

**UNIwersYTET W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ BIOLOGICZNO-CHEMICZNY**

Edyta Monika Nalewajko-Sieliwoniuk

**WYKORZYSTANIE ZJAWISKA CHEMILUMINESCENCJI
DO OZNACZANIA POLIFENOLI
W UKŁADACH PRZEPŁYWOWYCH**

(streszczenie)

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Chemii Analitycznej
Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku

Promotor pracy: dr hab. Anatol Kojło, prof. UwB

Recenzenci pracy: prof. dr hab. Krystyna Pyrżyńska (Uniwersytet Warszawski)

dr hab. Joanna Karpińska, prof. UwB

Białystok 2009

Założenia i cel pracy

Polifenole to duża grupa organicznych związków chemicznych z grupy fenoli, posiadających w cząsteczce przynajmniej dwie grupy hydroksylowe. Są to substancje powszechnie występujące w świecie roślin i należą do podstawowych składników naszej diety (ich codzienne spożycie szacuje się na poziomie około jednego grama). Polifenole roślinne ze względu na swoją budowę wykazują silne właściwości przeciwutleniające i chronią nasz organizm przed skutkami tzw. stresu oksydacyjnego. Są stosowane jako substancje aktywne wielu preparatów farmaceutycznych, kosmetyków opóźniających efekty starzenia się skóry, a także jako dodatki do żywności (tzw. żywność funkcjonalna). Część spośród polifenoli będących przedmiotem przedstawionych w rozprawie badań to związki biogenne (katecholaminy), które w naszym organizmie pełnią rolę ważnych neuroprzekaźników i hormonów. Zaburzenia metabolizmu tych związków prowadzą do groźnych chorób, m.in. nadciśnienia tętniczego i hiperglikemii. Ostatnia grupa badanych związków to proste fenole polihydroksylowe, które naturalnie występują w wodach powierzchniowych (są produktami przemiany materii i pochodzą z rozkładu roślin). Zwiększone stężenie tych substancji w środowisku związane jest z zanieczyszczeniem wód ściekami przemysłowymi. Zanieczyszczona woda nie nadaje się do celów konsumpcyjnych, ma nieprzyjemny smak i zapach, a jej spożywanie może być groźne dla zdrowia. Dlatego kontrola zawartości tych związków w środowisku jest ważnym problemem analitycznym.

Ze względu na wyżej omówione właściwości polifenoli oraz powszechność ich występowania i znaczenie dla zdrowia człowieka, podstawowym celem niniejszej rozprawy stało się opracowanie nowych, odpowiednio selektywnych i czułych metod oznaczania tej grupy związków w różnych próbkach rzeczywistych. Jest to szczególnie trudne zadanie analityczne w przypadku analizy próbek o bardzo złożonym składzie i zawierających bardzo małe ilości oznaczanych składników. W ostatnim czasie rosnącym zainteresowaniem analityków cieszą się metody analityczne wykorzystujące zjawisko chemiluminescencji. Charakteryzują się one bardzo niskimi granicami wykrywalności, szerokimi zakresami liniowości wykresów kalibracyjnych i nie wymagają skomplikowanej aparatury. Detekcję chemiluminescencyjną zazwyczaj stosuje się łącznie z techniką wstrzykowej analizy przepływowej (FIA), która zapewnia wysoką precyzję pomiarów, krótki czas analizy i umożliwia mechanizację i automatyzację procedur analitycznych. Jest to jednak detekcja niespecyficzna, w związku z czym podczas analizy materiałów o złożonym składzie łączy się ją *on-line* z takimi technikami rozdzielania jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) i elektroforeza kapilarna (CE).

