

# Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Analytische Chemie

## Diplom 2011

*Alexandra Hugon*

*Entwicklung  
eines quantitativen CE Verfahrens  
zur Bestimmung von Zuckern,  
die zur Abschätzung  
der intestinalen Permeabilität  
von Patienten verwendet werden*

Dozentin

Franka Kalman

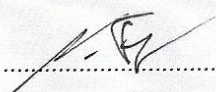
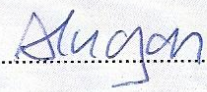
Experte

Wofgang Thorman

SI	TV
X	X

Alexandra Hugon

Titre / Titel <p style="text-align: center;"><b>Entwicklung eines quantitativen CE Verfahrens zur Bestimmung von Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden</b></p>
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele  <p>— Es soll ein quantitatives analytisches Verfahren zur simultanen Bestimmung von nicht metabolisierten Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden, aus Urin entwickelt werden.</p> <p>— Als Methode soll Kapillarelektrophorese verwendet werden.</p> <p>— Verschiedene Detektionstechniken als auch Probenvorbereitungstechniken wie z.B. Leitfähigkeitsdetektion oder UV-Detektion von derivatisierten Zuckern sollen hinsichtlich ihrer praktischen Anwendbarkeit für einen Routineeinsatz in der Diagnostik verglichen werden, ein einfaches, schnelles Probenvorbereitungsverfahren zur Analyse der Zucker aus Urin soll entwickelt werden.</p>

Délais / Termine	
Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: <b>02.05.2011</b>	Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: <b>02.09.2011</b>
Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école / Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule: <b>15.07.2011</b>	Défense orale / Mündliche Verteidigung: <b>dès la semaine 35 / ab Woche 35</b>
Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: <b>19.08.2011   12h00</b>	
Signature ou visa / Unterschrift oder Visum	
Responsable de la filière Leiter des Studiengangs: 	<sup>1</sup> Etudiant/Student: 

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive et le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.

Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

SI	TV
X	X

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2010/2011</b>	No TD / Nr. DA <b>ca/2011/35</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte Berne	Etudiant / Student <b>Alexandra Hugon</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent <b>Franka Kalman</b>	Expert / Experte (données complètes) <b>Wofgang Thorman</b>	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <input type="checkbox"/> non / nein	Leiter F820a Inselspital   Analytical Services   Drug Monitoring Murtenstrasse 35   3010 Bern	

# Entwicklung eines quantitativen CE Verfahrens zur Bestimmung von Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden

Alexandra Hugon

## Ziel des Projekts

Es soll ein quantitatives Kapillarelektrophorese- (CE) Verfahren zur simultanen Bestimmung von 3 nicht metabolisierenden Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden, aus Urin entwickelt werden. Dabei soll der Probenvorbereitungsaufwand so gering wie möglich gehalten werden und ein LOD von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose und von  $3 \cdot 10^{-6}$  M für Laktulose in Urin erreicht werden.

## Methoden | Experimente | Resultate

Verschiedene Trenn- und Detektionsmethoden wurden für die Laktulose, Rhamnose und Xylose Bestimmung in Urin getestet. CE-Systeme mit anschliessender Leitfähigkeits- oder indirekter UV-Detektion konnten die Zucker trennen gaben aber ein ungenügendes Detektionslimit von ungefähr  $3 \cdot 10^{-1}$  M.

APTS-Derivatisierung der Zucker und ihre Trennung mit verschiedenen CE-Systemen ermöglichte, Rhamnose & Xylose mit UV und LIF mit einem LOD von  $0.8 \cdot 10^{-6}$  M bzw.  $5 \cdot 10^{-9}$  M zu detektieren. Laktulose hat ein ca. 20 x kleineres LOD, d.h. mit der LIF-Detektion ist es genügend für das Ziel dieser Arbeit. Optimierung der Reaktionsbedingungen ( $T^\circ$ , Zeit, ...) verbessert die Reaktionsausbeute. Laktulose migriert in Multi-Peaks, was seine Quantifizierung schwierig macht. Des weiteren muss die Spezifität der Methode verbessert werden, da mögliche Urinmatrixzucker gleichzeitig mit Rhamnose migrieren. Galaktose, ein Monosacharidbaustein von Laktulose, kann effizient mit APTS reagieren, d.h. es wäre möglich nach Laktulosespaltung Galaktose zu detektieren.

Diplomarbeit  
| 2011 |

Studiengang  
*Life Technologies*

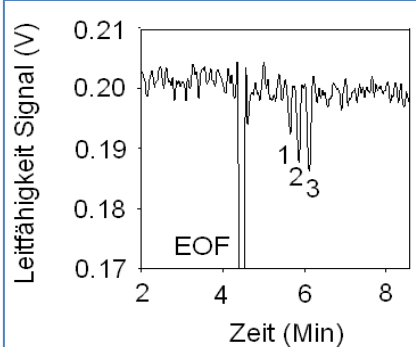
Vertiefungsrichtung  
*Analytische Chemie*

Verantwortliche/r Dozent/in  
*Franka Kalman*  
*Franka.Kalman@hevs.ch*

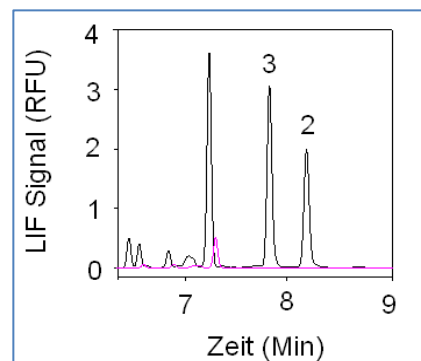
Partner  
*Dr. Wolfgang Thormann*  
*Institut für Klinische*  
*Pharmakologie und Viszerale*  
*Forschung Universität Bern*

HES-SO Wallis  
Route du Rawyl 47  
1950 Sitten

Tel. 027 606 85 11  
Web [www.hevs.ch](http://www.hevs.ch)



CE-Leitfähigkeitselektropherogramm einer Mischung aus 3 Zuckern : Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3), je 0.3 mg / ml in  $H_2O$ . RB : 50 mM NaOH + 22.5 mM  $Na_2HPO_4$  pH 12.4



CE-LIF-Elektropherogramm : APTS-derivatisierter Urin (schwarz) eines Patienten 5 Stunden nach Zuckerverabreichung und Blank (pink). RB : 50 mM Phosphat pH 7.5, 3 ; Rhamnose (2), Xylose (3),



# Entwicklung eines quantitativen CE Verfahrens zur Bestimmung von Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden

Alexandra Hugon

## Ziel des Projekts

Es soll ein quantitatives Kapillarelektrophorese- (CE) Verfahren zur simultanen Bestimmung von 3 nicht metabolisierenden Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden, aus Urin entwickelt werden. Dabei soll der Probenvorbereitungsaufwand so gering wie möglich gehalten werden und ein LOD von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose und von  $3 \cdot 10^{-6}$  M für Laktulose in Urin erreicht werden.

## Methoden | Experimente | Resultate

Verschiedene Trenn- und Detektionsmethoden wurden für die Laktulose, Rhamnose und Xylose Bestimmung in Urin getestet. CE-Systeme mit anschliessender Leitfähigkeits- oder indirekter UV-Detektion konnten die Zucker trennen gaben aber ein ungenügendes Detektionslimit von ungefähr  $3 \cdot 10^{-1}$  M.

APTS-Derivatisierung der Zucker und ihre Trennung mit verschiedenen CE-Systemen ermöglichte, Rhamnose & Xylose mit UV und LIF mit einem LOD von  $0.8 \cdot 10^{-6}$  M bzw.  $5 \cdot 10^{-9}$  M zu detektieren. Laktulose hat ein ca. 20 x kleineres LOD, d.h. mit der LIF-Detektion ist es genügend für das Ziel dieser Arbeit. Optimierung der Reaktionsbedingungen ( $T^\circ$ , Zeit, ...) verbessert die Reaktionsausbeute. Laktulose migriert in Multi-Peaks, was seine Quantifizierung schwierig macht. Des weiteren muss die Spezifität der Methode verbessert werden, da mögliche Urinmatrixzucker gleichzeitig mit Rhamnose migrieren. Galaktose, ein Monosacharidbaustein von Laktulose, kann effizient mit APTS reagieren, d.h. es wäre möglich nach Laktulosespaltung Galaktose zu detektieren.

Diplomarbeit  
 | 2011 |

Studiengang  
 Life Technologies

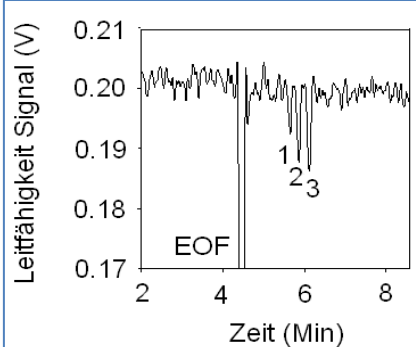
Vertiefungsrichtung  
 Analytische Chemie

Verantwortliche/r Dozent/in  
 Franka Kalman  
 Franka.Kalman@hevs.ch

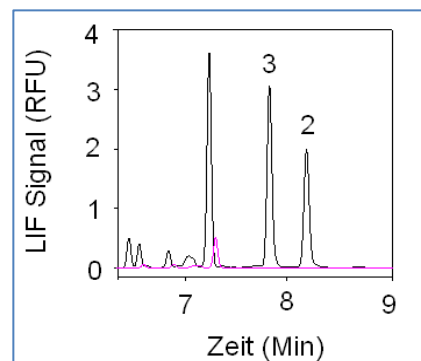
Partner  
 Dr. Wolfgang Thormann  
 Institut für Klinische  
 Pharmakologie und Viszerale  
 Forschung Universität Bern

HES-SO Wallis  
 Route du Rawyl 47  
 1950 Sitten

Tel. 027 606 85 11  
 Web www.hevs.ch



CE-Leitfähigkeitselektropherogramm einer Mischung aus 3 Zuckern : Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3), je 0.3 mg / ml in  $H_2O$ . RB : 50 mM NaOH + 22.5 mM  $Na_2HPO_4$  pH 12.4



CE-LIF-Elektropherogramm : APTS-derivatisierter Urin (schwarz) eines Patienten 5 Stunden nach Zuckerverabreichung und Blank (pink). RB : 50 mM Phosphat pH 7.5, 3 ; Rhamnose (2), Xylose (3),

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Zielsetzung.....	3
1.2. Formelsammlung.....	3
1.3. Abkürzungen.....	4
<b>2. Theoretischer Teil .....</b>	<b>5</b>
2.1. Intestinale Permeabilität .....	5
2.2. Kohlenhydratanalyse.....	6
2.2.1. Kohlenhydrate.....	6
2.2.2. Analytische Methoden zur Bestimmung von Kohlenhydraten .....	7
2.3. Kapillarelektrophorese von Kohlenhydraten .....	10
2.3.1. Detektion ohne Probenvorbereitung .....	10
2.3.2. Detektion nach Derivatisierung.....	12
2.3.3. Kapillarelektrophorese-Theorie und Gleichungen.....	16
2.3.4. Instrumentierung .....	17
2.3.5. Elektrophoretische Mobilität .....	18
2.3.6. Elektroendosmotische Mobilität.....	19
2.3.7. Effektive Mobilität .....	20
2.3.8. Optimierung .....	21
2.3.9. Strategie.....	22
<b>3. Experimenteller Teil.....</b>	<b>24</b>
3.1. Material und Methode.....	24
3.1.1. Chemikalien .....	24
3.1.2. Trennpuffer und Lösungen .....	25
3.1.3. Geräte.....	28
3.2. Probenvorbereitung.....	28
3.2.1. APTS-Derivatisierung.....	28
3.3. CZE Analyse .....	30
3.3.1. Analysensystem 1 (PrinCE, <i>uncoated</i> , 25 µm) .....	30
3.3.2. Analysensystem 2 (PA800, <i>uncoated</i> , 50 µm).....	31
3.3.3. Analysensystem 3 (PA800, <i>uncoated</i> , 20 µm).....	31
3.3.4. Analysensystem 4 (PA800, <i>coated</i> , 50 µm).....	32
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>33</b>

4.1.	Leitfähigkeit und indirekte UV-Detektion .....	33
4.1.1.	PDC Puffersysteme (26) .....	33
4.1.2.	NaOH und LiOH Puffersysteme.....	35
4.1.3.	Diskussion.....	37
4.2.	APTS- Derivatisierung mit UV Detektion .....	38
4.2.1.	Analyse nach Trennung mit einer <i>uncoated capillary</i> .....	38
4.2.2.	Analyse mit einer N-CHO <i>coated capillary</i> .....	40
4.2.3.	Diskussion.....	41
4.3.	LIF Detektion nach APTS-Derivatisierung .....	42
4.3.1.	Derivatisierungssysteme .....	42
4.3.2.	Optimierung der Bedingungen zur Laktulose Derivatisierung / Analyse .....	45
4.3.3.	Untersuchung weiterer Mono- und Disaccharide .....	51
4.3.4.	Diskussion.....	55
4.4.	Urinanalyse .....	57
4.4.1.	Eichkurve in Wasser.....	60
4.4.2.	Eichkurve in Urin .....	63
4.4.3.	Diskussion.....	63
4.1.	Stabilität der Probe.....	65
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerungen und Perspektiven.....</b>	<b>69</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Zielsetzung

Die quantitative Bestimmung der intestinalen Permeabilität mit Differenzialausscheidung nach Zuckerverabreichung findet in der Gastroenterologie vielseitige Verwendung. Verschiedene analytische Techniken ermöglichen die dazu nötige Zuckerquantifizierung durchzuführen. Viele Publikationen haben gezeigt, dass man mit Kapillarelektrophorese (CE) effizient und schnell Zucker trennen und empfindlich detektieren kann. CE findet oftmals erfolgreich Anwendung für die Analyse von Molekülen in sehr komplexen Matrices wie Urin, da aufgrund der hohen Trenneffizienz der Matrixbestandteile und der Analyten erreicht werden kann und da im Gegensatz zur HPLC keine Interaktion mit einer stationären Phase stattfindet, d.h. es treten relative wenige Memoryeffekte auf.

Die empfindliche und präzise Analyse von Zuckern stellt eine grosse Herausforderung dar, da sie strukturell sehr ähnlich sind, keine Chromophore tragen und sehr hydrophile Eigenschaften haben.

Um Zucker zu trennen und zu detektieren, sind verschiedene Trennstrategien und Detektionsarten mit oder ohne Derivatisierung möglich. Für die Routineanalyse sind Methoden ohne Derivatisierung (z.B. UV direkt mit Boratkomplex, UV indirekt, Leitfähigkeit, arbeit bei hohen pH-Werten) interessant, da der Probenvorbereitungsschritt der Derivatisierung entfällt, was eine schnelle Analyse erlaubt, aber auch ein geringes Fehlerpotential aufweist. Nachteil ist die im Fall von Zuckern geringe Nachweisempfindlichkeit. Durch Derivatisierung (z.B. mit APTS oder ANTS Derivatisierung), wodurch Chromophore oder Fluorophore am Zucker angehängt werden, ist es möglich, sehr geringe Mengen an Zuckern (pmol) zu bestimmen.

Die Aufgabe dieser Bachelorarbeit ist es, eine kapillarelektrophoretische Methode zu entwickeln, die eine gleichzeitige Quantifizierung von Rhamnose, Xylose und Laktulose in Urin zulässt und routinetauglich ist. Es soll ein Detektionslimit von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose und von  $3 \cdot 10^{-6}$  M für Laktulose erreicht werden. Dabei soll der Probenvorbereitungsaufwand so gering wie möglich gehalten werden.

Verschiedene Detektionsmethoden sollen getestet und miteinander verglichen werden. Als erstes soll die Leitfähigkeitsdetektion getestet werden, da sie universell ist und keine spezielle Probenvorbereitung erfordert. Der Nachteil dieser Methode ist eine geringe Empfindlichkeit, die eventuell nicht dem Ziel dieser Arbeit entspricht. Parallel soll die indirekte UV Detektion getestet werden. Wenn diese zwei Detektionsmethoden nicht zum Ziel führen, soll die Zuckerderivatisierung mit verschiedenen Chromophoren und anschliessender UV- oder LIF-Detektion getestet werden.

## 1.2. Formelsammlung

Tabelle 1: Formelsammlung

$E$	elektrische Feldstärke [V/cm]
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante des Puffer [ $C^2/Jm$ ]
$L_{det}$	Kapillarlänge bis zum Detektor [cm]
$L_{tot}$	totale Kapillarlänge (Kapillarlänge vom Inlet bis Outlet) [cm]



## Abkürzungen

$\eta$	Pufferviskosität [Ns/cm <sup>2</sup> ]
$q$	Elektrische Teilcheladung [C]
$r_{st}$	STOKEscher Radius [ $\mu$ m]
$t_M$	Migrationszeit [s]
$V$	elektrische Spannung [V]
$v_{eff}$	effektive Migrationsgeschwindigkeit des Analyt
$v_{EOF}$	Wanderungsgeschwindigkeit des EOF [cm/s]
$v_{ep}$	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [cm/s]
$\mu_{EOF}$	elektrophoretische Mobilität des EOF [cm <sup>2</sup> /Vs]
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität [cm <sup>2</sup> /Vs]
$\zeta$	Zeta-Potential [V]

### 1.3. Abkürzungen

**Tabelle 2: Abkürzungen und Definitionen**

ANTS	<i>8-amminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid</i>
APTS	<i>8-amminopyren-1,3,6-trisulfonic acid</i>
Ara	Arabinose
RB	<i>Background Electrolyte</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CTAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
EI	<i>Electron Impact</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
EOF	Elektro(end)oosmotischer Fluß
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
Frau	Fruktose
Gal	Galaktose
Gluc	Glukose
GC	<i>Gaz Chromatography</i> , Gaschromatographie
HPAEC	<i>High Performance Ion-Exchange Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographi
ID	Innerer Durchmesser
LIF	<i>Laser Induced Fluorescence</i> , Laserinduzierter Frluoreszenz
LOD	<i>Limit of Detection</i> , Detektionslimit
Man	Mannose
MS	<i>Mass Spectrometry</i> , Massenspektrometrie
NMP	<i>1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone</i>
PMP	<i>1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone</i>
Rha	Rhamnose
RB	<i>Running Buffer</i>
RI	Refractivity Index, Brechungsindex
THF	Tetrahydrofurane
TTAB	<i>Tetradecyl-trimethyl-ammonium bromide</i>
UV	Ultraviolett
Xyl	Xylose

## 2. Theoretischer Teil

Dieses Kapitel behandelt die theoretischen Grundlagen, die für diese Bachelorarbeit notwendig sind. Die intestinale Permeabilität, die Kohlenhydratanalyse und besonders die Mono- und Disaccharid-Analyse, die Kapillarelektrophorese, Möglichkeiten und Strategien für eine quantitative Bestimmung von Laktulose, Rhamnose und Xylose werden behandelt.

### 2.1. Intestinale Permeabilität

Der Test für die intestinale Permeabilitätsbestimmung ist eine nicht invasive diagnostische Prozedur zur Beurteilung der Differenzialurinausscheidung nach oraler Zuckerverabreichung. Er findet Anwendung in Bereichen der Gastroenterologie, Toxikologie oder der Untersuchung von Unterernährungsmechanismen (1).

Permeabilität bezeichnet die Durchlässigkeit einer Membran für einen gelösten Stoff mit unmittelbarer Diffusion. Die Darmschleimhaut ist im Vergleich zu ihrem Grundzustand durchlässiger für intakte Zucker und Proteine wenn die Mukosagrenze beschädigt ist. Dies kann z.B. durch Diabetes oder die Abdominal- und Krohn-Krankheit verursacht werden.

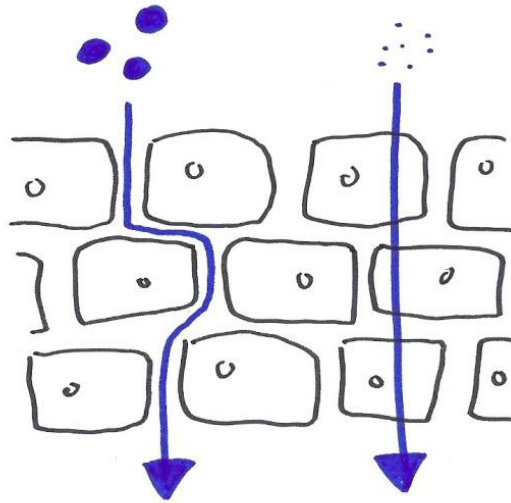
Verschiedenen Faktoren wirken auf die Urinausscheidung von Zuckern. Es gibt premukosale Faktoren, wie der aktuelle Flüssigkeitsgehalt im Magen, Magenentleerung, der aktuelle Flüssigkeitsgehalt im Darm, bakterielle Abbauaktivität. Es gibt auch mukosale Faktoren wie Permeationsweg oder Darmblutfluss und schliesslich auch postmukosale Faktoren wie Metabolismus und endogene Produktion, Renalfunktion, Zeit und Vollständigkeit von Urinsammlung oder analytische Leistungen. Wenn unhydrolisierte Di- und Monosaccharide zusammen aufgenommen werden, wirken alle diese Faktoren auf die Urinausscheidung. Premukosale und postmukosale Faktoren wirken auf Mono- und Disaccharide gleichermassen, folglich haben sie keinen Einfluss auf das 5-Stunden Differenzialurinausscheidungsverhältnis von Mono- zu Disacchariden. Das Laktulose / Mannitol Verhältnis wird oft als ein spezifischer Index für intestinale Permeabilität benützt (1).

Es gibt zwei Möglichkeiten für die Permeation von Stoffen und im besonderen von Zuckern durch Darmmukosa. Kleinere Moleküle wie Monosaccharide gehen durch die Mukosa auf einer transzellulären „Route“ durch kleine Poren, und grössere Moleküle wie Disaccharide gehen durch die Mukosa auf einer parazellulären „Route“ durch größere Poren. Diese zwei Möglichkeiten sind in Abbildung 1 illustriert (2).

Laktulose, Rhamnose und Xylose sind für die Bestimmung der intestinalen Permeabilität interessant. Da diese zwei Monosaccharide eine unterschiedliche intestinale Absorption haben kann ihr Mengenverhältnis bestimmt werden:

- Laktulose ist ein Disaccharid und geht langsam durch die parazelluläre „Route“.
- Rhamnose ist ein Monosaccharid und diffundiert meist auf transzelluläre passive Art durch die wässrigen Poren mit einer höheren Rate als Laktulose.
- Xylose ist auch ein Monosaccharid verwendet aber einen Carrier-vermittelten Transport (3).

Abbildung 1: parazelluläre Diffusion von grösseren Molekülen (links) und transzelluläre Diffusion von kleineren Molekülen (rechts) durch die Mukosa



Die Bestimmung der intestinalen Permeabilität hat viele verschiedene Anwendungen, am meisten in der Gastroenterologie als Diagnostik für gastrointestinale Krankheiten, aber auch zur Bestimmung von Drogen- und Toxineinflüssen, oder bei Unterernährung. Dieser Test ist eine nicht invasive Prozedur, die eine invasive Erforschung des Darms antizipiert oder ersetzt. Differenzialurineausscheidung von Mono- und Disacchariden ermöglicht, mehr als 90% von Patienten mit der Crohn-Krankheit zu diagnostizieren. Andere Krankheiten wie Giardiasis, Diabetes, Durchfallkrankheiten mit Beschädigungen der Magenschleimhaut oder Rotavirus Infektion sind auch oft mit erhöhter intestinaler Permeabilität verbunden (1).

## 2.2. Kohlenhydratanalyse

Kohlenhydrate spielen eine entscheidende Rolle in der Biotechnologie, in der Pharmazie und in der Ernährungstechnologie. Die Entwicklung von angemessenen analytischen Strategien und Techniken ist notwendig zur effizienten Kohlenhydratuntersuchung (4). Die verwendeten Zucker für den Test der intestinalen Permeabilität dieser Arbeit sind zwei Monosaccharide und ein Disaccharid. Einige ihrer physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

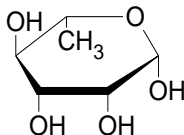
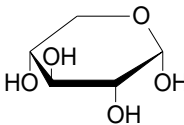
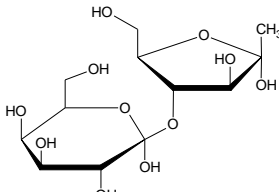
### 2.2.1. Kohlenhydrate

Von allen organischen Stoffen auf der Erde sind Zucker, oder Kohlenhydrate, nicht nur am weitesten verbreitet, sondern sie kommen auch in sehr grossen Mengen vor. Kohlenhydrate sind polyhydroxylierte Aldehyde oder Ketone, die in viele Lebensvorgänge involviert sind. Kohlenhydrate haben die folgenden wichtigen Funktionen:

- Sie dienen als Energiespeicher, Brennstoff und metabolische Zwischenprodukte
- Sie sind strukturelle Elementen in der Zellwand von Bakterien und Pflanzen und im Exoskelett der Arthropoden
- Sie sind integraler Bestandteil von Glycoproteinen und Glycolipiden
- Sie spielen Schlüsselrollen in *cell-to-cell* Erkennungsprozessen (5)

Die Kohlenhydrate sind in Monosaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide eingeteilt. Monosaccharide sind Kohlenhydrate die mit 1 Kohlenhydratbaustein aufgebaut sind, Oligosaccharide haben weniger als 10 Kohlenhydratbausteine und Polysaccharide mehr als 10. Die Eigenschaften der Polysaccharide sind unterschiedlich von denjenigen der Mono- und Oligosaccharide, sie sind z.B. oftmals schlechter löslich in Wasser, sie schmecken nicht süß und sind reaktionsträger. Bekannte Vertreter sind Stärke, Cellulose und Pektin (6). Die Eigenschaften und die Struktur von Rhamnose, Xylose und Laktulose sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Rhamnose-, Xylose- und Laktulose-Eigenschaften: Name, Vorkommen, Struktur, molare Masse (g / mol), pK<sub>a</sub>**

Zucker	Vorkommen	Struktur	MM	pK <sub>a</sub>
<b>L-Rhamnose</b> $C_6H_{12}O_5$	Pflanzengummi, Pflanzenschleime, Glykoside		164.16	12.04
<b>D- Xylose</b> $C_5H_{10}O_5$	Xylane, Hemicellulosen, Pflanzengummi, Glykoside		150.13	12.79
<b>Laktulose</b> $C_{12}H_{22}O_{11}$	Reversionsprodukt der Laktose		342.30	12.14

## 2.2.2. Analytische Methoden zur Bestimmung von Kohlenhydraten

Aufgrund der grossen Verbreitung und vielseitigen Rolle der Kohlenhydrate erlangt ihre Analyse eine mehr und mehr steigende Wichtigkeit. In den letzten Jahren wurde die Quantifizierung von Mono- und Disacchariden mit der Entwicklung von neuen Technologien immer empfindlicher, schneller und präziser (7).

### 2.2.2.1. Kolorimetrie

Sehr einfache Bestimmungsmethoden von Zuckern basieren auf kolorimetrischen Messungen. Die Zucker reagieren mit spezifischen Reagenzien und bilden farbige Reaktionsprodukte. Diese können dann spektrophotometrisch gemessen werden. Kolorimetrische Methoden basieren auf der Detektion von kolorierten Reaktionsprodukten, nach chemischen oder enzymatischen Reaktionen. Diese Methodik ermöglicht z.B. ein Detektionslimit von  $1 \cdot 10^{-5}$  M für Laktulose (8). Die Methodik ist einfach, quantitativ, billig und schnell (viele Proben können gleichzeitig analysiert werden). Ihr Nachteil ist, dass Zucker in Mischungen bei der spektrophotometrischen Messung interferieren und damit die Richtigkeit der Ergebnisse nicht genügend ist und eine Quantifizierung der einzelnen Zucker ist nicht möglich.

#### 2.2.2.2. Chromatographie (LC)

Mit chromatographischen Methoden können die in Mischungen vorhandenen Zucker analysiert werden und anschliessend mit verschiedenen Trenn- und Detektionsmethoden quantifiziert / detektiert werden. Besonders die Hochleistung-Flüssigchromatographie, in Englisch *high performance liquid chromatography* (HPLC), ermöglicht hohe Auflösung und effiziente Trennungen, benötigt allerdings im Vergleich zur Kolorimetrie teurere Geräte.

##### Trennung

Eine weitverbreitete Methode zur Zuckertrennung basiert auf ihrer Trennung als negativ geladene Moleküle bei sehr hohen pH-Werten (grösser als pH 12) mittels der Anionenaustauschchromatographie. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass zur Arbeit bei den hohen pH spezielle pH stabile HPLC Anlagen nötig sind, die im Vergleich zu konventionellen Anlagen sehr teuer sind. Als Eluent werden Wasser / Salz und Basengemische (NaOH) verwendet. Gebräuchlich sind auch relativ hydrophile Amino- oder Hyliphasen mit Wasser/Acetonitril Eluenten (9).

*High Performance Ion-Exchange Chromatography* (HPAEC) ist eine sehr verbreitete Technik zur Zuckerbestimmung, es werden optimierte Systeme zur Zuckertrennung und Detektion von der Firma Dionex angeboten. Zucker sind im stark alkalischen pH Bereich negativ geladen und können somit mit einem Anionenaustauscher getrennt werden. Die Trenneffizienz reicht jedoch nicht aus, um Laktulose und Laktose zu trennen. *Ion-exchange chromatography* ist oft mit *Pulsed Amperometric Detector* (PAD) gekoppelt. Das Detektionslimit von Laktulose kann  $1.2 \cdot 10^{-6}$  M erreichen. (8) Die amperometrische Detektion hat jedoch für komplexe Proben und komplexe Probenmatrices Nachteile: nicht abgetrennte Aminosäuren, Peptide oder organische Säuren können interferieren, wenn sie bei gegebenem Potential oxydierbar sind. Die Signalintensität innerhalb einer Analytklasse ist nicht uniform (Abhängig vom spezifischen Oxydationspotential), d.h. jeder Analyt braucht eine spezifische Kalibrierkurve, d.h. es entsteht ein hoher Aufwand in der Routineanalytik. Aus diesem Grund ist diese Art der Trennung und Detektion für das Ziel dieser Arbeit nicht zweckmässig.

##### Detektion

Nach Auftrennung müssen die Zucker detektiert werden. Die in der HPLC / Chromatographie übliche UV-VIS Detektion von ca. 190–700 nm kann für native Zucker nicht verwendet, da sie keine chromophoren Gruppen tragen, d.h. diese kommt erst nach Derivatisierung mit UV-aktiven Reagenzien zur Anwendung. Es existieren in der Literatur viele Derivatisierungsreagenzien für Zucker, die im Allgemeinen eine sehr empfindliche Detektion der Zucker zulassen. Nachteil ist der zusätzliche Probenvorbereitungsschritt, der zu einer konstanten oder 100%-igen Ausbeute optimiert werden muss und die Analysenzeit in der Routine verlängert. Des weiteren kann die Reaktionsrate / Ausbeute für verschiedene Zucker unterschiedlich sein.

Die gebräuchlichste direkte Detektionsmethode für Zucker ist die Brechungsindexdetektion (*refractivity index* oder RI), da keine Derivatisierung der Zucker nötig ist. Jedoch ist diese Methode relativ unempfindlich sondern temperaturempfindlich und es kann keine Gradientenelution verwendet werden, was bei komplexen Zuckergemischen zu sehr langen Retentionszeiten führen kann (9). Dieser Detektor ist eine interessante Lösung für Moleküle ohne einen Chromophor und Fluorophor, da er ein universeller Detektor ist. Die Nachteile von RI sind eine beschränkte Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-VIS Detektion, die Inkompatibilität mit Gradient Elution und die grosse Empfindlichkeit auf Temperatur- und Flussveränderungen im chromatographischen System.



Der *evaporating light scattering detector* (ELSD) ist eine andere übliche Detektionsart für Zucker (9). Dieser Detektor ist stabiler und empfindlicher als ein RI-Detektor und ist auch gradientenkompatibel. Ein wichtiger Nachteil ist die Nichtlinearität zwischen Detektorsignal und Probenkonzentration im Bereich höherer Konzentrationen.

Massenspektrometrie (MS) ist eine selektive und empfindliche Detektionsmethode, die keine Derivatisierung erfordert. Verschiedene Ionisationsmethoden wie *electrospray ionization* (ESI) oder *electron impact ionization* (EI) existieren. Ein MS-Gerät ist jedoch teuer und für diese Arbeit nicht verfügbar (8). Des weiteren ist eine präzise Quantifizierung mit MS nur sehr schwer und unter hohem Aufwand zu erreichen. Eine Arbeit über einer LC-MS Methode für die Evaluation der intestinale Permeabilität hat eine Detektionslimit von  $3 \cdot 10^{-5}$  für Lactulose ermöglicht (10).

