# Elektrokemijska karakterizacija rutina

**Marčinko, Tajana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:380994

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Tajana Marčinko

# *Elektrokemijska karakterizacija rutina*

Diplomski rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Tajana Marčinko

# *Elektrokemijska karakterizacija rutina*

Diplomski rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović

Osijek, 2017.

***Zahvala***

*Najprije se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović na strpljenju, pomoći i svim korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i ostatku obitelji koji su uvijek vjerovali u mene i bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i riječima ohrabrenja.*

*Također se zahvaljujem svojim kolegama kemičarima, sada mogu reći i prijateljima, koji su uvijek bili oslonac i podrška.*

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA** **Diplomski rad**

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

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA RUTINA**

**Tajana Marčinko**

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju
**Mentor:** doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

**Sažetak**
U ovom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva rutina u različitim puferima (pH = 3,5 do 8,0) cikličkom voltametrijom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Cilj rada bio je ispitati utjecaj pH vrijednosti na potencijal oksidacijskog strujnog vrha rutina, istražiti utjecaj koncentracije rutina i brzinu promjene polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva rutina, te istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta rutina na površinu elektrode od staklastog ugljika. Elektrokemijska mjerenja su provedena u elektrokemijskoj ćeliji s troelektrodnim sustavom, a kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika. Utvrđeno je da je proces oksidacije rutina reverzibilan, ovisan o pH i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona. Potencijal oksidacijskog strujnog vrha rutina linearno se smanjuje s povećanjem pH vrijednosti, dok se struja oksidacijskog strujnog vrha povećava do pH = 5,5 i nakon toga opada (optimalna pH vrijednost za oksidaciju je pH = 5,5). Također je ustanovljeno da povećanjem koncentracije rutina raste visina oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha, te da struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Rezultati su također pokazali da dolazi do adsorpcije rutina i oksidacijskih produkata rutina na površinu elektrode od staklastog ugljika, budući da visina oba oksidacijska strujna vrha rutina opada uzastopnim snimanjem voltamograma za sve pH vrijednosti. U metodičkom dijelu rada obrađena je nova nastavna jedinica „Reakcije oksidacije i redukcije“, koja je predviđena za jedan školski sat. Nastavna jedinica uključuje obradu novog nastavnog sadržaja, pokus, brojne primjere i zadatke za ponavljanje.

**Diplomski rad obuhvaća:** *64 stranice, 37 slika, 3 tablice, 23 literaturna navoda*

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, rutin, oksidacija, redukcija

**Rad je pohranjen:** u Knjižnici Odjela za kemiju, F. Kuhača 20, Osijek

**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. Doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**BASIC DOCUMENTATION CARD** **Diploma Thesis**

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

**ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF RUTIN**

**Tajana Marčinko**

**Thesis completed at:** Department of chemistry
**Supervisor:** Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović

**Abstract**
In this work electrochemical properties of rutin in different buffers (pH = 3,5 to 8,0) was studied by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The main goal of this thesis was to examine the influence of pH on the rutin oxidation peak potential, to investigate the effect of rutin concentration and scan rate on the oxido-reduction properties of rutin and the possible adsorption of the oxidation product of rutin on the surface of the glassy carbon electrode. Electrochemical measurements were carried out in an electrochemical cell with a three electrode system and as a working electrode was used a glassy carbon electrode. It was found that the oxidation process of rutin is reversible, pH dependent and involves the exchange of two protons and two electrons. The oxidation peak potential of the rutin decreases linearly by increasing the pH value, while the oxidation peak current increases to pH = 5,5 and then decreases (the optimum pH for oxidation is pH = 5,5). It has also been found that the increase of rutin concentration and scan rate increases the oxidation and reduction peak current. The results also showed that the adsorption of rutin and its oxidation products on the surface of the glassy carbon electrode occurs since the height of both oxidation peaks of rutin decreases with successive scans for all pH values. In the methodological part of the thesis, a new teaching unit "Oxidation and Reduction Reactions" is provided, which is foreseen for one class. The teaching unit includes the processing of new teaching content, experiment, numerous examples and repetition tasks.

**Thesis includes:** *64 pages, 37 figures, 3 tables, 23 references*

**Original in:** Croatian

**Keywords:** cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, rutin, oxidation, reduction

**Thesis deposited:** at the Library of Department of Chemistry, F. Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

**Reviewers:**

1. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić
2. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović
3. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik

**SADRŽAJ:**

1. UVOD ..... 1

2. LITERATURNI PREGLED ..... 2

2.1. Polifenolni spojevi ..... 2

2.1.1. Mehanizam djelovanja polifenola kao antioksidansa ..... 4

2.1.2. Flavonoidi ..... 5

*2.1.2.1. Podjela i kemijska struktura flavonoida ..... 5*

*2.1.2.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida ..... 9*

*2.1.2.3. Metabolizam flavonoida kod ljudi ..... 11*

2.1.3. Rutin ..... 12

*2.1.3.1. Neka farmakološka djelovanja rutina ..... 13*

*2.1.3.2. Odnos strukture i aktivnosti rutina ..... 14*

*2.1.3.3. Elektrokemijska svojstva rutina ..... 14*

2.2. Metode karakterizacije polifenolnih spojeva (flavonoida) ..... 15

2.2.1. Elektroanalitičke metode ..... 15

2.2.2. Elektrokemijske metode karakterizacije polifenolnih spojeva (flavonoida)-VOLTAMETRIJA ..... 16

*2.2.2.1. Ciklička voltametrija ..... 17*

*2.2.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija ..... 19*

2.3. Kompleksi flavonoida i metala ..... 20

3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 21

3.1. Kemikalije i priprava otopina ..... 21

3.2. Elektrokemijska ćelija ..... 22

3.2.1. Radna elektroda ..... 22
3.2.2. Protuelektroda ..... 23
3.2.3. Referentna elektroda ..... 23

3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja ..... 24
3.3.1. Ciklička voltametrija ..... 24
3.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija ..... 24

4. REZULTATI ..... 25

4.1. Ciklička voltametrija ..... 25
4.1.1. Utjecaj koncentracije ..... 35

4.2. Diferencijalna pulsna voltametrija ..... 36
4.2.1. Utjecaj pH ..... 42

5. RASPRAVA ..... 44

5.1. Ciklička voltametrija ..... 44

5.2. Diferencijalna pulsna voltametrija ..... 46

5.3. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije rutina ..... 49

6. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE „REAKCIJE OKSIDACIJE I REDUKCIJE“ ..... 50

ZADATCI ZA PONAVLJANJE ..... 60

7. ZAKLJUČAK ..... 62

8. LITERATURA ..... 63

# 1. UVOD

Rutin pripada skupini polifenolnih spojeva, koji čine grupu hormona, vitamina i antioksidansa u hrani. On je jedan od biološki najaktivnijih flavonoida kojeg najviše ima u biljkama. Može djelovati kao antioksidans, antibakterijski, protuupalno i može spriječiti nastajanje tumora.

Cilj ovog rada je odrediti elektrokemijska svojstva rutina; odnosno ispitati utjecaj pH vrijednosti na potencijal oksidacijskog strujnog vrha rutina, istražiti utjecaj koncentracije rutina, zatim promjene brzine polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva rutina te istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta rutina na površinu elektrode od staklastog ugljika.

U literaturnom pregledu opisani su polifenolni spojevi, njihova podjela i važnost te svojstva rutina. Također je dan uvid u farmakološka djelovanja rutina i opisane su korištene tehnike i aparatura za elektrokemijska mjerenja.

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su dvije elektrokemijske tehnike: ciklička voltametrija i diferencijalna pulsna voltametrija. Navedeni su uvjeti pri kojima se provode elektrokemijska mjerenja, te su prikazani dobiveni rezultati i dana su njihova objašnjenja.

U metodičkom dijelu rada obrađena je nova nastavna jedinica „Reakcije oksidacije i redukcije“ za treći razred gimnazije. Osim pripreme za izvođenje nastavnog sata, ovaj dio sadrži radni listić s pokusom te radni listić za ponavljanje obrađene nastavne jedinice.

# 2. LITERATURNI PREGLED

## 2.1. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi ili polifenoli čine jednu veliku skupinu organskih molekula, biljnog podrijetla. Osnovna struktura polifenola je aromatski prsten, na koji je vezan jedan ili više hidroksilnih supstituenata, pa osim jednostavnih fenolnih molekula ($C_6$), postoje kompleksniji spojevi $(C_6\text{-}C_3\text{-}C_6)_n$. Veći broj polifenola prisutan je u konjugiranom obliku (s mono- i polisaharidima), a postoje i derivati navedenih spojeva poput estera i metilestera [1]. Polifenoli su u prirodi često podijeljeni, što je posljedica njihove velike strukturne raznolikosti. Najčešće se, prema razlikama u strukturi, dijele u četiri skupine:

1. Fenolne kiseline
2. Stilbeni
3. Lignani
4. Flavonoidi

Navedene osnovne skupine polifenola podijeljene su u niz podskupina kao što su: monohidroksibenzojeva kiselina, dihidroksibenzojeva kiselina, flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, monomerni stilbeni, oligomerni stilbeni, derivati tetrahidrofurana i mnoge druge [2].

Fenolne kiseline su najjednostavniji polifenolni spojevi, čija se struktura bazira na aromatskom prstenu koji ima najmanje jednu hidroksilnu skupinu. Možemo ih podijeliti u dvije skupine; prvoj skupini pripadaju derivati hidroksibenzojeve kiseline, a drugoj skupini derivati hidroksicimetne kiseline [3].

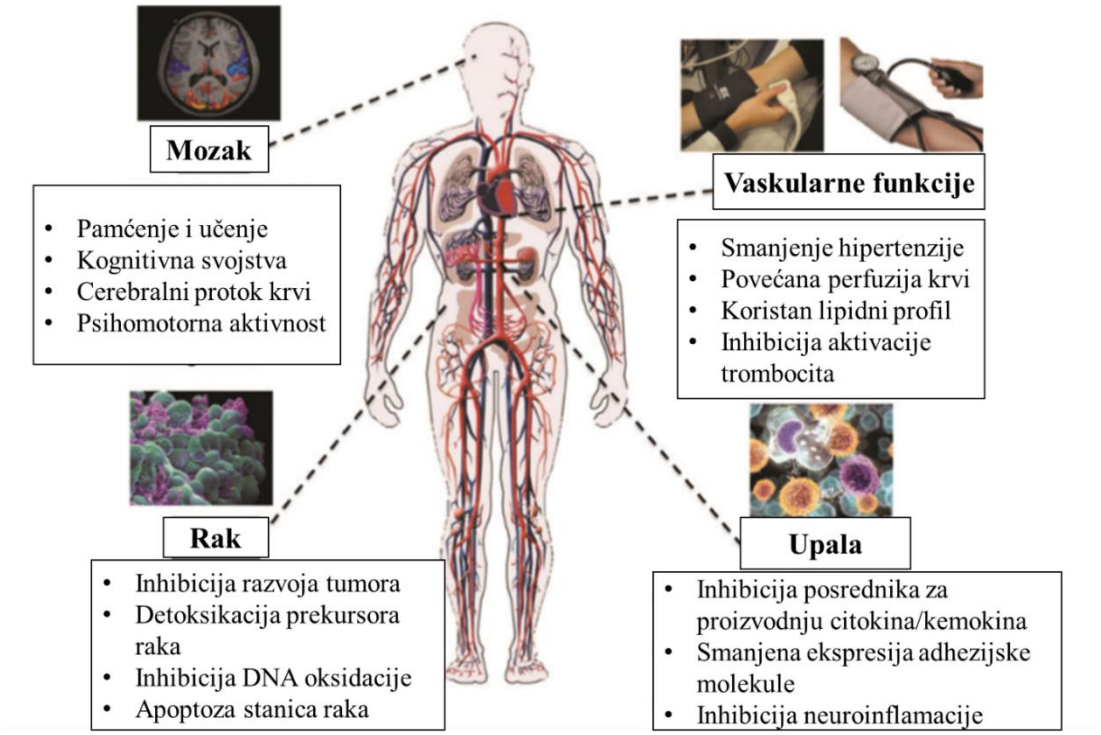
Stilbeni su polifenolni spojevi koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida. Njihova funkcionalna skupina je 1,2-difenileten [3].

Lignani su prirodni polifenoli koji su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, kao prirodne obrambene tvari [4].

Najviše istražena skupina polifenola su flavonoidi, koji su u prirodi najčešće vezani s molekulama šećera. Na taj način, stvaraju glikozide, kod kojih je jedna ili više hidroksilnih skupina flavonoida vezana na molekulu šećera [3].

Poznato je da neki prirodni izvori sadrže velike količine polifenola uključujući: jabuke, brusnice, crveno grožđe, borovnice, crni čaj, sok od šipka, crveno vino, zeleni čaj, crveni luk, jagode, banane, kukuruz, lubenice, kivi, šljive i još niz voća i povrća.

Polifenolni spojevi su potencijalno preventivna i terapeutska sredstva za niz bolesti, kao što su: Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, dijabetes, sindrom kroničnog umora, razni oblici raka, kardiovaskularne bolesti, autizam i mnoge druge (Slika 1). Oksidacijska svojstva polifenola su u većini slučajeva zaslužna za njihove korisne učinke [2]. Oni također osim oksidacijskih svojstava, imaju i druge važne uloge; djeluju protuupalno (polifenoli inhibiraju prostanglandine koji za vrijeme upalnog procesa izazivaju visoku temperaturu i osjet boli), antibakterijski, antimikrobno (protiv bakterija i gljivica) i sudjeluju u postupku prijenosa iona [3].

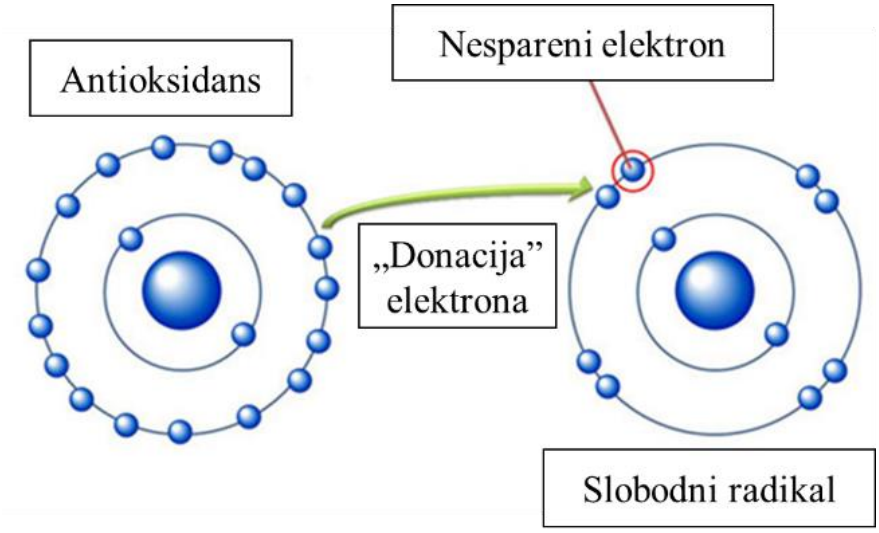



**Slika 1.** Potencijalne zdravstvene koristi polifenolnih spojeva [5].

### 2.1.1. Mehanizam djelovanja polifenola kao antioksidansa

Brojna istraživanja u posljednjih nekoliko godina, su pokazala da namirnice koje sadrže polifenolne spojeve imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi, upravo zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja (Slika 2).

Postoji nekoliko mehanizama prema kojima polifenolni spojevi pokazuju svoje antioksidacijsko djelovanje. Između nekoliko mogućih mehanizama, postavljena je hipoteza, da polifenoli posebno traže i „hvataju“ slobodne radikale i vežu ih [2].




**Slika 2.** Prikaz interakcije antioksidansa (elektron donora) i slobodnog radikala (elektron akceptora) [6].

Reaktivna vrsta kisika (ROS) je grupa molekula nastalih iz metaboličkih reakcija unutar aerobnih organizama. Ta vrsta uključuje: superokside ($O_2^{-}\cdot$), hidroksilne radikale ($\cdot OH$) i vodikov peroksid ($H_2O_2$). Radikalni mehanizmi su vrlo jednostavni, ali nisu pouzdani u slučaju vrlo reaktivnih radikala (poput hidroksilnog radikala), koji reagiraju s gotovo svim organskim spojevima unutar stanice [2].

S druge strane, pretpostavlja se da polifenoli vežu slobodne metale (posebno željezo) unutar stanica, čime se sprječava napredovanje Fentonove reakcije. Fentonova reakcija je reakcijski put kroz koji slobodno željezo ($Fe^{2+}$) reagira s vodikovim peroksidom, kako bi nastao hidroksilni radikal. Ova hipoteza je ispitivana na temelju činjenice da je u normalnom fiziološkom stanju čovjeka koncentracija željeza gotovo zanemariva [2].

Ipak, u nekim bolestima kao što je Alzheimerova, koncentracija željeza nije zanemariva i primarni je doprinos oksidativnom stresu. Reaktivne vrste kisika su fiziološki važne jer su ključne u nekim signalnim putevima stanice, ali isto tako mogu imati štetan fiziološki učinak (superoksidi i hiroksilni radikali nanose štetu DNA). Oksidativni stres, uzrokovan ROS-om povezan je s pojavom nekih oblika raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest [2].

### 2.1.2. Flavonoidi

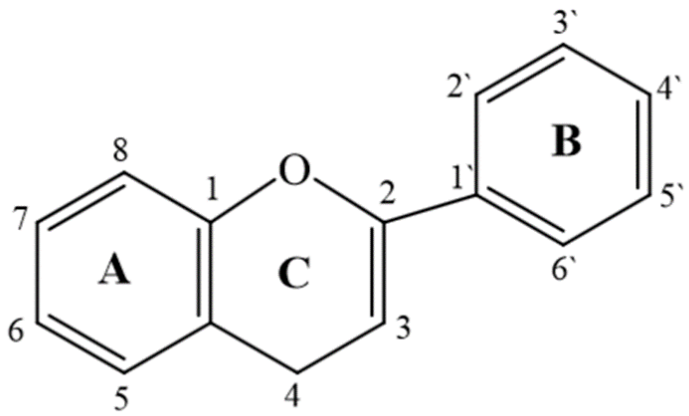
Flavonoidi su najveća grupa polifenolnih spojeva koji su prisutni u biljkama (lišću, cvijeću, kori drveća, sjemenkama). Mnogi flavonoidi su prisutni u ljekovitim biljkama, gdje su pokazali izvrsna antioksidacijska i antiradikalska svojstva. Ti spojevi su vrlo važni jer imaju mnoga terapijska djelovanja (protuupalno, antibakterijsko, antialergijsko, antikancerogeno), a čak utječu na okus i boju hrane. Kao što flavonoidi pozitivno utječu na biljke (zaštita od UV zračenja, antioksidacijski, antimikrobno...), isto tako pozitivno utječu i na druga živa bića. Flavonoidi imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala, sposobnost stvaranja kompleksa s metalnim ionima-kelirajuće djelovanje ($Fe^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$ i $Mg^{2+}$), sposobnost aktiviranja antioksidacijskih enzima, te sposobnost inhibiranja oksidaza [7]. Zatim, mogu djelovati kao slaba estrogenska sredstva, kao protivnici kontroliranja endogenog hormonskog djelovanja, te mogu imati antiproliferativno djelovanje kod tumora (inhibiraju rast tumorskih stanica). Svi flavonoidi su elektroaktivni (sudjeluju u reakcijama oksidacije ili redukcije) i mogu se ispitati elektrokemijskim metodama [8].

