

STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK V ROSTLINNÉM MATERIÁLU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU A KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

JIŘÍ VLČEK, BOŘIVOJ KLEJDUS
a VLASTIMIL KUBÁŇ^{*}

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická
univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 15.VIII.2001

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, kapalinová chromatografie, rostlinný materiál, fenolické látky, vanilin, kyselina kávová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina ferulová, kyselina salicylová, kyselina protokatechová, kyselina *p*-kumarová

Úvod

Současný zvýšený zájem o allelochemikálie^{1,2} je vysvětlitelný možností použití těchto chemických látek přírodní povahy jako ekologičtější alternativy dnes hojně využívaných syntetických prostředků sloužících k ovlivnění růstových fází rostliny či k její ochraně před napadením škůdci nebo plevely. Mimo oblast agronomie najdou látky s allelopatickými vlastnostmi využití i v mnoha jiných oborech, jako je medicína, farmacie, potravinářství, biologie atp.

Velkou část allelochemikálií³ tvoří fenolické látky, jejichž významnou skupinou jsou fenolkarboxylové kyseliny a jejich deriváty. Účinky fenolkarboxylových kyselin na rostlinu jsou velice rozdílné v závislosti na koncentraci a druhu sloučeniny. Stejná látka může v rozdílných koncentracích proces aktivovat i inhibovat. Obsah fenolických látek v rostlinném materiálu je závislý na mnoha faktorech. Koncentrace fenolických látek je dána rostlinným druhem, vývojovou fází rostliny, ročním obdobím, polohou vůči okolním rostlinám, stupněm poškození atd. Vhodná a citlivá analytická separační metoda nám umožňuje sledovat závislost obsahu fenolických látek na některém ze zvolených faktorů.

Pro sledování funkce a účinků fenolických látek již není dostačující stanovení celkového obsahu fenolických látek, nýbrž je nutné určit koncentraci jednotlivých fenolických sloučenin a jejich úlohu. Tento úkol je splnitelný za použití moderních analytických separačních metod. V literatuře popsané elektroforetické separace podobných skupin látek fenolické povahy ve vzorcích s jednoduchou maticí nejčastěji používají metody zónové elektroforézy⁴⁻⁶ (CE) a micelární elektrokinetické chromatografie^{7,8} (MEKC). Jako základní elektrolyt je nejvíce používán pufr boritanový, fosforečnanový, uhličitanový, nebo jejich směsi⁹⁻¹². V metodách MEKC se jako aditivum přidává natrium-dodecyl-sulfát (SDS), hexa-

decyl(trimethyl)amonium-bromid (CTAB) a hexadimethrin-bromid^{13,14} (HDB). Doposud se však k separaci a stanovení fenolických látek nejčastěji používá klasické metody kapalinové chromatografie^{5,15,16}.

Úkolem této práce bylo ukázat, že stejný úkol může být vyřešen i za použití kapilární elektroforézy s vysokým rozlišením. Metoda CE byla optimalizována pro rozdělení vybrané skupiny sedmi rostlinných fenolických látek (vanilinu, ferulové, *p*-kumarové, *p*-hydroxybenzoové, salicylové, kávové a protokatechové kyseliny), u kterých byl předpokládán výrazný allelopatický účinek.

Experimentální část

Pro elektroforetickou separaci, identifikaci a stanovení vybraných fenolických sloučenin byly používány přístroje Beckman P/ACE System 5510 ovládaný programem Gold (Beckman Instruments, Fullerton, USA) a HP^{3D} CE Instrument ovládaný programem ChemStation (Hewlett Packard, Analytical Division B4, Waldbronn, Německo). Oba přístroje byly vybaveny detektory s diodovým polem, kterými byla měřena absorpční spektra v rozsahu 190–400 nm na počátku, ve vrcholu a na konci každého píku. Pro dávkování vzorků bylo použito hydrodynamické dávkování vakuem (přístroj Hewlett Packard) nebo tlakem plynu (přístroj Beckman), které pro daný typ vzorků zajišťovalo dobrou reprodukovatelnost dávkovaného množství vzorku.

