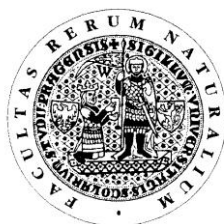


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jakub Ederer

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN
VE VÍNĚ

Electrochemical determination of carboxylic acids in wine

Bakalářská práce

Školitel bakalářské práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Školitel-konzultant: Ing. Pavel Janda, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. května 2012.

Abstrakt

Mezi organické kyseliny s cyklem ve své molekule, nacházejícími se ve víně, patří askorbová, kávová a salicylová kyselina, které se podílejí na charakteristice vína a současně mají pozitivní účinky na lidské zdraví. Uvedené organické kyseliny byly v této práci stanovovány elektrochemicky metodou cyklické voltametrie na pevné elektrodě. Výhodou je možnost zvýšení selektivity stanovení použitím pracovních elektrod s modifikovaným povrchem nebo z materiálů s rozdílnými elektrochemickými vlastnostmi. V této práci je popsáno stanovení uvedených látek metodou cyklické voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku (GC) v prostředí voda-ethanol.

Klíčová slova: Cyklická voltametrie, víno, kávová, askorbová, salicylová kyselina.

Abstract

The cycle of organic acids in its molecule, located in wine include ascorbic acid, caffeic acid and salicylic acid, which contribute to the characteristics of wine while having positive effects on human health. The organic acids were determined electrochemically by cyclic voltammetry on solid electrodes in this work. The advantage is the possibility of increasing the selectivity of determination using the modified working electrode surface or from materials with different electrochemical properties. This work describes the determination of these compounds by cyclic voltammetry on glassy carbon electrode (GC) in a water-ethanol medium.

Key words: Cyclic voltammetry, wine, caffeic, ascorbic, salicylic acid.

Poděkování

Děkuji především svým školitelům RNDr. Karlu Nesměrákovi, PhD. a Ing. Pavlu Jandovi, CSc. za odbornou pomoc a cenné rady. Také bych chtěl poděkovat svým kolegům z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze a také své rodině za podporu během studia.

Obsah

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Víno.....	8
2.2 Kávová kyselina.....	9
2.3 Salicylová kyselina.....	11
2.4 Askorbová kyselina.....	13
2.5 Oxid siřičitý, siřičitany.....	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Studované vzorky a použité chemikálie.....	19
3.2 Použitá metodika měření a vyhodnocení dat	20
3.3 Zpracování naměřených dat	21
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	22
4.1 Elektrochemické chování studovaných látek	22
4.2 Kalibrační závislosti.....	24
4.3 Analýza modelového roztoku vína.....	25
4.4 Analýza reálných vzorků vína.....	29
5 ZÁVĚR.....	32
LITERATURA	33

Seznam použitých zkratk a symbolů

E	potenciál [V]
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
I_{an}	anodický proud [A]
E_{p}	píkový potenciál [V]
SCE	nasyčená kalomelová elektroda (z angl. Saturated calomel electrode)
GC	skelný uhlík (z angl. Glassy carbon)
CV	cyklická voltametrie, cyklický voltamogram
v	rychlost polarizace elektrody [V s^{-1}]

1 ÚVOD

Víno je alkoholický nápoj obsahující řadu organických i anorganických látek. Mnohé z těchto látek, především organických, jsou zodpovědné za charakteristiku vín a některé z nich jsou studovány v souvislosti s jejich prospěšnými účinky na lidské zdraví. Mezi látkami nacházejícími se ve víně najdeme i organické kyseliny s cyklem ve své molekule (kávová, salicylová, askorbová, gallová) [1]. Především organické kyseliny obsahující ve své molekule benzenové jádro jsou významné svými antioxidačními vlastnostmi. Některé z těchto látek jsou studovány v souvislosti s prospěšnými účinky na kardiovaskulární onemocnění a rakovinu. Antioxidanty prospěšné pro lidské zdraví jsou obsaženy i v ovoci, obilí, zelenině, kávě a koření [2]. Hlavním cílem této práce je prostudovat chování vybraných organických kyselin pomocí elektroanalytických metod, především cyklické voltametrie na nemodifikované skelné uhlíkové elektrodě. Tyto látky se podílejí na charakteristice vín (chuť, vůně). Znalost jejich obsahu ve vínech je důležitá z toho hlediska, že v případě jejich nadbytku dochází ke znehodnocení konečného produktu, a proto je důležité sledovat obsah těchto látek během jednotlivých fází výroby vína [3].

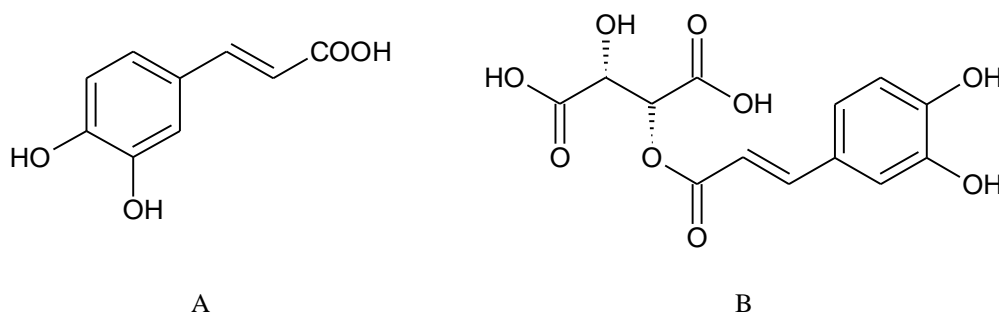
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno

Víno je alkoholický nápoj, který je získáván fermentací hroznové šťávy pocházející z plodů révy vinné (*Vitis vinifera*) [4]. Víno je komplexní nápoj skládající se z několika stovek látek, které mohou mít vliv na jeho kvalitu [5]. Majoritními složkami vína jsou voda a ethanol. Nejběžnějšími aromatickými látkami přítomnými ve víně jsou těkavé kyseliny a estery mastných kyselin. V nepatrném množství jsou ve víně přítomny i jiné alkoholy (glycerol, methanol), fenoly, vitamíny, karbonylové sloučeniny, sloučeniny dusíku a síry, které jsou důležité pro rozdílné a jedinečné sensorické vlastnosti vín (vůně, chuť) [6]. Na chuti vína se podílejí jednak minerální látky (draslík, vápník) [7], ale i voda, ethanol, vázané kyseliny (primárně vinná a jablečná kyselina), cukry (fruktóza a glukóza) a glycerol. Významně se na chuti také podílí methanol, který vzniká rozkladem pektinů. Koncentrace methanolu ve víně se pohybuje v rozmezí 0,1 – 0,2 g dm⁻³ (cit. [6]).

2.2 Kávová kyselina

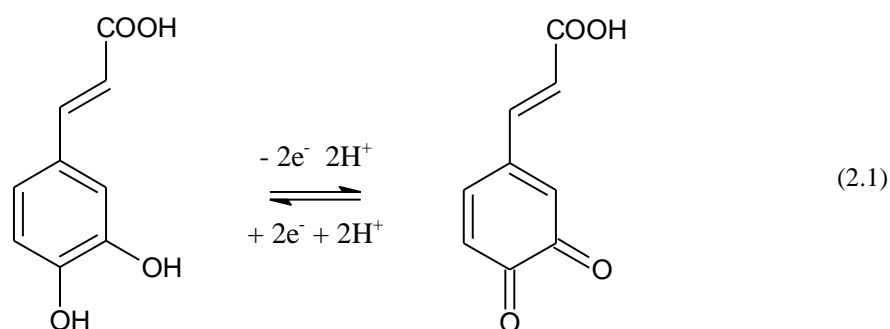
Mezi běžně rozšířené látky v rostlinné říši patří fenolické kyseliny, nalézající se v řadě produktů: čaj, víno, ovoce, nápoje a různé léčivé rostliny [9]. Kávová kyselina (systematicky 3,4-dihydroxybenzoická kyselina, obr. 2.1A), se řadí mezi polyfenolické látky, které jsou hojně rozšířeny ve vyšších rostlinách ve formě glykosidů, esterů a také je zde přítomna ve volné formě [10]. Byly zjištěny její farmakologické účinky, působí jako antioxidant, antimutagen a antikarcinogen [9]. Tato kyselina je jedna z nejběžnějších hydroxybenzoických kyselin přítomných ve víně. Nejvíce zastoupenou kyselinou v hroznech je kaftarová kyselina (obr. 2.1B).



