

# Karakterizacija nekih polifenola iz čaja kadulje primjenom dvije voltametrijske tehnike

---

**Bobovec, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:109:911235>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

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**

**Josipa Bobovec**

**Karakterizacija nekih polifenola iz čaja kadulje primjenom dvije  
voltametrijske tehnike**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2022.

## 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 VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 28. travnja 2022.

**Mentor:** doc. dr. sc. *Ivana Tomac*

### Karakterizacija nekih polifenola iz čaja kadulje primjenom dvije voltametrijske tehnike

*Josipa Bobovec, 0113142855*

**Sažetak:** Voltametrijske tehnike omogućuju dobivanje velikog broja eksperimentalnih parametara koji pomažu u identifikaciji i kvantifikaciji polifenolnih spojeva prisutnih u različitim uzorcima. Cilj ovog diplomskog rada je primijeniti dvije voltametrijske tehnike, cikličku i pravokutnovalnu voltametriju za karakterizaciju polifenola iz čaja od kadulje. Čaj od kadulje je biljna infuzija koja se dobiva vodenom ekstrakcijom osušenih listova ljekovite i aromatične biljke *Salvia officinalis* L. Za elektrokemijsku karakterizaciju odabrani su najznačajniji polifenoli čaja kadulje, (+)-katehin, kafeinska i ferulična kiselina. Voltametrijska mjerenja provedena su na standardnoj troelektrodnoj ćeliji u prisustvu inertnog elektrolita, fosfatnog pufera. Rezultati istraživanja su pokazali da pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija i koncentracija analita utječu na elektrokemijsko ponašanje (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline te je dokazana njihova prisutnost u čaju od kadulje.

**Ključne riječi:** čaj kadulje, polifenoli, ciklička voltametrija, pravokutnovalna voltametrija

**Rad sadrži:** 45 stranica  
29 slika  
2 tablice  
36 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. izv. 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. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>         | zamjena člana |

**Datum obrane:** 26. rujna 2022.

**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. VII held on April 28, 2022.  
**Mentor:** *Ivana tomac*, PhD, assistant prof.

### Characterization of Some Polyphenols from Sage Tea Using Two Voltammetric Techniques

*Josipa Bobovec, 0113142855*

**Summary:** *Voltammetric techniques enable obtaining a large number of experimental parameters that help in the identification and qualification of polyphenolic compounds present in different samples. The aim of this work was to apply two voltammetric techniques, cyclic and square wave voltammetry for the characterization of polyphenols from sage tea. Sage tea is a herbal infusion obtained by aqueous extraction of dried leaves of the medicinal and aromatic plant *Salvia officinalis* L. The most important sage tea polyphenols were selected for electrochemical characterization: (+)-catechin, caffeic and ferulic acids. Voltammetric measurements were performed on a standard three-electrode cell in the presence of a neutral electrolyte, phosphate buffer. The results of the research showed that the value of the electrolyte, multiple successive polarization and concentration of analyte affect the electrochemical behavior of (+)-catechin, caffeic and ferulic acids and their presence in sage tea was demonstrated.*

**Key words:** Sage tea, polyphenols, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry

**Thesis contains:** 45 pages  
29 figures  
2 tables  
36 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

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

**Defense date:** September 26, 2022

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

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Tomac na savjetima, razumijevanju, prenesenom znanju te na velikoj pomoći tijekom izrade ovog rada. Nadalje, zahvaljujem se prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje studentske dane. I na kraju, najveće zahvale idu mojim roditeljima, Andrijani i Antoniju koji su mi omogućili studiranje i koji su uz Petra i ostatak obitelji bili moja najveća podrška i oslonac. Hvala vam svima što ste vjerovali u mene, uz vas je sve bilo mnogo lakše.*

Ovaj diplomski rad izrađen je sklopu istraživanja Županijskog projekta iz 2022. godine pod nazivom "Ispitivanje važnih bioaktivnih tvari iz poljoprivrednih proizvoda s gospodarstava Osječko-baranjske županije".

## Sadržaj

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>4</b>
2.1.	ČAJ OD KADULJE .....	5
2.1.1.	<i>Kadulja (Salvia officinalis L.) .....</i>	<i>5</i>
2.2.	POLIFENOLI U KADULJI .....	6
2.2.1.	<i>(+)-Katehin .....</i>	<i>8</i>
2.2.2.	<i>Kafeinska kiselina .....</i>	<i>9</i>
2.2.3.	<i>Ferulična kiselina .....</i>	<i>10</i>
2.3.	ELEKTROKEMIJSKE TEHNIKE .....	10
2.3.1.	<i>Ciklička voltometrija .....</i>	<i>12</i>
2.3.2.	<i>Pravokutnovalna voltometrija .....</i>	<i>14</i>
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>16</b>
3.1.	ZADATAK RADA.....	17
3.2.	MATERIJALI I METODE .....	17
3.2.1.	<i>Kemikalije i priprema otopina.....</i>	<i>17</i>
3.2.2.	<i>Čaj od kadulje .....</i>	<i>17</i>
3.2.3.	<i>Ciklička i pravokutnovalna voltometrija .....</i>	<i>18</i>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>22</b>
4.1.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KATEHINA.....	23
4.1.1.	<i>pH profil (+)-katehina primjenom cikličke i pravokutnovalne voltetrije .....</i>	<i>23</i>
4.1.2.	<i>Pravokutnovalna voltetrija (+)-katehina .....</i>	<i>24</i>
4.2.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINSKE KISELINE .....	25
4.2.1.	<i>pH profil kafeinske kiseline primjenom cikličke i pravokutnovalne voltetrije .....</i>	<i>25</i>
4.2.2.	<i>Pravokutnovalna voltetrija kafeinske kiseline .....</i>	<i>26</i>
4.3.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE FERULIČNE KISELINE .....	27
4.3.1.	<i>pH profil ferulične kiseline primjenom cikličke i pravokutnovalne voltetrije .....</i>	<i>27</i>
4.3.2.	<i>Pravokutnovalna voltetrija ferulične kiseline .....</i>	<i>28</i>
4.4.	KALIBRACIJSKE KRIVULJE POLIFENOLA .....	29
4.5.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE ČAJA KADULJE.....	31
4.5.1.	<i>Identifikacija polifenolnih spojeva u uzroku čaja od kadulje .....</i>	<i>32</i>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
5.1.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE (+)-KATEHINA .....	35
5.2.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINSKE KISELINE .....	36

5.3.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE FERULIČNE KISELINE .....	37
5.4.	KALIBRACIJSKE KRIVULJE ISPITANIH POLIFENOLA .....	37
5.5.	ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE POLIFENOLA IZ UZORKA ČAJA OD KADULJE .....	38
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>42</b>



## **1. UVOD**

*Salvia officinalis* L. (kadulja) je ljekovita i aromatična biljka koja se dugi niz godina koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje raznih upala i bolesti (Maliki i sur., 2021). Najčešće se upotrebljava u obliku biljne infuzija, odnosno čaja. Čaj od kadulje dobiva se od osušenih listova biljke, a terapijski učinci čaja potječu od listova ljekovite biljke koji sadržavaju značajne količine bioaktivnih spojeva kao što su polifenoli. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više fenolnih prstenova. Polifenoli su snažni antioksidansi koji imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Najznačajniji polifenoli u čaju od kadulje su flavonoidi i fenolne kiseline. Od flavonoida u najvećim je koncentracijama prisutan (+)-katehin, a od fenolnih kiselina, hidroksicimetna kafeinska i ferulična kiselina (Jakovljević i sur., 2019.; Boufadi i sur., 2020.).

Za karakterizaciju odnosno identifikaciju i kvantifikaciju navedenih polifenola iz različitih biljnih materijala razvijene su različite tehnike kao što su spektrofotometrijske, kromatografske te elektrokemijske. Danas se sve više koriste elektrokemijske voltametrijske tehnike jer su brze, precizne i ekonomične (Hoyos-Arbeláez i sur., 2016.). Ciklička, pravokutnovalna i diferencijalna pulsna voltametrija jedne su od najprimjenjivijih elektrokemijskih tehnika za karakterizaciju polifenola. Voltametrijske tehnike temelje se na mjerenju strujnog odziva, odnosno električne struje, koja nastaje kao posljedica elektrokemijske reakcije na površini radne elektrode.

Ciklička voltametrija sastoji se od linearnog skeniranja potencijala stacionarne radne elektrode u elektrolitnoj otopini pri čemu se dobije ciklički voltamogram. Ciklički voltamogram je grafički prikaz strujnog odziva cikličke voltametrije koji je prikladan za kvantitativnu analizu i određivanje kinetičkih parametara elektrokemijskih reakcija (Hoyos-Arbeláez i sur., 2016.).

Pravokutnovalna voltametrija je jedna je od najnaprednijih voltametrijskih tehnika koju karakterizira velika brzina polarizacije i visoka osjetljivost. Pogodna je za karakterizaciju elektroaktivnih tvari i za ispitivanje mehanizama i kinetike elektrokemijskih reakcija. U pravokutnovalnoj voltametriji struja se mjeri dvaput tijekom svakog pravokutnog ciklusa, mjeri se na kraju trajanja anodnih i na kraju trajanja katodnih naizmjeničnih pravokutnih pulseva (Tomic, 2016.; Čížmek, 2018.).

Cilj ovog diplomskog rada bio je primijeniti dvije voltametrijske tehnike, cikličku i pravokutnovalnu voltametriju, za karakterizaciju (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline iz čaja od kadulje.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ČAJ OD KADULJE

Čaj i proizvodi na bazi čaja popularna su pića koja se konzumiraju širom svijeta zbog karakterističnog okusa, mirisa i brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Za pripravu biljnog čaja mogu se koristiti listovi, cvjetovi, sjemenke, kore i plodovi ljekovitih i aromatičnih biljaka poput *Salvia officinalis* L. Čaj od kadulje je biljna infuzija koji se dobiva vodenom ekstrakcijom osušenih listova biljke, koji se preliju kipućom vodom s ciljem izdvajanja aktivnih komponenti. Čaj je bogatog okusa i mirisa te ima moguće antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje (Alašalvar i Çam, 2019.).

### 2.1.1. Kadulja (*Salvia officinalis* L.)

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) (Slika 1.) je višegodišnja vazdazelena biljka iz porodice *Labiatae/Lamiaceae*. Potječe s područja Mediterana i Bliskog istoka, no danas je zbog svoje aromatičnosti i ljekovitih svojstava rasprostranjena diljem svijeta, posebice u Sjevernoj Americi i Europi (Ghorbani i Esmaeilzadeh, 2016.). *Salvia officinalis* L. nalazi se u suhim kamenitim, vapnenačkim tlima ili uz rubove borovih šuma, korita rijeka ili uz puteve (Kamiloglu i sur., 2016.). Raste u polugrm visine 50 – 110 cm i sastoji se od drvenaste stabljike iz koje izbijaju grančice sa sivo dlakavim listovima i svijetlo ljubičastim cvjetovima (Hulina, 2011.).



Slika 1 *Salvia officinalis* L. (Web 1)

Klima, nadmorska visina i dostupnost vode važni su čimbenici koji utječu na kemijski sastav kadulje. Kemijski sastav kadulje uključuje fenolne spojeve (kumarine, flavonoide, tanine), alkaloide, ugljikohidrate, masne kiseline, terpene/terpenoide, glikozidne derivate, poliacetilene, steroide, voskove i vitamine A i C (Ghorbani i Esmailizadeh, 2016.; Patenkovic i sur., 2009.). Fenolni spojevi i terpenoidi su dva glavna sekundarna metabolita kadulje. Značajna količina terpenoide koja je prisutna u čajevima od kadulje, pridonosi mogućem protektivnom učinku (Arceusz i sur., 2013.). Najzastupljeniji fenolni spojevi u kadulji su fenolne kiseline i flavonoidi. Od fenolnih kiselina u velikoj je količini zastupljena kafeinska, ferulična, vanilinska, ružmarinska kiselina te flavonoidi luteolin, apigenin, kvercetin i katehin (Jakovljević i sur., 2019.; Boufadi i sur., 2020.).

