Elektrokemijska karakterizacija protokatehuične kiseline

Plasajec, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:182:377529

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Ana Plasajec

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Ana Plasajec

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Diplomski rad

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Komentorica: Doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Neposredni voditelj: Mag. chem. Dominik Goman

Osijek, 2022.

Ovaj rad prezentiran je na 1st International conference „Food & Climate Change", 16. listopada 2021. te na 3rd Young Scientists Day Conference, 30. studenog 2021.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović, komentorici doc. dr. sc. Anamariji Stanković te neposrednom voditelju mag. chem. Dominiku Gomanu na uloženom trudu, pomoći, suradnji te strpljenju i motivaciji prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala na prenesenom znanju!

Hvala mojoj obitelji i Luki na neizmjernoj podršci i ljubavi tijekom cijelog studiranja. Hvala što ste vjerovali u mene!

Hvala mojim dragim prijateljima, PUPA-ma i kolegama s fakulteta što su mi druženjima i smijehom ispunili i uljepšali studentske dane!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Ana Plasajec
Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Sažetak

Elektrokemijska svojstva 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ispitana su cikličkom voltametrijom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom, a antioksidativna aktivnost 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ispitana je DPPH metodom. Glavni cilj istraživanja bio je detektirati 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu u modelnim sustavima te u realnim uzorcima. Mjerenja su provedena pomoću PalmSens potenciostata/galvanostata kontroliranog pomoću PSTrace 1.2. softvera. Troelektrodni sustav sastoji se od radne elektrode od staklastog ugljika ili zlatne elektrode, referentne Ag/AgCl elektrode i protuelektrode platinske žice. Sustav je propuhivan argonom visoke čistoće (Φ_A= 99,999 %) prije svakog mjerenja. Ciklički voltamogrami ispitivanog polifenola pokazali su oksidacijski i redukcijski vrh koji odgovaraju oksidaciji hidroksilne skupine i redukciji oksidacijskog produkta ispitivanog antioksidansa. Također, utvrđeno je da je oksidacija ispitivanog polifenola difuzijski kontroliran proces. Diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su da visina oksidacijskog strujnog vrha 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline varira s promjenom pH vrijednosti. Utvrđeno je da je optimalna pH vrijednost za oksidaciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline pri pH = 4,0 za elektrodu od staklastog ugljika te pri pH=6,0 za zlatnu elektrodu. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom na elektrodi od staklastog ugljika detektirana je 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina u realnim uzorcima; bijelo grožđe, kašica od šljive, sok od jabuke i grožđa te kava od cikorije, gdje je njena količina varirala od 2 μM do 9 μM.

Diplomski rad obuhvaća: 59 stranica, 42 slike, 4 tablice, 38 literaturnih navoda.
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: antioksidans / ciklička voltametrija / diferencijalna pulsna voltametrija / polifenoli / realni uzorci
Rad je prihvaćen: 28.06.2022.
Stručno povjerenstvo za ocjenu:
1. Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović
2. Izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
3. Izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF 3,4-DIHYDROXYBENZOIC ACID

Ana Plasajec

Thesis completed at: Department of Chemistry
Supervisor: Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD

Abstract

The electrochemical properties of 3,4-dihydroxybenzoic acid were determined by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry, and the antioxidant activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid was determined by the DPPH method. The main goal of this study was to detect 3,4-dihydroxybenzoic acid in model systems and in real samples. Measurements were performed using a PalmSens potentiostat/galvanostat controlled by PSTrace 1.2. software. The three-electrode system consists of a glassy carbon electrode or gold electrode as a working electrode, Ag/AgCl reference electrode, and a platinum wire counter electrode. Before each measurement, the system was purged with high purity argon (ΦAr= 99.999 %). Cyclic voltammograms of the investigated polyphenol showed oxidation and reduction peak which correspond to the oxidation of the hydroxyl group and the reduction of the oxidation product of investigated antioxidant. Also, oxidation of the tested polyphenol was found to be a diffusion-controlled process. Differential pulse voltammograms showed that the height of the oxidation peak current of 3,4-dihydroxybenzoic acid varies with changes in pH value. The optimal pH value for the oxidation of 3,4-dihydroxybenzoic acid was found to be at pH = 4.0 for the glassy carbon electrode and at pH = 6.0 for the gold electrode. Differential pulse voltammetry on the glassy carbon electrode detected 3,4-dihydroxybenzoic acid in real samples; white grapes, baby plum food, apple and grape juice, and chicory coffee, where its amount varied from 2 μM to 9 μM.

Thesis includes: 59 pages, 42 figures, 4 tables, 38 references.
Original in: Croatian
Keywords: antioxidant / cyclic voltammetry / differential pulse voltammetry / polyphenols / real samples
Thesis accepted: 28.06.2022.

1. Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD
2. Assoc. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD
3. Assoc. Prof. Tomislav Balić, PhD

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 2

2.1. POLIFENOLI 2

2.2. 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVA KISELINA 5

2.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE 8

2.4. METODE KARAKTERIZACIJE 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE 9

2.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE 10

2.5.1. VOLTAMETRIJA 10

2.5.2. POTENCIOMETRIJA 16

2.5.3. KULOMETRIJA 17

2.5.4. KONDUKTOMETRIJA 18

2.5.5. DIELEKTROMETRIJA 19

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA 19

3.2. ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA 21

3.3. METODE 23

3.3.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA 23

3.3.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA 24

3.3.3. DPPH METODA 24

3.3.4. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 27

4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA 27

4.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA 33

4.3. ANALIZA REALNIH UZORAKA 49

4.3.1. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA 49
4.3.2. DPPH METODA.....54
5. ZAKLJUČAK.....56
6. LITERATURA 58
7. ŽIVOTOPIS 60

1. UVOD

3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, poznatija kao protokatehuična kiselina, pripada skupini polifenolnih spojeva te predstavlja vrstu široko rasprostranjene fenolne kiseline. Kao i ostali polifenoli koji se prirodno nalaze u biljkama, pokazuje značajan blagotvorni učinak na ljudski organizam što ju čini predmetom sve većeg znanstvenog interesa. Izuzev antioksidacijskog djelovanja, polifenole karakterizira antimutageno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje te je zbog navedenih svojstava važno detektirati njihove koncentracije u realnim uzorcima, kako bi se mogao pratiti njihov dnevni unos u organizam.

Cilj rada bio je ispitati elektrokemijska svojstva 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline, što je zahtijevalo pronalazak najpogodnije elektrode za elektrokemijsku karakterizaciju navedenog polifenola. Osim praćenja utjecaja pH vrijednosti, vremena i adsorpcije te koncentracije na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha, važno je bilo detektirati 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu u realnim uzorcima diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Također, ciklička voltametrija i DPPH metoda predstavljaju metode od velike važnosti, uz diferencijalnu pulsnu voltametriju, koje su omogućile praćenje utjecaja brzine polarizacije elektrode na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha te određivanje antioksidativne aktivnosti 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline.

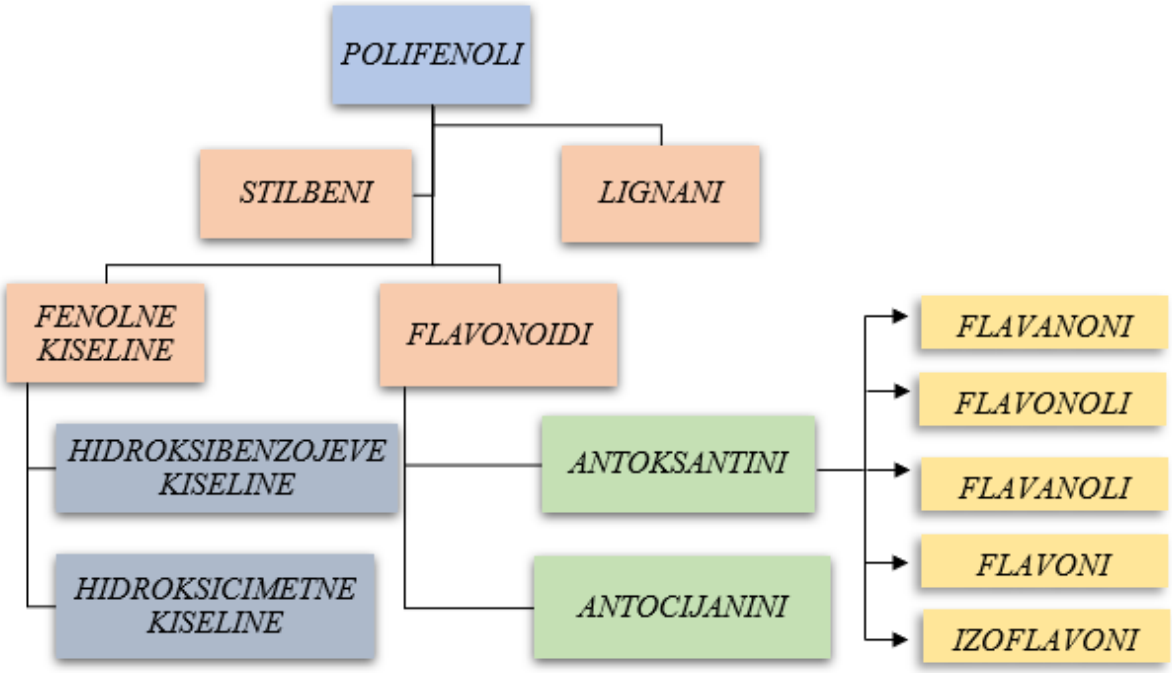
Prvi dio rada, odnosno Literaturni pregled obuhvaća definiciju, podjelu i glavna obilježja polifenola te 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline; njezina svojstva, biološku važnost te mehanizam njezina antioksidacijskog djelovanja. Također, detaljnije su opisane elektrokemijske metode koje obuhvaćaju potenciometriju, voltametriju, kulometriju, konduktometriju i dielektrometriju. U drugom dijelu rada, odnosno Eksperimentalnom dijelu navedene su korištene kemikalije, način pripreme otopina, korištene metode i aparatura te uvjeti pri kojima su elektrokemijska mjerenja provedena. U dijelu Rezultati i rasprava prikazani su i interpretirani dobiveni rezultati koji su konačno objedinjeni u Zaključku.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. POLIFENOLI

Polifenoli su tvari specifičnih svojstava koje su biljke sintetizirale za obranu od napada patogena, UV zračenja i herbivora te predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanasa koji mogu neutralizirati slobodne radikale doniranjem elektrona ili atoma vodika. Osim navedenog, polifenoli djeluju blagotvorno na organizam čak u vrlo malim količinama te su mnogi polifenoli pokazali širok raspon bioloških učinaka u prevenciji dijabetesa, raka, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i drugih bolesti [1].

Polifenoli podazumijevaju više od 8000 spojeva otkrivenih u različitim biljnim vrstama. Navedeni spojevi imaju različite kemijske strukture, uključujući jednostavne hidroksimetilne kiseline i antocijane te složene flavonoide i tanine s jednim ili pak više hidroksiliranih benzenskih prstenova u vlastitim strukturama. S obzirom na njihovu raznolikost, polifenoli se na temelju njihove kemijske strukture i kemijskih svojstava mogu svrstati u nekoliko definiranih grupa, a svi nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline. Glavne skupine uključuju fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Slika 1.) [1,3].



Slika 1. Klasifikacija polifenola.

Primarno se javljaju u konjugiranom obliku s jednim ili više ostataka šećera vezanih za hidroksilne skupine, iako postoje i izravne veze šećera (polisaharida ili monosaharida) s aromatičnim ugljikom. Povezivanje s drugim spojevima, poput karboksilnih i organskih kiselina, amina i lipida također je uobičajeno [2].

Polifenoli pokazuju širok spektar fizikalno-kemijskih svojstava, ovisno o njihovoj strukturi. Što se tiče topljivosti, osim ako nisu potpuno esterificirani ili glikozilirani, biljni fenoli obično su topljivi u polarnim organskim otapalima. Većina fenolnih glikozida topljiva je u vodi, dok odgovarajuće aglikone karakterizira manja topljivost. Uz nekoliko iznimaka, topljivost u vodi raste s brojem prisutnih hidroksilnih skupina. Također, svi fenolni spojevi pokazuju intenzivnu apsorpciju u UV području spektra te svaka skupina fenolnih spojeva ima specifične karakteristike apsorpcije [3].

Osim navedenih osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava, polifenoli imaju zajednička dva temeljna fizikalno-kemijska svojstva koja čine osnovu njihovog djelovanja; redukcijska aktivnost koja upravlja njihovim antioksidativnim svojstvima i osjetljivost na oksidaciju te svojstva vezivanja koja se pripisuju njihovim aktivnostima keliranja metala i njihovom afinitetu za proteine, uključujući enzime, transportne proteine i receptore. Fizikalno-kemijska svojstva polifenola, posebice njihova kemijska reaktivnost predstavlja jednu od najatraktivnijih tema istraživanja u području polifenolnih spojeva [3].

Znanstvena istraživanja ukazuju na to da polifenoli zbog specifične biološke aktivnosti štite krvne žile, srce i imunološki sustav. Također, smatra se da imaju pozitivan učinak na prevenciju kroničnih upalnih bolesti, tumora te na proces starenja. Najproučavanije svojstvo polifenola jest kapacitet zaštite organizma od slobodnih radikala i kisikovih reaktivnih vrsta nastalih tijekom metabolizma kisika koji su glavni uzročnici oksidativnog oštećenja u stanici. Mehanizmi antioksidativnog djelovanja polifenola mogu uključivati izravno uklanjanje reaktivnih slobodnih radikala, keliranje metalnih iona u tragovima uključenih u stvaranje slobodnih radikala, inhibiciju enzima uključenih u proizvodnju slobodnih radikala i regeneraciju antioksidansa vezanih za membranu [4].

Prooksidativna aktivnost polifenola (Ph-OH) obično je povezana sa stvaranjem ROS-a, u obliku superoksidnih aniona ($O_2^{\bullet -}$), vodikova peroksida (H_2O_2) te peroksilnih radikala (ROO●), koji su posljednje međuvrste u procesu lipidne peroksidacije. Navedeni oksidansi nastaju reakcijama autooksidacije, tj. izravnom oksidacijom molekularnim kisikom (Slika 2.) [5].

$$\text{Ph-OH} + O_2 \rightarrow \text{Ph-O}\bullet + O_2^{\bullet -} + H^+$$

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

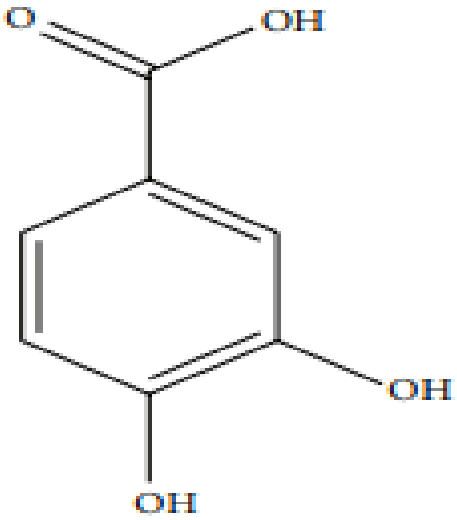
Slika 2. Reakcije autooksidacije polifenola.

Bioraspoloživost polifenola se razlikuje, no ne postoji veza između količine polifenola u hrani i njihove bioraspoloživosti u ljudskom tijelu. Općenito, aglikoni se mogu apsorbirati iz tankog crijeva; međutim većina polifenola prisutna je u hrani u obliku estera, glikozida ili polimera koji se ne mogu apsorbirati u prirodnom obliku. Prije apsorpcije, navedeni spojevi moraju biti hidrolizirani crijevnim enzimima ili mikroflorom debelog crijeva. Tijekom apsorpcije, polifenoli prolaze kroz opsežnu modifikaciju; konjugiraju se u crijevnim stanicama te u jetri metilacijom, sulfatizacijom i/ili glukuronidacijom. Kao posljedica toga, oblici koji dospijevaju u krv i tkiva razlikuju se od onih prisutnih u hrani te je vrlo teško identificirati sve metabolite i procijeniti njihovu biološku aktivnost. Najčešći polifenoli u ljudskoj prehrani nisu nužno oni koji pokazuju najveću koncentraciju aktivnih metabolita u ciljnim tkivima; posljedično, biološka svojstva polifenola uvelike se razlikuju [6,7].

2.2. 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVA KISELINA

3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (Slika 3.), poznatija kao protokatehuična kiselina (PCA), fenolni je spoj koji se prirodno pojavljuje u raznim biljnim vrstama, a sadrži aromatski prsten i dvije hidroksilne skupine. PCA je ekstrahirana iz cvjetova *Hibiscus sabdariffa L.* (Slika 4.) [8].

3,4-dihidroksibenzojeva kiselina predstavlja sve veći znanstveni interes zbog svog antioksidativnog djelovanja, antibakterijskog djelovanja, antikancerogenog djelovanja, antiulkusnog djelovanja, antidijabetičkog djelovanja, antivirusnog djelovanja, protuupalnog djelovanja, analgetskog djelovanja, hepatoprotektivnog djelovanja te neurološke i nefrozaštitne aktivnosti. Mehanizam kemopreventivnog djelovanja protokatehuične kiseline povezan je s antioksidativnim djelovanjem, uključujući inhibiciju stvaranja, kao i uklanjanje slobodnih radikala te regulaciju antioksidativnih enzima. Utječe na faze 1 i 2 metabolizma određenih kancerogena te izravno blokira specifična mjesta vezanja krajnjih kancerogena s molekulom DNA, čime se sprječava stvaranje adukta koji može rezultirati mutacijama i neoplastičnom transformacijom [9,10].





Slika 3. Struktura protokatehuične kiseline. *Slika 4.* Hibiscus sabdariffa L.

Novijim istraživanjima utvrđeno je da esterifikacija protokatehuične kiseline povećava njezinu učinkovitost kao inhibitora multienzimskog kompleksa NADPH oksidaze u neutrofilima. Također, esterifikacija mijenja i prooksidativnu aktivnost, jer veća hidrofobnost rezultira povećanom i selektivnom prooksidativnom aktivnošću [5].

Protokatehuična kiselina nalazi se u mnogim plodovima, kao što su šljive (*Prunus domestica L.*), ogrozd (*Ribes uvacrispa L.*), grožđe (*Vitis vinifera L.*) te u orašastim plodovima, poput badema. Također, prisutna je i u proizvodima biljnog podrijetla, poput maslinovog ulja ili bijelog vina te u začinima kao što su zvjezdasti anis (*Illicium verum L.*), melisa (*Melissa officinalis L.*) i medicinski ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*). Njezin sadržaj varira ovisno o vrsti namirnice (Tablica 1. prikazuje sadržaj PCA u raznim namirnicama) [8].

Tablica 1. Sadržaj PCA u hrani.

