

Elektrokemijska karakterizacija p-hidroksibenzojeve kiseline

Glavašević Arbutina, Darija

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:182:534912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Darija Glavašević Arbutina

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

***p*-HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Darija Glavašević Arbutina

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
***p*-HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE**

Diplomski rad

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

Komentorica: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Neposredni voditelj: Dominik Goman, mag.chem.

Osijek, 2022.

Ovaj rad prezentiran je na 1st International conference „Food & Climate Change”, 15. listopada 2021. te na 3rd Young Scientists Day Conference, 30. studenog 2021.

Zahvala

Želim se zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Martini Medvidović-Kosanović, komentorici doc.dr.sc Anamariji Stanković i neposrednom voditelju Dominiku Gomanu, mag.chem. na pruženoj suradnji, dobivenom znanju i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvalila bih se i svojim roditeljima, mojoj majci i mojem ocu, koji je moja snaga s neba i što su uvijek bili uz mene u usponima i padovima. Hvala vam za pruženu ljubav i potporu. Najveće hvala mojem malom anđelu Neu, što mi je pokazao da je sve moguće uz puno ljubavi i osmijeha. Hvala mojem suprugu i svekrvi na vremenu kojem su odvojili za čuvanje Nea da bih mogla biti na predavanjima te kako bih učila. Hvala vam svima što ste me bodrili i bili moja velika podrška.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama na lijepim studentskim danima, kavama, druženjima i izlascima. Zajedničkim učenjima i riječima potpore kada je to bilo najpotrebnije.

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

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA *p*-HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Darija Glavašević Arbutina

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju

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

Sažetak

Cilj diplomskog rada bio je ispitati elektrokemijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline u puferima određene pH vrijednosti i realnim uzorcima pomoću cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. Ispitivan je utjecaj pH na potencijal oksidacijskog strujnog vrha, utjecaj koncentracije te promjena brzine polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Cilj rada bio je odrediti moguću adsorpciju *p*-hidroksibenzojeve kiseline i detektirati *p*-hidroksibenzojevu kiselinu u realnim uzorcima. Mjerenja su provedena pomoću PalmSens potencioštata/galvanostata. Voltametrijski troelektrodni sustav sastoji se od radne elektrode od staklastog ugljika (GC), referentne (Ag/AgCl) elektrode i protuelektrode platinske žice. Prije svakog mjerenja, sustav je propušan argonom visoke čistoće ($\Phi_{Ar} = 99,999\%$). Cikličkom voltametrijom utvrđen je jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh koji odgovaraju oksidaciji hidroksilne skupine i redukciji oksidacijskog produkta *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Oba strujna vrha su se povećavala s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Također je utvrđeno da se radi o difuzijski kontroliranom oksidacijskom procesu. Pomoću diferencijalne pulsne voltametrije utvrđena je adsorpcija *p*-hidroksibenzojeve kiseline na površinu radne elektrode. Optimalna pH vrijednost za oksidaciju je pri pH = 6 za elektrodu od staklastog ugljika. Određena je i koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima (grožđu, bijelom vinu, kokosovom mlijeku i suhom kokosu) i ona je varirala od 1,4 μM do 7,6 μM .

Diplomski rad obuhvaća: 43 stranica, 35 slika, 4 tablica, 29 literaturna navoda.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *p*-hidroksibenzojeva kiselina / ciklička voltametrija / diferencijalna pulsna voltametrija

Rad je prihvaćen: 28.06.2022.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, mentorica i član
3. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, član
4. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-André, zamjena člana

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

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

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *p*-HYDROXYBENZOIC ACID

Darija Glavašević Arbutina

Thesis completed at: Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD

Abstract

The aim of this master thesis was to examine the electrochemical properties of *p*-hydroxybenzoic acid in buffers of certain pH values and properties of real samples using differential pulse and cyclic voltammetry. The impact of pH on the oxidation peak potential was examined as well as the effect of concentration and scan rate on the oxido-reduction properties of *p*-hydroxybenzoic acid. Measurements were performed by using the PalmSens potentiostat/galvanostat. The three-electrode voltammetric system consists of a working glassy carbon electrode (GC), reference (Ag/AgCl) electrode, and counter electrode platinum wire. Before each measurement, the system was purged with high purity argon ($\Phi_{Ar} = 99.999\%$). Cyclic voltammetry showed one oxidation and one reduction peak which corresponds to oxidation of the hydroxyl group and reduction of an oxidation product of *p*-hydroxybenzoic acid. Both peaks have increased with the increase of scan rate. It was also determined that the oxidation process was diffusion-controlled. The adsorption of *p*-hydroxybenzoic acid on the working electrode surface was determined by differential pulse voltammetry. The solution stability with time and the effect of pH on the oxidation peak current was determined. The optimal pH value for oxidation of *p*-hydroxybenzoic acid was pH = 6 for the glassy carbon electrode. It was determined that with an increase of concentration of *p*-hydroxybenzoic acid the oxidation peak current also increased. Concentration of *p*-hydroxybenzoic acid was determined in real samples (grapes, white wine, coconut milk, and dry coconut) and it varied from 1.4 μ M to 7.6 μ M.

Thesis includes: 43 pages, 35 figures, 4 tables, 29 references.

Original in: Croatian

Keywords: *p*-hydroxybenzoic acid/ cyclic voltammetry / differential pulse voltammetry

Thesis accepted: 28.06.2022.

Reviewers:

1. Assist. Prof. Olivera Galović, president
2. Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, mentor and member
3. Assist. Prof. Aleksandar Sečenji, member
4. Assoc. Prof. Elvira Kovač-Andrić, supstitution member

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. <i>p</i> -HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA.....	4
2.3. ANTIOKSIDANSI.....	6
2.4. METODE ODREĐIVANJA <i>p</i> -HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE.....	8
2.4.1. KROMATOGRAFSKE METODE.....	9
2.4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE	9
2.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE	11
2.6. VOLTAMETRIJA	12
2.6.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA	13
2.6.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. KEMIČKE I PRIPREMA OTOPINA	16
3.2. METODE	17
3.2.1. CIKLIČKA I DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA.....	17
3.2.2. ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA	19
3.2.3. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA	22
4.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA	27
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA	41

1.UVOD

p-hidroksibenzojeva kiselina koristi još nekoliko naziva, poput 4-hidroksibenzojeva kiselina, *para*-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksibenzoat te se koristi skraćenicom PHBA. Kiselina se nalazi u obliku bijele kristalne krutine. Može ju se sintetizirati na dva načina. Prirodno se nalazi u vinu, grožđu, rogaču te vaniliji. *p*-hidroksibenzojeva kiselina se često koristi kao konzervans u hrani, piću, lijekovima te kozmetici. Ova kiselina uz antimutageno i estrogeno djelovanje ima i antibakterijsko djelovanje protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, poput ostalih polifenola.

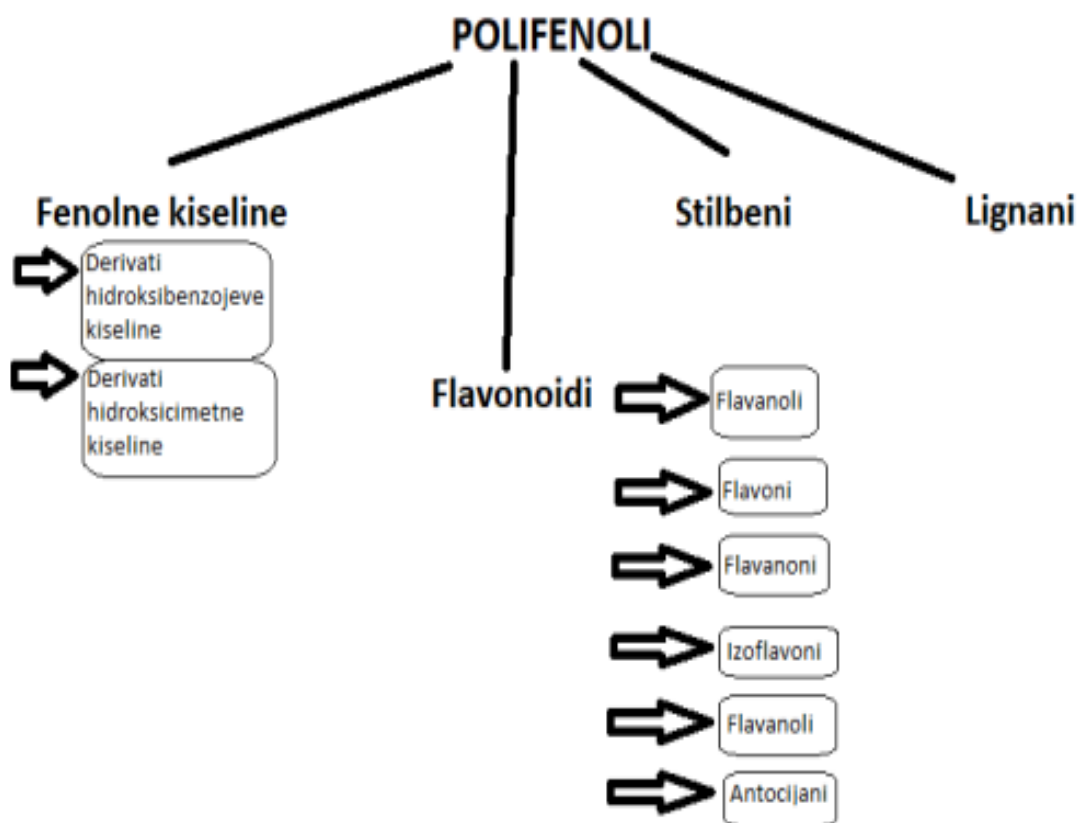
Cilj rada bio je odrediti elektrokemijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline te odrediti najbolju elektrodu (GC, platina, zlato) za praćenje *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Ispitan je utjecaj brzine polarizacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline te radi li se o difuzijski kontroliranom procesu. Određivala se moguća adsorpcija *p*-hidroksibenzojeve kiseline i utjecaj vremena stajanja na stabilnost otopine ispitivanog antioksidansa. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj koncentracije i promjene pH vrijednosti na oksidacijski strujni vrh *p*-hidroksibenzojeve kiseline, odrediti optimalan pH za njenu oksidaciju te detektirati *p*-hidroksibenzojevu kiselinu u realnim uzorcima.

Prilikom izvedbe korištene su dvije voltametrijske metode, ciklička voltametrija i diferencijalna pulsna voltametrija. Eksperimentalni dio rada proveden je u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji gdje su varirane radne elektrode (zlatna, platinska i elektroda od staklastog ugljika). Elektroda od staklastog ugljika se pokazala kao najbolji senzor za određivanje elektrokemijskih svojstava *p*-hidroksibenzojeve kiseline te su pomoću nje određene koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima.

2. LITERATURNI PREGLED

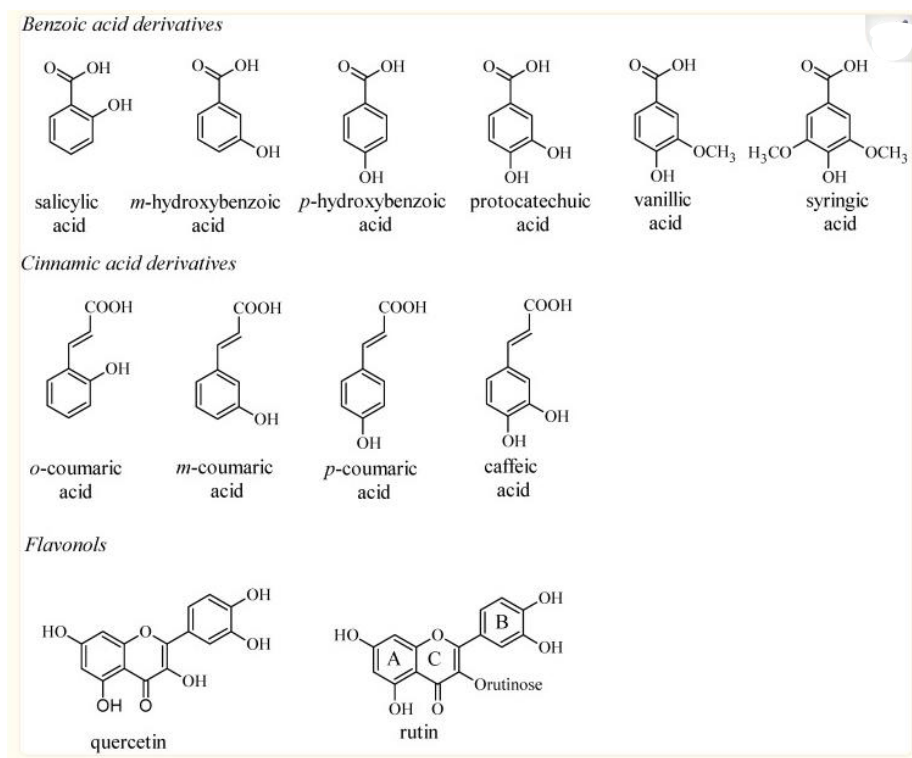
2.1. POLIFENOLI

Biljke služe kao izvor polifenolnih spojeva te na taj način putem hrane polifenolni spojevi dopijevaju u ljudski i životinjski organizam. Postoji veliki broj polifenolnih derivata poput derivata fenola, fenilpropanoida, derivata benzojeve kiseline, flavonoida, stilbena, tanina, lignana i ostalih. Svi navedeni derivati pomažu biljkama pri njihovom rastu i razvoju tako što djeluju antipatogeno. Sam cilj polifenola je povećati stabilnost kod biljaka te ih zaštititi od UV zračenja. Slika 1 prikazuje osnovnu podjelu polifenola [1].



Slika 1. Osnovna podjela polifenola [1].

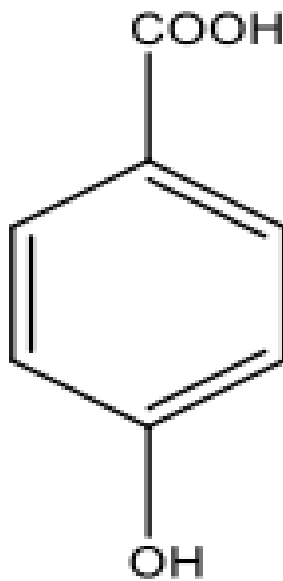
Glavna karakteristika svih polifenola je da sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih za benzenski prsten. Strukturno se mogu podijeliti u dvije glavne skupine, fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina) i flavonoidi. Na slici 2 prikazane su strukture različitih polifenola. Galna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina te 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina pripadaju derivatima prve skupine. Zajedničke karakteristike navedenim kiselinama i ostalim polifenolima su njihovo antibakterijsko, antitumogeno i estrogeno djelovanje. Velika skupina polifenola su flavonoidi koji se dijele na šest podskupina: flavanoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni, flavonoli i antocijani [1,2].



