

# Usporedba metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti elektrokemijskim i klasičnim metodama

---

**Radeljić, Mia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:011551>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Mia Radeljić**

**USPOREDBA METODA ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI  
ELEKTROKEMIJSKIM I KLASIČNIM METODAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2022. / 2023.**

**Mentor: Doc. dr. sc. Nives Vladislavić**

**Split, listopad 2023.**



**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Opća kemija sa stehiometrijom

**Tema rada** je prihvaćena na 79. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 24. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Nives Vladislavić

## USPOREDBA METODA ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ELEKTROKEMIJSKIM I KLASIČNIM METODAMA

Mia Radeljić, (201823)

### Sažetak

**Cilj istraživanja:** Ideja rada je ujedno i opći cilj ovog rada, a to je ispitati ponašanje galne kiseline kao jednostavnog fenola u fiziološkim elektrolitima, u simuliranoj želučanoj kiselini i fiziološkom fosfatnom puferu. Nadalje, bilo je potrebno odabrati elektrodu koja pokazuje najbolji odziv prema galnoj kiselini, odnosno elektrodu s najboljom osjetljivošću. Specifični ciljevi su pomoću odabrane elektrode odrediti s kolikom pouzdanošću možemo elektrokemijskim metodama odrediti koncentraciju galne kiseline, odnosno procijeniti antioksidacijsku aktivnost. Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima dobivenim klasičnom metodom izvedeni su zaključci o mogućnosti primjene voltametrijskih metoda u procjeni antioksidacijske aktivnosti. Potrebno je pronaći korelaciju između rezultata elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda koja bi omogućila primjenu elektrokemijskih metoda kao standardnih metoda za ovu namjenu.

**Materijali i metode:** Elektroda od staklastog ugljika je modificirana jednozidnim i višezidnim ugljikovim nanocjevčicama u svrhu poboljšanja prijenosa elektrona i povećanja osjetljivosti. Vodenim ekstraktima odabranih biljaka odrediti koncentraciju galne kiseline diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Istim ekstraktima odrediti ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost klasičnim spektrofotometrijskim metodama.

**Rezultati:** Nakon analize dobivenih rezultata najbolji odziv prema galnoj kiselini pokazala je elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama. Osjetljivost prema galnoj kiselini od 99  $\mu\text{A}$  ukazala je na vrlo visoku osjetljivost i odličnu linearnost (0,995) predložene metode. Najveća koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu ružmarina, 10700  $\mu\text{g GAE/L}$ , odnosno 171,2 mg/kg suhe tvari. Najmanja koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu matcha praha. Najveći udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom zabilježen je u ekstraktu ružmarina, dok je najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom zabilježena u ekstraktu kadulje.

**Zaključci:** Elektroanalitička metodologija koja je predstavljena u ovom radu može se koristiti za brzu procjenu ukupnih fenola u ekstraktima suhog bilja, a samim tim i za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Rezultati ovog diplomskog rada mogu znatno doprinijeti razvoju nove metode za određivanje galne kiseline, odnosno za procjenu ukupnih fenola u biljnom materijalu, što je ujedno i korak naprijed u razvoju voltametrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva.

**Ključne riječi:** Antioksidansi, galna kiselina, voltametrijske metode

**Rad sadrži:** 73 stranice, 37 slika, 7 tablica, 42 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:** 1. Izv. Prof. Dr. Sc. Ivana Škugor Rončević – predsjednica  
2. Doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, mag. pharm. – član  
3. Doc. dr. sc. Nives Vladislavić – član-mentor

**Datum obrane:** 23. listopada 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Teaching subject:** General chemistry with stoichiometry

**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 79. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 24.

**Mentor:** Nives Vladislavić, Assistant Profesor

### COMPARISON OF METHODS FOR DETERMINING ANTIOXIDANT ACTIVITY BY ELECTROCHEMICAL AND CLASSICAL METHODS

Mia Radeljić, 201823

#### Summary

**Objectives:** The idea is also the general objective of this work, which is to study the behaviour of Gallic acid as a simple phenol in physiological electrolytes, in simulated gastric acid and physiological phosphate buffer. In addition, it was necessary to select the electrode with best respond toward Gallic acid, the best sensitivity. The specific objectives of this work are to use the selected electrode to determine how reliably we can determine the concentration of Gallic acid by electrochemical methods and to evaluate the antioxidant activity of a substance. By comparing the obtained results with the results of the classical method, conclusions about the possibility of using voltammetric methods in the evaluation of antioxidant activity will be found. It is necessary to find a correlation between the results of electrochemical and spectrophotometric methods to make this method standard method for evaluation of total phenol and antioxidant activity.

**Material and Methods:** A glassy carbon electrode was modified with singlewalled and multiwalled carbon nanotubes to improve electron transfer and increase sensitivity toward Gallic acid. Using aqueous extracts of selected plants, Gallic acid concentration was determined by differential pulse voltammetry. Using the same extracts, total phenolic and antioxidant activity were determined by classical spectrophotometric methods.

**Results:** Analysis of the results showed that the electrode modified with singlewalled carbon nanotubes responded best to Gallic acid. Obtained sensitivity of 99  $\mu\text{A}$  indicates very high sensitivity and excellent linearity (0.995) of the proposed method. The highest concentration of Gallic acid was observed in rosemary extract, 10700  $\mu\text{g GAE/L}$ , or 171.2 mg/kg dry mass. The lowest concentration of Gallic acid was observed in Matcha powder extract. The highest level of total phenols by the spectrophotometric method was observed in the rosemary extract, while the highest antioxidant activity by the FRAP method was measured in the sage extract.

**Conclusions:** The electroanalytical method presented in this work can be used for the rapid determination of total phenols in dry extracts of herbs and, consequently, for the determination of antioxidant activity. The results of this work can significantly contribute to the development of a new method for the determination of Gallic acid, or for the determination of total phenols in plant material, which is also an advance in the development of voltammetric methods for the determination of antioxidant activity of various compounds.

**Keywords:** antioxidants, gallic acid, voltammetric methods

**Thesis contains:** 73 pages, 35 pictures, 7 tables, 42 literary references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. Assistant professor Ivana Škugor Rončević, PhD – chair person  
2. Ana Šešelja Perišin, mag. pharm. - member  
3. Assistant professor Nives Vladislavić PhD – supervisor

**Defence date:** October 23, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

*Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori, ljubavi i razumijevanju tokom studiranja.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nives Vladislavić na stručnom vodstvu, posvećenom vremenu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*I na kraju, hvala mojim prijateljima i kolegama što su dane studiranja učinili lakšima i ljepšima.*

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Opću i anorgansku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nives Vladislavić u razdoblju od travnja do rujna 2023. godine.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD	
1.1.	Antioksidansi	3
1.1.	Galna kiselina	4
1.2.	Literaturni pregled – dosadašnja postignuća	5
1.3.	Metode	5
1.3.1.	Voltametrijske metode	5
1.3.2.	Spektrofotometrijske metode	8
1.4.	Elektrode u voltametriji	10
1.5.	Ugljikove nanocjevčice	12
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3.	MATERIJALI I METODE	16
3.1.	Kemikalije i priprava otopina	17
3.2.	Metode	19
3.2.1.	Priprava elektroda	20
3.3.	Elektrokemijska mjerenja	21
3.4.	Spektrofotometrijska mjerenja	22
3.5.	Priprava i karakterizacija realnih uzoraka	22
3.6.	Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola	23
3.7.	FRAP metoda (eng. <i>Ferric reducing/Antioxidant power</i> ) - određivanje antioksidacijske aktivnosti	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1.	Elektrokemijska mjerenja	27
4.1.2.	Rezultati diferencijalne pulsne voltametrije	39
4.1.3.	Analitička primjena SWCNT-GC elektrode u realnim uzorcima	43
4.2.	Spektrofotometrijska mjerenja	47
5.	ZAKLJUČAK	51
6.	POPIS CITIRANE LITERATURE	54

7. SAŽETAK .....	59
8. SUMMARY .....	61
9. ŽIVOTOPIS .....	63



## **1. UVOD**

U suvremenom društvu sve je veći interes za zdravlje i dobrobit pojedinca. S porastom svijesti o važnosti pravilne prehrane i njezinog utjecaja na očuvanje zdravlja, znanstvenici su usmjereni na istraživanje različitih aspekata nutricionizma, među koje spada i antioksidacijska aktivnost.

Antioksidansi su tvari koje imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u tijelu, čime štite stanice od oksidativnog stresa i potencijalnih oštećenja. Stoga je određivanje antioksidacijske aktivnosti postalo ključnim za razumijevanje potencijalnih zdravstvenih beneficija različitih sastojaka hrane.

U ovom radu fokusirat ćemo se na usporedbu metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti u različitim uzorcima. Konkretno, usporedit ćemo elektrokemijske metode s klasičnim kemijskim metodama. Elektrokemijske metode, u ovom slučaju ciklička voltometrija, predstavljaju relativno nov pristup u analizi antioksidacijske aktivnosti, no u usporedbi s tradicionalnim metodama omogućuju brže, preciznije i osjetljivije mjerenje. Klasične kemijske metode, FRAP i Folin-Ciocalteu metoda, koriste kemijske reakcije za kvantitativno određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka.

Cilj rada je analizirati prednosti i ograničenja navedenih metoda te usporediti njihove rezultate u određivanju antioksidacijske aktivnosti u različitim uzorcima. Razumijevanje i evaluacija ovih metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti doprinose boljem razumijevanju njihove primjene u raznim istraživačkim i industrijskim granama te pruža smjernice za odabir najprikladnijih metoda ovisno o specifičnim potrebama i ciljevima analize antioksidacijske aktivnosti.

## 1.1. Antioksidansi

Antioksidansi su organske tvari ili molekule koje pronalazimo najčešće u biljkama, a služe kao tvari koje inhibiraju ili odgađaju oksidaciju koju mogu izazvati slobodni radikali (1).

Oksidacija je kemijska reakcija kojom nastaju slobodni radikali. Kao najznačajniji antioksidansi ističu se fenolni i polifenolni spojevi. Oni svojim djelovanjem inaktiviraju slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve, tako što im doniraju elektron čime se zaustavlja lančana reakcija oksidacije. Slobodni radikali i reaktivni kisikovi spojevi nastaju kao nusprodukti metabolizma stanica ili kao odgovor na vanjske faktore, a svojim djelovanjem mogu dovesti do oštećenja ili uništenja stanica. Antioksidansi njihovom inaktivacijom sprječavaju razvoj degenerativnih bolesti u ljudi koje mogu nastati oksidacijom nukleinskih kiselina, proteina ili lipida (2).

### Antioksidansi u začinskom bilju i dodacima prehrani

Timijan (*Thymus vulgaris*) je vrsta cvjetnice iz obitelji *Lamiaceae* (3). Kroz brojna istraživanja dokazana su antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva ekstrakta timijana koja se pripisuju različitim fenolnim spojevima, kao što su linalol, kamfen, tujon, karvakrol i timol (4,5). Danas se najčešće koristi kao začinsko bilje te u tradicionalnoj medicini.

Kadulja (*Salvia officinalis*) također pripada obitelji *Lamiaceae*, zbog svojih sekundarnih metabolita važna je ljekovita biljka. U te metabolite pripadaju razni fenoli, terpenoidi, polifenoli i flavonoidi. Razne studije identificirale su njihovu važnu ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa u stanicama, zajedno s njihovom antimikrobnom, antikancerogenom i protuupalnom ulogom (6).

Ružmarin (*Salvia rosmarinus*) se najčešće koristi kao konzervans za hranu te kao aromatični začim u mediteranskoj kuhinji. Najproučavaniji sastojci ružmarina su kafeinska kiselina i njezin derivat, ružmarinska kiselina. Smatra se da ti spojevi imaju antioksidativna svojstva i istražuju se kao potencijalne terapije za liječenje raznih upalnih stanja, posebice stanja vezanih uz jetru (7).

Islandski lišaj (*Cetraria islandica*) široko je korišten u narodnoj medicini za liječenje probavnih i respiratornih bolesti u obliku različitih tinktura, vodenih ekstrakata i infuza. Tradicionalna uporaba potvrđena je *in vitro* i *in vivo* farmakološkim studijama. Osim toga,

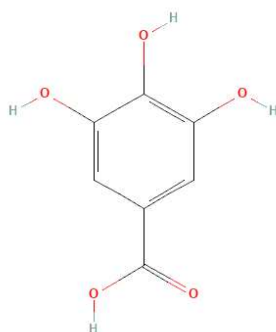
istražuju se nove terapijske aktivnosti, kao što su antioksidativne, imunomodulatorne i antigenotoksične (8).

Matcha prah dobiva se iz posebno uzgojenih i prerađenih listova kineskog čajevca (*Camellia sinensis*) koji se tradicionalno konzumira na području istočne Azije, a danas se uglavnom proizvodi u Japanu (9). Dokazane prednosti uporabe matcha praha proizlaze iz prisutnosti antioksidansa, kao što su flavonoli, flavandioli i fenolne kiseline, koji čine čak do 30% suhe mase. Zbog antioksidativne, antivirusne i protuupalne funkcije, stimulirajućih imunoloških i detoksikacijskih procesa, konzumacija zelenog čaja povezana je sa smanjenim rizikom od bolesti krvožilnog sustava i karcinoma (10).

Goji bobice (*plodovi Lycium*) dobivaju se iz dvije blisko povezane biljke, *Lycium chinense* i *Lycium barbarum*. Obično ih pronalazimo u Aziji, osobito u sjeverozapadnim dijelovima Kine. Za antioksidativno djelovanje goji bobica zaslužna je prisutnost brojnih fenolnih spojeva, kao što su kafeinska kiselina, kumarinska kiselina, rutin, rutinozid i kvercetin-diglukozid (11).

### 1.1. Galna kiselina

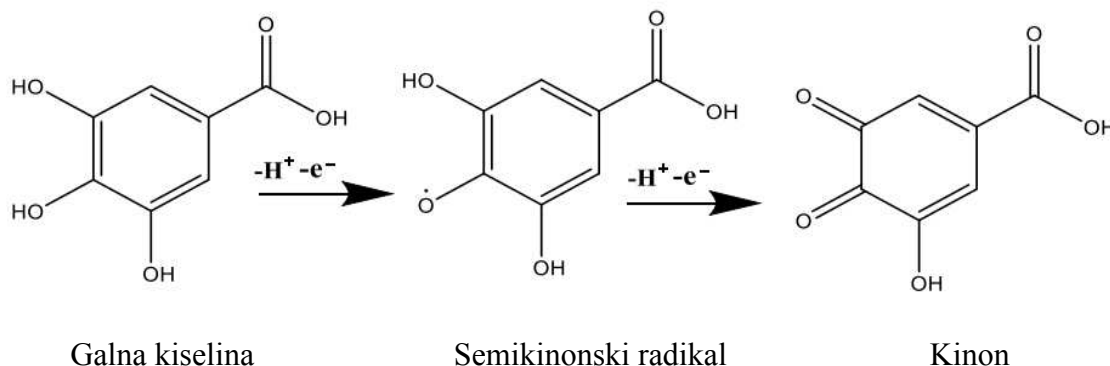
Galna kiselina (poznata i pod nazivom 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) pripada skupini fenolnih kiselina (Slika 1). Galnu kiselinu pronalazimo u biljnim materijalima u obliku slobodnih kiselina, estera, derivata katehina i hidroliziranih tanina. Ekstrakcija galne kiseline iz takvih prirodnih izvora provodi se sa polarnim otapalima kao što su voda, etanol, metanol ili njihove kombinacije.



**Slika 1.** Strukturni prikaz galne kiseline (12).

Antioksidativni učinak pokazao se ključnim u sudjelovanju galne kiseline u raznim biološkim procesima. Za snažno antioksidacijsko djelovanje zaslužna je sama struktura galne kiseline u kojoj se nalaze 3 hidroksilne skupine na položajima 3, 4 i 5. Te tri hidroksilne skupine, koje su direktno vezane na benzenski prsten, sklone su oksidaciji kao što je prikazano na slici 2. To rezultira nastankom vodikovog peroksida, semikinonskog radikala i

kinona (1). Galna kiselina ima raznovrsnu primjenu u različitim područjima farmaceutske i prehrambene industrije u kojima se koristi u proizvodnji antibiotika širokog spektra te kao antioksidans u mastima i uljima.



**Slika 2.** Reakcija oksidacije galne kiseline (1).

## 1.2. Literaturni pregled – dosadašnja postignuća

Pregledom dosadašnjih postignuća može se uočiti kako su se elektrokemijske metode (prije svega voltometrija) uglavnom koristile za određivanje antioksidativnog kapaciteta polifenolnih spojeva. Jedno od prvih zabilježenih istraživanja na ovu temu je ono profesora Kilmartina i suradnika na Sveučilištu Auckland 2001. godine u kojem je ciklička voltometrija na staklastoj ugljikovoj elektrodi predložena kao metoda za procjenu antioksidativnog kapaciteta vina i njegovih fenola (13). Firuzi i suradnici su kroz svoja istraživanja 2005. godine uočili učinkovitost cikličke voltetrije i spektrofotometrijskih metoda (FRAP metoda) u određivanju antioksidativnog kapaciteta flavonoida (14). Komorsky-Lovrić i suradnici su razvili voltometrijsku metodu na parafinom impregniranoj ugljikovoj elektrodi za određivanje antioksidativnog kapaciteta listova čaja te raznog voća i povrća (15). Moderne voltometrijske metode omogućuju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu uz korištenje osjetljive, jeftine i lako primjenjive opreme. Stoga je cilj daljnjih istraživanja na ovu temu razviti i validirati jednostavnu, osjetljivu, pouzdanu i brzu elektrokemijsku metodu za određivanje antioksidativnog kapaciteta pojedinih sastojaka u namirnicama, koja bi bila pogodna za daljnje analize u industriji (16).

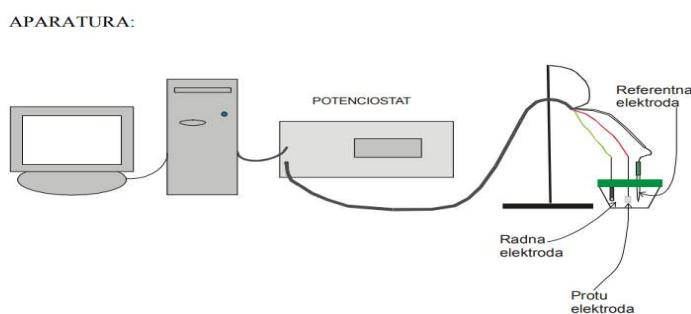
## 1.3. Metode

### 1.3.1. Voltometrijske metode

Voltometrija kakvu danas poznajemo razvijena je uz pomoć otkrića polarografije 1922. godine za što je zaslužan češki kemičar Jaroslav Heyrovsky. Rane voltometrijske

metode nisu bile pogodne za rutinsku analitičku uporabu, no tokom šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog stoljeća napravljeni su značajni pomaci u razvoju tih metoda. Povećanjem osjetljivosti i proširenjem repertoara analitičkih metoda zajedno s pojavom jeftinih operacijskih pojačala olakšan je brzi komercijalni razvoj jeftinih instrumenata (17). Zajednička karakteristika svih voltametrijskih metoda je mjerenje struje ( $i$ ) nastale na radnoj elektrodi koja se razvija uslijed kontinuirane promjene potencijala ( $E$ ) u određenom vremenu ( $t$ ) (18). Voltametrijske metode, za razliku od potenciometrijskih, smatramo aktivnima zato što primijenjeni potencijal uzrokuje promjenu u koncentraciji elektroaktivne tvari na površini elektrode uslijed redukcije, odnosno oksidacije koja se odvija pri njegovim promjenama. Glavne analitičke prednosti voltametrijskih metoda uključuju visoku osjetljivost ( $10^{-12}$  do  $10^{-1}$  M), širok temperaturni raspon, brzo vrijeme analize te velik broj različitih otapala i elektrolita koji se mogu koristiti. (17). Voltametrija se najčešće primjenjuje u istraživanju elektrokemijskih procesa, u medicini za *in vivo* praćenje koncentracije nekih molekularnih vrsta u životinjskim organima i organima čovjeka te u istraživanju stvaranja i reakcija oksidnih slojeva na površini metala (19).

