Ispitivanje oksido-redukcijskih svojstava L-histidina

Ilić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:799954

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Marina Ilić

Ispitivanje oksido-redukcijskih svojstava L-histidina

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Medvidović- Kosanović

Neposredna voditeljica: dr. sc. Anamarija Stanković, poslijedoktorand

Osijek, 2019.

SAŽETAK

U ovom završnom radu su ispitivana oksido-redukcijska svojstva L-histidina u pH području od pH =4 do pH = 10, te stvaranje kompleksa L-histidina sa ionima prijelaznih metala (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{3+}) uporabom voltametrijskih metoda (cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije) te UV/VIS spektroskopije. Utvrđeno je da je L-histidin elektroaktivan pri pH = 10, u potpuno deprotoniranom obliku te da se oksidacijski produkt L-histidina adsorbira na površinu elektrode od staklastog ugljika. Također je utvrđeno da nastaju kompleksi L-histidina i metalnog iona (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{3+}) u omjeru 1:1 u puferu pH = 10.

Ključne riječi: L-histidin, ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, UV/VIS spektroskopija

ABSTRACT

In this final work, the oxido-reduction properties of L-histidine in pH range from pH=4 to pH=10 and formation of the L-histidine complex with transition metals (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} and Fe^{3+}) were studied by voltammetric methods (cyclic and differential pulse voltammetry) and UV / VIS spectroscopy. It was found that L-histidine was electroactive at pH = 10, in a completely deprotonated form, and that the oxidative product of L-histidine was adsorbed on the glassy carbon electrode surface. It has also been found that complexes of L-histidine and metal ions (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} and Fe^{3+}) were formed in a 1: 1 ratio in a buffer pH = 10.

Key words: L-histidine, cyclic voltammetry, differential pulsevoltammetry, UV/VIS spectroscopy

Sadržaj

1. UVOD 5
2. LITERATURNI PREGLED 6
   2.1. Aminokiseline 6
      2.1.1. L-histidin 8
   2.2. Metode određivanja L-histidina 10
      2.2.1. Voltametrijske metode 10
         2.2.1.1. Ciklička voltametrija 11
         2.2.1.2. Diferencijalna pulsna voltametrija 12
      2.2.2. UV/VIS spektrofotometrijske metode 13
3. EKSPERIMENTALNI DIO 15
   3.1. Kemikalije i priprema otopina 15
   3.2. Aparatura 17
      3.2.1. Voltametrijska mjerenja 17
      3.2.2. Spektrofotometrijska mjerenja 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
   4.1. Voltametrijska mjerenja 23
      4.1.1. Ciklička volumetrija 23
         4.1.1.1. L-histidin 23
         4.1.1.2. L-histidin i kobalt 24
         4.1.1.3. L-histidin i mangan 25
         4.1.1.4. L-histidin i nikal 26
         4.1.1.5. L-histidin i željezo 27
      4.1.2. Diferencijalna pulsna voltametrija 28
         4.1.2.1. L-histidin 28
         4.1.2.2. Utjecaj koncentracije L-histidina 29
         4.1.2.3. L-histidin i kobalt 31
         4.1.2.4. L-histidin i mangan 32
         4.1.2.5. L-histidin i nikal 33
         4.1.2.6. L-histidin i željezo 34
   4.2 UV/VIS mjerenja 36
5. ZAKLJUČAK 40
6. POPIS LITERATURE 41

1. UVOD

L-histidin spada u osnovnih 20 aminokiselina, iako je jedna od esencijalnih aminokiselina tijelo ju ne proizvodi nego se treba uzimati putem hrane. Namirnice koje sadrže histidin su meso, riba te neki mliječni proizvodi. L-histidin je potreban iz više razloga, bitan je za očuvanje zdravlja srca i krvožilnog sustava, poboljšanje imunološkog sustava. L-histidin se nalazi u krvnom serumu gdje mu je uloga prijenos bakra između krvi i tkiva[1].

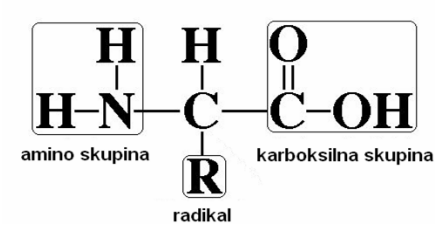
Cilj ovog rada je ispitivanje oksido-redukcijskih svojstava L-histidina pri različitim pH vrijednostima u puferima pH vrijednosti, pH = 4,6,8 i 10. Ispitivana je i adsorpcija oksidacijskog produkta L-histidina na površinu elektrode od staklastog ugljika te nastanak kompleksa L-histidina i iona prijelaznih metala (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{2+}) uporabom voltametrijskih metoda (cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije) te UV/VIS spektroskopije.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Aminokiseline

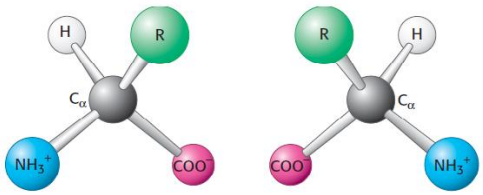
Proteini su najsvestranije molekule u živim sustavima, oni obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju različite molekule, osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, prenose živčane impulse, provode gibanje te kontroliraju rast[2].

Aminokiseline su osnovne građevne jedinice proteina. Sastoje se od amino-skupine, karboksilne skupine, vodikovog atoma i specifične R skupine (bočnog ogranka) vezanih na središnji ugljikov atoma, α-ugljik (*Slika 2.1.*) [2].



Slika 2.1. Opća struktura aminokiselina [2].

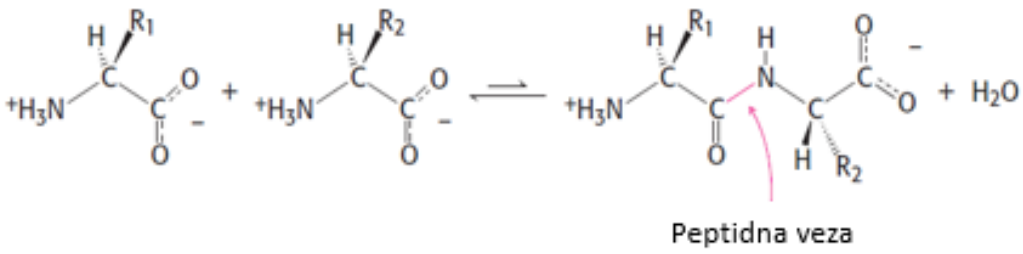
Zbog četiriju različitih skupina vezanih na α-ugljikov atom, aminokiseline su kiralne molekule; mogu postojati u dva zrcalno simetrična oblika, L-izomeri i D-izomeri. Gotovo sve aminokiseline imaju S apsolutnu konfiguraciju (*Slika 2.2.*)[2].



Slika 2.2. Zrcalna simetrija aminokiselina [2].

Aminokiseline u otopinama neutralne pH- vrijednosti postoje uglavnom kao dipolarni ioni (zwitter ioni). U dipolarnom obliku amino-skupina je protonirana ($-NH_3^+$), a karboksilna skupina deprotonirana ($-COO^-$). Ionizacijsko stanje aminokiselina se mijenja sa pH-vrijednošću. U proteinima razlikujemo dvadeset različitih bočnih ogranaka, koji se razlikuju oblikom, nabojem, sposobnošću za stvaranje vodikovih veza, hidrofobnošću i kemijskom reaktivnošću. Prema naboju bočnog ogranka, aminokiseline se dijele na neutralne (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, triptofan, metionin), polarne (glicin, serin, treonin, cistin, tirozin, asparagin, glutamin) i kisele (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina) ili bazične (lizin, arginin, histidin) [2].

Sama veza kojom se aminokiseline spajaju u proteinima zove se peptidna veza. Ona nastaje vezanjem α-karboksilne skupine jedne aminokiseline sa α-amino-skupinom druge aminokiseline. Tijekom samog procesa nastanka peptidne veze dolazi do gubitka vode. Ravnoteža ove reakcije je pomaknuta prema hidrolizi te je iz navedenog razloga za nastanak peptidne veze potrebno uložiti energiju (*Slika 2.3.*)[2].

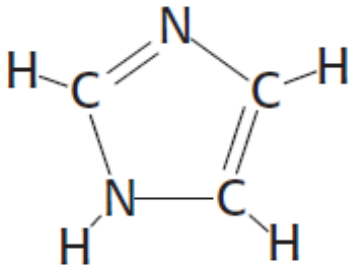


Slika 2.3. Nastanak peptidne veze [2].

2.1.1. L-histidin

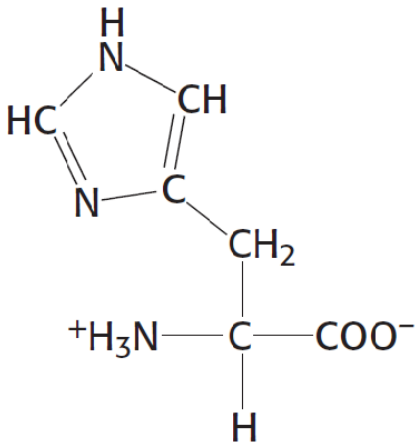
L-histidin spada u esencijalne aminokiseline koje tijelo ne proizvodi pa se one moraju unositi pomoću prehrane. Hrana bogata histidinom je govedina, piletina, janjetina, tuna, sir, jaja i soja. L-histidin je potreban organizmu iz više razloga: očuvanje zdravlja srca i krvožilnog sustava, poboljšanje imunološkog sustava i njegovog odgovora na infekcije. Osigurava ravnotežu minerala u krvi. L-histidin se nalazi u krvnom serumu gdje mu je uloga prijenos bakra iz krvi u tkiva[1].

Histidin spada u aminokiseline koje nose potpune naboje, te su iz toga razloga izrazito hidrofilne (*Slika 2.5.*). Sadržava imidazolnu skupinu tj.aromatski prsten koji može biti pozitivno nabijen (*Slika 2.4.*)[2].



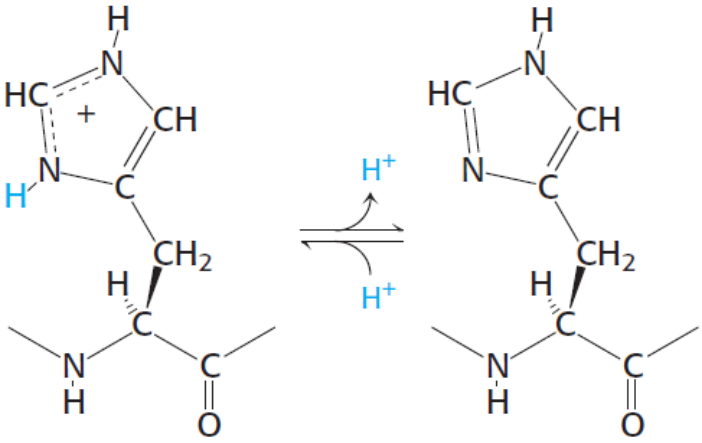
Slika 2.4. Struktura imidazolnog prstena [2].