Slika 2. Strukture polifenonih spojeva [2].

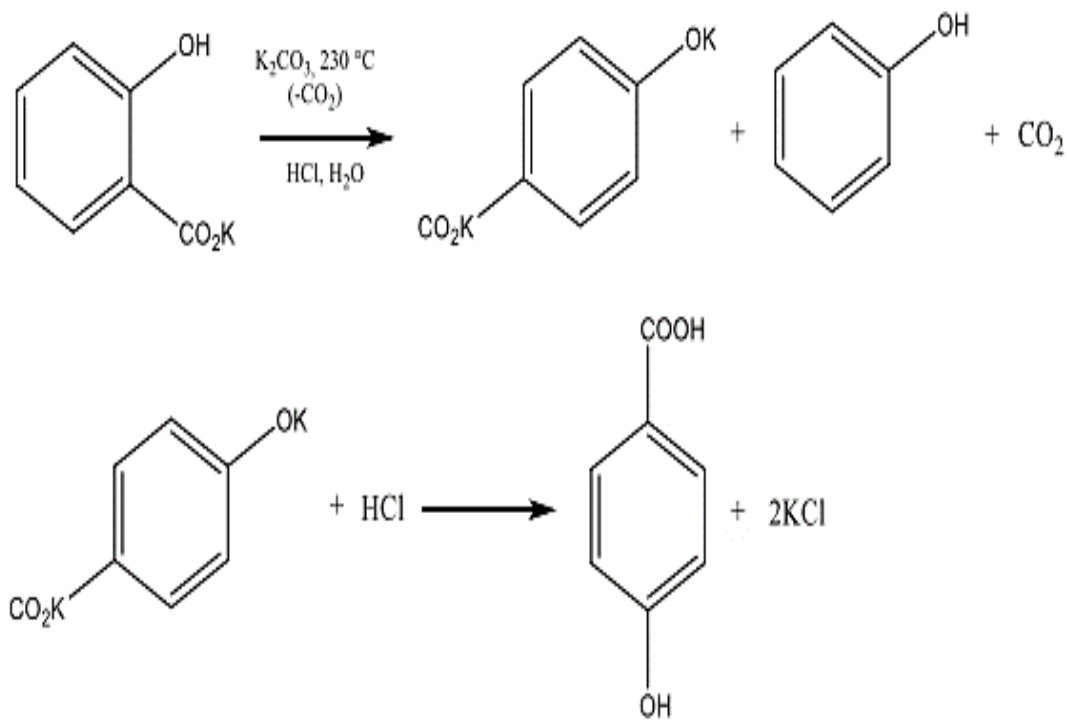
2.2. *p*-HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA

p-hidroksibenzojeva kiselina (skraćeno PHBA) je fenolni derivat benzojeve kiseline. Ostali nazivi navedene kiseline su 4-hidroksibenzojeva kiselina, para-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksibenzoat. Molekulska formula *p*-hidroksibenzojeve kiseline je $C_7H_6O_3$. To je bijela krutina, slabo topljiva u vodi, a dobro se otapa u organskim polarnim otapalima poput alkohola i acetona. Slika 3. prikazuje strukturnu formulu *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Iz slike se vidi da kiselina na benzenskom prstenu posjeduje karboksilnu skupinu na prvom mjestu te jednu hidroksilnu skupinu na četvrtom mjestu [1].



Slika 3. Strukturna fomula *p*-hidroksibenzojeve kiseline [1].

p-hidroksibenzojeva kiseline prirodno se nalazi u biljkama poput grožđa, kokosa, vanilije, rogača te se nalazi u vinu, produktu grožđa. *p*-hidroksibenzojeva kiselina može se industrijski dobiti na dva načina: 1) sintezom kalijeva fenoksida i ugljikova dioksida ili 2) reakcijom kalijeva salicilata i kalijeva karbonata uz prisutnost topline (Slika 4) [1].



Slika 4. Postupak dobivanja *p*-hidroksibenzojeve kiseline [1].

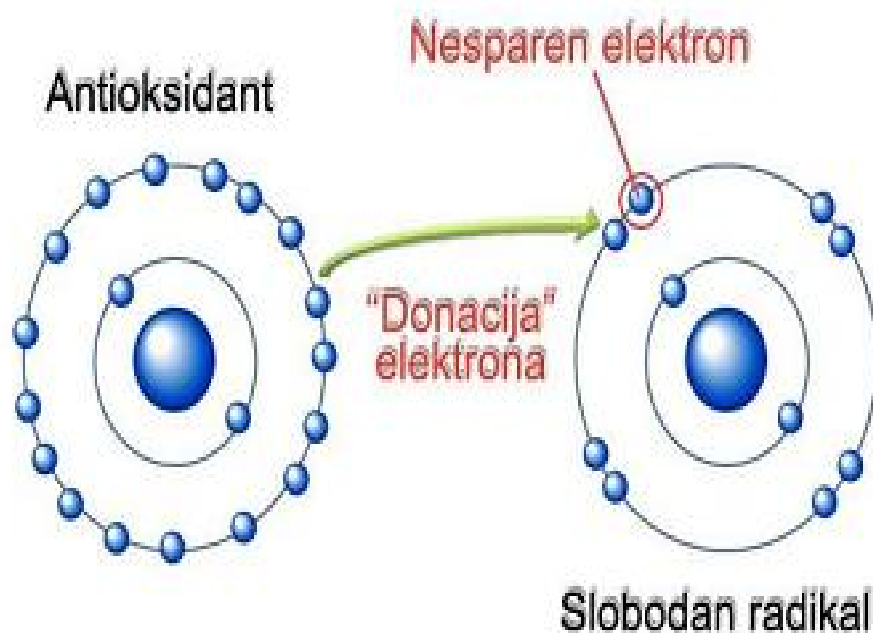
Kisela hrana pogoduje *p*-hidroksibenzojevoj kiselinu, pH 2 – 4. U neutralnom i lužnatom pH području *p*-hidroksibenzojeva kiselina ima slabije djelovanje protiv bakterija. Kod kisele hrane kojoj su plijesan i kvasci glavni uzročnici kvarenja, *p*-hidroksibenzojeva kiselina djeluje kao prirodni konzervans. OARS eng. *Organic Acid Redistribution System* je 2016. godine objavio podatak kako je *p*-hidroksibenzojeva kiselina rasprostranjena u pesticidima, lijekovima i kozmetici. Istraživanja su pokazala kako prevelika izloženost navedenoj kiselinu može uzrokovati bolesti respiratornog sustava te izazvati nadraživanje kože, uključujući dermatitis. Esteri *p*-hidroksibenzojeve kiseline nazivaju se parabeni. Parabeni se primjenjuju kao konzervansi u lijekovima i u kozmetičkoj industriji. Osim u losionima za tijelo, šamponima i kremama za sunčanje mogu se pronaći i u hrani. Konzervirana riba, deserti, marmalade te bezalkoholna pića sadrže parabene. Najčešće korišteni parabeni u kozmetici su metilparaben, propilparaben, butilparaben i etilparaben. Male količine parabena nalaze se u bobičastom voću te je njihova proizvodnja uglavnom industrijska [1,3].

p-hidroksibenzojeva kiselina ima djelovanje protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija te antimutageno i estrogeno djelovanje. *p*-hidroksibenzojeva kiselina počela se koristiti kao metabolit u biosintezi kemijskog fenola. Biofenoli imaju utjecaj na smanjenje CO₂. Ne postoje još dokazi o štetnom utjecaju parabena na ljudsko zdravlje, no o tome se još uvijek diskutira. Petty i Scully istaknuli su da polifenoli imaju važan utjecaj pri sprječavanju nastanka karijesa i paradontnih bolesti. Važni su kao antioksidansi te sudjeluju u borbi organizma protiv slobodnih radikala [4-6].

2.3. ANTIOKSIDANSI

Slobodni radikali su čestice koje u vanjskoj ljusci imaju jedan ili nekoliko nesparenih elektrona. Čestice slobodnih radikala su reaktivne i brzo stupaju u reakcije s organskim molekulama. Ukoliko je njihov nastanak velik dovode do oštećenja stanica. To pak dovodi do oštećenja tkiva te može doći do bolesti. Puljak i suradnici su proveli istraživanje u kojem su iznijeli teoriju da ukoliko metabolizam proizvodi više slobodnih radikala posljedica je brže starenje [7,8].

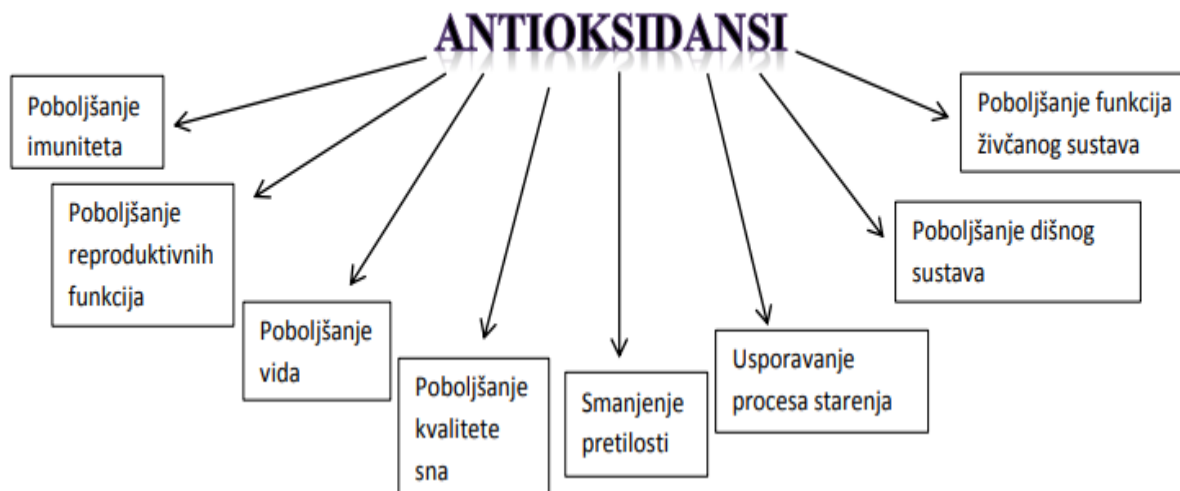
Antioksidansi sprečavaju negativan utjecaj slobodnih radikala te čiste metabolizam od istih. Antioksidanski inhibiraju druge molekule i smanjuju reakciju slobodnih radikala s drugim molekulama. Imaju ulogu elektron donora te u svakom trenu mogu reagirati sa slobodnim radikalima, smanjujući tako njihov štetan učinak na organizam (Slika 5) [9].



Slika 5. Prikaz djelovanja antioksidansa na slobodni radikal [9].

Ljudski organizam posjeduje antioksidativni obrambeni sustav. Sustav se dijeli na antioksidativne enzime i neenzimske antioksidanse. Antioksidativne enzime tvore superoksiddismutaza (SOD), katalaza, glutation-peroksidaza (GPRx), askorbat-oksidaza (AOx), glutation-S-transferaza (GSTs) i glutation-reduktaza (GR). Neenzimski antioksidansi su flavonoidi, karotenoidi, glutation, vitamin C, vitamin E i koenzim Q10 [9].

Antioksidansi se konstantno obnavljaju u ljudskom tijelu kako bi se uspostavila ravnoteža između njih i slobodnih radikala. Antioksidansi se dijele u tri grupe: 1) prva ili primarna grupa sprječava stvaranje slobodnih radikala, 2) sekundarni antioksidansi uništavanju nastale slobodne radikale dok 3) tercijarni antioksidansi obnavljaju oštećenja nastala u organizmu. Antioksidansi nastaju u organizmu, no važan je njihov unos kroz prehranu u obliku vitamina i minerala. Pozitivni učinci antioksidansa na organizam prikazani su na slici 6 [10,11].



Slika 6. Utjecaj antioksidansa na ljudski organizam [11].

2.4. METODE ODREĐIVANJA *p*-HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Kvalitativno i kvantitativno određivanje polifenola u različitim uzorcima je od velike važnosti. Prilikom odabira brze i osjetljive metode važno je razlikovati *p*-hidroksibenzojevu kiselinu i njezine estere (parabene). Postoji niz metoda za određivanje *p*-hidroksibenzojeve kiseline i estera *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Prvo su se koristile nespecifične analitičke metode koje su davale ograničene rezultate. Koristila se tankoslojna kromatografija (eng. *Thin Layer Chromatography*, TLC) i UV spektroskopija. Kasnije su se počele koristiti novije metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) plinske kromatografije (eng. *Gass Chromatography*, GC) fluorometrije, kapilarne elektroforeze (eng. *Electroforesis Capilar*, CE) tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) tandemске masene spektrometrije (eng. *Tandem Mass Spectrometry*, MS-MS). Prednost korištenja UPLC u odnosu na HPLC je pojačavanje odziva šum-signal, kraće vrijeme analize te bolja rezolucija pika. Iako plinska kromatografija daje pouzdane rezultate, potrebna je devijacija koraka te se zbog toga češće koriste metode tekućinske kromatografije. Sve ove tehnike imaju izuzetno visoke cijene, koriste skupu instrumentaciju te su dugotrajne. Kao alternativna i bolja

opcija pokazale su se elektrokemijske tehnike koje su pokazale jednostavnost, osjetljivost i bržu detekciju [12,13].

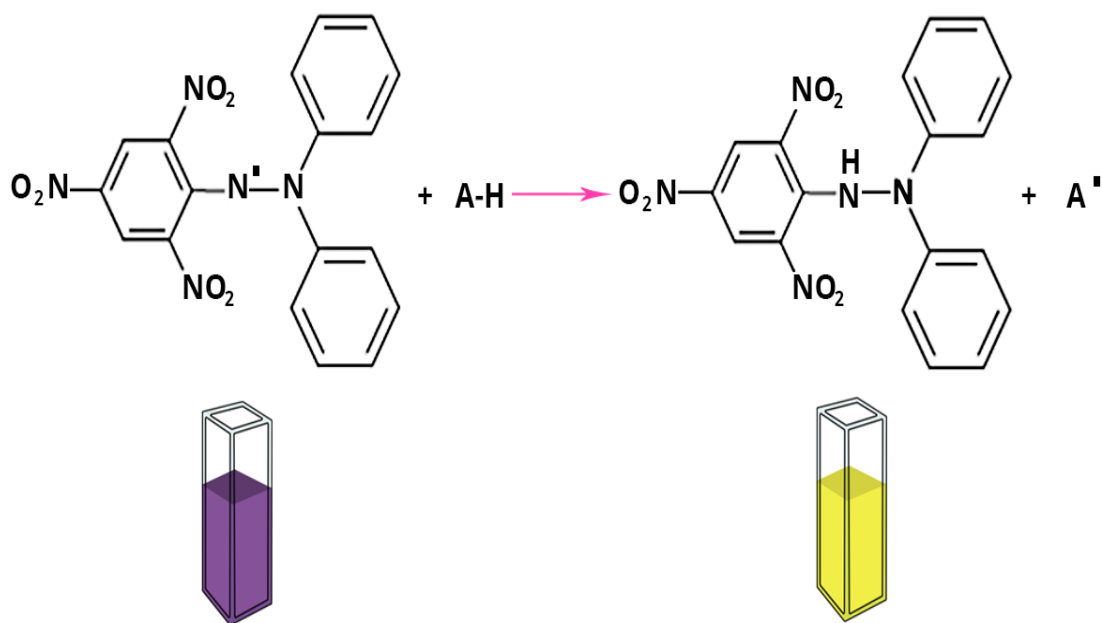
2.4.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Najčešće korištene kromatografske metode su plinska kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kod plinske kromatografije tijekom isparavanja dolazi do razdvajanja i analize spojeva, no spojevi se ne raspadaju. U plinskoj kromatografiji mobilnu fazu čini inertni plin, najčešće helij. Stacionarnu fazu čini tekućina na krutom inertnom nosaču. Kada se analiziraju antioksidansi koristi se plameni-ionizacijski detektor i detektor toplinske vodljivosti [14].

