

Schnelle und empfindliche Bestimmung von Gallussäure in Getränken mit einem neuartigen Nano-Biokomposit

Sedigheh Falahi, Parvaneh Rahimi, Hermann Ehrlich, Yvonne Joseph, Instituts für Elektronik- und Sensor-materialien, Fakultät für Werkstoffwissenschaft und Werkstofftechnologie, Freiberg/Deutschland; Kontakt: sedigheh.falahi@doktorand.tu-freiberg.de

Einleitung

In den letzten Jahren haben sich Antioxidantien aufgrund ihrer zahlreichen gesundheitlichen Vorteile wie Anti-Aging und entzündungshemmenden Eigenschaften als wichtige Bestandteile von Lebensmitteln und Getränken etabliert [1]. Sie neutralisieren freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, die Zellen schädigen und chronische Gesundheitsprobleme und Alterungsprozesse verursachen. Polyphenole, sekundäre Pflanzenstoffe mit über 8.000 Varianten, sind die häufigsten Antioxidantien in Gemüse, Obst, Getreide und Getränken. In letzter Zeit werden sie in großem Umfang als natürliche Futtermittelzusatzstoffe anstelle synthetischer Stoffe eingesetzt, um die Lebensmittelqualität zu verbessern und die Gesundheit zu fördern [2]. Unter ihnen haben Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure, GA) und ihre Derivate aufgrund ihrer außergewöhnlichen biologischen Eigenschaften große Beachtung gefunden. Die krebshemmenden [3], antidiabetischen [4], antiallergischen [5], antimykotischen [6], antibakteriellen [7], entzündungshemmenden [8], neuroprotektiven [9] und kardioprotektiven Eigenschaften [10] haben GA zu einer der am häufigsten verwendeten phenolischen Komponenten in der Medizin, Lebensmittel- und Pharmaindustrie gemacht. In Anbetracht dieser vielfältigen biologischen und pharmazeutischen Wirkungen ist der quantitative Nachweis von GA von großer Bedeutung. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [11], Spektralphotometrie [12], Fließinjektionsanalyse [13], Kapillarelektrophorese [14] und Chemilumineszenz [15] sind die konventionellen Analyseverfahren, die zur Identifizierung von GA eingesetzt werden. Trotz der hohen Empfindlichkeit dieser Verfahren erfordern sie jedoch eine komplizierte Ausrüstung, spezialisiertes Personal sowie eine komplexe Probenvorbereitung und -vorbehandlung. Da es sich bei GA um eine elektroaktive Phenolverbindung handelt, bieten elektrochemische Verfahren wie die zyklische Voltammetrie (CV), die Differential-Puls-Voltammetrie (DPV), die Amperometrie und die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) ein großes Potenzial für den GA-Nachweis. In Anbetracht der Vorteile dieser Technologie, wie hohe Empfindlichkeit und Selektivität, niedrige Kosten, kurze Messzeit und Einfachheit, wurden mehrere Studien zur elektrochemischen Bestimmung von GA unter Verwendung verschiedener Elektrodentypen in verschiedenen Lebensmitteln und pharmazeutischen Matrices durchgeführt [2].

Es wurden mehrere elektrochemische Sensoren auf Kohlenstoffbasis zur Bestimmung von GA in Lebensmittelmatrices entwickelt. Dazu gehören modifizierte Glaskohlenstoffelektroden (GCE), mit Nanomaterialien funktionalisierte

Verbundelektroden auf Kohlenstoffbasis, modifizierte siebgedruckte Elektroden und modifizierte Kohlenstoffpasten Elektroden (CPE). Unter allen verfügbaren elektrochemischen Methoden und Elektrodenmodifikationen scheinen modifizierte Kohlenstoffpastenelektroden die Technik der Wahl zu sein. Der Grund dafür sind die geringen Kosten für die Modifizierung von Kohlenstoffpastenelektroden, der niedrige Hintergrundstrom, die einfache Modifizierung und die schnell regenerierbare Oberfläche. Da CPEs jedoch nicht ausreichend selektiv und empfindlich für den Zielanalyten sind, muss ihre elektrochemische Leistung durch Modifizierung verbessert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein einfacher, kostengünstiger, umweltfreundlicher und empfindlicher elektrochemischer Sensor für die effektive Bestimmung von GA auf der Grundlage eines neuartigen Bio-Nanokomposits aus porösem 3D-Schwamm, Atacamit ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$) als hochaktivem Katalysator und mehrwandigen CNTs (MWCNTs) (bezeichnet als Sp-At/MWCNTs) entwickelt. Die vorbereiteten 3D-Sp-At/MWCNTs/CPE wurden für die Bestimmung von GA in Schwarz-/Grüntee- und Rotweinproben verwendet (Abbildung 1).

