

# Elektrokemijska karakterizacija p-kumarinske kiseline

---

Vukić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:182:165757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku-Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; smjer: nastavnički

Maja Vukić

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA**  
***p*-KUMARINSKE KISELINE**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku-Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; smjer: nastavnički

Maja Vukić

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA**  
***p*-KUMARINSKE KISELINE**

Diplomski rad

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

Neposredni voditelj: Dominik Goman, mag. chem.

Osijek, 2024.

Naziv Sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku-Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni diplomski studij Kemija; smjer: nastavnički**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Znanstvena grana:** Fizikalna kemija

## **ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA *p*-KUMARINSKE KISELINE**

**Maja Vukić**

**Rad je izrađen na:** Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

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

### **Sažetak:**

Ovim radom ispitivana su elektrokemijska svojstva *p*-kumarinske kiseline cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj pH vrijednosti, brzine polarizacije elektrode i koncentracije *p*-kumarinske kiseline na njena oksido-redukcijska svojstva, te ispitati adsorpciju *p*-kumarinske kiseline na površinu radne elektrode i detektirati *p*-kumarinsku kiselinu u realnim uzorcima. Mjerenja su provedena pomoću PalmSens potencioštata/galvanostata kontroliranog s PSTrace 1.2. računalnim programom. Mjerenja su izvedena u elektrokemijskoj ćeliji s troelektrodnim sustavom koji se sastoji od radne elektrode od staklastog ugljika, referentne Ag/AgCl elektrode i protuelektrode platinske žice. Sustav je prije svakog mjerenja propuhan argonom visoke čistoće ( $\varphi_{Ar} = 99,999\%$ ). Ciklički voltamogrami pokazali su oksidacijski strujni vrh, što ukazuje na oksidaciju hidroksilne skupine *p*-kumarinske kiseline, pri čemu je utvrđeno da je proces kontroliran difuzijom. Diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su da se visina oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline mijenja s promjenom pH vrijednosti, pri čemu je optimalna pH vrijednost za oksidaciju pri pH = 3,0. U realnim uzorcima (sok od jabuke, mrkve, limuna i šipka) detektirana je *p*-kumarinska kiselina u koncentracijskom području od 2  $\mu$ M. do 9  $\mu$ M.

**Ključne riječi:** *antioksidans, ciklička voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija, polifenoli, realni uzorci.*

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Diplomski rad obuhvaća:** 56 stranica, 29 slika, 5 tablica, 45 literaturnih navoda

**Rad prihvaćen:** 19.6.2024.

### **Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

1. Izv.prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Doc.dr.sc. Olivera Galović

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek  
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josipa Jurja Strossmayera University in Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Graduate study programme in Chemistry; educational program**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Physical chemistry

## **ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *p*-COUMARIC ACID**

**Maja Vukić**

**The paper was created on:** Department of Chemistry

**Supervisor:** Assoc. Prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

### **Abstract**

In this study, the electrochemical properties of *p*-coumaric acid were determined by using cyclic and differential pulse voltammetry. The study aimed to examine the influence of pH, scan rate, and *p*-coumaric acid concentration on its redox properties, to study the adsorption of *p*-coumaric acid on the surface of the working electrode and to detect *p*-coumaric acid in real samples. Measurements were performed by using a PalmSens potentiostat/galvanostat controlled by the PSTrace 1.2 software. The measurements were conducted in an electrochemical cell with a three-electrode system consisting of a glassy carbon working electrode, an Ag/AgCl reference electrode, and a platinum wire counter electrode. Before each measurement, the system was purged with high-purity argon ( $\varphi_{Ar} = 99.999\%$ ). Cyclic voltammograms showed an oxidation peak corresponding to the oxidation of the hydroxyl group of *p*-coumaric acid, indicating that the process is diffusion-controlled. Differential pulse voltammograms revealed that the height of the oxidation peak of *p*-coumaric acid changes with pH, while the optimal pH for oxidation was at the pH= 3.0. In real samples (apple juice, carrot juice, lemon juice, and pomegranate juice), *p*-coumaric acid was detected in the concentration range from 2  $\mu\text{M}$  to 9  $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** *antioxidant, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, polyphenols, real samples.*

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 56 pages, 29 figures, 5 tables, 45 references

**Thesis accepted:** June 19, 2024

**Reviewers:**

1. Assoc. Prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Assoc. Prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Assist. Prof. Olivera Galović

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek  
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada! Hvala Vam na izvrsnom mentorstvu, svakom savjetu, posvećenosti, brzom odgovoru, ugodnoj atmosferi i iznimnoj stručnosti. Od Vas se toliko toga može naučiti i hvala što se toliko trudite ne samo za mene, nego i za ostale studente i pružate puno prilika za napredak. Zahvaljujem se i neposrednom voditelju Dominiku Gomanu mag.chem., na iznimnom trudu, svakoj riječi hvale i kritike, prenesenom znanju i velikoj pomoći u diplomskom radu.*

*Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Elviri Kovač-Andrić, na prenesenom znanju, trudu i prije svega motivaciji za upis i završetku nastavničkog studija. Hvala što ste nas motivirali za rad s učenicima i probudili ljubav i strast za taj posao. Hvala što ste uvijek bili uz nas i poticali nas na razne aktivnosti i suradnju s drugim školama!*

*Hvala mojoj obitelji, zaručniku i prijateljima koji su bili uz mene i vjerovali, te bili podrška tijekom cijelog studiranja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	2
2.1. Polifenoli .....	2
2.2. <i>p</i> -kumarinska kiselina(PCA).....	6
2.3. Antioksidativno djelovanje hidroksicimetnih kiselina .....	8
2.4. Metode karakterizacije <i>p</i> -kumarinske kiseline.....	9
2.6. Elektrokemijske metode .....	10
2.6.1. Voltometrija .....	11
2.6.2. Diferencijalna pulsna voltometrija.....	13
2.6.3. Ciklička voltometrija .....	14
3.1. Kemikalije i priprava otopina .....	16
3.2. Elektrokemijska ćelija .....	18
3.3. Priprava realnog uzorka .....	19
3.4. Metode.....	20
3.4.1. Ispitivanje topljivosti <i>p</i> -kumarinske kiseline .....	20
3.4.2. Ciklička voltometrija .....	20
3.4.3. Diferencijalna pulsna voltometrija.....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
4.1. Ciklička voltometrija .....	21
4.1.1. Izbor radne elektrode .....	21
4.1.2. Utjecaj brzine polarizacije .....	22
4.1.3. Utjecaj pH .....	25
4.2. Diferencijalna pulsna voltometrija .....	27
4.2.1. Ispitivanje adsorpcije .....	27
4.2.2. Ispitivanje utjecaja pH .....	28
4.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije .....	31
4.3. Analiza realnog uzorka .....	34
<b>5. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE</b> .....	38
5.1. Priprema za nastavni sat .....	38

<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	52
<b>7. LITERATURA</b> .....	53



## 1. UVOD

Antioksidans *p*-kumarinska kiselina je prirodni organski spoj koji pripada skupini fenolnih kiselina i derivat je hidroksicimetne kiseline. Bijela kristalna krutina koja je na sobnoj temperaturi i tlaku, slabo topiva u vodi, a lako topiva u etanolu i eteru. Ova kiselina široko je rasprostranjena u biljkama, gdje ima ključnu ulogu u njihovoj obrani protiv patogena i štetnika. Kemijska struktura *p*-kumarinske kiseline sadrži benzenski prsten s hidroksilnom skupinom i bočnim lancem s karboksilnom skupinom, što joj omogućava sudjelovanje u brojnim biološkim i kemijskim procesima. Uglavnom se nalazi u kikirikiju, rajčici, mrkvi, bosiljku i češnjaku, te je glavni sastojak vina, octa i meda. Studije su pokazale da *p*-kumarinska kiselina pruža niz zdravstvenih dobrobiti, uključujući protuupalna, antikancerogena i antimikrobna svojstva [1].

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti elektrokemijska svojstva *p*-kumarinske kiseline u odgovarajućem otapalu primjenom voltometrijskih metoda, kao što su ciklička i diferencijalna pulsna voltometrija. Praćen je utjecaj brzine polarizacije elektrode, pH-vrijednosti otapala te koncentracije *p*-kumarinske kiseline na potencijal i struju oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha. Adsorpcija oksidacijskog produkta *p*-kumarinske kiseline ispitana je diferencijalnom pulsnom voltometrijom na površinu radne elektrode, te je uspješno detektirana u realnom uzorku.

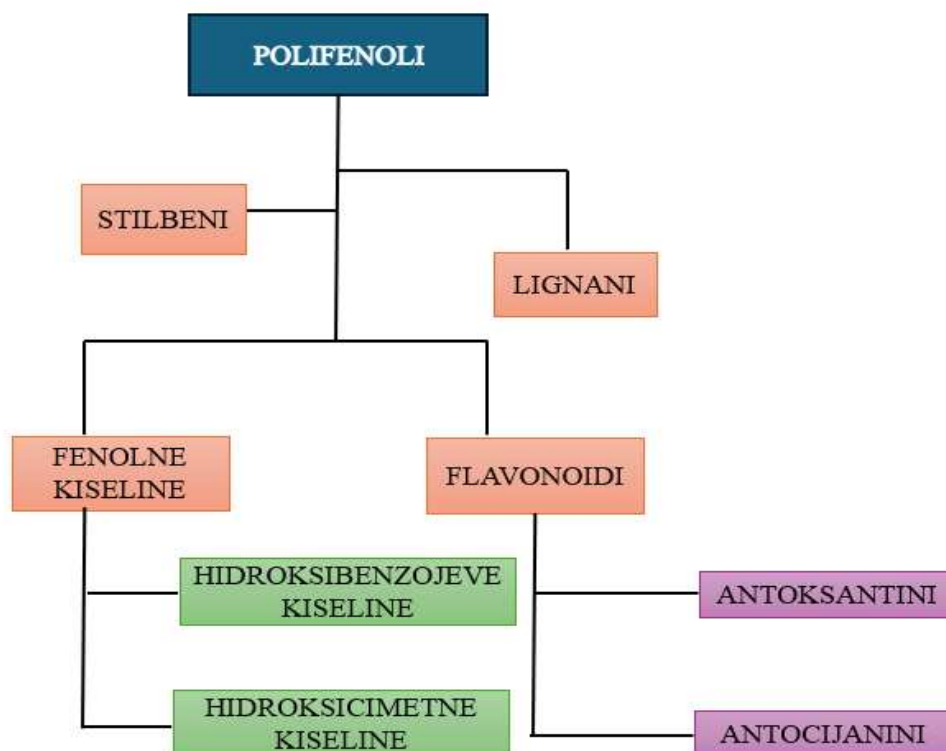
Prvi dio rada, Literaturni pregled, opisuje svojstva, reakcije i glavna obilježja *p*-kumarinske kiseline uključujući strukturu, biokemijske reakcije, ulogu u organizmu, antioksidativno djelovanje i metode karakterizacije. Također su detaljno prikazane elektrokemijske metode primijenjene u istraživanju. Drugi dio rada, Eksperimentalni dio, obuhvaća opis korištenih kemikalija, postupke za pripremu otopina i realnog uzorka, detaljan pregled metoda i instrumenata, kao i uvjete pod kojima su provedena elektrokemijska mjerenja. U trećem dijelu, Rezultati i rasprava, prikazani su i opisani dobiveni eksperimentalni rezultati. Četvrti dio je metodički dio, u kojem je obrađena nastavna jedinica „Elektrodni potencijal i galvanski članci“. Cilj je upoznati učenike s osnovnim pojmovima kao što su elektrodni potencijal i galvanski članci, te ih poučiti kako povezati redoks reakcije koje se događaju na anodama i katodama s promjenama u elektrodnom potencijalu. Posljednji dio rada je Zaključak, osmišljen je na osnovu prezentiranih rezultata.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Polifenoli

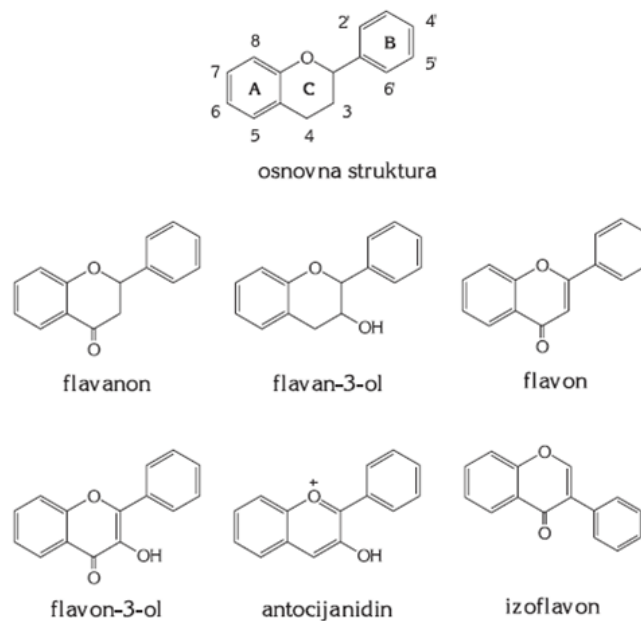
Polifenoli su raznovrsna skupina sekundarnih metabolita koje biljke koriste kao obranu protiv patogena i UV zračenja. U prirodi se nalazi više od 8000 polifenolnih spojeva, a najčešća skupina među njima su flavonoidi. S obzirom na njihovu rasprostranjenost, imaju značajnu ulogu u ljudskoj prehrani. Osim svoje antioksidativne uloge, imaju ključnu ulogu u sprječavanju kardiovaskularnih bolesti, raka i neurodegenerativnih bolesti. Polifenoli su postali važni u istraživanjima znanstvenika, nutricionista i javnosti zbog njihove značajne uloge u očuvanju zdravlja. Djeluju kao snažni antioksidansi, pomažući tijelu u borbi protiv oksidativnog stresa uzrokovanog viškom reaktivnih kisikovih spojeva. Iako većina dokaza o njihovom djelovanju dolazi iz laboratorijskih studija, sve više istraživanja dokazuju da imaju pozitivan utjecaj i u stvarnom životu. Unos polifenola može varirati, ali njihov učinak na organizam ovisi o načinu apsorpcije i metabolizma u probavnom traktu, što je određeno njihovom kemijskom strukturom. Budući da se nalaze u mnogim namirnicama koje se redovito konzumiraju, polifenoli su postali neizostavan dio prehrane većine ljudi [2].

Prehrambeni fenoli, poznati i kao polifenoli, spadaju među najbrojnije i najrasprostranjenije prirodne tvari prisutne u biljkama. Do sada je poznato više od 8000 različitih polifenolnih struktura. Ova skupina prirodnih molekula je vrlo raznolika i obuhvaća nekoliko podskupina, iako se svi kemijski definiraju kao spojevi s fenolnim strukturnim obilježjima. Raznolikost i široka distribucija polifenola u biljkama rezultirale su različitim metodama kategorizacije ovih spojeva koji se pojavljuju u prirodi. Klasificiraju se prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Glavne skupine polifenola obuhvaćaju fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Slika 1.) [3].



*Slika 1.* Klasifikacija polifenola [3].

Flavonoidi su među najistraživanijim polifenolima, s više od 4000 otkrivenih spojeva. Većina njih je odgovorna za boju cvjetova, voća i lišća. Opća struktura flavonoida je C6-C3-C6, što znači da se sastoji od dvije C6 podjedinice, tj. od prstena A i prstena B karakterističnih za ove spojeve. Flavonoidi se mogu podijeliti u različite podskupine kao što su antocijanini, flavanoli, flavoni, flavanoni i flavonoli, ovisno o različitim hidroksilacijama i varijacijama u heterocikličkom prstenu C (Slika 2.). Većina flavonoida ima prsten B vezan za položaj C2 prstena C, dok izoflavonoidi i neoflavonoidi imaju prsten B vezan za položaje C3 i C4 prstena C [4]. Kalkoni, se također smatraju dijelom flavonoidne skupine iako nemaju heterociklički prsten C.

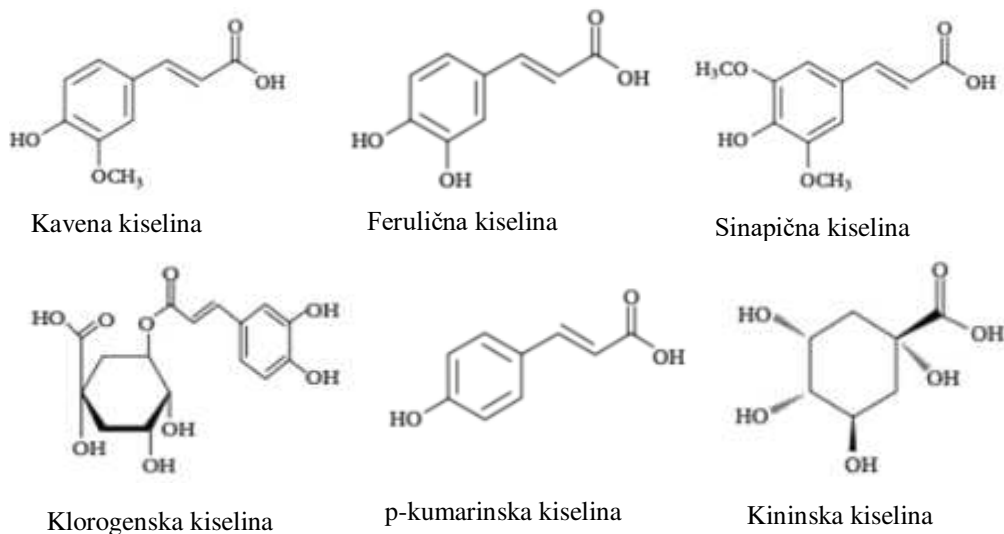


**Slika 2.** Klasifikacija Flavonoida [5].

Fenolne kiseline su vrsta polifenolnih spojeva koje se dijele na derivate benzojeve i cinaminske kiseline, pri čemu su hidroksibenzojeve kiseline prisutne u manjim količinama u jestivim biljkama, osim u određenim vrstama voća, crnim rotkvicama i luku. Hidroksicimetne kiseline, kao što su *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina, vidljive na slici 3., češće se javljaju u biljkama, ali su većinom prisutne u esterificiranom obliku. Kofeinska kiselina je najčešći oblik fenolne kiseline u većini voća. Hidroksicimetne kiseline (engl. *Hydroxycinnamic Acids*, HCA) i hidroksibenzojeve kiseline (engl. *Hydroxybenzoic Acids*, HBA) su fenolne kiseline koje pokazuju antioksidativnu aktivnost ovisnu o broju hidroksilnih skupina u molekuli. HCA su široko prisutne u voću, povrću, pićima i žitaricama te su istraživanja povezala njihovo djelovanje s farmakološkim i protukancerogenim svojstvima [6]. Budući da se pojavljuju u niskim koncentracijama, za njihovo mjerenje potrebne su osjetljive analitičke metode.