#### *2.1.2.1. Podjela i kemijska struktura flavonoida*

Po kemijskom sastavu, flavonoidi su polifenolni spojevi male molekulske mase. Nastaju kombinacijom derivata, sintetiziranih iz fenilalanina i octene kiseline. Prvi korak uključuje stvaranje fenilalanina iz fenilpiruvata, koji prelazi u *trans*-cimetnu kiselinu, koja se zatim sintetizira u *p*-kumarinsku kiselinu (C-9). C-9 kiseline se kondenziraju s tri C-2 (malonil-CoA) jedinice, kako bi nastao C-15 halkon. Nakon zatvaranja prstena i hidrolize

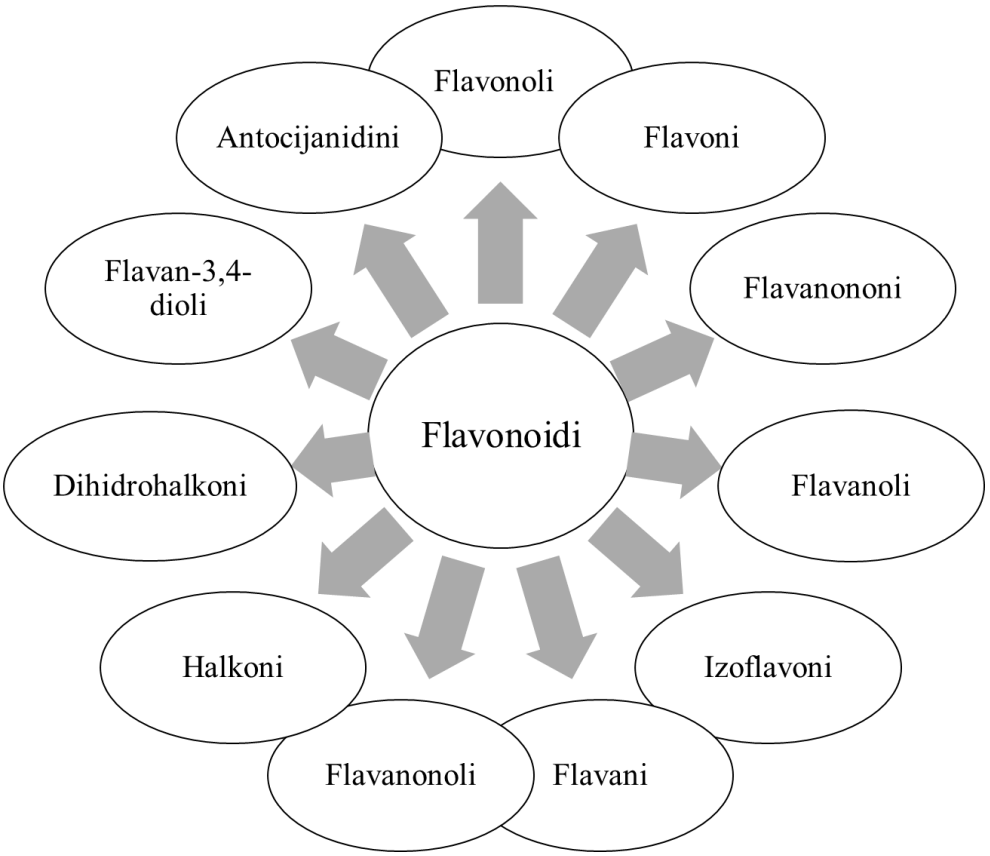
nastaju spojevi, primjerice 3-hidroksiflavonoidi (katehin) i 3,4-diolflavonoidi (flavonoli) [9].

Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri, koja se sastoji od tri fenolna prstena A, B i C (Slika 3). Benzenski prsten A je kondenziran sa šesteročlanim prstenom C, koji na C-2 ugljikovom atomu ima vezan supstituent, odnosno fenil-benzenski prsten (B). Prsten C može biti heterociklički piran iz kojeg se dobivaju flavanoli (katehin) i antocijanidini; a može biti heterociklički piron iz kojeg se dobivaju flavonoli, flavoni i flavanoni [9].

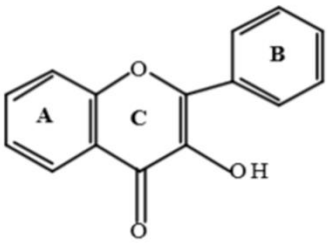



**Slika 3.** Osnovna struktura molekule flavonoida [1].

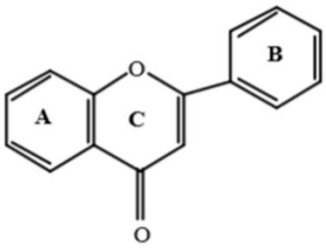
Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko skupina (Shema 1), prema strukturnim razlikama u prstenu C (Slika 4) [1]:



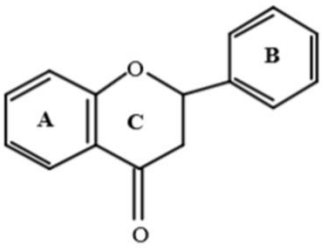

**Shema 1.** Podjela flavonoida na podskupine.



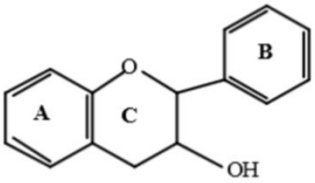

Flavonol



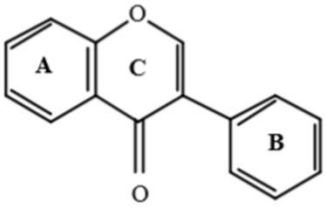

Flavon



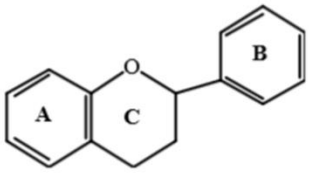

Flavanon



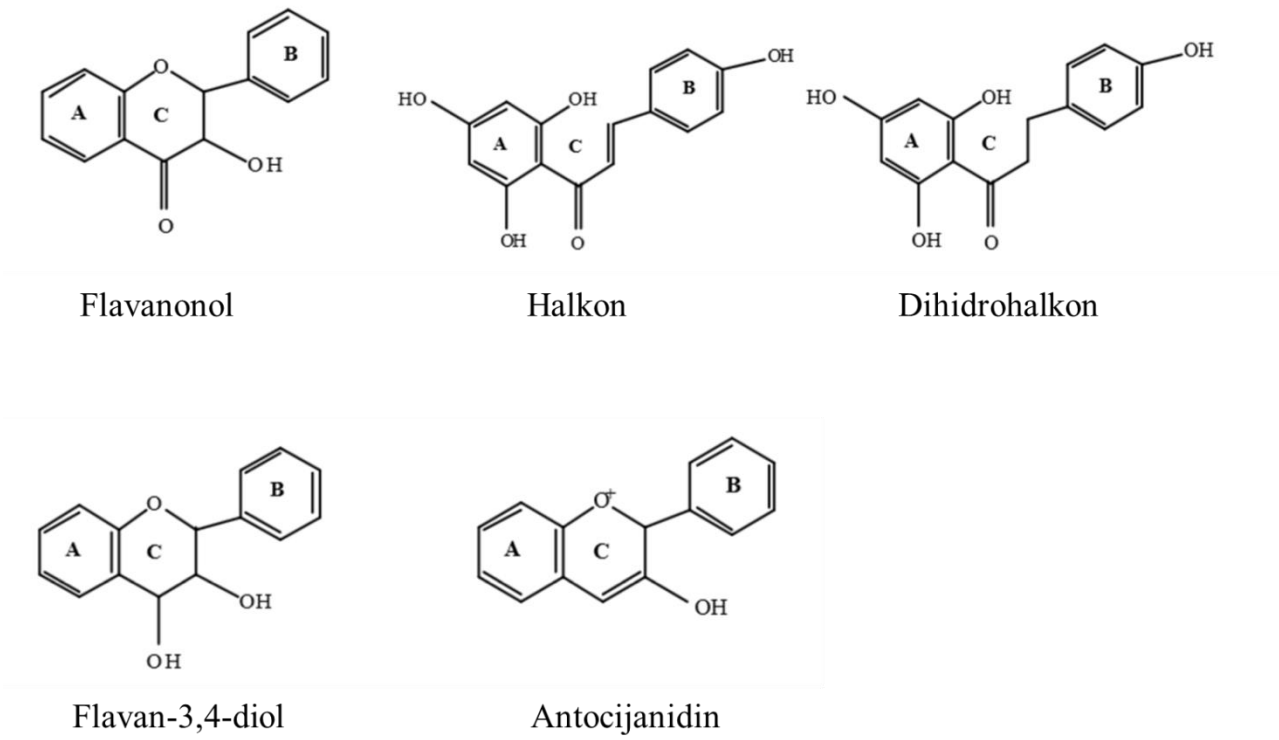

Flavanol




Izoflavon




Flavan




**Slika 4.** Prikaz struktura podskupina flavonoida [1].

Većina nabrojanih flavonoida postoje kao glikozidi, mogu se hidroksilirati i metoksilirati (s monosaharidima ili oligosaharidima), te se većina njih može umrežavati i polimerizirati [7].

Upravo, o gore navedenim karakteristikama i strukturnoj raspodjeli flavonoida, ovise njihova kemijska svojstva.

Glikolizacija se kod većine flavonoida odvija na C-7 ugljikovom atomu, na koji je vezana hidroksilna skupina; posebice kod flavona, izoflavona i dihidroflavona. Kod flavonola i dihidroflavonola proces glikolize se odvija na C-3 i C-7 ugljikovim atomima na kojima su vezane hidroksilne skupine, dok se kod antocijanida glikoliza odvija na hidroksilnim skupinama vezanim na C-3 i C-5 ugljikovim atomima. Glukoza (monosaharid), je šećer koji u većini slučajeva sudjeluje u glikolizi. Galaktoza, ramnoza i ksiloza su također monosaharidne molekule koje se isto tako javljaju tj. sudjeluju u procesu glikolize [1].

**Flavonoli** su prisutni u hrani (jabuke, bobice, crveno grožđe, luk, crveno vino, čajevi, poriluk, brokula…). U skupinu flavonola ubrajaju se: kvercetin, rutin i kempferol.

Kvercetin je najzastupljeniji u kori jabuke, dok konzumiranje crnog i zelenog čaja najviše doprinosi unosu drugih flavonola [10].

U skupinu **flavanola** spadaju katehin, galokatehin i srodni spojevi. Dobar izvor ovih spojeva su: različite vrste bobica, trešnje, grožđe, šljive, marelice, crno vino, čokolada te jabuke [10].

**Antocijanidini** su prirodni pigmenti u biljkama, pokazuju plavu, ljubičastu i crvenu boju. Ljubičaste bobice, jabuke, trešnje, šipak, crveno vino, kupus, luk i rotkvice su namirnice koje su bogate ovim spojevima. Predstavnici ove skupine su: cijanidini, delfinidini, malvidini i srodni glikozidi [10].

**Izoflavoni** se nalaze u mahunarkama i posebnoj vrsti soje. Izoflavonima pripadaju genisten i daidzen. Oni imaju estrogensku aktivnost i mogu se vezati na receptore estrogena [10].

Predstavnici skupine **flavanona** su: hesperidin, naringenin i taksifolin. Ovi spojevi se najčešće nalaze u agrumima, a u manjoj količini su prisutni u rajčicama i menti [10].

**Flavoni** su manje uobičajeni flavonoidi i mogu se naći u celeru, peršinu i kamilici. Ovim spojevima pripadaju: luteolin, apigenin i krisin [10].

Podskupine flavonoida međusobno se razlikuju po broju i rasporedu hidroksilnih skupina te stupnju glikolizacije. Za ljudsku prehranu, od svih podskupina flavonoida, najvažniji su **procijanidini.** Ti spojevi se sastoje od monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina [7].

#### *2.1.2.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida*

Kao što je do sada već nekoliko puta navedeno, flavonoidi, odnosno polifenolni spojevi, imaju dobra oksidacijska svojstva tj. djeluju kao antioksidansi. Flavonoidi najčešće „hvataju“ slobodne radikale kako bi nastao flavonoidni fenoksidni radikal (Fl-O·), koji je manje reaktivan:

$$ROO\cdot + Fl\text{-}RO \longrightarrow OH + Fl\text{-}O\cdot$$

$$HO\cdot + Fl\text{-}OH \longrightarrow H_2O + Fl\text{-}O\cdot$$

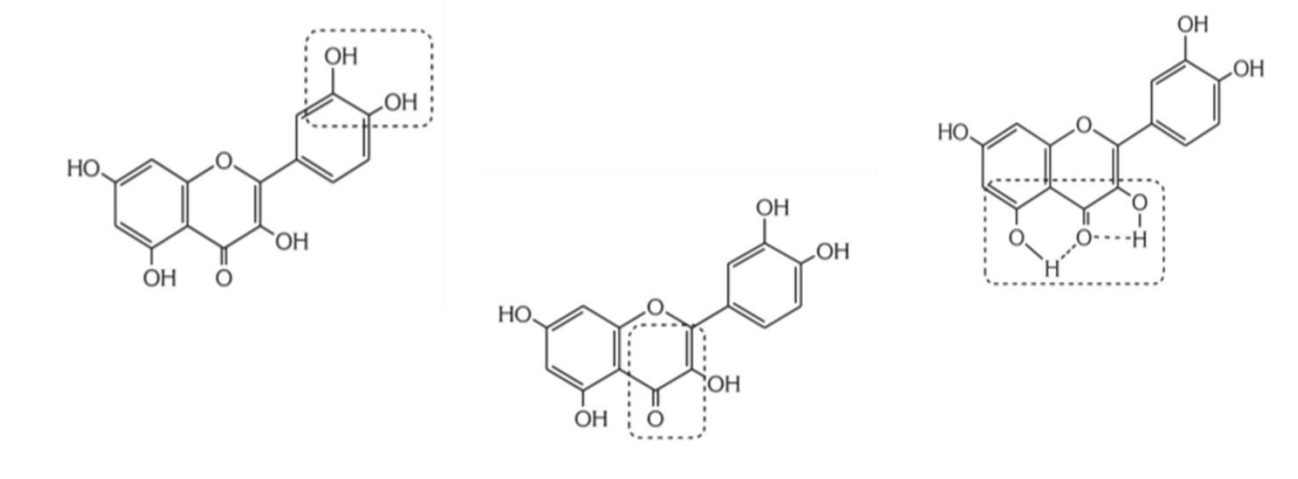
Flavonoidi moraju zadovoljiti dva uvjeta da bi djelovali kao antioksidansi:

1. kada je flavonoid prisutan u maloj koncentraciji, u odnosu na tvar koja je podložna oksidaciji, on mora djelovati tako da usporava ili čak sprječava reakciju oksidacije
2. radikal koji nastaje iz flavonoida, mora biti stabilan, kako ne bi poticao lančanu reakciju

Radikali se najčešće stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim radikalom [7].

Kod flavonoida, postoje određene strukturne karakteristike (Slika 5), koje određuju njihovu antioksidacijsku aktivnost:

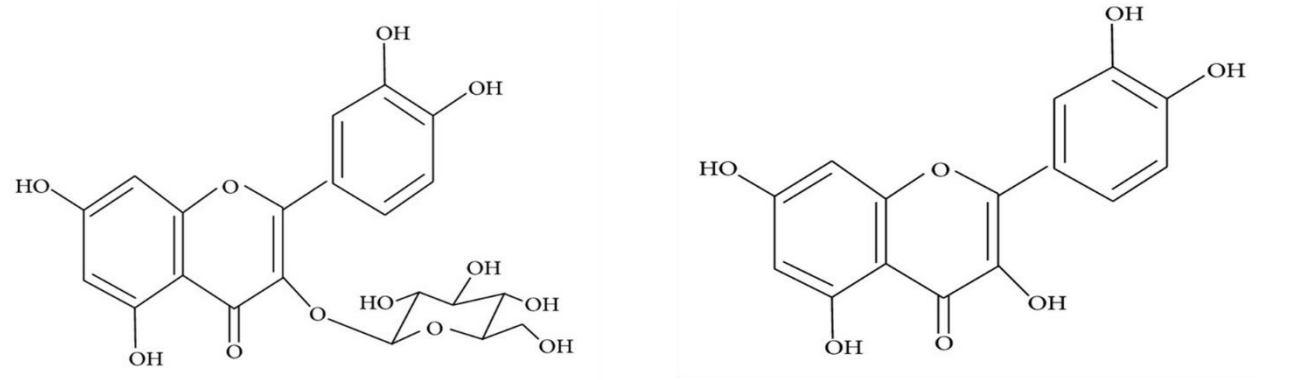
a) u prstenu B, prisutna je *o*-dihidroksilna tj. kateholna struktura, koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona, odnosno povećava antioksidacijski kapacitet,
b) antioksidacijski kapacitet flavonoida, je veći kod onih flavonoida, kod kojih je prisutna hidroksilna skupina na 3'-, 4'-, 5'- ugljikovom atomu u prstenu B, u odnosu na one flavonoide koji imaju samo jednu hidroksilnu skupinu,
c) u prstenu C, dvostruka veza između C-2 i C-3 ugljikovih atoma konjugirana s 4-okso skupinom, povećava sposobnost vezanja slobodnih radikala,
d) u prstenu C, dvostruka veza između C-2 i C-3 ugljikovih atoma u kombinaciji s 3-OH skupinom, također povećava sposobnost vezanja slobodnih radikala,
e) u prstenu B, supstitucija hidroksilnih skupina s metoksilnim skupinama, mijenja redoks potencijal flavonoida, što utječe na sposobnost vezanja slobodnih radikala, a ujedno i na antioksidacijski kapacitet [1, 7].




**Slika 5.** Neke strukturne skupine koje su važne za antioksidacijsku aktivnost flavonoida [7].

### *2.1.2.3. Metabolizam flavonoida kod ljudi*

Apsorpcija flavonoida oslobođenih iz hrane žvakanjem, ovisit će o nekim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su: veličina molekula, konfiguracija, lipofilnost, topivost i pKa vrijednost. Flavonoidi se mogu apsorbirati iz tankog crijeva ili moraju prijeći do debelog crijeva prije procesa apsorpcije, što ovisi o kemijskoj strukturi flavonoida, odnosno da li je glikozid ili aglikon. Većina flavonoida (osim podklase katehina) prisutna je u biljkama vezanim za šećere kao *β*-glikozidi (Slika 6).




(a) (b)

**Slika 6.** Struktura flavonoid glikozida (a) i struktura aglikonskog flavonoida (b) [11].

Aglikoni se lako apsorbiraju u tankom crijevu, dok se flavonoidni glikozidi moraju pretvoriti u oblik aglikona [11].

Hidrofilni flavonoidni glikozidi (npr. kvercetin) prenose se preko tankog crijeva uz pomoć intestinalnog kotransportera glukoze, ovisnog o koncentraciji $Na^+$ iona. Alternativni mehanizam sugerira da su flavonoidni glikozidi hidrolizirani uz pomoć laktaze florizin hidrolaze (LPH), a *β*-glukozidaze na vanjskoj granici membrane tankog crijeva. Nakon toga se oslobođeni aglikon može apsorbirati iz tankog crijeva. Supstratna specifičnost LPH enzima značajno varira u širokom rasponu glikozida flavonoida. Glikozidi, koji nisu supstrati za ove enzime se prenose prema debelom crijevu, gdje bakterije imaju sposobnost hidrolize flavonoidnih glikozida, ali istovremeno će razgraditi oslobođene flavonoidne aglikone. Budući da je apsorpcijska sposobnost debelog crijeva puno manja od tankog crijeva, očekuje se samo beznačajna apsorpcija tih glikozida [11].

