

HPLC STANOVENIE SACHARIDOV V PROCESE MODELOVANÉHO ZRÝCHLENÉHO STARNUTIA PAPIERA

KATARÍNA HROBOŇOVÁ^a, JOZEF LEHOTAY^a,
MICHAL JABLONSKÝ^b a SVETOZÁR
KATUŠČÁK^b

^a Oddelenie analytickej chémie, Ústav analytickej chémie,

^b Oddelenie chemickej technológie dreva, celulózy a papiera, Ústav polymérnych materiálov, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
jozef.lehotay@stuba.sk

Došlo 14.5.07, prepracované 12.3.08, prijaté 12.6.08.

Kľúčové slová: papier; degradačné produkty; sacharidy; HPLC

Úvod

Papier podlieha starnutiu, vplyvom ktorého sa rozpadajú dokumenty a knihy. Vzhľadom na množstvo týchto dokumentov a pokročilý stav ich znehodnotenia je snaha vypracovávať konzervačné metódy, ktorých základným cieľom je odstránenie hlavných príčin degradácie. Degradáčny procesy závisia od prítomnosti kyslých látok, vlhkosti, slnečného/UV žiarenia^{1,2}, teploty, oxidačných činidiel^{3,4} alebo mikroorganizmov^{5–7} a sú príčinou rozkladu celulózy a depolymerizácie celulózy, hemicelulózy a lignínu. Zníženie stupňa polymerizácie následne vedie k zmene mechanických a optických vlastností lignocelulóзовých vlákien^{8,9}. Sú známe tri spôsoby degradácie celulózy – degradácia teplom, oxidačná degradácia a kyslá alebo zásaditá hydrolýza. Znakom degradácie je roztrhnutie glykozidickej väzby a oxidácia –OH skupín v celulóзовom reťazci alebo otvorenie β-D-glukopyranozového kruhu a postupné oxidačné reakcie. Výsledkom je tvorba nízkomolekulových produktov ako sú voda, CO, CO₂, atď. Impregnácia papiera vhodnými činidlami (napr. Bookkeeper disperzia založená na MgO v perfluórheptáne) je jednou z možností stabilizácie celulózy proti kyslej deštrukcii¹⁰.

Prirodzeným starnutím papiera dochádza ku vzniku uhlíkovodíkových fragmentov z celulózy a hemicelulózy^{11–13}. Druh a množstvo degradačných produktov závisí od podmienok starnutia a dĺžky expozície¹⁴. Glukóza a xylóza, produkty hydrolytickej degradácie celulózy a xylánu, sú hlavné degradačné produkty starnutia papiera pri teplote 90 °C a relatívnej vlhkosti 100 %. Zvýšenie teploty (150 °C) má za následok zvýšenie počtu druhov degradačných produktov počas starnutia papiera^{15,16}.

Na analýzu sacharidov sa vypracovali mnohé analytické techniky. Metódy stanovenia monosacharidov a disacharidov zahŕňujú kapilárnu elektroforézu¹⁷ a chromatografické metódy. Staršie metódy (TLC, papierová chromatografia) boli nahradené plynovou a kvapalinovou chromatografiou. Chromatografické metódy sa využívajú aj na identifikáciu sacharidov predovšetkým v kombinácii s detekčnými technikami ako sú napr. hmotnostná spektroskopia (MS), infračervená spektroskopia (IR) a jadrová magnetická rezonancia (NMR)^{18–20}. Iónovo-výmenná chromatografia a adsorpčná chromatografia v kombinácii s refraktometrickou (RI), spektrofotometrickou (UV)²¹, pulznou ampérometrickou^{22,23} detekciou a detekciou rozptylu žiarenia²⁴ sú najčastejšie využívané HPLC separačné techniky vďaka svojej separačnej účinnosti. Citlivosť UV a RI detektora je podobná, ale nie dosť vysoká na stopové koncentrácie sacharidov. Jednou z možností zvýšenia citlivosti je fluorescenčná detekcia založená na pred- alebo pokolónovej derivatizácii skúmadlami ako napr. 9-fluorometylhydrazín²⁵, kyselina 2-aminobenzoová²⁶, 1-fenyl-3-metyl-5-pyrazolón²⁷, dansylhydrazín²⁸ a iné.

Cieľom predkladanej práce bolo navrhnúť najvhodnejšie HPLC podmienky na stanovenie sacharidov a jej využitie na sledovanie degradácie vzoriek papiera po modelovanom zrýchlennom starnutí.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

Suspenzia Bookkeeper na impregnáciu papiera – roztok MgO v perfluórheptáne (4,3 g l⁻¹, veľkosť častíc menej ako 1 μm) (Preservation Technologies, LP., USA).

Chemikálie na prípravu mobilných fáz – kyselina sírová (p.a.) (Microchem), kyselina octová (p.a.) (Microchem), acetonitril a metanol (pre HPLC) (Merck).

Chemikálie na derivatizáciu – derivatizačné skúmadlo dansylhydrazín (Sigma-Aldrich), kyselina trichlóroctová (p.a.) (Microchem).

Referenčné látky sacharidov – celobióza, D-arabinoza, D-fruktóza, D-galaktoza, D-glukóza, D-manóza, laktóza, D-xylóza a metyl-D-glukopyranozid (Merck).