Podstawowym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych przepływowych metod oznaczania substancji należących do różnych grup polifenoli (prostych fenoli polihydroksylowych, katecholamin oraz fenoli pochodzenia roślinnego) w próbkach rzeczywistych z wykorzystaniem

detekcji chemiluminescencyjnej. Badania prowadzono z zastosowaniem techniki wstrzykowej analizy przepływowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu *on-line* z przepływowym układem chemiluminescencyjnym. Polifenole oznaczano wykorzystując ich różny wpływ (wzmacnianie lub osłabianie) na chemiluminescencję powstającą podczas reakcji utleniania luminolu jodem i heksacyjanożelazianem(III) potasu oraz uczulaną formaldehydem reakcją redukcji manganu(IV). Przeprowadzone badania miały również na celu wyjaśnienie wpływu analizowanych związków na chemiluminescencję towarzyszącą reakcji utleniania luminolu oraz redukcji manganu(IV) oraz praktyczne zastosowanie zaproponowanych metod do ilościowego oznaczenia polifenoli w preparatach farmaceutycznych, próbkach o matrycy biologicznej (mocz, ekstrakty roślinne, produkty spożywcze) i środowiskowej (wody naturalne).

Opracowane metody zostały scharakteryzowane pod względem parametrów analitycznych, a otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej.

Badania własne i omówienie wyników

Reakcja utleniania luminolu jest jedną z najbardziej wydajnych reakcji chemiluminescencyjnych stosowanych w analizie chemicznej. Jest ona wykorzystywana do ilościowego oznaczania wielu substancji, które w istotny sposób wpływają na zwiększenie lub osłabienie intensywności emitowanego promieniowania. Opracowane metody oznaczania polifenoli opierają się na pomiarze zmian chemiluminescencji powstającej w wyniku reakcji utleniania luminolu za pomocą heksacyjanożelazianu(III) potasu i jodu. Do tej pory opublikowano kilka prac, w których jod został wykorzystany do utleniania luminolu, żadna z nich nie dotyczy oznaczania polifenoli. Badania prowadzono z wykorzystaniem techniki wstrzykowej analizy przepływowej (analiza preparatów farmaceutycznych i ekstraktów roślinnych) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej *on-line* z przepływowym układem chemiluminescencyjnym (analiza moczu i wód naturalnych).

Reakcję utleniania luminolu wykorzystano między innymi do opracowania przepływowych metod oznaczania katecholamin w preparatach farmaceutycznych. Zastosowanie jodu w charakterze utleniacza luminolu umożliwiło uzyskanie kilkudziesięciokrotnie niższych granic wykrywalności (0,15 – 0,34 ng/mL) w porównaniu do metody, w której luminol utleniano za pomocą heksacyjanożelazianu(III) potasu. Obie metody charakteryzują się wysoką powtarzalnością pomiarów ($RSD \leq 3,03\%$, $n = 15$) i są selektywne w stosunku do związków, które obok analitów są obecne w preparatach farmaceutycznych. Opracowane metody oznaczania katecholamin charakteryzuje wysoka dokładność, o czym świadczy ich zgodność z wynikami otrzymanymi metodami farmakopealnymi, wysoki odzysk wzorca dodanego do preparatu farmaceutycznego oraz wyniki testu *t*-Studenta. Biorąc pod uwagę prostotę stosowanych procedur, niski koszt analizy

i możliwość oznaczenia ponad 80 próbek w ciągu godziny, zaproponowane metody oznaczania katecholamin są konkurencyjne w porównaniu do metod chromatograficznych i mogą być zamiast nich stosowane w laboratoriach kontroli jakości leków.

Konieczność monitorowania śladowych stężeń katecholamin w płynach biologicznych wymaga stosowania bardzo specyficznych i czułych metod ich oznaczania. Skomplikowany skład matrycy organicznej powoduje, że oznaczanie katecholamin w moczu i we krwi przeprowadza się głównie metodami chromatograficznymi stosując czule techniki detekcji. Dotychczas opracowano niewiele prac dotyczących zastosowania połączenia HPLC-CL do jednoczesnego oznaczania śladowych ilości polifenoli. Przyczyną tego są trudności związane z wygaszaniem chemiluminescencji przez rozpuszczalniki organiczne wchodzące w skład faz ruchomych. Ponadto z przeglądu literatury wynika, że reakcja utleniania luminolu nie była do tej pory stosowana do pokolumnowego oznaczania katecholamin w płynach biologicznych. W związku z tym podjęto próbę wykorzystania zoptymalizowanej wcześniej (w układzie FIA-CL) reakcji utleniania luminolu jodem jako detekcji pokolumnowej w HPLC do oznaczania śladowych ilości katecholamin w próbkach moczu. W celu zwiększenia selektywności opracowanej metody anality najpierw wydzielano z moczu techniką ekstrakcji do fazy stałej, a potem rozdzielano w kolumnie RP-8 stosując elucję w warunkach izokratycznych. Wadą dotychczas opisanych w literaturze metod HPLC-CL, wykorzystywanych do jednoczesnego oznaczania katecholamin w próbkach biologicznych, jest konieczność ich wstępnego przekształcania w pochodne o właściwościach luminescencyjnych. Opracowana metoda nie wymaga przeprowadzenia procesu wstępnej derywatywacji analitów i umożliwia ilościowe oznaczanie katecholamin w próbkach moczu w zakresie stężeń: 5 – 48 ng/mL (adrenalina), 5 – 72 ng/mL (noradrenalina) i 5 – 96 ng/mL (dopamina) z dobrą dokładnością i precyzją.

