

Analiza šećera u voćnim sokovima primenom visokoeffikasne tečne hromatografije

Alma Bušatlić¹,
Svetlana Đogo Mračević²,
Marko Krstić¹,
Zorica Basić³,
Slavica Ražić²

¹Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Srbija

²Katedra za analitičku hemiju, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Srbija

³Institut za higijenu VMA, Beograd

Rad primljen: 08.02.2015.

Kontakt adresa:

Slavica Ražić,
Farmaceutski fakultet,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd
Tel/Faks: +381 11 3951208
E-mail: slavica.razic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj: *Određivanje šećera u voćnim sokovima je veoma važno, imajući u vidu njihov nutritivni značaj, ali i povećane zahteve u kontroli hrane kada su u pitanju pojedine frakcije ugljenih hidrata u sveže pripremljenim proizvodima. S obzirom na to da postoji porast industrijske proizvodnje voćnih sokova i značaj stabilnosti mono- i disaharida za kvalitet proizvoda, domaći sokovi, kao funkcionalna hrana, postaju sve značajniji.*

U ovom radu je analiziran sadržaj osnovnih šećera u voćnim sokovima i sirupima kućne izrade primenom visokoeffikasne tečne hromatografije (HPLC).

Analiziran je sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u sokovima od ribizle, višnje, breskve, kajsije i jagode, kao i u sirupima od višnje i kajsije. Određivanje se zasnivalo na poređenju hromatograma rastvora standarda šećera i naših uzoraka. Uz izokratsko eluiranje analiza je izvođena pri temperaturi od 90 °C. Sa vodom kao mobilnom fazom i kolonom Nucleogel Sugar Ca, primenjena je refraktometrijska detekcija.

Analizom je pokazano da sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze varira u rasponu 3,149-38,405 g/100 ml, 1,931-30,851 g/100 ml i 0,670-6,072 g/100 ml, respektivno. Sadržaj glukoze i fruktoze se ne razlikuje značajno između sokova, a u sirupima je za deset puta veći. Sadržaj saharoze takođe se ne razlikuje značajno među ispitivanim uzorcima, osim u jednom sirupu zbog najverovatnije enzimske razgradnje ovog šećera.

Ključne reči: voćni sokovi, fruktoza, glukoza, saharoza, HPLC, kontrola hrane.

UVOD

Zahtevi savremene ishrane su takvi da ona mora da zadovolji, ne samo osnovnu ulogu u organizmu – pravilan rast i razvoj, nego i određeni kvalitet, i može da deluje u smislu sprečavanja nastanka hroničnih tzv. civilizacijskih bolesti, bolesti novog doba. Upravo sa tim u vezi se razvio koncept proizvodnje funkcionalne hrane, hrane koja, pored svojih uobičajenih nutritivnih svojstava, ima i povoljan uticaj na ljudsko zdravlje i blagostanje [1,2].

U cilju postizanja dobrog kvaliteta namirnica, a time i zaštite zdravlja, neophodno je da se sprovede unapred utvrđeni standardi, koji se odnose na proizvodnju, distribuciju, čuvanje i rukovanje namirnicama, ali i njihovu redovnu kontrolu. Svetska zdravstvena organizacija (WHO¹) naglašava da je loš kvalitet namirnica jedan od najrasprostranjenijih uzroka zdravstvenih problema u svetu bez obzira na to koliki je stepen razvijenosti zemalja. Organizacije WHO i FAO² su objavile vodič "Food Safety risk analysis"³, u kome su analizirani faktori rizika u ishrani i način na koji bi se sistem kontrole namirnica uredio radi očuvanja zdravlja [3].

Sadržaj šećera u ishrani je od posebnog značaja, jer ugljeni hidrati spadaju u grupu makronutrijenata koji imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja ljudi, a nalaze se u svim grupama prehrambenih namirnica

(daju ukus i teksturu, učestvuju u očuvanju svežine, utiču na proces fermentacije i imaju antioksidativnu aktivnost) [4].

Hemijski gledano, ugljeni hidrati predstavljaju aldehidne ili α-ketonske derivate polihidroksilnih alkohola, i njihove kondezacione proizvode. Na osnovu veličine molekula i stepena polimerizacije mogu se podeliti na: proste šećere (mono- i disaharide), oligosaharide (3-9 monosaharidnih jedinica), polisaharide (skrobne i neskrobne) i poliole (redukovane ugljene hidrate) [5]. Prema prvom principu racionalne ishrane ukupne energetske potrebe zdravih osoba treba zadovoljiti energijom koja 55-60% potiče iz ugljenih hidrata i to 45-50% iz složenih i 10% iz prostih. Najnovije preporuke WHO iz 2015. godine ukazuju da bi unos prostih šećera trebalo smanjiti ispod 10%, idealno na 5%, odnosno 25g (6 čajnih kašika) dnevno [6].

