

WSPÓŁCZESNE METODY STOSOWANE W ANALIZIE CHEMICZNEJ

(chemia, studia II stopnia, I rok, II semestr)

Specjalizacja: Chemia analityczna

ĆWICZENIE

Oznaczanie sumy związków fenolowych pochodzenia roślinnego w naparach roślinnych z zastosowaniem układu przepływowego i detekcji chemiluminescencyjnej

(Opracowała: mgr Izabela Wysocka)

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z budową, zasadą działania oraz wykorzystaniem układu przepływowego z jednoczesnym wstrzykiwaniem odczynników i detekcją chemiluminescencyjną (MPFS-DID-CL) do oznaczania sumy związków fenolowych pochodzenia roślinnego (w przeliczeniu na mg kwasu galusowego) w naparach herbat i kaw.

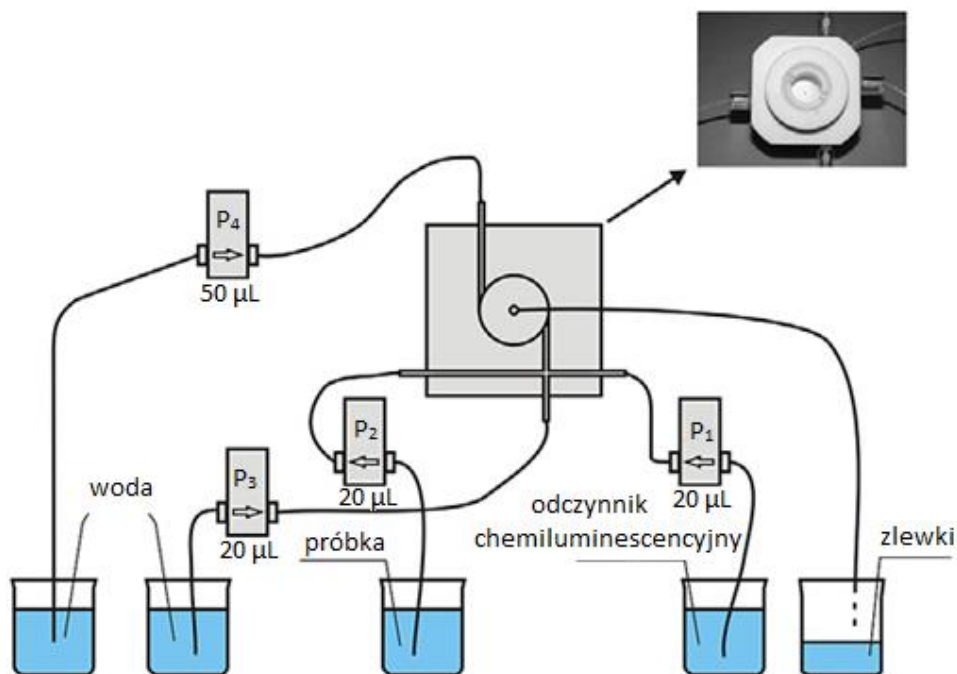
Wprowadzenie:

Rozwój analizy przepływowej zawdzięcza się badaniom Leonarda T. Skeggs'a z 1957 roku, który zaproponował możliwość analizy próbek w sposób ciągły, bez konieczności stopniowego pomiaru i dodawania odczynników [1]. Na przestrzeni lat wielu badaczy opracowywało nowe, coraz bardziej zaawansowane metody przepływowe, poszerzając możliwości tej techniki. Układy przepływowe z wykorzystaniem mikropomp pulsowych (MPFS) zostały wprowadzone do praktyki analitycznej w 2002 roku przez dwie grupy naukowców z Wydziału Farmacji Uniwersytetu w Porto (Portugalia) i Piracicaba (Brazylia) [2].

Układ przepływowy z jednoczesnym wstrzykiwaniem odczynników i detekcją chemiluminescencyjną (MPFS-DID-CL) zbudowany jest z mikropomp pulsowych, przewodów wykonanych z teflonu, naczynka pomiarowego z komorą reakcyjno-detekcyjną oraz detektora chemiluminescencyjnego. Pompy o pojemności 20 μL służą do wstrzykiwania roztworów próbki i odczynnika chemiluminescencyjnego do naczynka pomiarowego, zaś pompa o pojemności 50 μL jest wykorzystywana do przepłukiwania naczynka pomiarowego wodą po zakończonym pomiarze [3].

