

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE

Fakulta chemicko-inženýrská

Ústav fyzikální chemie

Disertační práce

MECHANISMUS ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE FLAVONOIDNÍCH SLOUČENIN

Autor:	Mgr. Šárka Ramešová
Školitel:	Mgr. Romana Sokolová, Dr.
Konzultant:	
Studijní program:	chemie
Studijní obor:	Fyzikální chemie

Praha 2015

INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, PRAGUE

Faculty of Chemical Engineering

Department of Physical Chemistry

Dissertation

ELECTROCHEMICAL OXIDATION MECHANISM OF FLAVONOID COMPOUNDS

Author:	Mgr. Šárka Ramešová
Supervisor:	Mgr. Romana Sokolová, Dr.
Consultant:	
Study program:	Chemistry
Field of study:	Physical Chemistry

Prague 2015

V úvodu této práce bych ráda vyjádřila poděkování Mgr. Romaně Sokolové, Dr. za odborné teoretické i praktické vedení dizertační práce a za předané zkušenosti a připomínky během studia. Dále bych ráda poděkovala Dr. Ilarii Degano za pomoc při interpretaci chromatografických dat, cenné rady a připomínky k práci. Poděkování patří také kolegům z laboratoře za pomoc v průběhu měření a příjemné pracovní prostředí.

Tato dizertační práce byla vypracována v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR v Oddělení molekulární elektrochemie. Práce byla finančně podporována projektem Grantové agentury ČR (203/09/1607) a projektem Program interní podpory mezinárodní spolupráce AV ČR (M200401201).

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním dizertační práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne.....

Mgr. Šárka Ramešová

SOUHRN

V této dizertační práci byla studována oxidace rhamnazu (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on), fisetinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-on) a rhamnetinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on). Tyto intenzivně barevné flavonoidní sloučeniny patří do skupiny látek, které jsou hojně zastoupené v přírodě. Jsou to důležité bioaktivní sloučeniny s antioxidačními, antiagregačními, protizánětlivými, protinádorovými a antivirovými účinky.

Flavonoidy byly studovány pomocí elektrochemických metod a UV/Vis spektroskopie ve vodném pufrovaném i nepufrovaném prostředí. Dále byly zkoumány produkty oxidace a následně byl navržen oxidační mechanismus. Oxidační mechanismus je spojený s přenosem elektronů a s následnou chemickou reakcí. Stabilita látek je významně ovlivněna přítomností vzdušného kyslíku. Distribuce oxidačních produktů jednotlivých látek byla sledováno pomocí HPLC-MS/MS a HPLC-DAD.

SUMMARY

The oxidation of rhamnazin (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one), fisetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one) and rhamnetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-one) has been studied. These intensively coloured flavonoid compounds belong to group of natural occurring compounds. Rhamnazin, fisetin and rhamnetin are important bioactive compounds with antioxidative, anti-carcinogenic, antiviral, anti-allergic and anti-inflammatory properties.

Flavonoids have been studied using electrochemical methods and UV/Vis spectroscopy in aqueous, buffered or unbuffered solution. This thesis is focused on the determination of oxidation mechanism of the flavonol structure. The oxidation mechanism involves electron transfer coupled with chemical reaction. Stability of these compounds significantly depends on the presence of the oxygen. The distribution of oxidation products of these compounds was monitored by HPLC-MS/MS and HPLC-DAD.

OBSAH

1. Úvod	11
2. Cíle práce	12
3. Teoretická část	13
3.1. Flavonoidy	13
3.2. Klasifikace flavonoidů	15
3.2.1. Flavonoly	16
3.2.2. Flavony	17
3.2.3. Isoflavony	17
3.2.4. Flavanony	18
3.2.5. Anthokyanidiny	18
3.2.6. Flavanoly	19
3.3. Antioxidační vlastnosti flavonoidů	19
3.4. Analýza barviv v uměleckých dílech	20
3.4.1. Nedestruktivní techniky	21
3.4.2. Mikro-destruktivní techniky	22
3.5. Rhamnazin	24
3.6. Fisetin	25
3.7. Rhamnetin	26
3.8. Fyzikální a chemické vlastnosti studovaných látek	26
3.9. Elektrochemické vlastnosti flavonolů	27
3.10. Teorie reakčních mechanismů	31
3.10.1. CE mechanismus	31
3.10.2. EC mechanismus	33
3.10.3. ECE mechanismus	34
3.11. Spřažené chemické reakce	35
4. Experimentální část	36
4.1. Použité reagensy	36
4.2. Použité přístroje	37
4.2.1. Elektrochemická měření	37

4:2.2. Spektrofotometrická měření	37
4.2.3. Spektroelektrochemická měření	38
4.2.4. Chromatografická měření	38
4.3. Pracovní postupy	40
4.3.1. Voltametrie a coulometrie	40
4.3.2. Spektrofotometrická měření	41
4.3.3. Spektroelektrochemická měření	42
4.3.4. Chromatografická měření	42
5. Výsledky a diskuze	44
5.1. Rhamnazin	44
5.1.1. Elektrochemická měření	44
5.1.2. Stabilita rhamnazu	61
5.1.3. Elektrolýza	64
5.1.4. UV/Vis spektroelektrochemie rhamnazu	68
5.1.5. Chromatografická měření rhamnazu	70
5.1.6. Mechanismus oxidace rhamnazu	71
5.2. Fisetin	75
5.2.1. Elektrochemická měření	75
5.2.2. Stabilita fisetinu	92
5.2.3. Elektrolýza	95
5.2.4. UV/Vis spektroelektrochemie fisetinu	98
5.2.5. Chromatografická měření fisetinu	99
5.2.6. Mechanismus oxidace fisetinu	100
5.3. Rhamnetin	103
5.3.1. Elektrochemická měření	103
5.3.2. Stabilita rhamnetinu	119
5.3.3. Elektrolýza	122
5.3.4. UV/Vis spektroelektrochemie rhamnetinu	124
5.3.5. Chromatografická měření rhamnetinu	126
5.3.6. Mechanismus oxidace rhamnetinu	127
6. Závěr	130

7. Literatura	132
8. Přílohy	148
Příloha 1: Odvození vztahu pro distribuční diagram rhamnazu	149
Příloha 2: Odvození vztahu pro distribuční diagram fisetinu a rhamnetinu	150
Příloha 3: Publikace	151

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	Absorbance
A ²⁻	Dianion
AH ⁻	Anion
AH ₂	Nedisociovaná molekula studované látky
CE	Pomocná elektroda (counter electrode)
CE – mechanismus	Chemická reakce předřazená vlastnímu elektrodovému ději
DAD	Detektor s diodovým polem
<i>E</i>	Potenciál (V)
EC – mechanismus	Chemická reakce následná po elektrodovém ději
ECE – mechanismus	Reakce vřazená do elektrodového děje
<i>E_p</i>	Potenciál píku (V)
ESI	Ionizace elektrosprejem
ESI-Q-TOF	Hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým a průletovým hmotnostním analyzátozem s ionizací elektrosprejem
F1	2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-hydroxybenzaldehyd
F2	2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2 <i>H</i>)-on
F3	(2,4-dihydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina
F4	2,4- dihydroxybenzoová kyselina
F5	3,4-dihydroxyfenyl(oxo)octová kyselina
F6	3,4- dihydroxybenzoová kyselina
F7	(2 <i>E</i>)-7-hydroxy-2-(3'-hydroxy-4'-oxocyklohexa-2',5'-dien-1'-yliden)-2 <i>H</i> -chromen-3,4-dion
F8	(4-hydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina
F9	4-hydroxybenzaldehyd
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC-ESI-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem s ionizací za pomoci elektrospreje

HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
<i>i</i>	Elektrický proud (μA)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
M1	2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2 <i>H</i>)-on
M2	(2,6-dihydroxy-4-metoxyfenyl)(oxo)octová kyselina
M4	3,4-dihydroxybenzoová kyselina
MS	Hmotnostní spektroskopie
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti ku náboji
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OTTLE	Opticky transparentní tenkovrstevná elektroda
PIGE	Parafilmem impregnovaná grafitová elektroda
R1	2,4-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-6-methoxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-on
R2	4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselinu
R3	(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) (oxo)octová kyselina
R4	2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoová kyselina
R6	2,6-dihydroxy-4-methoxyfenyl) (oxo)octová kyselina
R7	2-hydroxy-6-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oxy]-4-methoxyfenyl-2-(oxo)octová kyselina
RE	Referentní elektroda (reference electrode)
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (obrácenou fází)
<i>t</i>	Čas (s)
<i>t_R</i>	Retenční čas (min)
UV/Vis	Ultrafialová a viditelná (spektroskopie)
<i>v</i>	Rychlost polarizace ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)
WE	Pracovní elektroda (working electrode)

1. Úvod

Předkládaná dizertační práce byla vypracována v rámci dvou projektů řešených v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Tyto projekty se věnují elektrochemické studii oxidace flavonoidů a rozkladu přírodních barviv používaných na uměleckých památkách.

Analýza historických barviv používaných na uměleckých památkách může být cenným nástrojem k pochopení, jak objekt původně vypadal, odkud pochází, popřípadě jak je starý. Toto poznání také umožňuje odborníkům zvolit vhodné postupy při restaurování. Mohou pomoci při výběru muzejních podmínek, které následně zabrání dalšímu poškození uměleckého díla. Identifikace historických barviv na starých textiliích je mimořádně náročný úkol kvůli složitosti procesů degradace [1], v nichž hraje významnou roli oxidace. Zjištění degradačních produktů a změny ve struktuře matrice by mohly pomoci při výběru muzejních podmínek, jako jsou například intenzita osvětlení, UV záření, vlhkost prostředí, a tím i snížit riziko rozkladu historického materiálu [2]. Procesy stárnutí a změny uměleckých děl jsou zejména v poslední době urychlovány působením polutantů.

Flavonoidy jsou velmi bohatou skupinou rostlinných fenolických látek, které se řadí mezi sekundární metabolity produkované různými druhy rostlin. Jsou také hlavními chromofory ve většině běžně používaných žlutých barviv, která se již od počátku 16. století používala pro barvení tapisérií a dalších uměleckých děl. Elektrochemické metody jsou nástrojem při studiu oxidačních procesů. Dávají možnost objasnit komplikovaný mechanismus, kde je přenos elektronu spřažen s chemickými reakcemi a reakční cesta vede přes vznikající meziproducty. Využití UV/Vis spektroeletrochemie a separačních technik přispěje k odhalení meziproductů a oxidačních produktů.

Mnou studovanými zástupci jsou rhamnazin (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on), fisetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-on) a rhamnetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on), které se vyskytují v ovoci, zelenině, čaji, dále pak v běžně se nacházejících rostlinách, například v řešetláku počistivém (*Rhamnus Catharticus*), dřezovci trojtrnném (*Gleditsia triacanthos*) a koriandru setém (*Coriandrum sativum*) a v minulosti byly používány jako přírodní barviva.

2. Cíle práce

Předkládaná dizertační práce je zaměřená na elektrochemickou studii vybraných přírodních flavonoidů používaných jako barviva. Výzkum se týká objasnění degradačních oxidačních procesů rhamnazu (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on), fisetinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-on) a rhamnetinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on).

Hlavními cíli bylo studovat oxidaci pomocí elektrochemických metod ve vodném prostředí a určit mechanismus elektrochemické oxidace. K určení složitého oxidačního mechanismu a identifikaci oxidačních produktů bude využita *in situ* UV/Vis spektroelektrochemie a chromatografické metody. Distribuce obsahu rozkladných produktů bude sledována pomocí HPLC-MS/MS a HPLC-DAD analýzy.

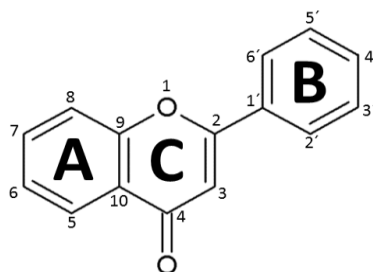
Vzhledem k tomu, že flavonoidní barviva jsou ovlivněna přítomností kyslíku, byl také sledován vliv přítomnosti kyslíku na tvorbu oxidačních produktů a stabilitu meziproductů.

Oxidační vlastnosti rhamnazu, fisetinu a rhamnetinu jsou sledovány z důvodů jejich vzájemného porovnávání.

3. Teoretická část

3.1. Flavonoidy

Flavonoidy, jinak také nazývané bioflavonoidy či vitamíny P, jsou bohatou a pestrou samostatnou skupinou fenolických přírodních sloučenin s patnáctiuhlíkatým skeletem. Ve své chemické struktuře obsahují dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C₆-C₃-C₆. U většiny flavonoidů je C₃ řetězec součástí heterocyklického kruhu. Flavonoidy jsou proto odvozené od heterocyklické sloučeniny 2*H*-chromenu, substituovaného v poloze C2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavon. Jeho chemická struktura se skládá ze dvou benzenových jader a kruhu odvozeného od 2*H* pyranu, jak ukazuje obr.1. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány různými kombinacemi substituentů (hydroxylovou, methoxylovou, methylovou, O- a C- glykosidickou skupinou), jednotlivé deriváty se pak navzájem liší pouze stupněm substituce nebo přítomností dvojných vazeb.



Obr. 1: Strukturální vzorec flavonu.

V současné době je chemicky identifikováno okolo 4000 flavonoidů [3]. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou složku (umístěnou na pozici C3 nebo C7) a cukernou složku (navázanou na hydroxylové skupině flavonoidu). Vázaná sacharidová skupina je velmi často glukosa nebo rhamnosa, ale mohou být zapojeny i jiné cukry (např. galaktosa, arabinosa, xylosa nebo kyselina glukuronová). Tvorba těchto glykosidových konjugátů je řízená světlem (chemicky je glykosid acetál tvořený OH

skupinou cukru a OH skupinou flavonoidu). Obvykle je vázána pouze jedna cukerná jednotka, ale mohou být vázány i dvě, tři či více. Cukry mohou být dále substituovány např. malonylovou skupinou [4]. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka [5]. Flavonoidy jsou zpravidla barevné látky, proto se také řadí mezi barviva. Všeobecně se vyskytují zejména v povrchových pletivech vyšších rostlin, kde jsou zodpovědné za barvu květů, plodů a listů v podzimním období. Mnoho flavonoidů přispívá také k chuti a barvě potravin [6]. Jsou důležité pro normální růst, rozvoj a ochranu rostlin. V rostlinném organismu plní celou řadu funkcí a zasahují například do dějů spojených s růstem a reprodukcí. Podílejí se i na ochraně rostlin před nemocemi, predátory a proti vlivu UV záření [7-9]. Chrání buňky před toxickým působením škodlivých látek z vnějšího prostředí, ale i proti těm, které se tvoří v rostlinném organismu. Tím, že chrání buňky před následky oxidačního stresu, brzdí degenerativní procesy a obnovují jejich přirozený stav [4].

Flavonoidy jsou v přírodě hojně rozšířené, nacházejí se v čaji, ovoci, zelenině, zejména v jablkách, červeném víně, cibuli, hlavně v jejích červených odrůdách, v červené, žluté a zelené zelenině. Káva, ovocné šťávy a kvalitní hořká čokoláda jsou též významným zdrojem flavonoidů [10-14]. Některé flavonoidy jsou účinné antioxidanty, jsou schopny zachytávat reaktivní radikály. Kromě toho, že mají přímý antioxidační účinek, ovlivňují tvorbu radikálů i nepřímo, a to aktivací nebo deaktivací antioxidačních enzymů podílejících se na procesu vzniku různých radikálů (superoxiddismutasa). Jako nesmírně důležité se ukázalo, že právě flavonoidy mohou pomáhat endogenním obranným antioxidantům přítomným v těle k další deaktivaci vzniklých radikálů a zabránit tak poškození životně důležitých složek, jako jsou bílkoviny nebo lipidy [15]. Ukázalo se, že vinná réva, třešně, višně, švestky, hrušky, červené grapefruity, ostružiny, malinoostružník, maliny, černý rybíz, borůvky, granátová jablka, černé olivy, rajčata nebo červená řepa obsahují nejvíce látek s antioxidačními vlastnostmi. Látky různé chemické struktury snižují také mutagenitu a karcinogenitu [3]. Dalším významným zdrojem flavonoidů jsou plody ostropestřce mariánského, roketa a arónie, tzv. černý jeřáb, chmel, sója, pohanka, lékořice [5,16,17]. Flavonoidy jsou také přítomny v léčivých rostlinách a bylinách, které se dosud hojně využívají v lidové medicíně [3]. Člověk přijme za den v průměru 1g flavonoidů s potravou, avšak záleží na jeho výživových zvyklostech [18]. Flavonoidy nejsou pro tělo nepostradatelné. Lidský organismus se bez nich obejde, ale jsou zdraví prospěšné. Flavonoidy mají v potravinách důležitou nutriční, ale i farmaceutickou funkci. Z důvodů jejich specifického výskytu v různých druzích rostlin mohou být vhodnými ukazateli kvality a bezpečnosti potravin [19].

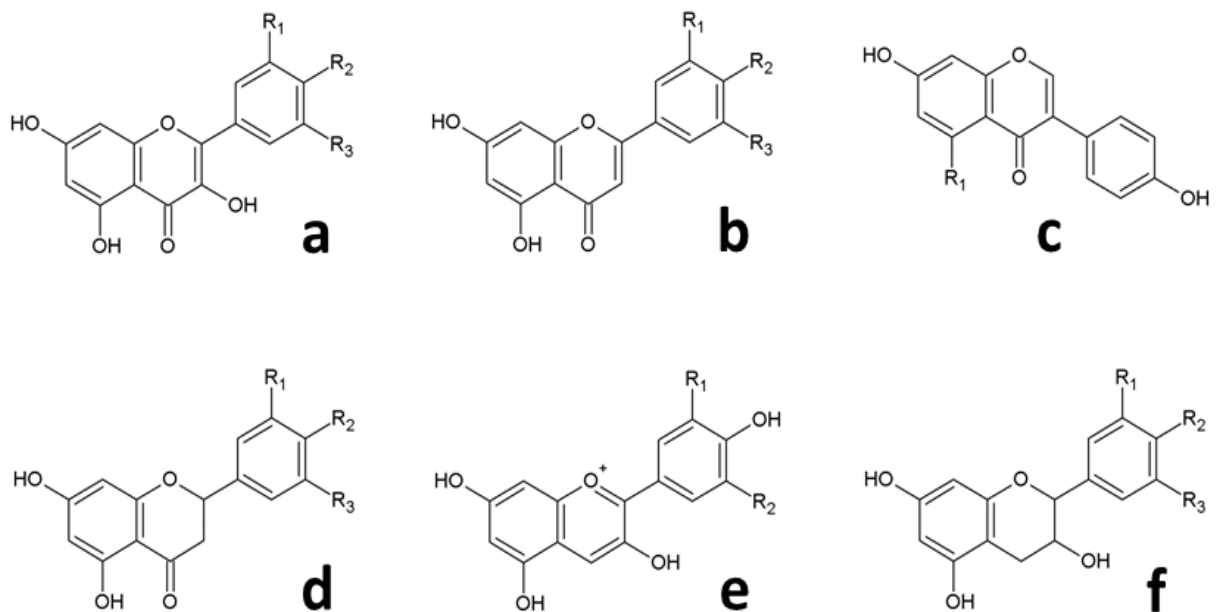
Flavonoidy mají řadu chemických vlastností, díky nimž mohou na různých úrovních zasahovat do dějů v organismu konzumenta. Klinická a experimentální sledování ukázala, že flavonoidy mají antioxidační, antivirový, antialergický, antiagregační, protizánětlivý a protinádorový účinek [20-22].

Flavonoidy pomáhají při léčbě a prevenci mnoha chorob. Chrání především vnitřek cév (žíly, tepny, vlasečnice), neboť způsobují pružnost a permeabilitu krevních kapilár. Jsou účinnými prostředky proti zvýšené lámavosti krevních vlasečnic. Příznivě tak ovlivňují mikrocirkulaci krve a tím i látkovou výměnu v postižených tkáních. Je prokázáno, že dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů ve vyvážené stravě je spojen s nižším výskytem onemocnění srdce a cév [23]. Jejich antioxidační schopnost ochraňuje krevní lipidy před oxidací a tím zabraňuje vzniku aterosklerózy a trombotických onemocnění [24].

3.2. Klasifikace flavonoidů

Klasifikace flavonoidů podle jednotlivých skupin se u různých autorů liší [25-28]. Nejběžnější dělení flavonoidů je dle Manach a kol. [4], kdy se dělí flavonoidy podle jejich struktury do šesti skupin:

- 1) Flavonoly (Obr. 2a)
- 2) Flavony (Obr. 2b)
- 3) Isoflavony (Obr. 2c)
- 4) Flavanony (Obr. 2d)
- 5) Anthokyanidiny (Obr. 2e)
- 6) Flavanoly (Obr. 2f)



Obr. 2: Klasifikace flavonoidů.

3.2.1. Flavonoly

Flavonoly patří mezi nejobsáhlejší skupinu flavonoidů. Nejčastěji jsou substituovány v poloze 3 na kruhu C, ale mohou být substituovány i v jiných polohách. Jsou obvykle žlutavé až žluté barvy, bez chuti, někdy až nahořklé. Nejhojněji jsou zastoupené v česneku, cibuli, pórků, brokolici, kapustě, meruňkách, borůvkách a jablkách, ale pouze v nízkých koncentracích čerstvé hmotnosti [4,29,30]. Ovoce často obsahuje 5 až 10 různých flavonolových glykosidů. Tyto flavonoly se akumulují ve vnějších částech rostlinných tkání (slupkách, listech), neboť jejich biosyntéza je stimulována světlem. A proto jsou možné rozdíly v koncentraci flavonolů mezi kousky ovoce na stejném stromě, a dokonce i mezi různými stranami jednoho kusu ovoce, v závislosti na jejich vystavení slunečnímu záření [31]. V listové zelenině (hlávkový salát, zelí) bývá koncentrace glykosidů i více než desetkrát vyšší ve vnějších listech než ve světlejších vnitřních částech [4]. Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou quercetin ($R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$, obr. 2a), kaempferol ($R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, obr. 2a), myricetin ($R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$, obr. 2a). V přírodních zdrojích se quercetin nachází jednak ve formě volné, nebo také vázán s cukernými

jednotkami, jako například quercetin-3-O-glukosid, quercetin-4'-O-glukosid, quercetin-3-O-rhamnosid.

3.2.2. Flavony

Tato skupina flavonoidů patří mezi žluté rostlinné pigmenty, které se vyskytují ve formě glykosidů nebo esterů. Narozdíl od flavonolů nejsou substituovány v poloze 3 na kruhu C a jsou méně často zastoupeny v ovoci a zelenině. Mezi flavony patří především glykosid luteolinu ($R_1 = R_2 = \text{OH}$, obr. 2b) a apigeninu ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, obr. 2b). Jedinými důležitými zdroji flavonů ve výživě jsou petržel, celer a červená paprika [29,32]. Pokud jsou přítomné ve vyšších koncentracích, přispívají k barevnosti rostlinných tkání. Obiloviny, především pšenice a proso, jsou také dobrým zdrojem C-glykosidů (vitexin, orientin) [33]. Citrusové ovoce obsahuje polymethoxylované flavony (nobiletin, tangeretin), které se podílejí na příchuti ovoce díky přítomnosti sensoricky výrazných látek [4].

3.2.3. Isoflavony

Isoflavony jsou strukturně podobné estrogenům. I když to nejsou steroidy, mají hydroxylové skupiny v poloze 7 a 4' podobně jako u estradiolu. Tato vlastnost podporuje jejich schopnost vázat se na estrogení receptory, a proto mohou být následně klasifikovány jako fytoestrogeny.

Tyto látky vykazují různé biologické účinky a výsledky studií naznačují, že chrání, nebo alespoň zpomalují, vývoj hormonálně závislých nádorů (prsou a prostaty) a nemocí (osteoporózy) [34]. Pravděpodobně se uplatňují i v iniciační a promoční fázi karcinogeneze a inhibují proliferaci endoteliálních buněk [35].

Isoflavony se nacházejí téměř výhradně v luštěninách (čeled' bobovitá), například v soje, tofu, dále také v amarantu, moruších a jeteli lučním [36,37]. Tyto potraviny obsahují zejména genistein ($R_1 = \text{OH}$, obr. 2c) a daidzein ($R_1 = \text{H}$, obr. 2c). Tyto isoflavony jsou rozšířeny ve 4 formách: aglykon, 7-O-glukosid, 6"-O-acetyl-7-O-glukosid a 6"-O-malonyl-7-O-glukosid [38].

3.2.4. Flavanony

Flavanony se nacházejí v rajčatech a bylinách, jako je máta či lékořice. Avšak nejvíce zastoupené jsou v citrusových plodech. Přispívají k typické chuti citrusového ovoce, a proto se také nazývají „citrusové“ flavonoidy [39,40].

Hlavním aglykonem je naringenin ($R_1 = H$, $R_2 = OH$, obr. 2d) obsažený v grapefruitech, hesperetin ($R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, obr. 2d) v pomerančích a eriodictyol ($R_1 = R_2 = OH$, obr. 2d) v citronech [41]. Flavanony jsou obecně glykosylovány disacharidy v pozici 7, a to buď neohesperidosou, zodpovědnou za hořkou chuť, či rutinosou, která je bezbarvá [40].

3.2.5. Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou nejrozšířenější skupinou rostlinných pigmentů rozpustných ve vodě a v epidermálních tkáních květin a ovoce. V přírodě jsou v řadě případů hlavním nositelem barvy květů, a to především odstínů růžové, červené, modré a fialové [6]. Existují v různých chemických formách, které mohou být bezbarvé i barevné v závislosti na pH a struktuře. Anthokyanidiny jsou značně nestabilní. Aby se zabránilo jejich degradaci, dochází ke glykosylaci glukosou v pozici 3 a esterifikaci různými organickými kyselinami [4]. V lidské stravě můžeme anthokyanidiny nalézt v červeném víně, některých druzích obilovin, listové (lilek, fazole) a kořenové (ředkvičky, cibule) zelenině i v ovoci (černý rybíz, ostružiny) [4]. Nalézají se zejména ve slupkách, ale také v dužině.

Hlavními zástupci anthokyanidinů jsou pelargonidin ($R_1 = R_2 = H$, obr. 2e), cyanidin ($R_1 = OH$, $R_2 = H$, obr. 2e), delphinidin ($R_1 = R_2 = OH$, obr. 2e), petunidin ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, obr. 2e), malvidin ($R_1 = R_2 = OCH_3$, obr. 2e).

3.2.6. Flavanoly

Flavanoly jsou přírodní látky, které existují jak v monomerní formě (katechiny), tak ve formě polymeru (proanthokyanidiny). Na rozdíl od jiných tříd flavonoidů nejsou flavanoly v potravinách glykosylovány.

Katechin ($R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$, obr. 2f) a gallokatechin ($R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$, obr. 2f) se nachází v zelenině a ovoci, například v hroznech, v semenech luštěnin a kakau. Avšak nejbohatším zdrojem je čaj [42]. Nálev ze zeleného čaje obsahuje více katechinů než čaj černý. Koncentrace katechinů v černém čaji je redukována asi na polovinu v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během procesu fermentace. Katechin podléhá oxidaci za vzniku kondenzovaných polyfenolů známých jako teaflaviny a tearubigeny [16].

Proanthokyanidiny jsou známé jako kondenzované taniny. Jsou to dimery, oligomery a polymery katechinů, které jsou k sobě vázány vazbou C4 a C8 (nebo méně často C6) [4]. Taniny jsou vysoce hydroxylované molekuly a mohou tvořit nerozpustné komplexy s proteiny. Kondenzované taniny jsou zodpovědné za trpký charakter ovoce (hrozny, broskve, jablka, hrušky, jahody) a nápojů (jablečný mošt, čaj, víno, pivo) [43]. Tato polymerace tríslovin se pravděpodobně týká zdánlivého snížení obsahu taninů, které je běžně k vidění v průběhu zrání u mnoha druhů ovoce.

3.3. Antioxidační vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy patří mezi přírodní fenolické sloučeniny, které vykazují antioxidační schopnost. Jejich antioxidační aktivita souvisí s chemickou strukturou. Látky s nasyceným heterocyklickým kruhem převážně reagují s radikály v místě *o*-dihydroxy- skupiny v kruhu B. Vznikající semichinony jsou poměrně stabilní. Látky s dvojnou vazbou mezi C2 a C3 a látky s 3- a 5- OH substituenty vykazují vyšší intenzitu absorbance, která nesouvisí s chemickou strukturou radikálů [17,44,45]. Bors a kol. [46] zkoumali, jak polyfenoly reagují jako radikály.

Závěr efektivního záchytu radikálů byl shrnutý do tří kritérií:

- dvě hydroxylové skupiny v *orto*- poloze na kruhu B propůjčují vyšší stabilitu formě radikálu a podílí se na elektronové delokalizaci
- dvojná vazba mezi C2 a C3 konjuguje s 4-oxo skupinou na kruhu C a je zodpovědná za elektronovou delokalizaci z kruhu B
- 3- a 5- OH a 4-oxo substituenty na kruhu A a C jsou potřebné pro maximální záchyt radikálu

Quercetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-on) splňuje všechny výše uvedené body a je účinnějším antioxidantem než například katechin ((2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2*H*-chromen-3,5,7-triol), neboť katechin díky své chemické struktuře nemá výše jmenované vlastnosti. Bylo zjištěno, že na antioxidační aktivitu flavonoidů má také vliv poloha a míra hydroxylace. Rice-Evans a kol. [17] navrhli, že kombinace hydroxylových skupin v *orto*- poloze na jednom kruhu, společně s hydroxylovými skupinami v *para*- poloze na jiném kruhu poskytuje velmi účinné antioxidanty, zatímco hydroxylace na kruhu A v polohách C5 a C7 má malý vliv.

3.4. Analýza barviv v uměleckých dílech

Flavonoidy byly využívány k barvení tapiserií a dalších historických předmětů již od 16.století [47]. V uměleckých dílech byla nalezena celá řada flavonoidů, indigo barviv [48,49], taninů [50] a dalších barevných látek [51-56]. Přírodní barviva obsahující především flavony a isoflavony mají žluté odstíny, ale mohou být také červené i tmavší. Barva flavonoidů koresponduje s jejich chemickou strukturou. Nejčastější žluté chromofory jsou apigenin (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-on), fisetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-on), isorhamnetin (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)chromen-4-on), kaempferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4*H*-chromen-4-on), luteolin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)- 5,7-dihydroxy-4-chromenon), morin (2-(2,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on), myricetin (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-4-chromenon), quercetin (2-(3,4-

dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-on), rhamnazin (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on), rhamnetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on) a rutin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosyloxy]-4*H*-chromen-4-on). V Evropě se nejčastěji žlutá barviva extrahovala z rýtu barvířského (*Reseda luteola* L), škumy vlasaté (*Cotinus coggyria* Scop.), kručinky barvířské (*Genista tinctoria* L.), srpice barvířské (*Serratula tinctoria* L. Gaud.) [57]. Červená barviva jsou získávána z rostlin rodu sapan (*Caesalpinia sappan*, *Caesalpinia Brasiliensis*, *Caesalpinia crista*, *Caesalpinia echinata*) rostoucích v jižní Asii a Jižní Americe. Nejběžnější chromofory jsou santalin (5,7-dihydroxy-6-methoxy-1,2,3,4,4a,9a-hexahydroantracen-9,10-dion) a santarubin (2,10-dihydroxy-1,3-dimethoxy-5-(3,4-dihydroxyfenyl)-6-(2,4-dimethoxybenzyl)-9*H*-benzo[*a*]xanthen-9-on) [58]. Modré, někdy i fialové až černé odstíny flavonoidů, byly získávány z kreveně obecné (*Haematoxylon campechianum* L.), která pochází původně z Jižní Ameriky. Z této rostliny jsou izolovány látky hematoxylin (7,11*b*-dihydroindeno[2,1-*c*]chromen-3,4,6a,9,10(6*H*)-pentol) a hematein (3,4,6a,10-tetrahydroxy-6,7-dihydroindeno[2,1-*c*]chromen-9-on) [57,59].

V posledních několika desetiletích, byly vyvinuty užitečné postupy pro charakterizaci organických barviv a jejich identifikaci v uměleckých dílech, ale i přesto je analýza historických vzorků stále náročný úkol. Analytik se musí vypořádat se čtyřmi hlavními problémy, a to: s poměrně malým množstvím vzorku, s nízkou koncentrací chromoforů v původním materiálu, s přítomností možných degradačních produktů a s nedostatkem informací o původním způsobu přípravy barev [60]. Optimální analýza by měla spočívat v použití nedestruktivní metody pro první skenování v kombinaci s destruktivní metodou pro získání co největšího množství informací. Nedestruktivní metodou je myšlena metoda, při které není vzorek spotřebováván nebo změněn. Následuje odebrání vzorku (destruktivní metoda) a následná analýza, především analýza využívající separačních metod.

3.4.1. Nedestruktivní techniky

Prvním krokem při analýze uměleckého díla je vizuální analýza (pořízení fotodokumentace) a následné proměření vlastností předmětu za pomoci spektrálních metod. Nedestruktivní metody,

jako jsou UV/Vis, fluorescenční, infračervená a Ramanova spektroskopie, mohou vést k selektivnímu odběru vzorků pro další analýzy, čímž se zvýší kritický sběr dat a zároveň se minimalizuje destrukce historického předmětu [61-63].

- Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) ve spojení s mikroskopem se používá k analýze textilních vzorků, nátěrů a povrchových úprav [64]. Je vhodná obzvláště pro analýzu organických sloučenin, protože infračervená spektroskopie umožňuje sledovat vibrační stavy v molekulách.
- Ramanova spektroskopie je široce využívaná pro charakterizaci organických materiálů, jako jsou například organická barviva [62]. Nevýhodou této techniky je silná fluorescence bílkovin v matrici v případě textilních barviv, která znesnadňuje identifikaci signálu. Nicméně, díky vývoji nových metod, jakou je Ramanova spektroskopie v kombinaci s Fourierovou transformací nebo povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, se použití této techniky vylepšilo. Nyní je možné měřit *in situ* a s dobrým prostorovým a spektrálním rozlišením [65,66].
- 3D fluorescenční spektroskopie již byla použita pro charakterizaci zdroje barviva v různých referenčních a historických vzorcích [67]. Fluorescenční spektroskopie je spolehlivá a citlivá technika, která může být aplikována *in situ*. Její nevýhodou jsou široké absorpční a fluorescenční pásy při měření na povrchu textilu a velký vliv prostředí na měření (citlivost na pH, substrát, chemická citlivost, přítomnost jiných sloučenin a další) [63].

3.4.2. Mikro-destruktivní techniky

Nejčastěji používanými analytickými technikami v oblasti analýzy barviv jsou mikro-destruktivní techniky. Nejprve se analyt získává izolací z matrice, následně se separuje a nakonec se analyzuje separačními technikami. Obecně platí, že identifikace barviva analytickými metodami je založena na kvalitativním a kvantitativním porovnávání výsledků. Je třeba uvést, že v případě

chromatografických metod je analýza barviva pouze kvalitativní a není tedy možné říci, kolik bylo skutečného množství barviva na uměleckém předmětu.

Chromatografické metody jsou dobrou volbou pro analýzu polárních a ve vodě rozpustných sloučenin. Nejčastěji používanou metodou pro analýzu organických barviv je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) se spektrofotometrickým (UV/Vis) detektorem. V posledních letech byly zavedeny také detektory s diodovým polem (DAD) a hmotnostní detektory (MS), díky nimž byly výrazně zlepšeny detekční limity a došlo k identifikaci dosud neznámých složek [30,68-75]. Dále je tu fluorimetrický detektor [76], který má velkou sensitivitu, ale na druhé straně má omezené využití, protože barviv vykazujících fluorescenci je méně.

Díky chromatografickým podmínkám je nutnost použití kolony s reverzní fází (nejběžněji C8 a C18). Nejčastěji používaná eluční činidla jsou voda, acetonitril a methanol, většinou s konstantním přídatkem kyseliny, která se používá pro dosažení reversibilní disociace analytů. Mezi nejčastěji používané přídatky do mobilní fáze patří fosfáty a organické kyseliny, jako jsou například trifluoroctová a mravenčí kyselina. Eluce probíhá v gradientovém režimu [77].

Elektroforéza je pro stanovení obsahu organických složek barviv v historických vzorcích jen zřídka využívána, avšak i takové práce se objevují [78,79]. Ve studiu přírodních barviv nebyla plynová chromatografie (GC) [80-82] příliš využívána, vzhledem k relativně vysoké molekulové hmotnosti a polaritě cílových skupin. Další nevýhodou této metody je složitá příprava vzorku před vlastním stanovením a vysoké nároky na přístrojové vybavení a personál laboratoře. Většina flavonoidů navíc obsahuje ve své chemické struktuře alespoň jednu hydroxylovou skupinu, což značně znesnadňuje její chromatografické (GC-MS) stanovení. Tento problém může být překonán derivatizací vzorku [83]. Tvorba vhodných derivátů zajistí vyšší těkavost vzorku, zvýší teplotní stabilitu,lepší citlivost a selektivitu detekce.

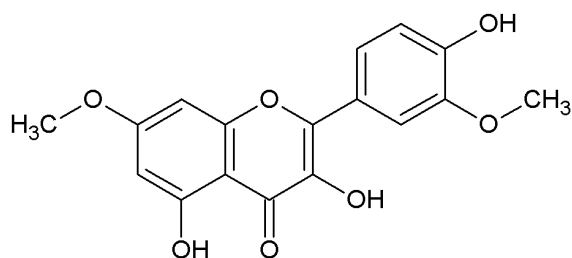
S ohledem na analytické techniky pro identifikaci a charakterizaci barviv je zřejmé, že nedestruktivní techniky jsou cenným nástrojem při použití pro předběžný průzkum historických objektů, ale není dostačující pro přesnou identifikaci organických barviv. Barviva se skládají z extrémně složitých směsí, jejichž charakteristika může být dosažena pouze díky analýze separačními technikami, a proto je potřeba i mikro-destruktivních metod. Nejslibnější technikou je kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS), neboť umožňuje identifikovat i

neočekávané nebo neznámé sloučeniny, které jsou obsažené v historických předmětech [84]. Nicméně v současné době byla tato technika použita pro charakterizaci relativně malého počtu barviv.

3.5. Rhamnazin

Rhamnazin (3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on, obr. 3) patří strukturně mezi flavonoly, které jsou, stejně jako flavonoidy, syntetizovány rostlinami a jsou hlavními chromofory ve většině používaných žlutých barviv.

Tento rostlinný flavonol je hojně rozšířen v přírodě, v ovoci, zelenině, čaji, dále pak v běžně se nacházejících rostlinách, například v řešetláku počistivém (*Rhamnus Catharticus*), jírovci maďalovi (*Aesculus hippocastanum*), morači zakrovnatém (*Ammi visnaga*), blahovičnicku kulatoplodém (*Eucalyptus Globulus*), meduňce lékařské (*Melissa officinalis*) a z těchto rostlin je také izolován [16,79]. Rhamnazin je znám pro své terapeutické účinky. Užívá se jako preventivní přípravek při kardiovaskulárních onemocněních, rakovině a hepatitidě [85,86]. Dále také flavonoly vykazují antioxidační aktivitu, antihepatotoxické a protizánětlivé vlastnosti a inhibují některé enzymy [87-90]. Rhamnazin je zkoumán především díky těmto farmaceutickým vlastnostem.



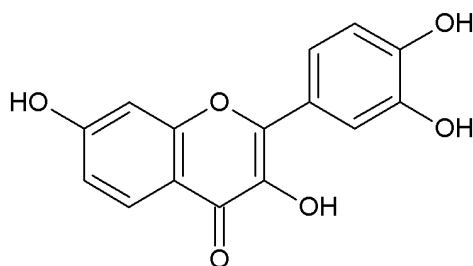
Obr. 3: Strukturní vzorec rhamnazinu.

3.6. Fisetin

Fisetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-on, obr. 4) je flavonol. Lze ho nalézt v celé řadě rostlin, stromů a keřů, jako jsou například akáty (*Acacia greggii* a *Acacia berlandieri*), butea (*butea monosperma*), dřezovec trojtrnný (*Gleditsia triacanthos*), žlutý cypřiš (*Callitropsis nootkatensis*) nebo ruj vlasatá (*Rhus cotinus*) [91]. Také mnoho druhů ovoce (jahody, borůvky, jablka, hrozny) a zeleniny (slupka okurek a cibule) obsahuje fisetin [92-94]. Dále může být fisetin získáván z ovocných nebo rostlinných šťáv, například z vína a čaje [95].

Fisetin je v posledních letech aktivně zkoumán díky své biologické aktivitě s ohledem na jeho inhibiční účinek HIV-1 proteasy. Tento virem kódovaný protein je nezbytný pro zránění a zpracování viru a životaschopného substrátu pro boj proti HIV [96]. Fisetin se řadí mezi možné aktivátory sirtuinů (Sir2 proteiny) [97], které využívají NAD^+ k odstranění acetylové skupiny z proteinů. Sirtuiny se často angažují při kalorické restrikci. Za těchto stavů dochází k masivní deacetylaci proteinů v buňkách. Sirtuiny zřejmě takto pomáhají spouštět obrannou reakci proti stresové situaci vyvolané nedostatkem potravy. Studie ukázaly, kromě svých účinků na stárnutí, že fisetin má také protizánětlivé [98,99], anti-karcinogenní [100,101] a antivirové [102-105] účinky. Podobně jako mnoho jiných flavonoidů (například quercetin), je fisetin vzhledem ke svým strukturálním vlastnostem také silný antioxidant [106].

Fisetin může modulovat určité buněčné signální dráhy, zejména protein kinázy. U fisetinu bylo prokázáno, že indukuje transkripční faktor Nrf2 [107], což vede ke zvýšené expresi několika ochranných a antioxidantních genů. Fisetin je také silný inhibitor topoizomerázy, která řídí provádění změn ve struktuře DNA [108]. Tento účinek může být zodpovědný za anti-karcinogenní, ale bohužel i karcinogenní potenciál fisetinu [109].

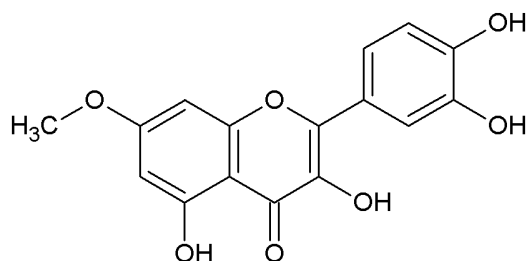


Obr. 4: Strukturální vzorec fisetinu.

3.7. Rhamnetin

Rhamnetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on, obr. 5) je přirozeně se vyskytující flavonol. Lze ho získat z mnoha přírodních zdrojů, například z hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*), koriandru setého (*Coriandrum sativum*), višně obecné (*Prunus cerasus* L.), srhy laločnaté (*Dactylis glomerata* L), pelyňku valéského (*Artemisia Valesiaca*), blahovičnicku kulatoplodého (*Eucalyptus Globulus*) a dalších rostlin [110,111].

Rhamnetin je dlouhodobě studován pro své slibné farmakologické vlastnosti. Výzkumy potvrdily, že může působit jako radiosenzitizér, který zvyšuje radioterapeutickou účinnost [112]. Kromě svých radioterapeutických účinků je také studován pro významný antioxidační [113,114] a protizánětlivý účinek [113]. Jeho působení bylo zkoumáno v souvislosti s rakovinou prostaty [113]. Dále byl studován možný kladný účinek rhamnetinu při obezitě, která je významným rizikovým faktorem pro některá onemocnění, jako je diabetes mellitus, hypertenze a ischemická choroba srdeční. Rhamnetin snižuje hromadění lipidů a inhibuje zvýšení obsahu triglyceridů v tukových buňkách [115].



Obr. 5: Strukturní vzorec rhamnetinu.

3.8. Fyzikální a chemické vlastnosti studovaných látek

Studované látky (obr. 3-5) jsou za laboratorní teploty světle žluté, pevné sloučeniny. Dobře se rozpouští v methanolu, ethanolu, acetonu, acetonitrilu a hydroxidu sodném a draselném. Rozpustnost ve vodě a v pufrch je omezená, např. ve vodném roztoku Brittonova -Robinsonova pufru o pH = 6,5 byla dosažena maximální koncentrace $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po sonifikaci a při pH = 4 se látka nerozpouští již při koncentraci $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Studované látky jsou v pevném

stavu stabilní, avšak v roztoku podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem v závislosti na složení roztoku [113,116,117].

Studované látky podléhají v roztoku disociaci do několika stupňů v závislosti na počtu hydroxylových skupin v molekule. Znalost disociačních konstant je nutná pro specifikaci jejich redoxních vlastností v prostředích s různými hodnotami pH, nicméně jejich správné určení je spojeno s problémem nedostatečné stability zásobních roztoků v přítomnosti vzdušného kyslíku [118-120].

3.9. Elektrochemické vlastnosti flavonolů

Studované látky jsou snadno elektrochemicky oxidovatelné, a proto mohou být voltametricky stanovovány na vhodné pevné či pastové elektrodě. Oxidační reakce probíhá přes kaskádu mechanismů, které z počátku vedou k oxidaci hydroxylové skupiny na kruhu B. Následně se oxidují zbývající hydroxylové skupiny na kruzích C a A [121]. Elektrochemické studie ukázaly trendy, jak flavonoidy poskytují elektron [122]. Oxidační mechanismus polyfenolů a stabilita jejich oxidačních produktů závisí na pH prostředí [83,123]. Elektrochemická oxidace flavonolů je poměrně často studována [20,118-120,124]. Oxidační degradace zahrnuje přítomnost dalších chemických reakcí, jako je hydroxylace nebo dimerizace [125].

Jungbluth a kol. [126] studovali reakce flavonolů s kationty kovů ve směsi acetonitrilu a kyseliny sírové (30/70, v/v). Autoři identifikovali produkty reakce jako 2-(hydroxybenzoyl)-2-hydroxy-3-(2*H*)-benzofuranony. Elektrochemické chování sloučenin studovali za pomoci cyklické voltametrie. Masek a kol. [127] zaznamenali dva oxidační píky při elektrochemické oxidaci flavonoidů v nevodném prostředí za pomoci cyklické a diferenční pulzní voltametrie. Sloučeniny, které obsahují dvě hydroxylové skupiny na kruhu B, jsou snadněji oxidovatelné (nižší hodnota potenciálu prvního píku na cyklické voltametrii), než ty, které obsahují pouze jednu hydroxylovou skupinu v kruhu A. Autoři navrhli, že první pík ve voltamogramu by mohl být přičítán elektrochemické oxidaci hydroxylové skupiny na kruhu B, která je spojena s výměnou jednoho nebo dvou elektronů v závislosti na počtu hydroxylových skupin na kruhu B. Následující

pík lze přičíst elektrochemické oxidaci na kruhu A a C. Tato skutečnost je také v souladu s výsledky Zielinska a kol. [128], Nematollahi a kol. [129] a Sokolová a kol. [130].

Hvattum a kol. [131] studovali reakci flavonolů se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem (DPPH \cdot) v prostředí acetonitrilu a methanolu. Jako zástupci flavonolů byli vybrány látky quercetin, kaempferol a myricetin. Pro quercetin byly nalezeny a identifikovány dva oxidační produkty 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dimethoxy-2,3-dihydrochromen-4-on a 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,3,5,7-tetrahydroxy-2-methoxy-2,3-dihydrochromen-4-on. Díky chromatografickým měřením zjistili, že kaempferol a myricetin mají stejné produkty jako quercetin, avšak s příslušnými methylovými skupinami.

Cyklické voltamogramy flavonolu kaempferolu v neutrálním prostředí (methanol : 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,5) ukazují, že tato sloučenina je elektrochemicky aktivní a podle autorů [121,132,133] se jedná o dvouelektronový proces. Yang a kol. [132] a Jorgensen a kol. [118] navrhli oxidační mechanismus flavonolů kaempferolu a quercetinu, kde oxidační rodukt vznikne dvouelektronovým přenosem. Dvouelektronová oxidace mateřského flavonolu je navržena tak, že po prvním elektronu vzniká fenoxylový radikál, z kterého následným elektronovým přenosem a sérií chemických reakcí vznikne konečný oxidační produkt, který byl identifikován jako 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon pro quercetin a 2-(4-hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranon pro kaempferol. Struktura těchto produktů byla identifikována díky UV/Vis, MS, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopii. Zheng a kol. [134] studovali kaempferol v pufovaném prostředí a zjistili, že se jedná o quazireversibilní heterogenní elektronový přenos. Anodické i katodické proudy jsou úměrné rychlosti polarizace. Ze závislosti potenciálu na pH usuzují, že příjem elektronů je doprovázen příjmem stejného počtu protonů. Intenzity píků se s hodnotou pH mění.

Janeiro a kol. [135] studovali elektrochemickou oxidaci flavonolu morinu ve vodném prostředí za pomoci cyklické, pulzní a square-wave voltametrie. Na cyklické voltametii morinu byly nalezeny dva oxidační píky, kde první pík je reversibilní a druhý ireversibilní, dále jeden redukční pík, který odpovídá oxidačnímu produktu vzniklému po první oxidační vlně. He a kol. [136] charakterizovali flavonoly morin a kaempferol spektrálními a voltametrickými metodami ve vodném prostředí. V případě kaempferolu je možné vidět na cyklickém voltamogramu jednu ireversibilní vlnu. U morinu jsou na cyklickém voltamogramu vidět dvě anodické vlny, které

korespondují s dvěma katodickými vlnami. Velmi nízké katodické píky naznačují nízký stupeň reversibility. První oxidační vlna, jak u morinu, tak u kaempferolu, souvisí s oxidací 4'-OH skupiny na kruhu B, kde vzniká fenoxyl radikál za pomoci jednoho elektronu a jednoho protonu. Současná oxidace 2',4'-OH skupin na kruhu B u morinu není pravděpodobná, jelikož se chinon netvoří v *meta*-polohách u benzenových kruhů, ale v polohách *orto*- a *para*- [136]. Kang a kol. [137] navrhli oxidační mechanismus flavonolu morinu, kde se oxidují dvě hydroxylové skupiny v poloze 2',4' na chinon. Tento oxidační mechanismus je podobný jako u ostatních flavonoidů, jako je například quercetin a rutin [125].

Liu a kol. [138] studovali elektrochemické chování isorhamnetinu v pufovaném prostředí. Na cyklické voltametii byly zaznamenány dvě anodické vlny a jedna katodická. První oxidační vlna je jedoelektronová a reversibilní. Jedná se o oxidaci 4'-hydroxylové skupiny na kruhu B. S touto vlnou koresponduje katodická vlna, která odpovídá redukci 4'-oxoskupiny. Druhá anodická vlna je ireversibilní a souvisí s oxidací hydroxylových skupin v poloze C5 a C7 na kruhu A.

Masek a kol. [124] navrhli oxidační mechanismus hydroxymorinu (2-(2,4,5-trihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on) v acetonitrilu. Oxidace hydroxylové skupiny na kruhu B se účastní jeden elektron a jeden proton. Následuje druhý krok oxidace, kde se oxiduje hydroxylová skupina v poloze 3 na kruhu C za účasti jednoho elektronu a jednoho protonu.

