

Szénhidrátok elektrokémiai detektálása, fókuszban a laktóz

Stefán G^{1.}, M. Eysberg²

¹ *ABL&E-JASCO Magyarország Kft., Budapest*

² *Antec Scientific, Zoeterwoude, Hollandia*

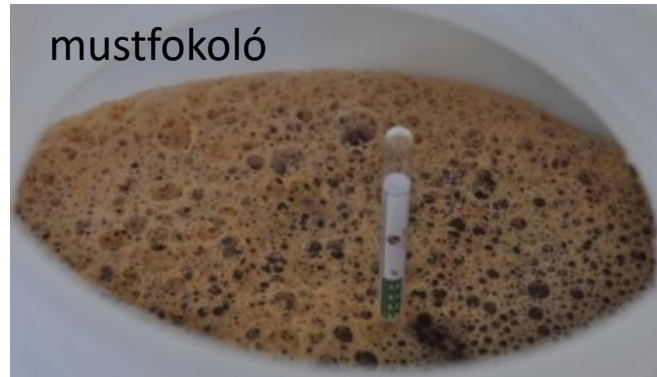


ABL&E-JASCO
Magyarország Kft.



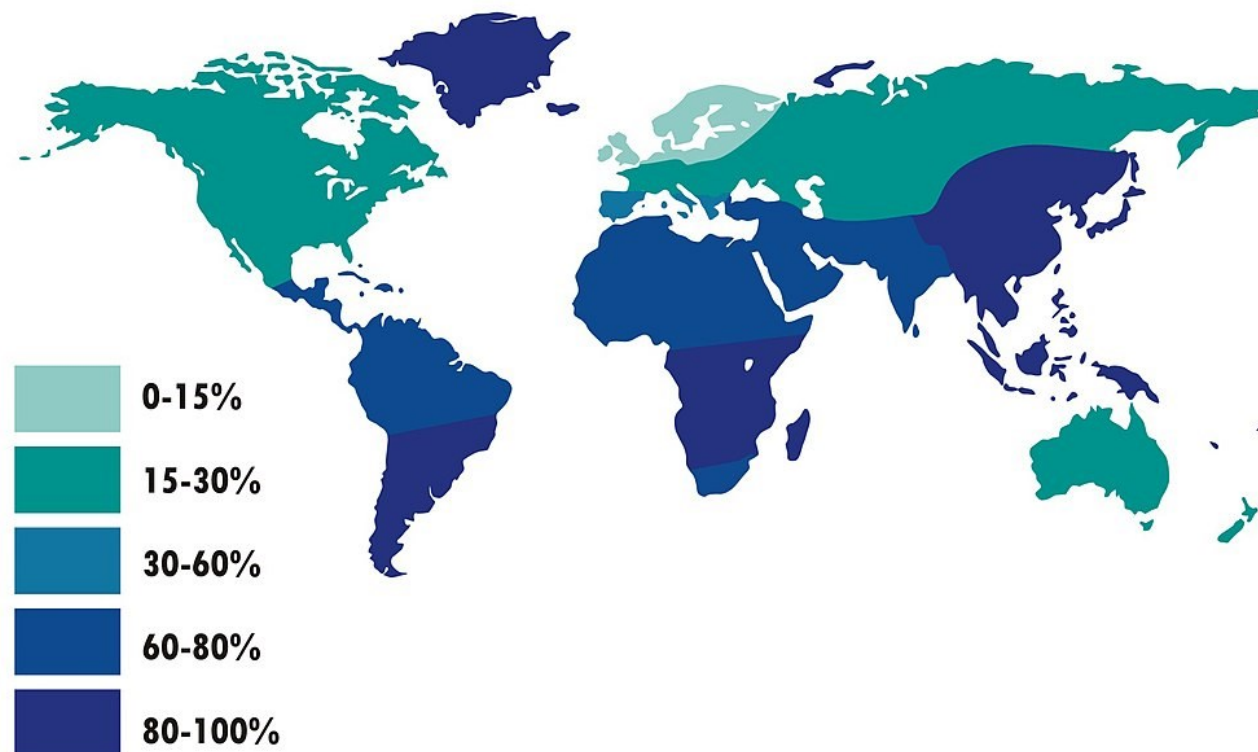
Szénhidrát tartalom meghatározás

- Számolás vagy mérés
- Iparági követelmények
- Hasznos vagy szennyező komponens
- Összes szénhidrát vagy szénhidrát csoportok



Miért és mikor fontos a laktóz mérése?

Worldwide prevalence of lactose intolerance in recent populations
(schematic)



- Laktózmentes jelölésű termékeknél
- Élelmiszer adalékanyag is tartalmazhat (pl: laktoszérum, tejsavó, tejpor) laktózt
- Nem csak tejtermékekben fordulhatnak elő (húskészítmények, pékáru, táplálékkiegészítők)

https://en.wikipedia.org/wiki/Lactose_intolerance

Szénhidráttartalom meghatározása folyadékkromatográfiával (HPLC)

Kvalitatív és kvantitatív meghatározás

- HPLC-RI rendszer:
 - széles koncentrációtartományban lineáris
 - hőmérsékletre, nyomásra és áramlási sebességre érzékeny
 - valamennyi komponens jelet ad
 - gradiens elúcióval együtt nem alkalmazható
 - alacsony koncentrációk esetén érzékenysége nem kielégítő

Miért az elektrokémiai detektor?

