

Joanna GŁAZOWSKA, Marian KAMIŃSKI*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk,
*Autor do korespondencji, e-mail: markamin@pg.gda.pl

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych - HILIC/NH₂ - w rozdzielaniu mono- i disacharydów oraz badaniu cukrowych frakcji eluatu z rozdzielania składników serwatki mleka

Streszczenie: Wysokosprawna chromatografia oddziaływań hydrofilowych - HILIC-HPLC, to alternatywne - w stosunku do warunków faz odwróconych RP-HPLC - warunki rozdzielania polarnych, rozpuszczalnych w wodzie składników mieszanin. Wykorzystywanie w warunkach HILIC jednocześnie kilku mechanizmów rozdzielania, umożliwia rozdzielanie mieszanin polarnych składników, trudnych, albo niemożliwych do rozdzielania w warunkach RP, w tym, mono i disacharydów. Praca dotyczy badań nad określeniem optymalnych warunków rozdzielania wybranych mono i disacharydów w warunkach HILIC, z zastosowaniem kolumn HPLC z fazą stacjonarną typu NH₂, na bazie żelu krzemionkowego i eluentów będących mieszaninami acetonitrylu oraz wody. Przedstawiono możliwość i wyniki rozdzielania mieszanin cukrów redukujących i nieredukujących. Stwierdzono rozdzielanie poszczególnych anomerów cukrów redukujących - zależnie od warunków separacji. Wykonane badania pozwoliły też na zaproponowanie metodyki oznaczania laktozy i glukozy we frakcjach eluatu z preparatywnego rozdzielania składników serwatki mleka.

Słowa kluczowe: HILIC; mono- i disacharydy - rozdzielanie; serwatka mleka - rozdzielanie składników; kontrola składu i czystości frakcji eluatu.

Hydrophilic interaction chromatography – HILIC/NH₂ –in separation of mono, disaccharides and sugar fractions from whey.

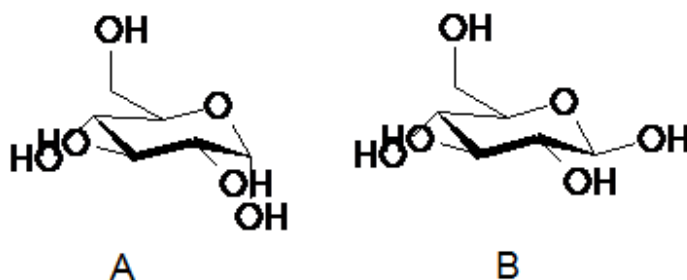
Abstract: High performance hydrophilic interaction chromatography - HILIC-HPLC is an alternative technique - to the conditions of reverse phase chromatography (RP-HPLC) - for the separation of polar, water-soluble components of complex mixtures. This technique uses several mechanisms of separation what allows the separation of mixtures of polar components which are difficult or impossible to separate under RP, including mono- and disaccharides. This work relates to studies on determining the optimum conditions for the separation of mono- and disaccharides the selected conditions HILIC, using an HPLC column the amino-type stationary phase, based on silica gel and mobile phases which are mixtures of acetonitrile and water. The possibility of separating sugar mixtures and non-reducing sugars is shown as well as the separation of the individual anomers of reducing sugars - depending on the conditions of separation. The presented studies propose a methodology of determination of lactose and glucose in the fractions eluted from the preparative separation of milk whey components.

Key words: HILIC, mono-, disaccharides – separation, separation of whey components, control of composition and the quality of sugar fractions

1. Wstęp (Introduction)

Cukry (sacharydy) to organiczne związki węgla i wody ("węglowodany") - podstawowe źródło energii w żywności i surowcach żywnościowych. Cukry proste i dwucukry odgrywają zasadniczą rolę w procesach metabolicznych roślin i zwierząt, a także stanowią jednostkę budulcową długich łańcuchów polocukrowych. Obecne są w przeważającej większości produktów spożywczych. W związku z tym, mają duże znaczenie dla przemysłu żywnościowego oraz przetwórczego. Cukry podzielić można m. in. pod względem liczby grup cukrowych w cząsteczce, na: monosacharydy (cukry proste) złożone z jednej jednostki cukrowej, np. glukoza, fruktoza, oligosacharydy, do których zalicza się disacharydy składające się z dwóch cząsteczek cukrów np. laktoza, maltoza oraz polisacharydy, czyli polimery, zbudowane z wielu reszt cukrowych, np. celuloza, skrobia. Cukry są grupą związków chemicznych, pochodnych najprostszycy aldoz i ketoz (aldehyd glicerynowy i dihydroksyaceton) różniących się liczbą atomów węgla w cząsteczce (pentozy, heksozy), a także pod względem rodzaju wiązania chemicznego pomiędzy poszczególnymi "merami" w łańcuchu polocukrowym (wiązania α - i β -O-glikozydowe). Cukry występują zarówno w formie cyklicznej (najczęściej w roztworach wodnych) jak i łańcuchowej.

Cukry można podzielić również pod względem ich właściwości chemicznych na cukry redukujące, posiadające grupę aldehydową oraz posiadające zdolność redukowania określonych tlenków i wodorotlenków metali (próba Tollensa, próba Trommera, próba z odczynnikiem Fehlinga) oraz nieredukujące – zawierające w swojej strukturze liniowej grupę ketonową (nie posiadające zdolności redukcji tlenków i wodorotlenków metali). Ponadto monocukry, posiadające na węglu C1 u aldoz i C2 u ketoz grupę aldehydową oraz grupę hydroksylową w pozycji γ oraz δ , dzięki którym z łatwością dochodzi do wewnątrzcząsteczkowej reakcji cyklizacji, z utworzeniem formy hemiacetalowej. Reakcja ta prowadzi do powstania nowego centrum chiralności – anomerycznego atomu węgla C1 lub C2 oraz występowania cyklicznych form w dwóch formach anomerycznych – α i β (Rys.1). W roztworze wodnym formy te występują w stanie równowagi, a cały proces nosi nazwę mutarotacji [1].



Rys. 1. Struktury α -D-glukopiranozy (A) i β -D-glukopiranozy (B) w formie hemiacetalowej.

Fig. 1. The structure of α -D-glucopyranose (A) i β -D-glucopyranose (B) in hemiacetal form.

