

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Kateřina Holušová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

Mgr. Jana Horská

OLOMOUC 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 4. 4. 2017

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Poděkování patří paní Mgr. Janě Horské za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost, obětavost a čas, který mi během její tvorby věnovala.

Dále děkuji panu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace, které mi napomohly k dokončení práce.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za možnost studovat, jejich pomoc a podporu v průběhu celého studia.

Souhrn

Předkládaná bakalářská práce má za cíl stanovit antioxidanty v potravinách kapilární elektroforézou.

Teoretická část popisuje antioxidanty a kapilární elektroforézu. První část práce pojednává o základních vlastnostech antioxidantů, jejich stanovení a dělení. Charakterizuje též volné radikály, jakožto původce různých typů onemocnění, včetně nezávažnějších, jako je rakovina. A právě antioxidanty mají schopnost s radikály reagovat a zastavovat jejich negativní činnost. Další kapitola pojednává o kapilární elektroforéze. Popisuje její základní mechanismy, instrumentaci, jak dané látky stanovit a získané výsledky vyhodnotit.

Experimentální část popisuje chování fenolových kyselin ve dvou různých prostředích a hledá neoptimálnější podmínky pro jejich stanovení v potravinách, konkrétně čokoládě pomocí kapilární elektroforézy s online prekoncentrací. Je v ní rozebírán výběr vhodného základního elektrolytu, vliv koncentrace přidaného aditiva do základního elektrolytu, vliv separačního napětí a také teploty na průběh analýzy. V případě elektrokinetického nástřiku je diskutována doba a napětí při dávkování vzorku. Zjištěné podmínky jsou poté aplikovány na reálný vzorek čokolády, z nichž je lipidová složka odstraněna extrakcí s hexanem.

Summary

This bachelor's thesis provides information about antioxidants and their determination in food by capillary electrophoresis.

The description of antioxidants and capillary electrophoresis is given in the theoretical part. The first part is devoted to the basic information about antioxidants and their determination. Free radicals are characterized as source of various types of diseases, including cancer and other serious diseases. Antioxidants react with radicals and then they stop their negative function. The next chapter is about principles and instrumentation of capillary electrophoresis and how to determine phenolic acids, as well. The evaluation of obtained results is also discussed.

The experimental part describes the behaviour of phenolic acids in two different buffers and finding the most optimal conditions for their determination in food, specifically in chocolate by capillary electrophoresis with on-line electrokinetic preconcentration. The influence of the background buffer, concentration of additive in electrolyte, separation voltage and temperature during analysis, are studied. The time of injection and voltage are also discussed, in case of electrokinetic injection. These conditions are subsequently applied to real sample analysis of chocolate. Lipids part of it is removed by extraction with hexane.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	4
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	5
3.1	Antioxidanty	5
3.2	Důkaz a stanovení antioxidantů.....	6
3.3	Dělení antioxidantů.....	7
3.3.1	Přírodní antioxidanty.....	8
3.3.2	Syntetické antioxidanty	9
3.3.2.1	Buthylhydroxyanisol (BHA).....	10
3.3.2.2	Butylhydroxytoluen (BHT).....	10
3.4	Mechanismus účinku antioxidantů.....	11
3.5	Fenolové kyseliny.....	11
3.5.1	Kyselina skořicová	11
3.5.2	Kyselina kávová	11
3.5.3	Kyselina vanilová	12
3.5.4	Kyselina gallová.....	13
3.5.5	Kyselina kumarová.....	13
3.5.6	Kyselina sinapová	14
3.6	Volné radikály	14
3.6.1	Vznik volných radikálů	15
3.6.1.1	Exogenní příčiny vzniku radikálů.....	15
3.6.1.2	Endogenní příčiny vzniku radikálů.....	15
3.6.2	Nemoci, za jejichž příčinou stojí volné radikály.....	15
3.6.3	Odstranění volných radikálů	16
3.7	Čokoláda.....	17
3.8	Kapilární elektroforéza	18
3.8.1	Princip metody	18
3.8.2	Elektroosmotický tok	19
3.8.3	Základní instrumentace	20
3.8.4	Dávkování vzorku	20
3.8.5	Analyty v CE.....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22

4.1	Materiál.....	22
4.1.1	Chemikálie	22
4.1.2	Vzorky.....	22
4.2	Příprava elektrolytů	22
4.3	Instrumentace a experimentální podmínky.....	22
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
5.1	Optimalizace experimentálních podmínek	24
5.2	Volba vhodného elektrolytu	24
5.2.1	Vliv složení elektrolytu na separaci fenolových kyselin.....	24
5.3	Online prekoncentrační technika	26
5.3.1	Hydrodynamické dávkování	26
5.3.1.1	Vliv koncentrace aditiva SDS.....	26
5.3.2	Vliv separačního napětí	28
5.3.3	Vliv teploty.....	30
5.4	Elektrokinetické dávkování	32
5.4.1	Vliv doby dávkování	32
5.4.2	Vliv napětí při dávkování.....	34
5.5	Analýza reálného vzorku	35
5.5.1	Metoda standardního přídávku.....	36
6	ZÁVĚR.....	39
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	41
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	44

1 ÚVOD

Termín „antioxidant“ pochází z potravinářské chemie ze 40. let, a je původně celkem úzce definován jako látka schopná zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů. [1]

V jednom živém organismu probíhá současně nespočet procesů, které potřebují kyslík. Ale ne vždy, může mít právě kyslík, tolik potřebný k životu, pozitivní účinky. Jedny z největších problémů představují kyslíkové radikály. Volné radikály jsou původci závažných onemocnění, jako jsou kardiovaskulární nemoci a podílí se i na patologii rakoviny. [2]

V současné době však existuje celá řada léků a jsou vyvíjeny stále další a další pro léčbu i těch nejzávažnějších onemocnění. Jedny z hlavních látek, které reagují s volnými radikály a jejich činnost zastavují, jsou antioxidanty. Některé si organismus dokáže vytvořit sám, jiné přijímá v potravě nebo ve formě tablet, jako potravinové doplňky.

A právě stanovit antioxidanty, jako fenolické kyseliny, můžeme pomocí kapilární elektroforézy, která je v současné době, jednou z nejvíce rozvíjejících se analytických metod.

BIBLIOGRAFICKÉ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení	Kateřina Holuřová
Název práce	Analýza antioxidantů kapilární elektroforézou
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Horská
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Tato bakalářská práce se zabývá stanovením optimálních podmínek pro separaci fenolových kyselin kapilární elektroforézou s online prekoncentrací a elektrokinetickým dávkováním. Studován byl vliv elektrolytu, koncentrace SDS, doba dávkování, separační napětí a teplota.
Klíčová slova	antioxidant, kapilární elektroforéza, online prekoncentrace, elektrokinetické dávkování, čokoláda
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname	Kateřina Holuřov
Title:	Analysis of antioxidants by capillary electrophoresis
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	This bachelor's thesis finding the most optimal conditions for determination of phenolic acids in chocolate by capillary electrophoresis with on-line electrocinetic preconcentration. The electrokinetic injection is also discussed. The influence of the background buffer, concentration of additive in electrolyte and temperature, the time of injection and voltage during analysis, are studied.
Keywords	Antioxidant, capillary electrophoresis, on-line electrocinetic preconcentration, electrocinetic injection, chocolate
Number of pages	51
Language	Czech

2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo optimalizovat podmínky separace vybraných fenolových kyselin pomocí kapilární elektroforézy s online prekoncentrací a aplikovat optimalizovanou metodu na analýzu těchto kyselin ve vzorku čokolády. Optimalizace podmínek se týkala zejména volby elektrolytu, koncentrace SDS, doby dávkování, vlivu separačního napětí, teploty a vliv doby dávkování a aplikovaného napětí při elektrokinetickém dávkování analytů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Antioxidanty

Z chemického hlediska jsou antioxidanty látky, které podléhají reakci s volnými radikály a poskytují jim chybějící elektron. Díky tomu volný radikál zaniká, nedochází k šíření oxidační řetězové reakce a látka není poškozena. Volné radikály, jak již bylo řečeno v úvodu, jsou příčinou závažných onemocnění. Poškozují strukturu DNA, lipidů a proteinů. Jsou původci kardiovaskulárních onemocnění a neurodegenerativních poruch, např. Alzheimerovy choroby, protože mozkové buňky jsou náchylné k napadení volnými radikály.

Antioxidanty jsou důležitou skupinou léčivých a preventivních sloučenin. Jedná se o potravinová aditiva, sloužící jako ochrana před oxidačním procesem. Projevem oxidace může být žluknutí tuků související s následným zápachem. V důsledku toho se snižuje nutriční kvalita a potravina se znehodnocuje z hlediska výživového, hygienicko-toxikologického i sensorického (barva, vůně, chuť). [2]

Antioxidanty mají schopnost „opravit“ molekuly, které již volné radikály poškodily. Činnost všech antioxidantů v organismu je propojena a vytváří ochranný systém. Antioxidační obrana, která vzniká v těle během aerobního dýchání v buňkách, může být endogenního (enzymatického a neenzymatického) nebo dietního (vitamíny, karotenoidy, flavonoidy) původu. Enzymatické antioxidanty zahrnují superoxid dismutázu (SOD), glutathion peroxidázu (GPx) a katalázu (CAT). Mezi neenzymatické antioxidanty patří kyselina askorbová (vitamín C), tokoferol (vitamin E), glutathion (GSH), karotenoidy a flavonoidy. Glutathion se podílí na odstraňování peroxidu vodíku z organismu. [3]

K zjištění účinnosti antioxidantů byl zaveden pojem *celková antioxidační kapacita*. Jedná se o celkovou schopnost sloučeniny významně potlačit nebo zpomalit škodlivé oxidační procesy, zejména reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento parametr je proměřován pomocí metody ORAC (Absorpční kapacita kyslíkových radikálů). [4]

Nesmí být opomenut fakt, že i když mnoho látek vykazujících antioxidační aktivitu působí *in vitro*, nemusí nutně působit také *in vivo*. Je to způsobeno zejména tím, že mnoho látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým přeměnám již

v trávicím traktu a tudíž je jejich účinek značně ovlivněn resorpcí a následným metabolismem. [5]

3.2 Důkaz a stanovení antioxidantů

Různé látky obsahují rozdílné množství různých antioxidantů (různých chemických struktur) a vedlejších látek, proto jejich stanovení není stejné a existuje řada metod, jak antioxidanty a antioxidační aktivitu stanovit. Matrice vzorku bývá často komplexní a samotné antioxidanty jsou v nich přítomny v malých, nepatrných koncentracích a je nutné provést prekoncentraci, kterou se ve své práci budu zabývat i já.

Před samotným stanovením musí být antioxidanty nejdříve izolovány ze vzorku. Extrakce je prováděna např. z roztoku tuků v petroletheru nebo hexanu 75% ethanolom či acetonitrilem. V případě málo polárních antioxidantů (BHA, BHT) je možné použít pro izolaci destilaci s vodní parou. Dalším krokem už je stanovení konkrétního antioxidantu. [6] K tomu jsou nejvíc využívány metody elektromigrační, chromatografické a elektroanalytické.

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) má v některých případech nedostatečnou rozlišovací schopnost, je časově náročná, neexistuje pro ni vnitřní standard a je finančně nákladnější, v porovnání s elektromigračními metodami. Plynovou chromatografií nelze stanovit látky netěkavé a nestabilní, pokud neproběhne derivatizace látek.

Alternativní metodu k HPLC představuje v současnosti CE (kapilární elektroforéza). V porovnání s HPLC má několik výhod, ke kterým patří minimální požadavky na objem vzorku, krátký čas analýzy a vysoká účinnost separace. Účinnost separace je ovlivněna počtem teoretických pater (100-200 tisíc na metr délky kapiláry) a vloženým napětím. CE se vyznačuje vysokou rozlišovací schopností. Velká citlivost je dána především použitím nízkých vlnových délek detekce. Elektrochemická detekce je prováděna v amperometrickém režimu. [7, 8, 9].

Extrakci fenolických látek je možné provést metodou MAE (metoda mikrovlnné asistované extrakce) směsí ethanol/voda. Nebo více používanou extrakcí pomocí ultrazvuku, směsí methanol/voda a ethanol/voda. Druhá možnost se vyznačuje vyšší výtěžností.

Samotná analýza může být provedena metodou CE s UV detektorem. Hojně se využívá CZE nebo MEKC s přídavkem SDS do elektrolytu. [7, 8, 9]

3.3 Dělení antioxidantů

Dělení může spočívat v původu a struktuře. Základním dělením je na antioxidanty přírodní (v přírodě nebo potravině jsou obsaženy) a syntetické. [Tab. I] Některé antioxidanty si je schopen organismus vytvořit sám, ovšem většinu jich musíme přijímat v potravě.

Tabulka I: Dělení antioxidantů [11]

Podle původu		Podle struktury
Přírodní	Syntetické	
Jednoduché fenoly	BHA	Fenolové antiantioxidanty
Fenolové kyseliny a jejich deriváty	BHT	Endioly
Lignany	TBHQ	
Kurkuminoidy	Galláty	
Terpenoidy	Kyselina askorbová	
Flavonoidy		

Do skupiny fenolů patří jednoduché fenoly, jako hydrochinon a guajakol, dále galláty a tokoferoly. Galláty nazýváme estery kyseliny gallové. Používají se jako jedny z nejúčinnějších esterů ke stabilizaci olejů a vepřového sádla.