Osnovne jedinice modernog voltametrijskog instrumenta čine računalo, potencijostat i elektrokemijski članak (Slika 3). Potencijostat služi za promjenu potencijala i mjerenje struje, dok elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koje su uronjene elektrode. Tri elektrode koje se koriste u voltametrijskim metodama su radna, referentna i protuelektroda. Struja se mjeri između radne i protuelektrode (mjeri se signal odziva), a potencijal između radne i referentne elektrode (signal pobude) (19,20).

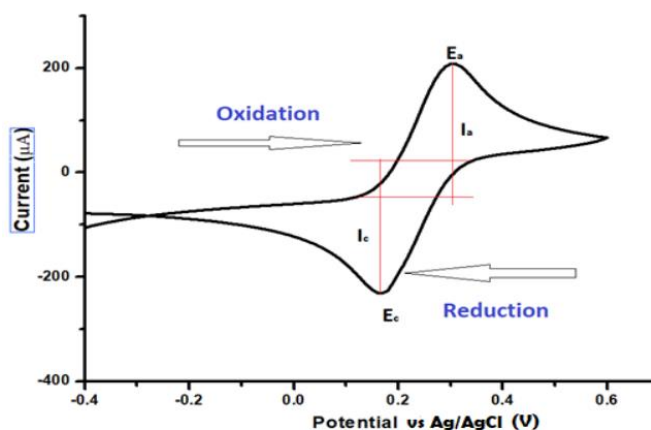


**Slika 3.** Prikaz aparature za provedbu voltametrijskih mjerenja (21).

### ***Ciklička voltametrija***

Ciklička voltametrija jedna je od najčešće korištenih elektrokemijskih tehnika za određivanje različitih svojstava antioksidansa. Ova tehnika pruža informacije o difuzijskoj i

adsorpcijskoj prirodi elektrodne reakcije, termodinamici redukcijskih i oksidacijskih procesa te kinetici heterogenih reakcija prijenosa elektrona (1). Potencijal radne elektrode linearno se skenira (u usporedbi s referentnom elektrodom) od početne do konačne vrijednosti, a zatim se vraća natrag dok se istovremeno bilježi struja (22). Rezultati se prikazuju u obliku voltamograma (Slika 4) gdje se na x-osi prikazuje parametar koji je nametnut sustavu, ovdje je to primijenjeni potencijal ( $E$ ), dok je na y-osi prikazan rezultirajući strujni prolaz ( $i$ ) (23). Voltamogrami pružaju vrlo važne podatke poput  $E_a$  (anodni potencijal),  $E_c$  (katodni potencijal),  $I_a$  (anodna vršna struja) i  $I_c$  (katodna vršna struja) (1).



Slika 4. Voltamogram (1).

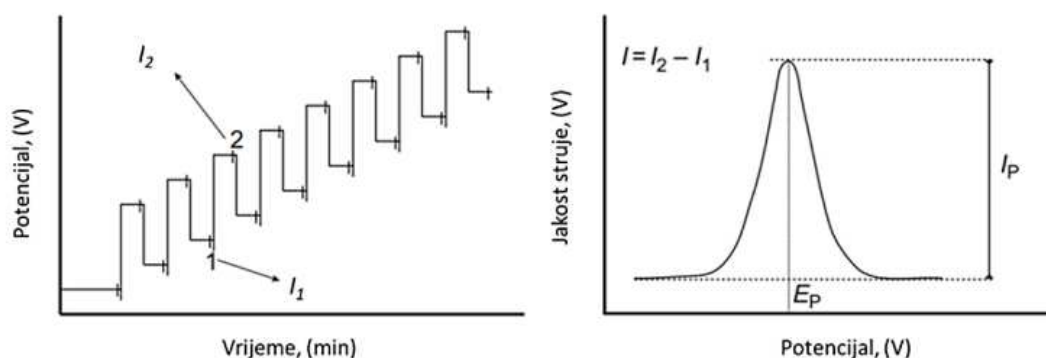
Važan parametar u cikličkoj voltametriji je brzina skeniranja (*scan rate*), odnosno brzina kojom se mijenja potencijal. Obično se izražava u voltima po sekundi (V/s) ili milivoltima po sekundi (mV/s). Brzina skeniranja utječe na oblik voltamograma i može se koristiti za proučavanje kinetike elektrokemijskih reakcija. Pri većim brzinama skeniranja dolazi do smanjenja difuznog sloja na elektrodi što kao posljedicu ima opažanje većih struja. Općenito, odabir odgovarajuće brzine skeniranja ovisi o samom istraživačkom pitanju i svojstvima analiziranog sustava (23).

Ciklička voltametrija najčešće se primjenjuje u istraživanju elektrokemijskih procesa i u analitičke svrhe. Prikladna je za utvrđivanje mehanizma elektrokemijskih reakcija, a rabi se i u medicini za *in vivo* praćenje koncentracija različitih molekularnih vrsta u životinjskim i ljudskim organima (19).

### **Diferencijalna pulsna voltametrija**

Diferencijalnu pulsnu voltametriju karakterizira stupnjevita promjena potencijala u ovisnosti o vremenu. Provodi se tako da se na osnovni potencijal ( $E_i$ ) superponira pravokutni naponski impuls amplitude od 10 do 100 mV u kratkom vremenskom intervalu (5 do 100 ms).

Na slici 5 prikazani su signal pobude i signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije. Takvi kratkotrajni pulsevi predstavljaju signal pobude. Struja unutar ćelije mjeri se prije idućeg naponskog impulsa ( $I_1$ ) i na kraju trajanja impulsa ( $I_2$ ). Kao signal odziva bilježi se razlika između tih izmjerenih vrijednosti u ovisnosti o potencijalu elektrode i ima oblik vrha (pika) čija je visina proporcionalna koncentraciji analita (19). Diferencijalni pulsni voltamogrami imaju jasno izražene vrhove što ih čini pogodnima za analitičke svrhe. Granica detekcije iznosi  $10^{-8}$  M (20).



**Slika 5.** Signal pobude i signal odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije (24).

Diferencijalnu pulsnu voltametriju predložili su Barker i Gardber 1958. godine kao tehniku za elektrokemijsko otkrivanje spojeva pri niskim granicama kvantifikacije i detekcije (1). Osim za analitičke svrhe koristi se i za karakterizaciju molekulske građe čestica elektroaktivne tvari u otopini. Zbog izrazite osjetljivosti same metode nužna je uporaba posebno čistih otapala (takozvana ultra čista otapala) i kemikalija koje se koriste kao osnovni elektroliti pri mjerenju. Osim vode, koriste se i brojna nevodena otapala što omogućuje određivanje molekulskih vrsta koje nisu topljive u vodi. Nedostaci ove metode uključuju relativno dugo vrijeme mjerenja i neprikladnost za istraživanje složenijih sustava zbog nemogućnosti razlučivanja signala odziva (19).

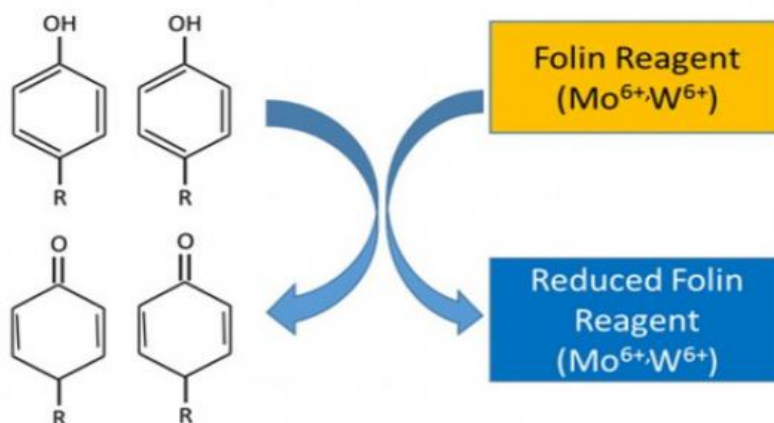
### 1.3.2. Spektrofotometrijske metode

#### *Folin-Ciocalteu metoda*

Folin-Ciocalteu metodu osmislili su 1927. znanstvenici Otto Folin i Vintil Ciocalteu kao metodu za kvantifikaciju tirozina i triptofana u proteinima (25). Određivanje Folin-Ciocalteu indeksa je spektrofotometrijska metoda temeljena na mjerenju apsorbancije pri



valnoj duljini od oko 760 nm. Folin-Ciocalteu index je numerička vrijednost koja predstavlja ukupnu količinu fenola u uzorku temeljena na reakciji između fenolnih spojeva i Folin-Ciocalteu reagensa (Slika 6). Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens (žuto obojenje) sastoji se od fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koje reagiraju s fenolnim spojevima prilikom čega se reagens reducira i nastaje mješavina plavih molibdenovih i volframovih oksida.



**Slika 6.** Prikaz redukcije Folin-Ciocalteu reagensa (26).

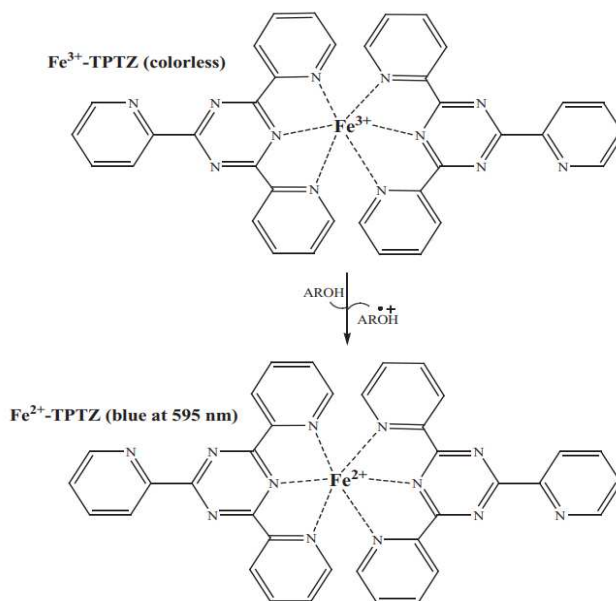
Reakcija se odvija u lužnatom mediju, a intenzitet dobivenog plavog obojenja ovisi o količini fenola u otopini. Nastalo obojenje nije stabilno i razvija se tijekom vremena u dvije faze: brza i spora faza. U brzom fazi (0-30 minuta) dolazi do nastanka plave boje, a u sporoj (nakon 30 minuta) razvija se tamno plavo obojenje. Ako se očitavanje apsorbancije vrši nakon 30-45 minuta pogreška je vrlo mala i dobivena vrijednost se može reproducirati (27). Galna kiselina je najčešća referentna molekula koja se koristi za izražavanje rezultata, koji se prikazuju kao ekvivalenti galne kiseline po jedinici uzorka (25).

Unatoč svojoj prvotnoj namjeni, prehrambena i poljoprivredna industrija već dugi niz godina upotrebljavaju ovu metodu za određivanje ukupnih fenola. Široka primjena Folin-Ciocalteu reakcije kao zlatnog standarda za kolorimetrijsku kvantifikaciju ukupnih fenola leži u njejoj jednostavnosti, brzini i niskoj cijeni, budući da se temelji na redukciji molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona u lužnatom mediju pomoću fenola, koji se oksidiraju do kinona. Ipak, jednostavnost ove redoks reakcije dovodi do nedostatka specifičnosti zbog raznih interferencija kao što su proteini, aminokiseline, nukleotidi, askorbinska kiselina, aldehidi, ketoni i organske kiseline (28).

## FRAP metoda

FRAP (eng. Ferric reducing/Antioxidant power) metodu 1996. godine razvili su znanstvenici Benzie i Strain kako bi odredili antioksidacijsku aktivnost krvne plazme (29). Metoda mjeri sposobnost antioksidansa da reducira kompleks  $\text{Fe}^{3+}$  (feri oblik) i liganda, koji je najčešće TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), u kompleks  $\text{Fe}^{2+}$  (fero oblik) i ligand prilikom čega nastaje plavo obojenje (Slika 7). Antioksidativna aktivnost određuje se kao promjena apsorbancije pri 593 nm, a rezultati se izražavaju kao mikromolarni ekvivalenti  $\text{Fe}^{2+}$  ili u odnosu na antioksidativni standard. Za razliku od drugih metoda koje se temelje na prijenosu elektrona, FRAP se provodi u kiselim uvjetima ( $\text{pH} = 3,6$ ) kako bi se zadržala topljivost željeza. Iako izvorni FRAP test koristi TPTZ kao ligand koji veže željezo, postoje i alternativni ligandi također korišteni za vezanje željeza kao što je ferozin za procjenu antioksidativnog djelovanja askorbinske kiseline (30).

FRAP je brza, jeftina i jednostavna metoda koja ne zahtjeva specijaliziranu opremu. Originalno zamišljena za mjerenje redukcijske snage u plazmi, danas se najčešće koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti u hrani, biološkim tekućinama i ekstraktima biljaka (31).



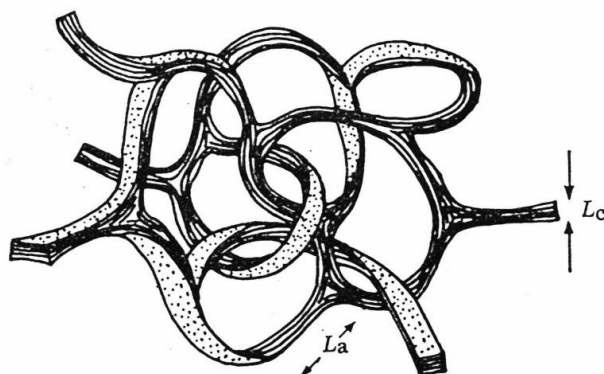
Slika 7. Strukturni prikaz reakcije do koje dolazi FRAP metodom (29).

### 1.4. Elektrode u voltametriji

#### Radna elektroda – elektroda od staklastog ugljika

Struktura staklastog ugljika dugo je bila predmet rasprava. Raniji strukturni modeli pretpostavljali su prisutnost  $\text{sp}^2$  i  $\text{sp}^3$  hibridiziranih atoma, no utvrđeno je da se radi samo o  $\text{sp}^2$  hibridiziranim atomima. Model prikazan na slici 8 bio je široko prihvaćen, no pokazao se

nedostatan u brojnim aspektima. Primjerice, model sa Slike 8 bi zbog svoje strukture trebao biti propustan za plinove, no to kod staklastog ugljika nije slučaj. Novija istraživanja pokazuju da staklasti ugljik ima strukturu povezanu s fulerenom (32).



**Slika 8.** Jenkins - Kawamura model staklastog ugljika (33).

Karakteristične osobine elektroda od staklastog ugljika su relativno velika tvrdoća, lomljivost, niska žilavost, visoka električna vodljivost, visoka toplinska otpornost, niska gustoća, nepropusnost za plinove i tekućine, inertnost na koroziju i druge oblike kemijskog napada, otpornost na abraziju, nisko trenje te karakteristična sjajna površina. Obrada staklasto-ugljičnih materijala također je izražena, s mogućnošću pripreme materijala u obliku velikih kompaktnih tijela, ali i sitnih čestica, tankih filmova, listova i vlakana (34). Elektroda se priprema utiskivanjem valjčića ili pločice staklastog ugljika u teflonski nosač ili se staklasti ugljik zalijepi aralditnim ljepilom u staklenu cjevčicu (19).

### ***Referentna elektroda – srebro/srebroklorid elektroda***

Zasniva se na reakciji :



Priprema se tako da se komadić srebrne žice (srebrna elektroda) kojoj je jedan kraj savijen u uzvojnici i na čijoj je površini joj je anodnom oksidacijom u kloridnoj otopini stvoren sloj teško topljiva AgCl, uroni u kloridnu otopinu zasićenu s AgCl. Aktivitet  $\text{Ag}^+$  iona a time i potencijal elektrode, reguliran je koncentracijom kloridnih iona u otopini. Najčešće se upotrebljava Ag/AgCl elektroda sa zasićenom otopinom KCl-a kojoj je elektrodni potencijal +0,197 V u odnosu prema standardnoj vodikovoj elektrodi (19).

## ***Protuelektroda***

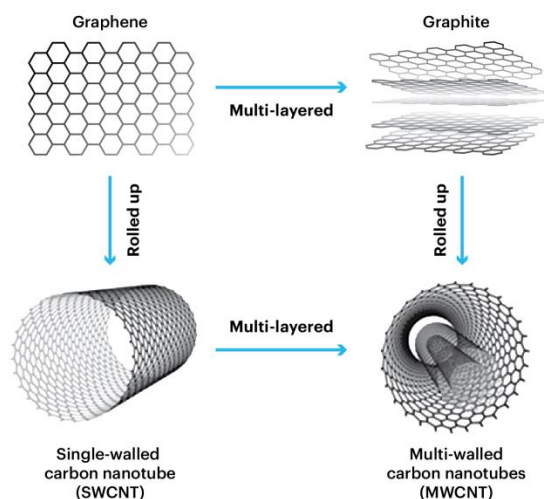
Kao protuelektroda koristi se najčešće elektroda od platinskog lima čija površina mora biti višestruko veća od radne elektrode, npr. površine 1 cm<sup>2</sup>. Platinska protuelektroda u elektrokemijskoj ćeliji je smještena nasuprot radnoj elektrodi u svrhu postizanja simetričnog električnog polja.

### **1.5. Ugljikove nanocjevčice**

Ugljikove nanocjevčice su cilindrične velike molekule sastavljene od heksagonalnog rasporeda hibridiziranih atoma ugljika, koje se mogu oblikovati tako da se zavijaju u jedan list grafena (jednozidno omotane cjevčice od ugljika, SWCNT-ovi) ili zavijanjem više listova grafena (višezidne cjevčice od ugljika, MWCNT-ovi) (Slika 9). Obično su ugljikove nanocjevčice zatvorene na jednom kraju hemisferičnim rasporedom ugljikovih mreža, nazvanih fulereni, omotanih listom grafena (35). Nekoliko su stotina puta čvršće od čeličnih istoga presjeka, smatra se da to potječe iz njihove šesterokutne strukture u kojoj se sile istezanja raspoređuju većom površinom i dijelom zbog jakosti kemijske veze između atoma ugljika. Pokazuju neobična električna svojstva koja su posljedica "slobodnih" elektrona na površini cjevčica "oslobođenih" u sp<sup>2</sup> hibridizaciji atomskih orbitala ugljika.

Svojstva nanocjevčica na kojima se temelji njihova primjena jesu:

- veliki omjer između duljine i radijusa, što omogućuje bolju regulaciju usmjerenih svojstava učinjenog materijala
- imaju električna svojstva metala, poluvodiča ili izolatora, što ovisi o njihovom promjeru, kiralnosti, površinskoj modifikaciji odnosno dopiranju
- imaju veliku mehaničku čvrstoću; čvršće su i fleksibilnije od ugljikova vlakna (eng. *carbon fiber*)
- svojstva im se mogu promijeniti umetanjem metala u unutrašnjost cijevi, pri čemu nastaju električni i magnetski nanovodovi; mogu se umetnuti i plinovi i tako služe za spremanje ili odvajanje plinova (19).



**Slika 9.** Smjer nastanka, struktura i svojstva ugljikovih nanocjevčica (36).

### ***SWCNT***

Jednozidne ugljikove nanocjevčice (SWCNT) su šuplji, dugi cilindri izrađeni od jednog atomskog lista ugljikovih atoma u rešetki saća. Posjeduju izvanredna toplinska, mehanička i električna svojstva te se smatraju jednim od najperspektivnijih nanomaterijala za primjenu i osnovna istraživanja. Promjeri ugljikovih nanocjevčica izražavaju se u nanometrima, dok su njihove duljine obično mikroni i milimetri. Tipična jednozidna ugljikova nanocjevčica ima promjer od otprilike 1 nm i sastoji se od samo jednog atomskog lista, koji se može zamisliti kao smotana verzija grafena, tj. atoma ugljika (37).