Sokolová a kol. [139] studovali flavonol quercetin ve vodném prostředí. V cyklické voltametii quercetin vykazuje tři oxidační vlny. První dvoelektronová oxidační vlna je quazireversibilní a souvisí s oxidací 3',4'-OH skupin na kruhu B. Druhá oxidační vlna je vlna produktu, který vznikl po prvním elektronovém přenosu. Třetí oxidační vlna souvisí s oxidací hydroxylových skupin v polohách C5 a C7. Proces oxidace je silně závislý na pH. Při hodnotách pH nad 7,0 se hydroxylová skupina quercetinu deprotonuje, což výrazně usnadňuje proces uvolňování elektronu [121,128]. Identifikace oxidačních produktů byla ztížena nestabilitou quercetinu. Makris a kol. [120] studovali flavonol quercetin. Vystavili ho hydroxylové oxidaci za přítomnosti katalyzátoru $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Objevili dva hlavní oxidační produkty, ale neidentifikovali je. Navrhli možnou oxidaci, která vede přes tvorbu nestabilního Cu^{2+} -chelátu k nízkomolekulárním produktům (3,4-dihydroxybenzoová kyselina a kyselina gallová). Zhou a kol. [140] našli 18 možných oxidačních produktů díky analýze GC-MS a LC-MS. Sokolová a kol. [130,139] navrhli oxidační mechanismus quercetinu, kde oxidačním produktem je 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-on. Ramešová a kol. [117] stanovili oxidační mechanismus

quercetinu jako kaskádu dějů, kde nejprve vzniká produkt 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-on. Tento produkt se dále rozkládá na 2-(3,4-dihydroxyfenyl) -2-oxooctovou kyselinu, 2,4,6-trihydroxybenzoovou kyselinu a 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu [113]. Uvedené produkty byly identifikovány pomocí HPLC-MS a GC-MS.

Látky studované v této práci sice v posledních letech získaly velkou pozornost díky svým biologickým účinkům, ale jejich základní elektrochemické vlastnosti nejsou stále důkladně prozkoumány.

Markovic a kol. [141] zjistili, že se vzrůstající hodnotou pH se oxidační vlny fisetinu posouvají k negativnějšímu potenciálu. To znamená, že se na mechanismu podílí protony.

Maza a kol. [142] studovali elektrochemickou oxidaci fisetinu a zjistili, že se fisetin v roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) s pufrům o pH 4,00 (15% : 85%, v/v) oxiduje při nízkých potenciálech. Reakce je reversibilní a zahrnuje dva elektrony a dva protony. Na cyklické voltametii fisetin vykazuje tři oxidační píky. První pík odpovídá oxidaci 3',4'-dihydroxy-skupiny, jak již bylo v předešlých odstavcích naznačeno. Druhý pík souvisí s oxidací prvního píku. Třetí pík odpovídá oxidaci hydroxylové skupiny v poloze C7. Dále také studovali posun oxidačních píků vlivem pH, který může být vysvětlen přenosem protonu, který je součástí přenosu náboje. Autoři nenavrhlí konkrétní oxidační mechanismus fisetinu. Dále zjistili, že fisetin se v roztoku DMSO s pufrům adsorbuje na povrch elektrody. Výsledky ukazují, že jak reaktant, tak produkt, se adsorbují na povrch elektrody. Osman a kol. [143] navrhli mechanismus oxidace fisetinu, kde fisetin reaguje s dioxidem (O₂) díky působení peroxidázy s následným produktem peroxidu fisetinu, který po nukleofilní reakci na C4 atomu generuje endoperoxid. Následná analýza díky HPLC odhalila tvorbu tří hlavních oxidačních produktů, a to 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu, 2,4-dihydroxybenzoovou kyselinu a 2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-dihydroxybenzoovou kyselinu.

Elektrochemická oxidace rhamnazu a rhamnetinu nebyla dosud studována a v literatuře nalezena. Studium oxidace flavonoidů a tvorby oxidačních meziproduktů za pomoci elektrochemických metod je důležité především proto, že mohou být zdrojem informací užitečných při určování jejich možného uplatnění při terapeutických procesech.

3.10. Teorie reakčních mechanismů

Každou chemickou přeměnu můžeme popsat jejím mechanismem, tj. sledem elementárních reakcí (reakčních kroků), které se odehrávají na molekulární úrovni. Výsledný navržený mechanismus a jeho řešení má vysvětlovat všechny známé experimentální skutečnosti a musí být slučitelný s kinetikou reakce do všech důsledků.

Heterogenní přenos elektronů je velice často spřažen s homogenní chemickou reakcí různých typů. Tyto mechanismy jsou běžné pro většinu organických sloučenin.

Podle vzájemného pořadí chemického děje (C) a elektrodového děje (E), lze rozlišit následující základní typy mechanismů [144]:

- Chemická reakce předřazená vlastnímu elektrodovému ději (CE - mechanismus)
- Chemická reakce následná po elektrodovém ději (EC – mechanismus)
- Reakce vřazená do elektrodového děje (ECE – mechanismus)

Tímto způsobem je možné sledovat zejména velmi rychlé reakce, které bývají těžko přístupné jiným měřením, a proto je voltametrie vhodnou metodou pro studium rychlých reakcí v roztoku. Vhodnou změnou rychlosti polarizace lze identifikovat produkty a analyzovat probíhající děje.

3.10.1. CE mechanismus

V případě CE mechanismu vzniká forma A depolarizátoru chemickou reakcí z formy C (inaktivní v daném oboru potenciálů) a přechází elektrodovou reakcí na produkt B.

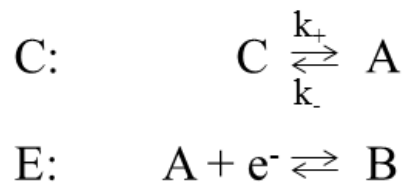


Schéma 1: CE mechanismus pro redukci látky C.

Kde k_+ je rychlostní konstanta tvorby depolarizátoru A. Rychlostní konstantu zpětné reakce k_- lze vyjádřit pomocí rovnovážné konstanty K , kterou lze definovat poměrem koncentrace elektroinaktivní formy ke koncentraci formy elektroaktivní.

Odčerpáním aktivní formy elektrodovou reakcí se rovnováha stále porušuje. Limitní proud ovlivňovaný předřazenou chemickou reakcí je vždy větší, než by byl limitní difúzní proud inaktivní formy. Je-li koncentrace depolarizátoru velmi malá vzhledem ke koncentraci inaktivní formy, je limitní proud řízen prakticky jen rychlostí chemické reakce [145]. Při větší koncentraci depolarizátoru má na velikost proudu vliv i rychlost difúze. Podobně je tomu, zvýšíme-li značně rychlost vzniku depolarizátoru, např. zvýšením teploty, změnou pH a podobně [144]. Molekula atrazinu elektrochemicky neaktivní v zásaditém prostředí poskytuje redukční vlnu, pokud dojde k protonizaci molekuly okyselením roztoku [146].

Nejnámějším CE mechanismem je redukce organických kyselin [147,148]. Elektroaktivní kyselá forma se zpravidla redukuje při pozitivnějším potenciálu než její disociovaná forma. V dostatečně kyselé oblasti pH, kde je v roztoku kyselina přítomna jen v nedisociované formě, se objevuje na křivce jen jedna katodická vlna. S rostoucím pH se výška této vlny postupně zmenšuje a zároveň při negativnějším potenciálu narůstá nová vlna, která přísluší redukci disociované formy. Pokud jsou elektrochemicky aktivní obě formy kyseliny, disociovaná i nedisociovaná, je součet výšek obou vln konstantní. Při dostatečně vysokém pH zůstane jen vlna negativnější [149]. Výška registrovaných proudů je pak dána rychlostí rekombinace aniontů s vodíkovými ionty a rychlostí disociace.

Dalším typickým příkladem kinetických proudů řízených rychlostí předřazené reakce jsou redukční vlny aldosa a hexosa [150,151] nebo redukce formaldehydu [152].

3.10.2. EC mechanismus

U EC mechanismu se jedná o jednu z nejjednodušších reakčních schémat, kde je heterogenní přenos elektronu ve spojení s reakcí, která probíhá v přilehlém roztoku. Primární produkt přechází depolarizací chemickou reakcí na elektrochemicky méně aktivní nebo inaktivní formu. Jestliže tento primární produkt depolarizace je v dokonalé mobilní rovnováze s původním depolarizátorem a jestliže jeho konverze na inaktivní formu je dostatečně rychlá, následná homogenní reakce nemá vliv na výšku ani tvar reversibilního ustáleného stavu. Chemický krok nemá vliv na polohu vlny, ale vlna může být posunutá díky rychlosti polarizace [153,154].

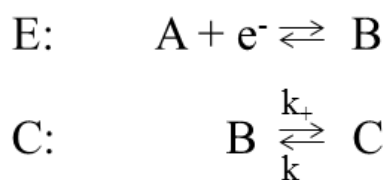


Schéma 2: EC mechanismus pro redukci látky A.

Přírůstek proudu závislý na rychlosti regenerace depolarizátoru bývá nazýván katalytickým proudem. Katalytická funkce tu přísluší produktu elektrodového děje B [144].

Reakce následné po elektrodovém ději se uplatňují velmi často u ireversibilních depolarizací, například oxidace fenolových sloučenin. Kinetické zhodnocení těchto reakcí je u ireversibilních procesů velmi obtížné, neboť je nutno uvažovat mechanismus vlastního elektrodového děje [154,155].

V literatuře je například EC mechanismus spojován se studiem anodické oxidace kyseliny askorbové [153], kde bylo zjištěno, že se kyselina reversibilně oxiduje na nestálý elektroaktivní meziproduct, jenž přechází velmi rychlou nevratnou chemickou reakcí na elektrodově inaktivní kyselinu dehydroaskorbovou. Podobné chování bylo zjištěno i u dalších endiolových sloučenin [156,157]. Dalším příkladem EC mechanismu může být elektrodový děj s nestálými meziproducty, spojený s následnými chemickými reakcemi [158].

3.10.3. ECE mechanismus

ECE mechanismus je složitější varianta následné chemické reakce po elektrodo­vém ději. Po elektrodo­vé reakci následuje chemická reakce, jejíž produkt je elektrochemicky aktivní a může být redukován, resp. oxidován na elektrodě. Jak první, tak druhý elektronový přenos se odehrává na povrchu elektrody. Meziprodukt C, vytvořený v průběhu ECE mechanismu, snadněji podléhá elektrodo­vé reakci ve velkém počtu případů [154]. Standardní potenciál druhého elektronového přenosu (E_2) je pozitivnější než standardní potenciál prvního elektronového přenosu (E_1). Pokud $E_2 > E_1$ v případě redukce nebo $E_2 < E_1$ v případě oxidace, jedná se o tzv. inverzi potenciálu. Z toho vyplývá, že v rámci rozsahu cyklické voltametrické vlny, každá molekula C, která doputuje na povrch elektrody je okamžitě přeměněna na molekulu D. Proto se reakce jeví jako dvouelektronová, i když se ve skutečnosti jedná o dvě jednoelektronové reakce oddělené chemickou reakcí [154,159]. Jedná se pak o dva elektrodo­vé děje jdoucí za sebou. Příkladem může být oxidace polyfenolu hematoxylinu v zásaditém prostředí [83]. Oxidaci této látky vystihuje dobře schéma popsané v následující kap. Spřažené chemické reakce.

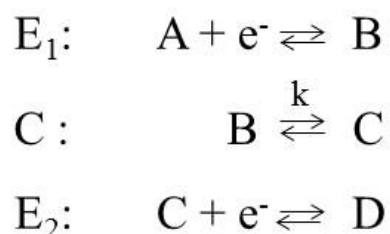


Schéma 3: ECE mechanismus pro redukci látky A.

Tento ECE mechanismus je důležitý pro objasnění skutečné podstaty mnoha organických a anorganických multi-elektronových elektrochemických reakcí. Při celkovém elektrodo­vém přenosu se mohou uplatňovat chemické reakce: disproportionace nebo komproporcionace [154].

3.11. Spřážené chemické reakce

Vztah elektronového přenosu a disociačních reakcí při oxidaci flavonoidů ukazuje schéma 4 [83]. Toto čtvercové schéma prvně publikoval Jacq [160] pro redukce. Schéma ukazuje souvislost mezi víceelektronovou oxidací sloučeniny AH_2 a její disociací do prvního stupně na anion AH^- charakterizovaný disociační konstantou pK_1 nebo disociací do druhého stupně na dianion A^{2-} charakterizovaný disociační konstantou pK_2 .

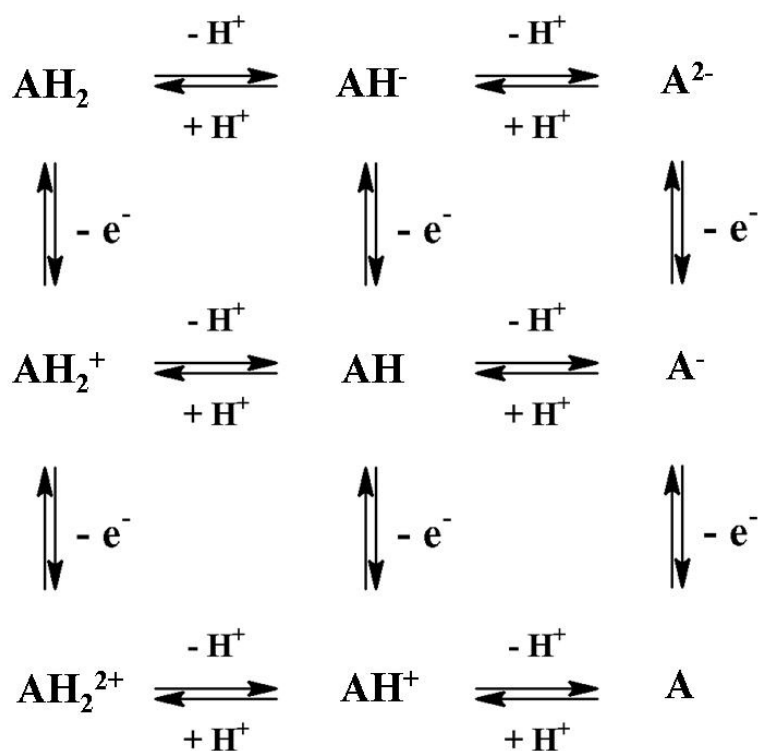


Schéma 4: Obecné schéma „carré“ pro oxidace.

Uvedené schéma se uplatňuje například při oxidaci flavonoidu hematoxylinu. Oxidace probíhá podle schématu různě v závislosti na pH roztoku a tedy přítomnosti disociovaných forem látky v roztoku [83].

4. Experimentální část

4.1. Použité reagensy

Studované látky: (99%) rhamnazin, (98%) fisetin a (99%) rhamnetin (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) byly použity bez dalšího čištění.

Zásobní roztoky látek nebyly připravovány a uchovávány, protože jsou to nestabilní látky a na každou analýzu se připravovaly čerstvé roztoky.

Pro přípravu základních elektrolytů a mobilních fází byly použity chemikálie: chlorid draselný (Lachema, Brno, Česká republika), hydroxid draselný (Lachema, Brno, Česká republika), ethanol (AppliChem, Darmstadt, Německo), aceton (mikroCHEM, Pezinok, Slovensko), acetonitril (Merck, Praha, Česká republika), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), tetrabutylammonium hexafluorofosfát (Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika, sušen při 70°C před použitím) – vše čistoty p.a.

Brittonovy – Robinsonovy tlumivé roztoky [161] o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol·dm⁻³ hydroxidu sodného (Lachema, Brno, Česká republika) s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (min 99,5%, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), fosforečnou (Lachema, Brno, Česká republika) a octovou (Lachema, Brno, Česká republika), každou o koncentraci 0,04 mol·dm⁻³. Všechny chemikálie byly použity bez dalšího čištění. Kyslík byl z používaných roztoků odstraněn proudem argonu (Messer Technogas, Praha, Česká republika). K chromatografickým měřením byl použit dusík (Messer Technogas, Praha, Česká republika).

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem pH 340 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Bronshoj, Dánsko). Kalibrace pH-metru byla prováděna standardními vodnými puframi za laboratorní teploty.

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda ze systému Mili Q (Milipore, Praha, Česká republika). Použité roztoky byly uchovány ve skleněných nádobách.

4.2. Použité přístroje

4.2.1. Elektrochemická měření

Pro elektrochemická měření cyklických voltamogramů byl použit potenciostat s rychlou odezvou [162], který byl zkonstruován v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i. Spojení s počítačem bylo zajištěno pomocí IEEE-rozhraní (PC–Lab, AdvanTech Model PCL–848) a digitalizace měřených výstupů byla provedena pomocí PCL-818 karty s 12 bitovým převodníkem pro A/D i D/A (AdvanTech Co., USA). Měření se provádělo ve skleněné elektrochemické cele s tříelektrodovým zapojením. Jako pracovní elektroda (WE) byla použita elektroda ze skelného uhlíku (o průměru 0,7 mm), referentní (RE) argentchloridová elektroda Ag|AgCl|1 M LiCl , byla oddělená od roztoku elektrolytu solným můstkem (0,43 V oproti Fc / Fc^+ -karboxylová kyselina) a jako srovnávací (CE) elektroda byla použita cylindrická platinová síťka. Roztok byl zbaven kyslíku probubláváním proudem argonu.

Elektrolýza a coulometrické měření při konstantním potenciálu bylo prováděno na potenciostatu Autolab PgStat 30 (Ecochemie, Utrecht, Nizozemí) s elektrochemickou celou s odděleným anodickým a katodickým prostorem v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (PIGE – parafilmem impregnovaná grafitová elektroda), jako referentní argentchloridová elektroda a uhlíková elektroda jako pomocná. Referentní elektroda byla od anodického prostoru oddělena fritou. Roztok byl míchán pomocí elektromagnetického míchadla a neustále probubláván proudem argonu.

4.2.2. Spektrofotometrická měření

Pro spektrofotometrická měření byl použit spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, Kalifornie, USA) s křemennými kyvetami s tloušťkou absorbující vrstvy 1 cm. Spektrofotometrická měření byla využívána při elektrolýze studovaných látek a při sledování jejich stability.

4.2.3. Spektroelektrochemická měření

Spektroelektrochemie byla prováděna za použití cely s opticky transparentní tenkovrstvou elektrodou (OTTLE), (Specac, Velká Británie) [163] s následujícími parametry: dostatečně opticky transparentní platinová síťka o velikosti 5x5 mm sloužila jako pracovní elektroda. Stříbrný drát měl funkci jako quazireferentní elektroda (0,35 V oproti Fc / Fc⁺ -karboxylová kyselina). Jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda. Elektrody jsou zabudovány v cele v tenké vrstvě (tloušťka 1,7 mm) mezi optickými okny. Rychlost polarizace byla 5 mV · s⁻¹. Spektrální změny byly v průběhu měření registrovány pomocí Agilent 8453 s diodovým polem UV/Vis spektrometr.

4.2.4. Chromatografická měření

Chromatografická měření byla měřena na přístrojích:

- 1) Agilent 1200 Series HPLC Systems s G1311A kvarterní gradientovou pumpou, G1322A odplyňovacím zařízením s G1329A automatickým dávkovačem a G1315B detektorem s diodovým polem (Agilent Technologies). Chromatografická separace byla prováděna na analytické koloně s reverzní fází C8 (HyPurity C8, 150x3 mm, 5 μm, Thermo Scientific, Dubuque, USA) a předkolonou C18 (HyPurity C18, 10x3 mm, 5 μm, Thermo Scientific, USA, Dubuque). Teplota kolony byla nastavena na 20°C. Použitá mobilní rozpouštědla byla (A): deionizovaná voda s 0,1% kyselinou fosforečnou a (B): acetonitril. Použitý gradientový program byl nastaven následovně: 0 - 2 min: 95% A; 2 - 30 min: lineární gradient do 40% A; 30 - 35 min: lineární gradient na 0% A a 100% B; 35 - 40 min: 100% B. Průtok byl 0,2 ml · min⁻¹. Nástříkový objem byl 20 – 40 μl. Sběrné parametry pro detektor s diodovým polem byly nastaveny na rozsah akvizice 190 - 800 nm s nastaveným krokem 2 nm.
- 2) Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s diodovým polem se skládá z PU-2089 kvarterního gradientového čerpadla s odplyňovačem a modulem Rheodyne 7125 (Jasco, Japonsko). Spojení vstříkovacího ventilu a detektoru bylo umožněno díky

Jasco MD-2010. Data byla zpracovávána softwarem ChromNav. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Agilent TC-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) s předkolonou Agilent TC-C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 μ m). Teplota kolony byla nastavena na laboratorní teplotu. Použitá mobilní rozpouštědla byla (A): deionizovaná voda s 0,3% kyselinou mravenčí a (B) acetonitril s 0,3% kyselinou mravenčí. Použitý gradientový program byl nastaven: 0 – 5 min: 85% A, 5 - 30 min: lineární gradient do 50% A, 30 - 40 min: lineární gradient do 30% A, 40 - 41 min: lineární gradient do 0% A, 41 - 45 min: 100% B. Průtok byl nastaven na 1 ml \cdot min⁻¹ a nástřikový objem byl 20 μ l. Sběrné parametry detektoru byly nastaveny na rozsah akvizice 200 - 650 nm s nastaveným krokem 4 nm.

- 3) Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem s ionizací za pomoci elektrospreje (HPLC-ESI-MS/MS). Měření bylo provedeno pomocí 1200 Infinity HPLC (Agilent Technologies, USA), připojeného k rozhraní Jet Stream ESI (Agilent Technologies, USA) s kvadrupolovým průletovým hmotnostním spektrometrem 6530 Infinity Q-TOF (Agilent Technologies, USA). Chromatografická separace proběhla při teplotě 30°C a byla provedena na analytické koloně s reverzní fází C-18 (C18 50 x 2,1 mm, 1,8 μ m, Agilent Technologies, USA) spojenou s předkolonou C-18 (TC-C18, 12,5 x 2,1 mm, 5 μ m, Agilent Technologies, USA). Mobilní fáze byly: (A): destilovaná voda s 1% kyselinou mravenčí a (B): acetonitril s 1% kyselinou mravenčí. Použitý gradientový program byl nastaven následovně: 0 - 2 min: 90% A; 3 - 11 min: lineární gradient do 50% A; 12 - 14 min: lineární gradient do 30% A; 15 - 19min: lineární gradient do 10% A; 20 - 24 min: 10% A. Průtok byl nastaven na 0,2 ml \cdot min⁻¹. Nástřikový objem byl 1 μ l. Podmínky pro elektrosprej byly nastaveny následujícím způsobem: sušící plyn (*drying gas*) (N₂, čistota > 98%): 350°C a 10 L \cdot min⁻¹, napětí na kapiláře (*capillary voltage*) 4,5 KV, rozprašovací plyn (*nebulizer gas*) 35 psig, ochranná atmosféra (*sheath gas*) (N₂, čistota > 98%): 375°C a 11 L \cdot min⁻¹. Količní plyn byl dusík (čistota 99,999%). Fragmentační potenciál (*fragmentor potential*) byl 175 V a kolizní energie pro experimenty MS/MS se pohybovaly v rozmezí 20 až 50 V v závislosti na cílové sloučenině. Vysoké rozlišení MS a MS/MS spekter bylo měřeno v negativním módu v rozmezí 100 - 3200 *m/z*. Stroj byl před každým

měřením kalibrován pomocí Agilent tuning mix HP0321 (Agilent Technologies, USA) připravený v acetonitrilu a byl naladěn *in continuo* ve srovnání s *m/z* 121,050873 a 922,009798 jako referenční roztok HP0921 (Agilent Technologies, USA).

4.3. Pracovní postupy

Před každým měřením bylo nutné připravit roztoky studovaných látek, neboť nemohly být uschovávány z důvodu nestability (viz kap.5.1.2., 5.2.2. a 5.3.2.).

4.3.1. Voltametrie a coulometrie

Veškerá použitá elektrochemická měření byla prováděna v elektrochemické cele v tříelektrodovém zapojení, jak je uvedeno v kap. 4.2.1. (Elektrochemická měření). Kyslík v roztoku byl vždy odstraněn proudem argonu. Po celou dobu měření byl argon přiváděn nad analyzovaný roztok. Před vstupem argonu do nádoby byla zařazena promývačka s příslušným rozpouštědlem. Vždy byla nejprve změřena základní linie, poté byl do roztoku přidán analyt a byl registrován voltamogram. Získaná elektrochemická data v digitální formě byla zpracována v programu Origin 8.0.

Měření voltametrických křivek bylo prováděno v roztoku Brittonova –Robinsonova pufru a 40% methanolu (*v/v*) nebo ve vodném roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu draselného. Z důvodů špatné rozpustnosti látek bylo měřeno v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu draselného za přítomnosti $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidem draselným. Nejprve byla naměřena základní linie a následně pokračovalo další měření. Před každým dalším záznamem cyklického voltamogramu byl roztok opět probublán argonem. Mezi měřeními byla elektroda opláchnuta deionizovanou vodou, důkladně vyleštěna pomocí oxidu hlinitého naneseném na jemném leštícím filcu DP-Nap (Struers, Roztoky u Prahy, Česká republika) a opět opláchnuta. Takto obnovený povrch elektrody byl připraven k dalšímu měření. Dlouhodobým opakovaným měřením bylo zjištěno, že látky

nejdou citlivé na světlo. Nebylo tedy nutné měřit v elektrochemické nádobce stíněné proti přístupu světla.

Coulometrie byla prováděna ve skleněné cele s odděleným anodickým a katodickým prostorem, jak je uvedeno v kap. 4.2.1. (Elektrochemická měření). Elektrolyzovaný roztok tvořila směs 15 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Roztok byl zbaven kyslíku proudem argonu. Katodický prostor byl také naplněn základním elektrolytem a odkysličen. Potenciál byl nastaven na požadovanou hodnotu potenciálu a kontrolován pomocí potenciostatu Autolab (model PGSTAT30), který zároveň registroval faradaický proud a náboj. Roztok byl míchán pomocí elektromagnetického míchadla. Po celou dobu elektrolýzy byl roztok probubláván proudem argonu. Spotřeba náboje odpovídala přenosu elektronů na molekulu podle Faradayova zákona, kde hmotnost látky m vyloučené na elektrodě je přímo úměrná prošlému náboji podle rovnice $m = QM/zF$, kde F je Faradayova konstanta ($F = 96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), z je počet elektronů, Q je prošlý náboj a M je molární hmotnost. Získaná data byla opět analyzována v programu Origin 8.0.

4.3.2. Spektrofotometrická měření

Při spektrofotometrických měřeních s Brittonovými – Robinsonovými puframi bylo postupováno následujícím způsobem: 80 μl studované látky o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v methanolu bylo převedeno do odměrné baňky obsahující 5 ml roztoku Brittonova – Robinsonova pufru (pH 4,3 – 11,2) a 40 % methanolu (v/v), který byl předem vybublán proudem argonu. Tento roztok byl převeden bez přístupu kyslíku do speciálně upravené křemenné kyvety (měrné tloušťky 1 cm) se septem, které zamezí přístupu vzduchu. Vzorek byl proměřen na spektrofotometru vůči pozadí Brittonův – Robinsonův pufr : methanol (3:2; v/v).

Roztoky studovaných látek o koncentraci $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byly měřeny také v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Měření bylo provedeno ve stejné křemenné kyvetě, v rozmezí vlnových délek 200 - 700 nm, a to ve všech případech. Jako pozadí sloužil roztok $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH.

Při měření vlivu působení kyslíku na změnu absorpčního spektra studované látky byla absorpční spektra měřena po otevření kyvety v intervalu 8 - 40 s. Míchání bylo prováděno ručně.

4.3.3. Spektroelektrochemická měření

Při spektroelektrochemických měřeních byla využita OTTLE cely vložena do UV/Vis spektrometru. Spektroelektrochemie byla měřena v roztoku Brittonova-Robinsonova pufru o pH 5,2 a pH 9,0 nebo v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH se studovanou látkou o koncentraci $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Ve spektroelektrochemických experimentech mohou být prováděny dva typy měření, a to registrování absorpčních spekter při plynulé změně vkládaného potenciálu (cyklický voltamogram) nebo snímání absorpčních spekter při zvoleném vloženém potenciálu (chronoamperometrie). Záznam cyklického voltamogramu se vždy provádí nejdříve, neboť je nutné najít vhodný potenciál elektrody, při kterém můžeme roztok elektrolyzovat. V praxi lze použít oba typy měření najednou.

Studovaný roztok byl připravován bez přístupu kyslíku a následně převeden do měrné OTTLE cely. Nejprve byl proměřen cyklický voltamogram, u kterého byl zjištěn vhodný potenciál pro chronoamperometrii. U cyklické voltametrie jsme sledovali *in situ* změnu UV/Vis spekter v závislosti na změně potenciálu. Následně u chronoamperometrie byl nastaven konstantní potenciál pracovní elektrody a zároveň jsme mohli sledovat *in situ* změnu spekter v rozmezí vlnových délek 200 - 700 nm. Rychlost polarizace byla nastavena na $5\cdot 10^{-3} \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Mezi měřeními byla spektroelektrochemická cely vymyta roztokem deionizované vody a následně elektrochemicky čištěna roztokem 0,1 M tetrabutylammonium hexafluorofosfátu (TBAPF₆) rozpuštěném v acetonitrilu.

4.3.4. Chromatografická měření

Produkty elektrolýzy studovaných látek byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s diodovým polem (HPLC-DAD) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Vzorek byl přenesen za nepřístupu vzduchu do vialky, která byla uzavřena proti přístupu vzdušného kyslíku septem. Podobně byly analyzovány standardní roztoky rhamnazinu, fisetinu a rhamnetinu a roztoky těchto látek před elektrolýzou.

Při sledování tvorby produktů v průběhu elektrolýzy bylo hamiltonkou odebíráno 40 μ l roztoku přímo z měřicí cely a dávkováno do speciální nízkoobjemové vialky předem naplněné argonem. Při měření vlivu působení kyslíku na změnu spektra studované látky byla vialka po prvním nástřiku otevřena a ručně promíchána. Po proběhnutí celé metody prvního nástřiku bylo vše cyklicky opakováno a chromatogramy byly registrovány po 35 - 50min.

5. Výsledky a diskuze

Elektrochemické chování studovaných látek nebylo v literatuře doposud objasněno. Počet a poloha hydroxylových skupin v chemické struktuře výrazně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti. Jelikož se chemická struktura studovaných látek liší v počtu a poloze hydroxylových skupin a dále v povaze některých substituentů, je objasnění jejich mechanismu oxidace významné pro vyjasnění rozdílných údajů v literatuře týkajících se oxidace flavonoidů. Rhamnazin (obr. 3) obsahuje ve své chemické struktuře dvě methoxy-skupiny. První v poloze 7 na kruhu A a druhou v poloze 3' na kruhu B. Rhamnetin (obr. 5) obsahuje ve své chemické struktuře jednu methoxy-skupinu v poloze 3 na kruhu A a fisetin (obr. 4) neobsahuje methoxy-skupinu žádnou. Narozdíl od rhamnazinu a rhamnetinu mu chybí hydroxy- skupina v poloze 5 na kruhu A. K určení oxidačního mechanismu byly použity nejen elektrochemické metody, ale také separační techniky a UV/Vis spektroelektrochemie.

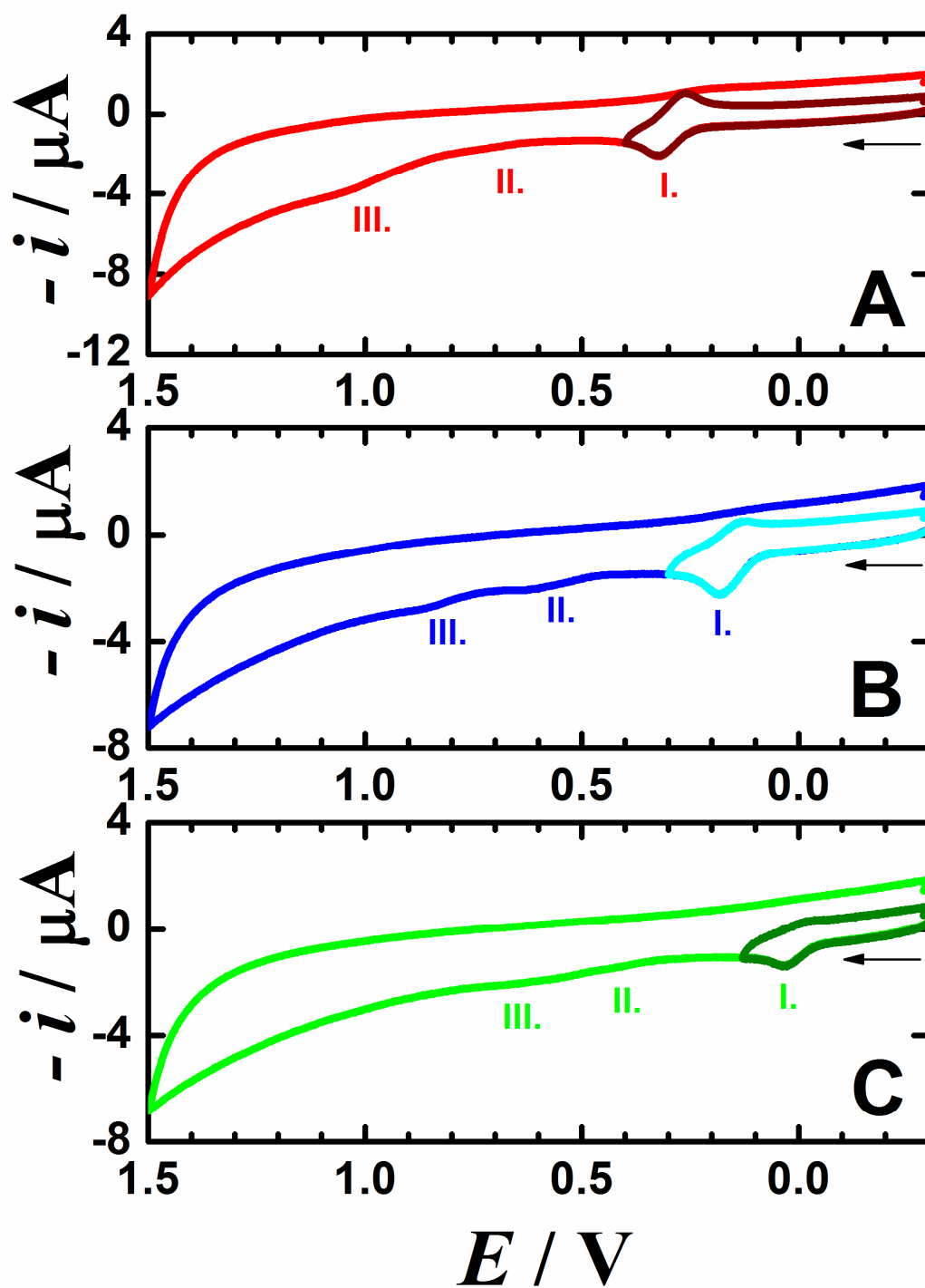
5.1. Rhamnazin

5.1.1. Elektrochemická měření

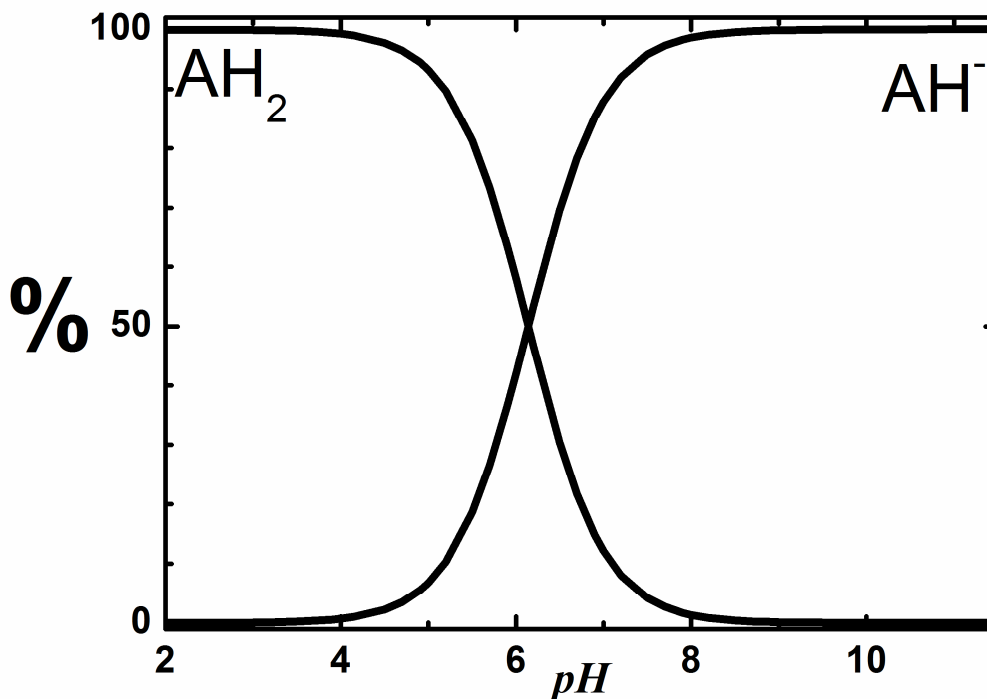
Pufrované prostředí

Elektrochemické chování rhamnazinu bylo studováno v pufrovaném prostředí, obr. 6-17. Cyklická voltametrie rhamnazinu, měřená ve vodném pufrovaném prostředí na elektrodě ze skelného uhlíku, vykazuje tři oxidační vlny v rozmezí potenciálů od -0,3 do 1,5 V, obr. 6. Na obr. 6-A, je vyobrazen cyklický voltamogram rhamnazinu při pH = 6,6, který vykazuje první oxidační vlnu při potenciálu 0,32 V. První oxidační vlna je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu 0,27 V. Druhá oxidační vlna se objevuje při 0,76 V a třetí oxidační vlna při 1,08 V. Obě tyto vlny jsou ireversibilní. Na obr. 6-B je cyklický voltamogram rhamnazinu s konečnou hodnotou pH = 8,9. První oxidační vlna při potenciálu 0,18 V je quazireversibilní, její redukční protipík se objevuje při potenciálu 0,13 V. Druhá oxidační vlna při 0,65 V je ireversibilní, stejně jako třetí oxidační vlna při potenciálu 0,86 V. Na obr. 6-C je

cyklický voltamogram rhamnazu při $\text{pH} = 10,5$, který vykazuje první oxidační vlnu při potenciálu $0,03 \text{ V}$. Druhá oxidační vlna se objevuje při potenciálu $0,41 \text{ V}$ a třetí oxidační vlna při potenciálu $0,65 \text{ V}$. Při této hodnotě pH se v roztoku již nevyskytují molekuly nedisociované látky, ale pouze anion, případně dianion. Distribuční diagram vypočtený ze známé disociační konstanty rhamnazu je zobrazen na obr. 7. V případě rhamnazu se uvádí teoreticky vypočtená disociační konstanta s hodnotou $\text{pK}_1 = 6,14 \pm 0,40$ [164], hodnota pK_2 není známa. Je patrné, že s rostoucím pH roztoku klesá reversibilita první oxidační vlny.



Obr. 6: Výběr cyklických voltamogramů $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: A) 6,6; B) 8,9; C) 10,5. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

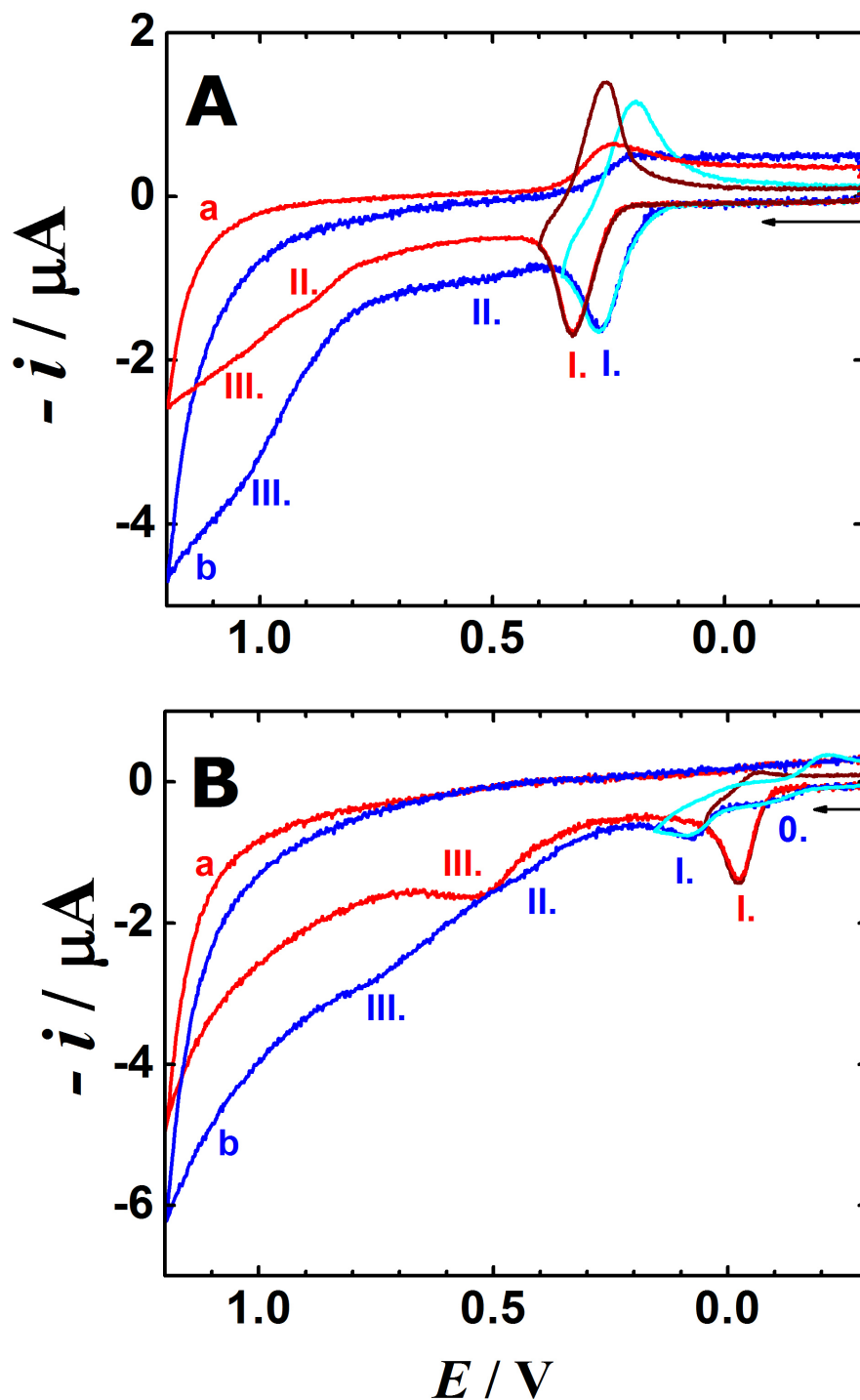


Obr. 7: Distribuční diagram rhamnazinu. Hodnota $pK_1 = 6,14 \pm 0,40$ [164], hodnota pK_2 není známá, viz příloha 1.

K posouzení elektrochemického chování rhamnazinu významně přispělo jeho porovnání s oxidačním mechanismem quercetinu, obr. 8. Quercetin je flavonoidní sloučenina, strukturně podobná rhamnazinu. Quercetin neobsahuje žádné methoxy- skupiny, které u rhamnazinu mohou hrát důležitou roli v jeho red-ox vlastnostech. Mechanismus oxidace quercetinu ve vodném prostředí jsme objasnili v nedávné publikaci [139]. Porovnání cyklických voltamogramů obou látek je na obr. 8. Cyklická voltametrie rhamnazinu vykazuje tři oxidační vlny v rozmezí potenciálů od -0,3 do 1,2 V ve vodném roztoku při $pH = 6,6$ (obr. 8-A, křivka a). První oxidační vlna je reversibilní a odpovídá oxidaci hydroxylové skupiny $C4'-OH$ na kruhu B. V případě rhamnazinu dochází k oxidaci při vyšším potenciálu než u odpovídající vlny v případě quercetinu. Druhá oxidační vlna souvisí s oxidací produktu vytvořeného při první oxidaci. Třetí oxidační vlna souvisí s oxidací hydroxylové skupiny na kruhu A, stejně jako v případě quercetinu.

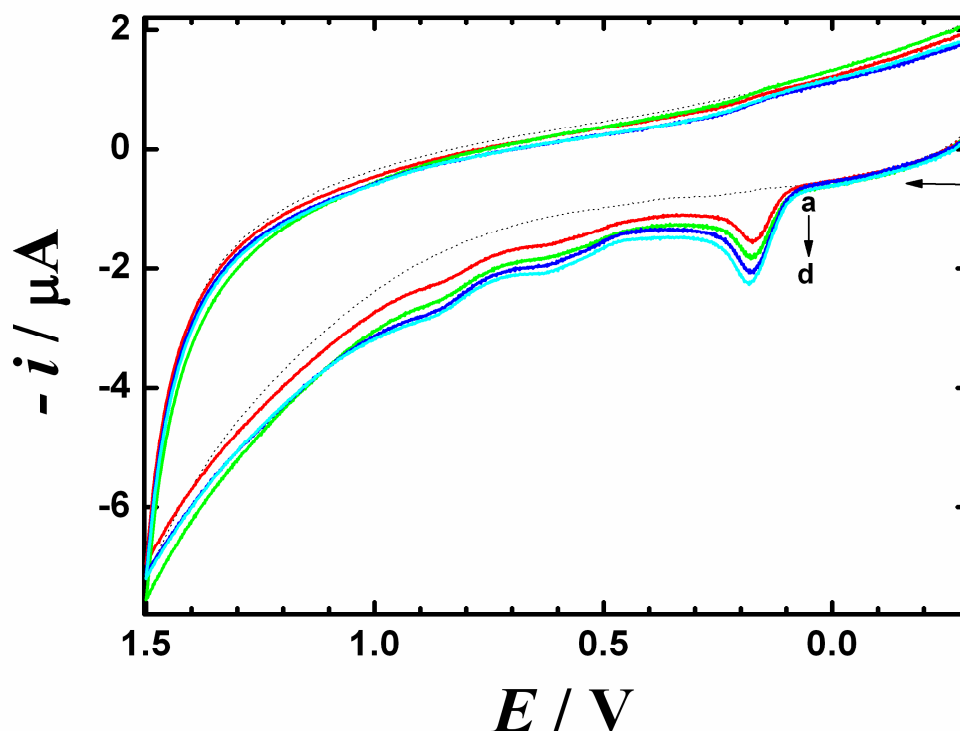
Významný rozdíl byl pozorován v elektrochemickém chování rhamnazinu a quercetinu v alkalickém prostředí. Cyklická voltametrie quercetinu při $pH = 10,8$ vykazuje další jednoelektronovou quazireversibilní oxidační vlnu při potenciálu -0,07 V, jejíž redukční protipík

se objevuje při potenciálu -0,21 V. Tato oxidační vlna (0.) souvisí s oxidací dianionu quercetinu přítomného v roztoku při této hodnotě pH (viz obr. 8-B, křivka b). Tato jednoelektronová oxidační vlna není přítomna u rhamnazu ani při vyšších hodnotách pH. Pravděpodobně rhamnazin disociuje do druhého stupně hůře než quercetin, který má dvě hydroxylové skupiny na kruhu B. Podle vypočtených hodnot nábojů na atomech kyslíku a vodíku příslušných hydroxylových skupin lze předpovědět, že po disociaci hydroxylové skupiny v poloze C4' bude další disociovaná hydroxylová skupina v poloze C5. Dianion rhamnazu neposkytuje oxidační vlnu ve studovaném rozmezí potenciálů. Jeho tvorbu lze pouze předpovídat díky snížení oxidační vlny anionu s rostoucím pH roztoku.



Obr. 8: Cyklický voltamogram $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a) rhamnazu b) quercetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: A) 6,6; B) 10,8. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

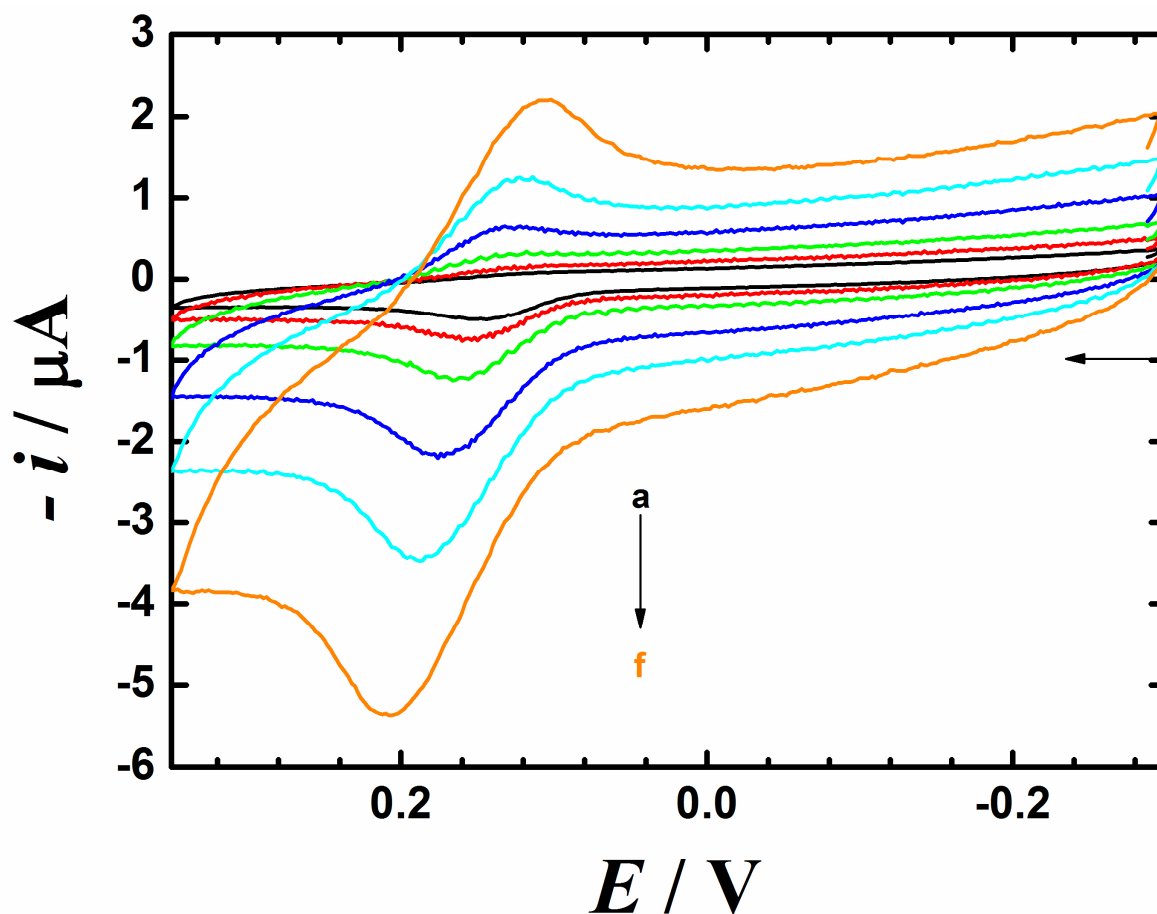
Koncentrační závislost anodické odezvy rhamnazinu byla měřena cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufovaném prostředí (obr. 9). S rostoucí koncentrací studované látky dochází u všech třech oxidačních vln ke zvýšení měřeného proudu. Výška oxidačního píku se zvyšuje s rostoucí koncentrací lineárně.



