Abbauraten zu 5FFA bei den im Assay gewählten Erhitzungsbedingungen, welche eine gemeinsame Quantifizierung verschiedener US in einer Probe nicht erlaubt, sowie in der hohen Anfälligkeit des Verfahrens gegenüber geringen Schwankungen von Temperatur und Erhitzungsdauer beim Abbau der US in konzentrierter Schwefelsäure. Das Ausmaß verschiedener Nebenreaktionen wie Kondensation der Furanderivate untereinander und/oder mit weiteren gebildeten, hoch reaktiven Verbindungen wie α -Dicarbonylen während des Erhitzens der Probe, ist in dieser Analyse nahezu nicht kontrollierbar und führt zu einem unbekanntem Verlust des Analyten. In Kombination mit der Interferenz durch die aus Abbauprodukten der in pflanzlichen Proben meist im deutlichen Überschuss vorkommenden Neutralzuckern gebildeten Xanthylium-Chromophore führt dies zu einer nicht nachvollziehbaren Beeinflussung der Ergebnisse, die zur Unter- oder Überbestimmung der US beitragen

kann. Darüber hinaus bleibt unklar, in welchem Umfang die Umsetzung der Abbauprodukte zum Chromophor erfolgt und wie Konzentrationsunterschiede der Reaktionsprodukte die Kinetik der Farbbildung beeinflussen. Diese Effekte können durch die matrixunabhängig angefertigte externe Kalibrierung des Assays nicht ausgeglichen werden, wodurch diese keine repräsentative Quantifizierungsgrundlage der Methode bieten kann.

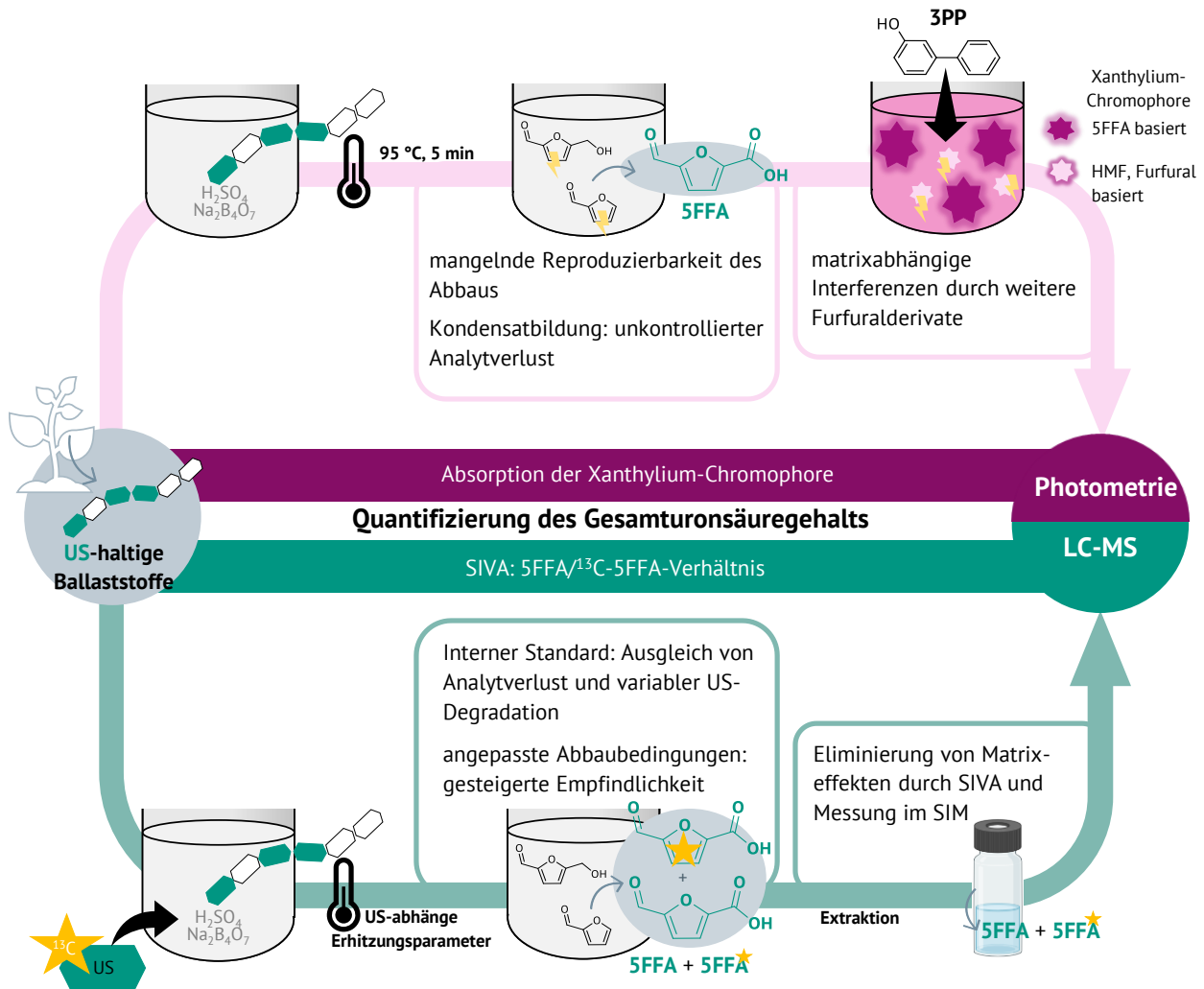


Abbildung 70: Vergleich der Gesamturonsäurebestimmung mittels Photometrie (oben) und Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS, unten). Beide Verfahren basieren auf der Behandlung der uronsäurehaltigen Probe in konzentrierter natriumtetraborathaltiger Schwefelsäure, wobei das Abbauprodukt 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) aus der Uronsäure (US) gebildet wird. Weitere enthaltene Neutralzucker bilden zudem die Furfuralderivate 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural, die in der photometrischen Methode ebenfalls ein Chromophor mit 3-Phenylphenol (3PP) ausbilden und interferieren. Durch Zusatz einer ^{13}C -markierten US als interne Standardsubstanz stellt die LC-MS Methode eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) dar (SIM: engl. *Single Ion Monitoring*).

Da die photometrische Methode aufgrund der dargelegten Punkte keine zuverlässige Quantifizierung erlaubt, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine alternative, chromatographiebasierte Analysemethode entwickelt. Ziel war es, die Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts unabhängig von der Farbreaktion sowie von den unkontrollierbaren Nebenreaktionen des klassischen

photometrischen Assays zu gestalten. Dabei sollte eine Methode entstehen, die empfindlich, reproduzierbar, für verschiedene Probenmatrizes geeignet und zugleich instrumentell einfach umsetzbar ist.

Das entwickelte SIVA-Verfahren (Abbildung 70) beruht ebenfalls auf dem Säureabbau der US zu 5FFA unter kontrollierten Bedingungen, gefolgt von einer Extraktion dieses Abbauprodukts und dessen MS-Detektion nach UHPLC-Trennung (vgl. Kapitel 4.5.1). Die Maximierung der 5FFA-Ausbeuten der einzelnen in pflanzlichen und algenbasierten Polysacchariden relevanten US durch die Optimierung der Erhitzungszeit und -temperatur zwischen 5 – 15 min sowie 60 – 95 °C ermöglicht hier eine maximal empfindliche Analyse der US (vgl. Kapitel 4.5.3). Zudem wurden in einer weiteren Optimierung Abbaubedingungen für die Kombinationen aus GalA + GlcA sowie ManA + GulA erarbeitet, welche eine gemeinsame Analyse (vergleichbare Empfindlichkeit) dieser Paarungen ermöglicht.

Das Einbinden einer vollständig ^{13}C -markierten US als interne Standardsubstanz sowie die damit notwendige MS-Detektion bei Verwendung diagnostischer SIM-Spuren des 5FFAs sowie seines ^{13}C -markierten Analogons stellt einen zentralen Vorteil der SIVA-Methode dar (vgl. Kapitel 4.5.4). Da sowohl die Standardsubstanz als auch die US dieselben Reaktionsschritte durchlaufen (Abbau zu 5FFA) und somit während der Analyse dieselben Einflüsse und Verluste (z.B. Abbauschwankungen, matrixbedingte Nebenreaktionen, Extraktionsverluste) erfahren, ist davon auszugehen, dass deren Verhältnis dabei unverändert bleibt. Durch die Extraktion der Säureabbauprodukte wird zudem der Gehalt an HMF und Furfural aufgrund einer schlechteren Extrahierbarkeit (HMF) sowie der höheren Flüchtigkeit (Furfural) beim Trocknen des Extrakts minimiert. In Kombination mit der gezielten Auswertung der Flächenverhältnisse der für 5FFA bzw. ^{13}C -5FFA charakteristischen SIM-Spuren können Matrixeffekte somit nahezu vollständig eliminiert werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung polymerer Uronsäurederivate gelegt, da US in realen Proben überwiegend in Oligo- und Polymerform vorliegen. Zu diesem Zweck wurden HGO sowie AOS mit einem DP von 3 – 10 semipräparativ isoliert (vgl. Kapitel 4.6.1.1), ebenso wie GXOS mit variierender Kettenlänge (DP 5 – 7, vgl. Kapitel 4.6.3.1). Ziel war es, den Einfluss des DP, aber auch spezieller Bindungstypen, wie der Aldobiuronsäurebindung, auf die Wiederfindung der US in der chromatographischen Quantifizierung zu klären.

Die Untersuchungen zeigten, dass HGO und AOS (DP 3 – 10) unter den optimierten Reaktionsbedingungen in vergleichbarem Umfang wie die entsprechenden Uronsäuremonomere abgebaut werden (vgl. Kapitel 4.6.1.2). Es ließ sich somit kein signifikanter Einfluss des DP auf die Wiederfindung gegenüber einem mitgeführten Monosaccharidstandard nachweisen. Daraus wurde geschlossen, dass der saure Abbau polymerer US unter Bedingungen der SIVA-Analyse weitgehend unabhängig von dem DP verläuft und die glycosidische Bindung zwischen Uronsäureeinheiten die Kinetik des Abbaus unter den verwendeten Bedingungen kaum beeinflusst.

Demgegenüber zeigte die Analyse der GXOS-Fractionen einen deutlichen Einfluss der Aldobiuronsäurebindung: Die 4-O-Me-GlcA-Substituenten, die in diesem Bindungstyp vorliegen, wurden nur

zu etwa 73 % wiedergefunden (DP 5 und 6), im GXOS mit einem DP von 7 sogar nur zu etwa 64 % (vgl. Kapitel 4.6.3.2). Versuche, die Ausbeute durch veränderte Erhitzungszeiten zu erhöhen, blieben erfolglos. Dies deutet darauf hin, dass die verringerte Wiederfindung nicht auf einen unvollständigen Abbau der US zu 5FFA zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf die hohe Stabilität der Aldoburonsäurebindung, die eine vollständige Freisetzung der Monomere im Rahmen der Analyse verhindert. Zudem besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass 5FFA direkt nach Hydrolyse und Abbau mit weiteren, v.a. xylosebasierten Abbauprodukten, kondensiert, was nur unzureichend durch die interne Standardsubstanz kompensiert wird. Auch die Position der US innerhalb des Oligomers wurde als möglicher Einflussfaktor diskutiert. Dabei konnte jedoch nur für einen Standard ($XU^{4m2}XXX$) die vollständige Struktur per NMR verifiziert werden, für die übrigen Standardsubstanzen waren die Probenmengen zu gering, sodass hier nur eingeschränkte Aussagen möglich waren. In Summe legen diese Ergebnisse nahe, dass in komplexen GX-haltigen Matrices die 4-O-Me-GlcA-Komponente systematisch unterbestimmt wird. Dem steht möglicherweise entgegen, dass bei der Analyse von unlöslichem Probenmaterial, wie GX-haltigen Holzproben, eine saure Vorbehandlung erforderlich ist. Diese dient der Solubilisierung der Probe durch Disruption der Zellulosematrix und verbessert dadurch die Zugänglichkeit der US. Es ist denkbar, dass bereits in diesem Schritt eine partielle Hydrolyse der Uronsäurebindungen stattfindet, was die Detektion der 4-O-Me-GlcA-Komponente beeinflussen kann. Die Beantwortung dieser Frage, insbesondere hinsichtlich des Einflusses einer Vorbehandlung auf unlösliches Probenmaterial, sollte in zukünftigen Untersuchungen näher betrachtet werden.

Abschließend wurden sowohl die photometrische Methode als auch die entwickelte SIVA hinsichtlich ihrer Eignung zur quantitativen Gesamturonsäureanalyse validiert (vgl. Kapitel 4.7.1). Dabei zeigte sich, dass die SIVA eine signifikant höhere Präzision und Richtigkeit aufweist. Während die photometrische Bestimmung stark von der Zusammensetzung der Probe und der genauen Einhaltung der Reaktionsbedingungen abhängt, erwies sich die SIVA als robust gegenüber Variationen der Reaktionsbedingungen sowie weitgehend matrixunabhängig. Darüber hinaus konnte eine verbesserte Linearität des Messsignals über einen weiten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Der für die photometrische Uronsäureanalyse in der Originalliteratur empfohlene Kalibrierbereich von 10 – 85 mg/L US beginnt stets unterhalb der tatsächlichen BG, wodurch eine verlässliche quantitative Aussage in diesem Konzentrationsbereich nicht möglich ist. Die ermittelten NG und BG der SIVA belegen, dass durch Anpassung der Abbaubedingungen eine etwa fünffache Verbesserung der Empfindlichkeit gegenüber der photometrischen Methode erzielt werden konnte. Zudem weist die SIVA mit einem mittleren Verfahrensvariationskoeffizienten von lediglich 1,95 % eine deutlich höhere Präzision auf als die photometrische Analyse (10,9 %). Der Einsatz der internen Standardsubstanz zeigt hierbei einen eindeutig positiven Effekt auf die Präzision. Aufgrund der massenspektrometrisch gewonnenen Spezifität der SIVA liegen sowohl die externen Wiederfindungen als auch die Wiederfindungen in realen Matrices bei annähernd 100 %. Dies zeigt, dass ein Matrixeinfluss weitgehend eliminiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der photometrischen Methode deutliche Abweichungen zwischen externer und matrixbasierter Wiederfindung, was die in den vorhergehenden Abschnitten diskutierte Über- bzw.

Unterbestimmungen des Gesamturonsäuregehalts bestätigt. Die zugrunde liegenden Ursachen dieser Schwankungen sind komplex und bislang nicht vollständig verstanden.

Die abschließende Anwendung der entwickelten SIVA sowie der photometrischen Methode zur Analyse von pektinhaltigen Karotten-, Zitronen- und Apfel-LBS bzw. UBS, sowie Hartholzproben, verschiedenen Hydrokolloiden (Xanthan, Gummi arabicum, Karayagummi) und einer Braunalgenprobe bestätigten, dass es bei der Analyse komplexer Proben grundsätzlich schwierig ist, die absolute Richtigkeit eines Messergebnisses zu beurteilen (vgl. Kapitel 4.7.2). Eine Bewertung kann meist nur relativ, im Vergleich zu alternativen Methoden mit demselben Zielparameter erfolgen.

Die Güte einer Methode lässt sich weitaus besser beurteilen, wenn ein grundlegendes Verständnis der chemischen Prozesse und der Kontrolle über deren Einflussfaktoren besteht. Die photometrische Bestimmung ist in hohem Maße von einer Vielzahl solcher Einflussgrößen abhängig: von der Probenvorbehandlung, der Kalibrierung mit lediglich einer US unter nicht optimierten Bedingungen, über die unkontrollierte Nebenreaktion von 5FFA mit Abbauprodukten bis hin zur Farbreaktion selbst, deren Kinetik bislang nur unzureichend verstanden ist. Hinzu kommen die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht quantifizierten Effekte weiterer Matrixkomponenten auf die Bildung der Triarylmetan-Vorstufe und des finalen Xanthylium-Chromophors. Da keine praktikablen Ansätze zur Minimierung dieser Unsicherheitsfaktoren gefunden werden konnten, wurde mit der entwickelten SIVA eine alternative Methode eingesetzt, welche dieselbe Fragestellung, die Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts, adressiert, dabei jedoch auf der direkten Quantifizierung des charakteristischen Abbauprodukts 5FFA beruht. Durch den Verzicht auf die Farbreaktion und die Verwendung einer isotopenmarkierten internen Standardsubstanz werden systematische Fehler, insbesondere jene durch Kondensationsreaktionen und unvollständigen Abbau, weitgehend eliminiert. Aufgrund ihrer ausgeprägten Robustheit und Selektivität stellt die SIVA trotz des erforderlichen zusätzlichen Extraktionsschritts einen verlässlichen und differenzierten Ansatz zur quantitativen Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts in komplexen biologischen Matrices dar.

5. Zusammenfassung

Uronsäuren (US) sind Monosaccharide, die durch eine Carboxygruppe am terminalen Kohlenstoff charakterisiert sind und in zahlreichen Zellwandpolysacchariden phototropher Organismen vertreten. Sie sind wesentliche Strukturkomponenten von Pektin in Zellwänden höherer Pflanzen sowie von Glucuronoxylan (GX), eine Hemicellulose der Harthölzer. Pektin besteht aus Homogalacturonan- und Rhamnogalacturonan-dominierten Domänen. Ersteres besitzt ein lineares Rückgrat aus α -1,4-verknüpfter D-Galacturonsäure (GalA), während Rhamnogalacturonan I alternierende Einheiten aus Rhamnose und GalA enthält. In GX der Harthölzer ist das Xyloserückgrat häufig mit 4-O-Methyl-Glucuronsäure (GlcA) substituiert. Auch mikrobielle oder exsudatbasierte Hydrokolloide wie Xanthan, Gummi arabicum und Karayagummi enthalten variable Anteile an GalA und GlcA. In Zellwänden von Braunalgen bilden Mannuronsäure (ManA) und Guluronsäure (GulA) die Bausteine des Alginats, das der Zellwandhydratation dient und als Lebensmittelzusatzstoff von Bedeutung ist.

Die Quantifizierung von US besitzt zum einen eine hohe Relevanz für die Strukturaufklärung und Charakterisierung komplexer Polysaccharide, zum anderen setzen regulatorische Vorgaben, wie etwa der nach Verordnung (EU) Nr. 231/2012 vorgeschriebene Mindesturonsäuregehalt von 65 % im Pektin, eine zuverlässige Quantifizierung dieser Zucker voraus. Traditionell erfolgt die Analyse der Monomerbausteine im Rahmen der Monosaccharidverteilung nach Hydrolyse des Polymers und anschließender chromatographischer Erfassung. Diese liefert jedoch stark von der hydrolytischen Freisetzung der US aus verschiedenen Polymerstrukturen abhängige Ergebnisse. Für absolute Bestimmungen werden daher kolorimetrische Verfahren eingesetzt, die auf der Bildung farbiger Chromophore nach Abbau der US im stark Sauren beruhen. Ein Standardverfahren zur Bestimmung von US wurde 1973 von Blumenkrantz und Asboe-Hansen entwickelt. Dabei werden US in natriumtetrahydroborat-haltiger konzentrierter Schwefelsäure zu 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) abgebaut, die mit 3-Phenylphenol (3PP) ein magentafarbenes, photometrisch quantifizierbares, Chromophor bildet. Das Vorgehen ist einfach und schnell, zeigt jedoch deutliche Schwächen in Bezug auf die Selektivität, insbesondere hervorgerufen durch Neutralzucker, und führt häufig zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen. Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus und die Struktur des Chromophors waren bislang unzureichend verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus des Blumenkrantz-Asboe-Hansen-Assays erstmals detailliert untersucht und die Struktur des farbgebenden Chromophors aufgeklärt. Durch Extraktion aus konzentrierter Schwefelsäure und anschließende NMR-Analysen konnte folgendes aromatisches Triarylmethan-Derivat identifiziert werden: 5-(Bis(3-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)furan-2-carbonsäure. Dieses tritt in unterschiedlichen Sulfonierungsgraden auf und stellt eine Vorläuferstruktur des eigentlichen Chromophors dar, das aufgrund geringer Stabilität während der Isolierung nicht direkt charakterisiert werden konnte. Quantenchemische Berechnungen bestätigten, dass das aus diesem Triarylmethan-Derivat durch intramolekulare Etherbildung und Oxidation entstehende Xanthylium-Derivat 9-(5-Carboxyfuran-2-yl)-3,6-diphenyl-9H-xanthen-9-ylum das experimentell beobachtete Absorptionsspektrum reproduziert und die farbgebende Struktur im

Assay bildet. Zur experimentellen Verifizierung wurde der instabile 5FFA-Baustein durch 4-Carboxybenzaldehyd ersetzt. Diese Modifikation führte zur Bildung eines strukturell analogen, jedoch deutlich stabileren Chromophors, das mittels NMR-, Massenspektrometrie und quantenchemischer Berechnungen eindeutig als Xanthylium-Spezies charakterisiert werden konnte. Untersuchungen mit neutralzuckerbasierten Abbauprodukten wie Hydroxymethylfurfural und Furfural zeigten, dass diese zwar ebenfalls Farbreaktionen eingehen, die Konzentration der daraus gebildeten Chromophore jedoch geringer ist, da 3PP bevorzugt mit 5FFA reagiert.

Durch Zugabe von Borat kann die Empfindlichkeit der Analyse gesteigert werden. Borat fördert sowohl den Abbau der US zu 5FFA, insbesondere bei lactonisierbaren US wie GlcA, ManA und GulA, als auch die Stabilität der gebildeten Farbstoffe. Dies steht im Zusammenhang mit einer verstärkten Sulfonierung der 3PP-Einheiten, wodurch die positive Ladung des Chromophors stabilisiert wird.

Trotz der mechanistischen Aufklärung konnten wesentliche Einschränkungen des photometrischen Verfahrens hinsichtlich Präzision und Matrixunabhängigkeit nicht beseitigt werden. Daher wurde eine alternative, chromatographiebasierte Methode entwickelt, die auf dem Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) beruht. Die Methode verzichtet auf die Chromophorbildung und quantifiziert das gebildete 5FFA direkt nach Extraktion aus der Säure. Durch den Einsatz einer ^{13}C -markierten US als interne Standardsubstanz werden Verluste infolge von Kondensation, Extraktionsschwankungen oder variablen Abbaubedingungen bei der Säurebehandlung kompensiert. Die Quantifizierung erfolgt massenspektrometrisch über die relativen Signalflächen von nativem und ^{13}C -markiertem 5FFA. Die Abbaubedingungen wurden systematisch hinsichtlich Temperatur und Reaktionszeit für jede US sowie relevante Uronsäure-kombinationen optimiert. Zudem wurden Einflüsse struktureller Variationen wie Polymerisationsgrad (DP), Methylveresterung oder Methylierung auf die Analyse untersucht. Hierzu dienten isolierte GalA-, Alginat- und Glucuronoxylanoligosaccharide (DP 3 – 10) als Modellsysteme. Die Ergebnisse zeigten, dass die Methode unabhängig vom DP stabile und reproduzierbare Resultate liefert. Lediglich bei GX-basierten Oligomeren wurde eine geringere Wiederfindung beobachtet, was auf die Stabilität der Aldobiuronsäurebindung zurückgeführt wurde. Die Validierung der Methode ergab gegenüber der photometrischen Analyse eine rund fünffach verbesserte Nachweisgrenze sowie eine deutlich höhere Präzision.

Die Anwendung beider Methoden auf verschiedene Proben, darunter Apfel- und Karottentrester, Zitronenschale, Braunalgen, Buchen- und Eukalyptusholz sowie verschiedene Hydrokolloide, zeigte teils deutliche Abweichungen zwischen den Ergebnissen. Aufgrund des umfassenderen methodischen Verständnisses sowie der Korrektur der inkonsistenten Uronsäuredegradation ist jedoch davon auszugehen, dass die mittels SIVA erzielten Ergebnisse die tatsächlichen Gesamturonsäuregehalte zuverlässiger widerspiegeln.

Diese Arbeit liefert somit einen umfassenden mechanistischen Einblick in die photometrische Standardmethode zur Gesamturonsäurebestimmung, klärt die Struktur des zugrunde liegenden Chromophors und den Reaktionsmechanismus dessen Bildung auf und etabliert mit der SIVA eine robuste, hochpräzise Methode zur verlässlichen Quantifizierung des Gesamturonsäuregehalts in komplexen Polysaccharidmatrices.