Histidin ima tri potencijalna vezna mjesta: karboksilnu skupinu, imidozolni prsten i amino skupinu [7]. Vrijednost pKa za dušik imidazolnog prstena histidina je oko 6, pa iz tog razloga pri neutralnom pH imidazolna skupina može biti nenabijena ili pozitivno nabijena, ovisno o okruženju u kojem se nalazi[2].



Slika 2.5. Struktura histidina [2].

Sam histidin se često nalazi u aktivnim mjestima enzima, gdje tijekom enzimske reakcije dolazi do protoniranja i deprotoniranja imidazolnog prstena (*Slika 2.6.*) [2].



Slika 2.6. Prikaz procesa protoniranja i deprotoniranja histidina [2].

2.2. Metode određivanja L-histidina

2.2.1. Voltametrijske metode

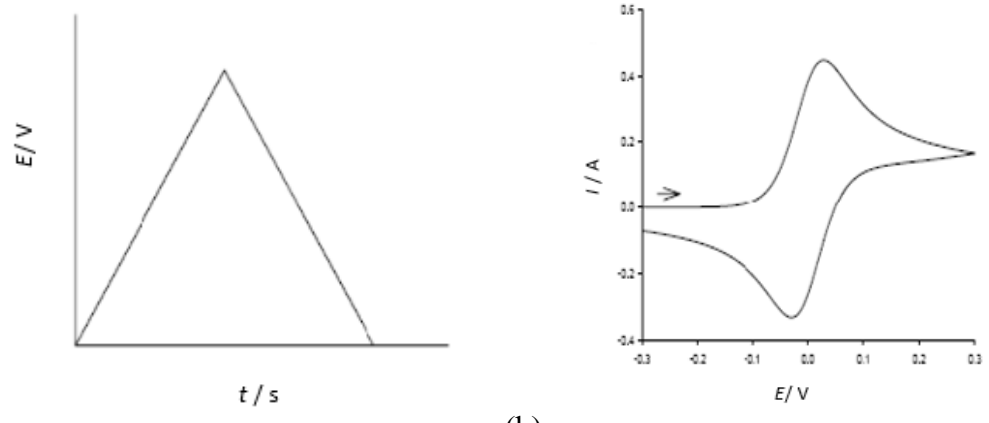
Voltametrijske metode pripadaju u skupinu elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje u ovisnosti o priključenom naponu pri uvjetima koji izazivaju polarizaciju neke indikatorske ili radne elektrode. Te metode su prikladne za određivanje mahanizama elektrokemijskih reakcija i reakcija koje prate elektrokemijsku reakciju [3,4].

Voltametrija se razvila iz polarografije koju je otkrio češki kemičar Jaroslav Heyrovsky 1922.godine. Nju često koriste kemičari koji se bave anorganskom i fizikalnom kemijom, i biokemijom. Voltametrijom se obavljaju temeljna proučavanja procesa oksidacije i redukcije u različitim sustavima. Proučavaju se adsorpcijski procesi na površinama i mehanizmi prijenosa elektrona na kemijski modificiranim površinama elektroda [4].

U voltametriji se promjenjivi potencijal koji se zove pobudni ili ekscitacijski signal, dovodi na elektrokemijski članak koji sadrži mikroelektrodu. Taj pobudni signal stvara tipičan strujni odziv na kojem se i temelji ova metoda. Oblik i vremenska ovisnost amplitude signala pobude mogu biti različiti. Kvalitativno tumačenje oblika signala odziva voltametrije slijedi iz analogije s oblikom signala odziva klasične polarografije. Obje metode imaju isti signal pobude, tj.linearno rastući napon. Razlikuju se po tome što u voltametriji koristimo radnu mikro elektrodu stalne površine, u otopini koja stalno miruje (stacionarna elektroda), a u polarografiji koristimo živinu kapajuću elektrodu kojoj se radna površina mijenja i neprestano obnavlja.Voltametrijski odziv ima oblik vrha a ne oblik klasičnog polarograma. Kod snimanja polarograma ne dolazi do izražaja iscrpljivanje otopine na elektroaktivnoj vrsti, zbog neprestanog povećanja radne površine rastuće živine kapi i redovitog otkapavanja i stvaranja nove kapi žive. Grafički prikaz signala odziva u voltametriji naziva se voltamogram [3,4]. Selektivnost analita posljedica je primijenjenog potencijala na radnu elektrodu. Elektroaktivne vrste iz otopine uzorka kreću se ka radnoj elektrodi gdje se odvija redoks-reakcija polučlanka.Redoks-reakcija drugog polučlanka odvija se na pomoćnoj elektrodi da se zatvori tok elektrona. Rezultirajuća struja koja teče kroz elektrokemijsku ćeliju mjera je aktiviteta (odnosno ≈koncentracije) uključenih elektroaktivnih vrsta[5].

2.2.1.1. Ciklička voltametrija

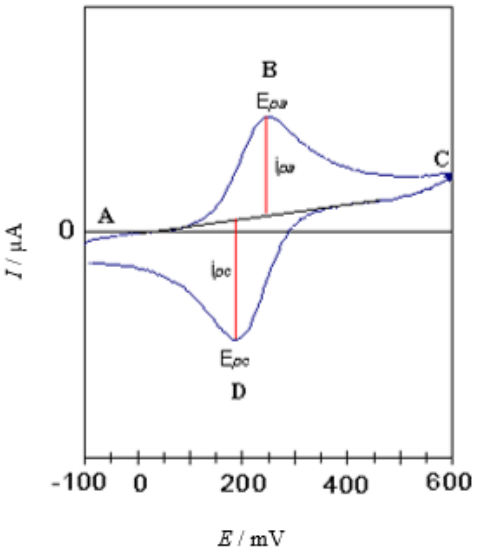
Ciklička voltametrija (CV) je jedna od najviše korištenih elektroanalitičkih metoda zbog mogućnosti studija i karakterizacije redoks sustava od makroskopskih razmjera pa do nanoelektroda. CV je slična voltametriji s linearnom promjenom potencijala osim što se potencijal mijenja od početnog do krajnjeg potencijala, potom obrće od krajnjeg potencijala nazad do početnog potencijala. Napon signala pobude od početka mjerenja se negativira, a zatim se kod određenog potencijala počinje pozitivirati. Promjene potencijala u oba smjera su linearne. Signal odziva ima karakterističan oblik s katodnim i anodnim vrhom. Signal pobude najprije linearno raste kroz određeno vrijeme. Pošto signal pobude dosegne izabranu vrijednost (*E*), promijeni se smjer posmika potencijala. U povratnom posmiku potencijala razvija se oksidacija produkta elektrodne reakcije redukcije (*Slika 2.7.*). U signalu odziva nastaje anodni vrh. Ako je potencijal kod kojeg se obavlja promjena smjera negativniji od potencijala vrha katodnog vala, signal odziva u povratnom smjeru ima isti oblik kao i katodni val, ali je položaj anodnog vala obrnut u odnosu prema katodnom valu. Grafički prikaz mjerenja cikličke voltametrije nazivamo ciklički voltamogram (*Slika 2.8.*). Veličine koje karakteriziraju ciklički voltagram jesu omjer visine polaznog i povratnog vala, te razlika potencijala vrhova katodnog i anodnog vala[3,5].



(a) (b)

Slika 2.7. Ciklička voltametrija na stacionarnoj elektrodi: pobuda (a) i odziv (b) [5].

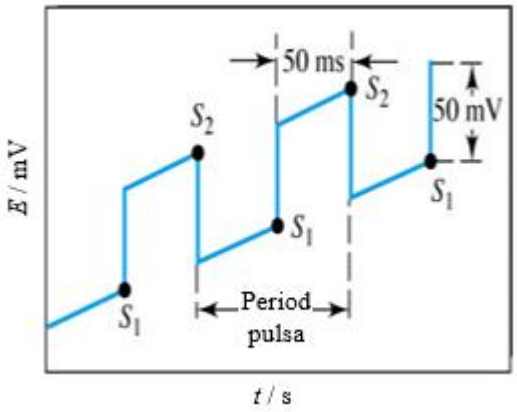
CV može brzo generirati novo oksidacijsko stanje pri promjeni potencijala s lijeva na desno i odrediti njegovo ponašanje pri obrnutoj promjeni. Prednosti cikličke voltametrije su da možemo kontrolirati brzine promjene potencijala, te možemo odrediti mehanizme i kinetiku redoks reakcija [5].



Slika 2.8.Prikaz cikličkog voltamograma jednostavnog sustava [5].

2.2.1.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

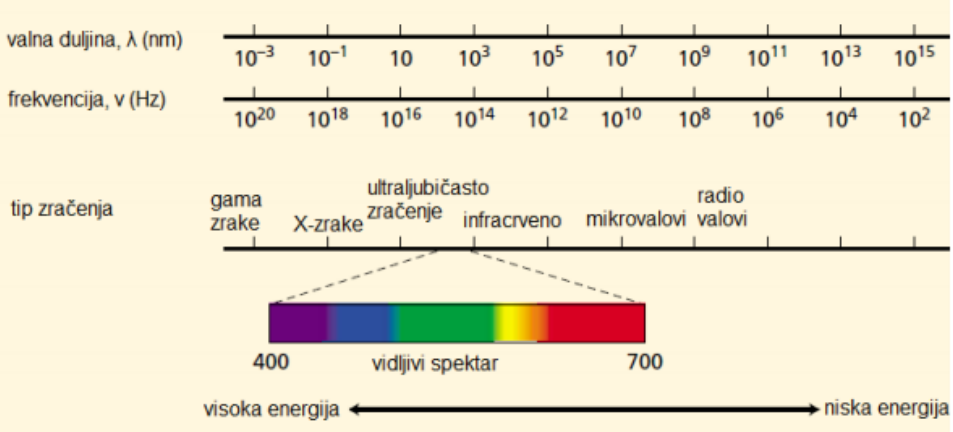
Osnovni signal pobude u diferencijalnoj pulsnoj voltametriji jest linearno rastući napon. Uz linearno rastući napon, superponira se mali kvadratični naponski impuls, amplitude od 10 mV do 100mV (*Slika 2.9.*). Diferencijalna pulsna voltametrija se često primjenjuje u elektrokemijskoj analizi, naročito za određivanje malih koncentracija odnosno tragova elektroaktivnih vrsta. Osim za analitičke svrhe, ta se metoda koristi i za karakterizaciju molekularne građe čestica elektroaktivne tvari u otopini. Određivanje se vrši s obzirom na vrstu i stupanj kompleksiranja, oksidacijsko stanje i kiselo-bazna svojstva [3].



