

Uniwersytet w Białymstoku  
Wydział Biologiczno-Chemiczny  
Instytut Chemii

**Jolanta Magnuszewska**

# **Elektrochemiczna detekcja wybranych flawonoidów w warunkach przepływowych z zastosowaniem „zimnych” i „gorących” mikroelektrod platynowych i złotych**

Streszczenie rozprawy doktorskiej wykonanej  
w Zakładzie Metod Fizykochemicznych Instytutu Chemii

Promotor pracy: dr hab. Tadeusz Krogulec, prof. UwB  
Recenzenci pracy: dr hab. Krzysztof Winkler, prof. UwB  
prof. dr hab. inż. Andrzej Sobkowiak, Politechnika Rzeszowska

**Białystok, 2008**

Głównym celem pracy było zbadanie przydatności kilku rzadko stosowanych lub też wręcz nowych elektrochemicznych metod detekcji z zastosowaniem mikroelektrod platynowych i złotych w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej (FIA) i elektroforezy kapilarnej (CE). Metody te zastosowano do oznaczania flawonoidów.

W części teoretycznej przedstawiono najważniejsze informacje o flawonoidach, ich rozpowszechnieniu w świecie roślinnym i zwierzęcym, właściwościach farmakologicznych i leczniczych. Na podstawie przeglądu literatury omówiono metody oznaczania flawonoidów - bez uprzedniego ich rozdzielania - z wykorzystaniem detekcji spektrofotometrycznej i technik elektrochemicznych, a także metody rozdzielania i oznaczania w elektroforezie kapilarnej. Następnie opierając się na nielicznych dostępnych pracach przedstawiono właściwości elektrochemiczne badanych flawonoidów. Omówiono również stosowane w pracy techniki detekcji elektrochemicznej: woltamperometrię cykliczną (CV), woltamperometrię fali prostokątnej z szybką transformacją Fouriera (FFT SWV) oraz chronopotencjometrię (CP). Te dwie ostatnie techniki są nowymi technikami oznaczania analitów intensywnie rozwijanymi w Zakładzie Metod Fizykochemicznych Uniwersytetu w Białymstoku. Teoretyczny opis metody wykorzystującej cykliczną chronopotencjometrię do detekcji różnego rodzaju analitów został szerzej przedstawiony w publikacjach w *Analytical Chemistry* [1] i *Journal of Chromatography A* [2].

W kolejnym rozdziale omówiono wpływ temperatury na procesy elektrodowe. Obszernie przedstawiono zagadnienia związane z grzaniem elektrod. Omówiono metodę zaproponowaną przez Gründlera i współpracowników [3, 4] oraz nową, inną metodę przedstawioną w pracy Barańskiego odnoszącą się do grzania mikroelektrod [5]. Opisano konstrukcję „gorących” elektrod, techniki grzania, zastosowanie tych elektrod w metodach analitycznych (elektrody Gründlera), a także sposoby wyznaczania temperatury elektrody i warstewki przyelektrodowej stosowane przez obu autorów.

Grzanie elektrod przedstawione przez Gründlera i współpracowników polega na stosowaniu prądu o wysokim natężeniu (powyżej 6 A) i częstotliwości 100 kHz, który płynie przez różnego rodzaju elektrody [6-8]. Gründler przedstawia dwie techniki grzania tych elektrod. Pierwszą z nich jest grzanie elektrody w taki sposób, by temperatura przez cały czas eksperymentu pozostawała stała [9]. Technika ta pozwalała przeprowadzać badania tylko w temperaturze poniżej punktu wrzenia roztworu. Drugi sposób to grzanie pulsowe TPV (Temperature Pulse Voltammetry) [10]. Technika ta przypomina woltamperometrię pulsową różnicową (DPV), ale w przeciwieństwie do niej w TPV występują pulsy grzania.

