

STANOVENÍ RUTINU S VYUŽITÍM UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY MODIFIKOVANÉ SILIKAGELEM

Simona Žabčíková, Milan Sýs, Libor Červenka a Marie Benešová-Balvínová

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 95, 532 10 Pardubice*

Abstract

Carbon paste electrode modified with 15 % wt. of silicagel was prepared for determination of rutin. The electrochemical behavior of rutin in electrolytes with different pH and appropriate assay condition were investigated using cyclic voltammetry. The effect of the presence of quercetin on the determination of rutin in model sample was evaluated. Square-wave voltammetry was used for quantification of rutin in model sample.

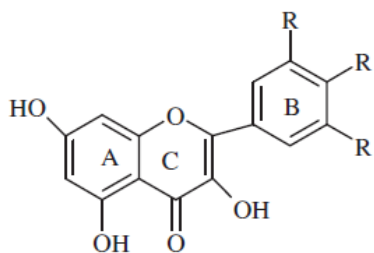
Souhrn

Byla připravena uhlíková pastová elektroda modifikovaná 15 % hm. silikagelu pro stanovení rutinu. Bylo zkoumáno elektrochemické chování rutinu v prostředí o různém pH a také vhodné podmínky stanovení. V práci byl také posuzován vliv přítomnosti kvercetinu na stanovení rutinu ve vzorku. Pro měření charakterizace byla použita metoda cyklické voltametrie, pro vlastní měření pak metoda square-wave voltametrie.

1. Úvod

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující organické sloučeniny. Jsou to přírodní barviva, rostliny je syntetizují z fenylalaninu, dávají barvu např. květům. Patří mezi přírodní antioxidanty, akceptory volných radikálů. Bylo identifikováno více než 4000 flavonoidních látek, které se liší strukturou, stupněm hydroxylace, funkčními substituenty, konjugací nebo stupněm polymerace, a dělí se na antokyany, flavony, flavonony, flavonoly, isoflavony a katechiny. Každý flavonoid obsahuje tři jádra označována jako A, B, a C (Obrázek 1) [1,2].

Rutin a kvercetin patří mezi jedny z nejrozšířenějších flavonoidů, řadí se mezi flavonoly, žluté pigmenty [3]. Vzhledem k tomu, že molekula rutinu se skládá z kvercetinu a disacharidu rutinose, vyskytují se tyto dva flavonoidy většinou v matrici vzorku společně, nicméně mohou navzájem rušit stanovení každého z nich. Rutin má široký rozsah fyziologických účinků na lidský organismus. Působí protizánětlivě, protinádorově, antibakteriálně, zvyšuje propustnost krevních vlásečnic a pomáhá k léčbě poškození žil a cév. Kvercetin má podobné



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidů

účinky jako rutin [4]. Ke stanovení flavonoidů bylo vyvinuto mnoho metod. Patří mezi ně např. kapilární elektroforéza [4], vysoko-účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS) [5], chromatografie na tenké vrstvě [6], UV-VIS spektrofotometrie [3,7] a další. Bylo také vyvinuto několik elektrochemických metod pro stanovení rutinu a flavonoidů. Ensafi a kol. využívali ke stanovení rutinu ve farmaceutických sloučeninách a čaji adsorptivní stripping voltametrii (AdSV) s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) [8]. Malagutti a kol. použili tuhou uhlíkovo-polyuretanovou kompozitní elektrodu (RCPE) při voltametrických měřeních ke stanovení rutinu v čaji [9]. Lin a kol. ke stanovení rutinu využívali uhlíkové pastové elektrody v kombinaci s vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (CPE/MWCN) [10]. Rutin a kvercetin poskytuje elektrochemickou odezvu také na obyčejné uhlíkové pastové elektrodě (CPE) [11]. V naší studii elektrochemického chování rutinu byla jako pracovní elektroda používána uhlíková pastová elektroda s 15 % hm. silikagelu. Silikagel byl do pasty přidáván pro zvětšení pracovního povrchu elektrody a tím zvýšení citlivosti měření. Obecně se uhlíkové pastové elektrody skládají z uhlíkového prášku o velikosti částic řádově v nm, a z vhodného pojiva, obvykle minerálního nebo silikonového oleje. Tyto dvě komponenty jsou smíchány v třecí misce a vzniklá homogenní pasta je vpravena do teflonového držáku s pístem. Výhodou uhlíkových elektrod je obnovitelný a snadno modifikovatelný pracovní povrch, široké potenciálové okno použití a nízké pozadí proudu. Naopak nevýhodou je pomalejší přenos elektronů při elektrodové reakci [12].