HCA su jednostavni fenilpropanoidni spojevi koji imaju ključnu ulogu u biosintezi složenijih fenolnih sustava te se mogu pojaviti kao esteri, amidi ili glikozidi. Njihova prisutnost, posebno u plodovima, daje značajan doprinos fenolnom sastavu biljaka. HCA se ističu kao snažni antioksidativni spojevi s raznim fiziološkim ulogama u biološkim sustavima [7]. Istraživanja pokazuju da imaju potencijalnu primjenu u prevenciji i terapiji bolesti povezanih s oksidativnim stresom poput ateroskleroze, upalnih stanja, raka i

kardiovaskularnih bolesti. Glavni mehanizam njihovog djelovanja je hvatanje slobodnih radikala i stabilizacija fenoksilnih radikala, iako se istražuju i drugi mehanizmi poput kelacije prijelaznih metala i modulacije genske ekspresije. HCA se dobro snalaze u vodenim medijima, ali njihova hidrofilna priroda može ograničiti njihovu učinkovitost u lipofilnim sustavima. Međutim, esterifikacija karboksilne skupine može poboljšati njihovu hidrofobnost, što ih čini primjerenima za širok spektar aplikacija u lipofilnim medijima [8].



**Slika 3.** Derivati hidroksicimetne kiseline [9].

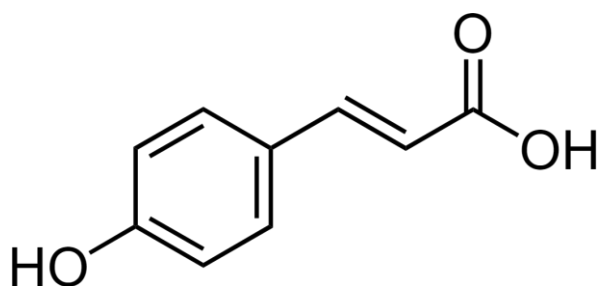
Polifenoli, osim svojih osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava, dijele dva ključna svojstva koja su temelj njihovog djelovanja: redukcijsku aktivnost koja kontrolira njihova antioksidativna svojstva, te osjetljivost na oksidaciju i svojstva vezivanja koja su povezana s njihovom sposobnošću keliranja metala i afinitetom prema proteinima poput enzima, transportnih proteina i receptora. Njihova fizikalno-kemijska svojstva, osobito kemijska reaktivnost, predstavljaju zanimljivo područje istraživanja. Znanstvena istraživanja su pokazala da polifenoli pružaju zaštitu krvnim žilama, srcu i imunološkom sustavu, te smanjuju rizik od kroničnih upalnih bolesti, tumora i procesa starenja. Najistraživanija sposobnost polifenola je zaštita organizma od slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta koji nastaju tijekom metabolizma kisika, a koji uzorkuju oksidativno oštećenje stanica. Mehanizmi njihovog antioksidativnog djelovanja također uključuju zaštitu od oksidativnog stresa putem izravnog neutraliziranja reaktivnih slobodnih radikala, vezivanja metalnih iona

koji potiču stvaranje slobodnih radikala, inhibiciju enzima koji generiraju slobodne radikale te obnavljanje antioksidativnih enzima povezanih s membranama stanica [10].

## 2.2. *p*-kumarinska kiselina(PCA)

Kumarinska kiselina, hidroksi derivat cimetne kiseline, prirodno se pojavljuje u tri izomera (orto-, meta- i para-), pri čemu je *p*-kumarinska kiselina jedan od najčešćih izomera u prirodi. Na slici 4. prikazana je kemijska struktura *p*-kumarinske kiseline. Ta tvar je kristalna krutina koja se lako otapa u etanolu i dietil-eteru, ali ima ograničenu topljivost u vodi. Klasificirana kao fitokemikalija i nutraceutik, kiselina se nalazi u raznim jestivim biljkama poput mrkve, rajčice i žitarica [11].

Osobito se *p*-kumarinska kiselina (4-hidroksi-cimetna kiselina) nalazi u staničnim stijenkama velikog broja žitarica. Pokazuje sposobnost smanjenja peroksidacije lipoproteina niske gustoće (engl. *Low-Density Lipoproteins*, LDL), te ima izražena antioksidativna i antimikrobna svojstva, što ima važan utjecaj na ljudsko zdravlje. Iako se nalazi u endospermu jezgre u ograničenim količinama, njena prisutnost značajno se povećava u perifernim tkivima. Zbog svojih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava, *p*-kumarinska kiselina postaje sve popularniji prirodni izbor kao alternativa sintetičkim aditivima u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. PCA se može naći u mnogim vrstama voća i povrća u obliku slobodne kiseline ili estera. U biljkama se nalazi kao sastavni dio lignina i tanina [12].



**Slika 4.** Kemijska struktura *p*-kumarinske kiseline [13].

PCA uspješno inhibira rast bakterijskih patogena, s minimalnim inhibitornim koncentracijama (engl. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) između 10 i 80 mg/ml [14].

Također, značajno povećava vanjsku propusnost i propusnost plazma membrane, što rezultira gubitkom funkcije barijere. Istraživanja su pokazala sposobnost vezanja *p*-kumarinske kiseline za fosfatne anione u dvostrukoj uzvojnici DNA, te njeno interkaliranje u utor dvostruke uzvojnice DNA, što može utjecati na replikaciju, transkripciju i ekspresiju genoma bakterija.

Prisutna je u raznim vrstama voća, povrća, začina i sjemenki. Ovaj spoj nalazi se u: voću poput borovnica, višanja, trešanja, šipka, limuna, jabuka i grejpa, te povrću poput: rajčice, maslina i patlidžana, začинима kao što su ocat, kadulja, majčina dušica, ružmarin, klinčić, muškadni oraščić i med, te sjemenkama poput kikirikija, oraha i leće (Tablica 1.). Ovi raznoliki izvori *p*-kumarinske kiseline pružaju brojne mogućnosti za obogaćivanje prehrane, naglašavajući zdravstvene koristi koje ovaj spoj pruža .

**Tablica 1.** Sadržaj *p*-kumarinske kiseline u određenoj hrani [16].

<i>Hrana</i>	<i>Koncentracija p-kumarinske kiseline u proizvodu</i>
<i>Jabuka</i>	0,27 mg/100g
<i>Kikiriki, pečeni</i>	6,46 mg/100 g
<i>Riža, kuhana</i>	0,19 mg/100 g
<i>Sušene datulje</i>	5,77 mg/100 g
<i>Svježe datulje</i>	2,89 mg/100 g
<i>Ocat</i>	0,29 mg/100 ml
<i>Zelena maslina</i>	5,90 mg/100 g

U slučaju mikroorganizama *p*-kumarinska kiselina se biosintetizira uglavnom iz tirozina. Kao komponenta lignina, sveprisutna je u biljkama u niskim koncentracijama. U biljkama, biosinteza *p*-kumarinske kiseline uključuje dva kemijska procesa: fenilalanin amonij-liaza (PAL) prvo katalizira pretvorbu fenilalanina u trans-cimetnu kiselinu, koja se zatim hidroksilira u para položaju pod djelovanjem enzima trans 4-hidroksilaze cimeta (C4H). S druge strane, određeni PAL enzimi mogu koristiti tirozin kao početni supstrat (PAL/TAL), što dovodi do izravnog stvaranja *p*-kumarinske kiseline iz tirozina, bez posredničke faze trans-cimetne kiseline [17]. Osim toga, postoje određeni specifični enzimi amonijeve liaze u desaminirajućem tirozinu (TAL 1). Uvođenjem PAL/TAL ili TAL 1, mikroorganizmi poput

*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces lividans* i *Pseudomonas putida* sposobni su proizvesti *p*-kumarinsku kiselinu iz tirozina [18].

### 2.3. Antioksidativno djelovanje hidroksicimetnih kiselina

Antioksidativna svojstva hidroksicimetnih kiselina (HCA), poput kumarinskih kiselina, imaju značajnu važnost u sprječavanju ili inhibiranju oksidacijskih procesa, što ih čini korisnima u raznim područjima, od industrije do medicine. Smatraju se snažnim antioksidansima s različitim fiziološkim ulogama u organizmu. Studije su pokazale da HCA mogu biti korisne u prevenciji i terapiji bolesti povezanih s oksidativnim stresom poput ateroskleroze, upalnih stanja, raka i kardiovaskularnih bolesti.

Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa je njihova sposobnost hvatanja slobodnih radikala, čime sprječavaju oksidacijske procese [19]. Osim toga, predloženi su i drugi mehanizmi djelovanja, poput kelacije prijelaznih metala koji su katalizatori oksidativnog stresa, inhibicije enzima koji proizvode reaktivne kisikove i dušikove spojeve te modulacije ekspresije gena.

Cimetne kiseline dobro djeluju u vodenim medijima budući da njihova hidrofilna priroda predstavlja ograničenje za zaštitu lipofilnih sustava (npr. prehrambenih ili kozmetičkih matrica ili bioloških membrana) uglavnom zbog teškoća njihove ugradnje u masne i uljne medije. Međutim, hidrofobnost HCA može se pojačati kemijskom modifikacijom, poput esterifikacije karboksilne skupine fenolne kiseline s masnim alkoholima. Važno je zadržati izvorna funkcionalna svojstva HCA tijekom ovih kemijskih modifikacija kako bi se osigurala učinkovitost i sigurnost njihove primjene [20].

Slobodni radikali mogu dovesti do mnogih kroničnih zdravstvenih problema kao što su kardiovaskularne bolesti i rak. Stoga, fenolni spojevi, koji djeluju kao redukcijska sredstva i hvatači slobodnih radikala, igraju ključnu ulogu u prevenciji i kontroli tih bolesti. Ovi spojevi su široko rasprostranjeni u biljkama, povrću, voću, žitaricama i drugim sjemenkama te predstavljaju važnu skupinu prirodnih antioksidansa s potencijalnim blagotvornim učincima na ljudsko zdravlje. Antioksidativna aktivnost se definira kao sposobnost spoja da inhibira oksidativnu degradaciju, poput peroksidacije lipida, koja može uzrokovati oštećenje stanica i tkiva. PCA kao jedna od fenolnih spojeva, pokazala je značajnu antioksidativnu aktivnost i



dokazano je da ima izvrstan učinak hvatanja slobodnih radikala. Navedeno je da *p*-kumarinska kiselina ima značajno protuupalno djelovanje te pokazuje antitumorske učinke na maligne tumore. Također, ovaj spoj je sposoban smanjiti proliferaciju stanica za 50% pri koncentracijama od 1-4,5 mmol/L. Osim toga, može biti korisna u borbi protiv raka želuca jer smanjuje stvaranje kancerogenih nitrozamina [21].

Zabilježeno je da *p*-kumarinska kiselina ima zaštitni učinak protiv srčanih bolesti jer smanjuje peroksidaciju lipida, oksidaciju kolesterola i otpornost na lipoproteine niske gustoće (LDL). S druge strane, oralna primjena kumarinske kiseline (317 mg/dan) tijekom 30 dana značajno je inhibirala oksidaciju LDL-a. Ističe se da *p*-kumarinska kiselina omogućuje smanjenje peroksidacije lipida emulzije linolne kiseline od 71,2 % pri koncentraciji od 45 µg/ml. Uspoređujući s drugim poznatim antioksidansima poput BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline, *p*-kumarinska kiselina pokazala je veću učinkovitost, postižući veću redukciju peroksidacije lipida [22].

#### 2.4. Metode karakterizacije *p*-kumarinske kiseline

Analitičke metode za detekciju *p*-kumarinske kiseline su ključne zbog njezine biološke važnosti i sveprisutnosti u raznim prehrambenim i farmaceutskim proizvodima. Primijenjene su različite analitičke metode kako bi se omogućila precizna identifikacija i kvantifikacija ove hidroksicimetne kiseline [23].

Kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) kao jedna od metoda koja se koristi za analizu *p*-kumarinske kiseline koja omogućuje odvajanje i detekciju spojeva nabijene čestice u otopini elektrolita pod utjecajem električnog polja gdje putuju različitim brzinama prema jednoj od elektroda na temelju njihove pokretljivosti u kapilarnom sustavu. Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) s UV detekcijom također se koristi za analizu *p*-kumarinske kiseline. Ova tehnika omogućuje razdvajanje spojeva pomoću micelarnih agregata u mobilnoj fazi, što rezultira poboljšanom selektivnošću i osjetljivošću [24]. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je jedna od najčešće korištenih tehnika za analizu *p*-kumarinske kiseline. Ova tehnika omogućuje razdvajanje i kvantifikaciju spojeva u tekućoj fazi pomoću visokotlačne pumpe i kolone napunjene stacionarnom fazom [25]. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl.

*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) je tehnika vibracijske spektroskopije koja se koristi za analizu molekula adsorbiranih na nanostrukturiranu površinu metala. Ova tehnika se široko koristi u analizi različitih spojeva, uključujući *p*-kumarinsku kiselinu, zbog svoje visoke osjetljivosti, brzine i sposobnosti analize čak i u malim koncentracijama. Također, u ovom diplomskom radu su korištene elektrokemijske metode za karakterizaciju *p*-kumarinske kiseline kao što su ciklička i diferencijalna pulsna voltometrija [26].

## 2.6. Elektrokemijske metode

Grana kemije koja se bavi kemijskim promjenama povezanih s električnom strujom naziva se elektrokemija. Ova grana kemije obuhvaća elektroanalitičke metode koje proučavaju tvari temeljem elektromagnetskih zakona, posebno oksido-redukcijskih reakcija. Među elektroanalitičkim metodama su potenciometrija, voltometrija, polarografija, elektrogravimetrija, kulometrija i konduktometrija. Ove metode odlikuju se točnošću, selektivnošću, osjetljivošću, preciznošću, pristupačnom cijenom i dostupnošću instrumenata. Elektrokemijske metoda mjerenja se provode u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji koja se sastoji od tri elektrode: referentne, radne elektrode i protuelektrode [27]. Elektrode su uronjene u elektrolit, otopinu koja omogućuje protok iona, te su povezane putem solnog mosta ili polupropusne membrane. Radna elektroda reagira s analitom i na njoj se odvija redoks reakcija pri zadanim vrijednostima potencijala. Referentna elektroda ima konstantni potencijal, dok protuelektroda omogućava protok električne struje kroz ćeliju. Postoje dva osnovna tipa elektrokemijskog članka: galvanski i elektrolitički. Galvanski članak pretvara kemijsku energiju u električnu energiju bez potrebe za vanjskim izvorom struje, dok elektrolitički članak koristi električnu energiju za pokretanje kemijskih reakcija [28]. Kemijske reakcije obično se odvijaju na radnoj elektrodi, pri čemu nastaje signal odziva. Taj signal se mjeri i daje tražene analitičke ili druge podatke o analitu. Signal odziva može biti izazvan signalom pobude ili prisutnošću određenih molekula u otopini. Izbor prikladne radne elektrode temelji se na redoks potencijalu tvari koja se analizira, kao i na pozadinskoj struji unutar raspona potencijala potrebnog za mjerenje. Dodatni čimbenici kao što su dostupnost, vodljivost, toksičnost, mehanička svojstva i raspoloživi raspon potencijala također mogu utjecati na odabir radne elektrode [28].

