

VYUŽITIE EXTRAKCIE PODPORENEJ ULTRAZVUKOM PRE ANALÝZU ŠKORICE A POTRAVINOVÝCH VÝROBKOV

KRISTÍNA ČIŠOVSKÁ
a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemická a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

xcisovska@stuba.sk, katarina.hrobonova@stuba.sk

Kľúčové slová: kumarín, škorica, extrakcia podporená ultrazvukom, extrakčné rozpúšťadlo

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220323>

Úvod

Kumaríny, deriváty benzopyrónu, sú látky prírodného pôvodu. Zdrojmi mnohých kumarínov, ako aj základného predstaviteľa podskupiny jednoduchých kumarínov, kumarínu, sú rastliny, niektoré huby a baktérie. Tieto zlúčeniny sú charakteristické vôňou sušeného sena a rôznymi biologickými účinkami. Kumarín sa pridáva do potravín a kozmetických výrobkov ako aromatická prísada na zvýraznenie a doplnenie vône¹. Vzhľadom na to, že vo vyšších dávkach môže spôsobovať bolesti hlavy, nevoľnosť, ospalosť a v niektorých prípadoch aj poškodenie pečene u človeka, maximálne povolené množstvo kumarínu v potravinách a nápojoch je 2 mg kg⁻¹ (s výnimkou pre určité karamelizované a alkoholické nápoje, kde je povolená maximálna koncentrácia kumarínu 10 mg kg⁻¹)².

Príprava vzorky je dôležitou časťou procesu chemickej analýzy. Na prípravu vzorky pre analýzu cielenú na stanovenie vybraných účinných látok v extraktoch, alebo aj na izoláciu látok z rastlinných materiálov sa využívajú viaceré extrakčné techniky. Na extrakciu kumarínu a jeho

derivátov z rastlín, korenín, potravinových výrobkov sú vhodné techniky, ako napr. extrakcia kvapalinou podporená miešaním, extrakcia podporená ultrazvukom (UAE) alebo mikrovlnným žiarením (MAE), extrakcia pri zvýšenom tlaku (ASE) a iné (tab. I). Primárne extrakty sú často zložitou zmesou látok, a preto na prečistenie alebo aj skoncentrovanie analytu je vhodné použiť extrakciu tuhou fázou (SPE)³.

Extrakcia podporená ultrazvukom využíva pri extrakcii látok z tuhých vzoriek pomocou vhodného rozpúšťadla aj ultrazvukové vlnenie, ktoré spôsobuje lepší prienik rozpúšťadla do štruktúry matrice. To spôsobí rozvíbrowanie častíc rozpúšťadla a tým sa zrýchli ich pohyb, čo vedie k rýchlejšiemu a účinnejšiemu uvoľneniu analytu zo vzorky do rozpúšťadla. Účinnosť extrakcie v systéme kvapalina-tuhá fáza je vo veľkej miere ovplyvnená typom extrakčného rozpúšťadla. Tradične sa používajú organické rozpúšťadla, napr. alkoholy (metanol, etanol, zmesi s vodou). Novou skupinou ekologických a bioodbornejších extrakčných rozpúšťadiel sú zmesi z nízkou prechodovou teplotou (LTTM, Low transition temperature mixture). LTTM predstavuje zmes minimálne dvoch zložiek, akceptor a donor vodíka, ktorá má menšiu teplotu tavenia ako každá z týchto látok, pričom vo výslednej kvapalnej zmesi sú zložky viazané vodíkovými väzbami. Vlastnosti LTTM závisia od typu a pomeru východiskových zložiek a z toho dôvodu je potrebné optimalizovať zloženie zmesi pre extrakciu cieľových látok⁴.

Cieľom práce bolo prešetriť vplyv zmeny podmienok UAE (typ rozpúšťadla, čas, teplota) na výťažok kumarínu zo škorice a potravinového výrobku obsahujúceho škoricu.

