

Винахід відноситься до способів визначення фракційного складу вуглеводного комплексу інулінвмісткої рослинної сировини в харчовій промисловості, сільському господарстві, наукових дослідженнях і може бути використаний для оцінки вмісту високомолекулярних фруктанів, олігосахаридів та низькомолекулярних фруктозовмістких вуглеводів в топінамбурі, цикорії, бульбах георгінів та інш. при вивченні метаболізму та оцінці харчових і технологічних якостей сировини.

Дані різних авторів по вмісту, наприклад, високомолекулярних фруктанів в топінамбурі дуже відрізняються і пояснюється це не тільки його сортовими особливостями чи певним періодом вегетації, а й різноманітністю методів, що застосовувались при їх визначенні.

Відомий спосіб виділення Іннуліну (тобто високомолекулярних фруктанів) 82% етиловим спиртом при 4-кратній обробці [Хрусталева В.П., Козлов В.В. Колориметрическое определение инулина//Изв. вузов. Пищевая технология. -1961. - №4. - С. 152-156], в якому одержаний осадок розчиняють в гарячій воді на протязі 2 годин і визначають колориметричним способом після реакції з фосфорно-молібденовою кислотою в присутності ортофосфорної кислоти.

Відомий спосіб [Починков Х.Н. Методы биохимического анализа растений. - К.: Наукова думка, 1976. - 334 с], а якому виділяють високомолекулярні фруктани 80% етиловим спиртом з сухого рослинного матеріалу і 95% спиртом - з свіжого. Отриманий осадок відцентрифугують при 2000 хв<sup>-1</sup> і ще три рази промивають 80% спиртом. Потім осадок розчиняють в гарячій воді на протязі 30 хв і проводять колориметричне визначення після проведення реакції з молібдатом сірчанокислого реактиву.

Недоліки вищеописаних методів в тому, що по-перше, в жодному з них не вказується, якому ж ступеню полімеризації (СП) відповідають виділені фракції, а при використанні різних концентрацій спирту це, звичайно, будуть фракції з різним СП; по-друге, при коливаннях вологості сировини концентрація спирту в сфері реакції буде різною, а отже, різними будуть склад і величина виділених фракцій; по-третє, для проведення більш детального аналізу фракційного складу вуглеводного комплексу потрібно виділяти кілька спиртових фракцій - з використанням різної концентрації спирту, а це довготривала робота.

Відомий метод визначення якісного і кількісного складу цукрів в рослинних зразках [Небытов В.Г., Калинин В.А., Зинченко В.А., Давыдов В.Я. Определение качественного и количественного состава сахаров в растительных образцах с использованием жидкостной хроматографии//Известия ТСХА. - 1984. - Вып. 1. - С. 191-195], оснований на екстрагуванні цукрів з рослинних зразків, зафіксованих рідким азотом, сумішами етанол-вода, ацетонітрил-вода і визначенні вмісту цукрів методом вискоэффективної рідинної хроматографії з використанням рідинного хроматографа і чутливого детектора.

Недоліками, цього методу є: по-перше, та ж невизначеність в СП цукрів; по-друге, використання рідкого азоту; по-третє, необхідність складного і дорогого обладнання, що не кожна лабораторія може собі дозволити.

Найближчим технологічним рішенням до запропонованого є спосіб розподілу вуглеводів зразку соку з вмістом сухих речовин 5% на колонці з сефадексом Г-25, визначення екстинції елюатів після проведення реакції Селіванова та визначення концентрації вуглеводів методом накладання гель-хроматограми на калібровочний графік залежності екстинції стандартних розчинів фруктози від її концентрації [Гриненко И.Г. Физико-химические свойства инулина и получение его производных: Автореф. канд. техн. наук К., 1993. - 24 с], який дає можливість одержати гель-хроматограму вуглеводного комплексу в координатах E-V<sub>e</sub>, де E - екстинція елюату, а V<sub>e</sub> - об'єм виходу елюату. Порівняння гель-хроматограм різних зразків дає можливість оцінити фракційний склад вуглеводного комплексу в межах "більше-менше", а накладання гель-хроматограми на калібровочний графік - визначити вміст фруктози в певній фракції елюату.

Недоліки цього методу в тому, що по-перше, необхідно суворо дотримуватись постійного вмісту сухих речовин в пробах соку, що наносяться на колонку з сефадексом, бо при коливаннях цього показника порівняльна характеристика буде необ'єктивною; по-друге, кількісна характеристика найбільш важливих фракцій. вуглеводного комплексу сировини методом накладання неточна; по-третє, необхідність відбору і аналізу великої кількості проб.

