

# HPLC analiza monosaharida nekih domaćih vrsta drva

## HPLC ANALYSIS OF MONOSACCHARIDES OF SOME HOME GROWN WOOD SPECIES

Prof. dr. Vesna Tišler, dipl. inž.  
Majda Kanop, dipl. inž.  
Biotehniška fakulteta, Ljubljana  
Prof. dr. Vladimir Sertić, dipl. inž.  
Šumarski fakultet, Zagreb

UDK 630\*813

Prispjelo: 18. ožujka 1993.  
Prihvaćeno: 28. svibnja 1993.

Izvorni znanstveni rad

### Sažetak

U radu je istražen kvalitativni i kvantitativni sastav monosaharida pojedinih vrsta listača koje su najrasprostranjenije na našem području.

Cilj istraživanja bilo je nalaženje mogućnosti iskorištenja drvnih otpadaka ispitivanih vrsta listača za proizvodnju šećera.

Analiza monosaharida obavljena je tekućinskom kromatografijom visokog stupnja razdvajanja (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), a otopina monosaharida pripremljena je hidrolitičkom razgradnjom uzoraka drva pomoću sulfatne kiseline.

Istraženi su uzorci drva hrasta, bukve, javora, kestena, brijesta, oraha, jasena, joha i trešnje.

Ključne riječi: monosaharidi, listače, hidroliza, tekućinska kromatografija.

### Summary

The paper presents a qualitative and quantitative analysis of monosaccharides in prevalent home-grown hardwood species.

The aim of this investigation was to determine the possibility of using the wood residue of examined species for a production of sugar.

Oak, chestnut, maple, beech, elm, walnut, cherry, ash and alder wood samples were analysed.

Monosaccharides were identified by HPLC - High Performance Liquid Chromatography. Monosaccharide solution was prepared by hydrolysis with sulphuric acid.

Monosaccharides were quantitatively determined using BIOTRONIC LC 5001 apparatus combined with SHIMADZU C-R6A CHROMATOPAC integrator.

Results of investigation show that glucose and xylose are present in significant amounts in all examined wood samples, whereas galactose, mannose and rhamnose were also identified in all wood samples but in very small amounts.

The obtained results show that the HPLC method applied here is advantageous as compared with the usual gravimetric and volumetric procedures for the analysis of monosaccharides in hardwoods.

Key words: Monosaccharides, hardwoods, hydrolysis, liquid chromatography

## 1. UVOD

### 1. Introduction

Drvni otpaci u drvnoj industriji veliki su problem. Zato traženje rješenja za iskorištenje drvnih otpadaka ima veliku važnost.

Jedna od mogućnosti iskorištenja drvnih otpadaka jest proizvodnja šećera. Osobito se uspješno primjenjuje ksilitol dobiven od ksilana, sastojka drvene tvari.

Ksilani su drvene polioze koje se, uz manane i galaktane, pri hidrolizi razgrađuju na monosaharide glukoze, manoze, galaktoze, ksiloze i arabinoze [3].

Sve češća uporaba lignoceluloznih tvari kao sirovine za kemijske procese dala je velik poticaj nalaženju brze i točne metode analize tih tvari.

Tekućinska kromatografija visokog stupnja razdvajanja (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) počela se primjenjivati najprije u kemijskoj, biokemijskoj i farmaceutskoj analitici, a u posljednje vrijeme postaje sve važnija i u drvnoj industriji.

Analiza monosaharida drva provodi se kromatografijom - primjenom ionskih izmjenjivača s naknadnim odvajanjem u kolonama [2].

## 2. TEORIJA KROMATOGRFSKE ANALIZE

### 2. Theory of Chromatographic Analysis

Kromatografija je proces razdvajanja i skupni je naziv za fizikalno-kemijske postupke razdvajanja komponenata iz smjese ili otopine. Kromatografska je analiza postupak tijekom kojega najprije odjeljujemo pojedine komponente uzorka, a zatim ih detekcijom točno određujemo radi kvantitativne i kvalitativne analize [9].