W pracy szczególną uwagę zwrócono na omówienie nowego sposobu grzania mikroelektrod, który zaproponował Barański [5]. Sposób grzania mikroelektrod przedstawiony w pracy [5] zastosowany został w moich badaniach. Metoda Barańskiego to ogrzewanie bardzo cienkiej warstewki przy powierzchni dyskowej mikroelektrody za pomocą prądu zmiennego o dużej amplitudzie do  $2 V_{\text{rms}}$  i wysokiej częstotliwości 0,1-2 GHz (1000 – 20 000 razy większej niż u Gründlera). Materiał mikroelektrody nie nagrzewa się, grzana jest bowiem warstewka roztworu przylegającego do elektrody, dzięki temu następuje wzrost powierzchniowej temperatury dyskowej

mikroelektrody. W roztworach wodnych powierzchniowa temperatura dyskowej elektrody o średnicy 25  $\mu\text{m}$  może wynosić nawet 225°C i być utrzymywana przez długi czas (powyżej 15 minut). Barański zaproponował oszacowanie temperatury warstwy przyelektrodowej na podstawie analizy logarytmicznej krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych przy bardzo małych szybkościach zmian potencjału.

W dalszej części pracy zamieszczono również podstawowe informacje dotyczące rozdzielania elektroforetycznego i detekcji elektrochemicznej w elektroforezie kapilarnej.

W części eksperymentalnej przedstawiono woltamperometryczne i chronopotencjo-metryczne krzywe dla kwercetyny i rutyny rejestrowane w warunkach przepływowych z zastosowaniem mikroelektrody platynowej i złotej. Oba anality powodują tylko niewielkie zmiany kształtu tych krzywych (*Rys.1 a*). Są one jednak mierzalne i można wykorzystać je do oznaczenia tych flawonoidów z wykorzystaniem obu mikroelektrod. We wszystkich badaniach jako elektrolit podstawowy wykorzystywano roztwór boraksu o stężeniu 0,04 M. W roztworze tym oznaczane anality uzyskują ładunek ujemny, dzięki czemu mogą być rozdzielane w elektroforezie kapilarnej.

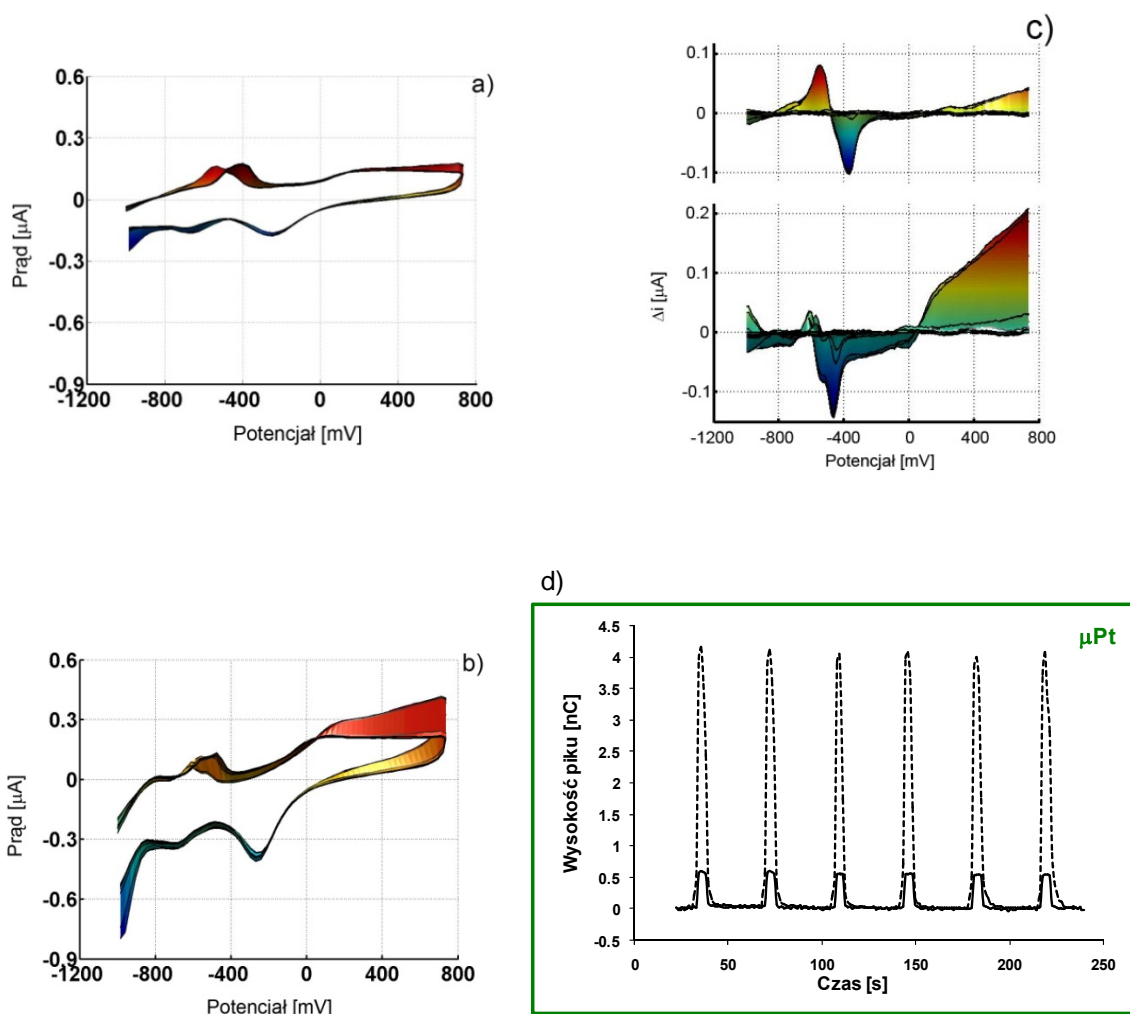
Zbadano też przydatność woltamperometrii cyklicznej, woltamperometrii fali prostokątnej z szybką transformacją Fouriera oraz chronopotencjometrii cyklicznej do ilościowego oznaczania kwercetyny i rutyny. Dla każdej z tych elektrochemicznych technik detekcji ustalono optymalne warunki oznaczania w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej z zastosowaniem obu mikroelektrod. Ustalono warunki detekcji wykorzystano do sporządzenia krzywych kalibracyjnych oraz wyznaczenia zakresów liniowości i granic wykrywalności badanych flawonoidów w warunkach FIA. W eksperymentach CV z zastosowaniem mikroelektrody platynowej w przypadku rutyny otrzymano zakres liniowości od  $8 \times 10^{-7}$  do  $5 \times 10^{-5}$  M, zaś dla mikroelektrody złotej od  $10^{-7}$  do  $10^{-6}$  M. Dla FFT SWV z zastosowaniem mikroelektrody złotej zakres jest szerszy niż w przypadku mikroelektrody platynowej i wynosi od  $8 \times 10^{-8}$  do  $5 \times 10^{-5}$  M. Zakresy liniowości dla CCP na mikroelektrodzie złotej wynoszą od  $10^{-7}$  do  $7,5-10 \times 10^{-6}$  M.

