

Elektrokemijska karakterizacija (+)-katehina

Škrljac, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:969509>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mario Škrljac

Elektrokemijska karakterizacija (+)-katehina

Diplomski rad

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

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mario Škrljac

Elektrokemijska karakterizacija (+)-katehina

Diplomski rad

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

Osijek, 2017.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović na svim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, ostatku obitelji i svojoj djevojci koji su uvijek vjerovali u mene. Kada sam htio odustati i kad mi je bilo najteže bodrili su me i gurali naprijed. Bez njih nikad ne bih dogurao ovako daleko. Neizmjereno hvala.

Zahvaljujem se i svim svojim kolegama i prijateljima.

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

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA (+)-KATEHINA**Mario Škrljac**

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju
Mentor: doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Sažetak

U ovom diplomskom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva (+)-katehina u različitim puferima uporabom cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije. Vrijednosti pH pufera varirale su od pH = 3,5 do pH = 8,0. Cilj rada bio je ispitati utjecaj pH vrijednosti na potencijal oksidacijskog strujnog vrha (+)-katehina, istražiti utjecaj koncentracije (+)-katehina i brzinu promjene polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva (+)-katehina, te istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta (+)-katehina na površinu elektrode od staklastog ugljika. Elektrokemijska mjerenja provedena su u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji gdje je kao radna elektroda korištena elektroda od staklastog ugljika, kao referentna Ag/AgCl elektroda, te kao protuelektroda platinska žica. Utvrđeno je da je proces oksidacije (+)-katehina pri nižim pH vrijednostima (pH = 3,5 i 4,5) kvazireverzibilan ($\Delta E_p = 140$ mV) i slijedi EC mehanizam oksidacije dok pri višim pH vrijednostima postaje reverzibilan ($\Delta E_p = 50$ mV). Potencijal oksidacijskog strujnog vrha (+)-katehina linearno se smanjuje s povećanjem pH vrijednosti, dok se struja oksidacijskog strujnog vrha povećava do pH = 4,5 i nakon toga opada. Optimalna pH vrijednost za oksidaciju je pH = 4,5. Također je ustanovljeno da s povećanjem koncentracije (+)-katehina raste visina oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha. Struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Rezultati su također pokazali da dolazi do adsorpcije (+)-katehina i oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu elektrode od staklastog ugljika (visina oba oksidacijska strujna vrha (+)-katehina opada uzastopnim snimanjem voltamograma za sve ispitivane pH vrijednosti).

Diplomski rad obuhvaća: 51 stranice, 34 slika, 3 tablice, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, (+)-katehin, oksidacijski mehanizam, adsorpcija

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. Doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

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

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF (+)-CATECHIN
Mario Škrljac

Thesis completed at: Department of chemistry
Supervisor: Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović

Abstract

In this diploma thesis electrochemical properties of (+)-catechin, in different buffers, was studied by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. Values of pH of buffers were varied from pH = 3.5 to pH = 8.0. The main goal of this thesis was to examine the influence of pH on the (+)-catechin oxidation peak potential, to investigate the effect of (+)-catechin concentration and scan rate on the oxido-reduction properties of (+)-catechin and the possible adsorption of the oxidation product of (+)-catechin on the surface of the glassy carbon electrode. Electrochemical measurements were carried out in an electrochemical cell with a three electrode system. Glassy carbon electrode was used as a working electrode, Ag/AgCl electrode was the reference electrode and platinum wire electrode was used as auxiliary electrode. It was found that the oxidation process of (+)-catechin at lower pH values (pH = 3.5 and 4.5) is quasi-reversible ($\Delta E_p = 140$ mV) and follows the EC mechanism of oxidation. At higher pH values proces becomes reversable ($\Delta E_p = 50$ mV).The oxidation peak potential of the (+)-catechin decreases linearly by increasing the pH value, while the oxidation peak current increases to pH = 4.5 and then decreases. The optimum pH for oxidation is pH = 4.5. It has also been found that the increase of (+)-catechin concentration and scan rate increases the value of oxidation and reduction peak current. The oxidation and reduction peak current increases with increasing scan rate. The results also showed adsorption of (+)-catechin and its oxidation products on the surface of the glassy carbon electrode (the height of both oxidation peaks of (+)-catechin decreases with successive scans for all observed pH values).

Thesis includes: *51 pages, 34 figures, 3 tables, 26 references*

Original in: Croatian

Keywords: cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, (+)-catechin, oxidation mechanism, adsorption

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, F. Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

Reviewers:

1. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić
2. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović
3. Assist. Prof. Aleksandar Sečenji

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Polifenolni spojevi.....	2
2.1.1. Polifenoli kao antioksidansi	3
2.1.2. Flavonoidi	4
2.1.2.1. <i>Podjela i kemijska struktura flavonoida</i>	5
2.1.2.2. <i>Antioksidacijska aktivnost flavonoida</i>	8
2.1.3. (+)-Katehin.....	100
2.1.3.1. <i>Elektrokemijska svojstva (+)-katehina</i>	111
2.2. Metode karakterizacije flavonoida.....	11
2.2.1. Elektroanalitičke metode.....	122
2.2.2. Elektrokemijske metode karakterizacije polifenolnih spojeva - VOLTAMETRIJA	133
2.2.2.1. <i>Ciklička voltametrija</i>	144
2.2.2.2. <i>Diferencijalna pulsna voltametrija</i>	155
2.3. Kompleksi flavonoida i metala	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. Kemikalije i priprava otopina.....	17
3.2. Elektrokemijska ćelija	18
3.2.1. Radna elektroda.....	19
3.2.2. Protuelektroda	19
3.2.3. Referentna elektroda	20

3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja.....	211
3.3.1. Ciklička voltametrija.....	211
3.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija.....	211
4. REZULTATI.....	222
4.1. Ciklička voltametrija.....	222
4.1.1. Utjecaj koncentracije.....	32
4.2. Diferencijalna pulsna voltametrija.....	344
4.2.1. Utjecaj pH.....	39
5. RASPRAVA.....	41
5.1. Ciklička voltametrija.....	411
5.2. Diferencijalna pulsna voltametrija.....	433
5.3. Mehanizam oksidacije (+)-katehina.....	466
6. ZAKLJUČAK.....	48
7. LITERATURA.....	49-51

1. UVOD

(+)-Katehin pripada skupini polifenolnih spojeva i jedan je od bio-aktivnih flavonoida kojeg se u većim količinama može naći u jabukama, crnom grožđu, crnom vinu, čokoladi, zelenom i crnom čaju [1]. Može imati antioksidacijsko, antibakterijsko, i protuupalno djelovanje te može spriječiti nastajanje tumora.

Cilj ovog rada je istražiti i odrediti elektrokemijska svojstva (+)-katehina. Ispitati utjecaj pH, koncentracije (+)-katehina i promjenu brzine polarizacije elektrode na oksidoredukcijska svojstva (+)-katehina. Uz gore navedeno ispitan je utjecaj i pojava adsorpcije oksidacijskog produkta (+)-katehina na površinu elektrode od staklastog ugljika.

Literaturni pregled sadrži opise polifenolnih spojeva, njihovu podjelu i važnost, te svojstva (+)-katehina. Također opisuje djelovanje (+)-katehina i korištene tehnike i aparaturu za elektrokemijska mjerenja.

Za eksperimentalni dio rada korištene su dvije elektrokemijske tehnike: ciklička voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija. Navedeni su i uvjeti pri kojima su provedena elektrokemijska mjerenja, te su prikazani dobiveni rezultati i dana su njihova objašnjenja.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi čine jednu veliku skupinu organskih molekula, biljnog podrijetla. Aromatski prsten, na koji je vezan jedan ili više hidroksilnih supstituenata, čini osnovu strukture polifenola pa osim jednostavnih fenolnih molekula (C_6), postoje kompleksniji spojevi ($C_6-C_3-C_6$)_n. Veći broj polifenola prisutan je u konjugiranom obliku (s mono- i polisaharidima), a postoje i derivati navedenih spojeva poput estera i metilestera [1]. Polifenoli su u prirodi često podijeljeni, što je posljedica njihove velike strukturne raznolikosti. Najčešće se, prema razlikama u strukturi, dijele u četiri skupine:

1. Fenolne kiseline
2. Stilbeni
3. Lignani
4. Flavonoidi

Fenolne kiseline su najjednostavniji polifenolni spojevi, čija se struktura bazira na aromatskom prstenu koji ima najmanje jednu hidroksilnu skupinu[2].

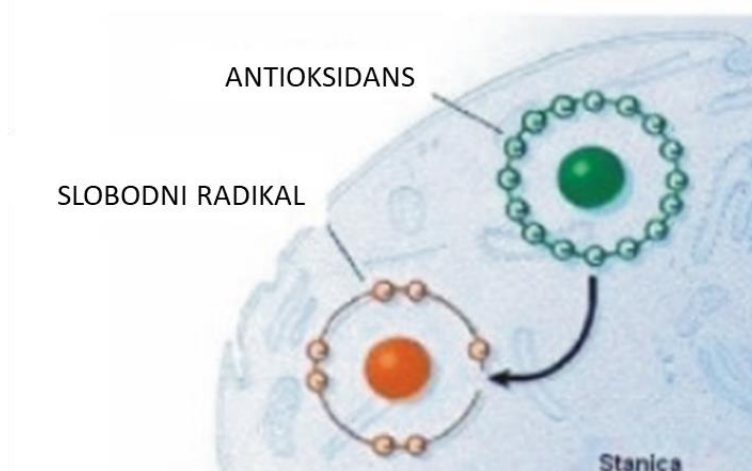
Stilbeni su polifenolni spojevi koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida. Njihova funkcionalna skupina je 1,2-difeniletan [3]. Lignani su prirodni polifenoli koji su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, kao prirodne obrambene tvari [4].

Najviše istražena skupina polifenola su flavonoidi, koji su u prirodi najčešće vezani s molekulama šećera. Na taj način, stvaraju glikozide, kod kojih je jedna ili više hidroksilnih skupina flavonoida vezana na molekulu šećera [3].

Oksidacijska svojstva polifenola su zaslužna za njihove korisne učinke [2]. Oni također osim oksidacijskih svojstava, imaju i druge važne uloge; djeluju protuupalno (polifenoli inhibiraju prostaglandine koji za vrijeme upalnog procesa izazivaju visoku temperaturu i osjet boli), antibakterijski, antimikrobno (protiv bakterija i gljivica) i sudjeluju u postupku prijenosa iona [3].

2.1.1. Polifenoli kao antioksidansi

Istraživanja su pokazala da namirnice koje sadrže polifenolne spojeve imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi, upravo zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja (Slika 1). Postoji nekoliko mehanizama prema kojima polifenolni spojevi pokazuju svoje antioksidacijsko djelovanje. Između nekoliko mogućih mehanizama, postavljena je hipoteza, da polifenoli posebno „traže“ i „hvataju“ slobodne radikale i vežu ih [2].



Slika 1. Prikaz interakcije antioksidansa i slobodnog radikala [6].

Reaktivna vrsta kisika (ROS) je grupa molekula nastalih iz metaboličkih reakcija unutar aerobnih organizama. Ta vrsta uključuje: superoksidge ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilne radikale ($\cdot OH$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Radikalni mehanizmi su vrlo jednostavni, ali nisu pouzdani u slučaju vrlo reaktivnih radikala (poput hidroksilnog radikala), koji reagiraju s gotovo svim organskim spojevima unutar stanice [2].

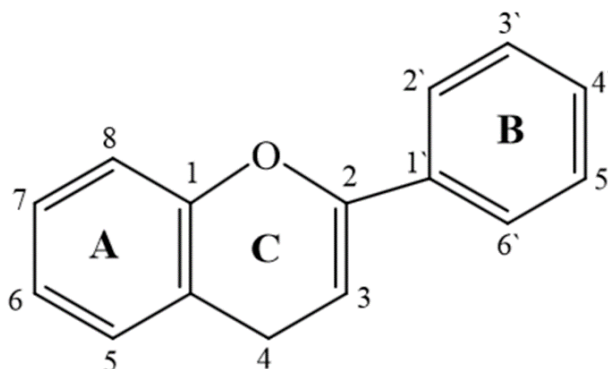
Polifenoli vežu slobodne metale (posebno željezo) unutar stanica, čime se sprječava napredovanje Fentonove reakcije. Fentonova reakcija je reakcijski put kroz koji slobodno željezo (Fe^{2+}) reagira s vodikovim peroksidom, kako bi nastao hidroksilni radikal. Ova hipoteza je ispitivana na temelju činjenice da je u normalnom fiziološkom stanju čovjeka koncentracija željeza gotovo zanemariva [1, 2]. Oksidativni stres, uzrokovan ROS-om povezan je s pojavom nekih oblika raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest [2].