### 2.2.2.3. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Gaschromatographie (GC) ist eine empfindliche (Laktulose LOD  $\approx 1.5 \cdot 10^{-6}$  M), spezifische und reproduzierbare Methode zur präzisen Bestimmung von Zuckern. Mit GC kann man sehr effiziente Trennungen erhalten und kann oftmals empfindlicher als in der HPLC detektieren. Der Hauptnachteil der GC ist, dass die Zucker derivatisiert werden müssen, was die Analyse aufwendig und lang macht. Deshalb wird diese Methode für Routineanalysen nur selten gebraucht (8).

### 2.2.2.4. Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese (CE) ist die Methode der Wahl für die Analyse von geladenen hydrophilen Mono- und Oligosacchariden, mit vielen verschiedenen Trennmechanismen und Detektionsarten. CE verwendet ein einfaches Gerät, hat eine hohe Trennungseffizienz, ist meist schnell und ermöglicht eine Minimierung von Eluent-, Proben- und Solventvolumina. Trotzdem ist die CE nicht eine offensichtliche Wahl, weil sie eine Technik zur Trennung von geladenen Analyten ist (nur geladenen Moleküle wandern im elektrischen Feld). Einfache Kohlenhydrate sind bei üblichen pH Werten ungeladen. Folglich sind die elektrophoretischen Methoden auf permanente oder dynamische chemische Veränderungen der Zucker angewiesen. Um neutrale Kohlenhydrate in geladene Moleküle zu verändern, gibt es verschiedene Strategien: Ionisierung über dem  $pK_a$  der Hydroxylgruppen, meist über pH 12, Bildung von z.B. Borat-Komplexen oder Derivatisierung. Für eine empfindliche Detektion wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie direkte und indirekte UV-, RI-, oder Fluoreszenz-Detektion (4).

### 2.2.2.5. Zusammenfassung

Tabelle 4 fasst die verschiedenen analytischen Methoden zur Zuckerbestimmung zusammen:

**Tabelle 4: analytische Methode, Vorteile und Nachteile zur Kohlenhydratanalyse, Bemerkungen und Möglichkeiten bezüglich des Einsatzes für diese Arbeit, Detektionslimit (LOD) von Laktulose.**

Methode	Vorteil	Nachteil	Bemerkungen	LOD von Laktulose
GC-MS	Empfindlich	lange Probenvorbereitung (Derivatisierung)	Gerät für Routine nicht optimal, gerät für dieser Arbeit nicht verfügbar	$1.5 \cdot 10^{-6}$ M (8)
LC-RI	keine Probenvorbereitung universell	beschränkte Empfindlichkeit, Gradientelution nicht möglich, empfindlich auf Temperatur- und Flussveränderungen	geringe Empfindlichkeit	$50 \cdot 10^{-6}$ M (8)
HPAEC-PAD	Empfindlich, spezifisch, keine Probenvorbereitung	Interferenzen, jeder Analyt braucht eine Kalibrierungskurve	geringe Empfindlichkeit	$1.2 \cdot 10^{-6}$ M (8)
LC-ELSD	stabiler und empfindlicher als RI-Detektor	Unlinearität zwischen Detektorsignal und Probenkonzentration,	Detektor nicht vorhanden (kostet ca 30'000)	$1.2 \cdot 10^{-6}$ (11)
LC-MS	Keine Derivatisierung, Empfindlich und schnell (10)	teures Gerät	kein Gerät vorhanden	$3 \cdot 10^{-5}$ (10)
CE	hohe Trennungseffizienz, kurze Analysezeit, kleine Volumina	CE ist üblich eine Methode für geladene Analyte, meist UV Detektion	interessante Möglichkeiten	Hängt von Detektionsmethode ab

## 2.3. Kapillarelektrophorese von Kohlenhydraten

Kriterium für die Wahl der CE und Detektionsmethode für diese Arbeit soll ein LOD kleiner als  $3 \cdot 10^{-6}$  M (Laktulose) und  $6 \cdot 10^{-6}$  M (Rhamnose und Xylose) sein. Die Methode muss die 3 Saccharide gut trennen um ihre präzise Quantifizierung zu ermöglichen und wenn möglich keine lange Probenvorbereitung haben, da die Methode in der Routine anwendbar sein soll.

### 2.3.1. Detektion ohne Probenvorbereitung

#### 2.3.1.1. direkte UV Detektion

UV Detektion ist gleich der HPLC die gebräuchlichste Detektionsmethode in der CE und ist in den meisten kommerziellen Geräten eingebaut. Ihre Anwendung für Kohlenhydratanalyse ist limitiert, da die meisten Kohlenhydrate kein Chromophor haben.

### 2.3.1.2. indirekte UV Detektion

Indirekte Detektionsmethoden sind interessante Alternativen zur Detektion von Molekülen ohne Chromophor. Um die Saccharide zu detektieren, kann ein UV absorbierender Puffer benutzt werden. Dieser Puffer nennt sich *background electrolyte* oder *running buffer* (RB) und das Detektionsprinzip basiert auf einer geringeren Absorption des Zucker als der RB, wodurch ein negatives Signal entsteht, das proportional zur Konzentration ist. Um gute Detektionsgrenzen zu haben, muss der RB eine grosse Absorptionsfähigkeit haben, seine effektive Mobilität soll ähnlich der Mobilität des Analyten sein.

### 2.3.1.3. Trennung in alkalischen Elektrolyten

Nur einige Kohlenhydrate haben bei pH Werten im üblichen Bereich funktionelle Gruppen, die eine Elektromigration und damit ihre eventuelle Trennung ermöglichen. Diese Kohlenhydrate sind zum Beispiel Aldonsäure, Uronsäure, Sialinsäure oder Aminosucker (Glukosamin, Galaktosamin). Die meisten Kohlenhydrate wie die, die Gegenstand der Arbeit sind, haben Hydroxylgruppen, die bei sehr hohen pH Werten, über ihrem  $pK_a$  (für  $pK_a$  von Lactulose, Rhamnose und Xylose siehe Tabelle 3) geladen sind. Es erfolgt eine differenziale Elektromigration der Kohlenhydrate in Metalhydroxid alkalischen Lösungen wie Lithium, Natrium oder Kaliumhydroxid infolge der Ionisation der Hydroxylgruppe des Sacharids bei alkalischem pH-Werten.

Starke alkalische RB wie NaOH oder LiOH werden oft benutzt. Bei hohen pH-Werten sind die Zucker dissoziiert und negativ geladen. Die Hydroxylgruppen im Kohlenhydratmolekül haben eine sehr kleine Dissoziationskonstante (zwischen  $10^{-11}$ - $10^{-13}$  M) die Kohlenhydrate verhalten sich als sehr schwache Anionen und können somit mit CZE getrennt werden.

In der CE werden Quarzkapillaren zur Trennung eingesetzt. Für Trennungen bei hohen pH verwendet man *naked fused silica capillary*, da handelsübliche *coated fused silica capillaries* einer hydrolytischen Degradationen bei solch basischen Bedingungen ausgesetzt sind (5). Die *coated capillaries* eliminieren den EOF, und die Trenneffizienz für Zucker ist deutlich höher als in *naked* oder *uncoated capillaries* (12).

### 2.3.1.4. Borat Komplexierung

Polyhydroxy-Substanzen einschliesslich der Kohlenhydrate können reversible anionische Komplexe mit Borat ausbilden. Dadurch erhalten die Zucker bei pH Werten von Ladungen, die ihre Wanderung im elektrischen Feld ermöglichen. Des weiteren ermöglicht die *on-column* Komplexierung mit Borat die UV-Detektion der Zucker bei 195 nm (12). Komplexierte Kohlenhydrate absorbieren 2 bis 20 Mal mehr als einfache Kohlenhydrate. Bei der Komplexierung werden neutrale Kohlenhydraten partial negativ und wandern durch das elektrische Feld. Die Methode benötigt keine Derivatisierung und so keine Probenvorbereitung, aber die Empfindlichkeit ist in vielen Fälle beschränkt.

### 2.3.1.5. Leitfähigkeitsdetektion

Die Leitfähigkeitsdetektion ist universell und hat den Vorteil, im Vergleich zum UV-Detektor, dass ein elektrisches Signal als Antwort ohne intermediäre physikalische Parameter wie Lichtintensität erhältlich ist. Als Folge davon wird das Untergrundrauschen kleiner. Leitfähigkeitsdetektion ist eine universelle Methode mit Möglichkeiten von direkter oder indirekter Messung der Analytensignals (13). Die Leitfähigkeitsdetektion kann mit galvanischem Kontakt oder kontaktlos durchgeführt werden. Nachteil von Kontakt-

Leitfähigkeitsdetektion ist, dass die Elektrode polarisiert oder beschädigt werden kann. Leitfähigkeitsdetektion ohne galvanischen Kontakt, *Contactless conductivity detection*, bringt den grosse Vorteil, dass die Elektrode an keiner Korrosion leidet. Das Detektionslimit von Glukose, Fruktose und Sukrose in Getränken ist zwischen  $13$  und  $31 \cdot 10^{-6}$  M (7). Die Trennung einer Mischung von Glukose, Galaktose, Fruktose, Sukrose und Laktose kann mit einem RB von  $75$  mM NaOH, pH  $12.6$ , in  $5.5$  Minuten durchgeführt werden. Diese Methode erfordert keine Derivatisierung und ist folglich zeitsparend. Sie ermöglicht ein LOD von  $0.1 \cdot 10^{-6}$  M und ist zur Anwendung für diese Arbeit sehr interessant (14).

### 2.3.2. Detektion nach Derivatisierung

Zwecks direkter Detektion mit UV- oder Fluoreszenzdetektion und / oder zecks Wanderung im elektrischen Feld kann man Kohlenhydrate mit Chromophoren oder Fluorophoren markieren. Die Derivatisierung erfordert Zeit zur Probenvorbereitung und muss optimiert werden. Entsprechend der UV- oder LIF-Aktivität des Derivatisierungsreagenz kann man sehr niedrige Detektionslimite für Zucker erhalten (bis zu  $1 \cdot 10^{-9}$  M) (15). Wenn Methoden ohne Derivatisierung nicht empfindlich genug sind, wird oft eine Derivatisierung verwendet, auch wenn das für Routine nicht optimal ist.

Erforderliche Faktoren für eine gute Derivatisierung sind eine hohe Ausbeute, die Bildung von möglichst einem einzigen Produkt für jedes Molekül, und eine minimale Probevorbereitung.

#### 2.3.2.1. UV-Markierung: UV und LIF

Die am meisten verwendete Methode für *pre-column Derivatisation* von Zuckern ist die reduktive Aminierung (16). Reduzierende Kohlenhydrate bestehen in Lösung in Ring- oder in offener Form. Der Carbonylgruppe kann mit einer Aminogruppe reagieren um eine Schiff'sche Base auszubilden. Dann wird die Schiff'sche Base in ein stabiles sekundäres Amin umgewandelt. Das LOQ für die UV Detektion von markierten Zuckern liegt zwischen  $4 \cdot 10^{-6}$  und  $3 \cdot 10^{-7}$  M (12).

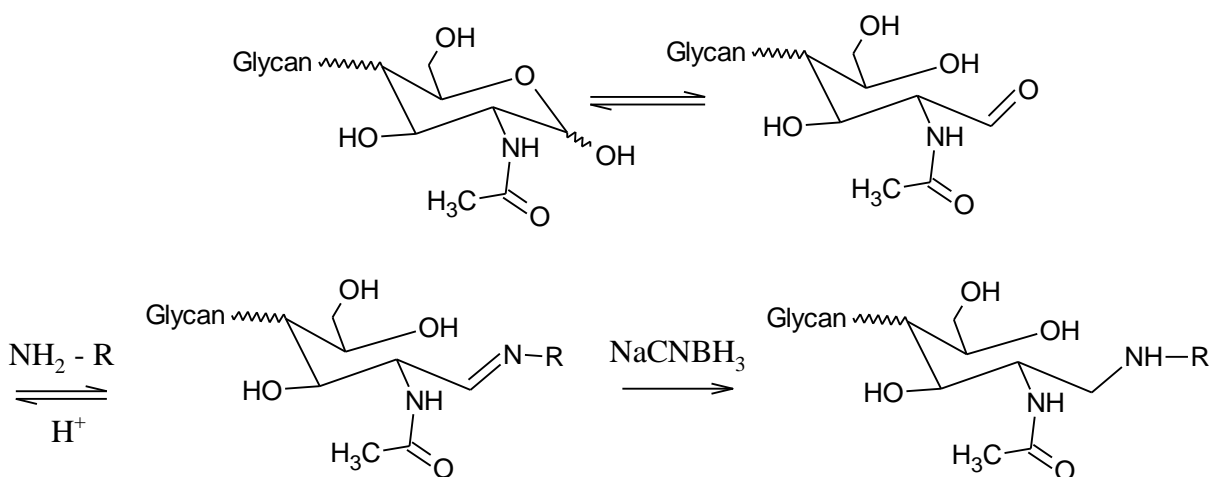
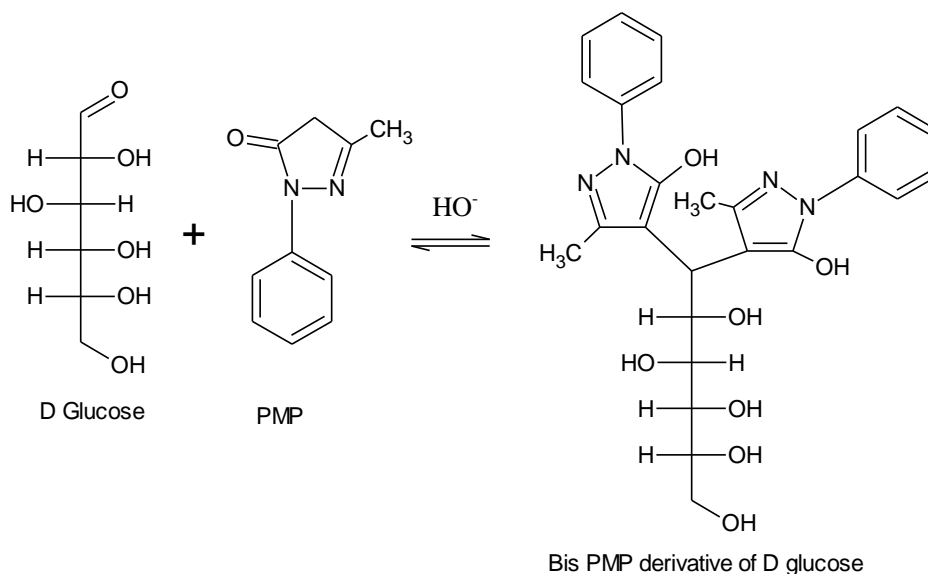


Abbildung 2: Schema der reduktiven Amimierung

Eine gebräuchliche Methode für die sensitive Zuckerdetektion nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung ist die Einführung eines Fluoreszenzmarkers am Analyten. Für die Trennung in der CE ist es zweckmäßig, negativ geladene Moleküle als Fluoreszenzmarker zu nutzen, da dies den Zuckermolekülen die nötige Ladung zur elektrophoretischen Migration verschafft. Zudem zeigen negativ geladene Moleküle ein geringeres Adsorptionspotenzial an der Kapillaroberfläche als positiv geladene, was wiederum zu einer hohen Trenneffizienz beiträgt. In diesem Zusammenhang werden in der Regel aromatische Aminosulfonsäuren zur Markierung der Monosaccharide und ihrer Fluoreszenzdetektion genutzt (17). *Laser-induced fluorescence* (LIF) ermöglicht besonders niedrige Detektionslimite im Bereich von nM für Zucker (15).

## 2.3.2.2. PMP und NMP

1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) ist ein Molekül, welches dem Kohlenhydrat ein Chromophor / Fluorophor gibt. PMP hat eine hohe Absorptionsintensität im UV bei 245 nm ( $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (12). PMP führt keine Ladung in die Zucker ein, d.h. um eine Migration der Zucker im elektrischen Feld zu erreichen, müssen diese komplexiert oder bei hohen pH Werten analysiert werden, was zur Hydrolyse der Zuckerderivate führen kann.



**Abbildung 3: Schema der PMP-Derivatisierung von reduzierenden Zuckern**

Eine Mischung von PMP-Aldopentosen und PMP-Hexosen kann in einem 100 mM Boratpuffer bei pH 9.5 mit einem LOD von  $(1-5) \cdot 10^{-6} \text{ M}$  für die UV-Detektion getrennt werden. Diese Methode ist für alle reduzierenden Zucker anwendbar. Die Derivatisierung dauert ca. 30 Minuten (12).

1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) ist ein weiterentwickeltes PMP-Derivat, welches von einer chinesischen Forschungsgruppe synthetisiert wurde (18). Das Chromophor des PMP wird durch eine Naphthylgruppe ersetzt, welche einen höheren molaren Absorptionskoeffizienten ( $5.5 \cdot 10^4 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) als PMP ( $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) hat. So können mikromolare Konzentrationen detektiert werden. Für eine Mischung von neun Monosacchariden (Mannose, Galacturonsäure, Glucuronsäure, Rhamnose, Glukose, Galaktose, Xylose, Arabinose und Fucose) wird mit einem 100 mM Boratpuffer pH 9.5, einer fused silica Kapillare (50  $\mu\text{m}$  ID, 40 cm zum UV-Detektor) und 22 kV wurde ein LOD von  $85 \cdot 10^{-9} \text{ M}$  erreicht (18). Die Derivatisierung dauert nur 30 Minuten. Falls diese Substanz



kommerziell erhältlich wäre, könnte ihre Verwendung eine gute Lösung für diese Arbeit darstellen, aufgrund der kurzen Derivatisierungszeit und der hohen Empfindlichkeit.

### 2.3.2.3. ANTS

Kohlenhydrate können mit 8-aminonaphtalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) derivatisiert werden. ANTS wurde zuerst zur Analyse von Kohlenhydraten mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese entwickelt und wird jetzt auch für die CE verwendet (12). Da ANTS drei Sulfonsäuregruppen trägt, können die ANTS-Derivate unter alkalischen oder sauren Bedingungen analysiert werden.

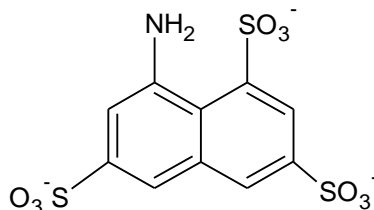


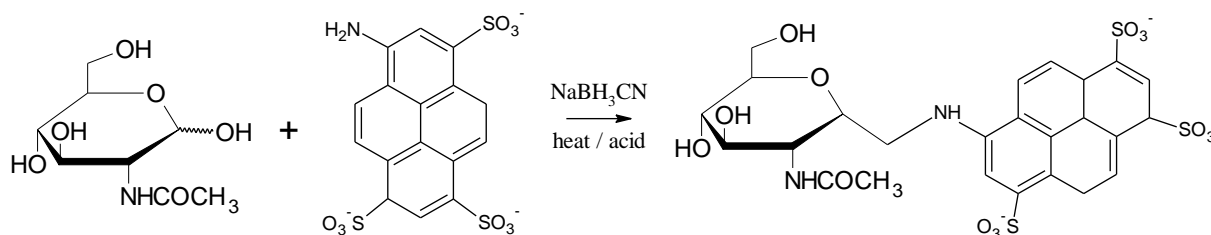
Abbildung 4: 8-aminonaphtalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS)

ANTS hat einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten von  $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 238 nm in Phosphatpuffer pH 2.5. Mit einem Kohlenhydrat gekoppelt verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum zu 223 nm, mit einem LOD von etwa  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (UV). Mit Glukose kann diese Derivatisierung eine Ausbeute von 99% erreichen. (12).

Optimale Derivatisierungsbedingungen mit ANTS für Kohlenhydratanalyse sind ein pH von 2.5, eine Temperatur von 68°C und eine Reaktionszeit von 120 Minuten, diese könne aber zuckerspezifisch variieren. Als Fluorophor hat ANTS eine maximale Anregungswellenlänge bei 360 nm, mit einer Verschiebung zu 360 nm für eine ANTS-derivatisierte Maltose. Mit einem He-Cd Laser kann ein Detektionslimit für Monossacharide und komplexe Oligosacharide von  $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  erreicht werden (16). Diese Methode ist für alle reduzierenden Zucker anwendbar, die He-Cd Laser sind jedoch sehr teuer und nicht Standard für kommerzielle CE Geräte.

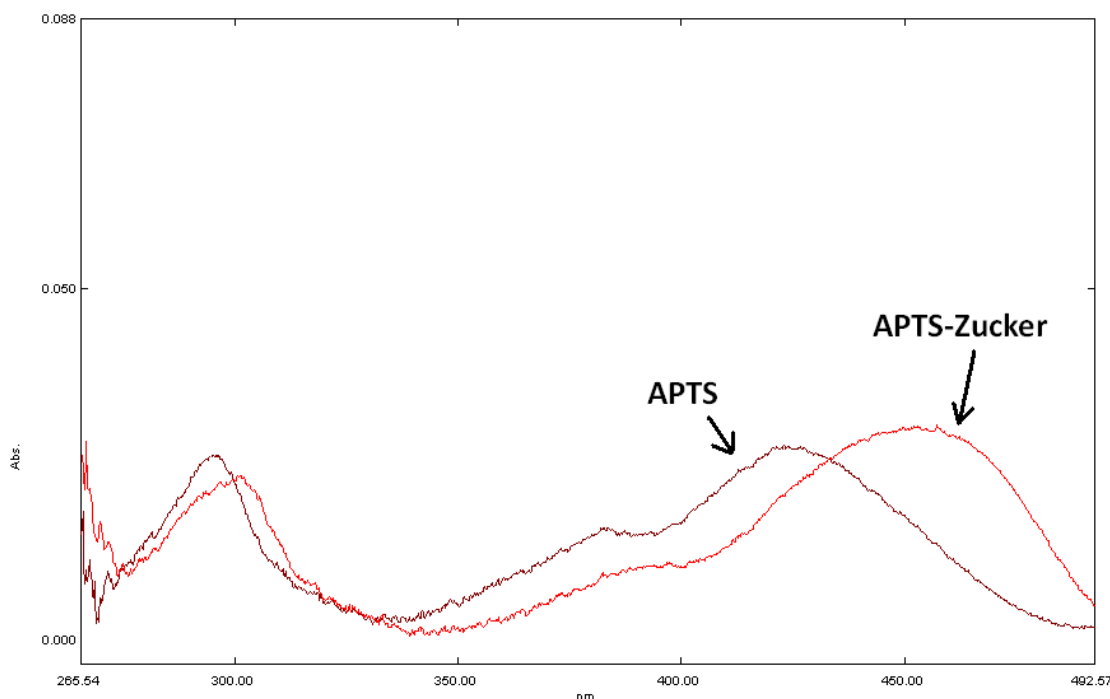
### 2.3.2.4. APTS

Das Detektionslimit für APTS-derivatisierte Monosaccharide liegt in der CE-LIF bei 50-100 pmol (15). Obwohl APTS wie ANTS ähnlich aufgebaut sind, hat es gegenüber diesem Fluoreszenzmarker deutliche Vorteile. Die mit APTS derivatisierten Monosaccharide haben einen höheren Absorptionskoeffizienten als ANTS-Monosaccharid Derivate. Ein weiterer Vorteil von APTS als Markierungsreagenz liegt in den unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima von APTS und APTS markierten Monosacchariden.



**Abbildung 5: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung am Beispiel von N-Acetyl-Glukosamin (Glc-Nac) markiert mit 8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonsäure (APTS)**

Das Absorptionsmaximum von APTS liegt bei 424 nm, die Anregungswellenlänge eines Argon-Ionen Lasers beträgt 488 nm. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums eines APTS-Monosaccharidderivates beträgt 455 nm. Bei dieser Wellenlänge zeigt das APTS-Monosaccharid Derivat ein größeres Absorptionsvermögen als APTS, wie gemessen und in Abbildung 6 dargestellt. Des Weiteren emittiert bei Anregung mit einem Argon-Ionen Laser das APTS-Monosaccharidderivat (maximale Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{max}} = 512$  nm) mit einer höheren Intensität als APTS ( $\lambda_{\text{max}} = 501$  nm). Aufgrund dieser unterschiedlichen Emissionsmaxima wird ein Emissions-Bandpass-Filter genutzt, um bevorzugt die emittierte Strahlung der APTS-Monosaccharidderivate bei 512 nm herauszufiltern. Das Signal des überschüssigen APTS in der Probe beeinflusst infolge seiner geringen Absorption und seiner aufgrund des Bandpassfilters verringerten Emission kaum das Signal der derivatisierten Monosaccharide. Aus diesem Grund ist ein Entfernen des überschüssigen APTS nach der Derivatisierung nicht notwendig. Im Vergleich mit dem ebenso geeigneten He-Cd Laser ist der Ar-Ionen Laser kommerziell und preiswert erhältlich und ist daher der gebräuchlichste Laser zur LIF Detektion in der pharmazeutischen Industrie (17). Diese Methode ist für alle reduzierenden Zucker anwendbar. Die Derivatisierung dauert ca. 90 Minuten (16).



**Abbildung 6: UV/visible Spektrum von APTS und einem APTS-Zuckerderivat**

**Tabelle 5: CE Detektionsmethoden, Vorteile und Nachteile für Kohlenhydratanalyse, LOD, Bemerkungen und Möglichkeiten für diese Arbeit**

Detektion	Vorteil	Nachteil	Möglichkeiten	LOD*
<b>UV direkt (Borat-komplex)</b>	keine Derivatisierung	geringe Empfindlichkeit	nicht empfindlich genug	$10^{-3}$ M (12)
<b>UV indirekt (high pH &gt;12)</b>	keine Derivatisierung	Detektionslimit 10-100 mal kleiner als direkte Methoden (19)	nicht empfindlich genug	$2 \cdot 10^{-4}$ M (12)
<b>Leitfähigkeit</b>	empfindlich, universell, keine Derivatisierung	benötigt spezial Detektor	Gerät erhältlich, interessant für Routine	$0.1 \cdot 10^{-6}$ M (14)
<b>PMP</b> (UV : 245nm)	kurze Derivatisierung (30 Minuten)	geringe Empfindlichkeit	nicht empfindlich genug	UV: $(1-5) \cdot 10^{-6}$ M (12)
<b>NMP</b> (UV: 251nm)	sehr hohe Empfindlichkeit für UV, kurze Derivatisierung (30 Minuten)	NMP muss synthetisiert werden, wenige Informationsquellen, ungeladene Moleküle	hohe Empfindlichkeit, aber Probenvorbereitung nötig + ungeladen	UV: $85 \cdot 10^{-9}$ M (18)
<b>ANTS</b> (UV: 223nm) (LIF: 360nm)	bessere Empfindlichkeit als PMP, negativ geladen	lange Derivatisierung (120 Minuten)	hohe Empfindlichkeit aber Probenvorbereitung nötig	UV: $5 \cdot 10^{-7}$ M LIF: $5 \cdot 10^{-8}$ (20)
<b>APTS</b> (Ar-Laser LIF:EX 488nm EM 520nm)	höheren Absorptionskoeffizient und bessere Empfindlichkeit als ANTS, negativ geladen	relativ lange Derivatisierung (90 Minuten)	hohe Empfindlichkeit aber Probenvorbereitung nötig	LIF: $0.6 \cdot 10^{-9}$ M (15)

LOD\*: (12) ist Detektionslimit für Lac in Lebensmittel, (20) für eine Mischung von GalNAc, GlcNAc, Man, Glc, Gal, Fuc, Xyl, (21) für eine Mischung von Xyl, Ara, Glc, Rha, Man, Fuc, Gal, GlcUA, GalUA in Wasser, (15) für Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc

### 2.3.3. Kapillarelektrophorese-Theorie und Gleichungen

Die Kapillarelektrophorese (CE) hat sich in letzten Jahren als bedeutende Trenntechnik in der Analytik etabliert. Die CE ist eine physikalische analytische Methode begründet auf der Migration von geladenen Analyten in einer Kapillare unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Die treibende Kraft dieser Trennmethode ist Strom, wie das Präfix „Elektro-“ andeutet. Das Begriff „-phorese“ kommt von dem griechischen Wort „Phoresie“, das die Beziehung zwischen zwei Tieren verschiedener Art bezeichnet, wobei das eine Tier das andere vorübergehend zum Transport benutzt, ohne es zu schädigen (22).

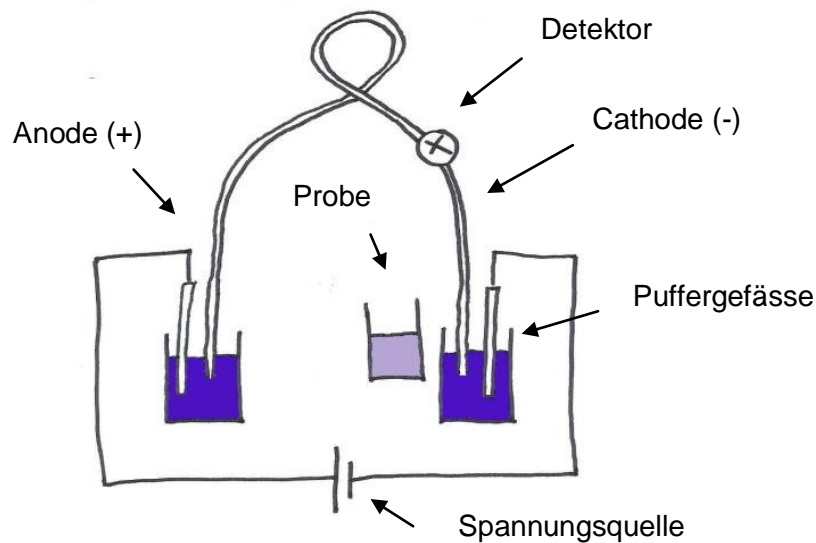
Klassische Elektrophorese begann mit Tiselius (22) und die Methode entwickelte sich dann rasant für verschiedene analytische Fragestellungen in der Biochemie. Diese Methode ermöglicht die Trennung von Makromolekülen mit sehr kleinen Ladungsdifferenzen. Klassische Elektrophorese hat viele Anwendungen aber hat auch entscheidende Nachteile. Sie ist schwierig zu automatisieren, schlecht reproduzierbar, und die Joulesche Erwärmung wächst über die Trennstrecke mit der Spannung quadratisch an, was zu starker Diffusion und damit starker Bandenverbreiterung / geringer Trenneffizienz führt. Das heisst die Trennung ist ein Kompromiss aus benötigter Trenneffizienz und Zeit. Elektrophoretische Trennung brauchen lange, in Standardsystemen mehrere Stunden, dafür lassen sich mehrere Proben parallel analysieren. Ein weiterer Nachteil der klassischen Elektrophorese ist die nur semiquantitative Detektion der diffusen Banden nach der Einfärbung (19).

Die CE ist die Weiterentwicklung der klassischen Gelelektrophorese und bietet der zur HPLC vergleichbaren Quantifizierbarkeit, Automatisierbarkeit, kürzere Analysezeiten und eine extrem hohe Trenneffizienz. Kapillarelektrophorese hat gegenüber den anderen Methoden (HPLC und Gelelektrophorese) verschiedene Vorteile, z.B. wie die Benützung von Kapillaren für die Trennung (viel billiger als eine HPLC Säule, keine stationäre Phase, kleine Mengen von Eluent), die Leistungsfähigkeit der Trennung (vergleichbar oder bedeutend besser als in der HPLC), die kürzere Analysezeit, geringer Verbrauch an Reagenzien. Die Nachteile sind eine geringe Schichtdicke in der UV-Detektion, was aber durch die extrem hohe Trenneffizienz kompensiert wird und damit ähnliche Detektionslimita wie in der HPLC erlaubt und für nicht stabil entwickelte Trennsysteme eine ungenügende Reproduzierbarkeit, die Methodenentwicklung in der CE ist sehr komplex und erfordert viel Erfahrung.

In der Kapillarelektrophorese unterscheidet man verschiedene Trennmechanismen. Das universellste und verbreitetste von allen CE Trennverfahren ist die Kapillarzonenlektrophorese, oder abgekürzt CZE (*capillary zone electrophoresis*). In CZE die geladenen Moleküle sind durch die eigene elektrophoretische Wanderung auf Grund von Unterschieden in der elektrophoretischen Mobilität getrennt. Wichtige Anwendungen beinhalten Peptide und Proteine ebenso wie Kohlenhydrattrennungen. CZE ist für geladene Makromoleküle, organische Substanzen und Ionen anwendbar.

### 2.3.4. Instrumentierung

Die CE-Instrumentierung ist sehr einfach. Benötigt werden eine Spannungsquelle, zwei miteinander verbundenen Elektroden, ein Detektor (z.B. UV-VIS, LIF oder Leitfähigkeitsdetektor) und selbstverständlich eine Kapillare mit einem Detektorfenster für UV- und LIF Detektion als auch Puffergefässe.



