

Elektrokemijska detekcija vitamina C u realnim uzorcima

Blažević, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:182:128518>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Jelena Blažević

Elektrokemijska detekcija vitamina C u realnim uzorcima

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Jelena Blažević

Elektrokemijska detekcija vitamina C u realnim uzorcima

Diplomski rad

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

Neposredna voditeljica: Doc. dr.sc. Anamarija Stanković

Osijek, 2020.

Ovaj rad prezentiran je na 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH te predstavlja dio istraživanja koja provodi Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Martini Medvidović Kosanović i neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Anamariji Stanković, na velikoj pomoći oko izrade diplomskog rada. Na velikom strpljenju, uloženom vremenu, riječima podrške i razumijevanju. Zahvaljujem se na spremnosti za odgovore i dogovore i lijepo provedenom vremenu u vrlo ugodnom radnom okruženju. To mi je jako olakšalo stres i strah od nepoznatog i sa zadovoljstvom sam upijala sve konstruktivne kritike i jako puno naučila iz njih.

Zahvaljujem se svojoj majci, sestri i bratu za neizmjernu podršku, beskonačne savijete i utjehe u teškim razdobljima, te za velika veselja pri postignutim uspjesima. Uvijek su bili veliki oslonac kada sam i sama sumnjala u sebe i svoje sposobnosti, te smo kao jedno čekali rezultate ispita i dočekali završetak studija.

Zahvaljujem se tati za to što je sigurno bio dašak sreće s neba, “moja sretna zvijezda”, pri svakom ispitu.

Zahvaljujem se svojim prijateljima iz djetinjstva, svome “MZP-u”, kojima sam uvijek bježala kada bi zagustilo, i druženje s njima mi je uvijek vraćalo volju i uljepšavalo vrijeme koje sam provodila doma. S kojima sam isto tako najbolje proslavljala sva postignuća.

Zahvaljujem se svojim novim prijateljima koje sam stekla tijekom studiranja, koji su mi pomagali na “licu mjesta”, s kojima sam dijelila sve, i najbolje smo se razumijeli jer smo svi prolazili isto. Zbog njih ću studiranje uvijek imati u prelijepom sjećanju i kao najljepši period života do sada. Posebno se među njima izdvajaju moji “Pasuljci”, te njima dajem posebnu zahvalu, bez njih sigurno ništa ne bi bilo isto.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

ELEKTROKEMIJSKA DETEKCIJA VITAMINA C U REALNIM UZORCIMA

Jelena Blažević

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju

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

Sažetak

Elektrokemijska svojstva vitamina C (poznatoga i kao L-askorbinska kiselina) ispitivana su cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom u modelnim sustavima, kako bi se razvila jednostavna i prihvatljiva metoda kojom bi se detektirao vitamin C u realnim uzorcima. Rezultati su pokazali da je oksidacija vitamina C kvazi-reverzibilni i difuzijski kontrolirani proces. Utvrđeno je i da se produkt oksidacije askorbinske kiseline, dehidroaskorbinska kiselina, adsorbira na površinu elektrode od staklastog ugljika. Konstruirana je kalibracijska krivulja i linearni odgovor je dobiven u rasponu koncentracija od 2,5 mmol/dm³ do 1000 mmol/dm³. Vitamin C je uspješno određen u realnim uzorcima (voćnim sokovima i dodacima prehrani) s cikličkom voltametrijom u rasponu koncentracija od 33,9 mmol/dm³ do 367,1 mmol/dm³. Određena je i antioksidativna aktivnost vitamina C u realnim uzorcima koristeći DPPH metodu te je dobivena dobra linearna korelacija između rezultata cikličke voltetrije i rezultata dobivenih DPPH metodom za ispitivane uzorke.

Diplomski rad obuhvaća: 44 stranice, 31 sliku, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: vitamin C, ciklička voltetrija, DPPH metoda, voćni sokovi

Rad je prihvaćen: 07.09.2020.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. Doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, mentor i član
3. Doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, član
4. Izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, zamjenski član

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

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

ELECTROCHEMICAL DETECTION OF VITAMIN C IN REAL SAMPLES

Jelena Blažević

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

Abstract

Electrochemical properties of vitamin C (also known as L-ascorbic acid) have been studied by cyclic and differential pulse voltammetry in the model systems in order to develop simple and suitable method for vitamin C detection in real samples. The results indicated that vitamin C oxidation is a quasi-reversible and diffusion-controlled process. It was also determined that the oxidation product of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, is adsorbed on the glassy carbon electrode surface. Calibration curve was constructed, and the linear response was obtained in a concentration range from 2.5 mmol/dm³ to 1000 mmol/dm³. Vitamin C was successfully determined in real samples (fruit juices and food supplement) with cyclic voltammetry within concentration range from 33.9 mmol/dm³ to 367.1 mmol/dm³. In addition, antioxidant activity of vitamin C in real samples was determined using DPPH assay, with a good linear correlation obtained between the cyclic voltammetry results and the results evaluated by DPPH assay of the investigated samples.

Thesis includes: 44 pages, 31 figures, 46 references

Original in: Croatian

Keywords: vitamin C, cyclic voltammetry, DPPH assay, fruit juices

Thesis accepted: 07.09.2020.

Reviewers:

1. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić, president
2. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, mentor and member
3. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, member
4. Assoc. Prof. Mirela Samardžić, substitution member

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. OTKRIĆE VITAMINA C	3
2.2. VITAMIN C.....	4
2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA C	7
2.4. VOLTAMETRIJSKE METODE	9
2.4.1. Ciklička voltometrija.....	10
2.4.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	12
2.5. DPPH METODA.....	14
2.5.1. Slobodni radikali.....	14
2.5.2. Antioksidansi	16
2.5.3. Osnova DPPH metode.....	17
2.6. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA	21
3.2. METODE.....	23
3.2.1. Ciklička i diferencijalna pulsna voltometrijska mjerenja	23
3.2.2. DPPH metoda (Brand-Williams metoda).....	24
3.3. REZULTATI I RASPRAVA	27
3.3.1. Ciklička voltometrija.....	27
3.3.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	31
3.3.3. Analiza realnih uzoraka.....	33
3.3.3.1. Ciklička voltometrija.....	33
3.3.3.2. Spektrofotometrijska mjerenja – DPPH metoda	36

4. ZAKLJUČAK.....	38
5. LITERATURA	39
6. ŽIVOTOPIS.....	43

1. UVOD

Vitamin C (L-askorbinska kiselina) je vitamin topljiv u vodi koji pokazuje brojna pozitivna nutritivna i medicinska svojstva. Biološka aktivnost vitamina C otkriva se kroz njegov antioksidativni kapacitet i mogućnost blokiranja ili zaustavljanja reakcije slobodnih radikala, dok u isto vrijeme sprječava oštećenje stanice. Nadalje, vitamin C se smatra biološki aktivnim spojem i esencijalnim mikronutrientom koji je široko prisutan u voću i povrću te igra važnu ulogu u antioksidativnom kapacitetu različitog voća i povrća (posebno citrusnog voća) [1,2]. Pored mnogih pozitivnih učinaka, vitamin C sudjeluje u biološkim funkcijama i metaboličkim putevima kao kofaktor za enzime koji su uključeni u sintezu kolagena i balansiranje norepinefrina i nadbubrežnih hormona. Vitamin C je i reducens u metabolizmu stanica [3]. Prema preporučenim dnevnim količinama (RDA), procjenjuje se da je prosječan i preporučen dnevni unos vitamina C, za optimalno zdravstveno stanje, 75 mg/dan za odraslu ženu i 90 mg/dan za odraslog muškarca. Zbog toga, nedostatak ili neuravnoteženost vitamina C u tijelu može uzrokovati razne zdravstvene probleme, npr. skorbut (lat. *scorbutus*), iako bolest više nije široko rasprostranjena i rijetko se pojavljuje zbog razvoja moderne znanstvene medicine [4]. Posljedice skorbuta uključuju promjene na koži, sluznicama, veznom tkivu i zglobovima [5,6,7].

Vitamin C je jedan od najistraživanijih vitamina. Bez obzira na to, istražuje se i dalje. Kod vitamina C jako brzo dolazi do oksidacijskog procesa. Stvaraju se askorбилni radikali ili oksidirani produkt s dva elektrona, poznat kao dehidroaskorbinska kiselina (DHA). Oksidacijski proces vitamina C može se povećati povišenjem temperature ili pH vrijednosti, dok izloženost zraku, prekuhavanje i temperatura skladišta pokazuju značajne efekte na stabilnost spoja [8]. Askorbinska kiselina sadrži visoko reaktivnu hidroksilnu skupinu koja je jako osjetljiva na svjetlost, zagrijavanje i na prisutstvo oksidirajućeg sredstva [9]. Iznad pH 5,0; vitamin C postoji pretežno u obliku askorbat monoaniona (AscH^-), i u alkalnom okruženju iznad pH 12,0; prisutan je potpuno disociran oblik askorbat dianiona (AscH^{2-}). Produkt vitamina C u fiziološkom pH je nedvojeno i dominantno u obliku monoaniona AscH^- , što najviše pridonosi antioksidativnoj aktivnosti molekule u živom organizmu [10]. Zbog svog elektron-donorskog i reducirajućeg svojstva [11], antioksidans vitamin C je sposoban kelirati metalne ione ili djelovati direktno uklanjanjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i spriječavanjem oksidativnog oštećenja [12].

Stoga, jednostavne i brze metode za određivanje vitamina C mogu biti zanimljiva tema istraživanja. U današnje vrijeme, koriste se brojne analitičke metode za istraživanje vitamina C u različitim uzorcima: titrimetrija, spektrofotometrija, fluorimetrija, kromatografija i elektrokemijske tehnike. Kromatografske i elektrokemijske tehnike smatraju se najsofisticiranijim metodama kemijske analize koje omogućavaju selektivnu i osjetljivu detekciju analita [9]. Kromatografske separacijske tehnike najčešće uključuju tekućinsku kromatografiju povezanu s masenim spektrometrom (LC-MS) i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC). Iako se radi o osjetljivim tehnikama, one zahtijevaju visoke troškove održavanja te se konstantno traga za jeftinijim, a efikasnim i pouzdanim analitičkim tehnikama [13].

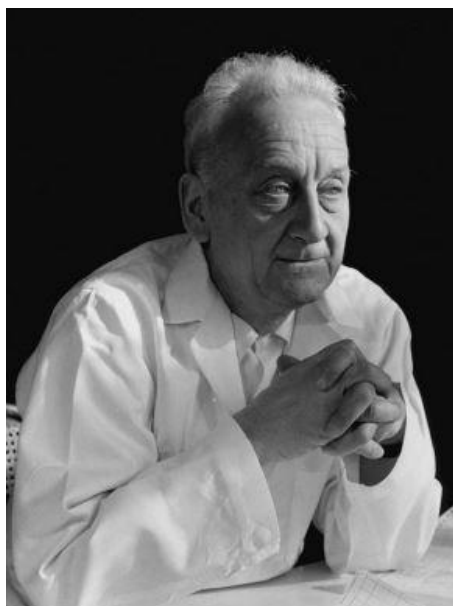
Elektrokemijske metode predstavljaju efikasnu alternativu, robusnijim analitičkim tehnikama, koja omogućava točno i precizno određivanje ispitivanih spojeva. Obično se elektrokemijska svojstva elektroaktivnih molekula mogu istražiti voltametrijskim tehnikama (ciklička voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija, pravokutnovalna voltometrija, voltometrija s linearnom promjenom potencijala, kronokulometrija, kronoamperometrija), UV-spektroelektrokemijom i s biosenzorima. Antioksidativni kapacitet može biti procjenjen jednako s elektrokemijskim tehnikama, kao i s upotrebom UV-VIS spektrofotometrijskih metoda koristeći 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i/ili Folin-Ciocalteu reagense (FCR) [13].

U ovom radu su ispitivana elektrokemijska svojstva vitamin C u modelnom sustavu uporabom cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije. Razvijene metode su primjenjene za kvalitativna i kvantitativna istraživanja vitamina C u realnim uzorcima uključujući komercijalne sokove i dodatke prehrani, dok je antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određena DPPH metodom.

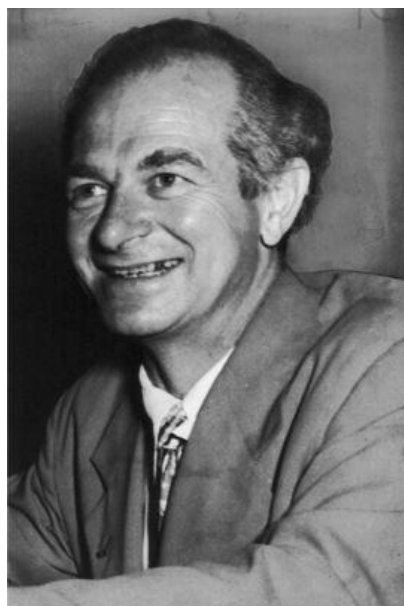
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. OTKRICE VITAMINA C

U prvoj polovici 20. stoljeća, otkriće i spoznaja o izuzetnoj važnosti vitamina C za zdravlje ljudi donijelo je veliki doprinos medicini. Vitamin C je prvi izolirao mađarski nobelovac, biokemičar dr. Albert Szent-Györhyi (Slika 1.). On je izolirao reducirajući faktor iz nadbubrežnih žlijezda domaćih zamoraca, kojemu je određena kemijska formula $C_6H_8O_6$ i nazvao ga heksuronska kiselina. U isto je vrijeme američki istraživački tim, vođen biokemičarem Charles Glen Kingom, izolirao askorbinski faktor iz limunovog soka povezujući ga s heksuronskom kiselinom. Konačnu strukturu vitamina C objavio je 1933. godine istraživački tim iz Birminghama, koji je vodio Reginald Herbert. Dr. Linus Pauling (Slika 2.), dvostruki nobelovac, prvi je spoznao veliku važnost vitamina C za imunološki sustav ljudi. Pauling je bio ispred svog vremena (sedamdesetih godina 20. stoljeća bio je barem 25 godina ispred medicinske zajednice). Pauling je smatrao da čak sto puta viši svakodnevni unos vitamina C od preporučenog preventira oboljenje od obične gripe. Iako je primao osude konvencionalne medicinske zajednice, imao je povjerenje „običnih ljudi“. Vitamin C ima današnji, zasluženi status, zbog takvog stava i smjelosti Paulinga [14].



