

STUDY OF AN ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF FLAVONOIDS ON A SURFACE OF A CARBON PASTE ELECTRODE

STUDIUM FLAVONOIDŮ POMOCÍ ELEKTROCHEMICKÉ DETEKCE NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Hanuštiak P.¹⁾, Mikelová R.^{1,2)}, Křížková S.¹⁾, Adam V.^{1,3)}, Hodek P.⁴⁾, Stiborová M.⁴⁾, Beklová M.⁵⁾, Zeman L.⁶⁾, Trnková L.²⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Department of Chemistry and Biochemistry and ⁶⁾Department of Animal Nutrition, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²⁾Department of Theoretical and Physical Chemistry, and ³⁾Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

⁴⁾Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, Czech Republic

⁵⁾Department of Veterinary Ecology and Environment Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

E-mail: zabak.pub@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Even a low amounts of compounds contained in foodstuffs could considerably affect a health of consumers. Nutraceuticals represent a large group of these compounds that could positive affect physiological functions of a human organism. Isoflavones, anthocyanes, flavonoids and others sure belongs to the nutraceuticals. Flavonoids comprise a wide-ranging group of plant phenols derived from heterocyclic oxygen compound, flavan, which is formed by two benzene rings linked by heterocyclic pyran. In this work we were concerned with suggestion of electroanalytical technique for a determination of quercetin, quercitrin, rutin, diosmin and chrysin on the surface of a carbon paste electrode. Electrochemical measurements were performed with AUTOLAB connected to VA-Stand 663, using a standard cell with three electrodes. We used phosphate buffer (pH = 7.0) as a supporting electrolyte. We optimized properties (frequency, step potential etc.) of the square wave voltammetry and, consequently, applied it to determine of a content of flavonoids in a few apple species. Moreover, we studied changes in flavonoids content in human urine.

Keywords: Sensor, Flavonoids, Quercetin, Quercitrin, Rutin, Diosmin, Carbon paste electrode.

ABSTRAKT

Látky přijímané v potravinách i v malém množství mohou působit na zdraví konzumenta. Významnou skupinou těchto látek jsou nutraceutika s pozitivním účinkem na fyziologické pochody zvířat i lidí. Bezesporu je možné do této skupiny zařadit isoflavony, anthokyany, flavonoidy a řadu dalších. Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, které jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma

benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. V naší práci jsme se zaměřili na vypracování elektroanalytického stanovení quercetinu, quercitrinu, rutinu, diosminu a chrysinu na uhlíkové pastové elektrodě. Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB ve spojení s VA-Stand 663 v tříelektrodovém uspořádání. Jako základní elektrolyt byl zvolen fosfátový pufr o pH = 7,0. Optimalizovaná elektroanalytická metoda (frekvence, potenciálový krok atd.) byla využita pro studium obsahu flavonoidů v několika odrůdách jablek. Navíc byla studována změna obsahu flavonoidů v lidské moči.

Klíčová slova: Senzor, Flavonoidy, Quercetin, Quercitrin, Rutin, Diosmin, Uhlíková elektroda.

