

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ TŘÍ ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ OBSAHU RUTINU V POHANCE TATARSKÉ

LENKA ŠTOČKOVÁ, EVA MATĚJOVÁ,
DAGMAR JANOVSKÁ a SVĚTLANA SÝKOROVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507,
Praha 6
stockova@vurv.cz

Došlo 22.2.08, přepracováno 3.10.08, přijato 5.12.08.

Klíčová slova: pohanka, rutin, porovnání metod

Úvod

Rutin (quercetin-3-rutinosid), někdy nazývaný vitamín P, je nejčastěji se vyskytující glykosidickou formou quercetinu¹. Tato látka je vyššími rostlinami syntetizována jako obrana vůči ultrafialovému záření a chorobám². Rutin jako sekundární metabolit rostlin se používá k léčení zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic způsobených různými chorobami (chorobná krvácivost na podkladě cévním, změny na sítnici při cukrovce, při nedostatku vitamínu C)³. Velmi významná je také jeho antioxidační účinnost – tj. schopnost působit proti volným radikálům^{3–5}. Z chemického hlediska se jedná o diglukosid polyfenolu quercetinu.

V současné době je za hlavní zdroj rutinu v dietě považována pohanka, a to zejména druhy pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*) a pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*)¹. Pohanka dále obsahuje v menším množství i jiné flavonoidy – jmenovitě quercetin, kaempferol nebo kaempferol-3-rutinosid⁷ – které jsou rutinu strukturně podobné a také vykazují antioxidační účinky.

Existuje již mnoho studií zabývajících se obsahem rutinu v pohance a jiném rostlinném materiálu. Mezi často používané metody patří především spojení kapalínové chromatografie s UV detekcí^{1,2,5,6,9,11}, spektrofotometrické metody^{4,7,9,10} nebo v menší míře i elektrochemické metody^{12,13}.

Problémem spektrofotometrických metod mohou být interference s jinými strukturně podobnými látkami – zejména s quercetinem – a následné nadhodnocení výsled-

ků. Cílem této studie je porovnat výsledky tří analytických metod pro stanovení rutinu. Byla zvolena metoda chromatografická, kde nejsou žádné interference předpokládány. Dále byla vzhledem k četnosti použití srovnávána metoda spektrofotometrická za použití $AlCl_3$ a spektrofotometrická metoda pro stanovení rutinu dle AOAC, která je však apriori určena pro rutin v čisté, např. lékové formě.

Experimentální část

Materiál

Pro studii byl použit rostlinný materiál pohanky tatarské různého geografického původu (viz tab. I). Vzorky byly získány z Genové banky VÚRV, v. v. i. v Praze Ružyni, kde byly rostliny pěstovány na pokusných pozemcích. Pro analýzu byly použito max. 10 rostlin od každé varianty. Část rostlin byla rozdělena na jednotlivé partie (stonky, listy, nažky). Část rostlin byla ponechána nerozdělena a dále je označována jako celá rostlina. Vzorky byly sušeny v sušárně s nuceným oběhem vzduchu při 50 °C cca 96 hodin a poté byly jednotlivé partie jemně namlety na laboratorním mlýnku na částice o velikosti zhruba 0,01 mm.

Dále byly používány tyto látky: standard rutinhydrátu (Sigma Aldrich, SRN), chlorid hlinitý (Merck, SRN), kyselina octová 99,7+ % (Sigma Aldrich, SRN), voda pro chromatografii (Merck, SRN), methanol gradient grade (Merck, SRN).

Tabulka I
Analyzovaný materiál

Ozn.	Druh	Původ
A	<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	Bhutan
B	<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	USA
C	<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	neznámý

Metody

Příprava vzorku

0,5 g umletého rostlinného materiálu (stonky, listy, semena, celé rostliny) bylo extrahováno 10 ml roztoku methanol : kyselina octová : voda 100:2:100 (v:v:v) 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. 2 ml extraktu byly centrifugovány 10 min při 9000 ot min⁻¹. Čirý supernatant byl zfiltrován přes mikrofiltr s regenerovanou celulóзовou membránou s velikostí pórů 0,22 μm.

