

# Odabir i optimiranje elektrokemijske metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

---

**Kondža, Ana Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:130824>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ODABIR I OPTIMIRANJE ELEKTROKEMIJSKE METODE ZA  
ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA MARIJA KONDŽA**

**Matični broj: 443**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ODABIR I OPTIMIRANJE ELEKTROKEMIJSKE METODE ZA**  
**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANA MARIJA KONDŽA**

**Matični broj: 443**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF  
ELECTROCHEMICAL METHOD FOR DETERMINATION OF  
ANTIOXIDANT CAPACITY**

**BACHELOR THESIS**

**ANA MARIJA KONDŽA**

**Parent number: 443**

**Split, September, 2021.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA  
ZAVRŠNI RAD**

**Sveučilište u Splitu  
Kemijско – tehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Kemije**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско–tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Nives Vladislavić

**ODABIR I OPTIMIRANJE ELEKTROKEMIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE  
ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA**

Ana Marija Kondža, 443

**Sažetak:**

Poznato je kako elektrode izrađene od ugljikovih materijala (grafita, staklastog ugljika, ugljikove paste ili grafena) zbog niskog omskog otpora mogu značajno poboljšati elektroanalitička svojstva osjetljivih slojeva i pružaju različite mogućnosti modifikacija koje se često koriste za razvoj visoko osjetljivih senzora za istraživanje elektrokemijskih svojstava i otkrivanje raznih spojeva. Prvi cilj ovog rada bio je razviti jednostavnu elektrokemijsku metodu za određivanje vitamina C (VitC) na posebno konstruiranoj mikroelektrodi od lista pirolitičkog grafita (PGS – *Pyrolytic Graphite Sheet*). Ciklička voltametrijа korištena je za karakterizaciju mikroelektrode i pravokutnovalna voltametrijа za elektroanalitičke svrhe. Utvrđen je postupak za kvantificiranje VitC –a u realnom uzorku. VitC pokazuje jednu kvazireverzibilnu reakciju koja uključuje prijenos dva elektrona, dok potencijal oksidacije ovisi o koncentraciji analita. Pravokutnovalna voltametrijа (SWV) optimizirana je i provedeno je analitičko određivanje u području potencijala od –0,30 do 0,80 V. Dobiveni rezultati pokazuju linearni odziv PGS elektrode u širokom području koncentracija. Drugi cilj bio je utvrditi učinak dodavanja različite vrste „zelenog“ biootpada na rast biljaka, sadržaj VitC –a i antioksidacijsku aktivnost u rikoli (*Eruca sativa L*) uporabom PGS elektrode. Dobiveni rezultati uspoređeni su sa standardiziranim metodama. Nakon tri tjedna uzgoja uočene su male razlike u rastu i velike razlike u određenim nutritivnim karakteristikama. Dodavanje ljuske kikirikija doprinosi prozračivanju tla, a primijećen je i najbrži razvoj zdrave i zelene *Eruca sativa*. Dodatak crne kave čini tlo blago alkalnim i rezultira značajnim povećanjem sadržaja VitC –a i antioksidacijske aktivnosti.

**Ključne riječi:** elektrokemijske metode, mikroelektroda od lista pirolitičkog grafita (PGS), vitamin C, „zeleni“ biotpad, rikola, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 53 stranice, 37 slika, 4 tablice, 56 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević – predsjednica
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza – član
3. Doc. dr. sc. Nives Vladislavić – član–mentor

**Datum obrane:** 28.09.2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско – tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

**BASIC DOCUMENTATION CARD  
BACHELOR THESIS**

**University of Split**  
**Faculty of chemistry and technology Split**  
**Undergraduate study of Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28

**Mentor:** Assistant prof Nives Vladislavić, PhD

**DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF ELECTROCHEMICAL METHOD FOR  
DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY**

Ana Marija Kondža, 443

**Abstract**

It is known that electrodes made of carbon materials (graphite, glassy carbon, carbon paste or graphene) due to low ohmic resistance can significantly improve the electroanalytical properties of sensitive layers and provide a variety of modification options that are often used to develop highly sensitive sensors for investigation of electrochemical properties and give opportunity for detection of various compounds. The first goal of this work was to develop a simple electrochemical method for the determination of vitamin C (VitC) on a specially constructed microelectrode made from the Pyrolytic Graphite Sheet (PGS). Cyclic voltammetry was used to characterize the microelectrode and square wave voltammetry for electroanalytical purposes. A procedure for quantifying VitC in a real sample was established. VitC shows a single quasi-reversible reaction involving the transfer of two electrons, while the oxidation potential depends on the analyte concentration. SWV was optimized and analytical determination was performed in the potential range from  $-0.30$  to  $0.80$  V. The obtained results show a linear response of the PGS electrode in a wide range of concentrations. The second goal was to determine the effect of adding different types of "green" biowaste on plant growth, VitC content and antioxidant activity in arugula (*Eruca sativa L*) using PGS electrode. The obtained results were compared with standardized methods. After three weeks of cultivation, small differences in growth and large differences in certain nutritional characteristics were observed. The addition of peanut shell contributes to soil aeration, and the fastest development of healthy and green *Eruca sativa* has been observed. The addition of black coffee makes the soil slightly alkaline and results in a significant increase in VitC content and antioxidant activity.

**Keywords:** electrochemical methods, Pyrolytic Graphite Sheet (PGS) microelectrode, vitamin C, "green" biowaste, arugula, antioxidant activity

**Thesis contains:** 53 pages, 37 pictures, 4 tables, 56 references

**Original in :** Croatian

**Defence committee:**

1. Assistant Professor Ivana Škugor Rončević, PhD – chair person
2. Assistant Professor Danijela Skroza, PhD – member
3. Assistant Professor Nives Vladislavić, PhD – supervisor

**Defence date:** 28.09.2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

*Završni rad je izrađen u Zavodu za Opću i anorgansku kemiju Kemijsko–tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nives Vladislavić u razdoblju od svibnja do srpnja 2021. godine.*



## **Zahvala**

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nives Vladislavić na vodstvu, uloženom trudu i nesebičnoj pomoći, koja me je strpljivo i s razumijevanjem vodila kroz pisanje ovog završnog rada i izvođenju eksperimenta.*

*Hvala svim mojim kolegama i kolegicama s kojima sam provela ove tri godine studiranja, a posebno novostečenim prijateljicama koje su mi uljepšavale studentske dane.*

*Na kraju se želim zahvaliti svojoj obitelji. Bili ste mi podrška, ohrabivali me i veselili se samnom svakom novom položenom ispitu.*

*Rad posvećujem svom djedu koji je najviše od svih vjerovao u mene i uvijek mi govorio da ću ja to uspjeti.*

# ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

## OPĆI CILJEVI RADA

1. Opći cilj ovog rada bio je pregledom recentne literature utvrditi mogućnost određivanja Vitamina C elektrokemijskim metodama.
2. Izraditi mikroelektrodu od grafenskog lista i ispitati elektrokemijsko ponašanje Vitamina C na pripremljenoj mikroelektrodi.

## SPECIFIČNI CILJEVI RADA

1. Specifični cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj različitih dodataka “zelenog” biootpada na rast, razvoj i sadržaj bioaktivnih spojeva: Vitamin C i fenolne spojeve prikazane kroz antioksidacijsku aktivnost
2. Na različitim substratima dobivenim miješanjem “zelenog” biootpada i zemlje zasijati rikolu, pratiti njezin rast, pH supstrata i izgled biljke.
3. Realnim uzorcima rikole ekstrahiranim u vodi odrediti količinu Vitamina C predloženom elektrokemijskom metodom pomoću konstruirane elektrode.
4. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima dobivenim klasičnom metodom.
5. Odrediti antioksidacijsku aktivnost u realnim uzorcima koristeći FRAP–metodu, te naći korelaciju između rezultata elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda.

## SAŽETAK

Poznato je kako elektrode izrađene od ugljikovih materijala (grafita, staklastog ugljika, ugljikove paste ili grafena) zbog niskog omskog otpora mogu značajno poboljšati elektroanalitička svojstva osjetnih slojeva i pružaju različite mogućnosti modifikacija koje se često koriste za razvoj visoko osjetljivih senzora za istraživanje elektrokemijskih svojstava i otkrivanje raznih spojeva. Prvi cilj ovog rada bio je razviti jednostavnu elektrokemijsku metodu za određivanje vitamina C (VitC) na posebno konstruiranoj mikroelektrodi od lista pirolitičkog grafita (PGS – *Pyrolytic Graphite Sheet*). Ciklička voltometrija korištena je za karakterizaciju mikroelektrode i pravokutnovalna voltometrija za elektroanalitičke svrhe. Utvrđen je postupak za kvantificiranje VitC –a u realnom uzorku. VitC pokazuje jednu kvazireverzibilnu reakciju koja uključuje prijenos dva elektrona, dok potencijal oksidacije ovisi o koncentraciji analita. Pravokutnovalna voltometrija (SWV) optimizirana je i provedeno je analitičko određivanje u području potencijala od –0,30 do 0,80 V. Dobiveni rezultati pokazuju linearni odziv PGS elektrode u širokom području koncentracija. Drugi cilj bio je utvrditi učinak dodavanja različite vrste „zelenog“ biootpada na rast biljaka, sadržaj VitC –a i antioksidacijsku aktivnost u rikoli (*Eruca sativa L*) uporabom PGS elektrode. Dobiveni rezultati uspoređeni su sa standardiziranim metodama. Nakon tri tjedna uzgoja uočene su male razlike u rastu i velike razlike u određenim nutritivnim karakteristikama. Dodavanje ljuske kikirikija doprinosi prozračivanju tla, a primijećen je i najbrži razvoj zdrave i zelene *Eruca sativa*. Dodatak crne kave čini tlo blago alkalnim i rezultira značajnim povećanjem sadržaja VitC –a i antioksidacijske aktivnosti.

**Ključne riječi:** elektrokemijske metode, mikroelektroda od lista pirolitičkog grafita (PGS), Vitamin C, „zeleni“ biotpad, rikola, antioksidacijska aktivnost

## SUMMARY

It is known that electrodes made of carbon materials (graphite, glassy carbon, carbon paste or graphene) due to low ohmic resistance can significantly improve the electroanalytical properties of sensitive layers and provide a variety of modification options that are often used to develop highly sensitive sensors for investigation of electrochemical properties and give opportunity for detection of various compounds. The first goal of this work was to develop a simple electrochemical method for the determination of vitamin C (VitC) on a specially constructed microelectrode made from the Pyrolytic Graphite Sheet (PGS). Cyclic voltammetry was used to characterize the microelectrode and square wave voltammetry for electroanalytical purposes. A procedure for quantifying VitC in a real sample was established. VitC shows a single quasi-reversible reaction involving the transfer of two electrons, while the oxidation potential depends on the analyte concentration. SWV was optimized and analytical determination was performed in the potential range from  $-0.30$  to  $0.80$  V. The obtained results show a linear response of the PGS electrode in a wide range of concentrations. The second goal was to determine the effect of adding different types of "green" biowaste on plant growth, VitC content and antioxidant activity in arugula (*Eruca sativa L*) using PGS electrode. The obtained results were compared with standardized methods. After three weeks of cultivation, small differences in growth and large differences in certain nutritional characteristics were observed. The addition of peanut shell contributes to soil aeration, and the fastest development of healthy and green *Eruca sativa* has been observed. The addition of black coffee makes the soil slightly alkaline and results in a significant increase in VitC content and antioxidant activity.

**Keywords:** electrochemical methods, Pyrolytic Graphite Sheet (PGS) microelectrode, Vitamin C, "green" biowaste, arugula, antioxidant activity

## SADRŽAJ

1.	OPĆI DIO .....	3
1.1	VITAMIN C – OTKRIĆE, ZNAČAJ, SVOJSTVA .....	3
1.2	SLOBODNI RADIKALI i ANTIOKSIDANSI.....	6
1.3	ZELENI“ BIOOTPAD.....	8
1.4	METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA C .....	9
1.4.1	VOLTAMETRIJSKE METODE.....	9
1.4.2	SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE.....	15
1.4.3	UV–VIS SPEKTROSKOPIJA .....	15
2	EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
2.1	KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA .....	18
2.1.1	Postupak pripreme otopina .....	19
2.1.2	Priprema radne elektrode – mikroelektroda od lista pirolitičkog grafita... 20	
2.1.3	Priprema ćelije za elektrokemijsko mjerenje.....	23
2.1.4	Priprema realnih uzoraka – biljni materijal .....	23
2.2	METODE .....	25
2.2.1	Elektrokemijska mjerenja .....	25
2.2.2	Određivanje vitamina C titracijom s otopinom jodida.....	26
2.2.3	Spektrofotometrijska mjerenja.....	27
3	REZULTATI I RASPRAVA .....	30
3.1	Rezultati i rasprava cikličke voltametrije.....	30
3.2	Rezultati i rasprava pravokutnovalne voltametrije .....	33
3.3	Analiza realnih uzoraka.....	35
3.3.1	Karakteristike biljnog materijala .....	35
3.3.2	Rezultati određivanja vitamina C pravokutnovalnom voltametrijom.....	38
3.3.3	Rezultati određivanja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti .....	43
4	ZAKLJUČAK.....	48
5	LITERATURA .....	51

## UVOD

Potreba za pronalaskom brze i jednostavne metode evaluacije razine vitamina C u hrani svakako zaokuplja veliku pažnju osobito u današnje vrijeme. Razvoj i implementacija elektrokemijskih metoda u analizi hrane u posljednjem desetljeću naišla je na veliki interes u znanstvenim krugovima. Danas istraživanja idu u smjeru pronalaska i razvoja elektrode/biosenzora za brzu, jednostavnu, selektivnu i osjetljivu karakterizaciju bioaktivnih tvari u prirodnim uzorcima, bez njihove predobrade. Glavne prednosti elektrokemijskih metoda u usporedbi s tradicionalnim su svakako osjetljivost, brzina, jednostavnost primijene, postupak koji ne zahtijeva komplicirani predtretman uzoraka, ekonomski su povoljne, itd. U tom smislu mikroelektrode idu i korak dalje, te omogućavaju minijaturizaciju izvedbe i analizu u vrlo maloj količini uzorka. S elektrokemijske strane omogućen je bolji prijenos tvari prema površini i smanjeno je kapacitivno nabijanje elektrode, poboljšan je omjer signala i šuma, povećana osjetljivost u analizi tvari u tragovima i bolja je rezolucija interferirajućih signala u elektroanalizi.

U tom smislu ideja rada je bila razviti jednostavnu elektrokemijsku metodu za određivanje vitamina C (VitC) na posebno konstruiranoj mikroelektrodi od lista pirolitičkog grafita (PGS – *Pyrolytic Graphite Sheet*). Pirolitički grafit je nova vrsta ugljičnog materijala, s visokom kristalnom orijentacijom, koji se iz ugljikovodičnih plinova visoke čistoće taloži na grafitnoj podlozi pri 1800 °C ~ 2000 °C, pod određenim tlakom u peći. Ima visoku gustoću, visoku čistoću i izuzetnih je toplinskih, električnih, magnetskih i mehaničkih svojstava.

U današnje doba kada čovjek više razmišlja o posljedicama loše i nepravilne prehrane, ali i odnosu prema prirodi spojili smo te dvije važne premise (prednosti elektrokemije i mikroelektrode, te karakteristike PGS materijala) i pokušali utvrditi učinak dodavanja različite vrste svježeg nekompostiranog, takozvanog „zelenog“ biootpada na rast biljaka, sadržaj vitamina C i antioksidacijsku aktivnost u rikoli (*Eruca sativa L.*) uporabom PGS elektrode.

Važnost vitamina C i ostalih antioksidansa (reducensa) u prehrani i za zdravlje čovjeka je tema koja zaokuplja prostor svih portala, društvenih mreža i predstavlja uvijek atraktivnu i važnu temu u znanosti, obrazovanju i životu. Vitamin C je važan mikronutrijent, jer kao biološki čimbenik igra mnoge uloge u imunološkom sustavu, metabolizmu i biosintezi. Kao jako redukcijsko sredstvo bitan je antioksidans, jer uklanja slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve (ROS). Koliki je njegov sadržaj u svježem

voću i povrću uvelike ovisi o starosti biljke i načinu uzgoja, podneblju uzgoja, i mnogim drugim faktorima.

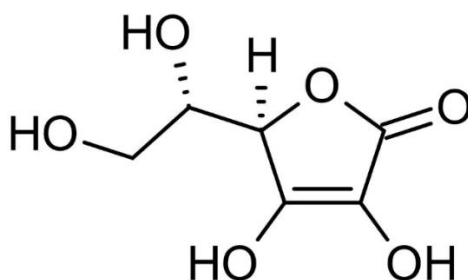
Utvrđiti može li dodatak svježeg biootpada učiniti biljku superhranom je bio specifični cilj ovog istraživanja. Biootpad koji u kućanstvu nastaje svaki dan moramo promatrati kao izvor energije za biljke, ali i za čovjeka, a ne samo kao otpad. Kore banane, ljuske jaja, talog kave i listovi čaja mogu poslužiti kao izvor nutritivnih sastojaka za biljke, papirnati ručnici, novine i ljuske orašastih plodova mogu značajno doprinijeti prozračivanju tla i poboljšanju sposobnosti za održavanje biljnog života, dok citrusi ili ljute paprika pružaju biljkama prirodnu zaštitu od štetočina. Listovi čaja i ostaci kave mogu se koristiti za promicanje plodnosti vrtnog tla i poboljšanje cjelokupnog zdravlja biljke zahvaljujući velikom udjelu dušika.

O vrsti biootpada kojim smo neposredno hranili biljke ovisila je i boja, brzina rasta i izgled biljke, a elektrokemijskom i spektroskopijskom analizom utvrđeno je kako pravilnim izborom svježeg biootpada možemo doprinijeti povećanju nutritivnih karakteristika odabrane biljne vrste – rikole.

