



# **Glukoosin ja fruktoosin analysointi ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialla**

Taru Väisänen  
Kandidaatintutkielma  
Kemian tutkinto-ohjelma  
Oulun yliopisto  
2023

## TIIVISTELMÄ

Monosakkaridien analysointi esimerkiksi elintarvike- ja kudoksenäytteistä on tärkeää. Monosakkaridit ovat poolisia, huonosti haihtuvia, useita hydroksyyli-ryhmiä sisältäviä biomolekyylejä, mikä tekee niiden analysoinnista haastavaa.

Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia on kohtalaisen uusi analyysimenetelmä, jolla voidaan analysoida biomolekyylejä kuten glukoosia ja fruktoosia. Sen suosioon on vaikuttanut sen herkkyys ja nopeus monien erilaisten näytteiden analysoinnissa. Analyyttien erottuminen tapahtuu kolonnissa. Eri näytteiden tapauksessa on valittava oikeanlainen kolonni, jossa kiinteän faasin eli stationäärifaasin ja tutkittavan analyytin välille muodostuu vuorovaikutuksia. Tutkielmassa perehdyttiin monosakkarideista glukoosin ja fruktoosin analysoinnissa käytettäviin hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografiaan tarkoitettuihin kolonneihin, joissa stationäärifaasi sisälsi amidi- tai aminoryhmiä. Analyysiolosuhteita optimoitiin tutkittavien analyyttien erottumisen mukaan.

Tutkimusten perusteella parhaimmaksi kolonniksi monosakkaridien analysointiin valikoitui amidikolonni. Kolonnin pituus vaihteli, mutta vaihtelua oli myös eluentin koostumuksessa, gradientissa, lämpötilassa ja virtausnopeudessa. Tutkimuksissa käytettiin gradienttieluutiota ja eluentina vesi-asetonitriiliseosta. Vaikutusta oli kolonnin pituudella, virtausnopeudella, kolonniuunin lämpötilalla, eluentin koostumuksella sekä gradientilla. Tehdyissä tutkimuksissa elintarvike- ja seeruminäytteitä pystyttiin analysoimaan luotettavasti ja toistettavasti.

## SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO.....	4
2	MONOSAKKARIDIT.....	5
3	NESTEKROMATOGRAFIA.....	7
	3.1 Laitteiston rakenne ja toimintaperiaate .....	8
	3.2 Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia .....	9
	3.3 Monosakkaridien analysointi nestekromatografialla.....	10
4	GLUKOOSIN JA FRUKTOOSIN ANALYSOINTIIN KÄYTETYT OLOSUHTEET .....	12
	4.1 Kolonnin dimensioiden ja eluutin virtausnopeuden vaikutus erottumiseen .....	14
	4.2 Eluutin ja kolonniuunin lämpötilan vaikutus erottumiseen.....	17
5	YHTEENVETO .....	20
6	KIRJALLISUUSVIITTEET .....	22

## 1 JOHDANTO

Hiilihydraatit ovat runsain biomolekyylien luokka luonnossa, ja niitä esiintyy eliöissä monissa erilaisissa rakenteissa, kuten kasvisolun soluseinässä ja eläinsolussa DNA- ja RNA-molekyyliissä. Pitkäketjuiset hiilihydraattipolymeerit ovat nimeltään polysakkarideja ja yhdestä monomeeristä muodostuvat hiilihydraatit ovat monosakkarideja. Tunnetuimpia monosakkarideja ovat glukoosi eli rypälesokeri ja fruktoosi eli hedelmäsokeri. Monosakkarideilla on monia tehtäviä luonnossa ja esimerkiksi glukoosi on eliöiden tärkein energianlähde aineenvaihdunnassa. Rakenteen ja kemiallisten ominaisuuksien vuoksi niitä löytyy myös monista ihmisen valmistamista tuotteista, kuten lääkkeitä ja elintarvikkeista. Elintarvikkeiden laadunvalvonnassa on tärkeää monosakkaridien nopea ja tarkka analysointi. Monosakkaridit liukenevat hyvin veteen, mutta ovat heikosti haihtuvia yhdisteitä, mikä vaikeuttaa niiden analysointia.

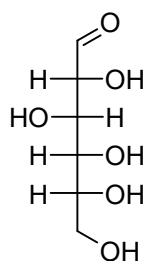
Kromatografia on analyysi- ja erotusmenetelmä, jota käytetään apuna kemiallisten yhdisteiden puhdistamisessa, eristämisessä ja analysoinnissa. Kromatografinen erottuminen perustuu näytteen eri komponenttien erilaiseen jakautumiseen liikkuvan faasin ja kiinteän faasin eli stationäärifaasin välillä. Sitä käytetään apuna monilla kemian aloilla ja esimerkiksi lääke- ja elintarviketeollisuudessa sillä on tärkeä rooli, kun halutaan tietää jonkin tietyn kemiallisen yhdisteen pitoisuus tuotteessa.

Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografian suosioon on vaikuttanut sen tehokkuus ja herkkyys nestemäisten näytteiden analysoinnissa. Se soveltuu hyvin monosakkaridien analysointiin, kun analyysiolosuhteet optimoidaan ja valitaan sopiva kolonni ja detektori. Tutkielmassa perehdytään ennen kaikkea glukoosin ja fruktoosin analysointiin ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialla sekä tutkimuksissa parhaimmiksi todettuihin kolonneihin ja analyysiolosuhteisiin.

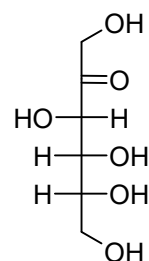
## 2 MONOSAKKARIDIT

Hiilihydraatit eli sakkaridit ovat tärkeitä biomolekyyliä, joilla on monia tehtäviä solussa. Ne esimerkiksi toimivat energianlähteenä sekä osana eliöiden erilaisia rakenteita. Hiilihydraatit jaotellaan niiden sakkaridiketjun pituuden mukaan. Yksinkertaisimpia hiilihydraatteja ovat monosakkaridit. Ne ovat pieniä monomeerisiä molekyylejä, joissa on yksi tai useampi hydroksyyli- ja karbonyyli-ryhmä, aldehydi tai ketoni. Useiden hydroksyyli-ryhmiensä ansiosta ne ovat poolisia molekyylejä, mikä on otettava huomioon niitä analysoitaessa.<sup>1</sup>

Monosakkaridit ovat helposti veteen liukenevia, mutta huonosti haihtuvia molekyylejä. Niissä voi olla 3–6 hiiliatomia ja ne esiintyvät ketju- tai rengasmuodossa. Vesiliuoksissa näiden välillä on tasapaino. Monosakkaridit luokitellaan niiden hiiliketjun pituuden mukaan; trioosissa on kolme hiiltä, tetraosissa neljä, pentoosissa viisi ja heksoosissa kuusi. Niiden empirinen kaava on muotoa  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . Monosakkarideja on paljon erilaisia, mutta yleisimmät niistä ovat glukoosi **(1)** ja fruktoosi **(2)**, joissa on kuusi hiiliatomia. Glukoosia syntyy kasvien fotosynteesissä hiilidioksidista ja vedestä. Pidemmän sakkaridiketjun omaavat hiilihydraatit di-, oligo- ja polysakkaridit rakentuvat monosakkarideista.<sup>1</sup>