Automatyzacja procedury wstępnego przygotowania próbki do analizy znajduje się w nurcie obecnych kierunków rozwoju chemii analitycznej. Jest to związane z krótszym czasem oznaczenia i mniejszym prawdopodobieństwem kontaminacji próbki. Wykorzystując chemiluminescencję układu luminol- I_2 opracowano nową wstrzykowo-przepływową metodę oznaczania ogólnej zawartości prostych fenoli di- i trihydroksylowych w wodach naturalnych z etapem ich wydzielania *on-line* w kolumnie ekstrakcyjnej wypełnionej sorbentem polimerowym Dowex Optipore L493. Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej umożliwiło usunięcie z badanej próbki wody rzecznej większości składników przeszkadzających i jednoczesne obniżenie granicy wykrywalności hydrochinonu z 0,016 ng/mL do $5 \cdot 10^{-3}$ ng/mL. Niestety wysokie stężenie substancji humusowych (kilkadziesiąt mg na litr) w analizowanej wodzie rzecznej (rzeka Biała, teren miasta Białystok) uniemożliwiło przeprowadzenie selektywnego oznaczenia sumy fenoli polihydroksylowych. Związki te ulegały koekstrakcji wraz z fenolami, powodując zwiększenie wysokości uzyskiwanych sygnałów

analitycznych. W celu zwiększenia selektywności metody i wyeliminowania interferencji pochodzących od substancji humusowych, detekcję chemiluminescencyjną w układzie FIA-CL poprzedzono etapem rozdzielania analitów *on-line* w kolumnie chromatograficznej RP-18. Jako fazę ruchomą zastosowano układ rozpuszczalników metanol:woda (2:98, v:v) z dodatkiem 0,5% kwasu fosforowego(V). Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką precyzją ($RSD \leq 2,69\%$) i dokładnością (średni odzysk wzorców z próbek wody rzecznej wyniósł 97,5 – 98,6 %) oraz najniższymi wartościami granic wykrywalności spośród dotychczas opisanych w literaturze metod oznaczania hydrochinonu i pirokatechiny (wynoszą one odpowiednio 0,049 ng/mL i 0,36 ng/mL). Może być zatem stosowana do jednoczesnego oznaczania śladowych stężeń obu analitów w obecności dużego nadmiaru substancji humusowych w skomplikowanej matrycy środowiskowej.