Vzorka papiera – drevitý, strojne hladený, neglejený, novinový papier (hmotnosť: 45 g m⁻²; povrchové pH: 4,5 až 5,0; zloženie: 55 % mechanickej bielenej drevoviny, 20 % bielenej sulfátovej buničiny, 15 % zachytených odpadových vlákien, 10 % kaolínu) (Jihočeské papírny, JSC Větřní).

HPLC zariadenie a podmienky

Na separáciu sa použil kvapalinový chromatograf pozostávajúci z vysokotlakového čerpadla DeltaChrom SDS 030, dávkovacieho ventilu Rheodyne 7125, termostatu kolón LCT 5100, fluorescenčného detektora Shimadzu RF 551 a refraktometrického detektora Waters R401.

Na spracovanie signálu z detektora, zaznamenávanie, uchovávanie a vyhodnocovanie chromatografických záznamov sa použila datastanica CSW32.

Na separáciu a stanovenie uvedených sacharidov sa použili tri metódy:

Metóda I: Na separáciu sa použila chromatografická kolóna Polymer IEX v H^+ forme (250×8 mm I.D., $10 \mu\text{m}$) (Watrex) spojená s predkolónou Separon SGX C18 (10×4 mm I.D., $7 \mu\text{m}$) (Watrex). Mobilnou fázou bol 9 mmol l^{-1} roztok kyseliny sírovej. Prietok mobilnej fázy bol $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny 25°C . Na detekciu sa použil refraktometrický detektor. Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$.

Metóda II: Separácia sa uskutočnila použitím chromatografickej kolóny Separon SGX NH_2 (150×3 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Watrex) (kolóna A). Ako mobilná fáza sa použila zmes acetonitrilu a vody ($82:18 \text{ v/v}$). Prietok mobilnej fázy bol $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny 25°C . Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$ (bez predkoncentrácie) alebo $500 \mu\text{l}$ (s predkoncentráciou).

Na on-line predkoncentráciu sa použila kolóna Separon SGX NH_2 (30 a 150×3 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Watrex) (kolóna B) kondicionovaná s acetonitrilom. Po nadávkovaní $500 \mu\text{l}$ roztoku referenčných látok alebo extraktu vzorky do kolóny B, sa kolóna 3 min premývala acetonitrilom. Následne sa sacharidy eluovali opačným smerom z kolóny B do analytickej kolóny A mobilnou fázou (acetonitril-voda ($82:18 \text{ v/v}$)). Na detekciu sa použil refraktometrický detektor. Prietok mobilnej fázy na kondicionovanie a elúciu látok z predkolóny bol $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny a predkolóny bola 25°C .

Metóda III: Uskutočnila sa derivatizácia sacharidov podľa postupu uvedeného v práci²⁸. K $100 \mu\text{l}$ vodného roztoku vzorky v reakčnej nádobe sa pridalo $10 \mu\text{l}$ kyseliny trichlóroctovej ($10\% \text{ w/v}$) a $40 \mu\text{l}$ dansylhydrazínu ($5\% \text{ w/v}$ v acetonitrile). Zavretá reakčná nádoba sa temperovala 20 min na vodnom kúpeli pri teplote 65°C . Na ukončenie reakcie sa reakčná nádoba ponorila do ľadového kúpeľa. Pred dávkovaním do chromatografickej kolóny sa zmes zriedila vodou v pomere $1:1$.

Na separáciu sa použila chromatografická kolóna Nucleosil 120-5 C18 (250×4 mm I.D., $5 \mu\text{m}$) (Macherey-Nagel) spojená s predkolónou Separon SGX C18 (10×4 mm I.D., $7 \mu\text{m}$) (Watrex). Mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu a vodného roztoku kyseliny octovej (80 mmol l^{-1}) v pomere $21:79 \text{ (v/v)}$. Prietok mobilnej fázy bol $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ a teplota kolóny 25°C . Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$. Na detekciu sa použil fluorescenčný detektor ($\lambda_{\text{Ex}}=360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=470 \text{ nm}$).

Postupy

Priprava vzoriek papiera

Vzorka papiera (20 listov formát A4 a 160 listov formátu A5 zviazaných do knihy) bola kondicionovaná 24 h pri teplote $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (relatívna vlhkosť vzduchu $50 \pm 2\%$). Papier bol rozdelený na dve skupiny:

A (neimpregnovaný): Vzorka papiera (20 listov, formát A4) sa uzavrela pomocou zvarovacieho prístroja do obalu z PET/Al/PE materiálu (trojvrstvá laminovaná fólia s hliníkovou medzivrstvou). Takto pripravené vzorky papiera sa zabalili ešte dvakrát do PET/Al/PE obalu. Pripravené vzorky papiera sa podrobili zrýchlenému modelovanému starnutiu pri teplote $98 \pm 2^\circ\text{C}$ počas 0 – 30 dní.