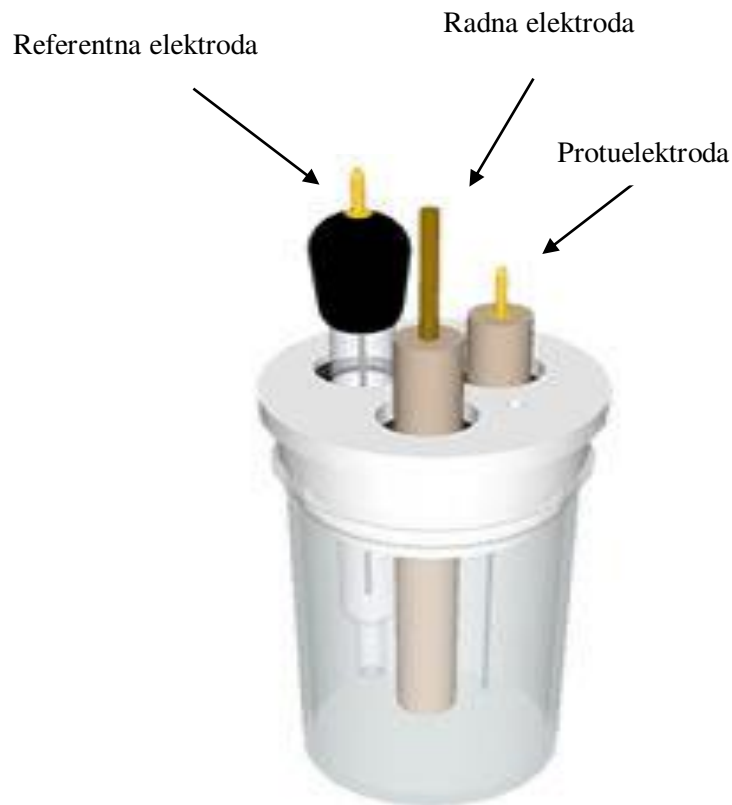
### 2.6.1. Voltometrija

Voltometrijske metode su elektroanalitičke tehnike koje omogućuju analizu kemijskih spojeva mjerenjem struje (signal odziva) u funkciji primijenjenog napona (signal pobude), izazivajući polarizaciju radne elektrode. Voltometrija se često koristi u različitim područjima kemije, uključujući analitičku kemiju, biokemiju i fizikalnu kemiju. Ova metoda omogućava detaljno proučavanje procesa oksidacije i redukcije, adsorpcijskih procesa na površinama i mehanizama prijenosa elektrona na kemijski modificiranim površinama elektroda, te elektrokemijsku detekciju analita eluiranih u visokodjelotvornoj tekućinskoj kromatografiji (HPLC). Voltometrijske metode temelje se na mjerenju struje kao odgovora na promjenjivi potencijal (pobudni signal) primijenjen na elektrokemijski članak. Promjena potencijala izaziva elektrokemijske reakcije na površini radne elektrode, što rezultira protokom struje koja se mjeri i analizira. Voltometrijski sustav sastoji se od tri glavne komponente koje zajedno omogućuju precizno upravljanje elektrokemijskim eksperimentima i analizu rezultata. Ove komponente su: računalo, potencijostat i elektrokemijska ćelija prikazani na slici 5. Računalo se koristi za upravljanje potencijostatom i obradu podataka dobivenih tijekom eksperimenta. Specijalizirani računalni program instaliran na računalu omogućava korisniku kontrolu nad eksperimentalnim parametrima, kao što su potencijal i vrijeme. Rezultati se prikazuju na voltamogramu koji grafički prikazuje jakost struje u odnosu na potencijal između radne i referentne elektrode, što omogućava detaljnu analizu elektrokemijskih svojstava istraživnog sustava. Potencijostat je ključni instrument u voltometrijskom sustavu koji kontrolira potencijal između radne i referentne elektrode. Precizna kontrola potencijala je važna za izazivanje i proučavanje elektrokemijskih reakcija na površini radne elektrode, dok mjerenje struje omogućuje kvantitativnu analizu tih reakcija [29, 30].



**Slika 5.** Sustav za voltometrijska mjerenja obuhvaća: voltometrijsku ćeliju, potenciostat i računalo. [31].

Elektrokemijska ćelija je naziv za sustav u kojem se nalazi analit tijekom mjerenja voltometrijskom metodom. Bitna je komponenta za voltometrijski sustav, jer omogućuje proučavanje elektrokemijskih reakcija analita. Shematski prikaz elektrokemijske ćelije može se vidjeti na slici 6. Posuda u voltometrijskoj ćeliji ima čep s otvorima za tri elektrode: radnu, referentnu i protuelektrodu. Elektroda na kojoj se odvijaju redoks reakcije naziva se radna elektroda (WE, engl. *Working Electrode*). Na radnoj elektrodi dovodi se promjenjivi potencijal koji djeluje kao signal pobude, potičući redoks reakcije analita na njezinoj površini. Potencijal radne elektrode održava se na određenoj, stalnoj vrijednosti tijekom eksperimenta. Radna elektroda se naziva i mikroelektrodom zbog njene male površine koja pojačava sklonost polarizaciji i sprječava razgradnju analita elektrolizom. Referentna elektroda (engl. *Reference Electrode*, RE) ima stabilan potencijal što omogućuje točna i ponovljiva mjerenja. Služi i kao referentna točka za mjerenje potencijala radne elektrode. Najčešće korištena referentna elektroda je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda. Protuelektroda (engl. *Counter Elektrode*, CE) omogućuje tok električne struje kroz ćeliju. Obično je izrađena od inertnog materijala, kao što je platina, kako bi se spriječile neželjene kemijske reakcije koje bi mogle utjecati na mjerenje. Kada se oksidacija ispitivanog uzorka događa na radnoj elektrodi, elektroni se kreću kroz vanjski električni krug prema protuelektrodi. Na protuelektrodi zatim dolazi do redukcije otapala, što omogućuje nastavak strujnog toka. Tijekom reduciranja analita na radnoj elektrodi, potrebni su elektroni iz vanjskog izvora, koji dolaze od protuelektrode [32].



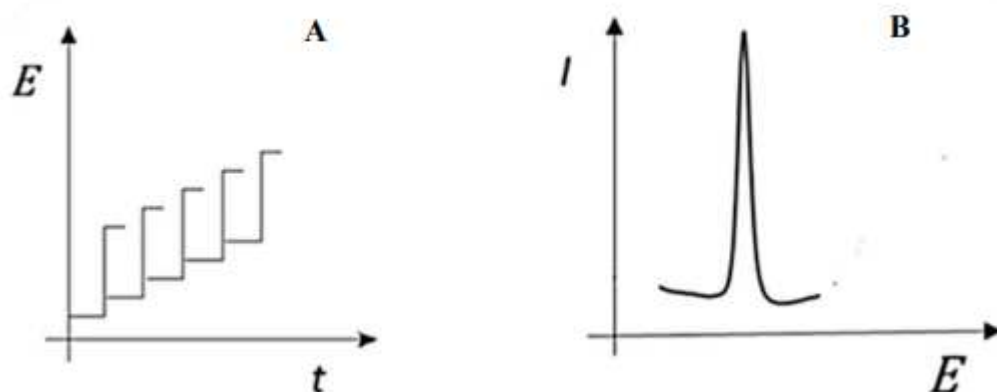
**Slika 6.** Troelektrodna voltametrijska ćelija sastoji se od: protuelektrode, radne elektrode i referentne elektrode. [33].

Voltametrijske metode koje se najčešće upotrebljavaju su ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna i *stripping* voltametrija. Također, postoje i različite polarografske metode u kojima su radne elektrode obično kapajuće živine elektrode, za razliku od voltametrijskih metoda [34].

### 2.6.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija (engl. *Differential Pulse Voltammetry*, DPV) poznata kao visoko osjetljiva voltametrijska metoda, primjenjuje se za analizu niskih koncentracija elektroaktivnih komponenti u različitim uzorcima. DPV je posebno korisna zbog svoje visoke osjetljivosti, s granicom detekcije do  $10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>. Ova metoda omogućava precizno mjerenje promjene potencijala u odnosu na vrijeme kako bi se odredila

koncentracija ispitivanog analita. Kako bi se utvrdio odnos potencijala napona ( $E$ ), struje ( $I$ ) i vremena ( $t$ ), uzorci se uzimaju tijekom određenog razdoblja. Radna elektroda koristi kratke impulse koji traju između 10 ms i 100 ms, pri čemu postupno povećava potencijal od 10 mV do 100 mV. Nakon svakog pulsa, potencijal se vraća na početnu vrijednost, dok protuelektroda prima struju tijekom razdoblja mirovanja od 1-2 sekunde. Pulsevi primijenjeni na radnu elektrodu omogućuju mjerenje jakosti struje prije njihove primjene ( $I_1$ ) i nakon njihove primjene ( $I_2$ ). Razlika ove dvije vrijednosti ( $\Delta I = I_2 - I_1$ ) prikazana je kao funkcija potencijala, stvarajući diferencijalni pulsni voltamogram. Strujni vrh u voltamogramu nastaje kada mala promjena potencijala radne elektrode uzrokuje mjerljivu promjenu struje ćelije, a visina tog vrha proporcionalna je koncentraciji ispitivanog analita. Niz kratkotrajnih pulseva predstavlja signal pobude (Slika 7.A) dok strujni vrhovi označavaju signal odziva (Slika 7.B). Potrebne su tri elektrode za rad diferencijalne pulsne voltametrije, a to su radna elektroda koja prenosi pulseve napona i mjeri pripadajuću struju, protuelektroda koja omogućava protok struje kroz sustav, dok treća elektroda, referentna elektroda, kontrolira potencijal protuelektrode, osiguravajući stabilnost i točnost mjerenja [35, 36].

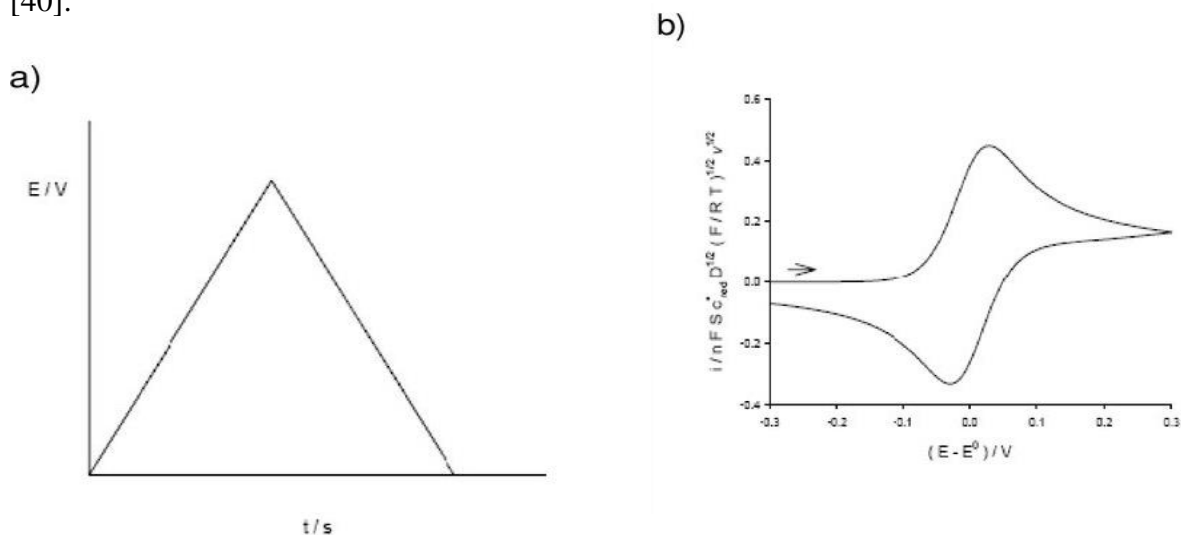


**Slika 7.** A) signal pobude i B) signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije [37].

### 2.6.3. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija (engl. *Cyclic Voltammetry*, CE) je elektroanalitička metoda koja se koristi za određivanje redoks potencijala, proučavanje mehanizma redoks reakcija, analizu broja prenesenih elektrona, ispitivanje adsorpcijskih procesa te proučavanje kinetike elektrokemijskih reakcija. Ova metoda se rijetko koristi za kvantitativna određivanja, ali je

izuzetno korisna za proučavanje redoks procesa, omogućujući dobivanje detaljnih informacija o prirodi intermedijera i stabilnosti produkata reakcije [38]. Koristi se kao prva analiza elektrokemijskih reakcija na površini elektrode, otkrivajući mehanizam reakcije koji može biti reverzibilan, ireverzibilan ili kvazireverzibilan proces. Granica detekcije cikličke voltametrije obično varira od  $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> do  $10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, ovisno o specifičnim uvjetima eksperimenta. Signal pobude, prikazan kao potencijal radne elektrode linearno se mijenja s vremenom, a pri određenom potencijalu dolazi do oksidacije analita. Kad se postigne odgovarajući potencijal, smjer promjene potencijala se mijenja, omogućujući redukciju oksidiranog oblika. Signal odziva je struja koja se mjeri kao funkcija potencijala, rezultirajući karakterističnim voltamogramom s anodnim i katodnim strujnim vrhovima. Promatra se potencijal radne elektrode koji se mijenja linearno u ovisnosti o vremenu od početnog potencijala ( $E_{\text{poč}}$ ) do konačnog ( $E_{\text{kon}}$ ) i natrag, što je vidljivo na slici 8.A. Rezultat je ciklički voltamogram, koji grafički prikazuje elektrokemijsku reakciju na elektrodi kao odnos između struje i potencijala (Slika 8.B) [39]. Brzina promjene potencijala može se prilagoditi, što omogućuje ispitivanje brzih i sporih reakcija na elektrodi. Visina strujnog odziva ovisi o : broju izmijenjenih elektrona po čestici, koncentraciji elektroaktivne tvari, difuzijskim svojstvima i površini radne elektrode. Parametri koji su važni za cikličku voltametriju obuhvaćaju brzinu promjene potencijala ( $\nu$ ), granice potencijala ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ) te smjer promjene potencijala. Trajanje reakcije zavisi od brzine kojom se mijenja potencijal, obično u rasponu od 25 do 500 mV/s [40].



**Slika 8.** A) signal pobude i B) signal odziva u cikličkoj voltametriji [41].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije i priprava otopina

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije i uzorci:

1. *p*-kumarinska kiselina, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>
2. destilirana voda
3. ultra čista voda ( $\kappa \leq 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ )
4. Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH
5. Metanol, CH<sub>3</sub>OH
6. Dimetil-formamid (DMF)
7. Dimetil-sulfoksid (DMSO)
8. Kalijev klorid, KCl ( $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ )
9. Klorovodična kiselina, HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ )
10. Natrijev hidroksid, NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )
11. Kalijev hidrogen ftalat, C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )
12. Natrijev dihidrogen fosfat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )
13. Boraks, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O ( $c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ )
14. Realni uzorci: sok od jabuke, sok od mrkve, sok od šipka, sok od limuna

U ovom su radu pripremljeni puferi određenih pH vrijednosti na sljedeći način: otopine pufera su pripremljene u odmjernim tikvicama volumena 100 cm<sup>3</sup>, koristeći ultra čistu vodu s električnom provodnošću ( $\kappa$ ) manjom ili jednakom 0,055  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Za pripremu pufera pH = 2, u odmjernu tikvicu od 100 cm<sup>3</sup> dodano je 25 cm<sup>3</sup> otopine KCl ( $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 6,5 cm<sup>3</sup> otopine HCl ( $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je volumen dopunjen vodom do 100 cm<sup>3</sup>.

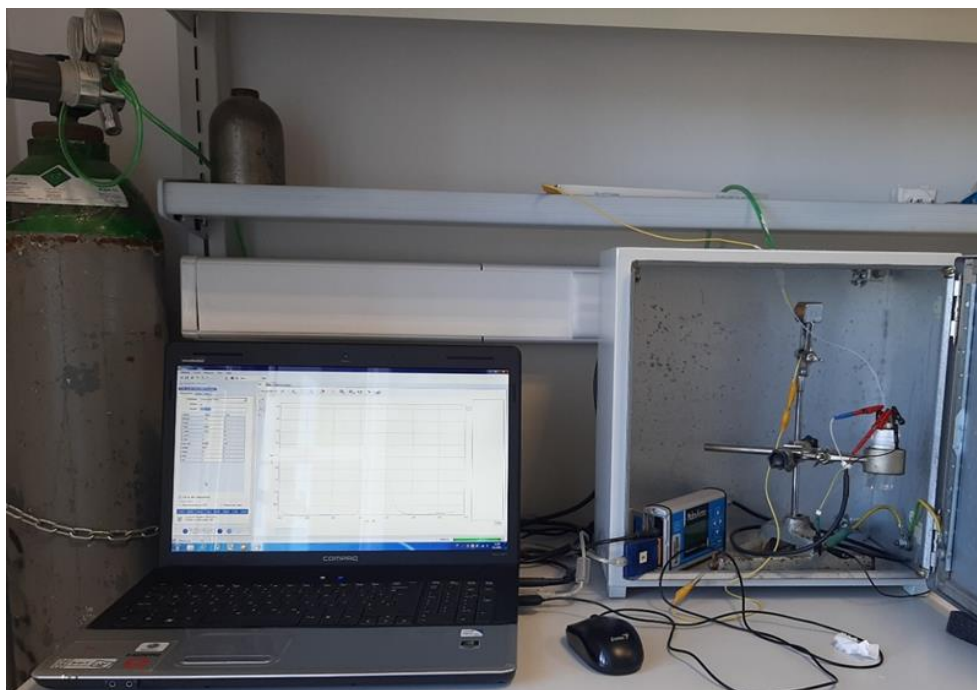


Za pripremu pufera pH = 3, u odmjernu tikvicu od 100 cm<sup>3</sup> dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 22,3 cm<sup>3</sup> otopine HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je volumen dopunjen vodom do 100 cm<sup>3</sup>. Za pripremu pufera pH = 4, dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 0,1 cm<sup>3</sup> otopine HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), uz nadopunu vodom do 100 cm<sup>3</sup>. Za pufer pH = 5, korištena je otopina C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 22,6 cm<sup>3</sup> otopine NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), s dopunom vode do 100 cm<sup>3</sup>. Za pufer pH = 6, u odmjernu tikvicu dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 5,6 cm<sup>3</sup> otopine NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je volumen dopunjen vodom do 100 cm<sup>3</sup>. Za pufer pH = 7, dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 29,1 cm<sup>3</sup> otopine NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) s dopunom vode do 100 cm<sup>3</sup>. Za pufer pH = 8, dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 46,1 cm<sup>3</sup> otopine NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Za pripremu pufera pH = 9, dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O ( $c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 4,6 cm<sup>3</sup> otopine HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je volumen dopunjen vodom do 100 cm<sup>3</sup>. Za pufer pH = 10, dodano je 50 cm<sup>3</sup> otopine Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O ( $c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 18,3 cm<sup>3</sup> otopine NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) uz nadopunu vodom do 100 cm<sup>3</sup>. Nakon pripreme pufera, njihove pH vrijednosti su precizno određene pH metrom.

