

Elektrokemijska karakterizacija galne kiseline

Jurišić, Mirjana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:310895>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mirjana Jurišić

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA GALNE
KISELINE**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mirjana Jurišić

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA GALNE
KISELINE**

Diplomski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Komentor: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Neposredni voditelj: Dominik Goman

Osijek, 2021.

*Ovaj rad prezentiran je na 13. Međunarodnom znanstveno-stručnom skupu HRANOM
DO ZDRAVLJA koji je održan 16. i 17. rujna 2021. u Osijeku.*

Zahvala

Veliko hvala mentorici, komentorici i neposrednom voditelju na pomoći tijekom rada u laboratoriju, velikom strpljenju, pristupačnosti, korisnim savjetima te ugodnoj i radnoj atmosferi tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj majci i obitelji što su mi podrška i oslonac u životu, tijekom svih mojih uspona i padova. Hvala vam što vjerujete u mene, motivirate i potičete da nikada nema odustajanja nego samo treba gledati kako ići naprijed.

Naposljetku, zahvaljujem se prijateljima što su bili tu za mene kada sam ih najviše trebala, društvu, kavama, izlascima, na svakoj pomoći i motivaciji da završim studij.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA GALNE KISELINE****Mirjana Jurišić****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović**Sažetak**

U ovom diplomskom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva galne kiseline u različitim puferima i realnim uzorcima uporabom diferencijalne pulsne voltametrije. Vrijednosti pH pufera su varirale od $\text{pH} = 3,0$ do $\text{pH} = 9,5$. Cilj rada bio je ispitati utjecaj pH na potencijal oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline, istražiti utjecaj koncentracije galne kiseline i brzinu promjene polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva galne kiseline, istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta galne kiseline na površinu radne elektrode te odrediti galnu kiselinu u realnim uzorcima. Elektrokemijska mjerenja provedena su u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji gdje su kao radne elektrode korištene zlatna, platinska i elektroda od staklastog ugljika, kao referentna elektroda korištena je Ag/AgCl elektroda, te kao protuelektroda korištena je platinska žica. Utvrđeno je da se galna kiselina oksidira pri navedenim eksperimentalnim uvjetima pri čemu su detektirana dva oksidacijska strujna vrha, te da dolazi do adsorpcije njenog oksidacijskog produkta na površinu elektrode. Visina oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline je varirala s promjenom pH vrijednosti, dok je optimalna pH vrijednost za njenu oksidaciju bila oko $\text{pH} = 6,0$. Utvrđeno je da se oksidacijski strujni vrh galne kiseline povećava sa povećanjem koncentracije (linearna ovisnost u području od $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do $66,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Galna kiselina je detektirana u realnim uzorcima u kojima joj je koncentracija varirala od $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do $35,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Diplomski rad obuhvaća: 41 stranice, 29 slika, 6 tablica, 47 literaturnih navoda**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** galna kiselina / oksidacija / diferencijalna pulsna voltametrija / antioksidans / realni uzorci / detekcija**Rad je prihvaćen:** 23.11.2021.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. Doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, mentorica i član
3. Doc. dr. sc. Anamarija Stanković, komentorica i 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 CHARACTERIZATION OF GALLIC ACID
Mirjana Jurišić

Thesis completed at: Department of Chemistry
Supervisor: Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD

Abstract

In this thesis, the electrochemical properties of gallic acid in different buffers and real samples were investigated using differential pulse voltammetry. The pH values of the buffers ranged from pH = 3.0 to pH = 9.5. The aim of this study was to investigate the influence of pH value on the potential of oxidation current peak of gallic acid, to investigate the influence of gallic acid concentration and rate of electrode polarization change on oxido-reduction properties of gallic acid, to investigate possible adsorption of the oxidation product of gallic acid on the surface of the working electrode and determine the gallic acid in real samples. Electrochemical measurements were performed in a three-electrode electrochemical cell where gold, platinum and glassy carbon electrodes were used as working electrodes, Ag / AgCl electrode was used as a reference electrode, and platinum wire was used as a counter electrode. It was found that gallic acid is oxidized under these experimental conditions, where two oxidation current peaks were detected, and its oxidation product was adsorbed on the electrode surface. The height of the oxidation current peak of gallic acid varied with the change of pH value, while the optimal pH value for its oxidation was around pH = 6.0. It was found that the oxidation current peak of gallic acid increases with increasing concentration (linear dependence in the range from 0.1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ to 66.6 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Gallic acid was detected in real samples in which its concentration varied from 0.4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ till 35.6 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Thesis includes: 41 pages, 29 figures, 6 tables, 47 references

Original in: Croatian

Keywords: gallic acid / oxidation / differential pulse voltammetry / antioxidants / real samples / detection

Thesis accepted: 23.11.2021.

Reviewers:

1. assist. prof. Olivera Galović, PhD, president
2. assoc. prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, mentor and member
3. assist. prof. Anamarija Stanković, PhD, co-mentor and member

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

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Fenoli | 2 |
| 2.2. Antioksidansi | 4 |
| 2.3. Galna kiselina | 6 |
| 2.4. Metode određivanja galne kiseline | 8 |
| 2.4.1. Spektroskopija | 8 |
| 2.4.2. Kromatografija | 9 |
| 2.4.3. Elektrokemijske metode | 11 |
| 2.4.3.1. Voltometrija | 12 |
| 2.4.3.2. Voltometrijska ćelija | 13 |
| 2.4.3.3. Diferencijalna pulsna voltometrija | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. Kemikalije i priprava otopina | 17 |
| 3.2. Elektrokemijska ćelija | 18 |
| 3.2.1. Radna elektroda | 19 |
| 3.2.2. Referentna elektroda | 20 |
| 3.2.3. Protuelektroda | 21 |
| 3.3. Priprava realnih uzoraka | 21 |
| 3.4. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja | 23 |
| 3.4.1. Diferencijalna pulsna voltometrija | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |
| 4.1. Ispitivanje oksidacije galne kiseline | 24 |
| 4.2. Ispitivanje adsorpcije galne kiseline | 27 |
| 4.3. Utjecaj pH | 28 |
| 4.4. Utjecaj koncentracije | 31 |

| | |
|--|----|
| 4.5. Detekcija galne kiseline u realnim uzorcima | 34 |
| 5. ZAKLJUČAK | 38 |
| 6. LITERATURA | 39 |

1. UVOD

Galna kiselina pripada skupini polifenolnih spojeva te ima snažno antikancerogeno, antioksidacijsko, protuupalno i antimutageno djelovanje. Može se naći u medu, hrastovim šiškama (cecidijama), mangu, kori hrasta, bobičastom voću te šipku.

Cilj ovog rada bio je ispitati elektrokemijska svojstva galne kiseline, pronaći najbolji senzor (elektrodu) za elektrokemijsku karakterizaciju galne kiseline, pratiti utjecaj pH vrijednosti na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha, odrediti granicu detekcije galne kiseline i detektirati galnu kiselinu u realnim uzorcima.

Pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada korištena je diferencijalna pulsna voltometrija.

U prvom dijelu rada opisana je galna kiselina, njena svojstva, biološka važnost i primjena u svakodnevnom životu, te je detaljno opisana korištena tehnika i aparatura koja je potrebna za elektrokemijska mjerenja.

U drugom djelu rada navedeni su uvjeti pri kojima su izvršena elektrokemijska ispitivanja, zatim su prikazani dobiveni rezultati i prokomentirana je njihova važnost.

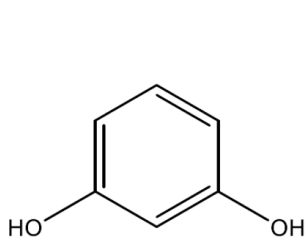
U zadnjem dijelu rada dan je zaključak koji je proizašao iz dobivenih rezultata mjerenja.

2. LITERATURNI PREGLED

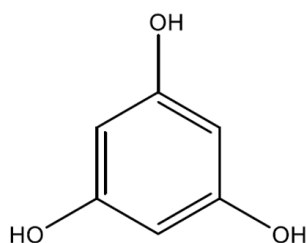
2.1. Fenoli

Fenoli su skupina spojeva koji se sastoje od hidroksilne skupine koja je izravno vezana na benzenski prsten. U širem smislu se često nazivaju polifenolima te se u prirodi nalaze u većini biljaka i biljnih materijala. Nalaze se u sjemenkama, kori drveća, lišću, cvijeću te kori voća. U biljkama polifenoli nastaju putem dva biosintetska puta: preko šikimatske kiseline i iz acetata [1]. Fenolni spojevi mogu se klasificirati na različite načine s obzirom na broj C-atoma u molekuli. Swain i Bate-Smith (1962.) su ih klasificirali kao učestale i manje učestale fenolne spojeve, dok ih je Ribereau-Gayon (1972.) grupirao s obzirom na mjesto gdje ih se može pronaći kao npr. u biljkama, manje rasprostranjeni, ili pak prisutni u polimerima. Korištenjem Harbone-ove i Simmonds-ove klasifikacije fenolni spojevi se dijele na jednostavne fenole (C₆), fenolne kiseline (C₆-C₁), acetofenone i fenilacetatne kiseline (C₆-C₃), cimetnu kiselinu, cimetne aldehide i alkohole (C₆-C₃), kalkone, aurone, flavone, flavonole, antocijanine (C₁₅), betacijanine (C₁₈), biflanole (C₃₀), benzofenone, ksantone, stilbene (C₆-C₁-C₆, C₆-C₂-C₆), kinone, itd. [2]. Podjela fenola je prikazana na slici 1 [3].

a) Jednostavni fenoli

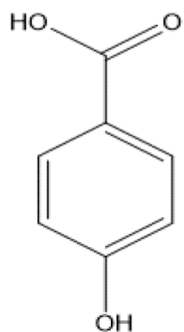


Rezorcinol
(1,3-dihidroksibenzen)

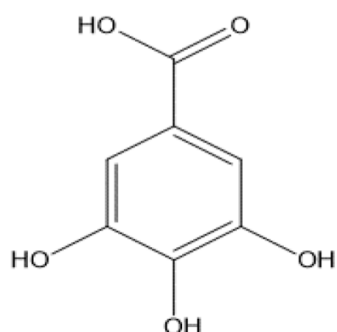


Floroglucinol
(1,3,5-trihidroksibenzen)

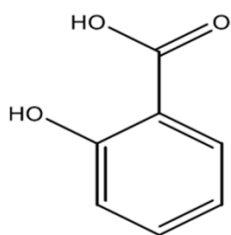
(b) Fenolne kiseline i aldehidi



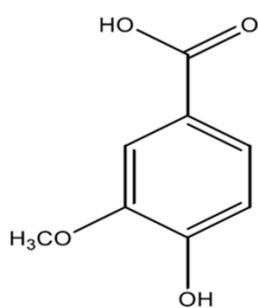
p-hidroksibenzojeva kiselina



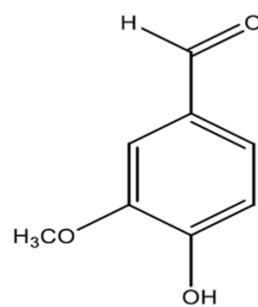
Galna kiselina



Salicilna kiselina

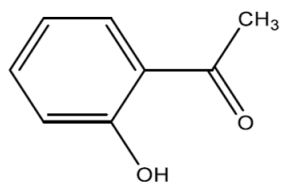


Vanilinska kiselina

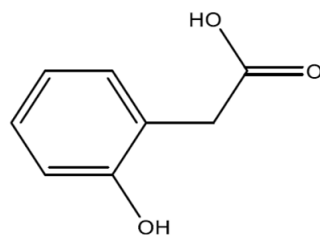


Vanilin

(c) Acetofenoni i fenilacetatne kiseline

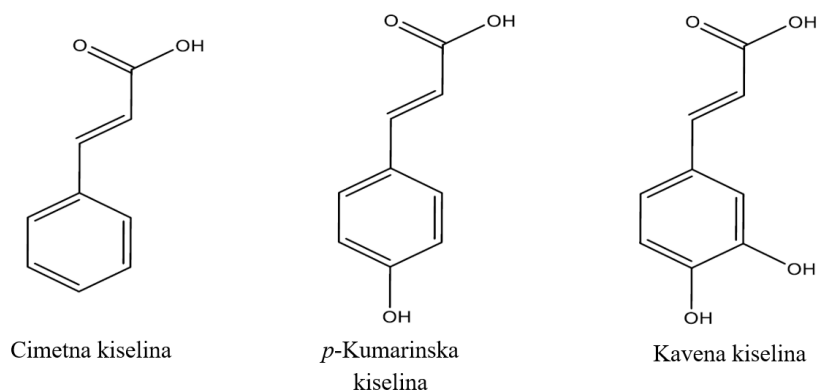


2-Hidroksiacetofenon



2-Hidroksifenil acetatna kiselina

(d) Cimetne kiseline



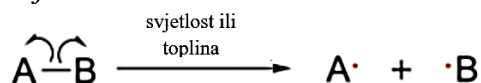
Slika 1. Prikaz struktura fenolnih spojeva i njihova podjela.