3.3.1 Přírodní antioxidanty

Řadíme zde nejružnější byliny a koření. [Tab II]

Tabulka II: Příklady antioxidantů obsažených v potravinách rostlinného původu [11]

Antioxidant	Zdroj	Zástupce
Tokoferoly, tokotrienoly	Rostlinné oleje	α -tokoferol
Kyselina askorbová	Ovoce a zelenina	
Flavonoidy		
<i>Flavanoly</i>	Zelený a černý čaj	Katechiny
<i>Flavony</i>	Celer, petržel	Apigenin
<i>Flavonoly</i>	Pórek, brokolice, grapefruit, černý čaj, cibule, jablka, olivový olej, čaj	Kaemferol
<i>Flavanony</i>	Citrusové plody	Naringenin
<i>Isoflavony</i>	Sója	Daidzein
<i>anthokyanidiny</i>	Maliny, jahody, červené hrozny	Kyanidin
Fenolové kyseliny		
<i>Hydroxyškořicové</i>	Olivy, káva, bílé víno, špenát, pšenice, rýže, kukuřice, rajčata	Kávová kyselina, ferulová kyselina
<i>Hydroxybenzoové</i>	Řepka, pšenice	Syringová kyselina
Karotenoidy	Ovoce, zelenina, palmový olej	β -karoten

Z epidemiologických výzkumu můžeme usoudit, že pravidelná konzumace přírodních antioxidantů (zejména v ovoci, zelenině a obilovinách) snižuje riziko vzniku chronických a degenerativních onemocnění. [11]

Antioxidanty přidávané do potravin musí být zdravotně nezávadné, snadno aplikovatelné, účinné již v nízkých koncentracích, bez nežádoucí chuti a aroma. Dobře zvážen musí být i jejich prooxidační účinek. [11]

Přírodní antioxidanty jsou izolovány z rostlinných materiálů vhodnými extrakčními metodami, olejem, organickými rozpouštědly, nebo extrakce superkritickým fluidním CO₂. Vhodná je metoda extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), jejíž výhoda spočívá v minimalizaci použití organických rozpouštědel a CO₂ a krátké extrakční době právě díky nadkritickým hodnotám tlaku a teploty rozpouštědla. [12]

Mezi přírodní antioxidanty můžeme zařadit také endogenní nízkomolekulární antioxidanty, neboli antioxidanty těla vlastní. Patří zde glutathion, kyselina močová a koenzym Q. [6]

Jako příklad je možné uvést olej z ovsa či amaranthu (laskavce), obsahující vysoké koncentrace antioxidantů tokoferolu a skvalenu. Tyto oleje se přidávají do jiných olejů, aby je stabilizovaly vůči oxidaci. Vitamín C se přidává do piva. Tokoferoly jsou součástí margarínů. Antioxidanty z přírodních zdrojů se často vyskytují v kombinaci s dalšími sloučeninami. Každá sloučenina se může vyskytovat společně se svým prekurzorem a reakčním produktem. Z toho vyplývá, že možnost působení přírodních antioxidantů se může měnit, zahrnovat různé mechanismy působení, a to v závislosti na typu a zdroji požitého výchozího materiálu. [13]

3.3.2 Syntetické antioxidanty

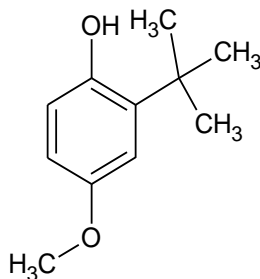
Syntetické antioxidanty jsou laboratorně vyráběné látky, mezi které se řadí BHA a BHT. Jedná se o povolené přísady do potravin, nebo látky užívané se ve formě tablet jako potravinové doplňky. I přesto, že jsou účinné a ve srovnání s přírodními antioxidanty levné, musí být jejich používání omezené. Mnoho z nich může působit karcinogenně a organismus naopak poškodit. [14]

Používání syntetických antioxidantů je regulováno právními předpisy. Pro potraviny v zemích Evropské unie se vztahuje Nařízení 1333/2008/ES. V České republice platí Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. [15]

Nejčastěji se využívají syntetické fenolové deriváty, které nesou dvě nebo tři hydroxyskupiny v ortho- a para-poloze. Synteticky připravené antioxidanty jsou substituovány v para-poloze a díky tomu jsou méně toxické. Přírodní antioxidanty mají substituenty v poloze ortho- a vykazují větší účinnost. [11]

3.3.2.1 Butylhydroxyanisol (BHA)

Mezi nejvýznamější syntetické antioxidanty patří butylhydroxyanisol (BHA), [Obr. 1] povolený v EU jako látka přidávaná do potravin s akceptovatelným denním příjmem 0,5 mg/kg podle *the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Jedná se o látku, která inhibuje vznik některých nádorů, ale naopak ve vyšších koncentracích může působit karcinogenně a organismus dále poškozovat. [15]

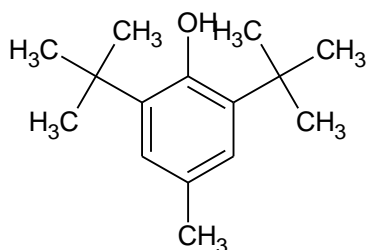


Obr. 1: Butylhydroxyanisol

3.3.2.2 Butylhydroxytoluen (BHT)

Dalším syntetickým antioxidantem je BHT. [Obr. 2] Účinky na živé organismy stále nejsou dostatečně prozkoumané a v literatuře se objevují protichůdné názory na jejich zdravotní a dietický význam. Testování na laboratorních zvířatech ukázalo, že nízké dávky BHT (0,6 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti) prodlužovaly délku jejich života. Na druhou stranu byly prokázány i jejich teratogenní účinky. [16]

Užíváním BHA i BHT dochází k potlačení fyziologického bakteriocidního působení radikálů a organismu hrozí infekce. [16]



Obr. 2: Butylhydroxytoluen

3.4 Mechanismus účinku antioxidantů

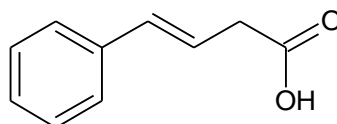
Hlavní účinky antioxidantů je možno shrnout do několika základních bodů. Antioxidanty interferující s procesem oxidace lipidů a jiných „oxylabilních“ sloučenin tak, že:

1. Primární antioxidant podléhá reakci s volnými radikály nebo sekundárními antioxidanty
2. Váží do komplexů katalyticky působící kovy
3. Eliminují přítomný kyslík
4. Redukují hydroperoxydy [11]

3.5 Fenolové kyseliny

3.5.1 Kyselina skořicová

Kyselina hydroxyskořicová neboli kyselina (E)-3-fenylprop-2-enová je hojně zastoupena v obilovinách. [17] Díky přítomnosti aromatického fenolického kruhu vykazuje dobré antioxidační vlastnosti a je schopna stabilizovat nepárový elektron v aromatickém kruhu. [18]



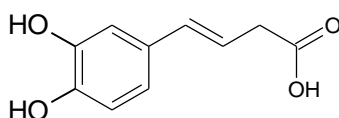
Obr. 3: Kyselina skořicová

3.5.2 Kyselina kávová

Kyselina kávová, neboli dle platného názvosloví [3-(3, 4-dihydroxyfenyl 2-propenová kyselina)]. Jedná se o hydroxyderivát kyseliny skořicové. Kyselina kávová je meziproduktem při biosyntézy ligninu a je tedy důležitým zdrojem biomasy. Vykazuje antioxidační účinky *in vitro*. Zachycuje hydroxylový a peroxidový radikál a slouží tak jako prevence před kardiovaskulárními nemocemi, rakovinou, chrání proti poškození DNA a navíc vykazuje antibakteriální účinky. Vzhledem k tomu, že se jedná o α -

tokoferol poskytuje ochranu lipoproteinů v LDL. Vyskytuje se v rostlinných potravinách, olejninách a ovoci. V přírodě se běžně vyskytuje jak volně, tak i ve formě derivátů. Hydroxyderiváty se vyskytují v *cis* a *trans* formě, volně se vyskytuje v pouze *trans* forma. [19]

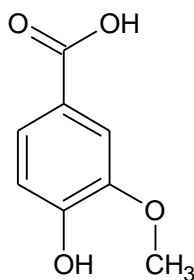
Na základě porovnávání inhibice oxidace LDL, zhášení volného radikálu a singletového kyslíku byla kyselina kávová prokázána jako lepší antioxidant v porovnání s kyselinou p-kumarovou a felurovou. [20]



Obr. 4: Kyselina kávová

3.5.3 Kyselina vanilová

Kyselina vanilová (4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina), je methoxyderivát kyseliny benzoové. Vzniká oxidací vanilinu, který je hlavní složkou vanilky a vytváří její typické aroma. Vanilin snižuje výskyt střevních karcinomů. Nachází se v ovoci, zelenině, bobulích, ořechách a obilninách. [19] [21]

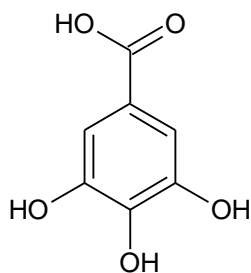


Obr. 5: Kyselina vanilová

3.5.4 Kyselina gallová

Kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybezoová kyselina). Využívá se jako antioxidační přísada. Nachází se v řadě potravin, v rostlinách, čajových listech a je vázána v taninech. [22]

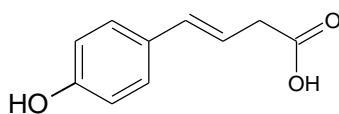
Kyselina gallová má antimikrobiální vlastnosti [23]



Obr. 6: Kyselina gallová

3.5.5 Kyselina kumarová

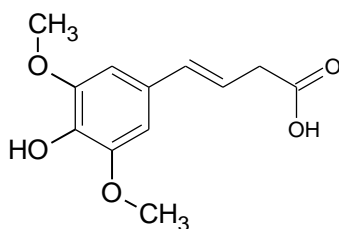
Kyselina kumarová (3-(4-hydroxyfenyl)-2-propenová kyselina) je hydroxy-derivátem kyseliny skořicové. Snižuje tvorbu karcinogenních nitrosaminů a tím snižuje pravděpodobnost vzniku rakoviny žaludku. Zabraňuje ateroskleróze. [19]



Obr. 7: Kyselina kumarová

3.5.6 Kyselina sinapová

Kyselina sinapová, derivát kyseliny skořicové. Je široce rozšířena v rostlinné říši a získáváme ji ze žita, ovoce a zeleniny. Studie prokázaly, že kyselina sinapová vykazuje protizánětlivý účinek a chrání neurony proti poškození. [24]



Obr. 8: Kyselina sinapová

3.6 Volné radikály

Volné radikály jsou částice, které ve svém elektronovém obalu obsahují jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopny samostatné existence. Tyto nepárové elektrony zvyšují chemickou reaktivitu. Radikály vznikají z částic se zaplněnou elektronovou konfigurací, přijetím elektronu od jiné molekuly, v jejich bezprostředním okolí nebo naopak ztrátou svého elektronu. Nejjednodušším radikálem je vodíkový radikál ($H\cdot$), obsahující jeden proton a jeden elektron. [25]

Nejdůležitější skupinou radikálů produkovaných v živých organismech jsou radikály odvozené od kyslíku a dusíku – ROS a RNS. [3]

Tabulka III: Reaktivní formy kyslíku a dusíku [26]

Reaktivní formy kyslíku a dusíku	
Radikály	Neradikály
Superoxidový aniont (superoxid) $O_2\cdot^-$	Peroxid vodíku H_2O_2
Hydroxylový radikál $OH\cdot$	Singletový kyslík 1O_2
Hydroperoxylový radikál $HO_2\cdot$	Kyselina chlorná $HClO$
Peroxylové $ROO\cdot$, alkoxylové $RO\cdot$	Ozon O_3

Radikály jsou málo stabilní a velmi reaktivní částice. Snaží se dosáhnout stabilní elektronové konfigurace, tedy mít párové seskupení elektronů. Radikál odtrhne chybějící elektron jinému radikálu nebo molekule, ve své blízkosti a zahajuje tím řetězovou reakci. Tyto reakce bývají často iniciovány odštěpením vodíkového radikálu, H• ze sloučeniny. Řetězové reakce poškozují molekuly. Jsou ukončeny až srážkou dvou radikálů. Z chemického hlediska je ztráta elektronu oxidace a proto mají volné radikály oxidační účinky. [27]

3.6.1 Vznik volných radikálů

Příčiny vzniku radikálů mohou být exogenního nebo endogenního původu. Vliv na jejich vznik má prostředí, ve kterém se organismus vyskytuje.