HPLC je građen od pumpe koja pokreće mobilnu fazu i stacionarne faze, odnosno kolone. Kolona je smještena u pećnicu. Posjeduje detektor koji mjeri vrijeme zadržavanja pojedine komponente u koloni. Kolona (stupac) je zbijena sitnim česticama stacionarne faze [12,15].

2.4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

Osnova spektrofotometrijskih metoda kod praćenja antioksidativne aktivnosti je reakcija radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s antioksidansom koji donira atom vodika. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je metoda u kojoj se mjeri aporbancija otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom. U prvom koraku antioksidans donira jedan vodikov atom dušiku koji posjeduje jedan nespareni elektron odgovarajućeg hidrazna. DPPH radikal je stabilan zbog svoje delokalizacije elektrona preko cijele molekule. Dimerizira se kao ostali slobodni radikali. Zbog delokalizacije nastaje ljubičasta otopina s apsorpcijskim maksimumom na 520 nm u etanolu (Slika 7) [16].



Slika 7. Redukcija DPPH radikala u reakciji s antioksidansom [17].

Za određivanje antioksidativne aktivnosti koristi se i ABTS metoda (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sumporna kiselina). Kod navedene metode slobodni radikal se uklanja pomoću flavonoida i fenola. Kao radikal se koristi plavo-zeleno obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline odnosno ABTS radikal. Metoda se zasniva na reakciji kationskog radikala i antioksidansa. Za razliku od DPPH metode koja se koristi pri niskim pH vrijednostima, ABTS je osjetljivija metoda i može se primjenjivati pri različitim pH vrijednostima otopina [16].

2.5. ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode dijele se na potenciometriju, voltometriju, kulometriju i konduktometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju te kronopotenciometriju. Kod elektrokemijskih metoda odvija se pretvorba kemijskog signala (koncentracije, količine analita) u fizikalni signal (napon, struja) koji se potom pretvara u odgovarajući električni signal. Signal se zatim obrađuje pomoću računala. Metode su jednostavne jer je elektroda glavni detektor te nije potreban drugi detektor. Koriste se za detekciju tvari nakon odvajanja kromatografijom, kapilarnom elektroforezom i protočnom injekcijskom analizom. Prednost elektrokemijskih metoda je da zahtijevaju malu količinu uzorka. Elektrokemijske tehnike se odlikuju dobrom detekcijom, jednostavnošću i niskom cijenom [18].

Arts i Bergs određivali su elektrokemijsku oksidaciju benzojeve kiseline i njezinih aromatskih međuprodukata pomoću dijamantne elektrode. Korištene su puferske otopine, 0,4 M natrijevog sulfata i 0,1 M natrijevog fosfata. Dodan je natrijev hidroksid da se dobije konačni pH = 6. Početna koncentracija organskih tvari u otopini bila je 10 mM. Određeno je da je aromatski međuprodukt s najvećim prinosom *p*-hidroksibenzojeva kiselina, za koju se vjeruje da je prvi međuprodukt koji nastaje oksidacijom benzojeve kiseline [19].

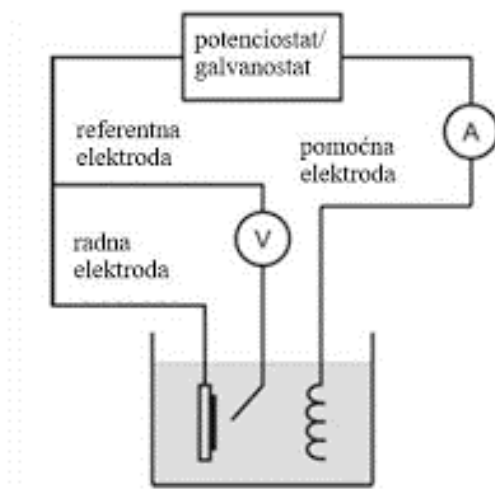
Ojani, Khanmohammadi i Raoof određivali su fotoelektrokatalitičku razgradnju *p*-hidroksibenzojeve kiseline na površini niza nanocijevi titan/titan dioksid elektrode pomoću elektrokemijskog praćenja. Elektroda s nizom nanocijevi od titana/titanovog dioksida (Ti/TiO₂) pripremljena je anodnom oksidacijom elektrode od Ti folije. Unutarnji promjer nanocijevi bio je 100 nm. Ti/TiO₂ elektroda proučavana je cikličkom voltametrijom. Fotoelektrokemijsko ponašanje *p*-hidroksibenzojeve kiseline na Ti/TiO₂ elektrodi određeno je pomoću hidrodinamičke fotoamperometrije. Zatim je došlo do fotoelektrokatalitičke (PEC) razgradnje *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Praćenje koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline određeno je diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Određen je utjecaj pH otopine te primijenjenog potencijala i proučavana je koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline na učinkovitost razgradnje te su rezultati pokazali da je optimalni pH za fotoelektrokatalitičku razgradnju pH = 7,00 [20].

2.6. VOLTAMETRIJA

Preteča današnjoj voltametrijbi bio je razvoj polarizacije koju je 1922. godine otkrio češki kemičar Jaroslav Heyrovski. Jaroslav Heyrovski dobio je 1959. Nobelovu nagradu iz područja kemije. Voltametrijba pripada elektroanalitičkim tehnikama u kojoj se podaci o analitu dobiju iz mjerenja jakosti struje tj. signala odziva koji je funkcija potencijala, odnosno signala pobude narinutog na elektrodu. Uvijek je izazivanje polarizacije elektrode. To jest, primijenjeni potencijal E (V) i vrijeme (t) su nezavisne varijable, a struja I (A) je zavisna varijabla. Voltametrijba se smatra aktivnom tehnikom, za razliku od potenciometrije koja pripada pasivnim tehnikama, jer primijenjeni potencijal potiče reakciju tvari na površini elektrode i uzrokuje promjenu njene koncentracije oksidirajući ili reducirajući uzorak koji se ispituje. Prikaz ovisnosti struje o potencijalu naziva se voltamogram. U početku su postojali analitički nedostaci ove metode koji su potom riješeni uporabom i dizajnom drugih mikroelektroda. One se razlikuju u materijalu, dizajnu i načinu na koji su u interakciji s otapalom; stacionarni ili rotacijski. Sve ove pojedinosti su namijenjene da pospješuju polarizaciju elektrode [21,22].

Voltametrijska ćelija sastoji se od tri elektrode (Slika 8). Elektrode su uronjene u otopinu analita uz dodatak elektrolita. Troelektrodnju voltametrijsku ćeliju čine radna elektroda, referentna elektroda i protuelektroda [1,23].

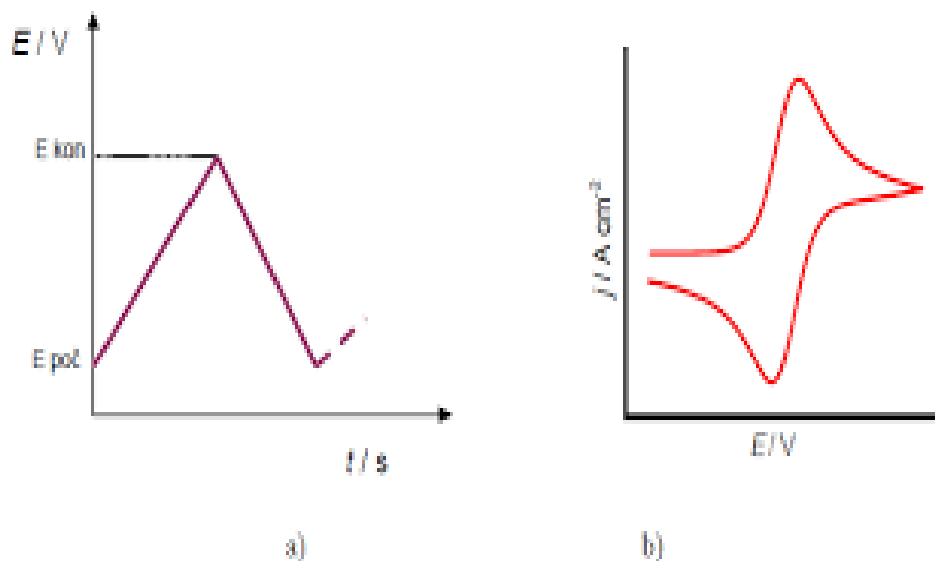
- **Radna elektroda**, elektroda na kojoj se odvija elektrokemijska reakcija. Potencijal joj se mijenja u odnosu na vrijeme. Radne elektrode mogu biti zlatna (Au), platinska (Pt), elektroda od staklastog ugljika (GC) i sl.
- **Referentna elektroda** ima stalan nepromjenjivi potencijal. Kao referentne elektrode uglavnom se koriste kalomelova elektroda ili Ag/AgCl elektroda.
- **Pomoćna elektroda** naziva se još i protuelektroda. Omogućava prolazak struje kroz otopinu, odnosno vodi elektrone od izvora signala do radne elektrode. Kao protuelektroda najjčešće se koristi Pt žica.



Slika 8. Troelektrodni voltametrijski sustav [24].

2.6.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltametrija (CV) je elektroanalitička tehnika koja ima široku primjenu. Jedna je od kompleksnijih elektrokemijskih tehnika koja daje puno eksperimentalnih podataka te omogućava uvid u kinetiku kemijskog sustava. Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti te se zapisuje trenutni intenzitet struje. Signal pobude kod cikličke voltametrije je promjenjiv. Najprije linearno raste od početne do konačne vrijednosti kroz određeno vrijeme gdje se odvija oksidacija. Zatim pada od konačne do početne vrijednosti. To je područje na kojem se odvija redukcija (Slika 9.a). Signal odziva kod cikličke voltametrije prikazuje specifični anodni i katodni strujni vrh (Slika 9.b). Signal odziva ovisi o potencijalu pri kojem se odvija promjena smjera. Kod cikličke voltametrije potencijal se nameće između radne i referentne elektrode, dok se mjeri struja koja teče između radne elektrode i protuelektrode [23,25,26].



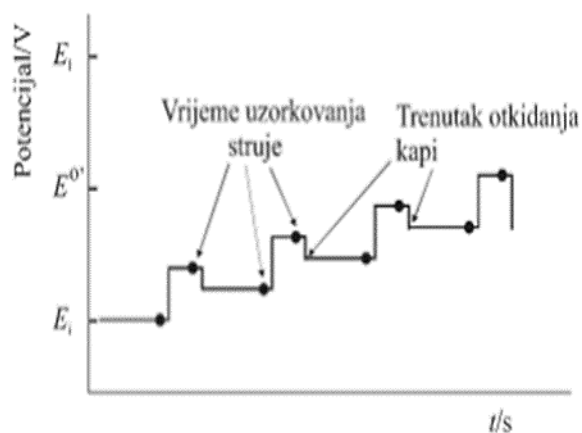
Slika 9.a) signal pobude, **9.b)** signal odziva [25].

Visina anodnog i katodnog strujnog vrha ovisi o površini radne elektrode (A), broju elektrona koji će se izmjeniti (n), koncentracijama oksidiranog i reduciranog oblika u otopini i o koncentracijskom gradijentu uz površinu elektrode. Brzina promjene potencijala može biti brža i sporija. Zbog promjenjive brzine mogu se ispitivati elektrodne reakcije širokog područja [27].

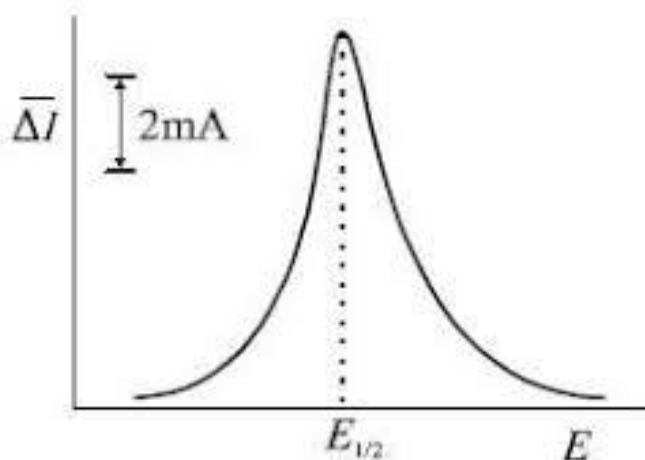
2.6.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) je voltametrijska metoda u kojoj se mali pravokutni naponski impuls koji ima amplitudu od 10 - 100 mV dodaje rastućem naponu pobude. DPV se ubraja u pulsne tehnike u kojima se određuju niske koncentracije elektroaktivnih tvari u uzorcima. Struja se mjeri i uzrokuje prije svakog naponskog impulsa i na kraju svakog naponskog impulsa. Takva struja registrira se kao konstantna vrijednost do sljedećeg naponskog impulsa. Ima oblik stepenica što se vidi na slici 10. Signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije je promjena struje prije i po završetku naponskog impulsa koji ovisi o potencijalu elektrode ($I = I_2 - I_1$). Ima oblik pika (Slika 11). Naponskim impulsom

izaziva se elektrodna reakcija oksidacije odnosno redukcije. Signal odziva predstavlja razliku u jakosti struje, dok signal odziva prikazuje niz kratkih pulseva [23,28,29].



Slika 10. Signal pobude kod diferencijalne pulsne voltametrije [28].



Slika 11. Signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije [28].

