

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФРУКТАНИ В ХРАНИ

Н. Петкова, М. Саватинова, Б. Витанова, П. Денев

*Катедра „Органична химия и микробиология“
Университет по хранителни технологии,
бул. Марица 26, гр. Пловдив 4002;
E-mail: petkovanadejda@abv.bg, denev57@abv.bg*

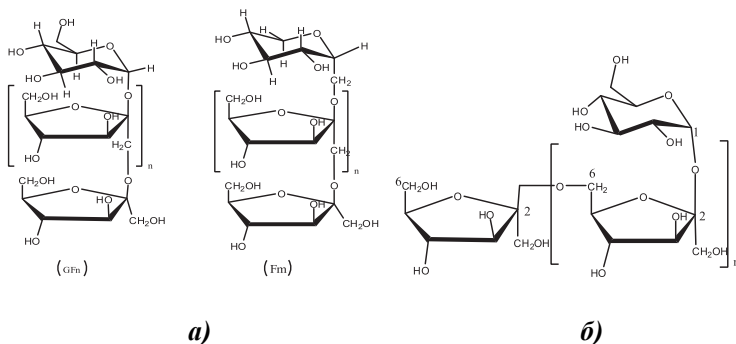
ABSTRACT

A simple, rapid and sensitive spectrophotometric method was developed for determination of fructans in food products (chewing candies with inulin). The proposed method is based on the familiar Seliwanoff test for ketoses. The presence of monosaccharides glucose and galactose did not show any interference in the analysis. The best operating conditions for development and measurement of a colored compound formed by interaction of fructans with resorcinol and thiourea in the hydrochloric acid medium was heating the samples for 8 min at 80°C. The producing red colored product is measured spectrophotometrically at 480 nm and the color is stable more than 60 min. Beer's law was obeyed in concentration range of fructose $0,5 \div 20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ($R^2=0,997$). The proposed method was tested and validated for various parameters according to the ICH (International Conference on Harmonization) guidelines. The results demonstrated that the method is accurate, reproducible, cheap and less time consuming.

Ключови думи: *инулин, олигофруктози, фруктоза, спектрофотометрия, реакция на Селиванов.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Фруктаните са широко разпространени резервни въглехидрати в растенията. Тяхната молекула съдържа една или повече фруктозил-фруктозни връзки. В зависимост от типа на свързване между фруктозните остатъци фруктаните могат да бъдат класифицирани в пет отделни групи: инулин, леван (Фиг. 1), смесени левани (граминан), инулин неосерия и неосерия левани (Таблица. 1). Инулинът е полидисперсен полизахарид, чиято верига е съставена основно от β -(2 \rightarrow 1) фруктозил-фруктозни остатъци (F_m), която обикновено, но не винаги, завършва с един глюкопиранозен остатък в редуциращия си край (GF_n) (Фиг. 1) [6]. Степента на полимеризация (DP) на фруктозата в инулина варира между 2 и 70. Олигофруктозите са фруктани от инулинов тип с DP между 2 и 12. Инулинът и олигофруктозите спадат към групата на диетичните влакнини и намират широко приложение в хранителните продукти като подсладители, сгъстителни или текстуриращи агенти [8].



Фигура 1. Фруктани: а) инулин и б) леван

Таблица 1. Типове фруктани срещани се в растенията

Тип фруктан	Вид на фруктозил-фруктозната връзка	Разпространение	Начален тризахарид
Инулин	2 \rightarrow 1	Топинамбур (гулия), цикория, далия	1 – кестоза
Леван	2 \rightarrow 6	<i>Dactylis glomerata</i>	6-кестоза
Разклонен (граминан)	2 \rightarrow 1 и 2 \rightarrow 6	Жито, ечимик	1 – кестоза и 6 – кестоза

Инулин неосерия	2→1	Аспержи и лук	6G – кестотриоза
Леван неосерия	2→6	Овес и <i>Lolium</i>	6G – кестотриоза