6. Literatur

- Abka-khajouei, R.; Tounsi, L.; Shahabi, N.; Patel, A. K.; Abdelkafi, S.; Michaud, P., Structures, Properties and Applications of Alginates. *Marine Drugs* **2022**, 20(6), 364-384.
- Abubakr, N.; Jayemanne, A.; Audrey, N.; Lin, S. X.; Chen, X. D., Effects of encapsulation process parameters of calcium alginate beads on Vitamin B12 drug release kinetics. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* **2009**, 5(5), 804-810.
- Ahmad, T.; Andersson, R.; Olsson, K.; Theander, O., On the formation of 2,3-dihydroxyacetophenone from pentoses or hexuronic acids. *Carbohydrate research* **1993**, 247, 211-215.
- Akhter, M. J.; Sarkar, S.; Sharmin, T.; Mondal, S. C., Extraction of pectin from powdered citrus peels using various acids: An analysis contrasting orange with lime. *Applied Food Research* **2024**, 4(2), 100614.
- Albersheim, P.; Nevins, D. J.; English, P. D.; Karr, A., A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate research* **1967**, 5(3), 340-345.
- Anderson, D. M. W.; Garbutt, S., Studies on uronic acid materials. Part VII. The kinetics and mechanism of the decarboxylation of uronic acids. *Journal of the Chemical Society* **1963**, 3204.
- Aspinall, G.; Baillie, J., Gum tragacanth. Part I. Fractionation of the gum and the structure of tragacanthic acid. *Journal of the Chemical Society* **1963**, 1702-1714.
- Awanthi, M. G. G.; Umosa, M.; Yuguchi, Y.; Oku, H.; Kitahara, K.; Ito, M.; Tanaka, A.; Konishi, T., Fractionation and characterization of cell wall polysaccharides from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *Carbohydrate research* **2023**, 523, 108722.
- Babbar, N.; Dejonghe, W.; Gatti, M.; Sforza, S.; Elst, K., Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology* **2016**, 36(4), 594-606.
- Badin, J.; Jackson, C.; Schubert, M., Improved method for determination of plasma polysaccharides with tryptophan. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1953**, 84(2), 288-291.
- Barazarte, H.; García, T.; Duran, L.; Chaparro, L.; Gamez, J., Evaluación de la exactitud y precisión de los métodos m-Hydroxyfenilfenol y carbazol aplicados en la cuantificación de sustancias pécticas. *Revista Agrollania de Ciencia y Tecnología* **2007**, 4, 53-62.
- Barbat, A.; Gloaguen, V.; Sol, V.; Krausz, P., Aqueous extraction of glucuronoxylans from chestnut wood: new strategy for lignin oxidation using phthalocyanine or porphyrin/H₂O₂ system. *Bioresource technology* **2010**, 101(16), 6538-6544.
- Barrett, A. J.; Northcote, D. H., Apple fruit pectic substances. *Biochemical Journal* **1965**, 94(3), 617-627.
- Baskerville, C., Reactions between copper and concentrated sulphuric acid. *Journal of the American Chemical Society* **1895**, 17(11), 904-912.
- Bazak, J. D.; Wong, A. R.; Duanmu, K.; Han, K. S.; Reed, D.; Murugesan, V., Concentration-dependent solvation structure and dynamics of aqueous sulfuric acid using multinuclear NMR and DFT. *The Journal of Physical Chemistry B* **2021**, 125(19), 5089-5099.
- Bédouet, L.; Courtois, B.; Courtois, J., Rapid quantification of *O*-acetyl and *O*-methyl residues in pectin extracts. *Carbohydrate research* **2003**, 4(7), 379-383.

- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2012). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6 ed.). Springer, Berlin.
- Bemiller, J. N. (1967). *Advances in Carbohydrate Chemistry* (1 ed., Vol. 22). Academic Press, London.
- Ben-Shalom, N.; Gross, K. C.; Conway, W. S.; Pinto, R.; Livsey, J. N., Effect of water content on sensitivity and stability of the m-phenylphenol uronic acid assay. *Food chemistry* **1994**, 50(1), 99-101.
- Benen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J., Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry* **1999**, 259(3), 577-585.
- Berteau, O.; Mulloy, B., Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, 13(6), 29-40.
- Biely, P.; Singh, S.; Puchart, V., Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology advances* **2016**, 34(7), 1260-1274.
- Bindereif, B.; Eichhöfer, H.; Bunzel, M.; Karbstein, H.; Wefers, D.; van Der Schaaf, U., Arabinan side-chains strongly affect the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids* **2021**, 121, 106968.
- Bishop, M.; Shahid, N.; Yang, J.; Barron, A. R., Determination of the mode and efficacy of the cross-linking of guar by borate using MAS ^{11}B NMR of borate cross-linked guar in combination with solution ^{11}B NMR of model systems. *Dalton Transactions* **2004**, (17), 2621-2634.
- Bitter, T.; Muir, H. M., A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* **1962**, 4(4), 330-334.
- Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G., New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **1973**, 54(2), 484-489.
- Bornik, M.-A.; Kroh, L. W., D-Galacturonic acid as a highly reactive compound in nonenzymatic browning. 1. Formation of browning active degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61(14), 3494-3500.
- Borowitzka, M. A., High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* **2013**, 25(3), 743-756.
- Bowness, J. M., 5-Formylfuroic acid and the carbazole reaction for uronic acids and acidic polysaccharides. *Biochemical Journal* **1958**, 70(1), 107-110.
- Bromley, J. R.; Busse-Wicher, M.; Tryfona, T.; Mortimer, J. C.; Zhang, Z.; Brown, D. M.; Dupree, P., GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *The Plant Journal* **2013**, 74(3), 423-434.
- Broxterman, S. E.; Picouet, P.; Schols, H. A., Acetylated pectins in raw and heat processed carrots. *Carbohydrate Polymers* **2017**, 177, 58-66.
- Brummell, D. A., Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **2006**, 33(2), 103-119.
- Buckeridge, M. S., dos Santos, H. P., Tiné, M. A. S., Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **2000**, 38(1-2), 141-156.
- Bunzel, M.; Ralph, J.; Steinhart, H., Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research* **2005**, 49(6), 551-559.

- Busse-Wicher, M.; Gomes, T. C.; Tryfona, T.; Nikolovski, N.; Stott, K.; Grantham, N. J.; Bolam, D. N.; Skaf, M. S.; Dupree, P., The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **2014**, 79(3), 492-506.
- Caffall, K. H.; Mohnen, D., The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research* **2009**, 344(14), 1879-1900.
- Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **1993**, 3(1), 1-30.
- Challinor, S. W.; Haworth, W. N.; Hirst, E. L., XXXIV.-The compound uronic acids. Structure of the aldobionic acid from gum arabic. *Journal of the Chemical Society* **1931**, 258-265.
- Chan, E.-S., Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84(4), 1267-1275.
- Cheetham, N. W.; Sirimanne, P., Methanolysis studies of carbohydrates, using HPLC. *Carbohydrate research* **1983**, 112(1), 1-10.
- Chevolot, L.; Mulloy, B.; Ratskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S., A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate research* **2001**, 330(4), 529-535.
- Chhaperwal, P.; Soni, S.; Teli, S.; Rundla, H. K.; Agarwal, S., A retrospective 9-years overview of sulfated polyborate as a robust catalyst for organic transformations. *RSC Advances* **2025**, 15(30), 24880-24904.
- Ching, S. H.; Bansal, N.; Bhandari, B., Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, 57(6), 1133-1152.
- Chong, S. L.; Koutaniemi, S.; Virkki, L.; Pynnonen, H.; Tuomainen, P.; Tenkanen, M., Quantitation of 4-O-methylglucuronic acid from plant cell walls. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 91(2), 626-630.
- Churms, S. C., Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A* **1990**, 500, 555-583.
- Claridge, T. D. W. (2016). *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Elsevier, Amsterdam.
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, 29(1), 3-23.
- Combo, A. M. M.; Aguedo, M.; Goffin, D.; Wathelet, B.; Paquot, M., Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing* **2012**, 90(3), 588-596.
- Conrad, C. M., The decarboxylation of D-galacturonic acid with special reference to the hypothetical formation of L-arabinose. *Journal of the American Chemical Society* **1931**, 53(6), 2282-2287.
- Corradini, C.; Cavazza, A.; Bignardi, C., 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**, 2012(1), 1-13.
- Dahlman, O.; Jacobs, A.; Liljenberg, A.; Olsson, A. I., Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2000**, 891(1), 157-174.

- Daré-Doyen, S.; Doizi, D.; Guilbaud, P.; Djedaïni-Pilard, F.; Perly, B.; Millié, P., Dimerization of xanthene dyes in water: Experimental studies and molecular dynamic simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107(50), 13803-13812.
- De Angelis, A.; Ingallina, P.; Perego, C. S., Solid acid catalysts for industrial condensations of ketones and aldehydes with aromatics. *Industrial & engineering chemistry research* **2004**, 43(5), 1169-1178.
- De Rooter, G. A.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J.; Rombouts, F. M., Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry* **1992**, 207(1), 176-185.
- De Souza, A.; Hull, P. A.; Gille, S.; Pauly, M., Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta* **2014**, 240(5), 1123-1138.
- De Vries, J. A.; Rombouts, F. M.; Voragen, A.; Pilnik, W., Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers* **1982**, 2(1).
- Delwiche, C. F.; Cooper, E. D., The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Current Biology* **2015**, 25(19), 899-910.
- Deniaud-Bouet, E.; Kervarec, N.; Michel, G.; Tonon, T.; Kloareg, B.; Herve, C., Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany* **2014**, 114(6), 1203-1216.
- Dickinson, E.; Murray, B. S.; Stainsby, G.; Anderson, D. M., Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums. *Food Hydrocolloids* **1988**, 2(6), 477-490.
- DIN 32645:2008-03, Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Deutsches Institut für Normung e. V. **2008**.
- Dinger, M. B.; Scott, M. J., Extended structures built on a triphenoxymethane platform –C₃-symmetric, conformational mimics of calix[n]arenes. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 2000(13), 2467-2478.
- Dische, Z., A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry* **1947**, 167(1), 189-198.
- Dobberstein, D.; Bunzel, M., Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58(16), 8927-8935.
- Donoghue, P. C. J.; Harrison, C. J.; Paps, J.; Schneider, H., The evolutionary emergence of land plants. *Current Biology* **2021**, 31(19), 1281-1298.
- Dreywood, R., Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **1946**, 18(8), 499.
- DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, 28(3), 350-356.
- Dunlop, A. P., Furfural formation and behavior. *Industrial & Engineering Chemistry* **1948**, 40(2), 204-209.

- Ebringerová, A.; Alföldi, J.; Hromádková, Z.; Pavlov, G. M.; Harding, S. E., Water-soluble p-carboxybenzylated beechwood 4-O-methylglucuronoxylan: structural features and properties. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 42(2), 123-131.
- Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I* (pp. 1-67). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Eichhofer, H.; Bindereif, B.; Karbstein, H. P.; Bunzel, M.; van der Schaaf, U. S.; Wefers, D., Influence of arabinan fine structure, galacturonan backbone length, and degree of esterification on the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2023**, 71(4), 2105-2112.
- Evtuguin, D. V.; Tomas, J. L.; Silva, A. M.; Neto, C. P., Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate research* **2003**, 338(7), 597-604.
- Fagnani, E.; Melios, C. B.; Pezza, L.; Pezza, H. R., Chromotropic acid-formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. *Talanta* **2003**, 60(1), 171-176.
- Farooq, M. A.; Nóvoa, H.; Araújo, A.; Tavares, S. M. O., An innovative approach for planning and execution of pre-experimental runs for Design of Experiments. *European Research on Management and Business Economics* **2016**, 22(3), 155-161.
- Fatouros, A.; Einhorn-Stoll, U.; Kastner, H.; Drusch, S.; Kroh, L. W., Influence of the carboxylic function on the degradation of d-galacturonic acid and Its Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, 69(32), 9376-9382.
- Fauré, R.; Courtin, C. M.; Delcour, J. A.; Dumon, C.; Faulds, C. B.; Fincher, G. B.; Fort, S.; Fry, S. C.; Halila, S.; Kabel, M. A.; Pouvreau, L.; Quemener, B.; Rivet, A.; Saulnier, L.; Schols, H. A.; Driguez, H.; O'Donohue, M. J., A brief and informationally rich naming system for oligosaccharide motifs of heteroxylans found in plant cell walls. *Australian Journal of Chemistry* **2009**, 62(6), 533-537.
- Feather, M. S.; Harris, J. F., Relationships between some uronic acids and their decarboxylation products. *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, 31(12), 4018-4021.
- Feigl, F. (1966). *Spot tests in organic analysis* (7 ed.). Elsevier Science, Amsterdam.
- Filisetti-Cozzi, T. M.; Carpita, N. C., Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* **1991**, 197(1), 157-162.
- Fleming, I.; Williams, D. H. (1966). *Spectroscopic methods in organic chemistry* (6 ed.). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Flowers, R.; Gillespie, R.; Oubridge, J., Solutions in sulphuric acid. Part XIX. The formation of tetra (hydrogen sulphato) boric acid and its anion in solutions of boric acid and boric oxide. *Journal of the Chemical Society* **1956**, 40, 1925-1938.
- Friebolin, H. (2010). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung* (5 ed.). Weinheim.
- Friedmann, E. (2024). *Analysen zum Einfluss von Borat innerhalb der photometrischen Gesamturonsäurebestimmung* [Masterarbeit]. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Galambos, J. T., The reaction of carbazole with carbohydrates, I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. *Analytical Biochemistry* **1967**, 19(1), 119.
- García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E., Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*. *Biotechnology advances* **2000**, 18(7), 549-579.

- Garna, H.; Mabon, N.; Nott, K.; Wathelet, B.; Paquot, M., Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food chemistry* **2006**, 96(3), 477-484.
- Gashua, I. B.; Williams, P. A.; Baldwin, T. C., Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both *Acacia senegal* and *Acacia seyal*. *Food Hydrocolloids* **2016**, 61, 514-522.
- Gee, M.; McComb, E. A.; McCready, R. M., A Method for the characterization of pectic substances in some fruit and sugar-beet marcs. *Journal of Food Science* **1958**, 23(1), 72-75.
- Georghiou, P. E.; Ho, C. K., The chemistry of the chromotropic acid method for the analysis of formaldehyde. *Canadian Journal of Chemistry* **1989**, 67(5), 871-876.
- Gillespie, R. J.; Robinson, E. A., The sulphuric acid solvent system: Part III. The preparation and structures of some complex sulphatoborates. *Canadian Journal of Chemistry* **1962**, 40.
- Giovannelli, A.; Emiliani, G.; Traversi, M. L.; Deslauriers, A.; Rossi, S., Sampling cambial region and mature xylem for non structural carbohydrates and starch analyses. *Dendrochronologia* **2011**, 29(3), 177-182.
- Goulao, L. F.; Vieira-Silva, S.; Jackson, P. A., Association of hemicellulose- and pectin-modifying gene expression with *Eucalyptus globulus* secondary growth. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, 49(8), 873-881.
- Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P. J. C.; Thom, D., Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters* **2002**, 32(1), 195-198.
- Grantham, N. J.; Wurman-Rodrich, J.; Terrett, O. M.; Lyczakowski, J. J.; Stott, K.; Iuga, D.; Simmons, T. J.; Durand-Tardif, M.; Brown, S. P.; Dupree, R.; Busse-Wicher, M.; Dupree, P., An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nature Plants* **2017**, 3(11), 859-865.
- Gray, C. W.; Houston, T. A., Boronic acid receptors for α -hydroxycarboxylates: High affinity of Shinkai's glucose receptor for tartrate. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67(15), 5426-5428.
- Gregory, J. D., The effect of borate on the carbazole reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1960**, 89(2), 157-159.
- Grüttner, C.; Böhmer, V.; Assmus, R.; Scherf, S., A convenient and general synthesis of alkanediyl diphenols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1995**, 26(2), 93-94.
- Harris, P. J.; Smith, B. G., Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science & Technology* **2006**, 41(2), 129-143.
- Heinonen, E.; Sivan, P.; Jimenez-Quero, A.; Lindstrom, M. E.; Wohler, J.; Henriksson, G.; Vilaplana, F., Pattern of substitution affects the extractability and enzymatic deconstruction of xylan from *Eucalyptus* wood. *Carbohydrate Polymers* **2025**, 353, 123246.
- Hentati, F.; Tounsi, L.; Djomdi, D.; Pierre, G.; Delattre, C.; Ursu, A. V.; Fendri, I.; Abdelkafi, S.; Michaud, P., Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules* **2020**, 25(14).
- Hicks, K. B.; Feather, M. S., The acid-catalyzed dehydration of 1-benzylamino-1-deoxy-d-threo-pentulose, 1-dibenzylamino-1-deoxy-d-fructuronic acid, and d-glucuronic acid. *Carbohydrate research* **1977**, 54(2), 209-215.
- Hilborn, R. C., Einstein coefficients, cross sections, f values, dipole moments, and all that. *arXiv preprint physics* **2002**.

- Holdt, S. L.; Kraan, S., Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* **2011**, 23(3), 543-597.
- Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N.; Fischer, G. (2017). *Anorganische Chemie* (103 ed.). De Gruyter, Berlin.
- Hopkinson, A.; Wyatt, P., Substituent effects on the electronic absorption spectra of phenolphthalein and phenolsulphonphthalein monocationic ions. *Journal of the Chemical Society B* **1970**, 17, 530-535.
- Horvat, J.; Klaić, B.; Metelko, B.; Šunjić, V., Mechanism of levulinic acid formation. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26(17), 2111-2114.
- Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40(4), 430-443.
- Huang, W.; Tan, H.; Nie, S., Beneficial effects of seaweed-derived dietary fiber: Highlights of the sulfated polysaccharides. *Food chemistry* **2022**, 373(B), 131608.
- Huber, G.; Deuel, H., Über den Mechanismus der sauren Decarboxylierung von Hexuronsäuren. *Helvetica Chimica Acta* **1951**, 34(3), 853-858.
- Isbell, H. S., Synthesis of vitamin C from pectic substances. *Synthesis* **1944**, 33, 45-61.
- Ishii, T.; Matsunaga, T., Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate research* **1996**, 284(1), 1-9.
- Ishii, T.; Tobita, T., Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. *Carbohydrate research* **1993**, 248, 179-190.
- Jacob, N.; Prema, P., Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology & Biotechnology* **2006**, 44(2).
- Jakobsen, P.; Andersen, A. P.; Lyon, H.; Treppendahl, S., Preparation and characterization of Pyronin Y. *Microscopy Research and Technique* **1983**, 87(1), 41-47.
- Jankovic, A.; Chaudhary, G.; Goia, F., Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy and Buildings* **2021**, 250, 111298.
- Jarvis, M. C.; Apperley, D. C., Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from ¹³C NMR. *Carbohydrate research* **1995**, 275(1), 131-145.
- Jarvis, M. C.; Forsyth, W.; Duncan, H. J., A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* **1988**, 88(2), 309-314.
- Jensen, H. H.; Bols, M., Steric effects are not the cause of the rate difference in hydrolysis of stereoisomeric glycosides. *Organic Letters* **2003**, 5(19), 3419-3421.
- Jonathan, M. C.; Bosch, G.; Schols, H. A.; Gruppen, H., Separation and identification of individual alginate oligosaccharides in the feces of alginate-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61(3), 553-560.
- Kachur, A. V.; Popov, A. A.; Delikatny, E. J.; Karp, J. S.; Popov, A. V., Synthesis of (18)F-labeled phenolphthalein and naphtholphthalein. *Journal of Fluorine Chemistry* **2013**, 151, 1-6.
- Kadam, S. U.; O'Donnell, C. P.; Rai, D. K.; Hossain, M. B.; Burgess, C. M.; Walsh, D.; Tiwari, B. K., Laminarin from Irish brown seaweeds *ascophyllum nodosum* and *laminaria hyperborea*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Marine Drugs* **2015**, 13(7), 4270-4280.
- Kamino, S.; Uchiyama, M., Xanthene-based functional dyes: towards new molecules operating in the near-infrared region. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2023**, 21(12), 2458-2471.

- Kang, X.; Kirui, A.; Dickwella Widanage, M. C.; Mentink-Vigier, F.; Cosgrove, D. J.; Wang, T., Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications* **2019**, 10(1), 347.
- Kant, S.; Vohra, A.; Gupta, R., Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification* **2013**, 87(1), 11-16.
- Kawada, A.; Hiura, N.; Shiraiwa, M.; Tajima, S.; Hiruma, M.; Hara, K.; Ishibashi, A.; Takahara, H., Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture. *FEBS Letters* **1997**, 408(1), 43-46.
- Kemnitz, K.; Yoshihara, K., Entropy-driven dimerization of xanthene dyes in nonpolar solution and temperature-dependent fluorescence decay of dimers. *The Journal of Physical Chemistry B* **1991**, 95(16), 6095-6104.
- Kersten, F.; Martin, D.; van der Schaaf, U. S.; Wefers, D., Gum Arabic – Same but different: Comparative analysis of structural characteristics and emulsifying properties of 20 *Acacia senegal* samples of various qualities. *Food Hydrocolloids* **2025**, 165.
- Kintner, P. K.; Van Buren, J. P., Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *Journal of Food Science* **1982**, 47(3), 756-759.
- Kloareg, B.; Quatrano, R., Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* **1988**, 26, 259-315.
- Knop, A.; Pilato, L. A. (1985). *Phenolic resins: Chemistry, applications and performance future directions* (1 ed.). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Knutson, C. A.; Jeanes, A., A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Analytical Biochemistry* **1968**, 24(3), 470-481.
- Koch, H.; Krause, F.; Steffan, R.; Woelk, H. U., Herstellung von Phenolharzen unter Verwendung von Stärkeprodukten. *Starch - Stärke* **1983**, 35(9), 304-313.
- Koch, H.; Pein, J., Condensation reactions between phenol, formaldehyde and 5-hydroxymethylfurfural, formed as intermediate in the acid catalyzed dehydration of starchy products. *Polymer Bulletin* **1985**, 13, 525-532.
- Kool, M. M.; Gruppen, H.; Sworn, G.; Schols, H. A., Comparison of xanthans by the relative abundance of its six constituent repeating units. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 98(1), 914-921.
- Köse, D. A.; Zümreoglu-Karan, B.; Hökelek, T.; Şahin, E., Boric acid complexes with organic biomolecules: Mono-chelate complexes with salicylic and glucuronic acids. *Inorganica Chimica Acta* **2010**, 363(14), 4031-4037.
- Kozlov, V. A.; Ivanov, S. N.; Koifman, O. I., Solvated proton as the main reagent and a catalyst in the single-stage aromatic sulfonation and protodesulfonation of sulfonic acids. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2017**, 30(12).
- Kreppenhof, S.; Frank, O.; Hofmann, T., Identification of (furan-2-yl)methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee. *Food chemistry* **2011**, 126(2), 441-449.
- Kromidas, S. (2011). *Handbuch Validierung in der Analytik* (2 ed.). Wiley-VCH, Weinheim.
- Kurata, H.; Oki, Y.; Matsumoto, K.; Kawase, T.; Oda, M., Synthesis of tetrakis(2-furyl)methane. *Chemistry Letters* **2005**, 34(7), 910-911.
- Lambert, J. B.; Gronert, S.; Shurvell, H. F.; Lightner, D. A. (2012). *Spektroskopie: Strukturaufklärung in der Organischen Chemie* (2 ed.). Pearson, München.

- Latscha, H. P.; Kazmaier, U.; Klein, H. (2016). *Organische Chemie* (U. Kazmaier & H. Klein, Trans.; 7 ed.). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Laurent, M. A.; Boulenguer, P., Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids* **2003**, 17(4), 445-454.
- Lavis, L. D., Teaching old dyes new tricks: Biological probes built from fluoresceins and rhodamines. *Annual Review of Biochemistry* **2017**, 86, 825-843.
- Lehrfeld, J., Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acids in carbohydrate mixtures. *Analytical Biochemistry* **1981**, 115(2), 410-481.
- Leijdekkers, A. G.; Sanders, M. G.; Schols, H. A.; Gruppen, H., Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatographie A* **2011**, 1218(51), 9227-9235.
- Leschinsky, M.; Sixta, H.; Patt, R., Detailed mass balances of the autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* at 170° C. *BioResources* **2009**, 4(2).
- Levigne, S.; Thomas, M.; Ralet, M.-C.; Quemener, B.; Thibault, J.-F., Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids* **2002**, 16(6), 547-550.
- Li, J.; Kisara, K.; Danielsson, S.; Lindström, M. E.; Gellerstedt, G., An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydrate research* **2007**, 342(11), 1442-1449.
- Liang, X.; Haynes, B. S.; Montoya, A., Acid-Catalyzed ring opening of furan in aqueous solution. *Energy Fuels* **2017**, 32(4), 4139-4148.
- Liners, F.; Letesson, J. J.; Didembourg, C.; Van Cutsem, P., Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. *Plant physiology* **1989**, 91, 1419-1424.
- Link, K. P.; Niemann, C., The action of weak mineral acids on uronic acids. *Journal of the American Chemical Society* **1930**, 6(52), 2474-2480.
- Lorenz, D.; Erasmy, N.; Akil, Y.; Saake, B., A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydrate Polymers* **2016**, 140, 181-187.
- Luisa, M.; Ramos, D.; Madalena, M.; Caldeira, M.; Gil, V. M., NMR study of uronic acids and their complexation with molybdenum (VI) and tungsten (VI) oxoions. *Carbohydrate research* **1996**, 286(5), 1-15.
- Ma, X.; Li, P.; Ma, T.-X.; Chu, G.-W.; Luo, Y.; Zou, H.-K.; Sun, B.; Chen, J.-F., Study on phenol sulfonation by concentrated sulfuric acid: Kinetics and process optimization. *Chemical Engineering Science* **2019**, 202, 15-25.
- Mabeau, S.; Kloareg, B., Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*. *Journal of Experimental Botany* **1987**, 38(9), 1573-1580.
- Maeda, Y.; Awano, T.; Takabe, K.; Fujita, M., Immunolocalization of glucomannans in the cell wall of differentiating tracheids in *Chamaecyparis obtusa*. *Protoplasma* **2000**, 213(3), 148-156.
- Maia, M.; Resende, D.; Duraes, F.; Pinto, M. M. M.; Sousa, E., Xanthenes in medicinal chemistry - Synthetic strategies and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 210, 113085.