Sve se kromatografske metode temelje na raspodjeli pojedinih tvari u dvije faze: stacionarnu i mobilnu. Stacionarna faza je kruta (TLC) ili tekuća (HPLC), a mobilna je faza plin (GC) ili tekućina (HPLC).

Kombinacijom mobilnih i stacionarnih faza dobivamo različite tipove kromatografije [1].

Pri tome se zbivaju fizikalne i kemijske interakcije pojedinih komponenata smjese mobilne i stacionarne faze.

Brzina kojom pojedina komponenta putuje kroz kromatografski sustav ovisi o protoku mobilne faze i stupnju zadržavanja komponente na stacionarnoj fazi. Na svom putu kroz kolonu pojedini se sastojak stalno pokreće između mobilne i stacionarne faze. Sastojak u mobilnoj fazi putuje brzinom  $u$ , a u stacionarnoj fazi miruje. Prosječna brzina pojedine komponente izražena je jednadžbom [9]:

$$u = l/tr,$$

u kojoj je:

$u$  - brzina kretanja

$l$  - dužina kolone

$tr$  - vrijeme zadržavanja komponente.

Vrijeme zadržavanja pojedine komponente može se podijeliti na vrijeme u mobilnoj fazi i na vrijeme u stacionarnoj fazi.

Vrijeme zadržavanja pojedine komponente karakteristična je vrijednost pomoću koje, pri konstantnom protoku, obavljamo identifikaciju [9].

### 2.1. Tekućinska kromatografija visokog stupnja odvajanja

#### 2.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Tekućinska kromatografija visokog stupnja odvajanja ima široko područje primjene, uz ostalo i u laboratorijima drvne industrije.

Prednosti HPLC-metode su velike. To su:

- selektivnost
- reproducibilnost
- pouzdanost
- brzina
- jednostavna priprema uzorka
- mogućnost automatizacije cijele analize.

Ograničnost u primjeni čini:

- nužnost primjene standarda

- slabija osjetljivost detektora

- manja selektivnost kolona [7].

S razvojem odgovarajućih detektora, kolona i materijala tekućinska je kromatografija postala vrlo usavršena.

Izbor stacionarne faze, mobilne faze i detektora određuje priroda analizirane tvari. U ovom radu to su monosaharidi. Za određivanje monosaharida najčešće se upotrebljava stacionarna faza na osnovi alkalnih ionsko-izmjenjivih smola koje su vrlo djelotvorne u razdvajanju složene smjese ugljikohidrata. To su poliesterski polimeri veličine pora 10 - 16  $\mu\text{m}$  [4].

Kao mobilna faza upotrebljavaju se različiti boratni puferi pH-vrijednosti između 8,5 i 9,5 te molarnosti 0,15 - 1,26 [6].

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Izbor uzoraka

##### 3.1. Selection of samples

U radu su istraženi monosaharidi pojedinih vrsta listača, najrasprostranjenijih na našem području.

Pri preradi nekih vrsta ostaju veće količine otpadaka koje je moguće kemijski preraditi pa je zato zanimljivo istražiti njihov sastav.

Istraživani su uzorci hrasta, bukve, javora, kestena, brijesta, oraha, jasena, johe i trešnje. Metodom HPLC ispitan je kvalitativni i kvantitativni sadržaj monosaharida pojedinih drvnih vrsta.

