

## **TENZIDY POVRCHOVĚ MODIFIKOVANÉ UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY PRO STANOVENÍ LÁTEK URČUJÍCÍCH VANILKOVÉ AROMA**

Amir Shaaban Farag, Milan Sýs a Karel Vytřas

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,*

*Studentská 573, 532 10 Pardubice*

*E-mail: [st56093@student.upce.cz](mailto:st56093@student.upce.cz)*

### **Souhrn**

Tato práce je zaměřena na přípravu povrchově modifikovaných uhlíkových pastových elektrod (CPE) vybranými tenzidy a jejich následné využití při voltametrickém stanovení potravinářských aditiv zodpovědných za vanilkové aroma, jakožto sumu methylvanilinu a ethylvanilinu. Z trojice vybraných tenzidů (dodecylsírán sodný, Triton X-100 a chlorid cetylpyridinia) se první zmíněný ukázal jako nejvhodnější povrchový modifikátor. Ve srovnání s nemodifikovanou elektrodou byla dosažena pozoruhodná reprodukovatelnost 0.3% relativní směrodatné odchylky pro pět opakování. Srovnatelné lineární rozsahy koncentrací od  $\sim 1$  do  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  s limity detekce kolem  $\sim 20 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  by dosaženy za optimálních podmínek square wave voltametrie pro obě aditiva, jmenovitě při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 70 mV a frekvenci 50 Hz. Vyvinutá metoda byla rovněž validována pomocí standardní referenční metody ISO 5565 2:1999(en) pomocí analýzy pekárenského cukru, vanilkových sušenek a alkoholického nápoje. Obdržené výsledky nasvědčují, že voltametrický přístup nabízí slibnou alternativu vysokoúčinné kapalinové chromatografii pro nízkorozpočtové kontrolní laboratoře.

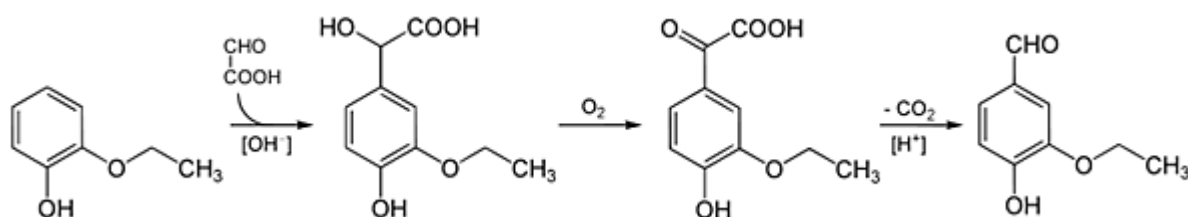
### **Abstract**

This work is focused on the preparation of surface modified carbon paste electrodes (CPE) by selected surfactants and their subsequent use in the voltammetric determination of food additives responsible for vanilla flavor as the sum of methylvaniline and ethylvaniline. From three selected surfactants (sodium dodecyl sulfate, Triton X 100 and cetylpyridinium chloride), the first mentioned one proved to be the most suitable surface modifier. Compared to an unmodified electrode, a remarkable reproducibility of 0.3% relative standard deviation for five replicates was achieved. Comparable linear ranges of concentrations of  $\sim 1$  to  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  with detection limits of  $\sim 20 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  were achieved under optimum square wave voltammetry conditions for both additives, namely at a potential step of 5 mV, an amplitude of 70 mV and a frequency of 50 Hz. The developed method was also validated using the standard ISO 5565 2: 1999 (en) reference method using analysis of bakery sugar, vanilla biscuits and alcoholic beverages. The results obtained suggest that the voltammetric approach offers a promising alternative to high performance liquid chromatography for low-cost control laboratories.