**Abbildung 7: Schema von einem CE Gerät**

Eine typische Kapillare misst zwischen 30 und 100 cm und hat einen Innendurchmesser von 10 und 150  $\mu\text{m}$ . Die Kapillare ist in der CZE mit einer Elektrolytlösung gefüllt und es wird bei kommerziellen Geräten eine Potentialdifferenz von maximal 30 kV zwischen den zwei Elektroden angelegt. Die Elektrolytlösung ist meistens ein wässriger Puffer mit einem bestimmten pH und mit einer bestimmten Ionenstärke. Häufig verwendete Elektrolyte sind z.B. Phosphat- und Zitratpuffer bei saurem pH-Wert, TRIS und Boratpuffer bei basischen pH, und auch die zahlreichen zwitterionischen Puffer wie Betain,  $\beta$ -Alanin, MES, MOPS und CAPS werden eingesetzt. Der Elektrolyt kann auch Additive enthalten, um die Trennung zu verbessern. Um die joulesche Erwärmung und seine Konsequenzen auf die Trenneffizienz zu vermeiden, wird der Strom kontrolliert und die Kapillare wird wenn möglich thermostatisiert. Die Probenaufgabe und ihre Automatisierung sind kritische Faktoren für die Präzision von quantitativen Analysen. Verschiedene Verfahren sind hydrodynamische Probenaufgabe (Druck auf der Einlassseite, Probenaufgabe mit Vakuum auf der Detektionsseite oder Probenaufgabe mit Gravitationskraft durch Anheben der Einlassseite) als auch elektrokinetische Probenaufgabe (Hochspannung an das Probengefäß). In dem Fall der elektrokinetischen Probenaufgabe, wandern die verschiedenen Analyte entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in die Kapillare, dies ist ein diskriminativer Prozess, was bei unterschiedlicher Geschwindigkeit zu unterschiedlichen Probenmengen für die verschiedenen Analyten führt (22).

## 2.3.5. Elektrophoretische Mobilität

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten  $v$ , hängt in Abhängigkeit der Feldstärke  $E$ , von zwei Faktoren ab: von der elektrophoretischen Mobilität des Analyten  $\mu_{ep}$  und von der elektro-endosmotischen Mobilität der Puffer  $\mu_{EOF}$ .

Der Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Mobilität  $\mu_{ep}$  und der elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep}$  eines Analyten ist in Gleichung 1 beschrieben:



$$v_{ep} = \mu_{ep} \times E = \left( \frac{q}{6 \pi \eta r_{st}} \right) \times \left( \frac{V}{L_{tot}} \right)$$

(Gleichung 1)

$v_{ep}$	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [cm/s]
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität [cm <sup>2</sup> /Vs]
$E$	elektrische Feldstärke [V/cm]
$q$	Ladung [C]
$\eta$	Pufferviskosität [Ns/cm <sup>2</sup> ]
$r_{st}$	STOKEScher Radius [μm]
$V$	elektrische Spannung [V]
$L_{tot}$	totale Kapillarlänge (Kapillarlänge vom Inlet bis Outlet) [cm]

Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  hängt von den Eigencharakteristika der Analyten (elektrische Ladung, Größe und Form des Moleküle) und von den Charakteristika des Puffers ab (ionische Stärke, Elektrolyt, pH, Viskosität, Additive). Sie ist eine Stoffkonstante im gegebenen elektrophoretischen System und für verschiedene Stoffe meist unterschiedlich. Aus Gleichung 2 ergibt sich (23):

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{\left( \frac{L_{det}}{t_M} \right)}{\left( \frac{U}{L_{tot}} \right)} = \frac{(L_{det} \times L_{tot})}{(U \times t_M)}$$

(Gleichung 2)

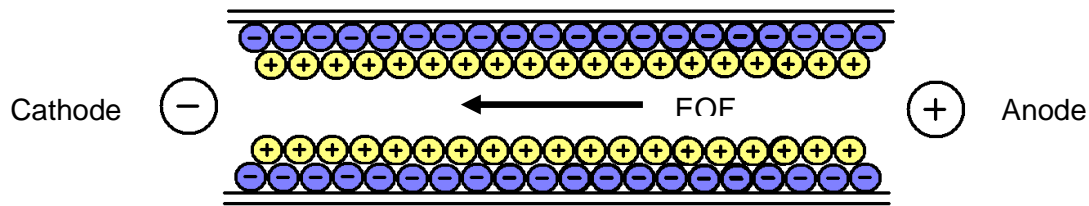
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität [cm <sup>2</sup> /Vs]
$v_{ep}$	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [cm/s]
$E$	elektrische Feldstärke [V/cm]
$L_{det}$	Kapillarlänge zu Detektor [cm]
$L_{tot}$	totale Kapillarlänge [cm]
$U$	elektrische Spannung [V]
$t_M$	Migrationszeit [s]

### 2.3.6. Elektroendosmotische Mobilität

Durch Elektroendosmose an geladenen Kapillaroberflächen entsteht ein Fluss des Elektrolyten Lösung innerhalb der Kapillare. Diesen nennt man den Elektroosmotischen Fluss (EOF), die „elektrische Pumpe“ der Kapillarelektrophorese.

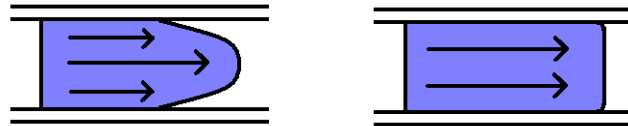
Die Wände einer Kapillare aus Silka besitzen Silanolgruppen, die bei einem pH höher als 1.5 (isoelektrischer Punkt des Quarzglas) deprotoniert werden (SiO<sup>-</sup>). Diese negativen Ladungen bilden eine negative Schicht. Dadurch entsteht entlang der Wand der Kapillare eine Potentialdifferenz zwischen den fixierten, negativen Ladung der Wand und den mobilen Kationen des Puffers. Diese Spannung wird Zeta-Potential  $\zeta$  genannt und ist umgekehrt proportional zur Ladung pro Flächeneinheit, zur Anzahl Valenzelektronen und zur Quadratwurzel der Elektrolytkonzentration. Die positivgeladene Schicht ist stark durch Wasserstoffbrücken vernetzt und bildet eine Art Film, welcher sich in Richtung Kathode bewegt sobald eine genügend grosse Spannung angelegt wird.

Abbildung 8: "double layer" Schicht am Wand von ein Silikakapillare und electroosmotischer Fluss (EOF)



Der grosse Vorteil dieser „elektrischen Pumpe“ gegenüber einer LC-Pumpe ist das flache Flussprofil. Eine traditionelle Pumpe bewirkt an der Wand der Kapillare Reibungskräfte, welche einen Geschwindigkeitsgradienten und ein parabolisches Flussprofil zur Folge haben. Je länger die Kapillare ist, desto stärker wird der Einfluss des Flussprofils auf die Bandenverbreiterung (22).

Abbildung 9: Flussprofile einer klassischen LC- Pumpe (links) und von EOF (rechts)



Die Wanderungsgeschwindigkeit des EOF  $v_{EOF}$ , hängt von dessen elektrophoretischer Mobilität ab EOF  $\mu_{EOF}$  und lässt sich wie folgt (Gleichung 3) beschreiben:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} * E = \left( \frac{\epsilon * \zeta}{\eta} \right) * \left( \frac{U}{L_{tot}} \right)$$

(Gleichung 3)

$v_{EOF}$	Wanderungsgeschwindigkeit des EOF [cm/s]
$\mu_{EOF}$	elektrophoretische Mobilität des EOF [cm <sup>2</sup> /Vs]
$E$	elektrische Feldstärke [V/cm]
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante des Puffer [C <sup>2</sup> /Jm]
$\zeta$	Zeta-Potential [V]
$U$	elektrische Spannung [V]
$L_{tot}$	totale Kapillarlänge [cm]

### 2.3.7. Effektive Mobilität

Die effektive Migrationsgeschwindigkeit des Analyten  $v_{eff}$  ergibt sich aus der Summe der elektrophoretischen und der elektroendosmotischen Mobilitäten (Gleichung 4):

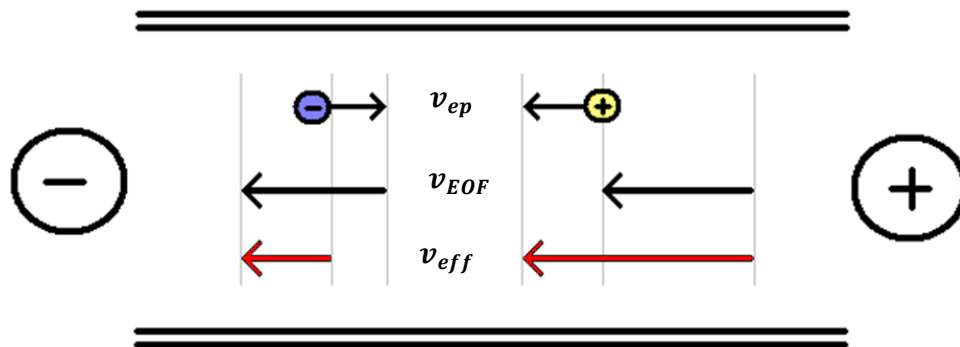
$$v_{eff} = v_{ep} + v_{EOF}$$

(Gleichung 4)

$v_{eff}$	effektive Migrationsgeschwindigkeit des Analyt
$v_{ep}$	elektrophoretischen Migrationsgeschwindigkeit des Analyt
$v_{EOF}$	elektroendosmotischen Migrationsgeschwindigkeit

Der EOF muss konstant gehalten werden um reproduzierbare Trennungen zu erhalten. Ein negativ geladener Analyt (Anion) wird in einer Quarzkapillare ohne Oberflächenmodifikation gegen den EOF wandern. Um das Detektorfenster auf der Kathodenseite passieren zu können, muss der elektroosmotische Fluss grösser als die elektrophoretische Geschwindigkeit des Analyten sein. Ein positiv geladener Analyt wird in einer Quarzkapillare ohne Oberflächenmodifikation schneller mit dem EOF-Strom zu Kathode wandern. Ein elektrisch neutraler Analyt wird keine elektrophoretische Geschwindigkeit haben, seine effektive Geschwindigkeit wird gleich wie dem EOF sein ( $v_{eff} = v_{EOF}$ ). Elektrisch neutrale Substanzen, die zur Bestimmung der Geschwindigkeit des EOF benutzt werden, nennt man neutrale Marker (22).

**Abbildung 10: Einfluss von EOF auf die effektive Migrationsgeschwindigkeit eines Cations und eines Anions**



Die Migrationszeit eines Analyten, wird mit der Gleichung 5 beschrieben:

$$t = \frac{L_{det}}{v_{ep} + v_{EOF}} = \frac{L_{det} * L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{EOF}) * v}$$

(Gleichung 5)

## 2.3.8. Optimierung

Verschiedenen chemischen und physikalischen Parameter wirken auf die Qualität der Trennung, und sind für die Optimierung wichtig.

Die Migrationszeit ist umgekehrt proportional zur angelegten Spannung, aber mit einer zu hohen Spannung gibt es eine starke Wärmeproduktion. Diese Wärme induziert einen Temperatur- und einen Viskositätsgradienten in der Kapillare. Dieses Phänomen heisst die Joulsche-Wärme und verbreitet die Banden und erniedrigt die Effizienz und Resolution.

Wenn der EOF von Anode (+) zur Kathode (-) geht ist die Polarität normal. Sie kann auch umgekehrt sein, in diesem Fall geht der EOF von Kathode zur Anode. In diesem Fall werden nur die geladenen Moleküle, deren elektrophoretische Mobilität grösser als der EOF ist den Detektor erreichen.

Die Temperaturänderung wirkt sich hauptsächlich auf die Viskosität und die Leitfähigkeit des Puffers aus, folglich wird die Migrationsgeschwindigkeit verändert.

Kapillarlänge und Innendurchmesser haben Einfluss auf die Migrationszeit und die Trennungsleistung. Wenn ein Analyt an der Wand der Kapillare adsorbiert, ist die Effizienz

limitiert. Um diese Adsorption zu vermeiden ist es möglich, die Chemie der Kapillaroberfläche zu verändern.

Der Puffer ist wichtig für die Optimierung. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration verkleinert der Migrationsgeschwindigkeit aber steigert den Joule-Effekt. Das Zeta-Potential und damit auch die Geschwindigkeit des EOF sind umgekehrt proportional zur Wurzel der Pufferkonzentration. Bei grösser werdender Pufferkonzentration verringert sich also die Geschwindigkeit des EOF. In gleichem Mass wird auch die elektrophoretische Geschwindigkeit der Analyt reduziert. Sein pH wirkt auf die Ladung der Analyt und auf die Ladung der Kapillarwand, und ebenso die Richtung der EOF. Die Mobilität des *running buffer* sollte in der CZE der Mobilität des Analyten angepasst werden, um eine effiziente Trennung zu erlangen. Die optimale Wahl des Puffers ist entscheidend für eine effiziente Trennung.

### 2.3.9. Strategie

Für diese Arbeit werden basierend auf Literatursystemen verschiedene Trenn- und Detektionsmethoden getestet und verglichen. Die erste Möglichkeit ist die Leitfähigkeitsdetektion, weil sie universell ist und keine Probenvorbereitung erfordert, was für die Routine ein grosser Vorteil ist. Mit Leitfähigkeitsdetektion wurden verschiedene Puffersystem getestet, und parallel wird auch mit indirekter UV gemessen. Wenn diese zwei Methoden nicht ausreichend sind, wird eine APTS-Derivatisierung mit UV- oder LIF-Detektion durchgeführt.

#### 2.3.9.1. CE Trennmechanismus der 3 Kohlenhydrate

Die Migrationsreihenfolge der Kohlenhydrate ist proportional dem Verhältnis des hydrodynamischen Radius zur Ladung der Analyten (Gleichung 1). Laktulose, die ein Disaccharid ist, hat folglich einen grösseren Radius und so eine kleinere elektrophoretische Mobilität als Monosaccharide. Die Ladung der Zucker wird als gleich angenommen.

#### 2.3.9.2. Alkalischer Elektrolyte (pH > 12)

Die Kapillare aus *fused silica* ist im stark alkalischen Milieu bei pH-Werten (pH > 12) negativ geladen. Bei normaler Polarität wandern die Kohlenhydrate mit dem EOF zum Detektor an das kathodische Ende. Bei diesen pH-Werten sind die Zuckern auch negativ geladen und nach Anlegen der Trennungsspannung wandern sie in Richtung Anode, entgegen dem elektroosmotischen Fluss. Um die Zuckern zu detektieren, muss der EOF grösser als die elektrophoretische Mobilität der Zuckern sein. Laktulose elektrophoretische Mobilität verzögert weniger den elektroosmotischen Fluss und so wird sie früher als Rhamnose und Xylose zum Detektor kommen.

Bei *reversed polarity* sind die Anode und Kathode umgekehrt, und so die Richtung des EOF. Die Zucker wandern in Richtung des Detektors und darum muss deren elektrophoretische Mobilität grösser als der EOF sein.

#### 2.3.9.3. Borat-Komplex

Weitere negative Ladungen und damit weitere Möglichkeiten zur selektiven Trennung der chemisch sehr ähnlichen Zucker, können durch Komplexbildung des Borats mit den vicinalen Hydroxylgruppen der Monosaccharide hervorgerufen werden. Der Einfluß der

Boratkomplexierung auf die relative Migrationszeit ist abhängig von der Position der Hydroxylgruppen am Monosaccharid (24).

### **2.3.9.4. APTS**

Wie im Kapitel 2.3.2.4 beschrieben, werden durch die Derivatisierung mit APTS an jedem ungeladenen Saccharid drei negative Ladungen anfügt, das heisst sie haben alle die gleiche Ladung, unterscheiden sich aber in ihren hydrodynamischen Radien. Die Kohlenhydrate wandern in Richtung Anode über den gesamten pH Bereich.



### 3. Experimenteller Teil

In diesem Kapitel werden die gebrauchten Chemikalien, Lösungen und Materialien aufgelistet und die Derivatisierungs- und Analysemethoden beschreiben.

#### 3.1. Material und Methode

##### 3.1.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

**Tabelle 6: Chemikalien, Reinheit, Lieferant, Nummer, Formel und molare Masse (MM) in g/mol**

Produkte	Lieferant	Nummer	Formel	MM (g/mol)
Laktulose, > 98%	Sigma	61360	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30
L-Rhamnose Monohydrat, > 99%	Sigma	R3875-5G	$C_6H_{10}O_5 \cdot H_2O$	182.2
D-(+)-Xylose, > 99%	Sigma	X 3877-25G	$C_5H_{10}O_5$	150.13
2,6-pyridindicarboxylic acid, 99% (PDC)	Aldrich	380-8	$C_7H_5NO_4$	167.12
Natronlauge, 1M	Merck	1.09137.1000	NaOH	40.00
Tetradecyl-trimethyl-ammonium bromide, 99% (TTAB)	Sigma	T-4762	$C_{17}H_{38}NBr$	336.4
Hexadecyltrimethylammonium bromide, 99% (CTAB)	Sigma	H-S ?? 2	$C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Br$	364.5
Lithium hydroxid monohydrat, 99%	Sigma	L-4256	$LiOH \cdot H_2O$	41.96
Sorbic acid potassium salt, >99%	Fluka	85520	$C_6H_7KO_2$	150.22
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat, min 99.5%	Merck	6346	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	137.99
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck	18317563	$CH_3COOH$	60.05
Borsäure	Merk	1.00165.1000	$H_3BO_3$	61.83
Zitronensäure Monohydrate, >99.5%	Merck	1.00244.1000	$C_2H_8O_7 \cdot H_2O$	210.14
8-Aminopyrene-1,3,4-trisulfonic acid (APTS und APTS-M)	Beckman-Kit	477600	$C_{16}H_{18}NNa_3O_9S_3$	523.40
Natrium Cyanoborohydrid, >95%	Fluka	71435-10G	$NaBH_3CN$	62.84
2-Picoline-Borane Komplex, 95%	Hunsele	7-77534-213-56	$C_4H_8N_2B$	72.106.96
Dimethylsulfoxid, <95%	Merck	2952	$C_2H_6O_S$	78.13

### 3.1.2. Trennpuffer und Lösungen

Folgende Lösungen und Puffer wurden hergestellt und verwendet:

#### 20mM PDC pH 12.10:

334.3 mg PDC wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (1,83) wurde unter Rühren und Erhitzen mit ca. 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 20mM PDC pH 12.40:

335.3 mg PDC wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (1,65) wurde unter Rühren und Erhitzen mit ca 6ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 20mM PDC pH 12.70:

335.3 mg PDC wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (1,90) wurde unter Rühren und Erhitzen mit ca 6ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 20mM PDC + 0.5mM TTAB pH 12.10:

334.5 mg PDC wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser gelöst. 10 ml TTAB 5mM (168.8 mg TTAB in 100 ml Wasser gelöst) wurden angefügt. Der pH Wert wurde unter Rühren und erhitzen mit ca 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 20mM PDC + 1mM CTAB pH 12.10:

334.2 mg PDC wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser gelöst. 10 ml CTAB 10mM (364,8 mg CTAB in 100 ml Wasser gelöst) wurden angefügt. Der pH Wert wurde unter Rühren und erhitzen mit ca 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 25mM LiOH + 6mM Sorbinsäure pH 12.32:

105.9 mg LiOH und 90.1 mg Sorbinsäure wurden in ca. 80ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einen 100ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 50mM LiOH + 6mM Sorbinsäure pH 12.66:

210.0 mg LiOH und 90.3 mg Sorbinsäure wurden in ca. 80ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

#### 75mM LiOH + 6mM Sorbinsäure pH 12.76:

3315.9 mg LiOH und 90.1 mg Sorbinsäure wurden in ca. 80ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

50mM NaOH pH 12.62:

5 ml NaOH 1M wurden in 100 ml Wasser gelöst.

50mM NaOH + 22.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 12.40:

510.2 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O wurden in ca. 60 ml destilliertem Wasser, 10 ml NaOH 0.1M und 2ml CTAB 10mM gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

100mM Natriumacetat pH 4.50:

572 µl Essigsäure wurden in ca. 80 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (2.69) wurde unter Rühren mit ca 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

120mM Borat Puffer pH 9.0 und pH 10.20:

743.0 mg Borsäure wurden in ca. 80 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (4.84) wurde unter Rühren mit ca. 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

50mM Phosphat Puffer pH 7.50:

690.0 mg Natriumdihydrogenphosphat monohydrat wurden in ca. 80 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH Wert (5.34) wurde unter Rühren mit ca 6 ml NaOH 1M eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

1mg/ml 3-Zuckermix (je ca. 0.33 mg/ml = ca. 1 mM Lactulose, 2mM Rhamnose und Xylose ):

1 mg Laktulose wurde in 1ml Wasser gelöst. 1 mg Rhamnose wurde in 1ml Wasser gelöst. 1 mg Xylose wurde in 1ml Wasser gelöst. 100 ml von jede einzelne Zuckerlösung wurde gemischt.

100mM 3-Zuckermix (je ca. 33.3mM = ca. 11 mg/ml Lactulose, 5 mg/ml Rhamnose und Xylose):

34.2 mg Laktulose, 16.4 mg Rhamnose und 15.0 mg Xylose wurden in 1 ml Wasser gelöst.

5mM 3-Zuckermix (je ca. 1.67mM = ca. 0.5 mg/ml Lactulose, 0.25 mg/ml Rhamnose und Xylose):

Die 100 mM 3-Zuckermix wurde 20 x verdünnt.

100mM 8-Zuckermix (je ca. 12.5mM):

34.23 mg Laktulose wurde in 1ml Wasser gelöst. 16.4 mg Rhamnose wurde in 1 ml Wasser gelöst. 15.0 mg Xylose wurde in 1ml Wasser gelöst. 18.0 mg Fruktose wurde in 1 ml gelöst. 18.0 mg Galaktose wurde in 1 ml gelöst. 34.23 mg Saccharose wurde in 1 ml gelöst. 34.23 mg Laktose wurde in 1 ml gelöst. 100 ml von jede einzelne Zuckerlösung wurde gemischt

100mM Lactulose (34.2 mg/ml):

34.2 mg Laktulose wurden in 1 ml Wasser gelöst.

### 5mM Lactulose (1.7 mg/ml):

Die 100mM Lactulose wurde 20 x verdünnt.

### 100mM Rhamnose (16.4 mg/ml):

16.4 mg Rhamnose wurden in 1 ml Wasser gelöst.

### 5mM Rhamnose (0.8 mg/ml):

Die 100mM Rhamnose wurde 20 x verdünnt.

### 100mM Xylose (15.0 mg/ml):

15.0 mg Xylose wurden in 1 ml Wasser gelöst.

### 5mM Xylose (0.75 mg/ml):

Die 100mM Xylose wurde 20 x verdünnt.

### 1M Zitronensäure:

420 mg Zitronensäure wurden in 2 ml Wasser gelöst.

### APTS-Lösung in Zitronensäure:

5 mg APTS wurden in 48 µl Zitronensäure 1M gelöst

### APTS-M-Lösung in Zitronensäure:

5 mg APTS-M wurden in 48 µl Zitronensäure 1M gelöst

### 4.2M Essigsäure:

12 ml Eisessig wurden in 50 ml Wasser gelöst

### APTS-Lösung in Essigsäure:

5 mg APTS wurden in 95.5 µl Essigsäure 4.2mM gelöst

### 1M Natriumcyanoborohydrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) in Tetrahydrofuran (THF):

62.84 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  wurden in 1 ml THF gelöst

### 0.2 M Picoline-Borane:

45.1 mg Picoline-Borane wurde in 2 ml DMSO gelöst

### 3.1.3. Geräte

Tabelle 7: verwendete Geräte, Hersteller, Software, und Seriennummern

Gerät	Hersteller	Software	Seriennummer
Kapillarelektrophorese Gerät, PrinCE	PrinCE Lauerlabs	-	1343
UV Detektor	Spektro Focus	eDAQ Chart	-
Datenaufnahme e-corder Tracedec	Sensor Technologies GmbH	eDAQ Chart	-
Kapillarelektrophorese Gerät, Proteomelab PA800	Beckman Coulter	32 Karat	1792
N-CHO coated capillary ProteomeLab	Beckman Coulter	-	477601
Thermomixer comfort	Vaudoux-eppendorf	-	1956
Vortex Genie 2TM	Laborbedarf AG	-	G-560E
pH-Meter	Orion	-	-

## 3.2. Probenvorbereitung

Die Urine wurden filtriert und im Tiefkühlschrank (-18°C) gleich den Zuckerlösungen gelagert.

### 3.2.1. APTS-Derivatisierung

#### 3.2.1.1. Mit Zitronensäure-Lösung, „DA“ (17):

5 Milligramm APTS wurden vollständig in 48 µl 1M Zitronensäurelösung gelöst. Zu 3.6 µl Probe (oder 5mM Zuckerlösung) wurden 2.5 µl APTS-Zitronensäurelösung und 2.5 µl NaBH<sub>3</sub>CN 1M in THF zugegeben. Die erhaltene Lösungen wurde gevortext und im Wasserbad 90 Minuten bei 55°C (oder ganze Nacht bei 37°C) inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Wasser gestoppt. Aliquote der derivatisierten Proben wurden bei -18°C gelagert. Diese Derivatisierungsprozedur wird im folgenden als „DA“ bezeichnet.

#### 3.2.1.2. Mit Essigsäure Lösung, „C&E“ (24):

5 Milligramm APTS wurden vollständig in 95.5 µl 4.2M Essigsäure gelöst. Zu 2 µl Probe (oder 5mM Zucker) wurden 2 µl APTS-Essigsäurelösung und 4 µl NaBH<sub>3</sub>CN 1M in THF zugegeben. Die erhaltene Lösungen wurde in einem Vortex-Mixer homogenisiert und im Wasserbad 60 Minuten bei 75°C (oder ganze Nacht bei 37°C) inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Wasser gestoppt. Aliquote der derivatisierten Proben wurden bei -18°C gelagert. Diese Derivatisierungsprozedur wird im folgenden als „C&E“ bezeichnet.

### 3.2.1.3. Mit Picoline-Borane anstelle von $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , „Picoline“:

5 Milligramm APTS wurden vollständig in 95.5  $\mu\text{l}$  4.2M Essigsäure gelöst. Zu 2  $\mu\text{l}$  Probe (oder 5 mM Zucker) wurden 2  $\mu\text{l}$  APTS-Essigsäurelösung und 2  $\mu\text{l}$  Picoline-borane 0.2 M in DMSO zugegeben. Die erhaltene Lösungen wurde in einem Vortex-Mixer homogenisiert und im Wasserbad 60 Minuten bei 75°C (oder ganze Nacht bei 37°C) inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  Wasser gestoppt. Aliquote der derivatisierten Proben wurden bei -18°C gelagert. Diese Derivatisierungsprozedur wird im folgenden als „Picoline“ bezeichnet.

### 3.2.1.4. Höhere Zuckerkonzentration und $\text{NaBH}_3\text{CN}$ als in 3.2.1.1. – 3.2.1.3., „C,L&E“ (25):

5 Milligramm APTS wurden vollständig in 95.5  $\mu\text{l}$  4.2M Essigsäure gelöst. Zu 10  $\mu\text{l}$  Probe (oder Zucker 100mM) wurden 2.5  $\mu\text{l}$  APTS-Essigsäurelösung und 10  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_3\text{CN}$  1M in THF zugegeben. Die erhaltene Lösungen wurde in einem Vortex-Mixer homogenisiert und im Wasserbad 2.5 Stunden bei 75°C inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  Wasser gestoppt. Aliquote der derivatisierten Proben wurden bei -18°C gelagert. Diese Derivatisierungsprozedur wird im folgenden als „C,L&E“ bezeichnet.

### 3.2.1.5. Verwendung von APTS-M gelöst in Zitronensäure sonst nach 3.2.1.4. „C,L&E modifiziert“:

5 Milligramm APTS wurden vollständig in 48  $\mu\text{l}$  1M Zitronensäurelösung gelöst. Zu 10  $\mu\text{l}$  Probe (oder Zucker 100mM) wurden 2.5  $\mu\text{l}$  APTS-M-Zitronensäurelösung und 10  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_3\text{CN}$  1M in THF zugegeben. Die erhaltene Lösungen wurde in einem Vortex-Mixer homogenisiert und im Wasserbad 2.5 Stunden bei 75°C inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  Wasser gestoppt. Aliquote der derivatisierten Proben wurden bei -18°C gelagert. Diese Derivatisierungsprozedur wird im folgenden als „C,L&E modifiziert“ bezeichnet.

### 3.2.1.6. Zusammenfassung von Derivatisierungsmethoden

In der Tabelle 9 wurden die getestete Derivatisierungssysteme zusammengefasst:

**Tabelle 8: Derivatisierungssysteme getestet**

Name	„DA“ (17)		„C&E“ (24)		„Picoline“ (26)		„C,L&E“ (25)	„C,L&E modifiziert“
	„DA.1“	„DA.2“	„C&E.1“	„C&E.2“	„Picoline.1“	„Picoline.2“		
Probe	3.6 $\mu\text{l}$ Zucker 5mM* oder Urin		2 $\mu\text{l}$ Zucker 5mM* oder Urin		2 $\mu\text{l}$ Zucker 5mM* oder Urin		10 $\mu\text{l}$ Zucker 100mM** oder Urin	10 $\mu\text{l}$ Zucker 100mM** oder Urin
APTS	2.5 $\mu\text{l}$ APTS in Zitronensäure 1M		2 $\mu\text{l}$ APTS in Essigsäure 4.2M		2 $\mu\text{l}$ APTS in Essigsäure 4.2M		2.5 $\mu\text{l}$ APTS in Essigsäure 4.2M***	2.5 $\mu\text{l}$ APTS-M in Zitronensäure 1 M
Reduzierende Agent	2.5 $\mu\text{l}$ $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 1M in THF		4 $\mu\text{l}$ $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 1M in THF		2 $\mu\text{l}$ Picoline-borane 0.2M		10 $\mu\text{l}$ $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 1M in THF	10 $\mu\text{l}$ $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 1M in THF
Inkubation	90 Min 55°C	16 Std 37°C	60 Min 75°C	16 Std 37°C	60 Min 75°C	16 Std 37 °C	2.5 Stunden / 75°C	2.5 Stunden / 75°C



## CZE Analyse

Verdünnung	Stop: + 800 µl H <sub>2</sub> O Dil: 500x	Stop: + 800 µl H <sub>2</sub> O Dil: 200x	Stop: + 800 µl H <sub>2</sub> O Dil: 200x	Stop: + 800 µl H <sub>2</sub> O Dil: 500x	Stop: + 800 µl H <sub>2</sub> O Dil: 500x
------------	--	--	--	--	--

\*einzige Zucker 5 mM, 3 Zucker Mischung je 1.67mM

\*\* einzige Zucker 100 mM, 3 Zuckern Mischung je 33.3mM

### 3.3. CZE Analyse

Die Messungen wurden mit den Kapillarelektrophorese-Geräten PrinCE der Firma Lauerlabs und einem PA800 von Beckman-Coulter durchgeführt. Die Detektion auf der PrinCE erfolgte mit einem Leitfähigkeitdetektor und einem UV-Detektor bei verschiedenen Wellenlängen und auf dem PA800 mit UV und laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) unter Verwendung eines Ar-Ionen Lasers bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

Quarzglas (*fused Silica*) *uncoated capillary* mit einem inneren Durchmesser (ID) von 25, 20 und 50 µm und eine *coated capillary* von Beckman Coulter kit (50 µm ID) wurden genutzt. Die Kapillarlänge betrug für das PrinCE Gerät und *uncoated capillary* 80 cm (52 cm zum Leitfähigkeitdetektor und 62 cm zum UV-Detektorfenster, ID = 25 µm ), für das PA800 und *uncoated capillary* 50 cm (40 cm zum UV-Detektorfenster, ID = 50 µm) und für das PA800 und *coated capillary* aus dem Beckman-Kit 60 cm (50cm zum UV- oder LIF-Detektor).

Verschiedene Feldstärken zwischen 12 und 30 kV wurden mit *normal* (Anode am Autosampler) oder *reversed polarity* (Anode am Ende der Kapillare) angelegt. Daraus resultierten verschiedene Ströme zwischen 4.5 µA und 30 µA. Die Kapillartemperatur betrug 35°C (PrinCE) und 20°C (PA800), wenn nicht anders angegeben.

Für PrinCE Analysen, nach Einbau einer neuen Kapillare wurde die Kapillare mit 1M NaOH (45'), 0.1M NaOH (45'), destilliertem Wasser (45') und *running buffer* (RB) (20') bei einem Druck von 2500 mbar gespült. Zwischen den Läufen wurde die Kapillare 10 Minuten mit Trennpuffer gespült.