3.6.1.1 Exogenní příčiny vzniku radikálů

Mezi exogenní příčiny způsobující vznik radikálů náleží ionizující záření (γ -paprsky) a UV-světlo. Dalším podnětem ke vzniku VR je kouření. Jedna vykouřená cigareta zatěžuje organismus 10^{17} volnými radikály. Každý den je organismus vystavován nejrůznějším intoxikacím (PCB, CCl₄, alkohol), které rovněž přispívají ke vzniku radikálů. A v neposlední řadě zde patří tepelná úprava potravin a vliv světla na ně. [27]

3.6.1.2 Endogenní příčiny vzniku radikálů

K hlavním endogenním příčinám, díky kterým radikály vznikají, patří vznik kyseliny močové (při úrazech nebo pooperačních stavech), rozpad fagocytů a makrofágů, autooxidace thiolů, hyperglykémie a vznik methemoglobinu. [27]

3.6.2 Nemoci, za jejichž příčinou stojí volné radikály

Volné radikály mohou napadnout kteroukoli molekulu organismu a oxidačně ji poškodit. Nejhorším případem je poškození fosfolipidů buněčných membrán. Vede k poruchám životně důležitých membránových dějů a poškozuje strukturu DNA, čímž dochází k mutagenezi, karcinogenezi a zániku buňky. Negativní vliv mají i na bílkoviny, dochází k inaktivaci enzymů a dalších bílkovin s biologickým významem. [27]

Mezi hlavní nemoci spojené s VR náleží záněty, diabetes mellitus a v neposlední řadě nejzávažnější nádorová onemocnění, které způsobují vysoké koncentrace ROS. [17]

Hydroxidový radikál reaguje téměř se všemi složkami molekul DNA, trvale poškozuje purinové a pyrimidinové báze a tato změna genetického materiálu je prvním krokem k mutagenезi a následné karcinogenезi. [16, 25]

Jednu lidskou buňku denně napadne okolo 10 000 volných radikálů. Pokud má organismus slabší antioxidační ochranu, nastává poškození buňky a může dojít k nádorovému bujení. Paradoxní je, že při ozáření, tedy léčbě nádorových onemocnění, se opět používají volné radikály. [25]

Mozek se se vyznačuje velmi slabou oxidační ochranou oproti ostatním orgánům těla. Důsledkem napadení mozku nadměrným množstvím volných radikálů se u člověka projeví Downův syndrom, Wilsonova chorobou, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba, epilepsie, roztroušená skleróza a mnoha dalších závažných nemocí. [25]

Tabulka IV: Poškození a následky organismu způsobené volnými radikály

Cíl	Poškození	Následky
DNA	Štěpení kruhu deoxyribosy, modifikace a poškození bází, řížové vazby řetězců zlomy řetězce	Mutace, inhibice proteosyntesy, translační chyby
Proteiny	Agregace a síťování, fragmentace a štěpení, reakce s hemovým železem, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin	Změny v transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu, změny v aktivitě enzymů

3.6.3 Odstranění volných radikálů

Volné radikály mohou být z těla odstraněny několika cestami. Nevýznamnějšími metodami jsou – použití antioxidantů, zachycení radikálů a jejich zneškodnění jinými

molekulami („quenching“) a reakce dvou radikálů s následným zánikem a eliminace z organismu. [26]

Důležitou roli zde hrají antioxidační vitamíny – A, E, C a β -karoten. Slouží jako prevence proti vzniku radikálů.

3.7 Čokoláda

Čokoládu obecně dělíme na mléčnou a tmavou podle obsahu kakaa a dalších přidávaných látek.

Tmavá čokoláda nabízí svým spotřebitelům řadu zdravotních výhod, kterým se mléčná čokoláda nikdy nevyrovná.

Kakaové boby jsou neobyčejně bohaté na polyfenoly, zejména na katechiny a proanthocyanidiny. Nicméně, v průběhu fermentace, sušení a pražení dochází k prudkému poklesu polyfenolů. [28]

Kakaové boby obsahují z 50-57% tuky, převážně nasycené (35% kyselina olejová, 35% kyselina stearová, 25% kyselina palmitová). Při konzumaci tmavé, 70% a víceprocentní čokolády je hladina cholesterolu v krvi ovlivněna pouze minimálně. Oproti tomu mléčná čokoláda a další čokoládové pochoutky, které obsahují ztužené tuky (nahrazují kakaové máslo), ovlivňují cholesterol nepříznivě. [29]

Flavonoidy z čokolády, zejména (-)-epikatechin, podporují díky přímým antioxidačním účinkům nebo antitrombotickému mechanismu, kardiovaskulární systém. Působí na cévní endotel a tím brání tvorbě krevních sraženin. Spotřeba tmavé čokolády vede ke zvýšení antioxidační kapacity a obsahu (-)-epikatechinu v krevní plazmě. Naopak mléko zasahuje do vstřebávání čokolády *in vivo* a může tím vyvracet zdravotní výhody hořké čokolády. [30]

Pro stanovení antioxidační kapacity v čokoládě musí být nejdříve čokoláda odtučněna. To můžeme provést extrakcí s n-hexanem. [30]

3.8 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (anglicky Capillary Electrophoresis, CE), resp. vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) patří mezi elektromigrační separační metody. Rozlišujeme zónovou elektroforézu (CZE), izotachoforézu (CITP), izoelektrickou fokusaci (CIEF), micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) a kapilární elektrochromatografii (CEC). V současné době je díky své vysoké účinnosti a malé spotřebě vzorku stále využívanější a perspektivnější analytická separační metoda. CE umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. [31]

První pokusy o rozdělení analytů metodou elektroforézy byly provedeny v roce 1937 A. Tiselie, který za svou práci získal Nobelovu cenu. Velký zlom v elektromigračních technikách však provedl S. Hjertén. Tento švédský chemik byl první, kdo použil separační kapiláru v elektroforéze. [32]

3.8.1 Princip metody

Kapilární elektroforéza jako elektroforetická metoda slouží k separaci látek na základě rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Separace probíhá v kapiláře naplněné roztokem základního elektrolytu, puřem. [33]

Základní fyzikální veličinou elektroforézy je elektroforetická pohyblivost μ_e , neboli mobilita. Jedná se o veličinu definovanou jako rychlost pohybu nabitých částic v_{ep} v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě E :

$$v_{ep} = \mu_e \cdot E \quad (\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}), \quad (1)$$

Pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil. Nabité částice (o náboji q) se začnou pohybovat vlivem elektrické síly F_{el} , která na ně působí.

$$F_{el} = qE \quad (2)$$

Pohyb iontů o poloměru r , je brzděn frikční silou F_{fr} prostředí, jež je dána Stokesovým zákonem. Podle něj je závislá na velikosti iontu a prostředí, ve kterém se vyskytuje.

$$F_{fr} = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (3)$$

v_{ep} je rychlost pohybu iontu a η viskozita prostředí.

V rovnovážném stavu jsou síly rovny

$$F_{el} = -F_{fr} \quad (4)$$

a pro elektroforetickou pohyblivost lze odvodit vztah:

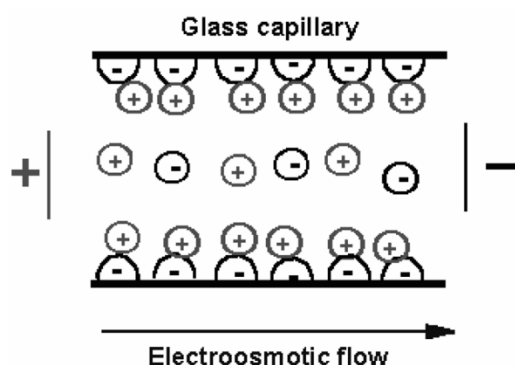
$$\mu_e = v/E = q/6\pi\eta r v \quad (5)$$

Z dané rovnice vyplývá, že elektroforetická mobilita iontu μ_e je přímo úměrná náboji iontu q a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku.

Elektroforetická mobilita je kvalitativní charakteristikou látek pro dané prostředí a teplotu. [34]

3.8.2 Elektroosmotický tok

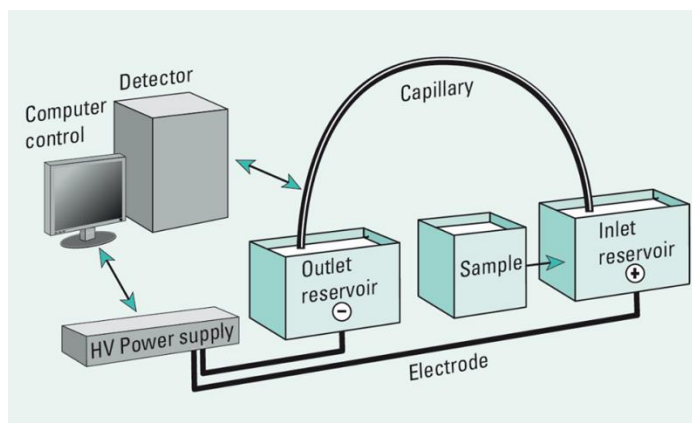
Dalším využívaným transportním jevem v kapilárních elektromigračních technikách je elektroosmotický tok (EOF). [Obr. 9] Projevuje se jako tok kapaliny uvnitř kapiláry. Vzniká po aplikaci stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy, která vzniká na rozhraní pevné a kapalně fáze u vnitřní stěny separační kapiláry. [34]



Obr. 9: Elektroosmotický tok

3.8.3 Základní instrumentace

Pozitivní vlastností CE spočívá v jednoduchosti přístrojové techniky. Schéma kapilární elektroforézy je znázorněno na [Obr. 10] Základem je zdroj vysokého napětí, separační kapilára, systém elektrod, zásobník na základní elektrolyt a detektor.



Obr. 10: Schéma kapilární elektroforézy

Nejčastěji používaná napětí jsou v CE v rozsahu 5-30 kV, aby produkovaly proudy v rozmezí 10 – 100 μA . Při použití vyššího napětí by mohlo dojít k nadměrnému ohřevu uvnitř kapiláry, následně k rozmytí zón a ztrátě rozlišení. [31]

Separací kapilára bývá zhotovena z taveného křemene, který je však velmi křehký, a proto se povrch pokrývá polyamidovým potahem. Před začátkem detekce se část povrchu odstraní a vytvoří se okénko, které je směřováno do detektoru. Kapiláry se používají v délce 10 -100 cm, s vnitřním průměrem 50-75 μm . [31]

Nejčastěji využívaným detektorem v CE je UV detektor, který bývá doplněn diodovým polem pro rychlejší snímání spekter. Mezi další používané detektory patří fluorescenční a vodivostní detektor.

3.8.4 Dávkování vzorku

Vzorek je do kapiláry dávkován ve velmi malých objemech 10 – 100 nl. Nejvýznamnější dávkování je založeno na hydrodynamické nebo elektrokinetické injekci. Při hydrodynamickém vstřikování působí zvýšený tlak na nádobu se vzorkem. Následně dojde k přímé injekci vzorku do kapiláry. [31]

Elektrokinetické dávkování využívá vlastní mobility iontů. Jeden konec kapiláry je ponořen do nádoby s pufrem a druhý do nádoby se vzorkem, která obsahuje (oproti hydrodynamickému dávkování navíc) elektrodu, na kterou je přiváděno napětí. Vložené napětí způsobuje migraci iontů dovnitř kapiláry. Nevýhodou tohoto typu dávkování je změna složení vzorku v průběhu injekce. [31]

3.8.5 Analyty v CE

CE je vhodná pro separaci biologicky aktivních látek, pro separaci všech typů rozpustných ionogenních látek nízko- i vysokomolekulární povahy. Tedy anorganických a organických kyselin a bází, aminokyselin, bílkovin, peptidů, sacharidů, nukleotidů, nukleových kyselin nebo také pro separaci virů a buněk. Mohou být však separovány i látky neionogenní povahy, jako aromatické a alifatické uhlovodíky a jejich deriváty (alkoholy, aldehydy, ketony a další). Rovněž optické izomery biologicky aktivních látek mohou být separovány pomocí HPCE technik. Velmi užívaná je ve forenzních laboratořích. [31]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Pro analýzy byla používána voda v čistotě LC-MS, zakoupena od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Na přípravu základních elektrolytů a promývacích roztoků byly použity: hydroxid sodný, kyselina boritá a SDS od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Standardy používaných kyselin – kyselina skořicová, sinapová, kumarová, gallová, kávová a vanilová byly zakoupeny taktéž od firmy Sigma-Aldrich.

4.1.2 Vzorky

K samotné analýze byly použity vzorky čokolády: Belgická čokoláda značky Prestige s obsahem 80 % kakaa a mléčná čokoláda značky Orion (zakoupené v prodejně potravin Tesco Olomouc).

4.2 Příprava elektrolytů

Byly testovány dva typy pufrů, fosfátový a borátový. Zásobní roztok borátového pufru o koncentraci 50 mM byl připraven rozpuštěním potřebného množství kyseliny borité (H_3BO_3) v 50 ml vody a za stálého míchání titrován 1 molárním roztokem NaOH do bazického pH 9,5. Hodnota pH byla v průběhu titrace kontrolována pomocí pH metru. Fosfátový pufr byl připraven smísením požadovaného množství kyseliny fosforečné (H_3PO_4), pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu 2,5 opět pomocí 1 M NaOH.

