Elektrokemijska karakterizacija antioksidanasa na modificiranim elektrodama: Karotenoidi

Santro, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:531001

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA

- Karotenoidi -

ZAVRŠNI RAD

ANA SANTRO

Matični broj: 1200

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA

- Karotenoidi -

ZAVRŠNI RAD

ANA SANTRO

Matični broj: 1200

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

CHEMICAL ENGINEERING

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANTS ON MODIFIED ELECTRODES

- Carotenoids -

BACHELOR THESIS

ANA SANTRO

Parent number: 1200

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko – tehnološki fakultet
Preddiplomski studij Kemijske tehnologije, smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko–tehnološkog fakulteta održanoj dana 25. rujna 2019. godine.

Mentor: doc. dr. sc. Nives Vladislavić

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA

- Karotenoidi -

Ana Santro, 1200

Sažetak:

Brojna istraživanja pokazuju kako konzumacija namirnica bogatih tvarima s antioksidacijskim djelovanjem imaju izrazito povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka. Uloga antioksidansa je spriječiti štetne oksidacijske procese slobodnih radikala. Unošenjem različitih biljnih vrsta (voća, povrća, orašastih plodova, začinskoga bilja…) osobito onih iz prirodnog i organskog uzgoja sprječavamo reakcije koje mogu dovesti do mnogih degenerativnih promjena u stanicama čovjeka, te narušiti ljudsko zdravlje.
Primjena različitih elektrokemijskih metoda u analizi antioksidacijske aktivnosti u posljednjem desetljeću naišla je na veliki interes u znanstvenim krugovima. Danas istraživanja idu u smjeru pronalaska i razvoja metodologije pripreme elektrode/senzora za brzu jednostavnu, selektivnu i osjetljivu karakterizaciju bioaktivnih tvari u prirodnim uzorcima, bez njihove predobrade. Elektrokemijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti na različitim elektrodama nailaze već danas na primjenu, osobito u karakterizaciji prirodnih bojila – KAROTENOIDA.
Cilj ovog rada je pregledom literature pokazati kako je jednostavnim elektrokemijskim metodama moguće je odrediti antioksidacijski kapacitet *β*-karotena, koji je primjer najzastupljenijeg prirodnog bojila i antioksidansa, te radi svojih povoljnih svojstava primjenu pronalazi u raznim industrijama.

Ključne riječi: antioksidansi, metode određivanja, elektrokemijske metode, *β*-karoten

Rad sadrži: 36 stranica, 30 slika, 2 tablice, 39 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu: 1. doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević - predsjednica
2. doc. dr. sc. Franko Burčul– član
3. doc. dr. sc. Nives Vladislavić – član-mentor

Datum obrane: 28. rujna 2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of chemistry and technology Split
Undergraduate study of chemical technology, orientation: Chemical engineering

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28

Mentor: Assistant Professor Nives Vladislavić, PhD

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANTS ON MODIFIED ELECTRODES

- Carotenoids -

Ana Santro, 1200

Abstract

Numerous studies show that the consumption of foods rich in antioxidants has a very positive effect on human health. The role of antioxidants is to prevent harmful oxidative processes of free radicals. By consuming different types of plants (fruits, vegetables, nuts, herbs...), especially naturally and organically grown, we prevent reactions that can lead to many degenerative changes in human cells and affect human health.

The use of various electrochemical methods in the analysis of antioxidant activity has found great interest in scientific circles over the last decade. Current and new research are directed towards finding and developing a methodology for preparing electrodes/sensors for a fast, simple, selective and sensitive characterization of bioactive substances in natural samples without pre-treatment. Electrochemical methods for the determination of antioxidative activity of different electrodes are already available today, especially for the characterization of natural dyes - CAROTENOIDS.

β-Carotene as the most common natural dye and antioxidant can be used in the food industry, but also in many other branches of industry. The aim of this review article is to demonstrate possibility of determination of the antioxidant capacity of β-carotene using simple electrochemical methods.

Keywords: antioxidants, determination methods, electrochemical methods, β-carotene

Thesis contains: 36 pages, 30 pictures, 2 tables, 39 literatury references

Original in: Croatian

Defence committee: 1. Assistant Professor Ivana Škugor Rončević, PhD - chair person
2. Assistant Professor Franko Burčul– član PhD - member
3. Assistant Professor Nives Vladislavić PhD - supervisor

Defence date: September 28, 2020.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nives Vladislavić u razdoblju od srpnja do rujna 2020. godine.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Nives Vladislavić na savjetima, strpljenju i izdvojenom vremenu kojim je doprinijela izradi ovog završnog rada.

Posebnu zahvalu dugujem svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci kada mi je bilo najpotrebnije.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Upoznati se s konceptom antioksidansa.
2. Pregledom recentne literature utvrditi mogućnosti elektrokemijskih metoda u određivanju antioksidacijskog kapaciteta.
3. Upoznati se s značajem β-karotena.
4. Predstaviti prednosti elektrokemijskih metoda u odnosu na sofisticirane metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta na primjeru β-karotena.

SAŽETAK

Brojna istraživanja pokazuju kako konzumacija namirnica bogatih tvarima s antioksidacijskim djelovanjem imaju izrazito povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka. Uloga antioksidansa je spriječiti štetne oksidacijske procese slobodnih radikala. Unošenjem različitih biljnih vrsta (voća, povrća, orašastih plodova, začinskoga bilja…) osobito onih iz prirodnog i organskog uzgoja sprječavamo reakcije koje mogu dovesti do mnogih degenerativnih promjena u stanicama čovjeka, te narušiti ljudsko zdravlje.

Primjena različitih elektrokemijskih metoda u analizi antioksidacijske aktivnosti u posljednjem desetljeću naišla je na veliki interes u znanstvenim krugovima. Danas istraživanja idu u smjeru pronalaska i razvoja metodologije pripreme elektrode/senzora za brzu jednostavnu, selektivnu i osjetljivu karakterizaciju bioaktivnih tvari u prirodnim uzorcima, bez njihove predobrade. Elektrokemijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti na različitim elektrodama nailaze već danas na primjenu, osobito u karakterizaciji prirodnih bojila – KAROTENOIDA.

Cilj ovog rada je pregledom literature pokazati kako je jednostavnim elektrokemijskim metodama moguće je odrediti antioksidacijski kapacitet β-karotena, koji je primjer najzastupljenijeg prirodnog bojila i antioksidansa, te radi svojih povoljnih svojstava primjenu pronalazi u raznim industrijama.

Ključne riječi: antioksidansi, metode određivanja, elektrokemijske metode, β-karoten

SUMMARY

Numerous studies show that the consumption of foods rich in antioxidants has a very positive effect on human health. The role of antioxidants is to prevent harmful oxidative processes of free radicals. By consuming different types of plants (fruits, vegetables, nuts, herbs...), especially naturally and organically grown, we prevent reactions that can lead to many degenerative changes in human cells and affect human health.

The use of various electrochemical methods in the analysis of antioxidant activity has found great interest in scientific circles over the last decade. Current and new research are directed towards finding and developing a methodology for preparing electrodes/sensors for a fast, simple, selective and sensitive characterization of bioactive substances in natural samples without pre-treatment. Electrochemical methods for the determination of antioxidative activity of different electrodes are already available today, especially for the characterization of natural dyes - CAROTENOIDS.

β-Carotene as the most common natural dye and antioxidant can be used in the food industry, but also in many other branches of industry. The aim of this review article is to demonstrate possibility of determination of the antioxidant capacity of *β*-carotene using simple electrochemical methods.

Keywords: antioxidants, determination methods, electrochemical methods, β-carotene

SADRŽAJ:

UVOD 1
1.OPĆI DIO 2
1.1. ANTIOKSIDANSI 2
1.1.1. VITAMIN C 2
1.1.2. VITAMIN E 3
1.1.3. KAROTENOIDI 4
1.1.4. POLIFENOLI 5
1.2. METODE MJERENJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI 8
1.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE 9
1.2.1.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 9
1.2.1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI 9
1.2.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE 10
1.2.2.1. DPPH METODA 10
1.2.2.2. ABTS METODA 11
1.2.2.3. FRAP METODA 13
1.2.2.4. ORAC METODA 13
1.2.2.5. HORAC TEST 14
1.2.2.6. TRAP METODA 14
1.2.2.7. PFRAP METODA 14
1.2.2.8. CUPRAC METODA 15
1.2.3. ELEKTROKEMIJSKE METODE 16
1.2.3.1. VOLTAMETRIJSKE METODE 16
1.2.3.2. AMPEROMETRIJSKE METODE 21
1.2.3.3. POTENCIOMETRIJSKE METODE 22
2. KAROTENOIDI 23
2.1. ELEKTROKEMIJSKE METODE I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET 23
2.3. MOGUĆNOSTI ELEKTROKEMIJSKOG ODREĐIVANJA IZOLIRANOG BETA KAROTENA I NJIHOVA PRIMJENA U REALNOM UZORKU 27
3. ZAKLJUČAK 34
4. LITERATURA 35

UVOD

Konzumacija namirnica biljnog porijekla ima povoljan učinak na ljudski organizam. Razlog tomu je antioksidativno djelovanje sastojaka pojedinih namirnica. Antioksidansi sprječavaju štetno djelovanje slobodnih radikala koji nastaju oksidacijom, te na taj način usporavaju ili potpuno sprječavaju štetne oksidacijske procese. U suprotnom slobodni radikali bi započeli lančanu reakciju u stanici i tako prouzrokovali štetu ili smrt stanice.

Antioksidansi biljnog porijekla su uključeni u sprječavanje bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom poput zloćudnih tumora, ateroskleroze, Alzehemirove bolesti i Parkinsonove bolesti. Najznačajniji prirodni sastojci za sprječavanje antioksidativnog djelovanja u namirnicama biljnog porijekla su polifenoli, vitamini C i E, te karotenoidi. Sadržaj antioksidansa u voću, povrću i njihovim prerađevinama ovisi o agrotehničkim mjerama, tehnološkim postupcima prerade sirovine, uvjetima čuvanja i skladištenja, te okolišnim uvjetima uzgoja biljke, kao što su tip tla, količina padalina, stupanj zrelosti biljke u fazi berbe, itd.

Da bi svojstva hrane bila što povoljnija potrebno je pratiti ukupni antioksidativni kapacitet. On predstavlja mjeru za sposobnost reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija u hrani i organizmu. Bitan pojam je i antioksidativna aktivnost neke tvari koja se odnosi na brzinu kojom promatrana tvar reagira s nekom reaktivnom kisikovom ili dušikovom vrstom.

Kako bi se izmjerila antioksidativna aktivnost pojedinih spojeva koriste se razne metode, od kojih su najznačajnije kromatografske, spektrometrijske i elektrokemijske metode.

1.OPĆI DIO

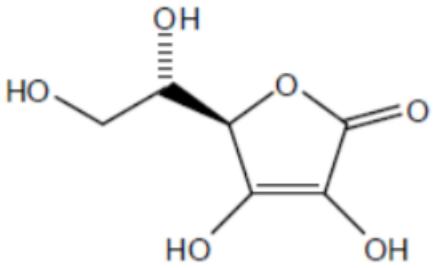
Antioksidansi su neophodni za održavanje optimalnog zdravstvenog stanja. Stoga je potrebno unositi što više voća i povrća tamno zelene, crvene i narančaste boje jer su te namirnice bogate anioksidansima.

1.1. ANTIOKSIDANSI

Ovisno o načinu na koji antioksidansi deaktiviraju slobodne radikale postoje metode koje rade na SET (engl. *Single Electron Transfer*) mehanizmu i na HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) mehanizmu. SET mehanizam se temelji na prijenosu elektrona, tj. predstavlja sposobnost antioksidansa da donira elektron i na taj način reducira određene komponente. To su najčešće spore metode koje ovise o pH vrijednosti i otapalu. U reakcijama SET mehanizma oksidans prima elektron od antioksidansa i kao rezultat dolazi do promjene boje. HAT mehanizam se temelji na prijenosu atoma vodika tako da se mjeri sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima uz doniranje atoma vodika. Za razliku od SET mehanizma, HAT mehanizam ne ovisi o pH vrijednosti i otapalu. Te metode su brze.

