

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN V SILÁŽÍCH KAPILÁRNÍ ISOTACHOFORÉZOU A KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU

MARTIN DUŠEK^a, FRANTIŠEK KVASNIČKA^a a JITKA MORAVCOVÁ^b

^aÚstav konzervace potravin a technologie masa, ^bÚstav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6
Martin.Dusek@vscht.cz

Došlo 8.4.03, přepracováno 11.8.03, přijato 20.11.03.

Klíčová slova: organické kyseliny, siláž, kapilární isotachoforéza, kapilární zónová elektroforéza

Úvod

Kyseliny octová, mléčná, propionová a máselná jsou produkty fermentačních procesů při silážování píce a jejich obsah i relativní zastoupení jsou jedním z hlavních kritérií pro posouzení kvality siláže. Tradiční metodou^{1,2} bylo hodnocení pomocí tzv. Fliegovy stupnice, kdy je vzorek siláže destilován s vodní parou a kyselina octová a máselná jsou poté stanoveny v destilátu titračně. Do výpočtu se dále zahrnuje pH vodného výluhu a obsah sušiny a výsledek je vyjádřen pomocí bodů odvozených z nelineární stupnice. Přesnost této metody je značně omezena nízkou selektivitou, a proto byly hledány účinnější separační analytické postupy. Hodnocení kvality siláží se v ČR provádí podle ČSN 467092 a ČSN 467012 metodami odvozenými od metody popsané Fliegem¹. V současné době mohou být karboxylové kyseliny v silážích sledovány nejrůznějšími chromatografickými metodami (plynová³, kapalinová^{4–7} a tenkovrstvá⁸ chromatografie) i elektromigračními technikami^{9,10}. Velkou výhodou elektromigračních metod oproti chromatografickým je jednoduchá příprava vzorku, což je zvláště důležité pro rutinní analýzy velkých souborů vzorků. Rovněž doba analýzy je obvykle kratší při stejné separační účinnosti.

Cílem práce bylo stanovit kyselinu mléčnou, octovou, propionovou a máselnou v silážích vojtěšky (*Medicago sativa*) použitím kapilárních elektromigračních metod; nalézt vhodné separační podmínky pro jejich rychlou analýzu pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) a tyto výsledky srovnat s kapilární isotachoforézou (CITP) standardně¹¹ používanou pro analýzu siláží.

Experimentální část

Elektromigrační metody

Pro elektroforetickou separaci (CITP a CZE) byl použit isotachoforetický analyzátor ZKI 02 (Labeco, Slovenská republika) ovládaný programem ITPWin 2.20 (KasComp, Slovenská republika). Separace byly prováděny v FEP (fluorovaný kopolymer ethylenu a propylenu) analytické kapiláře (160 mm × 0,3 mm I.D.) s přímou vodivostní detekcí. Vzorky byly do systému dávkovány pomocí dávkovacího kohoutu s fixním objemem 35 µl v ITP módu pro separace pomocí CITP a v případě CZE kohoutem s objemem 200 nl. Hodnota aplikovaného konstantního proudu v CZE módu byla 20 µA (~5 kV) a 75 µA, resp. 30 µA v módu CITP.

Pracovní elektrolyty byly připraveny z kyseliny 2-[*N*-morfolino]ethansulfonové (MES), kyseliny 6-amino-kapronové (EACA), kyseliny kapronové, hydroxypropylmethylcellulosity (HPMC) (Sigma-Aldrich, Česká republika) a L-histidinu (Reanal, Maďarsko). Kyselina chlorovodíková (Lachema Brno, Česká republika) byla přečištěna izotermickou destilací. Základní roztoky standardů kyselin byly připravené rozpuštěním přesně odváženého množství octanu sodného, kyseliny propionové (VEB Laborchemie Apolda, Německo), mléčnanu litního (Fluka Chemie AG, Švýcarsko), máselnanu sodného a fosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, Česká republika) v destilované vodě.

