

Kompleksi metala i karnozina

Drulak, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:402260>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mateja Drulak

KOMPLEKSI METALA I KARNOZINA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Mateja Drulak

KOMPLEKSI METALA I KARNOZINA

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Neposredni voditelj: Anamarija Stanković

Osijek, 2017.

Ovaj rad prezentiran je na 4. simpoziju studenata kemičara (SISK) koji je održan 28. listopada 2017. godine na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Zahvala

Najprije zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović na strpljenu, svim sugestijama i stručnim savjetima te vodstvu tijekom izrade Diplomskog rada.

Također zahvaljujem neposrednoj voditeljici asistentici Anamariji Stanković na strpljenju i velikoj pomoći koja je uvelike pridonijela kvaliteti ovog Diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem pokojnom prof. dr. sc. Milanu Saku-Bosnaru na predloženoj temi, velikoj motivaciji i svim nesebično podijeljenim savjetima.

Zahvaljujem svojim kolegama kemičarima koji su mi bili podrška i svim djelatnicima Odjela za kemiju koji su mi pomogli u izradi Diplomskog rada.

Na posljeku najviše zahvaljujem svojim roditeljima, sestri, bratu, Janu te svim bitnim ljudima u mom životu na velikoj podršci i razumijevanju. Hvala vam što ste vjerovali u mene.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****KOMPLEKSI METALA I KARNOZINA****Mateja Drulak****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju**Mentor:** Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović**Sažetak**

U ovom radu ispitivana su elektrokemijska i spektrofotometrijska svojstva β -alanina, L-histidina i L-karnozina koncentracije, $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ te stvaranje kompleksa navedenih spojeva s bakrom u omjerima 1:1, 2:1, 4:1, 1:2 i 1:4 u puferu pH = 10. Cilj rada bio je ispitati stvaranje kompleksa β -alanina, L-histidina i L-karnozina s dvovalentnim bakrovim ionom, Cu^{2+} u puferu pH = 10, odrediti omjer pri kojem nastaju kompleksi, istražiti utjecaj brzine promjene polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva kompleksa, istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta na površinu radne elektrode. Elektrokemijska svojstva ispitivana su pomoću potenciometrijske titracije te cikličke i diferencijalno pulsne voltametrije, a spektrofotometrijska pomoću UV/VIS spektrofotometrije. Elektrokemijska ćelija za potenciometrijska mjerenja sadržavala je platinsku indikatorsku elektrodu. U otopinu analita (β -alanin, L-histidin ili L-karnozin) dodavala se otopina bakrova nitrata, a završna točka titracije određena je instrumentalno. Za voltametrijska mjerenja koristio se troelektrodni sustav s radnom elektrodom od staklastog ugljika. Potenciometrijskom titracijom utvrđeno je da L-histidin i L-karnozin tvore kompleks s bakrovim ionom u omjeru 1:1 u puferu pH = 10. Ciklička voltametrija pokazala je da β -alanin, L-histidin i L-karnozin nisu elektroaktivni te da dolazi do stvaranja kompleksa između L-histidina i bakrovog iona te L-karnozina i bakrovog iona već u omjeru 1:1 kao i da je proces koji se odvija na površini radne elektrode difuzijski kontroliran. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom potvrđeno je nastajanje kompleksa L-histidina i L-karnozina s bakrovim ionom u puferu pH = 10, utvrđeno je da su L-histidin i L-karnozin elektroaktivni te da ne dolazi do adsorpcije L-histidina i L-karnozina te njihovih kompleksa s bakrovim ionom na radnu elektrodu od staklastog ugljika.

Diplomski rad obuhvaća: 80 stranice, 71 sliku, 4 tablice, 38 literaturnih navoda**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** β -alanin / ciklička voltametrija / diferencijalna pulsna voltametrija / L-histidin / L-karnozin / potenciometrijska titracija / UV/VIS spektrofotometrija**Rad je prihvaćen:** 17.3.2017.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. Doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Department of Chemistry****Graduate Study of Chemistry****Scientific Area: Natural Sciences****Scientific Field: Chemistry****METAL COMPLEXES OF CARNOSINE****Mateja Drulak****Thesis completed at:** Department of Chemistry**Supervisor:** Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović**Abstract**

In this work electrochemical and spectrometric properties of β -alanine, L-histidine and L-carnosine concentration, $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ as well as complexation of those compounds with copper in ratio 1:1, 2:1, 4:1, 1:2 and 1:4 prepared in buffer pH = 10 were studied. Main purpose of this thesis was to examine complexation of β -alanine, L-histidine and L-carnosine with divalent copper ion, Cu^{2+} in buffer pH = 10, determine ratio of complexation, investigate influence of the scan rate on the oxido-reduction properties of complexes, study possible adsorption of oxidation product on the surface of the working electrode. Electrochemical properties were investigated by potentiometric titration, cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry, while spectrometric with UV/VIS spectrometry. Electrochemical cell for potentiometric measurements was consisted of platinum indicator electrode. Solution of copper nitrite was added in solution of analyte (β -alanine, L-histidine, L-carnosine) and equivalent point was determined instrumentally. Three electrode system with glassy carbon working electrode was used for voltammetric measurements. It was found by potentiometric titration that L-histidine and L-carnosine form complex with copper ion in ratio 1:1 in buffer pH = 10. Cyclic voltammetry showed that β -alanine, L-histidine and L-carnosine were not electroactive and also that there is complexation among L-histidine and copper ion as well as L-carnosine and copper ion from ratio 1:1. Likewise measurements showed that process which undergoes on working electrode is diffusion controlled. Complexation of L-histidine and L-carnosine with copper ion in buffer pH = 10 was confirmed by differential pulse voltammetry as well as that L-histidine and L-carnosine were electroactive and that there was not undergone adsorption of L-histidine, L-carnosine and its complex with copper ion on glassy carbon working electrode.

Thesis includes: 80 pages, 71 figures, 4 tables, 38 references**Original in:** Croatian**Keywords:** β -alanine / cyclic voltammetry / differential pulse voltammetry / L-histidine / L-carnosine / potentiometric titration / UV/VIS spectrophotometry**Thesis accepted:** 7th March 2017**Reviewers:**

1. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić
2. Assist. Prof. Aleksandar Sečenji
3. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović

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

Sadržaj

1.	UVOD	8
2.	LITERATURNI PREGLED.....	9
2.1.	Aminokiseline.....	9
2.1.1.	β -alanin.....	11
2.1.2.	L-histidin	12
2.1.2.1.	Kompleksi Cu^{2+} i L-histidina.....	13
2.2.	Bakar	14
2.3.	Dipeptid.....	14
2.4.	Karnozin	15
2.4.1.	Biološka aktivnost karnozina	17
2.4.2.	Kompleksi metala s karnozinom	19
2.4.2.1.	Kompleksi bakra i karnozina.....	20
2.5.	Metode određivanja karnozina	22
2.5.1.	Elektrokemijske metode	23
2.5.1.1.	Potenciometrijske metode	24
2.5.1.2.	Voltametrijske metode.....	27
2.5.1.2.1.	Ciklička voltametrija	28
2.5.1.2.2.	Diferencijalna pulsna voltametrija	30
2.5.2.	UV/VIS spektrofotometrijske metode	31
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	35
3.1.	Kemikalije i priprava otopina	35
3.2.	Aparatura	38
3.2.1.	Potenciometrijska mjerenja	38
3.2.1.1.	Elektrokemijska ćelija za potenciometrijska mjerenja	39
3.2.2.	Voltametrijska mjerenja	40
3.2.2.1.	Elektrokemijska ćelija za voltametrijska mjerenja	41
3.2.3.	Spektrofotometrijska mjerenja	42
3.3.	Uvjeti mjerenja	43
3.3.1.	Potenciometrijska titracija	43
3.3.2.	Ciklička voltametrija	43
3.3.3.	Diferencijalna pulsna voltametrija.....	44
3.3.4.	UV/VIS spektrofotometrija	44
4.	REZULTATI I RASPRAVA	45

4.1. Potenciometrijska mjerenja	45
4.1.1. β -alanin.....	45
4.1.2. L-histidin	46
4.1.3. L-karnozin	47
4.2. Voltametrijska mjerenja	49
4.2.1. Ciklička voltametrija	49
4.2.1.1. β -alanin.....	49
4.2.1.2. L-histidin	52
4.2.1.3. L-karnozin	57
4.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija.....	64
4.2.2.1. β -alanin.....	64
4.2.2.2. L-histidin	66
4.2.2.3. L-karnozin	69
4.3. UV/VIS mjerenja.....	73
5. ZAKLJUČAK	77
6. POPIS LITERATURE	78

1. UVOD

β -alanil-L-histidin, odnosno L-karnozin je dipeptid sačinjen od β -alanina i L-histidina međusobno povezanih peptidnom vezom. Nalazi se u poprečno prugastim mišićima, srčanom mišiću i živčanom tkivu ljudi. Sadrži tri ionizirajuće skupine: karboksilnu skupinu, dušik imidazolnog prstena i amino terminalnu skupinu. Zbog njegovih svojstava brojni autori bavili su se istraživanjem upravo ovog dipeptida. Karnozinu se pripisuju antioksidativna svojstva, puferska aktivnost, keliranje metalnih iona, sudjelovanje u neurotransmisiji i dr. Istraživanja su pokazala da L-karnozin kelira dvovalentni bakrov ion čime sprječava trovanje organizma uzrokovano povećanom koncentracijom bakra. On je polidentatni ligand koji ima 6 potencijalnih vezivnih mjesta, a koji kompleks nastaje ovisi o metalnom kationu, omjeru liganda i metala te o pH otopine.

Cilj ovog rada bio je ispitati stvaranje kompleksa β -alanina, L-histidina i L-karnozina s dvovalentnim bakrovim ionom u puferu pH = 10, odrediti omjer pri kojem nastaju kompleksi, istražiti utjecaj brzine promjene polarizacije elektrode na oksido-redukcijska svojstva kompleksa te istražiti moguću adsorpciju oksidacijskog produkta na površinu radne elektrode.

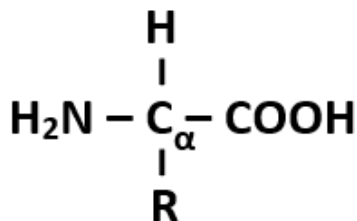
U radu su ispitana elektrokemijska i spektrofotometrijska svojstva L-karnozina i aminokiselina od kojih se sastoji L-karnozin te stvaranje kompleksa s bakrom iz otopine bakrovog nitrata u puferu pH = 10. Za ispitivanje elektrokemijskih svojstava korištene su tri elektrokemijske metode: potencijometrijska titracija, ciklička voltametrija i diferencijalna pulsna voltametrija, a za spektrofotometrijska mjerenja UV/VIS spektrofotometrija. U potencijometrijskoj titraciji korišten je dvoelektrodni sustav s platinskom radnom elektrodom dok je u voltametrijskim mjerenjima korišten troelektrodni sustav gdje je kao radna elektroda služila elektroda od staklastog ugljika. Potencijometrijska titracija se vršila titriranjem analita (β -alanina, L-histidina i L-karnozina) s otopinom bakrovog nitrata.

U završnom dijelu rada nalazi se zaključak koji je proizašao iz dobivenih rezultata mjerenja.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Aminokiseline

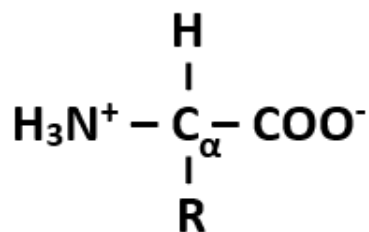
Aminokiseline su osnovne jedinice koje izgrađuju proteine. Proteini su od iznimne važnosti u svim biološkim procesima. Njihove najvažnije funkcije su: enzimska kataliza, koordinirano kretanje, prijenos i pohrana, mehanička čvrstoća, imunološka zaštita, stvaranje i provođenje živčanih impulsa, te kontrola rasta i diferencijacije. Aminokiseline se sastoje od središnjeg atoma ugljika (α -ugljik) na koji su vezane karboksilna skupina, amino skupina, atom vodika i bočni ogranak R (*Slika 2.1.*). Bočni ogranak je ono po čemu se aminokiseline razlikuju. On je zaslužan za naboj, veličinu i oblik aminokiseline, njezinu hidrofobnost, sposobnost stvaranja vodikovih veza i samu kemijsku reaktivnost. Prema naboju bočnog ogranka, aminokiseline se dijele na neutralne (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, triptofan, metionin), polarne (glicin, serin, treonin, cistin, tirozin, asparagin, glutamin) i kisele ili bazične (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, odnosno lizin, arginin, histidin)¹. Svi proteini izgrađeni su od 20 aminokiselina čijim modifikacijama mogu nastati neke posebne aminokiseline koje su od iznimne biološke važnosti [1].



Slika 2.1. Opća formula aminokiseline.

S obzirom da se aminokiseline sastoje od karboksilne i amino skupine, pri neutralnom pH one su najčešće u obliku *zwitteriona* gdje je karboksilna skupina disocirana ($-\text{COO}^-$), a amino skupina protonirana ($-\text{NH}_3^+$) (*Slika 2.2.*) [1].

¹ Glicin nije kiralan jer nema ugljikovodični bočni ogranak kao ostale neutralne aminokiseline, već se na mjestu ogranka nalazi atom vodika.



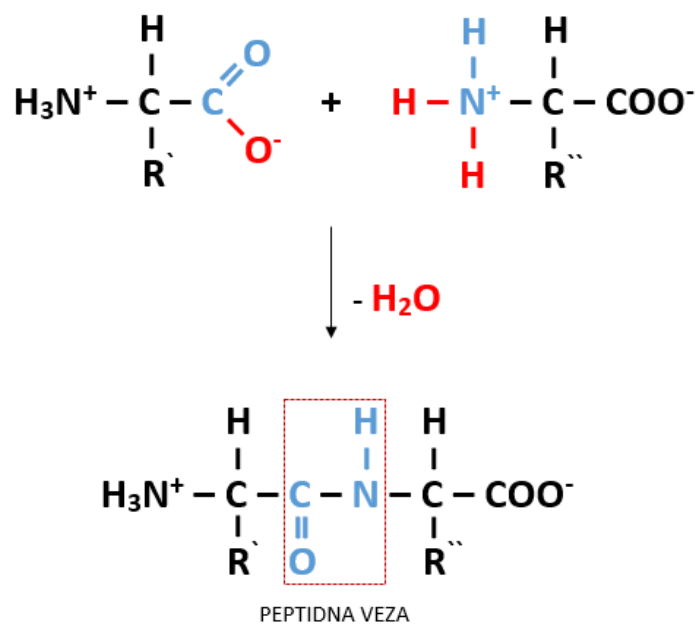
Slika 2.2. Opća formula aminokiseline u obliku *zwitteriona*.

Zbog tetraedarskog rasporeda aminokiselina, one su optički aktivne. Postoje L- i D-izomeri, a proteini u ljudskom organizmu sastoje se od L-aminokiselina². Gotovo sve aminokiseline imaju S apsolutnu konfiguraciju³.