1.1.1. VITAMIN C

Vitamin C (Slika 1) se smatra najvažnijim hidrofilnim antioksidansom.[1] Učinkovit je u uklanjanju superoksidnih radikalnih aniona, hidroksilnih radikala, vodikovog peroksida, reaktivnih dušičnih vrsta i atomarnog kisika. Može se ponašati kao reaktivni kisik kada se koristi u količinama većim od 1000 mg/kg i u tom slučaju inhibirati oksidaciju. U manjim koncentracijama, ispod 100 mg/kg, može katalizirati oksidaciju u mišićnom tkivu. Neki od prirodnih izvora vitamina C su limun, naranča, kivi, jabuka i cvjetača.

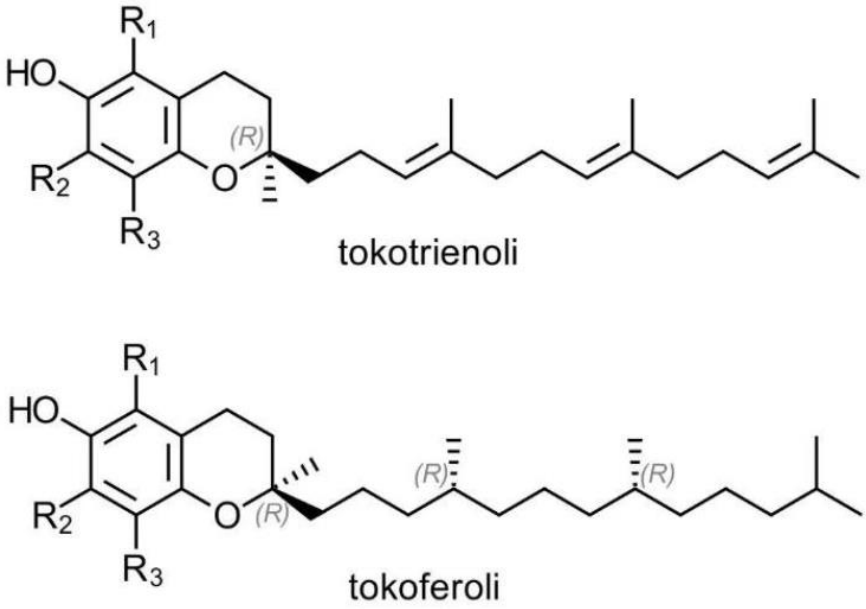


Slika 1. Struktura vitamina C.[3]

Vitamin C u strukturi sadrži četiri OH skupine koje može donirati vodiku ili oksidiranom sustavu.[2]

1.1.2. VITAMIN E

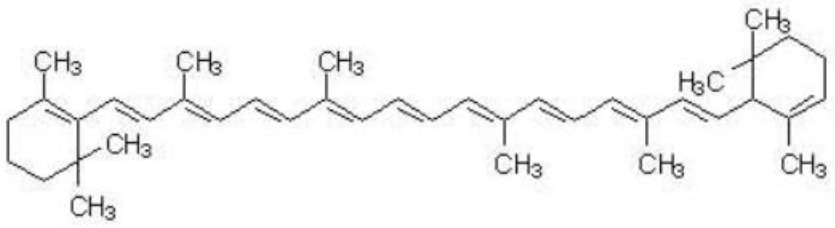
Vitamin E (Slika 2) obuhvaća grupu kemijskih tvari izvedenih od tokoferola i tokotrienola. To je liposolubilni antioksidans (topiv u mastima) koji djeluje preko dva osnovna mehanizma: mehanizma razaranja lanca elektron-donora i mehanizma razaranja lanca elektron-akceptora. Strukturu vitamina E čine četiri tokoferola i četiri tokotrienola. Tokoferolska skupina pokazuje antioksidativnu aktivnost.[4] Prirodni izvori vitamina E su žitarice, zeleni čaj i uljarice.



Slika 2. Struktura vitamina E.[5]

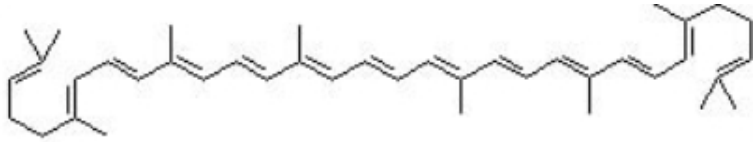
1.1.3. KAROTENOIDI

Od karotenoidnih antioksidansa najzastupljeniji su β-karoten, likopen i hidroksi-karotenoid. β-karoten (Slika 3) je liposolubilni (topiv u mastima) provitamin vitamina A, te jedan je od najjačih antioksidansa. Može blokirati atomarni kisik i inhibirati lipidnu oksidaciju. Prirodni izvori β-karotena su tamno zeleno lisnato povrće, maslinovo ulje i crvene mrkve.



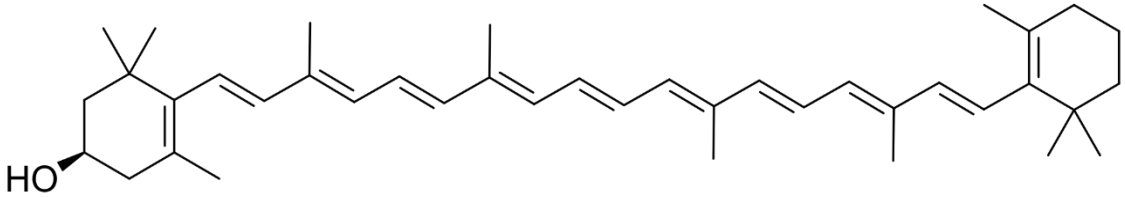
Slika 3. Struktura β-karotena.[6]

Likopen (Slika 4) je terpen (hlapljivi nezasićeni ugljikovodik) s jedanaest konjugiranih i dvije nekonjugirane dvostruke veze. Najučinkovitiji je u reduciranju atomarnog kisika i prirodnih karotenoida.[7] Prirodni izvori likopena su mrkve, grejp, rajčice, marelice, rajčice, lubenice.



Slika 4. Struktura likopena.[6]

Hidroksi-karotenoidi (ksantofili) (Slika 5) su oksidirani karotenoidi koji se uglavnom nalaze kao žuti pigmenti lišća.[8]
Prirodni izvori hidroksi-karotenoida su špinat, mrkva, kukuruz.



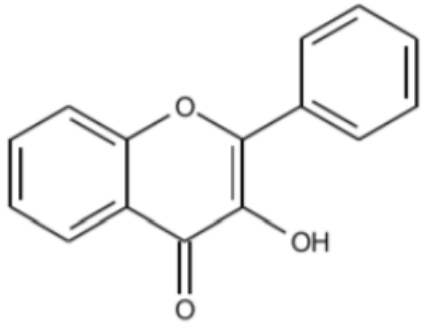
Slika 5. Struktura ksantofila.[6]

1.1.4. POLIFENOLI

Polifenoli su biološka komponenta koja je sveprisutna u biljnim organizmima, te stoga čine sastavni dio ljudske prehrane. Sposobni su neutralizirati, odnosno zasititi slobodne radikale zbog posjedovanja antioksidativne aktivnosti. Također pokazuju značajnu zaštitu od oksidativnog stresa *in vitro*.[9] Najzastupljenije skupine prirodnih spojeva sa antioksidativnim djelovanjem su flavonoidi i fenolne kiseline.

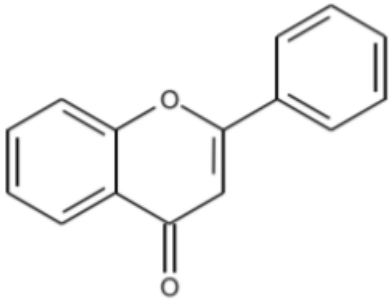
Flavonoidi su jako zastupljeni u prirodi, te se dijele u nekoliko skupina, a to su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni. Prirodni izvori flavonoida su žitarice, med i naranče.

Flavonoli (Slika 6) su zastupljeni u voću i povrću. Sadržaj im varira jer ovisi o čimbenicima rasta, klime, skladištenja, svjetlosti i obrade. Predstavnik je kvercetin i njegovi derivati koji su uglavnom prisutni u lišću. Prirodni izvori flavanola su zeleni čaj i vino.



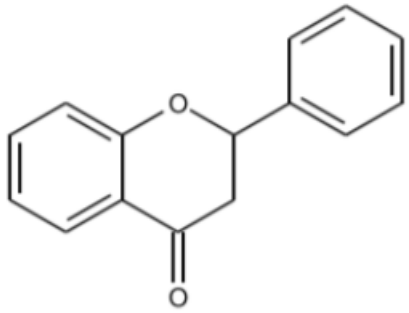
Slika 6. Struktura flavonola.[10]

Flavoni (Slika 7) su pronađeni u svim dijelovima biljaka, povrću, te generativnim organima biljaka. Prirodni izvori flavona su kora citrusa i kukuruz.



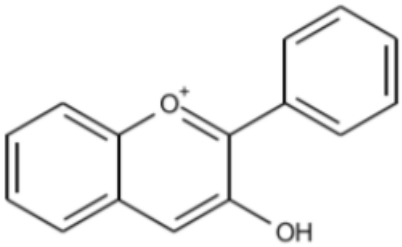
Slika 7. Struktura flavona.[10]

Flavanoni (Slika 8) su prisutni kod citrusnog voća kao što su naranča i grejp.[11]



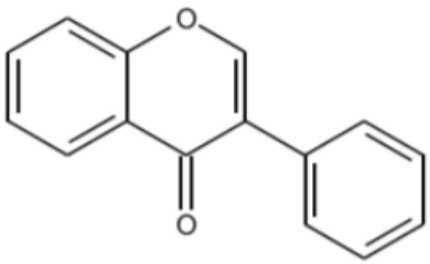
Slika 8. Struktura flavanona.[10]

Antocijanidini (Slika 9) su najveća grupa biljnih pigmenata u prirodi. Odgovorni su za boju voća i cvijeća. Prirodni izvori antocijanidina su bobičasto voće, grejp, rajčice, šipak, zelena zrnca kave i crveni kupus.



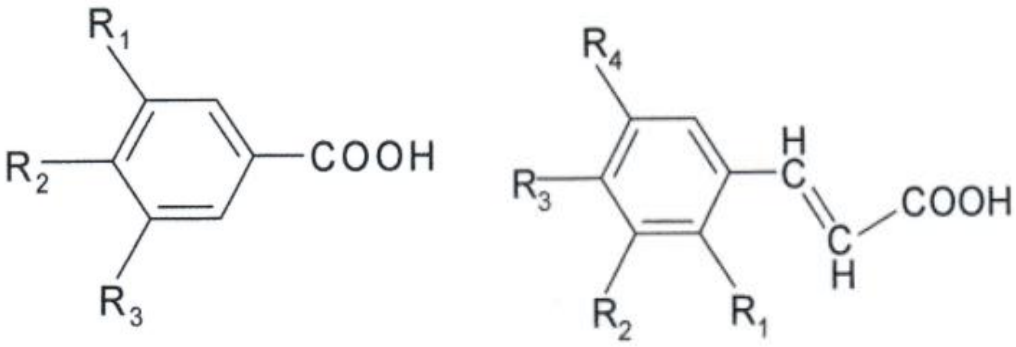
Slika 9. Struktura antocijanidina.[10]

Izoflavoni (Slika 10) su grupa oksidiranih heterocikličnih spojeva koji pripadaju skupini fitoestrogena. Najpoznatiji su daidzein, geninstein i glicitein koji prevladavaju u mahunarkama. Osnovni oblici izoflavona u biljkama su glikozidi sa šećerom (glukoza, galaktoza, ramnoza). Prirodni izvori izoflavanona su primjerice zelena, žuta i crvena leća, te grah.



Slika 10. Struktura izoflavona.[10]

Fenolne kiseline (Slika 11) su druga velika skupina prirodnih antioksidansa. Mogu se podijeliti u dvije grupe, ovisno o njihovoj strukturi. Razlikuju se derivati benzojeve kiseline i derivati cimetne kiseline. Najvažnije hidroksibenzojeve kiseline su galna, *p*-hidroksibenzojeva, vaniliska i siringinska kiselina. Najvažnije hidroksicimetne kiseline su kafeinska, ferulna, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina.[11] Prirodni izvori fenolnih kiselina su osušeni đumbir, žitarice, zelena zrnca kave, sok od naranče, te razni začini. Osim jednostavnih fenolnih kiselina, antioksidacijsko djelovanje pokazuju i njihovi kondenzacijski produkti, nastali kondenzacijom nekoliko fenolnih jedinica, od kojih su najznačajniji tanini, stilbeni i lignani.