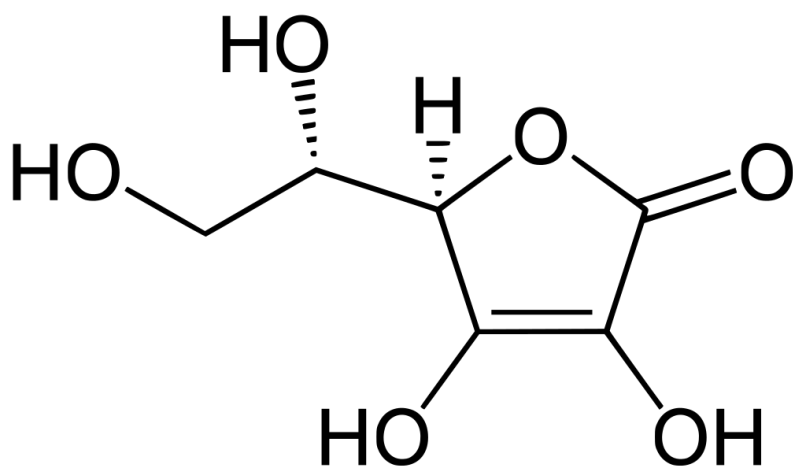
Slika 1. Albert Szent-Györhyi (1893.-1986.) [14].



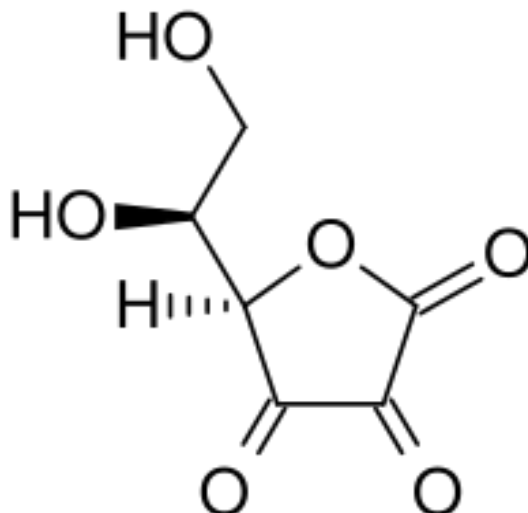
Slika 2. Linus Pauling (1901.-1994.) [14].

2.2. VITAMIN C

Vitamin C ($C_6H_8O_6$) je vitamin topljiv u vodi, esencijalan za organizam čovjeka i ne može se proizvesti u tijelu, stoga se mora unositi u organizam hranom. Ima dva bioaktivna oblika, to su L-askorbinska kiselina (Slika 3.) i dehidroaskorbinska kiselina (Slika 4.). Navedeni oblici vitamina C su pronađeni u hrani, najviše u voću i povrću (npr. u šipku, crnom ribizlu, trešnji, limunu, naranči, mandarinu, lisnatom povrću, paprici, kupusu, rajčici, krumpiru i sl.). Mnoga istraživanja su pokazala da ga najviše ima u crvenoj paprici i kiselom kupusu. Isto tako ima jako puno dodataka prehrani koji se mogu koristiti. Preporučeni dnevni unos za žene je 75 mg, a za muškarce 95 mg [1,2].



Slika 3. Strukturna formula L-askorbinske kiseline [15].

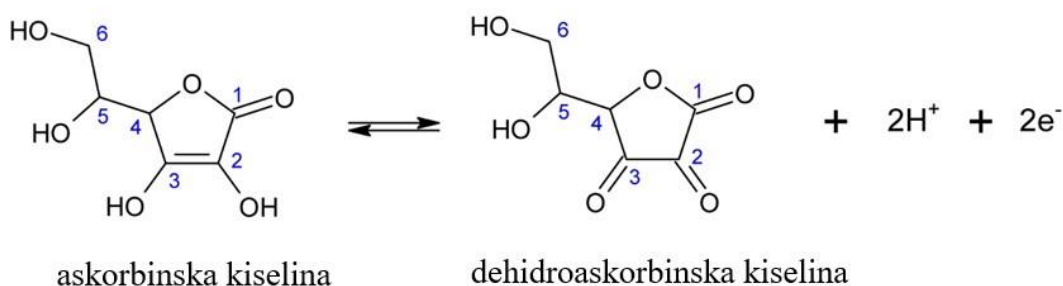


Slika 4. Strukturna formula dehidroaskorbinske kiseline [16].

Vitamin C je vrlo važan zbog svojih brojnih nutritivnih svojstva i pozitivnog utjecaja na zdravlje čovjeka. On je kofaktor za enzime uključene u sintezi kolagena, noradrenalina i balansiranje hormona adrenalina [5]. Vitamin C pomaže kod rasta i obnavljanja zubnog mesa i krvnih žila te potiče apsorpciju željeza u krv [6]. Odličan je za prevenciju bakterijskih i virusnih infekcija jer jača imunološki sustav. Nedovoljan unos vitamina C dovodi do vrlo poznate bolesti skorbuta do koje danas vrlo rijetko dolazi zbog toga što je većina zemalja opskrbljena voćem i povrćem koje sadrži vitamin C gotovo kroz cijelu kalendarsku godinu [1,7,17,18]. Deficit dovodi i do kancerogenih, endokrinoloških, kardioloških i neuroloških bolesti [18]. Vitamin C je najjači antioksidans među vitaminima topljivim u vodi, što je još jedan razlog njegove važnosti. Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Imaju sposobnost doniranja elektrona slobodnim radikalima, a da sami pri tome ne postaju nestabilni [1,2,3].

Kod vitamina C jako brzo dolazi do oksidacijskog procesa. Stvaraju se askorbilni radikali ili oksidacijski produkt koji nastaje otpuštanjem dva elektrona, poznat kao dehidroaskorbinska kiselina (DHA). Na slici 5. je prikazan mehanizam oksidacije vitamina C koji uključuje izmjenu dva elektrona i dva protona. Prikazani oksidacijski proces može se intenzivirati povišenjem temperature ili pH vrijednosti [8]. Iznad pH 5 vitamin C postoji pretežno u obliku askorbat monoaniona (AscH^-), dok je u alkalnom mediju iznad pH 12, prisutan potpuno disocirani oblik askorbat dianiona (AscH^{2-}). Produkt vitamina C u fiziološkom pH je

nedvojeno i dominantno u obliku monoaniona AscH^- , što najviše pridonosi antioksidativnoj aktivnosti molekule u živom organizmu [10]. Zbog svojih elektron-donorskih i reducirajućih svojstva [11], antioksidans vitamin C je sposoban kelirati metalne ione ili djelovati direktno uklanjanjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i na taj način spriječiti oksidativno oštećenje stanica. Dakle vitamin C je reducens koji otpušta elektrone i na taj način neutralizira slobodne radikale [12].



Slika 5. Mehanizam oksidacije vitamina C (L-askorbinske kiseline) [19].

Askorbinska kiselina sadrži visoko reaktivnu hidroksilnu skupinu koja je jako osjetljiva na svjetlost, zagrijavanje i na prisutstvo oksidirajućeg sredstva [20]. Kisik, svjetlost, usitnjavanje, rezanje, pranje, kuhanje i konzerviranje izazivaju značajan gubitak vitamina C iz hrane, jer u neutralnoj i alkalnoj okolini u organizmu vitamin C vrlo lako iz dehidroaskorbinske kiseline ireverzibilno oksidira do 2,3-diketogulonske kiseline [17].

2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA C

Do sada su provedena istraživanja vitamina C titrimetrijskim, spektrofotometrijskim [20], fluorimetrijskim, kromatografskim i elektrokemijskim metodama. Rezultati su pokazali da je najosjetljivija metoda bila kromatografska – tekućinska kromatografija povezana s masenom spektrometrijom (LC-MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) [9,12,21].

Elektrokemijska svojstva molekula mogu se određivati UV spektroelektrokemijom, biosenzorima [22], voltametrijskim metodama (ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, voltametrija s linearnom promjenom potencijala, kronokulometrija, kronoamperometrija) [11,22]. Dok se antioksidativni kapacitet može određivati elektrokemijskim metodama, UV-VIS spektrofotometrijskim metodama uz korištenje različitih reagensa: ABTS, FRAP, DPPH i Folin-Ciocalteu [23].

Majidi i AlQubury su određivali vitamin C u raznovrsnom voću i povrću s UV – spektrofotometrijskom i titracijskom metodom. Određivan je ukupni vitamin C (askorbinska kiselina i dehidroaskorbinska kiselina). Izmiksani uzorak raznovrsnog voća i povrća homogeniziran je s otopinom 85% sumporne kiseline – 10% octene kiseline. Bromna voda je dodana da oksidira askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu. Dodatkom 3-4 kapi 10% tioureje uklonjen je višak broma. Dodan je 2,4- dinitrofenil hidrazin, te je otopina stajala, na temperaturi od 37 °C, dva sata. Zatim je otopina hlađena u ledu i titrimetrijski se određivao vitamin C. Tretiranjem s razrijeđenom sumpornom kiselinom se stvarao crveni kompleks. Spektrofotometrijski su sve otopine voća i povrća mjerene pri valnoj duljini od 280 nm gdje vitamin C pokazuje maksimalnu apsorbanciju. Rezultati su pokazali da je vitamin C prisutan u velikim količinama u naranči i kiviju. Usporedba dvije metode je pokazala da je uspješnije određivanje vitamina C spektrofotometrijskom metodom [20].

Karlsen, Blomhoff i Gundersen su analizirali vitamin C u ljudskoj plazmi uz korištenje HPLC-a s monolitskom kolonom i UV detekcijom. Razmak između pripreme uzoraka i analize je minimaliziran, dopuštajući analizu 100 uzoraka u manje od 3,5 sati. Krv je uzorkovana od zdravih, odraslih volontera. Prema preporukama WHO, vakumske cijevi s heparinom se koriste za određivanje vitamina C u ljudskoj plazmi. Generiranje plazme počinje odmah po uzorkovanju

krvi, plazma je zakiseljena i smrznuta na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 3 mjeseca prije analize. Metafosforna kiselina (MPA) je korištena za stabilizaciju vitamina C u biološkim uzorcima. Na taj se način zakiseljavanjem sprječava oksidacija askorbinske kiseline i hidroliza dehidroaskorbinske kiseline. Zbog svoje polarne prirode i male molekularne mase, vitamin C ima slabo svojstvo zadržavanja na regularnim obrnutim fazama. Korišten je ionski par (dodecil-trimetil amonijev klorid) u mobilnoj fazi za povećanje zadržavanja. Za detekciju je korišten detektor s nizom dioda (DAD, eng. *Diode Array Detector*). Identificiranje pika vitamina C na kromatogramu je potvrđeno tretiranjem krvne plazme s askorbat oksidazom. Metoda je pokazala izvrsnu analitičku osjetljivost, specifičnost, preciznost, i linearnost tijekom validacije [21].

Arabali, Ebrahimi, Abbasghorbani i ostali su elektrokemijski određivali vitamin C u prisutnosti nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) koristeći modificiranu elektrodu kao senzor. Senzor je baziran na ugljikovoj pasta elektrodi modificiranoj s CdO nanočesticama i 1-metil-3-butylimidazol bromidom (CdO/NP/IL/CPE). Senzor je vrlo osjetljiv i pokazuje veliku elektrokatalitičku aktivnost prema vitaminu C. Iscijedili su svježi sok iz realnih uzoraka. Sok je zatim filtriran i zakiseljen s limunskom kiselinom do pH 2. Senzor je pripremljen miješanjem ionske tekućine, tekućeg parafina, Cd/NPs i grafita u prahu. Staklena cjevčica je napunjena potrebnom količinom paste. Vitamin C i nikotinamid adenin dinukleotid istraživani su voltametrijom s linearnom promjenom potencijala. Senzor je pokazao dobru stabilnost, osjetljivost, selektivnost i ponovljivost [22].

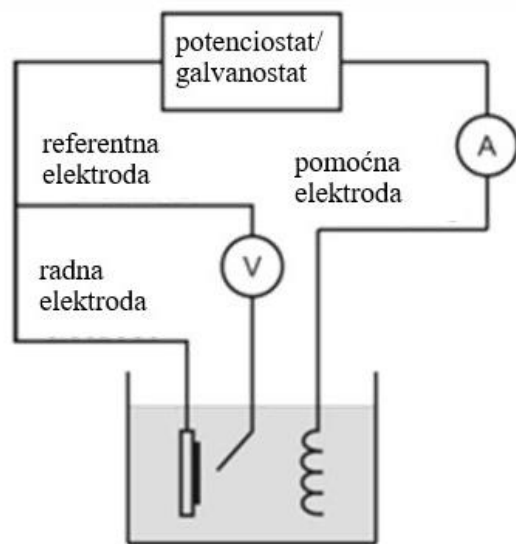
U ovom diplomskom radu korištene su voltametrijske metode za elektrokemijsku karakterizaciju vitamin C te je DPPH metoda korištena za određivanje antioksidacijske aktivnosti vitamin C u realnim uzorcima.

2.4. VOLTAMETRIJSKE METODE

Voltometrija je skupina elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje (signal odziva) kao funkcije potencijala (signal pobude) narinutog na elektrodu, ali uz uvjete koji izazivaju polarizaciju radne elektrode. Grafički prikaz te ovisnosti je voltamogram. U voltametrijskoj ćeliji na radnoj elektrodi odvijaju se oksido – redukcijske reakcije, čija se izmjena elektrona, između oblika neke tvari koji je reduciran (R), i oblika druge tvari koji je oksidiran (O), odvija tako da ne dolazi do direktnog kontakta R i O oblika tvari odnosno odgovarajućih iona. Izmjena elektrona se odvija posredstvom vodiča (metal, grafit, živa), koji su uronjeni u odvojene otopine R i O tvari. Na površini vodiča tvar R se oksidira u oksidirani oblik (O) odnosno oksidirani oblik tvari (O) se reducira u reducirani oblik (R). Elektroda je vodič u kontaktu sa smjesom oblika neke tvari koji su reducirani i oksidirani. Dok se sve zajedno naziva polučlanak. Tvar mora biti otopljena ili rastaljena u otapalu, da bi došlo do pokretljivosti iona ili molekula tvari s kojom je vodič u kontaktu. U voltimetriji se najveći broj eksperimenata provodi u vodenom mediju. Od kada je 1922. godine, češki kemičar Jaroslav Heyerovsky uveo polarografiju, razne voltametrijske tehnike analiza se razvijaju u kontinuitetu sve do danas, te zamjenjuju klasične analitičke metode [24].