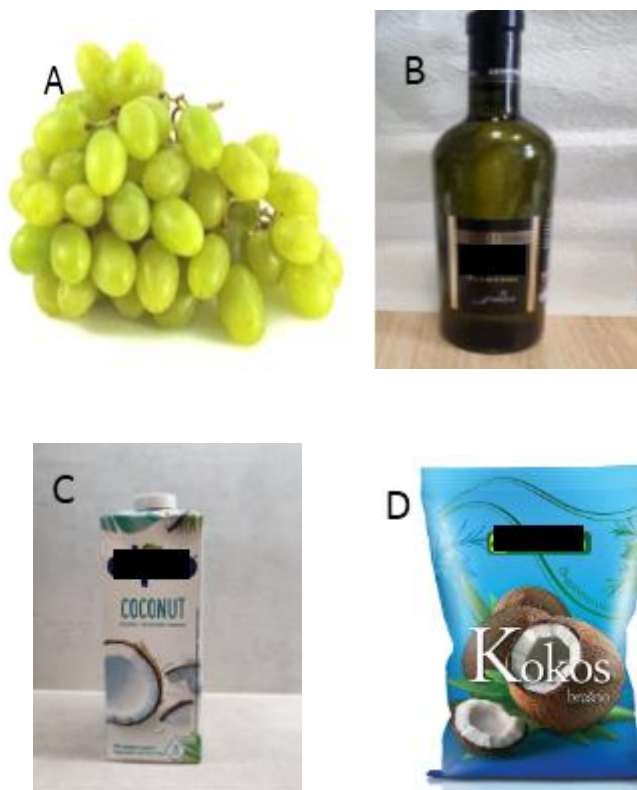
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIČALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

Prilikom izrade ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- *p*-hidroksibenzojeva kiselina, $C_7H_6O_3$
- 0,1 M HCl
- 0,1 M NaOH
- Natrijev dihidrogen fosfat, NaH_2PO_4
- Etanol, C_2H_6O
- Metanol, CH_3OH
- DMF, $(CH_3)_2NC(O)H$
- DMSO, $(CH_3)_2SO$
- Octena kiselina, CH_3COOH
- Realni uzorci: grožđe, bijelo vino, kokosovo mlijeko, suhi kokos
- Destilirana i ultračista voda

Prema literaturnim podacima (Handbook of chemistry and physics, Lide D.R.) pripremljene su otopine pufera u rasponu $pH = 3,0-9,5$. pH priređenih otopina pufera određen je pomoću pH -metra. Standardna otopina *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljena je otapanjem 0,034529 g *p*-hidroksibenzojeve kiseline u 25 mL vode iz MiliQ Millipore sustava ($\kappa \leq 0,055 \text{ } \mu\text{S/cm}$). Ostale otopine različitih koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline pripremljene su razrjeđivanjem standardne otopine do željene koncentracije. Koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline određena je u četiri realna uzorka: grožđu, bijelom vinu, suhom kokosu i kokosovom mlijeku (Slika 12). Od realnih uzoraka kokosovo mlijeko i bijelo vino analizirani su u obliku u kojem su nabavljeni. Suhi kokos i grožđe su razrijeđeni u destiliranoj vodi, otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta i profiltrirana prije analize.



Slika 12. Realni uzorci analizirani u ovom radu: A) grožđe, B) bijelo vino, C) kokosovo mlijeko, D) suhi kokos.

3.2. METODE

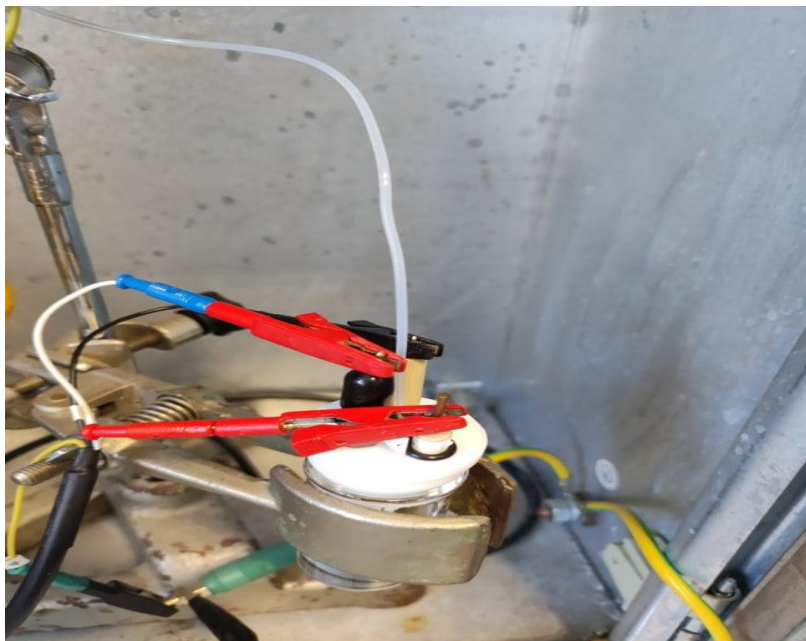
3.2.1. CIKLIČKA I DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Prilikom izvođenja rada koristile su se dvije voltametrijske metode. Ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija odrađene su pomoću PalmSens potencioštata/galvanostata koji je direktno spojen na računalo (Slika 13). Eksperimenti su izvedeni u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji (Slika 14 i Slika 15). Cikličkom voltametrijom određena su elektrokemijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline, brzina polarizacije elektrode koja je bila u granicama od 25 mV/s do 300 mV/s te se proučavao mehanizam oksidacije

p--hidroksibenzojeve kiseline. Pomoću diferencijalne pulsne voltametrije praćeni su oksidacija i adsorpcija *p*-hidroksibenzojeve kiseline te utjecaj pH na visinu oksidacijskog strujnog vrha u rasponu od pH = 3,0 do 9,5. Također je određena *p*-hidroksibenzojeva kiselina u realnim uzorcima (grožđu, bijelom vinu, kokosovom mlijeku i suhom kokosu). Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni su u otopinama *p*-hidroksibenzojeve kiseline u granicama potencijala od – 0,4 V do 1,2 V, brzina polarizacije elektrode je iznosila 5 mVs⁻¹, visina pulsa 25 mV, širina pulsa 70 ms i „scan increment“ 5mV. Ukupan volumen otopine u voltametrijskoj ćeliji iznosio je 15 mL. Standardne otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm⁻³) priređivana je svaki dan. Otopine ostalih koncentracija priređene su razrjeđivanjem standardne otopine. Prije svakog mjerenja sustav je propuhan argonom visoke čistoće Ar 5 ($\Phi_{Ar} = 99,999\%$) kako bi se uklonio kisik i ostali plinovi. Za mjerenja su korištene tri elektrode. Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika ili eng. “*glassy carbon elektroda*” (GC). Ag/AgCl elektroda korištena je kao referentna elektroda i platinska žica kao protuelektroda. Za poliranje površine radne elektrode korišten je α -Al₂O₃.



Slika 13. PalmSens potencijostat/galvanostat.



Slika 14. Voltametrijska ćelija.

3.2.2. ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA

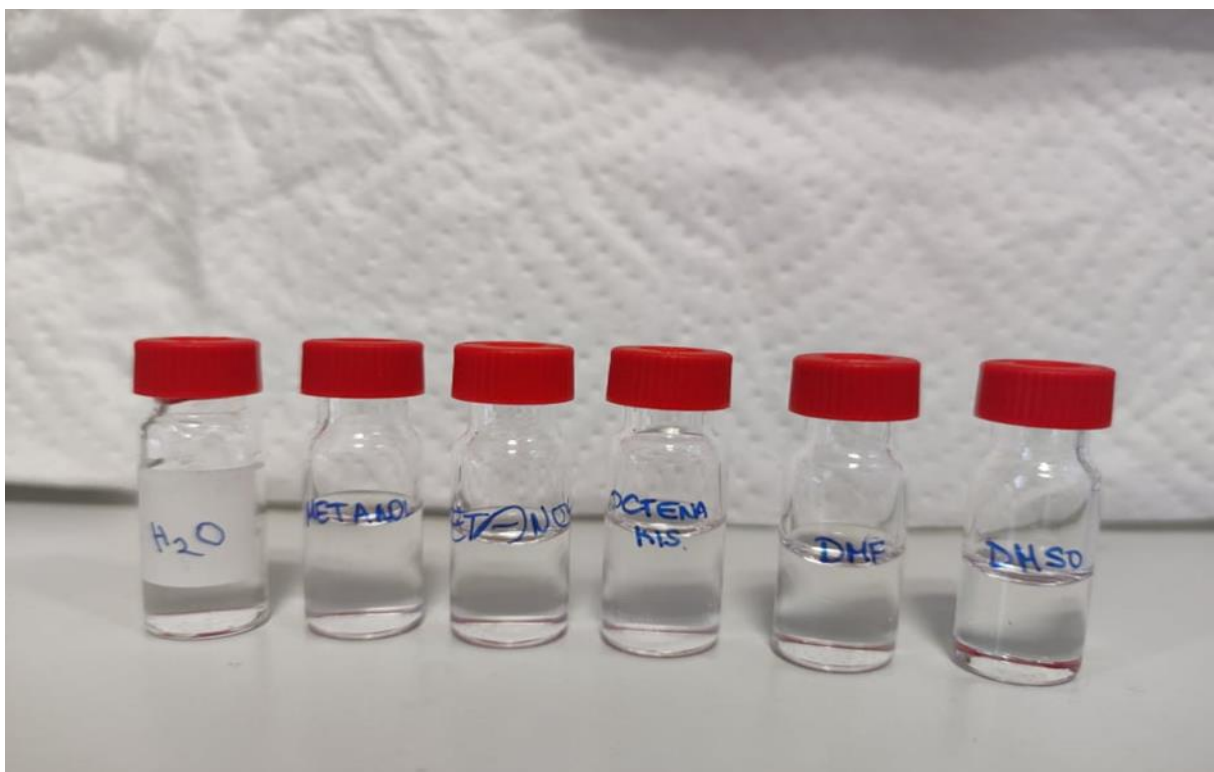
- **Radna elektroda** je elektroda na kojoj se odvija redoks reakcija. Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (GC).
- **Referentna elektroda** je elektroda pomoću koje se određuje pobudni ili odzivni signal. Kao referentna elektroda korištena je Ag/AgCl elektroda.
- **Protuelektroda** je inertna elektroda, velike površine. Koristi se za prolaz električne struje ćelijom i zatvara strujni krug sa radnom elektrodom. Kao protuelektroda korištena je platinska žica.



Slika 15. Prikaz elektroda u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji. Radna elektroda – GC elektroda, referentna elektroda – Ag/AgCl, protuelektroda – platinska žica.

3.2.3. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI

Topljivost *p*-hidroksibenzojeve kiseline ispitana je u sljedećim otapalima: voda, etanol, metanol, octena kiselina, dimetilformamid (DMF) i dimetilsulfoksid (DMSO). Ispitivana kiselina se otopila u svim otapalima (Slika 16).



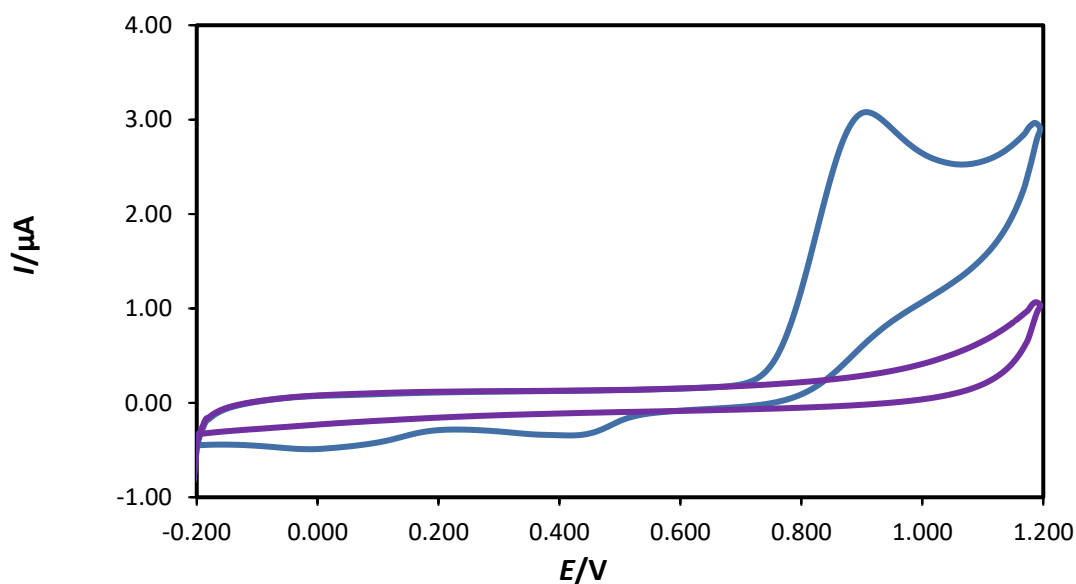
Slika 16. Ispitivanje topljivosti *p*-hidroksibenzojeve kiseline u vodi, metanolu, etanolu, octenoj kiselini, dimetilformamidu (DMF) i dimetilsulfoksidu (DMSO).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

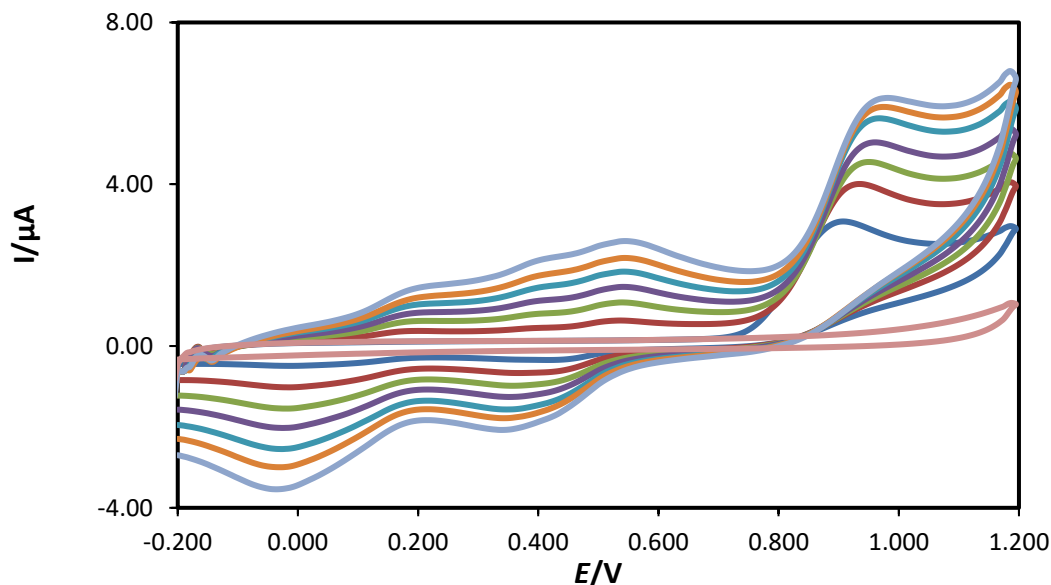
Utjecaj brzine promjene potencijala GC elektrode

Elektrokemijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline ispitivana su cikličkom voltametrijom u granicama potencijala od -0,4 V do 1,2 V. Na slici 17. prikazani su ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6,0) i otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika pri brzini polarizacije elektrode, $\nu = 50 \text{ mV/s}$. U cikličkom voltamogramu vidljiv je jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu, $E_{\text{Pa}} = 0,195 \text{ V}$ koji odgovara oksidaciji hidroksilne skupine *p*-hidroksibenzojeve kiseline i jedan redukcijski strujni vrh pri potencijalu, $E_{\text{Pk}} = 0,440 \text{ V}$ koji odgovara redukciji oksidacijskog produkta.