Slika 2.9. Prikaz signala pobude i karakterističnog vremena primjene impulsa napona kod diferencijalne pulsne voltametrije [5].

2.2.2. UV/VIS spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija se odnosi na granu znanosti koja se bavi svjetlošću, tj.vidljivim zračenjem, razlučenom u komponente, valne duljine, koje tvore spektar. Spektroskopija se pokazala široko primjenjivom metodom kako u kvalitativnoj, tako i u kvantitativnoj analitičkoj kemiji. Tijekom vremena značenje spektroskopije se proširilo, uz proučavanje svjetlosti uključujući i druge vrste elektromagnetskog zračenja kao što su X-zrake, ultraljubičasto, infracrveno, mikrovalno i radiofrekvencijsko zračenje (*Slika 2.10.*).



Slika 2.10. Prikaz elektromagnetskog spektra [8].

Primjena spektroskopskih metoda danas je proširena i na tehnike koje ne uključuju elektromagnetsko zračenje, kao što su akustična, masena i elektronska spektroskopija. Elektromagnetsko zračenje je energija koja velikom brzinom prolazi prostorom [4].

Kod samog prolaza zračenja nije potrebno sredstvo za širenje, te se ono može prenositi i vakuumom. Poznata je dualna priroda zračenja (elektromagnetsko zračenje ima čestična i valna svojstva) koja se međusobno ne isključuje nego se radi o komplementarnim svojstvima. Valni parametri su:1) amplituda vala (A) koja se definira kao duljina električnog vektora u maksimumu vala, 2) period zračenja (p) koji označava vrijeme potrebno za prolaz uzastopnih maksimuma ili minimuma čvrstom točkom u prostoru, 3) frekvencija (ν) predstavlja broj titraja električnog polja u sekundi, 4) brzina (v) kojom fronta vala prolazi sredstvom te 5) valna duljina (λ) koja se definira kao linearna udaljenost između dva uzastopna valna maksimuma. Čestična svojstva se temelje na pretpostavci da se elektromagnetsko zračenje sastoji od čestica zvanih fotoni. Energija fotona (E) ovisi o frekvenciji zračenja (v) a definirana je jednadžbom (2.1):

$$E=h\nu \tag{2.1}$$

gdje je h Planckova konstanta koja iznosi $6{,}63\cdot10^{-34}$ Js. Energija fotona se može definirati i jednadžbom (2.2) kao omjer umnoška brzine svjetlosti (c) i Planckove konstante (h) te valne duljine (λ) [4]:

$$E=\frac{hc}{\lambda} \tag{2.2}$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i priprema otopina

Osnovna pripremljena otopina je otopina L-histidina koncentracije $1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, koju smo pripremili otapanjem 0,07750 g čvrstog L-histidina u 50 cm^3 ultračiste vode. Priprema otopina L-histidina različitih koncentracija prikazana je u *Tablici 3.1*. Ukupan volumen svake otopine iznosio je 15 cm^3. Otopine su pripremljene razrjeđivanjem koncentrirane otopine L-histidina sa otopinom pufera pH = 10.

Tablica 3.1. Priprema otopina L-histidina (His) različitih koncentracija, razrjeđivanjem standardne otopine L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}) pomoću pufera pH = 10.

$10^4 \cdot c$ (His)/ mol dm^{-3}	***V* (0,01 M His)/ cm^3**	***V*(pufer, pH=10)/ cm^3**
1	0,15	14,85
2	0,30	14,70
4	0,60	14,40
6	0,90	14,10
8	1,20	13,80
10	1,50	13,50
30	4,50	10,50
50	7,50	7,50

Pufer pH = 4 pripremljen je miješanjem 211,75 cm^3 octene kiseline (c = 0,1 mol dm^{-3}) i 38,25 cm^3 natrijevog acetata (c = 0,1 mol dm^{-3}). Pufer pH = 6 pripremljen je miješanjem 13,05 cm^3 octene kiseline (c = 0,1 mol dm^{-3}) i 236,95 cm^3 natrijevog acetata (c = 0,1 mol dm^{-3}). Pufer pH = 8 pripremljen je miješanjem 10,6 cm^3 natrijevog dihidrogenfosfata (c = 0,2 mol dm^{-3}) i 189,4 cm^3 natrijevog hidrogenfosfata (c = 0,2 mol dm^{-3}). Pufer pH = 10 pripremljen je miješanjem 50 cm^3 natrijevog bikarbonata (c = 0,05 mol dm^{-3}) i 10,7 cm^3 natrijevog hidroksida (c = 0,1 mol dm^{-3}).

Korištene kemikalije za pripremu otopina kompleksa navedene su u *Tablici 3.2*. Otopine koncentracije 0,01 mol dm^{-3} pripremljene su u odmjernoj tikvici volumena 50 cm^3 sa ultračistom vodom. Potrebna masa za pripremu svake otopine, kao i molarna masa odgovarajućeg spoja, prikazani su u *Tablici 3.3*.

Prilikom voltametrijskih mjerenja uzimali smo jednake volumene L-histidina i otopine soli prijelaznih metala u omjeru 1:1, tj. 0,15 cm^3otopine L-histidina i 0,15 cm^3 otopine soli metala, te 14,70 cm^3otopine pufera pH = 10. Ukupan volumen otopine u voltametrijskim mjerenjima iznosio je 15 cm^3.

Tablica 3.2.Popis naziva kemikalija, molekulskih formula i njihovih proizvođača korištenih u radu.

Naziv kemikalije	**Molekulska formula**	**Proizvođač**
Željezov(III)nitrat nonahidrat	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	T.T.T. d.o.o., Sveta nedjelja, Hrvatska
Kobaltov(II)nitrat heksahidrat	$CoN_2O_6 \cdot 6H_2O$	VWR Chemicals, Pennsylvania, SAD
Kadmijev nitrat tetrahidrat	$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Manganov(II) nitrat hidrat	$Mn(NO_3)_2 \cdot H_2O$	Alfa Aesar, Massachussets, USA
Kalcijev nitrat tetrahidrat	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	T.T.T. d.o.o., Sveta nedjelja, Hrvatska
Niklov(II) nitratheksahidrat	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	VWR Chemicals, Pennsylvania, SAD

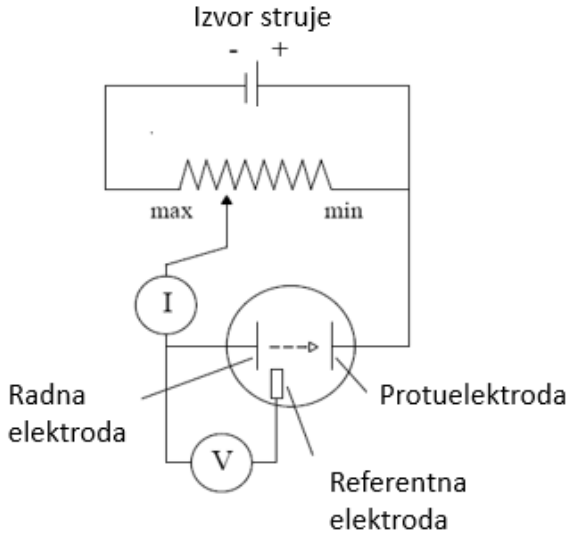
Tablica 3.3.Popis naziva kemikalija, molekulskih formula, molarnih masa i masa kemikalija potrebnih za pripremu otopina soli prijelaznih metala.

Naziv kemikalije	**Molekulska formula**	**Mr / g·mol^{-1}**	***m* / g**
Željezov(III)nitrat nonahidrat	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	404,4	0,202
Kobalt(II)nitrat heksahidrat	$CoN_2O_6 \cdot 6H_2O$	291,03	0,146
Kadmijev nitrat tetrahidrat	$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	308,47	0,154
Manganov(II) nitrat hidrat	$Mn(NO_3)_2 \cdot H_2O$	178,95	0,089
Kalcijev nitrat tetrahidrat	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	0,118
Niklov(II) nitratheksahidrat	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	290,81	0,145

3.2. Aparatura

3.2.1. Voltametrijska mjerenja

Danas se sve više za odrađivanje ovih metoda koriste elektronički sklopovi analogne tehnike, kao i mikroračunala. Računala se koriste za kontrolu i generiranje potrebnih električnih signala te za vođenje cjelokupnog postupka mjerenja i obrade izmjerenih veličina [2]. Uređaj za izvođenje voltametrijskih mjerenja sadrži članak koji se sastoji od tri elektrode uronjene u otopinu analita i elektrolita koji ne sudjeluje u elektrokemijskoj reakciji, a zove se inertni elektrolit. Jedna od triju elektroda je mikroelektroda ili radna elektroda. Potencijal koje se održava na određenoj poznatoj vrijednosti, ili se kao u voltametriji s linearnom promjenom potencijala, mijenja linearno s vremenom (*Slika 3.1.*) [4].



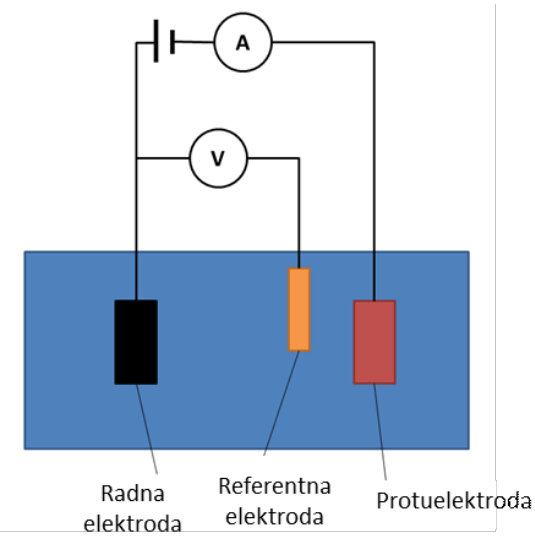
Slika 3.1. Shematski prikaz aparature za voltametrijska mjerenja [5].

Radna elektroda je mala, čime se pojačava njena sklonost polarizaciji. Druga elektroda je referentna elektroda i njen potencijal ostaje stalan tijekom mjerenja. Treća elektroda je pomoćna elektroda (odnosno protuelektroda), koja je često svitak platinske žice ili posuda sa živom, i koja omogućava tok struje od izvora kroz otopinu do mikroelektrode [4].

Kod voltametrije i cikličke voltametrije u analitičkoj praksi se najčešće koriste živine elektrode, najčešće viseća živina kap elektroda. Pri uporabi živine radne elektrode izražene su sve prednosti, a to su posebno idealna reproducibilnost i obnovljivost čiste radne površine elektrode. Osim živine elektrode u voltametriji se koriste i čvrste elektrode male površine. Izrađene su od plemenitih metala: platine, zlata, rodija, iridija, srebra i drugih kovina. Rabe se i elektrode od ugljika (grafita) odnosno od spojeva ugljika. To su elektrode izrađene od staklastog ugljika, grafitne paste, u vosku impregniranog grafita odnosno bor-karbida. Nedostaci čvrstih elektroda su slaba reprodukcija radne površine i njezino lako onečišćenje. Kao referentne elektrode koristi se najčešće zasićena kalomel elektroda [3].

