

Elektrokemijska karakterizacija antioksidansa na modificiranim elektrodama - pregled dostignuća

Krpina, 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:167:661356>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA
NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA
- PREGLED POSTIGNUĆA -

ZAVRŠNI RAD

ANA KRPINA
Matični broj: 1262

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
ZAŠTITA OKOLIŠA

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA
NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA

- PREGLED POSTIGNUĆA -

ZAVRŠNI RAD

ANA KRPINA
Matični broj: 1262

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY:
ENVIRONMENTAL PROTECTION

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
ANTIOXIDANTS ON MODIFIED ELECTRODES

- REVIEW OF THE ACHIEVEMENTS -

BACHELOR THESIS

ANA KRPINA

Parent number: 1262

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko – tehnološki fakultet

Preddiplomski studij Kemijske tehnologije, smjer: Zaštita okoliša

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

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

Mentor: doc. dr. sc. Nives Vladislavić

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDANSA NA MODIFICIRANIM ELEKTRODAMA - PREGLED POSTIGNUĆA - Ana Krpina, 1262

Sažetak:

Brojna istraživanja pokazuju kako je oksidativni stres stanje u kojem koncentracija antioksidansa u organizmu nije dovoljna za održavanje ravnoteže sa slobodnim radikalima. 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, osobito začinskoga bilja...) sprječavamo reakcije koje mogu dovesti do mnogih degenerativnih promjena u stanicama čovjeka, te narušiti ljudsko zdravlje.

Interes za primjenu različitih elektrokemijskih metoda u posljednjem desetljeću naišao je na veliki interes u znanstvenim krugovima.

Cilj ovog završnog rada je pokazati potencijal elektrokemijskih metoda kao jednostavnih, brzih, pouzdanih, osjetljivih i preciznih metoda za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta namirnica, koja bi bila pogodna za rutinske analize hrane kako u istraživačkim laboratorijima tako i u industriji, te sumirati dosadašnja postignuća u njihovoj primjeni.

Ključne riječi: antioksidansi, elektrokemijske metode, modificirane elektrode

Rad sadrži: 29 stranica, 19 sliku, 5 tablica, 54 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

Datum obrane: 01. listopada 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: Environmental protection

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

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

Mentor: assistant prof Nives Vladislavić

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANTS ON MODIFIED ELECTRODES

- REVIEW OF THE ACHIEVEMENTS -

Ana Krpina, 1262

Abstract

Numerous studies show that oxidative stress is a state in which the concentration of antioxidants in the body is not sufficient to maintain the balance with free radicals. The consumption of food rich in substances with antioxidant effects has a very positive effect on human health. The role of antioxidants is to prevent harmful oxidative processes of free radicals. By ingesting different types of plants (fruits, vegetables, especially herbs...) we prevent reactions that lead to many degenerative changes in human cells and can affect human health.

The interest in the use of various electrochemical methods has been met with great interest in scientific circles over the last decade.

The aim of this thesis is to demonstrate the potential of electrochemical methods as simple, fast, reliable, sensitive and precise methods for determining the total antioxidant capacity of food, which would be suitable for routine analysis of food in research laboratories and industry, and to summarize the successes achieved so far in their application.

Keywords: antioxidants, electrochemical methods, modified electrodes

Thesis contains: 29 pages, 19 pictures, 5 tables, 54 literary references

Original in : Croatian

Defence committee: 1. Assistant Professor Ivana Škugor Rončević, PhD – chair person

2. Assistant Professor Maša Buljac – član PhD - member

3. Assistant Professor Nives Vladislavić PhD – supervisor

Defence date: 1st October, 2020.

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

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

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Nives Vladislavić na stručnim savjetima i pomoći pri izradi ovog završnog rada.

Posebne zahvale želim uputiti svojoj obitelji i prijateljima za pruženu podršku tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Upoznati se sa značajem antioksidansa i antioksidativnog kapaciteta.
2. Pregledom recentne literature utvrditi mogućnost određivanja antioksidativnih svojstava elektrokemijskim metodama.
3. Predstaviti prednosti elektrokemijskih metoda u odnosu na sofisticirane metode prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta.

SAŽETAK

Brojna istraživanja pokazuju kako je oksidativni stres stanje u kojem koncentracija antioksidansa u organizmu nije dovoljna za održavanje ravnoteže sa slobodnim radikalima. 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, osobito začinskoga bilja...) sprječavamo reakcije koje mogu dovesti do mnogih degenerativnih promjena u stanicama čovjeka, te narušiti ljudsko zdravlje.

Primjena različitih elektrokemijskih metoda u posljednjem desetljeću naišla je na veliki interes u znanstvenim krugovima.

Cilj ovog završnog rada je pokazati potencijal elektrokemijskih metoda kao jednostavnih, brzih, pouzdanih, osjetljivih i preciznih metoda za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta namirnica te razviti metodu koja bi bila pogodna za rutinske analize hrane kako u istraživačkim laboratorijima tako i u industriji i sumirati dosadašnja postignuća u njihovoj primjeni.

Ključne riječi: antioksidansi, elektrokemijske metode, modificirane elektrode

SUMMARY

Numerous studies show that oxidative stress is a state in which the concentration of antioxidants in the body is not sufficient to maintain the balance with free radicals. The consumption of food rich in substances with antioxidant effects has a very positive effect on human health. The role of antioxidants is to prevent harmful oxidative processes of free radicals. By ingesting different types of plants (fruits, vegetables, especially herbs...) we prevent reactions that lead to many degenerative changes in human cells and can affect human health.

The use of various electrochemical methods has been met with a great interest in scientific circles over the last decade.

The aim of this thesis is to demonstrate the potential of electrochemical methods as simple, fast, reliable, sensitive and precise methods for determining the total antioxidant capacity of food, to develop the method which would be suitable for routine analysis of food in research laboratories and industry, and to summarize the successes achieved so far in their application.

Keywords: antioxidants, electrochemical methods, modified electrodes

SADRŽAJ

1. OPĆI DIO	2
1.1. Slobodni kisikovi radikali i oksidativni stres	2
1.2. Antioksidansi.....	3
1.3. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta.....	5
1.3.1. Spektrofotometrijske metode.....	6
1.3.2. Elektrokemijske metode	7
2. PREGLED POSTIGNUĆA PRIMJENE ELEKTROKEMIJSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA.....	13
2.1. Primjena cikličke voltametrije	13
2.2. Primjena diferencijalne pulsne voltametrije.....	17
2.3. Primjena pravokutnovalne voltametrije	20
2.4. Primjena kronoamperometrije.....	22
3. ZAKLJUČAK.....	25
4. LITERATURA	26

UVOD

Biološka oksidacija (stanično disanje) obuhvaća niz metaboličkih procesa kojima se iz hranjivih tvari dobiva kemijska energija potrebna za sve stanične procese. Osim energije, biološkom oksidacijom nastaju i štetni produkti, slobodni radikali. Njihovo štetno djelovanje posljedica je težnje za elektronskom stabilnosti odnosno sparivanjem nesparenog elektrona. Stabilnost postižu reakcijom s najbližom stabilnom molekulom uzimajući njezin elektron, čime započinju lančane reakcije koje dovode do štetnih biokemijskih, strukturnih i funkcionalnih promjena biomolekula [1,2]. Obzirom da su gotovo svi živi organizmi ipak prilagođeni aerobnim uvjetima života, jasno je da mora postojati evolucijsko rješenje tj. zaštita od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Osnovna zaštita organizma od kisikovih slobodnih radikala su biološki antioksidansi koje je Hallwell (1990.) opisao kao tvari koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekulu) koji se oksidira, značajno usporavaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata [3]. Endogeni antioksidansi nastaju u samom organizmu i ključni su za uspostavljanje ravnoteže sa slobodnim radikalima. Međutim, pri izlaganju raznim oblicima stresa, lijekovima, infekcijama, endogena antioksidativna obrana nije dovoljna za suprotstavljanje radikalima pa zaštita organizma ovisi o učinkovitosti egzogenih antioksidansa odnosno antioksidansa koji se unose hranom [2].

Stanje neravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti organizma da neutralizira njihove štetne učinke izaziva oštećenja strukture brojnih biomolekula što uzrokuje promjene u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa [3, 4]. Dakle, uloga antioksidansa u očuvanju zdravlja organizma je od iznimne važnosti što doista motivira na proučavanje i dublje razumijevanje antioksidansa i mehanizama kojima u organizmu djeluju.

Stoga, cilj ovog završnog rada je pokazati potencijal elektrokemijskih metoda kao jednostavnih, brzih, pouzdanih, osjetljivih i preciznih metoda za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta namirnica te razviti metode koje bi bila pogodne za rutinske analize hrane kako u istraživačkim laboratorijima tako i u industriji, i sumirati dosadašnja postignuća u njihovoj primjeni.

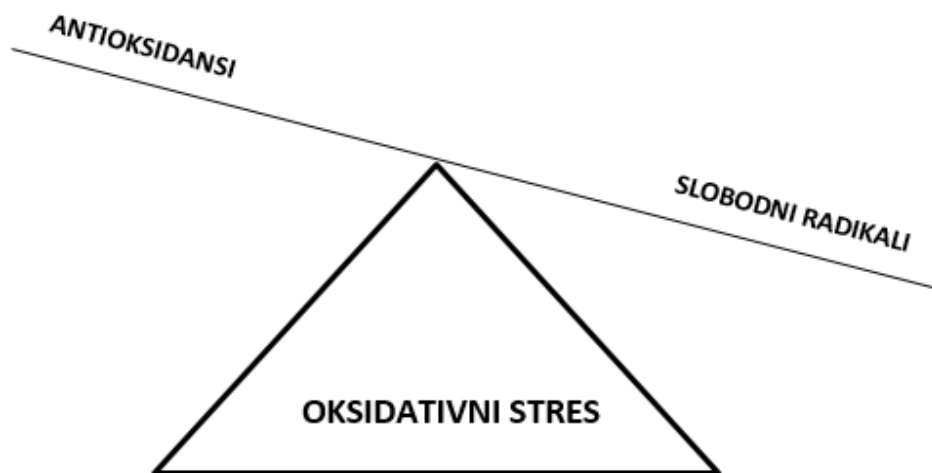
1. OPĆI DIO

1.1. Slobodni kisikovi radikali i oksidativni stres

Stvaranje slobodnih radikala u organizmu posljedica je aktivnosti aerobnog metabolizma. Reaktivne kisikove vrste (ROS) (eng. *Reactive Oxygen Species*) u organizmu se nalaze u relativno malim količinama. ROS su produkti normalnog staničnog metabolizma, njihov glavni izvor je molekularni kisik. Slobodni radikali su visoko reaktivne molekule, atomi ili ioni koji imaju nesparen elektron u valentnoj ljusci i najčešće su to superoksid (O_2^-) te hidroksil radikal ($OH\cdot$). Njihovo štetno djelovanje posljedica je težnje za elektronskom stabilnosti odnosno sparivanjem nesparenog elektrona.

