

Stanovení obsahu fruktanů metodou HPLC s refraktometrickou detekcí

FRUCTAN CONTENT DETERMINATION BY HPLC METHOD WITH REFRACTOMERIC DETECTION

Ivan Boháčenko, Jitka Pinkrová – Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.

Fruktany jsou polysacharidy složené z řetězců fruktosy a zakončené jednotkou glukosy napojené vazbou α (1 \rightarrow 2). Obecně se dělí (1) na inuliny, kde jsou fruktosové jednotky vázány glykosidovou vazbou β (1 \rightarrow 2), a na levany s vazbou fruktosových jednotek β (2 \rightarrow 6). Inuliny se přirozeně vyskytují v mnoha rostlinách, nejvíce jsou obsaženy v kořenech čekanky a hlízách topinamburů (cca 15–20 %), liší se však polymeračním stupněm (DP). Jsou často nazývány „fruktany inulinového typu“ a zahrnují přírodní inulin a také oligosacharidy, které lze z inulinu získat buď chemickou nebo řízenou enzymovou hydrolyzou s inulinasou. Tyto oligosacharidy lze dále rozdělit na fruktooligosacharidy (FOS) složené z jednotek fruktosy, zakončené molekulou glukosy, tzv. typ GF_n, a na inulooligosacharidy (IOS), složené z jednotek fruktosy, tzv. typ F_n (kde G = glukosa, F = fruktosa a n = počet jednotek fruktosy).

Fruktany inulinového typu jsou komerčně vyráběny např. belgickou firmou BENEOLTM s názvy Orafit GR (nativní inulin, DP 2–60), Orafit HP (inulin bez oligomerů s DP <10), Orafit P95 (směs oligomerů typu GF_n a F_n s DP 2–7) nazývaný též „oligo-fruktosa“ a Orafit Synergy (směs Orafit HP a oligofruktosy). Další možností je příprava FOS ze sacharosy transfruktosylační reakcí s enzymy skupiny fruktosyltransferas (2). Výsledkem reakce je směs oligomerů typu GF_n, kde n je 2–4. Komerční výroba je zavedena nejvíce v Japonsku, v Evropě např. francouzskou firmou Beghin Meiji, jejíž produkty mají název Actilight. Obsah FOS se pohybuje v rozmezí 55–95 % a zbytek tvoří glukosa, fruktosa a sacharosa.

Fruktany lze obecně charakterizovat jako rozpustnou nestraavitelnou vlákninu. Jsou však též klasifikovány jako „prebiotika“, tj. látky resistantní ke gastrické aciditě a hydrolyze zažívacími enzymy, které jsou fermentovatelné intestinální mikroflórou a selektivně stimulují růst a/nebo aktivitu vybraných bakterií tlustého střeva, což v důsledku zlepšuje zdraví a „wellbeing“ hostitele (3). Z tohoto důvodu jsou používány jako ingredience do funkčních potravin s prebiotickými nebo synbiotickými vlastnostmi. Využívány jsou též při výrobě nízkenergetických potravin, a to inulin jako náhrada tuků (4), nebo FOS jako náhradní sladidlo, vhodné i pro diabetiky (2).

Analytické metody na stanovení celkového obsahu fruktanů v potravinách

Metody jsou založeny na hydrolyze fruktanů inulinasou a následném stanovení vznikajících monosacharidů glukosy a fruktosy. Obecný postup většiny stanovení spočívá v extrakci fruktanů ze vzorku horkou vodou a úpravě extraktu hydroly-

zou/odstraněním látek, které by mohly při stanovení fruktanů interferovat. V upraveném extraktu je pak chromatografickou nebo spektrofotometrickou metodou stanovena glukosa a fruktosa před a po hydrolyze inulinasou. Výpočet celkového obsahu fruktanů je kalkulován na základě obsahů glukosy a fruktosy před a po hydrolyze inulinasou.