- Mann, F.; Tollens, B., Ueber die Bildung von Furfurol und Kohlensäure aus Glucuronsäure. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1896**, 290(2), 155-158.
- Manns, D.; Deutschle, A. L.; Saake, B.; Meyer, A. S., Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (*Laminariaceae*). *RSC Advances* **2014**, 4(49), 25736-25746.
- Margarella, A. M.; Perrine, K. A.; Lewis, T.; Faubel, M.; Winter, B.; Hemminger, J. C., Dissociation of sulfuric acid in aqueous solution: Determination of the photoelectron spectral fingerprints of H₂SO₄, HSO₄⁻, and SO₄²⁻ in water. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, 117(16), 8131-8137.
- Maseda, M.; Miyazaki, Y.; Takamuku, T., Thermodynamics for complex formation of boric acid and borate with hydroxy acids and diols. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, 341.
- Matsushashi, S.; Hatanaka, C., Simultaneous measurement of the galacturonate and neutral sugar contents of pectic substances by an enzymic-HPLC Method. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1992**, 56(7), 1053-1057.
- McCleary, B. V.; Sloane, N.; Draga, A., Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates in vivo digestion. *Starch - Stärke* **2015**, 67(9-10), 860-883.
- McComb, E. A.; McCready, R. M., Colorimetric determination of pectic substances. *Analytical Chemistry* **1952**, 24(10), 1630-1632.
- McDougall, G. J.; Morrison, I. M.; Stewart, D.; Hillman, J. R., Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1996**, 70(2), 133-150.
- Miguez, N.; Fernandez-Polo, D.; Santos-Moriano, P.; Rodríguez-Colinas, B.; Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J.; Ballesteros, A. O.; Plou, F. J., Enzymatic bioconversion of beechwood xylan into the antioxidant 2'-O- α -(4-O-methyl-D-glucuronosyl)-xylobiose. *Biomass Conversion and Biorefinery* **2022**, 14(11), 12365-12376.
- Milagres, F. R. (2011). *Structure of Eucalyptus Xylans and its Effects on Kraft Pulp Retention*. The International Colloquium on Eucalyptus Pulp, Bahia, Brazil.
- Milas, M.; Rinaudo, M., Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydrate research* **1979**, 76(1), 189-196.
- Mirhosseini, H.; Amid, B. T., A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International* **2012**, 46(1), 387-398.
- Mizuno, H.; Saito, T.; Iso, N.; Onda, N.; Noda, K.; Takada, K., Mannuronic to guluronic acid ratios of alginic acids prepared from various brown seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **1983**, 49(10), 1591-1593.
- Molisch, H., Zwei neue Zuckerreaktionen. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* **1886**, 7(1), 198-209.
- Mortensen, A.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Di Domenico, A.; Frutos, M. J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; Lambré, C.; Leblanc, J. C.; Lindtner, O.; Moldeus, P.; Mosesso, P.; Oskarsson, A.; Parent-Massin, D.; Stankovic, I.; Waalkens-Berendsen, I.; Woutersen, R. A.; Wright, M.; Younes, M.; Brimer, L.; Peters, P.; Wiesner, J.; Christodoulidou, A.; Lodi, F.; Tard, A.; Dusemund, B., Re-evaluation of karaya gum (E 416) as a food additive. *EFSA Journal* **2016**, 14(12).
- Müller-Maatsch, J.; Caligiani, A.; Tedeschi, T.; Elst, K.; Sforza, S., Simple and validated quantitative ¹H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2014**, 62(37), 9081-9087.

- Nakamura, A.; Furuta, H.; Maeda, H.; Takao, T.; Nagamatsu, Y., Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2002**, 66(6), 1301-1313.
- Nakayasu, S.; Soegima, R.; Yamaguchi, K.; Oda, T., Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2009**, 73(4), 961-964.
- Nguyen, T. T.; Mikkelsen, M. D.; Tran, V. H. N.; Trang, V. T. D.; Rhein-Knudsen, N.; Holck, J.; Rasin, A. B.; Cao, H. T. T.; Van, T. T. T.; Meyer, A. S., Enzyme-Assisted Fucoidan Extraction from Brown Macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*. *Marine Drugs* **2020**, 18(6).
- Nie, S.-P.; Wang, C.; Cui, S. W.; Wang, Q.; Xie, M.-Y.; Phillips, G. O., A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*). *Food Hydrocolloids* **2013**, 31(1), 42-48.
- Nordberg Karlsson, E.; Schmitz, E.; Linares-Pasten, J. A.; Adlercreutz, P., Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2018**, 102(21), 9081-9088.
- Noyce, D. S.; Brauman, S. K.; Kirby, F. B., The acid-catalyzed decarboxylation of β -phenylcinnamic acid and the intermediate role of β , β -diphenyl- β -hydroxypropionic acid. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87(19), 4335-4338.
- O'Neill, M. A.; Ishii, T.; Albersheim, P.; Darvill, A. G., Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology* **2004**, 55, 109-139.
- Ohta, M.; Iwasaki, M.; Kouno, K.; Ueda, Y., Study on the color reaction mechanism of the Seliwanoff reaction with 4-ethylresorcinol as the color-developing reagent. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1985**, 33(6), 2421-2424.
- Pappin, B.; Kiefel, M. J.; Houston, T. A., Boron-carbohydrate interactions. *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology* **2012**, 37-54.
- Patankar, M. S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R. L.; Clark, G. F., A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268(29), 21770-21776.
- Patil, S. K. R.; Lund, C. R. F., Formation and growth of humins via aldol addition and condensation during acid-catalyzed conversion of 5-hydroxymethylfurfural. *Energy & Fuels* **2011**, 25(10), 4745-4755.
- Pena, M. J.; Kong, Y.; York, W. S.; O'Neill, M. A., A galacturonic acid-containing xyloglucan is involved in *Arabidopsis* root hair tip growth. *Plant Cell* **2012**, 24(11), 4511-4524.
- Pereira, C. S.; Silveira, R. L.; Dupree, P.; Skaf, M. S., Effects of xylan side-chain substitutions on xylan-cellulose interactions and implications for thermal pretreatment of cellulosic biomass. *Biomacromolecules* **2017**, 18(4), 1311-1321.
- Petersen, B. O.; Vinogradov, E.; Kay, W.; Wurtz, P.; Nyberg, N. T.; Duus, J. O.; Sorensen, O. W., H2BC: a new technique for NMR analysis of complex carbohydrates. *Carbohydrate research* **2006**, 341(4), 550-556.
- Peterson, G., Gas-chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives, . *Carbohydrate research* **1974**, 33(1), 47-61.
- Phillips, G. O.; Williams, A. P. (2020). *Handbook of Hydrocolloids* (2 ed.). Woodhead Publishing, Cambridge.

- Pinto, P.; Evtuguin, D.; Neto, C., Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 60(4), 489-497.
- Pizer, R., Boron acid complexation reactions with polyols and α -hydroxy carboxylic acids: Equilibria, reaction mechanisms, saccharide recognition. *Inorganica Chimica Acta* **2017**, 467, 194-197.
- Postulkova, H.; Chamradova, I.; Pavlinak, D.; Humpa, O.; Jancar, J.; Vojtova, L., Study of effects and conditions on the solubility of natural polysaccharide gum karaya. *Food Hydrocolloids* **2017**, 67, 148-156.
- Prasad, N.; Thombare, N.; Sharma, S. C.; Kumar, S., Recent development in the medical and industrial applications of gum karaya: a review. *Polymer Bulletin* **2022**, 80(4), 3425-3447.
- Punke, M. (2025). *Isolierung von Glucuronoxylan-Oligosacchariden zur Optimierung der Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts* [Masterarbeit]. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Puscaselu, G. R.; Lobiuc, A.; Dimian, M.; Covasa, M., Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers* **2020**, 12(10), 2417.
- Püschner, D. (2017). *Quantitative Rechenverfahren der Theoretischen Chemie* (1 ed.). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ralet, M.-C.; Crépeau, M.-J.; Buchholt, H.-C.; Thibault, J.-F., Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, 16(2), 191-201.
- Randall, R. C.; Phillips, G. O.; Williams, P. A., Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids* **1989**, 3(1), 65-75.
- Reichstein, T.; Oppenauer, R., Reduktinsäure, ein stark reduzierendes Abbauprodukt aus Kohlehydraten. II. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **1934**, 17(1), 390-396.
- Renarda, C. M. G. C.; Jarvis, M. C., Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 39(3), 201-207.
- Rietjens, M.; Steenbergen, P. A., Crosslinking mechanism of boric acid with diols revisited. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, 2005(6), 1162-1174.
- Rocklin, R. D.; Clarke, A. P.; Weitzhandler, M., Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrates via a new quadruple-potential waveform. *Analytical Chemistry* **1998**, 70(8), 1496-1501.
- Romieu, A.; Dejoux, G.; Valverde, I. E., Quest for novel fluorogenic xanthene dyes: Synthesis, spectral properties and stability of 3-imino-3H-xanthen-6-amine (pyronin) and its silicon analog. *Tetrahedron Letters* **2018**, 59(52), 4574-4581.
- Rosenau, T.; Potthast, A.; Zwirchmayr, N. S.; Hettegger, H.; Plasser, F.; Hosoya, T.; Bacher, M.; Krainz, K.; Dietz, T., Chromophores from hexeneuronic acids: identification of HexA-derived chromophores. *Cellulose* **2017**, 24(9), 3671-3687.
- Round, A. N.; Rigby, N. M.; MacDougall, A. J.; Morris, V. J., A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate research* **2010**, 345(4), 487-497.
- Rychlik, M.; Asam, S., Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **2009**, 21(5), 470-482.
- Saeman, J. F.; Bubl, J. L.; Harris, E. E., Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry-Analytical Edition* **1945**, 17(1), 35-37.

- Sailer-Kronlachner, W.; Thoma, C.; Böhmendorfer, S.; Bacher, M.; Konnerth, J.; Rosenau, T.; Potthast, A.; Solt, P.; van Herwijnen, H. W. G., Sulfuric acid-catalyzed dehydration of carbohydrates for the production of adhesive precursors. *ACS Omega* **2021**, 6(25), 16641-16648.
- Savary, B. J.; Nuñez, A., Gas chromatography–mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1017(1), 151-159.
- Scheller, H. V.; Ulvskov, P., Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **2010**, 61, 263-289.
- Schmid, V.; Trabert, A.; Keller, J. S.; Bunzel, M.; Karbstein, H. P.; Emin, M. A., Functionalization of enzymatically treated apple pomace from juice production by extrusion processing. *Foods* **2021**, 10(3), 485.
- Schmidt, M.; Hafner, M.; Frech, C., Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography. *Journal of Separation Science* **2014**, 37(1-2), 5-13.
- Schmidt, R. (2025), Charakterisierung mechanisch-enzymatisch hergestellter niedrigviskoser Ballaststoffpräparate aus gemüsebasierten Lebensmittelnebenströmen. Dissertation: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie*, M. Bunzel.
- Schmidt, U. S.; Schmidt, K.; Kurz, T.; Endress, H. U.; Schuchmann, H. P., Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. *Food Hydrocolloids* **2015**, 46, 59-66.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., Voragen, A. G., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate research* **1995a**, 279, 265-279.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., Voragen, A. G., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate research* **1995b**, 279(265-279).
- Schröder, R., Nicolas, P., Vincent, S. J., Fischer, M., Reymond, S., Redgwell, R. J., Purification and characterisation of a galactoglucomannan from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Carbohydrate research* **2001**, 331(3), 291-306.
- Scott, R. W., Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry* **1979**, 51(7), 936-941.
- Scott, R. W.; Moore, W. E.; Effland, M. J.; Millett, M. A., Ultraviolet spectrophotometric determination of hexoses, pentoses, and uronic acids after their reactions with concentrated sulfuric acid. *Analytical Biochemistry* **1967**, 21(1), 68-80.
- Seaver, J. L.; Kertesz, Z. I., The "Browning (Maillard) Reaction" in heated solutions of uronic acids. *Journal of the American Chemical Society* **1946**, 68(11), 2178-2179.
- Seliwanoff, T., Notiz über eine Fruchtzuckerreaction. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1887**, 20(1), 181-182.
- Selvendran, R.; March, J. F.; Ring, S. G., Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Analytical Biochemistry* **1979**, 96(2), 282-292.
- Shi, N.; Liu, Q.; Ju, R.; He, X.; Zhang, Y.; Tang, S.; Ma, L., Condensation of alpha-carbonyl aldehydes leads to the formation of solid humins during the hydrothermal degradation of carbohydrates. *ACS Omega* **2019**, 4(4), 7330-7343.
- Shoolery, J. N.; Alder, B. J., Nuclear magnetic resonance in concentrated aqueous electrolytes. *The Journal of Chemical Physics* **1955**, 23(5), 805-811.

- Simmons, T. J.; Mortimer, J. C.; Bernardinelli, O. D.; Poppler, A. C.; Brown, S. P.; deAzevedo, E. R.; Dupree, R.; Dupree, P., Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications* **2016**, 7, 13902.
- Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M., Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A* **1995**, 51(6), 7-21.
- Skjåk-Bræk, G.; Grasdalen, H.; Draget, K.; Smidsrød, O., Inhomogeneous calcium alginate beads. *Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides*. **1989**, 345-363.
- Stutz, E.; Deuel, H., Über die saure Decarboxylierung von Hexuronsäuren. *Helvetica Chimica Acta* **1958**, 41(6), 1722-1730.
- Sundheq, A.; Sundberg, K.; Lillandt, C.; Holmhø, B., Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* **1996**, 11(4), 216-219.
- Takahashi, N.; Koshijima, T., Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Science and Technology* **1988**, 22, 231-241.
- Takeuchi, M.; Yamamoto, M.; Shinkai, S., Fluorescent sensing of uronic acids based on a cooperative action of boronic acid and metal chelate. *Chemical Communications* **1997**, 18, 1731-1732.
- Taylor, K. A.; Buchanan-Smith, J. G., A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Analytical Biochemistry* **1992**, 201(1), 190-196.
- Teleman, A.; Hausalo, T.; Tenkanen, M.; Vuorinen, T., Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate research* **1996**, 280(2), 197-208.
- Tenkanen, M.; Gellerstedt, G.; Vuorinen, T.; Teleman, A.; Perttula, M.; Li, J.; Buchert, J., Determination of hexenuronic acid in softwood kraft pulps by three different methods. *Journal of Pulp & Paper Science* **1999**, 25(9).
- Thibault, J. F., Automation of the determination of pectic substances by the m-hydroxydiphenyl method. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1979**, 12(5), 247-251.
- Timell, T. E., Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology* **1967**, 1(1), 45-70.
- Tollens, B., Über einen einfachen Nachweis der Glucuronsäure mittels Naphthoresorcin, Salzsäure und Äther. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1908**, 41(2), 1788-1790.
- Trabert, A.; Schmid, V.; Keller, J.; Emin, M. A.; Bunzel, M., Chemical composition and technofunctional properties of carrot (*Daucus carota* L.) pomace and potato (*Solanum tuberosum* L.) pulp as affected by thermomechanical treatment. *European Food Research and Technology* **2022**, 248(10), 2451-2470.
- Valdes-Aguilera, O.; Neckers, D. C., Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Accounts of Chemical Research* **1989**, 22(5), 171-177.
- Valent, B. S.; Darvill, A. G.; McNeil, M.; Robertsen, B. K.; Albersheim, P., A general and sensitive chemical method for sequencing the glycosyl residues of complex carbohydrates. *Carbohydrate research* **1980**, 79, 165-192.
- Valls, C.; Pastor, F. I. J.; Vidal, T.; Roncero, M. B.; Diaz, P.; Martinez, J.; Valenzuela, S. V., Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydrate Polymers* **2018**, 194, 43-50.

- van der Klis, F.; van Haveren, J.; van Es, D. S.; Bitter, J. H., Synthesis of furandicarboxylic acid esters from nonfood feedstocks without concomitant levulinic acid formation. *Chemistry & Sustainability, Energy & Materials* **2017**, 10(7), 1460-1468.
- van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H., Studies on borate esters 1: The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by ¹¹B NMR. *Tetrahedron* **1984**, 40(15).
- van Hoogen, B. M.; Weeren, P. R.; Lopes-Cardoso, M.; Golde, L. M. G.; Barneveld, A.; Lest, C. H. A., A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **1998**, 257(2), 107-111.
- Verhoeven, G. J., The reflection of two fields – Electromagnetic radiation and its role in (aerial) imaging. *AARGnews* **2017**, 55.
- Verordnung (EU) Nr. 231/2012 der Kommission vom 9. März 2012 mit Spezifikationen für die Anhänge II und III der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates aufgefützten Lebensmittelzusatzstoffe, L83/1, 22.03.2012.
- 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.
- Vinod, V. T. P.; Sashidhar, R. B.; Sarma, V. U. M.; Raju, S. S., Comparative amino acid and fatty acid compositions of edible gums kondagogu (*Cochlospermum gossypium*) and karaya (*Sterculia urens*). *Food chemistry* **2010**, 123(1), 57-62.
- Vogel, J., Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11(3), 301-307.
- Voragen, A.; Schols, H. A.; Pilnik, W., Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids* **1986**, 1(1), 65-70.
- Voragen, A. G. J.; Coenen, G.-J.; Verhoef, R. P.; Schols, H. A., Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **2009**, 20(2), 263-275.
- Voragen, A. G. J.; Pilnik, W.; Thibault, J.-F.; MAV, M. A.; Renard, C., Pectins. *Food polysaccharides and their applications* **1995**, 67, 287-339.
- Wardi, A. H.; Allen, W. S.; Warma, R., A simple method for the detection and quantitative determination of hexuronic acids and pentose. *Analytical Biochemistry* **1974**, 57(1), 268-273.
- Wefers, D.; Tyl, C. E.; Bunzel, M., Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in chemistry* **2014**, 2, 100.
- Wegener, S.; Bornik, M. A.; Kroh, L. W., D-galacturonic acid: A highly reactive compound in nonenzymatic browning. 2. Formation of amino-specific degradation products. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **2015**, 63(28), 6457-6465.
- Westbye, P.; Köhnke, T.; Gatenholm, P., Fractionation and characterization of xylan rich extracts from birch. *Holzforschung* **2008**, 62(1), 31-37.
- Willför, S.; Pranovich, A.; Tamminen, T.; Puls, J.; Laine, C.; Suurnäkki, A.; Saake, B.; Uotila, K.; Simolin, H.; Hemming, J.; Holmbom, B., Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing

- polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products* **2009**, 29(2-3), 571-580.
- Willför, S.; Sundberg, A.; Pranovich, A.; Holmbom, B., Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Science and Technology* **2005**, 39(8), 601-617.
- Wittke, G., Reactions of phenolphthalein at various pH values. *Journal of Chemical Education* **1983**, 60(3), 239.
- Yapo, B. M., Improvement of the compositional quality of monocot pectin extracts contaminated with glucuronic acid-containing components using a step-wise purification procedure. *Food and Bioproducts Processing* **2010**, 88(2-3), 283-290.
- Yapo, B. M., Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86(2), 373-385.
- Yapo, B. M., On the colorimetric-sulfuric acid analysis of uronic acids in food materials: Potential sources of discrepancies in data and how to circumvent them. *Food Analytical Methods* **2012**, 5(2), 195-215.
- Yapo, B. M.; Koffi, K. L., Yellow passion fruit rind a potential source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54(7), 2738-2744.
- Yapo, B. M.; Wathelet, B.; Paquot, M., Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids* **2007**, 21(2), 245-255.
- Yoo, S.-H.; Fishman, M. L.; Hotchkiss, A. T.; Lee, H. G., Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids* **2006**, 20(1), 62-67.
- Zamil, M. S.; Geitmann, A., The middle lamella—more than a glue. *Physical Biology* **2017**, 14(1), 015004.
- Zhang, B.; Gao, Y.; Zhang, L.; Zhou, Y., The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology* **2021**, 63(1), 251-272.
- Zhang, Z.; Pierce, M. L.; Mort, A. J., Changes in homogalacturonans and enzymes degrading them during cotton cotyledon expansion. *Phytochemistry* **2007**, 68(8), 1094-1103.
- Zhao, Y.; Lu, K.; Xu, H.; Qu, Y.; Zhu, L.; Wang, S., Comparative study on the dehydration of biomass-derived disaccharides and polysaccharides to 5-hydroxymethylfurfural. *Energy & Fuels* **2019**, 33(10), 9985-9995.
- Zhou, Q.-L.; Wang, Z.; Chen, W.-T.; Liu, X.-F.; Cheong, K.-L.; Zou, Y.-X.; Zhong, S.-Y.; Li, R., The structural characteristics, biological activities and mechanisms of bioactive brown seaweed polysaccharides: A review. *Journal of Functional Foods* **2024**, 119, 106303.
- Zhu, B.; Yin, H., Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered* **2015**, 6(3), 125-131.

7. Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit	Gefahren- piktogramme (GHS)	H-Sätze	P-Sätze
2-Deoxy-D-glucose	Merck	≥ 99,0 %	-	-	-
2-Furancarbonsäure	Thermo Scientific	98,0 %	05, 07	315, 318, 335	280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 310
3-Methoxybiphenyl	Merck		05, 07	302, 315, 318, 335	261, 264, 280, 301 + 312, 302 + 352, 305 + 351 + 338
3-Phenylphenol	Merck	100 %	07	319, 315, 335	261, 305 + 351 + 338
4-Carboxybenzaldehyd	Thermo Scientific	96,0 %	07, 08	315, 335, 319, 373	261, 260, 302 + 352, 280, 305 + 351 + 338
4-O-Methyl-D-glucuronsäure	Santa Cruz Bio- techno- logy	≥ 95,0 %	-	-	-
5-Formyl-2-furancarbonsäure	Apollo Scientific	99,5 %	07	315, 319, 335	302 + 352, 305 + 351 + 338, 304 + 340, 312, 280
5-Hydroxymethylfurfural	Apollo Scientific	99,5 %	07	315, 319, 335	261, 280, 302 + 352, 305 + 351 + 338
5-Methylfurfural	Merck	99,0 %	-	-	-
Aceton	VWR	≥ 99,8 %	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338

7. Chemikalien und Instrumente







Aceton- d_6	Deutero	99,5 %D	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338
Acetonitril	VWR	LC-MS grade	02, 07	225, 302 + 312 + 332, 319	210, 240, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 403 + 233
Ameisensäure	VWR	98 – 100 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 331	210, 280, 301 + 330 + 310, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Ammoniumformiat	VWR	≥ 99,0 %	07	315, 319, 335	280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 311
Buchenxylan	Mega- zyme	> 95,0 %	-	-	-
D-[UL- $^{13}C_6$] Galacturo- nsäure Kaliumsalz	Omicron	99,6 %	-	-	-
D-[UL- $^{13}C_6$] Glucuron- säure Natriumsalz	Omicron	99,0 %	-	-	-
Deuteriumoxid	Deutero	99,9 %D	-	-	-
D-Fructose	Merck	≥ 99,0 %	-	-	-
D-Galactose	Merck	≥ 99,0 %	-	-	-
D-Galacturonsäure Monohydrat	Fluka	≥ 97,0 %	-	-	-
D-Glucose	Merck	≥ 99,5 %	-	-	-
D-Glucuronolacton	Merck		-	-	-
D-Glucuronsäure	Merck	≥ 98,0 %	-	-	-
Dichlormethan	VWR	≥ 99,5 %	07, 08	315, 319, 351, 336	201, 280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 311
Dimethylsulfoxid- d_6	Deutero	≥ 99,8 %D	-	-	-
Dinatriumhydrogen- phosphat, wasserfrei	Merck	≥ 99 %	-	-	-

D-Mannose	Merck	≥ 99,0 %	-	-	-
D-Mannuronsäure Natriumsalz	Biosynth	<i>Analytical Standard</i>	-	-	-
D-Xylose	Merck	≥ 99,9 %	-	-	-
Essigsäure	Merck	≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 233, 240, 280, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338
Ethanol, vergällt	VWR	≥ 99,0 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305 + 351 + 338, 403 + 233
Ethylacetat	VWR	99,9 %	02, 07	225, 319, 336	210, 243, 205 + 351 + 338
Furfural	Merck	99,0 %	02, 06, 08	226, 301, 312, 330, 315, 319, 335, 351, 412	210, 273, 280, 303 + 361, 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338
Isomaltotriose	Merck	≥ 95 %	-	-	-
Isopropanol	VWR	≥ 99,0 %	02, 07	225, 319, 336	210, 250, 305 + 351 + 338, 403 + 223
L-Arabinose	Merck	≥ 99,0 %	-	-	-
L-Fucose	Alfa Aesar	99,0 %	-	-	-
L-Guluronsäure Natri- umsalz	Biosynth	<i>Analytical Standard</i>	-	-	-
Lithiumchlorid	Merck	≥ 99,9 %	07	302, 315, 319	264, 270, 280, 301 + 312, 302 + 352, 305 + 351 + 338
L-Rhamnose	Merck	> 99,0%	-	-	-
Methanol- <i>d</i> ₄	Deutero	99,8 %D	02, 06, 08	225, 301 + 311 + 331, 370	210, 301 + 311 + 331, 370

7. Chemikalien und Instrumente

Methanolische Salzsäure	Merck	1,25 M	02, 06, 08, 05	225, 290, 301 + 311 + 331, 370	210, 233, 280, 301 + 310, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 311
Natrium-3-trimethylsilyl propionat-2,2,3,3-d ₄	Merck	≥ 98 %D	-	-	-
Natriumacetat	Ho-neywell	≥ 99,0 %	-	-	-
Natrium-Alginat	PanReac Appli-Chem	≥ 90,8	-	-	-
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka	≥ 99,0 %	07	319	305 + 351 + 338, 337 + 313
Natriumchlorid	Roth	≥ 99,0 %	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	VWR	p. a.	-	-	-
Natriumhydroxid	Merck	49 - 51 %	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Natriumsulfat, wasserfrei	VWR	≥ 99,0 %	-	-	-
Natriumtetraborat	Merck	≥ 99,0 %	07, 08	319, 360FD	201, 308+313
Polygalacturonsäure	Mega-zyme	> 95,0 %	-	-	-
Salzsäure	Merck	37 %	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310

Schwefelsäure	Merck	95,0 97,0%	- 05	290, 314	234, 280, 301 + 330 + 331, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338
Schwefelsäure- d_2	Deutero	99,5 %D	05	290, 314	234, 280, 301 + 330 + 331, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338
Stärke	Merck	-	-	-	-
Tetrahydrofuran- d_8	Deutero	99,5 %D	02, 07, 08	225, 302, 319, 335, 336, 351	210, 280, 305 + 351 + 338, 308 + 313
Toluol	Roth	≥ 99,5 %	02, 07, 08	225, 304, 315, 336, 361d, 373, 412	210, 280, 302 + 352, 308 + 313, 331
Trifluoressigsäure	Merck	≥ 99,0 %	05, 07	314, 332, 412	261, 280, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338
Xylobiose	Mega- zyme	> 95,0 %	-	-	-
Xylohexaose	Mega- zyme	> 95,0 %	-	-	-
Xylopentaose	Mega- zyme	> 95,0 %	-	-	-
Xylotetraose	Mega- zyme	> 95,0 %	-	-	-
Xylotriase	Mega- zyme	> 90,0 %	-	-	-

GHS02	GHS05	GHS06	GHS07	GHS08	GHS09
					
Entzündlich	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung	Umweltge- fährlich

7.2 Enzyme

Enzym	Herkunft	EC-Nummer	Aktivität	Hersteller
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	≥ 260 U/mL	Sigma-Aldrich
α-Amylase (Termamyl 120 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	≥ 500 U/mg Protein (Biuret)	Sigma-Aldrich
endo-Polygalacturonase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
endo-1,4-β-Xylanase	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	3.2.1.8	~ 800 U/mg	Megazyme
Xylanase 10B	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.8	~ 1400 U/mg	NZYtech

7.3 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Natriumtetraborat (12,5 mM) in konzentrierter Schwefelsäure 2,515 g Na₂B₄O₇ | 1 L H₂SO₄

gesättigte Natriumchlorid-Lösung NaCl in 1 L Reinstwasser unter Rühren lösen, bis sich ein Bodensatz bildet

3-Phenylphenol-Lösung (0,15 % in 0,5 % NaOH) 1,5 mg 3PP | 1 mL NaOH 0,5 %

US-Stammlösungen (200 mg/L)

- GalA-Stammlösung 1,10 mg GalA*H₂O | 5 mL
- GlcA-Stammlösung 1,00 mg GlcA | 5 mL
- ManA-Stammlösung 1,11 mg ManA-Natriumsalz | 5 mL
- GulA-Stammlösung 1,11 mg GulA-Natriumsalz | 5 mL

NaOH (4 M) 210 mL NaOH 50 %ig | 1 L

Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6)	I: 12,41 g Natriumhydrogenphosphat Dihydrat 1L II: 13,31 g Dinatriumhydrogen- phosphat 1 L Unter Vorlage von I einen pH-Wert von 6 mit II einstellen.
Schwefelsäure (12 M)	66,50 mL H ₂ SO ₄ 100 mL
TFA (2 M)	15,40 mL TFA 100 mL
TMSP-Lösung (0,5 mg/mL)	25 mg Natrium-TMSP 50 mL D ₂ O

7.4 Instrumente

7.4.1 Verwendete Säulen

Säule	Partikel- größe	Maße (Länge × Innendurchmesser)	Hersteller
Acquity UPLC BEH Amide	1,7 µm	150 × 2,1 mm	Waters
Kinetex C18	2,6 µm	150 × 4,6 mm	Phenomenex
Luna Omega C18 Polar	1,6 µm	150 × 2,1 mm	Phenomenex
Luna C18 (2)	5 µm	250 × 10 mm	Phenomenex
XBridge BEH Amide	5 µm	250 × 10 mm	Waters
CarboPac PA200	5 µm	250 × 3,0 mm	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
SweetSept AEX200	5 µm	4,0 × 200 mm	Antec Scientific

7.4.2 Analysegeräte

HPAEC-PAD (Monosaccharidanalyse)

Hersteller	AntecScientific
Bezeichnung	ALEXYS Analyzer
Pumpe	P 6.1 L
Autosampler	AS 6.1 L
Säulenofen	CT 2.1
Detektor	DECADE Elite, elektrochemischer Detektor

HPAEC-PAD/MS (Oligosaccharidanalyse)

Hersteller	ThermoFisher Scientific™
Bezeichnung	Dionex™ ICS-6000 System
Pumpen	Dionex™ ICS-6000 SP (Eluent) Dionex™ AXP (Regenerent) Dionex™ AXP-MS (LiCl)
Autosampler	Dionex™ AS-AP
Detektoren	PAD/CD: Dionex™ ICS-6000 DC, elektrochemischer Detektor, Leitfähigkeitsdetektor MS: ISQ IC Mass Spectrometer
Suppressor	Dionex™ AERS 500 (4 mm)

HPAEC-PAD (Oligosaccharidanalyse)

Hersteller	ThermoFisher Scientific™
Bezeichnung	Dionex™ ICS-5000 System
Pumpen	Dionex™ ICS-5000 Dual Pump
Autosampler	Dionex™ AS-AP
Detektor	Dionex™ ICS-5000 DC, elektrochemischer Detektor

HPLC-UV/ELSD (Fraktionieren)

Hersteller	Knauer
Pumpe	AZURA P2.1L
Autosampler	Smartline Autosampler, Optimas
Säulenofen	Spark, Mistral™
UV-Detektor	AZURA UVD2.1L
ELSD-Detektor	Sedex 85LT, Sedere
Fraktionsventil	AZURA V2.1S

UHPLC-PDA/MS

Hersteller	Shimadzu
Bezeichnung	Nexera X2
Kommunikationsmodul	CBM-20A
Pumpe	LC-30AD
Autosampler	SIL-30AC
Säulenofen	CTO-20AC
Detektor	PDA: SPD-M30A MS: LCMS 2020 mit ESI-Ionenquelle

UHPLC-UV

Hersteller	Shimadzu
Bezeichnung	Nexera XS
Pumpe	LC-40D XS
Autosampler	SIL-40C XS
Säulenofen	CTO-40S
Detektor	SPD-40

UHPLC-Orbitrap-MS

Hersteller	ThermoFisher Scientific™
Bezeichnung	Vanquish Flex Binary UHPLC System
Detektor	Q Exactive™ Plus

NMR-Spektrometer

Hersteller	Bruker
Bezeichnung	Ascend 500
Feldstärke	500 MHz
Probenkopf	Prodigy, Kryoprobenkopf

Photometer

Hersteller	Jasco
Bezeichnung	V-550 UV/Vis Spectrophotometer

8. Arbeitsvorschriften

8.1 Charakterisierung des Probenmaterials

8.1.1 Präparative Ballaststoffisolierung

- Einwaage von 15 g Probenmaterial in einen 500 mL Erlenmeyerkolben und Zugabe von 200 mL (Braunalge: 400 mL) Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0)
- Die Probe nach Zugabe von 1,5 mL α -Amylase bei 92 °C für 20 min im Wasserbad inkubieren, dabei alle 5 min schwenken
- Die Probe auf Raumtemperatur abkühlen und mit 0,275 M NaOH-Lösung einen pH-Wert von 7,5 einstellen
- Die Probe nach Zugabe von 700 μ L Protease für 30 min bei 60 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubieren
- Die Probe auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Im Falle von starkem Andicken einer Braunalgenprobe mit Phosphatpuffer verdünnen, anschließend den pH-Wert mit 0,325 M Salzsäure auf 4,5 einstellen
- Die Probe nach Zugabe von 700 μ L Amyloglucosidase für 30 min bei 60 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubieren

Abtrennen der UBS

- Zentrifugieren der warmen Lösung für 15 min bei 5000 rpm, Überstand in 5 L Gefäß überführen (zur LBS-Isolierung)
- Waschen des Rückstands mit zweimal 100 mL und einmal 50 mL 60 °C warmem Wasser, Zentrifugieren nach jedem Waschschrift, Überstände aufbewahren und mit vorherigen vereinigen (zur LBS-Isolierung)
- Waschen des Rückstands mit einmal 100 mL und einmal 50 mL Ethanol (99,5 %), Zentrifugation nach jedem Waschschrift, Überstände verwerfen
- Waschen des Rückstands mit einmal 100 mL und einmal 50 mL Aceton, Zentrifugation nach jedem Waschschrift, Überstände verwerfen
- Trocknen des Rückstands bei 60 °C über Nacht

Abtrennen der LBS

- Aufbewahrte Überstände durch Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (99,5 %) ausfällen, Präzipitatbildung über Nacht
- Ethanolische Überstände unter Zurückhalten des Präzipitats abgießen und ggf. zentrifugieren (5000 rpm)
- Waschen des Rückstands mit einmal 100 mL und einmal 50 mL Ethanol (78 %), Zentrifugation nach jedem Waschschrift, Überstände verwerfen

- Waschen des Rückstands mit einmal 100 mL und einmal 50 mL Ethanol (99,5 %), Zentrifugation nach jedem Waschschrift, Überstände verwerfen
- Waschen des Rückstands mit einmal 100 mL und einmal 50 mL Aceton, Zentrifugation nach jedem Waschschrift, Überstände verwerfen
- Trocknen des Rückstands bei 60 °C über Nacht

8.1.2 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung

a) Analyse des unlöslichen Probenmaterials

Schwefelsäurehydrolyse

- Einwaage von 10 mg Ballaststoffmaterial in ein 3,5 mL Vial, mit wenigen Glasperlen versetzen
- 150 µL 12 M Schwefelsäure zugeben und vortexen
- 30 min im Eisbad stehen lassen, dabei alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei alle 30 min vortexen
- Mit 975 µL Wasser verdünnen und 3 h bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Abkühlen lassen und alles durch einen PTFE-Spritzenfilter (0,45 µM) filtrieren.
- 100 µL Filtrat mit 75 µL 4 M NaOH und 825 µL Wasser versetzen
- Eine zur Analyse mittels HPAEC-PAD (Tabelle 16) geeignete Verdünnung herstellen, Zugabe von 2-Deoxy-D-glucose als internen Standard bis zur Endkonzentration von 25 µM

Methanolyse

- 6 mg der Probe in ein 1,5 mL-Vial einwiegen und mit 0,5 mL 1,25 M methanolischer Salzsäure versetzen
- Mit geschlossenem Deckel bei 80 °C 16 h im Trockenschrank behandeln
- Abkühlen lassen und 40 µL möglichst partikelfrei in ein GC-Vial pipettieren
- Im Evaporator zur Trockne eindampfen.
- 500 µL 2 M TFA-Lösung zugeben und verschlossen bei 121 °C 1 h im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockne eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol zufügen und zur Trockne eindampfen
- In 200 µL Wasser aufnehmen und eine zur Analyse mittels HPAEC-PAD (Tabelle 16) geeignete Verdünnung herstellen, Zugabe von 2-Deoxy-D-glucose als internen Standard bis zur Endkonzentration von 25 µM

b) Analyse des löslichen Probenmaterials

Methanolyse

- Lösung der zu analysierenden Probe herstellen und ein Volumen, das ca. 20 µg Poly- bzw. Oligosaccharid enthält, in ein GC-Vial pipettieren.

- Im Evaporator zur Trockne eindampfen
- Mit 0,5 mL 1,25 M methanolischer Salzsäure versetzen und mit geschlossenem Deckel bei 80 °C 16 h im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockne eindampfen
- 500 µL 2 M TFA-Lösung zugeben und verschlossen bei 121 °C 1 h im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockne eindampfen
- Zweimal je 200 µL EtOH zufügen und zur Trockne eindampfen
- In 200 µL Wasser aufnehmen und eine zur Analyse mittels HPAEC-PAD (Tabelle 16) geeignete Verdünnung herstellen, Zugabe von 2-Deoxy-D-glucose als internen Standard bis zur Endkonzentration von 25 µM

c) Kalibrierung

- Kalibriert wird für folgende Monosaccharide: Fuc, Fru, Man, Rha, Xyl, Ara, Gal, Glc, GalA, GlcA, GulA, ManA. Jeder Kalibrierpunkt enthält 25 µM 2-Deoxy-D-glucose als internen Standard
- Es werden zwei 5-Punkt Kalibrierungen für alle Monosaccharide durchgeführt:
 - Kalibrierung 1: 1 µM, 6 µM, 12 µM, 18 µM, 25 µM
 - Kalibrierung 2: 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM
- Die Anpassung aller Kalibrierungen erfolgt quadratisch

Tabelle 16: Bedingungen der Monosaccharidanalyse mit Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC) mit gepulstamperometrischer Detektion (PAD)

HPAEC-Bedingungen				
Säule	SweetSept AEX200, 4 ×200 mm, 5 µm, Antec Scientific			
Eluent	A: Wasser B: 10 mM NaOH C: 100 mM NaOH + 100 mM NaOAc			
Gradient	Zeit/min	A/%	B/%	C/%
	0,00	60	40	0
	12,50	60	40	0
	17,00	0	0	100
	23,00	0	0	100
	28,50	60	40	0
	41,00	60	40	0
Flussrate	0,7 mL/min			
Injektionsvolumen	25 µL			
Ofentemperatur	30 °C			
Detektion: PAD				
Elektrode	Pt/H ₂			

8.1.3 Bestimmung des Acetylierungs- und Methylierungsgrades pektinhaltiger Proben

- 20 mg der Probe in ein 3,5 mL Glasvial einwiegen und mit 1,5 mL NaOH 2 M (in D₂O) und 150 µL TMSP-Lösung (0,5 mg/mL in D₂O) versetzen
- 2 h bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandeln
- Überstand in ein Eppi überführen und Rückstand abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und durch einen PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) filtrieren
- 550 µL zur NMR-Analyse gemäß Tabelle 17 in ein NMR-Röhrchen überführen

Tabelle 17: Mess- und Prozessierungsparameter der kernspinresonanzspektroskopischen Messungen zur Ermittlung des Veresterungsgrades pektinhaltiger Proben

Messparameter	
Pulsprogramm	zg30
Kern	^1H
Inkrementzahl	65536
<i>Scans</i>	32
<i>Dummy Scans</i>	2
Spektrale Breite/ppm	20
<i>D₁-Delay/s</i>	35
Prozessierungsparameter	
Datenpunkte <i>zero filling</i>	131072
<i>Window function</i>	EM
Linienbreite/Hz	0,3

8.2 Isolierung von Uronsäureoligosaccharid-Standardsubstanzen

8.2.1 Gesättigte Homogalacturonsäureoligosaccharide

- Für einen Ansatz 0,5 g Polygalacturonsäure in 100 mL Wasser lösen.
- Durchführen von zwei getrennten Ansätzen: Nach Zugabe von je 9 U/g *endo*-Polygalacturonase 2 h (1) bzw. 1,5 h (2) bei 35 °C im Schüttelinkubator behandeln
- Das Enzym 10 min bei 95°C inaktivieren
- Abgekühlte Suspensionen vereinigen, mit 200 mL Acetonitril fällen und den Überstand abzentrifugieren (5000 rpm)
- Das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, übriges Wasser über Nacht gefriertrocknen
- Den Rückstand in 5 mL Acetonitril 50 %ig lösen und zur Fraktionierung (Tabelle 18) unverdünnt verwenden.
- Das Lösungsmittel der einzelnen Fraktionen am Rotationsverdampfer entfernen und den wässrigen Rückstand über Nacht gefriertrocknen
- Fraktionen auswiegen und Reinheit mittels UHPLC-MS gemäß
- Tabelle **19** bestimmen

Tabelle 18: Bedingungen der semipräparativen Isolierungen von gesättigten Homogalacturonsäureoligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Lichtstreuungsdetektion (engl. *High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Lightscattering Detector*, HPLC-ELSD)

HPLC-Bedingungen		
Säule	XBridge BEH Amide, 10 × 250 mm, 5 µm, Waters	
Eluent	A: 80:20 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure B: 20:80 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	100
	1,00	100
	22,00	45
	40,00	20
	45,00	20
	50,00	100
	65,00	100
Flussrate	4,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	50 °C	
Detektion: ELSD		
Temperatur	40 °C	
Receiver gain	4	

Tabelle 19: Bedingungen der chromatographischen Trennung von gesättigten Homogalacturonsäureoligosacchariden mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) und massenspektrometrischer Detektion nach Elektrosprayionisation (ESI-MS) (*m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis, GalA: Galacturonsäure)

UHPLC-Bedingungen		
Säule	Acquity UPLC BEH-Amide, 150 × 2,1 mm, 1,7 µm, Waters	
Eluent	A: 80:20 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure + 10 mM Ammoniumformiat B: 20:80 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure + 10 mM Ammoniumformiat	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	100
	1,00	100
	31,00	20
	35,00	20

	36,00	100
	41,00	100
Flussrate	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen	10 µL	
Ofentemperatur	50 °C	
Detektion: ESI-MS		
ESI-Modus	negativ	
Scan	SIM: <i>m/z</i>	
	193	GalA [M-H] ⁻
	369	GalA ₂ [M-H] ⁻
	545	GalA ₃ [M-H] ⁻
	721	GalA ₄ [M-H] ⁻
	897	GalA ₅ [M-H] ⁻
	536	GalA ₆ [M-2H] ²⁻
	624	GalA ₇ [M-2H] ²⁻
	712	GalA ₈ [M-2H] ²⁻
	800	GalA ₉ [M-2H] ²⁻
	888	GalA ₁₀ [M-2H] ²⁻
	976	GalA ₁₁ [M-2H] ²⁻
	1064	GalA ₁₂ [M-2H] ²⁻
	768	GalA ₁₃ [M-3H] ³⁻
	826	GalA ₁₄ [M-3H] ³⁻
	885	GalA ₁₅ [M-3H] ³⁻
	944	GalA ₁₆ [M-3H] ³⁻
	1003	GalA ₁₇ [M-3H] ³⁻
	1061	GalA ₁₈ [M-3H] ³⁻
	1120	GalA ₁₉ [M-3H] ³⁻
	1179	GalA ₂₀ [M-3H] ³⁻
<i>Spray Voltage</i>	-4,5 kV	
Interfacetemperatur	350 °C	
<i>Desolvation Line Temperatur</i>	250 °C	
<i>Nebulizing Gas Flow</i>	1,5 L/min	
<i>Drying Gas Flow</i>	15 L/min	
Heat Block	200 °C	

8.2.2 Alginatoligosaccharide

- Für einen Ansatz 0,5 g Alginat in eine 250 mL Schottflasche einwiegen und unter Rühren in 100 mL Wasser lösen. Einen pH-Wert von 4 mit 0,25 M Salzsäure einstellen
- Durchführen von zwei getrennten Ansätzen: Die Ansätze bei 100 °C und geschlossenem Deckel 3 h (1) und 2 h (2) im Trockenschrank hydrolysieren und anschließend bei Raumtemperatur abkühlen
- Die vereinigten Ansätze mit NaOH (0,25 M) neutralisieren, mit 660 mL EtOH 96 % fällen und den Überstand abzentrifugieren (5000 rpm)
- Das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und übriges Wasser über Nacht gefriertrocknen
- Den Rückstand in 5 mL Acetonitril 50 % lösen und zur Fraktionierung (Tabelle 20) unverdünnt verwenden
- Das Lösungsmittel der einzelnen Fraktionen am Rotationsverdampfer entfernen und den wässrigen Rückstand über Nacht gefriertrocknen
- Die Fraktionen auswiegen und Reinheit mittels UHPLC-MS gemäß Tabelle 21 bestimmen

Tabelle 20: Bedingungen der semipräparativen Isolierungen von Alginatoligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Lichtstredetektion (engl. *High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Lightscattering Detector*, HPLC-ELSD)

HPLC-Bedingungen		
Säule	XBridge BEH Amide, 10 × 250 mm, 5 µm, Waters	
Eluent	A: 80:20 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure B: 20:80 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	80
	30,00	30
	55,00	0
	60,00	0
	65,00	80
	80,00	80
Flussrate	4,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	50 °C	
Detektion: ELSD		
Temperatur	40 °C	
Recivergain	6	

Tabelle 21: Bedingungen der chromatographischen Trennung von Alginat-Oligosacchariden (AOS) mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UH-PLC) und massenspektrometrischer Detektion nach Elektrosprayionisation (ESI-MS) (*m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis)

UHPLC-Bedingungen							
Säule	Acquity UPLC BEH-Amide, 150 × 2,1 mm, 1,7 µm, Waters						
Eluent	A: 80:20 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure + 10 mM Ammoniumformiat B: 20:80 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure + 10 mM Ammoniumformiat						
Gradient	Zeit/min	B/%					
	0,00	100					
	1,00	100					
	60,00	40					
	65,00	0					
	70,00	0					
	75,00	100					
	80,00	100					
Flussrate	0,4 mL/min						
Injektionsvolumen	10 µL						
Ofentemperatur	50 °C						
Detektion: ESI-MS							
ESI-Modus	negativ						
Scan	SIM: <i>m/z</i>	193	GuIA/ ManA	[M-H] ⁻	976	AOS ₁₁	[M-2H] ²⁻
		369	AOS ₂	[M-H] ⁻	1064	AOS ₁₂	[M-2H] ²⁻
		545	AOS ₃	[M-H] ⁻	768	AOS ₁₃	[M-3H] ³⁻
		721	AOS ₄	[M-H] ⁻	826	AOS ₁₄	[M-3H] ³⁻
		897	AOS ₅	[M-H] ⁻	885	AOS ₁₅	[M-3H] ³⁻
		536	AOS ₆	[M-2H] ²⁻	944	AOS ₁₆	[M-3H] ³⁻
		624	AOS ₇	[M-2H] ²⁻	1003	AOS ₁₇	[M-3H] ³⁻
		712	AOS ₈	[M-2H] ²⁻	1061	AOS ₁₈	[M-3H] ³⁻
		800	AOS ₉	[M-2H] ²⁻	1120	AOS ₁₉	[M-3H] ³⁻
		888	AOS ₁₀	[M-2H] ²⁻	1179	AOS ₂₀	[M-3H] ³⁻
<i>Spray Voltage</i>	-4,5 kV						
Interfacetemperatur	350 °C						
<i>Desolvation Line Temperatur</i>	250 °C						
<i>Nebulizing Gas Flow</i>	1,5 L/min						

<i>Drying Gas Flow</i>	15 L/min
<i>Heat Block</i>	200 °C

8.2.3 Glucuronoxylanoligosaccharide

Optimierung des Enzymverdaus

- 1,5 mL einer Buchenxylan-Standardlösung (10 mg/mL) mit jeweils der gewünschten Enzymmenge des GH10 oder des GH11-Enzyms (0,5 µL, 1 µL, 1 µL und 5 µL) versetzen
- Inkubation bei 75 °C (GH10) oder 50 °C (GH11) für 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 16 und 24 h
- Das Enzym durch Zugabe von 1,6 mL Ethanol inaktivieren und anschließend für 5 min zentrifugieren
- 500 µL des Überstandes evaporieren und erneut in 500 µL Wasser aufnehmen
- Die Proben zur Analyse mittels HPAEC-PAD bzw. -MS (Tabelle 22) entsprechend verdünnen und mit 10 µM Isomaltotriose versetzen