Slika 11. Opća struktura hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicmetne kiseline.[12]

1.2. METODE MJERENJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Do danas su razvijene brojne metode za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u hrani, pićima i biološkim uzorcima te ih općenito možemo podijeliti u nekoliko skupina;

- KROMATOGRAFSKE METODE
  - plinska kromatografija
  - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC
- SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE
  - DPPH metoda ili Brand-Williams metoda
  - ABTS METODA (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina))
  - FRAP METODA (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Potential*)
  - ORAC METODA (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
  - HORAC TEST (engl. *Hydroxyl Radical Averting Capacity*)
  - TRAP METODA (engl. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*)
  - PFRAP METODA (engl. *Potassium Ferricyanide Reducing Power*)
  - CUPRAC METODA (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Power*)
- ELEKTROKEMIJSKE METODE
  - Voltametrijske metode
  - Amperometrijske metode
  - Potenciometrijske metode

1.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Najčešće korištene kromatografske metode su plinska kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Kromatografske metode se uglavnom koriste prije spekrometrijskih i elektrokemijskih metoda kako bi se odredili, te odvojili antioksidansi iz smjese.

1.2.1.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija se koristi za odvajanje i analizu spojeva kod kojih prilikom isparavanja ne dolazi do raspada istih. Prilikom razdvajanja spojeva mobilnu fazu čini plin, a stacionarnu tekućina. Mobilna faza je najčešće inertni plin, helij, ili nereaktivni plin, dušik.[13] Stacionarnu fazu čini mikroskopski sloj tekućine ili polimera na čvrstom inertnom nosaču. Tijekom analiziranja antioksidansa detektori koje se koriste u plinskoj kromatografiji su plameno-ionizacijski detektor i detektor toplinske vodljivosti.

1.2.1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) se sastoji od pumpe koja pokreće mobilnu fazu i smjese kroz stacionarnu fazu (kolonu), te detektora koji mjeri vrijeme zadržavanja pojedine komponente. Kolona (stupac) je gusto pakirana sitnim česticama stacionarne faze.

Antioksidativna aktivnost ove metode se temelji na radikal 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskoj kiselini. Otopina ABTS kationa je tamno plave boje, te kako se gubi radikal iz otopine tako nestaje plavo obojenje. Metoda je primijenjena za određivanje sadržaja antioksidansa u kavi.

Uz ABTS radikal antioksidativna aktivnost ove metode se može temeljiti i na DPPH radikalu. Metoda je primijenjena za procjenu aktivnosti uklanjanja slobodnih radikala silimarina i nekoliko komercijalnih hepatoprotektivnih poliherbalnih formulacija.[14]

Također, HPLC metoda se može temeljiti na detekciji fluorescencije. Razvoj takve metode je omogućio određivanje propil-galata, butiliranog hidroksianisola, terc-butilhidrokinona i oktil-galata u jestivim uljima i hrani

1.2.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

Spektrofotometrijske metode se temelje na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s molekulom antioksidansa koja donira atom vodika.

1.2.2.1. DPPH METODA

DPPH metoda temelji se na mjerenju sposobnosti redukcije 2,2-difenilpikrilhidrazil radikala pomoću antioksidansa. Mjerenje se vrši pomoću spektrofotometra. DPPH je jeftina, brza i jednostavna metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. Može se mjeriti antioksidativna aktivnosti u složenim biološkim sustavima, a također i u voćnim i povrtnim sokovima. (Slika 12)

Ovom metodom se mjeri apsorbancija otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom. DPPH reagira s cijelim antioksidansom, te se može koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa.

Delokalizacija slobodnog radikal DPPH• s neparnim elektronima daje maksimalnu apsorpciju pri 517 nm ljubičaste boje. Kada antioksidansi reagiraju s DPPH•, stabilni slobodni radikal postaje sparen u prisutnosti donora vodika i reducira se u DPPH(H). Posljedica toga je da se apsorbancija smanjuje i dolazi do nestanka ljubičaste boje.

DPPH• s antioksidansom reagira prema HAT mehanizmu ili prema SET mehanizmu. Kojim se mehanizmom odvija reakcija ovisi o mediju u kojem se odvija reakcija, polarnosti, kiselosti i broju fenolnih hidroksilnih skupina.[15]

Mehanizam HAT:

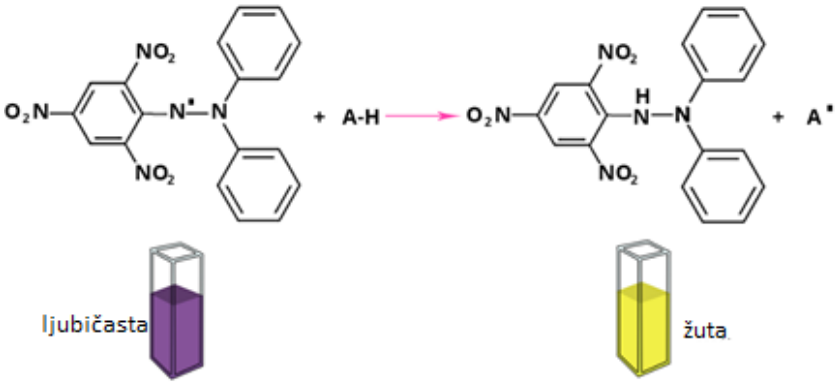
$$DPPH\bullet + ArOH \rightarrow DPPH(H) + ArO\bullet$$

Mehanizam SET:

$$DPPH\bullet + ArOH \rightarrow DPPH^{-} + [ArOH]\bullet$$

DPPH(H) predstavlja reducirani oblik, a ArO• slobodni radikal koji ulazi u daljnju reakciju prilikom čega se neutralizira.

Učinkovitost antioksidansa se mjeri pri sobnoj temperaturi.[15] DPPH metoda se najčešće izvodi u otopini metanola jer se tako olakšava ekstrakcija antioksidativnih spojeva iz uzorka. Apsorbancija DPPH u organskim otopinama se smanjuje pod utjecajem svjetla.



Slika 12. Reakcija DPPH metode.[16]

1.2.2.2. ABTS METODA

U ABTS metodi se radikali uklanjaju pomoću flavonoida i fenola. Kao radikal koristi se plavo-zeleno obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline, odnosno ABTS radikal. Ova metoda se temelji na reakciji kationskog radikala i antioksidansa. Kada ABTS radikal reagira s antioksidansom dolazi do redukcije ABTS radikala u stabilan ABTS spoj. Prilikom dodatka antioksidansa

dolazi do gubitka plavo zelene boje. Promjena boje se detektira pri valnoj duljini od 734 nm.[15]

ABTS može reagirati putem SET mehanizma:

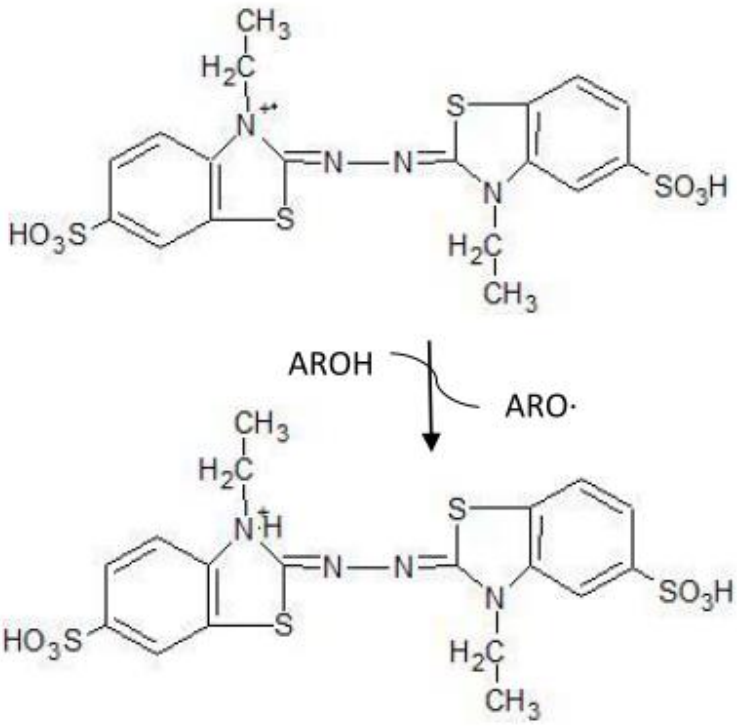
$$ABTS^{\bullet} + ArOH \rightarrow ABTS + [ArOH]^{\bullet +},$$

i putem HAT mehanizma:

$$ABTS^{\bullet +} + ArOH \rightarrow ABTS(H) + ArO^{\bullet}$$

ABTS(H) predstavlja reducirani oblik, a ArO• slobodni radikal koji ulazi u daljnju reakciju prilikom čega se neutralizira.

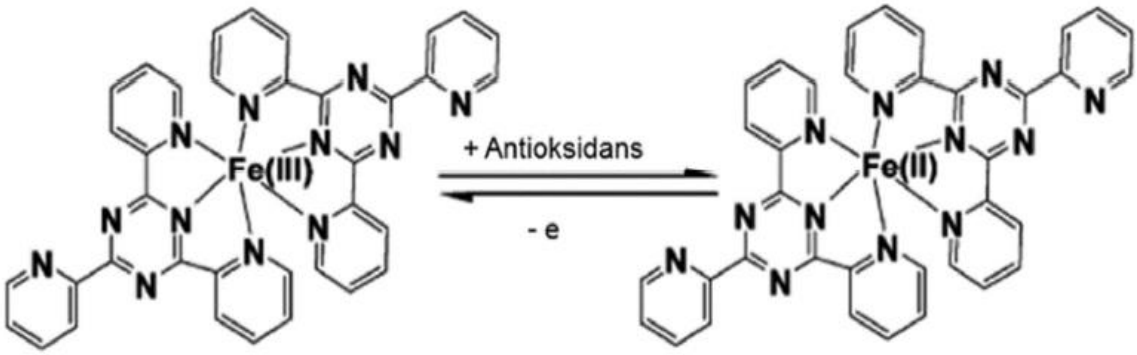
Za razliku od DPPH metode koja se primjenjuje najčešće pri niskim pH vrijednostima, ABTS metoda je osjetljivija i može se primjenjivati za različite vrijednosti pH. Koristi se za određivanje antioksidativne aktivnosti u ekstaktima voća i povrća, u bezalkoholnim i alkoholnim pićima, kavi i čaju.



Slika 13. Reakcija ABTS radikala sa antioksidansom ArOH.[15]

1.2.2.3. FRAP METODA

FRAP metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona - TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) u Fe^{2+} - TPTZ s antioksidansom. Reakcija se izvodi pri niskim pH vrijednostima kako bi se održala topljivost željeza. Rezultat reakcije je promjena iz žute boje u plavu, a apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 550 nm.[15]



Slika 14. Reakcija FRAP metode.[17]

Reakcija se odvija putem SET mehanizma:

$$Fe^{3+} + ArOH \rightarrow Fe^{2+} + [ArOH]^{\bullet +}$$

$[ArOH]^{\bullet +}$ predstavlja slobodni radikal koji ulazi u daljnju reakciju prilikom čega se neutralizira.

1.2.2.4. ORAC METODA

Za ORAC metodu je izvor radikala najčešće azo-spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid). Reakcija se prati fluorescencijskom spektroskopijom. Azo-spoj se raspada stvarajući peroksil radikale koji oštećuju fluorescentnu molekulu što rezultira gubitkom fluorescencije. Mjerenje se provodi pri valnoj duljini od 515 nm.[15]

Mehanizam odvijanja reakcije je HAT:

$$2RO2\bullet + (FL)OH \rightarrow 2ROOH + (FL)O\bullet$$

(FL)O• predstavlja slobodni radikal koji ulazi u daljnju reakciju prilikom čega se neutralizira.

ORAC metoda se koristi za određivanje antikosidativnog kapaciteta u voću i povrću, i to se najčešće mjere antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva, ali se koristi i za mjerenje antioksidacijskih svojstava vitamina C i E.