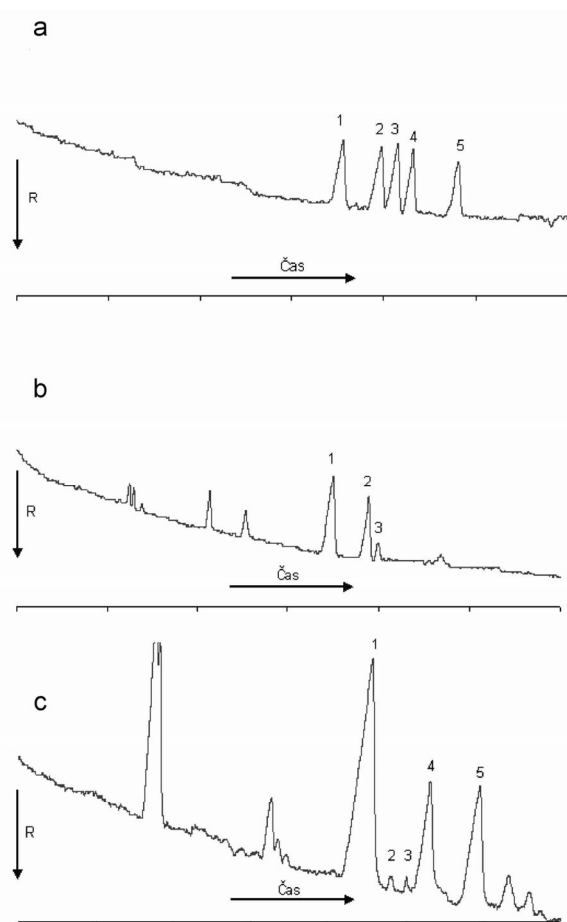
Vzorky siláží a jejich úprava

Řezanka z vojtěšky byla silážována v laboratorním měřítku v sáčcích a pro každou analýzu byl otevřen jeden sáček. Odebráno bylo vždy 5 g materiálu, přidáno bylo 20 ml ethanolu a 0,5 ml chloroformu a vzorky byly skladovány při –18 °C. Při extrakci vodou byl takto upravený vzorek kompletně převeden do 500 ml kádinky a k němu bylo přidáno přesně 200 ml vody. Obsah v kádince byl použitím ručního mixéru (AEG, E EM 0031, Německo) homogenizován po dobu 3 minut a následně zfiltrován přes filtrační papír (Filtrak 390, Niederschlag, Německo). Takto připravené filtráty byly 100, 50, 25 nebo 10krát naředěny s ohledem na obsah kyselin ve vzorku. Před vlastní analýzou byly tyto roztoky filtrovány přes membránový filtr WN, 0,45 µm (*P*-lab, Česká republika).

Výsledky a diskuse

Kapilární zónová elektroforéza

Složení nosného elektrolytu bylo zvoleno s ohledem na použitou vodivostní detekci tak, aby jeho specifická



Obr. 1. Elektroforegram standardní směsi $60 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (a), vzorku siláže se správným (b) a nesprávným (c) průběhem fermentačního procesu. (b) vzorek 6 (tab. II) $100\times$ zředěný, (c) vzorek 4 (tab. II) $10\times$ zředěný; 1 - kyselina octová, 2 - kyselina mléčná, 3 - fosfát, 4 - kyselina propionová, 5 - kyselina máselná

elektrická vodivost byla pokud možno co nejmenší. Separace byla optimalizována v nosných elektrolytech s pH v intervalu od 5,5 do 6,5 na standardní směsi kyselin a fosfátu, který v tomto intervalu pH migruje v blízkosti kyseliny mléčné a propionové, hodnoty pH nosného elektrolytu byly nastaveny změnou poměru mezi MES a L-histidinem. V elektrolytu o složení 6 mM MES a 4 mM L-histidin (pH 5,9) byly kyseliny mléčná a propionová od fosfátu spolehlivě odděleny, pokud byla koncentrace každé z nich v intervalu $10\text{--}60 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (obr. 1a).