Rozdzielanie i oznaczanie cukrów prostych i dwucukrów jest istotnym zagadnieniem podczas kontroli procesów fermentacyjnych lub przetwórstwa żywności, a także w kontroli jakości żywności, gdy niezbędna jest ocena jakości surowców i produktów, jak również podczas śledzenia procesów metabolicznych roślin, zwierząt oraz organizmów niższych. W każdym z wymienionych obszarów matryca analityczna, w której są oznaczane cukry, zawiera liczne substancje dodatkowe. Należą do nich m. in. alkohole i kwasy karboksylowe, peptydy oraz rozdrobnione i rozpuszczone w wodzie substancje budulcowe i zapasowe materii organicznej.

Przykładem tego typu matrycy jest serwatka, płynna pozostałość po produkcji serów metodą podpuszczkową, bogata przede wszystkim w białka serwatkowe, takie jak α -laktoalbumina, β -laktoglobulina oraz laktoferyna. Obecnie produkcja serwatki w Polsce wynosi ponad milion ton rocznie i stanowi duże zagrożenie dla środowiska ze względu na znaczną zawartość składników odżywczych. Z tego względu ważne jest jej odpowiednie zagospodarowanie i wykorzystanie w przemyśle żywnościowym oraz farmaceutycznym [2].

Do oznaczania i identyfikacji cukrów w złożonej matrycy popularnie wykorzystuje się technikę chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *High Performance Liquid Chromatography*). Ze względu na całkowity brak lotności cukrów, chromatografia gazowa (GC, ang. *Gas Chromatography*) nie może być bezpośrednio stosowana [3, 4]. Rozdzielanie, a następnie oznaczanie cukrów z zastosowaniem GC charakteryzuje się bardzo dobrą selektywnością, możliwością oznaczania analitów w szerokim zakresie stężeń z wykorzystaniem detektora płomieniowo jonizacyjnego (FID), jednak wymaga przeprowadzenia oznaczanych cukrów w lotne pochodne, a niektóre procedury wymagają też dodatkowo zastosowania wstępnej ekstrakcji [4, 5]. Obecnie opracowano wiele procedur rozdzielania cukrów przy pomocy technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej [4, 6-8]. Wśród nich chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC, ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). HILIC to metodyka, która pozwala oznaczać polarne, rozpuszczalne w wodzie związki chemiczne, wykorzystując podział substancji między unieruchomioną na fazie stacjonarnej hydrofilową fazę stacjonarną, bogatą w warstwę wody, a względnie bardziej hydrofobową fazę ruchomą, którą jest najczęściej roztwór wody i acetonitrylu, o wysokiej zawartości składnika organicznego (70-95%). Technika HILIC uważana jest za rodzaj chromatografii prowadzonej w normalnych układach faz [8]. Pierwszy raz technikę tę zastosowano w latach 70-tych. Wówczas rozdzielanie cukrów na kolumnie wypełnionej krzemionką modyfikowaną grupami aminowymi z fazą ruchomą acetonitryl-woda (75:25) zaproponował Linden i in. [9]. W kolejnej dekadzie wykorzystywano wypełnienia diol- i amido-krzemionkowe [8]. W 1990 roku Alpert [10] użył akronimu HILIC, którym określana jest obecnie chromatografia oddziaływań hydrofilowych. Technika ta jest ciągle rozwijana, pojawiają się nowe prace dotyczące modyfikacji fazy stacjonarnej [7, 11] znajdujące zastosowanie m. in. przy oznaczaniu cukrów. Przykładowe układy stosowane do rozdzielania cukrów przedstawiono w tabeli 1. Chromatografia

oddziaływań hydrofilowych to technika umożliwiająca selektywne rozdzielanie polarnych składników skomplikowanych mieszanin takich jak np. serwatka, dzięki zastosowaniu połączonych mechanizmów normalnych układów faz (faza stacjonarna), odwróconych układów faz (faza ruchoma – wodno-organiczna) oraz chromatografii jonowymiennej (oddziaływania analitów z faza stacjonarna i ruchomą). Stosowane fazy stacjonarne, w połączeniu z wodno-organicznymi fazami ruchomymi, charakteryzują się dużą selektywnością w stosunku do takich analitów jakimi są cukry, zarówno proste jak i złożone [17].

Celem niniejszej pracy jest dobór warunków rozdzielania cukrów prostych i dwucukrów w warunkach HILIC z wykorzystaniem kolumny modyfikowanej grupami NH₂ oraz Diol. W badaniach wykorzystano roztwory wzorcowe oraz serwatkę z niepasteryzowanego mleka krowiego.

Tabela 1. Przykłady wykorzystania HILIC do oznaczania cukrów.

Table 1. Examples of the use of HILIC for the determination of sugars.

Kolumna (The column)	Warunki rozdzielania (Separation conditions)	Rozdzielane cukry (Separated sugars)	Lit. (Ref.)
1 ft.x1/4"; Bondapak carbohydrate	Acetonitryl:woda (75:25); objętościowe natężenie przepływu eluentu 2 mL/min; detektor typu RID	glukoza, fruktoza, dekstroza, sacharoza, melibioza, 1-kestoza, neokestoza, 6-kestoza, rafinoza, matloza, matlotrioza, maltotetroza i in.	[9]
250 × 4,6-mm, 5-µm Spherisorb NH ₂	Acetonitryl:woda (78:22 przez 12 min; 60:40); objętościowe natężenie przepływu eluentu 0,8 mL/min; detektor typu RID	fruktoza, glukoza, sacharoza, maltoza, rafinoza, stachioza, ekstrakty roślinne	[6]
100 x 4,6 mm, Silica, Diol, TSK Amide-80, XAmide, Click Maltose, Click β-CD, Click TE-Cys	Acetonitryl:woda (80:20 przez 20 min; 60:40); objętościowe natężenie przepływu eluentu 1 mL/min; temperatura rozdzielania 40°C; detektor typu ELSD	glukoza, sacharoza, turanoza, celobioza, maltoza, trehaloza, laktoza, melibioza, próbka zawiera ksylooligosacharydy	[12]
100 x 4,6 mm, Click Maltose	Acetonitryl:woda (różne programy); objętościowe natężenie przepływu eluentu 1 mL/min; temperatura rozdzielania 30°C; Detektor typu ELSD, UV	galaktooligosacharydy, chitooligosacharydy, fruktooligosacharydy	[13]
267 mm x 200 µm; krzemionka modyfikowana poliakryloamidem	Acetonitryl-13M octan amonu (pH=4,7; 80:20); objętościowe natężenie przepływu eluentu 0,2 mL/min; temperatura rozdzielania 30°C; Detektor typu UV-Vis	sedoheptuloza, sacharoza, trehaloza, rabinoza	[14]
100 x 4,6 mm , krzemionka modyfikowana dekstranem	Acetonitryl:woda - bufor (różne programy); temperatura rozdzielania 30°C; objętościowe natężenie przepływu eluentu 1 mL/min; Detektor typu: ELSD, MS	ryboza, mannitol, sacharoza, maltitol, melezytoza, rafinoza, fruktooligosacharydy, glukooligosacharydy, galaktooligosacharydy,	[7]