B (impregnovaný): Vzorka papiera (160 listov papiera formátu A5 zviazaných do knihy) sa v reaktore uchytila za hrebeň knihy do držiaka a do stredu otvorenej knihy sa zaviedla tryska. Papier sa 4 h vákuovo sušil pri tlaku $0,1 \text{ MPa}$ a teplote 55°C . Potom sa ohrev vypol a impregnačný roztok (suspenzia Bookkeeper, 4 l) sa rozprašoval v reaktore 20 min pri teplote 20°C . Následne sa nadbytočná impregnačná kvapalina vypustila a reaktor sa 4 h vymrazoval (teplota -40°C , tlak $0,1 \text{ MPa}$). Na záver sa vzorka papiera po impregnácii klimatizovala 24 h pri teplote $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (relatívna vlhkosť vzduchu $50 \pm 2\%$).

Impregnované listy papiera z vnútornej časti knihy (2×20 listov formátu A5 uložených vedľa seba) sa uzavreli do obalu z PET/Al/PE materiálu. Takto pripravené vzorky impregnovaného papiera sa zabalili ešte dva krát do PET/Al/PE obalu a použili sa na modelovanie zrýchleného starnutia papiera pri teplote $98 \pm 2^\circ\text{C}$ počas 0 až 30 dní.

Modelovanie zrýchleného starnutia papiera

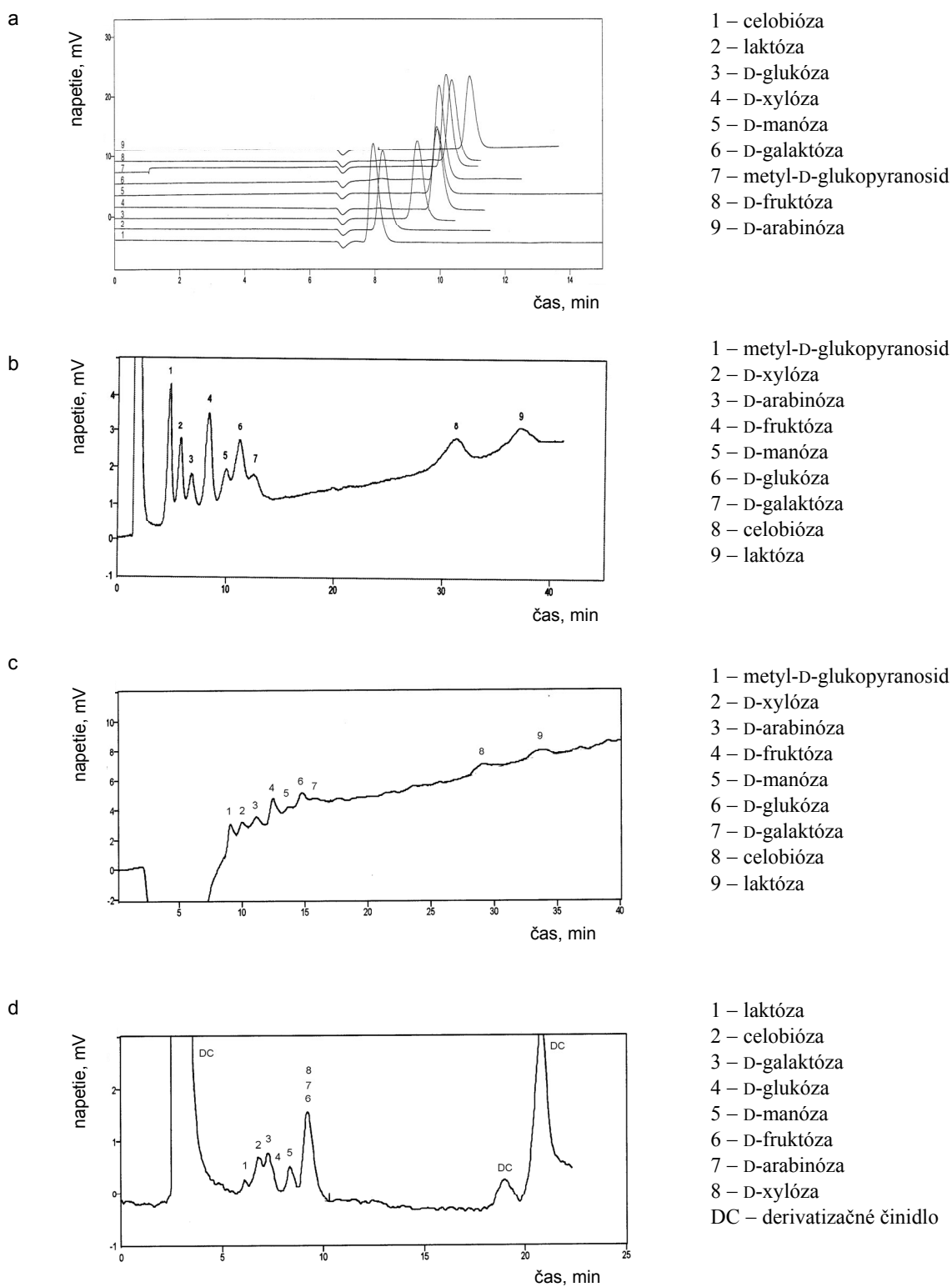
Modelovanie zrýchleného starnutia papiera sa uskutočnilo podľa normy²⁹ temperovaním vzoriek papiera uzavretých v troch obaloch z PET/Al/PE materiálu v cirkulačnej sušiarňi pri teplote $98 \pm 2^\circ\text{C}$ počas 0 , 2 , 3 , 5 , 10 , 15 , 20 , 30 dní.