Slika 17. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH=6) (—) i otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline (—) ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$), $\nu = 50 \text{ mV/s}$.

Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) i otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50, 100, 150, 200, 250$ i 300 mV/s) prikazani su na slici 18. Utvrđeno je da struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije GC elektrode.



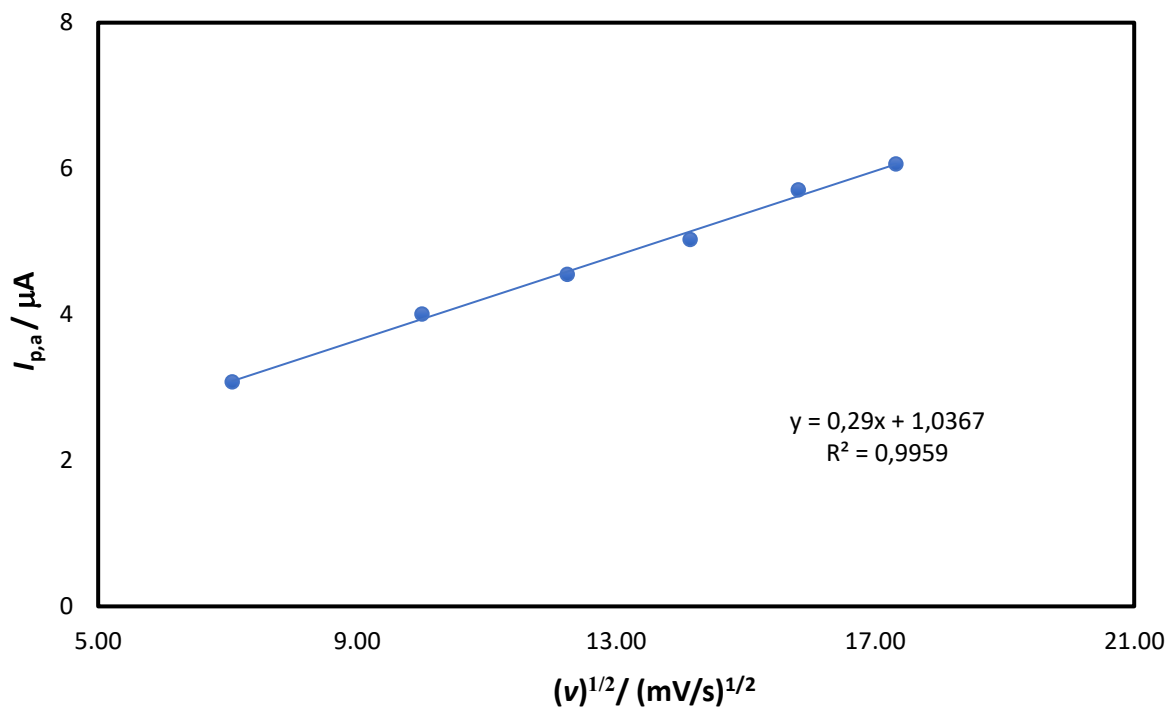
Slika 18. Ciklički voltamogram blank otopine (pufer pH=6) (—) i otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50 \text{ mV/s}$ (—), 100 mV/s (—), 150 mV/s (—), 200 mV/s (—), 250 mV/s (—), 300 mV/s (—) i 350 mV/s (—)).

U tablici 1 prikazani su struja ($I_{p,a}$) i potencijal ($E_{p,a}$) oksidacijskog strujnog vrha *p*-hidroksibenzojeve kiseline kao funkcije brzine polarizacije GC elektrode. Iz tablice je vidljivo da s porastom brzine polarizacije rastu i struja i potencijal oksidacijskog strujnog vrha ispitivane kiseline.

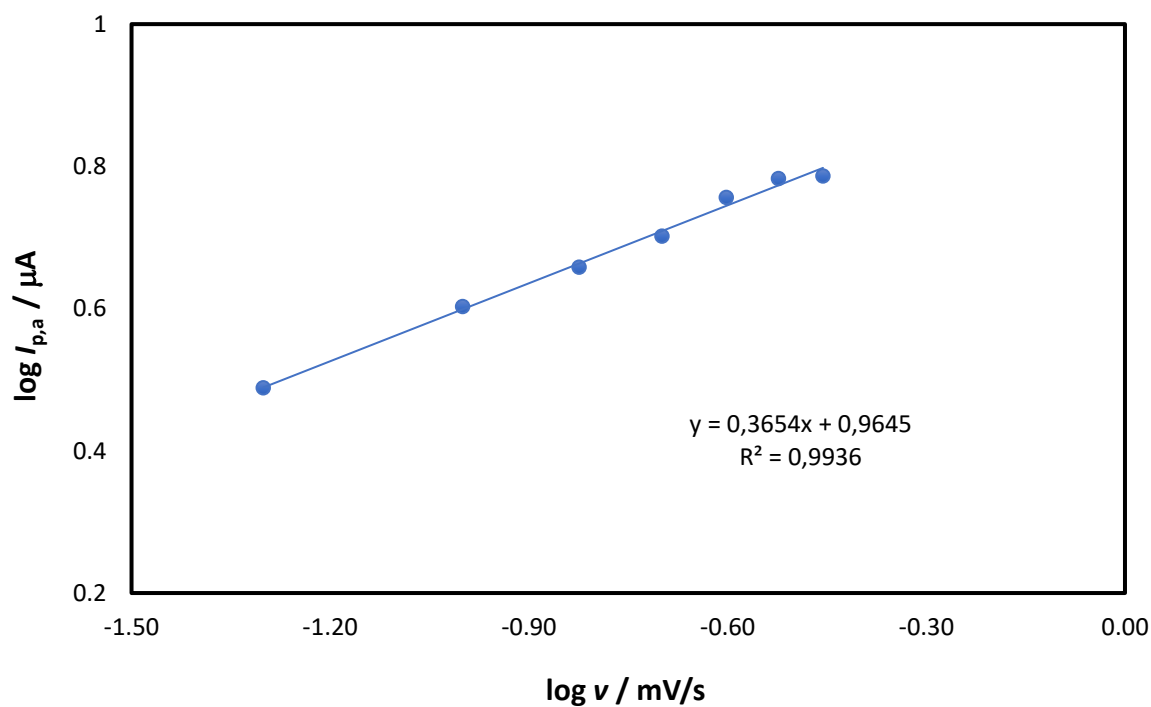
Tablica 1. Prikaz ovisnosti struje ($I_{p,a}$) i potencijala ($E_{p,a}$) oksidacijskog strujnog vrha kao funkcije brzine polarizacije elektrode.

$v / \text{mV/s}$	$E_{p,a} / \text{V}$	$I_{p,a} / \mu\text{A}$
50	0,905	3,08
100	0,935	4,01
150	0,915	4,55
200	0,955	5,03
250	0,935	5,71
300	0,960	6,06
350	0,970	6,12

Ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o drugom korjenu brzine polarizacije elektrode je linearna (Slika 19) što ukazuje na difuzijski kontroliran proces. Grafički prikaz $\log I_{p,a}$ u ovisnosti o $\log v$ (Slika 20) daje pravac, $\log I_{p,a} / \mu\text{A} = 0,3654 \log v / \text{mV s}^{-1} + 0,9645$, $R^2 = 0,9936$. Nagib dobivenog pravca iznosi 0,37; što potvrđuje da je oksidacija *p*-hidroksibenzojeve kiseline difuzijski kontroliran proces.



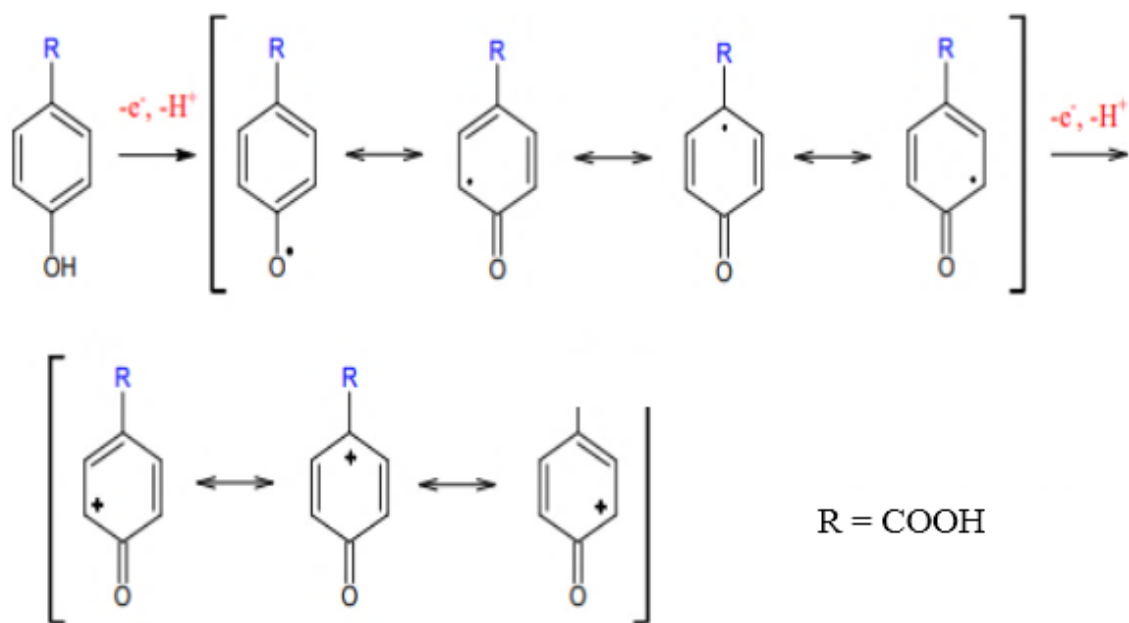
Slika 19. Prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o drugom korjenu polarizacije elektrode ($v^{1/2}$).



Slika 20. Grafički prikaz $\log I_{p,a}$ u ovisnosti o $\log v$ za difuzijski kontroliran proces.

Oksidacijski mehanizam *p*-hidroksibenzojeve kiseline

Na slici 21. je prikazan oksidacijski mehanizam *p*-hidroksibenzojeve kiseline koji se odvija u dva koraka. U prvom koraku nastaje fenoksi radikal, a nastaje prijelazom jednog elektrona i jednog protona s neutralne molekule. U drugom koraku dolazi do odlaska još jednog protona i elektrona te nastaje fenoksonijev ion.

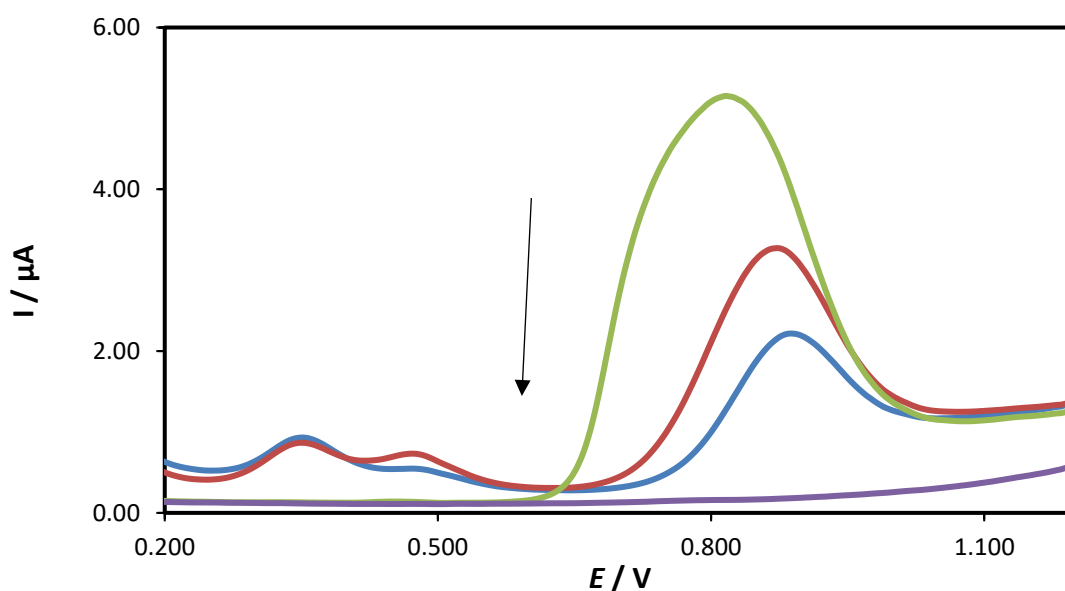


Slika 21. Oksidacijski mehanizam *p*-hidroksibenzojeve kiseline [2].

4.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Adsorpcija p -hidroksibenzojeve kiseline na GC elektrodu

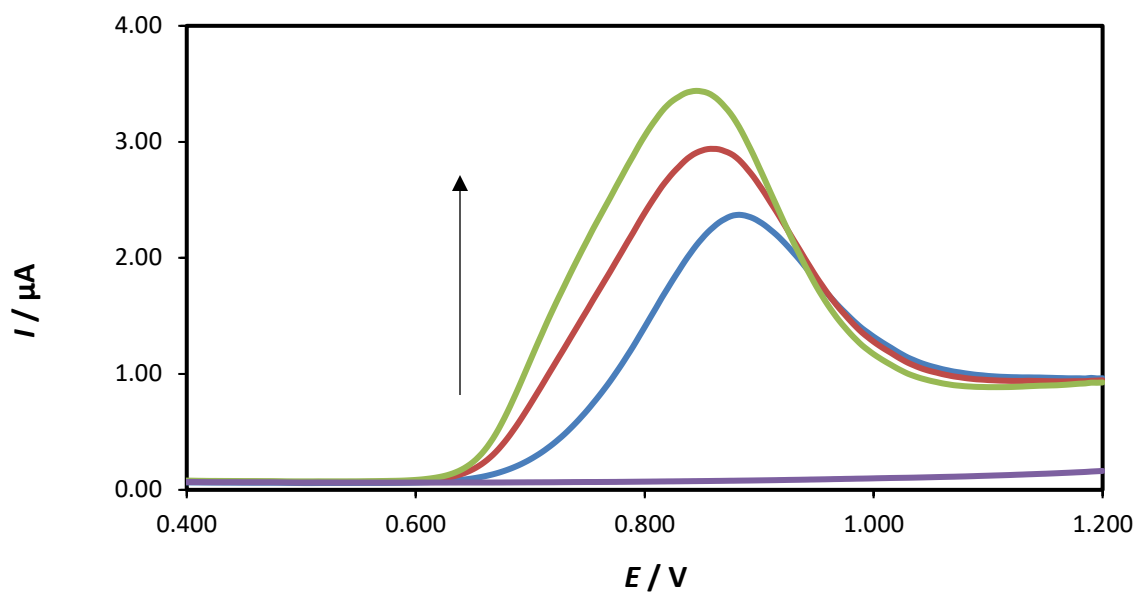
Diferencijalnom pulsnom voltametrijom praćena je moguća adsorpcija p -hidroksibenzojeve kiseline na elektrodu od staklastog ugljika (GC). Utvrđeno je da uzastopnim snimanjem opada visina anodnog strujnog vrha te se može zaključiti da se produkt oksidacije p -hidroksibenzojeve kiseline adsorbira na površinu GC elektrode (Slika 22).