Aminokiseline se povezuju u polipeptidne lance preko peptidne veze. Peptidna veza nastaje vezanjem α -karboksilne skupine jedne aminokiseline i α -amino skupine druge aminokiseline uz gubitak jedne molekule vode (*Slika 2.3.*). Ravnoteža ove reakcije je pomaknuta prema hidrolizi i zato za sintezu peptidne veze treba uložiti energiju. Dogovoreno je da se terminalna amino skupina uzima kao početak polipeptidnog lanca [1].

² Oznake L- i D- izvode se iz Fischerove projekcije u odnosu na L-gliceraldehid, odnosno D-gliceraldehid.

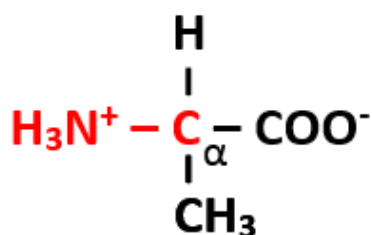
³ Apsolutna konfiguracija aminokiselina se određuje tako da se supstituent najnižeg prioriteta (atom vodika) okrene od smjera promatrača i ostalim trima supstituenta određuju se prioriteti. Ako je progresija od najvišeg prema najnižem prioritetu u suprotnom smjeru od kazaljke na satu, tada je apsolutna konfiguracija aminokiseline S.



Slika 2.3. Nastanak peptidne veze.

2.1.1. β -alanin

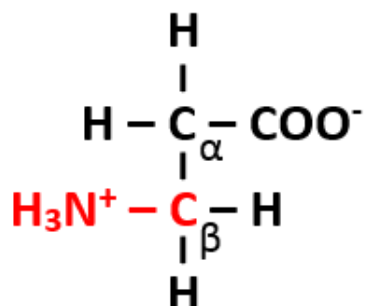
Alanin je neutralna 2-aminopropionska kiselina koja na bočnom ogranku ima metilnu skupinu (*Slika 2.4.*). To je neesencijalna aminokiselina koja se u ljudskom organizmu nalazi u dva oblika α - i β -alanin. α -alanin je jedna od najčešće korištenih aminokiselina u sintezi proteina [2].



Slika 2.4. Struktura α -alanina.

Razlika između α - i β -alanina je u položaju amino skupine. Kod β -alanina amino skupina nalazi se na β -ugljikovom atomu (*Slika 2.5.*). β -alanin se u velikim koncentracijama

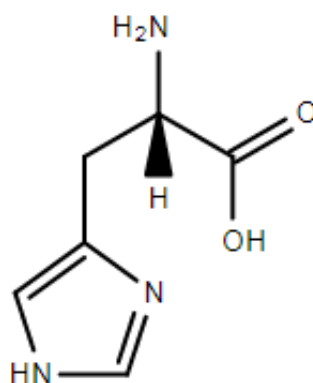
nalazi u mozgu. Sportaši ga često koriste kao suplement jer povećava koncentraciju karnozina u organizmu. Nešto više o tome će biti napisano u nastavku ovog rada [2].



Slika 2.5. Struktura β-alanina.

2.1.2. L-histidin

Za razliku od alanina, histidin (2-amino-3-imidazolpropionska kiselina) esencijalna je aminokiselina. Ova endogeno sintetizirana aminokiselina nalazi se u jetri, mozgu i skeletnim mišićima. Kako se nalazi i u krvnom serumu, ponaša se kao nosilac bakra između krvi i tkiva [3]. Histidin na bočnom ogranku sadrži imidazolni prsten (*Slika 2.6.*). Istraživanja su pokazala da histidin zbog svoje strukture djeluje protiv oksidativnog stresa [4].

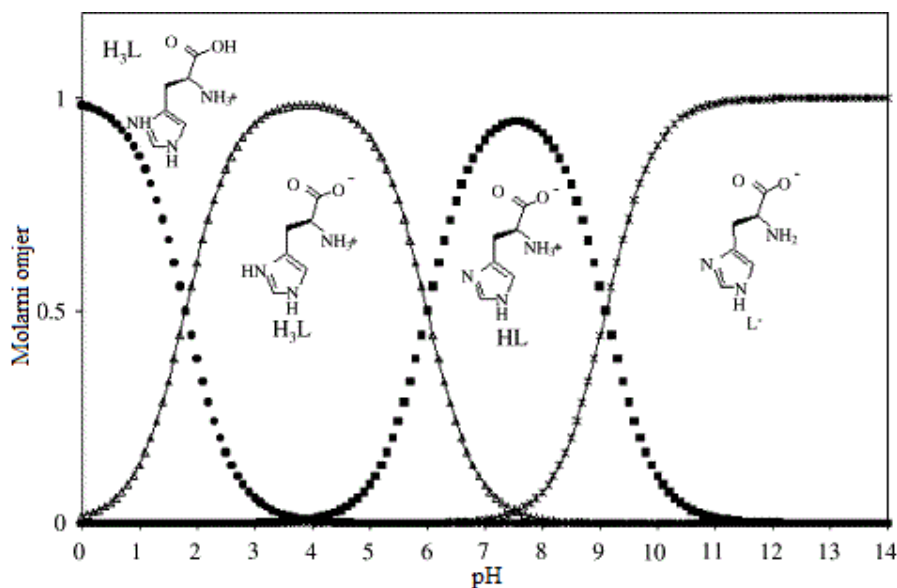


Slika 2.6. Struktura L-histidina.

Protonirani kation histidina ima tri ionizirajuća vodikova iona te tako može tvoriti i tri različita protonirana kompleksa. Pri pH nižem od 13 ima tri potencijalna donorska centra, a to su karboksilni kisik i dva dušika (amino skupina i imidazolni prsten). Pri pH višem od 13 pirolni proton može ionizirati i dati četvrti potencijalni koordinacijski centar. Zbog tri potencijalna donorska centra, histidin tvori mono i bis metalne komplekse. Tris metalni kompleksi su rijetki. Mnogi autori spominju ML i ML₂ komplekse bakra i histidina [3].

2.1.2.1. Kompleksi Cu²⁺ i L-histidina

Kompleksi bakra i histidina otkriveni su 1966. godine u ljudskoj krvi. Od tada se istražuje uloga unosa bakra u stanice. Istraživanja su pokazala da je kompleks odgovoran za prijenos bakra do stanica. Bakar je esencijalni element koji je potreban svim živim organizmima. U našem se organizmu nalazi u tragovima, a povećane koncentracije bakra mogu biti iznimno toksične. Poznata je fiziološka važnost kompleksa i primjenjuje se u liječenju Menkesove bolesti, smrtonosne genetske neurodegenerativne bolesti i dr., ali nije još u potpunosti razriješena struktura kompleksa pri fiziološkom pH. Na slici 2.7. prikazani su različiti protonirani oblici histidina, a najučestaliji oblik histidina u fiziološkoj otopini je HL. Na izgled kompleksa osim pH utječe i jačina veze metal-ligand, stereokemija kompleksa, entropija keliranja i energija stabilizacije ligandnog polja. Kompleks Cu²⁺ i histidina stabilniji je u usporedbi s kompleksima s drugim metalima kao što su Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ i dr. Istraživanja su pokazala da su najučestalije vrste kompleksa Cu²⁺ i histidina MHL, MHL₂ i ML₂. U omjeru 1:1 pri pH = 6 dominira ML, iznad pH = 6 ML(OH), a ispod oko pH = 4 MHL. Navedeni su razni načini vezanja bakra i histidina, a Makinen je objasnio da Cu²⁺ reagira s histidinom koji je u obliku *zwitteriona* te da dolazi do brzog prijenosa protona s amino skupine na imidazolni prsten i nastajanja MH₂L₂. Istraživanja su pokazala da u ML strukturi postoje dva donorska atoma dušika u kvadratno planarnom rasporedu. Struktura MHL₂ sastoji se od jednog tridentatnog liganda histidina i jednog bidentatnog liganda. Stereokemija je također jako bitna, jer uključuje elektrostatske interakcije kao što je vodikova veza koja se javlja kod imidazola i karboksilne skupine tridentatnog histidina [5].



Slika 2.7. Protonirani oblici histidina u ovisnosti o pH [5].

2.2. Bakar

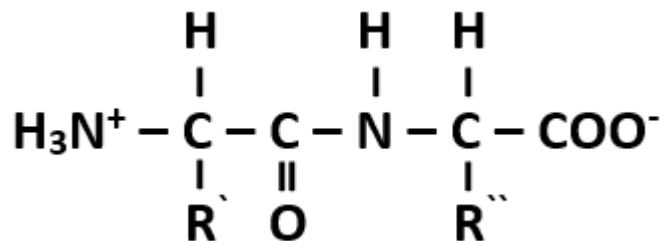
Bakar je prvi metal kojeg su ljudi obrađivali. Nalazi se u prirodi i najveći izvor su minerali kao što je halkopirit (CuFeS_2) i bornit (Cu_5FeS_4). Ovaj prijelazni metal ima veliku primjenu zbog svojih dobrih svojstava. Koristi se u elektronici za izradu elektroničke opreme, otporan je na utjecaje iz atmosfere, ali i mnoge druge kemikalije; bakrov sulfat koristi se kao poljoprivredni otrov, ali i kao algicid za pročišćavanje voda [6, 7].

Bakar je esencijalni element kojeg u organizam unosimo pomoću hrane kao što su iznutrice, zeleno lisnato povrće, orašasti plodovi i dr. Odrasloj osobi potrebno je oko 1,2 mg bakra dnevno koji potpomaže prijenos energije u stanice. Iako je on esencijalan element, njegov suvišak izaziva toksičnost [6].

2.3. Dipeptid

Dipeptidi su proteini koji se sastoje od dvije aminokiseline (Slika 2.8.). Kao i kod svih ostalih proteina, dipeptidi nastaju stvaranjem peptidne veze između α -karboksilne skupine

jedne aminokiseline i α -amino skupine druge. Peptidna veza je tvrda i planarna. Između ugljika i dušika peptidne veze nema rotacije jer ta veza ima djelomice svojstva dvostrukih veza⁴ [1].

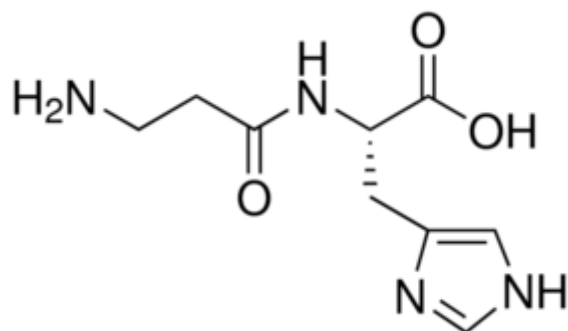


Slika 2.8. Opća formula dipeptida.

2.4. Karnozin

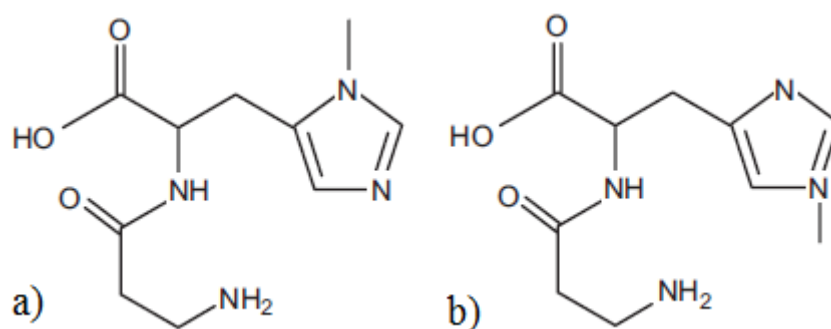
Karnozin (2-[(3-aminopropanoil)amino]-3-(1H-imidazol-4-il) propionska kiselina [8], odnosno β -alanil-L-histidin otkriven je 1900. godine, a otkrio ga je ruski kemičar W. S. Gulewitsch. Izolirao ga je iz Liebigovog mesnog ekstrakta. Struktura karnozina određena je 1918. godine, a prikazana je na slici 2.9. To je prvi peptid koji je izoliran iz biološkog materijala [9]. Mnogi znanstvenici istraživali su biološku funkciju ovog dipeptida. 1949. godine znanstvenici Hanson i Smith pronašli su proteazu koja napada peptidnu vezu u karnozinu i nazvali je karnozinaza. Otkrili su da je enzim stabiliziran dvovalentnim metalima, Mn^{2+} i Zn^{2+} [10]. Njegovu prvu jasnu funkciju opisao je S. E. Severin 1953. godine. Dokazao je kako izolirani žablji mišić u prisutnosti karnozina može akumulirati velike količine laktata, odnosno spriječiti zakiseljavanje tkiva [11]. Ovaj dipeptid je od biološke i farmakološke važnosti, a njegove funkcije opisat će se kasnije u radu. Koristi se u prehrambenoj industriji kao dodatak hrani, u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji [9].

⁴ Duljina peptidne veze iznosi 0,132 nm, što je između jednostruke (duljina jednostruke C-N veze iznosi 0,149 nm) i dvostruke (duljina dvostruke C=N veze iznosi 0,127 nm) veze.



Slika 2.9. Struktura L-karnozina.

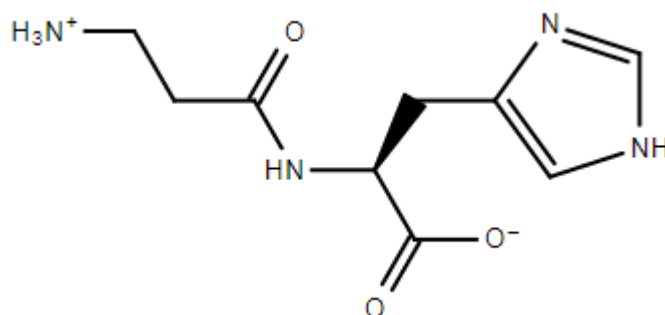
Karnozin je bezbojni kristalični dipeptid molekulske formule $C_9H_{14}N_4O_3$. Njegova molekulska masa iznosi 226,23 g/mol. Sintetizira se u tijelu iz β -alanina i L-histidina. Nalazi se u velikim koncentracijama u moždanom, mišićnom i gastrointestinalnom tkivu ljudi, a sastavni je dio svih kralježnjaka. Koncentracija karnozina u ljudskim mišićima iznosi 20 mmol L^{-1} [12]. Osim karnozina, u ljudskom se organizmu nalaze njegovi derivati kao što su anserin i ofidin (Slika 2.10.). Oni su metilirani analozi karnozina. Karnozin je dobro topljiv u vodi. Pri 25 °C može se otopiti 1 g karnozina u 3,1 mL vode [13]. On sadrži tri ionizirajuće skupine: karboksilnu skupinu (pK_1), dušik imidazolnog prstena (pK_2) i amino skupinu (pK_3). pK vrijednosti prema različitim izvorima navedene su u tablici 2.1. [14]. Karnozin je u organizmu prisutan u obliku *zwitteriona* gdje su slobodna karboksilna i amino skupina u svom ionizirajućem stanju (Slika 2.11.) [13].



Slika 2.10. Kemijske strukture prirodnih derivata karnozina a) anserina i b) ofidina [13].

Tablica 2.1. Vrijednosti pK karnozina pri 25 °C [14].