1.2.2.5. HORAC TEST

U HORAC testu se koristi Co(II) kompleks. Test se temelji na određivanju antioksidativne sposobnosti protiv stvaranja hidroksil-radikala, te se tehnika oslanja na mjerenju metal-kelirajućeg djelovanja antioksidansa u uvjetima Fenton reakcija.[18]

1.2.2.6. TRAP METODA

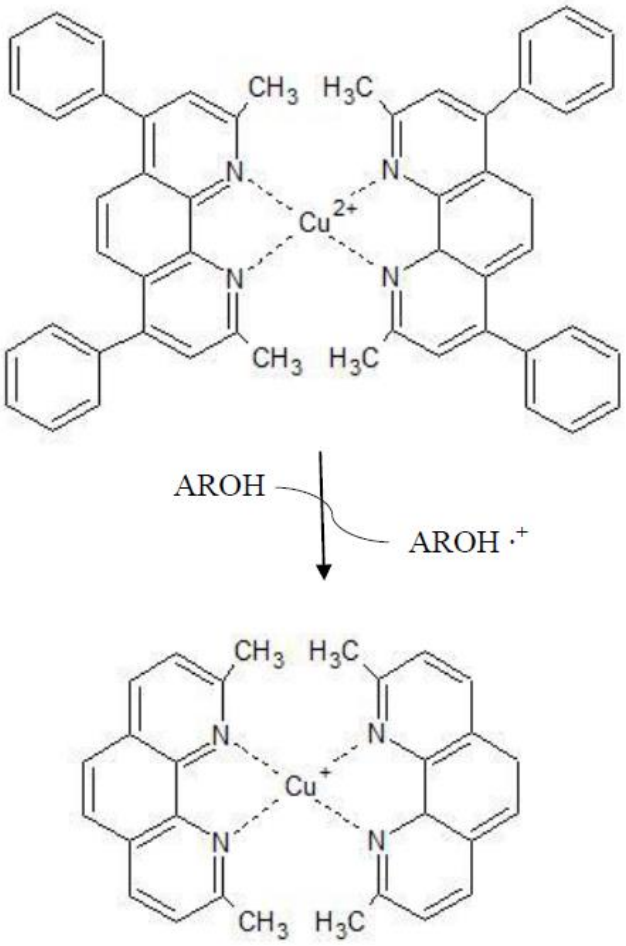
TRAP metoda je složena i vremenski duga metoda koja je osjetljiva na sve antioksidanse. Metoda se temelji na određivanju antioksidativne sposobnosti hvatanja peroksil-radikala. Koristi se luminiscencijski spektrofotometar za mjerenje smanjenja luminiscencije tijekom reakcije peroksidacije pri čemu nastaju peroksilni radikali.

1.2.2.7. PFRAP METODA

Metoda koja se temelji na sposobnosti reduciranja kalijevog fericijanida. Antioksidansi reagiraju s kalijevim fericijanidom stvarajući kalijev ferocijanid. Nastali kalijev ferocijanid reagira sa željezovim trikloridom stvarajući željezov ferocijanid koji daje plavo obojenje. Maksimalna apsorbancija je pri valnoj duljini od 700 nm.

1.2.2.8. CUPRAC METODA

CUPRAC metoda se temelji na određivanju antioksidativne sposobnosti reduciranja Cu(II) u Cu(I) tijekom reakcije antioksidansa s neokuproinom[15] (Slika 15). Metoda se može primjenjivati na lipofilne i na hidrofilne antioksidanse. Analiza je gotova za nekoliko minuta za jednostavnije molekule, kao što su, askorbinska kiselina, mokraćna kiselina, galna kiselina i kvercetin, dok kod složenijih molekula zahtijeva nešto duže vrijeme. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 950 nm.[15]



Slika 15. CUPRAC reakcija.[15]

1.2.3. ELEKTROKEMIJSKE METODE

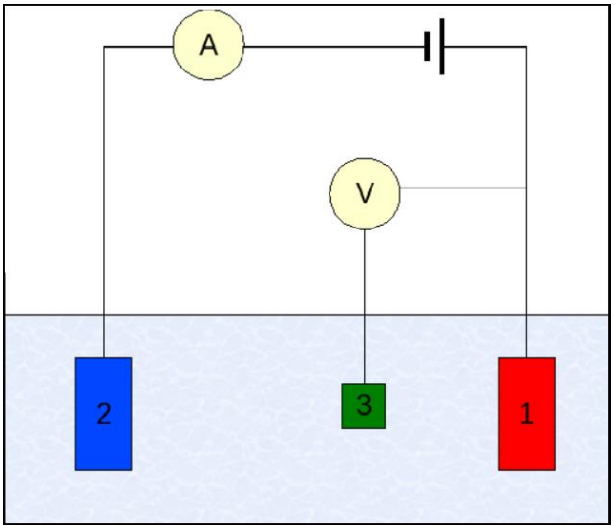
Elektrokemijske metode koje se najčešće primjenjuju su ciklička voltametrija i biamperometrija. Metode se primjenjuju za određivanje sadržaja antioksidansa i antioksidativne aktivnosti.

1.2.3.1. VOLTAMETRIJSKE METODE

Karakteristično za voltametrijske metode je to da je signal pobude linearno promjenjiv potencijal, a signal odziva je struja ćelije koja se mjeri kao funkcija narinutog potencijala. Ćelija voltametrijskih metoda se sastoji od 3 elektrode (Slika 16). To su:

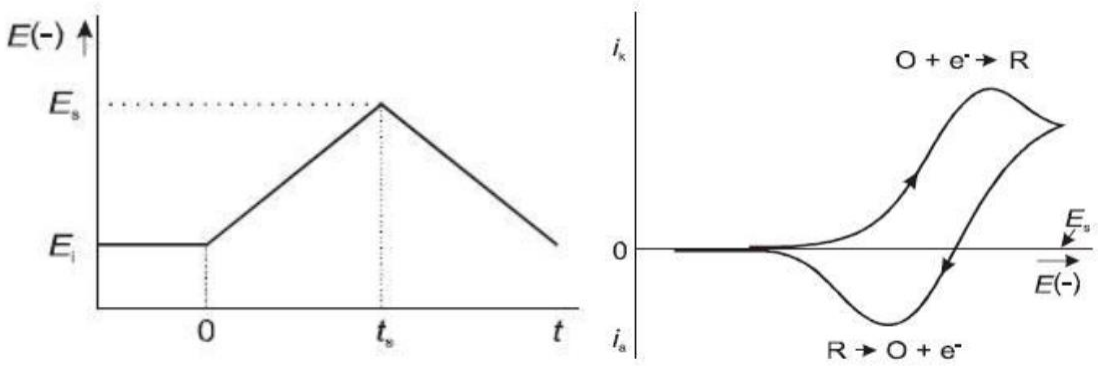
- radna elektroda,
- referentna elektroda i
- pomoćna, tj. protuelektroda.

Referentna elektroda je elektroda čiji je potencijal poznat i potpuno neovisan o koncentraciji analita. Kao referentne elektrode najčešće se koriste kalomel i Ag/AgCl elektroda. Radna elektroda je elektroda na čijoj se površini odvija elektrokemijska reakcija, pa se njezin potencijal mijenja s vremenom. Pomoćna elektroda je najčešće Pt elektroda. Ona zatvara krug i provodi elektrone od izvora signala kroz otopinu do radne elektrode.[19]



Slika 16. Eleketrokemijska ćelija:
1-radna elektroda, 2-pomoćna elektroda, 3-referentna elektroda.

Ciklička voltametrija spada u grupu potenciodinamičkih elektroemijskih mjerenja, te je jedna od najčešće korištenih tehnika budući da je prikladna za mjerenje kapaciteta antioksidansa krvne plazme, tkivnih homogenata i biljnih ekstrakata. Signal pobude (Slika 17 lijevo) je linearno promjenjivi potencijal, a signal odziva (Slika 17 desno) je struja koja se mjeri kao funkcija narinutog električnog potencijala. Ciklički voltamogram prikazuje ovisnost struje o naponu, te se iz njega očitavaju parametri. Najvažnije veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su omjer visine polaznog i povratnog vala, te razlika potencijala vrhova katodnog i anodnog vala.



Slika 17. Signal pobude i odziva.[19]

Eksperiment cikličke voltametrije najčešće počinje pri naponu gdje se ne odvija elektrodna reakcija, tj. $i = 0$. Zatim se odziv pomiče prema pozitivnijim vrijednostima za proučavanje oksidacije, te prema negativnijim vrijednostima za proučavanje redukcije.

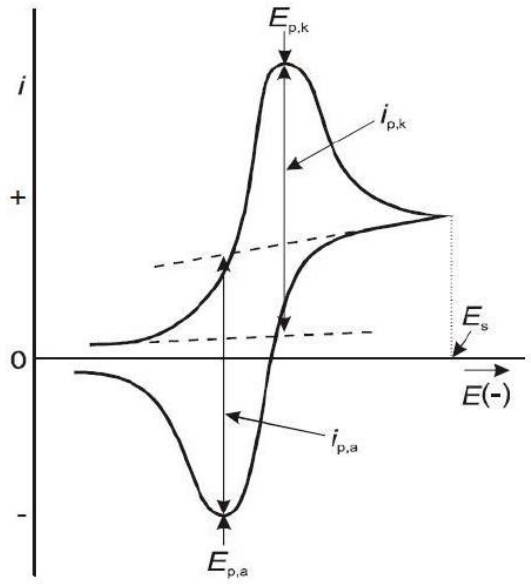
Visina strujnog odziva, odnosno anodnog i katodnog pika ovisi o površini radne elektrode, A, o broju izmijenjenih elektrona, *n*, koncentracijama oksidiranog, O, i reduciranog, R, oblika u otopini, te o koncentracijskom gradijentu uz površinu elektrode. Koncentracijski gradijent ovisi o difuzijskom koeficijentu, D_O *i* D_R, te o brzini promjene signala pobude, *v*. Brzina pobude električnog potencijala može biti vrlo spora i vrlo brza, stoga se ovom metodom mogu ispitivati elektrodne reakcije širokog opsega. Za vrijeme mjerenja na elektrodi se mogu odvijati različiti procesi ovisno o brzini prijenosa naboja. Ti procesi mogu biti reverzibilni procesi, ireverzibilni procesi i kvazireverzibilni procesi.

Kod reverzibilnog procesa na površini elektrode se uspostavlja ravnoteža, prema Nernstovom izrazu. Razlog tome je što je prijenos naboja značajno brži od difuzije. Stoga, struja ovisi o dopremi reaktanata do površine elektrode.

Za ireverzibilan proces struja slijedi Butler-Volmerovu kinetiku jer je prijenos naboja jako spor u odnosu na proces difuzije.

