



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS



Estabilidade térmica de glicose e outras aldoses de açúcar em cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1118 (2006) 281–284

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Short communication

Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography

Rune Slimestad^{a,*}, Ingunn M. Vågen^b

^a PlantChem, Saerheim Research Centre, N-4353 Klepp station, Norway

^b The Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research, Bioforsk Øst Landvik, Reddalsveien 215, N-4886 Grimstad, Norway

Received 10 March 2006; received in revised form 26 April 2006; accepted 28 April 2006

APRESENTAÇÃO DA DISCIPLINA DE BIOQUÍMICA ANIMAL

MESTRANDA: NATHALIA RUBIO ECKERMANN.

PROFESSORA: DRª CARLA MARIS MACHADO BITTAR.

Introdução

- ▶ Análise de açúcares é comumente realizada.
- ▶ HPLC é um dos métodos mais utilizados.
- ▶ ↓ Tempo de retenção ➡ ↑ Fluxo de taxa.
- ▶ Viscosidade do solvente ➡ ↑ Temperatura
- ▶ Carboidratos são modificados com temperatura e pressão elevadas.

Introdução

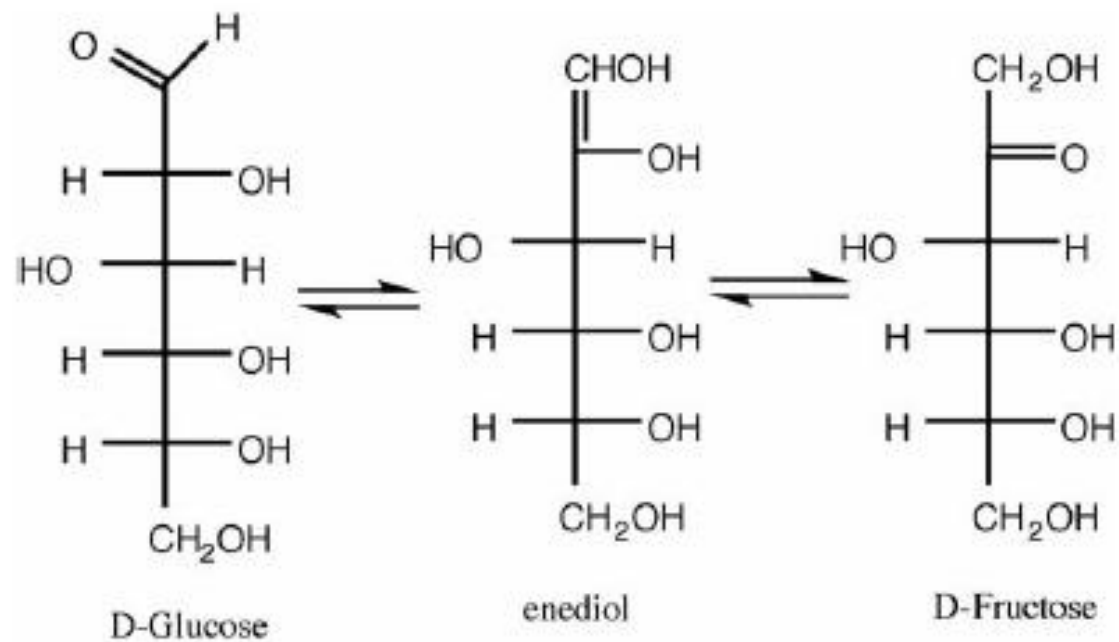
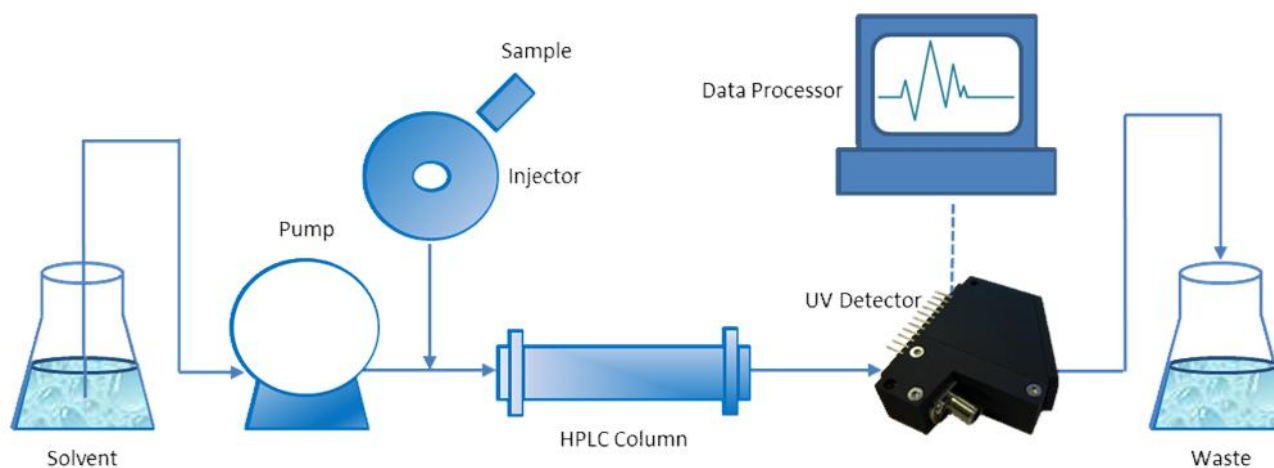


Fig. 1. Keto-enol tautomeric transformations which is a start reaction in the decomposition of glucose.