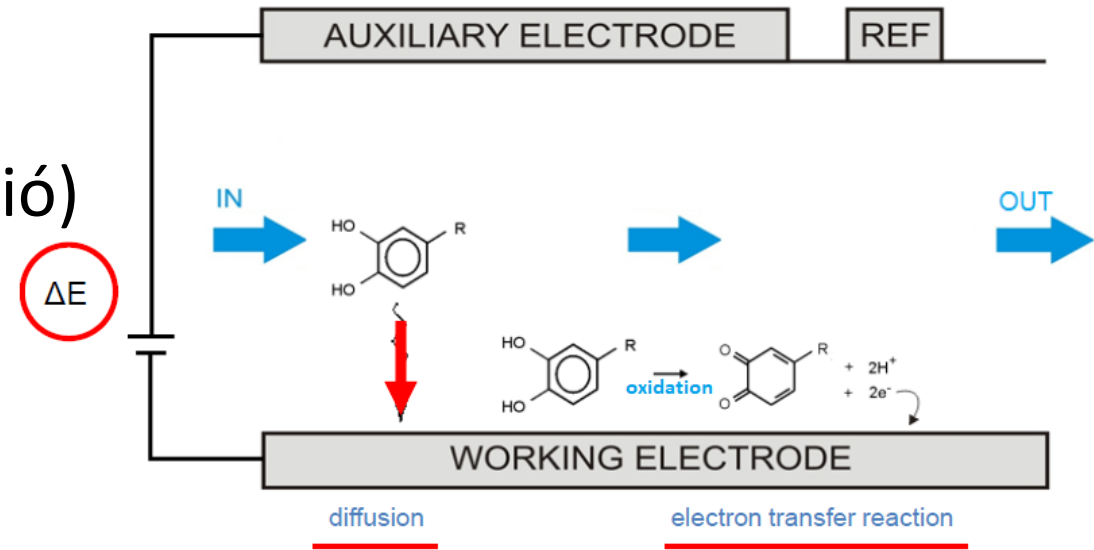
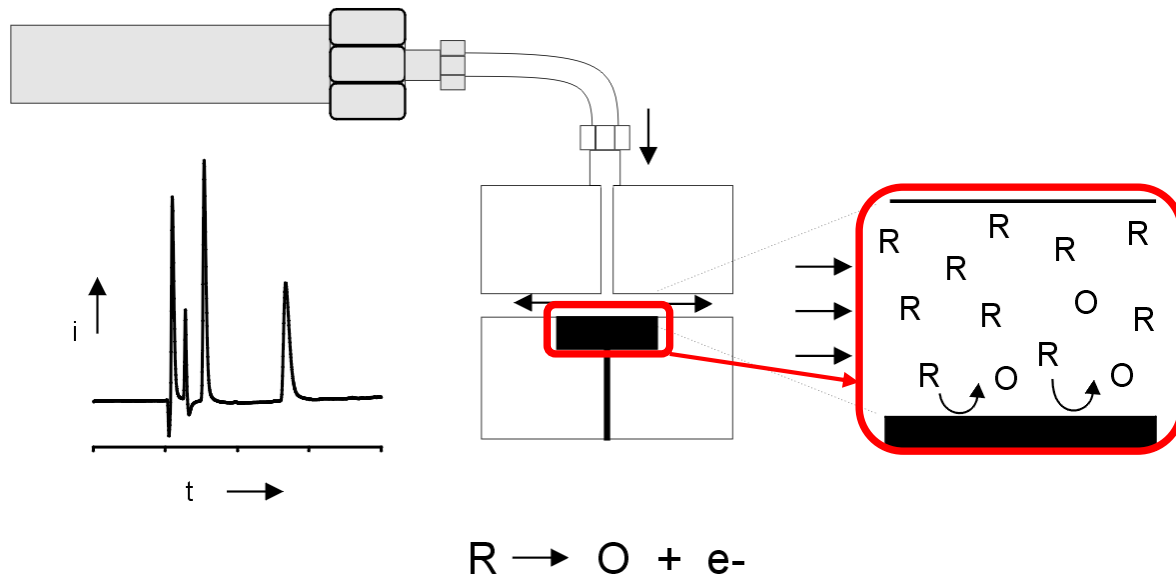
HPLC-ECD rendszer:

- Érzékeny
- Szelektív – laktóz izomerjeire is megkülönböztethetők
- Robusztus és reprodukálható
- Nincs származékképzés
- Gyors és oldószertakarékos



HPLC-ECD működése

- Elektrokémiai reakció (oxidáció, redukció)
- Elektród potenciál a mozgató erő



- UV → **Beer's law**

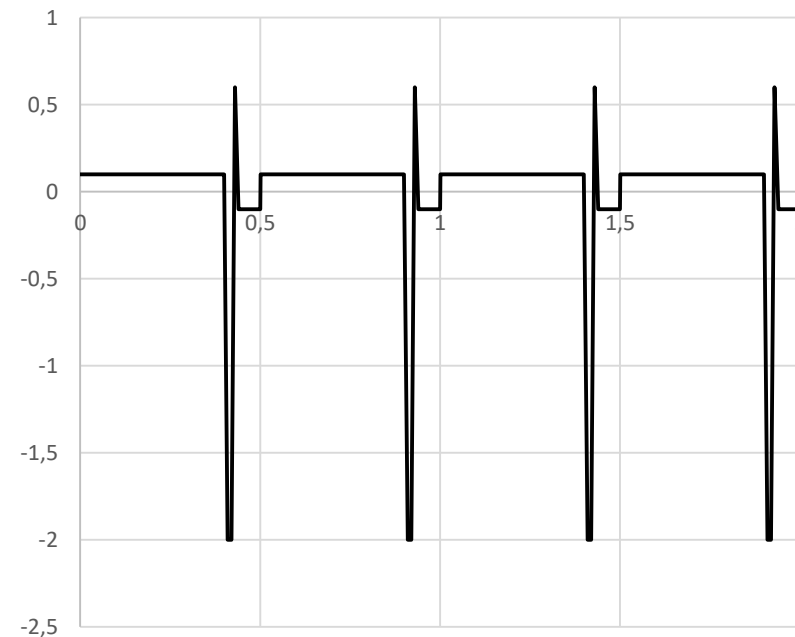
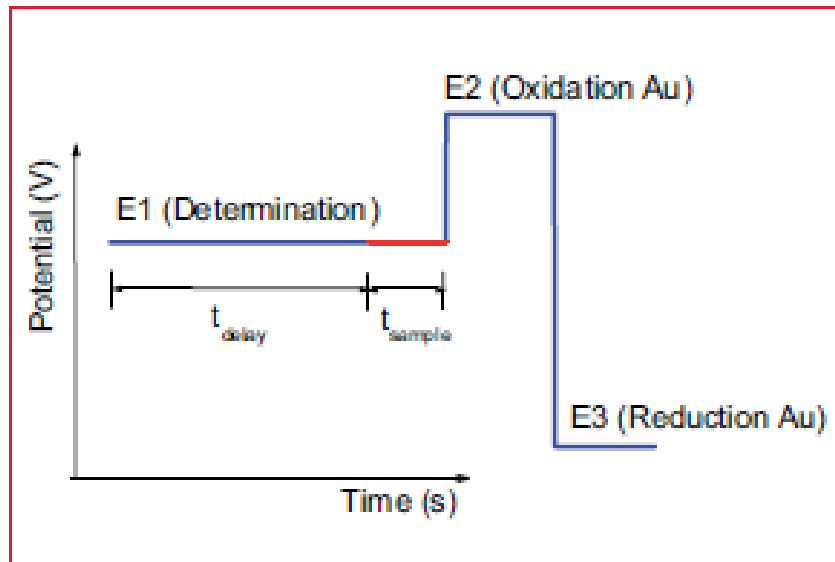
$$E = \varepsilon d C$$

