

ANTIOKSIDACIJSKA KARAKTERIZACIJA ZAČINA I AUTOHTONIH DALMATINSKIH VRSTA ELEKTROKEMIJSKIM I SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA

Maričević, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:707812>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTIOKSIDACIJSKA KARAKTERIZACIJA ZAČINA I
AUTOHTONIH DALMATINSKIH VRSTA ELEKTROKEMIJSKIM
I SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA**

DIPLOMSKI RAD

MARTINA MARIČEVIĆ

Matični broj: 92

Split, prosinac 2024.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**ANTIOKSIDACIJSKA KARAKTERIZACIJA ZAČINA I
AUTOHTONIH DALMATINSKIH VRSTA ELEKTROKEMIJSKIM
I SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA**

DIPLOMSKI RAD

MARTINA MARIČEVIĆ

Matični broj: 92

Split, prosinac 2024.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**ANTIOXIDANT CHARACTERISATION OF SPICES AND
AUTOCHTONIC DALMATIAN SPECIES BY
ELECTROCHEMICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC
METHODS**

DIPLOMA THESIS

MARTINA MARIČEVIĆ

Parent number: 92

Split, December 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nives Vladislavić

ANTIOKSIDACIJSKA KARAKTERIZACIJA ZAČINA I AUTOHTONIH DALMATINSKIH VRSTA ELEKTROKEMIJSKIM I SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA

Martina Maričević, 92

Sažetak: Kao doprinos u proučavanju oksidacije galne kiseline na ugljikovim materijalima izrađeno je pet elektroda: elektroda od staklastog ugljika, elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, te tri elektrode od ugljikovih mikrovlakana različite površine. Ovisnost vršne struje o pH ispitana je cikličkom voltametrijom u fosfatnom puferu sa i bez prisutne galne kiseline. Kao najjednostavniji i najosjetljiviji elektrokemijski senzor izdvojila se elektroda s jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, odnosno modificirana elektroda od staklastog ugljika (SWCNT/GCE). Svojevrsni senzor pripremljen je za izravno određivanje ukupnog sadržaja fenola kao ekvivalenta galne kiseline. Radna elektroda karakterizirana je voltametrijom s pravokutnim signalom pobude. Rezultati otkrivaju da SWCNT/GCE senzor može značajno poboljšati oksidacijski signal kao i pomaknuti vršne potencijale prema manje pozitivnim vrijednostima. Koristeći optimizirane uvjete, senzor je dao izuzetan linearni odziv u cijelom rasponu koncentracije; $\Delta I = 0,280 \times c$, (osjetljivost $0,280 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$), od 2×10^{-7} do $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, s granicom detekcije od $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Konstruirani senzor pokazuje dobru stabilnost i ponovljivost. Za validaciju predložene metode priređeni su vodeni ekstrakti mikrovalnom ekstrakcijom lavande, smilja, kadulje, muškato oraščića, cimeta i klinčića. Svim uzorcima su spektrofotometrijski određeni ukupni fenoli Folin–Ciocalteu metodom i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. SWCNT/GCE je također primijenjena za određivanje galne kiseline kao ekvivalenta ukupnih fenola i procjenu antioksidacijskog kapaciteta. Sa SWCNT elektrodom pri pH3 nađena je najveća koncentracija GK u uzorku klinčića, $60,25 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a Folin–Ciocalteu metodom određeni su ukupni fenoli čija je najveća vrijednost izmjerene apsorbancije u klinčiću i iznosi $1328,74 \text{ mg GAE dm}^{-3}$. Dobiveni rezultati FC/SWV su pokazali izuzetno dobro slaganje predložene i standardne procjene ukupnih fenola, te ukazuju na mogućnost korištenja ovakve metodologije za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima kao standardne metode. FRAP metodom najveći antioksidacijski kapacitet posjeduje klinčić, $26687,70 \mu\text{M}$. Omjer FRAP/SWV govori kako predložena metoda nije pogodna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Ključne riječi: elektrokemijski senzor; galna kiselina; jednozidne ugljikove nanocjevčice; mikrovalna ekstrakcija, začini i autohtono dalmatinsko bilje.

Rad sadrži: 70 stranica, 58 slika, 10 tablica, 59 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član
3. izv. prof. dr. sc. Nives Vladislavić	mentor

Datum obrane: 19. prosinca 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Associate professor Nives Vladislavić

ANTIOXIDANT CHARACTERISATION OF SPICES AND AUTOCHTHONIC DALMATIAN SPECIES BY ELECTROCHEMICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

Martina Maričević, 92

Abstract: As a contribution to the study of gallic acid oxidation on carbon materials, five electrodes were fabricated: a glassy carbon electrode, an electrode modified with single-walled carbon nanotubes, and three electrodes made of carbon microfibers of different surface areas. The dependence of the peak current on pH was examined by cyclic voltammetry in phosphate buffer with and without gallic acid present. The electrode with single-walled carbon nanotubes, or modified glassy carbon electrode (SWCNT/GCE), was selected as the simplest and most sensitive electrochemical sensor. A unique sensor was prepared for the direct determination of the total phenol content as gallic acid equivalent. The working electrode was characterized by voltammetry with a rectangular excitation signal. The results reveal that the SWCNT/GCE sensor can significantly improve the oxidation signal as well as shift the peak potentials towards less positive values. Using optimized conditions, the sensor gave an exceptional linear response over the entire concentration range; $\Delta I = 0.280 \times c$, (sensitivity $0.280 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$), from 2×10^{-7} to $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, with a detection limit of $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. The constructed sensor shows good stability and repeatability. To validate the proposed method, aqueous extracts of lavender, immortelle, sage, nutmeg, cinnamon and cloves were prepared by microwave extraction. Total phenols were determined spectrophotometrically by the Folin–Ciocalteu method and antioxidant capacity by the FRAP method for all samples. SWCNT/GCE was also applied to determine gallic acid as an equivalent of total phenols and to estimate antioxidant capacity. With the SWCNT electrode at pH3, the highest concentration of GK was found in the clove sample, $60.25 \mu\text{mol dm}^{-3}$, and the Folin-Ciocalteu method was used to determine total phenols, the highest value of the measured absorbance in cloves being $1328.74 \text{ mg GAE dm}^{-3}$. The obtained FC/SWV results showed an extremely good agreement between the proposed and standard estimates of total phenols, and indicate the possibility of using such a methodology for estimating total phenols in real samples as a standard method. By the FRAP method, cloves have the highest antioxidant capacity, $26687.70 \mu\text{M}$. The FRAP/SWV ratio indicates that the proposed method is not suitable for estimating antioxidant capacity.

Keywords: electrochemical sensor; gallic acid; single-walled carbon nanotubes; microwave extraction, spices and autochthonous Dalmatian herbs.

Thesis contains: 70 pages, 58 figures, 10 tables, 59 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--|--------------------|
| 1. Ivana Škugor Rončević, PhD, associate | prof. chair person |
| 2. Zvonimir Marijanović, PhD, associate | prof. member |
| 3. Nives Vladislavić, PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: December 19, 2024.

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju pod mentorstvom izv.
prof. dr. sc. Nives Vladislavić, u razdoblju od srpnja do prosinca 2024 godine.*

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nives Vladislavić na izvanrednom trudu, predanosti i susretljivosti u izradi ovog diplomskog rada. Jedno veliko hvala na nesebičnom dijeljenju znanja te strpljenju u pojašnjavanju nejasnoća.

Hvala mojim najbližima, mojoj obitelji koja je uvijek bila vjetar u leđa bez obzira na daljinu i koja nikada nije dopustila da se osjećam usamljeno. Od srca hvala mom Petru koji je vjerovao u mene onda i kada sama nisam.

Naposljetku, hvala dragom Bogu koji me čuvao i pratio kroz ovaj trnoviti put, poslao predivne ljude u moj život i omogućio mi da dođem do cilja puna znanja, ponosa i zahvalnosti.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada se može podijeliti u nekoliko osnovnih i specifičnih ciljeva:

1. Izraditi ukupno pet različitih ugljikovih elektroda: elektroda od staklastog ugljika, elektroda od staklastog ugljika modificirana ugljikovim nanocjevčicama, te tri elektrode od mikrovlakana promjera 7 μm različitih površina.
2. Na svim priređenim elektrodama ispitati elektrokemijsko ponašanje galne kiseline u fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima.
3. Odabrati elektrodu i uvjete koje pokazuju najbolji odziv prema galnoj kiselini.
4. Pomoću odabrane elektrode ispitati pouzdanost, točnost i koncentracijsko područje za primjenu u kvantitativnom određivanju galne kiseline.
5. Prirediti ekstrakte lavande, smilja, lovora, cimeta muškarnog oraščića i klinčića mikrovalnom ekstrakcijom
6. Dobivene ekstrakte karakterizirati obzirom na ukupne fenole i antioksidativni kapacitet elektrokemijskim i spektrofotometrijskim metodama.
7. Usporedbom dobivenih rezultata konstatirati kakve su mogućnosti primjene elektrokemijskih metoda u procjeni antioksidacijskog kapaciteta. Usporedbom faktora sličnost zaključiti o mogućoj primjeni predložene metode kao standardne metode za karakterizaciju realnih uzoraka.

SAŽETAK

Kao doprinos u proučavanju oksidacije galne kiseline na ugljikovim materijalima izrađeno je pet elektroda: elektroda od staklastog ugljika, elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, te tri elektrode od ugljikovih mikrovlakana različite površine. Ovisnost vršne struje o pH ispitana je cikličkom voltametrijom u fosfatnom puferu sa i bez prisutne galne kiseline. Kao najjednostavniji i najosjetljiviji elektrokemijski senzor izdvojila se elektroda s jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, odnosno modificirana elektroda od staklastog ugljika (SWCNT/GCE). Svojevrsni senzor pripremljen je za izravno određivanje ukupnog sadržaja fenola kao ekvivalenta galne kiseline. Radna elektroda karakterizirana je voltametrijom s pravokutnim signalom pobude. Rezultati otkrivaju da SWCNT/GCE senzor može značajno poboljšati oksidacijski signal kao i pomaknuti vršne potencijale prema manje pozitivnim vrijednostima. Koristeći optimizirane uvjete, senzor je dao izuzetan linearni odziv u cijelom rasponu koncentracije; $\Delta I = 0,280 \times c$, (osjetljivost $0,280 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$), od 2×10^{-7} do $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, s granicom detekcije od $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Konstruirani senzor pokazuje dobru stabilnost i ponovljivost. Za validaciju predložene metode priređeni su vodeni ekstrakti mikrovalnom ekstrakcijom lavande, smilja, kadulje, muškarnog oraščića, cimeta i klinčića. Svim uzorcima su spektrofotometrijski određeni ukupni fenoli Folin–Ciocalteu metodom i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. SWCNT/GCE je također primijenjena za određivanje galne kiseline kao ekvivalenta ukupnih fenola i procjenu antioksidacijskog kapaciteta. Sa SWCNT elektrodom pri pH3 nađena je najveća koncentracija GK u uzorku klinčića, $60,25 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a Folin-Ciocalteu metodom određeni su ukupni fenoli čija je najveća vrijednost izmjerene apsorbancije u klinčiću i iznosi $1328,74 \text{ mg GAE dm}^{-3}$. Dobiveni rezultati FC/SWV su pokazali izuzetno dobro slaganje predložene i standardne procjene ukupnih fenola, te ukazuju na mogućnost korištenja ovakve metodologije za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima kao standardne metode. FRAP metodom najveći antioksidacijski kapacitet posjeduje klinčić, $26687,70 \mu\text{M}$. Omjer FRAP/SWV govori kako predložena metoda nije pogodna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Ključne riječi: elektrokemijski senzor; galna kiselina; jednozidne ugljikove nanocjevčice; mikrovalna ekstrakcija, začini i autohtono dalmatinsko bilje.

ABSTRACT

As a contribution to the study of gallic acid oxidation on carbon materials, five electrodes were fabricated: a glassy carbon electrode, an electrode modified with single-walled carbon nanotubes, and three electrodes made of carbon microfibers of different surface areas. The dependence of the peak current on pH was examined by cyclic voltammetry in phosphate buffer with and without gallic acid present. The electrode with single-walled carbon nanotubes, or modified glassy carbon electrode (SWCNT/GCE), was selected as the simplest and most sensitive electrochemical sensor. A unique sensor was prepared for the direct determination of the total phenol content as gallic acid equivalent. The working electrode was characterized by voltammetry with a rectangular excitation signal. The results reveal that the SWCNT/GCE sensor can significantly improve the oxidation signal as well as shift the peak potentials towards less positive values. Using optimized conditions, the sensor gave an exceptional linear response over the entire concentration range; $\Delta I = 0.280 \times c$, (sensitivity $0.280 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$), from 2×10^{-7} to $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, with a detection limit of $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. The constructed sensor shows good stability and repeatability. To validate the proposed method, aqueous extracts of lavender, immortelle, sage, nutmeg, cinnamon and cloves were prepared by microwave extraction. Total phenols were determined spectrophotometrically by the Folin–Ciocalteu method and antioxidant capacity by the FRAP method for all samples. SWCNT/GCE was also applied to determine gallic acid as an equivalent of total phenols and to estimate antioxidant capacity. With the SWCNT electrode at pH3, the highest concentration of GK was found in the clove sample, $60.25 \mu\text{mol dm}^{-3}$, and the Folin-Ciocalteu method was used to determine total phenols, the highest value of the measured absorbance in cloves being $1328.74 \text{ mg GAE dm}^{-3}$. The obtained FC/SWV results showed an extremely good agreement between the proposed and standard estimates of total phenols, and indicate the possibility of using such a methodology for estimating total phenols in real samples as a standard method. By the FRAP method, cloves have the highest antioxidant capacity, $26687.70 \mu\text{M}$. The FRAP/SWV ratio indicates that the proposed method is not suitable for estimating antioxidant capacity.

Keywords: electrochemical sensor; gallic acid; single-walled carbon nanotubes; microwave extraction, spices and autochthonous Dalmatian herbs.

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE	2
1.2 CIKLIČKA VOLTAMETRIJA	2
1.2.1 VOLTAMETRIJSKI ODZIV I REVERZIBILNOST REAKCIJE	3
1.3 VOLTAMETRIJA S PRAVOKUTNIM I SIGNALOM POBUDE.....	11
1.4 GALNA KISELINA.....	13
1.5 ZAČINI I AUTOHTONO DALMATINSKO BILJE.....	14
1.6 ANTIOKSIDANSI	19
1.7 EKSTRAKCIJA.....	21
1.7.1 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	21
1.8 SPEKTROFOTOMETRIJA.....	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	25
2.1 KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA	25
2.2 PRIPRAVA ELEKTRODA	27
2.3 METODE	29
2.3.1 ELEKTROKEMIJSKA MJERENJA	29
2.3.2 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	29
2.3.3 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA.....	30
2.4 PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA REALNIH UZORAKA.....	31
2.5 FOLIN-CIOCALTEU METODA - ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA.....	32
2.6 FRAP METODA - ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA.....	34
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	37
3.1 REZULTATI CIKLIČKE VOLTAMETRIJE I SQUARE WAVE VOLTAMETRIJE.....	37
3.1.1 REZULTATI CIKLIČKE VOLTAMETRIJE	37
3.1.2 REZULTATI VOLTAMETRIJE S PRAVOKUTNIM IZMJENIČNIM SIGNALOM POBUDE	51
3.2 ANALITIČKA PRIMJENA VOLTAMETRIJSKIH METODA NA REALNIM UZORCIMA	55
3.3 REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA.....	58
3.4 USPOREDBE REZULTATA.....	60
4. ZAKLJUČAK.....	62
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	64
6. LITERATURA	65

UVOD

Fenolni spojevi, poznati po svojim redoks-aktivnim svojstvima, mogu se analizirati elektrokemijski zbog svoje sposobnosti podvrgavanja oksidacijsko-redukcijskim reakcijama. Tehnike poput cikličke voltometrije ili voltometrije s pravokutnim signalom pobude su tu posebno učinkovite. Elektrokemija pruža uvid u redoks svojstva, kao što su oksidacijski potencijal, kapacitet doniranja elektrona, odnosno procjenjuje antioksidacijski kapacitet. Prednosti elektrokemije obuhvaćaju visoku osjetljivost, brzu analizu i prikupljanje podataka u stvarnom vremenu. Elektrokemijski dobivene vršne struje koreliraju s koncentracijama fenolnih spojeva. Niži oksidacijski potencijali često ukazuju na jače antioksidativno djelovanje. S druge strane spektrofotometrija je jedna od najpristupačnijih i najraširenijih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti i ukupnih fenola. Spektrofotometrijski se mjeri opseg aktivnosti uklanjanja radikala ili redukcijska snaga. Uobičajeno korišteni testovi uključuju Folin-Ciocalteuova metodu, FRAP, DPPH i ABTS testove. Spektrofotometrija tako pruža jednostavnu i učinkovitu metodu za komparativnu analizu. Kombinacija ovih metoda nudi jaku platformu za analizu mehanizma i antioksidativni kapacitet bilo koje kemijske vrste.

Stoga je cilj ovo rada bio naći elektrokemijsku metodologiju koja će moći procijeniti ukupne fenole i antioksidacijski kapacitet te je usporediti s klasičnim spektrofotometrijskim metodama. Usporedbom rezultata i povezivanjem spektrofotometrijske antioksidativne mjere s elektrokemijskim parametrima poput vršne struje i oksidacijskog potencijala mogu se uspješno odrediti mehanizmi prijenosa elektrona, kinetika reakcije i pratiti sadržaj fenola u pićima, voću i povrću kao prirodnim bioaktivnim tvarima u razvoju lijekova, otkrivati fenolni zagađivači i procijeniti njihov utjecaj na okoliš. Za validaciju razvijene metodologije priređeno je 6 uzoraka. Testirana su tri začina i tri autohtone dalmatinske biljke. Ekstrakcija realnih uzoraka potpomognuta je mikrovalovima, koji su znatno povećali udio bioaktivnih spojeva u vodenom ekstraktu.

Odabir prikladne metode ovisi o specifičnim potrebama i ciljevima analize. Upravo doprinos evaluacije i usporedbe metoda vodi boljem razumijevanju primjene elektrokemijskih metoda u različitim istraživačkim i industrijskim sektorima.

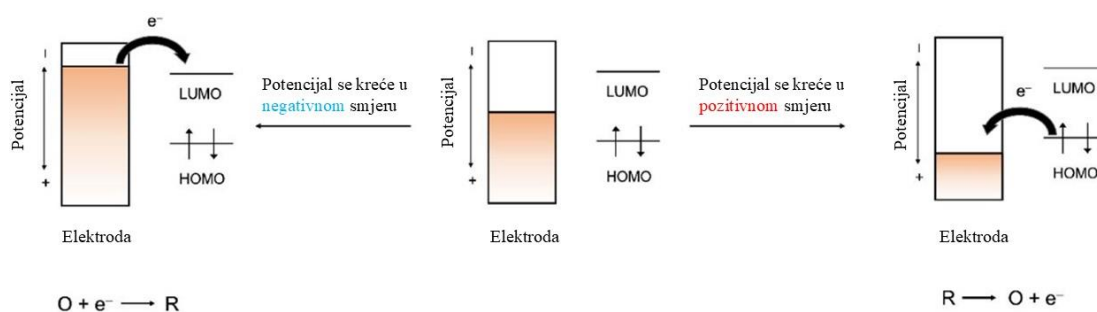
1. OPĆI DIO

1.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode su metode koje se koriste za ispitivanje reakcija u kojima se prenose elektroni. Elektrokemijska metoda odnosi se na oksidacijsko-redukcijske reakcije u krugu koji se sastoji od elektrolita, katode i anode pod vanjskim naponom, kako bi se potrebni elementi istaložili na katodi ili određene vrste oksidirale ili reducirale na elektrodi. Iz tog razloga elektrokemijske metode imaju vrlo široku primjenu u proučavanju mehanizama oksidacije i redukcije kako anorganskih tako i organskih vrsta. Osobito veliki interes privlače još od polovice 20. stoljeća u svrhu kvantitativne i kvalitativne analize svih vrsta uzoraka.[1]

1.2 CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltometrija (CV) je najčešće korištena metoda od svih elektrokemijskih metoda. Ciklički voltamogram pruža uvid u razumijevanje reakcije elektrokemijski aktivnih vrsta koja se odvija na površini elektrode. Ova metoda osigurava podatke o kinetičkim te termodinamičkim informacijama koje ovise o analitu i uvjetima u kojima se reakcija odvija, poput vrste i koncentracije elektrolita, vrste elektrodnog materijala, temperature, pH vrijednosti i drugih parametara. Početni potencijal je potencijal pri kojem ne teče vanjska struja i oznaka mu je E_i , a potencijal se skenira pri postavljenoj konstantnoj brzini u početnom vremenu, a zatim slijedi reverzibilni smjer kretanja pri potencijalu okreta, E_k . U CV potencijal se definira funkcijom vremena. Prijenos potencijala na elektrodu prikazan je na slici 1.[2]



Slika 1. Shema prijenosa elektrona. [2]

Oksidans se reducira (dobiva elektrone), dok se reducens oksidira (gubi elektrone). Kada se potencijal kreće u negativnom smjeru, energija elektrona raste na radnoj elektrodi što pogoduje redukcijskim reakcijama, a kada se potencijal kreće u

pozitivnom smjeru tada se energija elektrona u elektrodi snižava i to pogoduje oksidacijskim reakcijama. Za provedbu voltametrijskih mjerenja potreban je potenciostat, elektrode (radna elektroda, protuelektroda (kontra elektroda) i referentna elektroda), elektrokemijska ćelija, radna otopina i računalo.[2]

1.2.1 VOLTAMETRIJSKI ODZIV I REVERZIBILNOST REAKCIJE

Reverzibilna i kvazireverzibilna reakcija redukcije može se prikazati na sljedeći način:



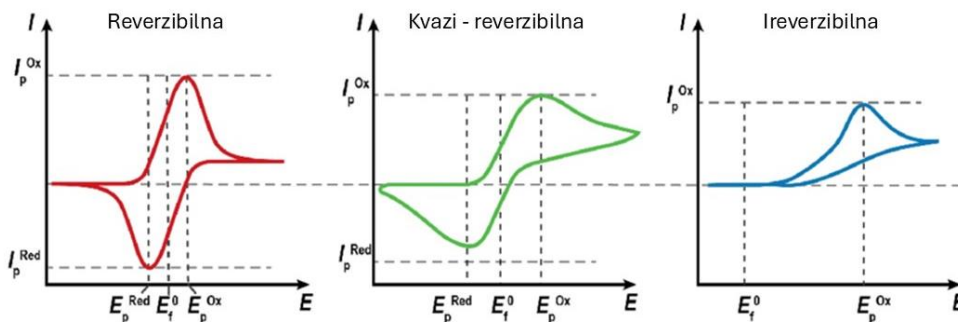
uz uvjet da su obje vrste redoks-sustava (O i R) stabilne i topljive u odabranom elektrolitu. Struja voltametrijskog odziva ovisi o kinetici polaznog i povratnog procesa elektrodne reakcije.

Za ireverzibilni elektrodni proces redukcije:



standardna konstanta brzine promjene koncentracija elektrodne reakcije vrlo je malena.

Voltametrijski odziv ima oblik vala iz čijeg oblika i vrijednosti strujnih maksimuma možemo izvesti zaključke o reverzibilnosti reakcije (Slika 2)



Slika 2. Ciklički voltamogrami reverzibilne, kvazireverzibilne i ireverzibilne reakcije.[3]

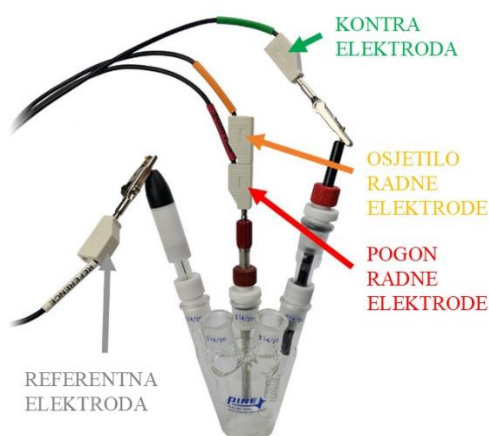
Tijekom voltametrijskih mjerenja električna neutralnost održava se migracijom iona u otopini. Kako se elektroni prenose s elektrode na analit, ioni se kreću u otopini kako bi kompenzirali naboj i zatvorili električni krug. Pomoćni elektrolit, najčešće sol, otopljena je u otapalu kako bi se smanjio otpor otopine. Najčešće otapalo u elektrokemijskim reakcijama je voda. Mješavina otapala i pomoćnog elektrolita obično se naziva “osnovni elektrolit”. [1]

Dobro otapalo ima sljedeće karakteristike:

1. Tekuće je na eksperimentalnim temperaturama
2. Potpuno otapa analit i visoke koncentracije pomoćnog elektrolita
3. Stabilan je prema oksidaciji i redukciji u potencijalnom rasponu eksperimenta
4. Ne dovodi do štetnih reakcija s analitom ili pomoćnim elektrolitom
5. Može se pročistiti [1]

1.2.2. Troelektrodni sustav

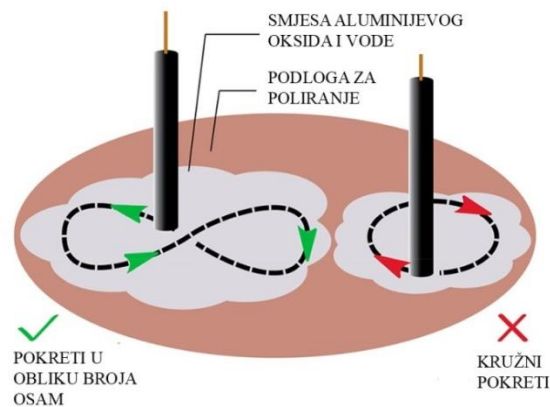
Troelektrodni sustav prikazan na slici 3 se koristi u većini elektrokemijskih mjerenja.