Fenolne kiseline se sastoje od hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te se mogu naći u biljkama u obliku estera i glikozida. One djeluju kao kelirajući agensi i „hvatači“ slobodnih radikala kao što su npr. hidroksilni i peroksidni radikali, superoksidni anioni i peroksinitriti. Stoga, im je glavna uloga njihova antioksidacijska aktivnost [4].

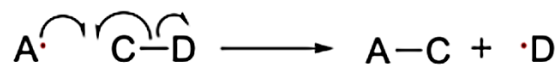
2.2. Antioksidansi

Antioksidansi su organski spojevi ili molekule koje sprječavaju oksidaciju molekula ili ju mogu značajno usporiti. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona sa neke tvari na oksidirajuću tvar pri čemu mogu nastati slobodni radikali. Oni mogu započeti lančanu reakciju u stanici pri čemu može doći do njenog oštećenja ili čak do uništenja. Na slici 2 je shematski prikaz nastanka radikala kao i njihove lančane reakcije [3].

inicijacija



propagacija



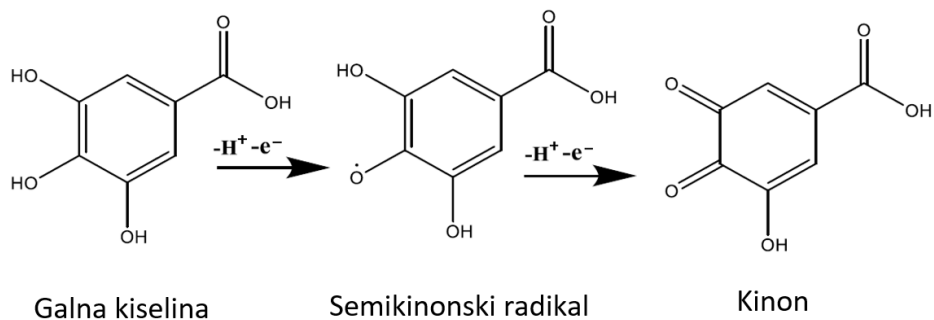
terminacija



Slika 2. Prikaz lančane reakcije slobodnih radikala i njihovog nastanka [5].

Antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima pa oni više nemaju potrebu napadati stanicu te se na taj način zaustavlja lančana reakcija oksidacije. U biljnom i životinjskom svijetu postoji čitav niz različitih vrsta antioksidansa. Neki od njih su enzimi poput katalaze, superoksid-dismutaze i glutation-peroksidaze. Ne-enzimatski antioksidansi su beta-karoten, askorbinska kiselina (Vitamin C) i alfa-tokoferol (Vitamin E) [6]. Uz pojam antioksidans često se veže pojam oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže i smanjenja antioksidacijske obrane organizma (slika 3). Sustav obrane organizma je u velikoj mjeri uvjetovan primjerenom prehranom, tako da nepravilan režim prehrane može dovesti do oksidacijskog stresa. Također, do stanja oksidacijskog stresa može dovesti i metabolizam različitih lijekova i toksina [3].

benzenski prsten, sklone oksidaciji. To rezultira nastankom vodikovog peroksida, kinona i semikinona što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Prikaz procesa oksidacije galne kiseline pri čemu nastaju semikinonski radikal i kinon [3].

Galna kiselina se nalazi u čaju, bobičastom voću, grožđu, šiškama hrasta i vinu [10]. Primjenu je našla u medicini, farmaciji te kao aditiv koji se dodaje prehrambenim proizvodima. Zbog svog snažnog antioksidacijskog djelovanja predmet je proučavanja znanstvenika dugi niz godina [11].

Galna kiselina se pokazala kao moćan antioksidans za masti i biljna ulja u studiji koju su proveli Golumbic i Mattil [12]. Studija Bajpala i Patila je pokazala primjenu galne kiseline kao konzervansa u industriji hrane i pića [13]. Galna kiselina se koristi i u farmakologiji gdje je pokazala antikancerogeni učinak u studiji koju su proveli Chia i suradnici [14]. Također je pokazala i antitumorski efekt pri liječenju osteosarkoma¹ u studiji Lianga i suradnika [15]. U studiji koju su proveli Kratz i suradnici pokazano je inhibitorско djelovanje galne kiseline i pentil-galata na Herpes Simplex Virus tip 1 (HSV 1) i Virus humane-imunodeficijencije (HIV) [16]. Jung i suradnici su proučavali antiulcerogeno djelovanje galne kiseline, te se pokazalo da korištenje 100 mg/kg galne kiseline dovodi do inhibicije želučanih lezija u štakorima u iznosu od 40,6 % [17]. U studijama provedenim od strane Liu i suradnika te Jayamania i Shanmungama pokazala je potencijal u liječenju nekih neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova i

¹ Osteosarkom je tumor kostiju.

Huntingtonova bolest [18]. Neka ostala područja primjene galne kiseline uključuju kožarsku industriju gdje se koristi kao kelirajući agens, te u razvoju fotografije što je opisano u studiji Beniwala i suradnika [19]. Budući da se široko primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, postoji potreba za razvojem analitičkih metoda za njeno određivanje.

2.4. Metode određivanja galne kiseline

Za određivanje galne kiseline koriste se razne analitičke metode koje uključuju spektroskopiju, kromatografiju, kemoluminiscenciju sa injektiranjem u protok, te elektrokemijske metode.

2.4.1. Spektroskopija

Spektroskopija je grana znanosti koja koristi apsorpciju, emisiju, ili rasipanje elektromagnetskog zračenja od strane tvari u svrhu kvalitativnih i kvantitativnih ispitivanja materije ili studija fizikalnih procesa. Pojam tvari podrazumijeva atome, molekule, ione atoma ili molekula, ili čvrste tvari. Interakcija zračenja s tvari može izazvati prijelaze između energijskih stanja atoma ili molekula rezultirajući s tri glavna procesa: apsorpcija, emisija, fluorescencija. Svaka molekula ima karakterističan sustav energijskih stanja (nivoa) koja ovise o njenom sastavu i strukturi (broju jezgara, broju elektrona, relativnom položaju svih čestica u molekuli). To znači da svaka molekula ima karakterističan spektar koji daje informaciju o sastavu, strukturi i energijskim nivoima molekule. Galna kiselina ima maksimum apsorpcije pri 272,5 nm sa $\log \varepsilon = 4,06$ [20]. Ova apsorpcija je rezultat sume apsorpcija glavne kromoforne grupe²-benzenskog prstena sa tri hidroksilne skupine [21]. Glavna primjena UV-VIS spektroskopije je u određivanju ukupnih polifenola. Folin-Ciocalteova metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na prijenosu elektrona između reagensa i polifenola. U takvoj metodi se galna kiselina koristi kao

² Kromofori su dijelovi molekule koje apsorbiraju zračenje.

standard te se rezultat izražava u obliku ekvivalenata galne kiseline [22]. Chaves i suradnici su razvili i validirali ovu metodu za određivanje ukupnih polifenola u *Guapira graciliflora* i *Pseudobombax marginatum* [23].

Druga mogućnost kvantifikacije galne kiseline je pomoću infracrvene spektroskopije. Ta tehnika se zasniva na interakciji infracrvenog zračenja³ sa tvari. Pri tome dolazi do promjena u vibracijskim i rotacijskim stanjima molekula. Budući da svaka molekula ima karakteristične vibracije, koje pak ovise o čvrstoćama veza i masama dijelova molekule koji vibriraju, infracrvena spektroskopija pruža velike analitičke mogućnosti jer je moguće odrediti od kojih funkcionalnih skupina se molekula sastoji. Zbog toga rotacijski ili vibracijski spektar predstavlja na neki način „otisak prsta“ neke molekule, te je on karakterističan za pojedinu molekulu.

Infracrveni spektar galne kiseline je karakteriziran sa nekoliko specifičnih pikova. Vijayalakshimi i Ravindhran su identificirali 8 pikova i to na 1022, 1234, 1448, 1622, 1714, 3034, 3280 i 3365 cm^{-1} , pri čemu je pik na 1714 cm^{-1} najvažniji jer je on karakterističan za polifenolnu skupinu spojeva [24]. Lam i suradnici su pak identificirali karakteristične pikove pri 3492, 3370, i 3282 cm^{-1} koji odgovaraju hidroksilnim skupinama galne kiseline; 2920 cm^{-1} i 2850 cm^{-1} koji odgovaraju aromatskom istezanju C-H; 1701 cm^{-1} koji odgovara istezanju karbonilne skupine; te pri 1615 cm^{-1} koji odgovara istezanju C-C veze alkena [25].

2.4.2. Kromatografija

Kromatografija je tehnika odjeljivanja pri čemu se smjese tvari rastavljaju na svoje komponente razdiobom između dvije faze: pokretne i nepokretne. Nepokretnu (stacionarnu) fazu čine čvrsta tvar, gel ili tekućina koja ispunjava usku cijev ili je nanosena na neku ravnu plohu, te se često naziva sorbens. Pokretnu fazu čini tekućina, plin ili fluid koji prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze u određenom smjeru. Pokretna faza se često naziva i eluens. Kromatogram koji se pri tome dobije predstavlja ispis bilo koje funkcije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu ispiranja

³ Infracrveno zračenje je u području valnih brojeva od 14000 – 400 cm^{-1}

(eluiranja) ili o volumenu eluensa. Kromatografija služi za odjeljivanje, identifikaciju, te kvantitativnu analizu sastojaka prisutnih u složenim smjesama.

Kod tankoslojne kromatografije razdvajanje smjese na komponente se odvija na temelju njihovog različitog afiniteta i raspodjele između mobilne i stacionarne faze. Sharma i suradnici su pomoću tankoslojne kromatografije (TLC⁴) na pločicama od silika gela uspješno identificirali galnu kiselinu i ostale fenolne spojeve [26]. Kao najbolji odabir mobilne faze pokazala se smjesa kloroform : etil-acetat : octena kiselina u omjerima 50 : 50 : 1. Za vizualizaciju komponenti smjese korišteni su željezov klorid i sumporna kiselina te vanilin. Dharwal i suradnici su razvili i validirali metodu za kvantifikaciju galne kiseline pomoću TLC-a u *Bergenia ciliata* i *Bergenia ligulata* [27]. Mobilna faza je bila smjesa toluen : etil-acetat : metanska kiselina u omjeru 40 : 60 : 10. Vizualizacija i detekcija komponenti je učinjena pomoću automatiziranog sustava koji se zove HPTLC (eng. *High Performance Thin Layer Chromatography*). Ova tehnika je korištena u svrhu kvantifikacije galne kiseline u *Hygrophila auriculata*, *Terminalia chebula*, *Acacia leucophloea* i *Syzygium aromaticum* [28-31].