# 1. OPĆI DIO

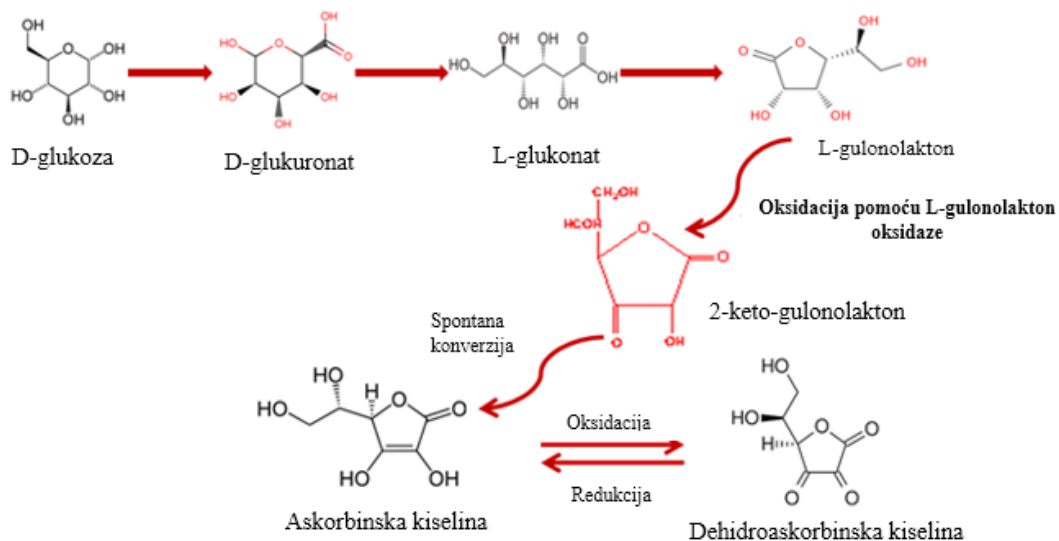
## 1.1 VITAMIN C – OTKRIĆE, ZNAČAJ, SVOJSTVA

L–askorbinska kiselina (vitamin C, VitC), empirijske formule  $C_6H_8O_6$ , je bijeli kristaliničan prah, bez mirisa i kiselog okusa. Po strukturi je slična molekuli glukoze jer sadrži šest ugljikovih atoma (Slika 1). Prirodni je antioksidans koji se potpuno otapa u vodi i posjeduje mnoga biokemijska svojstva.[1,2]



Slika 1. Struktura L–askorbinske kiseline [1]

Prvi put je kemijski sintetizirana ranih tridesetih godina i prvi je vitamin dobiven sintetskim putem. Nalazi se u oksidiranom obliku kao askorbinska kiselina, i reduciranom obliku kao dehidroaskorbinska kiselina, koje zajedno tvore reverzibilni redoks par (Slika 2).[3,4]



Slika 2. Sinteza vitamina C iz D–glukoze pomoću enzima gulonolakton oksidaze [3]



VitC predstavlja važan mikronutrijent, jer kao biološki čimbenik igra mnoge uloge u imunološkom sustavu, metabolizmu i biosintezi. Kao jako redukcijsko sredstvo bitan je antioksidans, jer uklanja slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve (ROS). VitC je poznat kofaktor za prolil i lizil hidroksilaze, dva enzima koja stabiliziraju tercijarnu strukturu kolagena. Također je kofaktor i dviju hidroksilaza koje sudjeluju u biosintezi karnitina. Istraživanja su pokazala da VitC ima ulogu u regulaciji DNA i transkripciji gena, povećava apsorpciju željeza tako što reducira  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ , i sudjeluje u prevenciji mnogih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti. Nedovoljan unos VitC dovodi do skorbuta, kvarenja desnih te drugih simptoma. Skorbut uzrokuje slabljenja kolagenih struktura, lošeg zacjeljivanja rana i oslabljenog imuniteta.[1,4–7]

VitC je široko zastupljen u voću (posebice citrusnom voću), povrću (crvenim i zelenim paprikama, brokuli, rajčicama, jagodama, te ostalom lisnatom povrću) i životinjskim organima (mozak, jetra, bubreg). Životinjski izvori su veoma siromašni udjelom VitC, čiji se nivo kreće i do ispod 30–40 mg/100 g, za razliku od biljnih izvora čiji se sadržaj VitC kreće do 5000 mg/100 g.[8,9]

VitC je esencijalna tvar koja se ne može proizvesti u organizmu čovjeka, majmuna i zamorca, nego se mora unositi u tijelo hranom. Razlog tome je što ljudima, za razliku od biljaka i većine životinja, nedostaje enzim gulonolakton oksidaza, koji je odgovoran za njegovu konačnu sintezu iz glukoze, a izgubljen je mutacijom pri evoluciji primata.[10]

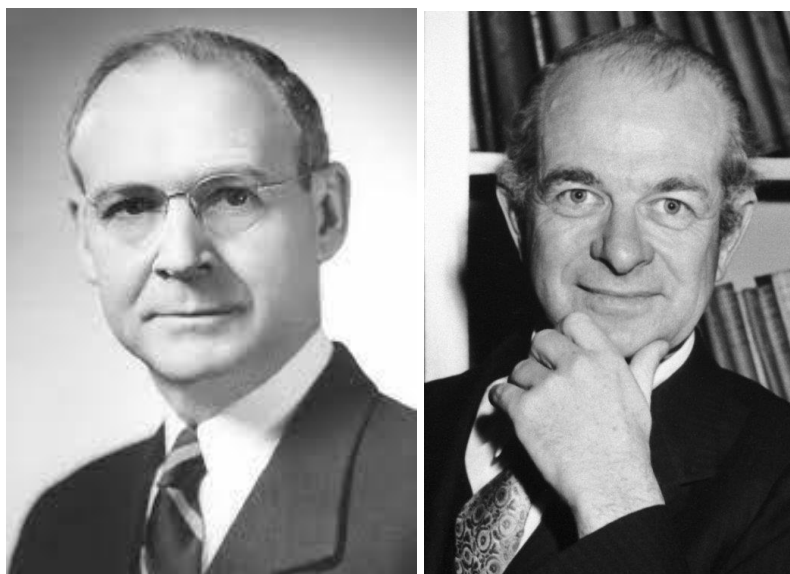
Najveća koncentracija VitC u čovjeka se nalazi u mozgu, nadbubrežnim žlijezdama, hipofizi, jajnicima, slezeni, jetri, izvanstraničnoj tekućini pluća, oku i krvnim stanicama.[11] Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina C iznosi 75 mg/dan za žene, a za muškarce 90 mg/dan.[12]

Albert Szent–Györgyi (Slika 3) je u Cambridge 1928. godine uspio izolirati VitC, spoj za kojeg se znalo da se nalazi u velikoj koncentraciji kore nadbubrežne žlijezde i da ima jaku redukcijsku moć. Dokazao je da ima empirijsku formulu  $C_6H_8O_6$  i nazvao ga je "heksuronska kiselina".



*Slika 3. Albert Szent–Györgyi*

Charles Glen King (Slika 4 lijevo) je zajedno sa svojim timom u Pittsburgu 1932. izolirao VitC iz limunovog soka povezujući ga sa heksuronskom kiselinom.



*Slika 4. Charles Glen King i Linus Pauling*

Konačnu strukturu VitC objavio je Istraživački tim iz Birminghama kojeg je vodio Norman Haworth 1933. godine.[13]

Linus Pauling (Slika 4 desno), kao dvostruki nobelovac, objavio je u svojoj knjizi „Vitamin C i obična prehlada“ da se dnevnim uzimanjem 1 g VitC prevenira oboljenje od prehlade i štiti od moždanog udara, raznih infekcija i raka.[14]

## 1.2 SLOBODNI RADIKALI i ANTIOKSIDANSI

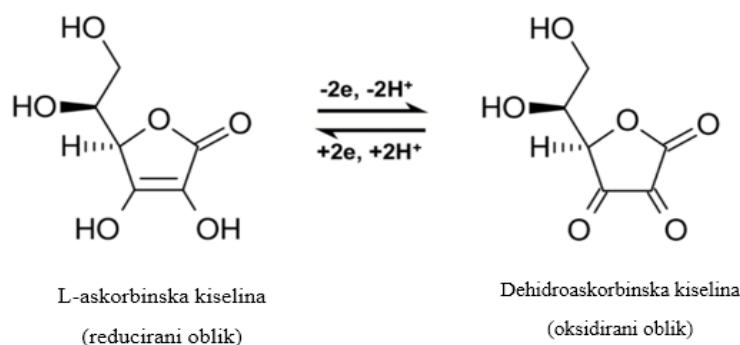
Slobodni radikali, oksidansi, oksidacijski stres, antioksidansi, predstavljaju termine s kojima se u posljednjih dvadesetak godina često susrećemo. Oksidansi i slobodni radikali mogu imati dvostruku ulogu, kao korisni i kao otrovni spojevi.[4]

Slobodni radikali predstavljaju kratkoživuće molekule s nesparenim elektronom, pa su stoga vrlo reaktivne i nestabilne. Pod pojmom slobodni radikali najčešće se misli na RNS–reaktivni dušikovi spojevi i ROS–reaktivni kisikovi spojevi.[15,16] Sadrže ih zagađivači okoliša, kao što su dim cigareta i ispušni plinovi automobila. Također mogu nastati u tijelu nakon izloženosti organizma zarazama, štetnim kemikalijama, zračenju i konzumacijom raznih lijekova, ali i putem hrane. Inače je količina stvaranja slobodnih radikala mala.[11] Oksidacijski stres nastaje njihovim prevelikim nakupljanjem koje organizam ne može ukloniti, te može doći do razvoja degenerativnih i kroničnih bolesti kao što su rak, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti, starenje, autoimuni poremećaji i reumatoidni artritis.[4]

U organizmu antioksidansi imaju važnu ulogu, jer se proizvode u normalnim fiziološkim procesima (dobivanja energije u mitohondrijima stanica reakcijom glukoze s kisikom), a njihova proizvodnja i unos posebno mora biti izbalansirana tijekom tjelovježbi ili borbe protiv bolesti, kada je povećana proizvodnja slobodnih radikala. Antioksidans je prisutan u stanici u odgovarajućoj količini, reagira sa slobodnim radikalima i odgovoran je za regeneraciju stanica.[6]

VitC ima sve ove odlike što ga čini savršenim antioksidansom koji štiti stanice većine aerobnih organizama od oštećenja, koje može biti uzrokovano ovim reaktivnim molekulama.[6,11] Također, sprječava oksidaciju drugih molekula donirajući elektrone slobodnim radikalima kojima je potreban elektron kako bi nastao stabilan radikal, te na taj način smanjuje njihovu reaktivnost.[4] Tako štiti biomolekule (proteine, ugljikohidrate, lipide i nukleinske kiseline) od oštećenja koja mogu prouzročiti oksidansi nastali tijekom rada staničnog metabolizma i izloženosti zagađivačima i toksinima.[7] Također reducira i tokoferoksilne radikale, pa je učinkovit i u regeneraciji vitamina E.[4]

Elektrokemijska istraživanja su pokazala kako askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina tvore reverzibilni redoks par.[4] Pri neutralizaciji slobodnih radikala (kao što su  $\text{OH}^-$ ,  $\text{RO}^-$ ,  $\text{RO}^{2-}$ ,  $\text{NO}_2$ ), VitC se oksidira u dehidroaskorbinsku kiselinu na način da otpušta dva elektrona i dva protona (Slika 5).[4,17]

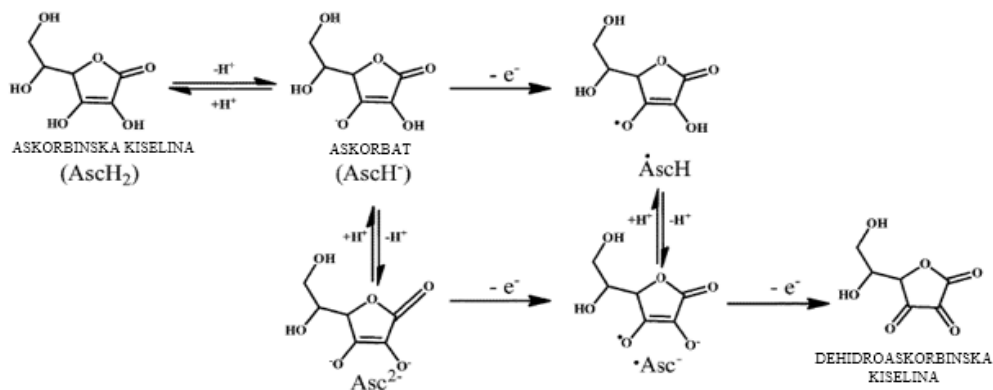


**Slika 5.** Oksidacija L–askorbinske kiseline (AA) u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA)[4]

Askorbinska kiselina ( $\text{AscH}_2$ ) ima dvije  $pK_a$ ;  $pK_1 = 4.2$  i  $pK_2 = 11.6$ . Zbog toga se u fiziološkim uvjetima VitC pretežito nalazi kao monoanion askorbat ( $\text{AscH}^-$ ). Odličan je reducens i može se lako oksidirati do askorbatnog radikala ( $\text{Asc}^{\bullet-}$ ) i dehidroaskorbinske kiseline (DHA).[18] Askorbatni radikal se disproporcionira na askorbat i dehidroaskorbinsku kiselinu:



ili sudjeluje u reakcijama sa slobodnim radikalima i tako smanjuje broj slobodnih radikala (Slika 6).[11]



**Slika 6.** Ravnoteža L–askorbinske kiseline i njenih oksidiranih oblika [11]

U prisutnosti iona, kao što su bakar i željezo, ima ulogu prooksidansa stvarajući hidroksilne radikale koji dovode do oksidacije DNA, lipida ili proteina.[4] Na primjer,  $\text{Fe}^{3+}$  se reducira u  $\text{Fe}^{2+}$  pomoću askorbata, koji se ponovno može oksidirati i proizvesti  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoksid i hidroksilni radikal.[19]

Općenito, u niskim koncentracijama VitC će djelovati prooksidativno, a u visokim antioksidativno.[20]

### 1.3 „ZELENI“ BIOOTPAD

Zbog urbanizacije i stalnog rasta ljudske populacije neprestano se povećava količina otpad. Njegovo gospodarenje u svijetu postaje jedno od najvažnijih ekoloških pitanja i pokušava se smanjiti količina otpada koja odlazi u okoliš uzrokujući onečišćenja, a tako i ekološke i higijenske probleme. Biootpad također nastaje u ogromnim količinama, a njegova uporaba na zemljištu je poželjna i potrebna kako bi očuvali okoliš i prirodne resurse. Biomasa predstavlja materijale koji su organskog podrijetla. Izvori biomase su drveni otpad, otpad iz hrane, industrijski i poljoprivredni ostatci, zeljaste i drvenaste vrste, otpadni papir, životinjski otpad, alge, vodeno bilje, itd. Biokompozitni proizvodi mogu se proizvoditi od materijala biomase.[21–24]

Gospodarenje biootpadom ovisi o lokalnim čimbenicima, klimatskim uvjetima, kvaliteti i sastavu otpada, sustavima prikupljanja i mogućnosti upotrebe proizvoda iz otpada kao što su toplina, električna energija, plin ili kompost. Energija biomase može se iskoristiti na četiri načina: anaerobnom probavom, pirolizom, rasplinjavanjem i izravnim izgaranjem. Suha biomasa se može prevesti u tekuće gorivo. Također spaljivanjem suhe biomase dobiva se električna energija, a rasplinjavanjem se može proizvesti vodik, metan i ugljikov monoksid. Fermentacijom vlažne biomase kao što je stajski gnoj, mulj iz kanalizacije i otpad prehrambene industrije može se dobiti gnojivo i gorivo.[21,25]

Osnovne organske komponente koje izgrađuju biomasu su lignin, celuloza i hemiceluloza.[21] Organska tvar je biorazgradiva radi visokog sadržaja kuhinjskog otpada i ostataka iz restorana, stanova, kafeterija i tržnica, u odnosu na fosilne ugljikohidrate i anorganske materijale te igra veliku ulogu u biološkim, kemijskim i fizičkim svojstvima tla, a time utječe i na njegovu plodnost.[23, 25] Ukoliko se doda u tlo, poboljšavaju se njegova fizička svojstva i uvjeti za rast mikroorganizama i biljaka. Također dolazi do nakupljanja čestica tla. Organska tvar ima pozitivne učinke na kapacitet zadržavanja vode i topline, te pH tla i sudjeluje u transportu i dostupnosti metalnih iona u okolišu. Zbog jakog afiniteta ka adsorpciji može sniziti ukupnu koncentraciju metala, dok se istodobno otapanjem organske tvari u vodi povećava koncentracija metala koji se mogu otapati. Na taj način topljiva organska tvar omogućava veću pokretljivost iona metala čija je aktivnost u otopini inače vrlo niska, a u isto vrijeme i neophodna. Procesom mineralizacije oslobađaju se hranjive tvari iz organske tvari te hrane biljku i pozitivno utječu na plodnost tla. Također služi kao rezerva mikro i makro hranjivih tvari.[26,27]

Podrijetlo biootpada povezano je s njegovom kvalitetom kao sirovina i određuje sadržaj teških metala i hranjivih tvari. Ukoliko su prisutni neprikladni materijali dobivamo kompost koji ima nižu kvalitetu. To mogu uzrokovati razni zagađivači koji dospiju u organsku tvar tijekom procesa kompostiranja putem zraka i vode, ili male nečistoće prisutne u konačnom proizvodu poput mikroplastike.[28]

## 1.4 METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA C

Određivanje VitC do sada je provedeno fluorimetrijskim, titrimetrijskim, kromatografskim, elektrokemijskim i spektrofotometrijskim metodama.[29]

Voltametrijskim metodama (cikličkom voltametrijom, pravokutnovalnom voltametrijom, diferencijalno pulsnom voltametrijom, kronoamperometrijom i kronokulometrijom) i biosenzorima se mogu proučavati elektrokemijske značajke molekula.[30,31] Elektrokemijskim metodama kao i UV–VIS spektrofotometrijskim metodama u kojima se koriste različiti reagensi (FRAP, ABTS, Folin–Ciocalteu i DPPH) moguće je odrediti antioksidativni kapacitet.[32,33]

### 1.4.1 VOLTAMETRIJSKE METODE

Prednosti elektroanalitičkih metoda odnose se na složenost potrebnih alata, jednostavnost primijenjenih procedura, trajanje analize, biološku važnost i izvedbu metode (osjetljivost, preciznost, točnost, granica detekcije). Većina metoda se može brzo automatizirati i neke se mogu primijeniti i *in vivo*.

Voltometrija je elektroanalitički postupak u kojemu je električni napon signal pobude, a struja ćelije signal odziva. Naziv voltometrija potječe od skraćenice volt–amper–metrija jer se struja prikazuje kao funkcija narinutog napona. Moguće su različite vremenske ovisnosti i oblici amplitude kod nekog signala pobude.[34]

Voltametrijske metode koriste se u određivanju redoks potencijala, kvantitativnoj analizi raznih organskih i anorganskih tvari, proučavanju mehanizma i kinetike redoks reakcija te u elektrokemijskoj detekciji eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC).[33]

Osnovne jedinice voltametrijskog instrumenta čine potencijostat, računalo i elektrokemijski članak. Pomoću potencijostata se narine određeni potencijal i mjeri jakost

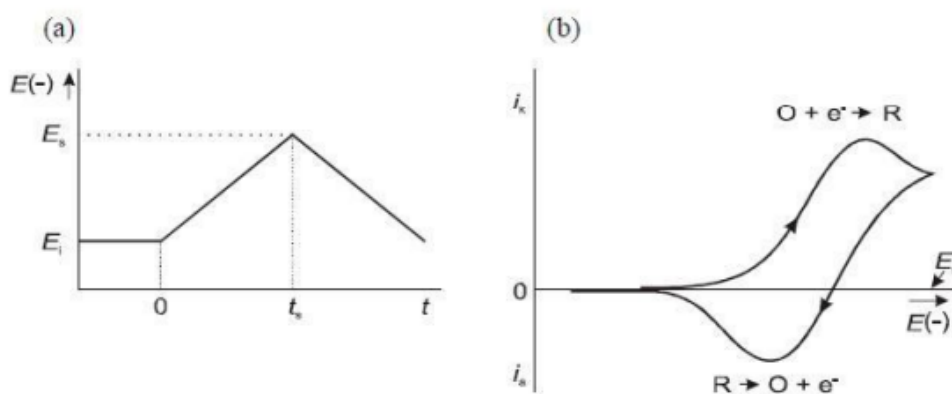
električne struje.[33] Elektrokemijski članak sastoji se od ionskog elektrolita, otopine analita i voltametrijske ćelije sastavljene od 3 elektrode: radne elektrode, referentne elektrode i protuelektrode. Protuelektroda omogućava tok struje unutar ćelije, a najčešće su ugljikove, platinske, grafitne ili zlatne elektrode. Regulacija pobudnog signala kao i mjerenje odzivnog signala vrši se pomoću referentne elektrode koja je najčešće Ag/AgCl elektroda. Redoks reakcija odvija se na radnoj elektrodi.[34]

Postoji mnogo voltametrijskih metoda a najveću primjenu od njih imaju ciklička voltametrija (CV), diferencijalna pulsna voltametrija (DPV), pravokutnovalna voltametrija (SWV), normalno pulsna voltametrija (NPV), linearna ili linear sweep voltametrija (LSV), polarografija i stripping voltametrija.[35]

#### 1.4.1.1 CIKLIČKA VOLTAMETRIJA (CV)

Ciklička voltametrija spada u elektroanalitičke tehnike kojom se proučavaju razne elektroaktivne vrste. Ima opsežnu upotrebu u područjima organske kemije, anorganske kemije, biokemije i elektrokemije. Često se izvodi kao prvi eksperiment u elektrokemijskom istraživanju nekog biološkog materijala, spoja ili površine elektrode.[36]