В практиката за определянето на инулин се използват колориметрични (спектрофотометрични) [1–5, 9], ензимни [8] и HPLC [10] методи за анализ. Повечето от съществуващите колориметрични методи се прилагат за определяне на инулин в кръв и урина като индикация за гломерулната филтрация на бъбреците [4, 9]. Други от тях се използват за стандартизация на изолиран инулин [3, 4] или за определянето му в растителни екстракти [1, 2, 5]. За анализа на инулин и олигофруктози в хранителни продукти се използват ензимни и HPLC методи. И двата метода обаче изискват наличие на специализирано и скъпоструващо оборудване, използване на пречистени ензими, а понякога е необходима продължителна пробоподготовка.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Всички химикали и реактиви използвани за метода са чисти за анализ. Те включват: D-фруктоза, глюкоза и галактоза (anhydrous, Fluka, 99% puriss); D-лактоза (monohydrate, Fluka, puriss), олигофруктози Frutafit CLR и инулин Frutafit TEX (Roosendaal, the Netherlands), резорцинол (Fluka, puriss >99%), тиокарбамид (VEB YENAPHARM pro Analysi – Laborchemie APOLDA) и дъвчащи бонбони за отслабване (без захар, със захарни алкохоли, олигофруктози и екстракт от сена), закупени от търговската мрежа. Използваните инструменти и апаратура включват автоматични пипети Ахурет (Ахуген), аналитична везна Kern ABJ, спектрофотометър Samspec M107, центрофуга – MLW T23 и магнитна бъркалка MSH 300 (BOECO, Germany).

Определяне на абсорбционния максимум

За определяне на абсорбционния максимум се приготвят стандартни разтвори на глюкоза, фруктоза, галактоза, лактоза, олигофруктоза, инулин – всички с концентрация $1,00 \text{ mg.cm}^{-3}$. В мерителна колба от 100 cm^3 се прибавят последователно $1,00 \text{ cm}^3$ проба, $1,00 \text{ cm}^3$ резорцинол (1 mg.cm^{-3}), $1,00 \text{ cm}^3$ тиокарбамид (0,1 %), $8,00 \text{ cm}^3$ етанол, $9,00 \text{ cm}^3$ к.НCl. Колбата се нагрява на водна баня в продължение на 8 min при 80°C . Следва охлаждане, доливане до марката с дест. вода и измерване на абсорбцията на съответната проба при различна дължина на вълната в диапазон от 340 до 660 nm, спрямо дест. H_2O .

Построяване на стандартна права

За построяване на калибрационна права са използвани стандартни разтвори на фруктоза с концентрации от $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ до $20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Подготовка на пробата за анализ

Претегля се $2,50 \text{ g}$ дъвчащ бонбон, към него се прибавят 25 cm^3 дестилирана вода и пробата се разбърква на магнитна бъркалка при температура 50°C . Разтворената проба се прехвърля в мерителна колба от 50 cm^3 , долива се до марката с дестилирана вода и се филтрува през хартиен филтър с диаметър на порите $0,45 \mu\text{m}$. Полученият бистър филтрат се прехвърля в центрофужна епруветка от 50 cm^3 с винт и се екстрахира двукратно с по 5 cm^3 петролеев етер за извличане на липидите. Пробата се центрофугира двукратно в продължение на 15 min при 2000 min^{-1} с последващо отделяне на етерния слой. От водния слой се взема 1 cm^3 и се разработва по описания по-горе начин. Измерва се абсорбцията при 480 nm с три повторения. Извършва се и снемане на спектъра на поглъщане при различна дължина на вълната в диапазона от 340 nm до 660 nm .

Процедурата по валидирането на спектрофотометричния метод за вътрешно-лабораторни анализи е извършена според указанията на Международната конференция за хармонизация (ICH) [7], като са определени: линейност, прецизност и точност на метода.

Прецизността на метода е изразена чрез повторямостта и междинната прецизност (intermediate precision). Те се изразяват чрез относителното стандартно отклонение (RSD) и се изчисляват по формула (1):

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} 100\% \quad (1)$$

където: S – стандартно отклонение от измерванията на 6 отделно претеглени, паралелно разработени и анализирани проби от един и същ аналитик в един и същи ден (за повторямост); S – стандартно отклонение от измерванията на 6 отделно претеглени, разработени и анализирани проби в различни дни и от различни аналитици (за междинната прецизност); \bar{X} – средно аритметично съдържание на фруктани в пробата, $\text{g}/100 \text{ g}$.