Obr. 2.1 Strukturní vzorce (A) kávové kyseliny a (B) kaftarové kyseliny

Kaftarová kyselina je tvořena kávovou a vinnou kyselinou, které jsou spojeny esterickou vazbou. Metabolizmem kvasinek dochází k hydrolyze kaftarové kyseliny, nacházející se zejména v mladých vínech, při čemž se uvolňuje kávová kyselina. Rychlost metabolického rozkladu kaftarové kyseliny je proměnná a závislá na pH vína a přítomnosti specifického enzymu [8]. Estery kávové kyseliny se řadí mezi látky, které jsou schopny selektivně zpomalit růst některých typů rakovinných buněk, mimo jiné i fenyl ester kávové kyseliny, který je součástí propolisu [10]. Obsah kávové kyseliny v bílém víně může být až 70 mg dm^{-3} (cit. [8]).

Používanou elektrochemickou metodou pro stanovení kávové kyseliny je cyklická voltametrie, kde jako pracovní elektroda je použit tepelně ošetřený polymerní uhlík (GPC) na bázi fenolové pryskyřice [2]. Byl zjištěn $E_p = 0,40$ V (vs. SCE) odpovídající anodickému píku, $E_p = 0,36$ V (vs. SCE) odpovídající katodickému píku. Elektrochemický děj probíhá na elektrodě podle reakce 2.1. Detekční mez této metody je $1,24 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ a mez stanovitelnosti $2,54 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³.



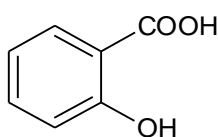
Jinou elektrochemickou metodou použitou pro stanovení kávové kyseliny v rostlinném materiálu byla diferenční pulzní voltametrie na GC pracovní elektrodě modifikované olověným filmem (vs. Ag/AgCl) v 0,05 mol dm⁻³ acetátovém pufru (pH = 4,0) [10]. Pro vytvoření olověného filmu byl použit dusičnan olovnatý přidáný do voltametrické cely, který byl deponován na povrch elektrody při $E = -1,3$ V. Zjištěná hodnota E_p anodického píku kávové kyseliny touto metodou byla + 0,38 V (vs. Ag/AgCl). Mez detekce byla $4,0 \times 10^{-9}$ mol dm⁻³ a mez stanovitelnosti $1,3 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³.

Kromě uvedených elektrochemických metod se kávová kyselina běžně stanovuje metodou HPLC využívající DAD detekci při 270 nm [26]. Jako stacionární fáze byl zvolen silikagel chemicky modifikovaný oktadecylovými řetězci (C18). Optimálních separačních podmínek bylo dosaženo použitím gradientové eluce acetonitrilem. Analyzované vzorky byly zkoncentrovány rotační vakuovou odparkou s následným rozpuštěním zbytků v HCl (pH = 2,5)

a zachycením na SPE kolonce. Interferující složky byly odstraněny acetonitrem. Před vlastní analýzou byla provedena filtrace přes 0,45 μm filtr. Mez detekce kávové kyseliny použitím této metody je $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

2.3 Salicylová kyselina

Salicylová kyselina (systematicky 2-dihydroxybenzoová kyselina, obr. 2.2) a salicyláty jsou látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinách [28], kde ve formě solí a esterů salicylové kyseliny slouží jako mediátory hormonů [12].

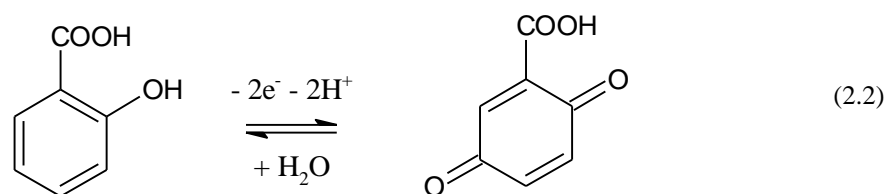


Obr. 2.2 Strukturální vzorec salicylové kyseliny

Salicylová kyselina a salicyláty jsou přítomny ve značném množství v ovoci a zelenině, víně, čaji, ovocných džusech a koření [14]. Salicylová kyselina se řadí mezi fenolkarboxylové kyseliny, u kterých bylo prokázáno, že patří mezi důležité signální látky, které se účastní aktivace obraných mechanismů při nemoci rostliny. Salicylová kyselina je také endogenní růstový faktor, podílející se na řadě rozdílných funkcí, které probíhají v rostlině za běžných podmínek [11]. O kyselinu salicylovou vzrostl zájem z hlediska potravinového doplňku, jakožto látky s prospěšnými účinky na lidské zdraví [12]. Salicylová kyselina a salicyláty jsou přidávány do řady potravin a nápojů jako konzervační látky a dochucovadla, kde mohou mít klinický význam [28]. Salicylová kyselina má antipyretické, analgetické a protizánětlivé vlastnosti, salicyláty mohou oddálit či zabránit vývoji kardiovaskulárních onemocnění a několika typů rakoviny. Přítomnost salicylátů a salicylové kyseliny v některých potravinách a nápojích může částečně vysvětlit jejich kardioprotektivní vlastnosti. Koncentrace salicylové kyseliny a salicylátů

dosahuje v bílých vínech hodnoty $0,44 \text{ mg kg}^{-1}$ a v červených vínech $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit. [14]).

Pro stanovení salicylové kyseliny ve farmaceutických přípravcích obsahující acetylsalicylovou kyselinu byla použita diferenční pulsní voltametrie a cyklická voltametrie v tříelektrodovém uspořádání v Britton-Robinsonově pufru ($\text{pH} = 2,37$) na GC pracovní elektrodě. Vzorek známého počtu tablet byl rozdrcen na jemný prášek, následně převeden do odměrné baňky a extrahován methanolem. Nerozpuštěné zbytky byly odstraněny filtrací, získaný filtrát byl následně převeden do Britton-Robinsonova pufru. Takto připravený roztok byl následně analyzován. Byl zjištěn píkový potenciál odpovídající ireverzibilní oxidaci salicylové kyseliny $E_p = 1,088 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) [29]. Elektrochemický děj probíhá na elektrodě podle reakce [23].



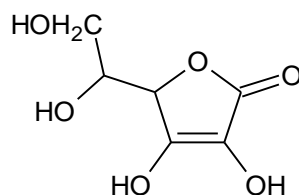
Detekční mez salicylové kyseliny použitím této metody je $6,5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (cit. [29]).

Pro stanovení salicylové kyseliny ve vrbové kůře a větvích byla použita SWV (square wave voltammetry) v tříelektrodovém uspořádání [11]. Salicylová kyselina ze vzorků byla extrahována methanolem s následnou homogenizací na Vortexu po dobu 72 hodin při 4°C . Jako základní elektrolyt byl použit $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ Britton-Robinsonův pufr ($\text{pH} = 1,81$) Použitou pracovní elektrodou byla grafitová tužková elektroda ($500 \mu\text{m}$). Touto metodou byla zjištěna hodnota anodického píku salicylové kyseliny $E_p = 1,0 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). Mez detekce použitím této metody je $1,2 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.