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Standardní roztoky rutinu a kvercetinu o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) byly připraveny rozpuštěním navážky látky v metanolu (Sigma-Aldrich). Základní elektrolyty, HCl o koncentraci 1 a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, a série Britton-

Robinsonových pufrů, byly připraveny z běžných chemikálií (Sigma-Aldrich). Pro přípravu všech roztoků byla použita čištěná voda (Milli-Q Reference, Merc-Millipore, Francie).

2.2. Instrumentace

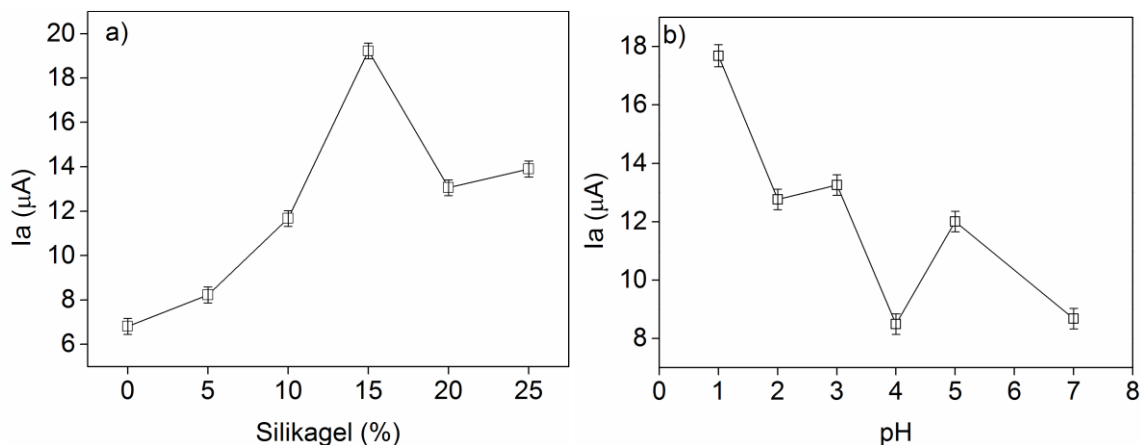
Všechna elektrochemická měření byla provedena s použitím elektrochemického rozhraní PalmSens (Houten, Nizozemí). Bylo použito tříelektrodevého zapojení s CPE nebo uhlíkovou pastovou elektrodou s 15 % silikagelu (CPE/15 % SG) (uhlík 5,5 – 7,0 μm , CR-5, Maziva Týn, Týn nad Vltavou; minerální olej M5904, Sigma-Aldrich; silikagel (5-25 μm , 60 Å), Sigma-Aldrich) jako pracovní elektrodou, platinovým drátkem jako pomocnou a chloridostříbrnou elektrodou ($\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{KCl} (3,0 \text{ mol.l}^{-1})$) jako referentní.

2.3. Cyklická a square-wave voltametrie (CV a SWV)

Experimenty byly prováděny v roztocích výše zmíněných elektrolytů s různou koncentrací rutinu, popřípadě kvercetinu. U většiny měření byly použity podmínky cyklické voltametrie: počáteční potenciál 0,0 V vs. ref., potenciál zvratu +1,0 V, konečný potenciál - 0,1 V, potenciálový skok 5 mV, rychlost skenu 50 mV.s^{-1} . U square-wave voltametrie bylo využíváno podmínek: počáteční potenciál -0,1 V, konečný potenciál +0,7 V, potenciálový skok 5 mV, rychlost skenu 25 mV.s^{-1} , frekvence 1 Hz, amplituda pulzu 25 mV.

