

# Elektrokemijska karakterizacija čaja od mente na površini dijamantne elektrode dopirane borom

---

Dukši, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:790056>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Jelena Dukši**

**Elektrokemijska karakterizacija čaja od mente na površini  
dijamantne elektrode dopirane borom**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Inženjerska kemija  
**Tema rada:** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.  
**Mentor:** doc. dr. sc. *Ivana Tomac*

### Elektrokemijska karakterizacija čaja od mente na površini dijamantne elektrode dopirane borom *Jelena Dukši, 0113142967*

**Sažetak:** Čaj od mente je biljni pripravak od aromatične biljke *Mentha piperita*. Prema sadržaju čaj od mente je bogat bioaktivnim tvarima među kojima se izdvajaju askorbinska kiselina i polifenoli. (+)-katehini su elektroaktivne tvari koje se lako detektiraju primjenom elektrokemijskih tehnika. Jedna od elektrokemijskih tehnika pogodna za detekciju (+)-katehina u čaju je ciklička voltametrij. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio primijeniti tehniku cikličke voltametrije za elektrokemijsku karakterizaciju (+)-katehina u čaju od mente na površini radne dijamantne elektrode dopirane borom. Kao osnovni elektrolit koristio se fosfatni pufer, a referenta elektroda je bila Ag/AgCl. Ispitao se utjecaj pH osnovnog elektrolita, višestruke uzastopne polarizacije, koncentracije. Ispitani eksperimentalni utjecaji na elektrokemijsku oksidaciju (+)-katehina pokazali su da je prisutna pH ovisnost, linearni utjecaj promjene koncentracije, da je mehanizam oksidacije difuzijski kontroliran te je prisutna izmjena jednakog broja elektrona i protona.

**Ključne riječi:** čaj od mente, (+)-katehin, ciklička voltametrij

**Rad sadrži:** 28 stranica  
15 slika  
1 tablicu  
0 priloga  
29 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i>	predsjednik
2. doc. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i>	član-mentor
3. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i>	član
4. dr. sc. <i>Petra Matić</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 25. rujan 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program ...

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Course title:** Engineering Chemistry  
**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on July 17, 2023.  
**Mentor:** *Ivana Tomac*, PhD, assistant prof.

### Electrochemical Characterization of the Mint Tea using Boron-Doped Diamond Electrode

*Jelena Dukši, 0113142967*

**Summary:** Mint tea is an herbal preparation from the aromatic plant *Mentha piperita*. According to its content, mint tea is rich in bioactive substances, among which ascorbic acid and polyphenols. Catechins are electroactive substances that are easily detected using electrochemical techniques. One of the electrochemical techniques suitable for the detection of catechins in tea is cyclic voltammetry. Therefore, the aim of this thesis was to apply the cyclic voltammetry technique for the electrochemical characterization of catechins in mint tea on the surface of a working boron doped diamond electrode. Phosphate buffer was used as the supporting electrolyte, and the reference electrode was Ag/AgCl. The influence of the pH of the supporting electrolyte, multiple successive polarizations, and concentration was examined. The tested experimental influences on the electrochemical oxidation of (+)-catechin showed that there is a pH dependence, a linear influence of the change in concentration, that the oxidation mechanism is diffusion controlled and that there is an exchange of an equal number of electrons and protons.

**Key words:** mint tea, catechin, cyclic voltammetry

**Thesis contains:** 28 pages  
15 figures  
1 tables  
0 supplements  
29 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Maja Molnar</i> , PhD, prof.           | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD, assistant prof. | supervisor   |
| 3. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, prof. | member       |
| 4. <i>Petra Matić</i> , PhD                  | stand-in     |

**Defense date:** September 25, 2024

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

25. 9. 2024.

**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

izvrsnom (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

**1. prof. dr. sc. Maja Molnar**

predsjednik

Molnar

**2. doc. dr. sc. Ivana Tomac**

član

Tomac

**3. prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron**

član

L. Jakobek Barron

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
2.1. ČAJ OD MENTE .....	4
2.2. (+)-KATEHIN .....	6
2.2.1. <i>Tehnike za karakterizaciju (+)-katehina.....</i>	<i>7</i>
2.3. CIKLIČKA VOLTAMetriJA .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>10</b>
3.1. ZADATAK RADA .....	11
3.2. MATERIJALI I METODE.....	11
3.2.1. <i>Priprema standarda i osnovnog elektrolita .....</i>	<i>11</i>
3.2.2. <i>Priprava čaja od mente .....</i>	<i>11</i>
3.2.3. <i>Ciklička voltametrija .....</i>	<i>11</i>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>13</b>
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE (+)-KATEHINA.....	14
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE ČAJA OD MENTE.....	17
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>19</b>
5.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE (+)-KATEHINA PRIMJENOM CIKLIČKE VOLTAMetriJE NA DIJAMANTNOJ ELEKTRODI DOPIRANOJ BOROM .....	20
5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE ČAJA OD MENTE PRIMJENOM CIKLIČKE VOLTAMetriJE NA DIJAMANTNOJ ELEKTRODI DOPIRANOJ BOROM .....	22
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>24</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>26</b>

## **1. UVOD**

Otpriblike 80% svjetske populacije trenutno se oslanja na autohtone ili tradicionalne lijekove kako bi zadovoljili svoje primarne zdravstvene potrebe, što je dokaz značajne uloge koju ove drevne prakse imaju u suvremenom društvu. Velik dio spomenutih praksi uključuje korištenje biljnih ekstrakata, često pripremljenih u vodenim otopinama, koje se stoljećima koriste zbog svojih prirodnih ljekovitih svojstava. Među širokim rasponom biljnih namirnica koje se koriste u medicini, biljni lijekovi dobili su najviše pažnje i široko se primjenjuju u različitim kulturama (McKay i Blumberg, 2006).

Jedan od najpopularnijih biljnih lijekova je menta (*Mentha piperita L.*), osobito u obliku biljne infuzije. Ova aromatična biljka tradicionalno se koristi za ublažavanje niza tegoba. Njena primjena uključuje liječenje bilijarnih poremećaja, probavnih smetnji, enteritisa, nadutosti, gastritisa, crijevnih kolika i grčeva koji zahvaćaju žučne kanale, žučni mjehur i gastrointestinalni trakt (McKay i Blumberg, 2006).

Znanstvena zajednica posljednjih godina sve više prepoznaje važnost flavonoida, jedinstvene klase terapijskih molekula poznatih po svojim raznovrsnim zdravstvenim koristima. U njih se ubraja (+)-katehin, sekundarni metabolit biljnog porijekla iz obitelji flavonola koji je opširno proučavan zbog svojih farmakoloških svojstava. Mehanizam oksidacije (+)-katehina je izmjena jednakog broja elektrona i protona, pri čemu nastaje kinon preko semikinonskog međuprodukta (Ganeshpurhar i Saluja, 2020; Surovec i sur., 2019).

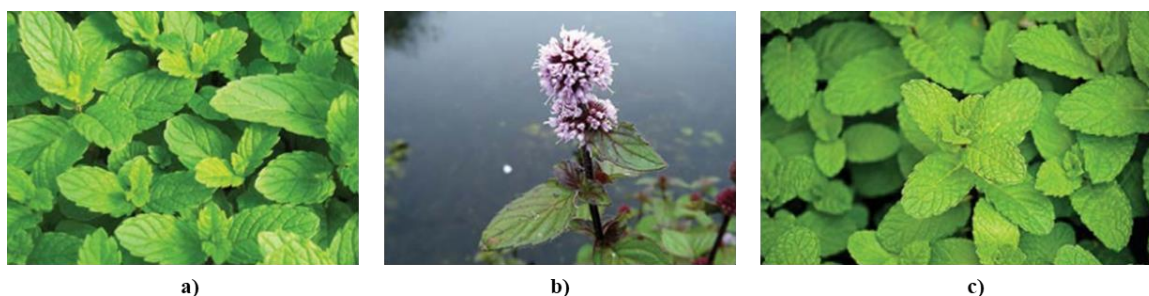
Stoga je cilj ovog diplomskog rada primijeniti tehniku cikličke voltometrije za elektrokemijsku karakterizaciju (+)-katehina u čaju od mente na površini radne dijamante elektrode dopirane borom.