Za određivanje galne kiseline u raznim uzorcima koristi se i plinska kromatografija. To je tehnika kod koje uzorci za analizu trebaju biti lako hlapljivi te ne smiju isparavati pri temperaturama višim od 300 °C. Također, plinska kromatografija je visoko osjetljiva tehnika sa niskim granicama detekcije te je vrlo često spregnuta sa spektrometrom masa (GC/MS). Kuskoski i suradnici su analizirali fenolne spojeve u guarani (*Paullinia cupana*) pomoću GC/MS. U tu svrhu korištena je kapilarna kolona od taljenog kvarca, pri temperaturi od 300 °C, kao plin nosilac je korišten helij sa brzinom protoka od 1 mL/min [32]. GC/MS je također korištena i za određivanje fenolnih spojeva, slobodnih šećera i polifenola u mangu (*Mangifera indica L.*) [33].

Od svih kromatografskih tehnika, za detekciju i kvantifikaciju galne kiseline se najčešće koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC⁵). Zahvaljujući visokoj osjetljivosti, velikoj rezoluciji prilikom separacije sastojaka smjese, prilagodljivosti te analizi širokog spektra uzoraka, ova tehnika je postala „zlatni standard“ pri analizi galne kiseline kao i većine fenolnih spojeva [34]. Za otapala se najčešće koriste smjese vode i alkohola, uglavnom metanola i etanola [35]. Za kolone se najčešće koriste kolone obrnutih faza i to one od 250 mm

⁴ engl. *Thin-layer chromatography*

⁵ engl. *High performance liquid chromatography*

[36]. Za detekciju komponenata se uglavnom koristi UV-VIS detektor s diodnim nizom i to u valnom području od 270-280 nm [37].

2.4.3. Elektrokemijske metode

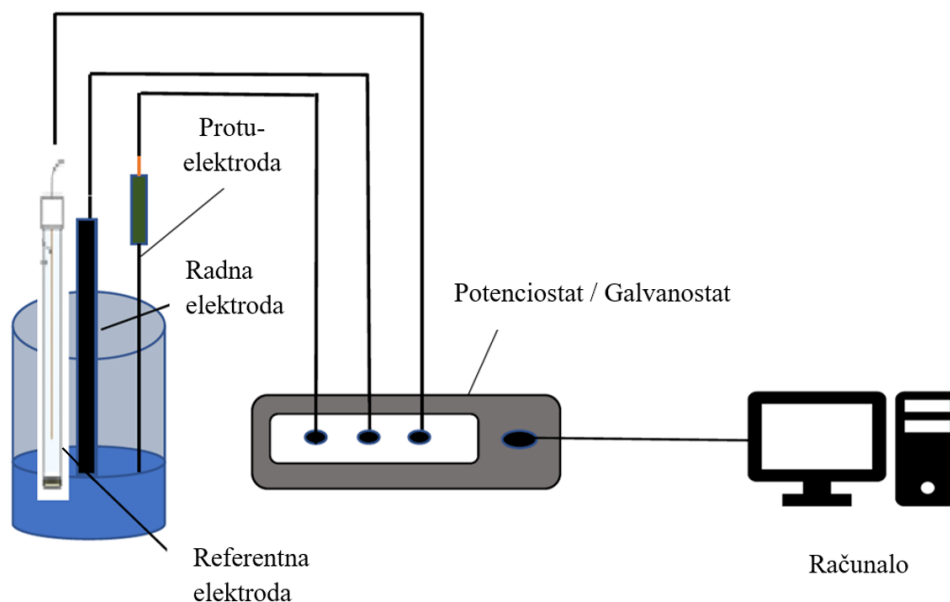
Elektrokemija je grana kemije koja se bavi međusobnim odnosom električnih i kemijskih utjecaja. Ona proučava kemijske promjene koje su uzrokovane prolaskom električne struje i proizvodnjom električne energije koja je nastala kemijskim reakcijama. Sve elektrokemijske metode zahtijevaju najmanje dvije elektrode i otopinu elektrolita koji čine elektrokemijsku ćeliju. Jedna od elektroda se naziva indikatorska tj. radna elektroda i ona daje odziv na željeni analit. Druga elektroda, koja se naziva referentna, ima konstantan potencijal. Kemijska reakcija se kod svih elektrokemijskih metoda odvija na radnoj elektrodi. Posljedica elektrokemijske reakcije je analogna električna veličina - tzv. signal odziva, čijim se mjerenjem dobiva željeni analitički ili neki drugi podatak o ispitivanoj tvari. Signal odziva može nastati pod utjecajem signala pobude (dovodimo ga na radnu elektrodu) ili pak nastaje kao posljedica prisutnosti određene molekulske vrste u otopini [38]. Učinkovitost mjerenja u značajnoj mjeri ovisi o materijalu od kojega je načinjena elektroda. Odabir elektrode ponajviše ovisi o dva faktora: redoks potencijalu ispitivane tvari i pozadinskoj struji u području potencijala koji je potreban za mjerenje. Neki od drugih faktora koji utječu na izbor radne elektrode su: dostupnost, električna provodnost, toksičnost, mehanička svojstva i dostupan raspon potencijala. Najpopularniji metali za izradu elektroda su ugljik, živa i plemeniti metali (Pt i Au) [39].

Iako se za određivanje galne kiseline koriste tehnike navedene u poglavlju 2.4.1 i 2.4.2., one imaju i mnoge nedostatke kao što su cijena i veličina instrumenata, dugo vrijeme pripreme uzoraka za analizu te uporaba toksičnih i skupih reagenasa. Zbog toga se, u zadnje vrijeme, sve češće proučavaju elektrokemijske metode budući da su jednostavne za uporabu, cjenovno prihvatljive, prijenosne, zahtijevaju minimalnu pripremu uzorka za analizu, visoko su osjetljive, te je kraće vrijeme analize. Kako su svi antioksidansi elektroaktivni, elektrokemijske metode se sve više izučavaju za određivanje antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih polifenola u hrani i plazmi. Elektrokemijski senzori i biosenzori se primjenjuju za određivanje galne kiseline.

Oni su uglavnom razvijeni korištenjem voltametrijskih tehnika kao što su ciklička voltametrija (CV) i diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) [40].

2.4.3.1. Voltametrija

Voltametrija je naziv za skupinu elektroanalitičkih tehnika kod kojih se informacija o analitu dobiva na način da se mjeri jakost struje (signal odziva) u ovisnosti o električnom naponu (signal pobude), ali uz uvjete koji izazivaju polarizaciju indikatorske ili radne elektrode. Naziv voltametrija potječe od skraćenice: volt-amper-metrija. Vrste voltametrijskih tehnika su: ciklička, diferencijalna pulsna, *stripping* i pravokutnovalna, ali i razne vrste polarografskih tehnika koje se od voltametrijskih tehnika razlikuju po tome što radna elektroda ima oblik kapajuće živine elektrode. Voltametrijski se sustav sastoji od potencioštata, računala i elektrokemijske ćelije što se može vidjeti na slici 5. Uloga potencioštata je pružanje potencijala i mjerenje struje, dok računalo pomoću odgovarajućeg programa prikazuje rezultate u obliku voltamograma. Voltamogram predstavlja grafički prikaz jakosti struje kao funkcije potencijala između radne i referentne elektrode. Voltametrijska ćelija je detaljno opisana u tekstu koji slijedi [38].



Slika 5. Voltametrijski sustav sastoji se od voltametrijske ćelije, potenciostata/galvanostata i računala [3].

Voltametrijske tehnike karakterizira dobra osjetljivost, široki raspon koncentracijskog područja za određivanje organskih i anorganskih analita, široki temperaturni raspon analize⁶, proučavanje kinetike elektroda/analit, mogućnost analize kod raznih otapala, elektrolita i matrica, te mogućnost istovremenog određivanja različitih analita.

Osjetljivost voltametrijskih tehnika se može definirati kao nagib kalibracijske krivulje koja se dobije kada se jakost struje prikaže kao funkcija koncentracije analita. Snaga voltametrijskih tehnika se najbolje očituje u granicama detekcije (LOD⁷) koje, kod takvih tehnika, dosežu i $1 \cdot 10^{-9}$ mol dm⁻³. Voltametrijske analize se provode u širokom koncentracijskom rasponu analita od 10^{-9} do 10^{-4} mol dm⁻³ sa vremenom analize od 35 sekundi [41].

2.4.3.2. Voltametrijska ćelija

Voltametrijska ćelija se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu koja sadrži analit i inertni elektrolit (Slika 6). Tri elektrode koje se koriste u voltametrijskim mjerenjima su referentna (RE⁸), protuelektroda (CE⁹) i radna elektroda (WE¹⁰). Na radnu elektrodu se dovodi promjenjivi potencijal koji se naziva i signal pobude, te ona mijenja svoj potencijal u odnosu na stalan potencijal referentne elektrode. Mjeri se struja između radne i protuelektrode. [38]

Radna elektroda, čiji se potencijal mijenja s vremenom, je elektroda na kojoj se odvija elektrokemijska reakcija. Kada dođe do oksidacije ispitivanog analita na radnoj elektrodi, struja

⁶ Voltametrijske analize se mogu provoditi u rasponu temperature od 25 °C do 40 °C.

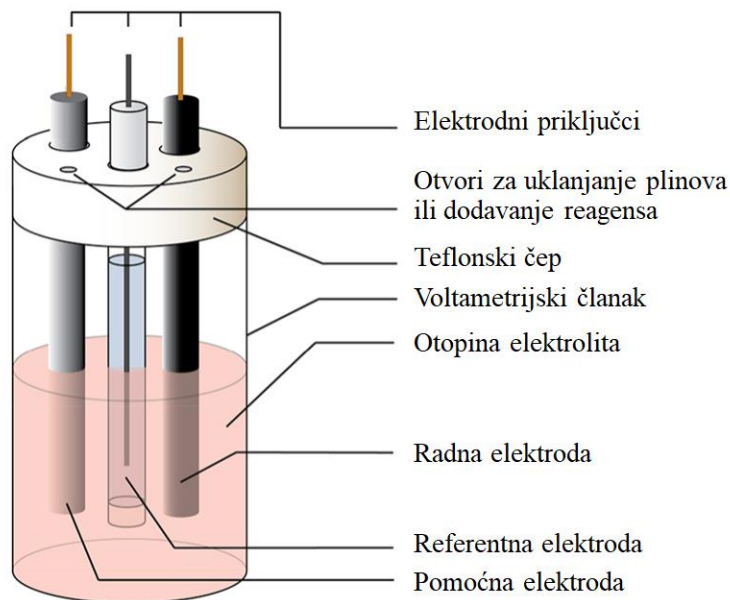
⁷ engl. *Limit of detection*

⁸ engl. *Reference electrode*

⁹ engl. *Counter electrode*

¹⁰ engl. *Working electrode*

tada prolazi elektronima kroz vanjski električni krug do protuelektrode gdje se odvija redukcija otapala ili neke druge specije koja je prisutna u otopini matriksa. Redukcija analita na radnoj elektrodi zahtjeva izvor elektrona odnosno generiranu struju koja putuje od protuelektrode do katode [38].