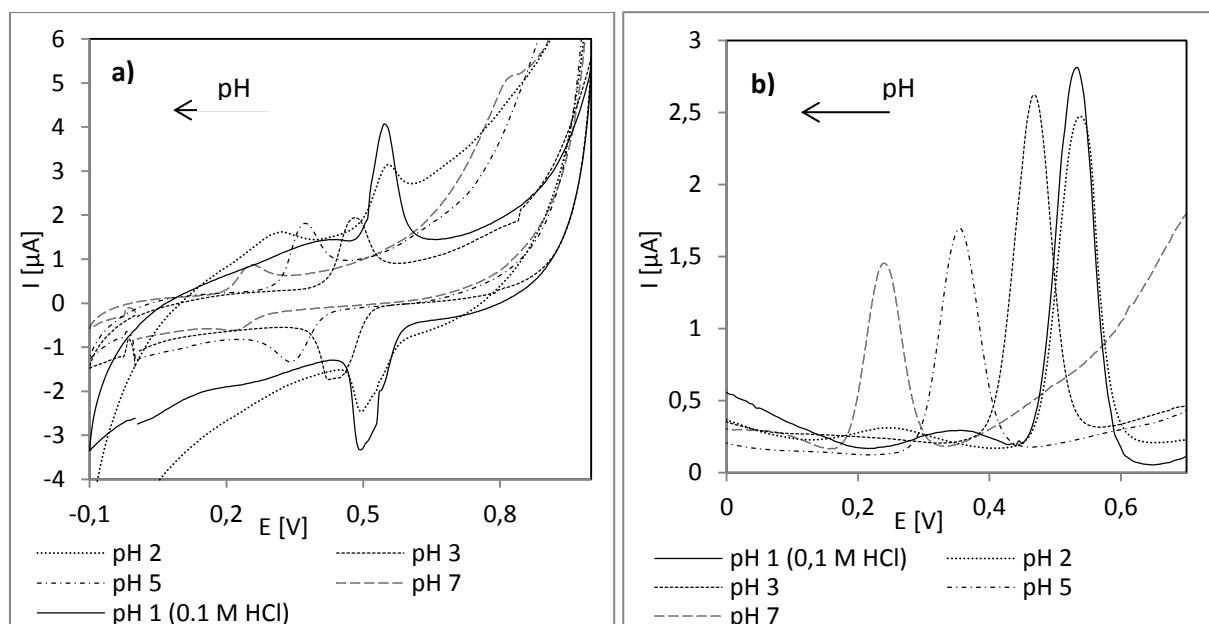
3. Výsledky a diskuze

Pomocí cyklické voltametrie bylo studováno elektrochemické chování rutinu v prostředí různých elektrolytů (0,1 M HCl a série Britton-Robinsonových pufrů) s použitím uhlíkových pastových elektrod (CPE) s různým obsahem silikagelu. Ze závislostí velikostí oxidačních proudů bylo provedeno jejich statistické vyhodnocení dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA), kde byly obsah silikagelu v pastě a pH elektrolytu použity jako faktory ovlivňující velikost oxidačního proudu (obrázek 2). Je patrné, že CPE s obsahem 15 % hm. silikagelu poskytuje nejvyšší signál v porovnání s ostatními použitými elektrodami, a to nezávisle na elektrolytu použitému k měření (obrázek 2a). Z elektrolytů byly nejvyšší signály zaznamenány v případě použití 0,1 M HCl (pH 1,0), v elektrolytech o pH 2,0 a 3,0 byl rozdíl v proudových odezvách elektrod statisticky nevýznamné ($p > 0.05$) (obrázek 2b). Oba sledované faktory měly výrazný vliv ($p < 0.001$) na velikost proudové odezvy elektrody v roztoku obsahující rutin, navíc existuje i významná interakce mezi obsahem silikagelu a použitým pH pracovního elektrolytu ($p < 0.001$).



Obrázek 2: Statistické vyhodnocení závislostí velikostí proudů oxidačních a redukčních proudových vln

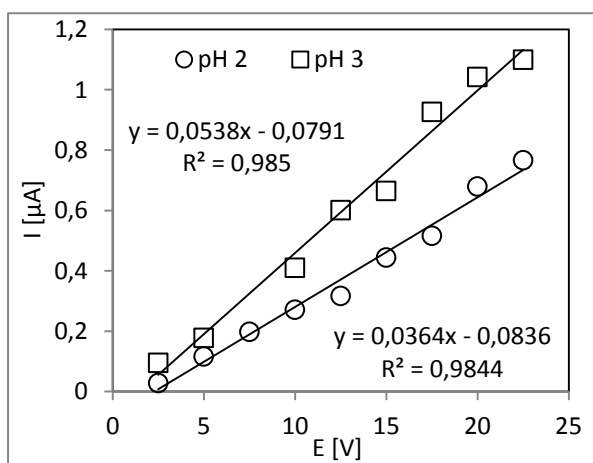
a) Závislost obsahu silikagelu v pastě, b) Závislost pH elektrolytu (dvoufaktorová ANOVA (n = 10))