Slika 3. Referentna, radna i kontra. [4]

Zlato ili različite vrste ugljikovih materijala najčešće se koriste za izradu radnih elektroda (WE). Slični materijali mogu se koristiti za proizvodnju protuelektroda (CE). Kako bi se dobili pouzdani i ponovljivi elektrokemijski odgovori, sve elektrode moraju imati dobre karakteristike materijala željenog kemijskog sastava i mikrostrukture, dobro izrađene kontakte, bez nedostataka u tehničkoj izvedbi i jednostavne za upotrebu i regeneraciju. Primjer je žarenje na nedovoljno visokoj temperaturi može rezultirati nepotpunim uklanjanjem organskih dodataka koji bi mogli prekriti aktivni materijal, čime se smanjuje aktivna površina i povećava otpor prijenosu elektrona. To može rezultirati sporijom kinetikom i kvazi-reverzibilnošću i ireverzibilnošću redoks procesa. Kako bi se postigla poboljšana elektrokemijska svojstva, poboljšana elektroanalitička aktivnost i selektivnost prema ciljnim analitima, te omogućio brži prijenos elektrona i povećala aktivna površina radna elektroda može se dodatno modificirati brojnim materijalima.

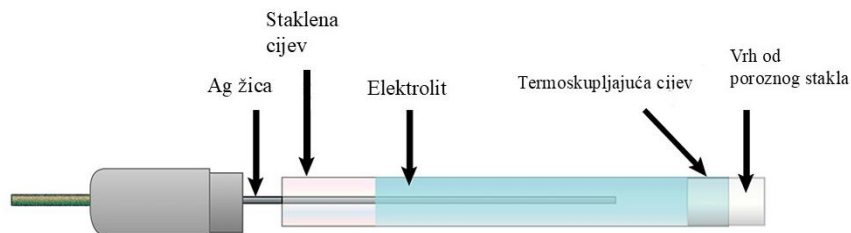
Predobrada elektroda još je jedna metoda koja se može primijeniti za poboljšanje elektrokemijskih karakteristika. Može se postići mehanički putem, brušenjem i poliranjem, ispiranjem i namakanja, ili elektrokemijskom, toplinskom i plazma obradom te laserskom aktivacijom. Odabir metoda prethodne obrade obično ovisi o vrsti i materijalu radne elektrode. Poliranje elektrode (Slika 4) provodi se na mekim podlogama odnosno posebnim platnenim podlogama za poliranje u vodenoj otopini aluminijske oksida (Al_2O_3) uz naknadno ispiranje elektrode destiliranom vodom ili etanolom kako bi se uklonile čestice poliranja. Zbog jednostavne praktične primjene, visoke učinkovitosti i sprječavanja oštećenja površine elektrode, elektrokemijska predobrada je najpoželjnija i najčešće primjenjivana metoda.[1,5]



Slika 4. Pravilno poliranje elektrode. [1]

Referentna elektroda

Referentna elektroda (RE) ima stabilan ravnotežni potencijal koji je dobro definiran. Predstavlja referentnu točku prema kojoj se može mjeriti potencijal drugih elektroda u elektrokemijskoj ćeliji. Tijekom mjerenja omogućava kontrolu potencijala radne elektrode. Najčešće korištene referentne elektrode su zasićena kalomelova elektroda (SCE), standardna vodikova elektroda (SHE) i Ag/AgCl elektroda. Jedan jednostavan način za sastaviti referentnu elektrodu na bazi srebra je uvođenje srebrne žice u malu staklenu cijev koja je na vrhu zatvorena poroznim staklom - fritom i napunjena elektrolitnom otopinom KNO_3 visoke koncentracije (Slika 5).[1]



Slika 5. Sastavljanje referentne elektrode na bazi srebra. [1]

Protuelektroda

Kada se na radnu elektrodu primjeni potencijal dolazi do redukcije ili oksidacije analita i struja počinje teći. Svrha protuelektrode (CE) je zatvoriti električni krug. Struja se bilježi kao protok elektrona između radne i protuelektrode. Kako bi se osiguralo da kinetika reakcije koja se odvija na protuelektrodi ne inhibira reakciju na radnoj elektrodi, površina elektrode je deset i više puta veća od površine radne elektrode. Kao protuelektroda obično se koristi platinasta žica ili disk, iako su dostupne i protuelektrode na bazi ugljika. Kada se proučava redukcija na radnoj elektrodi, oksidacija se događa na protuelektrodi. Kao takva, protuelektroda trebala bi biti što inertnija. Osim prijenosa naboja, protuelektroda je ključna za učinkovitost ćelije. Platina ili ugljik, koji su izuzetno vodljivi i katalitički aktivni, koriste se kako bi se osigurao učinkovit prijenos naboja i smanjio otpor električnog kruga. Materijal protuelektroda mora biti pažljivo dizajniran za optimalne performanse.[1,6]

Radna elektroda

Potenciostat se koristi za kontrolu primijenjenog potencijala radne elektrode kao funkcije potencijala referentne elektrode. Najvažniji aspekt radne elektrode je da se sastoji od redoks-internog materijala u potencijalnom rasponu od interesa. Vrsta radne elektrode može se mijenjati od eksperimenta do eksperimenta kako bi se osigurali različiti potencijalni “prozori“ ili kako bi se povećala adsorpcija vrste od interesa. Obzirom da se elektrokemijski događaj od interesa događa na površini elektrode, neophodno je da površina elektrode bude izuzetno dobro priređena, a njezina površina dobro definirana. Postupak za poliranje elektroda razlikuje se ovisno o vrsti elektrode i može se razlikovati od laboratorija do laboratorija. Kada se koriste elektrode kao što su stakleni ugljik ili platina, čiste površine elektroda mogu se pripremiti mehaničkim poliranjem. Da bi se uklonile čestice, elektroda se zatim sonificira u čistoj vodi. Elektrokemijski se elektroda aktivira predobradom cikličkom voltametrijom u kiselini ili lužini visoke koncentracije

skeniranjem u širokom području potencijala, kako bi se uklonile sve adsorbirane vrste zaostale nakon postupka poliranja.[1]

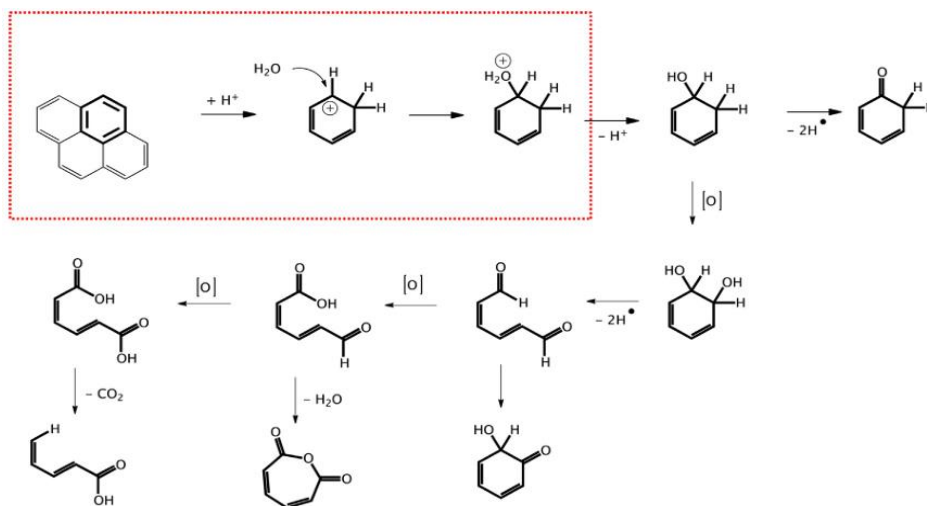
1.2.3. MATERIJALI U IZRADI ELEKTRODA

Staklasti ugljik

Jedan od najčešćih materijala današnjice za izradu radne elektrode je staklasti ugljik (*Glassy carbon*, GC). Staklasti ugljik zbunio je znanstvenike za materijale svojom strukturnom zamršenosti. Danas, nakon rada tisuća istraživača u posljednjih 50 godina, može se s pouzdanjem reći da s mikrostrukturnog stajališta, GC predstavlja jedan od najnedostižnijih monofaznih materijala poznatih čovječanstvu. GC pripada obitelji ugljika, čija sposobnost formiranja različitih alotropa zahvaljujući različitim hibridizacijama kovalentne C – C veze (sp , sp^2 , sp^3) već ukazuje na neobičnu strukturnu svestranost za monoatomske materijale. U GC-u raznolikost translacijskih simetrija, njihovo međusobno pričvršćivanje i druge interakcije, postojanje nedostataka strukture i učinci granice zrna i mikroporoznosti doprinose složenostima koje proizlaze iz postojećih kemijskih veza. Iako je GC strukturno amorfno, pojam "GC" nije sinonim za "amorfni ugljik", kao što je onaj koji tvori aktivni ugljen, ali također, posjeduje određeni stupanj čađe i ugljikovih mikročestica. Ključna razlika leži u prisutnosti planarnih, 2D strukturnih elemenata i činjenici da su gotovo svi atomi ugljika u njemu sp^2 hibridizirani, u usporedbi sa široko i nasumično raspoređenim hibridizacijama prisutnim u 'amorfnom' ugljiku. Za razliku od većine amorfne materijale koji kristaliziraju nakon žarenja GC nastaje na izuzetno visokim temperaturama (≈ 3000 K).[7]

Staklasti ugljik naširoko se koristi u elektrokemiji zbog svojih svojstava otpornosti na visoke temperature, tvrdoće, male gustoće i niskog električnog otpora. Zbog kemijske inertnosti, također se često koristi kao supstrat za katalizatore u prahu kako bi se procijenila njihova katalitička učinkovitost u elektrokemijskim reakcijama. Međutim, pri visokim anodnim potencijalima može doći do oksidacije ugljika, što dovodi do pogoršanja elektrode i potencijalno utječe na procjenu elektrokemijske učinkovitosti katalizatora. Elektrokemijska oksidacija ugljika s druge strane može biti korisna za elektrokemijske senzore, jer se na taj način aktivira elektroda, što dovodi do brže kinetike prijenosa elektrona. Dobro pripremljena površina GC sadržava male pore, a time i malu propusnost za plin i tekućinu.

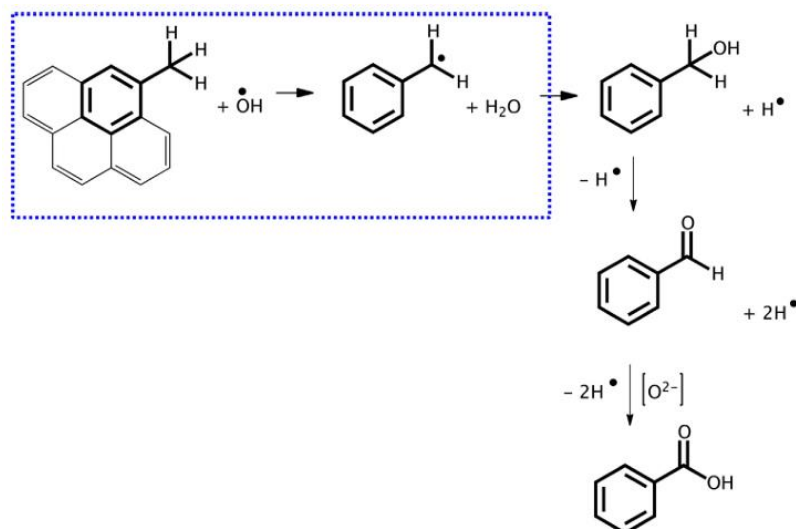
Različito ponašanje ugljikove elektrode pri razgradnji ovisno je o pH elektrolita i može se objasniti glavnim reakcijama oksidacije ugljika u kiselom i lužnatom vodenom elektrolitu. U kiselom mediju (Slika 6) prisutnost protona katalizira elektrofilno dodavanje vode u konjugiranom π -sustavu. Naknadni koraci oksidacije i kondenzacije temelje se na poznatom mehanizmu oksidacije u organskoj kemiji.[8]



Slika 6. Predloženi mehanizam elektrofilne reakcije u kiselom mediju (točkasti okvir) i nekoliko mogućih koraka oksidacije u karboksilne skupine, anhidrate, aldehide ili alkohole koji dovode do deformacije prstena ili otvaranja strukture. [7]

Postupak oksidacije u alkalnom mediju (Slika 7) mogao bi se objasniti radikalnim procesom. Reakcija OH^- iona na anodnim potencijalima dovodi do stvaranja hidroksilnih radikala. Radikali preferirano reagiraju s lancima alkilnih mjesta.

Dobro definirane površine elektroda mogu se pripremiti mehaničkom obradom, koja uključuje abraziju brusnim papirom i poliranje glicom. Ostale metode, kao što je laserska obrada, zračenje staklastog ugljika ultrazvukom ili aktivacija staklastog ugljika pomoću ugljičnog luka, primijenjene su za stvaranje ponovljive i aktivne površine.[9]



Slika 7. Lokalna selektivna radikalna supstitucija na alkilnim bočnim lancima u alkalnom mediju (točkasti okvir) i moguća oksidacija [7]

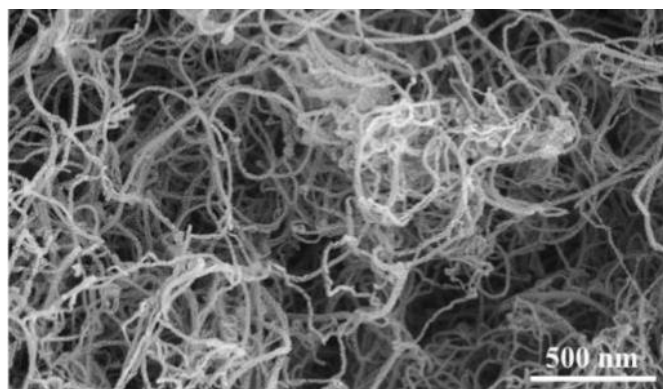
Ugljikove nanocjevčice

Neuronska sučelja temeljena na nizovima mikroelektroda (ME) proširila su naše razumijevanje mozga i pokazali su se obećavajućim za liječenje neuroloških poremećaja uzrokovanih bolestima i ozljedama. Alternativa postojećim mikroelektrodama na bazi metala ili silicija su elektrode od mikrovlakana, koje su uglavnom izrađene od materijala na bazi ugljika kao što su ugljična vlakna (CF), ugljikove nanocjevčice (CNT) i grafen. Ova mikrovlakna na bazi ugljika, malih mikronskih dimenzija, mekšim površinama, poboljšanom fleksibilnošću i podesivim elektrokemijskim svojstvima, mogu riješiti mnoge izazove povezane sa zahtjevima za specifičnim dizajnom elektroda. Ugljikove nanocjevčice su od svog pojavljivanja u području bioinženjerstva privukle veliku pozornost zbog svoje biokompatibilnosti te izvanrednih mehaničkih, električnih i kemijskih svojstava. Zbog svojih velikih aktivnih površina i visoke vodljivosti, CNT su primijenjene kao premazi za poboljšanje performansi elektroda za neuronsku stimulaciju i snimanje. Ugljikove nanocjevčice mogu se prevesti u mikrovlakna ili pređe kontinuiranim tkanjem. Promjeri sintetiziranih vlakana obično su u rasponu između 5 i 50 μm , ovisno o parametrima pređenja.[10]

Otkako su 1991. otkrivene ugljikove nanocjevčice (CNT), ova klasa nanomaterijala opsežno je istražena za različite primjene. Realizirane su različite vrste konfiguracija koje sadrže jednoslojne, (SWCNT) dvoslojne (DWCNT) ili višeslojne (MWCNT) ugljikove nanocjevčice. Mreža ugljikovih nanocjevčica s jednom stjenkom

(SWCNT) obećavajući je elektrodni materijal za biodetekciju. Nažalost, povezanost između njihovih fizičkih i kemijskih svojstava i promatrane elektrokemijske izvedbe nije poznata. To sprječava bilo kakvu sustavnu optimizaciju svojstava mreže prema specifičnim analitima. Izvedba CNT-a uvelike ovisi o parametrima sinteze kao i mogućim koracima pročišćavanja/modifikacije koji se često koriste za uklanjanje zaostalih čestica metalnog katalizatora i amorfni ugljičnih nečistoća. Bez dubljeg strukturnog znanja o njima, otkrivanje bilo kakve povezanosti strukture i svojstava za te materijale postaje izuzetno teško. Kako na elektrokemijsku izvedbu ugljičnih elektroda utječu brojni čimbenici uključujući mikrostrukturu, čistoću površine i kemiju površine, može se očekivati da CNT proizvedeni u različitim uvjetima mogu pokazati širok spektar elektrokemijskih svojstava.[11]

Slika 8. prikazuje sliku strukture SWCNT-a, skeniranu elektronskim mikroskopom kao bezgranične cijevi zbog van der Waalsovih sila. Kao jedan od ugljikovih materijala, ugljikove nanocjevčice s jednom stjenkom posjeduju visoku vodljivost, veliku specifičnu površinu, brojne kanale za prijenos naboja i obilje aktivnih mjesta.[12,13]

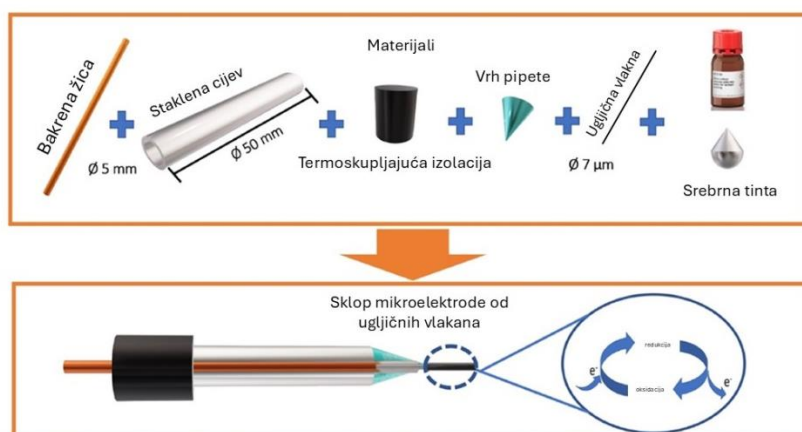


Slika 8. Slika SWCNT-a.[14]

Elektrode od mikrovlakana

Ugljikova mikrovlakna (*Carbon nanofibers*, CNF) su hidrofobne prirode. To su mikrovlakna promjera većeg od 100 nm. Površinska kemija CNF-a može se prilagoditi uz pomoć različitih funkcionalnih skupina, koje se koriste u različitim poljima kao što su elektrokemijsko skladištenje energije, senzori i pročišćavanje vode. Glavne metode za sintezu CNF uključuju kemijsko taloženje iz pare, proizvodnju uz pomoć šablona i raspršivanje uz pomoć žara.[15]

Ugljična vlakna (CF) smatraju se prikladnim materijalom za senzorsku elektrodu zbog svoje izvrsne električne i toplinske vodljivosti, niske gustoće, visoke elastičnosti i visoke otpornosti na koroziju. CF mikroelektroda (CFME) ima nizak omski pad napona, visoku osjetljivost, učinkovit prijenos mase i željeni omjer signala i šuma što, uz vlastite odgovarajuće karakteristike, čini CFME prikladnom alternativom za elektrokemijsku analizu. Slika 9. sažima proces izrade mikroelektrode od ugljičnih vlakana.[16]



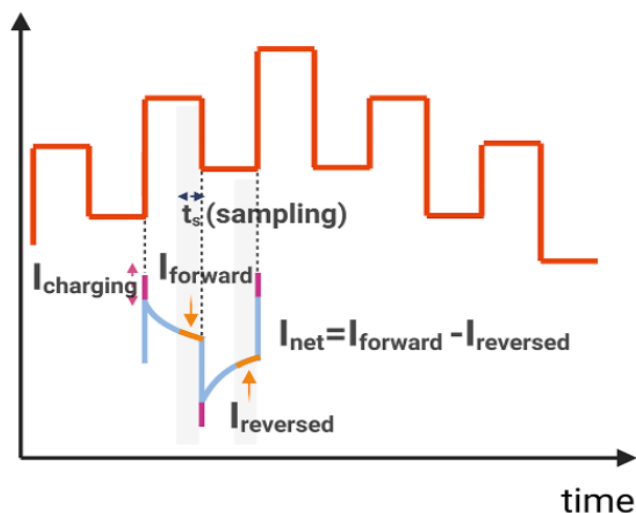
Slika 9. Proces razvoja mikroelektrode od ugljičnih vlakana [15]

Ciklička voltometrija s brzim skeniranjem (FSCV) s mikroelektrodama od ugljičnih vlakana nudi jedinstvenu mogućnost otkrivanja ciljnih neurotransmitera brzom oksidacijom i redukcijom elektroaktivnih vrsta na površini elektrode. Mala veličina i biokompatibilnost CFME u kombinaciji s izvrsnom prostorno-vremenskom rezolucijom omogućuje mjerenje pH u mozgu *in vivo* kroz relativno dugo vremensko razdoblje.[17]

1.3 VOLTAMETRIJA S PRAVOKUTNIM SIGNALOM POBUDE

Voltometrija s pravokutnim signalom pobude (*Sqaure Wave Voltammetry*, SWV) je voltametrijska metoda s primjenom simetričnih impulsa pri progresivno rastućim potencijalima na elektrokemijski sustav. Napon se mijenja u koracima i struja se mjeri na kraju svakog potencijalnog koraka. Reakcija elektrode teče istovremeno u anodnom i katodnom smjeru putem izmjeničnih promjena impulsa (naprijed-natrag) koji se javljaju na svakom potencijalnom koraku. Rezultat mjerenja su dvije krivulje odziva, odnosno struje koje se naknadno oduzimaju jedna od druge kako bi se izračunala neto-struja. Neto-struja je signal koji se vizualizira u voltamogramu. Time se mjeri prijenos naboja između analita i radne elektrode.[18]

SWV nudi atraktivnu alternativu CV-u kroz koju se doprinos nefaradajske struje u voltamogramu može svesti na minimum. Umjesto linearnog pomaka potencijala s definiranom brzinom skeniranja, potencijal se primjenjuje kao valni oblik određene amplitude impulsa (E_{amp}) i širine (t_p) na stepenasti način: u prvom ciklusu nakon pozitivnog E_{amp} impulsa slijedi suprotno usmjeren negativni E_{amp} impuls jednake amplitude, nakon čega slijedi sljedeći ciklus koji počinje s povećanim potencijalom u skladu s E_{step} vrijednošću (Slika 10).[19]

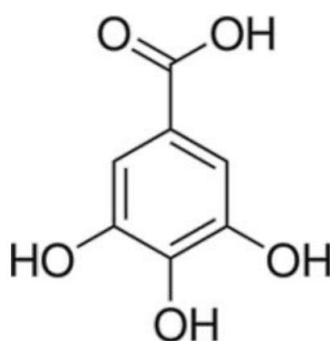


Slika 10. SWV komponente struje označene su: ružičasto - struja punjenja, plavo - struja na kraju impulsa polazne promjene potencijala ($I_{forward}$) i narančasto - na kraju impulsa povratne promjene potencijala ($I_{reversed}$).[18]

SWV objedinjuje prednosti cikličke voltetrije i diferencijalne pulsne voltetrije (DPV), omogućujući visoko razdvajanje struje punjenja i pozadinske struje i bolju definiciju signala. Štoviše, rastući pravokutni val korišten u SWV-u ponavlja oksidaciju i redukciju elektroaktivnih vrsta, čime se povećava osjetljivost i omogućuje uvid u kinetičke informacije kroz analizu polazne i povratne struje. Uglavnom se koristi za analizu odgovora unutar određenog raspona SW frekvencija, kao analogija učinka brzine skeniranja. Ako se kvazireverzibilni maksimum promatra sam u frekvencijski normaliziranoj vršnoj struji, moguće je dobiti informacije o reverzibilnosti i brzini prijenosa elektrona. Primjenjivost SWV-a za razumijevanje elektrodnih mehanizama odnedavno je kritički ocijenjena kao vrlo učinkovita, te se intenzivno istražuje radi brojnih informacija koje daje o mehanizmu prijenosa elektrona određene reakcije.[20,21]

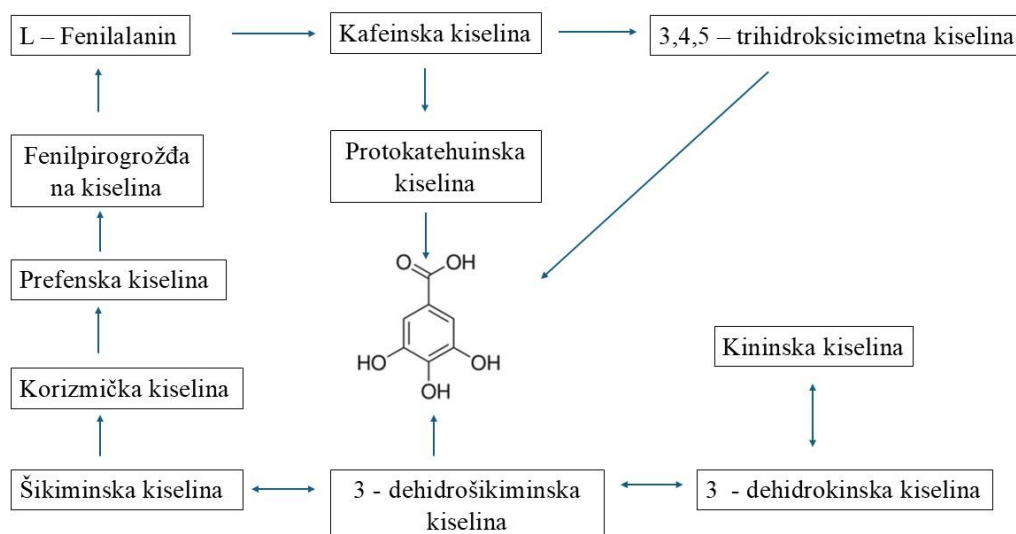
1.4 GALNA KISELINA

Galna kiselina je kristalna krutina, bijele do blago žute boje. Molekularna težina je 170,11954 g/mol, a sumarna molekularna formula $C_7H_6O_5$. Talište je 210 °C s razgradnjom između 235 i 240 °C, pri čemu nastaju ugljikov dioksid i ugljikov monoksid. Gustoća je 1,69 kg/dm³ pri 20 °C, *pKa* je 4,40, a koeficijent otapanja u vodi, *logP* 0,70 pri 20 °C. Topiv je u vodi, alkoholu, eteru i glicerolu i praktički netopiv u benzenu, kloroformu i eteru. Kemijska struktura galne kiseline prikazana je na slici 11.