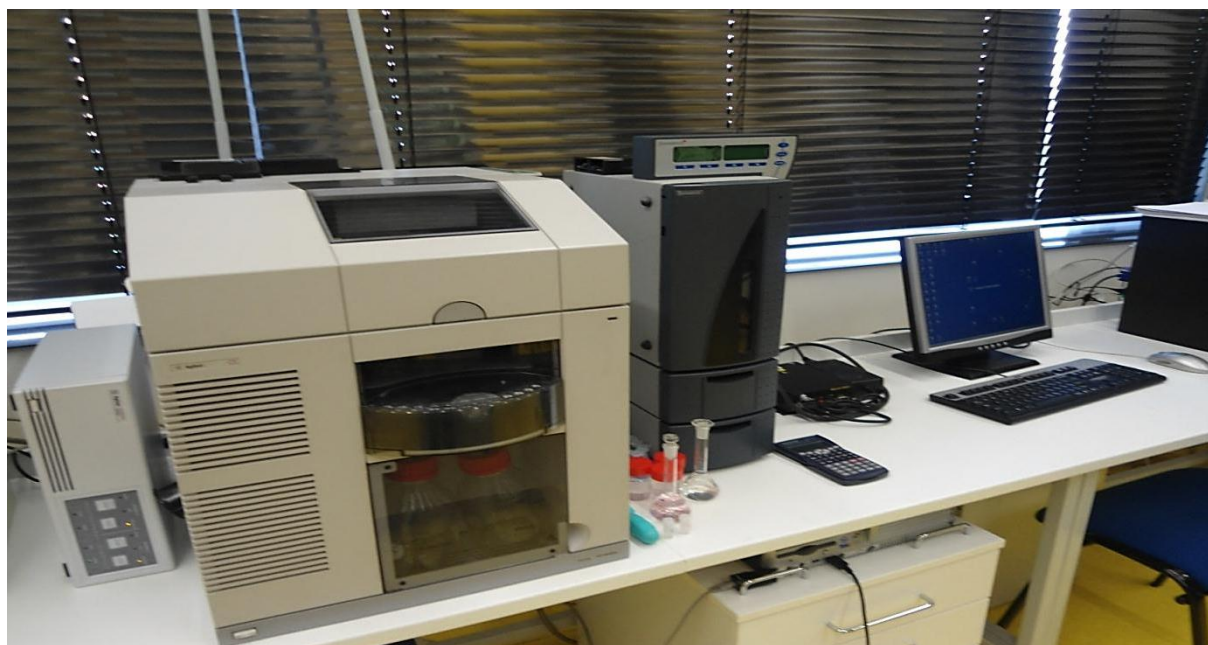
4.3 Instrumentace a experimentální podmínky

Vzorky byly měřeny s pomocí kapilární elektroforézy HP 3D-CEs detekcí s diodovým polem DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), obr. 10. Vlnová délka byla nastavena na 205 nm. Separace probíhala v nepokryté křemenné kapiláře o

celkové délce 33 cm a vnitřním průměru 50 μm (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 24,5 cm.

Před prvním použitím byla křemenná kapilára v kazetě, vytemperované na 25°C, promyta 0,1 M NaOH po dobu 30 minut, poté vodou v čistotě LC-MS 20 minut a nakonec pracovním elektrolytem (BGE) 10 minut. Před jednotlivými analýzami se kapilára promývala 5 minut 0,1 M NaOH, poté 3 minuty deionizovanou vodou a nakonec 2 minuty připraveným elektrolytem. Všechna proplachování kapiláry byla pod tlakem 925 mbar.

Všechny zásobní roztoky standardů kyselin byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml v methanolu a následně postupně ředěny deionizovanou vodou na požadovanou koncentraci. Pro online prekoncentrační krok byly rozpuštěny v borátovém pufru o koncentraci 50 mM pH = 9,5 a opět ředěny deionizovanou vodou na potřebné koncentrace.



Obr. 11: Fotografie používaného přístroje HP 3DCE Agilent Technologies

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

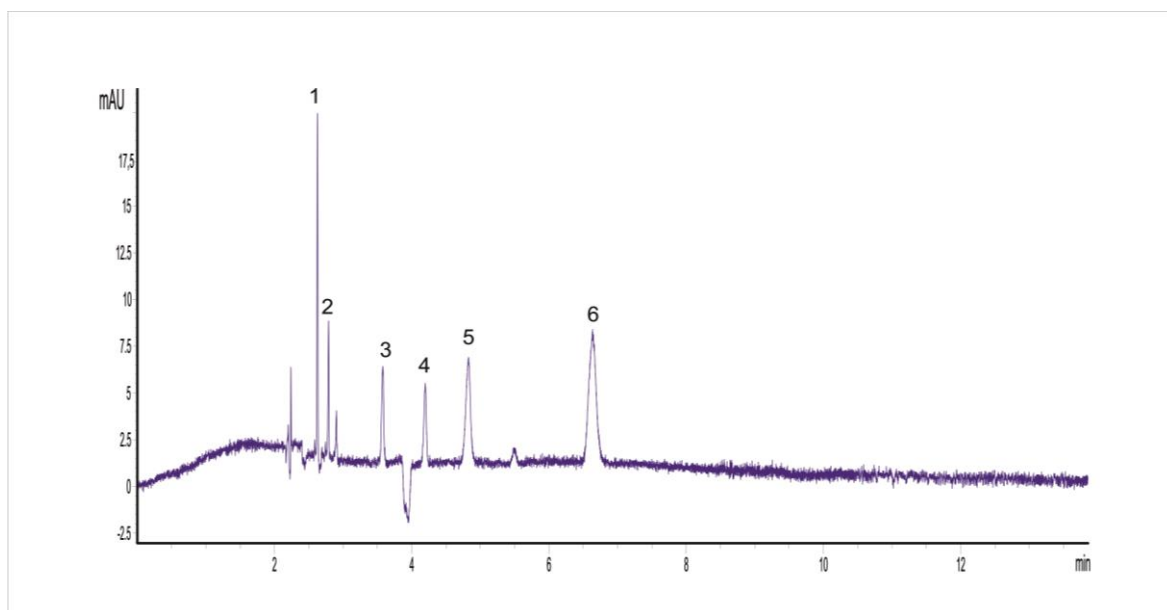
5.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Stojím-li před problémem separace jednotlivých antioxidantů ve směsi, je nutné nalézt vhodné experimentální podmínky. V této práci byl v prvním kroku zkoumán výběr vhodného základního elektrolytu a v druhém kroku v rámci námi zvolené online prekoncentrační techniky založené na elektrokinetické prekoncentraci ve spojení s „vybíjením“ látek na pH rozhraní studován vliv parametrů na průběh analýzy. Pro optimalizaci separačních podmínek byla navržena směs standardů (tzv. modelová směs) obsahující tyto analyty: kyselina skořicová, sinapová, kumarová, gallová, kávová a vanilová.

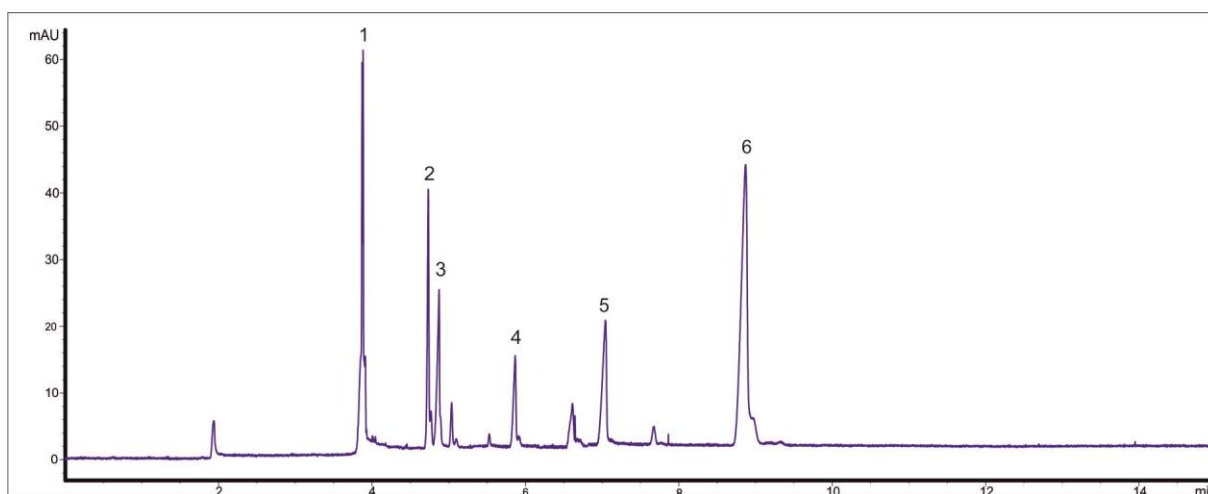
5.2 Volba vhodného elektrolytu

5.2.1 Vliv složení elektrolytu na separaci fenolových kyselin

Separace je ovlivněna volbou pufru a jeho koncentrací. Vzhledem k chemické povaze studovaných látek, fenolových kyselin, které jsou záporně nabitě při vysokém pH (disociační konstanty látek se pohybují v rozmezí pKa 4 – 6) byl vybrán borátový pufr pro kapilární zónovou elektroforézu. V případě nízkého pH byl zvolen fosfátový pufr, přičemž analýza probíhala v módu micelární elektrokinetické chromatografie. Pro prvotní experimenty byl studován borátový pufr o koncentraci 50 mM pH 9,5 a fosfátový pufr o koncentraci 50 mM pH 2,5 s přidavkem 50 mM SDS. K rychlejší separaci docházelo ve fosfátovém pufru, proto byl vybrán pro další experimenty.



Obr. 12: Separace kyselin ve fosfátovém pufru: 1. kyselina skořicová, 2. kyselina sinapová, 3. kyselina kumarová, 4. kyselina gallová, 5. kyselina kávová, 6. kyselina vanilová



Obr. 13: Separace kyselin v borátovém pufru: Obr. 12 Separace standardů kyselin v borátovém pufru: 1. kyselina skořicová, 2. kyselina sinapová, 3. kyselina kumarová, 4. kyselina gallová, 5. kyselina vanilová, 6. kyselina kávová

5.3 Online prekoncentrační technika

Pro zvýšení koncentrační citlivosti kapilární elektroforézy byla pro analýzu antioxidantů v čokoládě použita technika online prekoncentrace vyvinutá v laboratoři elektromigračních technik PřF UP Olomouc. [35] Tato technika je založena na elektrokinetickém dávkování fenolových kyselin rozpuštěných v pufru o pH 9,5 (kde jsou negativně nabitě) do kapiláry, která je naplněna pufrem o pH 2,5. V okamžiku, kdy daná kyselina „domigruje“ na rozhraní obou elektrolytů, dojde k jejímu „vybití“: skupina COO^- (pH 9,5) se změní na COOH (pH 2,5). Díky tomu dojde zároveň k „zastavení“ migrace této kyseliny (protože již nenese žádný náboj, tj. nemůže se pohybovat v elektrickém poli). Toto dávkování je někdy označováno jako elektrokinetická akumulace. V dalším kroku je nutné, aby se prekoncentrované (akumulované) kyseliny opět „daly do pohybu“, dosáhly detekčního okna a rozseparovaly se. Toto se uskutečňuje výměnou pufru ve vstupní víalce („inlet“) za pufr o pH 2,5 obsahující SDS a aplikací záporného separačního napětí. V tomto případě micely SDS promigrují skrz zakoncentrovanou zónu fenolových kyselin, kde dochází k jejich vzájemné interakci a tím následně i k separaci. Tomuto kroku se někdy říká mobilizace.

V případě obou kroků byly optimalizovány podmínky separace.

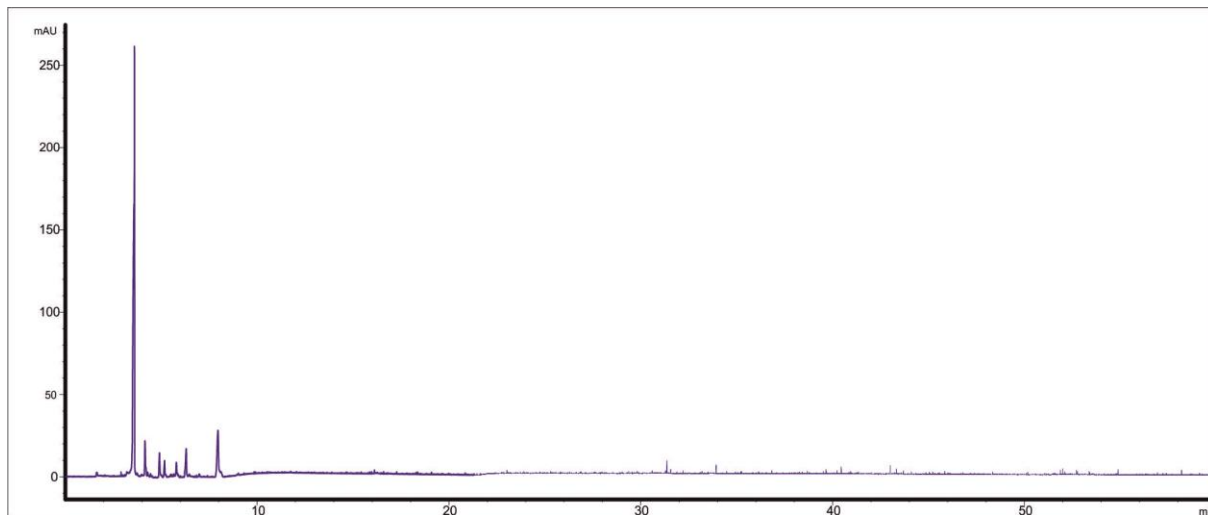
5.3.1 Hydrodynamické dávkování

Optimalizaci některých parametrů není nutné provádět přímo při elektrokinetickém dávkování (akumulaci) a lze jej provádět i při hydrodynamickém dávkování. Jde o parametry, které primárně neovlivňují akumulací krok, ale ovlivňují separaci a mobilizaci látek. Nicméně je nutné, aby hydrodynamicky dávkované vzorky byly rozpuštěny v prostředí, ve kterém bude následně probíhat elektrokinetické dávkování (v tomto případě 50 mM borát/NaOH pH 9,5).