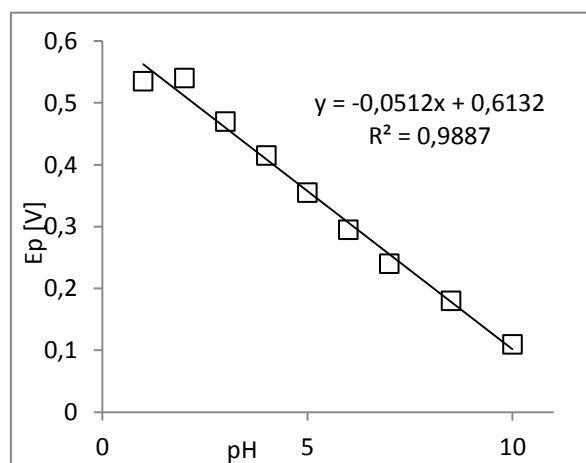
Obrázek 3: Vybrané záznamy a) rutinu na CPE/15% SG, CV; b) rutinu na CPE/15% SG, SWV: $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, 10 ml B-R pufru/0,1M HCl, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenů 5. Parametry SWV: E_{beg} : - 0,1 V, E_{end} : 0,7 V, E_{step} : 0,005 V, E_{amp} : 0,05 V, frekvence: 1 Hz.

Na obrázku 3a jsou znázorněny záznamy měření pomocí metody cyklické voltametrie. Je patrné, že s rostoucím pH se signál rutinu posunuje k zápornějším potenciálům a zároveň se snižuje výška proudové vlny. Totéž lze pozorovat při použití square-wave voltametrie (SWV) (Obrázek 3b).

Bylo zjištěno, že elektroda modifikovaná 15 % silikagelu poskytuje v prostředí 0,1 M HCl oxidační proudovou vlnu v oblasti cca +0,48 V. V této oblasti potenciálů dochází také k oxidaci kvercetinu, v jehož přítomnosti se tyto signály překryjí a nelze je rozlišit. Tato vlna také ruší stanovení rutinu. Z tohoto důvodu bylo dále k měření používáno Britton-Robinsonova pufru. Ze statistického vyhodnocení vyplývá pH 2 a 3 srovnatelné, nicméně bylo zvoleno pH 3, a to vzhledem ke směrnici kalibračních závislostí oxidačních vln rutinu v tomto elektrolytu (obrázek 4). Z kalibrační závislosti pH elektrolytu na potenciálu oxidační vlny rutinu (obrázek 5) lze usuzovat, že při elektrodové reakci je poměr vyměňovaných protonů a elektronů roven 1:1. Tato domněnka je v souladu s mechanismem reakce navrženým v literatuře (obrázek 6).

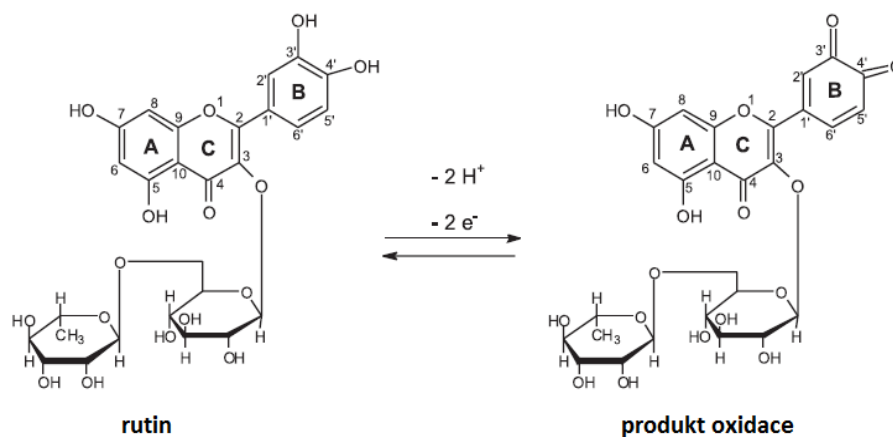


Obrázek 4: Kalibrační přímky rutinu v Britton-Robinsonově pufru pH 2 a pH 3. $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry SWV: E_{beg} : - 0,1 V, E_{end} : 0,7 V, E_{step} : 0,005 V, E_{amp} : 0,05 V, frekvence: 1 Hz.