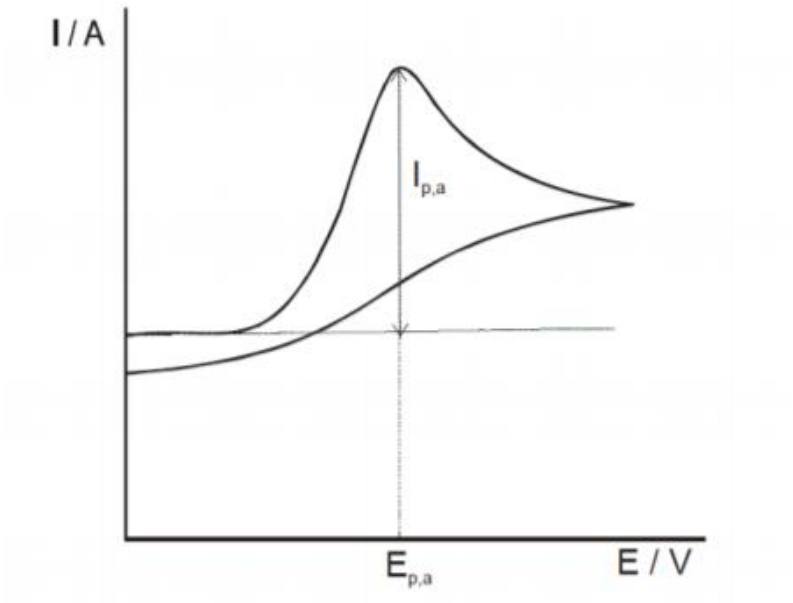
Kvazireverzibilni procesi su procesi koji se kod malih brzina promjena potencijala ponašaju reverzibilno, dok porastom brzine odstupaju od reverzibilnog ponašanja.[19]

Reverzibilni ciklički voltamogram - Ciklički voltamogram reverzibilnog procesa u početku promjene potencijala pokazuje linearan tok. Linarni tok ukazuje da ne dolazi do elektrodne reakcije, nego samo do polarizacije elektrode. Kako raste elektrodni potencijal tako raste i brzina reakcije oksidacije, te kroz ćeliju počinje teći mjerljiva struja koja se na voltamogramu očituje kao uzlazni dio krivulje odziva. Pri dovoljno pozitivnoj vrijednosti elektrodnog potencijala dolazi do oksidacije čestica na površini elektrode i struja odziva tada ima maksimalnu vrijednost. Procesom oksidacije postupno se smanjuje struja odziva jer se sve više isrcpljuju reaktanti iz otopine u sloju uz elektrodu. Nakon što se postigne konačni potencijal dolazi do negativiranja vrijednosti elektrodnog potencijala i javlja se reakcije redukcije oksidiranoga oblika. Pri tom se javlja katodna struja, tj. struja redukcije. Negativiranjem elektrodnog potencijala opada struja oksidacije i raste struja redukcije. Struja ćelije raste sve dok ne dosegne maksimalnu vrijednost. Daljnjim negativiranjem elektrodnog potencijala, struja redukcije kontinuirano opada jer se iscrpljuje otopina uz površinu elektrode oksidiranom vrstom redoks sustava. U konačnici se postiže vrijednost osnovne struje. S obzirom da se u cikličkoj voltametriji koriste brzine promjene potencijala od 0.04 do 1000 V s^{-1}, voltametrijsku reverzibilnost pokazivat će elektrodni procesi kojima je standardna konstanta brzine elektrodne reakcije veća od 0.1 cm s^{-1}.[19]



Slika 18. Ciklički voltamogram za reverzibilnu reakciju.[19]

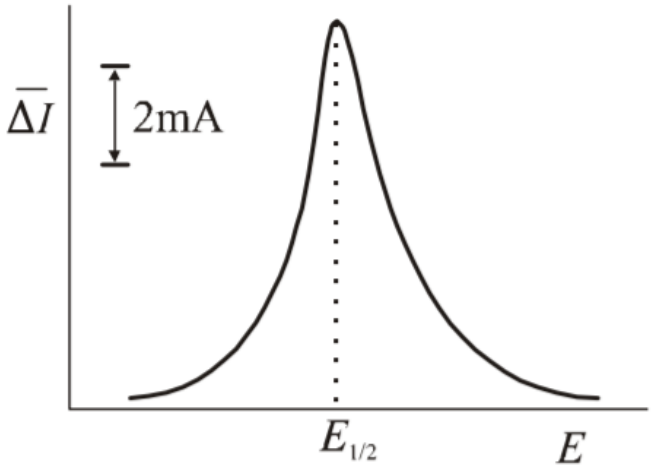
Karakteristično za voltamogram ireverzibilne reakcije je da u povratnom dijelu ne registrira strujni vrh jer se ne odvija elektrodni proces, odnosno samo je jedan pik prikazan na voltamogramu.



Slika 19. Ciklički voltamogram za ireverzibilnu reakciju.[19]

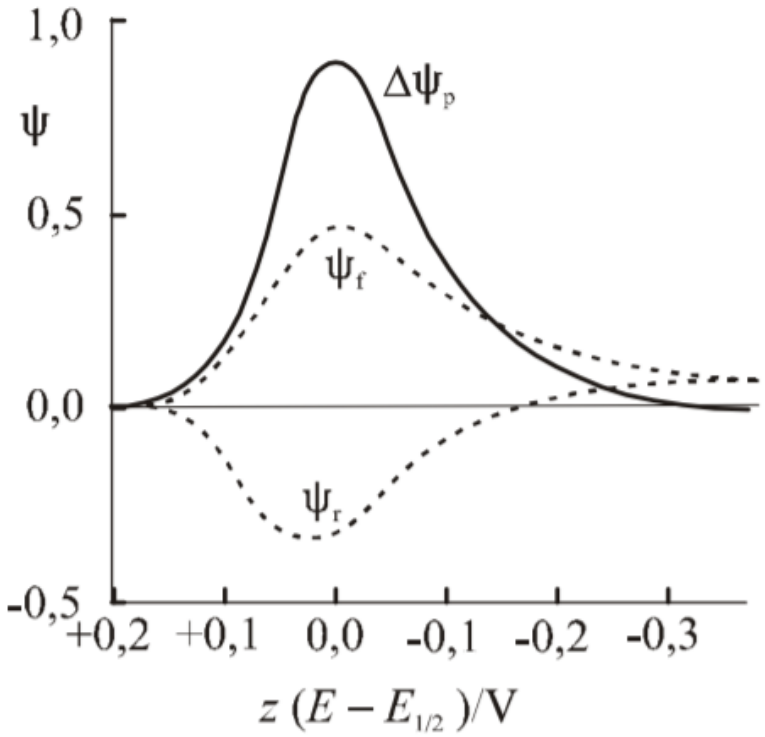
Diferencijalna pulsna voltametrija se temelji na tome da se na radnu elektrodu primjenjuju pulsevi određene veličine koji su dodani na linearno rastući potencijal. Struja se mjeri prije primjene pulsa i na kraju pulsa, te se bilježi razlika između izmjerenih vrijednosti kao funkcija potencijala. Oblik promjene razlike struje prije i poslije primjene naponskog impulsa u ovisnosti o potencijalu elektrode, odnosno oblik signala odziva ima oblik pika koji je jasno izražen. Izraženi pik i osjetljivost diferencijalne pulsne voltametrije su razlog njezine pogodnosti za primjenu u analitičke svrhe. Osjetljivost ove metode iznosi otprilike 10^{-8} mol dm^{-3}.

Osjetljivost je veća nego kod konkurentnih metoda spektrofotometrije i većine drugih analitičkih metoda. Može se korsititi za određivanje niskih koncentracija elektroaktivnih komponenata u raznim uzorcima.[19]



Slika 20. Diferencijalni pulsni voltamogram.[19]

Pravokutnovalna voltametrija (square wave) **-** U ovoj metodi se struja mjeri pri kraju trajanja pozitivne i negativne poluperiode izmjeničnog pravokutnog impulsa. Kao radna elektroda koristi se elektroda stalne površine, kao što je kapajuća živina elektroda. U pravokutnovalnoj voltametriji struja odziva se zapisuje kao razlika struja pri negativnoj i pozitivnoj poluperiodi izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude. S obzirom na to da se vrijednosti struje uzimaju kod pozitivnih i negativnih pulseva potencijala moguće je u istom eksperimentu dobiti pikove koji odgovaraju i oksidaciji i redukciji elektroaktivne tvari na elektrodnoj površini.[19]



Slika 21. Signal pobude i signal odziva pravokutnovalne voltametrije.[19]

Za razliku od diferencijalne pulsne voltametrije koja se izvodi uz brzinu promjene potencijala od 1 – 10 mV s^{-1}, mjerenje pravokutnom voltametrijom se može provoditi uz znatno veće brzine od 1 V s^{-1} što predstavlja njezinu prednost.

1.2.3.2. AMPEROMETRIJSKE METODE

Biamperometrijska metoda se temelji na mjerenju struje koja putuje između dvije jednake radne elektrode polarizirane na malu razliku potencijala i uronjene u otopinu koja sadrži reverzibilni redoks par.[19] Redoks parovi koji se najčešće koriste u biamperometrijskim mjerenjima su Fe^{3+}/Fe^{2+}, I_2/I^-, $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, DPPH•/DPPH, $ABTS^{\bullet+}$/ABTS.

U redoks paru DPPH•/DPPH antioksidansi reagiraju s DPPH• stvarajući reducirani oblik DPPH. Intenzitet rezultantne struje proporcionalan je zaostaloj koncentraciji DPPH• nakon reakcije s antioksidansom. Radne elektrode su ili dvije identične Pt ili elektrode od staklastog ugljika na kojima se događa redukcija DPPH• radikala i oksidacija reduciranog obilka, DPPH.

Reakcije:

Elektroda 1: DPPH• + e- →DPPH

Elektroda 2: DPPH→DPPH• + e-

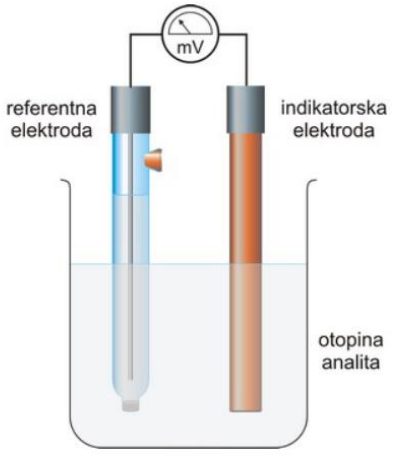
Katodnu struju daje redukcija DPPH• koja se događa na elektrodi 1. Na elektrodi 2 se odvija oksidacija DPPH koja daje anodnu struju.

Parameter koji se prati u biamperometriji je razlika potencijala između radnih elektroda. Dodatkom antioksidansa u otopinu koja sadrži redoks par DPPH•/ DPPH smanjuje se koncentracija oksidiranog oblika, a povećava koncentracija reduciranog oblika. Na taj način nastaje struja koja je proporcionalna koncentraciji antioksidansa.

Redoks par DPPH•/DPPH primjenjuje se za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u voćnim sokovima, čaju, vinu i kavi.

1.2.3.3. POTENCIOMETRIJSKE METODE

Potenciometrijske metode se sastoje od dvije elektrode. Pri toj metodi se mjeri razlika potencijala između elektroda u ovisnosti o dosegu reakcije titracije. Jedna od elektroda je referentna elektroda i njezin je potencijal konstantan.[19] Druga elektroda je radna, odnosno indikatorska elektroda koja se zbog protoka struje polarizira. Potencijal radne elektrode ovisi o elektrodnoj reakciji koja se na njoj odvija, a elektrodna reakcija ovisi o dosegu reakcije titracije.



Slika 22. Shema aparature za potenciometrijsku titraciju.[20]