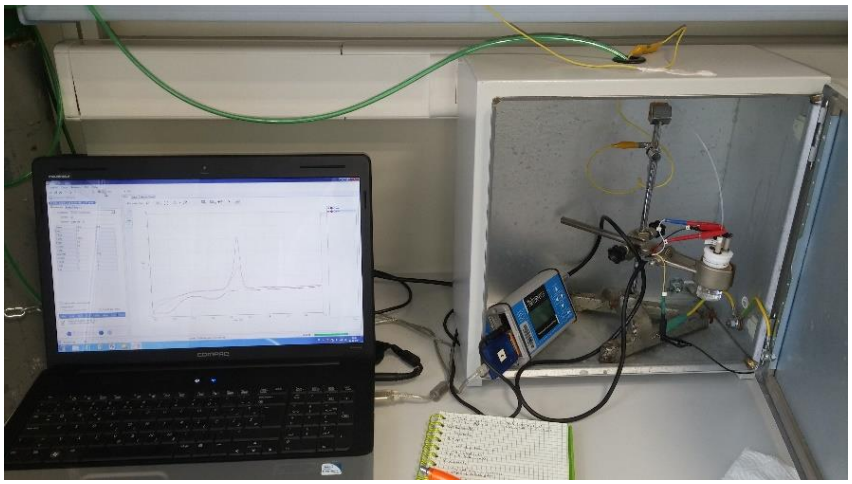
Mikroelektrode koje se upotrebljavaju u voltametriji različitog su oblika i sastava. To su često mali plosnati diskovi izrađeni od vodiča koji su utisnuti u štapić od inertnog materijala, kao što je teflon ili Kel-F (Kel-F: također znan kao poliklorotrifluoroetilen ili Neoflon), i u koji je zataljena žica za spajanje. Vodič može biti od inertnih kovina kao što su platina ili zlato, pirolitički grafit ili staklasti grafit, od poluvodiča kao što su kositar ili indijev oksid te od kovina presvučenih tankim slojem žive. Područje potencijala koje se može

upotrijebiti s ovim elektrodama u vodenim otopinama je promjenjivo i ne ovisi samo o građi elektrode, već i o sastavu otopine u kojoj su elektrode uronjene (*Slika 3.2.*) [4].



Slika 3.2. Prikaz troelektrodnog sustava korištenog za voltametrijska mjerenja [5].

Voltametrijska mjerenja u ovom radu izvedena su pomoću PalmSens potenciostata/galvanostata spojenog na računalo (*Slika 3.3.*). PSTrace računalni program se koristio za akviziciju i obradu podataka. Mjerenja su provedena u troelektrodnom sustavu pri sobnoj temperaturi ($\theta = 25 \pm 1°$ C) u Faradayevom kavezu. Elektrokemijska ćelija sastojala se od radne, referentne i protuelektrode, te cjevčice za uvođenje argona. Prije svakog mjerenja, uzorak je propuhivan argonom visoke čistoće Ar 5 (ϕ_{Ar} = 99,999%) 1-2 minute. Ukupan volumen ispitivane otopine iznosio je 15 cm^3 [6].



Slika 3.3. Aparatura za voltametrijska mjerenja koja se sastoji od PalmSens potenciostata/galvanostata, računala s odgovarajućim računalnim programom i boce inertnog plina argona visoke čistoće [6].

Za cikličku i diferencijalno pulsnu voltametriju koristile su se jednake elektrokemijske ćelije. Radna je elektroda (*Slika 3.4.)* od staklastog ugljika (ALS Co., Japan). Površina radne elektrode iznosila je 0,018 cm^2 [6].



Slika 3.4. Radna elektroda od staklastog ugljika (ALS Co., Japan) [6].

Referentna Ag/AgCl elektroda prikazana je na *slici 3.5.* Kao i ostale Ag/AgCl elektrode i ova elektroda sačinjena je od srebrne žice uronjene u zasićenu otopinu srebrovog klorida. Kloridni ioni kontroliraju potencijal elektrode i aktivitet Ag^+ iona [6].



Slika 3.5. Referentna srebro/srebrov klorid elektroda (Ag/AgCl) čiji je unutrašnji elektrolit 3 mol dm^{-3} KCl (ALS Co., Japan) [6].

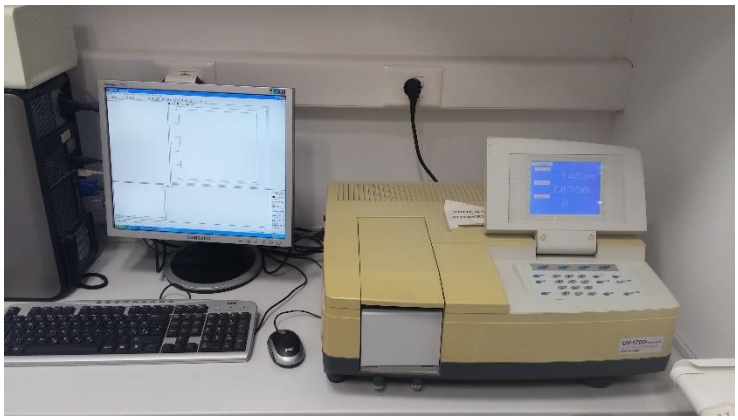
Protuelektroda služi za zatvaranje strujnog kruga elektrokemijske ćelije i najčešće se koristi platinska žica. Na *slici 3.6.* prikazana je protuelektroda duljine 3 cm koja je korištena u ovom radu [6].



Slika 3.6. Protuelektroda sačinjena od platinske žice (ALS, Japan) [6].

3.2.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Spektrofotometrijska mjerenja obuhvaćala su ultraljubičasto, vidljivo područje, ali i blisko infracrveno područje. Raspon valnih duljina tijekom mjerenja varirao je od 250 nm do 1000 nm. Shimadzu 1700 je instrument koji se koristio za UV/VIS mjerenja. Uređaj je povezan s računalom koje sadrži računalni program UVProbe za akviziciju i obradu podataka (*Slika 3.7.*). Ovaj instrument spada u vrstu dvosnopnih spektrofotometara gdje se paralelno mjeri apsorbancija referentne otopine i oduzima od apsorbancije otopine uzorka [6].



Slika 3.7. Aparatura za UV/VIS mjerenja, Shimadzu 1700 [6].

4. REZULTATI I RASPRAVA

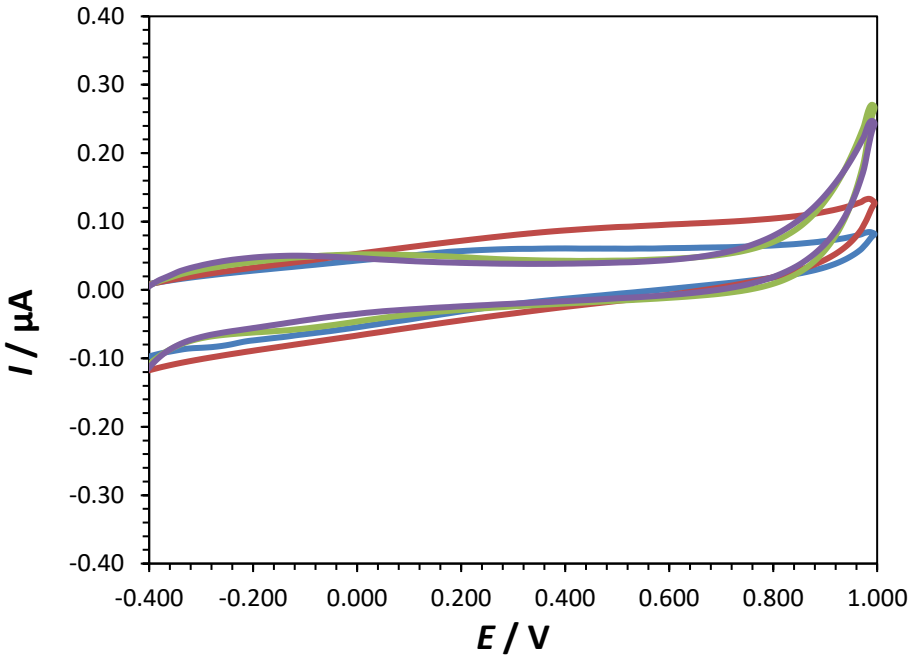
4.1. Voltametrijska mjerenja

U ovom radu su za ispitivanje oksido-redukcijskih svojstava L-histidina, te njegovog kompleksiranja sa metalnim ionima Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{3+} korištene dvije voltametrijske metode, ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija. Mjerenja su izvedena u fosfatnom puferu pH = 10, pa se navedeni pufer koristio kao slijepa proba.

4.1.1. Ciklička volumetrija

4.1.1.1. L-histidin

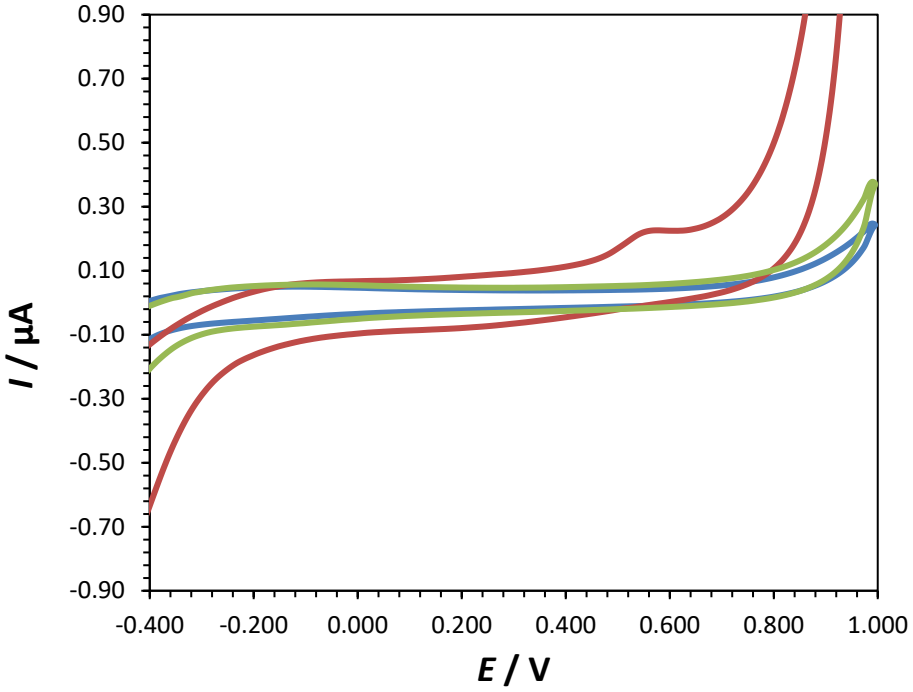
Na *slici 4.1.* je prikazani su ciklički voltamogrami L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u pH području pod pH = 4 do pH = 10. Iz cikličkih voltamograma je vidljivo da L-histidin nije elektroaktivan u ispitivanom pH području.



