

PRÓBA ROZDZIAŁU KWASÓW FENOLOWYCH ZAWARTYCH
W GRANULACIE KERATYNO-KORO-MOCZNIKOWYM PRZY UŻYCIU
KAPILARNEJ ELEKTROFOREZY STREFOWEJ

G. Bowanko

Instytut Agrofizyki PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27
Gbowanko@demeter.ipan.lublin.pl

Streszczenie. Wykorzystując metodę kapilarnej elektroforezy strefowej przeprowadzono rozdział kwasów fenolowych w granulacie keratyno-koro-mocznikowym (KKM), ustalając warunki tego rozdziału.

Słowa kluczowe: kwasy fenolowe, kapilarna elektroforeza strefowa, granulaty keratyno-koro-mocznikowy (KKM).

WSTĘP

Granulaty keratyno-koro-mocznikowy (KKM) jest produktem wytworzonym z odpadów przemysłowych kory drzew i piór drobiu traktowanych mocznikiem według metody opracowanej przez Wolskiego i Glińskiego [12–14].

Granulaty ten może być stosowany jako nawóz organiczno-mineralny [12–14], a jego ekstrakty służą do ochrony roślin [9,15–17].

Z uwagi na wymierne korzyści działania granulatu KKM ważna jest jakościowa ocena zawartości w nim kwasów fenolowych.

Celem pracy było wyznaczenie standardowych warunków analizy jakościowej kwasów fenolowych zawartych w granulacie KKM, w oparciu o przeprowadzoną analizę rozdziału mieszaniny 14 wzorców kwasów fenolowych, stosując metodę kapilarnej elektroforezy strefowej.

MATERIAŁY I METODY

Do oceny jakościowej zawartości kwasów fenolowych zastosowano kapilarną elektroforezę strefową. Metoda ta wykorzystuje zjawisko kinetyczne polegające na ruchu obdarzonych ładunkiem cząstek fazy rozproszonej w środowisku rozpraszającym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. [1–8,10,11].

Analizie poddano pojedyncze wzorce kwasów fenolowych jak i ich mieszaninę składającą się z 14 kwasów pochodnych kwasów: benzoowego: (1) salicylowy, (2) p-hydroksybenzoowy, (3) gentyzynowy, (4) protokatechowy, (5) galusowy, (6) wanilinowy, (7) izo-wanilinowy, (8) syringowy, oraz kwasu cynamonowego: (9) m-kumarynowy, (10) p-kumarynowy, (11) kawowy, (12) felurowy, (13) synapisowy, (14) chorożenowy. Wzorce kwasów fenolowych zostały rozpuszczone w metanolu.

Ekstrakt granularu KKM został przygotowany przez rozpuszczenie go w metanolu w stosunku wagowym granulatu:metanol 1–10 [18].

Proces analizy prowadzono na lektroforezrze, w skład którego:

- detektor – Linear UVIS 200. Linear Instruments Co. USA,
- źródło wysokiego napięcia – HNC 6M – 30000. F.u.G. Elektronik GmbH,
- kapilara – kwarcowa pokryta z zewnątrz polimerem o średnicy wewnętrznej 50 μm , długość 60,3 cm.

Jako substancję tworzącą środowisko rozpraszające w procesie elektroforezy zastosowano bufor fosforanowy. Otrzymano go w wyniku zmieszania ze sobą NaH_2PO_4 o stężeniu 0,01 M i Na_2HPO_4 o stężeniu 0,006M. Oczekiwane wartości pH były otrzymywane przez dodanie do NaH_2PO_4 odpowiedniej ilości Na_2HPO_4 i sprawdzenie pH. W wyniku stosowania buforu zawierającego cyklodekstrynę o stężeniu 0,025M, najpierw ustalano pH dopiero potem dodano surfaktantu. W każdym wypadku gdy wprowadzano do aparatury nowy bufor, poddawano go filtracji.

