

Kvantitativní stanovení sacharózy a rafinózy vedle některých redukujících cukrů

MILAN TROJNA a JAROMÍR HUBÁČEK, Katedra chemická, Vysoká škola zemědělská v Praze

547.453.233.32

Jedním z významných druhů kvantitativní analýzy sacharidů jsou metody papírové chromatografie. Vedle stanovení prováděných přímo na chromatogramech objektivním nebo subjektivním hodnocením intenzity zabarvení nebo velikosti skvrny, vzniklé detekcí chromatograficky rozdělených látek vhodným činidlem (metody „in situ“), jsou většinou přesnější metody po eluci. Jejich úspěšné provedení závisí v kvantitativní eluci chromatograficky rozdělených sacharidů. Poněvadž se pro eluci provádí oddělování příčných pruhů chromatogramu, obsahujících jednotlivě oddělené sacharidy bez předchozí detekce, toliko podle souhlasné polohy odkrytých skvrn paralelně chromatografovaných referenčních vzorků, lze této metody použít jen pro takové směsi, které lze chromatograficky dostatečně rozdělit. Tuto podstatnou nevýhodu, jinak přesných kvantitativních elučních metod papírové chromatografie odstraňují ta stanovení, která jsou založena na eluci barevných redukčních zplodin, vytvořených na chromatogramu reakcí redukujících cukrů s vhodným detekčním činidlem. Na principu těchto metod lze pak stanovit i takové redukující sacharidy, jež mají blízké hodnoty R_F .

Z detekčních činidel, použitých v tomto směru, se osvědčily některé tetrazoliové soli, z nichž doznal nejširšího použití zejména snadno dostupný 2,3,5-trifenylyltetrazoliumchlorid (TTC). Ve spojení s metodami papírové chromatografie bylo tohoto činidla použito toliko v případě stanovení redukujících cukrů, zatímco neredukující cukry byly dosud stanoveny vždy až po kyselé nebo enzymatické hydrolýze eluátu. Při tomto postupu se neliší stanovení neredukujících cukrů od běžných elučních metod, protože neskýtá výhody eluce formazanů z chromatogramu, jak je tomu při stanovení cukrů redukujících.

Z těchto důvodů se nám jevilo účelné rozšířit použitelnost původní Wallenfelsovy [1,2] chromatografické metody v úpravě Fischera a Dörfela [3] též na stanovení sacharidů neredukujících.

Stanovení těchto látek jsme založili na poznatcích Bacona a Edelmana [4], kteří pro kvalitativní průkaz některých složených sacharidů prováděli jejich enzymatickou hydrolýzu přímo na chromatogramech. Aplikací této techniky na Wallenfelsovu formazanovou metodu jsme vypracovali metodiku, jež umožňuje stanovit z jednoho chromatogramu sacharózu a rafinózu současně vedle jiných sacharidů. Takto lze stanovit též melibiózu vedle rafinózy, což je při užití obvyklých elučních metod pro velmi blízké R_F obou těchto cukrů velmi nesnadné.

Uvedený analytický postup jsme prozkoušeli při stanovení některých sacharidů v modelové směsi a jeho aplikaci jsme prověřovali při stanovení sacharidů ve chmelu a melase.

Část metodická

Použité cukry pro chromatografii

Glukóza a sacharóza (Nár. pod. Léčiva), fruktóza purris., melibióza purris. (obě Merck), rafinóza (podle Ritthausena-Merck), byly sušeny ve vakuu nad P_2O_5 při b. v. etanolu. Vodný srovnávací roztok směsi cukrů objemu 1 ml byl připraven rozpuštěním 6 až 6,5 mg glukózy, 5,5 až 6 mg rafinózy, melibiózy, sacharózy a asi 5 mg fruktózy. Různá navážka glukózy a fruktózy je podmíněna jejich rozdílnou redukční mohutností vůči TTC činidlu [Mattson a Jensen [5]].

