ANALÝZA KYSELINY L-ASKORBOVÉ V NÁPOJÍCH S VYUŽITÍM TECHNIKY MEPS

KATEŘINA JEŽKOVÁ, PETRA PAVLÍKOVÁ, PETR DOBIÁŠ, MARTIN ADAM a KAREL VENTURA

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
katchi.bodlina@seznam.cz

Úvod

Kyselina askorbová patří mezi přírodní antioxidanty. Tyto látky chrání buňky před účinky volných radikálů, tj. aktivních forem kyslíku, které v organismu vznikají např. působením výfukových plynů, kouření, UV záření atd. Převaha volných radikálů způsobuje tzv. oxidační stres[1,2]. Kyselina askorbová se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, stimuluje transport sodných a chloridových iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu a v řadě dalších reakcí[3].

Mikroextrakce tuhou fází v mikrostříkačce – MEPS (MicroExtraction by Packed Sorbent) je moderní mikroextrakční technikou izolace zkoumaného analytu z matrice. Zvolená tuhá fáze je umístěna do bloku v injekční jehle, která je vsunuta do injekční stříkačky. Přes tento blok je nasáván vzorek a sledované analyty jsou sorbovány a převedeny. Po promytí jsou zachycené analyty eluovány organickým rozpouštědlem na chromatografickou kolonu. MEPS je výsledkem snahy o miniaturizaci extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction – SPE). Oproti SPE ovšem pracuje s mnohem nižšími objemy vzorků (až do 10 µl) i rozpouštědel a lze ji plně automatizovat. Dále může být bez jakýchkoliv modifikací spojena on-line s LC nebo GC. Mezi další výhody MEPS patří rychlost, nízká cena, přesnost, citlivost a selektivita[4–6].

Antioxidační kapacita je míra, jakou jsou antioxidanty schopné eliminovat volné radikály. Metody měření antioxidační kapacity dělíme na chemické a fyzikální. Mezi chemické metody patří metody založené na eliminaci syntetických radikálů DPPH (2,2-difenyl-pikrylhydrazyl) nebo ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)), případně na eliminaci kyslíkových radikálů (ORAC – oxygen radical absorbance capacity), dále pak metody využívající redukci železitých komplexů (FRAP – ferric reduction antioxidant power). Inhibice radikálu DPPH (*I*) se dá vyjádřit v procentech vztahem (*1*), kde A_{blank} odpovídá absorbanci získané při slepém pokusu a A_{sample} absorbanci analyzované sloučeniny[7,8].

$$I\% = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}}.100 \qquad (1)$$

Experimentální část

Analyzováno bylo 10 vzorků nealkoholických nápojů od českých, slovenských a rakouských výrobců zakoupených v maloobchodní síti. Z rozpouštědel a činidel byly použity následující: ethanol (pro UV), methanol (pro HPLC), kyselina L-askorbová p.a., kyselina octová p.a., volný radikál DPPH (vše Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a redestilovaná voda (Univerzita Pardubice).

K nalezení vhodné vlnové délky pro detekci kyseliny askorbové a pro stanovení antioxidační kapacity byl použit HELIOS Gamma UV-VIS spektrometr (Thermo Fisher Scientific, Inc.,Waltham, MA USA). K izolaci kyseliny askorbové z matrice byla použita mikroextrakce tuhou fází v mikrostříkačce MEPS s kapacitou 100 µl a sada BIN (barrel insert and needle assembly) jehel s náplněmi (vše Chromservis s.r.o, Praha, Česká republika).

Pro analýzu extraktů byl použit kapalinový chromatograf GBC LC 1445, vybaven pumpou LC 1150, degasserem ERC-3415, autosamplerem LC 1650 a UV detektorem LC 1210 (vše GBC, Regents Park, Austrálie). K separaci byla použita kolona LiChrospher® 100 RP-18e (250 × 3 mm i.d., 5 µm) a předkolonka LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm), vše Merck (Darmstadt, Německo).

Po zjištění vhodných podmínek pro MEPS (jehla BIN, extrakční rozpouštědlo, objem rozpouštědla) byly vzorky nealkoholických nápojů extrahovány přes silikagelovou jehlu (BIN) a eluovány 10% methanolem. Vzorek nealkoholického nápoje o objemu 100 µl byl natažen do mikrostříkačky MEPS se silikagelovou jehlou a následně vypuštěn do odpadu. Poté bylo přes jehlu nataženo 60 µl 10% methanolu. Získaný extrakt byl analyzován pomocí HPLC-UV.