Tabelle 22: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC)-Bedingungen der Analyse der Xylooligosaccharide und Glucuronoxylanoligosaccharide mit gepulstamperometrischer (PAD) sowie massenspektrometrischer (MS) Detektion (*m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis)

HPAEC-Bedingungen				
Säule	CarboPac PA200, 250 × 3,0 mm, 6,0 µm			
Eluent	A: Wasser B: 100 mM NaOH C: 100 mM NaOH + 500 mM NaOAc			
Gradient	Zeit/min	A/%	B/%	C/%
	- 30,0	0	0	100
	- 20,0	0	0	100
	- 19,9	90	10	0
	0,0	90	10	0
	10,0	35	65	0
	18,0	35	63,5	1,5
	22,0	35	63,5	1,5
	50,0	35	53	12
	57,0	35	53	12
	57,1	0	0	100
	65,0	0	0	100
Flussrate	0,4 mL/min			
Injektionsvolumen	25 µL			
Ofentemperatur	25 °C			

Detektion: PAD							
Elektrode	Au (Arbeitselektrode), PdH (Referenzelektrode)						
Detektion: MS							
ESI-Modus	Elektrolytisch regenerierter Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser positiv, Li-Addukte nach Zuführung von 0,5 mM LiCl						
Scan	SIM	157	X	[M+Li] ⁺	507	X ₆ U ^{4m2}	[M+2 Li] ²⁺
	<i>m/z</i>						
		289	X ₂	[M+Li] ⁺	573	X ₇ U ^{4m2}	[M+2 Li] ²⁺
		421	X ₃	[M+Li] ⁺	428	X ₈ U ^{4m2}	[M+3 Li] ³⁺
		553	X ₄	[M+Li] ⁺	472	X ₉ U ^{4m2}	[M+3 Li] ³⁺
		658	X ₅	[M+Li] ⁺	516	X ₁₀ U ^{4m2}	[M+3 Li] ³⁺
		412	X ₆	[M+2 Li] ²⁺	465	X ₂ U	[M+Li] ⁺
		478	X ₇	[M+2 Li] ²⁺	497	X ₃ U	[M+Li] ⁺
		544	X ₈	[M+2 Li] ²⁺	368	X ₄ U	[M+2 Li] ²⁺
		409	X ₉	[M+3 Li] ³⁺	434	X ₅ U	[M+2 Li] ²⁺
		453	X ₁₀	[M+3 Li] ³⁺	500	X ₆ U	[M+2 Li] ²⁺
		479	X ₂ U ^{4m2}	[M+3 Li] ⁺	566	X ₇ U	[M+2 Li] ²⁺
		309	X ₃ U ^{4m2}	[M+2 Li] ²⁺	424	X ₈ U	[M+3 Li] ³⁺
		375	X ₄ U ^{4m2}	[M+2 Li] ²⁺	468	X ₉ U	[M+3 Li] ³⁺
		441	X ₅ U ^{4m2}	[M+2 Li] ²⁺	512	X ₁₀ U	[M+3 Li] ³⁺

Upscale-Ansatz

- 100 mL einer Buchenxylan-Lösung (10 mg/ml) in einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit 250 µL der GH11-Xylanase versetzen
- Inkubation bei 50 °C für 5 h im Schüttelinkubator, anschließend das Enzym durch Zugabe von 400 mL Ethanol inaktivieren
- In 50 mL Tubes überführen und bei 5000 rpm 7 min zentrifugieren
- Die Überstände in Rundkolben zusammenführen und am Rotationsverdampfer einengen
- Die wässrigen Rückstände gefriertrocknen

Abtrennung der GXOS von den XOS

- Abtrennen der GXOS mittels Anionenaustauscher-SPE:
 - Konditionieren: dreifaches Kartuschenvolumen MeOH danach Äquilibrieren mit sechsfachem Volumen Reinstwasser
 - Probenaufgabe: 1 mL der getrockneten GXOS-XOS-Mischung (10 mg/ml)

- Waschen: zweimal mit 2 mL Reinstwasser waschen (aufgefangene Waschlösung kann zur Kontrolle gemäß Tabelle 20 mittels HPAEC analysiert werden)
- Elution der GXOS: 9 mL 100 mM Ameisensäure
- Mit 1 M NaOH den pH-Wert des Eluats auf 5 einstellen und Eluat gefriertrocknen, zur Kontrolle des Produktspektrums eine entsprechende Verdünnung der Probe gemäß Tabelle 20 mittels HAPEC analysieren

Semipräparative Fraktionierung der GXOS

- Das gefriergetrocknete GXOS-Gemisch (90 mg/ml in 25 % Acetonitril) semipräparativ mittels HILIC-ELSD fraktionieren (Tabelle 23)
- Das Lösungsmittel der einzelnen Fraktionen am Rotationsverdampfer entfernen und den wässrigen Rückstand über Nacht gefriertrocknen
- Fraktionen auswiegen und Reinheit mittels HPAEC-PAD gemäß Tabelle 22 bestimmen

Tabelle 23: Bedingungen der semipräparativen Isolierungen von Glucuronoxylanoligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Lichtstreuungsdetektion (engl. *High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Lightscattering Detector*, HPLC-ELSD)

HPLC-Bedingungen		
Säule	XBridge BEH Amide, 10 × 250 mm, 5 µm, Waters	
Eluent	A: 95:5 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure B: 20:80 (Wasser:Acetonitril) + 0,2 % Ameisensäure	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	70
	5,00	70
	35,00	49
	38,00	10
	48,00	10
	51,00	70
	61,00	70
Flussrate	4,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	50 °C	
Detektion: ELSD		
Temperatur	40 °C	
Receiver gain	6	

Strukturcharakterisierung mittels NMR-Spektroskopie

- 2 – 3 mg der jeweiligen GXOS-Fraktion einwiegen und nach Lösen in 200 µL Deuteriumoxid gefriertrocknen. Den Trocknungsvorgang insgesamt zwei Mal durchführen
- Die getrocknete Probe in 500 µL Deuteriumoxid aufnehmen und 0,5 µL Aceton hinzugeben
- Die Proben gemäß Tabelle 24 mittels NMR analysieren

Tabelle 24: Zur Strukturaufklärung verwendete kernspinresonanzspektroskopische Experimente und die dazugehörigen Mess- und Prozessierungsparameter (HSQC: engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*, HMBC: engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlaton*, TOCSY: engl. *Total Correlation Spectroscopy*, H2BC: engl. *Heteronuclear 2-Bond Correlation*)

	¹ H	HSQC (F2/F1)	HMBC (F2/F1)	HSQC/TOCSY (F2/F1)	H2BC (F2/F1)
Messparameter					
Pulsprogramm	zg30	hsqcedetgp	hmbcg- plpndqf	hsqcetgpml	h2bctqpl3
Kern	¹ H	¹³ C/ ¹ H	¹³ C/ ¹ H	¹³ C/ ¹ H	¹³ C/ ¹ H
Inkrementzahl	65536	1024/1024	2048/2048	2048/2048	256/2048
Scans	32	8	16	8	32
Dummy Scans	2	16	16	16	16
Spektrale Breite/ppm	20	8,5/165	4,0/165	4,0/180	4,0/180
D ₁ -Delay/s	1 ¹	1,5	1,5	1,5	1,5
NUS-Anteil/%	-	50	50	50	50
Prozessierungsparameter					
Datenpunkte <i>zero filling</i>	131072	2048/2048	4194/4194	4194/4194	512/4194
Window function	EM	QSINE	QSINE	QSINE	QSINE
Linienbreite/Hz	0,3	1/0,3	1/0,3	1/0,3	1/0,3

¹ Zur Bestimmung des Lacton-Säure-Gleichgewichts wurde ein Wert von 35 s verwendet.

8.3 Quantifizierung der Abbauprodukte von Zuckern im Sauren

- Eine wässrige Lösung, die 1 – 2 µmol der zu analysierende Monosaccharide enthält, zur Trocknen eindampfen
- Unter kurzem Vortexen 0,5 mL konzentrierte Schwefelsäure (bzw. Natriumtetraboratlösung, 12,5 mM in konzentrierte Schwefelsäure) zugeben und die Probe 3 min auf Eis kühlen
- Die Probe bei 95 °C für 5 min im Wasserbad erhitzen und anschließend 5 min auf Eis kühlen
- 0,5 mL Wasser und 2 mL 4 M NaOH vorsichtig unter Kühlen zugeben und vortexen
- Den Rückstand durch einen PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) filtrieren und unverdünnt mittels UHPLC-DAD gemäß Tabelle 25 analysieren

Tabelle 25: Bedingungen der chromatographischen Trennung von Furfuralderivaten mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC)

UHPLC-Bedingungen		
Säule	Luna Omega C18 Polar, 150×2,1 mm, 1,6 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	0
	12,00	0
	20,00	80
	25,00	80
	27,00	0
	38,00	0
Flussrate	0,2 mL/min	
Injektionsvolumen	25 µL	
Ofentemperatur	40 °C	
Detektion: UV		
Wellenlänge	260 nm	

Kalibrierung

- Ausgehend von einer Furan-Stammlösung, die jeweils 400 µM 5FFA, Furfural, HMF, F2A sowie 5MF in 5 % Acetonitril enthält, zwei Kalibrierungen erstellen (10 – 90 µM; 50 – 250 µM, Tabelle 26)

Tabelle 26: Pipettierschema zum Erstellen der Kalibrierung zur Quantifizierung der Säureabbauprodukte von Monosacchariden

Konzentration/µM	Verdünnung der Stammlösung
10	5 µL 200 µL
30	15 µL 200 µL
50	25 µL 200 µL
70	35 µL 200 µL
90	45 µL 200 µL
100	50 µL 200 µL
150	75 µL 200 µL
200	100 µL 200 µL
250	125 µL 200 µL

8.4 Analysen zum Einfluss von Borat

8.4.1 NMR-spektroskopische Analyse der Lactonisierung von Uronsäuren

- Je 1 mg der zweimal mit Deuteriumoxid gefriergetrockneten Probe in ein 4 mL Glasvial einwiegen und ggf. 1 mg Natriumtetraborat hinzufügen
- Probe in 150 μL 0,5 mg/mL TMSP- d_4 und entsprechend der gewünschten Säurekonzentration in variierende Mengen an Deuteriumoxid lösen (Tabelle 27)
- Gelöste Probe im Eis-Wasserbad vorkühlen, mit entsprechendem Volumen D_2SO_4 versetzten (Tabelle 25), vortexen und umgehend 5 min kühlen, anschließend weitere 5 min bei Raumtemperatur halten
- Inkubation für 5 min im Trockenschrank bei 100 °C, anschließend sofort für 5 min im Eisbad kühlen gefolgt von 5 min bei Raumtemperatur
- Mittels NMR gemäß den Angaben in Tabelle 24 analysieren

Tabelle 27: Volumina des zu pipettierenden Deuteriumoxids (D_2O) und der deuterierten Schwefelsäure (D_2SO_4)

Konzentration/M	$\text{D}_2\text{O}/\mu\text{L}$	$\text{D}_2\text{SO}_4/\mu\text{L}$
0	450	-
1	417	33
2	383	67
4	133	317
8	183	267

8.4.2 Bestimmung des Sulfonierungsgrades von 3-Phenylphenol bzw. 3-Methoxybiphenyl

- 5 mg 3PP bzw. m-3PP in ein Pyrexglas einwiegen und 1,2 mL konzentrierte Schwefelsäure bzw. natriumtetraborathaltige konzentrierte Schwefelsäure (12,5 mM) zugeben
- Die Mischung bei Raumtemperatur 20 min stehen lassen
- Vorsichtige Zugabe von 1,5 mL gekühltem Wasser, dabei die Probe im Eiswasser-Bad stetig schwenken, damit diese sich nicht zu stark erhitzt
- Vorsichtige Zugabe von 3 mL NaOH (4 M), dabei die Probe im Eiswasser-Bad stetig schwenken, damit diese sich nicht zu stark erhitzt
- Die Probe aus dem Eisbad herausnehmen und zweimal mit jeweils 3 mL Ethylacetat im Pyrexglas extrahieren
- Die organische Phase unter Stickstoff trocknen und den Rückstand in 500 μL Aceton- d_6 aufnehmen
- Mittels NMR gemäß den Angaben in Tabelle 24 analysieren

Zur Stabilitätsüberprüfung von 5FFA in konzentrierter Schwefelsäure wurden die Schritte äquivalent durchgeführt. Anstelle einer Standzeit von 20 min bei Raumtemperatur, wurde die Probe 5 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt.

8.5 Quantifizierung des Gesamturonsäuregehalts

8.5.1 Photometrische Quantifizierung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973)

Vorbehandlung von unlöslichem Probenmaterial

Unlösliche Probenmaterialien (UBS oder Holzmaterial) benötigen eine Vorbehandlung:

- 5 mg des unlöslichen Probenmaterials in ein 8 mL Glasvial einwiegen, wenige Glasperlen zugeben und mit 200 µL 12 M Schwefelsäure versetzen
- Gut vortexen und 15 min auf Eis kühlen, anschließend weitere 2 h bei Raumtemperatur schütteln
- 1,3 mL Wasser zugeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur schütteln.
- Nach der Zugabe von 3,5 mL Wasser durch einen PTFE-Spritzenfilter filtrieren (0,45 µm) und Filtrat zur Analyse entsprechend verdünnen

Quantitative Analyse

- 200 µL einer entsprechend verdünnten uronsäurehaltigen Lösung in ein 15 mL Pyrexglas pipettieren und in einem Eiswasser-Bad abkühlen, ein Blindwert wird zu jeder Probe mitgeführt
- Nacheinander unter kurzem Vortexen 1,2 mL Natriumtetraboratlösung (12,5 mM in konz. Schwefelsäure) zugegeben und umgehend in das Eisbad zurückstellen
- Die Proben 3 min im Eisbad abkühlen und anschließend 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Die Proben für 5 min bei 95°C im Wasserbad erhitzen und anschließend umgehend im Eisbad 5 min und dann weitere 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Zu jeder Probe 20 µL 0,15 %ige 3PP-Lösung zugeben und mindestens 30 Sekunden vortexen Im Blindwert diese durch 0,5 %ige NaOH ersetzen
- Die Proben in Küvetten überführen und die Absorption bei 520 nm nach 20 min messen

Kalibrierung

- Eine externe Kalibrierung mit Hilfe einer entsprechenden Uronsäurestammlösung (200 mg/L) gemäß Tabelle 28 erstellen. Zur Kalibrierung jeweils 200 µL jeder Kalibrierlösung verwenden, die Vorgehensweise erfolgt analog zur Probe (mit Blindwert).

Tabelle 28: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierlösungen zur photometrischen Gesamturonsäurebestimmung

Konzentration/mg/L	Verdünnung der Stammlösung
10	50 µL 1000 µL
25	125 µL 1000 µL
40	200 µL 1000 µL
55	275 µL 1000 µL
70	350 µL 1000 µL
85	425 µL 1000 µL

8.5.2 Quantifizierung von 5-Formyl-2-furancarbonsäure zur Optimierung der Analyse

- Erhitzen einer uronsäurehaltigen Probe in konzentrierter Schwefelsäure gemäß Abschnitt 8.4.3 (DoE-Ansatz): Variation der Erhitzungszeiten von 5, 10 und 15 min sowie Temperaturen von 60, 77,5 und 95 °C
- 5FFA mittels UHPLC-UV gemäß Tabelle 29 analysieren
- Zur Quantifizierung zwei Kalibrierungen gemäß Tabelle 26 ausgehend von einer 400 µM 5FFA-Stammlösung erstellen

Tabelle 29: Chromatographische Bedingungen der Quantifizierung von 5-Formyl-2-furancarbonsäure mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC)

UHPLC-Bedingungen		
Säule	Luna Omega C18 Polar, 150×2,1 mm, 1,6 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	0
	10,00	0
	15,00	80
	18,00	80
	23,00	0
	25,00	0
Flussrate	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen	25 µL	
Ofentemperatur	40 °C	
Detektion: UV		
Wellenlänge	280 nm	

8.5.3 Quantifizierung mittels LC-MS

Vorbehandlung von unlöslichem Probenmaterial

- Unlösliche Probenmaterialien (UBS oder Holzmaterial) benötigen eine Vorbehandlung gemäß 8.5.1.
- Pektinhaltige LBS anstelle von Reinstwasser zur Analyse in 0,05 M NaOH lösen

Quantitative Analyse

- 100 µL einer entsprechend verdünnten uronsäurehaltigen Lösung und 100 µL des entsprechend verdünnten ¹³C-markierten internen Standards (Tabelle 30) in ein 15 mL Pyrexglas pipettieren und in einem Eiswasser-Bad abkühlen
- Unter kurzem Vortexen 1,2 mL Natriumtetraboratlösung (12,5 mM in konzentrierter Schwefelsäure) zugeben und umgehend in das Eisbad zurückstellen
- Die Proben 3 min im Eisbad abkühlen und anschließend 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- In Abhängigkeit der zu analysierenden US-Probe im Wasserbad gemäß Tabelle 30 erhitzen und anschließend umgehend im Eisbad 5 min und dann weitere 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen

Tabelle 30: Analyseparameter der Uronsäurebestimmung über das Abbauprodukt 5-Formyl-2-furancarbonsäure (GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure, ManA: Mannuronsäure, GulA: Guluronsäure)

Uronsäuren in der Probe	Temperatur/°C	Zeit/min	interner Standard	Verdünnung des internen Standards ¹
GalA	77,5	5	¹³ C-GalA	400 µL 1 mL
GlcA	95	15	¹³ C-GlcA	400 µL 1 mL
ManA	77,5	15	¹³ C-GalA	400 µL 1 mL
GulA	95	10	¹³ C-GalA	400 µL 1 mL
GalA + GlcA	77,5	15	¹³ C-GalA	400 µL 1 mL
ManA + GulA	60	15	¹³ C-GalA	400 µL 1 mL

¹ ausgehend von einer 200 mg/L Stammlösung

- Vorsichtige Zugabe von 1,5 mL gekühltem Wasser, dabei die Probe im Eiswasser-Bad stetig schwenken, damit diese sich nicht zu stark erhitzt
- Vorsichtige Zugabe von 3 mL NaOH (4 M), dabei die Probe im Eiswasser-Bad stetig schwenken, damit diese sich nicht zu stark erhitzt
- Die Probe aus dem Eisbad herausnehmen und zweimal mit jeweils 3 mL Ethylacetat im Pyrexglas extrahieren
- Die gesammelte organische Phase zweimal mit je 1,5 mL NaCl ges. waschen. Die wässrige Phase verwerfen
- Die gewaschene organische Phase unter Stickstoff trocknen

- Zum Entfernen der NaCl Reste, den Rückstand in 0,5 mL Acetonitril lösen und in ein Eppi überführen (die Salzurückstände dabei nicht mit pipettieren)
- Nochmals unter Stickstoff trocknen
- Den Rückstand in 100 µL Acetonitril (10 %) aufnehmen und zum vollständigen Lösen 1 min im Ultraschallbad behandeln. Anschließend durch Zugabe von 100 µL Wasser auf eine Acetonitril-Konzentration von 5 % verdünnen. Treten hier Trübungen auf, können diese abzentrifugiert werden.
- Die Probe unverdünnt gemäß Tabelle 32 mittels UHPLC-MS analysieren

Kalibrierung

- Kalibrierungen ausgehend von einer 200 mg/L US-Stammlösung gemäß Tabelle 31 erstellen, folgende Bereiche werden kalibriert:
 - GalA, GlcA, ManA, GulA: 10 – 85 mg/L (Kalibrierlösungskonzentration 20 – 170 mg/L)
 - GalA + GlcA: 10 – 85 mg/L (Kalibrierlösungskonzentration 20 – 170 mg/L)
 - ManA + GulA: 25 – 100 mg/L (Kalibrierlösungskonzentration 50 – 200 mg/L)
 Der ¹³C-markierte interne Standard (200 mg/L) wird gemäß der Probenanalyse nach Tabelle 30 verdünnt.
- Zur Kalibrierung 100 µL der Kalibrierlösung und 100 µL der internen Standardlösung in ein 15 mL Pyrexglas pipettieren, entsprechend den Proben behandeln und wie in Tabelle 32 analysieren

Tabelle 31: Pipettierschema zum Erstellen der Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts über das Abbauprodukt 5-Formyl-2-furancarbonsäure

Konzentration/mg/L	Verdünnung der Stammlösung
20	100 µL 1000 µL
50	260 µL 1000 µL
80	400 µL 1000 µL
110	550 µL 1000 µL
140	700 µL 1000 µL
170	850 µL 1000 µL
200	unverdünnt

Tabelle 32: Bedingungen der chromatographischen Analyse von 5-Formyl-2-furancarbonsäure mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) und massenspektrometrischer (MS) Detektion (ESI: Elektrosprayionisation, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis)

UHPLC-Bedingungen		
Säule	Luna Omega C18 Polar, 150×2,1 mm, 1,6 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	0
	10,00	0
	15,00	80
	18,00	80
	23,00	0
	25,00	0
Flussrate	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen	25 µL	
Ofentemperatur	40 °C	
Detektion: ESI-MS		
ESI-Modus	negativ	
Scan	SIM <i>m/z</i> 139, 145	
Kapillartemperatur	320 °C	
<i>Spray Voltage</i>	-2,5 kV	

8.6 Strukturaufklärung des Chromophors

8.6.1 Analyse der aromatischen Reaktionsprodukte ausgehend von 5-Formyl-2-furancarbonsäure und 3-Phenylphenol

a) analytischer Ansatz

- Einwaage von 2 mg 5FFA oder 2 mg US in ein 15 mL Pyrexglas
- Zugabe von 1,2 mL konzentrierter Schwefelsäure oder schwefelsaurer Natriumtetraboratlösung (12,5 mM), vortexen
- Wird die Analyse ausgehend von 5FFA durchgeführt, können nachfolgende Schritte übersprungen werden
 - Das Pyrexglas verschlossen 5 min bei 95 °C in Wasserbad erhitzen
 - 5 min im Eisbad und 5 min bei Raumtemperatur abkühlen
- Nach der Zugabe von 6,4 mg 3PP (dreifacher molarer Überschuss) gut vortexen und 20 min zur Ausbildung der Pinkfärbung stehen lassen

- Zugabe von 4 mL gekühltem Wasser unter Schwenken im Eisbad, kurz vortexen und sofort wieder im Eisbad abkühlen lassen
- Nach dem Abkühlen Glas aus dem Eisbad nehmen und durch Zugabe von NaOAc einen pH-Wert von 4 – 5 einstellen (Test mit pH-Papier). Gegebenenfalls kann hier Na₂SO₄ ausfallen
- Den wässrigen Überstand mittels RP-PFP SPE wie folgt entsalzen:
 - Konditionieren: 4 mL Acetonitril, 4 mL H₂O
 - Probenaufgabe: 4 mL
 - Waschen: 6 mL Acetonitril 5 %
 - Elution: 3 mL Acetonitril 80 % + 0,2 % Ameisensäure
- Das Eluat unverdünnt mittels UHPLC-DAD/MS analysieren (Tabelle 33)

Tabelle 33: Bedingungen der chromatographischen Trennung des organischen Extraktes aus der Farbreaktion von 5-Formyl-2-furancarbonsäure mit 3-Phenylphenol mittel Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC), und der Detektion mit *Diodenarray*-Detektor (DAD) sowie Massenspektrometrie nach Elektrosprayionisation (ESI-MS) (*m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis)

UHPLC-Bedingungen			
Säule	Kinetex C18, 150 × 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex		
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril		
Gradient	Zeit/min	B/%	
	0,00	20	
	17,00	48	
	24,00	54	
	40,00	85	
	45,00	85	
	50,00	20	
	55,00	20	
Flussrate	0,4 mL/min		
Injektionsvolumen	10 – 50 µL (Anpassung je nach Versuch)		
Ofentemperatur	25 °C		
Detektion: DAD und ESI-MS			
Detektionswellenlängen	220 – 700 nm		
ESI-Modus	negativ		
Scan	<i>Full-Scan</i> (<i>m/z</i> 80 – 1000)		
	SIM <i>m/z</i> :	461 Triarylmethan	[M-H] ⁻
		541 Triarylmethan + 1 x -SO ₃ H	[M-H] ⁻
		621 Triarylmethan + 2 x -SO ₃ H	[M-H] ⁻
		701 Triarylmethan + 3 x -SO ₃ H	[M-H] ⁻

	477	Triarylmethan -OH	[M-H] ⁻
	539	Triarylmethan Kation + 1 x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
	619	Triarylmethan Kation + 2 x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
	699	Triarylmethan Kation + 3 x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
	443	Etherderivat	[M-H] ⁻
	523	Etherderivat + 1 x -SO ₃ H oder Triarylmethan -OH	[M-H] ⁻ [M+HCOO] ⁻
	603	Etherderivat + 2 x -SO ₃ H	[M-H] ⁻
	683	Etherderivat + 3 x -SO ₃ H	[M-H] ⁻
	459	Xanthylium-Ion -OH	[M-H] ⁻
	505		[M+HCOO] ⁻
	521	Xanthylium-Ion + 1 x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
	601	Xanthylium-Ion + 2x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
	681	Xanthylium-Ion + 3 x -SO ₃ H	[M-2H] ⁻
Interfacetemperatur	350 °C		
<i>Desolvation Line</i> Temperatur	250°C		
<i>Nebulizing Gas Flow</i>	1,5 L/min		
<i>Drying Gas Flow</i>	15 L/min		
<i>Heat Block</i>	200 °C		

b) präparativer Ansatz zum Anreichern der einzelnen Farbstufen

Ansatz nach Kreppenhofer *et al.* (2011)

- Einwaage von 128 mg 3PP und 440 mg 5FFA in ein 30 mL Pyrexglas
- Nach Zugabe von 8 mL Wasser den pH-Wert mit Schwefelsäure auf ca. 2,8 einstellen, Deckel verschließen und gut vortexen
- Bei 100 °C für 2,5 h im Trockenschrank erhitzen
- Nach dem Abkühlen zweimal mit jeweils 6 mL DCM extrahieren, die gesammelte DCM-Phase zweimal mit je 2 mL Wasser waschen
- Die organische Phase unter Stickstoff bis zur Trockenen eindampfen und zur präparativen Trennung (Tabelle 34) in 2 – 3 mL Acetonitril aufnehmen.