Separace probíhala při napětí 6 kV v nepotažené křemenné kapiláře Supelco-Select – FS75 o délce 31 cm (efektivní délka 22 cm), vnitřním průměru 75 μm a vnějším průměru 363 μm naplněné základním elektrolytem složeném z 20 mmol.l^{-1} kyseliny borité a 60 mmol.l^{-1} hydrogenfosforečnanu sodného o pH 8,75. Před prvním použitím byla kapilára iniciována nejprve propláchnutím 0,1 mol.l^{-1} roztokem kyseliny chlorovodíkové, vodou, 0,1 mol.l^{-1} roztokem hydroxidu sodného a opět vodou, každou látkou vždy po dobu 20 minut. Stejný postup, se zkrácenou dobou jednotlivých průplachů na 5 minut, se opakoval na začátku každého dne měření. Mezi jednotlivými separacemi byla kapilára před nástikem vzorku proplachována roztokem základního elektrolytu a po skončení separace vodou. Doba obou těchto průplachů byla 5 minut. V případě výskytu nežádoucích paměťových efektů se tyto obvyklé doby, které vyhovovaly pro většinu analyzovaných vzorků, aktuálně prodlužovaly.

Základní elektrolyt byl připraven rozpuštěním odváženého množství kyseliny borité a hydrogenfosforečnanu nebo dihydrogenfosforečnanu sodného (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko) v deionizované vodě (AquaDem 2, Tišnov, ČR) dočištěné systémem Millipore Milli-Q RG (Millipore, Bedford, USA). Požadované pH elektrolytu bylo nastaveno roztokem hydroxidu sodného (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko).

Pro CE byly základní roztoky standardů vanilinu, kávové, *p*-hydroxybenzoové (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko), ferulové, salicylové, protokatechové (Serva Feinbiochemica, Heidelberg/New York) a *p*-kumarové kyseliny (Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA) připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství standardu v methanolu (Merck KGaA,

* Autor pro korespondenci

Darmstadt, Německo) a doplněny vodou. Roztoky standardů a základního elektrolytu byly filtrovány membránovým filtrem s průměrem 47 mm a velikostí pórů 0,45 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a byly uchovávány v lednici.

HPLC separační systém Hewlett Packard model HP 1100 (Wilmington, USA) s detektorem s diodovým polem používal kolonu Zorbax SB C₁₈ Rapid ResolutionTM (75 × 4,6 mm i.d., velikost částic 3,5 μm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5 % (v/v) octové kyseliny. Pro separaci bylo použito lineárního gradientu od 5:95 až na 30:70 (v/v) za 12,5 minuty a průtoku 0,3 ml.min⁻¹. Kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Detekce byla prováděna při 280 nm. Absorpční spektra byla snímána ve vrcholu, patách a obou inflexních bodech každého píku v rozsahu 190–400 nm.

Pro přípravu vzorků a mobilní fáze byla použita rozpouštědla a chemikálie Merck (Darmstadt, Německo). Zásobní standardní roztoky fenolických látek o koncentraci 10 mg.l⁻¹ byly připraveny ve směsi voda–methanol (30:70, v/v). Pracovní roztoky standardů požadované koncentrace byly připravovány denně ředěním zásobních standardních roztoků vodou.

Vzorky suchých rostlin (pryskyřník cibulkový *Ranunculus bulbosus* – 8001, rozrazil rozekvítek *Veronica chamaedrys* – 8010 a krvavec menší *Sanguisorba minor* – 8012) a obilek ječmene (odruža Akcent v různém stupni zralosti) byly nejdříve jemně rozemlety na tříštivém mlýnku TZ 8017 (Oseva, Technický provoz n. p., Litomyšl, ČR). Navážka 0,5 g suché travní hmoty (1,75 g obilek ječmene) byla hydrolyzována 40 (50) ml 1 M-HCl pod refluxem po dobu jedné hodiny. Extrakt byl zfiltrován a doplněn na objem 50 ml. Alikvótní část 25 ml byla opakovaně (3×15 ml) extrahována diethyletherem (u suchých rostlin) nebo ethylacetátem (u obilek ječmene). Spojené organické frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným a do sucha odpařeny na vakuové odparce při teplotě 38±2 °C. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml směsi methanol–voda (1:1, v/v) pro CE separaci, nebo v roztoku mobilní fáze pro HPLC. Vzniklý roztok byl před nadávkováním filtrován jednorázovými filtry o průměru 13 mm a velikosti pórů 0,45 μm (MetaChem, Torrance, USA).