## **2. TEORIJSKI DIO**

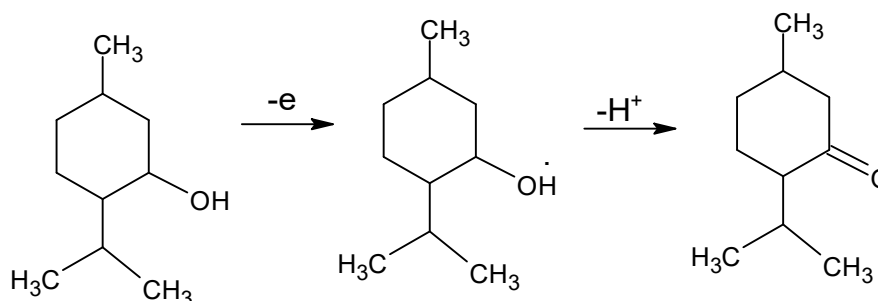
## 2.1. Čaj od mente

Menta (*Mentha piperita L.*) je višegodišnja biljka koja potječe iz Europe, a sada je njezino stanište rasprostranjeno na sjevernim dijelovima SAD-a i Kanade te se uzgaja u mnogim dijelovima svijeta. S obzirom na to da je menta hibrid pitome metvice (*M. spicata L.*) i vodene metvice (*M. aquatica L.*) (Slika 1), posebno dobro uspijeva na tlima koja imaju visoki kapacitet zadržavanja vode. Cijenjena je zbog svog karakterističnog okusa i mirisa. To je jedan od razloga zbog kojeg se njezini listovi (bilo svježi ili osušeni) i njihovo eterično ulje široko koriste u prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.



**Slika 1** Biljka menta i njezini hibridi a) *Mentha spicata*, b) *Mentha aquatica* i c) *Mentha piperita* (Loolai i sur., 2017)

Kemijski sastav listova mente i eteričnog ulja ovisi o nekoliko čimbenika uključujući zrelost biljke, sortu, geografski položaj i metode obrade. Napolarna lipidna frakcija listova mente prvenstveno sadrži palmitinsku kiselinu (16:0), linolnu kiselinu (18:2) i linolensku kiselinu (18:3). Eterično ulje mente posebno je bogato hlapljivim spojevima kao što su mentol (33–60 %), menton (15–32 %) (Slika 2) i dr. Oni uključuju primjerice izomenton, 1,8-cineol (poznat i kao eukaliptol) i limonen. Koncentracija eteričnog ulja u listovima iznosi od 1,2 % do 3,9 % po volumenu, dok infuzija suhih listova zadržava oko 21 % originalnog sadržaja ulja (McKay i Blumberg, 2006).



**Slika 2** Oksidacijski mehanizam mentola (Lim i sur., 2018; Javanshir i sur., 2021)

Istraživanja o mineralnom sadržaju listova mente pružaju detaljniji uvid u odnosu na istraživanja koja su se bazirala na vitaminski sastav. Primjerice, svježi listovi mente iz Brazila pokazali su značajne količine  $\beta$ -karotena, uz prisutnost drugih karotenoida, klorofila, tokoferola i askorbinske kiseline. Suhi listovi mente poznati su po mineralnom sadržaju koji uključuje glavne elemente poput kalija, kalcija i magnezija, kao i elemente u tragovima kao što su željezo, mangan, cink, bakar, krom, jod i selen. Kada se ti listovi natope u vrućoj vodi, otprilike 8–60% tih minerala prelazi u čaj. Selen i jod posebno su istaknuti kao najlakše ekstrahirani minerali, dok je željezo ipak slabije ekstrahirano (McKay i Blumberg, 2006).

Polifenolni sadržaj u listovima mente procjenjuje se na oko 19–23 %, uključujući značajne količine npr. ružmarinske kiseline te uz manje količine drugih flavonoida. Oko 75% tih polifenolnih spojeva učinkovito se ekstrahira u infuziji čaja. Sadržaj salicilne kiseline u proizvodima od mente pokazuje značajne varijacije; rana istraživanja su prijavljivala visoke razine, dok su novije analize uz pomoć primjene naprednijih instrumentalnih tehnika ipak pokazale znatno niže koncentracije (McKay i Blumberg, 2006).

Fenolni spojevi nisu ravnomjerno raspoređeni u svim dijelovima biljke, pri čemu vanjski slojevi sadrže znatno veće koncentracije fenola u usporedbi s unutarnjim dijelovima. Primjerice, mnoga su istraživanja pokazala da kore voća i povrća imaju značajno viši sadržaj fenola nego njihovo meso (Kujala i sur. 2000). Na mikroskopskoj razini, fenoli vezani za netopive tvari često su povezani s komponentama stanične stijenke, dok se topljivi fenoli nalaze unutar vakuola biljnih stanica. Ti topljivi fenoli mogu se nalaziti kao slobodne fenolne kiseline, esterificirani s pektinima i arabinoksilanima, ili međusobno povezani s polisaharidima stanične stijenke u obliku dimera (Naczki i Shahidi, 2004).

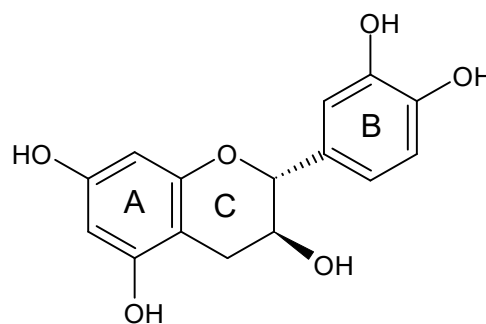
Rezultati istraživanja koje su proveli Brown i sur. (2019) su pokazali da listovi mente (*Mentha* sp.) imaju snažna antioksidativna svojstva u *in vitro* ispitivanjima koja se pokazuju kroz njihovu sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Ova sposobnost ima ključnu ulogu u neutralizaciji štetnih učinaka oksidativnog stresa koji može biti povezan s razvojem mnogih kroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti.

Spojevi koji su odgovorni za ove djelovanje biljke mente i njezinog čaja uključuju fenolne kiseline i flavonoide poznate po svojim protuupalnim i antioksidativnim svojstvima. Ovi spojevi ne samo da pomažu u sprječavanju oksidativnih oštećenja, već također pridonose ukupnom zdravlju. Rezultati ovog istraživanja naglašavaju potencijal listova mente i proizvoda od mente kao vrijednih sastojaka u prehrambenim formulacijama. Njihova upotreba mogla bi

unaprijediti prehrambene proizvode i promicati zdravlje, čineći ih korisnim dodatkom u svakodnevnoj prehrani, a isto tako u samoj prehrambenoj industriji. Ovi rezultati također podržavaju ideju da bi menta mogla igrati ključnu ulogu kao prirodni sastojak s brojnim zdravstvenim prednostima (Brown i sur, 2019; Tahira i sur, 2011).

## 2.2. (+)-katehin

(+)-katehini su sekundarni biljni metaboliti koji pripadaju grupi flavonoida, prirodnih spojeva poznatih po svom mogućem zaštitnom djelovanju. Ovi spojevi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, a nalaze se u npr. zelenom i crnom čaju, grožđu, luku, jabukama, kakau, povrću i slično. Naziv "katehin" dolazi od riječi "*katehu*", koja označava supstancu dobivenu iz ekstrakta biljke *Mimosa catechu*, poznate po svojoj uporabi u tradicionalnoj medicini.