Radna elektrode nalazi se u bistroj otopini, a referentna elektroda je najčešće Ag/AgCl. Transport oksidirajućih i reducirajućih elektroaktivnih vrsta u CV se odvija difuzijom. Elektrolit je potreban kako bi se osigurala vodljivost i izbjegle moguće migracijske struje. Potencijal radne elektrode se mijenja linearno s vremenom, te se pritom bilježi rezultirajuća struja tijekom primjene potencijala na radnu elektrodu.[37,38]



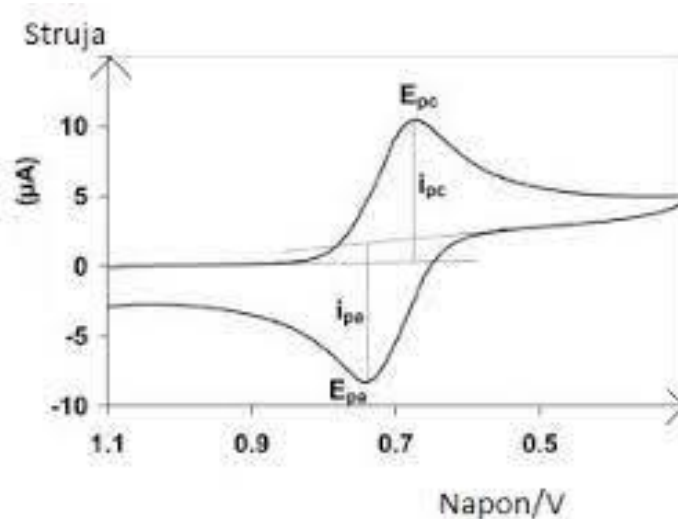
*Slika 7. Signal pobude i odziva CV [34]*

Dakle, signal pobude koji se nameće između referentne i radne elektrode je električni napon, a signal odziva je električna struja koja teče između radne elektrode i protuelektrode (Slika 7).[39]

Vrijeme je moguće prikazati kao potencijal zbog konstantne brzine promjene potencijala (*eng. scan rate; sweep rate*). Rezultati se prikazuju voltamogramima koji predstavljaju graf ovisnosti jakosti struje o promijenjenom potencijalu. Izgled voltamograma će ovisiti o redoks reakcijama te o brzinama prijenosa tvari i elektrona.[39]

Start snimanja je od potencijala pri kojemu se ne događaju reakcije na elektrodi i prelazi na potencijale pri kojima se odvija oksidacija ili redukcija otopljenih tvari (tvari koja se proučava). Nakon prelaska određenog potencijalnog područja smjer skeniranja se odvija unatrag.[37] Brzina skeniranja naprijed i nazad je obično ista. Način rada kod CV može biti jednociklički ili višeciklički. [38] Između prvog ciklusa skeniranja i uzastopnih skeniranja postoji mala razlika, ali nam te razlike mogu pružiti informacije poput mehanizama reakcije.[40]

Paramteri koji se mjere su katodni i anodni vršni potencijal ( $E_{pc}$  i  $E_{pa}$ ), katodna i anodna vršna struja ( $i_{pc}$  i  $i_{pa}$ ) i polovični potencijali ( $E_{p/2}$ ) na kojima anodna i katodna struja doseže pola vrijednosti svog vrha (Slika 8).[38]



**Slika 8.** *Određivanje potencijala i jakosti vršnih struja na cikličkom voltamogramu [38]*

Svaki spoj ima karakterističan potencijal vrha, a ovisi o njegovoj sposobnosti primanja ili davanja elektrona. Ukoliko se elektroni prenose velikom brzinom u odnosu na druge procese koji se odvijaju u otopini, onda je reakcija reverzibilna. Razlikom potencijala dvaju vrhova moguće je odrediti broj izmijenjenih elektrona:



$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2,303 (RT/nF) \quad (2)$$

gdje je:

$\Delta E_p$ – razlika potencijala vrha redukcije i oksidacije,  $R$ –opća plinska konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$ –apsolutna temperatura [K],  $n$ –broj izmijenjenih elektrona,  $F$ –Faradayeva konstanta ( $96485,34 \text{ C mol}^{-1}$ ).

Za neku redoks reakciju pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   $\Delta E_p$  iznosi  $0,0592 \text{ V/n}$  tj.  $59,2 \text{ mV}$  po jednom elektronu.[39]

Vršna struja i koncentracija povezane su Randles–Ševčikovom jednadžbom:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (3)$$

gdje je:

$I_p$ – vršna jakost struje [A],  $n$ –broj elektrona,  $A$ –površina elektrode [ $\text{cm}^2$ ],  $D$ –difuzijski koeficijent [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ],  $c_0$ –koncentracija otopine [ $\text{mol}/\text{cm}^3$ ], a  $v$ –brzina promjene potencijala [V/s]. Iz jednadžbe slijedi da je vršna jakost struje proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste koja je u otopini.[39,40]

Ukoliko se radi o ireverzibilnom procesu onda nema povratnog strujnog vrha, izmjena elektrona je znatno sporija, strujni vrhovi su manji i razdvojeni,  $E_p$  se pomiče prema pozitivnijim ili negativnijim vrijednostima ukoliko se brzina promjene potencijala poveća. Vršna struja u tom slučaju dobiva se prema izrazu:

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A c_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

gdje je:

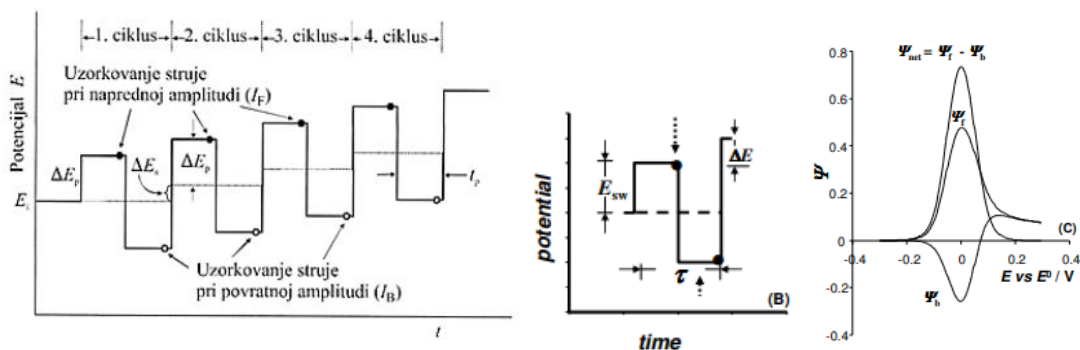
$n_a$ –broj elektrona u koraku prijenosa naboja, a  $\alpha$ –koeficijent prijelaza. Vršna struja i dalje je proporcionalna koncentraciji.[40]

#### 1.4.1.2 PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltometrija (SWV) primjenjuje se u analitici, elektrokinetičkim mjerenjima, te u proučavanju raznih elektrodnih procesa. Smatra se naprednom voltametrijskom tehnikom, jer spaja prednosti cikličke voltametrije (pruža uvid u elektrodni mehanizam), tehnike impedancije (pruža kinetičke informacije iznimno brzih procesa koji se odvijaju na elektrodi) i impulsnih tehnika (ima veliku osjetljivost). Potječe od Barkerove pravokutnovalne polarografije. SWV je ugrađen u elektrokemijske digitalne instrumente.[41]

Signal pobude (Slika 9) sastoji se od stepenastog napona ( $E_i$ ) i izmjeničnog pravokutnog pulsa s promjenom potencijala ( $\Delta E_p$ ), a vrijednost  $\Delta E_s$  predstavlja promjenu

napona poslije svakog ciklusa (smik). Tijekom svakog pojedinog ciklusa mjeri se struja na kraju negativne ( $I_b$ ) i pozitivne ( $I_f$ ) poluperiode pravokutnog pulsa, a jakost struje za svaki ciklus pobude dobiva se njihovom razlikom.[42]



**Slika 9.** Signal pobude pravokutnovalne voltametrije i vrijeme uzorkovanja struje, Jedan ciklus SWV i Tipični izgled voltamograma SWV [42,43,44]

Glavni parametri između dva susjedna pulsa su frekvencija ( $f$ ) i visina impulsa (amplituda,  $E_{sw}$ ). Frekvencija se određuje prema izrazu  $f = \tau^{-1}$ , gdje  $\tau$  označava trajanje ciklusa. Predstavlja broj ciklusa u jedinici vremena, a kreće se u rasponu od 5 do 2000 Hz. Vrijeme trajanja svakog pojedinačnog impulsa je  $t_p = \tau / 2$ , a kreće se od 0,25 do 100 ms. Brzina skeniranja definira se kao  $E/\tau$ , gdje je  $E$  potencijalni prirast.[43,44]

U ciklusu se razlikuju voltamogrami dobiveni očitavanjem struje polaznog i povratnog ciklusa ili pulsa (Slika 9 desno), struja se očitava u dvije točke, gdje jedna prikazuje anodnu a druga katodnu struju iste redoks reakcije. Na taj način dobiva se rezultantna struja koja ovu metodu čini izuzetno osjetljivom za reverzibilne redoks reakcije, a ujedno daje i dobar uvid u različite mehanizme reakcija.[43]

Tehnika je pogodna za proučavanje mehanizma kojim se prenose elektroni, jer je veličina pulsa kod reverzibilne reakcije dovoljna da se produkt koji je stvoren polaznim pulsom oksidira za vrijeme trajanja povratnog pulsa. Anodnu struju proizvodi povratni puls, a katodnu polazni puls. Koncentracija analita koji se nalazi u otopini može se odrediti razlikom tih struja, a identitet analita može se potvrditi potencijalom maksimuma. Dakle, visina vrha proporcionalna je elektroaktivnoj vrsti, a granice detekcije mogu ići i do  $10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>. To ju čini točnom, jednostavnom i brzom metodom za detekciju organskih i anorganskih vrsta u biološkim i farmaceutskim uzorcima.[35,39]

Najveća prednost ove tehnike je velika brzina. Moguće su vrlo brze promjene različitih potencijala zbog toga što frekvencija varira od 1 do 100 ciklusa u sekundi. Na

taj način se skraćuje vrijeme analize i cijeli voltamogram je snimljen u roku nekoliko sekundi.[39]

### 1.4.1.3 MIKROELEKTRODA

Mikroelektroda je elektroda sa najmanje jednom dimenzijom dovoljno malom da su njezina svojstva, npr. prijenos tvari, funkcija veličine. Po definiciji to su elektrode čija je najmanje jedna dimenzija u rasponu između 0,1 do 50  $\mu\text{m}$  odnosno, ovisno o izvedbi mogu biti vrlo male,  $1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ , pa i do  $5 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ . Male dimenzije mikroelektrode dopuštaju da se na elektrodi odvija tzv. „trodimenzionalna“ odnosno sferna difuzija.[45] Najvažnija svojstva mikroelektrode najčešće su:

- jeftina je za obnavljanje i jednostavna za primjenu
- temeljena je na teorijski razjašnjenim principima
- poboljšava kvalitetu eksperimentalnih podataka
- proširuje mjerni raspon eksperimenata
- nalazi upotrebu u brojnim znanstvenim poljima.

Upotreba im je vrlo raširena radi povećane osjetljivosti primjenom „stripping“ voltometrije u analizama, a i dobar su izbor za istraživanje brzih redoks reakcija, nadalje za istraživanje elektrodnih reakcija u otapalima niske provodnosti i mediju bez dodanog elektrolita, te za ispitivanje mehanizma elektrodnih reakcija koji odgovaraju industrijskim elektrokemijskim procesima. Mikroelektrode se koriste i za proučavanje reakcijskih mehanizama i njihove kinetike. Istraživanja reakcijskih mehanizama na mikroelektrodi izvode se velikom brzinom promjene potencijala, korištenjem raznih voltometrijskih metoda, što omogućava da je vrijeme izvedbe mjerenja vrlo kratko, što pogoduje provođenju procesa u stacionarnom stanju. Dakle, moguće je pratiti brze elektrodne procese prijenosa naboja u reakcijama s nestabilnim reaktantima, odnosno produktima. Zbog male površine elektrode smanjena je njezina kapacitivna komponenta (pozadinska struja) i utjecaj elektrolita na mjerenje, što daje mogućnost velikog izbora otapala i elektrolita i provođenje mjerenja bez dodanog elektrolita u otopinama velike otpornosti, kao što su nerazrijeđeni tekući organski spojevi.

## 1.4.2 SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

U spektrofotometrijske metode ubrajaju se:

- emisijska plazma spektrometrija
- emisijska plamena spektrometrija
- atomska apsorpcijska spektrometrija
- atomska fluorescencijska spektrometrija
- rendgenska emisijska spektrometrija
- $\gamma$ -spektrometrija
- ultraljubičasta/vidljiva UV–VIS spektrometrija

## 1.4.3 UV–VIS SPEKTROSKOPIJA

Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija (Slika 10) je spektrofotometrijska tehnika koja mjeri intenzitet svjetlosti u vidljivom (400–800 nm) i ultraljubičastom (10–400 nm) dijelu elektromagnetskog zračenja u funkciji valne duljine. Određuje se količina zračenja apsorbirana od strane analita, odnosno dobiveni spektar predstavlja interakciju UV–VIS elektromagnetskog zračenja i analita. Služi za analizu tvari kao što su farmaceutski, biokemijski, organski i anorganski spojevi. Elektromagnetski val predstavlja širenje elektromagnetskog polja, a opisan je valnom duljinom ( $\lambda$ ), frekvencijom ( $\nu$ ) i udaljenosti dva susjedna vrha. Valna duljina predstavlja udaljenost dviju čestica koje titraju u fazi, a frekvencija broj oscilacija zračenja električnog polja u 1 s. Jedinica za frekvenciju je herc [Hz].[46]

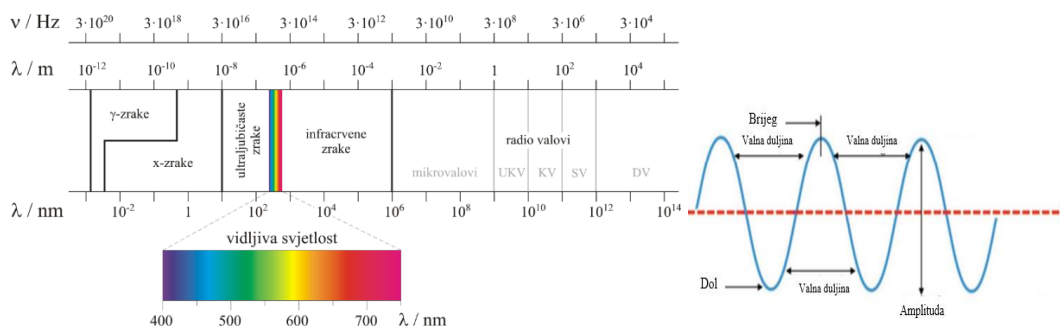
Brzina svjetlosti ( $c$ ) definirana je jednadžbom:

$$c = \nu\lambda \quad (5)$$

Energija zračenja ( $E$ ) kojoj je izložen foton računa se prema jednadžbi:

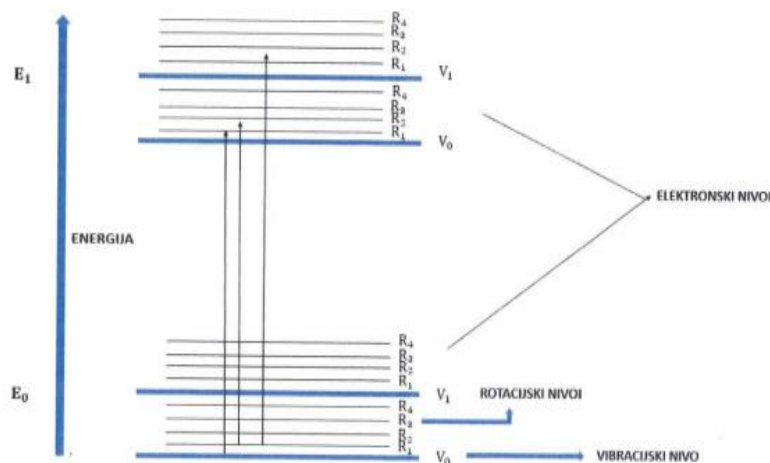
$$E = h\nu = hc/\lambda; \quad (6)$$

gdje je  $h$  – Planckova konstanta.



**Slika 10.** Elektromagnetski spektar i Elektromagnetski val [46]

UV-VIS spektroskopija pruža informacije o elektroničkim prijelazima koji se zbivaju u materijalu.[47] UV-VIS zračenje uzrokuje pobuđivanje valentnih elektrona molekule i dolazi do prijelaza iz nižih u više rotacijske i vibracijske nivoe elektronskog stanja (Slika 11).[46]



**Slika 11.** Shematski prikaz elektronskih prijelaza [48]

Interakcijom fotona i molekule pri kojemu molekula upija energiju zračenja (apsorbira), dolazi do prijelaza molekule iz osnovnog stanja  $E_0$  u pobuđena stanja, tj. stanja više energije.[48] Elektronska konfiguracija iona, atoma, molekula ili kompleksa utječe na apsorpciju zračenja. Količina svjetlosti koja je apsorbirana proporcionalna je količini analita u otopini. Kako se koncentracija analita povećava tako se i linearno povećava apsorpcija svjetlosti, a prijenos svjetlosti se eksponencijalno smanjuje.[46]

Elektroni koji se nalaze u organskoj molekuli mogu biti slabo vezani (zauzimaju  $\pi$  orbitale) i čvrsto vezani (zauzimaju  $\sigma$  orbitale), ili se nalaze kao usamljeni (nepovezani) par. Prema vrsti molekulskih orbitala koje se mijenjaju za vrijeme apsorpcije zračenja postoje sljedeći elektronski prijelazi:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$  i  $\pi \rightarrow$

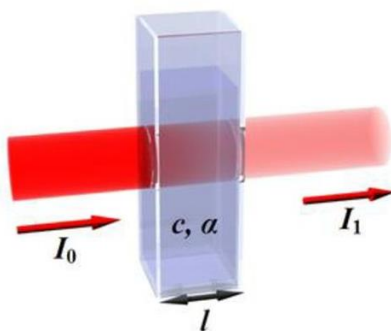
$\sigma^*$ , gdje npr.  $\pi \rightarrow \pi^*$  predstavlja prelazak elektrona iz vezne u protuveznu  $\pi$  orbitalu. Najčešći je prelazak  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$ , jer se nevezni elektroni (koji se nalaze u  $n$  orbitalama) i elektroni u  $\pi$  orbitalama koji tvore dvostruke i trostruke veze lako pobuđuju.[46]

Prema Beer - Lambertovom zakonu (Slika 12) apsorbancija  $A$  može se prikazati kao logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja ( $P_0$ ) i propuštenog zračenja ( $P$ ) kroz uzorak:

$$A = \log(P_0/P) \quad (7)$$

Apsorbancija svjetlosti,  $A$  je proporcionalna molarnom apsorpcijskom koeficijentu  $\epsilon$ , koncentraciji,  $c$  i duljini puta svjetlosti koja prolazi kroz uzorak,  $b$ :

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (8)$$



**Slika 12.** Shematski prikaz Beer – Lambertovog zakona – Smanjenje intenziteta ulaznog zračenja prolazom kroz uzorak kao rezultat apsorpcije elektromagnetskog zračenja [48]

Preuređenjem jednadžbe možemo jednostavno izračunati koncentraciju otopine ispitivane molekule nakon kalibracije poznatih parametara:

$$c = 1/(\epsilon \times b) \times A \quad (9)$$

UV–VIS spektrofotometar upućuje svjetlost kroz otopinu uzorka, a detektor bilježi svjetlost koja je propuštena.[49] U jednosnopnom spektrofotometru jedan snop svjetlosti prolazi kroz kivetu. U tom slučaju potrebno je prvo mjeriti referentnu kivetu koja sadrži samo otapalo te se njom kalibrira spektrofotometar, a zatim kivetu s uzorkom. Konačna apsorbancija dobije se oduzimanjem apsorbancije dobivene mjerenjem s referentnom kivetom od apsorbancije dobivene mjerenjem s uzorkom. Kod dvosnopnog spektrofotometra mogu se istodobno staviti obje kivete, jer se svjetlosni snop dijeli na referentni snop i snop uzorka. Spektri se ne obrađuju naknadno nego je odmah prikazana konačna apsorbancija.[46]

## 2 EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

Sve otopine su pripravljene otapanjem odgovarajuće mase čiste tvari u destiliranoj ili ultračistoj vodi.