### ***MWCNT***

Višezidne ugljikove nanocjevčice (MWCNT) sastoje se od više jednozidnih ugljikovih nanocjevčica koje su ugniježdene jedna unutar druge tvoreći koncentrične cilindre. Glavna razlika između SWCNT i MWCNT je u tome što su jednozidne fleksibilne, dok su višezidne čvrste i krute strukture u obliku šipke. Jednozidne su također manjih širina, promjera obično u rasponu od 1-2 nm, sa zakrivljenim strukturama, a ne ravnim. Zahvaljujući jedinstvenim cjevastim strukturama i savršenom kovalentnom C-C lijepljenju, MWCNT pokazuju fascinantna fizička i kemijska svojstva kao što su ultra visoka mehanička čvrstoća, vrlo dobra električna i toplinska vodljivost, velika površina, poželjna kemijska i ekološka stabilnost i različite optičke karakteristike. MWCNT smatraju se najjačim materijalom ikada otkrivenim (38).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati ponašanje galne kiseline kao jednog jednostavnog fenola, standarda za mnoge analize, u fiziološkim uvjetima, odnosno u fiziološkim elektrolitima.
2. Ispitati elektrokemijsko ponašanje galne kiseline u simuliranoj želučanoj kiselinu i fiziološkom fosfatnom puferu na elektrodama s modificiranom površinom.
3. Odabrati elektrodu koja pokazuje najbolji odziv prema galnoj kiselinu, odnosno elektrodu s najboljom osjetljivošću.
4. Odrediti pouzdanost pojedinih elektrokemijskih metoda pri određivanju koncentracije galne kiseline, odnosno pri procjeni antioksidacijske aktivnosti neke tvari.
5. Vodenim ekstraktima odabranih biljaka odrediti koncentraciju galne kiseline diferencijalnom pulsnom voltametrijom.
6. Vodenim ekstraktima odabranih biljaka odrediti ukupne fenole.
7. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima dobivenim klasičnom metodom i izvesti zaključke o mogućnosti primjene voltametrijskih metoda u procjeni antioksidacijske aktivnosti.

### **3. MATERIЈALI I METODE**



### 3.1. Kemikalije i priprava otopina

Za pripravu otopina potrebnih za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

**Tablica 1.** Korištene kemikalije

<b>Kemikalija</b>	<b>Molekulska formula</b>	<b>Dobavljač</b>
Dušična kiselina (65%)	HNO <sub>3</sub>	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Fosforna kiselina (85%)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck-Alkaloid, Skoplje
Klorovodična kiselina (36%)	HCl	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Octena kiselina (99,8 %)	CH <sub>3</sub> COOH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Etanol (96%)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Etanol (apsolutni)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Galna kiselina	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
N,N-Dimetilformamid (DMF)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	MerckKgaA, Darmstadt
Natrijev klorid	NaCl	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Kalijev klorid	KCl	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev hidrogenfosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev acetat	CH <sub>3</sub> COONa	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Željezo (III) klorid heksahidrat	FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Željezo(II) sulfat heptahidrat	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Folin-Ciocalteu reagens		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Jednozidne ugljikove nanocijevčice (SWCNT)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Višezidne ugljikove nanocijevčice (MWCNT)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

### **Otopina dušične kiseline ( $c = 0,5 \text{ mol/L}$ , $V = 1 \text{ L}$ )**

Otopina  $\text{HNO}_3$  koncentracije  $0,5 \text{ mol/L}$  pripravljena je razrjeđivanjem  $34,62 \text{ mL}$   $\text{HNO}_3$  (masenog udjela  $65\%$ ) do  $1 \text{ L}$  destiliranom vodom. Otopina služi za ispiranje troelektrodne ćelije i za ciklizaciju u svrhu čišćenja elektrode.

### **Simulirana želučana kiselina**

Koncentracija klorovodične kiseline u želučanoj kiselini iznosi oko  $0,155 \text{ mol/L}$  ( $\text{pH} = 1,45$ ). Ostali glavni sastojci želučane kiseline su kalijev i natrijev kation. Za pripremu  $1 \text{ L}$  želučane kiseline potrebno je  $13,31 \text{ mL}$   $\text{HCl}$ . U odgovarajuću čašu staviti  $800 \text{ mL}$  destilirane vode i dodati kiselinu. U tako pripravljenu kiselinu dodati  $5 \text{ g}$  natrijevog klorida i još  $5 \text{ g}$  kalijevog klorida. Priređenu otopinu prebaciti u odmjernu tikvicu i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

### **Fiziološki fosfatni pufer**

Koncentracija fiziološkog fosfatnog pufera iznosi oko  $0,1 \text{ mol/L}$  ( $\text{pH} = 7,4$ ). Ostali sastojci fiziološkog fosfatnog pufera su kalijev i natrijev kation. Za pripremu  $1 \text{ L}$  fiziološkog fosfatnog pufera : u odgovarajuću čašu staviti  $800 \text{ mL}$  destilirane vode te otopiti  $8 \text{ g}$   $\text{NaCl}$ ,  $200 \text{ mg}$   $\text{KCl}$  i  $1,44 \text{ g}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Priređenu otopinu prebaciti u odmjernu tikvicu i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

### **Priprava otopine galne kiseline ( $c = 0,01 \text{ mol/L}$ , $V = 25 \text{ mL}$ )**

$0,17 \text{ g}$  galne kiseline je dodano u destiliranu vodu i odmjerna tikvica je nadopunjena do konačnog volumena od  $10 \text{ mL}$ .

### **Zasićena otopina natrijeva karbonata**

Otopiti  $100 \text{ g}$  bezvodnog natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) u  $500 \text{ mL}$  vode kuhanjem. Ohladiti na sobnoj temperaturi uz dodatak nekoliko kristala natrijeva karbonata i filtrirati nakon  $24 \text{ sata}$ .

### **Priprava acetatnog pufera ( $c = 0,3 \text{ mol/L}$ , $V = 1 \text{ L}$ , $\text{pH} = 3,6$ )**

Otopiti  $3,1 \text{ g}$  natrijevog acetata,  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$  i  $16 \text{ mL}$  koncentrirane octene kiseline,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  u odmjernoj tikvici od  $1 \text{ L}$  s destiliranom vodom.

### Priprava klorovodične kiseline ( $c = 0,040 \text{ mol/L}$ , $V = 1 \text{ L}$ )

400 mL 0,1 mol/L HCl nadopuni sa destiliranom vodom do 1 L.

### Priprava otopine TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin)

U 50 mL klorovodične kiseline otopiti 159,4 mg TPTZ-a.

### Priprava otopine željezova (III) klorida ( $c = 0,020 \text{ mol/L}$ $V = 100 \text{ mL}$ )

Otopiti 551,6 mg željezo(III) klorida ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) u 100 mL destilirane vode.

### Priprava matične otopine standarda $\text{Fe}^{2+}$

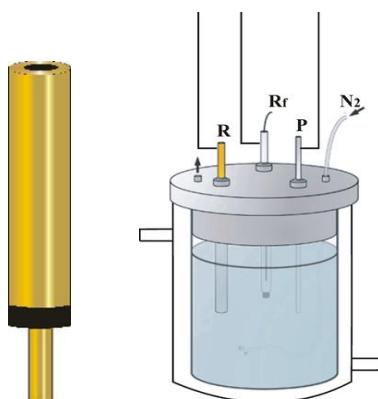
Matična otopina standarda pripravljena je otapanjem željezova(II) sulfata ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ). Od matične otopine pripravljene su otopine s različitim koncentracijama iona  $\text{Fe}^{2+}$ , od 100-1000  $\mu\text{mol/L}$ .

### Priprema radnog FRAP reagensa

Radni reagens FRAP-a pripravljan je svaki dan prije početka rada od : 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ otopine i 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ .

## 3.2. Metode

Na slici 10 prikazano je tijelo radne elektrode i shema aparature za elektrokemijska mjerenja.



**Slika 10.** Tijelo radne elektrode i shema aparature za elektrokemijska mjerenja. R – radna elektroda, Rf – referentna elektroda, P – protuelektroda (39).

### 3.2.1. Priprava elektroda

#### Priprava GC radne elektrode

Promjer elektroda: 6 mm

Površina elektroda:  $r^2\pi = 0,283 \text{ cm}^2$

Prije elektrokemijskih mjerenja elektrode su pripravljene na sljedeći način (39):

1. Mehanička priprema: - brušenje metalografskim brusnim papirom gradacije 1200, 2000, 3000, a nakon toga sukcesivno metalografskim brusnim pastama Buhler Micropolish Alpha Alumina finoće 1  $\mu\text{m}$  i 0,05  $\mu\text{m}$ . Elektroda je isprana u destiliranoj vodi i čišćena u ultrazvučnoj kupelji u destiliranoj vodi, kako bi se uklonile nečistoće zaostale nakon poliranja.
2. Kemijska priprema: ispiranje u destiliranoj vodi, etilnom alkoholu i redestiliranoj vodi, a zatim sušenjem u struji dušika 5 minuta.
3. Elektrokemijska priprema: u svrhu čišćenja i aktiviranja površine
  - I. Katodna predobrada 60 sekundi na potencijalu -1,2 V
  - II. Anodna predobrada 60 sekundi na potencijalu 1,2 V
  - III. Ciklizacija (50 ciklusa) - elektroda je ciklizirana u 0,5 mol/L  $\text{HNO}_3$  počevši od 0 V u katodnom smjeru do -1,0 V, u anodnom smjeru do 1,0 V te je završena na nuli uz brzinu promjene potencijala 100 mV/s.

Radna elektroda je imala stabilan i ponovljiv potencijal otvorenog strujnog kruga, što je bio pokazatelj dobro pripremljene površine.

#### Referentna elektroda

Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebroklorid elektroda, Ag/AgCl (3 mol/L KCl).

#### Protuelektroda

Kao protuelektroda korištena je elektroda od platinskog lima površine 1  $\text{cm}^2$ . Platinska protuelektroda u elektrokemijskoj ćeliji smještena je nasuprot radnoj elektrodi.

#### Modifikacija radne elektrode sa SWCNT i MWCNT

Za pripremu jednog sloja ugljikovih nanocjevčica na prethodno mehanički ili elektrokemijski pripremljenu GC elektrodu nanoseno je 15 mikrolitara suspenzije SWCNT (ili

MWCNT) te je elektroda sušena u sušioniku 30 minuta na 50 °C. Za drugi sloj postupak se ponovi.

Nakon nanošenja 2 sloja suspenzije i sušenja, elektroda je ciklizirana u 0,5 mol/L HNO<sub>3</sub> (deset ciklusa) u području potencijala od 0,0 V do 1,0 V te zatim u mjernom puferu pri istim uvjetima.

#### **Priprava suspenzije SWCNT ( $c=0,5$ mol/L, $V=10$ mL)**

5 mg SWCNT dodano je u 10 mL dimetilformamida (DMF) te je smjesa tretirana u ultrazvučnoj kupelji 2 sata za dobivanje homogene suspenzije pomoću uređaja Bandelin Sonorex SUPER RK 103 H.

#### **Priprava suspenzije MWCNT ( $c=0,5$ mol/L, $V=10$ mL)**

5 mg MWCNT dodano je u 10 mL dimetilformamida (DMF) te je smjesa tretirana u ultrazvučnoj kupelji 2 sata za dobivanje homogene suspenzije pomoću uređaja Bandelin Sonorex SUPER RK 103 H.

### **3.3. Elektrokemijska mjerenja**

Svi elektrokemijski eksperimenti izvedeni su pomoću potencioštata u standardnoj troelektrodnoj ćeliji volumena 50 mL. Na slici 11 prikazana je fotografija potencioštata, Autolab PGSTAT 302N sa softverom za prikupljanje i obradu podataka, GPES 4,9 Softwarea (Eco Chemie, Eco Utrecht, Nizozemska) koji je spojen na osobno računalo. Sve promjene su bilježene cikličkom voltametrijom u širokom rasponu potencijala od -1,0 do 1,0 V u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu.



**Slika 11.** Uređaj Autolab PGSTAT 302N, spojen na računalo i troelektrodna ćelija.

### 3.4. Spektrofotometrijska mjerenja

Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na uređaju Uređaj Cary 5000 UV-Vis-NIR spektrofotometar u području valnih duljina vidljive svjetlosti te na određenim fiksnim valnim duljinama ovisno o metodi. Dobiveni podaci su analizirani pomoću Cary WinUV softwara. Cary 5000 je UV-VIS-NIR spektrofotometar visokih performansi s izvrsnim fotometrijskim značajkama. Može mjeriti apsorbanciju(transmitanciju) uzoraka u širokom području valnih duljina, od 175 do 3300 nm te postaje moćan alat za znanstvena istraživanja.

### 3.5. Priprava i karakterizacija realnih uzoraka

Odabrani realni uzorci: kadulja, timijan, ružmarin, islandski lišaj, matcha prah i goji bobice prikazani su na slici 12. Odabrano suho bilje kupljeno je u lokalnom marketu zdrave prehrane.

Realni uzorci pripremljeni su ekstrakcijom 5 grama biljnog materijala u 80 mL redestilirane vode. Uzorci su ekstrahirani u čašama prekrivenim parafinskom folijom tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi (Slika 13). Nakon 24 sata uzorci su filtrirani te su filtratima odmah određeni ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost predloženim metodama.

Na isti način su uzorci priređeni i za elektrokemijska mjerenja, odnosno za određivanje galne kiseline diferencijalnom pulsnom voltametrijom.



**Slika 12.** Odabrano bilje za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.



**Slika 13.** Vodena ekstrakcija.

### 3.6. Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola

Za izradu standardne krivulje pripravljene su otopine galne kiseline različitih koncentracija koje su ustvari radni standardi koncentracija 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L (Slika 14). 250  $\mu\text{L}$  otopine standarda miješa se s 15 mL destilirane vode, 1250  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa, 3750  $\mu\text{L}$  zasićene otopine natrijeva karbonata, dobro se promućka i nadopuni do oznake s vodom (odmjerna tikvica od 25 mL) i ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku.

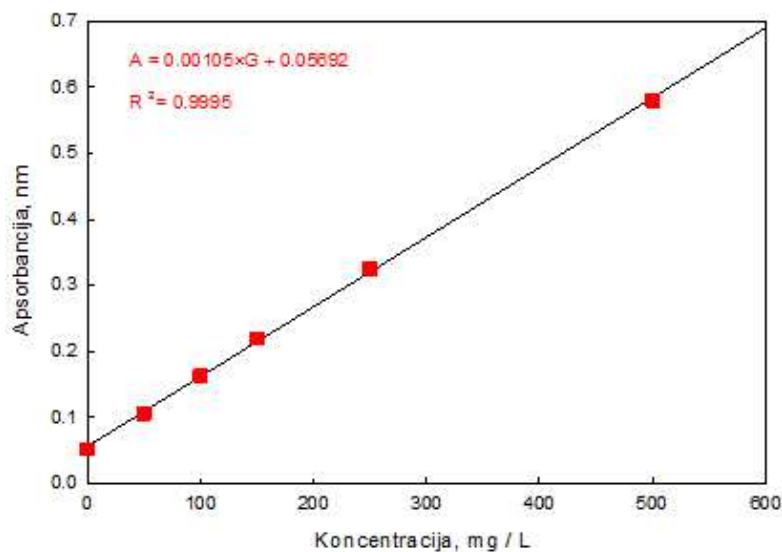


**Slika 14.** Priprema otopina galne kiseline za izradu krivulje umjeravanja.

Nakon 2 sata mjeri se apsorbancija svake otopine kod 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm. Konstruirana standardna krivulja koncentracija prema apsorbanciji (Slika 16) služi za procjenu ukupnih fenola u uzorcima. Vrijednosti za krivulju umjeravanja prikazane u Tablici 2.

**Tablica 2.** Vrijednosti apsorbancije za konstruiranje krivulje umjeravanja za standard galna kiselina.

Koncentracija, mg/L	Srednja vrijednost apsorbancije	Standardna devijacija
0,00	0,0527	$\pm 2,70 \times 10^{-4}$
50,00	0,1063	$\pm 4,00 \times 10^{-5}$
100,00	0,1636	$\pm 1,50 \times 10^{-4}$
150,00	0,2202	$\pm 1,60 \times 10^{-4}$
250,00	0,3255	$\pm 4,00 \times 10^{-5}$
500,00	0,5798	$\pm 3,00 \times 10^{-5}$



**Slika 15.** Krivulja umjeravanja standarda galne kiseline.

Iz krivulje umjeravanja slijedi matematički izraz za račun ukupnih fenole prema standardu galna kiselina, iz kojeg se dolazi do rezultata za ukupne fenole prema standardu galne kiseline:

$$A = 0,00105 \times G + 0,057$$

gdje je G masena koncentracija galne kiseline izražena mg/L uzorka.



### 3.7. FRAP metoda (eng. *Ferric reducing/Antioxidant power*) - određivanje antioksidacijske aktivnosti

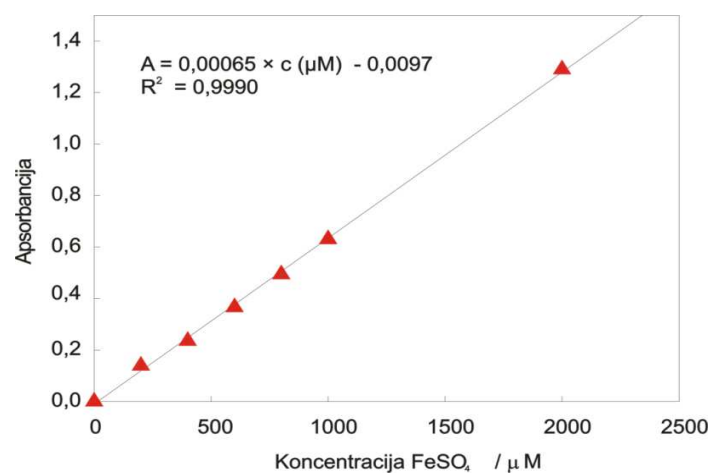
Radni reagens FRAP-a pripravljan je svaki dan prije početka rada od 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ otopine i 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ . Svježe pripravljeni FRAP reagens zagrijan je na  $37^\circ\text{C}$ . U kivetu od 10 mm staviti 1,5 mL FRAP reagensa i očitati apsorbanciju reagensa kod 593 nm ( $A_0$ ). Nakon toga u kivetu s FRAP reagensom dodati 50  $\mu\text{L}$  uzorka (koji se testira) i 150  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Pratiti promjenu apsorbancije kod 593 nm tijekom 4 minute i nakon 10 minuta. Stvara se plavo obojenje koje ima apsorpcijski maksimum kod 593 nm. Mjerenje traje 4 minute i nakon 10 minuta počevši od trenutka kada je dodan uzorak koji se analizira. Za svaki uzorak izračunati promjenu apsorbancije ( $\Delta A$ ) prema jednadžbi:

$$\Delta A = A - A_0$$

Promjenu apsorbancije uzorka usporediti s promjenom apsorbancije izazvane dodatkom standardne otopine iona  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $c(\text{Fe}^{2+})=1000 \mu\text{mol/L}$ , ( $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}}$ ) i izračunati FRAP vrijednost uzorka prema jednadžbi:

$$\text{FRAP } (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A / \Delta A_{\text{Fe}^{2+}}) \times 1000$$

FRAP metodom je učinak antioksidansa u analizi izračunat u odnosu na signal reakcije iona  $\text{Fe}^{2+}$  poznate koncentracije, a koja predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona.



**Slika 16.** Krivulja umjeravanja za standardnu otopinu  $\text{FeSO}_4$ , za FRAP metodu određivanja antioksidacijskog kapaciteta.

Iz krivulje umjeravanja standarda  $\text{FeSO}_4$  slijedi matematički izraz, iz kojeg se dolazi do rezultata za antioksidacijsku aktivnost prema standardu  $\text{FeSO}_4$ :

$$A = 0,00065 \times C + 0,0097$$

gdje je C množinska koncentracija u  $\mu\text{mol}$  po litri uzorka.

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Elektrokemijska mjerenja

### 4.1.1. Rezultati cikličke voltametrije

Elektrokemijska karakterizacija priređenih modificiranih elektroda provedena je cikličkom voltametrijom i uspoređena s nemodificiranom GC elektrodom. U širokom području potencijala snimljeni su ciklički voltamogrami (od  $-1,0$  V do  $+1,0$  V vs. Ag|AgCl). Procedura svih mjerenja je uključivala vrijeme uravnotežavanja na potencijalu otvorenog strujnog kruga ( $E_{osk}$ ), zatim u katodnom smjeru, povratno u anodnom smjeru i natrag na  $E_{osk}$ . Brzina promjene potencijala prikazana je za cikličke voltamograme ispod slike.