Pětibodové kalibrační křivky byly změřeny pro kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v intervalu $50\text{--}500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a pro kyselinu propionovou, máselnou a fosfát v rozmezí koncentrací $20\text{--}60 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s ohledem na to, že tyto kyseliny byly ve vzorcích v minoritním zastoupení (tab. I). Limit detekce (LOD), stanovený jako poměr $S/N = 3$, pro tyto kyseliny je $3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a limit kvantifikace (LOQ), poměr $S/N = 10$ (S/N – Signal/Noise), je

Tabulka I

Koeficienty kalibračních rovnic jednotlivých analytů a jejich korelační koeficient r . CZE: $c = a.A + b$ [$\mu\text{mol.l}^{-1}$], CITP: $c = a.L + b$ [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]

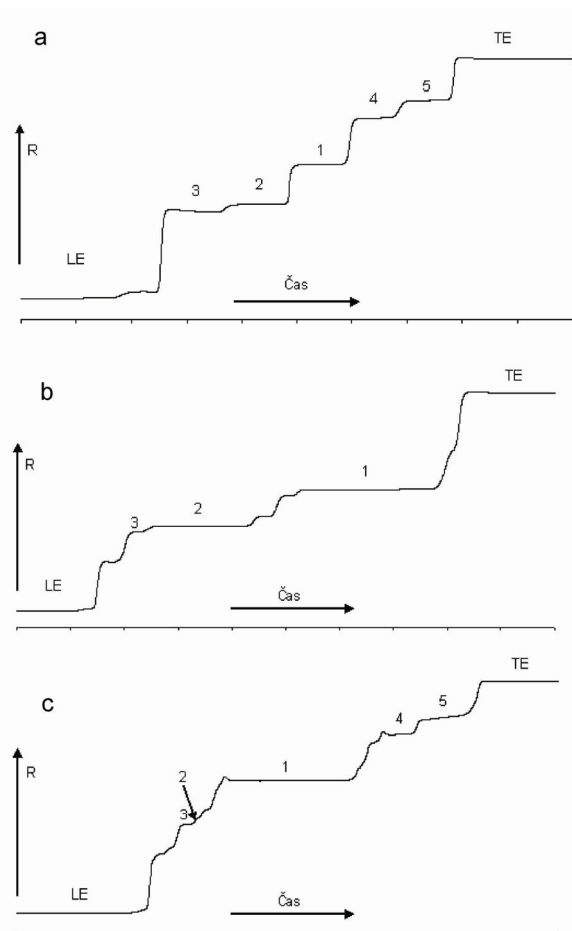
Analyt	a	b	r
<i>CZE</i>			
Kyselina octová	0,349	0,276	0,998
Kyselina mléčná	0,364	1,065	0,998
Kyselina propionová	0,346	0,605	0,997
Kyselina máselná	0,328	3,821	0,999
Fosfát	0,293	3,015	0,998
<i>CITP</i>			
Kyselina octová	3,5	18,9	0,998
Kyselina mléčná	5,3	1,1	0,998
Kyselina propionová	7,9	12,3	0,995
Kyselina máselná	5,0	11,9	0,999

A – plocha píku, L – délka zóny

$10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Metoda tedy má $10\times$ nižší detekční limit než metoda přímé UV detekce při 185 nm, kterou pro stanovení karboxylových kyselin v siláži použil Buchberger a spol.¹⁰ Doba trvání analýzy za těchto podmínek byla 7 minut.

K a p i l á r n í i s o t a c h o f o r e z a

Pro stanovení karboxylových kyselin je možné použít několik různých elektrolytových systémů. Hodnota pH vedoucího elektrolytu je obvykle v intervalu 3 až 5 a složení koncového elektrolytu je voleno podle toho, jaké karboxylové kyseliny je třeba stanovit. Elektrolytový systém použitý v této práci se skládal z vedoucího elektrolytu (LE): 10 mM HCl + 22 mM EACA + 0,05 % (m/v) HPMC (pH 4,5), a koncového elektrolytu (TE): 5 mM kyselina kapronová. Tento systém je odlišný od systému použitého Bočkem a spol.⁹ pro analýzu siláží, ale je na našem pracovišti standardně používán např. pro analýzu těchto kyselin v sýrech. Pětibodové kalibrační křivky (tab. I) byly pro kyselinu octovou, mléčnou, propionovou a máselnou změřeny v intervalu koncentrací $40\text{--}120 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Limit detekce pro CITP stanovení každé kyseliny je $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a limit kvantifikace, stanovený jako 1 s zóna, je $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Z hlediska citlivosti je tato metoda srovnatelná s CZE stanovením. Doba jedné analýzy ale byla 21 minut, což je oproti CZE hodnota zhruba třikrát vyšší.