Slika 11. Struktura galne kiseline

Iako njezina biogeneza nije do kraja definirana, poznato je da je galna kiselina jedan od međuprodukata šikiminske kiseline, koja postoji u biljkama i u određenim mikroorganizmima. Dobivanje galne kiseline počinje s aminokiselinama, posebno l-fenilalaninom i proizvodi važnu klasu spojeva, kao što su kumarini, alkaloidi, lignani i polifenoli. Smatra se jednom od glavnih fenolnih kiselina, takozvanim standardom za ostale fenole. Galna kiselina je benzojeva kiselina i od velike je važnosti za formiranje takozvane skupine tanina, koji se mogu hidrolizirati galatotanimom, a formirana je od jedinice šećera i promjenjivog broja molekula fenolne kiseline. Načini dobivanja galne kiseline prikazani su na slici 12.



Slika 12. Tri načina dobivanja galne kiseline.[22]

Galna kiselina se odvaja pomoću otapala iz raznih biljnih izvora. Znanstvenici su koristili kombinaciju ionskih tekućina i anorganskih soli kako bi razumjeli utjecaj strukture ionske tekućine i pH vodenog medija na raspodjelu galne kiseline. Pri niskom pH, neionizirana galna kiselina migrira u tekuću fazu bogatu ionima, dok njezina konjugirana baza prelazi u fazu soli. Tankoslojnom kromatografijom galna kiselina se može identificirati i izolirati iz etanolnih ekstrakata.[23]

Zbog svojih značajnih prednosti, kao što su visoka osjetljivost i selektivnost, brzo vrijeme odziva i jednostavnost primjene, fluorescentna tehnika je perspektivan način za detekciju galne kiseline.[24]

1.5 ZAČINI I AUTOHTONO DALMATINSKO BILJE

Lavanda

U rod *Lavandula* svrstava se 48 različitih vrsta zimzelenih grmova podrijetlom iz suhih i stjenovitih staništa Sredozemlja, te od sjeverne Afrike do jugozapadne Azije. Lavanda (Slika 13.) je vazdazelena otporna višegodišnja biljka kojoj je prirodno stanište Sredozemlje, rasprostranjena je i u drugim dijelovima Europe. Uobičajena visina joj je 0,5-1 m. Donji listovi su više dlakaviji od onih na vrhu koji su svijetlosivi, aromatični i uski. Cvjetovi lavande su pravoljubičasti ili svijetloljubičasti koji čine dugačke klasove.

Vrsta lavande koja je niža i ima sivo-zelene i kraće listove koji imaju nalik na dva leptira ili dva zečja uha je francuska ili španjolska lavanda. Idealno mjesto za rast je dobro odvodnjeno tlo i sunčano mjesto. Najčešće raste na kamenjarima te je samim time i otporna na visoke temperature i kamenito tlo. Primjena lavande ima širok spektar od formiranja niskih živica do aromatiziranja octa, paštete i keksa, te se koristi u kozmetici i medicini. Pripravci od lavande služe za opuštanje i umirivanje, dok se njena eterična ulja koriste kod uboda, posjeklina i opekline, protiv glavobolje i kožnih bolesti u kremama. Od davnina njezina primjena osušenih listova koristi se za pakiranje u platnene vrećice protiv moljaca.[25,26]



Slika 13. Lavanda [27]

Kadulja

Kadulja (Slika 14) ima aromatični, razgranati polugrm koji čine aromatični, hrapavi i krupni listovi. Najviše se primjenjuje u kulinarstvu dok plavi i ljubičasti cvjetovi sudjeluju u stvaranju cvjetnjaka. Postoje različite sorte kadulje poput tzv. Zlatne kadulje koja ima zlatno-žuto i zeleno prošarane listove, sorta Tricolor ima bijele, ljubičaste, zelene i ružičaste šare naposljetku sorta Purpurascens ima tamno ljubičaste listove. Za njezin rast poželjno je suho i toplo stanište, sunčani položaj te ocjedito tlo. Ima jako korijenje kojim se veže za tlo kamenjara, dok se u kontinentalnim krajevima sadi na zaklonjenim mjestima. Najjača aroma kadulje javlja se prilikom rezanja dijelova biljke za sušenje, prije otvaranja cvjetova. Ima denzificirajuće i protuupalno djelovanje te veliku primjenu u medicini.[24]



Slika 14. Kadulja [28]

Klinčić

Klinčić (Slika 15) je dobro poznat kao osušeni cvjetni pupoljak *Syzygium aromaticum* L. Prisutan je u raznim primjenama, od aromatiziranja jela do liječenja zdravstvenih problema. Klinčić je bogat izvor fenolnih spojeva, posebice flavonoida i fenolnih kiselina. Fenolni spojevi prisutni u ovoj ljekovitoj biljci uglavnom su odgovorni za antibakterijsko, fungicidno, antivirusno, antitumorsko i anestetičko djelovanje. Klinčić se zbog antioksidativnih svojstava svojih fenolnih spojeva intenzivno koristi kao prirodni konzervans za hranu. Ulje klinčića je eterično ulje i dobiva se iz osušenih cvjetnih pupova *Eugenia Caryophyllata*. Dokazano je da ima analgetska, antioksidativna, protuupalna, antikancerogena, antiinfektivna (protugljivična, antiparazitska, antivirusna) svojstva i svojstva zacjeljivanja rana. Glavni aktivni spoj je eugenol koji je odgovoran za te učinke. Utvrđeno je da biljna tekućina za ispiranje usta na bazi klinčića smanjuje oralni mukozitis izazvan zračenjem kod pacijenata s rakom glave i vrata. Eugenol ima antioksidativna, karminativna, antispazmatična, antiseptička i antibakterijska svojstva. Također pokazuje antimutagene učinke. [29,30,31]



Slika 15. Klinčić [32]

Muškatni oraščić

Sjemenke muškarnog oraščića (Slika 16) sadrže miristinšku kiselinu, trimiristin, gliceride masnih kiselina i eterično ulje, za koje se smatra da je odgovorno za trovanje muškarnim oraščićem, a koje sadrži miristicin, elemicin, eugenol i safrol. Koncentracija eteričnog ulja u sjemenkama muškarnog oraščića je oko 5-15%, a njegove glavne komponente su terpenški ugljikovodici, sabinen, pinen, kamfen, *p*-cimen, felandren, terpinen, limonen, a zajedno s mircenom čine 60%–80% sastava ulja, dok oksigenirani terpeni, linalol, geraniol i terpineol, čine približno 5%–15% i aromatski eteri, miristicin, elemicin, safrol, eugenol i eugenol derivati, zajedno čine 15-20%. Sjeme muškarnog oraščića i njegovo eterično ulje odavno se koriste u medicini kao rekreacijsko opojno sredstvo, s obzirom na navodno halucinogena svojstva sjemena. Eterično ulje muškarnog oraščića koristi se u kozmetičkoj industriji.[33]



Slika 16. Ilustrirano sjeme muškarnog oraščića [33]

Cimet

Rod *Lauraceae* obuhvaća i poznatu neuobičajenu tropsku biljku stablašicu, cimet. Koristi se u prirodnoj istočnjačkoj medicini i kao aroma za hranu već stotinama godina. *Cinnamomum verum*, često zvan cejlonski cimet ili *C. zeylanicum*, vrsta je cimeta koja se često uzgaja. Cimet kao začim se dobiva iz unutarnje kore stabla (Slika 17), ali sadrži i mnogo aktivnih kemikalija u svom korijenju i lišću. Glavne aktivne komponente dostupne u cimetu su cinamaldehyd, cinamil alkohol, cinamil acetat, cimetna kiselina, eugenol, kamfor, tanin, metilhidroksi halkon polimer. Eterično ulje cimeta sadrži bioaktivne komponente cinamat, cimetni alkohol, cimetnu kiselinu i cimetov aldehyd. Na slici 17 navedene su zdravstvene vrijednosti cimeta.[34]



Slika 17. Klinički utvrđene zdravstvene prednosti [30]

Najkvalitetnija vrsta cimeta je cejlonski cimet zbog svojih intenzivnih aroma. Vrijeme berbe ja između svibnja i listopada. Kora cimeta čiji su komadi dugi oko 30 cm i vrlo tanki (0,3 - 1 mm) skupljaju se u svrhu očuvanja aromatičnih materijala i eteričnih ulja (0,5 – 1 % cimetni aldehid) i na taj način se suše.[35]



Slika 18. Cimet [36]

Smilje

Helichrysum italicum, obično poznat kao smilje (Slika 19), biljka je koja raste diljem Mediterana, ali posebno u jadranskoj regiji, gdje je lokalno stanovništvo koristi za niz bolesti zbog njezinih protuupalnih, antioksidativnih i antibakterijskih svojstava. Ova biljka je autohtona biljka na mediteranskom području. Visoke su do 60 cm visine dok su stabljike sitne i nose listove koji su dlakavi, a cvat obuhvaća više manjih cvjetova. Cvjetovi su zlatnožute boje, a postoje i one biljke s bijelim ili narančastim cvjetovima. Ovi cvjetovi zadržavaju boju i nakon sušenja. U periodu od kraja svibnja do srpnja odvija se cvatnja. Sve je veći interes za korištenje ove biljne vrste, poglavito eteričnog ulja u kozmetičkoj i parfemskoj industriji. Česta upotreba eteričnog ulja smilja u formulaciji proizvoda za njegu kože rezultat je njegove sposobnosti da odgodi proces starenja kože. Fitokemijska istraživanja eteričnog ulja smilja otkrila su prisutnost seskviterpena poput γ -kurkumena i β -selinena, kao i monoterpena, s α -pinenom i neril acetatom kao glavnim

komponentama. Terpeni, kao najkarakterističniji sastojci, mogli bi biti učinkoviti kao potencijalni agensi za zacjeljivanje rana.[37,38]



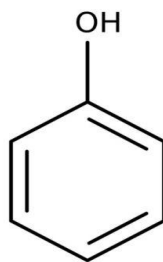
Slika 19. Smilje [39]

1.6 ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom spoju, odnosno slobodnom radikalu. Njihova uloga je neutraliziranje djelovanja slobodnih radikala i time štite ljudski organizam od raznih bolesti. Sama biljka se svojim antioksidansima štiti od nametnika, bolesti, oksidacijskog stresa i okolišnog utjecaja, a u hrani štite lipide od kvarenja.[40]

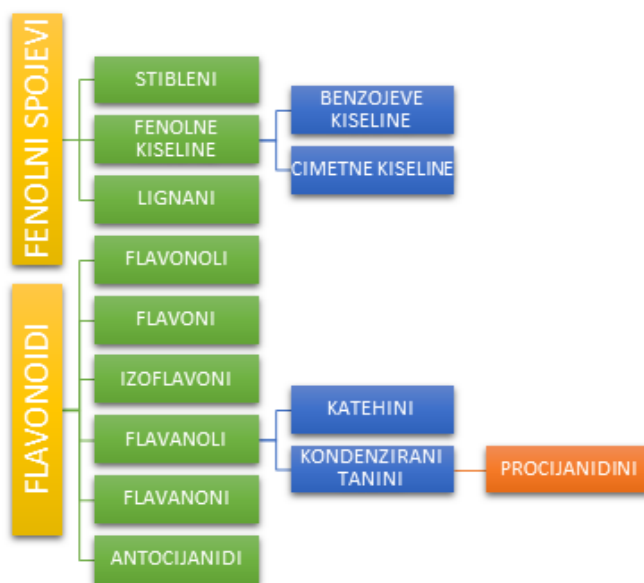
Antioksidativno djelovanje odnosi se na sposobnost bioaktivnog spoja da očuva staničnu strukturu i funkciju neutralizacijom slobodnih radikala, inhibicijom peroksidacije lipida i sprječavanjem drugih oblika oksidativnog oštećenja. Na sadržaj polifenola, razinu askorbinske kiseline i antioksidativni kapacitet u voću prvenstveno utječu vrijeme berbe i genetika, kao i klimatski čimbenici. Među čimbenicima koji utječu na antioksidativni kapacitet, fenolne spojeve i vitamin C u narančastom voću su uvjeti okoliša kao što su zračenje, temperatura (varijacije dan-noć), vlažnost tla i agronomsko upravljanje. Antioksidativni kapacitet naranči prvenstveno ovisi o sadržaju vitamina C u voću.[41]

Fenolni spojevi (Slika 20) čine veliku skupinu kemijskih spojeva, odnosno bioloških molekula s različitim funkcijama bitnim za rast, razvoj i obranu biljaka. Takve vrste sadrže hidroksilnu skupinu ($-OH$) vezanu na aromatsku skupinu, s prstenastom strukturom poput benzena.



Slika 20. Opća strukturalna formula fenola

Također su prisutni u strukturama hormona, vitamina, aminokiselina i složenih antioksidansa. Farmakološke studije fenolnih spojeva ukazuju na veliku biološku važnost i svojstva fenolnih spojeva, kao što su protuupalna, antibakterijska, antikonvulzivna, antitumorska i antioksidativna svojstva. Općenito, fenolni spojevi prirodni su spojevi koji se uglavnom nalaze u voću, povrću, žitaricama i mogu pomoći biljkama da se nose sa uzročnicima stresa. Zbog svoje kemijske strukture, fenoli, kao što su flavonoid, kvercetin, stilben i resveratrol proizvedeni iz grožđa, poznati su po svojim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima, korisnim u zaštiti bitnih tkiva od abiotičkih stresova i patogenih infekcija. Shematski (Slika 21) je prikazana podjela fenola. Ove karakteristike ih čine svestranim molekulama s obećavajućom terapijskom primjenom kod ljudi. Salicilna kiselina također je fenolni spoj koji djeluje kao ključna signalna molekula u imunitetu biljaka, pružajući otpornost protiv širokog spektra patogena.[42,43]



Slika 21. Podjela fenola

1.7 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda koncentriranja i razdvajanja tvari. Ukoliko se ekstrakcija provodi iz homogenih smjesa ekstrahira se na temelju različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Dobivenu otopinu potrebno je kristalizirati da bi se dobila čista tvar.

Postoje različite metode koje se koriste za ekstrakciju:

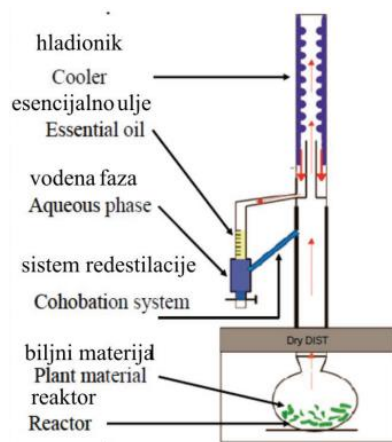
1. Ekstrakcija otapalima: dekokti, maceracija, ekstrakcija s uljima
2. Destilacija: direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom, Soxhlet destilacija, suha destilacija, destilacija s CO₂
3. Hladno prešanje
4. Nekonvencionalne tehnike: turbo–ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija s električnom energijom

Kad se vrši ekstrakcija čvrstih tvari potrebno je povećati brzinu gibanja faza u sredini, povećati površinu uzajamnog djelovanja usitnjavanjem među fazama, produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije za povećanje količine tvari. Pri sobnoj i povišenoj temperaturi ekstrahiraju se organske tvari iz čvrste faze postupcima poput perkoliranja ili maceriranja. Pri povišenoj temperature ekstrakcija se može provoditi zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom. Više je načina odvijanja ekstrakcije: kontinuirana, diskontinuirana, jednostupanjska, višestupanjska, protustrujna i ekstrakcija unakrsnim stupanjem s jednim otapalom.[44]

1.7.1 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije: ekstrakcija u zatvorenim posudama uz kontrolu tlaka i temperature, te: ekstrakcija u otvorenim posudama u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Tlak u posudi je funkcija volumena i vrelišta otapala. Mikrovalna ekstrakcija se može koristiti za izdvajanje temperaturno osjetljivih spojeva kao što su eterična ulja. Veličina čestica i raspodjela veličina obično imaju značajan utjecaj na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije. Utvrđeno je da je mikrovalna ekstrakcija neučinkovita ukoliko se provodi iz potpuno suhih ili svježih neosušenih materijala uz heksan kao ekstrakcijsko otapalo. Izbor otapala ovisi o dielektričnoj konstanti otapala koja je mjera upijanja mikrovalova, te o topljivosti

realnog uzorka i interakciji između otapala i realnog uzorka. Poželjne osobine su da otapalo ima visoku dielektričnu konstantu i da nije „prozirno“ na utjecaj mikrovalova, odnosno da dobro upija energiju mikrovalova. Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom. Temperatura je još jedan važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju. Povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. S druge strane, visoke temperature mogu uzrokovati razgradnju bioaktivnih termolabilnih tvari. Stoga se temperatura i snaga optimiziraju, kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature. Na slici 22. prikazan je uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.[43]



Slika 22. Shema uređaja za mikrovalnu ekstrakciju

1.8 SPEKTROFOTOMETRIJA

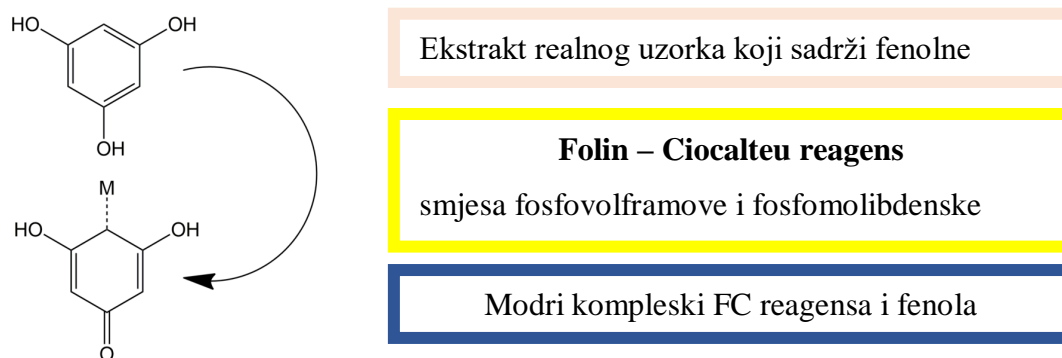
Spektrofotometrija je metoda kojom se mjeri koliko kemijska tvar apsorbira svjetlosti, odnosno zračenja, mjerenjem intenziteta svjetlosti dok snop svjetlosti prolazi kroz uzorak. Osnovno načelo je da svaki spoj apsorbira ili propušta svjetlost u određenom rasponu valnih duljina. Spektrofotometrija je grana elektromagnetske spektroskopije koja se bavi kvantitativnim mjerenjem svojstava refleksije ili prijenosa materijala kao funkcije valne duljine. Iako se spektrofotometrija najčešće primjenjuje na ultraljubičasto, vidljivo i infracrveno zračenje, moderni spektrofotometri mogu ispitivati široke dijelove elektromagnetskog spektra, uključujući rendgenske, ultraljubičaste, vidljive, infracrvene i/ili mikrovalne valne duljine. Spektrofotometrija je alat koji ovisi o kvantitativnoj analizi molekula ovisno o tome koliko svjetlosti apsorbiraju obojeni spojevi. Široko je korištena tehnika koja ima prednost, jer postoji mnogo kemijskih tvari (uglavnom aromatskih kao i mnogih farmaceutskih proizvoda) koje apsorbiraju svjetlost u UV-Vis području, pa su

stoga njihovi UV-Vis spektri karakteristični za svaku tvar. Međutim, ne apsorbiraju svi spojevi UV-Vis zračenje, a s druge strane neki se spektri mogu i preklapati. Kombiniranjem UV-Vis i masene spektrofotometrije dolazi se do potpune informacije o vrlo sličnim tvarima.[45]

FOLIN-CIOCALTEU METODA

Folin-Ciocalteu (FC) metoda je najčešće korištena analiza za mjerenje ukupnog sadržaja fenola u hrani/biljnim proizvodima. Posljednjih godina raste interes za primjenu ove metode na ljudskim uzorcima zbog njene jednostavnosti i učinkovitosti.[46]

Kontinuirana uporaba FC metode kao referentne metode za kolorimetrijsku kvantifikaciju ukupnih fenola, gotovo stoljeće nakon njezina razvoja, posljedica je njezine jednostavnosti upotrebe, brzine i niske cijene. FC metoda (Slika 23) temelji se na redukciji heteropolifosfovolframata/fosfomolibdata u alkalnom mediju i naknadnoj oksidaciji fenolata u kinone. Ipak, loša strana metode je nedostatak specifičnosti i unakrsna reaktivnost s drugim redukcijskim tvarima u sirovim uzorcima algi, ponajviše proteinima, askorbinskom kiselinom, aminokiselinama, reducirajućim šećerima i drugim monosaharidima. Uz ove, druge moguće smetnje koje su normalno prisutne u većini hrane, biljaka i biomase morskih algi, uključuju aromatske amine, nukleotide, sumporov dioksid, tiole, nezasićene masne kiseline, Fe^{2+} , vitamine, aldehide, ketone i organske kiseline. Tijekom godina predloženi su različiti pristupi poboljšanju specifičnosti FC metode, uglavnom kroz fizičko uklanjanje smetnje. Takvi protokoli pročišćavanja ili čišćenja oduzimaju puno vremena, povećavaju ukupne troškove i mogu dovesti do degradacije ili gubitka fenolnih spojeva.[47]

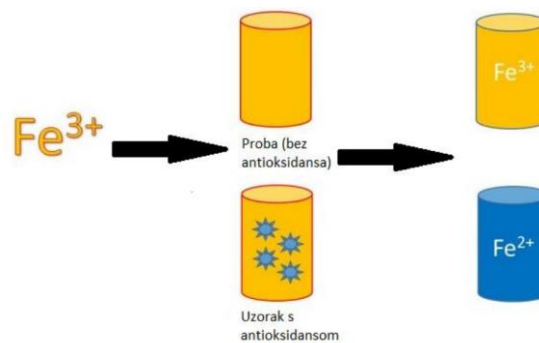


Slika 23. Redukcija Folin – Ciocalteu reagensa [48]

FRAP METODA

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) jedna je od metoda procjene antioksidacijskog kapaciteta, koja se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion. Metoda je poznata već više od 20 godina i može se susresti u literaturi sa različitim neznatnim modifikacijama. Standardno vrijeme reakcije je 10 minuta, ali to vrijeme nije dovoljno za reakciju kod nekih antioksidansa. Antioksidativni kapacitet (AC) je ukupno svojstvo mnogih tvari koje se nalaze zajedno u određenoj hrani. Antioksidansi obično uključuju fenolne/polifenolne tvari, ali i neke od vitamina. Tvari mogu međusobno djelovati aditivno, antagonistički ili sinergistički. Tvari koje se nazivaju antioksidativni sinergisti su tvari s minimalnim ili nikakvim antioksidativnim kapacitetom, ali mogu povećati antioksidativni kapacitet nekih antioksidansa. Sinergijski učinak nastaje kada je dobivena vrijednost veća od zbroja svakog od djelujućih elemenata pojedinačno. Antagonistički učinak je kada je učinak dviju kombiniranih komponenti manji od zbroja učinaka svake komponente pojedinačno.[49]

Shematski prikaz FRAP metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta prikazan je na slici 24.



Slika 24. Shematski prikaz FRAP metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta.[50]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

Sve navedene kemikalije i čistoća i porijeklo navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Korištene kemikalije

Kemikalija	Molekulska formula	Dobavljač
Dušična kiselina (65%)	HNO ₃	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Klorovodična kiselina (36%)	HCl	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Octena kiselina (99,8 %)	CH ₃ COOH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev hidroksid	NaOH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Etanol (96%)	C ₂ H ₅ OH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Galna kiselina	C ₇ H ₆ O ₅	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Natrijev hidrogenfosfat	Na ₂ HPO ₄	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev karbonat	Na ₂ CO ₃	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Folin-Ciocalteu reagens		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Jednozidne ugljikove nanocijevčice (SWCNT)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

Otopina dušične kiseline ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$) – otpipetirati 34,62 cm³ HNO₃ ($W = 65\%$) za 1 dm³ otopine. Otopina se koristi za ciklizaciju prilikom čišćenja elektrode i za ispiranje ćelije.

Otopina galne kiseline ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 10 \text{ cm}^3$) - odvagati 0,17 g galne kiseline i destiliranom vodom nadopuniti do oznake.

Zasićena otopina natrijeva karbonata - 100 g bezvodnog natrijevog karbonata (Na_2CO_3) kuhanjem otopiti u 500 cm^3 vode. Ohladiti na sobnoj temperaturi uz dodatak nekoliko kristala natrijeva karbonata i filtrirati nakon 24 sata.

Acetatni pufer ($c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$, **pH3,6**) - odvagati 3,1 g natrijevog acetata, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ i otpipetirati 16 cm^3 koncentrirane octene kiseline, CH_3COOH za 1 dm^3 otopine.