Pri izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije i otopine:

<b>Kemikalija</b>	<b>Molarna masa</b>	<b>Koncentracija</b>	<b>Priprema</b>
Dušična kiselina, HNO <sub>3</sub> w(65%)	63,01	0,5 mol dm <sup>-3</sup>	34,84 mL razrijediti do 1 L destiliranom vodom
Sumporna kiselina, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> w(98%)	98,08	3 mol dm <sup>-3</sup>	16,69 mL razrijediti do 100 ml destiliranom vodom
Klorovodična kiselina, HCl w(36%)	36,45	0,1 mol dm <sup>-3</sup>	8,32 mL razrijediti do 100 ml destiliranom vodom
		40 mmol dm <sup>-3</sup>	400 mL 0,1 M HCl nadopuni se s destiliranom vodom do 1000 mL
Octena kiselina, CH <sub>3</sub> COOH	60,05	0,1 mol dm <sup>-3</sup>	5,71 mL razrijediti do 100 mL destiliranom vodom
Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O	358,14	0,1 mol dm <sup>-3</sup>	35,81 g otopiti u 1 L destilirane vode
Vitamin C	176,13	0,01 mol dm <sup>-3</sup>	0,18 g otopiti u 100ml destilirane vode
Kalijev nitrat, KNO <sub>3</sub>	101,10	0,1 mol dm <sup>-3</sup>	10,11 g otopiti u 1 L destilirane vode
Natrijev acetat, trihidrat, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> × 3H <sub>2</sub> O	136,08	0,1 mol dm <sup>-3</sup>	13,61 g otopiti u 1 L destilirane vode
željezov(III) klorid, heksahidrat, FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	162,20	20 mmol dm <sup>-3</sup>	551,60 mg otopiti u 100 mL destilirane vode.
TPTZ-a (2,4,6- tripiridil-s-triazin)	312,30	10 mmol dm <sup>-3</sup>	U 50 mL klorovodične kiseline (40 mmol L <sup>-1</sup> ) otopiti 159,40 mg TPTZ-a.
Otopina škroba, (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>		Zasićena otopina	0,50 g škroba otopiti u 50 mL zagrijane vode.
Natrijev karbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	Zasićena otopina	200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 L
Galna kiselina, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> COOH, C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170,12		
Kalijev jodat, KIO <sub>3</sub>	214,00		
Kalijev jodid, KI	166,00		
Željezov(II) sulfat, heptahidrat, FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	287,55		
Folin-Ciocalteu reagens			

### 2.1.1 Postupak pripreve otopina

*Otopina vitamina C* priprema se svježa neposredno prije mjerenja. Za pripravu uzorka uzima se odvaga od 0,044 g VitC i prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Kako bi se VitC u potpunosti otopio tikvicu na kratko uronimo u ultrazvučnu kupelji u kojoj se nalazi destilirana voda. Pripremljena otopina dalje se koristi za elektrokemijska mjerenja.

*Priprava otopine acetatnog pufera* – Otopina pufera je pripravljena miješanjem 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine octene kiseline i 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine natrijeva acetata, odgovarajućih volumena, do željene pH vrijednosti (pH=4,5)

*Priprava otopine fosfatnog pufera* – Za pripravu otopine potrebno je izmiješati 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine dinatrijevog hidrogenfosfata i 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine natrijevog dihidrogenfosfata, odgovarajućih volumena, do željene pH vrijednosti (pH = 3,6).

*Priprava kalijeva nitrata* – Za pripravu otopine koncentracije 0,1 mol dm<sup>-3</sup> potrebno je izvagati 10,110 g kalijeva nitrata, otopiti ga te kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 1000 mL, te nadopuniti tikvicu do oznake destiliranom vodom.

*Priprava otopine dinatrijevog hidrogenfosfata* – Za pripravu otopine koncentracije 0,1 mol dm<sup>-3</sup> potrebno je izvagati 35,814 g dinatrijevog hidrogenfosfata, otopiti ga, kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 1000 mL te nadopuniti tikvicu do oznake destiliranom vodom.

#### Otopine za određivanje joda titracijom su sljedeće:

*Otopina škroba:* 0,500 g škroba otopiti u 50 mL zagrijane vode.

*Otopina jodida:* 5 g kalijevog jodida (KI) i 0,268 g kalijevog jodata (KIO<sub>3</sub>) otopiti u 200 mL destilirane vode. Dodati 30 mL sumporne kiseline ( $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=3 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Otopinu preliti u odmjernu tikvicu od 500 mL i dopuniti do konačnog volumena od 500 mL.

*Standardna otopina vitamina C:* 0,250 g VitC otopiti u 250 mL destilirane vode da koncentracija otopine bude 1 mg mL<sup>-1</sup>. Otopinu čuvati u zatamnjenoj boci jer je VitC osjetljiv na svjetlo.

#### Otopine za određivanje ukupnih fenola su sljedeće:

*Folin–Ciocalteu reagens:* Kupljen kao gotova već pripravljena kemikalija.



*Zasićena otopina natrijeva karbonata;  $w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$ : Otopiti 200 g bezvodnog natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) u 1 L vode kuhanjem. Ohladiti na sobnoj temperaturi uz dodatak nekoliko kristala natrijeva karbonata i filtrirati nakon 24 sata.*

*Priprema otopine standarda za određivanje fenola: U tikvici od 100 mL otopiti 0,500 g prethodno osušene galne kiseline Tikvicu nadopuniti destiliranom vodom do oznake.*

Otopine za FRAP metodu su sljedeće:

*Acetatni pufer;  $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 3,6: Otopiti 3,100 g  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  i 16 mL  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  u odmjerne tikvici od 1 L s destiliranom vodom.*

*Otopina TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin);  $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ : U 50 mL klorovodične kiseline otopiti 159,400 mg TPTZ-a.*

*Klorovodična kiselina;  $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol L}^{-1}$ : 400 mL 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl nadopuni se s destiliranom vodom do 1000 mL*

*Otopina željezova(III) klorida;  $c(\text{FeCl}_3) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ : Otopiti 551,600 mg željezo(III) klorida ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) u 100 mL destilirane vode.*

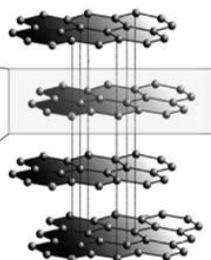
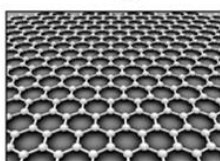
*Matična otopina Trolox standarda: Matična otopina standarda pripravljena je otapanjem Troloxa. Od matične otopine pripravljene su otopine s različitim koncentracijama od 100–1000  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ .*

*FRAP reagens pripremljen je od 25 mL acetatnog pufera, 2,500 mL TPTZ otopine i 2,500 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ .*

## 2.1.2 Priprava radne elektrode – mikroelektroda od lista pirolitičkog grafita

Grafen (Slika 13) čini jedan sloj ugljika koji je čvrsto vezan u heksagonalnu strukturu. Predstavlja altropsku modifikaciju ugljika kod kojeg su atomi vezani u obliku  $\text{sp}^2$  ravnine, a čija duljina kovalentne veze između molekula iznosi 0,142 nm. Povezivanjem slojeva grafena van der Waalsovima nastaje grafit, čiji je međuplanarni razmak 0,335 nm.

kovalentna veza između  
molekula ugljika u  
heksagonu  
 $\text{sp}^2$  ravnine  
Duljina veze ~0,142 nm



van der Waalsove veze među slojevima  
međuplanarni razmak 0,335 nm

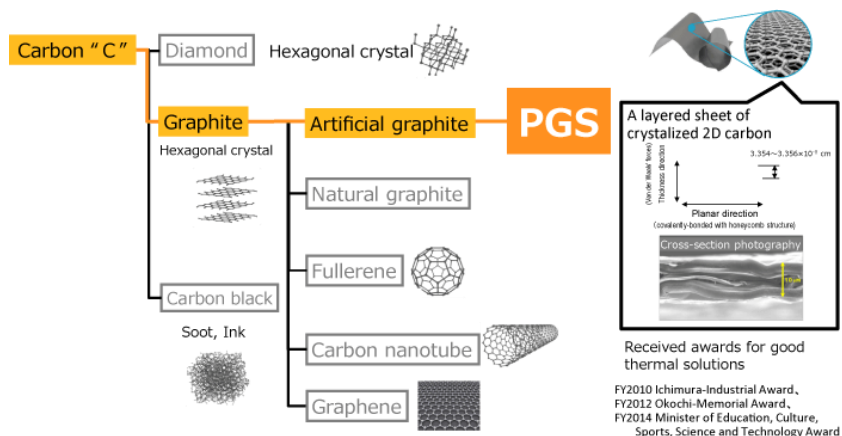
### ***Slika 13. Struktura i Slojevi grafena povezani u grafit.***

Grafen je najlakši poznati materijal (u 1 kvadratnom metru ima težinu 0,77 miligrama), najbolji vodič topline pri sobnoj temperaturi i najbolji provodnik električne energije. S debljinom od jednog atoma predstavlja najtanji spoj koji je poznat čovjeku te najjači otkriveni spoj (100–300 puta jači od čelika). Također ima sposobnost pohrane velike količine energije. Ova svojstva čine grafen održivim i ekološkim rješenjem za neograničen broj primjena.

Geim i Novoselov su uspjeli grafen odvojiti od metalne ploče na kojoj se „uzgaja“ koristeći običnu ljepljivu traku, a ploču je moguće ponovo koristiti beskonačan broj puta. To je najjednostavnija metoda proizvodnje grafena iz grafita mehaničkim pilingom tijekom kojeg se savladaju van der Waalove sile koje drže zajedno slojeve grafena. Za masovnu proizvodnju grafena koristi se skup i složen proces – taloženje kemijskim parama (*eng. chemical vapour deposition (CVD)*). U procesu se za taloženje jednog sloja grafena koriste otrovne kemikalije izlaganjem materijala parama nikla, platine, benzena ili etilena pri visokim temperaturama.[50] Još jedna metoda masovne proizvodnje moguća je toplinskom ili kemijskom redukcijom grafitnog oksida (GO).[51]

Grafen je privukao veliku pozornost za primjenu u znanstvenim disciplinama posebice izradi magnetskih, kemijskih i biosenzora, nanoelektronici i fotodetektorima. U sensorima djeluje kao osjetilni sloj, pruža izvrsnu toplinsku i električnu vodljivost, kompaktnost, odličnu mehaničku čvrstoću i potencijalno nisku cijenu. Grafen i elektrode koje su modificirane grafenom pokazuju odlične performance u elektrokemiji enzima, veliku osjetljivost i selektivnost, te mogućnost elektrokemijske detekciju molekula zbog čega prikazuju veliki interes u primjeni u elektroanalitici.[50]

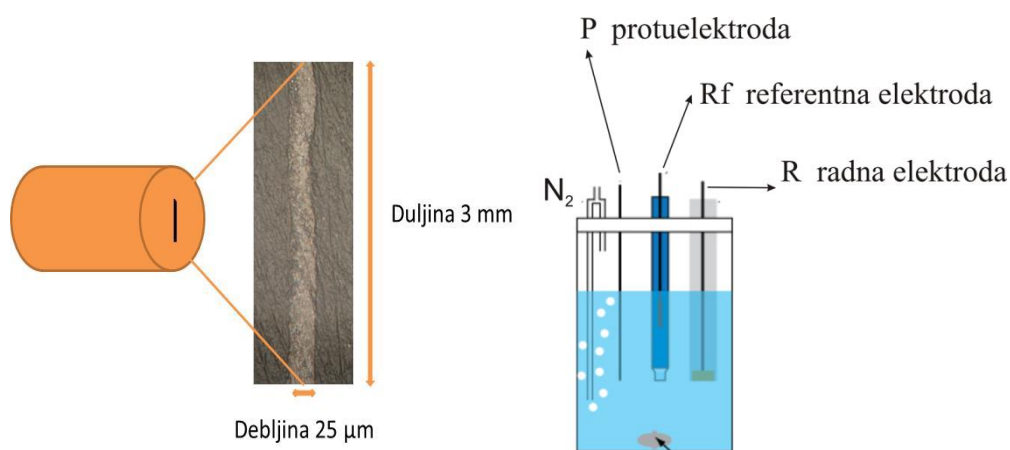
U ovom radu izrađena je mikroelektroda od presjeka grafenskog lista, čija je konačna osjetilna površina bila duljine 3 mm i širine 25  $\mu\text{m}$ . U presjeku lista od 25  $\mu\text{m}$  nalazi se približno 75000 grafenskih ploha. Površina mikroelektrode iznosila  $7,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ . Pirolitički grafenski list korišten za njenu izradu (*PGS – Pyrolytic Graphite Sheet – Panasonic EYGS121803 Thermal Interface Products*) (Slika 14) je sintetički izrađen od visoko orijentiranog grafitnog polimernog filma, vrlo tanak i lagan s izvrsnom toplinskom vodljivošću. Materijal je izuzetno fleksibilan i može se jednostavno rezati u prilagodljive oblike. Gustoća PGS od  $1,90 \text{ g/cm}^3$ , toplinska vodljivost od  $1600 \text{ W/(mK)}$ , električna provodljivost približno  $20000 \text{ S/cm}$ , egzistencijalna snaga od  $30,0 \text{ MPa}$ , koeficijent ekspanzije jednak  $9,3 \times 10^{-7} \text{ 1/K}$ , te toplinska otpornost do  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  čine ga izvrsnim materijalom za izradu elektroničkih sklopova.[52]



**Slika 14.** Shema dobivanja PGS [52]

Presjek PGS elektrode je dao mikroelektrodu izlivenu u tijelu od epoksidne smole, s osjetilnom površinom od  $7,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  (Slika 15).

Neposredno prije mjerenja provedena je mehanička obrada površine elektrode u svrhu postizanja njezine jednolične površine. To uključuje brušenje brusnim papirima različite finoće, te poliranjem s prahom aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) česticama promjera 1,0 i 0,05  $\mu\text{m}$ . Nakon pravilnog brušenja i poliranja elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom, osušiti i pravilno postaviti na mjesto u elektrokemijskoj ćeliji. Elektroda je elektrokemijski aktivirana u 0,5 mol  $\text{dm}^{-3}$  dušičnoj kiselini u rasponu potencijala izlučivanja vodika i kisika.



**Slika 15.** Tijelo radne elektrode i shema aparature za elektrokemijska mjerenja. R – radna elektroda, R<sub>f</sub> – referentna elektroda, P – protuelektroda.

### 2.1.3 Priprema ćelije za elektrokemijsko mjerenje

Za elektrokemijska mjerenja korištena je ćelija volumena 50 mL, konusnog oblika, koja se neposredno prije mjerenja dobro ispere redom kako je navedeno: vodovodnom vodom, destiliranom vodom, 0,5 mol dm<sup>-3</sup> dušičnom kiselinom i redestiliranom vodom.

U ćeliju se ulije 50 mL određenog elektrolita, te se spoje elektrode (radna, referentna Ag/AgCl i protuelektroda), ubaci se magnetno miješalo, uključi propuhivanje elektrolita dušikom, te se ćelija spoji na strujni krug i upali se računalno. Nakon 10 min propuhivanja, dušik se namjesti na položaj iznad elektrolita, kako bi se osigurala inertna atmosfera i ćelija je spremna za elektrokemijsko mjerenje.

PGS elektroda priređena je i optimirana za određivanje VitC u realnim uzorcima, odnosno u biljnom materijalu.

### 2.1.4 Priprema realnih uzoraka – biljni materijal

Drugi cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj različitih dodataka “zelenog” biootpada na rast, razvoj i na sadržaj bioaktivnih spojeva: VitC, fenolne spojeve prikazane kroz antioksidacijsku aktivnost. Za potrebe istraživanja korišteno je sjeme rikole *Rukola naturelle* – ROYAL SEEDS.

Navedena povrtna vrsta sijana je ručno u biorazgradivim kartonskim kontejnerima u 6 različitih supstrata (Slika 16), gdje je 1/2 zemlje zamijenjena mješavinom određenog biootpada i zemlje u omjeru 1:1. Odabrani biotoad je: ljuska od kikirikija, kora banane i kivija, usitnjeni papirnati ručnici, usitnjena ljuska jaja, talog od kave, te je šesti supstrat bio referentni, odnosno zemlja bez dodataka. Klijanje rikole provedeno je u zatvorenom prostoru s konstantnom temperaturom, dok je period rasta trajao tri tjedna na otvorenom prostoru. Nakon tog perioda biljke su rezane do razine zemlje, te im je istog dana određen sadržaj VitC, ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost.



*Slika 16. Rast rikole u biorazgradivim kartonskim kontejnerima*

Realni uzorci su priređeni ekstrakcijom 2 g biljnog materijala u 20 mL redestilirane vode ili 10 g biljnog materijala u 100 mL redestilirane vode, odnosno u omjeru 1:10 (Slika 17).



*Slika 17. Pripremljeni realni uzorci*

## 2.2 METODE

### 2.2.1 Elektrokemijska mjerenja

Korištena je elektrokemijska ćelija sa 3 elektrode:

- Ag/AgCl elektroda kao referentna,
- platinska pločica kao protuelektroda,
- PGS elektroda

Sva mjerenja su provedena potencijostatom (Autolab PGSTAT 302N) koji je spojen na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4.9 Softwarea (Eco Chemie) (Slika 18). Pri radu koristili smo i pH-metar, analitičku vagu (Mettler, AT261) i magnetsku miješalicu (MSH-20A).



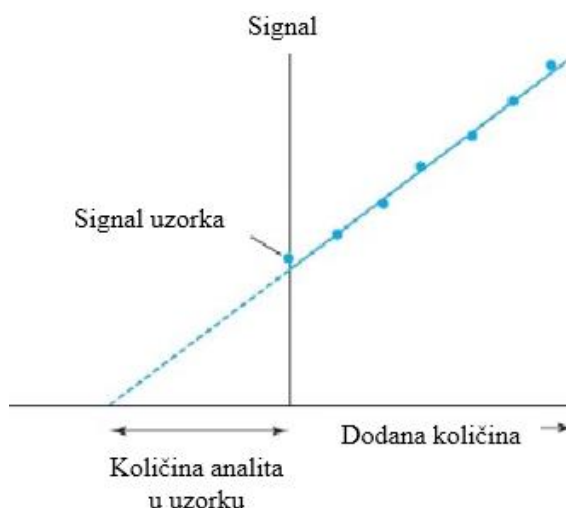
*Slika 18. Elektrokemijska ćelija sa postavljnim elektrodama (lijevo) i potencijostat sa računalom (desno).*

Svojstva PGS elektrode prvo su ispitana u različitim elektrolitima metodom cikličke voltametije s brzinom promjene potencijala 25 mV/s, te je nakon odabira pogodnog elektrolita praćena redoks reakcija do koje dolazi dodatkom otopine VitC. Osnovna otopina VitC pripravljena je svježe svaki dan, neposredno prije izvođenja mjerenja.

Uvjeti mjerenja za pravokutnovalnu voltometriju su prvo optimirani obzirom na frekvenciju, visinu impulsa, povećanje potencijala (smik) ( $f$ ,  $\Delta E_p$  i  $\Delta E_s$ ), te su zatim snimani voltamogrami u području promjene potencijala od  $-0,3$  do  $0,8$  V.

U ovom radu elektrokemijski je određivana koncentracija VitC metodom standardnog dodatka (Slika 19). Kod metode standardnog dodatka prvo se mjeri signal analita koji se nalazi u uzorku. Nakon što se doda određena količina analita, dodaje se standardna otopina, a koncentracija analita i signal trebaju biti u linearnom odnosu.