## 1. Úvod

Potravinářská aditiva lze definovat jako chemická individua, která se používají k zlepšení organoleptických vlastností a prodloužení trvanlivosti potravin. Aditiva se zpravidla nepoužívají samostatně jako potravina, nýbrž jako přísada do potravin při jejich výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy nebo jejich vedlejší produkty stávají nebo mohou stát součástí potraviny. Na základě původu se mohou tyto přídatné látky klasifikovat do dvou velkých skupin, a to přírodní nebo syntetická. Avšak v potravinách se mohou vyskytovat uměle vyrobené látky, které jsou současně chemicky identické v přírodě se vyskytujícími. Označování těchto látek na obalu potravinářských výrobků bylo zrušeno a není ho možno uvádět [1].

Příkladem je vanilin (methylvanilin, MVA), bílá krystalická látka se silnou květinovou vůní a sladkou chutí, která je těkavou složkou silice obsažené v plodech vanilkovníku (v tomto případě se jedná o přírodní aroma nebo přírodní vanilové aroma), ale v mnohonásobně větším množství je produkován chemicky nebo biochemicky z dřevného dehtu nebo celulózy. Poslední dobou bývá drahý MVA nahrazován jeho zcela syntetickým analogem ethylvanilinem (EVA), který jako ochucovadlo vykazuje třikrát silnější aroma než MVA [2]. EVA se připravuje vícekrokovým procesem z pyrokatecholu, počínaje ethylací, která poskytuje 2-etoxyfenol. Tento ether kondenzuje s kyselinou glyoxalovou za vzniku odpovídajícího derivátu kyseliny fenyglyoxylové [3]. Ten po oxidaci a dekarboxylaci dává EVA (viz reakce na Obr. 1).

