

Metoda HPLC/RI ke stanovení sacharidů v cukrovarnických meziproduktech a výrobcích

HPLC/RI METHOD FOR DETERMINATION OF CARBOHYDRATES IN SUGAR INDUSTRY INTERMEDIATES AND PRODUCTS

Marta Łaczkowska – Instytut Przemysłu Skórzanego w Łodzi, Polsko

Ewelina Małczak, Andrzej Baryga – Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Zakład Cukrownictwa, Leszno, Polsko

Sacharidy jsou nejčastěji se vyskytující látky v potravinách. Existují proto různé metody k jejich stanovení. K separaci a analýze mono- a oligosacharidů (1) mohou být využity např. papírová a tenkovrstvá chromatografie (PLC, TLC (2)), vysokovýkonná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí (HPLC/MS), UV detekcí (3, 4, 5), refraktometrickou detekcí (RI) (3, 5–17), pulsní amperometrickou detekcí (PAD) (18) nebo s detektorem Corona CAD (charged aerosol detector) (19).

Většina sacharidů je hydrofilních a elektroneutrálních. Derivatizace vhodnými reakčními činidly mění tyto vlastnosti a může pomoci při rozdělení, např. sacharidy může opatřit elektrickým nábojem k usnadnění jejich elektroforetické separace nebo hydrofobicitou, umožňující jejich efektivní rozdělení pomocí reverzní fáze HPLC nebo micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) (2). Jednou z nejoblíbenějších reakcí derivatizace sacharidů je reduktivní aminace, pro tento účel byla navržena celá řada reakčních činidel včetně derivatizačních činidel UV-aktivních fluoroforů, jako je např. 4-ethylester kyseliny aminobenzoové (4-ABEE) (2).

Další možnou metodou derivatizace je použití 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu s dělením reverzní fází vysokovýkonné kapalinové chromatografie a detekcí ionizační technikou LC-ESI-MS/MS (electrospray ionization tandem mass spectrometry) (20).

Monosacharidy a oligosacharidy mohou vytvářet detekovatelné komplexy s rozličnými anionty a kationty. Např. potenciál navázaného jódu byl použit ke zlepšení citlivosti analýzy glukosy pomocí LC/MS. Jód vytváří anionické adiční produkty s neutrálními monosacharidy v negativním iontovém módu ionizace elektrosprejem při detekci hmotnostní spektrometrií (21).

Existuje možnost stanovit sacharidy metodou GC/MS po reakci na vhodné deriváty, jako je např. trimethylsilyl-(oxim) ether/ester (22).

V tomto článku je popsána metoda HPLC/RI pro analýzu cukrovarnických produktů. Stanovení sacharidů metodou HPLC s RI detektorem je jednou z nejsnadnějších metod, porovnáme-li pracnost úpravy vzorků. Úprava vzorku není složitá a zaručuje

opakovatelné výsledky. Ze sacharidů se v cukrovarnických surovinách a produktech nejčastěji stanovují sacharosa, glukosa, fruktosa a rafinosa.

Přestože existují tyto nové metody, v cukrovarnických laboratořích se stále ke stanovení sacharosy používá polarimetrie a ke stanovení celkové koncentrace glukosy a fruktosy (invertní cukr) titrační metoda.

Obsah jednotlivých sacharidů v surovinách a finálních produktech dává velmi důležitou informaci o tom, zda je technologický proces prováděn náležitě. Charakteristickým jevem rafinosy je pravotočivé stáčení polarizovaného světla, takže vzniká nebezpečí, že získané výsledky obsahu cukru jsou nadhodnoceny. Úhel otáčení roviny polarizovaného světla (optická otáčivost) cukru je $(\alpha) = 66,50$ a rafinosy $(\alpha) = 104,50$. Z těchto dat vyplývá, že rafinosa zvyšuje obsah cukru $1,57\times$ (23). Proto jedním z cílů bylo vypracovat postup, který by umožnil detekovat rafinosu v přítomnosti jiných sacharidů.

Materiál a metody

Přístroje

Chromatografická separace byla prováděna pomocí systému Knauer s vakuovým odplyněním, byla vybavena automatickým vzorkovačem 3800, čerpadlem LC 1000 a refraktometrickým detektorem 2300. Pracovalo se při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na koloně Cosmosil Type Sugar-D Waters – $4,6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ s $5\text{ }\mu\text{m}$ částicemi a na koloně EUROSPHER 100-7 NH_2 , $4\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$.