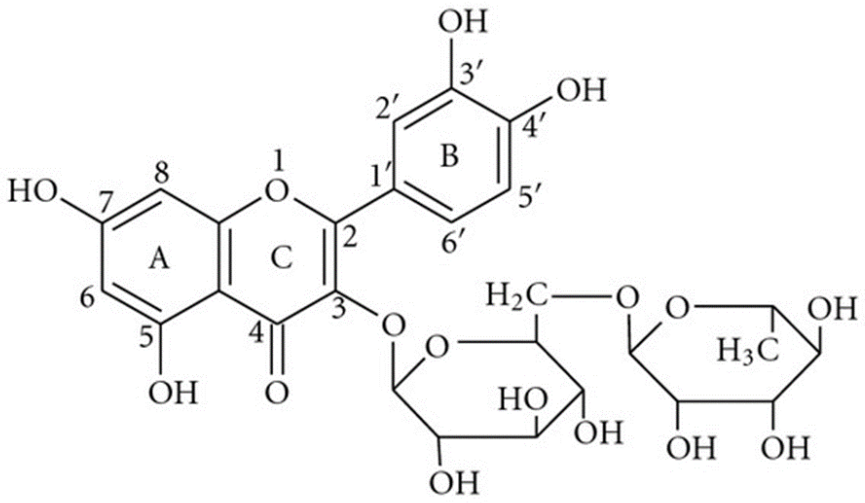
Nakon apsorpcije, flavonoidi su konjugirani u jetri glukoronidacijom, sulfatiranjem, metiliranjem ili metabolizirani na manje fenolne spojeve. Zbog tih reakcija konjugacije, u plazmi ili urinu se mogu naći slobodni flavonoidni aglikoni, osim katehina. Ovisno o izvoru hrane, bioraspoloživost određenih flavonoida se uvelike razlikuje. Na primjer, apsorpcija kvercetina iz luka je četiri puta veća nego iz jabuke ili čaja. Oligomerni flavonoidi se mogu hidrolizirati u dimere i monomere pod utjecajem kiselih tvari u želucu. Šećerni dio flavonoidnih glikozida je važna odrednica njihove bioraspoloživosti, a također se pokazalo da dimerizacija smanjuje bioraspoloživost. Od svih podskupina flavonoida, najveću bioraspoloživost pokazuju izoflavoni [11].

### 2.1.3. Rutin

Flavonoidi tj. polifenolni spojevi, jedna su od važnih skupina biljnih derivata, jer je oko 4000 vrsta flavonoida, pronađeno u biljkama. Rutin (3', 4', 5, 7-tetrahidroksiflavon-3*β*-D-rutinozid) je flavonol, pronađen u biljkama (heljda, čaj, jabuka). Osim naziva rutin, za ovaj spoj koriste se i druga imena, rutinozid ili kvercetin-3-rutinozid. Ime „rutin“ potječe od biljke *Ruta graveolens* koja također sadrži rutin [12]. On je jedan od najatraktivnijih bioaktivnih flavonoida, također poznat kao vitamin P; a smatra se aktivirajućim faktorom za vitamin C [8].

Struktura rutina (Slika 7), sastoji se od aglikona kvercetina i disaharida rutinozida, koji je vezan za kvercetin na C-3 ugljikovom atomu C prstena [13].

Rutin ima izražena farmakološka svojstva, kao što su: antitumorska, protuupalna, antivirusna, te ima dobra oksidacijska svojstva. Isto tako, korišten je u liječenju vaskularnih bolesti, jer ojačava stjenke krvnih žila i regulira njihovu permeabilnost [14].




**Slika 7.** Kemijska struktura rutina [13].

### *2.1.3.1. Neka farmakološka djelovanja rutina*

**a) Središnji živčani sustav**

Antikonvulzivna aktivnost: Rutin posjeduje antikonvulzivnu aktivnost i čini se prilično siguran za pacijente s epilepsijom. On ne mijenja aktivnost antiepileptičnih lijekova, niti pokazuje bilo kakve štetne učinke [12].

**b) Kardiovaskularni sustav**

Hipertenzija: Heljda, bogat izvor rutina, je pokazala antihipertenzivni učinak [12].

**c) Antikancerogeni učinak**

Rak uključuje skupinu bolesti koje su karakterizirane abnormalnim rastom stanica, koje napadaju druge dijelove tijela i šire se na njih. U nekim istraživanjima, pokazano je kako rutin uzrokuje značajno smanjenje veličine tumora, te inhibira rast stanica karcinoma uslijed staničnog ciklusa [12].

**d) Kemoterapijska aktivnost**

Antibakterijska aktivnost: Rutin se također koristi u svrhu proučavanja njegove antimikrobne aktivnosti protiv različitih spojeva bakterija. Istraživanja su pokazala da je rutin, inhibiranjem DNA izomeraze IV, pokazao antibakterijsko djelovanje protiv Esherichie coli [12].

### *2.1.3.2. Odnos strukture i aktivnosti rutina*

Keto skupina na C-4 ugljikovom atomu i dvostruka veza između C-2 i C-3 ugljikovih atoma u prstenu C u rutinu, mogu biti povezane s njegovim neuroprotektivnim djelovanjem.

Prisutnost šećernog dijela, nema značajnog utjecaja na ileum crijeva, što dokazuje da prisustvo supstitucije šećera, smanjuje biološku aktivnost flavonoida.

Hidroksilne grupe na C-5 i C-7 ugljikovim atomima A prstena i C-3` i C-4` ugljikovim atomima u B prstenu rutina, dvostruka veza između C-2 i C-3 ugljikovih atoma u C prstenu, te keto skupina na C-4 ugljikovom atomu C prstena povećavaju antioksidacijsku aktivnost rutina.

Rutin, koji na C-3 ugljikovom atomu C prstena ima vezan šećer rutinozid, ima manje izraženu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na aglikon kvercetin gdje je na C-3 ugljikovom atomu vezana hidroksilna skupina.

Fenolna skupina u rutinu, donira vodik za uklanjanje induciranih radikala, te inhibira oksidacijski stres uzrokovan zračenjem [12].

### *2.1.3.3. Elektrokemijska svojstva rutina*

Rutin se najčešće određuje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, kapilarnom elektroforezom, spektrofotometrijom i kemiluminiscencijskim tehnikama. Rutin je elektroaktivna tvar i upravo zbog toga se može određivati i elektrokemijskim tehnikama [13].

## 2.2. Metode karakterizacije polifenolnih spojeva (flavonoida)

Polifenolni spojevi se u biološkim materijalima karakteriziraju pomoću različitih metoda:

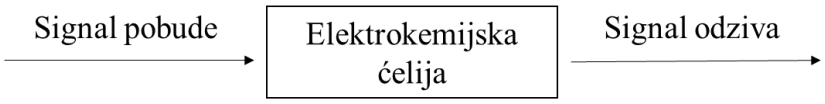
- Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)
- Spektroskopskim metodama (UV/VIS, FTIR, MS, NMR)
- Elektroforetskim tehnikama (kapilarna elektroforeza)
- Elektrokemijskim metodama (ciklička voltametrija, voltametrija s linearnom promjenom potencijala, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija)

U ovom radu su za ispitivanje rutina korištene dvije voltametrijske metode: ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija [1].

### 2.2.1. Elektroanalitičke metode

Sve elektroanalitičke metode su međusobno slične, jer se elektrokemijska reakcija kod svih metoda, odvija na radnoj odnosno indikatorskoj elektrodi, koja je smještena u elektrokemijskoj ćeliji. Posljedica elektrokemijske reakcije je analogna električna veličina tj. signal odziva, čijim se mjerenjem dobiva željeni analitički ili neki drugi podatak o ispitivanoj tvari (Shema 2).

Signal odziva može nastati pod utjecajem signala pobude (dovodimo ga na radnu elektrodu) ili nastaje kao posljedica prisutnosti određene molekulske vrste u otopini (prilikom uporabe indikatorske elektrode) [15].




**Shema 2.** Izvedba elektroanalitičkog mjerenja [15].

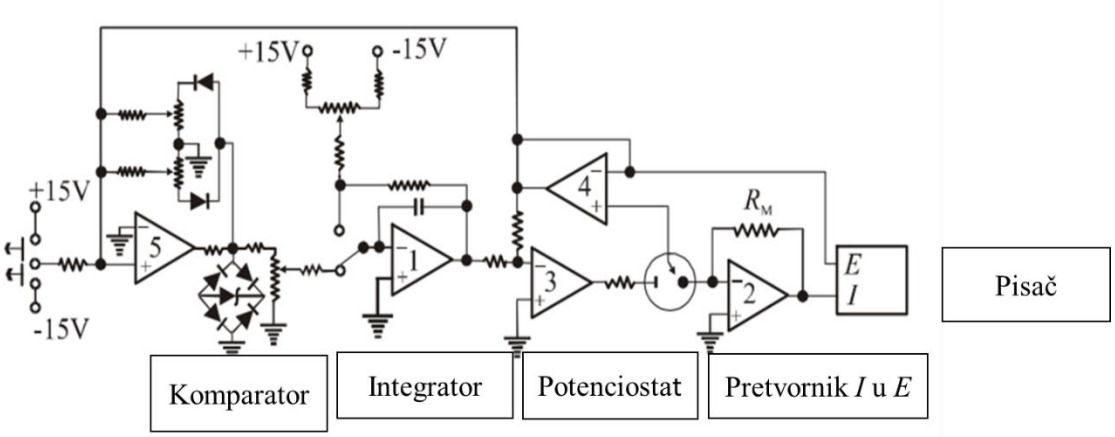
### 2.2.2. Elektrokemijske metode karakterizacije polifenolnih spojeva (flavonoida)- VOLTAMETRIJA

Otkriću voltametrije, prethodi polarografija, koju je u ranim dvadesetim godinama otkrio češki kemičar Jaroslav Heyrovsky, koji je 1959. godine dobio Nobelovu nagradu.
Voltametrija je skupina elektroanalitičkih metoda kod kojih se podatci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje (signal odziva) u ovisnosti o električnom naponu (signal pobude), ali uz uvjete koji izazivaju polarizaciju, bilo indikatorske ili radne elektrode [16]. Ime „voltametrija“ potječe od skraćenice: volt-amper-metrija [17].

Ako se na elektrodu koja je uronjena u otopinu, koja sadrži neku elektroaktivnu tvar, narine određeni potencijal, doći će do polarizacije na elektrodi. Elektroaktivna tvar će se oksidirati ili reducirati, kada potencijal elektrode dosegne vrijednost na kojoj dolazi do prijelaza elektrona između elektrode i elektroaktivne tvari u otopini. Kroz otopinu tada počinje teći struja čija jakost ovisi o koncentraciji elektroaktivne tvari u graničnom sloju uz površinu elektrode, ali i o koncentraciji elektroaktivne tvari u otopini. Grafički prikaz signala odziva u voltametriji (voltamogram) za pojedinu voltametrijsku tehniku uvjetovan je oblikom naponske pobude i brzinom promjene potencijala [17].

Voltametrija ima primjenu u anorganskoj i fizikalnoj kemiji te biokemiji. Pomoću nje se proučavaju procesi oksidacije i redukcije u različitim sredstvima, te adsorpcijski procesi i mehanizmi prijenosa elektrona na površinama elektroda. Također se primjenjuje u istraživanju elektrokemijskih procesa, a veliku primjenu ima u medicini, za in vivo praćenje koncentracija nekih molekulskih vrsta u ljudskim i životinjskim organima [15,18].

Razlika između voltametrije i polarografije je u elektrodi. Prilikom voltametrije koristimo radnu mikro elektrodu stalne površine, u otopini koja stalno miruje, dok se kod polarografije koristi kapajuća živina elektroda kojoj se radna površina stalno mijenja i obnavlja [15].
Voltametrijski uređaj (Shema 3) se sastoji od: komparatora, integratora, potenciostata (nameće potencijal i mjeri jakost struje), pretvornika struje u napon, računala i voltametrijskog članka (nosač otopine analita) [15,18].




**Shema 3.** Uređaj za voltametriju [15].

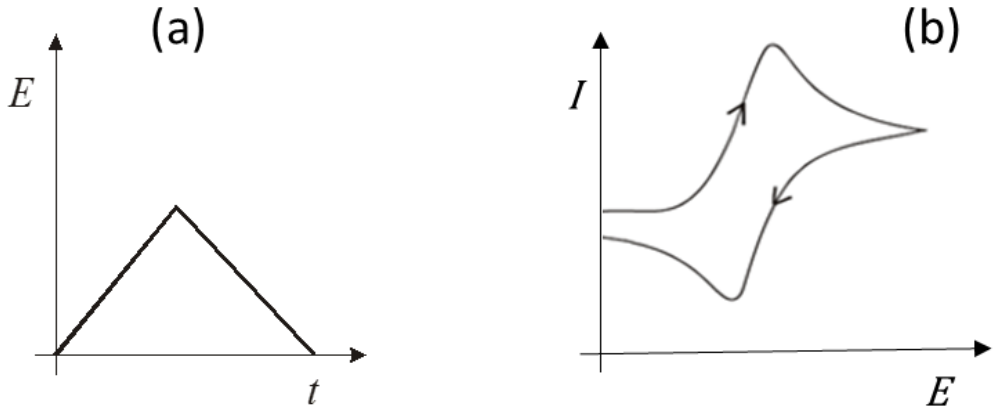
Voltametrijski članak se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu analita i viška elektrolita (koji ne reagira) tj. osnovnog elektrolita. Te tri elektrode su:

1. Radna elektroda (mikroelektroda) - njezin potencijal se održava na određenoj poznatoj vrijednosti, ona je vrlo mala i zbog toga je sklona polarizaciji,
2. Referentna elektroda - potencijal joj je stalan i ne mijenja se,
3. Pomoćna elektroda (najčešće platinska žica) - omogućuje tok struje od izvora kroz otopinu pa sve do mikroelektrode [16].

### *2.2.2.1. Ciklička voltametrija*

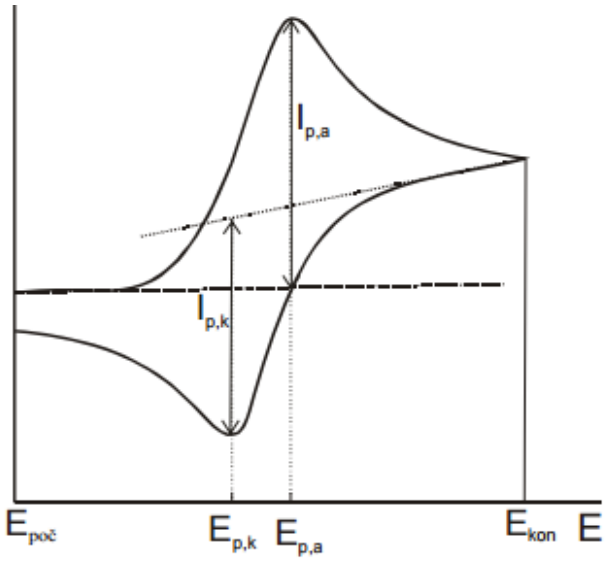
Ciklička voltametrija *(engl. cyclic voltammetry, CV)* je jedna od elektrokemijskih tehnika, koju su 1938. godine otkrili Matheson i Nichols, a teorijski opisali Randles i Ševčik [15]. Princip cikličke voltametrije je takav da signal pobude (napon) neprestano mijenja smjer: najprije linearno raste (Slika 8) do određene vrijednosti napona, te se promjeni smjer posmika potencijala, odnosno potencijal radne elektrode se s vremenom linearno mijenja; od početnog potencijala ($E_{poč}$) do konačnog potencijala ($E_{kon}$) i opet natrag [17].

U povratnom posmiku potencijala odvija se oksidacija produkata elektrodne reakcije redukcije, a u signalu odziva nastaje oksidacijski (anodni) vrh [15].




**Slika 8.** Signal pobude (a) i signal odziva (b) kod cikličke voltametrije [17].

- Veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram (Slika 9) su [1]:
- Potencijal i struja anodnog ($E_{p,a}$; $I_{p,a}$) i katodnog ($E_{p,k}$; $I_{p,k}$) strujnog vrha
- Omjer struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$ / $I_{p,k}$),
- Razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$)




**Slika 9.** Ciklički voltamogram s označenim strujama i potencijalima anodnog ($E_{p,a}$; $I_{p,a}$) i katodnog ($E_{p,k}$; $I_{p,k}$) strujnog vrha [15].

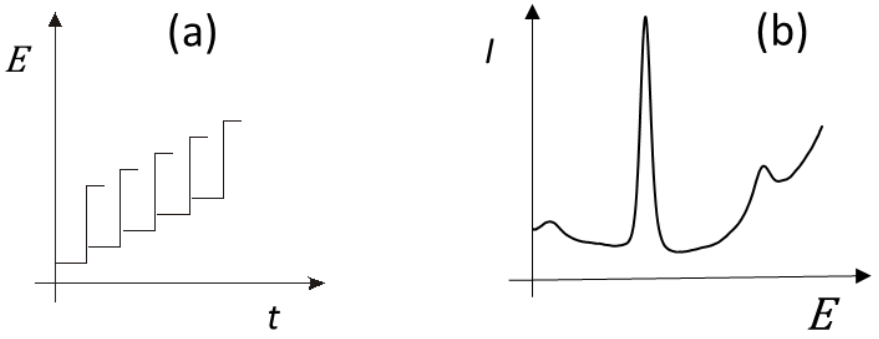
#### *2.2.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija*

Diferencijalna pulsna voltametrija *(engl. differential pulse voltammetry, DPV)* je dobila ime po tome što se mjeri razlika (diferencija) u struji ćelije, koja je uzrokovana naponskim impulsom. Kod ove metode, na radnoj elektrodi primjenjujemo pulseve određene veličine, koji su dodani na linearni nagib. Struja ćelije se mjeri neposredno prije primjene naponskog impulsa, ali i na kraju trajanja impulsa, pa je signal odziva razlika jakosti struja prije i nakon naponskog impulsa, kao funkcija potencijala. U području potencijala u kojem mala promjena potencijala radne elektrode izaziva mjerljivu razliku u struji ćelije, pojavit će se pulsno voltamografski odziv, koji ima oblik vrha. Dakle, kod diferencijalne pulsne voltametrije, signal pobude (Slika 10) je niz kratkotrajnih pulseva, a signal odziva je proporcionalan koncentraciji reaktanata [1,15].

Ova vrsta voltametrije se koristi za analitičke svrhe, ali isto tako i za karakterizaciju molekularne građe elektroaktivne tvari u otopini. Također se pomoću ove metode mogu analizirati elektroaktivne tvari, vrlo niskih koncentracija. Granica osjetljivosti metode je $10^{-8}$ $dm^{-3}$, što se može postići prikladno odabranim elektrolitnim medijem i dobrim uvjetima mjerenja [15].

Metoda je posebno osjetljiva, pa zahtjeva ultra čiste kemikalije i otopine, koje se koriste kao osnovni elektroliti. Ako se kao otapalo koristi voda, ona se pročišćava postupkom deionizacije. Osim vode, kao otapala se mogu koristiti i mnoga nevodena otapala; čijom upotrebom se mogu određivati i one molekulske vrste koje nisu topive u vodi. Čak u nekim slučajevima, upotrebom nevodenih otapala mogu se postići veća osjetljivost i rezolucija mjerenja. Također se pomoću diferencijalne pulsne voltametrije, može istodobno određivati veći broj elektroaktivnih vrsta koje su istovremeno prisutne u ispitivanoj otopini. Bitno je izabrati odgovarajući osnovni elektrolit, jer se onda vrhovi odziva pojedine molekulske vrste mogu uspješno razlučiti i mjeriti prema osnovnoj zajedničkoj struji [15].

Nedostatci ove metode su: relativno dugo vrijeme mjerenja, a ponekad neprikladnost za istraživanje složenijih sistema zbog nemogućnosti razlučivanja pripadajućih signala odziva [15].




**Slika 10.** Signal pobude (a) i signal odziva (b) za diferencijalnu pulsnu voltametriju [1].

## 2.3. Kompleksi flavonoida i metala

Zbog svoje specifične strukture, flavonoidi lako keliraju metalne ione i stvaraju složene komplekse.

Osim izravnog uklanjanja slobodnih radikala, flavonoidi djeluju kao antioksidansi preko interakcije s reduciranim oblikom prijelaznih metala, najčešće $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$ i $Cu^{+}$ koji sudjeluju u reakcijama, koje stvaraju slobodne radikale. Flavonoidi, mogu izdvojiti metalne ione kompleksiranjem i sprječavanjem generiranja slobodnih radikala posredovanih metalima i zbog toga mogu zaštiti potencijalne biološke ciljeve oksidativnog stresa. Prema tome, ukupni antioksidacijski učinak flavonoida je kombinacija izravne reakcije sa slobodnim radikalima i kompleksiranje metalnih iona, koji su odgovorni za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta.