Kromě elektrochemických metod je pro stanovení salicylové kyseliny ve vínech využívána metoda HPLC s isokratickou elucí fosfátovým pufrům (pH = 2,0) s UV/VIS detekcí při 235 nm [15]. Vlastní analýze předchází odstranění cukrů, aminokyselin, proteinů a organických kyselin ze vzorku pomocí filtračního materiálu (Extrelut 20®). U těchto látek je možnost, že by mohly interferovat se salicylovou kyselinou při využití UV/VIS detekce při 235 nm. Mez detekce použitím této metody je $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, mez stanovitelnosti $7,2 \times 10^{-8} \text{ dm}^{-3}$.

2.4 Askorbová kyselina

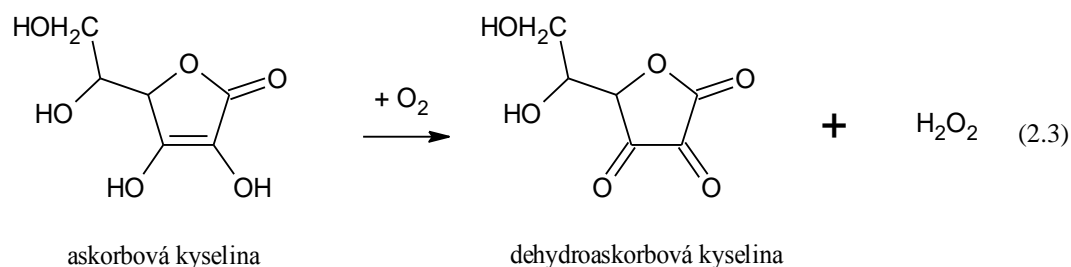
Askorbová kyselina (obr. 2.3) je známá i jako vitamín C. Je to velmi silný přírodní antioxidant, nacházející se v řadě potravin a nápojů [16].



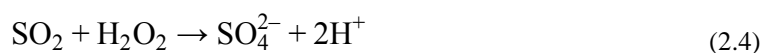
Obr. 2.3 Strukturální vzorec askorbové kyseliny

Tato kyselina společně s oxidem siřičitým je přidávána do řady potravin a nápojů jako konzervant zamezující oxidaci výrobku, což vede k prodloužení jeho trvanlivosti [17]. Především je přítomna v hroznech (50 mg dm^{-3}), ale během fermentačního procesu výroby vína její množství klesá. Je záměrně přidávána zvláště do bílých vín během jejich výroby jako ochrana proti oxidaci při skladování. Také je využívána k prodloužení trvanlivosti komerčně dostupných vín [16,18]. Důvodem využití askorbové kyseliny ve vinařství je, že přeměňuje chinony zpět na původní polyfenoly a zabraňuje barevným změnám při zpracování vína a jeho skladování. Dále se využívá její schopnosti vázat molekulární kyslík, který může negativně ovlivňovat především chuť

a barvu bílých vín. Naproti tomu reakce askorbové kyseliny s molekulárním kyslíkem, při které vzniká peroxid vodíku, způsobuje oxidativní hnědnutí vína [16].

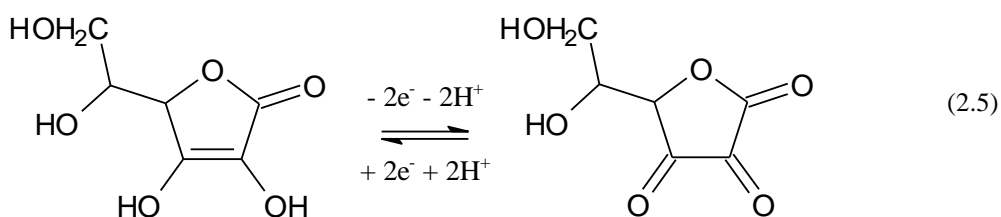


Pokud je ve víně dostatečné množství volného oxidu siřičitého, který reaguje se vzniklým peroxidem vodíku, je zamezeno oxidativnímu hnědnutí vína [18,21].



V prvním kroku aerobní oxidace askorbové kyseliny vzniká jak dehydroaskorbová kyselina tak i peroxid vodíku. Mimo to vznikají také vedlejší produkty rozkladu askorbové kyseliny, které jsou zodpovědné za vyšší úroveň zhnědnutí v některých bílých vínech [16].

Elektrochemickou metodou využívanou pro stanovení askorbové kyseliny ve vínech a ovocných nápojích je cyklická voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě (v tříelektrodovém uspořádání). Jako základní elektrolyt byl použit 0,10 mol dm⁻³ KCl. Pro oxidační pík byla zjištěna hodnota $E_p = 0,510$ V (vs. Ag/AgCl). Diferenční pulzní voltametrie na GC elektrodě bylo využito pro stanovení askorbové kyseliny ve farmaceutických výrobcích a ovocných nápojích. Tato metoda byla použita i pro stanovení vitamínu E ve farmaceutických přípravcích [27]. Elektrochemický děj probíhá na elektrodě podle reakce 2.5 (cit. [25]).



Limit detekce a stanovitelnosti získaný metodou cyklické voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě ve víně a ovocných nápojích je $6,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a $1,8 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ (cit. [27]).

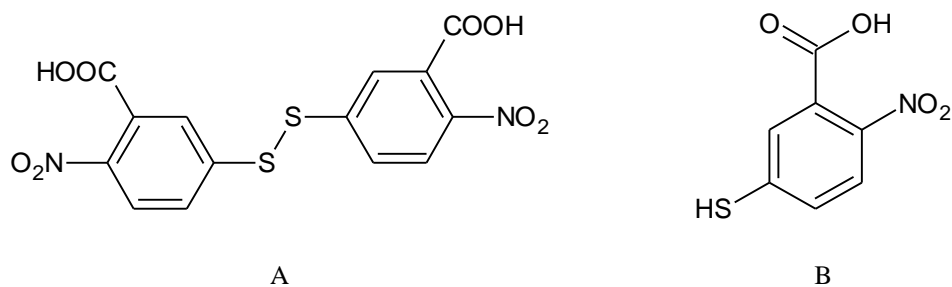
Pro elektrochemickou detekci askorbové kyseliny v reálném a modelovém roztoku ($0,033 \text{ mol dm}^{-3}$ vinná kyselina, 12% v/v ethanolický roztok) vína byla použita cyklická voltametrie v tříelektrodovém uspořádání [30]. Pracovními elektrodami byly zlatá, platinová a GC elektroda, jejichž povrch byl modifikován poly-(3,4-ethylendioxythiofenem) (PEDOT, obr. 2.5 na str. 18). Pro askorbovou kyselinu byl zjištěn $E_p = 0,240 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). U elektrod pokrytých PEDOT filmem došlo ke zvýšení citlivosti stanovení askorbové kyseliny oproti nemodifikovaným elektrodám.

Další běžně používanou metodu pro stanovení askorbové kyseliny ve vínech je LC s přímým nástřikem s UV/VIS detekcí při 243 nm na polymerní koloně PLRP-S 100A [16]. Používanou mobilní fází je směs vody a trifluoroctové kyseliny (99/1, v/v). Pro úpravu vzorků byla použita filtrace přes membránové filtry, na kterých se nezadržuje askorbová kyselina. Získaný filtrát byl přímo určen k analýze. Tato metoda je velmi rychlá a citlivá s mezí stanovitelnosti $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a mezí detekce $5,7 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

2.5 Oxid siřičitý, siřičitany

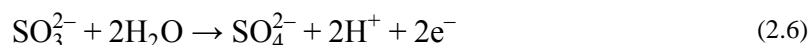
Siřičitany a oxid siřičitý jsou používány jako široké spektrum konzervantů. Zabraňují mikrobiálnímu rozkladu a reakcím způsobujícím změnu barvy potravin [21]. Oxid siřičitý je silný antioxidant a antiseptikum. Je hojně využíván při výrobě vína jako konzervant. Ve víně je oxid siřičitý přítomen ve dvou odlišných formách: volný a vázaný [19]. Volný oxid siřičitý přítomný ve víně je definován jako součet nezreagovaných forem (SO_2 , H_2SO_3 , HSO_3^- a SO_3^{2-}). Vázaný oxid siřičitý je chemicky vázán s různými aldehydy a ketony, ze kterých může být uvolněn hydrolýzou [20]. Pouze volný oxid siřičitý má antiseptické a redukční vlastnosti, avšak některé reakce podílející se na vázání oxidu siřičitého jsou reverzibilní a mohou tudíž být využity pro vyvážení nedostatku oxidu siřičitého při jeho poklesu. Oxid siřičitý ve víně může působit na vůni a chuť a také může být nebezpečný pro lidské zdraví [19]. Siřičitany mohou vyvolávat bolesti hlavy, poruchy chování a kožní vyrážky, zvláště u astmatiků [22]. Oxid siřičitý je využíván jako důležitý analytický parametr při kontrole vína [19]. Množství siřičitanů ve víně a jiných potravinách je upraveno zákonem. V červených vínech maximálně 160 mg ml^{-1} , v bílých a růžových vínech maximálně 210 mg ml^{-1} . Přijatelná denní dávka siřičitanů je $0,0 - 0,7 \text{ mg}$ na kilogram tělesné váhy, což odpovídá dvěma sklenicím vína pro 80 kg osobu [22].