2. Materiały i metody

(Materials and methods)

2.1. Substancje wzorcowe i odczynniki

(Standards and reagents)

Substancje wzorcowe – glukoza, galaktoza, sacharoza (cz.d.a., POCH Gliwice); fruktoza, maltoza, laktoza (cz.d.a., Sigma-Aldrich). Pozostałe odczynniki: azydek sodu – (cz.d.a., POCH Gliwice); woda demineralizowana (Lotos S.A); acetonitryl (czystość do elucji gradientowej, Merck, Niemcy). Serwatka z mleka krowiego, niepasteryzowanego i nieodtłuszczonego, otrzymana poprzez naturalnie zakwaszenie mleka, oddzielenie kazeiny poprzez wirowanie i filtrację pod zmniejszonym ciśnieniem, przez filtry będące mieszką estrów celulozy (85 % nitroceluloza i 15% octanu celulozy) o średnicy porów 0,45 µm (Millipore,

MA), z dodatkiem 0,1 % NaN_3 jako konserwantem, przechowywana w temperaturze 4 °C do czasu rozdzielania.

2.2. Aparatura chromatograficzna (Chromatographic apparatus)

Chromatograf cieczerowy 1: HP 1050, wyposażony w zasobnik eluentu HP1050 model 79856A, czterokanałowy degazer HP 1050, czterokanałową dwutłokową pompę HP 1050, detektor UV-VIS HP 1050 79853A, połączony szeregowo różnicowy detektor refraktometryczny, oraz 2 kanałowy integrator Merck-Hitachi D2500 wyposażony w rejestrator taśmowy oraz opcjonalnie zestaw komputerowy wyposażony w program TurboChrom. Chromatograf cieczerowy 2: Pompa L-2000 Merck-Hitachi, detektor refraktometryczny (Kanuer), Komputerowy system rejestracji danych, termostat ACS. Do odważenia potrzebnych składników wykorzystano wagę analityczną WPA 180/C o dokładności 0,1 mg (RADWAG, Polska). Dozowanie próbek odbywało się za pomocą strzykawki analitycznej o objętości 250 μL (Hamilton, USA). W badaniach zastosowano kolumny: Hypersil APS NH_2 5 μm 250x4 mm (Bischoff), Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm (Macherey-Nagel), LichroCart Lichrosphere® 100 NH_2 , 250x4 mm, 5 μm (Merck), Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody w stosunku objętościowym od 70 do 85 %. We wszystkich doświadczeniach zastosowano elucję izokratyczną, rozdzielanie przeprowadzane było w temperaturach 25, 45 i 60 °C, objętościowe natężenie przepływu wynosiło 1,5 i 2,0 mL/min.

2.3. Przygotowanie roztworów wzorcowych (Preparation of standard mixtures)

W badaniach wykorzystano mieszaniny wzorcowe cukrów. Mieszaniny sacharydów składały się z cukrów prostych takich jak: fruktoza, glukoza i galaktoza, a także cukrów złożonych takich jak: laktoza, maltoza i sacharoza. Wykonano cztery mieszaniny wymienionych cukrów, w różnych stężeniach, odpowiednio: C1 (laktoza 4,92; glukoza 4,74; fruktoza 4,88; sacharoza 4,84; galaktoza 4,78; maltoza 4,01 mg/mL), C2 (glukoza 5,20; maltoza 5,18 mg/mL), C3 (fruktoza 5,06; sacharoza 5,04 mg/mL) i C4 (laktoza 10,01 mg/mL). Cukry rozpuszczono w wodzie demineralizowanej oraz dodano 0,1 % NaN_3 aby uniemożliwić wzrost drobnoustrojów.