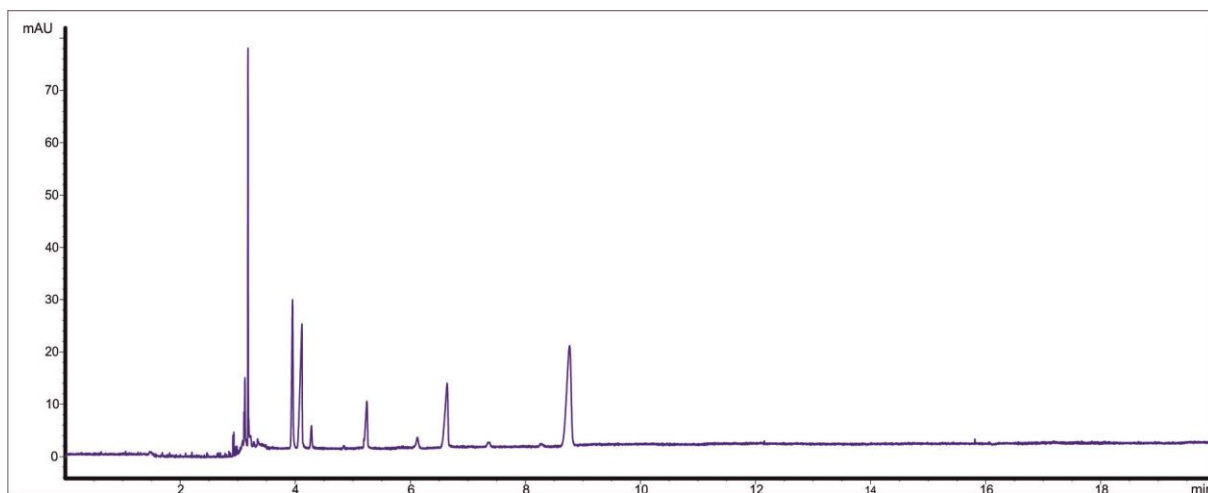
5.3.1.1 Vliv koncentrace aditiva SDS

Koncentrace SDS (dodecyl síran sodný) významně ovlivní separaci, protože SDS interaguje s analyty, a rozdílná koncentrace SDS ovlivňuje rozdělovací poměr analytů mezi micely a pufr a tím i selektivitu separace. Všechna měření byla provedena ve fosfátovém pufru vytitrovaném 1 M NaOH, s napětím -10 kV, dobou dávkování 10 s a

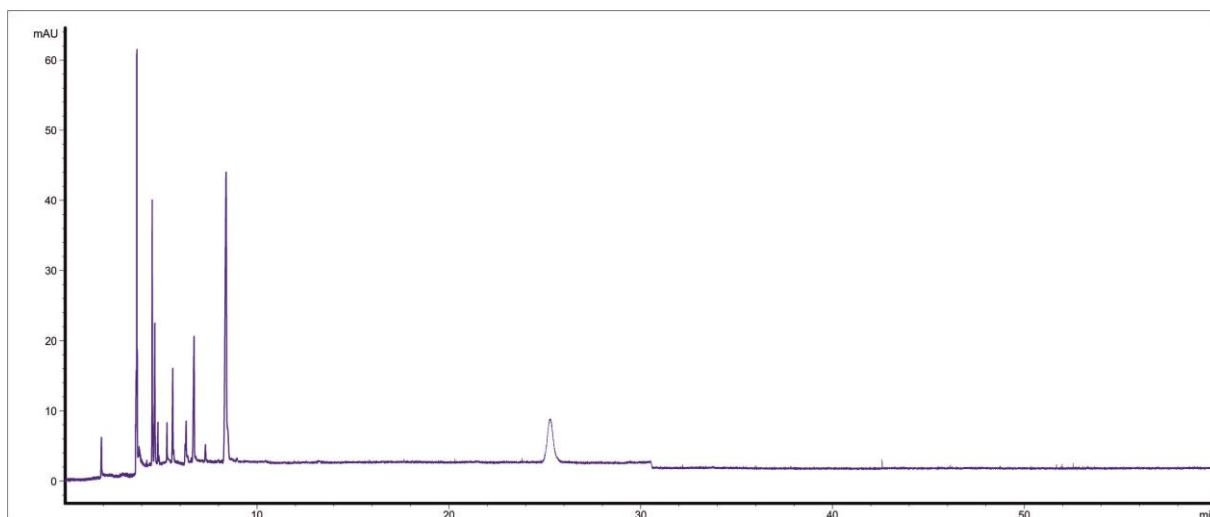
tlakem 50 mbar. Koncentrace směsi všech 6 standardů kyselin byla 0,001 mol/l. Vliv koncentrace SDS je na následujících obrázcích 14 – 17.



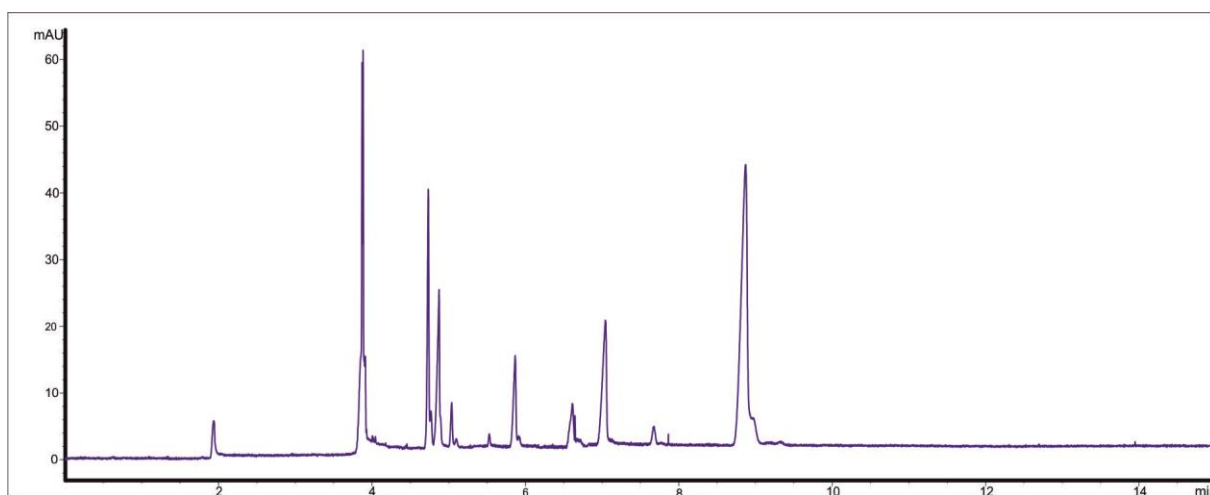
Obr. 14: Vliv koncentrace 25 mM SDS



Obr. 15: Vliv koncentrace 50 mM SDS



Obr. 16: Vliv koncentrace 75 mM SDS



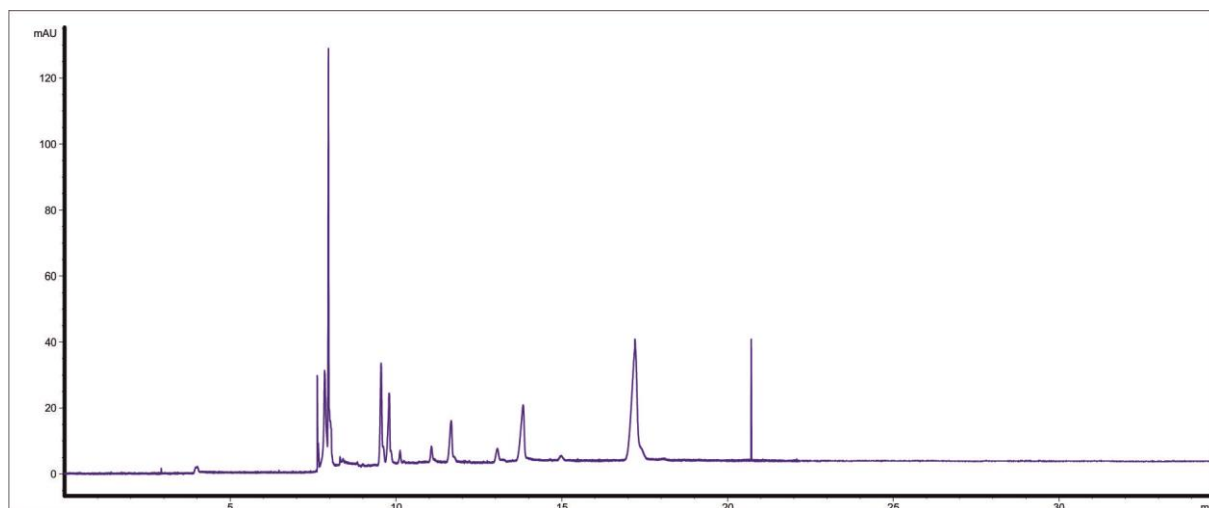
Obr. 17: Vliv koncentrace 100 mM SDS

Z výše uvedených elektroferogramů je patrné, že nejlepší separace probíhá v 50 mM SDS vzhledem k rozlišení píků, době analýzy a intenzitě signálu.

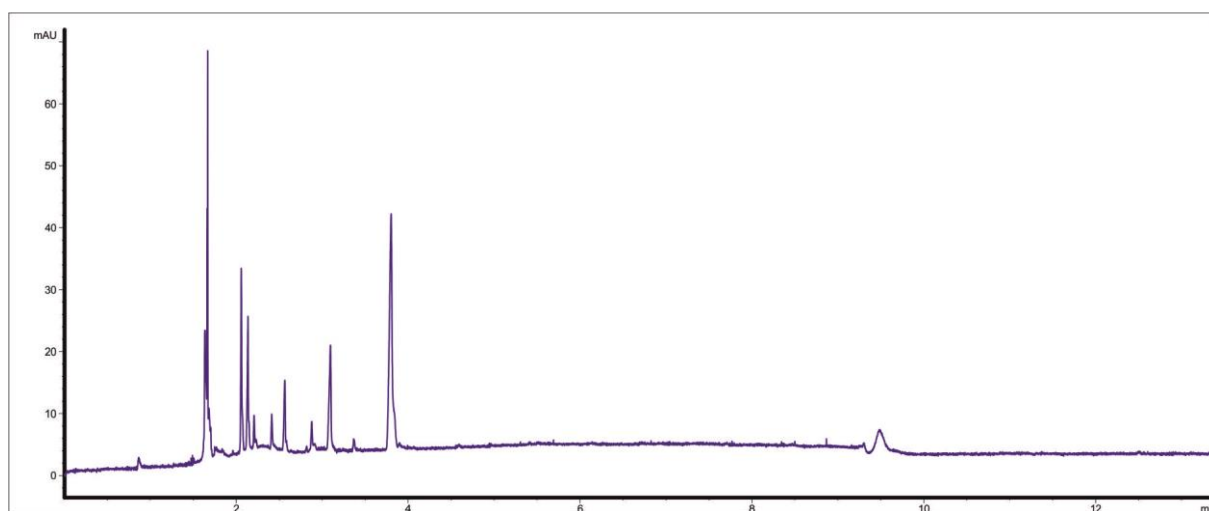
5.3.2 Vliv separačního napětí

Dalším studovaným parametrem bylo separační napětí v rozsahu -5 kV až -30 kV, které bylo postupně zvyšováno. Separační napětí je významným parametrem ovlivňujícím rychlost analýzy. Má vliv jak na migrační čas analytů, tak na

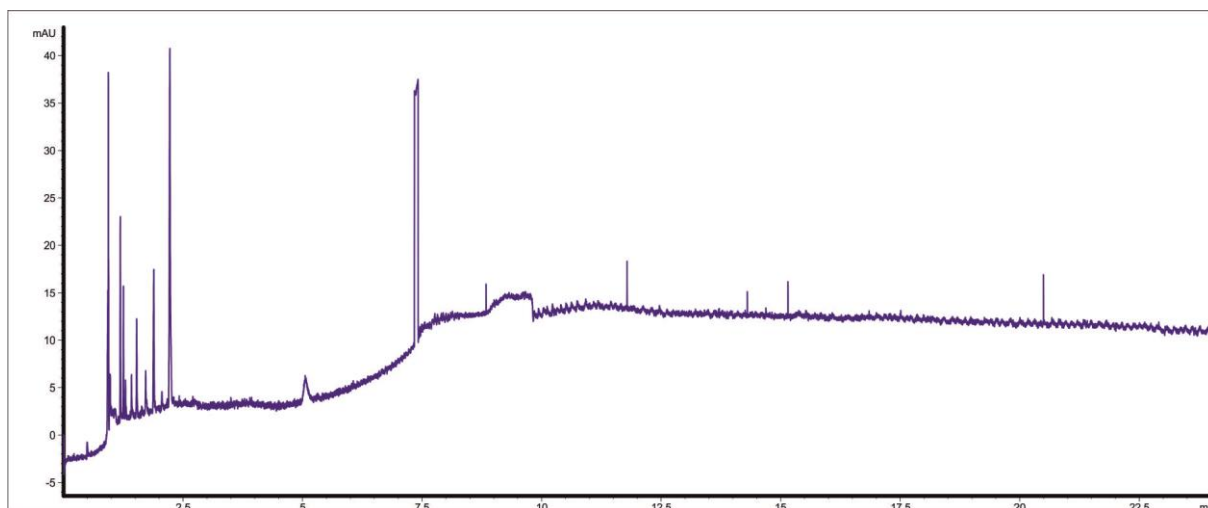
vznikající Jouleovo teplo. Opět bylo měření provedeno v neoptimálnějších podmínkách 50 mM fosfát/NaOH s přidavkem 50 mM SDS, tlakem 50 mbar a dobou dávkování 10 s. Koncentrace směsi standardů byla opět 0,0001 mol/l. Efekt napětí je znázorněn na obrázcích 18 – 20.