U mnogim istraživanjima je potvrđeno da flavonoidi djeluju kao antioksidansi, uglavnom zbog kompleksiranja s metalnim ionima, te da su kelati znatno učinkovitiji čistači slobodnih radikala od slobodnih flavonoida. Neki istraživači su otkrili, da su kompleksi rutina, dihidrokvercetina ili epikatehina s $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Cu^{2+}$ ili $Zn^{2+}$ učinkovitiji čistači radikala u odnosu na slobodne flavonoide. Ovi kompleksi, također pokazuju povećanu učinkovitost u zaštiti crvenih krvnih stanica [19].

Stvaranje kompleksa rutina i metalnih iona, najčešće se odvija preko 3', 4' hidroksilnih grupa B prstena, gdje metalni ion zamjenjuje jedan proton iz flavonoidne jezgre [1].

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. Kemikalije i priprava otopina

U diplomskom radu su korištene sljedeće kemikalije:

- rutin trihidrat, $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ (Sigma, St.Louis, MO, SAD)
- octena kiselina, $CH_3COOH$ (Kemika, Zagreb)
- natrijev acetat, $C_2H_3NaO_2$ (Kemika, Zagreb)
- natrijev dihidrogenfosfat , $NaH_2PO_4$ (Kemika, Zagreb)
- dinatrijev hidrogenfosfat, $Na_2HPO4$ (Kemika, Zagreb)
- prah $\alpha$-aluminijeva oksida, $\alpha$-$Al_2O_3$ (0,05 μm) (Buehler, SAD)

Otopine inertnog elektrolita, određenih pH vrijednosti (Tablica 1.) su priređene u ultračistoj vodi dobivenoj pomoću uređaja TKA, GenPure Ultra Pure Water System (TKA, Niederelbert, Njemačka), otpora većeg ili jednakog 18 MΩ, te su korištene za pripremu ispitivanih otopina rutina koncentracija od $6{,}67 \cdot 10^{-6}$ mol dm$^{-3}$ do $1{,}22 \cdot 10^{-4}$ mol dm$^{-3}$.
Izvorna otopina rutina ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm$^{-3}$) pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase rutina u metanolu. Otopine rutina odgovarajućih koncentracija priređene su razrjeđivanjem izvorne otopine rutina otopinom odgovarajućeg pufera, neposredno prije mjerenja.

**Tablica 1**. Priprava otopina pufera različitih pH vrijednosti.

| pH | Otopina inertnog elektrolita |
|---|---|
| **3,5** | $CH_3COOH + CH_3COONa$ |
| **4,5** | $CH_3COOH + CH_3COONa$ |
| **5,5** | $CH_3COOH + CH_3COONa$ |
| **7,0** | $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$ |
| **8,0** | $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$ |

## 3.2. Elektrokemijska ćelija

Elektrokemijska mjerenja su provedena u elektrokemijskom ćeliji s troelektrodnim sustavom (Slika 11.) pri sobnoj temperaturi ($\theta$ = 25 ± 1° C). Ukupan volumen elektrokemijske ćelije je iznosio 15 mL. Prije svakog mjerenja, sustav je propuhivan argonom visoke čistoće Ar 5 ($\phi_{Ar}$ = 99,999%).

**Slika 11.** Aparatura za voltametrijska mjerenja (PalmSens potenciostat/galvanostat).

### 3.2.1. Radna elektroda

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (Slika 12), (ALS; $A$ = 0,018 cm$^2$). Prije svakog mjerenja, površina elektrode je polirana prahom $\alpha$-$Al_2O_3$, veličine čestica 0,05 μm do zrcalnog sjaja, te ispirana destiliranom vodom.

**Slika 12.** Radna elektroda od staklastog ugljika („glassy carbon“) [20].

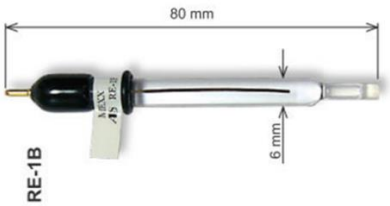
### 3.2.2. Protuelektroda

Kao protuelektroda je korištena platinska žica, duljine 3 cm (Slika 13). Protuelektroda zatvara strujni krug tijekom mjerenja i ne sudjeluje u elektrokemijskoj reakciji.

**Slika 13.** Protuelektroda platinska žica [21].

### 3.2.3. Referentna elektroda

Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov klorid elektroda (Slika 14). Srebro/srebrov klorid elektroda se priređuje tako da srebrnu elektrodu, odnosno komadić srebrne žice, čiji je kraj savijen u uzvojnicu, a na površini je anodnom oksidacijom stvoren teško topivi sloj AgCl; uronimo u otopinu kloridnih iona koja je zasićena sa srebrovim kloridom. Aktivitet $Ag^+$ iona i potencijal elektrode su kontrolirani koncentracijom kloridnih iona u otopini. Najčešće se koristi Ag/AgCl elektroda sa zasićenom otopinom kalijevog klorida. Sve vrijednosti potencijala u ovom diplomskom radu dane su u odnosu na potencijal Ag/AgCl elektrode, koji iznosi 0,210 V u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu, SVE ($E_{AgCl/Ag}$ = 0,210 V *vs*. SVE) [15].




**Slika 14.** Referentna srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda (unutrašnji elektrolit 3 mol $dm^{-3}$ KCl) [22].

## 3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja

### 3.3.1. Ciklička voltametrija

Pomoću cikličke voltametrije, dobivene su opće informacije o elektrokemijskim svojstvima ispitivane otopine rutina. Također je korištena za objašnjenje oksidacijskog mehanizma rutina. Ciklički voltamogrami su snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u otopini rutina u rasponu potencijala od −0,2 V do 1,2 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala je varirala od 50 mV/s do 300 mV/s.

### 3.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

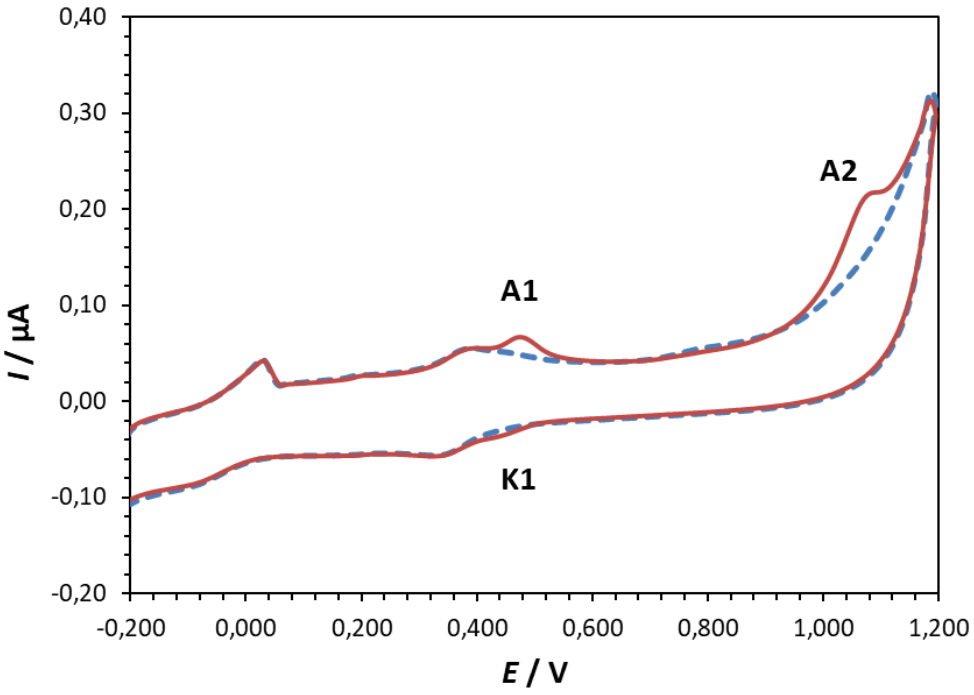
Pomoću diferencijalne pulsne voltametrije, dodatno je objašnjen mehanizam oksidacije, te su praćeni procesi adsorpcije oksidacijskih produkata rutina na površini radne elektrode. Voltamogrami su snimljeni u otopini rutina u granicama potencijala od −0,2 V do 1,2 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala je iznosila 5 mV/s, visina pulsa 25 mV, a širina pulsa 70 ms i „scan increment” 5 mV.

# 4. REZULTATI

Elektrokemijska karakterizacija polifenolnih spojeva, u ovom slučaju rutina, se temelji na poznavanju njihovih redoks-potencijala. Mjerenja su provedena cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom u svrhu dobivanja podataka o elektrokemijskim svojstvima rutina.

## 4.1. Ciklička voltametrija

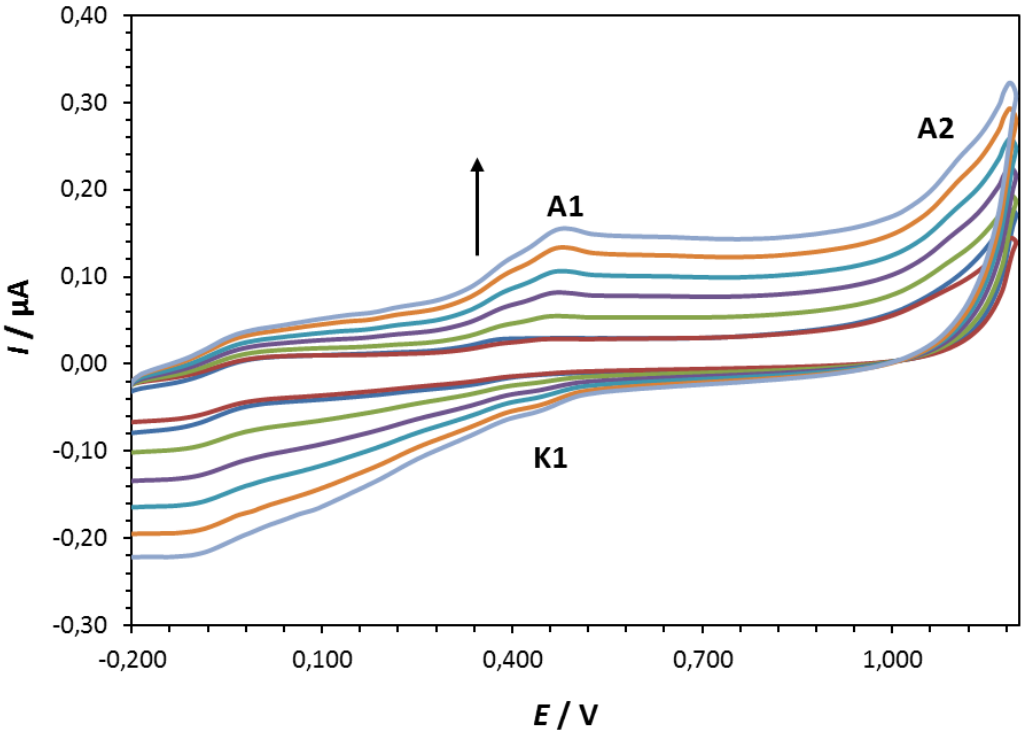
Na slici 15. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 3,5) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s.




**Slika 15.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 3,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s. (---) pufer, (–) otopina sa rutinom.

U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,A1}$ = 0,475 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 1,075 V (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1}$ = 0,445 V.

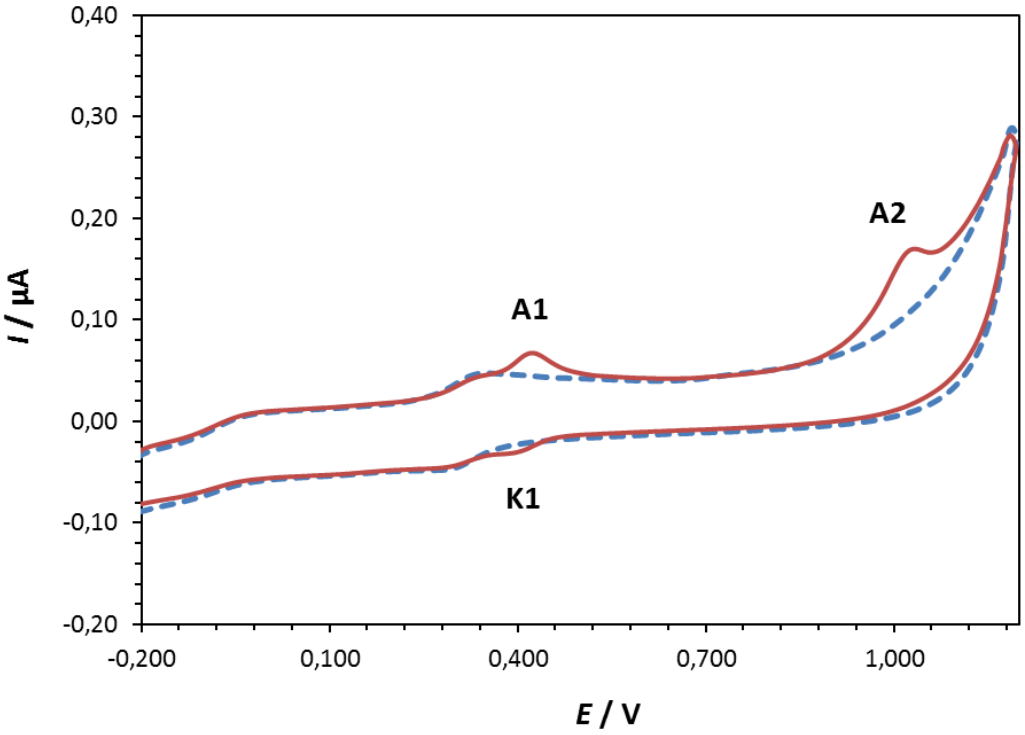
Na slici 16. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 3,5) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.




**Slika 16.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 3,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (–) pufer, (–) otopina s rutinom; brzina polarizacije elektrode: 50 mV/s, (–) 100 mV/s, (–) 150 mV/s, (–) 200 mV/s, (–) 250 mV/s, (–) 300 mV/s.

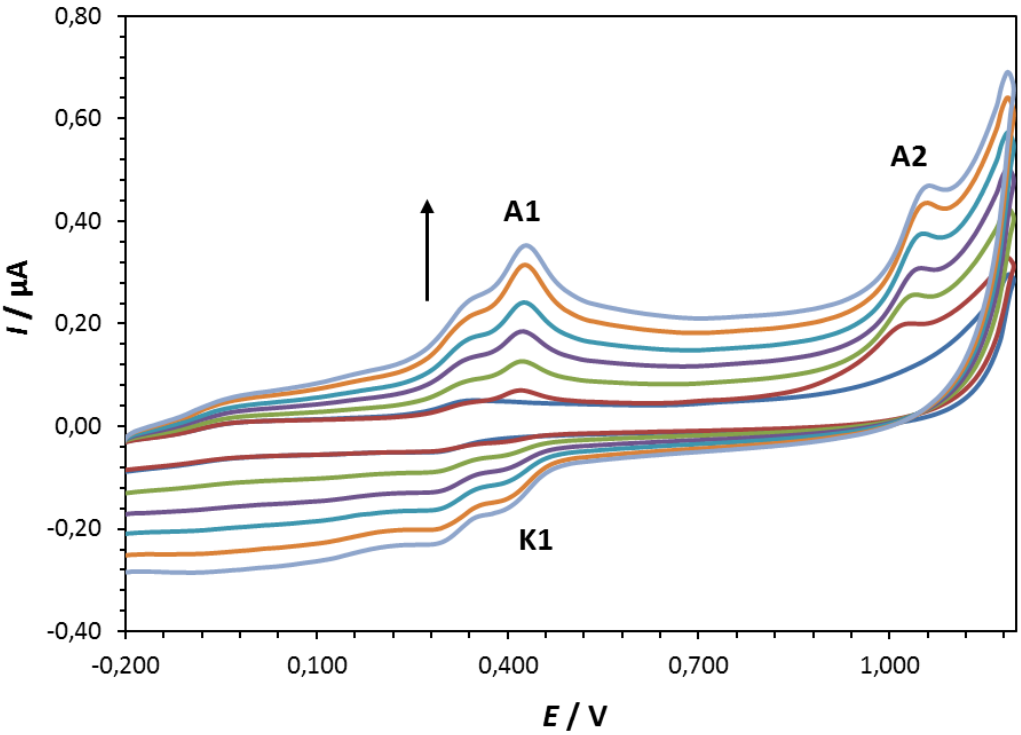
Na slici 17. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,5) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,421 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 1,020 V (A2), a u katodnom

dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1}$ = 0,395 V.



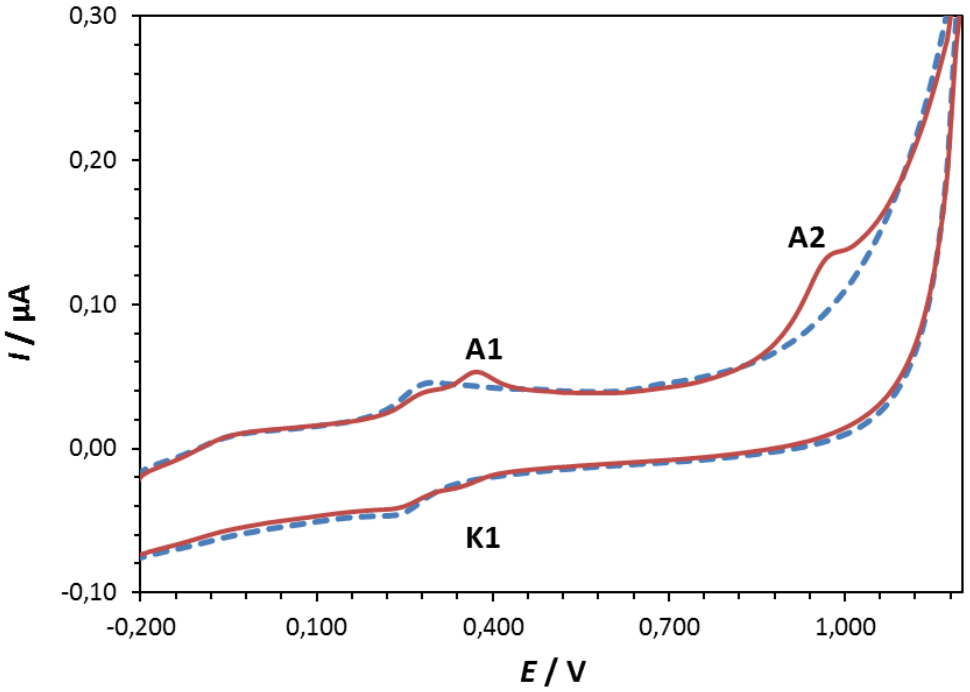

**Slika 17.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s. (---) pufer, (–) otopina sa rutinom.

Na slici 18. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,5) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) raste s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



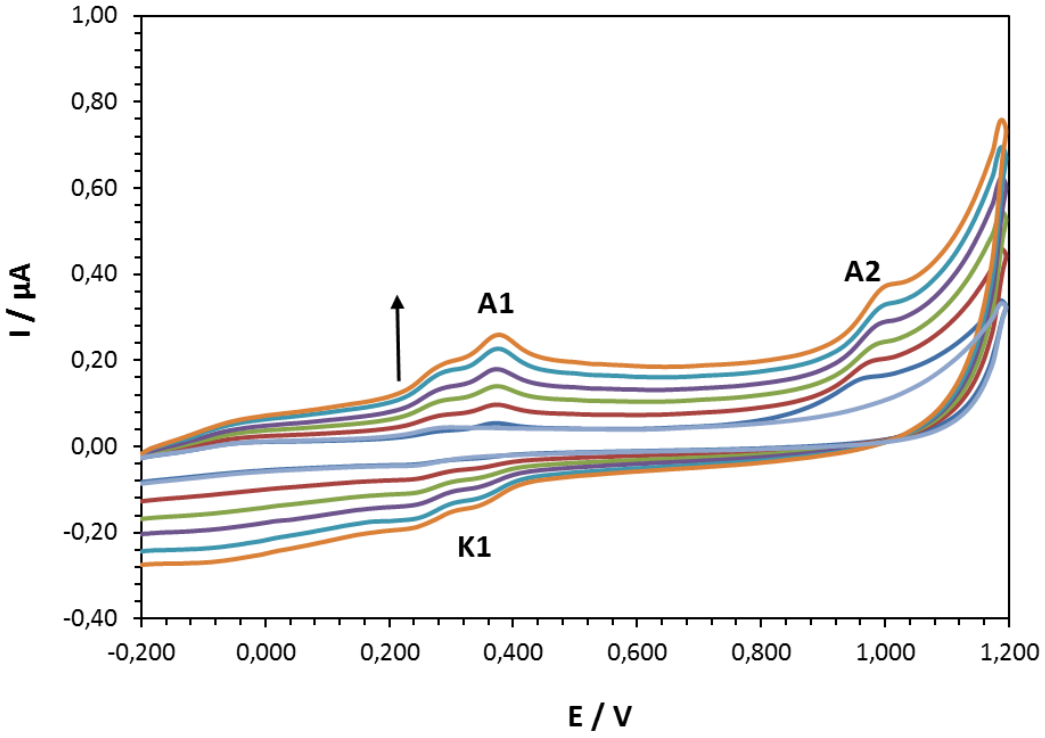

**Slika 18.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (–) pufer, (–) otopina s rutinom; brzina polarizacije elektrode: 50 mV/s, (–) 100 mV/s, (–) 150 mV/s, (–) 200 mV/s, (–) 250 mV/s, (–) 300 mV/s.