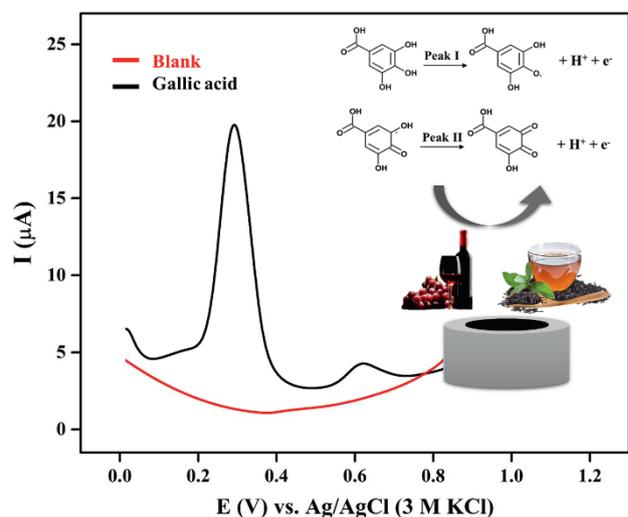


Abb. 1: Illustration eines Sensors auf der Basis von Sp-At/MWCNTs/CPE und seine Reaktion auf GA-Oxidation.

Methoden und Materialien

Apparate und Reagenzien

Graphitpulver, GA-Monohydrat (HPLC > 98%), Natriumphosphat (Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4), MWCNT und Paraffinöl wurden von Sigma Aldrich bezogen. Das Schwammgerüst

des Meeresschwamms *Hippospongia communis* wurde von der INTIB GmbH (Freiberg, Deutschland) bezogen. Kupferchlorid-Dihydrat und Ammoniaklösung wurden von Riedel-de Haën AG, Th. Geyer GmbH & Co. KG und abcr GmbH, Deutschland.

Elektrochemische Messungen wurden mit einem Palm-Sens 4 elektrochemischen Analysesystem mit der Software PStTrace 5.8 bei Raumtemperatur in einer elektrochemischen Zelle mit einer Drei-Elektroden-Plattform durchgeführt. Eine gesättigte Silber-/Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl) (3 M KCl-Lösung) und eine Platin-Drahtelektrode wurden als Referenzelektrode bzw. als Hilfselektrode verwendet. Blanke und modifizierte CPEs dienten als Arbeitselektroden. Phosphatpufferlösung (PBS, 0,1 M, pH 3,0-6) wurde aus einer Mischung der Stammlösungen (NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4) hergestellt und als Elektrolytlösung für alle Messungen verwendet.

Funktionalisierung der MWCNTs

Unbehandelte MWCNTs wurden mit einer Mischung aus Salpetersäure und Schwefelsäure (Volumenverhältnis 1:3) nach Wang et al. mit leichten Modifikationen vorbehandelt [16]. Im Detail wurden 0,1 g MWCNT in 75 mL gemischte Säurelösung gegeben und anschließend 6 h lang bei 40 °C mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde es zentrifugiert und gewaschen, bis der pH-Wert neutral war. Schließlich wurde das erhaltene Produkt bei 60 °C in einem Ofen getrocknet.

Herstellung der CPEs

3D Sp-At wurde gemäß unseren früheren Berichten [17, 18] hergestellt und gemahlen. Der Sensor wurde durch Mahlen von Graphit, MWCNTs, Sp-At-Pulver und Paraffinöl als Bindemittel in einem Mörser mit optimierten Verhältnissen von 70:5:5:20 (W/W/W/W) und einer Mahldauer von 40 Minuten hergestellt. Die Komponenten wurden zu einer Paste homogenisiert, die dann in einen Kohlenstoffpastenhalter mit einem Innendurchmesser von 2 mm gepresst wurde. Diese Elektrode wurde dann als Sp-At/MWCNTs/CPE bezeichnet. Die CPE ohne Sp-At wurde auf vergleichbare Weise hergestellt.