Voltametrijska ćelija se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu analita uz dodatak inertnog elektrolita (Slika 6.). Te tri elektrode su:

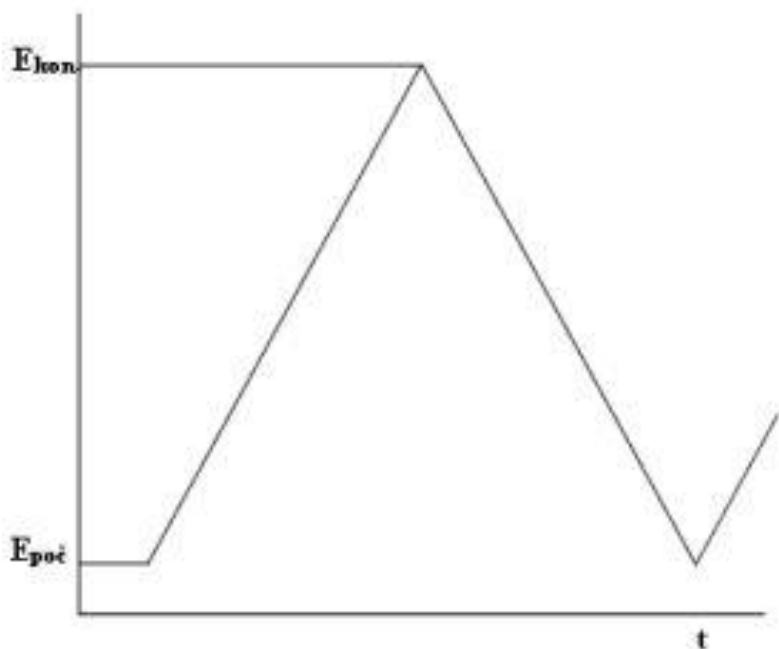
1. Radna elektroda (mikroelektroda) - njezin potencijal se održava unutar zadanih vrijednosti, ona je vrlo mala i zbog toga je sklona polarizaciji.
2. Referentna elektroda - potencijal joj je stalan i ne mijenja se.
3. Pomoćna elektroda (protuelektroda) - omogućava tok struje od izvora kroz otopinu pa sve do radne elektrode [13,25].



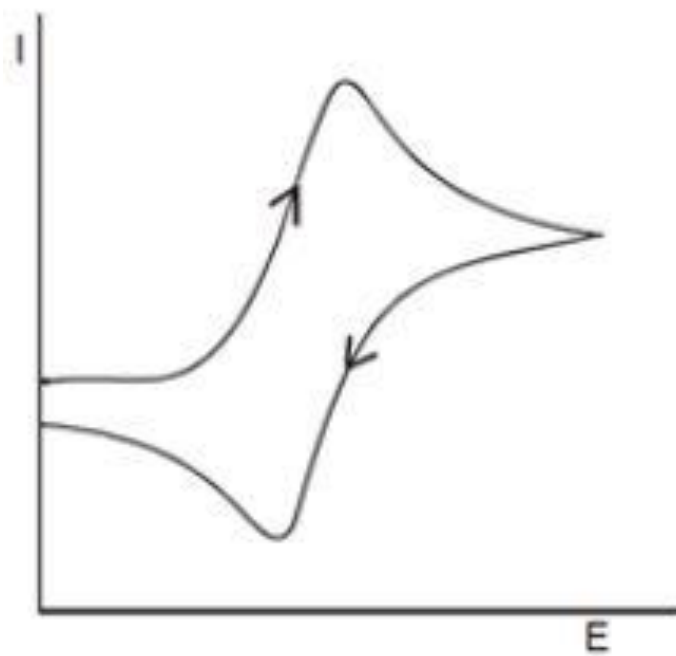
Slika 6 . Shema troelektrodne voltametrijske ćelije [26].

2.4.1. Ciklička voltametrija

Princip cikličke voltametrije je takav da signal pobude neprestano mijenja smjer, odnosno kroz određeno vrijeme najprije linearno raste (odvija se proces oksidacije elektroaktivne tvari) te nakon što dosegne određenu vrijednost potencijala, promijeni se smjer potencijala te dolazi do redukcije oksidiranog oblika elektroaktivne tvari. Tijekom eksperimenta potencijal radne elektrode se linearno mijenja s vremenom; od početnog potencijala ($E_{\text{poč}}$) do konačnog potencijala (E_{kon}) i opet natrag do početnog potencijala. Na slici 7. prikazan je signal pobude a na slici 8. signal odziva za cikličku voltametriju (ciklički voltamogram). Fizikalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su: ($I_{\text{p,a}} / I_{\text{p,k}}$), što odgovara omjeru visine oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha te ΔE_p ($\Delta E_p = E_{\text{p,a}} - E_{\text{p,k}}$), što je razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha [4,13,27].



Slika 7. Prikaz signala pobude za cikličku voltametriju [28].



Slika 8. Prikaz signala odziva za cikličku voltametriju [28].

Primjene cikličke voltametriju su razne:

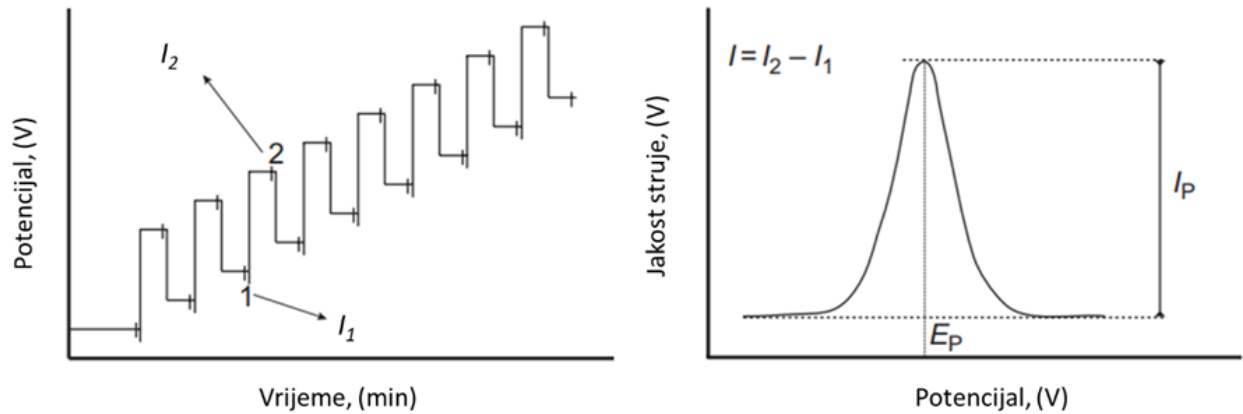
- Proučavanje redoks procesa/procjena reakcijskog mehanizma

- Određivanje stabilnosti reakcijskih produkata
- Prisutnost intermedijera u redoks reakcijama
- Praćenje kinetike prijenosa elektrona
- Praćenje reverzibilnosti reakcije
- Određivanje difuzije analita
- Određivanje formalnog potencijala redukcije analita

Primjena je rijetko kvantitativna, je su granice detekcije u optimalnim uvjetima $10^{-5} - 10^{-6}$ mol dm⁻³ [4,13,25].

2.4.2. Diferencijalna pulsna voltametrij

Diferencijalna pulsna voltametrij je dobila ime po tome što se mjeri razlika (diferencija) u struji ćelije, koja je uzrokovana naponskim impulsom (Slika 9.). Kod ove metode, na radnoj elektrodi se primjenjuju pulsevi određene veličine, koji su dodani na linearni nagib. Struja ćelije se mjeri neposredno prije primjene naponskog impulsa, I_1 , ali i na kraju trajanja impulsa I_2 ; pa je signal odziva (I), razlika jakosti struje ($I = I_2 - I_1$), 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. Visina toga strujnog vrha odgovara koncentraciji analita. Dakle, kod diferencijalne pulsne voltametrije, signal pobude je niz kratkotrajnih pulseva, a signal odziva je proporcionalan koncentraciji reaktanata. Ona pokazuje samo oksidaciju produkta, ali i njegovu adsorpciju ukoliko je ima. Izrazito je osjetljiva, može detektirati maksimume strujnih vrhova koji se razlikuju za samo 0,04 – 0,05 V [4,13,21].



Slika 9. Signal pobude i signal odziva (diferencijalni pulsni voltamogram) za diferencijalnu pulsnu voltametriju [29].

Primjene diferencijalne pulsne voltametrije:

- Analitičke svrhe
- Karakterizacija molekularne građe elektroaktivnih tvari u otopini.
- Analiza elektroaktivnih tvari vrlo niske koncentracije [13].

2.5. DPPH METODA

DPPH metoda naziva se još i „Metoda po Brand-Williamsu“. Koristi se za određivanje antioksidativne aktivnosti tvari. Metoda se zasniva na reakciji stabilnog slobodnog radikala, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, s antioksidansom [30].

2.5.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su kratkoživuće kemijske strukture, sadrže nesparene elektrone što ih čini nestabilnima i vrlo reaktivnima (NO^\bullet , NO_2^\bullet , O_2^\bullet , OH^\bullet , atom halogenih elemenata, alkalijски метали и сл.).

Oni nastaju:

1. Homolitičkim cijepanjem veza uz visoku temperature (taj proces se naziva fotoliza)
2. Reakcijama molekula s drugim slobodnim radikalima.

Mogu biti:

1. Reducensi – doniraju elektrone.
2. Oksidansi – primaju elektron od drugih molekula.

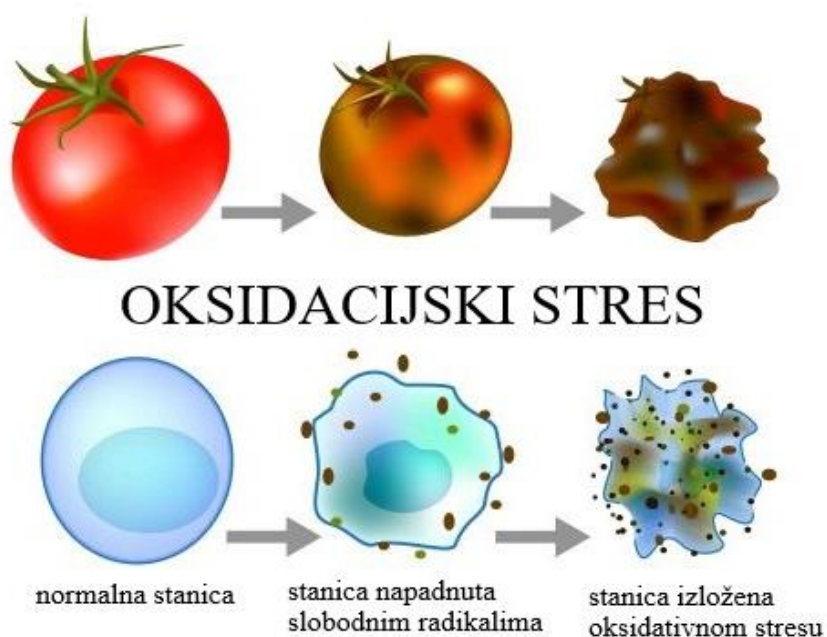
Oštećenja stanica izazvana djelovanjem slobodnih radikala su značajna u razvoju kardiovaskularnih i malignih bolesti. Mogu reagirati s drugim molekulama, te ponavljanjem takvih reakcija nanijeti veliku štetu molekulama DNA, proteina, lipida i ugljikohidrata.

Pod nazivom slobodni radikali najčešće se misli na ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*) – reaktivne kisikove spojeve i RNS (eng. *Reactive Nitrogen Species*) – reaktivne dušikove spojeve. Njihov nastanak u tijelu uzrokuju stres, loša prehrana, nesanica, povrede, lijekovi te upalni procesi.

ROS su ioni ili vrlo male anorganske ili organske molekule (ioni kisika, slobodni radikali i peroksidi). Međuprodukt su normalnog metabolizma kisika i imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji. U prisutnosti nesparenih elektrona su visoko reaktivni. RNS su skupina

antimikrobnih molekula izvedenih iz dušikovog oksida ($\cdot\text{NO}$) i superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Proizvedene su enzimskom aktivnošću sintaze dušikova oksida i NADPH oksidaze.

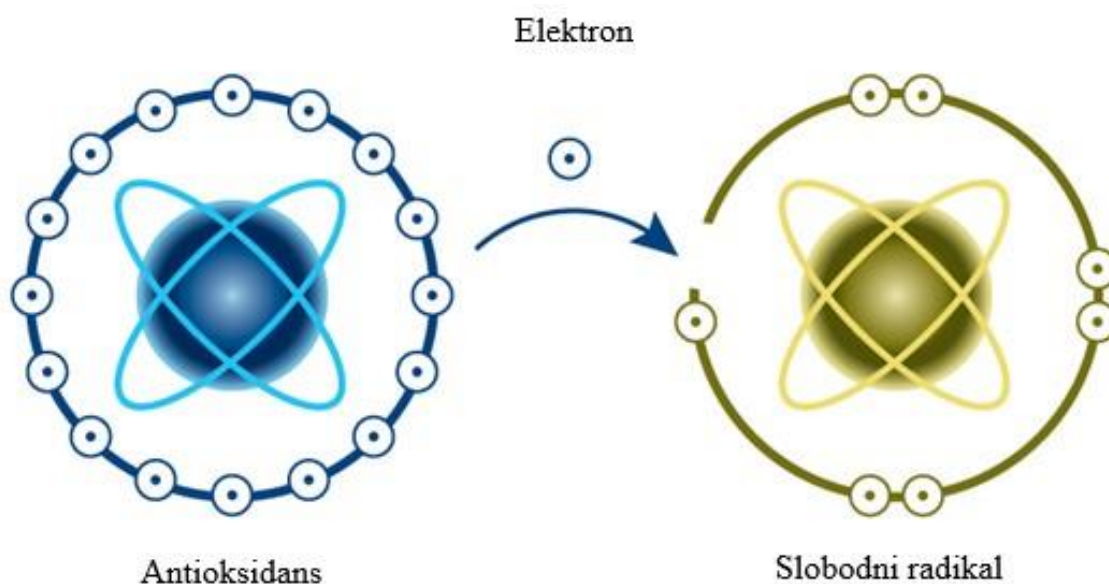
Male količine ROS i RNS aktiviraju protein kinazu i utječu na intracelularne redoks sustave, dok velike količine dovode do oksidacijskog stresa, koji predstavlja poremećaj ravnoteže nastajanja i uklanjanja slobodnih radikala. Prilikom oksidacijskog stresa dolazi do pomaka ravnoteže u smjeru oksidacije, u oksidativno-redukcijskim reakcijama, u stanici, što dovodi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala i uništavanja stanice (Slika 10.). Oksidacijski stres i općenito slobodni radikali iz organizma, mogu se neutralizirati djelovanjem antioksidansa [1,31,32].



Slika 10. Prikaz djelovanja slobodnih radikala na stanicu u organizmu [33].