Chromatografické metody

Ke stanovení obsahu fruktanů v potravinách byly navrženy různé chromatografické techniky, např. chromatografie na tenké vrstvě (5), kapilární plynová chromatografie (6, 7) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (8). V současné době je oficiální metodou AOAC Official Method 997.08 Fructan in Food Products, Ion Exchange Chromatographic Method z roku 1999, které předcházela její mezilaboratorní validace (9). Principem metody je extrakce fruktanů ze vzorku vroucí vodou a stanovení volné fruktosy a sacharosy. V extraktu je nejprve hydrolyzován škrob amyloglukosidasou na glukosu a následně fruktany inulinasou na glukosu a fruktosu. Ke stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy je použita vysokoúčinná anion-výměnná chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD). Obsah fruktanů je vypočítáván z bilance glukosy a fruktosy před a po hydrolyze inulinasou. Zjednodušení, resp. modifikaci této metody, při kterém je obsah fruktanů kalkulován pouze z obsahu fruktosy, navrhli STÖBER ET AL. (10). Platí však jen pro nízké obsahy fruktanů, při obsahu vyšším než 5 % musí být zachována kalkulace oficiální metodou AOAC 997.08. Pro účely potravinářského označování („food labeling“) byla ke stanovení inulinu publikována jednoduchá metoda HPLC s refraktometrickou detekcí, využívající iontoměničovou kolonu v Ca formě (11).

V poslední době bylo navrženo využití metody HPAEC-PAD pro charakterizaci FOS s DP 3–7 a IOS s DP 2–7. Současně byl navržen i výpočet množství oligomerů s DP 4–7, jejichž standardy nejsou komerčně dostupné, a to na základě faktoru vyjadřujícího závislost odezvy PAD na DP oligosacharidů (12).

Spektrofotometrické metody

Oficiální metodou je AOAC Official Method 999.03 Measurement of Total Fructan in Foods, Enzymatic/Spectrophotometric Method. Po extrakci fruktanů horkou vodou jsou sacharosa a škrob hydrolyzovány specifickým enzymem (sucrase), resp. amyloglukosidasou, na glukosu a fruktosu, které jsou redukovány

na cukerné alkoholy alkalickým borhydridem. Vlastní fruktan je hydrolyzován na glukosu a fruktosu enzymem fruktanasou (směs exo- a endo-inuliny), které jsou pak stanoveny po barevné reakci s hydrazidem kyseliny p-hydroxibenzoové (PAHBAH) při vlnové délce 410 nm. Obsah fruktanů je kalkulován na základě fruktosy. Nevýhodou této metody je skutečnost, že je doporučována pouze pro stanovení inulinu, nikoli pro stanovení fruktooligosacharidů, resp. oligofruktosy.

Tato metoda byla dále modifikována (13) tak, že byla vypuštěna redukce s přidavkem alkalického borhydridu. Glukosa a fruktosa jsou stanovovány barevnou reakcí s enzymovým systémem obsahujícím hexokinasu, glukosa-6-fosfát dehydrogenasu a glukosa isomerasu při vlnové délce 340 nm, a to jednak v extraktu po hydrolyze sacharosy a škrobu a dále v toméž extraktu po hydrolyze fruktanasou. Celkový obsah fruktanů je vypočten z rozdílu obsahů glukosy a fruktosy před a po hydrolyze fruktanasou. Na rozdíl od metody AOAC 999.03 je při použití této modifikované metody stanovován jak obsah inulinu, tak obsah fruktooligosacharidů a výsledky jsou srovnatelné se stanovením fruktanů metodou AOAC 997.08 (14, 15). Pro obě výše uvedené metody jsou též dostupné komerční kity K-FRUC (metoda AOAC 999.03) a K-FRUCHK (modifikovaná metoda) od firmy Megazyme International z Irsku. Někteří autoři jim pak dávají přednost před chromatografickými metodami, a to pro jejich rychlost a nenáročnost na laboratorní vybavení.

Cílem prezentované práce bylo implementovat a na úrovni standardů interně validovat metodu na stanovení fruktanů, využívající techniku HPLC s refraktometrickou detekcí a kolonu s váznou fází NH_2 , která je používána pro dělení monosacharidů a disacharidů, popř. i oligosacharidů s velmi nízkým DP. Na základě dosažených výsledků pak kvalifikovaně zhodnotit možnost použití této metody pro stanovení fruktanů v potravinách a potravinářských surovinách.