За оценка на точността на метода е използвана относителната грешка, изчислена по формула (2). Обикновено точността се представя и се определя чрез метода на аналитичния добив (recovery), за който се използват три подхода, един от които е методът на стандартната добавка. Още в началото на разработване на пробата към 1,5 g бонбон разтворен в 50 cm³ дестилирана вода се добавят съответно 4; 8 и 10 μg.cm⁻³ фруктоза. Пробите се разработват по описаната методика и резултатите се изчисляват по формулите (2) и (3):

$$\text{Относителна грешка (\%)} = \frac{V_0 - V_s}{V_s} \times 100 \quad (2)$$

където: V_0 – определеното съдържание на фруктани в пробата; g/100 g;

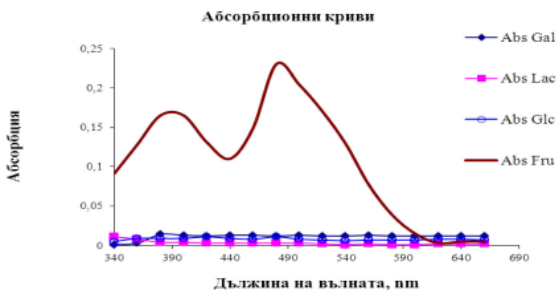
V_s – реалното (истинското) съдържание на фруктани в пробата. Стойността им се изчислява от правата построена по метода на стандартната добавка, g/100 g

$$\text{Точност (\%)} = 100 - [\text{Относителна грешка}] \quad (3)$$

РЕЗУЛТАТИ

От представените на фигура 2 абсорбционни спектри на формираното цветно съединение, получено при взаимодействието на фруктоза, глюкоза, галактоза и лактоза с резорцинол в кисела среда, ясно проличава високата специфичност на използвания реактив към кетози. Следователно присъствието на гореизброените алдози в изследваната проба няма да окажат пречещо влияние при спектрофотометричното определяне на фруктани. От снетата абсорбционна крива $Abs = f(\lambda)$ на фруктоза се забелязва, че полученият хромоген има максимална абсорбция при дължина на вълната 480 nm.

Изследвани са и абсорбционните спектри на дъвчащи бонбони, съдържащи олигофруктози, както и на разтвори на търговска марка инулин и олигофруктози. Получените резултати представени в таблица 2 показват, че и трите продукта в присъствие на резорцинол в кисела среда дават хромоген, който се характеризира с максимална абсорбция при 480 nm, както при фруктозата. Следователно фруктаните в тези продукти могат да бъдат анализирани при точно тази дължина на вълната, като определянето им се сведе до определяне на фруктоза в пробата.

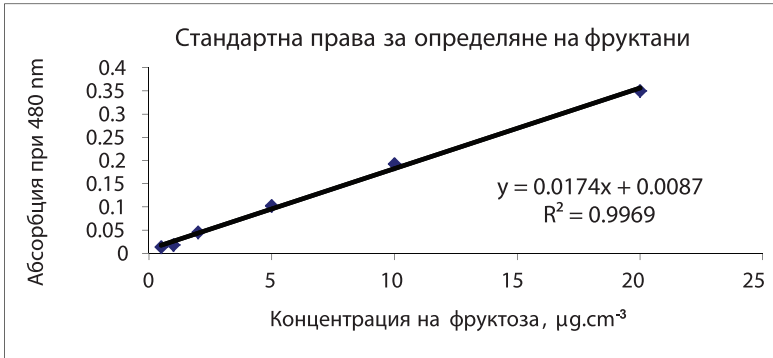


Фигура 2. Абсорбционни спектри на комплексните съединения получени при взаимодействие на фруктоза, глюкоза, галактоза и лактоза, всички с концентрация $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ с резорцинол

Таблица 2. Абсорбция на хранителни продукти и съставки при различна дължина на вълната

Дължина на вълната, nm	Абсорбция на дъвчащи бонбони	Абсорбция на Frutafit CLR, $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	Абсорбция на Frutafit TEX, $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
340	0,184	0,062	0,076
360	0,237	0,089	0,099
380	0,302	0,127	0,129
400	0,301	0,125	0,127
420	0,229	0,098	0,098
440	0,182	0,101	0,084
460	0,225	0,205	0,108
480	0,327	0,213	0,154
500	0,288	0,201	0,140
520	0,241	0,115	0,121
540	0,181	0,089	0,095
560	0,117	0,059	0,066
580	0,034	0,037	0,029
600	0,009	0,023	0,029
620	0,005	0,017	0,022
640	0,002	0,014	0,019
660	0,001	0,013	0,018

Стандартната права е построена с цел определяне линейността на спектрофотометричния метод (Фиг. 3) Получена е строга линейна зависимост между абсорбцията на формирания хромоген при 480 nm и концентрацията на фруктоза, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Полученият корелационен коефициент е по-висок от 0,995 в концентрационния интервал на фруктоза от $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ до $20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.