2.5.2. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Imaju sposobnost doniranja elektrona slobodnim radikalima (oksidacija), a da sami pri tome ne postaju nestabilni (Slika 11.). Djeluju na slobodne radikale tijekom sva tri glavna koraka procesa oksidacije, inicijacije, propagacije i terminacije [1,31].



Slika 11. Prikaz neutralizacije slobodnih radikala antioksidansima [34].

Antioksidansi se mogu podijeliti prema prisutnosti u organizmu na egzogene i endogene antioksidanse. Egzogeni antioksidansi se u organizam unose hranom. Najveći izvor egzogenih antioksidansa su svježe voće i povrće, meso, mliječni proizvodi i dodaci prehrani s vitaminom C i E, flavonoidima i β -karotenima. Endogeni antioksidansi nastaju u organizmu čovjeka kao produkti metabolizma živih organizama. Mogu se unijeti u organizam i hranom, najznačajniji su superoksid-dismutaza, koenzim Q10, glutation peroksidaza te katalaza. Antioksidansi se mogu podijeliti i prema aktivnosti na enzimske i neenzimske antioksidanse. Enzimski antioksidansi uklanjaju slobodne radikale tako da ih fragmentiraju, te prevode opasne ROS u vodikov peroksid, te u vodu (uz kofaktore Cu, Zn, Mn, Fe). Neenzimski antioksidansi prekidaju niz reakcija slobodnih radikala. Najznačajniji su vitamin C, vitamin E, glutation, koenzim Q10 te karotenoidi.

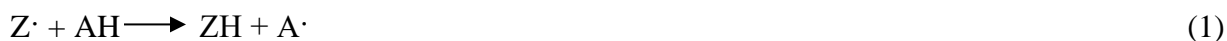
Antioksidansi usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, smanjuju rizik nastanka raka, pomažu pri suzbijanju razvoja tumora, štite srce i krvne žile i jačaju imunološki sustav [1,2,5,31].

2.5.3. Osnova DPPH metode

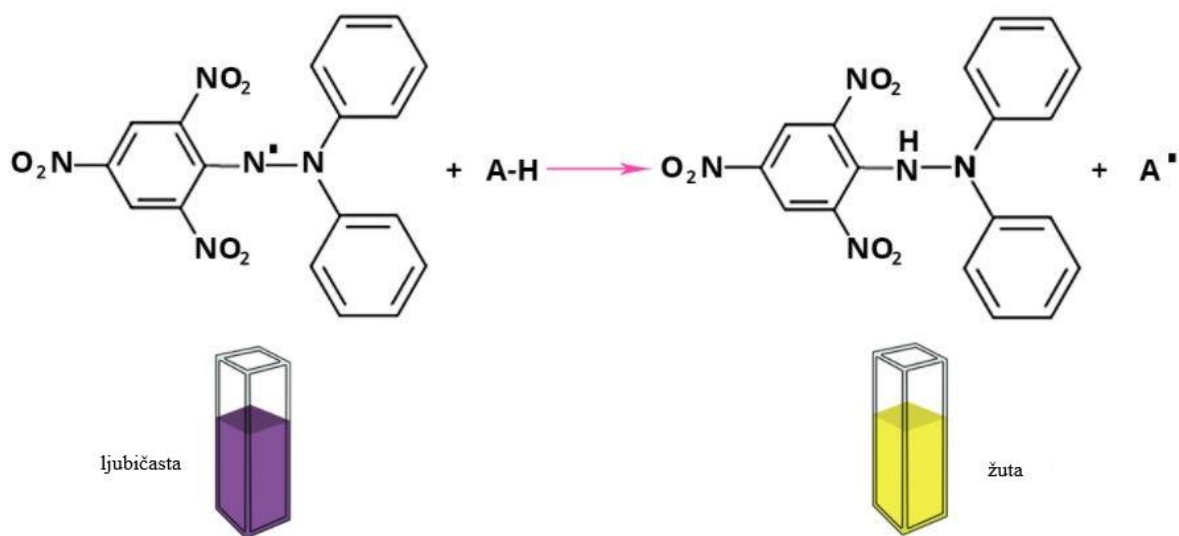
DPPH metodu se dugo svrstavalo u metode čija je baza reakcija izmjene vodikovog atoma. Praćenjem kinetike reakcije fenola i DPPH, došlo se do druge spoznaje. Korak, koji određuje brzinu reakcije između fenola i DPPH, uključuje brzu izmjenu elektrona između fenoksidnog aniona i DPPH. U metodi se prati promjena boje reagensa (otopine DPPH) koja uslijed procesa redukcije blijedi [34].

DPPH je karakteriziran kao stabilan slobodni radikal zbog delokalizacije nesparenog elektrona preko cijele molekule, tako da ne dolazi do dimerizacije, kao što je slučaj s većinom slobodnih radikala. Zbog delokalizacije otopina DPPH je ljubičaste boje. Kada je otopina DPPH pomiješana s tvari koja može donirati vodikov atom, prevladava reducirani oblik i dolazi do gubitka ljubičaste boje, te nastaje žuta otopina (Slika 12.).

Ukoliko DPPH predstavlja $Z\cdot$, a donorska molekula AH oblik, reakcija redukcije radikala koja opisuje ovu metodu opisana je relacijom (1):



gdje ZH predstavlja reducirani oblik DPPH molekule, a $A\cdot$ predstavlja slobodni radikal nastao u ovom prvom koraku. Zatim $A\cdot$ podliježe daljnjim reakcijama koje kontroliraju ukupnu stehiometriju, koja prikazuje brojne molekule DPPH reducirane (obezbojene) s jednom molekulom reducensa [32,36].



Slika 12. Prikaz redukcije DPPH radikala i promjene boje [37].

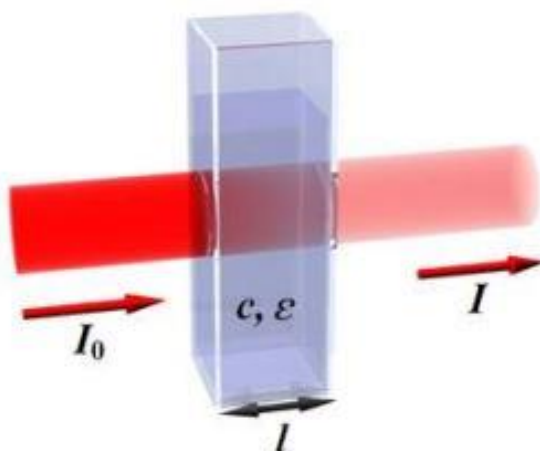
Postotak DPPH aktivnosti računa se prema relaciji (2):

$$\% \text{ DPPH aktivnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

gdje je A_0 apsorbancija otopine DPPH, a A_1 je apsorbancija otopine DPPH u koju je dodan ispitivani antioksidans, sve mjereno pri istoj valnoj duljini [29,32]. DPPH mjerenja odrađena su na UV-VIS spektrofotometru pa u nastavku teksta slijedi opis UV-VIS spektroskopije.

2.6. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija je grana fizike koja proučava efekte vezane uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja; tako nastali emisijski (apsorpcijski) spektri karakteristični su za određenu tvar. UV-VIS spektroskopija koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini, dakle onih koje apsorbiraju svjetlost u ultraljubičastom (UV 100-200 nm) i vidljivom dijelu spektra (VIS 380 – 750 nm). Mjeri se apsorbanacija uzorka iz kojeg se preko Beer Lambertovog zakona može odrediti koncentracija. Na slici 13. je shematski prikazan Beer-Lambertov-ovog zakona: $A = -\log(I/I_0) = \epsilon cL$ [38,39].



Slika 13. Shematski prikaz Beer-Lambertovog zakona [40].

gdje je : A -apsorbancija

I_0 -intenzitet upadnog zračenja

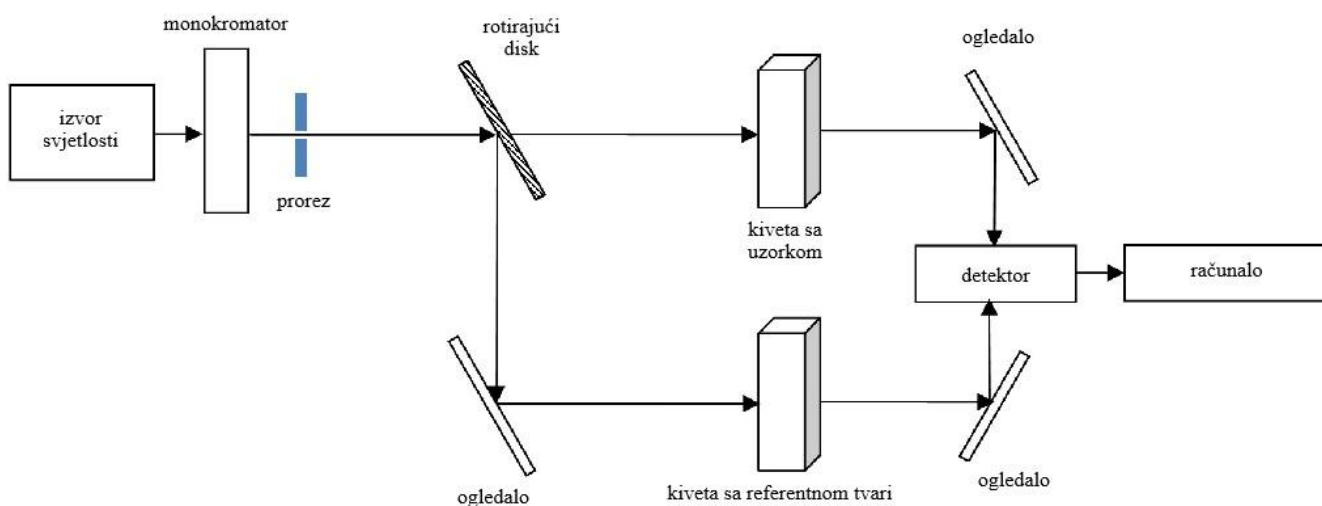
I -intenzitet propuštenog zračenja

ϵ -molarni apsorpcijski koeficijent

c -tražena koncentracija

L -duljina puta upadne svjetlosti pri prolasku kroz uzorak

Na slici 14. je prikaz dvosnopnog UV-VIS spektrofotometra na kojem se rade mjerenja za određivanje antioksidativne aktivnosti [38,39,41].



Slika 14. Shematski prikaz dvosnopnog UV-VIS spektrofotometra [42].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- L-askorbinska kiselina, $C_6H_8O_6$
- dinatrijev hidrogen fosfat, Na_2HPO_4
- prah α -aluminijeva oksida, $\alpha-Al_2O_3$
- destilirana voda

Standardne otopine L-askorbinske kiseline pripremljene su razrijeđivanjem osnovne otopine ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) vodom iz MiliQ Millipore sustava ($\kappa \leq 0,055 \text{ } \mu\text{S/cm}$) i dalje su korištene za elektrokemijska mjerenja. Komercijalni voćni sokovi su analizirani u obliku u kojem su nabavljeni, dok je instant narančasti prah otopljen u čistoj vodi ($\gamma = 5 \text{ g praha/100 mL vode}$) i dodatak prehrani-vitamin C je otopljen u čistoj vodi (1 tableta/100 mL vode). Analizirano je pet uzoraka, uzorak 1 (domaći bazgin sok) (Slika 15A), uzorak 2 (instant piće od naranče u prahu) (Slika 15B), uzorak 3 (komercijalni narančin sok) (Slika 15C), uzorak 4 (dodatak prehrani-vitamin C) (Slika 15D) i uzorak 5 (komercijalni sok od šljive) (Slika 15E).

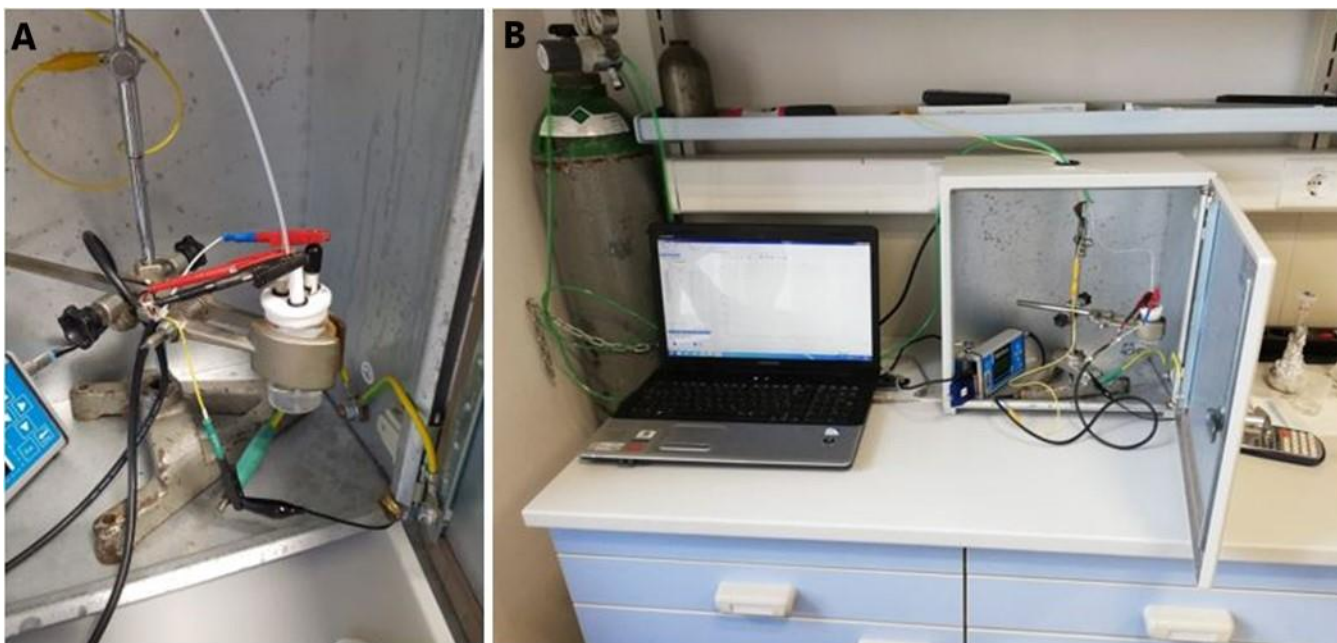


Slika 15. Uzorci korišteni u ovom radu: A) uzorak 1 – domaći bazgin sok, B) uzorak 2 – instant piće od naranče u prahu, C) uzorak 3 – komercijalni narančin sok, D) uzorak 4 – dodatak prehrani - vitamin C te E) uzorak 5 – komercijalni sok od šljive.