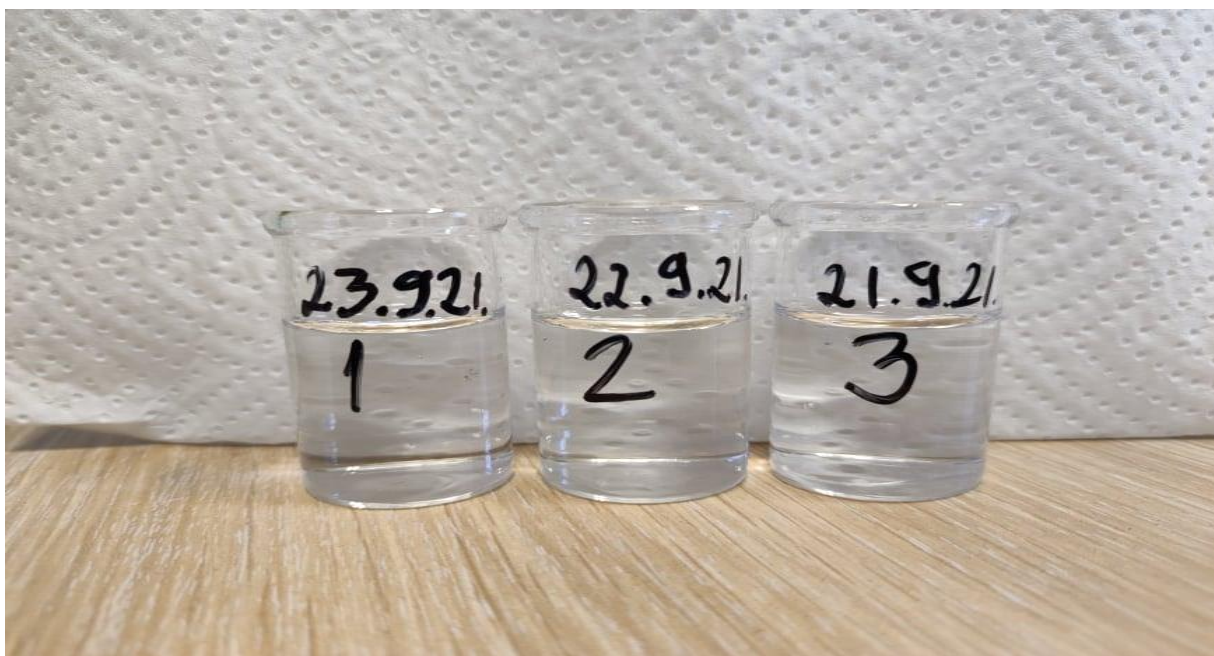
Slika 22. Diferencijalni pulsni voltagrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i uzastopno snimljene otopine p -hidroksibenzojeve kiseline (1. scan (—), 2. scan (—), 3. scan (—)) na GC elektrodi u puferu pH = 6.

Utjecaj vremena stajanja na stabilnost otopine

Dužim stajanjem otopine p -hidroksibenzojeve kiseline povećava se struja oksidacijskog strujnog vrha. Povećanje struje oksidacijskog strujnog vrha ukazuje na povećanje udjela disociranog oblika p -hidroksibenzojeve kiseline (Slika 23). Otopine stajanjem nisu promijenile boju što je vidljivo na slici 24.



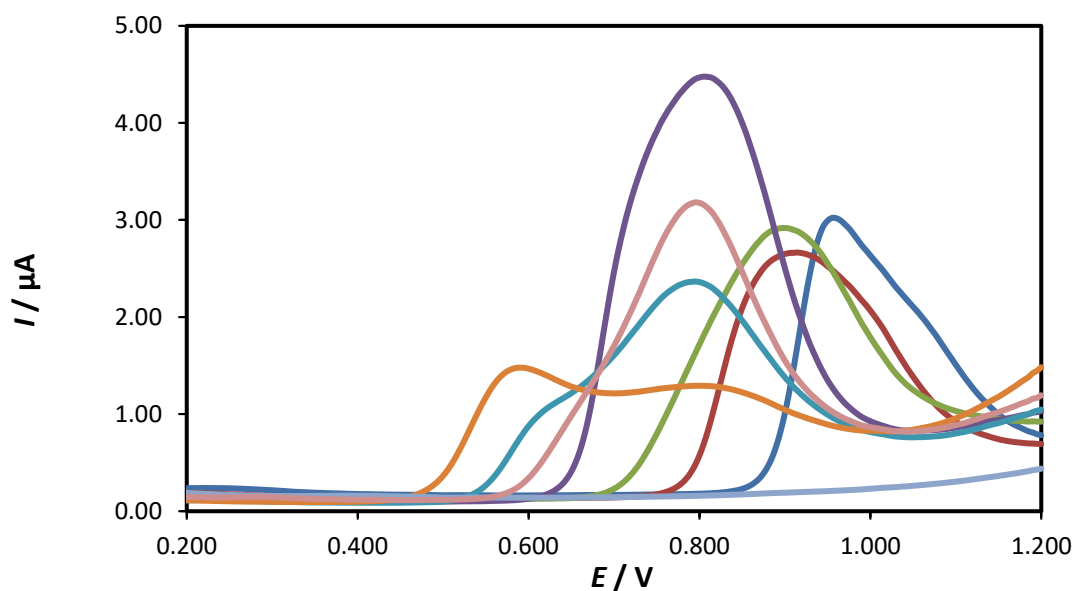
Slika 23. Diferencijalni pulsni voltamogram utjecaja vremena *p*-hidroksibenzojeve kiseline na GC elektrodu. Blank otopine (pufer pH=6) (—) i otopina *p*-hidroksibenzojeve kiseline različite starosti (svježa 4-H (—), 1 dan stara 4-H (—), 2 dana stara 4-H (—)).



Slika 24. Otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline različite starosti (1 dan, 2 dana i 3 dana).

Utjecaj pH ispitivan na GC elektrodi

Slika 25 prikazuje diferencijalne pulsne voltamograme *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) snimljene na GC elektrodi kao funkcije pH u rasponu pH=3,0 - 9,5. Iz slike je vidljivo da se potencijali oksidacijskog strujnog vrha pomiču prema negativnijim vrijednostima s povećanjem pH. Struja oksidacijskog strujnog vrha *p*-hidroksibenzojeve kiseline je najviša pri pH = 6 i smanjuje se u kiselijem i lužnatijem mediju.



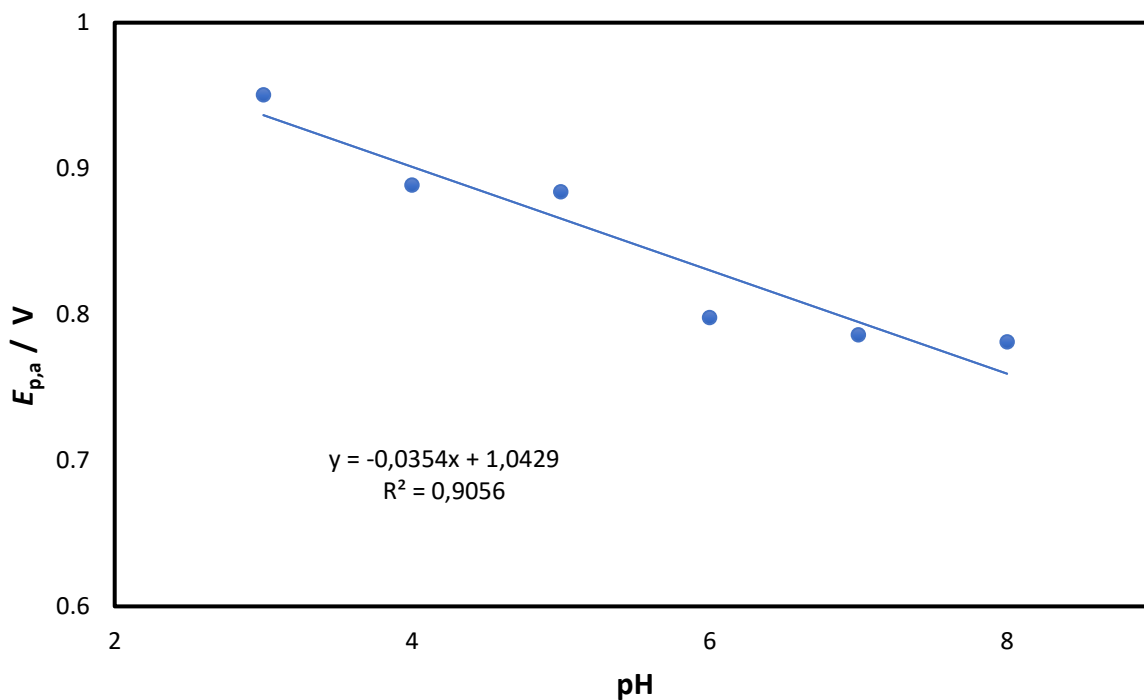
Slika 25. Diferencijalni pulsni voltamogrami za blank otopinu (pufer pH = 6 (—)) i *p*-hidroksibenzojevu kiselinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) snimljeni na GC elektrodi kao funkcije pH (pufer pH = 3,0) (—), (pufer pH = 4,0)(—), (pufer pH = 5,0)(—), (pufer pH = 6,0)(—), (pufer pH = 7,0)(—), (pufer pH = 8,0)(—), (pufer pH = 9,5)(—).

Potencijal ($E_{p,a}$) i struja ($I_{p,a}$) oksidacijskog strujnog vrha *p*-hidroksibenzojeve kiseline očitani iz slike 25 prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz vrijednosti potencijala ($E_{p,a}$) i struje ($I_{p,a}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) kao funkcije pH otopina *p*-hidroksibenzojeve kiseline.

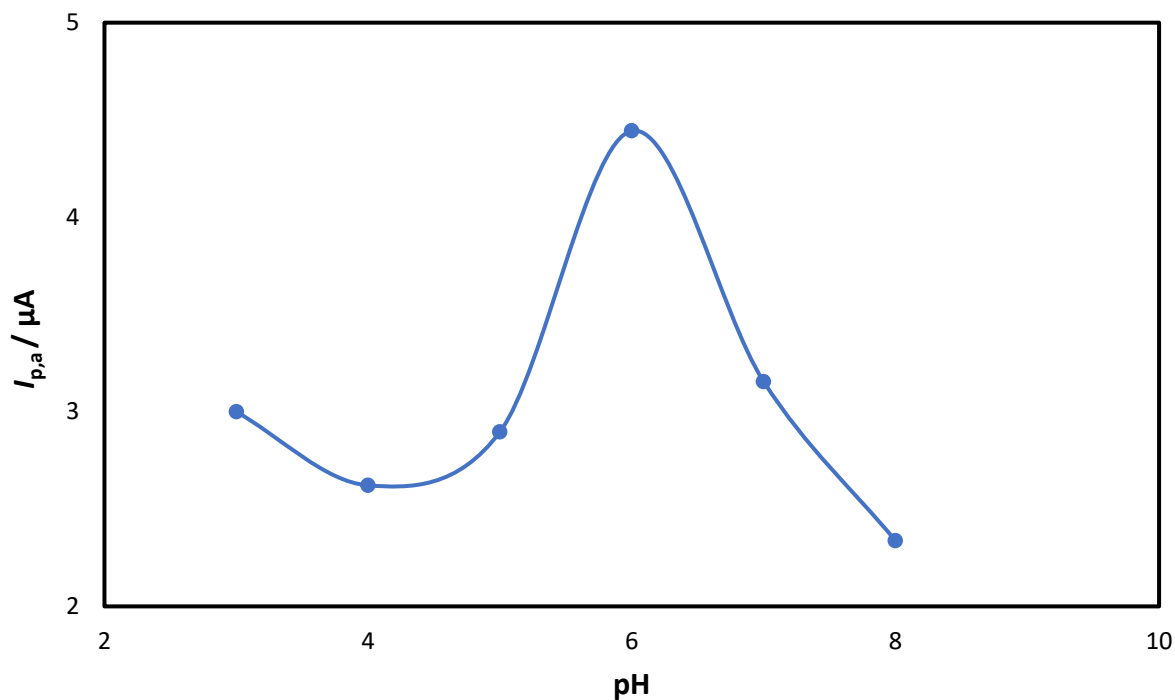
pH	$E_{p,a} / \text{V}$	$I_{p,a} / \mu\text{A}$
3,0	0,951	3,00
4,0	0,889	2,62
5,0	0,884	2,90
6,0	0,798	4,44
7,0	0,786	3,16
8,0	0,781	2,34
9,5	0,579	1,45

Slika 26 prikazuje ovisnost potencijala ($E_{p,a}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha *p*-hidroksibenzojeve kiseline o pH. Vidi se da potencijal anodnog strujnog vrha linearno ovisi o pH u ispitivanom pH području (od pH = 3,0 do pH = 9,5). Dobiveni pravac pada (ima negativan koeficijent smjera), a nagib pravca iznosi 35,4 mV što je pokazuje da se u oksidacijskom mehanizmu izmjenjuje jednak broja protona i elektrona.



Slika 26. Prikaz ovisnosti oksidacijskog potencijala, $E_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$).