Při přípravě vzorků bylo použito rotační vakuové odparky Model 350 (Unipan, Polsko) a ultrazvukové lázně (Cole – Parmer Instrument Comp., Chicago, USA). Kontrola pH základního elektrolytu byla prováděna na pH metru PHM 64 se skleněnou elektrodou G 202B a nasycenou kalomelovou elektrodou K 401 (vše Radiometer, Copenhagen, Dánsko). Kalibrace pH metru se prováděla denně standardními tlumivými roztoky o pH 7,00 a 9,18 (±0,01) při 25 °C (Radiometer, Copenhagen, Dánsko). Pro tlakové dávkování a proplachování kapiláry byly přístroje připojeny centrálním rozvodem na generátor dusíku Nitrobox N5 (Italfilo Energieering s. r. l., Grosseto, Itálie).

Knihovna spekter separovaných látek

Použití detekce pomocí detektoru s diodovým polem umožnilo identifikaci jednotlivých fenolických látek ve vzorku nejen podle migračních a retenčních časů, ale i vyhodnocením jejich absorpčních spekter. Pro tento účel bylo nutné vytvořit knihovnu absorpčních spekter vybraných fenolických látek, jejichž přítomnost byla v rostlinném materiálu předpokládána. Spektra standardních látek byla získána proměření standardních roztoků, vzniklých rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml

methanolu a doplněním na 5 ml vodou, při optimálních experimentálních podmínkách. Spektra jednotlivých analytů vzorku byla srovnávána s odpovídajícími spektry ve spektrální knihovně a shoda byla posouzena za použití hodnoty tzv. faktoru shody (match factor, identická spektra mají faktor shody 1000). Hodnoty faktoru shody se při stanovení vzorků ječmenů a travin pohybovaly v rozmezí 995–999.

Výsledky a diskuse

Optimalizace složení a vlastností základního elektrolytu

První fází vývoje elektroforetické separační metody bylo stanovení nejvýhodnějších vlastností základního elektrolytu pro dělení vybrané skupiny fenolických látek s předpokládávanými allelopatickými vlastnostmi.

Modelová směs sedmi fenolických látek (vanilin, kávová, *p*-hydroxybenzoová, ferulová, salicylová, protokatechová a *p*-kumarová kyseliny) byla separována za použití uhličitánového tlumivého roztoku, tlumivého roztoku boritan/fosforečnanového a tlumivého roztoku boritan/fosforečnanového s přídavkem SDS nebo CTAB (1–60 mmol.l⁻¹). Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při použití směsi boritan-fosforečnan. Přídavek aditiv do roztoku tlumiče nevedl ke zvýšení rozlišení. Proto byl jako základní elektrolyt zvolen tlumivý roztok složený z kyseliny borité a dihydrogenfosforečnanu sodného.

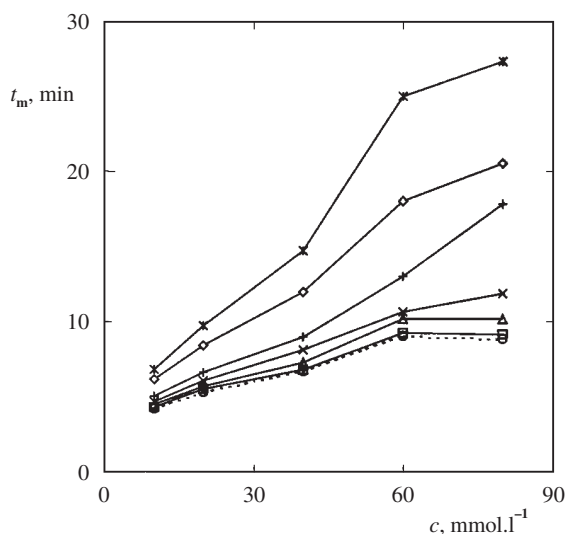
Prvním krokem byla optimalizace poměru a koncentrace jednotlivých složek pufru. Byla testována koncentrace kyseliny borité v rozsahu 5 až 40 mmol.l⁻¹ a fosforečnanu v rozsahu 20 až 80 mmol.l⁻¹, pH roztoků bylo udržováno na konstantní hodnotě. Optimální separace a délka analýzy odpovídala pufru složenému z 20 mmol.l⁻¹ kyseliny borité a 60 nebo 40 mmol.l⁻¹ dihydrogenfosforečnanu sodného. Změny migračních časů jednotlivých látek s měnícím se složením základního elektrolytu použitého k separaci jsou shrnuty v obrázcích 1 a 2. Při separaci modelové směsi standardů byl dostačující rozdíl pohyblivosti analytů odpovídající elektrolytu s koncentrací fosforečnanu 40 mmol.l⁻¹. Pro separaci reálných vzorků, kdy se v elektroforegramu objevují píky dalších podobných látek, byly vhodnější větší rozdíly migračních časů dosahované při použití pufru s 60 mmol.l⁻¹ fosforečnanu.