Ze względu na wysoką zapadalność ludzi na choroby u podłoża których leży stres oksydacyjny, obecnie intensywnie poszukuje się nowych surowców roślinnych, które mogą być bogatym źródłem przeciwutleniaczy. Celem badań, opisanych w kolejnym rozdziale części doświadczalnej rozprawy, było wykorzystanie zjawiska osłabiania chemiluminescencji układu luminol- I_2 przez pochodne kwasu cyjanonowego (kwas kawowy i 6'-kawoiloerigerozyd) do opracowania wstrzykowo-przepływowych metod oznaczania ogólnej zawartości związków polifenolowych w roślinie *Erigeron acris* L (przymiotna ostre, rodzina Astrowate). Roślina ta powszechnie występuje na terenie całej Polski. Do tej pory stosowana była jedynie w medycynie ludowej w leczeniu bólu zębów i bólów artretycznych. Badaniami objęto rozfrakcjonowane wyciągi metanolowe z korzeni, liści i koszyczków *E. acris*. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że badana roślina, a w szczególności jej liście i kwiatostany, zawiera duże ilości polifenolowych przeciwutleniaczy. Może być zatem stosowana w profilaktyce i leczeniu chorób o etiologii wolnorodnikowej. Ponadto zaobserwowano dodatnią korelację między ogólną zawartością polifenoli w poszczególnych częściach *E. acris* a ich aktywnością przeciwutleniającą, którą oznaczono z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej z syntetycznym rodnikiem DPPH \cdot . Chemiluminescencyjna metoda oznaczania sumy polifenoli w ekstraktach roślinnych (a pośrednio ich aktywności przeciwutleniającej) realizowana w układzie wstrzykowo-przepływowym jest szybka, precyzyjna i dokładna. Pod względem wykrywalności i selektywności znacznie przewyższa parametry analityczne większości dotychczas przedstawionych w literaturze metod, zwłaszcza tych spektrofotometrycznych.

Celem podjętych w rozprawie badań było także wyjaśnienie wpływu związków polifenolowych na chemiluminescencję towarzyszącą reakcji utleniania luminolu w środowisku zasadowym za pomocą $K_3[Fe(CN)_6]$ i I_2 . Na podstawie przeprowadzonych badań oraz danych zawartych w literaturze stwierdzono, że zjawisko osłabiania chemiluminescencji przez badane związki jest najprawdopodobniej efektem kilku różnych procesów zachodzących w mieszaninie

reakcyjnej: konkurencyjną reakcją analitów z zastosowanymi utleniaczami, wychwytywaniem rodników biorących udział w reakcji utleniania luminolu lub wygaszaniem wzbudzonych jonów 3-aminofalanu, które są emiterem promieniowania. Zjawisko wzmacniania chemiluminescencji zaobserwowano jedynie po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej roztworów katecholamin. Polifenole w środowisku zasadowym ulegają reakcji samorzutnego utlenienia pod wpływem tlenu zawartego w roztworze, podczas której powstają między innymi anionorodniki nadtlenkowe. Zjawisko wzmacniania chemiluminescencji może być więc spowodowane dodatkowymi ilościami rodników $O_2^{\cdot-}$, które są generowane w układzie i które biorą udział w chemiluminescencyjnej reakcji utleniania luminolu. Ponadto, utlenianie katecholamin w środowisku zasadowym prowadzi do powstawania produktów o właściwościach fluorescencyjnych (trihydroksyindoli). Mogą być one akceptorami energii wzbudzenia, którą następnie przekazują na aniony kwasu 3-aminofalanowego.

W ostatnim rozdziale części doświadczalnej rozprawy przedstawiono badania związane z analitycznym wykorzystaniem chemiluminescencji powstającej podczas reakcji utleniania polifenoli roztworem manganu(IV) w środowisku kwaśnym. Badania te uznano za celowe, ze względu na fakt, że odczynnik ten jest od niedawna wykorzystywany w analizie chemiluminescencyjnej. Zaproponowane nowe wstrzykowo-przepływowe metody oznaczania katecholamin i kwasu galusowego, realizowane w układzie mangan(IV)-formaldehyd-analit, pod względem czułości okazały się być porównywalne z opracowanymi wcześniej metodami oznaczania tych związków w układzie luminol- I_2 . Charakteryzują się jednak znacznie szerszym zakresem liniowości wykresu kalibracyjnego, lepszą odtwarzalnością ($RSD \leq 3,87\%$) i dwukrotnie większą ilością wykonywanych pomiarów w jednostce czasu. Użyteczność opracowanych metod została potwierdzona w wyniku oznaczania adrenaliny i dopaminy w preparatach farmaceutycznych oraz sumy związków polifenolowych (w przeliczeniu na kwas galusowy) w różnych produktach spożywczych (winach, sokach owocowych, naparach różnych gatunków herbaty). Przeprowadzono również badania, których celem było wyjaśnienie roli jaką związki polifenolowe pełnią w chemiluminescencyjnej reakcji redukcji manganu(IV).