2.4. Kontrola jakości frakcji serwatkowych (Quality control of whey fractions)

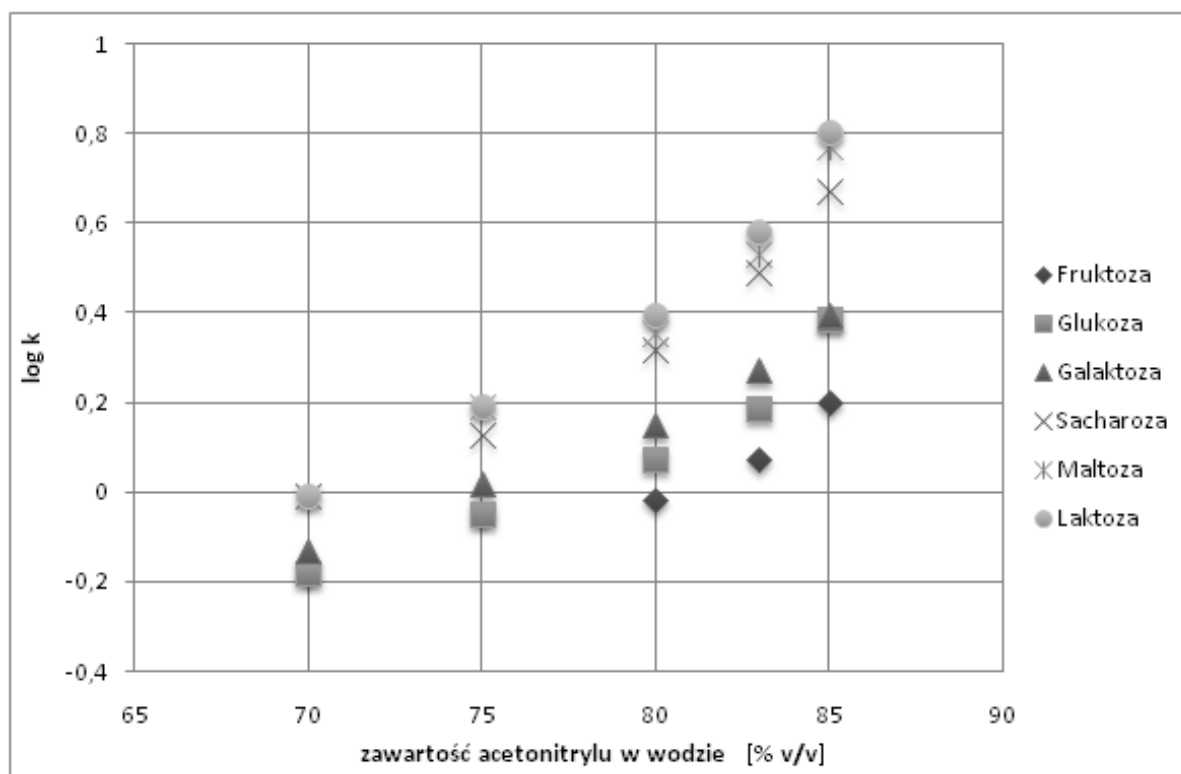
Rozdzielaniu w warunkach HILIC poddano frakcje bogate w cukry, otrzymane w wyniku semipreparatywnego rozdzielania serwatki w warunkach chromatografii odwróconych układów faz, w elucji gradientowej (kolumna: Symmetry C18 5 μm , 4,6x150 mm, 100 Å, program elucji: A: 95 % H_2O + 5 % MeOH + 0,075 % TFA; B: 5 % H_2O + 95 % MeOH + 0,075 % TFA; 0 – 25 min 0 – 95 % B, 2,0 mL/min). Frakcje zbierano w początkowej fazie programu elucji, w czasie, gdy eluowane są najbardziej polarne związki niewykazujące powinowactwa do niepolarniej fazy stacjonarnej jaką jest żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Następnie poddano je rozdzielaniu w układzie HILIC. Analizę ilościową wykonano w oparciu o metodę wzorca zewnętrznego - 3-punktowej krzywej kalibracyjnej roztworu laktozy.

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

W pierwszym etapie poszukiwano optymalnych warunków rozdzielania mieszaniny cukrów przy użyciu kolumny LichroCart Lichrosphere® 100 NH_2 , 250x4 mm, 5 μm (Merck) stosując różne wzajemne stosunki acetonitrylu i wody w fazie ruchomej. Na podstawie krzywych zależności $\log k$ od stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej (Rys. 2), można stwierdzić, iż w warunkach gdy stężenie acetonitrylu jest bliskie 70 % mieszanina rozdzielanych cukrów dzieli się na dwie grupy – cukry proste i złożone. Gdy stężenie acetonitrylu sięga 80 – 85 % możemy zaobserwować rozdzielanie wszystkich składników obecnych w badanym roztworze. Jako najkorzystniejsze warunki do rozdzielania mieszaniny 6 badanych cukrów wybrano fazę ruchomą o składzie: acetonitryl:woda 83:17 (v/v). Otrzymane wartości parametru k dla badanych cukrów przedstawiono w tabeli 2.

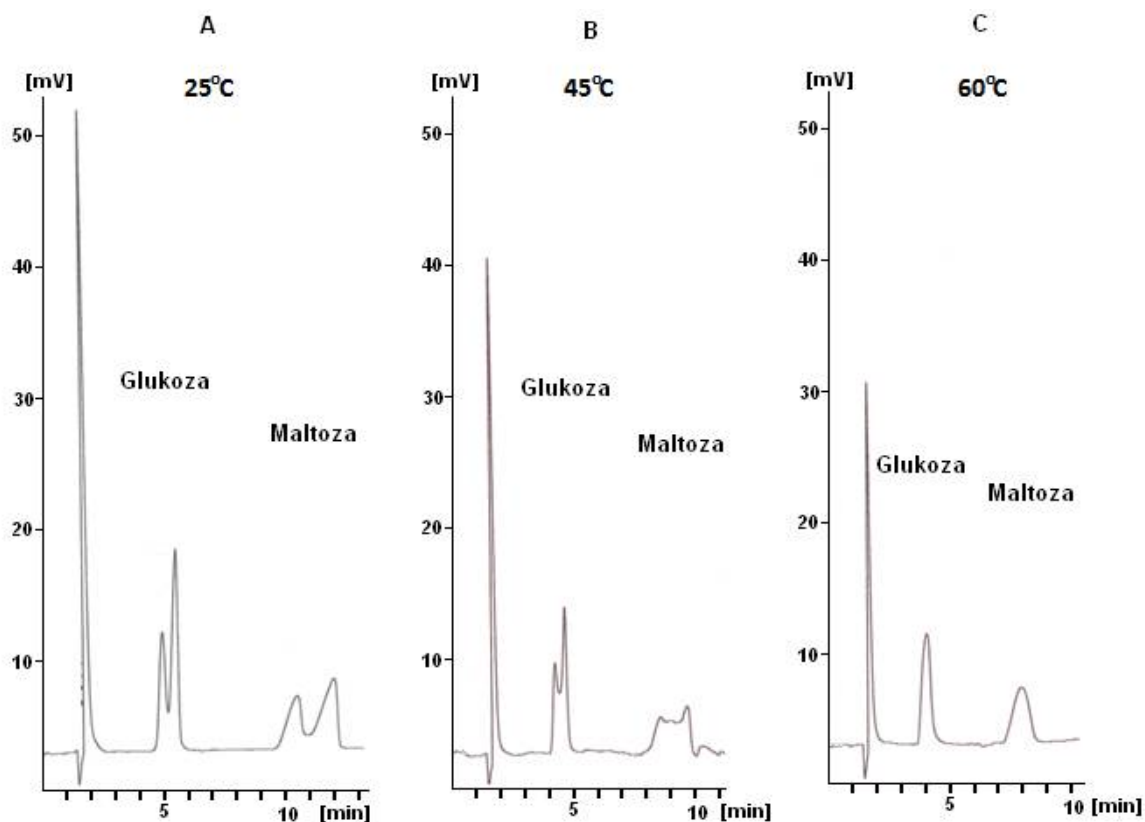
Tabela 2 Wartości współczynników k dla cukrów obecnych w mieszaninie wzorcowej C1.**Table 2.** Values of the k factor for the mono- and di-saccharides from the mixture C1.