Experimentální část

Materiál a přístroje:

- Vzorky komerčních fruktanů: Orafit GR, inulin > 90 %/suš., Orafit P95, oligofruktosa $\geq 93,2$ %/suš. (BENEOTM, Belgie), Actilight 950P, FOS ≥ 93 %/suš., průměr 95 %/suš. (Beghin Meiji, Francie).
- Standardní materiál, obsah fruktanu 28,8 % (Megazyme International, Irsko).
- Fructanase mixture (purif.) 40, směs exo- a endo-inuliny (Megazyme International, Irsko).
- Glukosa, fruktosa, sacharosa (Fluka), 1-F-fruktofuranosyl-nystosa, 1-kestosa, nystosa (Wako Pure Chemical Industrie, Ltd., Japonsko).
- Acetonitril, gradient grade (J. T. Baker, Holandsko), demineralizovaná voda a další chemikálie.
- SPE kolony Chromabond SB (Machary Nagel, Německo), mikrofiltry 0,22 μm .
- Sestava HPLC Waters: pumpa 515, In-line Degasser AF, termostat kolon, autosampler Waters 717 plus, Refractive Index Detector Waters 2414.

Stanovení obsahu fruktanů ve standardním materiálu a vzorcích komerčních fruktanů: Byly připraveny roztoky standardního materiálu, resp. komerčních fruktanů v acetátovém pufru, které obsahovaly cca 5 % fruktooligosacharidů. Roztoky pak byly zahřívány 15 minut při 80 °C a po ochlazení byly doplněny demineralizovanou vodou na původní hmotnost. Ze získaných roztoků byly provedeny dvě analýzy:

1. Stanovení obsahů volné fruktosy, glukosy a sacharosy před hydrolyzou.
2. Stanovení obsahů fruktosy a glukosy po hydrolyze fruktanasou.

ad 1. Přibližně 2 ml vzorku byly přefiltrovány přes SPE kolonku Chromabond SB, po 25% přidavku čistého acetonitrilu a následném přefiltrování přes mikrofiltr byl takto upravený vzorek použit k chromatografické analýze (fru_0 , glc_0 , sach).

ad 2. K vzorku o hmotnosti 1,25 g bylo přidáno 0,25 g enzymu fruktanasy a směs byla inkubována 30 minut při 40 °C v třepací vodní lázni. Po přefiltrování přes SPE kolonku Chromabond SB a po 25% přidavku čistého acetonitrilu byl vzorek přefiltrován přes mikrofiltr a použit k chromatografické analýze (fru_h , glc_h).

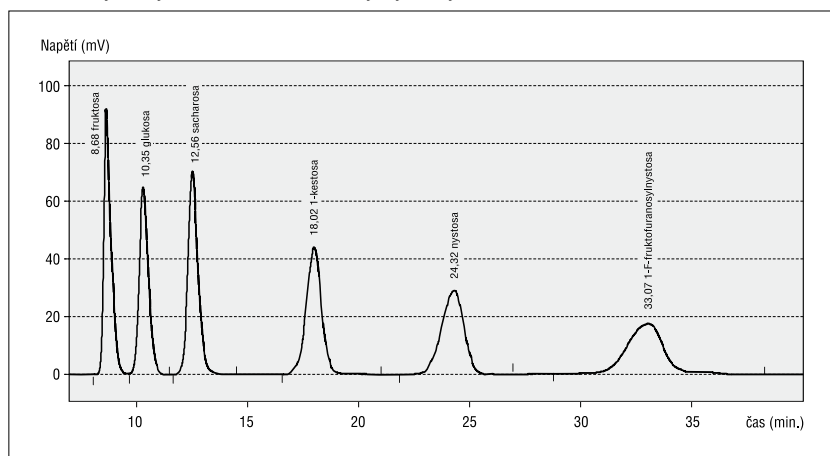
Chromatografické podmínky: Kolona Prevail Carbohydrate ES HPLC Polymer Column-W, 250 × 4,6 mm, 5 μm , předkolona Prevail Carbohydrate ES All-Guard Cartridge (obě Grace, USA). Mobilní fáze acetonitril : voda = 70 : 30 % obj., průtok 0,7 ml.min⁻¹, teplota 30 °C, nástřik 10 μl . Procentický obsah fruktanů byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{FOS} = [a_2 (\text{fru}_h + \text{glc}_h) - a_1 (\text{fru}_0 + \text{glc}_0 + \text{sach}/2)] \cdot k;$$