Ergebnisse

Für die GA-Analyse wurden die DPVs-Antworten von Sp-At/MWCNTs/CPE in 0,1 M PBS-Puffer bei einer Scanrate von $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ aufgezeichnet. In diesem Zusammenhang wurden die Elektrodencharakterisierung in An- und Abwesenheit von GA sowie der pH-Effekt auf die GA-Oxidation untersucht (Abbildung 2).

Die DPV-Reaktion von GA mit dem Sp-At/MWCNTs/CPE-Sensor wurde bei verschiedenen GA-Konzentrationen weiter untersucht. Abbildung 3 zeigt das entsprechende DPV-Ergebnis von GA in verschiedenen Konzentrationen.

Um die praktische Anwendbarkeit weiter zu untersuchen, wurde der Sp-At/MWCNTs/CPE-Sensor verwendet, um die GA-Konzentration in Blind-, Grüntee- und Rotweinproben zu ermitteln, und die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 4 aufgeführt.

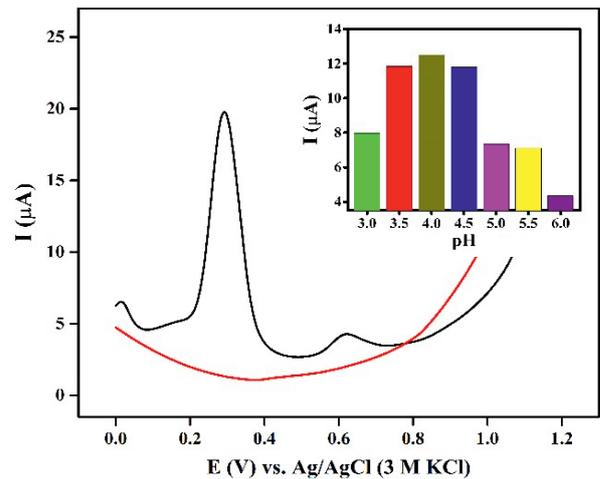


Abb 2: DPVs von Sp-At/MWCNTs/CPE in 0,1 M PBS pH 4 mit und ohne $30 \mu\text{M}$ GA bei einer Scanrate von $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Einschub: Auswirkung des pH-Werts auf den GA-Oxidationsstrom

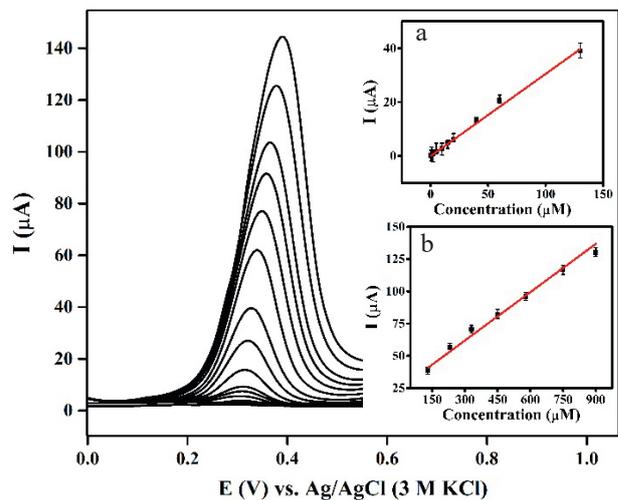


Abb 3: DPV-Antworten von Sp-At/MWCNTs/CPE mit aufeinanderfolgenden Zugaben verschiedener GA-Konzentrationen von 0,5 bis $930 \mu\text{M}$ in 0,1 M PBS pH 4 bei einer Abtastrate von $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Einschub: Strom-GA-Konzentrationskalibrierungskurve für a) niedrige und b) hohe GA-Konzentrationen.