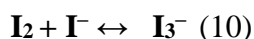
Svakim novim dodavanjem standardne otopine analita postižemo veću preciznost i odbacujemo ili potvrđujemo pretpostavku linearnog odnosa odziva i koncentracije. Ukoliko koncentracija nakon prvog dodatka odgovara dvostrukoj koncentraciji analita koji se nalazi u uzorku postižu se najprecizniji rezultati. Metoda je vrlo korisna za uzorke čija je koncentracija analita u uzorku u blizini granice određivanja ili ako na određivanje analita postoji značajan utjecaj matrice. Metodom standardnog dodatka prevladana su upravo ova ograničenja.



*Slika 19. Grafički prikaz metode standardnog dodatka.*

## 2.2.2 Određivanje vitamina C titracijom s otopinom jodida

Jedan od načina utvrđivanja količine VitC u voću, voćnim sokovima i povrću je titracija uz korištenje otopine jodida. Jod je relativno netopiv, međutim njegovim kompleksiranjem s jodidnim ionima u trijodidni oblik to svojstvo se poboljšava.



Trijodidni ioni oksidiraju VitC i prelaze u jodidne ione. Kada se sav VitC oksidira, jod i trijodidni ioni ostaju prisutni u smjesi i reagiraju sa škrobom u obliku kompleksa plavo–crne boje koji ujedno predstavlja krajnju točku titracije.



Prvo se u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL pipetira 25 mL standardne otopine VitC, doda 10 kapi otopine škroba i titrira smjesu otopinom jodida. Titracija je završena kada pojava plavo–ljubičaste boje traje duže od 20 sekundi pri stalnom miješanju otopine.

Postupak se ponovi tri puta. Zatim se 25 mL otopine uzorka prebaci u tikvicu i titrira s otopinom jodida do plavo–ljubičaste boje koja mora biti postojana 20 sekundi. Postupak se ponovi tri puta.

Sadržaj VitC u voću i povrću računa se prema jednadžbi:

$$C \text{ (g/25 mL)} = (V \times 0,25) / S \text{ (12)}$$

$C$  – g VitC u 25 mL uzorka

$V$  – volumen otopine jodida utrošen za titraciju uzorka (mL)

$S$  – volumen otopine jodida utrošen za titraciju standardne otopine VitC (mL)

Računom se dobije količina VitC u 25 mL uzorka! Za naše uzorke rezultat smo pomnožili sa 4, da se dobije količina VitC u 100 mL otopine, tj. u 10 g uzorka, odnosno rezultat smo množili s 40 kako bi se dobila količina VitC u 100 g uzorka sirove rikole.

### 2.2.3 Spektrofotometrijska mjerenja

Za spektrofotometrijska mjerenja korišten je spektrofotometar Cary 5000 UV–Vis–NIR *Agilent Technologies* (Slika 20 lijevo) i Vernier UV-VIS Spektrofotometar (Slika 20 desno).



**Slika 20.** Spektrofotometar Cary 5000 UV–Vis–NIR *Agilent Technologies* i Vernier UV–VIS Spektrofotometar

Spektrofotometrijski su određivani ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet. Uzorak se stavlja u kivete koje mogu biti načinjene od kvarca, plastike ili stakla koji ne apsorbira valnu duljinu, odnosno proziran je za UV–VIS valno područje. Kivete su posebno dizajnirane za spektrofotometrijsku analizu, a postoje u različitim veličinama i oblicima. Prije obavljanja analize potrebno ih je temeljito očistiti jer ne smiju sadržavati nečistoće koje mogu utjecati na spektroskopsko očitavanje.[45]

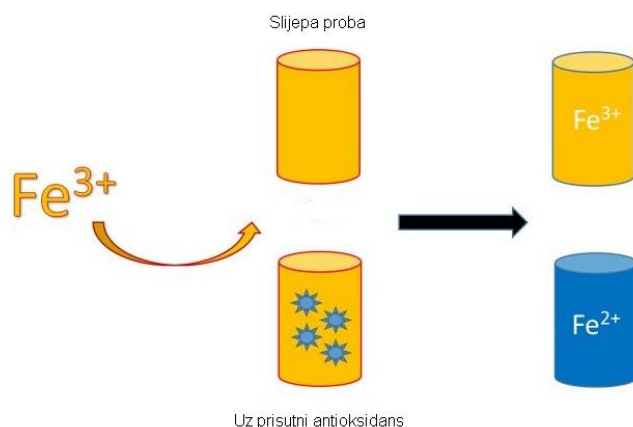
*Određivanje ukupnih fenola* – Ukupni fenoli određuju se metodom po Folin–Ciocalteu. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa



dodatkom Folin–Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Nereducirani Folin–Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Intenzitet obojenja mjeri se određivanjem apsorbancije pri 765 nm u odnosu na slijepu probu.

*Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom* – FRAP (Ferric reducing/Antioxidant power) je jednostavni direktni test antioksidacijske aktivnosti. Ova metoda je inicijalno razvijena da bi se odredila antioksidacijska aktivnost krvne plazme, ali se može koristiti i za određivanje antioksidacijskog djelovanja drugih uzoraka (npr. ekstrakti biljaka).

Neenzimski antioksidansi (npr. VitC) mogu se smatrati reducensima koji mogu inaktivirati oksidanse. To je redoks reakcija u kojoj je neka reaktivna vrsta (slobodni radikal) reducirana na račun oksidacije nekog drugog spoja. Antioksidacijska aktivnost je sposobnost reduciranja, a kod FRAP metode koristi reducense u redoks – kolorimetrijskoj reakciji „angažirajući“ oksidans koji se lako reducira (Slika 21).



**Slika 21.** Shema FRAP metode :  $Fe^{3+}$  – TPTZ (žuto obojenje) reducira se do  $Fe^{2+}$  – TPTZ (nastaje plavo obojenje)

Pri niskim pH ioni  $Fe^{3+}$  se reduciraju do iona  $Fe^{2+}$  koji apsorbiraju svjetlo kod valne duljine 593 nm.

FRAP reagens pripremljen je od 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ otopine i 2,5 mL  $FeCl_3 \times 6 H_2O$ . 1,5 mL pripremljenog reagensa se stavlja u kivetu od 10 mm i očita apsorbancija reagensa kod 593 nm ( $A_0$ ). Nakon toga se u kivetu doda 50  $\mu$ L uzorka i 150  $\mu$ L destilirane vode i prati promjena apsorbancije kod 593 nm tijekom 4 minute. Stvara se plavo obojenje. Nakon 4 minute očita se apsorbancija i za svaki uzorak izračuna promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) prema jednadžbi:

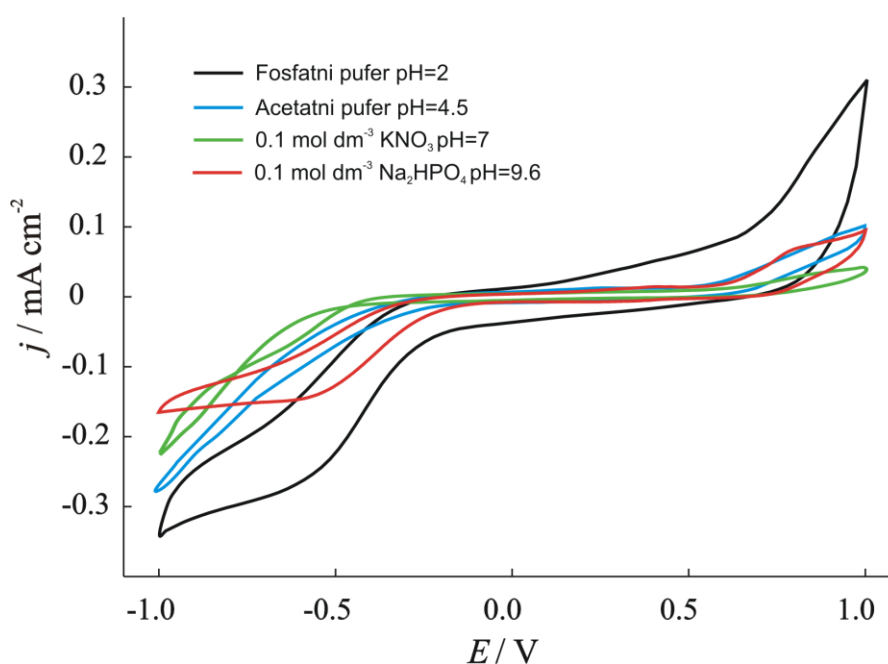
$$\Delta A = A - A_0 \quad (13)$$

Promjena apsorbancije uzorka usporedi se s promjenom apsorbancije izazvane dodatkom standardne otopine Troloxa i izračuna FRAP vrijednost prema jednadžbi pravca.

### 3 REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1 Rezultati i rasprava cikličke voltametrije

Na samom početku istraživanja, snimljeni su ciklički voltamogrami PGS elektrode u različitim elektrolitima. Rezultati su prikazani na Slici 22. Ciklički voltamogrami snimani su redom u navedenim elektrolitima (svi elektroliti su množinske koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u čistoj otopini fosfatnog pufera pH=2, acetatnog pufera pH=4,5, te u otopinama  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{KNO}_3$  s brzinom promjene potencijala od  $25 \text{ mVs}^{-1}$ .

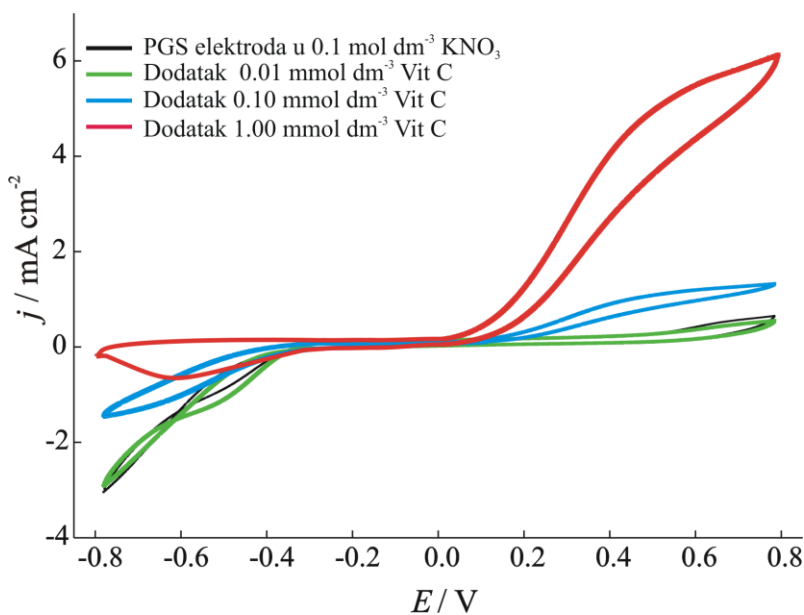


*Slika 22. Odziv elektrode od grafitnog lista (PGS elektrode) u različitim otopinama elektrolita.*

Snimljeni ciklički voltamogrami prikazani na Slici 22 pokazuju porast katodne i anodne struje pri potencijalima negativnijim od  $-0,2 \text{ V}$  i pozitivnijim od  $0,6$  za sve odabrane elektrolite u danim uvjetima. Najveće pozadinske struje snimljene na PGS elektrodi primijećene su u otopini fosfatnoga pufera. Iz oblika cikličkih voltamograma može se zaključiti kako su reakcije elektrodnog materijala nepotpune u fosfatnom puferu pri pH=2. Anodna grana ukazuje na oksidaciju PGS elektrode, što za posljedicu ima stvaranje skupina s kisikovim atomima – hidrokso, karboks ili keto skupina. U otopini  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anodna i katodna reakcija, također kataliziraju reakcije elektrodnog materijala uz najveću potpunost reakcija, kako anodne tako i katodne. Kinetika katodne reakcije razvijanja vodika kontrolirana je sastavom elektrolita i kinetičkim parametrima i ovisi o

difuziji vrsta k elektrodi, te je iz snimljenih voltamograma vidljivo da je pri vrlo negativnom potencijalu ( $-1,0$  V) upravo reakcija razvijanja vodika promatrana reakcija. Redukcija elektrodnog materijala pri potencijalu približno  $-0,5$  V karakteristična je za sve promatrane elektrolite. Ovaj porast katodnih struja je različit za različite pufere. One se mogu pripisati simultanim katodnim reakcijama izlučivanja vodika (HER) i redukciji oksidiranih vrsta iz anodnog ciklusa.

Daljnja mjerenja za određivanje VitC provedena su također u svim odabranim elektrolitima, ali je za prikaz i primjenu odabrana otopina  $\text{KNO}_3$  kao pogodan elektrolit. Elektrokemijska svojstva VitC su prvo proučavana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od  $-0,8$  V do  $0,8$  V s Ag/AgCl referentnom elektrodom. Na Slici 23. prikazan je ciklički voltamogram VitC, snimljen s promjenom potencijala  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , u širokom području potencijala.

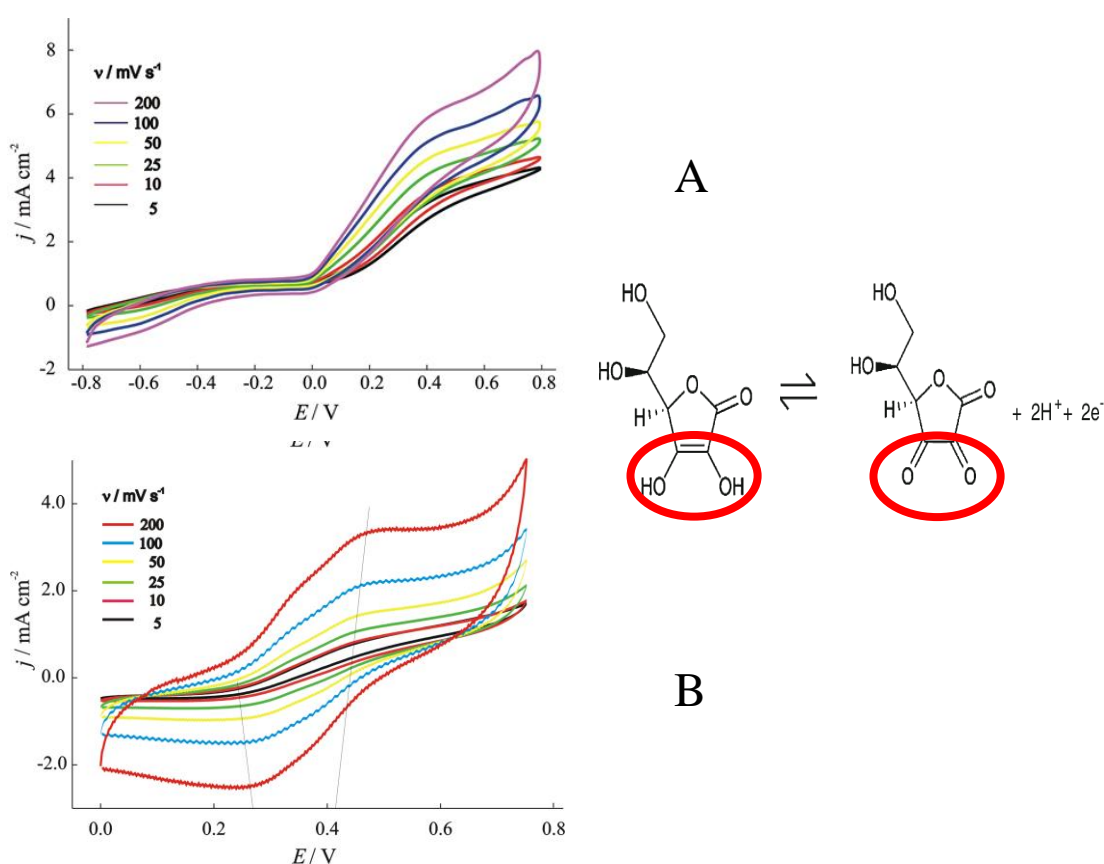


**Slika 23.** Ciklički voltamogram otopine VitC u otopini  $\text{KNO}_3$  koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  pri brzini promjene potencijala,  $v = 25 \text{ mV/s}$ .

Na cikličkom voltamogramu je vidljiv jedan anodni strujni vrh pri potencijalu,  $E_a = 0,45$  V, koji odgovara oksidaciji askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu. Kao što se može zamijetiti pri većoj koncentraciji VitC i s odabranom brzinom snimanja reakcija oksidacije je nepotpuna i odvija se usporedno s oksidacijom elektrodnog materijala. Katodni vrh pri danim uvjetima nije zapažen niti pri najvećoj koncentraciji VitC, što sugerira ireverzibilnu reakciju, a što nije u skladu s literaturnim podacima za redoks reakciju askorbinske/dehidroaskorbinske kiseline.

U svrhu razjašnjavanja mehanizma oksidacije VitC snimljeni su ciklički voltamogrami u širem i užem području potencijala, prikazani na slici 23A i 23B uz različite brzine promjene.

Kao što se može uočiti na slici 24A, katodna reakcija koja se odvija na elektrodnom materijalu, odnosno na negativnijim potencijalima čini oksidaciju VitC ireverzibilnom reakcijom. Sužavanjem područja potencijala i pravilnim odabirom uvjeta snimanja, odnosno odabirom katodne granice (Slika 24 B) uočen je i katodni vrh koji odgovara kvazireverzibilnoj reakciji redukcije dehidroaskorbinske u askorbinsku kiselinu.[53,54]



**Slika 24.** Ciklički voltamogrami otopine vitamina VitC  $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  u otopini  $\text{KNO}_3$  koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  pri različitim brzinama promjene potencijala, snimljeni u širem (A) i užem (B) području potencijala

U cikličkom voltamogramu je vidljiv jedan anodni predpik koji sugerira moguću adsorpciju VitC na površinu PGS elektrode i anodni strujni vrh pri potencijalu,  $E_a = 0,41 \text{ V}$ , koji odgovara oksidaciji askorbinske kiseline, a dobiven je ekstrapolacijom linearne ovisnost potencijala o brzini snimanja. Na voltamogramu se može uočiti jedan katodni vrh pri potencijalu  $E_k = 0,27 \text{ V}$  koji odgovara redukciji dehidroaskorbinske kiseline u

askorbinsku kiselinu. Dobivena vrijednost  $\Delta E_p$  iznosi približno 140 mV što ukazuje na kvazireverzibilnu reakciju i transport 2 elektrona. [53,54]

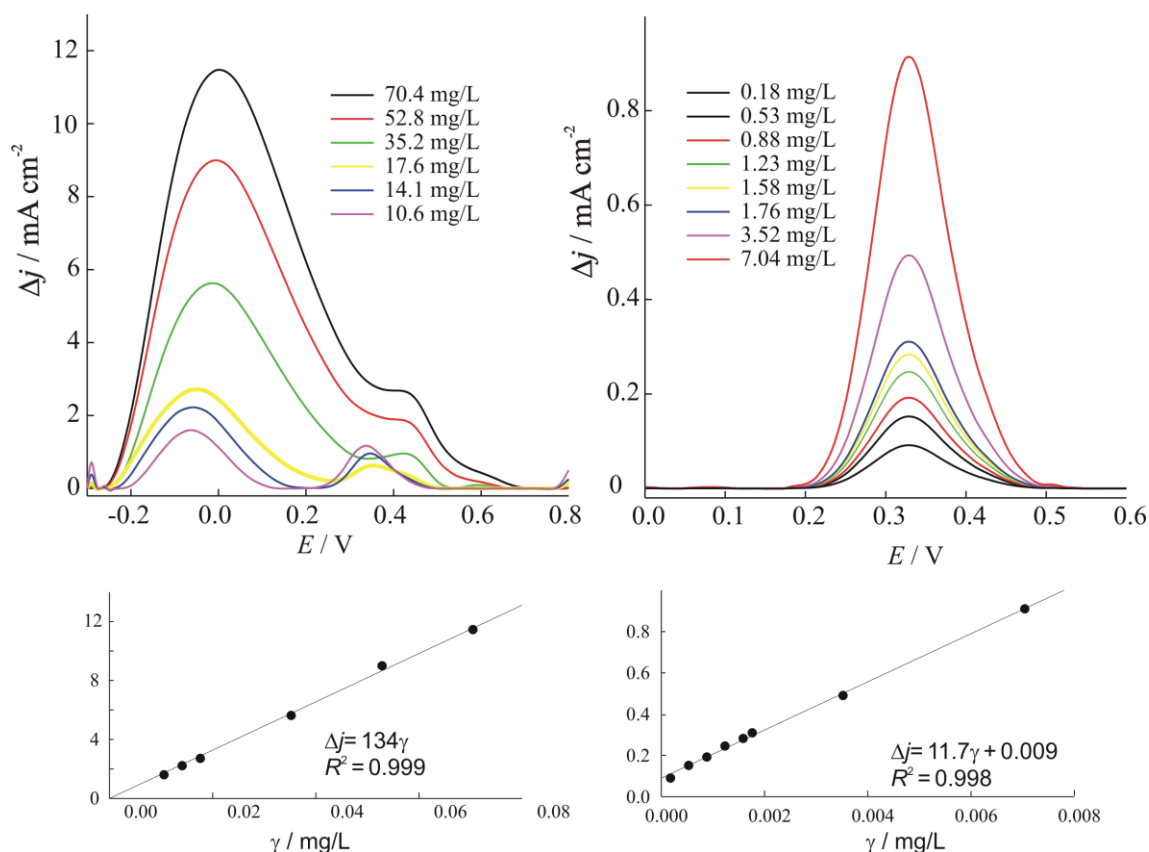
Kao što je prikazano na Slici 24B, jakosti struje oba strujna vrha, anodnog i katodnog, povećavaju se kada se povećava brzina promjene potencijala. Dobivena je i ovisnost visine strujnih vrhova o brzini promjene potencijala i njegovom korijenu pri koncentraciji 0,5 mmol dm<sup>-3</sup>. Prema literaturi linearna korelacija između struje anodnog vrha i drugog korijena brzine promjene potencijala dobivena primjenom Randles–Ševčikove jednadžbe pokazuje da je i primjenom PGS elektrode oksidacija VitC difuzijski kontroliran proces. [56]

### 3.2 Rezultati i rasprava pravokutnovalne voltametrije

Nakon optimizacije sustava, uvjeti su sljedeći: Odabrani elektrolit je 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopina KNO<sub>3</sub>, dok je izabrani potencijal akumulacije  $E_{acc} = -0,300$  V, a vrijeme akumulacije  $t_{acc} = 120$  s, s tim da je 60 s uz miješanje elektrolita, te 60 s vrijeme uravnoteženja u mirnom elektrolitu. Područje snimanja je od -0,30 do 0,80 V, s frekvencijom potencijalnog skeniranja ( $f$ ) od 8 Hz, visinom impulsa ( $\Delta E_p$ ) od 200 mV i povećanjem potencijala ( $\Delta E_s$ ) od 5 mV.