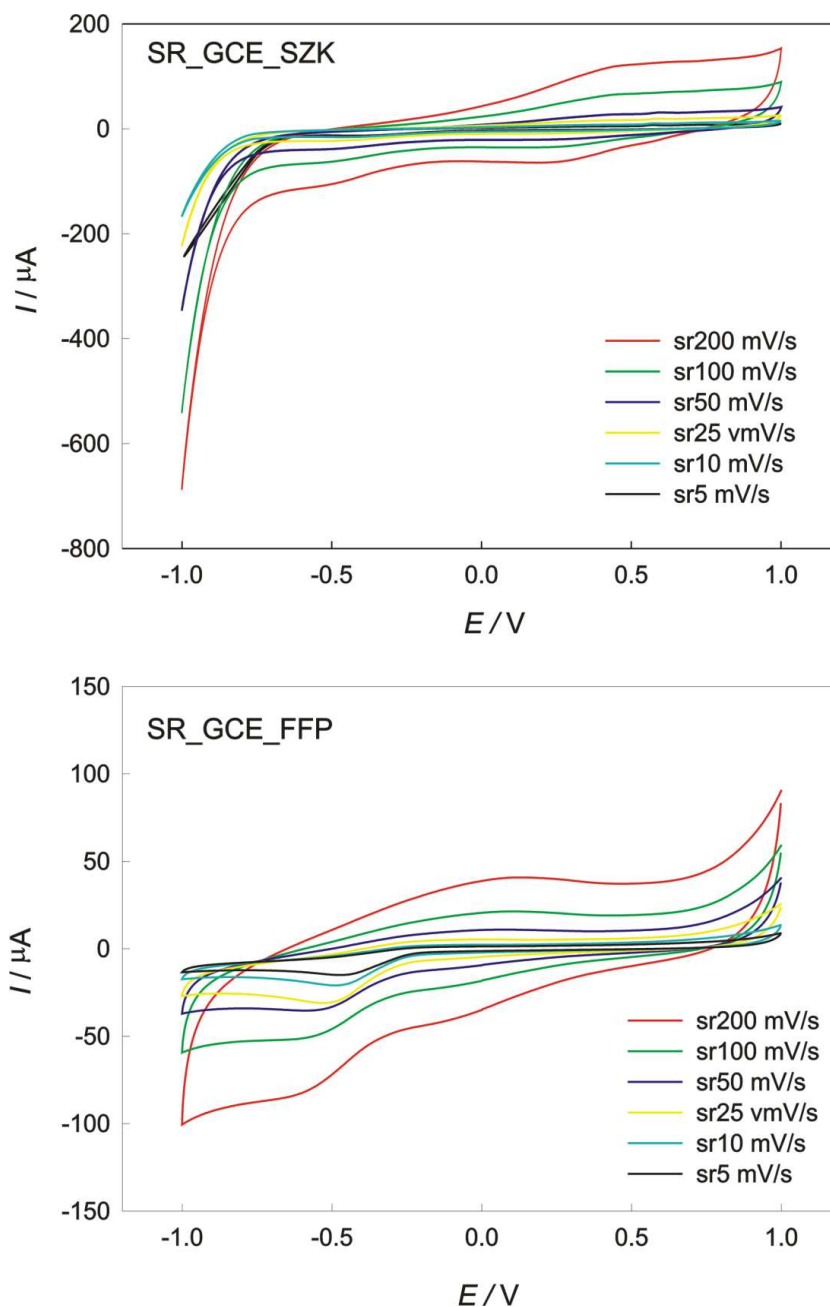
Ekperimentalni dio ovog rada je imao za cilj pokazati ponašanje galne kiseline u fiziološkim uvjetima, odnosno u uvjetima gdje neki fenol mora pokazati svoje antioksidacijsko djelovanje. Za ispitivanje mehanizma oksidacije, odnosno studiju antioksidacijskog djelovanja priređene su ukupno 3 elektrode, kao što je opisano u sekciji Ekperimentalni dio. Ponašanje elektroda u prisutnosti galne kiseline je studirano u dva odabrana elektrolita:

- Niži pH - simulirana želučana kiselina (SZK), koncentracije  $0,155$  mol/L (pH =  $1,45$ ) i
- Viši pH - fiziološki fosfatni pufer (FFP), koncentracije  $0,1$  mol/L (pH =  $7,4$ ).

Cilj modifikacija ugljikovim nanocjevčicama usmjeren je k razvoju filma s visokom intersticijskom aktivnošću, odnosno postojanjem aktivnih međuprostora, koji će omogućiti i olakšati prijenos elektrona određene reakcije između elektrolita/analita i elektrode. Takve elektrode trebaju imati visoko poroznu strukturu, koja može osigurati dovoljno kanala za transport analita unutar filma na elektrodi. Upravo se ove poželjne osobine mogu pronaći kod jednozidnih i višezidnih ugljikovih nanocjevčica. Velika aktivna površina, porozna struktura i svojstva dobrih vodiča poput metala su iskorištena u cilju dobivanja dobrih svojstava modifikacije za ciljanu primjenu.

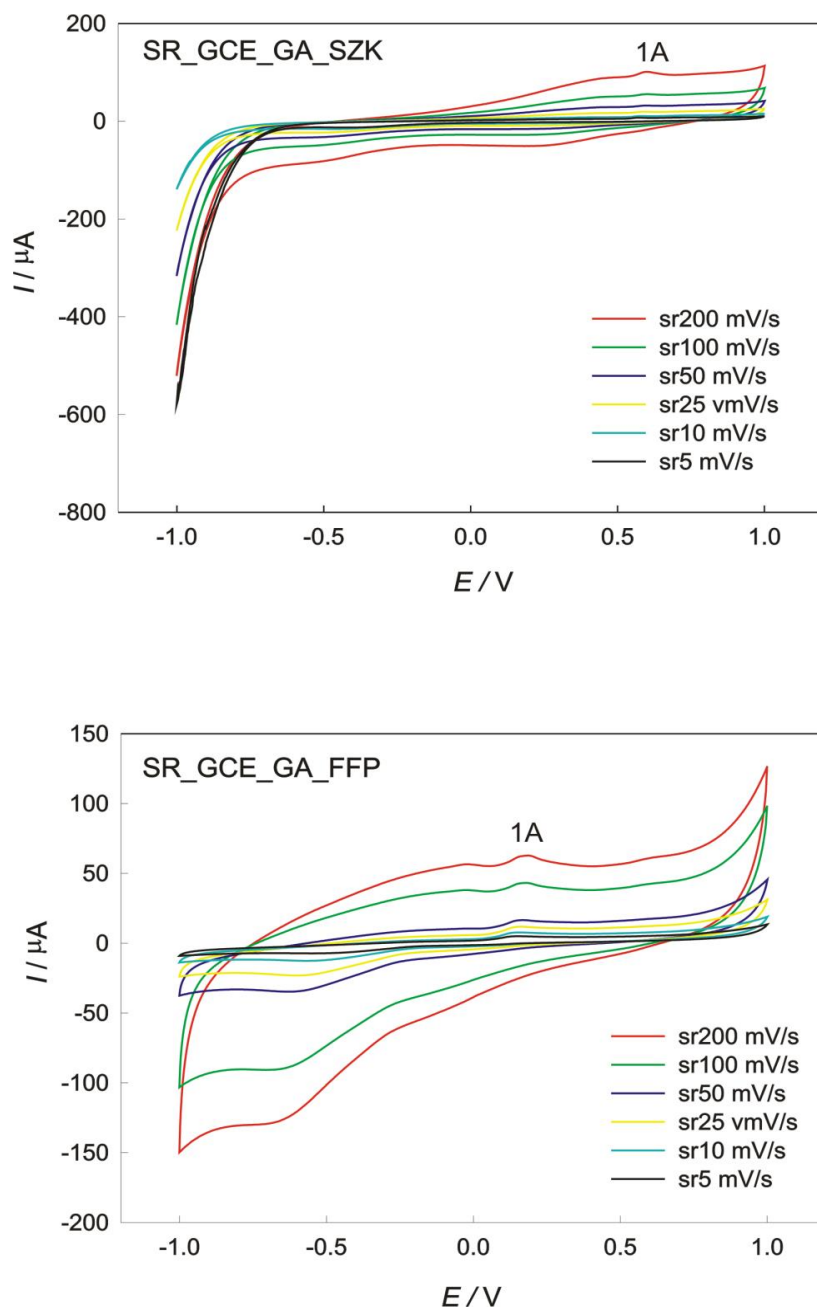
Na Slikama 17, 18 i 19 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na nemodificiranoj GC elektrodi u odabranim elektrolitima bez prisutnosti galne kiseline (slika 17 i 18) i u prisutnosti galne kiseline, koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L (slika 19 i 20). Praćen je utjecaj brzine promjene potencijala na elektrokemijsko ponašanje GC elektrode.

Slika 17 predstavlja cikličke voltamograme GC elektrode u različitim puferima. Uočava se katodna reakcija izlučivanja vodika pri potencijalu nižem od -0,6 V koja je izraženija u uvjetima niže pH vrijednosti pufera, odnosno pri pH vrijednosti 1,45 koja odgovara simuliranoj želučanoj kiselini. Pri pozitivnim vrijednostima potencijala ne uočavaju se nikakve značajne reakcije. Iz cikličkih voltamograma možemo uočiti kako porastom brzine promjene potencijala rastu vršne struje.



**Slika 17.** Ciklički voltamogrami GC elektrode u otopini SZK i FFP bez prisutnosti galne kiseline - utjecaj brzine promjene potencijala.

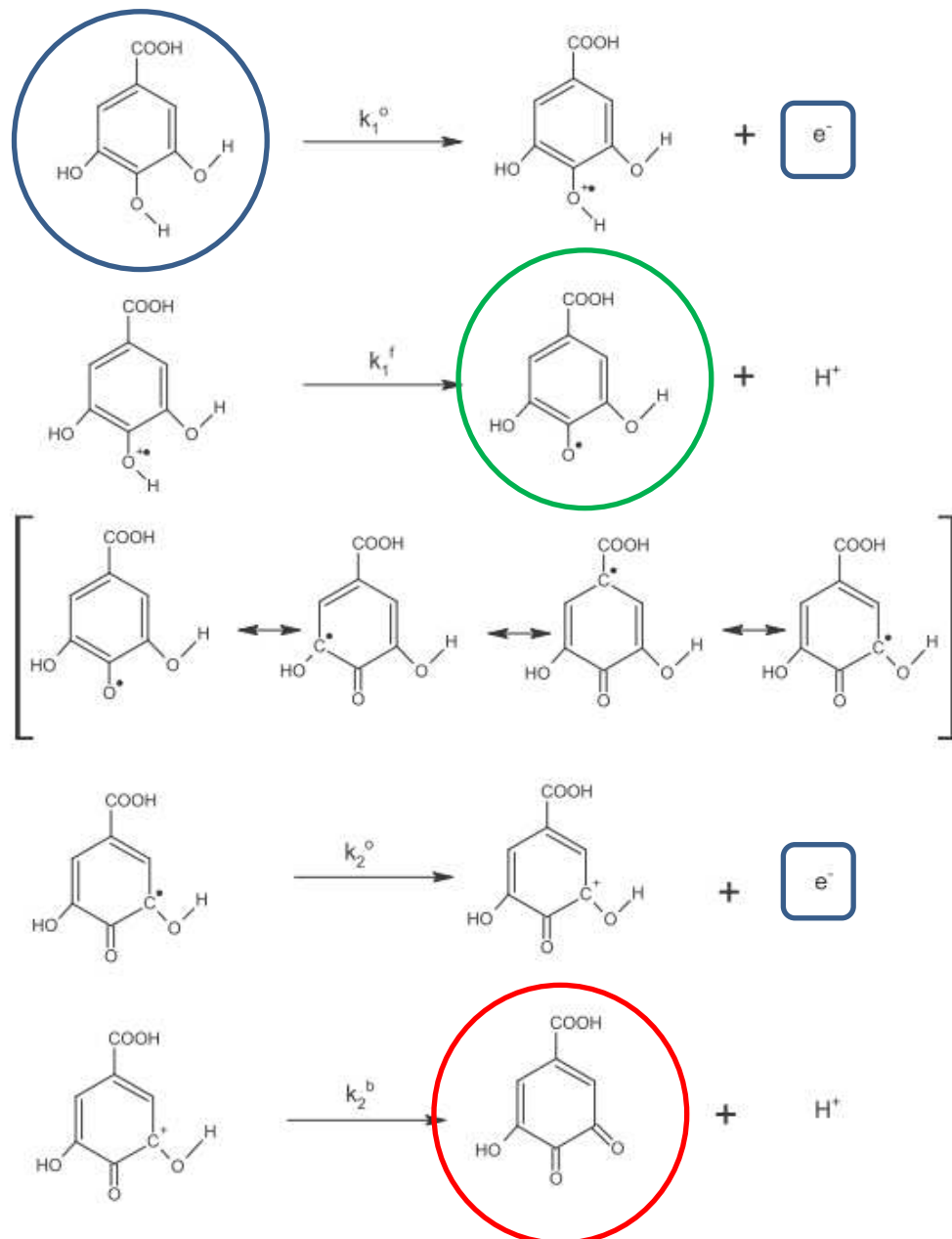
Slika 18 predstavlja cikličke voltamograme GC elektrode u različitim puferima uz dodatak galne kiseline. Kao i na prijašnjoj slici uočavamo katodnu reakciju izlučivanja vodika pri nižoj pH vrijednosti. Pri nižoj pH vrijednosti uočavamo i anodni pik (1A) koji odgovara prvom stupnju oksidacije galne kiseline, odnosno stvaranju semikinona.



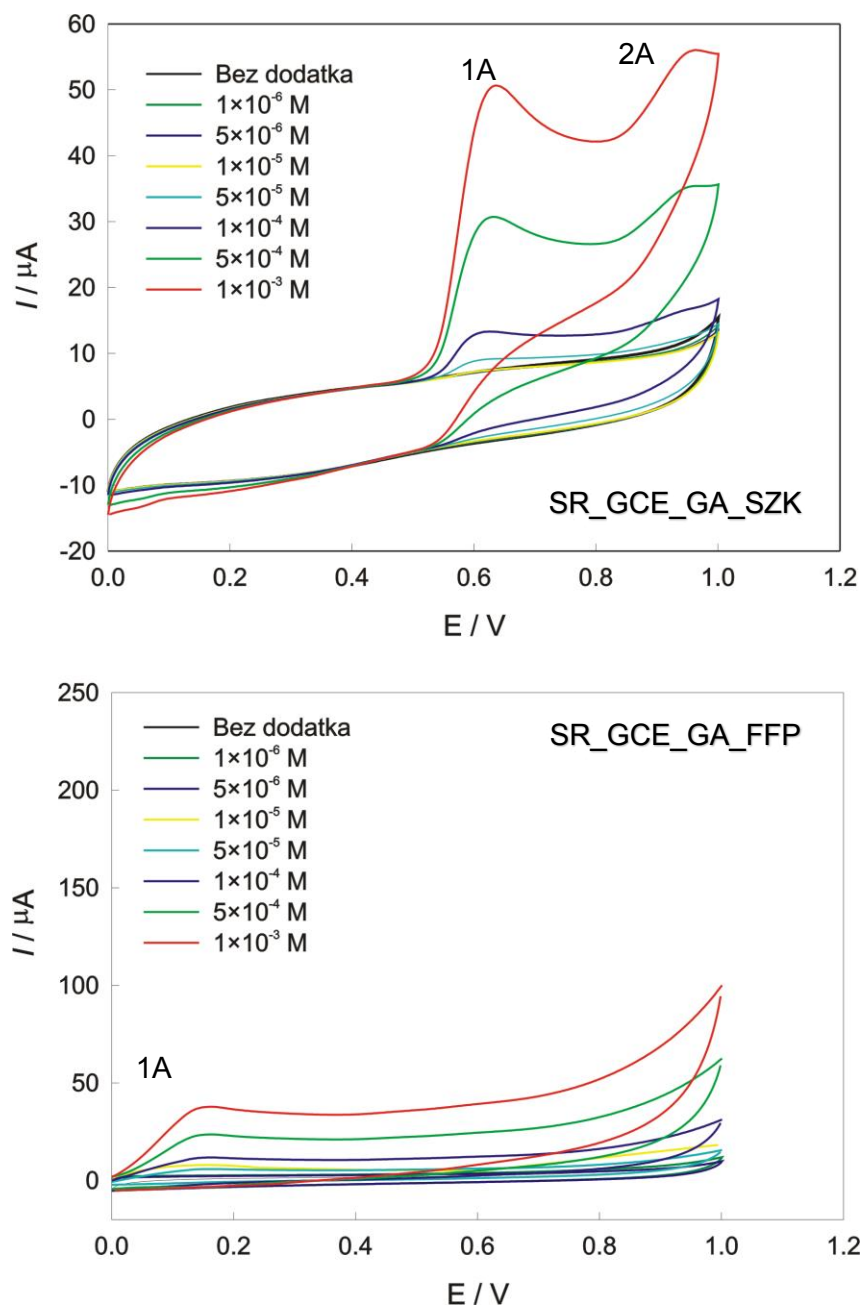
**Slika 18.** Ciklički voltamogrami GC elektrode u otopini SZK i FFP u prisutnosti galne kiseline, koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L – utjecaj brzine promjene potencijala.

Nakon što smo odabrali optimalnu brzinu promjene potencijala proveli smo mjerenje uz sukcesivni dodatak galne kiseline, ali u užem području potencijala od 0,0 V do +1,0 V. U

oba pufera povećanjem koncentracije galne kiseline uočava se porast anodne struje. U simuliranoj želučanoj kiselinu uočavamo dva anodna pika (1A, 2A) koji odgovaraju oksidaciji galne kiseline. Prvi strujni vrh na potencijalu približno +0,6 V, a drugi na približno +0,9 V. Katodni strujni vrhovi nisu zamijećeni, to sugerira ireverzibilnu reakciju. Pri ovim uvjetima reakcija oksidacije galne kiseline ide u dva stupnja kao što je prikazano Shemom 1, gdje galna kiselina u prvom stupnju daje semikinonski radikal a u drugom kinon.

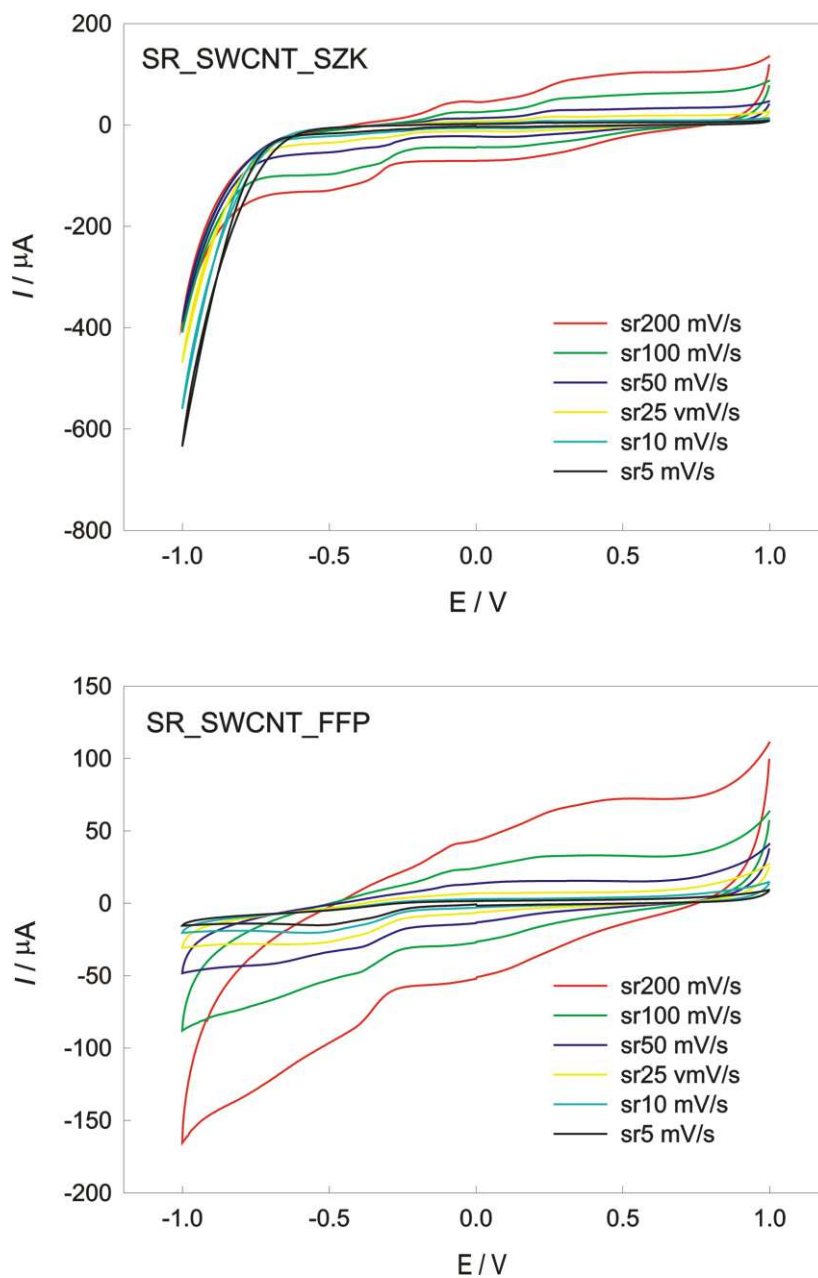


**Shema 1.** Detaljni shematski prikaz reakcije oksidacije galne kiseline (40).



**Slika 19.** Ciklički voltamogrami GC elektrode u otopini SZK i FFP uz sukcesivni dodatak galne kiseline – brzina promjene potencijala 25 mV/s.