Tabelle 34: Bedingungen der semipräparativen Fraktionierung des organischen Extraktes aus der Reaktion von 5-Formyl-2-carbonsäure mit 3-Phenylphenol mittel Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

HPLC-Bedingungen		
Säule	Luna C18 (2), 250 × 10 mm, 5 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	35
	35,00	85
	40,00	85
	42,00	35
	55,00	35
Flussrate	2,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	25 °C	
Detektion: UV		
Detektionswellenlänge	265 nm	

8.6.2 Synthese und Isolierung von chromophoren Strukturen aus dem Modellsystem 4-Carboxybenzaldehyd und 3-Phenylphenol

- Einwaage von 1,7 g 3PP und 0,83 g 4CBA in einen 500 mL Rundkolben
- Nach der Zugabe von 25 mL konzentrierte Schwefelsäure in einem Ölbad 2 h bei 120 °C reagieren lassen, bis sich eine dunkelrote bis pinke Farbe bildet
- Unter Eiskühlung 200 mL gekühlte Wasser zugeben und 30 min bei Raumtemperatur rühren
- Mit NaOAc einen pH-Wert von 4 – 5 einstellen
- Die farbigen Reaktionsprodukte mit DCM: Isopropanol (3:1, 5 x 200 mL) extrahieren und den Extrakt über Natriumsulfat trocknen
- Den organischen Extrakt am Rotationsverdampfer vollständig eindampfen und verbleibende Essigsäure mit wenig Toluol coevaporieren
- Den Rückstand in Wasser suspendieren und gefriertrocknen
- Die Probe in Acetonitril lösen, mittels UHPLC-MS analysieren (Tabelle 35) und semipräparativ fraktionieren (Tabelle 36)

Tabelle 35: Bedingungen der chromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol mittel Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) und der Detektion mit *Diodenarray*-Detektor (DAD) sowie Massenspektrometrie (MS) (*m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis)

UHPLC-Bedingungen		
Säule	Kinetex C18, 150 × 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Ameisensäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	10
	40,00	90
	42,00	90
	44,00	10
	50,00	10
Flussrate	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen	10 – 50 µL (Anpassung je nach Versuch)	
Ofentemperatur	25 °C	
Detektion: DAD und ESI-MS		
Detektionswellenlängen	220 – 700 nm	
ESI-Modus	negativ	
Scan	<i>Full-Scan (m/z 80 – 1000)</i>	
Interfacetemperatur	350 °C	
<i>Desolvation Line</i> Temperatur	250°C	
<i>Nebulizing Gas Flow</i>	1,5 L/min	
<i>Drying Gas Flow</i>	15 L/min	
<i>Heat Block</i>	200 °C	

Tabelle 36: Chromatographische Bedingungen der semipräparativen Trennung chromophorer Verbindungen aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)

HPLC-Bedingungen		
Säule	Luna C18 (2), 250 × 10 mm, 5 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure B: Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	10
	1,00	10
	25	80
	30	10
	40	10
Flussrate	2,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	25 °C	
Detektion: UV		
Detektionswellenlänge	520 nm	

8.6.3 Synthese und Isolierung einer Triarylmethan-Vorstufe ausgehend von 4-Carboxybenzaldehyd und 3-Phenylphenol

- 200 mg 3PP und 90 mg 4CBA in ein 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 1 mL Eisessig und 40 µL konzentrierte Schwefelsäure zugeben und 4 h bei 60 °C im Trockenschrank erhitzen
- 4 mL gekühltes Wasser zugeben und mit zweimal 2 mL DCM extrahieren
- Den organischen Extrakt zweimal mit je 1 mL Wasser waschen und anschließend semipräparativ fraktionieren (Tabelle 37). Es wurden zwei Ansätze angefertigt. Zur Kontrolle der Reinheit der Fraktionen wurde die UHPLC-DAD/MS Methode gemäß Tabelle 35 verwendet

Tabelle 37: Chromatographische Bedingungen der semipräparativen Trennung aromatischer Reaktionsprodukte aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)

HPLC-Bedingungen		
Säule	Luna C18 (2), 250 × 10 mm, 5 µm, Phenomenex	
Eluent	A: Wasser + 0,2 % Trifluoressigsäure B: Acetonitril	
Gradient	Zeit/min	B/%
	0,00	50
	5,00	50
	29,00	70
	34,00	70
	36,00	90
	42,00	90
	45,00	50
	55	50
Flussrate	2,0 mL/min	
Injektionsvolumen	100 µL	
Ofentemperatur	25 °C	
Detektion: UV		
Detektionswellenlänge	280 nm	

8.6.4 Strukturaufklärung der Fraktionen mittels NMR-Spektroskopie

- Mindestens 5 mg der zu analysierenden Probe in 500 µL deuteriertem Lösungsmittel lösen und mittels NMR-Spektroskopie analysieren (Tabelle 38)

Tabelle 38: Zur Strukturaufklärung verwendete kernspinresonanzspektroskopische Experimente und die dazugehörigen Mess- und Prozessierungsparameter (COSY: engl. *Correlation Spectroscopy*, HSQC: engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*, HMBC: engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

	¹ H	¹³ C	COSY (F2/F1)	HSQC (F2/F1)	HMBC (F2/F1)
Messparameter					
Pulsprogramm	zg30	zpgg30	cosygpppqf	hsqcedetgp	hmbcgplpndqf
Kern	¹ H	¹³ C	¹ H/ ¹ H	¹³ C/ ¹ H	¹³ C/ ¹ H
Inkrementzahl	65536	65536	1024/1024	1024/1024	2048/2048
Scans	128	2056	8	32	32
Dummy Scans	2	4	16	16	16
Spektrale Breite/ppm	20	263,6369	8,3/8,3	8,5/165	9,0/220
D ₁ -Delay/s	1	2	1,9	1,5	1,5
NUS-Anteil/%	-		50	50	50
Prozessierungsparameter					
Datenpunkte <i>zero filling</i>	131072	131072	2048/2048	2048/2048	4194/4194
Window function	EM	EM	QSINE	QSINE	QSINE
Linienbreite/Hz	0,3	-	1/0,3	1/0,3	1/0,3

9. Anhang

9.1 Abbildungen



120 g Bubble Tea Perlen

Bestandteile

Zutaten: Wasser, Fruktosesirup, Mangosaft (5 %), modifizierte Stärke, Geliermittel: Natriumalginat, Carrageen; Verdickungsmittel: Xanthan, Säuerungsmittel: Äpfelsäure, Konservierungsmittel: Kaliumsorbat, Farbstoff: Allurarot AC und Tartrazin, Säureregulator: Calciumlactat, Aromen. Allurarot AC und Tartrazin: (E1450, E420, E1520, E330), Farbstoff E129* Dieses Lebensmittel enthält den Farbstoff E129, der die Aktivität und Aufmerksamkeit von Kindern beeinträchtigen kann.

Abbildung A1: Analysierte Bubble-Tea Perlen, Typ Mango, sowie deren Zutatenliste (Quelle: Amazon.de)

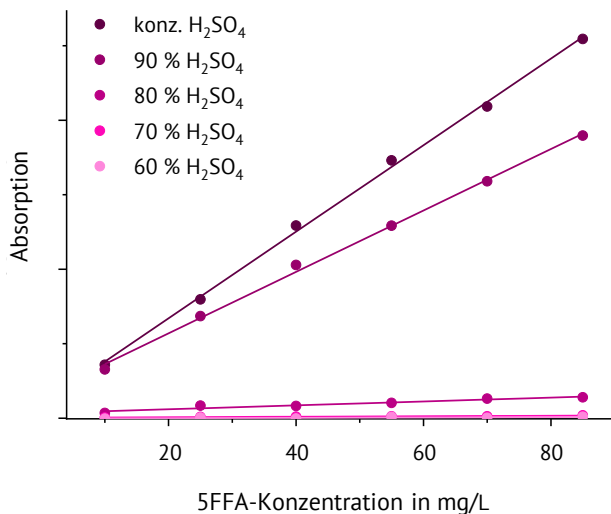


Abbildung A2: Photometrisch (520 nm) aufgenommene Kalibriergeraden des Chromophors aus der Reaktion von verschiedenen Konzentrationen an 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA) mit 3-Phenylphenol in variierenden Schwefelsäurekonzentrationen (ohne Zusatz von Borat)

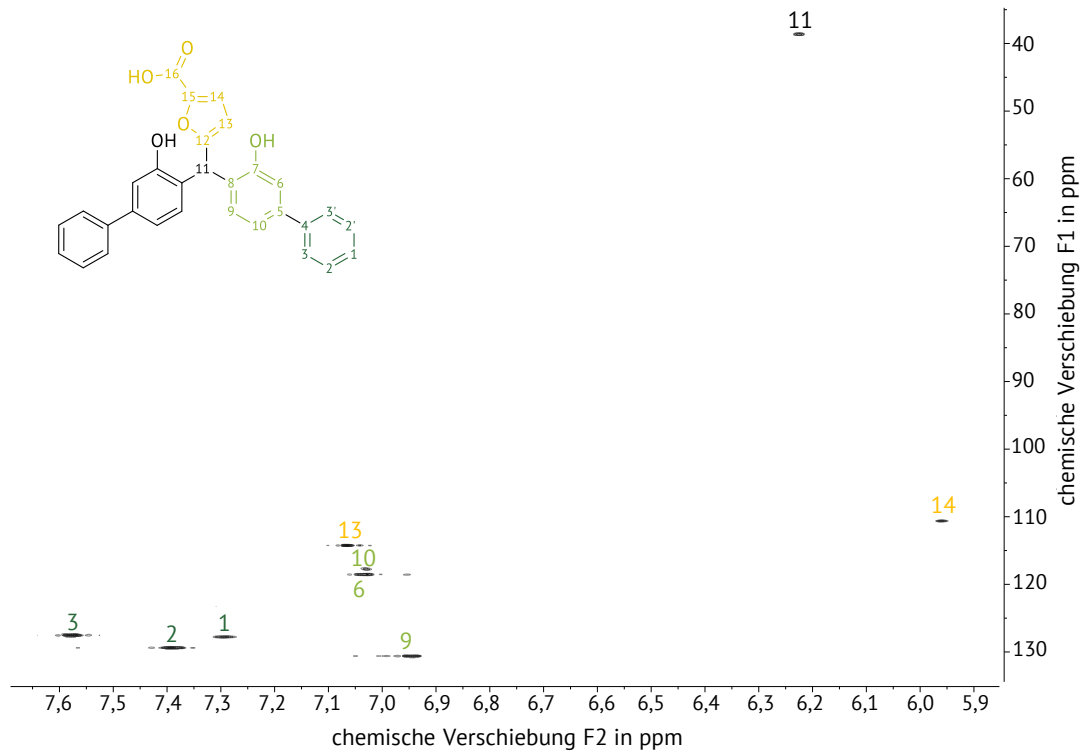


Abbildung A3: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum des isolierten Triarylmethans (36), aufgenommen in Methanol- d_4 und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 3,30/49,00$ ppm).

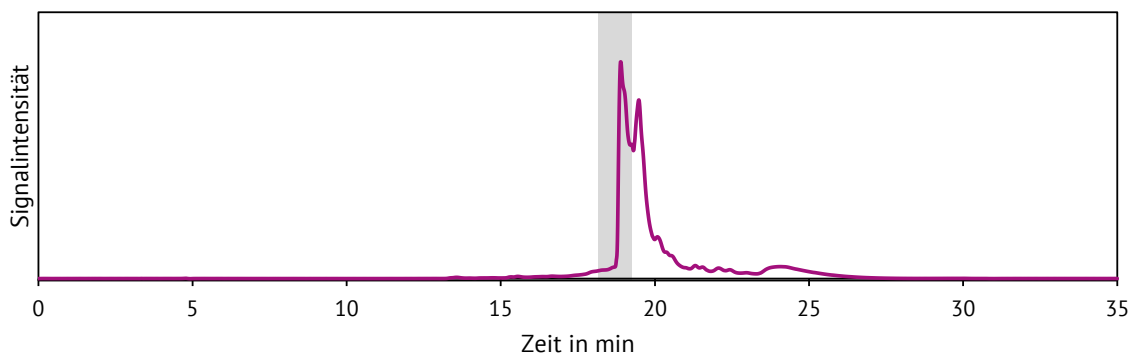


Abbildung A4: Chromatogramm (detektiert bei 520 nm) des zu fraktionierenden Chromophors aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol. Die grau hinterlegte Fraktion konnte in ausreichender Reinheit abgetrennt werden.

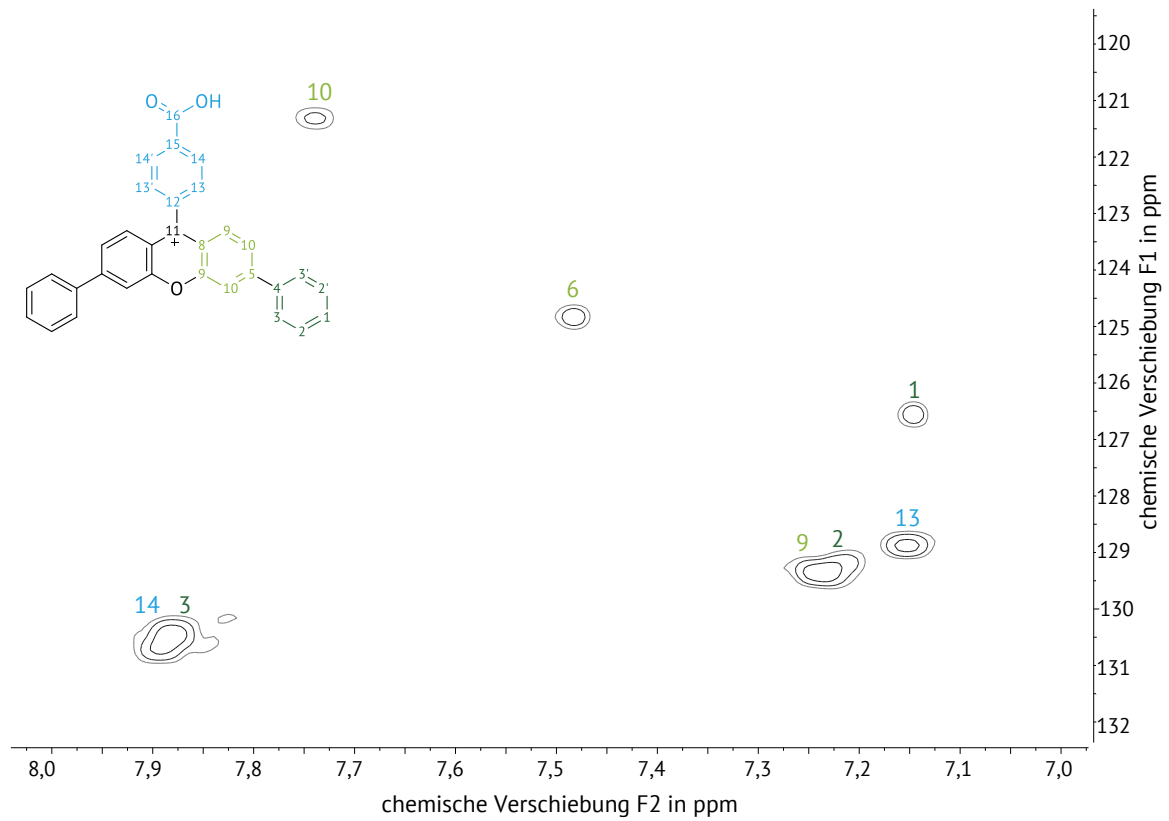


Abbildung A5: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum des isolierten Xanthylium-Chromophors (38) aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol, aufgenommen in Tetrahydrofuran- d_8 und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 3,59/67,57$ ppm)

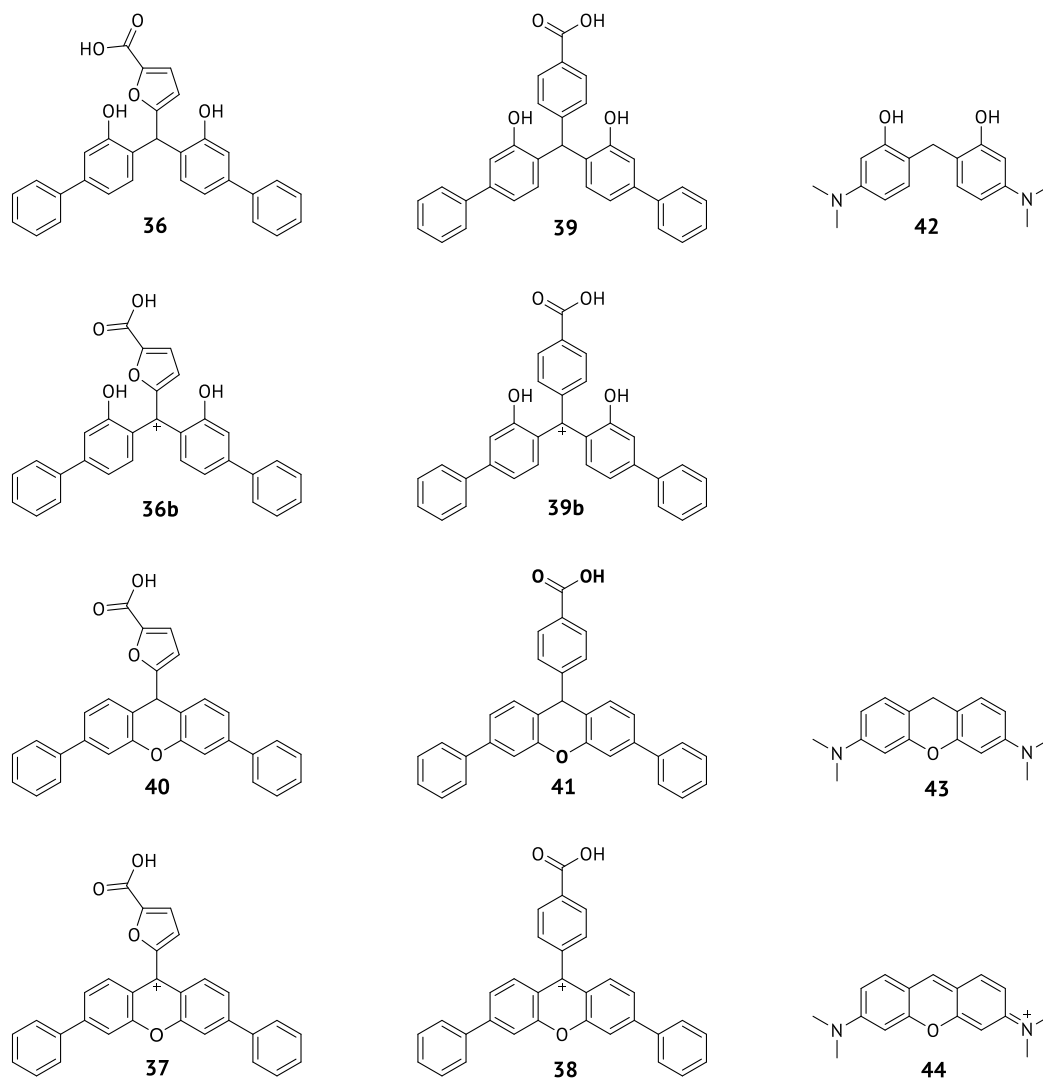


Abbildung A6: Zu Tabelle 2 zugehörige Strukturen des Triarylmethans (36, 39), des Triarylmethan-Kations (36b, 39b), des Xanthens (40, 41) sowie des Xanthylium-Ions (37, 38) aus der Reaktion von 5-Formyl-2-furan-carbonsäure bzw. 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol. Zum Vergleich wurden die Struktur des Pyrocins (44) sowie entsprechenden Vorläuferstrukturen (42, 43) herangezogen.

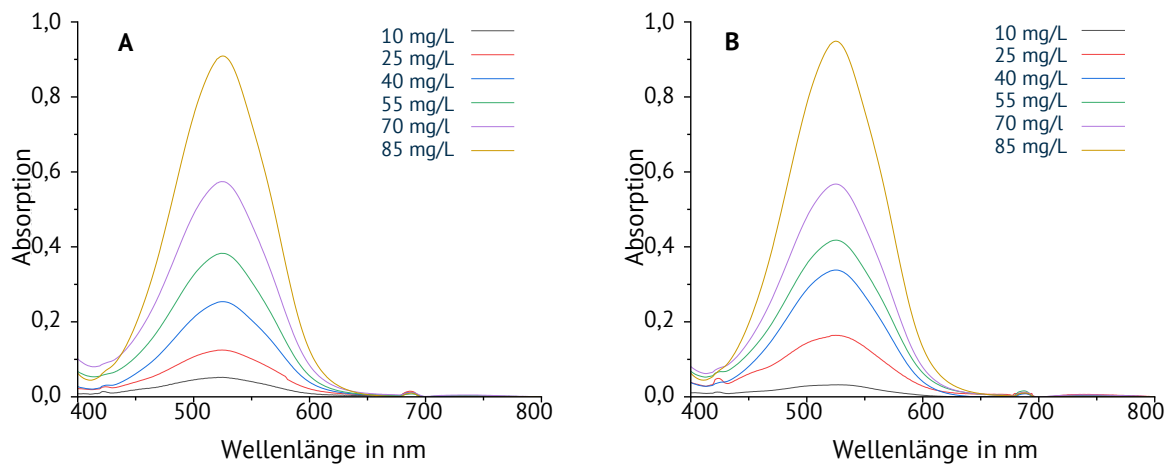


Abbildung A7: Aufgenommene Absorptionsspektren der verschiedenen Kalibrierpunkte einer Kalibrierung mit Galacturonsäure nach Abbau und Reaktion mit 3-Phenylphenol in konzentrierter Schwefelsäure im Blumenkranz-Asboe-Hansen Assays ohne Zusatz von Borat (A) und mit Boratzusatz (12,4 mM) (B)

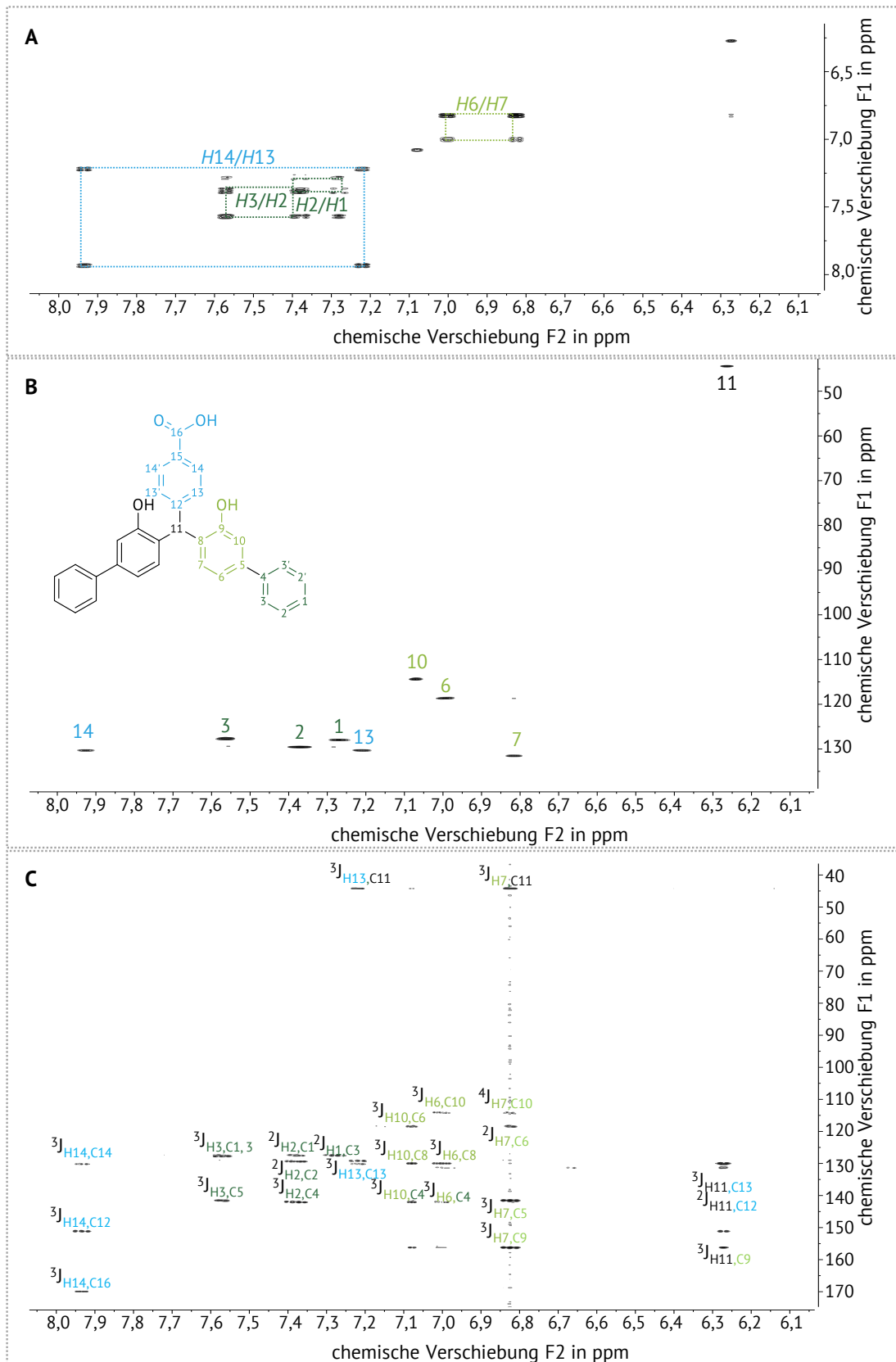


Abbildung A8: Correlation Spectroscopy-Spektrum (A), Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum (B) sowie Heteronuclear Multiple Bond Correlation-Spektrum (C) des synthetisierten Triarylmethans (**39**) aus der Reaktion von 4-Carboxybenzaldehyd mit 3-Phenylphenol. Die Spektren wurden in Aceton- d_6 aufgenommen und auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 2,05/ 29,84$ ppm) referenziert.

