

Afd. Akkerbouw

1983-01-31

VERSLAG 83.8

Pr.nr. 505.4000

Onderwerp: Bepaling van suikers met behulp van HPLC.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd.

Akkerbouw (4x), afd. Normalisatie (Humme),

Projektbeheer, Projektleider (Mause),

Afdeling Akkerbouw

1983-01-31

VERSLAG 83.8

Pr.nr. 505.4000

Projekt: Ontwikkeling en verbetering analysemethoden voor akkerbouw-
produkten

Onderwerp: Bepaling van suikers met behulp van HPLC

Bijlagen: 3

Doel:


Ontwikkeling van een methode voor de bepaling van mono- en disacchari-
den in levensmiddelen met behulp van vloeistofchromatografie (HPLC).


Samenvatting

In dit onderzoek wordt de bruikbaarheid van HPLC voor de bepaling van
suikers getest en vergeleken met enzymatische suiker-analyse.

Conclusie:

De HPLC analyse komt goed overeen met de enzymatische analyse. De HPLC
methode zal echter nog getoetst moeten worden op andere produkten voor
wat betreft de voorbereiding om het een bredere toepasbaarheid te
geven.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 

Medewerker/Samensteller: M.L. Essers 

Projectleider: drs B.G. Muuse

Inhoud

I Inleiding

II HPLC-analyse

III Vergelijking HPLC methode met de enzymatische methode

IV Conclusie

I Inleiding

Momenteel worden mono- en disacchariden (fructose, glucose, saccharose, maltose en lactose) op onze afdeling bepaald met behulp van enzymen (Interne analysevoorschriften D 91, D 93, D 94 en D 95). Enzymatisch kan echter slechts een suiker per analyse bepaald worden. Met de in dit onderzoek gebruikte HPLC methode (zie bijlage I) kunnen de mono- en disacchariden met behulp van één analyse allen tegelijk doch afzonderlijk bepaald worden. Tevens is de analysetijd korter. De bruikbaarheid van deze methode werd getest door analysemonsters zowel enzymatisch als met behulp van HPLC te analyseren.

II HPLC analyse

De suiker analyse met behulp van HPLC werd uitgevoerd met de Waters 6000 A en de Carbohydrate kolom van Waters, gekoppeld aan een RI detector R 401 gethermostatiseerd op 30°C. Het loopmiddel was acetonitril-water in een verhouding 75-25 (v/v). Van een mengsel van suikers werd 10 µl via de sample loop geïnjecteerd op de kolom. De suikers fructose, glucose en saccharose werden gescheiden tot de basislijn. Bij maltose en lactose was dit niet het geval (zie bijlage II). Op deze wijze kon in ca. 15 min bekeken worden welke suikers in een monster aanwezig zijn.

Kwantificatie suikers

Voor kwantificatie van de analyse werd de responsfaktor bepaald van de diverse suikers middels standaardoplossingen en werd de lineariteit van de responsen nagegaan. Als interne standaard werd steeds een oplossing van methyl α-D-Glucopyranoside in water gebruikt. De berekeningen werden uitgevoerd aan de hand van piekoppervlakte en ook met behulp van de piekhoogte.

Resultaat

In totaal werden 9 monsters geanalyseerd (3 x 0,5 gr, 3 x 1,0 gr en 3 x 1,5 gr van elke suiker per 100 ml).

	Interne					
	standaard	fructose	glucose	saccharose	maltose	lactose
gem. oppervlak/1 gr	61194	63504	58273	66483	56919	53796
standaardafwijking	590	388	524	348	884	1955
relatieve standaard- afwijking %	0,96	0,61	0,90	0,52	1,55	3,63
gem. piekhoogte/1 gr	135,8	104,5	60,9	64,7	37,3	31,6
standaardafwijking	1,1	0,8	0,6	0,7	0,3	0,4
relatieve standaard- afwijking %	0,81	0,77	0,99	1,08	0,82	1,33

Om na te gaan of deze cijfers reproduceerbaar waren werden na 2 weken nogmaals 9 standaardmengsels geanalyseerd.

