

RENATA RYBICKA

## WALIDACJA ENZYMATYCZNEJ METODY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI CUKRÓW W NAPOJACH BEZALKOHOLOWYCH, NIEGAZOWANYCH

### Streszczenie

Zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2000 [13], przed wprowadzeniem nowej metody do badań, laboratorium powinno potwierdzić, że jest w stanie prawidłowo ją realizować. Analizie poddano metodę enzymatyczną oznaczania zawartości cukrów w napojach stosując test enzymatyczny firmy Boehringer Mannheim.

W pracy sprawdzono metodykę oznaczania zawartości D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy w napoju bezalkoholowym, niegazowanym w oparciu o standardy dostępne w teście oraz przeprowadzono ocenę statystyczną metody. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że powyższa metoda nadaje się do zastosowania w warunkach laboratorium.

**Słowa kluczowe:** cukry, napoje, enzymatyczna metoda oznaczania cukrów, walidacja metody.

### Wstęp

W ostatnich latach wzrasta produkcja soków i napojów owocowych w kraju, dlatego istnieje potrzeba wzmoczonej kontroli jakości wyżej wymienionych produktów. Jednym z ważniejszych kryteriów przy ocenie napojów jest zawartość w nich cukrów, a zwłaszcza glukozy i fruktozy.

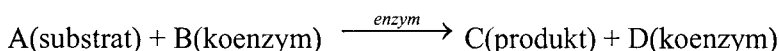
Wg normy PN-90/A-75101/07 [12], zawartość cukrów w sokach i napojach oznacza się metodą Lane-Eynona. Metoda ta oparta jest na redukcji soli miedzi przez cukry redukujące, tzn. cukry zawierające wolne grupy karbonylowe [1, 5]. Metoda ta nie jest specyficzna do oznaczania cukrów, co znaczy, że uzyskane wyniki nie są

związane wyłącznie z obecnością w roztworze cukrów redukujących, ale stanowią o ogólnej zdolności redukcyjnej badanego roztworu.

Od blisko 20 lat, w analizie węglowodanów coraz popularniejsze stają się metody enzymatyczne, w których wykorzystuje się katalityczną aktywność określonych enzymów. W ostatnich latach zaczynają one odgrywać coraz większą rolę w rutynowej kontroli jakości surowców i produktów spożywczych [4].

Najczęściej wykorzystywaną podstawą enzymatycznych metod ilościowego oznaczania substancji jest test optyczny odkryty przez O. Warburga w 1935 r., polegający na fotometrycznym pomiarze stężenia koenzymów pirydynowych przenoszących wodór NAD, NADH, NADP, NADPH.

Ogólny mechanizm reakcji przedstawić można w następujący sposób:



W przedstawionym mechanizmie w stosunkowo prosty sposób przy użyciu fotometru można oznaczyć stężenie utlenionej lub zredukowanej formy koenzymu [4].

Rozwinięciem metod enzymatycznych jest zastosowanie biosensorów. Jednym z typów biosensorów są elektrody enzymatyczne reagujące na obecność specyficznej substancji chemicznej i dające sygnał elektryczny proporcjonalny do stężenia tej substancji. W wyniku reakcji enzymatycznej zmiany stężenia jonów, pH, emisji światła itp. mogą zostać przetworzone w sygnał elektroniczny przy zastosowaniu potencjometrii, amperometrii, termistorów, tranzystorów efektu pola (FET) itp. W elektrodach enzymatycznych, służących do analiz zawartości cukrów, stosuje się różne rozwiązania polegające na unieruchomieniu enzymu za pomocą reakcji immunologicznych, zewnętrznym buforowaniu układu, kowalencyjnym unieruchamianiu enzymu na błonie kolagenowej elektrody gazowej, fizycznej adsorpcji enzymu bezpośrednio na elektrodzie amperometrycznej [14].

Największą zaletą metod enzymatycznych, której nie mają inne metody, jest wysoka specyficzność, pozwalająca na analizowanie kompleksowych mieszanin bez wstępnego rozdzielania oraz wykrywanie i oznaczanie bardzo niskich stężeń różnych substancji [1, 4, 6, 8, 14].