Kako je navedeno u uvodu, aerobni organizmi štite se od štetnog djelovanja slobodnih radikala antioksidansima koji neutraliziraju slobodne radikale, prevode ih u stabilne vrste ili prekidaju lančane reakcije.

Oksidativni stres stanje je u organizmu u kojem koncentracija antioksidansa u organizmu nije dovoljna za održavanje ravnoteže sa slobodnim radikalima. Tada slobodni radikali ubrzano narušavaju stabilnost drugih molekula u staničnoj okolini čime dolazi do oštećenja stanične strukture što dalje pokreće čitav niz različitih neželjenih procesa te dovodi do poremećaja i bolesti organizma.

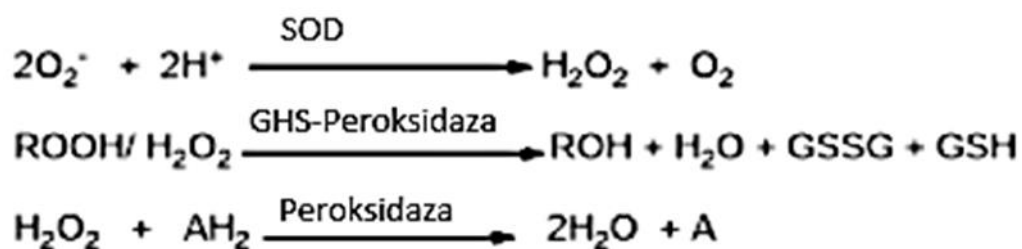


Slika 1. Shematski prikaz oksidativnog stresa (Izradio autor završnog rada)

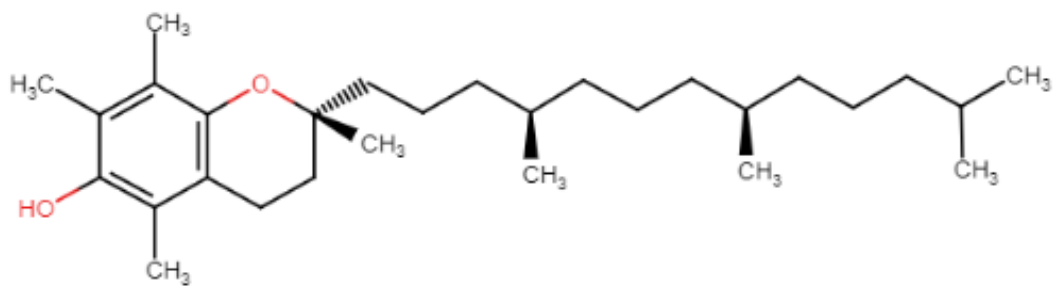
1.2. Antioksidansi

Prirodni antioksidansi nastaju biološkim procesima u organizmima. Izvori prirodnih antioksidansa u organizmu su, dakle, same stanice organizma ili hrana koja se unosi u organizam. Obzirom na aktivnost mogu se podijeliti na dvije glavne skupine, enzimске i neenzimске. Enzimski antioksidansi prevode štetne produkte oksidacije u stabilnije spojeve kao što su kisik i voda. Optimalnu enzimsku aktivnost postižu uz prisustvo metala kao što su selen, željezo, cink, bakar i mangan. Najznačajniji enzimski antioksidansi su superoksiddismutaza (SOD), katalaza, glutation-peroksidaza (GHS-peroksidaza), askorbat-oksidaza (AOx), glutation-S-transferaza (GSTs) i glutation-reduktaza (GR) [5,6,7].

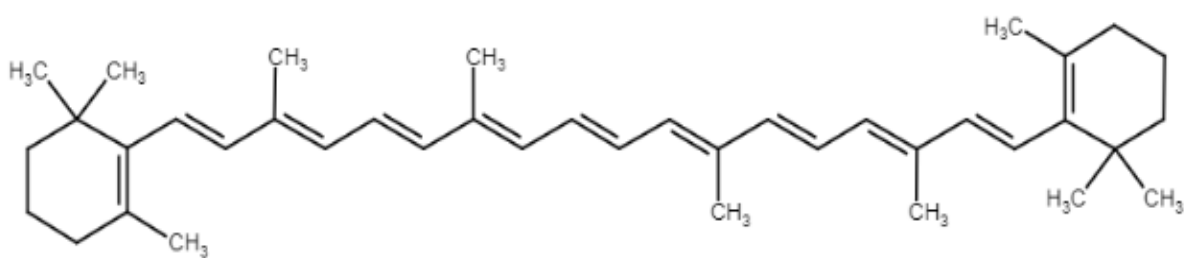
Neenzimski antioksidansi djeluju tako da prekidaju lančane reakcije izazvane slobodnim radikalima. Najveće količine neenzimskih antioksidansa organizam dobiva iz prehrambenih izvora, većinom voća i povrća, jer same stanice proizvode vrlo male količine ovih spojeva. Sastavom su većinom polifenoli (fenolne kiseline, flavonoidi), karotenoidi (likopen, β-karoten, lutein) i vitamini (vitamin A i E). Namirnice bogate navedenim antioksidansima su maslinovo ulje (polifenoli), narančasto i zeleno lisnato povrće (β-karoten), suncokretove sjemenke (vitamin E) [7,8].



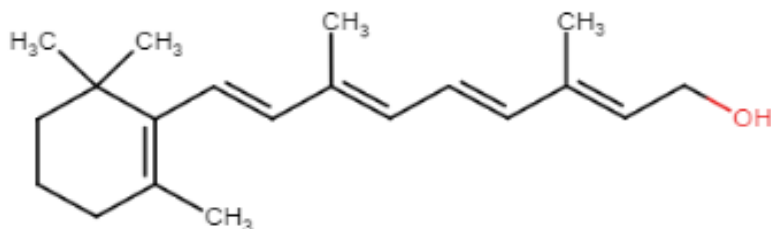
Slika 2. Prikaz reakcijskog mehanizma enzimskih antioksidansa [8].



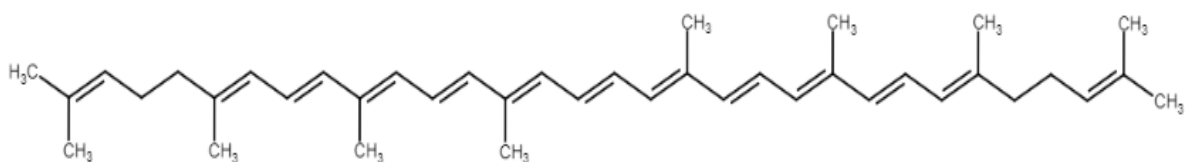
Slika 3. Kemijska struktura vitamina E [3].



Slika 4. Kemijska struktura β -karotena [3].

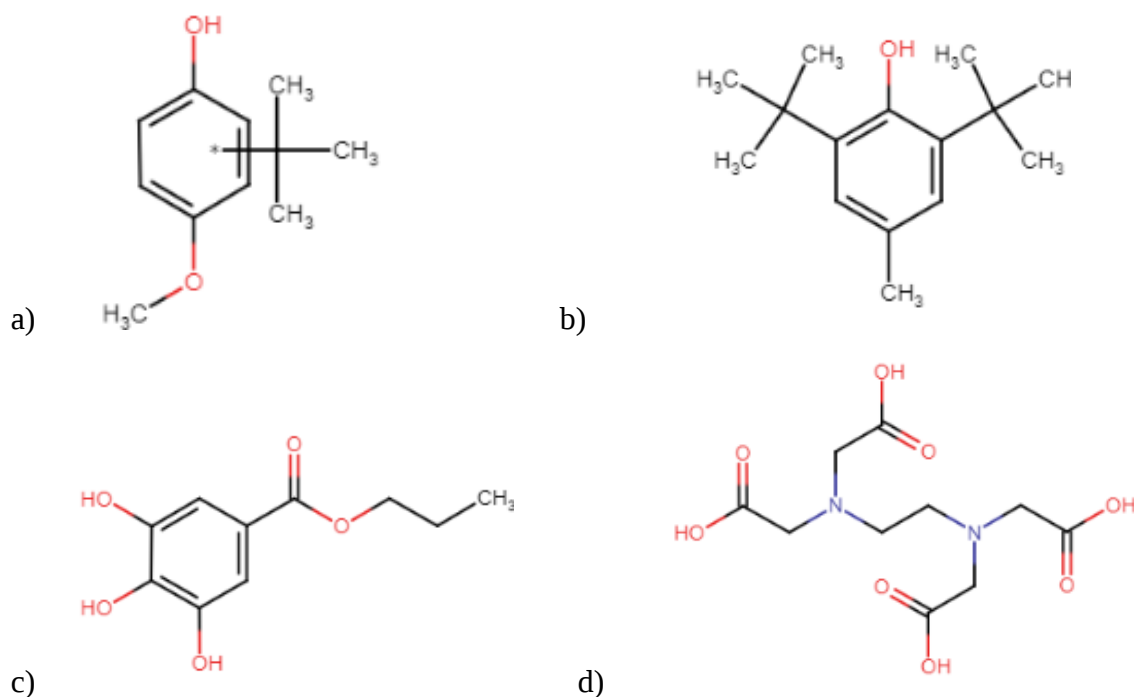


Slika 5. Kemijska struktura vitamina A [3].



Slika 6. Kemijska struktura likopena [3].

Sintetski antioksidansi su većinom fenolni spojevi dobiveni sintetičkim putem u laboratorijima. Uloga im je hvatanje slobodnih radikala i zaustavljanje njima izazvane lančane reakcije. Ti spojevi uključuju butilirani hidroksilanizol (BHA), butilirani hidroksiltoluen (BHT), propilgalat (PG), metalno kelatno sredstvo kao npr: etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), tercijarni butilhidrokinon (TBHQ) i nordihidroguaiaretsku kiselinu (NDGA).



Slika 7. Kemijska struktura: a) BHA b) BHT c) PG d) EDTA [3].