Granice wykrywalności (DL) obliczono na dwa różne sposoby. W pierwszym z nich wykorzystano odchylenie standardowe szumu (SD) i współczynniki kierunkowe (m) wyznaczone z krzywych kalibracyjnych, w drugim - stosunek sygnału do szumu (S/N) wyznaczony za pomocą programu „MicroVoltammetry-3” dla najniższego badanego stężenia analitu. W obu przypadkach otrzymano różne wartości granic wykrywalności. Bardziej wiarygodne wydają się wartości obliczone na podstawie odchylenia standardowego szumu. Najniższe stężenia kwercetyny i rutyny jakie można oznaczyć, otrzymano w detekcji na mikroelektrodzie złotej. Wynoszą one odpowiednio  $9,5 \times 10^{-11}$  i  $5,6 \times 10^{-11}$  M (w CV). Dla pozostałych technik detekcji otrzymano wyższe wartości DL.

Wybrane elektrochemiczne techniki detekcji zastosowano do oznaczania kwercetyny i rutyny rozdzielanych w warunkach CE. Na podstawie otrzymanych elektroferogramów sporządzono krzywe kalibracyjne. Wyznaczono granice wykrywalności, a także liczbę pól teoretycznych. Liniową zależność wysokości pików od stężenia obu analitów otrzymano w zakresie wyższych stężeń niż w warunkach FIA. Najniższe granice wykrywalności uzyskane na podstawie SD szumów wynoszą  $2,6 \times 10^{-8}$  M (0,01 fmol) dla rutyny i  $5,3 \times 10^{-8}$  M (0,02 fmol) dla kwercetyny (CV na  $\mu\text{Pt}$ ).

Zastosowanie FFT SWV i CCP (mikroelektroda Pt i Au) prowadzi do wyższych granic wykrywalności. Na podstawie elektroferogramów obliczono liczby pólek teoretycznych. Najwyższe wartości wydajności uzyskano dla kwercetyny w warunkach detekcji FFT SWV z wykorzystaniem elektrody platynowej (184 000).