Zawartość acetonitrylu [% v/v] (Acetonityl content)	70	75	80	83	85
	k	k	k	k	k
Fruktoza	0,66	0,89	0,96	1,18	1,59
Glukoza	0,66	0,89	1,18	1,54	2,44
Galaktoza	0,74	1,04	1,41	1,87	2,49
Sacharoza	0,98	1,34	2,07	3,09	4,68
Maltoza	0,98	1,55	2,27	3,4	5,93
Laktoza	0,98	1,55	2,48	3,81	6,37

Rys. 2. Zależność wartości $\log k$ od zawartości acetonitrylu w eluencie dla cukrów w mieszaninie wzorcowej C1.Fig. 2. The correlation of the $\log k$ and the concentration of acetonitrile in mobile phase for separation of mixture C1.

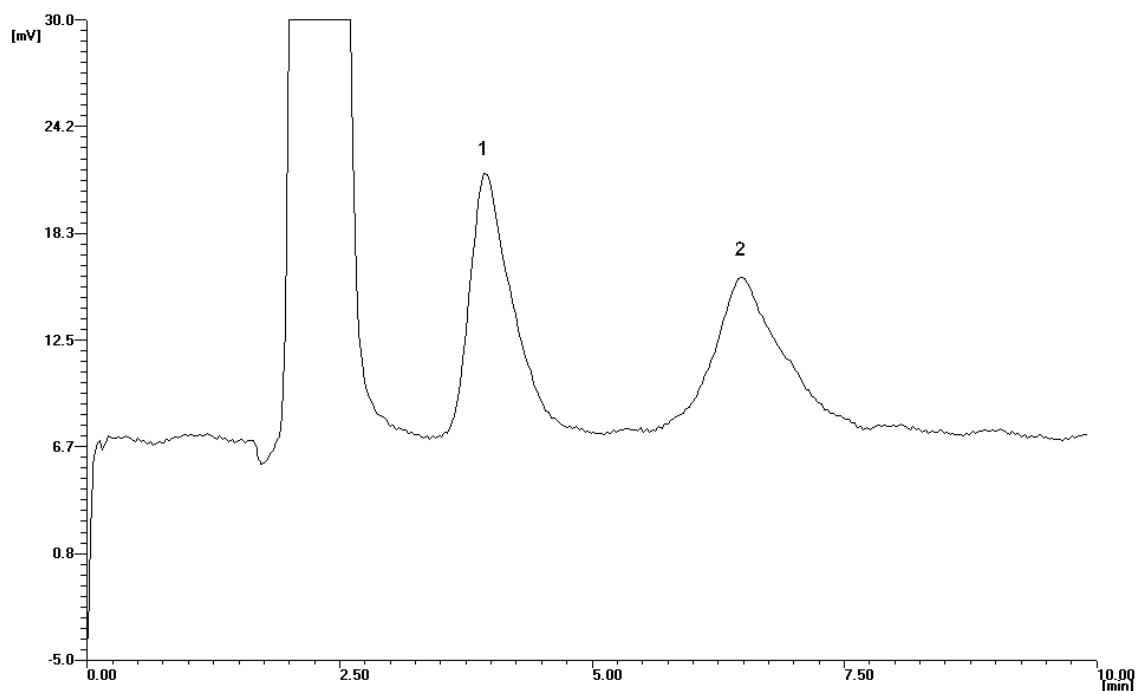
Rysunek 3 przedstawia rozdzielanie mieszaniny C2 na kolumnie LichroCart Lichrosphere® 100 NH₂, 250x4 mm, 5 μm (Merck) w trzech różnych temperaturach. Na przedstawionych chromatogramach można zauważyć różnicę w czasach retencji poszczególnych pików – wraz z wzrostem temperatury zmniejsza się czas retencji. Zauważyć można również zmiany w kształcie pików chromatograficznych – stają się szersze i niższe, co związane jest z zwiększeniem dyfuzji dwóch form anomerycznych rozdzielanych cukrów. Wraz z wzrostem temperatury piki odpowiadające anomerom poszczególnych cukrów (α i β) zbliżają się do siebie. W temperaturze 45 °C zaobserwować można dominującą formę pośrednią, łączącą sąsiadujące piki anomerów α i β – szczególnie wyraźnie widoczne jest to w przypadku dwucukrów, charakteryzujących się bardziej rozbudowaną strukturą (np. maltoza lub laktoza), a co za tym idzie, bardziej złożonymi oddziaływaniami z fazą stacjonarną. W temperaturze 60 °C badane cukry eluowane są w postaci pojedynczego, szerokiego pików. Taki kształt pików związany jest z wzrastającą szybkością przejścia cukru z struktury α w β . Zjawisko to obserwowane jest również w przypadku faz stacjonarnych innego typu, np. Click TE-Cys, Click Maltose i XAmide [12].

W wyniku rozdzielania tej samej mieszaniny cukrów (C2) na kolumnie typu Diol, w temperaturze pokojowej (25 °C), nie uzyskano rozdzielania na poszczególne anomery. Rozdzielane cukry eluowane zostały w postaci jednego, lecz dość szerokiego piku o niekorzystnej symetrii (Rys. 4). Na zjawisko to wpływu nie ma temperatura prowadzenia rozdzielania, a oddziaływania sorpcyjne na powierzchni fazy stacjonarnej.



Rys. 3. Chromatogramy przedstawiające rozdzielanie składników mieszaniny wzorcowej cukrów C2 w trzech temperaturach termostatowania kolumny: 25 °C (A), 45 °C (B), 65 °C (C). Zastosowana kolumna: Hypersil APS NH₂ 5µm 250x4 mm (Bischoff), objętościowe natężenie przepływu: 1,5 mL/min, objętość dozowanej próbki 20 µL, detektor refraktometryczny.