1.3. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta

Do danas su razvijene brojne metode određivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta u hrani, pićima i biološkim uzorcima kao što su spektrofotometrijske metode, NMR spektroskopija, plinska kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

Najzastupljenije metode za određivanja antioksidativnog kapaciteta biološki aktivnih tvari su u prvom redu spektrofotometrijske metode:

- ✚ TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*)
- ✚ FRAP (*ferric reducing ability*)
- ✚ ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*)
- ✚ Brand-Williams (DPPH)

Uzimajući u obzir nedostatke konvencionalnih spektrofotometrijskih metoda kao što su vremenski duge pripreme uzorka i analize, skupa oprema i skupi reagens koji su ujedno i štetni za okoliš, kao alternativna strategija nude se elektrokemijske tehnike.

Primjena elektrokemijskih metoda u određivanju antioksidativnog kapaciteta vrlo je zastupljena u današnjim istraživanjima zbog mnogih prednosti kao što su ekonomski aspekti. Također, elektrokemijske metode ne zahtijevaju upotrebu dodatnih reagensa za određivanje antioksidativne aktivnosti – tzv „*environmentally friendly*“ metode, omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu, te koriste osjetljive i ponovno upotrebljive elektrode.

Elektrokemijske metode:

- ✚ voltametrijske
- ✚ ciklička voltametrija
- ✚ diferencijalna pulsna voltametrija
- ✚ pravokutnovalna voltametrija (square wave)
- ✚ potenciometrijske metode
- ✚ amperometrijske metode

Upravo činjenica kako je antioksidativna jakost spojeva ustvari njihovo svojstvo da se ponašaju kao reducensi u reakcijama sa slobodnim radikalima, elektrokemijske metode nameću se kao logičan izbor u određivanju antioksidativne aktivnosti koja se temelji na reakcijama oksidacije i redukcije.

1.3.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode temelje se na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s molekulom antioksidansa koja donira atom vodika. Neke od najčešće upotrebljivanih spektrofotometrijskih metoda temelje se na mogućnosti detekcije promjene boje koja se snima spektrofotometrom – uređaj koji mjeri promjene u refleksiji, transmisiji ili zračenju, u intervalima, duž valnih duljina vidljivog dijela spektra.

TEAC test mjeri ukupni antioksidativni kapacitet u uzorku. Uzorci se uspoređuju s poznatim koncentracijama standarda Troloksa unutar mikrotitarske ploče s jažicama. Uzorci i standardi se dodaju u mikroploču, te reakcija traje nekoliko minuta. Zatim se očitava sa standardnom spektrofotometrijskom mikropločicom sa 96 jažica pri valnoj

duljini 405-415 nm. Antioksidativni kapacitet određuje se usporedbom uzorka s Troloks standardima. [9]

FRAP test je nova metoda za procjenu antioksidativnog kapaciteta. FRAP je automatizirani test za mjerenje sposobnosti redukcije iona željeza u plazmi pri niskom pH što uzrokuje nastanak obojenog kompleksa željezo-tripiridiltriazin. FRAP vrijednosti dobivaju se usporedbom promjene apsorbancije pri valnoj duljini od 593 nm u ispitivanim reakcijskim smjesama koje sadrže ione željeza u poznatoj koncentraciji. Promjene apsorbancije linearne su u širokom rasponu koncentracija u smjesi antioksidansa, uključujući plazmu i u otopinama koje sadrže jedan antioksidans u pročišćenom obliku. [10]

ORAC test koristi se za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Peroksidni radikal reagira s fluorescentnom sondom pri čemu se smanjuje fluorescencija, a smanjenje fluorescencije bilježi se fluorometrom. Fluorescencija se mjeri bez i uz prisustvo antioksidansa. Smanjenje fluorescencije u ovisnosti o koncentraciji peroksidnog radikala prikazuje se krivuljama, a područje ispod krivulja pokazuje kolika je sposobnost antioksidansa da ukloni peroksidne radikale. Kao referenca koristi se standardni antioksidans, obično troloks. [11]

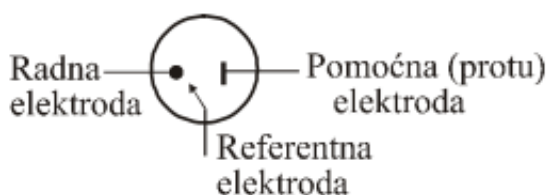
Brand Williams (DPPH) metoda uklanjanja slobodnih radikala određuje antioksidativni kapacitet antioksidansa biološkog izvora, npr. ekstrakta biljaka. Ovo je najjednostavnija metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta u kojoj ispitivani spoj ili ekstrakt reagira s otopinom DPPH-a te se mjeri apsorbancija nakon određenog vremenskog perioda. [12]

1.3.2. Elektrokemijske metode

Voltametrija obuhvaća skup elektroanalitičkih metoda koje se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka gdje je električni napon signal pobude, a električna struja signal odziva. Mjerenja temeljena na voltametriji odvijaju se u elektrokemijskoj ćeliji, u kojoj se signal pobude izaziva između referentne i radne elektrode, a mjeri se struja koja teče između radne elektrode i protuelektrode. Referentna elektroda služi kao standard prema kojem se mjeri potencijal radne elektrode. Dakle, uz radnu elektrodu elektrokemijska ćelija sadrži još najmanje jednu elektrodu kojom se

ostvaruje tok električne struje kroz ćeliju. Ta druga elektroda naziva se pomoćna elektroda ili protuelektroda. Druga elektroda može imati i ulogu referentne elektrode. Tada ona, istodobno, ima ulogu pomoćne elektrode i služi kao elektroda prema kojoj reguliramo pobudni signal ili mjerimo odzivni signal.

Danas se najčešće primjenjuju elektrolitne ćelije s tri elektrode od kojih je jedna radna, druga pomoćna, a treća referentna elektroda kroz koju struja elektrolize ne teče.

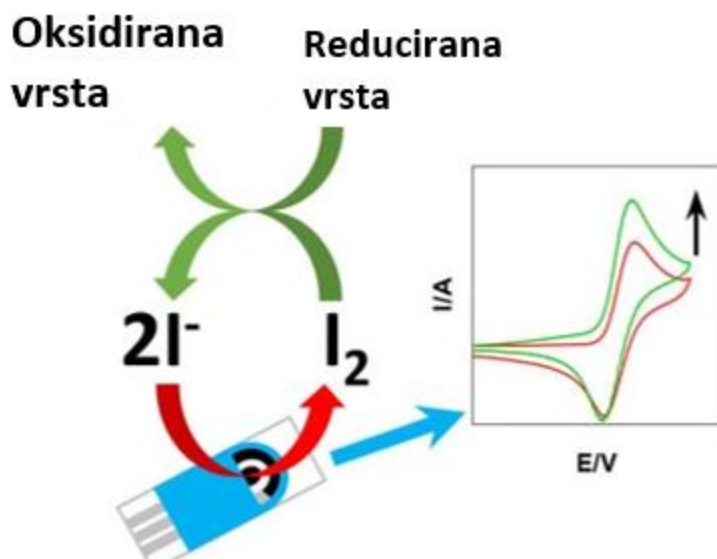


Slika 8. Uobičajeni simboli elektrokemijskih ćelija s tri elektrode. [14]

U voltametriji s linearnom promjenom potencijala s vremenom, potencijal se može mijenjati u jednom smjeru ili ciklički (ciklička voltametrija). Kada je grafički prikaz promjene potencijala mali pravokutni impuls radi se o signalu pobude diferencijalne pulsne voltametrije. Grafički prikaz promjene potencijala koji se sastoji od velikog broja uzastopnih simetričnih pravokutnika predstavlja signal pobude „square-wave” odnosno pravokutnovalne voltametrije. Iz grafičkog prikaza ovisnosti strujnog odgovora o vremenu (voltamogram) dobivamo podatke o koncentraciji ispitivanog uzorka.

Radna elektroda može biti stacionarna (viseća živina elektroda, staklasti ugljik, amalgamske ili metalne elektrode) ili nestacionarna (kapajuća živina elektroda – KŽE ili DME). Osjetljivost voltametrije je vrlo visoka te osigurava mjerenje koncentracija od 10^{-9} do 10^{-12} mol/dm³. [13,14]

Modifikacija elektroda - Kemijski modificirana elektroda je električni vodič čija je površina modificirana za različite namjene elektrokemijskih ispitivanja. Kemijski modificirane elektrode izrađuju se pomoću naprednih pristupa elektrodnim sustavima dodavanjem tankog filma ili sloja određenih kemikalija, radi promjene svojstava vodiča u skladu sa željenom namjenom, postizanja selektivnosti, stabilnosti, dugotrajnosti, te niskih granica kvantifikacije.

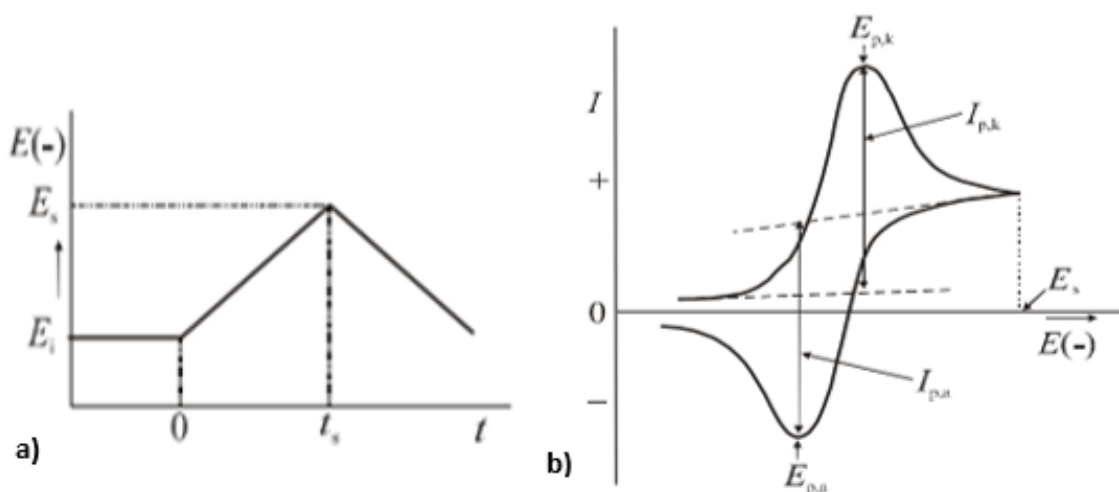


Slika 9. Shematski prikaz elektrokatalitičkog ciklusa sa jodid / jodni redoks sustavom kao posrednikom u oksidaciji spojeva na površini sitotiskane elektrode. [15]

Ciklička voltametrij (CV) najčešće je korištena tehnika kojom se uspješno određuju svojstva i karakteristike elektrokemijskih procesa. Ovom tehnikom mogu se dobiti ključne informacije o termodinamici elektrokemijskih reakcija i procesa adsorpcije. Ciklička voltametrij sastoji se od ispitivanja linearnog potencijala stacionarne radne elektrode (u neizmješanoj otopini) koristeći trokutasti potencijalni valni oblik kao što se vidi na slici 10. Ovisno o informacijama koje se žele dobiti, može se koristiti jedan ili više ciklusa.

