

VYUŽITÍ COULOMETRICKÉHO DETEKTORU PRO ANALÝZU FENOLICKÝCH LÁTEK

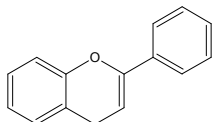
KATEŘINA MARCANÍKOVÁ
a BLANKA BEŇOVÁ

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-
technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573,
532 10 Pardubice
Blanka.Benova@upce.cz

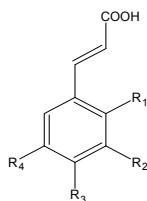
Úvod

Fenolické látky patří do široké skupiny antioxidantů. Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Záměrně se proto přidávají do potravin, kde svým antioxidačním působením prodlužují jejich stálost. Hlavní význam fenolických látek spočívá v tom, že působí jako prevence proti koronárním chorobám, snižují riziko rakovinových onemocnění a působí proti virům^{1,2}.

Fenolické látky jsou přírodní antioxidanty a můžeme je proto najít v přírodě. Nachází se v různých částech rostlin, např. kořeny, listy, plody. Podle struktury rozdělujeme fenolické látky do několika skupin³. První skupinu tvoří flavanoly odvozené od heterocyklického flavanu (obr. 1). Další skupinu tvoří aromatické hydroxykyseliny, kam patří deriváty kyseliny skořicové (obr. 2) a kyseliny benzoové (obr. 3).

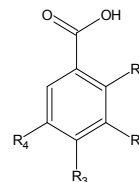


Obr. 1. Struktura flavanu



k. kávová: $R_2 = R_3 = \text{OH}$
k. *o*-kumarová: $R_1 = \text{OH}$
k. *m*-kumarová: $R_2 = \text{OH}$
k. *p*-kumarová: $R_3 = \text{OH}$
k. ferulová: $R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$

Obr. 2. Kyselina skořicová a její deriváty



k. gallová: $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
k. gentisová: $R_1 = R_4 = \text{OH}$
k. vanilová: $R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$
k. syringová: $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$

Obr. 3. Kyselina benzoová a její deriváty

Pro stanovení fenolických látek se v posledních letech začalo využívat vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s coulometrickým detektorem. Coulometrická detekce s elektrodovým polem je velmi citlivý způsob detekce, ve které je využita série 4–16 průtočných coulometrických cel, ve kterých dochází k elektrochemické přeměně analytu. Na každou celu je vložen jiný, ale konstantní potenciál a každá látka se oxiduje (nebo redukuje) při jiném potenciálu, ten je pak nazýván tzv. dominantním potenciálem⁵.

CoulArray detektor, používaný v této práci, je coulometrický multielektrodový detektor, který byl zkonstruován pro použití v HPLC a který se používá pro detekci elektroaktivních látek. Umožňuje charakterizaci látek na základě poměru odezvy signálu velkého počtu kanálů⁵.

Experimentální část

Standardy, chemikálie a vzorky

Standardy fenolických látek: kyselina gallová, kyselina protokatechuová, protokatechaldehyd, kyselina 4-hydroxyfenyloctová, kyselina vanilová, kyselina kávová, ethylvanilin a vanilin byly získány od firmy Fluka (Buchs, Switzerland). Kyselina ferulová, gentisová a syringová byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Ostatní používané chemikálie byly: octan amonný (Fluka, Buchs, Switzerland), kyselina mravenčí (Lachema, Brno, ČR), acetonitril (Merck, Darmstadt, Německo). Redestilovaná voda byla připravena na přístroji Ultraclear na Univerzitě Pardubice.

V aplikační části této práce bylo analyzováno 14 vzorků medoviny. Mezi vzorky byly jak medoviny přírodní (vzorky 5, 7 a 9), tak i s přidavkem ovocných šťáv, koření i bylin, např. medovina mandlová (vzorky 4

Tabulka I

Meze detekce a stanovitelnosti standardních látek

Fenolické látky	Mez detekce [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Mez stanovitelnosti [$\mu\text{g l}^{-1}$]
Kyselina gallová	5,4	18,0
Kyselina protokatechuová	6,5	21,6
Kyselina gentisová	2,8	9,3
Protokatechaldehyd	4,8	16,1
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	4,2	13,9
Kyselina vanilová	5,3	17,6
Kyselina kávová	4,4	14,8
Kyselina syringová	4,4	14,8
Vanilin	2,2	7,3
Kyselina ferulová	5,3	17,6
Ethylvanilin	1,9	6,5
Kyselina kumarová	4,0	13,3

a 10), ořechová (vzorky 2, 6 a 11), višňová (vzorek 14), sherry (vzorek 1), hořká (vzorek 3), bylinná (vzorky 12 a 13) nebo černorybízová (vzorek 8). Tyto vzorky byly dodány českými a moravskými včelaři. Medoviny byly zavřené uchovávány v ledničce, po otevření byly ihned analyzovány.

RP-HPLC analýza

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu s elektrochemickým CoulArray detektorem, který se skládal z následujících součástí:

- CoulArray detektor s 8 elektrochemickými celami,
- chromatografické pumpy,
- termostat pro kolonu, směšovač, tlumič pulzů a šesticestný dávkovací ventil,

vše od ESA, Chelmsford, MA, USA.