2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća grupa polifenolnih spojeva koji su prisutni u biljkama (lišću, cvijeću, kori drveća, sjemenkama). Mnogi flavonoidi su prisutni u ljekovitim biljkama, gdje su pokazali izvrsna antioksidacijska i antiradikalska svojstva. Ti spojevi su vrlo važni jer imaju mnoga terapijska djelovanja (protuupalno, antibakterijsko, antialergijsko, antikancerogeno), a čak utječu na okus i boju hrane. Flavonoidi imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala, sposobnost stvaranja kompleksa s metalnim ionima-kelirajuće djelovanje (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), sposobnost aktiviranja antioksidacijskih enzima, te sposobnost inhibiranja oksidaza [7]. Zatim, mogu djelovati kao slaba estrogenska sredstva, kao protivnici kontroliranja endogenog hormonskog djelovanja, te mogu imati antiproliferativno djelovanje kod tumora (inhibiraju rast tumorskih stanica). Svi flavonoidi su elektroaktivni (sudjeluju u reakcijama oksidacije ili redukcije) i mogu se ispitati elektrokemijskim metodama [8].

2.1.2.1. Podjela i kemijska struktura flavonoida

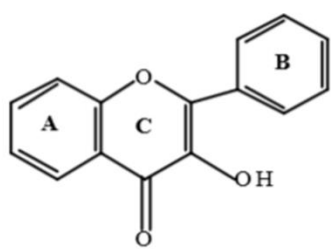
Osnovna strukturna jedinica flavonoida ($C_6-C_3-C_6$) (slika 2) sastoji se od dva aromatska prstena (A i B) povezana s tri ugljikova atoma u obliku heterocikličkog prstena C.



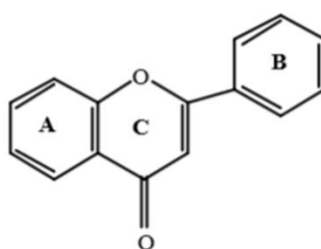
Slika 2. Osnovna struktura molekule flavonoida [1].

Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko skupina. Prema strukturnim razlikama u prstenu C (Slika 3) [1] dijele se na :

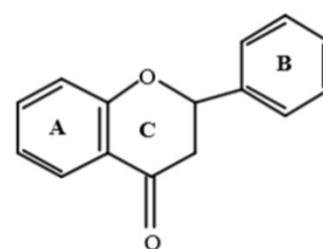
- a) flavonole (npr. kvercetin, rutin, kempferol)
- b) flavone (npr. luteolin, apigenin, krisin)
- c) flavanone (npr. hesperidin, naringenin, taksifolin)
- d) flavanole (npr. (+)-katehin, (+)-galokatehin i srodni spojevi)
- e) izoflavone (npr. genistein, daidzein)
- f) flavane (npr. 3,4-trans-3',4'-dimetoksi-6-metil-2,3-cis-flavan)
- g) flavanonole (npr. astilbin, engeletin)
- h) halkone (npr. butein, marein, floretin)
- i) dihidrohalkone (npr. krotaramin, krotin, izokamuvaritin, akumitin)
- j) flavan-3,4-diole (npr. leukopelargonidin, leukocijanidin), te
- k) antocijanidine (npr. cijanidin, delfinidin, malvidin i srodni glikozidi).



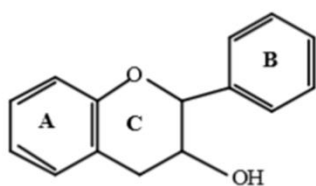
Flavonol



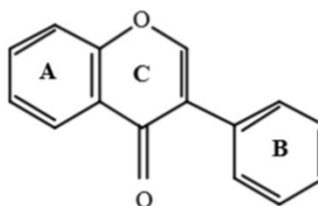
Flavon



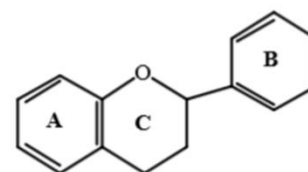
Flavanon



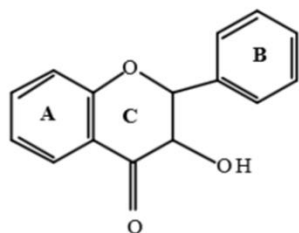
Flavanol



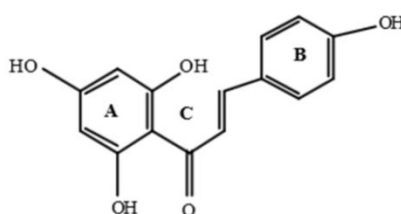
Izoflavon



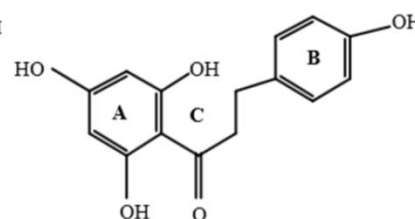
Flavan



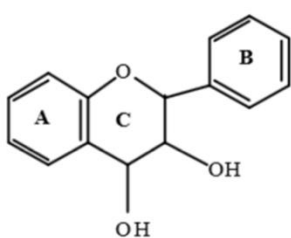
Flavanonol



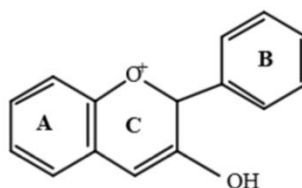
Halkon



Dihidrohalkon



Flavan-3,4-diol



Antocijanidin

Slika 3. Prikaz struktura podskupina flavonoida [1].

Većina nabrojanih flavonoida postoje kao glikozidi, mogu se hidroksilirati i metoksilirati (s monosaharidima ili oligosaharidima), te se većina njih može umrežavati tj. polimerizirati [7].

Gore navedene karakteristike i strukturne raspodjele flavonoida iskazuju se u njihovim kemijskim svojstvima.

Glikolizacija se kod većine flavonoida odvija na C-7 ugljikovom atomu, na koji je vezana hidroksilna skupina; posebice kod flavona, izoflavona i dihidroflavona. Kod flavonola i dihidroflavonola proces glikolize se odvija na C-3 i C-7 ugljikovim atomima na kojima su vezane hidroksilne skupine, dok se kod antocijanida glikoliza odvija na hidroksilnim skupinama vezanim na C-3 i C-5 ugljikovim atomima. [1].

Flavonoli su prisutni u hrani (jabuke, bobice, crveno grožđe, luk, crveno vino, čajevi, poriluk, brokula...). U skupinu flavonola ubrajaju se: kvercetin, rutin i kempferol. Kvercetin je najzastupljeniji u kori jabuke, dok konzumiranje crnog i zelenog čaja najviše doprinosi unosu drugih flavonola [10].

U skupinu **flavanola** spadaju katehin, galokatehin i srodni spojevi. Dobar izvor ovih spojeva su: različite vrste bobica, trešnje, grožđe, šljive, marelice, crno vino, čokolada te jabuke [10].

Antocijanidini su prirodni pigmenti u biljkama, pokazuju plavu, ljubičastu i crvenu boju. Ljubičaste bobice, jabuke, trešnje, šipak, crveno vino, kupus, luk i rotkvice su namirnice koje su bogate ovim spojevima. Predstavnici ove skupine su: cijanidini, delfinidini, malvidini i srodni glikozidi [10].

Izoflavoni se nalaze u mahunarkama i posebnoj vrsti soje. Oni imaju estrogensku aktivnost i mogu se vezati na receptore estrogena [10].

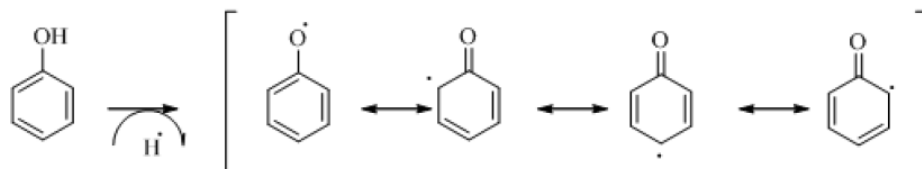
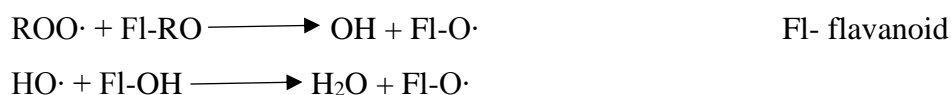
Predstavnici skupine **flavanona** su: hesperidin, naringenin i taksifolin. Ovi spojevi se najčešće nalaze u agrumima, a u manjoj količini su prisutni u rajčicama i menti [10].

Flavoni su manje uobičajeni flavonoidi i mogu se naći u celeru, peršinu i kamilici. Ovim spojevima pripadaju: luteolin, apigenin i krisin [10].

Podskupine flavonoida međusobno se razlikuju po broju i rasporedu hidroksilnih skupina te stupnju glikolizacije. Za ljudsku prehranu, od svih podskupina flavonoida, najvažniji su **procijanidini**. Ti spojevi se sastoje od monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina [7].

2.1.2.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida

Flavonoidi imaju dobra oksidacijska svojstva. Djeluju kao antioksidansi. Flavonoidi traže slobodne radikale i vežu se s njima kako bi nastao manje reaktivan flavonoidni fenoksidni radikal (Fl-O·) (Slika 4) [7]:



Slika 4. Prikaz stabilizacije fenoksidnog radikala rezonantnom delokalizacijom

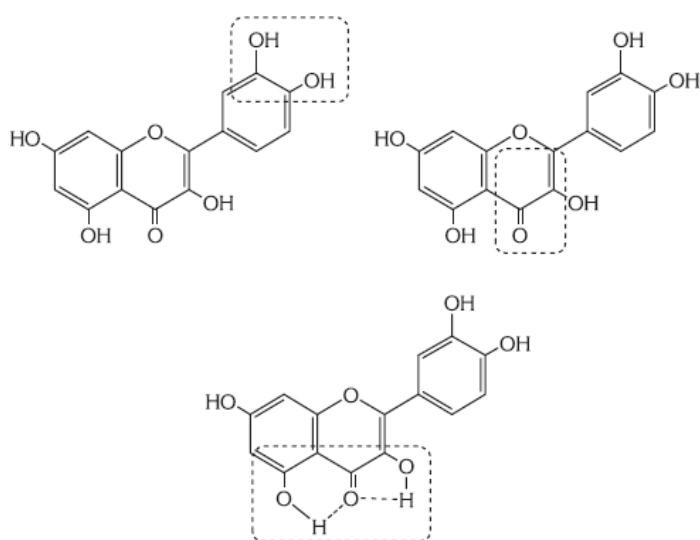
Flavonoidi moraju zadovoljiti dva uvjeta da bi djelovali kao antioksidansi:

1. prisutan u maloj koncentraciji, u odnosu na tvar koja je podložna oksidaciji, on mora djelovati tako da usporava ili sprječava oksidaciju
2. radikal koji nastaje iz flavonoida, mora biti stabilan, kako ne bi poticao nastavak oksidacije lančanom reakcijom

Radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim radikalom [7]. Zbog te stabilizacije ne sudjeluju dalje u oksidaciji.

