

Bestimmung der Holzzucker mittels Boratkomplex-Anionenaustauschchromatographie

Hintergrund

Die HPAEC-Borat (High Performance Anion Exchange Chromatography-Borate) wird in der Holzchemie für die Bestimmung der Holzzucker genutzt. Diese HPLC-Methode wird für die Analyse der qualitativen und quantitativen Kohlenhydratzusammensetzung von Hydrolysaten eingesetzt und ermöglicht die Trennung der Holzzucker (reduzierende Zucker), wie Glucose, Xylose, Fructose, Mannose, Arabinose, Galactose, Rhamnose und Cellobiose. Ein

großer Vorteil der Methode besteht darin, dass die sauren Hydrolysate ohne Neutralisation und weitere Probenvorbereitung analysiert werden können, da die hohe Molarität der mobilen Phase (Boratpuffer) eine kontinuierliche Regeneration des Ionenaustauscherharzes gewährleistet. Die Trennung der Holzzucker dauert etwa 50 min. Die Detektion erfolgt über einen UV/VIS-Detektor. Dafür ist eine Nachsäulenderivatisierung der Zucker erforderlich.

Geräteaufbau der HPAEC-Borat

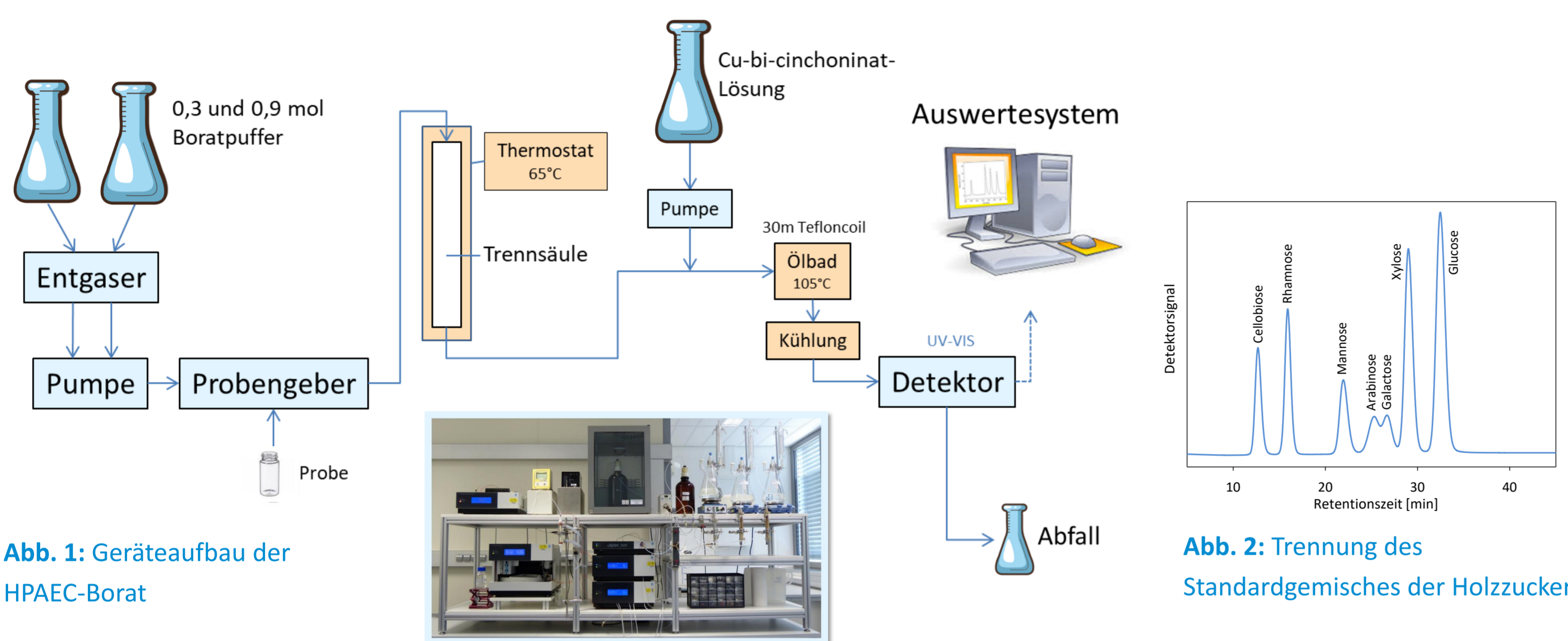


Abb. 1: Geräteaufbau der HPAEC-Borat

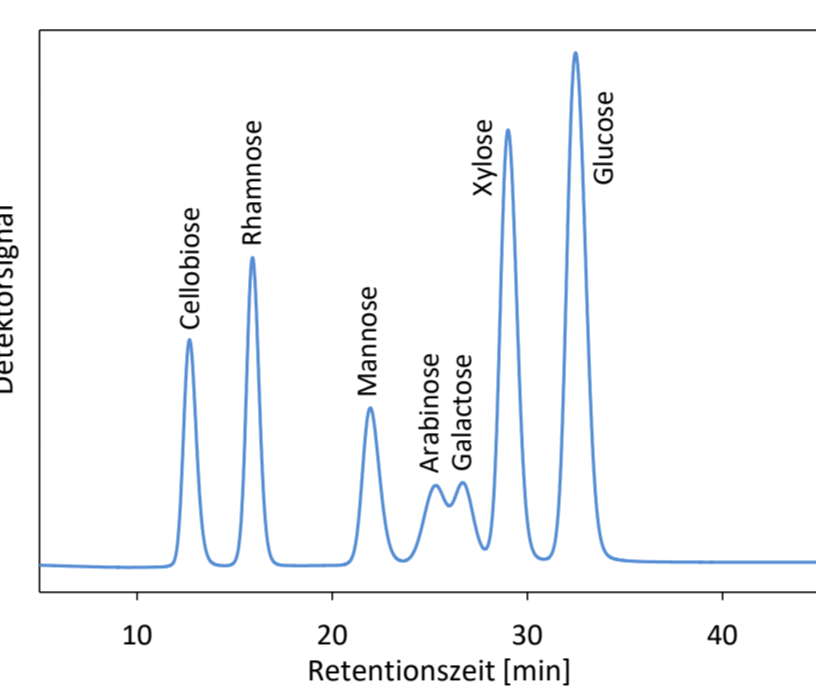
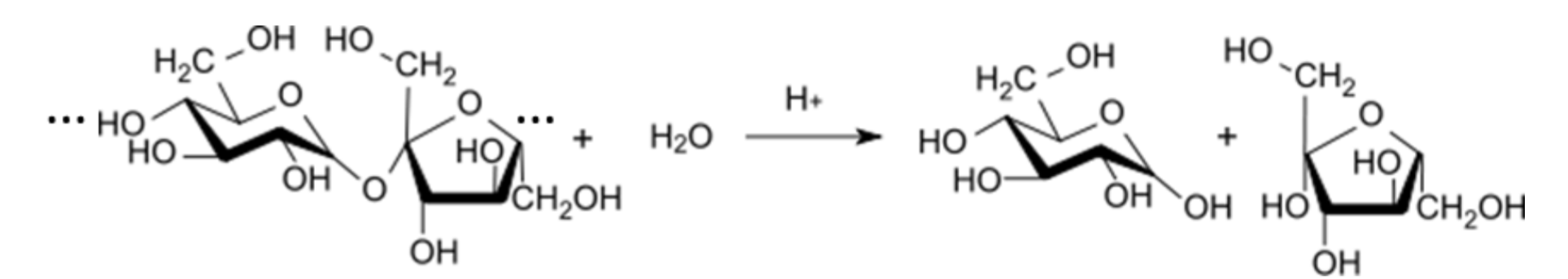


