

Delenie antokyanínov červených vín HPLC za využitia izokratickej elúcie

MILAN DRDÁK – PAVOL DAUČÍK – JOZEF KUBASKÝ

Súhrn. Práca sa zaoberá možnosťou využiť izokratickú elúciu antokyanínov delených HPLC za použitia alkylamínov v mobilnej fáze. Zloženie mobilnej fázy bolo optimalizované metódou plánovaného experimentu, pričom vypočítané zloženie mobilnej fázy na základe experimentu je 35 % CH_3OH , 0,16 mol/l kyseliny chloristej a 0,122 mol/l butylamínu. Napriek použitiu optimalizovanej mobilnej fázy rozlíšenie a separácia zložiek sú nižšie ako pri gradientovej elúcii. Ukázalo sa, že používať butylamín je vhodné aj pri gradientovej elúcii.

Antokyaníny patria do skupiny fenolických zlúčenín. Za základnú prácu v analýze antokyanínov metódou HPLC možno označiť prácu Wulfa a Nagela [1]. Pri skúmaní zloženia farbív ušľachtilej odrody *Vitis vinifera* použili ako mobilnú fázu 10 % kyselinu mravčiu v 50 % roztoku metanol–voda. Zistili, že antokyaníny sa na reverznej fáze eluujú v poradí ich polarity: delfidín-3-monoglukozid, kyanidín-3-monoglukozid, petunidín-3-monoglukozid, peonidín-3-monoglukozid, malvidín-3-monoglukozid.

Izokratickou elúciou antokyanínov sa zaoberali Wilkinson a kol. [2], pričom ako mobilnú fázu použili rozpúšťadlo voda–kyselina octová–metanol (71 : 10 : 19). Williams a Hrazdina [3] využili prednosti programovateľného gradientu. Na kolóne Bondapak C 18 sa im podarilo za relatívne krátky čas separovať 20 antokyanínov. Van de Castele a kol. [4] využili programovaný gradient. (pH rozpúšťadiel upravili HCOOH) na kolóne LiChrosorb RP-18; identifikovali 10 antokyanínov, analýza trvá 35 minút. Zamerali sa na analýzu vzoriek vína Cabernet Sauvignon. Preston a Timberlake [5] analyzovali antokyaníny vo všetkých vyskytujúcich sa formách (chalkón, pseudobáza, flavýliový kation). V poslednom období bolo publikovaných niekoľko prác, ktoré sa zaoberajú analýzou antokyanínov v portských vínach (odporúčajú analýzu pri $\text{pH} = 1,5$) a na úpravu pH využívajú kyselinu mravčiu [6–9].

Doc. Ing. Milan Drdák, CSc., Ing. Jozef Kubaský, Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Ing. Pavol Daučík, CSc., Katedra chemickej technológie ropy, Chemicko-technologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 821 37 Bratislava.

Cieľom našej práce bolo optimalizovať zloženie mobilnej fázy pri izokratickej elúcii antokyanínov červených vín za využitia alkylamínov na zvýšenie elučnej sily rozpúšťadla.

Materiál a metódy

Chemikálie: redestilovaná voda, metanol na UV spektroskopiu, HClO_4 (70 %) p. a., HCl (37 %) p. a., butylamín (Lachema) p. a., dietylamín a trietylamín (NDR) p. a., hexylamín a oktylamín (NSR) p. a.

Vzorky: červené značkové vína.

Delenie antokyanínov HPLC. Na delenie antokyanínových farbív červeného vína Račianska frankovka sme použili vysokoúčinný kvapalinový chromatograf typu VARIAN 8500 (USA), vybavený spektrofotometrickým detektorom UV/VIS VARISCAN 634 D, zapisovačom A-25 a vysokotlakovým nástrekovým systémom stop flow. Podmienky analýzy boli:

kolóna: SEPHARON-SGX-C18 ($0,32 \times 15$ cm),

prietok mobilnej fázy: 30 ml/h,

pracovný tlak: 14 MPa,

vlnová dĺžka detektora: 520 nm,

nástrek: 8 μl vína, citlivosť zapisovača 20 mV.