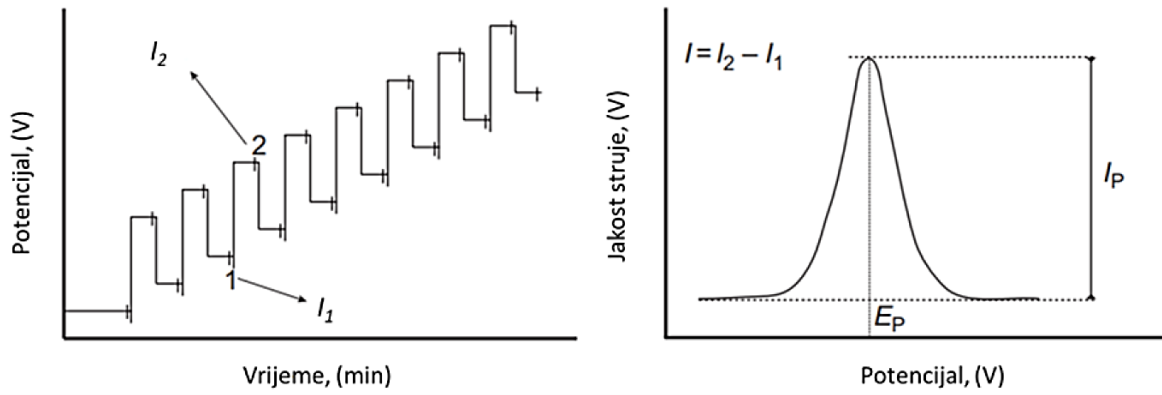
Slika 6. Voltametrijska ćelija koja se sastoji od tri elektrode uronjene u otopinu analita i inertnog elektrolita [42].

Dimenzije radne elektrode su uobičajeno male (mikro elektrode) kako bi se povećala njena sklonost polarizaciji i spriječila razgradnja analita elektrolizom. Kao referentna elektroda se najčešće koristi srebro-srebrov klorid (Ag/AgCl) ili zasićena kalomelova elektroda, te je njen potencijal stalan tijekom procesa mjerenja. Protuelektroda je najčešće platinska žica te je njena uloga zatvaranje strujnog kruga u elektrokemijskoj ćeliji. Potuelektroda je najčešće načinjena od materijala koji neće poremetiti rad radne elektrode kao što je npr. platina ili grafit. Elektrokemijska ćelija sadrži također i cjevčicu za uvođenje inertnog plina kako bi se uklonio otopljeni kisik te osigurala inertna atmosfera [38].

2.4.3.3. Diferencijalna pulsna voltametrij

Diferencijalna pulsna voltametrij je voltametrijska tehnika koja ima karakterističan signal pobude. On je ustvari linearno rastući potencijal na kojeg se pridružuju mali kvadratični naponski impulsi od 10 mV do 100 mV u vrlo kratkim vremenskim intervalima (od 5 do 100 ms). Drugim riječima, radi se o stupnjevitij promjeni potencijala u ovisnosti o vremenu. Struja ćelije se mjeri netom prije primjene naponskog impulsa (I_1) i na kraju impulsa (I_2) u svakom ciklusu. Signal odziva (I) predstavlja razliku izmjerenih vrijednosti struja ($I = I_2 - I_1$) te se prikazuje kao funkcija potencijala u obliku diferencijalnog pulsno voltamograma. U području potencijala, u kojemu mala promjena potencijala radne elektrode izaziva mjerljivu razliku u struji ćelije, pojaviti će se pulsno voltamogramski odziv koji ima oblik vrha. Visina tog strujnog vrha je proporcionalna koncentraciji ispitivanog analita. Dakle, niz kratkotrajnih pulseva predstavlja signal pobude, dok pojava jednog ili više strujnih pikova predstavlja signal odziva (Slika 7) [43].

Ovu tehniku su predložili Barker i Gardner 1958. za elektrokemijsko određivanje kemijskih vrsta pri niskim granicama detekcije i kvantifikacije. Zbog visoke osjetljivosti ova tehnika zahtjeva korištenje ultra čistih kemikalija i otopina. Kao otapalo se može koristiti voda ali i mnoga nevodena otapala čime se omogućuje određivanje i onih molekularnih vrsta koje nisu topive u vodi. Osim u analitičke svrhe, ova tehnika se upotrebljava i za karakterizaciju molekularne građe elektroaktivnih tvari u otopini. Zbog dugog vremena analize i nemogućnosti razlučivanja pripadajućih signala odziva, ova tehnika ponekad nije najbolji izbor za istraživanje složenijih sustava [43,44].



Slika 7. Signal pobude i signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije [45].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i priprava otopina

Kemikalije koje su korištene u ovom radu navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Popis kemikalija, molekulskih formula i njihovih proizvođača korištenih u radu.

| Naziv kemikalije | Molekulska formula | Proizvođač |
|-----------------------------|--------------------|------------------------------|
| Galna kiselina | $C_7H_6O_5$ | Alfa Aesar, Njemačka |
| Natrijev hidroksid | NaOH | Kemika, Zagreb |
| Klorovodična kiselina | HCl | Kemika, Zagreb |
| Natrijev karbonat | Na_2CO_3 | Kemika, Zagreb |
| Kalijev hidrogen ftalat | $C_8H_5KO_4$ | Prolabo VWR, Leuven, Belgija |
| Natrijev dihidrogen fosfat | NaH_2PO_4 | Kemika, Zagreb |
| Suspenzija $\alpha-Al_2O_3$ | | BASInc, Tokio, Japan |

Otopine pufera određenih pH vrijednosti koje su korištene za pripremu ispitivanih otopina galne kiseline priređene su u ultračistoj vodi i prikazane u tablici 2. Na slici 8 prikazane su otopine galne kiseline i puferi odgovarajućih pH vrijednosti koji su ispitivani u ovom radu.

Ishodna otopina galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) dobivena je otapanjem galne kiseline u ultračistoj vodi. Otopina galne kiseline željene koncentracije je priređena razrjeđivanjem ishodne otopine galne kiseline otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti neposredno prije mjerenja.



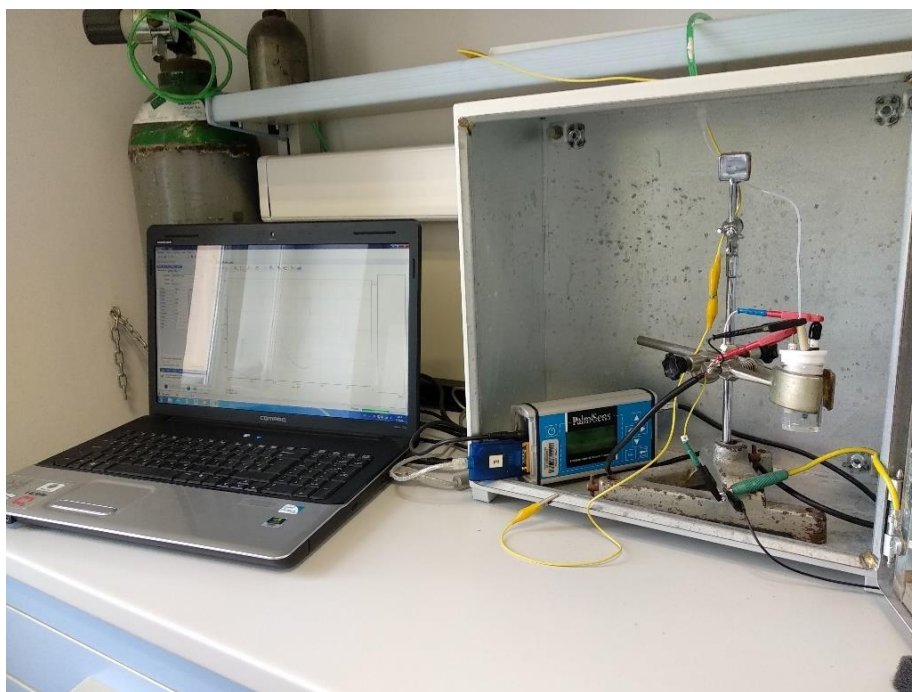
Slika 8. Otopine galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferima određenih pH vrijednosti (pH = 3,0 (U₁), 4,0 (U₂), 5,0 (U₃), 6,0 (U₄), 7,0 (U₅), 8,0 (U₆), 9,5 (U₇)).

Tablica 2. Priređivanje otopine pufera određenih pH vrijednosti.

| pH | Pufer |
|-----|---|
| 3,0 | $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4 / \text{HCl}$ |
| 4,0 | $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4 / \text{HCl}$ |
| 5,0 | $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4 / \text{NaOH}$ |
| 6,0 | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaOH}$ |
| 7,0 | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaOH}$ |
| 8,0 | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaOH}$ |
| 9,5 | $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaOH}$ |

3.2. Elektrokemijska ćelija

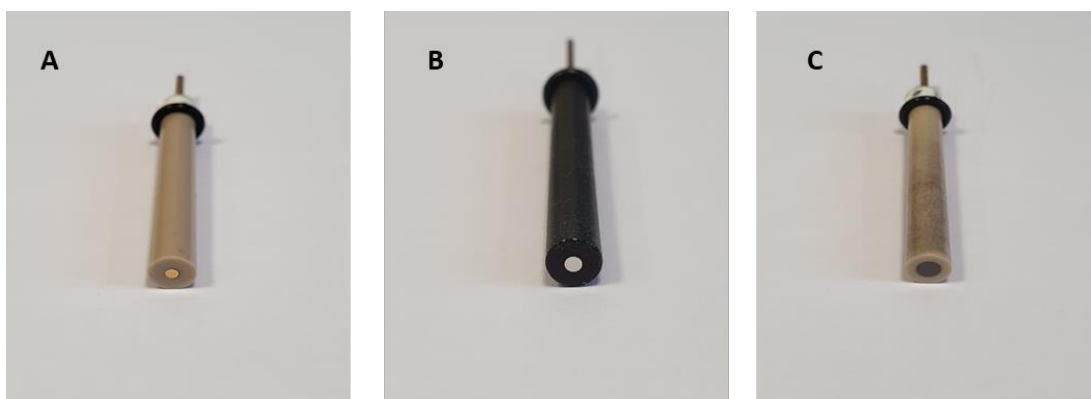
Sva elektrokemijska mjerenja su provedena u elektrokemijskoj ćeliji s troelektrodnim sustavom smještenoj u Faradayevom kavezu pri sobnoj temperaturi (slika 9). Inertna atmosfera je postignuta tako što se sustav propuhivao argonom visoke čistoće Ar 5 ($\Phi_{Ar} = 99,999\%$) prije svakog mjerenja u trajanju od 4-5 minuta pri sobnoj temperature ($\theta = \pm 25\text{ }^\circ\text{C}$). Ukupan volumen ispitivane otopine je iznosio 15 mL.



Slika 9. Prikaz aparature za provedbu elektrokemijskih mjerenja.

3.2.1. Radna elektroda

Kao radne elektrode korištene su zlatna elektroda proizvođača ALS, Japan; platinska elektroda proizvođača ALS, Japan i elektroda od staklastog ugljika proizvođača ALS, Japan (Slika 10). Površina elektrode prije svakog mjerenja je polirana suspenzijom α -Al₂O₃, veličine čestica 0,05 μ m, do zrcalnog sjaja te isprana ultračistom vodom.



Slika 10. Radne elektrode – zlatna elektroda (A), platinska elektroda (B) i elektroda od staklastog ugljika (C).

3.2.2. Referentna elektroda

Kao referentna elektroda korištena je Ag/ AgCl elektroda proizvođača ALS, Tokio, Japan (Slika 11). 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 ($E_{\text{AgCl/Ag}} = 0,210 \text{ V vs. SVE}$).



Slika 11. Referentna elektroda – Ag/ AgCl elektroda (unutrašnji elektrolit je KCl

($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$) [46].

3.2.3. Protuelektroda

Kao protuelektroda je korištena platinska žica proizvođača ALS, Japan, duljine 5 cm, kako bi se zatvorio strujni krug (slika 12).



Slika 12. Protuelektroda – platinska žica [47].