**1**



**2**

Sakkarideja luokitellaan myös pelkistäviin ja ei-pelkistäviin. Monosakkaridit ovat pelkistäviä, koska niistä löytyy vapaa aldehydyryhmä. Monosakkarideja, joissa on aldehydyryhmä, kutsutaan aldooseiksi ja ketoniryhmän omaavia ketooseiksi. Saman atomirakenteen omaavia aldooseja ja ketooseja kutsutaan toistensa tautomeereiksi, niiden hydroksyyli-ryhmien ja karbonyyli-ryhmien paikat vain ovat erit. Monosakkarideista löytyy yksi tai useampi kiraalinen hiili, joihin hydroksyyli-ryhmät voivat kiinnittyä eri tavalla. Tämän seurauksena monosakkarideilla on useita

konfiguraatioita eli muotoja, joissa hydroksyyliyhmiin järjestys kiraalisen hiilen ympärillä on eri ja näitä kutsutaan diastereomeereiksi. Monosakkaridilla voi olla diastereomeereja yhden tai useamman kiraalisen hiilen suhteen. Kauimpana karbonyyliyhmiistä olevan kiraalisen hiilen konfiguraation mukaan näillä diastereomeereilla on peilikuvaisomeerit eli enantiomeerit. Muilla hiilyhdisteillä näitä isomeerejä kutsutaan R- ja S-isomeereiksi, ja sokereilla vastaavat ovat D- ja L-enantiomeerit. Luonnossa yleisempiä ovat D-monosakkaridit.<sup>1,2</sup>

Monosakkaridien erottaminen toisistaan on jo pitkään ollut suuri haaste ja siihen on kokeiltu monenlaisia analyysimenetelmiä. Eri monosakkaridien erottaminen matriisissa on erityisen tärkeää esimerkiksi ruoka-aineiden ja lääkkeiden kuten lääkekasvien ja yrttien tapauksessa. Kemiallisten ominaisuuksien lisäksi erottamista vaikeuttaa eri monosakkaridien rakenteellinen samankaltaisuus. Monilla eri monosakkarideilla voi olla sama molekyylikaava, mutta niiden stereokemia on erilainen eli ne ovat toistensa isomeerejä. Ero voi olla vain yhteen hiileen kiinnittyneissä atomeissa, jolloin analyysimenetelmältä vaaditaan hyvää erotuskykyä.<sup>3</sup>

### 3 NESTEKROMATOGRAFIA

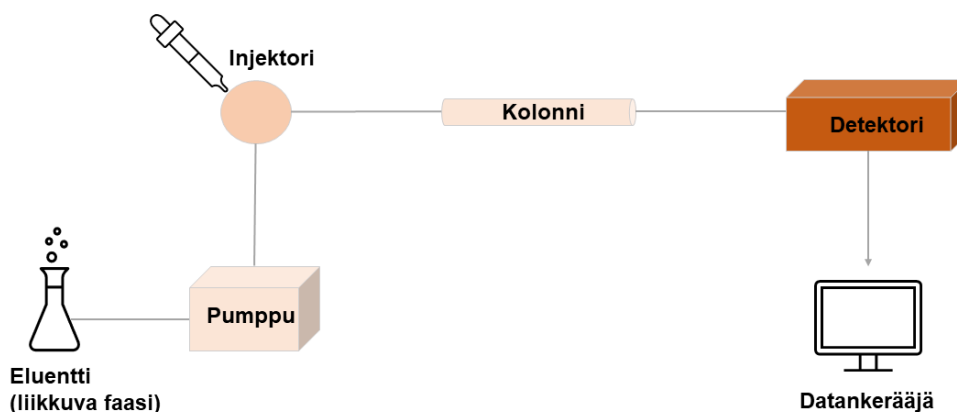
Nestekromatografialla (engl. liquid chromatography, LC) analysoidaan nestemäisessä olomuodossa olevia näytteitä. Näytteen ominaisuuksien mukaan valitaan sen analysointiin parhaiten sopiva menetelmä. Yksi yleisimmistä nestekromatografian alalajeista on partitiokromatografia. Partitiokromatografia voidaan vielä jakaa normaalifaasikromatografiaan ja käänteisfaasikromatografiaan. Muita nestekromatografian yleisiä alalajeja ovat ioninvaihtokromatografia, geelikromatografia ja adsorptiokromatografia.<sup>4</sup>

Partitiokromatografiassa, kuten muussakin nestekromatografiassa, näytteen komponenttien erottuminen perustuu komponenttien erilaiseen jakautumiseen stationäärifaasin eli kiinteän faasin sekä liikkuvan faasin eli eluentin välillä. Normaalifaasikromatografiassa stationäärifaasi on poolinen ja liikkuvana faasina on pooliton orgaaninen liuos. Tässä menetelmässä vähiten poolinen komponentti eluoituu ensin. Käänteisfaasikromatografiassa stationäärifaasi on pooliton ja liikkuva faasi poolinen. Tässä taas poolisin aine eluoituu ensin.<sup>4</sup>

Monosakkarideja analysoitaessa käytetään eniten korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (engl. high-performance liquid chromatography, HPLC) sekä ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (engl. ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC).<sup>5</sup> Korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteiston suosioon on vaikuttanut muun muassa sen herkkyyys eli laitteen ominaisuus pystyä analysoimaan myös pieniä pitoisuuksia analyyyttiä ja sopeutumiskyky tarkkoihin kvantitatiivisiin määrittäisiin. Monosakkaridien lisäksi, sillä voidaan analysoida esimerkiksi aminohappoja, proteiineja, nukleiinihappoja, hiilivetyjä, lääkkeitä, terpenoideja, torjunta-aineita, organometalliyhdisteitä ja erilaisia epäorgaanisia aineita.<sup>4</sup>

### 3.1 Laitteiston rakenne ja toimintaperiaate

Nestekromatografialaitteisto koostuu eluentista, pumppusysteemistä, injektorista, kolonnista, ilmaisimesta eli detektorista ja datankerääjästä kuvan 1 mukaisesti.<sup>4</sup>



