

PRÓBY ZASTOSOWANIA CHROMATOGRAFII GAZOWEJ
DO OZNACZANIA RZECZYWISTEJ ZAWARTOŚCI SACHAROZY
W SOKACH CUKROWNICZYCH

Tadeusz Pietrzykowski, Halina Gruszecka

Instytut Przemysłu Cukrowniczego

Andrzej Borys, Stanisław Kubacki

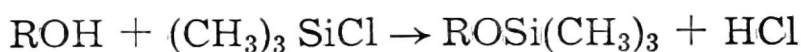
Instytut Przemysłu Fermentacyjnego

Warszawa, Polska

Jak wiadomo, jedyną metodą stosowaną powszechnie w chwili obecnej do kontroli zawartości sacharozy w sokach cukrowniczych jest metoda polarymetryczna. Wiele firm na świecie produkuje bardzo precyzyjne sacharymetry, przy czym niektóre z nich umożliwiają całkowicie zautomatyzowany i ciągły pomiar. Jednakże metoda polarymetryczna posiada jedną podstawową wadę, a mianowicie brak specyficzności. Odczyt uzyskiwany z sacharymetru jest ekwiwalentem wypadkowej wartości skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przez wszystkie obecne w testowanym roztworze substancje optycznie czynne. Dla przykładu, w soku cukrowniczym obok przeważającej ilości sacharozy z innych węglowodanów mogą znajdować się jeszcze α - i β -glukoza, fruktoza, sorbit i rafinoza. Powyższy fakt jest najczęściej przyczyną rozbieżności pomiędzy rzeczywistą zawartością sacharozy w soku cukrowniczym a jej wartością oznaczaną metodą polarymetryczną.

Niniejsza praca, podjęta przez Zakład Analizy Instrumentalnej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego, przy współpracy z Instytutem Przemysłu Cukrowniczego, ma na celu zastosowanie chromatografii gazowej do oznaczania sacharozy w sokach cukrowniczych, jako jednej z najbardziej doskonałych ze wszystkich znanych metod rozdzielczych. Chromatografia gazowa pozwala na całkowite rozdzielenie wszystkich węglowodanów mogących występować w sokach cukrowniczych, a co za tym idzie stwarza możliwości oszacowania ilości każdego z komponentów mieszaniny.

Niestety, węglowodany, nawet te najprostsze, posiadają bardzo duże cząsteczki. Ponadto obecność wielu polarnych grup hydroksylowych dodatkowo wpływa na obniżenie ich lotności. Ogólnie wiadomo również, że ogrzane do temperatury nieco wyższej niż temperatura topnienia ulegają rozkładowi chemicznemu. Aby więc umożliwić analizowanie węglowodanów na drodze chromatografii gazowej należy przeprowadzić je w znacznie lotniejsze od nich pochodne. Ostatnio prawie wszyscy na świecie wykorzystujący chromatografię gazową do oznaczania węglowodanów, przekształcają je w etery silylowe. Najpopularniejszym ze stosowanych do tego celu środków jest tandem odczynników, na który składają się sześciometylodwusilazan i trójmetylochlorosilan. Przebieg reakcji silylowania jest zilustrowany następująco:



Powstające w tej reakcji związki nazywamy eterami trójmetylosilylowymi węglowodanów. Niezmiernie ważne jest, aby reakcja silylowania przebiegała w warunkach bezwodnych. Najczęściej prowadzi się ją w środowisku polarnego rozpuszczalnika organicznego, którym może być dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek, dioksan a przede wszystkim pirydyna.

W Zakładzie Analizy Instrumentalnej prowadzone są od 1971 r. intensywne prace związane z opracowaniem i doskonaleniem metody oznaczania węglowodanów za pomocą chromatografii gazowej. Na III Sesji Komitetu Chemii i Technologii Żywności Polskiej Akademii Nauk w 1972 r., która była poświęcona przemysłowi cukrowniczemu, Gruszecka i Kubacki donieśli o zastosowaniu chromatografii gazowej do oznaczania węglowodanów w sokach cukrowniczych. Jednakże od tego czasu metoda ta była wielokrotnie modyfikowana oraz ulepszana i w formie obecnej różni się w sposób istotny od wersji pierwotnej.