Pro stanovení siřičitanů se využívá reakce DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzová kyselina), obr. 2.4A) se siřičitany přítomnými ve víně, při které vzniká TNBA (2-nitro-5-merkaptobenzoová kyselina, obr. 2.4B), sloužící jako prostředek k určení jejich množství [24].



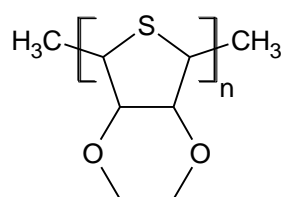
Obr. 2.4 Strukturní vzorce (A) 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzové kyseliny),
(B) 2-nitro-5-merkaptobenzoové kyseliny

Použitou metodou byla cyklická voltametrie v tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla nemodifikovaná GC elektroda, referenční argentschloridová elektroda a pomocnou Pt-drátek [22]. Tato metoda využívá přímou elektrochemickou redukci nitro skupin DTNB činidla na nemodifikované GC elektrodě. Základním elektrolytem používaným v této metodě byl 0,1 mol dm⁻³ fosfátový pufr (pH = 7,00). Přídavek DTNB umožňuje stanovení přítomnosti siřičitanů, citlivost tohoto stanovení roste se zvyšujícím se množstvím přídavku DTNB. Elektrochemický děj probíhá podle reakce [24].



Zjištěná koncentrace siřičitanu použitím této metody byla v bílých vínech 133,1 mg dm⁻³, v červených vínech 100,5 mg dm⁻³ (cit. [22]).

Pro elektrochemickou detekci oxidu siřičitého v reálném a modelovém roztoku vína ($0,033 \text{ mol dm}^{-3}$ vinná kyselina, 12% v/v ethanolický roztok) byla použita cyklická voltametrie v tříelektrodovém uspořádání [30]. Pracovními elektrodami byly zlatá, platinová a GC elektroda, jejichž povrch byl modifikován poly-(3,4-ethylendioxythiofenem) (PEDOT zobrazený na obr. 2.5). Použitou referenční elektrodou byla argentschloridová elektroda. U elektrod pokrytých PEDOT filmem došlo ke zvýšení citlivosti stanovení oxidu siřičitého oproti nemodifikovaným elektrodám.



Obr. 2.5 Strukturální vzorec poly-(3,4-ethylendioxythiofenu)

Kromě elektrochemických metod je pro stanovení oxidu siřičitého a siřičitanů ve vínech používáno iontově výměnné chromatografie s konduktometrickou detekcí [31]. Oxid siřičitý a siřičitany přítomné ve víně jsou před vlastní analýzou nejprve převedeny peroxidem vodíku v alkalickém pH na sírany, které jsou následně detekovány. Analýza byla prováděna na koloně IonPac AS15 elučním činidlem, kterým byl 22 mmol dm^{-3} hydroxid draselný. Mez stanovitelnosti a mez detekce oxidu siřičitého a siřičitanů použitím této metody je 4 mg dm^{-3} a 1 mg dm^{-3} .

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Studované vzorky a použité chemikálie

Jako základní elektrolyt byl používán 10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaH_2PO_4 (Merck) o $\text{pH} = 4,01$. Studovanými látkami v této práci byly salicylová kyselina (Lachema), askorbová kyselina (Lachema Ph. Eur. 3) a kávová kyselina (Sigma Aldrich). Zásobní roztoky těchto kyselin o koncentraci $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku základního elektrolytu ($\text{pH} = 4,01$) byly připravovány vždy čerstvé. Dále používanými chemikáliemi byly hydroxid sodný (Lachema), 85% kyselina fosforečná (VEB Laborchemie APOLDA), heptahydrát siřičitanu sodného (Lachema), 99,5% ethanol (Merck), argon (Messer, 99,996%), kyslík (Linde, 99,99 %). Všechny používané chemikálie byly analytické čistoty (p.a). Jako vzorek bylo použito bílé polosladké víno Svatý Urban (9,5 % ethanolu, šarže L1110507) vyrobené firmou Víno Mikulov. Jako další vzorek bylo použito bílé, polosladké sudové víno Aurelius (10 % ethanolu, roč. 2011), vyrobené firmou Sýkora Čejkovice.

Pro měření pH byl použit pH – metr Jenway typu 3510.

3.2 Použitá metodika měření a vyhodnocení dat

Zvolenou metodou pro stanovení studovaných látek byla cyklická voltametrie v tříelektrodovém uspořádání na pevné elektrodě. Jako elektrodový materiál pracovní elektrody byl použit nemodifikovaný skelný uhlík (GC) ($19,63 \text{ mm}^2$), ukotvený v teflonovém pouzdru. GC uhlík pochází od společnosti Tokai Electrode MGF Co Japonsko. Elektroda byla vyrobena na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze. Používanou referenční elektrodou byla komerčně dostupná kalomelová elektroda (SCE), pomocnou elektrodou byl Pt-drátek.

Pracovní elektroda byla před každým měřením leštěna diamantovou pastou WINTER diaplast (Ernst Winter & Sohn) nanesenou na bavlněné látce. Elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou, následovala sonifikace po dobu 2×5 minut v ultrazvukové vaně (VGT 1613T) k odstranění zbytků diamantové pasty z povrchu elektrody. Při sonifikaci byla elektroda umístěna v Petriho misce s destilovanou vodou.

Pro cyklickou voltametrii byla používána běžná voltametrická nádobka o objemu 50 ml. Do teflonové hlavice, ve které byla ukotvena voltametrická nádobka byla vložena pracovní, referenční SCE elektroda, pomocná Pt-elektroda a dvojcestný skleněný kohout umožňující přívod argonu pod hladinu a nad hladinu analyzovaného roztoku. Cela byla umístěna v kovovém držáku nad magnetickým míchadlem Baird & Tatlock (London) umožňujícím míchání analyzovaného roztoku. Do voltametrické nádoby bylo pipetováno vždy 5 ml základního elektrolytu, jenž byl probubláván argonem a míchán po dobu 5 minut. Pro odstranění přítomného oxidu siřičitého byl roztok probubláván a míchán 15 minut kyslíkem. Kyslík byl následně odstraněn probubláváním a mícháním roztoku argonem po dobu 15 minut.

Měření bylo realizováno na potenciostatu Wenking POS 2 (Bank electronic, Německo), jehož data byla zpracována počítačovým programem CPCDA v. 4.1.