Kuva 1. Nestekromatografialaitteisto

Näyte syötetään injektorin kautta laitteistoon, jossa pumppu työntää sen kolonniin eluentin mukana. Näytteestä määritettävät yhdisteet eli analyytit vuorovaikuttavat kolonnissa olevien partikkelien kanssa. Kolonne on pakattu usein huokoisella silikalla, johon on kiinnitetty jokin funktionaalinen ryhmä. Kolonne valitaan sen mukaan, millaisia komponentteja näyte sisältää ja kuinka ne vuorovaikuttavat stationäärifaasissa olevan funktionaalisen ryhmän kanssa. Myös eluentti valitaan näytteen mukaan. Yleensä eluentti koostuu 1–3 liuottimesta, jotka on valittu näytteen komponenttien poolisuuden mukaan. Eluentin koostumus voidaan pitää samana koko analyysin ajan, jolloin kyseessä on isokraattinen eluutio tai sen pitoisuutta voidaan vaihdella ajon aikana niin kutsutussa gradientteluutiolla. Kolonnissa erottuneet analyytit siirtyvät detektorille, jossa ne havaitaan. Nestekromatografiassa on laaja kirjo erilaisia detektoreja, jotka voidaan liittää laitteistoon. Sen valintaan vaikuttaa käytettävä menetelmä ja näytteen ominaisuudet. Dataa voidaan analysoida datankerääjällä. Tuloksina saatua dataa kutsutaan kromatogrammiksi, jossa tutkittavan näytteen eri komponenttien vasteet



ilmoitetaan retentioajan funktiona. Retentioaika tarkoittaa yhdisteen analysointiin kulunutta aikaa.<sup>4</sup>

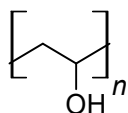
### **3.2 Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia**

Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia kehitettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografian rinnalle tehokkaampana analyysimenetelmänä, jonka ansiosta analyysiaikoja saatiin lyhennettyä. On arvioitu, että UHPLC lisää suorituskkyä 3–10-kertaisesti HPLC-tekniikkaan verrattuna.<sup>6</sup> UHPLC myös lisää analyysin herkkyyttä ja tarkkuutta.<sup>7</sup> UHPLC-tekniikalla voidaan lisäksi saavuttaa parempi resoluutio eli tutkittavien komponenttien parempi erottuminen toisistaan. Sitä voidaan pitää ympäristöystävällisempänä, sillä sen käytössä kuluu vähemmän orgaanisia liuottimia, mikä johtuu lyhyemmästä ja pienemmän sisähalkaisijan omaavasta kolonnista. Analyysiin riittää myös pienempi näytemäärä sekä virtausnopeus.<sup>6</sup>

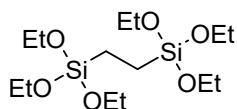
UHPLC:ssa on käytetty suoraan samoja menetelmiä kuin HPLC:ssa mutta siihen on myös kehitelty kokonaan uusia menetelmiä, jotka on myöhemmin muutettu HPLC-olosuhteisiin sopiviksi, jotta niitä voitaisiin käyttää maailmanlaajuisesti esimerkiksi lääketeollisuudessa. HPLC-menetelmä on voitu myös muuttaa suoraan UHPLC-menetelmäksi, mutta analyysiaika lyhenee, koska retentioajat ovat lyhyemmät.<sup>6</sup> Myös samat detektorit kuin HPLC-tekniikan tapauksessa sopivat käytettäväksi UHPLC:ssa.<sup>5</sup> UHPLC:n menetelmäkehityksessä on otettava huomioon kolonnin valinnan lisäksi liikkuvan faasin pH, puskurityyppi ja koostumus. Liikkuva faasi voi olla vesiliuos tai veden ja orgaanisen liuottimen seos, joka voi olla hapan, emäksinen tai neutraali. Orgaaninen liuotin voi olla esimerkiksi metanoli tai asetontriili.<sup>6</sup>

UHPLC-laitteen ominaisuuksien takia on huomattu, että laitteeseen soveltuvat parhaiten lyhyemmät ja pienemmän sisähalkaisijan omaavat kolonnit kuin HPLC-laitteeseen, ja myös stationäärifaasin partikkelikoko on pienempi. Tehokkaaseen käyttöön, noin 600–1400 bar paineessa, soveltuvat parhaiten kolonnit, joiden kolonnin sisähalkaisija on 2–3 mm.<sup>6</sup> Kolonnin pakkausmateriaaliksi käyvät

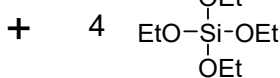
parhaiten huokoiset materiaalit kuten silika, sillä se on herkkä liikkuvan faasin pH-muutoksille. Stationäärifaasina voidaan käyttää myös synteettistä polymeeriä kuten, polyvinyylialkoholia (**3**) tai hybridipolymeeriä, jossa silika voidaan yhdistää bis(trietoksisilyli)etaanista (**4**) ja tetraetoksisilaanista (**5**) muodostuvan polyetoksisilaanin (**6**) kanssa. Jälkimmäistä materiaalia kutsutaan nimellä BEH (a bridged ethyl hybrid), joka on stabiili sekä korkeassa että matalassa pH:ssa. Partikkelien koko stationäärifaasissa on usein 1,7  $\mu\text{m}$ .<sup>7-10</sup>