Další veličinou, která zásadním způsobem ovlivňuje kvalitu separace, je pH základního elektrolytu. Zásobní roztok základního elektrolytu kyseliny borité a dihydrogenfosforečnanu sodného byl za míchání magnetickou míchačkou titrován roztokem hydroxidu sodného na požadovanou hodnotu pH. V této fázi byla hodnota pH z neutrální postupně zvyšována s krokem 0,25 jednotky pH. Pro separaci se jako optimální ukázala hodnota pH 8,75. Při nižších hodnotách docházelo k nedostatečné separaci, vyšší hodnoty vedly k velkému nárůstu doby separace. Vzhledem k optimální hodnotě pH základního elektrolytu byl při další práci tento elektrolyt připravován z kyseliny borité a hydrogenfosforečnanu sodného, čímž se zmenšilo množství hydroxidu sodného potřebného pro nastavení pH. Vliv měnícího se pH na migrační časy jednotlivých látek je shrnut v obr. 3.

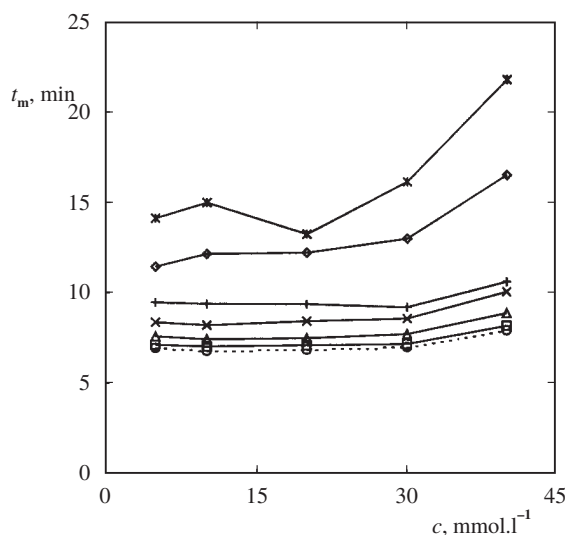
Separace probíhala za konstantního napětí 6 kV. Při tomto napětí dosahoval elektrický proud procházející kapilárou hodnoty 90 μA . Zvyšování separačního napětí vedlo ke zmenšení

rozdílů migračních časů separovaných látek, a tím i ke zhoršení kvality separace (obr. 4).

Separace probíhala v kapiláře, která byla v průběhu měření termostátována. Teplota separační kapiláry ovlivňuje rychlost migrace analytů, která se s nárůstem teploty zvyšuje. Dále s rostoucí teplotou dochází k rozšíření píků a klesá jejich



Obr. 1. Závislost migračního času (t_m) na koncentraci (c) fosforečnanu v základním elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); separace při napětí 6 kV v křemenné kapiláře o celkové délce 31 cm (efektivní délka 22 cm) a vnitřním průměru 75 μm naplněné základním elektrolytem 20 mmol.l⁻¹ kyselina boritá a 60 mmol.l⁻¹ dihydrogenfosforečnan sodný o pH 8,75



Obr. 2. Závislost migračního času (t_m) na koncentraci (c) boritanu v základním elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); experimentální podmínky viz obr. 1

symetrie, což vede ke snížení rozlišení píků. Modelová směs byla separována při teplotách 25, 30, 35 a 40 °C. Pro analýzu byla jako nejvhodnější zvolena teplota 25 °C.