- odplyňovač Vacuum Degasser DG 3014, ECOM, ČR.

Podmínky vlastního měření byly následující. Byla připravena dvousložková mobilní fáze. Mobilní fáze A (MF A), kterou představoval 5 mM vodný roztok octanu amonného, byla připravena rozpuštěním příslušné navážky octanu amonného v 1 dm⁻³ redestilované vody. Požadované pH ~ 3 bylo dosaženo přidáním několika kapek koncentrované kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B (MF B) byla připravena smícháním 80 % acetonitrilu a 20 % MF A. Takto připravené mobilní fáze byly vždy filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Při optimalizaci separace jednotlivých fenolických látek byly používány pracovní roztoky o koncentraci 5 mg l⁻¹, které byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 100 mg l⁻¹. K separaci byla použita kolona Gemini 3u C18 110A (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm , Phenomenex, USA). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,4 ml min⁻¹, byla použita gradientová eluce, dávkovaný objem vzorku byl 10 μl a teplota kolony 35 °C.

Látky byly detegovány při potenciálech 200–900 mV s krokem po 100 mV.

Příprava vzorků k analýze zahrnovala ředění medovin v poměru 1:5 až 1:30 a filtraci přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

Výsledky a diskuse

Cílem studie bylo vyvíjení metody pro analýzu fenolických látek a její následná aplikace na reálné vzorky medovin. Složení mobilních fází, optimální pH mobilní fáze a velikost průtoku bylo převzato z literatury⁵. Dalším úkolem bylo tedy optimalizovat eluci. Nejprve byla vyzkoušena izokratická eluce, při níž ale nedošlo k rozdělení látek. Proto bylo nutné optimalizovat gradient mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno několik gradientových programů, jako optimální vyšel: 0–10 min (2 % MF A), 20–30 min (10 % MF A), 30–35 min (20 % MF A), 35–40 min (40 % MF A) a po 40 min (100 % MF A). Při zvoleném gradientu byly rozděleny všechny standardní látky. Byly odečteny jejich retenční časy a následně byly připraveny kalibrační závislosti standardních látek v rozsahu, který byl očekáván ve vzorcích. Pro standardní látky byly také vyhodnoceny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Tyto hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Optimalizované podmínky byly aplikovány na analýzu reálných vzorků medovin. Porovnáním retenčních časů standardů s časy vzorků medovin bylo v medovinách identifikováno celkem 12 fenolických látek. Dále byl na základě kalibračních závislostí zjištěn jejich obsah.

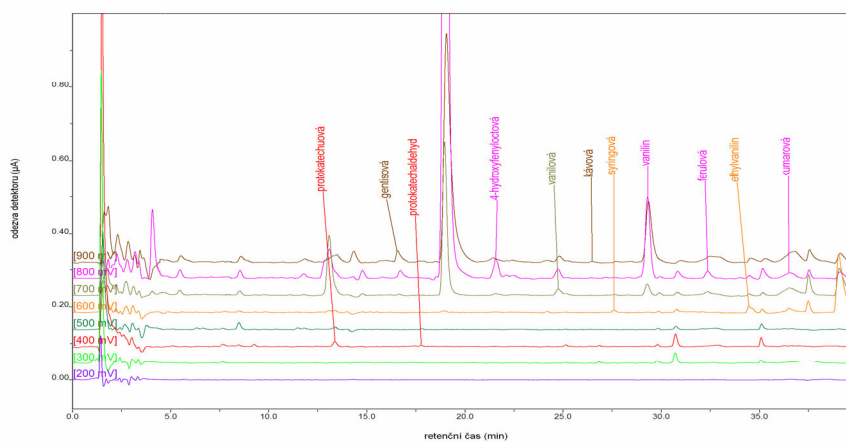
Na obr. 4 a 5 jsou zobrazeny ukázkové chromatogramy přírodní a černorybízové medoviny.

Na první pohled je patrný rozdíl mezi těmito dvěma ukázkovými chromatogramy, přírodní medovina neobsa-