Obrázek 5: Kalibrační závislost pH elektrolytu na potenciálu oxidační vlny rutinu. $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, 10 ml B-R pufru/0,1M HCl, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenů 5.

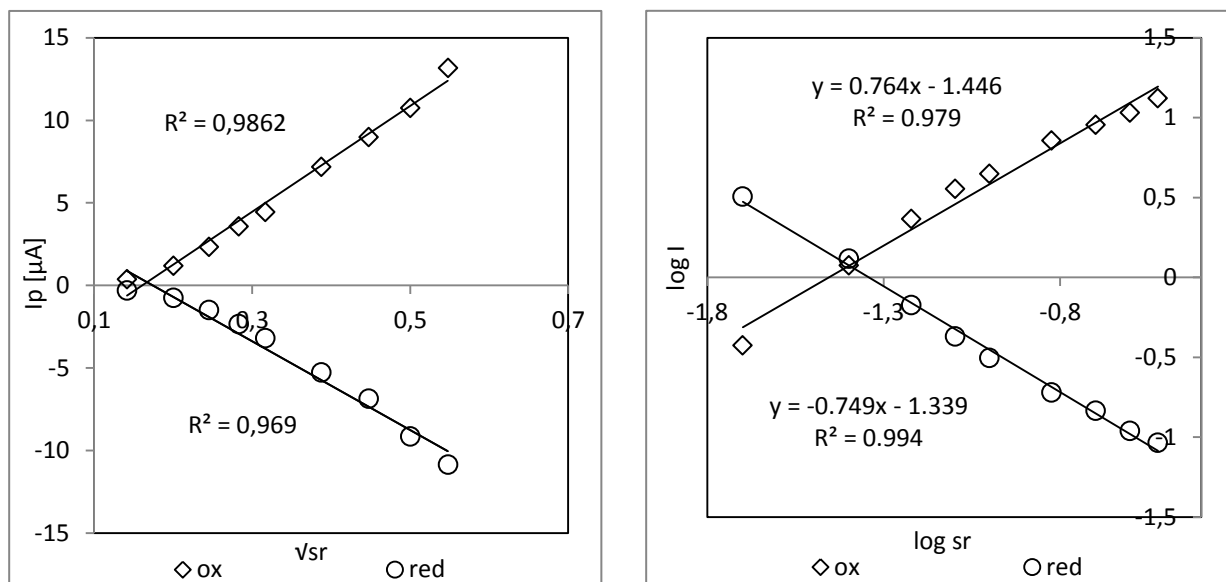
Linearita závislosti odmocniny skenovací rychlosti na proudové odezvě pro oxidační i redukční signál rutinu v BR pufru o pH 3 naznačuje, že proces je řízený difúzí (obrázek 7a). Nicméně, závislosti logaritmu skenovací rychlosti na logaritmu proudové odezvy oxidačních i redukčních vln rutinu, respektive směrnice těchto kalibračních přímek, poukazují na skutečnost, že proces je sice řízen převážně difúzí, nicméně je také částečně ovlivňován adsorpcí analytu na povrch pracovní elektrody (obrázek 7b).



Obrázek 6: Schéma elektrodové reakce rutinu [13]

Linearita závislosti odmocniny skenovací rychlosti na proudové odezvě pro oxidační i redukční signál rutinu v BR pufru o pH 3 naznačuje, že proces je řízený difúzí (obrázek 7a). Nicméně, závislosti logaritmu skenovací rychlosti na logaritmu proudové odezvy oxidačních i redukčních vln rutinu, respektive směrnice těchto kalibračních přímk, poukazují na skutečnost, že proces je sice řízen převážně difúzí, nicméně je také částečně ovlivňován adsorpcí analytu na povrch pracovní elektrody (Obrázek 7b).