Chemikálie

Glukosa byla získána od firmy Sigma Aldrich, fruktosa a sacharosa od firmy Fluka a rafinosa od firmy Merck. Všechny standardy měly čistotu pro analýzu. Deionizovaná voda byla čerstvě připravena na zařízení Hydrolab HLP1 a acetonitril (ACN)

Tab. 1. Podmínky analýz sacharidů na HPLC/RI

Sacharid	Eluát ACN : voda v/v	Eluce	Průtok (ml.min ⁻¹)	Teplota (°C)	Doba analýzy (min ⁻¹)	Kolona
Glukosafruktosagalaktosa	84 : 16	isokratická	1	30	20	Cosmosil Sugar-D, (4,6 × 250) mm, 5 μm
Rafinosa	75 : 25				15	EUROSPHER 100-7 NH ₂ , (4 × 250) mm, 5 μm

pro HPLC byl dodán firmou POCH. Kolona C18 byla nakoupena od firmy Waters, nylonové filtry od firmy ANCHEM a hydrofilní membrány PVDF od firmy Millipore.

Vzorky

Analýzy byly prováděny se surovinami (melasa, řepný výluh a surová šťáva) a výrobky (bílý a přírodní cukr) z polských cukrovarů. Pro přípravu řepného výluhu bylo naváženo 26 g dezintegrované řepy a kvantitativně vloženo do nádoby společně s 178,2 ml zředěného alkalického roztoku octanu sodného. Nádoba byla ponořena do vodní lázně o teplotě 80 °C na dobu 30 min. Po ochlazení na teplotu 20 °C byla pevná fáze odfiltrována. Prvních 25 ml filtrátu bylo vylito, zbylá část byla analyzována na HPLC.

Před analýzou byly vzorky uloženy v ledničce (při asi 4 °C), a následně analyzovány během dvou měsíců od data výroby.

Standardy a úprava vzorků

Jednotlivé standardní roztoky obsahující glukosu a fruktosu v koncentraci 0,5; 0,25; 0,1 (mg.ml⁻¹), cukr a rafinosu 10; 5,0; 2,5 (mg.ml⁻¹) byly připraveny rozpuštěním ve vodě a přefiltrovány přes nylonový střičkačkový filtr.

Tekuté roztoky bílého cukru, přírodního cukru, melasy, řepného výluhu a surové šťávy byly naředěny na 10 mg.ml⁻¹ pro stanovení rafinosy a sacharosy, 100 mg.ml⁻¹ pro stanovení glukosy a fruktosy.

Jako rozpouštědlo rafinosy byla použita homogenní směs acetonitril: voda 75:25 v/v, pro ostatní sacharidy 84:16 v/v. Rozpouštědla byla přefiltrována přes PVDF hydrofilní membrány. Všechny vzorky roztoků byly přefiltrovány přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,22 μm. Melasa, řepný výluh a surová šťáva byly mimo to filtrovány přes C18. Všechny vzorky a standardy byly čerstvě připraveny.