Modelový roztok vína byl připraven tak, že do voltametrické cely bylo napipetováno 5 ml základního elektrolytu, do kterého bylo přidáno 0,5 ml 99,5 % ethanolu, 560 μl zásobního roztoku kávové kyseliny, 495 μl zásobního roztoku salicylové kyseliny a 430 μl zásobního roztoku askorbové kyseliny. Koncentrace studovaných látek v takto připraveném modelovém roztoku byla $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Po provedení analýzy bylo do roztoku přidáno 340 μl zásobního roztoku heptahydrátu siřičitanu sodného o koncentraci $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

Reálné vzorky vína byly k měření připraveny tak, že $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$ základní elektrolyt o $\text{pH} = 4,01$ byl naředěn vzorkem vína tak, aby výsledná koncentrace základního elektrolytu v odměrné baňce byla $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

3.3 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu Origin, verze 6.1. Další programy, které byly použity pro vyhodnocení zpracování dat, byly Microsoft Office Word 2007 a Microsoft Office Excel 2007.

U studovaných látek byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti podle následujících vzorců

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s_{y,x} - q}{k} \quad (3.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s_{y,x} - q}{k} \quad (3.2)$$

kde $s_{y,x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese (chyba střední hodnoty), q je úsek na ose y a k je směrnice přímky. Hodnota $s_{y,x}$ byla získána pomocí regresní statistiky v programu Microsoft Excel.

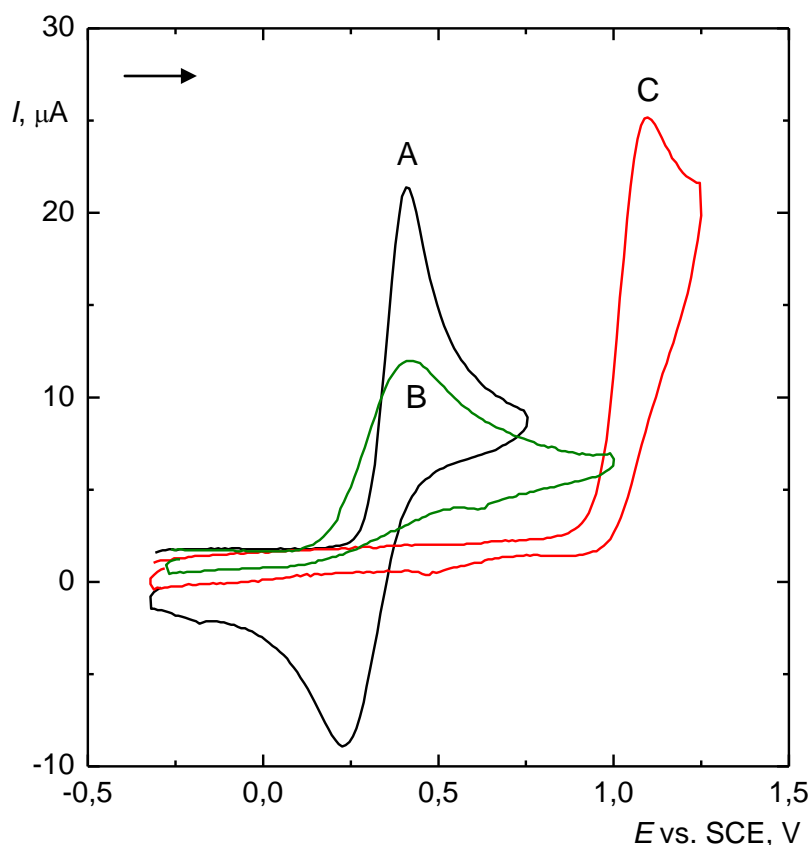
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Elektrochemické chování studovaných látek

Nejprve bylo studováno elektrochemické chování studovaných karboxylových kyselin na nemodifikované GC elektrodě v 10% ethanolickém roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ základního elektrolytu (obr. 4.1) při rychlosti polarizace elektrody 50 mV s^{-1} , koncentrace studovaných látek ve voltametrické cele byla $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Měření bylo prováděno proti nasycené kalomelové elektrodě (SCE). Hodnoty E_p anodického píku, které jsou uvedeny v tabulce 4.1 byly odečteny vždy z prvního cyklu.

Tab. 4.1 Hodnoty anodických E_p studovaných látek.

Studovaná látka	E_p vs. SCE
-	V
Kávová kyselina	0,410
Salicylová kyselina	1,100
Askorbová kyselina	0,420



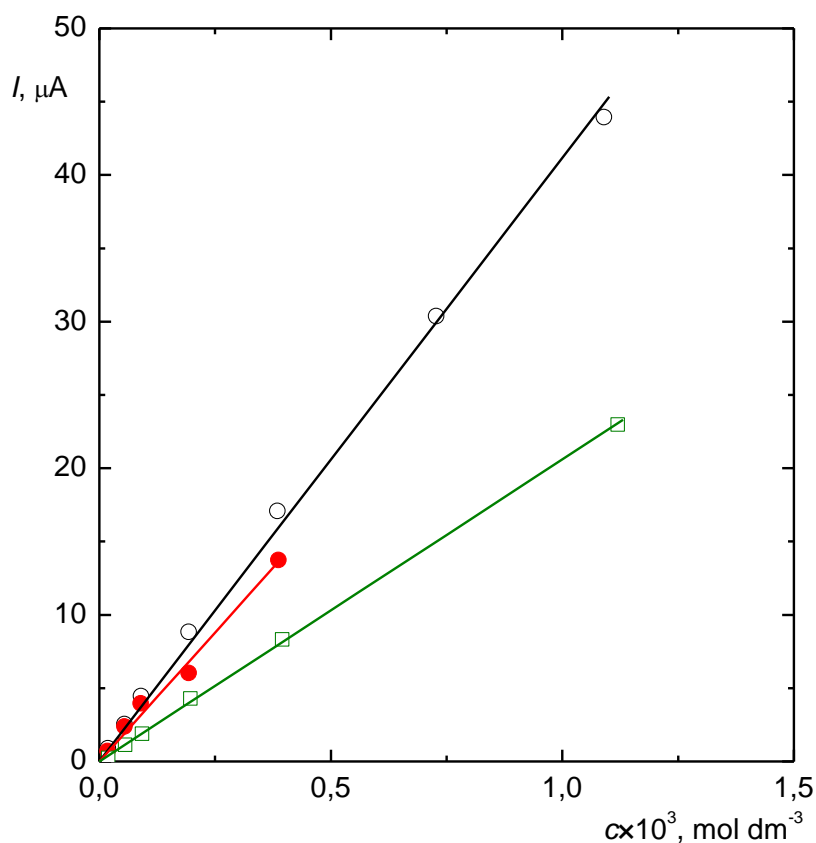
Obr. 4.1 Cyklický voltamogram studovaných látek (jejichž koncentrace ve voltametrické cele byla $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na nemodifikované GC elektrodě (vs. SCE) v 10% ethanolicém roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfátového pufru při rychlosti polarizace elektrody 50 mV s^{-1} . (A) Kávová kyselina, (B) askorbová kyselina, (C) salicylová kyselina.

Z obrázku 4.1 je patrné, že v případě kávové a askorbové kyseliny se překrývají jejich anodické píky. Oxidační pík salicylové kyseliny je lokalizován na kraji zvoleného potenciálového rozsahu. Reverzibilní průběh elektrochemického děje je patrný pouze u kávové kyseliny. Zjištěná hodnota E_p anodického píku je $0,410 \text{ V}$ (vs. SCE), což je ve shodě s hodnotou uváděnou v literatuře [10]. Pro E_p katodického píku kávové kyseliny byla zjištěna hodnota $0,230 \text{ V}$ (vs. SCE). U askorbové kyseliny je patrný pouze oxidační pík s hodnotou $E_p = 0,420 \text{ V}$ (vs. SCE). Pro salicylovou kyselinu byla zjištěna hodnota E_p anodického píku $1,100 \text{ V}$ (vs. SCE). Naměřená hodnota E_p salicylové

kyseliny je ve shodě s hodnotou uvedenou v literatuře [29]. V případě askorbové a salicylové kyseliny je patrný ireverzibilní průběh elektrochemického děje.