Preparatyka doświadczenia rozpoczynała się od przygotowania aparatu, które polegało na umyciu kapilary w następujący sposób: wodą (10 min.), metanolem (10 min.), 1 N NaOH (10 min.), wodą (5 min.) i stosowanym buforem (5 min.). Natomiast pomiędzy poszczególnymi dozowaniami kapilara była myta w następujący sposób: 1 N NaOH (10 min.), wodą (5 min.) i buforem (5 min.).

Przed przystąpieniem do analizy granulatu KKM przeprowadzono doświadczenia na pojedynczych kwasach fenolowych i ich mieszaninie wzorcowej, które mogą być obecne w granulacie. Wzorce otrzymano przez rozpuszczenie ich (każ-

dego z osobna) w 70% metanolu. Po uzyskaniu optymalnych warunków analizy przystąpiono do analizy ekstraktu granulatu KKM.

WYNIKI

Podstawowym czynnikiem decydującym o rozdziale jest czas retencji, którego wielkość zależy od wartości przyłożonego napięcia, pH, oraz natężenia promieniowania UV. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono że, w miarę wzrostu przyłożonego napięcia malał czas retencji analizowanego kwasu, ale jednocześnie spadała ich rozdzielczość w mieszaninie wzorcowej. W toku analizy stwierdzono, że najkrótszy czas retencji przy maksymalnym rozdziale, można uzyskać przy napięciu wynoszącym 27,9 V.

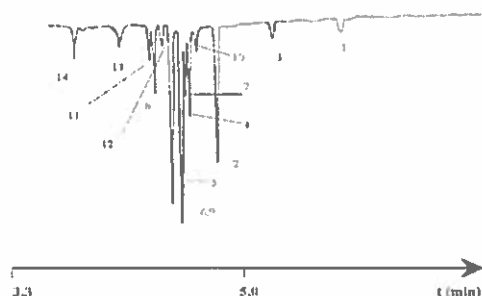
Długością fali dla detekcji kwasów fenolowych w mieszaninie wzorcowej i później w ekstrakcie granulatu KKM, przy której uzyskano optymalny rozdział była długość fali promieniowania UV równa 254 nm.

Optymalnym środowiskiem rozdziału okazał się bufor fosforanowy o pH 4,5.

Mimo ustalenia warunków rozdziału mieszaniny wzorcowej otrzymywany rozdział nie jest całkowity, ponieważ kwasy wanilinowy (6) i m-kumarynowy (9) w tych warunkach prowadzonej analizy dają jeden wspólny pik, Rys. 1.

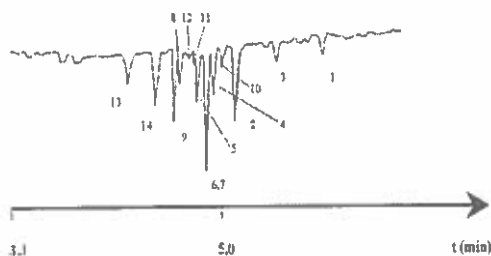
Problem został rozwiązany przez zastosowanie surfaktantu w postaci β -cyklodekstryny. Dodanie tego związku spowodowało jednak brak rozdziału kwasów wanilinowego (6) i izo-wanilinowego (7), Rys. 2.

W końcowym efekcie, wykonując dwa pomiary w tym jeden z dodatkiem β -cyklodekstryny uzyskano pełny rozdział 14 kwasów fenolowych.



Rys. 1. Rozdział kwasów fenolowych zawartych w mieszaninie wzorcowej. Bufor fosforanowy pH 4,5; UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A.

Fig. 1. Distribution of phenolic acids present in granulate KKM. Phosphate buffer pH 4,5. UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A.

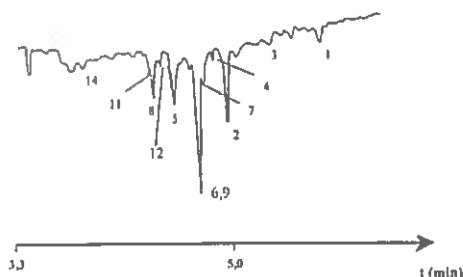


Rys. 2. Rozdział kwasów fenolowych zawartych w mieszaninie wzorcowej. Bufor fosforanowy pH 4,5; UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A; β -cyklodekstryna.