Pro vlastní analýzu byl na kolonu dávkován objem 20 µl standardu, resp. extraktu. Byly použity dvě mobilní fáze: redestilovaná voda okyselená kyselinou octovou, pH 2,94 (MF A) a methanol (MF B). Bylo pracováno s isokratickou elucí s 80% MF A po dobu 20 min. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml min^{-1}. Pro detekci kyseliny L-askorbové byla použita vlnová délka 258 nm. Každý extrakt byl proměřen 3×. Kvalitativní vyhodnocení bylo provedeno porovnáním retenčních časů se standardem. Následovalo vyhodnocení kvantitativní, ke kterému byla použita metoda kalibrační křivky.

Při stanovení antioxidační kapacity byla nejprve změřena absorbance čerstvě připraveného roztoku DPPH (o koncentraci 0,025 g l^{-1}). Následně bylo k 5 ml roztoku

DPPH přidáno 200 µl 10× zředěného nealkoholického nápoje a po 5 min stání na temném místě byla opět změřena absorbance. Měření probíhalo při vlnové délce 517 nm. Antioxidační kapacita byla vyhodnocena v % dle vztahu (*1*) jako množství inhibovaného radikálu DPPH.

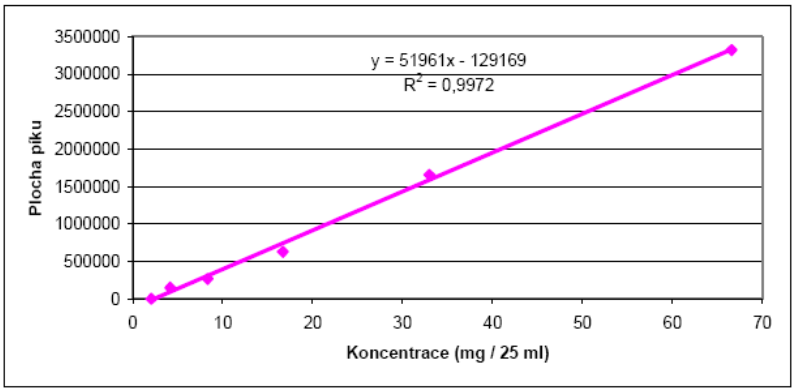
Výsledky a diskuse

Byly zjišťovány vhodné podmínky pro mikroextrakci MEPS: jehla BIN (C2, C8, C18, Silikagel a M1), extrakční rozpouštědlo (5%, 10%, 20% a 100% methanol, 5%, 10%, 20% a 96% ethanol, destilovaná voda a 2,5% kyselina octová) a objem extrakčního rozpouštědla (10–100 µl). Jako vhodné byly nalezeny tyto hodnoty: silikagelová jehla (BIN) a 60 µl 10% methanolu.

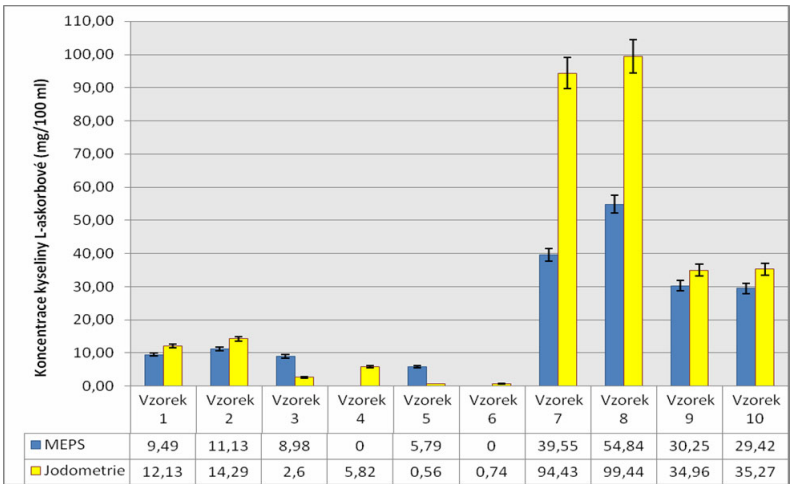
Pro možnost kvantitativního vyhodnocení byla proměřena kalibrační řada (obr. 1), a to v rozsahu 2,08 až 66,6 mg kyseliny L-askorbové v 25ml odměrných baňkách, při aplikaci metody MEPS s použitím eluce 60 µl 10% methanolu. Z grafu je patrné, že metoda poskytuje lineární odezvu v celém sledovaném koncentračním rozsahu. Křivka protíná osu x v bodě 2,49 mg/25 ml, což lze považovat za experimentálně zjištěnou hodnotu detekčního limitu. Kalibrační řada ve stejném rozsahu koncentrací byla proměřena také s přídavkem 2,5 g/25 ml cukru, avšak nebyla pozorována žádná změna v odezvě.