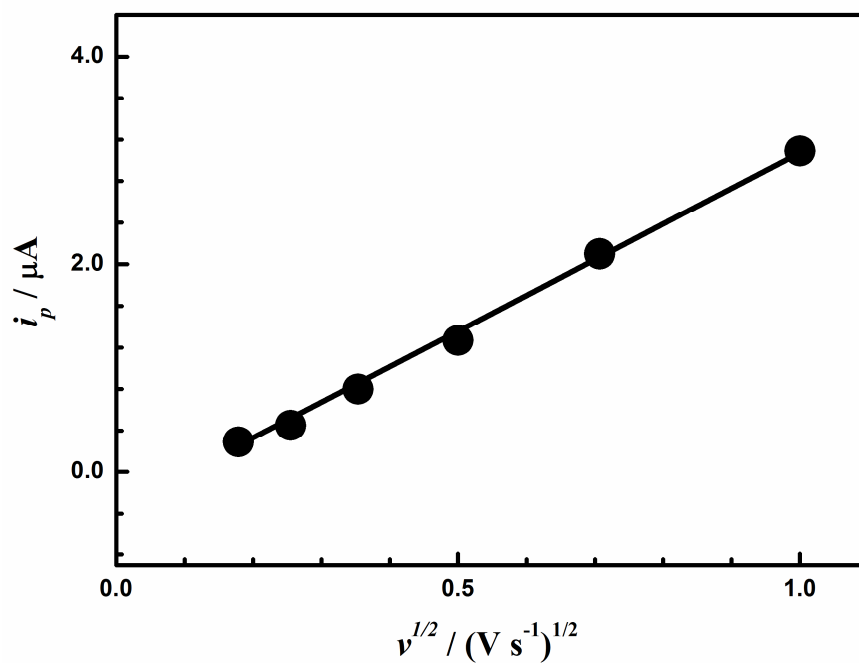
Obr. 9: Výběr cyklických voltamogramů rhamnazinu při různých hodnotách koncentrace a) 0,1; b) 0,15; c) 0,25; d) $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 8,8. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Černá tečkovaná křivka představuje cyklický voltamogram elektrolytu.

Cyklické voltamogramy (obr. 10) byly změřeny při různých rychlostech polarizace (v rozmezí $0,032$ až $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$). S rostoucí rychlostí polarizace narůstá výška oxidační vlny. Bylo zjištěno, že anodický proud první oxidační vlny vykazuje lineární závislost na druhé odmocnině rychlosti polarizace (obr. 11). Oxidační proces je difúzně řízen. Ze záznamů cyklické voltametrie s různou hodnotou rychlosti polarizace byl vynesena graf závislosti potenciálu první oxidační vlny na rychlosti polarizace (obr. 12). U píků v cyklické voltametrii byl pozorován posun potenciálu

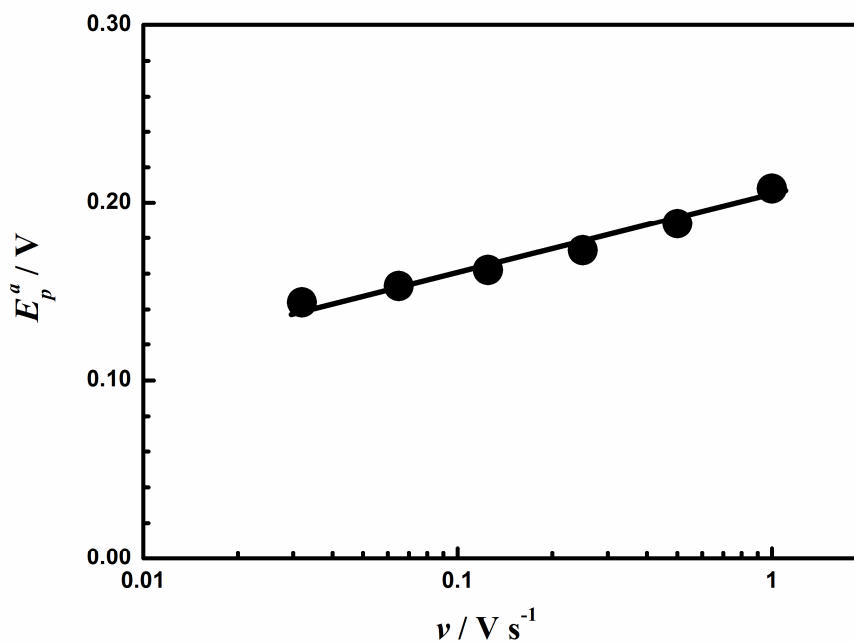
k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti polarizace. Tato závislost je lineární se směrnicí $\delta E/\delta \log v = 36 \text{ mV}$. Jelikož $\delta E/\delta \log c$ je 2 mV , oba tyto výsledky ukazují, že po elektronovém přenosu nedochází k bimolekulární chemické reakci, např. dimerizaci. Pro dimerizaci, která následuje přenos jednoho elektronu, jsou typické hodnoty $\delta E/\delta \log v = \delta E/\delta \log c = 19 \text{ mV}$ [154]. Jelikož coulometrická měření (viz kap.5.1.3.) ukázala, že při oxidaci dochází k přenosu dvou elektronů, výsledek $\delta E/\delta \log v = 36 \text{ mV}$ ukazuje na ECE proces (viz kap. 3.10.3.).



Obr. 10: Výběr cyklických voltamogramů $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazinu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 8,8. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5; f) $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

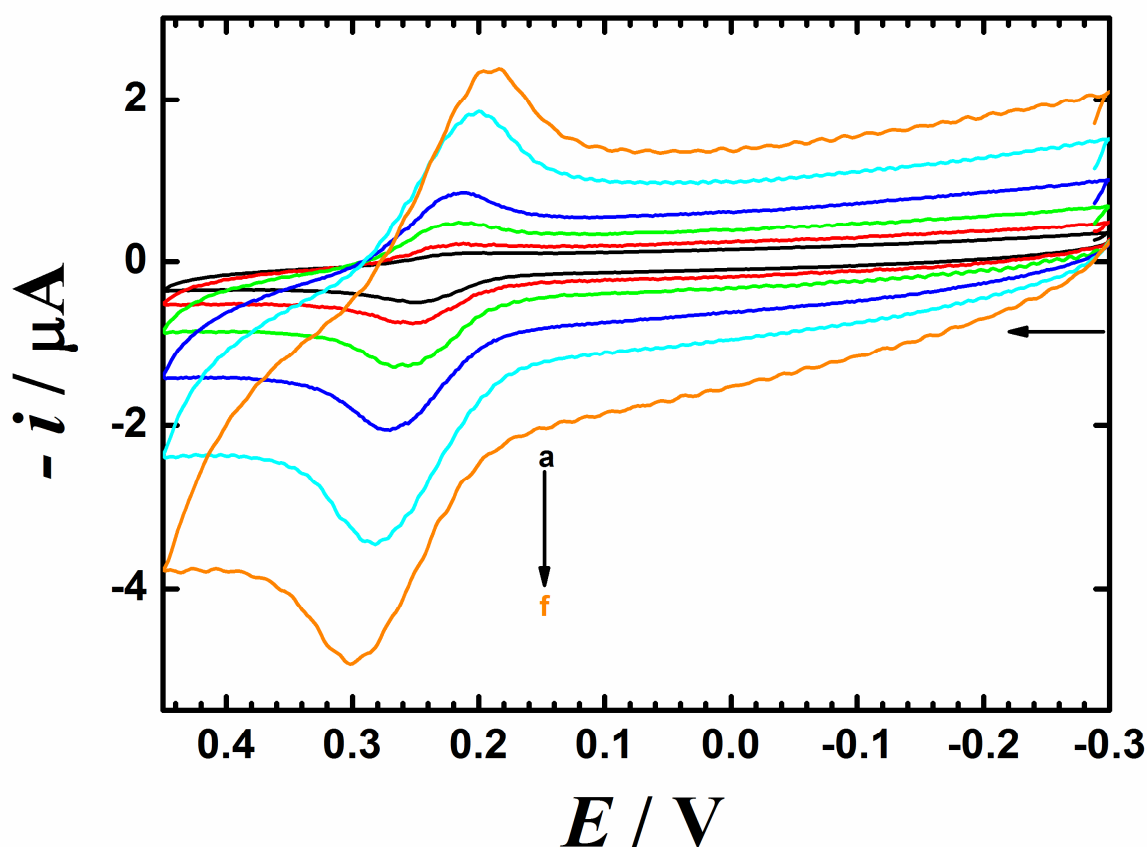


Obr. 11: Závislost výšky prvního oxidačního píku (I.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 10.

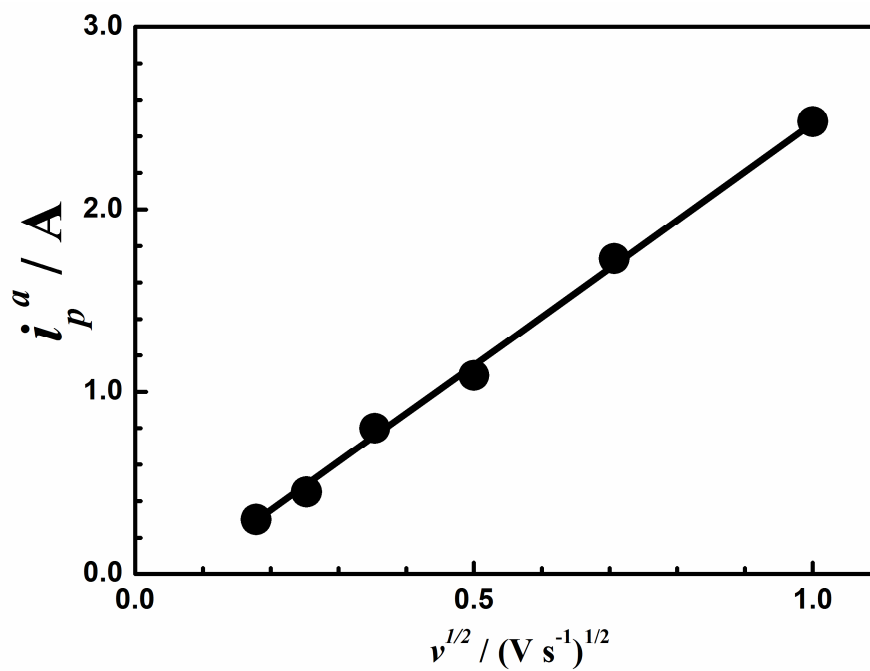


Obr. 12: Závislost potenciálu první oxidační vlny (I.) na rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 10.

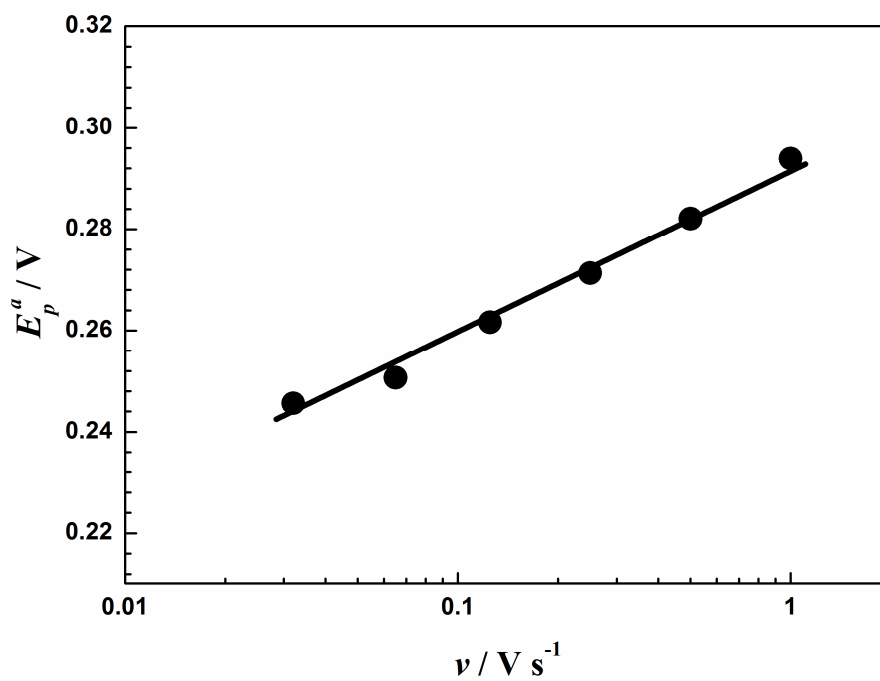
Stejné závislosti rychlosti polarizace (v rozmezí 0,032 až $1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) byly změřeny pro všechny měřené hodnoty pH (pH 4,3 až 11,4) s podobnými výsledky. Obr. 13 byl vybrán jako příklad elektrochemického chování v neutrálním prostředí. Se vzrůstající rychlostí polarizace vzrůstá i výška oxidační vlny. Závislost anodického proudu první oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace při pH = 7,4 je lineární (obr. 14), proces je kontrolován difúzí. Dále byl vynesena graf závislosti potenciálu oxidační vlny na rychlosti polarizace, obr. 15. Tato závislost je lineární se směrnici 33 mV. Tyto výsledky jsou v souladu s již uvedenými výsledky (obr. 10 – 12) a také se závislostmi v celém rozsahu měřených pH. Toto napovídá, že nedisociovaná molekula i molekula aniontu se oxiduje podobným mechanismem.



Obr. 13: Výběr cyklických voltamogramů $2\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ rhamnazu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 7,4. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5; f) $1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.



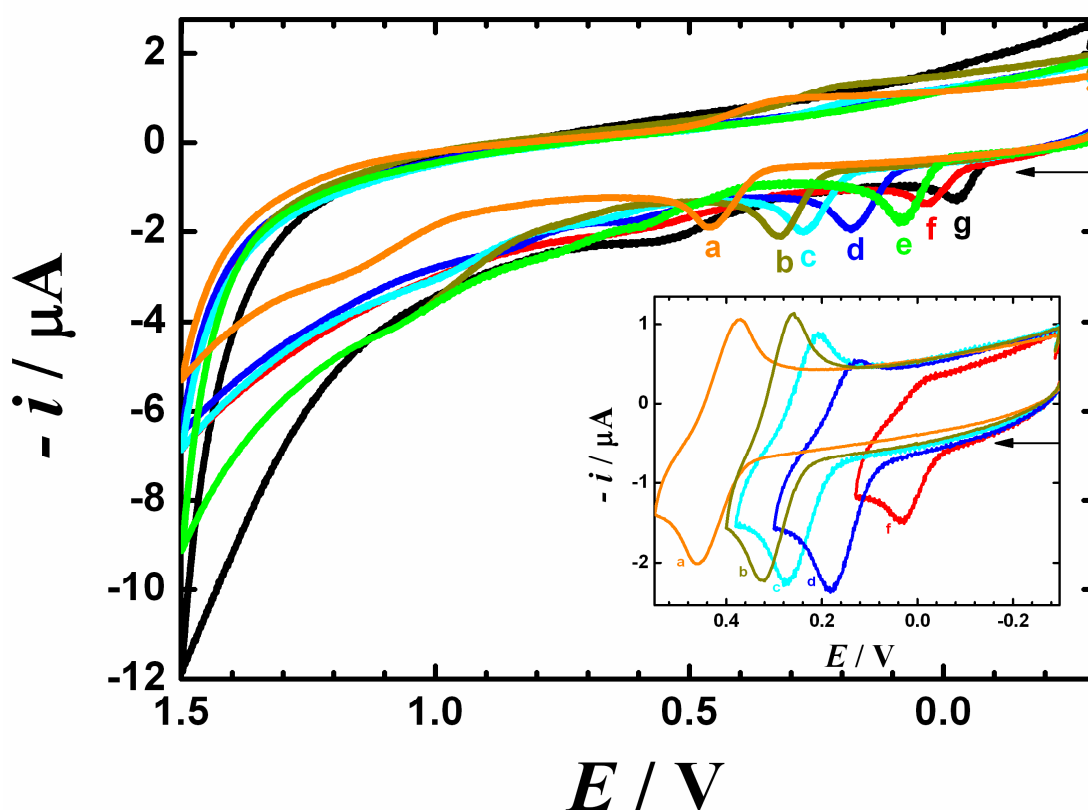
Obr. 14: Závislost výšky oxidačního píku (I.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 13.



Obr. 15: Závislost potenciálu oxidačního píku (I.) na rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 13.

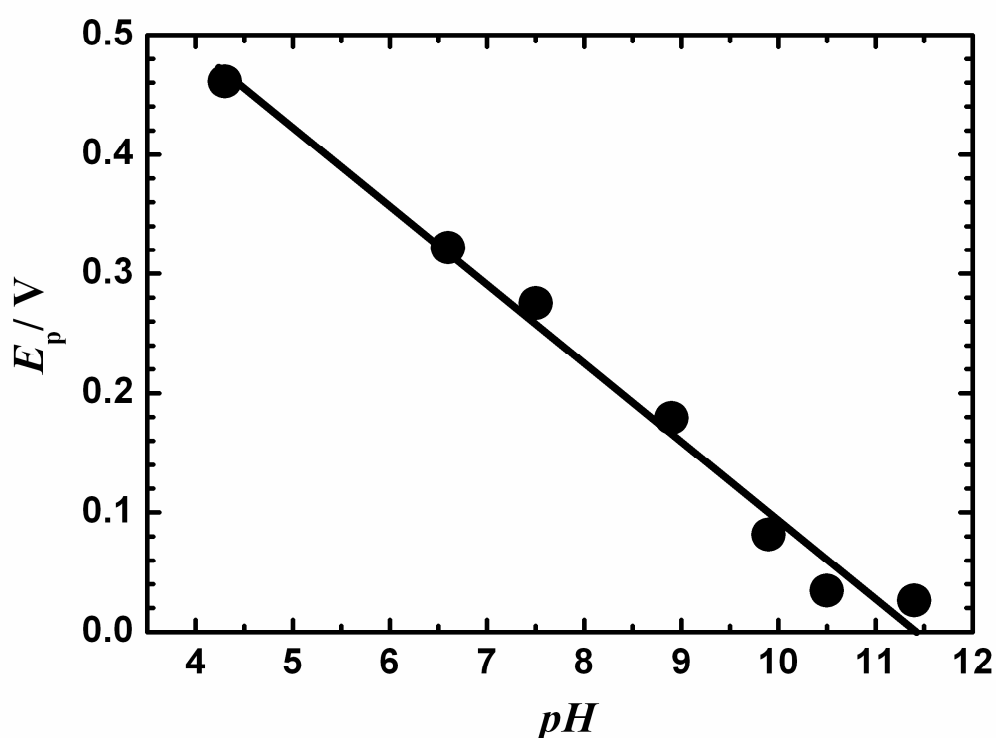
Vliv pH na chování rhamnazinu při cyklických voltamogramech na elektrodě ze skelného uhlíku byl sledován v Brittonově-Robinsonově pufru a 40% ethanolu (v/v) v rozmezí pH 4,3 až 11,4. Zaznamenané křivky jsou na obr. 16.

S rostoucí hodnotou pH dochází k posunu potenciálu všech tří oxidačních vln rhamnazinu směrem k nižším hodnotám potenciálu. Z toho je patrné, že na celkovém mechanismu oxidace se účastní vodíkové ionty. Potenciál každé oxidační vlny klesá s rostoucí hodnotou pH roztoku a tento posun je doprovázen ztrátou reversibility první oxidační vlny, jak ukazuje vložený obrázek v obr. 16.



Obr. 16: Výběr cyklických voltamogramů $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: a) 4,3; b) 6,6; c) 7,5; d) 8,9; e) 9,9; f) 10,5; g) 11,4. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Vložený obrázek ukazuje cyklické voltamogramy při uvedených hodnotách pH, kdy je směr polarizace změněn za první oxidační vlnou.

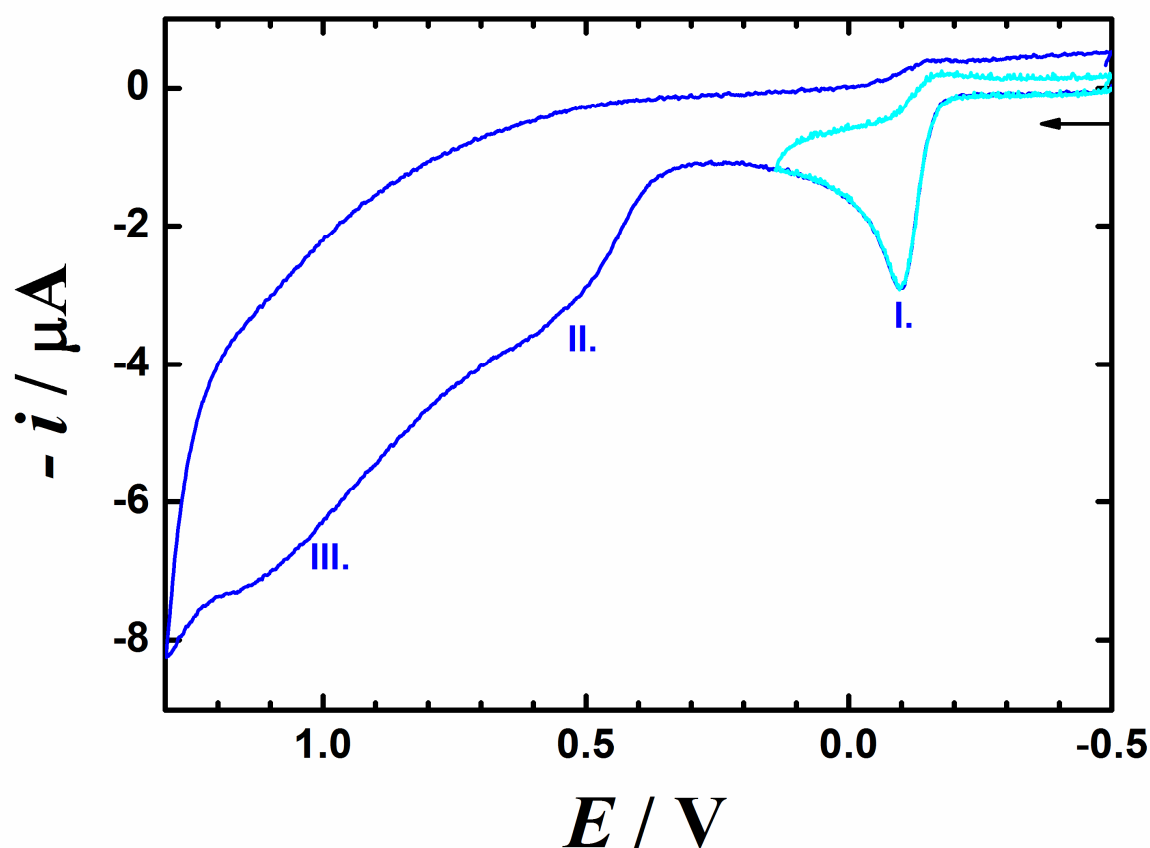
Závislost potenciálu vlny E_p na pH (obr. 17) je charakterizován přímkovou závislostí se směrnicí $66 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$. Pokud se směrnice blíží teoretické hodnotě $59 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$, při elektrochemické reversibilní reakci dochází k výměně stejného počtu protonů a elektronů podle rovnice $E_{1/2} = E_{1/2}^{\text{pH}=0} - [0,059 \cdot (m/n) \cdot \text{pH}]$, kde $E_{1/2}$ je půlvlnový potenciál, $E_{1/2}^{\text{pH}=0}$ je půlvlnový potenciál při daném pH, m počet protonů, n počet elektronů [165], a proto lze usuzovat, že na celkovém oxidačním mechanismu rhamnazinu se podílí dva elektrony a dva protony. Při výměně jednoho protonu a dvou elektronů bude hodnota směrnice poloviční (29 mV).



Obr. 17: Závislost E_p na pH pro rhamnazin v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) vyhodnocená z obr. 16.

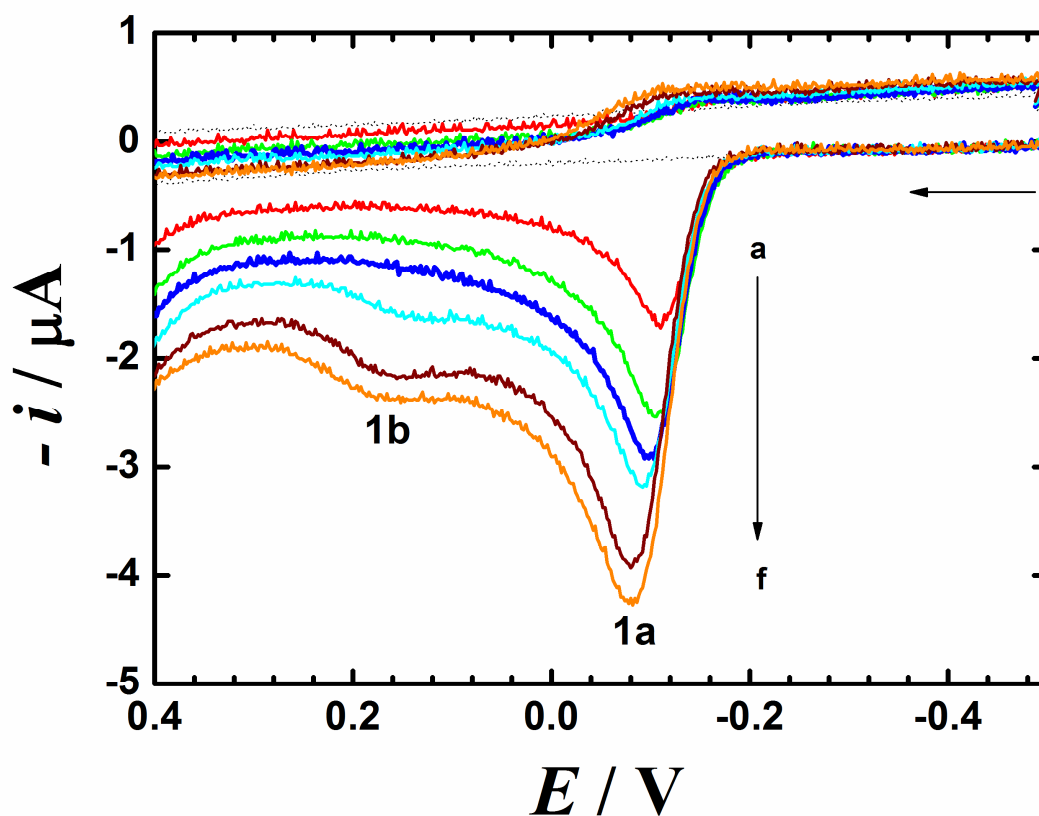
Nepufrované prostředí

Cyklický voltamogram rhamnazu (obr.18) v nepufrovaném prostředí vykazuje tři anodické oxidační signály, v rozmezí potenciálů od -0,5 do 1,3 V. První anodická oxidační vlna je při potenciálu -0,1 V. První oxidační vlna je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu -0,17 V. Druhá oxidační vlna se objevuje při potenciálu 0,53 V a třetí oxidační vlna při potenciálu 1,1 V. Druhá a třetí vlna jsou ireversibilní.



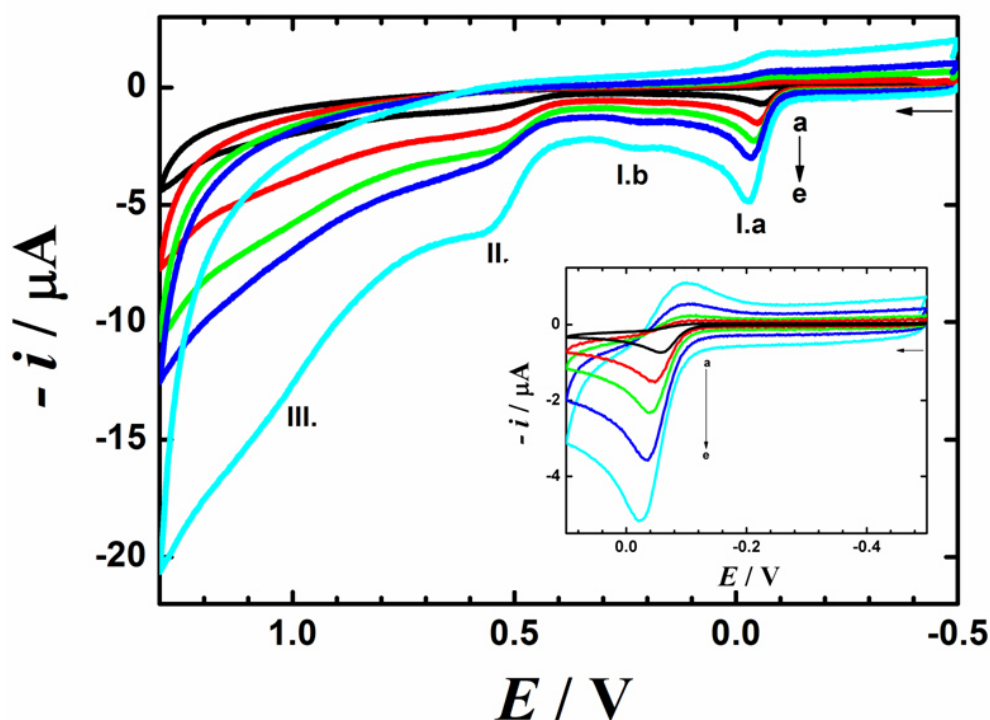
Obr. 18: Výběr cyklických voltamogramů $4,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Závislost anodické odezvy rhamnazu na koncentraci byly měřeny cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací $2,3 \cdot 10^{-4} - 1,07 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve vodném nepufrovaném prostředí (obr. 19). Závislost potenciálu první oxidační vlny na koncentraci studované látky byla v měřeném rozsahu lineární. Od koncentrace $5,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazu dochází k objevení oxidační vlny 1b (obr. 19), která se dále s rostoucí koncentrací zvětšuje. Tato oxidační vlna patří pravděpodobně oxidaci produktu, který se tvoří při potenciálu odpovídající první oxidační vlně. Závislost výšky oxidační vlny na mocnině koncentrace není lineární. Tvorba tohoto produktu není podporována bimolekulární reakcí. Tento fakt je v souladu s ECE mechanismem, zjištěným pro pufrované prostředí.

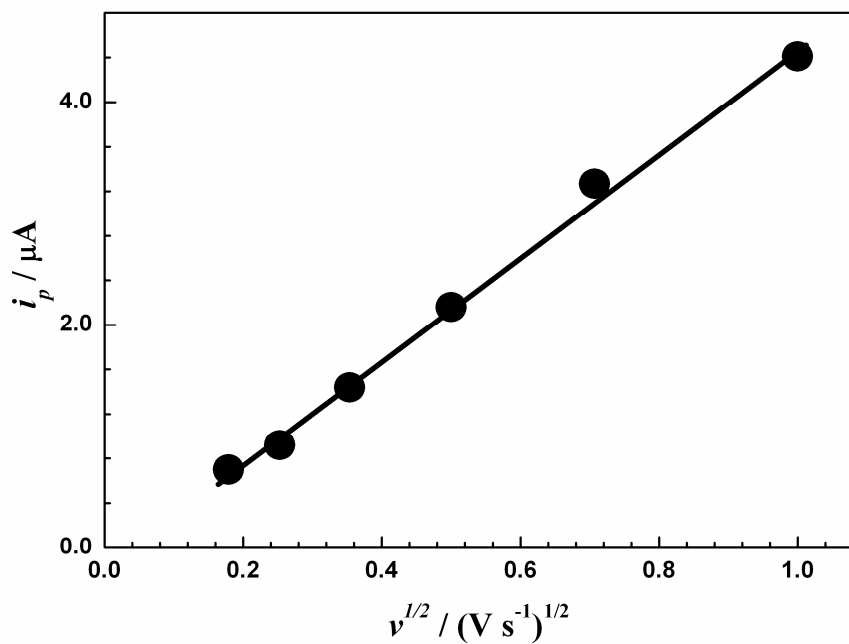


Obr. 19: Výběr cyklických voltamogramů rhamnazu při různých hodnotách koncentrace a) 0,23; b) 0,36; c) 0,43; d) 0,52, e) 0,81, f) $1,07 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

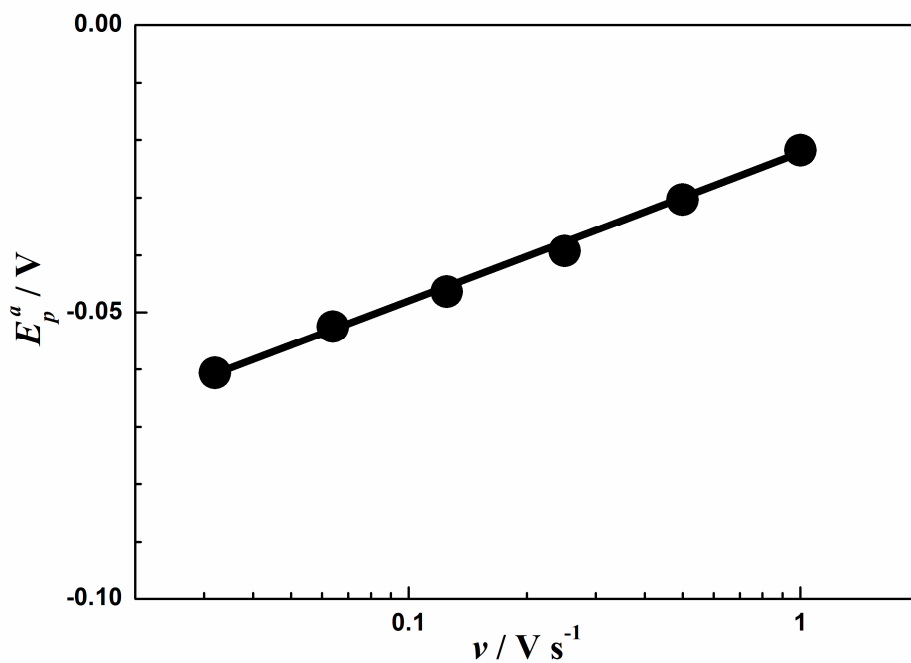
Tuto skutečnost potvrzuje záznam cyklických voltamogramů, (obr. 20), při zvyšující se rychlosti polarizace (rozmezí 0,032 až $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$). Rhamnazin poskytuje tři oxidační vlny v rozsahu potenciálů od -0,5 do 1,3 V. Se zvyšující se rychlostí polarizace vzrůstá výška všech oxidačních vln. Od rychlosti polarizace $0,25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dochází k objevení nové oxidační vlny, Ib, při potenciálu 0,24 V. V pufrovaném prostředí nebyla oxidační vlna Ib nalezena. V nepufrovaném roztoku dochází k lokální změně koncentrace vodíkových iontů u povrchu elektrody. Tento jev může mít vliv na tvorbu oxidačních produktů a meziproductů u povrchu elektrody. Také v nepufrovaném roztoku byla zjištěna lineární závislost výšky oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace (obr. 21), potvrzující, že děj je řízen difúzí. Závislost potenciálu první oxidační vlny na rychlosti polarizace je vynesena na obr. 22. Stejně jako u pufrovaného prostředí i v nepufrovaném prostředí byl pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti polarizace. Tato závislost je lineární, $\delta E_p / \delta \log v = 26 \text{ mV}$.



Obr.20: Výběr cyklických voltamogramů $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ rhamnazu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,125; c) 0,25; d) 0,5; e) $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.



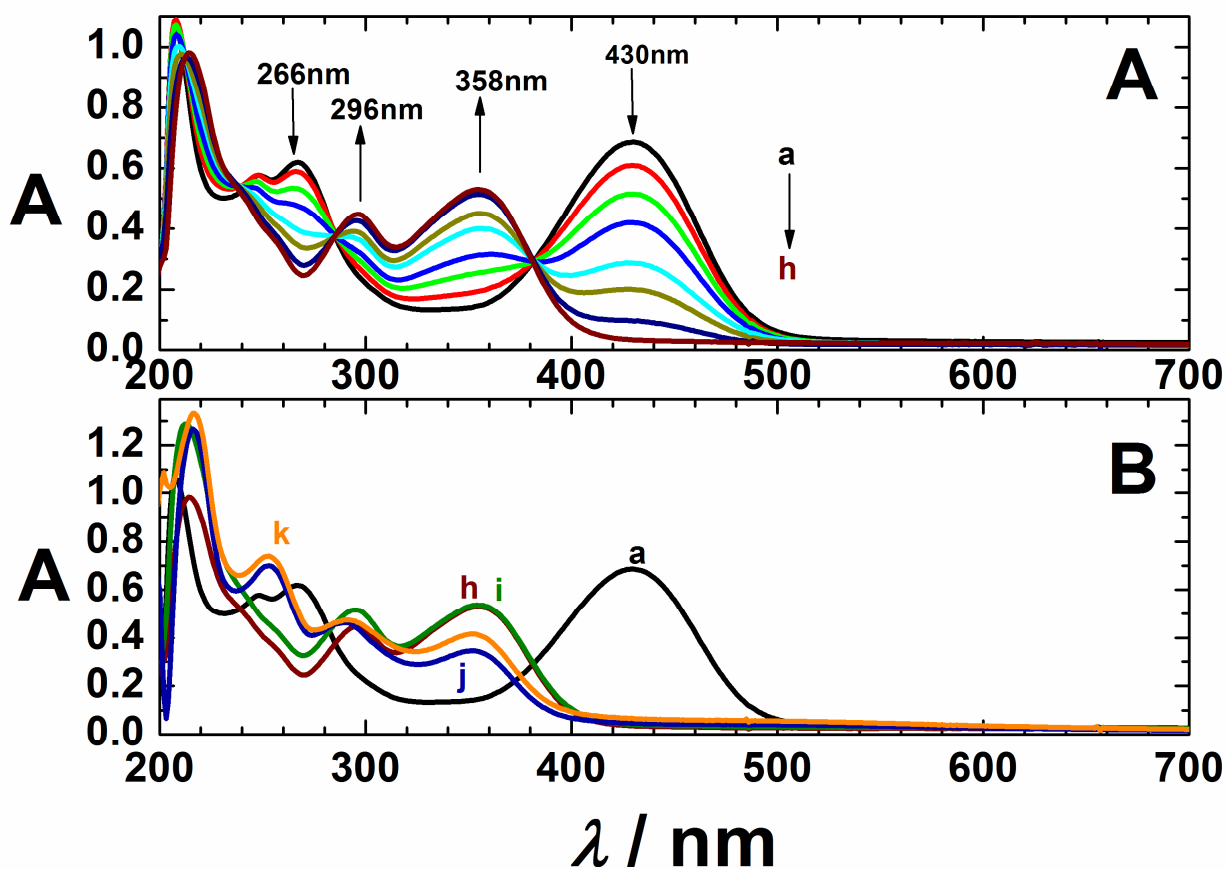
Obr. 21: Závislost výšky oxidačního píku (I.a) na druhé odmocnině rychlosti polarizace odečtená z obr. 20.



Obr. 22: Závislost potenciálu oxidační vlny (I.a) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 20.

5.1.2. Stabilita rhamnazu

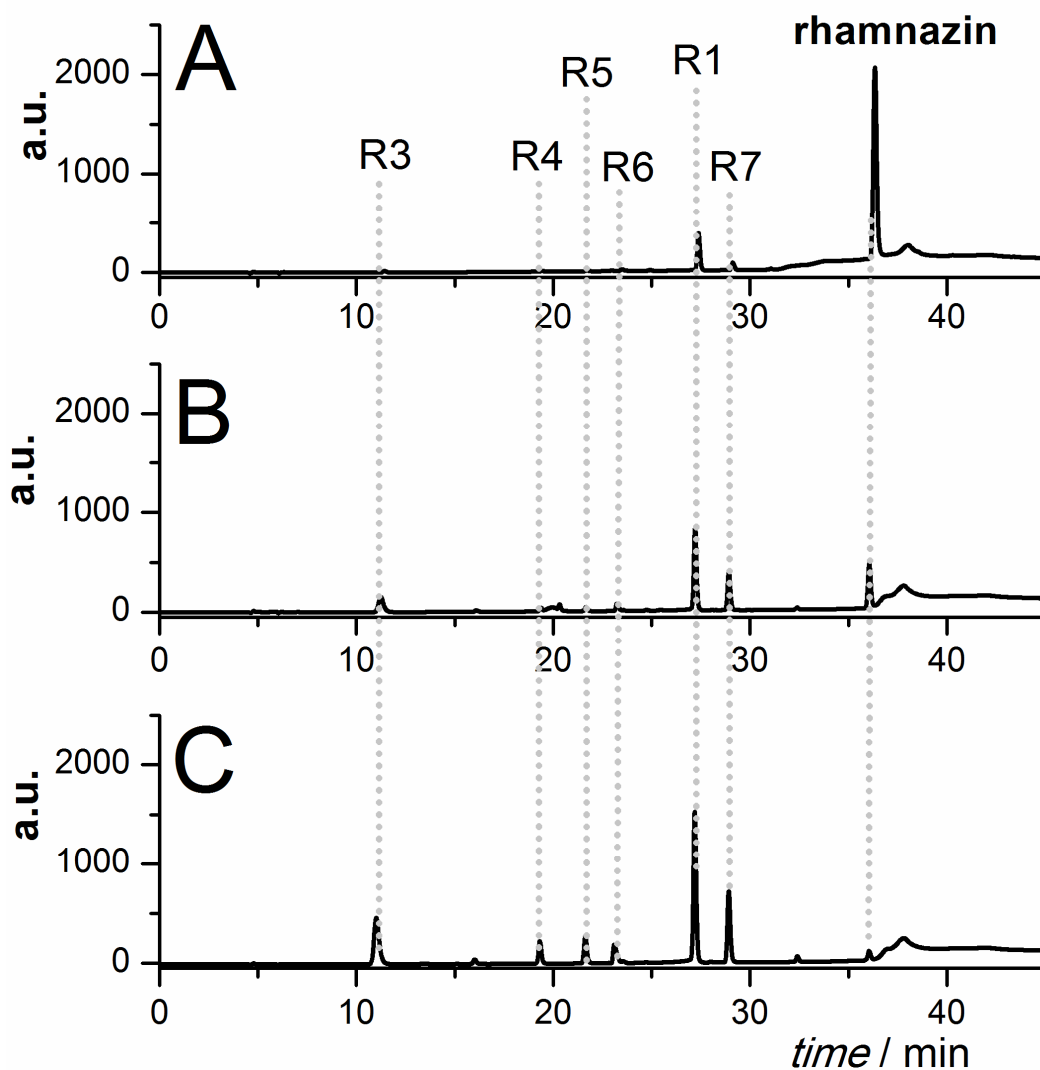
Dlouhodobá chemická stabilita byla zkoumaná několika způsoby, a to pomocí spektrometrických a chromatografických měření. Rhamnazin v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH byl vystaven přirozeným podmínkám působení atmosférického kyslíku. Jeho absorpční spektrum naměřené v inertní atmosféře argonu ukazuje křivka a, obr. 23. Obr. 23 ukazuje záznam změny absorpčních spekter po otevření kyvety v prodlužujících se intervalech až do několika hodin. Spektra během interakce se vzdušným kyslíkem vykazují pokles absorpčního pásu při 266 nm, 430 nm a zvýšení absorpčního pásu při 296 nm a 358 nm. Pokles absorpčního pásu u 430 nm a nárůst u 358 nm napovídají vzniku oxidačního produktu 2,4-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-6-methoxy-benzofuran-3(2H)-onu (R1). Na obr. 23-B můžeme vidět jak absorpční pásy oxidačního produktu R1 klesají a vznikají další absorpční pásy, které odpovídají dalším produktům, na které se produkt R1 dále rozkládá. Rhamnazin je plně degradován za hodinu. Absorpční spektra produktu R1 a dalších rozkladných produktů naměřená po odečtení pozadí při chromatografické analýze ukazuje obr. 27 v kapitole 5.1.3. Elektrolyza.



Obr 23: Absorpční spektra $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazuinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH při expozici vzdušného kyslíku. A) s různou dobou expozice a) 0, b) 360, c) 560, d) 760, e) 1160, f) 1560, g) 2520, h) 4520 s. B) s různou dobou expozice a) 0 s, h) 75min 20s, i) 92 min, j) 122 h, k) 124 h.

Během sledování chemické stability byl roztok rhamnazuinu vystaven působení vzdušného kyslíku po dobu 90 min a sledován separačními technikami HPLC-DAD a HPLC-MS/MS (obr. 29 v kapitole 5.1.5). Během 90 minut bylo sledováno zastoupení oxidačních produktů, obr. 24. Absorpční spektra zaznamenaná v příslušných retenčních časech píků se shodují s absorpčními spektry oxidačních produktů. Rhamnazin přechází na oxidační produkty R1 a R7, které se dále vlivem kyslíku rozkládají na řadu dalších hydroxysloučenin. Chromatogram na obr. 24-A ukazuje

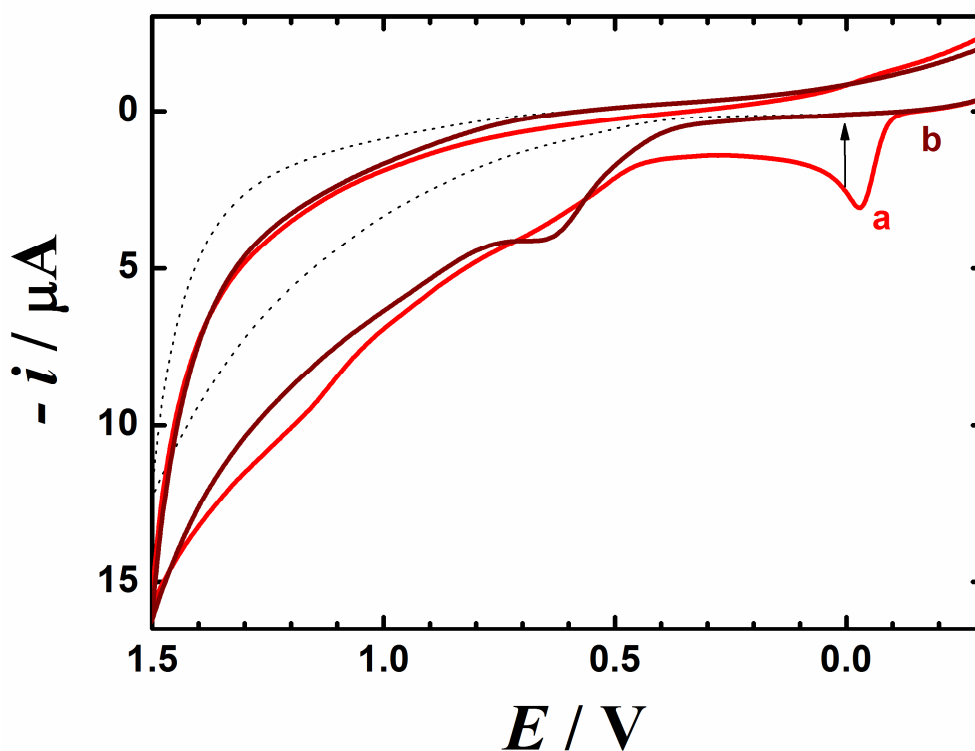
přítomnost oxidačních produktů R1 a R7, které se pravděpodobně vytvořily po kontaktu s mobilní fází, ve které je přítomen kyslík.



Obr. 24: Kapalinový chromatogram rhamnazu A) před otevřením vialky B) po 45 min vlivu vzdušného kyslíku C) po 90 min vlivu kyslíku. Průtok: $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřené podmínky číslo 1.

5.1.3. Elektrolýza

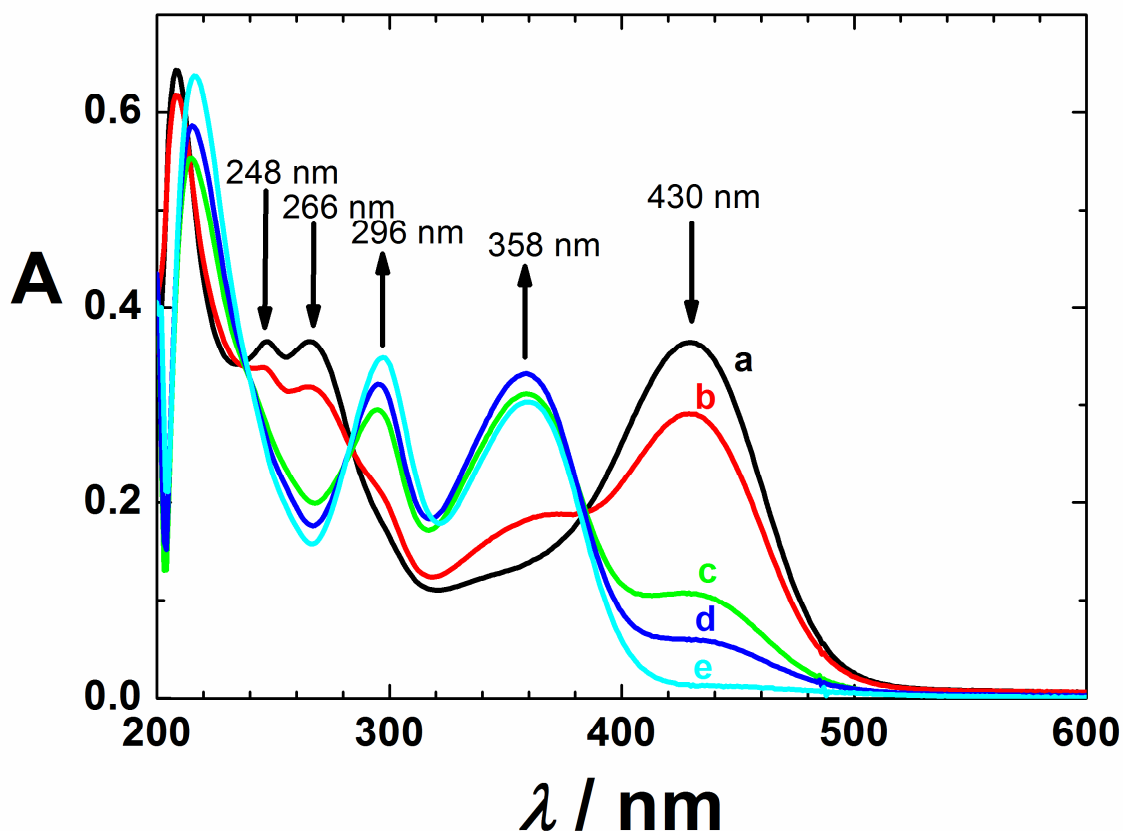
Roztok rhamnazu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH byl elektrolyzován při potenciálu $0,005 \text{ V}$. Cyklický voltamogram měřený před elektrolyzou vykazoval jednu dominantní oxidační vlnu, která se během elektrolyzy vytratila. Po elektrolyze na cyklickém voltamogramu byla registrována oxidační vlna u potenciálu $0,67 \text{ V}$, viz obr. 25, křivka b. Tato oxidační vlna souvisí se vzniklým oxidačním produktem, který byl vytvořen během elektrolyzy. Elektrický náboj spotřebovaný během elektrolyzy odpovídá spotřebě dvou elektronů.