Prehrambeni proizvod	*Koncentracija PCA u proizvodu*
Zelena cikorija	30,18 mg/100 g svježe težine
Crvena cikorije	25,71 mg/100 g svježe težine
Crne masline	21,00 mg/100 g svježe težine
Crna malina	8,35 mg/100 g sušene težine
Sušene datulje	8,34 mg/100 g sušene težine
Svježe datulje	4,49 mg/100 g svježe težine
Zelene masline	2,00 mg/100 g svježe težine
Sok od jabuke	1,64 mg/100 mL
Ocat	1,62 mg/100 mL
Bijelo vino	1,30 mg/100 mL
Kupine	1,01 mg/100 g sušene težine
Crno vino	0,71 mg/100 mL
Crni ribiz	0,71 mg/100 g sušene težine
Leća	0,14 mg/100 g svježe težine
Bademi	0,44 mg/100 g svježe težine
Cvjetača	0,45 mg/100 g svježe težine
Pivo (bezalkoholno)	0,51 mg/100 mL

LD_{50} (doza ispitivane tvari koja je smrtonosna za 50% eksperimentalne skupine) PCA iznosi 800 mg/kg intraperitonealnom primjenom i 3,5 g/kg intravenskom primjenom kod miševa. LD_{50} protokatehuičnog aldehida kod miševa oralnim putem je 1,7 g/kg. Poznato je da toksična oralna doza od 500 mg/kg kod miševa uzrokuje smanjenje GSH (glutationa) u jetri i bubrezima, ali ne i smrtnost. Zbog niske apsorpcije oralnim putem, PCA je netoksičan i relativno siguran spoj za oralnu primjenu [8].

2.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Derivati hidroksibenzojeve kiseline pokazuju snažno antioksidativno djelovanje. Konkretno, o-difenoli tipa katehola, kao što su 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (PCA) i njezini esteri, pokazuju visoko antiradikalno djelovanje prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilu (DPPH) in vitro, jer se lako pretvaraju u odgovarajuće o-kinone i daljnje složene produkte. Molekularna struktura PCA ukazuje na snažno antioksidativno i anti-radikalno djelovanje zbog broja hidroksilnih skupina prisutnih u molekuli PCA. Međutim, PCA esteri imaju veću antioksidativnu aktivnost od PCA zbog veće lipofilnosti, što je glavni čimbenik u suzbijanju lipoperoksidacije. Dokazano je da antioksidativna aktivnost PCA i njezinih estera ovise o korištenom otapalu, iz čega slijedi da, u bezalkoholnom acetonu ili acetonitrilu PCA i njezini esteri stabiliziraju dva radikala te se pretvaraju u odgovarajuće kinone. S druge strane, u metanolu ili etanolu PCA i PCA esteri stabiliziraju više od četiri radikala uz istodobnu konverziju u odgovarajuće kinon-3-hemiacetale. Konkretno, regeneracija kateholnih struktura nukleofilnim dodatkom molekule alkohola (otapala) na o-kinonima ključna je reakcija odgovorna za veću aktivnost stabilizacije tj. uklanjanja radikala PCA estera u alkoholnim otapalima nego u bezalkoholnim otapalima. Također, u obzir treba uzeti da visoke koncentracije PCA mogu iskazati prooksidativno djelovanje, pogodujući toksičnim učincima i oštećenjima tkiva. Istraživanja pokazuju da PCA (500 mg/kg) intraperitonealno primijenjen miševima izaziva smanjenje sadržaja GSH što posljedično uzrokuje oštećenja jetre, bubrega i kože [11,12].

2.4. METODE KARAKTERIZACIJE 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Razvijene su brojne instrumentalne metode za karakterizacija polifenola u biološkim uzorcima te kvantitativno određivanje antioksidativne aktivnosti polifenola. Najčešće primjenjivane metode za određivanje antioksidativne aktivnosti razne su spektroskopske metode koje, iako su relativno brze i jednostavne za provedbu, no imaju čitav niz nedostataka, npr. nedovoljno su osjetljive te zahtijevaju korištenje skupih reagensa. Također, često korištene metode za kvantitativno određivanje, detekciju te odvajanje polifenola su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), HPLC-PDA (eng. *High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection*), HPLC-DAD-UV (eng. *High-Performance Liquid Chromatography– Diode Array Detection-Ultraviolet (UV) Spectrophotometry*), UHPLC-PDA (eng. *Ultra High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection*) i HPLC-PDA-ESI-MS (eng. *High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*) te elektroforetske metode (kapilarna elektroforeza). HPLC tehnike su vrlo selektivne, ali su njihovi postupci složeni i dugotrajni. Alternativno, elektrokemijske metode su vrlo selektivne, jednostavne i osjetljive te zbog navedenoga u novije vrijeme postoji sve veći interes za primjenom različitih elektrokemijskih metoda za karakterizaciju polifenola u prirodnim uzorcima upravo zbog jednostavnosti upotrebe, pristupačnih instrumenata te mogućnosti analize velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Poznavanje elektrokemijskih svojstava polifenola jedan je od vrlo važnih uvjeta za razumijevanje mehanizma njihovog antioksidativnog djelovanja. U ovom radu korištene su elektrokemijske metode za karakterizaciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija) te DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima [13,14,15].

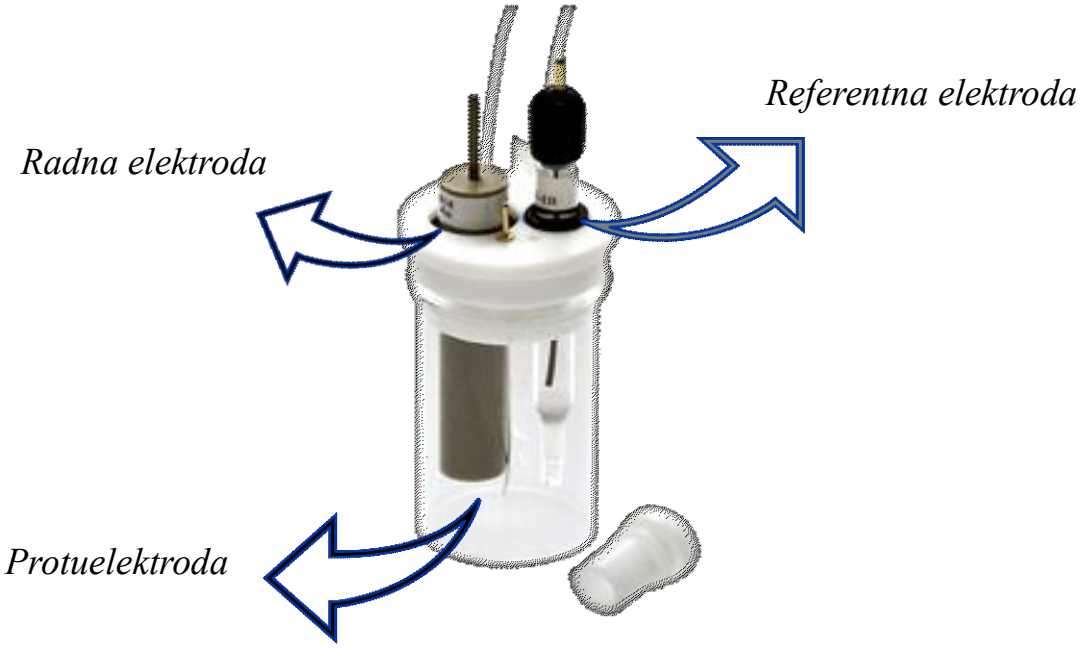
2.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode predstavljaju skupinu analitičkih tehnika koje se temelje na mjerenju potencijala, naboja ili struje za određivanje koncentracije analita te karakterizaciju kemijske reaktivnosti analita. Elektrokemijska ćelija sadrži najmanje dvije elektrode te otopinu elektrolita. Jedna od elektroda naziva se radna elektroda te daje odziv na analit, a druga elektroda naziva se referentna te ima konstantan potencijal. Kemijska reakcija se kod svih elektrokemijskih metoda odvija na radnoj elektrodi. Rezultat elektrokemijske reakcije je signal odziva, čijim se mjerenjem dobiva željeni analitički ili neki drugi podatak o ispitivanoj tvari. Signal odziva može nastati pod utjecajem signala pobude ili pak nastaje kao posljedica prisutnosti određene molekulske vrste u otopini. Odabir elektrode ponajviše ovisi o dva faktora: redoks potencijalu ispitivane tvari te pozadinskoj struji u području potencijala koji je potreban za mjerenje. Neki od drugih faktora koji utječu na izbor radne elektrode su: dostupnost, električna provodnost, toksičnost, mehanička svojstva i dostupan raspon potencijala. Navedene metode karakteriziraju točnost, osjetljivost, selektivnost, preciznost te pristupačna cijena i dostupnost instrumenata. Elektrokemijske metode dijele se u pet velikih skupina: potenciometrija, voltametrija, kulometrija, konduktometrija i dielektrometrija [16,17].

2.5.1. VOLTAMETRIJA

Voltametrijske metode predstavljaju skupinu elektroanalitičkih metoda koje se temelje na mjerenju jakosti struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala, a primjenjuju se u kvantitativnoj analizi anorganskih i organskih tvari u vodenom i nevodenom mediju, za ispitivanje kinetike, određivanje redoks potencijala, mehanizma redoks reakcija te za elektrokemijsku detekciju eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) [18].

Voltametrijska ćelija sastoji se od tri elektrode; radne elektrode na kojoj se odvija redoks reakcija te čiji se potencijal nalazi unutar zadanih vrijednosti, referentne elektrode čiji je potencijal stalan te protuelektrode koja omogućava tok električne struje kroz ćeliju (Slika 5.). Navedene elektrode uronjene su u otopinu ispitivanog analita uz dodatak odgovarajućeg inertnog elektrolita. Struja se mjeri između protuelektrode i radne elektrode (mjeri se signal odziva), a kontrolira se potencijal između radne i referentne elektrode (signal pobude). Kontroliranje potencijala između radne i referentne elektrode provodi se intrumentom koji se zove potenciostat [19].



Slika 5. Troelektrodna voltametrijska ćelija.

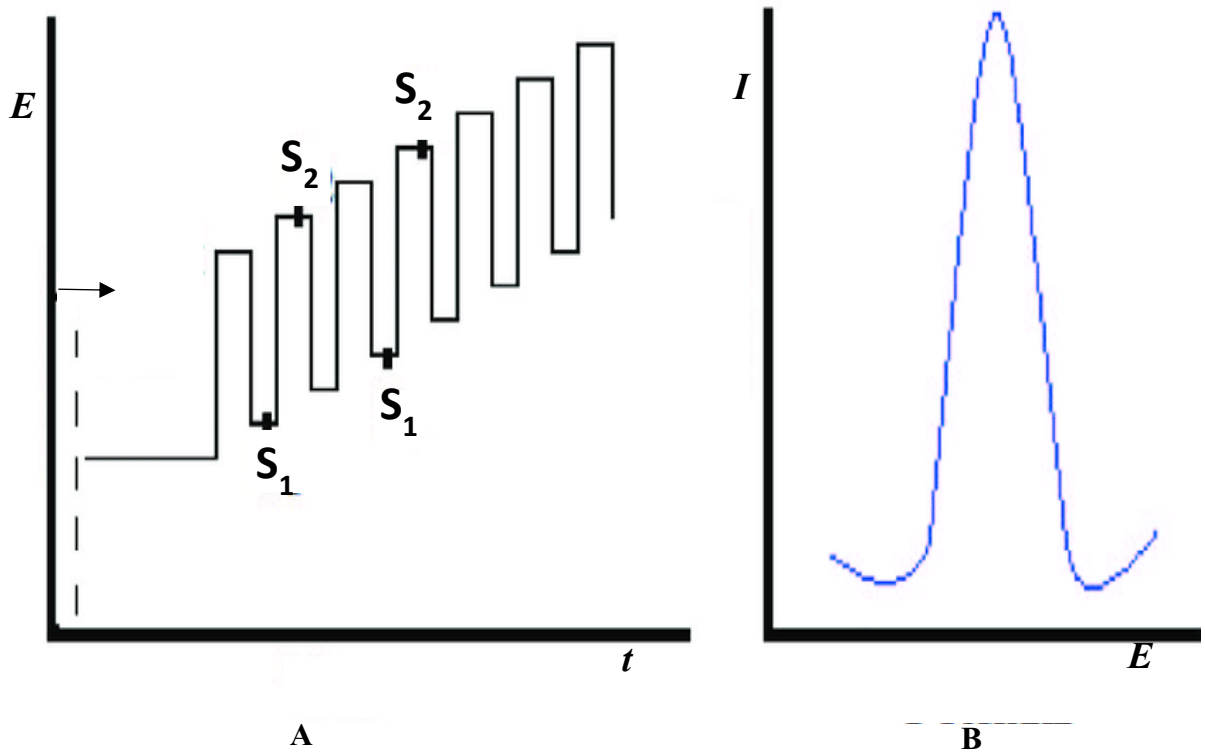
Većina potenciostata za mjerenja s tri elektrode radi na način da je potencijal otopine elektrolita jednak potencijalu metalne faze referentne elektrode. Razlika potencijala između metalne faze radne elektrode i otopine elektrolita jednaka je onoj između radne i referentne elektrode. Napon između radne i protuelektrode podešava se potenciostatom tako da ima željenu potencijalnu razliku između radne elektrode i otopine elektrolita.

Voltametrija obuhvaća veliku skupinu elektrokemijskih tehnika u kojima se nespontani, međufazni procesi prijenosa naboja (prijenos elektrona ili iona preko sučelja elektroda/otopina elektrolita) pokreću vanjsko primijenjenom razlikom električnog potencijala u elektrolitičkoj ćeliji, a najčešće primjenjivane su diferencijalna pulsna voltametrija, ciklička voltametrija, pravokutnovalna voltametrija i stripping voltametrija [19].

DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Difrencijalna pulsna voltametrija metoda je koju karakterizira visoka osjetljvost te se koristi za određivanje niskih koncentracija elektroaktivnih komponenti u raznim uzorcima (granica detekcije iznosi 10^{-8} mol/dm^3). Naziv metode potječe od postupka tj. mjerenja diferencije u struji ćelije koju uzrokuje naponski impuls [20].

Princip rada diferencijalne pulsne voltametrije temelji se na primjeni kratkih pulseva (t = 10–100 ms) na radnu elektrodu pri čemu se jakost struje mjeri prije primjene pulsa (I_1) i na kraju pulsa (I_2) te se razlika između tih izmjerenih vrijednosti bilježi kao funkcija potencijala ($I = I_2 - I_1$) (Slika 6A.). Ovaj postupak učinkovito smanjuje pozadinsku struju. Mehanizam rada uključuje najmanje dvije elektrode; radnu elektrodu i protuelektrodu. Pulseve napona prenosi protuelektroda, a radna elektroda mjeri rezultirajuću struju. Treća elektroda, referentna elektroda, uključena je u kontrolu napona protuelektrode. Osnovni signal pobude diferencijalne pulsne voltametrije predstavlja linearno rastući potencijal koji se modulira s kvadratičnim naponskim impulsima u kratkim vremenskim intervalima. Kao rezultat promjene potencijala radne elektrode koji uzrokuje značajnu razliku u struji ćelije nastaje diferencijalni pulsni voltamogram tj. pulsni voltamografski odziv kojeg karakterizira oblik vrha (Slika 6B.). Visina strujnog vrha funkcija je koncentracije analita, tj. signal odziva proporcionalan je koncentraciji reaktanta [20].

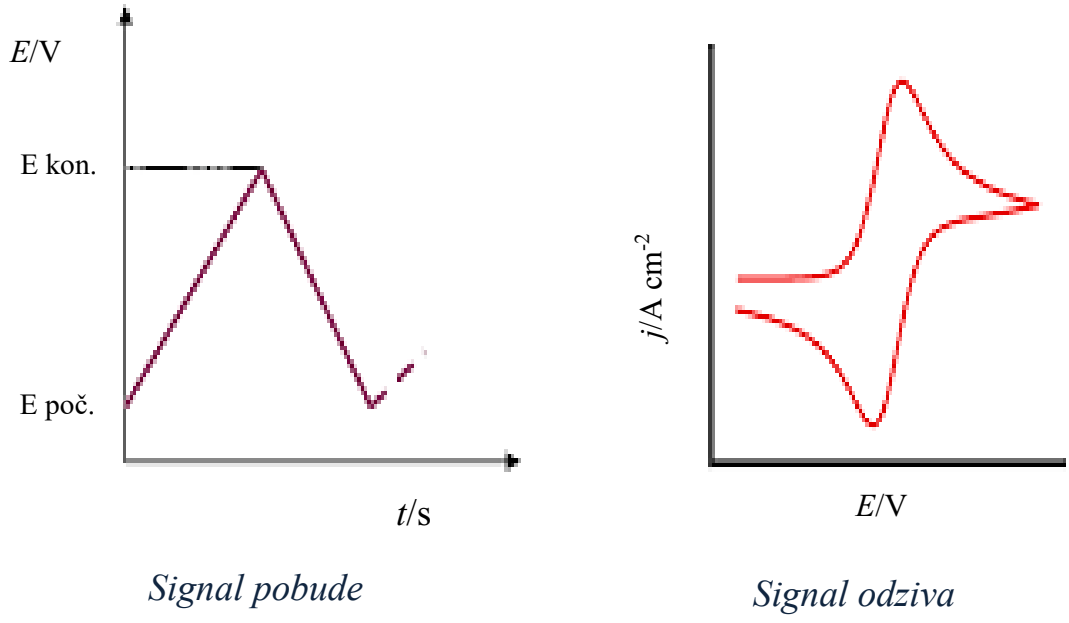


Slika 6. A) Oblik signala pobude i karakterističnog vremena primjene naponskog impulsa u diferencijalnoj pulsnoj voltametriji. B) Diferencijalni pulsni voltamogram.

CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltametrija primjenjuje se za određivanje redoks potencijala, broja izmijenjenih elektrona, ispitivanje kinetike i mehanizma redoks reakcija te istraživanje adsorpcijskih procesa. Također, predstavlja važnu metodu za prvu analizu elektrokemijske reakcije koja se odvija na površini elektrode jer otkriva reverzibilnost. Ovisno o tome, moguće je dobiti brojne informacije o elektroaktivnoj vrsti. Rijetko se upotrebljava za kvantitativnu analizu lijekova, jer granica detekcije iznosi od 10^{-5} mol/dm^3 do 10^{-6} mol/dm^3 u optimalnim uvjetima [18].

Kod cikličke voltametrije signal pobude tj. potencijal radne elektrode mijenja se linearno s vremenom pri odgovarajućem intenzitetu struje (odvija se proces oksidacije), a pri postizanju određenog potencijala, mijenja se smjer promjene potencijala (dolazi do procesa redukcije oksidiranog oblika elektroaktivne tvari). Signal odziva daje specifičan oblik voltamograma s anodnim i katodnim vrhom, tj. voltamogram je karakteriziran potencijalom strujnog vrha, E_p te potencijalom koji odgovara točki u kojoj izmjerena struja doseže svoju maksimalnu vrijednost I_p. Visina strujnog odziva ovisi o koncentraciji elektroreduktanta u otopini, broju izmijenjenih elektrona po čestici (z), površini radne elektrode (A) i čimbenicima koji određuju brzinu difuzije [18,19].



Slika 7. Oblik signala pobude i signala odziva u cikličkoj voltametriji.

PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltametrija jedna je od najbržih i najosjetljivijih tehnika pulsne voltametrije koju karakterizira velika brzina te upravo zbog toga pogodna je za jednostavna i brza određivanja kinetike i mehanizma proučavanog elektrodnog procesa. Granice detekcije mogu se usporediti s onima kod kromatografskih i spektroskopskih tehnika [21].

Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi omogućavaju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala pri čemu se vrijeme analize značajno skraćuje. Signal pobude nastaje kada se niz pravokutnovalnih pulseva primijeni na stepeničasti signal potencijala. Struja je mjerena dvaput tijekom svakog ciklusa; na početku polaznoga pulsa i na kraju pulsa suprotnoga smjera. Nastali strujni signal rezultat je razlike između eksperimentalno izmjerenih struja. Polazni puls stvara katodnu struju, a povratni puls anodnu struju. Razlika navedenih struja proporcionalna je koncentraciji analita u otopini, a potencijal maksimuma koristi se za potvrdu identiteta analita [23].

STRIPPING VOLTAMETRIJA

Stripping voltametrija (SV) podrazumijeva adsorpcijsko ili elektrolitičko pretkoncentriranje analita na površini elektrode prije samog voltametrijskog mjerenja u slučajevima analize uzoraka s koncentracijom analita ispod granice detekcije primijenjene metode. Ispitivani analit taloži se iz otopine na radnoj elektrodi pri određenom potencijalu. Tijekom akumulacije potrebni su optimalni uvjeti za adsorpciju analita kako bi se ostvarila maksimalna osjetljivost metode. Nakon određenog vremena akumulacije, istaloženi analit određuje se voltametrijski. Ispitivani analit otapa se s elektrode (eng. *stripping*) promjenom potencijala. S obzirom na promjenu potencijala, dolazi do oksidacije istaloženog analita (anodna stripping voltametrija) ili redukcije (katodna stripping voltametrija) u otopini, a snimljena struja tijekom ovog procesa proporcionalna je koncentraciji ispitivanog analita na elektrodi [24].

Anodna stripping voltametrija i katodna stripping voltametrija predstavljaju voltametrijske metode za kvantitativno određivanje specifičnih ionskih vrsta. Adsorptivna stripping voltametrija slična je anodnoj i katodnoj stripping voltametriji, osim što korak predkoncentriranja nije kontroliran elektrolizom. Korak predkoncentriranja u adsorpcijskoj stripping voltametriji postiže se adsorpcijom na površini radne elektrode ili reakcijom s kemijski modificiranim elektrodama [24].

Stripping voltametrija prvotno je podrazumijevala korištenje živinih radnih elektroda, ali u novije vrijeme živa se progresivno zamjenjuje drugim materijalima, uglavnom ugljikom ili plemenitim metalima, često modificiranim filmovima, nanostrukturiranim materijalima ili reagensima, kako bi se poboljšala selektivnost i/ili osjetljivost analize [24].

Glavne prednosti navedene metode su visoka osjetljivost (granice detekcije od 10^{-10} mol/dm^3 do 10^{-12} mol/dm^3), koja proizlazi iz koraka predkoncentriranja te niska cijena instrumentacije. Glavne primjene SV-a su određivanje elemenata u tragovima i organskih tvari u uzorcima okoliša, hrani, farmaceutskim proizvodima, kliničkim i industrijskim uzorcima [24].

2.5.2. POTENCIOMETRIJA

Potenciometrija predstavlja najčešće korištenu metodu elektrokemijske analize koja se temelji na ovisnosti potencijala indikatorske (radne) elektrode o koncentraciji ionske vrste s kojom se nalazi u aktivnom kontaktu u ispitivanoj otopini, tj. mjeri se potencijal radne elektrode u odnosu na referentnu elektrodu (elektrodu s konstantnim potencijalom). Potencijal radne elektrode varira ovisno o koncentraciji analita, dok je potencijal referentne elektrode konstantan. Radna elektroda u izravnom je kontaktu s otopinom analita, a referentna elektroda obično je odvojena od otopine analita pomoću solnog mosta [25].

Potenciometrija se temelji na Nernstovoj jednadžbi ($E = E^0 - \frac{RT}{zF} ln\ Q$), iz koje slijedi da potencijal članka izravno ovisi o aktivitetu istraživanog analita. Potenciometrijska mjerenja primarno se primjenjuju na dva načina; izravna metoda koja se koristi za određivanje koncentracije ionske vrste u ispitivanoj otopini te potenciometrijska titracija koja se temelji na određivanju nepoznate koncentracije otopine titracijom sa standardnom otopinom pri čemu nagla promjena potencijala indikatorske elektrode ukazuje na završnu točku titracije [26,27].

2.5.3. KULOMETRIJA

Kulometrija predstavlja elektrokemijsku tehniku kojom se određuje koncentracija analita u ispitivanoj otopini mjereći količinu električnog naboja koji je potreban za elektrokemijsku reakciju (granica detekcije oko 10^{-5} mol/dm^3). Analitu se unutar kulometrijske ćelije kvantitativno mijenja oksidacijsko stanje [26].

Kulometrijske metode temelje se na Faradayjevom zakonu pri čemu je ukupni naboj ili ukupna struja proporcionalna količini reaktanta i produkta u redoks reakciji. Kulometrija je apsolutna metoda, što znači da kalibracija općenito nije potrebna jer se električni naboj može mjeriti s velikom točnošću. Metoda je bila vrlo popularna sredinom dvadesetog stoljeća, ali je u mnogim primjenama zamijenjena voltametrijskim metodama kao što je diferencijalna pulsna voltametrija ili nedavnim neelektrokemijskim analitičkim metodama kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) [27].

Kulometrijska analiza provodi se kulometrom, pomoću kojeg se mjeri količina naboja potrebna za elektrolizu. Ova tehnika može se koristiti za kvantitativnu analizu različitih anorganskih i organskih spojeva. Postoje dvije vrste kulometrije: kulometrija uz kontrolirani potencijal i kulometrija uz kontroliranu struju. Kulometrijske analize uz kontrolirani potencijal koriste se za mjerenje količine elektriciteta tj. naboja koji je neophodan za elektrokemijsku reakciju, odnosno elektrolizu. Kulometrijske tehnike uz kontroliranu struju omogućuju mjerenje vremenskog intervala potrebnog za određeni elektrodni proces [23].

2.5.4. KONDUKTOMETRIJA

Konduktometrija je elektrokemijska tehnika koja se temelji na mjerenju električne vodljivosti otopine elektrolita. S obzirom da električna vodljivost ovisi o koncentraciji, njezinim mjerenjem te na temelju baždarnih podataka, moguće je odrediti nepoznatu koncentraciju otopine. Konduktometrija se koristi za analizu ionskih vrsta te za praćenje kemijske reakcije proučavanjem elektrolitičke vodljivosti reakcijskih vrsta ili rezultirajućih produkata. Mjerenje vodljivosti može se izvesti izravno pomoću mjerača vodljivosti ili provođenjem konduktometrijske titracije [28, 29].

Konduktometrija je metoda u kojoj ili uopće nema elektrokemijskih reakcija na elektrodama ili postoje sekundarne reakcije koje se mogu zanemariti. Stoga kod konduktometrijske metode najvažnije svojstvo elektrolitičke otopine je njezina vodljivost, koja varira u skladu sa širokim rasponom bioloških reakcija [30].

U principu, ovo je metoda u kojoj se prati sposobnost analita da provodi električnu struju. Iz Ohmovog zakona ($E = IR$) vidljivo je da je električna struja (I) obrnuto proporcionalna otporu (R), gdje E predstavlja razliku potencijala. Recipročna vrijednost otpora je vodljivost ($G = 1/R$). Kako se vodljivost otopine povećava, povećava se njezina sposobnost provođenja električne struje.

U otopinama struju između elektroda provode ioni te vodljivost otopine ovisi o broju i vrsti iona u otopini. Općenito mali i visoko nabijeni ioni provode struju bolje od velikih iona i iona s malim nabojem. Izmjerena vodljivost ukupna je vodljivost svih iona u otopini. Budući da svi ioni doprinose vodljivosti otopine, metoda nije osobito korisna za kvalitativnu analizu, tj. metoda nije selektivna. Također, budući da konduktometrijska mjerenja zahtijevaju prisutnost iona, konduktometrija nije korisna za analizu nedisociranih molekula [30].

Konduktometrijske krivulje titracije pripremaju se crtanjem vodljivosti kao funkcije volumena dodanog titranta. Krivulje se sastoje od linearnih područja prije i poslije točke ekvivalencije. Dva linearna dijela ekstrapoliraju se na njihovu točku presjeka u točki ekvivalencije. Kao i u drugim titracijama, volumen točke ekvivalencije koristi se za izračunavanje količine ili koncentracije analita koji je izvorno bio prisutan u otopini [33].

2.5.5. DIELEKTROMETRIJA

Dielektrometrija je elektrokemijska tehnika koja se temelji na mjerenju dielektrične konstante ili relativne permitivnosti otopine koja je rezultat orijentacije čestica (molekula ili iona) koje imaju dipolni moment u električnom polju kao funkcije koncentracije. Mjerenja se vrše neizravno preko otpora otopine s izmjeničnom strujom. Ova metoda koristi se za određivanje sadržaja vode, za identifikaciju farmaceutskih sastojaka, kao metoda praćenja stvrdnjavanja epoksidnog ljepila itd. [31,32].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije i uzorci:

1. 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, $C_7H_6O_4$
2. Destilirana voda
3. Ultra čista voda
4. Kalij hidrogen ftalat, $C_8H_5KO_4$
5. 0,1 M HCl
6. 0,1 M NaOH
7. Natrijev dihidrogen fosfat, NaH_2PO_4
8. Etanol, C_2H_6O
9. Metanol, CH_3OH
10. DMF, $(CH_3)_2NC(O)H$
11. DMSO, $(CH_3)_2SO$
12. Octena kiselina, CH_3COOH
13. Boraks, $Na_2[B_4O_5(OH)_4]\cdot 8H_2O$
14. Realni uzorci; kašica od šljive, bijelo grožđe, kava (cikorija), sok od jabuke i grožđa

Korišteni puferi određene pH vrijednosti pripremljeni su na temelju podataka iz knjige CRC Handbook of chemistry and physics, David R. Lide, 79th edition. Otopine pufera pripremljene su u odmjernim tikvicama od 200 mL. Za pripremu pufera pH = 3, otopljeno je 2.0422 g kalijevog hidrogen ftalata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 44,6 mL 0,1 M HCl u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Za pripremu pufera pH = 4, otopljeno je 2.0422 g kalijevog hidrogen ftalata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 0,2 mL 0,1 M HCl u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Za pripremu pufera pH = 5, otopljeno je 2.0422 g kalijevog hidrogen ftalata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 45,2 mL 0,1 M NaOH u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Za pripremu pufera pH = 6, otopljeno je 2.0422 g kalijevog hidrogen ftalata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 11,2 mL 0,1 M NaOH u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Za pripremu pufera pH = 7, otopljeno je 1,1998 g natrijevog dihidrogen fosfata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 58,2 mL 0,1 M NaOH u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Za pripremu pufera pH = 8, otopljeno je 1,1998 g natrijevog dihidrogen fosfata u 100 mL ultra čiste vode te je pomiješano s 92,2 mL 0,1 M NaOH u odmjernoj tikvici od 200 mL i nadopunjeno s ultra čistom H_2O do oznake. Nakon pripreme pufera, određena je njihova točna pH vrijednost pomoću pH metra.

Standardna otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline koja se koristi za elektrokemijska mjerenja, koncentracije $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}, pripremljena je otapanjem 0,03853 g 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u 25 mL vode iz MiliQ Millipore sustava ($\kappa \leq 0{,}055$ μS/cm). Otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline željene koncentracije ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti neposredno prije mjerenja.

Analizirana su četiri uzorka (Slika 8.); uzorak 1 (sok od jabuke i grožđa), uzorak 2 (bijelo grožđe), uzorak 3 (kava od cikorije) i uzorak 4 (kašica od šljive). Uzorak 1 analiziran je u obliku soka, uzorak 2 analiziran je u obliku soka koji je dobiven cijeđenjem bobe grožđa i filtracijom dobivenog soka, uzorak 3 pripremljen je otapanjem kave u vrućoj vodi te korištenjem filtrata kao uzorka za analizu, a uzorak 4 razrijeđen je destiliranom vodom te se analizirao filtrat dobiven filtracijom.



Slika 8. Ispitivani realni uzorci: uzorak 1 (sok od jabuke i grožđa), uzorak 2 (bijelo grožđe), uzorak 3 (kava od cikorije), uzorak 4 (kašica od šljive).

Izvedena su tri mjerenja svakog realnog uzorka: 1. mjerenje u blank otopini (pufer pH = 4), 2. mjerenje u otopini 200 µL uzorka i 14,80 mL pufera pH = 4 te 3. mjerenje u otopini 200 µL uzorka, 14,75 mL fosfatnog pufera i 50 µL standardnog dodatka 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}).

3.2. ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA

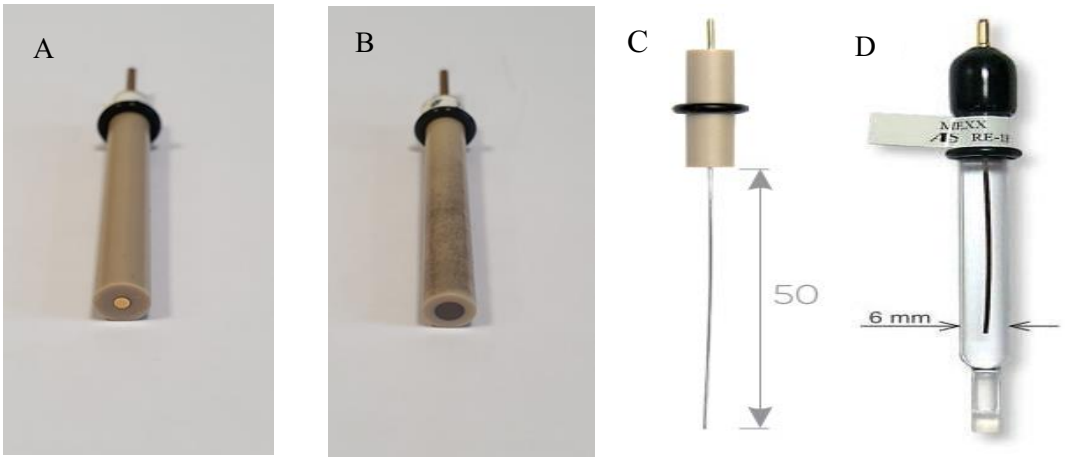
Elektrokemijska mjerenja izvedena su u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji (Slika 9.) na PalmSens potenciostatu/galvanostatu spojenom na računalo pri sobnoj temperaturi ($\theta = \pm 25$ °C) te je za obradu podataka korišten PSTrace softver (Slika 10.). Za elektrokemijska mjerenja korištene su dvije radne elektrode na kojima se odvija redoks reakcija: elektroda od staklastog ugljika tj. glassy carbon elektroda i zlatna elektroda. Referentna elektroda prema kojoj se mjeri odzivni signal jest Ag/AgCl elektroda, dok je protuelektroda pomoću koje se ostvaruje tok električne struje kroz ćeliju platinska žica (Slika 11.). Prije svakog mjerenja, radna elektroda polirana je s α-Al_2O_3 kako bi se dobili što točniji voltamogrami te je sustav propuhivan argonom visoke čistoće Ar 5 (Φ_{Ar} = 99,999 %). Standardna otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline priređivana je svaki dan. Ukupni volumen ispitivane otopine iznosio je 15 mL.



Slika 9. Troelektrodna voltametrijska ćelija.



Slika 10. Aparatura za izvođenje elektrokemijskih mjerenja.



Slika 11. A) Zlatna elektroda B) Elektroda od staklastog ugljika C) Platinska žica D) Ag/AgCl elektroda.

3.3. METODE

3.3.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

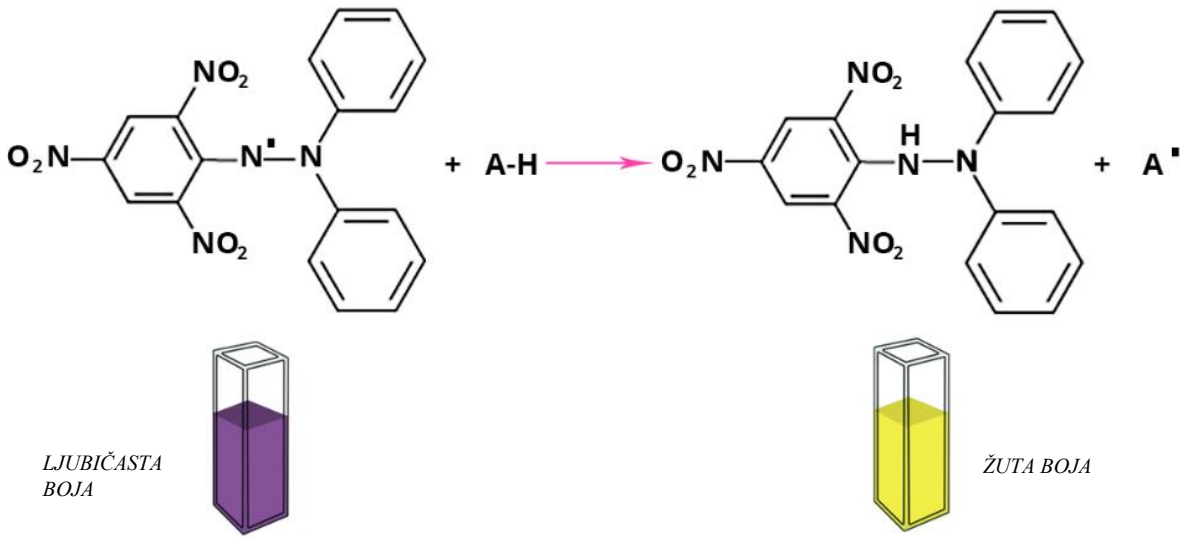
Ciklička voltametrija korištena je za proučavanje elektrokemijskih svojstava 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline te za proučavanje njenog oksidacijskog mehanizma. Također, proučavan je i utjecaj brzine promjene potencijala na oksido-redukcijske strujne vrhove 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Brzina polarizacije elektrode u cikličkoj voltametriji varirala je od 50 mV/s do 300 mV/s.

3.3.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Diferencijalna pulsna voltametrija korištena je za proučavanje oksidacijskih svojstava i adsorpcije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline na površini elektrode od staklastog ugljika i na površini zlatne elektrode te za detekciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (protokatehuične kiseline) u realnim uzorcima pomoću elektrode od staklastog ugljika. Navedena metoda omogućila je praćenje utjecaja pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha pri čemu je utvrđeno da oksidacija istraživanog polifenola ovisi o pH. Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni su u otopinama 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u granicama potencijala od – 0,4 V do 1,0 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu u vodenom mediju uz brzinu polarizacije elektrode od 5 mVs^{-1}, visinu pulsa 25 mV, širinu pulsa 70 ms i scan increment 5 mV.