Kod flavonoida određene strukturne karakteristike određuju njihovu antioksidacijsku aktivnost (slika 5):

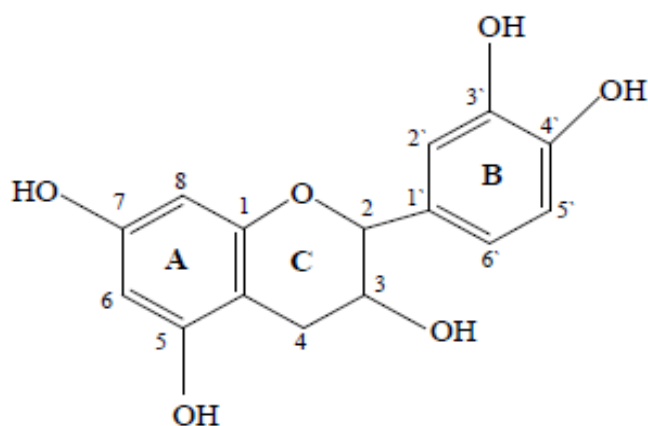
- kateholna struktura u prstenu B (*o*-dihidroksilna skupina) daje stabilnost radikalima i omogućuje delokalizaciju elektrona i povećava antioksidacijski kapacitet.
- antioksidacijski kapacitet flavonoida u kojih je prisutna hidroksilna skupina na 3'-, 4'-, 5'- ugljikovom atomu u prstenu B je veći, u odnosu na one flavonoide koji imaju jednu hidroksilnu skupinu,
- u prstenu C, dvostruka veza između C-2 i C-3 ugljikovih atoma konjugirana s 4-okso skupinom, povećava sposobnost vezanja slobodnih radikala,
- povećana sposobnost vezanja slobodnih radikala pripisuje se i dvostrukoj vezi između C-2 i C-3 ugljikovih atoma u prstenu C koja je spregnuta sa 3-OH skupinom
- supstitucija hidroksilnih skupina s metoksilnim skupinama u prstenu B, mijenja redoks potencijal flavonoida, što utječe na sposobnost vezanja slobodnih radikala, [1, 7].



Slika 5. Prikaz strukturnih skupina važnih za antioksidacijsku aktivnost flavonoida [7].

2.1.3. (+)-Katehin

Flavonoid (+)-*katehin* (trans-3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan) ima kateholnu grupu na prstenu B i rezorcinolnu grupu na prstenu A (ta dva prstena nisu konjugirana, pa ionizacija -OH skupina jednog prstena, ne utječe u značajnijoj mjeri na ionizaciju -OH skupina drugog prstena). Katehin ima hidroksilnu skupinu vezanu na C-3 ugljikov atom u prstenu C [12]. U prirodi je najzastupljeniji u jabukama, crnom grožđu, crnom vinu, čokoladi[13], zelenom i crnom čaju, gdje pokazuje izražena antioksidacijska svojstva. Nađeno je da konzumacija navedenih čajeva pomaže u ublažavanju tumora[14], bolesti krvožilnog sustava, te jačanju imunog sustava organizma. Kemijska struktura (+)-katehina prikazana je na slici 6.



Slika 6. Kemijska struktura (+)-katehina[1, 12].

2.1.3.1. Elektrokemijska svojstva (+)-katehina

Za istraživanje svojstava (+)-katehina u korištene su voltametrijske tehnike (ciklička voltometrija , [12, 24, 26] , diferencijalna pulsna voltometrija [12] voltometrija s linearnom promjenom potencijala[24].

Oksidacija katehina je složen proces, koji ovisi o pH, te se (+)-katehin snažno adsorbira na površinu elektrode od staklastog ugljika (produkt oksidacije (+)-katehina nije elektroaktivan i blokira elektrodnu površinu) [1].

Cikličkom voltametrijom [24, 25, 26] su određena dva oksidacijska i jedan reduksijski strujni vrh (+)-katehina. Prvi reverzibilni oksidacijski strujni vrh je pripisan oksidaciji kateholnih-hidroksilnih grupa na prstenu B, dok je drugi ireverzibilni strujni vrh pripisan oksidaciji *m*-difenolnih grupa na prstenu A [1, 12].

2.2. Metode karakterizacije flavonoida

Polifenolni spojevi se u biološkim materijalima karakteriziraju pomoću različitih metoda:

- 1) Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)
- 2) Spektroskopskim metodama (UV/VIS, FTIR, MS, NMR)
- 3) Elektroforetskim tehnikama (kapilarna elektroforeza)
- 4) Elektrokemijskim metodama (ciklička voltometrija, voltometrija s linearnom promjenom potencijala, diferencijalna pulsna voltometrija, pravokutnovalna voltometrija)

U ovom radu su korištene dvije voltometrijske metode za ispitivanje (+)-katehina: ciklička i diferencijalna pulsna voltometrija [1].

2.2.1. Elektroanalitičke metode

Sve elektroanalitičke metode su međusobno slične, jer se elektrokemijska reakcija kod svih metoda, odvija na radnoj odnosno indikatorskoj elektrodi, koja je smještena u elektrokemijskoj ćeliji. Posljedica elektrokemijske reakcije je analogna električna veličina tj. signal odziva, čijim se mjerenjem dobiva željeni analitički ili neki drugi podatak o ispitivanoj tvari

Signal odziva nastaje pod utjecajem signala pobude (dovodimo ga na radnu elektrodu) ili nastaje kao posljedica prisutnosti određene molekulske vrste u otopini (prilikom uporabe indikatorske elektrode) [15].

2.2.2. Elektrokemijske metode karakterizacije polifenolnih spojeva- VOLTAMETRIJA

Otkriću voltametrije, prethodi polarografija, koju je u ranim dvadesetim godinama otkrio češki kemičar Jaroslav Heyrovsky, koji je 1959. godine dobio Nobelovu nagradu. Voltametrija je skupina elektroanalitičkih metoda kod kojih se podatci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje (signal odziva) u ovisnosti o električnom naponu (signal pobude), ali uz uvjete koji izazivaju polarizaciju, bilo indikatorske ili radne elektrode [16]. Ime „voltametrija“ potječe od skraćenice: volt-amper-metrija [17].

Ako se na elektrodu koja je uronjena u otopinu, koja sadrži neku elektroaktivnu tvar, narine određeni potencijal, doći će do polarizacije na elektrodi. Elektroaktivna tvar će se oksidirati ili reducirati, kada potencijal elektrode dosegne vrijednost na kojoj dolazi do prijelaza elektrona između elektrode i elektroaktivne tvari u otopini. Kroz otopinu tada počinje teći struja čija jakost ovisi o koncentraciji elektroaktivne tvari u graničnom sloju uz površinu elektrode, ali i o koncentraciji elektroaktivne tvari u otopini. Grafički prikaz signala odziva u voltametriji (voltamogram) za pojedinu voltametrijsku tehniku uvjetovan je oblikom naponske pobude i brzinom promjene potencijala [17].

Voltametrija ima primjenu u anorganskoj i fizikalnoj kemiji te biokemiji. Pomoću nje se proučavaju procesi oksidacije i redukcije u različitim sredstvima, te adsorpcijski procesi i mehanizmi prijenosa elektrona na površinama elektroda. Također se primjenjuje u istraživanju elektrokemijskih procesa, a veliku primjenu ima u medicini, za in vivo praćenje koncentracija nekih molekulskih vrsta u ljudskim i životinjskim organima [15,18].

Razlika između voltametrije i polarografije je u elektrodi. Prilikom voltametrije koristimo radnu mikro elektrodu stalne površine, u otopini koja stalno miruje, dok se kod polarografije koristi kapajuća živina elektroda kojoj se radna površina stalno mijenja i obnavlja [15, 18].

Voltametrijski članak se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu analita i viška elektrolita (koji ne reagira) tj. osnovnog elektrolita. Te tri elektrode su:

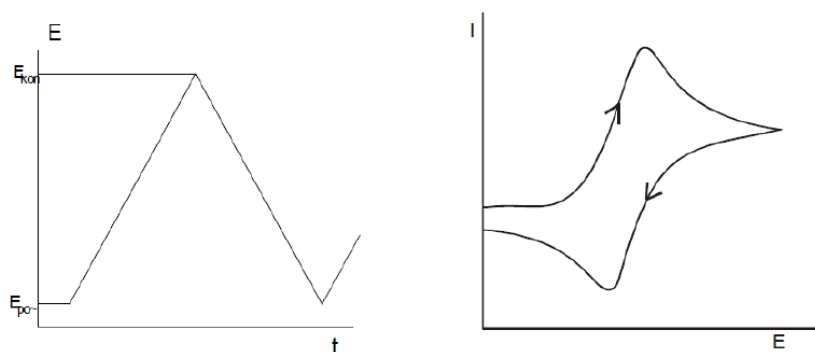
1. Radna elektroda (mikroelektroda) - njezin potencijal se održava na određenoj poznatoj vrijednosti, ona je vrlo mala i zbog toga je sklona polarizaciji,
2. Referentna elektroda - potencijal joj je stalan
3. Pomoćna elektroda (platinska žica) - omogućuje tok struje od izvora kroz otopinu pa sve do mikroelektrode [16].

2.2.2.1. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija (*engl. cyclic voltammetry, CV*) je jedna od elektrokemijskih tehnika, koju su 1938. godine otkrili Matheson i Nichols, a teorijski opisali Randles i Ševčik [15].

Signal pobude (napon) mijenja smjer: najprije linearno raste (Slika 7) do određene vrijednosti napona, te se potencijal radne elektrode se s vremenom linearno mijenja; od početnog potencijala ($E_{poč}$) do konačnog potencijala (E_{kon}) i opet natrag [17].

U povratnom posmiku potencijala odvija se oksidacija produkata elektrodne reakcije redukcije, a u signalu odziva nastaje oksidacijski (anodni) vrh [15].



Slika 7. Signal pobude (a) i signal odziva (b) kod cikličke voltametrije [17].

Veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su [1]:

- Potencijal i struja anodnog ($E_{p,a}$; $I_{p,a}$) i katodnog ($E_{p,k}$; $I_{p,k}$) strujnog vrha
- Omjer struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha ($I_{p,a} / I_{p,k}$),
- Razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$)

2.2.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija (*engl. differential pulse voltammetry, DPV*) dobila je ime po tome što se mjeri razlika (diferencija) u struji ćelije, koja je uzrokovana naponskim impulsom. Kod ove metode, na radnoj elektrodi primjenjujemo pulseve određene veličine, koji su dodani na linearni nagib. Signal odziva je razlika jakosti struja prije i nakon naponskog impulsa, kao funkcija potencijala. U području potencijala u kojem mala promjena potencijala radne elektrode izaziva mjerljivu razliku u struji ćelije, pojavit će se pulsno voltamografski odziv, koji ima oblik vrha. Dakle, kod diferencijalne pulsne voltametrije, signal pobude je niz kratkotrajnih pulseva, a signal odziva je proporcionalan koncentraciji reaktanata [1,15].

Koristi se za analitičke svrhe, ali isto tako i za karakterizaciju molekularne građe elektroaktivne tvari u otopini. Također se pomoću ove metode mogu analizirati elektroaktivne tvari, vrlo niskih koncentracija. Granica osjetljivosti metode je 10^{-8} dm^{-3} , što se može postići prikladno odabranim elektrolitnim medijem i dobrim uvjetima mjerenja [15].

Metoda je posebno osjetljiva, pa zahtjeva ultra čiste kemikalije i otopine, koje se koriste kao osnovni elektroliti. Ako se kao otapalo koristi voda, ona se pročišćava postupkom deionizacije. Osim vode, kao otapala se mogu koristiti i mnoga nevodena otapala. Također se pomoću diferencijalne pulsne voltametrije, može istodobno određivati veći broj elektroaktivnih vrsta koje su istovremeno prisutne u ispitivanoj otopini. Bitno je izabrati odgovarajući osnovni elektrolit, jer se onda vrhovi odziva pojedine molekulske vrste mogu uspješno razlučiti i mjeriti prema osnovnoj zajedničkoj struji [15].

Nedostatci ove metode su: relativno dugo vrijeme mjerenja, a ponekad neprikladnost za istraživanje složenijih sistema zbog nemogućnosti razlučivanja pripadajućih signala odziva [15].

2.3. Kompleksi flavonoida i metala

Zbog svoje specifične strukture, flavonoidi lako keliraju metalne ione i stvaraju složene komplekse.

Osim izravnog uklanjanja slobodnih radikala, flavonoidi djeluju kao antioksidansi preko interakcije s reduciranim oblikom prijelaznih metala, najčešće Fe^{2+} , Fe^{3+} i Cu^+ koji sudjeluju u reakcijama, koje stvaraju slobodne radikale. Flavonoidi, mogu izdvojiti metalne ione kompleksiranjem i sprječavanjem generiranja slobodnih radikala posredovanih metalima i zbog toga mogu zaštititi potencijalne biološke ciljeve oksidativnog stresa. Prema tome, ukupni antioksidacijski efekt flavonoida je kombinacija izravne reakcije sa slobodnim radikalima i kompleksiranje metalnih iona, koji su odgovorni za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta.