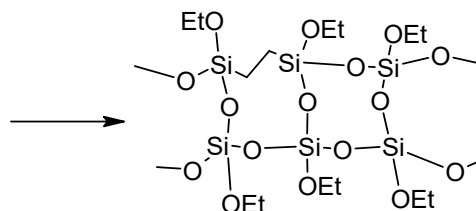
**3**



**4**



**5**

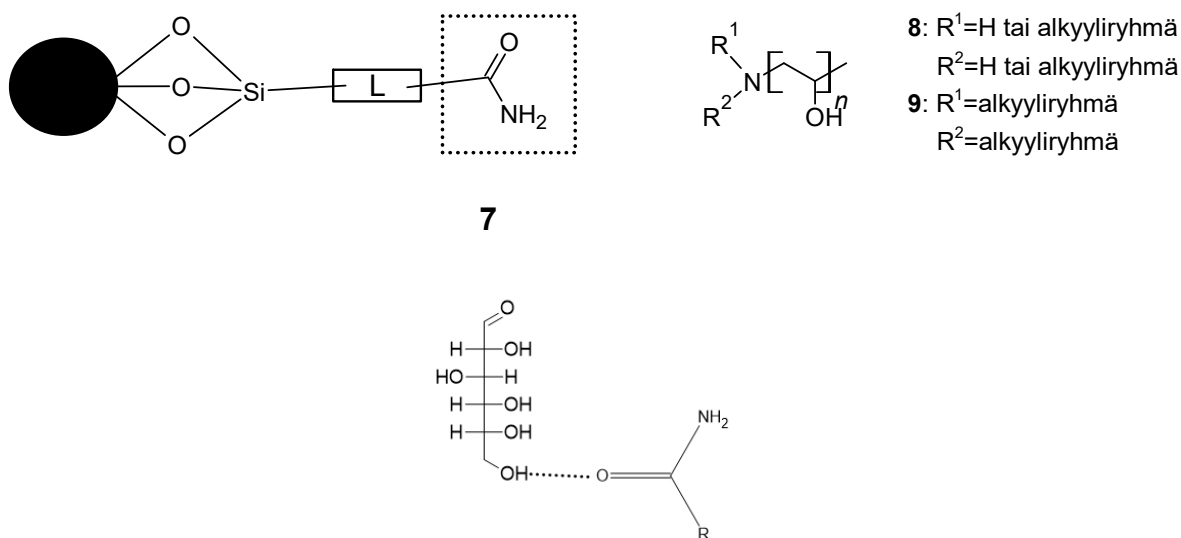


**6**

### 3.3 Monosakkaridien analysointi nestekromatografialla

Monosakkaridit ovat heikosti haihtuvia molekyyliä.<sup>1</sup> Jotta monosakkarideja voitaisiin analysoida, täytyy valita sellainen analyysimenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia haihtumattomia molekyyliä. Hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia (engl. hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) on paljon käytetty nestekromatografian muoto analysoitaessa poolisia molekyyliä korkean tai ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialla.<sup>11-14</sup> Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografiassa eluentina käytetään liuosta, jossa on vettä ja poolista orgaanista liuotinta, esimerkiksi asetonitriliä. Stationäärifaasi on poolinen, usein puhdasta silikaa tai silikaa, johon on kiinnitetty jokin poolinen funktionaalinen ryhmä kuten amidiryhmä. Tämän seurauksena stationäärifaasin ja analysoitavan näytteen välille syntyy hydrofiilisiä vuorovaikutuksia. Hydrofiilisen vuorovaikutuksen kromatografiaa käytetään monosakkaridien analysoinnissa.<sup>12,15</sup>

Nestekromatografia, jossa laitteiston ilmaisimena käytetään massaspektrometria tai valonsirontadetektoria (engl. evaporative light scattering detector, ELSD), on todettu toimivaksi haihtumattomille molekyyleille kuten monosakkarideille. Nestekromatografian avulla analysointi on nopeampaa ilman ylimääräistä työtä, ja esimerkiksi sokereiden derivatisointia eli niiden kemiallista muokkaamista analyysimenetelmään sopivaksi ei tarvita.<sup>4,16-18</sup> Monosakkarideja analysoitaessa tutkimuksissa on käytetty HILIC-kolonneja, joita ovat muun muassa amidi- **7**, amino- **8** ja tertiäärinen aminokolonne **9**. Tyypilliset tutkimuksissa käytetyt kolonnit ovat olleet Asahipak, HILICpak ja BEH Amide.<sup>11,14,16,19</sup> Asahipak-kolonnissa polyvinyylialkoholissa on kiinni aminoryhmä ja HILICpak-kolonnissa polyvinyylialkoholissa on kiinni tertiäärinen amiini. BEH Amide -kolonnissa (tästä eteenpäin BEH amidikolonne) amidiryhmä on kiinni siloksaanissa esimerkiksi propyyliin (rakenteessa **7** L) kautta, joka taas on sidoksissa BEH hybridipolymeeriin. Monissa tutkimuksissa BEH amidikolonne on todettu parhaimmaksi monosakkaridien analysointiin.<sup>14,16</sup> Monosakkarideissa on useita hydroksyyli ryhmiä, jotka vuorovaikuttavat kolonnissa stationäärifaasin kanssa, jolloin hydroksyyli ryhmän ja stationäärifaasissa olevan funktionaalisen ryhmän, esimerkiksi amidiryhmä, välille syntyy vetysidos kuvan 2 mukaisesti.<sup>14</sup>

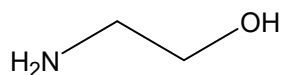


Kuva 2. Glukoosin ja amidiryhmän välille muodostuva vetysidos

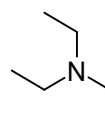
#### 4 GLUKOOSIN JA FRUKTOOSIN ANALYSOINTIIN KÄYTETYT OLOSUHTEET

Kolonnin valintaan vaikuttavat näytteen ominaisuudet kuten sen sisältämien analyttien funktionaaliset ryhmät. Kolonnissa vaihtelevat sen pituus, sisähalkaisija, pakkausmateriaali sekä sen partikkelien koko. Analyysin nopeuteen ja erotustehokkuuteen voidaan vaikuttaa muun muassa eluentin pH:lla, kolonniuunin lämpötilalla sekä virtausnopeudella.<sup>8</sup>

Koh tutkimusryhmineen tutkivat elintarvikenäytteiden fruktoosi-, glukoosi- ja sokerialkoholipitoisuuksia UPHLC-ELSD-menetelmällä. Eluentti koostui asetonitrilistä ja vedestä, ja siihen oli lisätty 0,05 % etanoliamiini (**10**) ja trietyyliamiini (**11**). Portaittaisen gradienttieluution alussa asetonitriliin ja veden suhde oli 6 minuutin ajan 90:10, jonka jälkeen suhde muutettiin 84:16, jossa se pidettiin 10 minuutin ajan. Etanoliamiinia käytettiin vetysidosten muodostajana muokkaamaan silikan pintaa, jolloin analyttien retentioajat pitenivät ja erottuminen parantui. Trietyyliamiinilla säädettiin eluentin pH:ta. Kalibrointiliuoksissa sokereiden pitoisuudet vaihtelivat välillä 0,1–5,0 %. Kolonnina käytettiin Acquity BEH amidikolonnia, jossa partikkelikoko oli 1,7 µm ja sisähalkaisija 2,1 mm. Kolonniuunin lämpötila oli 85 °C. Virtausnopeus oli 0,5 ml/min.<sup>16</sup>



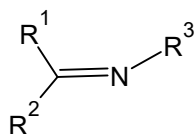
**10**



**11**

Ghfar tutkimusryhmineen käytti tutkimuksessa UHPLC-MS-laitteella monosakkaridien (glukoosi ja fruktoosi), disakkaridien ja oligosakkaridien analysointiin HILIC-menetelmää ja vesi-asetonitriliseoksen gradienttieluutiota. Eluenttiin lisättiin ammoniakkia niin, että ammoniakkipitoisuudeksi saatiin 0,1 %. Alussa 0–2 minuutin välillä veden ja asetonitriliin suhde oli 5:95, välillä 2–4 minuuttia suhde muutettiin lineaarisesti suhteeksi 30:70 ja välillä 4–6 minuuttia se muuttui lineaarisesti suhteeksi 40:60. Kolonnina käytettiin Acquity BEH amidikolonnia, jonka pituus oli 50 mm, sisähalkaisija 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Virtausnopeudeksi säädettiin 0,4 ml/min. Näytteet otettiin kolmesta eri taatelilajikkeesta.<sup>14</sup>

Han tutkimusryhmineen testasi kahta erilaista kolonnia Asahipak NH2P-50 2D (2,0 × 150 mm, 5 µm) ja Shodex HILICpak VG-50 4E (4,6 × 250 mm, 5 µm) monosakkaridien kuten fruktoosin ja glukoosin analysointiin. Paremmaksi kolonniksi tutkimuksessa todettiin Shodex HILICpak VG-50 4E-kolonne, koska sillä saavutettiin korkeampi resoluutio. Käyttämällä HILICpak-kolonnia vältettiin myös Schiffin emäksen (**12**) muodostuminen.<sup>11</sup> Schiffin emäs muodostuu primäärisen amiinin reagoitessa aldehydin tai ketonin kanssa, jolloin karbonyyliryhmä korvautuu Schiffin emäksen muodostavalla imiiniiryhmällä (C=N).<sup>20,21</sup> Monosakkaridien talteenottoaste pienenee, jos monosakkaridi reagoi aminokolonnin kanssa, muodostaen Schiffin emäksen. Tämän jälkeen analysoitiin gradienttieluution muutosten, virtausnopeuden (0,5–1,0 ml/min) ja kolonniuunin lämpötilan (30–60 °C) vaikutusta analyysiin.<sup>11</sup>