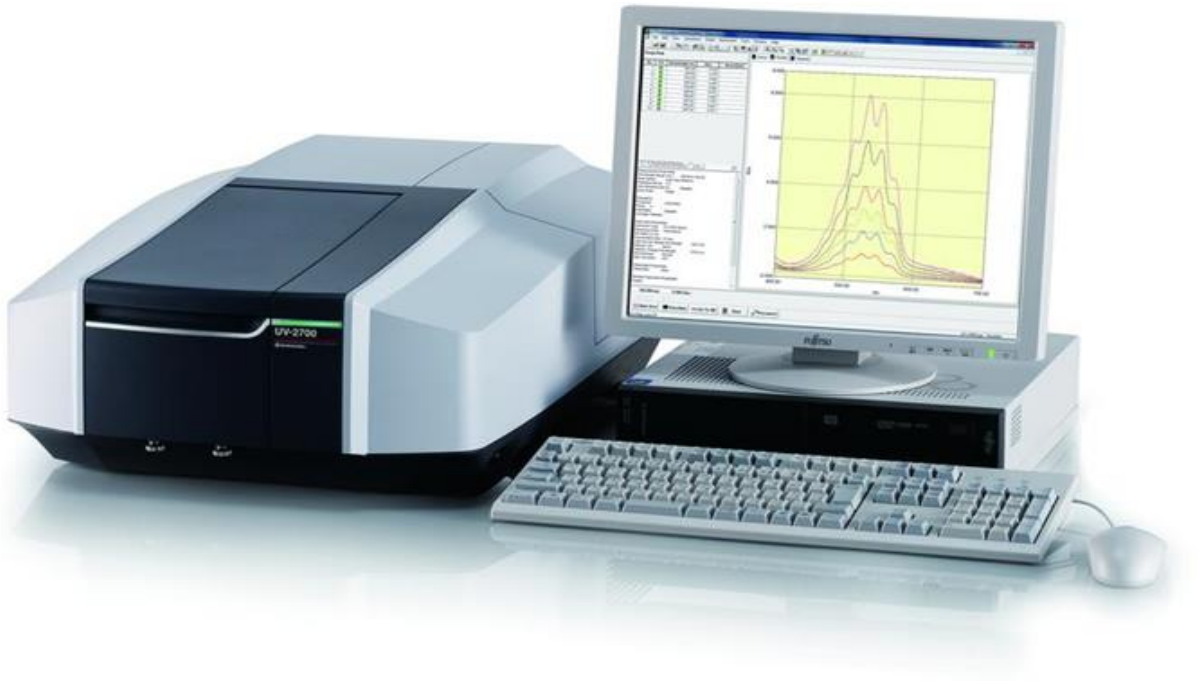
3.3.3. DPPH METODA

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) stabilni je slobodni radikal, koji zbog posjedovanja nesparenog elektrona apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri 517 nm (ljubičasta boja). Atom dušika koji sadrži nespareni elektron u DPPH radikalu reducira se primanjem atoma vodika iz antioksidansa u odgovarajući hidrazin. Pretvorbom u neradikalni oblik dolazi do smanjenja apsorbancije pri čemu se mijenja boja iz ljubičaste u žutu (Slika 12.). Ovo svojstvo omogućava vizualno praćenje reakcije. Smanjenje apsorbancije proporcionalno je aktivnosti antioksidansa. DPPH metodu razvio je 1958. godine Blois, a modificirali su je Brand-Williams i sur. [34-37].



Slika 12. Primarna reakcija DPPH i antioksidansa.

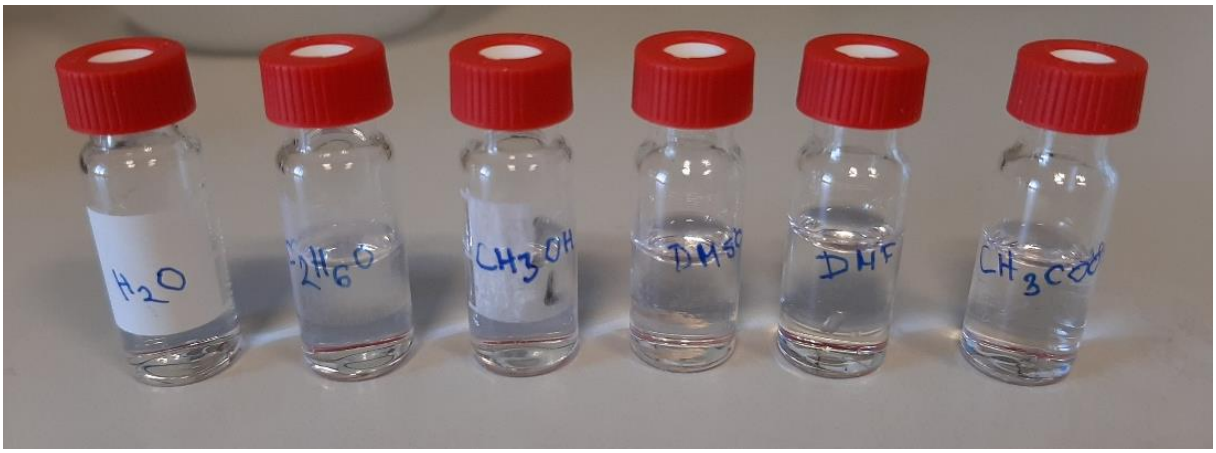
Nakon što su pripremljene otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u metanolu (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, $c = 2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c = 4 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c = 6 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} i $c = 8 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}), svježa DPPH otopina pripremljena je u metanolu prema Brand-Williams metodi. Nakon snimljene dvije kontrole koje se sastoje od 500 μL DPPH + 100 μL metanola (u razmaku od 2 minute), u kivete se dodaje 100 μL otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline i 500 μL DPPH pri čemu dolazi do reakcije uklanjanja radikala. UV-Vis mjerenja izvedena su pomoću Shimadzu UV-2600 spektrofotometra pri λ_{max} = 518 nm (Slika 13.). Za mjerenja su se koristile plastične kivete. Rezultati mjerenja su iskazani kao % inhibicije (%DPPH).



Slika 13. UV-VIS spektofotometar Shimadzu UV-2600.

3.3.4. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI 3,4-DIHIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Topljivost 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ispitana je u destiliranoj vodi, etanolu, metanolu, DMF, DMSO te u octenoj kiselini (Slika 14.). U svim otapalima vrlo je dobra topljivost tj. ispitivani spoj je topljiv je u svim otapalima.



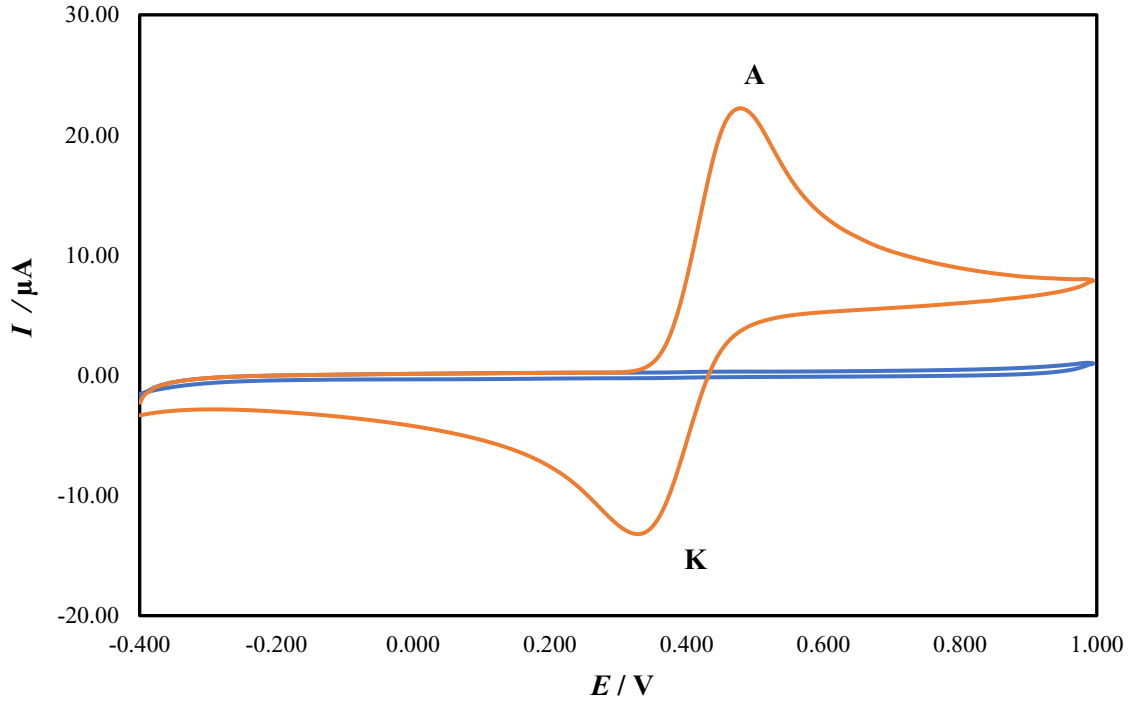
Slika 14. Ispitivanje topljivosti 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

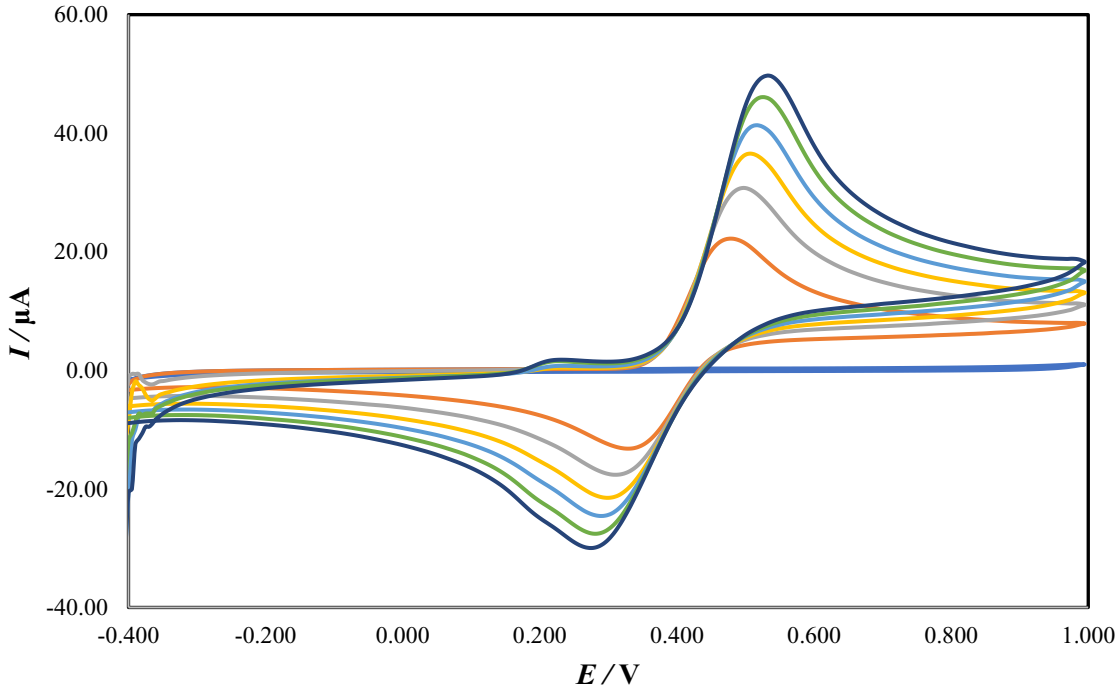
Utjecaj brzine promjene potencijala elektrode od staklastog ugljika

Elektrokemijska svojstva 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline najprije su proučavana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od -0,4 V do 1,0 V. Na slici 15. prikazan je ciklički voltamogram blank otopine (pufer pH = 4) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = 1·10^{-3} mol/dm^3) koristeći elektrodu od staklastog ugljika, pri v = 50 mV/s. Cikličkom voltametrijom detektirani su jedan anodni strujni vrh (A) pri potencijalu, $E_{p,a}$ = 0,54 V i jedan katodni strujni vrh (K) pri potencijalu, $E_{p,k}$ = 0,285 V. Navedeno odgovara oksidaciji hidroksilne skupine u 3,4-dihidroksibenzojevoj kiselini (protokatehuičnoj kiselini) te redukciji oksidacijskog produkta.



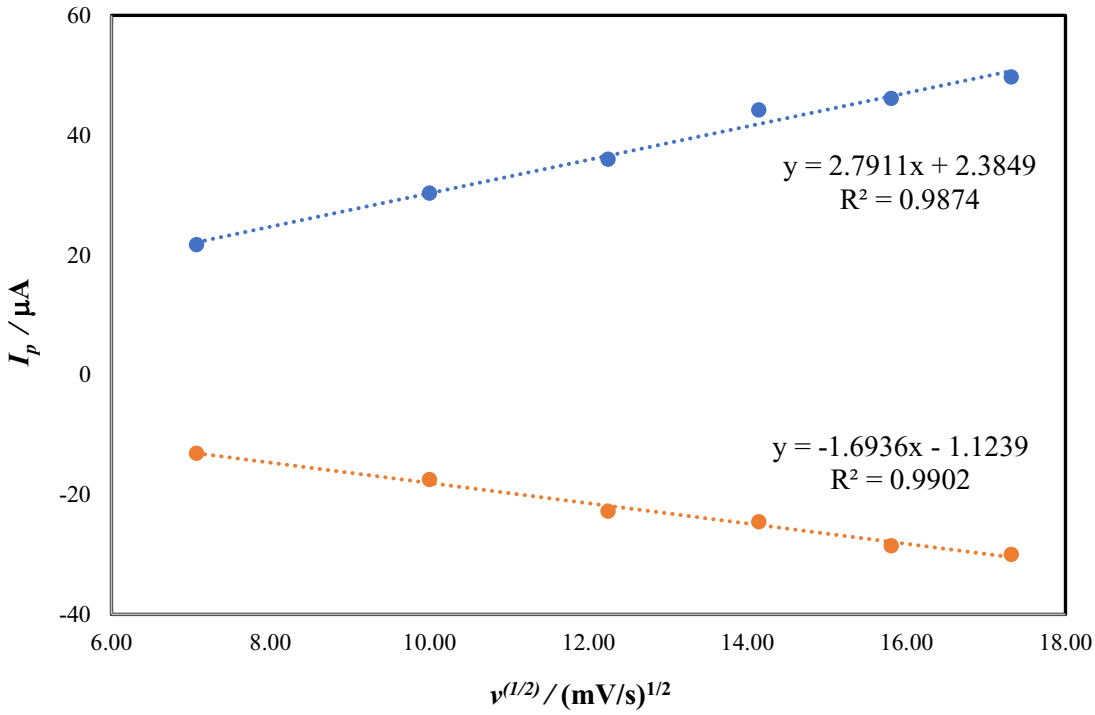
Slika 15. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (—) (c = 1·10^{-3} mol/dm^3), v = 50 mV/s.

Ciklički voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = 1·10^{-3} mol/dm^3) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode (v = 50, 100, 150, 200, 250 i 300 mV/s) prikazani su na slici 16. Utvrđeno je da struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



Slika 16. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = 1·10^{-3} mol/dm^3) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode (v = 50 mV/s (—), 100 mV/s (—), 150 mV/s (—), 200 mV/s (—), 250 mV/s (—), 300 mV/s (—)).

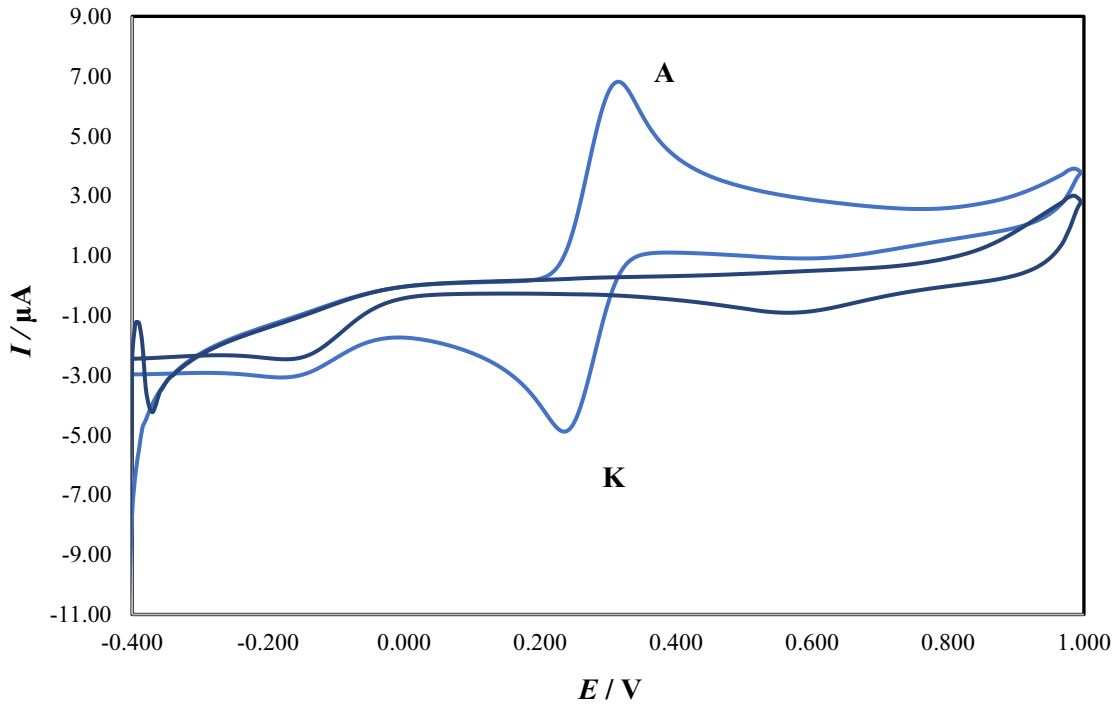
Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o drugom korijenu brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) pokazuje linearnu ovisnost za anodni i katodni strujni vrh što ukazuje da je oksidacijski mehanizam 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline difuzijski kontroliran proces (Slika 17.).



Slika 17. Struja anodnog i katodnog strujnog vrha, I_p kao funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode, $v^{1/2}$.

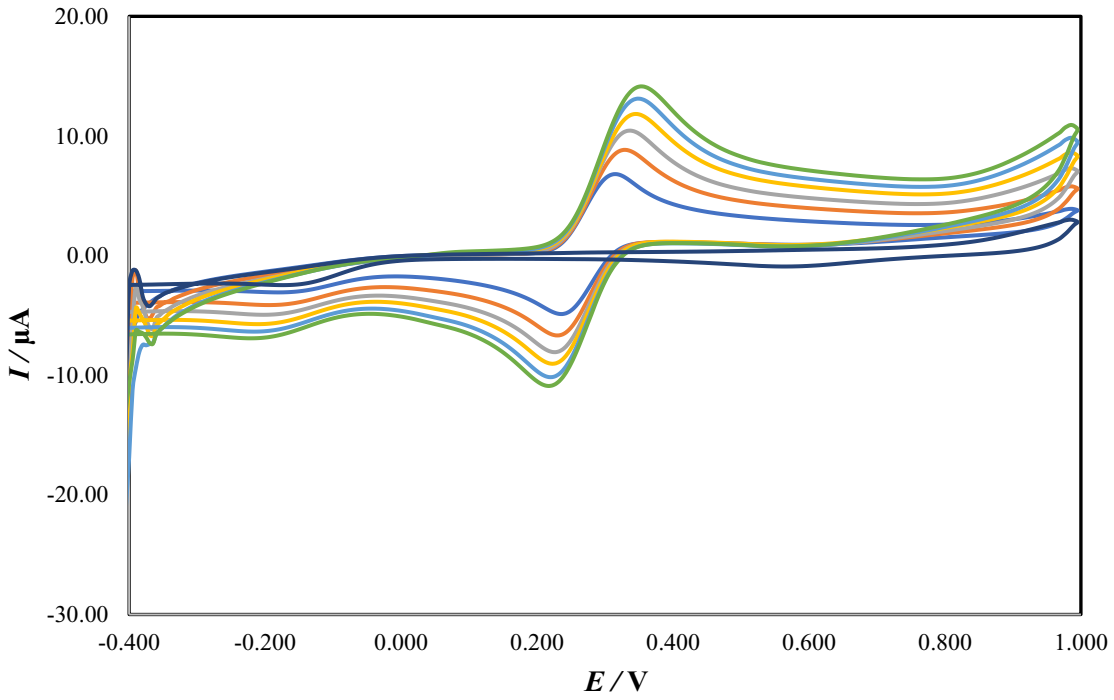
Utjecaj brzine promjene potencijala zlatne elektrode

Elektrokemijska svojstva 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline najprije su proučavana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od -0,40 V do 1,0 V. Na slici 18. prikazan je ciklički voltamogram blank otopine (pufer pH = 6) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = 1·10^{-3} mol/dm^3) koristeći zlatnu elektrodu, pri v = 50 mV/s. Cikličkom voltametrijom detektirani su jedan anodni strujni vrh (A) pri potencijalu, $E_{p,a}$ = 0,32 V i jedan katodni strujni vrh (K) pri potencijalu, $E_{p,k}$ = 0,235 V. Navedeno odgovara oksidaciji hidroksilne skupine u 3,4-dihidroksibenzojevoj kiselini (protokatehuičnoj kiselini) te redukciji oksidacijskog produkta.