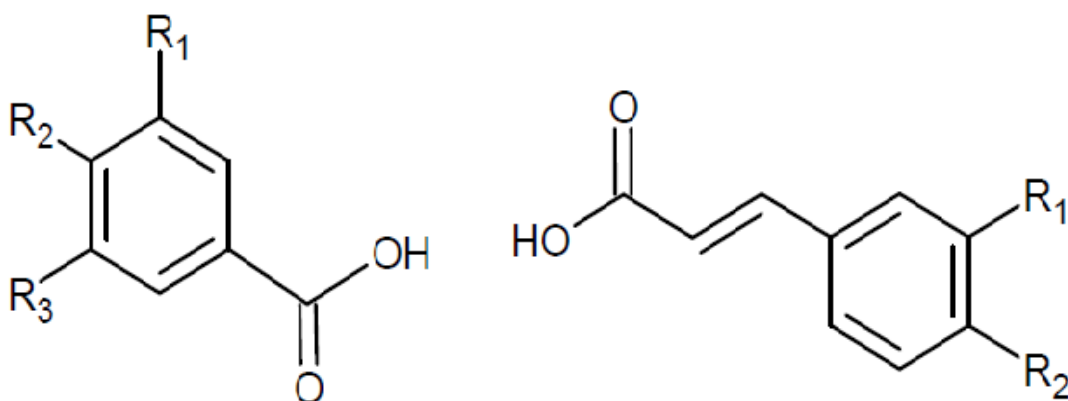
U tradicionalnoj narodnoj medicini kadulja se koristi za liječenje blage dispepsije (kao što su žgaravica i nadutost), pretjeranog znojenja, kognitivnih poremećaja povezanih sa starenjem te za liječenje različitih vrsta bolesti i poremećaja kao što su napadaji, čirevi, giht, reumatizam, upale u grlu i na koži, vrtoglavice, paralize, proljev i hiperglikemija (Maliki i sur., 2021.).

Ljekovita kadulja ima značajan sadržaj bioaktivnih spojeva (polifenolni spojevi, vitamini), što omogućuje njezinu upotrebu u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj, parfumerijskoj industriji i u proizvodnji biopesticida (Khiya i sur., 2021.). Osim čaja, na tržištu se mogu pronaći različiti proizvodi na bazi kadulje. Neki od značajnijih proizvoda su med, začini, eterična ulja, tinkture, hidrolati, kreme, sapuni, šamponi za kosu te razni farmaceutski proizvodi kao što su sprej za usta i sirupi za kašalj.

### **2.2. POLIFENOLI U KADULJI**

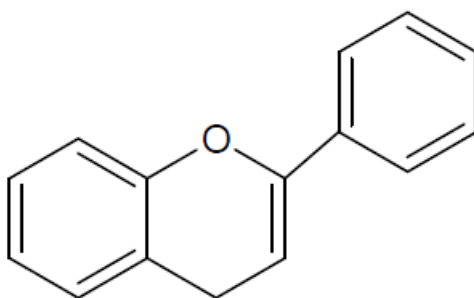
Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti i snažni antioksidansi koji su prisutni u mnogim biljnim materijalima te se svrstavaju u jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih spojeva. Do sad je identificirano više od 8000 fenolnih struktura koji nastaju iz zajedničkog intermedijera fenilalanina ili bliskog preteče, šikimske kiseline. Prema kemijskoj strukturi sastoje od jednog ili više fenolnih prstenova. Ovisno o broju fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji ih međusobno povezuju, polifenoli se dijele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignin (Pandey i Rizvi, 2009.).

Fenolne kiseline se nalaze u svim biljnim materijalima, a ponajviše u kiselom voću. Sastoje se od aromatskog prstena na koji je vezana karboksilna skupina i jedna ili više hidroksilnih skupina (**Slika 2**). Dijeleva na derivate hidoksicimetne i hidoksibenzojeve kiseline (Pandey i Rizvi, 2009.). U fenolne kiseline ubrajaju se ferulična, kafeinska, ružmarinska, vanilinska i galna kiselina.



**Slika 2** Kemijska struktura fenolne kiseline (hidoksibenzojeva i hidoksicimetna kiselina)  
(Pandey i Rizvi, 2009.)

Flavonoidi su polifenolni spojevi, koji se dijele se na flavonole, flavone flavanone, flavanole, antocijanine i izoflavone (**Slika 3**). Najčešći flavonoidi su (+)-katehin, kvercetin i miricetin (Pandey i Rizvi, 2009.).



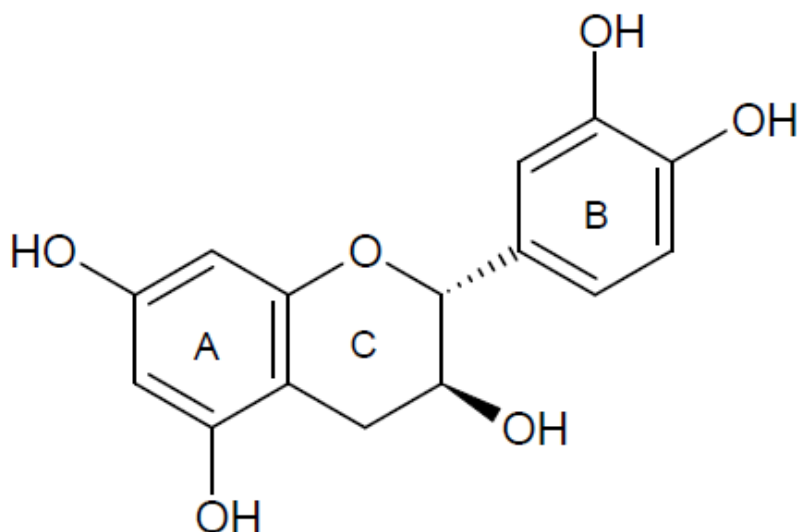
**Slika 3** Kemijska struktura flavonoida (Pandey i Rizvi, 2009.)

Polifenoli imaju moguća zaštitna svojstva za ljudski organizam, te je njihov unos u organizam od velike važnosti zbog blagotvornog utjecaja na zdravlje (Boufadi i sur., 2020.). U čaju od

kadulje nalaze se značajne količine polifenola, te prema Pandey i Rizvi (2009.) jedna šalica čaja kadulje sadrži oko 100 mg polifenola.

### 2.2.1. (+)-Katehin

(+)-Katehin (trans-3,3',4,5,7-pentahidroksiflavan) je flavonoid koji je zastupljen u raznim namjernicama kao što je čaj, vino, čokolada, svježe voće i povrće. U svojoj kemijskoj strukturi ima kateholnu skupinu u prstenu B, rezorcinolnu skupinu u prstenu A i hidroksilnu skupinu vezanu za C-3 ugljikov atom u prstenu C. Na Slici 4 prikazana je kemijska struktura (+)-katehina. A i B prstenovi (+)-katehina nisu konjugirani stoga ionizacija hidroksilnih skupina jednog prstena ne utječe značajno na ionizaciju hidroksilnih skupina drugog prstena (Janeiro i Brett, 2004.). Funkcionalne hidroksilne skupine (+)-katehina vezane na prstenaste strukture mogu elektrokemijski oksidirati. Mehanizam oksidacije (+)-katehina je složeni proces koji je ovisan o pH vrijednostima i odvija se u dva koraka. U prvom koraku se odvija oksidacija kateholne skupine, a u drugom koraku rezorcinolna skupine. Oksidacija kateholne skupine je reverzibilna reakcija dok je oksidacija rezorcinolne skupine ireverzibilna reakcija (Janeiro i Brett, 2004.). Novak i sur. (2009.) navode kako se u brojnim istraživanjima pokazalo da kateholne skupine u prstenu B u (+)-katehinima lakše oksidiraju od rezorcinolne skupine u prstenu A.



Slika 4 Kemijska struktura katehina (Janeiro i Brett, 2004.)

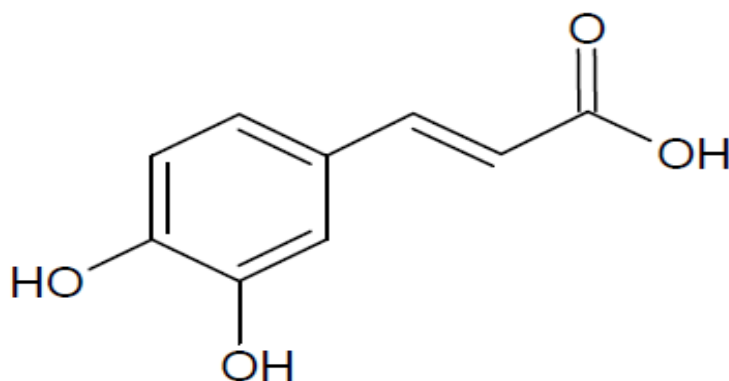
(+)-Katehini su važni sastojci čaja, smatraju se vrijednim funkcionalnim sastojkom za pripremu prehrambenih proizvoda s dodanom vrijednošću i za poboljšanje kvalitete prehrambenih



proizvoda. Danas se sve više koriste u kozmetičkoj industriji jer mogu poboljšati fotostabilnost i zaštititi kožu od UV zračenja (Yilmaz,2006.; Bae i sur.,2020.).

### 2.2.2. Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) (**Slika 5.**) je prisutna u mnogim vrstama voća, biljnim čajevima, kavi i sve se više koristi u proizvodnji lijekova na bazi propolisa (Magnani i sur., 2014.). U kadulji, kafeinska kiselina je građevni blok raznih biljnih metabolita od jednostavnijih monomera do višestrukih kondenzacijskih proizvoda koji daju niz oligomera. Najzastupljeniji monomer kafeinske kiseline u kadulji su sama kafeinska kiselina i 3-(3,4-dihidroksifenil) mliječna kiselina, a najzastupljeniji dimer kafeinske kiseline je ružmarinska kiselina. Kafeinska kiselina zajedno s kina kiselinom čini klorogensku kiselinu. Klorogenska kiselina se nalazi u mnogim vrstama voća i u visokim koncentracijama u kavi, međutim u kadulji nije zastupljena (Manach i sur., 2004.; Lu i Foo, 2002.).

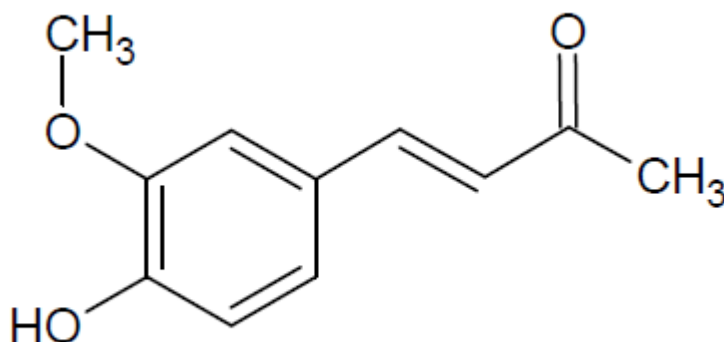


**Slika 5** Kemijska struktura kafeinske kiseline (Magnani i sur., 2014.)

Kafeinska kiselina ima važnu ulogu u zaštiti zdravlja i tretiranju nekih bolesti. Zbog mogućeg antioksidativnog djelovanja danas se sve više koristi u proizvodnji kozmetike za kožu gdje ima fotoprotektivnu ulogu, a njezino antimikrobno djelovanje usmjerena je na liječenje kožnih bolesti, kao što su akne. Kafeinska kiselina zajedno s feruličnom i *p*-kumarinskom kiselinom može inhibirati rast bakterija kao što je *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i neke kvasce (Magnani i sur., 2014.).

### 2.2.3. Ferulična kiselina

Ferulična kiselina (4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina) je bioaktivni spoj koji se ubraja u skupinu hidoksicimetnih kiselina (**Slika 6**). Nastaje iz metabolizma fenilalanina i tirozina. Vrlo je zastupljena u cjelovitim žitaricama, voću i povrću kao što je špinat, peršin, grožđe, te pivu (Manach i sur., 2004; Chen i Ho, 1997.; Zdunska i sur., 2018.), a u značajnim je koncentracijama prisutna i u kadulji.