Norma PN-EN 1140: 1999: Soki owocowe i warzywno. Oznaczanie enzymatyczne zawartości D-glukozy i D-fruktozy. Metoda spektrometryczna z NADPH [11] – opisuje metodę oznaczania zawartości tych dwóch cukrów w sokach owocowych, sokach zagęszczonych i w proszku oraz w nektarach. W laboratorium rozszerzono tę metodę o oznaczanie zawartości cukrów w napojach.

Celem pracy było przeprowadzenie walidacji enzymatycznej metody oznaczania zawartości cukrów, zastosowanej do analizy napojów bezalkoholowych i niegazowa-

nych, a w konsekwencji potwierdzenie kompetencji laboratorium [13] do jej przeprowadzania.

### **Materiał i metody badań**

Ze względu na to, że norma [11] dopuszcza stosowanie dostępnego w handlu uniwersalnego zestawu do testów, w analizie zawartości cukrów w napojach wykorzystano test enzymatyczny firmy Boehringer Mannheim. Test ten, w porównaniu z normą odnoszącą się do soków, umożliwia również oznaczanie zawartości sacharozy.

#### *Materiały*

Analizie poddano napój bezalkoholowy, niegazowany, pomarańczowy należący wg normy PN-94/A-79034 [10] do grupy C-2. Grupa ta obejmuje napoje zawierające naturalne lub identyczne z naturalnymi składniki smakowo-aromatyczne i barwniki, produkowane na bazie wody pitnej, z sokami owocowymi zagęszczonymi, emulgowanymi i liofilizowanymi.

Do oznaczeń stężenia sacharozy, glukozy i fruktozy w napoju zastosowano test enzymatyczny Sucrose/D-Glucose/D-Fructose Cat. No. 716260 firmy Boehringer Mannheim.

Wykorzystano standard D-glukozy i sacharozy dostępny w teście.

#### *Aparatura*

- Spektrofotometr Unicam UV/VIS 8625, rok prod. 1991.
- Kuwety szklane z 10mm długością drogi optycznej światła.
- Pipety automatyczne poj. 20  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l, 0,2–2 ml.

#### *Wykonanie oznaczenia*

Oznaczenia wykonano zgodnie z metodyką ustaloną przez producenta i załączoną do testu [7]. Do badań użyto próbę rozcieńczoną objętościowo 100 razy, bez uprzedniego odbiałczenia. Schemat postępowania zamieszczono w tab. 1.

#### *Zasada metody*

Podstawą tej metody są specyficzne reakcje substratu katalizowane przez enzym i prowadzące do powstania produktu, którego stężenie daje się zmierzyć spektrofotometrycznie.

Ogólnie zasada metody polega na tym, że D-glukoza i D-fruktoza ulegają fosforylacji podczas enzymatycznie katalizowanej reakcji z udziałem heksokinazy (HK) i ATP, a ilość utworzonego NADPH odpowiadająca ilości D-glukozy i/lub D-fruktozy, mierzona jest spektrometrycznie [1, 6, 8, 9, 11].

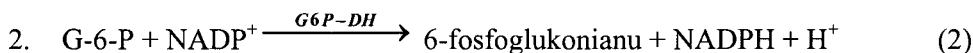
W teście tym stężenie D-glukozy oznaczane jest przed oraz po enzymatycznej hydrolizie sacharozy. D-fruktoza oznaczana jest po oznaczeniu D-glukozy.

#### Oznaczenie D-glukozy przed inwersją

Przy pH 7,6 enzym heksokinaza katalizuje fosforylowanie D-glukozy przez ATP przy jednoczesnym powstaniu ADP (1).



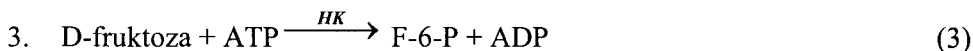
W obecności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej glukozo-6-fosforan jest specyficznie utleniany przez NADP do 6-fosfoglukonianu przy powstawaniu zredukowanego NADPH (2).