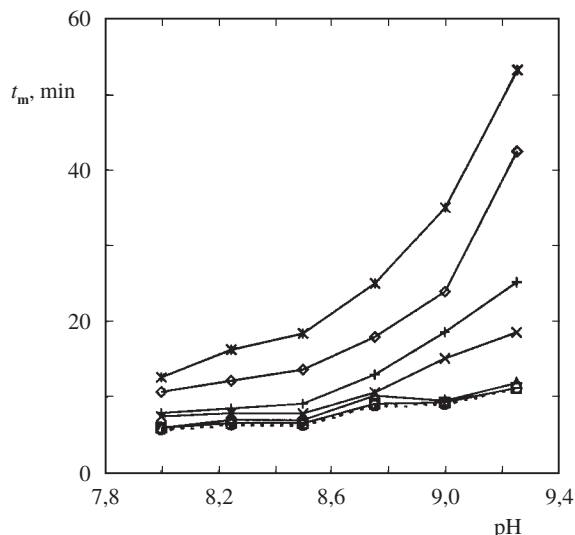
K získání kalibračních závislostí jednotlivých fenolických látek byly použity roztoky standardů o koncentraci 0,2; 2,0; 20,0 a 40,0 μg.ml⁻¹, kde každá ze čtyř použitých koncentrací jednotlivých standardů byla nezávisle proměřena třikrát. Pro měření kalibračních závislostí byla použita vlnová délka 254 nm (reference 450 nm), která vyhovovala většině standardů. Korelační koeficient kalibračních závislostí byl ve všech případech vyšší než 0,999.

Vzhledem k matici jednotlivých vzorků bylo možné obsah jednotlivých fenolických látek stanovit metodou kalibračních křivek. Meze detekce (LOD) a relativní směrodatné od-

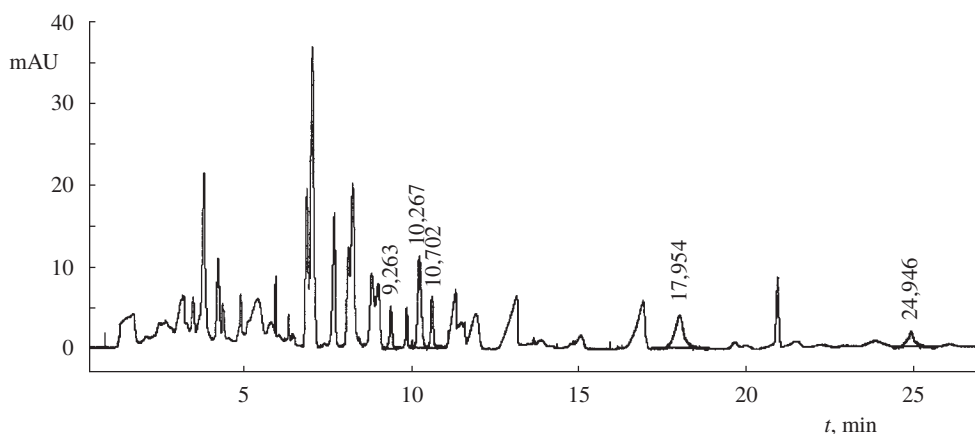
Tabulka I

Migrační časy (t_m), meze detekce (LOD) stanovené z trojnásobku maximálního kolísání základní linie slepého pokusu ($3 \times h_{\max}$) a relativní směrodatné odchylky měření (RSD), určené ze tří nezávislých opakování při koncentraci 2 μg.ml⁻¹ každé z elektroforeticky stanovovaných fenolických látek; podmínky CE separace viz obr. 1