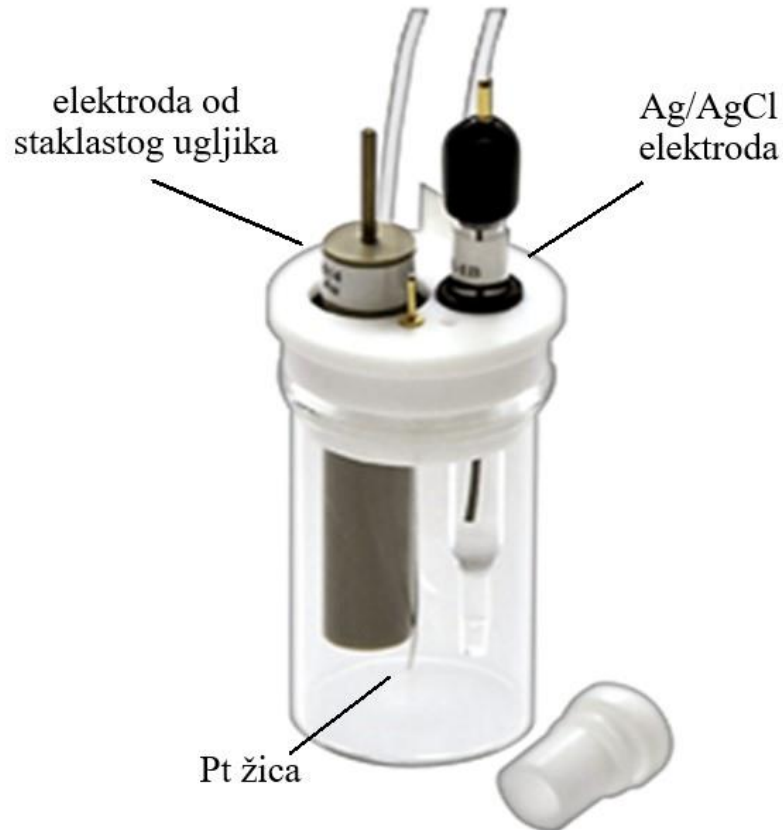
3.2. METODE

3.2.1. Ciklička i diferencijalna pulsna voltametrijska mjerenja

Elektrokemijski eksperiment je izveden u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji (Slika 16A) na PalmSens potenciostat/galvanostatu (PalmSens BV, Utrecht, The Netherlands) (Slika 16B). Elektroda od staklastog ugljika (geometrijsko područje $0,018 \text{ cm}^2$) je korištena kao radna elektroda, platinska žica kao pomoćna elektroda i Ag/AgCl kao referentna elektroda (Slika 17.). Prije svakog mjerenja, elektroda od staklastog ugljika polirana je s $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ($0,05 \text{ }\mu\text{m}$, ALS, Japan) i sustav je propuhivan argonom visoke čistoće, Ar5 ($\phi_{\text{Ar}} = 99,999 \%$). Natrijev dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), $c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ korišten je kao inertni elektrolit. Osnovna otopina vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) pripremljena je svaki dan i razrijeđivana do odgovarajuće koncentracije ovisno o mjerenju, Brzina polarizacije elektrode u cikličkoj voltametriji varirala je od 25 mV/s do 300 mV/s . Uvjeti mjerenja za diferencijalnu pulsnu voltametriju su sljedeći: amplituda pulsa 25 mV , “scan increment” 5 mV , brzina polarizacije elektrode 5 mV/s i širina pulsa 70 ms .



Slika 16. A) Troelektrodna voltametrijska ćelija, B) PalmSens potenciostat/galvanostat.



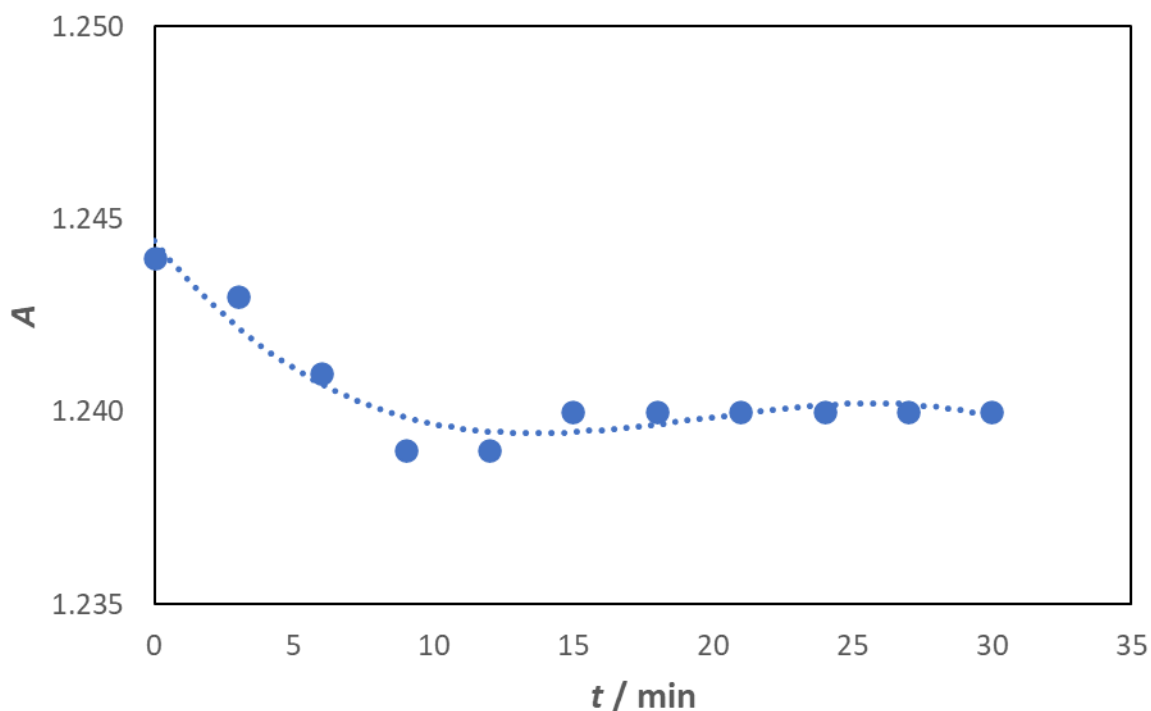
Slika 17. Prikaz elektroda na troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji. Elektroda od staklastog ugljika - radna elektroda, Ag/AgCl - referentna elektroda, platinska žica - protuelektroda [43].

Na radnoj elektrodi se odvija redoks reakcija. Prema referentnoj elektodi se regulira pobudni ili mjeri odzivni signal. Pomoću protuelektode se ostvaruje tok električne struje kroz ćeliju [44].

3.2.2. DPPH metoda (Brand-Williams metoda)

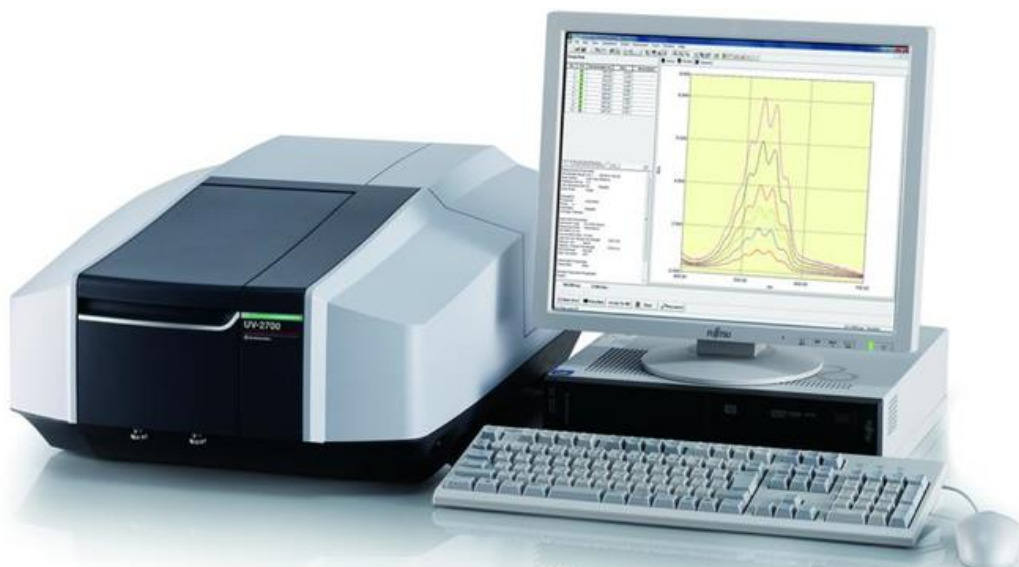
Svježa DPPH otopina (c (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) = 0,094 mmol/dm³) pripremana je u etanolu prema Brand-Williams metodi [30]. Reakcija uklanjanja radikala provedena je miješanjem 20 μ L vitamina C i 980 μ L DPPH otopine, te su uzorci držani u mraku zamotani folijom 15 minuta. Na slici 18. prikazana je ovisnost apsorbancije kontrolnog uzorka (980 μ L DPPH i 20 μ L etanola) o vremenu. Iz slike je vidljivo da je nakon 15 minuta postignuta približno

konstantna vrijednost apsorbancije, pa su u ovom radu apsorbancije ispitivanih uzoraka očitavane nakon 15 minuta.



Slika 18. Prikaz apsorbancije kontrolnog uzorka (0,98 mL DPPH i 0,02 mL etanola) kao funkcije vremena.

UV-VIS mjerenja su izvedena koristeći Shimadzu UV-2600 spektrofotometar pri $\lambda_{\max} = 515$ nm (Slika 19.). Antioksidacijska aktivnost uzoraka je procijenjena promjenom boje od tamno ljubičaste do blijedo žute [30,32,36]. Mjerenja su izvedena tri puta i iskazana kao % aktivnosti uklanjanja (%DPPH).

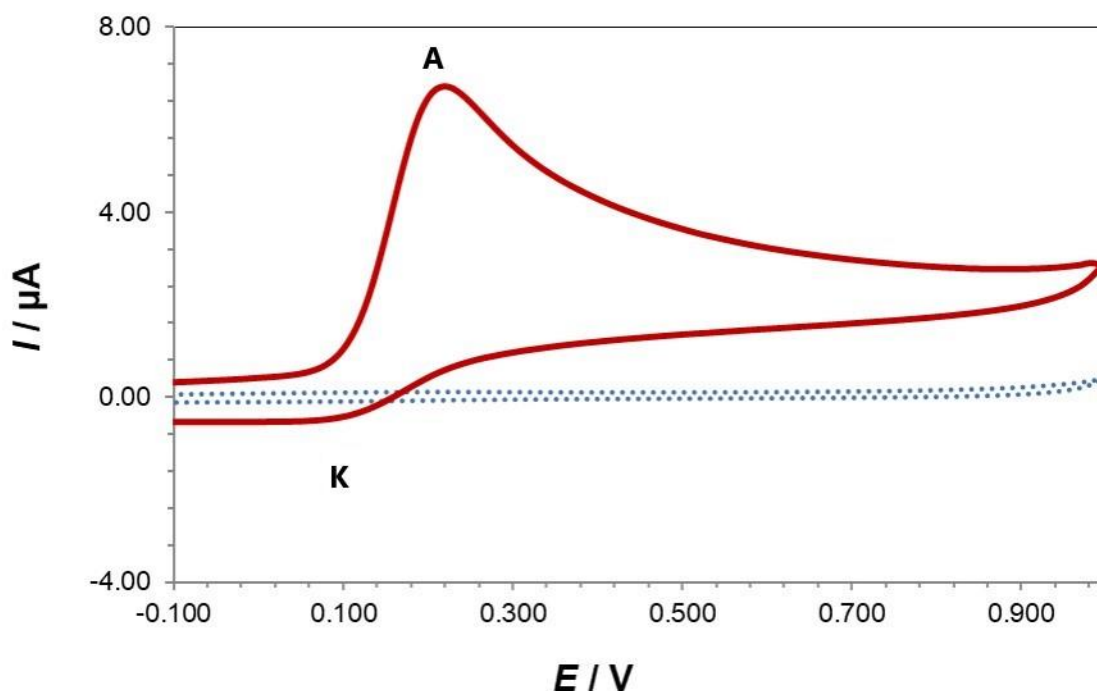


Slika 19. UV-VIS spektrofotometar Shimadzu UV-2600 [45].

3.3. REZULTATI I RASPRAVA

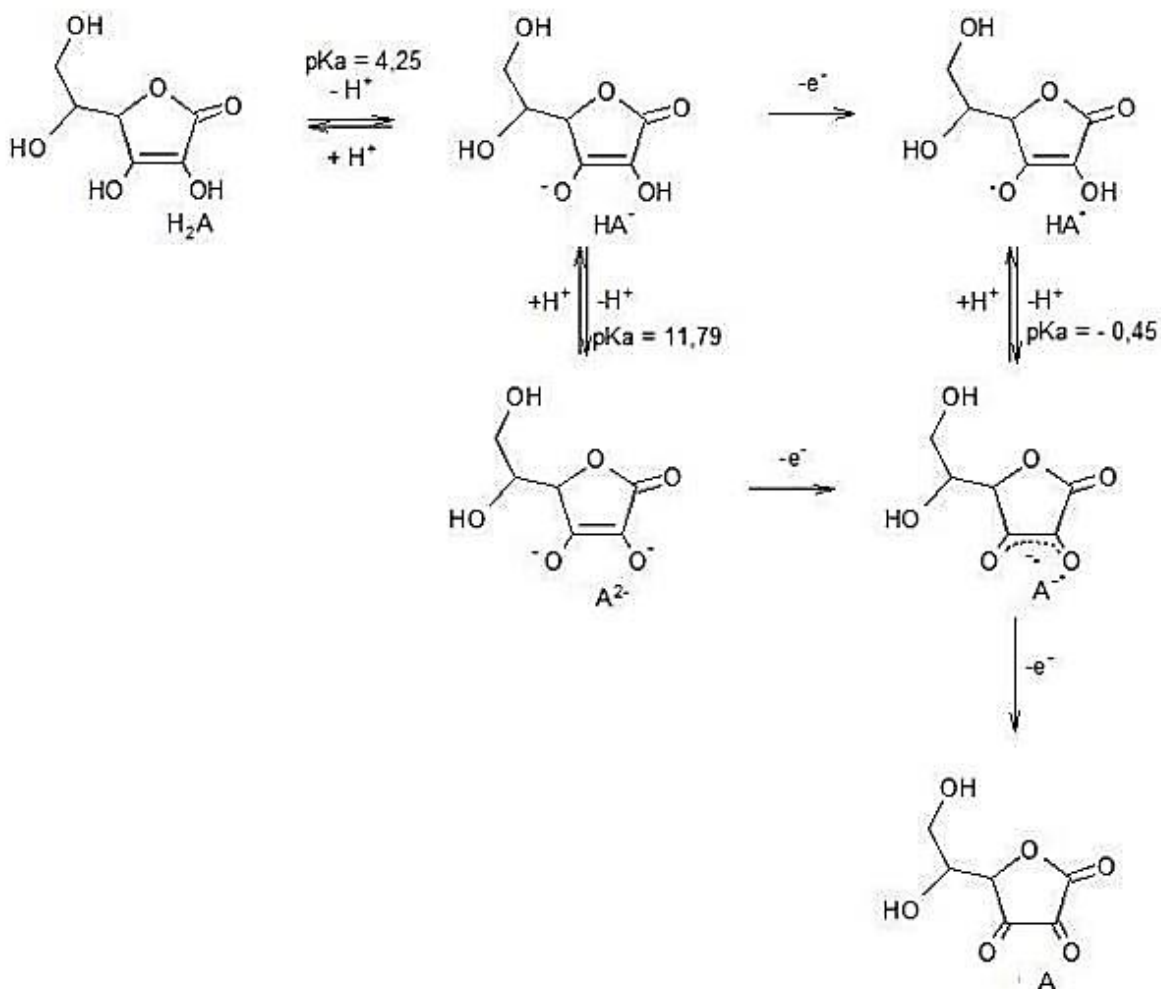
3.3.1. Ciklička voltametrija

Elektrokemijska svojstva L-askorbinske kiseline su prvo proučavana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od -0,1 V do 1,0 V s Ag/AgCl referentnom elektrodom. Na slici 20. prikazan je ciklički voltamogram L-askorbinske kiseline.