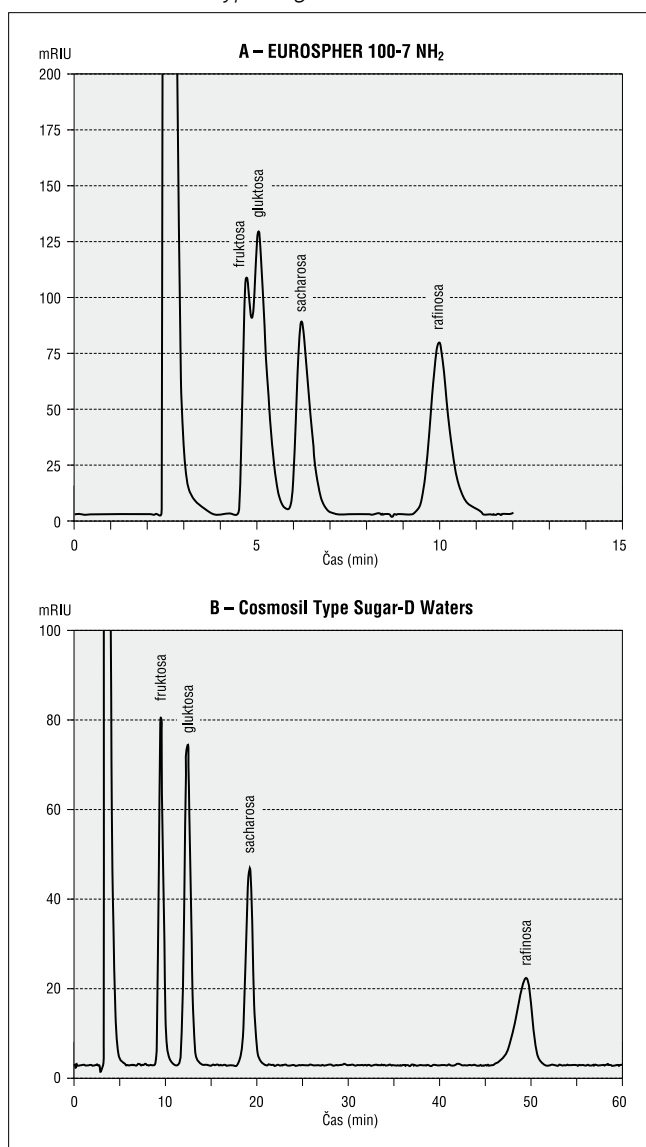
Podmínky analýz

Parametry analýz jsou shrnuty do tab. I. Byly vybrány ze seznamu testovaných systémů a dávaly nejlepší separační efekt. Před analýzou byla kolona promývána směsí ACN: voda.

Výsledky a diskuse

Předložená metoda byla vyvinuta ke stanovení nejčastěji se vyskytujících sacharidů v meziproduktech a výrobcích cukrovarnické technologie. Metoda HPLC je velmi exaktní a vhodná pro tento druh analýz. Příprava vzorků je snadná a rychlá, což podstatně redukuje čas vynaložený na činnosti, které jsou prováděny při zpracování. Byly testovány dvě kolony: EUROS-PHER 100-7 NH₂ a Cosmosil Type Sugar-D Waters. Obr. 1. zobrazuje získané chromatogramy. Je zřejmé, že glukosa a fruktosa se neoddělili na koloně EUROS-PHER 100-7 NH₂, doba analýzy však byla pod 15 min. Na druhé koloně byly pásy všech sloučenin odděleny, ale retenční čas pro rafinosu byl téměř 50 min. Proto bylo nutné k analýze tohoto trisacharidu používat NH₂ kolonu, zatímco ostatní cukry byly stanovovány na koloně Sugar-D.

Obr. 1. Chromatogramy fruktosy, glukosy, sacharosy a rafinosy stanovené HPLC na koloně EUROS-PHER 100-7 NH₂ a Cosmosil Type Sugar-D Waters



Použití dvou kolon může být uživatelsky nepohodlné. Avšak stanovení rafinosy je méně časté než zbylých tří analyzovaných sloučenin. Relativně krátký čas analýzy je důležitý, poněvadž přispívá ke snížení nákladů, které mohou být vysoké zvláště v případě kontinuální kontroly cukrovarnických produktů.

Tab. II. Výsledky rozsahu linearity, LOD and LOQ, koeficient determinace a studium opakovatelnosti

Sacharid	Rozsah linearity (mg.ml ⁻¹)	LOD (mg.ml ⁻¹)	LOQ (mg.ml ⁻¹)	Koeficient determinace R ²	Opakovatelnost RSD (%)
Glukosa	0,05–70	0,03	0,05	0,9998	0,54–9,53
Fruktosa	0,05–70	0,03	0,05	0,9997	0,57–7,90
Sacharosa	0,075–70	0,03	0,075	0,9996	2,05–8,77
Rafinosa	0,5–25	0,045	0,5	0,9999	0,32–9,77

Tab. III. Výsledky analýz cukrů získaných popsanou metodou v různých vzorcích z cukrovarů

Meziprodukt nebo produkt	Glukosa (%)	Fruktosa (%)	Sacharosa (%)	Rafinosa (%)
Bílý cukr	–	–	99,5	0,05
Přírodní cukr	–	–	99,6	–
Řepečná melasa	0,07	0,20	51,0	0,50
Třtinová melasa	2,79	4,60	32,5	–
Řepečný výluh	1,78	4,79	13,97	0,17
Surová šťáva	–	–	13,74	0,09
Invertní cukr	35,05	18,46	15,60	0,11

Rozsah linearity, mez detekce (LOD), mez kvantifikace (LOQ) a variační koeficient (RSD) jsou předloženy v tab. II. Lineární korelační koeficient R byl pro všechny cukry 0,9998 nebo vyšší.