**Slika 3** Kemijska struktura (+)-katehina (Janeiro i Brett 2004)

Strukturno, (+)-katehin sadrži A, B i C prsten (**Slika 3**). Na ovim prstenovima se nalaze hidroksilne skupine, koje su važne za mehanizam djelovanja (Janeiro i Brett, 2004). (+)-katehini mogu biti prisutni u obliku izomera, što znači da molekule mogu biti prostorno različito raspoređene. *Trans*-izomeri poznati su pod nazivom (+)-katehini, dok su *cis*-izomeri poznati kao epikatehini. Ovi izomeri mogu imati različite biološke učinke, što ih čini predmetom brojnih znanstvenih istraživanja.

Katehini su privukli veliku pažnju u znanstvenim istraživanjima zbog svojih potencijalnih zdravstvenih svojstava. Jedno od najvažnijih svojstava (+)-katehina je njihova sposobnost da djeluju kao antioksidansi, neutraliziraju slobodne radikale koji potencijalno mogu oštetiti stanice i dovesti do razvoja raznih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne poremećaje i slično. Osim toga, katehini mogu posjedovati protuupalna svojstva, koja dodatno vjerojatno mogu doprinijeti njihovom zaštitnom učinku na organizam.

### 2.2.1. Tehnike za karakterizaciju (+)-katehina

Polifenolni spojevi (uključujući (+)-katehin) se u biološkim materijalima mogu identificirati i kvantificirati pomoću četiri skupine instrumentalnih tehnika:

- 1) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC),
- 2) spektroskopskim metodama (UV/VIS, FTIR, MS, NMR),
- 3) elektroforetskim tehnikama (kapilarna elektroforeza) i
- 4) elektrokemijskim metodama (ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija).

HPLC je instrumentalna tehnika koja se temelji na separaciji pojedinih tvari i niske granice detekcije. Primarni cilj HPLC metode je odvojiti i kvantificirati komponente od interesa (Bhardwaj i sur., 2015). Tako npr. HPLC tehnika koju su predložili Saito i suradnici (2006) pokazala se učinkovitom za kvantifikaciju katehina i kafeina u zelenom čaju.

Spektroskopske metode koje se koriste za karakterizaciju polifenolnih spojeva su ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija (UV/VIS), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Ultraljubičasto-vidljiva (UV/VIS) spektrofotometrija je popularna analitička tehnika koja se koristi za mjerenje koncentracije analita, detekcijom apsorpcije svjetlosti unutar raspona valnih duljina od 190–1000 nm. Ova tehnika je često tehnika od izbora jer je ekonomična, jednostavne uporabe te pruža mogućnost kvantitativnih podataka. Temelj UV/VIS spektrofotometrije je Beer–Lambertov zakon (Shard i sur., 2019).

Nadalje, Shen i suradnici (2006) razvili su metodu korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom s ionizacijom (LC/ESI-MS) za odabrano praćenje iona za detekciju katehina u ljekovitoj biljci *Acacia catechu*. Autori ističu da je njihovo istraživanje prva kvantitativna analiza svih glavnih katehina u mesu i lišću *Acacia catechu*.

Elektrokemija je grana kemije koja se bavi odnosom između električnih i kemijskih procesa, odnosno proučava kako električna struja uzrokuje kemijske promjene i kako kemijske reakcije stvaraju električnu energiju. Glavni naglasak je na primjeni elektrokemijskih metoda za proučavanje elektrokemijskog sustava. Razumijevanje reakcija na površini elektroda i električnih svojstava elektroda-otopina osnovno je za primjenu elektrokemijskih metoda (Bard i Faulkner, 2001).

Tipična oprema za izvođenje elektrokemijskog mjerenja sastoji se od jednostavnog članka (ćelije) s tri elektrode: radnom, pomoćnom i referentnom, koje su uronjene u posudicu s elektrolitom. Potenciostat je kompjutorski kontroliran uređaj. Najčešće se za elektrokemijska mjerenja primjenjuju pravokutnovalna voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija i ciklička voltometrija.

Pravokutnovalna voltometrija (SWV) je sofisticirana voltometrijska tehnika. U SWV, struja se mjeri na kraju svakog pulsa, te se na pravokutnovalnom voltamogramu prikazuje ukupna struja koja se može razdvojiti na anodnu i katodnu, što je ujedno i prednost ove tehnike. Stoga SWV daje uvid u mehanizam reakcije, a često je metoda od odabira jer je brza (Mireceski i sur., 2018).

Nadalje, diferencijalna pulsna voltometrija primjenjuje se za kvantifikaciju sadržaja zbog svoje visoke osjetljivosti (niska granica detekcije).

### 2.3. Ciklička voltometrija

Ciklička voltometrija (CV) jedna je od najzastupljenijih elektroanalitičkih tehnika za proučavanje elektroaktivnih spojeva i reakcija. Često je prvi odabir koji se provodi u elektrokemijskom istraživanju nekog nepoznatog spoja, biološkog materijala ili ispitivanju modificirane površine elektrode.

Ciklički voltamogram dobije se mjerenjem struje na radnoj elektrodi tijekom polarizacije u određenom rasponu potencijala. Iz cikličkog voltamograma mogu se iščitati podaci kao što su struja pika ( $I_p$ ), potencijal pika ( $E_p$ ), reverzibilni potencijal ( $E_{rev}$ ) i potencijal na polovici pika ( $E_{1/2}$ ) (Parker, 1986).

Elektrokemijsku reverzibilnu reakciju karakterizira brza izmjena elektrona između redoks vrsta i radne elektrode. Formalni redukcijski potencijal za reverzibilan par smješten je između anodnog i katodnog potencijala pika. Broj elektrona koji se prenose u reakciji može se odrediti iz razlike između potencijala pikova. Za reverzibilan sustav, razlika između anodnog i katodnog potencijala pika iznosi oko 0,059 V.

Ireverzibilnost u elektrokemijskim sustavima uzrokovana je sporom izmjenom elektrona između redoks vrsta i radne elektrode što dovodi do većih razlika između potencijala pikova od očekivanih za reverzibilan sustav (više od 0,059V).

Jedna od primjena voltometrijskih tehnika na realan sustav je i istraživanje koje su proveli Maoela i suradnici (2009) po prvi put otkriva prisutnost (+)-katehina u etil-acetatnim

ekstraktima *C. mellei* i *C. quadrifidus* primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije. Prisutnost (+)-katehina u etil-acetatnim ekstraktima *C. mellei* i *C. quadrifidus* dodatno je potvrđena HPLC, UV-VIS i FT-IR spektroskopijom. Autori ističu da identifikacija (+)-katehina u ovim biljkama može pomoći objasniti razloge potencijalnih ljekovitih svojstava (+)-katehina iz istraživanih biljki.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je:

- ispitati elektrokemijski mehanizam oksidacije (+)-katehina primjenom cikličke voltametrije na površini radne dijamante elektrode dopirane borom i
- ispitati utjecaj pH osnovnog elektrolita, brzine polarizacije, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije na elektrokemijska svojstva (+)-katehina i čaja od mente.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Priprema standarda i osnovnog elektrolita

Za pripravu standarda u ovom diplomskom radu koristio se (+)-katehin ( $\geq 96\%$  (HPLC čistoće, Sigma Aldrich) koji se otopio u 100% metanolu. Radne koncentracije standarda (+)-katehina pripremile su se u određenom volumenu osnovnog elektrolita. Pripravljeni standard (+)-katehina (*stock* otopina) čuvao se zaštićen od svjetla na temperaturi hladnjaka ( $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kao osnovni elektrolit koristio se 0,1 M fosfatni pufer pripravljen u rasponu pH vrijednosti od 3 do 7. Za pripravu osnovnog elektrolita koristila se dvostruko destilirana voda.