Tab. 1: Ergebnisse der Analyse von GA in schwarzem und grünem Tee sowie in Rotwein

Probe	Anreicherung (µM)	Nachgewiesene GA (µM)	Wiederfindung (%)
Schwarzer Tee	-	30.7	-
	10	40.6	98.2
	30	59.9	97
Grüner Tee	-	31.2	-
	10	41	98
	30	62	102
Rotwein	-	18.2	-
	10	27.8	95.2
	30	47.4	97.1

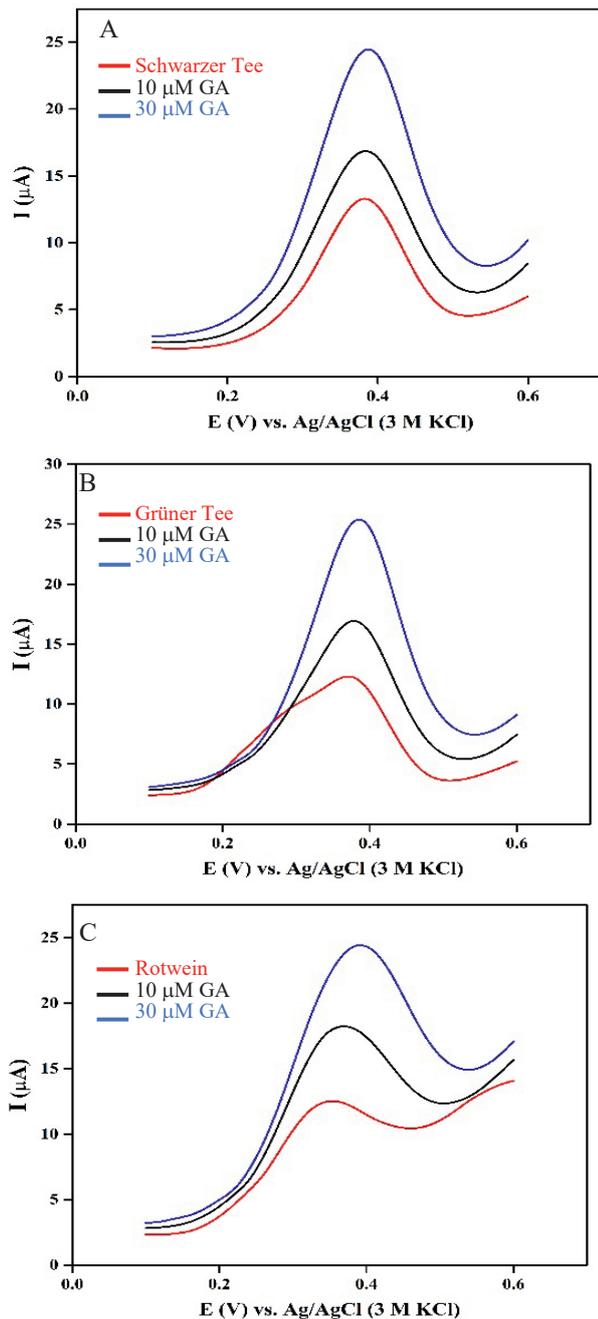


Abb 4: DPV-Antworten für die Bestimmung von GA in A) Schwarzem Tee, B) Grünem Tee und C) Rotwein

Diskussion

Abbildung 2 zeigt die DPVs von 30 μM GA in 0,1 M PBS, pH 4, an Sp-At/MWCNTs/CPE. Im Allgemeinen zeigt der Puffer ohne GA keinen Peak. Die DPVs zeigen auch, dass die elektrochemische Oxidation von GA durch zwei anodische Peaks definiert ist. Peak I (0,3 V) ist auf die Bildung des Semichinon-Radikals zurückzuführen, das dann zur Chinonform oxidiert wird (Peak II (0,6 V)) [19]. An beiden Reaktionen sind jeweils ein Proton und ein Elektron beteiligt (Abbildung 1).

Die Auswirkung des pH-Werts auf die Oxidation von 30 μM GA wurde in einem pH-Bereich zwischen 3 und 6 mit einer

0,1 M PBS-Pufferlösung untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Stromwerte des anodischen Peaks einen Maximalwert bei pH 4 erreichten, wie in Abbildung 2 dargestellt. Daher wird für weitere Untersuchungen eine PBS-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4 gewählt.