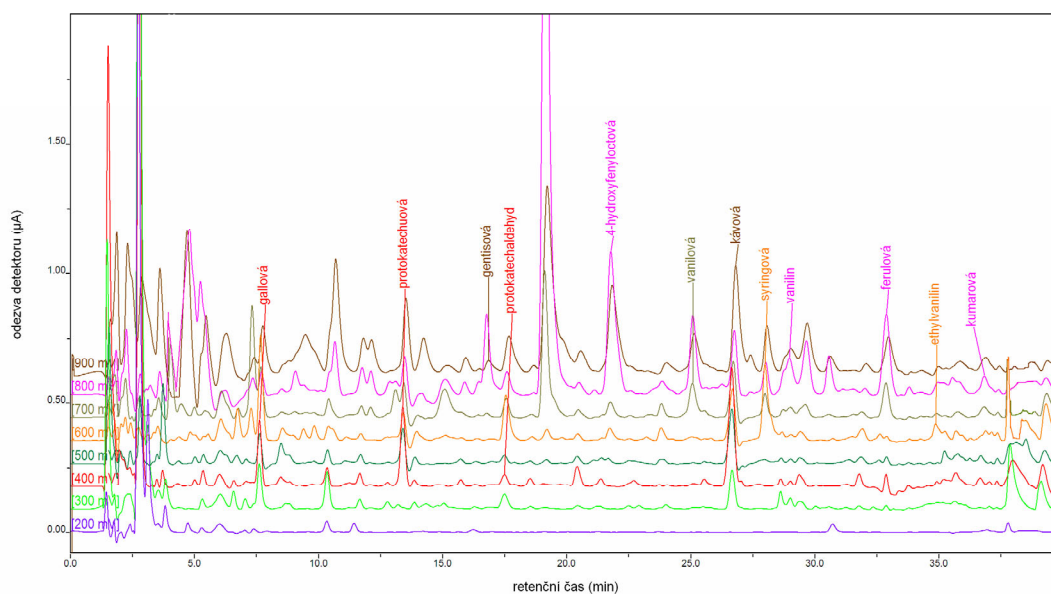
Tabulka II
Obsah fenolických sloučenin v medovinách

Fenolické látky [mg l ⁻¹]	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6	vzorek 7
Kyselina gallová	0,805	0,100	0,099	0,084			0,096
Kyselina protokatechuová	0,344	0,020	0,146	0,054	0,058	0,053	0,013
Kyselina gentisová	0,039		0,026	0,022	0,023	0,017	0,014
Protokatechaldehyd	0,029	0,048	< LOQ	0,027	< LOQ	0,022	0,023
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	0,057	0,060	0,088	0,054	0,041	< LOQ	< LOQ
Kyselina vanilová	0,152	< LOQ	0,071	0,114	0,051	< LOQ	0,076
Kyselina kávová	0,087	0,081	0,060	< LOQ	0,028	< LOQ	0,029
Kyselina syringová	0,038	0,088	0,057	< LOQ	0,035	0,030	0,029
Vanilin	4,126	0,312	2,214	40,403	1,195	2,378	65,856
Kyselina ferulová	0,224	0,059	0,079	0,085	0,090	0,121	0,111
Ethylvanilin	0,075	0,063	0,084	0,028	0,039	0,065	0,034
Kyselina kumarová	2,335	0,097	0,073	0,057	0,112	0,107	0,175
Fenolické látky [mg l ⁻¹]	vzorek 8	vzorek 9	vzorek 10	vzorek 11	vzorek 12	vzorek 13	vzorek 14
Kyselina gallová	3,367		0,092		0,570		0,472
Kyselina protokatechuová	1,525	0,129	0,033	0,079	0,084	0,242	0,600
Kyselina gentisová	0,191	0,024	0,022	0,109	0,054	0,015	
Protokatechaldehyd	0,272	0,062	0,042	0,030	0,064	0,027	0,238
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	1,867	< LOQ	0,025	0,042	0,615	0,248	0,494
Kyselina vanilová	0,724	< LOQ	0,071		0,376	0,222	0,369
Kyselina kávová	2,998	0,031		0,427	1,339	0,797	1,317
Kyselina syringová	2,443	0,089	0,072		0,040	0,066	0,271
Vanilin	1,297	0,270	0,324	5,171	1,167	1,548	0,868
Kyselina ferulová	1,701	0,154	0,108	0,071	2,556	1,919	2,418
Ethylvanilin	0,332	0,036		0,054	0,985	0,091	1,496
Kyselina kumarová	0,273	0,083	0,022	0,028	0,059	0,110	0,109

	látko nebyla ve vzorku nalezena
< LOQ	látko ve vzorku přítomna, ale její obsah byl pod mezi stanovitelnosti



Obr. 4. Ukázkový chromatogram přírodní medoviny



Obr. 5. Ukázkový chromatogram černorybízové medoviny

huje tolik látek ani v takovém množství jako medovina černorybízová, tedy s přidavkem ovocné šťávy.

Závěr

V této práci byl použit kapalinový chromatograf vybavený CoulArray detektorem. Bylo prakticky ověřeno, že technika kapalinové chromatografie s coulometrickou detekcí je selektivní a velmi citlivá. Meze detekce analyzovaných látek se pohybovaly řádově v jednotkách, maximálně desítkách $\mu\text{g l}^{-1}$. Optimalizovaná metoda, kterou bylo separováno 12 látek během 40 min, byla použita pro stanovení obsahu těchto látek ve vzorcích medovin. Bylo zjištěno, že látky s přidavkem ovocné šťávy či bylinných extraktů zpravidla obsahují větší množství fenolických látek než medoviny přírodní, tedy bez jakéhokoliv přidavku.

Tato práce byla realizována za podpory projektu MSM 0021627502.

LITERATURA

1. Slanina J., Táborská E.: Chem. Listy 98, 239 (2004).
2. Čepička J., Karabon M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
3. Škeříková V., Grynová L., Jandera P.: Chem. Listy 98, 343 (2004).
4. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*. Osis, Tábor 2002.
5. Beňová B.: *Disertační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2008.