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> ja R<sup>3</sup> =  
alkyyli tai aryyli

## 12

Tutkimuksissa käytetyt kolonnit ja parhaiksi havaitut analyysiolosuhteet on koottu taulukkoon 1. Taulukossa näkyy myös glukoosin ja fruktoosin määrittämissärajat (engl. limit of quantification, LOQ) ja havaitsemisrajat (engl. limit of detection, LOD) eri menetelmillä. Määrittämissärajat kertovat yhdisteen pienimmän pitoisuuden, joka voidaan määrittää näytteestä luotettavasti, kun taas havaitsemisrajat kertovat yhdisteen pienimmän pitoisuuden, joka voidaan tietyllä luottamustasolla havaita näytteessä.<sup>4</sup> Koh:n tutkimuksessa todettiin, että menetelmä sopii hyvin pienien ja suurien sokeri- ja sokerialkoholipitoisuuksien määrittämiseen elintarvikenäytteistä. Sokerit ja sokerialkoholit saatiin erottumaan parhaiten 15 minuutissa 15 cm pitkällä kolonnilla.<sup>16</sup> Ghfar:n tutkimuksessa päädyttiin tulokseen, että UHPLC-MS-menetelmä sopii hyvin muun muassa fruktoosin ja glukoosin analysointiin elintarvikenäytteistä, kuten taateleista. Yhden näytteen analysointiin kului korkeintaan 7 minuuttia.<sup>14</sup> Han tutkimusryhmineen totesi UHPLC-MS-menetelmän

sopivan hyvin myös ihmisestä peräisin olevien seeruminäytteiden sisältämien monosakkaridien analysointiin ilman derivatisointia.<sup>11</sup>

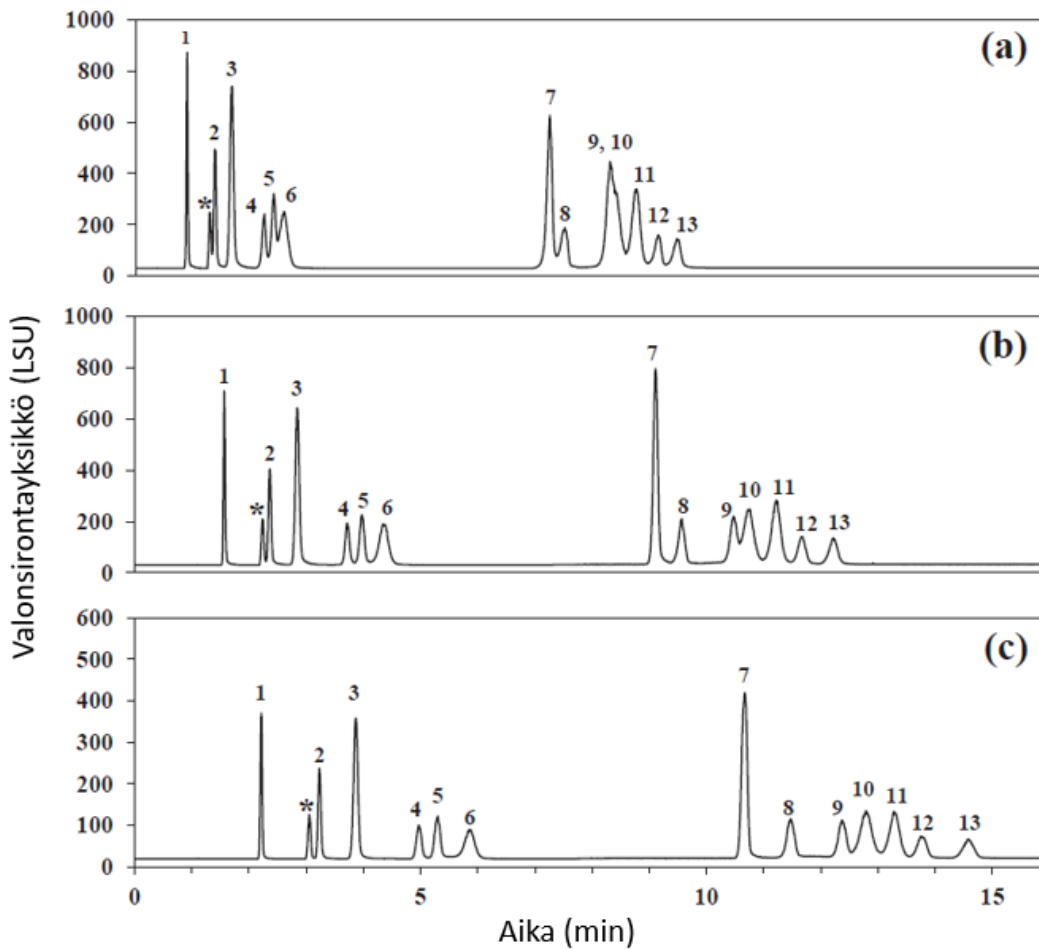
Taulukko 1. Eri tutkimuksissa käytetyt kolonnit ja analyysiolosuhteet, sekä analyyttien retentioajat ja määritetyt LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Retentioaika (min)	Virtausnopeus (ml/min)	Kolonne-uunin lämpötila (°C)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Eluentti
Acquity BEH Amide (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) <sup>16</sup>	Glukoosi: 5,70 Fruktoosi: 3,76	0,5	85	Glukoosi: 0,18 Fruktoosi: 0,15	Glukoosi: 0,59 Fruktoosi: 0,50	Gradientti-eluutio: vesi-asetonitrili, 0,05 % trietyyliamiini ja etanoliamiini
Acquity BEH Amide (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) <sup>14</sup>	Glukoosi: 5,32 Fruktoosi: 4,97	0,4	Ei mainittu	Glukoosi: 0,46 Fruktoosi: 0,45	Glukoosi: 1,08 Fruktoosi: 0,99	Gradientti-eluutio: vesi-asetonitrili, 0,1 % ammoniakki
Shodex HILICpak VG-50 4E (4,6 x 250 mm, 5 µm) <sup>11</sup>	Glukoosi: n. 28,5 Fruktoosi: n. 23	0,5	40	Glukoosi: 0,50 Fruktoosi: 0,50	Glukoosi: 1,00 Fruktoosi: 1,00	Gradientti-eluutio: vesi-asetonitrili, 0,1 % ammoniakki