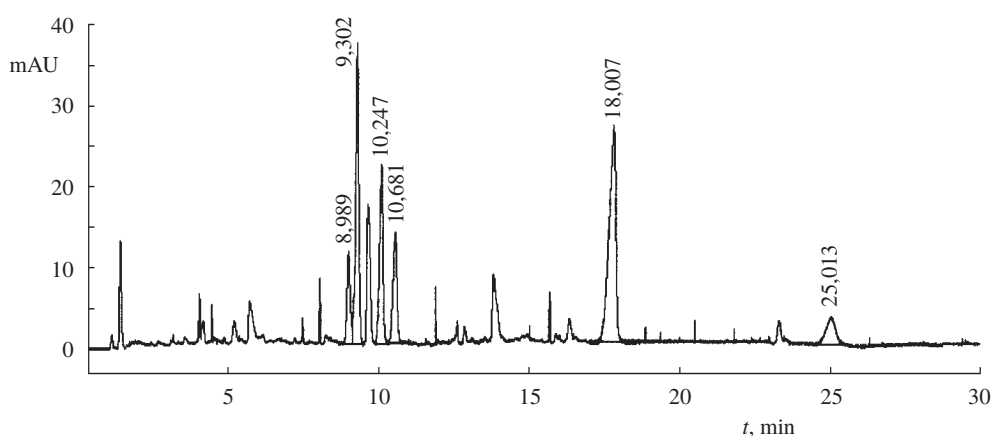
Analyt	t_m [min]	LOD [mg.ml ⁻¹]	RSD [%]
Vanilin	9,09	0,18	2,3
Kyseliny			
ferulová	9,27	0,16	2,5
<i>p</i> -kumarová	10,25	0,10	2,4
<i>p</i> -hydroxybenzoová	10,67	0,10	3,5
salicylová	13,04	0,51	3,0
kávová	17,98	0,13	6,0
protokatechová	25,00	0,15	6,4



Obr. 3. Závislost migračního času (t_m) na pH základního elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); experimentální podmínky viz obr. 1



Obr. 4. **Elektroforegram stanovení fenolických látek CE** (ferulová kyselina – 9,263 min, *p*-kumarová kyselina – 10,267 min, *p*-hydroxybenzoová kyselina – 10,702 min, kávová kyselina – 17,954 min, protokatechová kyselina – 24,946 min) ve vzorku 8010 rozrazil rozekvítek *Veronica chamaedrys*; experimentální podmínky viz obr. 1



Obr. 5. **Elektroforegram stanovení fenolických látek CE** (vanilin – 8,989 min, ferulová kyselina – 9,302 min, *p*-kumarová kyselina – 10,247 min, *p*-hydroxybenzoová kyselina – 10,681 min, kávová kyselina – 18,007 min, protokatechová kyselina 25,013 min) ve vzorku AII – obilky ječmene odrůdy Akcent; experimentální podmínky viz obr. 1

chytky měření (RSD), určené ze tří nezávislých opakování při koncentraci $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ každé ze stanovovaných fenolických látek jsou shrnuty v tabulce I a doplněny migračním časem. Meze detekce za podmínek zvolených pro stanovení vybraných fenolických látek byly stanoveny z trojnásobku maximálního kolísání základní linie slepého pokusu ($3 \times h_{\text{max}}$).

Stanovení obsahu vybraných rostlinných fenolických látek metodami CE a HPLC

Analýza reálných rostlinných materiálů s sebou přináší problém složité matrice obsahující velké množství látek s podobnými vlastnostmi, a tím i velice podobnými, nebo dokonce totožnými, migračními časy, jako mají hledané analyty. Další problém přináší skutečnost, že se stanovované fenolické látky nenacházejí jako volné, ale mohou být v rostlině přítomny v různých konjugovaných formách. Proto, aby byla analýza vůbec možná, je nutné oddělit analyty od osnovy a izolovat je z požadovaných konjugovaných forem.

Vhodné podmínky separace, získané optimalizací elektroforetického systému pro rozdělení modelové směsi fenolických sloučenin, byly použity pro stanovení fenolických látek s allelopatickými vlastnostmi ve vzorcích suché travní hmoty a obilky ječmene.

Ve třech vzorcích suché travní hmoty a čtyřech vzorcích obilky ječmene, připravených k analýze výše popsaným způsobem, byla stanovena vybraná skupina fenolických sloučenin s allelopatickými vlastnostmi výše popsanou metodou kapilární elektroforézy s vysokým rozlišením.