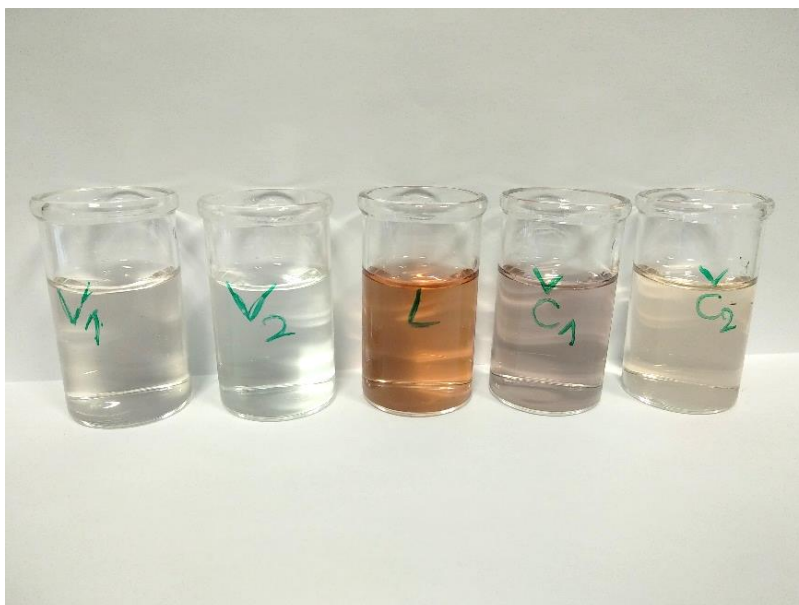
3.3. Priprava realnih uzoraka

U ovom radu je ispitivano 5 realnih uzoraka (slika 13). Uzorci vina (vino 1 (Cabernet Sauvignon) i vino 2 (Rose) te liker su pripremljeni na način da je u elektrokemijsku ćeliju stavljeno 250 μL uzorka i nadopunjeno fosfatnim puferom do ukupnog volumena od 15 mL (slika 14).

Uzorci čajeva (čaj 1 i čaj 2) su pripremljeni na način da se 3 g svakog čaja kuhalo u 50 mL ultračiste vode na magnetnoj mješalici kroz 15 min. Nakon hlađenja su uzorci profiltrirani. U elektrokemijsku ćeliju je stavljeno 250 μL filtrata i nadopunjeno fosfatnim puferom do ukupnog volumena od 15 mL (slika 14). Izvedena su tri mjerenja svakog realnog uzorka: 1. mjerenje je bila blank otopina (fosfatni pufer), 2. mjerenje je bila otopina 250 μL uzorka i 14,75 mL fosfatnog pufera, 3. mjerenje je bila otopina 250 μL uzorka, 14,55 mL fosfatnog pufera i 200 μL standardnog dodatka galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$).



Slika 13. Istraživani realni uzorci : Uzorak 1 (vino Cabernet Sauvignon), Uzorak 2 (vino Rose), Uzorak 3 (liker od lokalnih proizvođača), Uzorak 4 (čaj za sreću), Uzorak 5 (čaj od šipka).



Slika 14. Otopine ispitivanih realnih uzoraka u fosfatnom puferu pH = 6,0.

3.4. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja

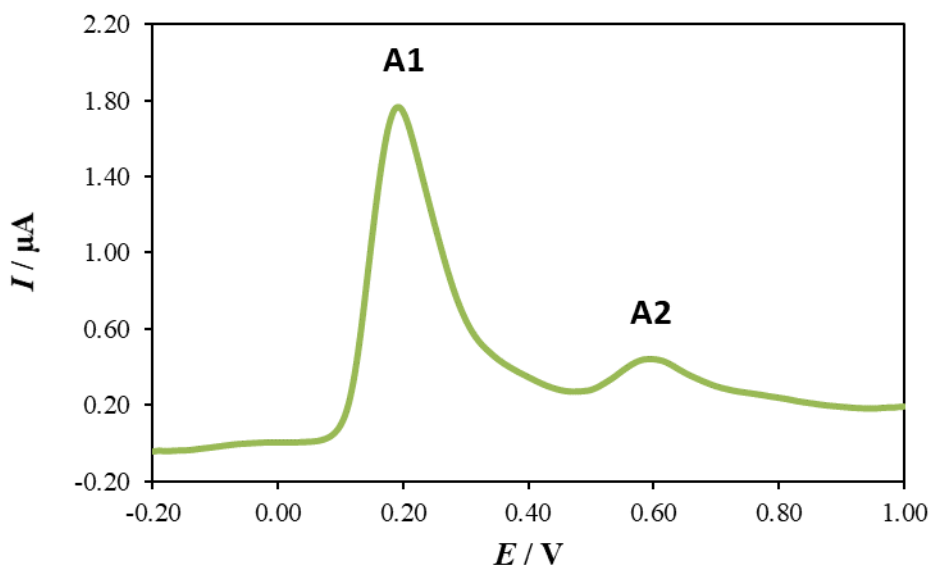
3.4.1. Diferencijalna pulsna voltometrija

Diferencijalna pulsna voltometrija korištena je za ispitivanje oksidacije i adsorpcije galne kiseline na površinu zlatne elektrode, za određivanje granice detekcije galne kiseline, za praćenje utjecaja pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline te za analizu realnih uzoraka. Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni su u otopinama galne kiseline u granicama potencijala od $-0,2$ V do $1,0$ V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu u vodenom mediju uz brzinu polarizacije elektrode od 5 mVs^{-1} , visinu pulsa 25 mV , širinu pulsa 70 ms i *scan increment* 5 mV . Mjerenja su izvedena pomoću PalmSens potencioštata/galvanostata spojenog na računalo, dok je za obradu podataka korišten PSTrace softver.

4. REZULTATI I RASPRAVA

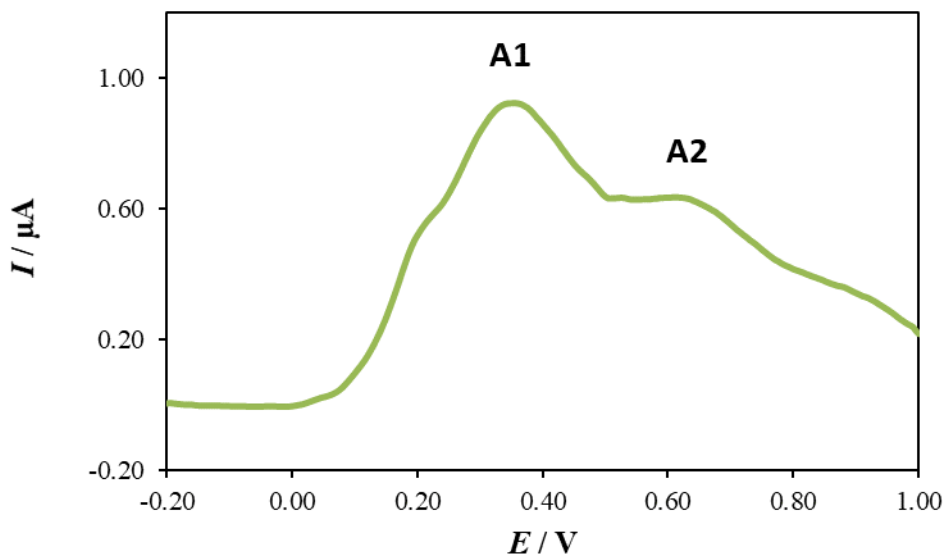
4.1. Ispitivanje oksidacije galne kiseline

Na slici 15 prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na zlatnoj elektrodi u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,0$). Na voltamogramu su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha (A1 i A2) na potencijalima $E_{p,a1} = 0,1865 \text{ V}$ i $E_{p,a2} = 0,582 \text{ V}$ koji se odnose na oksidaciju hidroksilnih skupina galne kiseline.



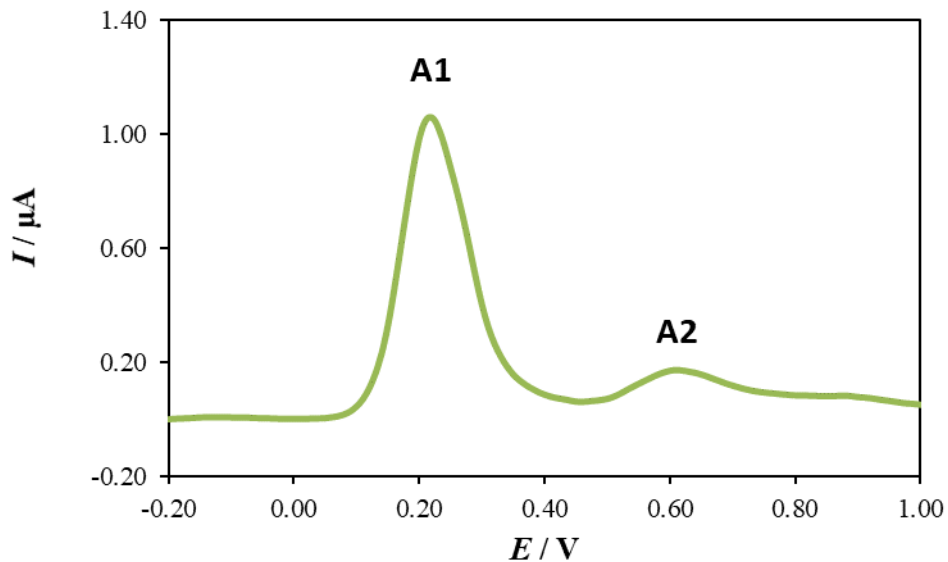
Slika 15. Diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen u fosfatnom puferu $\text{pH} = 6,0$ ($I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), pri brzini polarizacije 5 mV/s .

Na slici 16 prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na platinskoj elektrodi u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6$). Na voltamogramu se vide dva oksidacijska strujna vrha (A1 i A2) na potencijalima $E_{p,a1} = 0,3363 \text{ V}$ i $E_{p,a2} = 0,627 \text{ V}$ koji se odnose na oksidaciju hidroksilnih skupina galne kiseline.



Slika 16. Diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen u fosfatnom puferu $\text{pH} = 6,0$ ($I_c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), pri brzini polarizacije 5 mV/s .

Na slici 17 je prikazan diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,0$). Na voltamogramu se mogu vidjeti dva oksidacijska strujna vrha (A1 i A2) na potencijalima $E_{p,a1} = 0,2108 \text{ V}$ i $E_{p,a2} = 0,604 \text{ V}$ koji se odnose na oksidaciju hidroksilnih skupina galne kiseline.



Slika 17. Diferencijalni pulsni voltamogram galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen u fosfatnom puferu $\text{pH} = 6,0$ ($I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), pri brzini polarizacije 5 mV/s .

Potencijali i struje prvog oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline očitani iz diferencijalnih pulsnih voltamograma snimljenih na različitim radnim elektrodama (slika 15-17) uspoređeni su u tablici 3.