Metóda plánovaného experimentu. Z vypracovaných metód plánovaného experimentu najpresnejší matematický opis plochy odozvy umožňuje metóda rotatabelárneho ortogonálneho centrálného kompozičného plánu (ROCKP). Použili sme systém s tromi nezávisle premennými x_1 , x_2 , x_3 , ktoré sme menili v určitých intervaloch. Hraničným hodnotám týchto intervalov boli priradené hodnoty faktorov $+1,682$, resp. $-1,682$. Vypočítajú sa hodnoty premenných x_1 , x_2 , x_3 , ktoré patria hodnotám faktorov -1 , 0 , $+1$. Potom sme uskutočnili experimenty s hodnotami premenných x_1 , x_2 , x_3 , ktoré patria hodnotám faktorov X_1 , X_2 , X_3 , (tab. 3). Pre všetky experimenty sa sleduje odozva (veľičiny výstupných vlastností). Získané údaje boli spracované na PMD 85-1. Výsledné vrstevnicové diagramy umožňujú určiť hodnoty faktorov, pre ktoré je hodnota sledovanej veľičiny optimálna. Metódu sme použili na určenie optimálneho zloženia mobilnej fázy.

Výsledky a diskusia

Izokratická elúcia má oproti gradientovej elúcii nespornú výhodu v tom, že výsledky sa získavajú s vyššou reprodukovateľnosťou. Vyplýva to z toho, že zloženie mobilnej fázy je počas celej analýzy konštantné. V prvej etape práce sme vychádzali z osvedčenej mobilnej fázy pre gradientovú elúciu [10–13]. Vzhľadom na nevyhnutnosť zvýšiť elučnú silu rozpúšťadla zaoberali sme sa možnosťou využitia alkylamínov. Alkylamíny ako polárne rozpúšťadlá zvyšujú nielen elučnú silu, ale aj rozpúšťaciu schopnosť mobilnej fázy a ovplyvňujú polaritu stacionárnej fázy. Okrem alkylamínov ako ďalšie zložky mobilnej fázy sme použili kyselinu chloristú, metanol a redestilovanú vodu. Kyselina chloristá sa v predchádzajúcich prácach ukázala ako zložka potrebná na úpravu pH na optimálnu hodnotu 1,5.

Na určenie optimálneho zloženia mobilnej fázy sme použili metódu plánovaného experimentu, pričom nezávislými premennými boli:

x_1 – objemové percentá metanolu vo vode,

x_2 – koncentrácia kyseliny chloristej vo vode (mol/l),

x_3 – koncentrácia alkylamínu vo vode (mol/l).

Ich hodnoty sa menili v intervaloch x_1 (35 až 65 % obj.), x_2 (0,02 až 0,3 mol/l) a x_3 (0,01 až 0,2 mol/l). Hodnoty týchto veličín pre kritické hodnoty faktorov uvádzame v tab. 1. V tab. 2. je prehľad o zložení roztokov mobilnej fázy, s ktorými bolo nevyhnutné uskutočniť pokusy tak, ako to vyžadovala použitá metóda ROCKP. V prvej fáze pokusov sme vybrali ako tretiu zložku butylamín. Rovnakú vzorku červeného vína sme potom analyzovali tak, že mobilná fáza sa postupne menila v súlade s tab. 2 za využitia izokratickej elúcie. Počas analýzy sme sa zamerali na elučné časy jednotlivých píkovo a ich celkový počet.

Z výsledkov modelového pokusu vyplynulo, že za sledovanú veličinu (odozvu experimentov) je potrebné zvoliť pomer elučných časov deviateho a prvého píku, ktoré boli separované pri všetkých analýzach. Hodnoty tejto veličiny (označená symbolom $t_{9,1}$), ako aj počet rozlíšených píkovo pre jednot-

T a b u l k a 1. Hodnoty nezávislé premenných pre kritické hodnoty faktorov

T a b l e 1. Values of independent variables for critical values of factors

X	-1,682	-1	0	+1	+1,682
x_1	35,00	41,08	50,00	58,92	65,00
x_2	0,020	0,0768	0,160	0,2432	0,30
x_3	0,010	0,0485	0,105	0,1615	0,20