**Slika 6** Kemijska struktura ferulične kiseline (Ellouze i sur., 2015.)

Ferulična kiselina ima mogući terapijski učinak protiv raznih bolesti te se koristi u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Ou i Kwok., 2004.; De Olivera i sur., 2021.; Zdunska i sur., 2018.).

## 2.3. ELEKTROKEMIJSKE TEHNIKE

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva može se provesti pomoću različitih metoda kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektrofotometrijske metode i elektrokemijske metode (voltametrij).

Spektrofotometrijske metode temelje se na apsorpciji vidljivog i ultraljubičastog zračenja iz organskih molekula uslijed čega dolazi prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno energijsko

stanje. Ove su metode razvijene za procjenu sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana i primjenjuju se kvantitativne i kvalitativne analize. Kako bi se pojedinačni polifenoli točno kvantificirali i identificirali na spektrofotometru, oni se prvo trebaju razdvojiti pomoću različitih kromatografskih tehnika, najčešće HPLC-om (Tsao, 2010.). Spektrofotometar je uređaj s kojim se mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje, a se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Svjetlost od izvora zračenja prolazi kroz kivetu s uzorkom i kroz referentnu kivetu te zrake dolaze do detektora koji uspoređuje njihove intenzitete. Apsorbancija ( $A$ ) je logaritam omjera intenziteta ulazne i izlazne zrake odnosno mjera za količinu apsorbiranog svjetla u uzorku na određenoj valnoj duljini (Pavia i sur., 2001.; Jakobek Barron, 2017.).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je instrumentalna metoda za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju različitih spojeva prisutnih u bilo kojem uzorku koji posjeduje svojstvo topljivosti u nekom otapalu (Jakobek Barron, 2017.). HPLC sustav sastoji se od sustava za isporuku otapala, kolone u kojoj se odvajaju spojevi i detektora. Uzorci analita ubrizgavaju se izravno u tekuću mobilnu fazu pomoću sustava za ubrizgivanje. Kolona sadrži stacionarnu fazu kroz koju se pumpa mobilna faza i dolazi do odvajanja spojeva na temelju različite topljivosti koji se potom isporučuju u detektor. Detektor generira elektronički odgovor na odvojene uzorke koje računalo obrađuje i prikazuje kao kromatograme (Du Plessis, 2018.). HPLC metoda je učinkovita metoda za odvajanje flavonoida i fenolnih spojeva iz čaja kadulje u kratkom vremenskom periodu. Rezultati istraživanja su pokazali da je primjenom UHPLC metode moguće odvajanje flavonoida i fenolnih kiselina u samo 15 minuta (Zimmermann i sur., 2011.).

Elektrokemijske tehnike su brze, precizne i ekonomične, idealna su zamjena za konvencionalne spektrofotometrijske metode. Prednost elektrokemijskih metoda je što su brze, jednostavne i jeftine u odnosu na druge spomenute metode. Hoyos-Arbeláez i sur. (2016.) navode da u nekim slučajevima elektrokemijske tehnike dopuštaju mjerenja u prisutnosti spojeva koji inače ometaju druge metode, a kao primjer može poslužiti određivanje niskih koncentracija organskih kiselina u uzorku u prisutnosti askorbinske kiseline. Također, jedna od prednosti elektrokemijskih tehnika je ta što omogućuju dobivanje velikog broja eksperimentalnih podataka (mehanizam oksidacije, reverzibilnost/ireverzibilnost) koji pomažu

u identifikaciji i kvantifikaciji fenolnih spojeva prisutnih u uzorcima. Elektrokemijske tehnike imaju i sposobnost kvantificiranja polifenolnih spojeva s vrlo niskim granicama detekcije (Hoyos-Arbeláez i sur., 2016.).

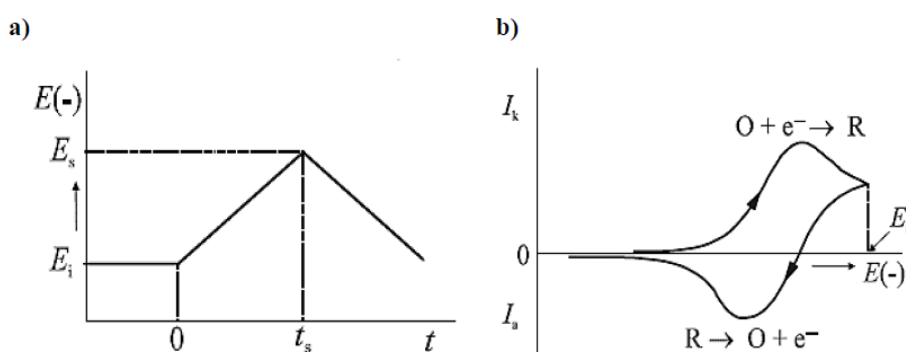
Elektrokemijske metode provode se u elektrokemijskoj ćeliji u kojoj se nalazi uronjena radna ili indikatorska elektroda. Na površini radne elektrode odvija se elektrokemijska reakcija i kao posljedica elektrokemijske reakcije nastaje odzivni signal. Razlika električnog potencijala između radne elektrode i elektrolitne otopine pokretačka je sila za elektrokemijsku reakciju (Mirceski i sur., 2018.). Odzivni signal je analogna električna veličina (električna struja, električni naboj, električni napon, frekvencija električnog signala), njegovim mjerenjem dobiva se željeni podatak o ispitivanoj otopini. Najčešće se koristi tro-elektrodni sustav koji se sastoji od elektrolitne ćelije s tri elektrode, radne, pomoćne i referentne elektrode. Pomoćna ili protuelektroda služi za ostvarivanje toka električne struje kroz ćeliju, dok referentna elektroda služi kao elektroda prema kojoj se regulira pobudni signal ili mjeri odzivni signal. Odzivni signal, osim što nastaje na radnoj elektrodi, može nastati pod utjecajem signala pobude (električne veličine, kemijske veličine, elektromagnetsko zračenje i promjena temperature) koji se dovodi na radnu elektrodu elektrolitne ćelije (Piljac, 2010). Kod voltametrijskih tehnika signal pobude je električni napon, a odzivni signal je električna struja koja se mjeri. U mnogim slučajevima, primijenjeni potencijal varira ili se struja prati tijekom određenog vremenskog razdoblja ( $t$ ). Prema tome, sve voltametrijske tehnike mogu se opisati kao neka funkcija  $E, I$  i  $t$ . Voltamogram je grafički prikaz signala odziva voltametrije. Pokazuje pikove i krivulje koji predstavljaju različite redoks procese koji se odvijaju u ispitivanoj otopini odnosno predstavlja ovisnost struje o elektrodnom potencijalu (Teixeira i sur., 2013.).

Među nekoliko spomenutih elektrokemijskih voltametrijskih tehnika, najčešće korištene su ciklička, pravokutnovalna i diferencijalno pulsna voltametrija.

### **2.3.1. Ciklička voltametrija**

Ciklička voltametrija (*engl. Cyclic Voltammetry, CV*) najraširenija je tehnika za dobivanje kvalitativnih informacija o svojstvima i karakteristikama elektrokemijskih procesa. Daje značajne informacije o elektrokemijskom redoks procesu i kinetici heterogenih reakcija

prijenosa elektrona, kao i o povezanim elektrokemijskim reakcijama (Hoyos-Arbeláez i sur., 2016.). Eksperimenti se mogu provesti u kratkom vremenskom periodu, a dobiveni ciklički voltamogrami prikladni su za kvantitativnu analizu i određivanje kinetičkih parametara (Metikoš-Huković, 2000.). Ciklička voltometrija sastoji se od linearnog skeniranja potencijala stacionarne radne elektrode u elektrolitnoj otopini korištenjem valnog oblika trokutastog potencijala kao što je prikazano na **Slici 7 a)**. (Hoyos-Arbeláez i sur., 2016.). Signal pobude radne elektrode mijenja se linearno s vremenom i kada dosegne izabranu vrijednost potencijala ( $E_s$ ), promijeni se smjer pomaka potencijala. Potencijal se mjeri od zadane početne do konačne vrijednosti i nazad, a za to vrijeme potenciostat mjeri i očitava jakost struje stvorene elektrokemijskim redoks procesom (Čižmek, 2018.). Uz pomoć eksperimentalnih uvjeta kao što su koncentracija reaktanta, pH osnovnog elektrolita, temperatura mogu se nadopuniti podaci dobiveni mijenjanjem granica potencijala i brzine polarizacije ili njezinog smjera (Metikoš-Huković, 2000.).

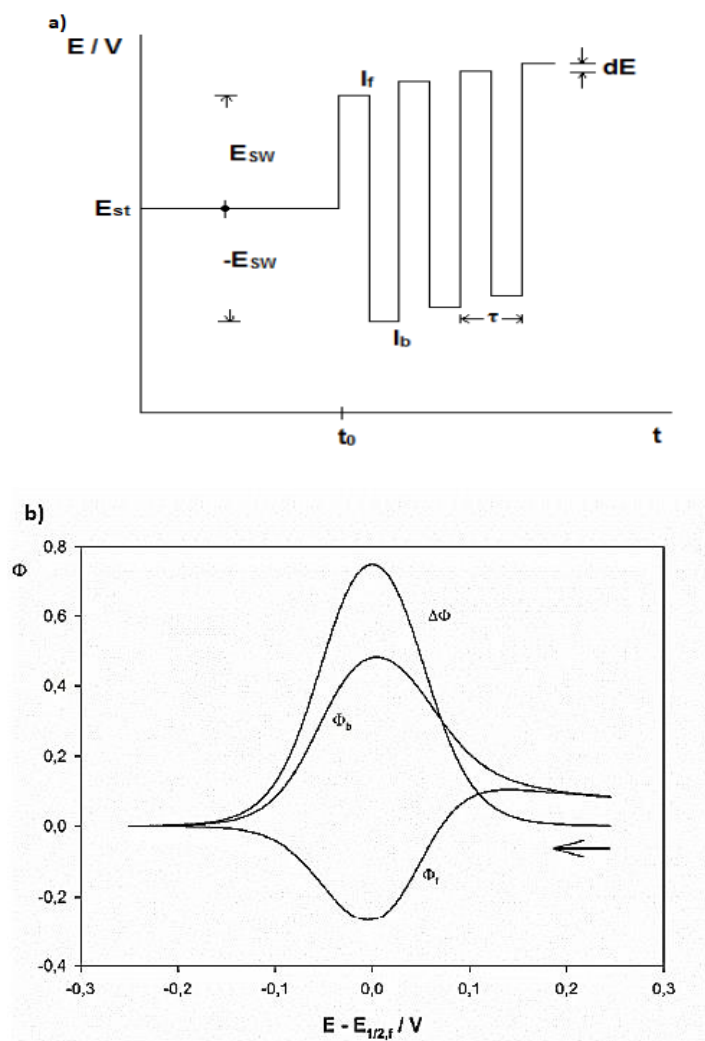


**Slika 7. (a)** Oblik signala pobude i **(b)** oblik signala odziva cikličke voltametrije (Čižmek, 2018.)

Cikličkim voltamogramom prikazuje se ovisnost promjene vrijednosti struje radne elektrode o primijenjenom potencijalu. Iz cikličkog voltamograma se mogu očitati eksperimentalne veličine, omjer visine anodne  $I_a$  i katodne struje  $I_c$  i razlika potencijala vrhova katodnog ( $E_c$ ) i anodnog ( $E_a$ ) pika (Čižmek, 2018.). Na **slici 7. b)** prikazan je oblik signala odziva cikličke voltametrije.