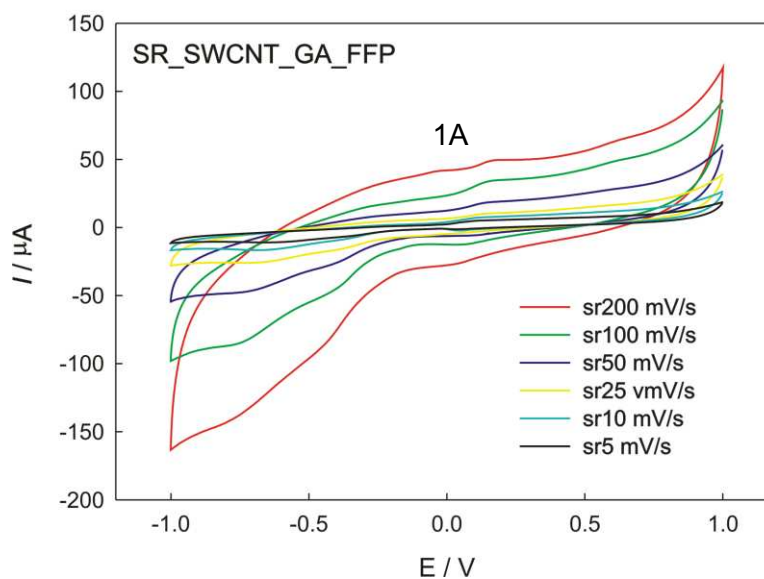
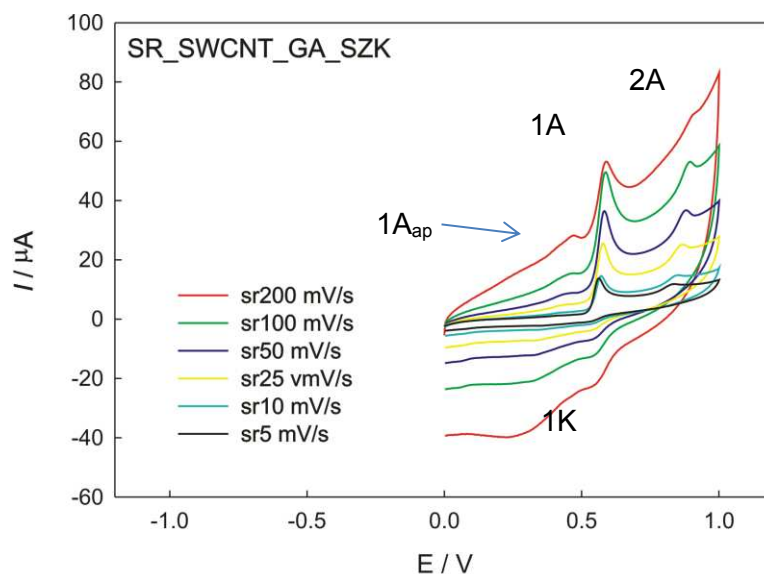
Kako bi se povećala osjetljivost elektroda je modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama. Na Slikama 20, 21 i 22 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na GC elektrodi modificiranoj jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama (SWCNT) u odabranim elektrolitima bez prisutnosti galne kiseline (slika 20) i u prisutnosti galne kiseline, koncentracija 1×10<sup>-4</sup> mol/L (slika 21). Praćen je utjecaj brzine promjene potencijala na elektrokemijsko ponašanje SWCNT elektrode.



**Slika 20.** Ciklički voltamogrami SWCNT elektrode u otopini SZK i FFP bez prisutnosti galne kiseline - utjecaj brzine promjene potencijala.

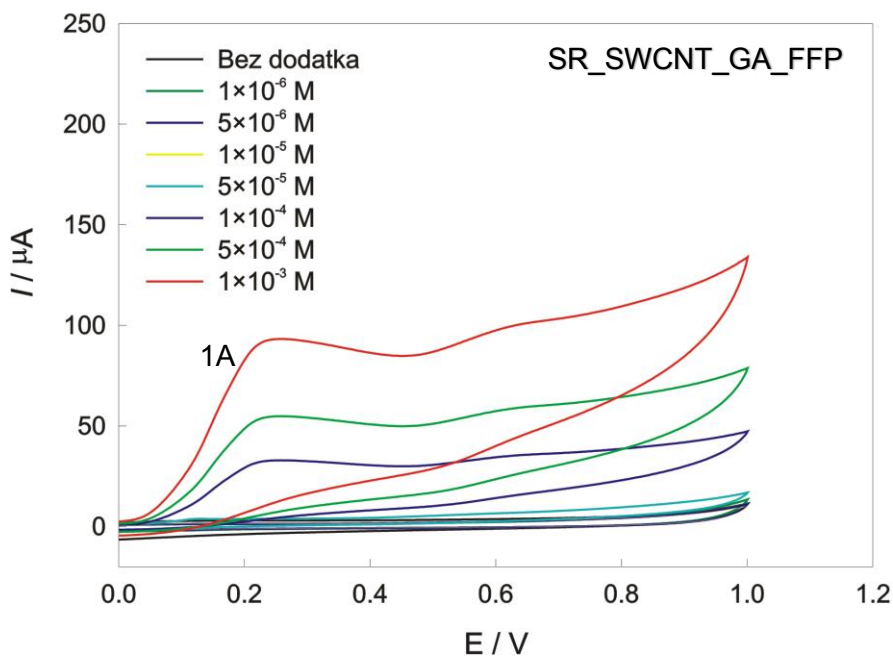
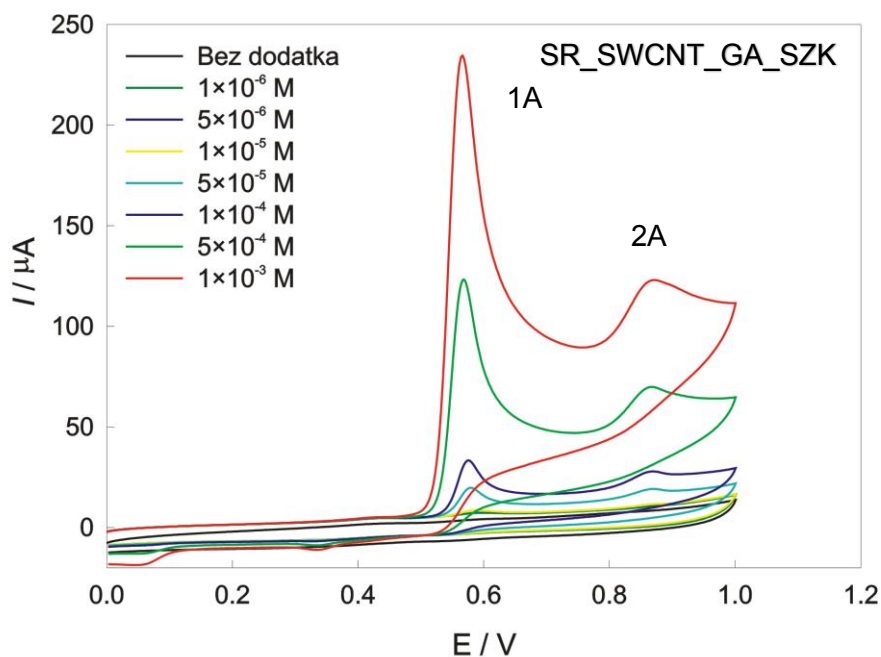
Kao i u prijašnjim mjerenjima uočavamo pojavu katodne reakcije izlučivanja vodika pri nižoj pH vrijednosti. Pri višoj pH vrijednosti ne uočavaju se nikakve značajne reakcije. U području oksidacije blagi porast vršnih struja ukazuje na neke procese u samom elektrodnom materijalu. Te promjene su izraženije u fosfatnom puferu te ih možemo pripisati i reakcijama iz elektrolita. Porastom brzine promjene potencijala uočava se i porast anodnih vršnih struja. Možemo zaključiti kako visoke vrijednosti brzine promjene potencijala u danim uvjetima nisu poželjne za ovaj tip modifikacije.





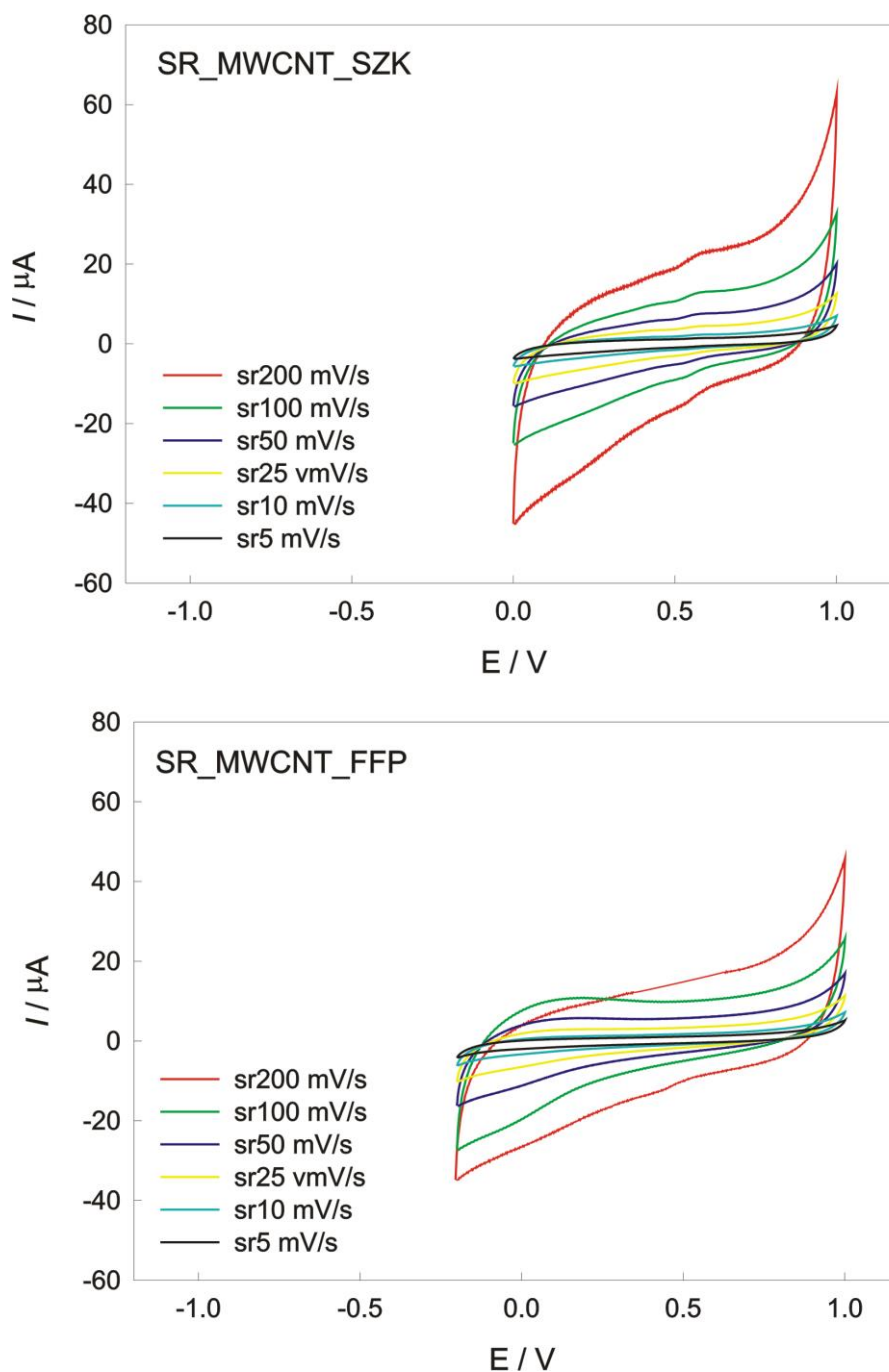
**Slika 21.** Ciklički voltamogrami SWCNT elektrode u otopini SZK i FFP u prisutnosti galne kiseline, koncentracija  $1 \times 10^{-4}$  mol/L - utjecaj brzine promjene potencijala.

Ponovno je kao optimalna brzina promjene potencijala odabrana brzina od 25 mV/s za sukcesivno dodavanje galne kiseline. Kao i u prijašnjim mjerenjima niži pH pokazao se pogodnijim za reakciju oksidacije galne kiseline. Mjerenje u oba pufera provedeno je u užem području potencijala (0,0 V do +1,0 V). U otopini simulirane želučane kiseline uočavaju se dva vrlo izražena anodna pika (1A, 2A) s visokim anodnim strujama. Pri ovoj brzini promjene potencijala ne uočava se pik koji bi mogao ukazivati na reverzibilnost reakcije.



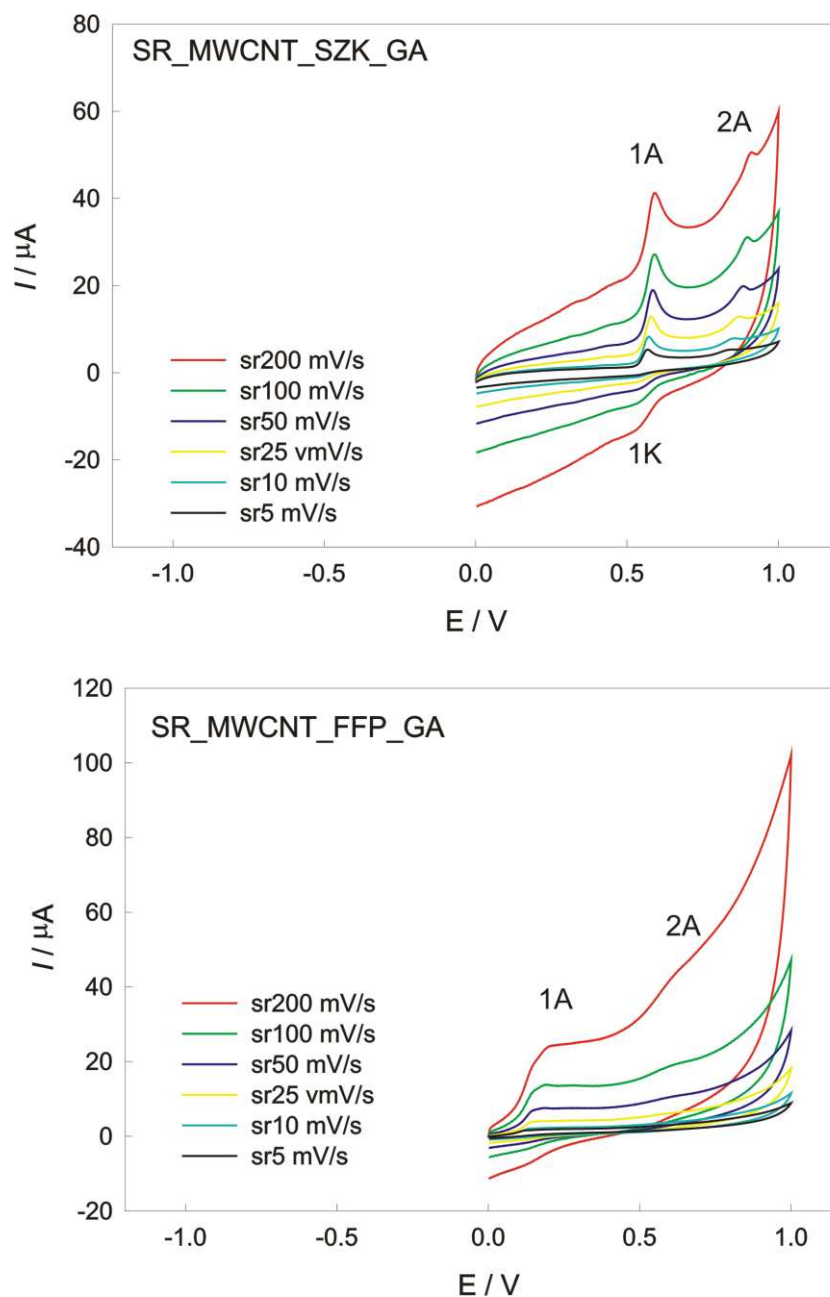
**Slika 22.** Ciklički voltamogrami SWCNT elektrode u otopini SZK i FFP uz sukcesivni dodatak galne kiseline – brzina promjene potencijala 25 mV/s.

Nakon mjerenja provedenih na GC elektrodi i na GC elektrodi modificiranoj jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama, mjerenje je provedeno na GC elektrodi modificiranoj višezidnim ugljikovim cjevčicama. Na Slikama 23, 24 i 25 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na GC elektrodi modificiranoj višezidnim ugljikovim nanocjevčicama (MWCNT) u odabranim elektrolitima bez prisutnosti galne kiseline (slika 23) i u prisutnosti galne kiseline, koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L (slika 24). Praćen je utjecaj brzine promjene potencijala na elektrokemijsko ponašanje MWCNT elektrode.



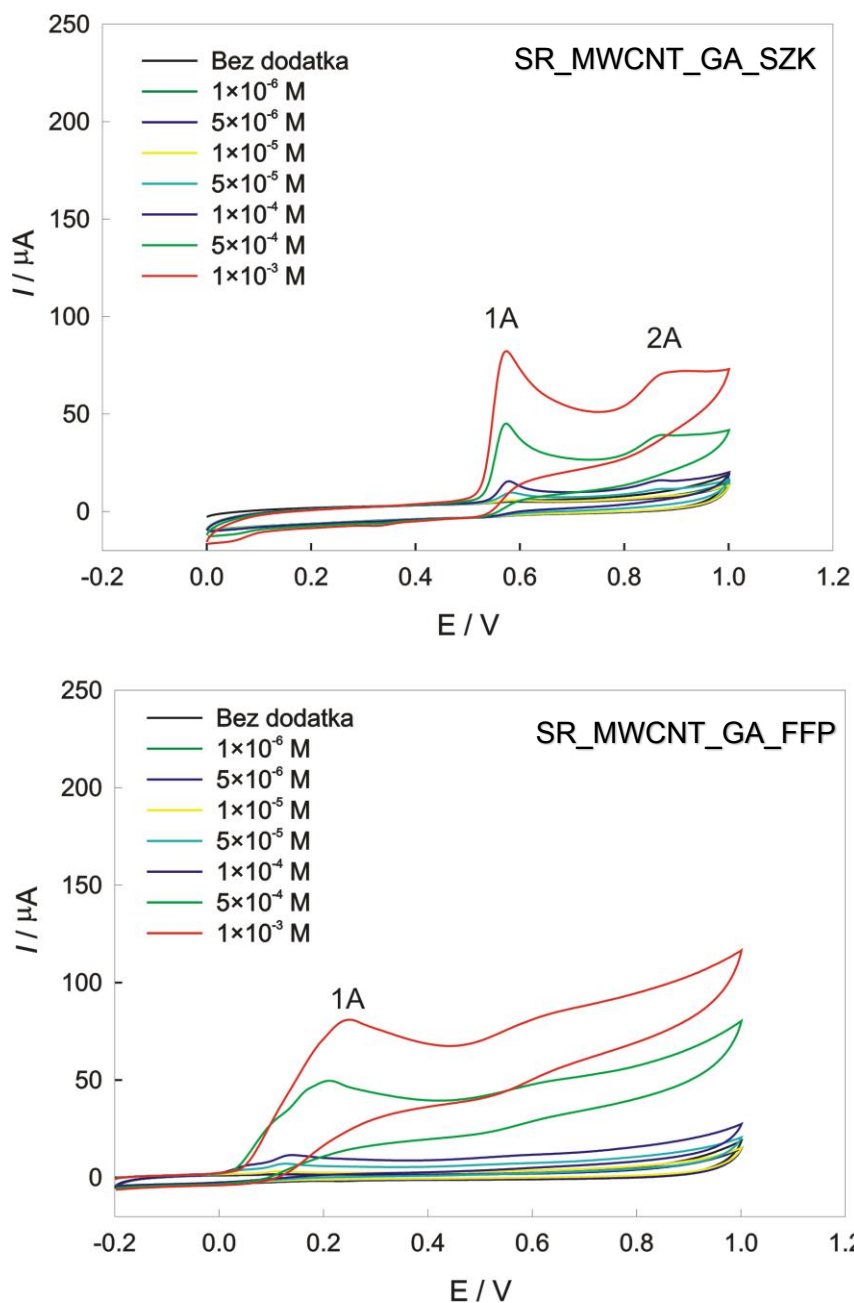
**Slika 23.** Ciklički voltamogrami MWCNT elektrode u otopini SZK i FFP bez prisutnosti galne kiseline - utjecaj brzine promjene potencijala.