Stosowany obecnie tok analityczny oznaczania węglowodanów w sokach cukrowniczych jest następujący. 1 cm³ soku cukrowniczego rozcieńcza się 100-krotnie mieszaniną etanolu i wody pozostających w stosunku 4:1, a po sedymentacji wytrącających się zanieczyszczeń pobiera się 0,5 cm³ supernatantu, który następnie odparowuje się do sucha w strumieniu azotu. Do suchej pozostałości dodaje się 0,2 cm³ uprzednio przygotowanej mieszaniny reakcyjnej o składzie: pirydyna, sześciometylodwusilazan, trójmetylochlorosilan, zmieszanych w proporcjach 10:2:1. Z kolei całość poddaje się przez 1 min działaniu generatora ultradźwię-

ków, a następnie ogrzewa się na łaźni powietrznej w temperaturze 60°C przez 15 min. Dla przyspieszenia sedymentacji chlorku amonu, wytrącającego się w wyniku reakcji silylowania węglowodanów, próbki odwirowuje się. Tak przygotowane próbki analizuje się na chromatografie gazowym. W naszych doświadczeniach stosowaliśmy chromatograf gazowy firmy PYE-UNICAM Serii 104. Jako optymalne ustalone zostały następujące warunki:

Warunki analizy chromatograficznej

1. Chromatograf gazowy — Pye-Unicam Seria 104 Model 64 wraz z wyposażeniem.
2. Kolumna — szklana, spiralna, średnica wew. 4 mm, wypełniona 1% OV-101 (olej silikonowy) na Gas Chrom Q 100/120 mesh, temperatura programowana od 100°C do 300°C, tempo programu 6°C/min.
3. Detektor — promieniowo-jonizacyjny (FID), temp. 320°C.
4. Gaz przenoszący — argon oczyszczany na sitach molekularnych typu 13X, przepływ 60 cm³/min.
5. Inne gazy — wodór — przepływ 60 cm³/min, powietrze — przepływ ok. 750 cm³/min.
6. Objętość wstrzykiwana — 0,005 cm³.
7. Rejestrator — Leeds and Northrup (1 mV), szybkość przesuwu taśmy 10 cali/h.