U mnogim istraživanjima je potvrđeno da flavonoidi djeluju kao antioksidansi, uglavnom zbog kompleksiranja s metalnim ionima, te da su kelati znatno učinkovitiji čistači slobodnih radikala od slobodnih flavonoida. Neki istraživači su otkrili, da su kompleksi rutina, dihidrokvercetina ili epikatehina s Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ili Zn^{2+} učinkovitiji čistači radikala u odnosu na slobodne flavonoide. Ovi kompleksi, također pokazuju povećanu učinkovitost u zaštiti crvenih krvnih stanica [19].

Stvaranje kompleksa rutina i metalnih iona, najčešće se odvija preko 3', 4' hidroksilnih grupa B prstena, gdje metalni ion zamjenjuje jedan proton iz flavonoidne jezgre [1].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i priprava otopina

U diplomskom radu su korištene sljedeće kemikalije:

- (+)-katehin hidrat, $C_{15}H_{14}O_6 \cdot H_2O$ (Sigma, St.Louis, MO, SAD)
- octena kiselina, CH_3COOH (Kemika, Zagreb)
- natrijev acetat, $C_2H_3NaO_2$ (Kemika, Zagreb)
- natrijev dihidrogenfosfat, NaH_2PO_4 (Kemika, zagreb)
- dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb)
- prah α -aluminijeva oksida, $\alpha-Al_2O_3$ (0,05 μm) (Buehler, SAD)
- metanol, CH_3OH (Panreac, Barcelona, Španjolska)

Otopine pufera, određenih pH vrijednosti (Tablica 1.), priređene su u ultračistoj vodi (korišten je uređaj TKA, GenPure Ultra Pure Water System (TKA, Niederelbert, Njemačka)). Otopine pufera su korištene za pripremu ispitivanih otopina (+)-katehina u koncentracijskom području od $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5,91 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Izvorna otopina (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) dobivena je otapanjem odgovarajuće mase (+)-katehin hidrata u metanolu. Otopine (+)-katehina odgovarajućih koncentracija priređene su, neosredno prije mjerenja, razrjeđivanjem izvorne otopine (+)-katehina otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti.

Tablica 1. Priprava otopina pufera različitih pH vrijednosti korištenih u ovom radu.

pH	Otopina inertnog elektrolita (PUFER)
3,5	$CH_3COOH + CH_3COONa$
4,5	$CH_3COOH + CH_3COONa$
5,5	$CH_3COOH + CH_3COONa$
7,0	$NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$
8,0	$NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$

3.2. Elektrokemijska ćelija

Sva mjerenja u ovom radu provedena su pri sobnoj temperaturi ($\theta = 25 \pm 1^\circ \text{C}$) u elektrokemijskoj ćeliji s troelektrodnim sustavom (Slika 8). Ukupan volumen elektrokemijske ćelije iznosio je 15 mL. Prije svakog mjerenja sustav je propuhivan argonom visoke čistoće ($\phi_{\text{Ar}} = 99,999\%$).



Slika 8. Prikaz aparature za voltametrijska mjerenja (PalmSens potencijostat/galvanostat)

3.2.1. Radna elektroda

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (Slika 9), (ALS; $A = 0,018 \text{ cm}^2$). Prije svakog mjerenja, površina elektrode je polirana prahom $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, veličine čestica $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ do zrcalnog sjaja, te ispirana destiliranom vodom.



Slika 9. Radna elektroda od staklastog ugljika („glassy carbon“) [20].

3.2.2. Protuelektroda

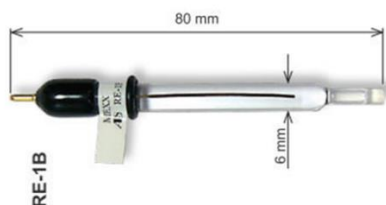
Kao protuelektroda je korištena platinska žica duljine 3 cm (Slika 10). Protuelektroda ne sudjeluje u elektrokemijskoj reakciji i služi za zatvaranje strujnog krug tijekom mjerenja



Slika 10. Protuelektroda platinska žica [21].

3.2.3. Referentna elektroda

Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov-klorid elektroda (Slika 11). Navedena elektroda sastoji se od srebrne žice, na čiju je površinu nanešen sloj teško topljive soli srebrovog klorida, uronjene u otopinu kloridnih iona zasićenu srebrovim kloridom. Potencijal elektrode i aktivitet Ag^+ iona kontrolirani su koncentracijom kloridnih iona u otopini. Najčešće se koristi Ag/AgCl elektroda sa zasićenom otopinom kalijevog klorida. Sve vrijednosti potencijala u ovom diplomskom radu izražene su u odnosu na potencijal Ag/AgCl elektrode, koji iznosi 0,210 V u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu, SVE ($E_{\text{AgCl}/\text{Ag}} = 0,210 \text{ V vs. SVE}$) [15].



Slika 11. Referentna srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda (unutrašnji elektrolit KCl, $c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$) [22].

3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja

3.3.1. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija korištena je za dobivanje općih informacija o elektrokemijskim svojstvima ispitivanih otopina (+)-katehina te za objašnjenje oksidacijskog mehanizma (+)-katehina. Ciklički voltamogrami snimljeni su na elektrodi od staklastog ugljika u otopini (+)-katehina u rasponu potencijala od $-0,2$ V do $1,0$ V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala je varirala od 50 mV/s do 300 mV/s.

3.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

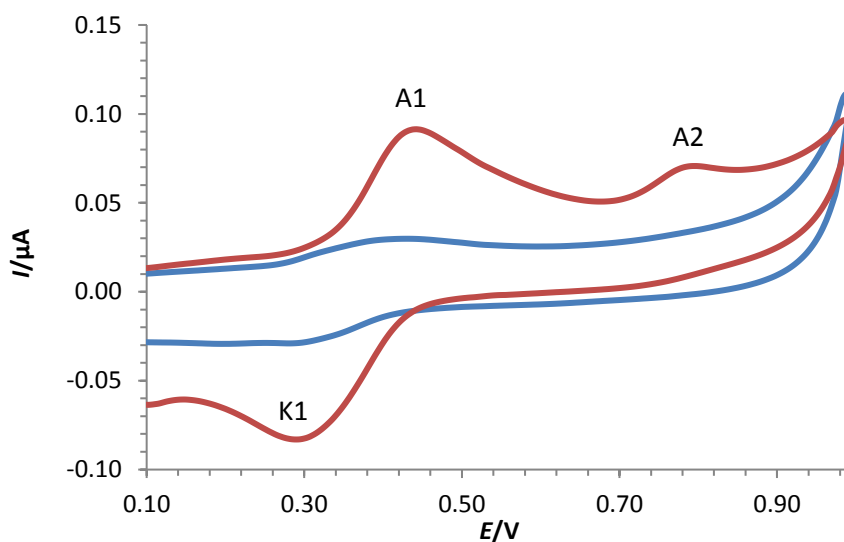
Diferencijalna pulsna voltametrija, korištena je za dobivanje dodatnih informacija potrebnih za objašnjenje mehanizam oksidacije (+)-katehina, te za praćenje procesa adsorpcije oksidacijskih produkata (+)-katehina na površini radne elektrode. Voltamogrami su snimljeni u otopini (+)-katehina u granicama potencijala od $-0,2$ V do $1,0$ V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala je iznosila 5 mV/s, visina pulsa 25 mV, a širina pulsa 70 ms i „scan increment” 5 mV.

4. REZULTATI

Elektrokemijska karakterizacija (+)-katehina, se temelji na poznavanju njihovih redoks potencijala. Mjerenja su provedena cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom i dobiveni su podatci o elektrokemijskim svojstvima (+)-katehina.

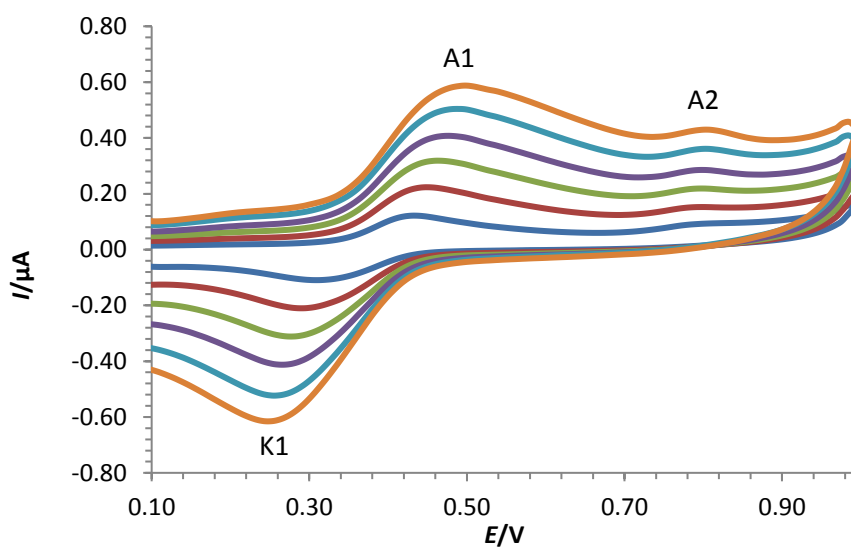
4.1. Ciklička voltametrija

Na slici 12. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 3,5$) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s . U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,A1} = 0,44 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,A2} = 0,79 \text{ V}$ (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1} = 0,30 \text{ V}$.



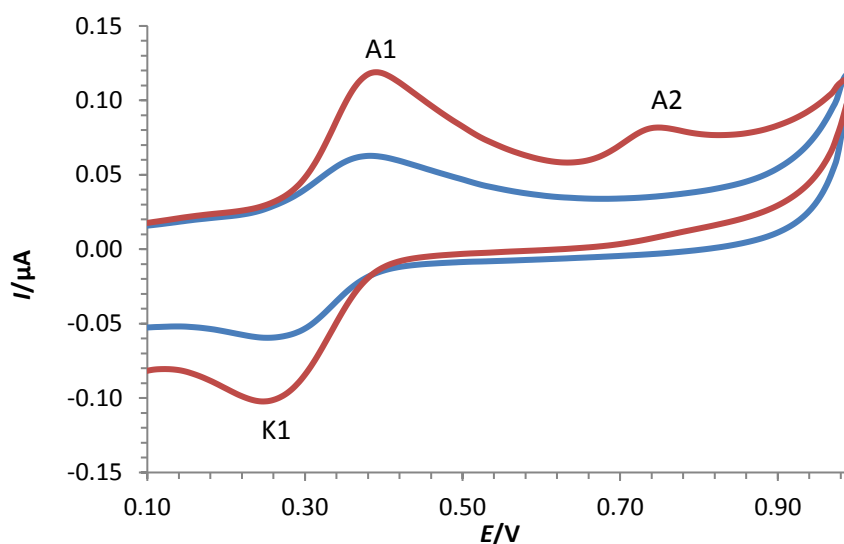
Slika 12. Ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 3,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s . (♦) pufer, (♦) otopina s (+)-katehinom.

Na slici 13. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 3,5$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



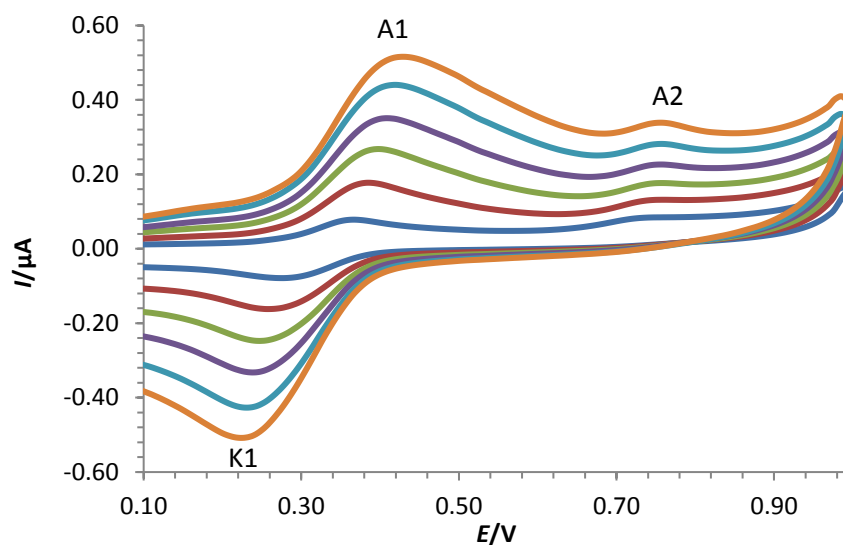
Slika 13. Ciklički voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 3,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Brzina polarizacije elektrode: (♦) 50 mV/s, (♦) 100 mV/s, (♦) 150 mV/s, (♦) 200 mV/s, (♦) 250 mV/s, (♦) 300 mV/s.