В основу винаходу поставлено завдання створення способу кількісного визначення основних фракцій вуглеводного комплексу інулінвмісткої сировини шляхом використання зразку соку з концентрацією сухих речовин в певних межах і відбору укрупнених проб елюату забезпечити простоту, швидкість і точність визначення вмісту основних фракцій вуглеводного комплексу.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі кількісного визначення основних фракцій вуглеводного комплексу інулінвмісткої сировини, що включає розподіл вуглеводів зразку соку на колонці з сефадексом Г-25 і визначення екстинції елюатів після проведення реакції Селіванова згідно винаходу для розподілу вуглеводів використовують зразок соку з концентрацією в межах 3-5% сухих речовин, проводять відбір 5-8 укрупнених проб елюатів і вміст фракцій розраховують за формулою

$$A_{\Phi} = (E_{\Phi} \cdot V_{\Phi} : \sum E_{\Phi} \cdot V_{\Phi}) \cdot 100, \quad (1)$$

де A<sub>Φ</sub> - вміст фракції, % до загальної кількості вуглеводів;

E<sub>Φ</sub> - екстинція проби фракції;

V<sub>Φ</sub> - об'єм фракції, мл.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками та очікуваним технічним результатом буде в наступному.

Відомо, що в топінамбурі та іншій Іннулінвмісткій сировині присутній широкий спектр вуглеводів від моносахарида фруктози до поліфруктанів зі ступенем полімеризації СП = 30 і більше. Але при вивченні метаболізму рослин, оцінці харчових і технологічних якостей сировини в харчовій промисловості, сільському господарстві та наукових дослідженнях важливо знати вміст не 30 вуглеводів, а окремих груп, що мають спільні властивості в метаболічних перетвореннях, а саме: фруктози (Φ), що використовується при синтезі сахарози; низькомолекулярних олігосахаридів; сахарози та трисахаридів (ТС), що беруть участь в синтезі вищих олігосахаридів та високомолекулярних фруктанів; вищих олігосахаридів (ВОС з СП 4-10), що присутні в сировині в найбільшій кількості і використовуються для синтезу високомолекулярних фруктанів;

високомолекулярних фруктанів (ВМФ з СП 11-35), які виявляють найбільший вплив на дієтичну та лікувальну цінність продуктів з топінамбура та мають велике значення для виробництва Інуліну.

Розподіл описаних вище фракцій ВМФ, ОС та ТС на підгрупи, а саме: ВМФ на Інулін, фруктани; ОС на олігосахариди з СП більше 6 і з СП менше 6; ТС на трисахариди і сахарозу - дозволить глибше вивчити механізм метаболізму вуглеводів в період вегетації і зберігання топінамбура та зміни вуглеводного комплексу при його переробці. Причому, розподіляти на підгрупи вказані вище фракції можна не всі, а на вибір.

Для визначення меж розподілу цих фракцій на колонці з сефадексом необхідно провести калібровку колонки (як і в способі-прототипі), використавши фруктозу, рафінозу та інулін. На калібровочний прямий  $V_e = f[\lg M]$  (фіг.1), де  $V_e$  - об'єм максимального виходу певного вуглеводу, а  $M$  - молекулярна маса вуглеводу, визначаємо  $V_e$  для  $M$  з СП=10 і СП=2 та інших вуглеводів, які важливі для характеристики сировини (СП=M:180).

Згідно з даними, приведеними на фіг.1, розділяють об'єм елюювання, на групи, приведені в табл. 1.

Концентрація сухих речовин в соку Інулінвмісткої сировини коливається в межах 16-22%. Щоб одержати сік з концентрацією сухих речовин 5%, щоразу треба підбирати коефіцієнт розведення - це вимагає певного часу. А гель-хроматограми зразків соку з різною концентрацією СВ не дають можливості зробити об'єктивну порівняльну характеристику фракційного складу різних зразків (фіг.2, кр. 1, 2). Об'єктивну оцінку може дати величина екстинції, яка обчислюється за формулою

$$E_{\text{пр}} = (E_{\text{ф}} : \sum E_{\text{ф}}) \cdot 100, \quad (2)$$

де  $E_{\text{пр}}$  - "приведена" величина екстинції;

$E_{\text{ф}}$  - значення екстинції проби фракції після проведення реакції.