Extrakcia impregnovaného a neimpregnovaného papiera kvapalinou – predseparačná úprava

K presne odváženej nastrihanej vzorke papiera (A alebo B) po modelovanom zrýchlenom starnutí (2 g) sa pridalo 15 ml deionizovanej vody (Millipore). Zmes sa 2 h premiešavala na trepačke. Čirý roztok sa prefiltroval cez fritu ($0,45 \mu\text{m}$). Filtrát sa použil na HPLC analýzu.

Výsledky a diskusia

Papier je relatívne stabilný materiál, avšak podlieha starnutiu, ktoré zapríčiňuje degradácia celulózy. Medzi degradačné produkty hydrolytickej degradácie celulózy a xylánu patria aj sacharidy. Druh a množstvo sacharidov závisí od podmienok a dĺžky starnutia. Z literárnych štúdií sa vybrala skupina sacharidov (celobióza, D-arabinóza, D-fruktóza, D-galaktóza, D-glukóza, D-manóza, laktóza, D-xylóza a metyl-D-glukopyranosid), u ktorých sa predpokladalo, že môžu byť degradačnými produktami starnutia papiera. Starnutie sa modelovalo formou zrýchleného starnutia pri teplote 98°C . Testované HPLC metódy sa aplikovali pre vzorku papiera impregnovanú „Bookkeeper“ roztokom a pre vzorku papiera bez impregnácie.



Obr. 1. HPLC chromatogramy analýzy sacharidov použitím kolón a) Polymer IEX-H, b) Separon NH₂ bez on-line predkoncentrácie, c) Separon NH₂ s on-line predkoncentráciou, d) Nucleosil 120-5 C18. Chromatografické podmienky uvedené v texte

HPLC separácia

Na separáciu vybraných sacharidov metódou HPLC sa testovali tri typy stacionárnych fáz.

V prvom kroku sa testovala iónovo-výmenná chromatografia (metóda I), kde sa separácia sacharidov uskutočnila na základe rozdielnosti pK_a hodnôt separovaných látok. Použitím chromatografických podmienok uvedených v experimentálnej časti sa však nedosiahla požadovaná separácia ($R_s \geq 1,0$) pre celú skupinu sledovaných sachari-

Tabuľka I

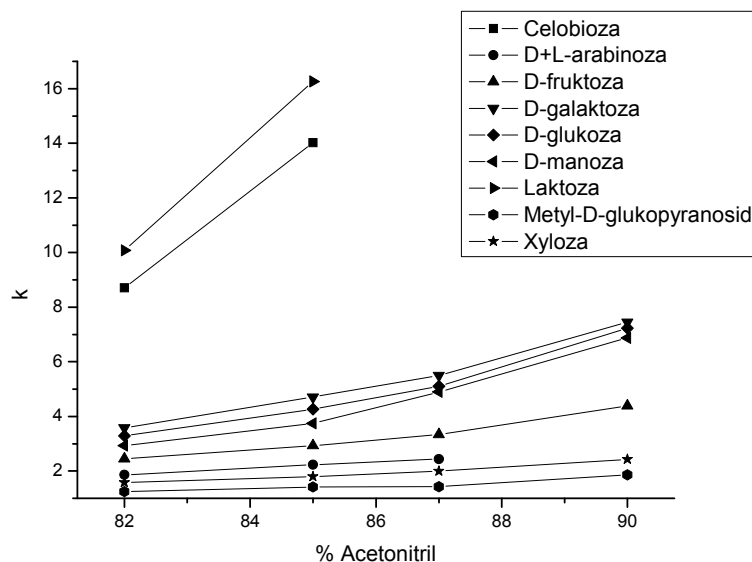
Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím ionexovej HPLC metódy; $n = 3$, RSD = do 5 %, koncentrácia sacharidov $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$

Sacharid	Polymer IEX-H	
	k	R_s
Celobióza	0,13	
Laktóza	0,17	0,55
D-Glukóza	0,33	1,73
D-Xylóza	0,42	1,27
D-Manóza	0,41	0,31
D-Galaktóza	0,42	0,43
Metyl- D-glukopyranozid	0,48	0,64
D-Fruktóza	0,45	0,59
D-Arabinóza	0,93	1,26

dov (tab. I, obr. 1a). Dosiahnuté hodnoty rozlišovacích faktorov pre skupinu látok xylóza/manóza/galaktóza/metyl-D-glukopyranozid/fruktóza boli veľmi nízke ($R_s = 0,3\text{--}0,6$). Na zlepšenie separácie uvedenej skupiny látok sa testoval vplyv koncentrácie kyseliny sírovej v mobilnej fáze v rozsahu $5\text{--}20 \text{ mmol l}^{-1}$, avšak výraznejšie zlepšenie sa nedosiahlo. Uvedená metóda je však vhodná na rýchlu separáciu (čas analýzy bol do 15 min) menšej skupiny sacharidov ako sú napr. laktóza, glukóza, xylóza, fruktóza, arabinóza.