#### 4.1 Kolonnin dimensioiden ja eluutin virtausnopeuden vaikutus erottumiseen

Kolonnin pituuden kasvattamisen on yleisesti havaittu parantavan resoluutiota kromatografisessa erotuksessa, niin myös monosakkarideja analysoitaessa. Tutkimuksessa, jossa aluksi käytettiin 50 mm pitkää amidikolonnin ja tämän jälkeen vaihdettiin se 100 mm ja 150 mm pitkiin kolonneihin, huomattiin pidempää kolonnin käytettäessä jokaisen komponentin kohdalla parempi erottuvuus. Eri kolonnien tapauksessa käytettiin samoja analyysiolosuhteita, jotka näkyvät taulukossa 1 Acquity BEH amidikolonnin (rivi 1) kohdalla. Käytettäessä 50 mm pitkää kolonnin

jokaista analyyttiä ei saatu erottumaan tarpeeksi selvästi toisesta analyytistä. Kuten kuvasta 3 huomataan, resoluutio paranee kolonnin pituuden kasvaessa.<sup>16</sup>

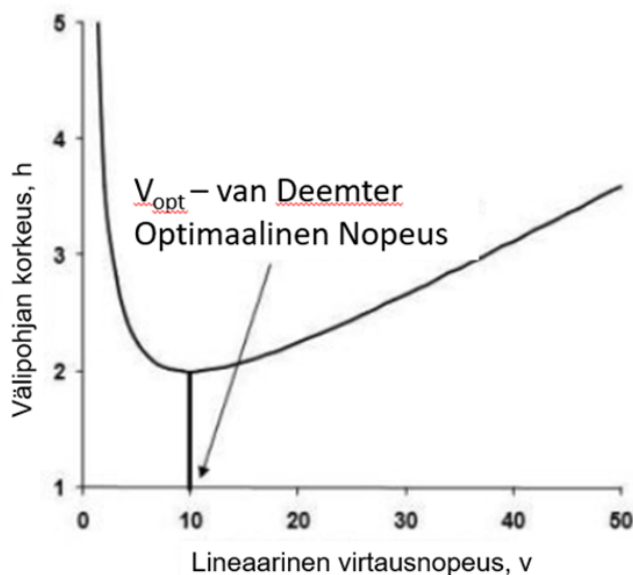


Kuva 3. Eri mittaisia kolonneja käyttäen saadut UHPLC-ELSD kromatogrammit standardinäytteille, jotka sisälsivät sokereita ja sokerialkoholeja: partikkelikoko 1,7  $\mu\text{m}$ , sisähalkaisija 2,1 mm ja pituus a) 50 mm b) 100 mm c) 150 mm. Numerolla 3 fruktoosi ja 6 glukoosi. Muokattu lähteestä<sup>16</sup>.

Pakattujen kolonnien tapauksessa voidaan kolonnin olosuhteiden optimointiin käyttää van Deemterin kuvaajaa (kuva 4), joka ottaa huomioon kolonnin pituuden, partikkelikoon ja eluentin virtausnopeuden. Siinä pystyakselilla on teoreettisen välipohjan korkeus ja vaaka-akselilla liikkuvan faasin lineaarinen nopeus. Kiinteän faasin huokoisella materiaalilla voidaan saavuttaa parempi tehokkuus, koska huokoisuuden kasvaessa myös materiaalin pinta-ala kasvaa. Myös partikkelien koko vaikuttaa erotustehokkuuteen, sillä erotustehokkuus kasvaa partikkelien koon

pienentyessä, mutta samalla kolonnissa vastapaine kasvaa. Tämä on yksi syy paine-eroon korkean ja ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistojen välillä.<sup>4,22</sup> Erotustehokkuuteen voidaan vaikuttaa eluentin virtausnopeudella. Hitaampi virtaus aiheuttaa piikin levenemistä. Toisaalta suuri virtausnopeus tekee piikeistä kapeampia, mutta pakottaa analyytit eluoitumaan lähempänä toisiaan, jolloin niiden erottuminen toisistaan voi heiketä.<sup>22</sup> Hanin tutkimuksessa oli 8 monosakkaridia ja niistä ensimmäisenä ja viimeisenä eluoituvan retentioaikojen ero oli 12 min virtausnopeuksilla 1,0, 0,9 ja 0,8 ml/min, 14 min virtausnopeuksilla 0,7 ja 0,6 ml/min ja 15 min virtausnopeudella 0,5 ml/min. Paras erottuminen saavutettiin virtausnopeudella 0,5 ml/min.<sup>11</sup>

Teoreettisen välipohjan yhtälöstä 1 havaitaan myös, että kolonnin pituuden kasvaessa kolonnin teoreettinen pohjaluku kasvaa eli mitä pidempi kolonni on, sitä enemmän siinä on teoreettisia välipohjia. Teoreettisten välipohjien lukumäärä  $N$  kuvaa kolonnin erotustehokkuutta. Pidemmän kolonnin tapauksessa analyytin retentioaika on pidempi ja myös kromatogrammissa havaittava analyytin piikki on leveämpi. Tällainen piikin leveneminen havaitaan kuvassa 3, kun 100 mm pitkä kolonni vaihdetaan 150 mm pitkään kolonniin. Kolonnin resoluution kasvaessa piikin muoto on ideaalinen eli piikit ovat kapeampia, kun taas resoluution huonontuessa piikit levenevät.<sup>22</sup>



$$N = \frac{L}{H} \quad (1)$$

$N$  = teoreettinen pohjaluku

$L$  = kolonnin pituus

$H$  = teoreettisen välipohjan korkeus

Kuva 4. Van Deemterin kuvaaja. Muokattu lähteestä<sup>22</sup>.