#### 3.2.2. Priprava čaja od mente

Čajevi koji su se koristili u diplomskom radu su čajevi od mente dva proizvođača dostupna na lokalnom tržištu. Otopine čaja su se pripremile prema napatku proizvođača navedenom na pakiranju. Vrećica čaja prelila se s 200 mL ključale dvostruko destilirane vode. Zatim se poklopila i ostavila da stoji 5 minuta uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici. Zatim se čaj filtrirao kroz filter papir i ostavio da se hladiti do sobne temperature ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Za elektrokemijsku analizu, čaj se razrjeđivao u određenom volumenu u osnovnom elektrolitu.

#### 3.2.3. Ciklička voltametrija

Uređaj korišten za provedbu cikličke voltametrije je kompjutorski kontroliran potencijostat/galvanostat/impedancijski analizator  $\mu\text{Stat-i 400}$  (Metrohm DropSens, Španjolska) uz programsku podršku DropView 8400. Kao radna elektroda korištena je komercijalna dijamantna elektroda dopirana borom, referentna elektroda srebro/srebro klorid i pomoćna elektroda ugljik.

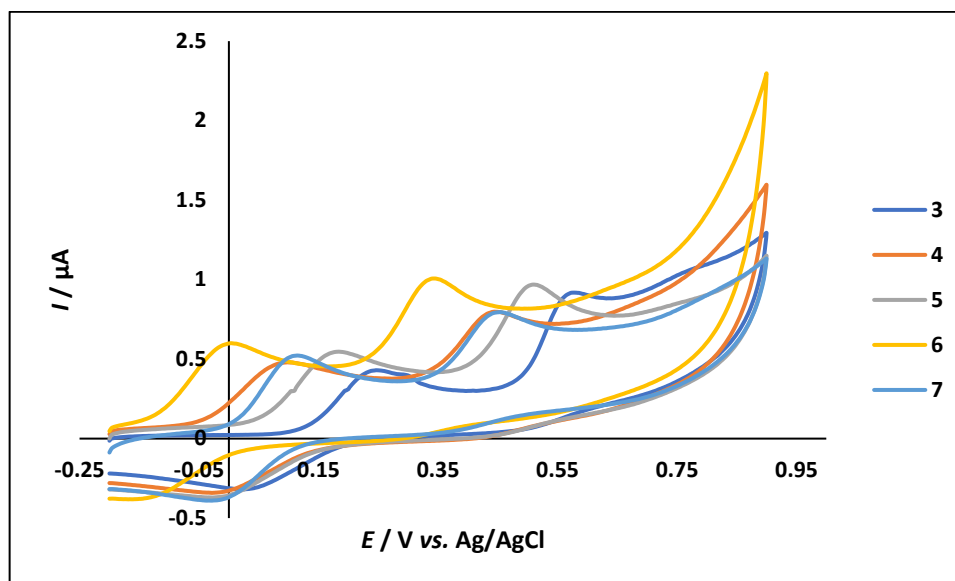
Eksperimentalni uvjeti za provođenje elektrokemijskog mjerenja cikličkom voltametrijom prikazani su u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Eksperimentalni uvjeti za provođenje elektrokemijskog mjerenja cikličkom voltametrijom

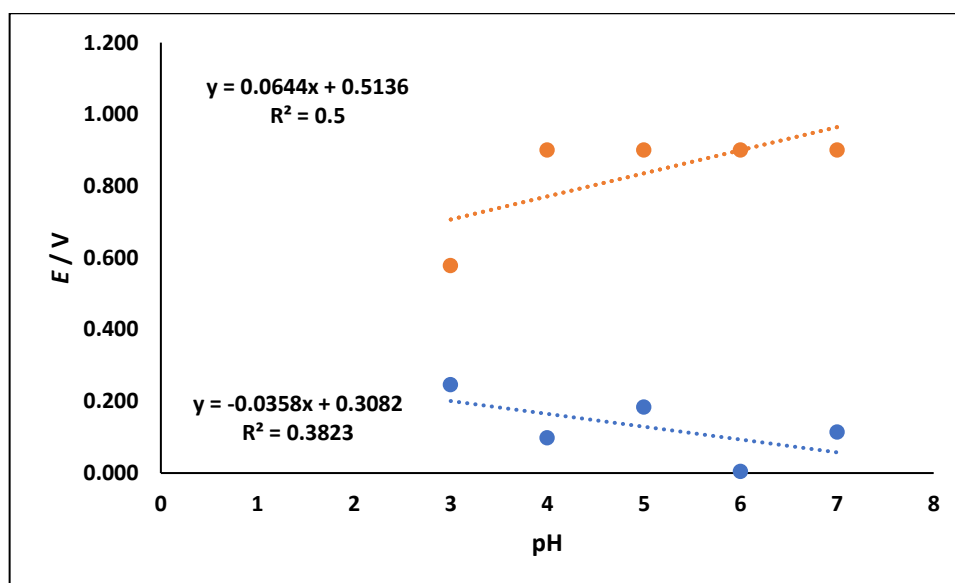
<b>Parametar</b>	<b>Vrijednost</b>
Početni potencijal	-0,2 V
<i>Vertex</i> potencijal	0,9 V
Konačni potencijal	-0,2 V
Korak polarizacije	0,002 V
Brzina polarizacije	0,05 V/s

## **4. REZULTATI**

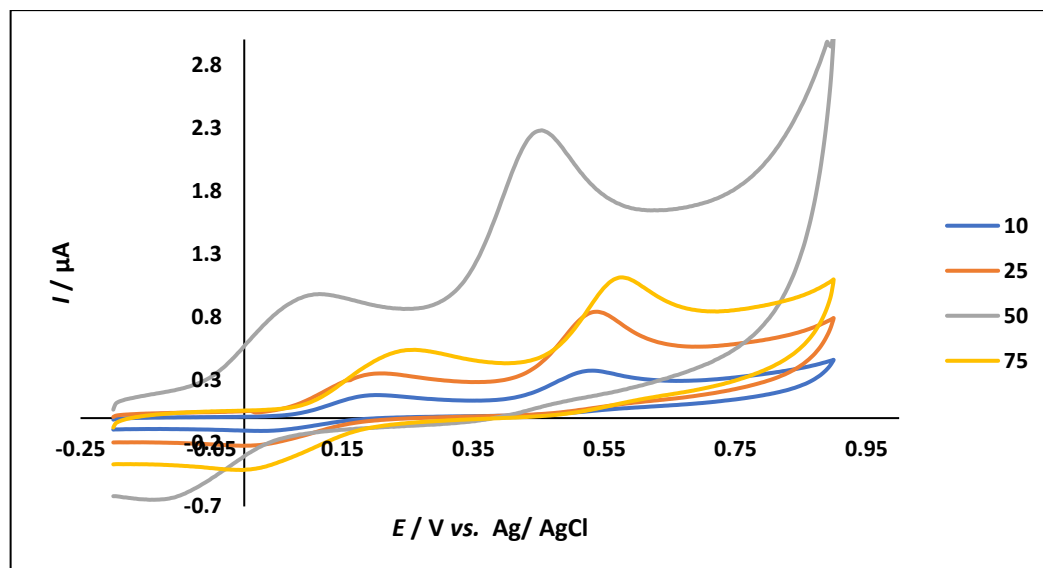
#### 4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE (+)-KATEHINA