Die GA-Bestimmung wurde unter den optimalen Versuchsbedingungen mittels DPV durchgeführt (Abbildung 3). Die Kalibrierungskurven für den Spitzenstrom in Abhängigkeit von der GA-Konzentration wurden für Sp-At/MWCNTs/CPE mit zwei verschiedenen linearen Abschnitten ermittelt. Abbildung 3 (Einschub A) zeigt den ersten linearen Teil, der zwischen 0,5 - 130 μM für niedrigere GA-Konzentrationen mit der linearen Regressionsgleichung $I_p (\mu\text{A}) = 0,306 \text{ CGA} (\mu\text{M}) + 0,2654$ ($R^2 = 0,9952$), und Abbildung 3 Einschub B zeigt den zweiten linearen Teil für höhere GA-Konzentrationen zwischen 130 - 930 μM mit einer linearen Regressionsgleichung von $I_p (\mu\text{A}) = 0,1156 \text{ CGA} (\mu\text{M}) + 28,86$ ($R^2 = 0,9918$). Die Nachweisgrenze (LOD) wurde anhand der Gleichung $\text{LOD} = 3 \sigma/m$ berechnet (σ : Standardabweichung des Signals in der Blindlösung; m : Steigung der Kalibrierkurve). Das Detektionslimit von Sp-At/MWCNTs/CPE wurde zu 96 nM ermittelt.

Wichtige Faktoren wie Selektivität, Reproduzierbarkeit und Stabilität wurden untersucht, um die Anwendbarkeit der vorgeschlagenen Methode abzuschätzen. Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurde die DPV-Reaktion von vier frischen Sp-At/MWCNTs/CPE-Elektroden auf 0,1 M PBS pH 4 mit 30 μM GA untersucht. Die relative Standardabweichung (RSD) betrug 4,22 %, was darauf hindeutet, dass die hergestellten Elektroden sehr gut reproduzierbar sind. Bei der Wiederholbarkeitsprüfung ergaben acht aufeinanderfolgende Messungen von 30 μM GA an einem Sp-At/MWCNTs/CPE eine RSD von 0,62 %, was das gute wiederholbare Verhalten des hergestellten Sensors bestätigt. Der Langzeitstabilitätstest wurde anhand der DPV-Messungen des Sp-At/MWCNTs/CPE in Gegenwart von 30 μM GA bewertet. Die Stromstärke blieb nach einem Monat bei über 87 % des ursprünglichen Wertes, was darauf hindeutet, dass der vorgeschlagene Sensor bemerkenswert stabil ist. Darüber hinaus wurde die Stromreaktion des Sp-At/MWCNTs/CPE in Intervallen von 2000 s nach Injektion von 30 μM GA aufgezeichnet. Die Spezifität des Sp-At/MWCNTs/CPE-Sensors wurde für 60 μM GA in Anwesenheit des 100-fachen möglicher Koexistenzspezies (Saccharose, Glukose, Ascorbinsäure und Harnsäure), die normalerweise zusammen mit GA vorhanden sind, bewertet [20]. Der Sp-At/MWCNTs/CPE-Sensor zeigt eine relativ geringe Änderung des Spitzenstroms, die weniger als ± 5 % betrug, was auf eine ausgezeichnete Selektivität für den Nachweis von GA schließen lässt. Bestimmung des GA-Gehalts in schwarzem und grünem Tee sowie in Rotwein mit Hilfe eines Sp-At/MWCNTs/CPE-Sensors. Die Proben wurden in 0,1 M PBS pH 4 vorbereitet und dann mit GA-Standardlösungen versetzt, um einen GA-Bereich von 0 bis 30 μM zu erhalten, gefolgt von der Aufzeichnung ihrer entsprechenden DPVs (Abbildung 4). Die Ergebnisse zeigten, dass Sp-At/MWCNTs/CPE in Abwesenheit von GA anodische Peaks aufwies. Dies bedeutet, dass die Elektrode