Autor	P. C. Daniele, P. Amico, i G. Ostacoli	P. G. Pietta, i A. Chersi	H. Dobbie i W. O. Kermack	R. P. Argawal i D. D. Perrin
pK ₁	2,64	2,619	2,77	2,64
pK ₂	6,59	6,656	6,90	6,58
pK ₃	9,04	9,237	9,70	9,04



Slika 2.11. Struktura karnozina u obliku *zwitteriona*.

Karnozin se može sintetizirati različitim kemijskim reakcijama ili alternativnim enzimskim putem. Za enzimatsku sintezu L-karnozina iz β -alanina i L-histidina koristi se karnozin sintetaza koja zahtjeva utrošak ATP-a [9].

2.4.1. Biološka aktivnost karnozina

Karnozin ima brojne funkcije među kojima su puferska aktivnost, keliranje metalnih iona, antioksidativni učinak i sposobnost smanjenja koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS)⁵ unutar stanica, hvatanje singletnog kisika i dr [8].

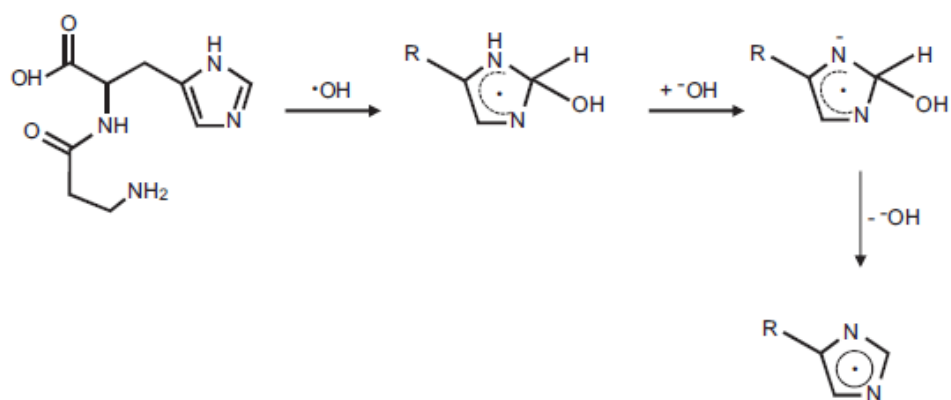
Karnozin igra ulogu u kontroli koncentracije unutarstaničnog vodikovog iona. Prilikom anaerobnog vježbanja, dolazi do nakupljanja protona i snižavanja unutarstaničnog pH. Sniženi pH utječe na nekoliko metaboličkih funkcija. pK_a vrijednost karnozina iznosi 7,01 što je blizu

⁵ ROS – engl. *reactive oxygen species*

unutarstaničnog pH i zbog toga karnozin ima veliki kapacitet hvatanja protona te na taj način doprinosi održavanju konstantne pH vrijednosti u poprečno-prugastim mišićima [12, 14].

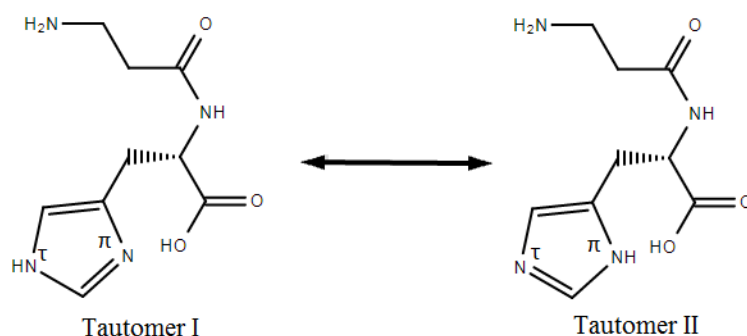
Karnozin tvori komplekse s brojnim dvovalentnim metalima. U ljudskom organizmu keliranje Ca^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} iona od iznimne je važnosti. Vezanjem Ca^{2+} iona, karnozin utječe na njihov metabolizam u srčanom mišiću i poprečno-prugastim mišićima. Ovaj dipeptid također kontrolira dostupnost Zn^{2+} iona u živčanom tkivu. Prekomjerne koncentracije Cu^{2+} iona izazivaju toksičnost što se sprječava keliranjem [15].

Zbog imidazalnog prstena karnozin hvata radikale u našem organizmu koji doprinose starenju kao i reaktivne kisikove i dušikove spojeve. Na *slici 2.13.* prikazan je mehanizam hvatanja hidroksidnog radikala. Neka istraživanja su pokazala kako karnozin privremeno smanjuje krvni tlak. Pretpostavlja se da je uzrok toga širenje arterija. Također se smatra da je ovaj dipeptid uključen u osjetilnu neurotransmisiju kao neurotransmiter ili kao neuromodulator [15].



Slika 2.12. Karnozinov mehanizam hvatanja hidroksidnih radikala [13].

Za pufersku aktivnost karnozina odgovoran je atom dušika imidazalnog prstena. Dokazano je da se imidazolni prsten u neutralnoj otopini nalazi u obliku dva tautomera: $\text{N}\tau$ protonirani oblik (tautomer I) i $\text{N}\pi$ protonirani oblik (tautomer II) (*Slika 2.13.*). Tautomer II je manje stabilan pa u otopini prevladava tautomer I (75%). Na ravnotežu tautomera utječe keliranje metala. Vezanje dvovalentnog metala, npr. Cu^{2+} čini tautomer II dominantnim jer je tautomer I taj koji sudjeluje u keliranju [13].



Slika 2.13. Tautomerni oblici (I i II) imidazolnog prstena karnozina.

2.4.2. Kompleksi metala s karnozinom

Karnozin je polidentatni ligand s potencijalnih šest vezivnih mjesta: dva dušika imidazolnog prstena, karboksilna skupina, terminalna amino skupina i peptidna veza. Mogu nastati tetraedarski i oktaedarski kompleksi. Koja vrsta kompleksa će nastati ovisi o veličini metalnog kationa, omjeru metala i liganda i o pH otopine te ionskoj jakosti pomoćne otopine. Karnozin ima tri skupine koje prolaze kiselo-bazne reakcije u rasponu pH = 1 do pH = 10: karboksilna skupina, amino skupina i protonirani dušik imidazolnog prstena [8, 14]. Ovaj dipeptid tvori komplekse s brojnim dvovalentnim kationima: Ru^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} i brojnim drugim [8, 13, 16]. Osim dvovalentnih kationa, karnozin tvori komplekse i s jednovalentnim te trovalentnim kationima. Najviše su se proučavali kompleksi s Cu^{2+} i Zn^{2+} ionima (pojedini kompleksi navedeni su u daljnjem tekstu).

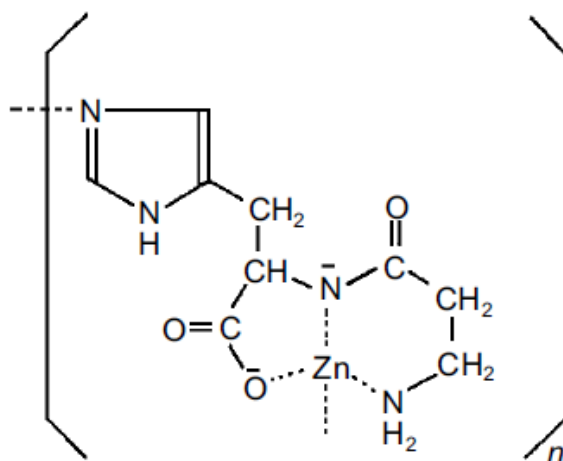
Nekoliko istraživanja opisalo je spojeve s rutenijem kao obećavajuće agense u borbi protiv raka. Takvi organorutenijski spojevi imaju manje nuspojava od uobičajenih lijekova za tu namjenu, jer se u tijelu metaboliziraju na sličan način kao i Fe^{2+} ioni. Keliranje Ru^{2+} iona s karnozinom omogućuje jedinstvenu priliku za dizajniranje lijekova zbog toga što je karnozin polidentatni ligand s antioksidativnim svojstvima. Istraživanja su pokazala da keliranjem nastaje stabilan bidentatni kompleks koji nastaje vezanjem karnozina i Ru^{2+} preko karboksilne skupine i dušika imidazolnog prstena [8].

Co^{2+} kompleksi imaju ograničen pH raspon i manje su stabilni. Istraživanja su pokazala formiranje dva različita kompleksa. Kada je suvišak liganda, dolazi do povezivanja isključivo preko dušika imidazolnog prstena. Ako je omjer 1:1, keliranje se odvija preko amino terminalne

skupine, deprotonirane peptidne veze i dušika imidazolnog prstena, a slobodno ekvatorijalno mjesto zauzima molekula vode. Osim s Co^{2+} karnozin tvori komplekse i s Co^{3+} kationom [14].

Najbitnija vrsta vanadija prisutna u biološkom sustavu je oksovanadij, VO^{2+} . Istraživanja su pokazala da se VO^{2+} koordinacija odvija preko imidazolnog atoma dušika četiri različite molekule karnozina [14].

Kompleksi Zn^{2+} -karnozin istraživani su zbog farmakološke primjene. Istraživanja ovog kompleksa može se vršiti u uskom pH rasponu. Nastajanje kompleksa može se mjeriti pri $\text{pH} = 6$, a iznad $\text{pH} = 7,5$ dolazi do taloženja iako je ligand prisutan u suvišku. Dimer je najučestalija vrsta pri $\text{pH} = 6$ zajedno s monomerom $[\text{ZnHL}]^{2+}$. Pri nižim pH vrijednostima pojavljuje se monomer $[\text{ZnL}]^+$. Istraživanja kristalne strukture Zn-karnozina pokazala su da kompleks nema jednostavnu dimernu strukturu, već polimernu što je prikazano na slici 2.14. [13, 14].

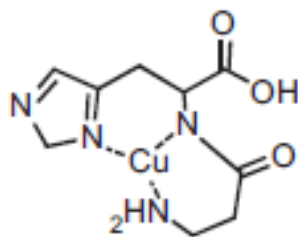


Slika 2.14. Polimerna struktura kompleksa Zn^{2+} i L-karnozina [14].

2.4.2.1. Kompleksi bakra i karnozina

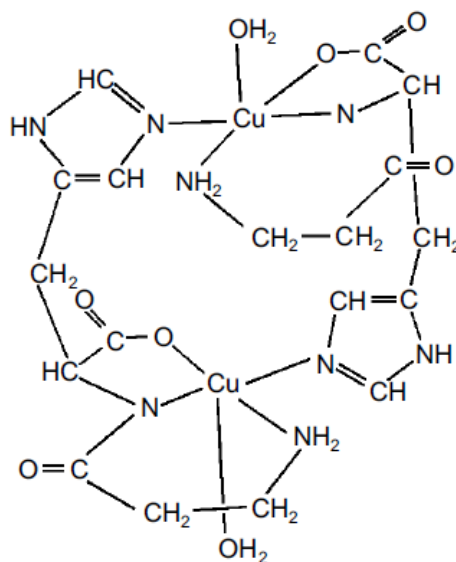
Do sada su najviše istraživani kompleksi bakra i karnozina. Dobbie i Kermack su se 1955. godine, zajedno s drugim autorima, složili da se Cu^{2+} veže na dušik imidazolnog prstena, terminalnu amino skupinu i deprotonirani dušik peptidne veze kako pH vrijednost raste (Slika 2.16.). Vezanje preko karboksilne skupine odbacilo se

zbog nemogućnosti nastanka modela koji bi uključivao sva četiri potencijalna donora dipeptida [13, 14].



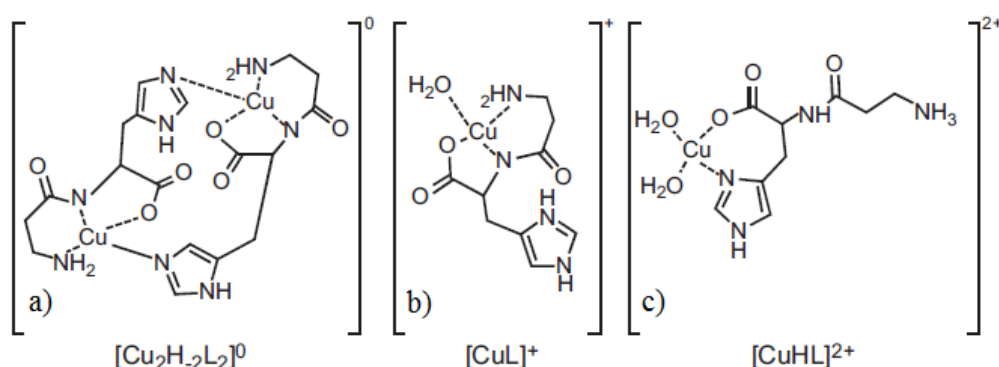
Slika 2.16. Prva predložena struktura kompleksa Cu^{2+} i karnozina [13].

Kristalni kompleks nastao pri $\text{pH} = 8$ može se vidjeti na *slici 2.17*. Struktura prikazuje da su dva Cu^{2+} centra vezana preko četiri najbliža ligandna atoma. Ova dimerna struktura nastaje vezanjem terminalnog dušika amino skupine, amidnog dušika, karboksilatnog kisika jedne od molekula dipeptida i dušika imidazolnog prstena druge molekule dipeptida. Peti ligand na svakom kationu koji upotpunjuje kvadratno piramidalnu koordinaciju je molekula vode [14].



Slika 2.17. Struktura dimernog kompleksa Cu^{2+} -karnozin pri $\text{pH} = 8$ [14].

Istraživanja su pokazala da se dimer u otopini nalazi u ravnoteži s monomerom. Pri pH rasponu od pH = 5 do pH = 7 uz suvišak karnozina, nastaju kompleksi vezanjem isključivo dušika imidazolnog prstena. Kada je omjer 1:1, preferira se nastajanje dimernog kompleksa $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^0$. Pri sobnoj temperaturi i pH = 7,2 nastaje dimer koji je stabilniji nego što se prvotno pretpostavljalo. Pri nižim pH vrijednostima prisutne su monomerni strukture $[\text{CuLH}]^{2+}$ i $[\text{CuL}]^+$. Na slici 2.18. prikazane su monomerni i dimerna struktura kompleksa Cu^{2+} iona i karnozina. Zbog male koncentracije Cu^{2+} kationa u ljudskom organizmu nastaju monomerni kompleksi [13, 14].



Slika 2.18. Molekulske strukture a) dimera, b) i c) monomera kompleksa Cu^{2+} iona i karnozina [13].

2.5. Metode određivanja karnozina

Kao što je ranije navedeno, karnozin ima brojne funkcije u ljudskom organizmu. Stoga je razvoj metoda za njegovo određivanje od iznimne važnosti. Postoje brojne metode za određivanje karnozina, a u ovom radu su navedene neke od njih.