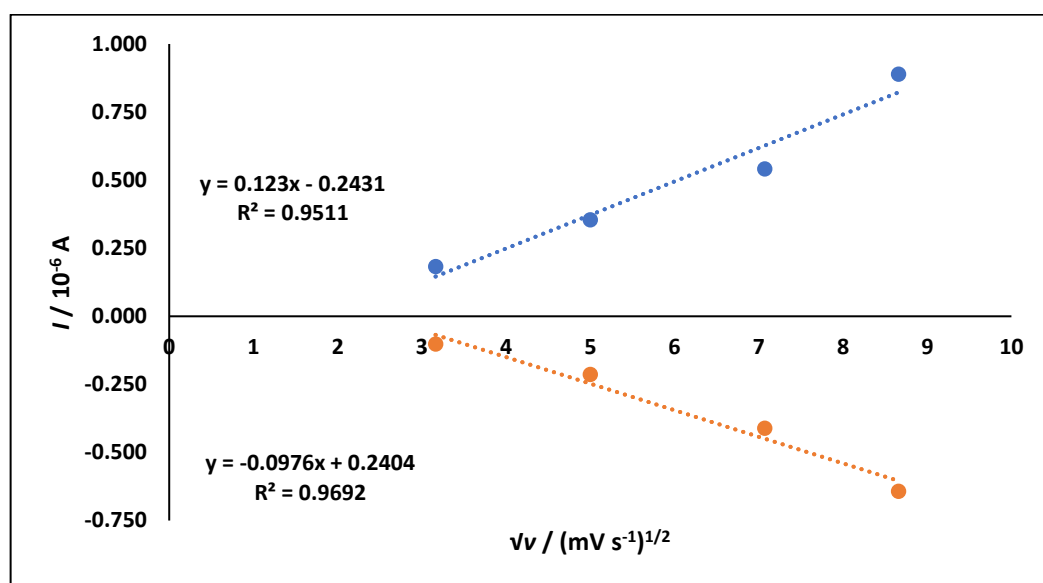
**Slika 4** Ciklički voltamogram 0,1M PBS koji sadrži  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (+)-katehina na dijamantnoj elektrodi dopiranoj boronom u rasponu pH od 3 do 7 dobivenih prema uvjetima uz **Tablice 1**



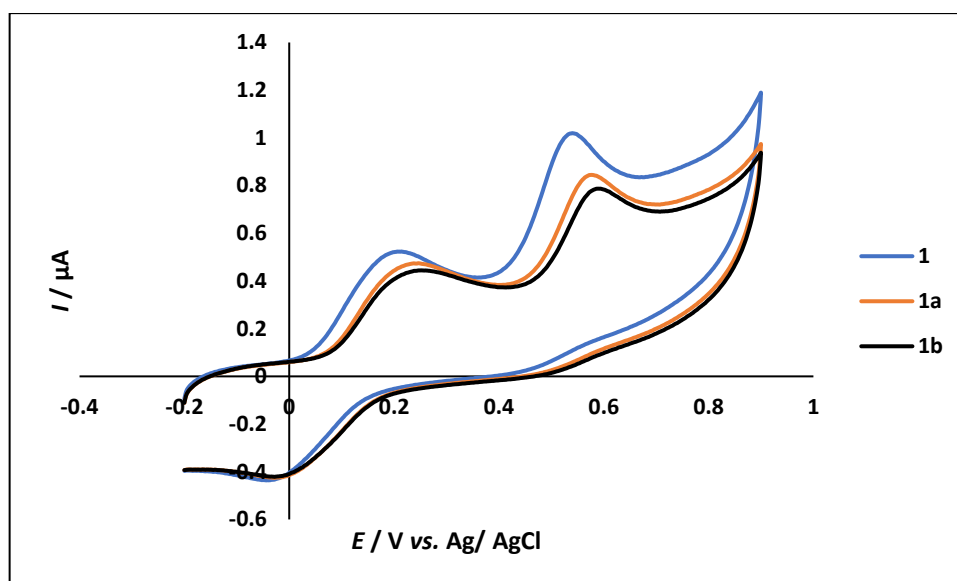
**Slika 5** Ovisnost potencijala pika o pH vrijednosti otopine (+)-katehina



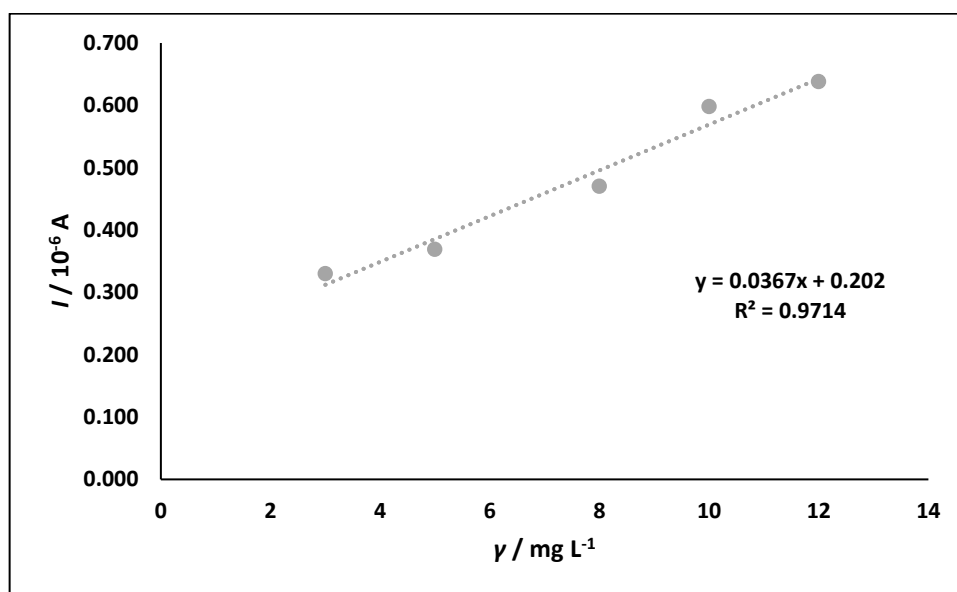
**Slika 6** Ciklički voltamogram (+)-katehina ( $\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$ ) u  $0,1 \text{ M}$  PBS  $\text{pH } 4$  pri brzinama polarizacije u rasponu od  $10$  do  $75 \text{ mVs}^{-1}$  prema uvjetima iz **Tablice 1**



**Slika 7** Ovisnost struje pika (+)-katehina ( $\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$ ) o drugom korijenu brzine polarizacije

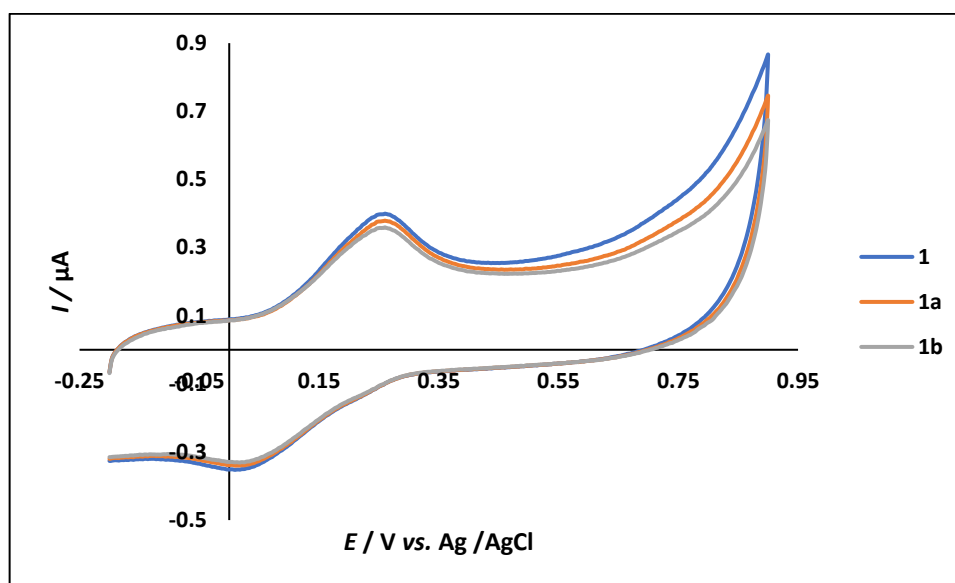


**Slika 8** Ciklički voltamogrami (+)-katehina ( $\gamma = 5 \text{ mgL}^{-1}$ ) u 0,1M PBS pH 4 dobiveni višestruko uzastopnom polarizacijom