Uz ove uvjete osigurali smo dobar odziv elektrode, visoku osjetljivost i reproducibilnost mjerenja.

Rezultati SWV u prisutnosti različitih koncentracija, odnosno različitih dodataka standardne otopine VitC, prikazani su na Slici 25, s odgovarajućim grafikonima umjeravanja kao ulomcima. Voltamogrami su dobiveni metodom standardnog dodatka. Grafikoni umjeravanja dobiveni su oduzimanjem pozadinske struje iz odgovarajućih voltamograma. Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata dobivena su dva različita linearna područja obzirom na koncentraciju prisnog analita. Za područje niže koncentracije, od 0,18 do 7,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ , osjetljivost je 11,7  $\mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, dok je za područje više koncentracije, od 10,6 do 70,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , osjetljivost 134  $\mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije. Linearnost oba koncentracijska područja je izvrsna ( $R^2 = 0,998$  i  $0,999$ ).



**Slika 25.** SW voltamogrami s osnovnom korekcijom, zabilježeni na PGS elektrodi u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  uz sukcesivno dodavanje VitC s odgovarajućim grafikonima umjeravanja kao ulomcima

Usporedbom različitih koncentracijskih područja uočena je i promjena u mehanizmu oksidacije VitC. Za više koncentracijsko područje pojava drugog oksidacijskog strujnog vrha pomaknuta u odnosu na niže koncentracijsko područje u katodnom smjeru, pri potencijalu približno  $-0,05 \text{ V}$  sugerira promjenu mehanizma, te se može zaključiti kako je izmjena elektrona olakšana za uzorke s većom koncentracijom VitC. Ova pojava nije utjecala na linearnu ovisnost koncentracije o visini strujnog pika. Sam oblik voltamograma sugerira o kojem koncentracijskom području je riječ.

### 3.3 Analiza realnih uzoraka

#### 3.3.1 Karakteristike biljnog materijala

Nakon provedenih predmjerenja pristupili smo određivanju VitC u realnim uzorcima.

Odabrani dodaci zelenog biootpada (Slika 26) su sljedeći:

1. Ljuske kikirikija doprinose **prozračivanju tla i zadržavanju vode**.
2. Papirnati ručnici – pomaže u **prozračivanju** tla i poboljšanju sposobnosti za održavanje biljnog života
3. Kora od banane i kivija – najveći izvor **kalija** u prehrani ne samo ljudi već i biljaka je upravo kora od banane. Kalij u biljci ima značajnu ulogu u aktivaciji enzima i regulaciji propusnosti staničnih membrana. Biljke dobro opskrbljene kalijem otporne su na posljedice suše i bolesti. Kivi kao jedan od citrusa pruža biljci prirodnu zaštitu od štetočina.
4. Talog kave promiče plodnost tla i poboljšanja cjelokupno zdravlje biljke zahvaljujući velikom udjelu **dušika**.
5. Ljuske jaja se brzo razgrađuju, a kako su bogate **kalcijem i mineralima**, pomoći će mikroorganizmima da biootpad bolje prerade i obogate zemlju kalcijem. Obzirom na navedeno za očekivati je kako će rezultati utjecaja ljuske jaja biti vidljiviji nakon duljeg vremena rasta.



*Slika 26. Odabrani dodaci biootpada i rikola.*



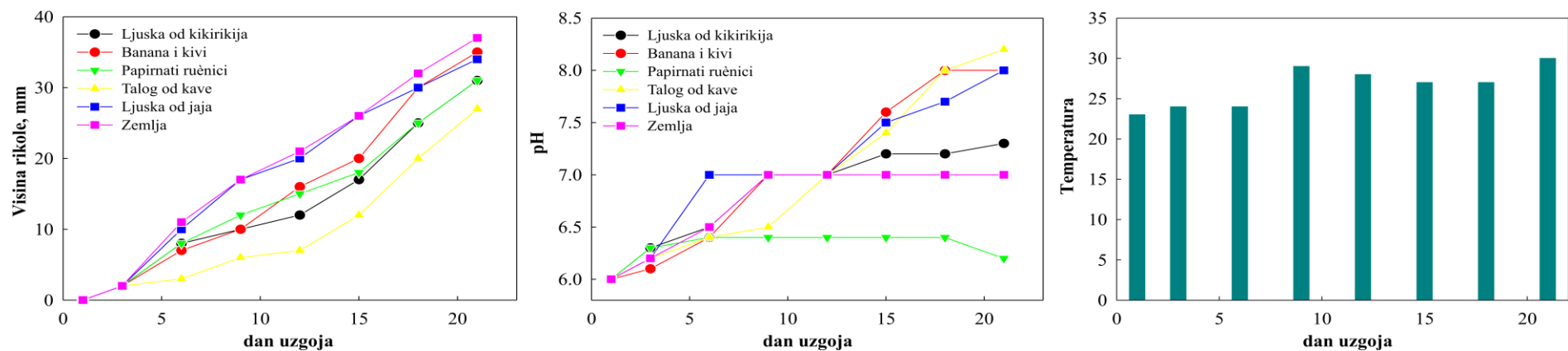
Biljni materijal, rikola (*Eruca sativa*) nakon tri tjedna uzgoja na otvorenom prostoru tijekom svibnja, rezana je do nivoa zemlje, te su joj prvo procijenjene vizualne karakteristike (boja i izgled biljke), te su rezultati prikazani u Tablici 1 i na Slici 27, zajedno s praćenim pH procjedne zemlje i temperaturom okoline.

Uvidom u Tablicu 1 možemo uočiti kako su biljke uzgojene na supstratima uz dodatak banane i kivija te ljuske jaja narasle do skoro iste visine kao i bez dodataka. Biljke uzgojene na supstratima uz dodatak ljuske od kikirikija, taloga kave i ljuske od jaja bile su zdravijeg izgleda u odnosu na rikolu uzgojenu na supstratu uz dodatak kuhinjskih ručnika. Razlog je najvjerojatnije u dodatku izbjeljivača koji se koristi u papirnoj industriji.

Biljka uzgojena na supstratu uz dodatak taloga kave pokazala je nešto viši pH procjedne zemlje, odnosno dodatak taloga od crne kave čini zemlju blago alkalnom. Nadalje, boja biljke je bila tamnozeleno s primjesom ljubičaste, te je mogući zaključak kako talog kave doprinosi rastu sadržaja pigmenta antocijanina ljubičaste boje koji mijenja boju ovisno o pH.

Tablica 1. Utjecaj dodatka „zelenog” biootpada na rast rikole i pH supstrata – nakon tri tjedna uzgoja na otvorenom.

	Ljuska od kikirikija			Banana i kivi			Papir			Talog od kave			Ljuska od jaja			Zemlja		
	h mm	t °C	pH	h mm	t °C	pH	h mm	t °C	pH	h mm	t °C	pH	h mm	t °C	pH	h mm	t °C	pH
<b>1. dan</b>	0	23	6,0	0	23	6,0	0	23	6	0	23	6,0	0	23	6,0	0	23	6,0
<b>3. dan</b>	2	24	6,3	2	24	6,1	2	24	6,3	2	24	6,2	2	24	6,2	2	24	6,2
<b>6. dan</b>	8	24	6,5	7	24	6,4	8	24	6,4	3	24	6,4	10	24	7,0	11	24	6,5
<b>9. dan</b>	10	29	7,0	10	29	7,0	12	29	6,4	6	29	6,5	17	29	7,0	17	29	7,0
<b>12. dan</b>	12	28	7,0	16	28	7,0	15	28	6,4	7	28	7,0	20	28	7,0	21	28	7,0
<b>15. dan</b>	17	27	7,2	20	27	7,6	18	27	6,4	12	27	7,4	26	27	7,5	26	27	7,0
<b>18. dan</b>	25	27	7,2	30	27	8,0	25	27	6,4	20	27	8,0	30	27	7,7	32	27	7,0
<b>21. dan</b>	31	30	7,3	35	30	8,0	31	30	6,2	27	30	8,2	34	30	8,0	37	30	7,0
<b>BOJA i IZGLED BILJKE</b>	Tamno zelena  Zdrava biljka			Zelena boja  Zdrava biljka			Svijetlo zelena  Slabije razvijena biljka			Zelena ljubičasta  Zdrava biljka			Tamno zelena  Zdrava biljka			Tamno zelena  Zdrava biljka		

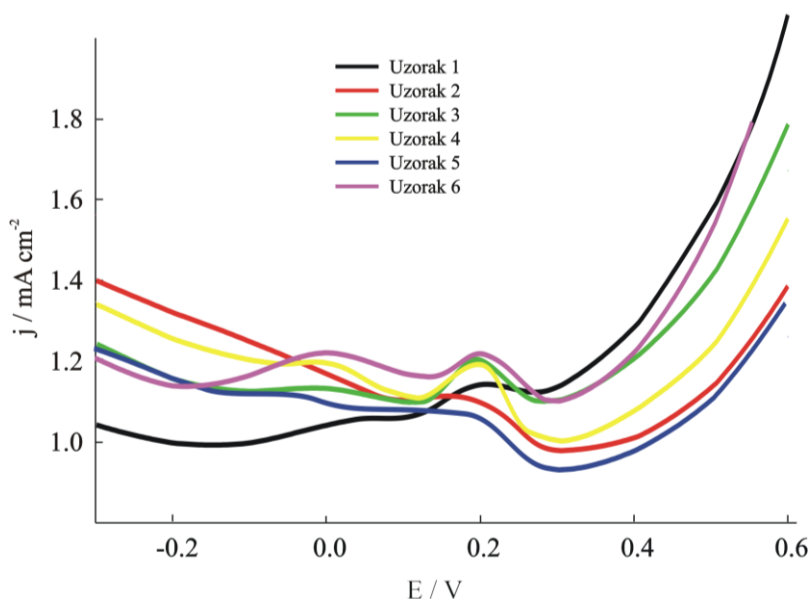


Slika 27. Grafički prikaz karakteristika rikole i uvjeta rasta nakon tri tjedna uzgoja na otvorenom.

### 3.3.2 Rezultati određivanja VitC pravokutnovalnom voltametrijom

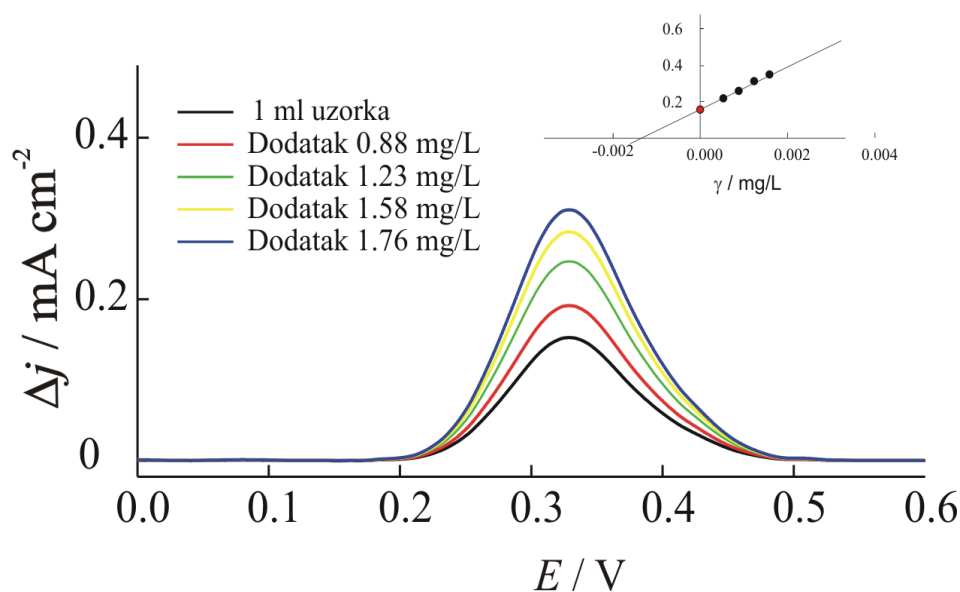
Na Slici 28 prikazani su voltamogrami bez korekcija za šest ispitivanih realnih uzoraka, odnosno vodenih ekstrakata rikole. Jedan mililitar uzorka dodan je u elektrokemijsku ćeliju, te je uz optimirane parametre snimljen voltamogram svakog uzorka. Na voltamogramima svih ispitivanih uzoraka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh oko potencijala  $E_a = 0,2$  V što odgovara proučavanom oksidacijskom procesu VitC. Naime, rezultati SV voltametrije su pokazali kako je oksidacijski strujni vrh VitC pomaknut nešto anodnije u odnosu na mjerenja cikličkom voltametrijom.

Skoro svi uzorci pokazali su i dodatni anodni strujni vrh na potencijalu blizu nuli, koji može ukazati na adsorpciju ili oksidaciju drugih bioaktivnih molekula, također s oksidacijskim djelovanjem, npr, jednostavni fenoli ili slični spojevi male molekulske mase.

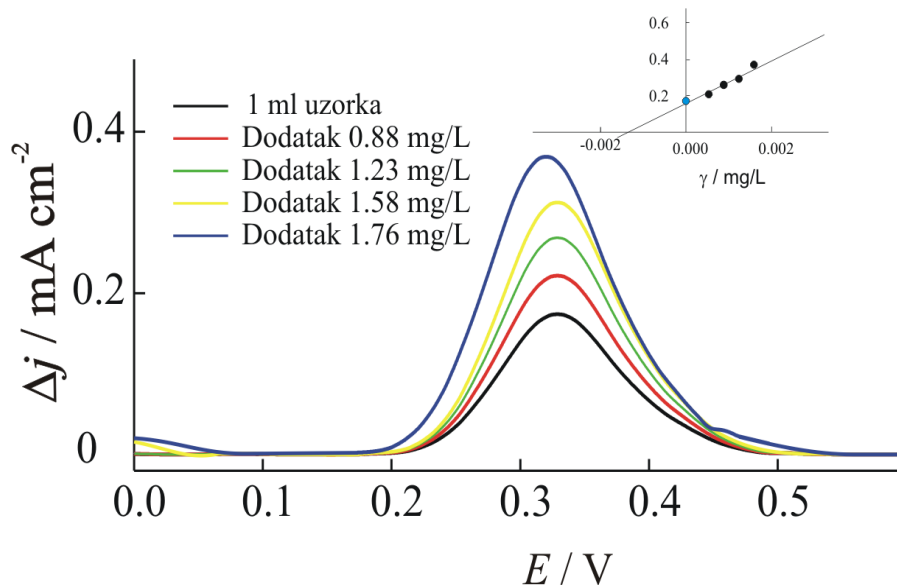


**Slika 28.** Voltamogrami snimljeni na PGS elektrodi u otopini  $KNO_3$  uz dodatak 1 mL uzorka – ekstrakta rikole.

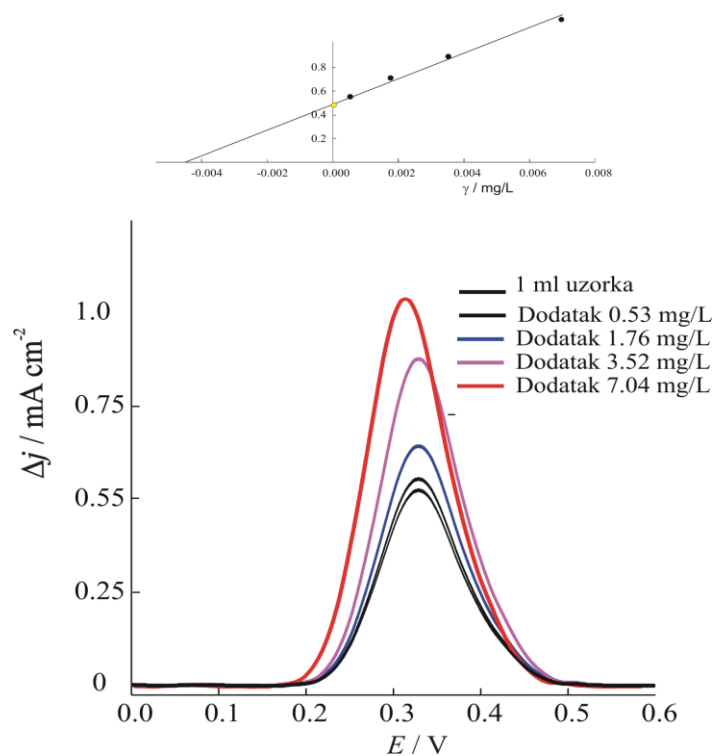
Na Slikama 29 do 34 prikazani su SW voltamogram korigirani za vrijednost bazne linije, s odgovarajućim grafikonom kao ulomkom snimljenim na PGS elektrodi u otopini  $KNO_3$  u svrhu određivanja koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka.