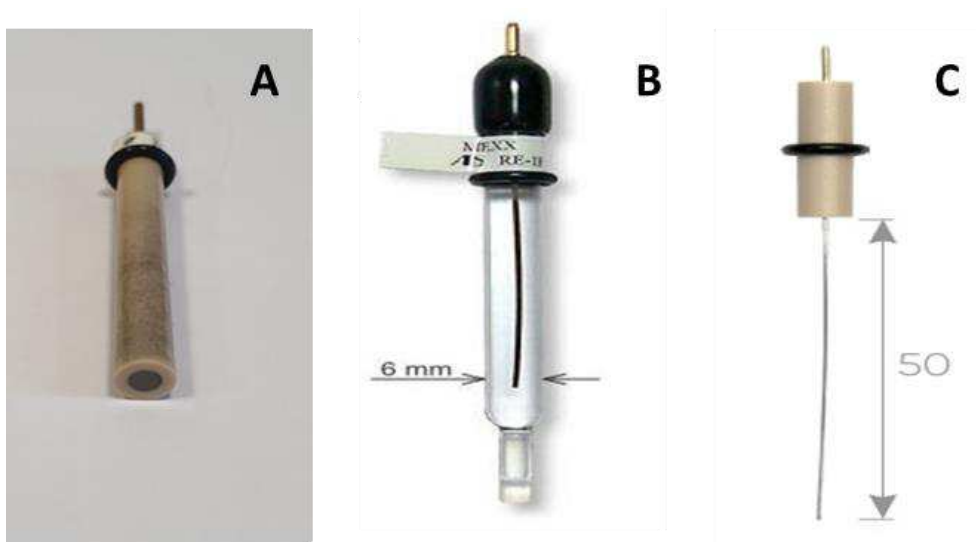
Standardna (engl. *stock*) otopina *p*-kumarinske kiseline korištena za elektrokemijska mjerenja, koncentracije  $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ , pripremljena je otapanjem 0,0164 g *p*-kumarinske kiseline molarne mase 163,0473 g mol<sup>-1</sup> u odmjernoj tikvici od 100 cm<sup>3</sup> s vodom. Da bi se u potpunosti otopio uzorak u vodi, otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 5 – 10 min. Otopina *p*-kumarinske kiseline željene koncentracije ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine *p*-kumarinske kiseline otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti neposredno prije mjerenja.

### 3.2. Elektrokemijska ćelija

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su na sobnoj temperaturi ( $\theta = 25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ ) u troelektrodnoj voltametrijskoj ćeliji. Ćelija je povezana s PalmSens potencijostat/galvanostatom (proizvođač PalmSens BV), smještenim u Faradayevom kavezu i spojenim na računalo (Slika 9.). Podaci su analizirani korištenjem računalnog programa PSTrace. Za provođenje elektrokemijskih mjerenja, korištena je radna elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon*), na kojoj se odvijaju redoks reakcije. Kao referentna elektroda korištena je Ag/AgCl elektroda za mjerenje signala odziva. Kao protuelektroda korištena je platinska elektroda. Elektrode su prikazane na slici 10. Prije svakog mjerenja, površina radne elektroda se polira pomoću suspenzije  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ , a sustav se propuhuje argonom visoke čistoće ( $\varphi_{\text{Ar}} = 99,999 \%$ ). Ukupni volumen ispitivane otopine u ćeliji iznosio je  $15 \text{ cm}^3$ . Blank otopina u voltametrijskoj ćeliji pripravljena je dodatkom  $15 \text{ cm}^3$  pufera određene pH vrijednosti. Jedan od primjera pripreme otopine ispitivanog analita pripremljen je dodavanjem  $0,75 \text{ cm}^3$  stock otopine *p*-kumarinske kiseline i  $14,25 \text{ cm}^3$  pufera odgovarajuće pH vrijednosti.



**Slika 9.** Prikaz aparature za izvođenje elektrokemijskih mjerenja.



**Slika 10.** Na slici su prikazane korištene elektrode: A) elektroda od staklastog ugljika, B) Ag/AgCl elektroda, i C) platinska žica.

### 3.3. Priprava realnog uzorka

Određivana je *p*-kumarinska kiselina u realnim uzorcima soka od jabuke, soka od limuna, soka od šipka i soka od mrkve (Slika 11.). Realni uzorci su profiltrirani prije mjerenja kako bi se dobila bistra otopina. Izvedena su tri mjerenja za svaki realni uzorak: 1. mjerenje u otopini pufera pH = 3, 2. mjerenje u otopini 300  $\mu\text{L}$  uzorka i 14,70  $\text{cm}^3$  pufera pH = 3, te 3. mjerenje u otopini 300  $\mu\text{L}$  uzorka, 14,70 mL pufera i 5  $\mu\text{L}$  standardnog dodatka *p*-kumarinske kiseline ( $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ).



**Slika 11.** Ispitivani realni uzorci: A) sok od šipka, B) sok od limuna, C) sok od mrve i D) sok od jabuke [42,43,44,45].

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Ispitivanje topljivosti *p*-kumarinske kiseline

Topljivost *p*-kumarinske kiseline ispitana je u etanolu, metanolu, dimetil-formamidu (DMF), dimetil-sulfoksidu (DMSO), ultračistoj vodi, i diklormetanu (DCM) (Slika 12.) Ispitivanja su pokazala da se *p*-kumarinska kiselina odlično otapa u svim korištenim otapalima, a slabije u diklormetanu. Za daljnja ispitivanja kao otapalo korištena je ultračista voda.



**Slika 12.** Ispitivanje topljivosti *p*-kumarinske kiseline.

#### 3.4.2. Ciklička voltametrija

Za istraživanje elektrokemijskih karakteristika *p*-kumarinske kiseline i njenog oksidacijskog mehanizma primijenjena je metoda cikličke voltametrije. Istraživan je i utjecaj brzine promjene potencijala na oksidacijske i redukcijske strujne vrhove *p*-kumarinske kiseline. U odnosu na Ag/AgCl elektrodu snimljeni su ciklički voltamogrami u otopinama *p*-kumarinske kiseline, pri potencijalima od -1,0 V do 1,0 V. Brzina polarizacije elektrode kretala se u rasponu od 50 mV/s do 300 mV/s. Također, cikličkom voltametrijom je praćen utjecaj pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha.

### 3.4.3. Diferencijalna pulsna voltimetrija

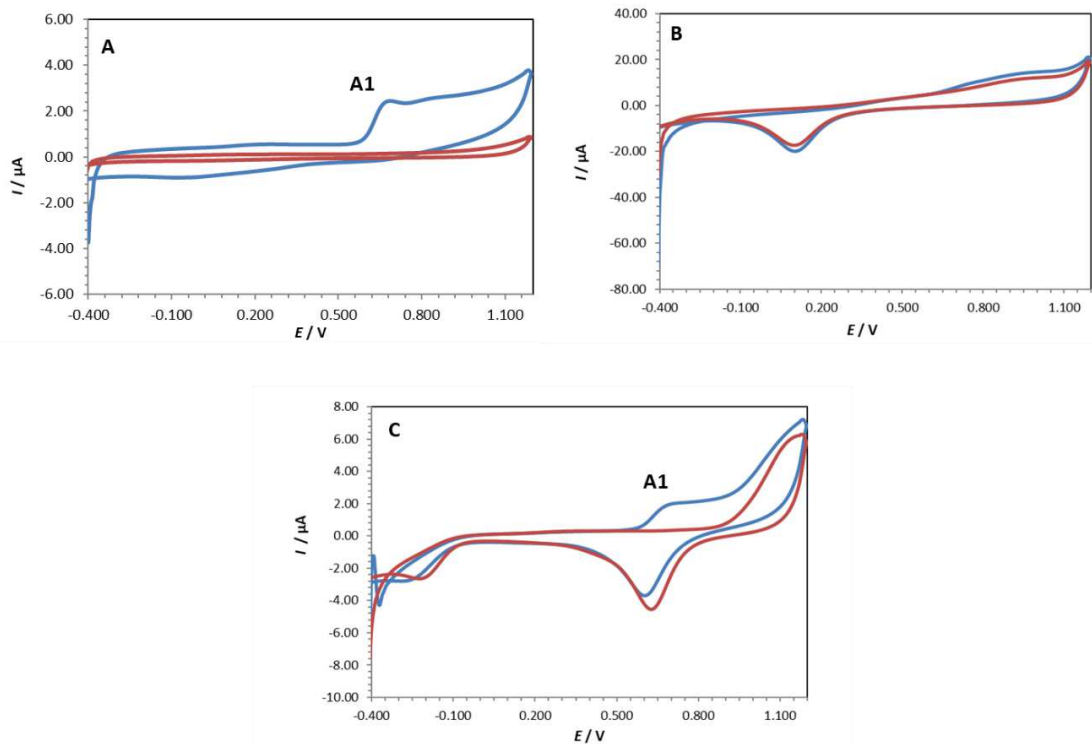
Za istraživanje oksidacijskih svojstava i adsorpcije *p*-kumarinske kiseline na površini elektrode od staklastog ugljika korištena je diferencijalna pulsna voltimetrija (DPV). Osim toga, *p*-kumarinska kiselina je određivana u realnim uzorcima primjenom iste metode, a praćen je i utjecaj pH na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline. Ispitano je da struja i potencijal oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline ovise o pH. Diferencijalni pulsni voltamogrami su snimljeni u području potencijala od -1,0 V do 1,0 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu uz brzinu polarizacije elektrode od 5 mV/s, visini pulsa 25 mV, širini pulsa 70 ms, i *scan increment* 5 mV.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ciklička voltimetrija

#### 4.1.1. Izbor radne elektrode

Na slici 13. prikazani su ciklički voltamogrami otopine pufera pH = 5 i *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika (A), platinskoj (B) i zlatnoj elektrodi (C), pri brzini polarizacije elektrode,  $\nu = 100 \text{ mV/s}$ . Iz cikličkih voltamograma se može uočiti da je na elektrodi od staklastog ugljika vidljiv jedan oksidacijski strujni vrh (A1) *p*-kumarinske kiseline pri potencijalu,  $E_{p,a} = 0,685 \text{ V}$ , koji se odnosi na oksidaciju hidroksilne skupine na aromatskom prstenu. Ciklički voltamogram *p*-kumarinske kiseline snimljen na platinskoj elektrodi nije pokazao oksidacijski strujni vrh *p*-kumarinske kiseline, dok je na cikličkom voltamogramu snimljenom na zlatnoj elektrodi uočen jedan oksidacijski strujni vrh (A1) *p*-kumarinske kiseline pri potencijalu  $E_{p,a} = 0,695 \text{ V}$ , koji je manje izražen u odnosu na oksidacijski strujni vrh dobiven na elektrodi od staklastog ugljika. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je elektroda od staklastog ugljika najpogodnija za ispitivanje elektrokemijskih svojstava *p*-kumarinske kiseline te je ona korištena za daljnja mjerenja.

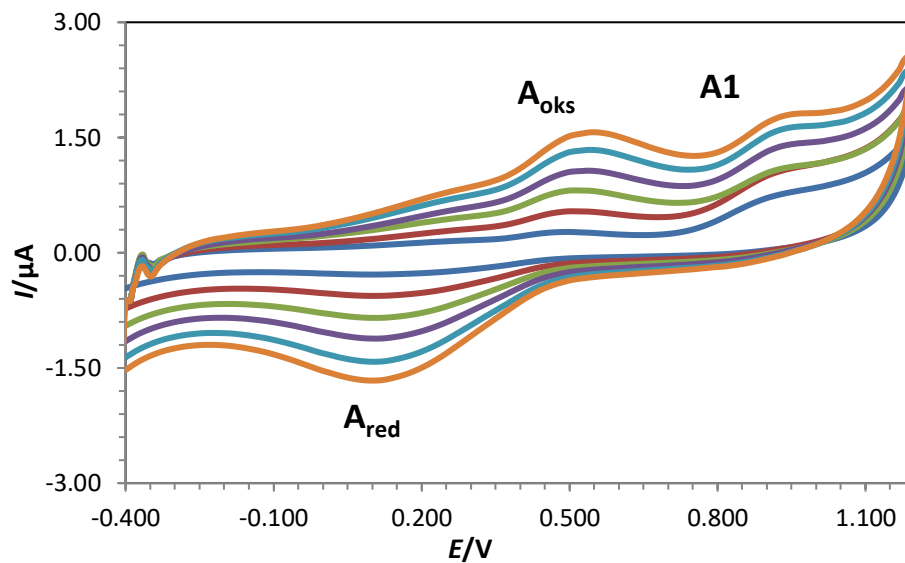


**Slika 13.** Ciklički voltamogrami otopine pufera pH = 5 (—) i standardne otopine (—) *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu pH=5 snimljeni pri brzini polarizacije elektrode,  $\nu = 100 \text{ mV/s}$  na: A) elektrodi od staklastog ugljika, B) platinskoj elektrodi i C) zlatnoj elektrodi.

#### 4.1.2. Utjecaj brzine polarizacije

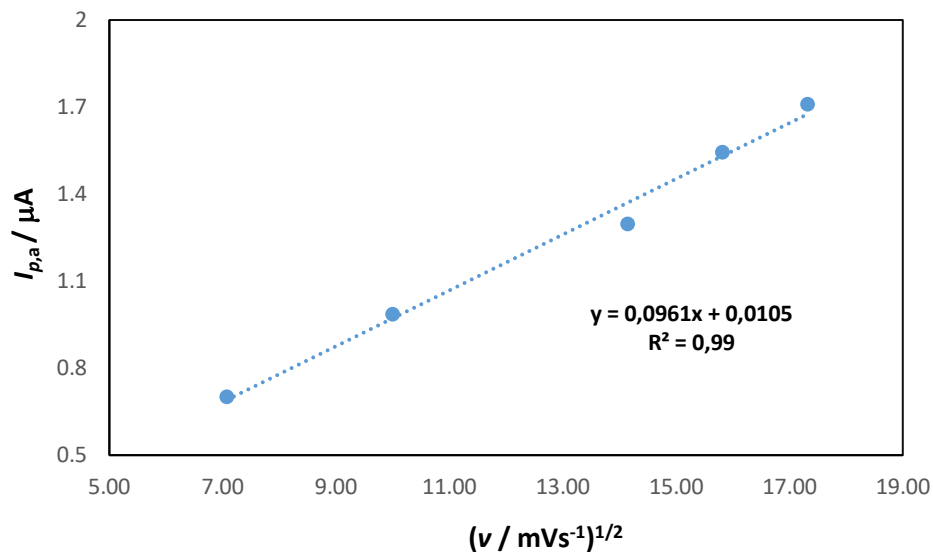
Na slici 14. prikazani su ciklički voltamogrami *p*-kumarinske kiseline u puferu pH = 3 koji su snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode od staklastog ugljika ( $\nu = 50, 100, 150, 200, 250$  i  $300 \text{ mV/s}$ ). Ustanovljeno je da s uzastopnim snimanjem voltamograma dolazi do vezanja oksidacijskog produkta *p*-kumarinske kiseline na površinu radne elektrode pri čemu nastaje polimerni film koji ometa oksidaciju *p*-kumarinske kiseline [19]. Stoga s povećanjem brzine polarizacije dolazi do nastajanja novog strujnog vrha ( $A_{\text{oks}}$ ) pri potencijalu,  $E = 0,545 \text{ V}$ , koji se odnosi na reverzibilnu oksidaciju oksidacijskog produkta *p*-kumarinske kiseline, dok se ireverzibilni oksidacijski strujni vrh (A1) *p*-kumarinske kiseline sporije povećava s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Struja oksidacijskog strujnog vrha ( $A_{\text{oks}}$ ) i A1, kao i redukcijskog strujnog vrha ( $A_{\text{red}}$ ), povećava se s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Istovremeno, potencijal oksidacijskog strujnog vrha pomiče se prema

višim vrijednostima, dok se potencijal redukcijskog strujnog vrha pomiče prema nižim vrijednostima.