Slika 20. Ciklički voltamogram blank (...) otopine i otopine vitamina C (—) ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol/dm³) u NaH₂PO₄ ($I_c = 0,1$ mol/dm³) pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150$ mV/s.

U cikličkom voltamogramu je vidljiv jedan anodni strujni vrh (A) pri potencijalu, $E_{p,a} = 0,22$ V, koji odgovara oksidaciji askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu i jedan katodni vrh (K) pri potencijalu, $E_{p,k} = 0,10$ V koji odgovara redukciji dehidroaskorbinske kiseline u askorbinsku kiselinu. Dobivena vrijednost ΔE_p iznosi 120 mV što ukazuje na kvazi-reverzibilnu reakciju oksidacije (Slika 21.) [21,27,46].

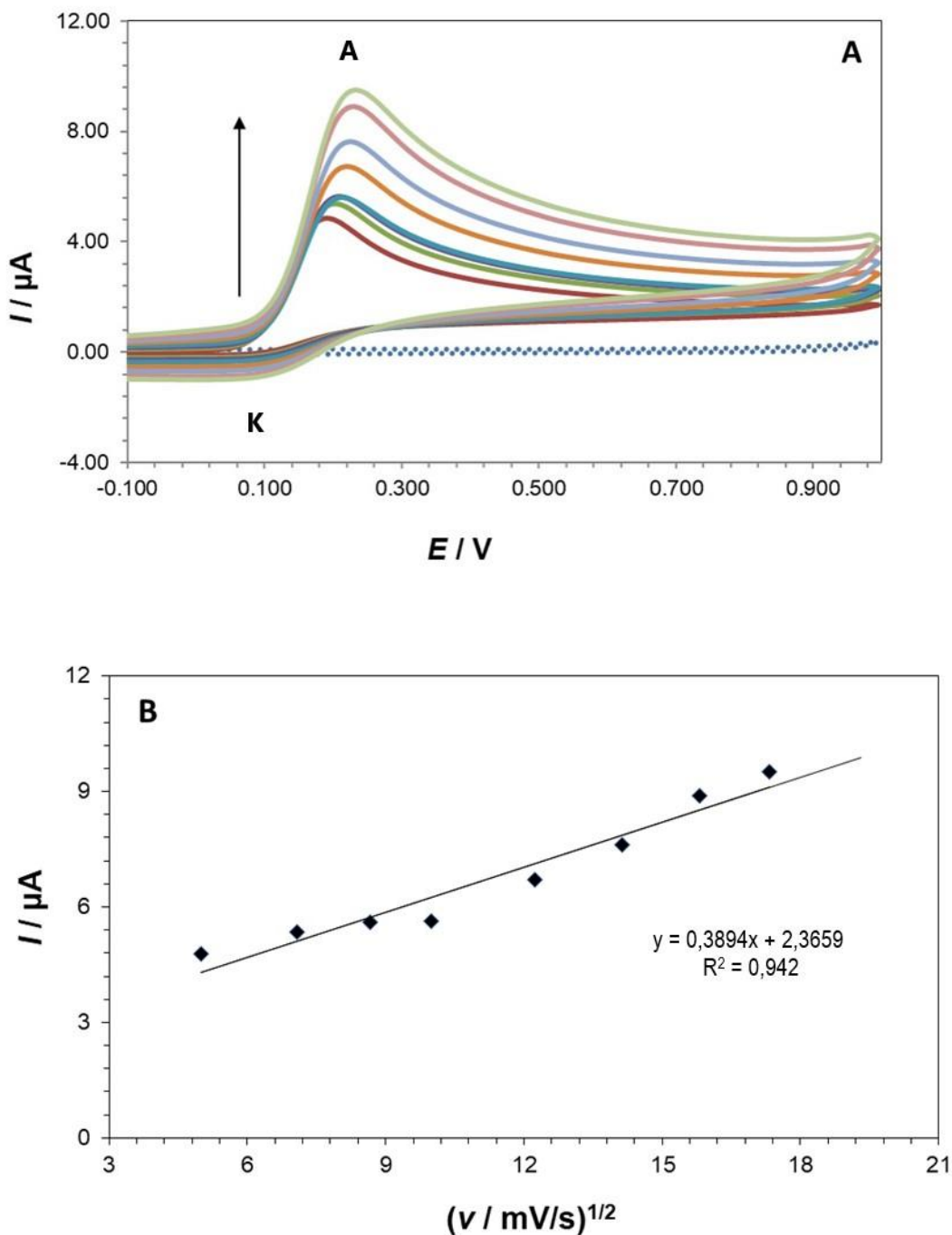


Slika 21. Oksidacijski mehanizam L-askorbinske kiseline [46].

Na slici 21. H_2A označava askorbinsku kiselinu, HA^- askorbatni monoanion (askorbat), A^{2-} askorbatni dianion, HA^\bullet askorbil radikal, A^\bullet askorbil radikal anion, $A^{\bullet+}$ askorbil radikal kation, A dehidroaskorbinsku kiselinu.

Proučavan je i efekt brzine promjene potencijala na oksido-redukcijske strujne vrhove L-askorbinske kiseline. Ciklički voltamogrami L-askorbinske kiseline ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$) snimljeni pri različitim brzinama promjene potencijala ($v = 25 - 300 \text{ mV/s}$) prikazani su na slici 22A. Kao što je prikazano, jakosti struje oba strujna vrha, anodnog i katodnog, povećavaju se kada se povećava brzina promjene potencijala. Linearna korelacija između struje anodnog vrha i drugog korijena brzine promjene potencijala pokazuje da je oksidacija vitamina C difuzijski kontroliran proces (Slika 22B). Dobivena linearna korelacija

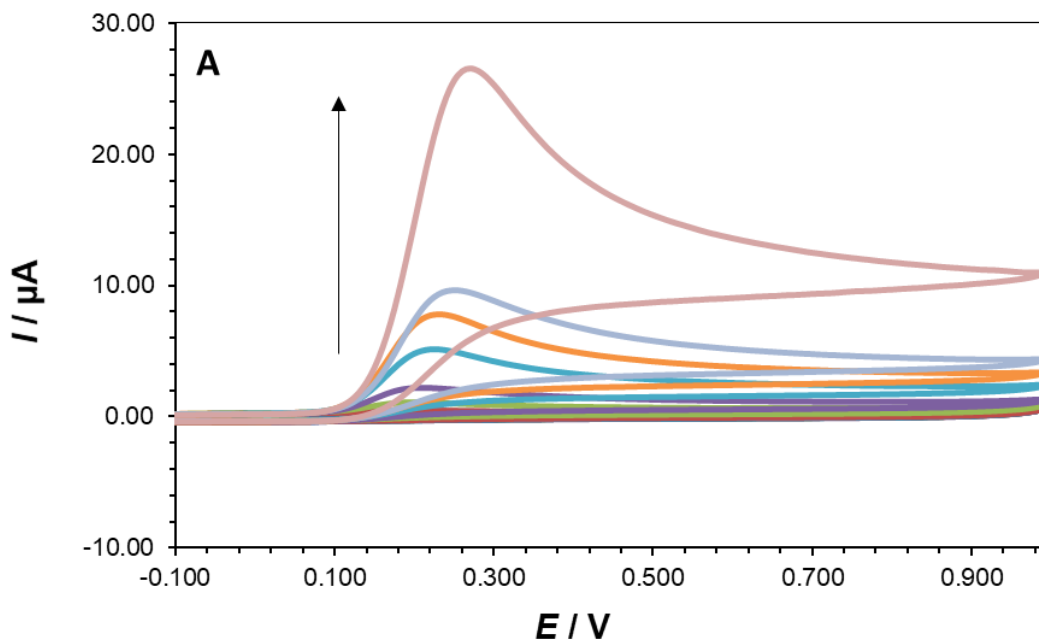
prikazana je jednadžbom: $I_{p,a} (\mu\text{A}) = 0,3894 v^{1/2} (\text{mV/s})^{1/2} + 2,3659$ s $R^2 = 0,942$, gdje je $I_{p,a}$ struja anodnog vrha i $v^{1/2}$ drugi korijen brzine promjene potencijala.

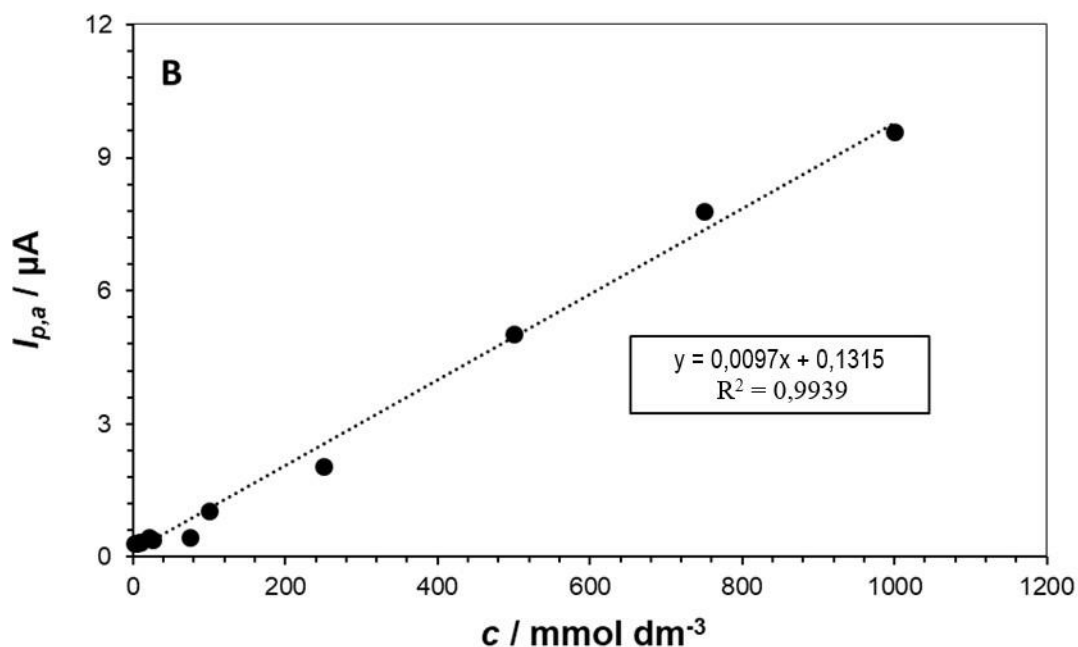


Slika 22. A) Ciklički voltamogrami blank otopine (...) i otopine vitamina C ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol/dm³) u NaH₂PO₄ ($I_c = 0,1$ mol/dm³) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije

elektrode ($v = 25 - 300 \text{ mV/s}$). B) Struja anodnog vrha, $I_{p,a}$ kao funkcija drugog korijena brzine promjene potencijala, $v^{1/2}$.

Proučavan je i efekt koncentracije L-askorbinske kiseline na njen oksidacijski proces te je utvrđeno da se anodni strujni vrh linearno povećava s povećanjem koncentracije askorbinske kiseline (Slika 23A). Na temelju podataka dobivenih iz cikličkog voltamograma, konstruirana je kalibracijska krivulja i dobivena linearna jednačba: $I_{p,a} (\mu\text{A}) = 0,0097 c (\text{mol/dm}^3) + 0,1315$ s $R^2 = 0,9939$, gdje je $I_{p,a}$ struja anodnog vrha i c označava koncentraciju L-askorbinske kiseline (Slika 23B). Linearni odgovor dobiven je u rasponu koncentracija od $2,5 \text{ mmol/dm}^3$ do 1000 mmol/dm^3 .

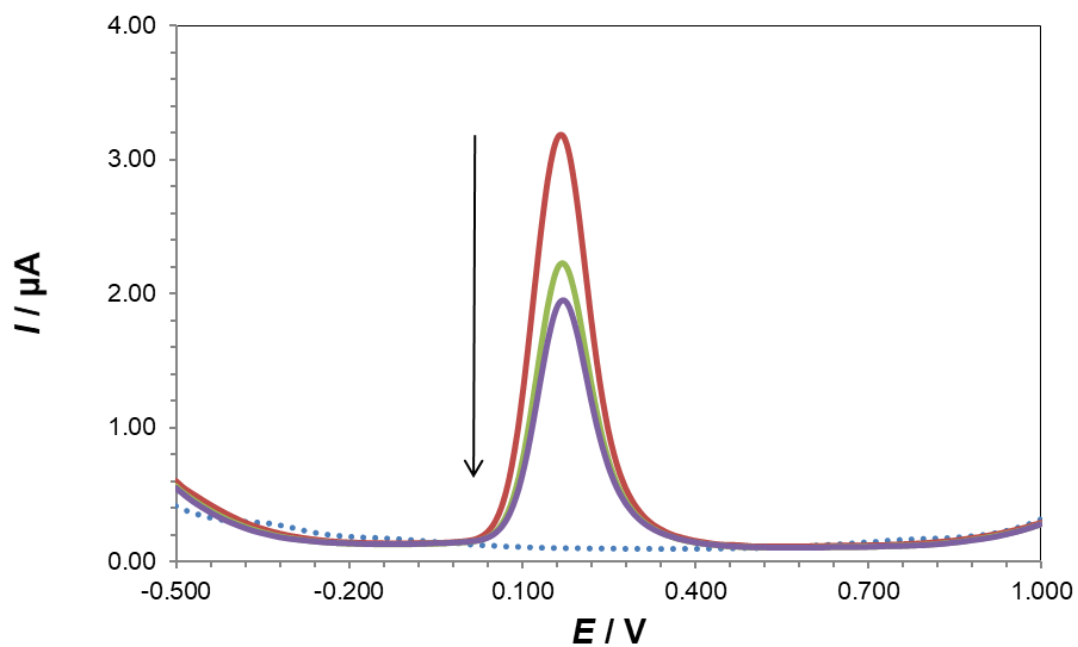




Slika 23. A) Ciklički voltamogrami otopina vitamina C ($c = 2,5 - 1000 \text{ mmol/dm}^3$) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljeni pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$. B) Kalibracijska krivulja standardnih otopina vitamina C.