4.2 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti studovaných látek byly stanoveny postupnými přidávkami zásobních roztoků těchto látek. Kalibrační přímky byly naměřeny pro rozsah koncentrací 10^{-5} až 10^{-3} mol dm^{-3} . Hodnoty anodického proudu I_{an} byly odečteny vždy z prvního cyklu. Ze získaných dat byly vytvořeny grafy závislosti anodického proudu na koncentraci přídavku (obr. 4.2).



Obr. 4.2 Kalibrační závislost I_{an} na koncentraci přídavku v 10% ethanolickém roztoku $0,1$ mol dm^{-3} fosfátového pufru. Kávová kyselina (○), salicylová kyselina (●), askorbová kyselina (□).

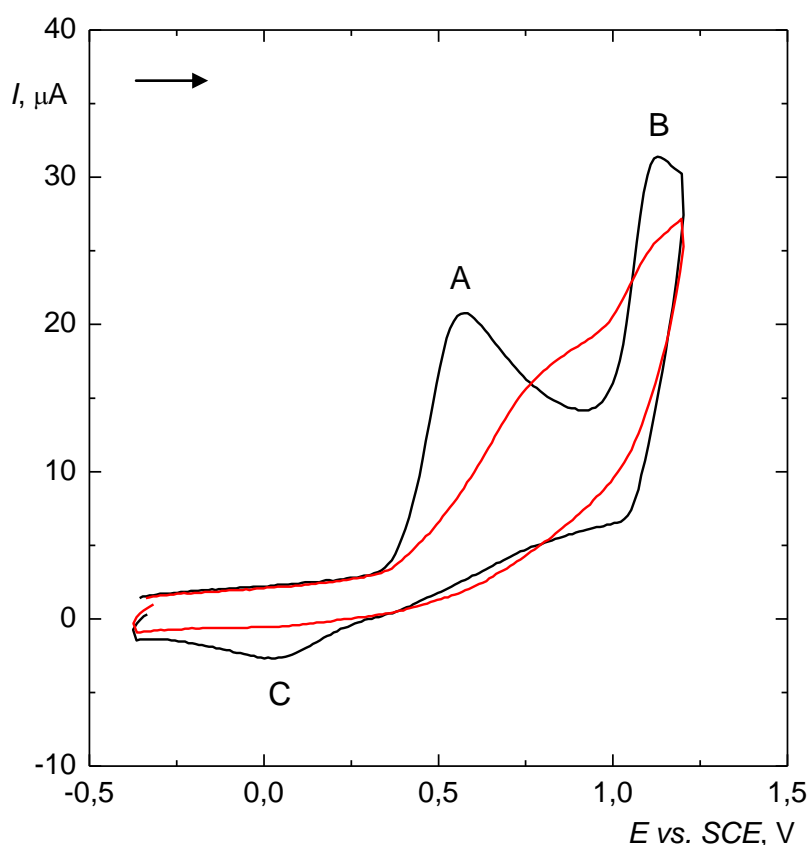
Kalibrační přímka salicylové kyseliny (●) na obr. 4.2 je lineární pouze do koncentrace $4,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³. Je to z toho důvodu, že z cyklických voltamogramů vyšších koncentrací nebylo možné odečíst I_{an} . V tabulce 4.2 jsou uvedeny vypočtené parametry kalibrační přímky a odpovídající limity detekce stanovitelnosti studovaných látek.

Tab. 4.2 Směrnice kalibračních rovnic a koeficient spolehlivosti.

Studovaná látka	k	R	LOD×10 ⁻⁴	LOQ×10 ⁻⁴
–	mA (mol dm ⁻³) ⁻¹	–	mol dm ⁻³	mol dm ⁻³
Kávoová kyselina	41,176	0,9994	0,268	1,34
Salicylová kyselina	35,199	0,9940	0,471	1,79
Askorbová kyselina	20,603	0,9999	0,542	0,192

4.3 Analýza modelového roztoku vína

Nejprve byla provedena analýza modelového roztoku vína (10% ethanolický roztok 0,1 mol dm⁻³ základního elektrolytu, směs studovaných kyselin o koncentraci $4,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³). Po provedení cyklické voltametrie na nemodifikované GC pracovní elektrodě (vs. SCE) při rychlosti polarizace elektrody 50 mV s⁻¹ byl získán cyklický voltamogram zobrazený na obr. 4.3 černou křivkou. Poté byl do voltametrické cely přidán zásobní roztok siřičitanu sodného ($1,0 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³). Získaný cyklický voltamogram je zobrazen na obr. 4.3 červenou křivkou.

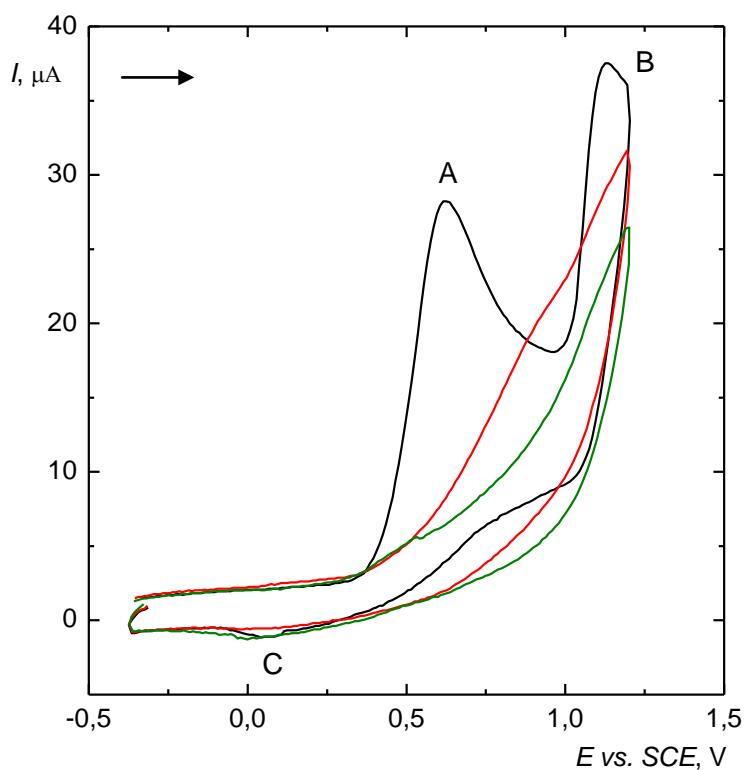


Obr. 4.3 Cyklický voltamogram modelového roztoku vína bez přidaného siřičitanu (černý CV), ve kterém byla koncentrace studovaných látek $4,0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Cyklický voltamogram s přidavkem zásobního roztoku siřičitanu sodného (červený CV) na nemodifikované GC elektrodě (vs. SCE) při rychlosti polarizace elektrody 50 mV s^{-1} . Společný anodický pík (A) kávové a askorbové kyseliny, anodický pík (B) salicylové kyseliny. Zřejmě redukční pík kávové kyseliny (C).

Na obrázku 4.3 jsou patrné dva oxidační píky přítomné na černém cyklickém voltamogramu, který odpovídá modelovému roztoku vína bez přítomnosti siřičitanu. Anodický pík (A) představuje směsný pík oxidace kávové a askorbové kyseliny s hodnotou $E_p = 0,570 \text{ V}$ (vs. SCE), anodický pík (B) odpovídá oxidaci salicylové kyseliny s hodnotou $E_p = 1,100 \text{ V}$ (vs. SCE). Tato hodnota je shodná s tou, která byla naměřena při analýze samostatné salicylové kyseliny. Je zde patrný i zřejmě katodický redukční pík kávové kyseliny s $E_p = 0,025 \text{ V}$ (vs. SCE), který se vytrácí po přidání zásobního roztoku siřičitanu. Po přidání zásobního

roztoku siřičitanu sodného a provedené analýze je patrné, že přidaný siřičitan zamezuje analýze studovaných látek v modelovém roztoku vína (červený CV, obr. 4.3). Toto může být způsobeno nízkou selektivitou nemodifikované GC elektrody nebo případnou interakcí se studovanými látkami. Na cyklickém voltamogramu modelového roztoku vína v přítomnosti siřičitanu je patrný náznak píku na kraji potenciálového rozsahu. Pokud by byl použit potenciálový rozsah, který by byl rozšířen do kladných potenciálů, docházelo by k anodické oxidaci povrchu GC elektrody a ztrátě jejího nemodifikovaného povrchu.