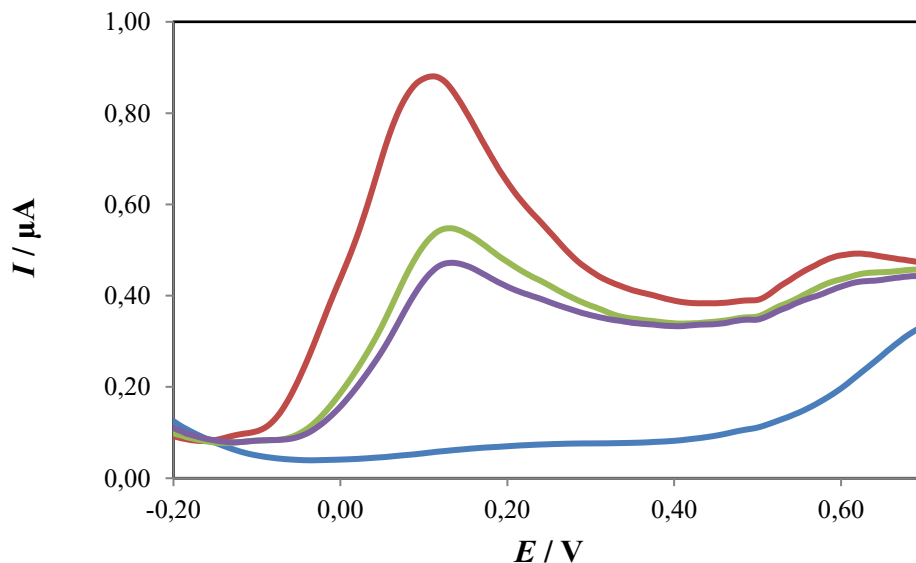
Tablica 3. Usporedba potencijala ($E_{p,a}$) i struje ($I_{p,a}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline određenih pomoću tri radne elektrode (zlatna (Au), platinska (Pt) i elektroda od staklastog ugljika (GC)).

| Radna elektroda | $E_{p,a} / \text{V}$ | $I_{p,a} / \mu\text{A}$ |
|-----------------|----------------------|-------------------------|
| Au | 0,1865 | 1,75 |
| Pt | 0,3363 | 0,92 |
| GC | 0,2108 | 1,04 |

Iz priloženih voltamograma i tablice može se vidjeti da se galna kiselina oksidirala pri najnižem potencijalu na zlatnoj elektrodi, a na toj je elektrodi detektirana i najviša struja oksidacijskog strujnog vrha te je iz navedenih razloga zlatna elektroda odabrana kao najbolja elektroda za provedbu ostalih mjerenja.

4.2. Ispitivanje adsorpcije galne kiseline

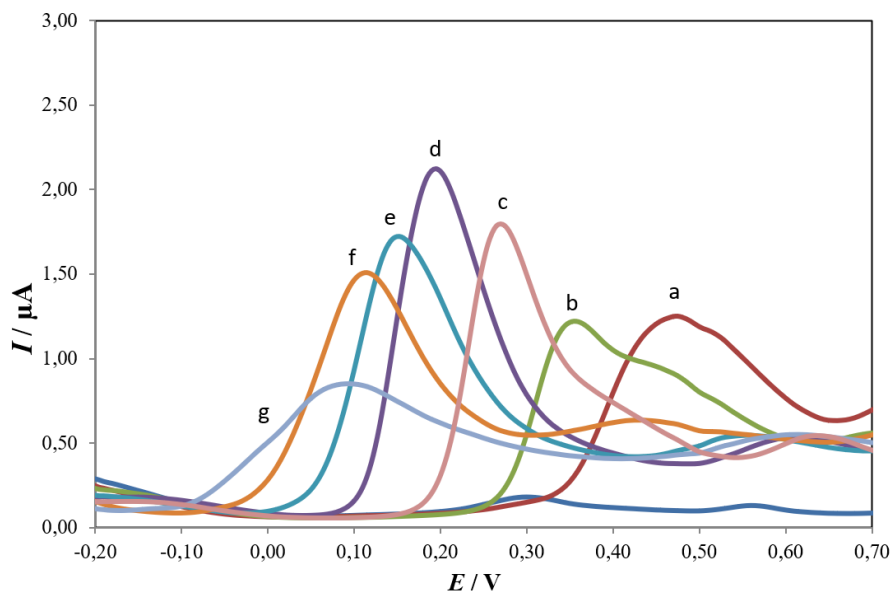
Na slici 18 prikazani su uzastopno snimljeni diferencijalni pulsni voltamogrami galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) koji su snimljeni na zlatnoj elektrodi u fosfatnom puferu (pH = 6,0). Iz slike je vidljivo da uzastopnim snimanjem voltamograma opada visina oba oksidacijska strujna vrha galne kiseline što može ukazivati na adsorpciju oksidacijskog produkta galne kiseline na površinu zlatne elektrode.



Slika 18. Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u fosfatnom puferu pH = 6,0 (—) i u otopini galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu pH = 6,0 ($I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$).
(—) 1. scan, (—) 2. scan, (—) 3. scan.

4.3. Utjecaj pH

Na slici 19 prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni na zlatnoj elektrodi kao funkcije pH vrijednosti ispitivanih otopina galne kiseline u pH području od pH = 3,0 do pH = 9,5.



Slika 19. Diferencijalni pulsni voltamogrami galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni na zlatnoj elektrodi kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH = (a) 3,0; (b) 4,0; (c) 5,0; (d) 6,0; (e) 7,0; (f) 8,0; (g) 9,5).

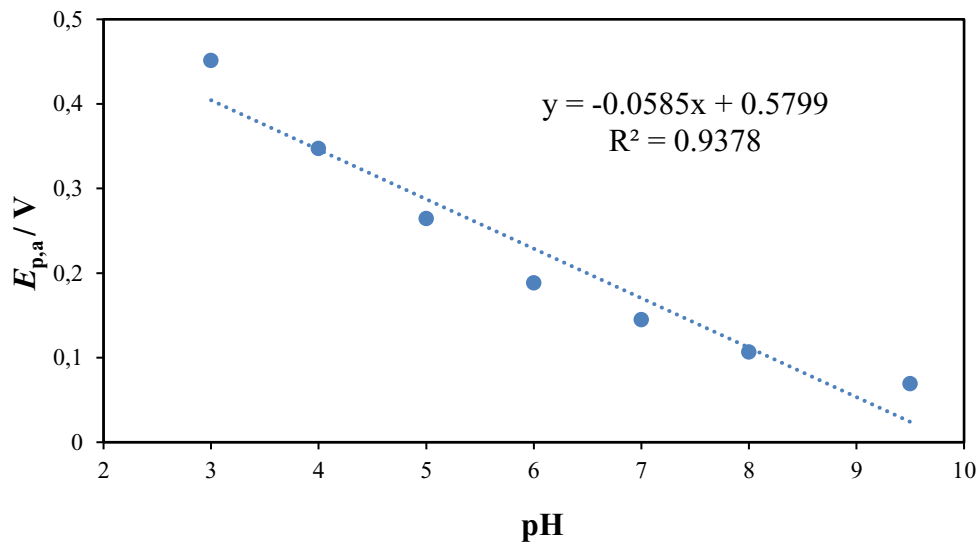
Iz slike 19 je vidljivo da visine anodnih strujnih vrhova rastu do pH = 6,0, a opadaju daljnjim porastom pH vrijednosti. Također se može vidjeti kako se s porastom pH vrijednosti otopina galne kiseline, vrijednosti potencijala prvog ($E_{p,a1}$) i drugog oksidacijskog strujnog vrha ($E_{p,a2}$) pomiču prema nižim vrijednostima.

Podaci koji su očitani iz diferencijalnih pulsni voltamograma galne kiseline sa slike 19 su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti potencijala ($E_{p,a}$) i struje ($I_{p,a}$) prvog oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) kao funkcije pH otopina galne kiseline.

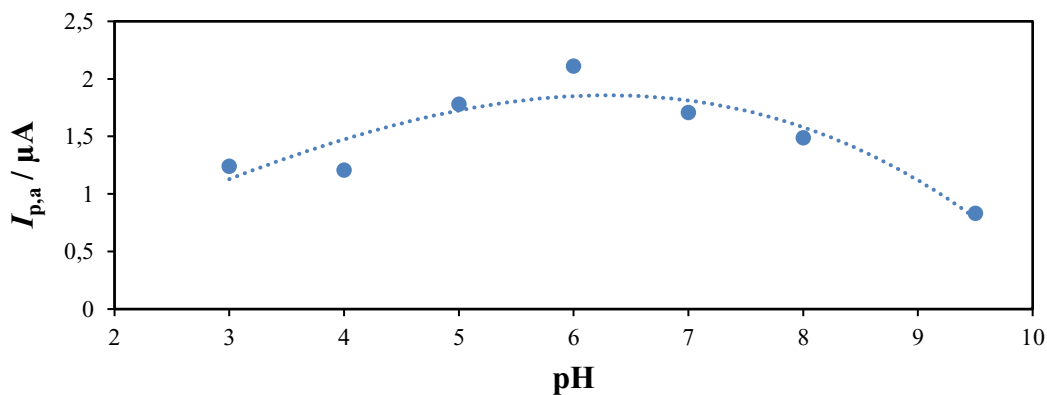
| pH | $E_{p,a} / \text{V}$ | $I_{p,a} / \mu\text{A}$ |
|------------|--|---|
| 3,0 | 0,4516 | 1,24 |
| 4,0 | 0,3474 | 1,21 |
| 5,0 | 0,2644 | 1,78 |
| 6,0 | 0,1885 | 2,11 |
| 7,0 | 0,1450 | 1,71 |
| 8,0 | 0,1066 | 1,49 |
| 9,5 | 0,0691 | 0,83 |

Na slici 20 prikazana je ovisnost potencijala prvog oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline o pH. Iz slike se može vidjeti da potencijal anodnog strujnog vrha linearno ovisi o pH u ispitivanom pH području (od pH = 3,0 do pH = 9,5), a nagib pravca iznosi 58,5 mV, što ukazuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu istog broja protona i elektrona.



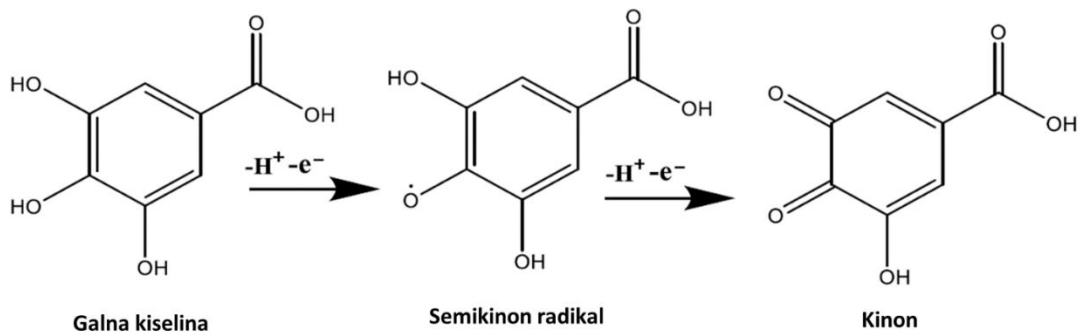
Slika 20. Prikaz ovisnosti oksidacijskog potencijala, $E_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

Na slici 21 prikazana je ovisnosti anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivanih otopina galne kiseline. Iz slike je vidljivo da visina anodnog strujnog vrha raste do $\text{pH} \sim 6,0$ a daljnjim povećanjem pH vrijednosti visina anodnog strujnog vrha počinje opadati. To pokazuje da je proces oksidacije galne kiseline najizraženiji oko $\text{pH} = 6,0$.