Fig. 2. Distribution of phenolic acids present in granulate KKM. Phosphate buffer pH 4,5. UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A; β -cyklodekstrine.

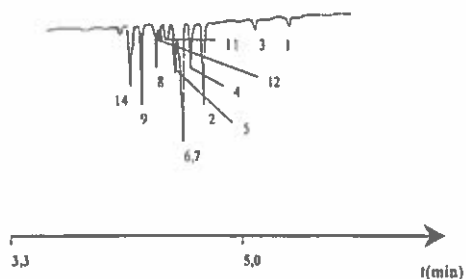
Dla sprawdzenia dokładności metody wykonano pięciokrotne dozowanie pojedynczych wzorców kwasów fenolowych i mieszaniny wzorcowej tych kwasów. Na podstawie otrzymanych czasów retencji, które zawarte były w granicach 241 s – 337 s, wyznaczono procentowe względne standardowe odchylenia. Analiza jakościowa obarczona jest błędem w granicach 0,3%–9,6%, natomiast analiza ilościowa obarczona jest błędem zawartym w granicach 1,2%–9,5%.

Wyniki otrzymane podczas analizy kwasów w mieszaninie wzorcowej zostały potwierdzone podczas analizy kwasów fenolowych w granulacie KKM, co przedstawia Rys. 3 i 4. Podczas analizy granulatu KKM stwierdzono obecność następujących kwasów fenolowych: (1) Salicylowy, (2) p-Hydroksybenzoesowy, (3) Gentyzynowy, (4) Protokatechowy, (5) Galusowy, (6) Wanilinowy, (7) Izomasłowy, (8) Syringowy, (9) m-Kumarynowy, (11) Kawowy, (12) Ferulowy, (14) Chlorogenowy.



Rys. 3. Rozdział kwasów fenolowych zawartych w granulacie KKM. Bufor fosforanowy pH 4,5; V 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A.

Fig. 3. Distribution of phenolic acids present in granulate KKM. Phosphate buffer pH 4,5. UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A.



Rys. 4. Rozdział kwasów fenolowych zawartych w granulacie KKM. Bufor fosforanowy pH 4,5; UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A; β -cyklodekstryna.

Fig. 4. Distribution of phenolic acids present in granulate KKM. Phosphate buffer pH 4,5; UV 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A; β -cyclodekstrine.

Mimo ręcznego, hydrodynamicznego dozowania uzyskana powtarzalność jest zadowalająca, w szczególności w przypadku czasów retencji, które odpowiadają analizie jakościowej. Natomiast podczas analizy ilościowej błąd pomiaru jest dużo większy.

Bardzo ważne jest odpowiednie termostatowanie kapilary podczas analizy i utrzymanie możliwie niskiej temperatury. przy dużej ilości analizowanych kwasów w próbce zbyt wysoka temperatura powoduje powiększenie pasm badanych substancji i pogorszenie rozdzielczości.

WNIOSKI

1. Zawartości kwasów fenolowych w granulacie KKM może być oznaczona metodą kapilarnej elektroforezy strefowej.
2. Optymalnymi warunkami analizy jakościowej ekstraktu granulatu KKM w stosunku do kwasów fenolowych jest środowisko o pH 4,5 przy zastosowaniu buforu fosforanowego; UV = 254 nm; V = 27,9 kV; I = 10 μ A.
3. Prowadzone doświadczenia potwierdziły korzystny wpływ surfaktantów na proces rozdziału w elektroforezie kapilarnej. Czego przykładem jest zastosowanie β -cyklodekstryny. Związek ten umożliwił rozdział dwóch kwasów i jednocześnie skrócił czas analizy poprzez procesy kompleksowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Heiger D.N.: High performance Capillary Electrophoresis – In introduction, End ed., Hewlett Packard, France, 1997.
2. Hjerten S., Zhu M.D.: Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, J. Chromatogr., 346, 265, 1985.