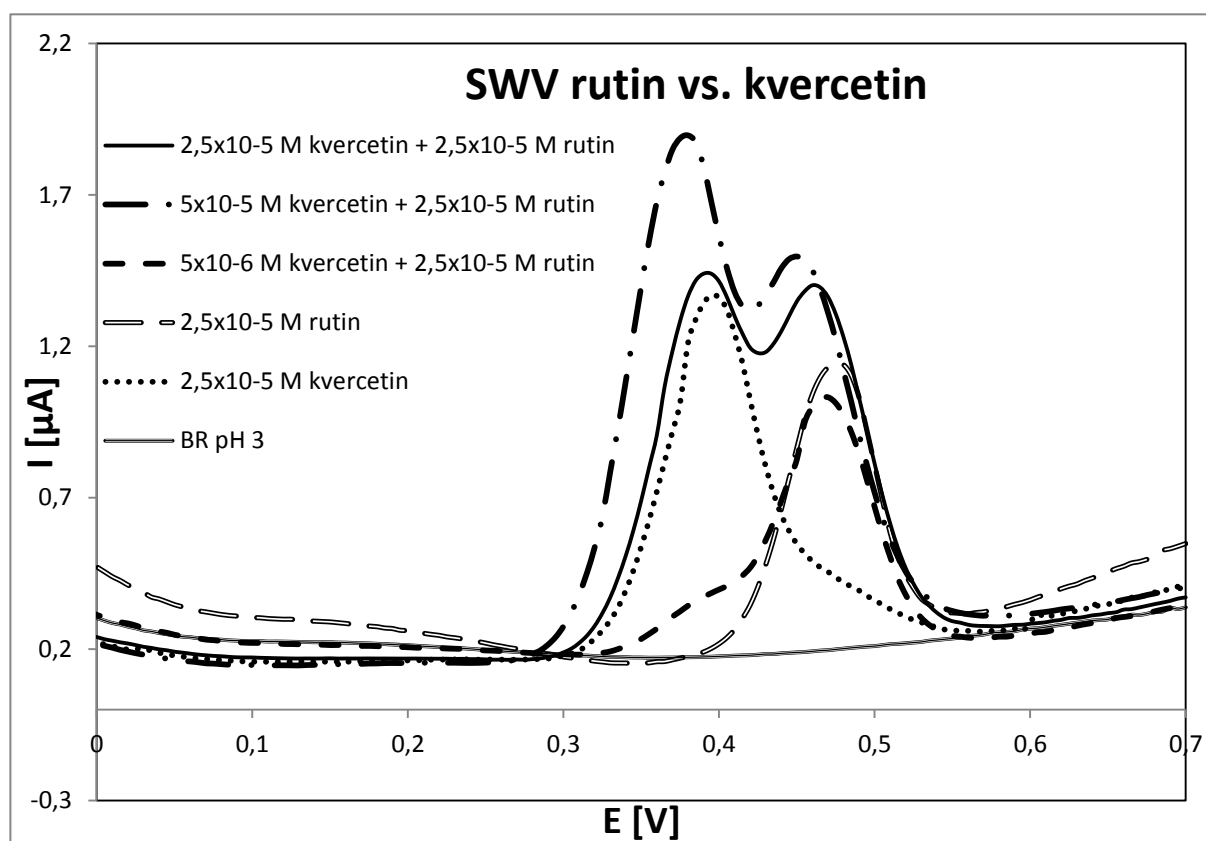
Na obrázku 8 jsou znázorněny square-wave voltamogramy rutinu a kvercetinů a jejich směsi v různém poměru. Při měření byla vždy konstantní daná koncentrace rutinu a byl porovnáván vliv množství přítomného kvercetinů na odezvu rutinu. Samotný kvercetin



Obrázek 7: a) Závislost odmocniny skenovací rychlosti na proudové odezvě, b) závislost logaritmu skenovací rychlosti na logaritmu proudové odezvy. $c_{\text{rutin}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referenční el.: Ag | AgCl | KCl (3,0 mol.l⁻¹), pomocná el.: platinový drátek. Parametry CV: Potenciálový rozsah - 0,1 až + 1,0 V, potenciálový skok 0,005 V, rychlost skenu 0,05 V.s⁻¹, počet skenů 5.

poskytuje oxidační signál při potenciálu +0,395 V (····), rutin při +0,480 V (- - -). V případě přítomnosti obou těchto flavonoidů v měřící cele dochází k posunu potenciálového maxima rutinu k zápornějším hodnotám, proudové odezvy pak odpovídají množství látek přítomných ve vzorku.