Introdução

HPLC:

- ▶ Cromatografia líquida de alta eficiência.
- ▶ Separação de compostos químicos em solução.
- ▶ Identifica e quantifica os componentes.



Introdução

Objetivo:

- ▶ Verificar o impacto da temperatura da coluna HPLC na detecção de glicose e outras aldoses de açúcar em HPLC de fase normal.

Material e métodos

- ▶ D-glicose
- ▶ D-galactose
- ▶ D-xilose
- ▶ D-frutose
- ▶ L-ramnose
- ▶ sacarose

Material e métodos

▶ Solução 1:

- ▶ fru 0,40mg/ml
- ▶ glc
- ▶ sucr

▶ Solução 2:

- ▶ rha 0,40mg/ml
- ▶ xil
- ▶ gal

▶ Solução ≠ concent.:

- ▶ fru
- ▶ glc
- ▶ sucr

- ▶ Coluna Prevail Carbohydrate.
- ▶ Temperatura do tubo 65°C.
- ▶ Temp. do forno entre 15°C a 70°C nos experimentos.
- ▶ Solvente acetonitrilo e adição linear de água:
 - ▶ 0-10 min: 25-36%
 - ▶ 10-11 min: 36-25%
 - ▶ 11-13 min: 25%
- ▶ Taxa de fluxo: 1,0 ml/min.

Material e métodos

▶ Solução 1:

- ▶ fru 0,40mg/ml
- ▶ glc
- ▶ sucr

- ▶ Coluna Kromasil NH2.
- ▶ Solvente acetonitrilo e adição linear de água:
 - ▶ 0-14 min: 10-35%
 - ▶ 14-16 min: 35-10%
 - ▶ 16-18 min: 10%
- ▶ Taxa de fluxo: 0,8 ml/min.
- ▶ Coluna Kromasil NH2 com ausência de água:
 - ▶ 0-2 min: 0%
 - ▶ 2-14 min: 0-35%
 - ▶ 14-16 min: 0%
- ▶ Taxa de fluxo: 1,0 ml/min.