### 2.3.2. Pravokutnovalna voltametrij

Pravokutnovalna voltametrij (engl. *Square Wave Voltammetry*, SWV) diferencijalna je tehnika velike brzine polarizacije s izmjeničnim naponskim pravokutnim signalom pobude koji je superponiran na stepenasto rastući ili padajući istosmjerni napon. **Slika 8** prikazuje tipični pobudni signal za SWV, gdje se struja mjeri dvaput tijekom svakog pravokutnog ciklusa, jednom pri kraju trajanja anodnih (oksidacijskih) (**a**) **1**) i jednom na kraju trajanja katodnih (redukcijskih) naizmjeničnih pravokutnih pulseva (**a**) **2**). Struja odziva (struja ćelije) u pravokutnovalnoj voltametrij zapisuje se kao razlika u struji između dva uzastopna pulsa:  $\Delta I = I_f - I_b$ .  $I_f$  je oznaka za struju anodnog , a  $I_b$  je oznaka za struju katodnog impulsa. Pravokutnovalni voltamogram, prikazan na **Slici 8 b**), sastoji se od tri voltamograma od kojih jedan prikazuje struju ćelije oksidacijskog pulsa, drugi redukcijskog pulsa i treći njihove razlike (Tomic, 2016.; Čižmek, 2018.).



**Slika 8 (a)** Oblik signala pobude i **(b)** oblik signala odziva pravokutnovalne voltametrije (Čižmek, 2018.)

Pravokutnovalna voltometrija jedna je od najnaprednijih voltometrijskih tehnika zbog visoke osjetljivosti i velike brzine mjerenja. Pogodna je za karakterizaciju elektroaktivnih tvari te za ispitivanje mehanizama i kinetike elektrokemijskih reakcija (Piljac, 2010).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je:

- ispitati utjecaj pH inertnog pufera, brzine polarizacije, višestruke uzastopne polarizacije, frekvencije pobudnog signala i koncentracije na elektrokemijska svojstva najzastupljenih polifenolnih spojeva čaja kadulje, (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline i
- ispitati elektrokemijska svojstva čaja kadulje primjenom elektrokemijskih tehnika cikličke (CV) i pravokutnovalne voltametrije (SWV).

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Kemikalije i priprema otopina

Kemikalije koje su se koristile tijekom izvođenja ovog diplomskog rada su ultračista voda, metanol HPLC čistoće, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, (+)-katehin, kafeinska i ferulična kiselina.

Otopina 0,1 mol L<sup>-1</sup> fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer solution*, PBS) pH vrijednosti 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 pripremljena je od natrijevog hidrogenfosfata dihidrata, natrijevog hidrogenfosfata dodekahidrata i ultračiste vode. Otopina PBS pufera koristila se kao osnovni elektrolit za provođenje elektrokemijskih tehnika.

(+)-Katehin, kafeinska i ferulična kiselina koncentracije  $3 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> pripremljene su u metanolu HPLC čistoće.

#### 3.2.2. Čaj od kadulje

Korišten je čaj od kadulje (*Salvia Officinalis* L.) od proizvođača OPG Katarina Šperanda (**Slika 9**). Kadulja je uzgojena po ekološkim principima na padinama Aljmaš planine te je kupljena preko platforme Solidarne eko grupe Osijek.

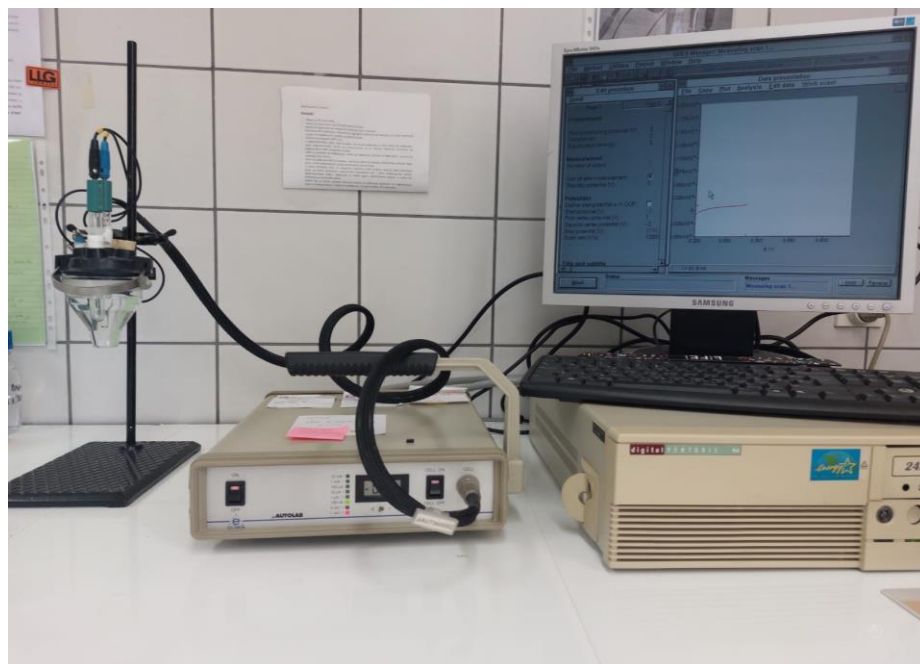
Čaj od kadulje je pripremljen prema uputi proizvođača, a koja se nalazi na deklaraciji proizvoda. U 200 mL kipuće vode dodaju se dvije žličice kadulje i kuha se uz miješanje 3 minute. Čaj se poklopi i pusti da odstoji 5 minuta te se nakon toga filtrira.



Slika 9 Čaj kadulje

### 3.2.3. Ciklička i pravokutnovalna voltometrija

Za provedbu voltometrijskih mjerenja korišten je uređaj potencijostat  $\mu$ Autolab uz primjenu GPES (General Purpose Electrochemical System) programske podrške, verzija 4.9.005. (Eco Chemie B. V., Utrecht, Nizozemska). Potencijostat  $\mu$ Autolab (**Slika 10**) služio je za provedbu mjerenja cikličke i pravokutnovalne voltetrije te za prikupljanje i analizu elektrokemijskih podataka. Mjerenja su provedena u staklenoj elektrokemijskoj ćeliji tro-elektrodnog tipa (Methrohm, Švicarska) volumena 100 mL (**Slika 11**), na radnoj elektrodi od staklastog ugljika (GCE), uz primjenu Ag/AgCl kao referentne elektrode i platinske elektrode kao pomoćne elektrode.



**Slika 10** Potenciostat

Prije provođenja voltametrijskih mjerenja, radna elektroda od staklastog ugljika je mehanički i elektrokemijski polirana kako bi se postigli reproducibilni rezultati. Radna elektroda od staklastog ugljika mehanički je polirana prahom aluminijevog oksida (promjer čestica  $0,05 \mu\text{m}$ ) uz dodatak ultračiste vode, te je isprana ultračistom vodom i uronjena u elektrokemijsku ćeliju u kojoj je 70 mL otopine elektrolita (PBS pufera). Potom je elektroda elektrokemijski polirana primjenom cikličke voltametrije (CV) višestrukom uzastopnom polarizacijom u rasponu potencijala od  $-0,2 \text{ V}$  do  $0,5 \text{ V}$  i brzinom polarizacije od  $100 \text{ mV/s}$ .



**Slika 11** Tro-elektrodni sustav

Elektrokemijska svojstva (+)-katehina, kafeinske kiseline, ferulične kiseline iz čaja kadulje ispitana su cikličkom (CV) i pravokutnovalnom voltametrijom (SWV). Nabrojanim elektrokemijskim tehnikama ispitana je utjecaj sljedećih eksperimentalnih uvjeta na elektrokemijska svojstva (+)-katehina, kafeinske kiseline, ferulične kiseline i čaja kadulje :

- utjecaj pH otopine osnovnog elektrolita, fosfatni pufer (PBS),  $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , u rasponu od pH 4,5 - 9,
- utjecaj višestruke uzastopne polarizacije,
- utjecaj brzine polarizacije pobudnog signala kod CV: 25, 50, 75, 100, 125  $\text{mV s}^{-1}$ ,
- utjecaj frekvencija pobudnog signala kod SWV: 50, 100 Hz i
- utjecaj koncentracije (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline.

Karakterizacija (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline provedena je u uzorku čaja kadulje, koji je za potrebe mjerenja razrijeđivan otopinom fosfatnog pufera  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; 70 puta (DF=70). S ciljem identifikacije (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline u uzorku čaja od kadulje provedeno je obogaćivanje uzoraka s navedenim polifenolnim spojevima primjenom

pravokutnovalne voltometrije. Nadalje, s ciljem kvantifikacije kreirane su kalibracijske krivulje pojedinog polifenolnog spoja primjenom cikličke i pravokutnovalne voltometrije u rasponu koncentracija od  $3 \cdot 10^{-6}$  do  $100 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

Sve elektrokemijske analize provedene su na sobnoj temperaturi od 25°C.

Eksperimentalni uvjeti primijenjeni za elektrokemijsku karakterizaciju polifenola iz čaja kadulje cikličkom voltametrijom prikazani su u **Tablici 1**, dok su eksperimentalni uvjeti pravokutnovalne voltometrije prikazani u **Tablici 2**.

**Tablica 1** Eksperimentalni uvjeti za cikličku voltametriju

Parametar	Vrijednost
Početni potencijal	0,2 V
Konačni potencijal	0,5 V
Brzina polarizacije	0,1 V/s
Korak potencijala	0,02 V

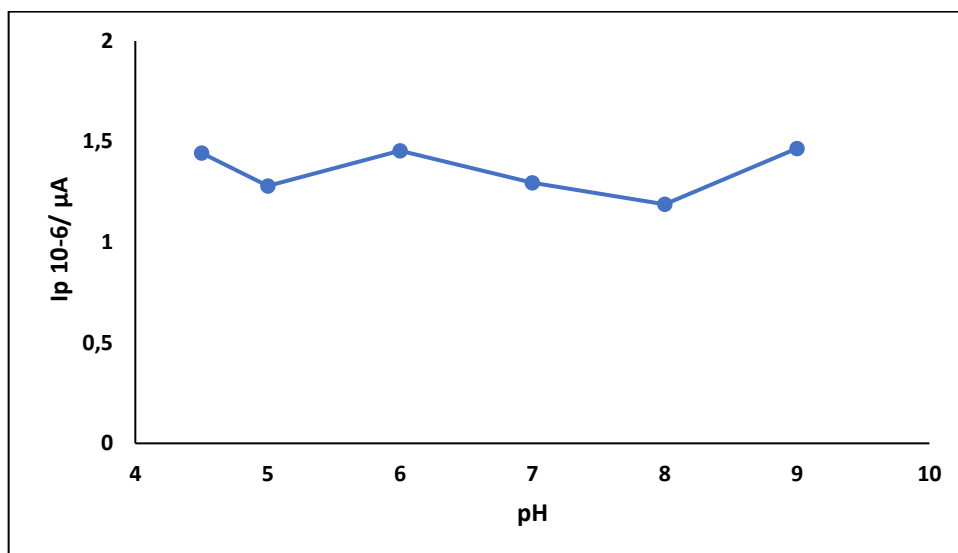
**Tablica 2.** Eksperimentalni uvjeti za pravokutnovalnu voltametriju

Parametar	Vrijednost
Početni potencijal	0,2 V
Konačni potencijal	0,5 V
Amplituda	0,05 V/s
Korak potencijala	0,002 V
Frekvencija	50 Hz

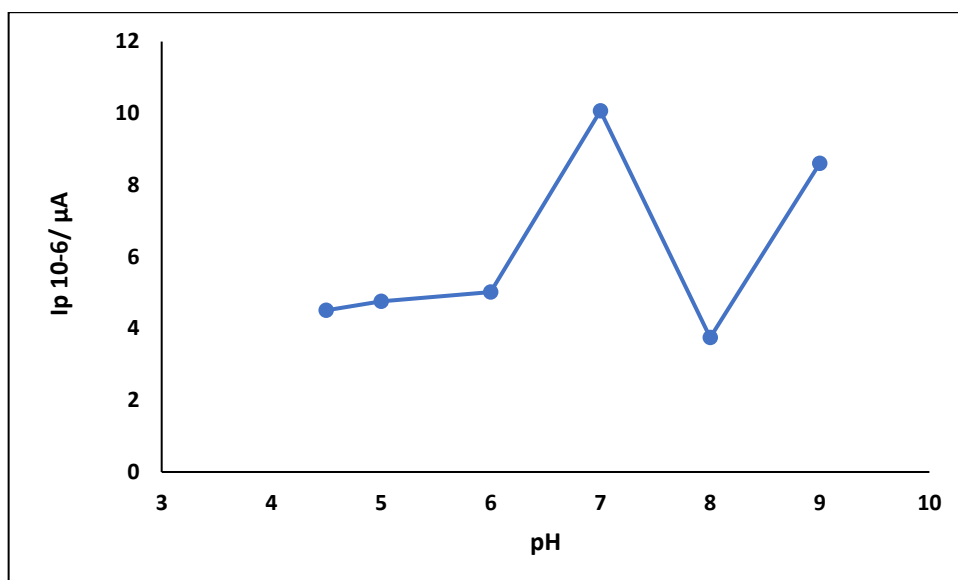
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KATEHINA