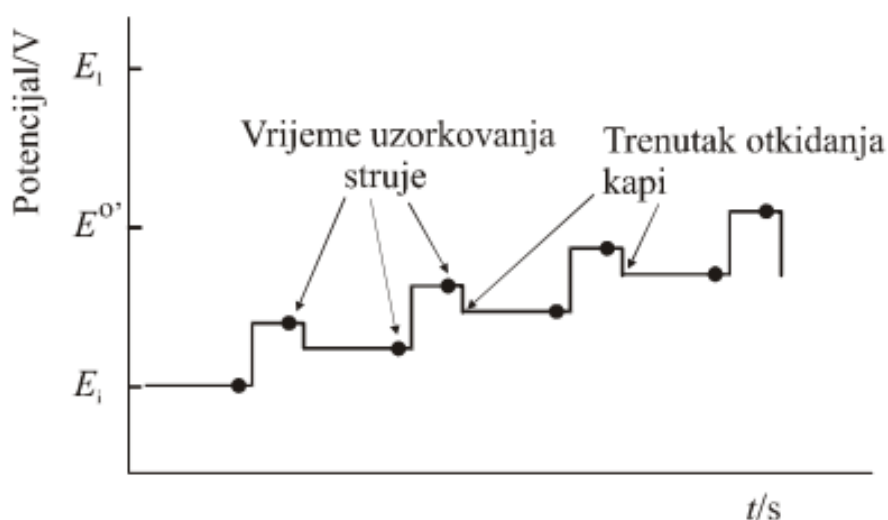
Potenciostat ili galvanostat mjeri generiranu struju redoks reakcije, a izmjereni rezultati prikazuju se na grafu ovisnosti električne struje o narinutom potencijalu.

Na slici 10 a) prikazan je oblik signala pobude cikličke voltametrije, a rezultirajuća struja odziva za elektrodni proces redukcije na slici 10b). Na početku signal pobude linearno raste do određenog vremenskog intervala. Kada signal pobude dosegne odabranu vrijednost (E_s), promijeni se smjer posmika potencijala. Pri povratnom posmiku potencijala razvija se oksidacija produkta elektrodne reakcije redukcije. U signalu odziva nastaje anodni vrh. Oblik signala odziva u povratnom posmiku potencijala ovisi o potencijalu pri kojem se obavlja promjena smjera (E_s). Ako je potencijal pri kojem se obavlja promjena smjera najmanje za $(35/z)$ mV negativniji od potencijala vrha katodnog vala, signal odziva u povratnom smjeru ima isti oblik kao i katodni val, ali položaj anodnog vala je obrnut u odnosu prema katodnom valu. Eksperimentalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram jesu omjer visine polaznog i povratnog vala i razlika potencijala vrhova katodnog i anodnog vala [14, 15].



Slika 10. a) Signal pobude cikličke voltametrije; b) Signal odziva i očitavanje eksperimentalnih parametara [16].

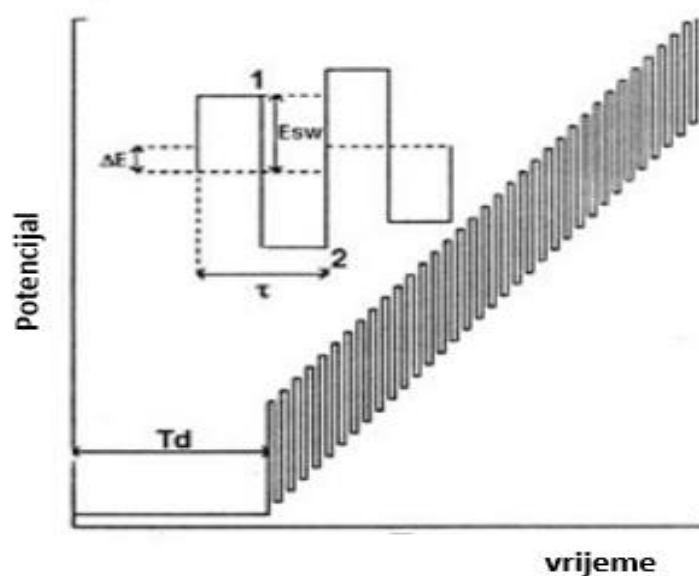
Diferencijalna pulsna voltametrija (DPP) je tehnika kod koje se impulsi fiksne amplitude superponiraju na stubasto rastući napon pobude. Slika 9. prikazuje tipični signal pobude odnosno ovisnost potencijala o vremenu, gdje se struja uzorkuje dva puta, neposredno prije svakog pulsa i opet pri kraju trajanja pulsa. Signal odziva predstavlja razlika jakosti struja prije i nakon svakog naponskog impulsa kao funkcija potencijala elektrode, tj. amplitude stubasto rastućeg osnovnog signala pobude. Otuda i naziv diferencijalna pulsna voltametrija jer se mjeri diferencija u struji ćelije koja je uzrokovana naponskim pulsom [14, 15, 16].



Slika 11. Signal pobude i vrijeme primjene naponskog impulsa te vrijeme uzorkovanja i mjerenja struje ćelije u diferencijalnoj pulsnoj voltametriji [14].

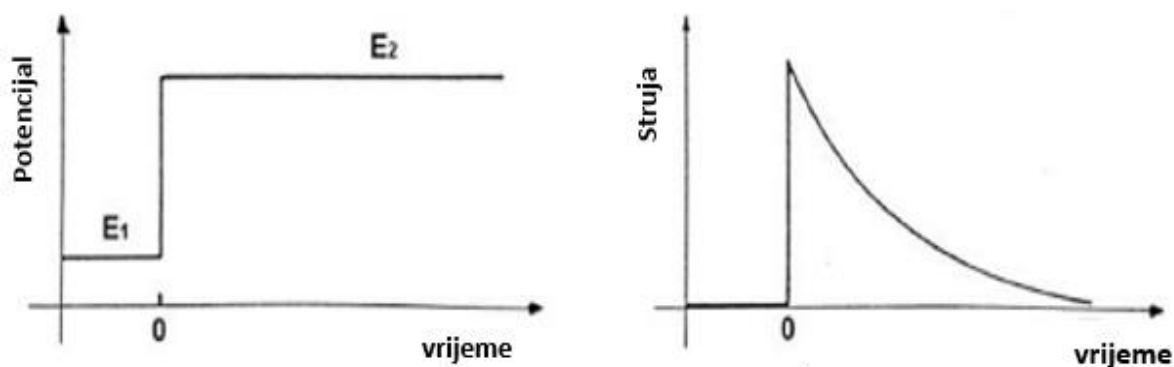
Pravokutnovalna voltametrija (square wave - SWV) je tehnika slična diferencijalnoj pulsnoj voltametriji, u kojoj se mjeri struja na stacionarnoj radnoj elektrodi dok je potencijal između radne i referentne elektrode linearan s vremenom. Signal odziva ima valni oblik koji se sastoji od simetričnih superponiranih četvrtastih valova, postavljenih na osnovni stubasto rastući istosmjerni potencijal. Slika 10 prikazuje tipični signal pobude za pravokutnovalnu voltametriju gdje se struja uzorkuje dva puta tijekom svakog ciklusa pravokutnih valova, jednom na početku pulsa i jednom na kraju pulsa.

Radna elektroda je obično stacionarna elektroda stalne površine, npr. viseća živina elektroda, statička živina kap elektroda ili živina film elektroda. U metodi se bilježi struja odziva kao razlika struja pri jednoj (negativnoj) odnosno drugoj (pozitivnoj) poluperiodi izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude. Izrazita osjetljivost pravokutnovalne voltametrije proizlazi iz činjenice da je ukupna struja veća od polazne i povratne komponente. Osjetljivost je veća od osjetljivosti diferencijalne pulsne voltametrije u kojoj se ne koristi povratna struja. Pravokutnovalnom voltametrijom može se postići detekcija tvari koncentracija $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ [14].



Slika 12. Pravokutni izmjenični signal pobude pravokutnovalne voltametrije [14].

Amperometrijska metoda (kronoamperometrija - CA) podrazumijeva postepeno pojačavanje potencijala radne elektrode od vrijednosti kod koje se ne javlja reakcija do potencijala pri kojem je površinska koncentracija elektroaktivnih vrsta efektivno nula. Rezultat ove tehnike je struja odziva koja se bilježi grafički u ovisnosti o vremenu. Na slici 13 prikazan je signal pobude, val ovisnosti potencijala o vremenu i odgovor kronoamperometrijskog eksperimenta. Kronoamperometrijom generiraju se velike struje koje se s vremenom eksponencijalno smanjuju. Ako je potencijal između elektroda dovoljno velik i nalazi se u području graničnih struja difuzije, koncentracija reaktanta na elektrodi pada na nulu. Prijenos mase pri ovim uvjetima odvija se isključivo difuzijom. Krivulja ovisnosti struje o vremenu odražava promjenu koncentracijskog profila reaktanta u blizini površine elektrode. Na početku eksperimenta uočava se velika količina struje zbog punjenja električnog dvoslojnog sloja elektrode (EDL). Maksimalna struja i punjenje EDL-a ovise o vrsti elektrode, veličini i odabranim parametrima (potencijal, vrijeme itd.). Kad ovaj proces završi, faradajska komponenta struje prikazuje promjene koncentracije u blizini površine elektrode. To uključuje postupno širenje difuzijskog sloja povezanog s trošenjem reaktanta, dakle kako vrijeme napreduje nagib koncentracijskog profila se smanjuje.



Slika 13. Signali pobude i odziva kronoamperometrijske metode [14].

2. PREGLED POSTIGNUĆA PRIMJENE ELEKTROKEMIJSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA

Usprkos navedenim nedostacima elektrokemijskih metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta (Tablica 1), prednosti ovih metoda potiču na sve češću primjenu. Ovaj pregled predstavlja primjene prethodno opisanih elektrokemijskih metoda kako bi se odredio antioksidativni kapacitet različitih uzoraka hrane i pića.