Zabilježeno je određivanje koncentracija karnozina u životinjskom tkivu i tekućinama pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, *engl. high-performance liquid chromatography*) s različitim detektorima: HPLC – UV detekcija, HPLC – fluorescentna detekcija, HPLC – amperometrijska detekcija [17], HPLC – elektrosprej ionizacija masena spektrometrija (EIS-MS, *engl. electrosprey ionization mass spectrometry*) [18]; sustava tekućinske kromatografije – masenog spektrometara (LC-MS, *engl. liquid chromatography mass spectrometry*) te kapilarne elektroforeze (CE, *engl. capillary electrophoresis*) [17]. Kod

kromatografskih mjerenja potrebno je odvajanje i obrada uzorka prije samog mjerenja. Kapilarna elektroforeza s detekcijom pomoću laserom inducirane fluorescencije (CE-LIF, *engl. capillary electrophoresis laser-induced fluorescence*) ili UV detekcijom (CE-UV) ima puno prednosti kao što su veća efikasnost razdvajanja, veća selektivnost, manja količina potrebnog uzorka i minimalna priprema uzorka prije injektiranja. Nedostatak je određivanje niskih koncentracija uzoraka. Ovom metodom ne mogu se detektirati spojevi prisutni u tragovima u biološkim tekućinama [19].

Mikročip elektroforeza s kemiluminiscencijskom detekcijom (MCE-CL, *engl. microchip electrophoresis chemiluminescence*) razvila se za određivanje karnozina i njegovih derivata kao što su homokarnozin i anserin u biološkim uzorcima. Ova metoda ima puno prednosti u odnosu na HPLC i CE, a to su kraće vrijeme analize, manja količina uzorka i korištenih reagensa, veća efikasnost razdvajanja i jednostavna automatizacija [20].

2015. godine uspješno je odrađena analiza karnozina i slobodnih amino kiselina u fermentiranom mesu pomoću NMR spektroskopije [21]. Kompleksi karnozina i dvovalentnih metala mogu se odrediti pomoću Ramanove i IR spektroskopije [22].

Zabilježeni su i radovi u kojima se koristila potenciometrija, ciklička voltometrija (CV, *engl. cyclic voltammetry*) i diferencijalna pulsna voltometrija (DPV, *engl. differential pulse voltammetry*) [18, 23].

2.5.1. Elektrokemijske metode

Elektrokemija je grana kemije koja se bavi međuodnosom električnih i kemijskih utjecaja. Veliki dio ovog područja proučava kemijske promjene uzrokovane prolaskom električne struje i proizvodnjom električne energije nastale kemijskim reakcijama. Elektrokemijska mjerenja koriste se za prikupljanje termodinamičkih podataka o reakciji, određivanje tragova metalnih iona u otopini ili organskih vrsta, za elektrosinteze, u monitoringu okoliša, industrijskoj kontroli kvalitete, biomedicinskim analizama i u brojnim drugim primjenama [24, 25].

Dvije osnovne vrste elektrokemijskih mjerenja su potenciometrijska i potencijostatska. Obje vrste zahtijevaju najmanje dvije elektrode i otopinu elektrolita što čini elektrokemijsku ćeliju. Tako je površina elektrode poveznica između ionskog (elektrolit) i električnog

(elektroda) provodnika. Jedna od elektroda daje odaziv na željeni analit i ona se naziva indikatorska ili radna elektroda. Druga elektroda, referentna, ima konstantan potencijal [25].

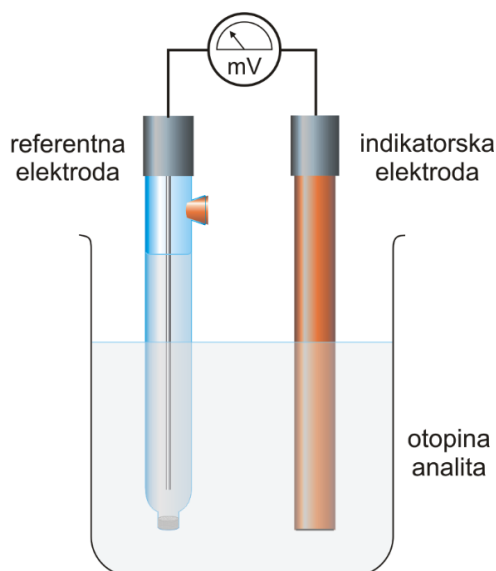
Princip elektrokemijskih mjerenja je pretvorba mjerene fizikalne veličine pomoću određenog senzora u analogni električni signal, te zatim u digitalni signal pomoću analogno-digitalnog pretvornika. Izlazna veličina pretvornika obično je napon ili jakost električne struje ili električni naboj [26].

Kao što je ranije navedeno u radu zabilježena su određivanja karnozina i njegovih derivata pomoću potenciometrije i voltametrije [18].

2.5.1.1. Potenciometrijske metode

Potenciometrija je klasična analitička metoda u kojoj se informacija o analitu dobiva iz razlike potencijala koji se javlja između dvije elektrode uz ravnotežne uvjete [24, 25]. Potenciometrija je elektrokemijska metoda koja spada u statičnu metodu jer se mjeri potencijal pri nultoj struji ili zanemarivo malom iznosu struje. Mjernom ćelijom teče mala električna struja tako da ona značajno ne utječe na stanje ravnoteže između elektroda. Ova metoda koristi se za kvantitativne analize. Potenciometrija omogućuje određivanje promjene slobodne entalpije, konstante ravnoteže reakcija, aktiviteta i koeficijenta aktiviteta molekulskih vrsta u otopinama. Potenciometrijska mjerenja koriste potencijometar i voltmetar s velikom ulaznom impedancijom koji određuju razliku potencijala između radne ili indikatorske elektrode i referentne elektrode. Primjer elektrokemijske ćelije za potenciometrijska mjerenja prikazan je na *slici 2.19*. Elektrokemijska mjerna ćelija sastoji se od dva polučlanka. Jedan polučlanak čini indikatorska elektroda, a drugi referentna elektroda. Obje elektrode uronjene su u otopinu elektrolita čiji aktivitet određuje potencijal indikatorske elektrode. Kako ne bi došlo do spontane redoks reakcije na jednoj od elektroda, one su odvoje elektrolitnim mostom. Elektrolitni most u ovom sustavu čini inertni elektrolit, a najčešće se koristi otopina kalijevog klorida koja se nalazi u sastavu referentne elektrode. Elektrolitni most omogućuje protok struje u obliku ionskog napona.

Potencijal referentne elektrode ne ovisi o aktivitetima aktivnih molekulskih vrsta u ćeliji te se on ne mijenja tijekom mjerenja. Za razliku od referentne elektrode, indikatorska elektroda razvija potencijal ovisno o aktivitetu analita u ćeliji [26, 27].

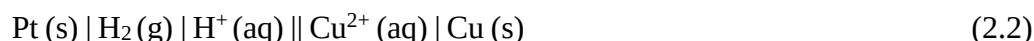


Slika 2.19. Elektrokemijska ćelija za potenciometrijsko mjerenje [27].

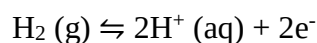
Ukupni elektrodni potencijal članka iznosi:

$$E_{MF} = E_R - E_L \quad (2.1)$$

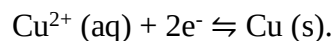
gdje je E_{MF} – elektromotorna sila članka, E_R – elektrodni potencijal referentne elektrode i E_L – elektrodni potencijal indikatorske elektrode. Prema dogovoru, elektroda na kojoj se odvija oksidacija – anoda piše se lijevo u zapisu elektrokemijske ćelije, a katoda, elektroda na kojoj se odvija redukcija, piše se desno. Primjer zapisa elektrokemijske ćelije je:



gdje je lijevo od elektrolitnog mosta (||) proces koji se odvija na referentnoj elektrodi (anodi):



a desno proces koji se odvija na indikatorskoj elektrodi (katodi):



Univerzalna referentna elektroda je standardna vodikova elektroda (SVE) za koju prema dogovoru elektrodni potencijal iznosi 0 V pri svim temperaturama. Prema toj elektrodi određeni su elektrodni potencijali drugih referentnih elektroda. Kao referentne elektrode najčešće se koriste kalomelova elektroda ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) čiji elektrodni potencijal iznosi 0,224 V pri 25 °C i srebro/srebrov (I) klorid elektroda (Ag/AgCl) čiji elektrodni potencijal iznosi 0,199 V pri 25 °C [29].

Indikatorske elektrode dijele se u dvije skupine na temelju razlike u načinu nastajanja razlike potencijala na dodirnoj površini elektroda-otopina, a to su kovinske i membranske elektrode.

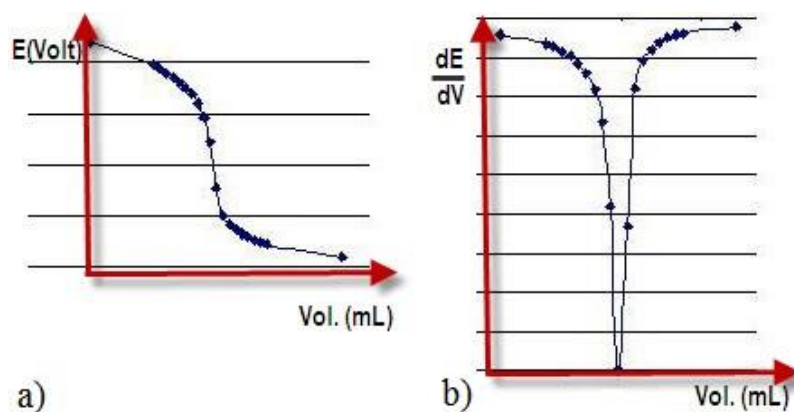
Na temelju Nernstove jednadžbe (2.3) moguće je odrediti aktivitet vrsta prisutnih u ispitivanoj otopini. Potencijal elektrode određen je izmjenom iona. Napon ovisi o logaritmu ionskog djelovanja prema Nernstovoj jednadžbi:

$$E_{MF} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{oks}}{a_{red}} \quad (2.3)$$

u kojoj E_{MF} označava elektromotornu silu, E^0 standardni elektrodni potencijal, R opću plinsku konstantu, T termodinamičku temperaturu, n nabojni broj iona, F Faradayevu konstantu, a_{oks} i a_{red} aktivitet vrsta prisutnih u ispitivanoj otopini.

Koncentracijsko područje za potenciometrijska mjerenja analita iznosi od 10^{-5} mol dm⁻³ do 10^{-1} mol dm⁻³. Postoje dvije potenciometrijske metode – potenciometrijska titracija i direktna potenciometrija.

Potenciometrijske titracije mjere potencijal indikatorske elektrode u funkciji volumena titranta. One su izrazito korisne za titracije obojenih ili mutnih otopina i za otkrivanje neočekivanih sastojaka. Postoji nekoliko vrsta ovih titracija: taložne titracije, titracije uz nastajanje kompleksnih spojeva, neutralizacijske titracije i oksidacijsko/redukcijske titracije. Za potenciometrijske titracije uz nastajanje kompleksnih spojeva koriste se metalne i membranske elektrode za određivanje završnih točaka. Kod takvih titracija dolazi do vezanja analita i titranta te nastajanja kompleksa. Završne točke titracije mogu se odrediti s nekoliko postupaka (*Slika 2.20.*). Jedan od njih, ujedno i najjednostavniji postupak, je grafički prikaz potencijala kao funkcije volumena titranta. Drugi način je računanje promjene potencijala po jedinici volumena titranta ($\Delta E/\Delta V$) [29].



Slika 2.20. Grafički prikaz potenciometrijske titracije kao a) potencijal u funkciji volumena analita i b) promjene potencijala po jedinici volumena titranta.

2.5.1.2. Voltametrijske metode

Voltametrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih metoda kod kojih se podatci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje u ovisnosti o priključenom naponu pri uvjetima koji izazivaju polarizaciju neke radne elektrode. Ova metoda koristi se u anorganskoj i fizikalnoj kemiji, te biokemiji. Grafički prikaz struje u ovisnosti o primijenjenom naponu naziva se voltamogram. Voltamogram je elektrokemijski ekvivalentan spektru u spektroskopiji koji daje kvalitativne i kvantitativne informacije o vrstama koje sudjeluju u oksidacijskim ili redukcijskim reakcijama [27].

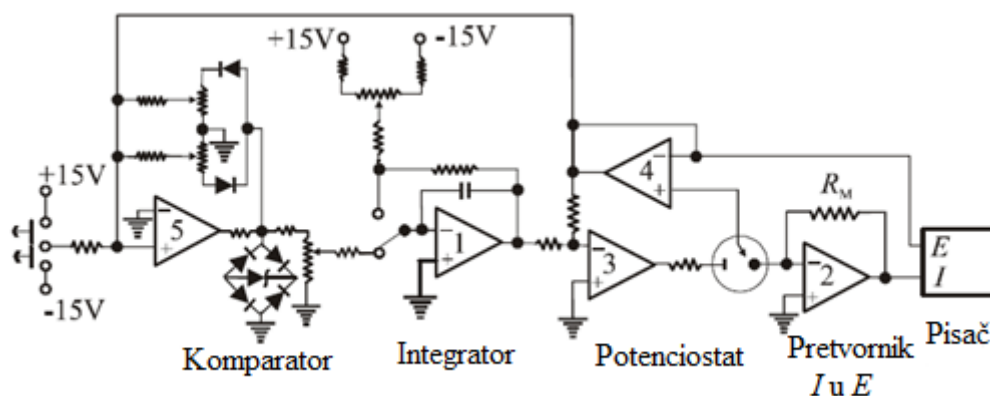
Voltametrija se razvila od polarografije koju je otkrio češki kemičar Jaroslav Heyrovski u ranim 20-im godinama. Polarografija se razlikuje od ostalih vrsta voltametrije u tome što radna mikroelektroda ima oblik kapajuće živine elektrode dok se u voltametriji koristi radna mikroelektroda stalne površine koja u otopini miruje [26, 29].

Voltametriju s linearnom primjenom potencijala i cikličku voltametriju otkrili su Matheson i Nichols 1938. godine, a teorijski su ju opisali Randles i Ševčík [26].

Moderne voltametrijske metode koriste troelektrodni sustav kod kojeg se primjenjuje pobudni signal na radnoj elektrodi. Radna elektroda mijenja potencijal u odnosu na stalan potencijal referentne elektrode. Mjeri se struja između radne i protuelektrode koja je najčešće platinska žica. Osim ove tri elektrode, elektrokemijska ćelija također sadržava cjevčicu za uvođenje inertnog plina kako bi se uklonio otopljeni kisik [27].

Kada dođe do oksidacije analita na radnoj elektrodi, struja prolazi elektronima kroz vanjski električni krug do protuelektrode gdje se događa redukcija otapala ili neke druge tvari prisutne u otopini matriksa. Redukcija analita na radnoj elektrodi zahtjeva izvor elektrona, generiranu struju koja putuje od protuelektrode do katode [27].

Na *slici 2.21.* shematski je prikaz uređaja za voltametriju. Uređaj se sastoji od komparatora (automatska promjena smjera posmika potencijala pobude), integratora (smanjenje i kontrola izlaznog napona), potenciostata (nameće potencijal i mjeri jakost struje), pretvornika struje u napon i računala (slikovni zapis signala odziva) [26].