З даних фіг.2 видно, що для фракції з об'ємом виходу  $V_e = 36$  мл значення  $E_1 = 0,570$ ;  $E_2 = 0,335$  - дуже відрізняються і здається, що в першому зразку вміст вуглеводів в цій фракції набагато вищий. Обчислення "приведеної" величини екстинції показали, що  $(E_1)_{\text{пр}} = E_3 = 8,50\%$  (кр. 3), а  $(E_2)_{\text{пр}} = E_4 = 8,60\%$  (кр. 4), тобто в другому зразку вміст вуглеводів в цій фракції більший на 0,1%.

При однаковому об'ємі всіх проб елюату величина  $E_{\text{пр}}$  характеризує відсоток певної групи вуглеводів до їх загальної кількості. Тобто цей спосіб дозволяє в деякій мірі удосконалити прототип. При великій кількості проб елюату гель-хроматограма вуглеводного комплексу буде деталізована, але водночас збільшиться вплив похибок, які виникають при відборі елюату та його аналізі. Якщо об'єми елюатів різні, то необхідні додаткові розрахунки, а саме: визначення абсолютної кількості вуглеводів в кожній фракції. Для цього потрібно визначити концентраційний коефіцієнт  $K$  за формулою

$$K = B : V_{\text{пр}}, \quad (3)$$

де  $V_{\text{пр}}$  - об'єм проби фракції для проведення аналізу, мл;

$B$  - коефіцієнт переведення значення екстинції в мг вуглеводів.

Визначають коефіцієнт  $B$  по калібровочному графіку  $E = f(C_{\text{фруктози}})$  після проведення реакції Селіванова з розчинами, фруктози відомої концентрації. В даному випадку при використанні колориметру КФК-2 і умов проведення реакції Селіванова, приведених в модифікованому методі визначення фруктози [Федоренченко Л.А., Бобровник Л.Д. Модифицированный метод колориметрического определения фруктозы//Хранение и переработка сельхозсырья. -1997. - № 6. - С. 34-35]:  $B = 1,371$  мг;  $V_{\text{пр}} = 0,5$  мл;  $K = 2,742$  мг/мл.

З даних, одержаних після аналізу укрупнених проб елюатів (табл. 2), кількість вуглеводів в кожній фракції елюату ( $G_{\text{ф}}$ , мг) можна розрахувати за формулою

$$G_{\text{ф}} = K \cdot E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}}, \quad (4)$$

де  $K$  - концентраційний коефіцієнт, мг/мл;

$E_{\text{ф}}$  - екстинція проби фракції;

$V_{\text{ф}}$  - об'єм фракції елюату, мл.

Загальну кількість вуглеводів ( $G_{\text{с}}$ ), нанесених на колонку, можна визначити по сумі вуглеводів, що містяться в кожній фракції, тобто за формулою

$$G_{\text{с}} = \sum G_{\text{ф}} = K \cdot \sum E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}}. \quad (5)$$

А вміст кожної фракції в відсотках до загальної кількості вуглеводів ( $A_{\text{ф}}$ ) визначають по відношенню ( $G_{\text{ф}} : G_{\text{с}}$ ), тобто за формулою(1):  $A_{\text{ф}} = (G_{\text{ф}} : G_{\text{с}}) \cdot 100 = (K \cdot E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}} : K \cdot \sum E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}}) \cdot 100 = (E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}} : \sum E_{\text{ф}} \cdot V_{\text{ф}}) \cdot 100$ .

Визначення кількісного вмісту основних фракцій вуглеводного комплексу зразку соку, розбавленого до концентрації 4,4% СП способом відбору укрупнених проб елюату показали, що одержані результати об'єктивно характеризують фракційний склад сировини, тобто значення вмісту ВМФ, ВОС, ТС і Ф характерні для топінамбура (табл. 2).

Порівняння значень  $A_{\text{ф}(2)}$ , одержаних з використанням даних по кількості вуглеводів в елюатах, і  $A_{\text{ф}(1)}$ , одержаних по екстинції проби елюату, практично однакові. Але перший спосіб дає економію часу і знижує похибку визначення за рахунок зменшення кількості обчислень і заокруглень.

На фіг.1 приведено калібровочний графік для колонки з сефадексом Г-25 (об'єм сефадексу 69 см<sup>3</sup>) в координатах "об'єм виходу - логарифм молекулярної маси". Для більшої зручності додатково приведена абсциса - ступінь полімеризації (СП) =  $M:180$ .