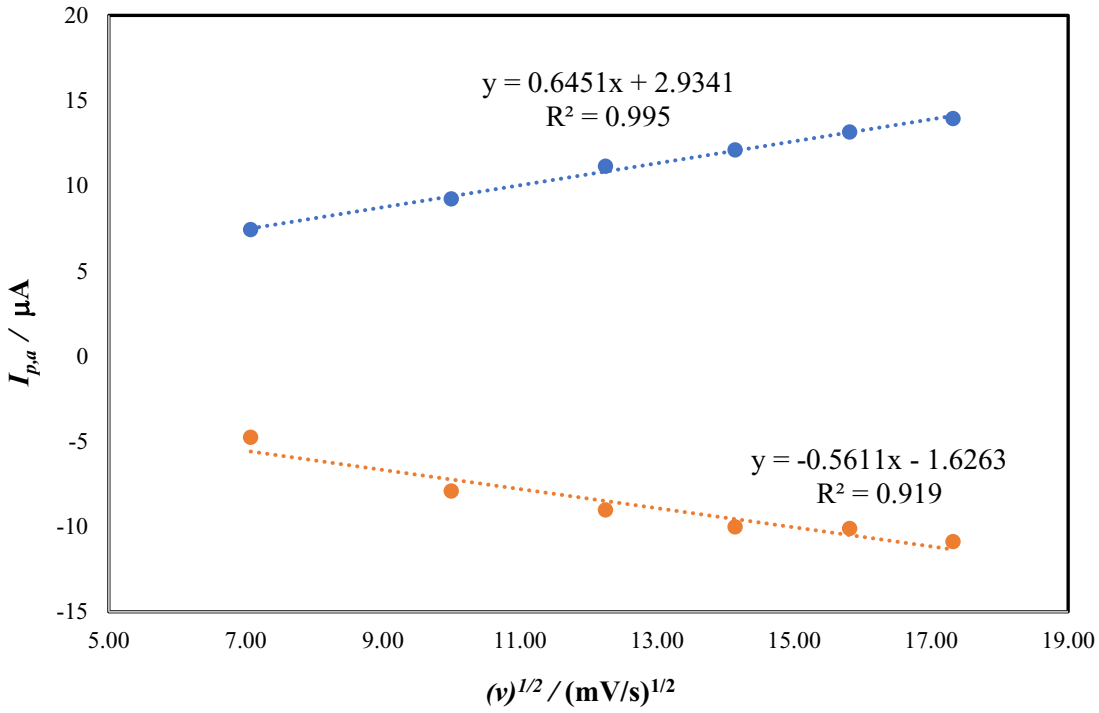
Slika 18. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (▬) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (▬) ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3), $v = 50$ mV/s.

Ciklički voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50$, 100, 150, 200, 250 i 300 mV/s) prikazani su na slici 19. Utvrđeno je da struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



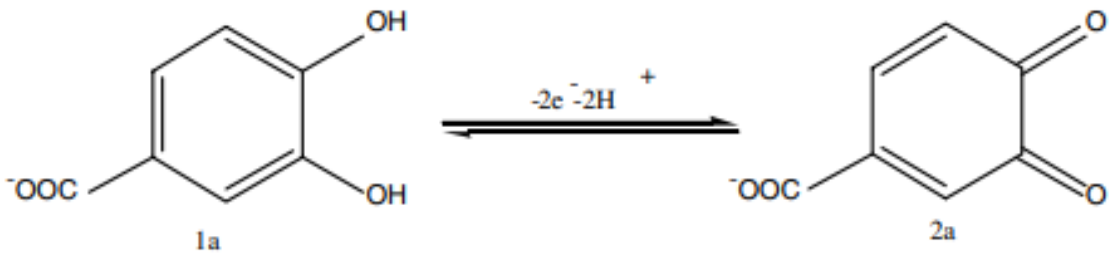
Slika 19. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode (v = 50 mV/s (—), v = 100 mV/s (—), v = 150 mV/s (—), v = 200 mV/s (—), v = 250 mV/s (—), v = 300 mV/s (—)).

Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o drugom korijenu brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) pokazuje linearnu ovisnost za anodni i katodni strujni vrh što ukazuje da je oksidacijski mehanizam 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline difuzijski kontroliran proces (Slika 20.). Male promjene funkcije $I_{p,a}$ s povećanjem brzine polarizacije elektrode ukazuju na EC oksidacijski mehanizam (elektrokemijska oksidacija nakon koje slijedi kemijska reakcija).



Slika 20. Struja anodnog i katodnog strujnog vrha, I_p kao funkcija drugog korijena brzine promjene potencijala, $v^{1/2}$.

Na slici 21. prikazan je oksidacijski mehanizam 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Oksidacijski mehanizam uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona pri čemu kao finalni produkt oksidacije nastaje *o*-benzokinon [38].

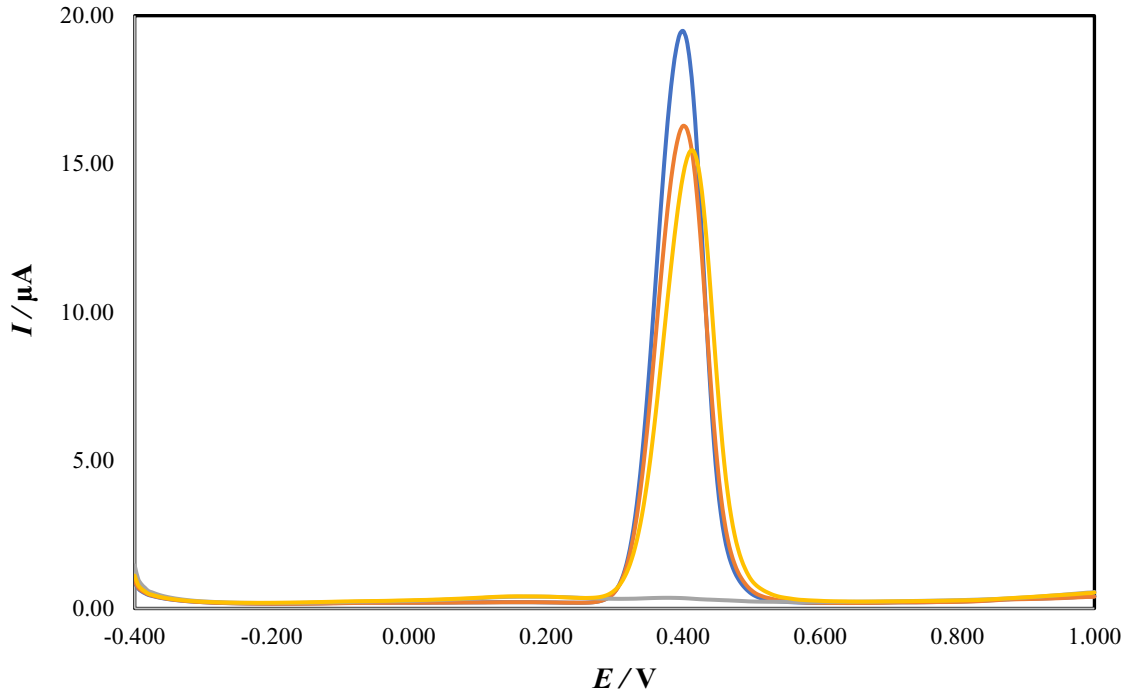


Slika 21. Oksidacijski mehanizam 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (1a) u *o*-benzokinon (2a).

4.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

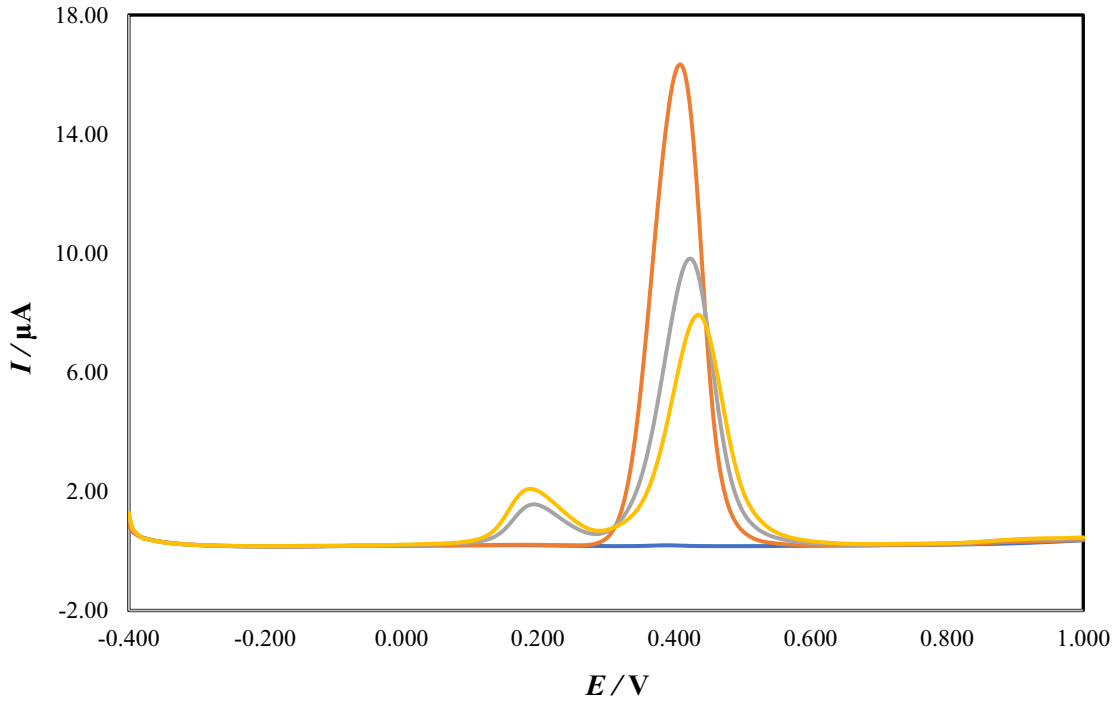
Ispitivanje utjecaja vremena i adsorpcije na elektrodi od staklastog ugljika

Na slici 22. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) različitog vremena stajanja (svježa PCA, 1 dan stara PCA i 2 dana stara PCA) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima može se uočiti da najviši oksidacijski strujni vrh pokazuje 2 dana stara otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline što ukazuje na povećanje udjela disociranog oblika 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline.



Slika 22. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitog vremena stajanja (svježa PCA (—), 1 dan stara PCA (—), 2 dana stara PCA (—)) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

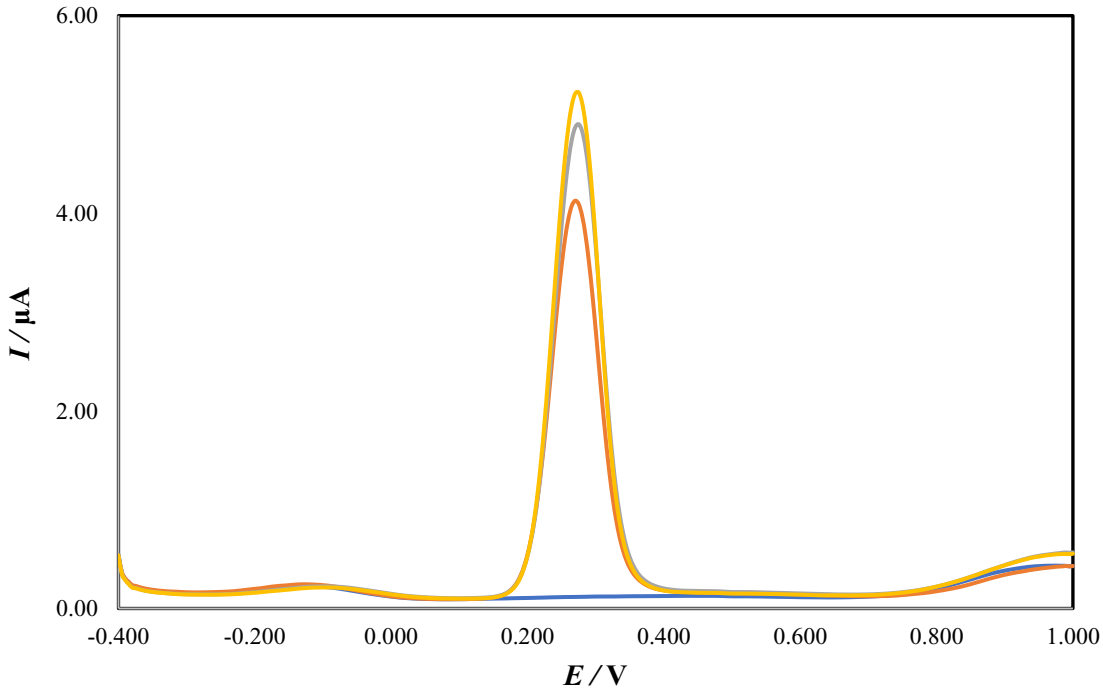
Na slici 23. prikazani su uzastopno snimljeni diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = 1·10^{-3} mol dm^{-3}) u puferu pH = 4 koristeći elektrodu od staklastog ugljika (*glassy carbon* elektrodu). Utvrđeno je da sukcesivnim snimanjem voltamograma opada visina oksidacijskog strujnog vrha 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Navedeno ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline na površinu elektrode od staklastog ugljika.



Slika 23. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—) i uzastopno snimljene otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (1. *scan* (—), 2. *scan* (—), 3. *scan* (—)) na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

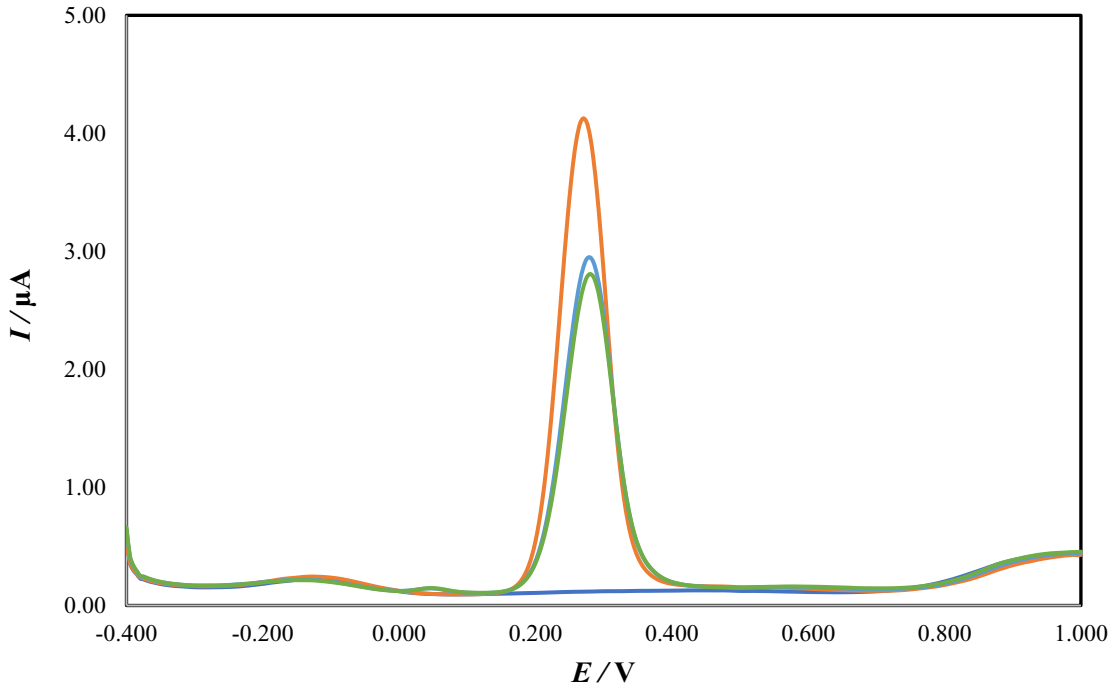
Ispitivanje utjecaja vremena i adsorpcije na zlatnoj elektrodi

Na slici 24. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) različitog vremena stajanja (svježa PCA, 1 dan stara PCA i 2 dana stara PCA) snimljeni na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima može se uočiti da najviši oksidacijski strujni vrh pokazuje 2 dana stara otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline što ukazuje na povećanje udjela disociranog oblika 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline.



Slika 24. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitog vremena stajanja (svježa PCA (—), 1 dan stara PCA (—), 2 dana stara PCA (—)) snimljeni na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6.

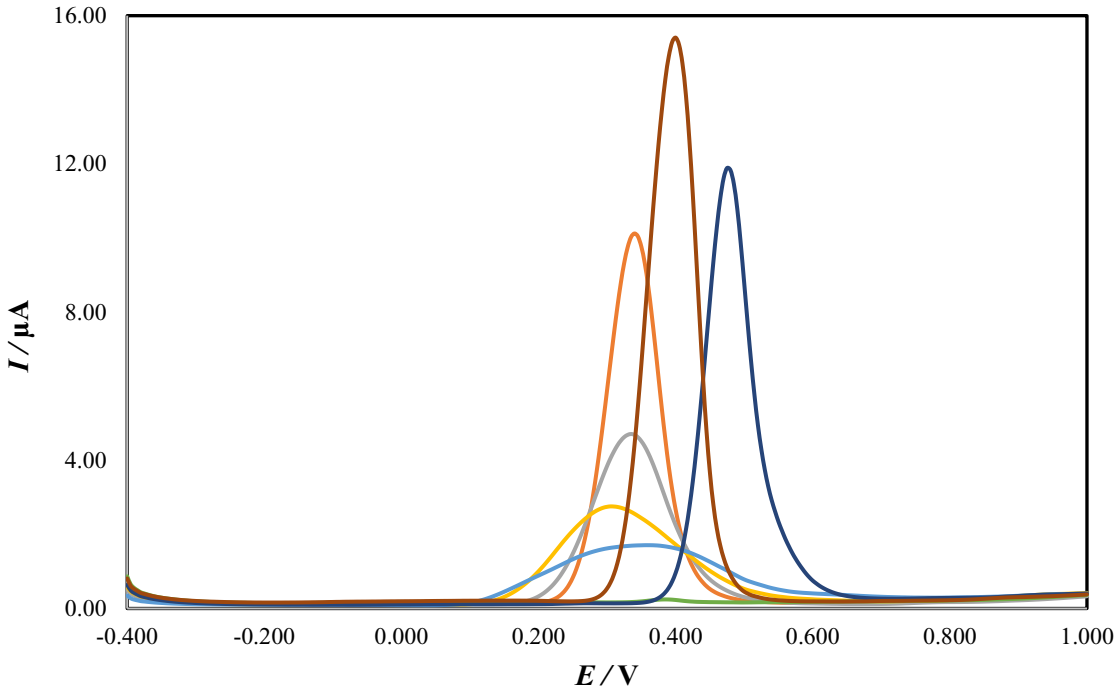
Na slici 25. prikazani su uzastopno snimljeni diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) u puferu pH = 6 koristeći zlatnu elektrodu. Utvrđeno je da sukcesivnim snimanjem voltamograma opada visina oksidacijskog strujnog vrha 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Navedeno ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline na površinu zlatne elektrode. Adsorpcija na zlatnoj elektrodi manje je izražena u odnosu na adsorpciju na elektrodi od staklastog ugljika.