Slika 21. Prikaz ovisnosti potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

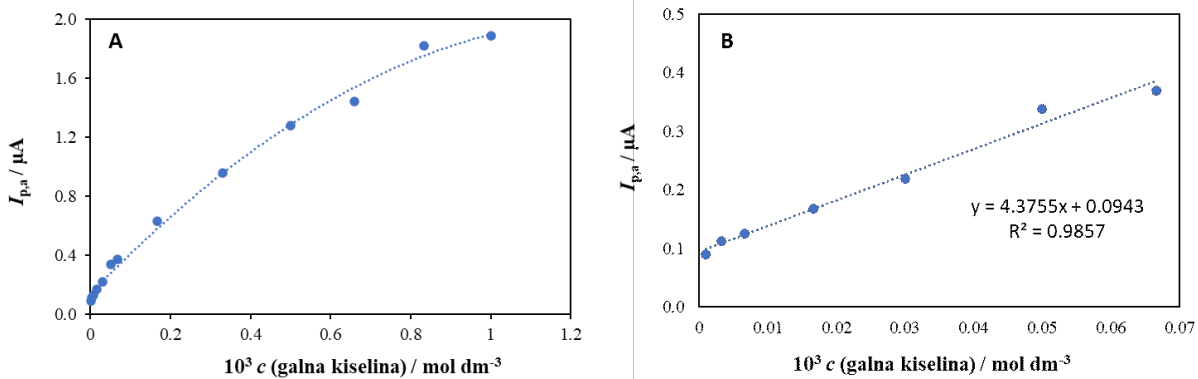
Oksidacijski mehanizam galne kiseline prikazan je na slici 22. U prvom koraku (prvi oksidacijski strujni vrh) dolazi do izmjene jednog elektrona i jednog protona iz 4-OH skupine galne kiseline pri čemu nastaje semikinon radikal. U drugom koraku (drugi oksidacijski strujni vrh) dolazi do izmjene jednog elektrona i jednog protona iz 5-OH skupine galne kiseline pri čemu nastaje kinon.



Slika 22. Oksidacijski mehanizam galne kiseline.

4.4. Utjecaj koncentracije

Na slici 23 prikazana je ovisnost struje anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o koncentraciji galne kiseline koja je mjerena pri pH = 6,0. Iz slike je vidljivo da struja oksidacijskog strujnog vrha raste sa povećanjem koncentracije (slika 23A) dok je je ta ovisnost linearna u koncentracijskom području od $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ do $6,66 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ (slika 23B). Dobivena je linearna regresijska jednadžba, $I_{p,a} = 1,8834 c + 0,1954$; sa koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9763$ ($I_{p,a}$ je struja oksidacijskog strujnog vrha, a c je koncentracija galne kiseline izražena u 10^{-3} mol dm⁻³). Eksperimentalno određena granica detekcije galne kiseline (LOD) iznosi $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³.



Slika 23. A) Grafički prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije koncentracije galne kiseline, B) kalibracijski dijagram galne kiseline.

U tablici 5 prikazani su podaci očitani iz dijagrama ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha o koncentraciji galne kiseline prikazanim na slici 23. Podaci koji su zasjenjeni plavom bojom pokazuju linearno područje gdje struja oksidacijskog strujnog vrha linearno ovisi o koncentraciji galne kiseline i u tom koncentracijskom području do $66,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ odvija se adsorpcija oksidacijskog produkta galne kiseline na površinu radne elektrode. Pri višim koncentracijama, nezasjenjeni podaci u tablici, dolazi do odstupanja od linearnog trenda što se može objasniti intenzivnijim interakcijama sa molekulama adsorbiranim na površini elektrode i difuzijskom strujom.

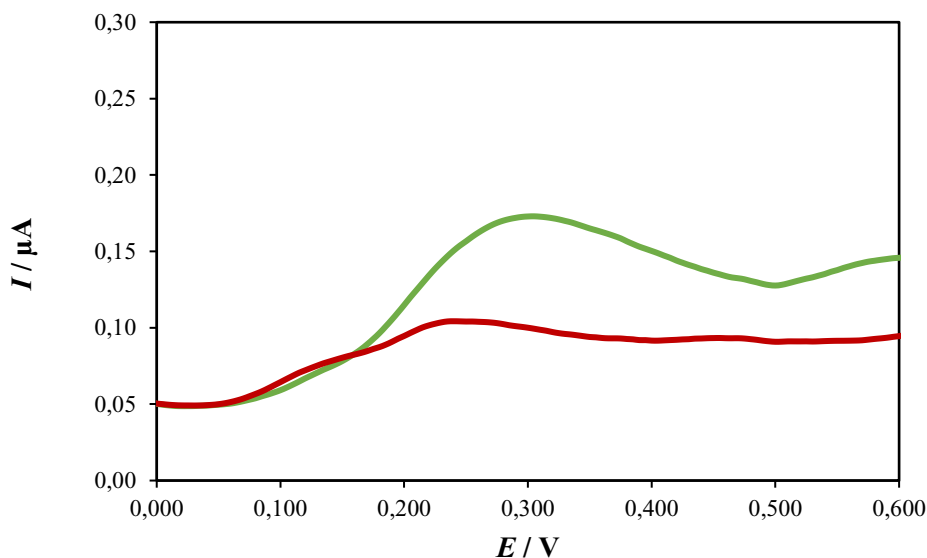
Tablica 5. Vrijednosti potencijala ($E_{p,a}$) i struje ($I_{p,a}$) oksidacijskog strujnog vrha otopina galne kiseline (n) kao funkcije koncentracije ispitivanih otopina galne kiseline.

| n | $10^6 c$ (galna kiselina) $mol\ dm^{-3}$ | $E_{p,a} / V$ | $I_{p,a} / \mu A$ |
|-----|---|---------------|-------------------|
| 1 | 1160,0 | 0,1897 | 1,98 |
| 2 | 1000,0 | 0,1843 | 1,89 |
| 3 | 833,3 | 0,1832 | 1,82 |
| 4 | 660,0 | 0,1857 | 1,44 |
| 5 | 500,0 | 0,1830 | 1,28 |
| 6 | 330,0 | 0,1803 | 0,96 |
| 7 | 166,0 | 0,1749 | 0,63 |
| 8 | 66,6 | 0,1736 | 0,37 |
| 9 | 50,0 | 0,1695 | 0,34 |
| 10 | 30,0 | 0,1749 | 0,22 |
| 11 | 16,6 | 0,1722 | 0,17 |
| 12 | 6,6 | 0,1790 | 0,13 |
| 13 | 3,3 | 0,1709 | 0,11 |
| 14 | 0,1 | 0,1682 | 0,09 |

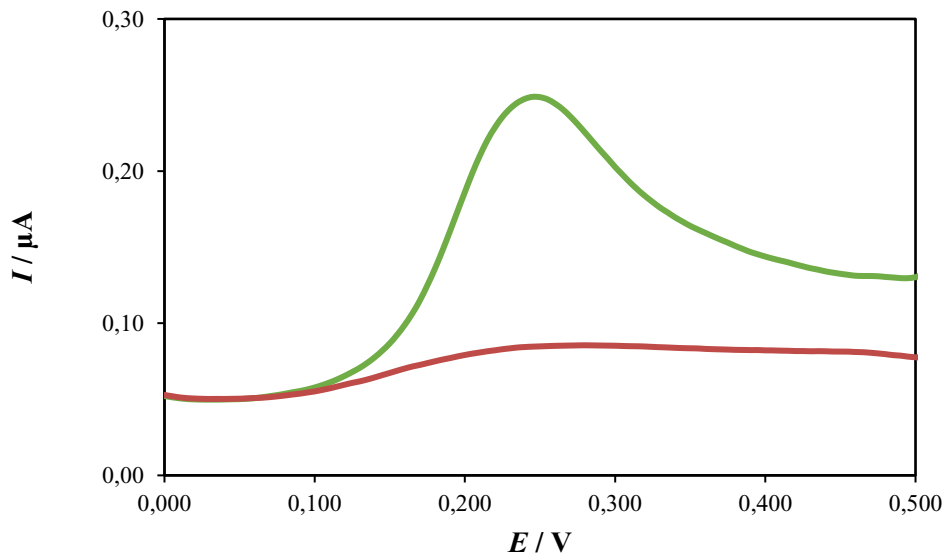
Linearna ovisnost

4.5. Detekcija galne kiseline u realnim uzorcima

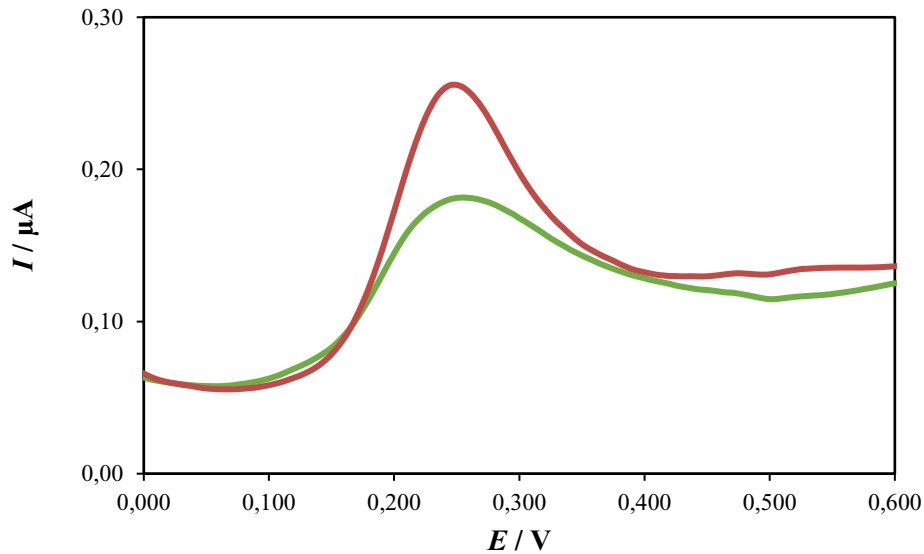
Na slikama 24 - 28 prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami 5 istraživanih realnih uzoraka. U diferencijalnim pulsnim voltamogramima svih ispitivanih uzoraka uočen je oksidacijski strujni vrh galne kiseline oko potencijala 0,25 V, koji je potvrđen dodatkom 250 μL galne kiseline $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ u svaki uzorak. Utvrđeno je da uzorak 3 (liker od lokalnih proizvođača) (slika 26) ima najveću količinu galne kiseline ($c = 35,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$) dok najmanju količinu galne kiseline ($c = 0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$) ima uzorak 2 (komercijalno vino Rose) (slika 25).



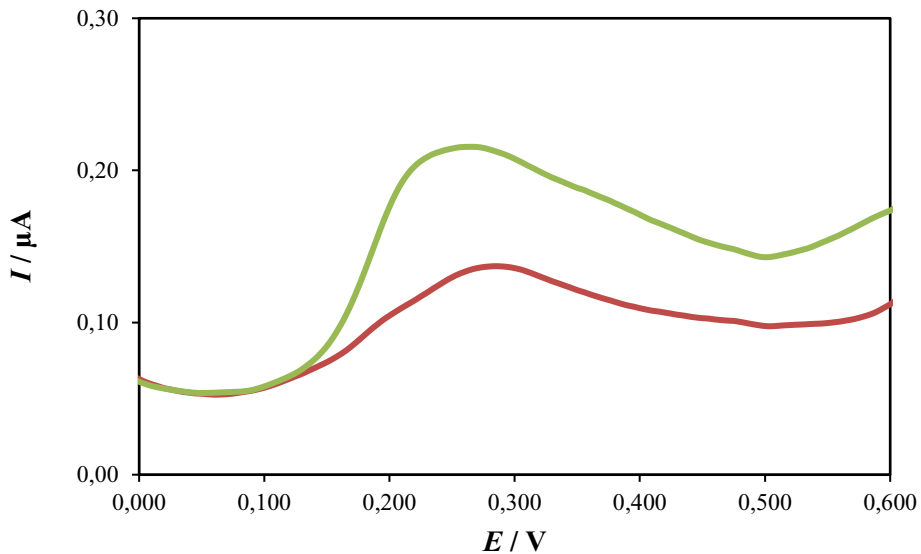
Slika 24. Diferencijalni pulsni voltamogrami otropole galne kiseline u uzorku 1 – komercijalno vino Cabernet Sauvignon (—) i s dodatkom 250 μL galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (—) u fosfatnom puferu (pH = 6,0).