Účinnejšia separácia (väčšie hodnoty R_s faktorov v porovnaní s metódou I) študovanej skupiny sacharidov sa dosiahla použitím NH_2 kolóny s mobilnou fázou acetonitril–voda, ktorých vzájomný pomer ovplyvňoval retenciu látok, ako to dokumentuje obr. 2. Výsledky separácie sacharidov použitím mobilnej fázy acetonitril–voda (82:18 v/v, metóda II) sú zhrnuté v tab. II. Doba analýzy bola 44 min (obr. 1b) a hodnoty rozlišovacích faktorov (R_s) boli v rozsahu 0,7–7,8. Mobilná fáza zloženia acetonitril–voda v pomere 82:18 (v/v) sa zvolila na separáciu sacharidov kvôli tomu, že sacharidy celobióza a laktóza už pri tomto zložení mali vysoké hodnoty retenčných faktorov, ktoré sa zvyšovaním koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze zvyšovali a zároveň ich elučné píky boli veľmi široké.

Uvedené chromatografické podmienky boli použité na separáciu sacharidov priamo vo vodnom extrakte vzoriek papiera (vzorky A a B) po procese modelovaného zrýchleného starnutia. Koncentrácia sledovaných sacharidov však bola pod medzou stanovenia danej metódy ($0,25$ až $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$). V prvom kroku sa na skoncentrovanie extraktov vzoriek použilo vákuové odparovanie. Tento



Obr. 2. Závislosť hodnoty retenčného faktora (k) sacharidov od koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze acetonitril–voda pre NH_2 kolónu. Chromatografické podmienky uvedené v texte

Tabuľka II

Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím HPLC metód s NH_2 stacionárnou fázou; $n = 3$, RSD = do 5 %

Sacharid	SGX NH_2^a		SGX NH_2^b	
	k	R_s	k	R_s
Metyl-D-glukopyranozid	1,83		1,82	
D-Xylóza	2,50	1,33	2,35	1,11
D-Arabinóza	2,99	0,89	2,73	1,14
D-Fruktóza	4,08	1,26	3,17	1,43
D-Manóza	4,91	1,10	3,60	1,45
D-Glukóza	5,67	0,67	3,94	1,37
D-Galaktóza	6,50	0,68	4,25	1,32
Celobióza	18,16	7,83	8,74	8,82
Laktóza	21,00	1,33	10,37	2,12

^a Bez predkoncentrácie, dávkovaný objem 20 μl , koncentrácia sacharidov 2,5 mg ml^{-1} , ^b s predkoncentráciou, dávkovaný objem 500 μl , koncentrácia sacharidov 0,25 mg ml^{-1}

spôsob skoncentrovania vodných extraktov nebol vhodný, pretože objem odparovaného extraktu bol veľký (15 ml), čo predlžovalo čas úpravy vodných extraktov. V druhom kroku sa testovala možnosť on-line predkoncentrácie sacharidov na predkolóne s NH_2 stacionárnou fázou. Postup predkoncentrácie zahrňoval dva kroky: I) nadávkovanie väčšieho objemu vzorky (500 μl štandardného roztoku sacharidov alebo vodného extraktu vzoriek papiera), fokusácia zóny sacharidov na začiatku predkolóny a zároveň ich separácia od zložiek matrice, II) elúcia sacharidov z predkolóny do analytickej kolóny, kde sa uskutočnila ich separácia. Zloženie mobilnej fázy, ktorá sa použila na fokusáciu zóny sacharidov na začiatku NH_2 predkolóny sa volilo tak, aby sacharidy neeluovali z predkolóny (nahromaďovali sa na začiatku kolóny), kým zložky matrice vzorky eluovali s krátkymi elučnými časmi (do 2,5 min). Ako vyplýva zo závislosti retenčného faktora sacharidov od koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze pre NH_2 kolónu a pre jednotlivé študované sacharidy (obr. 2), vhodnou mobilnou fázou na skoncentrovanie sacharidov v predkolóne bol acetonitril, ktorý bol tiež kompatibilný s mobilnou fázou pre analytickú kolónu (acetonitril-voda (82:18 v/v), metóda II). Na on-line predkoncentráciu sa testovali NH_2 predkolóny dvoch dĺžok 30 a 150 mm. Straty pri predkoncentracii použitím dlhšej predkolóny (150 mm) boli v rozsahu 40–55 %, kým použitím kratšej predkolóny (30 mm) 80–90 %. (Straty pri predkoncentracii sa zisťovali pre vzorku papiera A bez modelovaného procesu starnutia so štandardným prídavkom sacharidov s koncentráciou 0,25 mg ml^{-1} .) Vysoké straty pri predkoncentracii možno vysvetliť prítomnosťou vody,

ktorá bola použitá ako extrakčné činidlo vzoriek papiera. Množstvo nadávkovanej vodnej vzorky spôsobilo zmenu zloženia mobilnej fázy (acetonitril) použitej na on-line nahromadenie sacharidov na predkolóne, čo malo za následok čiastočnú elúciu sacharidov z predkolóny. Chromatografický záznam separácie sacharidov po on-line predkoncentracii dokumentuje obr. 1c. Chromatografické charakteristiky získané metódou s predkoncentráciou a bez predkoncentrácie sú zhrnuté v tab. II. Hodnoty retenčných faktorov pre separáciu s on-line predkoncentráciou sú nižšie v porovnaní bez on-line predkoncentrácie, čo bolo tiež spôsobené prítomnosťou väčšieho objemu vody vo vzorke dávkovanej do predkolóny (500 μl), ktorá znižuje retenčný faktor sacharidov na NH_2 kolóne, ako to dokumentuje obr. 2.