	Interne					
	standaard	fructose	glucose	saccharose	maltose	lactose
gem. oppervlak/1 gr	59653	62450	60348	65819	57449	56460
standaardafwijking	437	522	1008	440	2060	4483
relatieve standaard- afwijking %	0,73	0,84	1,67	0,67	3,59	7,94
gem. piekhoogte/1 gr	133,3	104,4	63,4	66,3	37,0	31,4
standaardafwijking	0,6	0,5	0,3	0,5	0,3	0,2
relatieve standaard- afwijking %	0,41	0,52	0,50	0,81	0,78	0,70

Bespreking van de resultaten

- De suikers geven grote verschillen in responsfactoren, zowel bij berekening via het oppervlak als piekhoogte. Hierdoor zal indien de berekening via de interne standaard uitgevoerd wordt een Respons Faktor (Rf) ingevoerd moeten worden.
- De ijklijnen zijn voor alle suikers lineair, echter niet constant en dienen per analysegang opnieuw te worden bepaald.
- Berekening via piekhoogte geeft een beter resultaat dan berekening via oppervlak (vooral bij maltose en lactose).

Conclusie:

- Bij de HPLC methode zal na enkele analysemonsters een standaardmonster geanalyseerd moeten worden voor een juiste berekening, b.v. om de 5 analyses.
- De berekening bij de HPLC methode zal met behulp van piekhoogte uitgevoerd moeten worden.

III Vergelijking HPLC methode met de enzymatische methode

De vergelijking vond op twee manieren plaats:

1. via piekhoogte interne standaard x Respons faktor
2. via piekhoogte van een standaard van de te bepalen suiker.

Uitgegaan werd van 10 marsepein monsters en 3 melkpoeders.

Marsepein

Vorbewerking:

Er werd 5 gr marsepein afgewogen in een maatkolf van 100 ml en 1 gr interne standaard toegevoegd. De suikers werden opgelost door 50 ml water toe te voegen en de kolf 45 min in een schudwaterbad van 65°C te plaatsen. Na afkoelen werd geklaard met 3 ml Carrez I + 3 ml Carrez II, aangevuld, gemengd en gefiltreerd. Voor de enzymatische analyses werd het filtraat volgens voorschrift verdund. Het filtraat was na filtratie door een 0,2 µm filter geschikt voor HPLC analyse. In enkele monsters werd een niet nader te definiëren verbinding aangetoond (zie bijlage III).

Resultaat

RIKILT-nummer	fructose	glucose	saccharose
	%	%	%
27782 a. enzymatisch	2,9	3,9	59,2
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	2,8	4,2	58,4
c. HPLC via piekhoogte suiker	2,8	4,1	59,9
27783 a. enzymatisch	8,7	9,2	48,5
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	8,8	9,3	47,1
c. HPLC via piekhoogte suiker	8,8	9,2	46,7

RIKILT-nummer	fructose	glucose	saccharose
	%	%	%
27784 a. enzymatisch	4,0	4,2	57,2
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	4,0	4,4	56,0
c. HPLC via piekhoogte suiker	4,1	4,4	55,8
27785 a. enzymatisch	3,0	4,3	59,3
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	3,2	4,4	58,1
c. HPLC via piekhoogte suiker	3,2	4,4	59,3
27786 a. enzymatisch	0,2	0,6	69,6
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	0,3	1,0	--
c. HPLC via piekhoogte suiker	0,3	1,0	--
27787 a. enzymatisch	7,6	8,3	50,2
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	7,5	8,3	48,5
c. HPLC via piekhoogte suiker	7,7	8,3	48,8
27788 a. enzymatisch	4,7	6,0	54,9
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	4,7	6,1	54,2
c. HPLC via piekhoogte suiker	4,8	6,1	54,2
27789 a. enzymatisch	9,9	10,8	48,8
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	10,1	11,1	48,4
c. HPLC via piekhoogte suiker	10,3	11,0	48,1
27790 a. enzymatisch	3,8	5,0	65,8
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	3,9	5,2	--
c. HPLC via piekhoogte suiker	4,0	5,2	--
27923 a. enzymatisch	4,8	5,5	52,2
b. HPLC via piekhoogte IS x RF	4,8	5,6	49,8
c. HPLC via piekhoogte suiker	5,0	5,6	50,3

Melkpoeders:

Vorbewerking:

Weeg af \pm 5 gr melkpoeder. Zie verder bij marsepein.