Na slici 14. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 4,5$) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s . U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,39 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,A2} = 0,75 \text{ V}$ (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1} = 0,25 \text{ V}$.



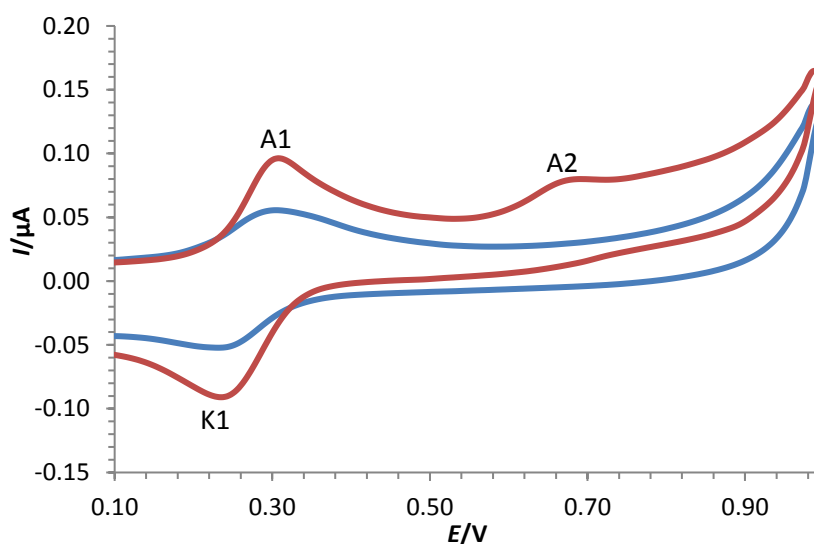
Slika 14. Ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 4,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s . (♦) pufer, (♦) otopina s (+)-katehinom.

Na slici 15. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 4,5$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



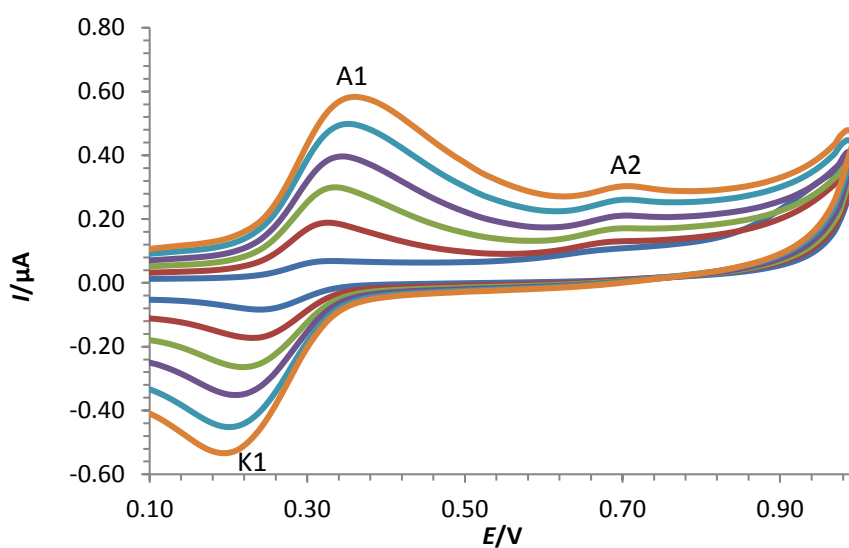
Slika 15. Ciklički voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 4,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Brzina polarizacije elektrode: (♦) 50 mV/s, (♦) 100 mV/s, (♦) 150 mV/s, (♦) 200 mV/s, (♦) 250 mV/s, (♦) 300 mV/s.

Na slici 16. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 5,5$) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s . U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,31 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,A2} = 0,68 \text{ V}$ (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1} = 0,24 \text{ V}$.



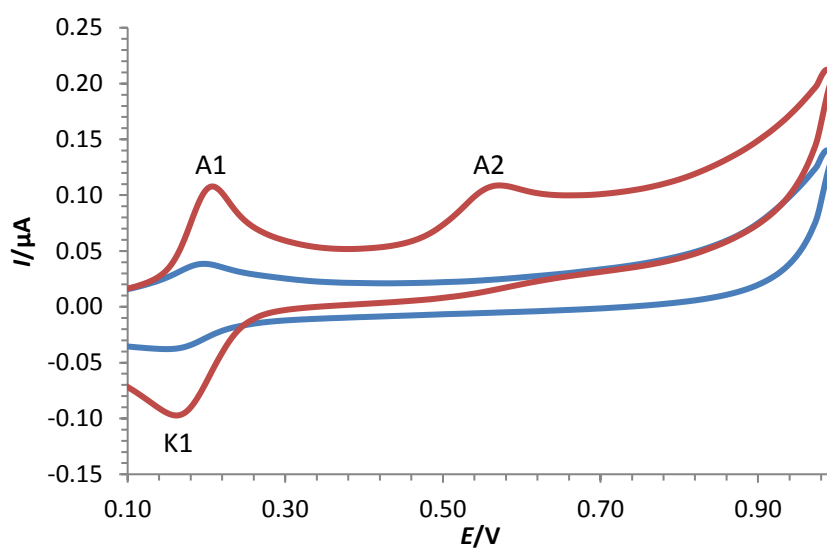
Slika 16. Ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 5,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s . (♦) pufer, (♦) otopina s (+)-katehinom.

Na slici 17. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 5,5$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



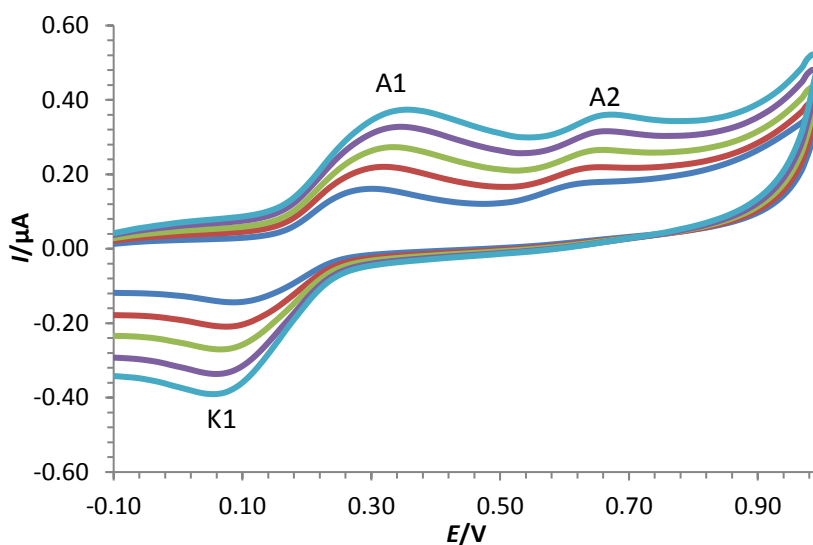
Slika 17. Ciklički voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 5,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (♦) 50 mV/s, (♦) 100 mV/s, (♦) 150 mV/s, (♦) 200 mV/s, (♦) 250 mV/s, (♦) 300 mV/s.

Na slici 18. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 7,0$) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s . U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,21 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,A2} = 0,57 \text{ V}$ (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1} = 0,16 \text{ V}$.



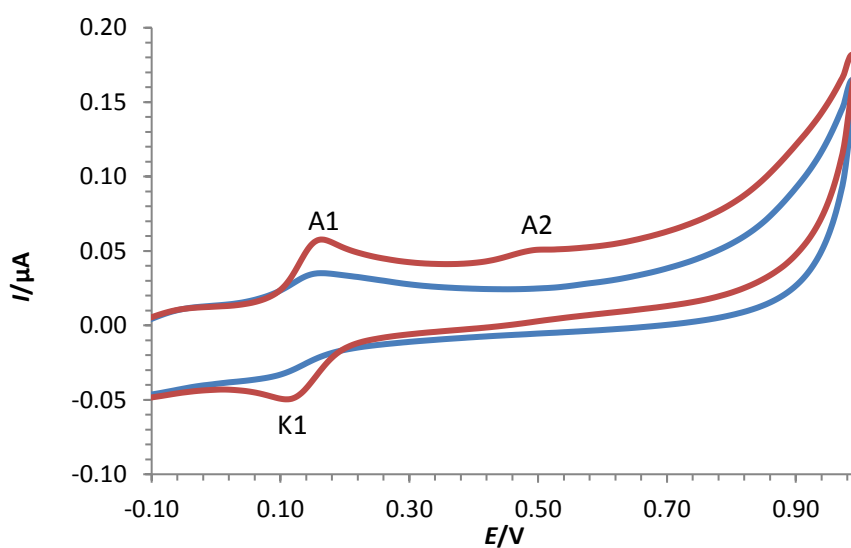
Slika 19. Ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 7,0$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s . (♦) pufer, (♦) otopina s (+)-katehinom.

Na slici 19. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 7,0$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



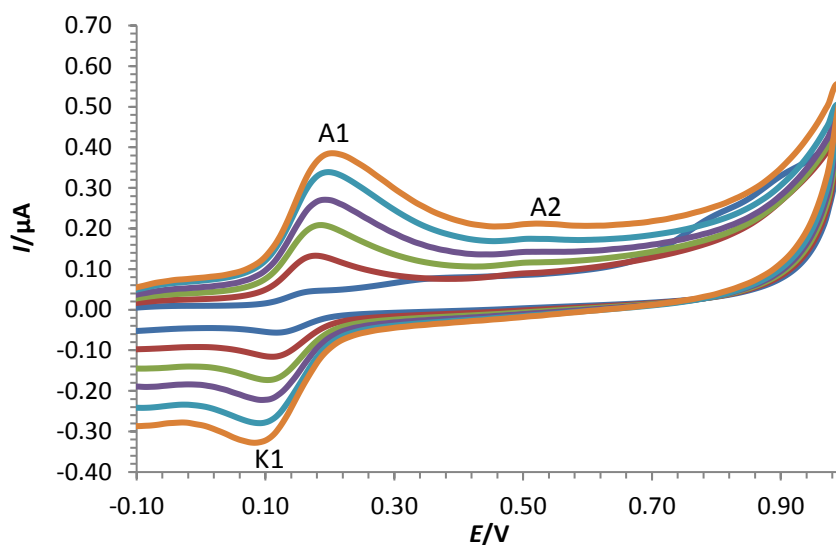
Slika 19. Ciklički voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 7,0$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (♦) 50 mV/s, (♦) 100 mV/s, (♦) 150 mV/s, (♦) 200 mV/s, (♦) 250 mV/s, (♦) 300 mV/s.

Na slici 20. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,16 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,A2} = 0,49 \text{ V}$ (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan reduksijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1} = 0,11 \text{ V}$.



Slika 20. Ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s.
(♦) pufer, (♦) otopina s (+)-katehinom.

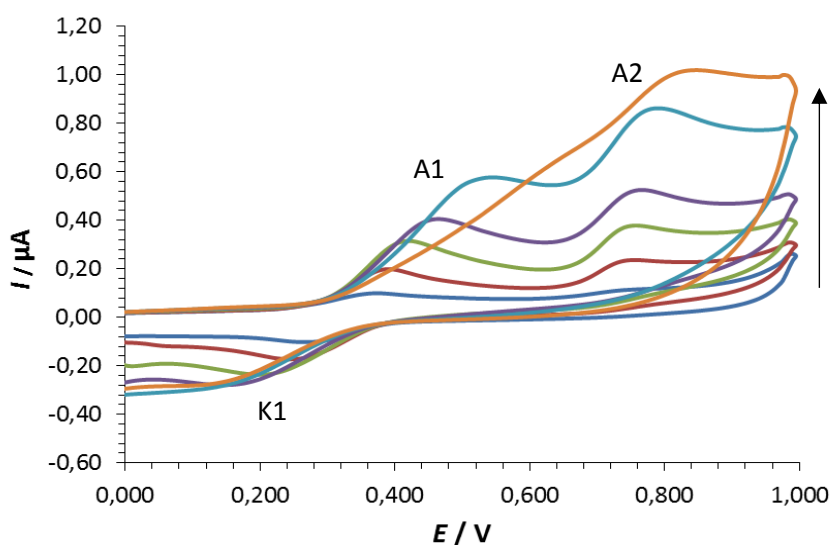
Na slici 21. prikazan je ciklički voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 8,0$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



Slika 21. Ciklički voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 8,0$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (♦) 50 mV/s, (♦) 100 mV/s, (♦) 150 mV/s, (♦) 200 mV/s, (♦) 250 mV/s, (♦) 300 mV/s.