Resultados e Discussão

9

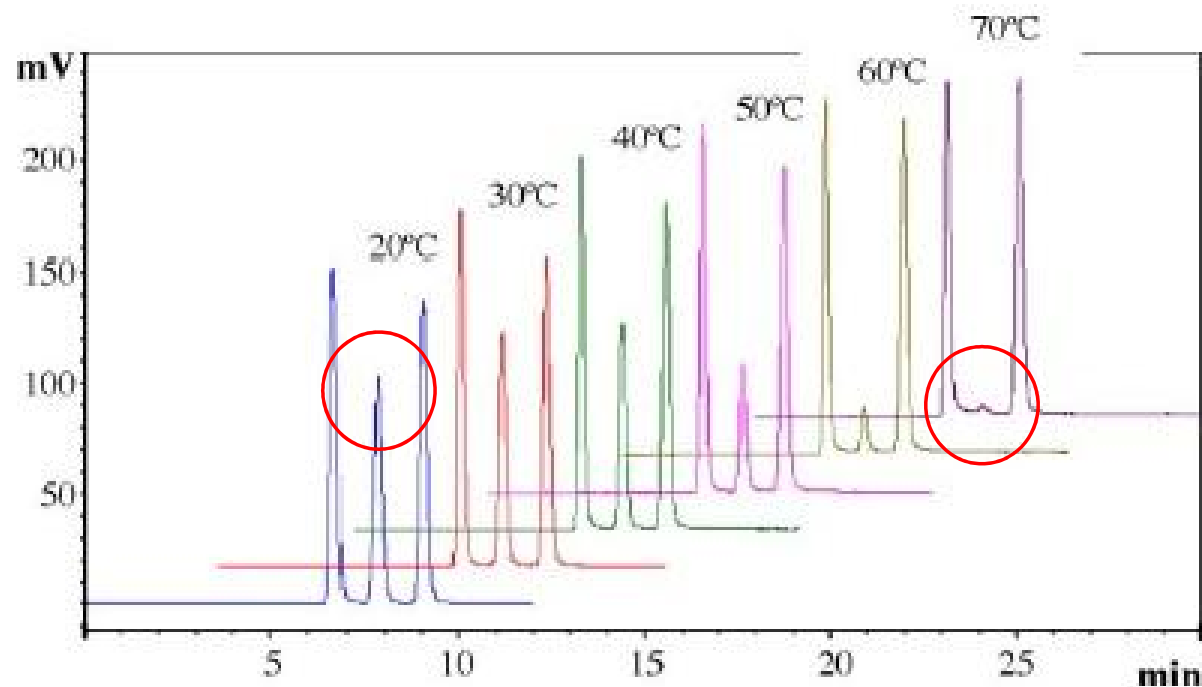


Fig. 2. HPLC chromatograms of fructose, glucose and sucrose, respectively (each 55.6 µg) at different column temperatures. The peak corresponding to glucose gradually disappears with increasing temperature according to the equation: $\text{area} = (1.831 - 0.032 \times \text{temp}) / (1 - 0.013 \times \text{temp})$ ($R^2 = 0.996$). The chromatograms were developed on a Prevail Carbohydrate column (Alltech).

- ▶ 70°C ↓ 98%
- ▶ Coluna Prevail Carbohydrate.
 - ▶ 4 a 50C.

Resultados e Discussão

10

Table 1

Retention and detection of common sugars (4 μ g each) by HPLC-ELSD at different temperatures on a Prevail Carbohydrate ES column

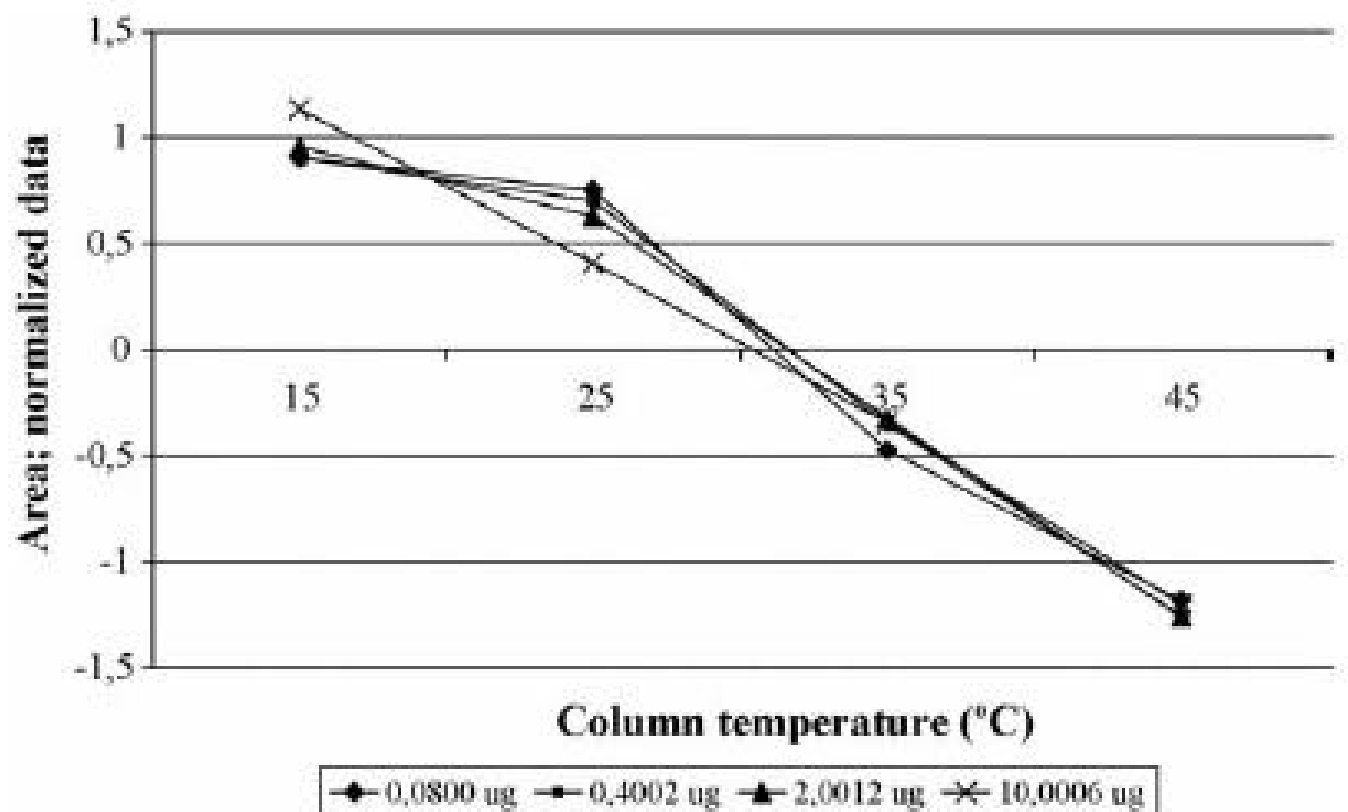
	Glc ^a	Gal	Rha	Xyl	Fru ^a	Sucr ^a
<i>t_R</i> (min)						
15 °C	7.82	7.79	5.47	6.38	6.74	9.01
25 °C	7.56	7.41	5.19	6.10	6.45	8.79
35 °C	7.12	6.98	4.90	5.80	6.04	8.28
45 °C	6.71	6.53	4.66	5.49	5.68	7.80
Area (mV s)						
15 °C	174	117	147	141	190	190
25 °C	176	65	116	95	209	204
35 °C	115	21	72	41	169	167
45 °C	73	3	26	8	166	170
S/N (ASTM)						
15 °C	142	102	198	145	161	175
25 °C	169	65	171	119	253	198
35 °C	112	18	122	62	166	137
45 °C	53	1	37	10	119	106