Chromatografie

Srovnávací roztoky pro zhotovení kalibrační křivky v množství 5, 10, 15 a 20 μ l byly střídavě s vhodnými objemy cukrů analyzovaných vzorků naneseny na start chromatografického papíru Whatman 4 ve vzdálenosti 3 cm, v délce nakapávání 1 cm, přičemž na obou krajích chromatogramu bylo naneseno 10 μ l orientačních analytických vzorků nebo srovnávacího roztoku referenčních cukrů.

Papírová chromatografie byla prováděna v běžném sestupném uspořádání v parách vodné fáze soustavy n-butanol-kyselina octová-voda [4:1:5]. Pro ustálení rovnováhy byly papíry syceny v chromatografické komoře 24 hodin a poté vyvíjeny organickou fází uvedenou soustavu dvakrát opakovaně na dotečení. Obsahuje-li analyzovaný vzorek vedle rafinózy též melibiózu, bylo vyvíjeno trojnásobně.

Detekční činidla

Pro detekci referenčních cukrů, rozdělených na obou krajích chromatogramu, bylo použito benzinového činidla podle Bacona a Edelmana [4]:

0,5 g benzinu a 10 ml 40% vodného roztoku kyseliny trichloroctové se rozpustí v 80 ml etanolu. Chromatogram se po postřiku suší několik minut při 110 až 120 $^{\circ}$ C.

Pro kvantitativní stanovení sacharidů bylo používáno trifenylyltetrazoliového činidla podle Fischera a Dörfela [3]:

4% metalonický roztok TTC byl smíchán se stejným objemem normálního metanolického roztoku hydroxydu sodného; činidlo bylo vždy připraveno bezprostředně před detekcí.

Úprava chromatogramu

Z obou krajů chromatogramu byly ve směru původního toku rozpouštědlové soustavy odstřiženy pásy s rozdělenou referenční směsí, která byla detegována benzinovým činidlem.

Podle polohy takto odkrytých skvrn sacharidů byla nedetegovaná část chromatogramu podstatně zmenšena sestřížením toliko na oblast obsahující chromatograficky rozdělené cukry srovnávacích roztoků a analyzovaných vzorků.

Enzymatická hydrolýza sacharózy a rafinózy na chromatogramu

Sestřižený chromatogram byl postříkán a rovnoměrně napojen 4% roztokem invertázy (4 ml invertázového koncentrátu — Pražské čokoládovny, nár. podnik — a 96 ml vody) buď celý, nebo pouze v části neredukujících cukrů, přičemž oblast obsahující glukózu a fruktózu, určená podle polohy odkrytých skvrn na obou odstřižených pásech byla chráněna před postříkem a bylo tak zabráněno sebemenšímu zbytečnému rozmývání těchto monosacharidů. Potom byl chromatogram zavěšen v termostatu, zahříván 3 hodiny v atmosféře vodní páry při teplotě 50° a posléze volně usušen na vzduchu. Pro dosažení atmosféry nasycené vodní parou bylo použito termostatu s vodním pláštěm, upraveného tak, aby na dně byla udržována hladina vody ve vrstvě asi 2 cm vysoké a jeho vnitřek byl opatřen skleněným lešením a opěrnými tyčemi pro volné zavěšení více chromatogramů pomocí kovových svorek.

Detekce chromatogramu trifenyltetrazoliovým činidlem

Vzhledem k citlivosti detekčního činidla vůči světlu byly všechny dále popsané úkony prováděny v pološeru.

Po provedení enzymatické hydrolýzy byly chromatogramy protaženy roztokem trifenyltetrazoliového činidla, vysušeny v proudu vzduchu (asi 10 minut) při laboratorní teplotě, potom zavěšeny v termostatu a zahřívány v atmosféře vodní páry jednu hodinu při 65° C.