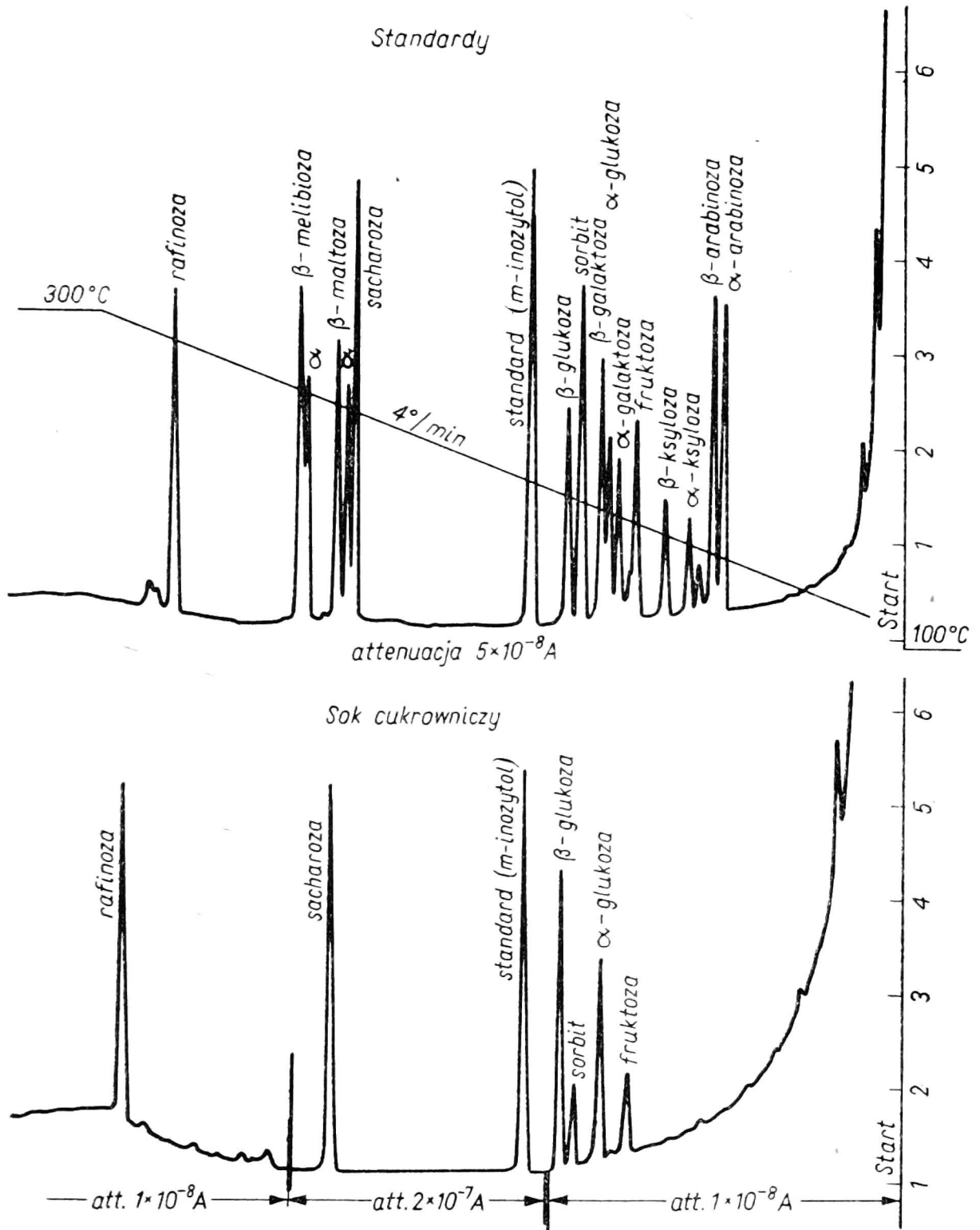
Do interpretacji jakościowej i ilościowej użyto m-inozytolu jako standardu wewnętrznego.

Z dwóch wykresów przedstawionych na rys. 1, pierwszy przedstawia chromatogram standardów bardziej znanych jedno, dwu, i trójcukrów, podczas gdy drugi został uzyskany w wyniku analizy soku cukrowniczego.

Na podstawie pięciu równoległych oznaczeń zawartości węglowodanów w tej samej średniej próbce laboratoryjnej soku cukrowniczego dokonaliśmy rozpoznania podstawowych parametrów statystycznych opracowanej metody.

Uzyskane przez nas rezultaty przedstawia tab. 1. Wartości średnie, wartości odchylenia standardowego oraz wartości błędu względnego metody wyrażono współczynnikiem zmienności. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że błąd względny wartości średniej z pięciu równoległych oznaczeń sacharozy wynosi jedynie 0,7%.

W następnej kolejności przeprowadziliśmy pierwsze próby ustalenia korelacji pomiędzy dotychczas stosowaną metodą polarymetryczną, a omówioną metodą chromatograficzną. Układ i wyniki wykonanego w tym celu doświadczenia przedstawia tab. 2. Zasługujący na podkreślenie jest przede wszystkim fakt wysokiej wartości współczynnika kore-



Rys. 1. Analiza estrów sililowych węglowodanów na drodze chromatografii gazowej

lacji liniowej, który równy jest 0,98, co świadczy o ścisłej zależności istniejącej pomiędzy wynikami otrzymanymi dla obydwu porównywanych metod. Na rysunku umieszczono ponadto równanie regresji pozwalające na przeliczenie wyników otrzymanych metodą chromatograficzną na wyniki metody polarymetrycznej i na odwrót. Z niewielkich wartości stałych tego równania wynika, że rozbieżności w rezultatach otrzymanych obydwojema metodami są niewielkie.