Naczynko pomiarowe wykonane jest z teflonu. W jego wnętrzu znajduje się komora reakcyjno-detekcyjna w kształcie stożka, do której wstrzykiwane są jednocześnie roztwory odczynników i próbki. Jest ona zamknięta przezroczystym, szklanym okienkiem i skierowana

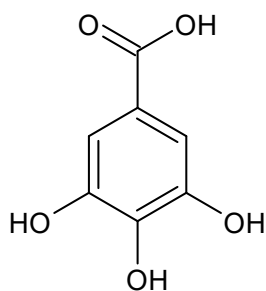
na fotopowielacz. W pobliżu okienka, naprzeciwko siebie, znajdują się dwa otwory wlotowe, którymi dostarczane są odczynniki. Otwór wylotowy znajduje się w górnej części stożka i odpowiada za odprowadzenie mieszaniny reakcyjnej z układu. Schemat układu przepływowego i zdjęcie naczynka pomiarowego przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat układu przepływowego z jednoczesnym wstrzykiwaniem odczynników i detekcją chemiluminescencyjną (MPFS-DID-CL)

Chemiluminescencja polega na emisji kwantów światła podczas zachodzenia niektórych reakcji chemicznych. Natężenie promieniowania emitowanego jest funkcją stężeń substancji biorących udział w reakcji. Z tego powodu pomiar tej wielkości wykorzystywany jest do celów analitycznych. Detekcja chemiluminescencyjna umożliwia uzyskanie odtwarzalnych i precyzyjnych wyników w krótkim czasie [4].

Związki fenolowe pochodzenia roślinnego to wtórne metabolity roślin o mniej lub bardziej skomplikowanej budowie, charakteryzujące się obecnością wielu grup hydroksylowych przy pierścieniu aromatycznym. Taki układ nadaje cząsteczce właściwości przeciwutleniające, co pozwala chronić komórki i tkanki w ciele człowieka przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu [5]. Bogatym źródłem związków fenolowych w diecie są owoce, warzywa oraz napoje pochodzenia roślinnego, takie jak herbata (zielona, biała i czarna), kawa czy napary ziołowe [6]. Przedstawicielem tych substancji jest kwas galusowy (rys. 2), który jest silnym przeciwutleniaczem i często wykorzystywany jest jako substancja wzorcowa podczas oznaczania sumarycznej zawartości związków fenolowych pochodzenia roślinnego.



Rysunek 2. Wzór kwasu galusowego

Aparatura i sprzęt laboratoryjny:

- układ przepływowy, składający się z:
 - 4 elektromagnetycznych mikropomp pulsowych o objętościach nominalnych 20 μL oraz 50 μL (Cole-Parmer, USA),
 - przewodów PTFE o średnicy wewnętrznej 0,8 mm (Cole-Parmer, USA),
 - naczynka pomiarowego z komorą reakcyjno-detekcyjną (KSP, Polska),
- komputer wraz z oprogramowaniem w języku programowania Delphi,
- waga analityczna AS 220.R2 (RADWAG, Radom, Polska),
- system oczyszczania wody Mili-Q (Millipore, USA),
- mikropipety o pojemności: 10 – 100 μL , 100 – 1000 μL , 500 – 5000 μL (Eppendorf, Niemcy),
- kolby miarowe o objętości 10 mL, 50 mL, 250 mL, 500 mL,
- zlewki szklane,
- cylinder miarowy,
- pipety Pasteura,
- łyżeczki,
- bagietki szklane,
- szkiełka zegarkowe,
- probówki,
- statyw do probówek,
- łaźnia wodna,
- czajnik laboratoryjny.

Odczynniki:

- etanol (POCH, Gliwice, Polska),
- heksametafosforan(V) sodu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy),
- kwas galusowy (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy),
- kwas ortofosforowy(V) (POCH, Gliwice, Polska),
- manganian(VII) potasu (POCH, Gliwice, Polska),
- mrówczan sodu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy).

Wykonanie ćwiczenia:

I. Przygotowanie roztworów.

1. 90 % roztwór etanolu.

Aby sporządzić 90% roztwór etanolu należy wlać 235 mL etanolu o stężeniu 96 % do kolby o objętości 250 mL i uzupełnić wodą Milli-Q do kreski.

2. 6-molowy roztwór kwasu ortofosforowego.

6-molowy roztwór kwasu ortofosforowego(V) przygotowuje się poprzez rozcieńczenie 201 mL stężonego 85% roztworu kwasu ortofosforowego(V) wodą Milli-Q w kolbie o objętości 500 mL. Roztwór następnie należy ostudzić do temperatury pokojowej.

3. Odczynnik chemiluminescencyjny.

Nanokoloidowy roztwór manganu(IV) o stężeniu 1,7 mol/L, sporządza się poprzez odważenie 0,2 g manganianu(VII) potasu i 0,2 g mrówczanu sodu. Substancje następnie rozpuszcza się w 50 mL wody Milli-Q i dokładnie miesza. pH roztworów reguluje się do wartości 6,8 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu i kwasu ortofosforowego(V). Tak przygotowane roztwory miesza się ze sobą i odstawia na 30 minut, w celu całkowitego wytrącenia tlenku manganu(IV). Powstały osad odsącza się próżniowo i przemywa trzykrotnie wodą Milli-Q. Odważone 0,2 g osadu tlenku manganu(IV) rozpuszcza się w 500 mL kwasu ortofosforowego(V) o stężeniu 6 mol/L. Otrzymany roztwór umieszcza się w łaźni ultradźwiękowej na 24 godziny.