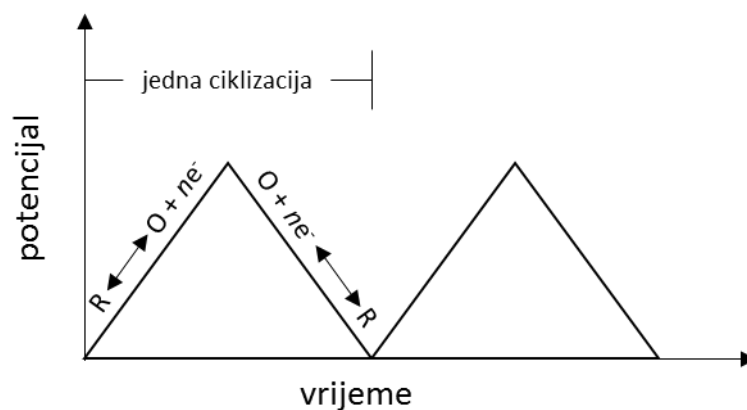


Slika 2.21. Shematski prikaz uređaja za voltametriju [26].

2.5.1.2.1. Ciklička voltametrija

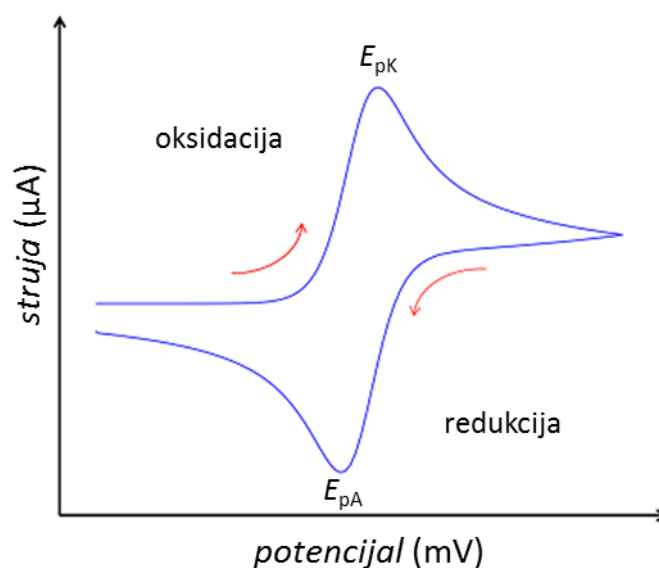
Ciklička voltametrija (CV) je najčešće korištena metoda za prikupljanje kvalitativnih informacija o elektrokemijskim reakcijama. Snaga ove metode je u brznoj informaciji o položaju redoks potencijala elektroaktivne vrste [25]. Kao što je već navedeno, ovu metodu otkrili su 1938. godine Matheson i Nichols, a opisali su je Randles i Ševčík [26].

Ciklička voltametrija sastoji se od linearne promjene potencijala stacionarne radne mikroelektrode koristeći trokutni valni oblik potencijala koji je prikazan na *slici 2.22.* Ovisno o tome koja se informacija traži, može se koristiti jedna ili više ciklizacija [25].



Slika 2.22. Pobudni signal u cikličkoj voltametrij. R – reducirani oblik, O – oksidirani oblik, n – broj izmijenjenih elektrona.

Prvotno signal pobude linearno raste (oksidacija) određeno vrijeme sve dok se ne dosegne izabrana vrijednost (E_s). Nakon toga promijeni se smjer posmika potencijala. Pri povratnom posmiku potencijala razvija se oksidacija produkta elektrodne reakcije redukcije te nastaje anodni vrh [26]. U signalu odziva javljaju se anodni i katodni strujni vrhovi. Voltametrijom se mjeri jakost struje u ovisnosti o primijenjenom potencijalu. Dobiveni struja-potencijal grafikon naziva se ciklički voltamogram, a prikazan je na slici 2.23. Eksperimentalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su potencijal i struja anodnog (E_{pA} , I_{pA}), odnosno katodnog (E_{pK} , I_{pK}) strujnog vrha, omjer visina oksidacijskog i redukcijskog vrha (I_{pA} / I_{pK}) te razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha ($\Delta E_p = E_{pA} - E_{pK}$) [30]. Karakteristični strujni vrhovi cikličkog voltamograma posljedica su formiranja difuznog sloja u blizini površine elektrode [25].

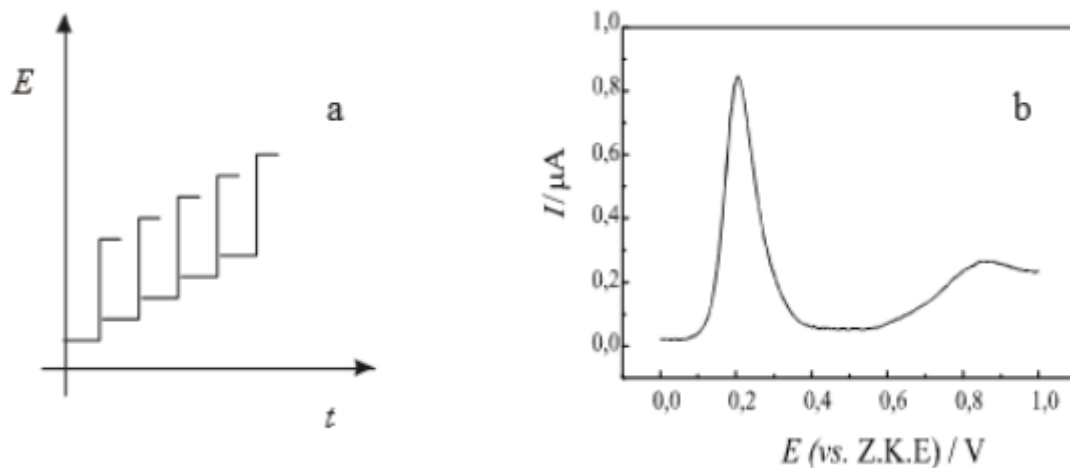


Slika 2.23. Primjer izgleda cikličkog voltamograma s naznačenim katodnim (E_{pK}) i anodnim (E_{pA}) strujnim vrhom.

2.5.1.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Za razliku od cikličke voltametrije, kod diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) koriste se stupnjevite promjene potencijala s vremenom. Pulsne voltametrijske tehnike uveli su Barker i Jenkin. One su počele zamjenjivati linearne tehnike jer imaju granicu osjetljivosti i do 10^{-8} mol dm⁻³. Stoga se diferencijalna pulsna voltametrija koristi za određivanje tragova organskih i anorganskih vrsta. Metoda je iznimno osjetljiva i zahtjeva korištenje čistih osnovnih elektrolita. Pomoću ove metode može se određivati veći broj elektroaktivnih vrsta prisutnih u ispitivanoj otopini. Glavni nedostatak ove metode je relativno dugo vrijeme mjerenja i nemogućnost razlučivanja pripadajućih signala kod složenijih sustava [25, 26].

U diferencijalnoj pulsnoj voltametriji mali pravokutni naponski impuls, amplitude od 10 mV do 100 mV, superponira se na linearno rastući potencijal ili na stepenastu rampu. Struja se mjeri prije naponskog impulsa i na kraju impulsa u svakom ciklusu. Naponski impuls najčešće traje od 40 ms do 60 ms. Signal odziva je razlika jakosti struje prije i nakon naponskog impulsa, kao funkcija potencijala. Signal pobude je niz kratkotrajnih pulseva, a signal odziva (visina strujnog vrha) proporcionalan je koncentraciji reaktanata (Slika 2.24.) [26, 30].



Slika 2.24. Signal pobude (a) i signal odziva (b) u diferencijalno pulsnoj voltametriji [30].

2.5.2. UV/VIS spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode temelje se na interakciji svjetla i materije. Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja velikom brzinom prolazi prostorom i koja ima dualnu prirodu. Elektromagnetsko zračenje ima valna, ali i čestična svojstva. Valni parametri su valna duljina (λ), brzina (v), amplituda sinusoidnog vala (A) te frekvencija (ν). Čestična svojstva zračenja opisana su jednačbom (2.4) gdje energija fotona (E) ovisi o frekvenciji zračenja (ν):

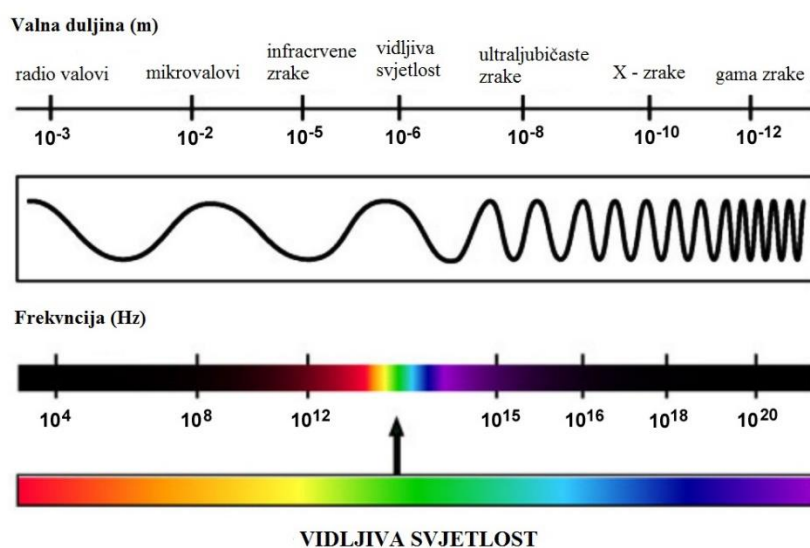
$$E = h\nu \quad (2.4)$$

i u kojoj je h Planckova konstanta koja iznosi $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$. Ako se energija prikazuje valnom duljinom, dobije se sljedeća jednačba:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.5)$$

gdje c brzina svjetlosti koja iznosi približno $3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ [29].

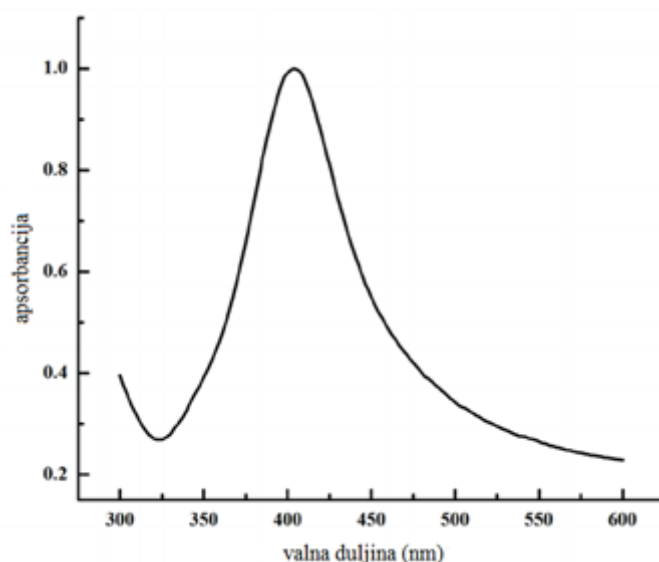
Elektromagnetski spektar obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija koji su prikazani na slici 2.25.



Slika 2.25. Elektromagnetski spektar [31].

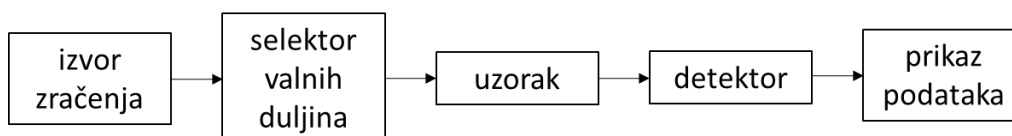
Molekulska spektrofotometrija temelji se na apsorpciji ultraljubičastog, vidljivog i infracrvenog zračenja. Ona se široko primjenjuje za kvalitativna i kvantitativna mjerenja brojnih anorganskih i organskih vrsta. Područje ultraljubičastog zračenja (UV) iznosi od 200 nm do 380 nm, a područje vidljivog zračenja (VIS) otprilike od 380 nm do 780 nm.

Molekula tvari može apsorbirati energiju elektromagnetskog vala i pri tom se povećava njezina energija. Može doći do promjene u energiji elektrona (elektronska pobuda), u energiji rotacije molekula (rotacijska pobuda) ili u energiji vibracije atoma u molekuli (vibracijska pobuda). Energije molekula su kvantizirane i molekula može apsorbirati fotone samo određene energije. Apsorpcijski spektar tvari je odnos između relativne apsorpcije i valne duljine svjetla. Iz njega se može očitati molekularna struktura tvari i neka druga svojstva. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja dolazi do prijelaza molekule iz osnovnog u pobuđeno stanje [26]. Na slici 2.26. prikazan je primjer spektra, grafičkog prikaza nastalog mjerenjem apsorpcije.



Slika 2.26. Primjer apsorpcijskog spektra vidljivog područja [32].

Instrument za UV/VIS spektrofotometriju sastoji se od izvora zračenja, selektora valnih duljina, držača uzorka, detektora te sustava za obradu i prikaz podataka. Oni mogu biti jednosnopni ili dvosnopni. Osnovni princip rada instrumenta za UV/VIS spektrofotometrijska mjerenja prikazan je na *slici 2.27*.



Slika 2.27. Sastavni dijelovi instrumenta za apsorpcijsku spektrofotometriju [29].

Apsorbancija otopine definirana je Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (2.6)$$

odnosno:

$$A = \epsilon bc \quad (2.7)$$

gdje je A apsorbancija, T transmitancija, P_0 intenzitet upadnog zračenja, P intenzitet propuštenog zračenja, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent koji se izražava u $\text{L cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$, b

duljina puta zračenja kroz uzorak koja se izražava u cm i c koncentracija uzorka izražena u mol dm^{-3} . Na temelju Lambert-Beerovog zakona može se odraditi kvantitativna analiza uzorka jer je koncentracija proporcionalna apsorbanciji [29].

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i priprava otopina

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u *tablici 3.1.*

Tablica 3.1. Popis kemikalija, molekulskih formula i njihovih proizvođača korištenih u radu.

Naziv kemikalije	Molekulska formula	Proizvođač
Bakrov (II) nitrat trihidrat	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija
(S)-2-amino-3-(4-imidazoil)propionska kiselina (L-histidin)	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države
3-aminopropionska kiselina (β -alanin)	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države
β -alanil-L-histidin (L-karnozin)	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države
Natrijev hidroksid	NaOH	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
Natrijev hidrogenkarbonat	NaHCO_3	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska

Iz kemikalija navedenih u *tablici 3.1.* priređene su različite otopine. Otopine su priređene u Milli-Q vodi ($\kappa \leq 5,6 \cdot 10^{-8} \text{ S cm}^{-1}$). Koncentracije otopina bakrovog nitrata, β -alanina, L-histidina i L-karnozina iznosile su $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Pufer pH = 10 pripremljen je pomoću $18,3 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevog hidroksida i 50 cm^3 $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevog hidrogenkarbonata te nadopunjavanjem otopine do ukupnog volumena od 100 cm^3 Milli-Q vodom.

Za potenciometrijska mjerenja, koncentracija ispitivanih analita iznosila je $9,09 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. U 20 cm^3 pufera pH = 10 otpipetirano je 2 cm^3 β -alanina, L-histidina ili L-karnozina. Otopine analita titrirane su sa 6 cm^3 otopine bakrovog nitrata koncentracije, $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Kao slijepa proba koristio se pufer pH = 10.