NADPH powstały w wyniku tej reakcji jest stechiometryczny do ilości D-glukozy i jest mierzony metodą absorpcji światła przy 340 nm.

#### Oznaczenie D-fruktozy

Heksokinaza katalizuje również fosforylowanie D-fruktozy do fruktozo-6-fosforanu przy udziale ATP (3).



Po zakończeniu reakcji (3) fruktozo-6-fosforan zmienia się pod wpływem izomerazy fosfoglukozy w glukozo-6-fosforan (4).



Glukozo-6-fosforan ponownie reaguje z NADP tworząc 6-fosfoglukonian i NADPH (2). Ilość powstałego teraz NADPH jest stechiometryczna do ilości D-fruktozy.

#### Inwersja enzymatyczna

Przy pH 4,6 sacharoza jest hydrolizowana enzymem  $\beta$ -fruktozydazą (inwertazą) do D-glukozy i D-fruktozy (5).

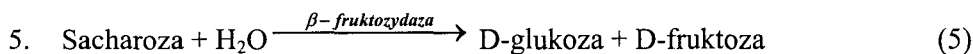


Tabela 1

Schemat postępowania przy oznaczaniu cukrów metodą enzymatyczną / Procedure.

Odmierzyć pipetą do kuwet Pipette into cu- vettes	Próba zerowa sacharozy Blank sucrose sample	Próba sacharozy Sucrose sample	Próba zerowa D-glukozy D-fruktozy Blank D-glucose D-fructose sample	Próba D-glukozy D-fruktozy D-glucose D-fructose sample
$\beta$ -fruktozydaza butelka (1) solution 1	0,200 ml	0,200 ml	----	----
Roztwór próbki Sample solution	----	0,100 ml	----	0,100 ml
Wymieszać, inkubować przez 15 min w temp. 20-25°C/ Mix, incubate for 15 min at 20-25°C				
Dodać:/ Addition of:				
NADP, ATP butelka (2) solution 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Woda redestyl. Redest. water	1,800 ml	1,700 ml	2,000 ml	1,900 ml
Wymieszać, odczytać wartości absorbancji roztworów po około 3 min ( $A_1$ )/ Mix, read absorbances of the solutions after approx. 3 min ( $A_1$ )				
Rozpocząć reakcję dodając:/ Start reaction by addition of:				
butelka (3)/ suspension 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Wymieszać, odczekać do końca reakcji (około 10 – 15 min) i odczytać wartość absorbancji roztworów ( $A_2$ )/ Mix, wait for completion of the reaction (approx. 10-15 min) and read absorbances of the solutions ( $A_2$ )				
Dodać:/ Addition of:				
butelka (4)/ suspension 4	---	---	0,020 ml	0,020 ml
Wymieszać, odczytać wartość absorbancji roztworów po 10 – 15 min ( $A_3$ )/ Mix, read absorbances of the solutions after 10-15 min ( $A_3$ )				

Objaśnienia / Notes:

- butelka (3) -zawiesina heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej  
suspension 3 – hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase suspension  
butelka (4) -zawiesina izomerazy fosfoglukozowej  
suspension 4 – phosphoglucose isomerase suspension

Oznaczenie D-glukozy po inwersji (całkowitej D-glukozy) dokonuje się zgodnie z zasadą opisaną powyżej.

Zawartość sacharozy oblicza się na podstawie różnicy stężenia D-glukozy przed i po inwersji enzymatycznej.

Symbole:

HK	heksokinaza (EC 2.7.1.1.)
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan
ADP	Adenozyno-5'-difosforan
NADP	Fosforan dinukleotydu $\beta$ -nikotynoamido-adeninowego
NADPH	Fosforan dinukleotydu $\beta$ -nikotynoamido-adeninowego
G6P-DH	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (EC 1.1.1.49.)
G-6-P	Glukozy-6-fosforan
F-6-P	Fruktozy-6-fosforan
PGI	izomeraza fosfoglukozy (EC 5.3.1.9.)
$\beta$ -fruktozydaza	= $\beta$ -D-fruktofuranozydaza (EC 3.2.1.26.)