- ECD → **Cottrell equation**

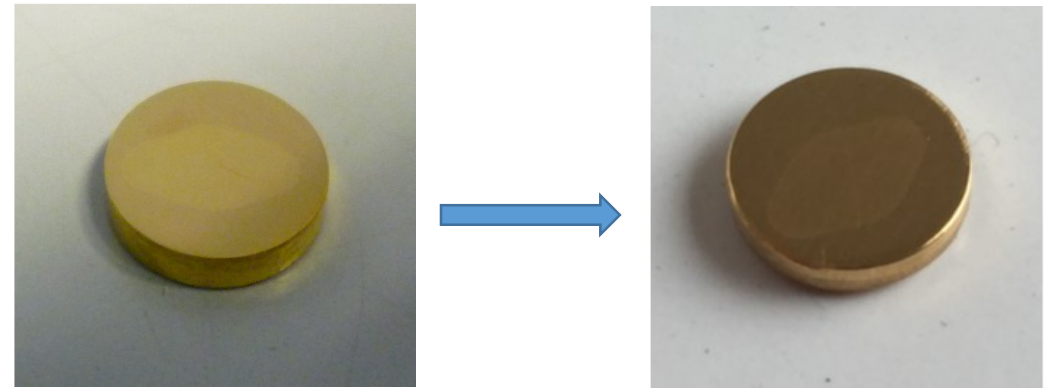
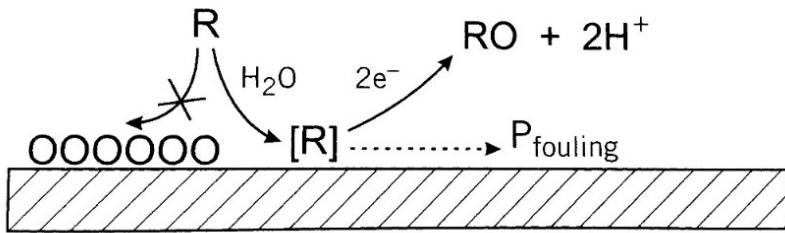
$$i_{lim} = f (A/b)^{2/3} C$$

Mérési módok EC detektorral

- DC = Konstans elektród potenciál
- SCAN = Voltamogram (optimális E potenciál keresésére)
- PAD = Pulzálásos amperometriás detektálás = pulzáló E potenciál
3 lépcsős (E1, E2, E3)



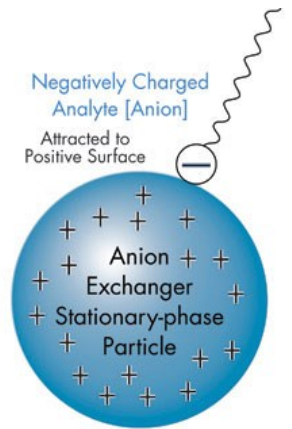
PAD pulzálásos amperometriás detektálás



Az arany munkaelektrodon az oxidréteg kialakulása

De az elektród potenciál pulzálásával folyamatosan megújul és aktív felületet kapunk!

Anioncserés folyadékkromatográfia - PAD



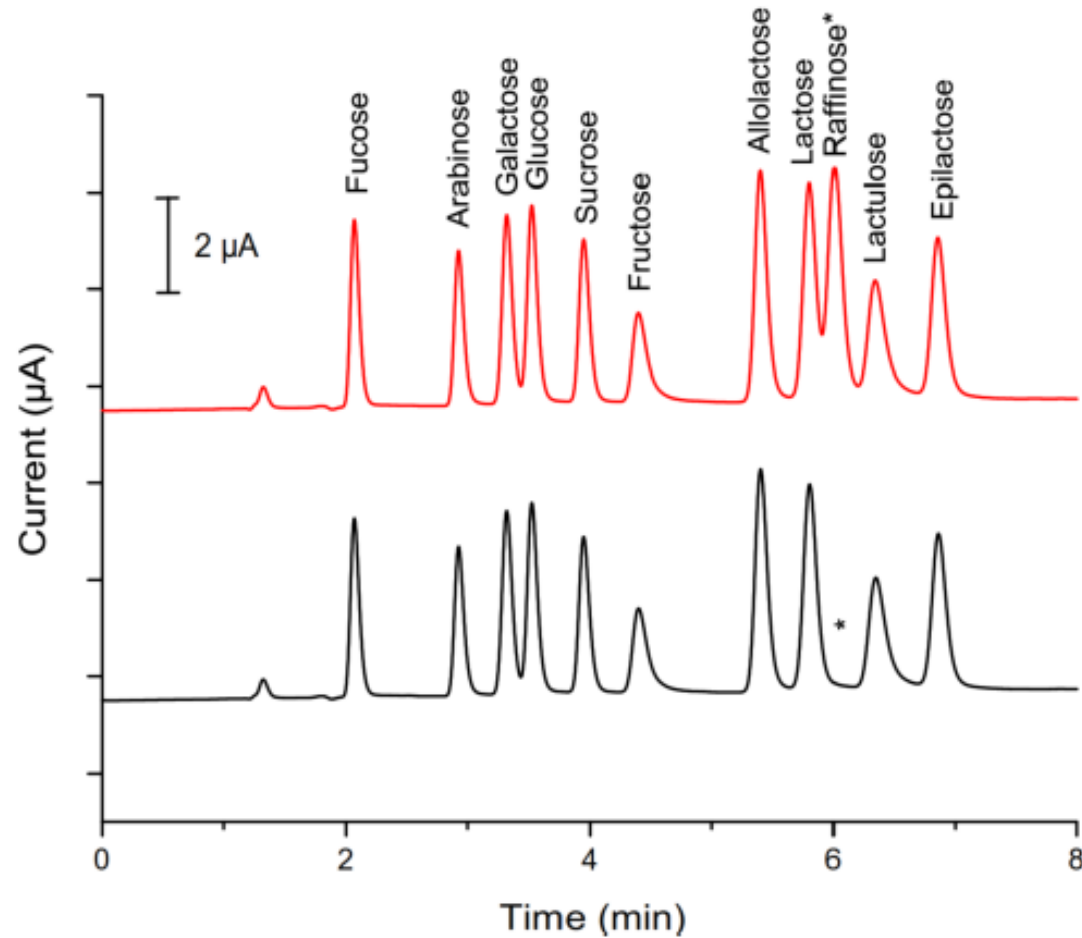
Ionkromatográfia, de NEM ionkromatográf és NEM szükséges a bio-inert HPLC!