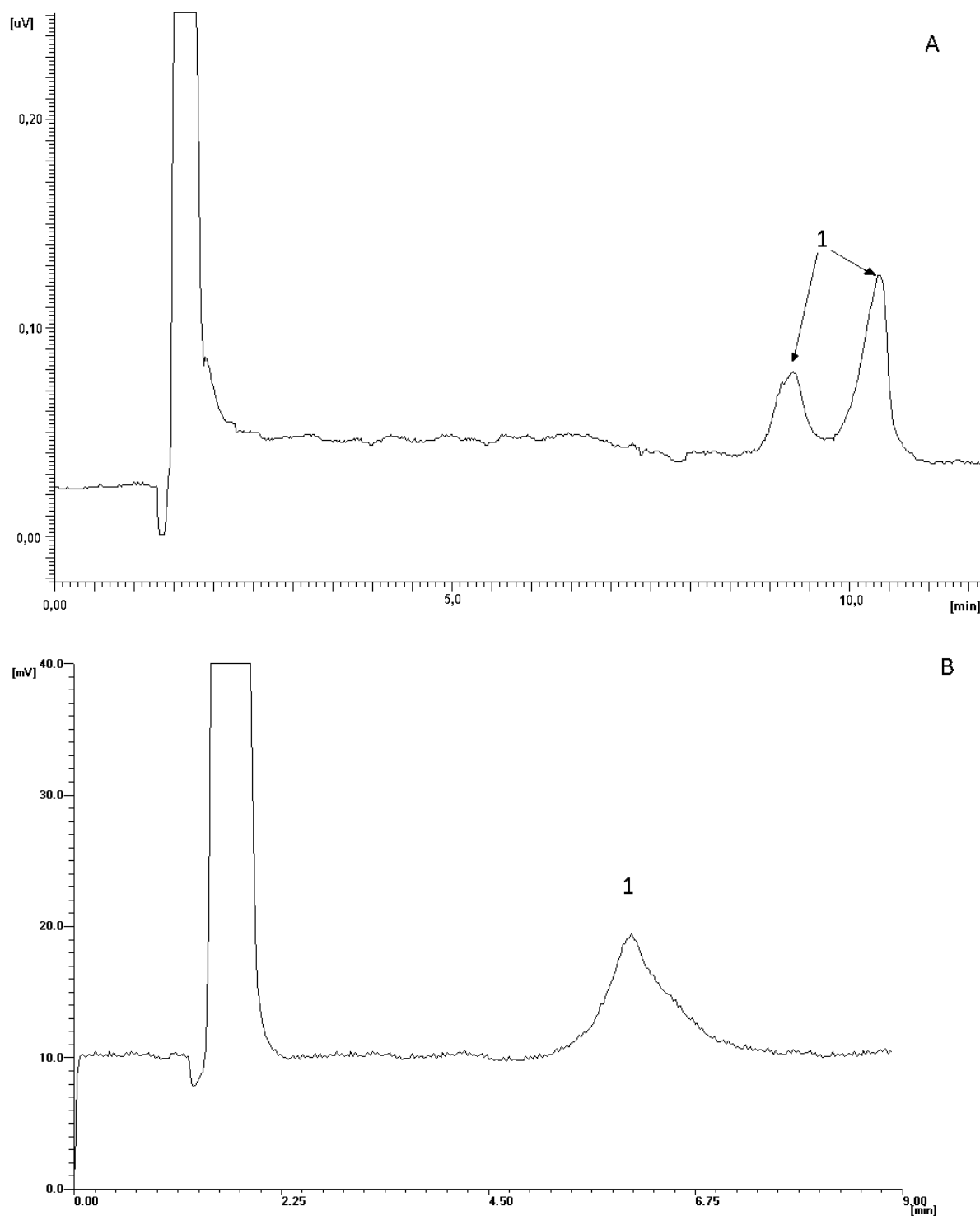
Fig. 3. Chromatograms showing the separation of the components of the reference mixture of sugars C2 in three different temperatures: 25 °C (A), 45 °C (B), 65 °C (C). The column: Hypersil APS NH₂ 5 µm, 250x4 mm (Bischoff), the volumetric flow rate: 1.5 mL/min, the injection volume: 20 µl, refractive index detector.



Rys.4. Chromatogram przedstawiający rozdzielanie mieszaniny cukrów redukujących (C2). Kolumna Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm, temperatura 25 °C, elucja izokratyczna, eluent: acetonitryl:woda (85:15, v/v), objętościowe natężenie przepływu 1,5 mL/min, detektor refraktometryczny. Zidentyfikowane piki: glukoza (1), maltoza (2).

Fig. 4. Chromatogram showing the separation of a mixture of reducing sugars (C2). Column Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm, temperature 25 °C, isocratic elution programme, mobile phase: acetonitrile: water (85:15, v/v), volumetric flow rate of 1.5 mL/min, refractive index detector. The identified peaks: glucose (1), maltose (2).

W badanych warunkach, na kolumnie typu NH₂ cukry redukujące, takie jak glukoza, maltoza i laktoza, eluowane są w postaci dwóch pików odpowiadających poszczególnym anomerom konformacyjnym, rozdzielonym praktycznie do poziomu linii bazowej, co sugeruje, że jeden z anomerów (eluowany szybciej) wykazuje mniejsze powinowactwo niż anomer eluowany później. Ma to również związek z rodzajem fazy stacjonarnej kolumny, a przede wszystkim z stopniem dyfuzji pomiędzy przepływającą fazą ruchomą a dynamicznie tworzoną warstwą wody zaadsorbowaną na powierzchni złoża. Retencja danej cząsteczki cukru zależy również od dostępności grup OH w stosunku do złoża – ich położenia w cząsteczce (położenie aksjalne lub ekwatorialne). Obecność dwóch pików świadczy o zróżnicowanych oddziaływaniach tych anomerów z fazą stacjonarną [15]. W przypadku cukrów nieredukujących nie mamy do czynienia z tego typu zróżnicowanymi oddziaływaniami ze względu na brak możliwości zmiany konformacji w wyniku mutarotacji przy węglu C1 łańcucha cukrowego. W toku przeprowadzonych badań porównano kolumny: Hypersil APS NH₂ 5 µm 250x4 mm (Bischoff), Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm (Macherey-Nagel) pod względem ich właściwości wobec cukrów redukujących na przykładzie laktozy w warunkach elucji izokratycznej. Rezultaty przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Zestawienie chromatogramów przedstawiających rozdzielanie laktozy (1; roztwór C4) w warunkach chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Zastosowana kolumna: Hypersil APS NH₂ 5 μm 250x4 mm (Bischoff), (A), Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm (Macherey-Nagel) (B), objętościowe natężenie przepływu: 2,0 mL/min, objętość dozowanej próbki 15 μL, detektor refraktometryczny, temperatura termostatowania kolumny: 25 °C.