U prirodne šećere spadaju fruktoza, glukoza, maltoza i saharoza i najčešće se nalaze u voću, povrću i žitaricama. Apсорbuju se u sluznici tankog creva, dospevaju u krv, a potrebni su svim ćelijama, naročito nervnim. Višak šećera u organizmu se deponuje u obliku glikogena u jetri, kao energetska rezerva ili se pretvara u masne materije. Potrebe organizma zavise od uzrasta, pola, stila života i zanimanja.

Određivanje sadržaja šećera u različitim namirnicama, pa tako i voćnim sokovima, je veoma značajno [7-9]. Pravilnik o kvalitetu voćnih sokova, koncentrisanih voćnih sokova, voćnih sokova u prahu, voćnih nektara i srodnih proizvoda, Službeni Glasnik Republike Srbije propisuje samo vrstu šećera

¹ WHO – World Health Organization

² FAO - Food and Agriculture Organisation

³ "Food Safety risk analysis" – „Bezbednost hrane i procena rizika"

koji mogu da se upotrebe u proizvodnji voćnih sokova. Ukupna količina šećera dodatog sokovima za korekciju kiselog ukusa i korekciju slasti ne sme da bude veća od 150 g/l [10].

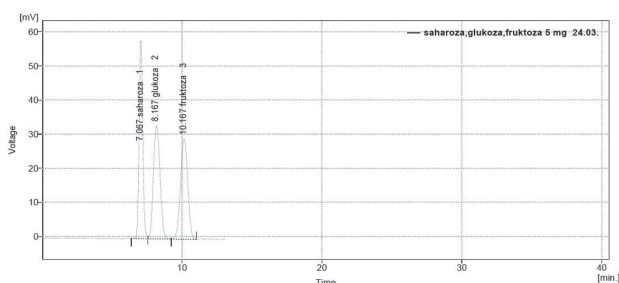
Tyagi i sar. [11] su određivali sadržaj vitamina C, organskih kiselina i šećera u različitim voćnim sokovima iz lokalnih supermarketa primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije reversnih faza uz refraktometrijski detektor. Analizom 10 različitih uzoraka voćnih sokova utvrđeno je da su glukoza, fruktoza i saharoza najzastupljeniji šećeri, te da njihove vrednosti za glukozu, fruktozu i saharozu variraju u rasponima 2,0-3,5%, 2,1- 6,1% i 0,94-6,9%, Pravilnik o kvalitetu voćnih sokova, koncentrisanih voćnih sokova, voćnih sokova u prahu, voćnih nektara i srodnih proizvoda respektivno.

Kelebek i Selli [12] su određivali fenole, nestabilna jedinjenja, organske kiseline i šećere u čedenom soku od narandže (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Šećeri su određivani primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije sa refraktometrijskim detektorom. Uzorci su pripremani od 50 kg sveže ubranih narandži. Ukupan sadržaj šećera je bio 110,44 g/l, a od toga 46,4 g/l saharoze, 30,99 g/l glukoze i 33,05 g/l fruktoze. Odnos glukoza/fruktoza je ključni indikator u utvrđivanju autentičnosti citrusnih sokova i trebalo bi da se nalazi u intervalu od 0,80 do 1,00. U ovom istraživanju taj odnos je 0,94, što ukazuje da su analizirani sokovi zadovoljavajućeg kvaliteta.

Imajući u vidu značaj šećera u ishrani i njihovu zastupljenost u voćnim sokovima, definisan je cilj ovog rada da se primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC) odredi sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u voćnim sokovima i sirupima.

METOD RADA

Analizirano je pet voćnih sokova (ribizla, višnja, breskva, kajsija i jagoda) i dva sirupa (višnja



Slika 1. Hromatogram smeše standarda šećera

Tabela 1. Operativni uslovi HPLC sistema

Pumpa	Waters M600 E, izokratsko eluiranje
Injektor	Rheodyne 7125, petlja 20 μ l
Analitička kolona	Nucleogel Sugar Ca, promera 300x6,5 mm
Detektor	Waters 410 Differential Refractometer
Mobilna faza	Voda
Protok	1 ml/min
Temperatura kolone	90 °C
Obrada podataka	Clarity chromatography station for Windows

i kajsija) kućne izrade, bez dodatka šećera.

Rastvori i reagensi

U analizi su primenjene standardne supstance glukoze, fruktoze i saharoze (Sigma-Aldrich) od kojih su pripremani rastvori za ispitivanje granice detekcije i kvantifikacije, kao i rastvori za kalibracionu krivu (1,0, 2,5, 5,0 i 10,0 mg/ml). Korišćena je voda HPLC čistoće (sistemski dobijena demineralizovana voda prečišćena na komercijalnom „Millipore Milli-Q“ sistemu).