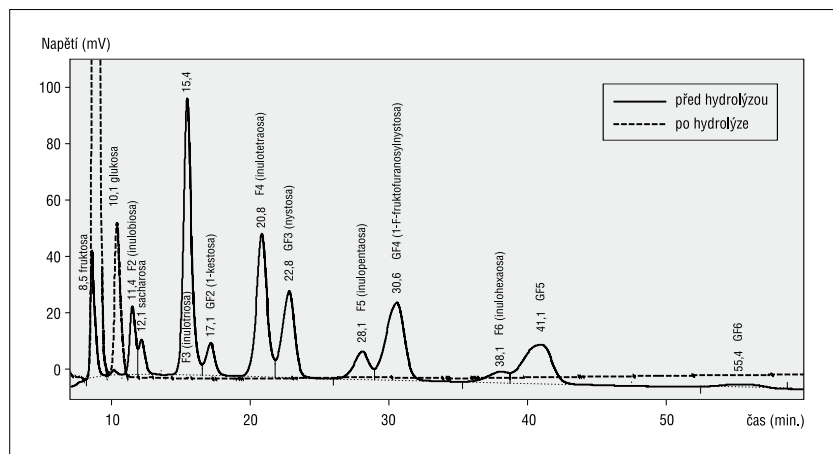
kde je a_1 – faktor zahrnující ředění vzorku před hydrolyzou, a_2 – faktor zahrnující ředění vzorku po hydrolyze, k – faktor pro přepočítání na obsah FOS o průměrném polymeračním stupni n (pro inulin doporučeno 0,91, pro oligofruktosu 0,93).

Rozšířená nejistota stanovení (U) byla vypočítána jako dvojnásobek směrodatné odchylky (s) ze sedmi paralelních stanovení. *Mez detekce* byla stanovena postupným zředěním 0,5% roztoku fruktanů.

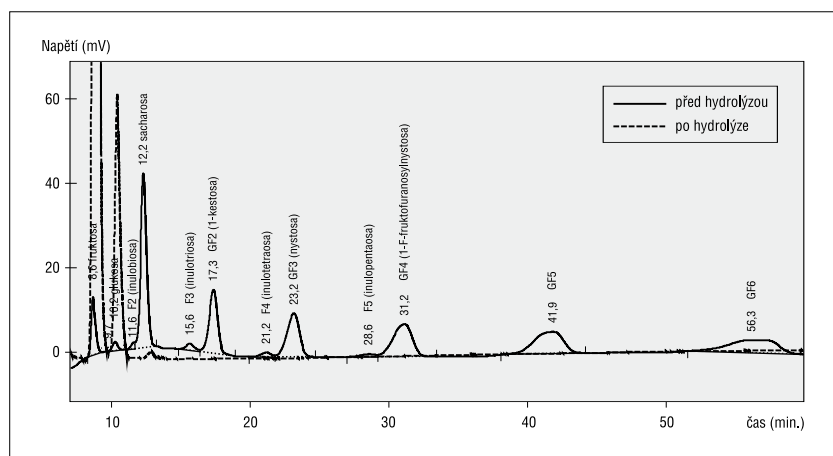
Obr. 1. Chromatogram směšného standardu fruktosy, glukosy, sacharosy, 1-kestosy, nystosy a 1-F-fruktofuranosyl-nystosy.



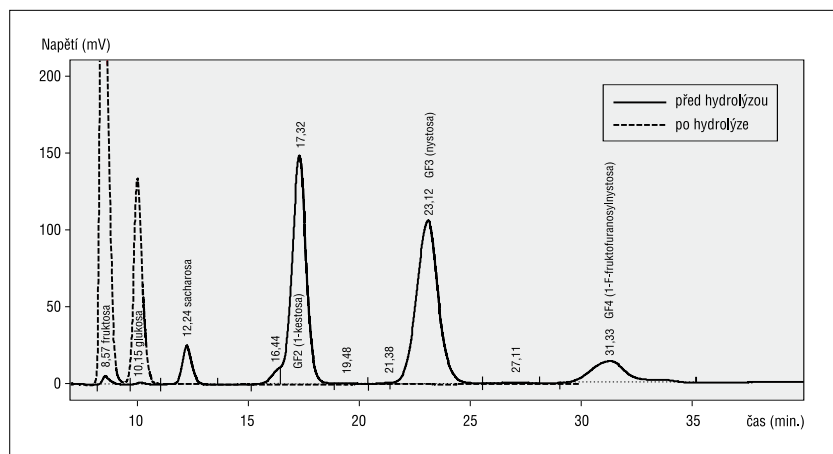
Obr. 2. Chromatogram 5% roztoku Orafiti P95