Slika 4.1. Ciklički voltagrami L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4 (—), 6 (—), 8 (—) i 10 (—). Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV/s.

4.1.1.2. L-histidin i kobalt

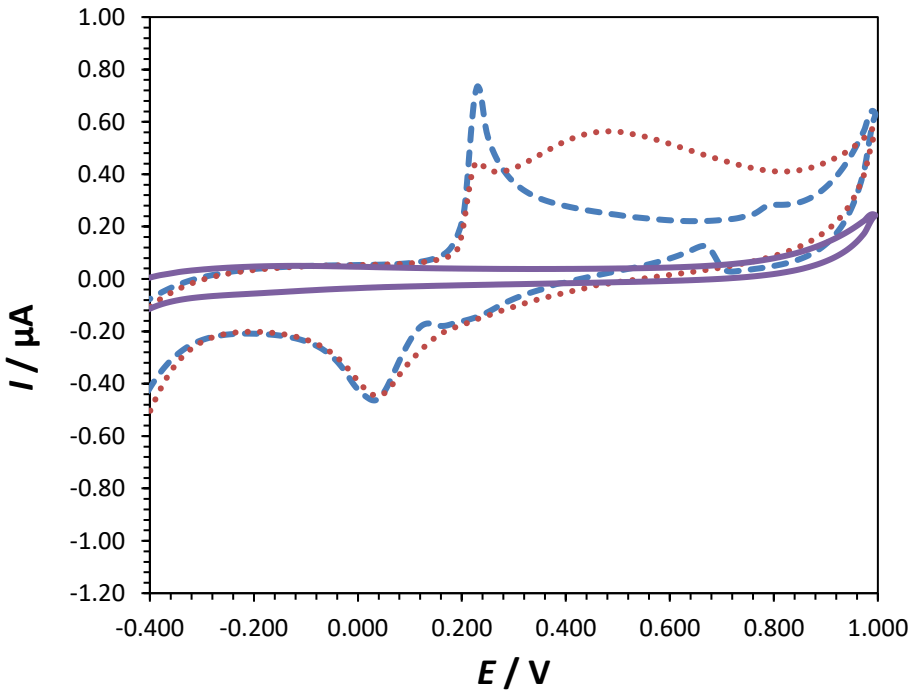
Na *slici 4.2.* prikazani su ciklički voltamogrami L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}), kobaltovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i kobalta u omjeru 1:1. Iz mjerenja se vidi da L-histidin i kobaltov nitrat nisu elektroaktivni u puferu pH = 10 dok se u otopini L-histidina i kobalta pojavljuje oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, $E = 0{,}55$ V; koji se odnosi na oksidaciju kobalta u nastalom kompleksu.



Slika 4.2. Ciklički voltagrami otopine L-histidina (—), $Co(NO_3)_2$ (—) te kompleksa L-histidina i kobalta u omjeru 1:1 (—) ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 10. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV/s.

4.1.1.3. L-histidin i mangan

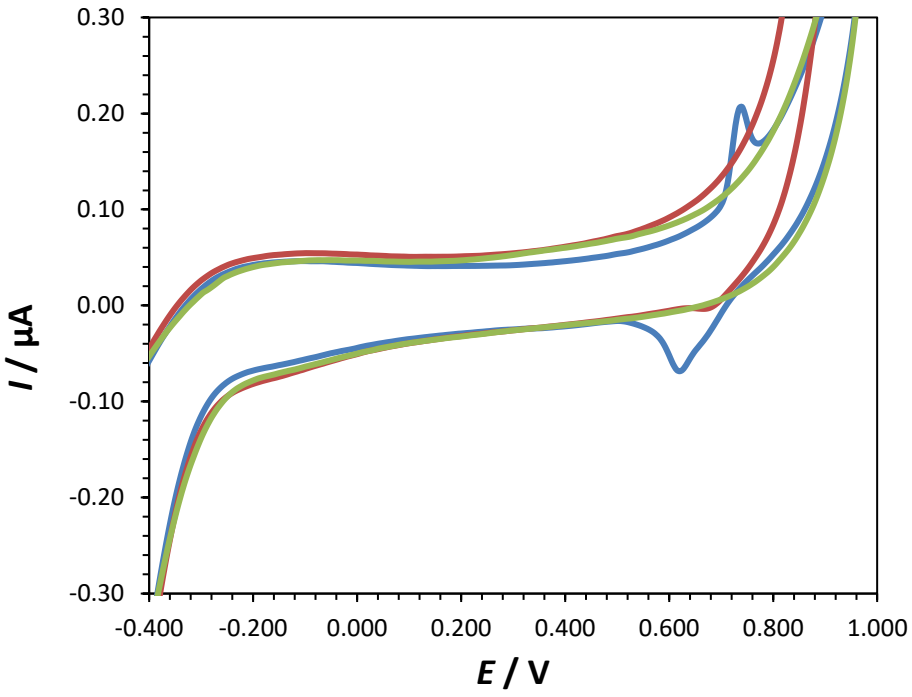
Na *slici 4.3.* prikazani su ciklički voltagrami L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}), manganovog nitrata (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i mangana u omjeru 1:1.Iz mjerenja se vidi da L-histidin nije elektroaktivan u puferu pH = 10 dok se u cikličkom voltamogramu manganovog kloride vide dva oksidacijska strujna vrha, jedan mali oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,24 V i jedan široki strujni vrh (shoulder) pri potencijalu; E = 0,47 V te jedan redukcijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,05 V. Prvi oksidacijski strujni vrh se odnosi na oksidaciju mangana iz Mn^0 u Mn^{2+} a drugi na oksidaciju Mn^{2+} u Mn^{4+}. Redukcijski strujni vrh se odnosi na redukciju mangana iz Mn^{4+} u Mn^{2+}. Ciklički voltamogram otopine L-histidina i mangana pokazuje jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,230 V i jedan redukcijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,035 V, koji se odnose na oksidaciju i redukciju mangana u kompleksu.



Slika 4.3. Ciklički voltagrami otopine L-histidina(—), $Mn(NO_3)_2$(••••) te kompleksa L-histidina i mangana u omjeru 1:1 (----) (c= 1·10^{-4} mol dm^{-3}) u puferu pH = 10. Brzina polarizacije elektrode, ν = 100 mV/s.

4.1.1.4. L-histidin i nikal

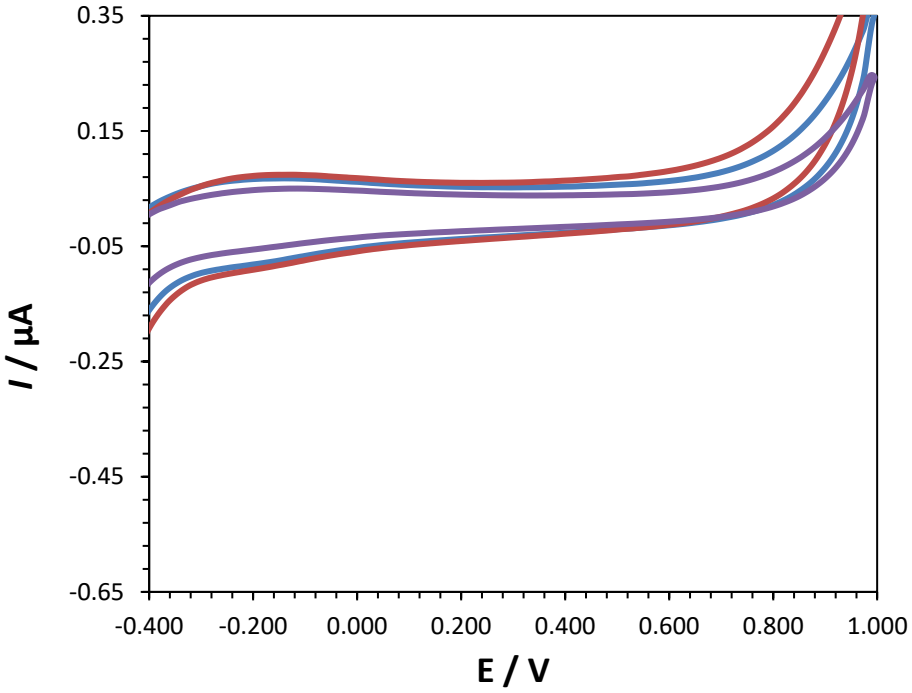
Na *slici 4.4.* prikazani su ciklički voltagrami L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}), niklovog nitrata (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i nikla u omjeru 1:1. Mjerenje pokazuje da L-histidin nije elektroaktivan u puferu pH = 10, a ciklički voltamogram niklovog nitrata pokazuje jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,730 V, koji se odnose na oksidaciju Ni^0 u Ni^{2+} te jedan redukcijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,625 V, koji se odnosi na redukciju Ni^{2+} u Ni^0. Ciklički voltamogram otopine L-histidina i nikla ne pokazuje oksido-redukcijske strujne vrhova karakteristične za nekompleksirani nikal, što se može objasniti postojanjem interakcija između L-histidina i nikla u otopini pufera.



Slika 4.4. Ciklički voltagrami otopine L-histidina(—), $Ni(NO_3)_2$ (—) te otopine L-histidina i Ni^{2+} iona u omjeru 1:1 (—) (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) u puferu pH = 10. Brzina polarizacije elektrode, ν = 100 mV/s.

4.1.1.5. L-histidin i željezo

Na *slici 4.5.* prikazani su ciklički voltagram L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}), željezovog(III) nitrata (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i željeza (III) u omjeru 1:1. Mjerenja pokazuju da L-histidin i željezov(III) nitrat nisu elektroaktivni u puferu pH = 10, a nisu vidljivi ni oksido-redukcijski strujni vrhovi u otopini L-histidina i željeza te cikličkom voltametrijom nije utvrđeno nastajanje kompleksa L-histidina i željeza.