- Polimer anion cserélő oszlop
- Eluens: magas pH, karbonátmentes
- Munkaelektrod Au
- Izokratikus elúció

Time (min)	Mobile phase	B (%)	Description
0 - 10	20 mM KOH	10	Isocratic elution and detection
10 - 15	100 mM KOH	50	Column clean-up and regeneration
15 - 30	20 mM KOH	10	Equilibration, starting conditions

LC system	Quaternary HPLC system
Detector	Antec DECADE Elite electrochemical detector
Columns	CarboPac PA210G-4 μ m column, 150 x 2.0 mm CarboPac PA210G-4 μ m column, 30 x 2.0 mm ID BorateTrap Inline Trap Column, 50 x 4.0 mm ID
Mobile phase (MP)	MP A: deionized (DI) water (resistivity > 18 MOhm.cm and TOC<10ppb) MP B: 200 mM KOH Eluents blanketed with Helium 5.0
Flow rate	0.2 mL/min
Injection	2.5 μ L
Temperature	30°C for separation, 35°C for detection
Flow cell	SenCell with Au WE, stainless steel AE and HyREF, AST 2
Potential waveform (4-step)	E1, E2, E3, E4: +0.1, -2.0, +0.6, -0.1 V ts, t1, t2, t3, t4: 0.2, 0.4, 0.02, 0.01, 0.07 s
I-cell	about 0.2— 0.4 μ A
ADF	0.5 Hz
Range	500 nA/V or 5 μ A/V

Gyors és szelektív



*10 µM (3,4 mg/l laktóz) cukor standard elegy, 2.5 µL injektálás.
Alsó kromatogram raffinóz nélküli standard elegy.*

Reprodukálható

Repeatability of 2.5 μL injections of a 10, 1 and 0.1 μM sugar standard mix in water (n=10)

Compound	RSD's (%) 10 $\mu\text{mol/L}$		RSD's (%) 1 $\mu\text{mol/L}$		RSD's (%)* 0.1 $\mu\text{mol/L}$	
	t_R	Area	t_R	Area	t_R	Area
Fucose	0.04	0.59	0.07	1.27	0.08	1.70
Arabinose	0.06	0.32	0.08	1.53	0.09	1.70
Galactose	0.06	0.23	0.08	0.30	0.12	1.52
Glucose	0.07	0.21	0.10	0.37	0.12	1.63
Sucrose	0.10	0.22	0.10	0.57	0.14	0.86
Fructose	0.08	0.20	0.11	1.12	0.17	2.22
Allolactose	0.11	0.22	0.12	0.36	0.16	1.04
Lactose	0.11	0.21	0.12	0.53	0.15	1.60
Lactulose	0.11	0.22	0.13	0.84	0.12	1.67
Epilactose	0.12	0.19	0.15	0.68	0.17	1.69

*) n=5 for the repeatability test with the 0.1 $\mu\text{mol/L}$ standard.

és érzékeny

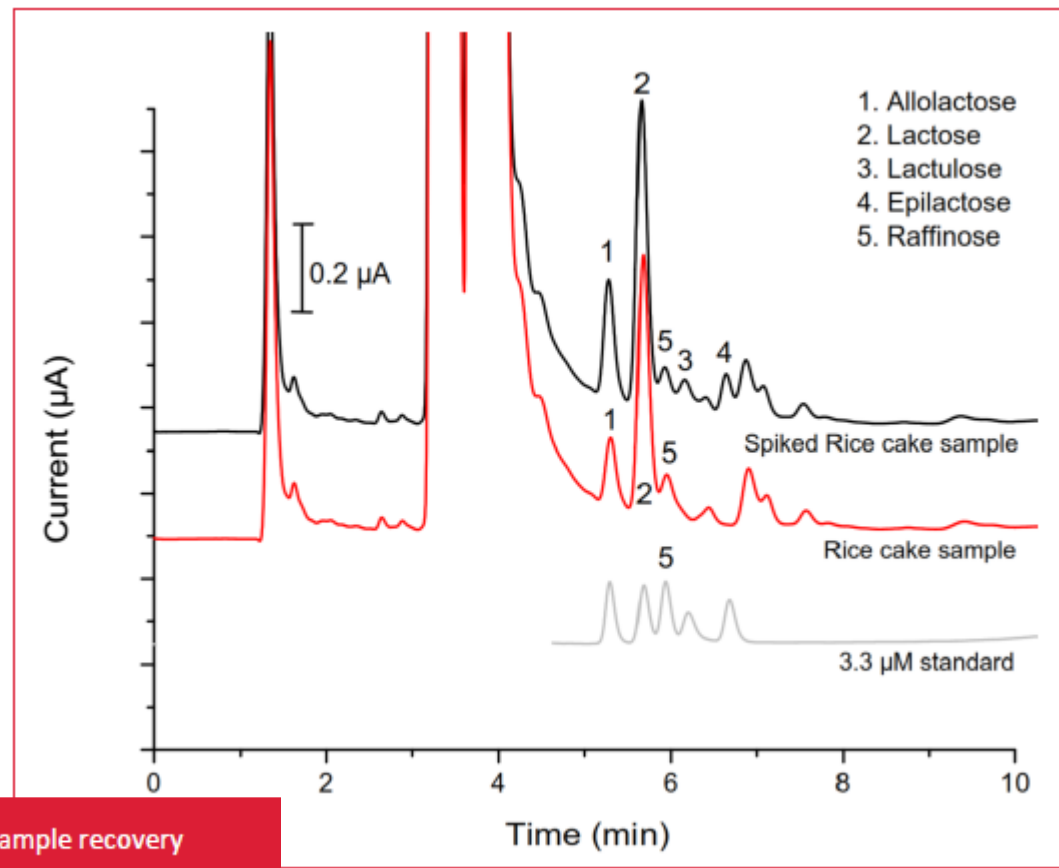
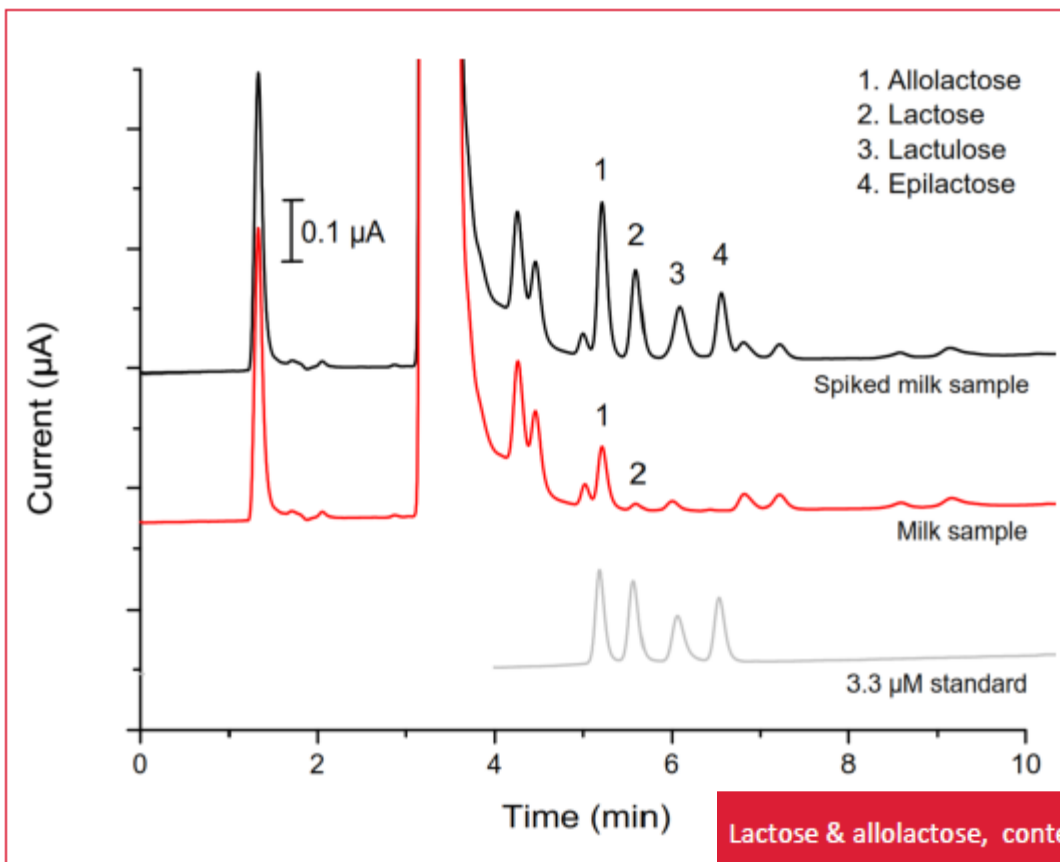
Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)