3.3.2. Diferencijalna pulsna voltimetrija

Snimljeni diferencijalni pulsni voltamogrami L-askorbinske kiseline ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$) su prikazani na slici 24. U diferencijalnom pulsnom voltamogramu može se vidjeti jedan oksidacijski strujni vrh pri potencijalu $E_{p,a} = 0,17 \text{ V}$ koji odgovara oksidaciji L-askorbinske kiseline. Također je vidljivo da se oksidacijski strujni vrh smanjuje uzastopnim snimanjem voltamograma u ispitivanoj otopini L-askorbinske kiseline, što pokazuje da se oksidacijski produkt L-askorbinske kiseline, dehidroaskorbinska kiselina, adsorbira na površini elektrode od staklastog ugljika.

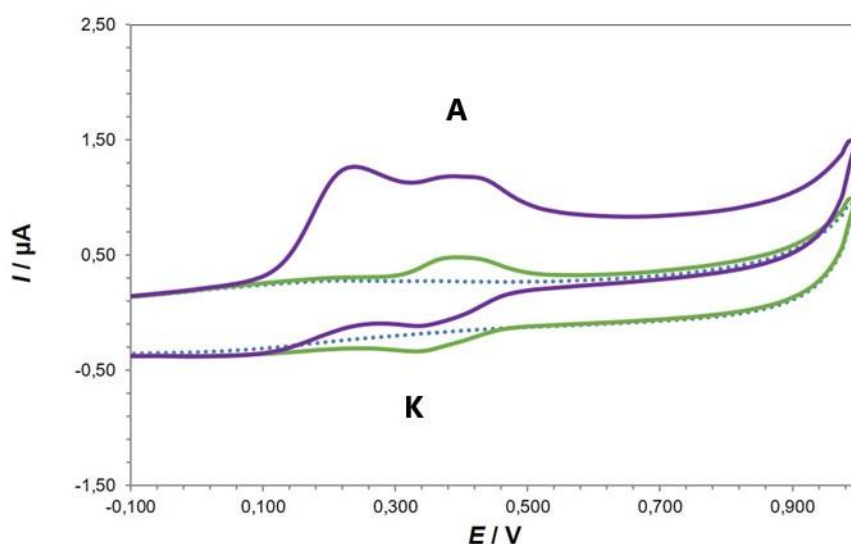


Slika 24. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (...) i otopine vitamina C ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$), brzina promjene potencijala, $\nu = 5 \text{ mV/s}$. 1. scan (—), 2. scan (—) i 3. scan (—).

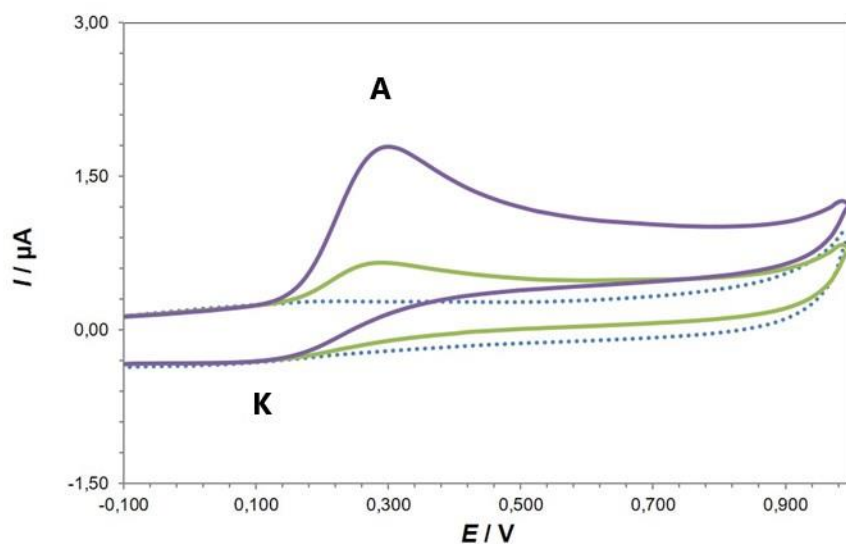
3.3.3. Analiza realnih uzoraka

3.3.3.1. Ciklička voltametrija

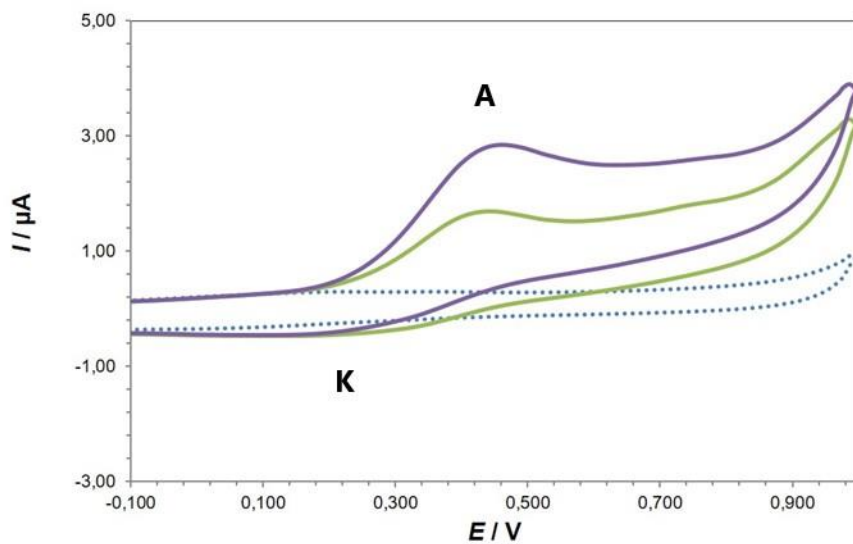
Na slikama 25.-29. prikazani su ciklički voltamogrami pet istraživanih realnih uzoraka. U cikličkim voltamogramima svih ispitivanih uzoraka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh (A) oko potencijala $E_{p,a} = 0,36$ V i jedan redukcijski strujni vrh (K) oko potencijala $E_{p,k} = 0,22$ V, što odgovara proučavanom oksido-redukcijskom procesu vitamina C. Dodatkom $0,15 \mu\text{L}$ L-askorbinske kiseline, koncentracije $1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ u svaki uzorak, dokazano je da se vitamin C može detektirati u svakom uzorku. Utvrđeno je da uzorak 4 (dodatak prehrani s vitaminom C) (Slika 28.) ima najveću ($340,27 \pm 28,35 \text{ mmol/dm}^3$) a uzorak 1 (domaći sok od bazge) (Slika 25.) najmanju ($34,40 \pm 2,03 \text{ mmol/dm}^3$) količinu vitamina C od svih istraživanih uzoraka.



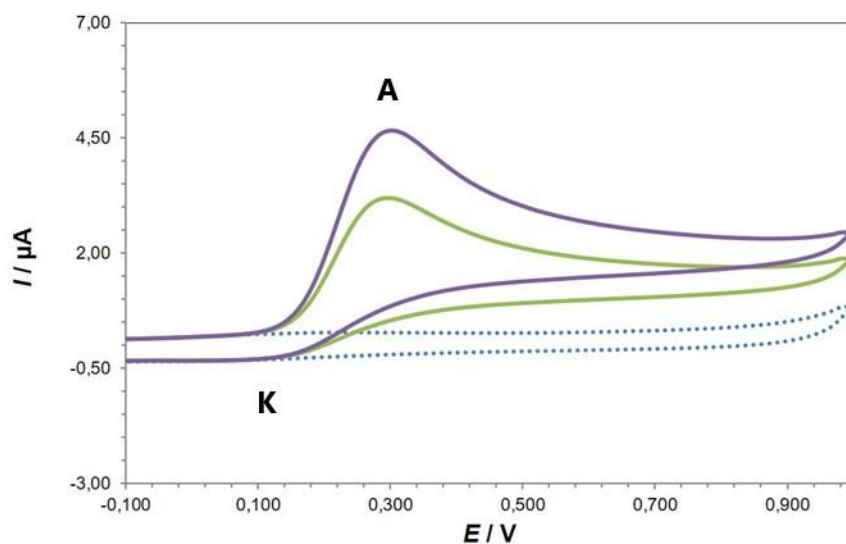
Slika 25. Ciklički voltamogrami blank otopine (...), vitamina C u uzorku 1 – domaći sok od bazge (—) i s dodatkom $0,15 \mu\text{L}$ standardne otopine vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljene pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$.



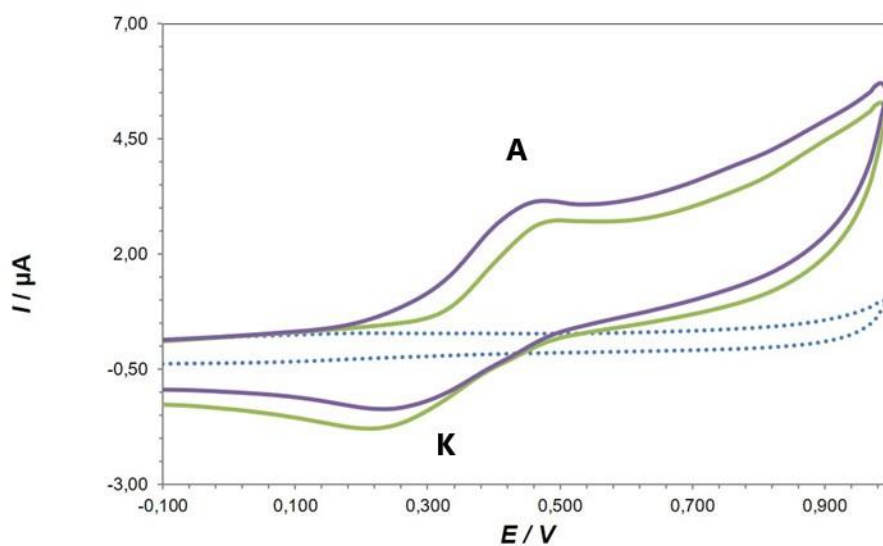
Slika 26. Ciklički voltamogrami blank otopine (...), vitamina C u uzorku 2 – instant piće od naranče u prahu (—) i s dodatkom 0,15 μL standardne otopine vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljene pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$.



Slika 27. Ciklički voltamogrami blank otopine (...), vitamina C u uzorku 3 – komercijalni narančin sok (—) i s dodatkom 0,15 μL standardne otopine vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljene pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$.

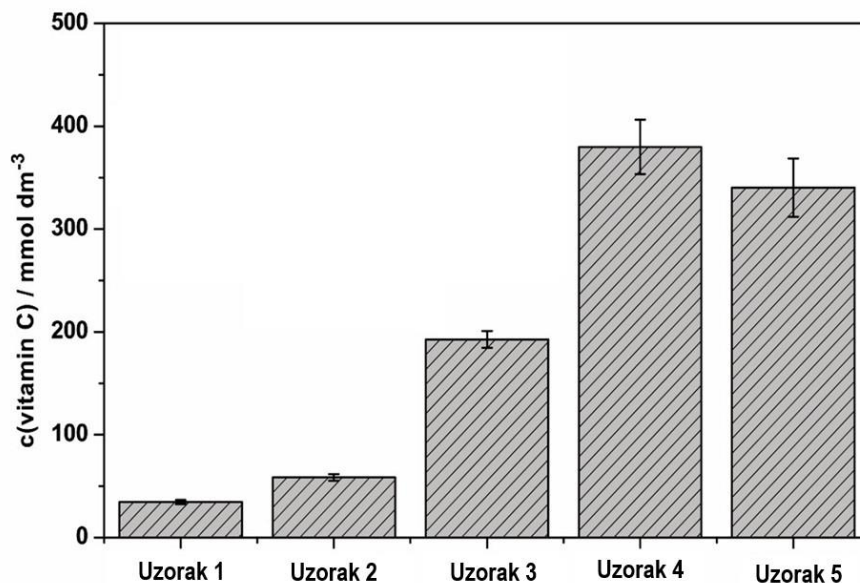


Slika 28. Ciklički voltamogrami blank otopine (...), vitamina C u uzorku 4 – dodatak prehrani- vitamin C (—) i s dodatkom 0,15 μL standardne otopine vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljene pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$.



Slika 29. Ciklički voltamogrami blank otopine (...), vitamina C u uzorku 5 – komercijalni sok od šljive (—) i s dodatkom 0,15 μL standardne otopine vitamina C ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) (—) u NaH_2PO_4 ($I_c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) snimljene pri brzini promjene potencijala, $\nu = 150 \text{ mV/s}$.

Na slici 30. prikazane su koncentracije vitamina C u svim istraživanim realnim uzorcima detektirane s cikličkom voltametrijom.

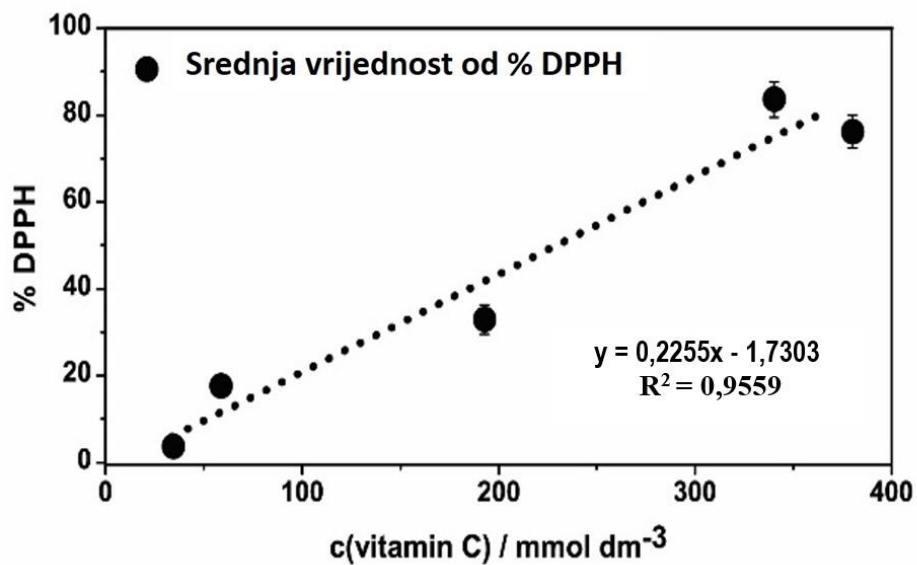


Slika 30. Stupičasti grafovi pokazuju koncentraciju vitamina C u realnim uzorcima određenim cikličkom voltametrijom.