Obr. 3. Chromatogram 5% roztoku Orafiti GR



Obr. 4. Chromatogram 5% roztoku Actilight 950 P



Výsledky a diskuze

Obdobně jako u ostatních metod na stanovení obsahu fruktanů je i námi navrhovaná metoda založena na principu bilance glukosy a fruktosy před a po hydrolyze fruktanů inulinasou. Nejprve byly testovány separační vlastnosti NH_2 kolony Prevail Carbohydrate ES za optimalizovaných chromatografických

podmínek. Použit byl směsný standard bilančních sacharidů glukosy, fruktosy a sacharosy, který dále obsahoval i 1-kestosu, nystosu a 1-F-fruktofuranosyl nystosu jako nejnižší komerčně dostupné oligomery FOS typu GF_2 – GF_4 . Jak je patrné z obr. 1., došlo k velmi dobré separaci jednotlivých sacharidů.

Dále byla hodnocena účinnost postupu hydrolyzy fruktanů při použití enzymu Fructanase mixture (purified) 40. Vzhledem k tomu, že na chromatogramech cca 5% roztoků komerčních vzorků Orafiti P95, Orafiti GR a Actilight 950P po jejich enzymové hydrolyze jsou přítomny pouze peaky glukosy a fruktosy (obr. 2. až obr. 4.), lze důvodně předpokládat úplnou hydrolyzu v nich přítomných fruktanů. Stanovena byla též mez detekce metodou postupného zředování 0,5% vzorku Orafiti P95, která činila 0,05 % fruktanů.

K interní validaci byl použit jednak standardní materiál se známým obsahem 28,8 % fruktanů a cca 5% roztoky komerčních fruktanů. Validace na hladině 5 % komerčních fruktanů byla zvolena jednak s ohledem na požadovaný prebiotický účinek, kdy doporučený denní příjem vyvolávající bifidogenní efekt činí 2–10 g fruktanů (16) a dále na předpokládanou průměrnou denní konzumaci 100 g fortifikované potraviny. Výsledky validace, tj. směrodatná odchylka s_r , rozšířená nejistota stanovení U a výtěžnost, jsou přehledně uvedeny v tab. I.

Pro stanovení obsahu fruktanů ve standardním materiálu byla určena směrodatná odchylka ze 7 paralelních stanovení $s_r = 0,2$ a rozšířená nejistota stanovení $U = \pm 0,4$ %. Průměrný obsah fruktanů zde činil 28,2 %, což je o 0,6 % méně než obsah deklarovaný a odpovídá průměrné výtěžnosti 97,9 %. Oproti enzymově/spektrofotometrické metodě AOAC 999.03, kde je pro obdobný standardní materiál prezentována mezilaboratorně určená směrodatná odchylka $s_r = 1,88$, poskytuje tedy námi navrhovaná metoda srovnatelné, resp. více reprodukovatelné výsledky. Srovnání s metodou AOAC 997.08 (HPAEC-PAD) nemohlo být provedeno, neboť zde hodnota s_r pro standardní materiál uvedena není.

Směrodatné odchylky stanovení fruktanů v roztocích komerčních materiálech Orafiti P95, Orafiti GR a Actilight 950P byly velmi nízké, a to 0,04; 0,05 resp. 0,04, což odpovídá i nízkým hodnotám rozšířené nejistoty stanovení $U = \pm 0,1$ %. Průměrná výtěžnost stanovení

v nich přítomných fruktanů, orientačně posouzená srovnáním s obsahem fruktanů deklarovaných výrobcem, se pohybovala v rozmezí 96,9–99,3 %.

Směrodatné odchylky stanovení fruktanů v 5% roztocích komerčních materiálů jsou oproti směrodatným odchylkám $s_r = 0,16$ – $0,54$, které jsou uváděny v metodě AOAC 997.08 pro vybrané potraviny s obsahem 4,6–9,4 % fruktanů (nízkotučná

a sýrová pomazánka, čokoláda), velmi nízké. Tento rozdíl lze vysvětlit tím, že vyšší hodnoty s_r u metody AOAC vznikají z titulu dalších zdrojů nepřesností při přípravě vzorku z reálných potravin (extrakce z matrice, odstranění tuků, bílkovin apod.). Obdobně lze tedy předpokládat i určité zvýšení nízkých hodnot směrodatných odchylek námi testované metody při její aplikaci u reálných vzorků potravin s přídavkem fruktanů.