Fig. 5. Chromatograms showing the separation of lactose (1: solution C4) under hydrophilic interaction chromatography. The column: Bischoff Hypersil APS NH₂ 5 μm 250x4 mm (A) Nucleosil 100-7 OH 250x4 mm (B), the volumetric flow rate: 2.0 mL/min, the injection volume 15 μL, refractive index detector, column temperature: 25 °C.

3.1. Zastosowanie HILIC do kontroli jakości cukrowych frakcji serwatki (The use of HILIC for quality control of sugar in whey fractions)

Serwatka jako materiał odpadowy w przetwórstwie mleczarskim, jest cennym źródłem białek, cukrów i mikroelementów. Ze względu na dużą produkcję serwatki oraz groźne dla środowiska naturalnego oddziaływanie, wynikające z dużego ładunku energetycznego (wysokiego ChZT), dąży się obecnie do zagospodarowania i wykorzystania jej w przemyśle żywnościowym, farmaceutycznym oraz w hodowli bydła. W związku z wzrastającym zainteresowaniem nad utylizacją zbędnej serwatki, konieczne jest opracowanie technik kontroli jakości i określania składu oraz właściwości serwatki otrzymywanej w procesach przetwórczych przemysłu mleczarskiego.

W niniejszej pracy podjęto próbę opracowania metody kontroli zawartości laktozy w badanych frakcjach serwatki, wykorzystując chromatografię oddziaływań hydrofilowych. Frakcje otrzymywane zostały w wyniku semipreparatywnego rozdzielania serwatki w warunkach odwróconych układów faz (metodyka do oznaczania białek serwatkowych (dane nieopublikowane)), gdzie rozdzielaniu poddawano 0,5 mL serwatki. Testowana metodyka kontroli zawartości laktozy charakteryzuje się krótkim czasem rozdzielania i pozwala na określenie stężenia laktozy w badanej frakcji serwatki. Stężenie laktozy w badanych frakcjach wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej (Tabela 3), a następnie porównano otrzymane wartości pól powierzchni pod pikiem laktozy.

Tabela 3. Wartości kalibracyjne dla laktozy.

Table 3. Calibration factors for lactose.

Stężenie (Concentration) [mg/mL]	Powierzchnia pod pikiem (Peak area) [μV/min]	Czas retencji (Retention time) [min]
10	794446	9,248
5	386273	8,750
2,5	195790	8,815
0,5	39271	8,894

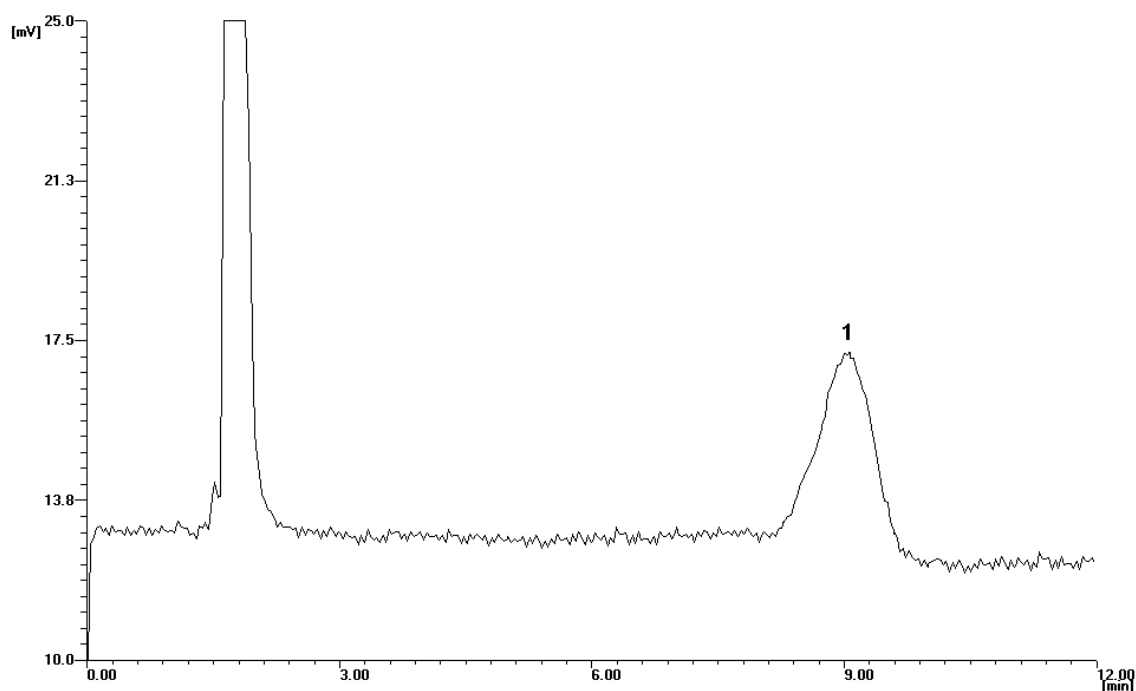
Otrzymano równanie prostej kalibracyjnej $y=80080x-8296$, przy współczynniku $r^2=0,999$.

W pracy rozdzielano frakcje serwatek otrzymanych w naturalny sposób z surowego mleka. Badane frakcje wykazują zróżnicowanie zawartości laktozy w zależności od czasu w jakim dana frakcja została zebrana. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić iż najwyższą zawartość laktozy stwierdzono w frakcji 2 (Rys. 6).

Tabela 4. Wyniki rozdzielania i oznaczania stężenia laktozy w badanych frakcjach serwatki.

Table 4. The results of separation and determination of lactose In investigated whey fractions.