### Obliczenia

Obliczanie stężenia substancji w rozcieńczonym roztworze na podstawie pomiarów absorbancji oparto na prawie Beera-Lamberta.

$$c = \frac{V_1 \cdot MW \cdot F}{\varepsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot 1000} \cdot \Delta A \quad [g/l]$$

$V_1$	– objętość końcowa [ml]
$V_2$	– objętość próby [ml]
MW	– masa cząsteczkowa oznaczanej substancji [g/mol]
d	– długość drogi optycznej kuwety [cm]
F	– rozcieńczenie próby
$\varepsilon$	– współcz. ekstynkcji NADPH: przy 340 nm $\varepsilon = 6,3 [l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}]$
$\Delta A$	– różnica absorbancji

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{próba badana}} - (A_2 - A_1)_{\text{próba ślepa}}$$

$$\Delta A_{\text{glukozy}} = (A_2 - A_1)_{\text{próba badana}} - (A_2 - A_1)_{\text{próba ślepa}}$$

$$\Delta A_{\text{fruktozy}} = (A_3 - A_2)_{\text{próba badana}} - (A_3 - A_2)_{\text{próba ślepa}}$$

$$\Delta A_{\text{sacharozy}} = \Delta A_{\text{całk.D-glukozy (po inwersji)}} - \Delta A_{\text{D-glukozy (przed inwersją)}}$$

### Wyniki i dyskusja

W poniższej pracy sprawdzono metodę oznaczania cukrów w oparciu o standardy dostarczone w teście. Metodę analizy enzymatycznej poddano również statystycznej ocenie na podstawie wyników oznaczeń przykładowego napoju.

## Sprawdzenie metodyki w oparciu o standardy

## a) standard sacharozy

Do sporządzenia roztworu standardowego sacharozy o stężeniu 1,600 g/l użyto sacharozy dostarczonej w teście. Oznaczenie wykonano w 6 powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Parametry statystyczne odnoszące się do standardu sacharozy.

Statistical parameters for sucrose standard.

Naważka sacharozy Weighed amount of sucrose	$c$ [g/l]	1,600					
Numer próbki Number of sample		1	2	3	4	5	6
Stężenie sacharozy Concentration of sucrose	[g/l]	1,605	1,611	1,616	1,618	1,620	1,621
Średnie stężenie sacharozy Mean concentration of sucrose	$\bar{c}$ [g/l]	1,615					
Odchylenie standardowe The standard deviation	$S_c$ [g/l]	0,006					
Odchylenie stand. wydajności $S_W = \frac{S_c}{c}$ [g/100g] The standard yield deviation		0,37					
Średnia wydajność $\bar{W} = \frac{\bar{c} \times 100}{c}$ [g/100g] Mean yield		100,94					
Odchylenie średniej wydajności od wydajności teoretycznej $\Delta W =  100 - \bar{W} $ [g/100g] Deviation of the mean yield from the theoretical yield		0,94					

Według metodyki oznaczania firmy Boehringer Mannheim, odchylenie standardowe wydajności  $S_W$  powinno być nie większe niż 0,79 g/100 g. W pracy uzyskano wynik  $S_W = 0,37$  g/100 g, co świadczy o dobrej dokładności.

Według danych z testu wynika, że jeżeli odchylenie średniej wydajności od wydajności teoretycznej (100 g/100 g) zawiera się w przedziale od 0,42 do 1,42 g/100g to znaczy, że występują oczywiste błędy systemowe. W tym oznaczeniu odchylenie śred-

niej wydajności od wydajności teoretycznej wynosi  $\Delta W = 0,94 \text{ g}/100 \text{ g}$ , więc należy się pogodzić z tymi błędami, ponieważ wynikają one z właściwości technicznych większości stosowanych obecnie fotometrów.