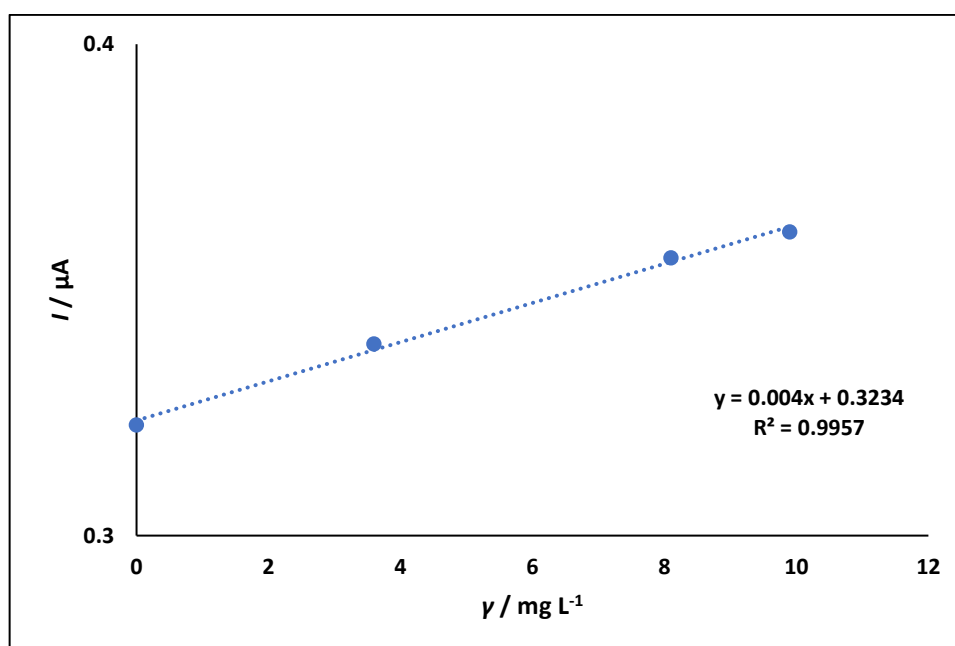


**Slika 9** Kalibracijska krivulja ovisnosti struje pika o masenoj koncentraciji (+)-katehina

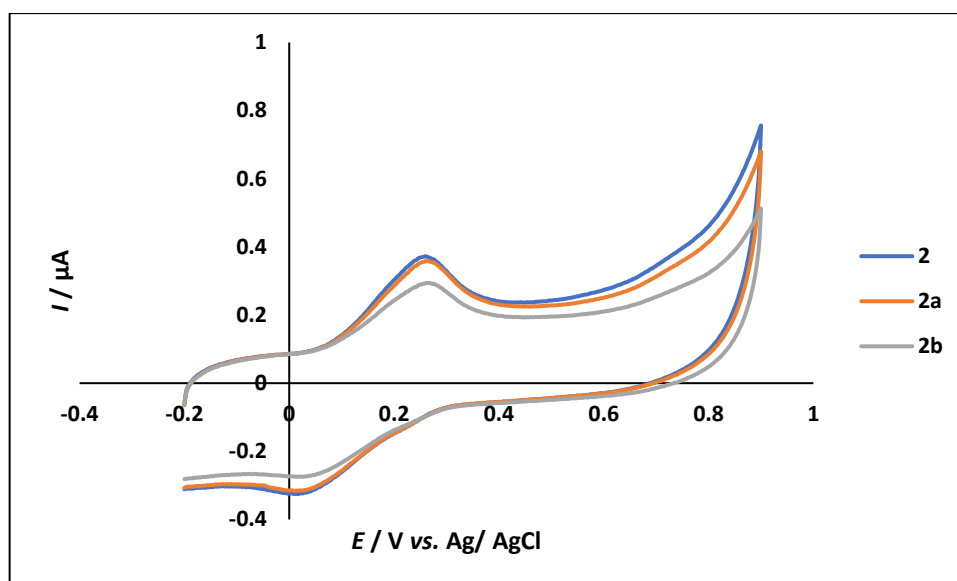
## 4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE ČAJA OD MENTE



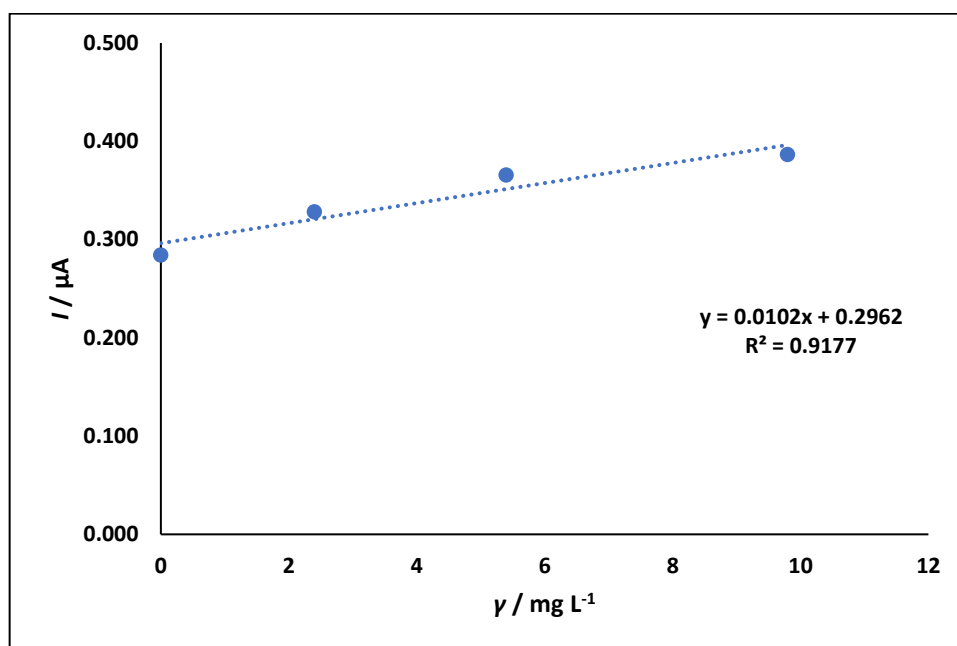
Slika 10 Ciklički voltamogrami čaja od mente 1 (DF= 200) u 0,1M PBS pH 4 dobiveni višestrukum uzastopnom polarizacijom pri uvjetima iz **Tablice 1**



Slika 11 Obogaćivanje uzorka čaja od mente 1 (DF=200) poznatom koncentracijom (+)-katehina (3,5, 8 i 10  $\text{mg L}^{-1}$ )



**Slika 12** Ciklički voltamogrami čaja od mente 2 (DF= 200) u 0,1M PBS pH 4 dobiveni višestrukom uzastopnom polarizacijom pri uvjetima iz **Tablice 1**



**Slika 13** Obogaćivanje uzroka čaja od mente 2 (DF=200) poznatom koncentracijom (+)-katehina (3,5, 8 i 10  $mgL^{-1}$ )



## **5. RASPRAVA**

U ovom diplomskom radu istražena je mogućnost primjene cikličke voltametrije za karakterizaciju (+)-katehina u uzorcima čaja od mente dva komercijalna brenda (čaj od mente 1 i čaj od mente 2). Kao tro-elektrodni sustav predstavljala je radna dijamantna elektroda dopirana borom, pomoćna elektroda od ugljika i kao referentna Ag/AgCl dok je osnovni elektrolit bio 0,1M fosfatni pufer.