Tabela 1

Zestawienie wyników pięciu równoległych oznaczeń węglowodanów z jednej jednorodnej średniej próby laboratoryjnej soku cukrowniczego wraz z opracowaniem statystycznym

Oznaczenia	Zawartość węglowodanów, %				
	fruktoza	α -glukoza	β -glukoza	sacharoza	rafinoza
1	0,24	0,16	0,154	13,2	0,55
2	0,27	0,16	0,150	13,4	0,51
3	0,26	0,16	0,153	13,1	0,51
4	0,28	0,17	0,154	13,2	0,52
5	0,31	0,16	0,152	13,6	0,53
Wartość średnia	0,27	0,16	0,152	13,3	0,52
Odchylenie standardowe	0,02	0,004	0,0016	0,1	0,01
Współczynnik zmienności, %	7,4	2,5	1,0	0,7	1,9

Dla ilustracji selektywności metody chromatograficznej w porównaniu z polarymetryczną, wykonano dwie serie analiz roztworów o stałej zawartości sacharozy i różnym dodatku rafinozy wynoszącym w pierwszym przypadku 0,3⁰%, a w drugim 0,6⁰%. Otrzymane wyniki ujmuje tab. 3. Jak łatwo zauważyć, wyniki polarymetryczne różnią się od siebie w oby-

Tabela 2

Korelacja oznaczeń zawartości sacharozy wykonanych metodami polarymetryczną i chromatografi gazowej

Równanie regresji: $y=1,0106x+0,1533$. Współczynnik korelacji liniowej: $r=0,98$

Oznaczenie	Zawartość sacharozy, %							
	seria I		seria II		seria III		seria IV	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	13,62	13,40	14,20	14,30	17,36	17,60	16,95	17,05
2	13,53	13,40	14,16	14,30	17,79	17,60	16,95	17,00
3	12,75	13,40	13,88	14,30	17,52	17,60	16,79	17,00
4	13,04	13,40	13,80	14,30	17,10	17,60	16,68	17,00
5	13,23	13,40	13,40	14,30	17,27	17,60	16,70	17,00
6	13,50	13,40	13,89	14,30	17,27	17,60	16,78	17,00
Wartość średnia	13,28	13,40	13,89	14,30	17,39	17,60	16,82	17,00
Odchylenie standardowe	0,298	—	0,264	—	0,235	—	0,098	—

A — metoda chromatograficzna, B — metoda polarymetryczna.

Tabela 3

Wpływ zawartości rafinozy na zawartość sacharozy oznaczana metodami polarymetryczną i chromatografii gazowej

Oznaczenia	Ilość oznaczanej sacharozy, %			
	0,3% rafinozy		0,6% rafinozy	
	A	B	A	B
1	14,99	15,10	15,10	16,10
2	14,30	15,10	15,32	16,10
3	15,37	15,10	15,47	16,10
4	15,05	15,10	14,97	16,10
5	14,54	15,10	15,51	16,10
6	14,67	15,10	15,36	16,10
Wartość średnia	14,82	15,10	15,13	16,10
Odchylenia standardowe	0,354	—	0,273	—

A — metoda chromatograficzna, B — metoda polarymetryczna.

dwu tych przypadkach, co jest spowodowane addytywnością skręcalności optycznej komponentów użytej mieszaniny. W przeciwieństwie do tego wyniku, wartości oznaczeń sacharozy metodą chromatograficzną można uznać za jednakowe w granicach istniejącego błędu metody.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że precyzja opracowanej metody chromatograficznej jest niższa niż metody polarymetrycznej. Jednakże pierwsza z nich, dzięki swej selektywności, już w stanie obecnym pozwala na wyeliminowanie wpływu innych związków optycznie czynnych na zawartość sacharozy oznaczaną w sokach cukrowniczych.