### b) standard D-glukozy

Jako standard wewnętrzny wykorzystano roztwór D-glukozy o stężeniu  $0,500 \text{ g/l}$  dostarczony z testem.

Oznaczono absorbancję próby napoju w 5 powtórzeniach, standardu i próbki fortyfikowanej (1/2 próbki + 1/2 standardu) i wyniki przestawiono w tab. 3.

Tabela 3

Różnice absorbancji badanych prób.

The absorbance differences of tested samples.

Różnica absorbancji The absorbance difference	Średnia z 5 oznaczeń Mean of 5 results	Standard	Standard	Próba fortyfikowana Fortification of sample	Próba fortyfikowana Fortification of sample
$\Delta A$	0,421	0,584	0,584	0,498	0,506
Śr. $\Delta A$	0,421	0,584		0,502	

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono odzysk z równania:

$$\text{Odzysk} = (2 \cdot \Delta A_{\text{pr+stand}} - \Delta A_{\text{pr}}) \cdot (\Delta A_{\text{stand}})^{-1} \cdot 100, [\%],$$

gdzie:

$\Delta A_{\text{pr}}$  – różnica absorbancji próby,

$\Delta A_{\text{pr+stand}}$  – różnica absorbancji próby fortyfikowanej,

$\Delta A_{\text{stand}}$  – różnica absorbancji standardu.

Otrzymano odzysk D-glukozy na poziomie 99,83%.

### Ocena statystyczna metody

Analizie poddano bezalkoholowy napój niegazowany, pomarańczowy. Wykonano badania w 7 powtórzeniach w zakresie oznaczania stężenia sacharozy, D-glukozy i D-fruktozy (tab. 4).

Na podstawie otrzymanych wyników obliczono średnią  $\bar{x}$ , rozstęp R, odchylenie poszczególnych wyników od średniej d, odchylenie standardowe s, względne odchylenie standardowe  $s_r$ , odchylenie standardowe średniej  $s_{\bar{x}}$ , przedział ufności  $\mu$  oraz względną szerokość przedziału ufności  $\tau$ .



Tabela 4

Statystyczna ocena wyników oznaczania zawartości sacharozy, glukozy i fruktozy w napoju.

Statistical estimation of determination results of the sucrose, glucose and fructose concentration in the tested soft drink sample.

Charakterystyczne wielkości Characteristical parameters	Dane liczbowe								
	Sacharoza Sucrose			D-glukoza D-glucose			D-fruktoza D-fructose		
$x_i$ [g/l]	28,70	28,70	28,34	36,79	36,70	36,62	37,21	36,95	36,77
	28,18	28,18	28,04	36,53	36,44	36,18	36,77	36,51	36,34
	27,85	-	-	36,10	-	-	36,25	-	-
$\bar{x}$	28,28			36,48			36,69		
$R = x_n - x_1$	0,09			0,07			0,10		
$d = x_i - \bar{x}$	0,42	0,42	0,06	0,31	0,22	0,14	0,52	0,26	0,08
	-0,10	-0,10	-0,24	0,05	-0,04	-0,30	0,08	-0,18	-0,35
	-0,43	-	-	-0,38	-	-	-0,44	-	-
$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	0,32			0,26			0,34		
$s_r = \frac{s}{x}$	0,011			0,007			0,009		
$s_r = \frac{s}{x} 100 (\%)$	1,1			0,7			0,9		
$s_x^- = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$	0,12			0,10			0,13		
$\mu = \bar{x} \pm t_{0,95} s_x^-$	28,28+/-0,297			36,48+/-0,240			36,69+/-0,316		
$\tau = \frac{2ts_x^-}{x} 100 \%$	2,10			1,31			1,72		

Obliczając przedział ufności skorzystano z rozkładu Studenta dotyczący małej liczby wyników, gdzie:

$$\mu = \bar{x} \pm ts_x^-$$

t-współczynnik, którego wartość przy poziomie ufności 0,95 i 7 pomiarach wynosi  $t = 2,447$ .

Przedział ufności  $\mu$  reprezentuje przedział, w którym z dużym prawdopodobieństwem znajduje się wartość prawdziwa, o ile nie pojawiają się błędy inne niż przypadkowe.