T a b u l k a 2. Zloženie roztokov mobilnej fázy pre metódu ROCKP
T a b l e 2. Composition of mobile phase solutions for ROCKP method

Číslo pokusu ¹	Zloženie roztoku ²		
	x_1	x_2	x_3
1	58,92	0,243	0,162
2	41,08	0,243	0,162
3	58,92	0,077	0,162
4	41,08	0,077	0,162
5	58,92	0,243	0,048
6	41,08	0,243	0,048
7	58,92	0,077	0,048
8	41,08	0,077	0,048
9	65,00	0,160	0,105
10	35,00	0,160	0,105
11	50,00	0,300	0,105
12	50,00	0,020	0,105
13	50,00	0,160	0,200
14	50,00	0,160	0,010
15–20	50,00	0,160	0,105

¹Number of experiment; ²Solution composition.

livé analýzy sú uvedené v tab. 3. Získané hodnoty sme spracovali počítačom (program ROCKP), výsledkom čoho sú vrstevnicové diagramy. Vzhľadom na trojzložkový systém hodnota jedného faktora je vždy konštantná. Po vyhodnotení vrstevnicových diagramov sme určili tieto optimálne hodnoty faktorov: $x_1 = -1,682$, $x_2 = 0,0$, $x_3 = 0,38$, čomu zodpovedá toto zloženie mobilnej fázy: $x_1 = 35\%$ CH₃OH, $x_2 = 0,16$ mol/l kyseliny chloristej a $x_3 = 0,122$ mol/l butylamínu, t. j. zloženie optimálnej mobilnej fázy.

Po určení optimálneho zloženia mobilnej fázy sme vzorku červeného vína delili HPLC izokratickou elúciou. Chromatografický záznam je na obr. 1. Veličina $t_{0,1}$ má hodnotu 4,51, teda lepšiu ako všetky predchádzajúce analýzy antokyanínov červených vín. Pri porovnávaní výsledkov získaných gradientovou elúciou a pri izokratickej elúcii za použitia optimálneho zloženia rozpúšťadla sme došli k záveru, že sústava nie je vhodná na delenie a stanovenie antokyanínov červených vín, keďže píky nie sú dostatočne oddelené. Znamená to, že elučná sila mobilnej fázy je veľmi vysoká, čiže je potrebné znížiť koncentráciu metanolu. Ďalej sme analyzovali vzorky vína tak, že izokratickú elúciu sme na porovnanie robili s mobilnou fázou s klesajúcou koncentráciou metanolu. Z hľadiska zastúpenia a významu jednotlivých antokyanínov sme osobitne sledovali malvidín-3-glukozid (elučný čas). V tab. 4 je prehľad do-