Für PA800 Analysen, nach Einbau einer neuen Kapillare (*uncoated capillary* / *normal polarity*) wurde die Kapillare mit 1M NaOH (10'), 0.1M NaOH (10'), destilliertem Wasser (10') und *running buffer* (5') bei einem Druck von 20 psi gespült. Zwischen den Läufen wurde die Kapillare 2 Minuten mit Trennpuffer gespült.

Für PA800 Analysen, nach Einbau einer neuen Kapillare (*coated capillary* Beckman-Kit / *reversed polarity*) wurde die Kapillare nur mit destilliertem Wasser (10') und *running buffer* (5') bei einem Druck von 20 psi gespült. Zwischen den Läufen wurde die Kapillare 2 Minuten mit Trennpuffer gespült.

Die genutzten und im Text verwendeten Analysensysteme sind in Tabellen 8 bis 11 gezeigt.

#### 3.3.1. Analysensystem 1 (PrinCE, *uncoated*, 25 µm)

Meßgerät: PrinCE mit Leitfähigkeitsdetektor und UV-Detektor ( $\lambda = 195 \text{ nm}$ )

*Fused silica uncoated capillary*:  $L_{\text{tot}} = 80 \text{ cm}$ ,  $L_{\text{det UV}} = 62 \text{ cm}$ ,  $L_{\text{det trac}} = 52 \text{ cm}$ , ID = 25 µm

Abbildungen 11-14

Tabelle 9: Analysensystem 1

Schritt	Druck / Spannung	Zeit	Chemikalien
Spülen	2500 mbar	6 min	RB
Injektion	70 mbar	0.3 min	Probe
Trennung	12 kV -30 kV 30 kV	(individuell)	RB

### 3.3.2. Analysensystem 2 (PA800, *uncoated*, 50 µm)

Meßgerät: PA800 mit UV-Detektor ( $\lambda_{UV} = 200 \text{ nm}$ )

*Fused silica uncoated capillary*:  $L_{tot} = 50 \text{ cm}$ ,  $L_{det} = 40 \text{ cm}$ , ID = 50 µm

Abbildung 15

Tabelle 10: Analysensystem 2

Schritt	Druck / Spannung	Zeit	Chemikalien
Spülen	20.0 psi	1 min	NaOH 0.1
Spülen	20.0 psi	1 min	H <sub>2</sub> O
Spülen	20.0 psi	2 min	RB
Injektion	1.0 psi	4 sec	Probe
Trennung	-20 kV	12 - 60 min	RB

### 3.3.3. Analysensystem 3 (PA800, *uncoated*, 20 µm)

Meßgerät: PA800 mit UV- (200 nm) und LIF-Detektor (Argon-ion Laser EX 488 / EM 520 nm)

*Fused silica uncoated capillary*:  $L_{tot} = 50 \text{ cm}$ ,  $L_{det UV} = 40 \text{ cm}$ , ID = 20 µm

Abbildungen 27- 28

Tabelle 11: Analysensystem 3

Schritt	Druck / Spannung	Zeit	Chemikalien
Spülen	20.0 psi	1 min	NaOH 0.1
Spülen	20.0 psi	2 min	RB
Injektion	1.0 psi	22 sec	Probe

## CZE Analyse

Wait (DIP)	-	0.2 sec	RB
Trennung	20 kV	12 - 60 min	RB

### 3.3.4. Analysensystem 4 (PA800, *coated*, 50 $\mu\text{m}$ )

Meßgerät: PA800 mit UV- (200 nm) und LIF-Detektor (Argon-ion Laser EX 488 / EM 520 nm)

Beckman-Kit *coated capillary*:  $L_{\text{tot}} = 60 \text{ cm}$ ,  $L_{\text{det}} = 50 \text{ cm}$ , ID = 50  $\mu\text{m}$

Abbildungen 16-17; Abbildungen 19; Abbildungen 21-23; Abbildung 25; Abbildungen 29-30.

**Tabelle 12: Analysensystem 4**

Schritt	Druck / Spannung	Zeit	Chemikalien
Spülen	20.0 psi	2 min	RB
Injektion	1.0 psi	4 / 6 sec	Probe
Wait (DIP)	-	0.2 sec	RB
Trennung	-20 kV	12 - 60 min	RB

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Für eine bessere Lesbarkeit werden Ergebnisse und Diskussion in 4 Teilen dargestellt und diskutiert.

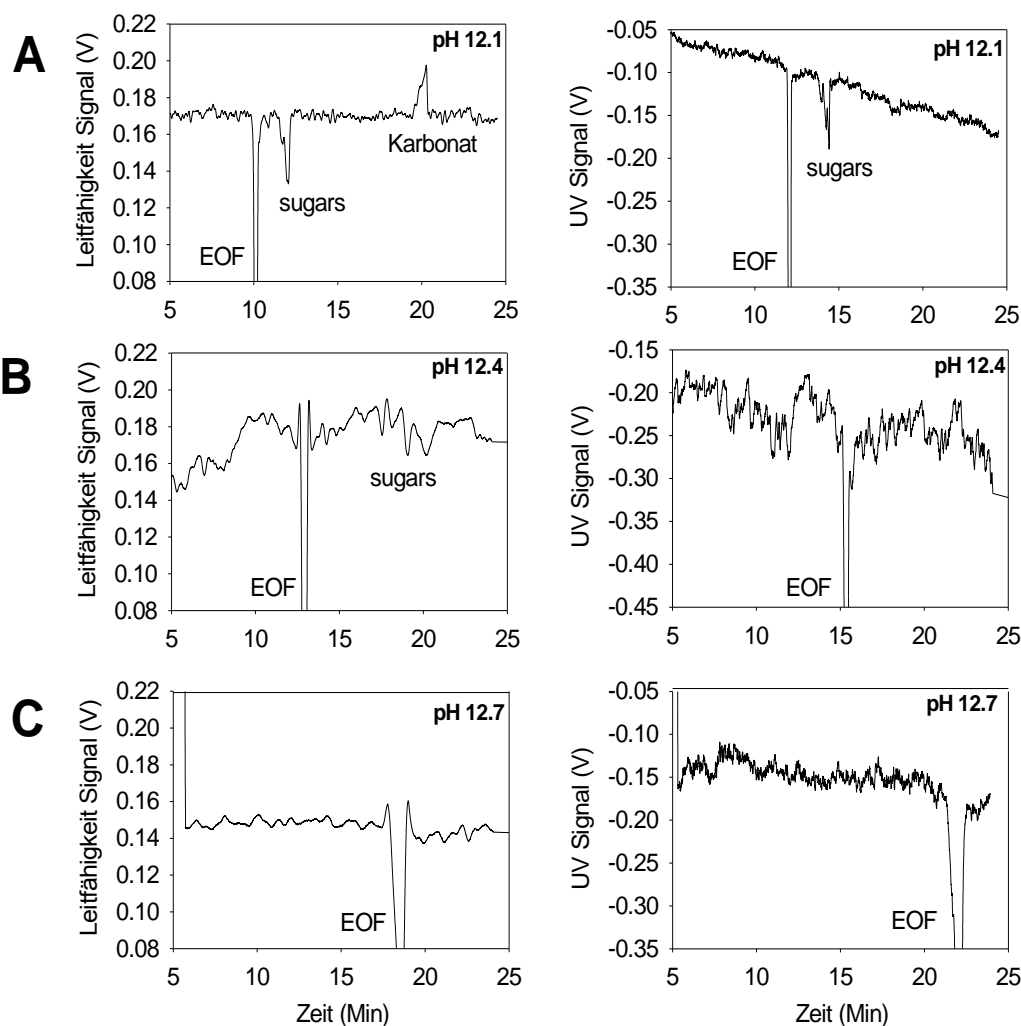
- 4.1. Analyse der Zucker in Wasser gelöst ohne Derivatisierung mit Leitfähigkeits- und indirekter UV-Detektion,
- 4.2. Analyse der Zucker in Wasser gelöst nach Derivatisierung mit UV- Detektion,
- 4.3. Analyse der Zucker in Wasser gelöst nach Derivatisierung mit LIF-Detektion,
- 4.4. Urinanalyse nach Derivatisierung mit LIF-Detektion,
- 4.5. Stabilität von Zucker- und Urin-Probe

### 4.1. Leitfähigkeit und indirekte UV-Detektion

Für die Leitfähigkeits- und UV-Detektion wurden die Analysensysteme 1 bis 4 und verschiedene Puffersysteme gebraucht. Die verwendete Probe ist eine 1 mg/ml Zuckermix, mit 0.3 mg/ml von jedem Zucker in Wasser gelöst (0.9 mM Laktulose, 1.8 mM Rhamnose, 2.0 mM Xylose. Die Experimente basieren auf Arbeiten von 4 verschiedenen Forschungsgruppen, die verschiedene Zucker erfolgreich mit CE getrennt und mit Leitfähigkeitsdetektion detektiert haben und dafür verschiedene Puffersysteme (RB) entwickelt haben. Die Methoden und Bedingungen dieser 4 Gruppen ( (27), (14), (7) und (28)) sind in Anhang 1 zusammengefasst.

#### 4.1.1. PDC Puffersysteme (26)

*2,6-pyridine dicarboxylic acid* (PDC) ist ein RB der die Detektion von Anionen mit indirekter UV- oder Leitfähigkeitsdetektion ermöglicht (27). PDC ist eine schwache organische Säure und ihre Konzentration im Milieu ist vom pH abhängig. Der Einfluss des pH Wertes des RBs aus 20mM PDC bei pH 12.1, 12.4 und 12.7 wurde im Rahmen der Arbeit untersucht, siehe Abbildung 11. Die Spannung war 12kV mit normaler Polarität und die Detektion wurde mit Leitfähigkeit und UV durchgeführt.



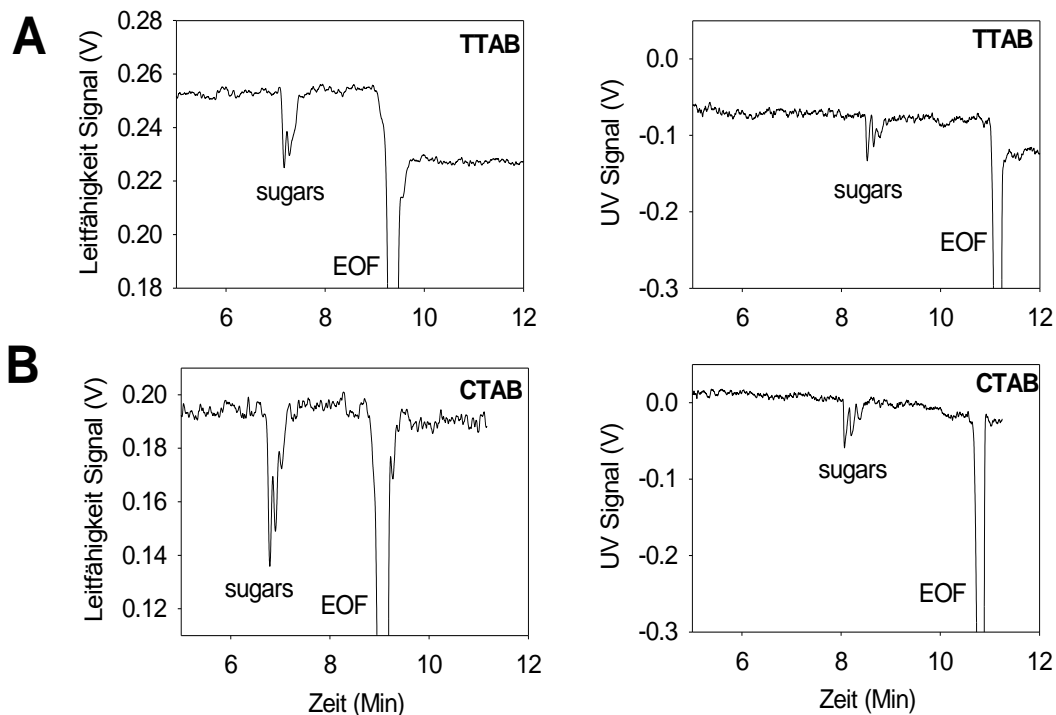
**Abbildung 11: Zuckertrennung mit RB PDC und Leitfähigkeits- (links) / UV- (rechts) Detektion, Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung; Probe: 1 g/ml 3-Zuckermix ;Anaysensystem 1, 12 kV; RB: 20 mM PDC; pH 12.1 (A), 12.4 (B) und 12.7 (C).**

Die EOF Mobilitäten werden wie erwartet bei höherem pH langsamer. Damit migrieren die Zucker später. Mit Leitfähigkeitsdetektion und einem pH von 12.1 (Abbildung 11, A) kommt der EOF Peak ungefähr nach 10 Minuten, mit einem pH von 12.4 (Abbildung 11, B) nach etwa 14 Minuten und mit einem von 12.7 (Abbildung 11, C) nach 18 Minuten.

Bei pH 12.1 (Abbildung 11, A) wird nur ein Peak für die 3 Zucker mit Leitfähigkeit und im UV sichtbar. Die Zuckern sind nicht getrennt. In dem Leitfähigkeitselektropherogramm ist ein zusätzlicher Peak nach ungefähr 20 Minuten sichtbar. Wenn pH des Puffers grösser als 9 ist, wird die Luft im Puffer absorbiert, es entsteht Karbonat, was mit dem Leitfähigkeitsdetektor detektiert wird. Manchmal ist auch die Basislinie stufenartig (29). Bei höheren pH-Werten wie 12.4 (Abbildung 11, B) und 12.7 (Abbildung 11, C) sind die Peaks für beide Detektionsmethoden kleiner als das Rauschen. Daraus folgt, der beste pH-Wert der 3 getesteten ist pH 12.1, jedoch ist unter diesen Bedingungen keine Trennung möglich. Wie zu sehen ist, ist mit allen getesteten Systemen die Trennung nicht ausreichend und auch das nötige LOD ( $3$  und  $6 \cdot 10^{-6}$ ) kann nicht erreicht werden.

Die Analyse wurde im folgenden mit *reversed polarity* nach EOF Umkehrung durchgeführt, um höhere Selektivitäten zu erhalten. Zwei Pufferadditive zur Umkehrung des EOF wurden getestet: CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*) und TTAB (*tetradecyltrimethylammonium bromide*). Beide sind oberflächenaktive Chemikalien, die im

wässrigen Milieu über der kritischen Mizellenkonzentration Mizellen bilden und ermöglichen, den elektroosmotischen Fluss (EOF) umzukehren. So wandern die Anionen in gleicher Richtung wie der EOF und können in relativ kurzer Zeit analysiert werden. CTAB liefert aufgrund seiner hohen Eigenmobilität eine schnellere Mobilität der Zucker als TTAB. Die Elektropherogramme sind in Abbildung 12 zusammengefasst.



**Abbildung 12:** Einfluss der Pufferadditive CTAB und TTAB auf die CZE Analyse von 1 g/ml 3-Zuckermix mit Leitfähigkeits- (links) und UV-Detektion- (rechts); Analysensystem 1, -30 kV; RB: 20mM PDC pH 12.1. mit Zugabe von 0.5 mM TTAB (A) und 1 mM CTAB (B)

Unter den gegebenen Bedingungen und bei Verwendung von *reversed polarity* sind mit Leitfähigkeits- und UV-Detektion 3 Pics sichtbar, es wird aber keine vollständige Trennung erhalten. Das Detektionslimit wird für die 3 Monosaccharide auf  $9 \cdot 10^{-1} \text{ M}$  geschätzt. Mit diesem System kann die Trennung der 3 Zucker erreicht werden, jedoch noch nicht basisliniengetrennt, jedoch ist das Detektionslimit nicht ausreichend für das Ziel der Arbeit.

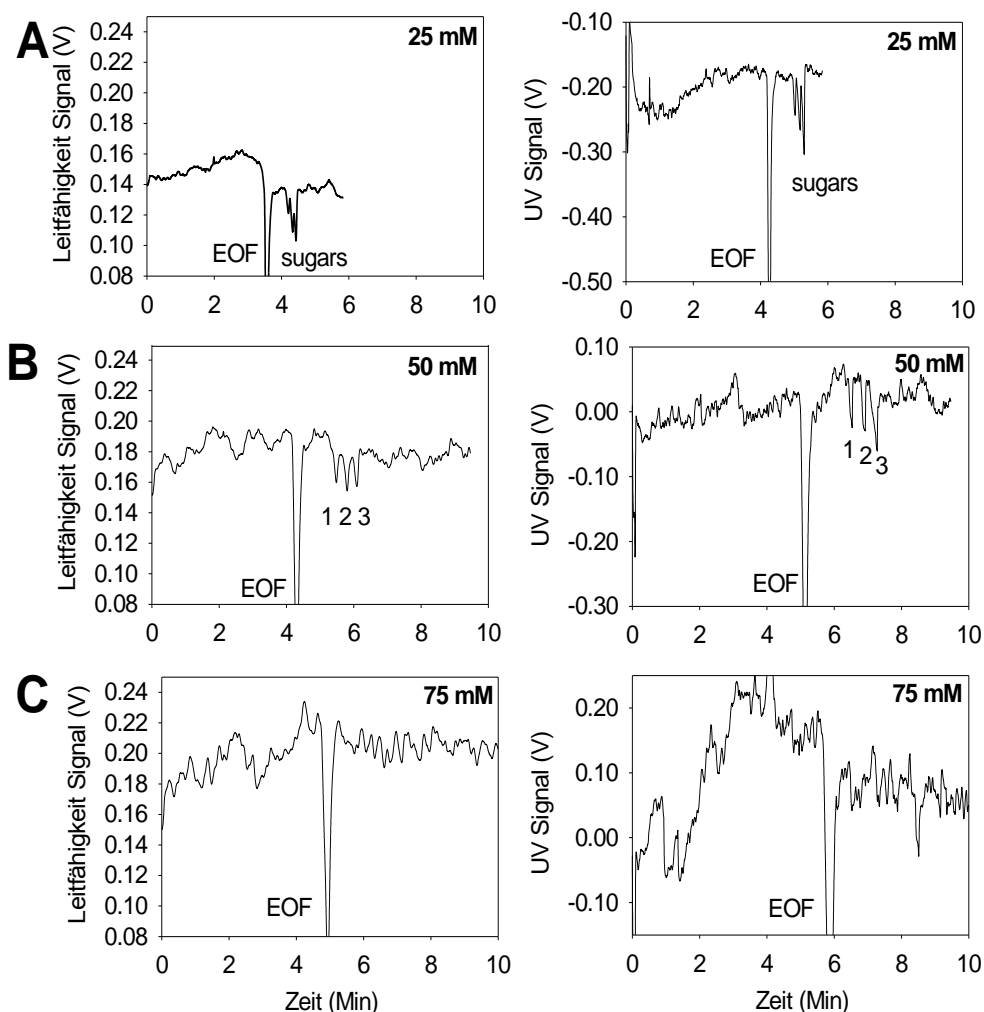
#### 4.1.2. NaOH und LiOH Puffersysteme

Die Trennung von Zuckern mit LiOH- und NaOH-Puffersysteme hat für verschiedene Forschungsgruppen erfolgreiche Ergebnisse gegeben: P.Tuma & Co (14) haben mit einem 75 mM NaOH Puffer (pH 12.6) und einer 50 cm lang Kapillare (ID = 10  $\mu\text{m}$ ) und 15 kV Sukrose, Laktose, Galaktose und Fruktose getrennt. Carvahlo & Co (7) haben mit verschiedenen RB (z.B. 10 mM NaOH + 4.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 200  $\mu\text{M}$  CTAB) und einer 44 cm langen Kapillare (ID = 10  $\mu\text{m}$ ) bei 25 kV, Fruktose, Glukose, Sukrose, Galaktose und Laktose getrennt. Paroni & Co (27) haben mit 50 mM LiOH + 6 mM sorbic acid + 1.25 mM CTAB pH 12.50 Xylose, Fruktose, Rhamnose, Glukose, Laktulose, Cellobiose und Mannitol gelöst in Wasser getrennt (*capillary*:  $L_{\text{tot}} = 27 \text{ cm}$ ,  $L_{\text{det}} = 20 \text{ cm}$ , ID = 50  $\mu\text{m}$ ; Gerät PA5500; *reversed polarity* -5 kV); Laktulose wurde in diesen Publikation nicht getrennt werden.



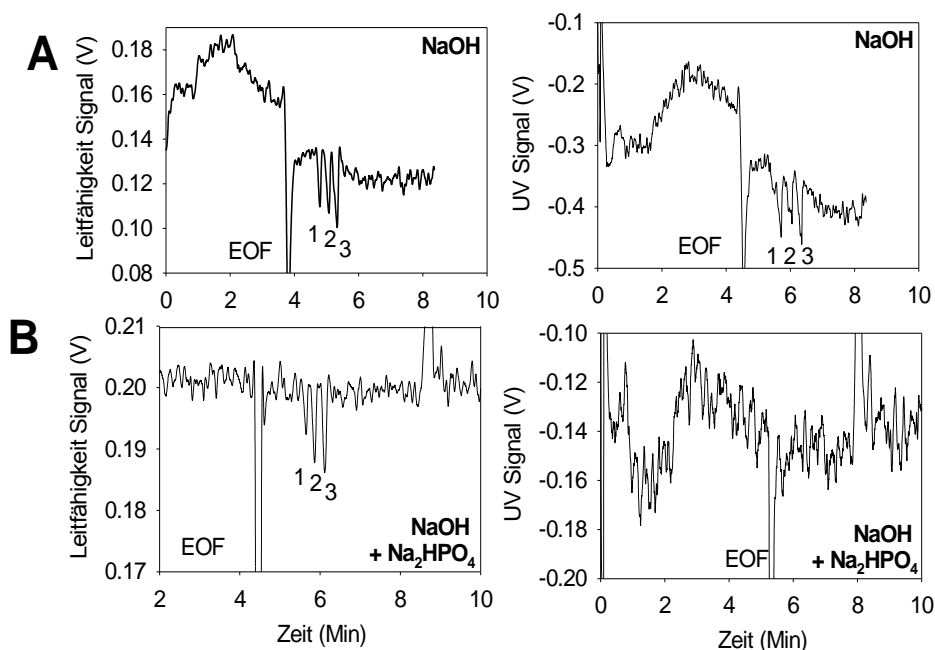
Hydroxid (das Hauptanion des Elektrolyten) ist ein sinnvoller RB unter Berücksichtigung der Tatsache, dass dissoziierte Kohlenhydrate langsame Mobilitäten haben und dass Hydroxid die schnellste Mobilität in wässrigem Medium hat. Lithiumhydroxid sollte das beste Alkali sein, kann aber manchmal ausfallen. Carvahlo & Co (7) berichten, dass Additive wie  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  können die Effizienz und die Empfindlichkeit verbessern.

Ein Puffersystem mit verschiedenen LiOH-Konzentrationen (25 mM, 50 mM und 75 mM) und 6mM Sorbinsäure wurde getestet, die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Die Konzentration des RB wirkt sich auf die Migrationszeit und die Resolution aus.



**Abbildung 13:** Einfluss der Pufferkonzentration auf die CZE Analysen von 1 g/ml 3-Zuckermix; Leitfähigkeits- (links) und UV-Detektion (rechts); Analysensystem 1, 30kV; RB: 6mM Sorbinsäure + LiOH 25mM (A), 50mM (B) und 75mM (C); Peak-Identifizierung: Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3).

Bei kleineren LiOH-Konzentrationen sind die Peakintensitäten grösser als bei höheren Konzentrationen, das Rauschen ist kleiner und die Migrationszeiten sind kürzer. Mit 25mM LiOH (Abbildung 13, A) sind die Peaks am grössten, aber sie überlagern sich teilweise. Die beste Trennung wird mit 50mM LiOH und 6mM Sorbinsäure (Abbildung 13, B) erreicht. Da LiOH ausfallen könnte, wurde die Analyse auch mit 50mM NaOH durchgeführt (Abbildung 14). Um die Empfindlichkeit zu vergrössern wurden auch 50mM NaOH + 22.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  als RB getestet.



**Abbildung 14:** Einfluss der Phosphatzugabe zum RB auf die CZE Analysen mit Leitfähigkeits- (links) und UV-Detektions- (rechts) von 1 g/ml 3-Zuckermix; Analysensystem 1, 30 kV; RB: 50mM NaOH pH 12.62 (A), 50mM NaOH + 22.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 12.40 (B); Peaks Identifizierung: Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3).

Mit 50mM NaOH (Abbildung 14, A) sieht man, dass das *signal-to-noise* Verhältnis besser ist als mit 50mM LiOH (Abbildung 13, B). Die Peaks sind gut getrennt. Die Addition von Phosphat (Abbildung 14, B) verbessert leicht die Empfindlichkeit bei der Leitfähigkeitsdetektion, aber mit UV-Detektion sind keine Peaks zu identifizieren / detektieren. Diese Analysen wurden nur einmal durchgeführt, d.h. nicht auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft. Dieses NaOH / Phosphat Puffersystem (Abbildung 14, B) gibt mit Leitfähigkeitsdetektion die besten Trennung und Empfindlichkeit, und ermöglicht die Zucker in nur 7 Minuten ohne Probenvorbereitung zu trennen, was für Routine interessant wäre. Das Detektionslimit wird für Rhamnose und Xylose auf ca.  $3 \cdot 10^{-1} \text{M}$  erreicht, ist also für das Ziel diese Arbeit nicht ausreichend.

#### 4.1.3. Diskussion

Leitfähigkeit als Detektionsmethode hat grosse Vorteile bezüglich dem Ziel dieser Arbeit. Diese Methode ist universell, das elektrische Signal gibt ein Signal ohne intermediären physischen Parameter wie Lichtintensität, und sie ermöglicht, die Zucker direkt zu detektieren. Die Probevorbereitung ist minimal und ideal für Routineanalyse. Die Indirekte UV-Detektion gibt ähnliche Empfindlichkeit wie Leitfähigkeitsdetektion, und hat den grossen Vorteil, dass sie mit fast jedem Kapillarelektrophorese-Geräte durchzuführen ist. Aus diesem Grunde wurde entschieden, diese 2 Methoden mit bekannten CE-Trennsystemen für Zucker (27), (14), (7) und (28) ) als erstes für Laktulose, Rhamnose und Xylose zu testen.

Die verschiedenen Versuche haben ermöglicht, die 3 Zucker gelöst in Wasser zu trennen. Der 50mM NaOH mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Puffer hat die beste Ergebnisse gegeben, aber die Peakshöhen sind nur 3 oder 4 Mal grösser als das Rauschen. Die Konzentration der Probe ist schon nah von dem Detektionslimit. Mit einer Menge von ungefähr 300  $\mu\text{g}$  Zucker pro ml Wasser ist die Empfindlichkeit noch weit, etwa 300 mal unter dem Ziel von ca. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Um die Trennung zu verbessern, wäre es möglich, mit einer dünneren Kapillare zu arbeiten, zum Beispiel von 10 µm ID wie Carvahlo & Co (7) gezeigt haben, aber mit einem dünneren Kapillardurchmesser würde sich das Detektionslimit noch verschlechtern, im Fall einer 10 µm Kapillare etwa um den Faktor 5 im Vergleich zur 50 µm Kapillare.

## 4.2. APTS- Derivatisierung mit UV Detektion

Eine in der Biotechnologie sehr gebräuchliche Methode zum effizienten und sehr empfindlichen Zuckernachweis von reduzierenden Zucker ist ihre Derivatisierung mit APTS, Trennung mit CZE und nachfolgender UV oder LIF Detektion. Da die LIF Detektion etwa 100 x empfindlicher ist als die UV Detektion, sind in der Literatur bedeutend mehr Zitate zu dieser als zur UV-Detektion zu finden (16). Die UV-Detektion wurde in dieser Arbeit mit einem System parallel zur LIF Detektion getestet, um die genauen Detektionslimits für Laktulose, Rhamnose und Xylose zu testen damit eine universelle detektionsmethode zur Verfügung zu haben, im Fall dass ein LIF Detektor nicht verfügbar ist.

In der Literatur sind nicht viele verschiedene APTS-Derivatisierungssysteme beschrieben, nur die Reaktionszeit, Zuckermenge, APTS-Lösungsmittel (Essigsäure oder Zitronensäure) und der reduzierende Agent (Natriumcyanoborhydrid oder Picoline-Borane) sind verschieden und wurden in vielen Arbeiten optimiert (in Anhang 2 zusammengefasst). Viele Publikation basieren auf einer Arbeit von Chen und Evangelista (24). In dieser Arbeit haben sie Rhamnose, Xylose und andere Saccharide getrennt. Es wurden keine Arbeiten zur Trennung von Laktulose nach APTS Derivatisierung gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 4 verschiedene, in der Literatur für Mono- und Disaccharide erfolgreich angewendete Derivatisierungssysteme, gewählt und mit verschiedenen Trennsystemen getestet. Die genauen Rezepte sind in Kapitel 3.2.1 (Material und Methode) beschrieben.

### 4.2.1. Analyse nach Trennung mit einer *uncoated capillary*

Unter Verwendung einer nicht modifizierten Kapillare zur Trennung lassen sich die mit APTS markierten Zucker entgegen dem EOF Trennen, d.h. der EOF bestimmt ihre zu messende Mobilität (*apparent mobility*), d.h. die Trennung kann z.B. über eine Einstellung des pH Wertes oder der Ionenstärke optimiert werden. Diese Trennung war erfolgreich für Rhamnose und Xylose siehe (24).

Die 3 Zucker wurden in Wasser gelöst nach „C&E“ derivatisiert (24). Es wurden die einzelnen Zucker (Laktulose 5mM, Rhamnose 5mM und Xylose 5mM) derivatisiert, als auch eine Mischung der 3 Zucker, je 1.67mM inklusive eines Blanks (Wasser derivatisiert). Nach Derivatisierung wurde die 3 einzeln derivatisierten Zucker gemischt.

Die Proben wurden zuerst bei, *reversed polarity* (-20kV) und mit einem 100mM Natriumacetat Puffer pH 4.5 analysiert (Analysensystem 2). Die Elektropherogramme vom Blank, den 3 derivatisierten Zuckern (3 sugars) und der Mischung der 3 einzeln derivatisierten Zucker (Mix) sind in Abbildung 15 dargestellt.

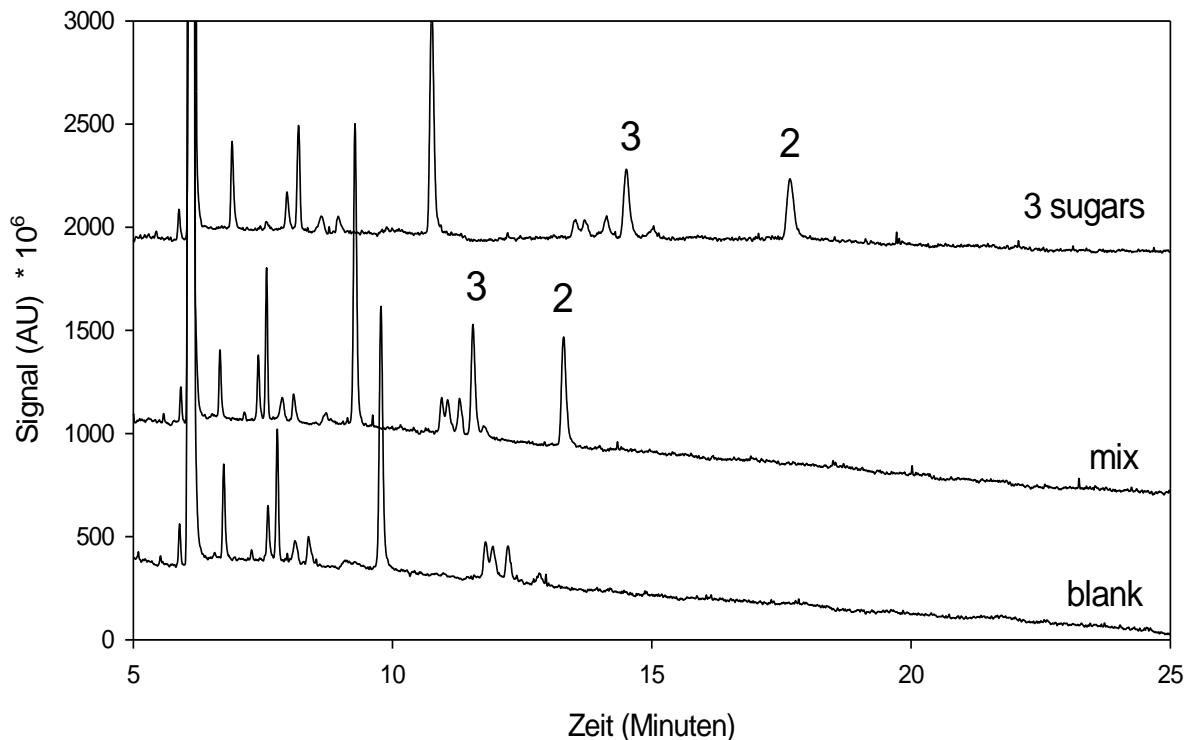


Abbildung 15: CZE Analysen einer Mischung von den drei 5 mM derivatisierten Zuckern je gelöst in Wasser (mix), 5 mM 3-Zuckermix (3 sugars), und einem Blank (Wasser), von oben nach unten; Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der y-Achse (+500 AU für blank, + 1100 AU für mix und + 2200 AU für 3 sugars) und Verschiebung auf der x-Achse (+0.35 Minuten für mix, -0.55 Minuten für 3 sugars); Derivatisierung nach „C&E“ (24); Analysensystem 2; Peak-Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3).