Za voltametrijska mjerenja priređene su otopine koje su navedene u *tablici 3.2*. Kao i za potenciometrijska mjerenja, tako i za voltametrijska mjerenja ispitivani uzorci priređeni su u puferu pH = 10, a ukupan volumen ispitivane otopine iznosio je 15 cm³. U *tablici 3.2.a* navedeni su točni volumeni dodanih otopina za ispitivanja elektroaktivnosti i nastanka kompleksa β-alanina. Za razliku od *tablice 3.2.a*, u *tablicama 3.2.b* i *3.2.c* navedene su i otopine L-histidina, odnosno L-karnozina i bakrovog nitrata u omjerima 2:1, 4:1, 1:2 i 1:4. Radi lakšeg iščitavanja navedene tablice, u nastavku se nalazi primjer pripreve otopine uzorka L-karnozina i bakrovog nitrata 2:1. Tako za pripravu otopine L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 2:1 u 14,55 cm³ pufera pH = 10 dodano je 0,30 cm³ 1·10⁻² mol dm⁻³ otopine L-karnozina i 0,15 cm³ 1·10⁻² mol dm⁻³ otopine bakrovog nitrata. Red veličina priređenih koncentracija iznosio je 10⁻⁴ mol dm⁻³.

Tablica 3.2. Priprava otopina β-alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³), bakrovog nitrata (Cu(NO₃)₂) ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³), L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³), L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³) te kompleksa omjera 1:1, 2:1, 4:1, 1:2, 1:4 za mjerenja cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom; voltametrijska istraživanja vezana za β-alanin (a), istraživanja vezana za L-histidin (b), istraživanja vezana za L-karnozin (c).

a			
Uzorak	V (pufer pH = 10)/dm ⁻³	V (0,01M β-alanin)/dm ⁻³	V (0,01M Cu(NO ₃) ₂)/dm ⁻³
Pufer pH = 10	15	/	/
Otopina β-alanina	14,85	0,15	/
Otopina bakrovog nitrata	14,85	/	0,15
Otopina β-alanina i bakrovog nitrata 1:1	14,70	0,15	0,15

b			
Uzorak	V (pufer pH = 10)/dm ⁻³	V (0,01M L-histidin)/dm ⁻³	V (0,01M Cu(NO ₃) ₂)/dm ⁻³
Pufer pH = 10	15	/	/
Otopina L- histidina	14,85	0,15	/
Otopina bakrovog nitrata	14,85	/	0,15
Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 1:1	14,70	0,15	0,15
Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 2:1	14,55	0,30	0,15
Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 4:1	14,25	0,60	0,15
Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 1:2	14,55	0,15	0,30

Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 1:4	14,25	0,15	0,60
--	-------	------	------

c			
Uzorak	V (pufer pH = 10)/dm ³	V (0,01M L-karnozin)/dm ³	V (0,01M Cu(NO ₃) ₂)/dm ³
Pufer pH = 10	15	/	/
Otopina L-karnozina	14,85	0,15	/
Otopina bakrovog nitrata	14,85	/	0,15
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 1:1	14,70	0,15	0,15
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 2:1	14,55	0,30	0,15
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 4:1	14,25	0,60	0,15
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 1:2	14,55	0,15	0,30
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 1:4	14,25	0,15	0,60

Za UV/VIS mjerenja priređene su otopine koncentracija $4 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³. Priprema otopina opisana je u *tablici 3.3*. Otopine su priređene u puferu pH = 10 do ukupnog volumena od 5 cm³. Za mjerenja se koristio 1 cm³ ispitivane otopine. Kao referentna otopina služio je pufer pH = 10.

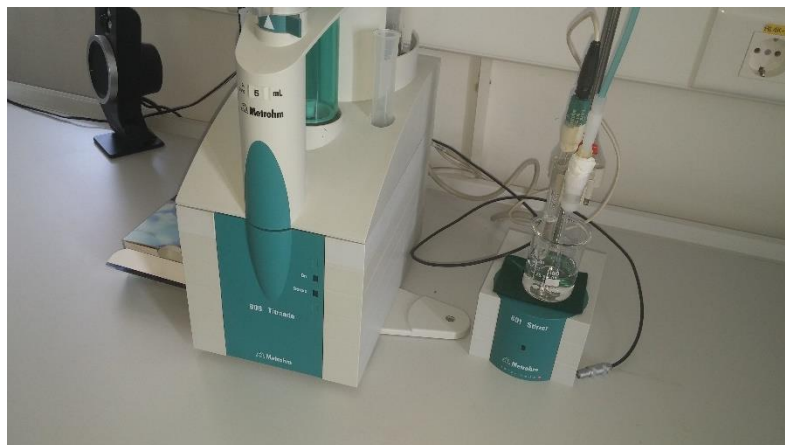
Tablica 3.3. Priprava otopina L-histidina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), L-karnozina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopina L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1, odnosno L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 za UV/VIS spektrofotometrijska mjerenja.

Uzorak	V (pufer pH = 10)/dm ³	V (0,01M L-histidin)/dm ³	V (0,01M L-karnozin)/dm ³	V (0,01M Cu(NO ₃) ₂)/dm ³
Otopina bakrovog nitrata	3	/	/	2
Otopina L-histidina	3	2	/	/
Otopina L-karnozina	3	/	2	/
Otopina L-histidina i bakrovog nitrata 1:1	3	2	/	2
Otopina L-karnozina i bakrovog nitrata 1:1	3	/	2	2

3.2. Aparatura

3.2.1. Potenciometrijska mjerenja

Potenciometrijska mjerenja rađena su na uređaju 808 Titrandu, Metrohm 806 s promjenjivom jedinicom i 801 Metrohm titracijskog stalka za magnetsko miješanje (*Slika 3.1.*). Uređaj je spojen na računalo, a podatci su obrađeni u softveru Tiamo. Uređaj je postavljen tako da se titrant (u ovom slučaju bakrov nitrat) dozirao u inkrementima u kojima je odziv signala bio 2-5 mV min⁻¹. Ukupan volumen dodanog titranta iznosio je 6 cm³. Analit se miješao pomoću magnetske miješalice tijekom mjerenja.



Slika 3.1. Aparatura za potenciometrijska mjerenja (Metrohm, Švicarska).

3.2.1.1. Elektrokemijska ćelija za potenciometrijska mjerenja

Potenciometrijska mjerenja rađena su u dvoelektrodnom sustavu pri sobnoj temperaturi ($\theta = 25 \pm 1^\circ \text{C}$). Elektrokemijska ćelija sastojala se od staklene čaše volumena 50 cm^3 s ravnim dnom, indikatorske i referentne elektrode. Osim elektroda, u ćeliji se nalazio i magnet za magnetsko miješanje. Ukupan volumen otopine u elektrokemijskoj ćeliji iznosio je 22 cm^3 .

Kao indikatorska elektroda koristila se elektroda s platinskim listićem (Metrohm, Švicarska). Elektroda je prikazana na *slici* 3.2. Ova elektroda daje odziv na bakrove ione prisutne u otopini.



Slika 3.2. Platinska indikatorska elektroda (Metrohm, Švicarska) [33].

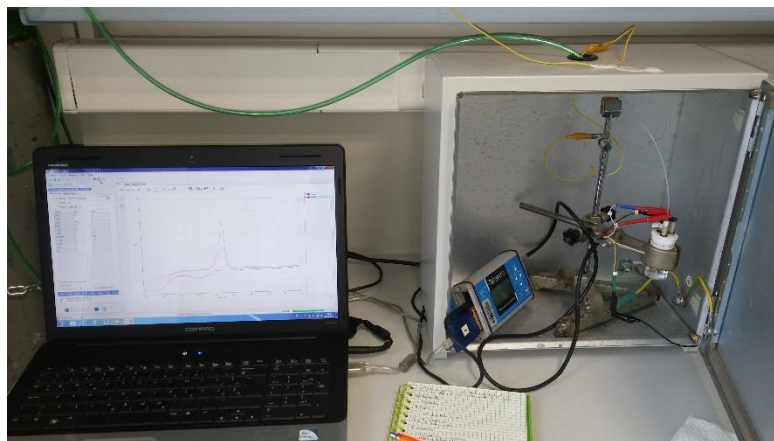
Srebro/srebrov (I) klorid (Ag/AgCl) elektroda je elektroda stalnog potencijala te se koristila kao referentna elektroda. Ona je također od istog proizvođača, Metrohm, Švicarska (*Slika 3.3.*). Prije svakog mjerenja elektrode se ispiru destiliranom vodom.



Slika 3.3. Ag/AgCl referentna elektroda (Metrohm, Švicarska) [34].

3.2.2. Voltametrijska mjerenja

Voltametrijska mjerenja izvedena su pomoću PalmSens potencioštata/galvanostata spojena na računalo (*Slika 3.4.*). Za akviziciju i obradu podataka koristio se PSTrace softver. Mjerenja su provedena u troelektrodnom sustavu pri sobnoj temperaturi ($\theta = 25 \pm 1^\circ \text{C}$) u Faradayevom kavezu. Elektrokemijska ćelija sastojala se od radne, referentne i protuelektrode, te cjevčice za uvođenje argona. Prije svakog mjerenja, uzorak je prvotno propuhivan argonom visoke čistoće Ar 5 ($\phi_{\text{Ar}} = 99,999\%$) 4-5 minuta. Ukupan volumen ispitivane otopine iznosio je 15 cm^3 .



Slika 3.4. Aparatura za voltametrijska mjerenja koja se sastoji od PalmSens potencijostata/galvanostata, računala s odgovarajućim softverom i boce inertnog plina.

3.2.2.1. Elektrokemijska ćelija za voltametrijska mjerenja

Za cikličku i diferencijalno pulsnu voltametriju koristile su se jednake elektrokemijske ćelije. Na *slici 3.5.* prikazana je radna elektroda od staklastog ugljika (ALS Co., Japan). Površina radne elektrode iznosi $0,018 \text{ cm}^2$. Prije svakog mjerenja površina elektrode polira se prahom $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (ALS Co., Japan). Veličina čestica praha iznosi $0,05 \text{ }\mu\text{m}$. Elektroda se polirala do zrcalnog sjaja te je na kraju dobro isprana Milli-Q vodom.



Slika 3.5. Radna elektroda od staklastog ugljika(ALS Co., Japan) [35].

Referentna Ag/AgCl elektroda nalazi se na *slici 3.6.* Kao i ostale Ag/AgCl elektrode i ova elektroda sačinjena je od srebrne žice uronjene u zasićenu otopinu srebrovih klorida. Kloridni ioni kontroliraju potencijal elektrode i aktivitet Ag^+ iona.



Slika 3.6. Referentna srebro/srebrov klorid elektroda (Ag/AgCl) čiji je unutrašnji elektrolit 3 mol dm⁻³ KCl (ALS Co., Japan) [36].

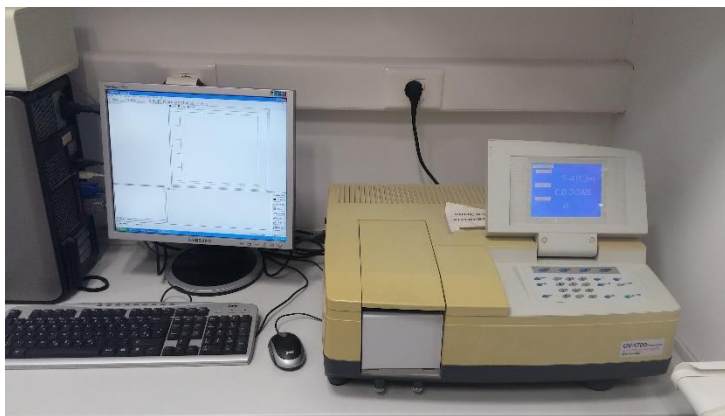
Protuelektroda služi za zatvaranje strujnog kruga elektrokemijske ćelije i najčešće se koristi platinska žica. Na *slici* 3.7. prikazana je protuelektroda duljine 3 cm koja je korištena u ovom radu.



Slika 3.7. Protuelektroda sačinjena od platinske žice (ALS, Japan) [37].

3.2.3. Spektrofotometrijska mjerenja

Spektrofotometrijska mjerenja obuhvaćala su ultraljubičasto, vidljivo područje, ali i blisko infracrveno područje. Odnosno, raspon valnih duljina varirao je od 250 nm do 1000 nm. Shimadzu 1700 je instrument koji se koristio za UV/VIS mjerenja. Uređaj je povezan s računalom koje sadrži softver UVProbe za akviziciju i obradu podataka (*Slika 3.8.*). Ovaj instrument spada u vrstu dvosnopnih spektrofotometara gdje se paralelno mjeri apsorbancija referentne otopine i oduzima od apsorbancije otopine uzorka.



Slika 3.8. Aparatura za UV/VIS mjerenja, Shimadzu 1700.

3.3. Uvjeti mjerenja

Svi uzorci priređeni su u puferu $\text{pH} = 10$ s obzirom da su β -alanin, L.histidin i L-karnozin potpuno dreprotonirani pri toj pH vrijednosti.

3.3.1. Potenciometrijska titracija

Potenciometrijska titracija je tehnika kojom se htjelo dokazati stvaranje kompleksa između analita i titranta. Na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje pomoću magnetske miješalice vršila se titracija. Titrant se automatski dodavao u inkrementima u kojima je odziv signala bio $2\text{--}5 \text{ mV min}^{-1}$. Mjerenje je trajalo sve dok nije dodano svih 6 cm^3 titranta ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ otopina bakrovog nitrata).

3.3.2. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija je tehnika kojom se ispituju elektrokemijska svojstva ispitivanog uzorka., ali također je moguće uočiti stvaranje novih kemijskih vrsta (kompleksa). Mjerenja su vršena na sobnoj temperaturi u Faradayevom kavezu. Prije mjerenja uzorci su propuhivani 4-5 minuta u struji argona. Voltamogrami za sve uzorke snimljeni su u rasponu potencijala od $-0,8 \text{ V}$ do 1 V u odnosu na referentnu Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala iznosila je 100 mV s^{-1} . Prilikom jednog mjerenja radile su se tri uzastopne ciklizacije. Za provjeru odvija

li se proces na radnoj elektrodi pod difuzijskom kontrolom, vršile su se ciklizacije s različitom brzinom promjene potencijala. Brzina promjene potencijala iznosila je od 50 mV s^{-1} do 300 mV s^{-1} .

3.3.3. Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija je puno osjetljivija metoda od cikličke voltametrije. Pomoću nje se može vidjeti stvaranje kompleksa i pratiti adsorpcija oksidacijskih produkata na površinu radne elektrode. Mjerenja su vršena na sobnoj temperaturi u Faradayevom kavezu. Prije mjerenja uzorci su propuhivani 4-5 minuta u struji argona. Za ova mjerenja korišten je raspon potencijala od $-0,5 \text{ V}$ do $1,1 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Brzina promjene potencijala iznosila je 5 mV s^{-1} .