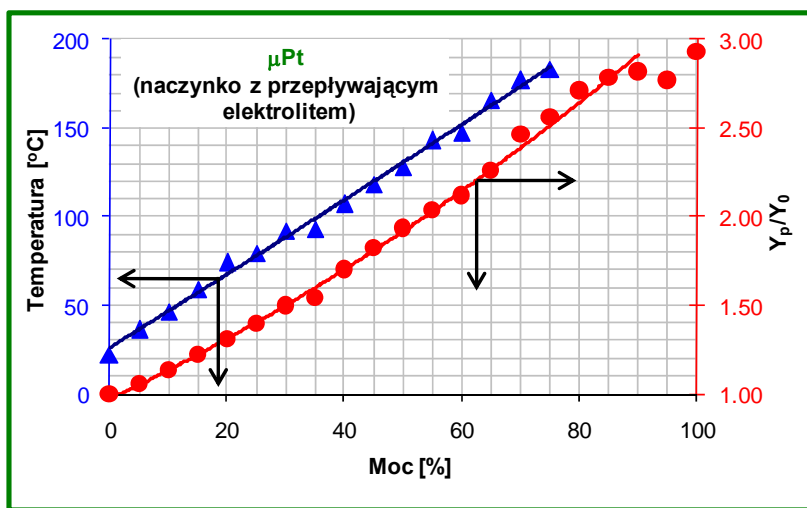
W dalszej części pracy przedstawiono badania dotyczące oznaczania kwercetyny i rutyny z zastosowaniem „gorących” mikroelektrod platynowych i złotych. Pod wpływem grzania następuje znaczny wzrost temperatury w warstewce przyelektrodowej. W technice CV z zastosowaniem „gorącej” elektrody platynowej obserwuje się znaczny wzrost prądu w obszarze tworzenia tlenku platyny w stosunku do elektrody „zimnej” (*Rys.1*).



**Rys.1.** Krzywe zmian natężenia prądu w funkcji potencjału rejestrowane na „zimnej” mikroelektrodzie platynowej (a), na „gorącej” mikroelektrodzie (b) oraz różnice zmian natężenia prądu w funkcji potencjału (c) (krzywa wyżej – „zimna”, krzywa niżej – „gorąca” mikroelektroda) w trakcie wstrzykiwania kwercetyny o stężeniu  $10^{-3}$  M do 0.04 M boraksu. d) piki wywołane wstrzykiwaniem kwercetyny o stężeniu  $10^{-3}$  M do 0.04 M boraksu na „zimnej” (linia ciągła) i „gorącej” (linia przerywana) mikroelektrodzie platynowej w warunkach FIA, detekcja CV. Szczegółowe warunki detekcji zamieszczono w rozprawie doktorskiej. Temperatura warstewki przyelektrodowej ok. 200°C.

Podobne zmiany widać też w przypadku elektrody złotej. Integracja w obszarze tych zmian pozwala otrzymać sygnały analityczne znacznie wyższe niż w eksperymentach z zastosowaniem „zimnych” elektrod. Zmiany admitancji czy potencjału obserwowano również w badaniach z zastosowaniem FFT SWV i CCP.

W tej części pracy dokładnie omówiono również zaproponowaną metodykę pomiaru temperatury. Temperaturę warstewki przyelektrodowej oszacowano na podstawie pomiaru wysokości pików redukcji tlenu platyny lub złota na krzywych CV oraz analizy logarytmicznej odpowiednich krzywych voltamperometrycznych. Jako parametr pozwalający określić temperaturę wykorzystano stosunek wysokości pików rejestrowanego na „gorącej” ( $Y_p$ ) do wysokości pików na „zimnej” ( $Y_0$ ) mikroelektrodzie w technice CV (**Rys.2**).



**Rys.2** Zależność  $Y_p/Y_0$  (●) oraz temperatury (▲) od mocy generatora grzania w 0.04 M boraksie na mikroelektrodzie platynowej (naczynko z przepływającym elektrolitem).  $Y_p$  – wysokość pików redukcji tlenu „gorącej” mikroelektrody,  $Y_0$  – wysokość pików redukcji tlenu „zimnej” mikroelektrody.

Korzystając z tej metody oszacowano temperaturę w roztworze boraksu w warunkach przepływowych. Stwierdzono, że możliwe jest osiągnięcie w warstewce przyelektrodowej temperatury powyżej 190°C.