Experimentálna časť

Chemikálie

Referenčná látka kumarín (98%) bola zakúpená od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Mobilnú fázu tvorili

Tabuľka I

Porovnanie výhod a nevýhod vybraných extrakčných techník vhodných na extrakciu kumarínu

Extrakčná technika	Extrakcia kvapalinou podporená miešaním	Extrakcia podporená ultrazvukom	Extrakcia podporená mikrovlnným žiarením
Výhody	- bežne používaná - najjednoduchšia metóda	- časovo nenáročná - malé náklady na vybavenie - vhodné pre termolabilné látky - ultrazvukové vlny zlepšujú prienik rozpúšťadla do matrice	- rýchlosť - nízka spotreba rozpúšťadiel - možnosť pracovať pri vysokých teplotách - automatizácia
Nevýhody	- prácnosť - časová náročnosť	- potrebná filtrácia - riedenie vzorky	- potrebná filtrácia - obmedzený výber rozpúšťadla

rozpúšťadlá, metanol (pre HPLC, VWR Chemicals) a kyselina octová (p.a., Centralchem). Deionizovaná voda (18,2 MW/cm) sa získala pomocou systému na čistenie vody AquaMax ultra (séria 370).

LTTM zmesi, cholín chlorid:L-kyselina mliečna (LTTM1: 1:2, LTTM2: 1:3, LTTM3: 1:4, LTTM4: 1:5, mol/mol), cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (LTTM5: 1:2:1, mol/mol/mol) alebo chlorid:L-kyselina mliečna:1,2-propándiol (LTTM6: 1:2:1, mol/mol/mol) (všetky chemikálie na prípravu boli čistoty p.a., Centralchem).

Vzorky mletej škorice a cereálií s obsahom škorice sa zaoštarali z obchodnej siete a boli skladované v pôvodnom obale na suchom a tmavom mieste pri laboratórnej teplote.

Extrakcia podporená ultrazvukom

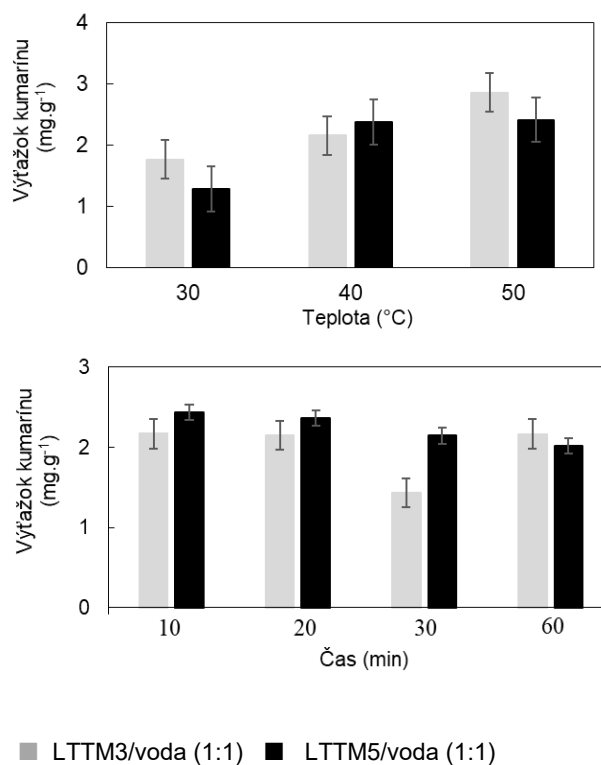
Vzorka (50 mg) sa extrahovala extrakčným rozpúšťadlom (1,5 ml; LTTM, deionizovaná voda, metanol) definovaný čas (10–60 min) v ultrazvukovom kúpeli pri konštantnej teplote (30–60 °C). Na záver sa zmes centrifugovala (5 min, 3000 rpm). Supernatant sa oddelil, prefiltravala cez 0,45 µm nylónový filter a dávkoval do HPLC.

HPLC analýza extraktov

Na analýzu extraktov sa použila HPLC s DAD detekciou. Na separáciu sa použila kolóna Kinetex C18 (100 × 4,6 mm, 5 µm) a mobilnou fázou bola zmes kyseliny octovej (1%, zložka A) a metanolu s prídavkom kyseliny octovej (1%, zložka B). Priebeh gradientu mobilnej fázy bol nasledovný: 0–12 min 20–45 % zložky B, 12–13 min 45–100 % B, 13–15 min 100 % B. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml min⁻¹, teplota kolóny 23 °C a dávkovací objem 20 µl. Chromatogramy sa snímali pri vlnovej dĺžke 280 nm a UV spektrá sa snímali v rozsahu vlnových dĺžok 190–400 nm.