Obr. 2. Isotachoforegram standardní směsi $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (a), vzorku siláže se správným (b) a nesprávným (c) průběhem fermentačního procesu. (b) vzorek 6 (tab. II) $20\times$ zředěný, (c) vzorek 4 (tab. II) $20\times$ zředěný; 1 - kyselina octová, 2 - kyselina mléčná, 3 - fosfát, 4 - kyselina propionová, 5 - kyselina máselná

Pořadí separace v CZE módu je: kyselina octová, mléčná, fosfát, kyselina propionová a máselná (obr. 1a). Protože je záměrem použít tuto metodu pro posuzování kvality siláží, je nezbytné, aby analyty byly dokonale separovány i ve vzorcích s nestandardním obsahem kyselin. Na obrázku 1b je záznam kvalitního vzorku siláže (vz. 6, tab. II), vzorek obsahuje pouze kyseliny mléčnou a octovou. Siláž (vz. 4, tab. II), u které došlo k zvrhnutí správného fermentačního procesu, obsahuje vysokou koncentraci kyseliny propionové a máselné a jen velmi málo kyseliny mléčné (obr. 1c). V módu CITP se pořadí kyselin při separaci liší a zóna kyseliny octové migruje až za kyselinou mléčnou. Rozdíly mezi relativními výškami zón analytů jsou dostatečně rozdílné (obr. 2a) a separaci neruší žádná ze složek matrice vzorku. Pro srovnání jsou na obrázcích 2b a 2c uvedeny záznamy stejných vzorků jako na obrázcích 1b a 1c.

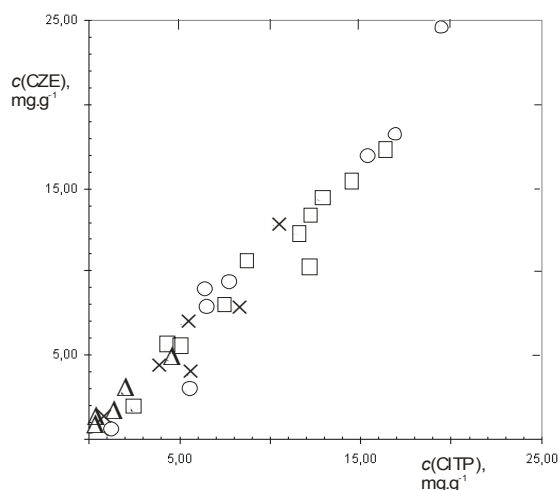
Srovnání CZE a CITP

Pomocí vypracovaných metodik CZE a CITP byla stanovena koncentrace kyselin v 10 vzorcích modelových siláží (tab. II). Pro porovnání obou metod byla kapilární isotachoforéza považována za metodu referenční. Porovnáním obsahů všech kyselin (obr. 3) naměřených oběma metodami (30 hodnot, tab. II), byla získána rovnice regresní přímky ve tvaru: $c_{\text{CZE}} = (1,22 \pm 0,05) \cdot c_{\text{CITP}} - (0,6 \pm 0,5)$; $r = 0,962$. Z hodnot parametrů této regresní přímky, směrnice a úseku na ose y je patrné, že CZE metoda poskytuje systematicky vyšší hodnoty. Největší rozdíly vykazují

Tabulka II
Výsledky stanovení koncentrace (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) kyseliny mléčné, octové a propionové v silážích metodami CZE a CITP