Elektroforetický systém byl nastaven na ideální podmínky separace, stanovené na modelové směsi standardních roztoků. Na elektroforegramu vzorků se na rozdíl od modelové směsi vyskytly i píky dalších v rostlině obsažených látek (obr. 4 a 5). Proto byl ke stanovení fenolických látek v reálných vzorcích jako základní elektrolyt zvolen pufr s $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforečnanu, při jehož použití se více lišily migrační časy stanovovaných látek. Metodou HPCE dosažené výsledky byly srovnány s výsledky stanovení metodou HPLC. Stanovení HPLC probíhalo za podmínek popsaných v literatuře¹⁵ na ko-

Tabulka II

Množství fenolických látek [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] stanovená metodou CE v jednotlivých vzorcích travin (pryskyřník cibulkový *Ranunculus bulbosus* – 8001, rozrazil rozekvítok *Veronica chamaedrys* – 8010 a krvavec menší *Sanguisorba minor* – 8012) a obilek ječmene (odráda Akcent v různém stupni zralosti) spolu se srovnávacími hodnotami získanými HPLC; podmínky separace CE viz obr. 1; mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5 % (v/v) kyseliny octové, byl použit lineární gradient od 5:95 až na 30:70 (v/v) za 12,5 minuty a průtok $0,3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; kolona byla temperována na teplotu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Metoda	Vzorek	Vanilin	Kyseliny				
			ferulová	<i>p</i> -kumarová	<i>p</i> -hydroxybenzoová	kávová	protokatechová
<i>Trávy</i>							
HPCE	8001	0,20±0,02	0,28±0,01	0,19±0,02	–	0,82±0,03	1,42±0,03
	8010	–	0,32±0,03	1,41±0,02	0,29±0,04	1,24±0,05	0,28±0,02
	8012	–	0,29±0,01	0,20±0,02	0,31±0,02	0,70±0,03	–
HPLC	8001	0,22±0,02	0,34±0,01	0,20±0,02	0,14±0,02	0,74±0,02	1,33±0,03
	8010	0,04±0,01	0,26±0,02	1,47±0,02	0,38±0,01	1,16±0,03	0,24±0,01
	8012	0,15±0,02	0,31±0,01	0,21±0,01	0,27±0,02	0,70±0,01	0,13±0,01
<i>Ječmeny</i>							
HPCE	A I	5,03±0,16	18,95±0,15	7,21±0,07	1,21±0,05	1,93±0,07	7,82±0,05
	A II	3,27±0,07	10,69±0,04	4,05±0,10	2,47±0,04	5,84±0,06	1,06±0,03
	A III	5,52±0,12	28,01±0,16	10,52±0,02	8,60±0,12	1,80±0,07	3,85±0,04
	A IV	3,64±0,06	27,54±0,10	11,11±0,06	7,08±0,08	1,83±0,01	3,27±0,02
HPLC	A I	4,96±0,12	19,49±0,10	7,24±0,07	1,29±0,06	1,82±0,06	7,69±0,05
	A II	3,23±0,08	10,61±0,09	3,89±0,04	2,45±0,05	5,81±0,04	1,22±0,03
	A III	5,45±0,06	28,15±0,05	10,65±0,06	8,56±0,07	1,74±0,06	3,70±0,05
	A IV	3,75±0,05	27,35±0,05	11,05±0,07	7,19±0,06	1,75±0,04	3,21±0,04

loně ZORBAX SB C_{18} bez použití v literatuře popsané SPE předseparace. Příprava vzorků pro HPLC i CE byla totožná, lišila se pouze v poslední fázi, kdy pro nástřik do HPLC byl suchý odpárek rozpuštěn v roztoku použité mobilní fáze.

Množství fenolických látek stanovená kapilární elektroforézou v jednotlivých vzorcích travin a obilek ječmene jsou shrnuta v tabulce II spolu se srovnávacími hodnotami získanými HPLC. Výsledky měření koncentrace fenolických látek (vanilin, ferulová, *p*-kumarová, *p*-hydroxybenzoová, kávová a protokatechová kyseliny) ukazují na rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na rostlinném druhu ve vzorcích sušených rostlin pryskyřníku, rozrazilu a krvavce. Vzorky různě zralých obilek ječmene Akcent demonstrují změnu obsahu v odlišných růstových fázích rostliny.