GA nachweisen konnte. Dieser anodische Spitzenstrom, der von den realen Proben erzeugt wird, wird im Allgemeinen auf die gesamte antioxidative Kapazität der Probe zurückgeführt. Mit zunehmender GA-Konzentration wurden in allen Proben mehr Oxidationspeaks erzeugt. Die erzielten ausgezeichneten Wiederfindungsergebnisse von 95 bis 102 % (Tabelle 1) bestätigten die Anwendbarkeit des entwickelten Sensors zur Bestimmung von GA in Getränkeproben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum ersten Mal das erneuerbare Biopolymer Spongin und Atacamit in Kombination mit modifizierten MWCNTs (SP-At/MWCNTs) erfolgreich als Sensormaterial für die Herstellung eines einfachen, kostengünstigen und zuverlässigen GA-Sensors eingesetzt wurde. SP-At/MWCNTs sorgten für schnellen Elektronentransfer, Ladungsleitung und effizienten Massentransport von GA an der Elektrodenoberfläche. Darüber hinaus zeigten die SP-At/MWCNTs/CPE eine verbesserte GA-Detektion bei einem niedrigeren Potential, was auf die hohe elektroaktive Oberfläche von 3D Sp-At mit der großen Adsorptionskapazität von GA auf der Oberfläche des CPE zurückzuführen ist. Es wurden eine hohe Empfindlichkeit, eine annehmbare Selektivität unter verschiedenen Störfaktoren, eine niedrige Nachweisgrenze und breite lineare Bereiche mit ausgezeichneter Stabilität, guter Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit erzielt. Auf dieser Grundlage wurde eine empfindliche und selektive elektrochemische Methode zur Bestimmung von GA in Getränkeproben wie Schwarz-/Grüntee und Rotwein entwickelt, die zufriedenstellende Wiederfindungsergebnisse liefert.