Obliczone odchylenia standardowe w przypadku sacharozy, glukozy i fruktozy wynoszą odpowiednio: 0,32, 0,26, 0,34 g/l, co świadczy o małym rozrzucie wyników [2, 3].

## Wnioski

1. Dobra dokładność wynikająca z odchylenia standardowego wydajności standardu sacharozy wynoszącego 0,37 g/100 g standardu sacharozy i odchylenie średniej wydajności od wydajności teoretycznej na poziomie 0,94 g/100 g umożliwiają wykorzystanie testu enzymatycznego do oznaczania zawartości cukrów w napojach bezalkoholowych, niegazowanych, w warunkach laboratorium.
2. Statystyczne wyniki badań dowodzą, że enzymatyczną metodę oznaczania zawartości cukrów w napojach można uznać za dobrą. O wysokiej precyzji metody świadczą wartości odchylenia standardowego glukozy i fruktozy, które wynoszą odpowiednio 0,26 i 0,34 g/l.
3. Przed ostatecznym wprowadzeniem metody do rutynowego oznaczania, należy przeprowadzić szersze badania obejmujące między innymi odtwarzalność.

## Literatura

- [1] Analysis of food carbohydrate - pod red. G.G. Birch. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York 1985.
- [2] Cygański A.: Chemiczne metody analizy ilościowej, WNT, Warszawa 1994.
- [3] Dobecki M.: Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Poradnik dla laboratoriów Państwowej Inspekcji Sanitarnej, Oficyna Wydawnicza Instytutu Medycyny Pracy, Łódź 1997.
- [4] Horubała A.: Zastosowanie metod enzymatycznych w kontroli jakości żywności. Przem. Ferm. Owoc-Warz., 1994, **38 (9)**, 1.
- [5] Ładoński Z, Gospodarek T.: Podstawowe metody analityczne produktów żywnościowych. PWN, Warszawa 1986.
- [6] Methods of Enzymatic Analysis, 3<sup>rd</sup> ed., vol. 6, pp. 163-172.
- [7] Methods of Enzymatic BioAnalysis and Food Analysis. Using Test – Combinations. UV method for the determination of sucrose, D-glucose and D-fructose in foodstuffs and other materials. Boehringer Mannheim Biochemica, 1997, p. 142.
- [8] Methods in plant biochemistry, Carbohydrates, vol. 2, - pod red. P. M. Dey, Academic Press.
- [9] Official Methods of Analysis of the Association of AOAC International (1995), 16<sup>th</sup> ed., vol. 2, (985.09).
- [10] PN-94/A-79034: Napoje bezalkoholowe niegazowane.
- [11] PN-EN 1140 : 1999: Soki owocowe i warzywne - Oznaczanie enzymatyczne zawartości D-glukozy i D-fruktozy - Metoda spektrometryczna z NADPH.

- [12] PN-90/A-75101/07: Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości cukrów i ekstraktu bezcukrowego.
- [13] PN-EN ISO/IEC 17025: 2000: Wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- [14] Tyszkiewicz I.: Aktualny stan metod badawczych w żywności w dziedzinie metod enzymatycznych. Postęp w analizie żywności - pod red. S. Tyszkiewicza, Warszawa 1990.

### INTRODUCTORY RESEARCH ON USING ENZYMATIC TEST FOR SUCROSE, D-GLUCOSE AND D-FRUCTOSE DETERMINATION IN SOFT DRINKS

#### S u m m a r y

According to the Standard PN-EN ISO/IEC 17025:2000, the laboratory shall confirm that it can properly operate methods before introducing the tests.

Enzymatic test, the product of Boehringer Mannheim Co., for determination of sugars in soft drinks was analysed. During the analyses of the method of determination of sugars according to the test standard was tested and statistical analyses were realized. The results of the test show, that the proposed method is suitable for the laboratory environment.

**Key words:** sugars, soft drinks, enzymatic method for sugars determination, introductory research. ☒