RIKILT-nummer		% lactose
25789	a. enzymatisch	45,6/44,8
	b. HPLC via piekhoogte IS x RF	44,8
	c. HPLC via piekhoogte suiker	45,6
29383/84	a. enzymatisch	53,1/53,8
	b. HPLC via piekhoogte IS x RF	52,0
	c. HPLC via piekhoogte suiker	52,9
29385/86	a. enzymatisch	55,0/55,0
	b. HPLC via piekhoogte IS x RF	53,6
	c. HPLC via piekhoogte suiker	54,6

Conclusie

De HPLC methode komt goed overeen met de enzymatische methode zowel via berekening piekhoogte IS x RF als via piekhoogte suiker. Om echter eventuele foutenbronnen (b.v. volumefout bij een grote inweeg) te kunnen verrekenen is de meest betrouwbare werkwijze met IS en berekening via piekhoogte. De RF waarden dienen echter wel regelmatig gecontroleerd en eventueel bijgesteld te worden. De HPLC methode zal nog vergeleken moeten worden met de enzymatische methoden aan de hand van andere praktijkmonsters voor wat betreft voorbereiding.

De vergelijking van maltose is niet mogelijk daar wij deze bepaling enzymatisch niet routinematig uitvoeren. Enzymatisch wordt momenteel dextrinen en maltose tesamen bepaald.

1. Onderwerp

Bepaling van mono- en disacchariden met behulp van vloeistofchromatografie (HPLC).

2. Toepassingsgebied

Deze methode is toepasbaar voor het bepalen van suikers met een gehalte in levensmiddelen van meer dan 0,5%.

3. Beginsel

Het analysemonster wordt na oplossen in water geklaard en afgefilterd waarna het geschikt is voor HPLC-analyse. De analyse wordt gekwantificeerd middels interne standaardisatie.

4. Reagentia

Alle reagentia en oplosmiddelen zijn van analysekwaliteit tenzij anders vermeld.

4.1 Acetonitril Uvasol.

4.2 Water millipore kwaliteit.

4.3 Water dubbelgedestilleerd.

4.4 Methyl- α -D-glucoopyranoside. Interne standaard.

4.5 Fructose.

4.6 Glucose.

4.7 Saccharose.

4.8 Maltose.

4.9 Lactose.

4.10 Carrez I:

Los op 106 g kaliumhexacyanoferraat (II) in water (4.3), vul aan tot 1 liter en meng.

4.11 Carrez II:

Los op 219,5 g zinkacetaat $2H_2O$ in water (4.3), voeg toe 30 g ijsazijn en vul aan tot 1 liter en meng.

5. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

5.1 Hogedruk vloeistofchromatograaf (Waters 6000 A).

5.1.1 Sample loop 10 μ l.

5.1.2 Carbohydraat kolom (Waters).

5.2 R.I. detector (Waters R 401).

5.3 Thermostaat regelbaar op 0,1°C.

5.4 Recorder.

5.5 Acrodisc wegwerpfILTER 0,2 μ m (Gelman).

6. Werkwijze

6.1 Monstervoorbereiding

Weeg af 5 g analysemonster en 1 g interne standaard op 1 mg nauwkeurig in een maatkolf van 100 ml en voeg toe \pm 50 ml water. Plaats de kolf gedurende 45 min in een schudwaterbad van 65°C. Koel af en voeg toe 3 ml Carrez I oplossing en schud 1 minuut. Voeg toe 3 ml Carrez II oplossing en schud nogmaals 1 minuut. Vul aan tot 100 ml, meng en filtreer. Het filtraat is, na filtratie over een Acrodisc 0,2 μ m, geschikt voor HPLC analyse.

6.2 HPLC analyse-omstandigheden

6.2.1 Injektie met behulp van een 10 µl loop.

6.2.2

Kolom : Carbohydrate (Waters) lengte 30 cm, I.D. 3,9 mm

Eluent : Acetonitril (4.1) : Water (4.2) 75:25 (v/v)
(Temperatuur 30°C)

Flow : 2,0 ml/min (druk ± 1500 psi).

Detektor: RI (Waters R 401) temp. 30°C ± 0,1.