Compound	Limit of detection (LOD)		Limit of Quantitation (LOQ)
	mg/L (ppm)	nmol/L	mg/L (ppm)
Fucose	0.001	9	0.005
Arabinose	0.002	10	0.005
Galactose	0.001	8	0.005
Glucose	0.001	7	0.004
Sucrose	0.003	9	0.010
Fructose	0.003	19	0.012
Allolactose	0.002	7	0.008
Lactose	0.002	7	0.008
Lactulose	0.005	14	0.016
Epilactose	0.003	10	0.011

A módszer alkalmazása laktózmentes termékeknél

'Lactose-free' labelled products

<i>Product</i>	<i>Lactose content on product label</i>
Semi-skimmed milk UHT*	Lactose < 10 mg / 100 mL
Cream cheese	Lactose < 10 mg / 100 g
Low-fat yoghurt	Lactose < 10 mg / 100 g
Matured cheese	Lactose < 10 mg / 100 g
Chocolate paste	Lactose < 100 mg / 100 g
Chocolate-covered rice cake	Lactose < 100 mg / 100 g



Lactose & allolactose, contents and sample recovery

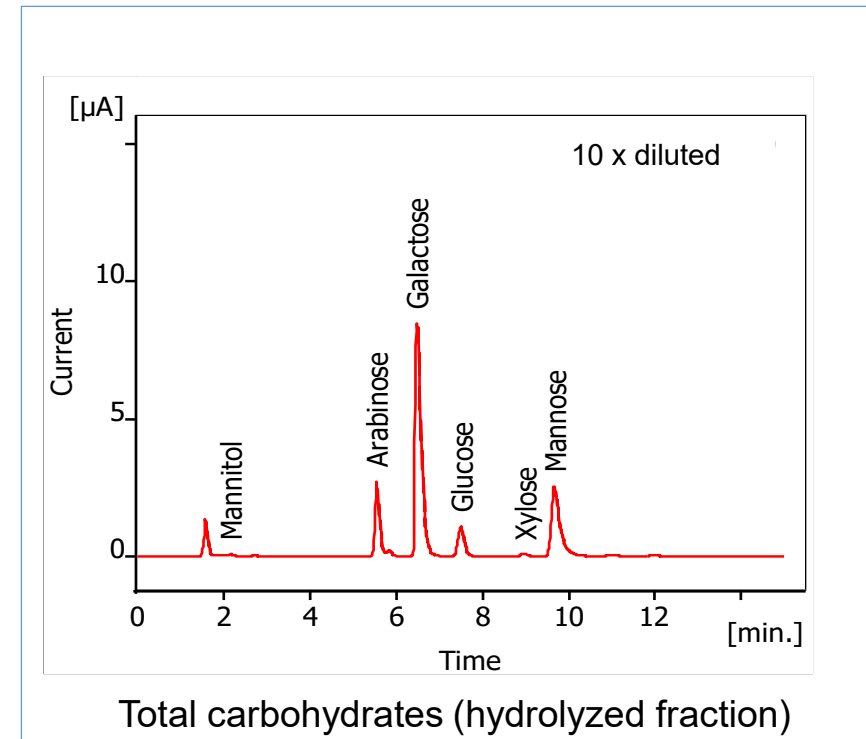
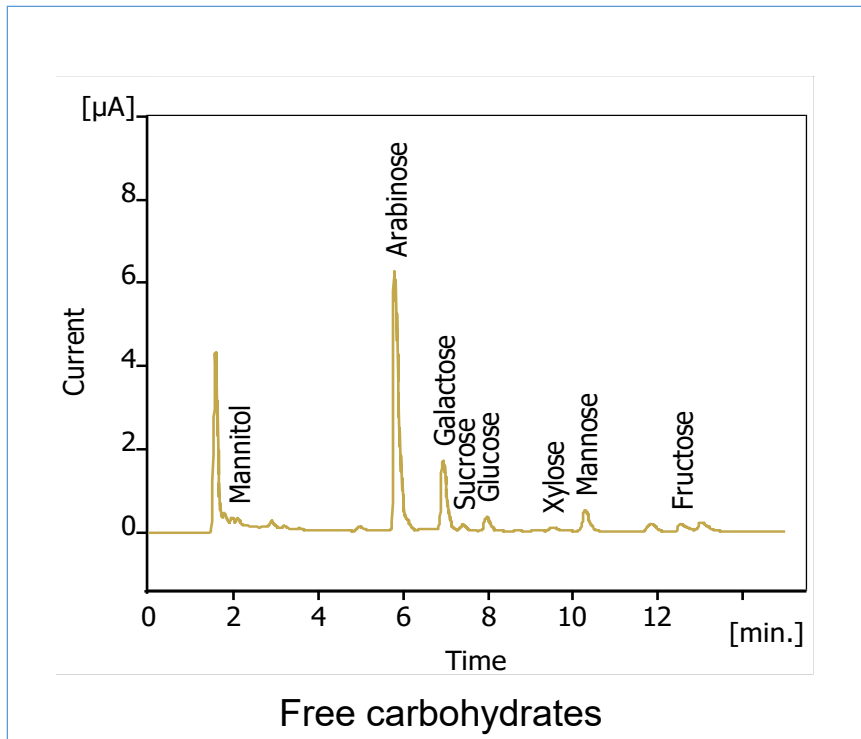
Product	Lactose		Allolactose	
	mg per 100 g product	Recovery (%)	mg per 100 g product	Recovery (%)
Semi-skimmed milk UHT	0.7	95.6	75	96.8
Cream cheese	6.7	90.5	17.6	94.4
Low-fat yoghurt	3.3	91.7	12.2	95.9
Matured cheese	-	94.6	-	.*
Chocolate paste	0.6	85.9	-	98.0
Chocolate-covered rice cake	60.5	87.1	13.9	95.2