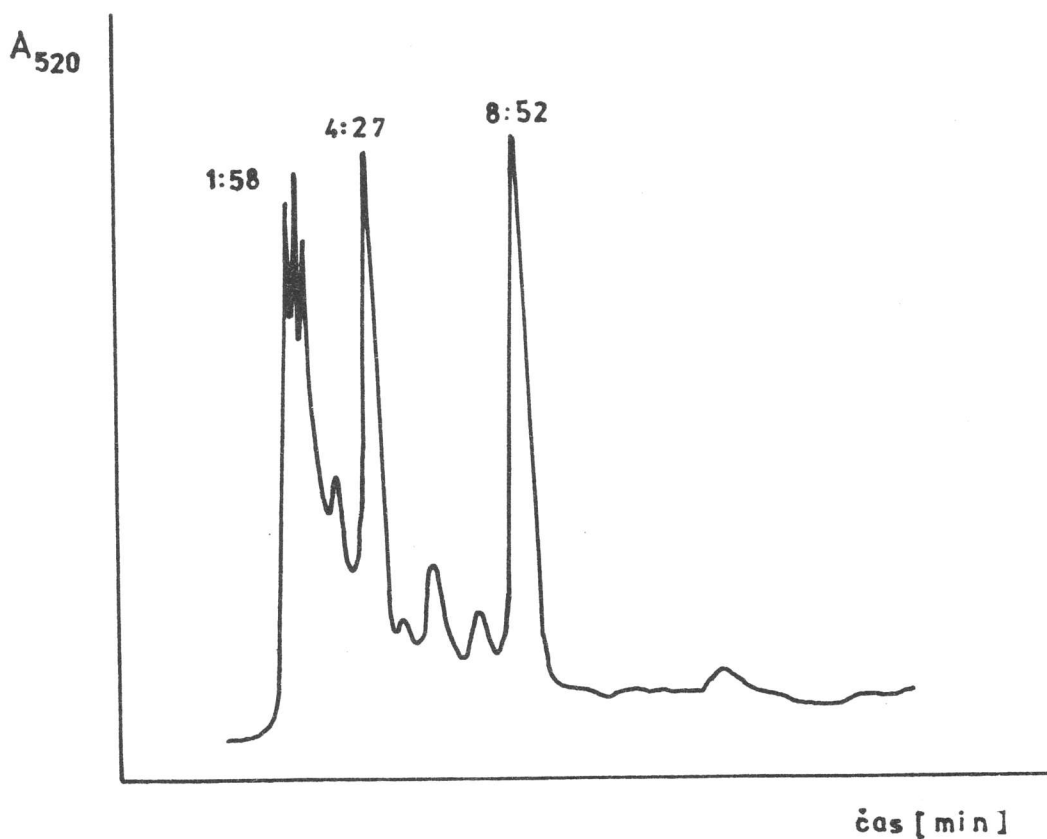
T a b u l k a 3. Hodnoty veličiny $t_{9,1}$ a počet píkov pre jednotlivé vzorky
T a b l e 3. Values of $t_{9,1}$ variable and number of peaks for individual samples

Roztok	Zloženie			$t_{9,1}$	Počet píkov
	x_1	x_2	x_3		
1	+1	+1	+1	2,00	4
2	-1	+1	+1	2,92	8
3	+1	-1	+1	1,18	3
4	-1	-1	+1	1,27	3
5	+1	+1	-1	1,63	4
6	-1	+1	-1	3,05	8
7	+1	-1	-1	1,90	4
8	-1	-1	-1	2,97	7
9	+1,682	0	0	1,57	4
10	-1,682	0	0	4,19	10
11	0	+1,682	0	1,77	4
12	0	-1,682	0	1,51	3
13	0	0	+1,682	1,18	2
14	0	0	-1,682	1,82	4
15	0	0	0	1,96	7
16	0	0	0	1,85	8
17	0	0	0	2,02	8
18	0	0	0	1,86	7
19	0	0	0	1,86	8
20	0	0	0	1,90	8

¹Solution; ²Composition; ³Number of peaks.

siahnutých výsledkov a súčasne aj počet separovaných píkov pri danej koncentrácii metanolu.

Z výsledkov uvedených pokusov možno vyvodiť, že pri nízkej koncentrácii metanolu (do 30 %) je elučná sila mobilnej fázy malá, takže nie je možné v primerane krátkom čase vymyť z kolóny všetky zložky vzorky. Na porovnanie sme analyzovali vzorku čereňého vína Alibernet, ktoré sa vyznačuje rovnomerným zastúpením 15 antokyanínov. Pri gradientovej elúcii analýza trvá 40 min. Pri vyššej koncentrácii metanolu v mobilnej fáze (35 %) sa počet separovaných zložiek zvýšil, ale je menší v porovnaní s gradientovou elúciou. Okrem toho prvých päť zložiek bolo zle rozlíšených a boli z kolóny vymývané veľmi rýchlo. Rozlíšenie sa zhoršilo po ďalšom zvýšení koncentrácie metanolu nad 35 %.



Obr. 1. Chromatografický záznam vzorky Račianska frankovka pri optimálnom zložení mobilnej fázy.

Fig. 1. Chromatographie record of „Račianska frankovka“ sample with optimal composition of mobile phase.