2. KAROTENOIDI

2.1. ELEKTROKEMIJSKE METODE I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

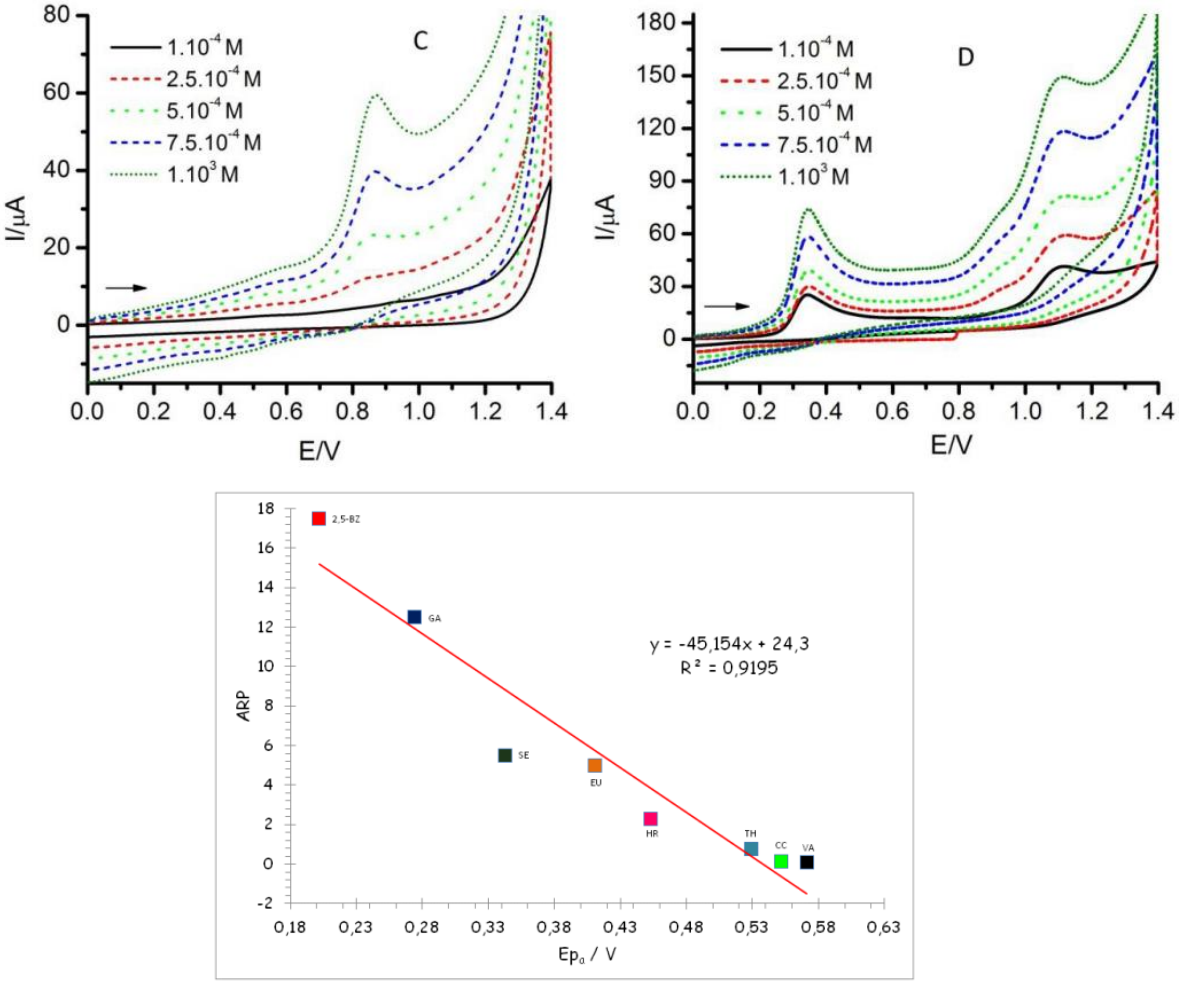
Pregledom literature možemo uvidjeti kako upotreba elektrokemijskih metoda u karakterizaciji i kvantifikaciji antioksidacijekog kapaciteta prirodnih antioksidansa predstavlja istraživačko područje u usponu. U znanstvenim radovima pokazuje se primjena ovih brzih i jednostavnih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti na različitim elektrodama i u različitim realnim uzorcima.

Tablica 1. Osnovni principi elektrokemijskih metoda.[21]

Analiza antioksidansa	***Načelo metoda***	***Određivanje krajnjeg proizvoda***
	Elektrokemijske tehnike	
Cikličkavoltametrija	Potencijal radne elektrode se linearno mijenja od početne vrijednosti do konačne vrijednost i natrag i bilježi se intenzitet odgovarajuće struje	Mjerenje intenziteta katodni / anodni vrh
Amperometrija	Potencijal radne elektrode se postavlja na fiksnu vrijednost s obzirom na referentnu elektrodu	Mjerenje intenziteta struje koju generira oksidacija / redukcija elektroaktivnog analita
Biamperometrija	Reakcija analita (antioksidansa) s oksidiranim oblikom reverzibilne indikacije redoks para	Mjerenje trenutnog protoka između dvije identične radne elektrode s malom razlikom potencijala uronjene u otopinu koji sadrži analizirani uzorak i reverzibilni redoks par

Kao primjer primjene ovih metoda možemo navesti mogućnost određivanja antioksidacijskog kapaciteta u vinima i grožđu na osnovu prisutnih ukupnih fenola:

- diferencijalnom pulsnom voltametrijom pomoću elektrode od grafitne paste u fosfatnom puferu[22]
- kakaa u prahu, tamne čokolade i mliječne čokolade na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu[23]
- ukupnog antioksidacijskog kapaciteitea za antioksidanse male mase kao što je askorbinska kiselina[24], galna kiselina, sezamola, eugenola, timola, karvakrola, vanilina, salicilaldehida, limonena, geraniola na elektrodi od staklastog ugljika[25]



Slika 23. Ciklički voltamogram jednostavnog fenola (timol) i hidroksikumarina (hidroksid i fenol), te krivulja umjeravanja dobivena iz strujnih vrhova.[25]

Zajedničko za sva navedena istraživanja je da se na osnovu anodnog strujnog vrha koji se pripisuje oksidaciji fenola može odrediti antioksidacijski kapacitet. Linearna ovisnost jakosti struje strujnog vrha i koncentracije konstruira krivulju umjeravanja koja daje informacije o primjeni metode za elektroanalitičke svrhe (Slika 23.)

Sklonost oksidaciji-redukciji antioksidansa je prepoznata i kao mogućnost da se prirodno bojilo-antioksidans, *β*-karoten, odredi na sličan način. Problem karotenoida je jedino njihova slaba ili nikakva topljivost u vodenom mediju.

2.2. STRUKTURA I KARAKTERISTIKE KAROTENOIDA

Prirodne boje iz biljnog podrijetla karakteriziraju se po tome što se lako ekstrahiraju iz biljne vrste, potpuno su biorazgradive i lako dostupne. S druge strane nedostatak prirodne boje u proizvodima je nestabilnost i sklonost oksidaciji, odnosno degradaciji, što priječi proizvođače u upotrebi prirodnih boja u prehrambenoj industriji. Mnoge prirodne boje, uključujući karotene, cijanin, tanin, antocijanin i klorofil pored svojstva obojanosti koje daju biljci, odnosno hrani imaju i antioksidacijsko djelovanje, te mogu pomoći u odgađanju ili sprečavanju oksidativnog oštećenja i pružiti zaštitu od raka, kardiovaskularne bolesti, očne bolesti, ateroskleroza i usporiti proces starenja.[26, 27, 28]

Karotenoidi su vrsta prirodnih pigmenata koji se prvenstveno nalaze u voću i povrću. Oni su svi redom tetraterpeni, odnosno posjeduju 40 atoma ugljika i višestruko konjugirane dvostruke veze. [29]

Nekoliko stotina poznatih karotenoida u prirodi dijelimo na dvije velike skupine:

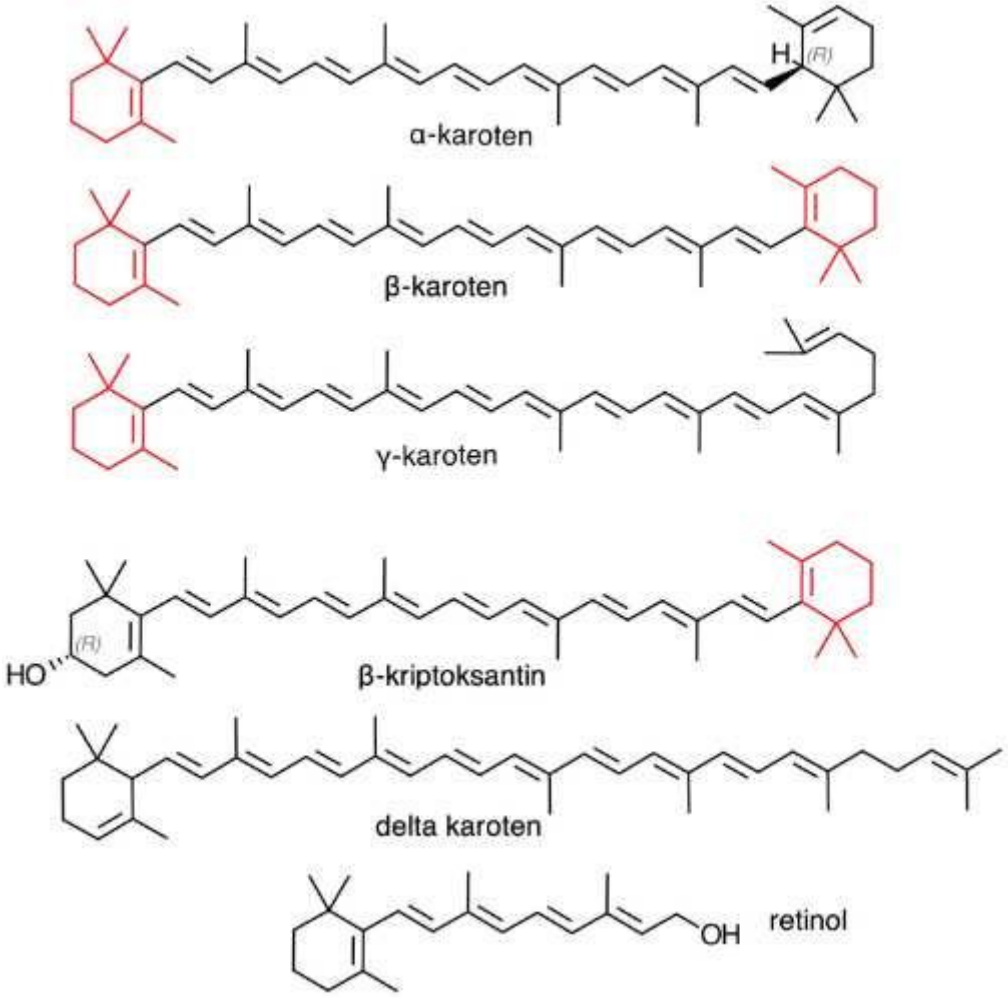
- karotene, koji ne sadrže kisik u svojoj strukturi i koji su po svojoj strukturi ugljikovodici
- ksantofile, koji sadrže kisik u svojoj strukturi i uglavnom su po strukturi alkoholi.

Najzastupljeniji karoten u prirodi je *β*-karoten, karotenoid koji se sastoji od kovalentno povezane izoprenske jedinice, odnosno polienskog sustava (polieni su

nezasićeni aciklički spojevi s više konjugiranih dvostrukih veza između atoma ugljika) s 11 konjugiranih dvostrukih veza i *β*-prstenom na svakom kraju lanca.[30, 31]

Puni naziv *β*-karotena: (1,3,3-trimetil-2-[3,7,12,16-tetrametil-18-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)oktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1-il]cikloheks-1-en, $C_{40}H_{56}$)

Nadalje, *β*-karoten je vrlo važan spoj u fotosintezi, farmaciji i medicini zbog izražene antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, te u sintezi vitamina A u organizmu, ali i u industriji, (npr. za polimere) za proizvodnju pro-ekoloških materijala.[32] *β*-karoten je simetrična molekula koja može generirati različite izomere zbog svojih jedanaest konjugiranih dvostrukih veza. Stoga je vrlo važno pronaći jednostavnu i točnu metodu za određivanje i proučavanje *β*-karotena.



Slika 24. Česte vrste karotena u upotrebi.[33]

2.3. MOGUĆNOSTI ELEKTROKEMIJSKOG ODREĐIVANJA IZOLIRANOG BETA KAROTENA I NJIHOVA PRIMJENA U REALNOM UZORKU

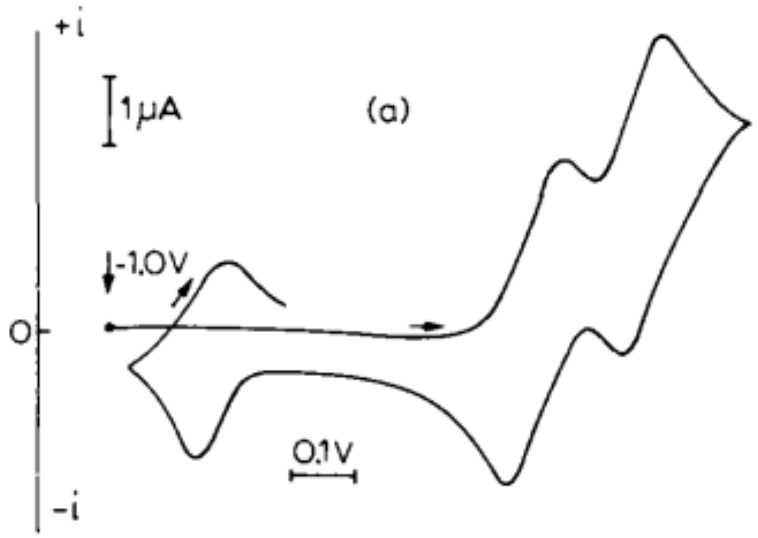
Težnja čovjeka da se okrene prirodi je potakla istraživače u pronalasku brze, jednostavne, precizne i standardizirane metode za određivanje i proučavanje ovog prirodnog bojila-antioksidansa - ***β-karotena***.