Mjerenje bez prisutnosti galne kiseline provedeno je u uskom području potencijala (0,0 V do +1,0 V) kako bi se izbjeglo katodno izlučivanje vodika u SZK puferu. Mjerenja su pokazala kako negativne vrijednosti potencijala znatno mijenjaju odziv MWCNT modificirane elektrode u odnosu na SWCNT i GC nedomificiranu elektrodu. Porastom brzine promjene potencijala, kao i u prijašnjim mjerenjima, uočava se porast anodnih vršnih struja.



**Slika 24.** Ciklički voltamogrami MWCNT elektrode u otopini SZK i FFP u prisutnosti galne kiseline, koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L - utjecaj brzine promjene potencijala.

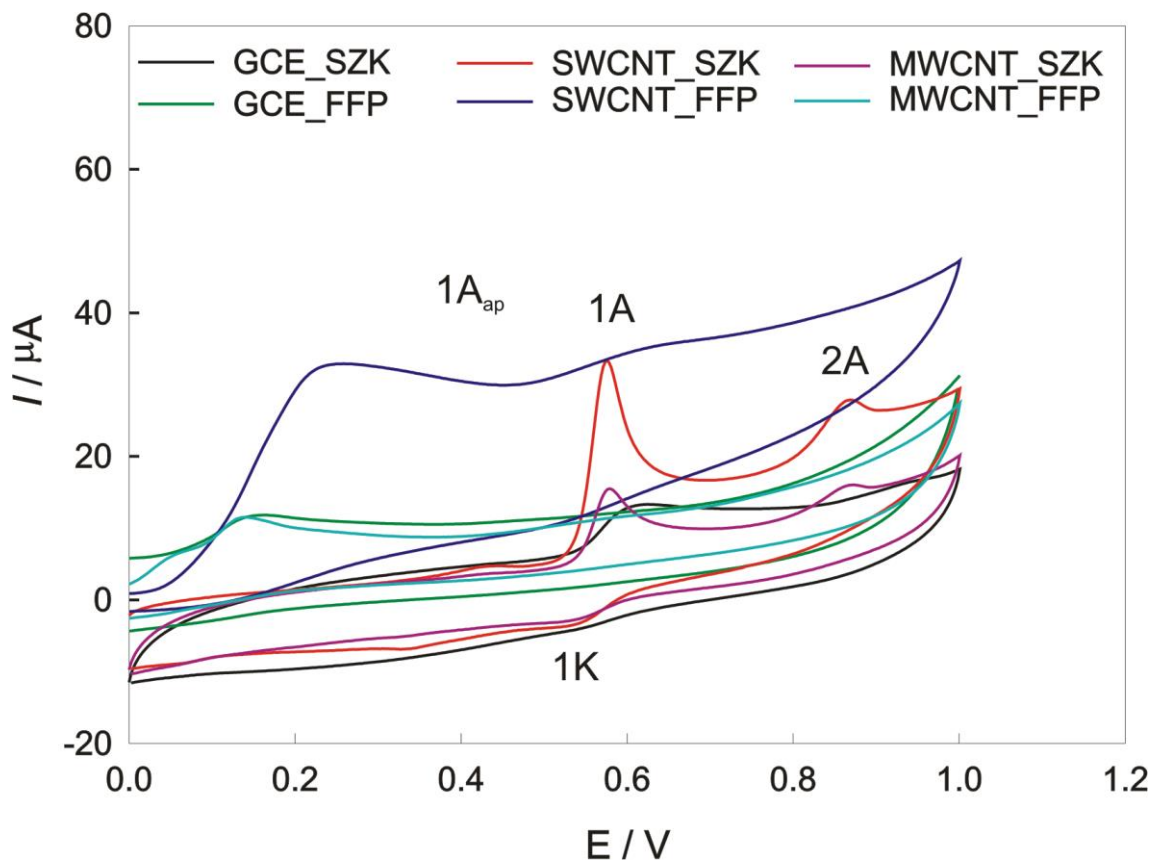
Dodatkom galne kiseline (slika 24), uočavamo dva anodna pika na cikličkim voltamogramima za mjerenja u obje otopine, no pikovi vezani uz oksidaciju u fosfatnom fiziološkom puferu i dalje nisu toliko jasno izraženi. U otopini simulirane želučane kiseline pri većim brzinama promjene potencijala uočavamo porast katodne struje (1K) koji ukazuje na kvazireverzibilnost reakcije oksidacije galne kiseline.



**Slika 25.** Ciklički voltamogrami MWCNT elektrode u otopini SZK i FFP uz sukcesivni dodatak galne kiseline – brzina promjene potencijala 25 mV/s.

Ciklički voltamogrami MVCNT uz sukcesivno dodavanje galne kiseline prikazani na slici 25 ukazuju na bolju osjetljivosti modificirane u odnosu na nemodificiranu GC elektrodu. Rezultati dobiveni na MWCNT pri brzini promjene potencijala od 25 mV/s pokazuju niže vrijednosti anodne struje od oni zabilježenih u mjerenjima provedenim s SWCNT. Ponovno uočavamo dva vrlo izražena anodna pika u SZK puferu, koji sugeriraju dvostupanjsku reakciju oksidacije galne kiseline. Pri ovoj brzini promjene potencijala ni na ovom cikličkom voltamogramu ne uočavamo pik koji ukazuje na reverzibilnost reakcije.

Nakon predmjerenja uspoređeni su rezultati svih priređenih elektroda te su ciklički voltamogrami za sve tri elektrode u oba elektrolita prikazani na slici 26.



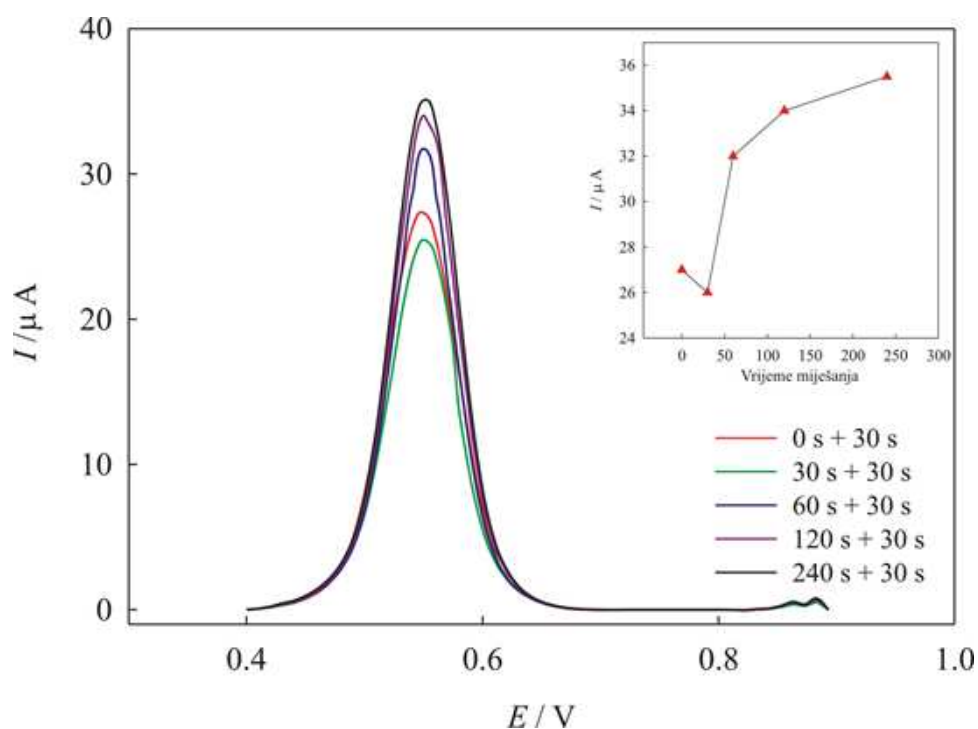
**Slika 26.** Ciklički voltamogrami svih elektroda u otopini SZK i FFP u prisutnosti galne kiseline, koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L – brzina promjene potencijala 25 mV/s.

Iz slike se može vidjeti kako se pri brzini promjene potencijala od 25 mV/s najveće anodne vršne struje oksidacije postižu u reakcijama koje se odvijaju na GC elektrodi modificiranoj jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama. Jasno izraženi pikovi u mjerenjima provedenim u simuliranoj želučanoj kiselini, dovode nas do zaključka kako oksidaciji galne kiseline pogoduju kiseli uvjeti.

Za provedbu ostalih elektrokemijskih mjerenja odabrana je GC elektroda modificirana s jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama u simuliranoj želučanoj kiselini.

#### 4.1.2. Rezultati diferencijalne pulsne voltametrije

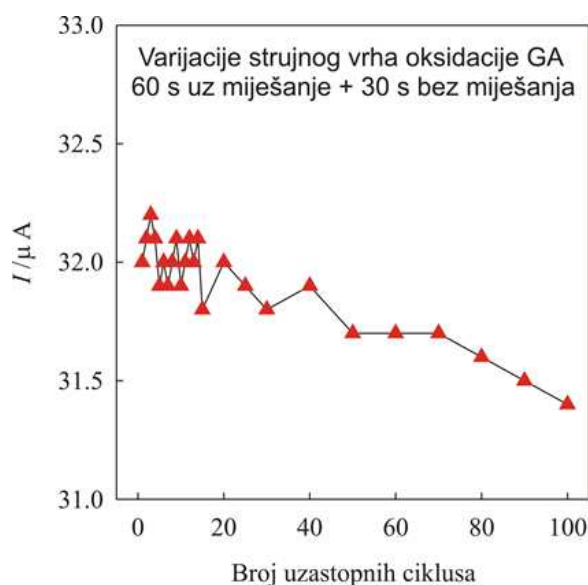
Predkoncentracija, odnosno utjecaj vremena akumulacije, prikazan na slici 27 na struju anodnog strujnog vrha praćena je u širokom vremenskom intervalu na potencijalu akumulacije  $E_{ac}=400$  mV. Optimirani su i odabrani parametri, amplituda naponskog impulsa,  $\Delta E_p=50$  mV i potencijal pomaka,  $\Delta E_s=10$  mV, DPV metodom. Nije zamijećena linearnost obzirom na vrijeme miješanja, ali nakon 60 s možemo vidjeti kako odziv opada što sugerira zasićenost površine galnom kiselinom. Za daljnja mjerenja odabrano je vrijeme akumulacije od 90 s, odnosno 60 s uz miješanje i propuhivanje te slijedi 30 s bez miješanja u atmosferi dušika. Promjene vremena akumulacije nisu uzrokovale pomak potencijala redukcije galne kiseline te je potencijal oksidacije na vrijednosti 551 mV. (NAPOMENA: množinska koncentracija galne kiseline u otopini  $1 \mu\text{mol/L}$  odgovara masenoj koncentraciji  $0,170 \text{ mg/L}$ .)



**Slika 27.** Utjecaj vremena predakumulacije na strujni vrh oksidacije u otopini SZK pH = 1,45) uz dodatak  $1 \mu\text{mol/L}$ , odnosno  $0,170 \text{ mg/L}$  galne kiseline. Optimiranje vremena akumulacije je izvedeno uz potencijal akumulacije,  $E_{ac}=400$  mV,  $\Delta E_s = 10$  mV i  $\Delta E_p = 50$  mV.

Pod optimalnim eksperimentalnim uvjetima ispitana je ponovljivost predložene metode za određivanje galne kiseline na SWCNT unutar približno tri sata (Slika 28). Ograničavajući faktor za određivanje galne kiseline je činjenica kako se ona počinje raspadati

pod utjecajem svjetlosti i kisika, a raspad rapidno raste nakon 3 sata (41). Raspad galne kiseline uočava se jasno samom promjenom boje otopine. Pri nižem pH pojava zamućenja, odnosno pojava modre boje, pri višem pH ukazuje na promjenu sastava analita. Uzastopnim mjerenjem signala odziva nakon pedeset ponovljenih mjerenja u otopini SZK (pH = 1,45) uz dodatak 1  $\mu\text{mol/L}$  galne kiseline dobivena je relativna standardna devijacija (RDS) u iznosu od 1,9%, koja ukazuje na dobru ponovljivost i stabilan odziv modificirane GC elektrode prema galnoj kiselini.



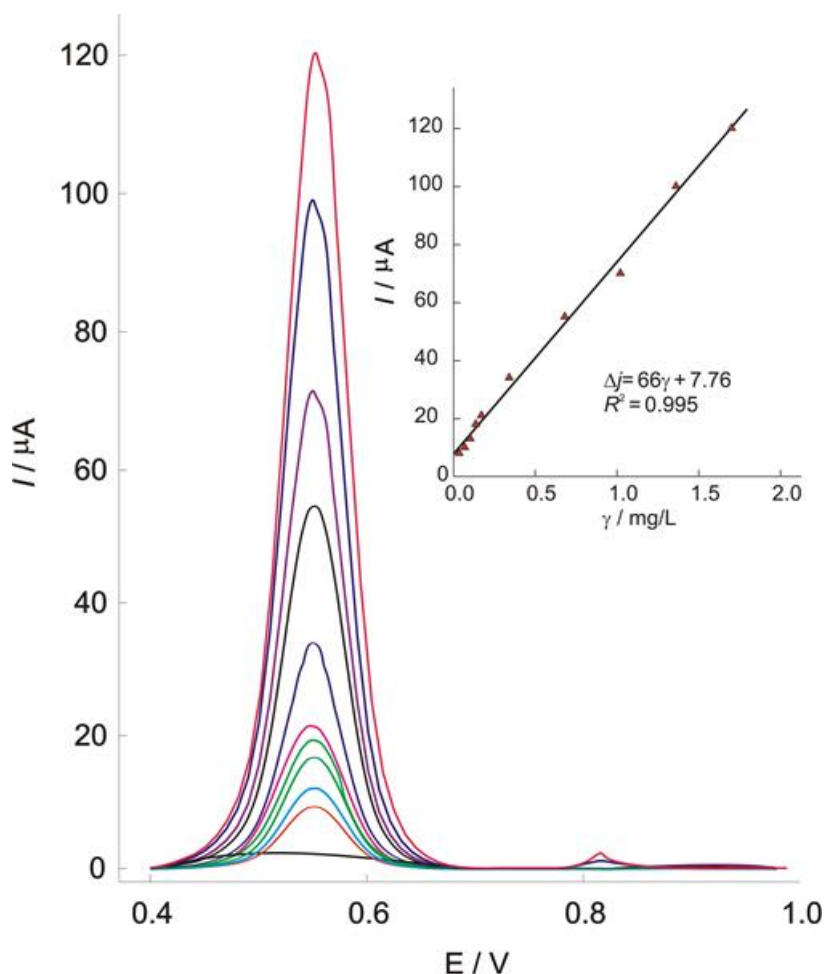
**Slika 28.** Ispitivanje ponovljivosti predložene metode za određivanje galne kiseline na SWCNT–GC elektrodi u otopini SZK pH = 1,45 uz dodatak 1  $\mu\text{mol/L}$ , odnosno 0,170 mg/L galne kiseline, unutar približno tri sata.

Za primjenu diferencijalne pulsne voltametrije u svrhu analitičke primjene ispitana je i linearnost ovisnosti struje oksidacije o koncentraciji galne kiseline. Rezultati DPV u prisutnosti različitih koncentracija, odnosno različitih dodataka standardne otopine galne kiseline, prikazani su na slici 29 i 30, s odgovarajućim krivuljama odnosno grafikonima umjeravanja odnosno kao isječcima. Voltamogrami su dobiveni metodom standardnog dodatka i dobiveni oduzimanjem pozadinske struje iz odgovarajućih voltamograma. Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata dobivena su dva različita linearna područja obzirom na koncentraciju galne kiseline.

Za područje niže koncentracije, od 0,034 do 1,70 mg/L, uočava se jedan izražajan anodni strujni vrh pri potencijalu 551 mV. Osjetljivost predložene metode za niže područje

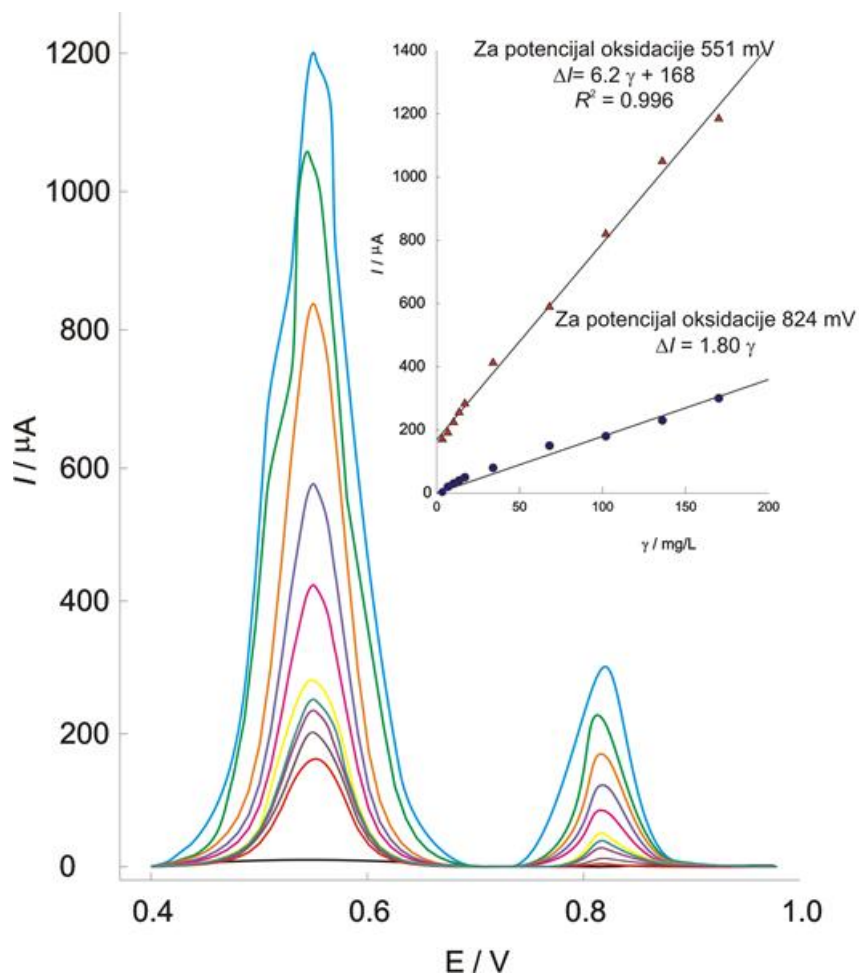


koncentracije, je  $99 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, dok je linearnost predložene metode  $R^2 = 0,995$ .



**Slika 29.** Voltamogrami DPV korigirani za vrijednost bazne linije snimljeni na SWCNT-GC elektrodi u otopini SZK (pH = 1,45) uz sukcesivni dodatak galne kiseline – za niže koncentracijsko područje ( $E_{ac}=400 \text{ mV}$ ,  $t_{ac}=90 \text{ s}$ ,  $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$  i  $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ ). Krivulje umjeravanja za pojedina područja prikazane su kao isječak voltamograma.

Na slici 30 prikazani su voltamogrami za područje više koncentracije, od 3,40 do 170,4 mg/L. Za ovo koncentracijsko područje uočavaju se dva strujna vrha oksidacije galne kiseline, pri 551 mV i 824 mV. Oba strujna vrha pokazuju linearnost vrijednosti vršne struje u odnosu na koncentraciju, ali s velikom razlikom u osjetljivosti. Pri 551 mV osjetljivost je  $6,2 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, dok je za viši potencijal, odnosno za drugi stupanj reakcije oksidacije  $1,8 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije. Ova razlika ukazuje na nepotpunost drugog stupnja oksidacije što je uočljivo i prema samom izgledu voltamograma. . Linearnost za oba područja je redom za 551 mV 0,996 te za 824 mV tek 0,885.