Operativni uslovi rada HPLC sistema prikazani su u tabeli 1.

Priprema uzoraka soka i sirupa

Svaki uzorak je homogenizovan i razblažen, uzorci soka 10, a sirupa 100 puta destilovanom vodom. Uporedo su pripremani standardi rastvora glukoze, fruktoze i saharoze koncentracije 2,5 mg/100ml. Uzorci su filtrirani kroz Wathman 42 filter papir, a zatim kroz membranski filter i potom injektirani u HPLC sistem.

Validacija metode

Ukupno vreme hromatografske analize je iznosilo 15 min. Obrada signala je rađena Clarify softverom, a na osnovu uporedne analize pikova standarda i uzoraka izračunat je sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze.

Određene su granica detekcije i kvantifikacije, specifičnost metode zbog mogućih interferencija, linearnost odnosa površine pika i koncentracije za standardne rastvore glukoze, fruktoze i saharoze u rasponu 1,0-10,0 mg/ml. Ispitana je preciznost za koncentraciju od 5,0 mg/ml i analitički prinos metoda. Nakon validacije metode određivanje sadržaja šećera urađeno je metodom standardne krive.

REZULTATI I DISKUSIJA

Određene su granice detekcije i kvantifikacije metode i one za sva tri određivana šećera iznose 0,02 mg/ml, odnosno, 0,05 mg/ml. Linearnost je određena analizom četiri standardna rastvora šećera koncentracija od 1,0 do 10 mg/ml. Kalibracione krive su dobijene kao rezultat četiri injektovanja za svaki koncentracijski nivo i određeni su koeficijenti korelacije: $r = 0,99931$ za fruktozu, $r = 0,99939$ za glukozu i $r = 0,99936$ za saharozu. Tačnost metode je ispitana određivanjem procenta prinosa na standardne rastvore koncentracije 5,0 mg/ml i iznosi 98,5% za fruktozu, 99,0% za glukozu i 98,1

za saharozu. Svi ispitivani parametri validacije za fruktozu, glukozu i saharozu potvrdili su dobru preciznost i reproduktivnost metode (RSD 1,85%, 1,31% i 1,62%, respektivno). Hromatogram dobijen prilikom validacije metode za sva tri analizirana šećera prikazan je na slici 1.

Ispitivani su sadržaji glukoze, fruktoze i saharoze u različitim uzorcima voćnih sokova i sirupa. Pokazano je da sadržaj u sokovima varira u rasponu 3,15-4,70 g/100ml za glukozu, 1,93-4,41 g/100ml za fruktozu i 3,74-6,07 g/100ml za saharozu (Tabela 2.). Sadržaj šećera se ne razlikuje značajno između pojedinačnih uzoraka i odgovara uobičajenom sadržaju u voćnim sokovima koji se navode u literaturi [10,11]. U sirupima je sadržaj glukoze (33,23-38,40 g/100ml) i fruktoze (27,31-30,85 g/100ml) više od deset puta veći nego u sokovima.

Sadržaj saharoze u sirupu od višnje (6,07 g/100ml) ne odstupa od sadržaja ovog šećera u sokovima. Međutim, u sirupu od kajsije koncentracija saharoze je bila značajno niža (0,67 g/100ml), što može ukazivati na to da se ovaj šećer razgradio na fruktozu i glukozu. Naime, u proizvodnji se šećeri dodaju, posebno u industrijskoj proizvodnji sirupa. Treba imati u vidu da se proizvodnja domaćih sokova izvodi obično na sobnoj temperaturi, pa se može očekivati spontrana hidroliza. To objašnjava niži sadržaj saharoze u domaćim, tradicionalno izrađenim sokovima, kao posledice dejstva enzima prisutnih u voću. Ovo može biti jedan od parametara kvaliteta prirodnih voćnih sokova, što ih svrstava u kategoriju funkcionalne hrane.

Tabela 2. Sadržaj šećera u uzorcima sokova i sirupa (g/100ml)

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Saharoza
Sok ribizle	2,78	3,66	4,76
Sok višnje	3,11	4,06	3,74
Sok breskve	3,94	4,53	3,81
Sok kajsije	4,41	4,70	3,84
Sok jagode	1,93	3,15	6,07
Sirup višnje	30,85	38,40	6,07
Sirup kajsije	27,32	33,23	0,67

ZAKLJUČAK

Tehnološki napredak proizvodnje hrane doveo je do velike konkurencije među kompanijama, što je za rezultat imalo povećanje proizvodnje jeftinije, ili uz dodatak raznih aditiva, primamljivije hrane, često slabe nutritivne vrednosti i lošijeg kvaliteta. Ljudi današnjice u savremenom društvu, sve više uviđaju važnost zdrave, tzv. funkcionalne hrane, što povećava zahteve za standardizacijom tehnoloških procesa proizvodnje, čuvanja, a posebno redovne kontrole.