Obr. 25: Cyklický voltamogram $6,2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ rhamnazu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH a) před elektrolyzou, b) po elektrolyze. Tečkovaná křivka zobrazuje základní elektrolyt. Roztok byl elektrolyzován při potenciálu $0,005 \text{ V}$.

V průběhu elektrolyzy bylo odebíráno $40 \mu\text{l}$ elektrolyzovaného roztoku a dávkováno za nepřístupu vzduchu do septem uzavřené spektrofotometrické kyvety. Zaznamenaná absorpční spektra vykazují pokles absorpčních pásů při 248 nm , 266 nm , 430 nm a zvýšení absorpčního

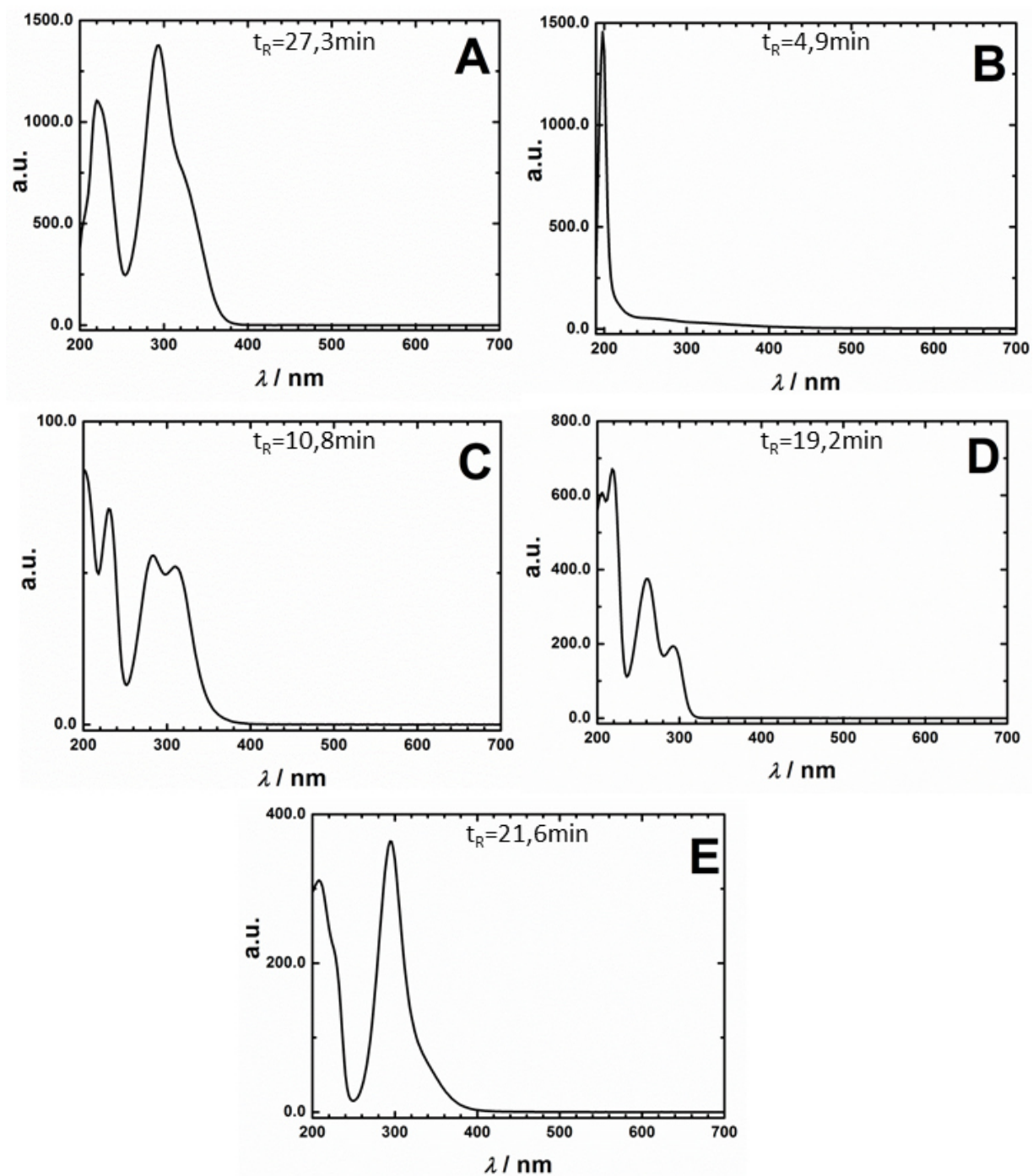
pásu při 296 nm a 358 nm (obr. 26). Absorpční spektrum roztoku po elektrolýze odpovídá absorpčnímu spektru produktu (produkt R1), který byl později identifikován jako hlavní produkt oxidace. Ostrý isosbestický bod naznačuje, že následná chemická reakce je rychlá za těchto experimentálních podmínek.



Obr. 26: Absorpční spektrum $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH měřené během elektrolýzy. Spotřebováno a) 0; b) 0,55; c) 1,37; d) 1,58; e) 1,79 elektronů.

Obr. 27 ukazuje absorpční spektra jednotlivých produktů rhamnazu, které byly analyzovány pomocí HPLC-DAD techniky. Produkty byly analyzovány v roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl a $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Obr. 27-A ukazuje produkt 2,4-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-6-methoxy-benzofuran-3(2H)-on (R1) s absorpčními maximy 221 nm a

293 nm. Obr. 27-B zobrazuje absorpční spektrum produktu 4-hydroxy-3-methoxybenzoové kyseliny (R2) s absorpčním maximem 198 nm. Na obr. 27-C je spektrum produktu (4-hydroxy-3-methoxyfenyl) (oxo)octové kyseliny (R3) s absorpčními maximy 231 nm, 283 nm a 310 nm. Obr. 27-D zobrazuje absorpční spektrum produktu 2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny (R4) s absorpčními maximy 206 nm, 219 nm, 261 nm a 292 nm. Obr. 27-E zobrazuje absorpční spektrum neznámého produktu (R5) s absorpčními maximy 207 nm a 295 nm.

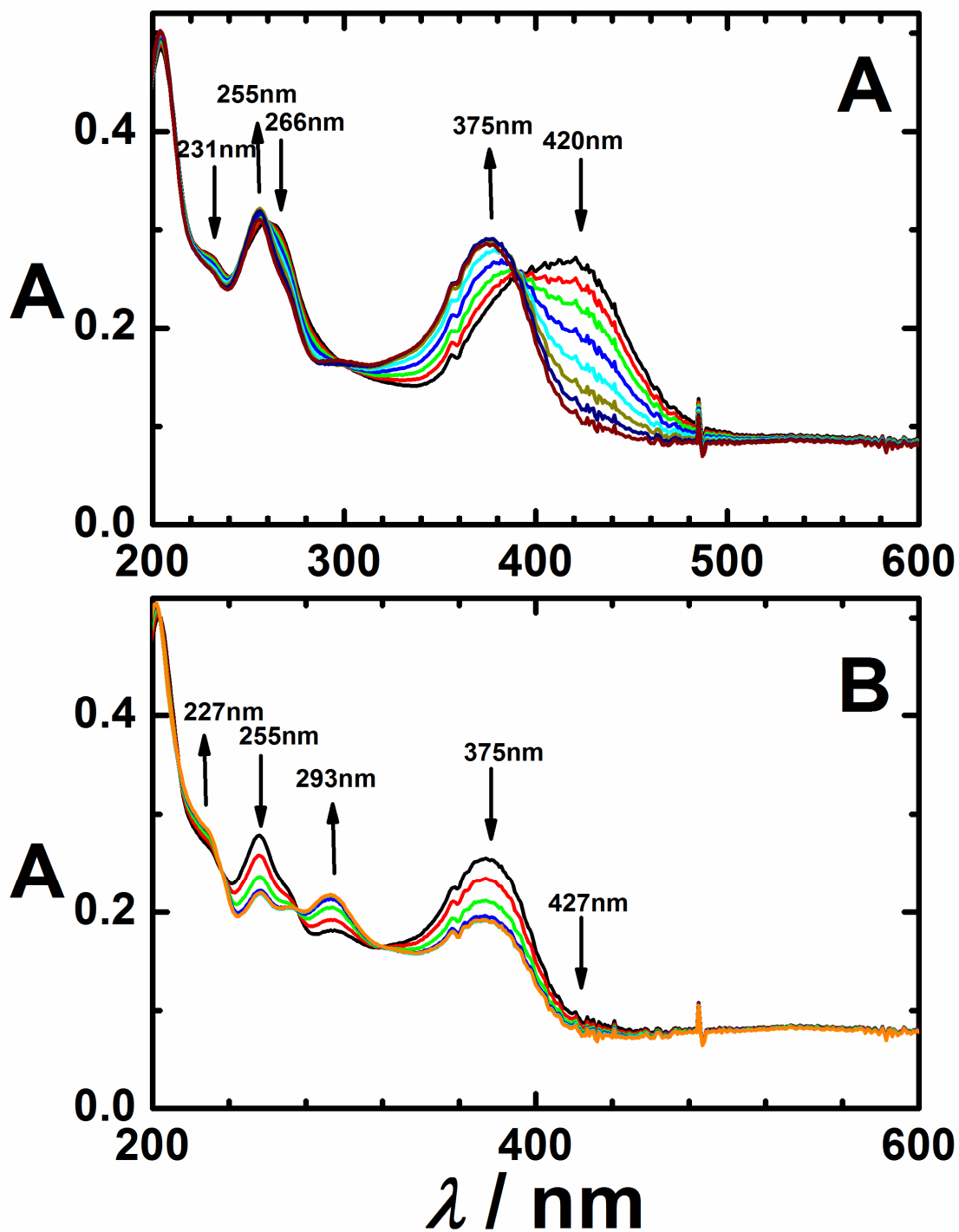


Obr. 27: Absorpční spektra produktů A) R1, B) R2, C) R3, D) R4, E) R5 registrovaná v retenčních časech uvedených v obrázcích po odečtení pozadí kolony.

5.1.4. UV/Vis spektroelektrochemie rhamnazu

V průběhu elektrolýzy v OTTLE cele byla získávána absorpční spektra. Spektra získaná v průběhu elektrolýzy, byla měřena při potenciálu za první oxidační vlnou (obr. 28-A) a za druhou oxidační vlnou (obr. 28-B) v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH = 9,0. Absorpční spektra první oxidační vlny vykazují pokles absorpčního pásu u 231 nm, 266 nm, 420 nm a zvýšení absorpčního pásu u 255 nm, 375 nm. Rozklad oxidačního produktu R1, ke kterému dochází během elektrolýzy na potenciálu druhé oxidační vlny, doprovází snížení absorpčního pásu u 255 nm, 375 nm, 427 nm a zvýšení absorpčního pásu u 227 nm a 293 nm (obr. 28-B).

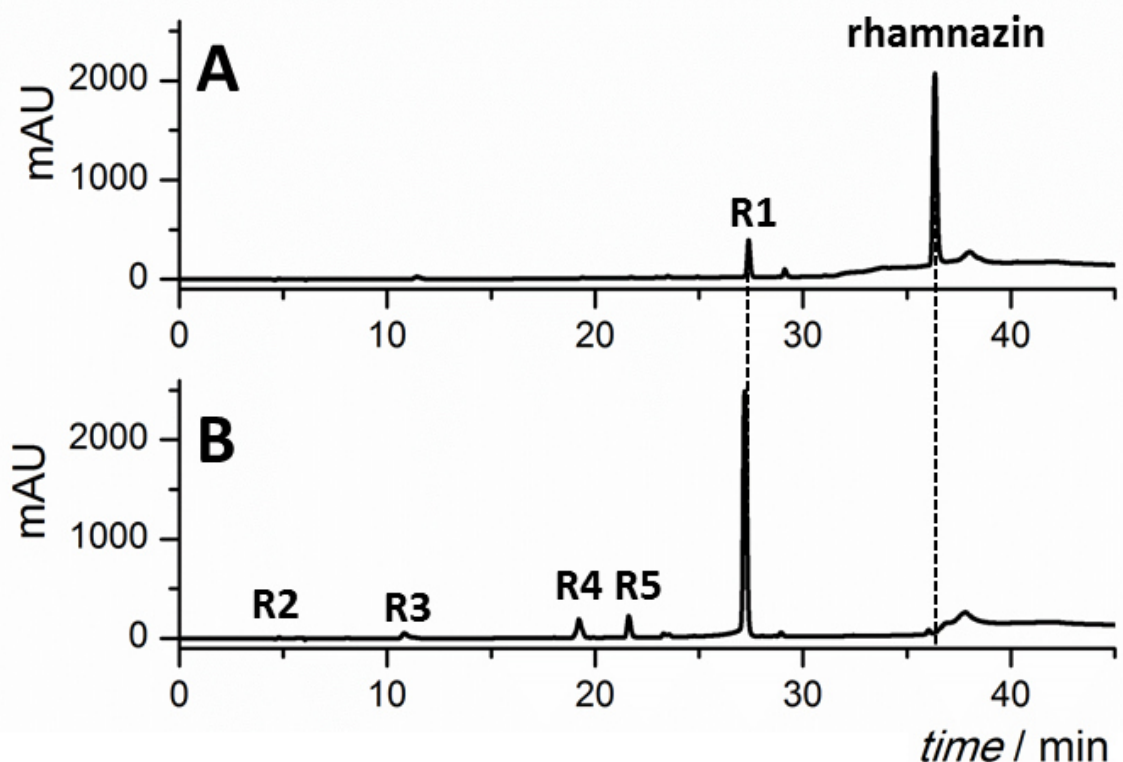
Spektroelektrochemie v kyselém prostředí a ve vodném nepufrovaném prostředí byla také měřena, ale není zde ukázána, neboť výsledky mají stejný trend jako v zásaditém prostředí.



Obr. 28: *In situ* spektroelektrochemie $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnazuinu v roztoku Brittonova – Robinsonova pufru a 40% ethanolu (*v/v*) s konečnou hodnotou $\text{pH} = 9,0$. A) při potenciálu za první oxidační vlnou, B) při potenciálu za druhou oxidační vlnou.

5.1.5. Chromatografická měření rhamnazinu

Pro zjištění oxidačních produktů byl zvolen vodný roztok směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Konečné produkty oxidace byly identifikovány analýzou složek po částečné nebo úplné elektrolýze při konstantním potenciálu. Byly použity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD) a hmotnostním detektorem (HPLC-MS/MS). Na obr. 29-A lze vidět kapalinový chromatogram roztoku rhamnazinu. V retenčním čase $t_R = 27 \text{ min}$ se vytváří první oxidační produkt R1, který byl identifikován jako oxidační produkt 2,4-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-6-methoxybenzofuran-3(2*H*)-on. Tento oxidační produkt podléhá další oxidaci a rozkládá se na další nízkomolekulární sloučeniny (R2 – R5), obr. 29-B. R1 a další sloučeniny v chromatogramu byly charakterizovány díky spektrům z hybridního hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým a průletovým hmotnostním analyzátozem s ionizací elektrosprejem (ESI-Q-TOF). Hlavní hodnoty poměru hmotnosti a náboje, m/z , pro oxidační produkt R1 jsou: 345,06 a 183,03. Tento oxidační produkt se dále rozkládá za běžných podmínek na produkty: 4-hydroxy-3-methoxybenzoovou kyselinu, R2, (m/z hodnota: 167,03), (4-hydroxy-3-methoxyfenyl) (oxo)octovou kyselinu, R3, (m/z hodnoty: 195,03 a 123,04) a 2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoovou kyselinu, R4, (m/z hodnoty: 211,02 a 167,03). Oxidační produkt R5 se nám nepodařilo identifikovat. Je patrné, že oxidační produkt R1 vzniká jak za podmínek inertní atmosféry, tak působením vzdušného kyslíku. V přítomnosti kyslíku existuje také druhá oxidační cesta rhamnazinu. Za běžných podmínek vede ke vzniku 2-hydroxy-6-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oxy]-4-methoxyfenyl-2-(oxo)octové kyseliny (R7), m/z hodnoty: 361,06 a 183,03 (schéma 7). Avšak i R7 sloučenina není stabilní a rozkládá se na 4-hydroxy-3-methoxybenzoovou kyselinu, R2 a 2,6-dihydroxy-4-methoxyfenyl) (oxo)octovou kyselinu, R6, (m/z hodnoty: 211,02 a 167,03) podle schématu 8.



Obr. 29: Kapalinový chromatogram rhamnazinu A) před elektrolýzou B) po elektrolýze při potenciálu 0,005 V. Průtok: 0,2 ml·min⁻¹, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřící podmínky číslo 1.

5.1.6. Mechanismus oxidace rhamnazinu

Z výsledků voltametrických experimentů a elektrolýzy za konstantního potenciálu s následnou analýzou oxidačních produktů pomocí HPLC-DAD a HPLC-MS/MS byl navržen mechanismus elektrochemické oxidace. Elektrochemická měření ukázala, že mechanismus oxidace rhamnazinu je podobný v celém měřeném rozsahu pH. Navržený mechanismus oxidace znázorňují schémata 5-8. V prvním reakčním kroku dochází ke vzniku chinoidního meziprojektu, který podléhá další chemické reakci za vzniku oxidačního produktu R1, schéma 5. Celkový mechanismus probíhá ECEC mechanismem.

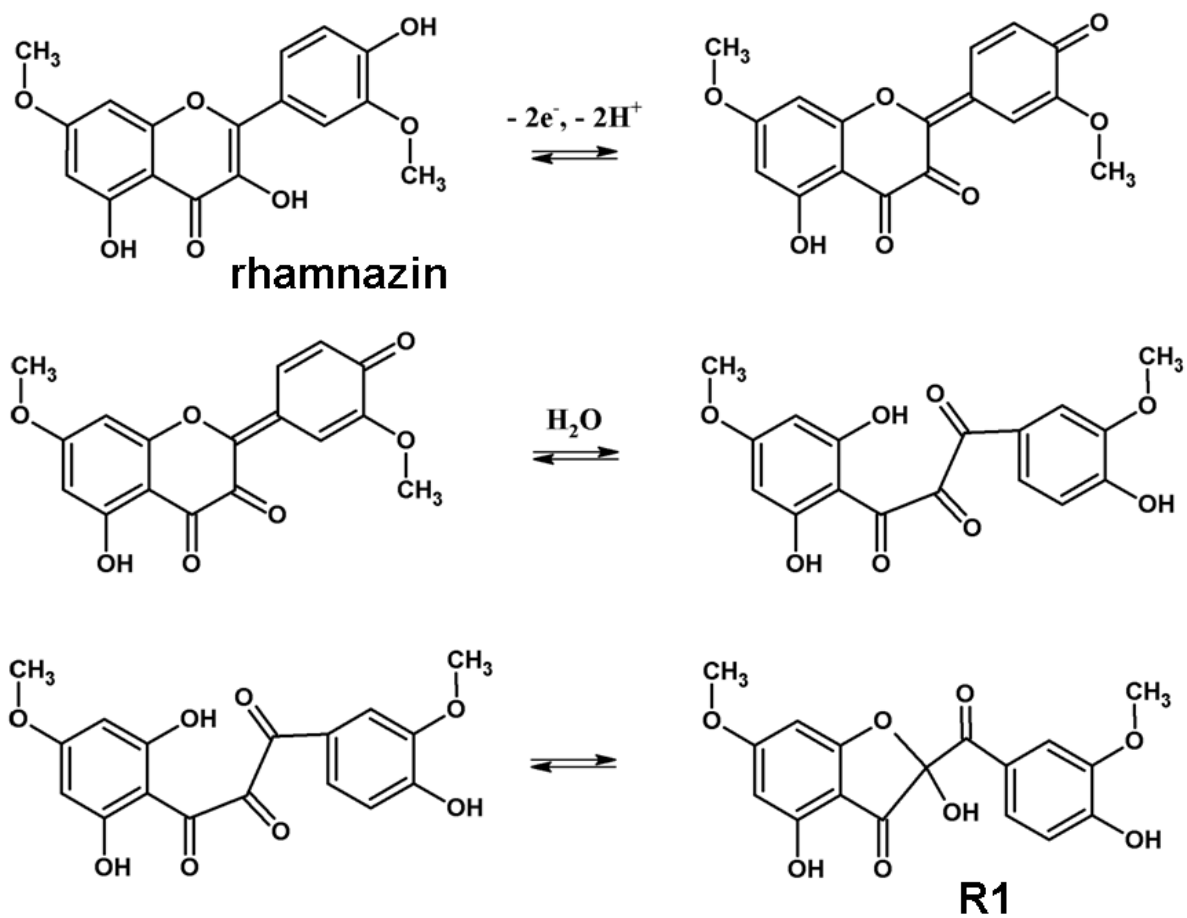


Schéma 5: Oxidační mechanismus rhamnazine na chinoidní produkt a následně na produkt R1.

Jak ukázala absorpční spektra a analýzy pomocí separačních metod, viz obr. 23 a 24, oxidační produkt R1 se vlivem kyslíku dále rozkládá na řadu dalších nízkomolekulárních hydroxyloučenin, schéma 6. Oxidační produkt R1 se dále rozkládá na produkty R2-R5.

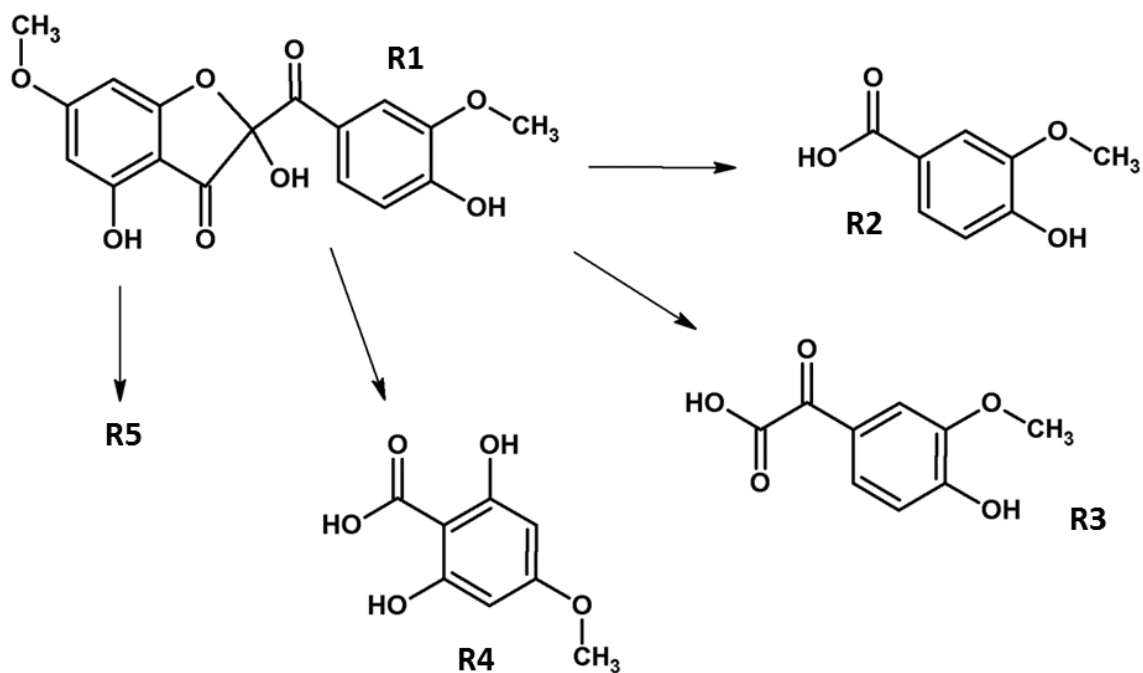


Schéma 6: Rozklad oxidačního produktu R1 na další produkty oxidace.

Schémata 5 a 6 zobrazují reakční cestu, kde z rhamnazu vzniká chinoidní meziprodukt, který se díky chemické reakci přemění na oxidační produkt R1. Ke vzniku produktu R1 dochází jak v přítomnosti kyslíku, tak v inertní atmosféře argonu. Druhá oxidační reakční cesta je umožněna díky oxidaci vzdušným kyslíkem, kdy je rhamnazin vlivem kyslíku přeměněn na meziprodukt 7,8a-dihydroxy-2a-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-5-methoxy-2a,8a-dihydro-8H[1,2]dioxeto[3,4b]chromen-8-on. Obdobný meziprodukt byl v literatuře nalezen pro quercetin [2]. Vlivem kyslíku se dále mění na 2-hydroxy-6-[(4hydroxy-3-methoxybenzoyl)oxy]-4-methoxyfenyl-2-(oxo)octovou kyselinu, R7. Tento produkt při oxidaci v inertní atmosféře argonu nevzniká.

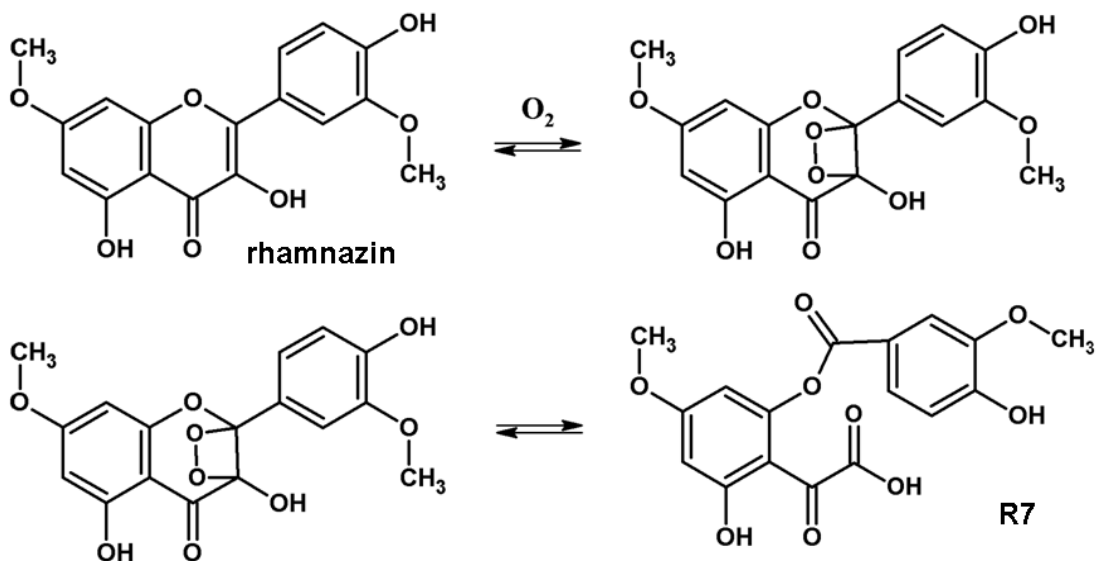


Schéma 7: Rozklad produktu R7.

Bylo prokázáno, že vlivem přítomnosti kyslíku dochází nejen k tvorbě oxidačního produktu R7, ale také ke vzniku dalších nízkomolekulárních rozkladných produktů, R2 a 2,6-dihydroxy-4-methoxyfenyl(oxo)octovou kyselinu, R6, jak ukazuje schéma 8.

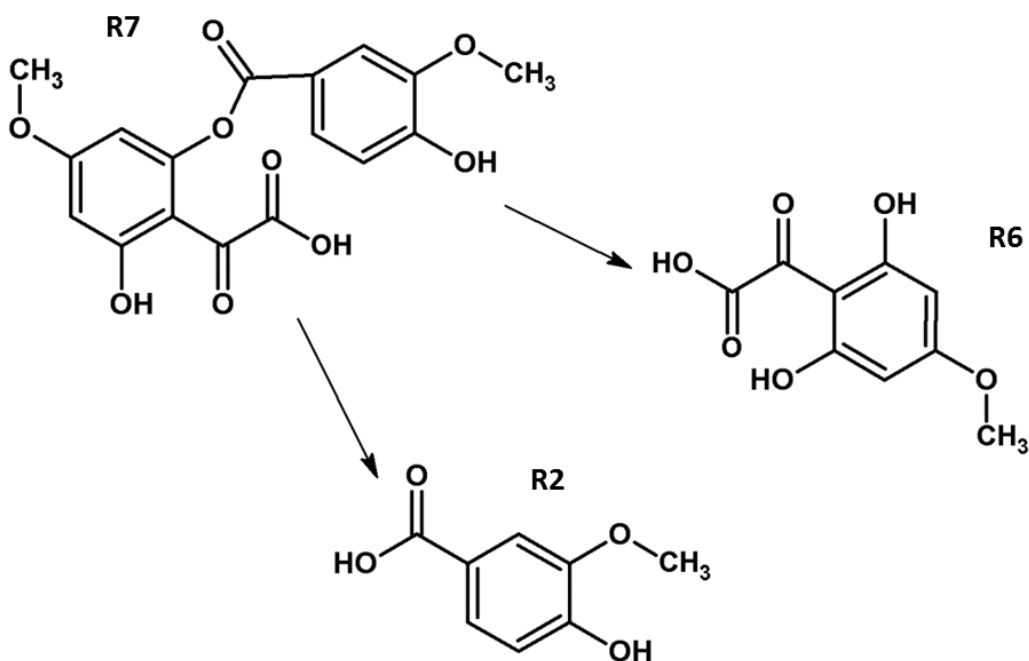


Schéma 8: Vznik rozkladných produktů vlivem kyslíku.

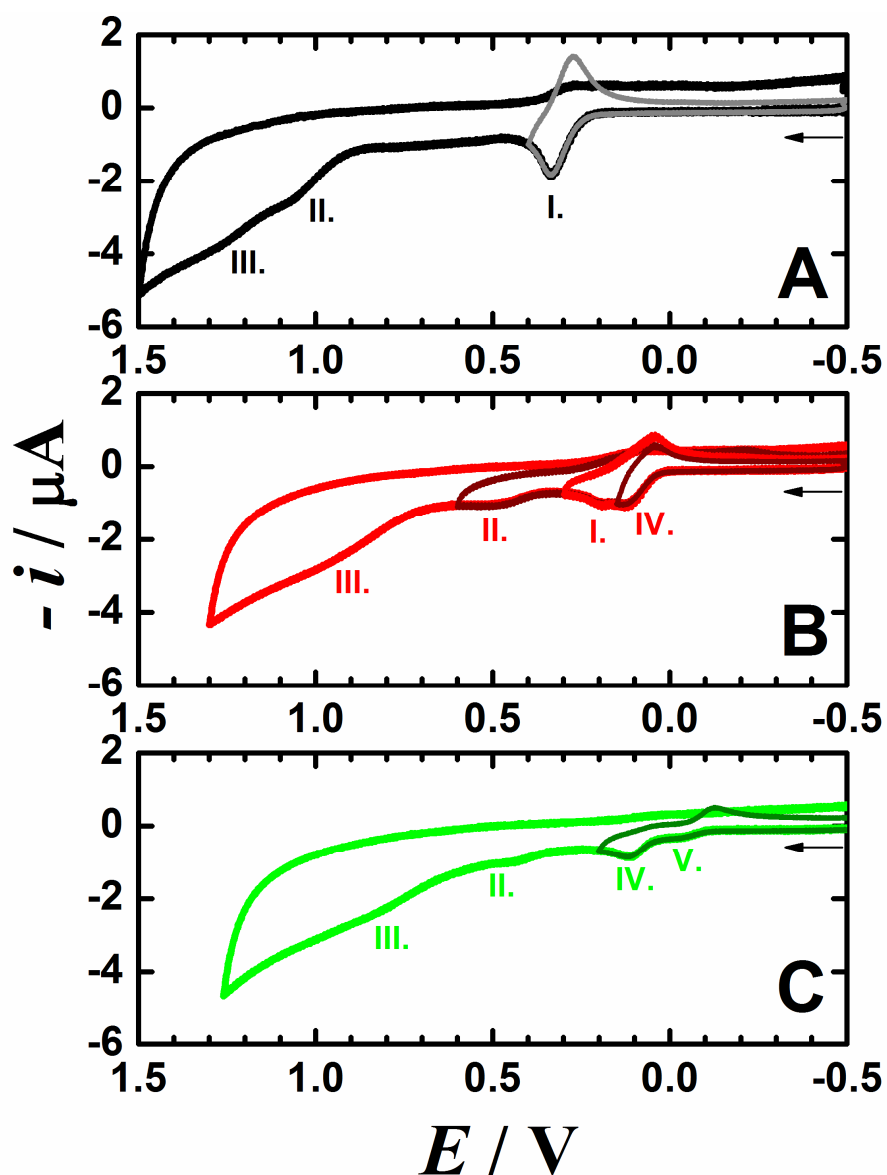
5.2. FISETIN

5.2.1. Elektrochemická měření

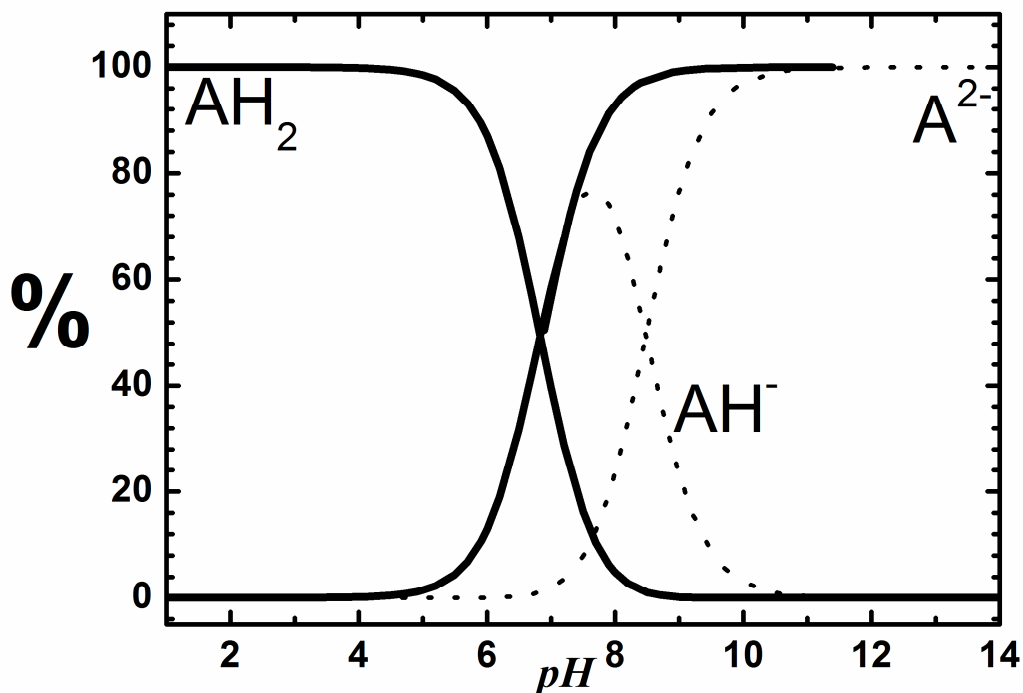
Pufrované prostředí

Elektrochemické chování fisetinu bylo studováno ve vodném pufrovaném prostředí, jak je zobrazeno na obr. 30-43. Cyklická voltametrie fisetinu, měřená na elektrodě ze skelného uhlíku, vykazuje různý počet vln v závislosti na pH prostředí v rozmezí potenciálů od -0,5 do 1,5 V. V kyselém prostředí, konkrétně při pH 5,3, viz obr. 30-A, je vyobrazen cyklický voltamogram fisetinu, který vykazuje první oxidační vlnu při potenciálu 0,33 V. První oxidační vlna (I.) je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu 0,27 V. Druhá oxidační vlna (II.) se objevuje u potenciálu 1,06 V a třetí oxidační vlna (III.) je u potenciálu 1,27 V. Druhá i třetí oxidační vlna jsou ireversibilní. Na obr. 30-B je cyklický voltamogram fisetinu v roztoku o pH 8,2. Druhá oxidační vlna (I.) se objevuje při potenciálu 0,19 V a je quazireversibilní. Její redukční protipík se objevuje při potenciálu 0,14 V. Třetí oxidační vlna (II.) při potenciálu 0,5 V je ireversibilní, stejně jako čtvrtá oxidační vlna (III.) při potenciálu 1,0 V. V tomto mírně zásaditém pH se objevuje čtvrtá oxidační vlna (IV.), a to při potenciálu 0,13 V. Tato oxidační vlna je quazireversibilní a její oxidační protipík se objevuje u potenciálu 0,04 V. Na obr. 30-C je cyklický voltamogram fisetinu, který vykazuje druhou oxidační vlnu (IV.) při potenciálu 0,11 V. Tato oxidační vlna je quazireversibilní a její protipík se objevuje při potenciálu 0,03 V. Třetí oxidační vlna (II.) se objevuje při potenciálu 0,46 V, čtvrtá oxidační vlna (III.) je u potenciálu 0,86 V. Obě tyto oxidační vlny jsou ireversibilní. V cyklickém voltamogramu měřeném v pufrovaném prostředí o pH 9,4 se objevuje oxidační vlna, v tomto případě nazvaná pátá (V.), při potenciálu -0,03 V. Její redukční protipík se objevuje při potenciálu -0,13 V. U tohoto pH se již neobjevuje oxidační vlna (I.), jako v případě kyselého prostředí o pH 5,3. Při pH = 9,4 se v roztoku nevyskytuje molekula nedisociované látky, pouze anion, popřípadě dianion. Distribuční diagram vypočtený ze známé teoreticky vypočtené disociační konstanty fisetinu ukazuje obr. 31. Hodnota pK_1 je $6,83 \pm 0,4$ [164]. Pro přiblížení procentuálního zastoupení jednotlivých forem

v roztoku při vyšších hodnotách pH jsme použili známou hodnotu pK_2 quercetinu [117]. Quercetin má podobnou chemickou strukturu, velmi blízkou struktuře fisetinu. Výpočty elektrostatických potenciálů na jednotlivých atomech kyslíku a vodíku obou látek ukázaly na možnou podobnou tvorbu dianionu – disociaci hydroxylových skupin.



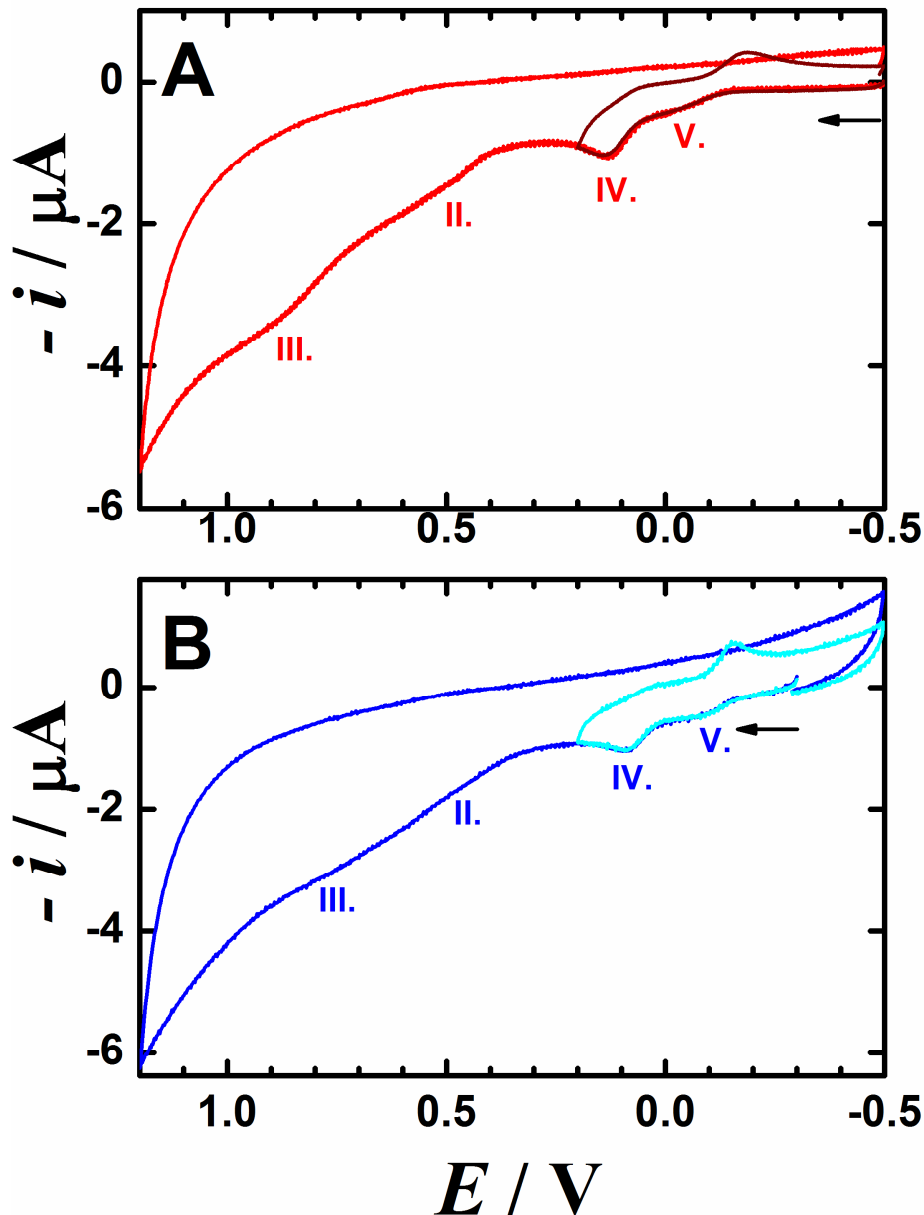
Obr. 30: Výběr cyklických voltamogramů $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova –Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: A) 5,3; B) 8,2; C) 9,4. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 31: Distribuční diagram fisetinu vypočtený použitím hodnoty $pK_1 = 6,83 \pm 0,4$ [164] (plná čára). Tečkovaná čára znázorňuje odhad přítomnosti disociačních forem AH^- a A^{2-} vypočtených použitím hodnoty $pK_2 = 8,48$ [117], viz příloha 2.

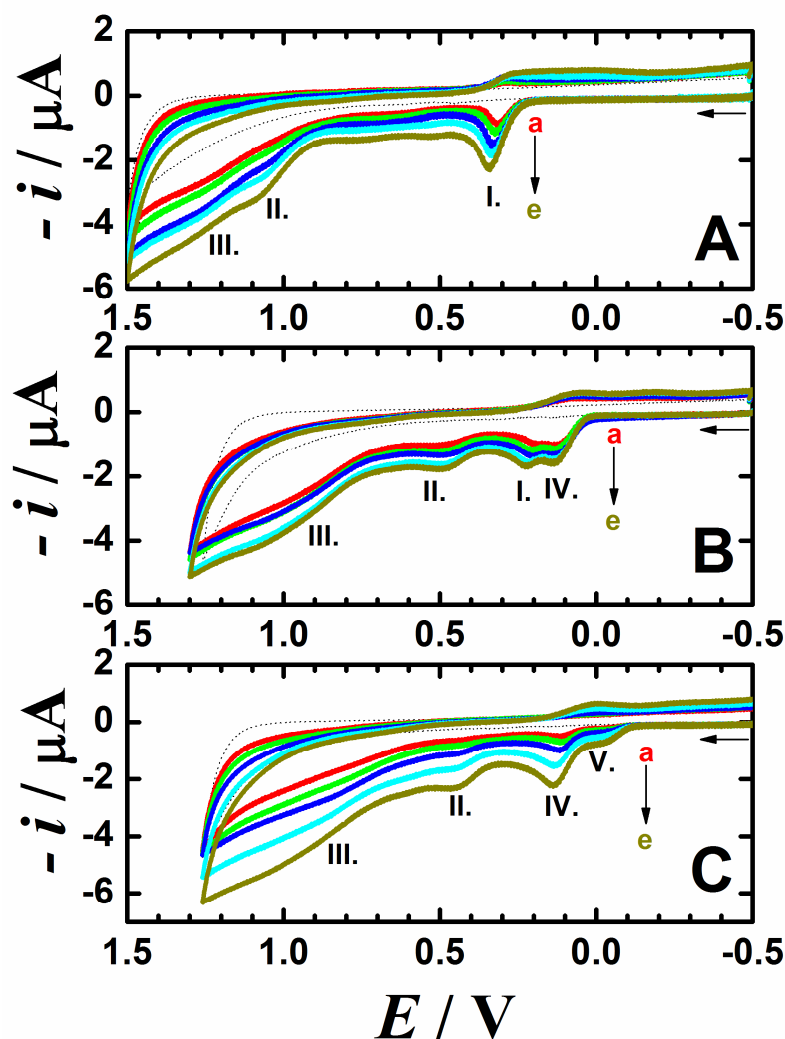
K posouzení elektrochemického chování fisetinu významně přispěla předchozí studie oxidačního mechanismu quercetinu [139]. Cyklická voltametrie fisetinu vykazuje ve vodném prostředí při $pH = 5,3$ tři oxidační vlny v rozmezí potenciálů od $-0,5$ do $1,5$ V (obr. 30-A). První oxidační vlna je quazireversibilní a odpovídá hydroxylové skupině $C4'-OH$ na kruhu B. Při tomto pH se v roztoku vyskytuje nedisociovaná forma fisetinu, zde označená jako AH_2 , viz distribuční diagram, obr. 31. Druhá oxidační vlna souvisí s oxidací produktu vytvořeného při první oxidaci. Při potenciálu třetí oxidační vlny se oxiduje hydroxylová skupina na kruhu A, stejně jako v případě quercetinu a rhamnazu. Cyklická voltametrie fisetinu při $pH = 8,2$ vykazuje první oxidační vlnu při potenciálu $0,13$ V. Tato oxidační vlna označená jako (IV.) je oxidační vlna disociované formy AH^- , která při tomto pH v roztoku převládá. Při tomto pH je stále patrná oxidační vlna I., která ukazuje, že v roztoku je stále přítomná nedisociovaná vlna fisetinu. Cyklická voltametrie při $pH = 10,5$, obr. 32-A, zobrazuje první oxidační vlnu (V.). Jde o oxidaci dianionu, zde označeno jako A^{2-} , který se v roztoku při tomto pH již vyskytuje. Jelikož se tato

vlna neobjevuje v cyklické voltametii fisetinu při pH = 8,2, lze usuzovat, že hodnota pK_2 pro fisetin bude vyšší než hodnota $pK_2 = 8,48$ použitá pro výpočet distribučního diagramu. Pro porovnání elektrochemického chování byl vynesena cyklický voltamogram za stejných podmínek pro fisetin (obr.32-A) a pro quercetin (obr. 32-B).



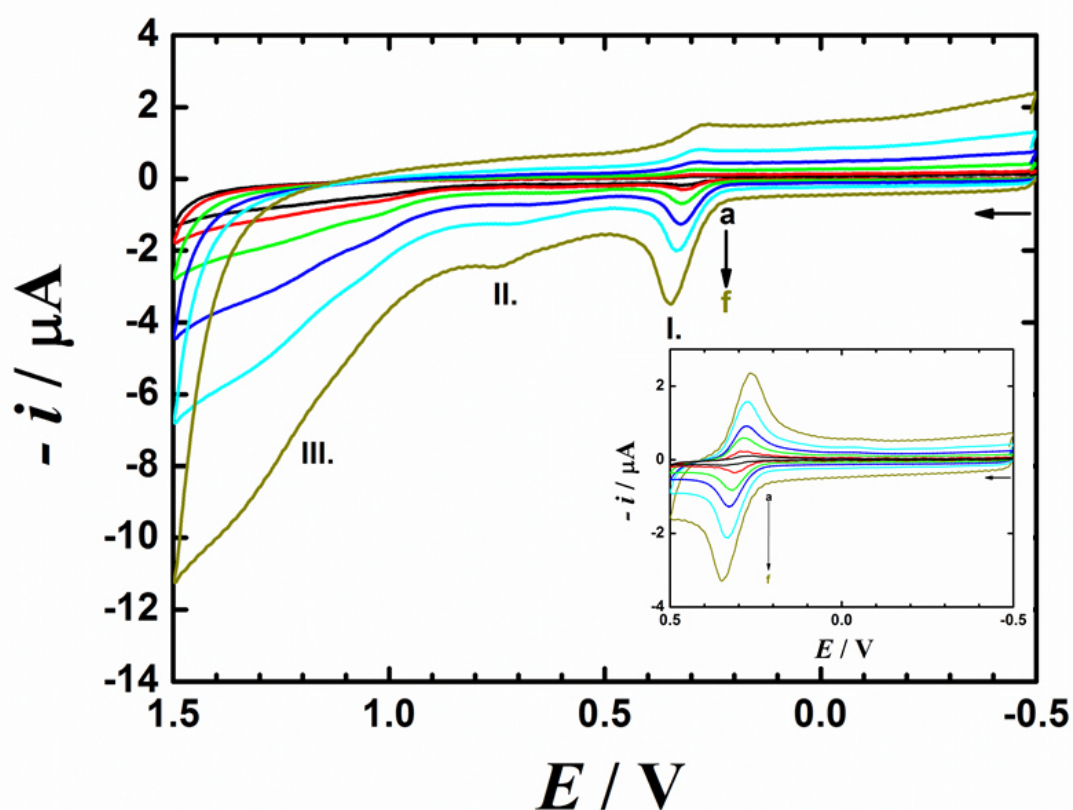
Obr. 32: Cyklický voltamogram $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ A) fisetinu, B) quercetinu měřený na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova-Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 10,5. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Koncentrační závislost anodické odezvy fisetinu byla měřena cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-5}$ - $3 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ v pufovaném vodném prostředí (obr. 33). S rostoucí koncentrací studované látky dochází u všech vln k zvýšení měřeného proudu. Závislost výšky píku fisetinu na jeho koncentraci jsou v měřeném rozsahu lineární.