In den Elektropherogrammen der Mischungen in Abbildung 15 sind die Zucker Rhamnose (2) und Xylose (3) identifizierbar (aufgestockt), Laktulose kann nicht detektiert werden. Wie im Vergleich mit dem Blank zu sehen ist, kann Xylose nur schlecht von einigen, aus dem Blank stammenden Signalen, abgetrennt werden. Die Migartionszeiten sind nicht reproduzierbar, der erste grosse Reagenzpeak zeigt in 6 aufeinanderfolgenden Analysen Migartionszeiten zwischen 5.22 und 7.50 Minuten (Variationskoeffizient = 15.9 %), der letzte Peak des Reagenz zwischen 8.35 und 16.07 Minuten (Variationskoeffizient = 29.2%). Um eine Verbesserung der Migrationszeitreproduzierbarkeit zu erhalten, wurden 2 verschiedene Kapillarwaschprozeduren getestet, mit dem Ziel, eine konstante Kapillaroberflächenladung und damit einen konstanten EOF und folglich Migartionszeiten zu erhalten. Im ersten Fall wurde die Kapillare nur mit Puffer gespült, im zweiten Fall mit NaOH 0.1M, Wasser und Puffer. Beide Prozeduren führten nicht zu dem gewünschten Erfolg, die Migartionszeiten variierten immernoch stark. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt Experimente mit oberflächenmodifizierten Kapillaren (*coated capillary CHN*, Beckman Coulter Kit für *N-Linked Oligosaccharide*) geplant, bei denen die Kiesegelkapillaroberfläche und damit die geladenen Silanolgruppen durch ein neutrales Polymer aRBSchirmt werden und somit für den Puffer nicht mehr zugänglich sind. Diese Kapillaren zeigen keinen EOF mehr, d.h. die geladenen Substanzen wandern nur aufgrund ihrer Eigenmobilität, was zu einer erhöhten Migartionszeitreproduzierbarkeit führen sollte.

Der Peak von Laktulose sollte auf Grund seines grösseren hydrodynamischen Radius unter den getesteten Bedingungen nach Rhamnose migrieren, dort ist jedoch kein Peak detektiert. Spiken mit derivatisierter 5mM Laktulose (gespiked 1:2 / mix:Lac) zeigte einen sehr kleinen

Peak nach Rhamnose im Rauschen. Wahrscheinlich reagiert Laktulose weniger mit APTS als die anderen 2 Zucker und ist somit nur weniger empfindlich detektierbar, auf dieses Verhalten wird später in Kapitel 4.3 eingegangen.

#### 4.2.2. Analyse mit einer N-CHO coated capillary

N-CHO coated capillary ermöglicht, der EOF zu eliminieren. Im Vergleich zur nicht oberflächenmodifizierten Kapillare (*uncoated capillary*) sind die Migartionszeiten mit der N-CHO coated capillary und *reversed polarity* gut reproduzierbar. Die Durchschnittsmigrationszeiten von 6 Analysen haben einen Variationskoeffizienten von 0.1% für den ersten als auch letzten Reagenzpeak. Da unter Verwendung von Natriumazetatpuffer sich der Xylose-Peak mit einem Reagenzpeak überlagert und die Trennung nicht weiter optimiert werden konnte (Abbildung 16, A), wurden verschiedene andere Trennpuffer getestet. Die Elektropherogramme der Mischung der 3 Zucker getrennt in Natriumazetat, Borat und Phosphat Puffern sind in Abbildung 16 dargestellt.

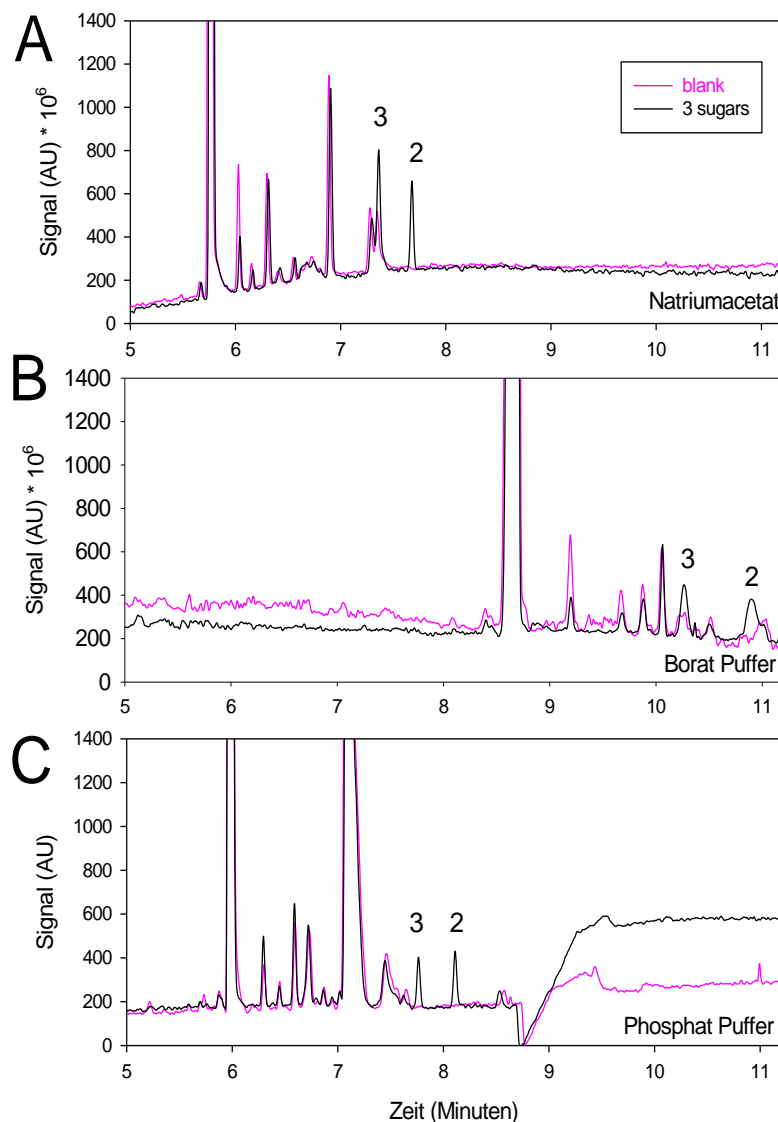


Abbildung 16: Einfluss verschiedener RB auf die CZE Analysen des Blanks (derivatisiertes Wasser) (pink) und von 5mM 3-Zuckermix (schwarz); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die

Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der Y-Achse (-690 AU für Blank (A), -1000 AU für 3 sugars (A), +450 AU für Blank (B), + 260 AU für 3 sugars (B), -450 AU für Blank (C) und -430 AU für 3 sugars (C) und Verschiebung auf der X-Achse (+0.845 Minuten für (B)); Derivatisierung nach „C&E“ (24); Analysensystem 4; RB: 100mM Natriumacetat Puffer pH 4.5 (A), 120mM Borat Puffer pH 9.0 (B) und 50mM Phosphat Puffer pH 7.5 (C); Peaks Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3).

Da die Trennung nicht mehr durch den EOF beeinflusst wird, d.h. keine Verlangsamung der Zuckerwanderung durch den bei pH 4.5 mittelstarken EOF stattfindet, erhält man mit Natriumazetatpuffer (Abbildung 16, A) kürzere Migrationszeiten, als mit der nicht oberflächenmodifizierten Kapillare (Abbildung 15) Rhamnose und Xylose wurden in weniger als 8 statt 20 Minuten getrennt. Jedoch ist der Xylose-Peak nicht von einem Reagenzpeak getrennt. Mit Boratpuffer (Abbildung 16, B) sind die Zucker-Peaks auch nicht von Blank getrennt und das Rauschen ist grösser. Die Migrationszeiten sind auch länger. Phosphatpuffer (Abbildung 16, C) ist die beste Lösung, die Peaks von Rhamnose und Xylose sind nicht von Reagenzpeaks überlagert und ihre Trennung erfolgt in 8.5 Minuten.

### 4.2.3. Diskussion

Die N-CHO *coated capillary* von Beckman Coulter liefert reproduzierbarere Ergebnisse als eine nicht modifizierte fused silica Kapillare. Sie ermöglicht, Rhamnose und Xylose in kürzeren Zeiten zu trennen als mit einer nicht modifizierten Kieselgelkapillare. 50mM Phosphat Puffer pH 7.50 zeigt die besten Ergebnisse und wird für die weitere Arbeit verwendet.

Für Rhamnose und Xylose ist die UV-Detektion nach Derivatisierung mit APTS empfindlich. Ein 5mM Xylose Probe (Elektropherogramm nicht gezeigt) kann nach Derivatisierung und Verdünnung mit UV-Detektion eine Konzentration von  $1.2 \cdot 10^{-5}$  M detektiert werden. Bei Trennung mit dem Phosphat Puffer ist das *signal-to-noise* Ratio des Xylose-Peaks ungefähr 43, d.h. die Probe könnte noch 14 Mal verdünnt werden, um ein Detektionslimit  $0.8 \cdot 10^{-6}$  M und ein *signal-to-noise* Ratio von 3 zu erreichen. Diese Empfindlichkeit ist für Rhamnose und Xylose gross genug, um dem Ziel dieser Arbeit von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für beide zu genügen.

Die Derivatisierung mit APTS zeigt gute Resultate für Rhamnose und Xylose, aber Laktulose ist nicht oder kaum detektierbar. Offensichtlich ist diese Derivatisierungsmethode („C&E“ (24)) für Laktulose weniger effizient als für Rhamnose und Xylose. Die Kinetik von Derivatisierungsreaktionen variiert für verschiedene Zucker (30). Es scheint, dass die selektive Aminierung für Laktulose schlechter funktioniert als für die anderen beiden Zucker.

Im nächsten Schritt um eventuell die Detektion der Laktulose zu ermöglichen, wird die LIF-Detektion benutzt, da sie um den Faktor von 100 empfindlicher ist als die UV-Detektion.



### 4.3. LIF Detektion nach APTS-Derivatisierung

APTS-Derivatisierung mit anschliessender LIF Detektion ist für die Zuckeranalyse in der Literatur häufig beschrieben, ein Detektionslimit von  $0.6 \cdot 10^{-9}$  M für Glukose (15) wird berichtet.

In dieser Arbeit wurden 4 verschiedenen Systems zur Derivatisierung basierend auf Literaturangaben getestet. Diese sind in Kapitel 3.2.1 (Material und Methode) genau beschrieben und in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Das erste System „DA“ wurde in einer Diplomarbeit gebraucht, um den Gehalt an Monosacchariden eines hochgradig glykosylierten therapeutischen Proteins zu bestimmen (17).

Das zweite System „C&E“ basiert auf einer Arbeit von Chen und Evangelista, die haben Xylose, Rhamnose, Arabinose, Ribose, Fucose, Glukose, Galaktose und Mannose derivatisiert und getrennt. Beide Methoden benutzen eine 27 cm lange Kapillare mit einem Innerendurchmesser von 20  $\mu$ m, 120 mM Boratpuffer pH 10.2 und eine elektrische Spannung von 25 kV. Chen und Evangelista (24) haben Pauch hospat- und Azetat-Puffer verwendet.

Natriumcyanoborohydrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) wird in beiden Sytemen als reduzierendes Agent zur Aminierung gebraucht. Es reduziert die schiffsche Base zu einem stabilen sekundären Amin. Ein bedeutender Nachteil von Natriumcyanoborohydrid ist, dass es das toxische volatile Hydrogenzyanid (HCN) bildet. Darum haben Ruhaak & Co (26) ein Protokoll mit Picoline-Boran statt Natriumcyanoborohydrid für die Derivatisierung von Oligossacharide und N-Glycan entwickelt und erfolgreich für Glukose und Galaktose getestet. Das System „Picoline“ benutzt Picoline-Borane statt Natriumcyanoborohydrid.

Nächste System „C,L&E“ wurde einer Publikation von Chen, Lui und Evangelista (25) entnommen, die Mono- und Oligosaccharide mit reduzierenden Enden trennen. Sie haben in dieser Publikation Rhamnose, Mannose, Glukose, Fruktose, Xylose, Fucose und Galaktose mit Borat und Phosphat Puffer und eine 27 cm lang Kapillare mit innere Durchmesser von 20 oder 50  $\mu$ m analysiert.

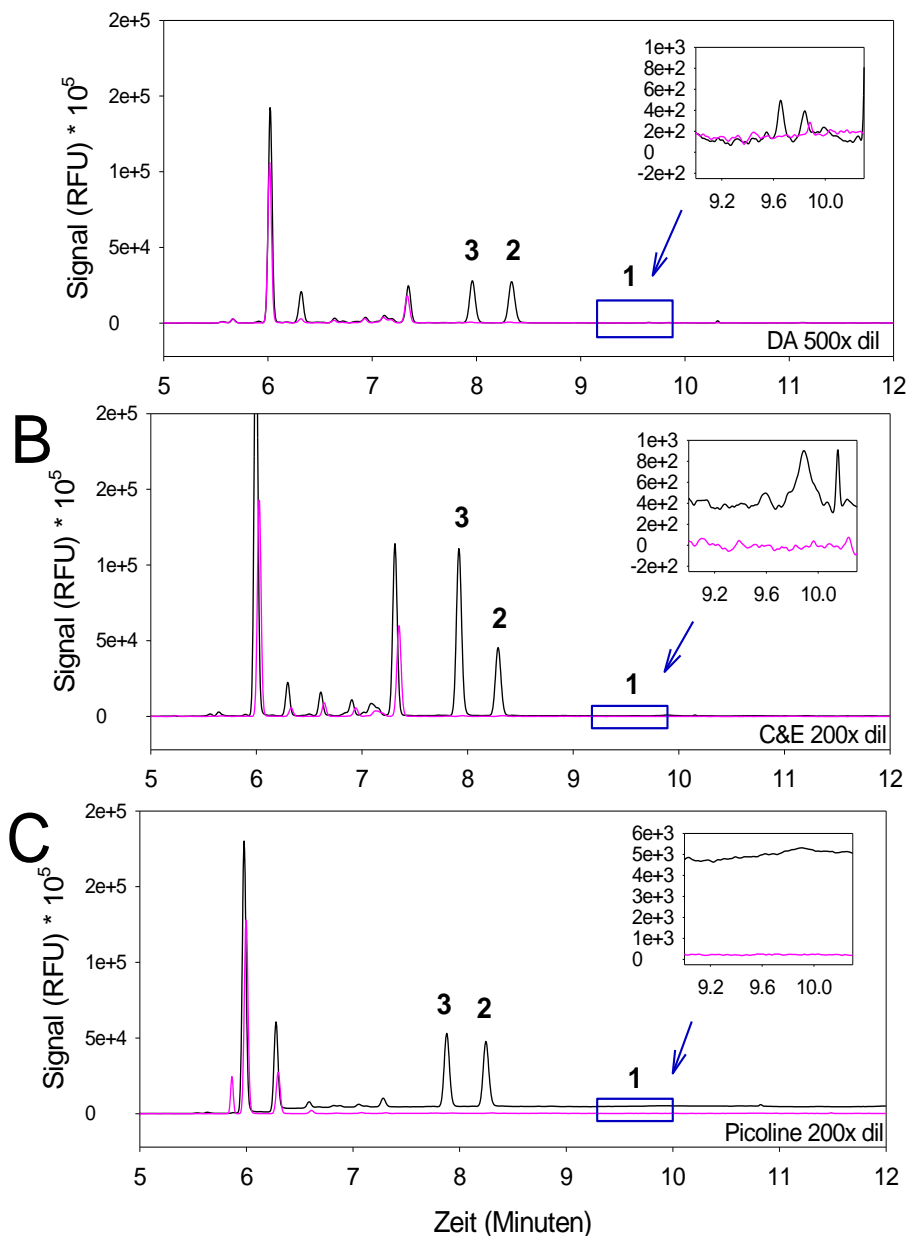
Alle diese Systeme verwenden CZE mit normaler Polarität und *fused silica capillary*, ausser die Trennung und Detektion mit dem Picoline-Bborane-System (26), die werden mit RP-HPLC-LIF durchgeführt. Es ist zu bemerken, dass die Trennung 60 Minuten dauert und die Zuckerpaeks gut von den Matrixpeaks des Derivatisierungsreagenz abgetrennt werden.

#### 4.3.1. Derivatisierungssysteme

Die drei ersten Derivatisierungsmethoden „DA“ (17), „C&E“ (24), „Picoline“, (26) ) wurden mit UV-Detektion und LIF-Detektion getestet. Die im UV-analysierten Proben wurden für die LIF Detektion weiter mit Wasser verdünnt. Entsprechend „DA“ derivatisierte Proben wurden etwa 500 x zu verdünnt, entsprechend „C&E“ und „Picoline“ 200 x.

In Abbildung 17 sind die Elektropherogramme der 3-Zuckermix mit den 3 verschiedenen Derivatisierungsmethoden, immer mit N-CHO *coated capillary*, Phosphat Puffer und *reversed polarity* dargestellt. Die Analyse derivatisierter Laktulose (5 mM Lösung, Elektropherogramm nicht gezeigt) hat ermöglicht, Laktulose zu identifizieren, wie erwartet wandert Laktulose mit der geringsten Geschwindigkeit.

## LIF Detektion nach APTS-Derivatisierung



**Abbildung 17:** Einfluss der Derivatisierungsmethode auf die CZE Analyse von Reagenzienblank (pink) und 5 mM 3-Zuckermix (schwarz); Derivatisierung nach „DA.2“ (A), „C&E.2“ (B), „Picoline.2“ (C); Analysensystem 4; RB: 50 mM Phosphat Puffer pH 7.5; Peaks-Identifizierung: Laktulose(1), Rhamnose (2), Xylose (3).

In Abbildung 17 sind die Peaks von Rhamnose und Xylose für alle 3 getesteten Systeme gut sichtbar und vom Reagenzpeak gut getrennt. Picoline-Boran (Abbildung 17, C) hat weniger Reagenzpeaks. Viele Reagenzpeaks kommen wahrscheinlich von Natriumcyanoborohydrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ). Picoline-Boran ist weiterhin interessant, da es für Gesundheit und Umwelt weniger gefährlich ist als  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Um Laktulose empfindlich zu detektieren, ist die Derivatisierung nach „DA“ (Abbildung 17A) am empfindlichsten.

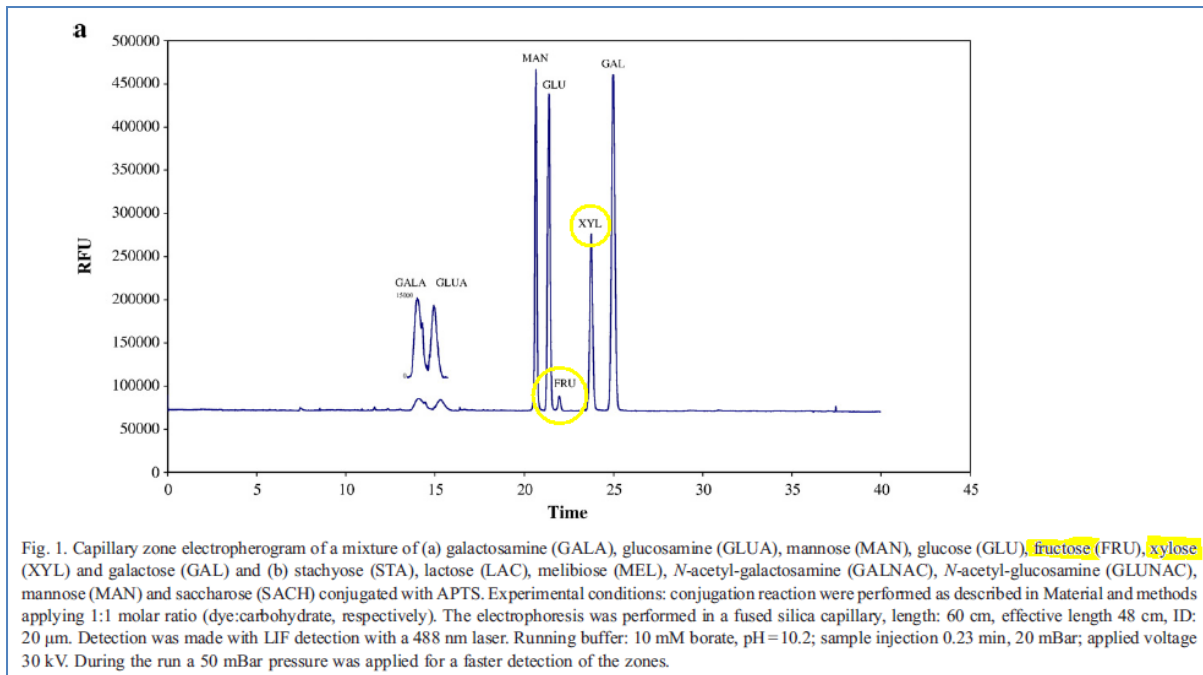
Die Signalintensität für Laktulose ist viel geringer als für Rhamnose und Xylose, teilweise kann man 2 oder sogar 3 Peaks detektieren. Um die Mehrfachpeaks zu erklären, sind verschiedene Hypothesen möglich: entweder wird Laktulose während der Derivatisierungsreaktion in seine Monosaccharide gespalten, die dann als einzelne Peaks auftreten oder Laktulose existiert in 2 oder mehreren verschiedenen Formen oder Isomeren die

dann nach Trennung detektiert werden. Die Hypothese der Aufspaltung in Monosaccharide ist jedoch unwahrscheinlich, weil die Monosaccharide Rhamnose und Xylose ganz andere Migrationszeiten haben, d.h. Monosaccharide Fruktose und Galaktose sollten aufgrund des geringeren hydrodynamischen Radius eher als die gleich geladenen Disaccharide migrieren (siehe Gleichung 1).

1.67mM Laktulose (aus der 3-Zuckermix) ist mit der „DA“- (17) und „C&E“-Derivatisierung (24) (Abbildung 17, A und B) detektierbar, aber mit einer ungefähr 20 x kleineren Intensität als Rhamnose. Eine weitere Analyse von Laktulose (5mM Laktulose gelöst in Wasser) hat einen Peak für Laktulose mit allen 3 Derivatisierungsmethoden gezeigt, aber in Abbildung 17 mit den 3-Zuckermix (nur 1.67mM Laktulose) ist der Peak von Laktulose nur mit „DA“ (Abbildung 17, A) und „C&E“ (Abbildung 17, B) Derivatisierungen sichtbar. Wie erwartet war das Signal etwa 3 höher als bei 1.67mM, d.h. Laktulose ist für alle 3 Derivatisierungsmethoden etwa 20 x weniger empfindlich zu detektieren als Xylose und Rhamnose. Wie erwartet, ist die LIF Detektion viel empfindlicher als die UV-Detektion. Ein 100mM 3-Zuckermix (Elektropherogramm nicht gezeigt) enthält  $3.33 \cdot 10^{-1}$  mM jeder Zucker, und nach Derivatisierung nach „DA“ und Verdünnung mit Wasser konnte Xylose oder Rhamnose in einer Konzentration von  $8,1 \cdot 10^{-7}$  M mit Analysensystem 3, 50mM Phosphat Puffer pH 7.5, detektiert werden. Das *signal-to-noise* Verhältnis vom Xylose und Rhamnose Peak ist ungefähr 2500, d.h. die Probe kann noch etwa 800 Mal verdünnt werden, um ein Detektionslimit von  $1 \cdot 10^{-9}$  M und ein *signal-to-noise* Ratio von 3 zu erreichen. Das Ziel dieser Arbeit ist  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose und von  $3 \cdot 10^{-6}$  M für Laktulose d.h. unter gegebenen Bedingungen ist die Methode auch für Laktulose genug empfindlich.

Um den kleineren Leistungsgrad der APTS-Derivatisierung für Laktulose zu verstehen, ist es interessant, sich in die chemische Struktur der Zucker zu vertiefen. Was primär Laktulose von Rhamnose und Xylose differenziert, ist dass Laktulose ein Disaccharid ist. Laktulose, wie der Name zeigt (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-Fructofuranose) ist aus Galaktose und Fruktose aufgebaut. Die reduktive Aminierung funktioniert mit der endständigen Fruktose. Fruktose differenziert sich von Rhamnose und Xylose, weil sie eine Ketose und keine Aldose ist.

In der Literatur wurden keine Beispiele einer Laktulose APTS-Derivatisierung gefunden, jedoch einige von Fruktose. Es gibt verschiedene Feststellungen und Ergebnisse, einige Gruppen konnten Fruktose derivatisieren, und andere konnten Fruktose nicht derivatisieren. Z.B. Lamari & Co (31) stellen in ihrem Review zur Kohlenhydratderivatisierung fest, dass die Derivatisierung von Ketosen ein spezifisches Problem ist, weil nur einige Derivatisierungsagentien mit Ketosen reagieren, oftmals ist die Reaktion nicht quantitativ. Im Patent von Chen & Co (32) Basis für das Beckman-Zuckeranalysekit ist zu lesen: „APTS unexpectedly also reacts with ketoses and therefore provides a mechanism for the analysis of nonreducing sugars“. Ähnlich unseren Ergebnissen Abbildung 18 zeigen Bui & Co (33), dass der Fruktosepeak viel kleiner (ungefähr 15 x kleiner) als der Xylosepeak ist. Tseng & Co (34) beschreiben die reduktive Aminierung von Fruktose mit 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F), sie haben 2 Peaks für Fruktose erhalten. Sie schreiben dieses Phänomen der Instabilität des Ketose-Skeletts der Fruktose zu. Des Weiteren stellen sie auch kleinere Markierungseffizienz für Fruktose im Vergleich zu Glukose fest (Faktor ca. 1 zu 20) .



**Abbildung 18: Elektropherogram der Publikation von Bui & Co (33), unterschiedliche Derivatisierungseffizienz für Aldosen und Ketosen**

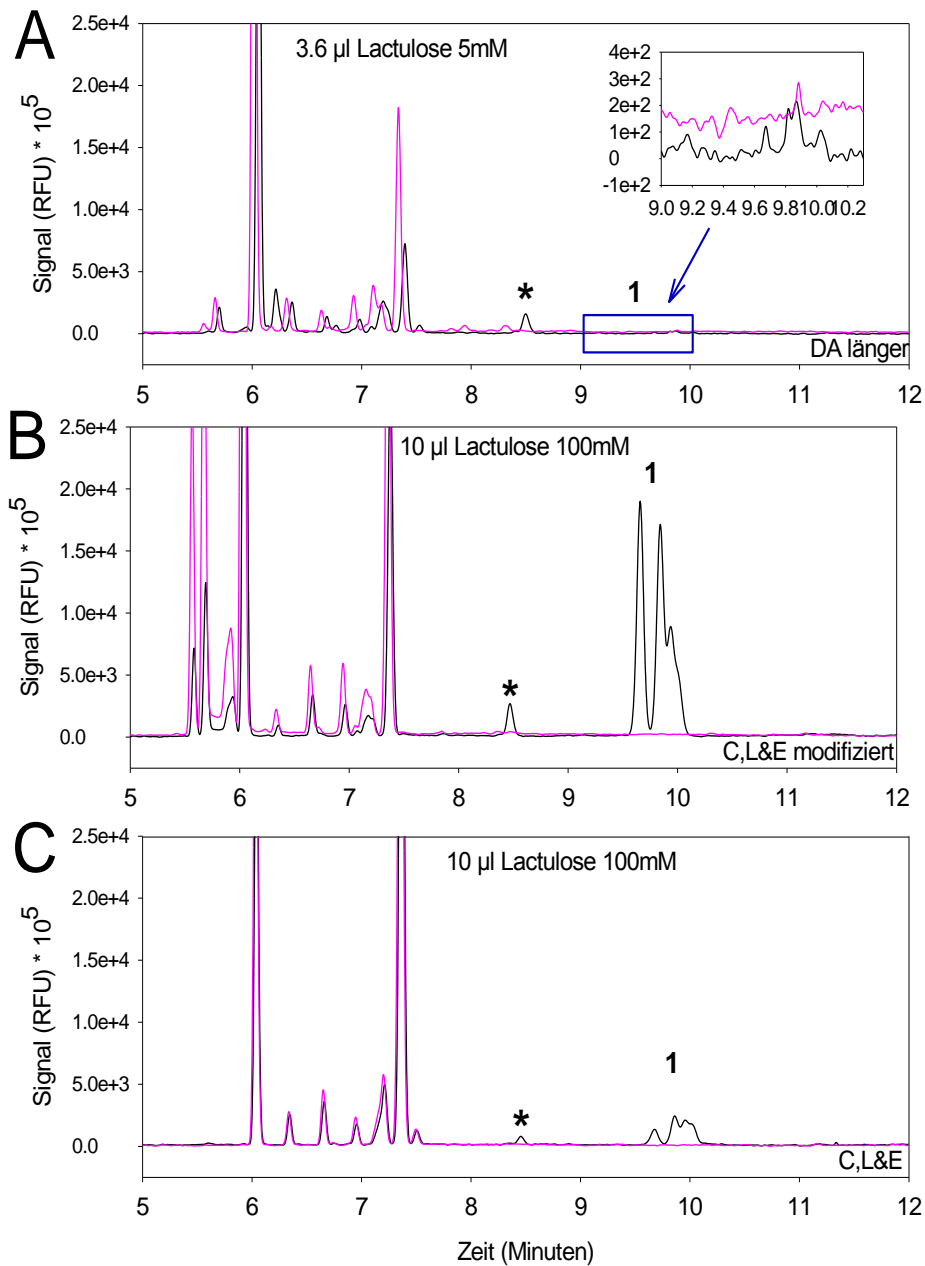
#### 4.3.2. Optimierung der Bedingungen zur Laktulose Derivatisierung / Analyse

Alle APTS-Publikationen stimmen in einer Frage überein: die Derivatisierungsausbeute für jeden Zucker ist zuckerspezifisch und von den Reaktionsbedingungen wie Reaktionszeit, Temperatur, pH, Solvent, APTS- und Zuckerkonzentration abhängig.

Eine interessante Publikation von Chen, Liu und Evangelista (25) geben spezielle Bedingungen zur Fruktose Derivatisierung. Sie konvertieren Fruktose zu seinem APTS Addukt mit einer längeren Reaktionszeit von 2.5 Stunden (75°C) als üblich für die anderen Zucker, für diese ist 1 Stunde ausreichend. Diese Derivatisierung (25) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet, und „C,L&E“ genannt (Abbildung 19, C). Es wurde auch die „DA“- Methode (17) mit 2.5 Stunden getestet (Abbildung 19, A).

Im Beckman-Zuckeranalysekit wird APTS-M, eine sehr reinere Form von APTS, zur Derivatisierung von Monosachariden vorgeschlagen, da es für schwer derivatisierbare Zucker höhere Ausbeuten liefert. APTS-M wurde in Zitronensäure (Erklärung siehe unten) statt in Essigsäure gelöst und sonst wurden die Bedingungen wie „C&E“ (25) getestet. Diese wurde „C,L&E modifiziert“ genannt (Abbildung 19, B).