Visokoeфикаsna tečna hromatografija se zbog eфикаsnosti i preciznosti pokazala kao moćna analitička tehnika u analizi i kontroli sastava hrane i u ovom radu su prikazani rezultati kvantitativne analize glukoze, fruktoze i saharoze u uzorcima voćnih sokova i sirupa kućne izrade. Uspešnim određivanjem pojedinačnog sadržaja ova tri šećera, primenom HPLC-a, pokazano je da se

ovom metodom može napraviti razlika između prirodnih sokova (sa niskim sadržajem saharoze) i industrijski proizvedenih sokova (sa visokim sadržajem saharoze). Dobijeni rezultati ukazuju da se tradicionalno izrađeni sokovi mogu svrstati u grupu funkcionalne hrane.

LITERATURA

1. Mark-Herbert C. Innovation of a new product category—Functional foods. *Technovation* 2004; 24: 713–719.
2. Mollet B, Rowland I. Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Curr Opin Biotech* 2002; 13: 483–485.
3. Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities Available from: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/riskanalysis06.pdf> (pristup, decembar, 2015).
4. Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin. Nutr* 2007; 61(1): 5-18.
5. Levy DE, Fügedi P. The organic chemistry of sugars. New York: CRC press; 2005; 25-85.
6. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: World Health Organization; 2015. Available from: http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/en (pristup, decembar, 2015).
7. Míguez Bernárdez M, De la Montaña Miguélez J, García Queijeiro J. HPLC determination of sugars in varieties of chestnut fruits from Galicia (Spain). *J Food Compos Anal* 2004; 17(1): 63-67.
8. Timpa JD, Burke JJ. Monitoring organic acids and carbohydrates in cotton leaves by high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1986; 34(5): 910–913.
9. Muir JG, Rose R, Rosella O, Liels K, Barrett SJ, Shepherd SJ i sar. Measurement of Short-Chain Carbohydrates in Common Australian Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem* 2009; 57 (2): 554–565.
10. Pravilnik o kvalitetu voćnih sokova, koncentrisanih voćnih sokova, voćnih sokova u prahu, voćnih nektara i srodnih proizvoda. Službeni glasnik RS, Beograd 2010; 27.
11. Tyagi G, Jangir D. K. Singh P, Mehrotra R, Ganesan R, Gopal E. S. R. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *J Food Sci Technol* 2011;48: 1-9.
12. Kelebek H, Selli S. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Doryol (Citrus sinesis L. Osbeck) orange juice. *J Sci Food Agric* 2011; 91: 1855–1862.

Analysis of sugars in fruit juices using high performance liquid chromatography

Alma Bušatlić¹,
Svetlana Đogo Mračević²,
Marko Krstić¹,
Zorica Basić³,
Slavica Ražić²

¹ Department of Pharmaceutical
Technology and Cosmetology, University
of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Serbia

² Department of Analytical Chemistry,
University of Belgrade-Faculty
of Pharmacy, Serbia

³ The Institute for Hygiene, Military
Medical Academy, Belgrade

Abstract: Determination of sugars, especially in fruit juices, is very significant bearing in mind their nutritive importance and the increased demands in food control, especially for fractions of carbohydrates in fresh products. Home-made juices as "functional food" are in the focus of scientific attention because of the expansion of industrial manufacturing of fruit juices and importance of mono- and disaccharides stability for the products quality.

In this work determination of content of basic sugars in fruit juices, by applying a high performance liquid chromatography (HPLC), was performed. Content of glucose, fructose and saccharose was analysed in currant, cherry, peach, apricot and strawberry juices as well as in home-made cherry and apricot syrups. Quantification was based on comparison of chromatograms of standard solutions of saccharose, glucose and fructose with our samples. With isocratic elution applied temperature was 90 °C, water as a mobile phase and column Nucleogel Sugar Ca, refractometric detection was applied.

The obtained results showed that concentrations of gucose, fructose and saccharose vary in the range 3,149-38,405 g/100 mL, 1,931-30,851 g/100 mL and 0,670-6,072 g/100 mL, respectively. Concerntrations of glucose and fructose do not exhibit significant variations in juices however, they are ten times higher in syrups. In all samples, juices and syrups, concentrations of saccharose do not differ significantly, except for one syrup sample where much lower content could be explained with possible enzymatic decomposition.

Key words: fruit juices, fructose, glucose, saccharose, HPLC, food control.