4.1.1. Utjecaj koncentracije

Na slici 22. prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u otopinama (+)-katehina rastućih koncentracija ($c = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5.91 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Voltamogrami su snimljeni u acetatnom puferu pri $\text{pH} = 4,5$.



Slika 22. Ciklički voltamogrami otopina (+)-katehina različitih koncentracija, snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 4,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$).

Iz slike je vidljivo da povećanjem koncentracije (+)-katehina u otopini, raste visina oksidacijskih (A1, A2) i redukcijskog (K1) strujnog vrha. Pri višim koncentracijama dolazi do adsorpcije samog katehina i produkata oksidacije na površini elektrode te pojedini oksidacijski vrhovi izostaju. U Tablici 2. navedeni su podatci očitani iz cikličkih voltamograma (+)-katehina prikazanih na slici 22.

Tablica 2. Vrijednosti potencijala ($E_{p,A1}$) i struje ($I_{p,A1}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha kao funkcije koncentracije ispitivanih otopina (+)-katehina.

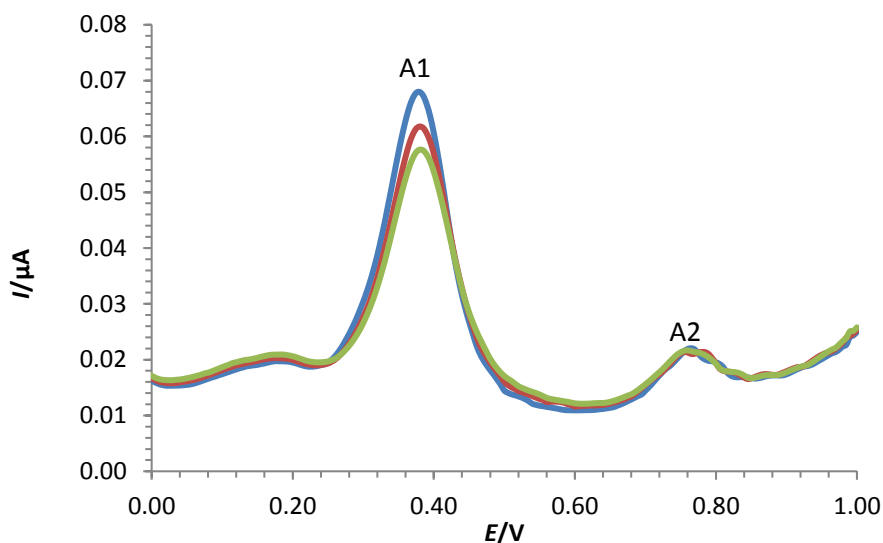
c ((+)-katehin) mol dm^{-3}	$E_{p,A1} / \text{V}$	$10^2 I_{p,A1} / \mu\text{A}$
$8,00 \cdot 10^{-6}$	0,37	10,05
$1,47 \cdot 10^{-5}$	0,37	19,89
$2,13 \cdot 10^{-5}$	0,42	31,51
$2,79 \cdot 10^{-5}$	0,46	40,51
$6,10 \cdot 10^{-5}$	0,53	57,92
$9,39 \cdot 10^{-5}$	0,61	59,38

Iz podataka u Tablici 2. vidljivo je da s porastom koncentracije (+)-katehina u ispitivanim otopinama raste visina prvog oksidacijskog strujnog vrha (+)-katehina ($I_{p,A1}$), dok se vrijednost oksidacijskog potencijala ($E_{p,A1}$) pomiče prema višim vrijednostima (pozitivira se).

4.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

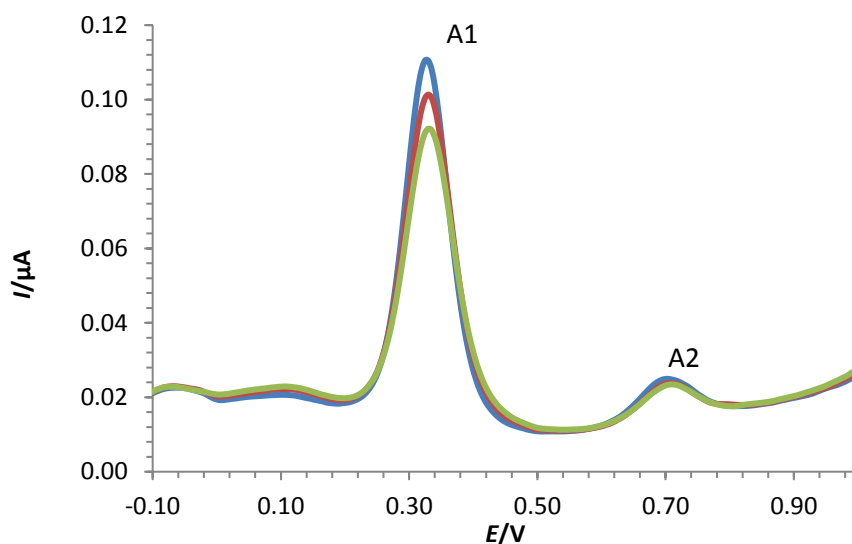
Ova metoda je korištena za praćenje ovisnosti struje anodnih vrhova ($I_{p,a 1,2}$) o pH (3,5...8,0), te za proučavanje adsorpcije ispitivanog polifenola (+)-katehina na elektrodi od staklastog ugljika.

Na slici 23. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 3,5) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,38$ V (A1) i $E_{p,A2} = 0,77$ V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.



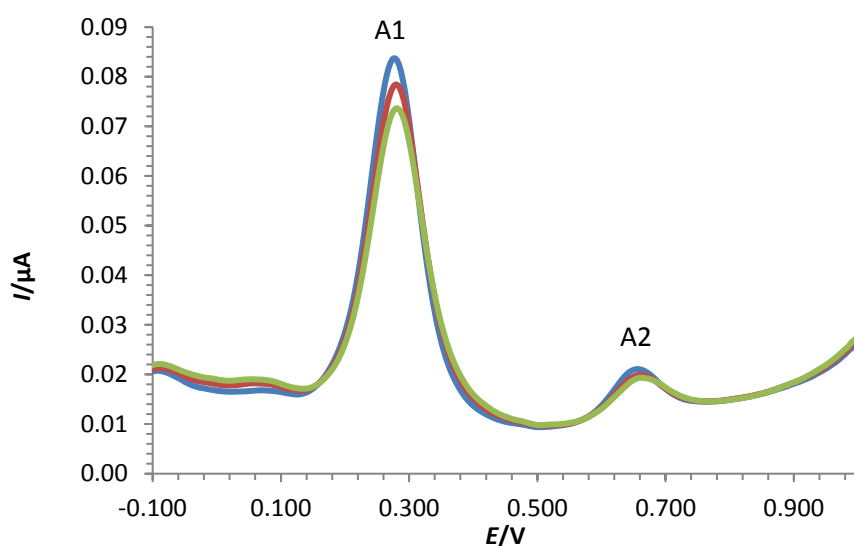
Slika 23. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 3,5; $I_c = 0,1$ mol dm⁻³). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (♦) 1. scan, (♦) 2. scan, (♦) 3. scan.

Na slici 24. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 4,5) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,33$ V (A1) i $E_{p,A2} = 0,70$ V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.



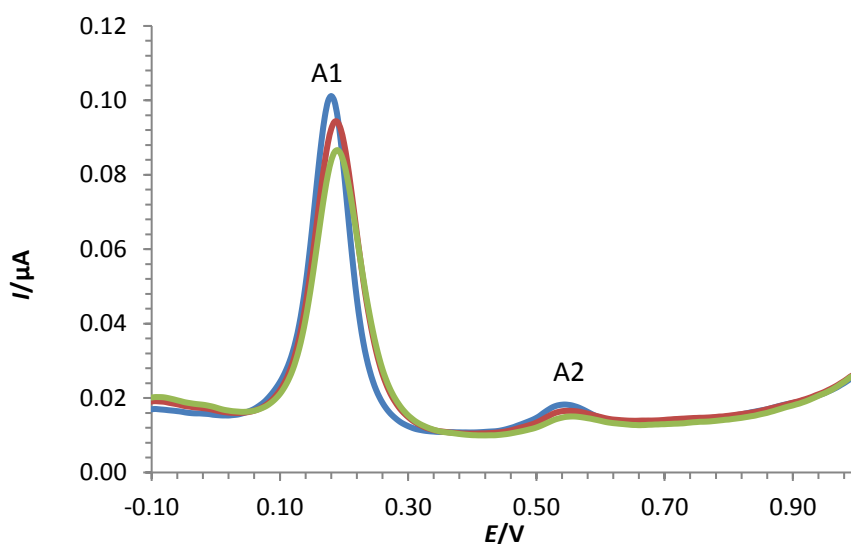
Slika 24. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,5; $I_c = 0,1$ mol dm⁻³). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (♦) 1. scan, (♦) 2. scan, (♦) 3. scan.

Na slici 25. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 5,5$) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s . Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha (A1) na $E_{p,A1} = 0,27\text{V}$ i $E_{p,A2} = 0,64 \text{ V}$ (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.



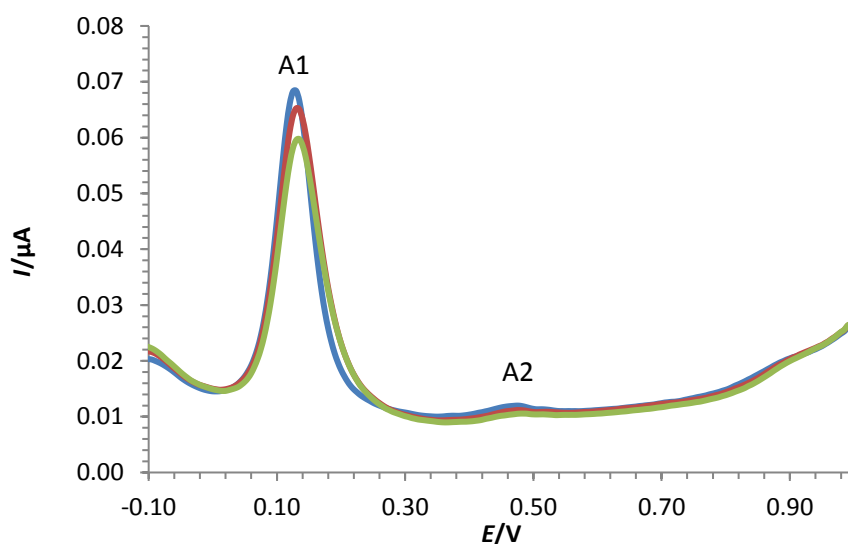
Slika 25. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu ($\text{pH} = 5,5$; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s . (♦) 1. scan, (♦) 2. scan, (♦) 3. scan.

Na slici 26. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,19$ V (A1) i na $E_{p,A2} = 0,55$ V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.



Slika 26. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0; $I_c = 0,1$ mol dm⁻³). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (♦) 1. scan, (♦) 2. scan, (♦) 3. scan.

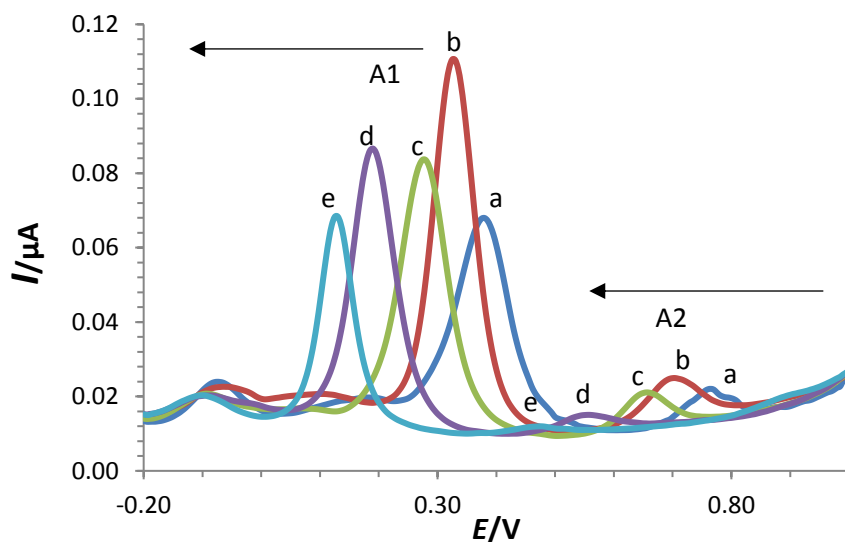
Na slici 27. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1} = 0,13$ V (A1) i $E_{p,A2} = 0,47$ V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.