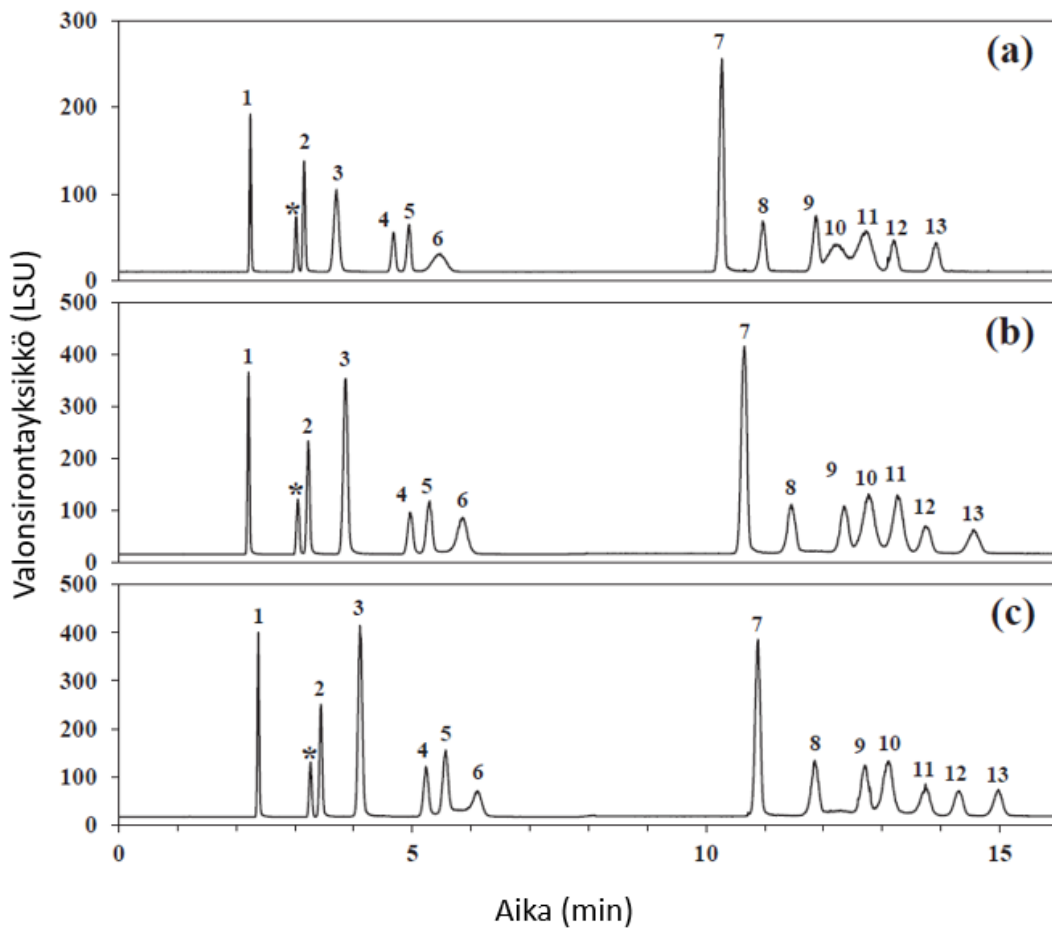


## 4.2 Eluentti ja kolonniuunin lämpötila

Eluentin valintaan vaikuttaa ennen kaikkea eluentin viskositeetti ja poolisuus. Tutkittavan analyytin täytyy liueta eluenttiin, mutta samalla sitoutua stationäärifaasiin. Korkea viskositeetti kasvattaa kolonnin sisäistä painetta, mikä ei ole optimaalista laitteen ja analyysin kannalta. Eluentin viskositeettiin vaikuttaa lämpötila, johon voidaan vaikuttaa kolonniuunin lämpötilaa säätämällä. Hanin tutkimuksessa lämpötilaa nostamalla saatiin lyhennettyä analyyttien retentioaikoja ja vaikutettua yhdisteiden erottumiseen. Esimerkiksi glukoosin retentioaika lyheni 33,5 minuutista 24 minuuttiin kun lämpötila nousi 30 °C:sta 60 °C:een. Samalla aika ensimmäisen ja viimeisen analyytin eluoitumisen välillä kasvoi 12 minuutista 17 minuuttiin. Paras erottuminen analyyttien välillä saavutettiin lämpötilassa 40 °C.<sup>11</sup>

Liikkuvan faasin pH:ta voidaan säätää lisäämällä eluenttiin modifioijia. Hiilihydraatteja analysoitaessa on käytetty etanoliamiinia modifioijana ja trietyyliamiinia pH:n säätäjänä johtuen niiden heikosta nukleofiilisyydestä, joka auttaa alentamaan havaitsemisrajoja ja parantamaan kvantitatiivista tarkkuutta.<sup>23</sup> Koh:n tutkimuksessa käytettiin gradientteluutiota, jolloin pH:n säätö tehtiin lisäämällä eluenttiliuoksiin A ja B pH:n säätöön tarkoitettua trietyyliamiinia **(10)**. Etanoliamiinia **(11)** käytettiin muokkaamaan silikan pintaa. Analyysi toistettiin kolmella eri määrällä trietyyliamiinia ja etanoliamiinia; a) 0,01 % etanoliamiini + 0,01 % trietyyliamiini, b) 0,05 % etanoliamiini + 0,05 % trietyyliamiini, c) 0,20 % etanoliamiini + 0,20 % trietyyliamiini. Trietyyliamiinin lisääminen ei vaikuttanut piikin leveyteen ja etanoliamiinin toimintaan.<sup>16</sup>

Parhaimmat tulokset saavutettiin lisäämällä molempiin eluenttiliuoksiin 0,05 % trietyyliamiinia, mutta tämä lisäsi minuutilla eluoitumiseen kuluvaa aikaa. Käytettäessä 0,01 % trietyyliamiinia ei saavutettu yhtä hyvää erottumista, koska vuorovaikutus kolonnin ja joidenkin analyyttien välillä oli huono. Kun pitoisuutta taas kasvatettiin 0,20 %:in muun muassa glukoosin piikki leveni. Parhain erottuvuus saavutettiin siis lisäämällä molempiin eluenttiliuoksiin 0,05 % trietyyliamiinia, kuten kuvassa 5 olevista kromatogrammeista voidaan huomata.<sup>16</sup>



Kuva 5. Eri trietyyliamiinin ja etanoliamiinin pitoisuuksilla saadut UHPLC-ELSD kromatogrammit standardinäytteille, jotka sisälsivät sokereita ja sokerialkoholeja: a) 0,01 % etanoliamiini + 0,01 % trietyyliamiini, b) 0,05 % trietyyliamiini + 0,05 % trietyyliamiini, c) 0,20 % etanoliamiini + 0,20 % trietyyliamiini. Numerolla 3 fruktoosi ja 6 glukoosi. Muokattu lähteestä<sup>16</sup>.

## 5 YHTEENVETO

Glukoosi ja fruktoosi ovat yleisimmät monosakkaridit ja niiden analysointi erilaisista näytteistä, kuten elintarvikkeista, on tärkeää esimerkiksi laadunvalvonnan vuoksi. Monosakkaridien analysoinnissa voi tulla vastaan haasteita, sillä ne ovat poolisia, heikosti haihtuvia yhdisteitä. Niiden kemiallisen samankaltaisuuden vuoksi ne ovat hankalasti erotettavia toisistaan. Monosakkaridien analysointiin sopivaksi menetelmäksi on todettu ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia yhdistettynä esimerkiksi massaspektrometriin tai valonsirontadetektoriin.

Glukoosin ja fruktoosin analysoinnissa on tyypillisesti käytetty HILIC-kolonneja, joissa materiaalina oli BEH hybridipolymeeri tai polyvinyylialkoholi. BEH hybridipolymeerissa oli kiinni siloksaani, joka oli linkkerin kautta sidoksissa amidiryhmään ja polyvinyylialkoholissa aminoryhmä tai tertiäärinen amiini. Havaittiin, että BEH amidikolonnin pituutta kasvattamalla saavutettiin parempi resoluutio, mutta myös muut kolonnin ominaisuudet ja olosuhteet vaikuttivat analyysiin. Mittauksissa käytettiin gradientteluutiota, jossa eluentina toimi poolinen vesi-asetonitriliseos, johon oli lisätty joko ammoniakkaa tai trietyyliamiinia ja etanoliamiinia. Tutkimuksissa virtausnopeus vaihteli välillä 0,4–0,5 ml/min. Tutkimuksessa, jossa tutkittiin virtausnopeuden vaikutusta analyysiin, saavutettiin paras resoluutio virtausnopeudella 0,5 ml/min. Samassa tutkimuksessa tultiin tulokseen, että paras erottuminen saatiin 40 °C:ssa. Trietyyliamiinin on havaittu parantavan monosakkaridien erottuvuutta käytettäessä kolonnia, jossa stationäärifaasina on siloksaani.