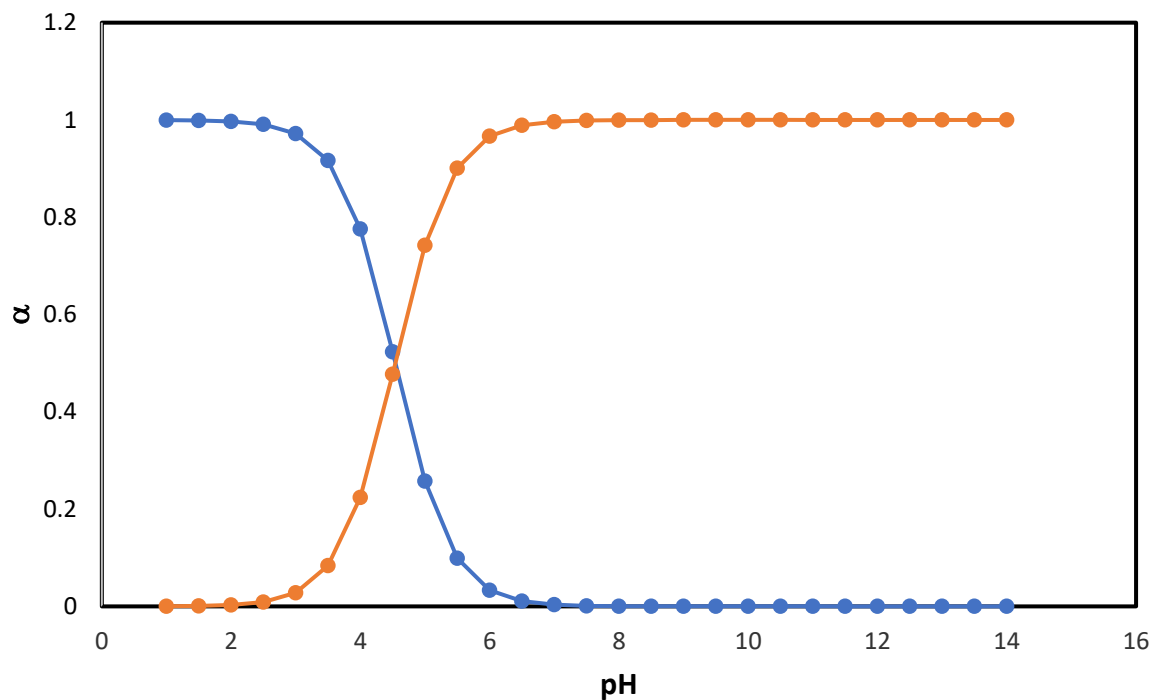
Na slici 27 prikazana je ovisnosti struje anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o pH vrijednostima ispitivanih otopina *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$). Iz slike 27 je vidljivo da visina anodnog strujnog vrha raste do pH = 6,0. Daljnjim povećanjem pH vrijednosti visina anodnog strujnog vrha pada. To ukazuje da je proces oksidacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline najizraženiji pri pH = 6,0.



Slika 27. Prikaz ovisnosti struje anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o pH vrijednosti otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$).

Specijacija p-hidroksibenzojeve kiseline

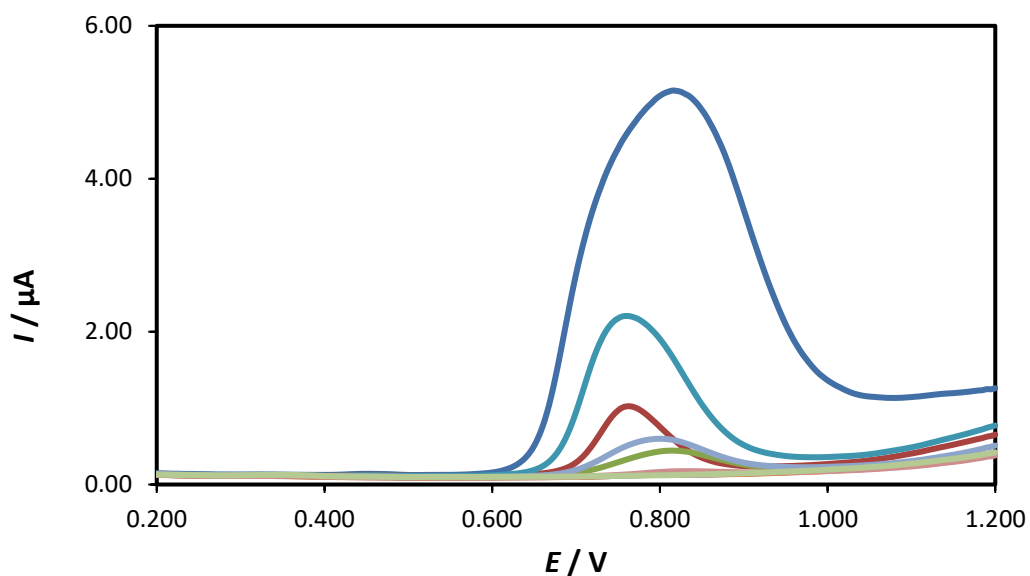
Na slici 28 prikazan je dijagram disocijacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Iz dijagrama je vidljivo je da *p*-hidroksibenzojeva kiselina spontano deprotonira pri $\text{pH} = 3$, što dokazuje da u oksidaciji *p*-hidroksibenzojeve kiseline i u adsorpcijskim procesima do $\text{pH} = 3$ sudjeluje nedisocirani oblik HA. Pri višim pH vrijednostima, daljnjom spontanom deprotonacijom nastaje disocirani oblici *p*-hidroksibenzojeve kiseline A^- .



Slika 28. Dijagram disocijacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Nedisocirani oblik HA (—), deprotonirani oblik A⁻ (—).

Utjecaj koncentracije

Diferencijalni pulsni voltamogrami različitih koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline snimljeni na elektrodi staklastog ugljika u puferu pH = 6 prikazani su na slici 29. Iz slike je vidljivo da s povećanjem koncentracije raste i struja oksidacijskog strujnog vrha. Eksperimentalno određena najniža koncentracija koja se može detektirati eng. “*Limit of Detection*” (LOD) iznosi $1 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³.



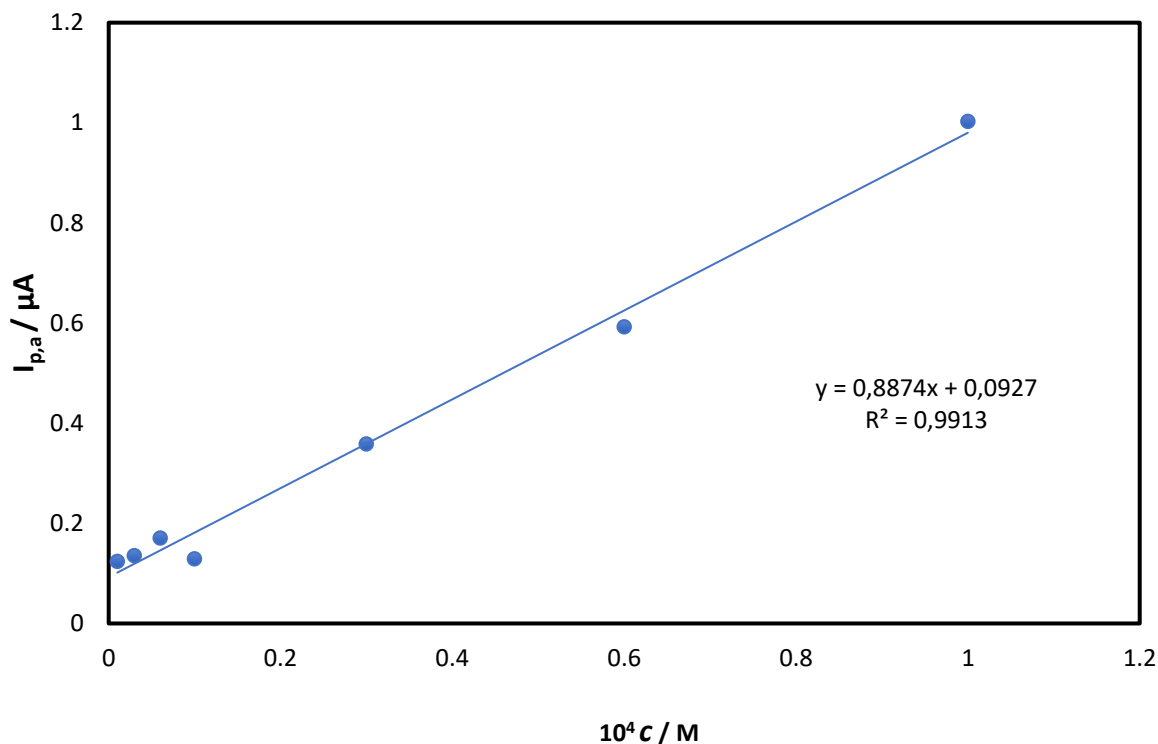
Slika 29. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH = 6) (—) i *p*-hidroksibenzojeve kiseline različitih koncentracija ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ M (—), $6 \cdot 10^{-6}$ M (—), $1 \cdot 10^{-5}$ M (—), $6 \cdot 10^{-5}$ M (—), $1 \cdot 10^{-4}$ M (—), $3 \cdot 10^{-4}$ M (—), $1 \cdot 10^{-3}$ M (—)) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 6.

U tablici 3 prikazane su struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) *p*-hidroksibenzojeve kiseline kao funkcija koncentracije.

Tablica 3. Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije različitih koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline snimljene na GC elektrodi u puferu pH=6.

$10^4 c / M$	$I_{p,a} / \mu A$
10,0	5,08
3,0	2,19
1,0	1,00
0,6	0,59
0,3	0,36
0,1	0,13
0,06	0,17
0,03	0,14
0,01	0,12

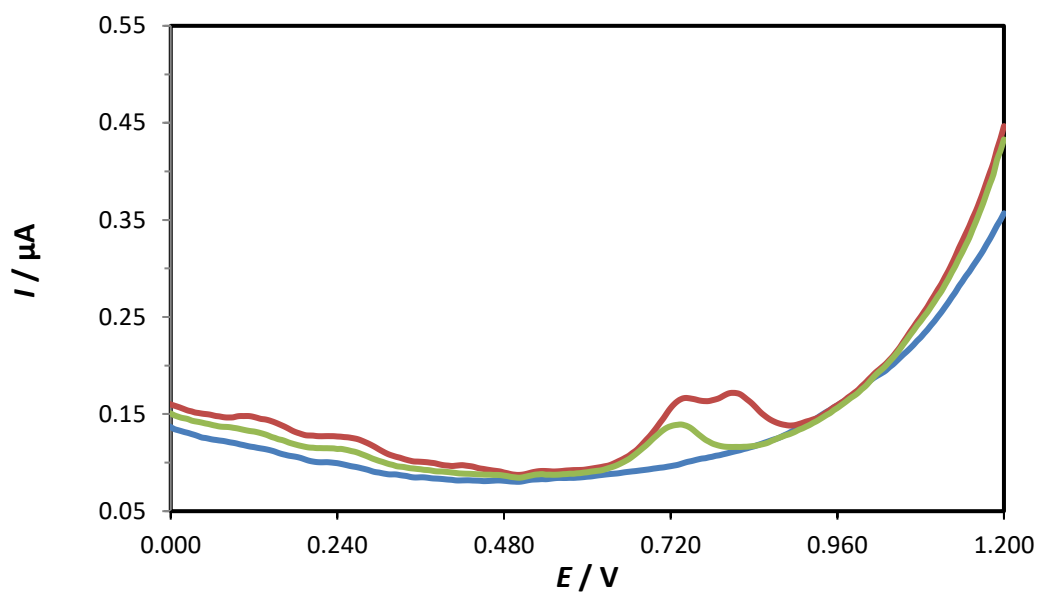
Na slici 30 prikazana je ovisnost struje anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o koncentraciji *p*-hidroksibenzojeve kiseline, određena u puferu pri pH = 6 (kalibracijski dijagram, $R^2 = 0,9913$). Linearna ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o koncentraciji dobivena je u koncentracijskom poručju o 1 μM do 100 μM .



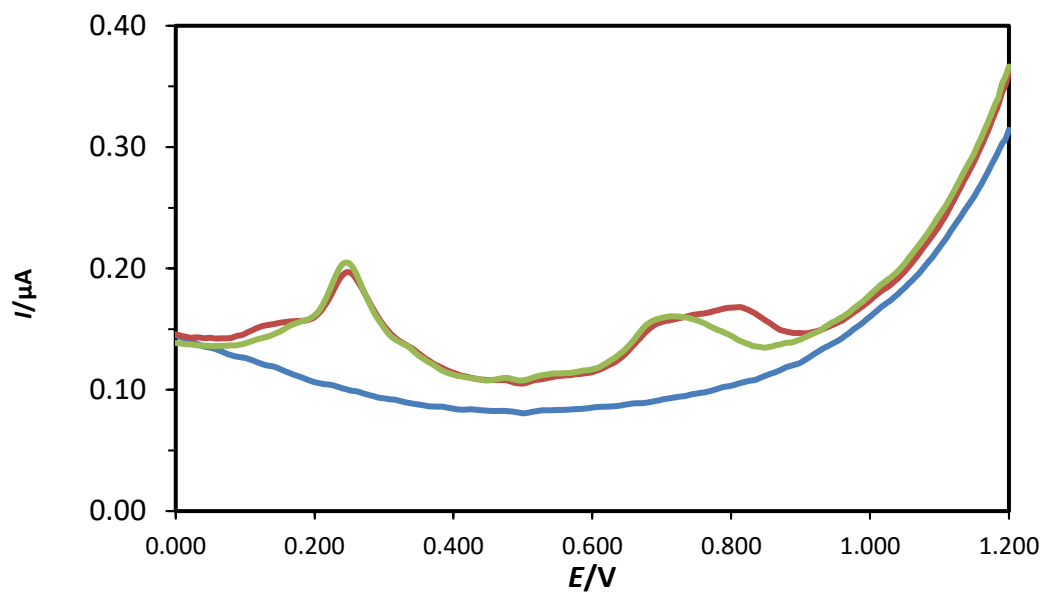
Slika 30. Kalibracijski dijagram *p*-hidroksibenzojeve kiseline.