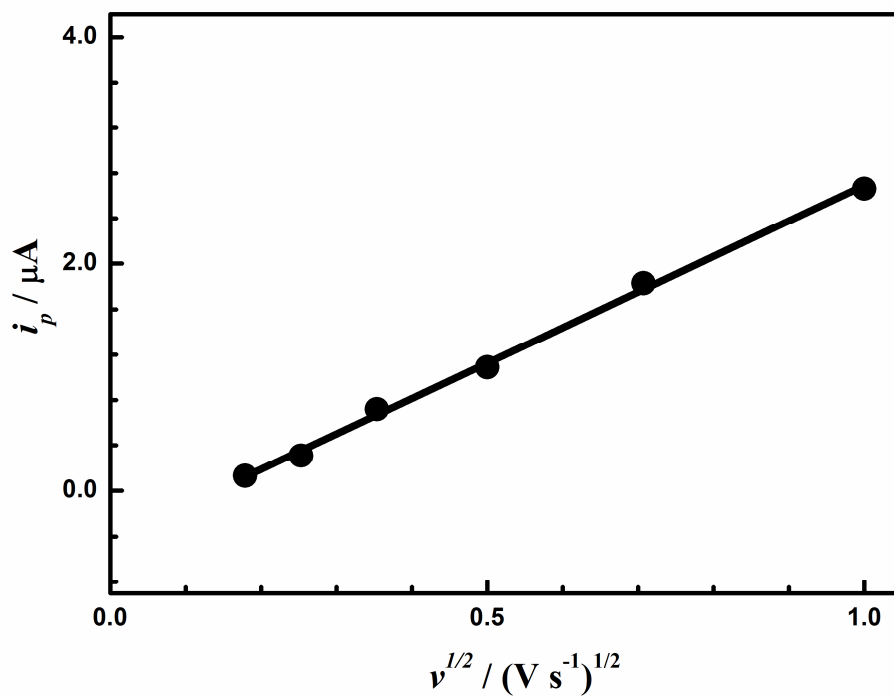


Obr. 33: Výběr cyklických voltamogramů fisetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) při pH: A) 5,3 s různou hodnotou koncentrace a) $5 \cdot 10^{-5}$; b) $1 \cdot 10^{-4}$; c) $1,5 \cdot 10^{-4}$; d) $2 \cdot 10^{-4}$; e) $3 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³; B) 8,2 s různou hodnotou koncentrace a) $2 \cdot 10^{-4}$; b) $2,5 \cdot 10^{-4}$; c) $3 \cdot 10^{-4}$; d) $3,5 \cdot 10^{-4}$; e) $4 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³; C) 9,4 s různou hodnotou koncentrace a) $1 \cdot 10^{-4}$; b) $1,5 \cdot 10^{-4}$; c) $2,5 \cdot 10^{-4}$; d) $4,5 \cdot 10^{-4}$; e) $6 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

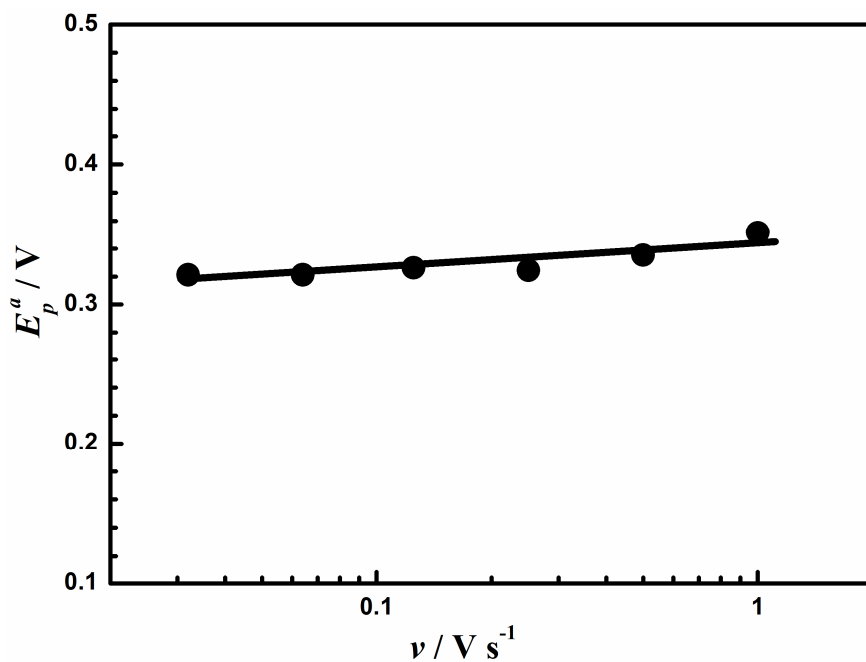
Obr. 34 ukazuje cyklické voltamogramy fisetinu, které byly měřeny při různých rychlostech polarizace (v rozmezí 0,032 až $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$), pro všechny měřené hodnoty pH. S rostoucí rychlostí polarizace narůstá výška oxidační vlny a dále byl pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám. Po vynesení výšky první oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace byla zjištěna lineární závislost (obr. 35). Lineární závislost odpovídá ději řízenému difúzí. Ze záznamů cyklické voltametrie s různou hodnotou rychlosti polarizace byl vynesen graf závislosti potenciálu první oxidační vlny na rychlosti polarizace, obr. 36. Výsledek $\delta E_p / \delta \log v = 19 \text{ mV}$ naznačuje typickou hodnotu pro přítomnost bimolekulární chemické reakce. Pokud po jednoelektronovém přenosu následuje bimolekulární reakce, lze ji ze závislosti potenciálu na rychlosti polarizace a koncentraci určit. V případě fisetinu jde o dvouelektronový proces a závislost potenciálu na koncentraci ukazuje na jiný výsledek, $\delta E_p / \delta \log c = 34 \text{ mV}$.



Obr. 34: Výběr cyklických voltamogramů $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fisetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 5,3. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5; f) $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

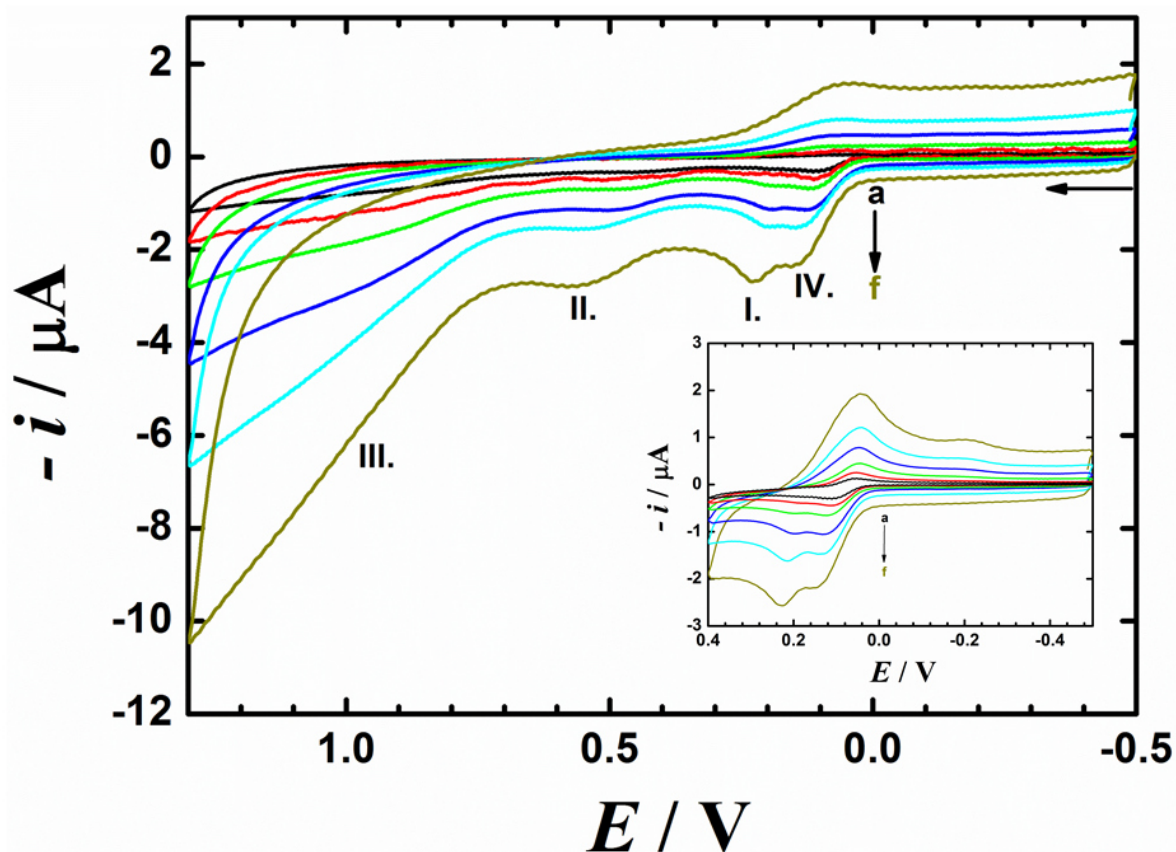


Obr. 35: Závislost výšky oxidačního píku (I.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace odečtená z obr. 34.

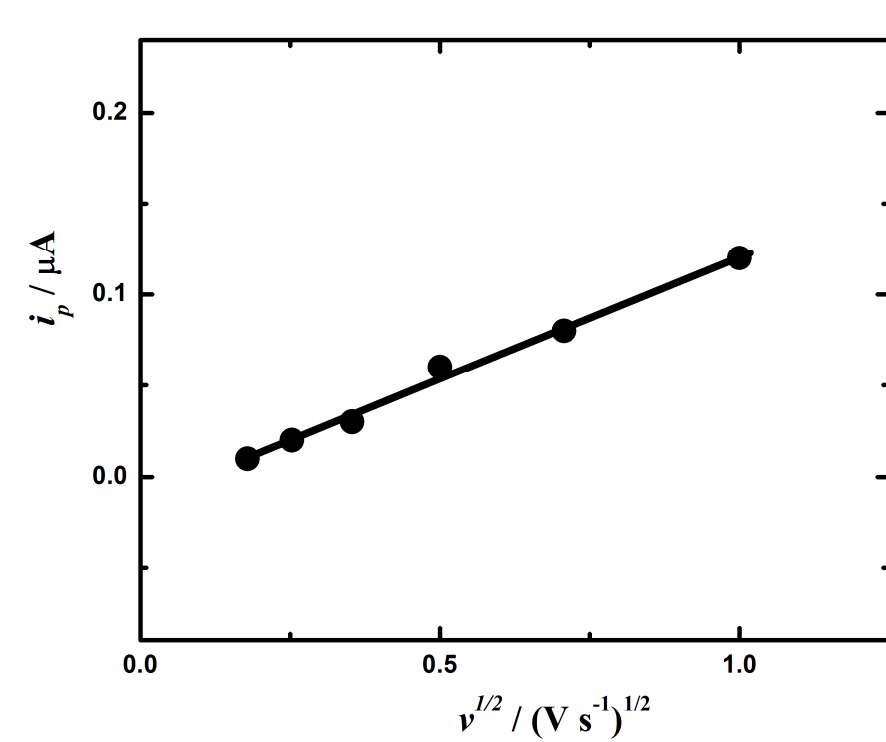


Obr. 36: Závislost potenciálu oxidační vlny (I.) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 34.

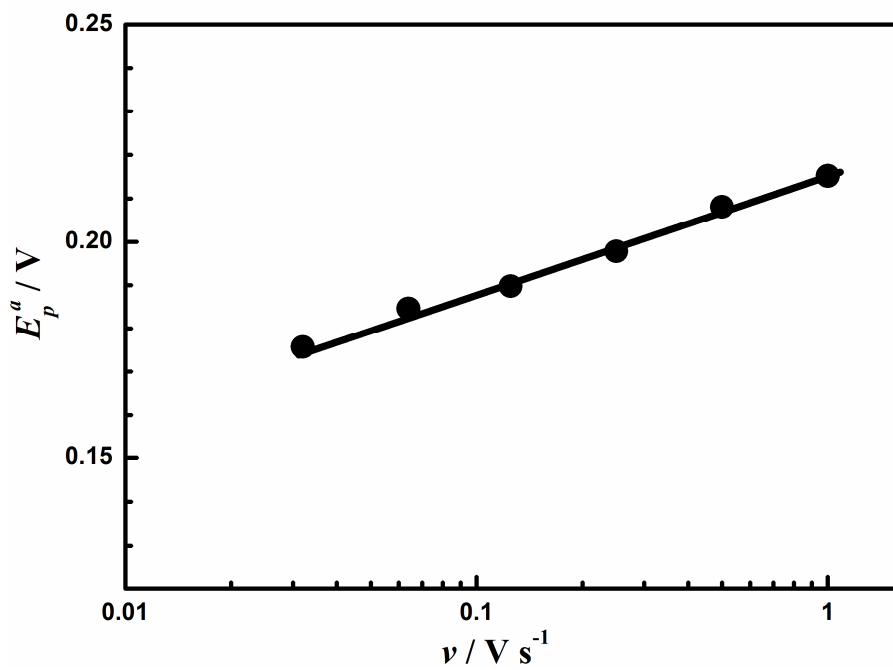
Obr. 37 ukazuje cyklické voltamogramy při různé rychlosti polarizace v roztoku fisetinu o $\text{pH} = 8,2$. Stejně jako u měření při $\text{pH} = 5,3$ byla zjištěná vzrůstající výška vlny s rostoucí rychlostí polarizace a poloha oxidační vlny se posouvala ke kladnějším hodnotám. Závislost anodického proudu oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace je lineární (obr. 38), proces je kontrolován difúzí. Dále byl vynesena graf závislosti potenciálu oxidační vlny na rychlosti polarizace $\delta E / \delta \log v$, obr. 39. Tato závislost je lineární se směrnici $26 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$. Závislost $\delta E / \delta \log c = 31 \text{ mV}$. Tyto hodnoty jsou blízké teoretickým hodnotám 30 mV , které podporují ECE-DISP mechanismus. Od rychlosti $0,065 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ se zviditelnila oxidační vlna při potenciálu $0,12 \text{ V}$.



Obr. 37: Výběr cyklických voltamogramů $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou $\text{pH} 8,2$. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5; f) $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.



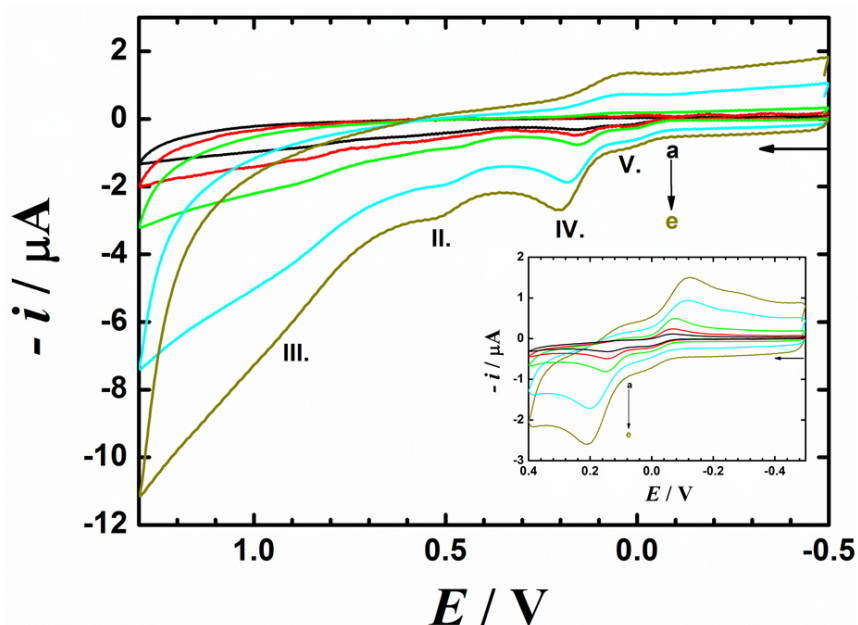
Obr. 38: Závislost výšky oxidačního píku (IV.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace odečtená z obr. 37.



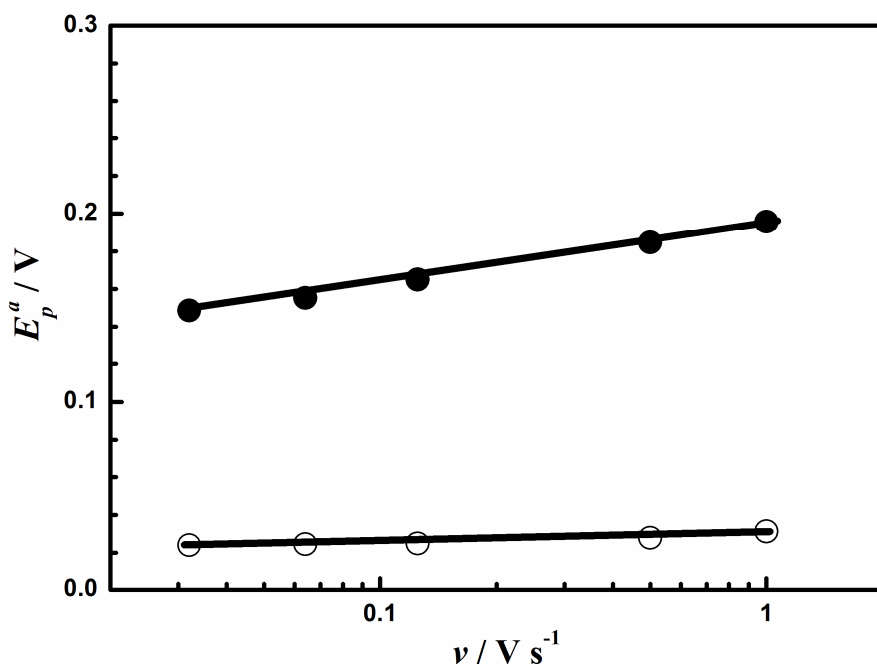
Obr.39: Závislost potenciálu oxidační vlny (IV.) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 37.

Dále jsme přikročili k měření cyklických voltamogramů při pH 9,4 (obr. 40), s různou rychlostí polarizace (v rozmezí 0,032 až $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$). Fisetin ve vodném pufovaném prostředí vykazuje čtyři oxidační vlny, které se zvyšují se vzrůstající rychlostí polarizace. Při uvedeném pH se vyskytuje v roztoku dianion, který se oxiduje při potenciálu první oxidační vlny (V.). Tato oxidační vlna je jednoelektronová. Po vynesení závislosti anodického proudu první oxidační vlny (V.) byla zjištěna lineární závislost na druhé odmocnině rychlosti polarizace. Ze záznamů cyklické voltametrie s různou hodnotou rychlosti polarizace byl vynesen graf závislosti potenciálu oxidační vlny (V.) na rychlosti polarizace $\delta E_p/\delta \log v$, obr. 41. Tato závislost je lineární, a to dle směrnice 7 mV. Tento výsledek vyvrací dimerizaci.

Závislost anodického proudu druhé oxidační vlny (IV.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace při pH = 9,4 je lineární, proces je také kontrolován difúzí. Tento výsledek je ve shodě s výsledky kyselějších roztoků (obr. 35 a 38). Závislost potenciálu oxidační vlny (IV.) na rychlosti polarizace je vynesena na obr. 41. Tato závislost je lineární se směrníci $\delta E_p/\delta \log v = 32 \text{ mV}$ a jen ověřuje výsledky pufovaného prostředí s pH = 8,2.



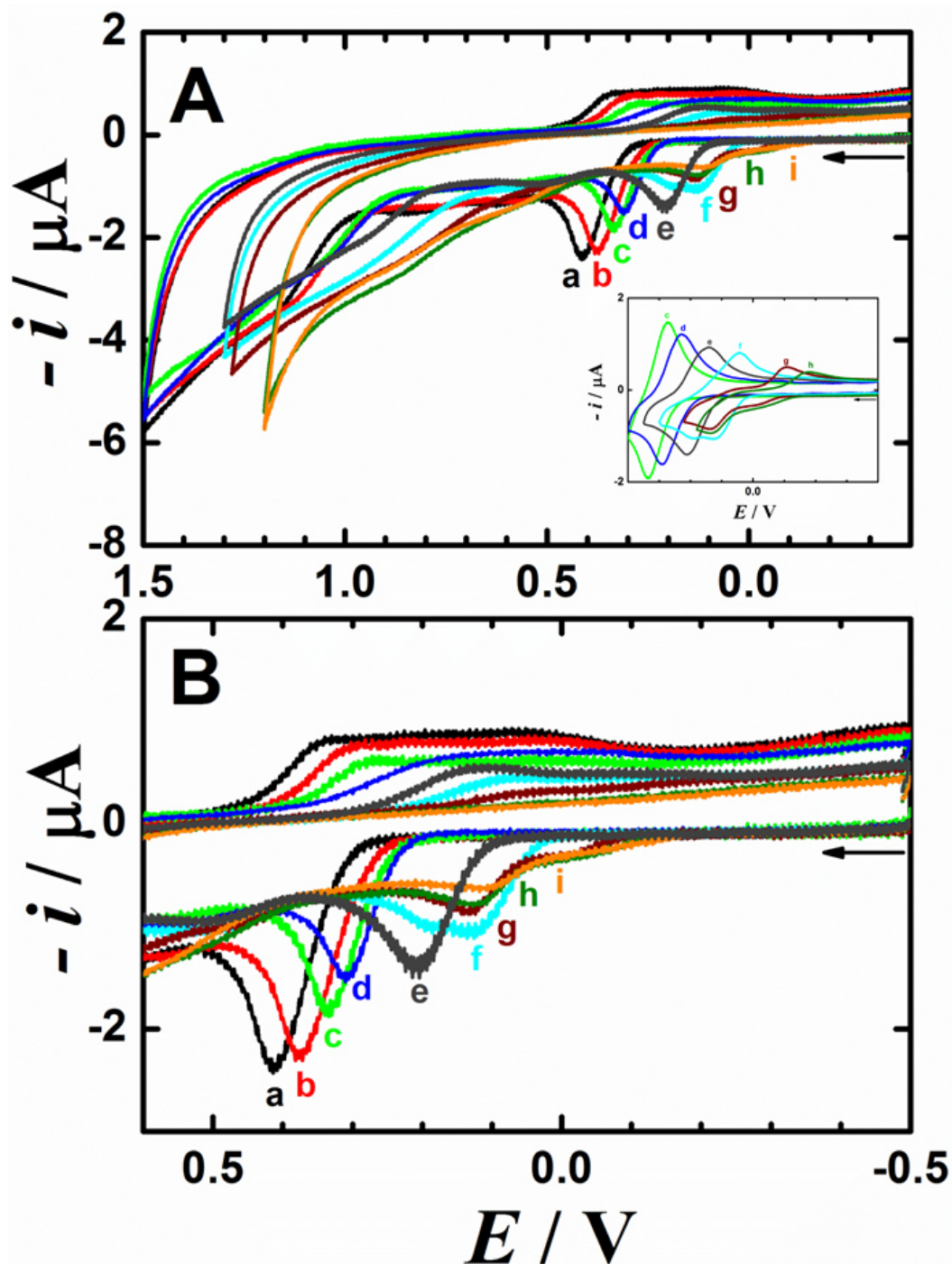
Obr.40: Výběr cyklických voltamogramů $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fisetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 9,4. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,5; e) $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr.41: Závislost potenciálu oxidačního piku IV. (●) a V. (○) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 40.

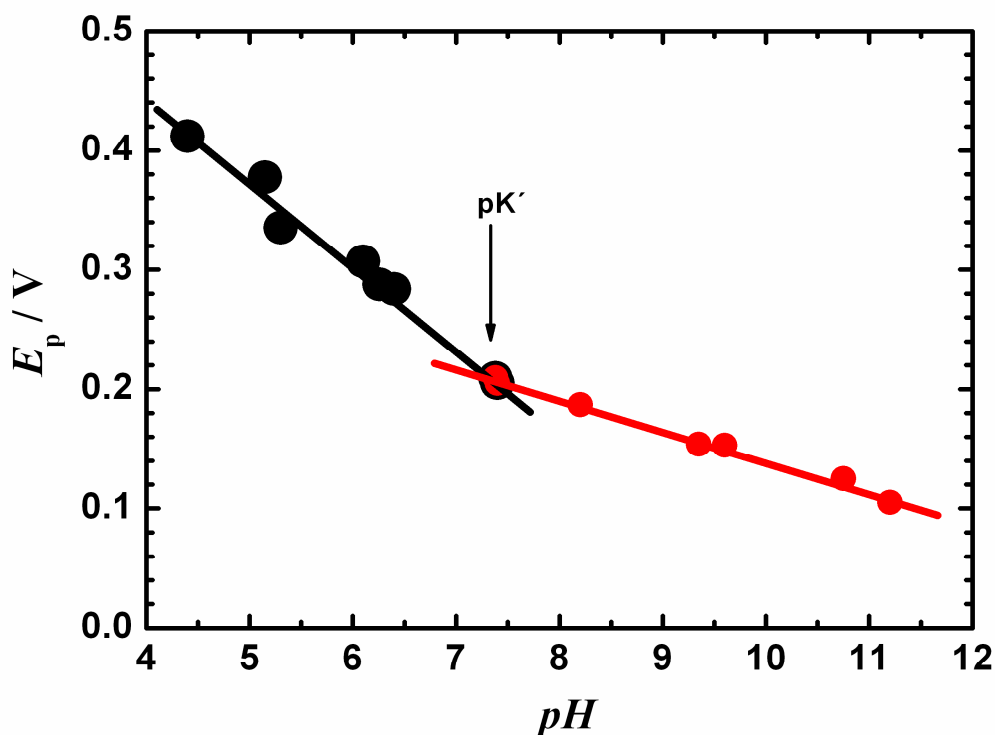
Jak je vidět z předchozích odstavců, oxidace fisetinu je závislá na pH, obr. 42-A. V kyselém prostředí do hodnoty $\text{pH} = 7,4$ dominuje oxidační pík formy AH_2 . Od $\text{pH} \geq 9,4$ se objevuje další oxidační vlna, tentokrát odpovídající formě A^{2-} . Výška píku formy AH_2 se snižuje s rostoucí hodnotou pH.

S rostoucí hodnotou pH dochází k posunu potenciálu všech oxidačních vln směrem k nižším hodnotám potenciálu, obr. 42-B. Z toho je patrné, že na celkovém mechanismu oxidace se účastní vodíkové ionty. Potenciál každé oxidační vlny klesá s rostoucí hodnotou pH roztoku a tento posun je doprovázen ztrátou reversibility oxidační vlny (I.), jak je vidět na vloženém obr. 42.



Obr.42: Výběr cyklických voltamogramů $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: a) 4,4; b) 4,9; c) 5,2; d) 6,2; e) 7,4; f) 8,2; g) 9,4; h) 10,8; i) 11,2. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Vložený obrázek ukazuje cyklické voltamogramy při uvedených hodnotách pH, kdy je směr polarizace změněn za první oxidační vlnou.

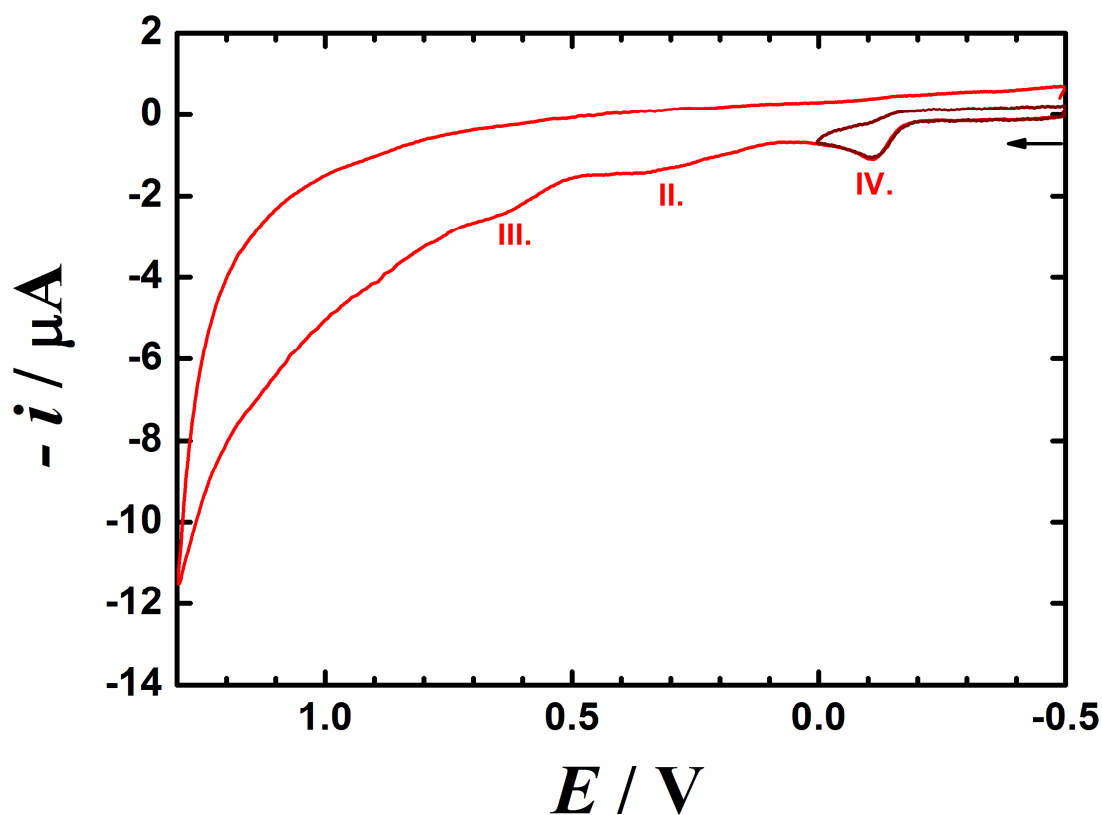
Závislost potenciálu píku fisetinu na pH (obr. 43) je tvořena dvěma lineárními úseky se směrnicí $68 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ a $26 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$. Směrnice blízkí se teoretické hodnotě $59 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ napovídá, že proces zahrnuje stejný počet protonů a elektronů. Za předpokladu, že v prvním stupni oxidace fisetinu se uvolňují $2e^-$, odpovídá vyšší hodnota směrnice zjištěné pro kyselé a neutrální prostředí ztrátě $2H^+$ a nižší hodnota, zjištěná pro alkalické roztoky, ztrátě $1H^+$. Průsečík obou přímek při pH 7,5 odpovídá zdánlivé distribuční konstantě ($pK'_a = 7,5$). Tato hodnota se liší od teoretické vypočítané hodnoty fisetinu $pK_1 = 6,83 \pm 0,4$ [164], což je v souladu s literaturou. Zdánlivá pK' je zpravidla vyšší než pK_a zjištěná např. spektrofotometricky a může se lišit až o 3 jednotky pH [139,166].



Obr. 43: Závislost potenciálu píku na pH pro fisetin vyhodnocená z obr. 42.

Nepufrované prostředí

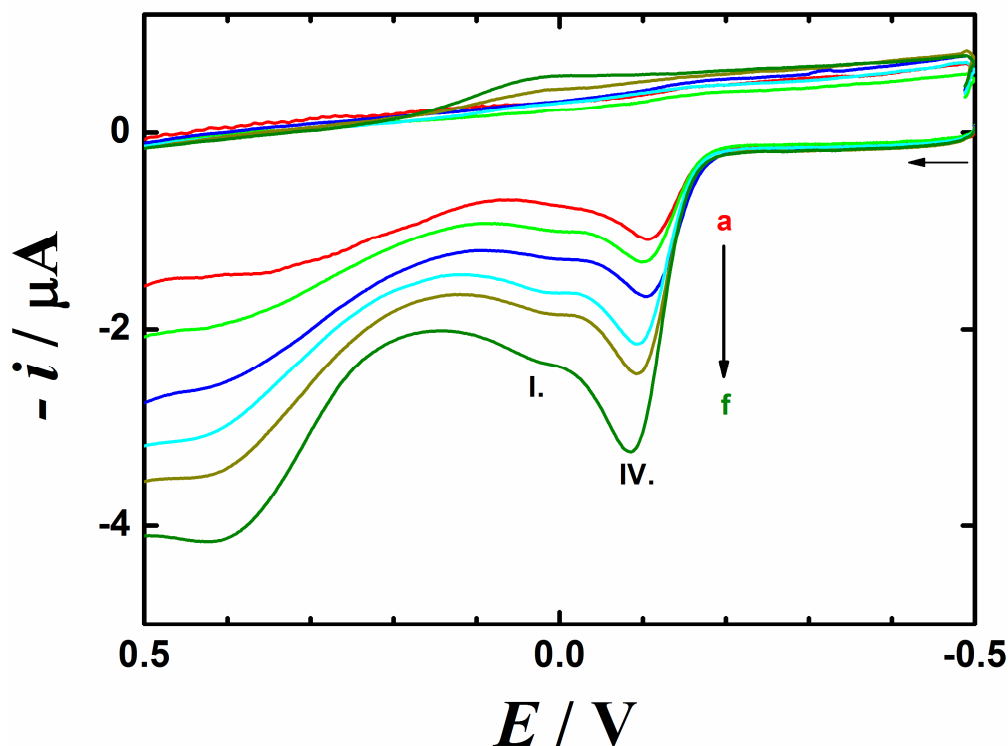
Cyklický voltamogram fisetinu (obr. 44) v nepufrovaném prostředí vykazuje tři anodické oxidační signály v rozmezí potenciálů od -0,5 do 1,3 V. První anodická oxidační vlna je při potenciálu -0,11 V. První oxidační vlna je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu -0,17 V. Druhá ireversibilní oxidační vlna se objevuje při potenciálu 0,35 V a třetí ireversibilní oxidační vlna při potenciálu 0,65 V.



Obr. 44: Cyklický voltamogram $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Závislosti anodických odezev fisetinu na koncentraci byly měřeny cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací $1,8 \cdot 10^{-3} - 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve vodném nepufrovaném prostředí (obr. 45).

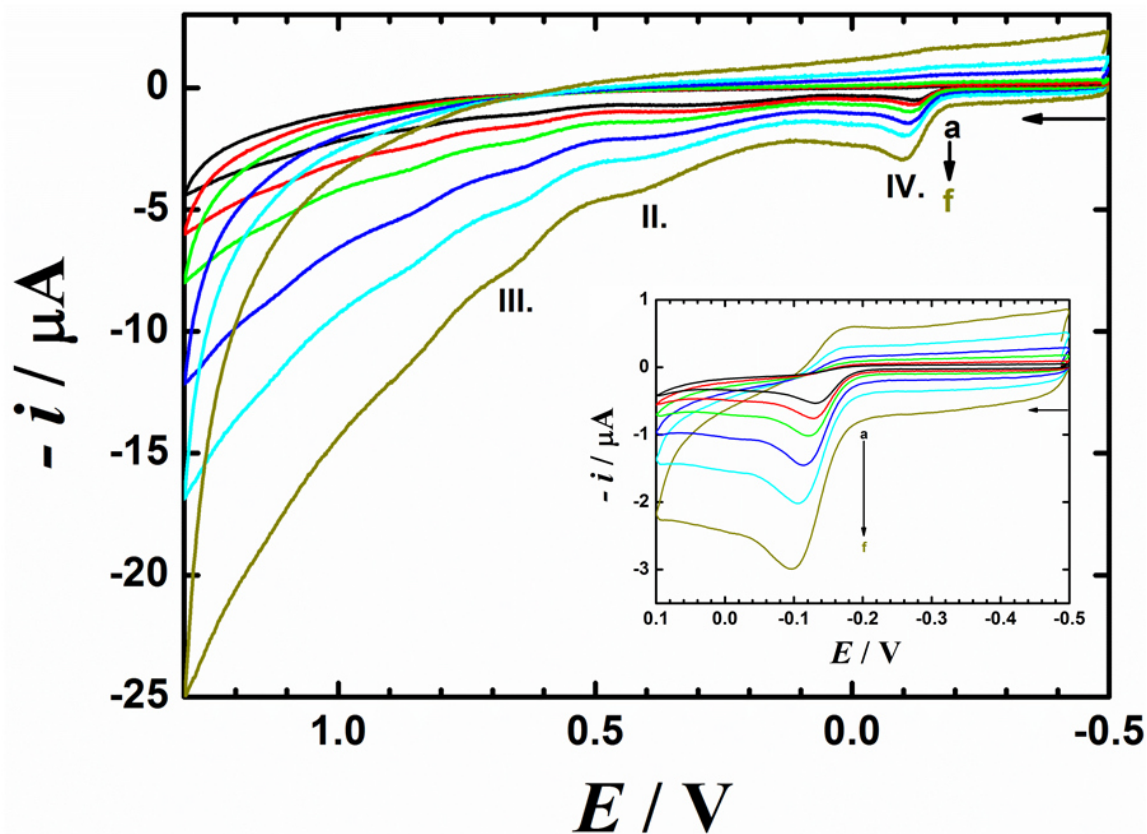
Při dostatečném přiblížení je na cyklickém voltamogramu ještě vidět vlna I. Poměr výšek vln IV. a I. je pro každou koncentraci zachován. V roztoku se fisetin vyskytuje převážně v disociované formě AH^- .



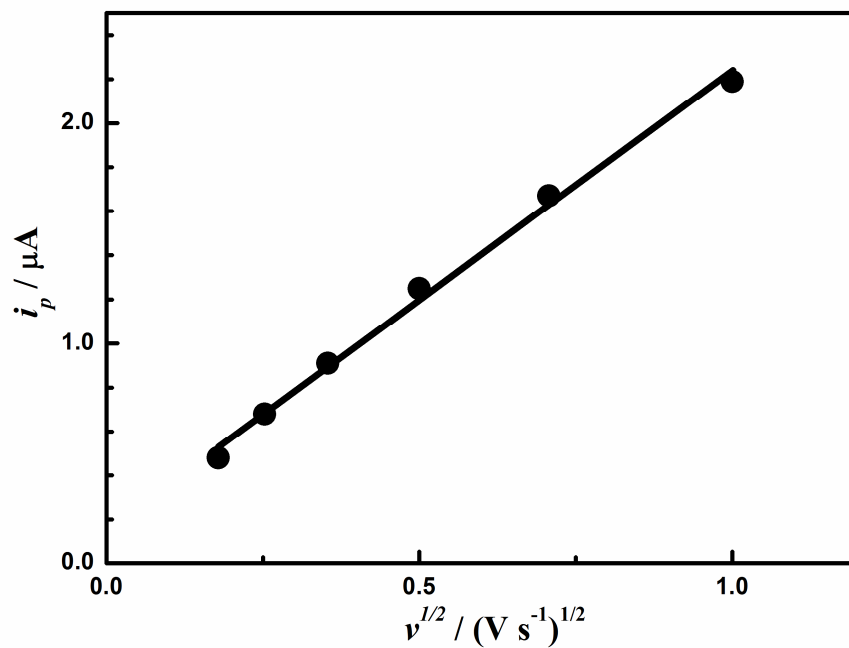
Obr. 45: Výběr cyklických voltamogramů fisetinu při různých hodnotách koncentrace a) 1,8; b) 3,4; c) 4,7; d) 5,8; e) 7,1; f) $8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřených na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$ s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KOH}$. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Dále jsme se zaměřili na měření cyklických voltamogramů fisetinu (obr. 46) s různou rychlostí polarizace (v rozmezí $0,032$ až $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$). Fisetin poskytuje tři oxidační vlny v rozsahu potenciálů od $-0,5$ do $1,3 \text{ V}$. Se zvyšující se rychlostí polarizace vzrůstá výška všech oxidačních vln. Z cyklických voltamogramů byly vyneseny závislosti výšky první oxidační vlny (IV.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace (obr. 47). Tato závislost je lineární, a proto odpovídá ději řízeném difúzí. Z cyklických voltamogramů byla vynesena závislost potenciálu první oxidační vlny (IV.)

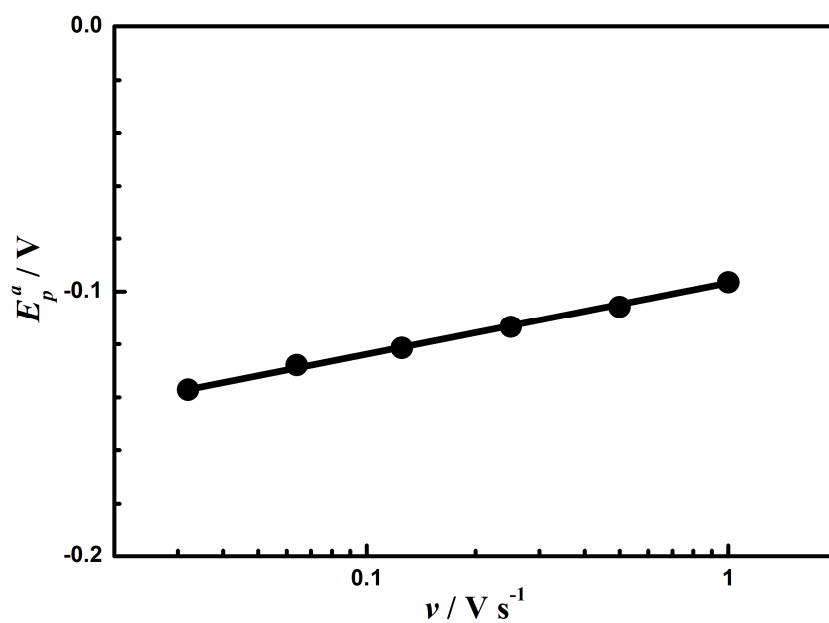
na rychlosti polarizace, obr. 48. Byl pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti polarizace a směrnice $\delta E_p / \delta \log v = 27 \text{ mV}$.



Obr. 46: Výběr cyklických voltamogramů $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace a) $0,032$; b) $0,064$; c) $0,125$; d) $0,25$; e) $0,5$; f) $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.



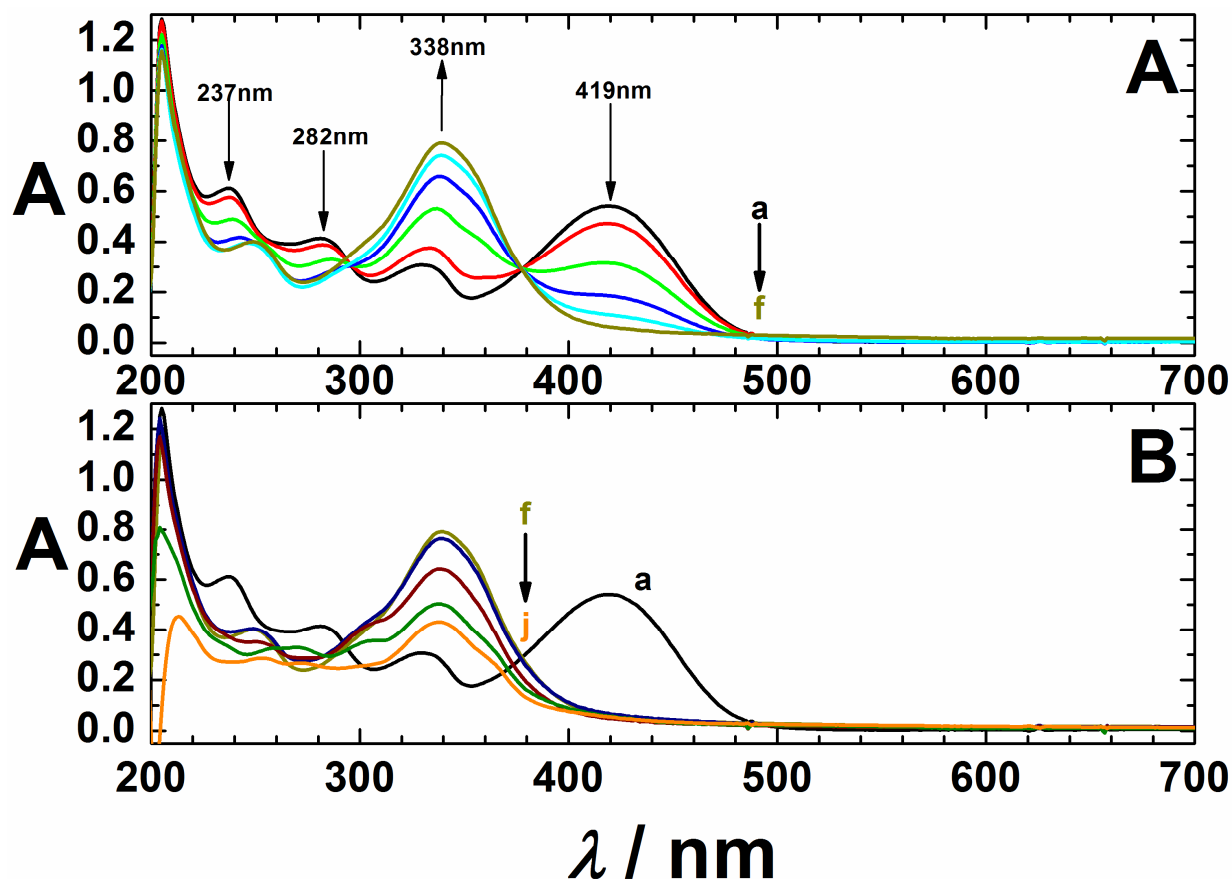
Obr. 47: Závislost výšky oxidačního píku (IV.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 46.



Obr. 48: Závislost potenciálu oxidačního píku (IV.) na rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 46.

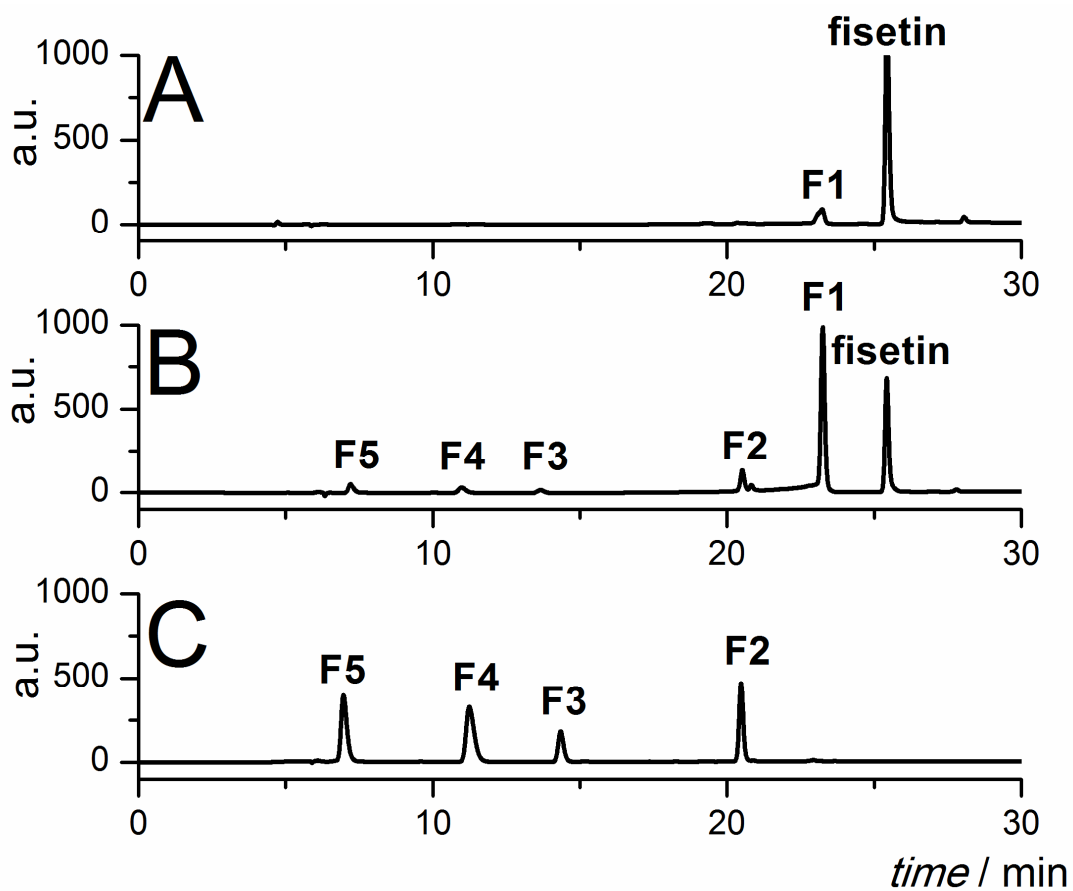
5.2.2. Stabilita fisetinu

Chemická stabilita byla zkoumaná dvěma způsoby, konkrétně pomocí spektrometrických a chromatografických měření. Fisetin ve vodném nepufrovaném roztoku byl vystaven přirozeným podmínkám, tedy působení vzdušného kyslíku. Jeho měnící se absorpční spektrum v závislosti na době expozice ukazuje obr. 49. Na obr. 49, křivka a ukazuje absorpční spektrum naměřené v inertní atmosféře argonu. Křivky b-j na obr. 49 ukazují záznam absorpčních spekter po otevření kyvety v prodlužujících se časových intervalech až po několik hodin. Spektra během interakce se vzdušným kyslíkem vykazují nárůst u 338 nm a pokles absorpčních pásů u 237 nm, 282 nm a 419 nm. Pokles pásu u 419 nm a nárůst u 338 nm odpovídají vzniku oxidačního produktu 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2*H*)-onu (F2). Na obr. 49-B můžeme vidět jak absorpční pásy produktu F2 klesají a vznikají další absorpční pásy, které odpovídají dalším oxidačním produktům, na které se oxidační produkt F2 rozkládá. Fisetin je úplně degradován za 13 minut.



Obr. 49: Absorpční spektra $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH při expozici vzdušného kyslíku. A) s různou dobou expozice a) 0, b) 100, c) 180, d) 280, e) 400, f) 760 s. B) s různou dobou expozice a) 0 s, f) 12min 40s, g) 22min 20s, h) 49min 20s, i) 4h 24min 20s, j) 71h 59min.

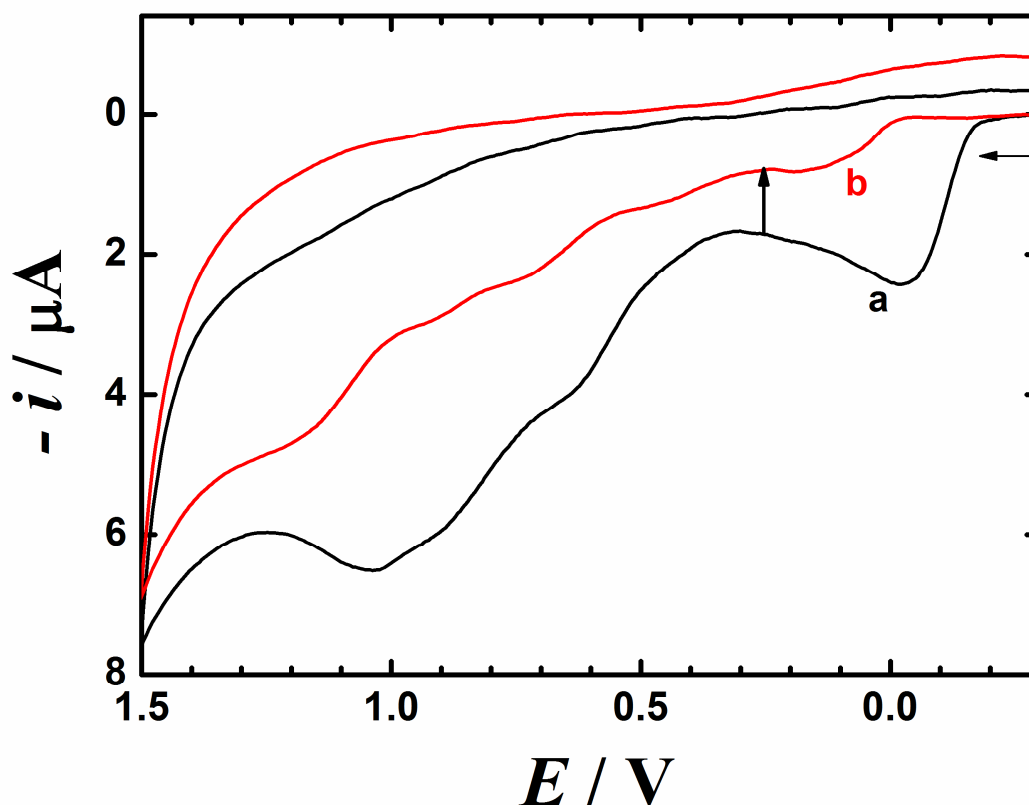
Chemická stabilita byla sledována také pomocí chromatografických měření. Roztok fisetinu byl vystaven vlivu vzdušného kyslíku a proměřen ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, kde bylo sledováno zastoupení jednotlivých produktů, obr. 50. Fisetin se vlivem vzdušného kyslíku nejprve rozkládá na produkt F1, který se dále přemění na produkt F2. Tyto produkty se dále rozkládají na další produkty F3-F9. Dle obr. 50-A-C je patrné, že rozklad fisetinu je velice rychlý proces, a proto je nutné přísně dodržovat postup, který zaručí inertní prostředí. Jak je vidět na obr. 50-B, roztok fisetinu připravený běžným způsobem obsahuje kromě fisetinu jeho degradační produkty.