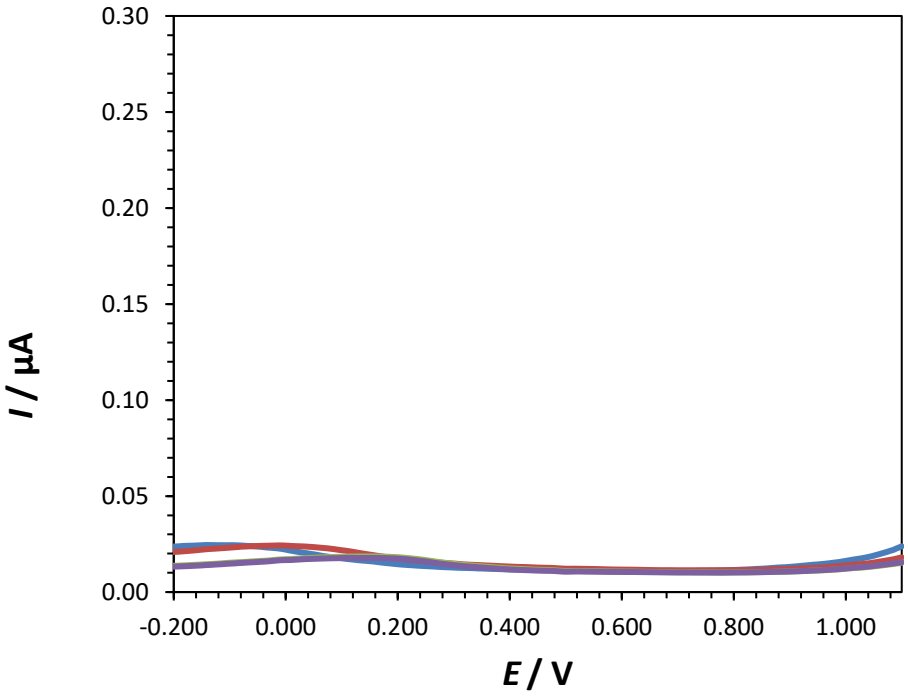


Slika 4.5. Ciklički voltagrami otopine L-histidina (—), $Fe(NO_3)_3$ (—) te otopine L-histidina i Fe^{3+} iona u omjeru 1:1 (—) (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) u puferu pH = 10. Brzina polarizacije elektrode, ν = 100 mV/s.

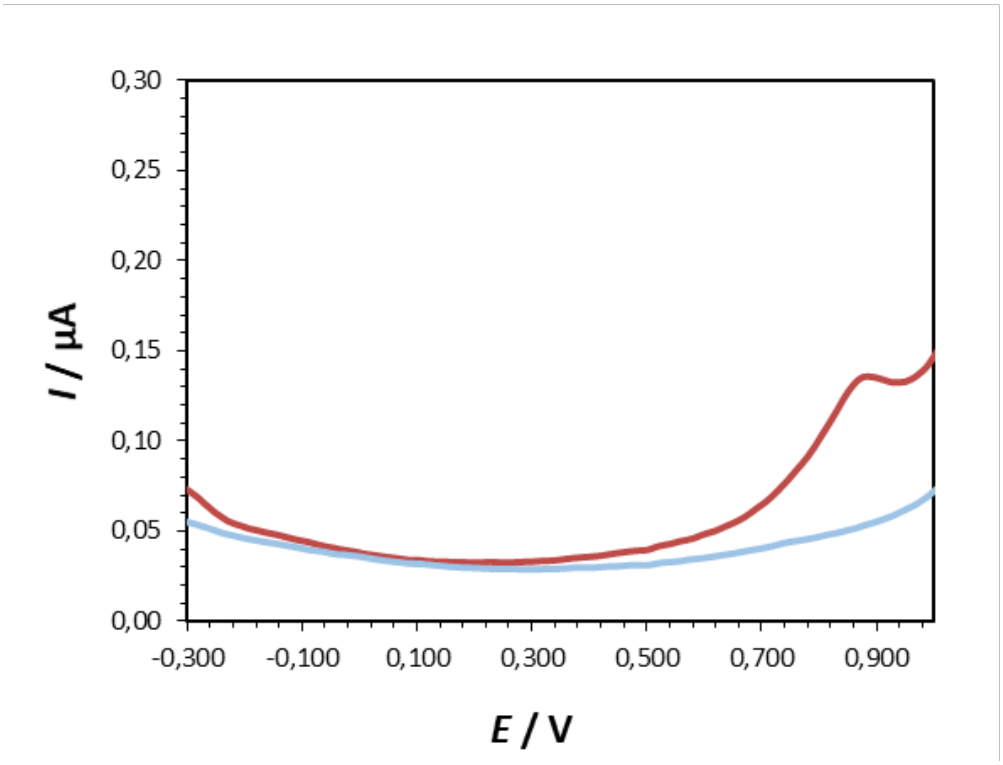
4.1.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

4.1.2.1. L-histidin

Na *slici 4.6.* prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) snimljeni u pH području od pH = 4 do pH = 8. Iz slike je vidljivo da L-histidin nije elektroaktivan u ispitivanom pH području. Na *slici4.7.* prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram L-histidina u puferu pH = 10. Pri toj pH vrijednosti uočen je jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,890 V, koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena L-histidina.



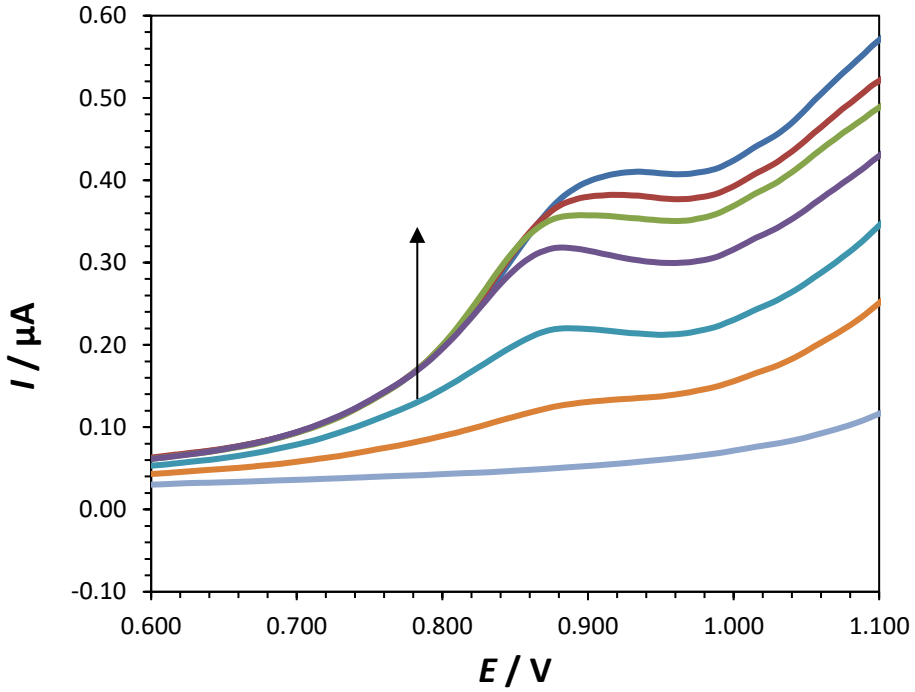
Slika 4.6. Diferencijalni pulsni voltagrami L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4 (—), 6 (—) i 8 (—). Brzina polarizacije elektrode, ν = 5 mV/s.



Slika 4.7. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—) i L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 (—). Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 5$ mV/s.

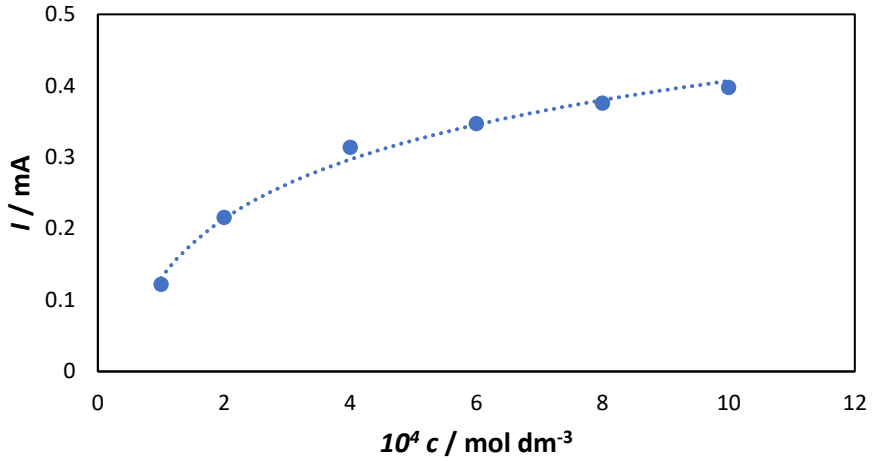
4.1.2.2. Utjecaj koncentracije L-histidina

Na *slici 4.8.* prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami otopina L-histidina u puferu pH = 10 različitih koncentracija (koncentracija je varirala od $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} do $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}). Iz slike je vidljivo da struja oksidacijskog strujnog vrha raste s povećanjem koncentracije L-histidina.



Slika 4.8. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—) i otopina L-histidina različitih koncentracija: c=1·10^{-3} (—), 8·10^{-4}(—), 6·10^{-4} M (—), 4·10^{-4} (—), 2·10^{-4} (—), 1·10^{-4} (—) mol dm^{-3} u puferu pH = 10.Brzina polarizacije elektrode, ν = 5 mV/s.

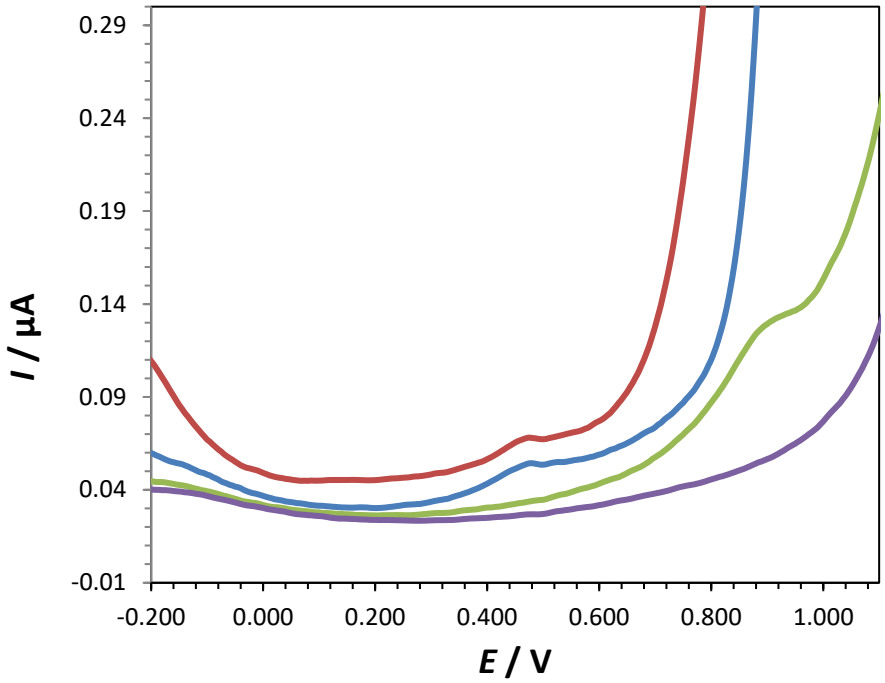
Na *slici 4.9.* prikazana je struja oksidacijskog strujnog vrha L-histidina kao funkcija njegove koncentracije (podaci su uzeti iz slike 4.8). Iz slike je vidljivo da struja oksidacijskog strujnog vrha (I_p) linearno raste s koncentracijom L-histidina do c ~ 4·10^{-4} mol dm^{-3} (odvija se proces adsorpcije oksidacijskog produkta L-histidina na površinu elektrode od staklastog ugljika. Pri višim koncentracijama L-histidina, struja anodnog strujnog vrha raste sporije (više nema linearne ovisnoti I_p o c), što se može objasniti postojanjem interakcija između molekula adsorbiranih na površinu radne elektrode i molekula okasidacijskog produkta L-histidina koje difundiraju iz otopine prema površini radne elektrode.