Na slici 19. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 5,5) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,370 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 0,970 V (A2), a u katodnom dijelu voltamograma vidljiv je jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijalu $E_{p,K1}$ = 0,340 V.



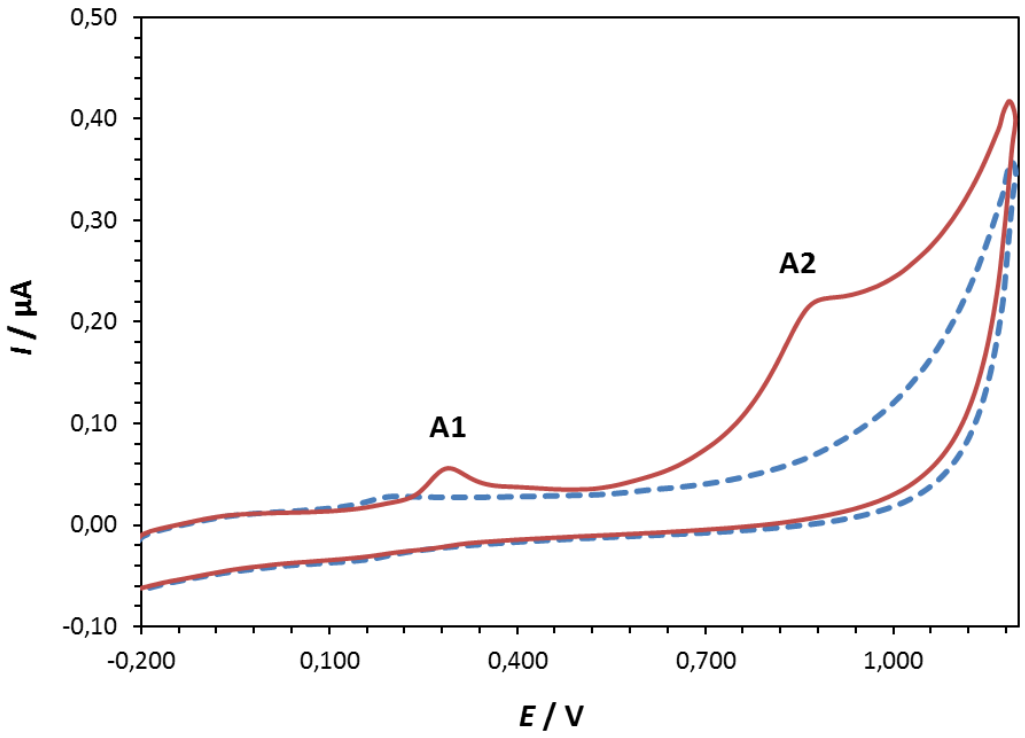

**Slika 19.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 5,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s. (---) pufer, (–) otopina sa rutinom.

Na slici 20. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 5,5) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



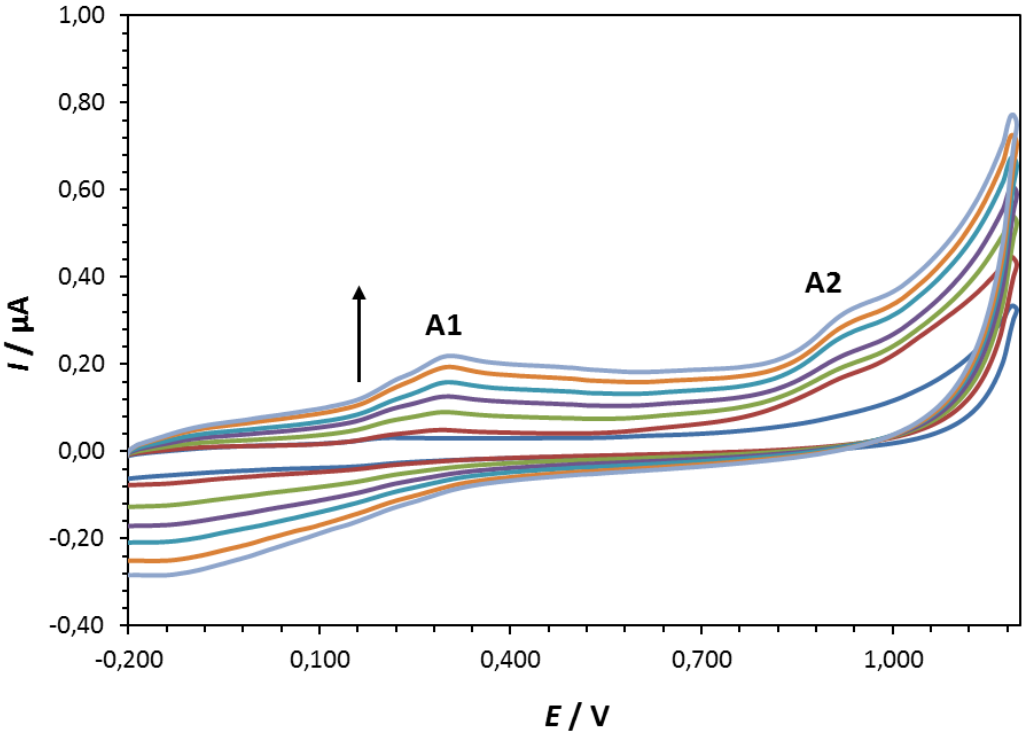

**Slika 20.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 5,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (–) pufer, (–) otopina s rutinom; brzina polarizacije elektrode: 50 mV/s, (–) 100 mV/s, (–) 150 mV/s, (–) 200 mV/s, (–) 250 mV/s, (–) 300 mV/s.

Na slici 21. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,290 (A1) V i $E_{p,A2}$ = 0,870 V (A2), a u povratnom, odnosno, katodnom dijelu voltamograma se ne registrira niti jedan strujni vrh.



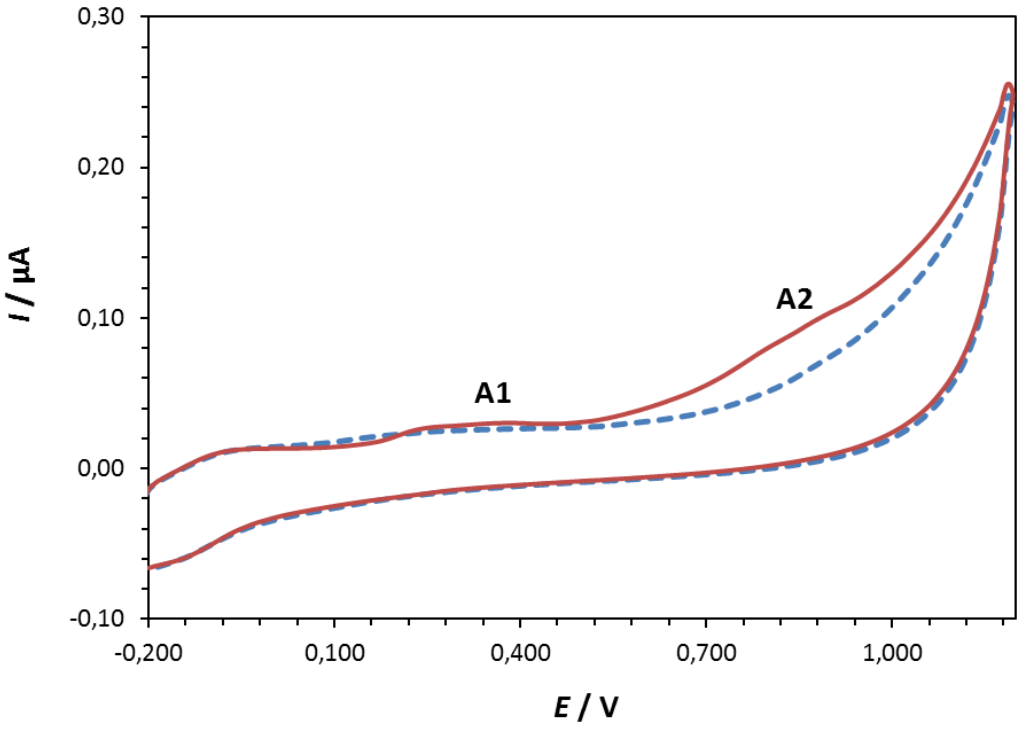

**Slika 21**. Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s. (---) pufer, (–) otopina sa rutinom.

Na slici 22. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 7,0) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.



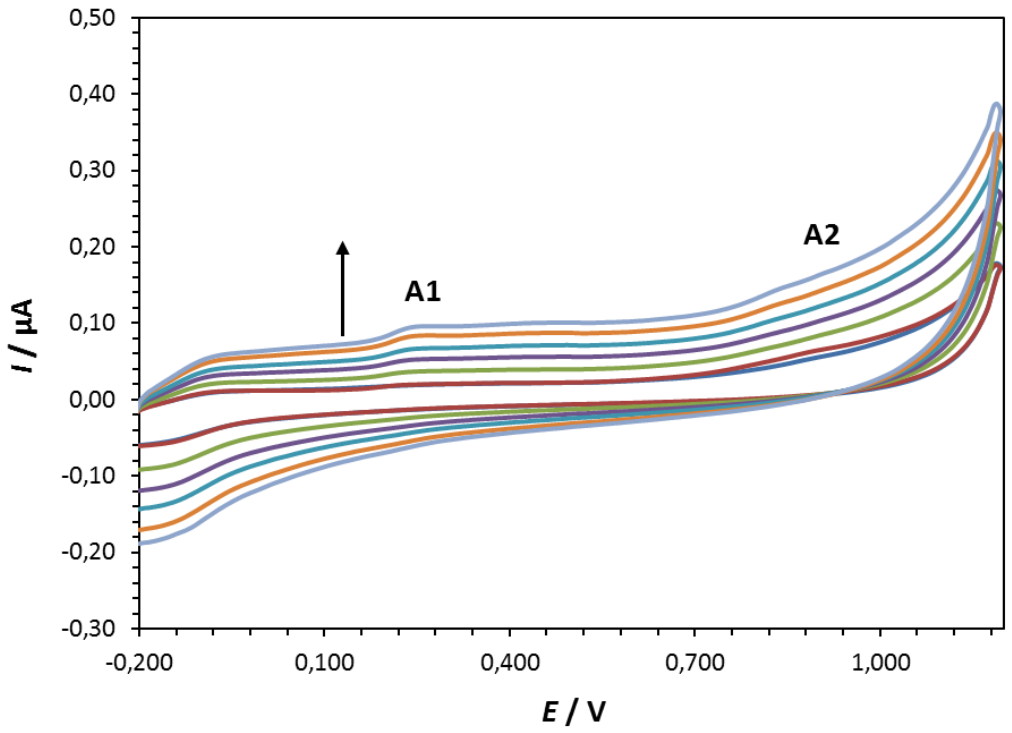

**Slika 22.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 7,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (–) pufer, (–) otopina s rutinom; brzina polarizacije elektrode 50 mV/s, (–) 100 mV/s, (–) 150 mV/s, (–) 200 mV/s, (–) 250 mV/s, (–) 300 mV/s.

Na slici 23. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. U anodnom dijelu cikličkog voltamograma vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,285 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 0,820 V (A2). Kao i kod pufera (pH = 7,0) u katodnom dijelu voltamograma nije registriran niti jedan strujni vrh.




**Slika 23**. Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 50 mV/s. (---) pufer, (–) otopina sa rutinom.

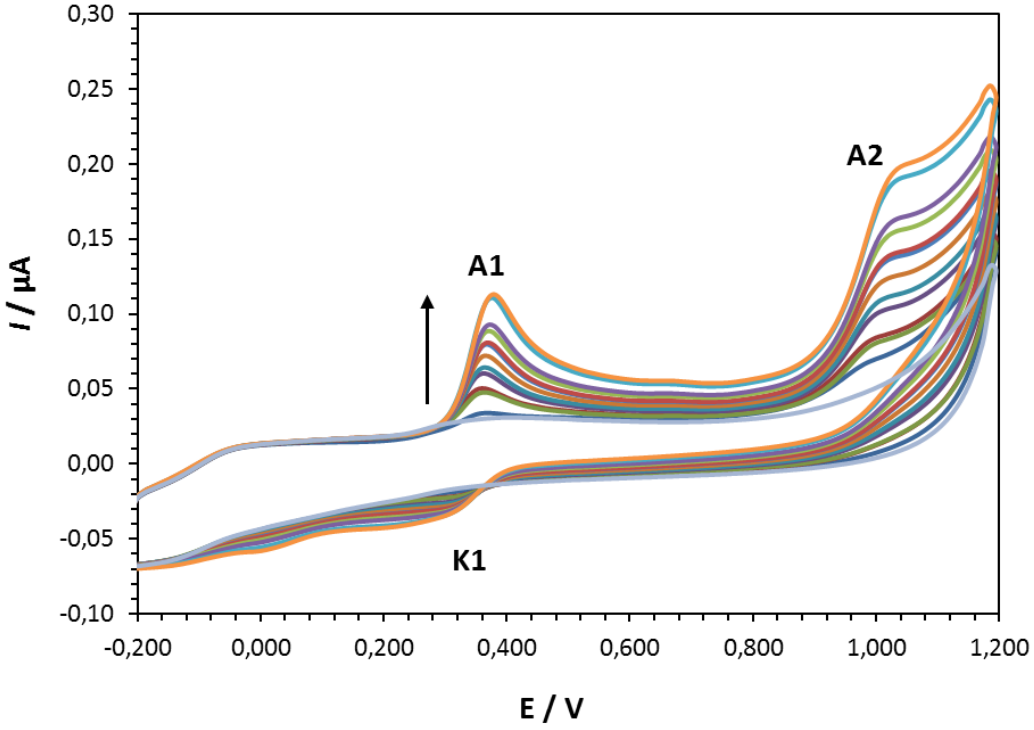
Na slici 24. prikazan je ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 8,0) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Iz slike je vidljivo da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode.




**Slika 24.** Ciklički voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 8,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$) pri različitim brzinama polarizacije elektrode. (–) pufer, (–) otopina s rutinom; brzina polarizacije elektrode: 50 mV/s, (–) 100 mV/s, (–) 150 mV/s, (–) 200 mV/s, (–) 250 mV/s, (–) 300 mV/s.

### 4.1.1. Utjecaj koncentracije

Na slici 25. prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika za različite koncentracije otopina rutina ($c$ = 6,67·10$^{-6}$ mol dm$^{-3}$ do 1,22·10$^{-4}$ mol dm$^{-3}$). Voltamogrami su snimljeni u acetatnom puferu pri pH = 5,5.




**Slika 25.** Ciklički voltamogrami različitih koncentracija otopine rutina, snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 5,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$).

Iz slike je vidljivo da povećanjem koncentracije rutina u otopini, raste visina oksidacijskih (A1, A2) i redukcijskog (K1) strujnog vrha. Podatci očitani iz cikličkih voltamograma rutina prikazanih na slici 25. navedeni su u Tablici 2.

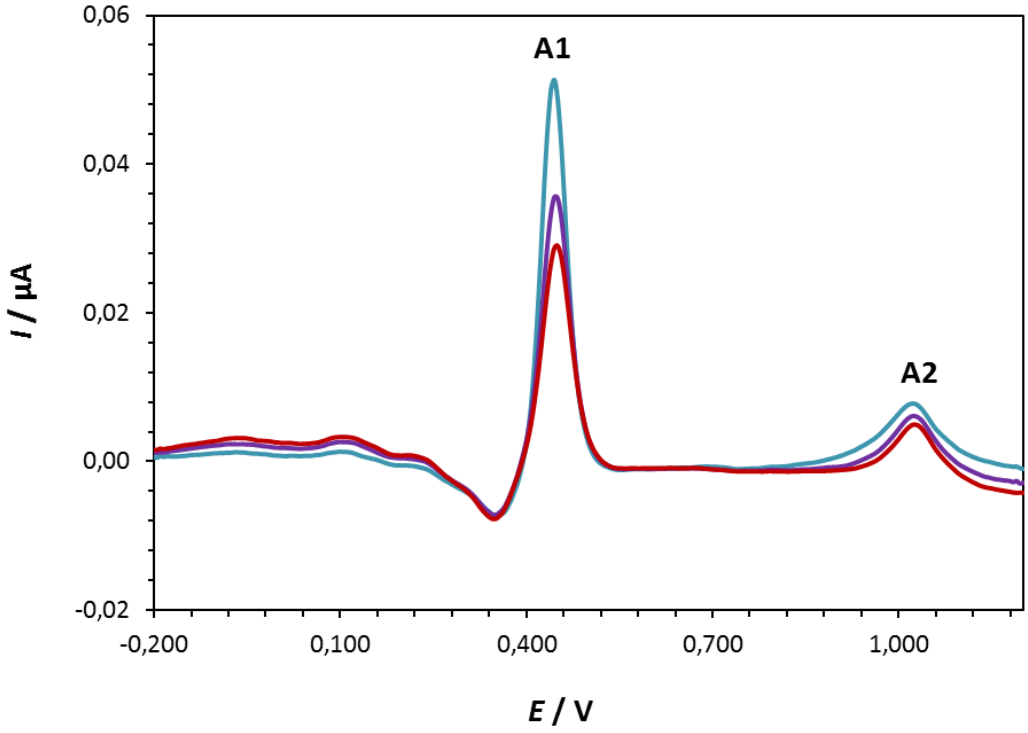
**Tablica 2.** Vrijednosti potencijala ($E_{p,A1}$) i struje ($I_{p,A1}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha rutina kao funkcije koncentracije otopina rutina.

| $c$ (rutin) / mol dm$^{-3}$ | $E_{p,A1}$ / V | $10^2$ $I_{p,A1}$ / μA |
|---|---|---|
| $6{,}67 \cdot 10^{-6}$ | 0,3628 | 3,443 |
| $1{,}33 \cdot 10^{-5}$ | 0,3613 | 5,027 |
| $2{,}00 \cdot 10^{-5}$ | 0,3613 | 4,754 |
| $2{,}66 \cdot 10^{-5}$ | 0,3613 | 6,066 |
| $3{,}32 \cdot 10^{-5}$ | 0,3613 | 6,393 |
| $4{,}32 \cdot 10^{-5}$ | 0,3628 | 7,213 |
| $5{,}31 \cdot 10^{-5}$ | 0,3628 | 7,923 |
| $6{,}30 \cdot 10^{-5}$ | 0,3628 | 7,978 |
| $7{,}28 \cdot 10^{-5}$ | 0,3691 | 8,871 |
| $8{,}27 \cdot 10^{-5}$ | 0,3691 | 9,253 |

Iz Tablice 1. jasno je vidljivo da s porastom koncentracije raste visina oksidacijskog strujnog vrha rutina ($I_{p,A1}$), dok se vrijednost oksidacijskog potencijala ($E_{p,A1}$) gotovo ne mijenja i ne ovise o promjeni koncentracije rutina.