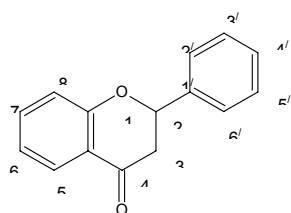
ÚVOD

Nelze nesouhlasit s faktem, že látky přijímané v potravě ovlivňují zdraví konzumenta, případně jeho fyziologický stav. V této souvislosti se hovoří o skupině potravin a látek zvaných nutraceutika. Navíc nezbytnost velkého rozšíření a použití potravin pro zvláštní výživu (kromě jiných také nutraceutik) je postaveno na mnoha faktech: **a)** nevhodné výživové zvyklosti zakořeněné u většiny populace; **b)** technologické zpracování surovin při výrobě potravin vede ke ztrátě živin; **c)** stále rostoucí použití farmak, to vede v mnoha případech ke zhoršení vstřebatelnosti živin; **d)** zhoršující se životní prostředí, má za následek zvýšené požadavky organismu na přítomnost ochranných látek; **e)** využití specificky definované výživy v prevenci i podpoře terapie, v našich zemích velmi zaostalá oproti většině západních zemí. Pro všechny tyto nevyvratitelné údaje se dá v blízkém budoucnosti předpokládat velký rozvoj těchto látek, zvýšená podpora jejich prodeje a tím také vyšší příjem obyvatelstvem. A konkrétně nutraceutika už pravděpodobně svůj velký rozkvět už započala, dostala se do podvědomí lidí a lze očekávat brzké obrovské zaplavení trhu. Co to vlastně ta nutraceutika jsou a jak se odlišují od farmak? Jednoduchá definice hovoří, že nutraceutika jsou potraviny, které mají pozitivní fyziologické účinky na lidský organismus. Bylo prokázáno, že mají vliv na celkový zdravotní stav člověka a mohou výrazně podporovat fyziologický výkon či snižovat riziko vzniku některých nemocí. čem se ale vlastně nutraceutika odlišují od běžných farmak? V případě, že nutraceutikum získalo atest a je puštěno do prodeje, není použití spojeno se zdravotně rizikovými vedlejšími efekty. Neexistuje (teoreticky) riziko návyku. A především - pokud nutraceutikum nepomůže, alespoň neuškodí. Nicméně, jsou skutečně nutraceutika bezpečná? Nikdy nelze zaručit, že určité nutraceutikum, byť i poměrně jednoduchého typu nebo případně tzv. "jednosložkové", bude účinné vždy a u každého. Je to přesně stejná situace jako v případě farmak. Vysvětlení spočívá v neustále se měnících podmínkách vnitřních i vnějších a v individualitě organismu.

Mezi významné látky, které lze řadit mezi nutraceutika, patří rozdílné skupiny metabolitů rostlin, jako fenolové kyseliny, lignany, fytosteroly, karotenoidy, glukosinoláty a mnoho dalších skupin, mezi které náleží i flavonoidy.

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Jsou odvozeny

od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem (Obr. 1). Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka. V některých případech (při technologickém zpracování při vyšších teplotách a v kyselém prostředí) může docházet k hydrolýze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů. V naší práci jsme se zaměřili na vypracování elektroanalytického stanovení quercetinu, quercitrinu, rutinu, diosminu a chrysinu na uhlíkové pastové elektrodě a tuto metodu použít na stanovení flavonoidů v složité biologické matici (jablko, moč).



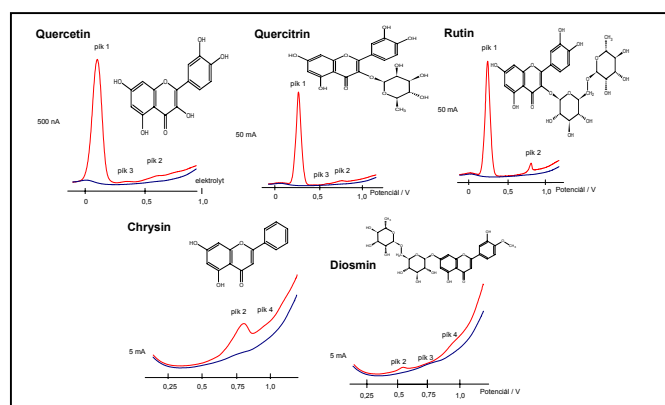
Obr. 1 Flavonoidní struktura, tvořená dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem.