Slika 27. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0; $I_c = 0,1$ mol dm⁻³). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (♦) 1. scan, (♦) 2. scan, (♦) 3. scan.

4.2.1. Utjecaj pH

Na slici 28. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcije pH vrijednosti ispitivanih otopina (+)-katehina.



Slika 28. Diferencijalni pulsni voltamogrami (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH = (a) 3,5; (b) 4,5; (c) 5,5; (d) 7,0; (e) 8,0). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s.

Iz slike 28. je vidljivo da visine anodnih strujnih vrhova rastu do pH = 4,5; a opadaju daljnjim porastom pH vrijednosti. S porastom pH vrijednosti otopina (+)-katehina, pomiču se vrijednosti potencijala prvog ($E_{p,a1}$) i drugog oksidacijskog strujnog vrha ($E_{p,a2}$) prema negativnijim vrijednostima.

Podatci koji su očitani iz diferencijalnih pulsni voltamograma (+)-katehina sa slike 28. prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz vrijednosti potencijala (E_p) i struje (I_p) prvog (A1) i drugog (A2) oksidacijskog strujnog vrha (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), kao funkcije pH otopina (+)-katehina.

pH	$E_{p,A1} / V$	$10^2 \cdot I_{p,A1} / \mu A$	$E_{p,A2} / V$	$10^2 \cdot I_{p,A2} / \mu A$
3,5	0,38	6,75	0,77	2,17
4,5	0,33	10,98	0,70	2,46
5,5	0,27	10,49	0,64	2,40
7,0	0,19	8,60	0,55	1,53
8,0	0,13	6,81	0,47	1,22

5. RASPRAVA

5.1. Ciklička voltometrija

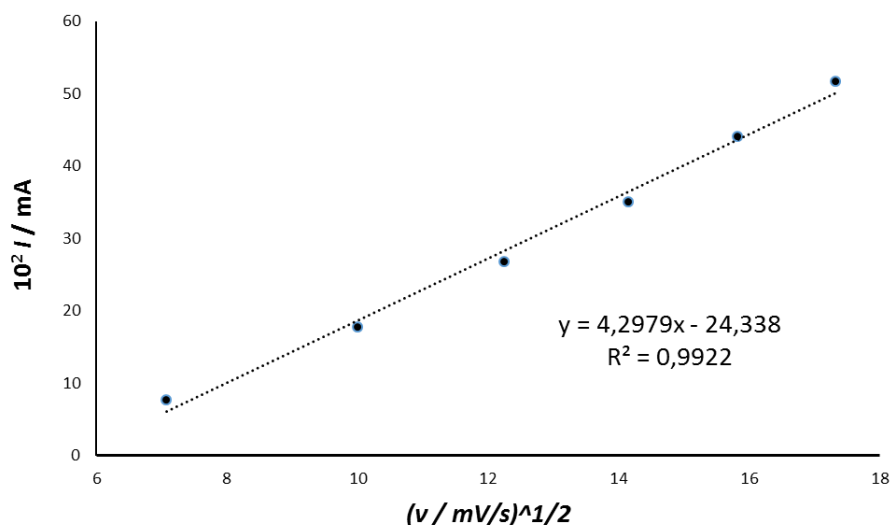
Prvi oksidacijski strujni vrh je reverzibilan i nedvojbeno se odnosi na oksidaciju 3`-OH i 4`-OH grupa u prstenu B. [12] [22] [24]. Drugi oksidacijski vrh je ireverzibilan. Objašnjenje za pojavu drugog oksidacijskog vrha kod (+)-katehina nije tako jednoznačno u literaturi. Neki autori ga pripisuju oksidaciji 3-OH grupe na prstenu C[12] dok neki drugi autori njegovu pojavu pripisuju oksidaciji m-difenolnih grupa na prstenu A [24] [25] .

Redukcijski strujni vrh K1 odnosi se na redukciju katehin o-kinona nastalog procesom oksidacije 3`-OH i 4`-OH grupe u prstenu B. [22] [12] [25]. Postojanje redukcijskog strujnog vrha (K1) jasno upućuje na proces redukcije elektroaktivne specije (ili više specija) nastale (odnosno nastalih) tijekom oksidacije (+)-katehina. [1]

Razlika potencijala oksidacijskog i redukcijskog vrha (ΔE_p), iznosi 140 mV pri nižim pH vrijednostima (pH = 3,5 i 4,5). Velika ΔE_p vrijednost može ukazivati na činjenicu da se proces oksidacije katehina odvija EC oksidacijskim mehanizmom. EC mehanizam upućuje na reverzibilnu elektrokemijsku oksidaciju katehina u o-kinon, nakon koje se odvija reverzibilna kemijska reakcija oksidacijskih produkata katehina[25]. Pri višim pH vrijednostima (pH = 5,5, 7;0 i 8;0) $\Delta E_p = 50$ mV što upućuje na reverzibilan oksidacijski proces.

Ciklički voltamogrami (+)-katehina snimljeni pri pH= 3,5; 4,5; 5,5; 7,0 i 8,0 (Slike 12, 14, 16, 18, 20) pokazuju dva oksidacijska i jedan redukcijski strujni vrh. Proces elektrokemijske oksidacije se odvija u dva koraka. Prvi korak je reverzibilan, uključuje izmjenu dva elektrona i dva protona i odnosi se na oksidaciju kateholne grupe na B prstenu katehina, dok je drugi korak ireverzibilan i odnosi se na oksidaciju rezorcinolne grupe A prstena [1].

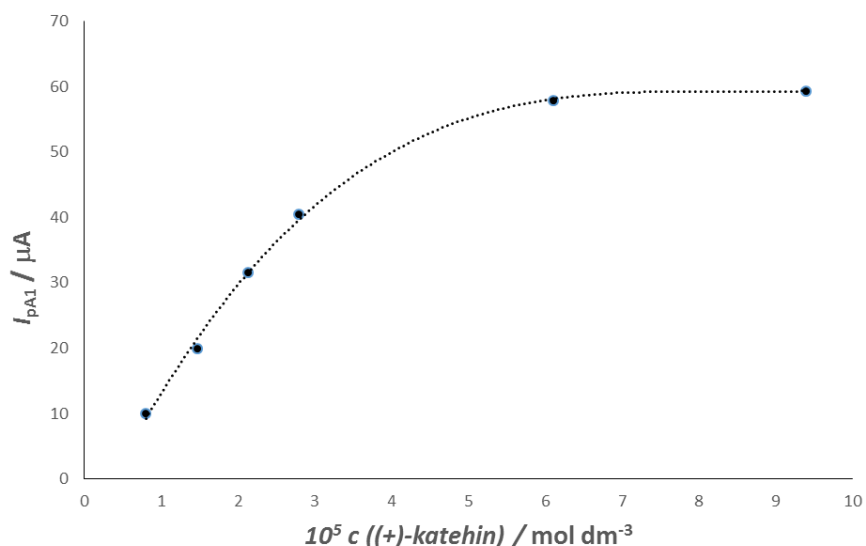
Iz slike 29. je vidljivo da visina prvog anodnog strujnog vrha linearno ovisi o drugom korijenu brzine promjene potencijala, što potvrđuje da je to reverzibilni oksidacijski proces kontroliran difuzijom.



Slika 29. Prikaz ovisnosti struje prvog anodnog strujnog vrha, $I_{p,a}$ o korijenu brzine polarizacije elektrode u otopini (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri pH=4,5.

Praćenjem utjecaja brzine promjene potencijala na visinu strujnog vrha (Slika 13, 15, 17, 19 i 21) utvrđeno je da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Povećanjem koncentracije (+)-katehina u ispitivanoj otopini također raste visina anodnih strujnih vrhova i katodnog strujnog vrha (Slika 22).

Pri nižim koncentracijama (+)-katehina, do $c(\text{katehin}) \sim 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, odvija se proces adsorpcije oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu elektrode od staklastog ugljika (Slika 30). Pri koncentracijama (+)-katehina višim od $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, struja prvog oksidacijskog strujnog vrha raste sporije s povećanjem koncentracije, zbog moguće interakcije molekula katehina koje su adsorbirane na površinu elektrode s molekulama u otopini.



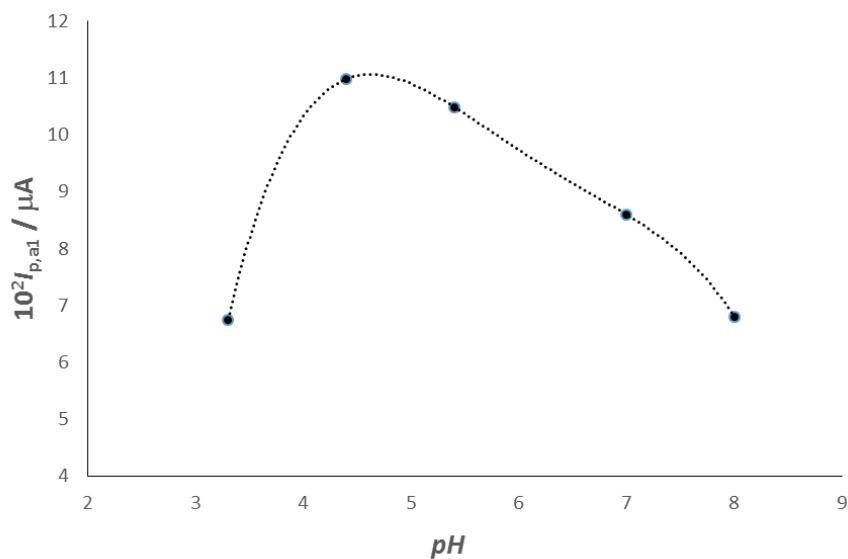
Slika 30. Prikaz ovisnosti struje prvog oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,A1}$) o koncentraciji (+)-katehina (pH = 4,5; $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$).

5.2. Diferencijalna pulsna voltometrija

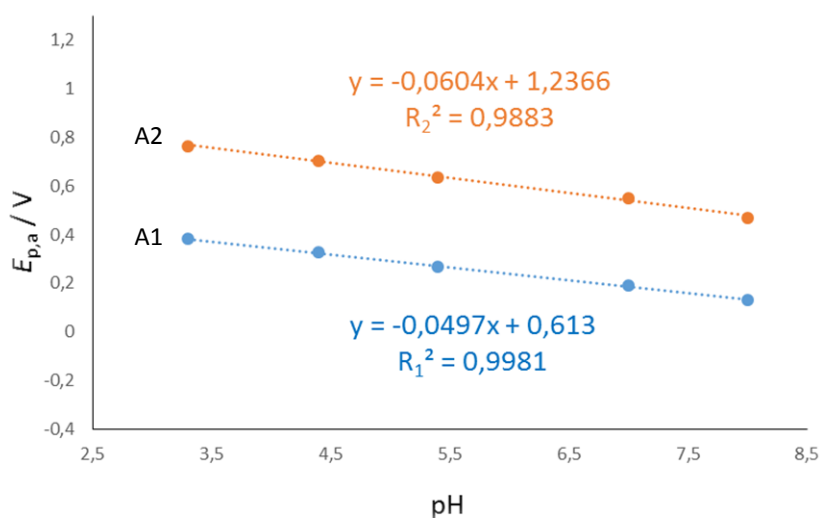
Na slici 31. prikazana je ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine (+)-katehina, te na slici 32. ovisnost potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine (+)-katehina.

Iz slike 31. je vidljivo da visina anodnog strujnog vrha raste do pH ~ 4,5; a daljnjim povećanjem pH vrijednosti visina anodnog strujnog vrha počinje opadati, što pokazuje da je proces oksidacije (+)-katehina najizraženiji oko pH ~ 4,5 .

Iz slike 32. vidljivo je da oksidacijski potencijali (+)-katehina ($E_{p,A1}$ i $E_{p,A2}$) linearno ovise o pH, a nagibi pravaca naznačeni su na slici 32., što upućuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu jednakog broja protona i elektrona.