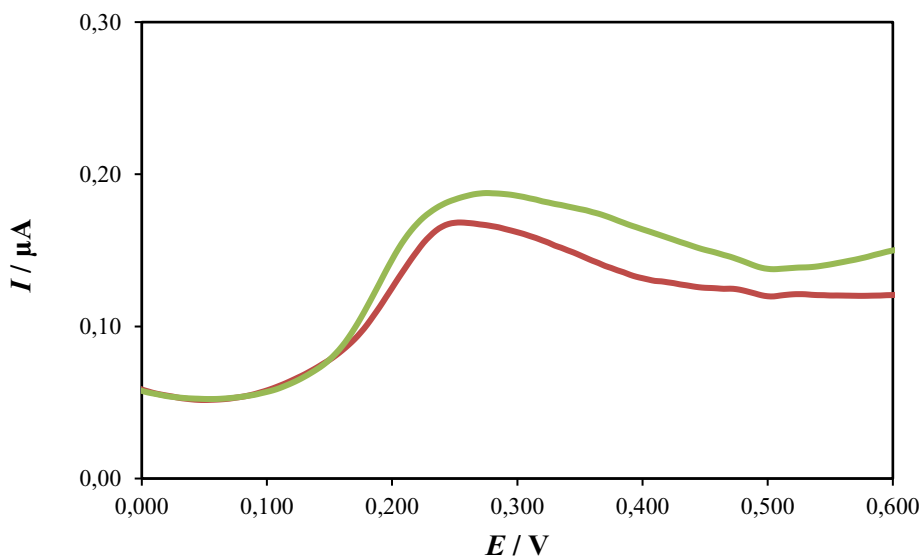
Slika 25. Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine galne kiseline u uzorku 2 – komercijalno vino Rose (—) i s dodatkom 250 μL galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (—) u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,0$).



Slika 26. Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine galne kiseline u uzorku 3 – likier od lokalnih proizvođača (—) i s dodatkom 250 μL galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (—) u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6$).

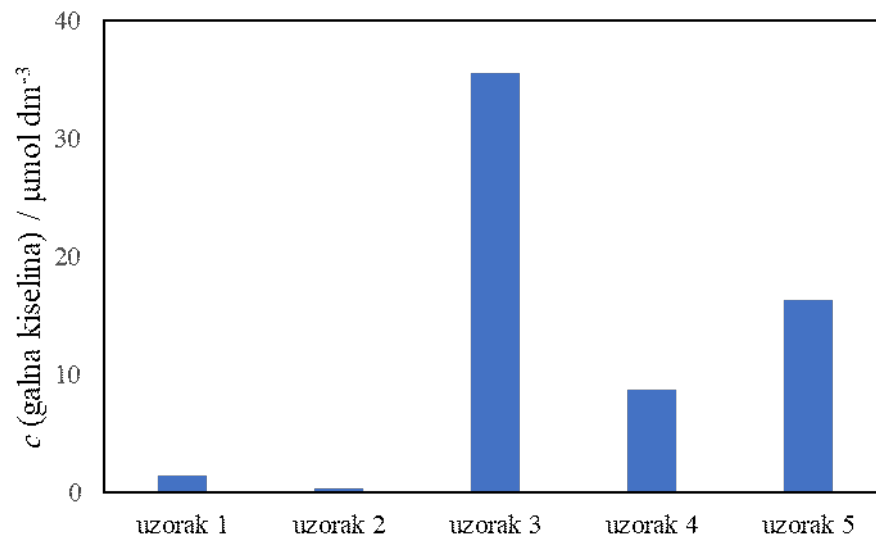


Slika 27. Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine galne kiseline u uzorku 4 – komercijalni čaj 1 (—) i s dodatkom 250 μL galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (—) u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,0$).



Slika 28. Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine galne kiseline u uzorku 5 – komercijalni čaj 2 (—) i s dodatkom 250 μL galne kiseline ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (—) u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,0$).

Na slici 29 i u tablici 6 prikazane su koncentracije galne kiseline u svim istraživanim realnim uzorcima detektirane diferencijalnom pulsnom voltametrijom.



Slika 29. Stupčasti dijagrami prikazuju koncentraciju galne kiseline u realnim uzorcima koji su određeni diferencijalnom pulsnom voltametrijom.

Tablica 6. Koncentracija galne kiseline u realnim uzorcima koji su određeni diferencijalnom pulsnom voltametrijom.

| uzorak | c / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ |
|--------|-----------------------------|
| 1 | 1,5 |
| 2 | 0,4 |
| 3 | 35,6 |
| 4 | 8,7 |
| 5 | 16,3 |

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu su istraživana elektrokemijska svojstva otopina galne kiseline u pH području od 3,0 do 9,5 na zlatnoj elektrodi uporabom diferencijalne pulsne voltametrije te je utvrđeno da se galna kiselina oksidira pri navedenim eksperimentalnim uvjetima. Oksidacijski mehanizam galne kiseline uključuje dva koraka u kojima se izmjenjuju ukupno dva protona i dva elektrona pri čemu nastaje kinon kao krajnji rezultat oksidacije.

Visina oksidacijskog strujnog vrha galne kiseline je varirala s promjenom pH, a najviša vrijednost oksidacijskog strujnog vrha dobivena je pri $\text{pH} = 6,0$ iz čega se može zaključiti da je to optimalna pH vrijednost za oksidaciju galne kiseline.

Uzastopnim snimanjem diferencijalnih pulsni voltamograma smanjivala se visina oksidacijskih strujnih vrhova, što upućuje na adsorpciju produkta oksidacije galne kiseline na površinu zlatne elektrode.

Visina oksidacijskog strujnog vrha povećavala se s povećanjem koncentracije galne kiseline. Dobivena je linearna ovisnost struje oksidacijske strujnog vrha o koncentraciji galne kiseline u koncentracijskom području od $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ do $6,66 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Analizom 5 ispitivanih realnih uzoraka dokazano je prisustvo galne kiseline u svakom od njih. Najveća koncentracija galne kiseline je detektirana u liker u od lokalnih proizvođača u kojemu je njena koncentracija bila $35,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Najmanja koncentracija galne kiseline je detektirana u komercijalnom vinu Rose u kojemu je njena koncentracija iznosila $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

6. LITERATURA

1. V. Lattanzio, Phenolic Compounds: introduction, Springer-Verlag, Berlin, 2013
2. M.L. Reis Giada, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A role for antioxidants, Intech Publisher, London, 2013
3. C.O. Chikere, Electrochemical determination of gallic acid in food matrices using novel materials, Robert Gordon University, Aberdeen, 2020. (doktorska dizertacija)
4. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, Free Radical Biology and Medicine, 18 (1995), 125-126
5. <https://courses.lumenlearning.com/suny-potsdam-organicchemistry2/chapter/18-4-radical-reactions-in-practice/> (28.9.2021.)
6. I. GÜLÇİN, Archives of Toxicology, 86 (2012), 345–391.
7. https://www.123rf.com/photo_109162355_stock-vector-oxidative-stress-diagram-free-radicals-attacking-cell-vector-illustration-flat-design.html (28.9.2021.)
8. M. López-Vélez, F. Martínez-Martínez, C. Valle-Ribes, Food Science and Nutrition, 43(2003), 233–244
9. M. Oroian, I. Eschriche, Food Research International, 74(2015), 10-36
10. Ü.T. Yilmaz, A. Kekillioglu, R. Mert, Journal of Analytical Chemistry, 68(2013), 1064–1069.
11. M. Becerra-Herrera, Food Analytical Methods, 8 (2015), 2554–2559.
12. C. Golumbic, H.A. Mattill) Oil & Soap, 19 (1942), 144–145.
13. B. Bajpai, S. Patil, Brazilian Journal of Microbiology, 39 (2008), 708–711
14. Y.C. Chia, Molecules, 15 (2010), 8377–8389.
15. C. Liang, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 27(2012), 701–710.
16. J.M. Kratz, Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 103 (2008), 437–442
17. J. Jung, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 36 (2013), 1535-1539
18. Y. Liu, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23(2013), 6336–6340.
19. V. Beniwal, Recent Patents on Biotechnology, 7(2013), 228–233.
20. F.H.A. Fernandes, H.R. Salgado, Analytical Chemistry, 46(2016), 257-265

21. D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introdução a Espectroscopia*. Cengage Learning, São Paulo, 2013
22. C.D. Stalikas, *Journal of Separation Science* 30 (2007), 3268-3295
23. T.P. Chaves, C.P.Santana, G.Véras, D.O. Brandão, D.C. Felismino, A.C.D. Medeiros, D.M.B.M.Trovão, *African Journal of Biotechnology*, 12(2013), 847-853.
24. R. Vijayalakshmi, R. Ravindhran, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 3(2012), 1367-1371.
25. P.L. Lam, K.K.H. Lee, S.H.L.Kok, G.Y.M.Cheng, X.M.Tao, D.K.P.Hao, M.C.W.Yuen, K.H.Lam, R.Gambari, C.H.Chui, R.S.M. Wong, *Soft Matter.*, 8(2012), 5027-5037.
26. O.P.Sharma, T.K.Bhat,; B.Singh, *Journal of Chromatography A*, 822(1998), 167-171.
27. K. Dhralwal, V.M.Shinde, Y.S. Biradar, K.R. Mahadik, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2008), 495-500
28. M.S Hussain, S.Fareed, M.Ali, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2012), 477-483
29. A.Kumar, K. Lakshman, K.N.Jayaveera, S.N.Mani Tripathi, K.V.Satish, *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2010), 63-68.
30. V.Leela, A. Saraswathy, *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 4(2013), 1-4.
31. Merr. & Perry (PATHAK et al., 2004) Pathak, S.B.; Niranjana, K.; Padh, H.; Rajani, M. TLC Densitometric Method for the quantification of eugenol and gallic acid in clove. *Chromatographia*. 2004. 60, 241-244
32. E.M.Kuskoski, J.J.Rios, J.M.Bueno, R.Fett, A.M.Troncoso, A.G.Asuero, *The Open Analytical Chemistry Journal.*, 6(2012), 1-8.
33. A.J.Nunes Sellés, H.T.Vélez Castro, J.Aguero-Aguero, J.González-González, F.De Simone, L. Rastrelli, *J. Agr. Food Chem.*, 50(2012), 762-766.
34. C.D. Stalikas, *Journal of Separation Science*, 30(2007), 3268-3295.
35. J. Azmir, I. S.M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A.N. Norulaini, A. K.M. Omar, *Journal of Food Engineering*, 117(2013), 426-436
36. X.He, J.Li, W.Zhao, R.Liu, L. Zhang, X. Kong, *Food Chemistry*, 171(2015),405-411.
37. Z. Sun, L. Zhao, L. Zuo, C. Qi, P. Zhao, X. Hou, 958(2014), 55-62.
38. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Mediaprint-Tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb, 2010.

39. G. Henze, *Polarographie und Voltammetrie*, Springer, Berlin, 2001.
40. S.A.Shahamirifard, *Biosensors and Bioelectronics*, 114(2018), 30-36
41. C.Xiong, *Sensors and Actuators*, 246(2017), 235-242
42. N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, *Journal of Chemical Education*, 95(2) (2017), 197 – 206.
43. 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
44. M.Mihaljević, (2017). *Elektrokemijska karakterizacija L-karnozina*, Odjel za kemiju (diplomski rad)
45. L. G. Dias, S. G. Meirinho, A. C. A. Veloso, L. R. Rodrigues, A. M. Peres. Electronic tongues and aptasensors. In *Bioinspired Materials for Medical Applications*, Ch. 13, pp. 371 – 402, L. R. Rodrigues, M. Mota (Eds), Elsevier, 2017.
46. <https://www.als-japan.com/1388.html>(28.9.2021.)
47. http://www.electrochemistry.co.kr/mall1/m_mall_detail.php?ps_goid=258(28.9.2021.)