Slika 25. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i uzastopno snimljene otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (1. *scan* (—), 2. *scan* (—), 3. *scan* (—)) na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6.

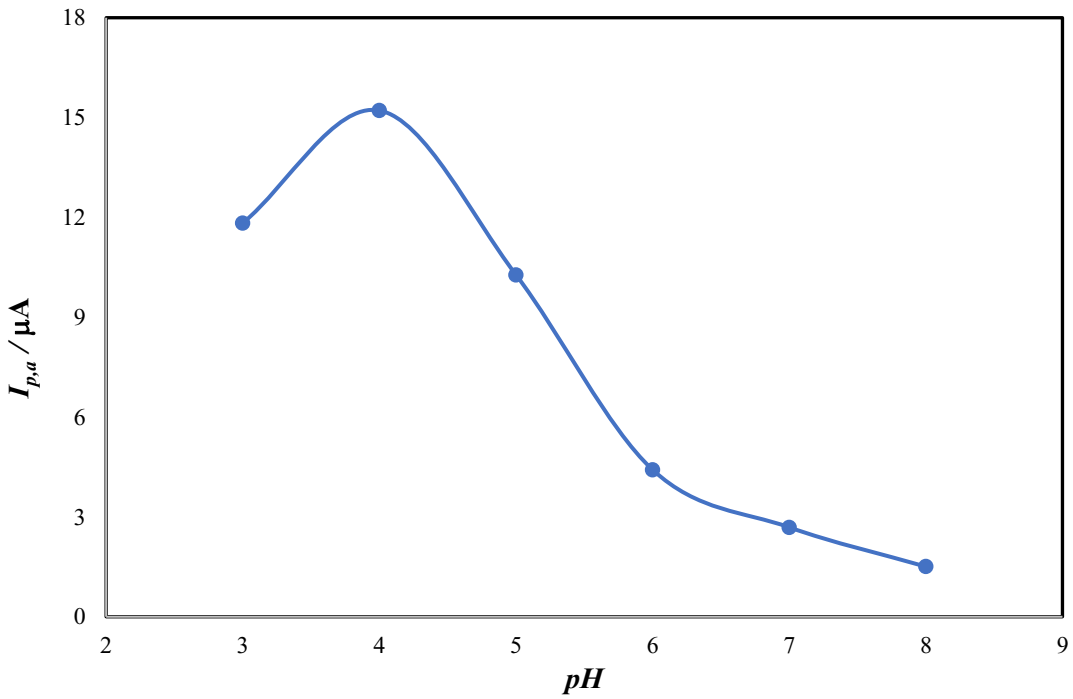
Ispitivanje utjecaja pH na elektrodi od staklastog ugljika

Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c =1·10^{-3} mol/dm^3) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferima pH = 3-8 prikazani su na slici 26. Na slici je vidljivo da se s povećanjem pH vrijednosti potencijali oksidacijskog strujnog vrha pomiču prema negativnijim vrijednostima.



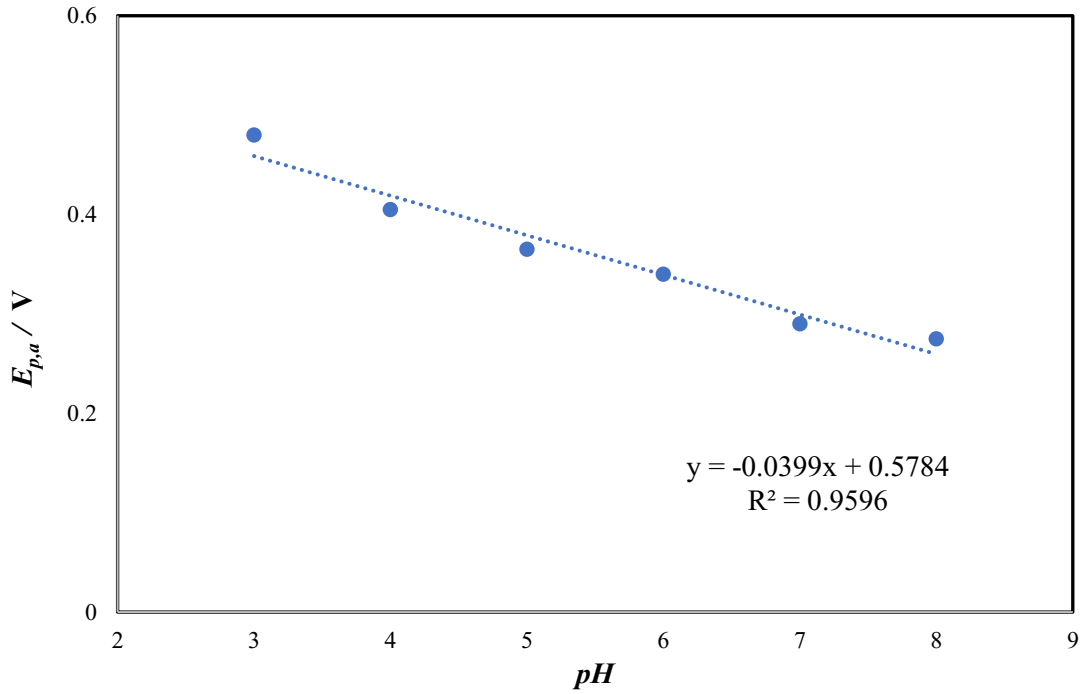
Slika 26. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH = 3 (—), pH = 4 (—), pH = 5 (—), pH = 6 (—), pH = 7 (—) i pH = 8 (—)).

Na slici 27. prikazana je ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Najviši strujni vrh 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline detektiran je pri pH = 4 koristeći elektrodu od staklastog ugljika te se smanjivao u kiselijem i alkalnijem mediju.



Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha, $I_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}).

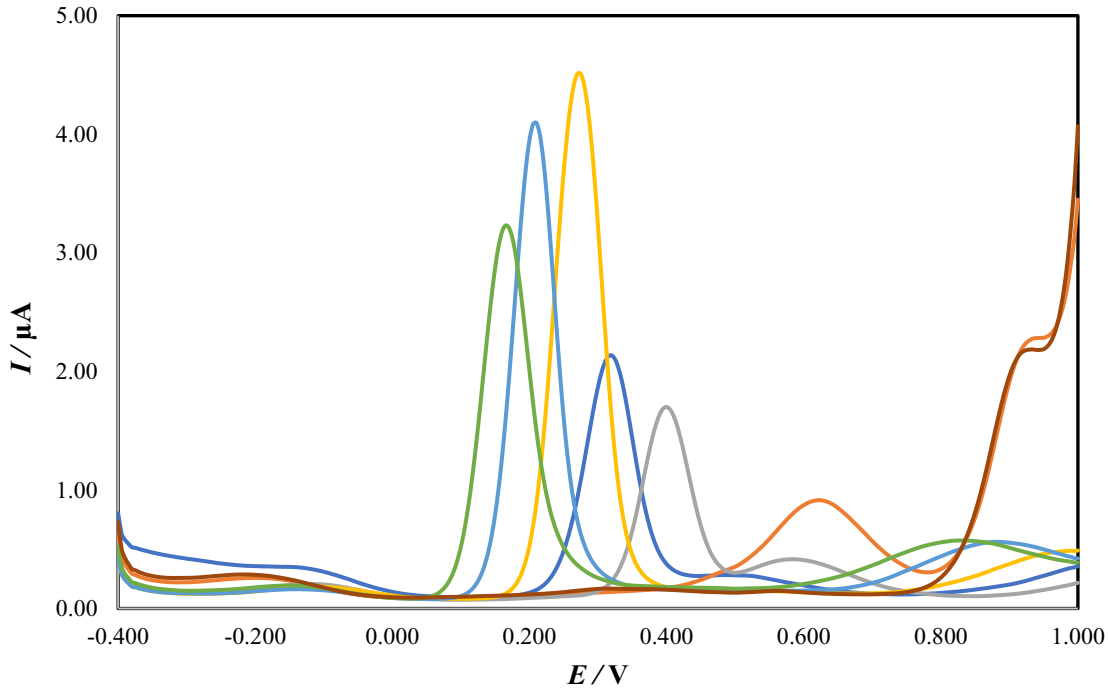
Na slici 28. prikazana je ovisnost potencijala oksidacijskog strujnog o pH vrijednosti te se može uočiti da potencijal anodnog strujnog vrha linearno ovisi o pH vrijednosti u ispitivanom pH području (od pH = 3 do pH = 8), a nagib pravca iznosi 39,9 mV. Navedeno ukazuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu istog broja protona i elektrona.



Slika 28. Grafički prikaz ovisnosti potencijala oksidacijskog strujnog vrha, $E_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}).

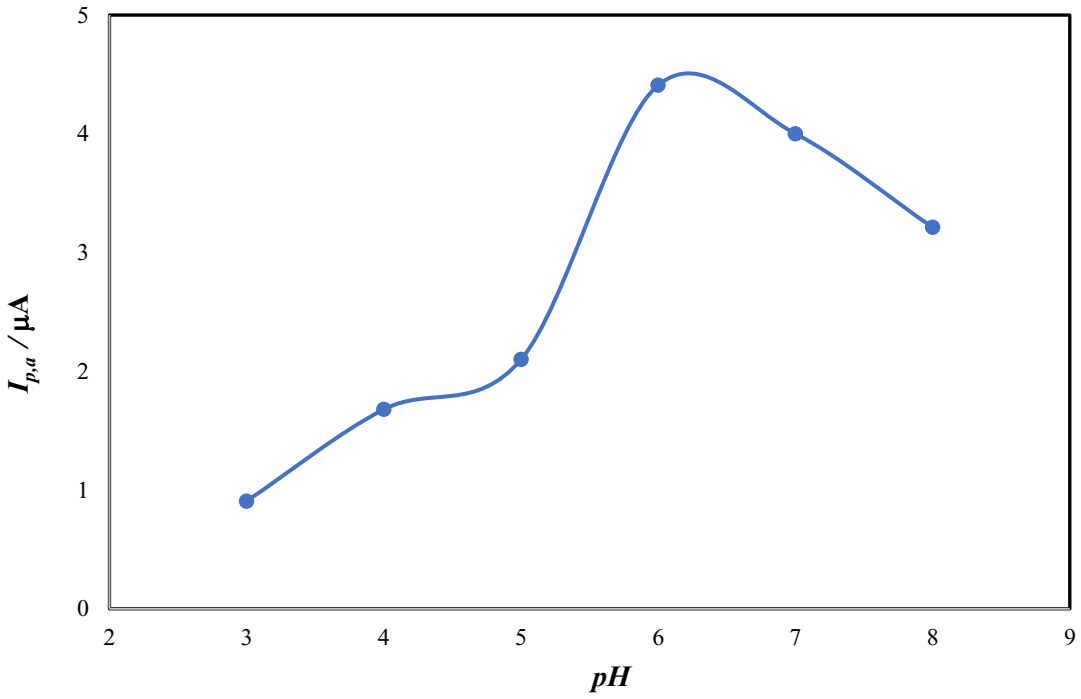
Ispitivanje utjecaja pH na zlatnoj elektrodi

Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3) snimljeni na zlatnoj (Au) elektrodi u puferima pH = 3-8 prikazani su na slici 29. Na slici je vidljivo da se s povećanjem pH vrijednosti potencijali oksidacijskog strujnog vrha pomiču prema negativnijim vrijednostima.



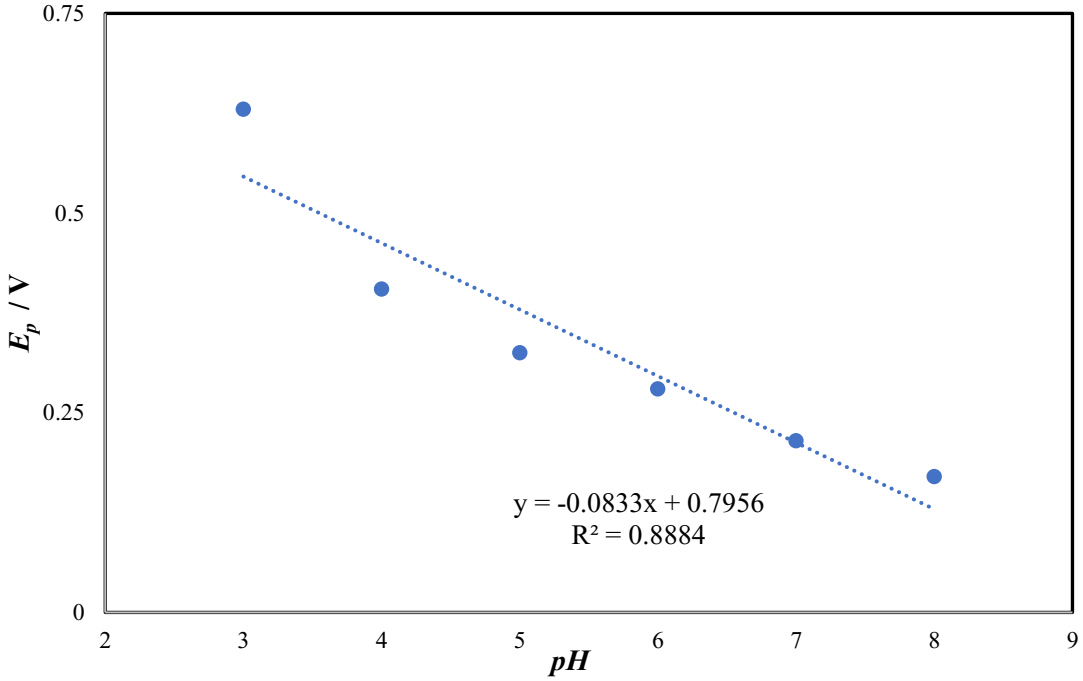
Slika 29. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) snimljeni na zlatnoj elektrodi kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH = 3 (—), pH = 4 (—), pH = 5 (—), pH = 6 (—), pH = 7 (—) i pH = 8 (—)).

Na slici 30. prikazana je ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Najviši strujni vrh 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline detektiran je pri pH = 6 koristeći zlatnu elektrodu te se smanjivao u kiselijem i alkalnijem mediju.



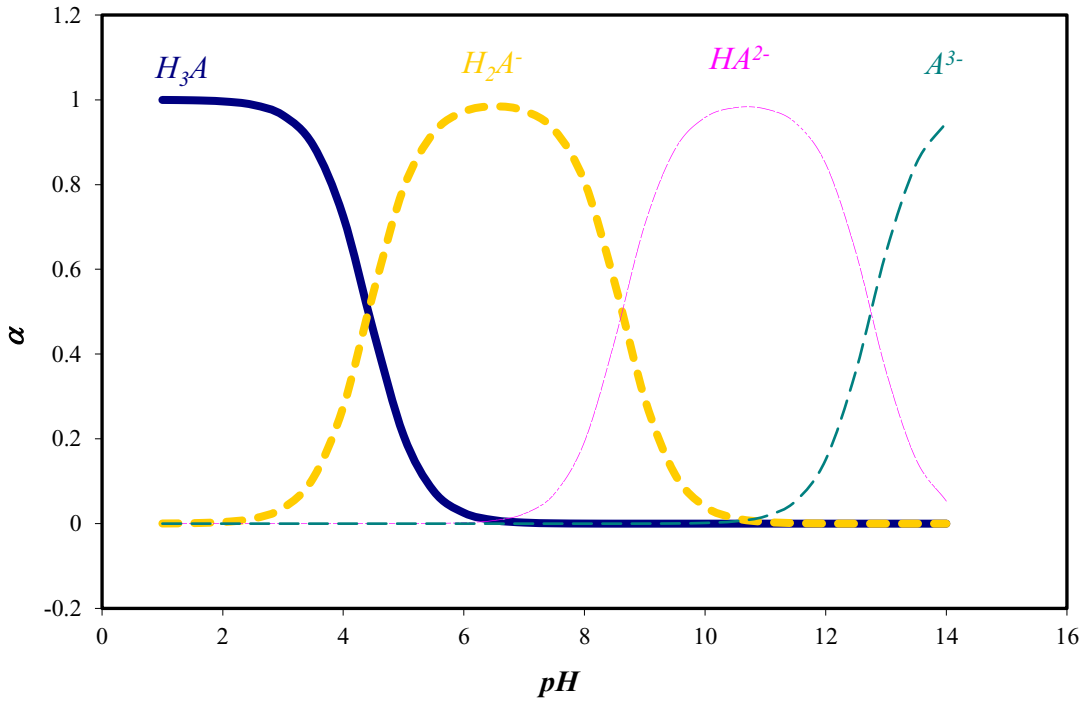
Slika 30. Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha, $I_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}).

Na slici 31. prikazana je ovisnost potencijala oksidacijskog strujnog o pH vrijednosti te može se uočiti da potencijal anodnog strujnog vrha linearno ovisi o pH vrijednosti u ispitivanom pH području (od pH = 3 do pH = 8), a nagib pravca iznosi 83,3 mV. Navedeno ukazuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu istog broja protona i elektrona.



Slika 31. Grafički prikaz ovisnosti potencijala oksidacijskog strujnog vrha, $E_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}).

Iz dijagrama specijacije (Slika 32.) vidljivo je da 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina spontano deprotonira pri pH = 1, što dokazuje da u oksidaciji 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline i u adsorpcijskim procesima do pH = 6 sudjeluje deprotonirani oblik H_2A^-. Pri višim pH vrijednostima, daljnjom spontanom deprotonacijom nastaju drugi disocirani oblici 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (HA^{2-}, A^{3-}).