3. **Hjerten S., Zhu M.D.:** Micropreparative version of high-performance electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 327, 157, 1985.
4. **Hjerten S.:** High-performance electrophoresis, elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chromatogr.* 347, 191, 1985.
5. **Jorgenson J., Lukas K.D.:** The electrophoretic counterpart of narrow-bore high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 53, 1298, 1981.
6. **Milczak M., Piotrowski J.:** Związki fenolowe roślin i ich rola w odporności na choroby powodowane przez grzyby. *Post. Nauk Roln.* 2, 1980.
7. **Smith S.C., Henry S.W.:** Theory of the Voltammetric response of electrodes of submicro dimension, *Anal. Chem.*, 65, 1993.
8. **Nann A., Silvestri I., Simon W.:** Quantitative analysis in capillary zone electrophoresis using ion-selective microelectrodes as on-column dejectors. *J. Chromatogr.* 346, 224, 1985.
9. **Orlikowski L.B., Skrzypczak C., Wolski T., Gliński J.:** Rola wyciągu Keratuno-koromocznikowego i wyciągu z wermikompostu w ochronie pelargonii i goździków przed patogenami. *Rocznik Akademii Rolniczej w Poznaniu . CCCIV Ogród.* 27, 195–199, 1998.
10. **Suprynowicz Z.:** Elektroforeza kapilarna w analizie jakościowej. *Mat. VIII Ogólnopolskiej Konferencji Chromatograficznej „Nauka-Przemysł”, Lublin 2–4,09,1997.*
11. **Suprynowicz Z.:** Elektroforeza kapilarna w elektroforezie chiralnej *Mat. VIII Ogólnopolskiej Konferencji Chromatograficznej „Nauka-Przemysł”, Lublin 22–24,06,1998.*
12. **Wolski T.:** Wykorzystanie odpadów przemysłowych do otrzymywania preparatów próchnico pochodnych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 315, 1986.
13. **Wolski T., Gliński J.:** Naturalne biopolimery i ich zastosowanie na przykładzie keratyny i surowców zawierających ligninę. *Krajowa Konferencja: polimery, środowisko, recykling,* 1995.
14. **Wolski T., Gliński J.:** Modyfikacja odpadowej kory i keratyny w technologii produkcji nawozów organiczno-mineralnych, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 437, 1996.
15. **Wolski T., Gliński J.:** Metabolity stresowe i inne substancje biologicznie czynne jako naturalne czynniki odporności Roślin, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 461, 1998.
16. **Wolski T., Orlikowski L.B., Gliński J.:** Możliwości wykorzystania przetworzonych odpadów ligninowo-celulozowych i keratynowych w ochronie roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 437, 1996.
17. **Wolski T., Gliński J., Orlikowski L.B.:** Lignins as a natural polymers and a source of compounds for biological liquidtion of plant diseases. *Trans . VII Conf. Of the Section for Biological Control Of Plant Diseases of the Polish Phytopathological Society, April 18–19, 1996, Skierniewice, Poland, 189–200, 1996.*
18. **Wolski T., Gliński J., Orlikowski L.B.:** Zmodyfikowane struktury ligninocelulozowe i keratynowe oraz ich zastosowanie w nawożeniu i ochronie roślin. *Post. Nauk Roln.*, 45, 1996.

AN ATTEMPT OF SEPARATION OF PHENOLIC ACIDS WITH THE USE
OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

G. Bowanko

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27
Gbowanko@demeter.ipan.lublin.pl

Summary. With the use of the method of Capillary Zone Electrophoresis, a separation of phenolic acids in keratin-bark-urea granulate (KKM), was performed.

Keywords: phenolic acid, capillary zone electrophoresis, keratin-bark-urea granulate (KKM).