Na obr. 4.4 je zobrazena analýza modelového roztoku vína bez přidaného zásobního roztoku siřičitanu (černý CV), po přidání zásobního roztoku siřičitanu (červený CV) a po 15 minutách probublávání kyslíkem (zelený CV). Zřejmě redukční pík kávové kyseliny (C).

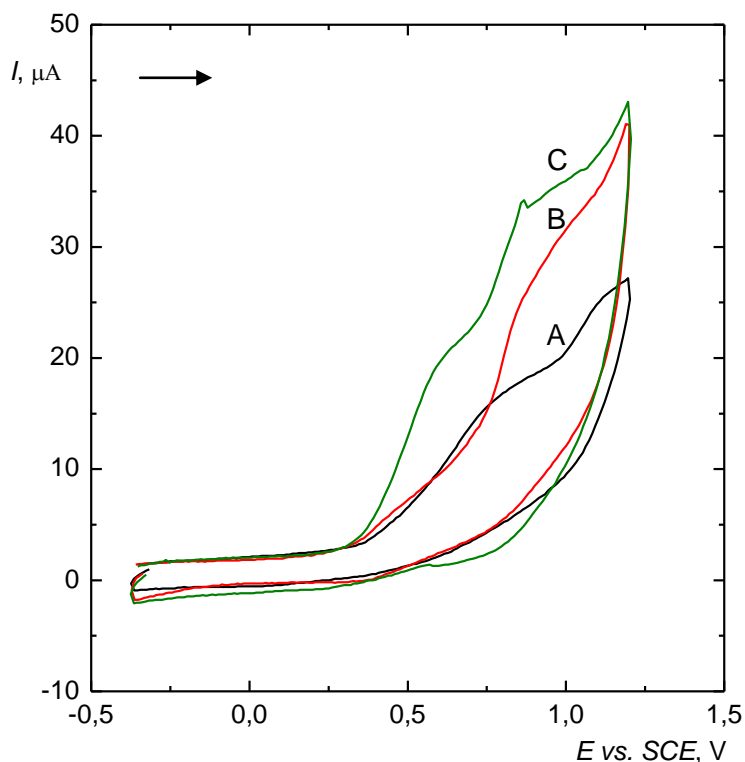


Obr. 4.4 Cyklický voltamogram modelového roztoku vína při rychlosti polarizace elektrody 50 mV s^{-1} (vs. SCE). Anodický dvojpík kávové a askorbové kyseliny (A), anodický pík salicylové kyseliny (B). Cyklický voltamogram po přidavku siřičitanu (červený CV), po 15 minutách probublávání celý kyslíkem (zelený CV). Zřejmě redukční pík kávové kyseliny (C).

Z tohoto cyklického voltamogramu je patrné, že po odstranění siřičitanu kyslíkem v modelovém roztoku vína dochází k objevení zřejmě redukčního píku kávové kyseliny (C, obr. 4.4), jehož $E_p = 0,030$ V (vs. SCE). Tato hodnota se neshoduje s naměřenou, která byla získána při samostatné analýze kávové kyseliny, jejíž $E_p = 0,230$ V (vs. SCE). Tento redukční pík (C, obr. 4.4) se ztrácí po přidání siřičitanu, opět se objeví po probublávání kyslíkem. Potenciálový rozdíl těchto dvou píků může být zřejmě způsoben vedlejšími elektrochemickými ději, které mohou v modelovém roztoku probíhat, či vzájemnou chemickou interakcí analyzovaných látek a přítomného siřičitanu, popřípadě nízkou selektivitou nemodifikované GC elektrody. Z obr. 4.4 je patrné, že v přítomnosti siřičitanu není možné provést elektrochemické stanovení těchto kyselin v modelovém roztoku vína.

4.4 Analýza reálných vzorků vína

Cyklickou voltametrií reálných vzorků vína (Svatý Urban, Aurelius) při rychlosti polarizace nemodifikované GC elektrody 50 mV s^{-1} (vs. SCE), byly získány cyklické voltamogramy zobrazené na obr. 4.5. Pro porovnání je zde uveden cyklický voltamogram modelového roztoku vína (křivka A).

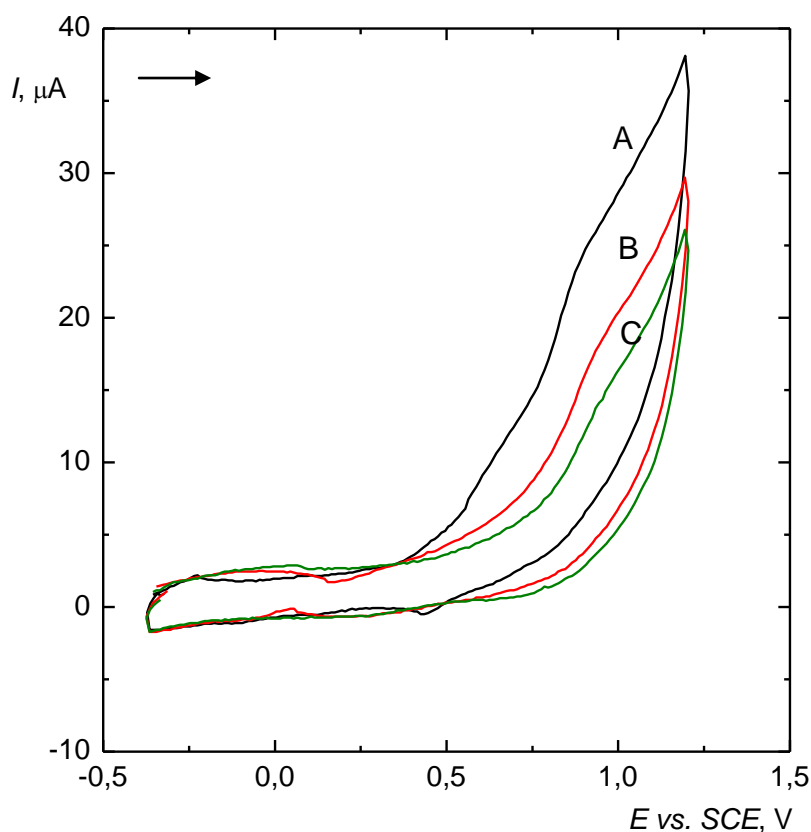


Obr. 4.5 Cyklický voltamogram modelového roztoku vína (A), bílého polosladkého vína Svatý Urban (B), údajně nesířeného bílého, polosladkého sudového vína Aurelius (C) na nemodifikované GC elektrodě (vs. SCE) při rychlosti polarizace 50 mV s^{-1} .

Cyklickou voltametrií bílého, polosladkého sudového vína Aurelius (křivka C, obr. 4.5), které mělo být dle prodejce nesířené, bylo zjištěno, že pravděpodobně obsahuje mnohem více siřičitanu než bílé polosladké víno Svatý Urban (křivka B, obr. 4.5). U vína Svatý Urban bylo výrobcem na viněťě

uvedeno, že bylo sířeno. Touto analýzou bylo zjištěno, že analýzu studovaných látek nelze provést ani v jednom z analyzovaných vín.

Přítomný siřičitan ve víně byl následně odstraněn probubláváním kyslíkem, čímž došlo k jeho oxidaci na sírany, naměřené cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obr. 4.6.



Obr. 4.6 Cyklické voltamogramy postupného odstraňování oxidu siřičitého a siřičitanů z reálného vzorku vína Svatý Urban na nemodifikované GC elektrodě (vs. SCE), při rychlosti polarizace 50 mV s^{-1} . Před odstraněním (A), po 15 minutách probublávání kyslíkem (B), po dalších 15 minutách probublávání kyslíkem (C).