MATERIÁL A METODIKA

NaH₂PO₄, Metanol, Diosmin, Chrysin, uhlíkový prášek a minerální olej byly dodány firmou Sigma Aldrich Corp. (USA). Rutin trihydrát a Quercitrin dihydrát byly dodány firmou Roth GmbH, Karlsruhe (Ger.). Na₂HPO₄ byla dodaná firmou Merck, Darmstadt (Ger.). Quercetin dihydrát byl dodán firmou Fluka chemie AG (USA). Všechny chemikálie byly ACS čistoty, stejně tak i voda (Sigma), ve které byly připraveny pracovní roztoky. Square-wave voltametrie byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Netherlands) v zapojení s tříelektrodovou celou VA–Stand 663 (Metrohm, Switzerland). Byla použita pracovní uhlíková pastová elektroda, referenční (Ag/AgCl, 3 M KCl) elektroda, a jako pomocná elektroda byla použita uhlíková tyčka. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo probíhalo v potenciálovém rozsahu od –0,1 V do 1,2 V s těmito parametry: potenciálový krok 1,95 mV, pulzní amplituda 49,85 mV. Jako základní elektrolyt jsme použili fosfátový pufr o pH = 7,0. Uhlíková pasta (asi 0.5 g) byla vyrobena z uhlíkového prášku a minerálního oleje (bez DNáz, RNáz, a proteáz). Poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje byl 70/30 (w/w). Pasta byla vložena do teflonového těla elektrody s průměrem plochy elektrody 2,5 mm. Před každým měřením byl povrch elektrody vždy obnoven, tedy očištěn od nečistot pomocí filtračního papíru.

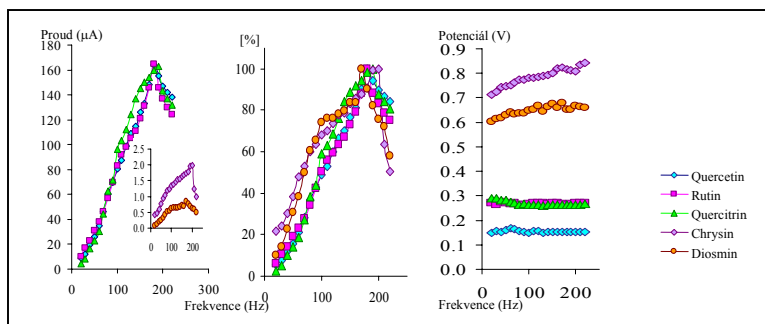
VÝSLEDKY A DISKUSE

V našich předešlých experimentech bylo zjištěno, že vysoký podíl organické složky zhoršuje elektrochemickou analýzu. Přesto byly standardy studovaných látek rozpouštěny v methanolu, neboť rozpustnost fenolických látek ve vodě je velmi nízká. Při studiu flavonoidů rozpouštěných v methanolu (96%) byl však podíl organické fáze v základním elektrolytu (2 ml) jen 0.1%, proto ovlivnění odezvy nebylo velké. Po přidavku flavonoidů do základního elektrolytu byly pozorovány na voltamogramech oxidační signály. Brettová popisuje signály pík 1 a pík 2 jako oxidace hydroxylové skupiny v poloze 7 flavonoidního skeletu (Obr.1) (Brett & Ghica, 2003). Při našich experimentech byly pozorovány další dva signály píky 3 a 4, které budou pravděpodobně souviset s oxidací hydroxylové skupiny v poloze 5 flavonoidního skeletu (Obr. 2). Pozorovali jsme, že pík 1 quercetinu byl při potenciálu 0,15 V a signály rutinu a quercitrinu při potenciálu 0,25 V. Potenciálový posun o 100 mV může být zapříčiněn přítomností sacharidové skupiny na flavonovém skeletu quercetinu. U chrysinu a diosminu byl elektrochemický signál výrazně potlačen. Předpokládáme, že to zapříčiňuje odlišná chemická struktura flavonoidu. U diosminu je vliv navázaného sacharidu nejpatrnější, jeho analytický signál byl nejnižší ze všech studovaných flavonoidů.