6.3 IJking

Weeg af in een maatkolf van 100 ml 1 g interne standaard + 1 g van alle te bepalen mono- en disacchariden op 1 mg nauwkeurig. Voeg toe 50 ml water, los suikers op, vul aan tot 100 ml en meng. Injeteer 10 µl van deze oplossing om de twee analysemonsters en bepaal de RF waarden ten opzichte van de interne standaard via de piekhoogte, voor alle te bepalen suikers.

7. Berekening

Bepaal het gehalte van een suiker in een analysemonster als volgt:

$$\frac{\text{Piekhoogte suiker} \times A \times \text{RF} \times 100\%}{\text{Piekhoogte interne standaard} \times B}$$

waarin:

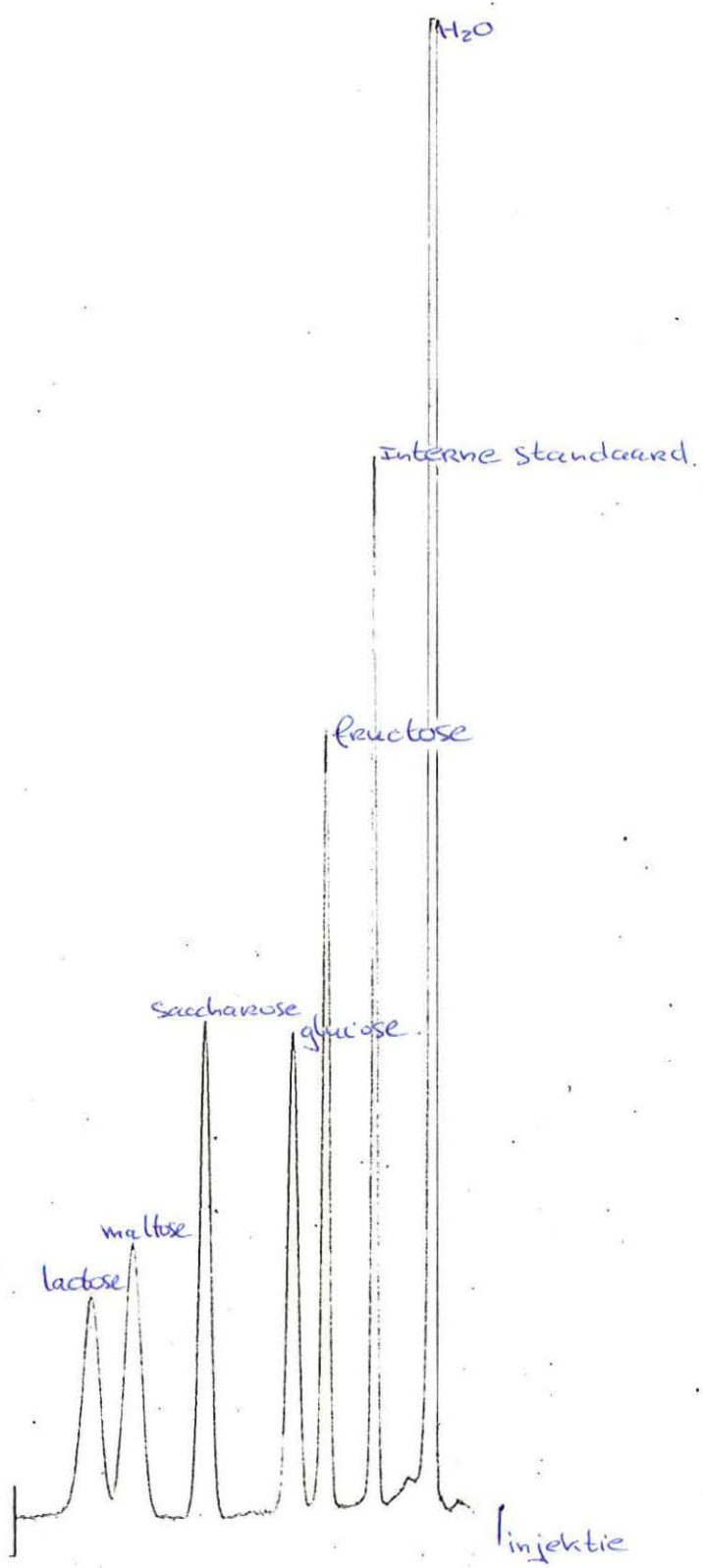
A = afgewogen interne standaard

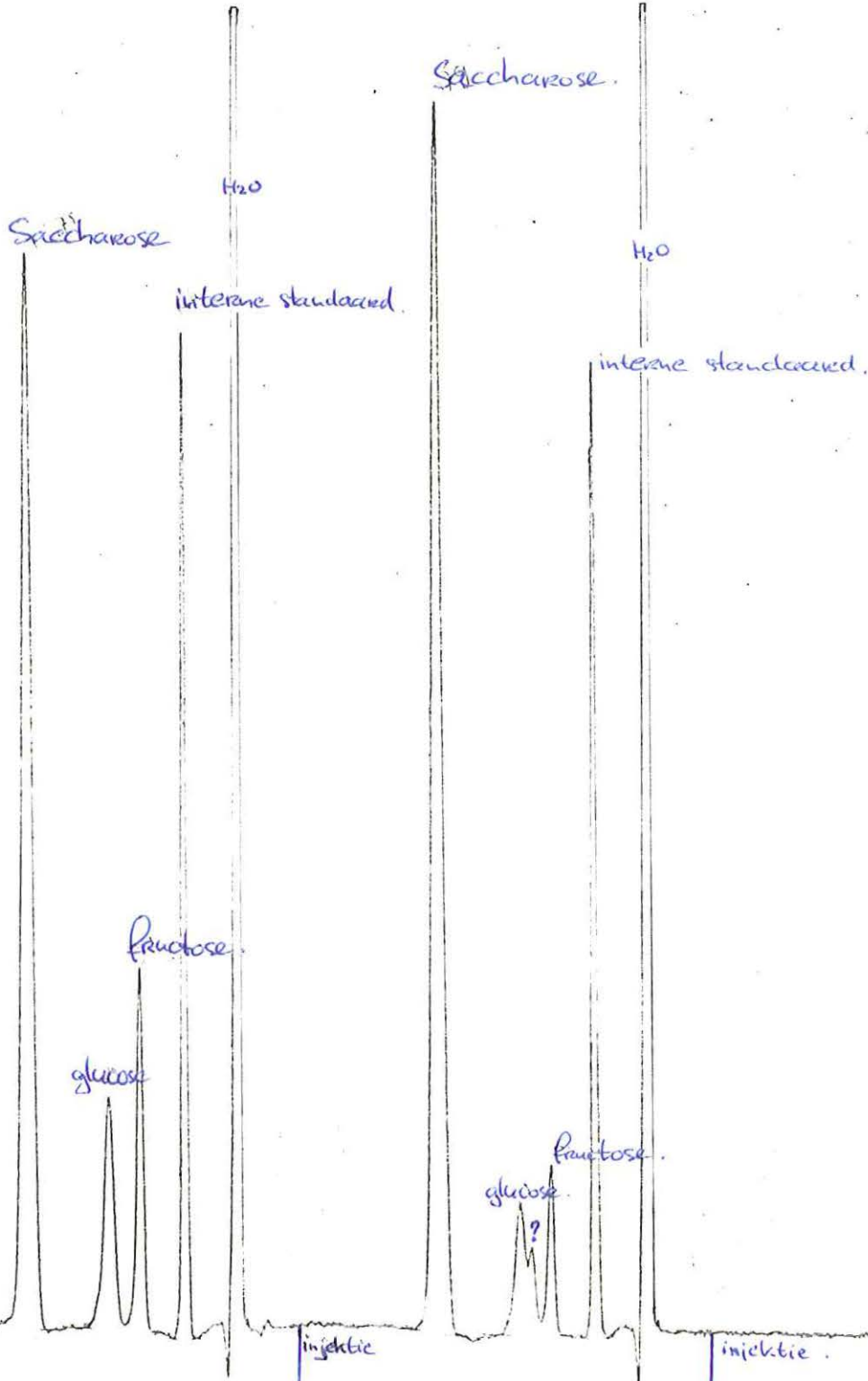
B = afgewogen analysemonster

RF = Response factor van de suiker ten opzichte van interne standaard.

8. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van een bepaling in duplo, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd, mag niet meer bedragen dan 2% relatief.





marsepein

marsepein + onbekende "suiker"