Literatur

- [1] ZEHIROGLU, C. ; OZTURK SARIKAYA, S. B.: The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. In: *J Food Sci Technol* 56 (2019), Nr. 11, S. 4757–4774
- [2] BADEA, M. ; DI MODUGNO, F. ; FLORIOAN, L. ; TIT, D. M. ; RESTANI, P. ; BUNGAU, S. ; IOVAN, C. ; BADEA, G. E. ; ALEYA, L.: Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses. In: *Sci Total Environ* 672 (2019), S. 129–140
- [3] JIANG, Y. ; PEI, J. ; ZHENG, Y. ; MIAO, Y.-J. ; DUAN, B.-Z. ; HUANG, L.-F.: Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. In: *Chin J Integr Med* 28 (2022), Nr. 7, S. 661–671
- [4] VARIYA, B. C. ; BAKRANIA, A. K. ; PATEL, S. S.: Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblica officinalis*: Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- γ and Akt signaling. In: *Phytomedicine* 73 (2020), S. 152906
- [5] KIM, S.-H. ; JUN, C.-D. ; SUK, K. ; CHOI, B.-J. ; LIM, H. ; PARK, S. ; LEE, S. H. ; SHIN, H.-Y. ; KIM, D.-K. ; SHIN, T.-Y.: Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. In: *Toxicol Sci* 91 (2006), Nr. 1, S. 123–131
- [6] LI, Z.-J. ; LIU, M. ; DAWUTI, G. ; DOU, Q. ; MA, Y. ; LIU, H.-G. ; AIBAI, S.: Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. In: *Phytother Res* 31 (2017), Nr. 7, S. 1039–1045
- [7] DOS SANTOS, J. F. S. ; TINTINO, S. R. ; FREITAS, T. S. de ; CAMPINA, F. F. ; A MENEZES, I. R. de ; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. ; COUTINHO, H. D. M. ; CUNHA, F. A. B.: In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. In: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 57 (2018), S. 22–28
- [8] BENSAD, L. A. ; KIM, K. H. ; QUAH, C. C. ; KIM, W. R. ; SHAHIMI, M.: Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. In: *BMC Complement Altern Med* 17 (2017), Nr. 1, S. 47–57
- [9] MAYA, S. ; PRAKASH, T. ; MADHU, K.: Assessment of neuroprotective effects of Gallic acid against glutamate-induced neurotoxicity in primary rat cortex neuronal culture. In: *Neurochem Int* 121 (2018), S. 50–58
- [10] EKINCI AKDEMIR, F. N. ; YILDIRIM, S. ; KANDEMIR, F. M. ; TANYELI, A. ; KÜÇÜKLER, S. ; BAHAEDDIN DORTBUDAK, M.: Protective effects of gallic acid on doxorubicin-induced cardiotoxicity; an experimental study. In: *Arch Physiol Biochem* 127 (2021), Nr. 3, S. 258–265
- [11] NARUMI, K. ; SONODA, J.-I. ; SHIOTANI, K. ; SHIGERU, M. ; SHIBATA, M. ; KAWACHI, A. ; TOMISHIGE, E. ; SATO, K. ; MOTOYA, T.: Simultaneous detection of green tea catechins and gallic acid in human serum after ingestion of green tea tablets using ion-pair high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 945–946 (2014), S. 147–153
- [12] López, M.: Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. In: *Talanta* 60 (2003), 2–3, S. 609–616
- [13] PHAKTHONG, W. ; LIARUANGRATH, B. ; LIARUANGRATH, S.: Determination of gallic acid with rhodanine by reverse flow injection analysis using simplex optimization. In: *Talanta* 130 (2014), S. 577–584
- [14] YUE, M.-E. ; JIANG, T.-F. ; SHI, Y.-P.: Determination of gallic acid and salidroside in *Rhodiola* and its preparation by capillary electrophoresis. In: *J Anal Chem* 61 (2006), Nr. 4, S. 365–368
- [15] WANG, X. ; WANG, J. ; YANG, N.: Flow injection chemiluminescent detection of gallic acid in olive fruits. In: *Food Chemistry* 105 (2007), Nr. 1, S. 340–345
- [16] WANG, L. ; WANG, Y. ; ZHUANG, Q.: Simple self-referenced ratiometric electrochemical sensor for dopamine detection using electrochemically pretreated glassy carbon electrode modified by acid-treated multi-walled carbon nanotube. In: *J Electroanal Chem* 851 (2019), S. 113446
- [17] FALAHI, S. ; JAAFAR, A. ; PETRENKO, I. ; ZAREJOUSHEGHANI, M. ; EHRlich, H. ; RAHIMI, P. ; JOSEPH, Y.: High-Performance Three-Dimensional Spongin-Atacamite Biocomposite for Electrochemical Non-enzymatic Glucose Sensing. In: *ACS Appl Bio Mater* 5 (2022), Nr. 2, S. 873–880
- [18] TSURKAN, D. ; SIMON, P. ; SCHIMPF, C. ; MOTYLENKO, M. ; RAFAJA, D. ; ROTH, F. ; INOSOV, D. S. ; MAKAROVA, A. A. ; STEPNIAK, I. ; PETRENKO, I. ; SPRINGER, A. ; LANGER, E. ; KULBAKOV, A. A. ; AVDEEV, M. ; STEFANKIEWICZ, A. R. ; HEIMLER, K. ; KONONCHUK, O. ; HIPPMANN, S. ; KAISER, D. ; VIEHWEGER, C. ; ROGOLL, A. ; VORONKINA, A. ; KOVALCHUK, V. ; BAZHENOV,

- V. V. ; GALLI, R. ; RAHIMI-NASRABADI, M. ; MOLODTSOV, S. L. ; RAHIMI, P. ; FALAHI, S. ; JOSEPH, Y. ; VOGT, C. ; VYALIKH, D. V. ; BERTAU, M. ; EHR- LICH, H.: Extreme Biomimetics: Designing of the First Nanostructured 3D Spongin-Atacamite Composite and its Application. In: *Adv Mater* 33 (2021), Nr. 30, e2101682
- [19] SOUZA, L. P. ; CALEGARI, F. ; ZARBIN, A. J. G. ; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. ; BERGAMINI, M. F.: Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode. In: *J Agric Food Chem* 59 (2011), Nr. 14, S. 7620–7625
- [20] ZHAO, H. ; RAN, Q. ; LI, Y. ; LI, B. ; LIU, B. ; MA, H. ; ZHANG, M. ; KOMARNENI, S.: Highly sensitive detection of gallic acid based on 3D interconnected porous carbon nanotubes/carbon nanosheets modified glassy carbon electrode. In: *J Mater Res Technol* 9 (2020), Nr. 4, S. 9422–9433