Abb. 2: Trennung des Standardgemisches der Holzzucker

2-stufige Hydrolyse

1. Stufe: Vorhydrolyse (72% H₂SO₄)
2. Stufe: Nachhydrolyse (4%iger H₂SO₄)

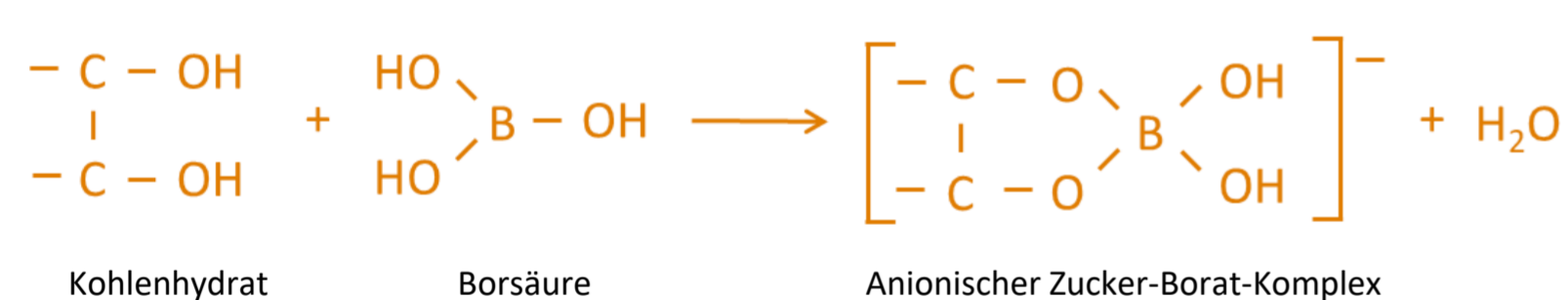
Polymere Kohlenhydrate werden in Monomereinheiten gespalten.



Hydrolyserückstand: kondensierte Bestandteile
Nicht lösliche Bestandteile
Lignin (analog Klason-Lignin)

Trennprinzip

- Dieses Trennprinzip nutzt die Tatsache aus, dass Zucker in Gegenwart von Borsäure entsprechend ihrer Stereochemie anionische Komplexe unterschiedlicher Stabilität bilden.



Kohlenhydrat Borsäure Anionischer Zucker-Borat-Komplex

- Diese Komplexe treten mit dem Säulenmaterial, einem stark basischen Ionenaustauscher, spezifisch in Wechselwirkung und lassen sich dadurch trennen.
- Die Molarität des Eluenten wird während eines Laufes von 0,3 auf 0,9 mol Boratpuffer erhöht, so dass die monomeren Zucker unterschiedlich von der Säule gespült werden. So kommt es zu den unterschiedlichen Retentionszeiten der Zucker.

- Hinter der Säule werden die getrennten monomeren Zucker mit dem postchromatischen Reagenz Cu-Bicinchoninat-Lösung versetzt.
- Die reduzierenden Zucker reduzieren das Kupfer (Cu²⁺ zu Cu⁺).

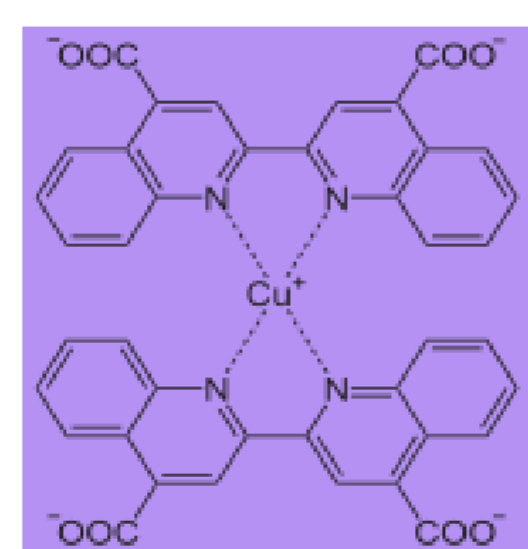


Abb. 3: Strukturformel des violetten Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplexes

- Es entstehen die violetten Cu⁺-Bicinchoninsäure-Komplexe, die mittels UV-VIS Detektion analysiert werden.

- Die Intensität ist proportional zur Konzentration der Zucker. Die farbigen Komplexe werden durch Erhitzen schneller gebildet. Daher wird die Zuckerlösung durch ein 30m langes Teflon-Coil bei 105°C geleitet.