Tretia testovaná metóda bola založená na predkolónovej derivatizácii sacharidov s dansylhydrazínom (metóda III). Toto derivatizačné činidlo bolo zvolené preto, že reakcia je rýchla, uskutočňuje sa vo vodnom prostredí a citlivosť detekcie je dostatočne vysoká aj pre stopové koncentrácie sacharidov, zvlášť vo vodných vzorkách so zložitou maticou²⁹. Na separáciu derivatizačných produktov je vhodná chromatografia na obrátených fázach s fluorescenčnou detekciou. Použitím vhodných separačných a detekčných podmienok sa dosiahli pre študovanú skupinu sacharidov chromatografické charakteristiky (retenčný faktor v rozsahu 2,2–3,4 a hodnoty rozlíšenia v rozsahu 0,5–1,7) dokumentované v tab. III. Elučné píky s retenčným faktorom 0 a 6,5 prislúchali derivatizačnému činidlu. Chromatografický záznam separácie sacharidov po derivatizácii dokumentuje obr. 1d. Metyl-D-glukopyranozid nereagoval s derivatizačným činidlom. Výhodou tejto metódy bol kratší čas analýzy (25 min)

Tabuľka III

Hodnoty retenčných faktorov (k) a rozlíšenia (R_s) sacharidov použitím HPLC metódy založenej na derivatizácii sacharidov; $n = 5$, RSD = do 4 %, koncentrácia sacharidov 0,1 mg ml^{-1}

Sacharid	Nucleosil C18	
	k	R_s
Laktóza	2,23	
Celobióza	2,44	1,03
D-Galaktóza	2,50	0,82
D-Glukóza	2,71	0,79
D-Manóza	3,09	1,67
D-Fruktóza	3,41	1,28
D-Arabinóza	3,42	0,51
D-Xylóza	3,44	0,55
Metyl-D-glukopyranozid	–	–

Tabuľka IV
Medze detekcie a stanovenia testovaných HPLC metód

Sacharid	LOD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]				LOQ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]			
	metóda				metóda			
	I	II ^a	II ^b	III	I	II ^a	II ^b	III
Laktóza	250	1000	800	20	500	1500	1000	50
Celobióza	250	1000	800	20	500	1500	1000	50
D-Galaktóza	250	600	350	20	500	900	600	40
D-Glukóza	250	300	200	15	500	600	400	35
D-Manóza	250	350	300	10	500	750	500	30
D-Fruktóza	250	200	100	40	500	300	200	90
D-Arabinóza	250	350	200	20	500	750	500	40
D-Xylóza	250	200	150	20	500	350	250	40
Metyl-D-glukopyranozid	250	100	75	–	500	250	150	–

^a Bez predkoncentrácie, dávkovaný objem 20 μl , ^b s predkoncentráciou, dávkovaný objem 500 μl

v porovnaní s metódou II. Použitím uvedených podmienok sa však nepodarilo rozseparovať skupinu látok fruktóza/arabinóza/xylóza.

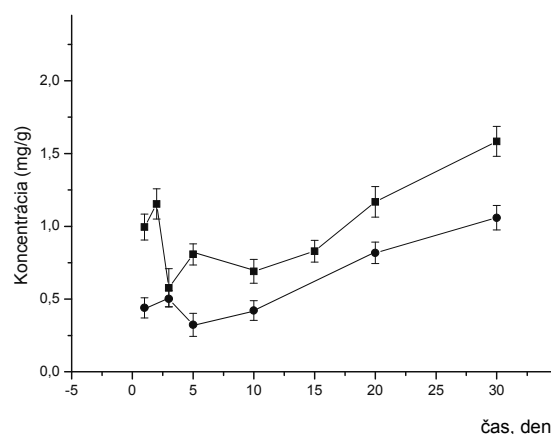
Jedným z rozhodujúcich kritérií medzi testovanými metódami bola medza stanovenia, keďže predpokladaná koncentrácia sacharidov vo vodných extraktoch vzoriek papiera bola nízka ($\leq \text{ppm}$). V tab. IV sú uvedené medze detekcie ($S/N = 3$) a stanovenia ($S/N = 10$) sacharidov pre testované chromatografické metódy. Použitím metódy s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou (metóda III) sa dosiahli medze stanovenia viac ako $10\times$ nižšie v porovnaní s ionexovou metódou (metóda I), metódou bez on-line a s on-line predkoncentráciou (metóda II). Vyššie medze stanovenia pre ionexovou metódu, metódu bez on-line a s on-line predkoncentráciou vyplývajú z použitia menej citlivej refraktometrickej detekcie a navyše pri použití on-line predkoncentráciou dochádzalo k vysokým stratám študovaných analytov.