Obr. 50: Kapalinový chromatogram fisetinu A) před přímým vlivem vzdušného kyslíku, B) připraveno za běžných laboratorních podmínek (s přístupem vzduchu), C) po 40 min vlivu vzdušného kyslíku. Průtok: $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřicí podmínky číslo 1.

5.2.3. Elektrolýza

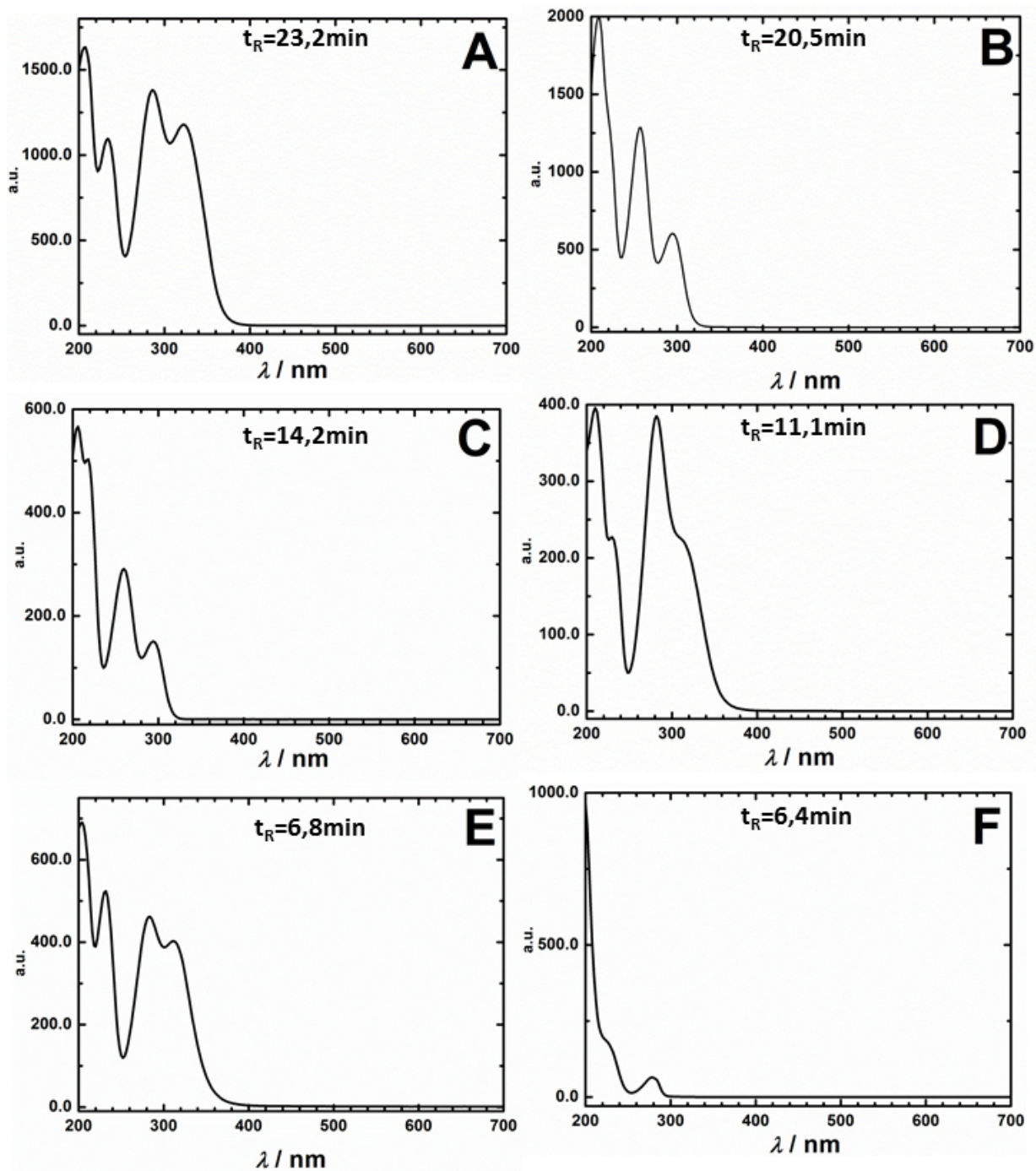
Za účelem zjištění oxidačních produktů fisetinu byl jeho roztok $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH elektrolyzován při potenciálu 0,25 V. Cyklický voltamogram před elektrolyzou a po jejím ukončení ukazuje obr. 51. Vyelektrolyzovaný náboj spotřebovaný během elektrolyzy odpovídá spotřebě dvou elektronů.



Obr. 51: Cyklický voltamogram $7,2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fisetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. a) před elektrolyzou, b) po elektrolyze. Elektrolyzováno při potenciálu 0,25 V. Rychlost polarizace 0,25 V.

Obr. 52 vyobrazuje absorpční spektra produktů fisetinu, které byly analyzovány v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH pomocí HPLC-DAD. Obr. 52-A ukazuje spektrum oxidačního produktu 2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-hydroxybenzaldehydu (F1) s absorpčními maximy 206 nm, 233 nm, 287 nm a 322 nm. Obr. 52-B zobrazuje absorpční spektrum produktu

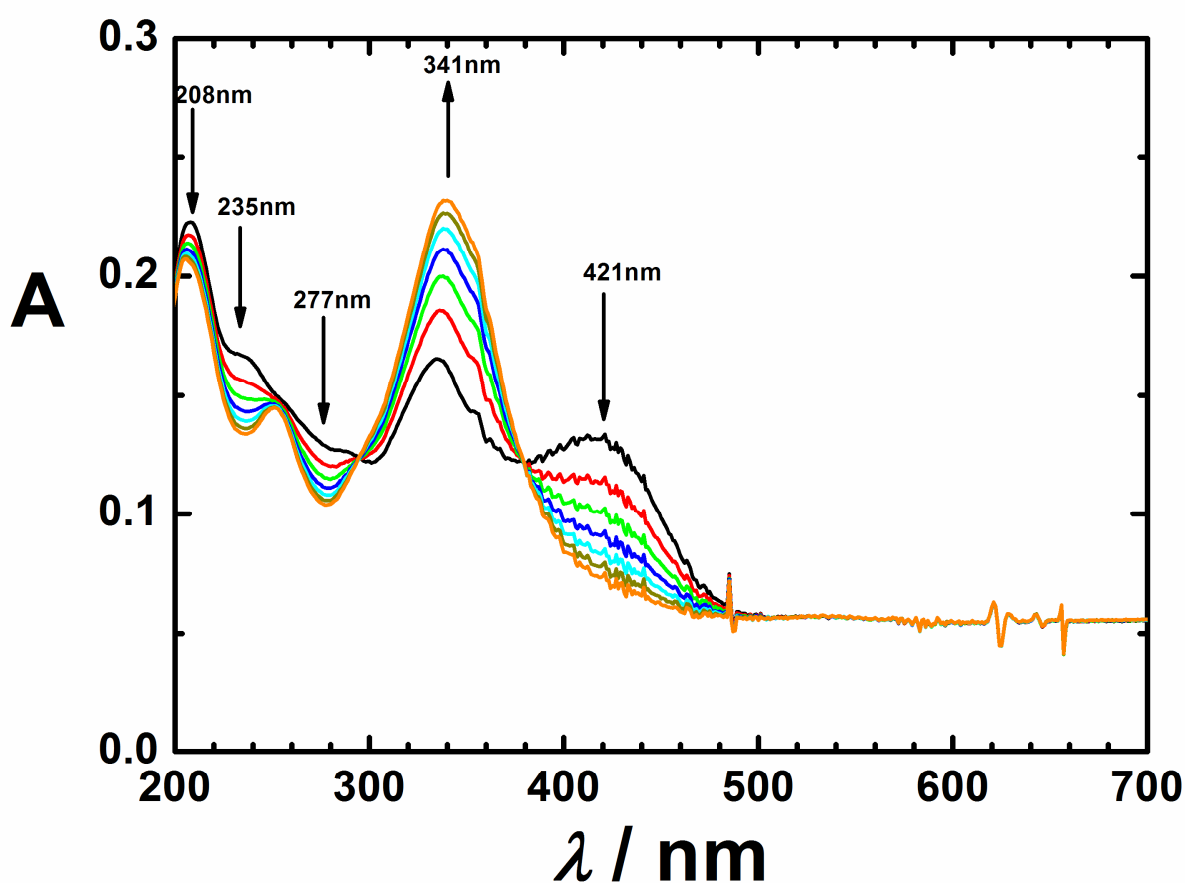
2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2*H*)-onu (F2) s absorpčními maximy 209 nm, 257 nm a 295 nm. Na obr. 52-C je spektrum produktu (2,4-dihydroxyfenyl)(oxo)octové kyseliny (F3) s absorpčními maximy 205 nm, 217 nm, 260 nm a 294 nm. Na obr. 52-D je spektrum oxidačního produktu fisetinu 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny (F4) s absorpčními maximy 210 nm, 229 nm, 282 nm a 314 nm. Obr. 52-E zobrazuje absorpční spektrum produktu 3,4-dihydroxyfenyl(oxo)octové kyseliny (F5) s absorpčními maximy 203 nm, 232 nm, 283 nm a 312 nm. Obr. 52-F ukazuje absorpční spektrum produktu 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny (F6) s absorpčními maximy 226 nm a 278 nm.



Obr.52: Absorpční spektra produktů A) F1, B) F2, C) F3, D) F4, E) F5 F) F6 registrovaná v retenčním čase uvedeném v obrázku. Spektra jsou zobrazena po odečtení pozadí kolony.

5.2.4. UV/Vis spektroelektrochemie fisetinu

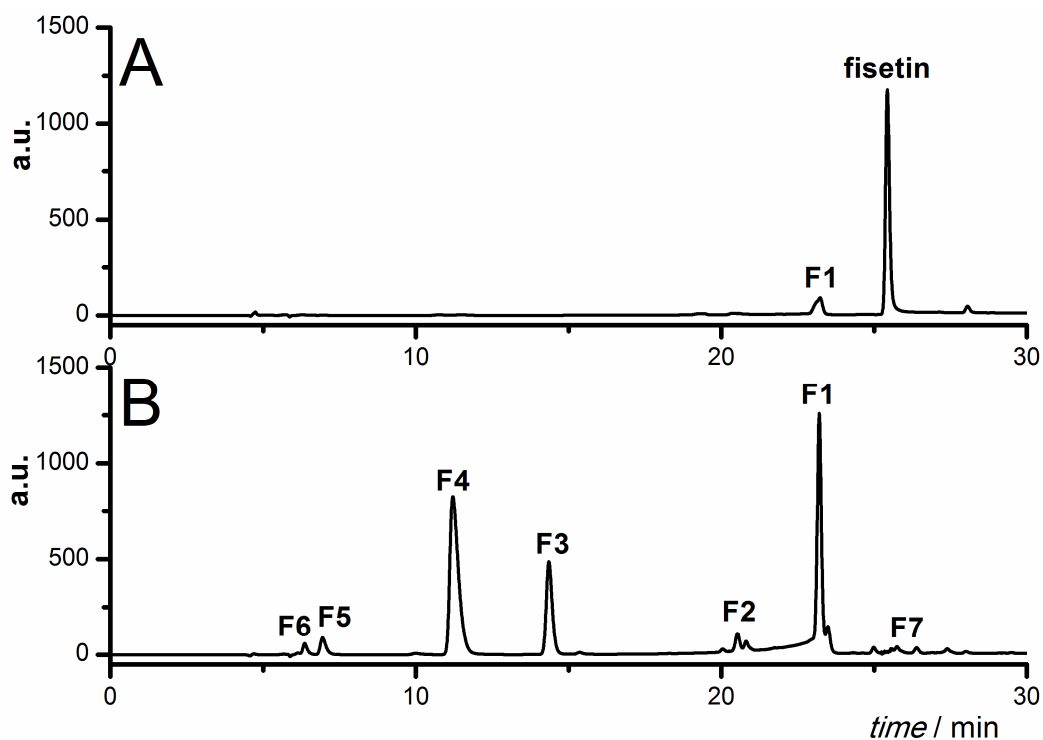
V průběhu elektrolýzy v OTTLE cele byla získána absorpční spektra, která jsou zobrazena na obr. 53. Absorpční spektra vykazují pokles absorpčního pásu u 208 nm, 235 nm, 277 nm, 421 nm a zvýšení absorpčního pásu u 341 nm. Absorpční pás při 421 nm je typický pro 3',4'-dihydroxyfenyl skupinu flavonoidů [17]. Snížení tohoto absorpčního pásu potvrzuje, že dochází k oxidaci v této části molekuly.



Obr. 53: *In situ* spektroelektrochemie $3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fisetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Měřeno za první oxidační vlnou.

5.2.5. Chromatografická měření fisetinu

Pro zjištění oxidačních produktů byly zvoleny separační analytické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (HPLC-MS/MS) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD). Konečné produkty oxidace byly identifikovány analýzou složek po částečné nebo úplné elektrolýze při konstantním potenciálu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Na obr. 54-A je vyobrazen kapalinový chromatogram před elektrolýzou fisetinu. V retenčním čase $t_R = 25,5 \text{ min}$ je vidět pík fisetinu. Na obr. 54-B je vyobrazen chromatogram po elektrolýze fisetinu. V retenčním čase $t_R = 23,2 \text{ min}$ se objevuje oxidační produkt F1. Tento a další oxidační produkty byly charakterizovány spektry z hybridního hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým a průletovým hmotnostním analyzátozem s ionizací elektrospřejem (ESI-Q-TOF). Hlavní hodnoty m/z oxidačního produktu 2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-hydroxybenzaldehydu, F1, jsou: 273,04; 243,03; 163,00; 135,01 a 109,03. Tento oxidační produkt se dále přemění na oxidační produkt 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2*H*)-on, F2, (hodnoty m/z : 301,04; 273,04; 191,00; 153,02 a 135,00), který také není stabilní a rozkládá se. Konečnými oxidačními produkty jsou (2,4-dihydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina, F3, (hodnoty m/z : 181,01; 165,02; 153,02; 137,03 a 109,03), 2,4-dihydroxybenzoová kyselina, F4, (hodnoty m/z : 153,02; 137,02 a 109,03), 3,4-dihydroxyfenyl(oxo)octová kyselina, F5, (hodnoty m/z : 181,01; 153,02 a 109,03), 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, F6, (hodnoty m/z : 153,02 a 109,03), (2*E*)-7-hydroxy-2-(3'-hydroxy-4'-oxocyklohexa-2',5'-dien-1'-yliden)-2*H*-chromen-3,4-dion, F7, (hodnoty m/z 283,03; 209,08; 187,10; 171,10 a 135,97), (4-hydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina, F8, (hodnoty m/z 165,02) a 4-hydroxybenzaldehyd, F9, (hodnoty m/z 121,03). Všechny oxidační produkty fisetinu vznikají jak v přítomnosti vzdušného kyslíku, tak díky elektrolýze v inertní atmosféře.



Obr. 54: Kapalinový chromatogram fisetinu A) před elektrolýzou, B) po elektrolýze při potenciálu 0,25 V. Průtok: 0,2 ml·min⁻¹, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřící podmínky číslo 1.

5.2.6. Mechanismus oxidace fisetinu

Z předchozích výsledků analytických separačních metod a elektrochemických měření byl navržen oxidační mechanismus fisetinu. Navržený mechanismus je vyobrazen na schématech 9-11. V prvním kroce se fisetin oxiduje na (2*E*)-7-hydroxy-2-(3'-hydroxy-4'-oxocyklohexa-2',5'-dien-1'-yliden)-2*H*-chromen-3,4-dion, produkt F7, který podléhá další chemické reakci za vzniku oxidačního produktu 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2*H*)-onu, F2, schéma 9.

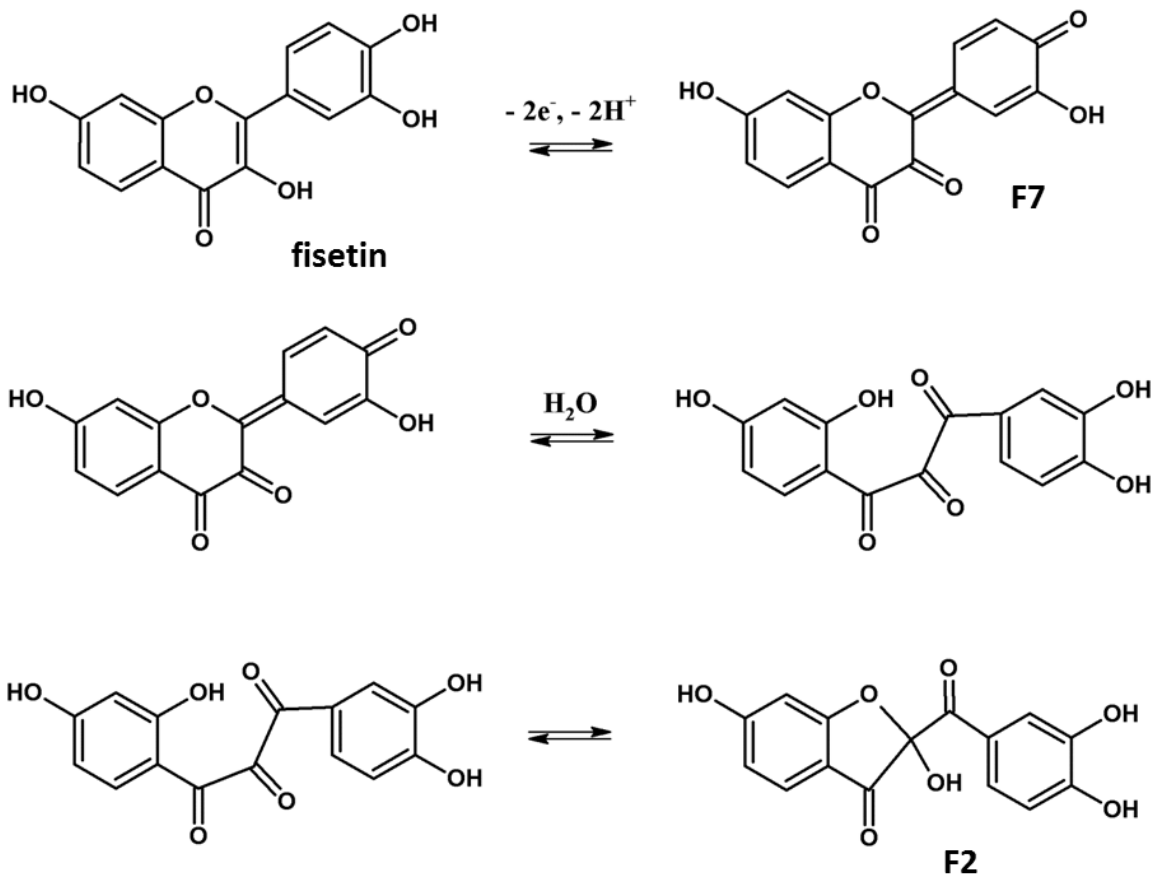


Schéma 9: Oxidační mechanismus fisetinu.

Jak ukázalo měření stability, ať už separačními nebo absorpčními metodami, oxidační produkt F2 se dále rozkládá na řadu nízkomolekulárních sloučenin jako jsou F3-F6, schéma 10.

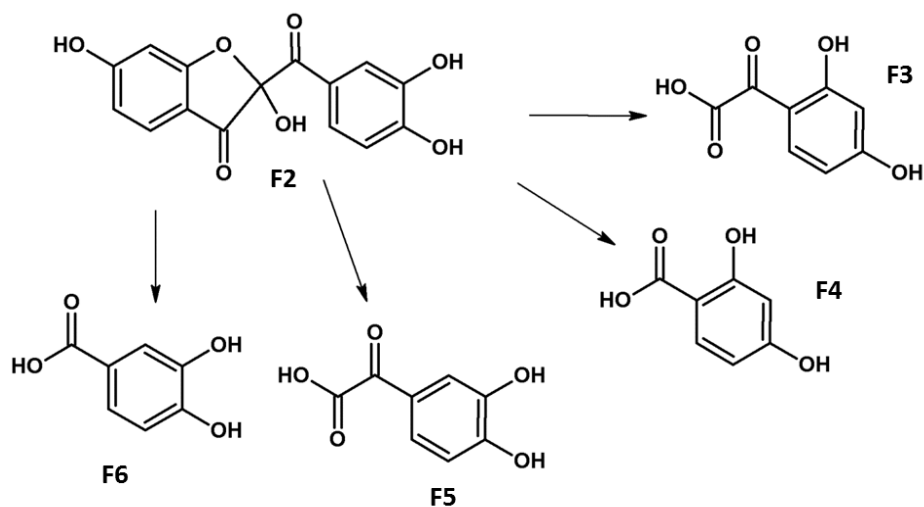


Schéma 10: Rozklad oxidačního produktu F2 na další nízkomolekulární produkty oxidace.

Schémata 9 a 10 ukazují hlavní reakční cestu fisetinu. Druhou reakční cestou je oxidace vlivem vzdušného kyslíku. Z fisetinu vzniká oxidační produkt 2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-hydroxybenzaldehyd, F1, který dále podléhá reakci se vzdušným kyslíkem a produkt F1 se rozkládá na další produkty 3,4- dihydroxybenzoovou kyselinu, F6, (4-hydroxyfenyl)(oxo)octovou kyselinu, F8, a 4-hydroxybenzaldehyd, produkt F9. Oxidační mechanismus je naznačen na schématu 11.

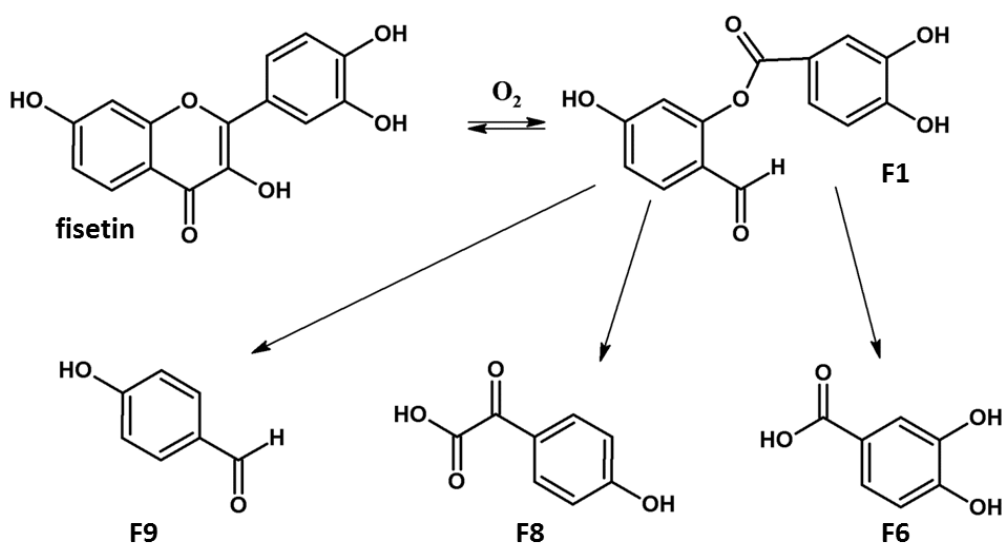


Schéma 11: Rozklad oxidačního produktu F1 na nízkomolekulární produkty oxidace.

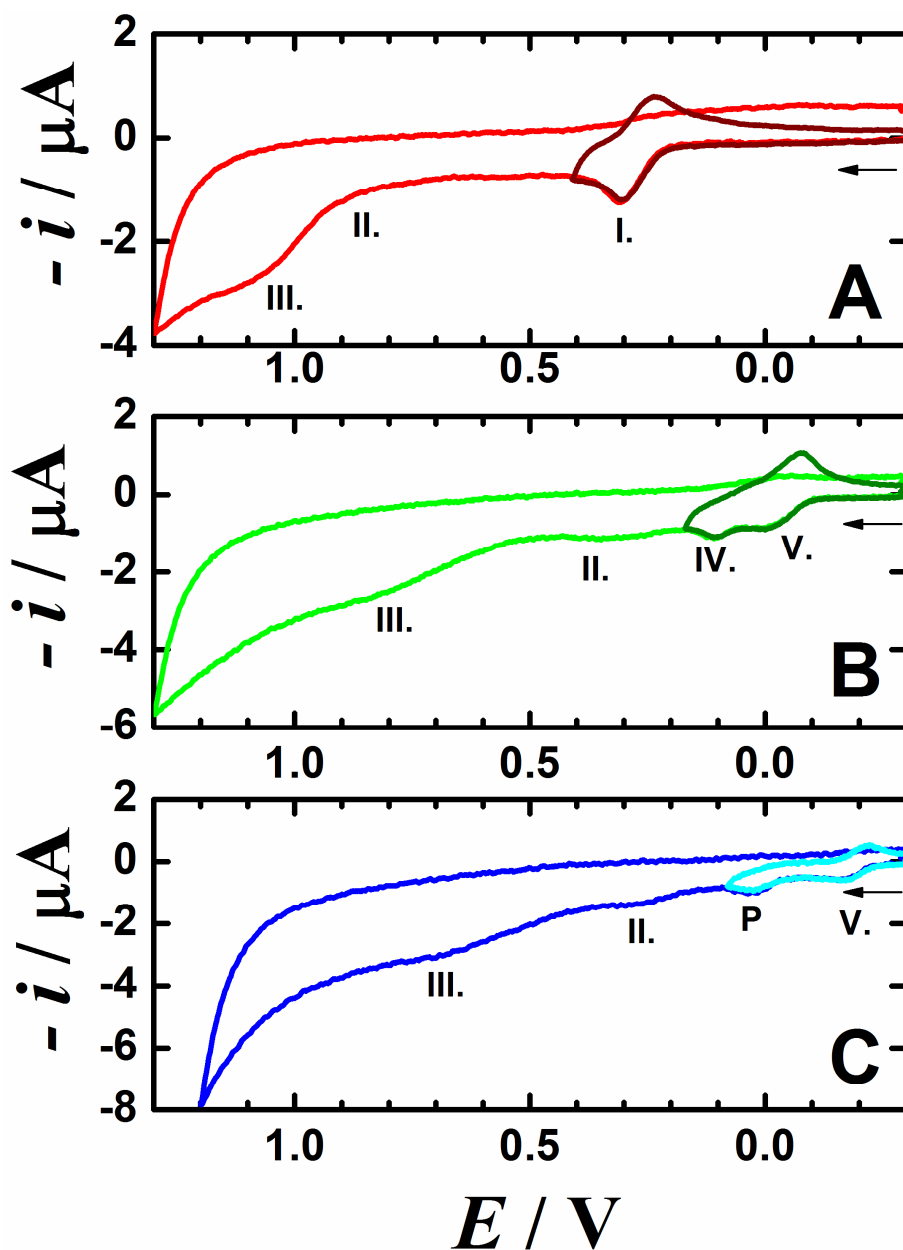
5.3.RHAMNETIN

5.3.1. Elektrochemická měření

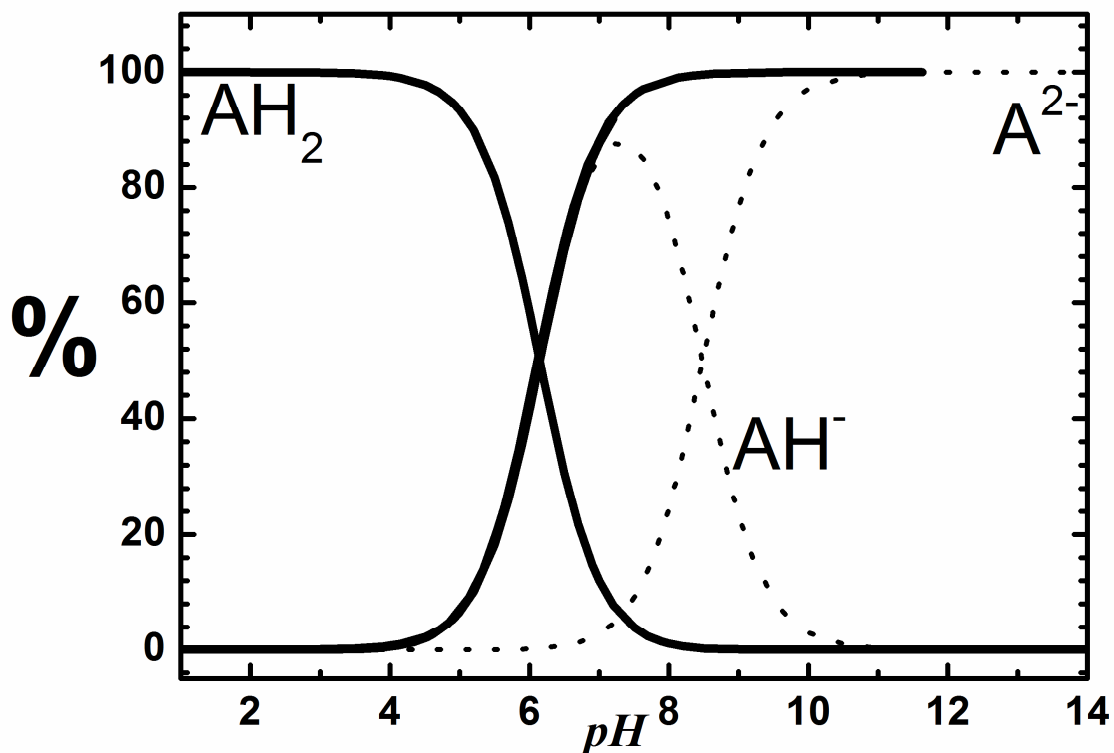
Pufrované prostředí

Elektrochemické chování rhamnetinu bylo nejprve studováno v pufrovaném prostředí. Cyklická voltametrie rhamnetinu byla měřená ve vodném pufrovaném prostředí v rozmezí potenciálů od -0,3 do 1,3 V. V tomto rozmezí byl pozorován různý počet oxidačních vln v závislosti na pH prostředí. V kyselém prostředí, při pH = 5,1, viz obr. 55-A, je zobrazen cyklický voltamogram rhamnetinu, který vykazuje tři oxidační vlny. První oxidační vlna (I.) při potenciálu 0,31 V je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu 0,23 V. Druhá oxidační vlna (II.) se objevuje u potenciálu 0,9 V a třetí oxidační vlna (III.) při potenciálu 1,09 V. Obě tyto vlny jsou ireversibilní. Na obr. 55-B je zobrazen cyklický voltamogram naměřený při pH = 9,0. První oxidační vlna (V.) při potenciálu -0,02 V je quazireversibilní a její oxidační protipík se objevuje u potenciálu -0,08 V. Druhá oxidační vlna (IV.) se objevuje při potenciálu 0,11 V a je také quazireversibilní s protipíkem u potenciálu 0,07 V. Třetí oxidační vlna (II.) rhamnetinu při potenciálu 0,36 V je ireversibilní, stejně jako čtvrtá oxidační vlna (III.) při potenciálu 0,84 V. Obě tyto vlny jsou ireversibilní. Na obr. 55-C je zobrazen cyklický voltamogram rhamnetinu při pH = 10,7. Při této hodnotě pH se objevuje první oxidační vlna (V.) při potenciálu -0,17 V. Tato oxidační vlna je quazireversibilní a její redukční protipík se objevuje při potenciálu -0,22 V. Při této hodnotě pH se již neobjevují oxidační vlny (I. a IV.) jako v případě kyselějších pH. Druhá oxidační vlna (P) se vyskytuje při potenciálu 0,03 V. I v tomto případě je oxidační vlna quazireversibilní s protipíkem u potenciálu -0,03 V. Třetí oxidační vlna (II.) se objevuje při potenciálu 0,26 V a čtvrtá oxidační vlna (III.) při potenciálu 0,7 V. Obě tyto vlny jsou ireversibilní. Už u pH = 9,0 se v roztoku nevyskytuje molekula nedisociované látky, pouze anion nebo dianion, viz. obr. 56. Na obr. 56 je znázorněn distribuční diagram rhamnetinu vypočtený ze známé disociační konstanty rhamnetinu. Teoreticky vypočtená disociační konstanta rhamnetinu

je $pK_1 = 6,15 \pm 0,4$ [164]. Pro odhad přítomnosti disociovaných forem rhamnetinu v roztoku jsme použili hodnotu pK_2 quercetinu [117], který má podobnou chemickou strukturu. V obr. 56 je možná disociace do 2.stupně znázorněna tečkovanou křivkou.



Obr. 55: Výběr cyklických voltamogramů $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: A) 5,1; B) 9,0; C) 10,7. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

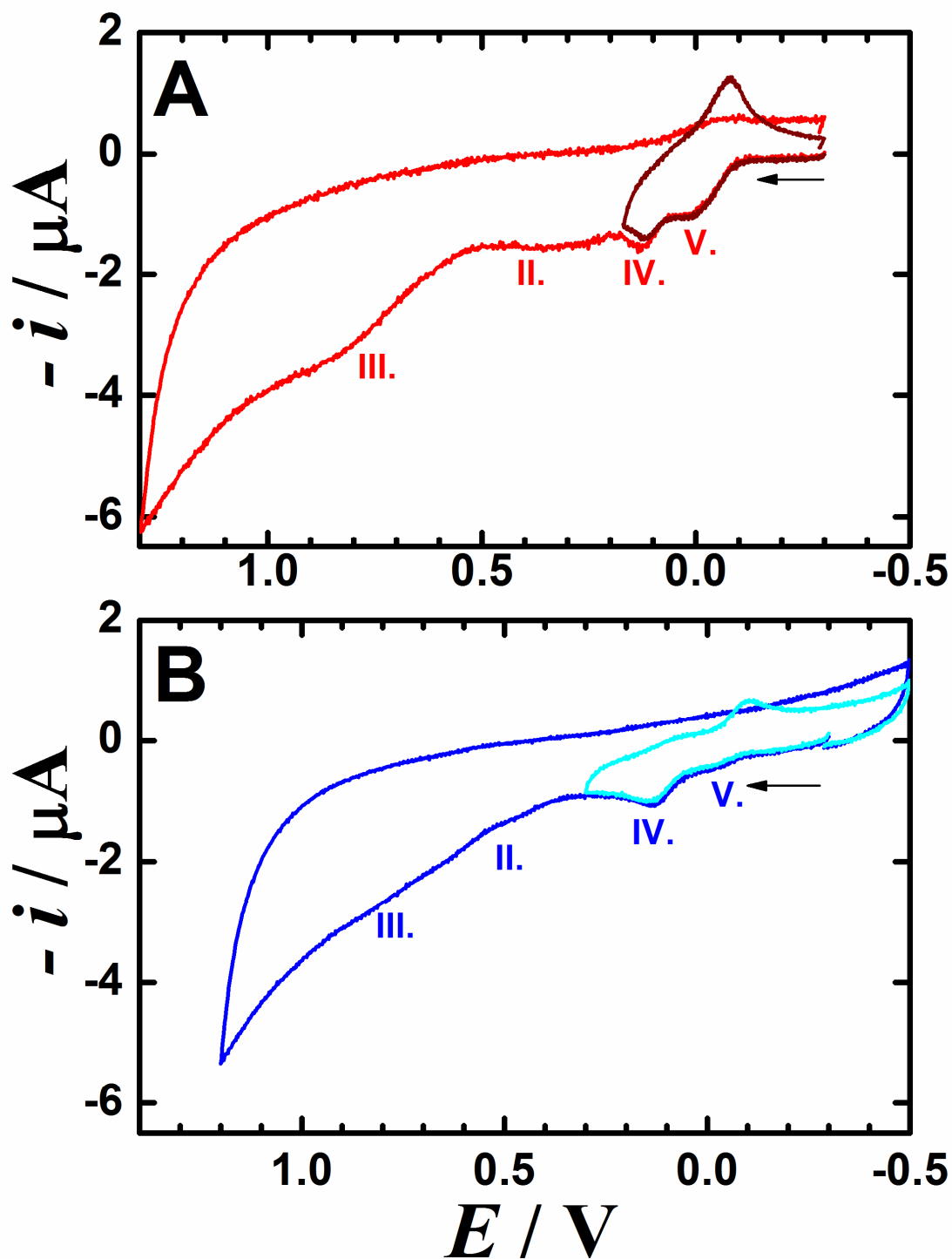


Obr. 56: Distribuční diagram rhamnetinu vypočtený použitím hodnoty $pK_1 = 6,15 \pm 0,4$ [164] (plná čára). Tečkovaná čára znázorňuje odhad přítomnosti disociačních forem AH^- a A^{2-} vypočtených použitím hodnoty $pK_2 = 8,48$ [117].

Při posouzení elektrochemického chování a oxidačního mechanismu nám napomohly již předešlé výsledky oxidační studie fisetinu a rhamnazu. Cyklická voltametrie rhamnetinu v kyselém prostředí, obr. 55-A, vykazuje v rozmezí potenciálů od -0,3 V do 1,3 V tři oxidační vlny. První oxidační vlna (I.) je quazireversibilní a odpovídá hydroxylové skupině C4'-OH na kruhu B odpovídající oxidaci AH_2 , viz obr. 56. Druhá oxidační vlna (II.) souvisí s oxidací produktu vytvořeného při první oxidaci. Třetí oxidační vlna (III.) souvisí s oxidací hydroxylové skupiny na kruhu A, stejně jako v případě předešlých studií. Na obr. 55-B je cyklický voltamogram rhamnetinu při $pH = 9,0$, vykazuje čtyři oxidační vlny. Druhá oxidační vlna (IV.) přísluší oxidaci disociované formy AH^- , která je v roztoku přítomna při slabě zásaditém prostředí. Při potenciálu první oxidační vlny (V.) dochází k oxidaci dianionu A^{2-} , viz obr. 56. Cyklická voltametrie při $pH = 10,7$, viz. obr. 55-C, zobrazuje čtyři oxidační vlny. První vlna (V.) stejně jak v mírně

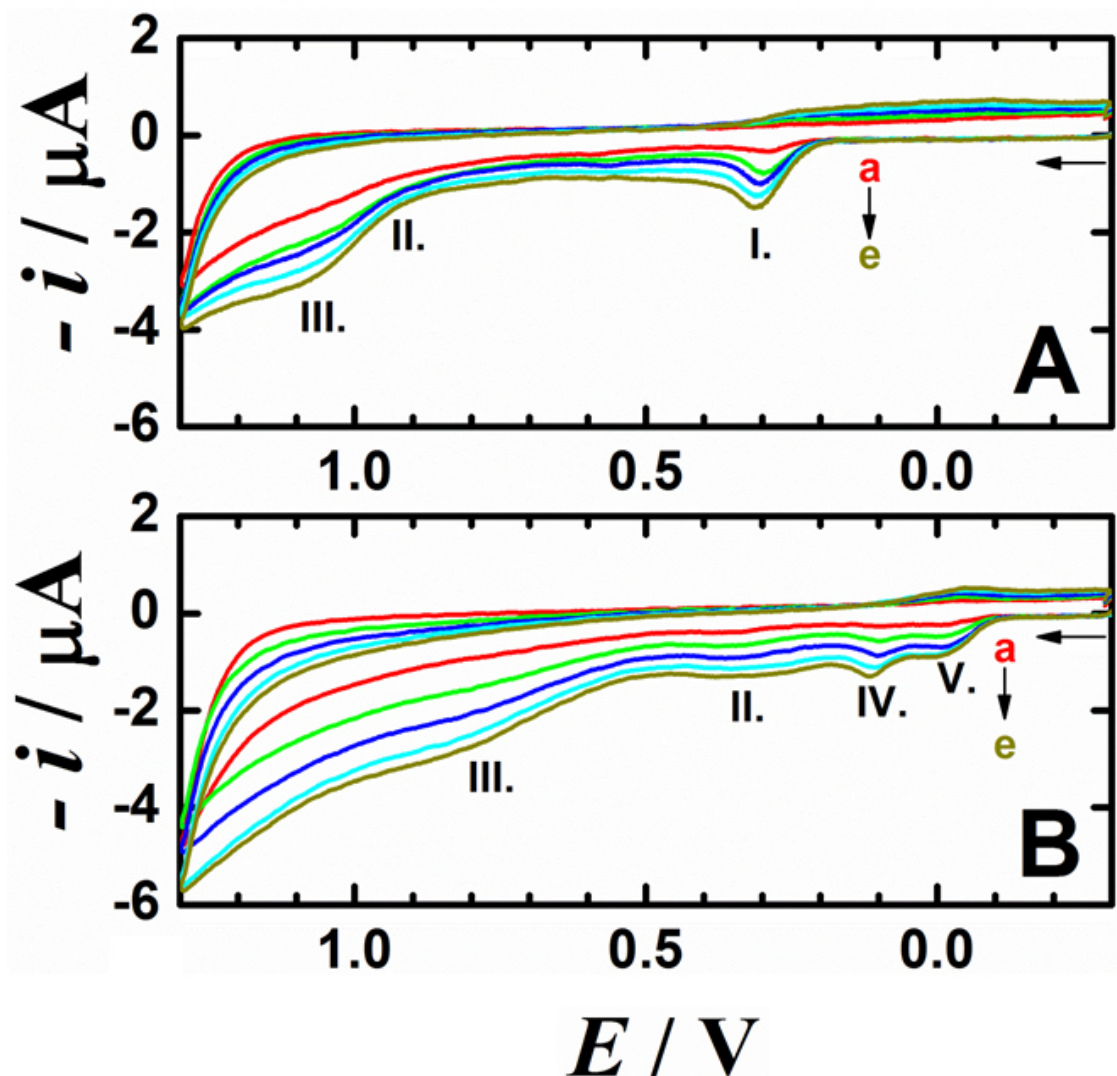
zásaditém pH souvisí s oxidací disociované formy A^{2-} , avšak druhá oxidační vlna (P) odpovídá produktu, který se vytvoří po první oxidační vlně. V tomto zásaditějším pH, není již v dostatečném množství zastoupena forma AH^- , jak je možné vidět na distribučním diagramu na obr. 56.

Na obr. 57 jsou porovnané cyklické voltamogramy studované látky rhamnetinu a quercetinu ve stejném prostředí. V případě rhamnetinu, obr. 57-A, jsou v měřeném rozmezí vidět čtyři oxidační vlny stejně tak jako u quercetinu, obr. 57-B. V cyklických voltamogramech není patrný významný rozdíl.



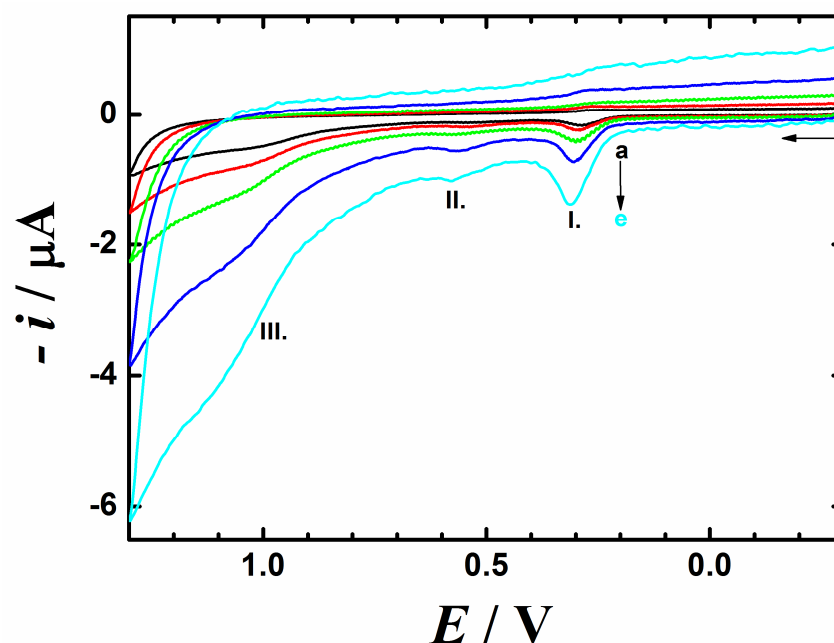
Obr. 57: Cyklický voltamogram $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ A) rhamnetinu, B) quercetinu měřený na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova-Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou $\text{pH} = 9,0$. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Koncentrační závislost anodické odezvy rhamnetinu byla měřena cyklickou voltametří v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufovaném vodném prostředí (obr. 58). S rostoucí koncentrací studované látky dochází u všech vln ke zvýšení měřeného proudu. Závislost výšky píku rhamnetinu na jeho koncentraci je v měřeném rozsahu lineární.

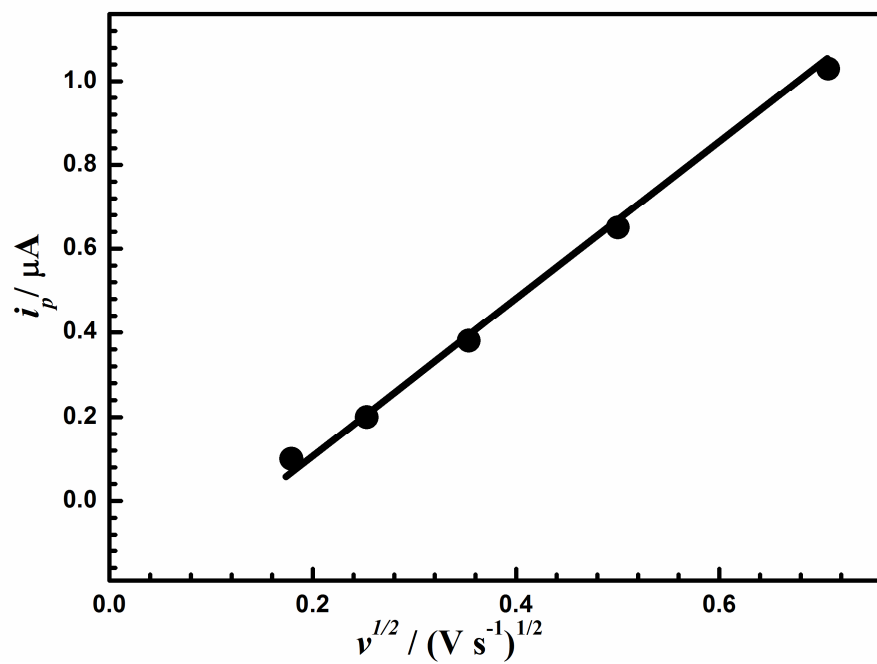


Obr. 58: Výběr cyklických voltamogramů rhamnetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) v rozmezí pH: A) 5,1 s různou hodnotou koncentrace a) $5 \cdot 10^{-5}$; b) $1 \cdot 10^{-4}$; c) $1,5 \cdot 10^{-4}$; d) $2 \cdot 10^{-4}$; e) $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; B) 9,0 s různou hodnotou koncentrace a) $5 \cdot 10^{-5}$; b) $1 \cdot 10^{-4}$; c) $1,5 \cdot 10^{-4}$; d) $2 \cdot 10^{-4}$; e) $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

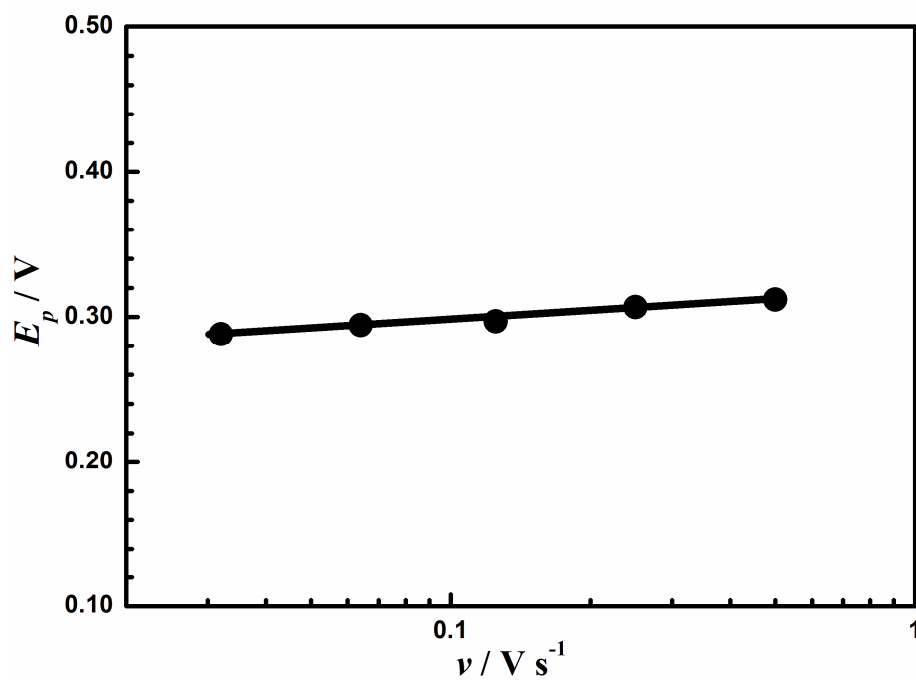
Dalším krokem studie rhamnetinu bylo naměřit cyklické voltamogramy (obr. 59), které byly měřeny při různých rychlostech polarizace (v rozmezí 0,032 až 0,5 V·s⁻¹). S rostoucí rychlostí polarizace narůstá výška oxidační vlny a dále byl také pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti polarizace. Po vynesení anodických proudů oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace byla zjištěna lineární závislost (obr. 60). Lineární závislost odpovídá ději řízenému difúzí. Ze záznamů cyklické voltametrie byl vynesen graf závislosti potenciálu první oxidační vlny na rychlosti polarizace, $\delta E_p / \delta \log v = 20 \text{ mV}$, obr. 61. Výsledek naznačuje typickou hodnotu pro přítomnost bimolekulární reakce, stejně jako u fisetinu, avšak $\delta E_p / \delta \log c = 32 \text{ mV}$ ukazuje na jiný výsledek, zvláště, když bylo zjištěno, že se jedná o dvouelektronový proces (kapitola 5.3.3.). Závislost $\delta E_p / \delta \log v$ pro vyšší hodnoty pH naznačuje, že se jedná o ECE mechanismus, jak je diskutováno dále.



Obr. 59: Výběr cyklických voltamogramů $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 5,1. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5 V·s⁻¹.

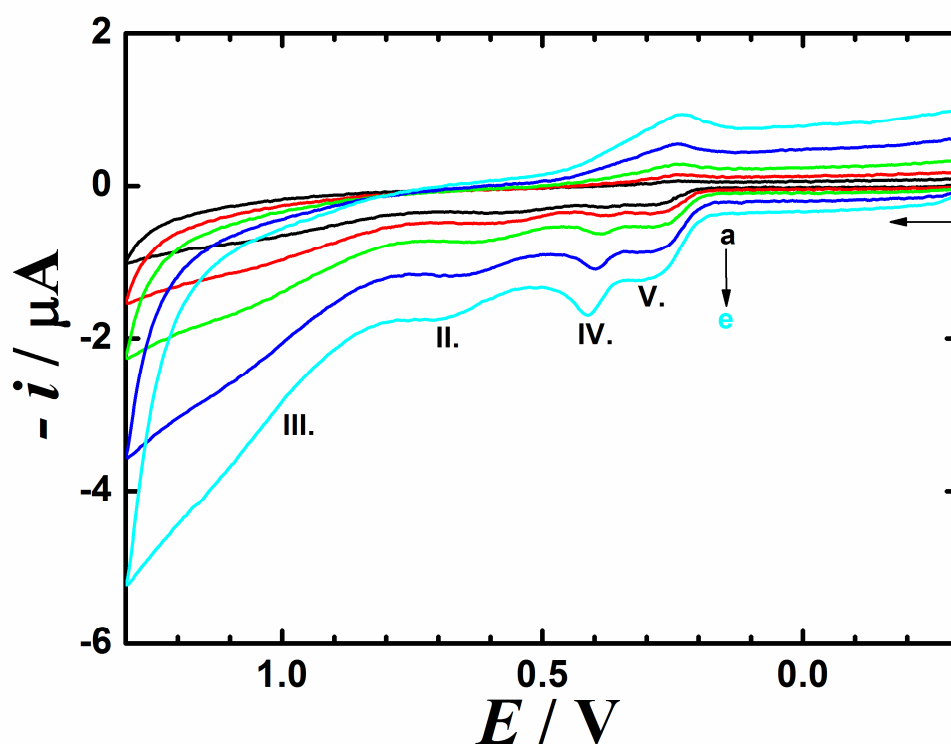


Obr. 60: Závislost výšky oxidačního píku (I_p) na druhé odmocnině rychlosti polarizace odečtená z obr. 59.