Tablica 1. Prikaz prednosti i nedostataka elektrokemijskih metoda pri određivanju antioksidativnog kapaciteta

<i>Prednosti</i>	<i>Nedostatci</i>
Brzo i jednostavno mjerenje	Sposobnost da reducira molekule koje interferiraju, a nemaju antioksidativni kapacitet
Visoka osjetljivost	
Potrebna mala količina uzorka	
Jednostavna priprema uzorka - najčešće nije potrebna izolacija niti predobrada uzorka	Nije selektivno za pojedine vrste spojeva unutar skupina (npr. karotenoidi, polifenoli), osim ako elektroda nije modificirana
Ne zahtijevaju upotrebu dodatnih reagensa	
Omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu	
Ekonomski aspekti	

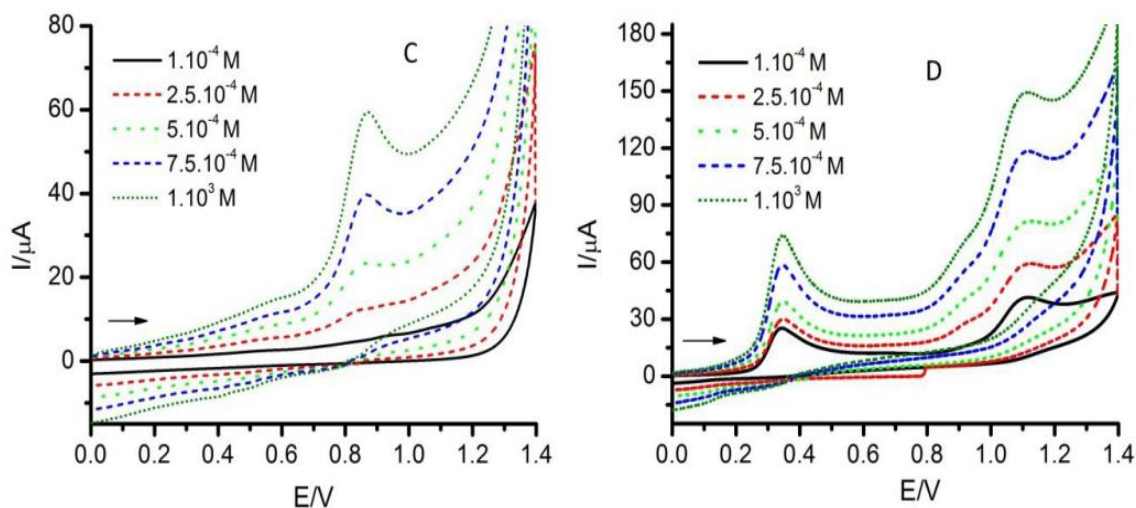
2.1. Primjena cikličke voltametrije

Ciklična voltametrija široko je korištena za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta nisko molekulskih antioksidansa prisutnih u životinjskoj plazmi, biološkim tekućinama, jestivim biljkama i voću. Tablica 2 prikazuje neke od radova u kojima je korištena ciklička voltametrija za određivanje vrijednosti antioksidativnog kapaciteta uzoraka ili standarda pomoću različitih elektroda i praćenja nekoliko parametara.

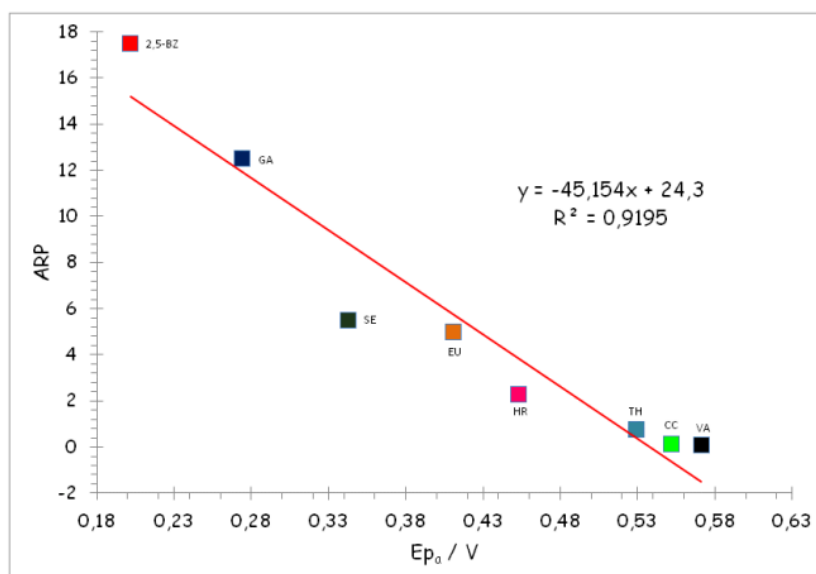
Tablica 2. Pregled primjene cikličke voltametrije.

Radna elektroda	Parametar	Uzorak / standard	Referenca
MWCNT/GCE	I_p	Kvercetin	Abdel-Hamid (2013) [17]
Au & Cysteamine/Au GCE	I_{pa}	Kvercetin, ekstrakti biljaka	Wan (2007) [18]
GCE	I_{pa}	Kupovni narančin sok, kofeinska, klorogenska i askorbinska kiselina	Sousa (2004) [19]
GCE	E_{p2} , I_{pc}/I_{pa} , Q_{600}	Infuzija voćnog čaja	Piljac-Zegarac (2010) [20]
CPE	EI	Uzorci kave	Oliveira (2016) [21]
GCE	I	DPPH, troloks, narančin sok, crno vino, sok crnog ribiza	Milardovic (2006) [22]
BDD	Q_p	Kupovni margarin i majoneza	Medeiros (2010) [23]
GCE	I_{pa2}	Sauvignon bijeli	Makhotkina (2012) [24]
GCE	E_{pa} , I_{pa} , Q	Komina grožđa, galna kiselina, kvarcetin	José Jara-Palacios (2014) [25]
PBHR-MWCNT CPE	I_p	Vino, čaj, kofeinska kiselina	Granero (2010) [26]
GC disk	I_p	BHA, TBHQ, BHT	dos Santos Raymundo (2007) [27]
PT disk	E_p	Ekstrakt đumbira	Chaisuksant (2012) [28]
CF-UME	I_p	Biljna ulja	Ceballos (2000) [29]
GCE	E_{pa} , I_{pa} , ARP	GPPH, galna kiselina, eugenol, kumarin	Arteaga (2012) [30]

Zajedničko svim navedenim istraživanjima je da se na osnovu anodnog strujnog vrha koji se pripisuje oksidaciji, 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 14. Ciklički voltamogram jednostavnog fenola (timol) i hidroksikumarina (hidroksid i fenol). Ispitivanje je provedeno na staklastoj ugljikovoj elektrodi pri eksperimentalnim uvjetima: pH = 7,0, $c = 5 \times 10^{-4}$ M [30].



Slika 15. Krivulja umjeravanja dobivena iz strujnih vrhova na osnovu struje oksidacije dobivene iz cikličkih voltamograma [30].

Iz dobivenih podataka proizlazi da su najvažniji parametri vršni potencijal i vršna struja. Vršni potencijal korelira s vrstom reducensa. Niži potencijal oksidacije ukazuje na snagu prisutne donorske grupe (jednostavno vezana - hidroksi - OH⁻) ka otpuštanju elektrona, a viši potencijal oksidacije sugerira prisutnu fenolnu skupinu. Vršna struja je pri tome izravno proporcionalna koncentraciji antioksidansa.

U radu koji su iznijeli autori (Piljac-Zegarac et al., 2010) [20], opisano je određivanje antioksidativnog kapaciteta u 10 različitih plodova čajne infuzije koristeći

spektrofotometrijske metode, ABTS, FRAP, DPPH i Folin; te su rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenima primjenom cikličke voltametrije. Za svaki uzorak čaja, određena je površina ispod većeg anodnog pika pri 400 mV, ta vrijednost nazvana je Q_{400} , te je narinut potencijal od 600 mV, a ta vrijednost nazvana je Q_{600} .

Usporedba svih metoda je provedena preko indeksa antioksidativnog kapaciteta (ACI), koji je utvrđen dodjeljivanjem jednake težine svim testovima. Vrijednost indeksa 100 dodijeljena je najboljem rezultatu svakog testa, a za svaki uzorak izračunat je ogovarajući indeks.

Indeks je izračunat pomoću formule

$$\text{ACI} = (\text{uzorak bodova/najbolji rezultat}) \times 100$$

Za sve uzorke analizirane u ovom radu, uzorak FT3, koji se sastoji od cvijeta hibiskusa (25%) i ploda šipka (75%), pokazao je najviši rezultat u svim testovima, uključujući Q_{600} . Ova činjenica potvrđuje da su rezultati izvedeni iz cikličke voltametrije pouzdani i usporedni s rezultatima drugih metoda. Glavni razlog podudaranja gore spomenutih spektrofotometrijskih metoda (ABTS, DPPH, FRAP i Folin) i provedenih elektrokemijskih mjerenja je da se obje temelje na mehanizmu prijenosa jednog elektrona.

Obzirom na radove iz Tablice 2, istaknuto je nekoliko zanimljivih činjenica o primjeni elektrokemijske tehnike. U navedenim izvještajima kao radne elektrode koriste se različiti nemodificirani materijali, npr. Pt, staklasta ugljikova elektroda (GCE – *glassy carbon electrode*) i dijamantna elektroda dopirana borom (BDDE).

S instrumentalne točke gledišta, ponekad se elektrokemijske metode primjenjuju prije upotrebe druge instrumentalne tehnike poput HPLC-MS, ili poslije kao detektor, a ponekad je antioksidativni kapacitet određen neizravno uzimajući u obzir redukcijska svojstva flavonoida.