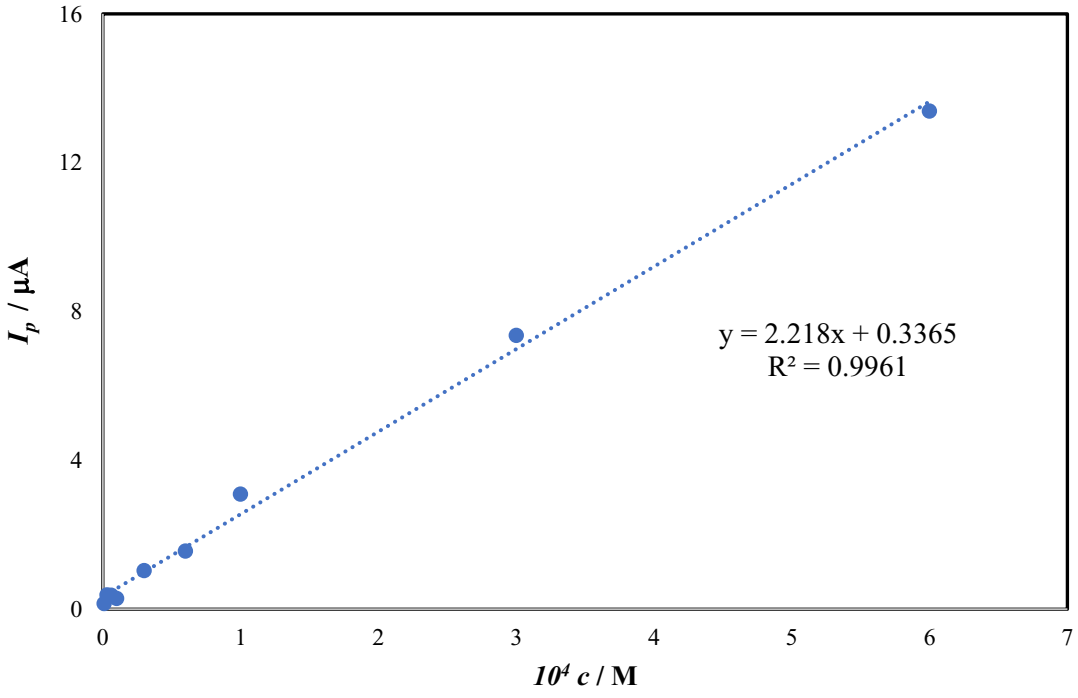
Slika 32. Dijagram disocijacije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline: nedisocirani oblik (H_3A), deprotonirani oblici (H_2A^-, HA^{2-}, A^{3-}). Konstante disocijacije ($pKa_1 = 4{,}5$; $pKa_2 = 9{,}00$; $pKa_3 = 13{,}00$).

Ispitivanje utjecaja koncentracije na elektrodi od staklastog ugljika

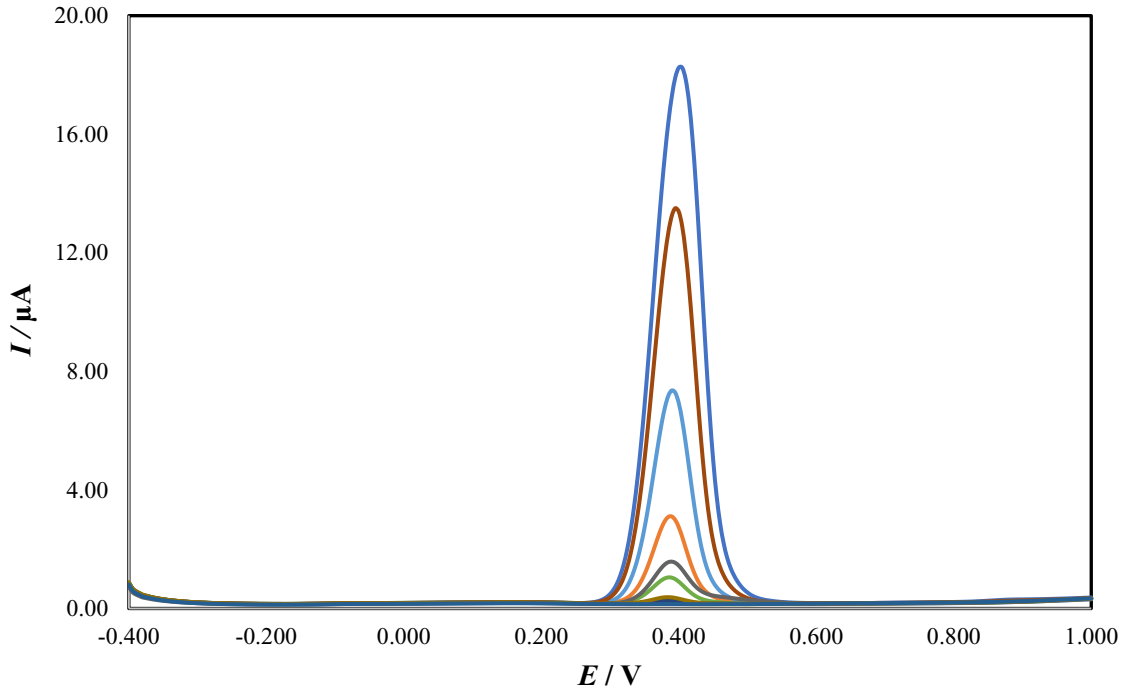
Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u otopinama 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitih koncentracija snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4 prikazani su na slici 34. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima može se uočiti da najniža koncentracija koja se može detektirati (granica detekcije) iznosi $1 \cdot 10^{-6}$ mol/dm^3. Utvrđeno je da struja oksidacijskog strujnog vrha raste s povećanjem koncentracije ispitivanog polifenola. Kod većih koncentracija ispitivanog polifenola dolazi do odstupanja od linearnosti, a razlog su intenzivnije interakcije s molekulama adsorbiranim na površini radne elektrode i difuzijska struja. Linearni trend tj. linearna ovisnost oksidacijske struje o koncentraciji ispitivanog polifenola može se uočiti u rasponu koncentracija 1 μM do 600 μM (Slika 33.).

Tablica 2. Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline snimljene na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

$10^4 c$/M	$I_{p,a}$ / μA
6,00	13,386
3,00	7,357
1,00	3,094
0,60	1,564
0,30	1,039
0,10	0,289
0,06	0,381
0,03	0,385
0,01	0,154



Slika 33. Kalibracijski dijagram 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline; struja anodnog strujnog vrha, $I_{p,a}$ kao funkcija koncentracije.



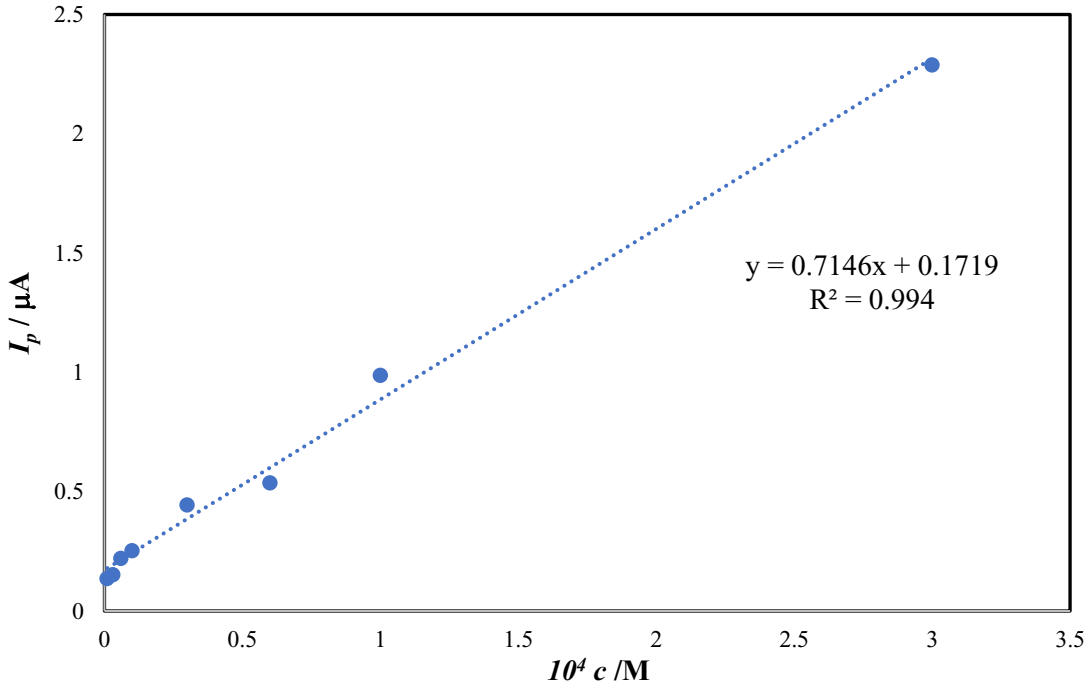
Slika 34. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (▬) i otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitih koncentracija (c = $1 \cdot 10^{-6}$ M (▬), $3 \cdot 10^{-6}$ M (▬), $6 \cdot 10^{-6}$ M (▬), $1 \cdot 10^{-5}$ M (▬), $3 \cdot 10^{-5}$ M (▬), $1 \cdot 10^{-4}$ M (▬), $3 \cdot 10^{-4}$ M (▬), $1 \cdot 10^{-3}$ M (▬)) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

Ispitivanje utjecaja koncentracije na zlatnoj elektrodi

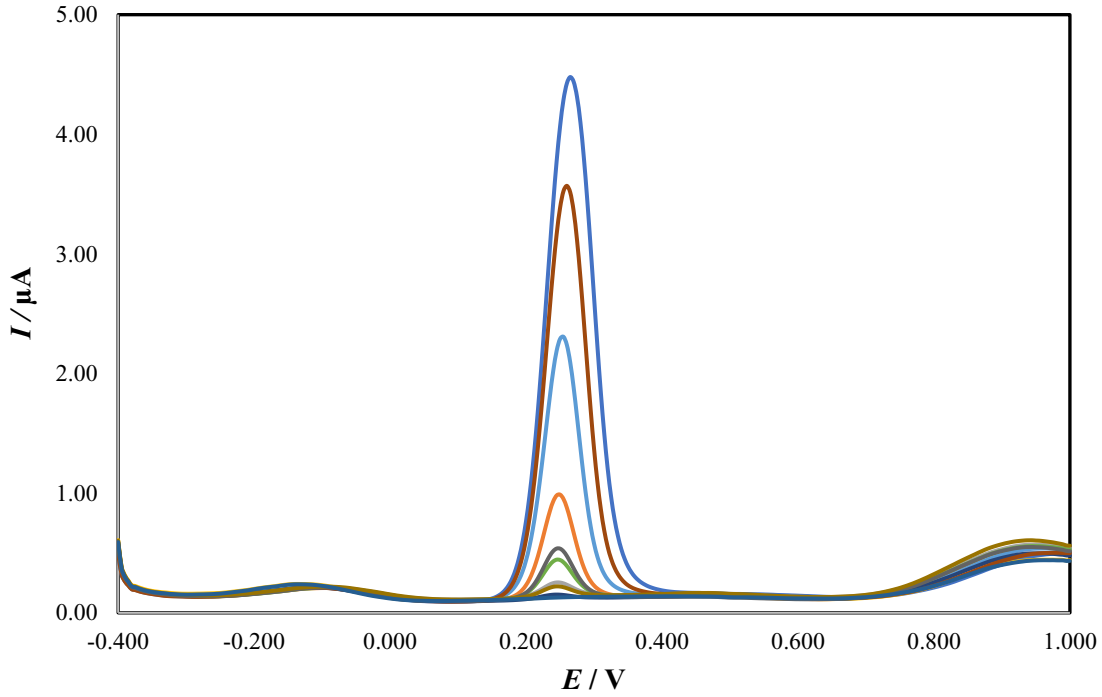
Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u otopinama 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitih koncentracija snimljeni na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6 prikazani su na slici 36. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima može se uočiti da najniža koncentracija koja se može detektirati (granica detekcije) iznosi $3 \cdot 10^{-6}$ mol/dm^3. Utvrđeno je da struja oksidacijskog strujnog vrha raste s povećanjem koncentracije ispitivanog polifenola. Linearni trend tj. linearna ovisnost oksidacijske struje o koncentraciji ispitivanog polifenola može se uočiti u rasponu koncentracija od 1 µM do 1 mM (Slika 35.).

Tablica 3. Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline snimljene na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6.

10^4 *c*/M	$I_{p,a}$ / μA
3,00	2,289
1,00	0,988
0,60	0,537
0,30	0,444
0,10	0,253
0,06	0,221
0,03	0,152
0,01	0,136



Slika 35. Kalibracijski dijagram 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline**;** struja anodnog strujnog vrha, $I_{p,a}$ kao funkcija koncentracije.

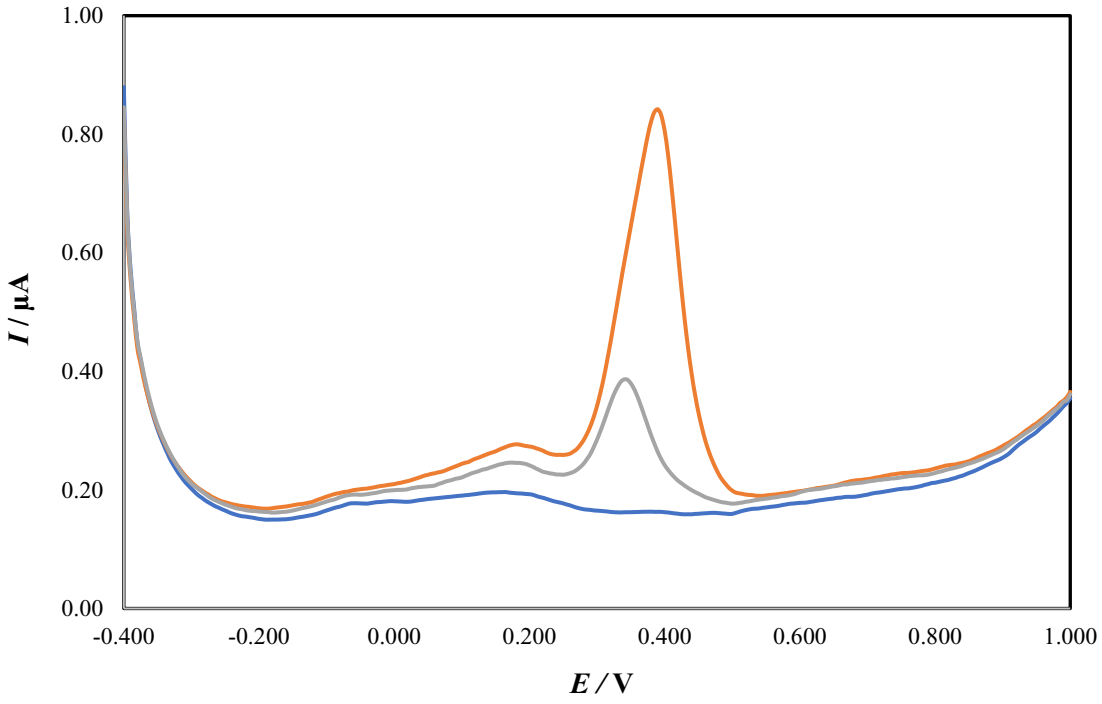


Slika 36. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline različitih koncentracija (c = $1 \cdot 10^{-6}$ M (—), $3 \cdot 10^{-6}$ M (—), $6 \cdot 10^{-6}$ M (—), $1 \cdot 10^{-5}$ M (—), $3 \cdot 10^{-5}$ M (—), $6 \cdot 10^{-5}$ M (—), $1 \cdot 10^{-4}$ M (—), $3 \cdot 10^{-4}$ M (—), $6 \cdot 10^{-4}$ M (—), $1 \cdot 10^{-3}$ M (—)) snimljeni na zlatnoj elektrodi u puferu pH = 6.

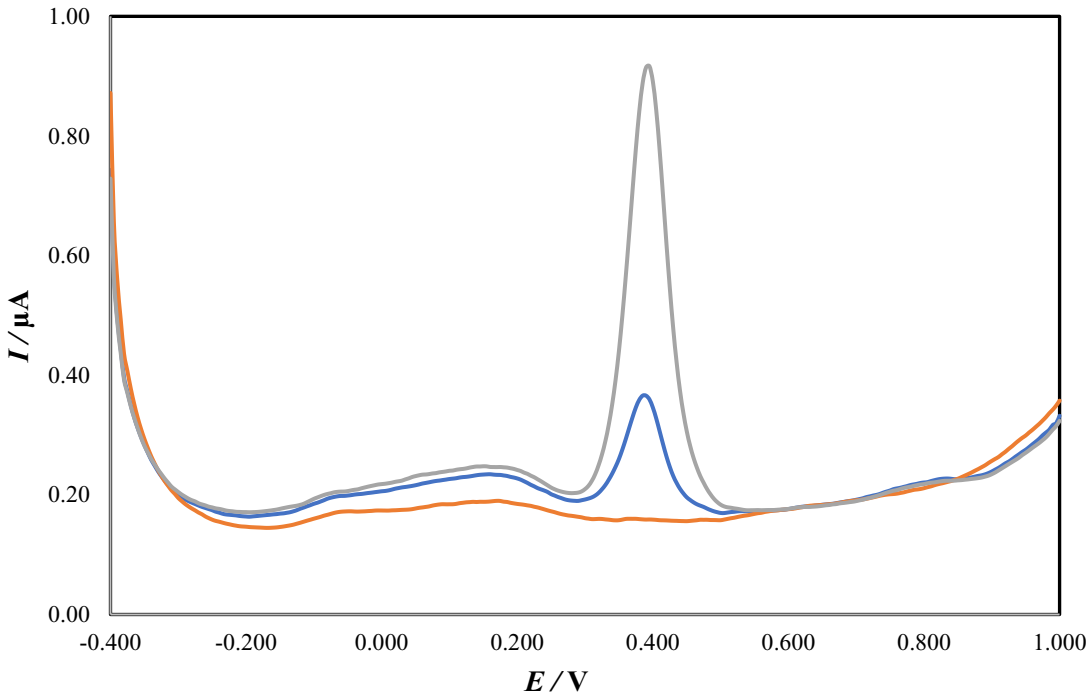
4.3. ANALIZA REALNIH UZORAKA

4.3.1. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

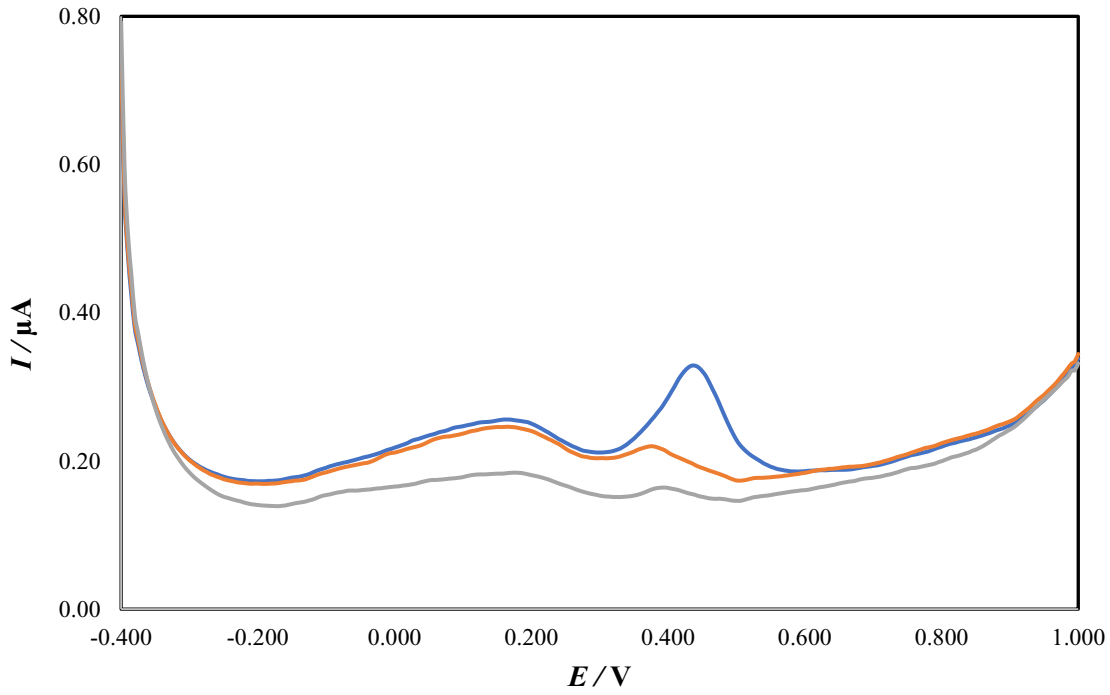
3,4-dihidroksibenzojeva kiselina detektirana je u realnim uzorcima diferencijalnom pulsnom voltametrijom gdje je njezina količina varirala od 2 μM do 9 μM. Na slici 37., slici 38. slici 39. i slici 40. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami četiri ispitivana realna uzorka (sok od jabuke i grožđa, bijelo grožđe, kava od cikorije i kašica od šljive) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima ispitivanih uzoraka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh koji odgovara oksidaciji protokatehuične kiseline. U uzorku soka od jabuke i grožđa (Slika 37.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu $E_{p,a}$, = 0,35 V, u uzorku bijelog grožđa (Slika 38.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu $E_{p,a}$, = 0,39 V, u uzorku kave od cikorije (Slika 39.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu $E_{p,a}$, = 0,38 V te u uzorku kašice od šljive (Slika 40.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu $E_{p,a}$, = 0,36 V. Oksidacija 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u ispitivanim uzorcima dokazana je dodatkom 50 μL otopine 3,4–dihidroksibenzojeve kiseline, koncentracije $1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3.