Następnie należy odważyć 1,5 g heksametafosforanu(V) sodu o wzorze $(\text{NaPO}_3)_6$ i rozpuścić w 50 mL nanokoloidowego roztworu manganu(IV) o stężeniu 1,7 mol/L.

4. Roztwór wzorcowy kwasu galusowego.

Aby przygotować roztwór wzorcowy kwasu galusowego o stężeniu 1 mg/mL, należy rozpuścić 0,01 g substancji w 10 mL 90% etanolu. Tak przygotowany roztwór należy przechowywać w ciemnym miejscu.

5. Roztwory do krzywej kalibracyjnej.

Roztwory do krzywej kalibracyjnej należy przygotować poprzez rozcieńczenie roztworu wzorcowego kwasu galusowego 90% etanolem w zakresie stężeń 10 – 350 ng/mL (10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 350 ng/mL).

II. Przygotowanie próbek naparów kaw i herbat.

1. Na wadze analitycznej odważyć po 1 g wybranych herbat i kaw, a następnie zaparzyć w 100 mL wody o temperaturze 80°C. Po 5 minutach parzenia ostudzić napary w łaźni wodnej do temperatury pokojowej.
2. Przed dokonaniem analizy otrzymane napary próbek herbat i kaw należy rozcieńczyć 90 % roztworem etanolu w odpowiednich proporcjach:

Badana próbka	Krotność rozcieńczenia
Herbata owocowa	1:500
Herbata zielona	1:4 000
Herbata czarna	1:4 000
Kawa mielona	1:4 000
Kawa rozpuszczalna	1:4 000

III. Przygotowanie aparatu MPFS-DID-CL do pracy.

Przed przystąpieniem do pracy należy przepłukać układ pomiarowy. Najpierw układ przepłukiwany jest wodą Milli-Q a następnie badanym roztworem. Między próbkami układ należy przepłukać 90% etanolem.

IV. Przeprowadzenie analizy

1. Zarejestrować po 5 sygnałów chemiluminescencyjnych dla każdego roztworu krzywej kalibracyjnej i sporządzić wykres kalibracyjny.
2. Zarejestrować po 5 sygnałów chemiluminescencyjnych dla każdej próbki naparu roślinnego.

Opracowanie wyników:

1. Odczytać wartości sygnałów analitycznych. Wyznaczyć wartość średnią z wykonanych pomiarów. Obliczyć odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (CV).
2. Sporządzić wykres krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego w zakresie stężeń 10 – 350 ng/mL. Podać równanie krzywej i współczynnik determinacji.
3. Przedstawić wyniki uzyskane podczas analizy próbek herbat i kaw. Na podstawie wykresu kalibracyjnego obliczyć całkowitą zawartość związków fenolowych pochodzenia roślinnego w próbkach, w przeliczeniu na miligramy kwasu galusowego w 100 mL naparu. Należy pamiętać o uwzględnieniu rozcieńczenia.
4. Sformułować wnioski dotyczące zawartości związków fenolowych pochodzenia roślinnego w poszczególnych rodzajach herbat i kaw oraz opisać zalety stosowanej metody przepływowej.

Wymagania:

1. Budowa układu przepływowego z jednoczesnym wstrzykiwaniem odczynników i detekcją chemiluminescencyjną (MPFS-DID-CL).
2. Zjawisko chemiluminescencji – ogólna charakterystyka.
3. Rodzaje luminoforów stosowanych w analizie chemicznej.
4. Zalety przepływowych metod chemiluminescencyjnych.
5. Związki fenolowe – ogólna charakterystyka (budowa, podział, właściwości i źródła pochodzenia).
6. Wzór kwasu galusowego.

Literatura:

[1] Skeggs L. T. (1957) An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 28(3):311-322.

[2] Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., Reis B. F., Santos J. L. M., Zagatto E. A. G. (2002) Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta* 466(1):125-132.

[3] Koronkiewicz S., Kalinowski S. (2015) Direct-injection chemiluminescence detector. Properties and potential applications in flow analysis. *Talanta* 133:112-119

[4] Malejko J., Nalewajko-Sieliwoniuk E. (2017) Detekcja chemiluminescencyjna. [W:] Pyrzyńska K. (red.) *Analiza przepływowa. Od teorii do praktyki*. Wyd. MALAMUT, Warszawa, 149-170.

[5] Halliwell B. (1997) Antioxidants: The Basics - What They Are and How to Evaluate Them. *Advances in Pharmacology* vol. 38, 3-20.

[6] Robak J., Zachwieja Z. (1999) Rola polifenoli zawartych w diecie w profilaktyce schorzeń. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* XXXII, 3: 215-220