Z tabulky I vyplývá, že již přítomnost $5 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ kvercetinu v B-R pufru o pH 3 při měření CPE/15% SG snižuje citlivost elektrody na rutin, zároveň se snižuje mez detekce a kvantifikace. Pravděpodobně se jedná o jev v rámci statistické chyby měření. Se vzrůstající koncentrací kvercetinu se snižuje směrnice přímky závislosti. Z výsledků měření za přítomnosti jak kvercetinu tak rutinu lze usuzovat, že kvercetin do jisté míry ovlivňuje stanovení rutinu pomocí CPE/15% SG.



Obrázek 8: Square-wave voltamogramy rutinu a kvercetinu ve směsi

$c_{\text{rutin}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, 10 ml B-R pufru, pracovní el.: CPE/15% SG, referentní el.: Ag | AgCl | KCl ($3,0 \text{ mol.l}^{-1}$), pomocná el.: platinový drátek. $E_{\text{beg}}: 0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 0,7 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0,005 \text{ V}$, $E_{\text{amp}}: 0,05 \text{ V}$, frekvence: 1 Hz.

Tabulka I: Porovnání rovnic přímek z kalibračních závislostí, mezi detekce a kvantifikace při měření za přítomnosti kvercetinu i rutinu

mez detekce a kvantifikace - statistické vyhodnocení závislosti množství kvercetinu v BR pufru o pH 3 na odezvu rutinu v SWV, F-test (), $P < 0,001$, $c_{\text{rutin}} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

Složení vzorku	Rovnice přímky	Korelační koeficient	Mez detekce [μM]	Mez kvantifikace [μM]
$c_{\text{kvercetin}} = 0 \text{ mol.l}^{-1}$	$y=0.0441x-0.0869$	0.9593	-	-
$c_{\text{kvercetin}} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$	$y=0.0325x-0.0543$	0.9976	1.48	2.21
$c_{\text{kvercetin}} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$	$y=0.0272x-0.0843$	0.9258	8.24	12.36
$c_{\text{kvercetin}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$	$y=0.022x-0.0996$	0.9136	13.39	20.08

4. Závěr

Uhlíková pastová elektroda modifikovaná 15 % silikagelu je citlivá na přítomnost rutinu i kvercetinu. Kvercetin a rutin jsou ovšem obvykle v matrici reálného vzorku přítomny společně a odstranění veškerého kvercetinu je téměř nemožné. Vzhledem k této skutečnosti lze říci, že využití uhlíkové pastové elektrody modifikované 15 % silikagelu je pro stanovení rutinu v reálných vzorcích nevhodné.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Univerzity Pardubice (projekt SGSFChT č. 2016001).

Literatura

- [1] Masek A., Zaborski M., Chrzescijanska E.: Food Chem. **127** (2011) 699-704.
- [2] Volikakis G.J., Efstathiou C.E.: Talanta **51** (2000) 775-785.
- [3] Hassan H.N.A., Barsoum B.N., Habib I.H.I.: J. Pharm. Biomed. Anal. **20** (1999) 315-320.
- [4] Chen G., Zhang H., Ye J.: Anal. Chimica Acta **423** (2000) 69-76.
- [5] Bojarowicz H., Marszałł M.P., Wnuk M., Goryński K., Buciński A.: Anal. Lett. **44** (2011) 1728-1737.
- [6] Trineeva O.V., Safonova I.I., Safonova E.F., Slivkin A.I.: Pharmaceut. Chem. J. **48** (2014) 48- 52.
- [7] Xu H., Li Y., Tang H., Liu Ch., Wu Q.: Anal. Lett. **43** (2010) 893- 904,
- [8] Ensafi A.A., Hajian R.: Electroanalysis **18** (2006) 579-585.
- [9] Malagutti A.R., Zuin V.G., Cavalheiro É.T.G., Mazo L.H.: Electroanalysis **18** (2006) 1028-1034.
- [10] Lin X.Q., He J.B., Zha Z.G.: Sensor. Actuator. B Chem. **119** (2006) 608-614.

- [11] Zoulis N.E., Efstathiou C.E.: *Anal. Chimica Acta* **320** (1996) 255-261.
- [12] Švancara I., Kalcher K., Walcarius A., Vytrás K.: *Electroanalysis with carbon paste electrodes*. CRC Press, Boca Raton, 2012, 666 s.
- [13] dos Santos S.X., Mazo L.H., Cavalleiro É.T.G.: *J. Braz. Chem. Soc.* **19** (2008) 1600-1606.