## LIF Detektion nach APTS-Derivatisierung



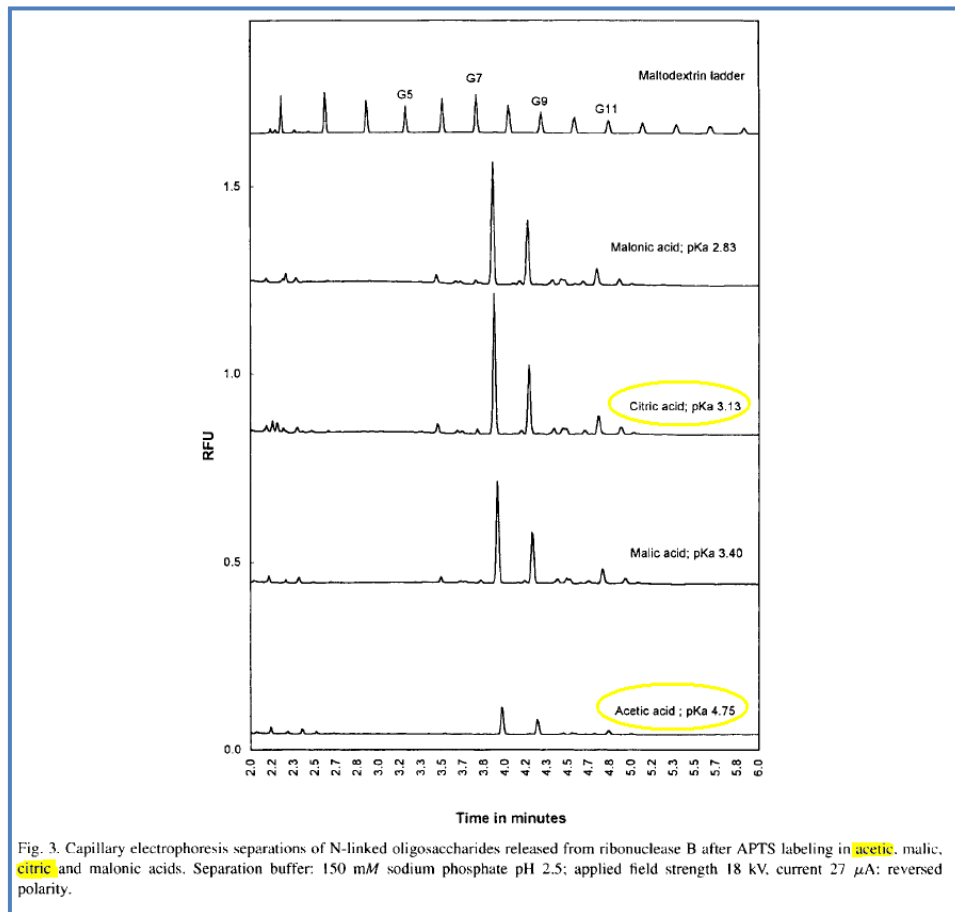
**Abbildung 19: Einfluss der Derivatisierungsmethode auf die CZE Analyse von des Reagenzienblank (pink) und 5mM (A) oder 100mM (B und C) Laktulose gelöst in Wasser (schwarz); Derivatisierung nach „DA“ aber mit Derivatisierungszeit von 2.5 Stunden / 75°C (A), nach „C,L&E modifiziert“ (B) und nach „C,L&E“ genau wie in Literatur (C); Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.5; Peak-Identifizierung: Laktulose (1), Unbekannt (\*).**

Bei gleichen Bedingungen wie die „DA“-Derivatisierung (17) aber mit 2.5 Stunden Inkubationszeit und bei 75°C (Abbildung 19, A) erhält man noch kleinere Peaks als mit 16 Stunden bei 37°C (Abbildung 17, A). Laktulose verschwindet fast im Rauschen. Wahrscheinlich ist die Menge von Laktulose (3.6 µl Zucker 5mM) zu klein. Andere Konzentrationen mit gleichen Bedingungen wurden allerdings nicht getestet.

Mit „C,L&E“-Derivatisierung (Abbildung 19, C) und mit „modifizierte C,L&E“-Derivatisierung (Abbildung 19, B) gibt es für Laktulose mehrere Peaks nach etwa 10 Minuten. Die modifizierte Methode (B) gibt aber grössere Peaks als die originale. APTS-M in

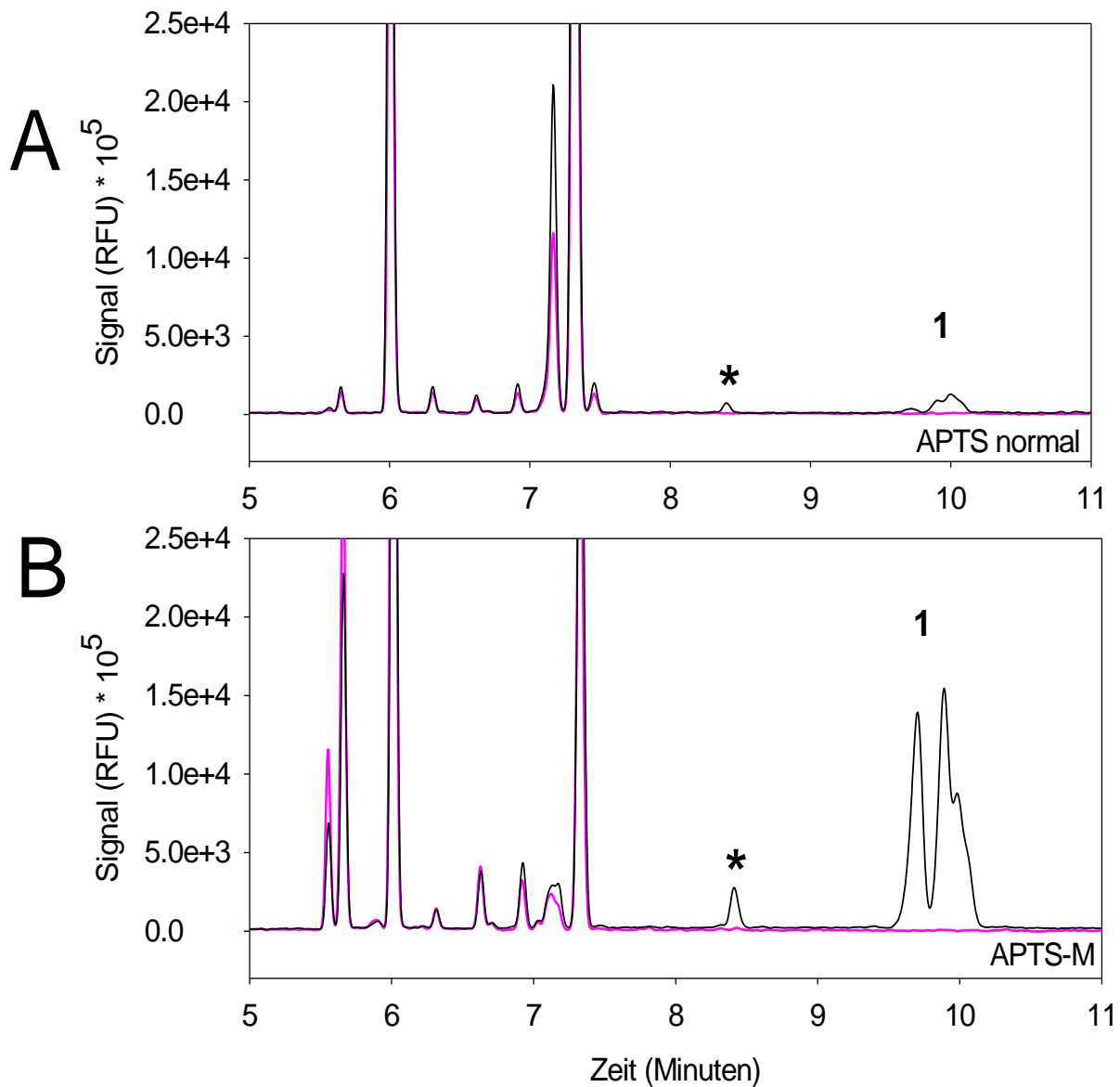
Zitronensäure (Abbildung 19, B / „C,L&E modifiziert“) ist hier für die Laktulose Derivatisierung besser geeignet als normales APTS in Essigsäure gelöst (Abbildung 19, C / „C,L&E“). Mit der „C,L&E modifizierten“ Methode sind die Peaks viel grösser, aber es ist auch klar sichtbar, dass mehr als 2 Peaks entstehen, was Fragen zu einer eventuellen Hydrolyse / Degradation von Laktulose generiert.

Zitronensäure ist für APTS-Derivatisierung theoretisch besser als Essigsäure, weil sie säurer ist. Evangelista & Co (35) haben verschiedene organische Säure getestet und gezeigt, dass sich die Ausbeute der Derivatisierung mit wachsender Säure verbessert, Beispiel siehe Abbildung 20.



**Abbildung 20: Evangelista & Co (35) Elektropherogramme von Oligosacchariden markiert mit APTS gelöst in verschiedenen organischen Säuren, unter ihnen Zitronen- und Essigsäure**

APTS-M ist ein APTS mit höherer Reinheit, speziell für Monosaccharide entwickelt, und sie sollte besser als normales APTS mit den Zuckern reagieren. Dieser Fakt wurde in Abbildung 21 bestätigt, wo das Laktulosesignal nach Derivatisierung mit APTS-M (Abbildung 21, B) grösser ist als mit normalem APTS (Abbildung 21, A) unter ähnlichen Bedingungen.



**Bild 21:** Einfluss der APTS-Reinheit auf die CZE Analyse von Reagenzienblank (pink) und 100mM Laktulose gelöst in Wasser (schwarz); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“ mit APTS normal (A) oder mit APTS-M (B); Analysensystem 4; RB: 50 mM Phosphat Puffer pH 7.5; Peak-Identifizierung: Laktulose (1), Unbekannt (\*).

Entsprechend dem „C,L&E“ (25) modifizierten Derivatisierungsprotokoll unter Verwendung von hochreinem APTS (APTS-M) (Abbildung 21, B) ist ein dem anderen Zucker in 10-maliger Intensität entsprechendes Signal für Laktulose erhalten worden, darauf aufbauend wurden die weiteren Experimente durchgeführt. In einem zweiten Schritt, wie oben diskutiert wurde mit der Reaktionszeit experimentiert. Die Derivatisierung von 100mM Laktulose in Wasser wurde mit 2.5, 5 und 16 Stunden durchgeführt, Ergebnisse siehe Abbildung 22.



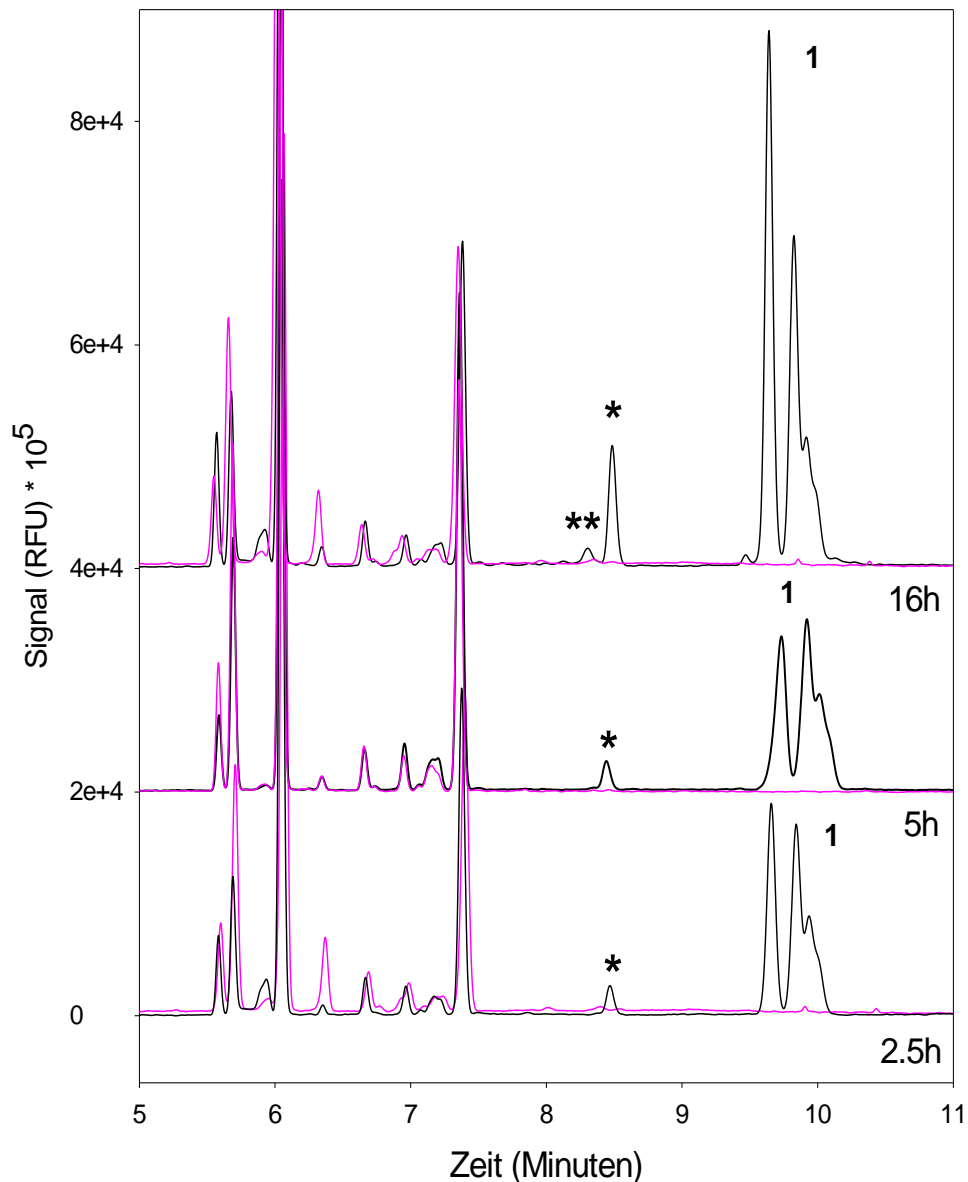


Abbildung 22: Einfluss der Derivatisierungszeit auf die CZE Analyse von Reagenzienblank (pink) und 100mM Laktulose in Wasser (schwarz); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der Y-Achse(+ 2E+4 AU für 5h, + 4E+4 AU für 16h) und Verschiebung auf der X-Achse (+0.03 Minuten für 5h, -0.05 Minuten für 16h); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 4; RB: 50m M Phosphat Puffer pH 7.5; Peak-Identifizierung: Laktulose(1), Unbekannt (\*), Unbekannt (\*\*).

In Abbildung 22 gibt es zwischen 2.5 und 5 Stunden fast keine Differenz in der Intensität der Laktulosepeakgruppe, aber die Intensität der Peaks die nach 16 Stunden Derivatisierungszeit erhalten wurde ist eindeutig stärker. Unter diese Bedingungen sieht man auch einen zusätzlichen Peak nach ungefähr 8.5 Minuten, der mit steigender Derivatisierungszeit grösser wird. Diese Migrazionszeit ist im Bereich der Migartionszeit von Rhamnose, einem Monozucker. Wie vorher schon andiskutiert, hydrolysiert / degradiert Laktulose möglicherweise während der sauren Derivatisierung, je länger um so stärker, und eines der entstehenden Produkte ist möglicherweise Galaktose. Die Hypothese von Spaltung und Abbau könnte das Vorhandensein von Multi peaks erklären und wird in Unterkapitel (4.3.3) weiter betrachtet.

Laktulose reagiert weniger stark als Rhamnose und Xylose mit APTS, der Grund liegt eventuell in der unterschiedlichen chemischen Struktur der Laktulose im Vergleich zu den zwei anderen Zuckern. Xylose und Rhamnose bilden eine stabile Aldoform nach Ringöffnung im sauren Medium getestet, die die Voraussetzung für die effektive reduktive Aminierung und damit Derivatisierung sind. Fruktose liegt nach der Ringöffnung in saurem Medium in einer Ketoform vor, diese kann sich in der Kettenform intramolekular über eine Endiol-Form zu Glukose umlagern. Begünstigt wird dieser Prozess durch ein alkalisches Milieu (Katalysatorwirkung). Da dies eine Gleichgewichtsreaktion ist, findet auch eine Rückreaktion statt. Diese Reaktion kommt nicht zum Stillstand solange Fruktose / Glukose vorhanden sind (36). Glukose ist ein reduzierender Zucker, der sich aufgrund seiner Aldoform gut derivatisieren lässt. So könnte vielleicht ein alkalisches Milieu für die Derivatisierung interessant sein, weil Glukose keiner Ketose aber eine Aldose ist und somit effizienter reagiert als Fruktose. Es ist jedoch fraglich, ob die Derivatisierung unter solchen Bedingungen noch funktionieren wird. Paulus & Co (12) haben das bejaht: „*Although the reductive amination works best in a pH range of 6 to 8, the reaction has been shown to work successfully at a pH as low as 4 and as high as 10.*“ Um diese Aussage für Laktulose zu testen, wurden 100mM Laktulose Lösung in Wasser, in NaOH 0.1M und in Ammoniak nach einer „modifizierten C,L&E“-Methode derivatisiert, d.h. im Vergleich zur ursprünglichen Prozedur wurden das Zuckerlösungsmittel verändert, die Ergebnisse sind in Elektropherogrammen Abbildung 23 gezeigt.

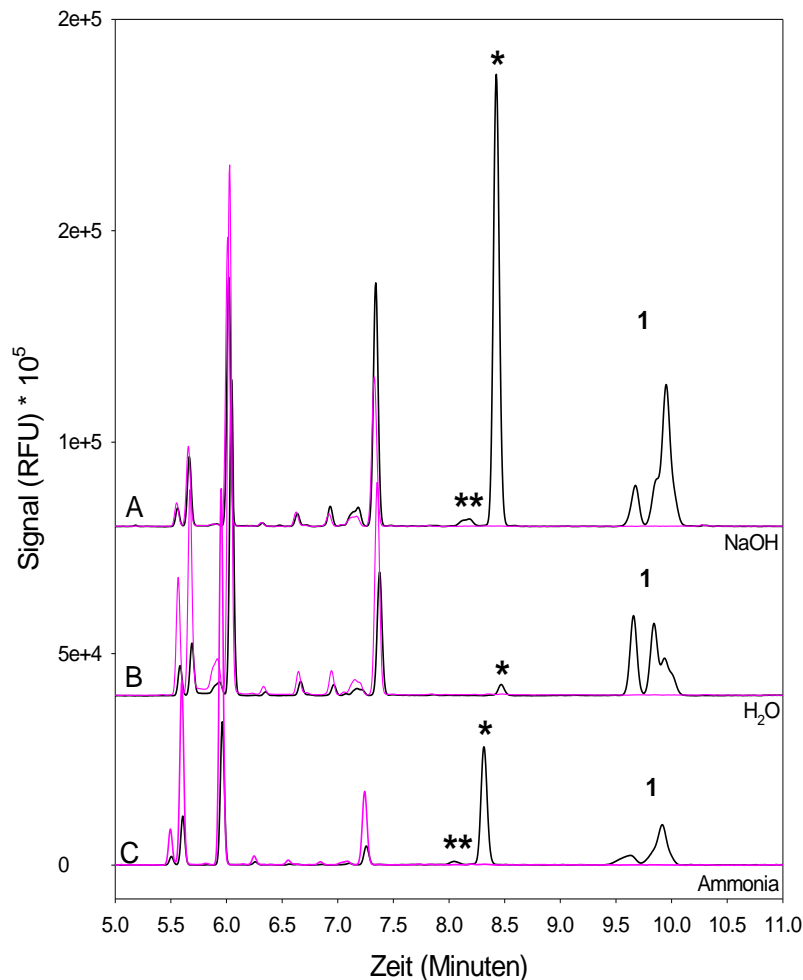


Abbildung 23: : Einfluss des Zuckerlösungsmittels auf die CZE Analyse von Reagenzienblank (Wasser) (pink) und 100mM Laktulose gelöst (schwarz) in 0.1 M NaOH, in Wasser und in 32% Ammoniaklösung;

Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der Y-Achse (+ 4E+4 AU für Wasser, + 8E+4 AU für NaOH); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.5; Peak-Identifizierung: Laktulose(1), Unbekannt (\*), Unbekannt (\*\*).

Die basischen Bedingungen zur Derivatisierung einer Laktuloselösung in 32% Ammoniaklösung pH 12.65 und in 0.1 M Natronlauge, pH = 12.70 (Abbildung 23) fördern klar die Bildung des Peaks mit einer Migrationszeit von ca. 8.4 Minuten, der im Migrationsbereich der Monosaccharide kommt und der im Falle des NaOH als Lösungsmittel am grössten ist. Wahrscheinlich ist das Disaccharid hydrolysiert und ist dieser Peak ein Monosaccharid. Diese Hypothese wird in Kapitel 4.3.3 diskutiert. Da dieser Peak eine ähnliche Migrationszeit wie Rhamnose hat, ist er ein Problem für die Analyse des interessierenden Zuckergemisches, um ihn zu minimieren wurden für die nachfolgende Derivatisierung neutrale Bedingungen zum Lösen des Zuckers verwendet.

In einer weiteren Trennung, Elektropherogramm nicht gezeigt, mit diesen optimisierten Bedingungen („C,L&E modifiziert“, neutrale Bedingungen, 2.5 Stunden Derivatisierungsreaktion, Analysensystem 4, RB: 50mM Phosphat pH 7.50, 5mM 3-Zuckermix) zeigt, dass der Laktulosepeak immer noch ungefähr 20x kleiner als Rhamnose und Xylose ist, das heisst dass die Ausbeute für diese 2 Zucker auch grösser ist, ein LOQ von ca.  $5 \cdot 10^{-9}$  M wird geschätzt, niedriger als die mit der „DA“-Derivatisierung ( $1 \cdot 10^{-9}$  M).

#### 4.3.3. Untersuchung weiterer Mono- und Disaccharide

Um die Hypothese der Hydrolyse von Laktulose (4-O-β-D-Galaktopyranosyl-D-Fruktofuranose) zu bestätigen, wurden die Monosaccharidbausteine der Laktulose, Fruktose und Galaktose derivatisiert und analysiert. Da das Problem der schlechten Ausbeute der Derivatisierungsreaktion für mit Laktulose wahrscheinlich auf seinen Fruktose Teil zurückzuführen ist, wurde Saccharose (1-α-D-Glukopyranosyl-2-β-D-Fruktofuranose) auch derivatisiert, das auch endständige Fruktose enthält. Um eine weitere Hypothese der möglichen Umwandlung der Laktulose in Laktose (1-α-D-Glukopyranosyl-4-Laktuloseβ-D-glucopyranose) zu bestätigen wurde auch Laktose analysiert.

Die 8 Zucker wurden gemischt und nach „C,L&E modifiziert“ derivatisiert und mit Analysensystem 4 analysiert. Die einzelnen Zucker wurden auch derivatisiert und analysiert, um die Peaks zu identifizieren. Das Elektropherogramm der Mischung der 8 Zucker ist in Abbildung 25 gezeigt, die Peakhöhen und Migrationszeiten den einzeln analysierten derivatisierten Zucker (die Elektropherogramme sind nicht gezeigt) sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13 Peakhöhen und Migrationszeiten von 8 einzeln derivatisierten und analysierten Zuckern gelöst in Wasser (je 100 mM) nach C,L&E derivatisiert und mit Analysensystem 4 analysiert**

N°	Zucker	Höhe (RFU)	Migrationszeit (Min)	Monosaccharid	Disaccharid
1	Laktulose	0.2	9.890	-	Gal + Fruc
2	Rhamnose	7.8	8.396	✓	
3	Xylose	10.8	8.012	✓	
4	Laktose	7.4	9.871	-	Gal + Gluc
5	Glukose	8.7	8.417	✓	

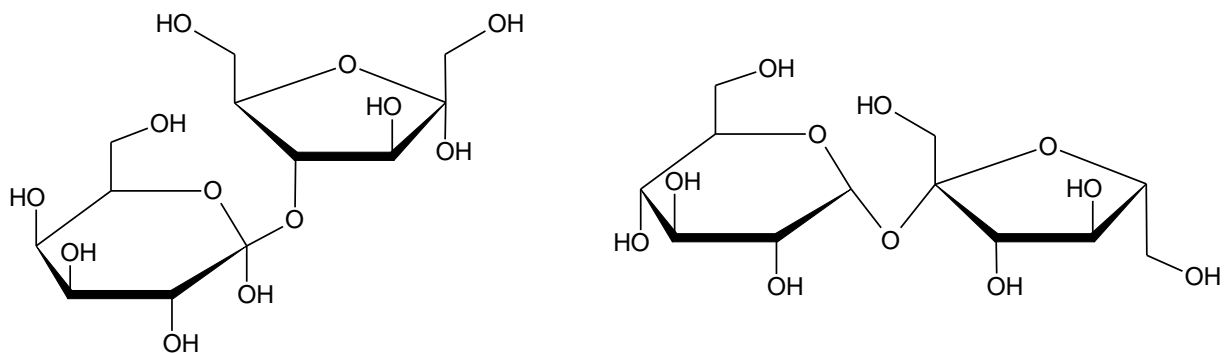
## LIF Detektion nach APTS-Derivatisierung

6	Fruktose	0.5	8.379	✓	
7	Saccharose	1.3	8.417	-	Gluc + Fruc
8	Galaktose	10.0	8.546	✓	

Galaktose und Fruktose, die zwei Einheiten von Laktulose, haben eine Migrationszeit von ungefähr 8.5 und 8.4 Minuten, was bedeutet, dass die Peakgruppe von Laktulose, die bei ca. 9.5 Minuten kommt, nicht diese Monosaccharide sind.

Die Intensität des Fruktosepeaks ( $H=0.5$ ) ist fast so gering wie Laktulose ( $H=0.2$ ), was nahelegt, dass Laktulose mit APTS nicht gut reagieren kann, da die reduktive Aminierung an seinem Fruktoseteil stattfindet. Saccharose, wo auch der Fruktose Teil reagiert, ist etwas besser derivatisiert, d.h. zeigt eine etwas höhere Peakintensität ( $H=1.3$ ). Die Fruktosereste von Saccharose und Laktulose haben eine verschiedene glykosytische Bindung zwischen den 2 Monosaccharidbausteinen. Der C-1 Kohlenstoff von Laktulose ist in einer Halbacetalstruktur und der von Saccharose ist einer Ketalstruktur (Abbildung 24). Dieser ist aber nicht so gut derivatisiert wie Galaktose ( $H=10.0$ ), Glukose ( $H=8.7$ ), Rhamnose ( $H=7.8$ ) oder Xylose ( $H=10.8$ ). Saccharose hat die genau gleichen Migrationszeit wie Glukose, ein von seinen Monosaccharidbausteinen, was bedeuten kann, dass sie während der Derivatisierungsreaktion in seine Monosaccharidbausteine aufgespalten wird und somit als Glukose migriert und detektiert wird.

Entsprechend dieser Beobachtungen kann man mit Sicherheit annehmen, dass bei der Derivatisierung unter basischen Bedingungen (Abbildung 21 / 4.3.2) Laktulose teilweise gespalten wird und seine Monosaccharide detektiert werden, dabei Glukose mit einer höheren Intensität als Fruktose.



**Abbildung 24: Chemische Struktur von Laktulose (4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-Fructofuranose) (links) und Saccharose (1- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-2- $\beta$ -D-Fructofuranose) (rechts)**

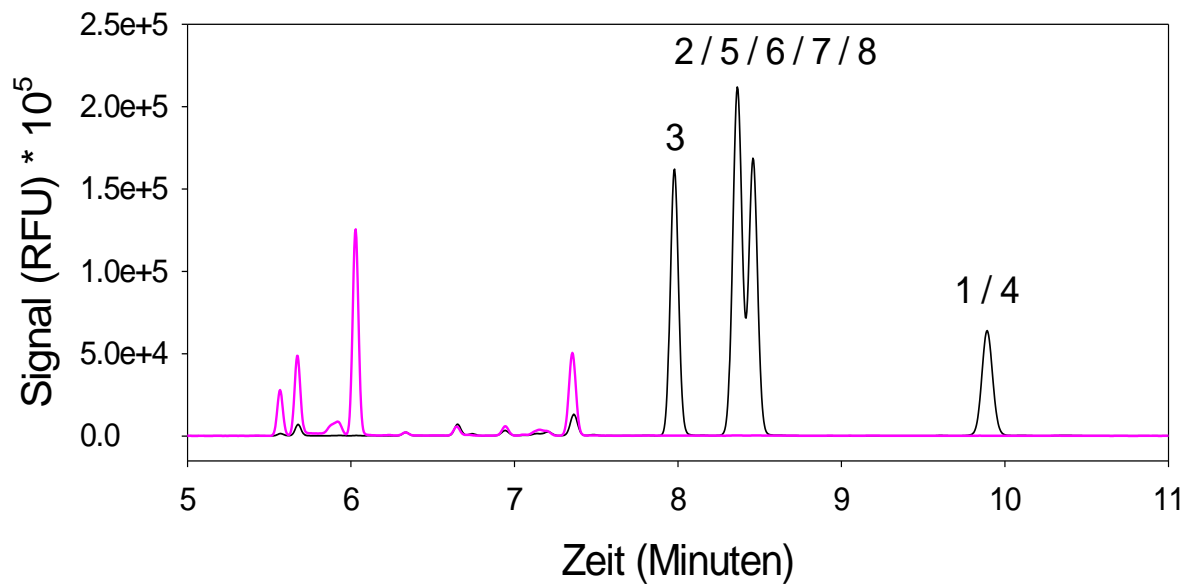


Abbildung 25: CZE Trennung von 8 Mono- und Disacchariden (100mM 8-Zuckermischung), Reagenzienblank (pink) und 8-Zuckermix (schwarz); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.5.; Peak Identifizierung: Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3), Laktose (4), Glukose (5), Fruktose (6), Saccharose (7), Galaktose (8).

Abbildung 25 zeigt das Elektropherogram der 8-Zuckermix; es ist klar sichtbar, dass die 8 Zucker nicht gut getrennt sind, anstelle von 8 Peaks erhält man nur 4 Peaks. Rhamnose (2) überlappt mit anderen Zuckern. Laktulose (1) und Laktose (4) sind nicht getrennt, aber der Peak ist sehr symmetrisch, so wahrscheinlich dominiert Laktose und überdeckt den kleinen Laktulose-Peak.

Die Anwendung der N-CHO *coated capillary* ist vorteilhaft, weil die Migrationszeiten reproduzierbar sind. Wie die Versuche in Abbildung 25 zeigen, ist die Trennung für die verschiedenen Zucker unter gegebenen Bedingungen nicht selektiv. Da im Urin Laktose oder Glukose vorkommen können, was bei bestimmten Krankheitsbildern der Fall ist, ist die Methode für Laktulose und Rhamnose nicht spezifisch genug und würde zu Falschresultaten führen.

In der Publikation von Chen, Liu und Evangelista (25) sind die Zucker aus Abbildung 25 gut getrennt (Abbildung 26), aus diesem Grund haben wir versucht, diese Analyse zu reproduzieren (Abbildung 27, Analysensystem 3). Mit einer nicht modifizierten Quarzkapillare (20 µm Innendurchmesser, 40 cm lang), -20 kV und 100 mM Borat Puffer pH 10.2 wurden tatsächlich die 8 Zucker besser getrennt, jedoch nicht vollständig (Abbildung 27). Um die Peaks zu identifizieren, war es nötig, mit gespickten Proben zu arbeiten.

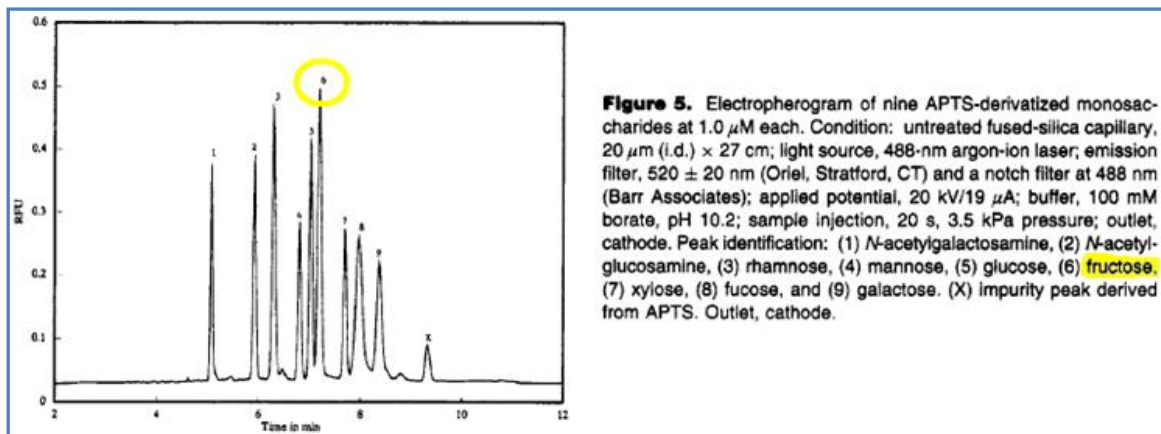


Abbildung 26: Elektropherogram einer Publikation von Chen, Liu und Evangelista (C,L&E) (25)

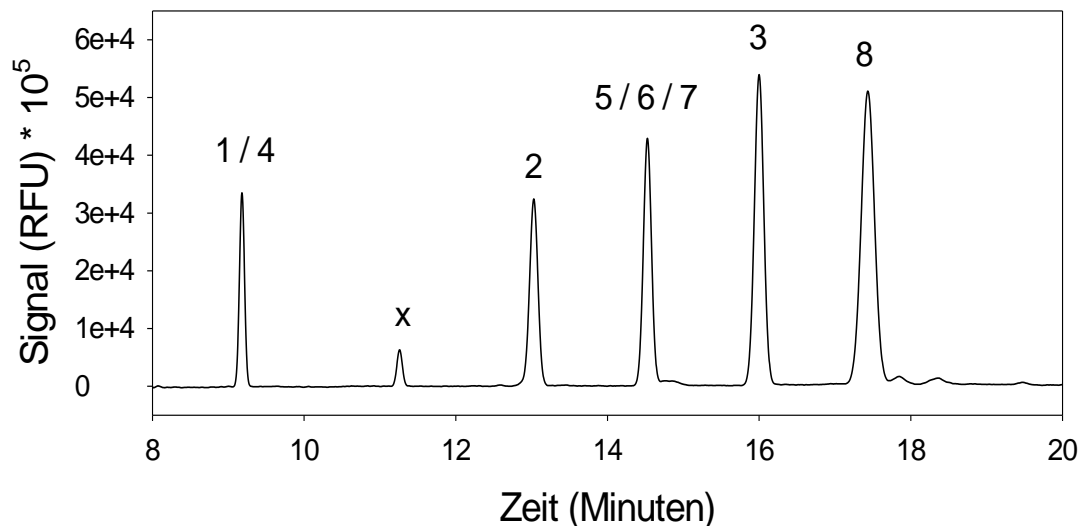


Abbildung 27: Trennung von 8 Mono- und Disacchariden mit CZE; 100mM 8-Zuckermix in Wasser gelöst; Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 3; RB: 100mM Borat Puffer pH 10.2; Peak Identifizierung: Laktulose (1), Rhamnose (2), Xylose (3), Laktose (4), Glukose (5), Fruktose (6), Saccharose (7), Galaktose (8), Reagenzpeak (x).