Aminokolonnilla oli korkeammat määritys- ja toteamisrajat kuin amidikolonnilla ja myös retentioajat olivat sillä huomattavasti suuremmat. BEH amidikolonnilla analysointi oli nopeaa ja glukoosin ja fruktoosin analysointi tapahtui 3–6 minuutissa. BEH amidikolonnilla saavutettiin toteamis- ja määritysrajat, jotka olivat jopa alle mikrogramman millilitrassa. Kaikissa tarkastelluissa tutkimuksissa analysoitiin glukoosin ja fruktoosin lisäksi myös muita analyyttejä, jotka tuli ottaa huomioon analyysiolosuhteita optimoitaessa. Tutkimuksien perusteella voidaan todeta, että kaikki kolme kolonnia soveltuivat hyvin glukoosin ja fruktoosin analysointiin. BEH

amidikolonnilla on saatu analysoitua pienempiä näytepitoisuuksia lyhyemmässä ajassa, joten se on osoittautunut parhaimmaksi kolonniksi.

## 6 KIRJALLISUUSVIITTEET

- (1) Mathews, C. K., *Biochemistry: Carbohydrates, Sugars, Saccharides, Glycans*, 4. painos, Pearson, Toronto, **2013**, 309-358
- (2) Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. 13 – Carbohydrates, *Principles of Organic Chemistry*, toimittaja: Ouellette, R. J., Rawn, J. D., Elsevier, Boston (MA), **2015**, 343–370  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802444-7.00013-6>.
- (3) Liu, J.; Li, J.; Yi, D.; Liu, Y.; Liu, R.; Xue, Y.; Huang, Q.; Liu, S.; Jiang, Y. Non-Derivatization Strategy for the Comprehensive Characterization of Neutral Monosaccharide Isomers and Neutral Disaccharide Isomers Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Chromatogr B*, **2021**, *1185*, 122972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122972>.
- (4) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis: High-Performance liquid chromatography*, 5. painos, Saunders golden sunburst series; Harcourt Brace College: Philadelphia (PA), **1998**, 725-767
- (5) Royle, L. Chapter 8 - Glycans and Monosaccharides, *Liquid Chromatography*, toimittaja: Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., Lloyd, D., Elsevier: Amsterdam, **2013**, 185–202, <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00008-5>.
- (6) Dong, M. W.; Zhang, K. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) in Method Development. *TrAC*, **2014**, *63*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.019>.
- (7) Cielecka-Piontek, J.; Zalewski, P.; Jelińska, A.; Garbacki, P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia* **2013**, *76* (21–22), 1429–1437.  
<https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>.
- (8) Unger, K. K.; Lamotte, S.; Machtejevas, E. Chapter 3 - Column Technology in Liquid Chromatography, teoksessa: *Liquid Chromatography*; Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., Lloyd, D., toimittaja: Elsevier: Amsterdam, **2013**, 41–86.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415807-8.00003-1>.
- (9) Gritti, F.; Guiochon, G. Performance of New Prototype Packed Columns for Very High-Pressure Liquid Chromatography. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (9), 1485–1495.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.057>.
- (10) Wyndham, K. D.; O’Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal Chem* **2003**, *75* (24), 6781–6788. <https://doi.org/10.1021/ac034767w>.
- (11) Han, B.; Park, J. W.; Kang, M.; Kim, B.; Jeong, J.; Kwon, O.-S.; Son, J. Simultaneous Analysis of Monosaccharides Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry without Derivatization for Validation of Certified Reference Materials. *J Chromatogr B*, **2020**, *1160*, 122370.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122370>.

- (12) Cavazzini, A.; Felinger, A. Chapter 5 - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, *Liquid Chromatography*, toimittaja: Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., Lloyd, D., Elsevier: Amsterdam, **2013**, 105–119.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415807-8.00005-5>.
- (13) Chung, H.; Shimura, A.; Matsui, T. Discriminant and Simultaneous HPLC Analysis of Reducing and Nonreducing Monosaccharides on a Polyethyleneimine-Attached Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Column. *Food Sci Technol Res* **2018**, *24* (3), 501–508.  
<https://doi.org/10.3136/fstr.24.501>.
- (14) Ghfar, A. A.; Wabaidur, S. M.; Ahmed, A. Y. B. H.; Alothman, Z. A.; Khan, M. R.; Al-Shaalan, N. H. Simultaneous Determination of Monosaccharides and Oligosaccharides in Dates Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Chem* **2015**, *176*, 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.035>.
- (15) Alpert, A. J. Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds. *J Chromatogr A* **1990**, *499*, 177–196.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3).
- (16) Koh, D. W.; Park, J. W.; Lim, J. H.; Yea, M. J.; Bang, D. Y. A Rapid Method for Simultaneous Quantification of 13 Sugars and Sugar Alcohols in Food Products by UPLC-ELSD. *Food Chem* **2018**, *240*, 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.142>.
- (17) Hetrick, E. M.; Kramer, T. T.; Risley, D. S. Evaluation of a Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Design Space for Sugars and Sugar Alcohols. *J Chromatogr A* **2017**, *1489*, 65–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.072>.
- (18) Poole, C. F. Chapter 2 - Derivatization in Liquid Chromatography, *Liquid Chromatography*, toimittaja: Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., Lloyd, D., Elsevier: Amsterdam, **2013**, 25–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00002-4>.
- (19) Guo, Y.; Gaiki, S. Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography. *J Chromatogr A* **2011**, *1218* (35), 5920–5938.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.052>.
- (20) da Silva, C. M.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V; Alves, R. B.; de Resende, M. A.; Martins, C. V. B.; de Fátima, Â. Schiff Bases: A Short Review of Their Antimicrobial Activities. *J Adv Res* **2011**, *2* (1), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.004>.
- (21) dos Santos, J. E.; Dockal, E. R.; Cavalheiro, É. T. G. Synthesis and Characterization of Schiff Bases from Chitosan and Salicylaldehyde Derivatives. *Carbohydr Polym* **2005**, *60* (3), 277–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.008>.
- (22) Carr, P. W.; Wang, X.; Stoll, D. R. Effect of Pressure, Particle Size, and Time on Optimizing Performance in Liquid Chromatography. *Anal Chem* **2009**, *81* (13), 5342–5353.  
<https://doi.org/10.1021/ac9001244>.
- (23) WEI, Y.; DING, M.-Y. Ethanolamine as Modifier for Analysis of Carbohydrates in Foods by Hplc and Evaporative Light Scattering Detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2002**, *25* (12), 1769–1778.