Na tomto cyklickém voltamogramu je křivkou (A, obr. 4.6) znázorněna analýza reálného vzorku vína Svatý Urban bez odstranění siřičitanů a oxidu siřičitého. Křivka (B, obr. 4.6) znázorňuje analýzu po 15 minutách probubláváním kyslíkem, z tohoto cyklického voltamogramu je patrné, že došlo k poklesu množství

siřičitanu přítomného ve víně. Cyklický voltamogram (C, obr. 4.6) zobrazuje analýzu po dalších 15 minutách probublávání kyslíkem, z této křivky je opět patrný pokles množství siřičitanu přítomného ve víně. Probublávání kyslíkem odstraňuje pouze volný siřičitan, který je ve víně přítomen (kap. 2.5). Ani po odstranění kyslíku nejsou na cyklickém voltamogramu patrné jiné píky, které by mohly odpovídat studovaným látkám obsaženým ve vzorku.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo studováno elektrochemické chování kávové, askorbové a salicylové kyseliny na nemodifikované GC elektrodě při rychlosti její polarizace 50 mV s^{-1} proti nasycené kalomelové elektrodě. Byla provedena analýza modelového roztoku a reálných vzorků vzorku vína (bílé polosladké víno Svatý Urban a bílé, polosladké sudové víno Aurelius). Pokud nebyl v modelovém roztoku vína přítomen siřičitan, bylo možno pozorovat dva anodické píky na cyklickém voltamogramu. Po přidavku siřičitanu došlo k zamezení detekce analyzovaných látek. Podobné výsledky byly získány i analýzou reálných vzorků vína, přítomný oxid siřičitý či siřičitany opět znemožnil provedení analýzy. Přítomnost oxidu siřičitého, či siřičitanu v analyzovaném vzorku zamezuje provedení analýzy na nemodifikované GC elektrodě zřejmě z důvodu její nízké selektivity nebo vedlejšími elektrochemickými ději, které mohou v modelovém roztoku vína, tak i v reálných vzorcích vína probíhat, či vzájemnou chemickou interakcí analyzovaných látek a přítomného siřičitanu. Ani po odstranění siřičitanu kyslíkem nebylo možné analýzu provést.

LITERATURA

- [1] Bastos, S. S. T.; Tafulo, P. A. R.; Queirós, R. B.; Matos, C. D.; Sales, M. G. F.: Rapid determination of tartaric acid in wines. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **12**, 712–722 (2009).
- [2] da Silva, L. F.; Stradiotto, N. R.; Oliveira, H. P.: Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method. *Electroanalysis* **20**, 1252–1258 (2008).
- [3] Farkaš, J.: *Technology and Biochemistry of Wine*. Vol. 2. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1988.
- [4] Walzem, R. L.: Wine and health: state of proofs and research needs. *Inflammopharmacology* **16**, 265–271 (2008).
- [5] Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A.: The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta* **668**, 155–165 (2010).
- [6] Jackson, R. S.: *Wine Science: Principles and Applications*. 3rd edition. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008.
- [7] Pavloušek, P.: *Výroba vína u malovinařů*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Praha: Grada, 2010.
- [8] Fracessetti, D.; Lawrence, N.; Tredoux, A. G. J.; Tirelli, A.; Nieuwoudt, H. H.; Du Toit, W. J.: Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry* **128**, 1136–1142 (2011).
- [9] Fernandes, S. C.; Zwirtes de Oliveira, I. R. W.; Vieira, I. C.: A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 661–668 (2007).

-
- [10] Tyszczyk, K.; Skalska-Kamińska, A.; Woźniak, A.: Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material. *Food Chemistry* **125**, 1498–1503 (2011).
- [11] Petrek, J.; Havel, J.; Petřlova, J.; Adam, V.; Potesil, D.; Babula, P.; Kizek, R.: Analysis of salicylic acid in willow barks and branches by an electrochemical method. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**, 553–558 (2007).
- [12] Wood, A.; Baxter, G.; Thies, F.; Kyle, J.; Duthie, G.: A systematic review of salicylates in foods: Estimated daily intake of a Scottish population. *Molecular Nutrition* **55**, 7–14 (2011).
- [13] Scheier, L.: Salicylic Acid: One more reason to eat your fruits and vegetables. *Journal of the American Dietetic Association* **101**, 1406–1408 (2001).
- [14] Duthie, G. G.; Wood, A. D.: Natural salicylates: foods, functions and disease preventive. *Food & Function* **2**, 515–520 (2011).
- [15] Nikfardjam, M. P.; Patz, C. D.; Kauer, R.; Schultz, H.; Dietrich, H.: A modified HPLC method to detect salicylic acid in must and wine after its application in the field to induce fungus resistance. *Vitis* **38**, 179–182 (1999).
- [16] Lopes, P.; Drinkine, J.; Saucier, C.; Glories, Y.: Determination of L-ascorbic acid in wines by direct injection liquid chromatography using a polymeric column. *Analytica Chimica Acta* **555**, 242–245 (2006).
- [17] Cardwell, T. J.; Christophersen, M. J.: Determination of sulfur dioxide and ascorbic acid in beverages using a dual channel flow injection electrochemical detection system. *Analytica Chimica Acta* **416**, 105–110 (2000).

-
- [18] Peng, Z.; Duncan, B.; Pocock, K. F.; Sefton, M. A.: The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**, 127–135 (1998).
- [19] Gomes, M. T.; Rocha, T. A.; Duarte, A. C.; Oliveira, J. P.: Determination of sulfur dioxide in wine using quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry* **68**, 1561–1564 (1996).
- [20] Sarudi, I.; Kelemen, J.: Determination of sulphur and total sulphur dioxide in wines by an ICP-AES method. *Talanta* **45**, 1281–1284 (1998).
- [21] Isaac, A.; Livingstone, C.; Wain, A. J.; Compton, R. G.; Davis, J.: Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 589–598 (2006).
- [22] Scampicchio, M.; Lawrence, N. S.; Arecchi, A.; Mannino, S.: Determination of sulfite in wine by linear sweep voltammetry. *Electroanalysis* **20**, 444–447 (2008).
- [23] Zhu, Y.; Guan, X.; Ji, H.: Electrochemical solid phase micro-extraction and determination of salicylic acid from blood samples by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. *Journal of Solid State Electrochemistry* **13**, 1417–1423 (2009).
- [24] O'Brien, J. A.; Hinkley, J. T.; Donne, S. W.; Lindquist, S-E.: The electrochemical oxidation of aqueous sulfur dioxide: A critical review of work with respect to the hybrid sulfur cycle. *Electrochimica Acta* **55**, 573–591 (2010).
- [25] Hinoue, T.; Kuwamoto, N.; Watanabe, I.: Voltammetry using an electrode surface continuously renewed by laser ablation and its demonstration on electrooxidation of L-ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **466**, 31–37 (1999).

-
- [26] Wang, S.-P.; Huang, K.-J.: Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1032**, 273–279 (2004).
- [27] Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Negulescu, G. P.; Pisoschi, A.: Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules* **16**, 1349–1365 (2011).
- [28] Scotter, M. J.; Roberts, D. P. T.; Wilson, L. A.; Howard, F. A. C.; Davis, J.; Mansell, N.: Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of food using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **105**, 273–279 (2007).
- [29] Torriero, A. A. J.; Luco, J. M.; Sereno, L.; Raba, J.: Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta* **62**, 247–254 (2004).
- [30] Türke, A.; Fischer, W.-J.; Beaumont, N.; Kilamrtin, P. A.: Electrochemistry of sulfur dioxide, polyphenols and ascorbic acid at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes. *Electrochimica Acta* **60**, 184–192 (2012).
- [31] Koch, M.; Köppen, R.; Siegel D.; Witt, A.; Nehls, I.: Determination of total sulfite in wine by ion chromatography after in-sample oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 9463–9467 (2010).