In Abbildung 27 sind Glukose, Fruktose und Saccharose nicht getrennt, jedoch Rhamnose ist abgetrennt. Galaktose (8) ist auch von den anderen Zuckern getrennt, was die Möglichkeit eröffnet, Laktulose nach enzymatischer Spaltung in Galaktose und Fruktose als Galaktose statt Laktulose zu detektieren und quantifizieren.

Allerdings, mit der *uncoated* Kapillare sind die Migationszeiten nicht reproduzierbar, d.h. in der Routine müsste immer eine Peakidentifizierung erfolgen oder man müsste die elektrophoretischen Mobilitäten mittels eines Markers berechnen, was von beiden Alternativen die zeitsparendere Variante darstellt und eher routinetauglich ist.

#### 4.3.4. Diskussion

Wie die Ergebnisse mit LIF-Detektion nach APTS Derivatisierung zeigen, sind die 5 Derivatisierungsmethoden („DA“, „C&E“, „Picoline“, „C,L&E“ und „C,L&E modifiziert“) für Rhamnose und Xylose erfolgreich. Picoline-Boran ist ein sehr interessanter Ersatz für Natrium Cyanoborhydrid, das für die Umwelt und die Gesundheit gefährlich ist, und ausserdem zusätzlich Matrixpeaks zeigt.

Wie erwartet, ist die LIF Detektion viel empfindlicher als die UV-Detektion. Eine LOD von  $5 \cdot 10^{-9}$  M mit „C,L&E modifizierte“-Derivatisierung, Analysensystem 3 und 50mM Phosphat Puffer pH 7.50 wurde erreicht. Diese Empfindlichkeit ist etwa 1000 x grösser als die der UV-Detektion und liegt etwa 1000 fach unter der Konzentration von  $6 \cdot 10^{-6}$  M, dem Ziel dieser Arbeit. Damit ist auch die Detektion der etwa 20 x weniger empfindlichen Laktulose im geforderten Konzentrationsbereich möglich.

Die „C,L&E modifiziert“-Derivatisierungsmethode mit APTS-M in Zitronensäure zeigt für Rhamnose und Xylose eine hohe, dem Ziel dieser Arbeit entsprechende Ausbeute. Die Zucker-APTS-Derivate, kann man reproduzierbar mit der *coated N-CHO capillary* von Beckman Coulter *reversed polarity* und Phosphat Puffer pH 7.50 gut trennen und mit LIF Detektion empfindlich detektieren. Jedoch kann Rhamnose nicht von anderen, im Urin eventuell vorkommenden Monosacchariden, abgetrennt werden. Laktulose zeigt in allen Fällen (Temperatur-, pH-, Reaktionszeitänderung) eine geringere Intensität als die zwei Monozucker, ungefähr 20 x kleiner als Rhamnose oder Xylose, auch Temperatur und pH Optimierung bringen keine Ideallösung. Fruktose und Saccharose sind im Vergleich zu den Aldosen schwierig derivatisierbar, wie schon von anderen Forschungsgruppen dargestellt (33). Mit basischen Bedingungen oder mit wachsender Reaktionszeit entsteht als Hydrolyseprodukt der Laktulose Glukose, die nach 8.5 Minuten gleich Rhamnose migriert, und sich damit mit Rhamnose überlappt. So ist es besser, mit 2.5 Stunden Derivatisierungszeit und in neutrale Bedingungen zu arbeiten.

Um die Monosaccharide Rhamnose / Xylose von anderen eventuell im Urin vorkommenden Monosacchariden abzutrennen ist es nötig, die Trennung mit einer *uncoated fused silica capillary, normal polarity* und Borat Puffer pH 10.2 durchzuführen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Migrationszeiten nicht sehr reproduzierbar sind. Auf der anderen Seite wäre es möglich, empfindlich Galaktose als Spaltprodukt der nicht empfindlich nachweisbaren Galaktose zu detektieren.

#### **Zusammenfassend lässt sich sagen:**

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde ein optimiertes Probenvorbereitungs-, Trenn- und Detektion für Laktulose, Xylose und Rhamnose entwickelt („C,L&E modifiziert“, Analysensystem 3) das ihre effiziente Trennung mit einer Migrationszeit von 9.9 für Laktulose, 8.4 für Rhamnose und 8.0 für Xylose mit der *coated N-CHO capillary* von Beckman Coulter, *reversed polarity* und Phosphat Puffer pH 7.50 ermöglicht. Die drei Zucker sind auch von möglichen Matrixzuckern des Urins abgetrennt. Das Detektionslimit ist für Xylose und Rhamnose etwa  $5 \cdot 10^{-9}$  M mM und für die Laktulosepeakgruppe etwa  $1 \cdot 10^{-7}$  mM.

Dieses „C,L&E modifiziert“ optimierte System hat Potential um eine routineteugliche Methode für die Gastrountersuchung von Zuckern zu erhalten. Es muss jedoch noch Entwicklungsarbeit geleistet werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Die Vorteile diese Systems bestehen in:



1. Routinetauglich: sehr reproduzierbar, schnelle Trennung (10 Minuten), gute Abtrennung von Matrixkomponenten aus dem Urin,
2. Empfindlich genug zur Bestimmung von Xylose, Rhamnose und Laktulose entsprechend dem geforderten Detektionslimit von  $5 \cdot 10^{-9}$  M für Rhamnose und Xylose und ca  $1 \cdot 10^{-7}$  M für Laktulose, trotzdem das Laktulose 20 x weniger empfindlich detektiert werden kann als Rhamnose und Xylose.

Seine Nachteile bestehen in:

1. Die Methode ist für Laktulose und Rhamnose nicht spezifisch genug und würde zu Falschresultaten führen, da im Urin Laktose oder Glukose vorkommen können, d.h. das Trennsystem muss so optimiert werden, dass Glukose und Rhamnose als auch Laktulose und Laktose getrennt werden
2. Laktulose migriert in mehreren Peaks und die Derivatisierungsreaktion ist etwa 20x weniger effizient als für Rhamnose und Xylose. Die Derivatisierungsreaktion für Laktulose muss im Detail untersucht werden, z.B. läuft sie quantitativ ab? Was sind die Bestandteile der Peakgruppe? Kann ein einzelner Peak dieser Gruppe zur Laktulosequantifizierung herangezogen werden? Dementsprechend sollte die Reaktion optimiert werden.

Das optimierte System wird im Folgenden für Urinproben getestet.

## 4.4. Urinanalyse

Am Institut für Klinische Pharmakologie und Viszerale Forschung Universität Bern wurde 2010 eine Arbeit auf ähnlichem Gebiet zur quantitativen Bestimmung von Laktulose, Rhamnose und Xylose in Urin durchgeführt. Die Zucker wurden in Urin mit GC-MS quantifiziert. Die gleichen Proben wurden auch von einer Arbeitsgruppe in England mittels LC-MS analysiert, beide Methoden ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Für diese Arbeit waren 7 Urinproben verfügbar, einige von Patienten und einige von gesunden Testpersonen. Bei allen Personen wurde vor und nach der Zuckeraufnahme Urin gesammelt. Die Urinprobe vor Zuckerabnahme ist eine „*overnight*“ Probe, d.h. der Urin wurde nach Zuckerverabreichung am Morgen gesammelt. Die Probe nach Zuckeraufnahme wurde 5 Stunden nach der Zuckeraufnahme gesammelt.

Der Urin kann verschieden konzentriert sein, abhängig davon, wieviel die betreffende Person getrunken hat. Das war auch an den untersuchten Urineproben sichtbar, die „*overnight*“ Proben sind für fast alle Patienten dunkler als die 5 h Proben, was einer erhöhten Ureakonzentration zuzuschreiben ist. Wenn keine zusätzlichen Matrixeffekte auftreten, ist das für den intestinalen Permeabilitätstest kein Problem, da nicht die Urinmengen wichtig sind, sondern die Verhältnis zwischen Laktulose und Rhamnose oder zwischen Laktulose und Xylose. Da mit der entwickelten Analysenmethode Laktulose in mehreren Peaks migriert, kann man dieses Verhältnis nicht genau berechnet werden. Es wurde in den folgenden Urinuntersuchungen daher das Xylose / Rhamnose Verhältnis berechnet.

Um den Urin vor und nach Zuckeraufnahme zu vergleichen, müssen die Probe gleich konzentriert sein. Dafür wurde die Leitfähigkeit jede Probe gemessen, und die Urine wurden verdünnt (1.5 bis 5 x), um ähnliche Werte zu haben (auf 5.0-5.6 mS/cm normalisiert). Diese normalisierten Proben wurden dann derivatisiert und analysiert. Die Verdünnungsfaktoren sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

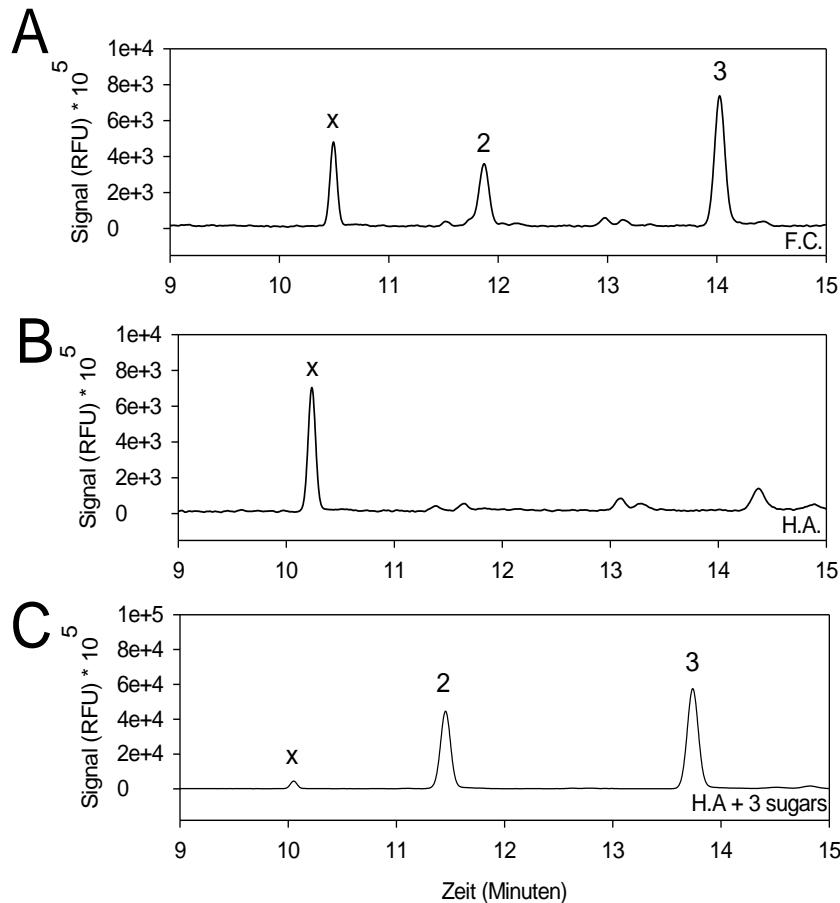
**Tabelle 14: Verdünnungsfaktoren von Urin entsprechend Testpersonen und Patienten, vor Zuckeraufnahme („*overnight*“ Probe: ON) und 5 h nach Zuckeraufnahme (5h)**

Patient	Verdünnungsf.		Testperson	Verdünnungsf.	
	ON	5 h		ON	5 h
<b>H.M</b>	3.8	3.45	<b>P.N</b>	2.88	1.52
<b>S.E</b>	3.98	2.34	<b>M.A</b>	4.40	1.81
<b>G.M</b>	3.13	2.93	<b>H.A</b>	1.44	-
<b>F.C</b>	4.83	1.78	<b>C.J</b>	4.80	-
<b>M.T</b>	2.12	2.21			

Die Urinproben wurden meistens als „normalisierte“ Probe d.h. verdünnt gemessen, einige wurden jedoch auch vor der Normalisierung gemessen. Wenn normalisiert, wird das in der Legende der Elektropherogramme angegeben.

Die 9 Proben wurden nach „C,L&E modifiziert“ derivatisiert und mit Analysensystem 3 und 4 analysiert. Wie schon erwähnt liefert das Analysensystem 4, reproduzierbare Resultate

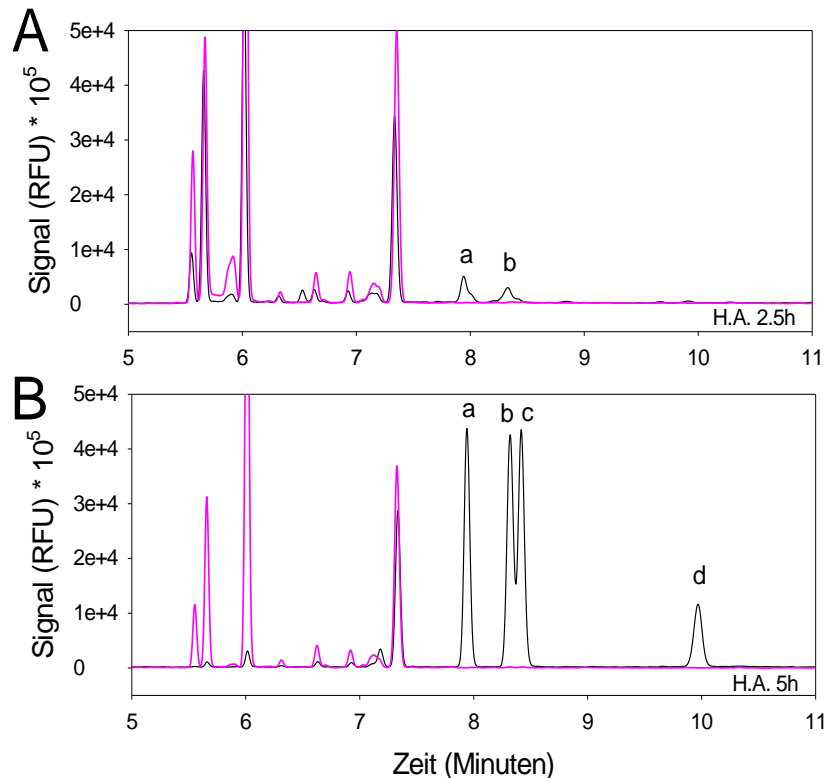
bezogen auf Migrationszeiten und Peakflächen. Die Urine von Patient F.C, dem Rhamnose, Xylose und Laktulose verabreicht wurde, wurde nach „C,L&E modifiziert“ derivatisiert und mit Analysensystem 4 analysiert. Nach dem gleichen Verfahren wurde der Urin der Testperson H.A., die keinen Zucker aufgenommen hat, ungespiked und mit den 3 Zuckern gespiked (H.A. + 3 sugars) analysiert (Abbildung 28).



**Abbildung 28: CZE Trennung von Urinproben Patient (F.C) 5 Stunden nach Zuckerverabreichung (A), Testperson (H.A.) ohne Zuckerverabreichung (B) und (H.A.) mit einer 3-Zuckerlösung nicht quantitativ gespiked (C); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 3; RB: 100 mM Borat Puffer pH 10.2; Peak-Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3), Reagenzpeak (x).**

Der Rhamnose- und Xylosepeaks von F.C. (Abbildung 28, A) sind gut sichtbar, Laktulose konnte nicht detektiert werden. In den Proben von H.A. (Abbildung 28, B) sind die Zucker wie erwartet nicht detektierbar. Für kleine Peaks ist die Peakzuordnung aufgrund leicht schankender Migrationszeiten schwierig, d.h. eine Identifizierung nur über die Mobilitäten mit Hilfe eines internen Mobilitätsstandards oder durch Spiken möglich (Abbildung 28, C).

Das Analysensystem 4, mit einer N-CHO *coated capillary* von Beckman Coulter liefert vielen reproduzierbare Resultate bezogen auf die Migrationszeit. Aus diesem Grund, und trotz Überlappungsproblemen von Rhamnose mit Glukose, Fruktose, Saccharose und Galktose wurde dieses System für die folgende Urinanalyse und für die Quantifizierung gebraucht. Die Urine einer Testperson (H.A.), die keine Rhamnose, Xylose und Laktulose aufgenommen hat, wurde nach „C,L&E modifiziert“ für 2.5 und 5 Stunden derivatisiert. Die Elektropherogramme sind in Abbildung 29 gezeigt.

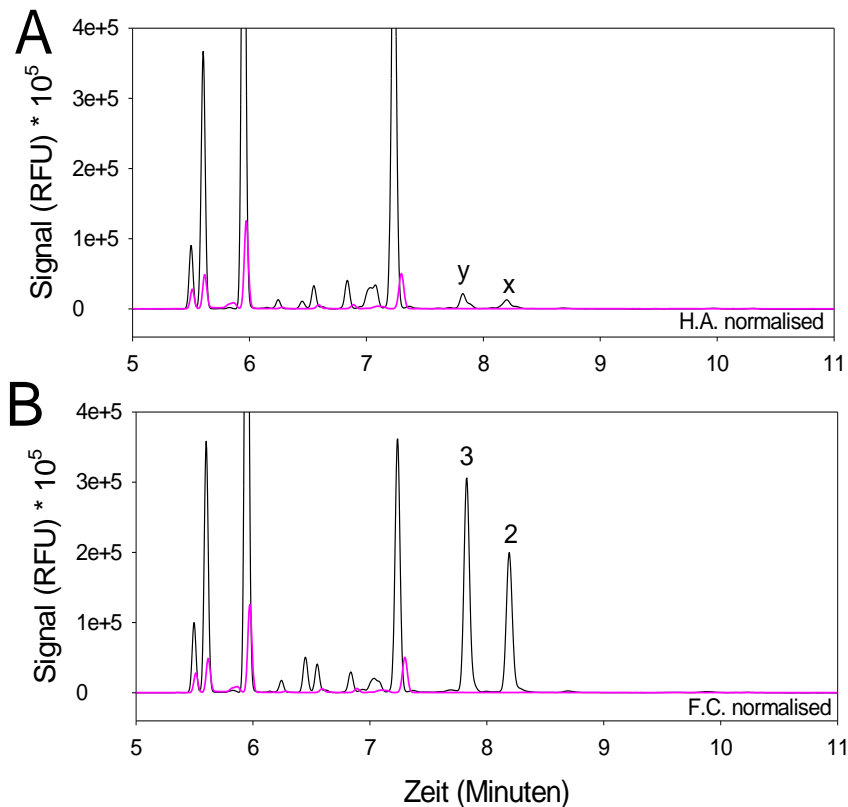


**Abbildung 29: Einfluss der Derivatisierungszeit auf die CZE Trennung von humanen Urinproben, Reagenzienblank (pink) und Urin (schwarz); Testperson (H.A.) ohne Zuckeraufnahme 2.5 h (A) und 5 h (B) derivatisiert; Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peak-Identifizierung: Unbekannt (a)-(d).**

Nach 2.5 Stunden (Abbildung 29, A) gibt es zwischen 7.5 und 8.5 Minuten 2 Peaks (a und b), die mit der gleichen Migrationzeit wie Rhamnose und Xylose kommen. Jin & Co (37) haben gefunden, dass der Urin einer „normalen, gesunden“ Person Laktose, Glukose, Xylose und Arabinose enthält. Entsprechend der Migrationszeiten der 8-Zuckeranalyse (Kapitel 4.3.3.) ist Peak (a) wahrscheinlich Xylose und den Peak (b) Glukose. Diese Hypothese wurde jedoch mit gespickten Proben noch nicht bewiesen, aus diesem Grund sind die Namen in der Legende „Unbekannt“.

Nach 5 Stunden (Abbildung 29, B) sind die Peaks der derivatisierten Zucker viel grösser und die von der Marix / Reagenzien relativ kleiner. Peaks (b/c) sind eventuell Glukose und Arabinose, die auch ein Monosaccharid ist. Ein Peak (d) ist auch sichtbar, wahrscheinlich Laktose.

Der Urin von Patient (F.C.), Probennahme 5 Stunden nachdem er 1g Rhamnose, 0.5g Xylose und 5g Laktulose aufgenommen hat, wurde mit dem einer Testperson ohne Zuckeraufnahme (H.A.) verglichen. Die Leitfähigkeit dieser 2 Proben wurde zuerst gemessen und die Proben wurden normalisiert. Die zwei Elektropherogramme sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: CZE Trennung von normalisierten humanen Urinproben Reagenzienblank (pink) und normalisiertem Urin (schwarz) einer Testperson (H.A.) ohne Zuckeraufnahme (A) und einer (F.C.) 5h nach Zuckeraufnahme (B); Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peak-Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3), Unbekannt (x), Unbekannt (y).**

In Abbildung 30 sieht man klar einen Unterschied zwischen den Proben der Testperson ohne (H.A.) und mit (F.C.) Zuckeraufnahme. Die Menge der Zucker im Urin der Testperson ohne Zuckeraufnahme ist unbedeutend. Die Peaks 2 und 3 sind sehr wahrscheinlich Rhamnose und Xylose und die Peaks x und y Glukose und Xylose oder Arabinose. Es ist sehr wahrscheinlich, dass unten den Rhamnose- und Xylosepeaks von F.C. (Abbildung 30, B) kleine Glukose- und Xylospeaks vorhanden sind, die nicht abgetrennt sind.

Der Arbeit mit der GC-MS Analyse der gleichen 7 Proben hatte Konzentrationsbereiche von 8 bis 40  $\mu\text{g/ml}$  (20-120  $\mu\text{M}$ ) Laktulose, 40 bis 180  $\mu\text{g/ml}$  (200-1000  $\mu\text{M}$ ) Rhamnose und 70 bis 250  $\mu\text{g/ml}$  (460-1650  $\mu\text{M}$ ) Xylose für die Patienten ergeben. Um sich ein Bild von der Präzision und Spezifität der Methode zu machen, wurde eine Quantifizierung durchgeführt, zuerst für jeden Zucker mit einer spezifischen Eichkurve in Wasser und dann auch in Urin, um den Matrixeffekt zu testen.

#### 4.4.1. Eichkurve in Wasser

5 Proben mit zunehmenden Konzentrationen von Rhamnose und Xylose gelöst in Wasser wurden nach „C,L&E modifiziert“ derivatisiert und mit „Analysensystem 4“ analysiert. Die Peakflächen-Konzentrationsgeraden von 2 Eichkurven zeigen einen Regressionskoeffizienten  $r^2$  von 0.9997 (Eichkurve und Peakfläche sind im Anhang dargestellt). Die Rhamnose- und Xylosekonzentrationen wurden mit diesen Eichkurven berechnet und sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

## Urinanalyse

**Tabelle 15: Rhamnose- und Xylose Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) in normalisiertem Urin von Testpersonen und Patienten, ohne und mit Zuckeraufnahme, mit Eichkurve aufgenommen mit in Wasser gelösten Zuckerstandrds berechnet, Verdünnungsfaktor, Rhamnose- ( $C_{\text{Rham}}$ ) und Xylosekonzentration ( $C_{\text{Xyl}}$ ) vor Zuckeraufnahme (Overnight Probe : ON) und nach Zuckeraufnahme (5 Stunden nach Zuckeraufnahme : 5h)**

Patient					Testperson				
Name	$C_{\text{Rham}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$C_{\text{Xyl}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		Name	$C_{\text{Rham}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$C_{\text{Xyl}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	ON	5h	ON	ON		ON	5h	ON	5h
<b>H.M</b>	*	79.4	*	121.1	<b>P.N</b>	29.4	91.1	116.4	161.5
<b>S.E</b>	5.5	74.9	8.9	116.2	<b>M.A</b>	32.7	106.7	40.4	136.7
<b>G.M</b>	40.7	42.6	12.3	36.8	<b>H.A</b>	13.7	-	18.8	-
<b>F.C</b>	53.3	141.3	32.1	205.8	<b>C.J</b>	26.6	-	41.2	-
<b>M.T</b>	35.2	127.7	21.4	155.6					

\*technisches Problem mit der Analyse

Die erwartenden Werte für Zucker in Urin nach Zuckeraufnahme sollen in einem Bereich von 40 bis 180  $\mu\text{g/ml}$  für Rhamnose und 70 bis 250  $\mu\text{g/ml}$  für Xylose liegen. Trotz der Unspezifität der Trennmethode sind die erhaltenen Werte im erwartende Bereich, was bedeutet, dass die Methodik akkurat ist und die Menge von anderen im Urin enthaltenen Zuckern wahrscheinlich so gering sind, dass sie die Richtigkeit der Rhamnose und Xylosebestimmung nicht stören. Wie erwartet, sind die Konzentrationen nach Zuckeraufnahme in allen Fällen grösser als vor Zuckeraufnahme.

In den früheren Arbeiten wurden die Konzentrationen nach Zuckeraufnahme mit GC-MS gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 zusammengefasst und mit den CE-Werte verglichen. Die GC-MS Werte waren nicht normalisiert, daraus folgt, dass die CE-Werte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert wurden.

**Tabelle 16: Rhamnose- und Xylose Konzentrationen ( $C_{\text{Rham}}$  und  $C_{\text{Xyl}}$ ) in  $\mu\text{g} / \text{ml}$  im normalisiertem Urin von Testpersonen oder Patienten nach Zuckeraufnahme (5h) mit Kapillarelektrophorese (CE) analysiert, Eichkurve in Wasser, Ergebnisse mit Verdünnungsfaktor multipliziert, vergleichen mit LC-MS (*liquid chromatography - mass spectrometry*) Werte einer früheren Arbeit mit den gleichen Proben (nicht normalisiert).**

Patient / Testperson	$C_{\text{Rham}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		(a)/(b)	$C_{\text{Xyl}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		(c)/(d)
	CE (a)	GC-MS (b)		CE (c)	GC-MS (d)	
<b>H.M</b>	273.8	123.8	2.2	417.9	235.8	1.8
<b>S.E</b>	175.2	91.8	1.9	271.8	172.0	1.6
<b>G.M</b>	124.9	34.8	3.6*	107.8	71.2	1.5
<b>F.C</b>	251.6	151.3	1.7	366.4	253.3	1.4

## Urinanalyse

<b>M.T</b>	282.1	176.9	1.6	343.8	255.4	1.3
<b>P.N</b>	138.5	89.5	1.5	245.5	188.2	1.3
<b>M.A</b>	193.1	126.0	1.5	247.4	191.9	1.3

\*Ausreisser (Q-Test)

Die CE-Werte sind alle grösser als die GC-MS Werte. Ausser einem Ausreisser (3.6 wurde nach einem Q-Test eliminiert) sind die Werten relative konstant, sie sind zwischen 1.3 x und 2.2 x grösser als GC-MS Werte (Durchschnitt = 1,7 x grösser, Variationskoeffizient 16.0%). Ursache der grösseren Werte aus den CE Analysen könnte sein, das die Methode auch andere Zuckern detektiert, und die nicht von den Rhamnose und Xylose Peaks abgetrennt sind. Auf der anderen Seite haben die vorangehenden Untersuchungen keine grosse Mengen an patienteneigenen Zuckern gezeigt, d.h. die Diskrepanz könnte auch in einer nicht akkuraten GC-MS-Methode liegen, um genauere Aussagen zu liefern, müssten die Wiederfindungsrate, Präzision und Richtigkeit bekannt sein, was nicht der Fall ist.

Die Methode zum Testen der intestinalen Permeabilität verwendet die Rhamnose/Laktulose und Rhamnose / Xylose Verhältnis. Die sind hier nicht berechenbar, da Laktulose nicht bestimmt wurde, jedoch wurden die Rhamnose/Xylose in der folgenden Tabelle berechnet.

**Tabelle 17: Rhamnose- und Xylose Konzentrationen ( $C_{Rham}$  und  $C_{Xyl}$ ) in  $\mu\text{g}$  pro ml im normalisiertem Urin von Testpersonen oder Patienten nach Zuckeraufnahme (5h) mit Kapillarelektrophorese (CE) analysiert, Eichkurve in Wasser, Ergebnisse mit Dilutionsfaktor multipliziert, verglichen mit GC-MS (*liquid chromatography - mass spectrometry*) Werten einer früheren Arbeit in der die gleichen Proben analysiert wurden (nicht normalisiert).**

Name	Rham/Xyl CE <sub>ratio</sub>	Rham/Xyl GC-MS <sub>ratio</sub>	CE <sub>ratio</sub> / GC-MS <sub>ratio</sub>
<b>H.M</b>	1.5	1.9	1.2
<b>S.E</b>	1.6	1.9	1.2
<b>G.M*</b>	0.9	2.0	2.4
<b>F.C</b>	1.5	1.7	1.1
<b>M.T</b>	1.2	1.4	1.2
<b>P.N</b>	1.8	2.1	1.2
<b>M.A</b>	1.3	1.5	1.2

\*Ausreisser (Q-Test)

Die Tabelle 17 zeigt, dass die Rhamnose/Xylose Verhältnisse bestimmt mit CE (Analysensystem 4, Derivatisierungsmethode „C,L&E modifiziert“) alle (ausser einem Ausreisser) etwa 1.2 x grösser sind als das Rhamnose/Xylose Verhältnis bestimmt mit GC-MS (Variationskoeffizient 2.7%). Das zeigt, dass es sich um einen systematischen Fehler / Abweichung handelt und dass nicht die im Patientenurin vorhandenen Zucker die hauptsächlich Ursache für die verschiedenen Werte der Methoden sein können, da es unwahrscheinlich ist, dass die verschiedenen Patienten alle die gleichen Zuckermengen haben, die sollten von Patient zu Patient schwanken.



#### 4.4.2. Eichkurve in Urin

Eine Eichkurve von Zuckerstandards gelöst in Wasser ermöglicht sich ein Überblick über den linearen Konzentrationsbereich zu verschaffen, jedoch um Matrixeffekte auszuschliessen, ist es besser, die Kalibration in der Messmatrix (hier Urin) mit Standardaddition durchzuführen, diese sollte genaue Werte und Wiederfindungsraten liefern. Diese Kalibrationsart ist jedoch für die Routine nicht optimal, da sie viel Zeit benötigt.

Es wurde eine Probe von Patient (F.C) nach Zuckeraufnahme und von Testperson (H.A). vor Zuckeraufnahme mit Analysensystem 4 und Probenvorbereitungssystem „C,L&E modifiziert“, 2.5 h Derivatisierung analysiert. Das gespikte Volumen von Zuckerstandards gelöst in Wasser wurde so klein wie möglich gewählt, um die Probe wenig zu ändern, jedoch so gross, um eine nicht zu grosse Pipettierungenauigkeit zu haben. Es wurden 2 µl Zuckerlösung (100 mM) zu 200 µl Urin gegeben. Die Zuckersignale vom nicht gespikten Urin (Blank) wurden von den Signalen des gespikten abgezogen.

Die Eichkurven der F.C Proben haben einen Regressionskoeffizienten  $r^2$  von 0.9625 für Rhamnose und 0.9163 für Xylose. Die Eichkurven der H.A Proben haben einen Koeffizienten von 0.9993 für Rhamnose und 0.9991 für Xylose. Die auf Basis dieser Regressionskurven berechnete Werte sind in Tabelle 18 mit Werten der aufgrund der in Wasser gelösten Zuckerstandards erstellten Eichkurve verglichen.