Oproti metodám HPAEC-PAD a MALDI-TOF (17), které mohou detekovat oligomery fruktanů s vysokým DP, lze metodou HPLC-RI s NH_2 kolonou dobře separovat a identifikovat pouze jednotlivé oligomery s DP 2–6, a to jak typ GF_n tak F_n (obr. 2. až obr. 4., chromatogramy před hydrolyzou inulinasou). Tuto vlastnost pak lze využít pro rozlišení přídavku jednotlivých druhů fruktanů do potravin. Tak např. Orafiti P95 (oligofruktosa) obsahuje vyšší množství oligomerů typu F_n než GF_n , zatímco u Orafiti GR (inulin) je tento poměr opačný. Actilight 950P oligomery typu F_n neobsahuje vůbec. V případě známého přídavku Actilight 950P je možno určit jeho obsah i přímo, tj. bez hydrolyzy inulinasou, a to na základě výpočtu obsahu 1-kestosy, nystosy resp. 1-F-fruktofuranosyl-nystosy, jejichž standardy jsou komerčně dostupné (experimentálně ověřeno, zde však není prezentováno).

Závěrem lze konstatovat, že námi implementovaná a na úrovni standardních a komerčních materiálů interně validovaná metoda HPLC s refraktometrickou detekcí a s NH_2 kolonou dává dobré předpoklady pro stanovení různých typů fruktanů. Po ověření na vzorcích reálných potravin s přídavkem fruktanů pak může být vhodnou alternativou k oficiální metodě AOAC 997.08 v laboratořích, které nedisponují chromatografickou technikou HPAEC-PAD.

Práce byly provedeny v rámci řešení projektu MZe ČR č. QJ91B724.

Souhrn

Pro stanovení fruktanů byla implementována a interně validována metoda HPLC s refraktometrickou detekcí a NH_2 kolonou. Stejně jako ostatní metody je založena na bilanci glukosy a fruktosy před a po hydrolyze fruktanů inulinasou. V první fázi testování byly za optimalizovaných chromatografických podmínek prokázány velmi dobré separační vlastnosti použité NH_2 kolony pro směs glukosy, fruktosy, sacharosy, 1-kestosy, nystosy a 1-F-fruktofuranosyl-nystosy. Při interní validaci byly pro stanovení fruktanů ve standardním materiálu určeny směrodatná odchylka $s_r = 0,2$; rozšířená nejistota stanovení $U = \pm 0,4$ % a průměrná výtěžnost 97,9 %. Směrodatné odchylky stanovení fruktanů v 5% roztocích komerčních materiálů Orafiti P95, Orafiti GR a Actilight 950P byly velmi nízké, a to 0,04; 0,05 resp. 0,04, což odpovídá rozšířené nejistoty stanovení $U = \pm 0,1$ %. Průměrná výtěžnost stanovení přítomných fruktanů, orientačně posouzená srovnáním s obsahem fruktanů deklarovaných výrobcem, se pohybovala v rozmezí 96,9–99,3 %. Touto metodou lze dobře separovat a identifikovat i jednotlivé oligomery fruktanů s DP 2–6, a to jak typ GF_n , tak F_n , což lze využít pro rozlišení jednotlivých druhů fruktanů. Závěrem lze konstatovat, že navrhovaná metoda dává dobré předpoklady pro stanovení fruktanů a po ověření na vzorcích reálných potravin může být vhodnou alternativou

Tab. 1. Výsledky interní validace metody HPLC-RI s NH_2 kolonou

Vzorek	Obsah fruktanů (%)			s	U (%)	Výtěžnost (%)		
	min.	max.	prům.			min.	max.	prům.
Standardní materiál	27,9	28,4	28,2	0,2	$\pm 0,4$	96,9	98,6	97,9
Orafiti P95	4,8	4,9	4,9	0,04	$\pm 0,1$	96,2	98,2	98,2
Orafiti GR	4,7	4,9	4,8	0,05	$\pm 0,1$	97,3	101,4	99,3
Actilight 950P	4,7	4,8	4,7	0,04	$\pm 0,1$	96,9	98,9	96,9

s – směrodatná odchylka vypočtená ze 7 paralelních stanovení,
 U – rozšířená nejistota stanovení, vypočtená jako $\pm 2 s$.

k oficiální metodě AOAC 997.08 v těch laboratořích, které nedisponují chromatografickou technikou HPAEC-PAD.

Klíčová slova: stanovení fruktanů, metoda HPLC-RI, NH_2 kolona, interní validace.