**Slika 30.** Voltamogrami DPV korigirani za vrijednost bazne linije snimljeni na SWCNT-GC elektrodi u otopini SZK (pH = 1,45) uz sukcesivni dodatak galne kiseline – za više koncentracijsko područje ( $E_{ac}=400$  mV,  $t_{ac}=90$  s,  $\Delta E_s = 10$  mV i  $\Delta E_p = 50$  mV). Krivulje umjeravanja za pojedina područja prikazane su kao isječak voltamograma.

#### 4.1.3. Analitička primjena SWCNT-GC elektrode u realnim uzorcima

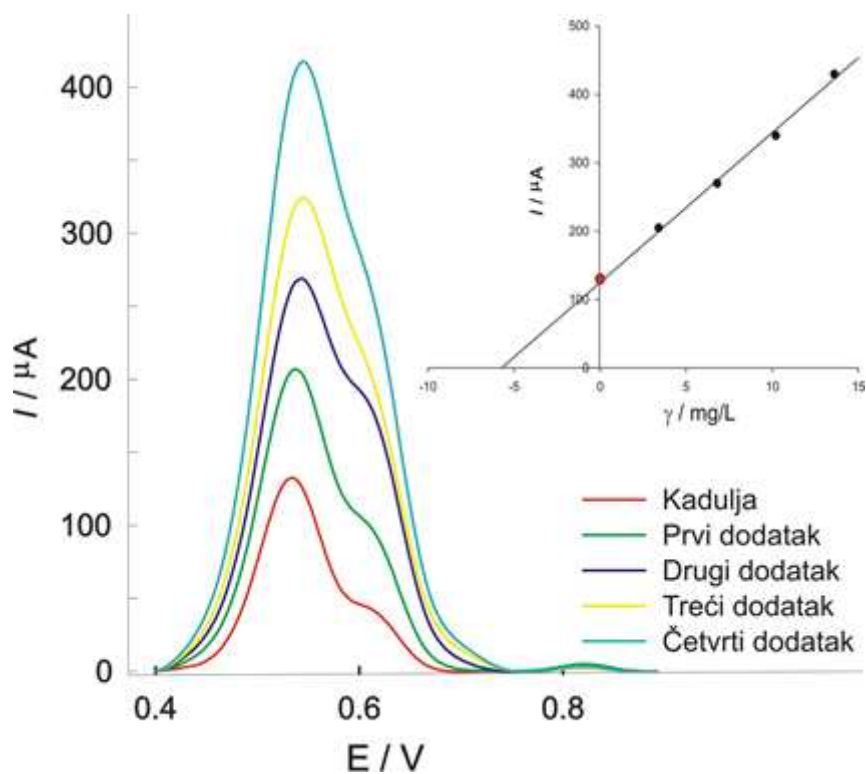
Predložena analitička metoda primijenjena je za određivanje galne kiseline, odnosno procjenu antioksidacijske aktivnosti u suhom bilju. Kao realni uzorci uzeti su: kadulja, timijan, ružmarin, matcha prah, islandski lišaj i goji bobice.

Na Slikama od 31. do 36. prikazani su DPV voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije snimljeni na SWCNT elektrodi u otopini simulirane želučane kiseline (pH = 1,45) za ekstrakte navedenog bilja. Određivanje količine galne kiseline izvedeno je na način da se 5 g suhog bilja ekstrahira u 80 ml destilirane vode tijekom 24 sata. Uzorci su profiltrirani te se iz ekstrakta određivala koncentracija analita. 1000  $\mu$ L ekstrakta doda se izravno u elektrolit, odnosno u ćeliju i metodom standardnog dodatka pomoću otopine galne kiseline poznate koncentracije određena je koncentracija galne kiseline u ekstraktima bilja. Srednja vrijednost koncentracije nepoznatog uzorka dobivena je na osnovu 3 uzastopna mjerenja. U detalju svake slike je krivulja umjeravanja ovisnosti strujnog vrha o koncentraciji galne kiseline (Eksperimentalni uvjeti:  $E_{ac}=400$  mV,  $t_{ac}=90$  s,  $\Delta E_s = 10$  mV i  $\Delta E_p = 50$  mV).

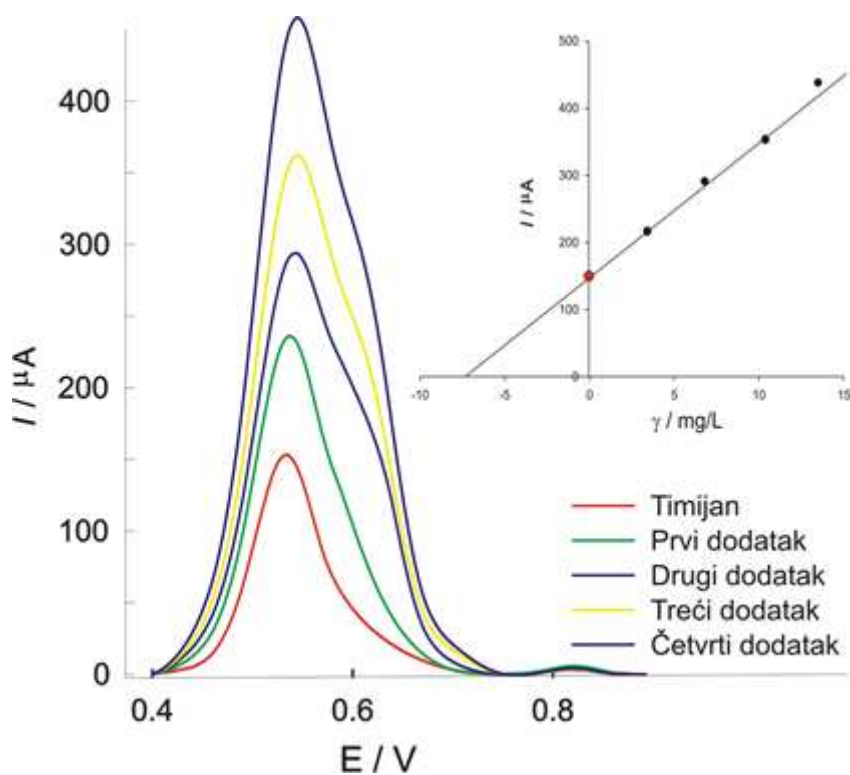
U Tablici 3 prikazani su rezultati masene koncentracije galne kiseline po litri dobiveni metodom standardnog dodatka. Navedena koncentracija odgovara masi galne kiseline u 1 mL uzorka. 1 mL dobivenog ekstrakta uzorka je ekvivalent 62,5 mg suhe tvari.

**Tablica 3.** Sadržaj galne kiseline u uzorcima dobiven diferencijalnom pulsnom voltametrijom – vrijednosti izražene prema ekvivalentu 1 ml odnosno 62,5 mg suhe tvari.

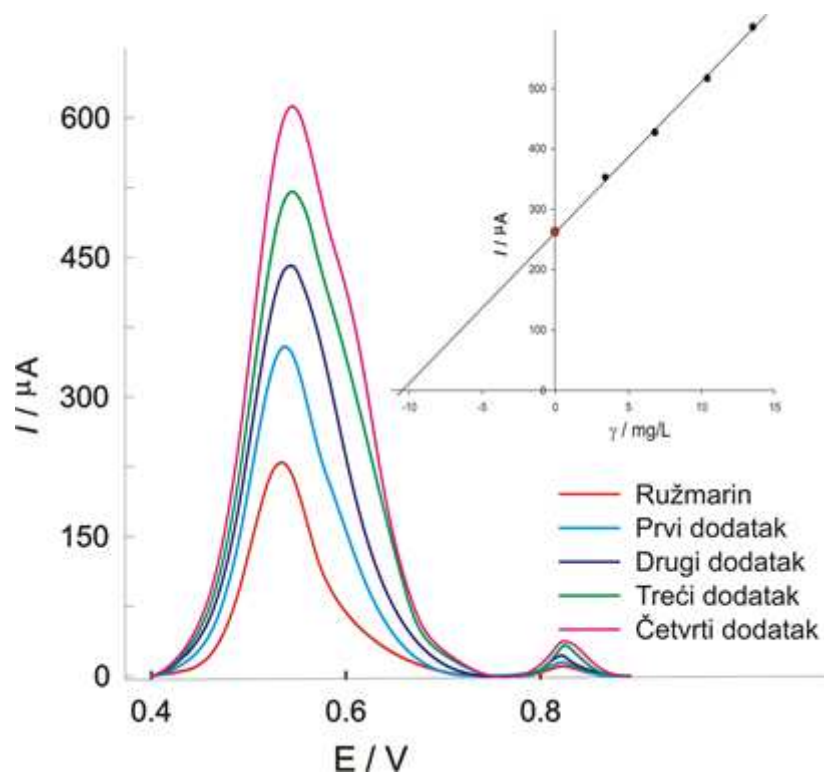
Uzorak	Masena koncentracija galne kiseline u uzorcima $\mu$ g GAE/L (volumen ekstrakta uzorka 1 mL – masena koncentracija odgovara masi galne kiseline u 1 mL ekstrakta)	Po kg suhe tvari
Kadulja	5 600 $\mu$ g GAE/L	89,6 mg
Timijan	7 500 $\mu$ g GAE/L	120,0 mg
<b>Ružmarin</b>	<b>10 700 <math>\mu</math>g GAE/L</b>	<b>171,2 mg</b>
Islandski lišaj	3 100 $\mu$ g GAE/L	49,6 mg
Matcha prah	1 750 $\mu$ g GAE/L	28,0 mg
Goji bobice	4 500 $\mu$ g GAE/L	72,0 mg



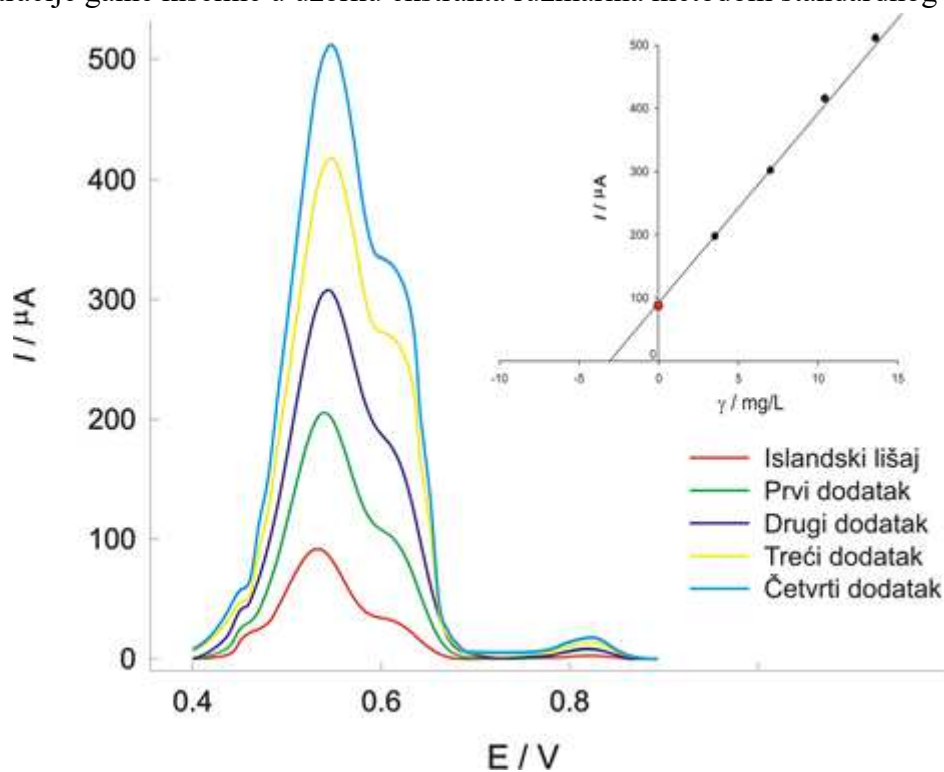
**Slika 31.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta kadulje metodom standardnog dodatka.



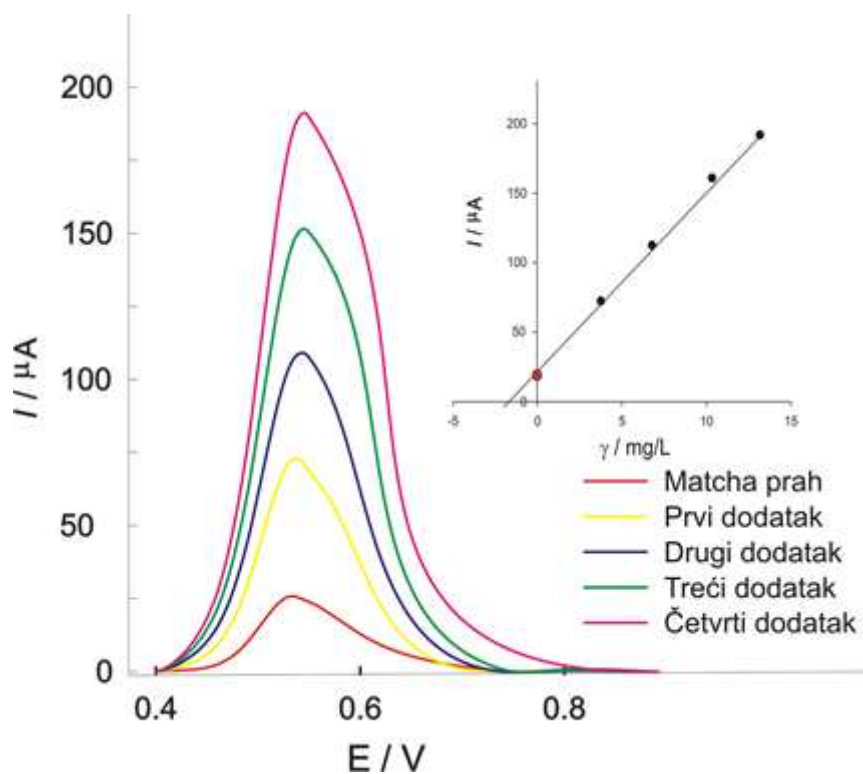
**Slika 32.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta timijana metodom standardnog dodatka.



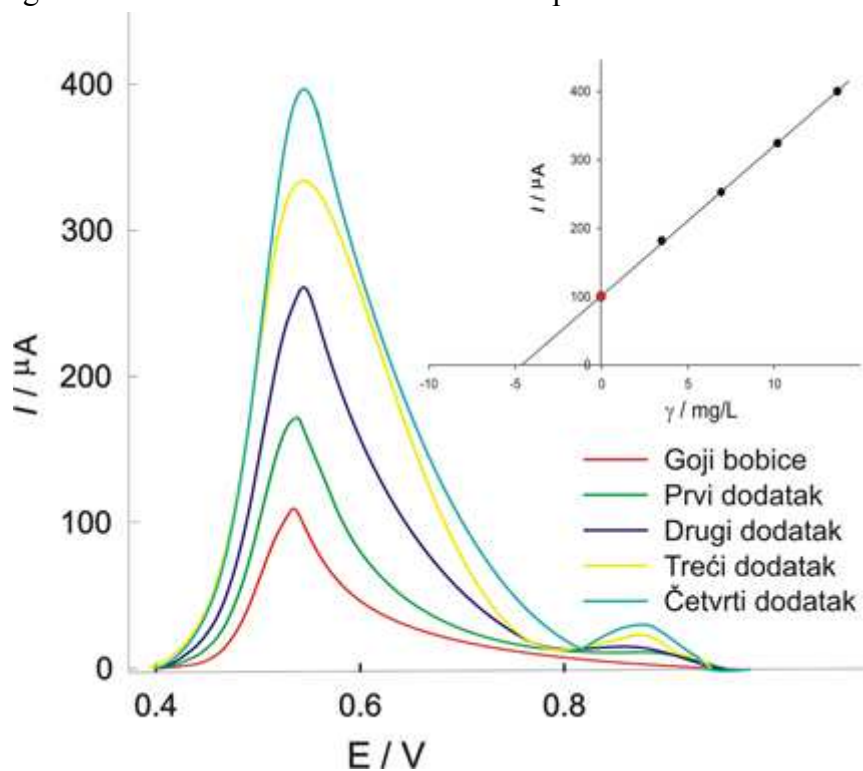
**Slika 33.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta ružmarina metodom standardnog dodatka.



**Slika 34.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta islandskog lišaja metodom standardnog dodatka.



**Slika 35.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta matcha praha metodom standardnog dodatka.



**Slika 36.** DPV - voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije - Određivanje masene koncentracije galne kiseline u uzorku ekstrakta goji bobica metodom standardnog dodatka.

## 4.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Postupak određivanja ukupnih fenola prema Folin-Ciocalteu metodi opisan je u sekciji Eksperimentalni dio. Isti postupak za određivanje ukupnih fenola mjerenjem vrijednosti apsorbancije se ponovi s realnim uzorcima (ekstraktima odabranih suhih biljaka), koji se dodaje u tikvicu umjesto standarda galne kiseline (Slika 37). Prave se tri otopine iste koncentracije ekstrakta i nakon 2 sata mjeri apsorbancija. Primjenom krivulje umjeravanja dobivene primjenom standarda, galne kiseline poznate koncentracije, odnosno iz matematički opisane jednadžbe pravca očita se ili izračuna koncentracija fenola u uzorku. Dobiveni rezultati izraženi su kao ekvivalenti galne kiseline (GAE), budući da je ona korištena kao standard.



**Slika 37.** Vodeni ekstrakti biljaka i njihove pripadajuće otopine s reagensom za određivanje ukupnih fenola, za volumen ekstrakta 25 mL.

Za sve odabrane uzorke izračunata je i antioksidacijska aktivnost. Praćena je promjena apsorbancije ispitivanog uzorka tijekom 4 minute i nakon 10 minuta. Izračunate su FRAP vrijednost nakon 4 minute i nakon 10 minuta

U tablicama 4 i 5 prikazan je sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom.

**Tablica 4.** Sadržaj ukupnih fenola uzoraka dobivene spektrofotometrijskom metodom - **VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.**

Uzorak	Ukupni fenoli			
	Folin-Ciocalteu metoda			
				Srednja vrijednost
Kadulja	1,696	1,701	1,621	<b>1,673</b>
Timijan	1,817	1,827	1,827	<b>1,824</b>
Ružmarin	2,464	2,474	2,473	<b>2,470</b>
Islandski lišaj	0,224	0,227	0,224	<b>0,225</b>
Matcha prah	0,573	0,575	0,576	<b>0,575</b>
Goji bobice	1,076	1,085	1,086	<b>1,082</b>

**Tablica 5.** Antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivene spektrofotometrijskom metodom - **VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.**

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minuta FRAP metoda				Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda			
				Srednja vrijednost				Srednja vrijednost
Kadulja	2,791	2,791	2,791	<b>2,791</b>	2,792	2,792	2,792	<b>2,792</b>
Timijan	1,799	1,804	1,800	<b>1,801</b>	1,801	1,801	1,800	<b>1,801</b>
Ružmarin	2,219	2,219	2,219	<b>2,219</b>	2,219	2,219	2,219	<b>2,219</b>
Islandski lišaj	0,379	0,378	0,379	<b>0,379</b>	0,430	0,426	0,428	<b>0,428</b>
Matcha prah	0,724	0,724	0,724	<b>0,724</b>	0,893	0,893	0,893	<b>0,893</b>
Goji bobice	0,883	0,883	0,883	<b>0,883</b>	1,130	1,134	1,130	<b>1,131</b>

Iz priloženih rezultata dobivenih Folin-Ciocalteu metodom kroz tri uzastopna mjerenja, uočavamo kako je najveći sadržaj ukupnih fenola izmjeren u ekstraktu ružmarina (srednja vrijednost = 2,4703 mg GAE/L). Najmanji sadržaj fenola izmjeren je u ekstraktima islandskog lišaja (0,2252 mg GAE/L) i matcha praha (0,5748 mg GAE/L). Antioksidacijska aktivnost određivala se FRAP metodom nakon 4 te nakon 10 minuta. Najveću redukciju



sposobnost kroz tri uzastopna mjerenja pokazao je ekstrakt kadulje (2,791  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ). Uspoređujući rezultate mjerenja nakon 4 minute te zatim nakon 10 minuta, možemo uočiti kako se antioksidacijska aktivnost minimalno mijenjala u svim uzorcima (slika 17), osim u uzorku goji bobica. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod uzorka goji bobica nakon 4 minute iznosila je 0,883  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , dok je nakon 10 minuta iznosila 1,131  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , bilježeći porast od približno 28%. Promatrajući rezultate dobivene jednom i drugom metodom može se uočiti povezanost između antioksidacijske aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola u ispitivanim uzorcima. Uzorci sa većim ukupnim sadržajem fenola pokazivali su i veću antioksidacijsku aktivnost te možemo zaključiti kako su ekstrakti kadulje i ružmarina pokazali najveću antioksidacijsku aktivnost.