Rodzaj próbki (Sample)	Czas retencji laktozy (Retention time for lactose) [min]	Powierzchnia (Peak area) [μV/min]	Zadozowana objętość (Injection volume) [μL]	Stężenie laktozy (Lactose concentration) [mg/mL]
Frakcja 1	8,998	1500419	200	1,30
Frakcja 2	8,948	188564	20	1,66
Frakcja 3	9,228	700527	200	0,55



Rys. 6. Chromatogram przedstawiający rozdzielanie frakcji cukrowej serwatki otrzymanej z surowego mleka krowiego (frakcja 2). Kolumna: Hypersil APS NH₂ 5 μm 250x4 mm (Bischoff), faza ruchoma: acetonitryl:woda 85:15 (v/v), objętościowe natężenie przepływu: 1,5 mL/min, dozowana objętość 20 μL, detekcja refraktometryczna. Zidentyfikowane piki: laktoza (1).

Fig. 6. Chromatogram representing separation of sugar fraction of whey, obtained from crude (fresh) cow milk (fraction 2). Column: Hypersil APS NH₂ 5 μm 250x4 mm (Bischoff), mobile phase: acetonitrile:water 85:15 (v/v), the volumetric flow rate: 1,5 mL/min, injection volume: 20 μL, refractive index detector. Identified peaks: lactose (1).

4. Wnioski (Conclusions)

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych to obecnie prężnie rozwijająca się technika rozdzielania skomplikowanych mieszanin polarnych składników. Ze względu na możliwość wykorzystania modyfikowanych faz stacjonarnych posiadających grupy funkcyjne o zróżnicowanych właściwościach, często również tworzonych pod konkretne aplikacje [16] możliwe staje się rozwiązanie nawet trudnych problemów separacyjnych. Wykorzystanie faz ruchomych zawierających grupy aminowe umożliwia rozdzielanie grupowe cukrów prostych od złożonych, rozdzielanie poszczególnych pojedynczych cukrów w obrębie danej grupy, a także otrzymanie rozdzielnia całkowitego poszczególnych anomerów cukrów redukujących. Na tego typu złożu obserwuje się zależność czasu retencji, kształtu pików oraz występowania oddzielnych pików dla poszczególnych anomerów w zależności od temperatury prowadzenia procesu rozdzielania – w temperaturze 25 °C zaobserwować można oddzielne piki dla poszczególnych anomerów α i β. Natomiast prowadząc rozdzielanie w temperaturze powyżej 60 °C zaobserwować można jeden pik chromatograficzny, charakterystyczny dla danego cukru. Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami literaturowymi [12] i jest to związane z specyficznym obszarem oddziaływania poszczególnych cukrów, ich konformacją, ilością dostępnych i oddziaływujących ze złożem grup hydroksylowych, a także orientacją względem fazy stacjonarnej oraz dynamicznie tworzonej warstewki wody na powierzchni sorbentu [15]. Dzięki zastosowaniu detektora refraktometrycznego, który charakteryzuje się dużą czułością oraz liniowością odpowiedzi detektora w zależności od stężenia analitu (pod warunkiem, że dane stężenie mieści się w zakresie liniowości detektora) możliwe jest oznaczenie stężenia danego cukru obecnego w próbce. Zastosowanie tego typu detektora w połączeniu z kolumną typu NH₂ jest również zdecydowanie korzystniejsze ze względów ekonomicznych, aniżeli stosowanie kolumn jonowymiennych, a także drogich detektorów takich jak: amperometryczne lub ELSD (ang. *evaporative light scattering detection*, pol. *ewaporacyjny detektor fotodyspersyjny*).

Zastosowany układ do kontroli jakości frakcji cukrowych serwatki umożliwia rozdzielanie oraz oznaczenie laktozy w badanym materiale jakim jest serwatka i jej frakcje.

5. Literatura (References)

- [1] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, ang. *Natural organic compounds*, PWN, Warszawa 2004
- [2] J. Król, A. Brodziak, A. Litwińczyk, *Podstawowy skład chemiczny i zawartość wybranych białek serwatkowych w mleku krów różnych ras i serwatce podpuszczkowej*, ang. *Basic chemical composition and content of selected whey proteins in milk from different cow breeds and in rennet whey*, *Żywność. Nauka, Technologia, Jakość*, 77 (2011) 74.
- [3] Z. El-Rassi, *Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis*, Elsevier 2002.
- [4] I. Molnár-Perl, *Simultaneous quantitation of acids and sugars by chromatography: gas or high-performance liquid chromatography?*, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 181.
- [5] B. S. Mason, H. T. Slover, *A gas chromatographic method for the determination of sugars in foods*, *J. Agric. Food Chem.*, 19 (1971) 551.
- [6] J. Lopez Hernandez, M.J. González-Castro, I. Naya Alba, C. de la Cruz Garcia, *High-Performance Liquid Chromatographic determination of mono- and oligosaccharides in vegetables with evaporative light-scattering detection and refractive index detection*, *J. Chromatogr. Sci.*, 36 (1998) 293.
- [7] Q. Shenga, X. Suc, X. Lib, Y. Kea, X. Liang, *A dextran-bonded stationary phase for saccharide separation*, *J. Chromatogr. Sci. A*, 1345 (2014) 57.
- [8] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography*, *J. Chromatogr. Sci. A*, 1184 (2008) 474.
- [9] J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Liquid chromatography of saccharides*, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 125.
- [10] A. J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, *J. Chromatogr. A*, 499 (1990) 177.
- [11] P. Hemstrom, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1784.
- [12] Q. Fu, T. Liang, Z. Li, Z. Xu, Y. Ke, Y. Jin, X. Liang, *Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography*, *Carbohydrate Res.*, 379 (2013) 13.
- [13] Q. Fu, T. Liang, X. Zhang, Y. Du, Z. Guo, X. Liang, *Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column*, *Carbohydrate Res.*, 345 (2010) 2690.
- [14] T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, *Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 2533.
- [15] A. Alpert, M. Shukla, A. Shukla, L. Zieske, S. Yuen, M. Ferguson, A. Mehler, M. Pauly, R. Orlando, *Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates*, *J. Chromatogr. A*, 676 (1994) 191.
- [16] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2012) 1.
- [17] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic Interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012) 231.