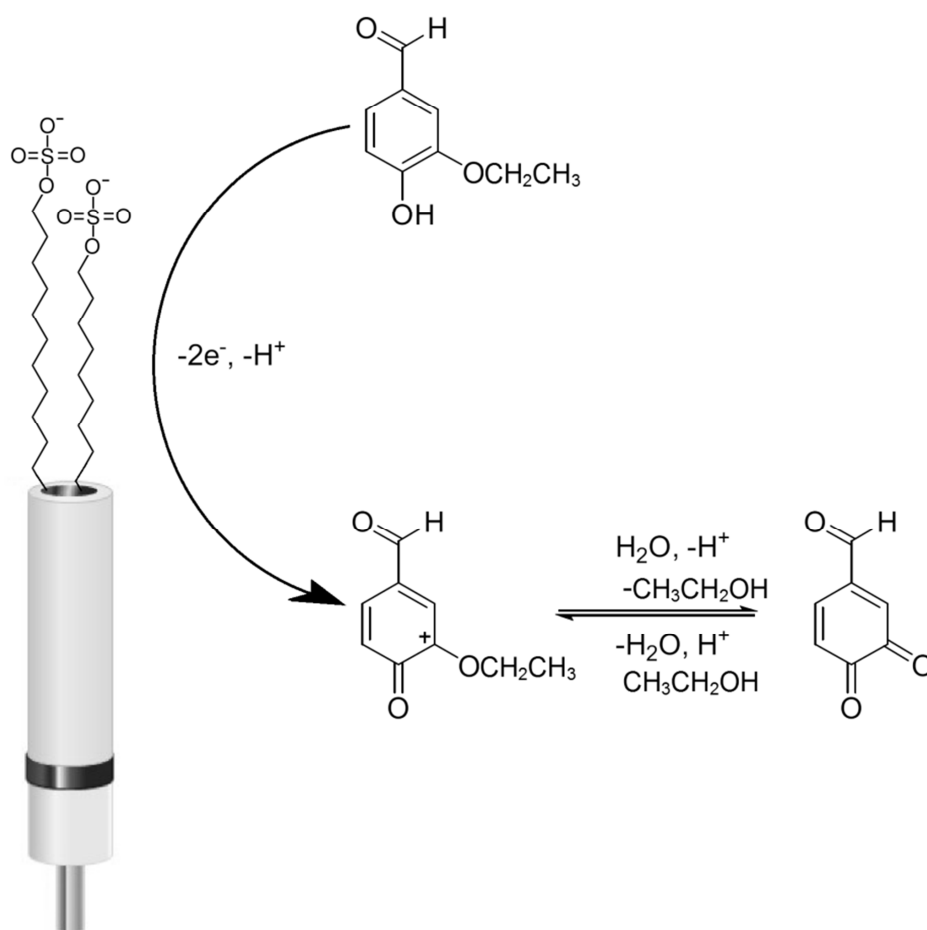


**Obrázek 1.** Průmyslová syntéza ethylvanilinu [3].

Obě tyto látky se přidávají do parfémů, léků a mnoha sladkých potravin, jako jsou sušenky, limonády, čokolády, zmrzliny, jogurty atp. Kromě zvýšení organoleptických vlastností potravin mají blahodárný vliv na lidské zdraví, neboť bylo zjištěno, že inhibují oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě, čímž snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění [4]. Na druhou stranu vysoký periodický příjem syntetického MVA a EVA způsobuje bolesti

hlavy, nevolnost a zvracení. Některé toxikologické studie dokonce uvádějí, že tato aditiva mohou poškodit játra a ledviny [5].

Pro stanovení obsahu MVA a EVA v potravinách byla vyvinuta standartní referentní metoda označována ISO 5565 2:1999(en), která využívá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s obrácenými fázemi (RP-HPLC), bohužel pořizovací náklady této metody jsou vysoké. Proto jsme se snažili vyvinout rychlou elektroanalytickou metodu, která by mohla posloužit jako levná alternativa pro nízkorozpočtové laboratoře v kontrole jakosti potravin. Byly popsány četné voltametrické metody, založené anodickou oxidací MVA a EVA. Nutno podotknout, že tyto analytické metody se neobešly bez použití sofistikovaných pracovních elektrod (senzorů) z důvodu špatné reprodukovatelnosti opakovaných měření. Při této studii jsme zjistili, že k dosažení uspokojivých výsledků přispívá přítomnost tenzidu jako modifikátoru povrchu CPE [6]. MVA a EVA se oxidují na kationty, které podléhají nukleofilní adici vody za vzniku 4-formyl-1,2-benzochinonu odtržení příslušného alkoholu (viz Obr. 2).



**Obrázek 2.** Princip voltametrického stanovení EVA na CPE modifikované SDS.

## 2. Experimentální část

### 2.1. Použité chemikálie

Analytické standardy methylvanilinu, ethylvanilinu, společně se použitými tenzidy (dodecylsírnat sodný, SDS, chlorid cetylpyridinia, CPC a Triton X-100) byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Výše uvedené tenzidy společně s grafitovým práškem o velikosti částic  $>5 \mu\text{m}$  (Graphite Týn, spol. s r. o., Týn nad Vltavou) a parafínovým olejem (Merck, Darmstadt, Německo) byly použity pro přípravu pracovních elektrod.

### 2.2. Pracovní elektrody a přístrojové vybavení

Veškerá voltametrická měření se prováděla v klasickém tříelektrodevém uspořádání. Jako elektrolyt byl zvolen 0.1 M fosforečnanový pufr o hodnotě pH 6. Pracovní uhlíková pastová elektroda modifikovaná jedním z testovaných povrchově aktivních látek byla spolu se srovnávací chloridostříbrnou elektrodou (se solným můstkem obsahujícím 3.0 M KCl, Metrohm ČR) a platinovým plíškem (pomocná elektroda) připojena k potenciostatu Autolab PGSTAT101, ovládaný programem Nova verze 1.11..