Klorovodična kiselina ($c = 0,040 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$) – odmjeriti 400 cm^3 $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ HCl za 1 dm^3 otopine.

Otopina TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin) – odvagati 159,4 mg TPTZ-a i otopiti u 50 cm^3 $0,040 \text{ mol dm}^{-3}$ klorovodične kiseline.

Otopina željezova(III) klorida ($c = 0,020 \text{ mol dm}^{-3}$ $V = 0,10 \text{ dm}^3$) - odvagati 551,6 mg željezo(III) klorida ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$) za $0,1 \text{ dm}^3$ otopine.

Matična otopina standarda Fe^{2+} - matična otopina standarda pripravljena je otapanjem željezova(II) sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Od nje su dalje pripravljene otopine različitih koncentracija Fe^{2+} iona, od $0,1$ - 1 mol dm^{-3} .

Radni FRAP reagens - FRAP reagens pripravlja se svaki put neposredno prije mjerenja od: 25 cm^3 acetatnog pufera, $2,5 \text{ cm}^3$ otopine TPTZ-a i $2,5 \text{ cm}^3$ otopine $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$.

Suspenzija SWCNT ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 10 \text{ cm}^3$) - 5 mg SWCNT dodano je u 10 cm^3 dimetilformamida (DMF), te je smjesa tretirana u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin Sonorex SUPER RK 103 H) 2 sata za dobivanje homogene suspenzije.

2.2 PRIPRAVA ELEKTRODA

Za ispitivanje svojstava galne kiseline u fosfatnom puferu priređeno je 5 različitih elektroda. Izgled elektroda je prikazan u tablici 2. Mikrografski prikaz površine mikroelektroda dat je na slici 25.

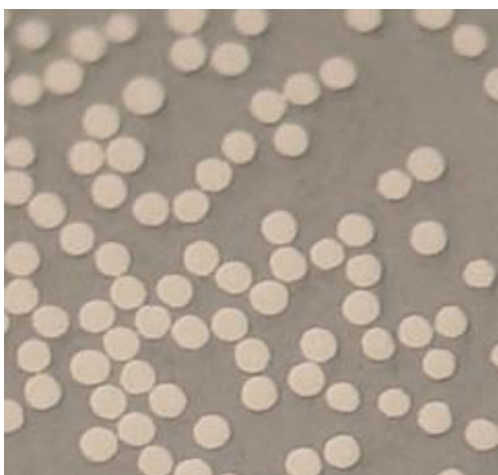
Elektroda 1 – U tijelo od teflona umetnut je valjak GC promjera 6 mm te je dobivena osjetilna površina $A=0,283 \text{ cm}^2$.

Elektroda 2 – GC elektroda promjera 6 mm modificirana je dodatkom suspenzije SWCNT. GC elektroda se prethodno mehanički ili elektrokemijski pripremi te se na nju nanese 15 μL suspenzije SWCNT i suši u sušioniku 30 minuta na 50 °C. Tako dobijemo jedan sloj ugljikovih nanocjevčica.




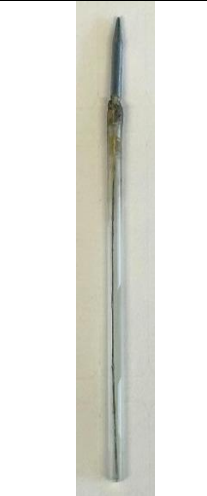






Elektroda 3 – Elektroda od ugljikovih mikrovlakana, srednje (*medium*) površine MVE_M – 12000 vlakana promjera 7 μm izliveno u epoksidnoj smoli, $A=0,000038 \text{ cm}^2 = 0,0038 \text{ mm}^2$.

Elektroda 4 - Elektroda od ugljikovih mikrovlakana, male (*small*) površine MVE_S – približno 100 vlakana promjera 7 μm izliveno u epoksidnoj smoli, $A=0,0046 \text{ cm}^2 = 0,46 \text{ mm}^2$.

Elektroda 5 - Elektroda od ugljikovih mikrovlakana, velike (*large*) površine MVE_L - 36000 vlakana promjera 7 μm izliveno u epoksidnoj smoli, $A=0,0138 \text{ cm}^2 = 1,38 \text{ mm}^2$.



Slika 25. Mikrograf površine MVE snimljen metalografskim mikroskopom.

GCE $A = 0,283 \text{ cm}^2$	SWCNT $A = 0,283 \text{ cm}^2$	MWE_M $A = 0,46 \text{ mm}^2$	MWE_S $A \approx 0.004 \text{ mm}^2$	MWE_L $A = 1,38 \text{ mm}^2$
				
				

Tablica 2. Tijelo i površina GCE, SWCNT, MWE_M, MWE_S i MWE_L elektrode

Prije elektrokemijskih mjerenja elektrode su pripravljene na sljedeći način:

1. Mehanička predobrada: - brušenje metalografskim brusnim papirom gradacije 1200, 2000, 3000, a nakon toga metalografskim brusnim pastama Buhler Micropolish Alpha Alumina, Al_2O_3 , finoće $1 \mu\text{m}$ i $0,05 \mu\text{m}$. Elektroda je isprana i sonificirana u destiliranoj vodi i etanolu, kako bi se uklonile nečistoće zaostale nakon poliranja i masnoće, a zatim i sušena u struji dušika.

2. Elektrokemijska predobrada: čišćenje i aktiviranje površine

I - Katodni predtretman 60 s na potencijalu $-1,2 \text{ V}$;

II - Anodni predtretman 60 s na potencijalu $1,2 \text{ V}$;

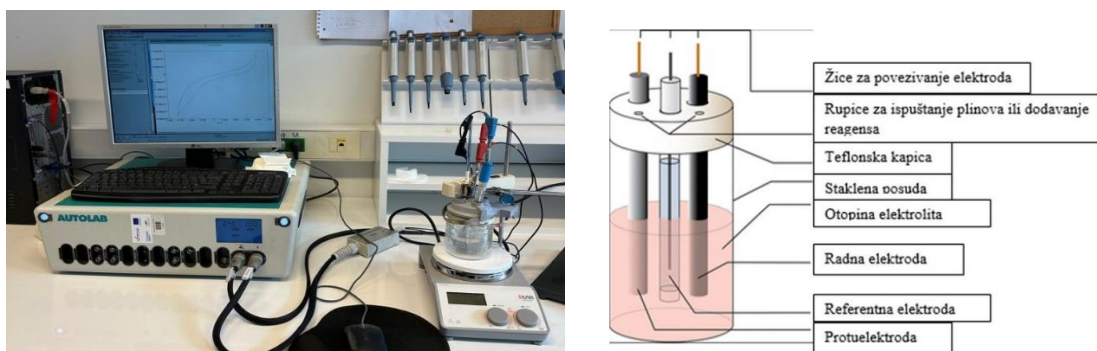
III - Ciklizacija (50 ciklusa) - elektroda je ciklizirana u $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ počevši od 0 V u katodnom smjeru do $-1,0 \text{ V}$, zatim u anodnom smjeru do $1,0 \text{ V}$ te je završena na nuli uz brzinu promjene potencijala 100 mVs^{-1} .

Sve radne elektrode imale su stabilan i ponovljiv potencijal otvorenog strujnog kruga, što je bio pokazatelj dobro pripremljene površine.

2.3 METODE

2.3.1 ELEKTROKEMIJSKA MJERENJA

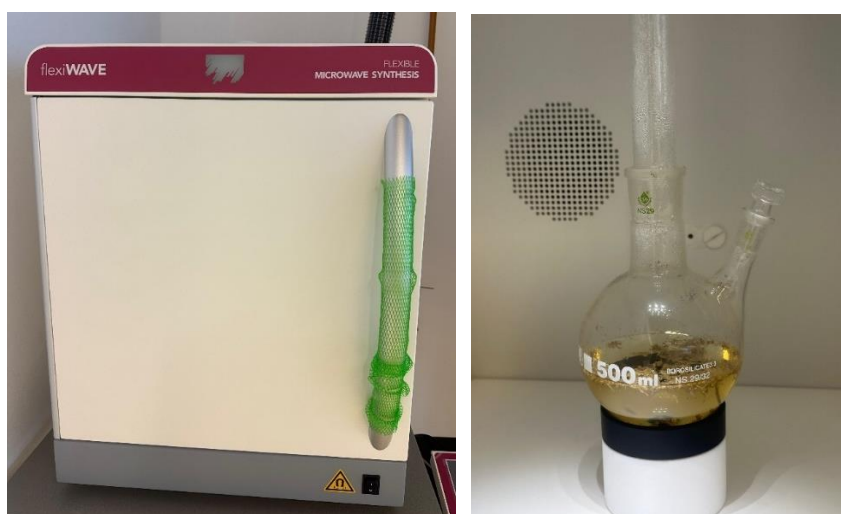
Svi elektrokemijski eksperimenti izvedeni su pomoću potenciostata u standardnoj troelektrodnoj ćeliji volumena 100 cm³. Na slici 26 prikazana je fotografija potenciostata, Autolab PGSTAT 302N sa softverom za prikupljanje i obradu podataka, GPES 4,9 Softwarea (*Eco Chemie, Eco Utrecht, Nizozemska*) koji je spojen na osobno računalo. Sve promjene su bilježene cikličkom voltametrijom u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu. Kao protuelektroda korištena je elektroda od platinske žice.



Slika 26. Uređaj Autolab PGSTAT 302N, spojen na računalo, troelektrodna ćelija i shematski prikaz troelektrodne ćelije [1]

2.3.2 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Za mikrovalnu ekstrakciju korišten je uređaj Milestone flexiWAVE prikazan na slici 27. Uređaj posjeduje dva magnetrona od 950 W te mu je ukupna snaga 1900 W i ubraja se među najjače dostupne uređaje za mikrovalnu ekstrakciju i organske i anorganske sinteze.



Slika 27. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju Milestone flexiWAVE

Performanse uz miješanje osiguravaju brzo i homogeno zagrijavanje uzoraka. Maksimum bioaktivnih komponenata u ekstraktu se tako može postići već nakon nekoliko minuta ekstrakcije, u odnosu na klasične metode, gdje je potrebno ekstrakciju provoditi i nekoliko sati uz veliki rizik raspada fenolnih spojeva i vitamina. Milestone flexiWAVE ima kapacitet od 70 litara, najnaprednije reakcijske senzore za kontrolu reakcije, omogućena je homogenost polja, magnetsko miješanje, optički i infracrveni senzori za kontrolu visoke temperature (do 300 °C) i kontrolu visokog tlaka, kamera za stalnu kontrolu unutrašnjosti reaktora, a svi parametri se mogu modelirati i prilagođavati tijekom eksperimenta.

2.3.3 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA

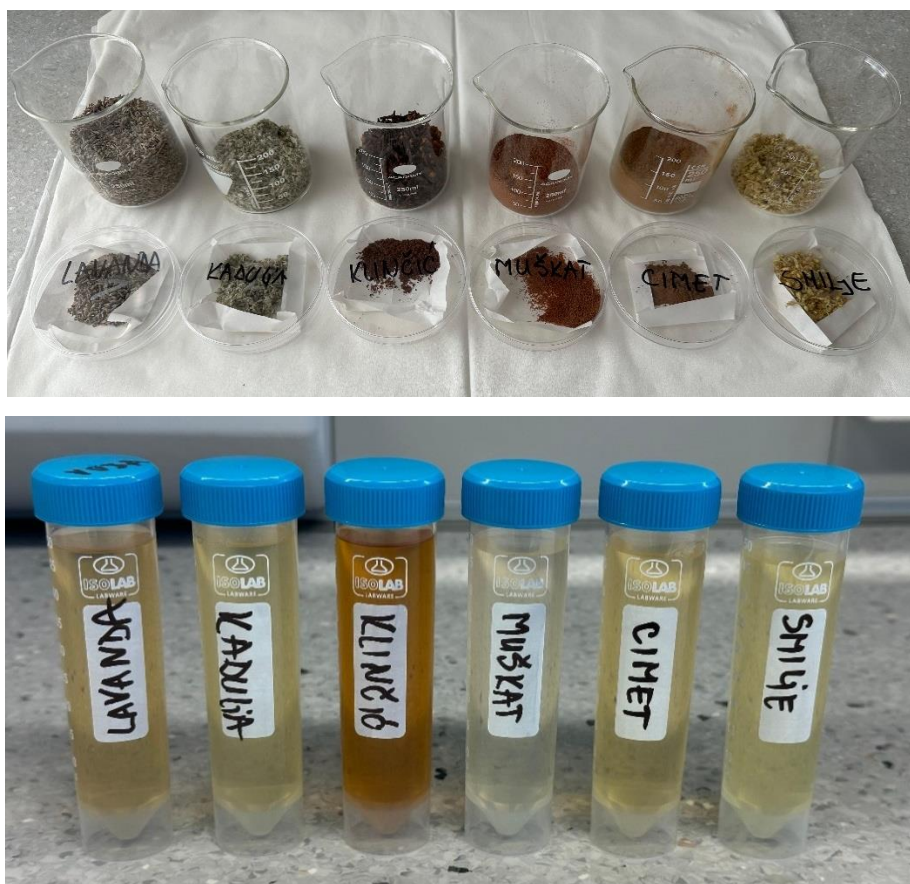
Za spektrofotometrijska mjerenja korišten je spektrofotometar Cary 5000 UV-Vis-NIR, uređaj (slika 28) visokih performansi s vrhunskim fotometrijskim značajkama. Uređaj omogućava mjerenje apsorpcijskih i transmissijskih spektara tekućih i praškastih uzorka u području od 175 do 3300 nm valne duljine. Sva mjerenja su provedena u području vidljive svjetlosti na odabranim fiksnim valnim duljinama ili skeniranjem cijelom području. Cary WinUV program je korišten za analizu dobivenih podataka.



Slika 28. Cary 5000 UV-Vis-NIR uređaj

2.4 PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA REALNIH UZORAKA

Na slici 29 prikazani su odabrani realni uzorci: lavanda, kadulja, klinčić, muškat, cimet i smilje.



Slika 29. Realni uzorci i ekstrakti: lavanda, kadulja, usitnjeni klinčić, muškat prah, cimet prah i smilje

Realni uzorci (lavanda, kadulja, usitnjeni klinčić, muškat prah, cimet prah i smilje) pripremljeni su ekstrakcijom 1 g biljnog materijala u 200 cm³ redestilirane vode. Mikrovalna ekstrakcija svih uzoraka provedena je u trajanju 10 minuta na 100°C. Vrijeme predgrijanja 2 minuta i snaga 600 W su osigurali optimalne uvjete ekstrakcije. Svi parametri ekstrakcije su prethodno optimizirani, kako bi se izbjegla degradacija bioaktivnih tvari i u isto vrijeme osigurala optimalna količina bioaktivnih tvari za kvantitativnu analizu. Dobiveni realni uzorci su filtrirani te su ekstraktima odmah određivani ukupni fenoli i antioksidativni kapacitet. Na isti način pripremljeni su i ekstrakti za elektrokemijska mjerenja.

2.5 FOLIN-CIOCALTEU METODA - ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Ukupni fenoli određuju se metodom po Folin-Ciocalteu. Folin–Ciocâlțeuov reagens (FCR) ili Folinov fenolni reagens ili Folin–Denisov reagens mješavina je fosfomolibdata i fosfovolframata koji se koristi za kolorimetrijsko *in vitro* ispitivanje fenolnih i polifenolnih antioksidansa, koja se također naziva metoda ekvivalencije galne kiseline (GAE). Ime je dobio po Ottu Folinu, Vintilă Ciocâlțeu i Willeyu Gloveru Denisu. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju u reakciji s fenolima i daju plavo obojenje. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona. Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Reducirani reagens pri 765 nm daje vrijednost apsorbancije prema intenzitetu obojenja u odnosu na slijepu probu.

Izrada standardne krivulje: otopine galne kiseline različitih koncentracija kao radnih standarda (0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg dm⁻³, Slika 30).

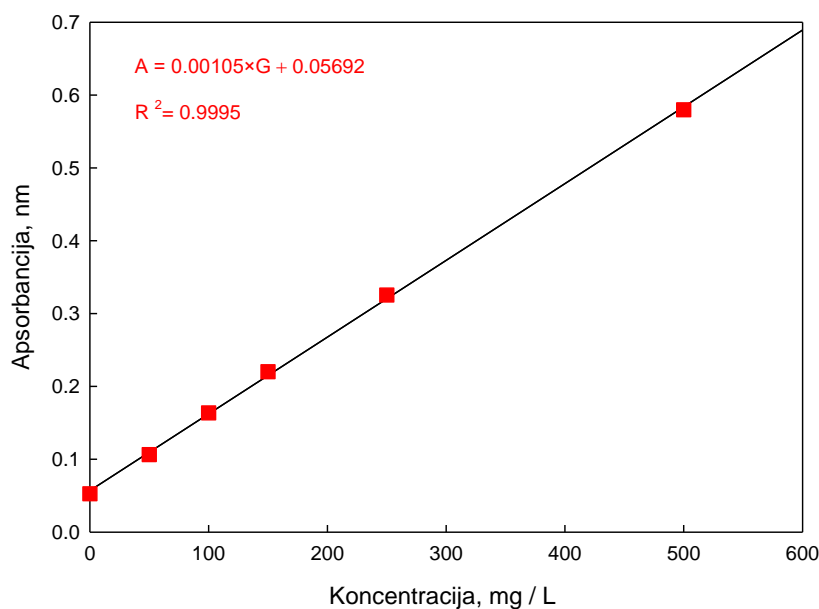
0,250 cm³ otopine standarda miješa se s 15 cm³ destilirane vode, 1,250 cm³ Folin-Ciocalteu, 3,750 cm³ zasićene otopine natrijeva karbonata, dobro se promućka i nadopuni do oznake s vodom (odmjerna tikvica 25 cm³) i ostavlja 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon isteka 2 sata izmjeri se apsorbancija svake otopine kod 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm. Iz podataka se konstruira krivulja umjeravanja kao odnos koncentracije prema apsorbanciji koja služi za procjenu ukupnih fenola u uzorcima. Tablica 3. prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbancije.



Slika 30. Standardne otopine galne kiseline za izradu krivulje umjeravanja.

Tablica 3. Konstruiranje krivulje umjeravanja za standard galnu kiselinu

Koncentracija mg/L	Srednja vrijednost apsorbancije	Standardna devijacije
0,0000	0,0527	$2,7000 \times 10^{-4}$
50,0000	0,1063	$4,0000 \times 10^{-5}$
100,0000	0,1636	$1,5000 \times 10^{-4}$
150,0000	0,2202	$1,6000 \times 10^{-4}$
250,0000	0,3255	$4,0000 \times 10^{-5}$
500,0000	0,5798	$3,0000 \times 10^{-5}$



Slika 31. Krivulja umjeravanja za standard galnu kiselinu

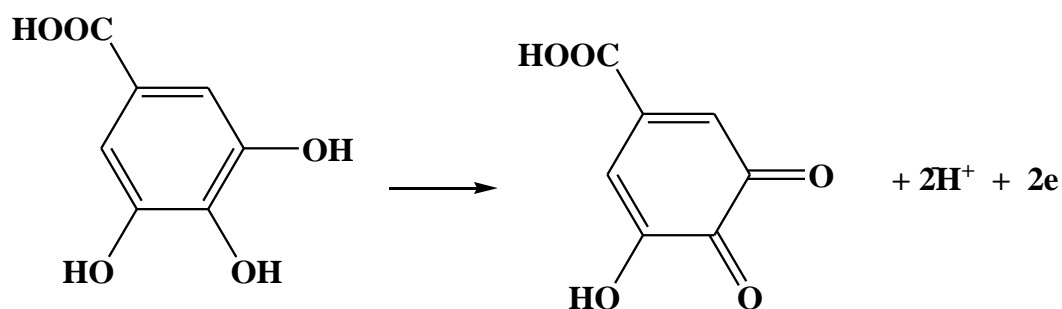
Matematički izraz koji opisuje krivulju umjeravanja koristi se za račun ukupnih fenola prema standardu galne kiseline. Jednostavnim uvrštavanjem vrijednosti apsorbancije za bilo koji uzorak dolazi do rezultata za ukupne fenole:

$$A = 0,00105 \times Y + 0,05692$$

gdje je Y masena koncentracija u mg GAE dm^{-3} uzorka.

Na istovjetan način priređuju se i realni uzorci, ali umjesto galne kiseline dodati ekstrakt, te im nakon isteka 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm.

Na slici 32 prikazana je fotografija ekstrakata odabranih biljnih vrsta u Falcon-kiveta i u čašicama dobiveni reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom, gdje se fenolne grupe oksidiraju do kinona. Takvi ekstrakti su spremni za određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski.



Slika 32. Ekstrakti prije i nakon reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom i pripadajuća reakcija oksidacije galne kiseline do kinona galne kiseline.

2.6 FRAP METODA - ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

FRAP (*Ferric reducing/Antioxidant power*) je jednostavni direktni test antioksidacijskog kapaciteta. Ova metoda je inicijalno razvijena da bi se odredio antioksidacijski kapacitet krvne plazme, ali se može koristiti i za određivanje antioksidacijskog djelovanja drugih uzoraka (npr. ekstrakti biljaka).

Antioksidansi se mogu zvati i reducensima, a inaktivacija oksidansa pomoću reducensa je u osnovi redoks – reakcija u kojoj neka reaktivna vrsta (slobodni radikal) biva reducirana. Tako se antioksidativna aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. To je slučaj i kod FRAP metode koja koristi reducense u redoks–kolorimetrijskoj reakciji

gdje je prisutan oksidans koji se lako reducira, TPTZ reagens. Ovom metodom aktivnost antioksidansa/reducensa je izražena u odnosu na signal reakcije od iona Fe^{2+} otopine poznate koncentracije, a koja predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona dajući intenzivno plavo obojenje. U reakciji ioni Fe^{3+} se reduciraju do iona Fe^{2+} koji apsorbiraju svjetlo kod valne duljine od 593 nm.



Radni FRAP reagens:

Neposredno prije analize realnog uzorka prirediti radni reagens miješanjem 50 cm^3 acetatnog pufera, 5 cm^3 TPTZ otopine i 5 cm^3 $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$.

Postupak:

U kivetu od 10 mm staviti 3 cm^3 FRAP reagensa i očitati apsorbanciju reagensa kod 593 nm (apsorbancija slijepe probe, A_0). Nakon toga u kivetu s FRAP reagensom dodati 0,100 cm^3 uzorka (koji se analizira) i 0,300 cm^3 destilirane vode. Pratiti promjenu apsorbancije kod 593 nm tijekom 4 i 10 minuta. Stvara se plavo obojenje koje ima apsorpcijski maksimum kod 593 nm. Mjerenje traje 10 minuta počevši od trenutka kada je dodan uzorak koji se analizira.

Za svaki uzorak izračunati promjenu apsorbancije (ΔA) prema jednadžbi:

$$\Delta A = A - A_0$$

Promjenu apsorbancije uzorka usporediti s promjenom apsorbancije izazvane dodatkom standardne otopine iona Fe^{2+} , $c(\text{Fe}^{2+})=1000 \mu\text{mol L}^{-1}$, ($\Delta A_{\text{Fe}^{2+}}$) i izračunati FRAP vrijednost uzorka prema jednadžbi:

$$\text{FRAP } (\mu\text{mol L}^{-1}) = (\Delta A / \Delta A_{\text{Fe}^{2+}}) \times 1000$$

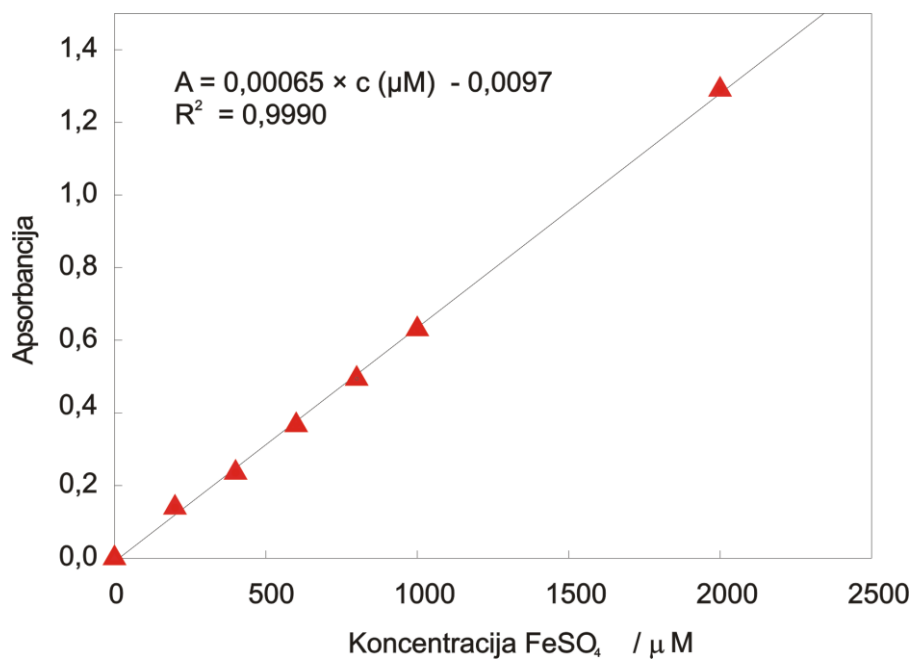
FRAP metodom je učinak antioksidansa u analizi izračunat u odnosu na signal reakcije od iona Fe^{2+} otopine poznate koncentracije, a koja predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona.

Krivulji umjeravanja (Slika 33) je napravljena linearna regresija, te je rezultat izražen kao matematički izraz za antioksidacijski kapacitet prema standardu FeSO_4 :

$$A = 0,00065 \times c + 0,0097$$

gdje je c množinska koncentracija u $\mu\text{M Fe}^{2+}$ po dm^3 uzorka.