Slika 4.9. Prikaz ovisnosti oksidacijske struje (I_p) o koncentraciji L-histidina.

4.1.2.3. L-histidin i kobalt

Na *slici 4.10.* prikazani su diferencijalni pulsni voltagrami L-histidina (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}), kobaltovog nitrata (c = 1·10^{-4} mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i kobalta u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da L-histidin ima oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,890 V, koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena L-histidina. Diferencijalni pulsni voltamogram kobaltovog nitrata pokazuje oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,460 V i odnosi se na oksidaciju kobalta iz Co^0 u Co^{2+}, dok je u diferencijalnom pulsnom voltamogramu otopine L-histidina i kobalta u omjeru 1:1 vidljiv jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,480 V, koji se odnosi na oksidaciju kobalta u kompleksu.

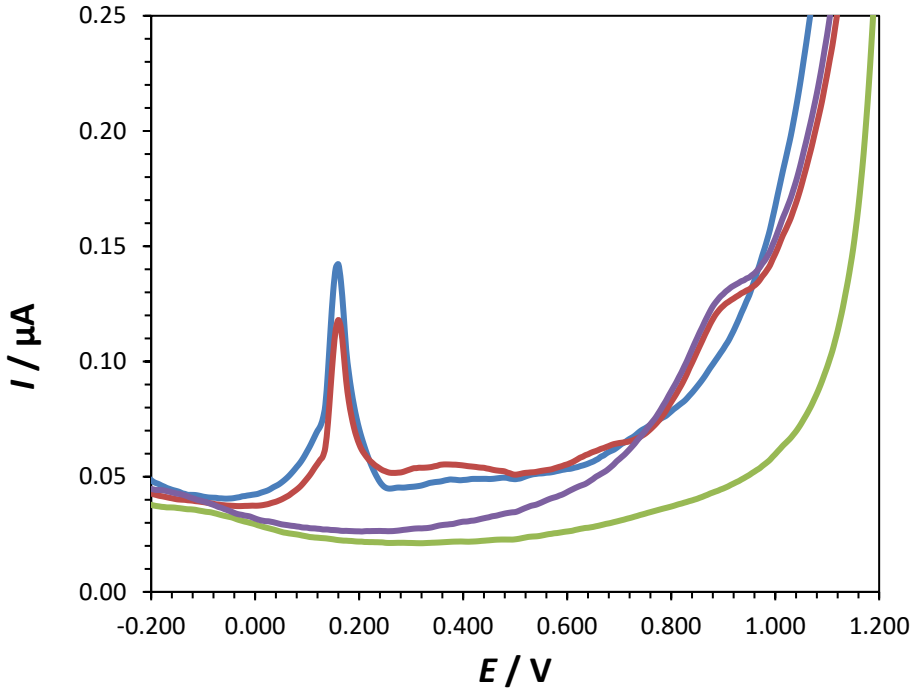


Slika4.10. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—),L-histidina (—), $Co(NO_3)_2$ (—) te kompleksa L-histidina i kobalta u omjeru 1:1 (—) (c= $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 10.

4.1.2.4. L-histidin i mangan

Na *slici 4.11.* prikazani su diferencijalni pulsni voltagrami L-histidina (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}), manganovog nitrata (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i mangana u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da L-histidin ima oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,890 V, koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena L-histidina. Diferencijalni pulsni voltamogram manganovog nitrata pokazuje oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0170 V, koji se odnosi na oksidaciju Mn^0 u Mn^{2+}. U diferencijalnom pulsnom voltamogramu otopine L-histidina i mangana u omjeru 1:1 vidljiva su tri oksidacijska strujna vrha, prvi pri potencijalu, E = 0,170 V (odnosi se na oksidaciju Mn^0 u Mn^{2+}), drugi (novi) oksidacijski strujni vrh pri potencijalu,

E = 0,370 V (odnosi se na oksidaciju mangana u kompleksu) te treći pri potencijalu, E = 0,890 V koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena.

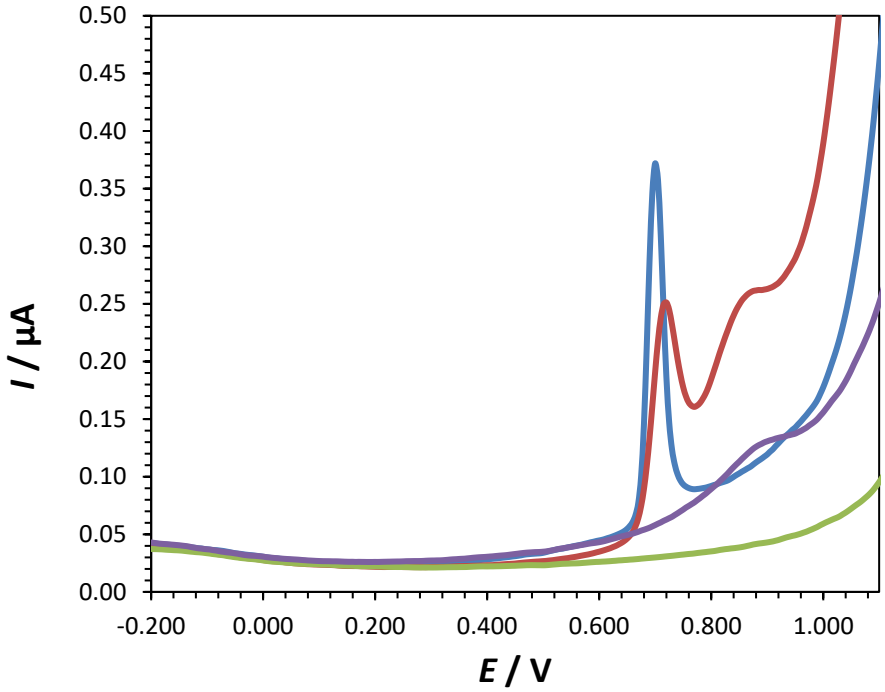


Slika 4.11. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—), L-histidina (—), $Mn(NO_3)_2$(—) te kompleksa L-histidina i mangana u omjeru 1:1 (—) (c= $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 10.

4.1.2.5. L-histidin i nikal

Na *slici 4.12.* prikazani su diferencijalni pulsni voltagrami L-histidina (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}), niklovog nitrata (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i nikla u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da L-histidin ima oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,890 V, koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena L-histidina. Diferencijalni pulsni voltamogram niklovog nitrata pokazuje oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,700 V, koji se odnosi na oksidaciju Ni^0 u Ni^{2+}. U diferencijalnom pulsnom voltamogramu otopine L-histidina i nikla u omjeru 1:1 vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha, prvi pri potencijalu, E = 0,725 V koji

se odnosi na oksidaciju nikla u kompleksu te drugi pri potencijalu, E =0,865 V koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena.

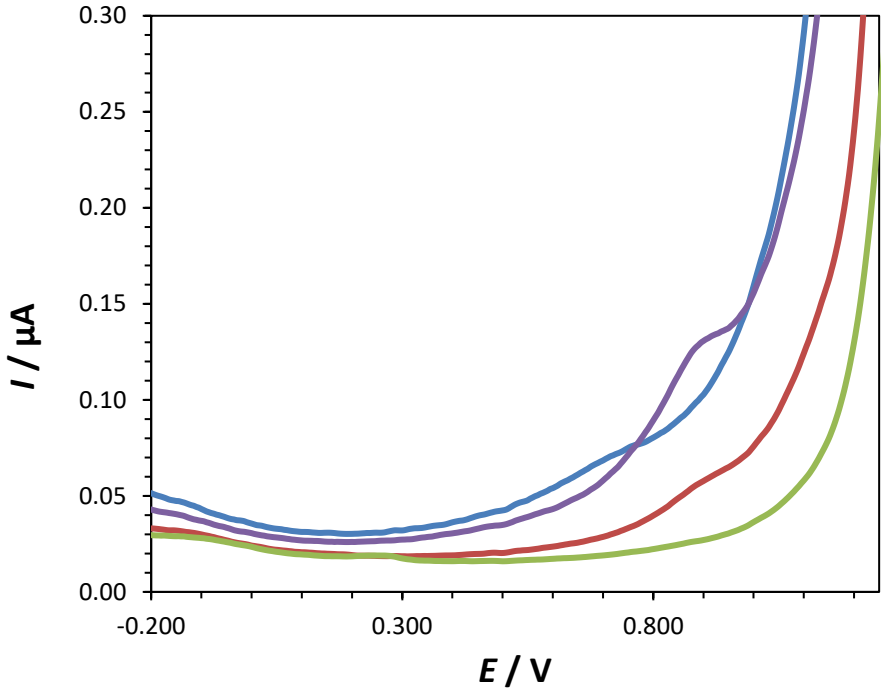


Slika 4.12. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—), L-histidina (—), $Ni(NO_3)_2$ (—) te kompleksa L-histidina i nikla u omjeru 1:1 (—) (c= $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 10.

4.1.2.6. L-histidin i željezo

Na *slici 4.13.* prikazani su diferencijalni pulsni voltagrami L-histidina (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}), željezovog(III) nitrata (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) te otopine L-histidina i željeza (III) u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da L-histidin ima oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E = 0,890 V, koji se odnosi na oksidaciju imidazolnog prstena L-histidina, dok je diferencijalni pulsni voltamogram željeza pokazao oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, E =0,665 V. U diferencijalnom pulsnom voltamogramu otopine L-histidina i željeza (III) u omjeru 1:1 vidljiv je jedan oksidacijski strujni vrh, prvi pri potencijalu, E=0,880 V, koji se odnosi na oksidaciju

imidazolnog prstena, dok oksidacijski strujni vrh nekomplesiranog željeza nije vidljiv. To se može objasniti postojanjem interakcija između L-histidina i željeza (III) u otopini pufera.