Do danas su opisane mnoge metode za određivanje *β*-karotena, uključujući spektrofotometriju, elektronsku paramagnetsku rezonanciju (EPR), tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, fluorescenciju i kemiluminescenciju. Također, veliku pozornost privlače elektroanalitičke metode za određivanje organskih spojeva u različitim medijima. Razlog tomu je visoka osjetljivost i selektivnost ovih metoda. Voltametrijske metode uspješno su korištene za istraživanje redoks ponašanja različitih spojeva, jer su relativno jednostavne i vrlo precizne. [34]

Elektrokemijska svojstva *β*-karotena su predmet istraživanja već dugi niz godina.[26,34-39] Ispitivanjem mehanizma oksidacije i redukcije na različitim elektrodama spoznalo se kako je moguće detektirati čak i male količine u umjetnim i realnim uzorcima. Problem netopljivosti *β*-karotena u vodenim otopinama riješen je upotrebom nevodenih otapala, kao što je npr. diklormetan uz dodatak tetrabutilamonijevog perklorata,[35] trifluorooctene kiseline[36] ili neke vrste alkohola, koje mogu poslužiti i kao elektroliti.

Mairanovsky i suradnici[36] su još davne 1975. elektrokemijski istraživali ponašanje *β*-karotena, te su definirali jednu reverzibilnu jednoelektronsku reakciju redukcije na potencijalu -1.68 V gdje nastaje stabilni anion i dvoelektronsku reakciju na potencijalu +0.61 V. Reakcija oksidacije je također reverzibilna dvoelektronska reakcija sa ireverzibilnim kemijskim korakom.

Primjer cikličkog voltamograma prema Mairanovskom i suradnicima možemo vidjeti na slici 25, na kojoj se mogu zamijetiti tri strujna vrha - reverzibilne reakcije.



Slika 25. Ciklički voltamogram za reakciju oksidacije i redukcije β-karotena koncentracije 0,5 × 10^{-3} mol dm^{-3}, na kapajućoj živinoj elektrodi (KŽE).[36]

Redukcijski mehanizam koji predlaže Mairanovsky je sljedeći:

$$R + e^- \rightarrow R^{\cdot -}$$

$$R^{\cdot -} + H^+ \rightarrow RH^{\cdot}$$

$$RH^{\cdot} + e \rightarrow RH^-$$

$$\boldsymbol{R + H^+ + 2e^- \rightarrow RH^-}$$

ili

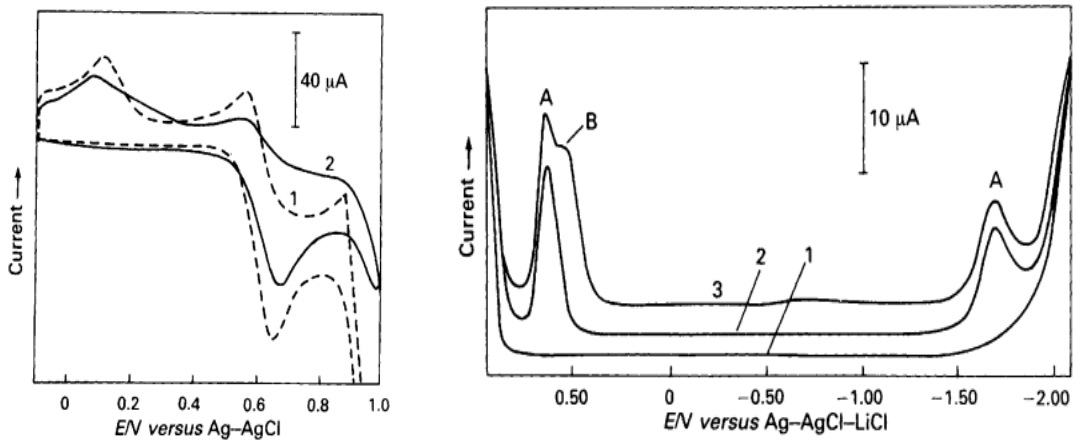
$$R + e^- \rightarrow R^{\cdot -}$$

$$R^{\cdot -} + H^+ \rightarrow RH^{\cdot}$$

$$RH^{\cdot} + R^{\cdot -} \rightarrow RH^- + R$$

$$\boldsymbol{R + H^+ + 2e^- \rightarrow RH^-}$$

Kao primjer moguće primjene DPP Pfund i suradnici[35] 1992. su također na KŽE i na Pt elektrodi odredili koncentraciju *β*-karotena u uzorcima sojinog ulja i salamure. Uzorak je ekstrahiran u destiliranom diklormetanu, te mu je dodan tetrabutilamonijev perklorat.



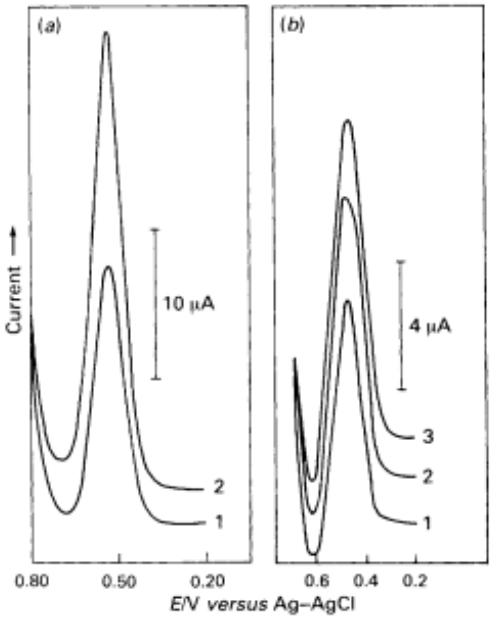
Slika 26. Ciklički voltamogram (lijevo) za reakciju oksidacije i redukcije *β*-karotena na (1) kapajućoj živinoj elektrodi (KŽE) - ispekidana krivulja i (2) platinskoj disk elektrodi (PtdE) – puna krivulja; koncentracija 1×10^{-3} mol dm^{-3}; i Diferencijalni pulsni polarogram (desno) bez (1) uz dodatak *β*-karotena (2) te uz dodatak *β*-karotena i ferocena. (nevodeni medij – diklormetan).[35]

Na Slici 26 možemo uočiti jasno definirane pikove koji opisuju oksidaciju i redukciju *β*-karotena:

- Ciklički voltamogram u uskom području potencijala prema Pfundu za koncentraciju *β*-karotena 1×10^{-3} mol dm^{-3} u diklormetanu – slično ponašanje uočeno je na obje elektrode, proces redukcije je jednoelektronska reakcija, a proces oksidacije je reverzibilna dvoelektronska reakcija.
- Diferencijalni pulsni polarogram - strujni vrh na potencijalu E_p = -1.70 V, prikazuje dobro definiran redukcijski odziv elektrode i na E_p = +0.59 V prema Ag/AgC1 vrlo izražen i jasan strujni vrh oksidacijskog procesa.

Dobiveni rezultati, kako su pokazali, slažu se sa literaturnim podacima za *β*-karoten, gdje se redukcija odvija redom na -1,63 V, -1,78 V, -2,46 V te -2,70 V, a oksidacija na 0,74 V i 1,01 V.

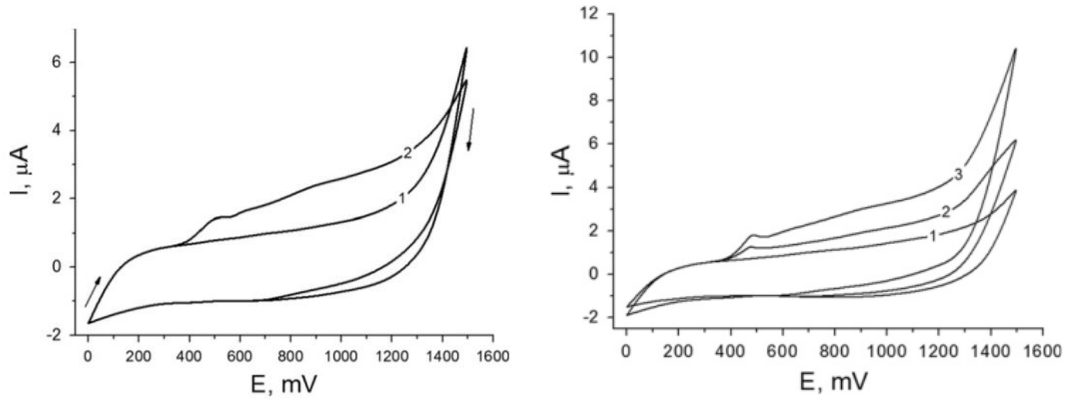
Na Slici 27 prikazan je diferencijalni pulsni polarogram (DPP) za određivanje *β*-karotena u sojinom ulju i salamuri, te je *β*-karoten određen s točnošću od 1.9 ± 0.1% . Usporedbom sa spektrofotometrijskim podacima pokazano je kako je ovo jedna vrlo jednostavna, brza i točna metoda, koja ne zahtjeva predobradu uzorka.



Sample origin	Mass used/g	Results (β-carotene concentration) Voltammetry ($n = 4$)	Spectrophotometry ($n = 2$)
Product 2	0.625	3.06 ± 0.07 (g kg^{-1})	3.06 ± 0.07 (g kg^{-1})
Product 3	50.0	37 ± 3 (mg kg^{-1})	37 ± 4 (mg kg^{-1})
Product 1	510	1.47 ± 0.02 (mg kg^{-1})	1.61 ± 0.02 (mg kg^{-1})

Slika 27. DPP za određivanje *β*-karotena u sojinom ulju i salamuri.[35]

Mogućnosti određivanja *β*-karotena na elektrodi od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon elctrode*, GCE) u etanolu i diklormetanu istraživana je 2012 godine od skupine znanstvenika[38] te je ciklički voltamogram *β*-karotena prikazan na Slici 28.



Slika 28. Ciklički voltamogram *β*-karotena koncentracije 50 × 10^{-3} mol dm^{-3} na GCE u 0.1 M $LiClO_4$ u etanolu (krivulja 2) i diklormetanu (krivulja 1) (desno) uz dodatak mM Triton X100.[38]

Prema Slici 28 na GCE β-karoten se ireverzibilno oksidira pri 500 mV i 920 mV, Povećanje oksidacijske struje za 7–11% je moguće dodatkom neionske površinski aktivne tvari, kao na primjer 10 mM Triton X100, neionski tenzid. Strujni vrh je pokazao linearnu ovisnost o koncentraciji β-karotena za koncentracijsko područje 10–380 mM s limitom detekcije od 2.5 mM i limitom kvantifikacije od 8.3 mM. Na ovaj način je provedeno određivanje β-karotena u nekolko vrsta povrća s velikom točnošću u usporedbi sa spektrofotometrijskom metodom (Tablica 2).