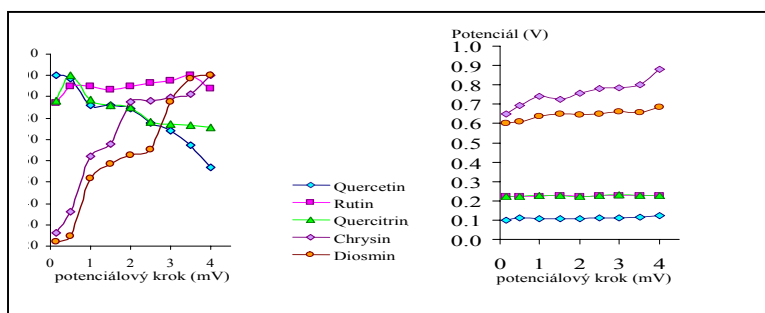
Obr. 2 Square-wave voltamogram 10 mM koncentrace a) quercetinu, b) quercitrinu, c) rutinu, d) chrysinu a e) 100 mM diosminu ve fosfátovém pufru o pH = 7,0 s těmito parametry: potenciálový krok 1,95 mV, pulzní amplituda 49,85 mV, potenciálové rozmezí od -0,1 V do 1,2 V.

Dále nás zajímal vliv frekvence na elektrochemickou odezvu. Sledovány byly změny, které se objevily u píku 1 pro látky rutin, quercetin, quercitrin a píku 2 pro chrysin a diosmin. Frekvence byla nastavena od 20 do 220 Hz. Se zvyšující frekvencí výšky píků rostly u všech studovaných látek. Na Obr. 3 jsou vidět křivky těchto závislostí. Všechny křivky mají maximum při frekvenci 180 nebo 190 Hz. (U všech studovaných látek při frekvenci 190 až 200 Hz došlo ke snížení.) Potenciálové pozice identifikovaných píků látek u quercetinu, rutinu a quercitrinu se téměř neměnily. U chrysinu a diosminu došlo se zvyšující frekvencí k lehkému posunutí do kladnějších potenciálových hodnot (Obr. 3). Frekvenci 180 Hz, při které měla většina studovaných látek maximální elektrochemickou odezvu, jsme použili při dalším měření.



Obr. 3 Změna výšky a pozice píku v závislosti na měněné frekvenci v rozsahu 20 až 220 Hz. Byla použita metoda Square-wave voltametrie. Parametry měření viz obr. 2

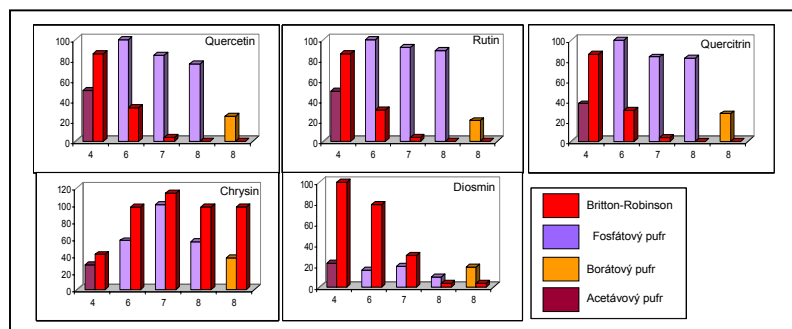
Dále bylo studováno chování uvedených látek při změně potenciálového kroku u Square-wave voltametrie. Zde se opět studoval první pík pro rutin, quercetin, quercitrin a druhý pík pro chrysin a diosmin. Potenciálový krok byl studován od 0,15 do 4 mV, po 0,5 mV. Zvýšení potenciálového kroku u quercetinu, quercitrinu způsobilo snížení proudové odezvy. Výška píku rutinu se téměř nezměnila. A odezvy píků chrysinu a diosminu s rostoucím potenciálovým krokem rostly. Závislosti pozice na změně potenciálového kroku měly stejný průběh jako u závislosti na frekvenci (Obr. 4). Z výše popsaných křivek závislosti byla vybrána jako nejvhodnější hodnota pro potenciálový krok 1,95 mV.