Literatura

- VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin*. 1, Tábor: OSSIS, 1999, s. 215–216.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G.: Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 16, 2005, s. 442–447.
- GIBSON, G. R. ET AL.: Dietary Modulation of the Human Colonic Mikrobiota: Updating the concept Prebiotics. *Nutrition Research Review*, 17, 2004, s. 259–275.
- TEEUVEN, M.; THONE, M.; VANDROPE, J.: Inulin: a versatile fibre ingredient. *International Food Ingredients*, 4, 1992, s. 10–14.
- SIMONOVSKA, B.: Determination of inulin in foods. *Journal of AOAC International*, 83, 2000, s. 675–678.
- QUIGLEY, M. E.; HUDSON, G. J.; ENGLYST, H. N.: Determination of resistant short-chain carbohydrates (non digestible oligosaccharides) using gas-liquid chromatography. *Food chemistry*, 65, 1999, s. 381–390.
- JOYE, D.; HOEBREGS, H.: Determination of oligofructose, a soluble dietary fiber, by high-temperature capillary gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 83, 2000, s. 1020–1025.
- QUEMENER, B.; THIBAUT, J. F.; COUSSEMENT, P.: Integration of inulin determination in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *Int. J. Biological Macromolecules*, 21, 1997, s. 175–178.
- HOEBREGS, H.: Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 80, 1997, s. 1029–1037.
- STOBER, P.; BENET, S.; HIRSCHENHUBER, C.: Simplified enzymatic high-performance anion exchange chromatographic determination of total fructans in food and pet food-Limitation and measurement uncertainty. *J. Agricult. and Food Chem.*, 52, 2004, s. 2137–2146.
- ZULETA, A.; SAMBUCETTI, M. E.: Inulin determination for food labeling. *J. Agricult. and Food Chem.*, 49, 2001, s. 4570–4572.
- BORROMEI, C. ET AL.: Characterisation and quantitation of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides in fermented milks by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Separation Science*, 32, 2009, s. 3635–3642.
- ANDERSON, R.; SORENSEN, A.: An enzymatic method for the determination of fructans in foods and food products-Comparison of the results by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *European Food Res. and Technol.*, 210, 1999, s. 148–152.
- KORAKLI, M. ET AL.: Enzymatic determination of inulin and fructooligosaccharides in food. *European Food Res. and Technol.*, 217, 2003, s. 530–534.

15. STEEGMANS, M.; ILIAENS, S.; HOEBREGS, H.: Enzymatic, spectrophotometric determination of glucose, fructose, sucrose and Inulin/Oligofructose in foods. *Journal of AOAC International*, 87, 2004, s. 1200–1207.
16. VORAGEN, G. J.: Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 9, 1998, s. 328–335.
17. BORROMEI, C. ET AL.: Evaluation of Fructooligosaccharides and Inulins as Potentially Health Benefiting Food Ingredients by HPAEC-PED and MALDI-TOF MS. *Int. J. Analytical Chem.*, 2009, Article ID 530639, s. 1–9, doi: 10.1155/2009/530639.

Bohačenko I., Pinkrová J.: Fructan Content Determination by HPLC Method with Refractometric Detection

The method for fructan content determination using HPLC with refractometric detection and NH_2 column has been implemented and internally validated. As well as other method, this method is based on the balance of glucose and fructose before and after hydrolysis of fructans by inulinase. In the first phase of testing under optimized chromatographic conditions, very good properties of NH_2 column for separation of glucose, fructose, saccharose, 1-kestose, nystose and 1-F-fructofuranosyl-nystose mixture have been demonstrated. During the internal validation of fructan determination in standard material, standard deviation $s_r = 0.2$; expanded uncertainty of measurement $U = \pm 0.4\%$ and mean recovery 97.9 % were determined. Standard

deviations of fructan determinations in commercial materials Orafit P95, Orafit GR and Actilight 950P were very low, i.e. 0.04 and 0.05 respectively, which corresponds to the extended uncertainty of measurements $U = \pm 0.1\%$. Mean recovery of fructan determination, indicatively assessed by comparison with the fructan contents declared by the producer, ranged from 96.9–99.3 %. The method also allows a good separation and identification of individual fructan oligomers with DP 2–6 (both types GF_n and F_n). These properties can be used to distinguish between different kinds of fructans. It can be concluded that the proposed method gives good prerequisites for the determination of fructans. After verification on real food samples, this method may be a good alternative to the official AOAC 997.08 method, especially in laboratories which do not have HPAEC-PAD chromatographic technology at their disposal.