Kapalinová chromatografie s UV detekcí¹⁴; dále jen HPLC/UV

Filtrát byl analyzován na kapalinovém chromatografu Waters Alliance 2690 (kolona Lichrospher 100RP-18 5 μm , 250 \times 4 mm) a eluován gradientovou elucí směsí methanolu (A) a vody (B) v prostředí 2% kyseliny octové. Gradient měl následující průběh: 0–2 min 20 % A, 2–4 min lineární vzestup na 60 % A, 6–8 min 60 % A, 8–10 min 20 % A.

Analyt byl detegován UV spektrometrem Waters 2487 při vlnové délce 355 nm v čase $R_t = 6$ min. Mez detekce byla u této metody stanovena na 0,05 mg ml^{-1} . Kvantifikace byla provedena metodou vnějšího standardu – kalibrační křivky. Odezva detektoru byla lineární v rozsahu koncentrací 0,1–1 mg ml^{-1} a pokud byl obsah rutinu ve vzorku mimo rozsah linearitu, byl vzorek vhodně zředěn extrakčním činidlem. Opakovatelnost této metody vypočtená jako relativní směrodatná odchylka osmi opakování byla 4,6 %.

Spektrofotometrická metoda využívající AlCl_3 (cit.¹); dále jen SPFM

40 μl supernatantu používaného pro stanovení HPLC/UV bylo 50 \times zředěno extrakční směsí. K takto zředěnému extraktu bylo přidáno 0,2 ml 5% AlCl_3 v methanolu nebo 0,2 ml čistého methanolu pro zjištění absorbance pozadí. Po třicetiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při vlnové délce 420 nm u obou roztoků. K měření byl používán spektrofotometr Genesys 10UV.

Limit detekce byl stanoven na 0,001 mg ml^{-1} . Obsah rutinu byl kvantifikován metodou vnějšího standardu – kalibrační křivky z hodnoty rozdílu absorbance vzorku a pozadí. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu koncentrací 0,002–0,02 mg rutinu ml^{-1} . Opakovatelnost jako relativní směrodatná odchylka osmi opakování byla 5,3 %.

Spektrofotometrická metoda podle AOAC⁶ (Association of Official Analytical Chemists); dále jen dle AOAC

Supernatant používaný pro HPLC byl 50 \times zředěn směsí methanol : kyselina octová : voda 11:1:8 (v:v:v). Poté byla měřena na spektrofotometru Genesys 10UV absorbance při 352,5 nm a 366,5 nm. Koncentrace rutinu byla vypočtena dle soustavy následujících rovnic.

$$A_{366,5} = \left(A_{R,366,5} \times r / 0,02 \right) + \left(A_{Q,366,5} \times q / 0,01 \right)$$

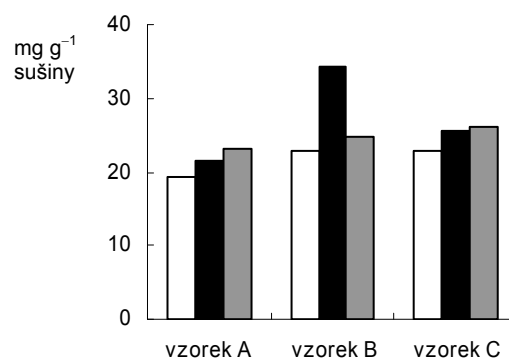
$$A_{352,5} = \left(A_{R,352,5} \times r / 0,02 \right) + \left(A_{Q,352,5} \times q / 0,01 \right)$$

kde A je absorbance vzorku při dané vlnové délce, $A_{R'}$ jsou absorbance standardního roztoku rutinu ($c = 0,02 \text{ mg ml}^{-1}$) při dané vlnové délce, jak je uvedeno v příslušném dolním indexu a $A_{Q'}$ jsou absorbance standardního roztoku quercetinu ($c = 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$). Písmena r, q značí koncentraci rutinu resp. quercetinu v analyzovaném vzorku v mg ml^{-1} .