Detekcija p-hidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima

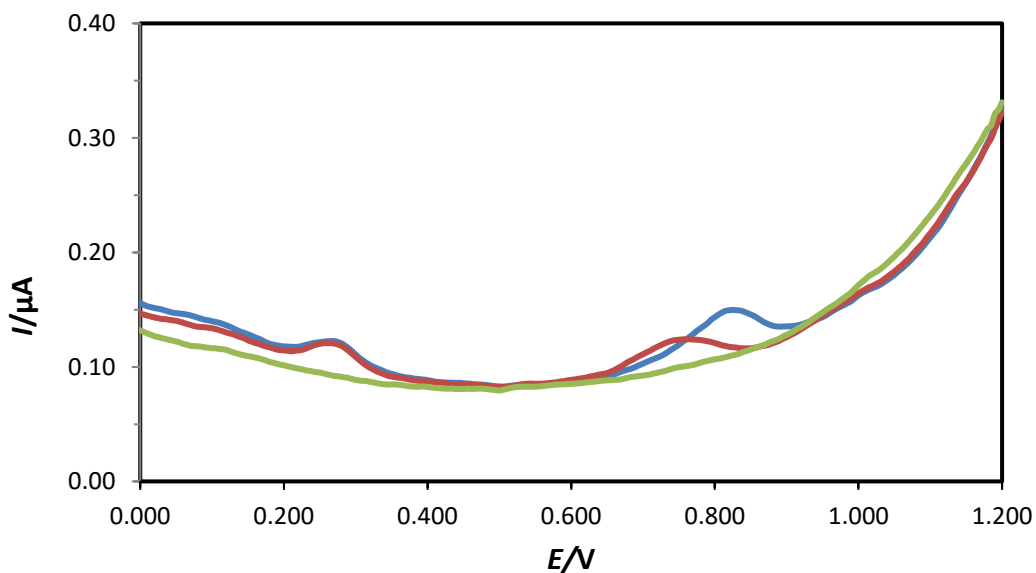
Na slikama 31 - 34 se mogu vidjeti diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u četiri različita realna uzorka na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 6,0. Na diferencijalnim pulsним voltamogramima ispitivanih uzoraka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh koji odgovara oksidaciji *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Na svim voltamogramima može se vidjeti oksidacijski strujni vrh *p*-hidroksibenzojeve kiseline nakon dodatka 300 μL ispitivanog uzorka u puffer pH = 6,0. Oksidacijski strujni vrh kod grožđa je na elektrodnom potencijalu $E_{p,a} = 0,74$ V, kod bijelog vina na $E_{p,a} = 0,71$ V. Kokos je pokazao oksidacijski strujni vrh na elektrodnom potencijalu $E_{p,a} = 0,73$ V, a kokosovo mlijeko na potencijalu $E_{p,a} = 0,76$ V. Dodatkom 10 μL *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³) u realni uzorak utvrđeno je da se navedena kiselina može detektirati u svim ispitivanim uzorcima. Najveća koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline detektirana je u bijelom vinu ($c = 7,6$ μM), zatim slijede bijelo grožđe i suhi kokos dok je u kokosovo mlijeko tek u tragovima detektirana *p*-hidroksibenzojeva kiselina ($c = 1,4$ μM).



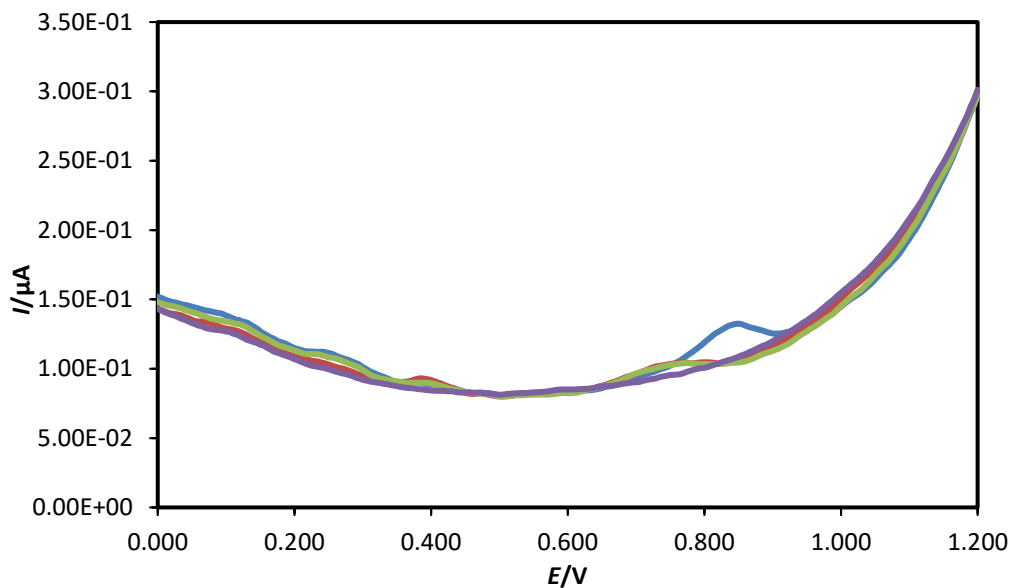
Slika 31. Diferencijalni pulsni voltamogrami 15mL blank otopine (pufer pH=6) (—), 300 μL uzorka (bijelo grožđe) (—), otopina uzorka u puferu pH =6,0 s dodanih 10 μL otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—).



Slika 32. Diferencijalni pulsni voltamogrami 15mL blank otopine (pufer pH=6) (—), 300 μL uzorka (bijelo vino) (—), otopina uzorka u puferu pH =6,0 s dodanih 10 μL otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—).

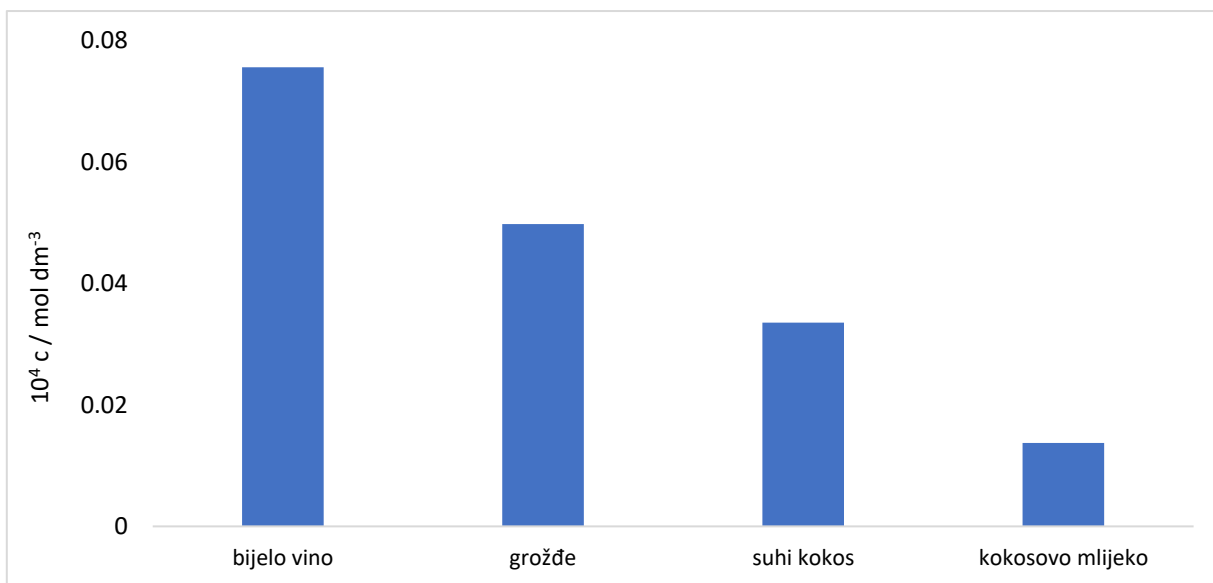


Slika 33. Diferencijalni pulsni voltamogrami 15mL blank otopine (pufer pH=6) (—), 300 mL uzorka (suhi kokos) (—), otopina uzorka u puferu pH =6,0 s dodanih 10 μ L otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³) (—).



Slika 34. Diferencijalni pulsni voltamogrami 15mL blank otopine (pufer pH=6) (—), 300 μ L uzorka (kokosovo mlijeko) (—), otopina uzorka u puferu pH =6,0 s dodanih 10 μ L otopine *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³) (—).

Na slici 35 prikazane su koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline u ispitivanim realnim uzorcima određene diferencijalnom pulsnom voltametrijom a dobiveni podaci prikazani su i u tablici 4.



Slika 35. Grafički prikaz koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline u različitim realnim uzorcima.

Tablica 4. Koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline u realnim uzorcima.

Uzorak	$10^4 c / \text{M}$	$V (\text{uzorka}) / \mu\text{L}$
grožđe	0,049	300
bijelo vino	0,076	300
kokosovo mlijeko	0,014	300
suhi kokos	0,034	300

5. ZAKLJUČAK

Tijekom ovog diplomskog rada ispitivana su elektrokemijska svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline u pH području od 3,0 do 9,5 na elektrodi od staklastog ugljika. Korištene su dvije voltametrijske metode, ciklička voltametrija i diferencijalna pulсна voltametrija.

Cikličkom voltametrijom ispitivan je utjecaj brzine polarizacije na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha. Određen je jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh te je utvrđeno da struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Ovisnost struje o brzini polarizacije elektrode je linearna te se radi o difuzijski kontroliranom procesu u kojem nagib pravca $\log I_{p,a}$ vs $\log v$ iznosi 0,37.

Diferencijalnom pulsnom voltametrijom praćena je adsorpcija *p*-hidroksibenzojeve kiseline na GC elektrodi te je utvrđeno da uzastopnim snimanjem pada visina anodnog strujnog vrha te se produkt oksidacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline adsorbira na površini GC elektrode. Stajanjem uzorci *p*-hidroksibenzojeve kiseline nisu mijenjali boju no povećavala se struja oksidacijskog strujnog vrha. To ukazuje na povećanje udjela disociranog oblika *p*-hidroksibenzojeve kiseline u otopini. Diferencijslni pulsni voltamogrami pokazali su da je najizraženija oksidacija *p*-hidroksibenzojeve kiseline pri pH = 6, dok se pri nižim i višim pH vrijednostima smanjuje visina oksidacijskog strujnoog vrha. Potencijal oksidacijskog strujnog vrha u ovisnosti o pH je linearan što ukazuje da se u oksidacijskom mehanizmu izmjenjuje jednak broj protona i elektrona. Eksperimentalno određena najniža koncentracija koja se može detektirati (LOD) iznosi $1 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³. Povećanjem koncentracija povećava se i struja oksidacijskog strujnog vrha (dobivena je linearna ovisnost u koncentracijskom poručju od 1 μM do 100 μM). Kao realni uzorci korišteni su bijelo vino koje je pokazalo najveću koncentraciju *p*-hidroksibenzojeve kiseline, a ispitivana kiselina je također detektirana u bijelom grožđu i suhom kokosu. Najniža koncentracija, određena je u kokosovom mlijeku.

6. LITERATURA

- [1] Bratuševac P., Kvalitativna i kvantitativna analiza *p*-hidroksibenzojeve kiseline UV-Vis spektrofotometrijom, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Završni rad, 2019
- [2] Simić A., Manojlović D., Šegan D., Todorović M., Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics, *Molecules*, 12 (10), 2327-2340, 2007.
- [3]Tade R., More M., Chatap V., Deshmukh P., Patil P., Safety and Toxicity Assessment of Parabens in Pharmaceutical and Food Products. *Inventi Rapid - Pharmacy Practice*, 1-5, 2018.
- [4] Petti S., Scully C., Polyphenols, oral health and disease. *Journal of Dentistry*, 37, 13-423, 2009.
- [5] Kitade Y., Hashimoto R., Suda M., Hiraga K., Inuia M., Applied and Environmental Microbiology. Production of 4-Hydroxybenzoic Acid by an Aerobic GrowthArrested Bioprocess Using Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum*, 84,2, 2018.
- [6] Munjanja B., Handbook of Food Analysis, UV-Visible Absorption, Fluorescence and Chemiluminescence Spectroscopy 31, 572-583, 2015.
- [7] Knez M., Antioksidansi, Odjel za kemiju u Osijeku, Završni rad, 2014.
- [8] Poon H. F., Free radicals and brain aging, *Clin Geriatr Med*, 20, 329-359,2004.
- [9] Bošnjaković A., Antioksidansi i njihov doprinos zdravlju i ljepoti kože, Odjel za kemiju u Osijeku, Završni rad, 2017.
- [10] Puljak, A., Perko, G., Mihok, D., & Radašević, H., Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix*, 10(52), 98-102, 2004
- [11] Sies H., Strategies of antioxidant defense, *European journal of biochemistry*, 215, 213-219, 1993.

- [12] Kashini F.Z., Ghoreshi S.M., Khoobi A., Experimental and statistical analysis on a nanostructured sensors for determination of *p*-hydroxybenzoic acid in cosmetics, Materials Science and Engineering 10, 2018.
- [13] Velagić D., Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
- [14] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [15] Chandrasekar D., Madhusudhana K., Ramakrishna S., Diwan P.V., Pharm. Biomed. Anal., 40, 460-464, 2006.
- [16] Crafovan B. D., Kerrihard A.L., Amarowicz R., Pegg R.B., Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11, 149-173, 2012.
- [17] <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> (15.3.2022.)
- [18] Hauser P.C., Electroanalytical methods, Instrumental Multi-Element Chemical Analysis. Alfassi ZB, 201-202, 1998.
- [19] Arts A., van den Berg K., de Groot M., van der Schaaf J., Electrochemical oxidation of benzoic acid and its aromatic intermediates on boron doped diamond electrodes, Current Research in Green and Sustainable Chemistry 4, 2021.
- [20] Ojani R., Khanmohammadi A., Raoof B.J., Photoelectrocatalytic degradation of *p*-hydroxybenzoic acid at the surface of a titanium/titanium dioxide nanotube array electrode using electrochemical monitoring, Materials Science in Semiconductor Processing 31, 651-657, 2015.
- [21] Nigović B., Behetić S., Electroanalysis in pharmacy, Farmaceutski glasnik, 63, 163– 175, 2007
- [22] Kounaves S., Voltammetric techniques, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall PTR, 709-725, 197.
- [23] Piljac I., Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, Mediaprint Tiskara Hrastić, Zagreb, 2010.

- [24] Blažević J., Elektrokemijska detekcija vitamin C u realnim uzorcima, Diplomski rad, Odjel za kemiju, Osijek, 2020.
- [25] Abdel-Hamid R., Rabia, M. K., Newair, E. F., Electrochemical behaviour of antioxidants: Part 2 Electrochemical oxidation mechanism of quercetin at glassy carbon electrode modified with multi-wall carbo nanotubes. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 350-356, 2016
- [26] De Rossi A., Desiderio C., Fast capillary electrochromatographic analysis of parabens and 4-hydroxybenzoic acid in drugs and cosmetics, *Electrophoresis* 23, 3410–3417, 2002.
- [27] Santro A., Elektrokemijska karakterizacija antioksidanasa na modificiranim elektrodama: Karotenoidi, Završni rad, Kemijsko – tehnološki fakultet, Split, 2020.
- [28] Dias, L. G., Meirinho, S. G., Veloso, A. C. A., Rodrigues, L. R., & Peres, A. M., Electronic tongues and aptasensors. *Bioinspired Materials for Medical Applications*, 371–402, 2017.
- [29] Ngai, K.S., Tan, W.T., Zainal, Z., Mohd Zawawi, R., Zidan, M., Voltammetry Detection of Ascorbic Acid at Glassy Carbon Electrode Modified by Single-Walled Carbon Nanotube/Zinc Oxide, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8(8), 10557-10567. 2013.