Фигура 3. Стандартна права на зависимостта между абсорбцията на формираното комплексно съединение и концентрацията на фруктозата

Прецизността на спектрофотометричния метод за определяне на фруктани беше оценена чрез повторемостта и междинната прецизност, изразени чрез стандартното отклонение и относителното стандартно отклонение (RSD) на фруктозата, определена в 6 отделно претеглени, разработени и анализирани проби. Отчетено е влиянието на човешкия фактор при извършване на анализа. От представените в таблица 3 резултати се вижда, че методът се отличава с много добра повторемост и междинна прецизност.

Таблица 3. Оценяване на прецизността на предложения метод

Номер на пробата	Съдържание на инулин и олигофруктози в дъвчащ бонбон, g/100g		
	Повторемост	Междинна прецизност *	Междинна прецизност **
1	3,6	4,0	3,3
2	4,6	4,4	4,3
3	3,8	4,6	4,1
4	4,4	3,6	4,3

5	4,2	4,0	4,4
6	3,4	3,8	4,7
Средно, g/100g	4,0	4,0	4,2
SD	0,5	0,4	0,5
RSD, %	11,6	8,9	11,9

*анализ на различно разработени проби в различни дни от един и същи аналитик

**анализ на различно разработени проби в различни дни от различни аналитици

В таблица 4 са представени резултати от оценката за точността на спектрофотометричния метод, изразена чрез относителната грешка. Представени са и данните от стандартната права построена в резултат на прилагане на метода на стандартната добавка. Разработеният метод се отличава с една добра точност, като се вземе предвид използването на реална проба с цялата си сложност на матрицата и наличие на интерфериращи компоненти.

Таблица 4. *Оценяване на точността на спектрофотометричния метод изразена чрез относителната грешка за определяне на фруктани*

Vs, g/100 g	Vo, g/100 g	Относителна грешка, %	Точност, %
4,8	5,0	5,3	94,7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработеният спектрофотометричен метод за определяне на фруктани, базиран на реакцията на Селиванов, е бърз, опростен и подходящ за рутинни анализи в ежедневната лабораторна практика. Характеризира се с добра линейност $R^2 = 0,997$ и е специфичен само за кетози (фруктани). Методът се отличава със сравнително висока прецизност RSD около 8–12% и се характеризира с относителна грешка 5,3 %. Пробоподрготовката и времето за анализ са сравнително кратки, а себестойността на метода е сравнително ниска.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите изказват благодарност на Фонд „Наука“ (проект по НИС, договор 10/11-Н), Университет по хранителни технологии – гр. Пловдив за оказаната финансова помощ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оленников, Д. Н.; Танхаева, Л. М.; Химия Растительного сырья; 2008; 69
2. Оленников, Д. Н.; Танхаева, Л. М.; Химия Растительного сырья; 2008; 95–99
3. Денев, П., Делчев, Н., Добрев Г., Панчев И., Кирчев, Н., Изолиране и характеристика на инулин от топинамбур, ХВП, 2010, 3, 48–51
4. Anan`ina, N., A., Andreeva O., A., Mycots, L. P., Oganesyanyan E., T., *Farmaceutical Chemistry Journal*, vol. 43, No.3, 2009, 157
5. Ashwell, G., In: *Methods in enzymol* 3, (Edscolowick, SJ and Kaplan, NO) Academic Press New York; 1957, 75
6. Van Laere, A. and Van Den Ende, Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system, *Plant, Cell and Enviroment*, 2002, 25, 803–813
7. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, validation of analytical procedures: Methodology, adopted in 1996, Geneva
8. McCleary et al., Measurement of total fructan in food by enzymatic/Spectrophotometric method Collaborative Study, *Journal of AOAC International* Vol. 83, 2000
9. Nolin, Th. D., et al. Rapid microtiter plate assay for determination of inulin in human plasma and dialysate, *J of Pharm & Biomed. Anal.*, 28 (2002), 209–315.
10. Vendrell-Pascuas, S. et al., Determination of inulin by high-performance liquid chromatography with refractive index detection, *J of chromatography A*, 881, 2002