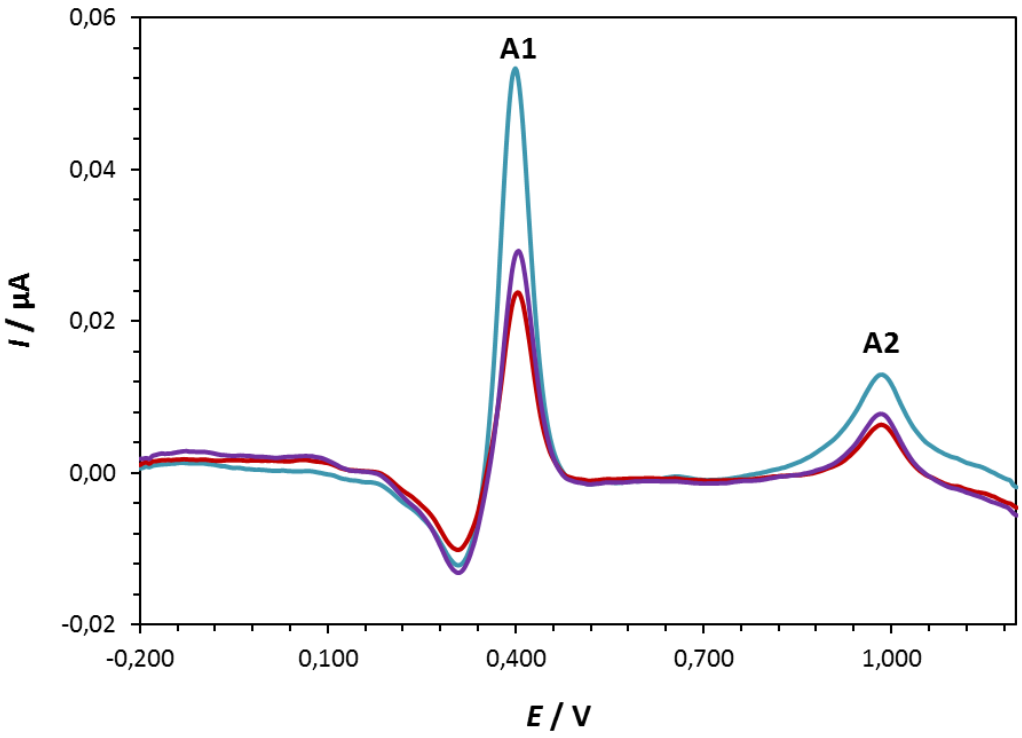
## 4.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Na slici 26. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 3,5) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,44 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 1,02 V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode.



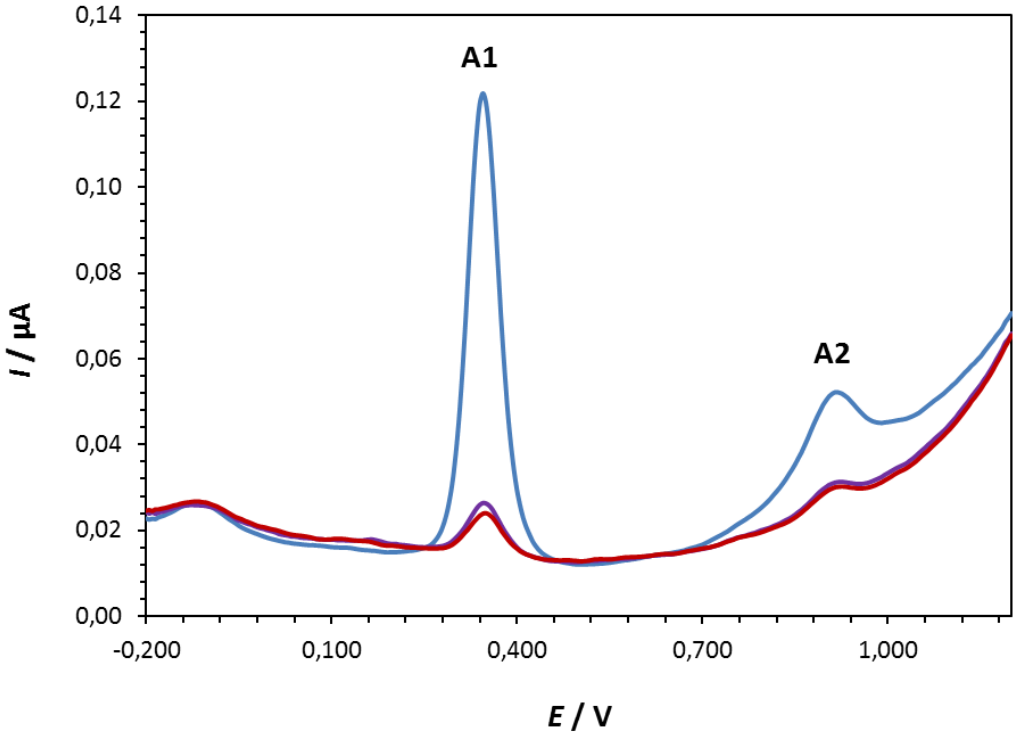

**Slika 26.** Diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 3,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (–) 1. scan, (–) 2. scan, (–) 3. scan.

Na slici 27. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 4,5) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,394 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 0,9881 V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode.



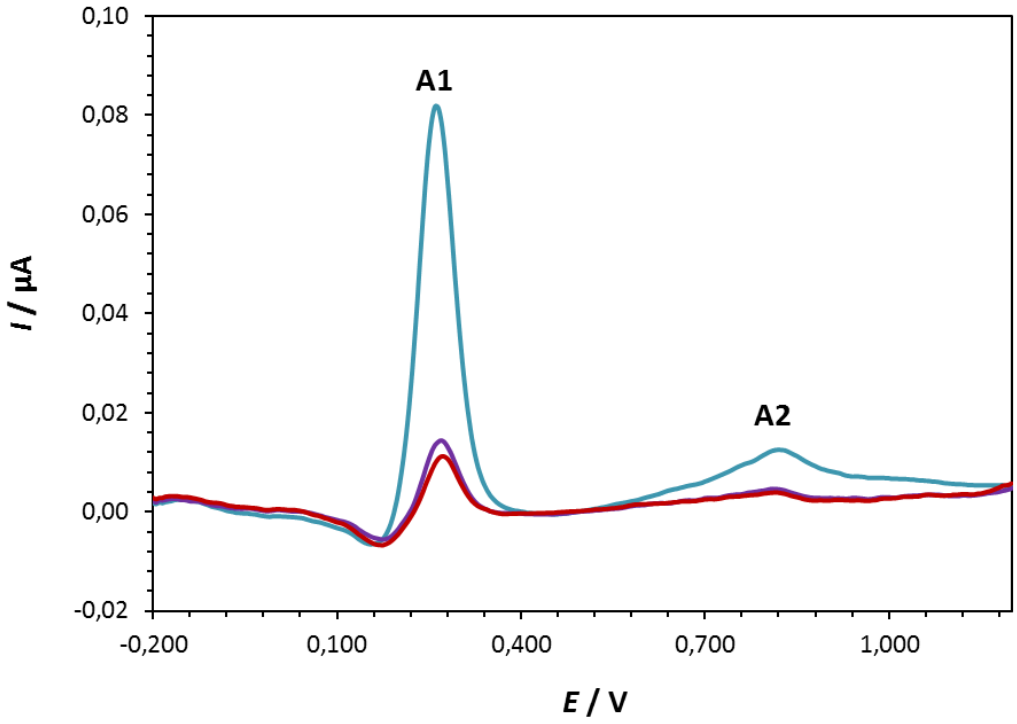

**Slika 27.** Diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 4,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (–) 1. scan, (–) 2. scan, (–) 3. scan.

Na slici 28. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 5,5) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha (A1) na $E_{p,A1}$ = 0,350 V i $E_{p,A2}$ = 0,91 V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode.



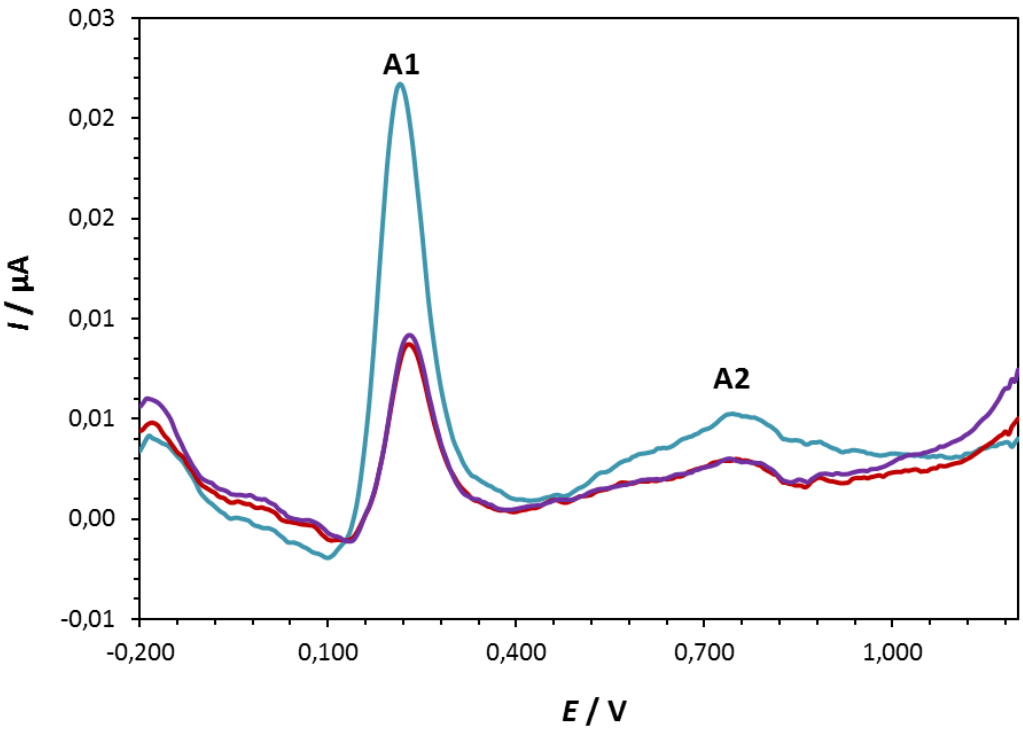

**Slika 28.** Diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 5,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (–) 1. scan, (–) 2. scan, (–) 3. scan.

Na slici 29. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0) pri brzini polarizacije elektrode 5 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,2604 V (A1) i na $E_{p,A2}$ = 0,83 V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode.




**Slika 29.** Diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (–) 1. scan, (–) 2. scan, (–) 3. scan.

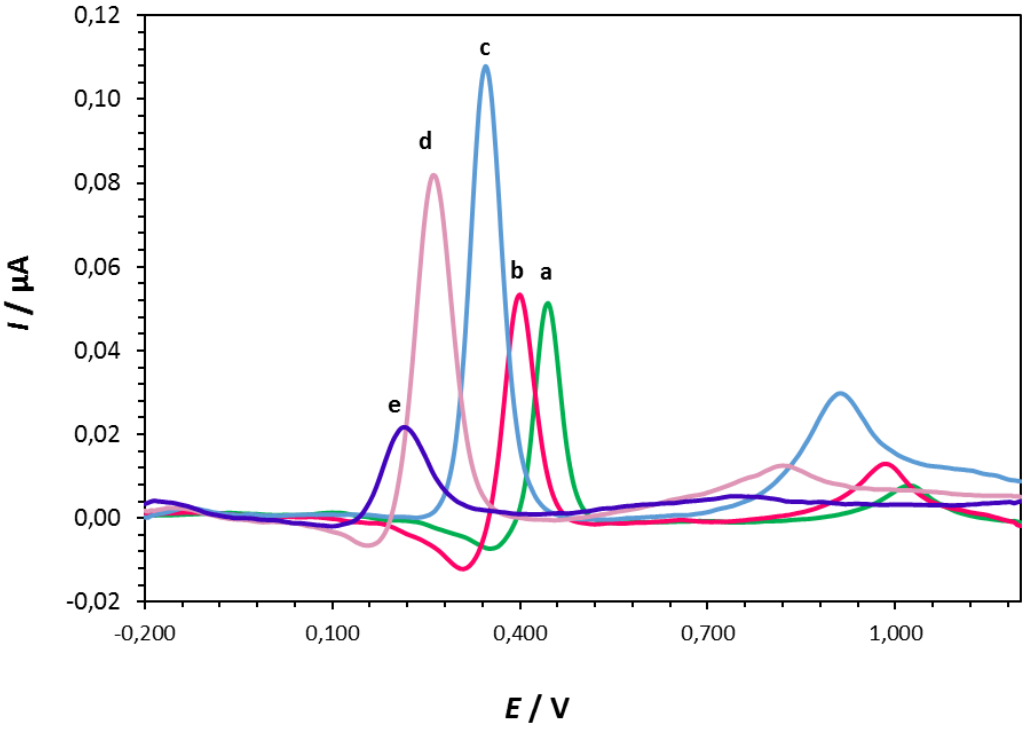
Na slici 30. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$), snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0) pri brzini polarizacije elektrode 50 mV/s. Na slici su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{p,A1}$ = 0,22 V (A1) i $E_{p,A2}$ = 0,7876 V (A2). Visina oba oksidacijska strujna vrha opada uzastopnim snimanjem voltamograma, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode.




**Slika 30.** Diferencijalni pulsni voltamogram rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu (pH = 8,0; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s. (–) 1. scan, (–) 2. scan, (–) 3. scan.

### 4.2.1. Utjecaj pH

Na slici 31. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcije pH vrijednosti ispitivanih otopina rutina.




**Slika 31.** Diferencijalni pulsni voltamogrami rutina ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH = (a) 3,5; (b) 4,5; (c) 5,5; (d) 7,0; (e) 8,0). Brzina polarizacije elektrode je 5 mV/s.

Vidljivo je da visina anodnog strujnog vrha raste do pH ~ 5,4; kako pH vrijednost dalje raste, tako visina anodnog strujnog vrha opada. Odnosno, s povećanjem pH vrijednosti otopina rutina, vrijednosti potencijala prvog ($E_{p,A1}$) i drugog ($E_{p,A2}$) anodnog strujnog vrha se pomiču prema negativnijim vrijednostima.

Podatci koji su očitani iz diferencijalnih pulsnih voltamograma rutina, prikazani su na slici 31. prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz vrijednosti potencijala ($E_p$) i struje ($I_p$) prvog (A1) i drugog (A2) oksidacijskog vrha rutina ($c$ = 1· $10^{-5}$ mol $dm^{-3}$), kao funkcije pH otopina rutina.

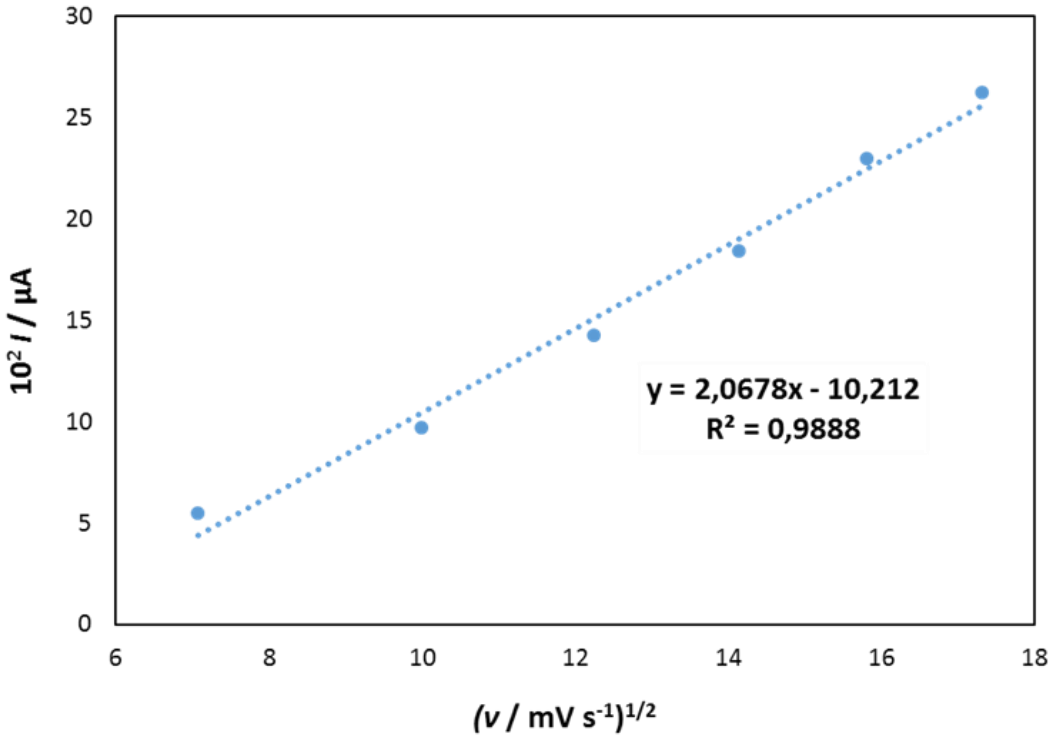
| **pH** | $E_{p,A1}$ / **V** | $10^2 \cdot I_{p,A1}$ / **μA** | $E_{p,A2}$ / **V** | $10^2 \cdot I_{p,A2}$ / **μA** |
|---|---|---|---|---|
| 3,5 | 0,444 | 5,082 | 1,023 | 0,772 |
| 4,5 | 0,400 | 5,317 | 0,983 | 1,301 |
| 5,5 | 0,346 | 10,720 | 0,912 | 2,933 |
| 7,0 | 0,263 | 8,177 | 0,822 | 1,284 |
| 8,0 | 0,216 | 2,181 | 0,742 | 0,523 |

# 5. RASPRAVA

## 5.1. Ciklička voltametrija

Ciklički voltamogrami rutina snimljeni pri pH= 3,5; 4,5 i 5,5 (Slike 15, 17 i 19) pokazuju dva oksidacijska i jedan redukcijski strujni vrh. Prvi oksidacijski strujni vrh se odnosi na oksidaciju 3' -OH i 4' -OH grupe u prstenu B, dok se redukcijski strujni vrh odnosi na redukciju rutin *o*-kinona koji je nastao oksidacijom navedenih hidroksilnih skupina u rutinu [1, 8]. Budući da je razlika potencijala na kojima se pojavljuju prvi oksidacijski strujni vrh i redukcijski strujni vrh ($\Delta E_p$) 30 mV radi se o reverzibilnom oksidacijskom procesu koji uključuje izmjenu 2 elektrona i 2 protona. Drugi anodni strujni vrh se odnosi na ireverzibilnu oksidaciju 5-OH i 7-OH grupe u prstenu A.

Iz slike 32. je vidljivo da visina prvog anodnog strujnog vrha linearno ovisi o drugom korijenu brzine promjene potencijala, što potvrđuje da je to reverzibilni oksidacijski proces kontroliran difuzijom.

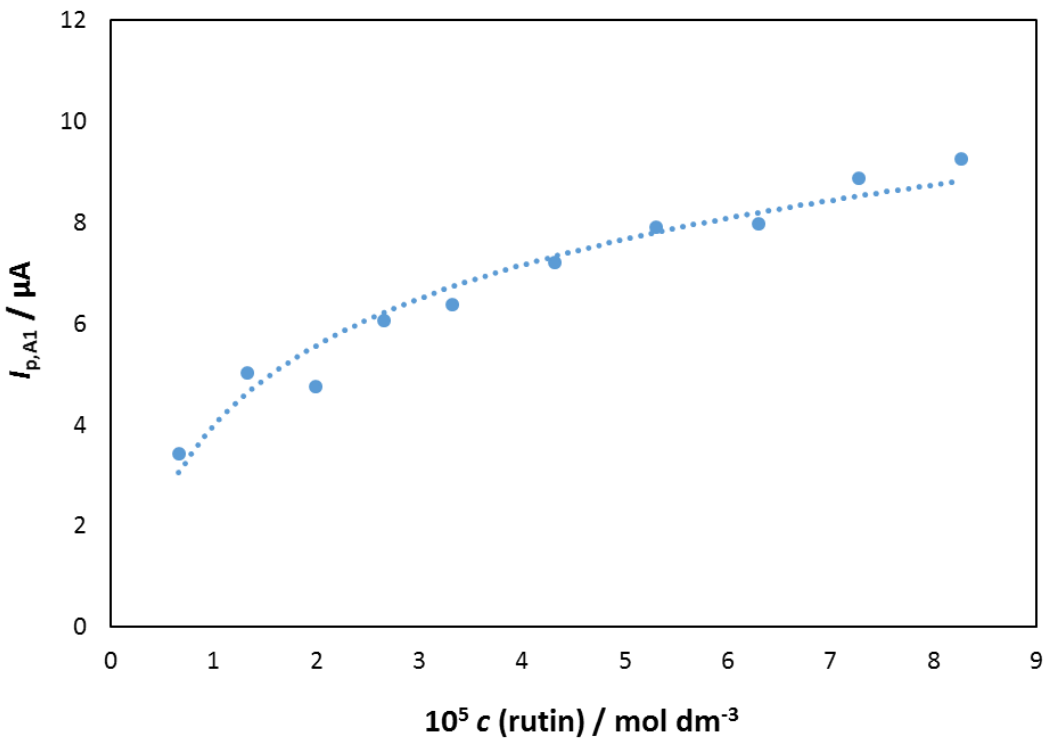


**Slika 32.** Ovisnost vrijednosti struje prvog oksidacijskog strujnog vrha (*I*) o drugom korijenu brzine promjene potencijala ($v^{1/2}$) pri pH = 5,5.