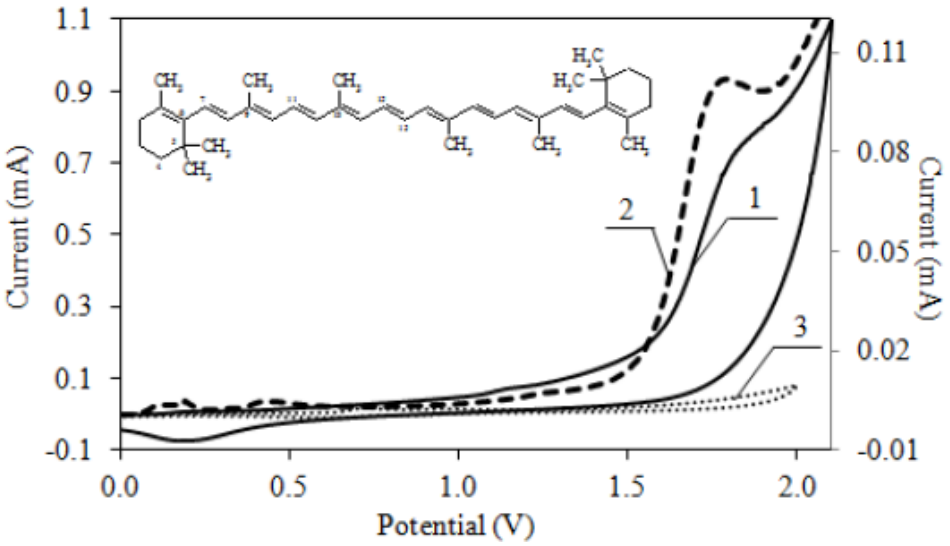
Tablica 2. Sadržaj β-karotena u sirovom povrću.[38]

Uzorak	Znanstveno ime	Ciklička voltametrija				Spektrofotometrija	
		Sadržaj β-karotena[a] (mg 100 g^{-1})	RSD (%)	Sadržaj β-karotena[b] (mg 100 g^{-1})	RSD (%)	Sadržaj β-karotena[a] (mg 100 g^{-1})	RSD (%)
Mrkva	Daucus carota	9.9 ± 0.3	2.5	9.7 ± 0.2	1.9	9.8 ± 0.4	3.2
Bundeva	Cucurbita pepo	2.94 ± 0.05	1.8	2.95 ± 0.06	2.2	2.90 ± 0.07	2.5
Bobičasto voće	Sorbus aucuparia	7.82 ± 0.08	1.0	7.86 ± 0.08	1.0	7.9 ± 0.1	1.3
Šipak	Rosa canina	2.90 ±0.08	2.8	2.9 ± 0.1	3.4	2.8 ± 0.1	3.6
Peršin	Petroselinum crispum	5.5 ± 0.2	2.2	5.6 ± 0.2	3.2	5.4 ± 0.2	3.1

[a] metoda kalibracije

[b] standardna metoda dodavanja

Nadalje 2015. godine Masek i suradnici[34] pokazuju novi trend upotrebe β-karotena u industrijske svrhe, s ciljem prirodnog bojanja polimera, odnosno plastike za široku upotrebu. Cilj njihovog istraživanja koji je opisan u daljnjem tekstu je bio utvrditi elektrokemijsko ponašanje β-karotena na Pt elektrodi tijekom elektrooksidacije u nevodenom mediju. Strukturna ispitivanja ovog spoja provedena su pomoću FTIR spektroskopije i termogravimetrijske analize. Također je ispitivan dodatak β-karotena polimernim materijalima.

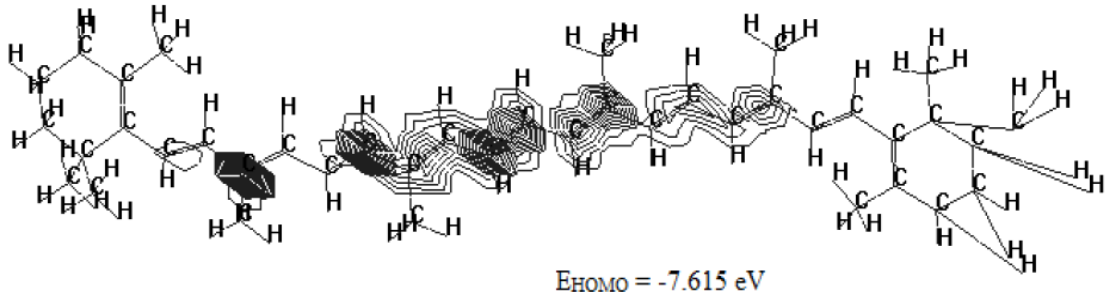


Slika 29. Ciklički voltamogram β-karotena koncentracije $0{,}5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} na Pt elektrodi u acetonitrilu (CH_3CN) i tetrabutilamonijevu perkloratu ($(C_4H_9)_4NClO_4$).[34]

Elektrokemijska oksidacija β-karotena ispitivana je na platinastoj elektrodi metodama diferencijalne pulsne voltametrije i cikličke voltametrije. Dobiveni voltammogrami predstavljeni su na Slici 29. Za mjerenje je korišten sustav od tri elektrode gdje je platina korištena kao anoda i pomoćna elektroda. Referentna elektroda je sustav ferrocenium/ferocen (Fe^+/Fe), te je potencijal elektrode izmjeren u odnosu na referentnu elektrodu.[34]

Elektrokemijsko ponašanje β-karotena na elektrodi od platine u nevodenim otopinama je ireverzibilno kod najmanje jednog elektrodnog skoka prije nego potencijal dosegne vrijednost izlučivanja kisika. Potencijal za elektrooksidaciju β-karotena određen je iz cikličkih voltamograma i iznosi 1,79 V. Taj potencijal odgovara vršnom potencijalu određenom iz diferencijalnog pulsnog voltamograma. Elektrooksidacija β-karotena je kontrolirana difuzijom.[37, 39]

U svrhu određivanja mjesta najvjerovatnije elektrooksidacije koristi se HyperChem softver za molekulsko modeliranje, te je izračunata energija najviše popunjene orbitale (E_{HOMO} - ionizacijski potencijal), Slika 30.



Slika 30. Elektronska gustoća i vjerojatna mjesta u molekuli *β*-karotena osjetljivoj na elektrooksidaciju.[34]

Postupak elektrooksidacije *β*-karotena uključuje izmjenu dva elektrona u prvom koraku nakon čega slijedi kemijska reakcija. Postupak se odvija prema sljedećem mehanizmu, gdje za reakciju dvoelektronske elektrooksidacije *β*-karotena, možemo pisati

$$\mathrm{Car} \rightarrow \mathrm{Car}^{\cdot +} + 1\mathrm{e}^{-}$$

$$\mathrm{Car}^{\cdot +} \rightarrow \mathrm{Car}^{2+} + 1\mathrm{e}^{-}$$

gdje je Car *β*-karoten, $\mathrm{Car}^{\bullet +}$ je radikalni kation i Car^{2+} je dikation.

Ciklična i diferencijalna pulsna voltametrija, FTIR spektroskopija i termogravimetrijska analiza brže su i jeftinije metode za analizu od kromatografskih metoda. Razlog tomu je što kromatografske metode često zahtijevaju velike količine toksičnih otapala i dugo vrijeme za analize. Voltametrijske metode su ekološke i mogu se uspješno koristiti za proučavanje antioksidativnog djelovanja spojeva.

Što se tiče polimernih materijala, ugradnjom *β*-karotena u određene polimere (Topasov kompozit) poboljšana je stabilnost materijala sastavljenih od etilen-norbornenskog kopolimera. Također, *β*-karoten može služiti kao pokazatelj vremena starenja polimera u funkciji klimatskih uvjeta i UV zračenja, jer se dodatkom *β*-karotena znatno promijenila boja Topasovih kompozita. Dakle, dodavanje *β*-karotena polimernim materijalima može olakšati procjenu njihovog radnog vijeka na temelju promjena boje.[34]

3. ZAKLJUČAK

Može se zaključiti da su antioksidansi neizostavan dio svakodnevnog unosa u ljudski organizam kako bi se istom omogućila što lakša borba protiv raznih toksina.

Da bi se što preciznije znali učinci antioksidansa, tj. njihov kapacitet potrebno ih je kemijski odrediti, što je moguće pomoću metoda navedenih u radu.

S obzirom na sve navedene metode može se zaključiti da najveću prednost imaju elektrokemijske metode. Prednost elektrokemijskih metoda u odnosu na kromatografske i spektrofotometrijske metode je u brzini izvođenja, cijeni i jednostavnosti. Također, elektrokemijske metode imaju niske granice detekcije, vrlo dobru preciznost i točnost.

Na primjerima β-karotena se može uočiti koliko je precizno i jednostavno određivanje antioksidansa u prehrambenim proizvodima pomoću elektrokemijskih metoda. Također, vidimo da antioksidansi osim u prehrambenoj industriji mogu imati primjenu i u organskoj industriji za poboljšanje i provjeru kvalitete određenih polimernih materijala.

4. LITERATURA

[1] J. Lykkesfeldt, *Anal. Biochem*. **2000**, 282, 89-93.

[2] M. S. Brewer, *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2011**, 10, 221-247.

[3] A. Hacisevki, *J. Fac. Pharm. Ankara*, **2009**, 38, 233-255.

[4] S. A.B.E. van Acker, L. M.H. Koymans, A. Bast, *Free Radical Bio. Med*. **1993**, 15, 311-328.

[5] URL: https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/antioksidansi-vitamin-e-kompleks/ (14.9.2020.)

[6] URL: https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti (15.9.2020.)

[7] A. Kaiser, R. Carle, D. R. Kammerer, *Food Chem.* **2013**, 138, 1648-1656

[8] M. S. Pasaporte, F. J. Rabayam, M. Toleco, D. M. Flores, *Food Chem*. **2014**, 158, 35-40.

[9] E. Weichselbaum, J. L. Buttriss, *Nutr. Bull*. **2010,** 35, 157-164.

[10] J .Viskupičova, M. Ondrejovič, E. Šturdik, *J Food Nutr Res*. **2008**, 47, 151- 162.

[11] L. Bravo, *Nutr. Rev.* **1998**, 56, 317–333.

[12] URL: https://atelim.com/nutricionizam-kristina-greblo-5276n-antioksidativno-i-antimikr.html?part=3 (14.9.2020.)

[13] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, **1999.**

[14] D. Chandrasekar, K. Madhusudhana, S. Ramakrishna, P. V. Diwan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, 460-464.

[15] B. D. Craft, A. L. Kerrihard, R. Amarowicz, R. B. Pegg, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012,** 11, 149-173

[16] URL: http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe (14.9.2020.)

[17] URL: https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/phytochemical-profile-of-honey (15.9.2020.)

[18] M. Číž, H. Čížová, P. Denev, M. Kratchanova, A. Slavov, A. Lojek, *Food Control*. **2010**, 21, 518-523.

[19] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Mediaprint Tiskara Hrastić, Zagreb, **2010.**

[20] URL: https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=potenciometrija (15.9.2020.)

[21] *N*. B. Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zenginand, M. F. Mahomoodally, Antioxidants. **2020**, 9, 709.

[22] F. M. A. Lino, L. Z. de S´a, I. M. S. Torres, M. L. Rocha, T. C. P. Dinis, P. C. Ghedini, V. S. Somerset, E. S. Gil, *Electrochim. Acta*. **2014**, 128, 25-31.

[23] J. M. Brcanović, A. N. Pavlović S. S. Mitić, G. S. Stojanović, D. D. Manojlović, B. M. Kaličanin, J. N. Veljković, *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, 51, 460–470.

[24] S. Chevion, M. A.Roberts, M. Chevion, *Free Radic. Biol. Med*. **2000**, 28, 860–870.

[25] J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez-Mellado, *Molecules.* **2012**, 17, 5126-5138.

[26] Y. Yue, Q. Liang, Y. Liao, Y. Guo, S. Shao, *J. Electroanal. Chem*. **2012**, 682, 90-94.

[27] C. O. Perera, G. M. Yen, *Int. J. Food Prop*. **2007**, 10, 201-230.

[28] E. S. M. Abdel-Aal, M. H. Akhtar, *Curr. Pharm. Anal*. **2006**, 2, 195-204.

[29] G. Knockaert, L. Lemmens, S. Van Buggenhout, M. Hendrickx, A. Van Loey, *Food Chem*. **2012**, 133, 60-67.

[30] L. Chen, G. Bai, R. Yang, J. Zang, T. Zhou, G. Zhao, *Food Chem.* **2014**, 149, 307-312.

[31] G. Knockaert, S. K. Pulissery, L. Lemmens, S. V. Buggenhout, M. Hendrickx and A. V. Loey. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 10312-10319,

[32] D. Tátraaljai, L. Major, E. Földes, B. Pukánszky, *Polym. Degrad. Stab*. **2014**, 10, 33-40.

[33] URL: https://www.plantagea.hr/aromaterapija/ugljikovodici-i-pigmenti/ (17.9.2020.)

[34] A. Masek , E. Chrzescijanska, K. Diakowska, M. Zaborski, *Int. J. Electrochem. Sci*. **2015**, 10, 3372 – 3386.

[35] B. V. Pfund, A. M. Bond, T. C. Hughes, *Analyst.* **1992**, 117, 857-862.

[36] V.G. Mairanovsky, A.A. Engovatov, N.T. Ioffe, G.I. Samokhvalov, *J. Electroanal. Chem.* **1975**, 66, 123-137.

[37] L. D. Kispert, T. Konovalova, Y. Gao, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 430, 49-60.

[38] G. Ziyatdinova, E. Ziganshina, H. Budnikov, *Talanta*. **2012**, 99, 1024-1029.

[39] D. Liu, Y. Gao and L. D. Kispert, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 488, 140-150.