Výsledky a diskusia

Dvojzložkové a trojzložkové LTTM zmesi na základe cholín chloridu a kyseliny mliečnej v rôznych pomeroch sa prešetrili ako extrakčné rozpúšťadlá pre extrakciu kumarínu zo škorice. Samotné zloženie LTTM malo vplyv na účinnosť extrakcie. Zvyšovaním podielu L-kyseliny mliečnej sa zvyšoval výtťažok kumarínu. Prídavok 1,3-propándiolu, ako tretej zložky, do extrakčnej zmesi mal pozitívny vplyv na výtťažok kumarínu. Z testovanej skupiny sa vybrali dve extrakčné rozpúšťadlá, pri ktorých sa získal najvyšší výtťažok kumarínu zo škorice, zmesi cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol). LTTM zmesi sa vyznačujú vyššou viskozitou, a preto sa prešetroval vplyv prídavku vody na účinnosť extrakcie kumarínu. Výsledky ukázali, že prídavok vody mal pozitívny vplyv na extrakčný výtťažok kumarínu. Najvhodnejší pomer vody a LTTM bol 1:1 (v/v)⁵. Okrem zloženia extrakčného rozpúšťadla sa prešetril vplyv teploty a času na



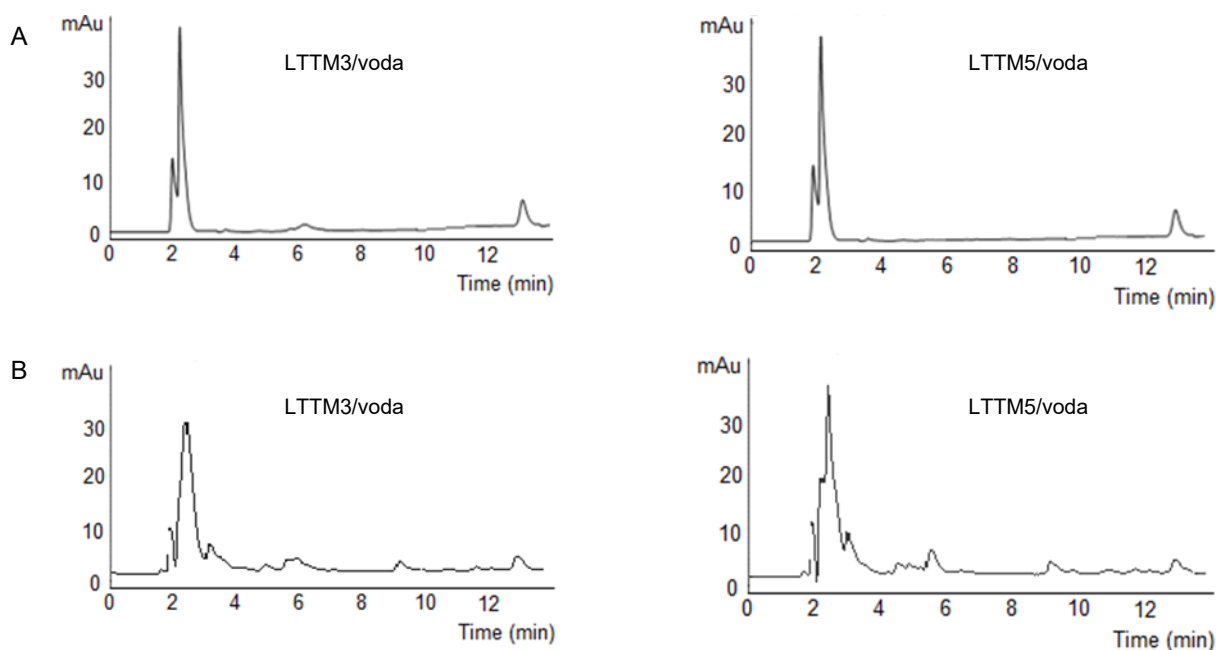
Obr. 1. Výtťažky kumarínu zo škorice získané pre UAE pomocou LTTM extrakčných rozpúšťadiel pri rôznych teplotách a časoch extrakcie

účinnosť UAE extrakcie. Z výsledkov vyplynulo, že vhodná teplota a čas extrakcie boli 50 °C a 10 min (obr. 1).