Skvrny vytvořených formazanů byly obrýsovány do kroužku průměru asi 3 cm. Pro stanovení slepého pokusu (blanku), byly podobně narýsovány kroužky téhož průměru na volných místech narůžověle zbarveného pozadí chromatogramu, a to v blízkosti skvrn formazanů každého druhu analyzovaných cukrů.

Takto vyznačená místa chromatogramu byla vystřižena a jednotlivě eluována v kalibrovaných zkumavkách směsí metanol-kyselina octová (10:1). Pro eluci formazanů vzniklých redukčním působením glukózy bylo použito 5 ml tohoto rozpouštědla. Pro eluci formazanů vzniklých redukčním působením ostatních cukrů (též směsi cukrů získaných na chromatogramu po enzymatické hydrolýze neredukujících oligosacharidů), bylo použito 10 ml uvedeného eluční směsi.

Měření bylo prováděno proti vodě výhylkovou metodou na Langeho fotokolorimetru, model IV, za použití 1 ml kyvet o tloušťce vrstvy 1 mm a modrozelených filtrů BG-7 (maximum propustnosti při vlnové délce 480 mμ).

*Příklady praktického použití popsané metody**a) Stanovení sacharózy a rafinózy vedle glukózy a fruktózy ve chmelu*

Na obsah volných sacharidů byly analyzovány vzorky tří odrůd chmele žatecké oblasti (sklizeň 1960): Osvaldův klon 72, Osvaldův klon 126 a Žatecká populace.

Do extrakčních patron bylo odvažováno 1 až 1,5 g rozemletého vzorku chmele a volné sacharidy byly

extrahovány v Soxletově extraktoru podle Laidlaw a Reida [6] 5 hodin asi 120 ml 80 % etanolu. Do varné baňky extraktoru bylo přidáno malé množství uhličitane vápenatého. Extrakt po zahuštění na vodní lázni na objem asi 15 ml byl odsát přes rourku naplněnou asi 4 cm vysokou vrstvou polyamidového prášku (Severočeské chemické závody, n. p. Lovosice, závod Rudník u Vrchlabí). Filtrační vrstva byla promyta vodou, filtrát odpáčen na vodní lázni téměř k suchu a rozpuštěním ve vodě upraven jeho objem na 2 ml. Centrifugováním byl zbaven event. suspenze. Z čirého, nažloutle zbarveného roztoku, bylo pipetováno 20 μl pro kvantitativní chromatografickou analýzu volných sacharidů.

U zmíněných odrůd chmele byl zjištěn následující obsah volných cukrů (uvedené výsledky, vztažené na sušinu stanovenou podle normy ČSN-46 2520, jsou průměrnou hodnotou pěti stanovení, při maximální chybě ± 4 %)

Chmel klon	Glukóza %	Fruktóza %	Sacharóza %	Rafinóza %
72	1,17	1,06	1,23	
126	0,91	0,97	1,17	0,17—0,18
Žatecká populace	1,53	1,43	1,22	

b) Stanovení rafinózy v melase

Do odměrné baňky na 10 ml bylo odváženo 4 až 4,5 g melasy (Pražské cukrovary n. p., závod 02 Čakovice) a rozpuštěno ve vodě. Pro chromatografii bylo použito 10 μl a ze srovnávacího roztoku rafinózy (5,91 mg v 1 ml) bylo pipetováno 5, 10, 15 a 20 μl. Uvedené objemy byly na chromatografickém papíru Watman 4 střídavě nakapány vedle analyzovaných vzorků. Proti popsaným předchozím postupům byla délka startu pro jednotlivé nakapávané objemy 2 cm. Vyvíjeno bylo třikrát opakovaně na dotečení v soustavě n-butanol-kyselina octová (4:1:5). Enzymatická hydrolýza rafinózy na chromatogramu, jakož i další postup byl proveden způsobem popsaným v metodické části.