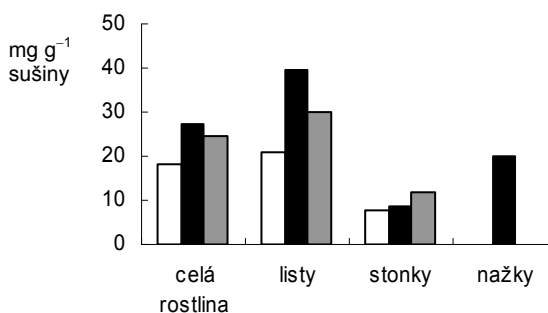
Limit detekce byl stanoven na 0,002 mg rutinu ml^{-1} . Opakovatelnost jako relativní směrodatná odchylka osmi opakování byla 5,2 %.

Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena počítačovými programy Excel a MultiQC 5. Metody stanovení rutinu byly graficky porovnány pomocí x-y grafu rozptylu¹⁵, s využitím programu MultiQC 5. Soubory dat příslušící jednotlivým metodám byly testovány na shodnost středních hodnot párovým oboustranným t-testem vždy pro každou část rostliny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a shodnost výsledků všech tří metod byla ověřována jednofaktorovým testem ANOVA na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro dvojice souborů dat byly stanoveny korelační koeficienty.



Obr. 1. Celkový obsah rutinu [mg g⁻¹ sušiny] ve třech vzorcích pohanky tatarské různého geografického původu (viz tab. I); □ stanovení HPLC/UV, ■ spektrofotometrické stanovení s AlCl_3 , ▒ spektrofotometrické stanovení podle AOAC



Obr. 2. Porovnání obsahu rutinu [mg g⁻¹ sušiny] v jednotlivých částech rostlin; □ stanovení HPLC/UV, ■ spektrofotometrické stanovení s AlCl_3 , ▒ spektrofotometrické stanovení podle AOAC

Výsledky a diskuse

Byl stanoven obsah rutinu v jednotlivých částech rostlin i v celých rozemletých rostlinách (tzv. celkový rutin), vždy ve třech opakováních na třech nezávislých vzorcích (tab. II).

Celkový obsah rutinu se mezi jednotlivými variantami pohanky tatarské významně neliší; nejvyšší celková koncentrace rutinu ($19,01 \text{ mg g}^{-1}$ sušiny metodou HPLC/UV) byla zaznamenána u vzorku B *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. původem z USA (obr. 1). Velké rozdíly v obsahu rutinu jsou však mezi jednotlivými částmi rostliny. Nejvyšší koncentrace rutinu byla stanovena v listech pro všechny tři varianty a naopak stonky vždy obsahují výrazně menší množství rutinu (obr. 2), což odpovídá výsledkům již uveřejněných studií^{1,3,14}.

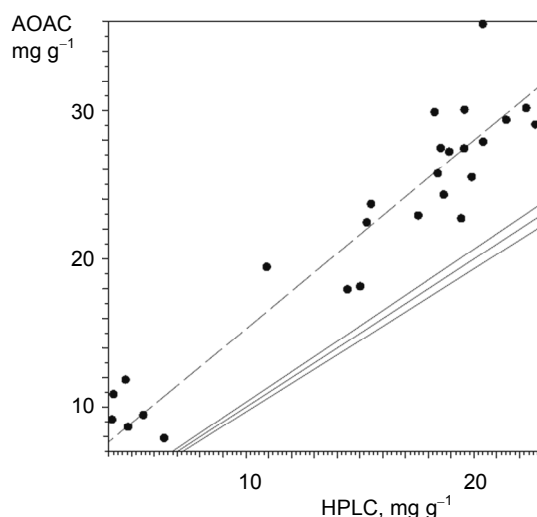
V semenech rostlin byl obsah rutinu stanovený metodou HPLC/UV pod mezí detekce a stanovení dle AOAC dávalo dokonce záporné výsledky, což naznačuje, že v případě nižších hladin rutinu, zvláště ve spojení s vyšším obsahem interferentů, není možné tuto metodu použít.