Vzorek	Octová	Mléčná	Propionová	Máselná
1.	$4,4 \pm 0,2$	$6,21 \pm 0,03$	– ^a	$0,95 \pm 0,05$
2.	$4,8 \pm 0,8$	$6,29 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,1$
3.	$2,5 \pm 0,2$	$7,53 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,02$	$5,20 \pm 0,09$
4.	$11,42 \pm 0,6$	$1,03 \pm 0,05$	$4,47 \pm 0,03$	$8,1 \pm 0,2$
5.	$8,47 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,3$	$1,98 \pm 0,01$	$10,3 \pm 0,5$
6.	$16,20 \pm 0,02$	$15,3 \pm 0,2$	– ^a	– ^a
7.	$7,22 \pm 0,4$	$26,4 \pm 0,3$	– ^a	– ^a
8.	$14,5 \pm 0,3$	$19,4 \pm 0,2$	– ^a	– ^a
9.	$12,01 \pm 0,05$	$17,10 \pm 0,04$	– ^a	– ^a
10.	$5,5 \pm 0,2$	$12,89 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$
			CZE	
1.	$5,5 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,2$	– ^a	$1,0 \pm 0,1$
2.	$5,6 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,1$
3.	$1,8 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,5$	$0,55 \pm 0,05$	$7,0 \pm 0,3$
4.	$12,5 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,02$	$4,9 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,2$
5.	$10,7 \pm 0,7$	– ^a	$2,9 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,5$
6.	$17,21 \pm 0,05$	$17,2 \pm 0,1$	– ^a	– ^a
7.	$8,05 \pm 0,01$	$35,5 \pm 0,2$	– ^a	– ^a
8.	$15,6 \pm 0,8$	25 ± 1	– ^a	– ^a
9.	$10,2 \pm 0,1$	$17,70 \pm 0,05$	– ^a	– ^a
10.	$2,9 \pm 0,2$	$14,5 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,05$	$4,0 \pm 0,2$

^a Méně než detekční limit



Obr. 3. Grafické srovnání koncentrací kyselin stanovených CITEP a CZE; ○ – kyselina mléčná, □ – kyselina octová, Δ – kyselina propionová, × – kyselina máselná

Tabulka III

Koeficienty regresních přímek statistického srovnání koncentrací jednotlivých kyselin stanovených CITEP a CZE, $c_{CZE} = a \cdot c_{CITEP} + b$

Analyt	Počet bodů	Koeficienty regresní přímky		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
Kyselina mléčná	9	1,4 ± 0,1	-1,7 ± 1,3	0,98
Kyselina octová	10	1,05 ± 0,09	0,4 ± 1,0	0,97
Kyselina propionová	5	1,1 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0,98
Kyselina máselná	6	1,2 ± 0,3	-0,6 ± 1,4	0,94

stanovené koncentrace kyseliny mléčné (tab. II), a tato se také nejvíce podílí na hodnotě směrnice regresní přímky, která je vyšší než očekávaná hodnota 1. Ne všechny kyseliny však vykazují stejné rozdíly koncentrací, proto byly stejným způsobem vyhodnoceny jednotlivé kyseliny (tab. III). Statistické vyhodnocení prokázalo, že koncentrace kyseliny mléčné se odlišují nejvíce a také že metoda CZE poskytuje systematicky vyšší nálezy kyseliny mléčné. Koncentrace zbylých tří kyselin jsou vzájemně srovnatelné, neboť interval spolehlivosti koeficientů *a* a *b* jejich regresních přímek (tab. III) v sobě zahrnuje 1, resp. 0, a proto se dají CZE a CITEP považovat za metody, jenž poskytují stejné výsledky stanovení kyseliny octové, propionové a mléčné.

Vyšší nálezy kyseliny mléčné z CZE stanovení je možné vysvětlit tím, že při CZE stanovení migruje společně s kyselinou mléčnou také jedna ze složek matrice vzorku, kterou není možné od kyseliny mléčné oddělit za pou-

žitých podmínek analýzy. Ostatní analyty jsou dobře separované a žádná ze složek matrice vzorku jejich analýzu neruší.

Závěr

Výsledky prezentované v této práci ukazují, že CZE je možné použít jako alternativní techniku k CITEP pro stanovení karboxylových kyselin v silážích. Záleží pouze na tom, zda je třeba analyzovat velké množství vzorků v co nejkratším čase, a v tomto případě použít CZE metodu s 3× kratším časem jedné analýzy a nebo klást důraz na absolutní hodnotu koncentrace kyseliny mléčné a zvolit v tomto případě přesnější stanovení pomocí CITEP. Metoda CZE nalezne využití zvláště v případech, kdy se průběžně sledují změny obsahu karboxylových kyselin během fermentačního procesu, a tudíž není kladen takový důraz na absolutní hodnoty obsahu kyselin.

Tato práce je součástí řešení projektu GA ČR č. 523/00/0567.