Pri višim pH vrijednostima (pH = 7,0 i 8,0) gubi se redukcijski strujni vrh (Slika 21 i 23) te i oksidacija 3' -OH i 4' -OH grupe u prstenu B postaje ireverzibilna.

Praćenjem utjecaja brzine promjene potencijala na visinu strujnog vrha (Slika 16, 18, 20, 22 i 24) utvrđeno je da visina oba anodna strujna vrha (A1, A2) i katodnog strujnog vrha (K1) (Slika 16, 18 i 20) rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Povećanjem koncentracije rutina u ispitivanoj otopini također raste visina anodnih i katodnog strujnog vrha.

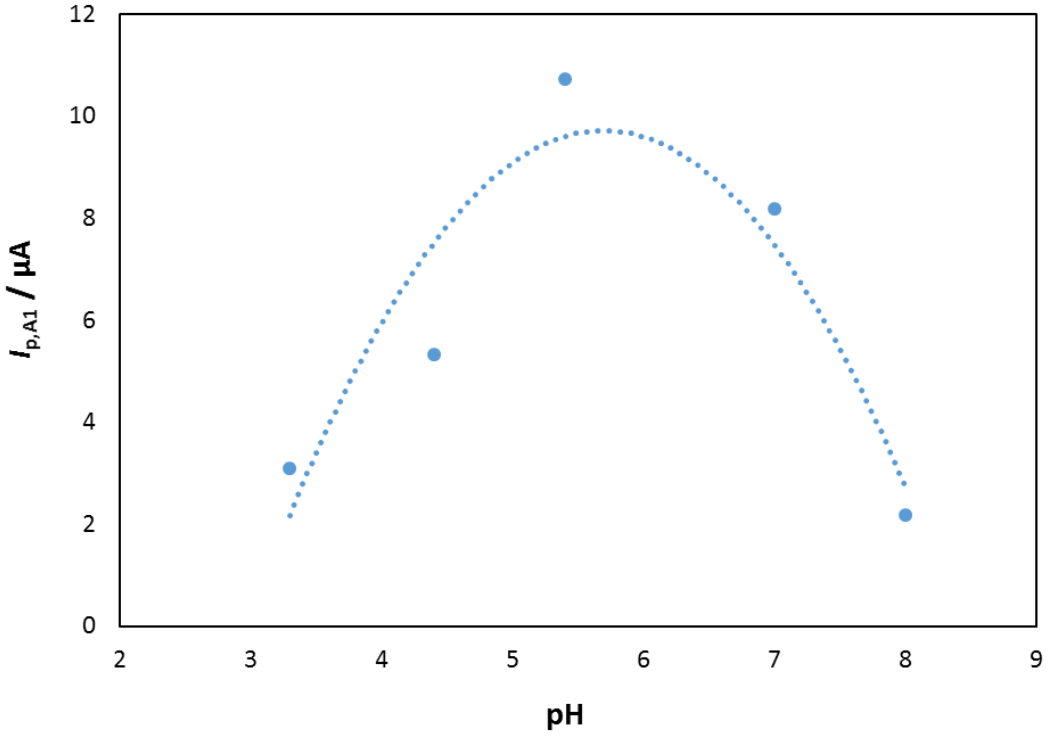
Pri nižim koncentracijama rutina do *c* (rutin) ~ $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm$^{-3}$, odvija se proces adsorpcije oksidacijskih produkata rutina na površinu elektrode (Slika 33). Pri koncentracijama rutina višim od $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm$^{-3}$, struja prvog oksidacijskog strujnog vrha raste sporije s povećanjem koncentracije, zbog moguće interakcije molekula rutina koje su adsorbirane na površinu elektrode.



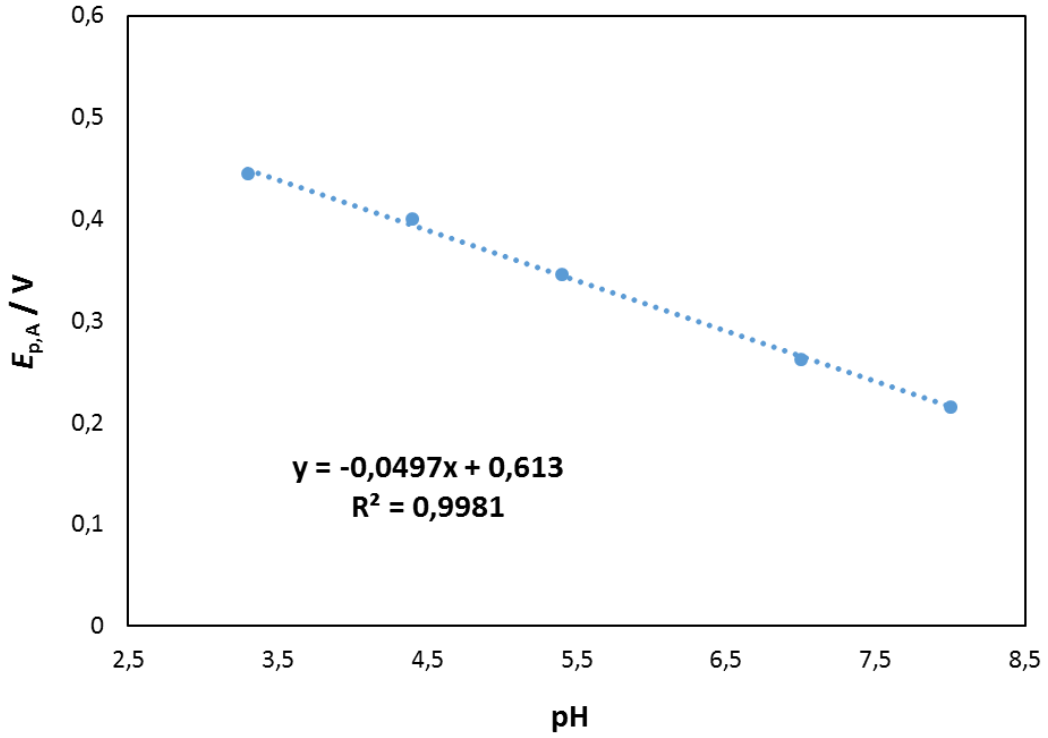
**Slika 33.** Prikaz ovisnosti struje prvog oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,A1}$) o koncentraciji rutina (pH = 5,5; $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$).

## 5.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Na slici 34. prikazana je ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine rutina, te na slici 35. ovisnost potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine rutina. Iz prve slike je vidljivo da visina anodnog strujnog vrha raste do pH ~ 5,5, a daljnjim povećanjem pH vrijednosti visina anodnog strujnog vrha počinje opadati, što pokazuje da je proces oksidacije rutina najizraženiji oko pH ~ 5,5 . Iz slike 35. vidljivo je da oksidacijski potencijal rutina ($E_{p,A}$) linearno ovisi o pH, a nagib pravca iznosi 49,7 mV/pH, što upućuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu jednakog broja protona i elektrona.



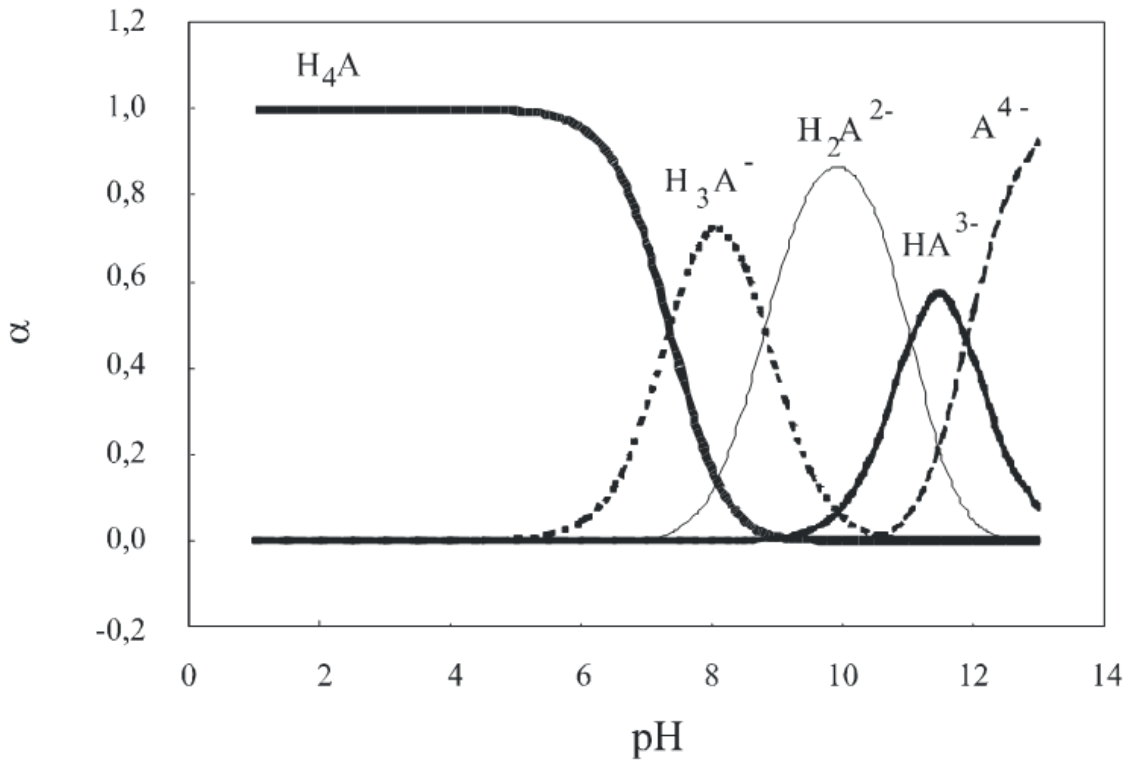

**Slika 34.** Ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednostima za rutin ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$, $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina promjene potencijala je 5 mV/s.




**Slika 35.** Ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednostima za rutin ($c$ = 1·10$^{-5}$ mol dm$^{-3}$, $I_c$ = 0,1 mol dm$^{-3}$). Brzina promjene potencijala je 5 mV/s.

Iz slika 26, 27, 28, 29 i 30 je vidljivo da visina oba oksidacijska strujna vrha (A1 i A2) opada uzastopnim snimanjem voltamograma pri svim ispitivanim pH vrijednostima, što potvrđuje adsorpciju oksidacijskih produkata rutina na površinu radne elektrode. Najdrastičniji pad visine oba anodna strujna vrha uočen je pri pH = 5,5 gdje je oksidacija rutina najizraženija.

Iz dijagrama specijacije (Slika 36) se može vidjeti da se disocijacija rutina ne odvija ispod pH = 5, što znači da u oksidaciji i adsorpcijskim procesima do pH = 5 sudjeluju neutralne molekule rutina. Disocijacija rutina se odvija pri višim pH vrijednostima (pH = 5 do 8) u kojoj uz neutralne oblike sudjeluju i anionski oblici, pa se zbog toga mogu odvijati kompleksniji oksidacijski i adsorpcijski procesi.

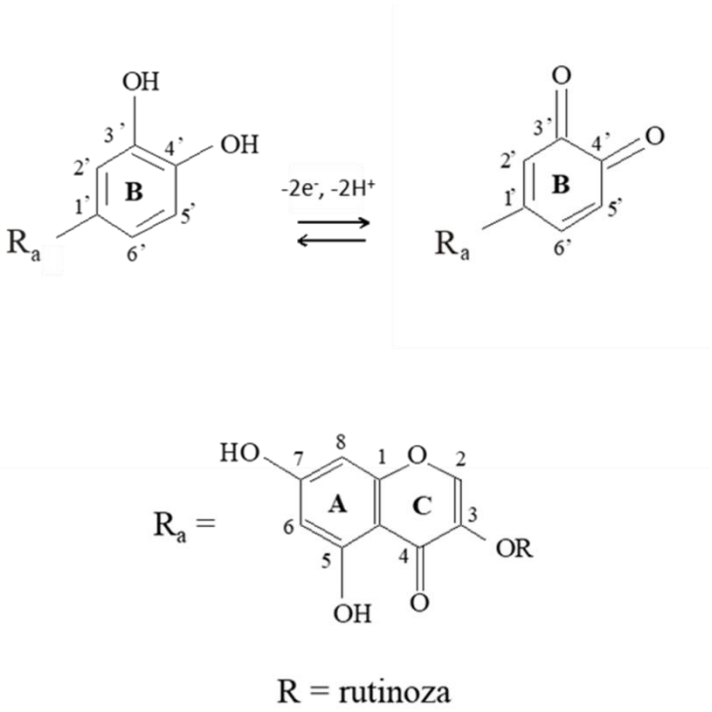



**Slika 36.** Dijagram specijacije rutina; nedisocirani oblik rutina ($H_4A$), deprotonirani oblici rutina ($H_3A^-$, $H_2A^{2-}$, $HA^{3-}$ i $A^{4-}$). Konstante disocijacije ($pK_{a7}$ = 7,35; $pK_{a4`}$ = 8,80: $pK_{a3}$` = 11,04 i $pK_{a4}$ = 11,90) su uzete iz literature [23].

## 5.3. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije rutina

Mogući oksidacijski mehanizam rutina, koji se odnosi na oksidaciju 3`-OH i 4`-OH grupe u prstenu B i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona prikazan je na slici 37. Mehanizam elektrokemijske oksidacije uključuje ionizaciju rutina, pri čemu zbog gubitka dva elektrona nastaje monoanionski rutin *o*-kinon (i rutin i oksidacijski produkti se adsorbiraju na elektrodnu površinu). Navedeni mehanizam je ovisan o pH, pa je primijećeno da je proces oksidacije najizraženiji pri pH = 5,5, a što je u skladu s literaturnim podacima [8]. Pri višim pH vrijednostima (pH = 7,0 i 8,0) nastanak rutin *o*-kinona je ireverzibilan proces.

Drugi oksidacijski strujni vrh rutina, odnosi se na oksidaciju 5-OH i 7-OH grupe u prstenu A i upućuje na ireverzibilan oksidacijski proces.




**Slika 37.** Mogući mehanizam elektrokemijske oksidacije rutina.

# 6. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE „REAKCIJE OKSIDACIJE I REDUKCIJE“

Za obradu ove nastavne jedinice predviđen je jedan školski sat, a daljnja razrada sata je opisana u pripremi.

| | |
|---|---|
| ***NASTAVNI PREDMET:*** | Kemija |
| ***RAZRED:*** | Treći razred gimnazije |
| ***BROJ NASTAVNOG SATA:*** | |
| ***NASTAVNA CJELINA:*** | Oksido-redukcijski procesi |
| ***NASTAVNA JEDINICA:*** | Reakcije oksidacije i redukcije |
| ***CILJ NASTAVNE JEDINICE:*** | 1. Upoznati učenike s pisanjem reakcija oksidacije i redukcije.<br>2. Naučiti učenike prepoznati takve reakcije u svakodnevnom životu. |
| ***KLJUČNI POJMOVI:*** | Oksidacija, redukcija, oksidacijski broj, oksidans, reducens |
| ***POTREBNO PREDZNANJE:*** | Oksidacijska stanja pojedinih elemenata, pravila za određivanje oksidacijskih brojeva. |
| ***OBLIK RADA:*** | Frontalni, individualni, razgovor |
| ***TIP SATA:*** | Usvajanje novih sadržaja |
| ***NASTAVNA SREDSTVA I POMAGALA:*** | PowerPoint prezentacija, računalo, LCD projektor, udžbenik, pribor i kemikalije |
| ***NASTAVNE METODE:*** | Predavanje, demonstracija pokusa, razgovor |
| ***KORELACIJA GRADIVA:*** | Fizika, biologija, matematika |
| ***LITERATURA:*** | Zora Popović, Ljiljana Kovačević, Mila Bulić, Kemija 3 (udžbenik i radna bilježnica za treći razred gimnazije), Alfa<br>Sva literatura propisana od strane MZOS |

# ISHODI UČENJA

| | |
|---|---|
| **OBRAZOVNI** (kognitivno-spoznajno područje; intelektualne vještine) | ✓ Definirati pojam oksidacije i redukcije.<br>✓ Razlikovati oksidacijsko i redukcijsko sredstvo tj. oksidans i reducens.<br>✓ Objasniti i ispisati parcijalne jednadžbe oksidacije i redukcije u zadanoj kemijskoj reakciji.<br>✓ Riješiti i izjednačiti redoks jednadžbu na primjeru dobivanja soli izravnom sintezom. |
| **FUNKCIONALNI** (psihomotoričko područje; praktične vještine) | ✓ Prepoznati oksidans i reducens u oksido-redukcijskoj jednadžbi.<br>✓ Znati izjednačiti zadanu oksido-redukcijsku jednadžbu.<br>✓ Prepoznati prisustvo oksido-redukcijskih procesa u svakodnevnom životu. |
| **ODGOJNI** (afektivno; odgojno područje, stavovi) | ✓ Poticati aktivnost učenika, njihovu kreativnost i kritičko promišljanje.<br>✓ Razvijanje sposobnosti logičkog zaključivanja. |