Spektrofotometrickou metodou využívající AlCl_3 byl však průměrný obsah rutinu stanoven na 20 mg g^{-1} sušiny. Vzhledem k tomu, že obsah rutinu je podle obou výše uvedených metod nulový, je pravděpodobné, že se na této hodnotě podílí jiné látky než rutinový komplex s Al^{3+} , taktéž absorbující při vlnové délce 420 nm .

V literatuře je uváděn obvyklý obsah rutinu v semenech v mezích 0,8 a 1,7 % sušiny¹¹. Pro rozdíl mezi literárními a naměřenými údaji nebylo nalezeno jednoznačné vysvětlení, možné je, že za skladovacích podmínek analyzovaných materiálů (bez přístupu světla, relativní

vlhkost do 40 % a laboratorní teplota po dobu tří měsíců) proběhly v semenech chemické změny, konkrétně přeměna rutinu na jinou látku (např. quercetin), kterou méně specifická metoda (spektrofotometrická s AlCl_3) stanoví jako rutin.

Při analýze listů rostlin byl obsah rutinu stanovený SPFM oproti výsledkům HPLC/UV vyšší o 70–120 %. Metoda dle AOAC nadhodnocovala méně v rozsahu 30 až 50 %.



Obr. 3. Grafické porovnání metod stanovení rutinu pomocí x-y grafu rozptylu pro metodu HPLC/UV (HPLC) a spektrofotometrické stanovení dle AOAC (AOAC); --- přímka rovnosti, — přímka rovnosti s vymezeným pásem spolehlivosti (± 2 standardní odchylky metody HPLC/UV)

Tabulka II

Obsah rutinu [mg g^{-1} sušiny] ve třech vzorcích pohanky tatarské různého geografického původu

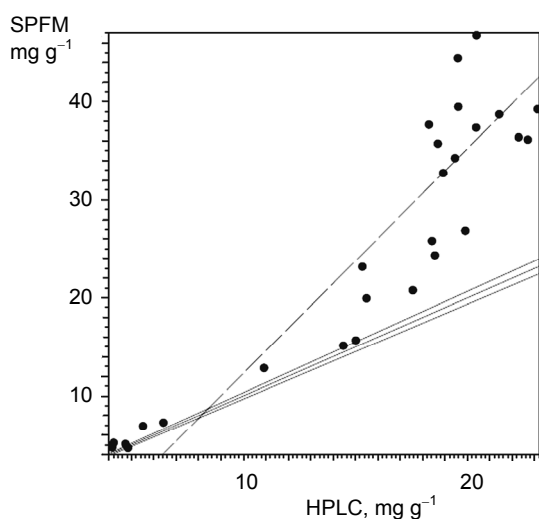
Vzorek ^a	Použitá metoda	Spektrofotometrické stanovení s AlCl_3 [mg g^{-1} sušiny]	HPLC/UV [mg g^{-1} sušiny]	Spektrofotometrické stanovení dle AOAC [mg g^{-1} sušiny]
A	celá rostlina	21,54	16,12	23,02
	listy	42,95	19,42	28,41
	stonky	5,73	4,82	8,03
	nažky	19,71	pod LOD	pod LOD
B	celá rostlina	34,23	19,01	24,75
	listy	37,06	22,14	29,54
	stonky	13,96	13,47	18,52
	nažky	20,11	pod LOD	pod LOD
C	celá rostlina	25,66	18,96	26,23
	listy	38,41	21,04	31,44
	stonky	5,56	5,14	8,57
	nažky	20,46	pod LOD	pod LOD