**Tabelle 18: Rhamnose- und Xylose Konzentrationen (µg/ml) im normalisierter Urin eines Patienten und einer Testperson mit CE analysiert und mit Eichkurven in Urin und in Wasser berechnet.**

Name	Eichkurve in Urin		Eichkurve in Wasser	
	C <sub>Rham</sub> (µg/ml)	C <sub>xyl</sub> (µg/ml)	C <sub>Rham</sub> (µg/ml)	C <sub>xyl</sub> (µg/ml)
<b>F.C.</b>	231.6	324.8	141.3	205.8
<b>H.A.</b>	17.4	25.7	13.7	18.8

Man sieht dass die Werte mit der Eichkurve in Urin noch höher als die in Wasser sind, speziell für F.C. Die Werte sind konstant ewta 1.4 bis 1.5 mal grösser, was wieder auf einen systematische Abweichung hindeutet.

Die Werten mit Messmatrixkalibration für F.C. (231.6 und 324.8 µg/ml) sind noch höher als die mit GC-MS gemessenen (151.3 und 253.3 µg/ml), was die Hypothese verstärkt, dass zwischen den verschiedenen Analysenmethoden systematische Abweichungen vorliegen.

#### 4.4.3. Diskussion

Die Analyse von Urin ist mit Analysensystem 3 (*uncoated capillary*) komplex. Da die Migrationszeiten Zeiten nicht sehr reproduzierbar sind, ist es schwierig, die Peaks zu identifizieren. Mit Analysensystem 4 (*coated capillary* von Beckman Coulter) ist diese Reproduzierbarkeit viel besser. Diese Methode ist jedoch für Rhamnose unspezifisch, und somit noch nicht für die Routine bereit, es gibt jedoch Möglichkeiten die Methode so zu optimieren, das auch quantitative Aussagen zu Rhamnose möglich sind. Diese Methode

kann Xylose von anderen getesteten Zucker trennen jedoch nicht Rhamnose von Glukose, Fruktose, Saccharose und Galaktose und jedoch nicht Laktulose von Galaktose.

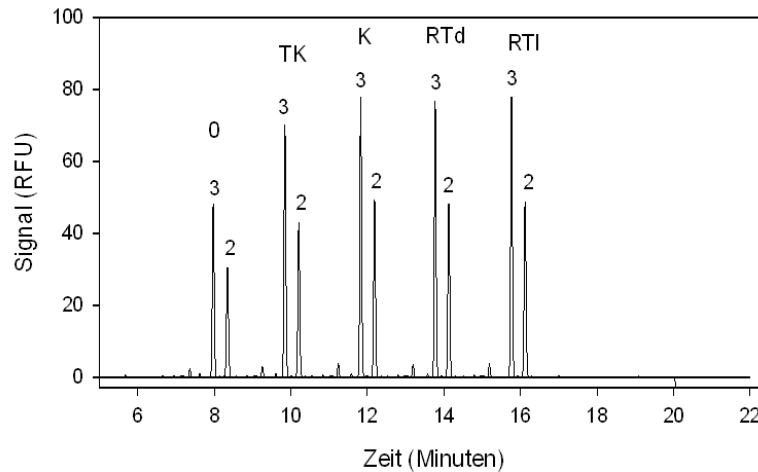
Die Quantifizierung von Rhamnose und Xylose, basierend auf Eichkurven gemessen mit in gelösten Zuckerstandards Wasser sowie in Urin gelösten Zuckerstandards, haben logische Werte ergeben, im erwartenden Konzentrationsbereich.

Alle Werte sind jedoch grösser als die mit GC-MS gemessen. Wie vorher diskutiert, der grösseren Werte aus den CE Analysen könnte sein, dass die Methode auch andere Zuckern detektiert. Auf der anderen Seite könnte die Diskrepanz auch in einer nicht akkuraten GC-MS-Methode liegen, um genauere Aussagen zu liefern, müssten die Wiederfindungsrate, Präzision und Richtigkeit bekannt sein, was nicht der Fall ist.

Urin ist eine komplexe Matrix, mit vielen verschiedenen Komponenten und auch verschiedenen Zuckern. Um dem Rechnung zu tragen, basiert die Methode zur Bestimmung der intestinalen Permeabilität auf Zuckerverhältnissen und nicht auf absoluten Zuckermengen. Die Rhamnose/Xylose Verhältnisse sind für CE konstant grösser als für GC-MS. Das deutet auf eine systematische Abweichung der 2 Methoden hin.

## 4.1. Stabilität der Probe

Eine Urin- und die „3-Zucker-Probe“ wurden derivatisiert, aliquotiert und bei verschiedenen Bedingungen gelagert. Eine Probe wurde im Tiefkühlschrank (-18°C) gelagert, eine im Kühlschrank (4°C), eine bei Raumtemperatur (vor Licht geschützt) und eine bei Raumtemperatur (nicht lichtgeschützt). Die Proben wurden über 14 Tage gelagert.



**Abbildung 31:** Einfluss der Lagerungsbedingungen und Zeitdauer einer Proben für die 5mM 3-Zuckermix, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 3 Tagen bei verschiedenen Bedingungen gelagert: im Tiefkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTI); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der X-Achse (+2 für TK, +4 für K, +6 für RTd und +8 für RTd) Derivatisierung nach C,L&E modifiziert; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peaks Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3).

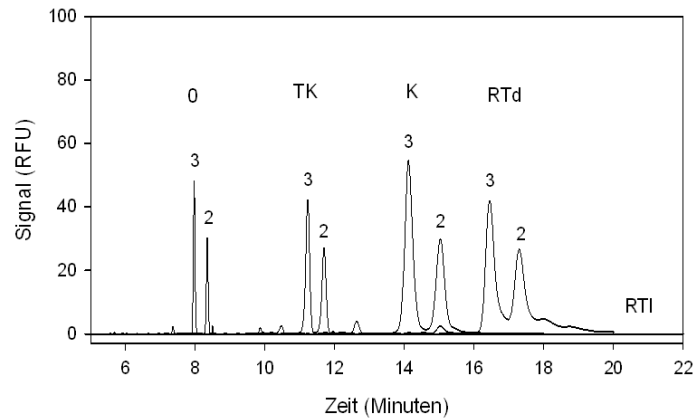
Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

**Tabelle 19:** Migrationszeit (Z) und Peaksfläche (P) von Rhamnose und Xylose einer 5mM 3-Zuckermix 3-Zuckermix, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 3 Tagen in verschiedenen Bedingungen gelagert: im Tiefkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTI), mit Durchschnitt (D) und Variationskoeffizient (VK) in %

		0	TK	K	RTd	RTI	D	VK (%)
Rham	Z	8.346	8.204	8.188	8.121	8.125	8.1968	1.11
	P	11187079	15105474	17090362	16944134	16679309	45424071.6	16.14
Xyl	Z	7.971	7.846	7.825	7.767	7.771	7.836	1.06
	P	16703842	23305684	25663211	25601321	25041816	23263174.8	16.29

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die derivatisierten Zuckerlösungen während mindestens 3 Tagen ohne Problem unter all diesen Bedingungen gelagert werden können (VK für Peakszeit sind kleiner als 1.5% und kleiner als 20% für die Peakshöhe). In Abbildung 31 ist klar zu sehen, dass die 2 Peaks (Rhamnose und Xylose) immer fast gleich gross sind. Die Peaks nach 3 Tagen sind noch etwas grösser als nach 0 Tagen, was nicht logisch ist. Diese Differenz könnte eventuell von Injektionsungenauigkeiten kommen.

## Stabilität der Probe



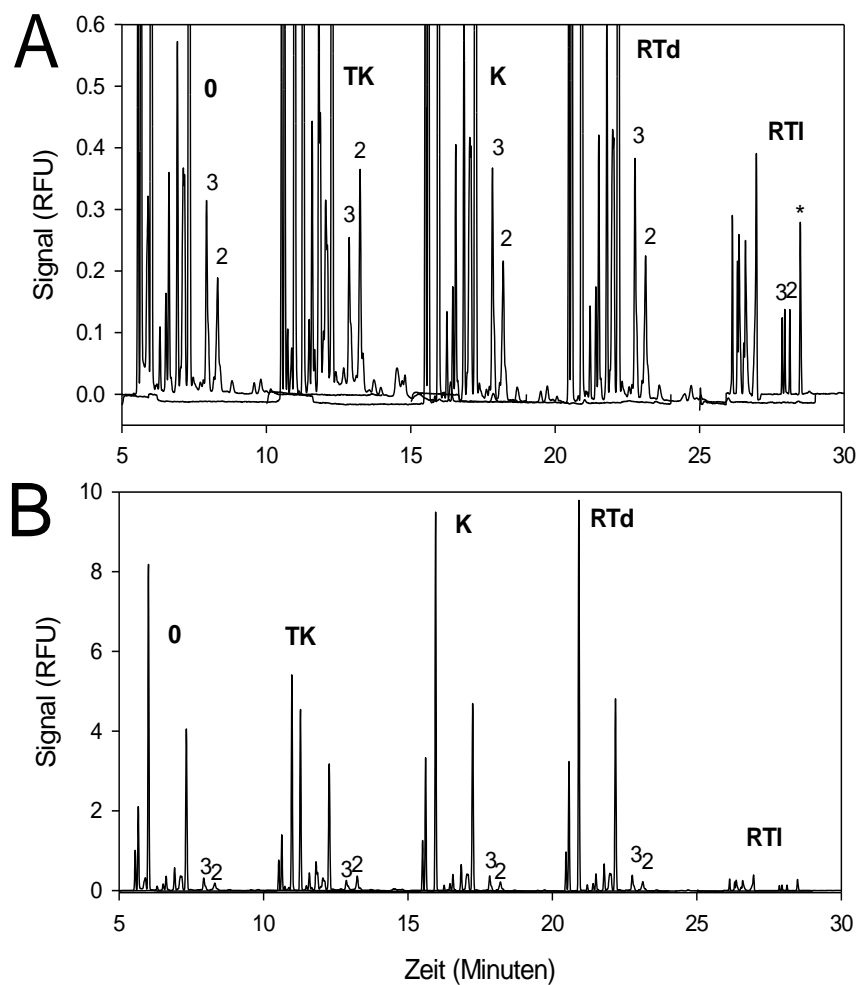
**Abbildung 32:** Einfluss der Lagerung einer 5mM 3-Zuckermix, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 14 Tagen bei verschiedenen Bedingungen gelagert: in Tiefkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTl); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der X-Achse (+2 für TK, +4 für K, +6 für RTd und +8 für RTl) Derivatisierung nach C,L&E modifiziert; Analysensystem 4; RB: 50 mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peaks Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3).

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

**Tabelle 20:** Migrationszeit (Z) und Peaksfläche (P) von Rhamnose und Xylose einer 5mM 3-Zuckermix, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 14 Tagen in verschiedenen Bedingungen gelagert: im Tiefkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTl), mit Durchschnitt (D) und Variationskoeffizient (VK) in %

		0	TK	K	RTd	RTl	D	VK (%)
Rham	Z	8.346	9.696	11.033	11.292	-	10.09175	46.21
	P	11187079	22386970	29263360	21494739	-	21083037	54.20
Xyl	Z	7.971	9.229	10.112	10.446	-	9.4395	45.86
	P	16703842	32884653	53013978	40582364	-	35796209.3	57.89

Wenn die derivatisierte Zuckerlösungen 14 Tage bei den verschiedenen Bedingungen gelagert werden, erfolgt eine Zersetzung, eine genaue Quantifizierung ist nicht mehr möglich, mit VK für Migrationszeiten und Peaksfläche von ungefähr 50%. Das Signal der Probe in Tiefkühlschrank (TK) ist gleich gross wie bei der t(0) Probe, jedoch ist der Peak breiter als bei t(0). Die 2 Signale der im Kühlschrank (K) und bei Raumtemperatur (geschützt vom Licht: RTd) gelagerten Probe sind noch breiter. Die Probe beim Raumtemperatur und in der Licht (RTl) gibt ein flaches Signal. Man kann daraus schlussfolgern, dass es wichtig ist, die derivatisierten Zuckerproben über längere Zeit vor Licht zu schützen und im Tiefkühlschrank zu lagern.



**Abbildung 33:** Einfluss der Lagerung einer humanen Probe, CZE Analyse von von normalisiertem Urin einer Testperson (H.A.) ohne Zuckeraufnahme, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 3 Tagen bei verschiedenen Bedingungen gelagert: Teilkühlschrank -18°C (TK), Kühlschrank 4°C (K), bei Raumtemperatur vor Licht geschützt (dunkel: RTd), bei Raumtemperatur im Licht (RTI). Verschieden skaliert (A und B); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der X-Achse (+5 für TK, +10 für K, +15 für RTd und +25 für RTd) Derivatisierung nach C,L&E modifiziert; Analysensystem 4; RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peaks Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3), Unbekannte (\*).

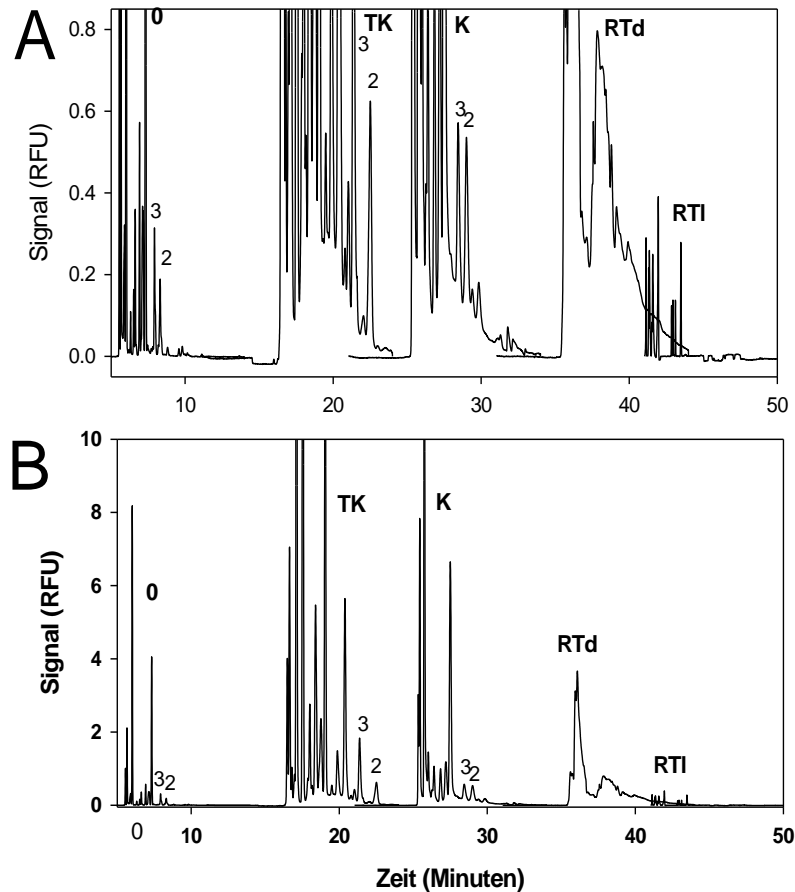
Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

**Tabelle 21:** Migrationszeit (Z) und Peaksfläche (P) der grösste Peak von normalisiertem Urin einer Testperson (H.A.) ohne Zuckeraufnahme, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 3 Tagen in verschiedenen Bedingungen gelagert: im Teilkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTI), mit Durchschnitt (D) und Variationskoeffizient (VK) in %

	0	TK	K	RTd	RTI	D	VK (%)
<b>Z</b>	7.329	7.325	7.242	7.183	7.192	7.2542	0.97
<b>P</b>	1216768	1362267	1389944	1403375	1234423	1321355.4	6.73

In Urinproben ist die Stabilität der derivatisierten Zuckeproben schlechter als die von in Wasser derivatisierten Zuckern. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Nach

3 Tagen sind die Laktulose- und Rhamnosepeaks der Probe beim Raumtemperatur in der Licht gelagert (RTI) schon 2 x kleiner. Es gibt auch einen zusätzlichen Peak. Die Reagenzpeaks sind auch ungefähr 25 x kleiner.



**Abbildung 34:** Einfluss der Probenlagerung auf die CZE Analyse von normalisiertem Urin einer Testperson (H.A.) ohne Zuckeraufnahme, direkt nach Derivatisierung analysiert (0) oder nach 14 Tagen in verschiedenen Bedingungen der behalten: in Tiefkühlschrank -18°C (TK), in Kühlschrank 4°C (K), beim Raumtemperatur von Licht geschützt (dunkel: RTd), beim Raumtemperatur in der Licht (RTI), und mit verschiedene Skala (A und B); Für eine bessere Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wurden die Elektropherogramme adjustiert, Verschiebung auf der X-Achse (+10 für TK, +20 für K, +30 für RTd und +40 für RTI) Derivatisierung nach C,L&E modifiziert; Analysensystem 4 RB: 50mM Phosphat Puffer pH 7.50; Peaks Identifizierung: Rhamnose (2), Xylose (3).

Wie für die in Wasser gelöste Zuckerlösung, gibt die Urineprobe nach 14 Tagen beim Raumtemperatur und Licht gelagert fast kein Signal mehr. Die Basislinie des Elektropherogramms ist nicht stabil, auch nicht für im Tiefkühlschrank gelagerte Proben. Für eine genaue Quantifizierung ist es nötig, die Urinproben spätestens 3 Tage nach der Derivatisierung zu analysieren.

## 5. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die Aufgabe dieser Bachelorarbeit ist es, eine kapillarelektrophoretische Methode zu entwickeln, die eine gleichzeitige Quantifizierung von Rhamnose, Xylose und Laktulose in Urin zulässt und routinetauglich ist. Es soll ein Quantifizierungslimit von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose und von  $3 \cdot 10^{-6}$  M für Laktulose erreicht werden. Dabei soll der Probenvorbereitungsaufwand so gering wie möglich gehalten werden.

Basierend auf Literaturangaben zur quantitativen Zuckerbestimmung wurden verschiedene CE-Trennmethoden und Detektionsmethoden für die quantitative Bestimmung von Laktulose, Rhamnose und Xylose gelöst in Wasser und Urin getestet, mit dem Ziel eine routinetaugliche Methode für die gastrologische Untersuchungen zu entwickeln.

Alle Methoden haben Vor- und Nachteile. Die Trennung der Zucker in einem CE Trennsystem und der Anwendung der Leitfähigkeitsdetektion ist für Zucker, also Moleküle ohne Chromophore / Fluorophore eine elegante Analysenmethode, die universell ist und bei entsprechender Trennung der Matrixbestandteile und der Analyten keine Probenvorbereitung erfordert. Für das Ziel dieser Arbeit ist diese Methode jedoch nicht empfindlich genug, mit einem Detektionslimit von ca.  $3 \cdot 10^{-1}$  M liegt sie etwa einen Faktor von 100000 über dem geforderten LOD. Mit indirekt UV-detektion erhält man für die getesteten Zucker ähnliche Nachweisgrenzen wie für die Leitfähigkeitsdetektion.

Eine Möglichkeit die Nachweisgrenze für die Zucker zu erniedrigen besteht darin, sie mit einem Chromophor / Fluorophor zu markieren. Da die Zucker bei nur bei extremen pH Werten von über pH 12 geladen sind, ermöglicht eine APTS-Derivatisierung nicht nur eine sehr empfindliche Detektion der Zucker im UV oder mit LIF sondern auch noch die Eigenwanderung der Zuckerderivate bei sauren oder neutralen pH Werten im elektrischen Feld. Mit der UV-Detektion konnte für Rhamnose und Xylose ein LOD von ca.  $0.8 \cdot 10^{-6}$  M erreicht werden, mit der LIF-Detektion wurde ein LOD von  $5 \cdot 10^{-9}$  M für Rhamnose und Xylose und von ca.  $1 \cdot 10^{-7}$  für Laktulose erreicht. Das Ziel von  $6 \cdot 10^{-6}$  M für Rhamnose und Xylose wurde mit beiden Detektionsmethoden und einer Trennung mit einem 50 mM Phosphat Puffer pH 7.50 erreicht, was interessant ist, da im Gegensatz zum UV-Detektor nicht alle CE Geräte mit einem LIF-Detektor ausgestattet sind. Laktulose reagiert jedoch viel schlechter mit APTS als die anderen beiden Zucker. Mit der LIF-Detektion gab sie ein etwa 20 x kleineres Signal als Rhamnose und Xylose. Des weiteren migrierte das Laktulosederivat in mehreren Peaks, deren Ursprung nicht aufgedeckt werden konnte. D.h. die entwickelte Methode kann zur empfindlichen Bestimmung von Rhamnose und Xylose eingesetzt werden jedoch nicht für Laktulose.

Es wurden Picoline-Boran und Natriumcyanoborohydrid als reagenzien für die reduktive Aminierung getestet, Natriumcyanoborohydrid wird in der Literatur (26) als Reduktionsmittel erfolgreich eingesetzt und garantiert eine hohe Ausbeute der Derivatisierungsreaktion. Trotzdem das Picoline-Boran ungefähr 4 x teurer als Natriumcyanoborohydrid ist, ist seine Anwendung vorteilhaft, da es weniger toxisch und *environmentally friendly* ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass die reduktive Aminierung ebenso unter wässrigen oder nicht wässrigen Bedingungen ausgeführt werden kann, was einen geringeren Verbrauch an organischen Lösungsmitteln ermöglicht.

Um Laktulose quantitativ zu bestimmen, gäbe es verschiedene Möglichkeiten, einige wurden getestet. Eine wäre, die Laktulose mit einem spezifischen Enzym oder chemisch in seine Monomerbausteine zu spalten, und das Spaltprodukt Galaktose statt Laktulose zu messen, da Galaktose (ähnlich Glukose, Xylose und Rhamnose) sehr gut mit APTS reagiert. Dazu muss jedoch das Trennsystem angepasst werden. Mit einer modifizierten Kapillare und



Phosphat Puffer pH 7.5 ist Galaktose nicht von anderen Zuckern wie Rhamnose, Glukose, und Fruktose, die in humanem Urin vorkommen können getrennt. Der Vorteil dieses Trennsystems besteht in seiner hohen Migrationszeit und Peakflächenreproduzierbarkeit. Eventuell könnte man durch Zusatz von Pufferadditiven wie TTAB oder CTAB die Trennleistung dieses Systems erhöhen. Mit einer fused Silika Kapillare nicht modifiziert und 100mM Boratpuffer pH 10.2 kann Galaktose von Rhamnose, Gukose und Fruktose getrennt werden jedoch sind in diesem System die Migartionszeiten nicht sehr reproduzierbar (RSD = 29.9 %, n = 6).  $\beta$ -Galaktosidase spaltet Laktulose in Fruktose und Galaktose. Dieses Enzym spaltet aber auch Laktose in Glukose und Galaktose. Kleine Menge von Laktose können schon im Urin vorhanden sein, d.h. man müsste ein Laktulose spezifisches Enzym finden, dass Laktulose quantitativ in Fruktose und Galaktose aufspaltet.

Eine andere Möglichkeit wäre, die 3 Zucker mit einem anderem Derivatisierungsagents zu derivatisieren und eine andere Selektivität für die Trennung und eine ähnliche Derivatisierungsausbeite für alle drei Zucker zu erhalten. Tseng & Co (34) haben zum Beispiel verschiedene Mono-, Di- und Oligosaccharide mit 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan derivatisiert. Das LOD war für Galaktose  $8.0 \cdot 10^{-8}$ , für Rhamnose  $6.9 \cdot 10^{-8}$  und Xylose  $9.2 \cdot 10^{-8}$ , aber auch hier ist die Laktulose nicht oder nur schlecht derivatisierbar.

Eine weitere Möglichkeit wäre, den Urin vor der Derivatisierung zu extrahieren. Jin & Co (37) haben Kohlenhydrate (Glukose, Galaktose, Fruktose, Laktose, Ribose, Maltose, Mannose und Xylose) in Urin mit CE-LIF semiquantitativ analysiert, sie entfernen potenzielle Matrixinterferenzen (Urin ist eine komplexe biologische Probe, mit vielen Komponenten wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Proteine, usw.) mit einer Mischung aus Wasser und Ethanol oder Acetonitril. Acetonitril ist bekannt als ein exzellent *deproteinization reagent* für biologische Probe. (37) Im Anschluss könnten die aufkonzentrierten Zuckerproben mit eine Leitfähigkeits- oder indirektem UV CE Sstem analysiert werden.

Urin vor Derivatisierung zu verdünnen resultiert in einem besseren Signal zu Rauschverhältnis, jedoch wird die Empfindlichkeit geringer, d.h. es muss das Optimum zwischen Verdünnung und Signalgrösse gefunden werden.

### Zusammenfassend lässt sich feststellen:

Analysensystem 4 (N-CHO coated capillary von Beckman Coulter, reversed polarity, Phosphatpuffer pH 7.5 ) mit LIF-Detektion (Argon-ion Laser EX 488 nm / EM 520 nm) und APTS Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“ ist stabil (die Migartionszeiten sind sehr reproduzierbar, Analyse sind empfindlich, Peakflächen reproduzierbar) und schnell (Trennung mit weniger als 12 Minuten), jedoch ist die Methode nicht spezifisch für Rhamnose und Laktulose. Analysensystem 3 (silica- capillary, normal polarity, 100 mM Boratpuffer pH 10.2) mit LIF-Detektion und APTS Derivatisierung nach „C,L&E modifiziert“ trennt Rhamnose, Xylose und Galaktose von anderen im Urin vorkommenden Mono- und Disacchariden. Aber diese Methode ist weniger stabil, die Migartionszeiten sind nicht reproduzierbar. Vielleicht mit einer Optimierung der Kaipllarkonditionierung könnten bessere Resultate erreicht werden. Für die Anwendung in der Routine muss die Methode noch entwickelt werden, und seine Stabilität, Wiederholbarkeit und Robustess getestet werden.

## **Danksagung**

Dr. Wolfgang Thormann

Frau Jitka Caslavaska

Dr. Franka Kálmán

Allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie und Viszerale Forschung  
Universität Bern

**Besten Dank an alle, die mir bei dieser Arbeit und seiner Redaktion geholfen.**

Entwicklung eines quantitativen CE Verfahrens zur Bestimmung von Zuckern, die zur Abschätzung der intestinalen Permeabilität von Patienten verwendet werden



Alexandra Hugon

## Bibliography

1. **I. Bjarnason, A. Macpherson, D. Hollander.** Intestinal Permeability: An Overview. *Gastroenterology* 108. 1996, 1566-1581, pp. 1566-1581.
2. **K. Miki, R. Butler, D. Moore, G. Davidson .** Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol, and lactulose in urine by HPLC for estimating intestinal permeability in pediatric practice. *Clinical Chemistry* 42. 1996, pp. 217-223.
3. **H. Rodríguez, N. Berghoff, J. S. Suchodolski, J. M. Steiner.** Kinetic analysis of 5 sugar probes in dog serum after orogastric administration. *The canadian journal of veterinary research* 73. 2009, 217-223, pp. 217-223.
4. **K.Antje,** *Analysis of carbohydrates in food and glycoconjugates with capillary electrophoresis.* s.l. : Thesis (doctoral) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 1995.
5. **Z.E.Rassi.** High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrate. *Beckman Instrument.* 1996.
6. **H.D.Belitz, W.Grosch, P.Schieberle.** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.* s.l. : Springer, 2001.
7. **A. Z. Carvalho, J. A. F. Da Silva, C. L. Do Lago.** Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 24. 2003, 2138-2143.
8. **Z. Zhang, R.Yang, H. Wang, F. Ye, S. Zhang, X. Hua.** *Determination of lactulose in foods: a review of recent research.* Wuxi, China : International Journal of Food Science and Technology 2010, 45, 2010. 1081–1087.
9. **L.C.Nogueira, F.Silva, I.M.P.L.V.O. Ferreira, L.C.Trugo.** Separation and quantification of beer carbohydrate by high-performance liquide chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* 1065. 2005, Vols. 207-210.
10. **A. M.Lostia, L. Lionetto, L. Principessa, M. Evangelisti, A. Gamba, M.P. Villa, M. Simmaco.** A liquid chromatography/mass spectrometry method for the evaluation of intestinal permeability. *Clinical Biochemistry* 41. 2008, 887-892.
11. **R. Marsilio, L. d'Antiga, L. Zancan, N. Dussini, F. Zaccello.** Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in studies of intestinal permeability in pediatrics. *General Clinical Chemistry* 44. 1998, 1685-1691.
12. **A. Paulus, A. Klockow.** Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A* 720. 1996, 353-376.

13. **A.J.Zemann.** Contactless Conductivity detection in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 20. 1998, 46-354.
14. **Tuma, Samcova.** Determination of neutral carbohydrate by CE with C4D. 2010.
15. **Victoria Ruiz-Calero, Lluís Puignou, Maria Teresa Galceran.** Determination of glycosaminoglycan monosaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. Barcelona, Spain : *Journal of Chromatography B*, 2003. 791.
16. **F. N. Lamaria, R. Kuhn, N. K. Karamanosa.** Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B*. 2003, 15-36.
17. **C.Michael.** Erarbeitung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes der Monosaccharide eines hochgradig glykosylierten therapeutischen Proteins. s.l. : Diplomarbeit TU Bergakademie Freiberg, 2008.
18. **Z. Zhang, R. Yang, H. Wang, F. Ye, S. Zhang, X. Hua.** Detection of carbohydrates using new labeling reagent 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone by capillary zone electrophoresis with absorbance (UV). *analytica chimica acta* 609. 2008, 66–75.
19. **H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt.** *Kapillarelektrophorese*. Braunschweig/Wiesbaden : Vieweg Analytische Chemie, 1994.
20. **A. Klockow, R. Amadbo, H.M. Widmer, A. Paulus.** The influence of buffer composition on separation efficiency and resolution in capillary electrophoresis of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid labeled monosaccharides and complex carbohydrates. *Electrophoresis* 17. 1996, 110-119.
21. **Sheng Xiao, Ding Chen-Xu, Liu Ling-Jun, Suo You-Ru, Sun Zhi-Wei, You Jin-Mao.** Separation of Derivatized Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis. Xinning, China : Chinese journal of analytical chemistry, 2008. 280–284.
22. **F.Kalmann.** Einführung in die Kapillarelektrophorese. s.l. : HES-SO, Module 346, Analytische Anwendungen, 2010.
23. **Pharmacopée Européenne.** *Electrophorèse capillaire*. 2008.
24. **F.T.A. Chen, R.A. Evangelista.** Analysis of Mono- and Oligosaccharide Isomers Derivatized with 9-Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence. *Analytical Biochemistry* 230. 1995, 273-280.
25. **A.Chen, M.S. Liu, R.A. Evangelista.** Characterization of S Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-Derivatized Sugars by Capillary Electrophoresis with Sugars by Capillary Electrophoresis with. *Analytical Chemistry* 67. 1995, 2239-2245.
26. **L.R.Ruhaak, E.Steenvoorden, C.A.M.Koeleman, A.M.Deelder, M.Wuhrer.** 2-Picolineborane: A non- toxic reducing agent for oligosaccharides labeling by reductive amination. *Proteomics* 10. 2010, 2330-2336.
27. **M. Jaros, T. Soga, T.Van de Goor, B.Gas.** Conductivity detection in capillary zone electrophoresis: Inspection by PeakMaster. *Electrophoresis* 26. 2005, 1948–1953.
28. **R.Paroni, I. Fermo, L. Molteni, L. Folini, M. R. Pastore, A. Mosca, E. Bosi.** Lactulose and mannitol intestinal permeability detected by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* . 2006, 183-187, pp. 183-187.

29. **P.Kuban, P.C.Hauser.** Ten year of acial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE- a review. *Electrophoresis* 30. 2009, 176-168.
30. **A.Guttman.** Analysis of monosaccaride composition by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 763. 1997, 271-277.
31. **F.N.Lamari, R.Kuhn, N.K.Karamanos.** Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography V* 793. 2003, 15-36.
32. **Chen&all.** *Fluorescent labeled carbohydrates and their analysis.* Januar 27, 1995. United States Patent no 5,569,366.
33. **A.Bui, B. Kocsis, F.Kilar.** Methodology to label mixed carbohydrate components by APTS. *Journal of biochemical and biophysical methods* 70. 2008, 1313-1316.
34. **H.M.Tseng, S.Gattolin, J.Pritchard, H.J.Newbury, D.A.Barrett.** Analysis of mono-, di- and oligosaccharides by CE using a two-stage derivatization method and LIF detection. *Electrophoresis* 30. 2009, 1399-1405.
35. **R.A.Evangelista, F.T.Chen, A.Guttman.** Reductive amination of N-linked oligosaccharides using organic acid catalysts. *Journal of Chromatography A* 745. 1996, 273-280.
36. Organische Chemie für Schüler / Kohlenhydrate. *Wikibooks*. [Online] Mai 26, 2011.  
[Cited: juillet 13, 2011.]  
[http://de.wikibooks.7val.com/wiki/Organische\\_Chemie\\_f%C3%BCr\\_Sch%C3%BCler/\\_Kohlenhydrate](http://de.wikibooks.7val.com/wiki/Organische_Chemie_f%C3%BCr_Sch%C3%BCler/_Kohlenhydrate).
37. **L.J.Jin, S.F.Y.Li.** Screening of carbohydrates in urine by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20. 1999, 3450-3454.