Za sve odabrane uzorke izračunat je učinak antioksidansa. Postupak određivanja je identičan mjerenju antioksidacijskog učinka standarda. Prati se promjena apsorbancije ispitivanog uzorka tijekom 4 i 10 minuta. Dobivene rezultate izraziti su kao ekvivalente FRAP reagensa, budući je on korišten kao standard.



Slika 33. FRAP metoda - Krivulja umjeravanja za standardnu otopinu FeSO₄.

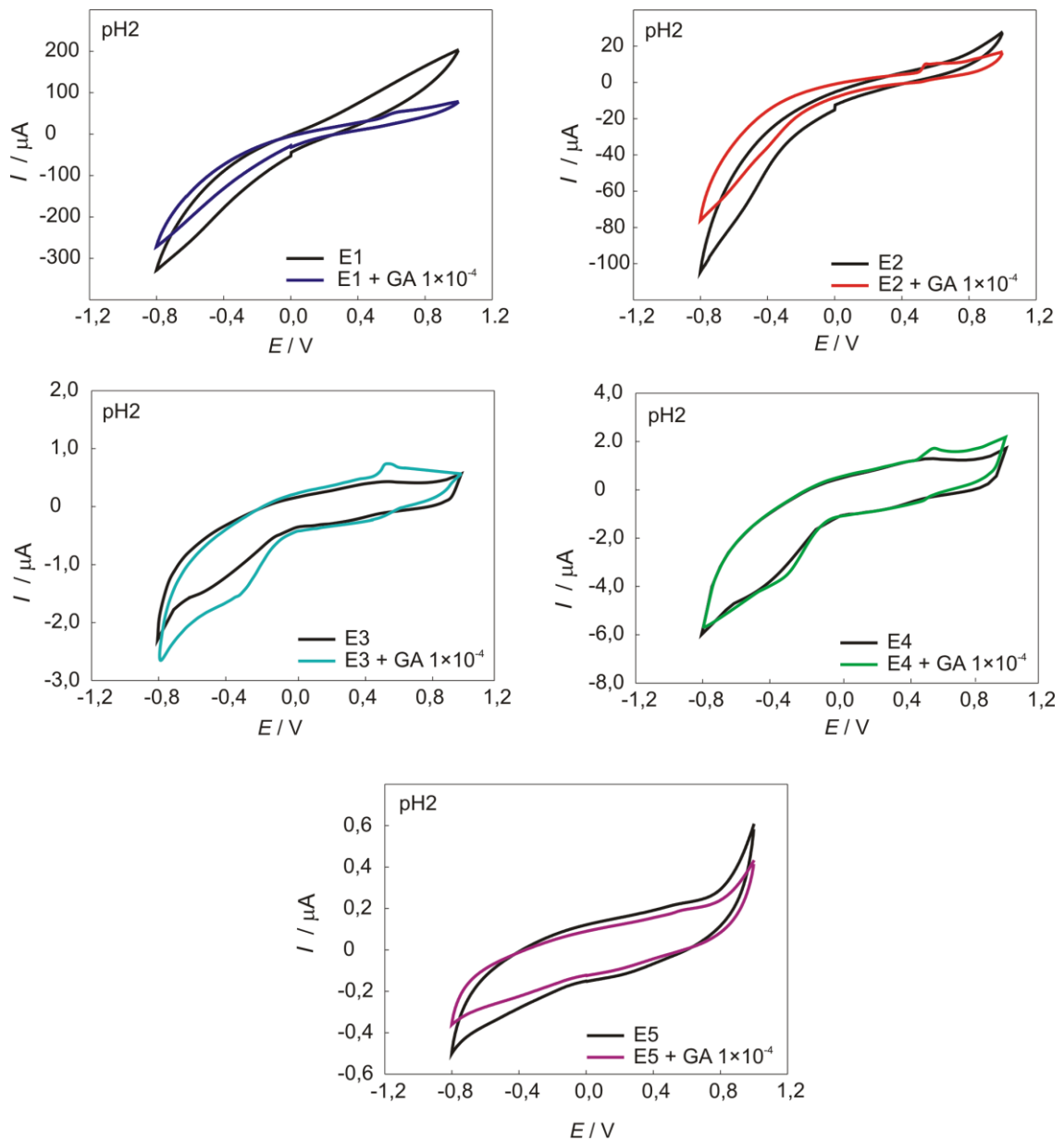
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1 REZULTATI CIKLIČKE VOLTAMETRIJE I SQUARE WAVE VOLTAMETRIJE

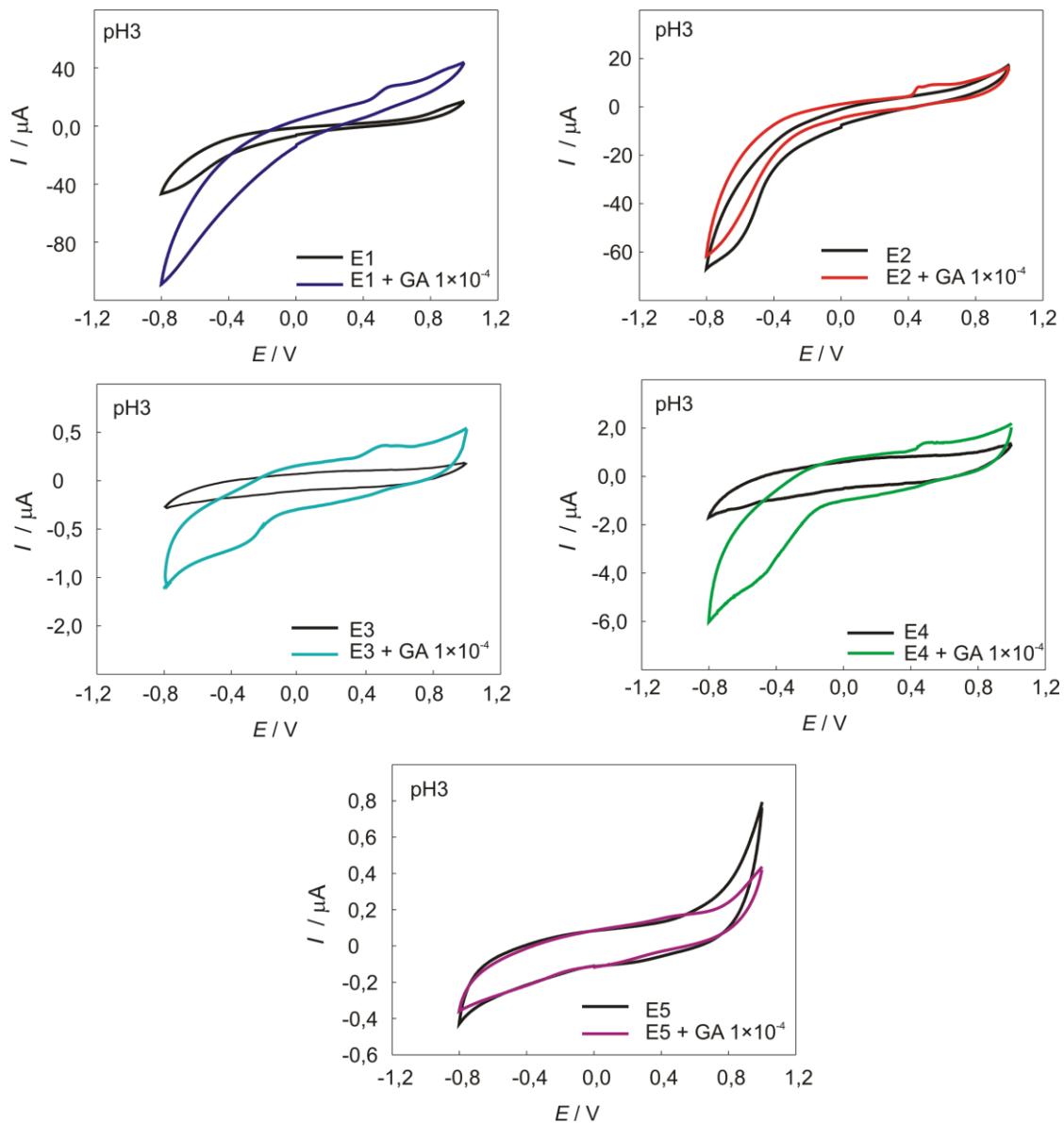
3.1.1 REZULTATI CIKLIČKE VOLTAMETRIJE

Kao doprinos u proučavanju oksidacije galne kiseline na ugljikovim materijalima izrađeno je pet elektroda. Elektroda od staklastog ugljika (GCE ili E1), elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama (SWCNT/GCE ili E2), te tri elektrode od ugljikovih mikrovlakana različite površine, (MVE_M ili E3, MVE_L ili E4 i MVE_S ili E5). Elektrokemijska karakterizacija svih elektroda provedena je cikličkom voltametrijom u širokom području potencijala, od $-0,8$ V do $+1,0$ V vs. Ag|AgCl, odnosno od područja potencijala razvijanja/redukcije vodika do područja razvijanja/oksidacije kisika. Snimljeni su ciklički voltamogrami, kako bi se ispitaio odziv različitih vrsta ugljikovih elektroda prema galnoj kiselini i utvrdila njihova mogućnost primjene u elektroanalitičke svrhe. Procedura svih mjerenja je uključivala vrijeme uravnoteživanja na potencijalu $E = 0,0$ V, zatim u anodnom smjeru, te povratno u katodnom smjeru i natrag na $E = 0,0$ V. Brzina promjene potencijala ($sr - scan rate$) za predmjerenja je 25 mV s^{-1} .

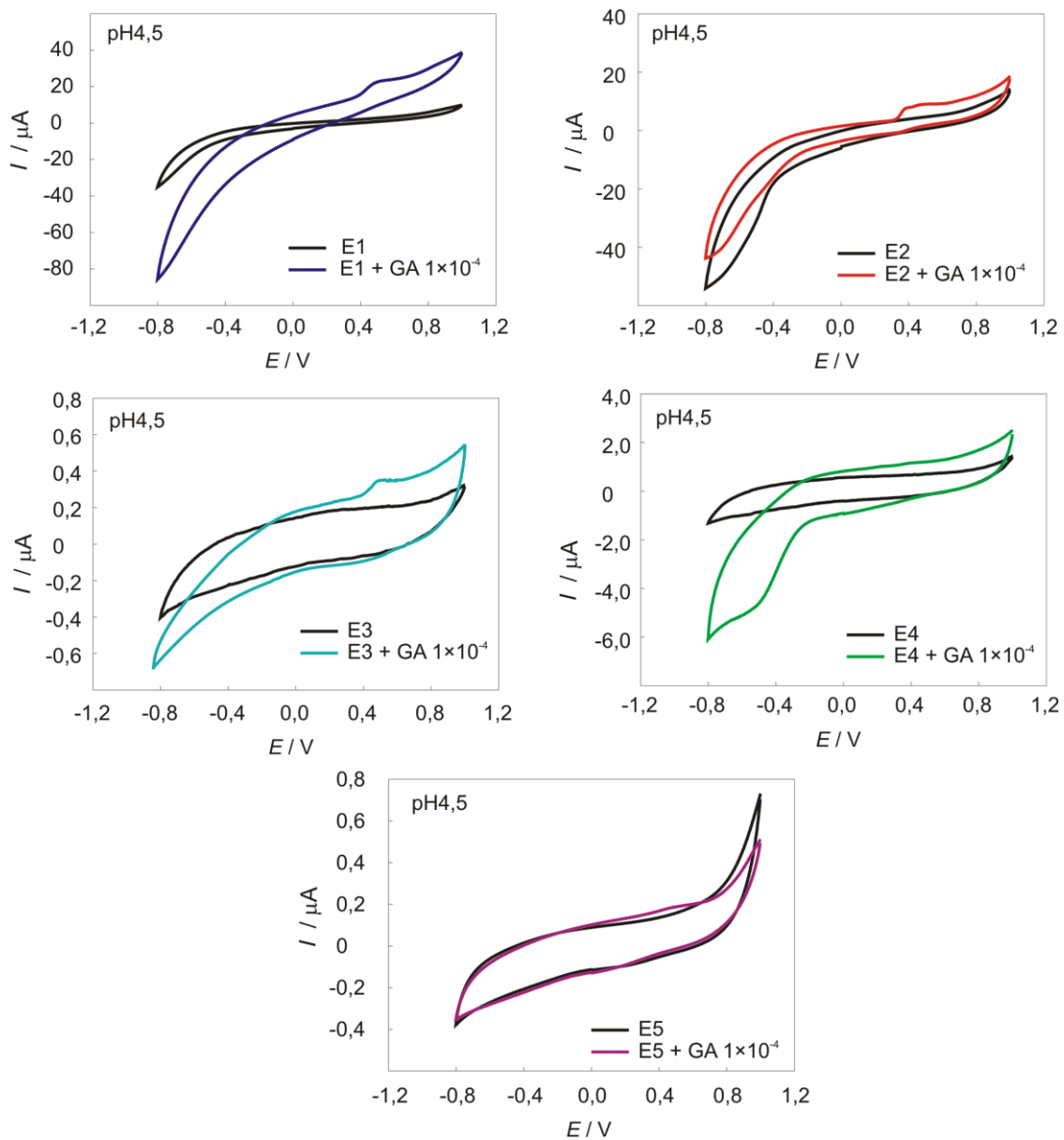
Ovisnost vršne struje o pH ispitana je cikličkom voltametrijom. Elektrode su ispitane u širokom rasponu pH u fosfatnom puferu, kako bi se utvrdili optimalni uvjeti za oksidaciju galne kiseline. Na slikama 34 do 39 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na svim elektrodama u fosfatnom puferu, bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.



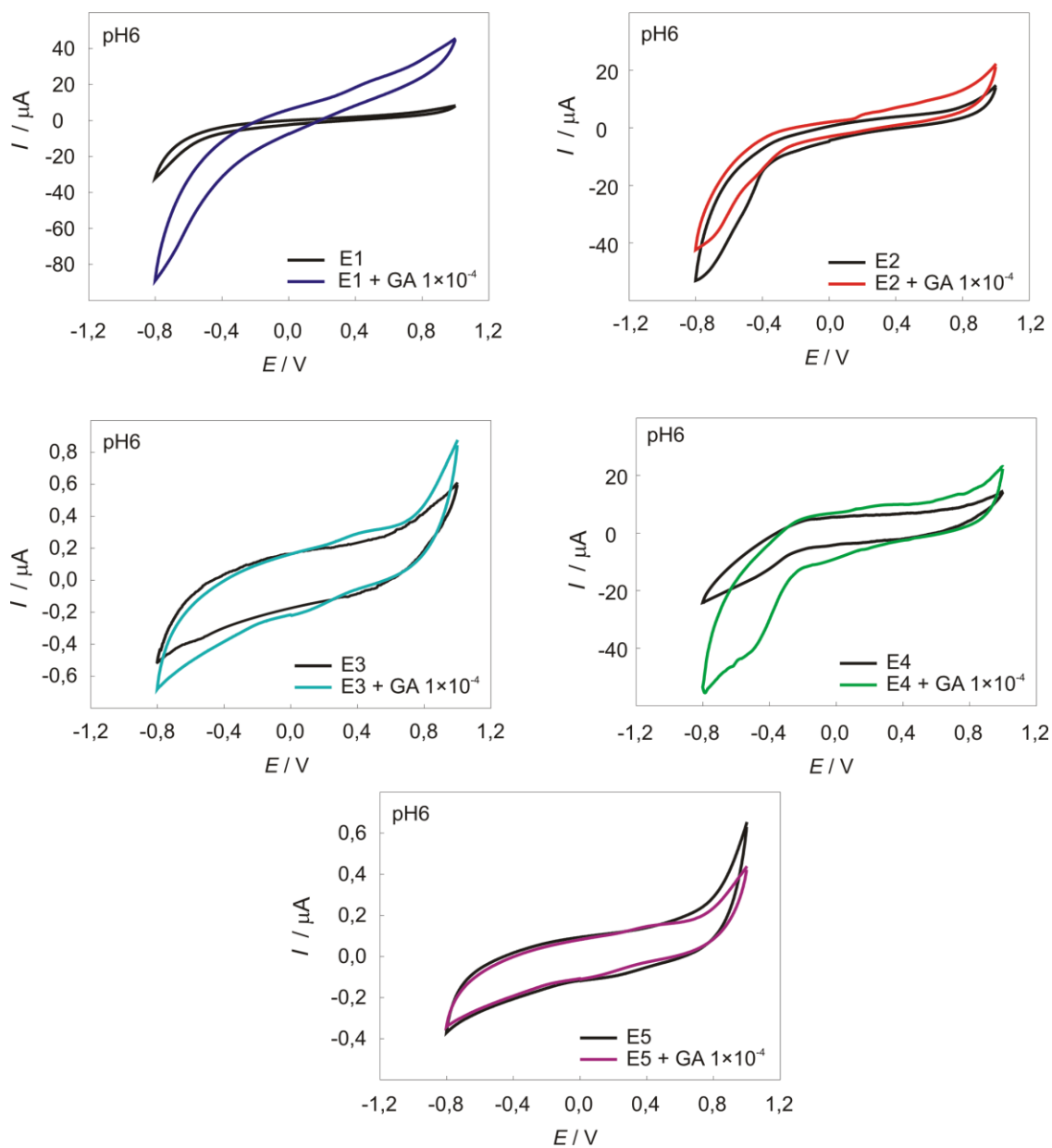
Slika 34. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH2 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



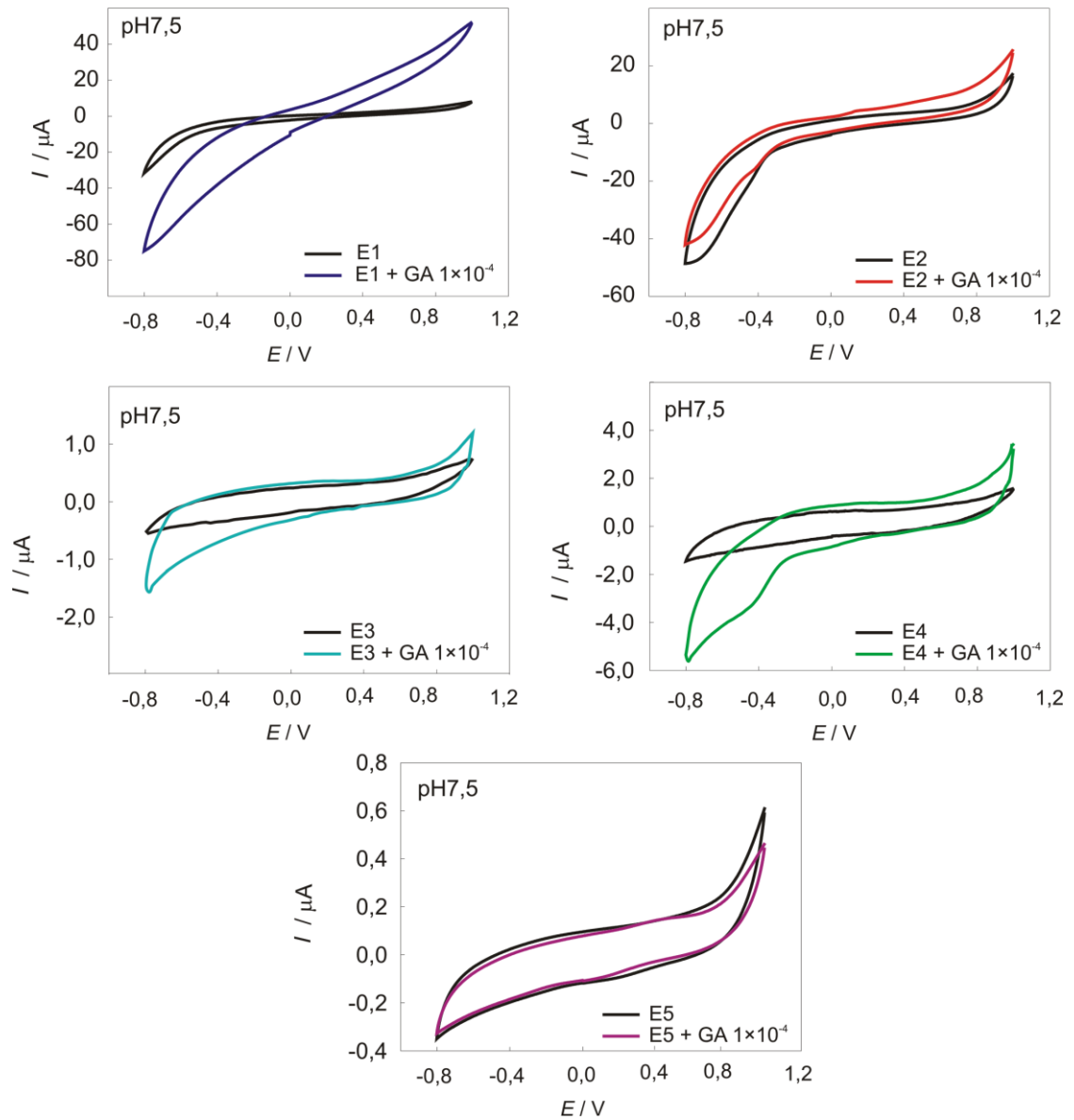
Slika 35. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH3 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



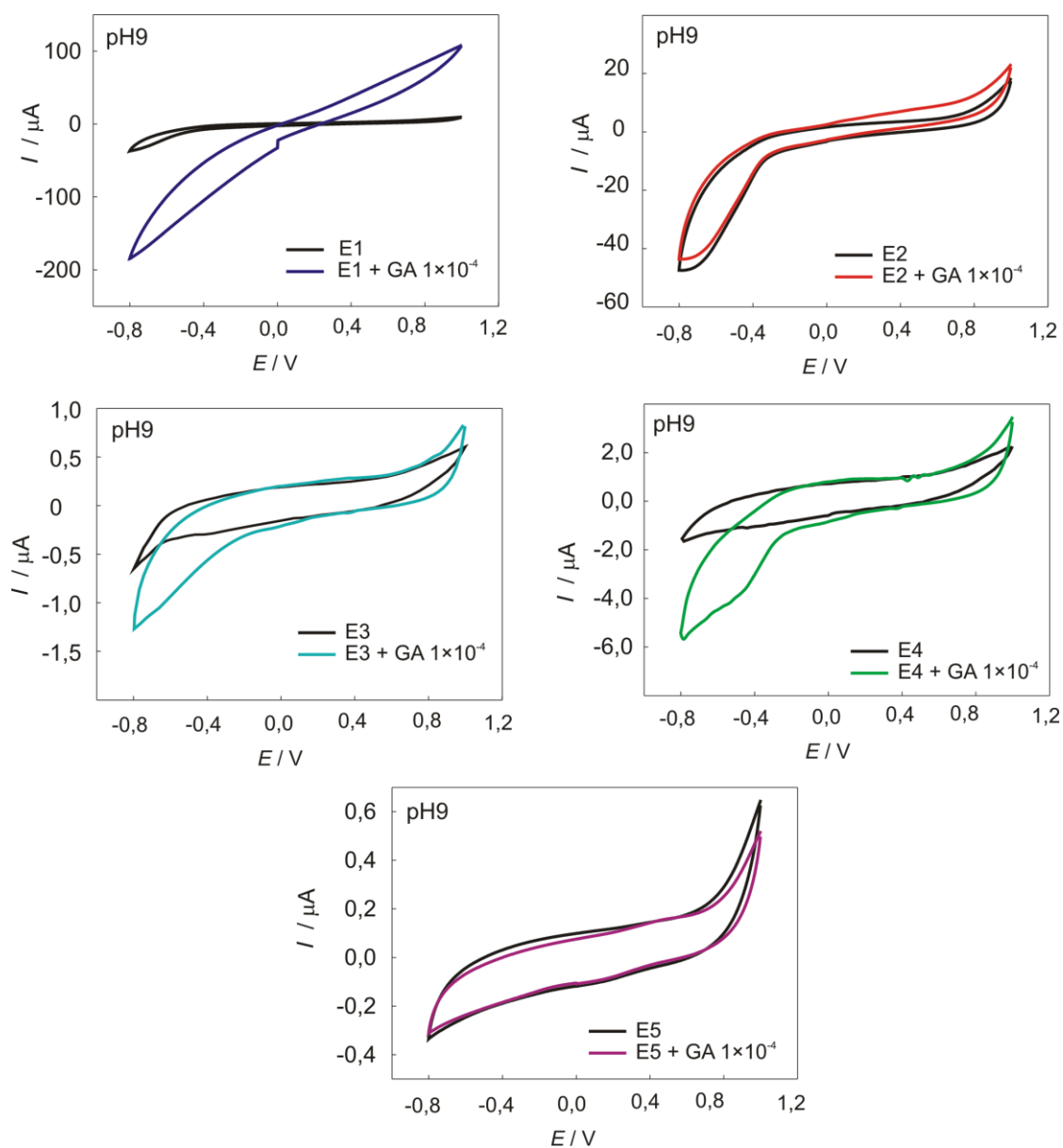
Slika 36. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH4,5 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$



Slika 37. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH6 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije 1×10^{-4} mol dm⁻³, $sr = 25$ mV s⁻¹.



Slika 38. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH7,5 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije 1×10^{-4} mol dm⁻³, $sr = 25$ mV s⁻¹.