*) recovery could not be calculated due to coeluting interference.





Alkalmas további szénhidrátok analízisére is



Instant kávé minta (Sample1) kromatogramjai (ISO method 11292 : 1995)

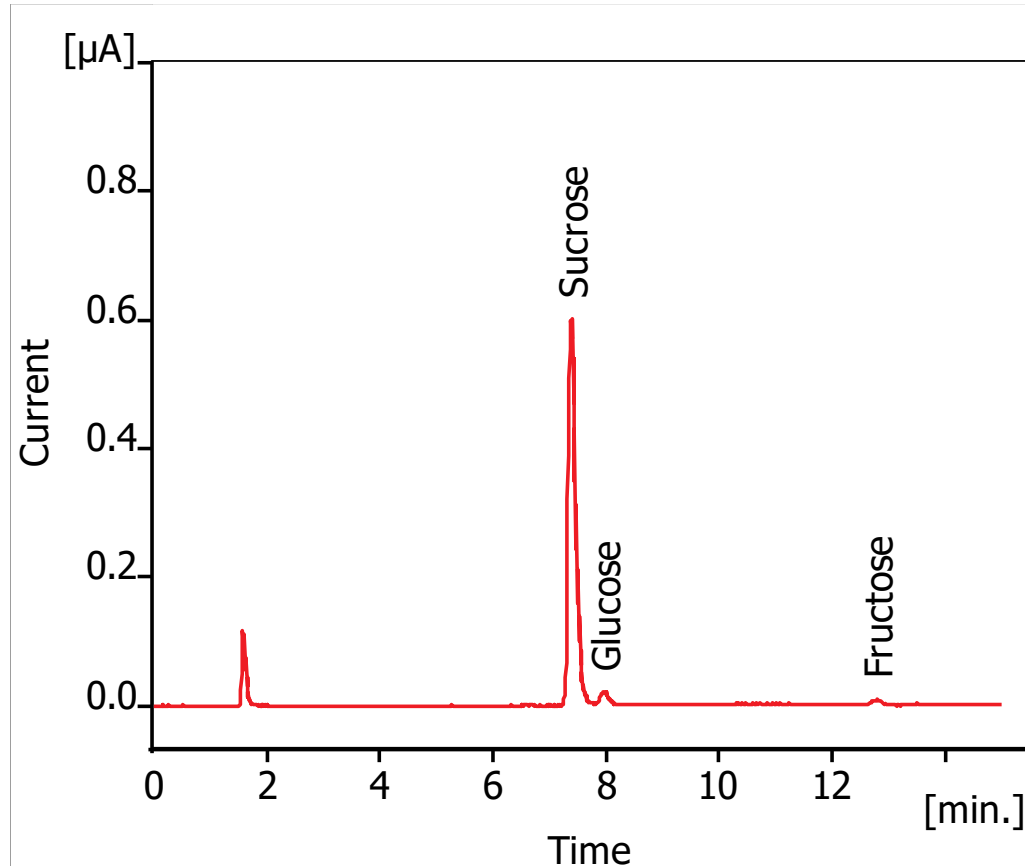
Szénhidrátartalom instant kávé mintáknál

SAMPLE	Free carbohydrates (g/100 g)			Total carbohydrates (g/100 g)		
	1a	2a	3a	1b	2b	3b
Mannitol	0.01	0.01	0.01	0.06	0.04	0.04
Arabinose	1.21	1.10	1.03	4	4	3
Galactose	0.34	0.24	0.22	18	13	13
Glucose	0.07	0.23	0.50	2	19	27
Sucrose	0.06	0.07	0.04	-	-	-
Xylose	0.02	0.02	0.01	0.22	0.16	0.15
Mannose	0.14	0.12	0.11	7	5	5
Fructose	0.09	0.09	0.06	-	-	-
TOTAL	2.0	1.9	2.0	32	42	50

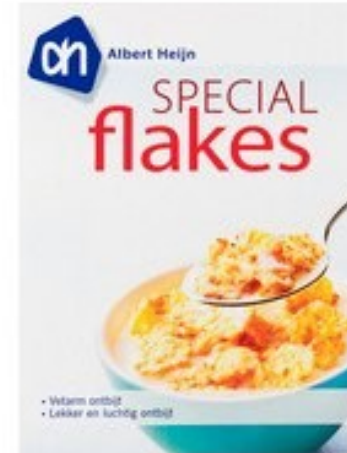


Szennyezett illetve hamisított kávénál a totál glukóz >2.46% (Girard et al, 2006)