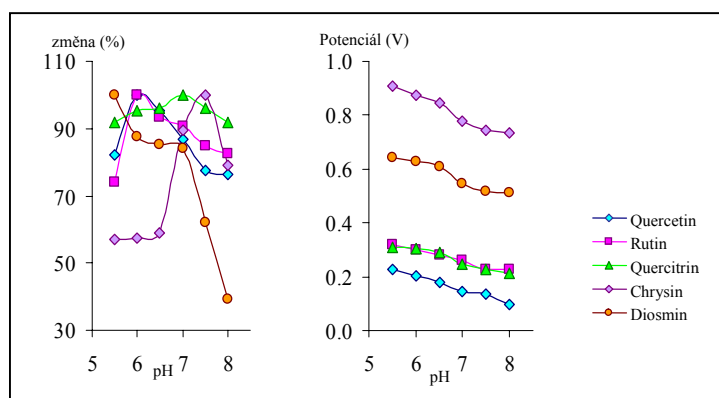
Obr. 4 Změna výšky (v procentech) a pozice píku v závislosti na potenciálovém kroku. Potenciálový krok se měnil v rozsahu 0.15 až 4 mV. Parametry měření viz obr. 3 + frekvence 180 Hz

Studium elektrochemických vlastností flavonoidních látek pokračovalo volbou vhodného elektrolytu a jeho pH. pH bylo studováno na universálním pufru Britton-Robinson (BR) v rozmezí pH 2 až 8, ve fosfátovém pufru v rozmezí pH 6 až 8, acetátový pufr o pH 4 a borátový pufr o pH 8. Na obrázku 5 je vidět porovnání výšky píku v závislosti na elektrolytu a jeho pH. U quercetinu, rutinu a quercitrinu je jasné vidět, že odezvy jsou nejvyšší za použití fosfátového pufru. U diosminu a ještě více u chrysinu je výška signálů u fosfátového pufru menší než za použití pufru Britton-Robinson, přesto však porovnání relativních výšek všech flavonoidů dohromady přesvědčivě převládá použití fosfátového pufru. Proto jsme studovaly fosfátový pufr a vliv jeho pH podrobněji. Měřili jsme flavonoidy v tomto pufru v rozmezí pH 5,5 až 8,0 se změnou 0,5 (Obr. 6). U quercetinu a rutinu bylo maximum při pH = 6,0, při vyšším pH docházelo ke snížení signálu. Quercitrin měl maximum při pH = 7,0, ovšem změny ve výšce byly nepatrné. U diosminu byl nejvyšší pík zaznamenán při pH = 5,5, při zvyšování pH docházelo k mírnému snižování signálu, ale při pH vyšším než 7,0 docházelo k prudkému snížení signálu. U chrysinu bylo maximum při pH = 7,5, poté také došlo k mírnému snížení. Zajímavé zjištění bylo posunutí potenciálových pozic u všech flavonoidů

zhruba o 0,1 V. Z našich měření po porovnání relativních výšek všech flavonoidů při různých pH fosfátového pufru vyšlo, že nejvhodnějším pH pro analýzu flavonoidů je pH = 7,0.



Obr. 5 Porovnání vlivů různých elektrolytů a jejich pH na výšku elektrochemického signálu. Podmínky měření viz obr. 4



Obr. 6 Změna výšky (v procentech) a pozice píku v závislosti na pH elektrolytu. Elektrolyt byl fosfátový pufr a pH se měnilo v rozsahu 5.5 až 8. Podmínky viz obr. 4

Dalším krokem bylo zjištění kalibračních závislostí flavonoidů. U všech stanovovaných látek byla vidět lineární závislost do určité koncentrace a při vyšších koncentracích už odezva rostla jen minimálně. V Tabulce 1 jsou znázorněny velikosti píků na koncentraci.