Bylo nalezeno 0,59 % rafinózy (počítáno jako bezvodá), jako průměr sedmi stanovení (0,57 až 0,61 %) při maximální chybě ± 3,4 %.

Diskuse

Jak zjistil Mattson a Jensen [5] neprobíhá reakce mezi redukcujícími cukry a trifenyltetrazoliovým činidlem ve stechiometrických poměrech. Vůči tomuto činidlu vykazují různé cukry nejen různou redukční účinnost, ale tvorba formazanů je též ovlivňována řadou faktorů, jejichž rozbor podává ve své práci Fischer a Dörfel [3]. Proto nelze zhotovit ani při pečlivém dodržení optimálních reakčních podmínek všeobecně platnou kalibrační křivku. Z těchto důvodů je nutno chromatografovat na každém archu chromatografického papíru vedle roztoků analyzovaných též roztoky srovnávací, jež slouží k zhotovení kalibrační křivky platné toliko pro příslušný chromatogram. Tuto nevýhodu podstatně však vyvažují přednosti přímé detekce chromatograficky rozdělených sacharidů redukcujících i neredukujících, které lze na jednom chromatogramu současně vedle sebe stanovit.



Obr. 1

B = мѣста про выстрѣженѣ ѣастѣ chromatogramu про hodnoty sleпѣго pokusu.

1 ml srovnávacѣho roztoku obsahoval: glukóza 6,95 mg, fruktóza 5,30 mg, sacharóza 6,46 mg, melibióza 5,92 mg, rafinóza 6,05 mg

Obr. 1 podává obraz takového chromatogramu, ze kterého je popsánѣм způsobem stanovena rafinóza a sacharóza, vedle melibiózy, glukózy a fruktózy ve třech různých modelových vzorcích (V_1 , V_2 , V_3)

Praktické uplatnění enzymatické hydrolýzy sacharózy a rafinózy na chromatogramu je závislé na jejím totálním průběhu. Při použití popsané metodiky bylo ještě bezpečně kvantitativně zhydrolýzováno 121,8 μ g sacharózy. Tomu nasvědčuje lineární průběh kalibrační křivky, není-li absorbance kolorimetricky proměřovaných roztoků větší než 40 %.

Spolehlivost popisované metodiky byla prověřena při zjišťování obsahu sacharózy ve chmelu. Sacharóza byla stanovena vedle postupu námi uváděném též podle Nelsona [7]. Rozdíly v nalezeném obsahu sacharózy se lišily při užití obou postupů toliko v setinách procenta a představovaly chybu ± 0 až 2,4 %.

Chmel-	Podle Nelsona	Užitím TTC	Chyba
	%	%	%
klon 72	1,22	1,26	$\pm 1,6$
126	1,17	1,17	± 0
Žatecká populace	1,19	1,25	$\pm 2,4$

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЗЫ И РАФИНОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ ДРУГИХ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ

В статье рассматривается количественный хроматографический анализ восстанавливающихся и не восстанавливающихся сахаров (сахарозы, рафинозы). Изолированные, не восстанавливающиеся олигосахариды подверглись на бумаге ферментативному гидролизу с помощью β -фруктозидазы (инвертазы). Формазаны, образующиеся под восстанавливающим влиянием ферментатического гидролизата на 2, 3, 5 — трифенилтетразолхлоридный реактив подвергаются при анализе элюированию, после чего определяются колориметрическими методами.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER SACHAROSE UND RAFFINOSE NEBEN EINIGEN REDUZIERENDEN ZUCKERN

In der Arbeit wird die quantitative chromatographische Analyse der reduzierenden und nichtreduzierenden Zuckern (Sacharose, Raffinose) erörtert. Die verteilten nichtreduzierenden Oligosaccharide wurden auf dem Papier mit β -Fruktosidase (Invertase) enzymatisch hydrolysiert. Die Formasane, die durch die Reduktionseinwirkung des enzymatischen Hydrolysatats auf die 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Reagenz entstanden, wurden nach der Elution aus dem Chromatogramm kolorimetrisch bestimmt.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SACCHAROSE AND RAFFINOSE AND OF SOME REDUCING SUGARS

The article deals with the quantitative chromatographic analysis of reducing and non-reducing sugars (saccharose, raffinose). Divided non-reducing oligosaccharides are exposed on paper to enzymatic hydrolysis by β -fructosidase (invertase). Formasanes emerging through the reducing effect of enzymatic hydrolysate upon 2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride reagent undergo elution from the chromatograph and are then identified by means of colorimetric methods.