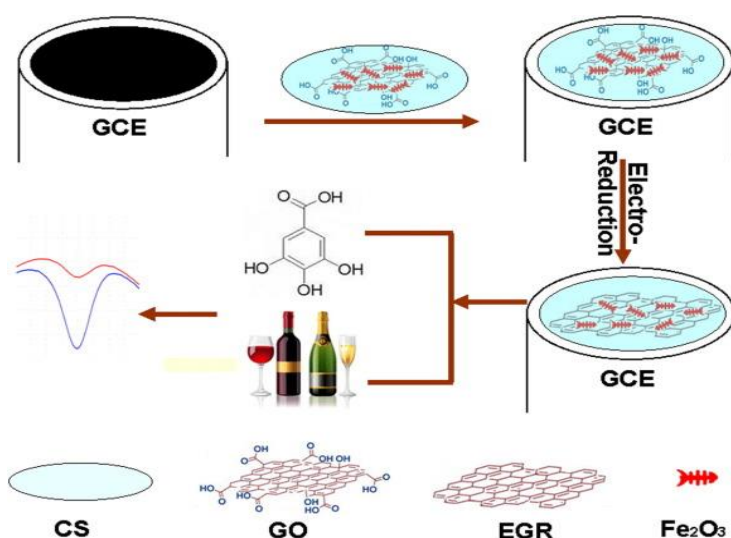
U drugom radu Milardović, Iveković i Grabarić, 2006., [22] možemo istaknuti kako je primijenjena amperometrijska metoda pomoću istog reagensa koji je korišten i u spektrofotometrijskom određivanju antioksidativnog kapaciteta. Dobiveni su zanimljivi rezultati na nekoliko uzoraka čaja, vina i soka. Amperometrijska metoda u ovom radu zasnovana na primijenjenoj staklastoj ugljikovoj elektrodi pokazala je dobru kemijsku stabilnost, a netransparentni i mutni uzorci nisu utjecali na odziv detektora. Dobro slaganje rezultata dobivenih predloženom amperometrijskom metodom klasičnom spektrofotometrijskom metodom potvrdilo je korisnost amperometrijske metode za određivanje antioksidativnog djelovanja širokog spektra uzoraka.

Iako se većina istraživanja antioksidativnih svojstava obično provodi na prehrambenim proizvodima što omogućuje usporedbu različitih svojstava s kvantitativnog gledišta, potrebno je definirati specifične parametre, kao što je ACI koji su predložili Piljac-Zegarac i sur. (2010.) [20].

Može se primijetiti da se ciklička voltametrija, čak i kod relativno složenih uzoraka, kao što je komina grožđa, pokazala pogodna za kvantificiranje fenolnih spojeva iz analiza vršnih struja dobivenih u istraživanju. Na primjer, u slučaju kada je radna elektroda staklasta ugljikova elektroda, ova se prednost temelji na činjenici da se i u uzorcima gdje je prisutna vrsta koja interferira s ciljanom skupinom, poput askorbinske kiseline, ne taloži na površini modificirane elektrode (Sousa, 2004.) [19] što čini ovu tehniku vrlo pogodnom za određivanje antioksidativnog kapaciteta.

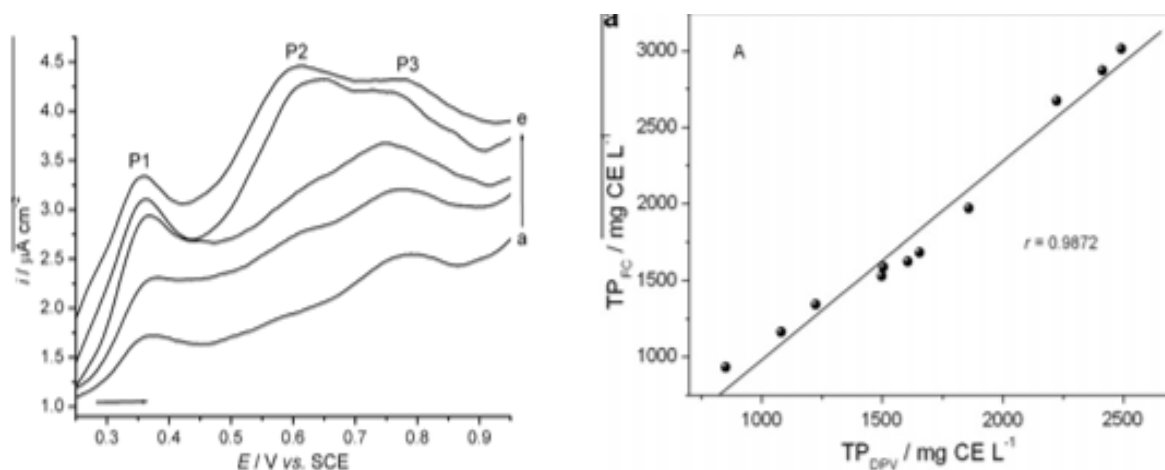
2.2. Primjena diferencijalne pulsne voltametrije

Glavni razlog svrhovitosti primjene diferencijalne pulsne voltametrije pri određivanju antioksidativnog kapaciteta je visoka osjetljivost metode. Na primjer, Gao i suradnici (2015) [31] izvijestili su o granici detekcije od $1,5 \times 10^{-7}$ M za galnu kiselinu korištenjem modificiranih elektroda. Modifikacija elektrode izvedena je na elektrokemijski reduciranom grafenovom oksidu (ERGO) koristeći hidridni materijal citosan (CS) i željezov(III) oksid dobiven hidrotermalnim postupkom koji kristalizira u dendritične strukture slične ribljoj kosti (Fe_2O_3), te se dobila izrazito selektivna i osjetljiva modifikacija. Na slici možemo vidjeti primjer izvedbe takvog senzora.



Slika 16. Primjer modifikacije elektrode: elektrokemijski reducirani grafenovom oksidu (ERGO), hidridni materijal citosan (CS) i željezov(III) oksid (Fe_2O_3) (struktura slična ribljoj kosti). [31]

Tablica 3 prikazuje neke radove u kojima je primijenjena diferencijalna pulsna voltametrija, te je određena koncentracija antioksidansa u raznim uzorcima. U navedenim radovima ispitivani su uzorci uporabom različitih vrsta elektroda. Najčešće korištene elektrode su staklasta ugljikova elektroda i elektroda od grafitne paste. Staklasta ugljikova elektroda i elektroda grafitne paste primijenjene su u istraživanju uzoraka vina za kvantitativno određivanje katehina (Šeruga, Novak i Jakobek, 2011) [32], (prikazano na slici 17.) kao i za analizu antocijanina u istom uzorku (Aguirre i sur., 2010) [33]. Elektrode od grafitne paste korištene su na uzorcima kave za određivanje njihovog elektrokemijskog indeksa (EI) (Oliveira-Neto i sur., 2016.) [21]. Staklaste ugljikove elektrode koriste se nakon modifikacija površine elektrode koje poboljšavaju njihovu osjetljivost. Te preinake mogu se postići na različite načine; na primjer, dodavanjem drugih materijala na površinu elektrode, kao u slučaju ugljikovih nanocijevčica za određivanje antioksidativnog kapaciteta u konjaku i rakiji (Ziyatdinova, Salikhova i Budnikov, 2014) [34], ili koristeći sinergiju ostvarenu s nekoliko modifikacijskih sredstava za izgradnju višestrukog sustava.



Slika 17. Voltamogram DPV i krivulja umjeravanja različitih crnih vina razrijeđenih u acetatnom puferu u omjeru 1/400. Ispitivanje je provedeno na staklastoj ugljikovoj elektrodi pri pH 3,6 [32].

Vrijedno je istaknuti i rad koji su izveli Lino i suradnici (2014.) [35], gdje su ispitivani i utvrđeni antioksidativni kapaciteti različitih vrsta vina poput crnih, bijelih, rozea i pjenušavih vina. Oni pokazuju zanimljivu povezanost između elektrokemijske metode primijenjene za određivanje antioksidativnog kapaciteta i konvencionalne metode DPPH radikala, izražene u EC50 (to predstavlja količinu vina koja je potrebna za 50% dekolorizacije DPPH u odnosu na praznu kontrolu). Pearsonova korelacija bila je 0,9110, stoga autori zaključuju da dobiveni rezultati podupiru upotrebu elektroanalitičke metode, koja je pak jeftinija, jednostavnija i najmanje dva puta brža.

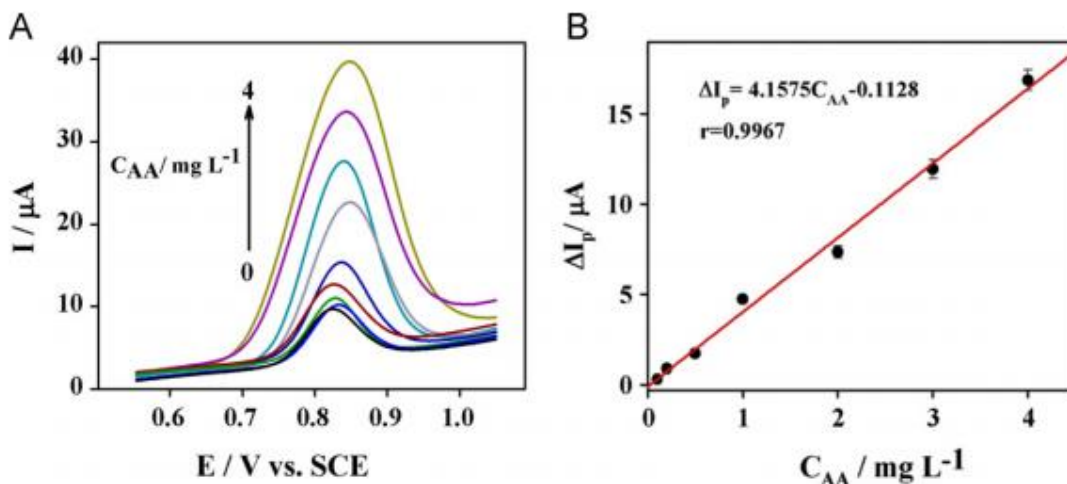
Tablica 3. Pregled primjene diferencijalne pulsne voltametrije

Radna elektroda	Parametar	Uzorak / standard	Referenca
Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Cu, Co, Ni	E_p , I_p	Tumbo (Passiflora mourisma), kamu-kamu (Myrcaria dubia) sok	Baldeón (2015) [36]
Hg Film	I_p	Zeleni čaj, askorbinska kiselina, citrična kiselina, glukoza, polivinilpirolidon	Korotkova, (2007) [37]
CPE	EI	Crno, bijelo, pjenušavo, obogaćeno vino, sok grožđa, nektar	Lino (2014) [35]
BDD	E_p , I_p	Komercijalni margarin i majoneza	Medeiros (2010) [23]
CPE	E I	Uzorci kave	Oliveira-Neto (2016) [21]
GCE	TAP	Ekstrakti biljaka: Melissa officinalis L., Fragaria L., Origanum majorana L., Salvia officinalis L., Equisetum arvense L., Tussilago farfara L., Hyssopus L., Urtica L., Mentha arvensis L., Calendula L., Alcea rosea L., Melilotus officinalis L.	Głód, (2014) [38]
GCE	E_p , I_p	Vino cabernet sauvignon, grožđe V. Vinifera, maline	Aguirre (2010) [32]
NiO-graphene/GCE	E_p , I_p	Askorbinska kiselina	Liu (2014) [39]
GCE	E_p , I_p	Hrvatska crna vina	Šeruga (2011) [32]
MWNCT/GCE	E_p , I_p	Komercijalni brendi i konjak	Ziyatdinova (2014) [34]
GCE	E_p , I_p	Cytisus multiflorus, Filipendula ulmaria, Sambucus nigra	Barros, (2011) [40]
CS-Fe ₂ O ₃ -GO/GCE	E_p , I_p	Galna kiselina, crno i bijelo vino	Gao (2015) [31]
Poly-CDDA/GCE	E_p , I_p	Askorbinska kiselina, dopamin, urična kiselina	Ensafi, (2009) [41]

2.3. Primjena pravokutnovalne voltametrije

Kao i u slučaju DPV-a, pravokutnovalna voltametrija je korištena za identifikaciju i kvantifikaciju antioksidansa u različitim vrstama uzoraka hrane i pića, čime se dobivaju vrlo niske granice detekcije.