Obr. 18: Efekt separačního napětí -5 kV



Obr. 19: Efekt separačního napětí -10 kV

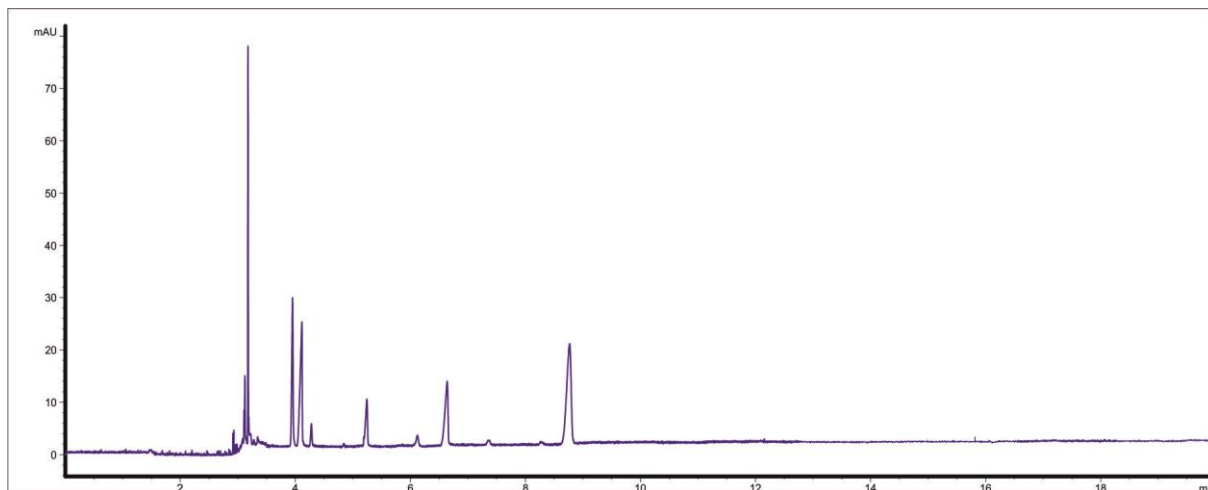


Obr. 20: Efekt separačního napětí, -30 kV

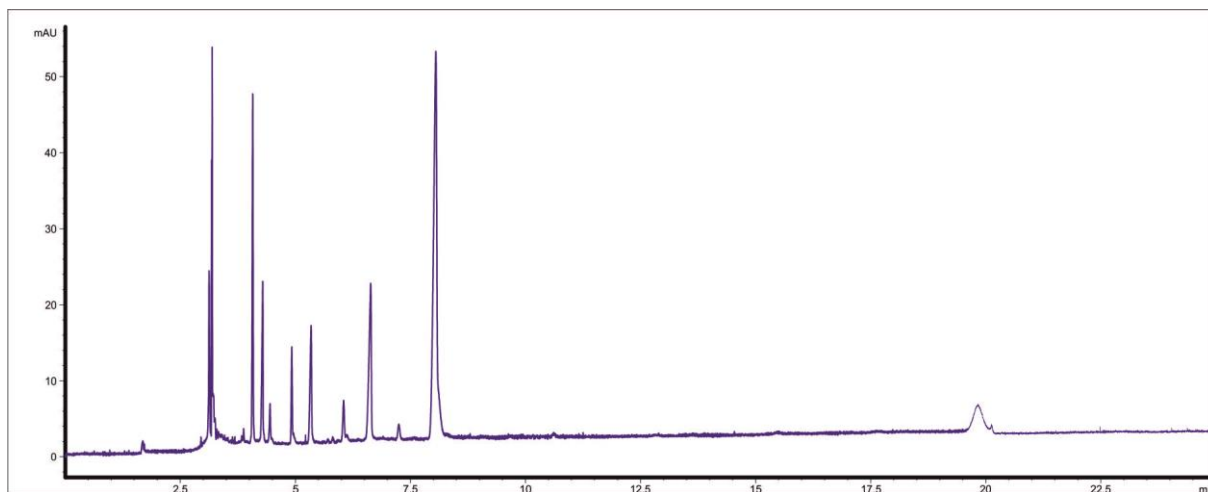
Ze záznamů vyplývá, že nejlepší hodnota napětí je 10 kV. V případě nižšího dochází k prodloužení migračního času analytů, naopak v případě vyššího dochází ke zvýšenému generování Jouleova tepla a analýza se stává neopakovatelnou.

5.3.3 Vliv teploty

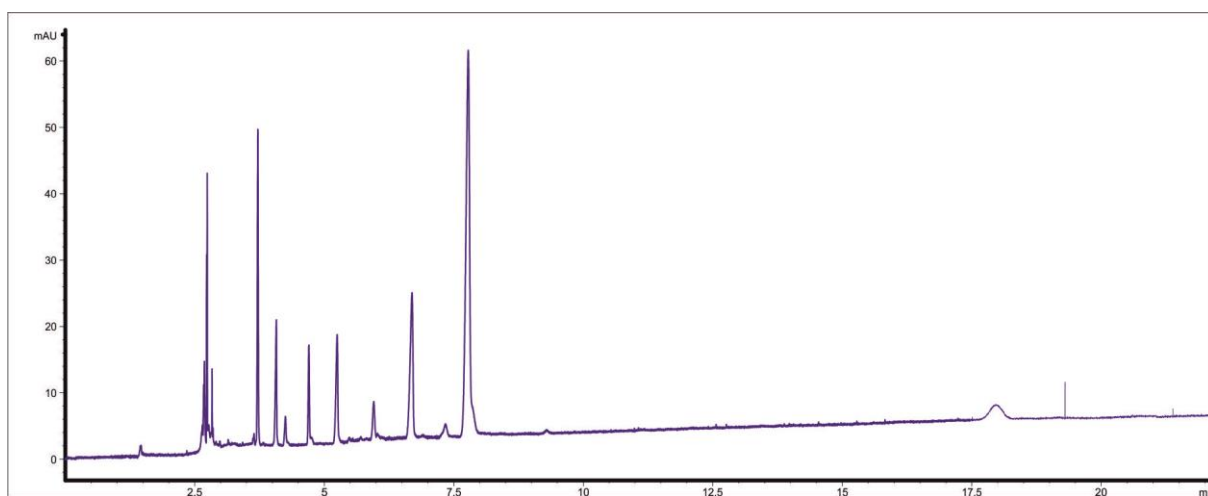
Dalším parametrem, který musí být brán při vývoji metody na zřetel, je vliv teploty. Stejně jako napětí i teplota ovlivňuje délku analýzy díky ovlivnění viskozity prostředí. Teplota může mít vliv i na tvorbu micel SDS. Opět je vliv teploty změřen v podmínkách 50 mM fosfát/NaOH s přídavkem 50mM SDS, tlakem 50 mbar a dobou dávkování 10 s. Koncentrace směsi standardů byla též 0,0001 mol/l. Vliv teploty je znázorněn na následujících obrázcích 21 – 23.



Obr. 21: Efekt teploty, 25 °C



Obr. 22: Efekt teploty, 40 °C



Obr. 23: Efekt teploty, 60 °C

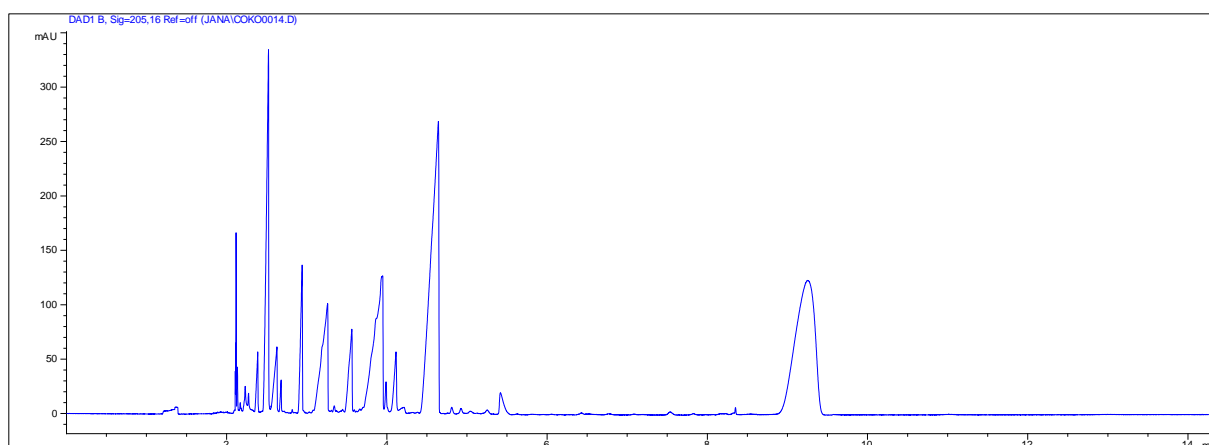
Z obrázků je patrné, že v případě zvyšování teploty dochází k zrychlování analýzy (25°C vs. 40°C) a dále k postupnému zvyšování intenzity píků. Při 60°C nedošlo k zrychlení analýzy, což si vysvětlují již diskutovanou změnou v interakci analytů a SDS micel. Nicméně při vyšších teplotách byly analýzy méně opakovatelné, a proto byla vybrána teplota 25°C pro další experimenty.

5.4 Elektrokinetické dávkování

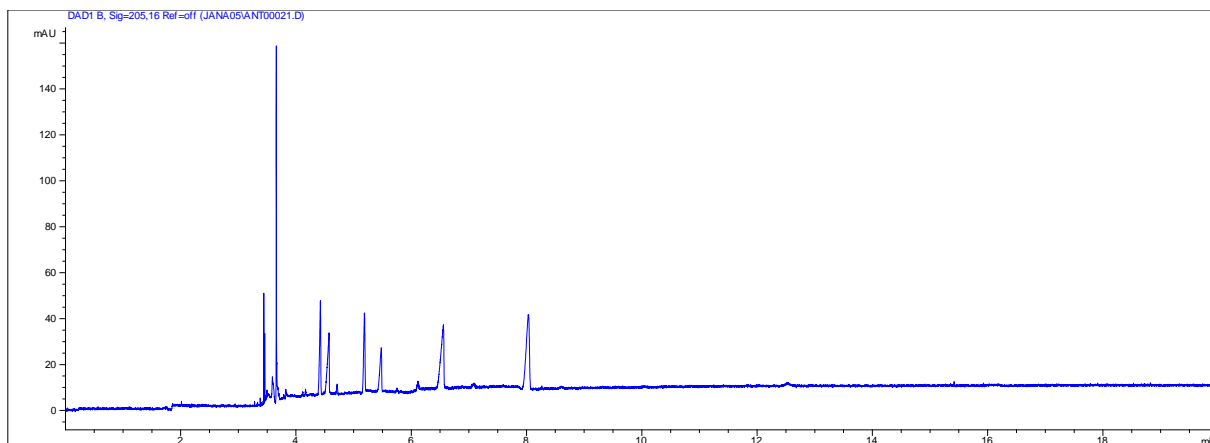
V případě elektrokinetického dávkování byly studovány 2 parametry a to doba a napětí při dávkování. Pro separaci látek se pak využívá optimalizovaný postup z předchozí kapitoly 5.3.

5.4.1 Vliv doby dávkování

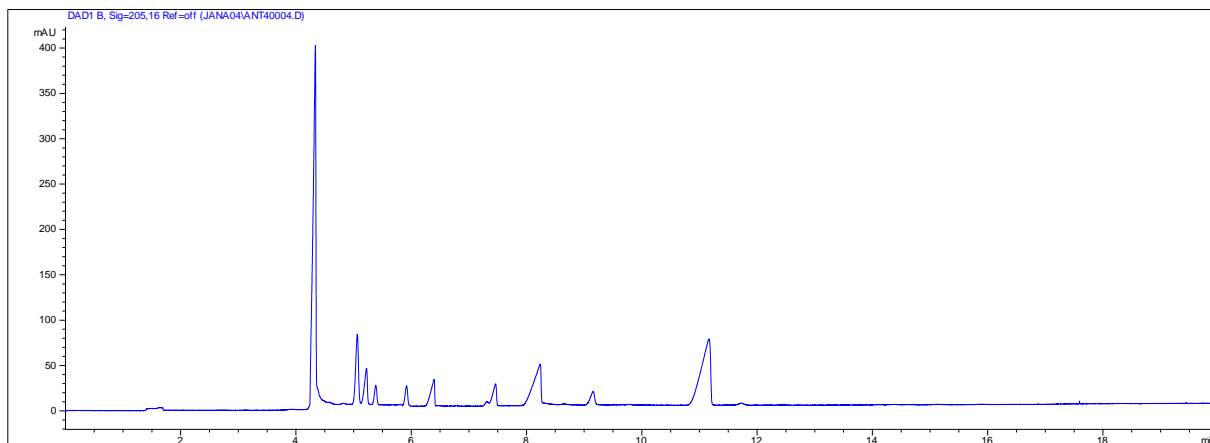
Doba dávkování vzorku odráží svůj vliv ve velikosti a intenzitě jednotlivých píků. Při zvyšování doby dávkování by mělo docházet k lineárnímu nárůstu intenzity (plochy) píků. Koncentrace směsi standardů byla pro dobu dávkování 5 s 10^{-4} mol/l. Pro 10 s, 30 s a 60 s 10^{-5} mol/l. A pro dobu dávkování 600 s 10^{-6} mol/l. Efekt doby dávkování znázorňují obrázky 24 - 28.