Uvedené hodnoty obou postupů jsou průměrem 4 až 5 stanovení při maximální chybě ± 4 %.

Další podstatnou výhodou metodiky při užití tri-fenyltetrazoliového činidla lze spatřovat v tom, že není nutné, jak je tomu v případě metod elučních, provádět deionizaci analyzovaných roztoků. Analyzovali jsme jak cukerné roztoky deionizované podle Malpresse a Morrisona [8] tak i roztoky nedeionizované a nezjistili jsme podstatné rozdíly v obsahu některých sacharidů. Proto jsme prováděli další stanovení těchto látek ve chmelu bez předchozího odsolení.

Klon 72	Glukóza	Chyba	Fruktóza	Chyba	Sacharóza	Chyba
	%	%	%	%	%	%
	A	B	A	B	A	B
	1,10	1,21	$\pm 4,3$	1,—	1,08	$\pm 3,5$
	1,22	1,24	$\pm 0,8$			

A = deionizovaný, B = nedeionizovaný analyzovaný cukerný roztok. Udané hodnoty jsou průměrem 3 až 4 stanovení.

Uvedená chromatografická metoda, jež slouží pro stanovení sacharózy, má podobný význam též v případě rafinózy, neboť umožňuje její stanovení vedle sacharidů, které s ní v řadě soustav mají tak blízké hodnoty R_F^*), že nelze bez předchozí detekce a bez nebezpečí částečného vymývání sacharidů jiných, provést kvantitativní eluci rafinózy z chromatogramu.

Stanovení rafinózy námi popsánѣм způsobem neruší přítomnost melibiózy, jež je obsažena mezi volnými sacharidy chmele, ani kestózy, která doprovází rafinózu ve chmelu i melase. Po chromatografii modelových nebo přirozených směsí těchto cukrů, lze na chromatogramu popsánѣм způsobem enzymaticky hydrolyzovat rafinózu na melibiózu a fruktózu, jejichž směs skýtá redukci tri-fenyltetrazoliového činidla červenou skvrnu formazanů, kterou lze pohodlně vystřížením z chromatogramu oddělit a pro kolorimetrické stanovení eluovat.

*) Např. podle Albona a Grosse [9] v soustavě n-propanol-etylacetát-voda (7 : 1 : 2) : rafinóza $R_{0,034}$, kestóza a melezitóza $R_{0,058}$, melibióza $R_{0,055}$.

Literatura

- [1] Wallenfels K.: Naturwiss. 37, 491 (1950).
- [2] Wallenfels K., Bernt E., Limberg G.: Angew. Chem., 65, 581 (1953).
- [3] Fischer F. G., Dörfel H.: Z. physiol. Chem. 297, 164 (1954).
- [4] Bacon J. S. D., Edelman J.: Biochem. J. 48, 114 (1951).
- [5] Mattson A. M., Jensen C. O.: Anal. Chem. 22, 182 (1950).
- [6] Laidlaw R. A., Reid S. G.: J. Sci. Food Agric. 3, 19 (1952).
- [7] Nelson N.: J. Biol. Chem. 153, 375 (1944).
- [8] Malpress F. H., Morrison A. B.: Nature 164, 1963 (1949).
- [9] Albon N., Gross D.: Analyst 77, 410 (1952).

Došlo do redakce 24. 10. 1962.