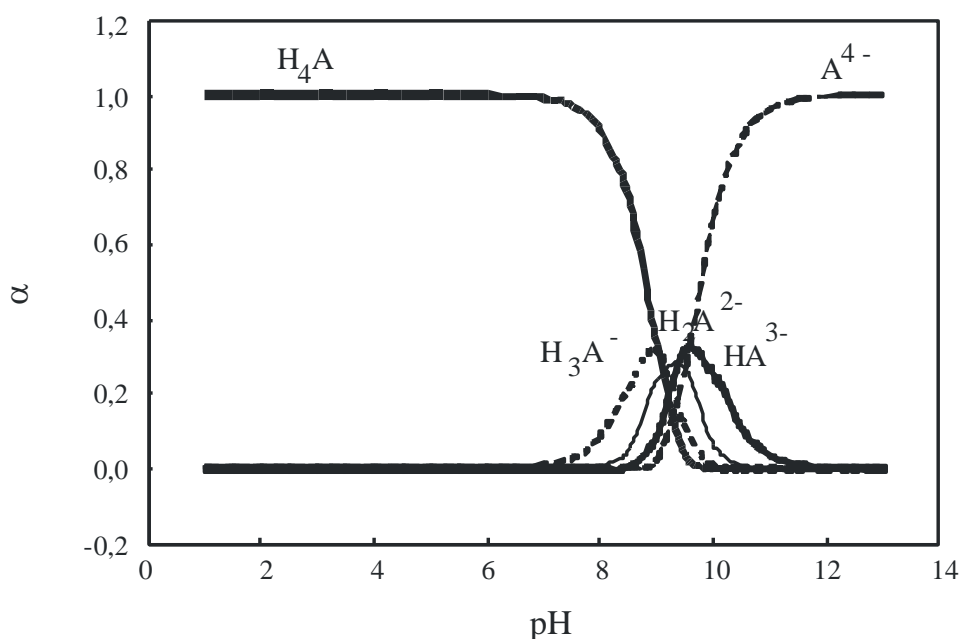
Slika 31. Ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednostima za (+)-katehin ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Brzina promjene potencijala je 5 mV/s.



Slika 32. Prikaz ovisnosti potencijala prvog (A1) i drugog (A2) oksidacijskog strujnog vrha (+)-katehina ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) o pH. Brzina promjene potencijala je 5 mV/s.

Iz slika 23, 24, 25, 26 i 27 je vidljivo da visina oba oksidacijska strujna vrha (A1 i A2) opada uzastopnim snimanjem voltamograma pri svim ispitivanim pH vrijednostima, što potvrđuje adsorpciju oksidacijskih produkata (+)-katehina na površinu radne elektrode.

Iz dijagrama specijacije (Slika 33) se može vidjeti da u oksidacijskim i adsorpcijskim procesima do $\text{pH} = 6$ sudjeluju neutralne molekule katehina jer katehin ne disocira ispod $\text{pH}=6$. Pri višim pH vrijednostima ($\text{pH} > 6$) odvija se disocijacija katehina. Uz neutralne oblike katehina u oksidaciji i adsorpciji sudjeluju i anionski oblici, pa se zbog toga mogu odvijati kompleksniji oksidacijski i adsorpcijski procesi.



Slika 33. Dijagram specijacije (+)-katehina: (H_4A) nedisocirani oblik (+)-katehina i (H_3A^- , H_2A^{2-} , HA^{3-} i A^{4-}) deprotonirani oblici (+)-katehina. Konstante disocijacije ($\text{pK}_{\text{a}3} = 9,02$; $\text{pK}_{\text{a}4} = 9,12$; $\text{pK}_{\text{a}5} = 9,43$ i $\text{pK}_{\text{a}7} = 9,58$) su uzete iz literature[26]. Oznake 3', 4', 5 i 7 kod pK_a vrijednosti se odnose na ugljikove atome u molekuli (+)-katehina na koje su vezane hidroksilne grupe.

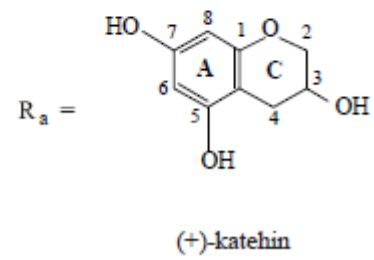
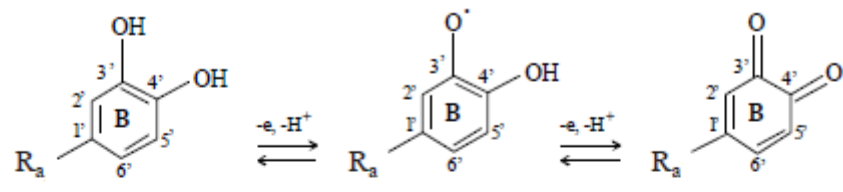
5.3. Mehanizam oksidacije (+)-katehina

Mogući oksidacijski mehanizam (+)-katehina, koji se odnosi na oksidaciju 3'-OH i 4'-OH grupe u prstenu B i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona prikazan je na slici 34. [12].

Mehanizam oksidacije uključuje ionizaciju pri čemu nastaje monoanionska specija nakon gubitka jednog elektrona. Iz monoanionske specije nakon oksidacije tj. izmjene jednog elektrona i protona nastaje radikal. Nakon toga se odvija reverzibilni korak koji uključuje izmjenu jednog elektrona pri čemu nastaje dehidro oblik koji se brzo protonira i hidratizira da bi nastao konačni produkt o-kinon. [1] [12] [24] [25] .

Navedeni mehanizam je ovisan o pH (najizraženiji je pri pH= 4,5), pa se pri nižim pH vrijednostima prvi oksidacijski korak (+)-katehina odvija prema **eH mehanizmu**. eH mehanizam upućuje na proces u kojem (+)-katehin najprije otpušta jedan elektron iz neutralne molekule, a nakon toga proton. Pri višim pH vrijednostima (pH= 7,0 i 8,0) oksidacija (+)-katehina odvija se paralelno prema eH i He mehanizmima. **He mehanizam** [24] upućuje na proces u kojem otpuštanjem jednog protona iz neutralne molekule nastaje fenolat anion, a nakon toga otpuštanjem jednog elektrona nastaje fenoksil radikal. [1]

Drugi oksidacijski vrh (+)-katehina se odnosi na oksidaciju 3-OH grupe na prstenu C [1], odnosno na oksidaciju 5-OH i 7-OH grupe na prstenu A [24] [25]. Uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona, pri čemu polimerizacijom, tj. kondenzacijskom reakcijom vezanja A prstena jedne molekule (+)-katehina s B prstenom druge molekule nastaje katehin polimer [1] [25].



Slika 34. Mogući mehanizam elektrokemijske oksidacije (+)-katehina.

6. ZAKLJUČAK

(+)-Katehin je elektroaktivna tvar, čija se svojstva mogu odrediti elektrokemijskim tehnikama. U ovom radu korištene su ciklička i diferencijalna pulsna voltometrija, za ispitivanje elektrokemijskih svojstava (+)-katehina u pH području od 3,5 do 8,0.

Utvrđeno je da je proces oksidacije katehina kvazireverzibilan pri nižim pH vrijednostima (pH = 3,5 i 4,5), a reverzibilan pri višim (pH = 5,5; 7,0 i 8,0) te uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona, a da se (+)-katehin i produkti oksidacije (+)-katehina adsorbiraju na površinu elektrode od staklastog ugljika (radna elektroda).

Cikličkom voltametrijom je potvrđeno da se pri pH = 3,5 do 8,0 pojavljuju 2 oksidacijska i jedan reduksijski strujni vrh. Prvi oksidacijski strujni vrh se odnosi na oksidaciju 3'-OH i 4'-OH grupe u prstenu B i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona, te nastanak katehin *o*-kinona. Drugi oksidacijski strujni vrh katehina se odnosi na oksidaciju 5-OH i 7-OH grupe u prstenu A i upućuje na ireverzibilan oksidacijski proces. Reduksijski strujni vrh se odnosi na redukciju *o*-kinona koji je nastao oksidacijom katehina u prvom koraku oksidacije.

Proces oksidacije (+)-katehina je najizraženiji pri pH = 4,5 što je u skladu s literaturnim podacima.

Dijagram specijacije (+)-katehina pokazuje da (+)-katehin ne disocira ispod pH = 6 što znači da u oksidaciji i adsorpcijskim procesima do pH = 6 sudjeluju neutralne molekule (+)-katehina. Disocijacija (+)-katehina se odvija pri višim pH vrijednostima (pH = 6 do 8) u kojoj uz neutralne oblike sudjeluju i anionski oblici, pa se zbog toga mogu odvijati kompleksniji oksidacijski i adsorpcijski procesi.

7. LITERATURA

- [1] M. Medvidović-Kosanović, Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola, Doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 2011.
- [2] J. Das, R. Ramani, M. Olufemi Suraju, *Biochimica et Biophysica Acta* **1860** (2016), 2107-2121
- [3] M. Drenjančević, V. Jukić, K. Mihaljević, V. Rastija, *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi* **5** (2016), 39-56
- [4] A. I. Smeds, P. C. Eklund, R. E. Sjöholm, S. M. Willför, S. Nishibe, T. Deyama, B. R. Holmbom, *J. Agric. Food Chem* **55** (2007), 1337-1346
- [5] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, *Antioxidants and Redox Signaling* **18** (2013), 1818-1892
- [6] https://www.google.hr/search?q=antioksidans+i+slobodni+radikal&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi2rpfC_6LWAhUFuhQKHeXHA10Q_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgrc=UQfbW-yVviPZ6M (18.6.2017.)
- [7] S. P. Kazazić, *Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida*, Arh Hig Toksikol, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2004, 279-290
- [8] M. E. Ghica, A. M. O. Brett, *Electrochemical Oxidation of Rutin*, *Electroanalysis* **17** (4) (2005), 313-318
- [9] S. A. Aherne, N. M. O'Brien, *Nutritio* **18** (2002), 75-81
- [10] S. H. Thilakarathna, H. P. V. Rupasinghe, *Nutrients*, **5** (9) (2013), 3367-3387
- [11] S. Kumar, A. K. Pandey, *ScientificWorldJournal*, **2013** (2013), 1-16

- [12] P. Janeiro and A. M. Oliveira Brett, *Anal. Chim. Acta* **518** (2004) 109-115.
- [13] C. J. Dufresne and E. R. Farnworth, *J Nutr Biochem* **12** (2001) 404-421.
- [14] C. S. Yang, J. D. Lambert, J. Ju, G. Lu, and S. Sang, *Toxicol Appl Pharmacol* **224** (2007) 265-273
- [15] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Mediaprint-Tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb, 2010.
- [16] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb 1999.
- [17] Nataša Stankir, *Završni rad, Izrada i karakterizacija superkondenzatora s grafenom kao aktivnim materijalom*, Zagreb, rujan 2015. (str.13)
- [18] I. Malenica, *Nove elektrokemijske metode za određivanje ropirinola*, Zagreb, 2012.
- [19] D. Malešev, V. Kuntić, *J. Serb. Chem. Soc.*, **72** (10) (2007), 921-939
- [20] https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=638&tbm=isch&sa=1&q=glassy+carbon+electrode&oq=glassy+carbon+el&gs_l=psyab.1.1.0i19k112.28141.32999.0.34605.17.17.0.0.0.0.218.2207.1j14j1.16.0...0...1.1.64.psyab..1.15.2102.0..0j0i67k1.WsZSRHYy0UA#imgrc=xRPSJwQLfZ5voM (16.8.2017.)
- [21] <https://www.basinc.com/products/ec/auxele> (19.8.2017.)
- [22] H. P. Hendrickson, M. Sahafayen, M. A. Bel, A. D. Kaufman, M. E. Hadwiger, and C. E. Lunte, *J Pharmaceut Biomed Anal* **12** (3) (1994) 335-341.
- [23] C. Mielczarek, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **25** (2005) 273-279
- [24] S. Martinez, L. Valek, T. Petrović, M. Metikoš-Huković, and J. Piljac, *J. Electroanal. Chem.* **584** (2005) 92-99.

[25] V. Castaignède, H. Durliat, and M. Comtat, *Anal Lett* 36 (9) (2003) 1707-1720.

[26] C. Cren-Olive, P. Hapiot, J. Pinson, and C. Rolando, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (47) (2002) 14027-14038.