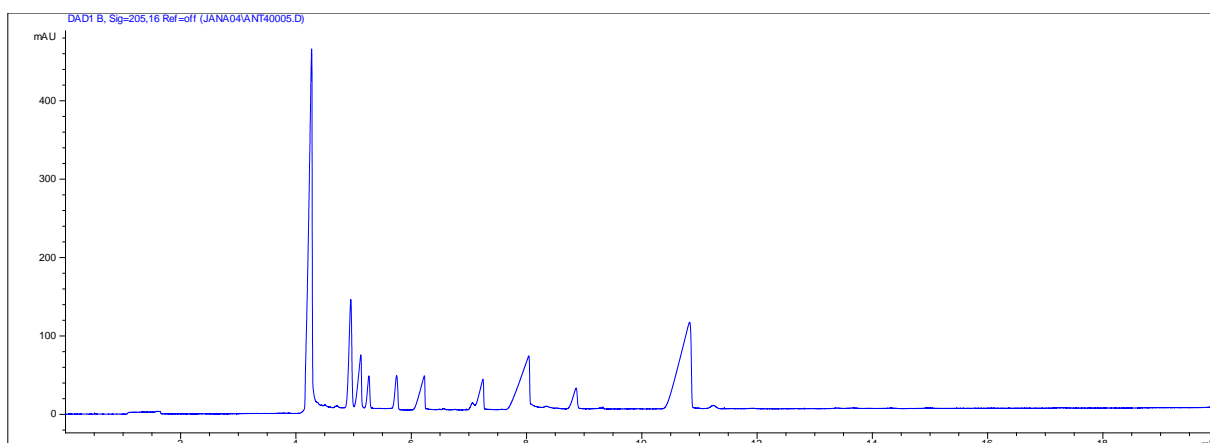
Obr. 24: Doba dávkování 5 s,



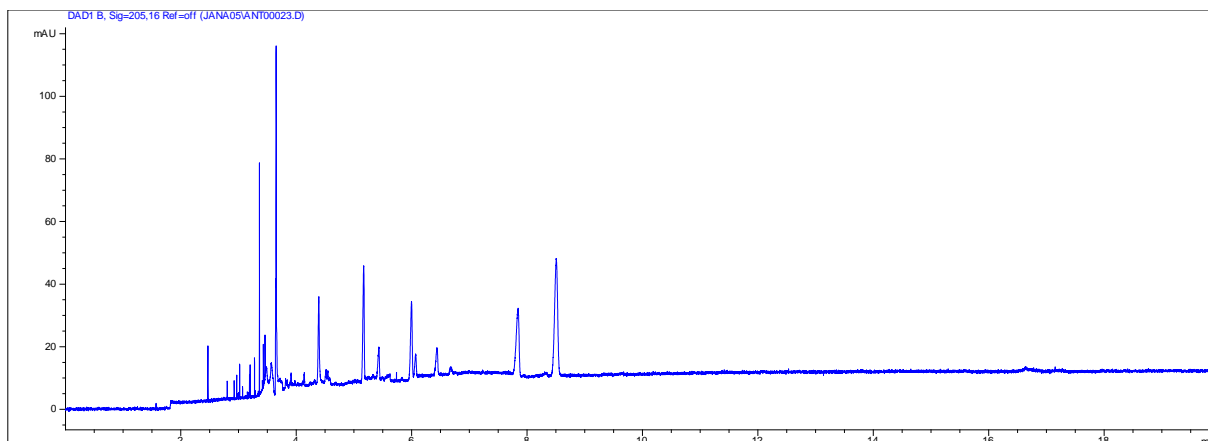
Obr. 25: Doba dávkování 10 s



Obr. 26: Doba dávkování 30 s



Obr. 27: Doba dávkování 60 s

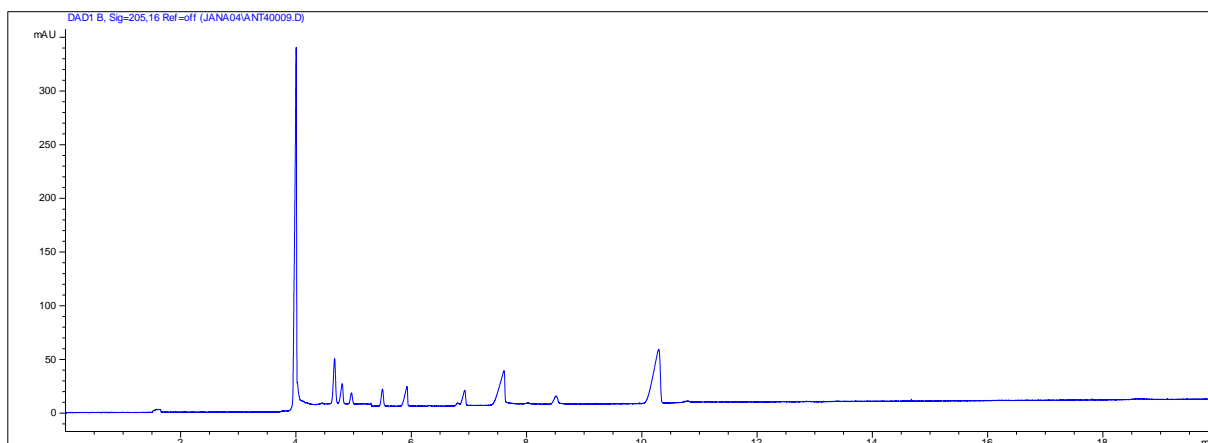


Obr. 28: Doba dávkování 600 s

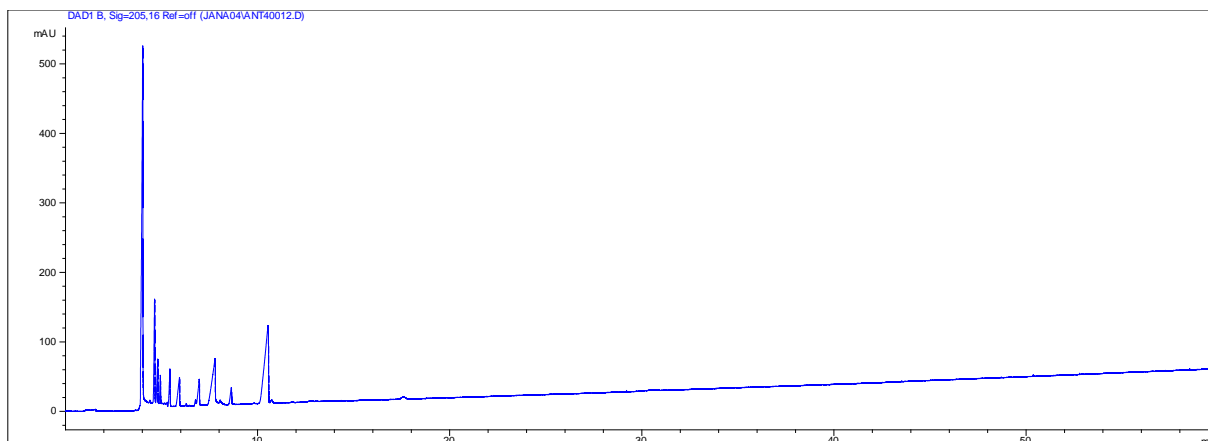
Z obrázků je patrné, že se zvyšující se dobou dávkování dochází k zvyšování intenzity píků analyzovaných fenolových kyselin. Zároveň je vidět, že dochází i k dávkování nečistot a jejich „větší viditelnosti“. Optimální doba dávkování závisí na konkrétním použití, je možné použít 10 s (pro více koncentrované vzorky) i 600 s (pro méně koncentrované vzorky).

5.4.2 Vliv napětí při dávkování

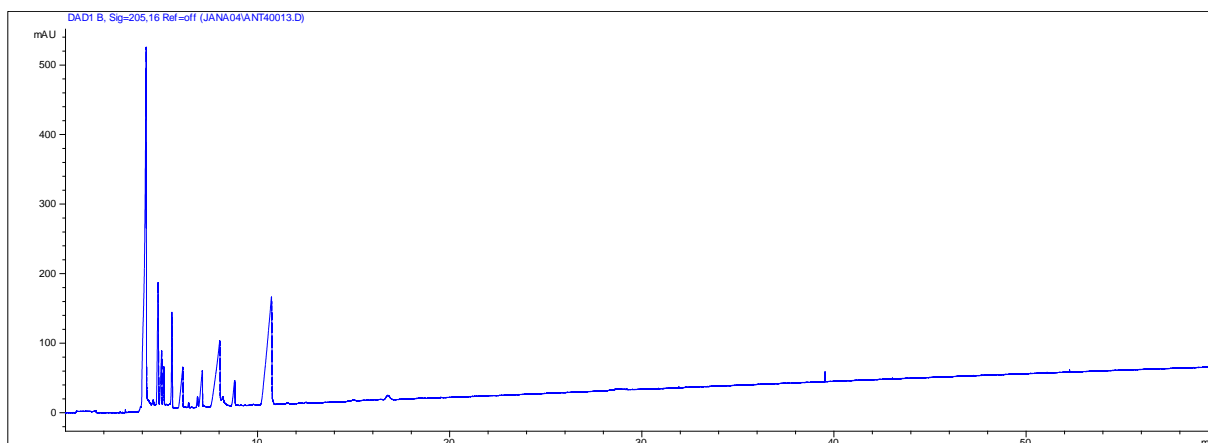
Dalším studovaným parametrem byl vliv napětí při dávkování. Napětí může ovlivnit množství nadávkovaných analytů, ale zároveň ovlivňuje generování Jouleova tepla a tím i opakovatelnost kroku dávkování. Vliv napětí znázorňují následující obrázky 29 – 31.



Obr. 29: Dávkování při -5 kV



Obr. 30: Dávkování při -20 kV

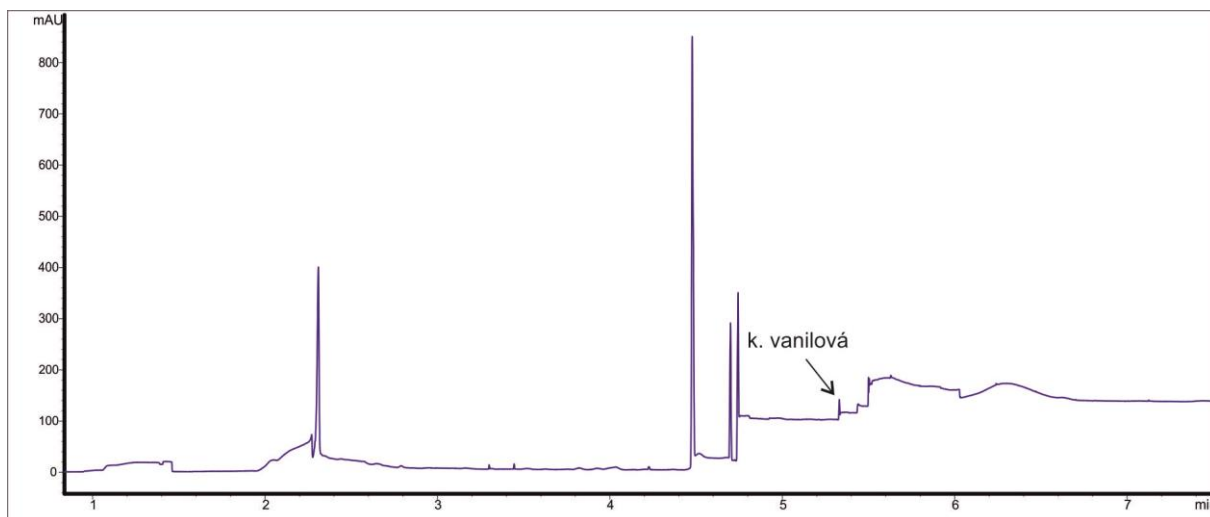


Obr. 31: Dávkování při -30 kV

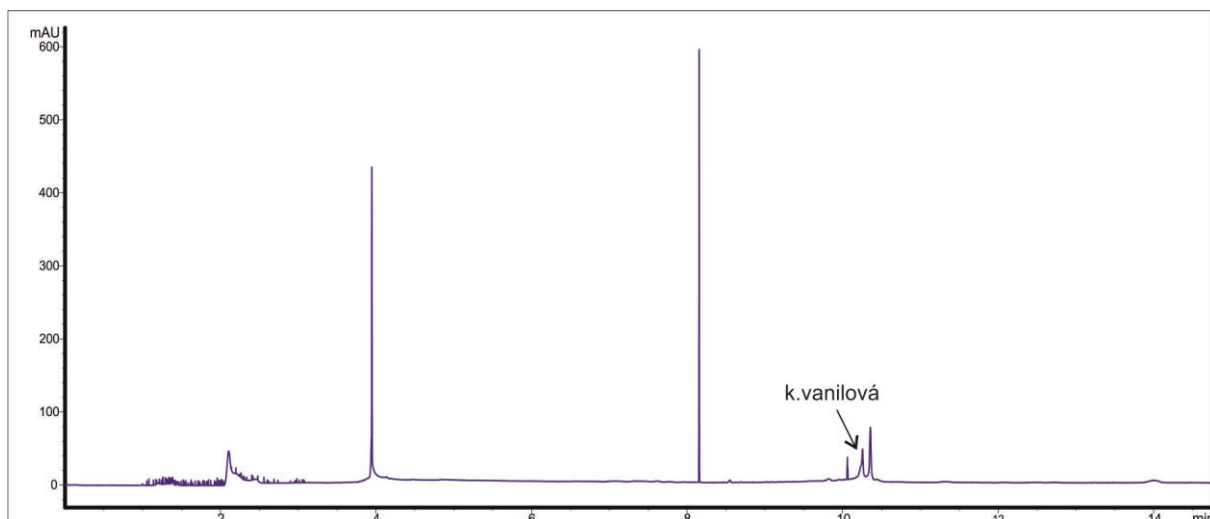
I zde je vidět, že vyšší napětí opět generuje vyšší Jouleovo teplo a analýzy nelze provádět opakovatelně. Jako optimální napětí pro dávkování bylo vybráno napětí -10 kV.