T a b u l k a 4. Elučný čas Mv-3-Gl a počet píkav pre rôzne koncentrácie metanolu v mobilnej fáze

T a b l e 4. Elution time Mv-3-Gl and number of peaks for various methanol concentrations in mobile phase

% CH ₃ OH	Elučný čas Mv-3-Gl ¹	Počet píkav
35	5 : 51	10
30	9 : 48	8
27	11 : 55	7
24	17 : 08	6
20	52 : 03	5

¹Elution time Mv-3-Gl; ²Number of peaks.

Ďalej sme za uvedených podmienok preskúmali možnosti použitia dostupných alkylamínov: dietylamínu, trietylamínu, hexylamínu a oktylamínu. Najvhodnejším sa ukázal butylamín.

Na záver možno konštatovať, že použitie alkylamínov v mobilnej fáze neumožňuje požadovanú separáciu antokyanínov červených vín izokratickou elúciou. Pozitívne je zistenie, že butylamín urýchľuje elúciu. To sme využili pri gradientovej elúcii, pričom sme dosiahli lepšiu reprodukovateľnosť analýz [14]. Mobilná fáza, ktorej zloženie sme zistili metódou plánovaného experimentu, vyhovuje aj preto, že hodnota jej pH (1,45) je veľmi blízka odporúčanej hodnote pH = 1,5.

Do redakcie došlo 21. 9. 1988

Literatúra

1. WULF, L. W. – NAGEL, C. W., Am. J. Enol. Vitic., 29, 1978, s. 42
2. WILKINSON, M. – SWEENEY, J. G. – IACOBUCCHI, G. A., J. Chrom., 132, 1977, s. 349.
3. WILLIAMS, M., – HRAZDINA, G., J. Chrom. 155, 1978, s. 389.
4. VANDE CASTEELE, K. – GEIGER, H. – DE LOOSE, R. – VAN SUMERE, CH. F., J. Chrom., 259, 1983, s. 291.
5. PRESTON, N. W. – TIMBERLAKE, F. C., J. Chrom., 214, 1981, s. 222.
6. BAKKER, Y. – TIMBERLAKE, C. F., J. Sci. Food Agric., 36, 1985, s. 1325.
7. BAKKER, J. – PRESTON, N. W. – TIMBERLAKE, C. F., Am. J. Enol. Vitic., 37, 1986, s. 121.
8. REVILLA, E. – ALONSO, E. – ESTRELLA, M. I., Chromatografia, 22, 1986, s. 157.
9. BAKKER, J., VITIS, 25, 1986, s. 203.
10. DRDÁK, M. – DAUČÍK, P., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 180.
11. DRDÁK, M. – DAUČÍK, P., KUBASKÝ, J., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 224.
12. DRDÁK, M. – DAUČÍK, P., KUBASKÝ, J., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 228
13. DRDÁK, M. – DAUČÍK, P., Acta Alimentaria (v tlači).
14. DRDÁK, M. – DAUČÍK, P., KUBASKÝ, J., J. Chrom., 504, 1990, s. 207.

Отделение антоцианинов красного вина высокoeffективной жидкостной хроматографией при применении изократической элюции

Резюме

Работа занимается возможностями использования изократической элюции антоцианинов, отделенных высокoeffективной жидкостной хроматографией при применении алкиламинов в подвижной фазе. Состав подвижной фазы был оптимизирован методом планированного эксперимента, причем определенный состав подвижной фазы на основе эксперимента был 35 % CH_3OH , 0,16 мол/л хлорной кислоты и 0,112 мол/л бутиламина. Несмотря на применение оптимизированной подвижной фазы, распознавание и сепарация компонентов ниже чем при градиентовой элюции.

Separation of red wines anthocyanins by HPLC with using isocratic elution

Summary

The work deals with the possibility of using isocratic elution of anthocyanins separated by HPLC with employing alkylamines in mobile phase. A composition of mobile phase was optimized by the method of planned experiment. The calculated composition of mobile phase on the basis of the experiment is 35 % of CH_3OH , 0.16 mol/l of perchloric acid, and 0.122 mol/l of butylamine. In spite of using the optimized mobile phase, the resolution and separation of components is worse than with (in) gradient elution. The employment of butylamine showed to be useful also with (in) gradient elution.