На фіг.2 приведені гель-хроматограми соку топінамбура різних концентрацій, одержані при відборі фракцій елюатів 1-24 мл і 20 фракцій по 2 мл: 1,2 - значення екстинцій фракцій; 3,4 - значення "приведених" екстинцій, розрахованих за формулою (2).

Спосіб кількісного визначення основних фракцій вуглеводного комплексу Інулінвмісткої сировини здійснюється таким чином.

Сировину подрібнюють, потім проводять екстрагування соку при кімнатній температурі при гідромодулі

2,0. В одержаний екстракт додають кизельгур і фільтрують. Доводять концентрацію фільтрованого соку до 3-5% сухих речовин. Наносять 1 мл соку на колонку з сефадексом Г-25 і проводять елювання. Відбирають об'єми фракцій елюатів, визначені за допомогою калібровочного графіку. Визначають екстинцію проб елюатів після проведення реакції Селіванова та обчислюють вміст основних фракцій вуглеводного комплексу в відсотках до загальної кількості вуглеводів -  $A_{\phi}$  за формулою

$$A_{\phi} = (E_{\phi} \cdot V_{\phi} : \sum E_{\phi} \cdot V_{\phi}) \cdot 100, \quad (1)$$

де  $A_{\phi}$  - вміст фракції, % до загальної кількості вуглеводів,

$E_{\phi}$  - екстинція розчину фракції;

$V_{\phi}$  - об'єм фракції, мл.

Приклади здійснення способу.

Приклад 1. Топінамбур подрібнюють, проводять екстрагування соку при гідромодулі 2,0. В одержаний, екстракт додають кизельгур і фільтрують. Доводять концентрацію фільтрованого соку до 4% СР. На заповнену сефадексом колонку наносять 1 мл фільтрованого соку топінамбура. Елюють, відбираючи такі проби: 1-24 мл, 2-12 мл, 3-10мл, 4-8мл, 5- 10 мл. Визначають екстинцію проб елюатів після проведення реакції Селіванова -  $E_{\phi}$ :

$E_1$	$E_2$	$E_3$	$E_4$	$E_5$
0,000	0,210	0,390	0,280	0,020

обчислюють  $E_{\phi} \cdot V_{\phi}$  та  $\sum E_{\phi} \cdot V_{\phi}$ :

$$E_2 V_2 = 0,210 \cdot 12 = 2,52;$$

$$E_3 V_3 = 0,390 \cdot 10 = 3,90;$$

$$E_4 V_4 = 0,280 \cdot 8 = 2,24;$$

$$E_5 V_5 = 0,020 \cdot 10 = 0,20;$$

$\sum E_{\phi} V_{\phi} = 2,52 + 3,90 + 2,24 - 0,20 = 8,86$ ; за формулою(1):  $A_{\phi} = (E_{\phi} \cdot V_{\phi} : \sum E_{\phi} \cdot V_{\phi}) \cdot 100$ , визначають величину  $A_{\phi}$  для кожної фракції:

$$A_2 = (2,52 : 8,86) \cdot 100 = 28,44;$$

$$A_3 = (3,90 : 8,86) \cdot 100 = 44,02;$$

$$A_4 = (2,24 : 8,86) \cdot 100 = 25,28;$$

$$A_5 = (0,20 : 8,86) \cdot 100 = 2,26.$$

Дані цього прикладу та прикладів 2-5 зведені в табл. 3.

Дані табл. 3 свідчать, що значення екстинції при проведенні колориметричного аналізу знаходяться в межах шкали колориметру, що відзначаються найбільшою точністю: 0,2-0,5. Одержані значення  $A_{\phi}$  об'єктивно характеризують фракційний склад вуглеводного комплексу топінамбура.

Результати табл. 3 свідчать, що при концентрації зразку соку 3-5% сухих речовин значення екстинцій проб елюату та соку за виключенням останньої, яка завжди має низьку концентрацію, знаходяться в межах шкали колориметру, що відзначається високою точністю. Але при СР соку 3% значення екстинції проби елюату №2 вже менше 0,2. При значенні концентрації соку, що наноситься на колонку нижчому за 3% СР, екстинція всіх проб елюату має низькі значення. В цьому діапазоні шкали колориметру велика похибка визначення екстинції, а значить і концентрації вуглеводів. При концентрації соку вищій за 5% СР екстинція тільки двох проб елюатів має значення в оптимальних межах шкали колориметру, одна з проб (№3) має високе значення екстинції, яке теж визначається з великою похибкою.