5.5 Analýza reálného vzorku

Nejdříve byl reálný vzorek zpracován. 7 mg čokolády bylo rozpuštěno ve 2 ml horké vody a dáno do ultrazvuku na dobu 10 minut. Následně bylo přidáno 5 ml hexanu a na 30 minut byl vzorek vložen do centrifugy, aby došlo k odstředění dvou fází (5000 otáček za minutu). Poté bylo z vodné fáze odebráno 60 μ l a k ní přidáno 540 μ l borátového pufru a takto připravený vzorek byl nadávkován do kapilární elektroforézy. Výsledky jsou na následujících obrázcích.



Obr. 32: Belgická čokoláda, separační napětí: -10 kV



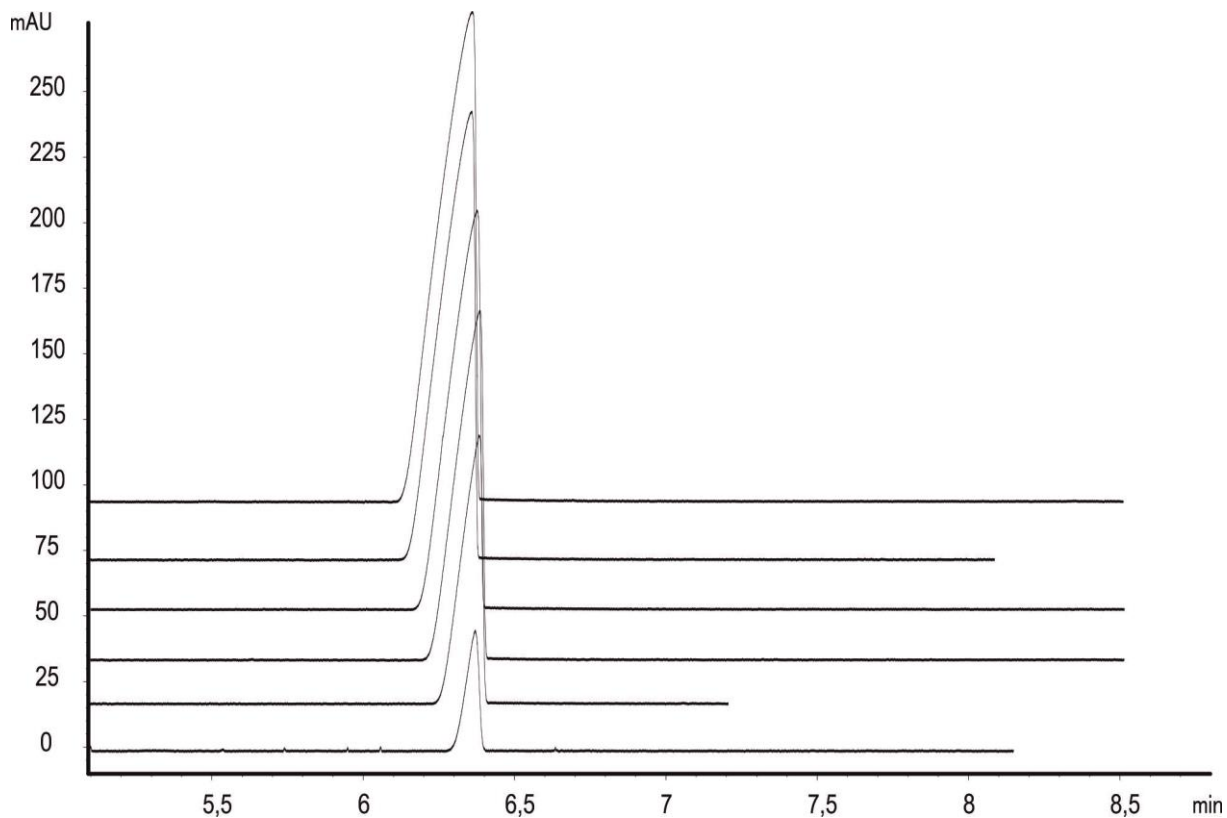
Obr. 33: Hořká čokoláda Orion, separační napětí: -5kV

K analyzovaným vzorkům čokolády byly přidány standardy fenolových kyselin a byla identifikována vanilová kyselina. Pro zjištění koncentrace vanilové kyseliny ve vzorcích čokolády byla provedena metoda standardního přídatku.

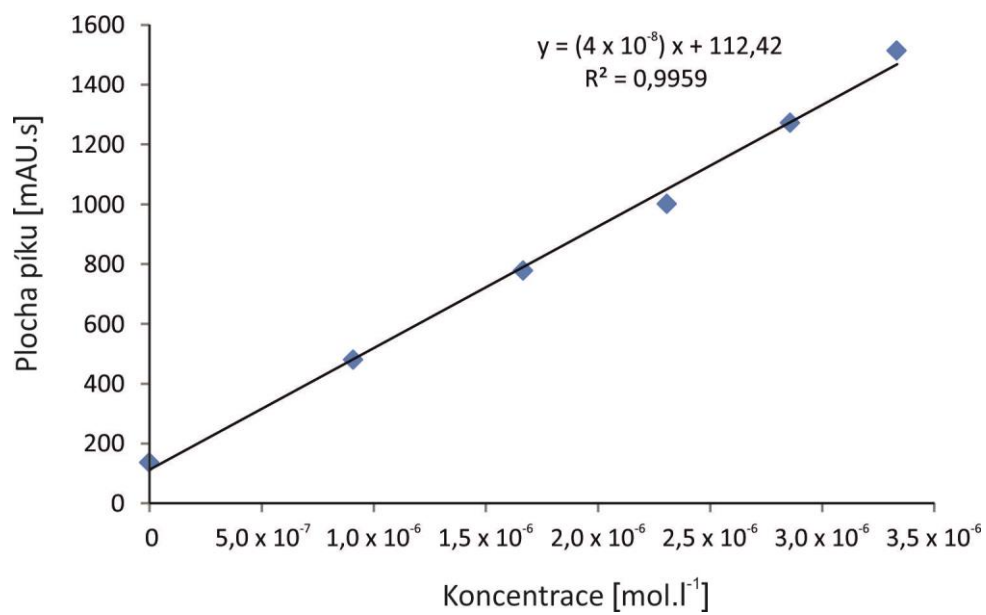
5.5.1 Metoda standardního přídatku

Tato metoda byla provedena následujícím způsobem: K objemu 400 uL vzorku čokolády se přidávalo 40 uL standardu kyseliny vanilové o koncentraci 10^{-5} mol/l, kdy přídatky se opakovaly celkem 5x (obr. 30). Měření na jednotlivých koncentračních hladinách se opakovalo celkem 3x. Na obrázku 31 je znázorněn příklad lineární kalibrační závislosti

pro belgickou čokoládu s $R^2 = 0,9959$. Vypočtená koncentrace kyseliny vanilové ve vzorku Belgické čokolády byla $2,76 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ ($\pm 0,04 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$), ve vzorku hořké čokolády Orion byla $1,34 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ ($\pm 0,05 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$). Analýza dat byla provedena pomocí softwaru MS Excel, funkcí "Analýza dat".



Obr 34: Standardní přídavky kyseliny vanilové ke vzorku Belgické čokolády: a) vzorek Belgické čokolády bez přídavku, b) – f) přídavky standardu



Obr. 35: Kalibrační závislost stanovení kyseliny vanilové metodou standardního přídavku.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce měla za cíl poukázat na kapilární elektroforézu, jako na nástroj vhodný pro stanovení antioxidantů ve vybraných potravinách.

Byly studovány dva základní elektrolyty, borátový a fosfátový, přičemž separace probíhala lépe ve fosfátovém pufru s přídavkem SDS. Reálný vzorek bylo možné pomocí CE analyzovat pouze za pomoci online prekoncentrace. Metoda byla optimalizována na standardech fenolových kyselin. V rámci optimalizace separačních podmínek byl studován vliv přidaného SDS, vliv separačního napětí, doby dávkování napětí při dávkování a teploty. Dále byly analyzovány dva reálné vzorky čokolády, kde byla detekována vanilová kyselina na nanomolární koncentrační úrovni.

Závěrem lze říci, že metoda kapilární elektroforézy je vhodná pro stanovení fenolových kyselin v potravinách.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PLÁTENÍK J.: Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi. Ústav lékařské biochemie 1. LF UK, 2009, 11(1).
- [2] MOURE A., et al.: Natural antioxidants from residual sources. Food chemistry. 2001, 72 (2), s. 145-171.
- [3] VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN MT., MAZUR M., TELSER J.: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39 (1), s. 44-84.
- [4] CHRISTODOULEAS D., FOTAKIS C., PAPADOPOULOS K., YANNAKOPOULOU E., CALOKERINOS A. C.: Development and validation of a chemilunogenic method for the evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants Analytica Chimica Acta. 2009, 652 (1–2), s. 295–302.
- [5] PAULOVÁ H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy. 2004, 98, s. 174–179.
- [6] KUBÁŇ V., KUBÁŇ P.: Analýza potravin. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007, s. 202, ISBN 978-80-7375-036-7.
- [7] BAHRUDDIN S., et al.: Food Chemistry. 2007, 105 (1), s. 389–394.
- [8] EHALA S., VAHER M., KALJURAND M.: Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry. [online], 2005, 53, s. 6484–6490.
- [9] WU T., GUAN Y., YE J.: Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Food Chemistry. 2005, 100, s. 1573–1579.
- [10] VELÍŠEK J.: Chemie potravin I. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [11] VELÍŠEK J.: Chemie potravin II. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [12] SLANINA J., TÁBORSKÁ E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chemické listy, 2004, 98, s. 239–245.
- [13] SHAHIDI F.: Antioxidants in food and food antioxidants. Molecular Nutrition & Food Research, 2000, 44 (3), s. 148–214.

- [14] WATTANASIRITHAM L., et al.: Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*, 2015, 192, s. 156–162.
- [15] Vyhláška č.4/2008 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.
- [16] Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000, s. 314, ISBN 80-7169-704-4.
- [17] GALLARDO C., JIMÉNEZ L., GARCÍA-CONESA M.-T.: Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, 2006, 99 (3), s. 455–463.
- [18] FARDET A., RÉMÉSY CH., ROCK E.: Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48, s. 258–276.
- [19] Zitka O., Sochor J., Rop O., Skaličková S., Šoborová P., Zehnálek J., Beklová M., Krška B., Adam V., Kizek R.: Comparison of various easy-to-use procedures for extraction of phenols from apricot fruits. *Molecules*, 2011, 16, s. 2914–2936.
- [20] GÜLCIN I.: Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 217, s. 213–214.
- [21] CROZIER A., JAGANATH I. B., CLIFFORD M.N.: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 2009, 26, s. 965–1096, cit.
- [22] STRATIL P. Fenolové látky v potravinách a metody stanovení jejich antioxidační aktivity. Brno, 2007. Habilitační práce, Mendelova univerzita.
- [23] SARJIT Amreeta, Yi WANG a Gary A. DYKES.: Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology*, 2015, vol. 46, s. 227-233.
- [24] ROY S. J., PRINCE P. S. M.: Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, vol. 50, s. 3984-3989.

- [25] HALLIWELL B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 1994, 344, s. 721–724.
- [26] HLÚBIK P., STRÍTECKÁ H., FAJFROVÁ J.: Antioxidanty v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, 2006, 2, s. 79–81.
- [27] RACEK J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Univerzita Karlova v Praze, LF a FN Plzeň, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, 2003, ISBN 80-7262-231-5.
- [28] WOLLGAST J., ANKLAM E.: Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 2000, 33, s. 423–447.
- [29] SERAFINI M., BUGIANESI R., MAIANI G., VALTUENA S., SANTIS S., CROZIER A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 2003, s. 1013.
- [30] VRÁNOVÁ, D.: I čokoláda může podpořit naše zdraví. CHEMPOINT, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012.
- [31] PAZOUREK J.: Moderní elektroforetické analytické metody. Přednášky pro magisterské studium. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Ústav chemických léčiv, [online], 2003.
- [32] LAUER H., ROZING G.: *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*. Agilent Technologies, Germany 2009.
- [33] <http://www.amedis.cz/laboratorni-technika/kapilarni-elektroforeza/>, [cit. 2015-06-05].
- [34] KAŠIČKA V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, 1997, 91, s. 320–329.
- [35] HORÁKOVÁ J., MAIER V., ŠEVČÍK J., On-line preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Chem. Listy*. 2006, 100, 163-168.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA	deoxyribonukleová kyselina
SOD	superoxid dismutáza
GPx	glutathion peroxidáza
CAT	kataláza
GSH	glutathion
TAA	celková antioxidační kapacita
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
ORAC	absorpční kapacita kyslíkových radikálů
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
CZE	kapilární zónová elektroforéza
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
PCB	polychlorované bifenyly
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
VR	volný radikál
CITP	izotachoforéza
CIEF	izoelektrická fokusace
MEKC	elektrokinetická chromatografie
CEC	kapilární elektrochromatografie
EOF	elektroosmotický tok
UV	ultrafialový
SDS	dodecyl síran sodný