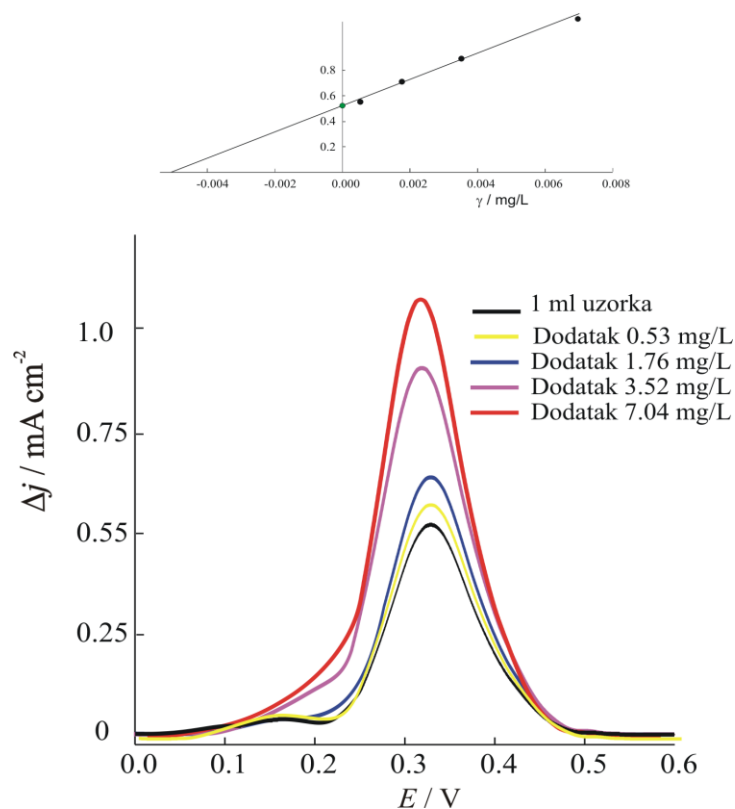
**Slika 29** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 1 – rikola sijana u supstratu s dodatkom ljuske od kikirikija



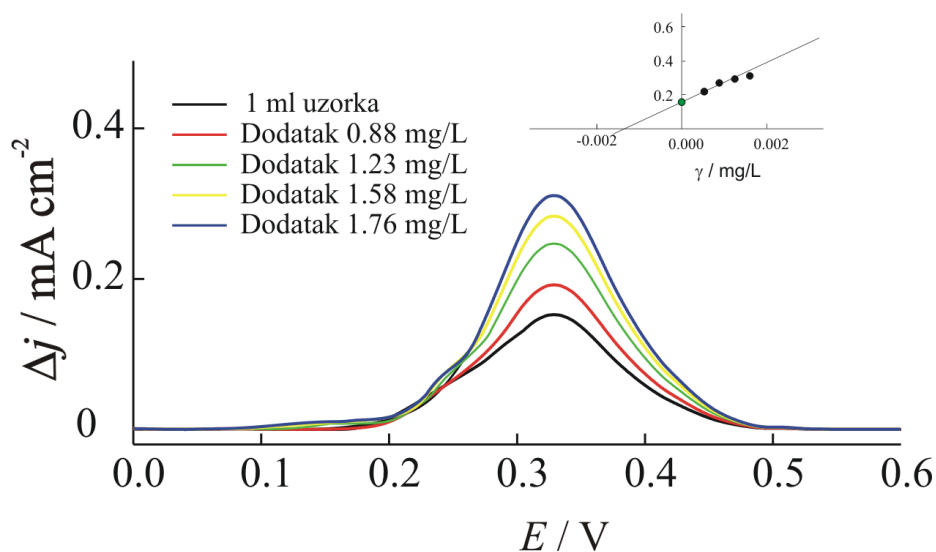
**Slika 30** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 2 – rikola sijana u supstratu s dodatkom papirnatih ručnika



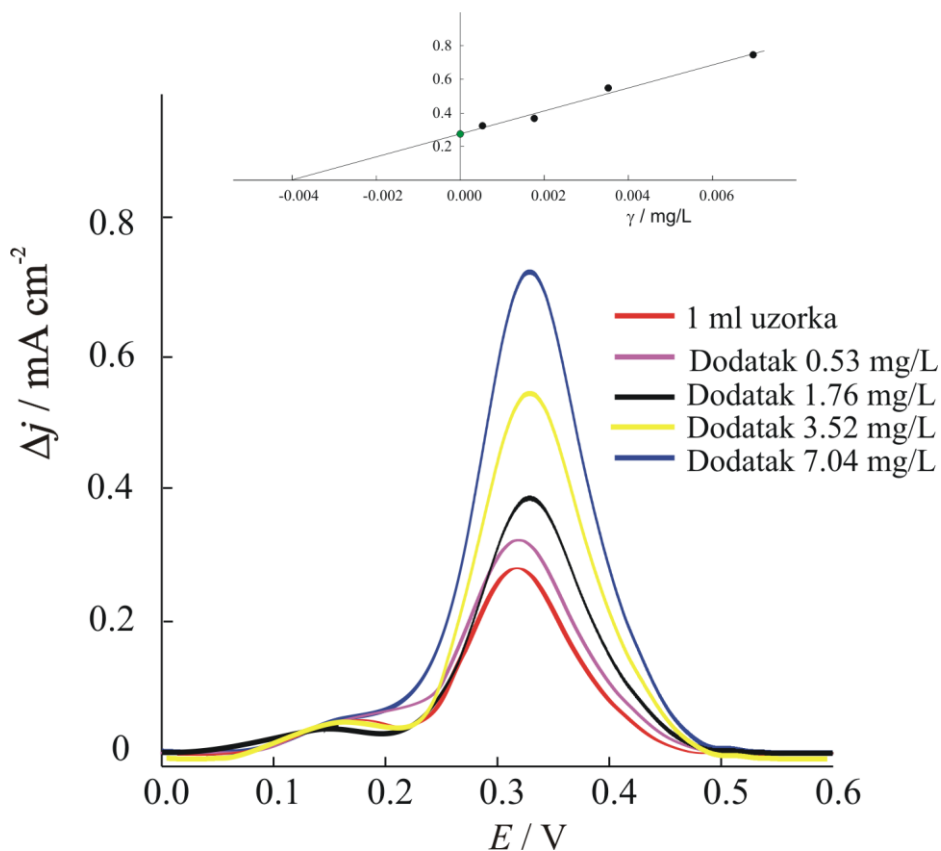
**Slika 31** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 3 – rikola sijana u supstratu s dodatkom kore banane i kivija



**Slika 32** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 4 – rikola sijana u supstratu s dodatkom taloga kave



**Slika 33** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 5 – rikola sijana u supstratu s dodatkom ljuske od jaja



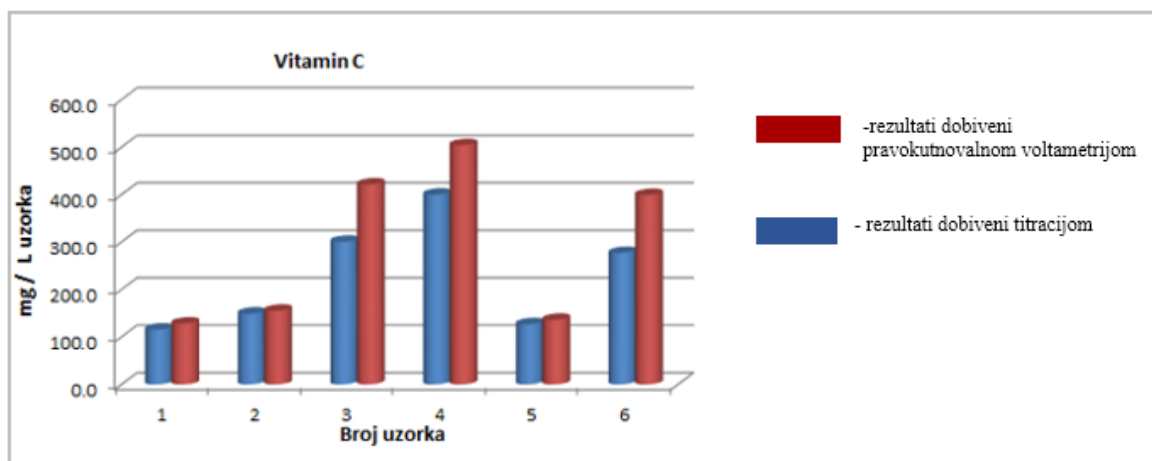
**Slika 34** – SW voltamogram – određivanje koncentracije VitC u uzorcima ekstrakta rikole metodom standardnog dodatka UZORAK 6 – rikola sijana u supstratu bez dodataka

Iz dobivenih krivulja umjeravanja ekstrapolacijom na negativni dio osi x očitana je koncentracija VitC u realnom uzorku, te preračunata na količinu uzorka rikole mase 100 g, koja odgovara volumenu ekstrakta od 1 L. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 2, te uspoređeni s rezultatima dobivenim klasičnom metodom titracije s otopinom jodida (Slika 35).

**Tablica 2.** Sadržaj VitC dobiven primjenom pravokutnovalne metode i klasičnom titracijom – nakon tri tjedna uzgoja na otvorenom.

	Uzorak – Rikola supstrat	SWV Rezultati	Vitamin C			
			Titracija otopinom jodida			Srednja vrijednost
		mg/1L uzorka	mg/1L uzorka			
<b>Uzorak 1</b>	<b>Zemlja s dodatkom ljuske od kikirikija</b>	<b>128</b>	111	115	120	<b>115.3</b>
<b>Uzorak 2</b>	<b>Zemlja s dodatkom papira</b>	<b>155</b>	150	147	150	<b>149.0</b>
<b>Uzorak 3</b>	<b>Zemlja s dodatkom kore banane i kivija</b>	<b>421</b>	301	300	300	<b>300.3</b>
<b>Uzorak 4</b>	<b>Zemlja s dodatkom taloga od kave</b>	<b>504</b>	360	415	424	<b>399.7</b>
<b>Uzorak 5</b>	<b>Zemlja s dodatkom ljuske jaja</b>	<b>136</b>	120	130	130	<b>126.7</b>
<b>Uzorak 6</b>	<b>Zemlja bez dodataka</b>	<b>399</b>	280	270	280	<b>276.7</b>

\*1L uzorka odgovara 100 grama sirovog biljnog materijala.



*Slika 35. Grafički prikaz sadržaja VitC u 100 g rikole*

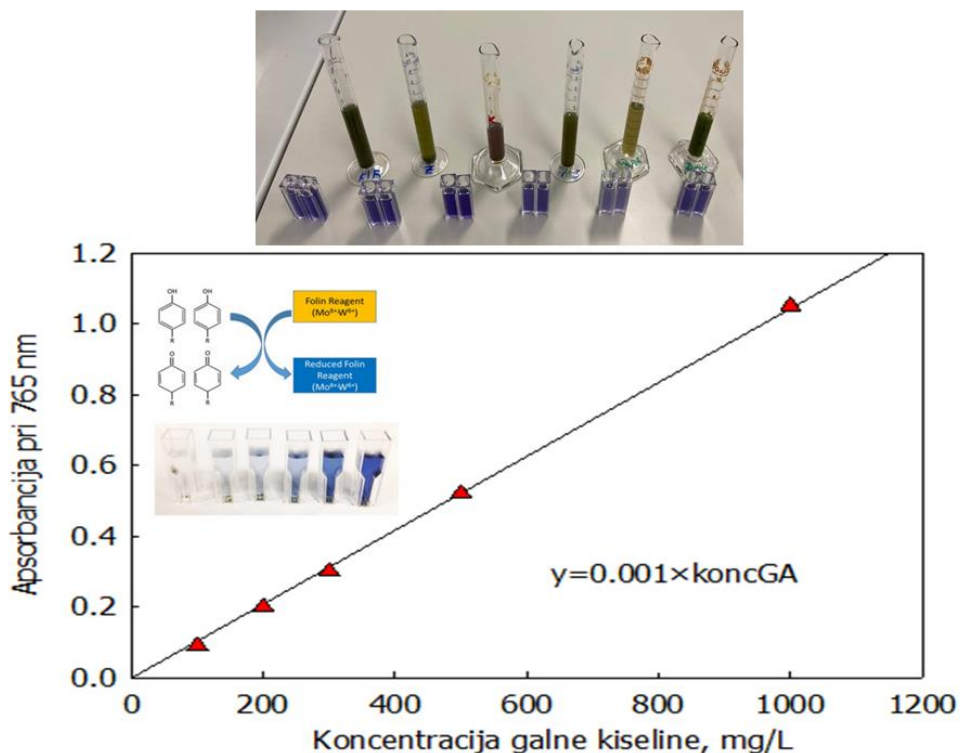
Nakon provedenih mjerenja možemo utvrditi kako je dodatkom 1 mL uzorka u elektrolitsku ćeliju moguće utvrditi koncentraciju VitC u realnim uzorcima. Koncentracijsko područje u kojem je mjereno je niže koncentracijsko područje (0,18 do 7,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a osjetljivost je 11,7  $\mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, prema krivulji umjeravanja standarda. Iz Tablice 2 je vidljivo kako je najveći sadržaj VitC prisutan u Uzorku 4, odnosno u rikoli sijanoj uz dodatak taloga kave, dok je najmanji sadržaj VitC u rikoli sijanoj uz dodatak ljuske kikirikija. Dobiveni rezultati za niže udjele VitC (uzorci 1, 2 i 5) su u suglasnosti s rezultatima dobivenim titracijom s otopinom jodida. Kod uzoraka s većim sadržajem VitC može se uočiti odstupanje rezultata, a rezultat elektrokemijskih mjerenja može biti i posljedica paralelne oksidacije drugih vrsta iz uzoraka u odabranom području mjerenja. Rezultate bi svakako bilo potrebno potvrditi i nekom drugom sofisticiranom metodom.

### 3.3.3 Rezultati određivanja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti

Ukupni fenoli u realnim uzorcima određeni su metodom po Folin–Ciocalteu (Slika 36). Spektrofotometrijski se prati promjena boje uzoraka kao posljedica oksidacije fenolnih spojeva dodatkom Folin–Ciocalteu reagensa, koji predstavlja smjesu molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona. Intenzitet obojenja mjeri se određivanjem apsorbancije kod 765 nm u odnosu na slijepu probu. Za izradu standardne krivulje potrebno je pripremiti otopine galne kiseline različitih koncentracija koje su ustvari radni standardi koncentracija 0, 50, 100, 150, 250 i 500  $\text{mg L}^{-1}$ . 1 ml otopine standarda miješa



se s 60 mL destilirane vode, 5 mL Folin–Ciocalteu, 15 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, dobro promućka i nadopuni do oznake s vodom i ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se izmjeri apsorbancija svake otopine kod 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm. Konstruirana standardna krivulja koncentracija prema apsorbanciji služi za procjenu ukupnih fenola u uzorcima.



*Slika 36. Određivanje ukupnih fenola.*

Isti postupak se ponovi s uzorcima (ekstraktima rikole) koji se dodaju u tikvicu umjesto standarda galne kiseline. Prave se tri otopine iste koncentracije ekstrakta i nakon 2 sata mjeri apsorbancija. Primjenom krivulje standarda, odnosno jednadžbe pravca očita se ili izračuna koncentracija fenola u uzorku. Dobiveni rezultati izraženi su kao ekvivalent galne kiseline (GAE), budući da je ona korištena kao standard, te su prikazani u Tablici 3.

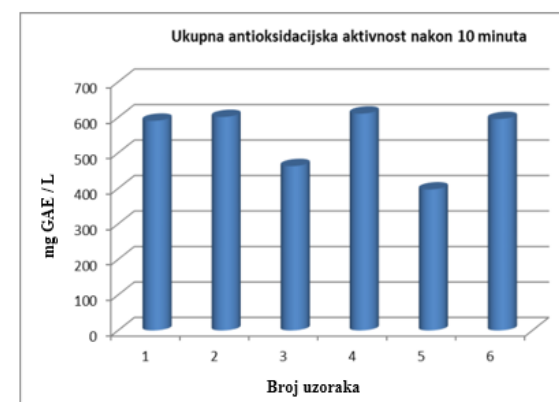
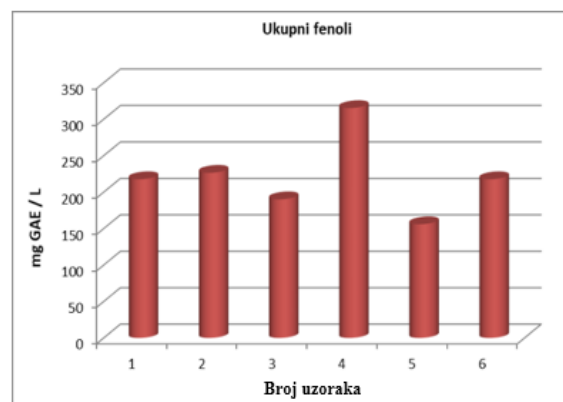
Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom. FRAP metodom je aktivnost antioksidansa izražena u odnosu na Trolox otopine poznate koncentracije. Svježe pripremljenom FRAP reagensu očitati smo apsorbanciju pri 593 nm koja predstavlja apsorbanciju slijepe probe,  $A_0$ . Nakon toga smo u kivetu s FRAP reagensom dodali 50  $\mu\text{L}$  uzorka, ekstrakta rikole i 150  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Kontinuirano je praćena

promjena apsorbancije kod 593 nm tijekom 10 minute, te je očitana nakon 4 i nakon 10 minuta. Dobiveni rezultati izraženi su kao Trolox ekvivalenti (TE), budući je on korišten kao standard, te su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost rikole dobivene spektrofotometrijskom metodom – nakon tri tjedna uzgoja na otvorenom.

Uzorak – Rikola supstrat	Ukupni fenoli Folin–Ciocalteu reagens				Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minuta FRAP metoda				Antioksidacijska aktivnost/ nakon 10 minuta FRAP metoda			
	mg GAE/L			Srednja vrijednost	μM TE			Srednja vrijednost	μM TE			Srednja vrijednost
Zemlja s dodatkom ljuske od kikirikija	222	216	216	<b>218</b>	211	305	318	<b>278</b>	555	601	617	<b>591</b>
Zemlja s dodatkom papira	216	232	232	<b>227</b>	248	198	222	<b>223</b>	595	606	604	<b>602</b>
Zemlja s dodatkom banane i kivija	199	186	186	<b>190</b>	165	205	207	<b>192</b>	486	504	399	<b>463</b>
Zemlja s dodatkom taloga od kave	333	302	311	<b>315</b>	318	345	366	<b>343</b>	604	615	614	<b>611</b>
Zemlja s dodatkom ljuske jaja	160	166	142	<b>156</b>	166	186	205	<b>186</b>	389	401	402	<b>397</b>
Zemlja bez dodataka	222	232	199	<b>218</b>	224	226	242	<b>231</b>	588	601	599	<b>596</b>

\*1L uzorka odgovara 100 grama sirovog biljnog materijala.



*Slika 37. Grafički prikaz – Usporedba dobivenih vrijednosti za ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost.*

Iz provedenih spektrofotometrijskih mjerenja možemo uočiti kako je najveća koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute (brzi antioksidansi) prisutna u Uzorku 4, odnosno u rikoli sijanoj uz dodatak taloga kave, dok je najmanji u rikoli sijanoj uz dodatak ljuske jaja. Iznenadjujući je podatak kako nakon 10 minuta antioksidacijska aktivnost skoro svih biljnih vrsta doseže gotovo istu vrijednost (Slika 37).

**Tablica 4.** Usporedba antioksidacijske aktivnosti prema TE reagensu i količine VitC određene voltametrijskom metodom – korelacija rezultata

<b>Uzorak – Rikola supstrat</b>	<b>Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minuta FRAP metoda</b>	<b>Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda</b>	<b>SWV Rezultati</b>
	<b>Srednja vrijednost <math>\mu\text{M TE}</math></b>	<b>Srednja vrijednost <math>\mu\text{M TE}</math></b>	<b>mg/1L uzorka</b>
<b>Zemlja s dodatkom ljuske od kikirikija</b>	<b>278</b>	<b>591</b>	<b>128</b>
<b>Zemlja s dodatkom papira</b>	<b>223</b>	<b>602</b>	<b>155</b>
<b>Zemlja s dodatkom banane i kivija</b>	<b>192</b>	<b>463</b>	<b>421</b>
<b>Zemlja s dodatkom taloga od kave</b>	<b>343</b>	<b>611</b>	<b>504</b>
<b>Zemlja s dodatkom ljuske jaja</b>	<b>186</b>	<b>397</b>	<b>136</b>
<b>Zemlja bez dodataka</b>	<b>231</b>	<b>596</b>	<b>399</b>

Važno je napomenuti kako se antioksidacijska aktivnost na sličan način provodi i u odnosu na VitC. Usporedimo li rezultate dobivene za sadržaj VitC pomoću PGS elektrode sa spektrofotometrijskim rezultatima možemo zaključiti kako se upravo ova metoda može koristiti i za određivanje antioksidacijske aktivnost većine uzoraka biljnog porijekla, radi sličnosti u trendu.