Na obr. 2 jsou hodnoty získané při aplikaci optimalizované MEPS na 10 reálných vzorků. Pouze u vzorků číslo 7, 8, 9 a 10 stanovená hodnota obsahu kyseliny L-askorbové odpovídala hodnotám udávaným výrobcem nealkoholického nápoje.

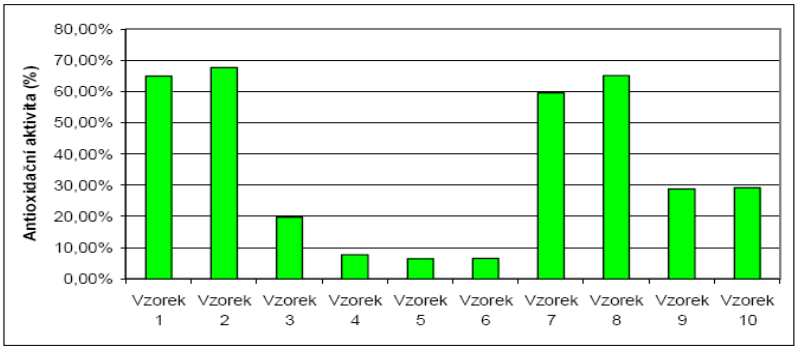
Pro zjištění antioxidační kapacity vzorků byla použita metoda využívající redukci volného radikálu DPPH. Tato metoda je jednoduchá na provedení a časově nenáročná. K výpočtu antioxidační kapacity byl použit vztah (*1*). Získané hodnoty antioxidačních kapacit nealkoholických nápojů jsou graficky znázorněné na obr. 3.



Obr. 1. **Kalibrační řada kyseliny L-askorbové pro optimalizovanou metodu MEPS**



Obr. 2. **Stanovený obsah kyseliny L-askorbové ve 100 ml nealkoholického nápoje**



Obr. 3. **Antioxidační kapacita analyzovaných nealkoholických nápojů**

Zjištěná antioxidační kapacita nekoresponduje pouze s obsahem kyseliny L-askorbové, ale s celkovým obsahem všech antioxidantů ve vzorku. U vzorků číslo 7, 8, 9 a 10, kde je hlavním antioxidantem kyselina L-askorbová, souvisí vyšší antioxidační kapacita s obsahem právě této kyseliny. Naopak u vzorků číslo 1 a 2 souvisí především s obsahem polyfenolů.

Závěr

Na závěr experimentu lze konstatovat, že byly nalezeny vhodné podmínky pro aplikaci mikroextrakce tuhou fází v mikrostříkačce na stanovení kyseliny L-askorbové v nealkoholických nápojích. Tato nová metoda se jeví jako vhodná pro izolaci látek s antioxidačním charakterem. Dále byly stanoveny antioxidační kapacity studovaných vzorků. Nejvyšší hodnoty inhibice volného radikálu poskytují vzorky čajového původu, což souvisí i s přítomností polyfenolických látek.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502) a Grantové agentury ČR (projekt 203/08/1536).

LITERATURA

1. Ortembergová A.: *Mládneme s antioxidanty*. Nakladatelství Ivo Železný, Praha 2002.
2. Hu Ch. Ch., Lin J. T., Lu F. J., Chou F. P., Yang D. J.: Food Chem. *109*, 439 (2008).
3. Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. OSSIS, Tábor 1999.
4. Altun Z., Abdel-Rehim M.: Anal. Chim. Acta *630*, 116 (2008).
5. Vita M., Skansen P., Hassan M., Abdel-Rehim M.: J. Chromatogr., B *817*, 303 (2005).
6. Abdel-Rehim M.: J. Chromatogr., B *801*, 317 (2004).
7. Es-Safi N., Kollmann A., Khlifi S., Ducrot P.: Food Sci. Technol. INT *40*, 1246 (2007).
8. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Yumrutas O., Sokmen A.: Food Chem. *98*, 9 (2006).