##### 4.1.1. pH profil (+)-katehina primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije

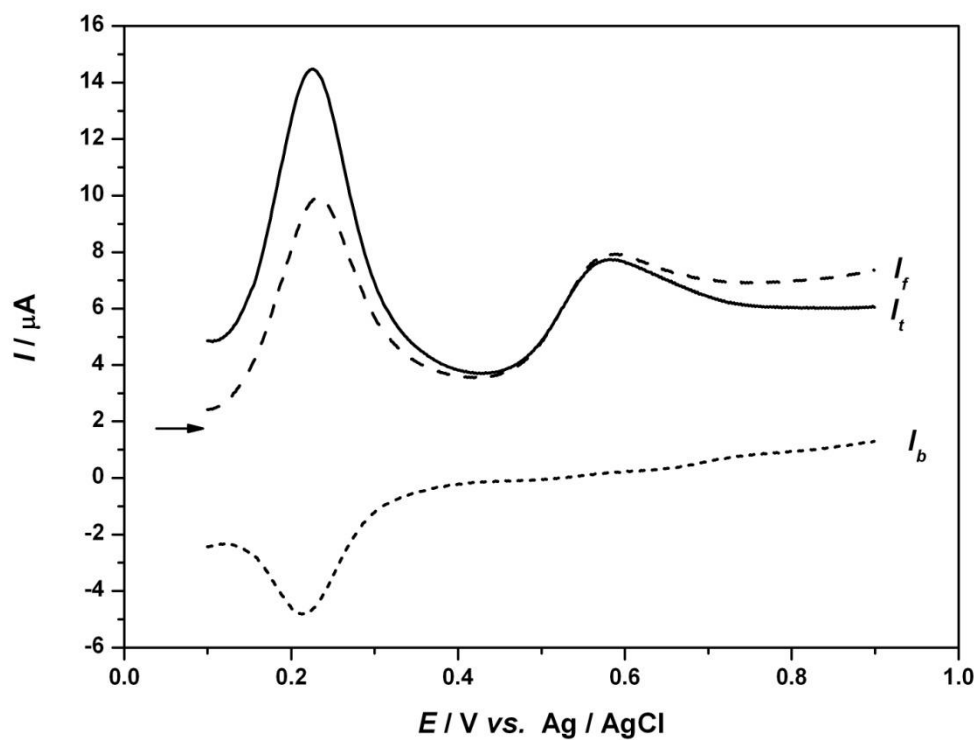


**Slika 12** Ovisnost pH o struji pika oksidacije (+)-katehina ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom cikličke voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 1**.



**Slika 13** Ovisnost pH o struji pika oksidacije (+)-katehina ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom pravokutnovalne voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2**.

## 4.1.2. Pravokutnovalna voltometrija (+)-katehina

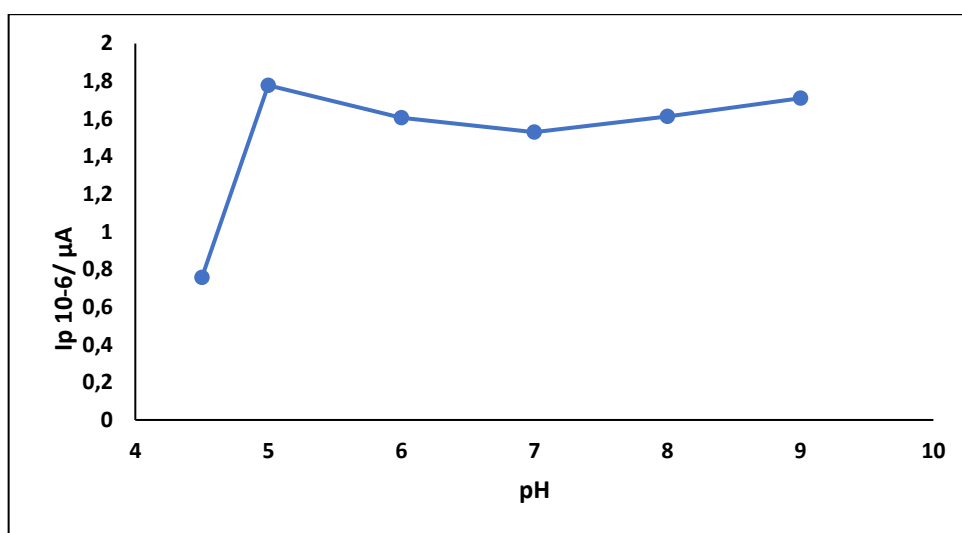


**Slika 14** Pravokutnovalni voltamogram oksidacije (+)-katehina ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2.** ( $I_t$  - ukupna struja,  $I_f$  - anodna struja,  $I_b$  - katodna struja)

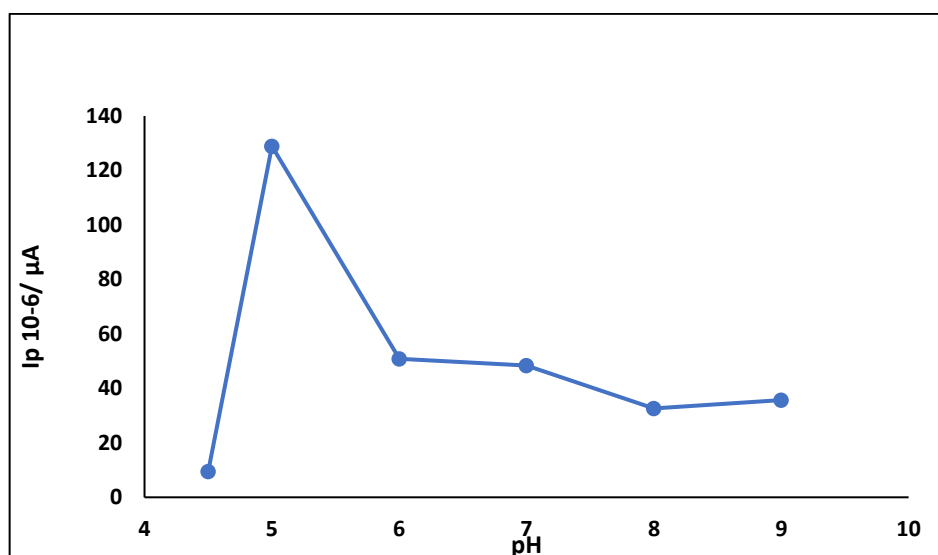


## 4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINSKE KISELINE

### 4.2.1. pH profil kafeinske kiseline primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije

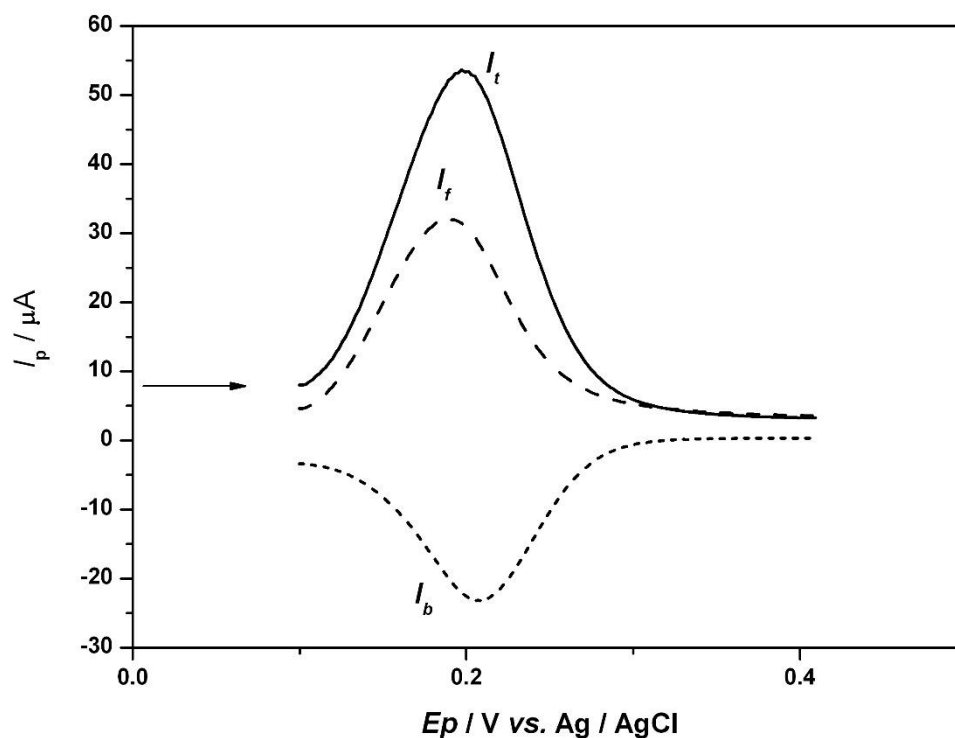


**Slika 15** Ovisnost pH o struji pika oksidacije kafeinske kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom cikličke voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 1**.



**Slika 16** Ovisnost pH o struji pika oksidacije kafeinske kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom pravokutnovalne voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2**.

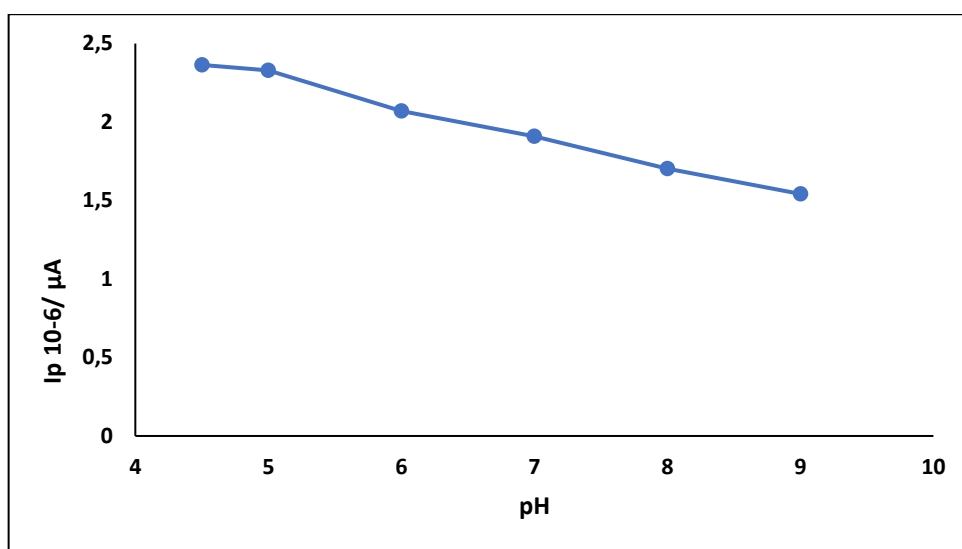
## 4.2.2. Pravokutnovalna voltometrija kafeinske kiseline