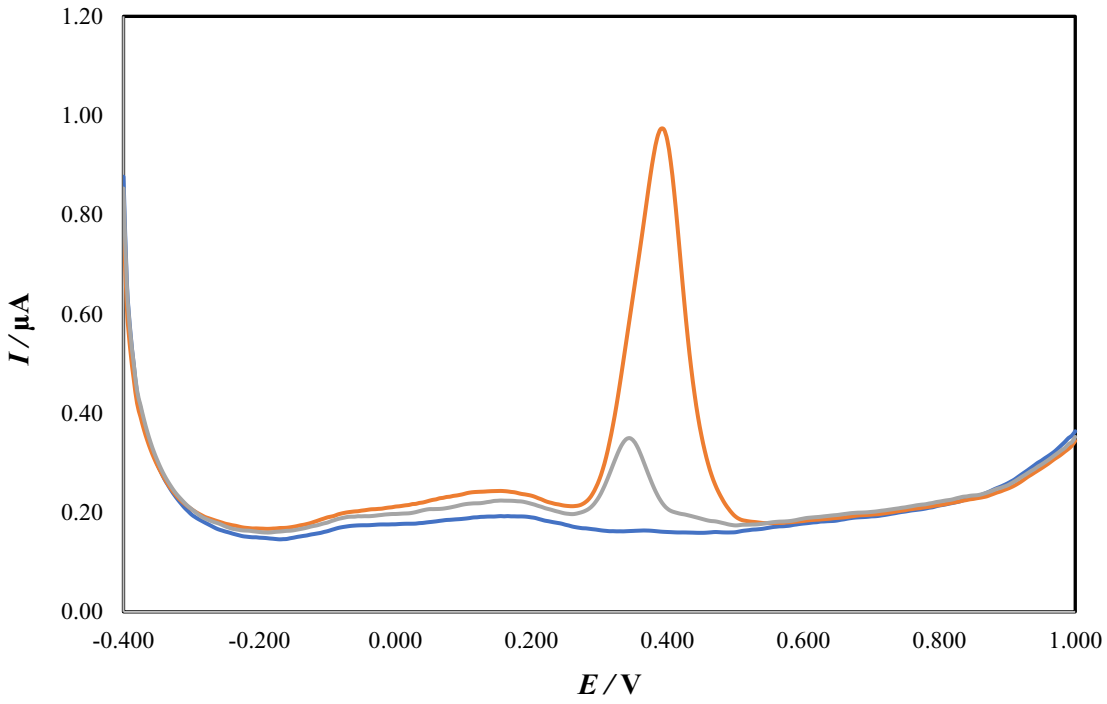
Slika 37. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—), 200 µL uzorka 1 (sok od jabuke i grožđa) u puferu pH = 4 (—) i uzorak 1 u puferu pH = 4 s dodatkom 50 µL otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = $1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.



Slika 38. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—), 200 µL uzorka 2 (bijelo grožđe) u puferu pH = 4 (—) i uzorak 2 u puferu pH = 4 s dodatkom 50 µL otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

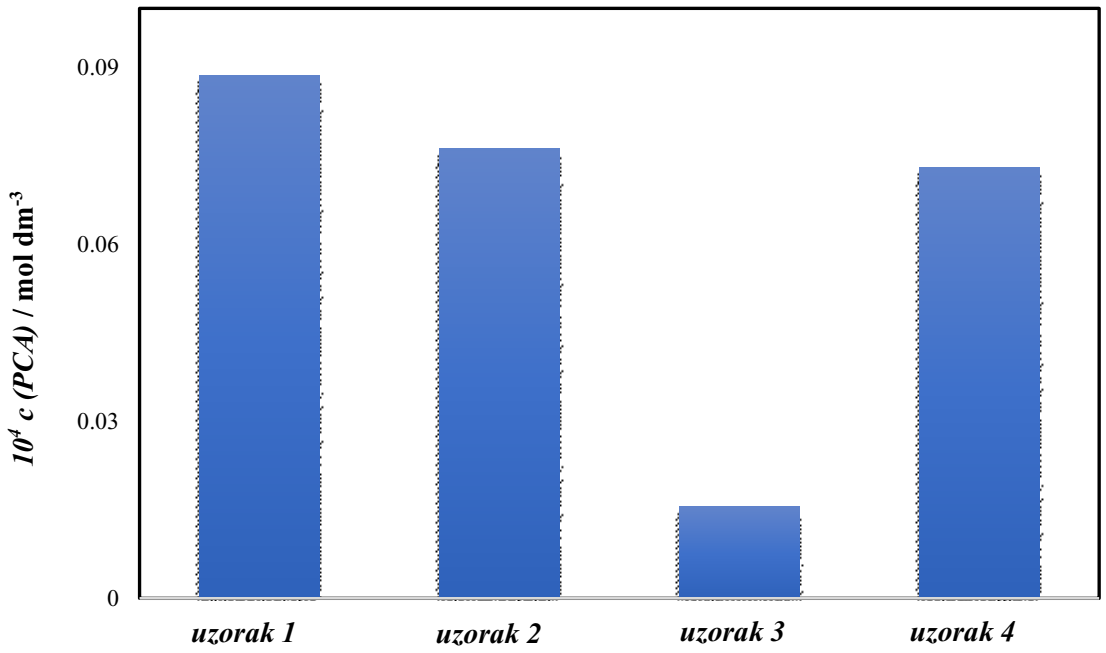


Slika 39. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—), 200 µL uzorka 3 (kava od cikorije) u puferu pH = 4 (—) i uzorak 3 u puferu pH = 4 s dodatkom 50 µL otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.



Slika 40. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (—), 200 µL uzorka 4 (kašica od šljive) (—) i uzorak 4 u puferu pH = 4 s dodatkom 50 µL otopine 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = $1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4.

Na slici 41. Prikazane su koncentracije protokatehuične kiseline u ispitivanim uzorcima određene diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Iz slike je vidljivo da uzorak 1 (sok od jabuke i grožđa) ima najveću, a uzorak 3 (kava od cikorije) najmanju količinu 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline od svih ispitivanih uzoraka.



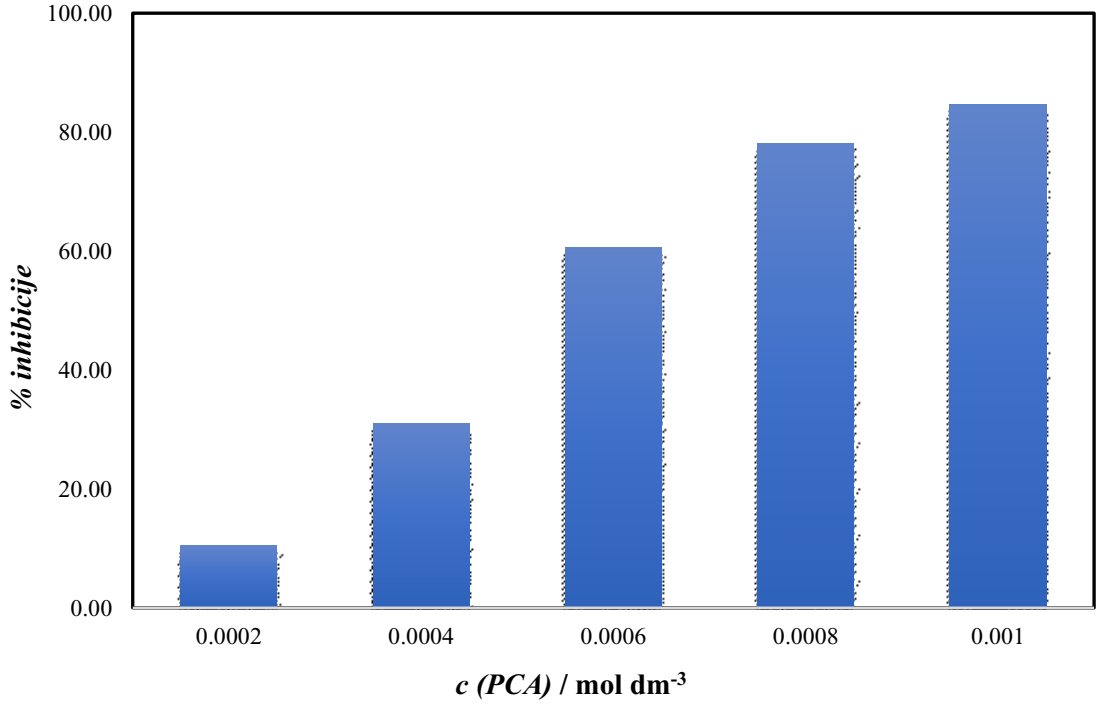
Slika 41. Grafički prikaz koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima.

4.3.2. DPPH METODA

Antioksidativna aktivnost 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ispitana je upotrebom UV/VIS spektroskopije s DPPH reagensom pri čemu se uz promjenu % inhibicije, može uočiti i promjena boje reagensa (otopine DPPH), koja blijedi uslijed procesa redukcije (mijenja se od tamnoljubičaste do bezbojne). UV-Vis mjerenja izvedena su koristeći Shimadzu UV-2600 spektrofotometar pri λ_{max} = 518 nm. Na slici 42. DPPH aktivnost prati linearni trend, dok ne dosegne najvišu koncentraciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Pri najnižoj koncentraciji 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c = $2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) DPPH postotak inhibicije aktivnosti uklanjanja radikala bio je najniži.

Tablica 4. %DPPH pri određenim koncentracijama 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline.

c (uzorak) / mol dm^{-3}	*%DPPH*
$2 \cdot 10^{-4}$	10,44
$4 \cdot 10^{-4}$	30,97
$6 \cdot 10^{-4}$	60,56
$8 \cdot 10^{-4}$	78,03
$1 \cdot 10^{-3}$	84,69



Slika 42. Korelacija između % DPPH (postotka inhibicije) i određenih koncentracija 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (PCA).

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu istraživana su elektrokemijska svojstva 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u pH području od pH = 3,0 do pH = 9,5 koristeći radnu elektrodu od staklastog ugljika (tzv. *glassy carbon elektrodu*) i zlatnu elektrodu. Korištene su dvije metode; ciklička voltametrija i diferencijalna pulsna voltametrija. Ciklička voltametrija korištena je za proučavanje oksidacijskog mehanizma polifenola, dok je diferencijalna pulsna voltametrija korištena za detekciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline, tj. protokatehuične kiseline u realnim uzorcima.

Standardna otopina 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline najprije je ispitivana cikličkom voltametrijom pri čemu je detektiran jedan oksidacijski strujni vrh i jedan redukcijski strujni vrh. Navedeno odgovara oksidaciji hidroksilne skupine u protokatehuičnoj kiselini te redukciji oksidacijskog produkta protokatehuične kiseline. Također, utvrđeno je da struja i potencijal oksidacijskog strujnog vrha rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode te da je oksidacijski mehanizam difuzijski kontroliran proces budući da je struja anodnog strujnog vrha linearna funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode (R^2 vrijednost iznosi oko 0,99).

Ispitivanjem adsorpcije diferencijalnom pulsnom voltametrijom utvrđeno je da sukcesivnim snimanjem voltamograma opada visina oksidacijskog strujnog vrha 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline što ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta na površinu radne elektrode. Također, ispitivanjem utjecaja vremena na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha, utvrđeno je da 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina koja najduže stoji (u ovom radu 2 dana) pokazuje najviši oksidacijski strujni vrh jer s vremenom raste koncentracija oksidiranog oblika. Diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su da oksidacija ispitivanog polifenola ovisi o pH vrijednosti. Utvrđeno je da je optimalna pH vrijednost za oksidaciju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline bila pri pH = 4,0 za elektrodu od staklastog ugljika te pri pH = 6,0 za zlatnu elektrodu jer su pri navedenim pH vrijednostima detektirani najviši oksdacijski strujni vrhovi ispitivanog polifenola koji su se smanjivali pri višim i nižim pH vrijednostima. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom je također utvrđeno da se visina oksidacijskog strujnog vrha povećava s povećanjem koncentracije polifenola.

Antioksidativna aktivnost 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline ispitana je DPPH metodom pri čemu DPPH aktivnost prati linearni trend, u koncentracijskom području od $c = 2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm^3 do $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3.

3,4-dihidroksibenzojeva kiselina detektirana je u realnim uzorcima diferencijalnom pulsnom voltametrijom, koristeći elektrodu od staklastog ugljika, gdje je njena količina varirala od 2 μM do 9 μM. Najveće koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline detektirane su u voćnom soku (uzorak 1), dok su najniže koncentracije detektirane u kavi od cikorije (uzorak 3).

6. LITERATURA

1. https://bit.ly/33Fyhiy (15.12.2021.)
2. https://bit.ly/32iRfvc (15.12.2021.)
3. H. Kurtagić, Hrana u zdravlju i bolesti, **6**(2017), 28-35.
4. R. Tsao, Nutrients, **2**(2010), 1231-1246.
5. M. L. Zeraik, M. S. Petronio, D. Coelho, L. O. Regasini, D. H. S. Silva, L. M. da Fonseca, S. A. S. Machado, V. S. Bolzani, V. F. Ximenes, PLoS ONE, **9**(2014), 1-9.
6. G. Williamson, Nutrition Bulletin, **42**(2017), 226-235.
7. A.Belščak-Cvitanović, K. Durgo, A. Huđek, V. Bačun-Družina, D.Komes, Polyphenols: Properties, Recovery and Applications, **10**(2018), 3-44.
8. S. Kakkar, S. Bais, International Scholarly Research Notices, **3**(2014), 1-9.
9. R. Masella, C. Santangelo, M. D'Archivio, G. LiVolti, C. Giovannini, F. Galvano, Current Medicinal Chemistry, **19**(2012), 2901–2917.
10. https://bit.ly/3FrAjku (17.12.2021.)
11. T. Takuji, T. Tanaka, M. Tanaka, Journal of Experimental and Clinical Medicine, **3**(2011), 27–33.
12. A.K. Khan, R. Rashid, N. Fatima, S. Mahmood, S. Mir, S. Khan, N. Jabeen, G. Murtaza, Acta Poloniae Pharmaceutica, **72**(2015), 643-650.
13. https://bit.ly/3mzhQuI (17.12.2021.)
14. Medvidović-Kosanović, M. (2011) Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola. Doktorska disertacija. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu.
15. R. Abdel-Hamid, A. Bakr, E. F. Newair, F. Garcia, Beverages, **5**(2019), 17-28.
16. P. Westbroek, Electrochemical methods, **10**(2005), 37–69.
17. https://bit.ly/32MgUwh (21.12.2021.)
18. B. Nigović, S. Behetić, Farmaceutski glasnik, **63**(2007), 163 – 175.
19. https://bit.ly/32tgxa0 (21.12.2021.)
20. https://bit.ly/32waMs9 (21.12.2021.)
21. V. Mirceski, S. Skrzypek, L. Stojanov, ChemTexts, **4**(2018), 17–31.
22. F.R. Simões, M.G. Xavier, Nanoscience and its Applications**, 6**(2017), 155-178.

23. P. Westbroek, G. Priniotakis, P. Kiekens, Analytical Electrochemistry in Textiles, **2**(2005), 37-69.
24. O. Abollino, A. Giacomino, M. Malandrino, Encyclopedia of Analytical Science, **3**(2019), 238-257.
25. https://bit.ly/3ew8jAj (28.12.2021.)
26. F. Scholz, A.M. Bond, R.G. Compton, D.A. Fiedler, G. Inzelt, H. Kahlert, Š. Komorsky-Lovrić, H. Lohse, M. Lovrić, F. Marken, A. Neudeck, U. Retter, F. Scholz, Z. Stojek, Electroanalytical Methods, **10**(2010), 237–256.
27. P. C. Hauser, Encyclopedia of Analytical Science, **10**(2005), 234–240.
28. https://bit.ly/32R3gbf
29. N. Shah, New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species, **4**(2020), 45–73.
30. https://bit.ly/3eyXRrX (28.12.2021.)
31. https://rsc.li/3EKoNiS (3.1.2022.)
32. https://bit.ly/3pDwKlO (3.1.2022.)
33. S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, Biological Identification, **6**(2014), 153-193.
34. https://bit.ly/3zOAqEO (12.1.2022.)
35. Z. Akar, M. Küçük, H. Doğan, J Enzyme Inhib Med Chem., **32**(2017), 640-647.
36. S. B. Kedare, R. P. Singh, J Food Sci Technol, **48**(2011), 412–422.
37. S. Škrovánková, L. Mišurcová, L. Machů, Advances in Food and Nutrition Research, **67**(2012), 75-139.
38. A. B. Moghaddam, F. Kobarfard, S. S. H. Davarani, D. Nematollahi, M. Shamsipur, A. R. Fakhari, Journal of Electroanalytical Chemistry, **586**(2006), 161–166.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ana Plasajec

31000 Osijek, Hrvatska

(+385) 958783435

✉ ana.plasajec@gmail.com

OBRAZOVANJE

2020. - 2022. Diplomski studij kemije, Odjel za kemiju

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Smjer: Anorganska kemija, organska kemija i biokemija

2017. - 2020. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad: Fotokemijsko zagađenje u Osijeku i njegova povezanost s meteorološkim parametrima

2013. – 2017. I. gimnazija u Osijeku

KONFERENCIJE I SEMINARI

2022. 19. Festival znanosti

2021. 3. Dani mladih istraživača

1st International conference „Food & Climate Change″

18. Festival znanosti

First conference of European clean energy transition

2020. 9. Simpozij Kopački rit jučer, danas, sutra

2019. 23. smotra Sveučilišta

2018. 16. Festival znanosti

Videokonferencijski sat u suradnji sa Gimnazijom „Matija Mesić″ i Gimnazijom Vukovar

PRIZNANJA I NAGRADE

2022. Nagrada za najboljeg studenta Sveučilišta Josip Jurja Strossmayera u Osijeku - Odjel za kemiju za akademsku 2020/2021. godinu

OSOBNE VJEŠTINE

STRANI JEZICI:

Engleski jezik

Njemački jezik (DSD diploma)