Отже, запропонований спосіб кількісного визначення основних фракцій вуглеводного комплексу Інulinвмісткої сировини простий в виконанні і забезпечує швидке і точне визначення вмісту фракцій вуглеводного комплексу, важливих для вивчення метаболізму рослинної сировини та її технологічної характеристики.

Таблиця 1

Розподіл об'єму елюювання на укрупнені проби

Номер проби	Назва фракції	Значення СП	Межі відбору фракцій елюату	Об'єм елюювання – $V_{\phi}$ , мл
1	Вільний об'єм колонки	–	0–24	24
2	ВМФ	35–11	25–36	12
3	ОС	10–4	37–46	10
4	ТС	3–2	47–54	8
5	Ф	1	55–64	10

Таблиця 2

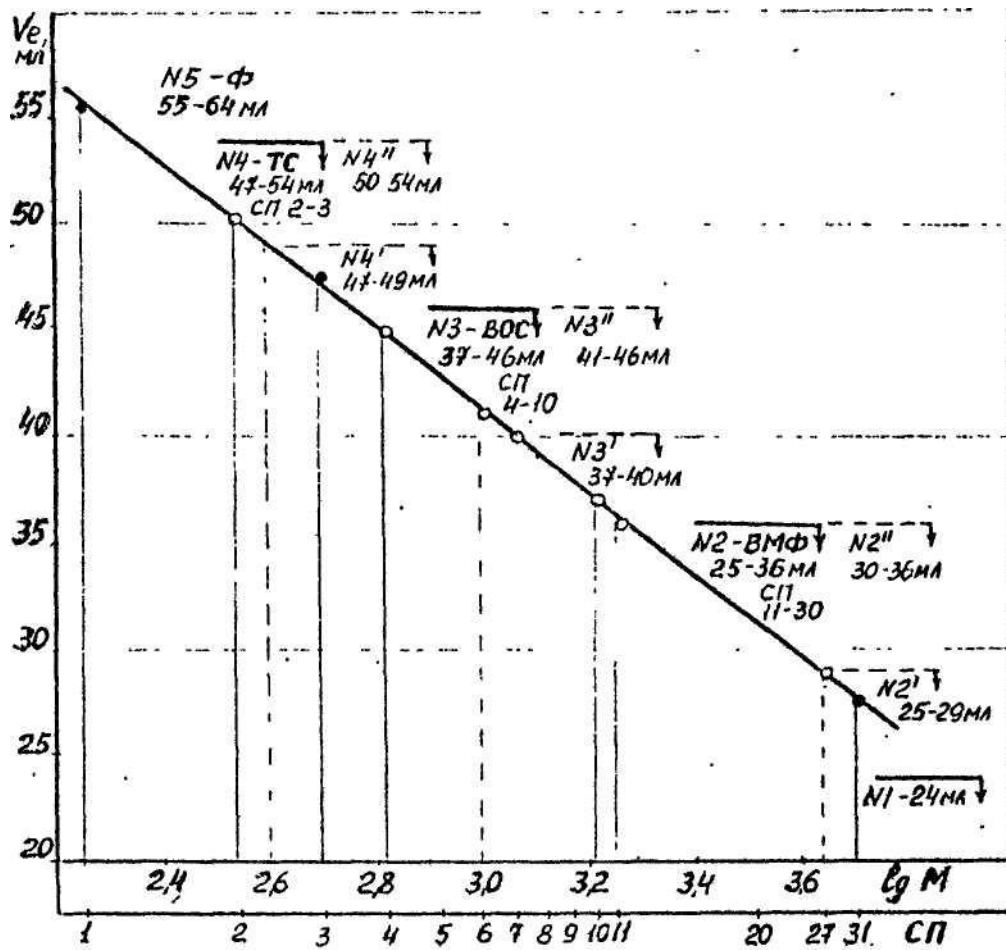
Дані аналізів укрупнених проб елюатів та розрахунки вмісту фракцій, % до загальної кількості вуглеводів

Номер фракції	Назва фракції	Аналітичні дані		Розрахунки			
		$V_{\phi}$ , мл	$E_{\phi}$	$E_{\phi} \cdot V_{\phi}$	$G_{\phi}$	$A_{\phi(1)}$	$A_{\phi(2)}$
1	Вільний об'єм колонки	24	–	–	–	–	–
2	ВМФ	12	0,208	2,50	6,86	24,90	24,92
3	ОС	10	0,497	4,37	11,98	43,52	43,52
4	ТС	8	0,354	2,83	7,76	28,19	28,19
5	Ф	10	0,034	0,34	0,93	3,39	3,38
	Сума – $\Sigma$				28,10	100,00	100,00