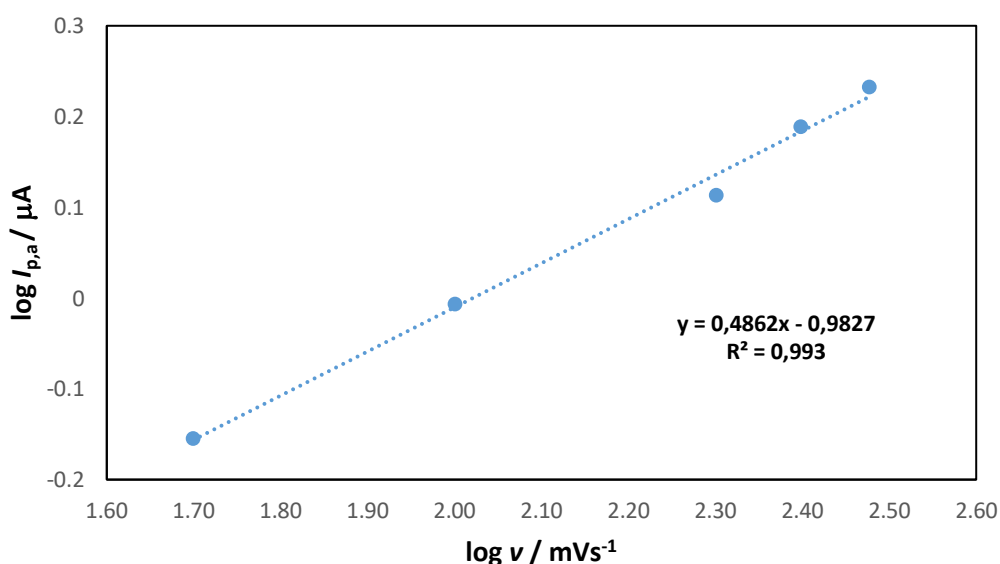
**Slika 14.** Ciklički voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) koji prikazuju ovisnost jakosti struje o brzini polarizacije radne elektrode ( $v = 50 \text{ mV/s}$  (—),  $100 \text{ mV/s}$  (—),  $150 \text{ mV/s}$  (—),  $200 \text{ mV/s}$  (—),  $250 \text{ mV/s}$  (—), te  $300 \text{ mV/s}$  (—)).

Slika 15. prikazuje ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline ( $I_{\text{p,a}}$ ) o drugom korijenu brzine polarizacije ( $v^{1/2}$ ). Iz slike je vidljivo da se radi o linearnoj ovisnosti, što pokazuje da je oksidacijski proces pod difuzijskom kontrolom.



**Slika 15.** Struja anodnog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline ( $I_{p,a}$ ), kao funkcija drugog korijena brzine promjene potencijala ( $v^{1/2}$ ).

Slika 16. prikazuje grafičku ovisnost logaritma oksidacijske struje vrha ( $\log I_{p,a}$ ) o logaritmu brzine polarizacije elektrode ( $\log v$ ), što ukazuje na linearnu ovisnost za anodni strujni vrh. Nagib pravca  $\log I_{p,a}$  vs.  $\log v$  je oko 0,5 iz čega se također može zaključiti da je proces oksidacije *p*-kumarinske kiseline difuzijski kontroliran.

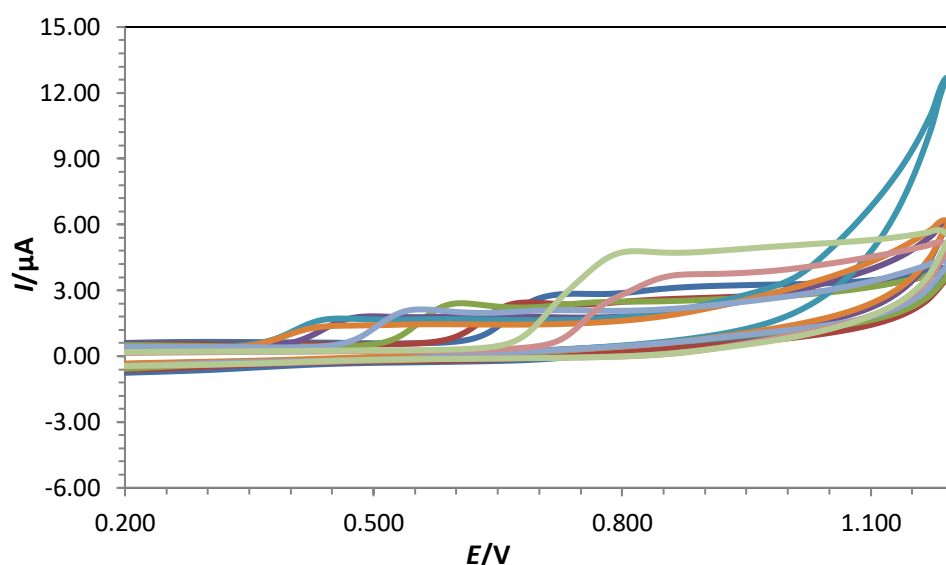


**Slika 16.** Ovisnosti logaritma struje oksidacijskog strujnog vrha ( $\log I_{p,a}$ ) o logaritmu brzine polarizacije elektrode ( $\log v$ ).



### 4.1.3. Utjecaj pH

Ciklički voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), snimljeni su na elektrodi od staklastog ugljika u puferima pH = 2-10. Slika 17. prikazuje cikličke voltamograme *p*-kumarinske kiseline snimljene pri pH vrijednostima od pH = 2 do pH = 10, gdje je vidljivo pomicanje potencijala oksidacijskog strujnog vrha prema negativnijim vrijednostima s porastom pH. Struja oksidacijskog strujnog vrha je najviša pri pH = 3 te opada u kiselijem i bazičnijem mediju.



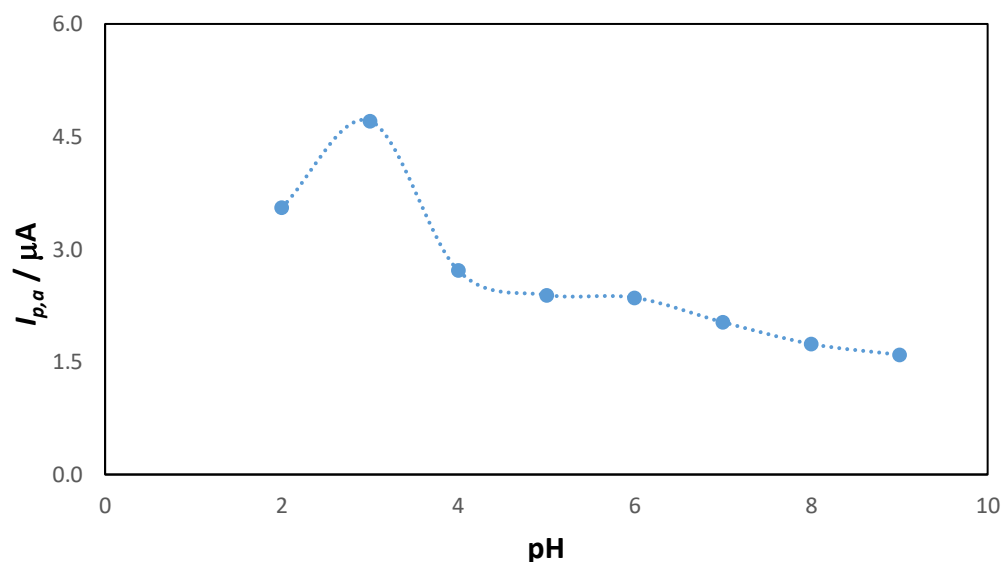
**Slika 17.** Ciklički voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH=2 (—), 3 (—), 4(—), 5 (—), 6 (—), 7 (—), 8 (—), 9 (—), 10, (—)).

U tablici 2. prikazane su vrijednosti struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) i potencijala oksidacijskog strujnog vrha ( $E_{p,a}$ ) o pH vrijednosti ispitivanih otopina *p*-kumarinske kiseline u pH području od pH = 2 do pH = 10. Iz tablice se može zaključiti da je anodni strujni vrh najviši pri pH = 3, a zatim daljnjim povećavanjem pH vrijednosti opada visina anodnog strujnog vrha.

**Tablica 2.** Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) i potencijala oksidacijskog strujnog vrha ( $E_{p,a}$ ) kao funkcija pH vrijednosti ispitivanih otopina *p*-kumarinske kiseline u pH području od pH = 2 do pH = 10.

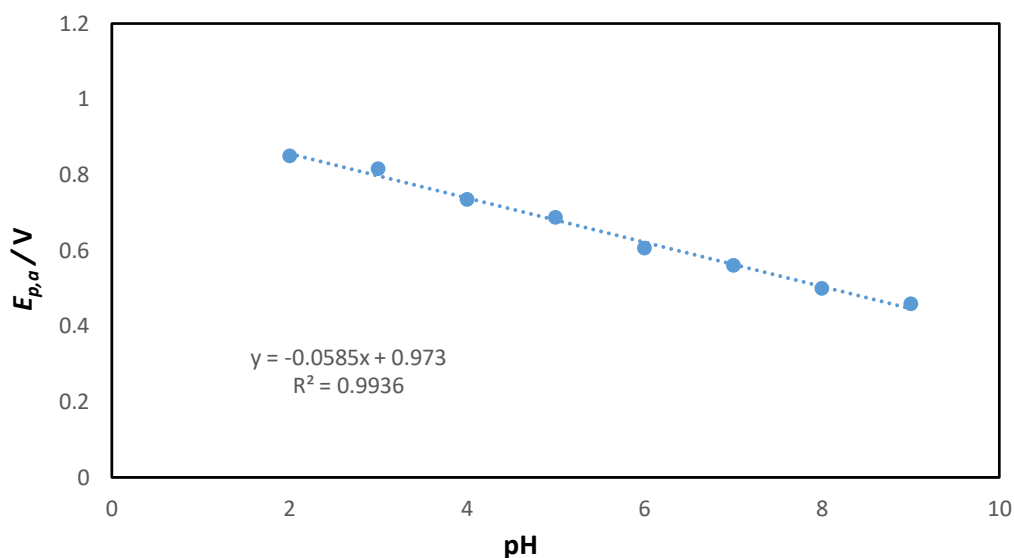
pH	$E_{p,a} / V$	$I_{p,a} / \mu A$
2	0,8488	3,551
3	0,8152	4,710
4	0,7345	2,717
5	0,6874	2,391
6	0,6051	2,355
7	0,5597	2,029
8	0,4992	1,739
9	0,4589	1,594
10	0,4706	1,304

Na Slici 18. prikazana je ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivane *p*-kumarinske kiseline. Najviši strujni vrh *p*-kumarinske kiseline je detektiran pri pH=3, dok se u kiselom i lužnatom mediju visina oksidacijskog strujnog vrha smanjivala.



**Slika 18.** Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacijskog strujnog vrha,  $I_{p,a}$  o pH vrijednosti otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ )

Slika 19. prikazuje ovisnost potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopina *p*-kumarinske kiseline. Vidljivo je da potencijal anodnog strujnog vrha linearno opada s porastom pH vrijednosti, što ukazuje na izmjenu jednakog broja elektrona i protona tijekom oksidacijskog procesa.

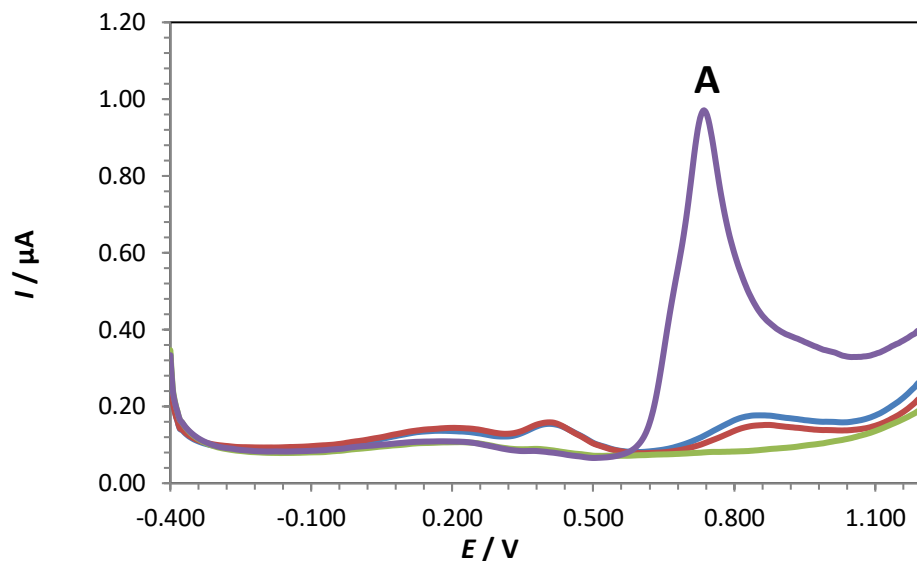


**Slika 19.** Prikaz ovisnosti potencijala anodnog strujnog vrha ( $E_{p,a}$ ) o pH vrijednosti otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

## 4.2. Diferencijalna pulsna voltometrija

### 4.2.1. Ispitivanje adsorpcije

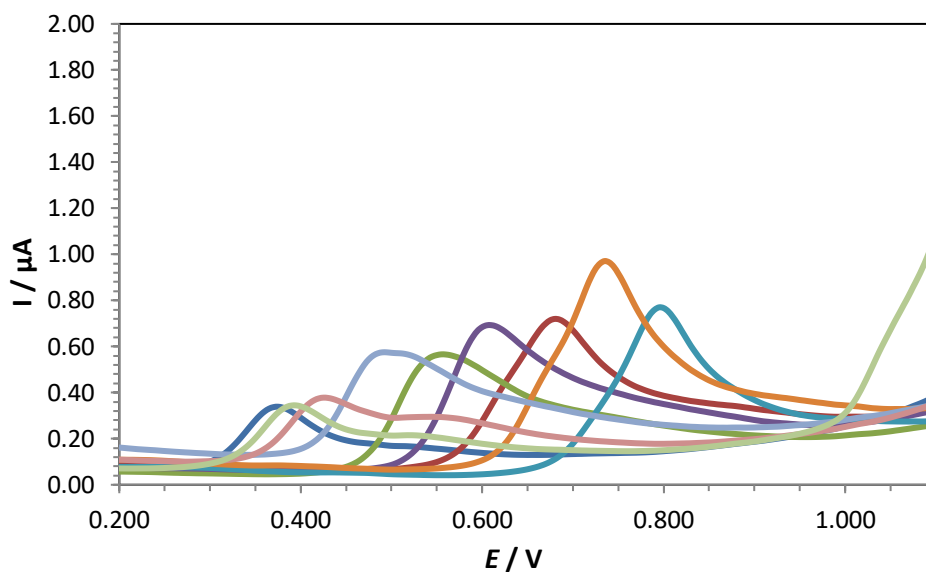
Diferencijalni pulsni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni u puferu pH = 3 koristeći elektrodu od staklastog ugljika, prikazani su na slici 20. Na slici je vidljiv oksidacijski strujni vrh (A1), pri potencijalu,  $E_{p,a,1} = 0,740 \text{ V}$ , koji odgovara oksidaciji hidroksilne skupine na aromatskom prstenu *p*-kumarinske kiseline. Utvrđeno je da uzastopnim snimanjem diferencijalnih pulsni voltamograma opada visina oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline što ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta *p*-kumarinske kiseline na površinu elektrode od staklastog ugljika. Iz prikazanih voltamograma se može zaključiti da je adsorpcija *p*-kumarinske kiseline jako izražena jer je uočen drastičan pad visine oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline.



**Slika 20.** Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine pufera pH=3 (—) i uzastopno snimljeni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu pH=3 na elektrodi od staklastog ugljika (1. scan (—), 2. scan (—), 3. scan (—)).

#### 4.2.2. Ispitivanje utjecaja pH

Diferencijalni pulsni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni su na elektrodi od staklastog ugljika u puferima u pH području od pH = 2 do pH = 10. Na slici 21. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline snimljeni pri različitim pH vrijednostima pri čemu je vidljivo da se potencijali oksidacijskog strujnog vrha pomiču prema negativnijim potencijalima s povećanjem pH vrijednosti. Struja oksidacijskog strujnog vrha je najviša pri pH = 3 te opada u kiselijem i bazičnijem mediju.



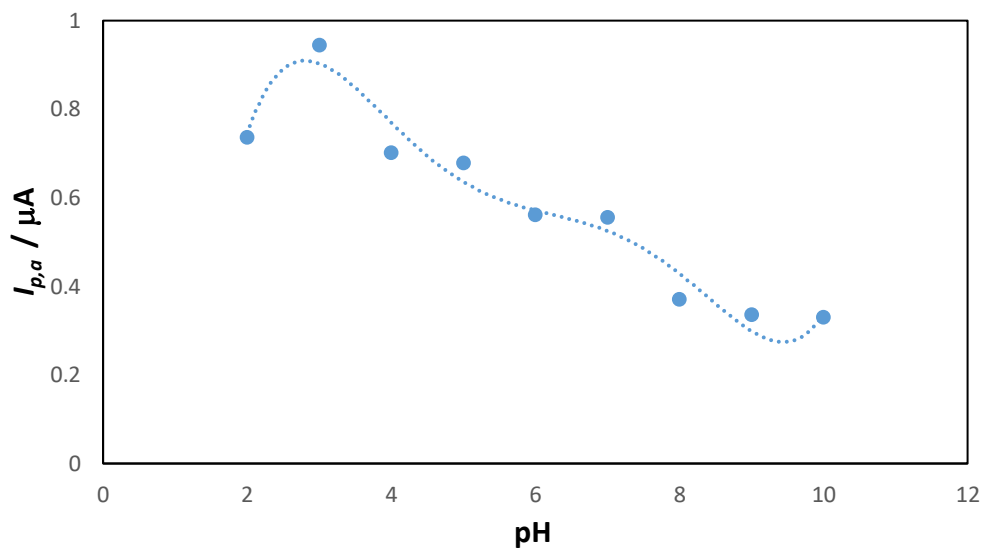
**Slika 21.** Diferencijalni pulsni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija promjene pH vrijednosti (pH=2 (—), 3 (—), 4 (—), 5 (—), 6 (—), 7 (—), 8 (—), 9 (—), 10, (—)).