LITERATURA

1. Flirt O.: *Tierrernährung* 9, 178 (1937).
2. Zimmer E.: *Wirtschaftseigenes Futter* 12, 299 (1966).
3. Richardson A. J., Calder A. G., Stewart C. S., Smith A.: *Lett. Appl. Microbiol.* 9, 5 (1989).
4. Mullin J. W., Emmons D. B.: *Food Res. Int.* 30, 147 (1997).
5. Cunha S. C., Ferreira I. M., Fernandes J. O., Faria M. A., Beatriz M., Oliveira P. P., Ferreira M. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 24, 1029 (2001).
6. Wei M. C., Chang C. T., Jen J. F.: *Chromatographia* 54, 601 (2001).
7. Alonso E. V., de Torres A. G., Pavon J. M. C.: *Quim. Anal.* 17, 167 (1998).
8. Sobu Y. M., Yamanaka H., Netto J. Z.: *Eletica Quimica* 20, 95 (1995).
9. Boček P., Pavelka S., Grígerová K., Deml M., Janák J.: *J. Chromatogr.* 154, 356 (1978).
10. Buchberger W., Klampfl Ch. W., Eibensteiner F., Buchgraber K.: *J. Chromatogr.*, A 766, 197 (1997).
11. Vyhláška MZe č. 124/2001 Sb. *o požadavcích na odběr vzorků a principech metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsobu uchování vzorků*. Sbírnka zákonů 2001, částka 50 (2001).

M. Dušek^a, F. Kvasnička^a, and J. Moravcová^b
^aDepartment of Food Preservation and Meat Technology,
^bDepartment of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague): **Determination of Organic Acids in Alfalfa Silage by Capillary Isotachopheresis and Capillary Zone Electrophoresis**

Analysis of acetic, lactic, propionic, and butyric acids in silages using both capillary zone electrophoresis (CZE) with conductivity detection and capillary isotachopheresis (CITP) is described. A linear detector response was found in the concentration range 50–500 and 40–120 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for CZE and CITP, respectively. The limit of detection (3S/N) as found by CZE and CITP was 3 and 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, respectively, and the limit of quantification (10S/N) 10 and 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, respectively. Based on the analysis of 10 si-

lage samples, the accuracy of both methods was compared using the calculated regression equation: $c_{\text{CZE}} = (1.22 \pm 0.05) \cdot c_{\text{CITP}} - (0.6 \pm 0.5)$, $r = 0.962$. CZE afforded a higher concentration of lactic acid than CITP ($P < 0.05$) while no significant difference was observed for the determination of all other acids. The developed CZE method separates all acids in less than 7 min and thus it could become preferred for the routine examination of changes in lactic acid concentration.

Naším klientem je nadnárodní výrobně-obchodní společnost se zaměřením na potravinářský průmysl. V současné době pro ni hledáme vhodného kandidáta na pozici

PROCESNÍ INŽENÝR

VAŠÍM ÚKOLEM bude pomoc při zavádění nových technologií, optimalizace stávajících technologických procesů, jejich analýza a dokumentace. K Vaší pracovní náplni bude patřit zvyšování kvality procesů, analýza výrobních parametrů, optimalizace nákladů a účast na zaškolování lidí při změně výrobních postupů. Místo výkonu práce bude v oblasti střední Moravy, případně ve východních Čechách.

OČEKÁVÁME od Vás

- VŠ vzdělání (**specializace chemické inženýrství**)
- praxi v potravinářském průmyslu (minimálně 2 roky)
- částečnou znalost anglického jazyka
- ochotu pracovat ve výrobě
- řídičské oprávnění "B"

NABÍZÍME zodpovědnou, samostatnou a zajímavou práci v prostředí mezinárodní společnosti, možnost odborného růstu a odpovídající ohodnocení.

Těšíme se na Vaše nabídky doplněné životopisem a označené kódem „TECH“ na adrese:

ACE Consulting

*ACE Consulting, s.r.o., Michalská 1, 110 00 Praha 1,
tel.: 222 00 51 05, fax: 222 00 55 10, e-mail: info@ace-consulting.cz
kontaktní osoba: PhDr. Pavel Dittrich*