Abb. 4: Tefloncoil



Abb. 5: Farbreaktionen bei der HPAEC-Borat

Cu²⁺ (aq) + SO₄²⁻ (aq) - „Asparagin-Kupferkomplex“ - Cu⁺-Bicinchoninsäure-Komplex

Methode

Stationäre Phase:

Starkes Anionenaustauscherharz MCI Gel CA08F (Mitsubishi Chemical), gepackt in Omnifit Leersäule 5*120mm (65°C)

Mobile Phase:

Kaliumtetraboratpuffer (Kaliumtetraborat/Borsäure)
0,7 ml/min Gradientenelution mit
A: 0,3 M Boratpuffer (pH-Wert 8,6)
B: 0,9 M Boratpuffer (pH-Wert 9,5)

0 min: 90% A, 10% B (0-35 linearer Gradient)
35 min: 10% A, 90% B
43 min: 10% A, 90% B (43-49,99 linearer Gradient)
49,99 min: 90% A, 10% B
50 min: Neustart

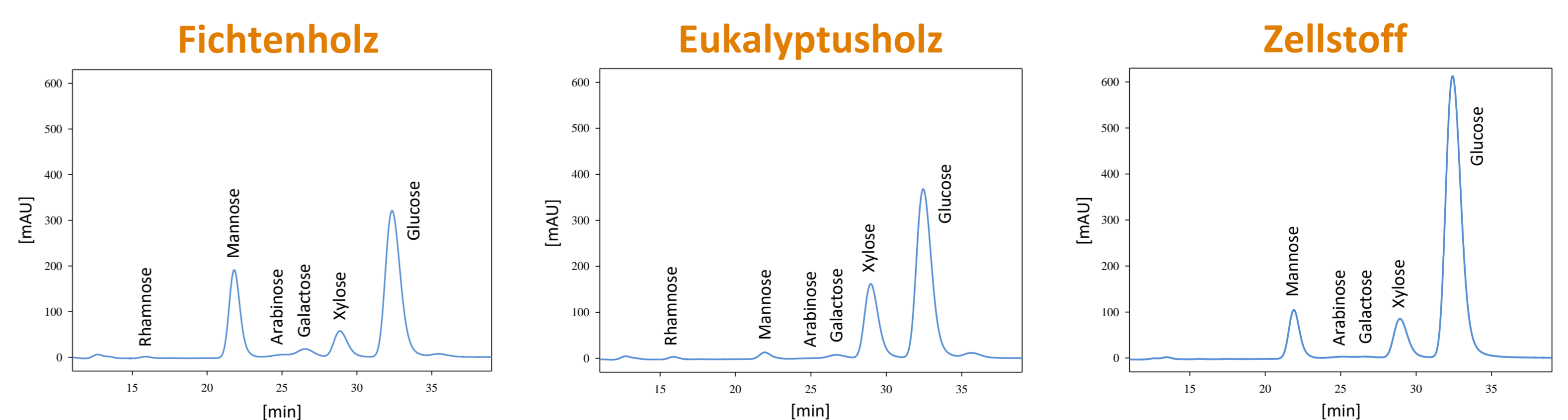
Anlage:
Dionex Ultimate 3000
Variable Wavelength Detector
Pump HPG-3200A
Pump HPG-3100A
Autosampler
Degasser
Auswertungssoftware:
Dionex Chromeleon Version 6.80

Nachsäulenderivatisierung durch Zuführung von
Cubicinchoninat-Lösung (Bicinchoninsäure, Natriumcarbonat, Asparaginsäure und Kupfersulfat*5H₂O)
0,35 ml/min
Erhitzen auf 105°C in einem 30m langen Tefloncoil (0,3 mm i.D.)

Nachweis:

Nachweis bei 560 nm im UV-Detektor

Kohlenhydratzusammensetzung von Proben im Vergleich



Probe	Hydrolyse-Methode	Kohlenhydratbestimmung							
		Hydrolyse-rückst. [%]	Σ Zucker [abs. %]	Xylose [% abs.]	Glucose [% abs.]	Mannose [% abs.]	Galactose [% abs.]	Arabinose [% abs.]	Rhamnose [% abs.]
Fichtenholz	2-stufig	28,6	65,0	5,4	44,6	11,9	1,9	1,1	0,1
Eukalyptusholz	2-stufig	24,9	63,8	12,9	48,9	0,8	0,7	0,2	0,2
Zellstoff	2-stufig	0,2	102,9	7,0	88,4	6,7	0,2	0,6	0,0