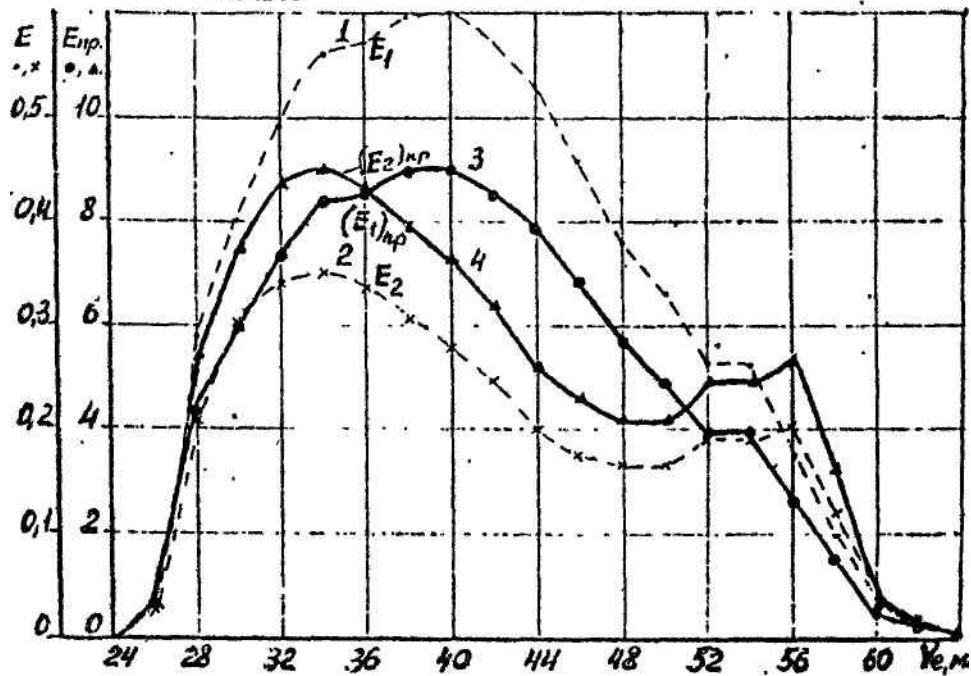
Таблиця 3

Дані прикладів здійснення способу

Показники	Номер фракції елюату та її об'єм, мл				Сума
	№ 2-12	№ 3-10	№ 4-8	№ 5-10	
Приклад № 1 (СР соку 4%)					
Екстинція – $E_{\phi}$	0,210	0,390	0,280	0,020	
Значення – $E_{\phi}V_{\phi}$	2,52	3,90	2,24	0,20	8,86
Вміст фракції – $A_{\phi}$	28,44	44,02	25,28	2,26	100,00
Приклад № 2 (СР соку 3%)					
Екстинція – $E_{\phi}$	0,150	0,280	0,200	0,015	
Значення – $E_{\phi}V_{\phi}$	1,80	2,80	1,60	0,15	6,35
Вміст фракції – $A_{\phi}$	28,35	44,09	25,20	2,36	100,00
Приклад № 3 (СР соку 5%)					
Екстинція – $E_{\phi}$	0,250	0,480	0,340	0,025	
Значення – $E_{\phi}V_{\phi}$	3,00	4,80	2,72	0,26	10,78
Вміст фракції – $A_{\phi}$	27,83	44,53	25,23	2,41	100,00
Приклад № 4 (СР соку 2 %)					
Екстинція – $E_{\phi}$	0,110	0,195	0,135	0,012	
Значення – $E_{\phi}V_{\phi}$	1,32	1,95	1,08	0,12	4,47
Вміст фракції – $A_{\phi}$	29,53	43,63	24,16	2,68	100,00
Приклад № 5 (СР соку 6%)					
Екстинція – $E_{\phi}$	0,320	0,580	0,410	0,030	
Значення – $E_{\phi}V_{\phi}$	3,84	5,80	3,28	0,30	13,22
Вміст фракції – $A_{\phi}$	29,05	43,87	24,81	2,27	100,00



Фиг. 1



Фиг. 2