Na kvantitatívnu analýzu sacharidov v extraktoch vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí sa použila metóda kalibračnej závislosti. Pre študované sacharidy mali kalibračné závislosti lineárny priebeh v rozsahu koncentrácií od medze stanovenia jednotlivých sacharidov do $5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ pre fruktózu a do $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ pre ostatné sacharidy s korelačnými koeficientami väčšími ako 0,995.

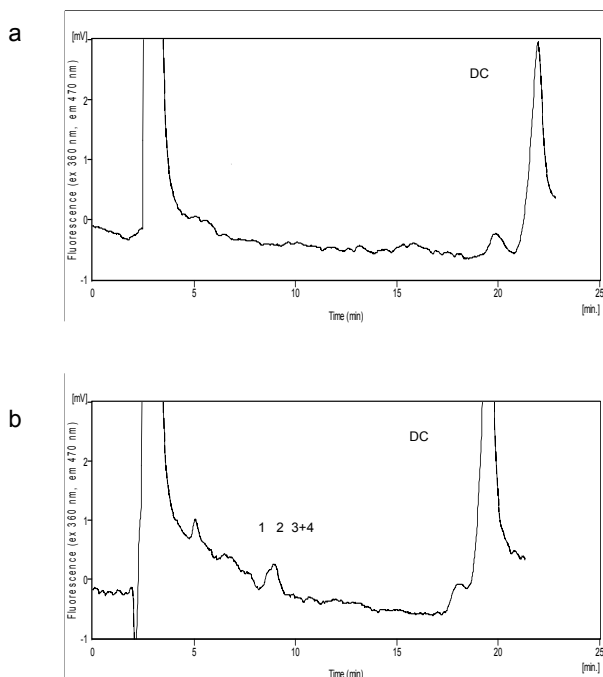
Analýza vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí

HPLC metóda s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou sa použila na analýzu vodných extraktov vzoriek neimpregnovaného (A) a impregnovaného (B) papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí (doba inkubácie vzo-

riek papiera 0, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 dní) pri teplote $98 \pm 2^\circ\text{C}$. V extraktoch sa zistila prítomnosť niektorých sacharidov nad medzou detekcie použitej HPLC metódy. Koncentrácia sacharidov závisela od typu vzorky (A, B) a času inkubácie (0–30 dní). Závislosti celkového obsahu sacharidov v papieri od času inkubácie v intervale 0–30 dní sú znázornené na obr. 3. Vzhľadom na typ vzorky, vyššia koncentrácia sacharidov bola zistená v extraktoch neimpregnovanej vzorky (A) než v extraktoch vzorky impregnovanej Bookkeeper suspenziou (B). Tento výsledok je v súlade s predpokladmi, keďže cieľom impregnácie



Obr. 3. Závislosť celkovej koncentrácie sacharidov od času inkubácie vzoriek neimpregnovaného (■) a impregnovaného (●) papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí v intervale 0–30 dní



Obr. 4. HPLC chromatogram analýzy vodného extraktu neimpregnovanej vzorky papiera (A) po a) 0 a b) 30 dňoch modelovaného zrýchleného starnutia. Chromatografické podmienky uvedené v texte. 1 – D-manóza, 2 – D-fruktóza, 3 – D-arabínóza, 4 – D-xylóza, DC- derivatizačné činidlo

papiera s Bookkeeper suspenziou (časť Príprava vzoriek papiera) ako deacidifikačného procesu bolo zabrániť štiepeniu celulóзовého reťazca počas starnutia papiera na mono- a disacharidy, čo má význam pri predĺžovaní životnosti a zlepšovaní kvality papiera. Z obr. 3 je tiež zrejmé, že počas prvých 10 dní modelovaného zrýchleného starnutia vzoriek papiera koncentrácia sacharidov nemala monotónny charakter a pri dlhších intervaloch modelovaného starnutia (10–30 dní) koncentrácia stúpala. Pribeh závislosti nasvedčuje tomu, že sacharidy, ktoré vznikali štiepením celulóзовého reťazca počas 0–3 dní starnutia papiera (narastanie koncentrácie sacharidov) pravdepodobne reagovali s ďalšími látkami prítomnými v reakčnom prostredí a tým priebeh závislosti koncentrácie sacharidov od času inkubácie v intervale 3–10 dní nemal monotónny charakter. Po určitom čase inkubácie papiera (10 dní) sa reakčný systém zmenil a dosiahol sa stav, kedy už zrejme nedochádzalo k vedľajším reakciám vznikajúcich sacharidov, čo sa prejavilo zvyšovaním koncentrácie sacharidov od času inkubácie (10–30 dní).

V extraktoch vzoriek papiera sa zistila prítomnosť D-manózy a D-fruktózy – D-arabínózy – D-xylózy v koncentráciách nad medzou stanovenia metódy. Obr. 4 dokumentuje charakteristické chromatogramy analýzy vodného extraktu vzoriek neimpregnovaného papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí 0 a 30 dní.

Záver

HPLC metóda stanovenia sacharidov tvorí vhodný doplnok k metódam analýzy a kontroly kvality lignocelulóзовých materiálov v modifikačných procesoch. Výber separačných a detekčných podmienok závisí od koncentrácie sacharidov vo vzorke.