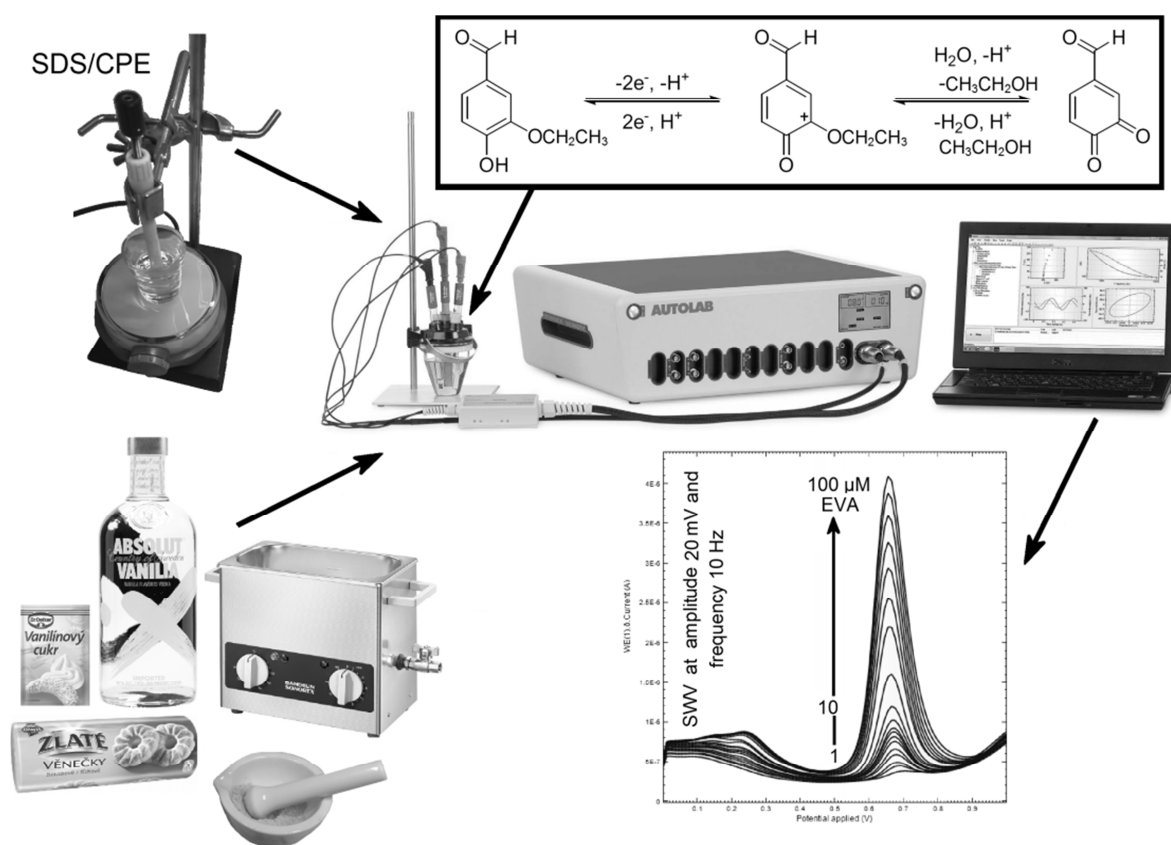
Nemodifikovaná CPE byla připravena smíšením 0.4 g grafitového prášku CR-5 a 0.1 g viskózního silikonového oleje MV 8000 (Lučební závody Kolín). Tato elektroda byla poté ponořena do 10 ml míchaného roztoku příslušného tenzidu o koncentraci  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 4 minuty. Takto modifikovaná elektroda byla poté použita při analýze potravin pomocí square wave voltametrie o potenciálovém skoku 5 mV, amplitudě 70 mV a frekvenci 50 Hz.

### 2.3. Analytické postupy

Celý postup analýzy pekárenského cukru (Castelo) dostupného z řetězce Lidl Česká republika v.o.s., vanilkových věnečků (Opavia) a vodky (Absolut Vanilia) ze supermarketu Tesco Česká Republika a.s. je znázorněn na Obr. 3. Příprava jednotlivých vzorků k analýze je podrobně popsána v odkazu [6]. Vzorek cukru (1 g) stačilo pouze rozpustit ve fosfátovém pufru s obsahem 10% etanolu. Vodka mohla být analyzována přímo (0.5 ml vzorku přidáno do 19.5 ml pufru). Sušenky musely být nejdříve nadrceny v třecí misce a aditiva byla poté extrahována fosforečnanovým pufrem (100 ml) z desetigramové navážky. Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut při laboratorních podmínkách. Po filtraci za použití vývěvy (přítomnost vlákniny) se 20 ml filtrátu voltametricky analyzovalo. Celková suma

EVA a MVA byla stanovena pomocí metody standartního přidavku (3× po 20 μl 0.01 M zásobního roztoku EVA do 20 ml fosforečnanového pufru s přítomným vzorkem).