Výsledky analýz čtyř sacharidů v několika meziproductech a produktech cukrovarnického průmyslu je ukázán v tab. III. Analýza malých množství glukosy a fruktosy (<0,03 %) v řepném a třtinovém cukru není snadným úkolem vzhledem k vysoké koncentraci sacharosy ve vzorku. Pás disacharidu může překrývat pásy monosacharidů. Klíčové je vybrat vhodné podmínky analýzy. Glukosa a fruktosa byly detekovány pouze ve vzorcích invertního cukru a v řepném výluhu.

Bílý cukr podle Nařízení rady (ES) č. 1234/2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty, by měl obsahovat alespoň 99,5 % sacharosy stanovené polarimetricky, s maximálním obsahem invertního cukru (součtu obsahu glukosy a fruktosy) 0,04 %. Polská norma (PN-76/R-64772) pro řepnou melasu určuje minimální obsah cukru v melase hodnotou 47 %, přičemž součet obsahu glukosy a fruktosy by neměl přesáhnout 1 %. Požadavky na přírodní cukr lze nalézt v Codex Alimentarius, kde se uvádí minimální obsah cukrů 88 %. Pokud jde o řepný výluh, surovou šťávu a třtinovou melasu, neexistují zákonné požadavky. V polských technologických publikacích se uvádí střední obsah rafinosy v řepném výluhu v rozmezí 0,01–0,03 % a v surové šťávě 0,02–0,075 %. Surová šťáva obsahuje 13,0–13,5 % cukru a 0,07–0,15 % fruktosy a glukosy. Řepečný výluh obvykle obsahuje 16,6–21,0 % sacharosy. Mělo by se vzít v úvahu, že uvedené údaje byly získány jinými metodami, než je HPLC. Přesto výsledky získané při měření se jim velmi blíží.

Závěr

Popsaná metoda umožňuje přesné, opakovatelné a rychlé analýzy čtyř sacharidů – glukosy, fruktosy, sacharosy a rafinosy – pomocí kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Poskytuje spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu cukru v přítomnosti rafinosy, která bývá nadhodnocena při použití polarimetrie.

Navržená metoda může být použita ke kvalitativní a kvantitativní analýze sacharidů v surovinách a výrobcích cukrovarnického průmyslu, ale rovněž i v dalších potravinách jako jsou med, nápoje nebo cukrovinky.

Poděkování: Autoři děkují polským cukrovarům za pomoc s přípravou článku.

Souhrn

Cílem článku bylo představit metodu HPLC/RI pro stanovení čtyř sacharidů: glukosy, fruktosy, sacharosy a rafinosy v bílém a přírodním (třtinovém) cukru, melase, řepném výluhu a surové šťávě. Jde o nejčastěji stanovované látky v cukrovarnických produktech. Metoda vykazuje dobrou opakovatelnost, přesnost a citlivost. Lineární rozsah je 0,05–0,25 mg.ml⁻¹ pro rafinosu, pro zbylé tři sacharidy 0,05–70 mg.ml⁻¹. Mez detekce byla stanovena na 0,045 mg.ml⁻¹ pro rafinosu, pro ostatní sacharidy 0,03 mg.ml⁻¹.

Klíčová slova: cukrovarnictví, sacharidy, metoda HPLC/RI.