^a *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn geografický původ Bhutan (A), USA (B) a neznámý (C)

Tabulka III

Nadhodnocení výsledků [%] spektrofotometrických metod oproti stanovení metodou HPLC/UV (HPLC/UV = 100%)

Část rostliny	Spektrofotometrické stanovení s AlCl_3	Spektrofotometrické stanovení dle AOAC
Stonky	107,8	149,9
Listy	189,2	142,8
Nažky	nepočitatelné	není
Celá rostlina	150,5	136,8

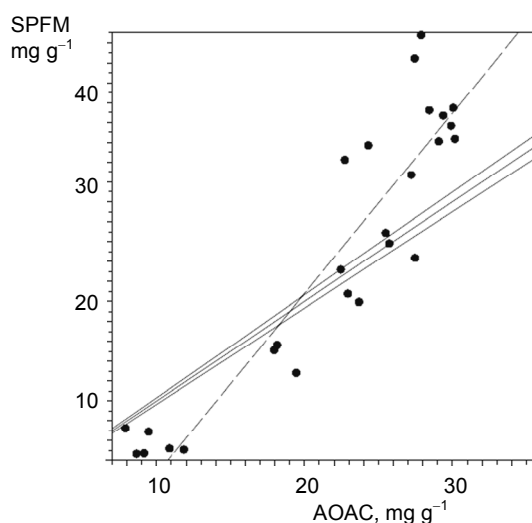


Obr. 4. Grafické porovnání metod stanovení rutinu pomocí x-y grafu rozptylu pro metodu HPLC/UV (HPLC) a spektrofotometrické stanovení s AlCl_3 (SPFM); --- přímka rovnosti, — přímka rovnosti s vymezeným pásem spolehlivosti (± 2 standardní odchylky metody HPLC/UV)

Ve výsledcích analýzy stonků se shodovaly metody HPLC/UV a SPFM, zatímco hodnoty získané metodou dle AOAC byly o 20–60 % vyšší. Procentuální nadhodnocení výsledků spektrofotometrických metod vůči HPLC/UV je popsáno v tab. III.

Porovnáním všech výsledků jsme zjistili stabilní trend, kdy nejnižší hodnotu udává HPLC a výsledky spektrofotometrických metod jsou podle konkrétní části rostliny srovnatelné nebo spíše vyšší. Pokud jsou z testovaných souborů hodnot eliminovány výsledky stanovení rutinu v semenech, je korelace mezi jednotlivými metodami dobrá, převyšující 90 %. Nadhodnocení výsledků spektrofotometrickými metodami a vysoké korelační koeficienty jsou v souladu s výsledky jiných autorů¹. Grafické znázornění porovnání metod je znázorněno na obr. 3–5.

Porovnání přímky rovnosti ($x = y$) s vymezeným pásem spolehlivosti $\pm 2\text{RSD}$ (relativní směrodatné odchylky z osmi opakování představující opakovatelnost metody) a přímky lineární regrese pro skutečné dvojice odpovídajících hodnot (obr. 3–5) ukazuje, že výsledky metod nejsou



Obr. 5. Grafické porovnání metod stanovení rutinu pomocí x-y grafu rozptylu pro spektrofotometrické stanovení dle AOAC (AOAC) a spektrofotometrické stanovení s AlCl_3 (SPFM); --- přímka rovnosti, — přímka rovnosti s vymezeným pásem spolehlivosti (± 2 standardní odchylky metody AOAC)

v žádném případě volně zaměnitelné. Soubory dat příslušící jednotlivým metodám byly testovány na shodnost středních hodnot párovým oboustranným t-testem. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lze zamítnout hypotézu rovnosti pro všechny testované soubory.