Tab. 1

c[mM]	Rutin výška (mA)	Quercetin výška (mA)	Quercitrin výška (mA)	Chrysin výška (mA)	c[mM]	Diosmin výška (mA)
10	81.65	119	82.68	5.29	200	0.894
5	76.85	67.3	66.5	1.28	100	0.55
2.5	43.2	35.7	51.97	0.617	50	0.311
1.25	23.2	17.55	26.486	0.163	25	0.127
0.625	10.465	8.18	15.7	0.079	12.5	0.06
0.3	4.59	3.8	7.5			
0.15	2.63	1.75	3.5			

V současné době probíhají pokusy stanovení flavonoidů v přítomnosti biologické matrice, konkrétně v jablečné slupce a moči. Ze zatím získaných výsledků je zřejmé, že stanovení flavonoidů není příliš ovlivněno biologickou maticí a byly stanoveny ve slupkách některých odrůd jablek.

ZÁVĚR

Elektrochemická detekce jako možnost stanovení flavonoidů je málo diskutovanou oblastí. Analytické stanovení flavonoidů se v současné době provádí především metodami chromatografickými a kapilární elektroforézou. Ovšem elektrochemické metody mají velkou výhodu v miniaturizaci a umožňují detekci látek *in vivo* bez usmrcení organismu. Byl proveden výzkum elektrochemického stanovení vybraných flavonoidů a metoda byla optimalizována. V současné době probíhají pokusy na stanovení flavonoidů v přítomnosti biologické matrice.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, INCHEMBIOL 0021622412, MŠMT 6215712402 a IGA MZLU 2348/F4a.

LITERATURA

- Brett, A.M.O. & Ghica, M.E. (2003). *Electroanalysis*, **15**, 1745-1750.
- Dixon, R.A. (2004). *Ann. Rev. Plant. Biol.*, **55**, 225-261.
- Escarpa, A. & Gonzales, M.C. (2001). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2**, 57-139.
- Ferguson, L.R. (2001). *Mut. Res.*, **475**, 89-111.
- Franke, A.A., Custer, L.J., Arakaki, C. & Murphy, S.P. (2004). *J. Food Compos. Anal.*, **1**, 1-35.
- Hodek, P., Trefil, P. & Stiborová, M. (2002). *Chem. Bio. Int.*, **139**, 1-21.
- Janeiro, P. & Brett, A.M.O. (2004). *Anal. Chim. Acta*, **518**, 109-115.
- Janout, V., Siroky, P., Novak, J., Cizek, L., Koukalova, H. & Beska, F. (2004). *Onkologie*, **27**, 376-379.
- Karimian-Teherani, D., Vutuc, C. & Janout, V. (2001). *Neoplasma*, **48**, 257-261.
- Klejdus, B., Sterbova, D., Stratil, P. & Kuban, V. (2003). *Chem. Listy*, **97**, 530-539.
- Komprda, T. *Základy výživy člověka*. MZLU Brno.
- Modrianský, M., Valentová, K., Přikrylová, V. & Walterová, D. (2003). *Chem. Listy*, **97**, 540-548.
- Robards, K. (2003). *J. Chrom. A*, **1-2**, 657-691.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). *J. Nutr.*, **8**, 2073S - 2085S.
- Slanina, J. & Táborská, E. (2004). *Chem. Listy*, 239-245.
- Smyth, W.F. & Brooks, P. (2004). *Electrophoresis*, **10-11**, 1413-1446.
- Suntornsuk, L. (2002). *J. Pharmaceut. Biomed.*, **5**, 679-698.
- Williams, C.A. & Grayer, R.J. (2004). *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 539-573.

Zoulis, N.E. & E., E.C. (1996). *Anal. Chim. Acta*, 255-261.

Hanustiak, P., R. Mikelova, et al.. (2005). *Biomed. Papers* **149**(Supplement 1): 44-47