3.3.4. UV/VIS spektrofotometrija

Spektrofotometrija je tehnika koja daje kvalitativne i kvantitativne podatke o ispitivanom uzorku. Kao i ostala mjerenja u ovom radu, tako se i ovo vršilo na sobnoj temperaturi. Korišten je dvosnopni spektrofotometar, a snimljena je apsorbancija u rasponu valnih duljina od 250 nm do 1000 nm .

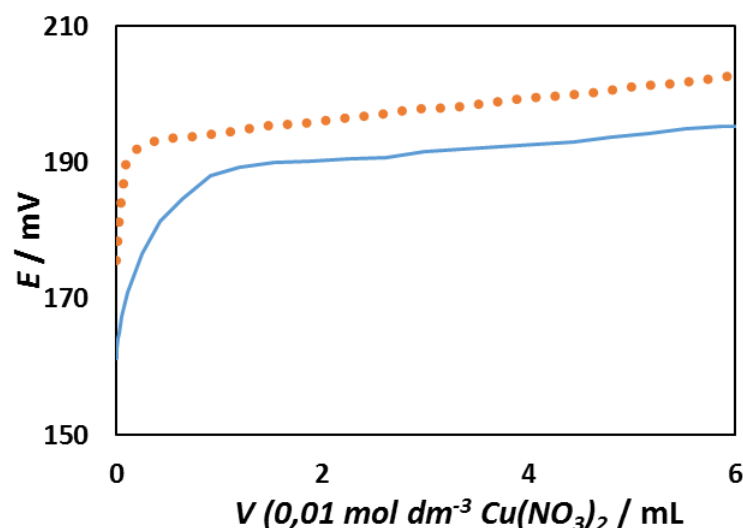
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Potenciometrijska mjerenja

Potenciometrijske titracije u ovom radu temelje se na stvaranju kompleksa između analita i titranta. Dodavanjem inkremenata bakrovog nitrata dolazi do polaganog rasta potencijala indikatorske elektrode. Na području točke ekvivalencije dolazi do naglog skoka potencijala. Krivulja koja označava nastanak kompleksa je sinusoidnog oblika.

4.1.1. β -alanin

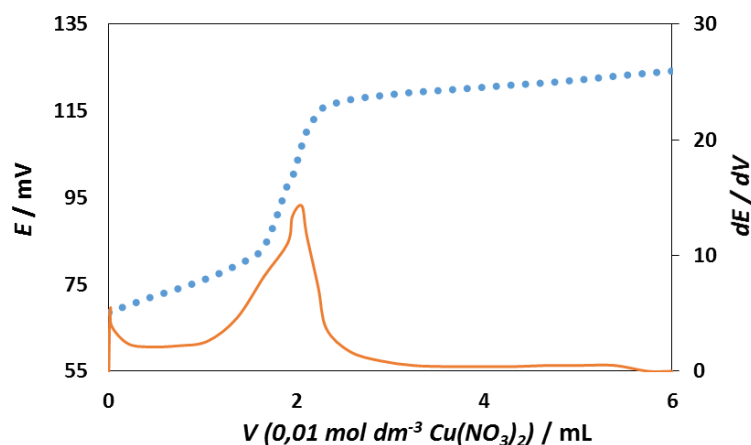
Slika 4.1. prikazuje potenciometrijsku titracijsku krivulju β -alanina. Točkasta narančasta krivulja prikazuje titraciju čistog pufera pH = 10 bakrovim nitratom. Puna plava linija označava titraciju otopine β -alanina. Krivulja nije sinusoidnog oblika i nigdje se ne pojavljuje nagli skok potencijala. Takav oblik krivulje jasno naznačava da se ne stvara kompleks između β -alanina i dodanih bakrovih iona u puferu pH = 10.



Slika 4.1. Potenciometrijska titracijska krivulja β -alanina ($c = 9,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 s bakrovim nitratom ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); pufer pH = 10 (••••), otopina β -alanina (—).

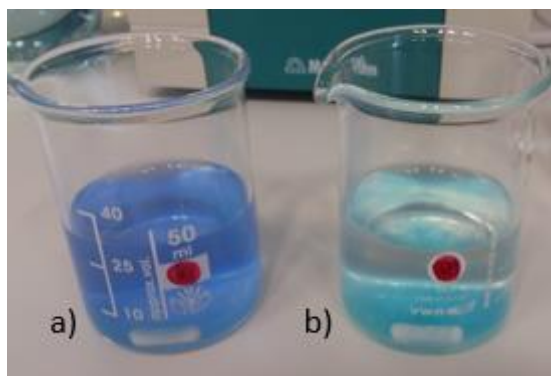
4.1.2. L-histidin

Potenciometrijska titracijska krivulja i odgovarajuća prva derivacija titracijske krivulje L-histidina u puferu pH = 10 s bakrovim nitratom prikazane su na *slici* 4.2. Volumen dodanog titranta u točki ekvivalencije iznosi 1,9 cm³.



Slika 4.2. Potenciometrijska titracijska krivulja i odgovarajuća prva derivacija L-histidina ($c = 9,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 s bakrovim nitratom ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); promjena potencijala u ovisnosti dodanog volumena titranta (••••), odgovarajuća prva derivacija titracijske krivulje (—).

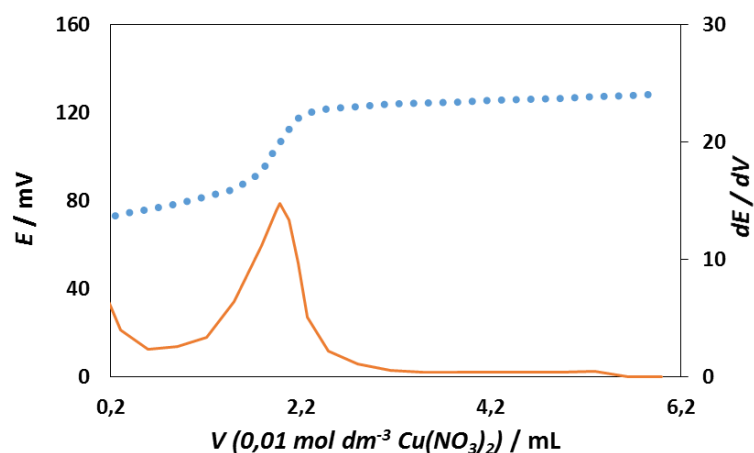
Potenciometrijska titracijska krivulja prikazuje nastajanje kompleksa L-histidina i Cu²⁺ iona. Ona je sinusoidnog oblika i jasno se vidi skok oko točke ekvivalencije. To je također potvrđeno i prvom derivacijom čiji vrh pokazuje volumen potreban da se postigne točka ekvivalencije. Dodavanjem bakrovog nitrata u otopinu analita dolazi do vezanja bakra na histidin. U točki ekvivalencije sav je L-histidin vezao bakar. Daljnjim dodavanjem bakra, potencijal ponovno polagano raste jer nema slobodnog L-histidina koji bi mogao vezati bakar te dolazi do suviška bakra u otopini. Osim potenciometrijske titracije, nastajanje kompleksa može se uočiti i vizualno na temelju promjene boje. Dodavanjem bakrovog nitrata, otopina analita poprima plavu boju. Na *slici* 4.3. uspoređene su boje otopina kompleksa L-histidina i Cu²⁺ (lijevo) s bojom otopine u kojoj se nalaze Cu(OH)₂ (desno). Prema dobivenim rezultatima nastaje kompleks L-histidina i Cu²⁺ u puferu pH = 10 i to u omjeru 1:1.



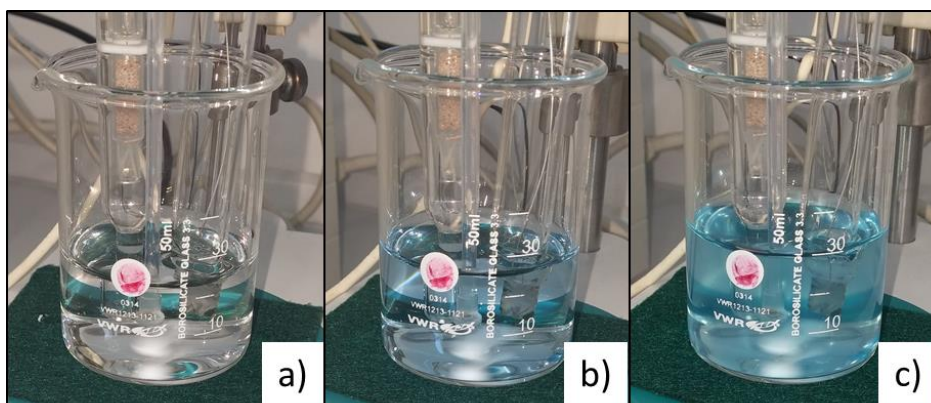
Slika 4.3. Otopina 2 cm³ L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) i 6 cm³ bakrova nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) u 20 cm³ pufera pH = 10 (a); otopina 6 cm³ bakrova nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) u 20 cm³ pufera pH = 10 (b).

4.1.3. L-karnozin

Slika 4.4. prikazuje potenciometrijsku titracijsku krivulju i odgovarajuću prvu derivaciju titracijske krivulje L-karnozina u puferu pH = 10 s bakrovim nitratom. Titriranjem otopine L-karnozina s bakrovim nitratom dolazi do stvaranja sinusoidne krivulje koja prikazuje ovisnost potencijala o volumenu dodanog titranta. Ukupno je odrađeno 5 mjerenja, a točka ekvivalencije iznosi 2,0 cm³. U točki ekvivalencije potrošen je sav L-karnozin za stvaranje kompleksa L-karnozin-Cu²⁺. Na *slici 4.5.* može se vizualno detektirati stvaranje kompleksa gdje *slika 4.5.a* predstavlja otopinu uzorka prije titracije, *slike 4.5.b* tijekom titracije, a *slika 4.5.c* poslije titracije. Dodavanjem bakrovog nitrata dolazi do promjene boje otopine iz bezbojne u tamnije plavu. Nastala plava boja razlikuje se od plave boje otopine kada su u njoj prisutni Cu(OH)₂. Stvaranjem kompleksa Cu²⁺ s L-karnozinom nastaje stabilnija vrsta od Cu(OH)₂. L-karnozin tvori kompleks s Cu²⁺ u puferu pH = 10.



Slika 4.4. Potenciometrijska titracijska krivulja i odgovarajuća prva derivacija L-karnozina ($c = 9,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 s bakrovim nitratom ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); promjena potencijala u ovisnosti dodanog volumena titranta (••••), odgovarajuća prva derivacija titracijske krivulje (—).



Slika 4.5. Otopina L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 (a); otopina L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 tijekom titracije s bakrovim nitratom ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (b); otopina L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 nakon titracije s bakrovim nitratom ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (c).

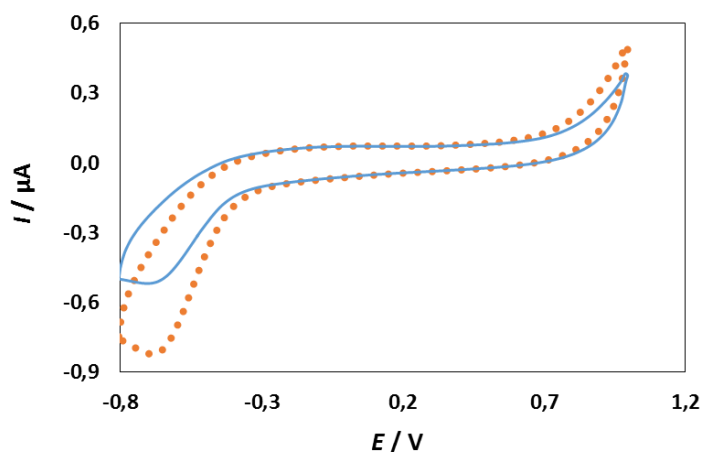
4.2. Voltametrijska mjerenja

Mjerenja su rađena cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom kako bi se dobili podatci o elektrokemijskim svojstvima β -alanina, L-histidina, L-karnozina i njihovih kompleksa s Cu^{2+} . Svi uzorci priređivani su u puferu pH = 10 i stoga se taj pufer koristio kao slijepa proba.

4.2.1. Ciklička voltametrija

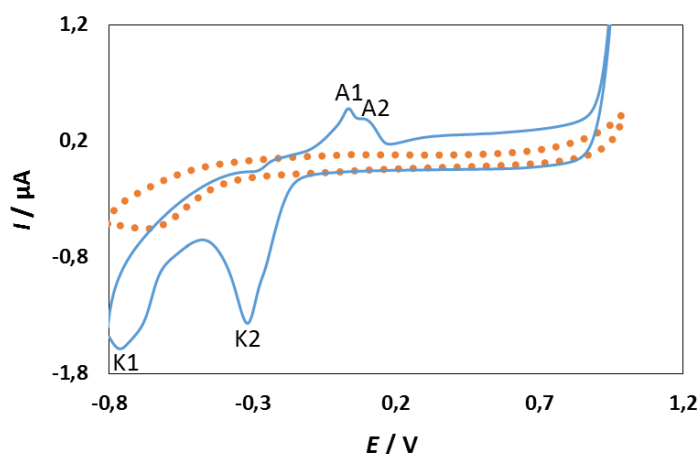
4.2.1.1. β -alanin

Na *slici 4.6.* prikazan je ciklički voltamogram otopine β -alanina koncentracije, $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ koja je priređena u puferu pH = 10. Voltamogram je snimljen na elektrodi od staklastog ugljika pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} . Ciklički voltamogram otopine β -alanina u puferu pH = 10 pokazuje da aminokiselina β -alanin nije elektroaktivna.



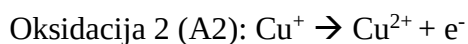
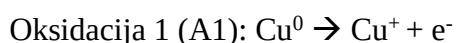
Slika 4.6. Ciklički voltamogram β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina β -alanina (—).

Slika 4.7. prikazuje ciklički voltamogram otopine bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s⁻¹.

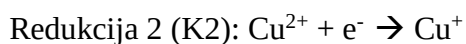
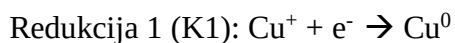


Slika 4.7. Ciklički voltamogram bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s⁻¹; pufer pH = 10 (••••), otopina bakrovog nitrata (—).