Müzliknél, gabonapelyheknél



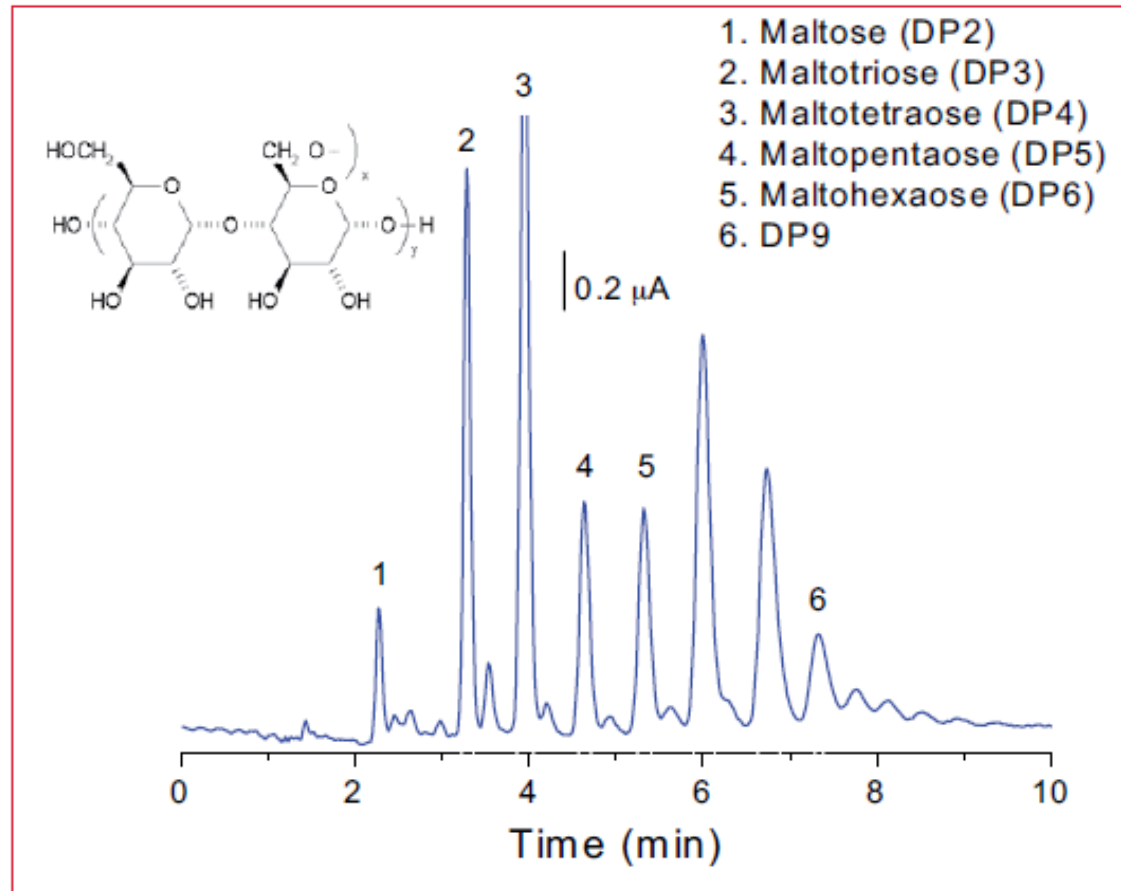
„Special Flakes” minta kromatogramja. 10 g termék extrahálva 200 ml vízzel, majd centrifugálva és 1000x hígítva



Voedingswaarde	
Portiegrootte: 100g (100 g)	
	per portie
Kilojoules	1590 kJ
Calorieën	380 kcal
Eiwitten	13 g
Koolhydraat	76 g
Vet	2 g
Verzadigd Vet	0,7 g
Vezels	3 g
Natrium	70 mg

	Content of product (g/100 g)	
	measured	label
Sucrose	15.4	15
Glucose	0.3	
Fructose	0.2	
TOTAL	15.9	15

Oligoszaharidoknál gradiens elúció



100 mg/l édesítőszer minta

Conditions for the analysis of Maltodextrin

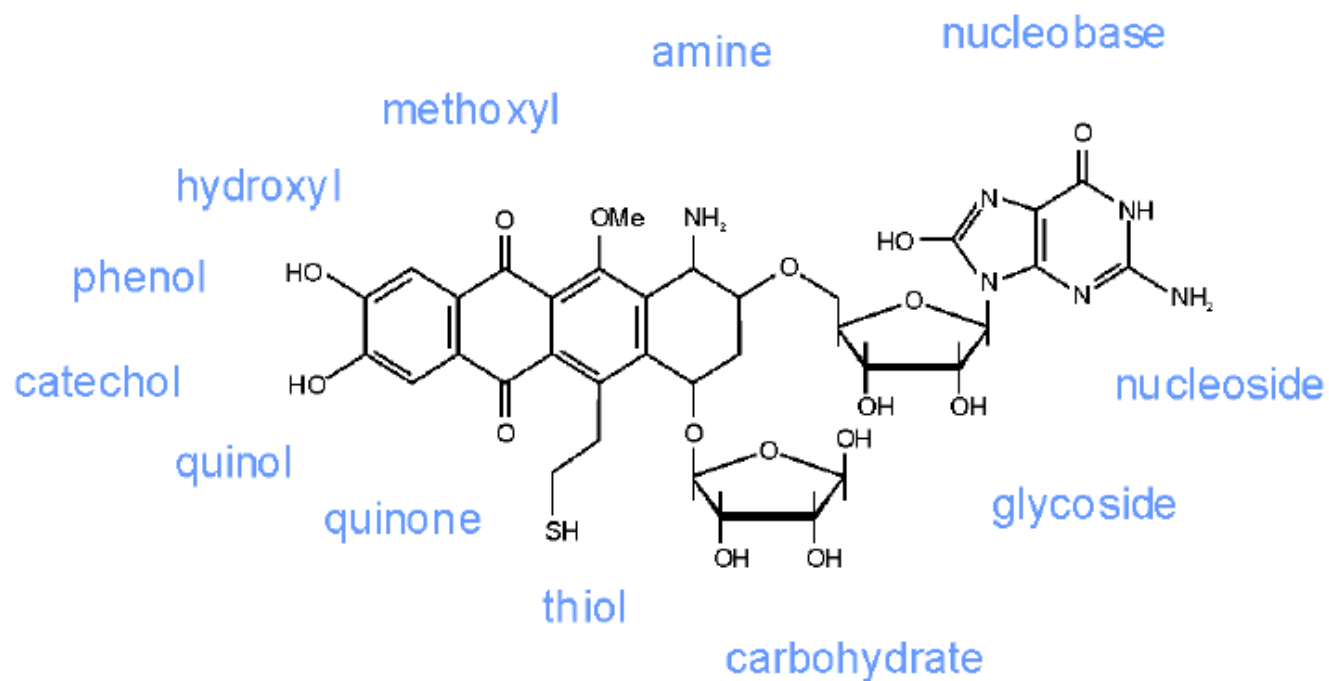
HPLC	ALEXYS Carbohydrates Analyzer
Sample	10 mg of artificial sweetener dissolved in 100 mL water
Mobile phase	A) 60 mM NaOH B) 60 mM NaOH – 500 mM NaOAc Mobile phases are continuous sparged with Helium 5.0
Gradient	t = 0 min: 90 % A, 10 % B t = 15 min: 10 % A, 90 % B
Flow rate	2 mL/min
V _{injection}	20 μ L
Temperature	30°C, column and flow cell
E-cell	E1, E2, E3: 0.05, 0.75, -0.80 Volt ts, t1, t2, t3: 0.06, 0.5, 0.13, 0.12 seconds
I-cell	-0.5 - 1 μ A