Slika 39. Ciklički voltamogrami elektroda u fosfatnom puferu, pH9 bez prisutnosti galne kiseline i uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Pri pH2 sve elektrode pokazuju osjetljivost prema galnoj kiselini. Na svim elektrodama se može uočiti porast anodne struje uslijed dodatka galne kiseline. Jasno izražene anodne strujne vrhove te pripadajuću reakciju redukcije u povratnom ciklusu, kao kvazireverzibilnu promjenu možemo uočiti kod elektroda GCE, SWCNT, MVE-M i MVE-L. Pri pH3 jasno izražene anodne strujne vrhove možemo uočiti kod svih elektroda, ali kvazireverzibilnu reakciju pokazuje samo MVE-M. Pri pH4,5 oksidacijski strujni vrh uočen je kod GCE, SWCNT i MVE-M. Povećanjem pH vrijednosti iznad 6 struja oksidacije galne kiseline blago raste kod svih elektroda, ali bez izražajnog anodnog strujnog vrha. Veća vrijednost pH dovodi i do pojave zamućenja i tamnjenja otopine, te nakon nekoliko sati i do pojave modro-zelene boje elektrolita, usljed raspada galne kiseline, koji je kataliziran u lužnatom mediju. [51]

Kod GCE elektrode dominira adsorpcija GK koja doprinosi porastu kapacitivnog ponašanja elektrode, što dovodi do pojave efekta adsorbirane čestice na izgled cikličkog voltamograma, odnosno do promjene u nagibu i porasta struja u cijelom području snimanja voltamograma.

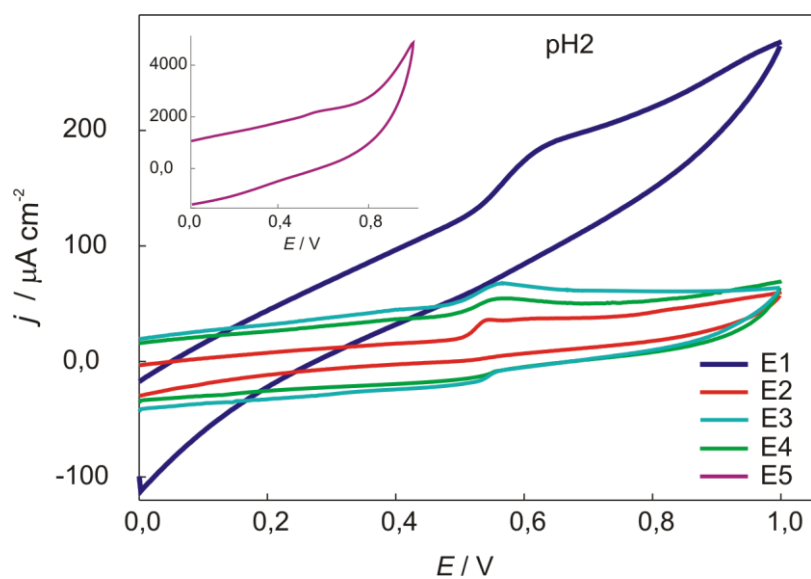
Na elektrodama od mikrovlakana sa i bez reakcija oksidacije GK pri svim vrijednostima pH uočeno je širenje cikličkog voltamograma. Na tim elektrodama se također uočava kapacitivno ponašanje. Kinetika transporta protona i odgovarajućih aniona kao protuiona može biti uzrok porasta Faradayskih struja. Čak i bez prisutne GK taj efekt je prisutan i možemo ga pripisati u prisutnim ionskim vrstama iz elektrolita, a znatno doprinose superkondenzatorskim karakteristikama ovog tipa elektroda. Dodatni razlog možemo tražiti i u samom mehanizmu oksidacije galne kiseline, koji u prvom stupnju daje semikinonski radikal. Takve vrste znatno utječu na raspodjelu jakosti električnog potencijala uzrokujući efekt adsorbirane čestice na izgled cikličkog voltamograma. Taj efekt je posebno izražen kod elektrode najmanje površine, gdje dominira sferna difuzija.

Na slikama 40 do 45 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na svim elektrodama u fosfatnom puferu, uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije 1×10^{-4} mol dm^{-3} , kao usporedba ponašanja svih pet elektroda. Ciklički voltamogrami snimljeni su pri brzini skeniranja od 25 mVs^{-1} . Voltamogrami prikazuju ovisnost potencijala o gustoći struje. Nakon sumiranja i pregleda svih voltametrijskih podataka, uočeno je da je anodni val vrlo osjetljiv na promjenu pH i modifikaciju. Pregledom svih slika od 40 do 45 može se općenito reći kako s porastom pH dolazi do pomaka vršnih potencijala oksidacije

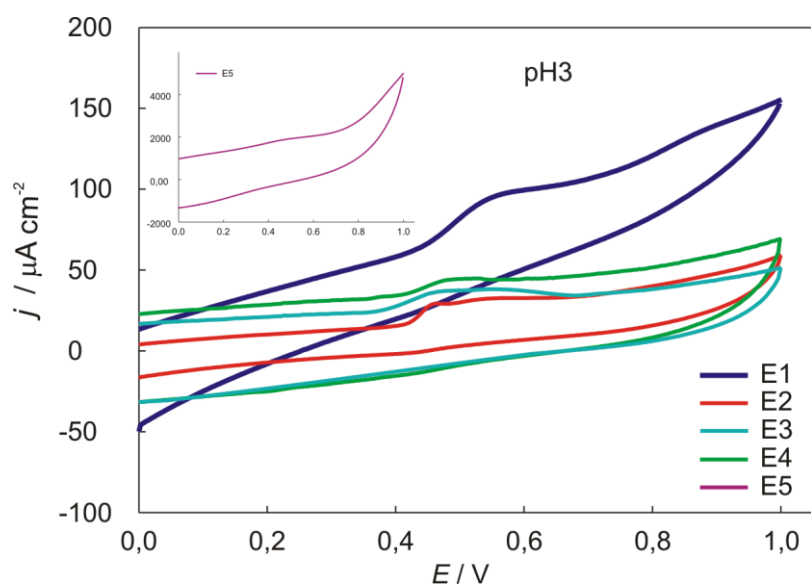
prema manje pozitivnim vrijednostima. Za SWCNT/GCE elektrodu pri pH2 potencijal oksidacije iznosi 0,52 V, te porastom pH se pomiče redom na pri pH3 0,45 V, pri pH4,5 0,38 V, te pri pH6 približno 0,20 V. Niže pH vrijednosti pogoduju poboljšanoj kinetici oksidacije galne kiseline na svim elektrodama. Vrijednosti struje redukcije su znatno niže, s pomakom u katodnom smjeru od približno 60 mV. Iznosi vršnih struja redukcije ne prate vrijednosti struje oksidacije, odnosno elektroda pokazuje kvazireverzibilno ponašanje. Takvo ponašanje pri nižim pH vrijednostima može se uočiti kod svih elektroda od ugljikovih mikrovlakana srednje i veće površine (MVE_M i MVE_L) dok je nešto manje izražajno kod SWCNT/GCE i elektrode od ugljikovih mikrovlakana male površine (MVE_S).

Galna kiselina pokazuje jedan voltametrijski val na anodnom prelasku potencijala, bez istovrsnih redukcijskih valova, nego tek porast struje redukcije kao kvazireverzibilnu reakciju redukcije. Porast vršne struje i pomak vršnih potencijala prema manje pozitivnim vrijednostima potencijala uočeni su nakon modifikacije GCE-a ugljikovim nanocjevčicama. Ovo otkriva da je kinetika elektrode poboljšana, odnosno pokazuje izvjesno elektrokatalitičko djelovanje naspram galne kiseline. Galna kiselina pri pH3 prikazuje anodni val s vršnim potencijalom na 0,55 V na nemodificiranom GCE-u. Na modificiranoj SWCNT/GCE taj potencijal je pomaknut na 0,45 V. Nadalje, uočeno je značajno povećanje vršne struje na modificiranoj elektrodi. Ova opažanja otkrivaju da modifikacija GCE-a pokazuje značajan učinak na elektrokemijski oksidacijski odgovor galne kiseline. Stoga se može zaključiti da senzor SWCNT/GCE osigurava veću aktivnost prema oksidaciji galne kiseline, poboljšava kinetiku elektrode i smanjuje njezin potencijal oksidacije.

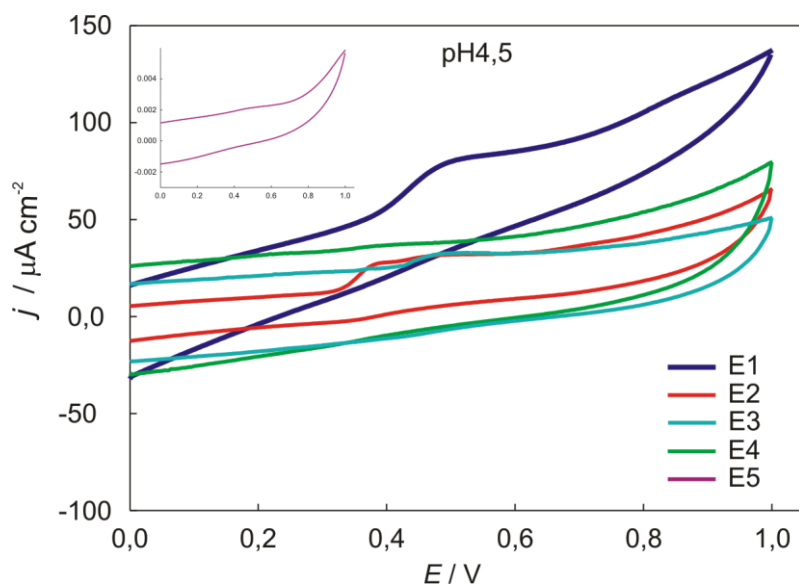
Svojevrsni senzor pripremljen je za izravno određivanje ukupnog sadržaja fenola kao ekvivalenta galne kiseline. Kao najjednostavniji i najosjetljiviji elektrokemijski senzor u fosfatnom puferu na svim vrijednostima pH prometnula se elektroda s jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama kojim je modificirana elektroda od staklastog ugljika. Elektrokemijsko ponašanje galne kiseline na različitim ugljikovim materijalima i na različitom pH fosfatnog elektrolita prometnulo je kao optimalnu elektrodu od staklastog ugljika modificiranu ugljikovim nanocjevčicama pri pH3. Radi kapacitivnog ponašanja elektrode od ugljikovih mikrovlakana su izuzete od daljnjih istraživanja. Širok anodni val i prisutna evidentna reakcija adsorpcije čistu elektrodu od staklastog ugljika karakteriziraju kao neprikladnu za elektroanalitička mjerenja.



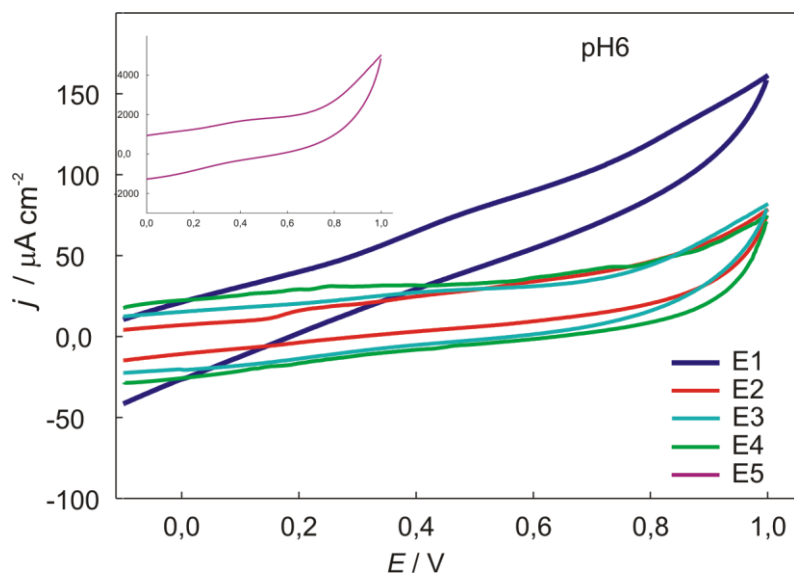
Slika 40. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH2 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



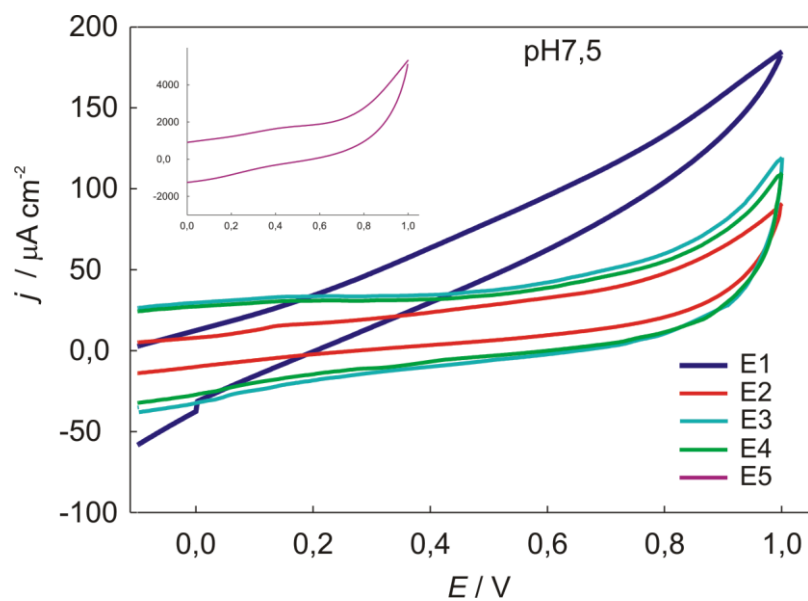
Slika 41. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH3 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



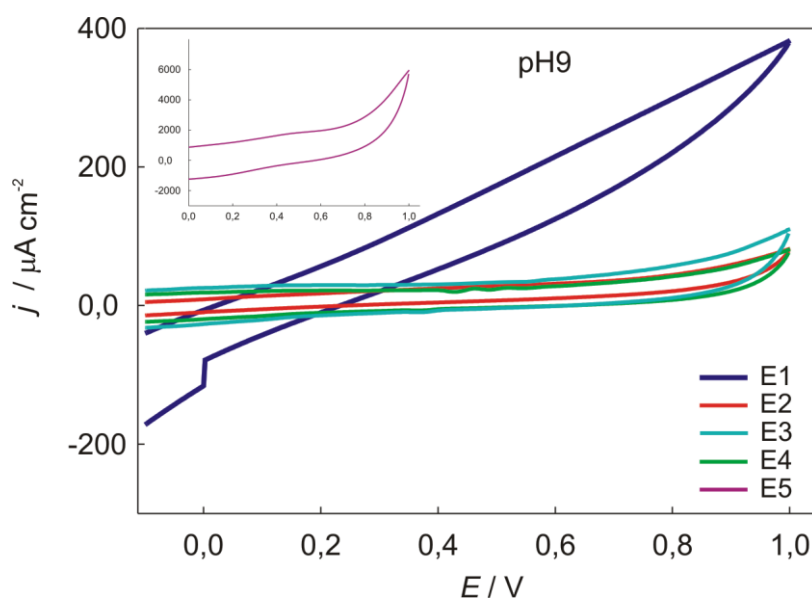
Slika 42. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH4,5 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



Slika 43. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH6 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $sr = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

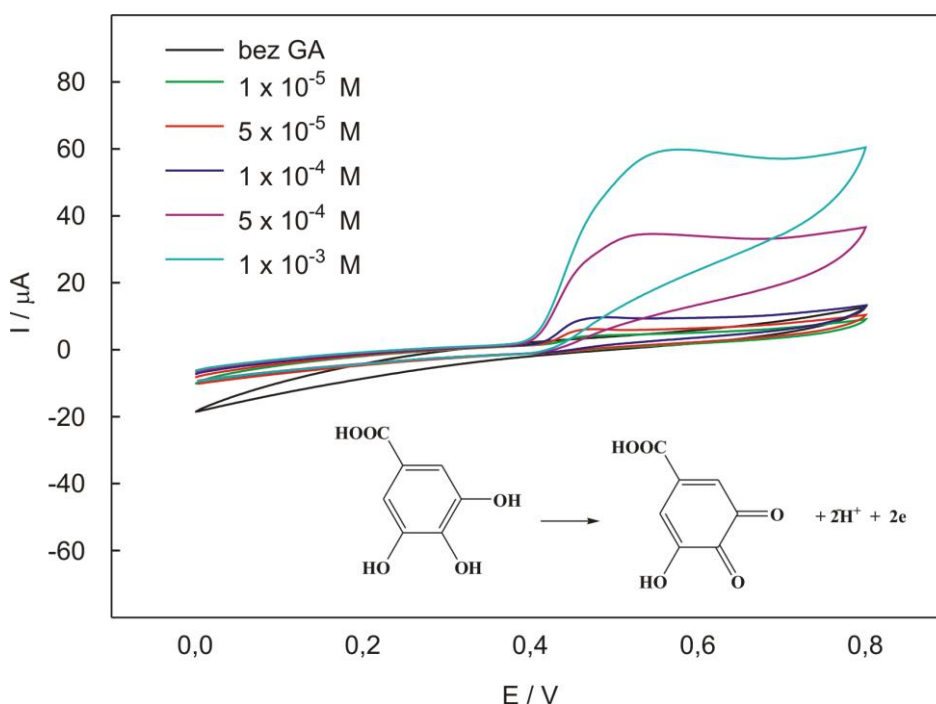


Slika 44. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH7,5 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije 1×10^{-4} mol dm⁻³, $sr = 25$ mV s⁻¹.



Slika 45. Usporedba rezultata - Ciklički voltamogrami svih elektroda u fosfatnom puferu, pH9 uz prisutnu galnu kiselinu koncentracije 1×10^{-4} mol dm⁻³, $sr = 25$ mV s⁻¹.

Utjecaj promjene koncentracije galne kiseline na elektrokemijsko ponašanje SWCNT/GCE elektrode prikazan je na slici 46. S porastom koncentracije dolazi do linearnog porasta struje oksidacije. Pri pH3 uočava se anodni strujni vrh te obzirom na oblik cikličkog voltamograma možemo zaključiti kako u jednom stupnju dolazi do oksidacije galne kiseline do forme kinona, osobito pri većim vrijednostima koncentracije. To sugerira dvoelektronsku reakciju prikazanu u isječku slike 46. Obzirom da se na voltamogramu ovisnosti struje o koncentraciji GK slabo uočava reverzibilnost reakcije bilo je potrebno napraviti dodatni studij utjecaja promjene brzine potencijala.



Slika 46. Ciklički voltamogram snimljeni na SWCNT elektrodi pH3 bez i uz sukcesivni dodatka naznačene koncentracije galne kiseline, $sr = 25 \text{ mVs}^{-1}$.

Na slici 47. prikazan je utjecaj promjene brzine potencijala. Pri vrijednostima brzine promjene potencijala većim od 100 mV s^{-1} znatno se bolje uočava i reakcija redukcije što sugerira vrlo brzu kinetiku izmjene elektrona. Pri vrijednosti brzine promjene potencijala 400 mVs^{-1} dolazi do neznatnog porasta struje neposredno prije oksidacije galne kiseline pri $\sim 0,30 \text{ V}$, sugerirajući moguću adsorpciju galne kiseline na odabrani materijal pri većim brzinama promjene potencijala.

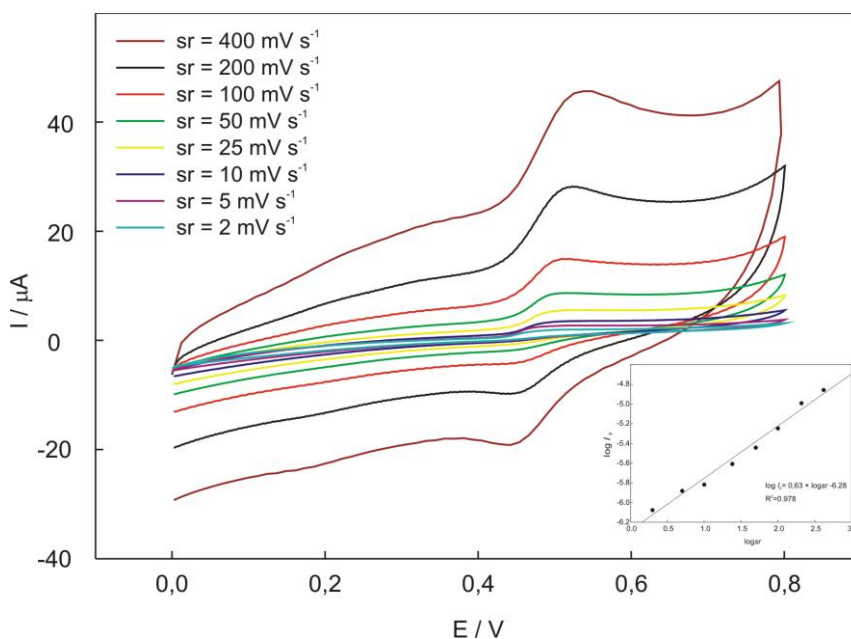
Nakon povećanja brzine skeniranja (v) u rasponu brzine promjene potencijala od $10\text{--}400 \text{ mVs}^{-1}$, vršna struja (I_a) proporcionalno se povećava s povećanjem brzine snimanja. Konstruiran je odnos između vršne struje oksidacije ($\log I_a$) i brzine skeniranja ($\log sr$) i prikazan kao detalj slike 47. Za slučaj čiste difuzije koeficijent nagiba pravca za

tu ovisnost iznosi 0,5, dok za slučaj čiste adsorpcije taj koeficijent nagiba iznosi 1,0.[52] Utvrđeno je da logaritamski dijagram ima pravolinijski odnos s koeficijentom korelacije od 0,630.

$$\log I_p = 0,630 \times \log sr - 6,28$$

Ovo potvrđuje da je proces oksidacije mješovito kontroliran proces, odnosno reakcija je pod difuzijsko/adsorpcijskom kontrolom. Prevladava difuzijska struja koja nastaje zbog difuzije iona galne kiseline iz mase otopine do površine elektrode, ali postoji i doprinos adsorpcije pristiglog iona na površinu elektrode. Zaključeno je da SWCNT modifikacija olakšava prijenos elektrona kao difuziju i adsorpciju galne kiseline na površinu elektrode.

Na osnovu ovih razmatranja, a za primjenu u elektroanalitičke svrhe optimirani će biti parametri koji bi uz visoku frekvenciju i akumulaciju pri ~0,3 V mogli osigurati primjenu odabrane elektrode kao senzora za galnu kiselinu.



Slika 47. Ciklički voltamogram snimljeni na SWCNT elektrodi pH 3 pri različitim brzinama promjene potencijala, koncentracija galne kiseline 5×10^{-5} .

Detalj: ovisnost $\log I_a$ o $\log sr$.

3.1.2 REZULTATI VOLTAMETRIJE S PRAVOKUTNIM IZMJENIČNIM SIGNALOM POBUDE

Za određivanje galne kiseline odabrana metoda je anodna voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV). U kombinaciji s adsorpcijom, ta metoda je vrlo osjetljiva, često dopušta izravne analize na razini ppb (dijelova na milijardu), pa čak i niske razine ppt (dijelova na bilijun), odnosno koristi se i za kvantitativnu kemijsku analizu i za proučavanje mehanizma, kinetike i termodinamike kemijskih reakcija. Ova učinkovita i brza elektroanalitička metoda ima i još jednu važnu prednost, a to je dobra eliminacija pozadinskih Faradayskih struja. SWV je poznata kao jedna od najnaprednijih voltametrijskih tehnika koja objedinjuje prednosti cikličke voltametrije, jer znatno pojačava osjetljivost i selektivnost prema analitu.

Sva mjerenja koja uključuju određivanje fenola rađena su pri pH3, radi mogućnosti raspada galne kiseline pri višim vrijednostima.

Procedura za SWV ustanovljena je ispitivanjem utjecaja sljedećih parametara na signal odziva, odnosno na vršne struje (I_{pa}): vrijeme akumulacije (t_{aq}), potencijal akumulacije (E_{aq}), amplitude pravokutnog naponskog impulsa (ΔE_p) u odnosu na potencijal pomaka (ΔE_s) i frekvencija impulsa (f).

Porastom potencijala od 0 V u anodnom smjeru vršna struja postupno raste i doseže maksimalnu vrijednost na potencijalu od 0,3 V. Ovo zapažanje potvrđuje pretpostavku kako se predpik na cikličkom voltamogramu oko 0,3 V (vidi slika 47) se može pripisati adsorpciji aniona galne kiseline. Pri odabranom potencijalu adsorpcije ili akumulacije E_{aq} , optimirano je i vrijeme akumulacije, te je izveden zaključak kako najveći i znatan porast vršnih struja je prisutan u prvih 60 s. Daljnje povećanje vremena akumulacije tek neznatno povećava vršnu struju, ali znatno može produljiti vrijeme mjerenja.

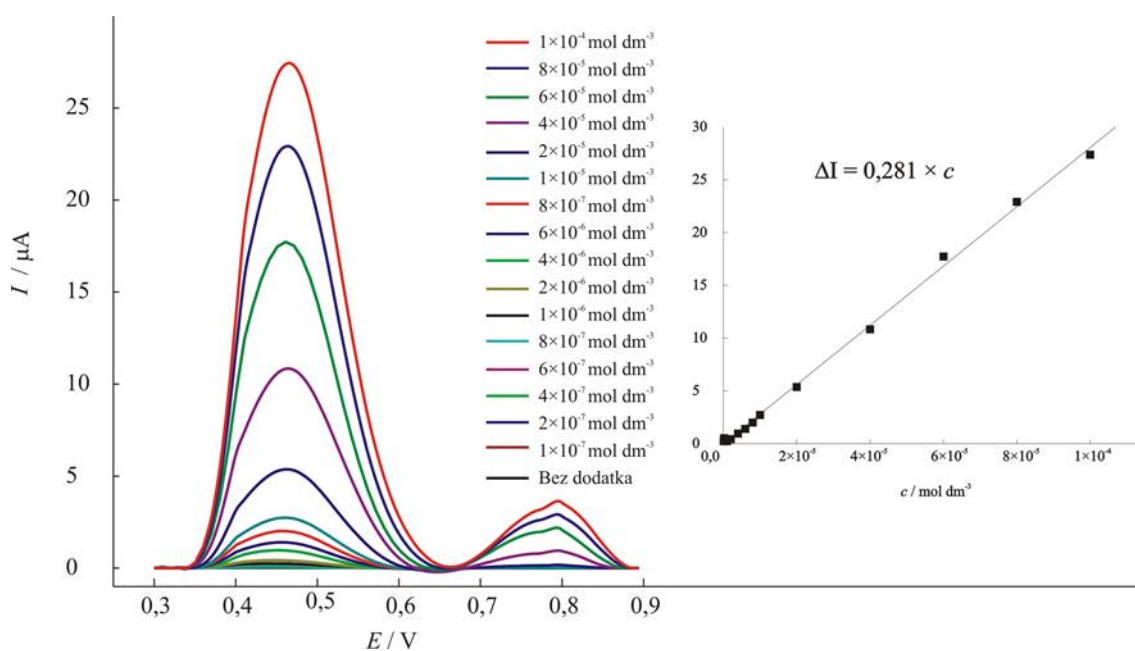
Zaključno, optimirani parametri su sljedeći: t_{aq} 60 sekundi uz miješanje te 30 s u mirujućem elektrolitu, $E_{aq} = 0,3$ V; $f = 20$ Hz; $\Delta E_s = 10$ mV; $\Delta E_p = 50$ mV te snimanje voltamograma od 0,3 V do 0,9 V. Sva elektroanalitička mjerenja su dobivena primjenom metode standardnog dodatka.