#### 3.2. Predhidroliza i hidroliza

##### 3.2. Primary and secondary hydrolysis

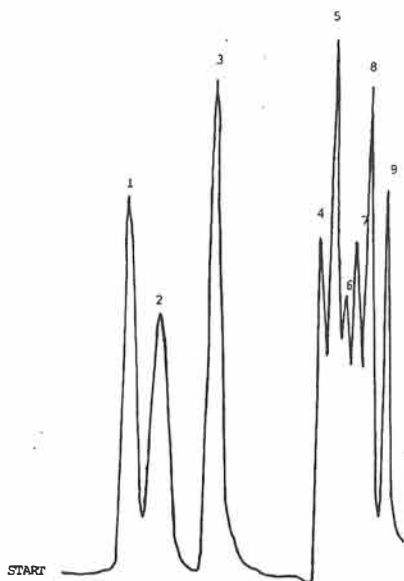
Hidroliza je nužan proces pri saharifikaciji drva, a razumijeva razgradnju svih disaharida, oligosaharida i polisaharida u kiselom mediju.

Reakcija hidrolize provodi se pri povišenoj temperaturi i tlaku u dva stupnja: kao predhidroliza i hidroliza, pri čemu se postiže maksimalno iskorištenje [3].

Postupak predhidrolize i hidrolize uzoraka

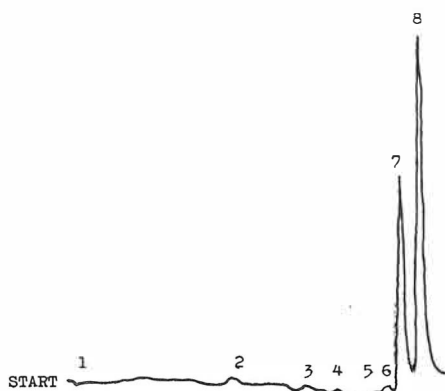
U epruvete se odvagne po 200 mg usitnjenoga i apsolutno suhog uzorka te prelije sa 2 ml 72 %-tne  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Epruvete s uzorcima ostave se u vodenoj kupelji jedan sat pri temperaturi od 30°C. Za to se vrijeme uzorci jedanput promućkaju radi jednoličnog djelovanja sulfatne kiseline.

Nakon provedene predhidrolize u epruvete se doda po 6 ml destilirane vode i smjesa se zatim sa 50 ml destilirane vode prenese u tikvicu od 100 ml. Pokrivene tikvice stave se u autoklav na 120°C i ostave 40 minuta radi odvijanja procesa hidrolize. Poslije hlađenja tikvice se dopune destiliranom vodom do znaka, sadržaj protrese i filtrira pomoću filter- lončića G 3. Filtrat se razrijedi destiliranom vodom u omjeru 1:3 tako da ukupni volumen bude 1000 ml. Tako pripremljeni



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	11.358	2487676			13.5966	Cellobiose
2	16.678	2443046	V		13.3526	Maltose
3	28.717	3546240			19.3822	L(+)-Rhamnose
4	45.967	1388589			7.5894	D(+)-Mannose
5	48.185	2618459	V		14.3114	D(-)-Fructose
6	50.328	1102982	V		6.0284	L(+)-Arabinose
7	52.357	1581315			8.6428	D(+)-Galactose
8	54.668	1923274			10.5118	D(+)-Xylose
9	57.633	1204779	V		6.5848	D(+)-Glucose
TOTAL		18296360			100	

Slika 1. Kromatogram smjese standarda  
Fig. 1 - Chromatogram of the mixture of standards



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.463	5247			0.3028	
2	26.408	27923			1.6113	L(+)-Rhamnose
3	38.362	17965			1.0366	D(+)-Ribose
4	43.59	20718			1.1955	D(+)-Mannose
5	49.887	14323			0.8265	L(+)-Arabinose
6	51.815	25272	V		1.4583	(D(+)-Galactose
7	54.287	592666			34.1994	D(+)-Xylose
8	57.478	1028858	V		59.3696	D(+)-Glucose
TOTAL		1732972			100	

Slika 2. Kromatogram monosaharida iz drva joha  
Fig. 2 - Chromatogram of monosaccharides from alder wood

uzorci filtriraju se pomoću filtera, a zatim se 15 minuta otplinjavaju ultrazvukom.

Dobiveni talozi u filter-lončićima isperu se destiliranom vodom, osuše na 100°C i izvažu. Mase taloga poslije hidrolize uzoraka iznosile su 40 do 56% početne mase apsolutno suhih uzoraka.