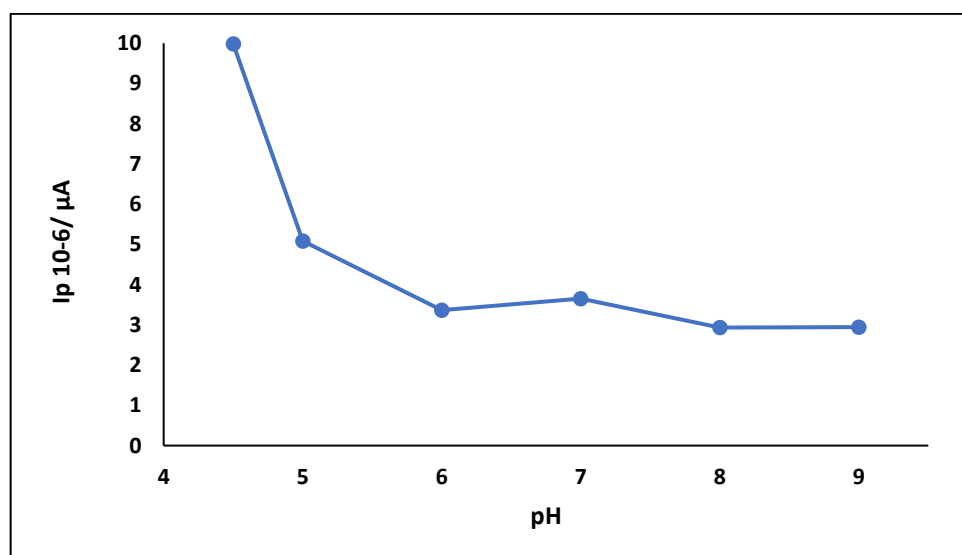
**Slika 17** Pravokutnovalni voltamogram oksidacije kafeinske kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2.** ( $I_t$  - ukupna struja,  $I_f$  - anodna struja,  $I_b$  - katodna struja)

### 4.3. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE FERULIČNE KISELINE

#### 4.3.1. pH profil ferulične kiseline primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije

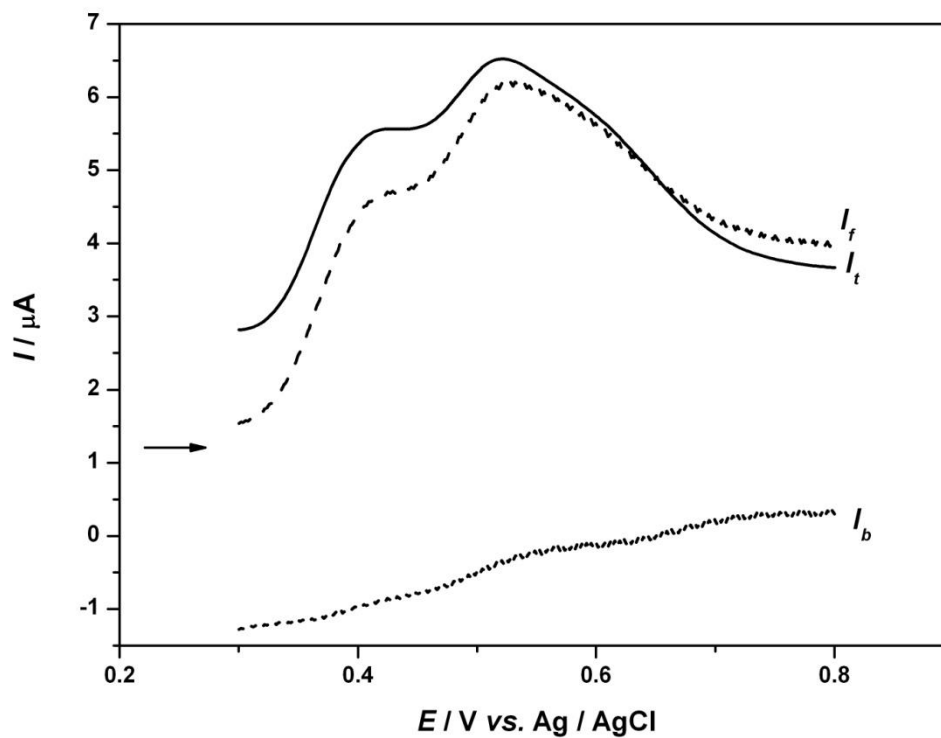


Slika 18 Ovisnost pH o struji pika oksidacije ferulične kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom cikličke voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 1**.



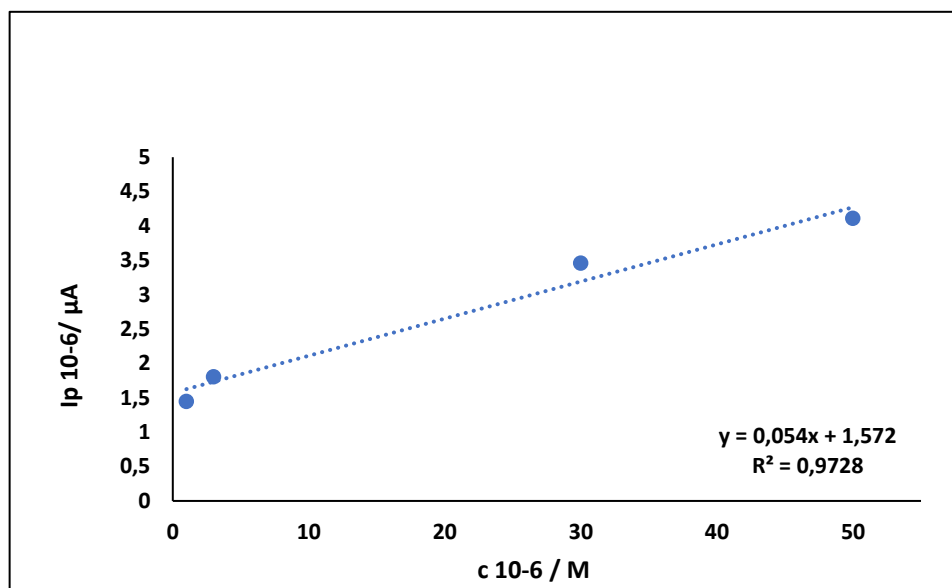
Slika 19 Ovisnost pH o struji pika oksidacije ferulične kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) primjenom pravokutnovalne voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2**.

## 4.3.2. Pravokutnovalna voltometrija ferulične kiseline

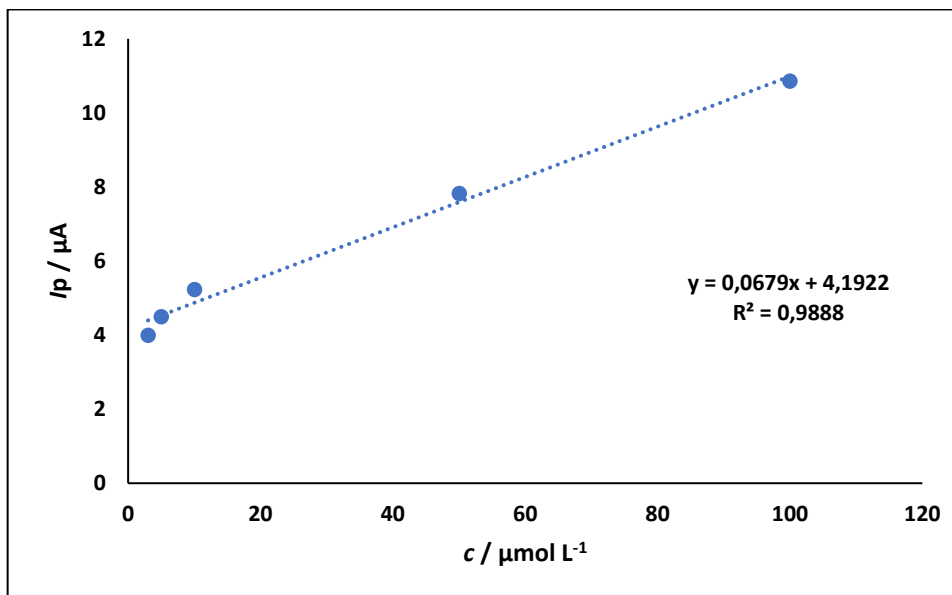


**Slika 20** Pravokutnovalni voltamogram oksidacije ferulične kiseline ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2.** ( $I_t$  - ukupna struja,  $I_f$  - anodna struja,  $I_b$  - katodna struja)

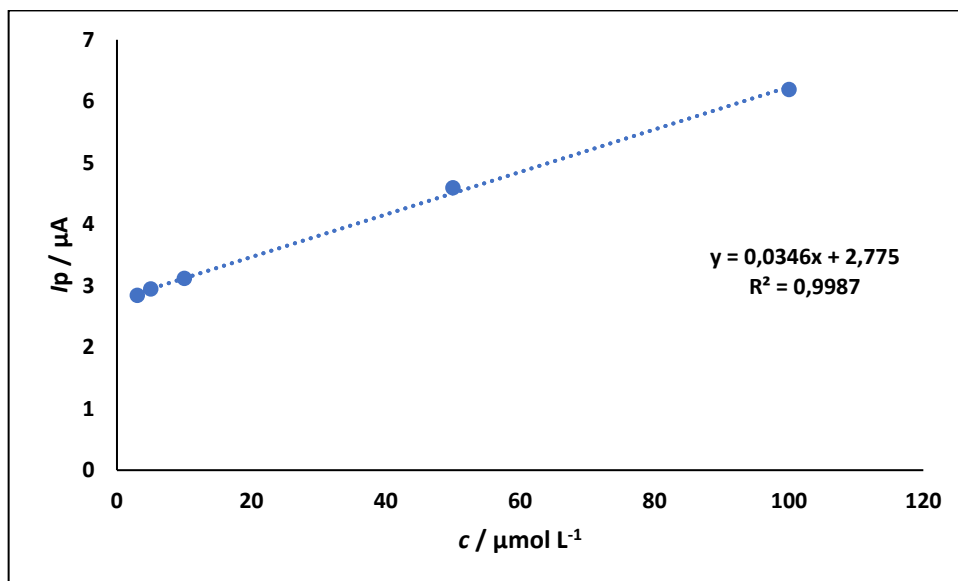
## 4.4. KALIBRACIJSKE KRIVULJE POLIFENOLA



**Slika 21** Kalibracijska krivulja oksidacije (+)-katehina kiseline dobivena primjenom pravokutnovalne voltometrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2**.

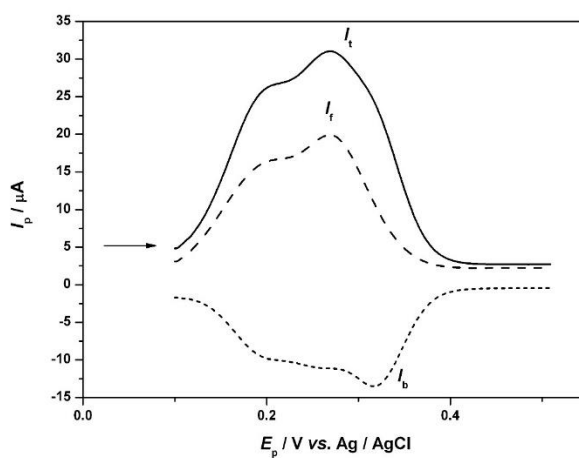


**Slika 22** Kalibracijska krivulja oksidacije kafeinske kiseline dobivena primjenom pravokutnovalne voltometrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 1**.



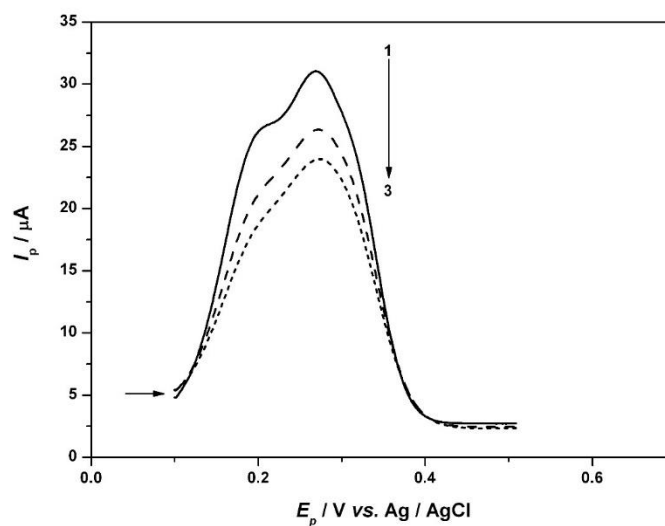
**Slika 23** Kalibracijska krivulja oksidacije ferulične kiseline dobivena primjenom pravokutnovalne voltametrije pri eksperimentalnim uvjetima iz **Tablice 2**.