3.3.3.2. Spektrofotometrijska mjerenja – DPPH metoda

Antioksidativna aktivnost vitamina C u realnim uzorcima procijenjena je s DPPH reagensom. Rezultati su prikazani na slici 30. i uspoređeni s rezultatima cikličke voltametrije. Pri najnižoj koncentraciji vitamina C određenoj cikličkom voltametrijom ($34,40 \pm 2,03 \text{ mmol/dm}^3$), DPPH postotak inhibicije aktivnosti uklanjanja radikala bio je najniži. DPPH aktivnost prati linearni trend, dok ne dosegne najvišu koncentraciju vitamina C ($340,27 \pm 28,35 \text{ mmol/dm}^3$), što se može objasniti adsorpcijom produkta oksidacije vitamina C pri višim koncentracijama vitamina C (Slika 31.). Nadalje, povišeni elektrokemijski signal u uzorcima s višom koncentracijom vitamina C, mogu biti detektirani zbog prisutnosti interferirajuće supstance iz kompleksne mješavine koja se sastoji od polifenola, što je slučaj u realnim uzorcima. Najviši dobiveni postotak DPPH aktivnosti je pri određenoj koncentraciji od $340,27 \pm 28,35 \text{ mmol/dm}^3$ i

procijenjen je na $83,54 \pm 4,03$ %. Dobivena je dobra koleracija dviju metoda s koeficijentom koleracije $R = 0,9770$ te koeficijentom determinacije $R^2 = 0,9559$ i evidentnom linearnom ovisnošću sadržaja vitamina C u uzorcima s mjerenim postotkom DPPH aktivnosti.



Slika 31. Korelacija između % DPPH (postotka inhibicije) i određenih koncentracija vitamina C u realnim uzorcima.

4. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja u ovom diplomskom radu pokazuju da je u svim istraživanim sustavima prisutan reverzibilni korak oksidacije L-askorbinske kiseline do dehidroaskorbinske kiseline, s velikom tendencijom adsorpcije vitamina C na elektrodu od staklastog ugljika pri višim koncentracijama. Pri promatranju linearne ovisnosti anodnog vrha jakosti struje i korijena brzine polarizacije elektrode, određeno je da je oksidacija L-askorbinske kiseline difuzijski kontrolirani proces. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom potvrđena je adsorpcija produkta oksidacije askorbinske kiseline (dehidroaskorbinske kiseline) na elektrodi od staklastog ugljika. Vitamin C je detektiran u modelnim sistemima gdje je linearni odgovor dobiven u rasponu koncentracija od $2,5 \text{ mmol/dm}^3$ do 1000 mmol/dm^3 . Također je uspješno detektiran u realnim uzorcima u rasponu koncentracija od $34,40 \pm 2,03 \text{ mmol/dm}^3$ do $340,27 \pm 28,35 \text{ mmol/dm}^3$. Rezultati DPPH analize pokazuju dobru koleraciju s rezultatima dobivenim s cikličkom voltametrijom, s koeficijentom koleracije $R = 0,9770$ te koeficijentom determinacije $R^2 = 0,9559$ i evidentnom linearnom ovisnošću koncentracije vitamina C u realnim uzorcima s izmjerenim postotkom DPPH aktivnosti.

5. LITERATURA

1. Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N. (2011): Vitamin Content and Antioxidant Capacity of Grapefruit Jams and Candies Obtained by Different Dehydration Methods. In: European Drying Conference - EuroDrying'2011, Palma, Spain.
2. Sdiri, S., Cuenca, J., Navarro, P., Salvador, A., Bermejo, A. (2019): New Triploids Late-maturing Mandarins as a Rich Source of Antioxidant Compounds, *Eur Food Res Technol.* 1-13.
3. Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673-24706.
4. Banan, D., Tan, W.T., Sulaiman, Y., Yusri, M.F., Zidan, M., Ab Ghani, S. (2013): Electrochemical Oxidation of Ascorbic Acid Using MgB₂-MWCNT Modified Glassy Carbon Electrode, *Int. J. Electrochem. Sci*, 8(12), 12519-12530.
5. Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M. (2003): Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of its Role in Disease Prevention, *J Am Coll Nutr.*, 2(1), 18-35.
6. Ravindran, P., Wiltshire, S., Das, K., Wilson, R. B. (2018): Vitamin C Deficiency in an Australian Cohort of Metropolitan Surgical Patients, *Pathology*, 50(6), 654-658.
7. Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C.N., Celano, G.V. (2016): The Use of Ascorbic Acid as a Food Additive: Technical-Legal Issues, *Ital J Food Saf.*, 5(1).
8. Oyetade, O.A., Oyeleke, G.O., Adegoke, B.M., Akintunde, A.O. (2012): Stability Studies on Ascorbic Acid (Vitamin C) From Different Sources, *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 2(4), 20-24.
9. Tadesse, T., Sirgawie, A. (2017): A Comparative Study on Electrochemical Determination of Vitamin C in Liver and Tomato Using Platinum and Glassy Carbon Electrodes, *Biochemistry and Molecular Biology*, 2(3), 25-36.
10. García-Rodríguez, M., Gordillo-García, A., Altamirano-Lozano, M. (2017): The Role of Vitamin C in the Protection and Modulation of Genotoxic Damage Induced by Metals

- Associated with Oxidative Stress. In: Vitamin C, IntechOpen, Amal H. Hamza (ed.), pp. 99-112.
11. Ngai, K.S., Tan, W.T., Zainal, Z., Mohd Zawawi, R., Zidan, M. (2013): Voltammetry Detection of Ascorbic Acid at Glassy Carbon Electrode Modified by Single-Walled Carbon Nanotube/Zinc Oxide, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8(8), 10557-10567.
 12. Yuswan, M.H.M.Y., Al-Obaidi, J.R., Rahayu, A., Sahidan, S., Shazrul, F., Fauzi, D. (2015): New Bioactive Molecules with Potential Antioxidant Activity from Various Extracts of Wild Edible Gelam Mushroom (*Boletus* spp.), *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(04), 320.
 13. Medvidović-Kosanović, M., Šeruga, M., Jakobek, L., & Novak, I. (2010). Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. *Croatica chemica acta*, 83(2), 197-207
 14. Magiorkinis, E., Beloukas, A., & Diamantis, A. (2011). Scurvy: past, present and future. *European journal of internal medicine*, 22(2), 147-152.
 15. https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C (25.04.2020.)
 16. https://sh.wikipedia.org/wiki/Dehidroaskorbinska_kiselina (25.04.2020.)
 17. Uğur, H., Çatak, J., Mızrak, Ö. F., Çebi, N., & Yaman, M. (2020). Determination and evaluation of in vitro bioaccessibility of added vitamin C in commercially available fruit-, vegetable-, and cereal-based baby foods. *Food Chemistry*, 127166.
 18. Gordon, D. S., Rudinsky, A. J., Guillaumin, J., Parker, V. J., & Creighton, K. J. (2020). Vitamin C in Health and Disease: A Companion Animal Focus. *Topics in Companion Animal Medicine*, 39, 100432-100432.
 19. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-ascorbic-acid-and-dehydroascorbic-acid-as-depicted-through-a-redox_fig1_312229647 (09.05.2020.)
 20. Majidi, M. I. H. A., & AlQubury, H. Y. (2016). Determination of vitamin C (ascorbic acid) contents in various fruit and vegetable by UV-spectrophotometry and titration methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 2972-2974.
 21. Karlsen, A., Blomhoff, R., & Gundersen, T. E. (2005). High-throughput analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *Journal of Chromatography B*, 824(1-2), 132-138

22. Arabali, V., Ebrahimi, M., Abbasghorbani, M., Gupta, V. K., Farsi, M., Ganjali, M. R., & Karimi, F. (2016). Electrochemical determination of vitamin C in the presence of NADH using a CdO nanoparticle/ionic liquid modified carbon paste electrode as a sensor. *Journal of Molecular Liquids*, 213, 312-316
23. Ruiz, J. J., Aldaz, A., & Dominguez, M. (1977). Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium. *Canadian Journal of Chemistry*, 55(15), 2799-2806.
24. Komorsky-Lovrić, Š & Lovrić, M. (2007) Voltametrija. Institut. ZIMO.
25. Abdel-Hamid, R., Rabia, M. K., & Newair, E. F. (2016). Electrochemical behaviour of antioxidants: Part 2. Electrochemical oxidation mechanism of quercetin at glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 350-356
26. https://ralphgroup.lassp.cornell.edu/projects/graphene_electrochemistry/ (10.05.2020.)
27. Phong, N.H., Tam Toan, T.T., Tinh, M.X., Tuyen, T.N., Mau, T.X., Khieu, D.Q. (2018): Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid, Paracetamol, and Caffeine Using Electrochemically Reduced Graphene-Oxide-Modified Electrode, *Journal of Nanomaterials*, 1-15.
28. G.Radić, Utjecaj pH vrijednosti na redukciju grafen oksida fenolnim spojevima iz vegetacijske vode masline, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
29. Dias, L. G., Meirinho, S. G., Veloso, A. C. A., Rodrigues, L. R., & Peres, A. M. (2017). Electronic tongues and aptasensors. *Bioinspired Materials for Medical Applications*, 371–402.
30. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995): Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
31. M. Knez, Antioksidansi, završni rad, Odjel za kemiju
32. Molyneux, P. (2004): The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
33. <http://zyciepo30.pl/wolne-rodniki-tlenowe/> (29.05.2020.)

34. M. Medvidović-Kosanović, Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet
35. <https://mailinhmart.com/blog/binh-tao-nuoc-hydrogen-tot-nhat/> (29.05.2020.)
36. Sharma, O. P., Bhat, T. K. (2009): DPPH Antioxidant Assay Revisited, *Food Chem*, 113(4), 1202-1205.
37. <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> (15.06.2020.)
38. Xu, L., Liu, N., Zhou, S., Zhang, L., & Li, J. (2020). Dual-spectroscopy technique based on quartz crystal tuning fork detector. *Sensors and Actuators A: Physical*, 304, 111873.
39. Wang, T. T., Zhang, X. Y., Sun, M. L., Du, X., Guan, M., Peng, H. B., & Wang, T. S. (2020). γ -Irradiation effects in borosilicate glass studied by EPR and UV-Vis spectroscopies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 464, 106-110.
40. P. Bajt, Lambert-Beerov zakon, završni rad, Odjel za kemiju
41. Li, J., Tong, Y., Guan, L., Wu, S., & Li, D. (2019). A turbidity compensation method for COD measurements by UV-vis spectroscopy. *Optik*, 186, 129-136.
42. Sing, L. Y., Ker, P. J., Jamaludin, M. Z., Ismail, A., Abdullah, F., Mun, L. H., ... & Shukri, M. (2016, November). Determining the inhibitor content of transformer insulating oil using UV-Vis spectroscopy. In *2016 6th IEEE International Conference on Control System, Computing and Engineering (ICCSCCE)* (pp. 179-183). IEEE.
43. <https://www.allumcorp.com/br/produtos/svc-2-voltammetry-cell/> (23.08.2020.)
44. Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 391-436.
45. <https://toshvin.com/wp-content/uploads/2014/05/DSC-60-Plus-Series.pdf> (23.08.2020.)
46. S. Osmak, Utjecaj temperature i izotopne supstitucije na UV-Vis spektar askorbata, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

6. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Adresa: Veliko Brdo 13, 44317 Popovača

jelenablazevic31@gmail.com

098/175-0376

Datum i mjesto rođenja: 06.05.1997., Zagreb

Obrazovanje:

2018. – 2020. Sveučilišni diplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, istraživački smjer: Biokemija i Organska kemija i Analitička kemija, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2011. – 2015. Srednja škola Viktorovac, Sisak, smjer: farmaceutski tehničar

2003. – 2011. Osnovna škola Popovača, Popovača

Ostale aktivnosti:

2020. Znanstveni rad objavljen u časopisu:

Blažević, Jelena; Stanković, Anamarija; Šafranko, Silvija; Jokić, Stela; Velić, Darko; Medvidović-Kosanović, Martina

Electrochemical Detection of Vitamin C in Real Samples // *Hrana u zdravlju i bolesti*, **9** (2020), 1; 1-8 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

2020. Sudjelovanje na projektu „masKEMbal“ na Odjelu za kemiju.

2019. Sudjelovanje na 23. Smotri Sveučilišta J. J. Strossmayera.

2019. Sudjelovanje na međunarodnoj konferenciji: „12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH, Osijek, 2019“ s posterskim priopćenjem: Blažević, Jelena; Stanković, Anamarija; Šafranko, Silvija; Jokić, Stela; Medvidović-Kosanović, Martina. Electrochemical Detection of Vitamin C in Real Samples // Book of Abstract of the 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH / Babić, Jurislav ; Šubarić, Drago ; Jašić, Midhat (ur.). Osijek and Tuzla, 2019. str. 133-133 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2014. Praksa u ljekarni Kijurina - Tušek u Popovači.

Prisustvovala sam i dvijema obdukcijama u sklopu srednjoškolskog obrazovanja na odjelu Patologije u Općoj bolnici „dr. Ivo Pedišić“ - SISAK.

Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja sam se aktivno bavila odbojkom i rukometom, te sudjelovala na natjecanjima iz istih, te iz matematike, tehničkog i amaterskog fotografiranja.

Materinski jezik mi je hrvatski. Govorim još engleski jezik, koji učim od prvog razreda osnovne škole. Govorim i njemački jezik, koji sam učila 4 godine u osnovnoj školi, te pohađala tečaj njemačkog jezika u Ad Hoc-Centru za edukaciju u Osijeku. U srednjoj školi sam godinu dana slušala i latinski jezik.

Komunikacijske i međuljudske vještine sam izgradila kroz godine seminarskih radova i timskog rada u laboratorijima u srednjoj školi i na fakultetu.

Posjedujem vozačku dozvolu kategorije B.