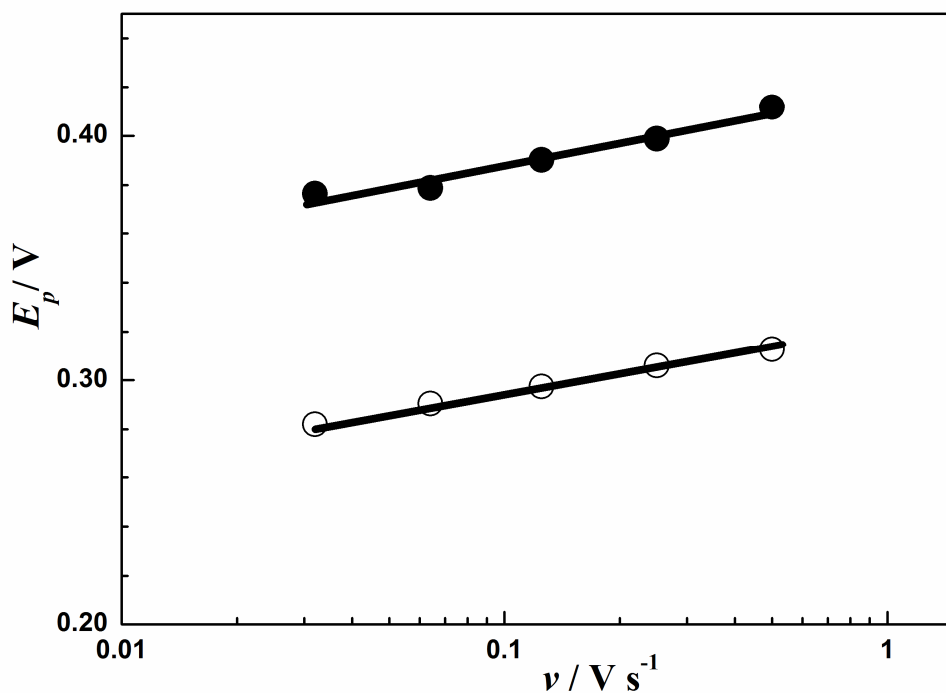


Obr. 61: Závislost potenciálu oxidační vlny (I_p) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 59.

Stejně závislosti rychlosti polarizace (v rozmezí 0,032 až 0,5 V·s⁻¹) byly změřeny také pro hodnotu při pH = 9,0, obr. 62. Stejně jako u měření při pH = 5,1 byla zjištěná vzrůstající výška vlny se vzrůstající rychlostí polarizace a poloha oxidační vlny se také posouvala ke kladnějším hodnotám potenciálu. Po vynesení závislosti anodického proudu první oxidační vlny (V.) byla zjištěna lineární závislost na druhé odmocnině rychlosti polarizace, proces je kontrolován difúzí. Tyto výsledky jsou ve shodě s předešlými. Dále byl vynesena graf závislosti potenciálu oxidační vlny na rychlosti polarizace $\delta E/\delta \log v$, obr. 63 Tato závislost je lineární se směrnicí 26 mV ·dec⁻¹. Dále byla analyzována druhá oxidační vlna (IV.). Závislost anodického proudu oxidační vlny na druhé odmocnině rychlosti polarizace je lineární. Závislost potenciálu oxidační vlny (IV.) na rychlosti polarizace je vynesena na obr. 63. Tato závislost je lineární, $\delta E/\delta \log v = 30$ mV. V obou případech, jak pro oxidaci dianionu A²⁻, tak anion AH⁻, jsou tyto hodnoty blízké teoretické hodnotě 29 mV ·dec⁻¹, která je typická pro ECE-DISP mechanismus.

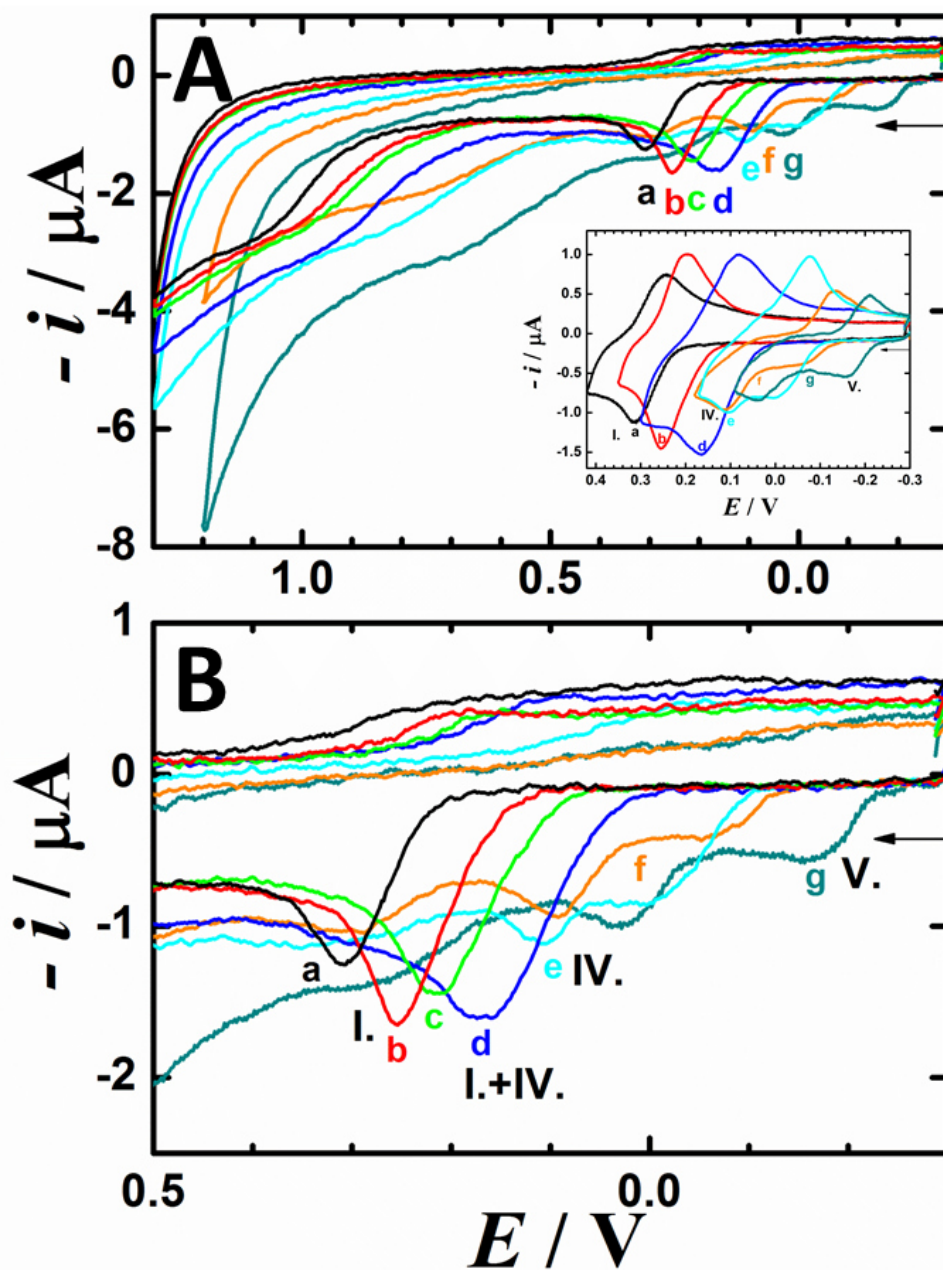


Obr. 62: Výběr cyklických voltamogramů $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ rhamnetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova –Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 9,0. Rychlost polarizace a) 0,032; b) 0,064; c) 0,125; d) 0,25; e) 0,5 V·s⁻¹.



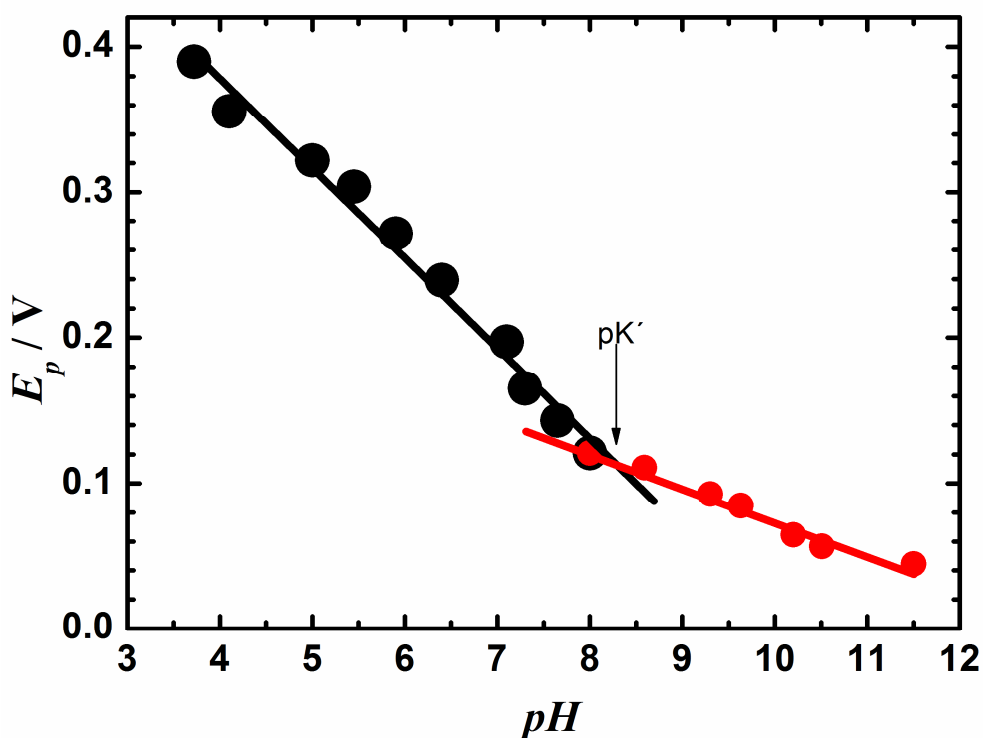
Obr. 63: Závislost potenciálu oxidačního píku IV. (●) a V. (○) na rychlosti polarizace odečtená z obr. 62.

Oxidace rhamnetinu je samozřejmě také závislá na pH, obr. 64. V kyselém prostředí až do $\text{pH} = 7,0$ dominuje oxidační pík formy AH_2 . Při $\text{pH} = 7,0$ se objevuje oxidační pík formy AH^\cdot , která je patrnější až od zásaditějšího pH. Od $\text{pH} \geq 9,0$ se objevuje další oxidační vlna, tentokrát pro formu A^{2-} . Se vzrůstající hodnotou pH dochází k posunu potenciálu všech oxidačních vln směrem k nižšímu potenciálu, obr. 64-B. Z toho je patrné, že na celkovém mechanismu oxidace se podílejí vodíkové ionty. Posun potenciálu je nejlépe patrný na vloženém obr. 64-A.



Obr. 64: A: Výběr cyklických voltamogramů $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH: a) 5,1; b) 6,0; c) 6,8; d) 7,0; e) 9,0; f) 9,8; g) 10,7. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Vložený obrázek ukazuje cyklické voltamogramy při uvedených hodnotách pH, kdy je směr polarizace změněn za první oxidační vlnou. B: Cyklické voltamogramy jako v obr. 64A vyobrazené v rozmezí od -0,3 do 0,5 V.

Závislost potenciálu píku (I. a IV.) rhamnetinu na pH (obr. 65) je tvořena dvěma lineárními závislostmi se směrnicí $62 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ a $24 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$. Směrnice blízké se hodnotě teoretické $59 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ napovídá, že reakce probíhá se stejným počtem protonů a elektronů. Za předpokladu, že v prvním stupni oxidace rhamnetinu se odštěpí $2 e^-$, odpovídá vyšší hodnota směrnice pro kyselé a neutrální prostředí, ztrátě $2 H^+$. Průsečík obou lineárních úseků při pH 8,3 odpovídá zdánlivé disociační konstantě.

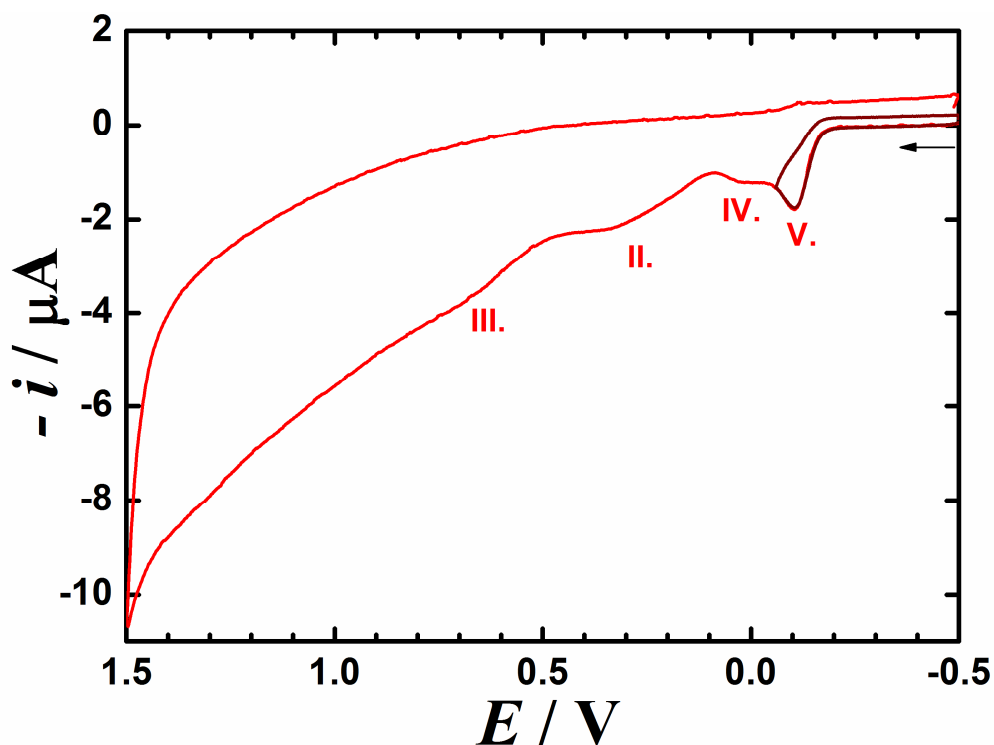


Obr. 65: Závislost potenciálu píku (I. a IV.) na pH pro rhamnetin.

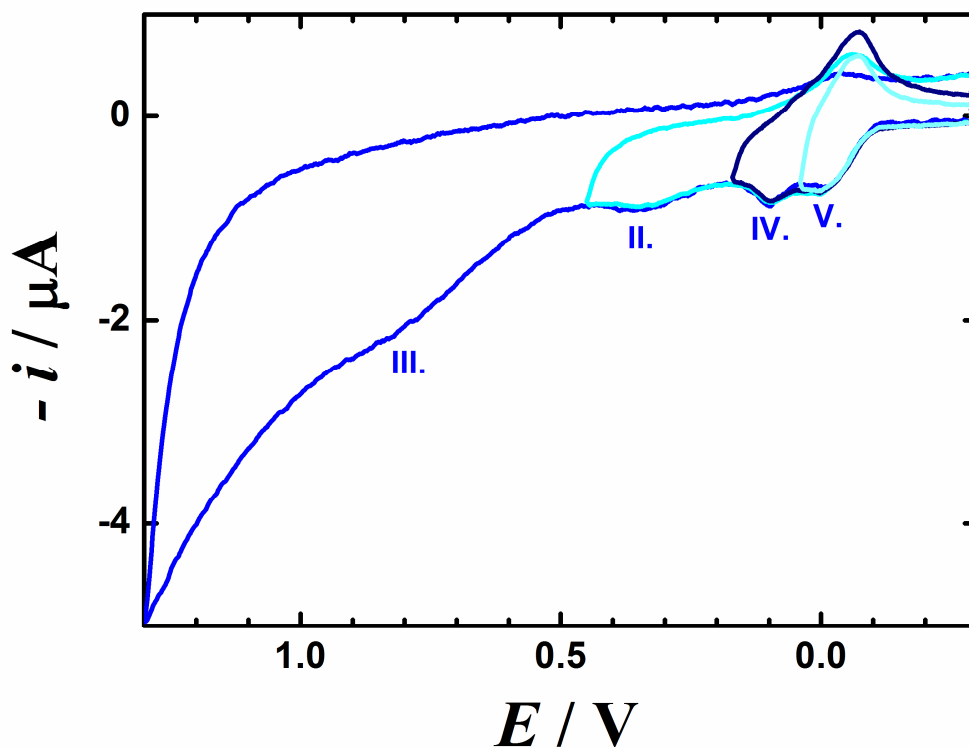
Nepufrované prostředí

Cyklický voltamogram rhamnetinu (obr. 66) v nepufrovaném prostředí vykazuje čtyři oxidační vlny v rozmezí potenciálů od -0,5 V do 1,5 V. První anodická oxidační vlna (V.) je při potenciálu -0,1 V. První oxidační vlna (V.) je ireversibilní. Druhá oxidační vlna (IV.) se objevuje při potenciálu 0,02 V. Třetí oxidační vlna (II.) se objevuje u 0,35 V a čtvrtá oxidační vlna (III.) při

potenciálu 0,66 V. Třetí (II.) a čtvrtá (III.) oxidační vlna jsou ireversibilní. Narozdíl od pufovaného prostředí, obr. 67, produkt tvořící se při potenciálu první oxidační vlny v prostředí nepufovaném podléhá snáze chemické reakci, a proto vlna nevykazuje reversibilitu.

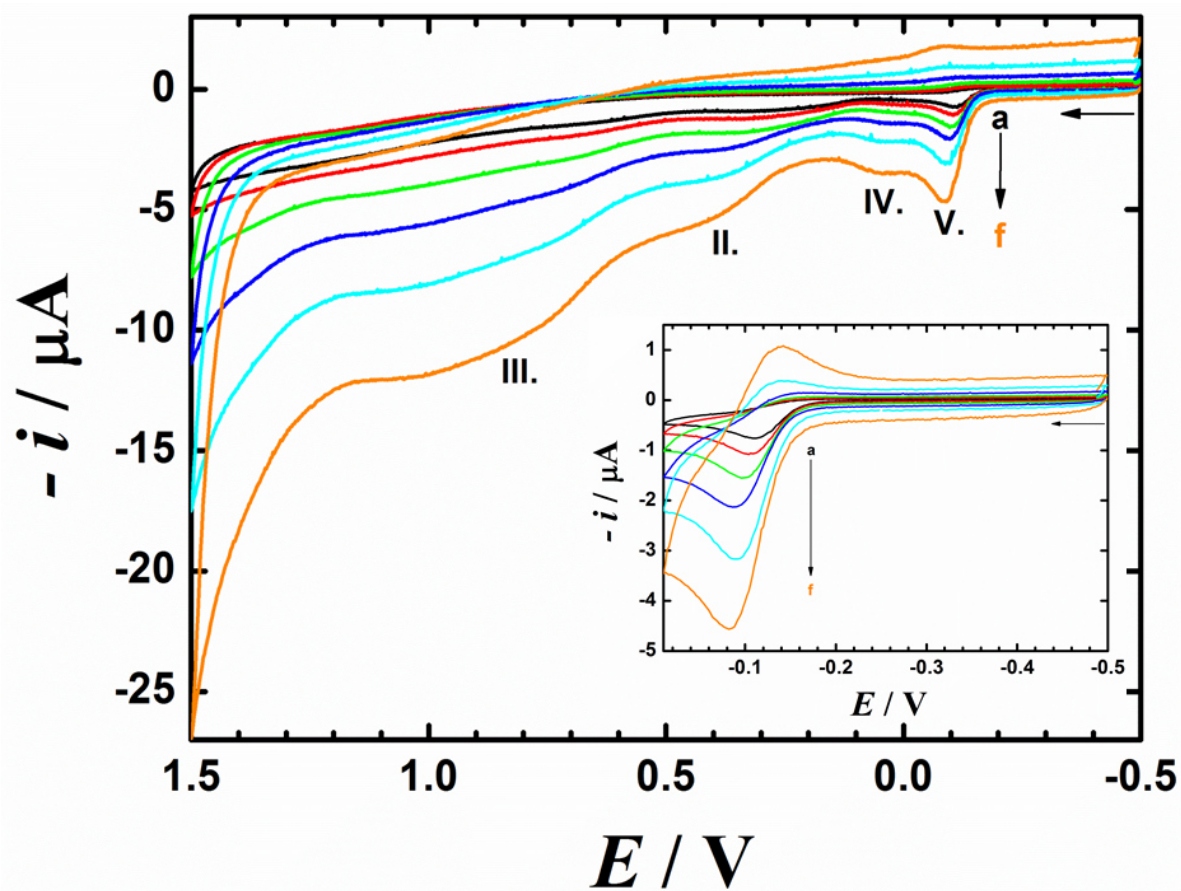


Obr. 66: Cyklický voltamogram $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

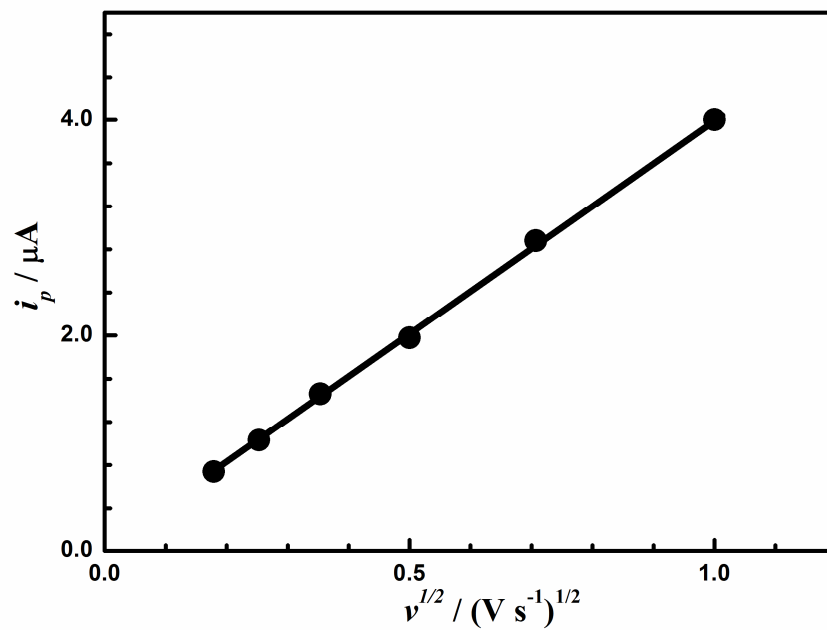


Obr. 67: Cyklický voltamogram $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu naměřený na elektrodě ze skelného uhlíku v roztoku Brittonova–Robinsonova pufru a 40% ethanolu (v/v) s konečnou hodnotou pH 9,0.

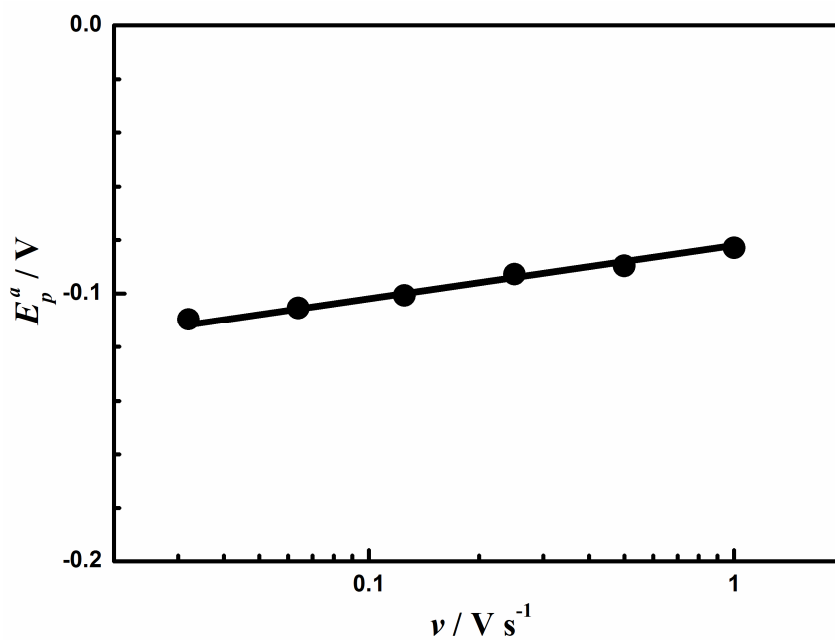
Dále byl studován cyklický voltamogram rhamnetinu (obr. 68) s různou rychlostí polarizace (v rozmezí $0,032$ až $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$). Rhamnetin poskytuje v tomto nepufrovaném roztoku čtyři oxidační vlny v rozsahu potenciálů od $-0,5$ do $1,5 \text{ V}$. Se zvyšující se rychlostí polarizace vzrůstá výška všech oxidačních vln. Z cyklických voltamogramů byly vyneseny závislosti anodického proudu oxidační vlny (V.) na druhé odmocnině polarizace (obr. 69). Tato závislost je lineární, a proto odpovídá reakci řízené difúzí. Dále byl vynesen graf závislosti potenciálu oxidační vlny na rychlosti polarizace $\delta E / \delta \log v$, obr. 70. Tato závislost je lineární se směrnici 18 mV . Dále byla vynesena závislost $\delta E / \delta \log c$ se směrnici 14 mV . Po přenosu jednoho elektronu dojde ke vzniku anion radikálu a je podporována bimolekulární reakce, pravděpodobně vznik dimeru.



Obr. 68: Výběr cyklických voltamogramů $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu naměřených na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. Rychlost polarizace a) $0,032$; b) $0,064$; c) $0,125$; d) $0,25$; e) $0,5$; f) $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.



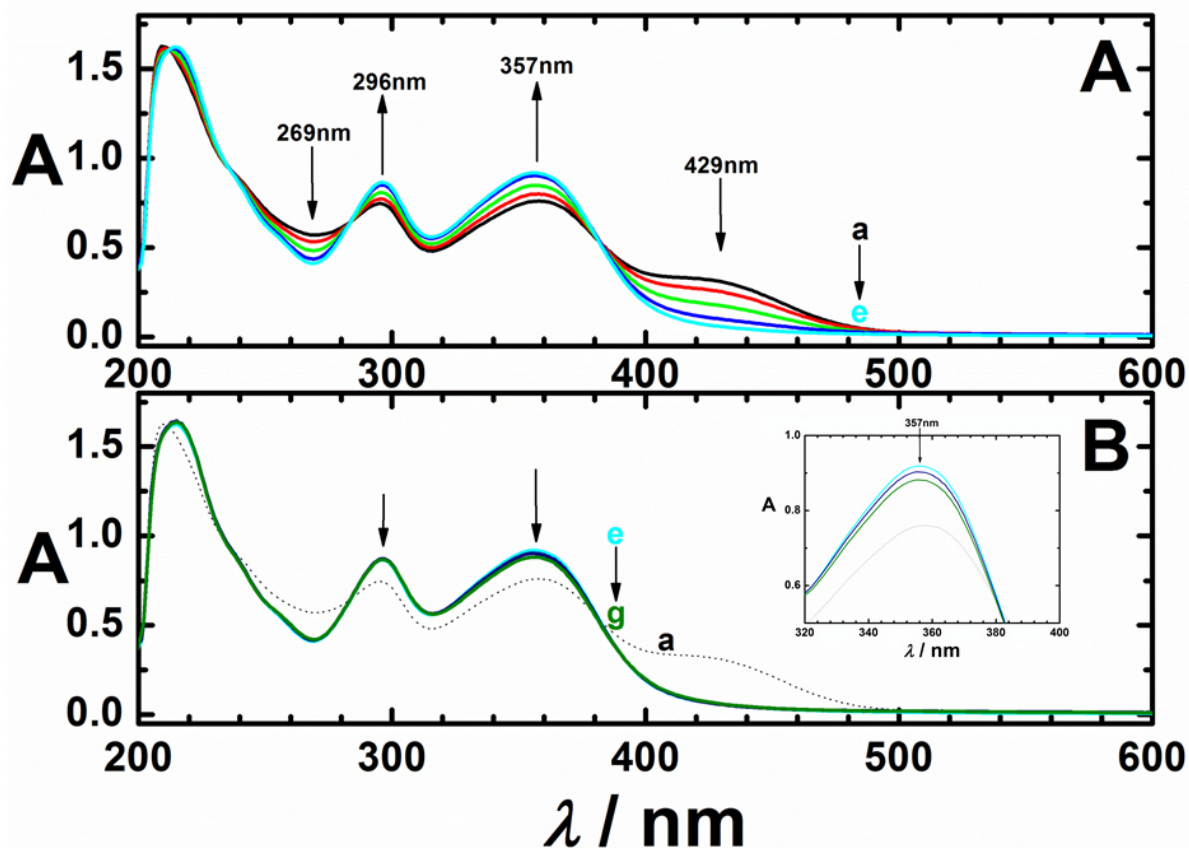
Obr. 69: Závislost výšky oxidačního píku (V.) na druhé odmocnině rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 68.



Obr. 70: Závislost potenciálu oxidačního píku (V.) na rychlosti polarizace vyhodnocená z obr. 68.

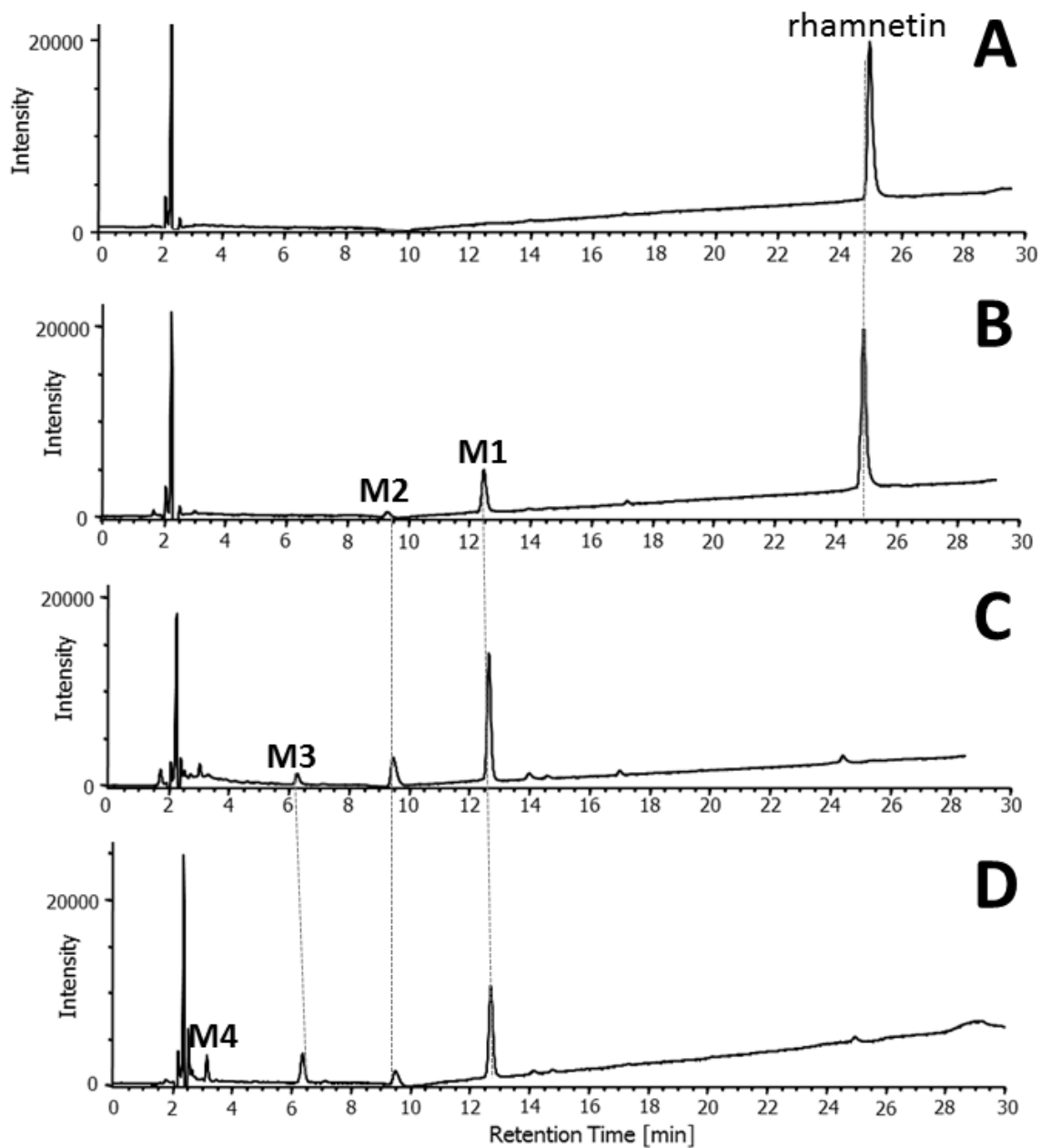
5.3.2. Stabilita rhamnetinu

Chemická stabilita byla studována dvěma způsoby, spektrofotometricky a chromatografickými měřeními. Rhamnetin ve vodném prostředí byl vystaven působení vzdušného kyslíku a bylo zjištěno, že jeho absorpční spektrum se mění již během desítek sekund. Na obr. 71 jsou vyobrazena absorpční spektra rhamnetinu v závislosti na době expozice vzdušným kyslíkem. Křivka a na obr. 71 vyobrazuje absorpční spektrum rhamnetinu naměřené v inertní atmosféře. Křivky b-g na obr. 71 ukazují záznam změny absorpčních spekter po otevření květy zaznamenané v různých časových intervalech. Spektra během interakce se vzdušným kyslíkem vykazují nárůst u 296 nm a 357 nm. Absorpční pás při 429 nm, charakteristický pro výchozí sloučeninu, rychle klesá s mírným bathochromním posunem. Absorpční pás s maximem při 269 nm také klesá. Tyto změny v absorpčních spektrech naznačují vznik oxidačního produktu, který se pak dalším vlivem vzdušného kyslíku rozkládá na další produkty, což naznačuje pokles absorpčních pásů s maximy u 296 nm a 357 nm, viz obr. 71–B. Rhamnetin je nejvíce reaktivní studovanou sloučeninou se vzdušným kyslíkem a je plně degradován po 6 minutách. Tento výsledek klade důraz na důležitost dodržení správného postupu přípravy roztoků těchto látek za inertní atmosféry, kdy také rozpouštědlo je potřeba před použitím vybublat argonem a zajistit jeho přenos za inertních podmínek.



Obr. 71: Absorpční spektra $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH při expozici vzdušného kyslíku: A) s různou dobou expozice a) 0, b) 40, c) 120, d) 240, e) 360 s. B) s různou dobou expozice a) 0, e) 360, f) 600, g) 800 s.

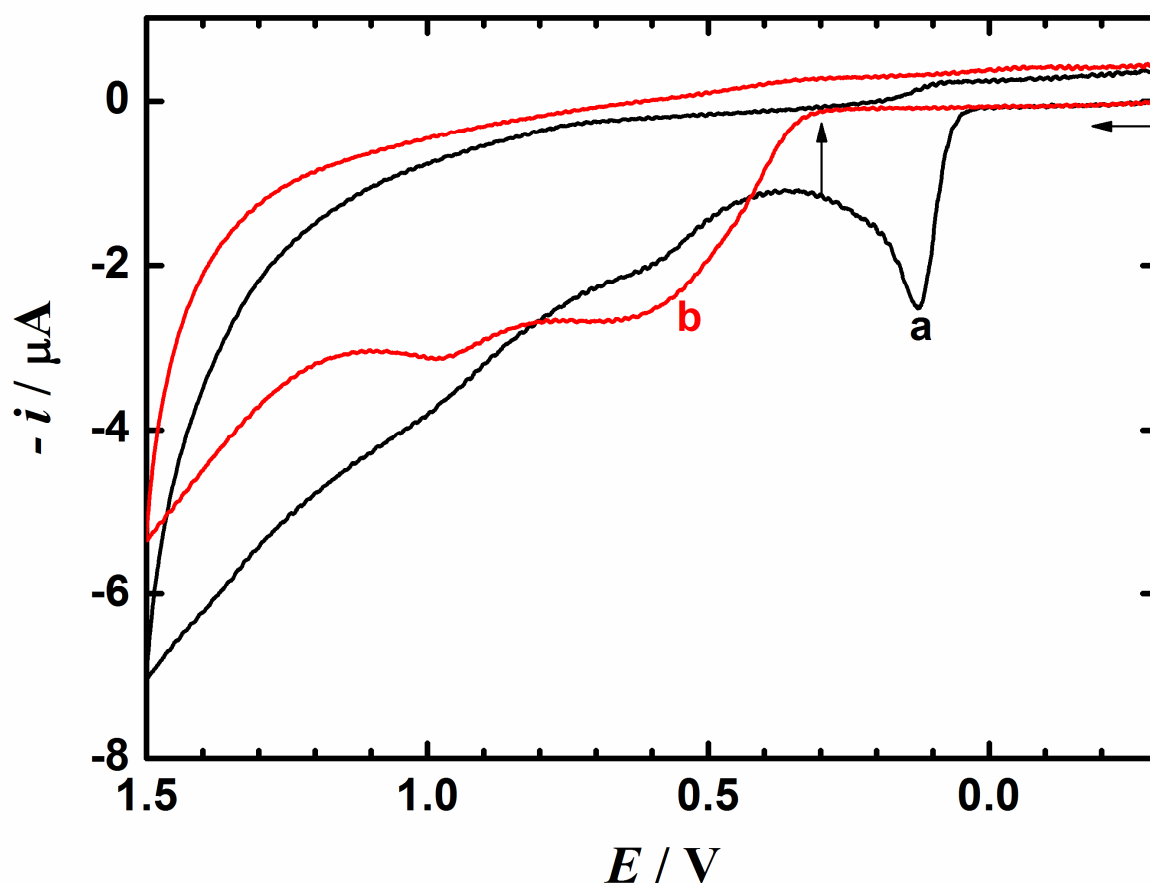
Dalším způsobem sledování chemické stability byla studie chromatografických měření. Na obr. 72 jsou vyobrazeny chromatogramy, které byly měřeny ihned za sebou po otevření vialky. Byl zde pozorován jasný vliv vzdušného kyslíku na stabilitu rhamnetinu. Na obr. 72-A je uvedený chromatogram rhamnetinu, kde je jediný pík, a to v retenčním čase $t_R = 25 \text{ min}$. Pík reprezentuje rhamnetin. Na obr. 72-B je chromatogram po 35 minutách vlivu vzdušného kyslíku. Pík rhamnetinu se zmenšuje a je vidět vznik dalších píků, konkrétně produktů 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2H)-onu, M1, a 2,6-dihydroxy-4-metoxyfenyl(oxo)octové kyseliny, M2. Po dalších 35 minutách, obr. 72-C, se na chromatogramu objevuje další produkt, M3, a po dalších 35 minutách se snižuje oxidační produkt M1 a vzniká další pík produktu M4, 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny.



Obr. 72: Kapalinový chromatogram rhamnetinu A) před vlivem vzdušného kyslíku, B) po 35 min, C) po 70 min, D) po 105 min vlivu vzdušného kyslíku. Průtok nastaven na $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřicí podmínky číslo 2.

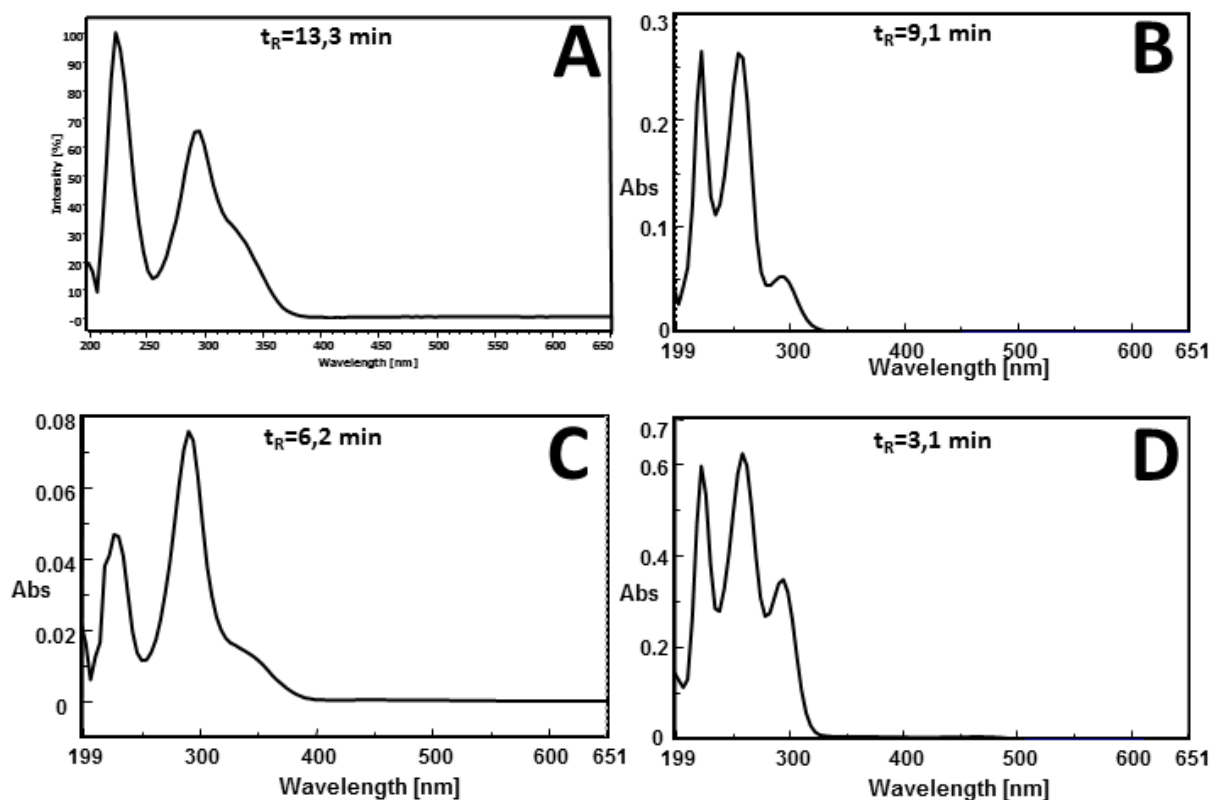
5.3.3. Elektrolýza

Roztok rhamnetinu ve směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH byl elektrolyzován u potenciálu $0,3 \text{ V}$. Cyklický voltamogram měřený před elektrolyzou vykazoval jednu dominantní oxidační vlnu, která se během elektrolyzy vytratila. Na cyklickém voltamogramu po elektrolyze byla registrována nová oxidační vlna u potenciálu $0,65 \text{ V}$, viz obr. 73, křivka b. Tato oxidační vlna souvisí se vzniklým oxidačním produktem, který byl vytvořen během elektrolyzy. Elektrolyzovaný náboj spotřebovaný během elektrolyzy odpovídá spotřebě dvou elektronů.



Obr.73: Cyklický voltamogram $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ rhamnetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH a) před elektrolyzou, b) po elektrolyze. Elektrolyzováno u potenciálu $0,3 \text{ V}$. Rychlost polarizace $0,25 \text{ V}$.

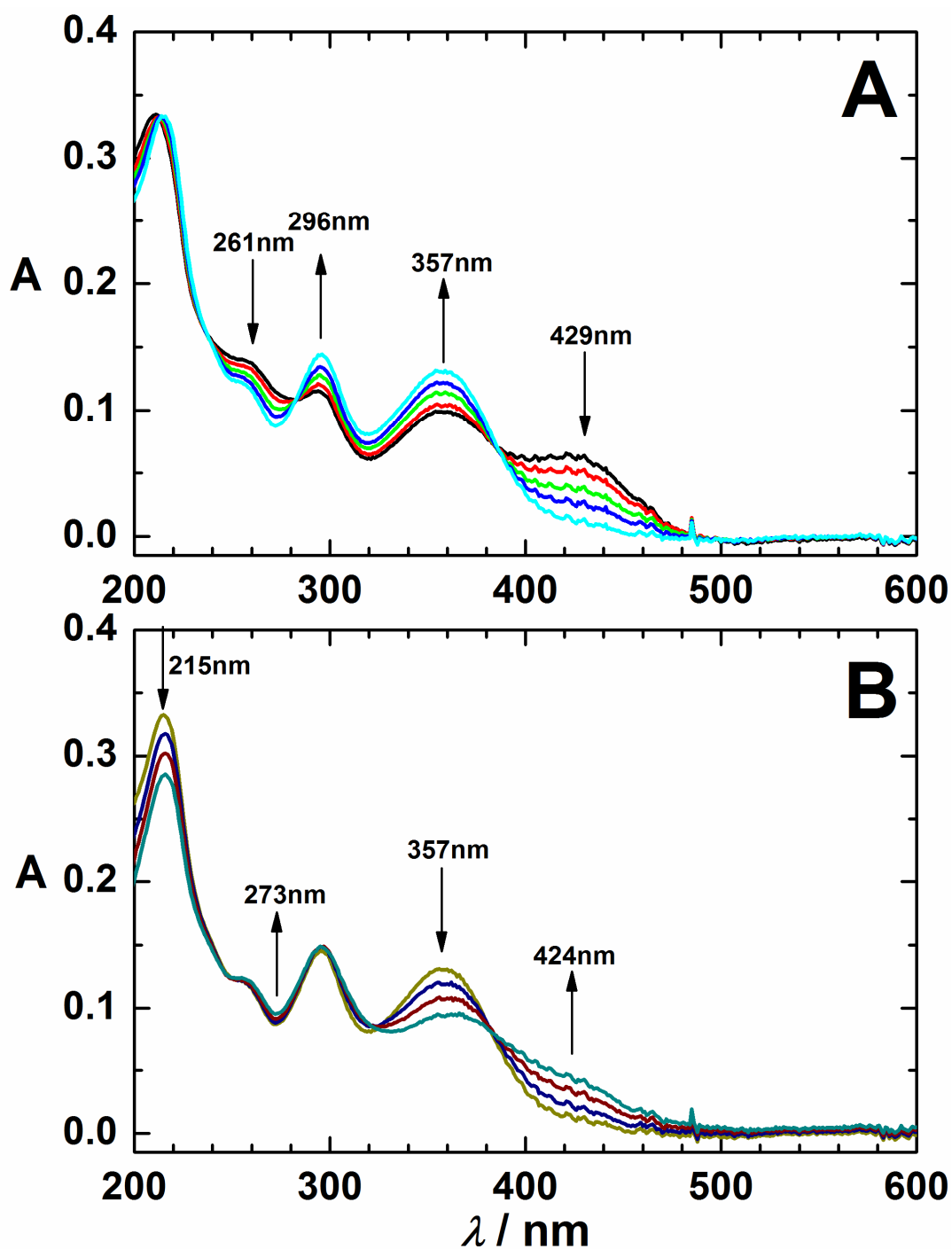
Na obr. 74 jsou absorpční spektra produktů rhamnetinu analyzovaná v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Obr. 74-A zobrazuje absorpční spektrum produktu v retenčním čase 13,3 min. Produkt 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2*H*)-on, M1, má absorpční maxima při 223 nm a 292 nm. Tento oxidační produkt je nestabilní a podléhá degradaci na další oxidační produkty, jako je: (2,6-dihydroxy-4-metoxyfenyl)(oxo)octová kyselina, M2, s absorpčními maximy při 223 nm, 255 nm a 295 nm, obr. 74-B. Oxidační produkt na obr. 74-C je neznámý produkt (M3) s absorpčními maximy při 227 nm a 291 nm. Poslední oxidační produkt v retenčním čase 3,1 min je produkt 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (M4) s absorpčními maximy při 223 nm, 259 nm a 295 nm.



Obr. 74: Absorpční spektra produktů A) M1, B) M2, C) M3 a D) M4 registrovaná v čase uvedeném v obrázku. Spektra jsou zobrazena po odečtení pozadí kolony.