## 4.5. ELEKTOKEMIJSKO PONAŠANJE ČAJA KADULJE



**Slika 24** Pravokutnovalni voltamogram oksidacije čaja kadulje (DF= 70) u osnovnom elektrolitu  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH 7 snimljenim pri mjernim uvjetima iz **Tablice 2**.

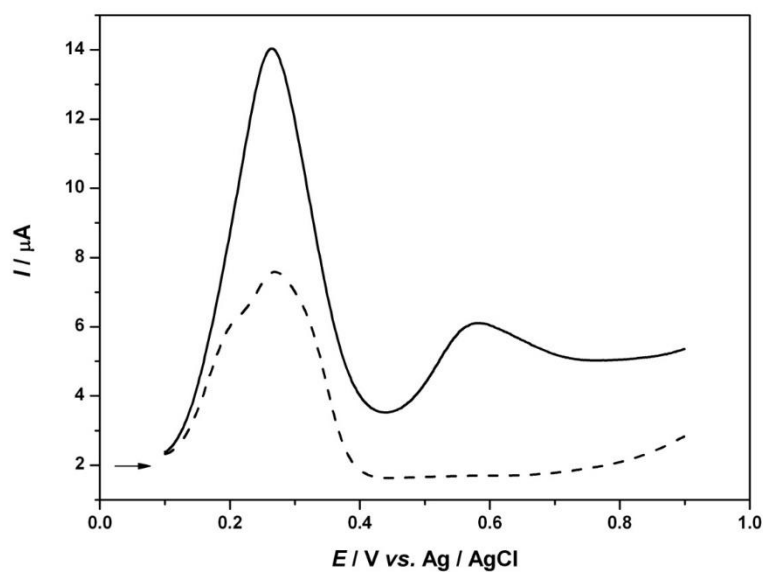
( $I_t$  - ukupna struja,  $I_f$  - anodna struja,  $I_b$  - katodna struja)



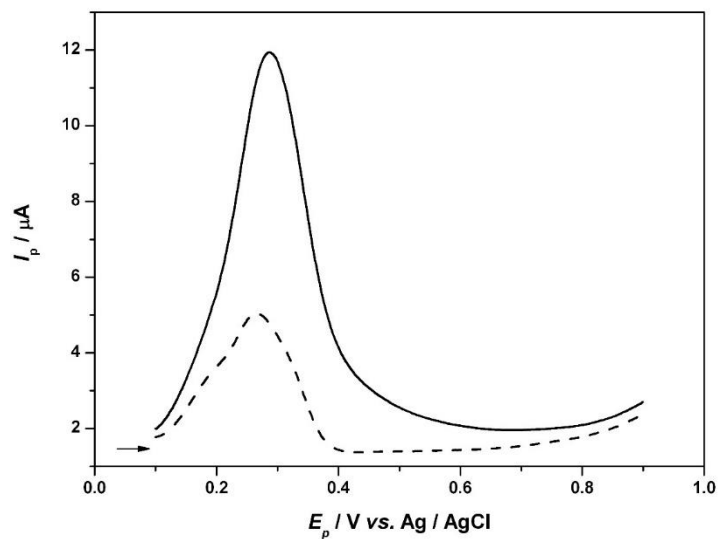
**Slika 25** Višestruka uzastopna polarizacija oksidacije čaja kadulje (DF=70) u osnovnom elektrolitnom  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH 7 snimljena pravokutnovalnom voltametrijom pri mjernim uvjetima iz **Tablice 2**.

(- prva polarizacija, - - - druga polarizacija, ... treća polarizacija)

## 4.5.1. Identifikacija polifenolnih spojeva u uzroku čaja od kadulje

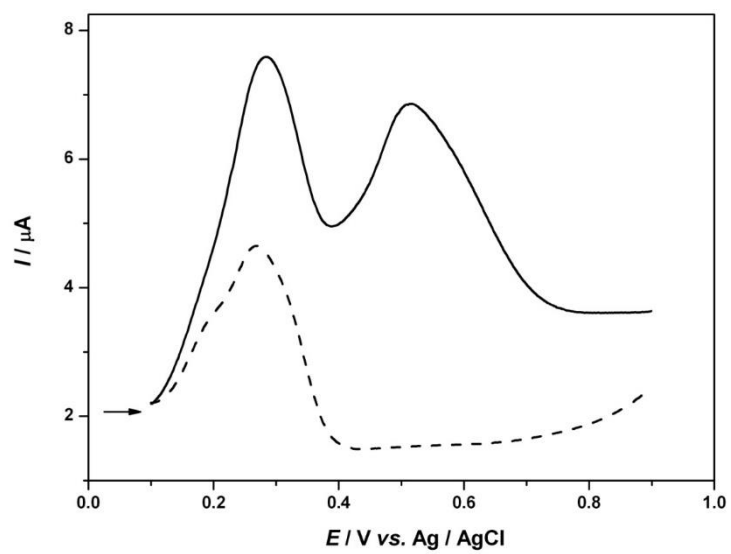


**Slika 26** Obogaćivanje uzorka čaja kadulje (- - -) (+)-katehinom (—) snimljeno pravokutnovalnom voltametrijom pri mjernim uvjetima iz **Tablice 2.**



**Slika 27** Obogaćivanje uzorka čaja kadulje (- - -) kafeinskom kiselinom (—) snimljeno pravokutnovalnom voltametrijom pri mjernim uvjetima iz **Tablice 2.**





**Slika 28** Obogaćivanje uzorka čaja kadulje (- - -) feruličnom kiselinom (—) snimljeno pravokutnovalnom voltametrijom pri mjernim uvjetima iz **Tablice 2**.

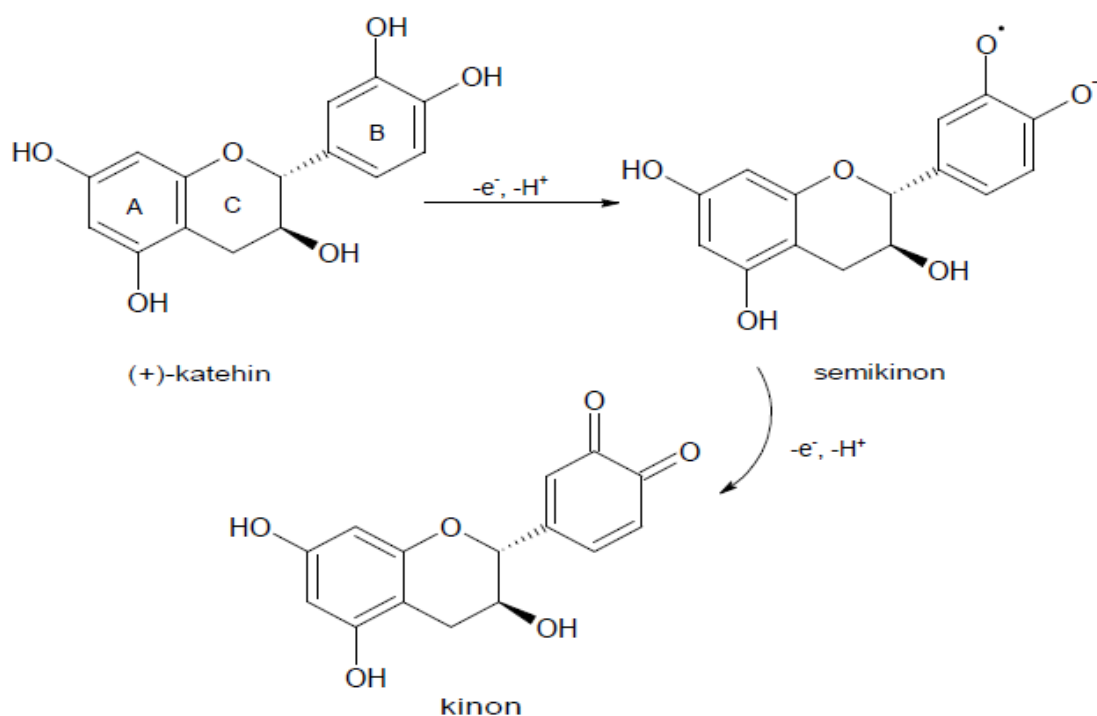
## **5. RASPRAVA**

U ovom diplomskom radu ispitano je elektrokemijsko ponašanje (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline u čaju kadulje primjenom voltametrijskih tehnika. Karakterizacija (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline u uzorku čaja kadulje provedena je primjenom cikličke i pravokutnovalne voltometrije. S ciljem identifikacije i kvantifikacije (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline u uzorku čaja kadulje ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, utjecaj pH vrijednosti osnovnog pufera, utjecaj koncentracije te brzina polarizacije i frekvencije.

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

Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita ispitan je na elektrokemijsko ponašanje standarda (+)-katehina koncentracije  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , primjenom cikličke i pravokutnovalne voltometrije, a prikazano na **Slikama 12 i 13**. Ispitan je utjecaj  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnog pufera od pH 4,5 do pH 9. Na **Slici 12** uočava se da je strujni odziv pri pH 9 nešto viši od strujnih odziva pri ostalim ispitanim pH vrijednostima. Povećanje pH vrijednosti povezano je s povećanjem strujnog odziva i sa smanjenjem oksidacijskog potencijala (Janeiro i Brett, 2004.). Na **Slici 13** prikazana je ovisnost pH o struji pika oksidacije (+)-katehina primjenom pravokutnovalne voltometrije i uočava se da je najviši strujni odziv pri pH 7 te se kod ostalih pH vrijednosti smanjuje te je slijedom toga pH 7 izabran za ispitivanje elektrokemijske oksidacije (+)-katehina.

Na **Slici 14** prikazan je pravokutnovalni voltamogram oksidacije (+)-katehina,  $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH=7. Iz pravokutnovalnog voltamograma uočavaju se dva oksidacijska pika odnosno dva oksidacijska strujna odziva. Prvi strujni odziv je na potencijalu 0,22 V, a drugi na potencijalu 0,6 V. Također, uočava se i redukcijski strujni odziv koji se javlja na istom potencijalu kao i prvi oksidacijski strujni odziv. Oksidacijski i redukcijski strujni odziv na istom potencijalu ukazuju na reverzibilnost reakcije koja se odvija na površini radne elektrode. Druga oksidacijski odziv, pik 2, u (+)-katehinu uvijek pokazuje ireverzibilnost reakcije. Oksidacija (+)-katehina odvija se uzastopnim mehanizmom (**Slika 29**) i povezana je s kateholnim skupinama u prstenu B čija se oksidacija događa pri vrlo niskim potencijalima koji odgovaraju prvom piku. Hidroksilne skupine u prstenu B doniraju elektrone i stabiliziraju se aktivni intermedijeri (Janeiro i Brett, 2004.).



Slika 29 Mehanizam (+)-katehina (Janeiro i Brett, 2004.)

## 5.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINSKE KISELINE

Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnog pufera u području od pH 4,5 do pH 9, ispitan je na elektrokemijsko ponašanje kafeinske kiseline primjenom cikličke i pravokutnovalne voltometrije (Slika 15 i 16). Na Slikama 15 i 16 prikazana je ovisnost pH o struji pika oksidacije kafeinske kiseline primjenom cikličke voltometrije i pravokutnovalne voltometrije. Uočava se da je kod obiju voltometrijskih tehnika najviši strujni odziv pri pH 5 te da se kod drugih pH vrijednosti smanjuje. Za ispitivanje elektrokemijske oksidacije kafeinske kiseline izabran je pH 7 zbog bolje usporedbe s uzorkom čaja kadulje čije elektrokemijsko ponašanje je ispitano u pH 7.