Na slici 18. prikazan je voltamogram pravokutnovalne voltametrije, odnosno odziv elektrode obzirom na koncentracije gvanina na kojem se vidi jasno definiran oksidacijski pik na 840 mV, te pripadajuća krivulja umjeravanja.



Slika 18. A) Voltamogram pravokutnovalne voltametrije različitih otopina gvanina, provedene na staklastoj ugljikovoj elektrodi pri pH= 4,92 [42].

Tablica 4 prikazuje odabrane radove gdje je primijenjena pravokutnovalna voltametrija za određivanje koncentracije antioksidansa u različitim uzorcima korištenjem vršne struje kao radnog parametra.

U nekim slučajevima korištenjem staklaste ugljikove elektrode kao radne elektrode, potvrđena je mogućnost proučavanja sastojaka koji nisu elektrokemijski aktivni zbog stvaranja polimernih filmova koji blokiraju površinu elektrode. Staklaste ugljikove elektrode također su korištene za elektrokemijsko određivanje putem adsorbiranja željenih spojeva prije anodnog otapanja odnosno oksidacije, npr. transresveratrola. Korištenjem ovog postupka uklanjanja postignute su vrlo niske granice detekcije. Slično onome što je učinjeno s prethodnim tehnikama; provedena su ispitivanja na modificiranim elektrodama. Na primjer, u slučaju elektrode od grafitne paste, polivinilpirolidon je ugrađen u pastu kako bi se iskoristila ekstrahirajuća snaga koju ovaj polimer pokazuje prema fenolnim spojevima. Ovaj postupak je testiran na jestivim biljnim ekstraktima [45].

Druga zanimljiva modifikacija je ona u kojoj se aktivnost antioksidansa procjenjuje analizom zaštitne snage antioksidansa protiv napada hidroksilnih radikala na purinskim bazama. Te baze, npr. gvanina, imobilizirane su na površini staklaste ugljikove elektrode i potom izložene radikalnom napadu u prisutnosti ili odsutnosti različitih ekstrakata, tj. voćnih sokova, koji sadrže antioksidativne spojeve.

Tablica 4. Pregled primjene pravokutnovalne voltametrije.

Radna elektroda	Koncentracija detekcije	Uzorak/standard	Referenca
GCE	4,2 mg/L za trans-resveratrol	Crno vino i trans-resveratrol	Airado-Rodríguez (2010) [43]
Guanin/GCE, Adenin/GCE	0,99 mg/L	Voda s okusom	Barroso (2012) [44]
BDD	1×10^{-6} M za butilhidroksianisol	Majoneza i margarin	Medeiros (2010) [23]
CF-UME, Pt Band- UME	Nije određeno	Jestiva ulja	Robledo, (2011) [45]
GCE	$0,04 \times 10^{-6}$ M za butilhidroksitoluen	Zeleni i crni čaj	Novak (2010) [46]
GCE	$0,326 \times 10^{-6}$ M za ECG $4,27 \times 10^{-6}$ M za EC	Epikatehin (EC), epikatehin galat (ECG)	Novak (2009) [47]
PVP/CPE	$0,01 \times 10^{-6}$ M za askorbinsku kiselinu	Špinat, kupus, brokula, cikorija	Piovesan (2015) [48]

U istraživanju koje su realizirali Medeiros i suradnici (2010) [23] provedena je usporedba između elektrokemijske metode i uobičajene analitičke metode (HPLC). HPLC je jedan od najčešće korištenih analitičkih metoda za kvantificiranje antioksidansa u hrani i pićima. Elektrokemijskim metodama autori su analizirali vršni potencijal u odnosu na logaritam frekvencije kako bi odredili broj prenesenih elektrona. Nakon matematičke obrade podataka, broj prenesenih elektrona za BHA i BHT je bio 2. Ovo je korisno za predlaganje oksidacijskog mehanizma. Osim ovog mehanizma, autori su uspoređivali učinkovitost elektrokemijske metode za otkrivanje i kvantificiranje ovih antioksidansa u komercijalnoj majonezi i margarinu uspoređujući ih sa HPLC analizom istih uzoraka; utvrđeno je da je elektrokemijska metoda prikazala vrlo dobru korelaciju korištenjem pogreške izračunate prema: $\text{greška\%} = 100 \left(\frac{\text{SWV vrijednost HPLC vrijednost}}{\text{HPLC vrijednost}} \right)$. Za BHA, najveća pogreška bila je 5,0%, a za BHT 7,7% [23].

Na osnovu ovih podataka autori su zaključili da su vrlo niske granice detekcije dobivene za istodobno određivanje BHA i BHT ($0,14 \times 10^{-6} \text{ M}$ i $0,2 \times 10^{-6} \text{ M}$); ove vrijednosti su bile niže od ostalih prethodno dobivenih korištenjem voltametrijske metode. Također, dobivene vrijednosti koncentracije za BHA i BHT bile su slične onima dobivenim pri uporabi HPLC metoda. Stoga je SWV metoda korištena u njihovom radu učinkovita je za istodobno određivanje BHA i BHT u prehrambenim proizvodima; nadalje, vrlo je jednostavna, jeftina i brza metoda [23].

2.4. Primjena kronoamperometrije

Tablica 5 prikazuje neke radove u kojima je CA primijenjena za kvantificiranje koncentracije antioksidansa kombinirajući i elektrokemijske i spektrofotometrijske metode. Da bi se proučio antioksidativni kapacitet, pokazalo se važnim procijeniti stacionarnu struju dobivenu pri radnom potencijalu.

Tablica 5. Primjena kronoamperometrije

Radna elektroda	Parametar	Uzorak / Standard	Referenca
GCE	I, Q	Galna kiselina	Abdel-Hamid (2011) [49]
MWCNT/GCE	I_{ss}	Komercijalna rakija i konjak	Ziyatdinova (2014) [34]
TFG, PT	I_{ss}	Urična i askorbatna kiselina	Ziyatdinova (2014) [34]
PCDDA/GCE	I_{ss}	Dopamin, askorbinska i urična kiselina	Ensafi (2009) [41]
BDD	I_{ss}	Kvarcetin, rutin, fenolne kiseline, butilhidroksianisol	Ferreira (2008) [50]
BDD	I_{ss}	Kvarcetin, morin, fizetin, luteolin	Ferreira (2015) [50]
GCE	I_{ss}	Komercijalni sokovi	De León (2011) [50]
GCE	I	Troloks, sok naranče, crno vino, sok crnog ribiza	Milardovic (2006) [22]
Ti/Pt	I_{ss}	Troloks, askorbinska i kofeinska kiselina	Oliveira (2013) [53]
GCE	I_{ss}	Suho crno vino	Zikos (2011) [54]

Radovi koje je zanimljivo istaknuti su oni od De León i sur. (2011) [50] i Milardović i sur. (2006) [22] gdje se konvencionalni spektrofotometrijski test kombinira s elektrokemijskim pristupom. U prvom radu, autori uspoređuju razlike između praćenja reakcije zahvata radikala DPPH uporabom spektrofotometrije i kronoamperometrije. Također su utvrdili da je moguće i adekvatno pratiti napredak reakcije elektrokemijskim

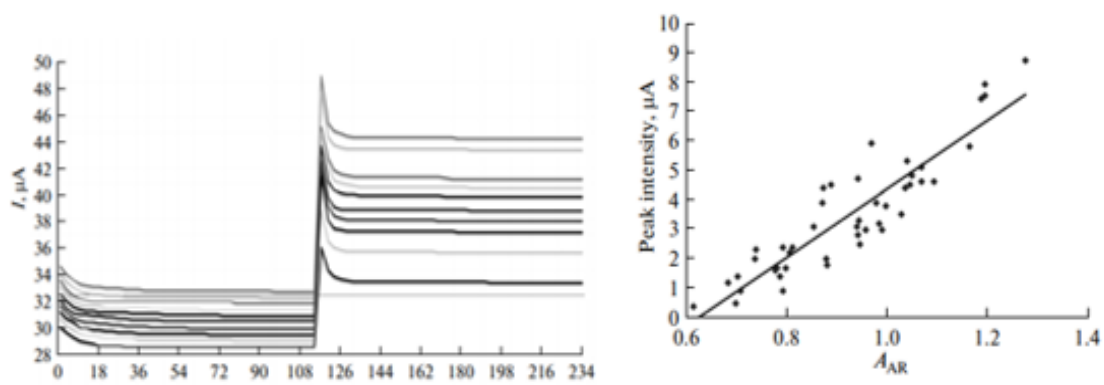
pristupom, dobivajući time vrlo dobru granicu detekcije za troloks ($1,5 \times 10^{-6}$ M) pri korištenju istog postupka spektrofotometrijskog ispitivanja. Ovom tehnikom radikal i uzorak se prije mjerenja miješaju te se smjesa inkubira 30 minuta. Prema autorima, jedna od prednosti kombiniranja obje metode je da se koncentracija DPPH radikala može povećati kako bi se izbjeglo razrjeđivanje pri prethodnoj obradi uzorka; inače bi u spektrofotometrijskom pokusu veće koncentracije DPPH rezultirale velikim vrijednostima apsorpcije koje mogu dati nepouzdan rezultate, ovisno o opremi.