Dakle, korelacija u rezultatima je prisutna. Izbor metode određivanja je ključan i ovisi o vrsti analita. Ovom metodom smo u mogućnosti brzo i precizno procijeniti antioksidacijsku aktivnost uzoraka prema VitC kao standardu. Moderne voltametrijske tehnike omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu i ne zahtijevaju upotrebu otapala za ekstrakciju i predobradu uzorka, te koriste osjetljive, jeftine i lako primjenjive instrumente. Sve navedeno govori u prilog tome kako je predloženu metodologiju svakako poželjno dodatno usavršiti.

## 4 ZAKLJUČAK

S obzirom na složenost analitičkih instrumenata voltametrijske metode zahtijevaju minimalnu pripremu uzorka i daje nam prednost brze analize. Zbog niske cijene opreme kao i jednostavnosti postupka, voltametrija pruža atraktivnu alternativu titrimetrijskih i instrumentalnih metoda, posebno u kontroli hrane. Ne zahtijeva skupu opremu i kvalificirano osoblje poput kromatografije, niti je dugotrajna i mukotrpa kao spomenuta instrumentalna tehnika. Posebno treba istaknuti kako razvijena metodologija ne zahtjeva predobradu uzorka, skupe kemikalije niti agresivna otapala.

U ovom radu prikazana je preliminarna studija o mogućnosti primjene PGS elektrode za određivanje VitC. Rezultati dobiveni primjenom GPS elektrode za određivanje VitC za uzorke visoke antioksidacijske aktivnosti govore u prilog tome da se razvijena metodologija može uspješno koristiti za određivanje VitC, a samim tim i za procjenu antioksidacijske aktivnosti. PGS elektroda je poslužila kao dobar materijal za elektrokemijsku primjenu.

Kao donator elektrona, askorbinska kiselina služi kao jedan od najvažnijih antioksidansa male molekularne mase koji doprinosi ukupnom antioksidativnom kapacitetu.

Pravokutnovalna voltametrija (SWV) optimizirana je i provedeno je analitičko određivanje u području potencijala od  $-0,30$  do  $0,80$  V, s frekvencijom potencijalnog skeniranja ( $f$ ) od 8 Hz, visinom impulsa ( $\Delta E_p$ ) od 200 mV i povećanjem potencijala ( $\Delta E_s$ ) od 5 mV. Dobiveni rezultati pokazuju linearni odziv PGS elektrode u širokom području koncentracija. Za područje niže koncentracije, od  $0,18$  do  $7,04 \mu\text{g L}^{-1}$ , osjetljivost je  $11,7 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, dok je za područje više koncentracije, od  $10,6$  do  $70,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , osjetljivost  $134 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije. Linearnost oba koncentracijska područja je izvrsna ( $R^2 = 0,998$  i  $0,999$ ).

Rezultati dobiveni za uzorke rikole posađene na različitim podlogama dobro se slažu s rezultatima dobivenim klasičnim metodama određivanja u slučaju nižih koncentracija VitC u uzorku. Pri većim koncentracijama VitC rezultati su nešto veći, što upućuje na moguće interferencije s nekim fenolnim spojevima, koji također imaju antioksidativno djelovanje. Rezultati za veće koncentracijsko područje su u skladu sa trendom povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti za ove uzorke. Promjena oksidacijskog mehanizma uočena je za veću koncentraciju VitC i prati trend rasta antioksidacijske aktivnosti.

U smislu procjene utjecaja dodataka zelenog biootpada zemlji, a u svrhu poboljšanja nutritivnih karakteristika rikole dobiveni su sljedeći rezultati:

- dodatak taloga crne kave čini tlo blago alkalnim što rezultira značajnim povećanjem sadržaja VitC, ukupnih fenola i antioksidacijskog djelovanja, te povoljno utječe na rast rikole.
- dodavanje ljuske jaja u supstratu nije pokazalo pozitivan učinak, niti na rast niti na sadržaj VitC, kao ni na ukupne fenole i antioksidativnu aktivnost nakon razdoblja od tri tjedna uzgoja.

**Na kraju možemo izvesti sljedeći zaključak:**

Korelacija u rezultatima je prisutna. Izbor metode određivanja je ključan i ovisi o vrsti analita. Ovom metodom smo u mogućnosti brzo i precizno procijeniti antioksidacijsku aktivnost uzoraka prema VitC kao standardu. Moderne voltametrijske tehnike omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu i ne zahtijevaju upotrebu otapala za ekstrakciju i predobradu uzorka, te koriste osjetljive, jeftine i lako primjenjive instrumente. Sve navedeno govori u prilog tome kako je predloženu metodologiju svakako poželjno dodatno usavršiti.

Obzirom kako smo se u radu bavili i zelenim biotpadom možemo reći kako biootpad koji u kućanstvu nastaje svaki dan moramo promatrati kao izvor energije za biljke, ali i za čovjeka, a ne samo kao otpad.

Rezultati ovog rada predstavljeni su na 13. međunarodnom znanstveno-stručnom skupu HRANOM DO ZDRAVLJA, koji je održan u Osijeku 16. i 17. rujna 2021. godine u vidu posterske prezentacije.

## DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR DETERMINATION OF VITAMIN C AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

Nives Vladislavić<sup>1\*</sup>, Ivana Škugor Rončević<sup>1</sup>, Danijela Skroza<sup>2</sup>, Ivana Vrca<sup>2</sup>, Ana Marija Kondža<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

<sup>2</sup>Department of Food Technology and Biotechnology, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

\*nives@ktf-split.hr

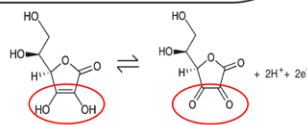
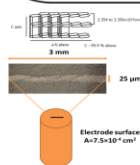
### INTRODUCTION

It is known that carbon materials due to low ohmic resistance can significantly improve the electroanalytical properties of the sensing layers. Carbon materials also provide a variety of modification options that often have been used to develop highly sensitive sensors to investigate electrochemical properties and detect organic and inorganic compounds. The first goal of this work was to develop a simple electrochemical method for the determination of Vitamin C (VitC). The cyclic voltammetry was used to characterize microelectrodes and square wave voltammetry to quantify VitC. A procedure for quantifying VitC in the real sample is established. The second goal was to determine the effect of the addition of a different type of "green" biowaste on plant growth, VitC content, and antioxidant activity in arugula (*Eruca sativa* L.) by using carbon microelectrode. The obtained results were compared with the standardized methods. After three weeks of cultivation, small differences in growth and large differences in certain nutritional characteristics were observed. The addition of peanut shell contributes to soil aeration and the fastest development of healthy and green *Eruca sativa* has been observed. The addition of black coffee makes the soil slightly alkaline and results in a significant increase in the VitC content and antioxidant activity.

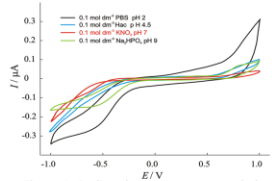
**Keywords:** carbon microelectrodes, "green" biowaste, vitamin C, antioxidant activity

### INSTRUMENTATION:

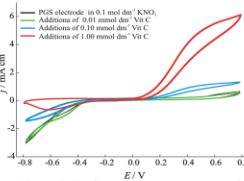
- ✓ Potentiostat (Autolab PGSTAT 302N), connected to PC and driven by GPES 4.9 Software (Eco Chemie).
- ✓ Cary 5000 UV-Vis-NIR spectrophotometer by Agilent Technologies
- ✓ **Electrode:** pyrolytic graphite sheet (PGS - EYGS121803) electrode; Electrode surface  $A=7.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ ;



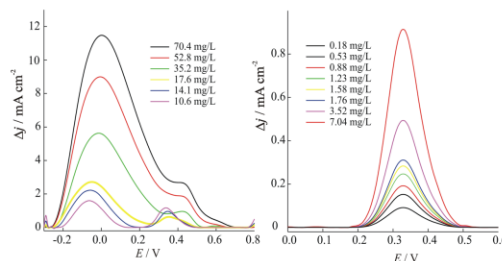
**Figure 3.** Structures for VitC - ascorbic acid and for the reduced form (dihydroascorbic acid).



**Figure 1.** Cyclic voltammograms recorded at PGS electrode in different electrolyte,  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ .



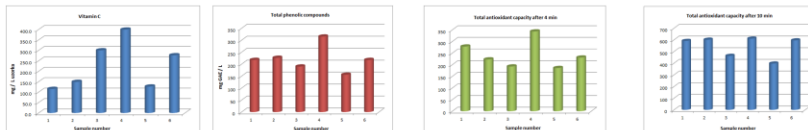
**Figure 2.** Cyclic voltammograms recorded at PGS electrode in  $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  with addition of VitC;  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figure 4.** SWCSVs recorded at PGS electrode in  $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$  with sequential addition of VitC. ( $E_{\text{acc}} = -0.300 \text{ V}$ ;  $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ )

**Table 1.** Content of VitC, total phenols and antioxidant activity of arugula - after three weeks period of outdoor cultivation. (A volume of 1 L corresponds to 100 g of raw material).

Sample – arugula substrate	SWCSV results	Vitamin C determination by Iodine Titration			Total phenolic compounds Folin-Ciocalteu reagents			Antioxidant activity after 4 minute FRAP method			Antioxidant activity after 10 minute FRAP method						
		mg/L sample	mg/L sample	Mean value	mg GAE/L	Mean value	μM TE	Mean value	μM TE	Mean value	μM TE	Mean value					
Soil with addition of peanut shells	128	111	115	120	115.3	222	216	216	218	211	305	318	278	555	601	617	591
paper	155	150	147	150	149.0	216	232	232	227	248	198	222	223	595	606	604	602
peel of banana and kiwi	421	301	300	300	300.3	199	186	186	190	165	205	207	192	486	504	399	463
coffee ground	504	360	415	424	399.7	333	302	311	315	318	345	366	343	604	615	614	611
eggshells	136	120	130	130	126.7	160	166	142	156	166	186	205	186	389	401	402	397
WITHOUT ADDITIVES	399	280	270	280	276.7	222	232	199	218	224	226	242	231	588	601	599	596



### CONCLUSION

- As an electron donor, ascorbic acid serves as one of most important small-molecular-weight antioxidants which contributes to the total antioxidant capacity. PGS electrode serves as a good material for electrochemical application. In this work the preliminary study on the relevance of PGS electrode for the determination of VitC are presented.
- A square wave stripping voltammetry (SWCSV) was optimized and analytical determination was performed in quiescent solutions from  $-0.30$  towards  $0.80 \text{ V}$ , with potential scan frequency ( $f$ ) of the  $8 \text{ Hz}$ , pulse height ( $\Delta E_p$ ) of the  $200 \text{ mV}$ , and potential increment ( $\Delta E_s$ ) of the  $5 \text{ mV}$ . The results for the obtained samples of arugula planted in different substrates are in good agreement with the classical methods of determination in the case of lower concentrations of VitC in the sample. At higher concentrations of VitC, the results are slightly higher, suggesting a possible reduction of some phenolic compounds, which also have antioxidant activity and results are in line with the trend of increasing total antioxidant activity for these samples. So, change in the oxidation mechanism is observed for higher concentration of VitC, with respect to the higher antioxidative activity.
- Also, the addition of black coffee grounds makes the soil slightly alkaline, which results in a significant increase in the content of VitC, total phenols and antioxidant activity, and has a beneficial effect on arugula growth. The addition of egg shell to the substrate did not show a positive effect, neither on growth nor on the content of VitC, total phenols and antioxidant activity after period of three weeks.

### Acknowledgment

This paper was supported by the Foundation of the Croatian Academy of Sciences and Arts.

## 5 LITERATURA

1. R. N. Allen, M. K. Shukla, D. Reed, J. Leszczynski. *Int J Quantum Chem.*, **2006.** 106, 2934-2943.
2. S. Hickey and A. W. Saul. *Vitamin C: The Real Story: the Remarkable and Controversial Healing Factor*, Basic Health Publications. **2008.**
3. A. Carr, M. Vissers. *Nutrients* **2013.** 5, 4284-304.
4. F. E. Pehlivan, *Vitamin C: An Antioxidant Agent*, **2017.**, URL: <https://www.intechopen.com/chapters/56013> , Posjećeno: 02.09.2021.
5. B. He, J. Zhang. *Int J. Electroche. Sci.* **2015.** 10, 9621-9631.
6. O. Arrigoni, M. C. De Tullio. *Biochim et Biophys Acta-GenSub.* **2002.** 1569, 1-9.
7. A. C. Carr S. Maggini. *Vitamin C and Immune Function*, *Nutrients* **2017.** 9, 1211.
8. S. Chambial, S. Dwivedi, K.K. Shukla, P.J. John, P. Sharma, *Indian J Clin Biochem.* **2013.** 28, 314-328.
9. URL: <https://nutrindrip.com.br/wp-content/uploads/2020/05/Vitamin-Handbook.pdf#page=545>, Posjećeno: 12.9.2021.
10. S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, M. Levine. *J Am Coll Nutr.* **2003.** 22, 18-35.
11. A. Bendich, L. J. Machlin, O. Scandurra, G. W. Burton, D. D. M. Wayner. *Adv Free Radic Biol Med.* **1986.** 2, 419-444.
12. R. Domitrović. *Biochem Medica* **2006.** 16, 89-228
13. K. J. Carpenter. *Ann Nutr Metab.* **2012.** 61, 259-264.
14. E. Magiorkinis, A. Beloukas, A. Diamantis. *European J Int Med.* **2011.** 22, 147-152.
15. URL: <http://zyciepo30.pl/wolne-rodniki-tlenowe/>, Posjećeno 26.08.2021.
16. N. T. Moldogazieva, I. M. Mokhosoev, N. B. Feldman, S. V. Lutsenko. *Free Radic Res.* **2018.** 52, 507-543.
17. S. Englard, S. Seifter. *Ann Rev Nutr.* **1986.** 6, 365-406.
18. J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner. *Biochim Biophys Acta-Rev Canc.* **2012.** 1826, 443-457.
19. D. Njus, P. M. Kelley, Y.-J Tu, H. B. Schlegel. *Free Radical Biol Med.* **2020.** 37-43.
20. J. Mand, A. Szarka, G. Bánhegyi, *Br J Pharmacol.* **2009.** 157, 1097-1110.
21. A. Demirbas, *Energy Convers Manag.* **2011.** 52, 1280-1287.
22. N. V. Hue, B. A. Sobieszczyk. *Compost Sci Util.* **1999.** 7, 34-41.
23. J. P. Van Wyk, *Trends Biotechnol.* **2001.** 19, 172-177.



24. H. R. Ali, M. Hassaan, *Adv Mater Sci.* **2017.** 6, 85-101.
25. S. Schmidt, C. Pahl-Wost, *J Ind Ecol.* **2008.**; 11(1), 181-199.
26. B. Stejska, A. Malsová, A. Báreková, *Comparison of family house and apartment households bio-waste production and composition*, Waste forum. **2017.**
27. H.A. van der Sloot, R.N.J. Comans, J.C.L. Meeussen, J.J. Dijkstra. *Leaching methods for soil, sludge and treated biowaste*, Environmental Risk Assessment. **2003.**
28. L. C. Rodrigues, I. Puig-Ventosa, M. López, F. X. Martínez, A. G. Ruiz, T. G. Bertrán. *The impact of improper materials in biowaste on the quality of compost*, J Clean Product. **2020.** 251, 119601.
29. M. T. Tarrago-Trani, K. M. Phillips, M. Cotty. *J Food Comp Anal.* **2012.** 26, 12-25.
30. K. S. Ngai, W. T. Tan, Z. Zainal, R. M. Zawawi, M. Zidan. *Int J Electrochem Sci.* **2013.** 8, 10557-10567.
31. V. Arabali, M. Ebrahimi, M. Abbasghorbani, V. K Gupta, M. Farsi, M. R. Ganjali, F. Karimi. *J Molecular Liquids*, **2016.** 213, 312-316.
32. J. Contreras-Calderón, L. Calderón-Jaimes, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova, *Food Res Int.* **2011.** 44, 2047-2053.
33. A.M. Pisoschi, C. Cimpeanu, G. Predoi. *Open Chem.* **2015.** 13, 824-856.
34. I. Piljac. *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media print, Zagreb, **2010.**
35. S. P. Kounaves, *Voltammetric techniques, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, **1997.** 709-725.
36. P. T. Kissinger, W. R. Heineman. *J Chem Educ.* **1983.** 60, 702-706.
37. D. H. Evans, K. M. O'Connell, R. A. Petersen, M. J. Kelly. *J Chem Educ.* **1983.** 60, 290-293.
38. O.A. Farghaly, R. S. Abdel Hameed, Abd-Alhakeem H. Abu-Nawwas. *Int J Electrochem Sci.* **2014.** 9, 3287-3318.
39. B. Nigović, S. Behetić. *Elektroanalitika u farmaciji*, Farmaceutski glasnik, **2007.** 63, 163-175
40. G. A. Mabbott. *J Chem Educ.* **1983.** 60, 697-702.
41. V. Mirceski, R. Gulaboski, M. Lovric, I. Bogeski, R. Kappl. M. Hoth. *Electroanalysis*, **2013.** 25, 2411-2422.
42. E. Brusač. *Oksidacija i adsorpcija nepafenaka na površini elektrode modificirane različitim nanomaterijalima*, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. **2018.**
43. V. Mirceski, R. Gulaboski. *Maced J Chem Chem En.* **2014.** 33, 1-12.

44. M. Lovrić. *Square-Wave Voltammetry. Electroanalytical Methods*, Springer, Berlin, Heidelberg **2009**. 121-145.
45. Montenegro, M. I., Queiros, M. A., Daschbach, John L., *Microelectrodes: Theory and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands **1990**. 197, 3-5.
46. M. S. H. Akash, K. Rehman. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, Springer New York **2020**.
47. Z. Chen, T. G. Deutsch, H. N. Dinh, K. Domen, K. Emery, A. J. Forman, J. Turner. *UV-Vis Spectroscopy. Photoelectrochemical Water Splitting*, Springer New York. **2013**. 49-62.
48. R. Radičić *UV/VIS spektroskopija i njena primjena u analizi fotokatalitičkih svojstava tankih filmova cinkovog oksida*, Završni rad, Sveučilište u rijeci, Odjel za fiziku. **2018**.
49. F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine & G. S. Patience, *Experimental Methods in Chemical Engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy/UV-Vis*, The Canadian Journal of Chemical Engineering, **2018**.
50. URL: [Graphene – What Is It? | Graphenea](#), Posjećeno: 13.09.2021.
51. Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, Y. Linx. *Electroanalysis*, **2010**. 22, 1027-1036.
52. URL: <https://industrial.panasonic.com/ww/products/pt/pgs> , Posjećeno: 16.09.2021.
53. H. Dai, X. P. Wu, Y. M. Wang, W. C. Zhou, G. N. Chen, *Electrochimica Acta*, **2008**. 535 113-5117.
54. S.Y. Ly, J.I. Chae, Y.S. Jung, W.W. Jung, H.J. Lee, S.H. Lee. *Nahrung*. **2004**. 48, 201-204.
55. X. Liu, X. Li, Y. Xiong, Q. M. Huang, X. Y. Li, Y. L. Dong, P. Liu, C. C. Zhang, *Microchim Acta*, **2013**. 180, 1309-1316.
56. Y. P. Wen, D. Li, Y. Lu, H. H. He, J. K. Xu, X. M. Duan, M. Liu, *Chinese Journal of Polymer*. **2012**. 30, 460-469.