Na HPLC analýzu vodných extraktov vzoriek papiera po modelovanom zrýchlenom starnutí bola vzhľadom na medzu stanovenia vhodnejšia metóda s derivatizáciou a fluorescenčnou detekciou. V extraktoch sa zistila prítomnosť sacharidov, ako degradačných produktov celulózy, nad medzou stanovenia použitej HPLC metódy. Koncentrácia sacharidov závisela od typu vzorky a času inkubácie.

Práca vznikla v rámci projektu Agentúry na podporu výskumu a vývoja Slovenskej republiky (projekt č. 20-035205 a 20-033004) a projektu Ministerstva školstva Slovenskej republiky KNIHA.SK 2003SP200280301. Účasť v projekte je podporovaná tiež z grantu Grantovej agentúry Slovenskej republiky (grant č. 1/2460/05).

LITERATÚRA

- Katuščák S.: Wood Res. 45, 1 (2000).
- Katuščák S., Ďurišová L.: Wood Res. 118, 75 (1988).
- Jablonský M., Vrška M., Katuščák S., Šutý Š.: Chem. Papers. S 99, 571 (2005).
- Valko L., Klein E.P., Kovařík-Bleha T., Šimin P.: Eur. Polym. J. 37, 1123 (2001).
- Katuščák S., Katuščáková G.: Holzforchung 41, 315 (1987).
- Kučera L. J., Katuščák S.: J. Forest. Sui. 144, 873 (1993).
- Katuščák S., Chovanec D., Katuščáková G.: Drevársky Výskum 120, 214 (1989).
- Kronek J., Rychlý J., Czomorová K., Kleinová A., Kirschnerová S., Vizárová K., Vrška M.: ChemZi 1, 217 (2005).
- Cedzová M., Vrška M., Szeiffová G.: Chem. Listy 99 (S), 442 (2005).
- Polovka M., Polovková J., Vizárová K., Kirschnerová S., Bieliková L., Vrška M.: Vibration Spectroscopy 41/1, 112 (2006).
- Shahani Ch. J.: Proc. Conf. "Save Paper", Swiss National Library, Berne 2006.
- Vives J. M. G., Escoda J. R. M., Guerra R. A., Hernandez L. A.: Restaurator 22, 187 (2001).
- Van Der Reyden D.: JAIC 31, 117 (1992).
- Feller R.: 15th Annual Meeting, American Institute for Conservation, Washington 1987.
- Erhardt D.: Paper Preservation Symposium, (Smith R., Norris T., ed.), Washington 1988.
- Erhardt D., Von Endt D., Hopwood W.: 15th Annual Meeting, American Institute for Conservation, Washington 1987.
- Hu Q., Hou T., Hu G., Fang Y.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 1047 (2002).

18. Zhang T., Zhou Y., Liu D., Petrus L.: *Bioresource Technol.* 98, 1454 (2007).
19. Boldizsár I., Szűcs Z., Füzfa Zs., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr., A* 1133, 259 (2006).
20. Menavuvu B. T., Poonperm W., Takeda K., Morimoto K., Granström T. B., Takada G., Izumori K.: *J. Biosci. Bioeng.* 102, 436 (2006).
21. Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr.* 891, 1 (2000).
22. Cai Y., Liu J., Shi Y., Liang L., Mou S.: *J. Chromatogr.* 1085, 98 (2005).
23. Cordella C., Militao J. S. L. T., Clement M.-C., Drajnudel P., Cabrolas D.: *Anal. Chim. Acta* 531, 239 (2005).
24. Karlsson G., Winge S., Sandberg H.: *J. Chromatogr., A* 1092, 246 (2005).
25. Rooyackers D. R., Van Eijk H. M. H., Deutz N. E. P.: *J. Chromatogr., A* 730, 99 (1996).
26. Anumula K. R.: *Anal. Biochem.* 220, 275 (1994).
27. Shen X., Perreault H.: *J. Chromatogr., A* 811, 47 (1998).
28. Mopper K., Johnson L.: *J. Chromatogr.* 256, 27 (1983).
29. ASTM 6819-02 (Standard test method for accelerated temperature aging of printing and writing paper by dry oven exposure apparatus).

K. Hroboňová^a, J. Lehotay^a, M. Jablonský^b, and S. Katuščák^b (^a*Department of Analytical Chemistry,* ^b*Department of Chemical Technology of Wood, Pulp and Paper, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*):
HPLC Determination of Saccharides in the Process of Accelerated Ageing of Paper

In study of degradation products of paper, LC methods were tested for determination of some saccharides in water extracts of paper. Saccharides were analyzed by ion-exchange and partition chromatography with differential refractive index detection and on-line preconcentration, and by RP-HPLC with fluorescence detection based on pre-column derivatization with dansylhydrazine. The limits of determination for sugars (cellobiose, D-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-mannose, D-xylose and methyl D-glucopyranoside) were evaluated by all the tested methods. The degradation products of paper after accelerated ageing for 0–30 days at 98 °C were estimated. The presence of some saccharides (D-mannose, D-fructose, D-arabinose and D-xylose) above the limits of determination was proved. Their concentrations depend on the type of paper modification and the ageing time.