S druge strane, Milardović i suradnici predlažu kronoamperometrijsku metodu za određivanje antioksidativnog djelovanja primjenom standarda troloksa na uzorak DPPH radikala. Time se utvrđuje sposobnost uklanjanja DPPH radikala standardom troloksa provođenjem kronoamperometrijskih eksperimenata na radnom potencijalu od 140 mV. Odabrana je ta vrijednost potencijala jer tada ne dolazi do elektrokemijske reakcije pa je očitana struja u eksperimentu rezultat kemijske reakcije koja se dogodila ili s troloksom ili između uzorka i DPPH radikala. Kada koriste ovu metodu, autori dodaju male dodatke od 10^{-6} M DPPH otopine i očitavaju struju odziva dok ne dobiju dovoljno rezultata za izradu kalibracijske krivulje. Zatim, DPPH otopini, dodaju $2,5 \times 10^{-6}$ M troloksa dok se struja ne vrati na početnu vrijednost. Nakon ovih eksperimenata, svoje rezultate usporedili su s rezultatima dobivenim spektrofotometrijskim ispitivanjem i odredili su vrijednost R od 0,9996, što ukazuje na vrlo dobru korelaciju između obje metode. Zaključuju da pod istim uvjetima obje metode imaju iste prednosti i nedostatke; međutim, na spektrofotometrijsku metodu mogu lako utjecati boja i zamućenost uzorka, što zahtijeva prethodnu obradu uzorka.

Amperometrijska metoda pokazala je dobru kemijsku stabilnost, a netransparentni ili mutni uzorci nisu utjecali su na odziv detektora. Dobro podudaranje rezultata dobivenih predloženim amperometrijskim metodama i klasičnom spektrofotometrijskom metodom potvrdilo je korisnost amperometrijske metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta širokog spektra uzoraka.

Važno je napomenuti da se ukupni antioksidativni kapacitet uzorka, sastavljen od nekoliko elektroaktivnih molekula, ne dobije zbrojem jedinice antioksidativnog kapaciteta njegovih komponenata, nego to ovisi o mikrookolini u kojoj se spoj nalazi. Elektroaktivni spojevi mogu međusobno međudjelovati što rezultira sinergijom ili inhibitornim učinkom.

Na slici 19. prikazan je voltamogram kronoamperometrije te umjerni pravac za 45 različitih uzoraka vina pri čemu je korištena staklasta ugljikova elektroda.



Slika 19. Kronoamperogram te krivulja umjeravanja. [54]

3. ZAKLJUČAK

Egzogeni antioksidansi, oni uneseni u organizam hranom i pićem, ključan su čimbenik u obrani od štetnog utjecaja slobodnih radikala na ljudsko zdravlje. Odatle proizlazi značajna zainteresiranost znanstvene zajednice za proučavanjem antioksidativnih karakteristika brojnih namirnica na kvalitativnoj i kvantitativnoj osnovi. Da bi se što preciznije znali učinci antioksidansa, tj. njihov kapacitet, potrebno ih je kemijski analizirati, što se ostvaruje metodama navedenim u radu. Pregledom navedenih radova može se zaključiti da elektrokemijske metode imaju prednost pred spektrofotometrijskim zbog jednostavnosti, brzine te povoljne cijene provođenja ispitivanja. Također, dokazano je podudaranje elektrokemijskih metoda sa spektrofotometrijskim u preciznosti, točnosti i osjetljivosti pri određivanju antioksidativnog kapaciteta pojedinih uzoraka.

Pregledom navedene literature pokazano je kako je jednostavnim elektrokemijskim metodama moguće vrlo precizno odrediti antioksidacijski kapacitet bilo kojeg uzorka prirodnog ili umjetnog na osnovu redukcijskih svojstava antioksidativnih sastojaka uzoraka hrane i pića.

4. LITERATURA

1. G. Rimbach, D. Höhler, A. Fischer, S. Roy, F. Virgili, J. Pallauf & L. Packer, *Archiv für Tierernaehrung*, **1999**, 52, 203–222.
2. F.M.A. Lino, L.Z. de Sa, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis, P.C. Ghedini, V.S. Somerset, E.S. Gil, *Electrochimica Acta*, **2013**, 128, 25–31.
3. B. Halliwell, J.M. Gutteridge. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 1-85.
4. B.N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1981**, 68, 58–62.
5. M. Mazloun Ardakani, Z. Akrami, H. Kazemian, H.R. Zare: *J. of Electroanal. Chem.*, **2006**
6. M. Butnariu, I. Grozea, *J. Bioequivalence Bioavailab.*, **2012**, 4(6): 4–6
7. URL: <https://www.intechopen.com/books/antioxidants/antioxidant-categories-and-mode-of-action> (19.09.2020.)
8. E. M. Atta, N. H. Mohamed and A. A. M. Abdelgawad: *Antioxidants*, **2017**, 365–375
9. OxiSelect™ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay Kit (ABTS): Catalog Number XAN-5040
10. Iris F.F. Benzie, J.J. Strain: *Anal Biochem*, **1996**, 70–76
11. Y. Zhong, F. Shahidi, in *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, **2015**
12. Sagar B. Kedare & R. P. Singh, *J. Food Sci Technol.* **2011**, 48(4): 412–422
13. URL: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=65300> (15.09.2020.)
14. Piljac, Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, **2010**, 400
15. M.I. Gonzales-Sanchez, J. Agrisuelas, E. Valero, R. G. Compton, *Electroanalysis* **2017**, 1316–1323.
16. J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez , J. Contreras-Calderón: *Food Chem.*, **2017**, 221: 1371–138
17. Abdel-Hamid, R., Rabia, M. K., & Newair, E. F. , *Arab. J. Chem.*, **2013**, 117(3)
18. Wang, J., Zhou, N., Zhu, Z., Huang, J., & Li, G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 388(5–6), 1199–1205
19. Sousa, W. R., da Rocha, C., Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., Zanoni, *J. Food Compost Anal.*, **2004**, 17 (5), 619-633
20. J. Piljac-Zegarac, L. Valek, T. Stipcevic, S. Martinez, *Food Chem.*, **2010**, 121 (3), 820–825.

21. J. R. Oliveira-Neto, S. G. Rezende, C. de Fátima Reis, S. R. Benjamin, M. L. Rocha, E. de Souza Gil, *Food Chem.*, **2016**, 190, 506–512.
22. Milardovic, S., Ivekovic, D., & Grabaric, B. S. *Bioelectrochemistry*, **2006**, 175–180.
23. R. A. Medeiros, R. C. Rocha-Filho, Fatibello-Filho, *Food Chem.*, **2010.**, 123(3), 886–891.
24. O. Makhotkina, P. A. Kilmartin. *J. Electroan. Chem.*, **2009.**, 633(1), 165–174.
25. J. Jara-Palacios, M., Hernanz, D., Luisa Escudero-Gilete, M., Heredia, F. J., *Food Res. Int.*, **2014.**, 66, 150–157.
26. Granero, A. M., Fernández, H., Agostini, E., & Zón, M. A.: *Talanta*, **2010.**, 83(1), 249–255.
27. M. dos Santos Raymundo, da Silva, Marques, M. Paula, C. Franco, R. Fett, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **2007.**, 40(7), 1133–1139.
28. R. Chaisuksant., K. Damwan, A. Poolkasem, *Acta Horticulturae*, **2007**, 943, 297–302.
29. C. Ceballos, H. Fernández, *Food Res. Int.*, **2000.** 33(5), 357–365.
30. Arteaga, J. F., M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, Rodríguez-Mellado: *Molecules*, **2012.**, 17, 5126–5138.
31. F. Gao, D. Zheng, H. Tanaka, F. Zhan, X. Yuan., F. Gao, Q. Wang., *Mater. Sci. Eng. C*, **2015.**, 57, 279–287.
32. M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, *Food Chem.*, **2011.**, 124(3), 1208–1216.
33. M. J. Aguirre, Y.Y. Chen, M. Isaacs, B. Matsuhir, L. Mendoza, S. Torres, *Food Chem.*, **2010.**, 121(1), 44–48
34. G. Ziyatdinova, I. Salikhova, H. Budnikov, *Talanta*, **2014.**, 125, 378–384.
35. F.M., A. Lino, L.Z. Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis, P. C.Ghedini, E. S. Gil, *Electrochimica Acta*, **2014.**, 128, 25–31.
36. E. O. Baldeón, M. Alcañiz, R. Masot, E. M. Fuentes, J. M. Barat, R. Grau, *Food Control*, **2015.**, 54, 181–187
37. Korotkova, E. I., Karbainov, Y. A, & Shevchuk, A. V.: *J. Electroanal. Chem.*, **2007.**, 518(C), 56–60.
38. B. K. Glód, I. Kiersztyn, P. Piszcz, *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 719, 24–29.
39. B. Liu, L. Luo, Y. Ding, X. Si, Y. Wei, X. Ouyang, D. Xu, *Electrochim. Acta*, **2014**, 142, 336–342.
40. L. Barros, L. Cabrita, M. V. Boas, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.* **2011**, 127, 1600–1608.

41. A. Ensafi, M. Taei, T. Khayamian. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, 633, 212–220.
42. Y. Yang, J. Zhou, H. Zhang, P. Gai, X. Zhang, J. Chen. *Talanta*, **2013**, 106, 206–211.
43. D. Airado-Rodríguez, T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, *Food Chem.* **2010**, 122, 1320–1326.
44. M. F. Barroso, C. Delerue-Matos, M. B. P. P. Oliveira, *Food Chem.* **2012**, 132, 1055–1062.
45. S. Noel Robledo, M. Alicia Zón, C. Daniel Ceballos, H. Fernández. *Food Chem.* **2011**, 127, 1361–1369.
46. I. Novak, M. Seruga, Š. Komorsky-Lovric, *Food Chem.*, **2010**, 122, 1283–1289.
47. I. Novak, M. Seruga, S. Komorsky-Lovric, M. Šeruga, Š. Komorsky-Lovrić, *J. Electroanal. Chem.*, **2009**, 631, 71–75.
48. J. V. Piovesan, C. L. Jost, A. Spinelli. *Sens. Actuators B Chem.*, **2015**, 216, 192–197.
49. R. Abdel-Hamid, E. F. Newair. *J. Electroanal. Chem.*, **2011**, 657, 107–112.
50. R. de Q. Ferreira, L. A. Avaca. *Electroanalysis*, **2008**, 20, 1323–1329.
51. R. de Q. Ferreira, S. J. Greco, M. Delarmelina, K. C. Weber. *Electrochimica Acta*, **2015**, 163, 161–166.
52. G. I. R. C. De León, M. G. Hernández, A. M. D. Ramírez, J. R. M. López, G. Alarcón Ángeles, A. M. Pérez. *ECS Transactions*, **2011**, 36, 401–411.
53. R. Oliveira, F. Bento, C. Sella, L. Thouin, C. Amatore. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 9057–9063.
54. N. Zikos, A. Karaliota, M. Liouni. *J. Anal. Chem.*, **2011**, 66, 859–864.