### **5.1. Elektrokemijsko ponašanje (+)-katehina primjenom cikličke voltametrije na dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom**

Ispitani su utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita, brzine polarizacije, višestruke uzastopne polarizacije i koncentracije (+)-katehina primjenom cikličke voltametrije. Istražena je i realna primjena odabranih eksperimentalnih uvjeta cikličke voltametrije na elektrokemijsku oksidaciju (+)-katehina u uzorcima čajeva od mente 1 i 2.

S ciljem određivanja utjecaja pH vrijednosti osnovnog elektrolita (0,1M PBS), učinjeno je ispitivanje u području od pH 3 do 7. Na **Slici 4** prikazani su ciklički voltamogrami (+)-katehina u 0,1M PBS te se uočava da je pH 4 najpogodniji medij za elektrokemijsku karakterizaciju (+)-katehina u 0,1M PBS na dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom.

Na **Slici 5** prikazana je ovisnost elektrodnog potencijala o pH vrijednosti te iz odsječka krivulje uočava se da bi elektrodni potencijal (+)-katehina na ovoj vrsti elektrode bio oko 0,514V (anodna oksidacija) te 0,308V (katodna redukcija). Ovo govori da je elektrokemijska redoks-reakcija (+)-katehina u 0,1M PBS pH ovisna reakcija.

Nadalje s ciljem pronalaska najpogodnije brzine polarizacije u 0,1M fosfatnom puferu pH 4 učinjeno je ispitivanje brzine polarizacije u rasponu od 10, 25, 50 do 75 mVs<sup>-1</sup>. Kao najpogodnija brzina polarizacije za (+)-katehin u ovom sustavu pokazala se brzina od 50 mVs<sup>-1</sup> (**Slika 6**) te je odabrana za nastavak elektrokemijskog ispitivanja. Iz **Slike 7** uočava se da porastom brzine polarizacije se povećava i drugi korijen brzine polarizacije porastom anodne i opadanjem katodne struje što govori da je reakcija difuzijski ovisna (Janeiro i Brett, 2004; Namazian i Zare, 2005).

Slijedeće, ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije (+)-katehina u 0,1M PBS pH 4 te se iz prikazanih cikličkih voltamograma uočava opadanje anodne struje i pomicanje elektrodnog potencijala prema višim vrijednostima u oba dva pika druge i treće polarizacije što govori da se na površini elektrode stvaraju oksidacijski produkti ili produkt te ometaju prolazak elektroaktivne tvari iz otopine prema površini elektrode (**Slika 8**). Razlog tomu je što se (+)-katehin snažno adsorbira na površinu elektrode i krajnji produkt oksidacije nije elektroaktivna

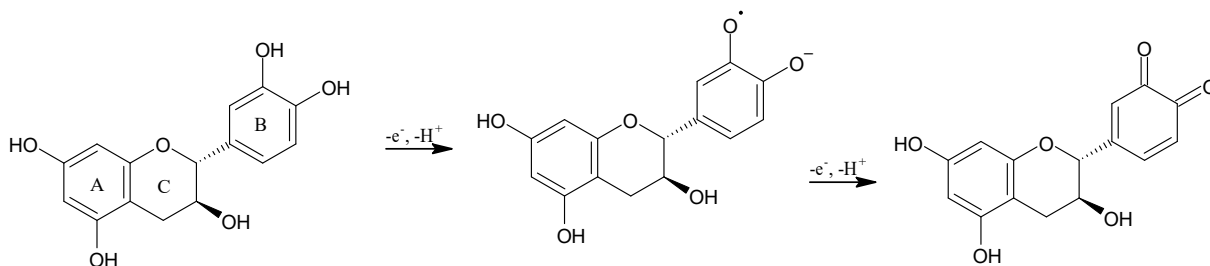
tvar te kao takva blokira površinu elektrode (Janeiro i Brett, 2004). Također, prvi oksidacijski pik na potencijalu od oko 0,2V vjerojatno je oksidacija kateholnog B-prstena koji se najlakše oksidira dok drugi pik bi bio posljedica oksidacije rezorcinolnog A-prstena. Nadalje, iz izgleda cikličkog voltamograma (+)-katehina uočava se da je drugi pik ireverzibilan (odsustvo katodnog pika).

Zatim je ispitan utjecaj koncentracije (+)-katehina u 0,1M PBS pH 4 u rasponu koncentracija od 3 do 12 mgL<sup>-1</sup> s ciljem kvantifikacije u uzorcima čaja od mente 1 i 2. Na osnovi struje pika u ovisnosti o masenoj koncentraciji kreiran je kalibracijski pravac (+)-katehina te je prikazana na **Slici 9** (Bagalkoti i sur., 2017). Na **Slici 9** se uočava linearni porast strujnog odziva povećanjem koncentracije (+)-katehina te je dobivena slijedeća **Jednadžba pravca 1**:

$$I_p(\mu A) = 0,0367 \gamma(mgL^{-1}) + 0,202 \quad (1)$$

Koeficijent korelacije ( $R^2$ ) iznosi 0,9714. Određene su granica detekcije (LOD) koja iznosi 18,31 mgL<sup>-1</sup> i granica kvantifikacije (LOQ) koja iznosi 60,4 mgL<sup>-1</sup>.

Kemijska struktura (+)-katehina sadrži kateholnu grupu na B-prstenu i rezorcinolnu na A-prstenu te sadrži još i OH skupinu u C-prstenu na C-3. Mehanizam oksidacije (+)-katehina prema, Janeiro i Brett (2004), temelji se na izmjeni jednakog broja protona i elektrona te (+)-katehin prelazi u kinon preko međuproducta semikinona (**Slika 14**).



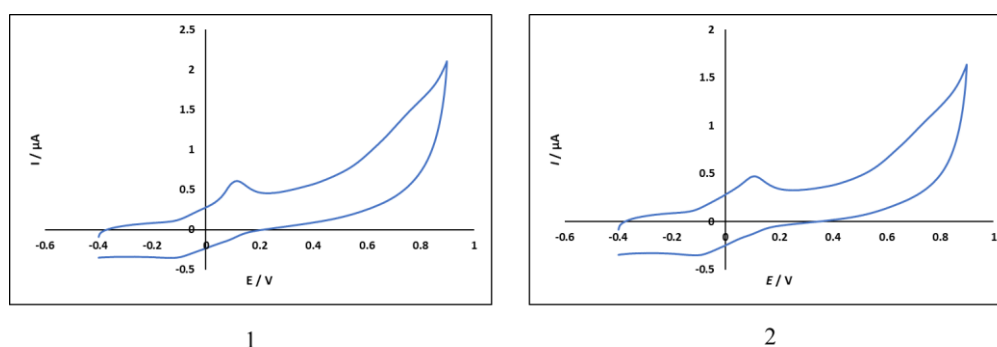
**Slika 14** Mehanizam oksidacije (+)-(+)-katehina (preuzeto iz Janeiro i Brett, 2004)

## 5.2. Elektrokemijsko ponašanje čaja od mente primjenom cikličke voltametrije na dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom

Na **Slikama 10 i 12** prikazani su ciklički voltamogrami čajeva od mente 1 i 2 u 0,1M PBS pH 4 te se na oba ciklička voltamograma uočava jedan jasno izraženi pik na potencijalu od oko 0,3V, također je učinjeno ispitivanje utjecaja višestruke uzastopne polarizacije na izgled cikličkih voltamograma oba dva čaja od mente te se uočava ista pojava kao i kod (+)-katehina (opadanje strujnog odziva i pomak elektrodnog potencijala prema višim vrijednostima).