U tablici 6 prikazani su rezultati sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivene spektrofotometrijskom metodom.

**Tablica 6.** Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivene spektrofotometrijskom metodom – **REZULTATI**.

Uzorak	Ukupni fenoli	Antioksidacijska	Antioksidacijska
	Folin-Ciocalteu	aktivnost - 4 minuta	aktivnost - 10 minuta
	reagens	FRAP metoda	FRAP metoda
	mg GAE/L	$\mu\text{M Fe}^{2+}$	$\mu\text{M Fe}^{2+}$
<b>Kadulja</b>	1,662	<b>4278,923</b>	<b>4280,462</b>
<b>Timijan</b>	1,813	2755,846	2755,846
<b>Ružmarin</b>	<b>2,460</b>	3398,923	3398,923
<b>Islandski lišaj</b>	0,214	568,154	643,539
<b>Macha prah</b>	0,564	1098,923	1358,923
<b>Goji bobice</b>	1,072	1343,539	1725,077

\*1 L dobivenog ekstrakta uzorka je ekvivalentna 62,5 g suhe tvari. Ukupni fenoli su određeni za volumen ekstrakta 25 mL.

Nakon provedenih mjerenja možemo i odgovoriti na pitanja, odnosno dati osvrt na specifični cilj ovog rada. Usporedbom rezultata dobivenih elektrokemijskim metodama s rezultatima dobivenim klasičnom spektrofotometrijskom metodom možemo zapaziti potpuno isti trend obzirom na vrijednost koncentracije galne kiseline u realnim uzorcima (Tablica 7).

**Tablica 7.** Usporedba rezultata dobivenih elektrokemijskim metodama s rezultatima dobivenim klasičnom spektrofotometrijskom metodom.

Uzorak	Koncentracija galne kiseline DPV mg/kg suhe tvari	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda mg/kg suhe tvari	Omjer FC/DPV	FRAP metoda	Omjer FRAP/DPV
Kadulja	89,6	85,094	0,950	4279	47,8
Timijan	120,0	92,826	0,774	2756	23,0
Ružmarin	171,2	125,950	0,736	3399	19,9
Islandski lišaj	49,6	10,957	0,221	568	11,5
Matcha prah	28,0	28,877	1,031	1099	39,3
Goji bobice	72,0	54,887	0,762	1344	18,7

Ako pogledamo tablicu 7 i omjere dobivenih rezultata za realne uzorke možemo zaključiti kako su rezultati dobiveni za ukupne fenole primjenom elektrokemijskih i spektroskopskih metoda usporedivi, jer je omjer dobivenih rezultata relativno konstantan za većinu uzoraka (SD 13%) (omjer FC/DPV) osim za islandski lišaj, gdje je odstupanje veliko. Ako pogledamo voltamogram islandskog lišaja vidljivo je kako doprinos visokoj vršnoj struji očigledno daju još neke vrste prisutne u ovoj biljci, a koje imaju potencijal oksidacije u području potencijala oksidacije galne kiseline. Voltamogram islandskog lišaja je pokazao prisutnost još dva strujna vrha uz strujni vrh galne kiseline. Također, ekstrakt kadulje i matcha praha pokazuju nešto drugačiji odziv na voltamogramu koji doprinosi porastu vršnih struja u području oksidacije galne kiseline. Upravo ta tri uzorka su pokazala veće vrijednosti za koncentraciju galne kiseline u realnim uzorcima. Ovo zapažanje sugerira također prisutnost neke druge vrste s redukcijskim svojstvima u uzorcima, kao na primjer vitamina C, čiji potencijal oksidacije može biti u zadanom području (42).

Prema dobivenim rezultatima možemo reći kako je predložena metoda pogodna za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima.

Omjer FRAP/DPV ne pokazuje konstantnost, odnosno pokazuje velika odstupanja te možemo reći kako predložena metoda nije u potpunosti pogodna za procjenu antioksidacijske aktivnosti, ali slijedi isti trend kao i antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom. Metodu je svakako moguće i potrebno, za ove svrhe optimirati izborom odgovarajućeg elektrolita svrhe.

## **5. ZAKLJUČAK**

Elektrode od staklastog ugljika modificirane su s jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama i višezidnim ugljikovim nanocjevčicama u svrhu istraživanja elektrokemijskih svojstava galne kiseline u odabranim fiziološkim elektrolitima uporabom cikličke voltametrije. Nakon provedenih mjerenja i analiziranjem dobivenih rezultata izvedeni su zaključci o ponašanju modifikacija prema galnoj kiselini. Uočena je znatna ovisnost elektrokemijskog ponašanja galne kiseline o odabranom elektrolitu.

Zaključci se mogu predstaviti kroz nekoliko točaka:

1. Površinski aktivne ugljikove nanocjevčice olakšavaju adsorpciju i akumulaciju galne kiseline i uvelike pojačavaju njezin oksidacijski signal. Kao najoptimalniji sustav za određivanje galne kiseline na osnovu analize, prometnula se elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama u simuliranoj želučanoj kiselini.
2. Jednozidne ugljikove nanocjevčice znatno poboljšavaju prijenos elektrona za reakcije oksidacije galne kiseline. Proces modifikacije poboljšao je redoks kinetiku galne kiseline, što je prikazano povećanim vršnim strujama.
3. SWCNT elektroda je dalje korištena za određivanje koncentracije galne kiseline u realnim uzorcima metodom diferencijalne pulsne voltametrije. Metoda je optimirana i provedeno je umjeravanje u širokom području koncentracija galne kiseline. Osjetljivost predložene metode za niže područje koncentracije je  $99 \mu\text{A}$  po jedinici masene koncentracije, a za područje više koncentracije je  $6,2 \mu\text{A}$  pri potencijalu  $551 \text{ mV}$ , dok je linearnost predložene metode  $0,995$ , odnosno  $0,996$ .
4. Uz primjenu optimiranih parametara određena je masena koncentracija galne kiseline u odabranim realnim uzorcima. Najveća masena koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu ružmarina,  $10\,700 \mu\text{g GAE/L}$ , odnosno  $171,2 \text{ mg}$  po  $\text{kg}$  suhe tvari. Najmanja koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu matcha praha.
5. Srednje vrijednosti ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom u šest odabranih uzoraka kretale su se od  $0,2252 \text{ mg GAE/L}$  do  $2,4703 \text{ mg GAE/L}$ . Najveći udio ukupnih fenola zabilježen je u ekstraktu ružmarina, dok je najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom zabilježena u ekstraktu kadulje.
6. Na temelju dobivenih rezultata može se izvesti zaključak da postoji povezanost antioksidacijske aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola u uzorcima. Antioksidacijski kapacitet je u skladu s koncentracijom fenolnih spojeva. Rezultati pokazuju kako uzorci s većim sadržajem fenola pokazuju i veću antioksidacijsku aktivnost.

Elektroanalitička metodologija koja je predstavljena u ovom diplomskom radu može se koristiti za brzu procjenu ukupnih fenola u ekstraktima suhog bilja, a samim tim i za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Rezultati ovog diplomskog rada mogu znatno doprinijeti razvoju nove metode za određivanje galne kiseline, odnosno za procjenu ukupnih fenola u biljnom materijalu, što je ujedno i korak naprijed u razvoju voltametrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva.

## **6. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Chikere CO. Electrochemical determination of gallic acid in food matrices using novel materials. Robert Gordon University, Aberdeen 2020. doi:10.1016/j.microc.2020.105668.
2. Arteaga JF, Ruiz-Montoya M, Palma A, Alonso-Garrido G, Pintado S, Rodríguez-Mellado JM. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules*. 2012;17:5126-38.
3. RHS A-Z encyclopedia of garden plants. 1.izdanje. Ujedinjeno Kraljevstvo: Dorling Kindersley; 2008. 1136. str.
4. Afonso AF, Pereira OR, Cardoso S.M. Health-Promoting effects of thymus phenolic-rich extracts: Antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties. *Antioxidants*. 2020;9:814.
5. Deans SG, Simpson E, Noble RC, MacPherson A, Penzes L. Natural antioxidants from *Thymus vulgaris* (Thyme) volatile oil: The beneficial effects upon mammalian lipid metabolism. *Acta Hort.* 1993;332:177-82.
6. Poullos E, Giaginis C, Vasios GK. Current state of the art on the antioxidant activity of sage (*Salvia* spp.) and its bioactive components. *Planta Med.* 2020;86:224-238.
7. Ulbricht C, Abrams T, Brigham A, Ceurvels J, Clubb J, Curtiss W i sur. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the natural standard research collaboration. *Journal of dietary supplements*. 2010;7:351-413.
8. Sánchez M, Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. The genus *Cetraria* s. str. - A review of its botany, phytochemistry, traditional uses and pharmacology. *Molecules*. 2022;27:4990.
9. Heiss ML, Heiss RJ. *The Story of Tea: A Cultural History and Drinking Guide*. 1. izdanje. New York: Ten Speed Press; 2007. 134. str.
10. Jakubczyk K, Kochman J, Kwiatkowska A, Kałduńska J, Dec K, Kawczuga D i sur. Antioxidant properties and nutritional composition of matcha green tea. *Foods*. 2020;9:483.
11. Ma ZF, Zhang H, Teh SS, Wang CW, Zhang Y, Hayford F i sur. Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;9:2437397.
12. National Center for Biotechnology Information. PubChem compound summary for Gallic Acid [Internet]. [citirano 5.rujna 2023.].

Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-Acid>.

13. Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agric Food Chem.* 2001;49:1957-65.
14. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1721:174-84.
15. Ruđer Bošković Institute. Development of voltammetric methods for the characterisation of natural antioxidant [Internet]. [citirano 5. rujna 2023.].  
Dostupno na: <https://www.irb.hr/eng/Divisions/Division-for-Marine-and-Environmental-Research/Laboratory-for-physical-chemistry-of-traces/Projects/Development-of-voltammetric-methods-for-the-characterisation-of-natural-antioxidant>.
16. Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada. Razvoj voltametrijskih metoda za karakterizaciju prirodnih antioksidansa – DVMCNA [Internet]. [citirano 5. rujna 2023.]. Dostupno na: <https://www.imi.hr/hr/projekt/razvoj-voltametrijskih-metoda-za-karakterizaciju-prirodnih-antioksidansa-dvmcna>.
17. Settle FA. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. 1. izdanje. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR; 1997. doi: 10.1080/10826079808006889.
18. Wang J. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. Voltammetry. 1994;39:129–45.
19. Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. 1. izdanje. Zagreb: Mediaprint-Tiskara Hrastić d.o.o.; 2010. 391-447 str.
20. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farmaceutski glasnik.* 2007;63:163-75.
21. Vježba 1. Ciklička voltometrija [Internet]. [citirano 21. rujna 2023.]. Dostupno na: [https://www.hdki.hr/\\_download/repository/KTvjezbe-vjezba1](https://www.hdki.hr/_download/repository/KTvjezbe-vjezba1).
22. Chevion S, Roberts MA, Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free radical biology and medicine.* 2000;28:860–70.
23. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education.* 2017;95:197–206.



24. Jurišić M. Elektrokemijska karakterizacija galne kiseline (Diplomski rad) [Internet]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; [citirano 21. rujna 2023.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:310895>.
25. Martins GR, Monteiro AF, do Amaral FRL. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (Euterpe oleracea Mart.) seeds extract. *J Food Sci Technol*. 2021;58:4693–4702.
26. G-Biosciences. Polyphenols (Folin Ciocalteu) Assay [Internet]. [citirano 21. rujna 2023.]. Dostupno na: [https://www.gbiosciences.com/Bioassays/Cell\\_Health\\_Assay/Food\\_Analysis/Polyphenol\\_Folin-Ciocalteu\\_Assay](https://www.gbiosciences.com/Bioassays/Cell_Health_Assay/Food_Analysis/Polyphenol_Folin-Ciocalteu_Assay).
27. Bancuta OR, Chilian A, Bancuta I, Ion RM, Setnescu R, Setnescu T i sur. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*. 2016;11:16-20.
28. Pico J, Pismag RY, Laudouze M, Martinez MM. Systematic evaluation of the Folin-Ciocalteu and fast blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds. *Food Funct*. 2020;11:9868-880.
29. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012;11:148–73.
30. Zhong Y, Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *ScienceDirect*. Woodhead Publishing. 2015;19:287–333.
31. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:3380.
32. Harris PJF. Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. *Philosophical Magazine*. 2004;84:3159-67.
33. Jenkins GM, Kawamura K. Structure of glassy carbon. *Nature*. 1971;231:175–76.
34. Serp P, Reedijk J, Poeppelmeier K. *Comprehensive inorganic chemistry II: From elements to applications*. Oxford: Elsevier; 2013;17:323-69.
35. Holban AM, Grumezescu AM, Andronescu E. Surface chemistry of nanobiomaterials, 2016;3:301-27.
36. Tuball. Single-walled carbon nanotubes: structure, properties, applications, health and safety [Internet]. [citirano 21. rujna 2023.]. Dostupno na: <https://tuball.com/articles/single-walled-carbon-nanotubes>.

37. Nanot S, Thompson NA, Kim J, Wang X, Rice W, Haroz EH i sur. Single-Walled Carbon Nanotubes. Springer eBooks. 2013;7:105–46.
38. Kotzabasaki M, Sotiropoulos I, Charitidis C, Sarimveis H. Machine learning methods for multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) genotoxicity prediction. *Nanoscale Advances*. 2021;3:3167–76.
39. Vladislavić N. Razvoj bizmutovih Film–elektroda za određivanje organskih tvari u vodenom mediju. FKIT, Zagreb, 2014., doktorska disertacija.
40. Abdel-Hamid R, Newair EF. Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2011;657:107-112, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.03.030>.
41. da Rosa CG, Borges CD, Zambiasi RC, Nunes MR, Benvenuti EV, da Luz SR, D'Avila RF, Rutz JK. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. *Ind. Crops Prod*. 2013;46:138–46.
42. Škugor Rončević I, Skroza D, Vrca I, Kondža AM, Vladislavić N. Development and Optimization of Electrochemical Method for Determination of Vitamin C. *Chemosensors*. 2022;10:283.

## **7. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Ideja rada je ujedno i opći cilj ovog rada, u fiziološkim elektrolitima, odnosno ponašanje galne kiseline u simuliranoj želučanoj kiselini i fiziološkom fosfatnom puferu. Nadalje, bilo potrebno je odabrati elektrodu koja pokazuje najbolji odziv prema galnoj kiselini, odnosno elektrodu s najboljom osjetljivošću. Specifični ciljevi su pomoću odabrane elektrode odrediti s kolikom pouzdanošću možemo elektrokemijskim metodama odrediti koncentraciju galne kiseline, odnosno procijeniti antioksidacijsku aktivnost. Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima dobivenim klasičnom metodom izvedeni su zaključci o mogućnosti primjene voltametrijskih metoda u procjeni antioksidacijske aktivnosti. Potrebno je pronaći korelaciju između rezultata elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda koja bi omogućila primjenu elektrokemijskih metoda kao standardnih metoda za ovu namjenu.

**Materijali i metode:** Elektroda od staklastog ugljika je modificirana jednozidnim i višezidnim ugljikovim nanocjevčicama u svrhu poboljšanja prijenosa elektrona i povećanja osjetljivosti. Vodenim ekstraktima odabranih biljaka odrediti koncentraciju galne kiseline diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Istim ekstraktima odrediti ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost klasičnim spektrofotometrijskim metodama.

**Rezultati:** Nakon analize dobivenih rezultata najbolji odziv prema galnoj kiselini pokazala je elektroda modificirana jednozidnim ugljikovim nanocjevčicama. Osjetljivost prema galnoj kiselini od 99  $\mu\text{A}$  ukazala je vrlo visoku osjetljivost i odličnu linearnost (0,995) predložene metode. Najveća koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu ružmarina, 10700  $\mu\text{g GAE/L}$ , odnosno 171,2 mg/kg suhe tvari. Najmanja koncentracija galne kiseline uočena je u ekstraktu matcha praha. Najveći udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom zabilježen je u ekstraktu ružmarina, dok je najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom zabilježena u ekstraktu kadulje.

**Zaključci:** Elektroanalitička metodologija koja je predstavljena u ovom radu može se koristiti za brzu procjenu ukupnih fenola u ekstraktima suhog bilja, a samim tim i za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Rezultati ovog diplomskog rada mogu znatno doprinijeti razvoju nove metode za određivanje galne kiseline, odnosno za procjenu ukupnih fenola u biljnom materijalu, što je ujedno i korak naprijed u razvoju voltametrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva.

**Ključne riječi:** Antioksidansi, galna kiselina, voltametrijske metode

## **8. SUMMARY**

**Objectives:** The idea is also the general objective of this work, which is to study the behaviour of Gallic acid as a simple phenol in physiological electrolytes, in simulated gastric acid and physiological phosphate buffer. In addition, it was necessary to select the electrode with best respond toward Gallic acid, the best sensitivity. The specific objectives of this work are to use the selected electrode to determine how reliably we can determine the concentration of Gallic acid by electrochemical methods and to evaluate the antioxidant activity of a substance. By comparing the obtained results with the results of the classical method, conclusions about the possibility of using voltammetric methods in the evaluation of antioxidant activity will be found. It is necessary to find a correlation between the results of electrochemical and spectrophotometric methods to make this method standard method for evaluation of total phenol and antioxidant activity.

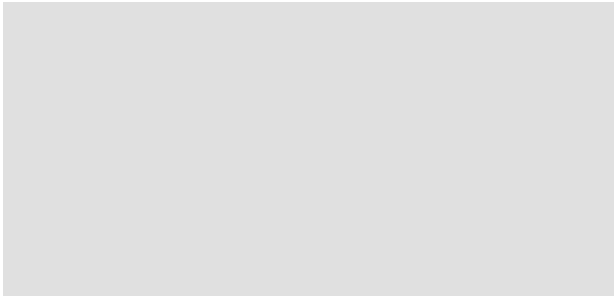
**Material and Methods:** A glassy carbon electrode was modified with singlewalled and multiwalled carbon nanotubes to improve electron transfer and increase sensitivity toward Gallic acid. Using aqueous extracts of selected plants, Gallic acid concentration was determined by differential pulse voltammetry. Using the same extracts, total phenolic and antioxidant activity were determined by classical spectrophotometric methods.

**Results:** Analysis of the results showed that the electrode modified with singlewalled carbon nanotubes responded best to Gallic acid. Obtained sensitivity of 99  $\mu\text{A}$  indicates very high sensitivity and excellent linearity (0.995) of the proposed method. The highest concentration of Gallic acid was observed in rosemary extract, 10700  $\mu\text{g GAE/L}$ , or 171.2 mg/kg dry mass. The lowest concentration of Gallic acid was observed in Matcha powder extract. The highest level of total phenols by the spectrophotometric method was observed in the rosemary extract, while the highest antioxidant activity by the FRAP method was measured in the sage extract.

**Conclusions:** The electroanalytical method presented in this work can be used for the rapid determination of total phenols in dry extracts of herbs and, consequently, for the determination of antioxidant activity. The results of this work can significantly contribute to the development of a new method for the determination of Gallic acid, or for the determination of total phenols in plant material, which is also an advance in the development of voltammetric methods for the determination of antioxidant activity of various compounds.

**Keywords:** antioxidants, gallic acid, voltammetric methods

## **9. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:****Obrazovanje:**

- 2005. – 2013. Osnovna škola „Petar Preradović“, Zadar
- 2013. – 2017. Gimnazija „Vladimir Nazor“, jezična gimnazija, Zadar
- 2018. – 2023. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

**Radno iskustvo:**

- II , 2023. – VIII , 2023. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Spinut

**Posebne vještine:**

- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000
- Strani jezici: engleski – izvrsno, talijanski – osnovno
- Vozačka dozvola: B kategorija