## ORGANIZACIJA (TIJEK) NASTAVNOG SATA-ARTIKULACIJA METODIČKE JEDINICE

| ETAPE | AKTIVNOST UČENIKA I AKTIVNOST NASTAVNIKA | SOCIOLOŠKI OBLIK RADA |
|---|---|---|
| **Uvod (5 min)** | Nastavnik postavlja učenicima pitanja za ponavljanje prethodne lekcije „Uvod u procese oksidacije i redukcije“:<br>1. **Što su to oksido-redukcijske reakcije?**<br>Očekivani odgovor: Oksido-redukcijske reakcije su jedna od najvećih skupina kemijskih reakcija koje su prisutne svuda oko nas.<br><br>2. **Nabrojati nekoliko primjera oksido-redukcijskih reakcija iz svakodnevnog života?**<br>Očekivani odgovor: hrđanje željeza, proces fotografiranja, tamnjenje površine prerezane jabuke, požari, eksplozije, itd.<br><br>3. **Što je to oksidacijski broj?**<br>Očekivani odgovor: Oksidacijski broj je broj koji je pridružen nekom atomu u spoju, a jednak je naboju iona ili naboju koji bi atom imao da je spoj ionski. Označava se rimskom brojkom.<br><br>4. **Utvrditi promjenu oksidacijskih stanja tvari u zadanoj reakciji: $Na(s) + Cl_2(g) \rightarrow NaCl(s)$**<br>Očekivani odgovor:<br>$\overset{0}{Na}(s) + \overset{0}{Cl_2}(g) \longrightarrow \overset{I}{Na}\overset{-I}{Cl}(s)$ | Razgovor<br>Frontalni |
| **Glavni dio** | ✓ ***Definirati pojam oksidacije i redukcije i navesti primjere*** | Frontalni<br>Individualni |

| | | |
|---|---|---|
| **(30 min)** | Reakcije spajanja kisika s mnogim tvarima, nazivaju se **reakcije oksidacije.**<br>Primjer: Izgaranje željeza na zraku.<br>$4\ Fe(s) + 3\ O_2(g) \longrightarrow 2\ Fe_2O_3\ (s)$<br><br>Reakcije razgradnje spojeva, uz gubitak kisika, nazivaju se **reakcije redukcije.**<br>Primjer: Redukcija bakrova(II) oksida u elementarni bakar uz pomoć plinovitog vodika.<br>$CuO(s) + H_2(g) \longrightarrow Cu(s) + H_2O(g)$<br><br>✓ ***Definirati oksidacijsko i redukcijsko sredstvo tj. oksidans i reducens i navesti primjer***<br>**Oksidans** je tvar koja uzrokuje oksidaciju neke druge tvari, a sama se reducira tj. prima elektrone.<br><br>**Reducens** je tvar koja uzrokuje redukciju druge tvari, a sama se oksidira tj. otpušta elektrone.<br><br>$\overset{0}{Mg}(s) + H_2\overset{I\ -II}{O}(g) \longrightarrow \overset{II\ -II}{MgO}(s) + \overset{0}{H_2}(g)$ (Pr.)<br><br>Na temelju izrečene definicije i navedenog primjera, pitati učenike; **što je u ovoj reakciji oksidans, a što reducens?**<br>Očekivani odgovor:<br>Magnezij je u reakciji redukcijsko sredstvo (reducens), jer se oksidira. Vodik je u reakciji oksidacijsko sredstvo (oksidans), jer se reducira.<br><br>✓ ***Objasniti i ispisati parcijalne jednadžbe oksidacije i redukcije u zadanoj kemijskoj jednadžbi***<br>Nastavnik objašnjava i opisuje parcijalne jednadžbe | |

| | | |
|---|---|---|
| | oksidacije i redukcije na jednostavnom primjeru:<br>$Mg(s) + O_2(g) \longrightarrow 2\ MgO(s)$<br><br>OKSIDACIJA: $\overset{0}{Mg} \longrightarrow \overset{II}{Mg^{2+}} + 2e^- \ /\cdot 2$<br>REDUKCIJA: $\overset{0}{O_2} + 4e^- \longrightarrow 2\ \overset{-II}{O^{2-}}$<br><br>Broj elektrona u obje parcijalne jednadžbe mora biti jednak, zato se jednadžba oksidacije množi s 2.<br><br>✓ ***Riješiti i izjednačiti redoks jednadžbu na primjeru dobivanja soli izravnom sintezom***<br><br>$Na(s) + Cl_2(g) \rightarrow NaCl(s)$<br><br>OKSIDACIJA: $\overset{0}{Na} \longrightarrow \overset{I}{Na^+} + e^- \ / \cdot 2$<br><br>REDUKCIJA: $\overset{0}{Cl_2} + 2e^- \longrightarrow 2\ \overset{-I}{Cl^-}$<br>Nastavnik podsjeća da broj elektrona u obje parcijalne jednadžbe mora biti jednak, zato se jednadžba oksidacije množi s 2.<br>Nastavnik objašnjava postupak izjednačavanja redoks jednadžbe koji slijedi nakon pisanja polureakcija. Za pisanje konačne jednadžbe reakcije, potrebno je zbrojiti parcijalne jednadžbe oksidacije i redukcije:<br><br>O: $2\ Na \longrightarrow 2\ Na^+ + 2\ e^-$<br>R: $Cl_2 + 2e^- \longrightarrow 2\ Cl^-$<br>———————————<br>$2\ Na + Cl_2 \longrightarrow Na^+ + 2\ Cl^- \longrightarrow 2\ NaCl$<br><br>**Koristeći ovaj primjer, nastavnik zadaje učenicima** | |

| | | |
|---|---|---|
| | **da sami riješe i izjednače prethodni primjer reakcije:**<br>**$Mg(s) + O_2(g) \longrightarrow 2\ MgO(s)$**<br><br>Demonstracijski izvesti pokus **1.1. Jednostavna redoks-reakcija**<br>**(Reakcija bakrova(II) sulfata i željeza)**<br>Nakon izvođenja pokusa, učenici odgovaraju na pitanja na radnom listiću:<br><br>1. **Skicirati pokus.**<br>2. **Napisati opažanja u pokusu.**<br>3. **Napisati jednadžbu kemijske reakcije željeza s otopinom bakrova(II) sulfata.**<br>4. **Napisati parcijalne jednadžbe kemijske reakcije oksidacije i redukcije.**<br>5. **Je li reakcija željeza s otopinom bakrova(II) sulfata redoks reakcija?**<br>6. **Što je u reakciji oksidans, a što reducens?** | |
| **Završni dio (10 min)** | Ponavljanje gradiva kroz rješavanje zadataka na radnom listiću. | Razgovor<br>Individualni<br>Frontalni |

# PLAN PLOČE

## Reakcije oksidacije i redukcije

- ✓ Reakcija oksidacije: $4\ Fe(s) + 3\ O_2(g) \longrightarrow 2\ Fe_2O_3\ (s)$
- ✓ Reakcija redukcije: $CuO(s) + H_2(g) \longrightarrow Cu(s) + H_2O(g)$

- ✓ **Oksidans** = tvar koja oksidira neku drugu tvar, a sama se reducira (prima elektrone)
- ✓ **Reducens** = tvar koja reducira neku drugu tvar, a sama se oksidira (otpušta elektrone)

$$\overset{0}{Mg}(s) + \overset{I\ -II}{H_2O}(g) \longrightarrow \overset{II\ -II}{MgO}(s) + \overset{0}{H_2}(g)$$

Mg = REDUCENS (OKSIDIRA SE)

H =OKSIDANS (REDUCIRA SE)

$$\overset{0}{Na}(s) + \overset{0}{Cl_2}(g) \longrightarrow \overset{I\ -I}{NaCl}(s)$$

O: $\overset{0}{Na} \longrightarrow \overset{I}{Na^+} + e^- \ /\cdot 2$

R: $\overset{0}{Cl_2} + 2e^- \longrightarrow 2\ \overset{-I}{Cl^-}$

O: $2\ Na \longrightarrow 2\ Na^+ + 2e^-$

R: $Cl_2 + 2e- \longrightarrow 2\ Cl^-$

$2\ Na + Cl_2 \longrightarrow 2\ Na^+ + 2\ Cl^-$

Oksidacijski broj natrija raste (reducens), a oksidacijski broj klora se smanjuje (oksidans).

Pokus 1.1. Jednostavne redoks-reakcije (Reakcija bakrova(II) sulfata i željeza)

Nastavna jedinica: **Reakcije oksidacije i redukcije**

Treći razred gimnazije

## Pokus 1.1. Reakcija bakrova(II) sulfata i željeza

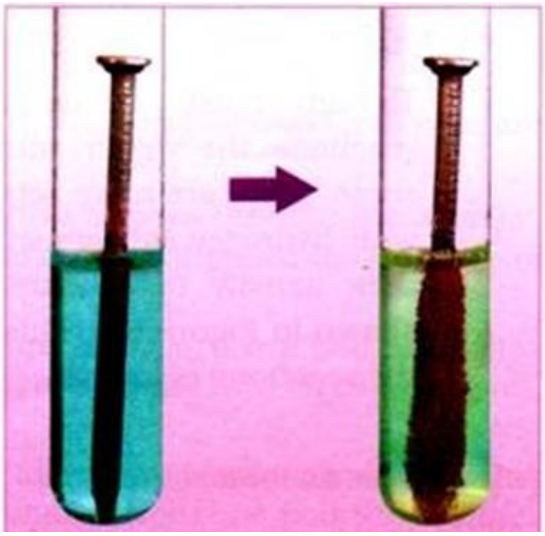
**Pribor i kemikalije:**

25 ml otopine bakrova(II) sulfata pentahidrata, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ ($c$ = 1 mol $dm^{-3}$), čaša (250 ml), željezna vuna, pinceta.

**Postupak:**

- ✓ U čašu uliti 25 ml otopine bakrova(II) sulfata.
- ✓ Pomoću pincete uroniti željeznu vunu u otopinu, ostaviti stajati nekoliko minuta, te ju izvaditi van.
- ✓ Uočiti promjenu boje željezne vune, ali i promjenu boje u čaši.

1. **Skica aparature:**



2. **Napisati opažanja.**

Odgovor: Boja vodene otopine blijedi, dok uzorak željezne vune poprima crvenu boju.

3. **Napisati jednadžbu kemijske reakcije željeza s otopinom bakrova(II) sulfata.**

Odgovor: $CuSO_4(aq) + Fe(s) \longrightarrow FeSO_4(aq) + Cu(s)$

4. **Napisati parcijalne jednadžbe kemijske reakcije oksidacije i redukcije.**

Odgovor: Oksidacija: $Fe(s) \longrightarrow Fe^{2+}(aq) + 2e^-$

Redukcija: $Cu^{2+}(aq) + 2e^- \longrightarrow Cu(s)$

5. **Je li reakcija željeza s otopinom bakrova(II) sulfata redoks reakcija? Zašto?**

Odgovor: Reakcija željeza s otopinom bakrova(II) sulfata je redoks reakcija; jer se željezo oksidira (prelazi iz oksidacijskog stanja 0 u +2), dok se bakar reducira (prelazi iz oksidacijskog stanja +2 u 0).

**6. Što je u reakciji željeza i bakrova(II) sulfata oksidans, a što reducens?**

Odgovor: U navedenoj reakciji željezo je reducens (otpušta elektrone), a bakar je oksidans (prima elektrone).

Nastavna jedinica: **Reakcije oksidacije i redukcije**

Treći razred gimnazije

## Zadatci za ponavljanje

1. U kemijskoj reakciji: $FeSO_4 + H_2 \longrightarrow Fe + H_2SO_4$ ioni željeza se:
   a) Oksidiraju
   b) Reduciraju
   c) Hidroliziraju
   d) Legiraju

   Odgovor: reduciraju

2. Tvar X prima elektrone. Navedite vrstu reakcije. Je li tvar X oksidans ili reducens?

   Odgovor: Vrsta reakcije je redukcija. Tvar X je onda oksidans.

3. Odredite oksidacijski broj označenih atoma u sljedećim primjerima:

   a) $KCl\mathbf{O}_3$

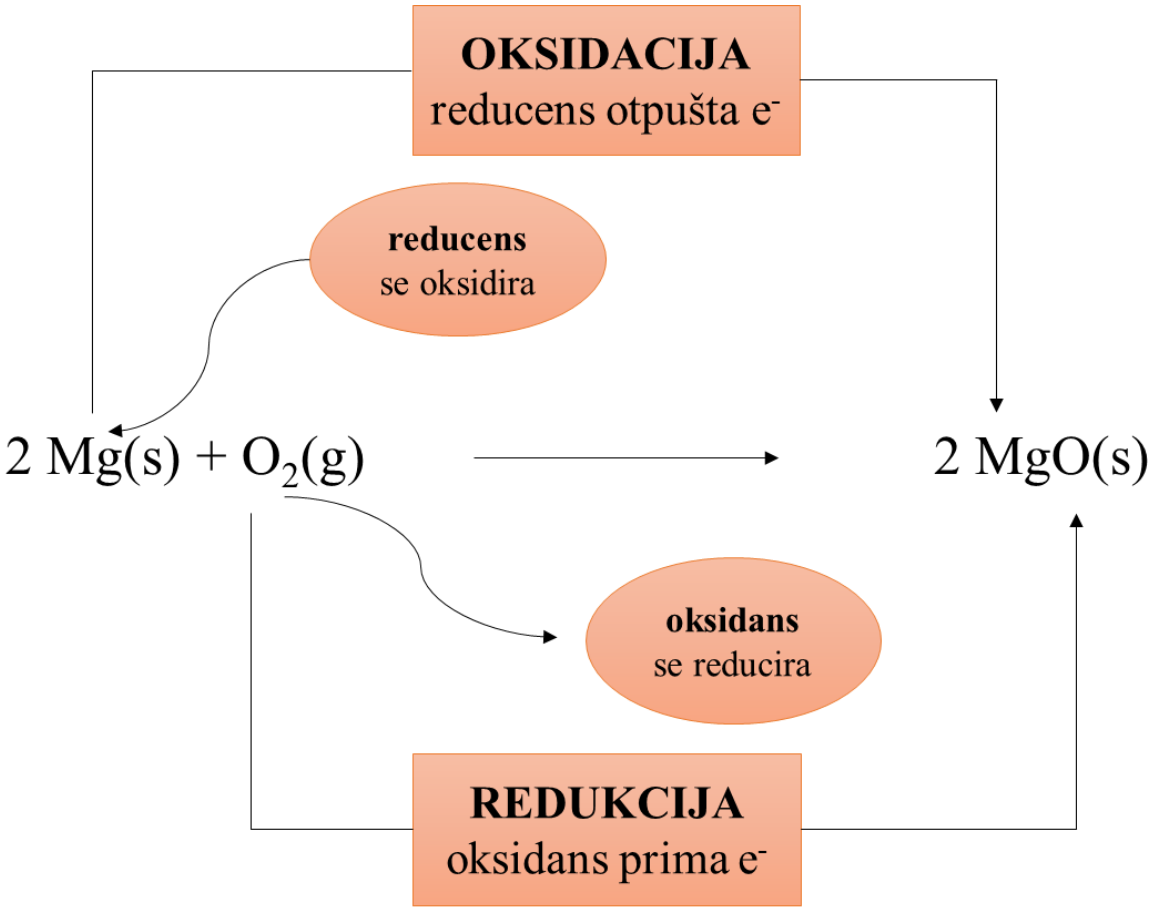
   b) $CuS\mathbf{O}_4$

   c) $P\mathbf{O}_4^{3-}$

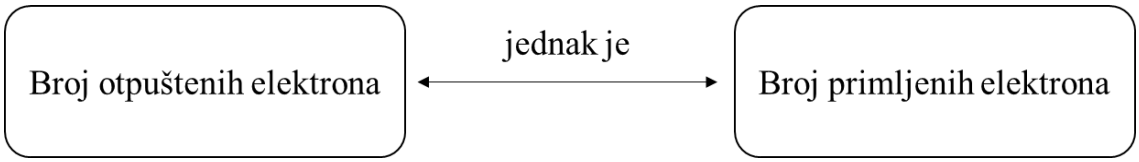
   d) $Cr_2\mathbf{O}_7^{2-}$

   Odgovor: Oksidacijski broj kisika je u svim primjerima –II.

# SHEMA ZA PONAVLJANJE GRADIVA




**Važno za zapamtiti!**



# 7. ZAKLJUČAK

Rutin je elektroaktivna tvar, čija se svojstva mogu odrediti elektrokemijskim tehnikama. U ovom radu korištene su ciklička i diferencijalna pulsna voltametrija, za ispitivanje elektrokemijskih svojstava rutina u pH području od 3,5 do 8,0.
Utvrđeno je da je proces oksidacije rutina reverzibilan, ovisan o pH i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona, a da se rutin i produkti oksidacije rutina adsorbiraju na površinu elektrode od staklastog ugljika (radna elektroda).

Cikličkom voltametrijom je potvrđeno da se pri pH = 3,3 do 5,5 pojavljuju 2 oksidacijska i jedan redukcijski strujni vrh. Prvi oksidacijski strujni vrh se odnosi na oksidaciju 3`-OH i 4`-OH grupe u prstenu B i uključuje izmjenu dva protona i dva elektrona, te nastanak rutin *o*-kinona. Drugi oksidacijski strujni vrh rutina se odnosi na oksidaciju 5-OH i 7-OH grupe u prstenu A i upućuje na ireverzibilan oksidacijski proces. Redukcijski strujni vrh se odnosi na redukciju *o*-kinona koji je nastao oksidacijom rutina u prvom koraku oksidacije.

Pri pH = 7,0 i pH = 8,0 pojavljuju se dva oksidacijska strujna vrha rutina, a nastanak rutin *o*-kinona je ireverzibilan proces.

Proces oksidacije rutina je najizraženiji pri pH = 5,5 što je u skladu s literaturnim podacima.

Dijagram specijacije rutina pokazuje da rutin ne disocira ispod pH = 5 što znači da u oksidaciji i adsorpcijskim procesima do pH = 5 sudjeluju neutralne molekule rutina. Disocijacija rutina se odvija pri višim pH vrijednostima (pH = 5 do 8) u kojoj uz neutralne oblike sudjeluju i anionski oblici, pa se zbog toga mogu odvijati kompleksniji oksidacijski i adsorpcijski procesi.

U metodičkom dijelu diplomskog rada obrađena je nastavna jedinica „Reakcije oksidacije i redukcije“ s ciljem upoznavanja učenika s pisanjem reakcija oksidacije i redukcije te prepoznavanja ovih reakcija u svakodnevnom životu.

# 8. LITERATURA

[1] M. Medvidović-Kosanović, Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola, Doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 2011.

[2] J. Das, R. Ramani, M. Olufemi Suraju, Biochimica et Biophysica Acta **1860** (2016), 2107-2121

[3] M. Drenjančević, V. Jukić, K. Mihaljević, V. Rastija, Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi **5** (2016), 39-56

[4] A. I. Smeds, P. C. Eklund, R. E. Sjöholm, S. M. Willför, S. Nishibe, T. Deyama, B. R. Holmbom, J. Agric. Food Chem **55** (2007), 1337-1346

[5] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, Antioxidants and Redox Signaling **18** (2013), 1818-1892

[6]https://www.google.hr/search?q=antioksidans+i+slobodni+radikal&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi2rpfC_6LWAhUFuhQKHeXHA10Q_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgrc=UQfbW-yVviPZ6M (18.6.2017.)

[7] S. P. Kazazić, Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, Arh Hig Toksikol, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2004, 279-290

[8] M. E. Ghica, A. M. O. Brett, Electrochemical Oxidation of Rutin, Electroanalysis **17** (4) (2005), 313-318

[9] S. A. Aherne, N. M. O'Brien, Nutritio **18** (2002), 75-81

[10] S. H. Thilakarathna, H. P. V. Rupasinghe, Nutrients, **5** (9) (2013), 3367-3387

[11] S. Kumar, A. K. Pandey, ScientificWorldJournal, **2013** (2013), 1-16

[12] A. Ganeshpurkar, A. K. Saluja, Saudi Pharm J., **25** (2) (2017), 149-164

[13] P. Macikova, V. Halouzka, J. Hrbac, P. Bartak, J. Skopalova, ScientificWorldJournal, **2012** (2012), 1-10

[14] C. F. L. Goncalves, M. C. S. Santos, M. G. Ginabreda, R. S. Fortunato, D. P. Carvalho, A. C. F. Ferreira, PLoS **8** (9) (2013), 1-12

[15] I. Piljac, Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, Mediaprint-Tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb, 2010.

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

[17] M. Gavran, Ispitivanje oksido – redukcijskih svojstava ((1E)-1-N-{[4-(4-{[(E)-N-(2-aminofenil) karboksiimidoil] fenoksi} butoksi) fenil] metiliden} benzen -1, 2 -diamina uporabom cikličke voltametrije , Završni rad, Osijek, 2014.

[18] I. Malenica, Nove elektrokemijske metode za određivanje ropirinola, Zagreb, 2012.

[19] D. Malešev, V. Kuntić, J. Serb. Chem. Soc., **72** (10) (2007), 921-939

[20]https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=638&tbm=isch&sa=1&q=glassy+carbon+electrode&oq=glassy+carbon+el&gs_l=psy-ab.1.1.0i19k1l2.28141.32999.0.34605.17.17.0.0.0.0.218.2207.1j14j1.16.0....0...1.1.64.psy-ab..1.15.2102.0..0j0i67k1.WsZSRHYy0UA#imgrc=xRPSJwQLfZ5voM (18.6.2017.)

[21]https://www.basinc.com/products/ec/auxele (18.6.2017.)

[22]https://www.google.hr/search?q=Ag+AgCl+elektroda&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjbuY27jKXWAhXIWhoKHYxZDIsQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgdii=MUWE4H8kLxnkmM:&imgrc=IVJLnies7p6i_M (18.6.2017.)

[23] C. Mielczarek, Eur. J. Pharm. Sci., **25** (2005) 273-279