Dobivene vrijednosti struje ( $I_{p,a}$ ) i potencijala ( $E_{p,a}$ ) oksidacijskog strujnog vrha prikazane su u tablici 3. Tablica pokazuje da je anodni strujni vrh najviši pri pH = 3. S daljnjim povećanjem pH vrijednosti, vrijednost anodnog strujnog vrha opada, što pokazuje da je proces oksidacije *p*-kumarinske kiseline najizraženiji pri pH = 3.

**Tablica 3.** Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) i potencijala oksidacijskog strujnog vrha ( $E_{p,a}$ ) kao funkcije pH vrijednosti ispitivanih otopina *p*-kumarinske kiseline u pH području od pH = 2 do pH = 10.

pH	$E_{p,a} / V$	$I_{p,a} / \mu A$
2	0,7966	0,7362
3	0,7361	0,9449
4	0,6824	0,7014
5	0,605	0,6783
6	0,5529	0,5623
7	0,4924	0,5565
8	0,4235	0,371
9	0,3882	0,3362
10	0,3731	0,3304

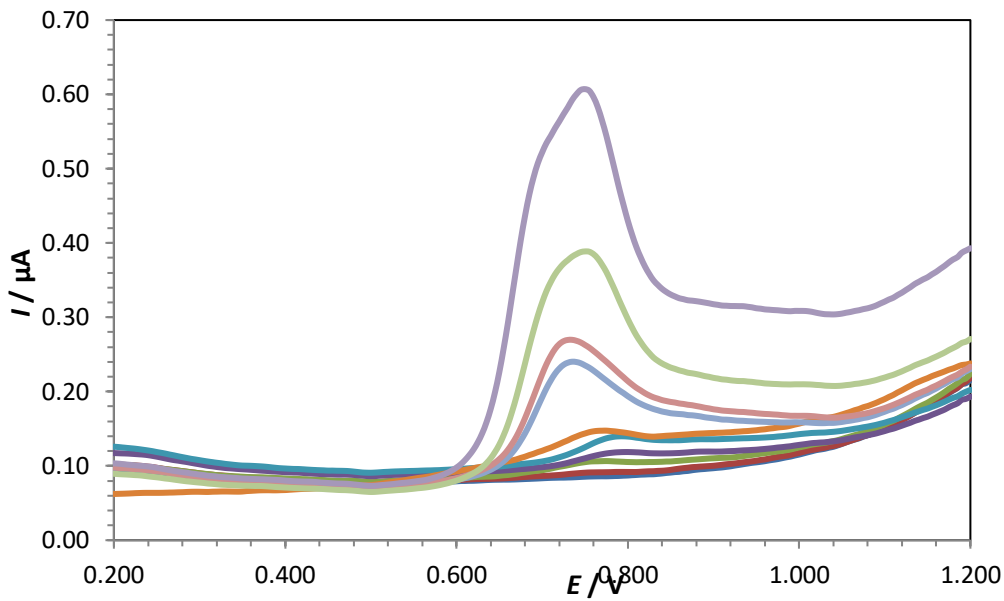
Na slici 22. prikazana je ovisnost struje anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivanih otopina *p*-kumarinske kiseline. Iz slike je vidljivo da je struja oksidacijskog strujnog vrha najviša pri pH = 3 te opada u kiselijem i bazičnijem mediju.



**Slika 22.** Prikaz ovisnosti struje anodnog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) o pH vrijednosti otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

#### 4.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije

Diferencijalnom pulsnom voltametrijom ispitan je utjecaj koncentracije na visinu oksidacijskog strujnog vrha *p*-kumarinske kiseline u puferu  $\text{pH} = 3$ . Na slici 23. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u otopinama *p*-kumarinske kiseline različitih koncentracija na elektrodi od staklastog ugljika. Na diferencijalnim pulsnim voltamogramima uočena je najniža koncentracija *p*-kumarinske kiseline koja se može detektirati, a iznosi  $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (granica detekcije *p*-kumarinske kiseline).



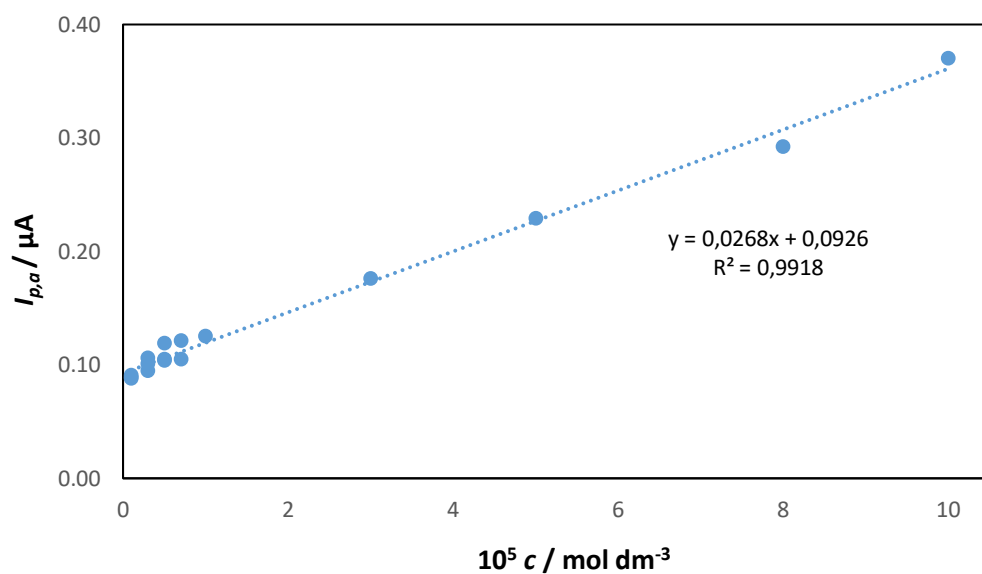
**Slika 23.** Diferencijalni pulsni voltamogrami *p*-kumarinske kiseline snimljeni u otopinama različitih koncentracija ( $c = 1 \times 10^{-6}$  (—),  $3 \times 10^{-6}$  (—),  $5 \times 10^{-6}$  (—),  $7 \times 10^{-6}$  (—),  $1 \times 10^{-5}$  (—),  $3 \times 10^{-5}$  (—),  $5 \times 10^{-5}$  (—),  $8 \times 10^{-5}$  (—),  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> (—)) na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3,  $v = 5$  mV/s.

U tablici 4. prikazane su struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) *p*-kumarinske kiseline kao funkcije koncentracije. Povećanjem koncentracije raste i struja oksidacijskog strujnog vrha. Uočava se linearni trend tj. linearna ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha o koncentraciji *p*-kumarinske kiseline, u rasponu koncentracija od  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> do  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> (Slika 24.).



**Tablica 4.** Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) kao funkcije koncentracije *p*-kumarinske kiseline

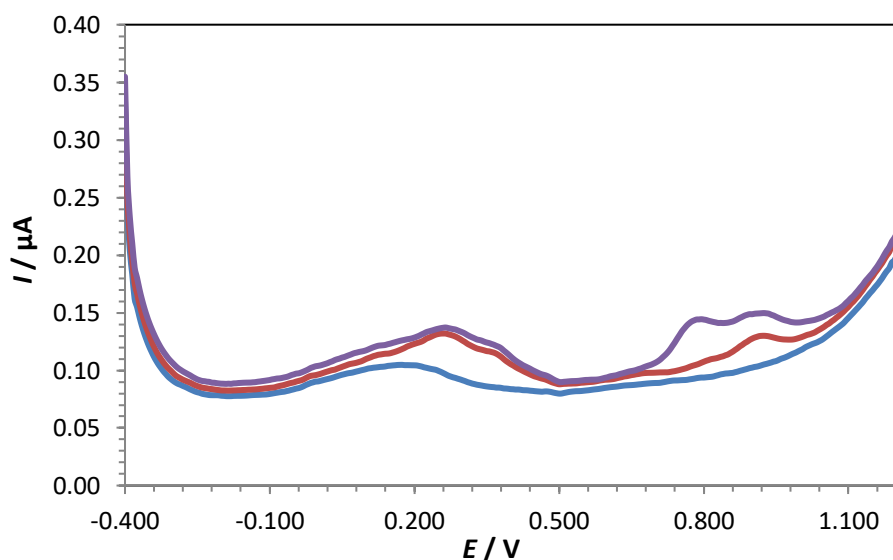
$10^5 c / \text{mol dm}^{-3}$	$I_{p,a} / \mu\text{A}$
0,1	0,091
0,3	0,106
0,5	0,119
0,7	0,139
1,0	0,147
3,0	0,240
5,0	0,270
8,0	0,388
10,0	0,606



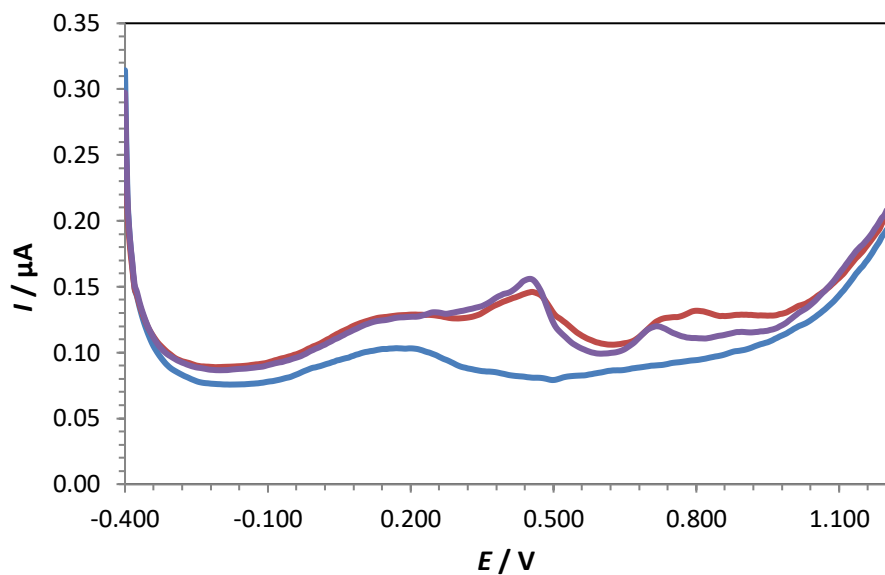
**Slika 24.** Prikaz linearne ovisnosti struje anodnog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) o koncentraciji (*c*) *p*-kumarinske kiseline

### 4.3. Analiza realnog uzorka

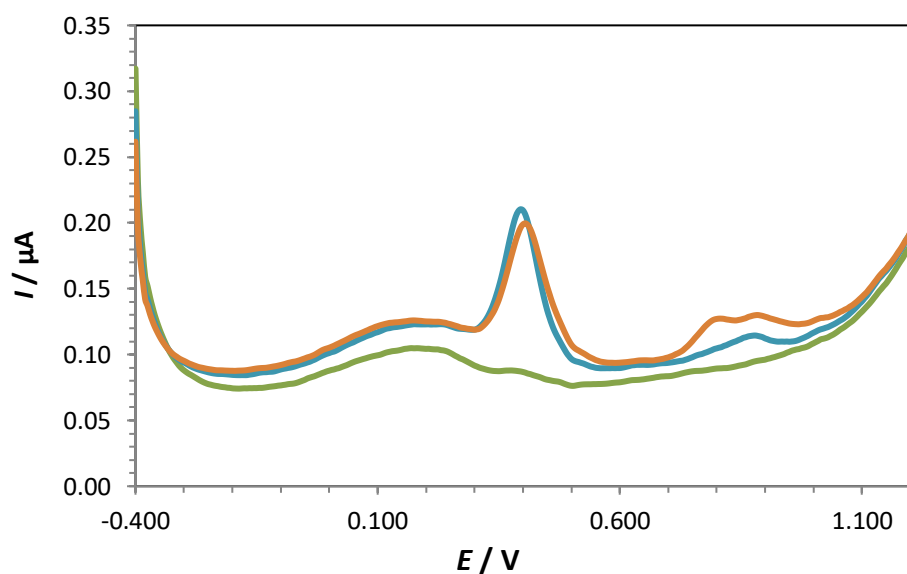
Za detekciju *p*-kumarinske kiseline u realnim uzorcima soka od jabuke, limuna, mrkve i šipka korištena je diferencijalna pulsna voltometrija. Na slici 25., slici 26., slici 27., i slici 28. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami četiri ispitivana realna uzorka snimljenih na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3. Za pripravu uzorka koristila se prethodno opisana metoda u odlomku “Priprava realnog uzorka“. Na diferencijalnim pulsni voltamogramima ispitivanih uzoraka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh koji odgovara oksidaciji *p*-kumarinske kiseline. U uzorku soka od jabuke (Slika 25.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu  $E_{p,a} = 0,925$  V, u uzorku soka od limuna (Slika 26.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu  $E_{p,a} = 0,710$  V, u uzorku soka od mrkve (Slika 27.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu  $E_{p,a} = 0,885$  V te u uzorku soka od šipka (Slika 28.) oksidacijski strujni vrh uočen je pri potencijalu  $E_{p,a} = 0,820$  V. Oksidacija *p*-kumarinske kiseline u ispitivanim uzorcima potvrđena je dodatkom 5  $\mu$ L standardne otopine *p*-kumarinske kiseline, koncentracije  $5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> u realni uzorak nakon čega je uočen oksidacijski strujni vrh *p*-kumarinske kiseline pri istom potencijalu koji je detektiran i u realnom uzorku.



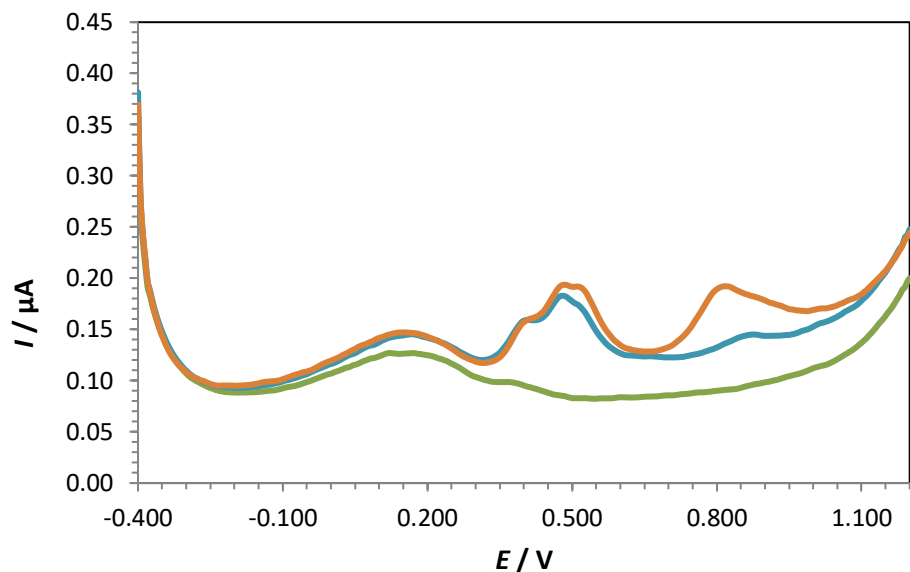
**Slika 25.** Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine pufera pH = 3 (—), 300  $\mu$ L uzorka 1 (sok od jabuke) u puferu pH = 3 (—) i uzorak 1 u puferu pH = 3 s dodatkom 5  $\mu$ L otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3,  $v = 5$  mV/s.



**Slika 26.** Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine pufera pH = 3 (—), 300  $\mu\text{L}$  uzorka 2 (sok od limuna) u puferu pH = 3 (—) i uzorak 2 u puferu pH = 3 s dodatkom 5  $\mu\text{L}$  otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3,  $v = 5 \text{ mV/s}$ .



**Slika 27.** Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine pufera pH = 3 (—), 300  $\mu\text{L}$  uzorka 3 (soka od mrkve) u puferu pH = 3 (—) i uzorak 3 u puferu pH = 3 s dodatkom 5  $\mu\text{L}$  otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3,  $v = 5 \text{ mV/s}$ .

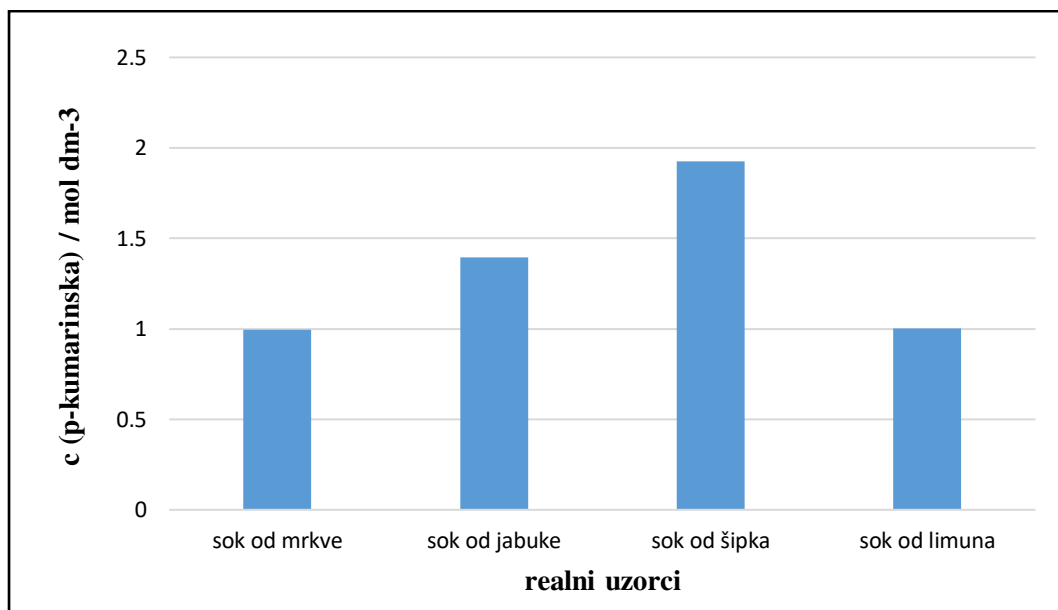


**Slika 28.** Diferencijalni pulsni voltamogrami otopine pufera pH = 3 (—), 300  $\mu\text{L}$  uzorka 4 (soka od šipka) (—) i uzorak 4 u puferu pH = 3 s dodatkom 5  $\mu\text{L}$  otopine *p*-kumarinske kiseline ( $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 3,  $\nu = 5 \text{ mV/s}$ .