5.3.4. UV/Vis spektroelektrochemie rhamnetinu

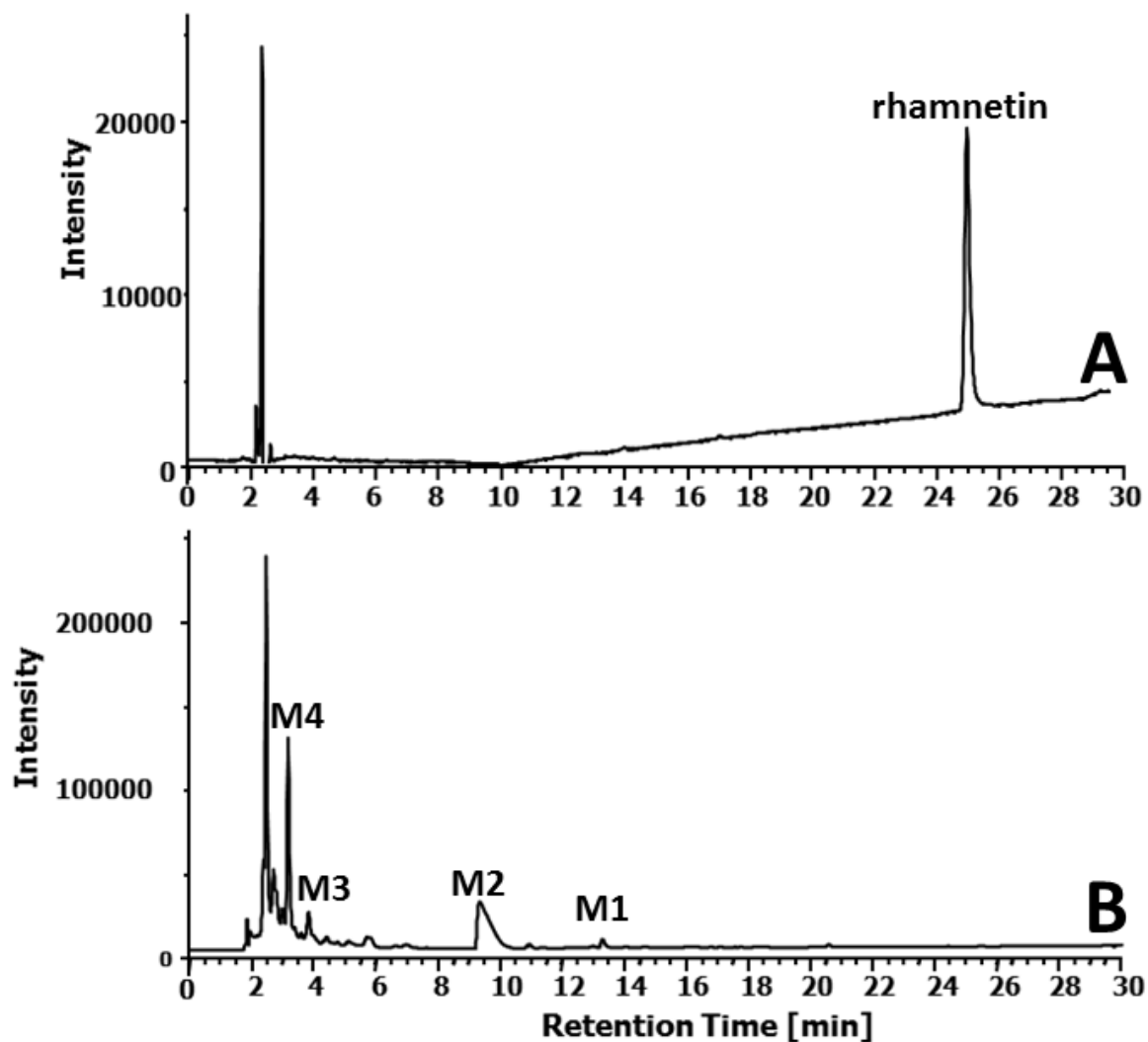
V průběhu elektrolýzy v OTTLE cele byla získávána absorpční spektra. Spektra získaná v průběhu elektrolýzy, byla naměřena při potenciálu za první oxidační vlnou (obr. 75-A) a za druhou oxidační vlnou (obr. 75-B) v roztoku směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl s $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH. Absorpční spektra první oxidační vlny vykazují pokles absorpčního maxima u 261 nm a 429 nm a zvýšení absorpčního pásu u 296 nm a 357 nm. Pokles absorpčního pásu při 429 nm je spojen se změnou 3',4'-dihydroxyfenyl skupiny [17]. Je patrné, že dochází k oxidaci hydroxylové skupiny v poloze 4'. Tyto změny jsou v souladu se vznikem oxidačního produktu, Jak je prokázáno později, jedná se o derivát 2-[(3,4-dihydroxyfenyl)karbonyl]-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2*H*)-onu. Tento produkt je oxidován při potenciálu druhé oxidační vlny. Dochází ke snížení absorpčního maxima u 215 nm a 357 nm a zvýšení absorpčního maxima u 273 nm a 424 nm.



Obr. 75: *In situ* spektroelektrochemie $6,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rhamnetinu v roztoku směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH. A) při potenciálu za první oxidační vlnou, B) při potenciálu za druhou oxidační vlnou.

5.3.5. Chromatografická měření rhamnetinu

Pro zjištění konečných oxidačních produktů po úplné a částečné elektrolýze při konstantním proudu roztoku rhamnetinu ve směsi $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl s $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KOH byly analyzovány roztoky chromatografickými metodami. Na obr. 76-A je vyobrazen chromatogram rhamnetinu naměřený před začátkem elektrolýzy. V retenčním čase $t_R = 25 \text{ min}$ je pík rhamnetinu. Na obr. 76-B je chromatogram naměřený po úplné elektrolýze rhamnetinu. V retenčním čase 13,3 min se objevuje oxidační produkt 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2*H*)-on, M1. Tento a další produkty byly charakterizovány spektry z hybridního hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým a průletovým hmotnostním analyzátozem s ionizací elektrosprejem (ESI-Q-TOF). Hlavní hodnoty m/z pro produkt M1 jsou 331,05; 221,02 a 153,02. Tento produkt, jak již bylo v předešlých kapitolách psáno, je nestabilní a dále se rozkládá na (2,6-dihydroxy-4-metoxyfenyl)(oxo)octovou kyselinu, M2, s hodnotami m/z : 183,04; 165,03 a 139,05. Další rozkladný oxidační produkt je M3, který se nám nepodařilo identifikovat. Oxidační produkt 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, M4, má m/z hodnotu 153,03. Všechny zmíněné oxidační produkty rhamnetinu jsou v roztoku přítomné jak díky vlivu kyslíku, tak díky elektrolýze.



Obr. 76: Kapalinový chromatogram rhamnetinu A) před elektrolýzou, B) po elektrolýze při potenciálu 0,3 V. Průtok: 0,2 ml·min⁻¹, optický detektor nastaven na 280 nm. Měřící podmínky číslo 2.

5.3.6. Mechanismus oxidace rhamnetinu

Na základě předešlých výsledků jsme navrhli oxidační mechanismus rhamnetinu takto: v prvním kroce se rhamnetin oxiduje na chinoidní produkt, který následně podléhá chemické reakci a vzniká tak oxidační produkt M1, schéma 12.

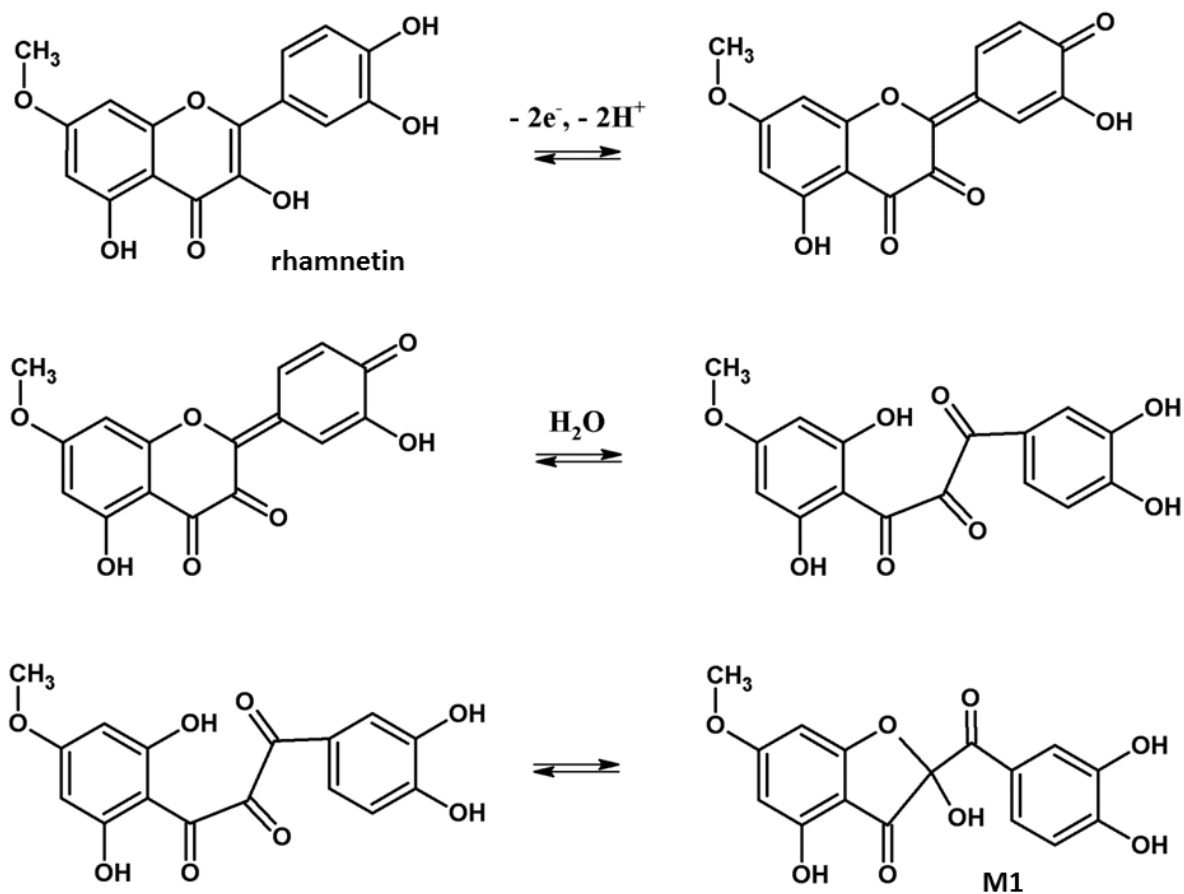


Schéma 12: Oxidační mechanismus přeměny rhamnetinu na chinoidní produkt a následně na produkt M1.

Oxidační mechanismus rhamnetinu však dále pokračuje na rozklad na nízkomolekulární oxidační produkty M2-M4, a to díky nestabilitě oxidačního produktu M1, schéma 13.

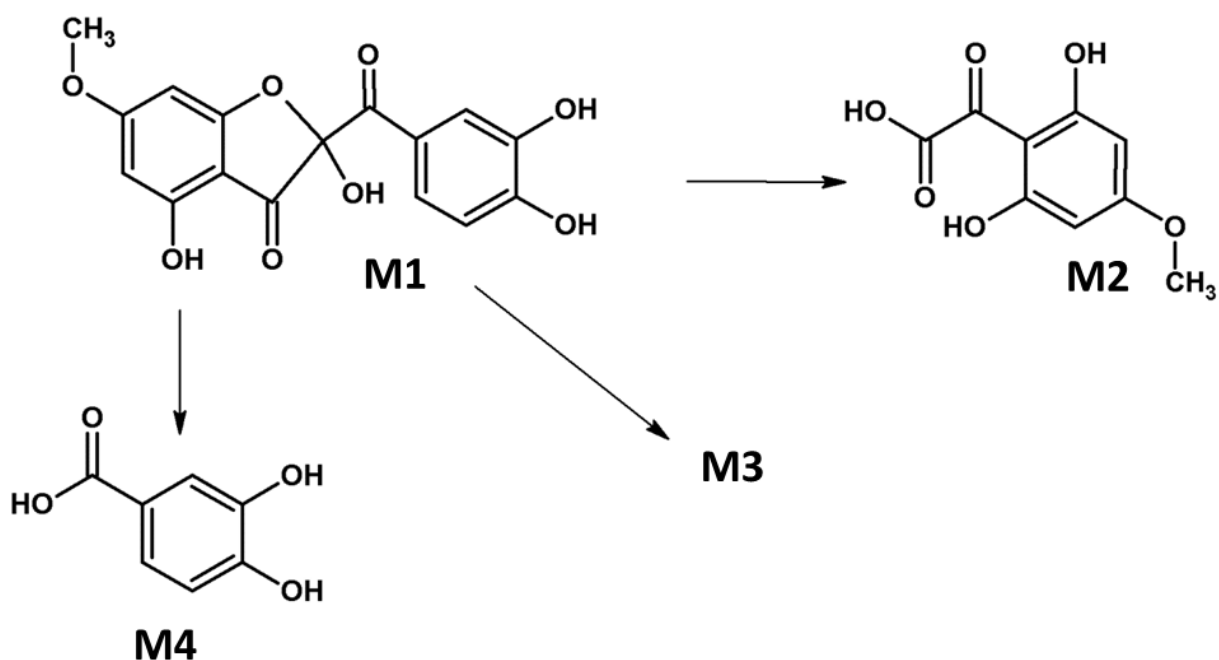


Schéma 13: Rozklad oxidačního produktu M1 na nízkomolekulární produkty oxidace.

Elektrochemická měření ukázala, že v zásaditém nepufrovaném prostředí je po elektronovém přenosu pravděpodobná bimolekulární reakce, vznik dimeru. Nicméně dimer nebyl v analyzovaných vzorcích po elektrolýze prokázán. Je pravděpodobné, že dimer je v přítomnosti kyslíku velmi nestabilní stejně jako v případě quercetinu [139]. Dimer quercetinu byl v literatuře nalezen v nízké koncentraci při dodržení přísně inertní atmosféry až do procesu analýzy.

6. Závěr

Bylo studováno elektrochemické chování chemicky příbuzných látek (rhamnazin, fisetin, rhamnetin). Porovnáním cyklických voltamogramů byla zjištěna reakční část molekuly a počet elektronů účastnících se oxidačního mechanismu. Elektrochemické chování studovaných látek je silně závislé na pH prostředí. Bylo zjištěno, že na celkovém mechanismu oxidace se podílí vodíkové ionty a že elektronový přenos je spojen s disociačními reakcemi v závislosti na pH prostředí. Z voltametrické analýzy rhamnazinu byly zjištěny tři oxidační odezvy. První odezva byla quazireversibilní, zbylé odezvy již ireversibilní. Jediný rhamnazin má stálý počet vln v průběhu změny pH prostředí a jeho oxidace je dvouelektronová. Fisetin má v cyklické voltametii v kyselém prostředí tři oxidační vlny a v neutrálním a zásaditém prostředí čtyři vlny, stejně jako rhamnetin. Poslední dvě jmenované látky v zásaditém prostředí poskytují jedoelektronovou oxidační vlnu, která přísluší oxidaci dianionu.

Byly zjištěny hlavní i konečné oxidační produkty studovaných látek. Na základě charakteristik elektrochemických procesů, pomocí výsledků spektroeletrochemie a určení oxidačních produktů chromatografickými metodami, byl navržen oxidační mechanismus. Prvotně vzniklý chinon podléhá chemickým reakcím, a proto hlavním oxidačním produktem rhamnazinu byl určen 2,4-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-6-methoxy-benzofuran-3(2H)-on (R1). Tento hlavní oxidační produkt podléhá další oxidaci a rozkládá se na nízkomolekulární konečné produkty oxidace rhamnazinu, a to jsou: 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina (R2), (4-hydroxy-3-methoxyfenyl) (oxo)octová kyselina (R3), 2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoová kyselina (R4) a neznámý produkt R5. Oxidačními produkty fisetinu byly určeny 2-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4-hydroxybenzaldehyd (F1) a 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,6-dihydroxy-1-benzofuran-3(2H)-on (F2). Tyto oxidační produkty se dále rozkládají na konečné produkty oxidace: (2,4-dihydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina, (F3), 2,4- dihydroxybenzoová kyselina (F4), 3,4-dihydroxyfenyl(oxo)octová kyselina (F5), 3,4- dihydroxybenzoová kyselina (F6), (2E)-7-hydroxy-2-(3'-hydroxy-4'-oxocyklohexa-2',5'-dien-1'-yliden)-2H-chromen-3,4-dion (F7), (4-hydroxyfenyl)(oxo)octová kyselina (F8) a 4-hydroxybenzaldehyd (F9). Pro rhamnetin byl určen jako hlavní oxidační produkt 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4-dihydroxy-6-metoxy-1-benzofuran-3(2H)-on (M1). Konečné produkty oxidačního mechanismu rhamnetinu byly určeny

tyto: 2,6-dihydroxy-4-metoxyfenyl)(oxo)octové kyseliny (M2), neznámý produkt (M3) a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (M4). Některé z uvedených produktů byly nalezeny v historických předmětech [70,73] a dokonce také v organických vzorcích jako produkty metabolismu flavonoidů [167].

Významným výsledkem bylo zjištění výrazné nestability látek a jejich produktů oxidace v roztocích za přirozených podmínek. V případě rhamanzinu byl zjištěn nejmenší vliv přítomnosti kyslíku, i když stále významný. Rhamnazin je plně degradován po hodině. Oproti tomu fisetin je po 13 minutách plně rozložen a rhamnetin je nejreaktivnější, ten je plně degradován po 6 minutách za mírně alkalických podmínek. Tento jev je zásadní při výzkumu farmaceutických a fyzikálních vlastností flavonoidů. Nesprávný postup přípravy roztoků ztěžuje například jejich analytické stanovení v reálných vzorcích.

Část výsledků uvedených v této dizertační práci byla publikována, další část je připravována do tisku. Výsledky byly prezentovány na sedmi mezinárodních konferencích.

7. Literatura

- 1 Cristea, D.; Vilarem, G. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. *Dyes and Pigments* **2006**, 70, 238-245.
- 2 Colombini, M. P.; Andreotti, A.; Baraldi, C.; Degano, I.; Lucejko, J. J. Colour fading in textiles: A model study on the decomposition of natural dyes. *Microchemical Journal* **2007**, 85, 174-182.
- 3 Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* **1999**, 65, 337-353.
- 4 Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 79, 727-747.
- 5 De Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1112, 31-63.
- 6 Timberlake, C. F.; Henry, B. S. Plant pigments as natural food colors. *Endeavour* **1986**, 10, 31-36.
- 7 Carey, C. C.; Strahle, J. T.; Selinger, D. A.; Chandler, V. L. Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the Zea mays anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar TRANSPARENT TESTA GLABRA1 gene in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **2004**, 16, 450-464.
- 8 Stapleton, A. E.; Walbot, V. Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiology* **1994**, 105, 881-889.
- 9 Fiscus, E. L.; Booker, F. L. Growth of Arabidopsis flavonoid mutant is challenged by radiation longer than the UV-B band. *Environmental and Experimental Botany* **2002**, 48, 213-224.
- 10 Breiter, T.; Laue, Ch.; Kressel, G.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chemistry* **2011**, 128, 338-347.
- 11 Manir, M. M.; Kim, J. K.; Lee, B.-G.; Moon, S.-S. Tea catechins and flavonoids from the leaves of Camellia sinensis inhibit yeast alcohol dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 2376-2381.

- 12 Andarwulan, N.; Batari, R.; Sandrasari, D. A.; Bolling, B.; Wijaya, H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry* **2010**, 121, 1231-1235.
- 13 González-Barrio, R.; Trindade, L. M.; Manzanares, P.; De Graaff, L. H.; Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. Production of Bioavailable Flavonoid Glucosides in Fruit Juices and Green Tea by Use of Fungal r-L-Rhamnosidases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2004**, 52, 6136-6142.
- 14 Singh, A. P.; Wilson, T.; Kalk, A. J.; Cheong, J.; Vorsa, N. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. *Food Chemistry* **2009**, 116, 963-968.
- 15 Volf, K.; Andrs, F. Flavonoidy a jejich biologické působení, s.n.: Praha, **2011**.
- 16 Hollman, P.; Arts, I. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, 1081-1093.
- 17 Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **1996**, 20, 933-956.
- 18 Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* **1976**, 24, 117-119.
- 19 Simó, C.; Barbas, C.; Cifuentes, A. Chiral electromigration methods in food analysis. *Electrophoresis* **2003**, 24, 2431-2441.
- 20 Timbola, A. K.; De Souza, C. D.; Giacomelli, C.; Spinelli, A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, 17, 139-148.
- 21 Kandaswami, C.; Perkins, E.; Soloniuk, D. S.; Drzewiecki, G. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Letters* **1991**, 56, 147-152.
- 22 Matsuda, H.; Morikawa, T.; Ando, S.; Togucida, I.; Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, 1995-2000.
- 23 Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, 1242-1246.

- 24 Goldberg, D. M.; Yan, J.; Soleas, G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry* **2003**, 36, 79-87.
- 25 Narayana, K. R.; Reddy, M. S.; Chaluvadi, M. R.; Krishna, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* **2001**, 33, 2-16.
- 26 Nijveldt, R. J.; Van Nood, E.; Van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; Van Nooren, K.; Van Leeuwen, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2001**, 74, 418-425.
- 27 Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **2001**, 126, 485-493.
- 28 Hendrickson, H. P.; Sahafayen, M.; Bell, M. A.; Kaufman, A. D.; Hadwiger, M. E.; Lunte, C. E. Relationship of flavonoid oxidation potential and effect on rat hepatic-microsomal metabolism of benzene and phenol. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **1994**, 12, 335-341.
- 29 Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40, 2379-2383.
- 30 Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1998**, 799, 101-110.
- 31 Price, S. F.; Breen, P. J.; Valladao, M.; Watson, B. T. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot-Noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, 187-194.
- 32 Crozier, A.; Lean, M. E. J.; McDonald, M. S.; Black, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 590-595.
- 33 Sartelet, H.; Serghat, S.; Lobstein, A.; Ingenbleek, Y.; Anton, R.; Petitfrere, E.; AguiéAguié, G.; Martiny, L.; Haye, B. Flavonoids extracted from Fonio millet (*Digitaria exilis*) reveal potent antithyroid properties. *Nutrition* **1996**, 12, 100-106.

- 34 Mazufr, W. Phytoestrogen content in food. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**, 12, 729-742.
- 35 Adlercreutz, H. Phytoestrogens. State of the art. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1999**, 7, 201-207.
- 36 Orhan, I.; Ozcelik, B.; Kartal, M.; Aslan, S.; Sener, B.; Ozguven, M. Quantification of daidzein, genistein and fatty acids in soybeans and soy sprouts, and some bioactivity studies. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **2007**, 49, 61-68.
- 37 Coward, L.; Barnes, N. C.; Setchell, K. D. R.; Barnes, S. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates-antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, 1961-1967.
- 38 Coward, L.; Smith, M.; Kirk, M.; Barnes, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition* **1998**, 8, 1486S-1491S.
- 39 Mouly, P. P.; Arzouyan, C. R.; Gaydou, E. M.; Estienne, J. M. Differentiation of Citrus Juices by Factorial Discriminant-Analysis Using Liquid-Chromatography of Flavanone Glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, 70-79.
- 40 Tomas-Barberan, F. A.; Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, 1073-1080.
- 41 Peterson, J. J.; Beecher, G. R.; Bhagwat, S. A.; Dwyer, J. T.; Gebhardt, S. E.; Haytowitz, D. B.; Holden, J. M. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, 19, S74-S80.
- 42 Arts, I. C. W.; van de Putte, B.; Hollman, P. C. H. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 1752-1757.
- 43 Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 80,1094-1117.

- 44 Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* **2006**, 97, 679-688.
- 45 Pannala, A. S.; Chan, T. S.; Brien, P. J. O.; Rice-Evans, C. A. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 282, 1161-1168.
- 46 Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M.: Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods of Enzymology* **1990**, 186, 343-355.
- 47 Hofenk de Graaff, J. H. The Colourful Past, Origins Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs, Abegg-Stiftung/Archetype Publications Ltd.: London/Riggisberg, **2004**.
- 48 Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Colombini, M. P.; Ribechini, E.: Characterization of natural indigo and shell-fish purple by mass spectrometric techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18, 1213-1220.
- 49 Cooksey, C. J. Tyrian purple: 6,6'-dibromoindigo and related compounds. *Molecules* **2001**, 6, 736-769.
- 50 Onal, A.; Sari, A.; Soylak, M. Ellagic acid from gallnut (*Quercus infectoria*): Extraction and determination of its dyeing conditions for natural fibres. *Journal of Scientific & Industrial Research* **2005**, 64, 491-495.
- 51 Kok, A. A short history of the orchil dyes. *The lichenologist* **1966**, 248-272.
- 52 Clementi, C.; Miliani, C.; Romani, A.; Favaro, G. In situ fluorimetry: A powerful non-invasive diagnostic technique for natural dyes used in artefacts. Part I. Spectral characterization of orcein in solution, on silk and wool laboratory-standards and a fragment of Renaissance tapestry. *Spectrochimica Acta part A* **2006**, 64, 906-912.
- 53 Carmona, M.; Sanchez, A. M.; Ferreres, F.; Zalacain, A.; Tomas-Barberan, F.; Alonso, G. L. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food chemistry* **2007**, 100, 445-450.
- 54 Hiserodt, R.; Hartman, T. G.; Ho, C.-T.; Rosen, R. T. Characterisation of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1996**, 740, 51-63.

- 55 Choo, C. K. K.; Lee, Y. E. Analysis of dyeings produced by traditional Korean methods using colorants from plant extracts. *Coloration Technology* **2002**, 118, 35-45.
- 56 Jayaprakasha, G. K.; Mohan Rao, L. J.; Sakariah, K. K. Improved HPLC method for the determination of Curcumin, Demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 3668-3672.
- 57 Peggie, D. A.; Hulme, A. N.; McNab, H.; Quye, A. Towards the identification of characteristic minor components from textile dyes with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyes with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). *Microchimica Acta* **2008**, 162, 371-380.
- 58 Surowiec, I.; Nowik, W.; Trojanowicz, M. Identification of „insoluble” red dyewood by high performance liquid chromatography-photodiode array detection - HPLC-PDA fingerprint. *Journal of Separation Science* **2004**, 27, 209-216.
- 59 Pawlak, K.; Puchalska, M.; Miszczak, A.; Rosloniec, E.; Jarosz, M. Blue natural organic dyestuffs – from textile dyeing to mural painting. Separation and characterization of coloring matters present in eldberry, logwood and indigo. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, 41, 613-622.
- 60 Nowik, W.; Desrosiers, S.; Surowiec, I.; Trojanowicz, M. The analysis of dyestuffs from first- to second-century textile artefacts found in the Martres-de-Veyre (France) excavations. *Archaeometry* **2005**, 47, 835-848.
- 61 Baldia, C. M.; Jakes, K. A. Photographic methods to detect colourants in archaeological textiles. *Journal of Archaeological Science* **2007**, 34, 519-525.
- 62 Clark, R. J. H. Pigment identification by spectroscopic means: an arts/science interface. *Comptes rendus Chimie* **2002**, 5, 7-20.
- 63 van Bommel, M. R.; Vanden Berghe, I.; Wallert, A. M.; Boitelle, R.; Wouters, J.: High-performance liquid chromatography and non-destructive three-dimensional fluorescence analysis of early synthetic dyes. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1157, 260-272.
- 64 Martoglio, P. A.; Bouffard, S. A.; Sommer, A. J.; Katon, J. E.; Jakes, K. A. Unlocking the secrets of the past: The analysis of archaeological textiles and dyes. *Analytical Chemistry* **1990**, 62, 1123A-1128A.

- 65 Andreev, G. N.; Shrader, B.; Schulz, H.; Fuchs, R.; Popov, S.; Handjieva, N. Non-destructive NIR-FT-Raman analyses in practice. Part 1. Analyses of plants and historic textiles. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2001**, 371, 1009-1017.
- 66 Leona, M.; Stenger, J.; Ferloni, E. Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, 37, 981-992.
- 67 Clarke, M. A new technique for the non-destructive identification of organic pigments, dyes and inks *in situ* on early mediaeval manuscripts, 3-D fluorescence reflectance spectroscopy. In *6th International Conference "Non-destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of the Cultural and Environmental Heritage"*, **1999**, 1423-1435.
- 68 Karapanagiotis, I.; Lakka, A.; Valianou, L.; Chryssoulakis, Y. High-performance liquid chromatographic determination of colouring matters in historical garments from the Holy Mountain of Athos.: *Microchimica Acta* **2008**, 160, 477-483.
- 69 Nindi, M. M.; Kgarebe, B. V.; Wolfender, J.-L.; Abegaz, B. M. Electrospray liquid chromatography mass spectrometry of the leaf extract of *Rhamnus prinoides*. *Phytochemical Analysis* **1999**, 10, 69-75.
- 70 Surowiec, I.; Szostek, B.; Trojanowicz, M. HPLC-MS of anthraquinolds, flavonoids, and their degradation products in analysis of natural dyes in archeological objects. *Journal of Separation Science* **2007**, 30, 2070-2079.
- 71 Mantzouris, D.; Karapanagiotis, I.; Valianou, L.; Panayiotou, C. HPLC-DAD-MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399, 3065-3079.
- 72 Surowiec, I.; Quye, A.; Trojanowicz, M. Liquid chromatography determination of natural dyes in extracts from historical Scottish textiles excavated from peat bogs. *Journal of Chromatography A* **2006**, 112, 209-217.
- 73 Zhang, X.; Boytner, R.; Cabrera, J. L.; Laursen, R. Identification of yellow dye types in pre-Columbian Andean textiles *Journal of Analytical Chemistry* **2007**, 79, 1575-1582.
- 74 Puchalska, M.; Polec-Pawlak, K.; Zadrozna, I.; Hryszko, H.; Jarosz, M. Identification of indigoid dyes in natural organic pigments used in historical art objects by high-

- performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39, 1441-1449.
- 75 Zhang, X.; Laursen, R. A. Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 2022-2025.
- 76 Colombini, M. P.; Carmignani, A.; Modugno, F.; Frezzato, F.; Olchini, A.; Brecolaki, H.; Vassilopoulou, V.; Karkanias, P. Integrated analytical techniques for the study of ancient Greek polychromy. *Talanta* **2004**, 63, 839-848.
- 77 Merken, H. M.; Beecher, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 577-599.
- 78 Puchalska, M.; Orlinska, M.; Ackacha, M. A.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38, 1252-1258.
- 79 Biesaga, M.; Pyrzynska, K. Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2009**, 39, 95-107.
- 80 Fabbri, D.; Chiavari, G.; Ling, H. Analysis of anthraquinoid and indigoid dyes used in ancient artistic works by thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2000**, 56, 167-178.
- 81 Fiamegos, Y. C.; Nanos, Ch. G.; Vervoort, J.; Stalikas, C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1041, 11-18.
- 82 Füzfai, Z.; Molnár-Perl, I. Gas chromatographic–mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1149, 88-101.
- 83 Sokolová, R.; Degano, I.; Hromadová, M.; Bulíčková, J.; Gál, M.; Valášek, M. Oxidation pathways of natural dye hematoxylin in aqueous solution. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2010**, 75, 1097-1114.

- 84 Jurinovich, S.; Degano, I.; Mennucci, B. A Strategy for the Study of the Interactions between Metal-Dyes and Proteins with QM/MM Approaches: the Case of Iron-Gall Dye. *The Journal of Physical Chemistry* **2012**, 116, 13344-13352.
- 85 Chokchaisiri, R.; Innok, P.; Suksamrarn, A. Flavonoid glycosides from the aerial parts of *Curcuma comosa*. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5, 361-366.
- 86 Zhao, Y.; Yu, Z.; Fan, R.; Gao, X.; Yu, M.; Li, H.; Wei, H.; Bi, K. Simultaneous Determination of Ten Flavonoids from *Viscum coloratum* Grown on Different Host Species and Different Sources by LC-MS. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2011**, 59, 1322-1328.
- 87 Marzouk, M. S.; El-Toumy, S. A. A.; Merfort, I.; Nawwar, M. A. M. Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochemistry* **1999**, 52, 943-946.
- 88 Guo, Z.; Liu, Z.; Wang, X.; Liu, W.; Jiang, R.; Cheng, R.; She, G. *Elsholtzia*: phytochemistry and biological activities. *Chemistry Central Journal* **2012**, 6, 147-154.
- 89 Ollila, F.; Halling, K.; Vuorela, P.; Vuorela, H.; Slotte, P. J. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Archives of Biochemistry Biophysics* **2002**, 399, 103-108.
- 90 Martini, N. D.; Katerere, D. R. P.; Eloff, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, 93, 207-212.
- 91 Gábor, M.; Eperjessy, E. Antibacterial Effect of Fisetin and Fisetinidin: *Nature* **1966**, 212, 1273.
- 92 Fiorani, M.; Accorsi, A. Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity. *The British journal of nutrition* **2005**, 94, 338-345.
- 93 Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of nutrition* **2000**, 130, 2243-2250.
- 94 Viñas, P.; Martínez-Castillo, N.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M. Directly suspended droplet microextraction with in injection-port derivatization coupled to gas

- chromatography–mass spectrometry for the analysis of polyphenols in herbal infusions, fruits and functional foods. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 639–646.
- 95 De Santi, C.; Pietrabissa, A.; Mosca, F.; Pacifici, G. M. Methylation of quercetin and fisetin, flavonoids widely distributed in edible vegetables, fruits and wine, by human liver. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2002**, 40, 207–212.
- 96 Brinkworth, R. S.; Stoermer, M. J.; Fairlie, D. P. Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, 188, 631-637.
- 97 Howitz, K. T.; Bitterman, K. J.; Cohen, H. Y.; Lamming, D. W.; Lavu, S.; Wood, J. G.; Zipkin, R. E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.; Scherer, B.; Sinclair, D. A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan *Nature* **2003**, 425, 191–196.
- 98 Geraets, L.; Haegens, A.; Brauers, K.; Haydock, J. A.; Vernooij, J. H. J.; Wouters, E. F. M.; Bast, A.; Hageman, G. J. Inhibition of LPS-induced pulmonary inflammation by specific flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, 382, 598-603.
- 99 Park, H.-H.; Lee, S.; Son, H.-Y.; Park, S.-B.; Kim, M.-S.; Choi, E.-J.; Singh, T. S. K.; Ha, J.-H.; Lee, M.-G.; Kim, J.-E.; Hyun, M. C.; Kwon, T. K.; Kim, Y. H.; Kim, S. H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of Pharmacal Research* **2008**, 31, 1303-1311.
- 100 Lim, D. Y.; Park, J. H. Y. Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **2009**, 296, 1060-1068.
- 101 Khan, N.; Afaq, F.; Syed, D. N.; Mukhtar, H. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells: *Carcinogenesis* **2008**, 29, 1049–1056.
- 102 Zandi, K.; Teoh, B. T.; Sam, S. S.; Wong, P. F.; Mustafa, M.; Abubakar, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal* **2011**, 8, 560-570.

- 103 Lin, Y.-J.; Chang, Y.-C.; Hsiao, N.-W.; Hsieh, J.-L.; Wang, C.-Y.; Kung, S.-H.; Tsai, F.-J.; Lan, Y.-C.; Lin, C.-W. Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71. *Journal of Virological Methods* **2012**, 182, 93–98.
- 104 Kang, S. Y.; Kang, J.-Y.; Oh, M.-J. Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes against fish pathogenic viruses in vitro. *The Journal of Microbiology* **2012**, 50, 293–300.
- 105 Lyu, S. Y.; Rhim, J. Y.; Park, W. B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Archives of pharmacal research* **2005**, 28, 1293–1301.
- 106 Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, 36, 838–849.
- 107 Hanneken, A.; Lin, F. F.; Johnson, J.; Maher, P. Flavonoids Protect Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Oxidative-Stress-Induced Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2006**, 47, 3164–3177.
- 108 Olaharski, A. J.; Mondrala, S. T.; Eastmond, D. A. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2005**, 582, 79–86.
- 109 López-Lázaro, M.; Willmore, E.; Austin, C. A. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2010**, 696, 41–47.
- 110 Jnawali, H. N.; Lee, E.; Jeong, K.-W.; Shin, A.; Heo, Y.-S.; Kim, Y. Anti-inflammatory Activity of Rhamnetin and a Model of Its Binding to c-Jun NH2-Terminal Kinase 1 and p38 MAPK. *Journal of Natural Products* **2014**, 77, 258–263.
- 111 Shukla, S.; Bhaskaran, N.; Gupta, S. Rhamnetin inhibits human prostate cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators and survival molecules. *Cancer Research* **2011**, 71, 5576.
- 112 Kang, J.; Kim, E.; Kim, W.; Seong, K. M.; Youn, H.; Kim, J. W.; Kim, J.; Youn, B. Rhamnetin and cirsiol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry* **2013**, 288, 27343–27357.

- 113 Zenkevich, I. G.; Eshchenko, A. Y.; Makarova, S. V.; Vitenberg, A. G.; Dobryakov, Y. G.; Utsal, V. A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature: *Molecules* **2007**, 12, 654-672.
- 114 Jiang, H.; Zhan, W. O.; Liu, X.; Jiang, S. X. Antioxidant activities of extracts and flavonoid compounds from *Oxytropis falcate* Bunge. *Natural product research* **2008**, 22, 1650-1656.
- 115 Ji, S.-Y.; Choi, K.-M.; Lee, Y.-S.; Yu, J.-Y.; Shin, D.-M.; Lee, S.; Yoo, K.-S.; Lee, Y.-M.; Yun, Y.-P.; Yoo, H.-S.: Rhamnetin-Induced Suppression of Clonal Expansion during Early Stage of Adipogenesis *Archives of pharmacal research* **2012**, 6, 1083-1089.
- 116 Zhou, A.; Sadik, O. A. Comparative Analysis of Quercetin Oxidation by Electrochemical, Enzymatic, Autoxidation, and Free Radical Generation Techniques: A Mechanistic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 12081-12091.
- 117 Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano, I.; Bulíčková, J.; Žabka, J.; Gál, M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions: *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402, 975-982.
- 118 Jorgensen, L. V.; Comett, C.; Justesen, U.; Skibsted, L. H.; Gragsted, L. O. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radical Research* **1998**, 29, 339-350.
- 119 Jungbluth, G.; Ruhling, I.; Temes, W. J. Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2000**, 2, 1946-1952.
- 120 Makris, D. P.; Rossiter J. T. Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: A preliminary investigation. *Journal of Food Composition and Analysis* **2002**, 15, 103-113.
- 121 Brett, A. M. O.; Ghica, M.-E. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis* **2003**, 15, 1745-1750.
- 122 Cren-Olivé, C.; Hapiot, P.; Pinson, J.; Rolando, Ch. Free Radical Chemistry of Flavan-3-ols: Determination of Thermodynamic Parameters and of Kinetic Reactivity from Short (ns) to Long (ms) Time Scale. *Journal of American Chemical Society* **2002**, 124, 14027-14038.

- 123 Ryan, M. D.; Yueh, A.; Chen, W.-Y. The Electrochemical Oxidation of Substituted Catechols. *Journal of the Electrochemical Society* **1980**, 127, 1489-1495.
- 124 Masek, A.; Chrzescijanska, E.; Zaborski, M. Electrooxidation of morin hydrate at a Pt electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chemistry* **2014**, 148, 18-23.
- 125 Hendrickson, H. P.; Kaufman, A. D.; Lunte, C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1994**, 12, 325-334.
- 126 Jungbluth, G.; Ternes, W. HPLC separation of flavonols, flavones and oxidized flavonols with UV-, DAD-, electrochemical and ESI-ion trap MS detection. *Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 367, 661-666.
- 127 Masek, A.; Zaborski, M.; Chrzescijanska, E. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chemistry* **2011**, 127, 699-704.
- 128 Zielinska, D.; Pierozynski, B. Electrooxidation of quercetin at glassy carbon electrode studied by a.c. impedance spectroscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2009**, 625, 149-155.
- 129 Nematollahi, D.; Malakzadeh, M. Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfinic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, 547, 191-195.
- 130 Sokolová, R.; Degano, I.; Ramešová, Š.; Bulíčková, J.; Hromadová, M.; Gál, M.; Fiedler, J.; Valášek, M. The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *Electrochimica Acta* **2011**, 56, 7421-7427.
- 131 Hvattum, E.; Stenstrøm, Y.; Ekeberg, D. Study of the reaction products of flavonols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl using liquid chromatography coupled with negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39, 1570-1581.
- 132 Yang, B.; Arai, K.; Kusu, F. Electrochemical Behaviors of Quercetin and Kaempferol in Neutral Buffer Solution. *Analytical Sciences* **2001**, 17, 987-989.
- 133 Aguilar-Sánchez, R.; Áhuatl-García, F.; Dávila-Jiménez, M. M.; Elizalde-González, M. P.; Guevara-Villa, M. R. G. Chromatographic and electrochemical determination of quercetin and kaempferol in phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38, 239-249.

- 134 Zheng, X. F.; Zao, J.; Chen, G. F.; Liu, S. L.; Li, G. X. Electroanalysis of Kaempferol Using Pyrolytic Graphite and a Hemoglobin/Polysorbate-20 Modified Electrodes. *Journal of Analytical Chemistry* **2008**, 63, 381-385.
- 135 Janeiro, P.; Brett, M. O. Solid State Electrochemical Oxidation Mechanisms Of Morin in Aqueous Media. *Electroanalysis* **2005**, 17, 733-738.
- 136 He, J.-B.; Yuan, S.-J.; Du, J.-Q.; Hu, X.-R.; Wang, Y. Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity. *Bioelectrochemistry* **2009**, 75, 110-116.
- 137 Kang, J.; Li, Z.; Lu, X. Electrochemical study on the behavior of Morin and its interaction with DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 40, 1166–1171.
- 138 Liu, A.-L.; Zhang, S.-B.; Chen, W.; Huang, L.-Y.; Lin, X.-H.; Xia, X.-H. Study of the electrochemical behavior of isorhamnetin on a glassy carbon electrode and its application. *Talanta* **2008**, 77, 314-318.
- 139 Sokolová, R.; Ramešová, Š.; Degano, I.; Hromadová, M.; Gál, M.; Žabka, J. The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chemical Communication* **2012**, 48, 3433-3435.
- 140 Zhou, A.; Kikandi, S.; Sadik, O. A. Electrochemical degradation of quercetin: Isolation and structural elucidation of the degradation products. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, 2246-2255.
- 141 Markovic, Z. S.; Mentus, S. V.; Markovic, J. M. D. Electrochemical and Density Functional Theory Study on the Reactivity of Fisetin and Its Radicals: Implications on in Vitro Antioxidant Activity. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, 113, 14170-14179.
- 142 Maza, E. M.; Moressi, M. B.; Fernandez, H.; Zon, M. A. Electrochemical oxidation of fisetin: Studies related to its adsorption on glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, 675, 11-17.
- 143 Osman, A.; Makris, D. P. Comparison of fisetin and quercetin oxidation with a cell-free extract of onion trimmings and peel, plant waste, containing peroxidase enzyme: a further insight into flavonol degradation mechanism. *International Journal of Food Science & Technology* **2010**, 45, 2265-2271.
- 144 Heyrovský, J.; Kůta, J. *Základy polarografie*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, **1962**.

- 145 Pospíšil, L.; Trsková, R.; Fuoco, R.; Colombini, M. P. Electrochemistry of s-triazine herbicides: reduction of atrazine and terbutylazine in aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, 395, 189-193.
- 146 Pospíšil, L.; Trsková, R.; Colombini, M. P.; Fuoco, R. Inclusion Complexes of Atrazine with α -, β - and γ - Cyclodextrins. Evidence by Polarographic Kinetic Currents. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry* **1998**, 31, 57-70.
- 147 Brdička, R.; Wiesner, K. Rate of recombination of ions derived from polarographic limiting currents due to the reduction of acids. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1947**, 12, 138-149.
- 148 Brdička, R. The mechanism of the polarographic reduction of pyruvic and phenylglyoxylic acid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1947**, 12, 212-224.
- 149 Brdička, R. The kinetics of reactions preceding and following the electrode process. *Chemical Papers* **1954**, 8, 670-692.
- 150 Wiesner, K. Polarographic Investigation of the Electroreduction of Sugar. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1947**, 12, 64-70.
- 151 Los, J. M.; Simpson, L. B.; Wiesner, K. The Kinetics of Mutarotation of D-Glucose with Consideration of an Intermediate Free-aldehyde Form. *Journal of American Chemical Society* **1956**, 78, 1564-1568.
- 152 Veselý, K.; Brdička, R. Polarographic limiting currents of formaldehyde as a measure of its dehydration rate. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1947**, 12, 313- 332.
- 153 Vavrin, Z. The significance of the polarographic half-wave potentials due to the electrooxidation of l-ascorbic acid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1949**, 14, 367-376.
- 154 Saveant, J. M. Elements of molecular and biomolecular electrochemistry: an electrochemical approach to electron transfer chemistry, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2006**; pp 78-102.
- 155 Koutecký, J.; Hanus, V. Dva příklady rychlých biomolekulárních reakcí, vřazených do depolarisačního děje na kapkové elektrodě. *Chemické listy* **1954**, 48, 1446-1457.

- 156 Šantavý, F.; Bitter, B. Polarographic behaviour of reductic acid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1950**, 15, 112-116.
- 157 Brdička, R.; Zuman, P. Polarographic behaviour of reductone and coumarindiol. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1950**, 15, 776-779.
- 158 Vlček, A. A. Relations between the electronic structure of inorganic depolarizers and their polarographic behaviour. II. Complex cyanides of nickel. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1957**, 22, 948-960.
- 159 Amatore, C.; Gareil, M.; Saveant, J. M. Homogeneous vs heterogeneous electron transfer in electrochemical reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1983**, 147, 1-38.
- 160 Jacq, J. Squares scheme – establishment and discussion of general equation for intensity – potential curve in stationary flow and convective diffusion. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1971**, 29, 149-180.
- 161 Sýkora, V.; Zátka, V. Příruční tabulky pro chemiky, 2.doplňené vydání, Státní nakladatelství technické literatury, Praha, **1960**.
- 162 Pospíšil, L.; Fiedler, J.; Fanelli, N. Computer-controlled instrumentation for fast voltammetry at ultramicroelectrodes. *Review of Scientific Instruments* **2000**, 71/4, 1804-1810.
- 163 Krejčík, M.; Daněk, M.; Hartl, F. Simple construction of an infrared optically transparent thin-layer electrochemical cell: Applications to the redox reactions of ferrocene, $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ and $\text{Mn}(\text{CO})_3(3,5\text{-di-}t\text{-butyl-catecholate})^-$. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1991**, 317, 179-187.
- 164 <https://scifinder.cas.org>, Advanced Chemistry Development(ACD/Labs/Software V.11.02 ©1994-2013).
- 165 Lund, H.; Hammerich, O. Organic Electrochemistry: Marcel Dekker, Inc., New York, **1991**, pp 147.
- 166 Ludvík, J.; Riedl, F.; Liška, F.; Zuman, P. Electrochemical reduction of metamidron. *Journal of Electrochemical Chemistry* **1998**, 457, 177-190.
- 167 Valentová, K.; Vrba, J.; Bancířová, M.; Ulrichová, J.; Křen, V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* **2014**, 68, 267-282.

8. Přílohy

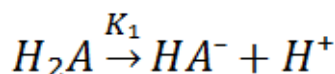
Příloha 1: Odvození vztahu pro distribuční diagram rhamnazinu

Příloha 2: Odvození vztahu pro distribuční diagram fisetinu a rhamnetinu

Příloha 3: Publikace v odborných časopisech

1. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano, I.; Hromadová, M.; Gál, M.; Kolivoška, V.; Colombini, M. P. The Influence of the Host-Guest Interaction on the Oxidation of Natural Flavonoid Dyes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, 76, 1651-1667.
2. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano, I.; Žabka, J.; Bulíčková, J.; Gál, M. On the Stability of Bioactive Flavonoids Quercetin and Luteolin under Oxygen-Free Conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402, 975-982.
3. Sokolová, R.; Ramešová, Š.; Degano, I.; Hromadová, M.; Gál, M.; Žabka, J. The Oxidation of Natural Flavonoid Quercetin. *Chemical Communication* **2012**, 48, 3433-3435.
4. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Tarábek, J.; Degano, I. The Oxidation of Luteolin, the Natural Flavonoid Dye. *Electrochimica Acta* **2013**, 110, 646-654.
5. Ramešová, Š.; Sokolová, R. Elektrochemická oxidace přírodních barviv používaných na uměleckých památkách. *Chemické Listy* **2014**, 108, 507-512.
6. Ramešová, Š.; Degano, I.; Sokolová, R. Two oxidation pathways of bioactive flavonol rhamnazin under ambient conditions. *Electrochimica Acta* **2014**, 133, 359-363.
7. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano I. The study of the oxidation of the natural flavonol fisetin confirmed quercetin oxidation mechanism. *Electrochemical Communication* **2015** (submitted)

Příloha 1: Odvození vztahu pro distribuční diagram rhamnazu



$$K_1 = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{[H_2A]}$$

$$[H_2A] = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{K_1}$$

$$[HA^-] = \frac{K_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]}$$

$$c = [H_2A] + [HA^-]$$

$$[HA^-] = c - [H_2A]$$

$$[H_2A] = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{K_1} = \frac{(c - [H_2A]) \cdot [H^+]}{K_1} = \frac{c \cdot [H^+] - [H^+] \cdot [H_2A]}{K_1}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 + [H^+] \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]$$

$$[H_2A] = \frac{c \cdot [H^+]}{K_1 + [H^+]}$$

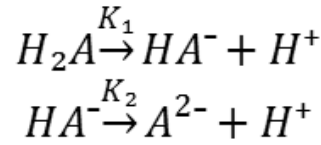
$$[HA^-] = \frac{K_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]} = \frac{K_1 \cdot \frac{c \cdot [H^+]}{K_1 + [H^+]}}{[H^+]}$$

$$[HA^-] \cdot [H^+] = K_1 \cdot \frac{c \cdot [H^+]}{K_1 + [H^+]}$$

$$[HA^-] \cdot [H^+] \cdot (K_1 + [H^+]) = K_1 \cdot c \cdot [H^+]$$

$$[HA^-] = \frac{K_1 \cdot c}{K_1 + [H^+]}$$

Příloha 2: Odvození vztahu pro distribuční diagram fisetinu a rhamnetinu



$$K_1 = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{[H_2A]} \qquad K_2 = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{[HA^-]}$$

$$[H_2A] = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{K_1} \qquad [HA^-] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{K_2}$$

$$c = [H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}] \qquad [H_2A] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+] \cdot [H^+]}{K_1 K_2}$$

$$[H_2A] = \frac{(c - [H_2A] - [HA^-]) \cdot [H^+]^2}{K_1 K_2} = \frac{c \cdot [H^+]^2 - [H_2A] \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot [HA^-]}{K_1 K_2}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot [HA^-]$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot \frac{K_1 [H_2A]}{[H^+]}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H_2A] \cdot K_1 \cdot [H^+]$$

$$[H_2A] \cdot (K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]) = c \cdot [H^+]^2$$

$$[H_2A] = \frac{c \cdot [H^+]^2}{K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]}$$

$$[HA^-] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{K_2} = \frac{[H^+] \cdot c - [H^+] \cdot [H_2A] - [H^+] \cdot [HA^-]}{K_2}$$

$$K_2 \cdot [HA^-] = [H^+] \cdot c - \frac{[H^+] \cdot [H^+] \cdot [HA^-]}{K_1} - [HA^-] \cdot [H^+]$$

$$K_1 K_2 \cdot [HA^-] = K_1 \cdot [H^+] \cdot c - [H^+]^2 \cdot [HA^-] - K_1 [HA^-] \cdot [H^+]$$

$$K_1 K_2 \cdot [HA^-] + [H^+]^2 \cdot [HA^-] + K_1 \cdot [HA^-] \cdot [H^+] = K_1 \cdot [H^+] \cdot c$$

$$[HA^-] = \frac{K_1 \cdot [H^+] \cdot c}{K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]}$$

$$[A^{2-}] = c - [H_2A] - [HA^-]$$

Příloha 3: Publikace v odborných časopisech

1. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano, I.; Hromadová, M.; Gál, M.; Kolivoška, V.; Colombini, M. P. The Influence of the Host-Guest Interaction on the Oxidation of Natural Flavonoid Dyes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, 76, 1651-1667.
2. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano, I.; Žabka, J.; Bulíčková, J.; Gál, M. On the Stability of Bioactive Flavonoids Quercetin and Luteolin under Oxygen-Free Conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402, 975-982.
3. Sokolová, R.; Ramešová, Š.; Degano, I.; Hromadová, M.; Gál, M.; Žabka, J. The Oxidation of Natural Flavonoid Quercetin. *Chemical Communication* **2012**, 48, 3433-3435.
4. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Tarábek, J.; Degano, I. The Oxidation of Luteolin, the Natural Flavonoid Dye. *Electrochimica Acta* **2013**, 110, 646-654.
5. Ramešová, Š.; Sokolová, R. Elektrochemická oxidace přírodních barviv používaných na uměleckých památkách. *Chemické Listy* **2014**, 108, 507-512.
6. Ramešová, Š.; Degano, I.; Sokolová, R. Two oxidation pathways of bioactive flavonol rhamnazin under ambient conditions. *Electrochimica Acta* **2014**, 133, 359-363.
7. Ramešová, Š.; Sokolová, R.; Degano I. The study of the oxidation of the natural flavonol fisetin confirmed quercetin oxidation mechanism. *Electrochemical Communication* **2015** (submitted)