Da bi se potvrdilo prisustvo katehinskih spojeva u uzorcima čaja od mente 1 i 2 u 0,1M PBS pH 4 izvršeno je obogaćivanje uzoraka poznatim koncentracijama (+)-katehina što je pokazalo da su katehinski spojevi prisutni u ispitanim uzorcima (**Slike 11 i 13**) jer se strujna pik na potencijalu od oko 0,3V povisila u usporedbi s čajevima od mente 1 i 2 bez dodatka (+)-katehina. Također je ovo i postupak standardne adicije s ciljem kvantifikacije (+)-katehina u čajevima od mente 1 i 2. Sadržaj (+)-katehina u čajevima od mente 1 i 2 kvantificiran pomoću kalibracijskog pravca i standardnom adicijom iznosi u rasponu od 660 do 16250 mgL<sup>-1</sup>.

Kao dodatno pokušala su se izvesti elektrokemijska mjerenja cikličkom voltametrijom antioksidacijskog djelovanja (+)-katehina iz uzorka čaja od mente na osnovi Troloxa kao standarda na radnoj komercijalnoj dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom u elektrolitu 0,1M sulfatnoj kiselini s dodatkom lužine. Međutim, potrebno je izvršiti dodatno elektrokemijsko istraživanje za pronalaženje idealnih eksperimentalnih parametara, faktora razrjeđenja, koncentracijskog profila standarda, osjetljivosti i slično za razvoj elektrokemijske tehnike na ovoj vrsti radne elektrode. Signal odziva je dobiven i prikazan na **Slici 15** te daje obećavajući put za razvoj ove tehnike.



**Slika 15** Ciklički voltamogrami čaja od mente proizvođača 1 a) (DF=12,5) i b) 2 (DF=10) u 0,1M sulfatnoj kiselini s dodatkom lužine

Ciklička voltometrija kao elektrokemijska tehnika pokazala se primjenjivom za elektrokemijsku analizu (+)-katehina u čajevima od mente 1 i 2 na komercijalnoj dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom u 0,1M PBS pH 4.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na osnovi dobivenih rezultata ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- kao osnovni elektrolit odabran je 0,1M fosfatni pufer pH 4 i brzina polarizacije od 50  $\text{mVs}^{-1}$ ,
- ispitani utjecaj koncentracije (+)-katehina pokazao je linearnu ovisnost,
- potvrđena je prisutnost katehinskih spojeva u uzorcima čaja od mente postupkom obogaćivanja uzoraka poznatim koncentracijama (+)-katehina,
- ciklički voltamogrami čajeva od mente pokazali su jedan jasno izraženi strujni pik na potencijalu od 0,3V,
- ciklička voltometrija kao elektrokemijska tehnika pokazala se primjenjivom za elektrokemijsku analizu (+)-katehina u čajevima od mente na komercijalnoj dijamantnoj elektrodi dopiranoj borom.

## **7. LITERATURA**



- Bagalkoti, J. T., Pattar V.P., Nandibewoor, S.T. (2017) Square wave and differential pulse voltammetric methods for the analysis of olivetol at gold electrode. *Journal of Electrochemical Science and Engineering* 7(2), str. 77-88.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R. (2001) *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications.* John Wiley & Sons, Inc.
- Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research* 101(2-3), str. 157–170.
- Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K., Agarwal, D.D. (2015) A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 5(4), str. 76-81.
- Brown, N., John, J.A., Shaidi, F. (2019) Polyphenol composition and antioxidant potential of mint leaves. *Food Production, Processing and Nutrition* 1(1), str. 1-14.
- Ganeshpurkar, A., Saluja, A. (2020) The pharmacological potential of catechin. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 57(5), str. 505-511.
- Isemura, M. (2019) Catechin in Human Health and Disease. *Molecules* 24(3), str. 528-533.
- Janeiro, P., Brett, A.M.O. (2004) Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta* 518, str. 109–115.
- Javanshir, Z., Razavi Mehr, M., Fekri, M.H. (2021) Experimental and Computational Studies on the Electrochemical Behavior of Carvacrol and Menthol. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 40(2), str. 487–499.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R. (1983) Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60(9), str. 702-706.
- Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11), str. 5338–5342.
- Lee, B.L., Ong, C.N. (2000) Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 881(1-2), str. 439-447.
- Lim, H.W., Kim, D.H., Kim, S.H., Lee, J.M., Chon, J.W., Song, K.Y., Bae, D., Kim, J., Kim, H., Seo, K.H. (2018) Antimicrobial Effect of *Mentha piperita* (Peppermint) oil against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, and *Salmonella Enteritidis* in various dairy foods: Preliminary study. *Journal of Milk Science and Biotechnology* 36(3), str. 146-154.
- Loolaie, M., Moasef, N., Rasouli, H., Adibi, H. (2017) Peppermint and its functionality: A review. *Archives of Clinical Microbiology* 8(4), str. 54-70.
- Lovrić, M., Osteryoung, J. (1982) Theory of differential normal pulse voltammetry. *Electrochimica Acta* 27(7), str. 963-968.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Akhilesh, P. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry* 70(1), str. 437-473.
- Maoela, M.S., Arotiba, A.A., Baker, P.G.L., Mabusela, W.T., Jahed, N., Songa, E.A., Iwuoha, I. (2009) Electroanalytical Determination of Catechin Flavonoid in Ethyl Acetate

- Extracts of Medicinal Plants. *International Journal of Electrochemical Science* 4(11), str. 1497-1510.
- McKay, D., Blumberg, J.B. (2006) A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 20(8), str. 619-633.
- Mireceski, V., Skzypek, S., Stojanov, L. (2018) Square-wave voltammetry. *ChemTexts* 4, str. 17-31.
- Naczk, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054(1-2), str. 95-111.
- Namazin, M., Zare, H.R. (2005) Electrochemistry of chlorogenic acid; experimental and theoretical studies. *Electrochimica Acta* 50, str. 4350-4355.
- Parker, V.D. (1986) Linear Sweep and Cyclic Voltammetry. *Comprehensive Chemical Kinetics*, str. 145-202.
- Saito, S.T., Welzel, A., Suyenaga, E.S., Bueno, F. (2006) A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Journal of Food Science and Technology* 26, str. 394-400.
- Shard, A.G., Schofield, R.C., Minelli, C. (2019) Ultraviolet-visible spectrophotometry. *Characterization of Nanoparticles*, str. 185-196.
- Shen, D., Wu, Q., Wang, M., Yang, Y., Lavoie, E.J., Simon, J.E. (2006) Determination of the Predominant Catechins in *Acacia catechu* by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(9), str. 3219-3224.
- Surovic, A.H., Jones, K., Sarabia, G. (2019) Quantification of Catechins in Tea Using Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* 96(2), str. 366-371.
- Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F.P. (1998) A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92(2-3), str. 75-88.
- Tahira, R., Naeemullah, M., Akbar, F., Masood, M. S. (2011) Major phenolic acids of local and exotic mint germplasm grown in Islamabad. *Pakistan Journal of Botany* 43, str. 151-154.
- Yaneva, Z., Ivanova, D., Besheva, K. (2020) Quantification of catechin in *Acacia catechu* extract by non-derivative, first derivative UV/Vis spectrophotometry and FT-IR spectroscopy. *Bulgarian Chemical Communications* 52, str. 41-47.