Na tablici 5. i slici 29. prikazane su koncentracije *p*-kumarinske kiseline u ispitivanim uzorcima određene diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Iz slike i tablice je vidljivo da je najveća koncentracija *p*-kumarinske kiseline ( $c = 1,93 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) detektirana u uzorku 3 (sok od šipka). U uzorku 2 (sok od jabuke) koncentracija *p*-kumarinske kiseline iznosi  $1,39 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a najniža koncentracija *p*-kumarinske kiseline detektirana je u uzorcima 1 (sok od mrkve) i 4 (sok od limuna).

**Tablica 5.** Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ( $I_{p,a}$ ) i koncentracije ( $c$ ) *p*-kumarinske kiseline određene u realnim uzorcima.

uzorci	$I_{p,a} / \mu\text{A}$	$10^5 c / \text{mol dm}^{-3}$
sok od mrkve	0,119	0,99
sok od jabuke	0,129	1,39
šipak	0,144	1,93
limun	0,119	1,00



*Slika 29.* Grafički prikaz koncentracije *p*-kumarinske kiseline u realnim uzorcima.

## 5. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE

### 5.1. Priprema za nastavni sat

Datum: \_\_.\_\_.\_\_\_\_. g.

Razred: SŠ, 3. razred

Ime i prezime nastavnice: Maja Vukić

Nastavna cjelina/tema: Oksidacijsko-redukcijski procesi

Nastavna jedinica: Elektroдни potencijal i galvanski članci

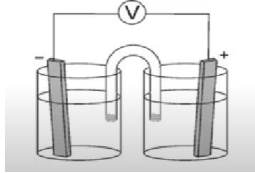
Cilj: Definirati pojmove elektrođni potencijal i galvanski članak. Povezati redoks reakcije koje se odvijaju na anodama i katodama s promjenama elektrođnog potencijala.

Potrebna predznanja i vještine: oksido-redukcijske reakcije, reaktivnost metala, oksidacijski broj

### Razrada postignuća (ishoda) i zadaci/aktivnosti za provjeru njihove usvojenosti

ISHODI IZ KURIKULUMA	ISHODI UČENJA I POUČAVANJA	RAZINA ISHODA (prema Crooksu, 1988)	PLANIRANI ZADACI / AKTIVNOSTI ZA PROVJERU USVOJENOSTI ISHODA UČENJA I POUČAVANJA
KEM SŠ C.3.1. Analizira promjene u elektrokemijskim člancima	+ Opisati proces oksidacije na cinkovoj elektrođi i redukcije na bakrenoj elektrođi tijekom pokusa s limunom.	R2	Što se događa na pojedinoj elektrođi tijekom pokusa s limunom?

	<p>+ Analizirati promjene na elektrodama u elektrokemijskim člancima.</p>	R3	<p>Što se događa na anodama i katodama tijekom elektrokemijskih reakcija.</p> <p><i>Shematski je prikazan galvanski članak koji se sastoji od kobaltove i aluminijske elektrode</i> <math>\text{Al}_{(s)} \mid \text{Al}^{3+}_{(aq)} \parallel \text{Co}^{2+}_{(aq)} \mid \text{Co}_{(s)}</math> ?</p> <p>a) Što označava jedna okomita crta, a što dvije okomite crte?  b) Odredi koja od elektroda je anoda, a koja katoda.  c) Koncentracija kojih iona se u otopini povećava?  d) Masa koje elektrode tijekom redoks-reakcije se povećava?</p>
	<p>+ Identificirati reakcije na elektrodama zadanog elektrokemijskog članka primjenom elektrokemijskog (Voltina) niza.</p>	R2	<p><i>Riješite zadatke na temelju sljedećega Voltina niza elemenata:</i></p> <p>Li, Na, Ca, Mg, Al, Mn, Zn, Fe, Cd, Co, Ni, Sn, Pb, H<sub>2</sub>, Cu, Ag, Hg, Pt, Au</p> <p>a) Koja tri metala mogu reducirati niklove (II) ione iz otopine niklova (II) nitrata?  <b>A</b> Ca, Mg, Sn <b>B</b> Al, Zn, Co  <b>C</b> Al, Cu, Pb <b>D</b> Cu, Ag, Pt  b) Koji metal reagira s otopinom kobaltova (II) klorida?  <b>A</b> Au <b>B</b> Ag <b>C</b> Mg <b>D</b> Pb</p>
	<p>+ Definirati elektrodni potencijal i galvanski članak.</p>	R1	<p>Što je elektrodni potencijal?</p> <p>Što je galvanski članak?</p>
	<p>+ Objasniti kako se stvara elektrodni potencijal i kako on utječe na kemijske reakcije u galvanskom članku.</p>	R2	<p>Demonstrirati pokus s Daniellovim člankom i objasniti stvaranje električnog potencijala.</p>

<p>A.3.2. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku za opisivanje sastava tvari.</p>	<p>+ Napisati jednadžbe reakcija na elektrodama i/ili jednadžbu ukupne reakcije u elektrokemijskome članku.</p>	<p>R2</p>	<p>Na slici je prikazan galvanski članak sastavljen od aluminijske pločice uronjene u vodenu otopinu aluminijskog sulfata i željezne pločice uronjene u vodenu otopinu željeznog (II) sulfata. Masa se aluminijske elektrode tijekom reakcije smanjuje.</p>  <p>a) Na slici označite aluminijsku elektrodu, vodenu otopinu aluminijskog sulfata, željeznu elektrodu, vodenu otopinu željeznog (II) sulfata, smjer elektrona i elektrolitni most.</p> <p>b) Prikažite jednadžbama polureakcije redukcije i oksidacije u galvanskome članku.</p> <p>c) Napišite ukupnu jednadžbu kemijske reakcije koja se odvija u galvanskome članku.</p>
<p>D.3.1. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama.</p>	<p>+ Analizirati procese oksidacije i redukcije na elektrodama tijekom pokusa s limunom.</p>	<p>R3</p>	<p>Napiši opažanje pokusa s limunom.</p>
	<p>+ Objasniti promjene na elektrodama tijekom pokusa s Daniellovim člankom.</p>	<p>R2</p>	<p>Kolika je vrijednost napona članka i skiciraj Daniellov članak u bilježnicu.</p>



D.3.2. Primjenjuje matematička znanja i vještine.	+ Izračunati razliku standardnih elektrodnih potencijala koristeći zadane standardne redukcijske elektrodne potencijale polučlanaka.	R2	Izračunajte potencijal galvanskog članka cink-bakar, $E^\circ(\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}) = -0,76 \text{ V}$ , $E^\circ(\text{Cu}/\text{Cu}^{2+}) = 0,34 \text{ V}$ .  <i>Izračunajte razliku standardnih elektrodnih potencijala u galvanskome članku. Vrijednosti standardnih redukcijskih potencijala polučlanaka su: <math>E^\circ(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}) = -0,41 \text{ V}</math> i <math>E^\circ(\text{Al}^{3+}/\text{Al}) = -1,66 \text{ V}</math>.</i>
D.3.3. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima	+ demonstrirati elektrokemijski članak crtežom i/ili shematski	R2	Demonstriranje pokusa.

**Tijek nastavnog sata:**

<b>ETAPE NASTAVNOG SATA</b>	<b>Aktivnosti učitelja/nastavnika</b>	<b>Aktivnosti učenika</b>	<b>Sociološki oblici rada</b>
<b><i>Uvodni dio (10 min)</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nastavnik započinje sat s pokusom s limunom</li> <li>- ponavlja s učenicima gradivo od prošlog sata</li> <li>- zapisuje naslov na ploču</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- odgovaraju na postavljena pitanja tijekom pokusa</li> <li>- aktivno sudjeluju prilikom ponavljanja gradiva</li> <li>- zapisuju naslov nastavne jedinice u bilježnicu</li> </ul>	<p><b><i>Frontalni rad</i></b></p> <p><b><i>Individualni rad</i></b></p>
<b><i>Središnji dio (30 min)</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nastavnik kroz prezentaciju pojašnjava gradivo. Tijekom prezentacije postavlja pitanja učenicima i navodi ih na razmišljanje</li> <li>- proziva jednog učenika da demonstrira pokus „Daniellov članak“, te objašnjava shematski prikaz Daniellova članka i prikazuje ga na ploči</li> <li>- zadaje zadatke s računanjem napona članka i pripomaže učenicima u rješavanju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- učenici pažljivo slušaju predavanje i zapisuju u bilježnicu što im nastavnik kaže.</li> <li>- odgovaraju na postavljena pitanja, te pokušavaju sami doći do zaključka.</li> <li>- rješavaju zadatke u bilježnicu</li> </ul>	<p><b><i>Frontalni rad</i></b></p> <p><b><i>Individualni rad</i></b></p>
<b><i>Završni dio(5 min)</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zadaje učenicima zadatke za ponavljanje za rad u paru</li> <li>- zadaje domaću zadaću ukoliko se zadaci ne dovrše na satu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rješavaju zadatke</li> <li>- surađuju u paru</li> </ul>	<p><b><i>Frontalni rad</i></b></p> <p><b><i>Rad u paru</i></b></p>

**Materijalna priprema:** udžbenik, PowerPoint prezentacija, aparatura i kemikalije za provedbu demonstracijskog pokusa, radni listić, kreda i ploča

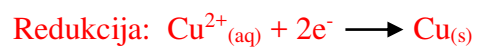
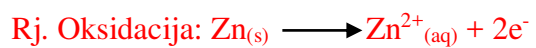
**Plan učeničkog zapisa:**

### ELEKTRODNI POTENCIJAL I GALVANSKI ČLANCI

- mjera za težnju metala da se oksidira naziva se **elektrodni potencijal**
- **galvanski članak** proizvodi električnu struju koja nastaje kao rezultat neke spontane reakcije koja se u njemu odvija
- u galvanskome se članku kemijska energija neke redoks-reakcije pretvara u električnu.
- galvanski je članak sačinjen od dva polučlanka
- polučlanak čini metal uronjen u otopinu vlastitih iona.
- otopine u čašama povezane su elektrolitskim mostom, a elektrode su međusobno spojene metalnim vodičima preko voltmetra
- **anoda(negativan pol)** je elektroda na kojoj se uvijek događa reakcija oksidacije
- **katoda(pozitivan pol)** je elektroda na kojoj se uvijek događa reakcija redukcije
- primjer: Daniellov članak:  $\text{Zn(s)} \mid \text{Zn}^{2+}(\text{aq}) \parallel \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) \mid \text{Cu(s)}$
- određivanje potencijala neke elektrode - ispitivana elektroda spoji kao katoda, a **standardna vodikova elektroda** kao anoda
- **Potencijal galvanskog članka ili napon članka**,  $E_{\text{čl}}$  čini razlika standardnih redukcijskih elektrodnih potencijala katode i anode
- $E_{\text{čl}} = E_{\text{katoda}} - E_{\text{anoda}}$

Zadatak 1.

- ✓ Izračunajte potencijal galvanskog članka cink-bakar,  $E^\circ(\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}) = -0,76 \text{ V}$ ,  
 $E^\circ(\text{Cu}/\text{Cu}^{2+}) = 0,34 \text{ V}$ .



$$E_{\text{čl}} = E_{\text{red}} - E_{\text{oks}} = 0,34 \text{ V} - (-0,76 \text{ V}) = 1,10 \text{ V}$$

## POKUSI:

### 1. Pokus s limunom

Pribor i kemikalije: 1 limun, 2 cinkove i 2 bakrene elektrode, 3 spojne žice, voltmetar

Opis postupka:

1. Utaknuti bakrenu i cinkovu elektrodu u limun. Treba pripaziti da se elektrode ne dodiruju unutar limuna.
2. Žice spojiti na elektrode i povezati ih s voltmetrom.
3. Uključiti voltmetar i prikazati očitavanje učenicima.

Pitanje: Vidite li kako se napon pojavljuje? Koji je zaključak ovog pokusa?

Rješenje: Kada utaknemo bakrenu i cinkovu elektrodu u limun, limunska kiselina djeluje kao elektrolit. Cink, koji je reaktivniji metal, otpušta elektrone i postaje pozitivni ion. Bakrena elektroda, s druge strane, privlači te elektrone, stvarajući električni tok. Ovo nas dovodi do dva ključna pojma koje ćemo danas istražiti: elektrodni potencijal i galvanski članak. Elektrodni potencijal je mjera sposobnosti elektrode da privlači ili otpušta elektrone, dok je galvanski članak uređaj koji pretvara kemijsku energiju u električnu energiju, što je vidljivo u pokusu s limunom.

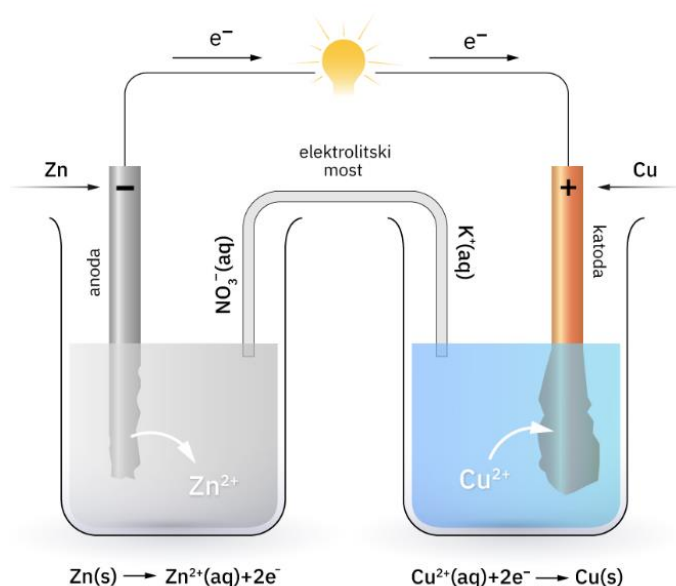
## 2. Pokus „Daniellov članak“

Pribor i kemikalije: 2 čaše od 150 mL, jedna pločica od bakra i cinka, staklena cjevčica svinuta u U-oblik, dvije žice s krokodilskim nastavcima, otopine cinkova salata  $\text{ZnSO}_4$ , bakrova(II) sulfata  $\text{CuSO}_4$ , kalijeva sulfata  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , množinske koncentracije  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ , želatina i voltmetar.

Opis postupka:

1. U jednu čašu uliti otopinu cinkova sulfata i uroniti pločicu cinka, a u drugu čašu uliti otopinu bakrova(II)sulfata i uroniti pločicu bakra.
2. Spojiti čaše s elektrodama uz pomoć cjevčice U-oblika u kojoj se nalazi gel želatine s otopljenim kalijevim sulfatom
3. Strujni krug zatvoriti spajanjem bakrene i cinkove elektrode preko voltmetra. Potrebno je očitati napon članka i zabilježiti opažanja, te skicirati Daniellov članak.

**Rješenje:** Pokus s Daniellovim člankom prikazuje osnovne principe galvanskog članka, gdje se kemijska energija pretvara u električnu energiju putem redoks reakcija. Cink se oksidira na anodi, dok se bakar reducira na katodi, što stvara razliku potencijala koja može biti mjerena voltmetrom.



Korištena metodička i stručna literatura za pripremu nastavnog sata:

<https://www.profil-klett.hr/sites/default/files/flip/11531/#p=102>

<https://www.youtube.com/watch?v=WXMqiT-wML0>

<https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/4d903566-3e87-45ae-9299-e35942520b45/elektrodni-potencijal-i-galvanski-clanci.html>

<https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/15cf791a-4c97-4f29-84d9-17c1b47ceccc/kemija-2/m05/j02/index.html>

Prilozi: radni listić sa zadacima te riješeni radni listić

## RADNI LISTIĆ-ZADACI ZA PONAVLJANJE

*1. Riješite zadatke na temelju sljedećega Voltina niza elemenata:*

Li, Na, Ca, Mg, Al, Mn, Zn, Fe, Cd, Co, Ni, Sn, Pb, H<sub>2</sub>, Cu, Ag, Hg, Pt, Au

a) Koja tri metala mogu reducirati niklove (II) ione iz otopine niklova (II) nitrata?

**A** Ca, Mg, Sn      **B** Al, Zn, Co      **C** Al, Cu, Pb      **D** Cu, Ag, Pt

b) Koji metal reagira s otopinom kobaltova (II) klorida?

**A** Au      **B** Ag      **C** Mg      **D** Pb

*2. Kao elektroda prema kojoj se iskazuje elektrodni potencijal ostalih elektroda odabrana je:*

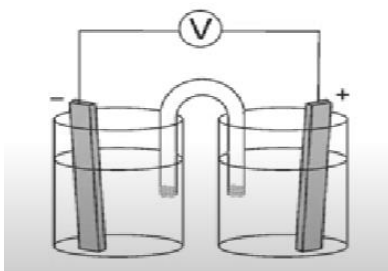
- a) Bakrena elektroda
- b) Cinkova elektroda
- c) Standardna vodikova elektroda
- d) Platinska elektroda

3. Shematski je prikazan galvanski članak koji se sastoji od kobaltove i aluminijeve elektrode  $\text{Al}_{(s)} \mid \text{Al}^{3+}_{(aq)} \parallel \text{Co}^{2+}_{(aq)} \mid \text{Co}_{(s)}$  ?