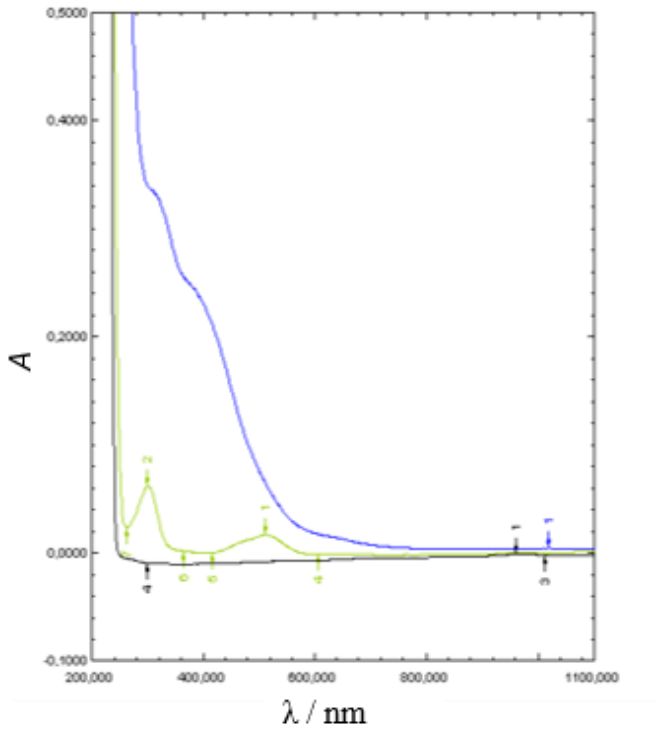


Slika 4.13. Diferencijalni pulsni voltagrami slijepe probe (—), L-histidina (—), $Fe(NO_3)_3$ (—) te kompleksa L-histidina i željeza u omjeru 1:1 (—) (c= $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 10.

4.2 UV/VIS mjerenja

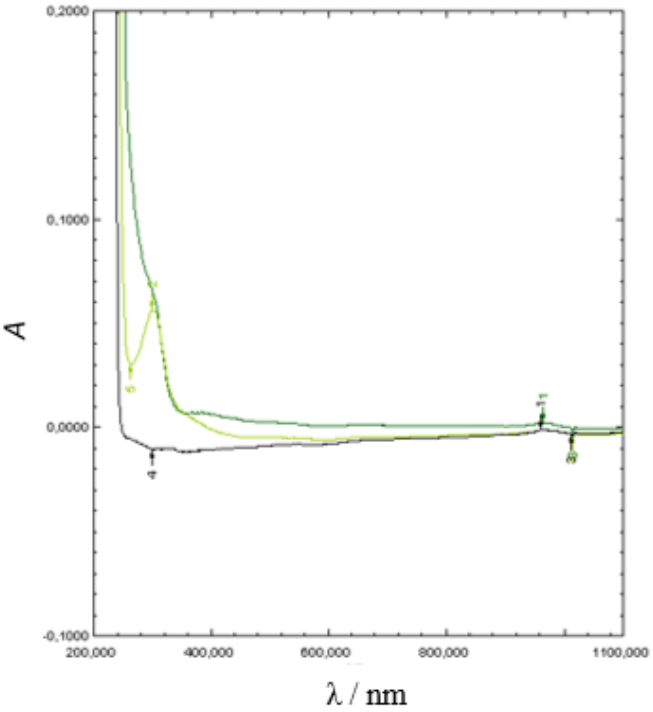
Nastanak kompleksa L-histidna i metalnih iona (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{3+}) u omjeru 1:1 u puferu pH = 10 , ispitivan je i UV/VIS spektroskopijom.

Na *slici 4.14.* prikazani su UV/VIS spektri L-histidina, $Co(NO_3)_2$ i otopine L-histidina i Co^{2+} iona u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da u otopini L-histidina i Co^{2+} iona nastaju nove apsorpcijske vrpce pri 300 nm i 511 nm, što potvrđuje nastanak kompleksa L-histidina i Co^{2+} iona.



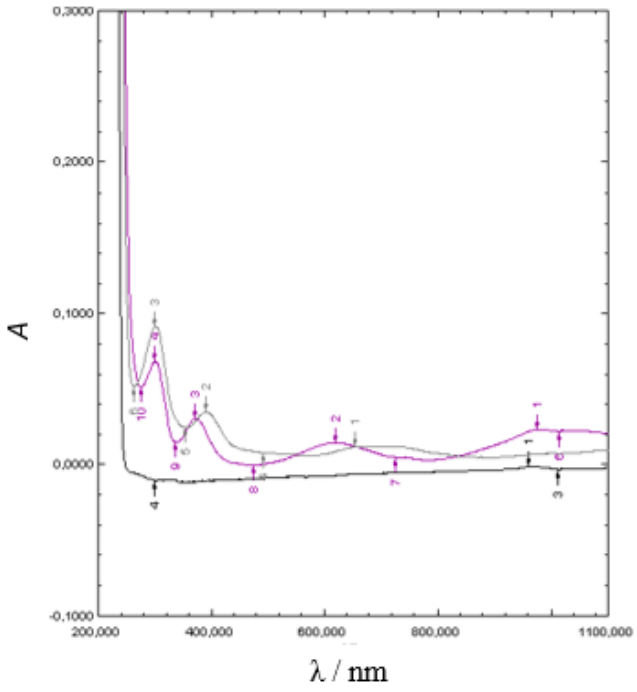
Slika 4.14. UV/VIS spektri L-histidina (—), $Co(NO_3)_2$ (—) i otopine L-histidina i Co^{2+} iona u omjeru 1:1 (—), $c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} u puferu pH = 10.

Na *slici 4.15.* prikazani su UV/VIS spektri L-histidina, $Mn(NO_3)_2$ i otopine L-histidina i Mn^{2+} iona u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da u otopini L-histidina i Mn^{2+} iona nastaje nova apsorpcijska vrpca pri 300 nm, što potvrđuje nastanak kompleksa L-histidina i Mn^{2+} iona.



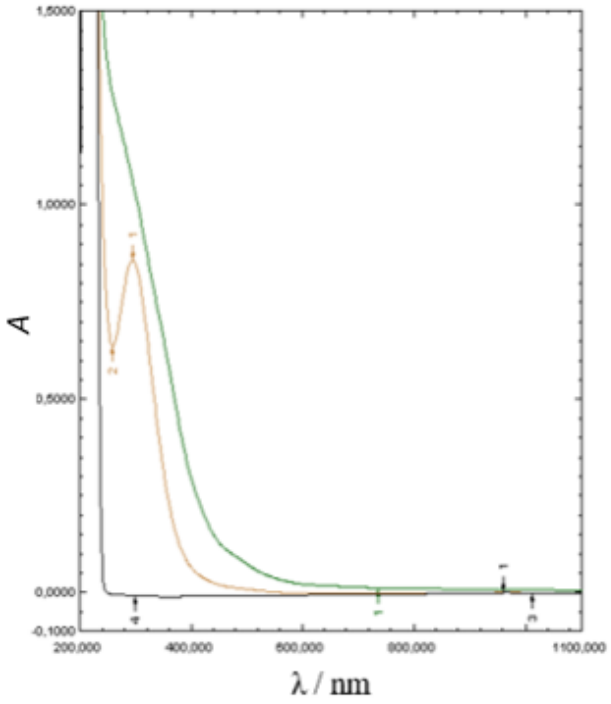
Slika 4.15. UV/VIS spektri L-histidina (—), $Mn(NO_3)_2$ (—) i otopine L-histidina i Mn^{2+} iona u omjeru 1:1 (—), $c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} u puferu pH = 10.

Na *slici 4.16.* prikazani su UV/VIS spektri L-histidina, $Ni(NO_3)_2$ i otopine L-histidina i Ni^{2+} iona u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da u otopini L-histidina i Ni^{2+} iona nastaju dvije nove apsorpcijske vrpca pri 720 nm i 1000 nm, što potvrđuje nastanak kompleksa L-histidina i Ni^{2+} iona.



Slika 4.16. UV/VIS spektri L-histidina (▬), $Ni(NO_3)_2$(▬) i otopine L-histidina i Ni^{2+} iona u omjeru 1:1 (▬), $c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} u puferu pH = 10.

Na *slici 4.17.* prikazani su UV/VIS spektri L-histidina, $Fe(NO_3)_3$ i otopine L-histidina i Fe^{3+} iona u omjeru 1:1. Iz slike je vidljivo da u otopini L-histidina i Fe^{3+} iona nastaje jedna nova apsorpcijska vrpca pri 300 nm, što potvrđuje nastanak kompleksa L-histidina i Fe^{3+} iona.



Slika 4.17. UV/VIS spektri L-histidina (—), $Fe(NO_3)_3$(—) i otopine L-histidina i Fe^{3+} iona u omjeru 1:1 (—), $c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} u puferu pH = 10.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati cikličke voltametrije su pokazali da L-histidin nije elektroaktivan u ispitivanom pH području od pH = 4 do pH = 10. Za razliku od cikličke voltametrije, diferencijalnom pulsnom voltametrijom uočena je elektroaktivnost L-histidina pri pH = 10 (pri toj pH vrijednosti je L-histidin u potpunosti deprotoniran), dok pri ostalim pH vrijednostima pH = 4, 6 i 8; nije utvrđena elektroaktivnost L-histidina. Porastom koncentracije L-histidina u puferu pH = 10, rasla je i struja oksidacijskog strujnog vrha. Adsorpcija oksidacijskog produkta L-histidina na površinu elektrode od staklastog ugljika odvijala se pri koncentracijama nižim od c ~$4 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3},dok je pri višim koncentracijama uočeno postojanje interakcija između molekula adsorbiranih na površinu radne elektrode i molekula oksidacijskog produkta L-histidina koje difundiraju iz otopine prema površini radne elektrode. Nastanak kompleksa L-histidina i iona metala (Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{3+}) u puferu pH = 10 u omjeru 1:1 potvrđen je voltametrijskim tehnikama (cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom) te UV/VIS spektroskopijom.

6. POPIS LITERATURE

[1] https://www.myprotein.hr/sports-nutrition/l-histidin/10529860.html (pristupljeno 17.7.2018.)

[2] J. M. Berg, J. T. Tymoczko, L. Strayer, *Biochemistry*, Fifth Edition, W. H. Freeman, 2002.

[3] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode: Teorijske osnove, mjerne naprave i primjena*, RMC, Zagreb, 1995.

[4] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, prvo izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 1999.

[5] M.Sak-Bosnar, Instrumentalne metode analitičke kemije, pp prezentacija, Sveučilište J.J.Strossmayera , Odjel za kemiju, 2001-2006.

[6] M.Drulak, *Kompleksi metala i karnozina*, diplomski rad, Sveučilište J.J.Strossmayera , Odjel za kemiju, Osijek, 2017.

[7] https://www.bib.irb.hr/941211 (pristupljeno 17.7.2018.)

[8] https://repozitorij.biologija.unios.hr/islandora/object/bioos%3A240/datastream/PDF/view (pristupljeno 17.7.2018.)