Závěr

Práce popisuje dostatečně rychlou (celková doba separace a stanovení, včetně pre- a postkondicionace – 35 min) a citlivou CE metodu stanovení a identifikace skupiny látek s allelopatickými vlastnostmi v rostlinném materiálu. LOD jednotlivých analytů leží v rozmezí $0,10\text{--}0,51\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (trojnásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu $3\times_{\text{max}}$). Metoda je použitelná jako alternativní možnost ke stanovení klasickou chromatografickou metodou. Výsledky ukazují na velmi dobrou shodu obsahů získaných měřeními metodami CE a kapalinové chromatografie.

Analýza rostlinného materiálu s sebou vždy přináší kom-

plikace v podobě složité matrice vzorku, lišící se vzorek od vzorku, která obsahuje velké množství interferujících látek velice podobných vlastností. Metoda CE umožnila stanovení hodnot koncentrace analytů ve vzorcích travin i ječmene. Přítomnost vysoké koncentrace neidentifikované látky s velice blízkým migračním časem ve složité matrici vzorků travin znemožnila stanovení některých analytů (kyseliny protokatechové a vanilinu v krvavci, kyseliny *p*-hydroxybenzoové v pryskyřníku a vanilinu v rozrazilu).

Problematika byla řešena v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR, reg. č. MSM 432100001 a grantu GA ČR reg. č. 521/99/0863.

LITERATURA

1. Klejdus B., Kubáň V.: Chem. Listy 93, 243 (1999).
2. Inderjit, Dakshini K. M. M., Einheling F. A.: *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications, ACS Symposium Series 582*. American Chemical Society, Washington, 1995.
3. Rice E. L.: *Allelopathy*. Academic Press, Orlando 1984.
4. Carcia-Viguera C., Bridle P.: Food Chem. 54, 349 (1995).
5. Andrade P. B., Oliveira B. M., Seabra R. M., Ferreira M. A., Ferreres F., Garcia-Viguera C.: Electrophoresis 22, 1568 (2001).
6. Ramos R., Andrade P. B., Seabra R. M., Pereira C., Ferreira M. A., Faia M. A.: Food Chem. 67, 39 (1999).

7. Rodriguez-Delgado M. A., Perez J. P., Sanchez M. J., Montelongo F. J. G.: *Chromatographia* 52, 289 (2000).
8. Issaq H. J.: *Electrophoresis* 20, 3190 (1999).
9. Masselter S., Zemann A., Bobleter O.: *Chromatographia* 40, 51 (1995).
10. Park S., Lunte S. M., Lunte C. E.: *Anal. Chem.* 67, 911 (1995).
11. Rodriguez-Delgado M. A., Perez M. L., Corbella R., Gonzalez G., Montelongo F. J. G.: *J. Chromatogr., A* 871, 427 (2000).
12. Kulomaa A., Siren H., Riekkola M. L.: *J. Chromatogr., A* 781, 523 (1997).
13. Masselter S. M., Zemann A. J.: *Anal. Chem.* 67, 1047 (1995).
14. Watanabe T., Yamamoto A., Nagai S., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 793, 409 (1998).
15. Klejdus B., Kubáň V.: *Phytochem. Anal.* 11, 375 (2000).
16. Amakura Y., Okada M., Tsuji S.: *J. Chromatogr., A* 891, 183 (2000).

J. Vlček, B. Klejdus, and V. Kubáň (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Determination of Phenolic Substances in Plant Materials by Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography**

A simple, sensitive and fast capillary electrophoretic method was optimized for the identification and determination of allelopathic phenolic compounds (vanillin, caffeic, 4-hydroxybenzoic, ferulic, salicylic, protocatechuic and 4-coumaric acids) in plant materials. Separation in an uncoated silica capillary (Supelco Select – FS75, effective length 22 cm, total length 31 cm, 75 μm I.D., 363 μm O.D.) was performed at 6 kV in 20 mmol.l^{-1} boric acid and 60 mmol.l^{-1} Na_2HPO_4 buffer (pH 8.75). The method was applied to the determination of vanillin, 4-hydroxybenzoic and protocatechuic acids in *Ranunculus bulbosus*, *Veronica chamaedrys* and *Sanguisorba minor* and in barley seeds. The results were in good agreement with those obtained by liquid chromatography.