K referenční metodě ISO 5565 2:1999(en) byl využit kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent, Palo Alto, CA, USA) vybavený binárním čerpadlem, odplyňovačem, autosamplerem, detektorem diodového pole a termostatem. Signál detektoru DAD-UV byl sledován při vlnové délce 310 nm, kdy byla zaznamenána příslušná spektra pro identifikaci píku. Pro izokratické separaci (30% acetonitrilu a 70% vody) s rychlostí průtoku 0,4 ml min<sup>-1</sup> a při teplotě 40°C byla vybrána kolona Ascentis Express C18 (2.7 μm, 150 × 3.0 mm) ze společnosti Supelco (Bellafonte, PA, USA). U všech analýz byl použit objem nástřiku 1 μL.



**Obrázek 3.** Laboratorní postup při voltametrickém stanovení přírodně identických aromátů.

### 3. Diskuze a závěry

Z obdržných voltamogramů (základní linie) lze učinit závěr, že ne každý tenzid je použitelný jako vhodný modifikátor. Například proudové pozadí o velikosti ~60 μA bylo naměřeno za použití CPE, jejichž povrch se modifikoval tenzidem Triton X-100. Co se týče

dalších testovaných tenzidů, tak u CPC byla pozorována dvojnásobně nižší výška píku pro  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  EVA (rovněž pro MVA) nežli v případě SDS. Jako optimální podmínky pro modifikaci byly nalezeny  $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace SDS po dobu čtyř minut za stálého magnetického míchadélka při 400 otáčkách za minutu.

Ve srovnání s nemodifikovanou CPE byla dosažena pozoruhodná reprodukovatelnost 0.3% relativní směrodatné odchylky (RSD) pro pět opakování. Ani obnovováním elektrodového povrchu po každém měření nebylo dosaženo lepší opakovatelnosti (RSD=5.85%). Srovnatelné lineární rozsahy koncentrací od  $\sim 1$  do  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  o koeficientu determinace  $R^2 \sim 0.9960$  s limity detekce kolem  $20 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  by dosáhnuty za optimálních podmínek square wave voltametrie pro obě aditiva, jmenovitě při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 70 mV a frekvenci 50 Hz. Jak je zřejmé, významný rozdíl v analytických parametrech nebyl pozorován, což lze odůvodnit velmi podobnou chemickou strukturou lišící se pouze éterickou skupinou. Přítomnost této skupiny nemá žádný vliv na pozici píku ( $E_p = +0.66 \text{ V}$  pro obě aditiva). Tudíž nelze voltametricky odlišit EVA a MVA ve vzorku potravin a jejich obsah lze jen vyjádřit jako sumu jednoho z nich. Vyvinutá metoda byla rovněž validována pomocí standartní referenční metody ISO 5565 2:1999(en) pomocí analýzy pekárenského cukru, vanilkových sušenek a alkoholického nápoje. Obdržené výsledky nasvědčují, že voltametrický přístup nabízí slibnou alternativu vysokoúčinné kapalinové chromatografii pro nízkorozpočtové kontrolní laboratoře.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem SGSFChT 2018/001 Univerzity Pardubice.

## Literatura

1. M. Spencer: Postgrad. Med. J., 50 (1974) 620–624.
2. N. J. Walton, M. J. Mayer, A. Narbad: Phytochemistry., 63 (2003) 505–515.
3. K. G. Fahlbusch, F. J. Hammerschmidt, J. Panten, W. Pickenhagen, D. Schatkowski, K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg: Flavors and fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2005.
4. P. L. Teissedre, A. L. Waterhouse: J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 3801–3805.
5. X. S. Han: Sichuan Chem indust Erod Control, 5 (2002) 36–37.
6. A. S. Farag, M. Sýs, T. Hájek, K. Vytřas: Monatsh. Chem., doi.org/10.1007/s00706-018-2266-z