W pracy przedstawiono też wpływ wielu czynników, między innymi częstotliwości i mocy generatora grzania, na efekt grzania, wzmocnienie sygnałów i szumów. W technice voltamperometrii cyklicznej z zastosowaniem mikroelektrody platynowej otrzymano najwyższe wzmocnienie sygnału. Dla kwercetyny zaobserwowano bowiem prawie 14-krotny wzrost sygnału na „gorącej” elektrodzie w stosunku do sygnału na elektrodzie „zimnej”, natomiast dla rutyny wzrost ten był aż 21-krotny. W przypadku zastosowania mikroelektrody złotej wzrost sygnału analitycznego był znacznie mniejszy niż na elektrodzie platynowej. W technikach FFT SWV i CCP wzmocnienie sygnału wynosiło dla kwercetyny od 2,5 do 4,0, a dla rutyny od 1,5 do 5,0, jednocześnie zaobserwowano znaczny wzrost szumów.

W kolejnym rozdziale porównano krzywe kalibracyjne sporządzone dla „zimnej” i „gorącej” mikroelektrody platynowej z zastosowaniem voltamperometrii cyklicznej i chronopotencjometrii cyklicznej w warunkach FIA. Zależności te prawie w całym zakresie badanych stężeń są liniowe, a odchylenia punktów pomiarowych dla wyższych stężeń rutyny z zastosowaniem „gorącej” elektrody najpewniej spowodowane są przegrzewaniem się roztworu w warstewce przyelektrodowej.

W pracy przedstawiono również wyniki otrzymane podczas rozdzielania kwercetyny i rutyny w elektroforezie kapilarnej z zastosowaniem detekcji na „zimnej” i „gorącej” mikroelektrodzie platynowej. W analizowanych próbkach - w roztworze wzorcowym i w próbkach naturalnych: ekstrakcie z pączków topoli (*Populus*) i z owoców rokitnika zwyczajnego (*Fructus Hippophaës Rhamnoides*) zidentyfikowano piki pochodzące od oznaczanych flawonoidów. Podczas badań z wykorzystaniem „gorących” mikroelektrod uzyskiwano wzmocnienia sygnałów od 1,3 do 2,5 dla kwercetyny i od 1,9 do 3,4 dla rutyny. Wzmocnienie to jest znacznie mniejsze niż w FIA, gdyż obecność kapilary w odległości od kilku do kilkudziesięciu mikrometrów od elektrody powoduje chłodzenie strefy gorącej. Niemożliwe staje się wtedy osiągnięcie wysokich temperatur. Na podstawie elektroferogramów zarejestrowanych z zastosowaniem detekcji na „gorącej” mikroelektrodzie platynowej oszacowano stężenia obu analitów w ekstrakcie z owoców rokitnika zwyczajnego. Stężenia kwercetyny i rutyny wynosiły odpowiednio  $3,7 \times 10^{-5}$  i  $1,6 \times 10^{-4}$  M.

Przeprowadzone i opisane w pracy badania pozwalają stwierdzić, że stosowane techniki detekcji są przydatne do oznaczania flawonoidów z zastosowaniem „zimnych” i „gorących” mikroelektrod platynowych i złotych w warunkach przepływowych (FIA oraz CE), również w próbkach naturalnych po uprzednim rozdzieleniu w CE.

#### Literatura:

1. A. Basa, J. Magnuszewska, T. Krogulec i A.S. Barański, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 6747
2. A. Basa, J. Magnuszewska, T. Krogulec i A.S. Barański, *J. Chromatogr. A*, 1150 (2007) 312
3. P. Gründler, A. Kirbs i T. Zerihun, *Analyst* 121 (1996) 1805
4. P. Gründler i A. Kirbs, *Electroanalysis*, 11 (1999) 223
5. A.S. Baranski, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1294
6. F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow i P. Gründlera, *Electroanalysis*, 19 (2007) 535
7. M. Jasinski, P. Gründler, G.U. Flechsig i J. Wang, *Electroanalysis*, 13 (2001) 34
8. O. Korbut, M. Buckova, J. Labuda i P. Gründler, *Sensors*, 3 (2003) 1
9. P. Gründler, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 180
10. T. Voß, A. Kirbs i P. Gründler, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 367 (2000) 320