Na slici 48 prikazani su voltamogrami dobiveni metodom SWV, korigirani za vrijednost bazne linije, uz prisutnost različitih koncentracija galne kiseline, s

pripadajućom krivuljom umjeravanja u detalju. Dobro definiran i oštar oksidacijski vrh opažen je pri uzastopnim dodavanjima standardne otopine galne kiseline.

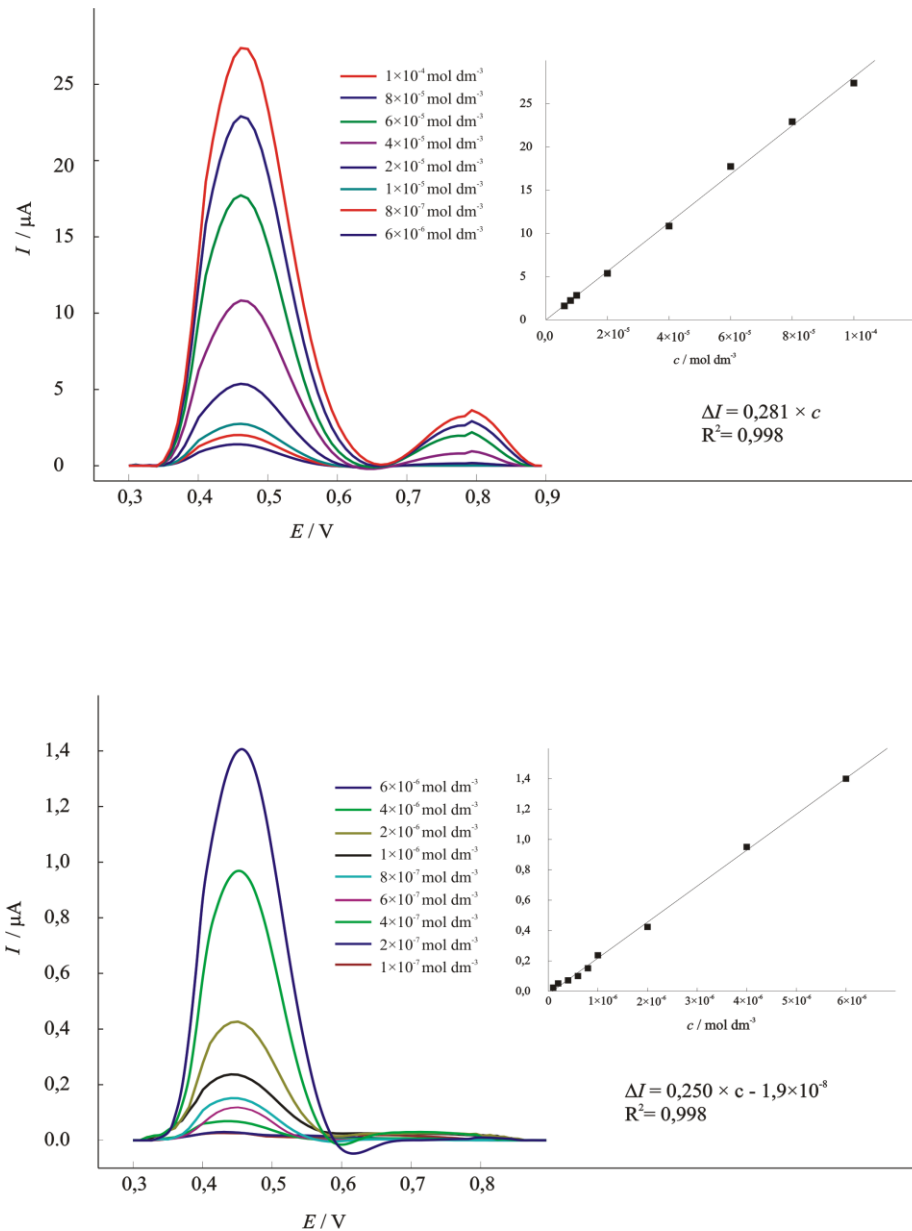
Galna kiselina pokazuje jedan anodni val pri nižim koncentracijama, te drugi anodni val uočljiv tek pri visokim koncentracijama. Iz voltamograma možemo uočiti i dva strujna vrha oksidacije GK, ali samo za vrijednosti koncentracije više od 4×10^{-5} mol dm^{-3} (prvi strujni vrh pri $\sim 0,45$ V je vidljiv za sve koncentracije, te drugi strujni vrh pri $\sim 0,80$ V za više koncentracije). O ovakvom su ponašanju ranije izvijestili Abdel-Hamid i Newair Abdel-Hamid.[53] Prvi anodni val koji pokazuje kvazireverzibilno ponašanje pripisan je oksidaciji $-OH$ skupine s prijenosom jednog elektrona kako bi se formirao kation radikala *o*-semikinona, koji se neutralizira deprotonacijom. Neutralni radikal se dalje oksidira u drugom strujnom vrhu ireverzibilnim gubitkom drugog elektrona i drugog protona do konačnog produkta, kinona galne kiseline.

Utvrđeno je da vršna struja galne kiseline u prvom strujnom vrhu korelira linearno s porastom koncentracije u rasponu od 1×10^{-7} do 1×10^{-4} mol dm^{-3} s koeficijentom linearnosti, odnosno osjetljivošću $0,281 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$, gdje linija regresije prolazi kroz ishodište. Kako bi potvrdili uočenu iznimnu linearnost koncentracijska područja su razdvojena u više i niže područje (Slika 49), te je izveden zaključak o vrlo malom odstupanju od linearnosti za niže koncentracijsko područje gdje osjetljivost iznosi $0,250 \mu\text{A mol}^{-1} \text{dm}^3$ s negativnim odsječkom na ordinati $1,9 \times 10^{-8}$.



Slika 48. Voltamogrami i pripadajuća krivulja umjeravanja za različite koncentracije galne kiseline.

Donja granica detekcije izračunata je iz podataka kalibracije pomoću sljedeće jednačbe, $LOD=3S/N$, gdje je S standardna devijacija presjeka i N je nagib regresijske linije. Dobivena granica detekcije iznosi od $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.



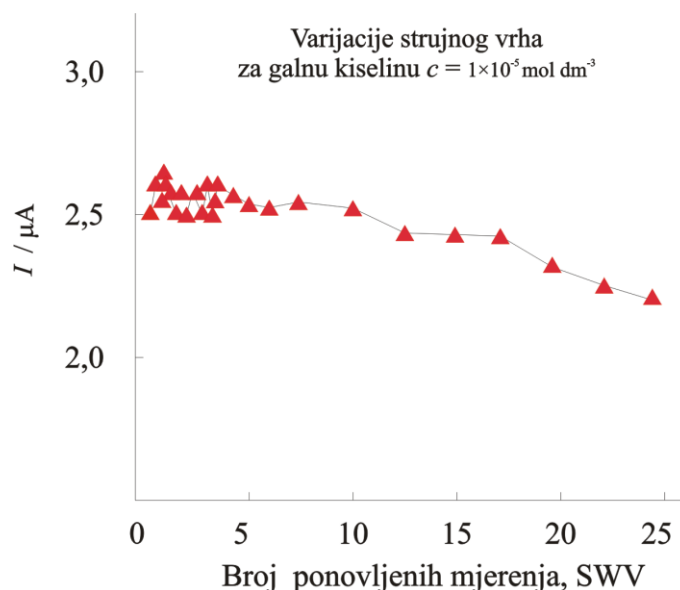
Slika 49. Voltamogrami i pripadajuće krivulje umjeravanja za različita koncentracijska područja galne kiseline.

Analitičke performanse pripremljenog senzora uspoređene su s poznatim podacima iz literature (Tablica 4). Izračunata vrijednost limita detekcije dobivena upotrebom odabrane elektrode (naš rad) niža je od prethodno objavljenih korištenjem drugih elektroanalitičkih metodologija. Jasno je da je sadašnja metoda brza zbog eliminacije koraka pripreme i predkoncentriranja analita neophodnih za kromatografske tehnike. Nadalje, optimirano vrijeme akumulacije je kraće od ostalih metoda s vremenom predkoncentracije koje iznose čak do 15 minuta, dok je u ovoj studiji optimalno vrijeme akumulacije bilo 90 s.

Tablica 4. Usporedba limita detekcije sličnih modifikacija i metoda dobivenih pregledom literature.

Elektroda	Linearno područje $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Granica detekcije $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Referenca
AuMCs/SF-GR/GCE - Mikroklasteri zlata/sulfonatfunkcionalizirani grafen na GCE	8,0–500,0	0,011	[54]
CS/fFe ₂ O ₃ /ERGO/GCE - bChitosan/fishbone-shaped Fe ₂ O ₃ /reducirani grafen-oksidi/GCE	10,0–100,0	0,150	[55]
SPCE/PME Preanodizirana screen-printed ugljikova elektroda/polimelamin;	0,5–500,0	0,076	[56]
Kapajuća živina elektroda	1,0–50,0	0,300	[57]
SiO ₂ /CPE Nano-SiO ₂ /elektroda od ugljikove paste	0,8–100,0	0,250	[58]
CNT/CPE	0,5–15,0	0,300	[59]
SWCNT	0,2–100	0,100	Naš rad

Predloženoj metodi je ispitana i ponovljivost, odnosno oscilacija anodnog strujnog vrha unutar dva sata, te je s jednakim vremenskim razmacima snimljeno ukupno 25 voltamograma u istoj otopini elektrolita uz koncentraciju galne kiseline 1×10^{-5} mol dm^{-3} (Slika 50).



Slika 50. Varijacije vrijednosti struje SWV za oksidaciju galne kiseline - ispitivanje ponovljivosti predložene optimirane metode i predložene elektrode za određivanje galne kiseline unutar dva sata.

Nakon dva sata se može uočiti odstupanje, odnosno slabljenje odziva što se može pripisati i raspadu GK pod utjecajem svjetlosti i kisika. Ova promjena se uočava po pojavi замуćenja i tamnjenje otopine, te nakon duljeg vremena pojavi modro-zelene boje. Elektroda je pokazala dobru ponovljivost i stabilan odziv prema GK uz relativnu standardnu devijaciju u iznosu od 1,5%. Nakon kratkog čišćenja i ispiranja ova elektroda se može ponovno koristiti tijekom cijelog dana, što joj je svakako prednost u odnosu na druge elektrode i metode evaluacije fenola. Tek visoke koncentracije galne kiseline ili uzorci s velikom koncentracijom bioaktivnih vrsta dovode do blokiranja površine elektrode, te je elektrodu potrebno ponovno pripremati, modificirati i aktivirati, kako je opisano u eksperimentalnom dijelu.

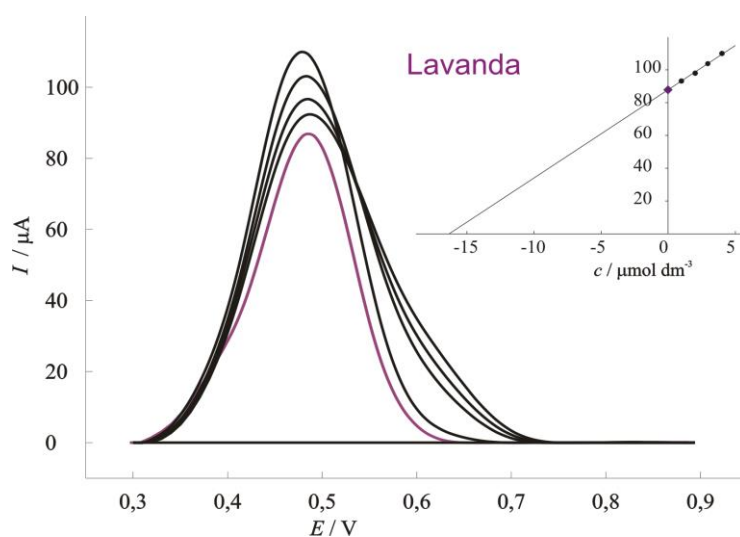
3.2 ANALITIČKA PRIMJENA VOLTAMETRIJSKIH METODA NA REALNIM UZORCIMA

Predložena optimirana metoda primijenjena je za određivanje GK u realnim uzorcima. Svi ekstrakti su priređeni na način kako je prethodno opisano. 200 cm^3 ekstrakta uzorka odgovara 1 g suhe tvari. U otopinu elektrolita od 100 cm^3 je dodavan 1 cm^3 ekstrakta uzorka što odgovara 5 mg suhe tvari. Na slikama 51 do 56 prikazani su voltamogrami za realne uzorke dobiveni metodom standardnog dodatka. U Tablici 5 prikazani su rezultati množinske i masene koncentracije. Navedena koncentracija odgovara masi galne kiseline u 1,0 cm^3 uzorka odnosno u 1,0 cm^3 ekstrakta.

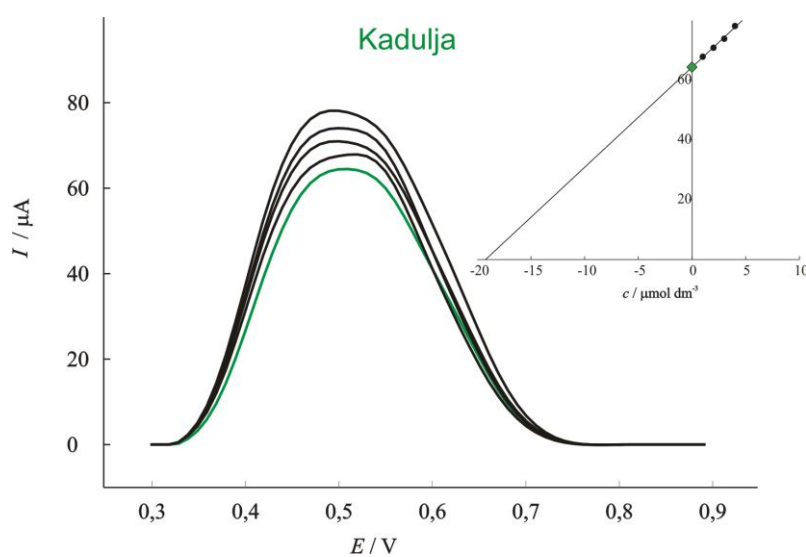
Tablica 5. Sadržaj galne kiseline u uzorcima dobiven SWV voltametrijom – vrijednosti izražene prema ekvivalentu 1,0 cm³ ekstrakta izražene kao množinska i masena koncentracija.

UZORAK	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens SWV	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens SWV
	Množinska koncentracija $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Masena koncentracija mg po 1 cm ³ ekstrakta
<i>Lavanda</i>	17,00	2,89
<i>Kadulja</i>	19,21	3,26
<i>Klinčić</i>	60,25	10,20
<i>Muškat</i>	7,15	1,21
<i>Cimet</i>	8,81	1,50
<i>Smilje</i>	20,10	3,42

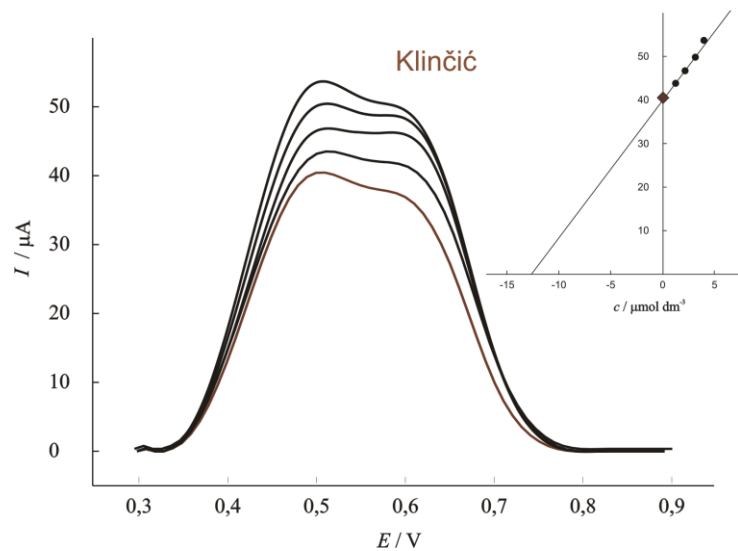
* 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ odgovara 0,170 mg dm^{-3}



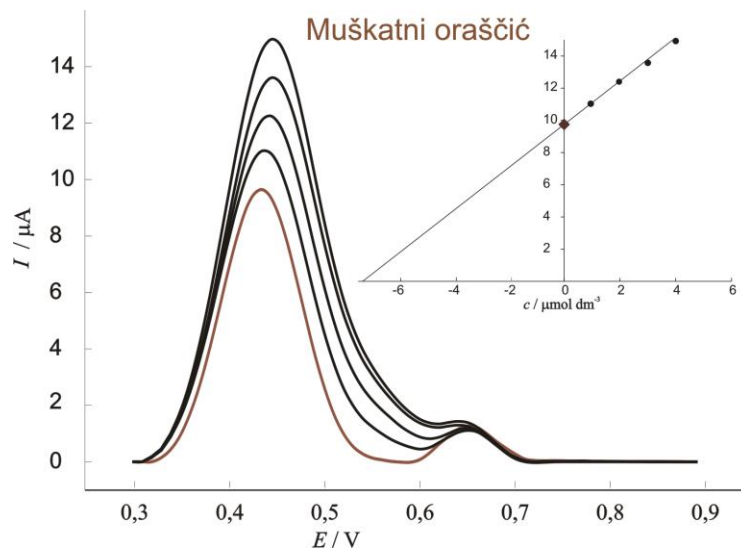
Slika 51. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Lavanda.



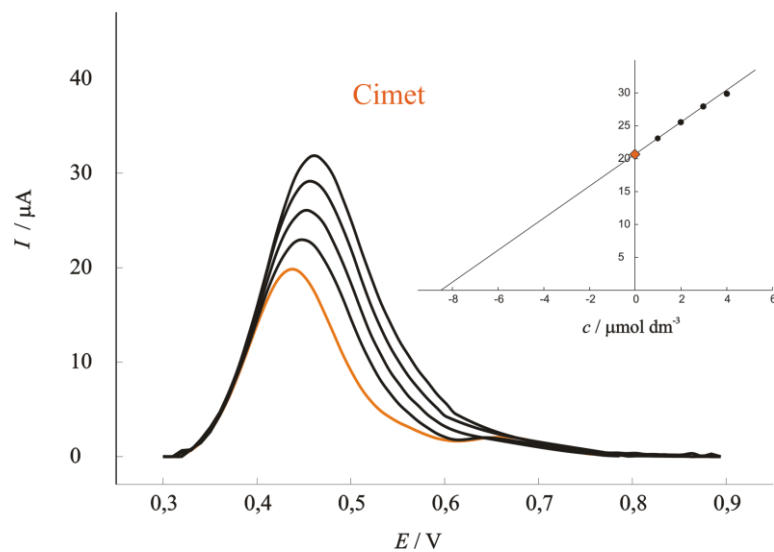
Slika 52. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Kadulja



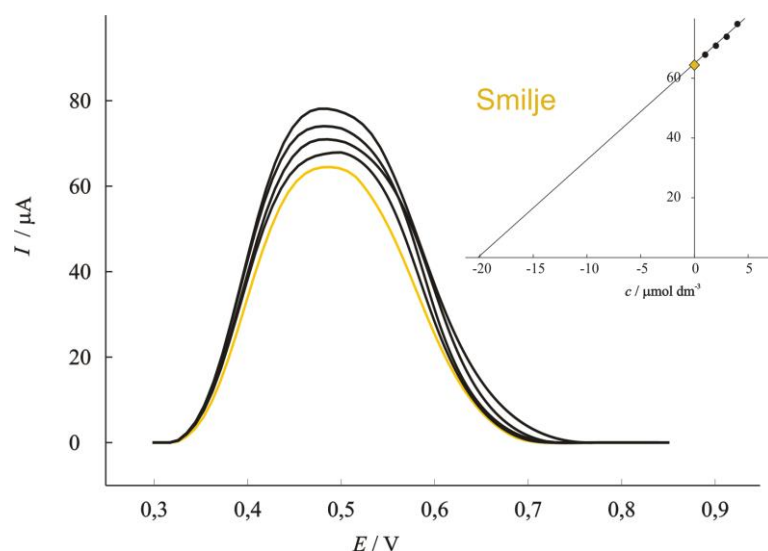
Slika 53. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Klinčić



Slika 54. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Mušklatni oraščić



Slika 55. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Cimet



Slika 56. SWV – Kvantitativno određivanje galne kiseline u uzorku Smilje

3.3 REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA

Prethodno opisana Folin-Ciocalteu metoda služi za određivanje ukupnih fenola. Dobiveni biljni ekstrakti dodani su umjesto standarda galne kiseline u tikvicu i nakon 10 minuta je izmjerena apsorbanacija. Na osnovu tri mjerenja nađena je srednja vrijednost apsorbanacije koja je prikazana u tablici 6. Obzirom na vrlo velike vrijednosti apsorbanacije, za određivanje ukupnih fenola u kivete je stavljeno 500 µL i 2000 µL vode, odnosno uzorci su razrijeđeni 5 puta.

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola uzoraka dobiven spektrofotometrijskom metodom - **VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE**

UZORAK	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			
				Srednja vrijednost
<i>Lavanda</i>	0,40532	0,40534	0,40538	0,40535
<i>Kadulja</i>	0,45147	0,45147	0,45161	0,45152
<i>Klinčić</i>	1,40483	1,40468	1,40414	1,40488
<i>Muškat</i>	0,17066	0,17066	0,17059	0,17064
<i>Cimet</i>	0,20761	0,20766	0,20762	0,20763
<i>Smilje</i>	0,46357	0,46353	0,46358	0,46356

Odabranim uzorcima je izračunat i antioksidacijski kapacitet određen prema prethodno opisanom FRAP metodom. Praćena je promjena apsorbanacije nakon 4 minute i nakon 10 minuta, te su FRAP vrijednosti očitane nakon 4 i nakon 10 minuta i prikazane u tablici 7. Uzorak klinčića je dodatno razrijeđen pet puta, te su u tablici prikazane dobivene vrijednosti za razrjeđenje.

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom. – **VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.**

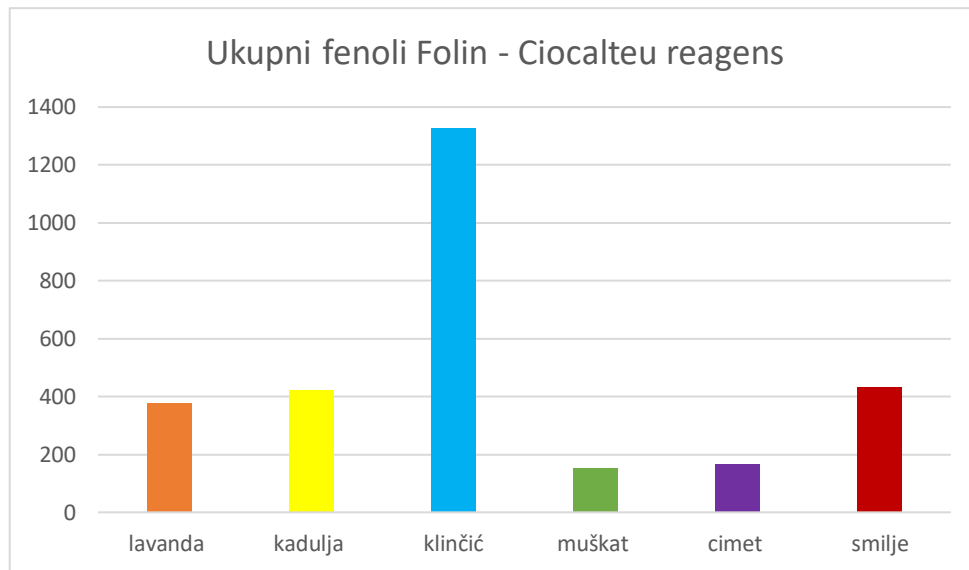
UZORAK	A₀ – 30 sek	A₄ – 4 min	A₁₀ – 10 min
<i>Lavanda</i>	0,323	2,613	3,09
<i>Kadulja</i>	0,239	2,409	2,843
<i>Klinčić/5</i>	0,377	3,699	3,856
<i>Muškat</i>	0,323	0,823	0,870
<i>Cimet</i>	0,239	0,836	0,925
<i>Smilje</i>	0,240	1,723	1,899

Svi rezultati spektrofotometrijskih mjerenja ispitanih biljnih ekstrakata prikazani su u tablici 8. Iz krivulje umjeravanja za standard galnu kiselinu, odnosno prema matematičkom izrazu za jednadžbu pravca izračunata je ili očitana koncentracija fenola u uzorku. Dobiveni rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE /L), budući da je ona korištena kao standard. Rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu metodom pokazali su da uzorak klinčića pokazuje najveći sadržaj ukupnih fenola 1328,74 mg GAE/L, dok je najmanju količinu fenola s istom pripremom pokazao muškat i iznosi 153,28 mg GAE/L. Antioksidacijski kapacitet je izračunat prema krivulji umjeravanja za standard Fe²⁺, odnosno prema matematičkom izrazu za jednadžbu pravca. Rezultati su prikazani u tablici 8, gdje je rezultat za klinčić pomnožen s njegovim razrjeđenjem (pet puta) kao bi mogli povući paralelu i izvesti zaključke.