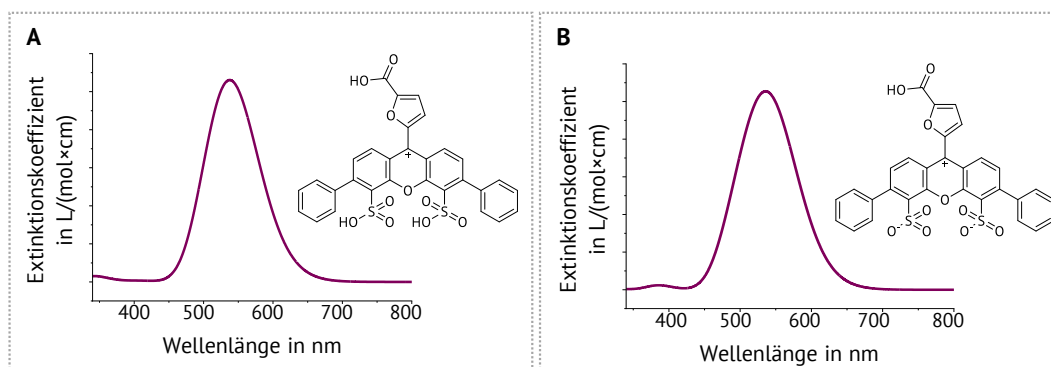


Abbildung A9: Berechnete Absorptionsspektren des doppelt sulfonierten Xanthylium-Chromophors aus der Reaktion von 5-Formyl-2-furancarbonsäure mit 3-Phenylphenol. Hier werden die beiden Grenzfälle der vollständigen Protonierung (A) sowie der vollständigen Deprotonierung (B) der Sulfonsäuregruppen betrachtet.

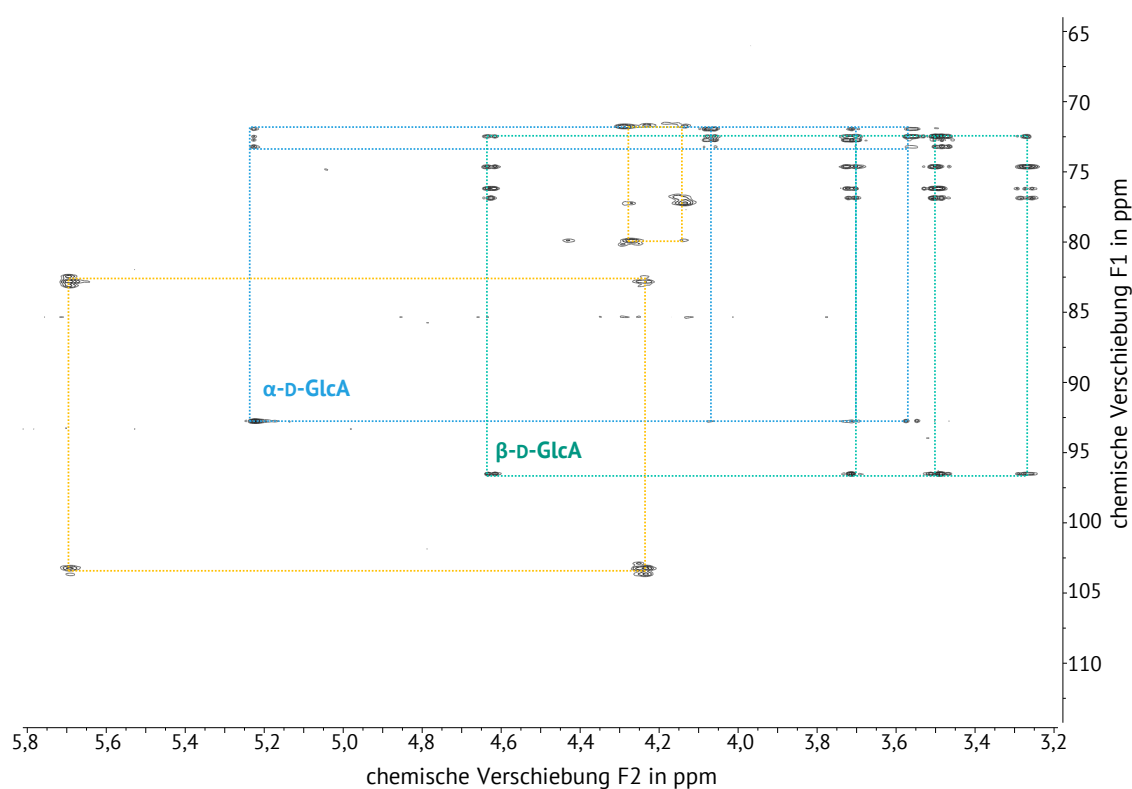


Abbildung A10: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Total Correlation Spectroscopy-Spektrum der Analyse von Glucuronsäure (GlcA) nach Erhitzen in borathaltigem Deuteriumoxid bei 95 °C für 5 min. Neben dem Spinsystem der α - und β -D-GlcA (türkis und grün), wurde ein weiteres nicht zuordenbares Spinsystem identifiziert (gelb). Das Spektrum wurden in Deuteriumoxid aufgenommen und auf 3-(Trimethylsilyl)propionsäure- d_4 ($\delta_{H/C} = 0/0$ ppm) referenziert.

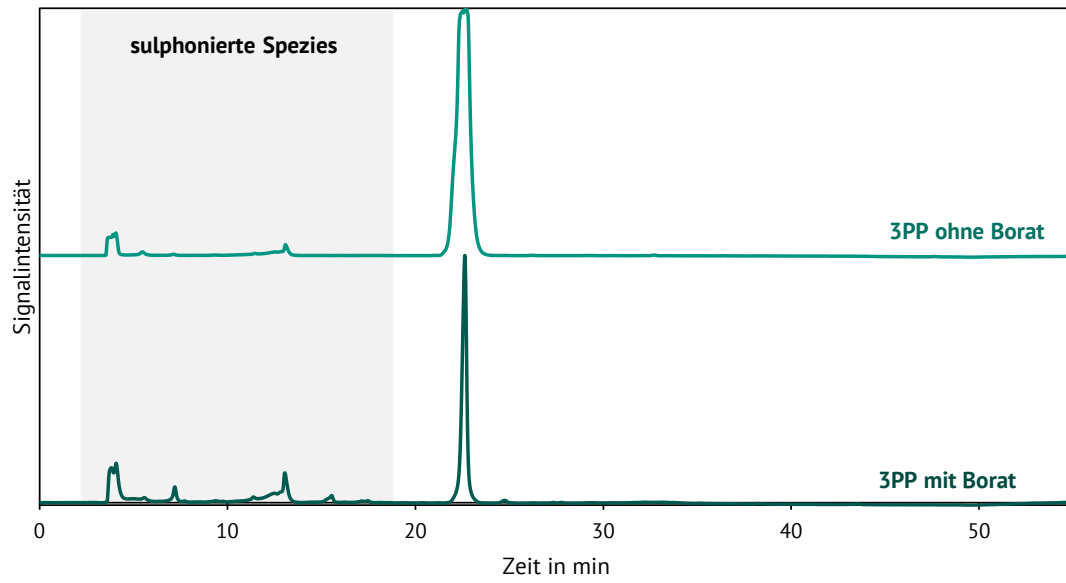


Abbildung A11: Chromatogramme (detektiert bei 265 nm) des mit konzentrierter Schwefelsäure (sowohl borathaltig als auch boratfrei) behandelten 3-Phenylphenols (3PP)

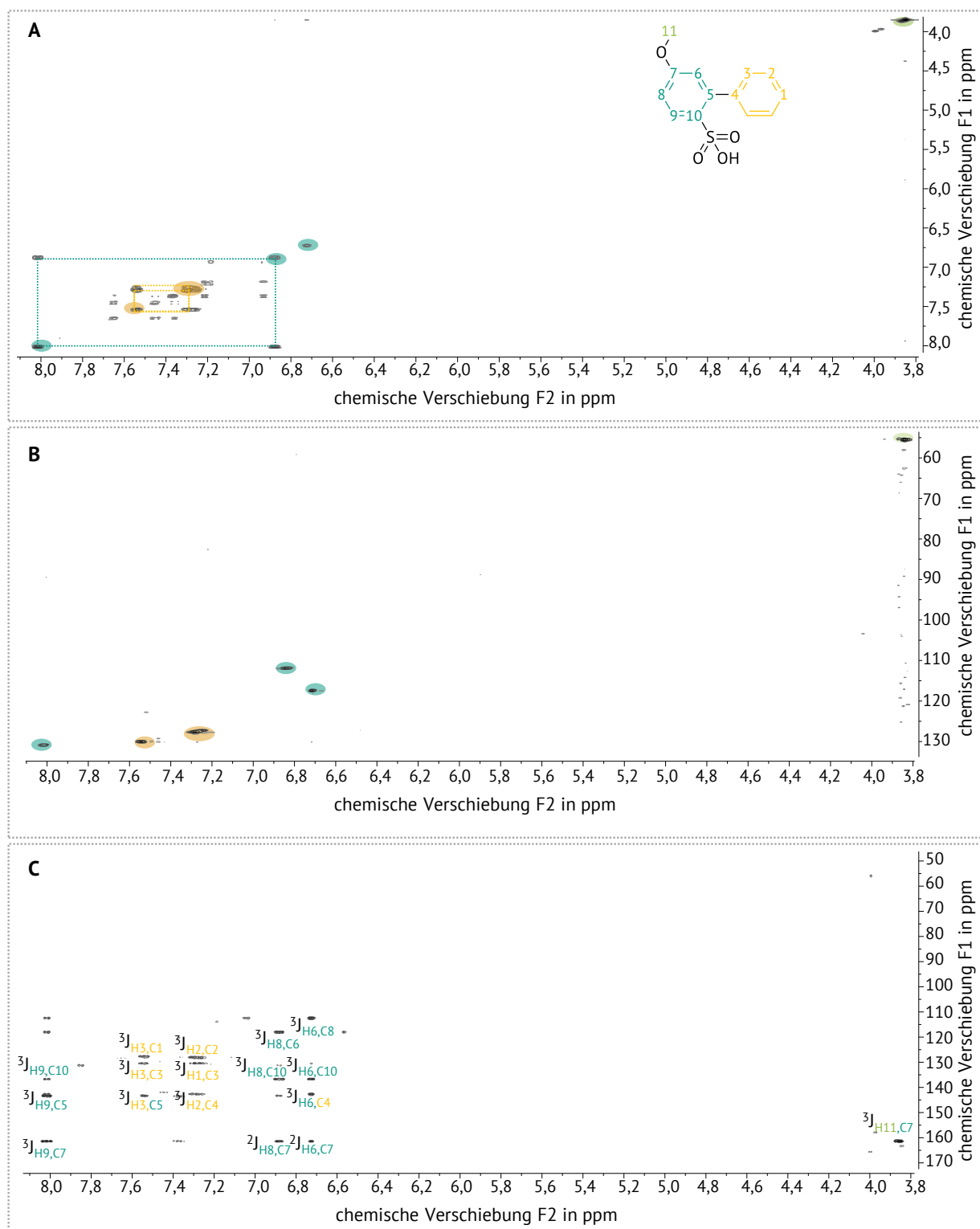


Abbildung A12: Correlation Spectroscopy-Spektrum (A) Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum (B) sowie Heteronuclear Multiple Bond Correlation-Spektrum (C) des mit borathaltiger konzentrierter Schwefelsäure behandelten 3-Phenylphenols. Hierbei wurde selektiv die 5-Methoxybiphenyl-2-sulfonsäure gebildet. Die Spektren wurden in Aceton- d_6 aufgenommen und auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{C/H} = 2,05/ 29,84$ ppm) referenziert.

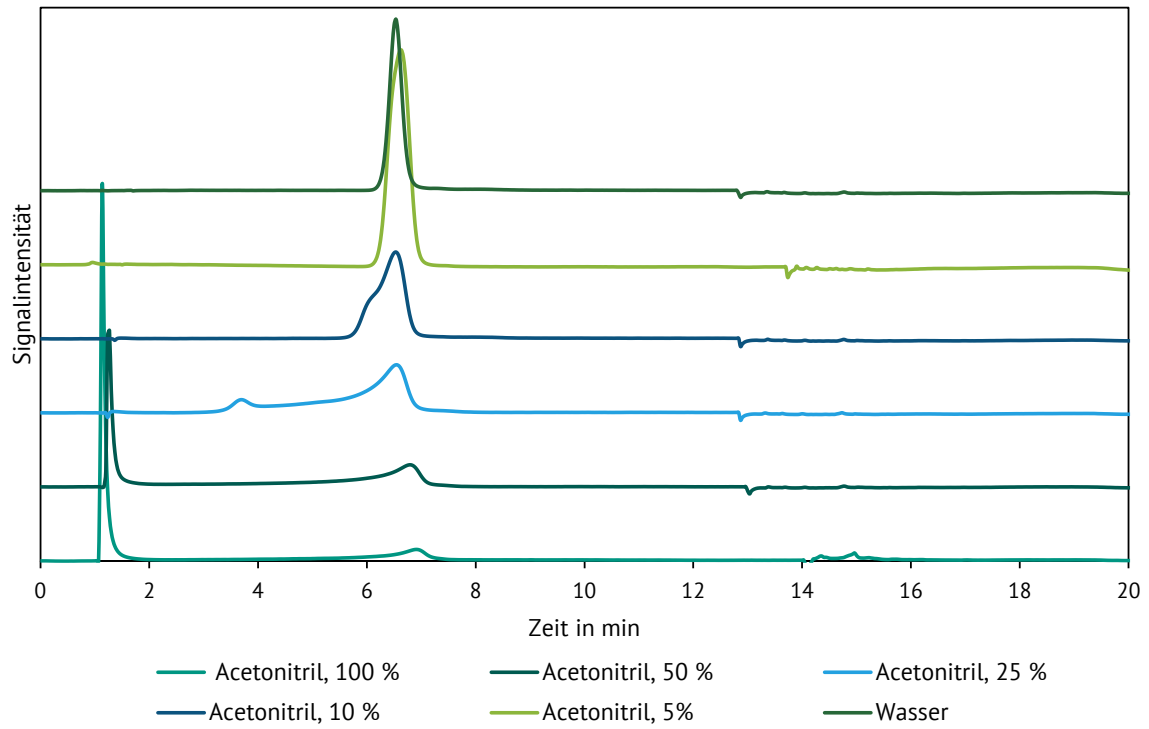


Abbildung A13: Elutionsprofil (detektiert bei 280 nm) von 5-Formyl-2-furancarbonsäure, injiziert in verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen

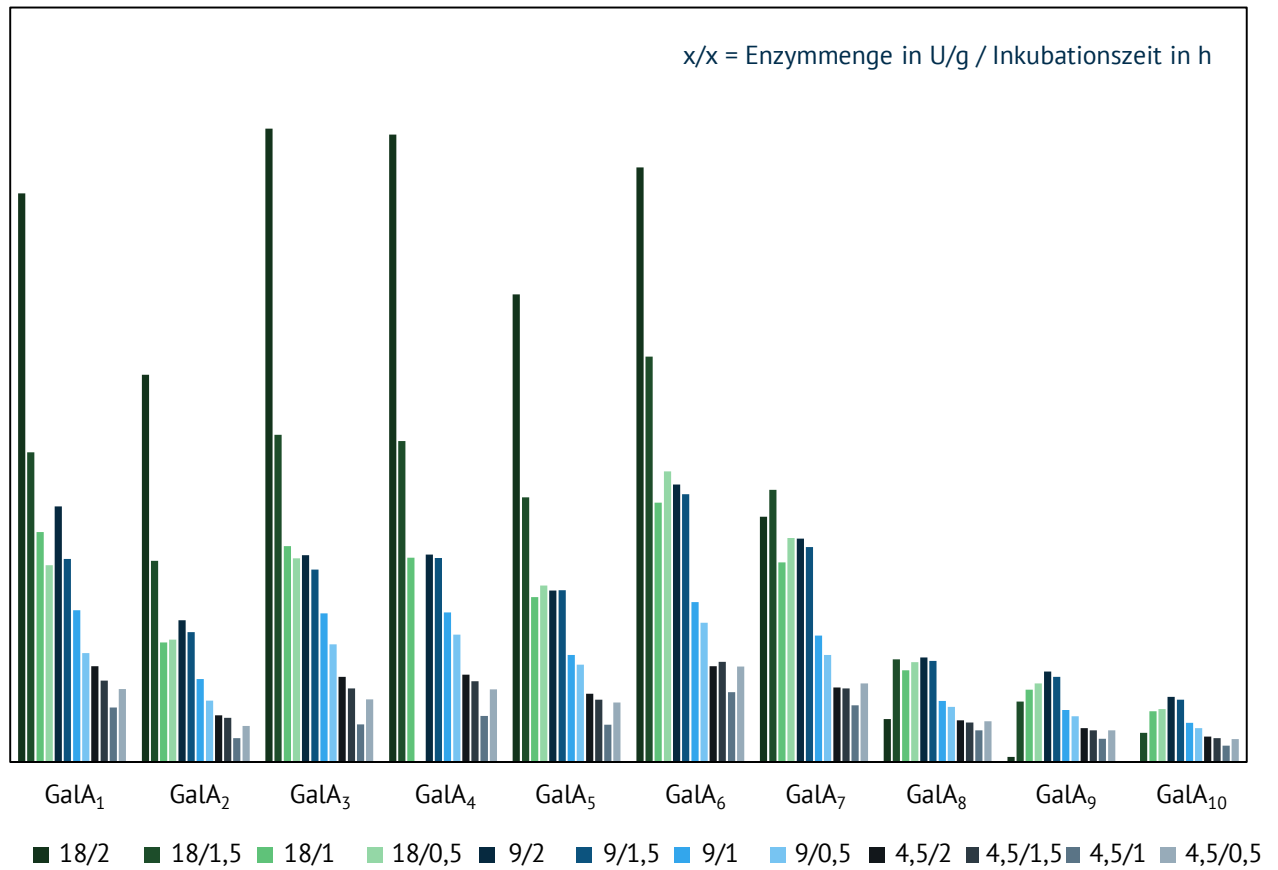


Abbildung A14: Relative Ausbeuten der verschiedenen Homogalacturonsäureoligosaccharide (GalA₁₋₁₀) in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen wie Enzymmenge und Inkubationszeit bei 35 °C der Fermentation der Polygalacturonsäure mit einer *endo*-Polygalacturonase

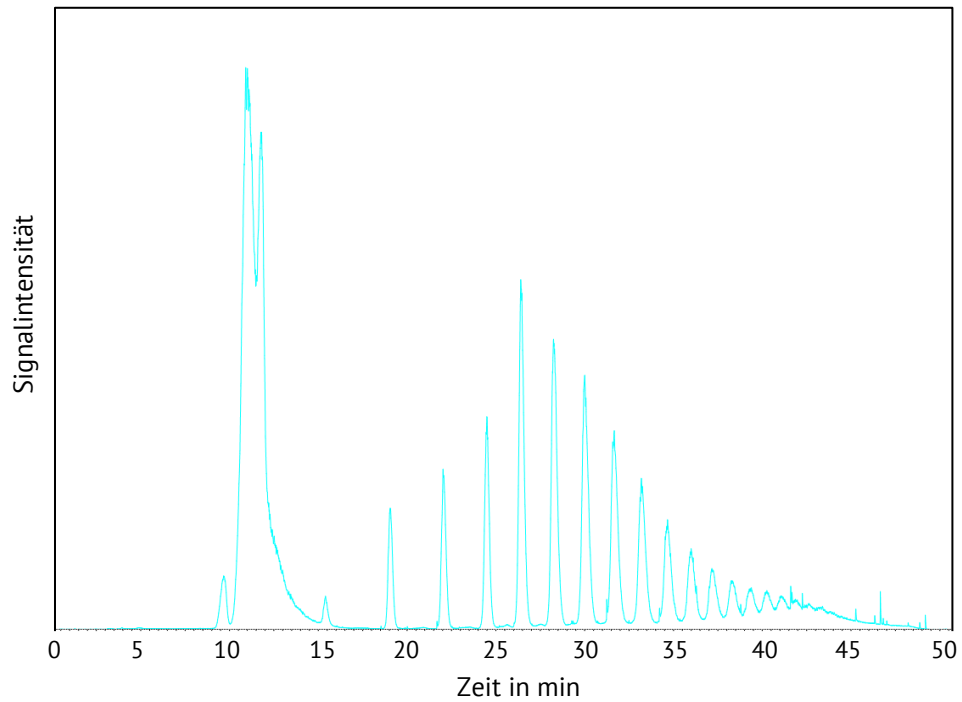


Abbildung A15: Mittels Lichtstredetektor detektiertes Chromatogramm der semipräparativen Trennung mittels hydrophiler Interaktionschromatographie der verschiedenen Homogalacturonsäureoligosaccharide (Polymerisationsgrad 1 – 17).