Elektrokémiai detektor tulajdonságai

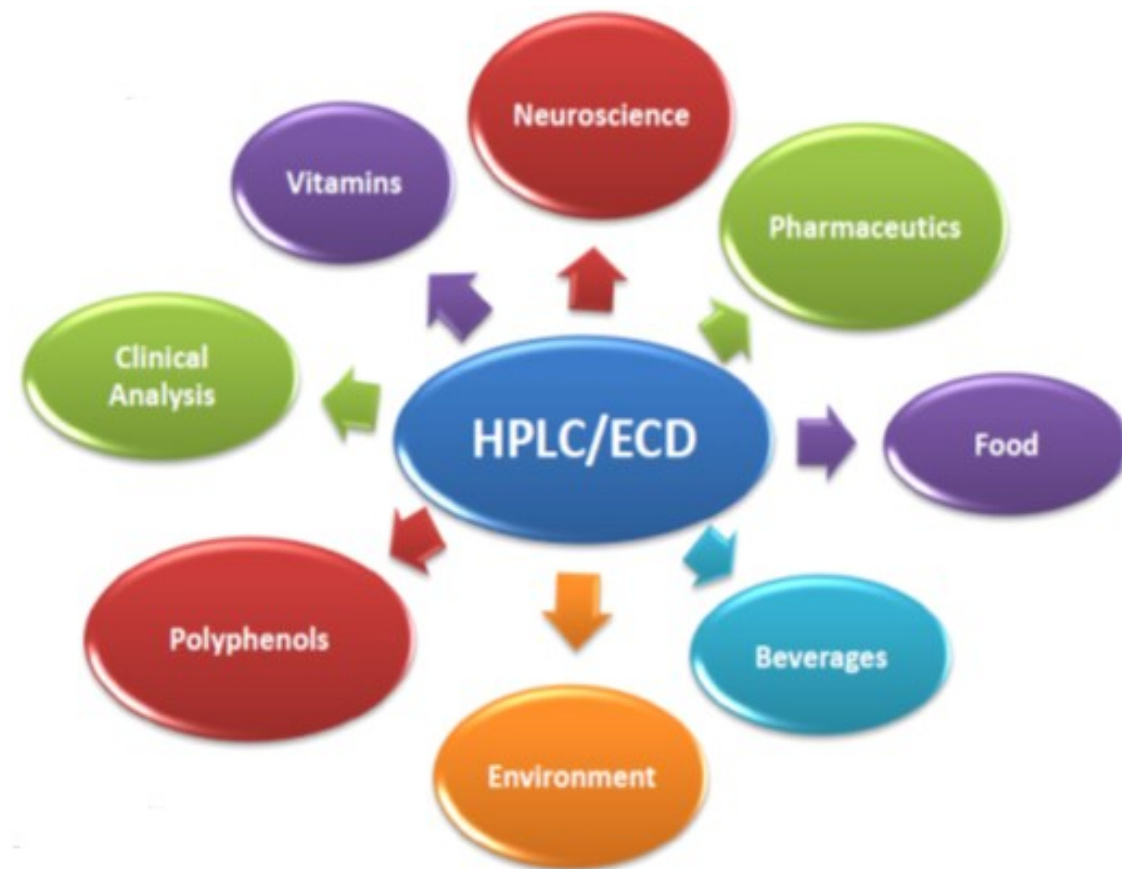
- Érzékeny és szelektív
- Meglévő HPLC-vel is összekapcsolható
- Kolonnatermosztát is egyben
- Több elektrokémiai cellával több HPLC-t is ki tud szolgálni



Számos alkalmazási lehetőség

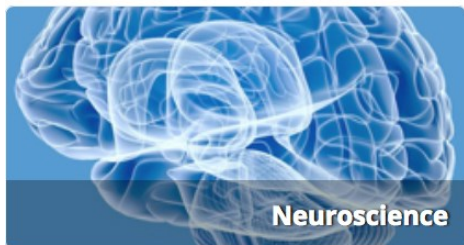


Elektrokémiailag aktív csoportok



Köszönöm a megtisztelő figyelmet!

I. Electrochemical Detectors & Analyzers



- Monoamines and Metabolites
- GABA and Glutamate
- Choline and Acetylcholine
- Online MD of Monoamines
- Glutathione and disulfides
- Nitrotyrosine



- Aminoglycoside antibiotics
Amikacin, Framycetin, Gentamicin,
Kanamycin, Lincomycin, Neomycin,
Spectinomycin, Streptomycin,
Tobramycin
- Macrolide antibiotics
Azithromycin, Erythromycin



- Catecholamines in urine or plasma
- Serotonin in urine or plasma
- Metanephrines in urine
- VMA HVA 5 HIAA in urine
- Homocysteine in plasma
- Glutathione and disulfides
- Fluorodeoxyglucose
- Vitamins
- Iodide in urine



- EPA Phenols in water and soil
- Bisphenol A in water
- Polyphenols in food
- Carbohydrates in food & life sciences
- Lactose-free products
- Iodide in milk