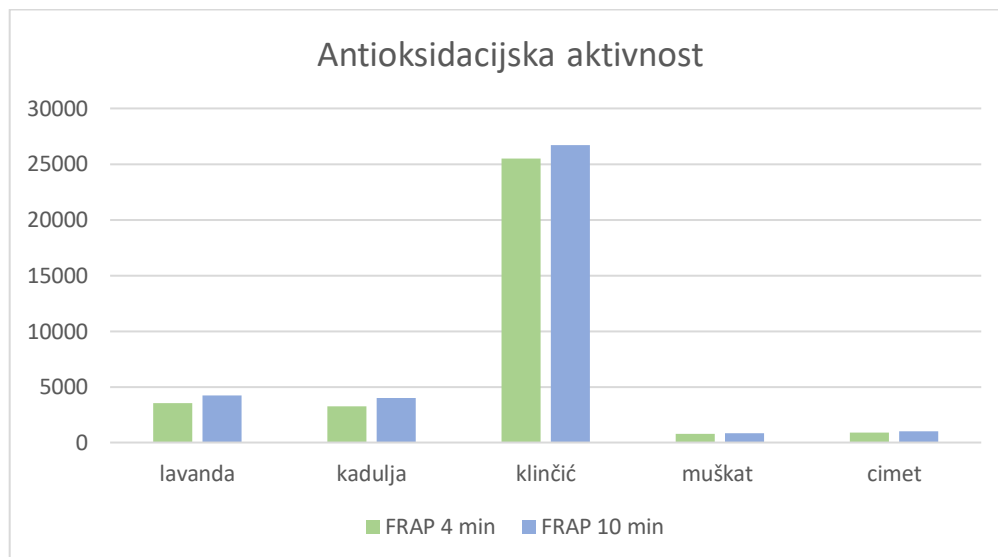
Slike 57 i 58 prikazuju rezultate ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivene spektrofotometrijskom metodom.

Tablica 8. Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet uzoraka dobivenih spektrofotometrijskom metodom – **REZULTATI.**

UZORAK	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens	Antioksidacijski kapacitet 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska kapacitet 10 minuta FRAP metoda
	mg GAE/dm ³	μM Fe ²⁺	μM Fe ²⁺
<i>Lavanda</i>	376,78	3509,69	4249,85
<i>Kadulja</i>	420,77	3235,05	3983,46
<i>Klinčić</i>	1328,74	25479,25	26687,70
<i>Muškat</i>	153,28	754,31	825,85
<i>Cimet</i>	188,50	903,46	989,85
<i>Smilje</i>	432,74	2265,04	2537,38



Slika 57. Ukupni fenoli - Folin - Ciocalteu reagens



Slika 58. Antioksidacijska aktivnost uzoraka poslije 4 i 10 minuta – FRAP metoda.

3.4 USPOREDBE REZULTATA

Konačni i najvažniji zadatak rada bio je utvrditi postoji li sličnost rezultata elektroanalitičkih i spektrofotometrijskih metoda. Nakon provedenih mjerenja i usporedbom rezultata za ukupne fenole, gdje je kao standard uzeta galna kiselina dobiveni su faktori sličnosti ili korelacije prikazani kao zadnji stupac u Tablici 9. Rezultati obje metode pokazuju isti trend i a faktor sličnosti je za sve uzorke identičan. Možemo zaključiti kako su rezultati dobiveni za ukupne fenole primjenom predloženih metoda komparativni za sve dobivene ekstrakte, jer je omjer dobivenih rezultata konstantan i njegova srednja vrijednost iznosi 130 (omjer FC/SWV). Dobiveni rezultat pokazuje

mogućnost korištenja ovakve metodologije za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima.

Tablica 9. Usporedba rezultata dobivenih elektrokemijskim i spektrofotometrijskim metodama - Ukupni fenoli.

UZORAK	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens SWV	OMJER FC / SWV metoda
	mg GAE dm ⁻³	mg GAE dm ⁻³	
<i>Lavanda</i>	376,78	2,89	130
<i>Kadulja</i>	420,77	3,26	129
<i>Klinčić</i>	1328,74	10,20	130
<i>Muškat</i>	153,28	1,21	127
<i>Cimet</i>	188,50	1,50	126
<i>Smilje</i>	432,74	3,42	127

S druge strane omjer FRAP/SWV ne pokazuje konstantnost, te je za uzorke s manjim antioksidacijskim kapacitetom omjer nizak, a sa porastom antioksidacijskog kapaciteta omjer raste (Tablica 10). Omjer FRAP/SWV govori kako predložena metoda nije pogodna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Tablica 10. Usporedba rezultata dobivenih elektrokemijskim i spektrofotometrijskim metodama – FRAP.

UZORAK	Antioksidacijski kapacitet 4 minute FRAP metoda	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens SWV	OMJER FRAP4 / SWV metoda
	μM Fe ²⁺	μmol dm ⁻³	
<i>Lavanda</i>	3509,69	17,00	206
<i>Kadulja</i>	3235,05	19,21	168
<i>Klinčić</i>	25479,25	60,25	423
<i>Muškat</i>	754,31	7,15	105
<i>Cimet</i>	903,46	8,81	103
<i>Smilje</i>	2265,04	20,10	113

4. ZAKLJUČAK

Elektroda od staklastog ugljika, elektroda od staklastog ugljika modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, te mikroelektrode od 100, 12000 i 36000 mikrovlakana korištene su u cilju istraživanja količine galne kiseline kao predstavnika fenolnih spojeva. Kao elektrolit je korišten fosfatni pufer pri različitim pH vrijednostima. Primjenom voltametrijskih tehnika dobiveni su rezultati istraživanja koji se dali sljedeće zaključke:

1. Nakon niza predmjerenja cikličkom voltametrijom s i bez galne kiseline izdvojena je elektroda od staklastog ugljika modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama površine, te pufer pH3 kao optimalni parametri za daljnja istraživanja u realnim uzorcima. SWCNT elektroda jasno pokazuje oksidacijski signal galne kiseline uz evidentan predpik, kao promjenu u nagibu anodnog vala. Time je potvrđena mogućnost adsorpcije galne kiseline na elektrodi čija je površina povećana zbog modifikacije. Logaritamska ovisnost struje o brzini promjene potencijala ukazuje na miješani mehanizam, odnosno potvrđuje da je proces oksidacije mješovito kontroliran proces, odnosno reakcija je pod difuzijsko/adsorpcijskom kontrolom.
2. Za potvrdu izabrane elektrode provelo se dodatno elektrokemijsko ispitivanje cikličkom voltametrijom sa sukcesivnim dodatkom GK pri pH3. Povećanjem koncentracije GK dobiven je linearni porast struje oksidacije. Uočeni su izražajni anodni strujni vrhovi, a najistaknutiji je pri $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ koji ukazuje na oksidaciju GK do forme kinona.
3. Utvrđivanje kinetike reakcije provedeno je pri većim brzinama promjena potencijala. Pri vrijednosti brzine od 400 mV s^{-1} katodni strujni vrh redukcije najizraženiji na potencijalu od $\sim 0,30 \text{ V}$, te su ti parametri uzeti u obzir za daljnja istraživanja. Potvrđena je kvazireverzibilnost s porastom brzine promjene potencijala, što omogućuje upotrebu voltametrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude u elektroanalitičke svrhe
4. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude metoda je za određivanje galne kiseline i provodi se sa SWCNT elektrodom bez realnih uzoraka sukcesivnim dodatkom GK sa prethodno optimiranim parametrima. Veći nagib kod većeg koncentracijskog područja ukazuje na bolju osjetljivost metode

koji iznosi $0,281 \mu\text{A mol}^{-1}\text{dm}^3$, a $R^2 = 0,998$. Odstupanje osjetljivosti za manje koncentracijsko područje, $0,250 \mu\text{A mol}^{-1}\text{dm}^3$ neznatno utječe na rezultate mjerenja. Elektroda je pokazala dobru ponovljivost i stabilan odziv prema GK uz relativnu standardnu devijaciju u iznosu od 1,5%.

5. Za realne uzorke uzeti su lavanda, kadulja, usitnjeni klinčić, muškat prah, cimet prah i smilje. Ekstrakti su dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom na 100°C u trajanju od 10 minuta. SWV mjeri elektroaktivnost galne kiseline u uzorku, odnosno njezin oksidacijski vrh koji predstavlja struju koja odgovara prijenosu elektrona u toj reakciji. SWV za SWCNT elektrodu pri pH3 pokazala je da najveću vrijednost galne kiseline u uzorku pokazuje klinčić i iznosi $60,25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ odnosno $10,20 \text{ mg po } 1 \text{ cm}^3$ ekstrakta.
6. Folin-Ciocalteu metodom određeni su ukupni fenoli čija je najveća vrijednost izmjerene apsorbancije u klinčiću i iznosi $1328,74 \text{ mg GAE dm}^{-3}$, dok je najmanju vrijednost ukupnih fenola pokazao muškat i iznosi $153,28 \text{ mg GAE dm}^{-3}$. Rezultati ostalih uzoraka variraju bliže nižoj vrijednosti fenola.
7. FRAP metodom određena je antioksidacijska aktivnost koja je u skladu s Folin-Ciocalteu metodom te je najveću FRAP-vrijednost pokazao klinčiću iznosu $25479,25 \mu\text{M Fe}^{2+}$ nakon 4 minute, a najmanju muškat u iznos $754,31 \mu\text{M Fe}^{2+}$ nakon 4 minute. Nakon 10 minuta FRAP za klinčić iznosi $26687,70 \mu\text{M Fe}^{2+}$, a za muškat $825,85 \mu\text{M Fe}^{2+}$.
8. Usporedbom voltametrijskih i spektrofotometrijskih metoda kojima je cilj odrediti količinu fenola prisutnih u uzorku dobiven je identičan trend porasta vrijednosti. Omjer Folin-Ciocalteu metode i voltametrije s pravokutnim signalom pobude iznosi u prosjeku 128,16. Preporučena metoda je prikladna za određivanje ukupnih fenola u uzorku. Kod analize antioksidacijske aktivnosti uočena su odstupanja te nije pogodna za procjenu.

Naposljetku, rad govori o svim pogodnostima navedenog dalmatinskog bilja uključujući antioksidacijsku aktivnost koje pomažu pri štetnom djelovanju slobodnih radikala i stvaranju oksidativnog stresa te u sprječavanju različitih tegoba i bolesti.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

CV – ciklička voltometrija

O – oksidacija

R – redukcija

WE – radna elektroda

CE – protuelektroda

RE – referentna elektroda

SCE – Kalomelova elektroda

SHE – standardna vodikova elektroda

GC – glassy carbon / staklasti ugljik

MEA – mikroelektroda

CF – ugljična vlakna

CNT – ugljikove nanocjevčice

SWCNT – jednoslojne ugljikove nanocjevčice

DWCNT – dvoslojne ugljikove nanocjevčice

MWCNT – višeslojne ugljikove nanocjevčice

CNF – ugljikova mikrovlakna / carbon nanofiber

CFME, ME – mikroelektroda

FSCV – ciklička voltometrija s brzim skeniranjem

SWV – voltometrija s pravokutnim signalom pobude

FC – Folin-Ciocalteu

FCR – Folin-Ciocalteu reagens

GK – Galna kiselina

FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

6. LITERATURA

1. N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart and J. L. Dempsey A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* 27599–95 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
2. H. Yamada, K. Yoshii, M. Chiku, Y. Kitazumi. Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals, *Electrochemistry*, 90 (2022) 102005 <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>
3. Wijeratne, K. Conducting Polymer Electrodes for Thermogalvanic Cells. Linköping University, Electronic Press. (2018).
4. Slika preuzeta sa: <https://pineresearch.com/shop/kb/applications/rde-and-rrde/three-electrode-setups/>
5. M. Dekleva, M. Kovačević, E. Gričar, M. Kolar, B. Genorio, B. Repič, D. Kuščer, H. Prosen, G. Marolt. An innovative pretreatment protocol to eliminate silver contamination-induced voltammetric interference on graphite-glass working electrode, *Electrochem. Com.* 162 (2024) 107707. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2024.107707>
6. S. Visnupriya, N. Prabavathi, P. Vijayakumar. Ni–Mo bimetallic oxides/rGO nanocomposites as counter electrode for the application of DSSCs, *Chemical Physics Impact* 8 (2024) 100598. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100598>
7. V. Uskoković. A historical review of glassy carbon: Synthesis, structure, properties and applications, *Advanced Materials and Nanobiotechnology, Carbon Trends* 5 (2021) 100116.
8. Y. Yia, G. Weinberg, M. Prenzela, M. Greinera, S. Heumanna, S. Beckera, R. Schlögl. Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode; *Catalysis Today*, 295 (2017) 32–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2017.07.013>
9. A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B.Z. Nikolić, V.M. Jovanović: Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation, *Carbon*, 39 (2001) 1195–1205.
10. M. Hejazi, W. Tong, M. R. Ibbotson, S. Praver, D. J. Garrett. Advances in Carbon-Based Microfiber Electrodes for Neural Interfacing, *Sec. Neural Technology* 15 (2021) 143059. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.658703>
11. E. Leppanen, T. Laurila, E. Gustafsson, N. Wester, I. Varjos, S. Sainio: Geometrical and chemical effects on the electrochemistry of single-wall carbon

-
- nanotube (SWCNT) network electrodes *Electrochim. Acta*, 466 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.143059>
12. M. Guoa, G. Zhua, Y. Mishchenkob, A. Butenkob, V. Kovalenkob, T. Rozhkovac, H. Zhaoa. Highly sensitive electrochemical detection of gallic acid in tea samples by using single-walled carbon nanotubes@silica dioxide nanoparticles decorated electrode; *J. Electrochem. Sci.* 18 (2023) 100291.
<https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100291>
 13. A. Mohammadi, A. B. Moghaddam, R. Dinarvand, J. Badraghi, F. Atyabi, A. A. Saboury. Bioelectrocatalysis of Methyldopa by Adsorbed Tyrosinase on the Surface of Modified Glassy Carbon with Carbon Nanotubes, *Iran Int. J. Electrochem. Sci.*, 3 (2008) 1248–1257. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15520-9](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15520-9)
 14. M. Guoa, J. Hana, Y. Mishchenkob, A. Butenkob, V. Kovalenkob, T. Rozhkovac, H. Zhaoa. Electrochemical detection of methyl parathion using zirconium dioxide@single-walled carbon nanotubes nanocomposite modified glassy carbon electrode, *Int. J. of Electrochem. Sci.* 18 (2023) 100340.
<https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100340>
 15. S. A. Thomas, J. Cherusseri D. N. Rajendran. Recent advancements in carbon fiber-based sustainable electrodes for flexible and wearable supercapacitors, *RSC Sustainability* 2 (2024) 2403–2443. <https://doi.org/10.1039/D4SU00146J>
 16. M. Vasquez-Velardea, L. Fernandez, D. Bolanos-Mendez, H. Burbano-Erazoa, J. Alvarez-Paguaya, P. Carrerab, P.J. Espinoza-Montero. Evaluation of a gold-nanoparticle-modified carbon-fiber microelectrode to quantify mercury in canned tuna sold in Ecuador, *Chemosphere* 338 (2023) 139483.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139483>
 17. Whirang Cho, H. Rafi, S. Cho, A. Balijepalli and A. G. Zestos: High resolution voltammetric and field-effect transistor readout of carbon fiber microelectrode biosensors, *Sensors & Diagnostics*, 1 (2022). 460–464.
<https://doi.org/10.1039/D2SD00023G>
 18. S. P. Whelan, S. Naserikarimvand, Z. Tehrani, M. Peacock, O. Guy, D. Gethin. Electrochemical based quantification of bacterial growth in media using square wave voltammetry and low cost screen printed electrodes, *J. Microbiolog. Methods*, 224 (2024) 107007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.107007>
 19. F.H. Pilz, P. Kielb. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry or electrochemical impedance spectroscopy? Interrogating electrochemical approaches

-
- for the determination of electron transfer rates of immobilized redox proteins, *BBA Advances* 4 (2023)100095. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100095>
20. M. López–Tenés, E. Laborda, F. Martínez–Ortiz, J. González, Á. Molina. Square wave voltammetry as a powerful tool for studying multi–electron molecular catalysts, *J. Electroanal. Chem.* 927 (2022) 116943. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116943>
 21. D. Guziejewski. Electrode mechanisms with coupled chemical reaction — Amplitude effect in square–wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem.* 870 (2020) 114186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114186>
 22. F.H. Alencar Fernandes, H.R. Nunes Salgado. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46 (2016) 257–265. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>
 23. I. Rahmawati, A. W. Pratama, S. A. Pratama, M. N. Khozin, A. Firmanda, F. H. Irawan, Asranudin , A. N. M. Ansori, T. H. Sucipto. Gallic acid: A promising bioactive agent for food preservation and sustainable packaging development, *CSCEE*, 10 (2024) 100776. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100776>
 24. C. Yang, G. Xu, C. Hou, H. Zhang. Cobalt oxyhydroxide nanoflakes enable ratiometric fluorescent assay of gallic acid, *Food Chemistry:X*, 24 (2024) 101843, <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101843>
 25. I. Kolak, Z. Šatović: Lavanda u krajobrazu; *Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, 20 (2003) 1–2; <https://hrcak.srce.hr/file/250525>
 26. V. Ljubešić: Cvijeće koje ne služi samo za ukras; *Glasnik zaštite bilja* 4 (2010). <https://hrcak.srce.hr/163368>
 27. Slika preuzeta sa: Lavanda – ljekovita i iznimno korisna biljka <https://www.rasadnik–milic.hr/lavanda–ljekovita–i–iznimno–korisna–biljka/>
 28. Slika preuzeta sa: Livadna kadulja. <https://www.plantea.com.hr/livadna–kadulja/>
 29. F.J. Alashti, F. Sohbatzadeh, S. Ahmadian, E. Nazifi. Enhancing the biological activities and altering the chemical structure of clove aqueous extract prepared with plasma–activated water as a novel technique, *LWT* 207 (2024) 116687. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116687>
 30. N. Lomi, S.S. Jena, J.K. Mitra, S. Misra. Effect of preoperative clove oil gargle on postoperative sore throat in adults after surgery: A randomized placebo–controlled blinded study, *JCA Advances* 1 (2024) 100014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcadva.2024.100014>

-
31. M. M. Islam, Md. Ibrahim H. Mondal: Carboxymethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone bio-composite hydrogels enriched with clove bud extracts for enhanced wound healing; *Arabian J. Chem.* 17 (2024) 105945. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105945>
32. Slika preuzeta sa: Klinčić <https://www.podravka.hr/namirnica/40c4fcec-610e-11eb-90ae-0242ac12002e/klincic/>
33. C. Spence: Nutmeg and mace. The sweet and savoury spices, *Int. J. Gastron. Food Sci.* 36 (2024) 100936. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.100936>
34. T. Bibi, A.B. Altemimi, R. Rabail, S. Munir, M.U. Shahbaz, M.K. Rizvi, M.F. Manzoor, G. Abdi, A. Ul Haq, R. Muhammad Aadil. The therapeutic perspective of cinnamon (*Cinnamomum verum*) consumption against metabolic syndrome, *J. Funct. Foods* 122 (2024) 106545. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106545>
35. M. Kolovrat: Tehnologija:cimet; MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu 6 (2007) <https://hrcak.srce.hr/21285>
36. Slika preuzeta sa: Školska knjiga <https://www.skolskiportal.hr/sadrzaj/iz-skolskog-svijeta/cimet-jedna-od-najstarijih-mirodija/>
37. M. Andjić, N. Draginić, A. Kočović, J. Jeremić, K. Vučićević, N. Jeremić, V. Krstončić, B. Božin, N. Kladar, I. Čapo, Lj. Andrijević, D. Pecarski, S. Bolevich, V. Jakovljević, J. Bradić. Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model, *Biomed. Pharmacother* 150 (2022) 112941. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112941>
38. M. Rajić, M. Bilić, K. Aldaić, D. Šimunović, T. Pavković, S. Jokić. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja, *Glasnik zaštite bilja*, 6 (2015). <https://hrcak.srce.hr/162322>
39. Slika preuzeta sa: Plantea – smilje. <https://www.plantea.com.hr/smilje/>
40. M. Marković, S.Talić. Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina, *Kemija u industriji*, 62 (2013) 1–2.
41. M. García-Infante, J.M. Moreno-Rojas, J.L. Ordonez-Díaz, A. Hervalejo, E. Romero-Rodríguez, F. J. Arenas-Arenas. Evaluation of antioxidant properties of thirteen orange genotypes [*Citrus sinensis* L. Osbeck] with juice industry interest, *J. Agric. Food Res.* 18 (2024) 191491. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101491>

-
42. T.A. Enache, A.M. Oliveira–Brett. Phenol and para–substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>
43. M. Greco, M. Fuertes–Rabanal, C. Frey, C. Del Grosso, D. Coculo, P. Moretti, P. Saldarelli, S. Agresti, R. Caliendo, H. Melida, V. Lionetti. Phenolic compounds–enriched extract recovered from two–phase olive pomace serves as plant immunostimulants and broad–spectrum antimicrobials against phytopathogens including *Xylella fastidiosa*, *Plant Stress*, 14 (2024) 100655. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100655>
44. M. Blekić, A. Režek Jamrak, F. Chemat: Microwave extraction of bioactive compounds, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3 (2011) 32–47. <https://hrcak.srce.hr/70918>
45. A. Queral–Beltran, M. Marín–García, S. Lacorte, R. Tauler. UV–Vis absorption spectrophotometry and LC–DAD–MS–ESI(+)-ESI(-) coupled to chemometrics analysis of the monitoring of sulfamethoxazole degradation by chlorination, photodegradation, and chlorination/photodegradation, *Anal. Chim. Acta*, 1276 (2023) 341563. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341563>
46. I. Dominguez–lópez, M. Pérez and R. M. Lamuela–Raventós: Total (poly)phenol analysis by the Folin–Ciocalteu assay as an anti–inflammatory biomarker in biological samples, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 64 (2024) 20048–20054. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031>
47. R. Martínez–Lopez, M. G. Tuohy. Rapid and cost–efficient microplate assay for the accurate quantification of total phenolics in seaweeds, *Food Chemistry: X*, 6 (2023) 100166 <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100166>
48. Slika preuzeta sa: https://www.researchgate.net/figure/Redox-reaction-between-polyphenols-and-Folin-Ciocalteu-reagent_fig2_357529163
49. P. Svestkova, J. Balík, I. Soral. Synergistic effect of selected carboxylic acids and phenolic compounds detected by the FRAP method, *Food. Chem. Mol. Sci.* 23 (2024) 101573. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101573>
50. S. Galušić: Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti; University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Završni rad (2020). <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf%3A3689/datastream/PDF/view>
51. C.G. da Rosa, C.D. Borges, R.C. Zambiasi, M.R. Nunes, E.V. Benvenuti, S.R. da Luz, R.F. D’Avila, J.K. Rutz. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β –

-
- cyclodextrin and xanthan. *Ind. Crops Prod.* 46 (2013) 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.053>
52. Wang J. *Analytical Electrochemistry*. 2. New York: Wiley–VCH; 2000. p. 37.
53. R. Abdel–Hamid, E.F. Newair. Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy–carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 657 (2011) 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.03.030>
54. Z. Liang, H. Zhai, H. Chen, Z. Wang, S. Wang, Q. Zhou, X. Huang. A simple, ultrasensitive sensor for gallic acid and uric acid based on gold microclusters/sulfonate functionalized graphene modified glassy carbon electrode *Sens. Actuators, B* 224 (2016) 915–925. [doi:10.1016/j.snb.2015.10.101](https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.101)
55. F. Gao, D. Zheng, H. Tanaka, F. Zhan, X. Yuan, F. Gao, Q. Wang. An electrochemical sensor for gallic acid based on Fe₂O₃/electro–reduced graphene oxide composite: Estimation for the antioxidant capacity index of wines, *Mater. Sci. Eng., C* 57 (2015) 279–287. [doi:10.1016/j.msec.2015.07.025](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.025)
56. Su, Y.–L.; Cheng, S.–H. Sensitive and selective determination of gallic acid in green tea samples based on an electrochemical platform of poly(melamine) film *Anal. Chim. Acta*, 901 (2015) 41–50. [doi:10.1016/j.aca.2015.10.026](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.026)
57. Ü.T. Yilmaza, A. Kekillioglu, R. Mert. Determination of Gallic acid by differential pulse polarography: Application to fruit juices, *J. Anal. Chem.* 68 (2013) 1064–1069. [doi:10.1134/S1061934813120113](https://doi.org/10.1134/S1061934813120113)
58. J. Tashkhourian, S.F. Nami–Ana. A sensitive electrochemical sensor for determination of gallic acid based on SiO₂ nanoparticle modified carbon paste electrode, *Mater. Sci. Eng., C* 52 (2015) 103–110. [doi:10.1016/j.msec.2015.03.017](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.017)
59. L.P. Souza, F. Calegari, A.J.G. Zarbin, L.H. Marcolino–Júnior, M.F. Bergamini. Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7620–7625. [doi:10.1021/jf2005589](https://doi.org/10.1021/jf2005589)