Iz pravokutnovalnog voltamograma kafeinske kiseline,  $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnog pufera pH 7, prikazanom na Slici 17, vidljiva je pojava jednog oksidacijskog i jednog redukcijskog strujnog odziva. Oksidacijski i redukcijski strujni odziv nalaze se na istom potencijalu od  $0,21 \text{ V}$  što ukazuje na reverzibilnost reakcije koja se odvija na površini elektrode od staklastog ugljika. Međutim, Teixeira i sur. (2013) navode kako se kafeinska kiselina reverzibilno oksidira u otopini pri pH do 5,5 pri čemu nastaje *o*-kinon. Na pH vrijednostima većim od 5,5 *o*-kinon postaje nestabilan spoj te dolazi do ireverzibilne reakcije.

### 5.3. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE FERULIČNE KISELINE

Na **Slikama 18 i 19** prikazana je ovisnost pH osnovnog elektrolita o struji pika oksidacije ferulične kiseline koncentracije  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije. Utjecaj je ispitan u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pri pH od 4,5 do 9. Iz navedenih grafičkih prikaza pH profila ferulične kiseline uočava se da je najviši strujni odziv pri pH 4,5 kod obiju metoda, no zbog bolje usporedbe sa elektrokemijskim ponašanjem uzorka čaja kadulje je odabran pH 7 za daljnje istraživanje.

**Slika 20** prikazuje je pravokutnovalni voltamogram oksidacije ferulične koncentracije  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH 7. Na pravokutnovalnom voltamogramu oksidacije ferulične koncentracije jasno je vidljiva anodna oksidacijska struja s dva izražena strujna odziva i katodna redukcijska struja bez izraženog strujnog odziva. Prvi strujni oksidacijski odziv je na potencijalu 0,4 V, a drugi na potencijalu 0,51 V. S obzirom da nema izraženog strujnog redukcijskog odziva i nema strujnih odziva oksidacije i redukcije na istim potencijalima, zaključuje se da se ferulična kiselina ireverzibilno oksidira na površini elektrode od staklastog ugljika.

### 5.4. KALIBRACIJSKE KRIVULJE ISPITANIH POLIFENOLA

Kalibracijske krivulje (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline kreirane su na osnovi ovisnosti množinske koncentracije o anodnom strujnom odzivu s ciljem ispitivanja utjecaja koncentracije na pravokutnovalne voltamograme (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline (**Slike 21-23**). Na **Slici 21** prikazana je kalibracijska krivulja (+)-katehina u rasponu koncentracija od 3 do  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Iz prikazane kalibracijske krivulje uočava se linearni porast anodnog oksidacijskog strujnog odziva s povećanjem koncentracije i dobila se **Jednadžba linearne regresije (1)**:

$$I_p(\mu A) = 0,054c(\mu mol L^{-1}) + 1,572 \quad (1)$$

s koeficijent korelacije 0,9728, granicom detekcije, LOD (eng. *limit of detection*) =  $22,7 \mu mol L^{-1}$  i granicom kvantifikacije, LOQ (eng. *limit of quantification*) =  $69 \mu mol L^{-1}$ ). **Slikama 22 i 23** prikazane su kalibracijske krivulje kafeinske i ferulične kiseline u rasponu koncentracija od  $3 \cdot 10^{-6}$  do  $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Uočava se linearni porast anodnog oksidacijskog odziva s povećanjem koncentracije i dobila se **Jednadžba linearne regresije (2)** za kafeinsku kiselinu:

$$I_p(\mu A) = 0,0679c(\mu mol L^{-1}) + 4,1922 \quad (2)$$

s koeficijent korelacije 0,9888 (LOD = 22,7  $\mu mol L^{-1}$ , LOQ = 69  $\mu mol L^{-1}$ ) i **Jednadžba linearne regresije (3)** za feruličnu kiselinu:

$$I_p(\mu A) = 0,0346c(\mu mol L^{-1}) + 2,775 \quad (3)$$

s koeficijent korelacije 0,9987 (LOD = 7,7  $\mu mol L^{-1}$ , LOQ = 23,5  $\mu mol L^{-1}$ ).

## 5.5. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE POLIFENOLA IZ UZORKA ČAJA OD KADULJE

Na **Slici 24** prikazan je pravokutnovalni voltamogram oksidacije čaja kadulje koji je 70 puta razrijeđen (DF=70) u osnovnom elektrolitu 0,1 mol L<sup>-1</sup> fosfatnom puferu pH 7. Iz pravokutnovalnog voltamograma jasno se uočava jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni odziv. Oksidacijski strujni odziv izražen je pri potencijalu od 0,28 V, a redukcijski pri potencijalu od 0,32 V. S obzirom na malu razliku elektrodnog potencijala mehanizam elektrokemijske oksidacije uzorka čaja smatra se reverzibilnim.

Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na pravokutnovalne voltamograme oksidacije čaja kadulje faktora razrjeđenja 70 u osnovnom elektrolitnom 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH 7 prikazan je na **Slika 25**. Iz prikaza pravokutnovalnog volamograma uočava se da u drugoj i trećoj polarizaciji čaja kadulje dolazi do opadanje strujnog oksidacijskog odziva i vidljiv je mali pomak potencijala prema većim vrijednostima jer na površini radne elektrode dolazi do mogućeg nastanka oksidacijskih produkata koji otežavaju prolazak uzorka do površine radne elektrode.

Provedeno je obogaćivanje uzorka čaja s poznatom koncentracijom standarda (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline s ciljem identifikacije navedenih polifenola i potvrde njihove prisutnost u uzorku. Na **Slici 26** prikazan je pravokutnovalni voltamogram uzorka čaja (DF= 70) prije i nakon dodatka (+)-katehina koncentracije  $3 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Uočava se značajni porast oksidacijskog strujnog odziva uzorka čaja nakon dodatka standarda (+)-katehina i vrlo mali pomak potencijala pika prema većim vrijednostima. Vrijednost potencijala pika prije dodatka (+)-katehina iznosi 0,28 V, a nakon dodatka iznosi 0,3 V. Na **Slikama 27** i **28** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami uzorka čaja (DF= 70) prije i nakon dodatka kafeinske i ferulične kiseline koncentracije  $3 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Također, uočava se porast oksidacijskog strujnog odziva

i mali pomak potencijala pika prema većim vrijednostima. Ovim ispitivanjem je potvrđena prisutnost ispitanih polifenola u uzorku čaja kadulje.

## **6. ZAKLJUČAK**



Na osnovi dobivenih rezultata ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- elektrokemijska oksidacija (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline ovisna je o utjecaju pH osnovnog elektrolita,
- mehanizmi elektrokemijske oksidacije (+)-katehina i kafeinske kiseline u pH 7 su reverzibilni elektroodni procesi, dok je mehanizam elektrokemijske oksidacije ferulične kiseline u pH 7 ireverzibilni elektroodni proces,
- višestruka uzastopna polarizacija na pravokutnovalne voltamograme uzorka čaja od kadulje utječe na opadanje strujnog odziva i na mali pomak potencijala prema većim vrijednostima, što ukazuje na mogući nastanak oksidacijskih produkata na površini radne elektrode,
- identifikacija (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline u čaju od kadulje proveda se obogaćivanjem čaja od kadulje s poznatom koncentracijom navedenih polifenola i dokazala se njihova prisutnost u čaju od kadulje (porast oksidacijskog strujnog odziva nakon dodatka polifenola) i
- obje ispitane voltametrijske tehnike pokazale su se primjenjive za elektrokemijsku karakterizaciju polifenola iz uzorka čaja od kadulje.

## **7. LITERATURA**

- Alaşalvar H, Çam M: Process for production of ready to drink iced teas from sage (*Salvia officinalis* L.) and linden (*Tilia cordata*): pressurized hot water extraction and spray drying, *Food Science and Biotechnology* 28:779-785, 2019.
- Arceusz A, Occhipinti A, Capuzzo A, Maffei ME: Comparison of different extraction methods for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thujone in sage (*Salvia officinalis* L.) herbal tea, *Journal of Separation Science* 36:3130-3134, 2013.
- Bae J, Kim N, Shin Y, Kim S-Y, Kim Y-J: Activity of catechins and their applications, *Biomedical Dermatology* 4, 8 2020.
- Boufadi MY, Keddari S, Moulai-hacene F, Chaa S: Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Salvia Officinalis* Extract from Algeria, *Pharmacognosy Journal* 13:06-515, 2020.
- Chen JH, Ho CT: Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2374-2378, 1997.
- Čižmek L: Elektrokemijska karakterizacija prirodnih antioksidansa primjenom voltametrijskih tehnika. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2018.
- De Oliveira M, Lang G. H, De Oliveira Raphaelli C, Lovegrove A: A Centum of Valuable Plant Bioactives, *Academic press*, 631-657, 2021.
- Du Plessis L: The development of simple HPLC methods to separate methylene blue and its metabolites. Disertacija, North West University, Potchefstroom, 2018.
- Ellouze S, Panizza M, Barbucci A, Cerisola G, Mhiria T, Elaouda SC: Ferulic acid treatment by electrochemical oxidation using a BDD anode, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 000:1–6, 2015.
- Ghorbani A, Esmailizadeh M: Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components: *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7:433-440, 2016.
- Hoyos-Arbeláez J, Vázquez M, Contreras-Calderón J: Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review, *Food Chemistry* 221:1371–1381, 2016.

- Hulina N: Više biljke- stablašice, Sistematika i gospodarsko značenje, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2011.
- Jakobek Barron L: Nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne metode II. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, Banjari I: Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations, *Plants* 8:55, 2019.
- Janeiro P, Brett AMO: Catechin electrochemical oxidation mechanisms, *Analytica Chimica Acta* 518:109–115, 2004.
- Kamiloglu S, Toydemir G, Boyacioglu D, Capanoglu E: Health perspectives on herbal tea infusions. U *Recent progress in Medicinal Plants: Phytotherapeutics II* 43, str. 353-368, Studium Press LLC, USA, 2016.
- Khiya Z, Oualcadi Y, Gamar A, Berrekhis F, Zair T, EL Hilali F: Correlation of total polyphenolic content with antioxidant activity of hydromethanolic extract and their fractions of the *Salvia officinalis* leaves from different regions of Morocco, *Journal of Chemistry* 2021: 1-11, 2021.
- Lu Y, Foo LY: Polyphenolics of *Salvia*—a review, *Phytochemistry* 59: 117–140, 2002.
- Magnani C, Isaac VLB, M, Correa AM, Salgado HRN : Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics, *Analytical Methods* 6: 3203-3210, 2014.
- Maliki I, Es-safi I, El Moussaoui A, Mechchate H, Oulad El Majdoub Y, Bouymajane A, Cacciola F, Mondello L, Elbadaoui K: *Salvia officinalis* and *Lippia triphylla*: Chemical characterization and evaluation of antidepressant-like activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 203:114207, 2021.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: Food source and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.
- Metikoš-Huković M: Elektrokemija. Interni udžbenik, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2000.
- Mirceski V, Skrzypek S, Stojanov L: Square-wave voltammetry, *ChemTexts* 4: 1-14, 2018.

- Novak I, Šeruga M, Komorsky-Lovrić Š: Square-wave and cyclic voltammetry of epicatechin gallate on glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 631:71-75, 2009.
- Ou S, Kwok K-C: Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:1261–1269, 2004
- Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270-278, 2009.
- Patenkovic A, Stamenkovic-Radak M, Banjanac T, Andjelkovic M: Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*, *Food and Chemical Toxicology* 47:180 –183, 2009.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS: Introduction to Spectroscopy, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, 2001.
- Piljac I (2010.): Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Media Print, Zagreb, 2010.
- Teixeira J, Gaspar A, Garrido E. M, Garrido J, Borges F: Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview, *Hindawi Publishing Corporation* 2013: 1-11, 2013.
- Tomac I: Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidativne aktivnosti u različitim vrstama kave primjenom elektrokemijskih metoda. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Tsao R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* 2:1231-1246, 2010.
- Web 1 <https://www.vrtlarica.com/kadulja/> ( 8.8. 2020.)
- Yilmaz Y: Novel uses of catechins in foods, *Trends in Food Science & Technology* 17:64–7, 2006.
- Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H: Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application, *Skin Pharmacology and Physiology* 31:332-336, 2018.
- Zimmermann BF, Stephan G, Walch SG, Ngaba Tinzoh L, Stühlinger W, Lachenmeier DW: Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea), *Journal of Chromatography B* 879:2459– 2464, 2011.