Jednofaktorová analýza rozptylu potvrdila vliv metody na výsledky analýz. Vysoké korelační koeficienty (viz tab. IV) znamenají, že při porovnávání hodnot získaných vždy jednou metodou, by počáteční výběr analytické metody neměl konečně relativní výsledky výrazně ovlivnit.

Závěr

Byly porovnány tři analytické metody na stanovení obsahu rutinu v rostlinném materiálu – dvě spektrofotometrické a metoda využívající vysokoučinnou kapalinovou chromatografii. Výsledky jednotlivých metod spolu korelují, vyjma hodnot stanovení rutinu v semenech pohanky, nicméně metody nejsou shodné a volně zaměnitelné.

Hodnoty stanovené metodou HPLC/UV byly cca o 10 až 20 % nižší než při použití obou spektrofotometrických metod. Spektrofotometrická metoda s AlCl_3 významněji nadhodnocuje obsah rutinu v listech a semenech, zatímco metoda dle AOAC nadhodnocuje obsah rutinu ve stoncích oproti oběma použitým metodám.

Získané výsledky se shodují s literárními údaji v metodické studii rutinu v pohance obecné (*Fagopyrum esculentum* Moench)¹. Je možno konstatovat, že při měření určitých souborů vzorků rostlinného materiálu a vzájemném porovnávání stanovených koncentrací rutinu v jednotlivých položkách, mohou být použity všechny tři výše uvedené metody.

Výsledků bylo dosaženo při řešení projektu QH 92111.

LITERATURA

- Kreft S., Štrukejl B., Gaberščik A., Kreft I.: *J. Exp. Bot.* 53, 1801 (2002).
- Gabersčik A., Vončina M., Trost T., Germ M., Björn L. O.: *J. Photochem. Photobiol., B* 66, 30 (2002).
- Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K.: *Food Chem.* 98, 508 (2006).
- Mikulajová A., Takácsová M., Alexy P., Brindzová L.: *Chem. Listy* 101, 563 (2007).
- Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J.: *Food Res. Int.* 40, 356 (2007).
- Deineka V. I., Grigoriev A. M., Staroverov V. M.: *Pharm. Chem. J.* 38, 487 (2004).
- Benguo L., Yongyi Z.: *J. Food Eng.* 78, 584 (2007).
- Horwitz W., Latimer G.W.: *Official Methods of Analysis of AOAC*. AOAC International, Gaithersburg 2005.
- Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinova S.: *Food Res. Int.* 35, 207 (2002).
- Hassan H. N. A., Barsoum B. N., Habib I. H. I.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 315 (1999).
- Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J.: *Bioresour. Technol.* 96, 1709 (2005).
- Malagutti A. R., Zuin V. G., Cavalheiro E. T. G., Mazo L. H.: *Electroanalysis* 18, 1028 (2006).
- Mousty C., Cosnier S., Lopez M. S.-P., Lopez-Cabarcos E., Lopez-Ruiz B.: *Electroanalysis* 19, 253 (2007).
- Matejova E., Sykorová S., Janovská D.: *Proceedings of the 10th International Symposium on Buckwheat "Advances in buckwheat research", Yangling, Shaanxi 14-18 August 2007* (Ohmi Ohnishi ed.), str. 137. Northwest A and F University, Yangling, Shaanxi 2007.
- Bland J. M., Altman D. G.: *Lancet* 327, 307 (1986).

L. Štočková, E. Matějová, D. Janovská, and S. Sýkorová (*Crop Research Institute, Prague, Czech Republic*): **Comparison of Analytical Methods for Rutin Determination in Tartary Buckwheat**

Rutin is a natural antioxidant useful for human health. The aim of this study was to compare some analytical methods for rutin determination in a plant material – tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) – of different origin. The methods used were HPLC/UV and two spectrophotometries. Both spectrophotometric methods gave higher values than HPLC/UV. The results mutually correlated well, except those obtained by the spectrophotometric method using $AlCl_3$. The method proved unsuitable for the purpose. The other spectrophotometric method overestimated the rutin content in leaves and stems.