### 3.3. Tekućinski kromatogrami

#### 3.3. Liquid chromatograms

Kvantitativno određivanje monosaharida provedeno je aparatom BIOTRONIC LC 5001. Preko programatora unese se program provedbe analize u sedam stupnjeva u trajanju 96 minuta.

Standardna otopina smjese šećera pripremljena je otapanjem 8 monosaharida i 2 disaharida: D(-)-fruktoze, L(+)-arabinoze, D(+)-glukoze, D(+)-galaktoze, D(+)-manoze, L(+)-ramnoze, D(+)-riboze, D(+)-ksiloze, celobioze i maltoze.

Na slici 1. prikazan je kromatogram smjese standarda s podacima o vremenima zadržavanja, površini i odgovarajućim koncentracijama standarda dobivenim pomoću intergratora SHIMADZU C-R6A CHROMATOPAC. Na temelju kromatograma standarda identificirani su kromatogrami uzoraka drvnih vrsta listača i određen udio pojedinih monosaharida u drvnj tvari.

Na primjeru kromatograma za joha (sl. 2) vidljivo je da se u drvnj tvari nalaze manje količine monosaharida ramnoze, riboze, arabinoze i galaktoze, a ksiloze i glukoze ima u većim količinama.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I ZAKLJUČCI

### 4. Results of investigation and conclusions

Rezultati provedenih određivanja sastava hidroliznih otopina predloženi su u tablicama 1. i 2. (Tablica 1., Tablica 2.)

Tablica 1. predložuje udio pojedinih monosaharida u odnosu prema ukupnim monosaharidima pojedinih uzoraka, a u tablici 2. prikazan je udio pojedinih monosaharida i nerazgrađenog ostatka u usporedbi s apsolutno suhim uzorkom drva.

- Iz snimljenih kromatograma svih uzoraka vidljivo je da u svim ispitanim drvnim vrstama ima glukoze, ksiloze,

Sastav otopina dobivenih hidrolizom uzoraka drva  
Composition of solutions obtained by hydrolysis of wood samples

Tablica 1.  
Table 1.

Sastojci Constituents		Vrsta drva - Wood species								
		Hrast	Kesten	Javor	Bukva	Brijest	Orah	Trešnja	Jasen	Joha
		Oak	Chestnut	Maple	Beech	Elm	Walnut	Cherry	Ash	Alder
D(+)-glukoza D(+)-Glucose	%	54,8	58,6	54,1	51,7	52,7	52,7	51,9	52,9	59,4
D(+)-ksiloza D(+)-Xylose	%	35,2	36,4	34,5	38,4	37,1	35,2	40,2	33,9	34,2
D(+)-galaktoza D(+)-Galactose	%	0,6	0,7	0,4	1,2	1,1	1,1	1,9	0,9	1,4
L(+)-arabinoza L(+)-Arabinose	%	0	0	0,3	0,9	0,5	0,6	1,3	1,1	0,8
D(-)-fruktoza D(-)Fructose	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(+)-manoza D(+)-Mannose	%	3,8	2,9	1,7	1,9	1,8	1,6	1,3	7,1	1,2
D(+)-riboza D(+)-Ribose	%	2,9	0	1,7	1,4	1,7	1,6	0,9	0,9	1,0
L(+)-ramnoza L(+)-Rhamnose	%	0,9	0,6	1,6	2,3	2,4	2,8	2,2	2,5	1,6
maltoza Maltose	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
celobioza Cellobiose	%	0	0	1,7	1,0	0,9	2,1	1,0	0	0
nepoznato Unidentified	%	1,8	0,8	4,0	1,2	1,8	2,3	0,5	0,7	0,4

Sastav otopina dobivenih hidrolizom u usporedbi s netopljivim ostatkom drva  
Composition of solutions obtained by hydrolysis as compared with insoluble wood residues.