Zvolené podmienky UAE sa aplikovali pri analýze vzorky škorice a cereálií s obsahom škorice. Na analýzu extraktov sa využila metóda HPLC-DAD v systéme

Tabuľka II
Chromatografické charakteristiky a niektoré validačné parametre metódy

Parameter	Kumarín	
t_R (min)	12,71	
k	5,49	
n	80042	
H (µm)	1,25	
Opakovateľnosť (RSD %)	1 deň	3 dni
t_R (min)	0,82	1,55
A	1,17	4,91
LOD (mg ml ⁻¹)	0,0022	
LOQ (mg ml ⁻¹)	0,0067	
Linearita (c , mg ml ⁻¹)	179,8+134433,2.c	
R^2	0,9959	
Koncentračný rozsah (mg ml ⁻¹)	0,007–0,05	



Obr. 2. Chromatografické záznamy UAE extraktov škorice (A) a cereálií (B) získané pomocou extrakčných rozpúšťadiel cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol; LTTM3) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol; LTTM5) v zmesi s vodou (1:1, v/v). Legenda: 1-kumarín

s obrátenými fázami. Čas analýzy bol 16 min. Metóda bola overená pre separáciu a stanovenie kumarínu pomocou chromatografických charakteristík a niektorých validačných parametrov (medza detekcie a medza stanovenia boli $2,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $6,7 \mu\text{g ml}^{-1}$, koncentračný rozsah $7,0\text{--}50,0 \mu\text{g ml}^{-1}$; tab. II). V škorici boli stanovené množstvá kumarínu $2,2 \text{ mg g}^{-1}$ a $2,4 \text{ mg g}^{-1}$ (pre zvolené extrakčné rozpúšťadlá). V porovnaní s tradičnými extrakčnými rozpúšťadlami sa dosiahol väčší (voda) alebo mierne nižší výťažok kumarínu (metanol). V cereáliách sa stanovili množstvá kumarínu $3,7 \mu\text{g g}^{-1}$ a $3,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (pre zvolené extrakčné rozpúšťadlá). Obr. 2 dokumentuje chromatografické záznamy UAE extraktov škorice a cereálií získané pomocou extrakčných rozpúšťadiel cholín chlorid:L-kyselina mliečna (1:4, mol/mol) a cholín chlorid:L-kyselina mliečna:1,3-propándiol (1:2:1, mol/mol/mol) v zmesi s vodou (1:1, v/v).

Záver

Z výsledkov vyplynulo, že LTTM na základe cholín chloridu a kyseliny mliečnej sú perspektívne rozpúšťadlá pre extrakciu kumarínu zo škorice a testovaných potravinových výrobkov. Okrem zloženia extrakčného rozpúšťadla mala na účinnosť extrakcie podporný ultrazvukom vplyv aj teplota a čas extrakcie.

Práca bola finančne podporená grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (grant č. VEGA

1/0412/20). Autori ďakujú doc. Ing. M. Jablonskému za prípravu LTTM zmesi.

LITERATÚRA

1. Kumar S., Kumari R., Mishra S.: *J. Pharm. Pharmacol.* **71**, 1735 (2019).
2. European Parliament and Council, 2008 European Parliament and Council Regulation (EC) no 1334/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending council regulation (EEC) no 1601/91.
3. Huie C. W.: *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 23 (2002).
4. Khandelwal S., Tailor Y.K., Kumar M.: *J. Mol. Liq.* **215**, 345 (2016).
5. Čišovská K.: *Bakalárska práca*, STU v Bratislave. 1–53, 2020.

K. Čišovská and K. Hroboňová (*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava, Slovak Republic*): **The Application of Ultrasonic Assisted Extraction in Analysis Cinnamon and Food Products**

The objective of this study was to select suitable experimental conditions for extraction of coumarin by Ultrasonic Assisted Extraction (UAE). Type of extraction solvent, extraction time and temperature were optimized to

increase the extraction yield of coumarin from samples of cinnamon and foods containing cinnamon. Optimal UAE conditions include extraction time of 10 min, temperature of 50 °C and extraction solvent based on choline chloride and L-lactic acid. The extraction yields were comparable to traditional solvents – water and methanol.

Keywords: coumarin, cinnamon, ultrasonic assisted extraction, extraction solvent

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20220323>

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (grant No. Vega 1/0412/20). The authors thank assoc. prof. M. Jablonský for the preparation of LTTM mixtures.