Obecnie zostały podjęte przez nas prace mające na celu podwyższenie precyzji metody chromatograficznej oraz skrócenie czasu trwania analizy, zwłaszcza w odniesieniu do sacharozy.

Т. Пестшиковски, Г. Грушецка, А. Борыс, С. Кубацки

ПОПЫТКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ САХАРОЗЫ В САХАРНЫХ СОКАХ

Резюме

Разработан метод одновременного определения простых сахаров (моноз), дву- и трисахаридов, образующихся в сахарных соках. Метод заключается в переводе углеводов в силиловые эфиры. Для определения оптимальных условий образования и растворимости силиловых эфиров сахаров, а также их разделе-

ния при помощи газовой хроматографии, были проведены исследования влияния таких факторов, как:

- продолжительности контакта реакционной смеси с сахарами,
- температуры реакционной среды,
- количества реакционной смеси,
- действия ультразвуков,

на высоту пиков, соответствующих разным сахарам.

На основании проведенных исследований принят следующий ход анализа: Для хроматографических измерений отбирали образцы сока после дигестии, предназначенные для поляриметрического определения сахара. Эти образцы разбавляли 80%-ным этанолом. Затем отмеренную часть этанолового раствора упаривали досуха в струе азота. К сухому остатку добавляли реакционную смесь следующего состава: пиридин, 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисиласан (ГМДС) и триметилхлорсилан (ТМХС) в соотношении 10 : 2 : 1. Для ускорения реакции силилования и процесса растворения образующихся производных силиловых сахаров, реакционную среду подвергали действию генератора ультразвуков и нагревали до 60°C.

Для отделения образующегося осадка хлористого аммония образцы после охлаждения центрифугировали. Прозрачные растворы полученных силиловых эфиров углеводов впрыскивали в колонну газового хроматографа.

Удовлетворительное разделение силиловых эфиров было получено при применении колонны наполненной 1%-ным метилированным силиконовым маслом (OV—101), осажденным на „Gas Crom Q 100/120 mesh” при запрограммированной температуре в пределах 100—320°C. Количественную и качественную расшифровку проводили техникой внутреннего стандарта.

Результаты определений содержания отдельных углеводов хроматографическими методом сравнивали с результатами параллельных определений содержания сахарозы, а также исходных соках, поляриметрическим методом.

Z. Pietrzykowski, H. Gruszecka, A. Borys, S. Kubacki

ATTEMPTS OF APPLICATION OF THE GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ESTIMATION OF THE SUCROSE CONTENT IN SYRUPS

Summary

The method for simultaneous estimation of monosaccharides, di- and trisaccharides in syrups has been developed. The method is based on the transformation of carbohydrates into silyl ethers using the mixture of pyridine, hexamethyl-disilazane (HMDS) and trimethyl-chlorosilane (TMCS).

To establish the optimal conditions of formation and dissolving of silyl sucrose ethers and their separation with gas chromatography the experiments were carried out to examine the influence:

- of the contact time of the reaction mixture with sugar,
- of the temperature of the reaction medium,
- of the quantity of the reaction mixture,
- of the quantity of pyridine in the reaction mixture,
- of the ultrasonic action,

on the peak height corresponding with the specific sugars.

Acceptable separation of silyl ethers was obtained by use of a column packed with 1% methylated silicone oil (OV — 101) coated on the "Gas Chrom Q 100/120 mesh" combined with programmed temperature within the range of 100—320°C.

The quantitative and qualitative interpretation was performed with the internal standards technique.

The results of estimation of individual carbohydrates with the use of the gas-liquid chromatography were compared with the results of a parallel estimation of the sucrose content in identical syrups with the use of polarimetric method.