^a Mean values, $n = 4$.

- ▶ Glicose: ↓ 41% de 25°C para 45°C.
- ▶ Ligeira redução para frutose e sacarose.
- ▶ Limite de detecção.

Resultados e Discussão

11



► Quedas semelhantes de detecção.

Fig. 3. Function of mass load (glucose) and column temperature on chromatogram peak area.

Resultados e Discussão

12

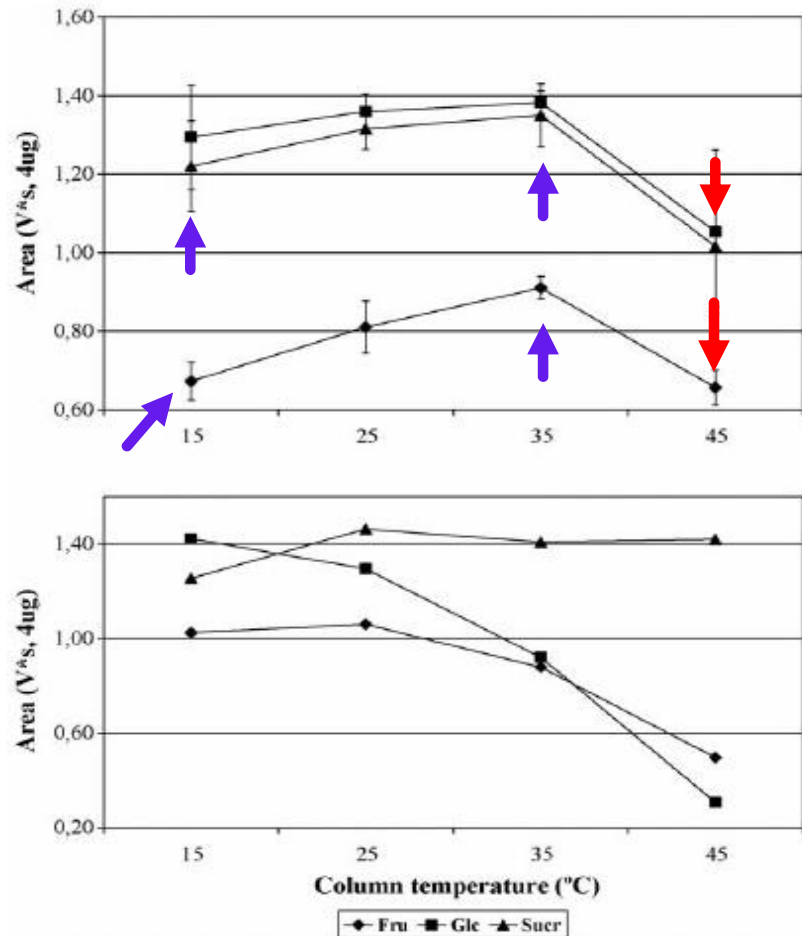


Fig. 4. Upper: detection vs. column temperature by separation of fructose, glucose and sucrose (4 µg each) on a Kromasil NH₂-column (n=4). Lower: similar analysis but with absence of water as initial part of the method (see Section 2).

- ▶ Pequeno aumento de 15°C para 35°C.
- ▶ Pequena queda aos 45°C.

- ▶ Diminuição para glicose e frutose.
- ▶ Não houve alteração para sacarose.

Água é um importante estabilizador importante para alguns açúcares em condições de temperatura e pressão tipicamente usados em HPLC.

Conclusão

- ▶ Coluna Prevail Carbohydrate: Diminiu a detecção de aldoses com aumento de temperatura, com acetonitrilo e água como solventes.
- ▶ A taxa de decomposição não depende da concentração da amostra.
- ▶ Controle de temperatura é essencial.
- ▶ Literatura: temperatura de 20°C a 30°C, o que abrange o que foi observado.