Key words: fructan determination, HPLC-RI method, NH_2 column, internal validation.

Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Ivan Boháčenko, CSc., Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i., Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika, e-mail: i.bohacenko@vupp.cz

ROZHLEDY

Šárka E., Bubník Z., Hinková A., Gebler J., Kadlec P. Řepná melasa – vycukerňování, složení, vlastnosti a aplikace (*Beet molasses – desugarization, composition, properties and application possibilities*)

Nehledě na pokles výroby cukru v Evropě zůstává melasa stále cennou surovinou. Článek popisuje základní rovnice matematického modelu pro krystalizaci zadinové cukroviny. Velmi podrobně je dále uvedeno složení melasy a základní fyzikálně chemické vlastnosti melasy, jejichž znalost je důležitá pro aplikační zpracování melasy.

Zuckerind./Sugar Ind., 138, 2013, č.2, s. 105–114.

Kadlec

Lohrey C., Kochergin V. Uvolnění tepla a vlhkosti ze surového cukru při ventilaci okolním vzduchem (*Heat and moisture release from raw sugar by ventilation with ambient air*)

Bylo zjištěno, že barva surového cukru se zvyšuje v závislosti na době skladování. Tento nárůst zabarvení může vést ke snížení zisku cukrovary, zvláště v těch případech, kdy lze získat prémie za surový cukr o vysoké polarizaci (VHP) a nízké barvě (VLC). V dřívější práci stejných autorů bylo zjištěno, že vlhkost a teplota jsou hlavními faktory, které přispívají ke zvýšení obsahu barevných látek. Byl vyhodnocen test ventilačního systému ve skladu surového cukru v době od října 2010 do srpna 2011. Cílem studie bylo stanovit schopnost jednoduchého ventilačního systému k odvedení tepla a vlhkosti z hromady surového cukru a vyhodnotit efektivitu z hlediska udržení kvality cukru. Jako kvalitativní parametry cukru byly sledovány polarimetrický obsah cukru, barva, vlhkost a pH jak u vzorků cukru, skladovaného ve skladišti, tak i v laboratoři. Provětrávaný surový cukr měl obsah cukru vyšší o 0,2 % a barva dosáhla jen 17 % IU neprovětrávaného

cukru (měřeno při pH 8,5). Během skladování byl monitorován průběh teploty a vlhkosti vzduchu v hromadě surového cukru. Výsledky ukázaly, že ventilační systém snižuje teplotu v hromadě surového cukru o 10 °C a vlhkost vzduchu o 22 %.

Int. Sugar J. 115, 2013, č.1370, s. 115–122.

Kadlec

Eggleston G., Gober J., Cyr E. S. Vývoj průmyslové metody stanovení amylasové aktivity v surovém a rafinovaném cukru (*Development of an industrial method to quantitatively measure carry-over amylase activity in raw and refined sugars*)

Podkladem pro provozní měření amylasové aktivity v krystalických cukrech byla metoda používající modrý Phadebas škrob, který je vysoce specifický na aktivitu α -amylasy. Při této metodě se používá minimum reagensů a využívá se zařízení, které je běžně k dispozici v cukrovarech a rafineriích. K surovému nebo rafinovanému cukru se přidá chlorid vápenatý Tris pufr (pH 6,0) v poměru 60 : 40 w/v, promíchá se s tabletkou Phadebas, nechá se inkubovat 45 min při teplotě 37 °C a změří se absorbance filtrátu na spektrofotometru při 620 nm. Přítomnost vápenatých iontů dramaticky zvyšuje aktivitu amylasy. Prodloužená inkubace delší než optimálních 45 min vede ke snížení citlivosti metody. Nejpřesnější výsledky byly dosaženy při porovnání se standardem bílého řepného cukru o sacharizaci 60 %. Střední rozsah aktivity detekovaný pro rafinované cukry byl 101–145 COU/L (Carry Over Units v litru) a pro surové cukry 272–552 COU/L. Nejnižší stanovitelná hladina byla 25 COU/L. Relativní směrodatná odchylka pro rafinovaný cukr byla 12–20 %. U surového cukru byly dosaženy nejlepší výsledky u průměrné aktivity 552,3 COU/L, kde byla relativní směrodatná odchylka 8,4 %.

Int. Sugar J., 115, 2013, č.1370, s. 123–131.

Kadlec