- Što označava jedna okomita crta, a što dvije okomite crte?
- Odredi koja od elektroda je anoda, a koja katoda.
- Koncentracija kojih iona se u otopini povećava?
- Masa koje elektrode tijekom redoks-reakcije se povećava?

4. Na slici je prikazan galvanski članak sastavljen od aluminijeve pločice uronjene u vodenu otopinu aluminijeva sulfata i željezne pločice uronjene u vodenu otopinu željezova (II) sulfata. Masa se aluminijeve elektrode tijekom reakcije smanjuje.

- Na slici označite aluminijevu elektrodu, vodenu otopinu aluminijeva sulfata, željeznu elektrodu, vodenu otopinu željezova (II) sulfata, smjer elektrona i elektrolitni most.



- Prikažite jednadžbama polureakcije redukcije i oksidacije u galvanskome članku.
- Napišite ukupnu jednadžbu kemijske reakcije koja se odvija u galvanskome članku.

5. Izračunajte razliku standardnih elektrodnih potencijala u galvanskome članku. Vrijednosti standardnih redukcijskih potencijala polučlanaka su:  $E^\circ(\text{Fe}^{2+}|\text{Fe}) = -0,41 \text{ V}$  i  $E^\circ(\text{Al}^{3+}|\text{Al}) = -1,66 \text{ V}$ .



## RJEŠENJA RADNOG LISTIĆA

1. 1. Riješite zadatke na temelju sljedećega Voltina niza elemenata:

Li, Na, Ca, Mg, Al, Mn, Zn, Fe, Cd, Co, Ni, Sn, Pb, H<sub>2</sub>, Cu, Ag, Hg, Pt, Au

a) Koja tri metala mogu reducirati niklove (II) ione iz otopine niklova (II) nitrata?

A Ca, Mg, Sn      **B Al, Zn, Co**      C Al, Cu, Pb      D Cu, Ag, Pt

b) Koji metal reagira s otopinom kobaltova (II) klorida?

A Au      B Ag      **C Mg**      D Pb

2. Kao elektroda prema kojoj se iskazuje elektrodni potencijal ostalih elektroda odabrana je:

a) Bakrena elektroda

b) Cinkova elektroda

**c) Standardna vodikova elektroda**

d) Platinska elektroda

3. Shematski je prikazan galvanski članak koji se sastoji od kobaltove i aluminijske elektrode



a) Što označava jedna okomita crta, a što dvije okomite crte?

b) Odredi koja od elektroda je anoda, a koja katoda.

c) Koncentracija kojih iona se u otopini povećava?

d) Masa koje elektrode tijekom redoks-reakcije se povećava?

**a) jedna okomita crta označava granicu između elektrode i elektrolita, a dvije okomite crte označavaju elektrolitski most koji povezuje dva polučlanka**

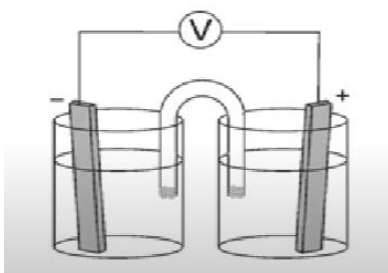
**b) anoda – Al, katoda – Co**

**c) Al<sup>3+</sup> (aq)**

d) Povećala se masa kobaltove elektrode

4. Na slici je prikazan galvanski članak sastavljen od aluminijske pločice uronjene u vodenu otopinu aluminijeva sulfata i željezne pločice uronjene u vodenu otopinu željezova (II) sulfata. Masa se aluminijske elektrode tijekom reakcije smanjuje.

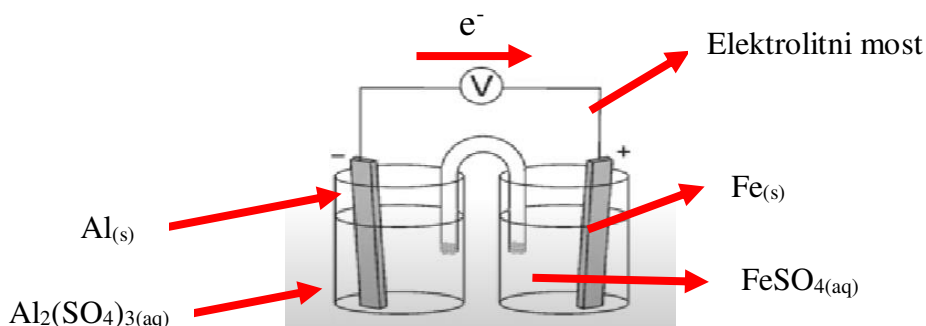
a) Na slici označite aluminijsku elektrodu, vodenu otopinu aluminijeva sulfata, željeznu elektrodu, vodenu otopinu željezova (II) sulfata, smjer elektrona i elektrolitni most.



b) Prikažite jednadžbama polureakcije redukcije i oksidacije u galvanskome članku.

c) Napišite ukupnu jednadžbu kemijske reakcije koja se odvija u galvanskome članku.

a)



b) Oksidacija (-):  $2 \text{Al(s)} \rightarrow 2 \text{Al}^{3+}(\text{aq}) + 6 \text{e}^-$

Redukcija (+)  $3 \text{Fe}^{2+}(\text{aq}) + 6 \text{e}^- \rightarrow 3 \text{Fe(s)}$

c)  $2 \text{Al(s)} + 3 \text{Fe}^{2+}(\text{aq}) \rightarrow 2 \text{Al}^{3+}(\text{aq}) + 3 \text{Fe(s)}$

5. Izračunajte razliku standardnih elektrodnih potencijala u galvanskome članku. Vrijednosti standardnih redukcijskih potencijala polučlanaka su:  $E^\circ(\text{Fe}^{2+}|\text{Fe}) = -0,41 \text{ V}$  i  $E^\circ(\text{Al}^{3+}|\text{Al}) = -1,66 \text{ V}$ .

$$E_{\text{čl}} = E_{\text{red}} - E_{\text{oks}} = E^\circ(\text{Fe}^{2+}|\text{Fe}) - E^\circ(\text{Al}^{3+}|\text{Al}) = -0,41 \text{ V} - (-1,66 \text{ V}) = 1,25 \text{ V}$$

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu istraživana su elektrokemijska svojstva *p*-kumarinske kiseline u pH području od pH = 2 do pH = 10. Oksidirana *p*-kumarinska kiselina stvara polimerni film koji se može reverzibilno oksidirati. Korištene su dvije metode: ciklička voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija. Ciklička voltometrija je korištena za proučavanje osnovnih elektrokemijskih karakteristika *p*-kumarinske kiseline, dok je diferencijalna pulsna voltometrija korištena za proučavanje adsorpcije, utjecaja pH i koncentracije na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha, kao i za detekciju *p*-kumarinske kiseline u realnim uzorcima. Standardna otopina *p*-kumarinske kiseline analizirana je cikličkom voltametrijom, pri čemu je određen oksidacijski strujni vrh povezan s oksidacijom hidroksilne skupine na aromatskom prstenu na elektrodi od staklastog ugljika. Utvrđeno je da struja i potencijal oksidacijskog strujnog vrha rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Oksidacija *p*-kumarinske kiseline je difuzijski kontroliran proces jer struja anodnog strujnog vrha linearno ovisi o drugom korijenu brzine polarizacije elektrode. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom utvrđeno je da visina oksidacijskog strujnog vrha opada uzastopnim snimanjem zbog adsorpcije oksidacijskog produkta na površini elektrode od staklastog ugljika. Zaključeno je da je adsorpcija *p*-kumarinske kiseline izrazita, što uzrokuje drastičan pad visine oksidacijskog strujnog vrha. DPV voltamogrami pokazuju da oksidacija *p*-kumarinske kiseline ovisi o pH vrijednosti. Optimalna pH vrijednost za oksidaciju *p*-kumarinske kiseline na elektrodi od staklastog ugljika je pH = 3, pri čemu je zabilježen najviši oksidacijski strujni vrh. Visina strujnog vrha opada s povećanjem pH vrijednosti. Diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su da je granica detekcije *p*-kumarinske kiseline  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom detektirana je *p*-kumarinska kiselina u sokovima od mrkve, jabuke, šipka i limuna koristeći elektrodu od staklastog ugljika u puferu pH = 3. Na voltamogramima ovih uzoraka uočen je oksidacijski strujni vrh pri istom potencijalu koji odgovara oksidaciji *p*-kumarinske kiseline, čime je dokazana njena prisutnost u ispitivanim uzorcima. U metodičkom dijelu diplomskog rada obrađena je nastavna jedinica „Elektrodni potencijal i galvanski članci“ s ciljem upoznavanja pojmova elektrodni potencijal i galvanski člana te povezivanja redoks reakcija koje se odvijaju na anodama i katodama s promjenama elektrodnog potencijala. Rješavanjem radnih listića učenici će razvijati kritičko mišljenje, sposobnost zapažanja te povezivati nova saznanja s prethodno stečenim znanjem i svakodnevnim životom.

## 7. LITERATURA

1. Ataman Chemicals, URL: [https://www.atamanchemicals.com/hydroxycinnamic-acid\\_u25435/](https://www.atamanchemicals.com/hydroxycinnamic-acid_u25435/), (19.5.2024.)
2. F. Cigić, Polifenoli - važni antioksidansi u prehrani, 2020. URL: <https://repozitorij.pmfst.unist.hr/islandora/object/pmfst%3A988/datastream/PDF/view> (19.5.2024.)
3. T. Vulić, Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva iz ploda trnine, 2017. URL: <https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A2529/datastream/PDF/view> (19.5.2024.)
4. M. Morović, Flavonoidi: metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave, 2018. URL: <https://repozitorij.mefst.unist.hr/islandora/object/mefst%3A652/datastream/PDF/view> (19.5.2024.)
5. H. Planinčić, Udio bioaktivnih spojeva u rizomu dvodomne koprive (*Urtica dioica* L.), 2016. URL: <https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A159/datastream/PDF/view> (20.5.2024.)
6. Agroekonomija, URL: <https://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/18/fenolne-kiseline/> (20.5.2024.)
7. K.Pavić, B. Zorc. Cimetna kiselina i njeni derivati. *Farm. Glasnik* **2018**, 74(4), 415-428.
8. O. Taofiq, A.M. González-Paramás, M. Filomena Barreiro, I. C. F. R. Ferreira. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives. *Molecules*, **2017**, 22(2), 281.
9. V. Bumba. Antioksidacijski potencijal odabranih fenolnih kiselina - teoretski pristup, 2021. URL: <https://repozitorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos:463/datastream/PDF/view> (20.5.2024.)
10. A.Petre, Healthline: What Are Polyphenols? Types, Benefits, and Food Sources, 2023. URL: <https://www.healthline.com/nutrition/polyphenols> (20.5.2024.)

11. H. Boz. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **2015**, 50, 2323–2328
12. P. S. Ferreira, F. D. Victorelli, B. Fonseca-Santos, M. Chorilli. A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. *Crit.Rev.Anal.Chem.* **2019**, 49, 21-31.
- 13 A. Antišić. HPLC analiza polifenola u samoniklim jestivim biljnim vrstama Dalmacije, 2017.URL:<https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A706/datastream/PDF/view> ( 21.5.2024.)
14. Z. Lou; H. Wang, S. Rao, J. Sun, C. Ma, Jing Li. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms , *Food Control.* **2012**, 25, 550-554
15. P. Kehan, O. Juanying, H. Junqing, O.Shiyi. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Int. J. Food Sci. Agric.* **2016**, 96, 2952–2962
16. Phenol explorer, URL: <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/454/>(23.5.2024.)
17. Y. Li, J. Li, B. Q. Li Cheng, S. Xu, R. Wang. De Novo Biosynthesis of p-Coumaric Acid in *E. coli* with a trans-Cinnamic Acid 4-Hydroxylase from the Amaryllidaceae Plant *Lycoris aurea*. *Molecules.* **2018**, 23, 3185
18. A.V. Bounegru, C. Apetrei. Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers–Cobalt Phthalocyanine- Laccase for the Detection of p-Coumaric Acid in Phytoproducts. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 9302
19. J. Patricia, I. Novak, M. Šeruga, A. M. Oliveira-Brett. Electroanalytical Oxidation of p-Coumaric Acid. *Anal.Lett.* **2007**, 40(17), 3309–3321.
20. S. Nieto, F. Martinez-Mora, I.Lozano , F. J. Ruiz, R. Villa , P. Lozano. New sustainable biocatalytic approach for producing lipophilic (hydroxy) cinnamic esters based on deep eutectic mixtures. *Catal. Today* **2024**. 431, 114500
21. J. Teixeira, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, F. Borges. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Res. Int.* **2013**. 1-11
22. I. Kiliç, Y. Yeşiloğlu. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2013**, 115, 719–724.

23. V. Miletić. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola izoliranih iz kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta, 2017. URL:  
<https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A2533/datastream/PDF/view>  
(22.5.2024.)
24. K. Laća. Primjena spektroskopskih metoda u analizi ulja, 2020.  
URL:<https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A9039/datastream/PDF/view>  
(22.5.2024.)
25. A. Kapusta. Pojačanje Ramanovog raspršenja na nanočesticama srebra i zlata veličine 20 nm, 2022. URL:<https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A10456/datastream/PDF/view> (22.5.2024.)
26. P. Westbroek, G. Priniotakis, P. Kiekens, *Electrochemical methods. // Analytical Electrochemistry in Textiles / P. Westbroek*. England: Elsevier, 2005. 37-69
27. Libre texts chemistry, URL:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Electrochemistry/Electrolytic\\_Cells/](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Electrochemistry/Electrolytic_Cells/) (22.5.2024.)
28. A. Gjerek. Određivanje stabilnosti modela klorogenska kiselina - β-glukan primjenom cikličke i pravokutnovalne voltometrije, 2021. URL:  
<https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A2288/datastream/PDF/view> (22. 5. 2024.)
29. Libre texts chemistry, URL:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Analytical\\_Sciences\\_Digital\\_Library/In\\_Class\\_Activities/Electrochemical\\_Methods\\_of\\_Analysis/02\\_Text/7%3A\\_Electrochemical\\_Analytical\\_Methods/7.5%3A\\_Voltammetric\\_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/In_Class_Activities/Electrochemical_Methods_of_Analysis/02_Text/7%3A_Electrochemical_Analytical_Methods/7.5%3A_Voltammetric_Methods) ( 22.5.2024.)
30. K.Sharma, Science info, Voltammetry: Definition, Types, Applications, 2023. URL:  
<https://scienceinfo.com/voltammetry-definition-types-applications/> (22.5.2024.)
31. Epi system, URL: <https://www.epi.ro/metrohm-autolab.html> (25.5.2024.)
32. A.Plesajec. Elektrokemijska karakterizacija protokatehnične kiseline, 2022.  
URL:<https://repozitorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos%3A477/datastream/PDF/view>  
(25.5.2024.)

33. SFTec, URL: <https://sftec.es/reference-electrodes/> (25.5.2024.)
34. Libre texts chemistry, URL: [https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern\\_University/11%3A\\_Electrochemical\\_Methods/11.4%3A\\_Voltammetric\\_Methods](https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/11%3A_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods) (25.5.2024.)
35. M. Guberac. Primjena elektrokemijske tehnike diferencijalne impulsne voltametrije na karakterizaciju kafeina iz uzorka dodatka prehrani, 2020. URL: <https://repositorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A2113/datastream/PDF/view> (25.5.2024.)
36. B.J. Venton, D. J. Di Scenza, *Differential pulse voltametry*.// *Electrochemistry for Bioanalysis*/ Bhavik Patel. England: Elsevier, 2020. 27-50
37. G. Bontempelli, N. Dossi, R. Toniolo, *Alternating Current Polarography*// *Encyclopedia of Analytical Science*/ Paul Worsfold. England: Elsevier, 2019. 218.-229.
38. V. Climent, J. M. Feliu, *Cyclic voltammetry*// *Encyclopedia of Interfacial Chemistry, Surface Science and Electrochemistry*, Elsevier, **2018**. Str. 48-74.
39. C. Bracher, H. Robson, M. Reinhardt, *Ossila enabling science. Cyclic Voltammetry Basic Principles and Theory*, URL: <https://www.ossila.com/pages/cyclic-voltammetry> (25.5.2024.)
40. Nanoscience instruments, URL: <https://www.nanoscience.com/techniques/electrochemistry/electrochemical-measurements-cyclic-voltammetry/> (25.5.2024.)
41. K. Ivić. Utjecaj strukture površinski aktivne tvari na elektrokemijsko raslojavanje grafita, 2016. URL: <https://repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A436/datastream/PDF/view> (25.5.2024)
42. Centar zdravlja, URL: <https://www.centarzdravlja.hr/zanimljivosti/5-razloga-zbog-kojih-volimo-sok-od-sipka/> (26.5.2024.)
43. Teglica, URL: <https://teglica.ba/tag/limunada/> (26.5.2024.)
44. Indiamart, URL: <https://www.indiamart.com/proddetail/carrot-juice-franchise-11925388430.html> (26.5.2024.)
45. Profruit, URL: <https://www.profruit.co.nz/quality/> (26.5.2024.)