Literatura

- HARUISON, J.; GALLAGHER, J. A.; POLLOCK, C. J.: A simple and rapid method for the analysis of water-soluble carbohydrates from small segments of cereal leaf tissue. *J. Plant Physiol.*, 151, 1997, s. 654–659.
- MOMENBEIK, F.; KHORASANI, J. H.: Analysis of sugars by micellar liquid chromatography with UV detection. *Acta Chromatogr.*, 16, 2006, s. 58–69.
- KARKACIER, M. ET AL.: Comparison of different extraction and detection methods for sugar using amino-bonded phase HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, 41, 2003, s. 331–333.
- RAHMAN, N. A.; HASAN, M.; HUSSAIN, M. A.: Determination of Glucose and Fructose from Glucose Isomerization Process by High performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Mod. Appl. Sci.*, 2, 2008 (4), s. 151–154.
- FALQUÉ LÓPEZ, E.; FERNÁNDEZ GÓMEZ, E.: Simultaneous Determination of the Major Organic Acids, Sugars, Glycerol, and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wines. *J. Chrom. Sci.*, 34, 1996, s. 254–257.
- SHARMA, A. ET AL.: Comparative Study for the Determination of Reducing Sugars by High-Performance Liquid Chromatography and Titration Method in 'Chyawanprash': A Traditional Polyherbal Formulation. *IJDDHR*, 1, 2011 (4) s. 106–110.
- SESTA, G.: Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apido.*, 37, 2006 s. 84–90.
- RYBAK-CHMIELEWSKA, H.: High performance liquid chromatography (HPLC) study of sugar composition in some kinds of natural honey and winter stores processed by bees from starch syrups. *J. Apic. Sci.*, 51, 2007 s. 23–38.
- KELEBEK, H. ET AL.: HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. *Kozan Microchem. J.*, 91, 2009, s. 187–192.
- ALJANE, F.; TOUMI, I.; FERCHICHI, A.: HPLC determination of sugars and atomic absorption analysis of mineral salts in fresh figs of Tunisian cultivars. *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 2007 (5), s. 599–602.
- CHEN, J. ET AL.: Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chem.*, 104, 2007, s. 268–275.
- BARREIRA, J. C. M. ET AL.: Sugars profiles of different chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and almond (*Prunus dulcis*) cultivars by HPLC-RI. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 2010, s. 38–43.
- PENNA, N. ET AL.: Characterization of carbohydrates in mucilage samples from the northern Adriatic Sea. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 2003, s. 436–439.
- CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER M. C.: Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chrom. A.*, 1043, 2004, s. 211–215.

15. PIECYK, M.; KLEPACKA, M.; WOROBIEJ, E.: Zawartość inhibitorów trypsyny, oligosacharydów oraz fosforu fitynowego w preparatach białkowych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) metodą krystalizacji i izolacji klasycznej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 44, 2005 (3), s. 92–104.
16. BOGDANOV, S.; VIT, P.; KILCHENMANN, V.: Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*, 27, 1996, s. 445–450.
17. DA COSTA LEITE, J. M. ET AL.: Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chem.*, 70, 2000, s. 93–98.
18. LEBIEDZIŃSKA, A. ET AL.: Ocena zawartości cukrów prostych i sacharozy w sokach owocowych z wykorzystaniem HPLC. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 44, 2011, s. 326–330.
19. OUCHEMOUKH, S. ET AL.: HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.*, 121, 2010, s. 561–568.
20. McRAE, G.; MONREAL, C. M.: LCMS/MS quantitative analysis of reducing carbohydrates in soil solutions extracted from crop rhizospheres. *Anal. Bioanal. Chem.*, 400, 2011, s. 2205–2215.
21. ROGATSKY, E.; TOMUTA, V.; STEIN, D. T.: LC/MS quantitative study of glucose by iodine attachment. *Anal. Chim. Acta*, 591, 2007, s. 155–160.
22. KAKASY, A. ET AL.: Analysis of Non-volatile Constituents in *Dracocephalum* Species by HPLC and GC-MS. *Chromatographia*, 63, 2006, s. 17–22.
23. GRUSZECKA H. ET AL.: *Sprawozdanie Końcowe Określenie wpływu rafinozy na wyniki bilansu cukru w cukrowniach. Etap II: Określenie wpływu zawartości rafinozy w soku rzadkim i melasie na wielkość strat nieoznaczonych w cukrowniach.* Instytut Przemysłu Cukrowniczego. Nr identyfikacyjny 14/99/ZAC/4. Symbol tematu: PB-38/01. Warszawa 1999.

Łaczkowska M., Małczak E., Baryga A.: HPLC/RI Method for Determination of Carbohydrates in Sugar Industry Intermediates and Products

The aim of the article is to present HPLC/RI method for determination of four carbohydrates: glucose, fructose, sucrose and raffinose in white sugar, brown sugar, molasses, sugar beet filtrate and diffusion juice. Those carbohydrates are most frequently assay substances in sugar products. The method shows good repeatability, precision and sensitivity. Linear range is 0.05–0,25 mg ml⁻¹ for raffinose and 0.05–70 mg ml⁻¹ for other three saccharides. The limit of detection (LOD) was determined 0.045 mg ml⁻¹ for raffinose and 0.03 mg ml⁻¹ for glucose, fructose and sucrose.

Key words: sugar industry, carbohydrates, HPLC/RI method.

Kontaktní adresa – Contact address:

Marta Łaczkowska, Msc Eng., Institute of Leather Industry, Department of Biotechnology and Environmental Protection, Zgierska 73, 91-462 Lodz, Poland, e-mail: m.laczkowska@ips.lodz.pl