Tablica 2.  
Table 2.

Sastojci Constituents		Vrsta drva - Wood species								
		Hrast	Kesten	Javor	Bukva	Brijest	Orah	Trešnja	Jasen	Joha
		Oak	Chestnut	Maple	Beech	Elm	Walnut	Cherry	Ash	Alder
D(+)-glukoza D(+)-Glucose	%	37,0	38,7	36,1	36,1	37,1	37,8	36,4	37,7	41,2
D(+)-ksiloza D(+)-Xylose	%	23,7	23,8	22,9	26,8	26,1	25,4	28,2	24,2	23,7
D(+)-galaktoza D(+)-Galactose	%	0,3	0,6	0,3	0,8	0,8	0,8	1,2	0,6	1,0
L(+)-arabinoza L(+)-Arabinose	%	0	0	0,2	0,6	0,3	0,4	0,9	0,8	0,6
D(-)-fruktoza D(-)Fructose	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(+)-manoza D(+)-Mannose	%	2,6	1,9	1,1	1,3	1,3	1,1	0,9	5,1	0,8
D(+)-riboza D(+)-Ribose	%	2,0	0	1,1	1,0	1,2	1,1	0,5	0,6	0,7
L(+)-ramnoza L(+)-Rhamnose	%	0,6	0,2	1,0	1,6	1,7	2,1	1,4	1,8	1,1
maltoza Maltose	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
celobioza Cellobiose	%	0	0	1,1	0,7	0,6	1,5	0,6	0	0
nepoznato Unidentified	%	1,2	0,1	2,7	0,8	1,3	1,6	0,3	0,5	0,3
netopljivo Insoluble	%	28,4	23,8	29,5	26,3	25,6	24,2	25,6	24,6	26,6

galaktoze, manoze i ramnoze.

- Celobioza je nađena samo u uzorcima javora, bukve, brijesta, oraha i trešnje.

- U kromatogramima su se pojavili i neki drugi otkloni u sadržaju tvari koji se nisu mogli ustanoviti standardnom otopinom monosaharida.

- Prema kvantitativnom udjelu u svim uzorcima ističu se glukoza i ksiloza, a ostali su monosaharidi zastupljeni u manjim koncentracijama.

- Rezultati analize monosaharida HPLC-metodom u odnosu prema rezultatima analize sastava drvene tvari klasičnom gravimetrijsko-volumetrijskom analizom upućuju na mnogostruke prednosti primijenjene HPLC-metode.

## 5. LITERATURA

### 5. References

- [1] Anon.: Biotronik Manual Carbohydrate Analyzer LC 5001, Maintal, 1991.
- [2] Engelhardt, H., Hupe, K.P.: Kopplungsverfahren in der HPLC. Git Verlag GmbH, Darmstadt, 1990.
- [3] Fengel, D., Wegener, G.: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1989.
- [4] Henschen, A., Hupe, K.P., Lotspeich, F., Voelter, W.: High Performance Chromatography in Biochemistry, VCH, Weinheim, 1985.
- [5] Jork, H., Funk, W., Fischer, G., Wimmer, H.: Dünnschicht-Chromatography, VCH, Weinheim, 1989.
- [6] Korner, H.U., Gottschalk, D., Wiegel, J., Puls, J.: The degradation pattern of oligomers and polymers from lignocelluloses, *Analitica Chimica Acta* 163 (1984), 55-56.
- [7] Moeckel, H.J., Aced, G.: HPLC Leichtverständliche Einführung in apparative, theoretische und methodische Grundlagen, Knauer GmbH, Berlin, 1991.
- [8] Sinner, M., Simatupang, M.H., Dietrichs, H.H.: Automated Quantitative Analysis of Wood Carbohydrates by Borate Complex Ion Exchange Chromatography, *Wood Science and Technology*, 9, (1975), 307-322.
- [9] Žorž, M.: HPLC, vlastito izdanje, Ljubljana, 1991.