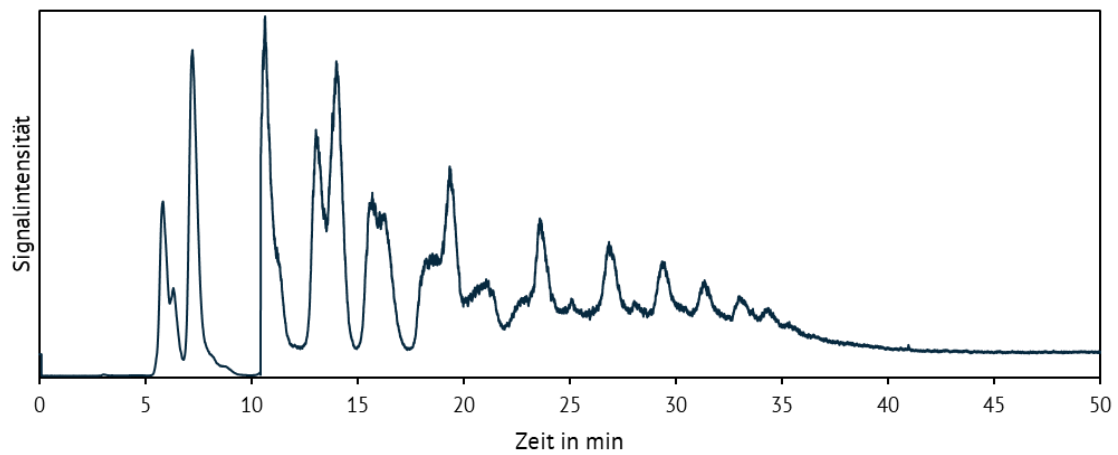


Abbildung A16: Mittels Lichtstredetektor detektiertes Chromatogramm der semipräparativen Trennung mittels hydrophiler Interaktionschromatographie der verschiedenen Alginatoligosaccharide (Polymerisationsgrad 1 – 20)

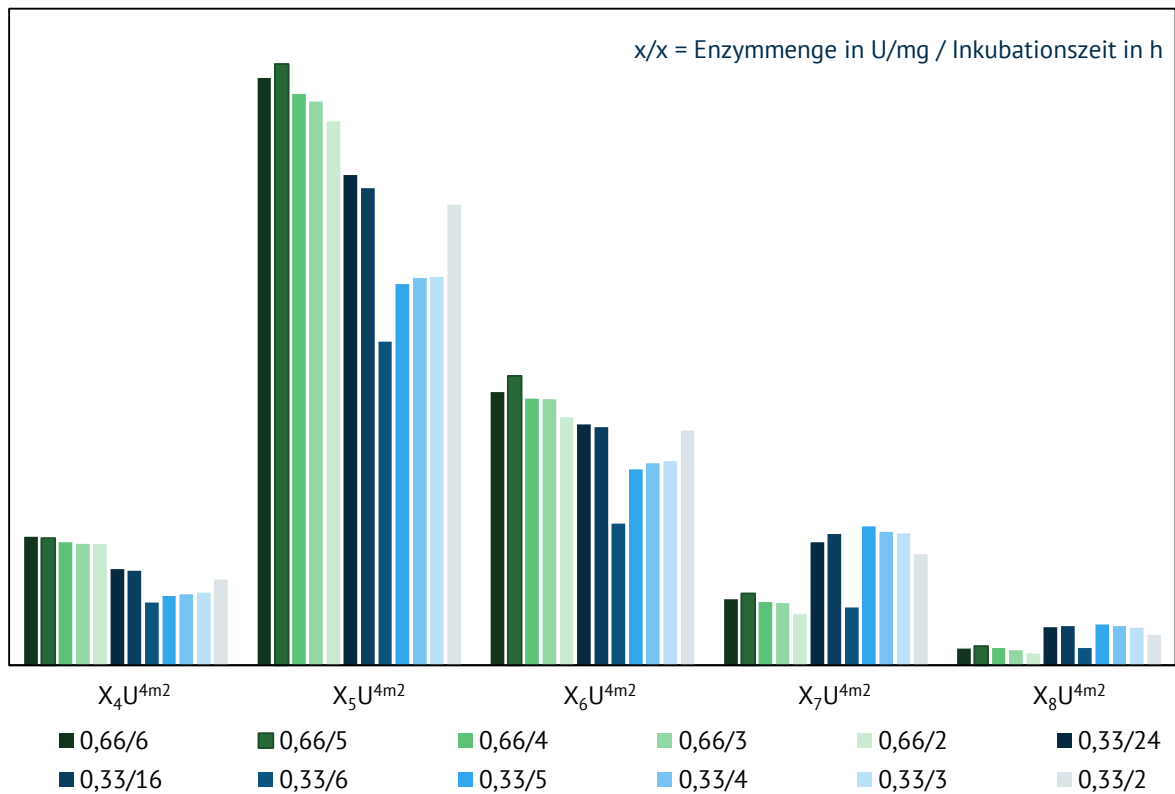


Abbildung A17: Relative Ausbeuten der verschiedenen Glucuronoxylanoligosaccharide in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen wie Enzymmenge und Inkubationszeit bei 50 °C der Fermentation eines Buchenxylanstandards mittels einer Glycosylhydrolase 11. Die Benennung der Oligosaccharide erfolgt dabei gemäß der Nomenklatur nach Fauré *et al.* 2009.

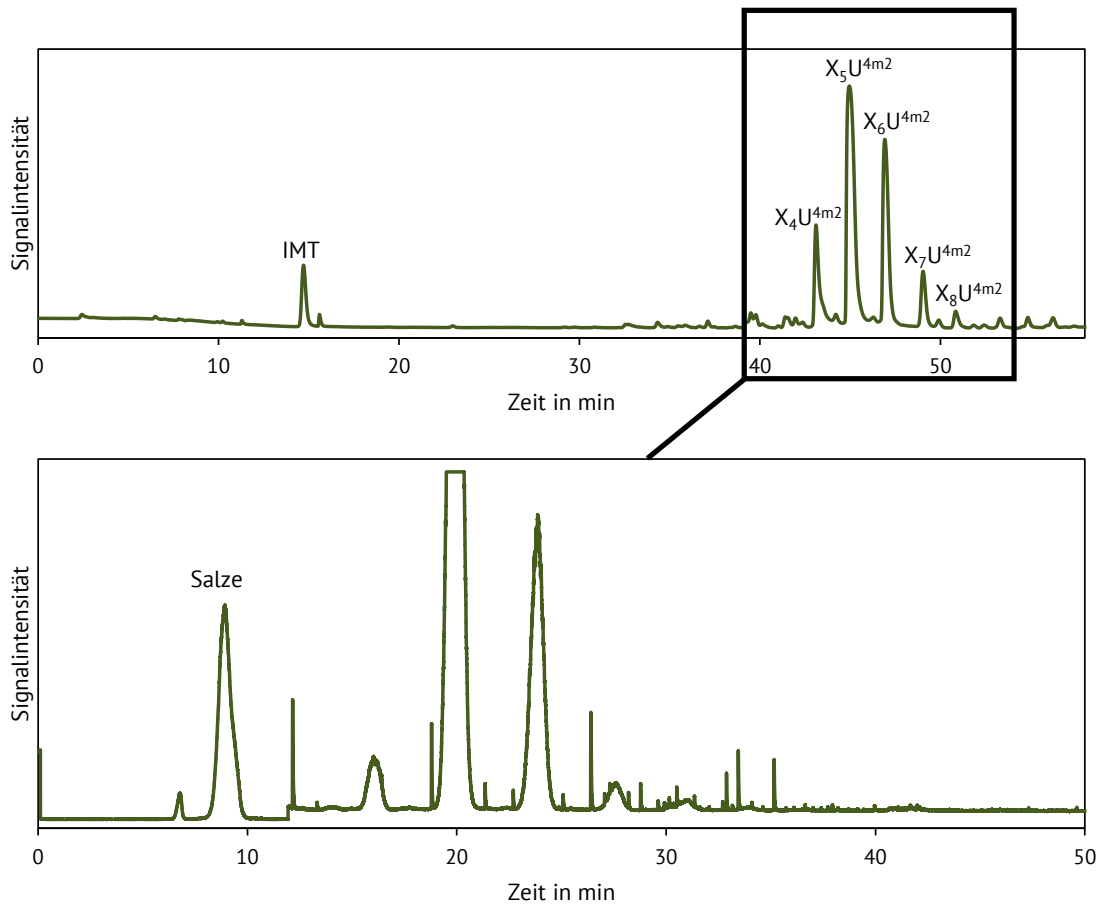


Abbildung A18: Gepulstamperometrisch detektiertes Hochleistungsanionenaustauschchromatographie-Chromatogramm des Ameisensäureeluats der Glucuronoxylanoligosaccharide nach Abtrennung der Xylooligosaccharide mittels Festphasenextraktion an einem Anionenaustauscher (oben). Das Eluat wurde mit Natonlauge neutralisiert und zur semipräparativen Fraktionierung verwendet (mittels Lichtstreuendetektor aufgenommenes Chromatogramm unten) (IMT: Isomaltotriose). Die Benennung der Glucuronoxylanoligosaccharide erfolgt gemäß Fauré *et al.* 2009.

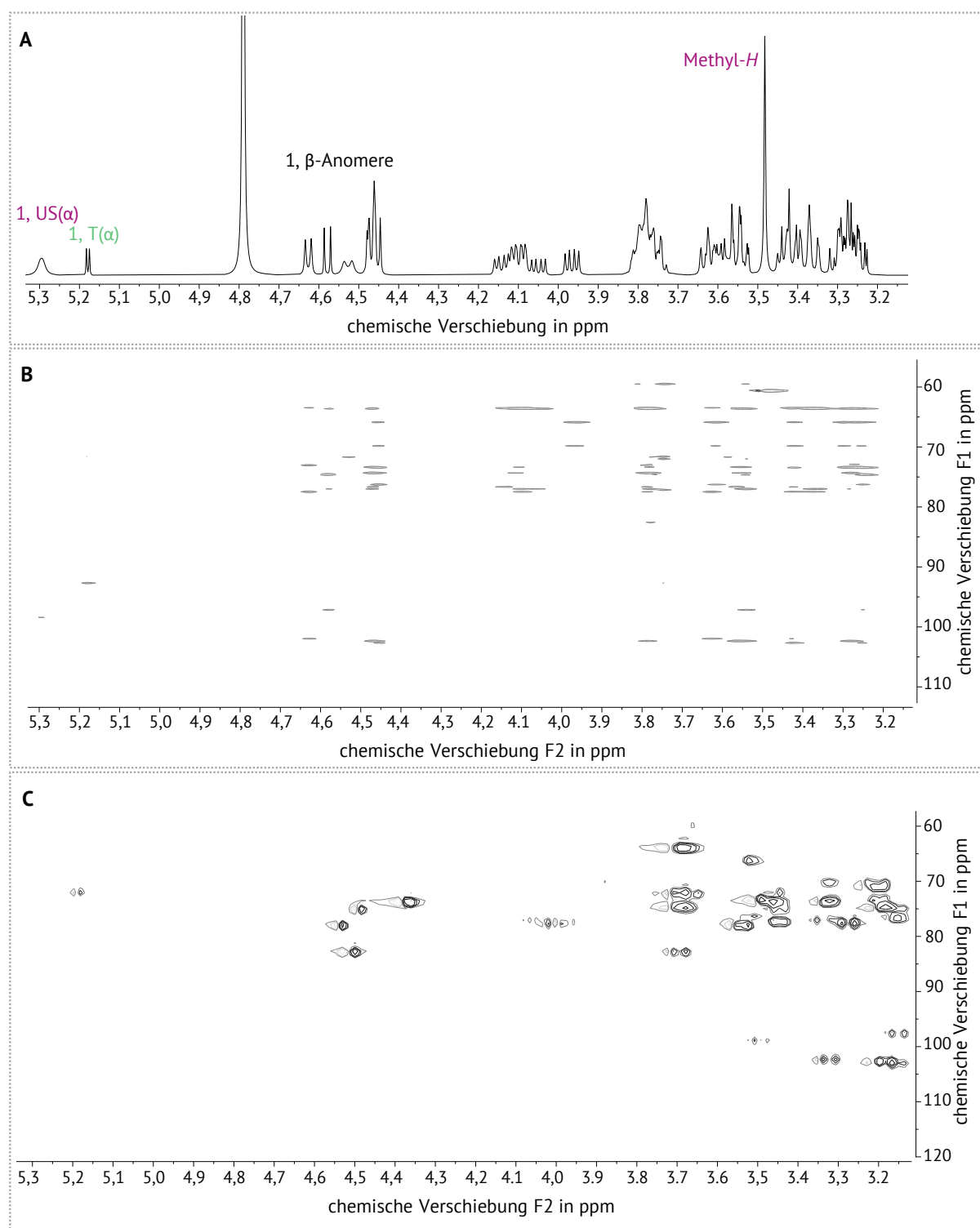


Abbildung A19: ^1H -Kernspinresonanzspektrum-Spektrum (500 MHz) (A), *Heteronuclear Single Quantum Coherence – Total Correlation Spectroscopy*-Spektrum (B) und *Heteronuclear 2 Bond Correlation*-Spektrum (C) des isolierten Glucuronoxylanstandards XU^{4m2}XXX. Alle Spektren wurde in Deuteriumoxid aufgenommen und auf das Signal von Aceton ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm) referenziert. Die zugehörigen chemischen Verschiebungen sind in Tabelle A5 gelistet.

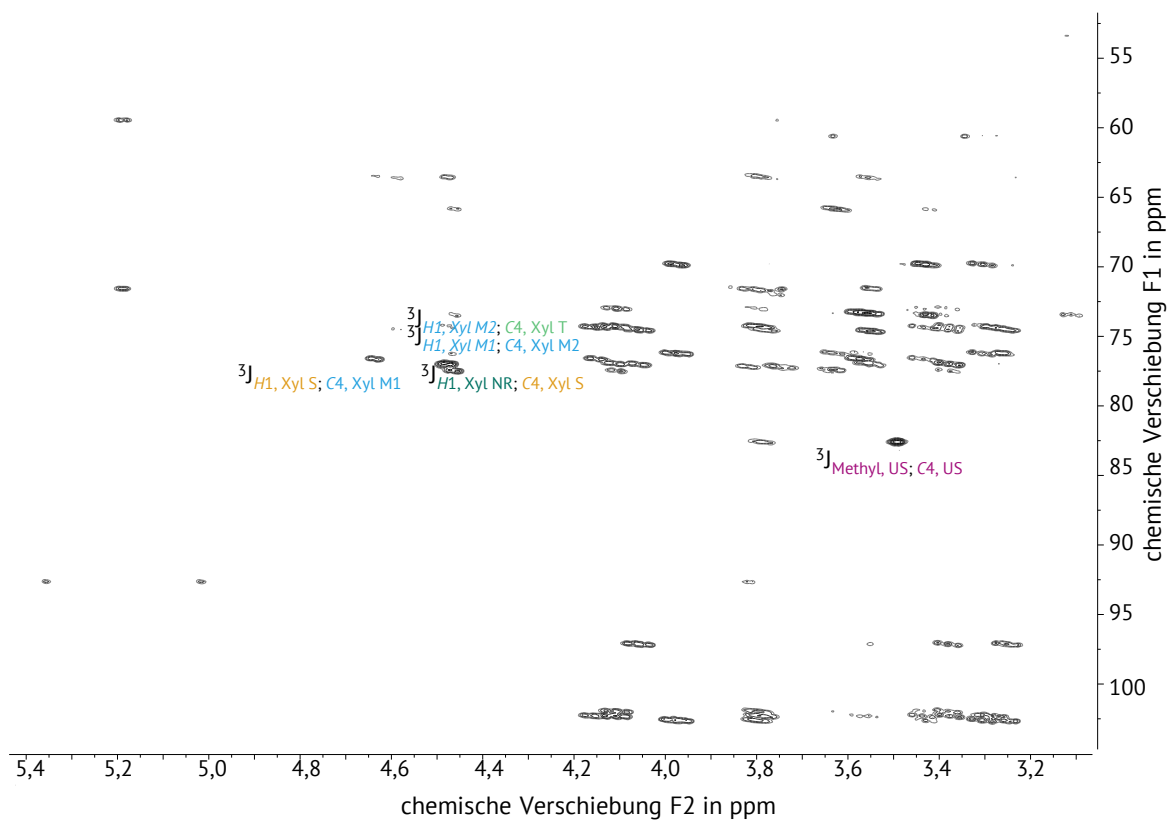


Abbildung A20: Heteronuclear Multiple Bond Correlation-Spektrum des isolierten XU^{4m2}XXX-Standards. Durch die Identifikation der entsprechenden gekennzeichneten heteronuklearen Kopplungen konnte die Reihenfolge der Xyloseeinheiten (Xyl) im Rückgrat des Oligosaccharids bestimmt sowie die Position der Methylierung der Uronsäure (US) bestätigt werden. Die Benennung der Einheiten erfolgt gemäß Abbildung 65. Das Spektrum wurde in Deuteriumoxid aufgenommen und auf das Signal von Aceton ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm) referenziert.

9.2 Tabellen

Tabelle A1: Chemische Verschiebungen der 5-(bis(3-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)furan-2-carbonsäure (36), aufgenommen in Methanol- d_4 und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 3,30/49,00$ ppm). Die folgenden Werte wurden innerhalb des durchgeführten ^1H -, sowie der verschiedenen 2D-Kernspinresonanzspektroskopie-Experimente ermittelt.

Nr.	δ_H in ppm	Anzahl der Kerne	Multiplizität	Kopplungskonstante in Hz	δ_C in ppm
1	7,29	2	t	7,5	128
2	7,39	4	t	7,6	129
3	7,58	4	dd	8,3; 1,3	127
4	-	-	-	-	143
5	-	-	-	-	142
6	7,00 – 7,05	2	m	6,7	119
7	-	-	-	-	157
8	-	-	-	-	142
9	6,94	2	d	6,6	131
10	7,00 – 7,05	2	m	6,6	118
11	6,22	1	s	-	38,6
12	-	-	-	-	147
13	7,07	1	d	2,8	114
14	5,95	1	d	3,0	110
15	-	-	-	-	143
16	-	-	-	-	163

Tabelle A2: Berechnete und experimentell ermittelte Absorptionsmaxima λ sowie die Extinktionskoeffizienten ϵ der verschiedenen betrachteten Chromophore. Als Lösungsmittel wurde jeweils konzentrierte Schwefelsäure verwendet (3PP: 3-Phenylphenol, 5FFA: 5-Formyl-2-furancarbonsäure, 4CBA: 4-Carboxybenzaldehyd, Tr: Triarylmethan)

	λ_{\max} berechnet in nm	ϵ berechnet in L/(mol×cm)	λ_{\max} experimentell in nm
5FFA + 3PP			525
5FFA + 3PP Tr⁺	604	66600	
5FFA + 3PP xanthen⁺	546	100100	
5FFA + 3PP xanthen⁺ /-SO₃H	538	106100	
5FFA + 3PP xanthen⁺ /-SO₃⁻	536	105500	
4CBA + 3PP			525
4CBA + 3PP Tr⁺	646	61800	
4CBA + 3PP xanthen⁺	528	95600	
4CBA + 3PP xanthen⁺ /-SO₃H	528	75400	
4CBA + 3PP xanthen⁺ /-SO₃⁻	525	8400	

Tabelle A3: Chemische Verschiebungen des 9-(4-carboxyphenyl)-3,6-diphenyl-9*H*-xanthen-9-ylum-Ionos (38), aufgenommen in Tetrahydrofuran-*d*₈ und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 3,58/67,57$ ppm). Die folgenden Werte wurden innerhalb des durchgeführten ¹H-, sowie der verschiedenen 2D-Kernspinresonanzspektroskopie-Experimente ermittelt.

Nr.	δ_H in ppm	Anzahl der Kerne	Multiplizität	Kopplungskonstante in Hz	δ_C in ppm
1	7,10 – 7,18	2	m	7,1; 8,3	127
2	7,22	4	t	7,6	129
3	7,89	4	bd	8,0	130
4	-	-	-	-	146
5	-	-	-	-	147
6	7,49	2	s	-	125
7	-	-	-	-	156
8	-	-	-	-	142
9	7,25	2	d	8,3	129
10	7,75	2	d	7,8	121
11	-	-	-	-	168
12	-	-	-	-	148
13	7,10 – 7,18	2	m	7,1; 8,3	129
14	7,90	2	d	7,8	131
15	-	-	-	-	131
16	-	-	-	-	168

Tabelle A4: Chemische Verschiebungen der 4-(bis(3-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)benzoesäure (39), aufgenommen in Aceton- d_6 und referenziert auf das Lösungsmittelsignal ($\delta_{H/C} = 2,05/29,84$ ppm). Die folgenden Werte wurden innerhalb des durchgeführten ^1H -, sowie der verschiedenen 2D-Kernspinresonanzspektroskopie-Experimente ermittelt.

Nr.	δ_H in ppm	Anzahl der Kerne	Multiplizität	Kopplungskonstante in Hz	δ_C in ppm
1	7,28	2	t	7,4	128
2	7,38	4	t	8,0	129
3	7,57	4	dd	8,0; 1,2	128
4	-	-	-	-	142
5	-	-	-	-	142
6	7,08	2	s	-	114
7	-	-	-	-	156
8	-	-	-	-	142
9	6,82	2	d	8,1	132
10	7,00	2	dd	8,0; 1,8	119
11	6,27	1	s	-	44,3
12	-	-	-	-	151
13	7,22	2	d	8,3	130
14	7,94	2	d	8,3	130
15	-	-	-	-	129
16	-	-	-	-	170

Tabelle A5: Kalibrierdaten zu den in Abbildung 58 gezeigten photometrischen Kalibrierungen von 5-Formyl-2-furancarbonsäure (5FFA), 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural in Abhängigkeit eines Boratzusatzes (12,5 mM). Die Kalibrierung wurde in einem Bereich von 51,4 – 438,2 mM erstellt (R^2 : Korrelationskoeffizient).

	5FFA		HMF		Furfural	
	mit Borat	ohne Borat	mit Borat	ohne Borat	mit Borat	ohne Borat ¹
mittlere Absorption	1,227	0,831	0,122	0,080	0,071	0,0056
Absorptionssteigerung durch Borat in %		47,6		53,3		1153,0
Geradensteigung	0,004940	0,003830	0,000196	0,000308	0,000015	0,000018
R^2	0,9994	0,9982	0,9958	0,9996	0,8897	0,7112

¹ Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass gemessene Absorptionen teilweise unterhalb der BG lagen, somit sind die angegebenen Ergebnisse nicht als zuverlässig zu bewerten.

Tabelle A6: Chemische Verschiebungen des isolierten und identifizierten Glucuronoxylanoligosaccharidstandards XU^{4m2}XXX gemessen in Deuteriumoxid und referenziert auf das Signal von Aceton ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Die Benennung der Einheiten erfolgt gemäß Abbildung 65. Die folgenden Werte wurden innerhalb des durchgeführten ¹H-, sowie der verschiedenen 2D-Kernspinresonanzspektroskopie -Experimente ermittelt.

$\delta_{C/H}$ in ppm Einheit	1	2	3	4	5	6	Methyl
T, α	92,7/5,18	72,1/3,54	71,6/3,75	77,2/3,75	59,5/3,74; 3,81	-	-
T, β	97,2/5,58	74,7/3,24	74,6/3,54	77,0/3,77	63,6/3,37; 4,05	-	-
M1	102/4,47	73,4/3,24	74,4/3,55	76,7/3,79	63,6/3,37; 4,05	-	-
M2	102/4,47	73,4/3,24	74,4/3,55	77,1/3,79	63,6/3,29; 4,08	-	-
S	102/4,62	73,1/3,62	77,5/3,42	77,5/3,79	56,9	-	-
NR	103/4,45	73,5/3,25	76,3/3,42	69,8/3,61	66,8/3,29; 3,97	-	-
US	98,4/5,28	71,7/3,52	73,0/3,78	82,6/3,27	nn	-	60,7/3,48

10. Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Braun, J.; Bunzel, M., Quantification of galacturonic acid in pectin-containing samples using a stable isotope dilution approach and LC-MS. *Carbohydrate Polymers* **2025**, vol. 365, 123816, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123816>.

Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M., Structural and mechanistic insights into the formation of xanthylum chromophores in uronic acid quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2026**, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c17509>.

Braun, J.; Punke, M.; Bunzel, M., Advancing total uronic acid quantification using a stable isotope dilution approach: Validation and application to plant- and algal-derived polysaccharides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2026** (submitted).

Braun, J.; Friedmann, E.; Bunzel, M., Analytical evaluation of sodium tetraborate effects on the colorimetric quantification of total uronic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2026** (submitted)

Vorträge auf Fachtagungen

Braun, J.; Bunzel, M. (2025): Entwicklung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung des Gesamturonsäuregehalts pektinhaltiger Proben mittels UHPLC-MS. Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Freiburg, Deutschland.

Braun, J.; Bunzel, M. (2025): A Stable Isotope Dilution Approach for Quantification of total uronic Acids in Dietary Fiber by LC-MS. *EPNOE 2025*, Sundsvall, Schweden.

Braun, J.; Bihlmeier, A., Friedmann, E., Bunzel, M. (2026): Vom Uronsäureabbau zur Chromophorbildung: Chemische Mechanismen der kolorimetrischen Uronsäureanalyse. Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Gießen, Deutschland.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M. (2024): Strukturaufklärung chromophorer Verbindungen innerhalb der Analyse des Gesamturonsäuregehalts im *m*-Hydroxybiphenyl-Assay. 52. *Deutsche Lebensmittelchemietage*, Freising, Deutschland.

Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M. (2024): Charakterisierung der Chromophor-Bildung bei der photometrischen Analyse von Uronsäuren nach saurem Aufschluss. 135. *VDLUFA-Kongress*, Karlsruhe, Deutschland.

Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M. (2025): Structural Characterization of chromophoric compounds within the analysis of total uronic acid contents using the *m*-hydroxybiphenyl assay. *EPNOE 2025*, Sundsvall, Schweden.

Braun, J.; Bihlmeier, A.; Bunzel, M (**2025**): Charakterisierung und Strukturaufklärung des Chromophors im *m*-Hydroxybiphenyl-Assay zur Bestimmung von Uronsäuren. 53. *Deutsche Lebensmittelchemietage*, Halle an der Saale, Deutschland.