Na voltamogramu bakrovog nitrata vidljiva su dva anodna i dva katodna strujna vrha. Oksidacijski strujni vrhovi nalaze se na potencijalima $E_{pA1} = 0,04$ V (A1) i $E_{pA2} = 0,11$ V (A2) u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Proces koji se događaju na anodnim strujnim vrhovima su sljedeći:

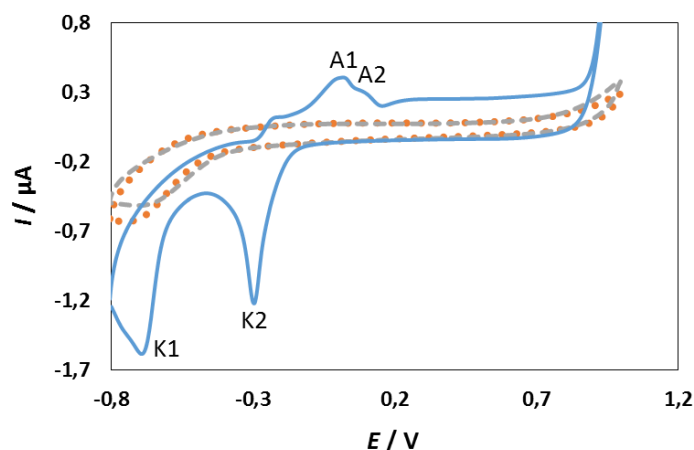


Redukcijski strujni vrhovi nalaze se na potencijalima $E_{pK1} = -0,69$ V (K1) i $E_{pK2} = -0,31$ V (K2) u odnosu na referentnu elektrodu. Oni su posljedica redukcije bakra:



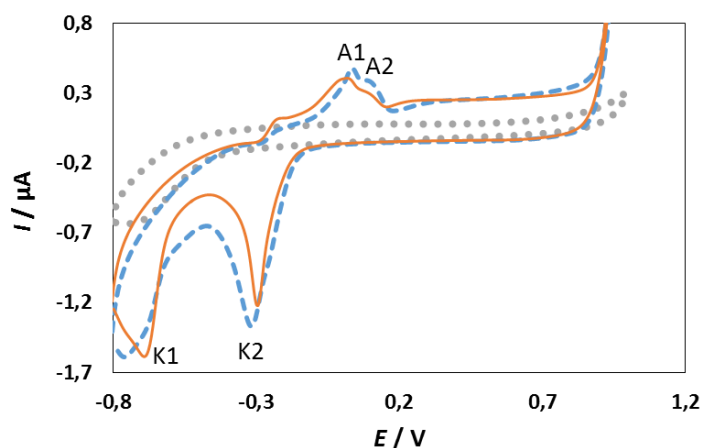
Ciklički voltamogrami β-alanina i otopine β-alanina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 prikazani su na slici 4.8. Kao što je već ranije zaključeno, β-alanin nije elektroaktivan.

Miješanjem β -alanina i bakrovog nitrata u jednakim omjerima ne dolazi do stvaranja kompleksa. To se jasno vidi iz cikličkog voltamograma otopine β -alanina i bakrovog nitrata 1:1. Na voltamogramu se pojavljuje 2 anodna i 2 katodna strujna vrha karakteristična za bakar. Uspoređeni anodni i katodni strujni vrhovi mogu se vidjeti na *slici 4.9*.



Slika 4.8. Ciklički voltamogram β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine β -alanina i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina β -alanina (— — —), otopina β -alanina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (—).

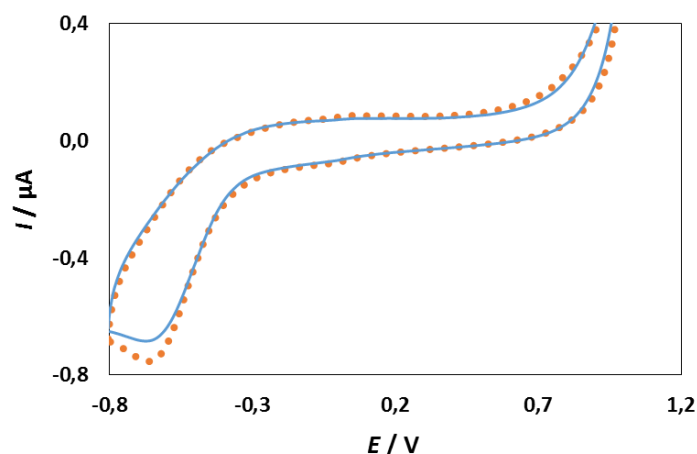
Oksidacijski strujni vrhovi otopine β -alanina i bakrovog nitrata omjera 1:1 nalaze se na potencijalima $E_{pA1} = 0,025 \text{ V}$ (A1) i $E_{pA2} = 0,10 \text{ V}$ (A2), a redukcijski na potencijalima $E_{pK1} = -0,68 \text{ V}$ (K1) i $E_{pK2} = -0,29 \text{ V}$ (K2) u odnosu na Ag/AgCl elektrodu što se preklapa s anodnim i katodnim strujnim vrhovima čiste otopine bakrovog nitrata. Cikličkom voltametrijom je također potvrđeno da ne dolazi do stvaranja kompleksa.



Slika 4.9. Ciklički voltamogram bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-4}$) i otopine β -alanina i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina bakrovog nitrata (— — —), otopina β -alanina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— — —).

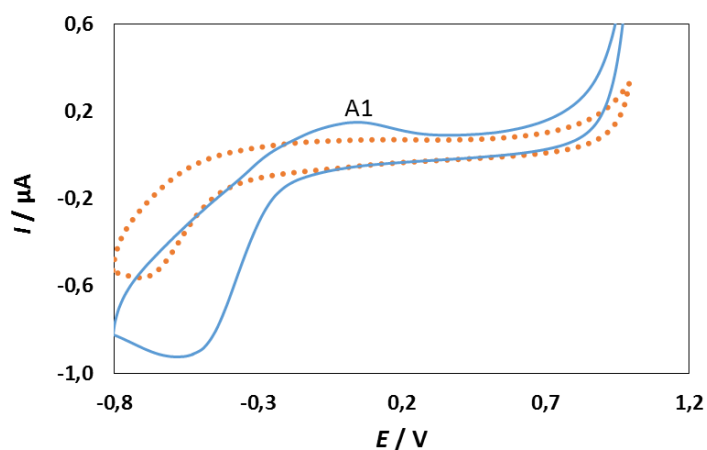
4.2.1.2.L-histidin

Na slici 4.10. prikazan je ciklički voltamogram otopine L-histidina koncentracije, $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ koja je priređena u puferu pH = 10. Voltamogram je snimljen na elektrodi od staklastog ugljika pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} . Odrađena su dva mjerenja, a svako mjerenje imalo je tri uzastopne ciklizacije. Na slici je grafički prikaz drugog mjerenja. Ciklički voltamogram L-histidina ne sadrži oksidacijske i redukcijske strujne vrhove čime se zaključuje da L-histidin nije elektroaktivan u puferu pH = 10.



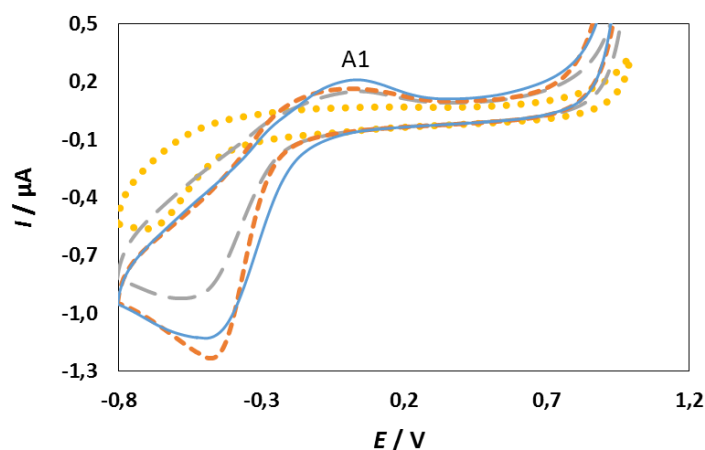
Slika 4.10. Ciklički voltamogram L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-histidina (—).

Slika 4.11. prikazuje ciklički voltamogram otopine L-histidina i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 priređenu u puferu pH = 10. Na voltamogramu je vidljiv jedan oksidacijski strujni vrh na potencijalu $E_{pA1} = 0,03 \text{ V}$. Taj strujni vrh označen je oznakom A1, a posljedica je kompleksacije Cu^{2+} i L-histidina, odnosno oksidacije metalnog centra kompleksa.



Slika 4.11. Ciklički voltamogram kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (—).

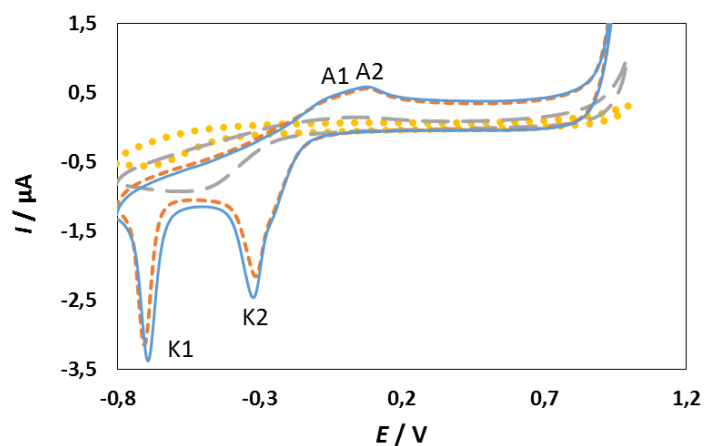
Na slici 4.12. prikazani su ciklički voltamogrami kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u omjerima 1:1, 2:1 i 4:1 snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika. Na voltamogramu se jasno vide anodni strujni vrhovi (A1) koji su posljedica oksidacije metalnog centra kompleksa. Također, vidljiv je i trend rasta anodnog strujnog vrha. Što je više L-histidina u otopini, to strujni vrh raste.



Slika 4.12. Ciklički voltamogram kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u omjerima 1:1, 2:1 i 4:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 2:1 (— — —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 4:1 (—).

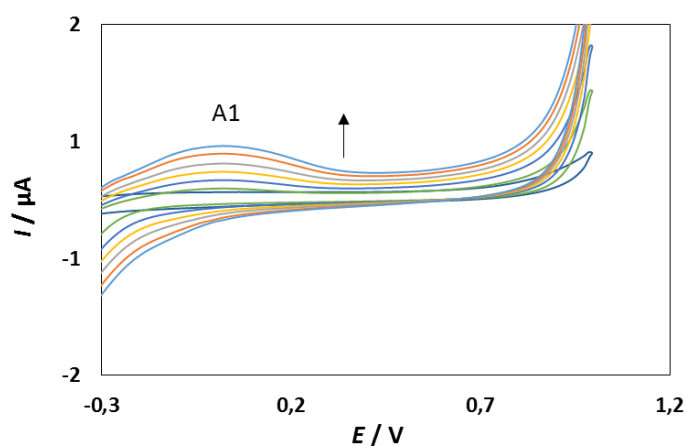
Na slici 4.13. prikazani su ciklički voltamogrami kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) priređeni u puferu pH = 10 u omjerima 1:1, 1:2 i 1:4. Dodavanjem otopine bakrovog nitrata u suvišku, dolazi do pojave anodnih i katodnih strujnih vrhova karakterističnih za ciklički voltamogram bakra. Oksidacijski strujni vrhovi su nešto malo slabije vidljiviji. Potencijal prvog anodnog strujnog vrha (E_{pA1}) iznosi 0,04 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Potencijal drugog anodnog strujnog vrha (E_{pA2}) iznosi 0,08 V u odnosu na referentnu elektrodu. Redukcijski strujni vrhovi otopine L-histidina i bakrovog nitrata omjera 1:2 i 1:4 nalaze se na potencijalima $E_{pK1} = -0,70$ V za omjer 1:2 i $E_{pK1} = -0,69$ V za omjer 1:4 (K1) i $E_{pK2} = -0,31$ V za omjer 1:2 i $E_{pK2} = -0,32$ V za omjer 1:4 (K2). U omjeru 1:1 nastaje kompleks i nema anodnih i katodnih strujnih vrhova karakterističnih za bakar.

Dodavanjem veće koncentracije bakra, dolazi do pojave suviška bakra u otopini što se očituje cikličkim voltamogramima omjera 1:2 i 1:4. Nema slobodnog L-histidina koji bi vezao bakar.



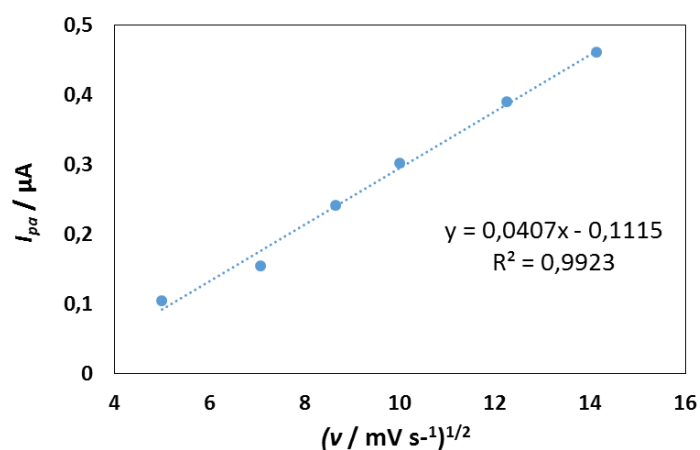
Slika 4.13. Ciklički voltamogram kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjerima 1:1, 1:2 i 1:4 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:2 (— — —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:4 (— — —).

Slika 4.14. prikazuje voltamogram kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 pri različitim brzinama polarizacije elektrode. Koristile su se brzine polarizacije od 50 mV s^{-1} do 300 mV s^{-1} . Iz slike je vidljiv trend rasta anodnog strujnog vrha koji je označen strelicom. Povećanjem brzine polarizacije elektrode, dolazi do povećanja anodnog strujnog vrha.



Slika 4.14. Ciklički voltamogram kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri različitim brzinama polarizacije elektrode; pufer pH = 10 (—), 50 mV s^{-1} (—), 100 mV s^{-1} (—), 150 mV s^{-1} (—), 200 mV s^{-1} (—), 250 mV s^{-1} (—), 300 mV s^{-1} (—).

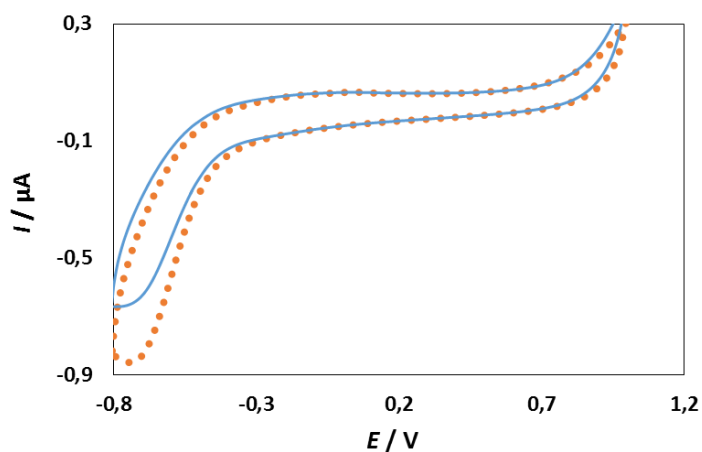
Ciklički voltamogrami kompleksa L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 pokazuju jedan oksidacijski vrh ($E_{pA1} = 0,03 \text{ V}$) koji se odnosi na oksidaciju metalnog centra kompleksa. Na elektrodi se odvija oksidacijski proces koji je kontroliran difuzijom jer je struja anodnog pika linearno ovisna o drugom korijenu promjene brzine potencijala (slika 4.15.).



Slika 4.15. Ovisnost vrijednosti struje anodnog strujnog vrha, I_{pa} , o drugom korijenu brzine promjene potencijala, $v^{1/2}$, za elektrodu od staklastog ugljika u puferskoj otopini pH = 10 za kompleks L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1.

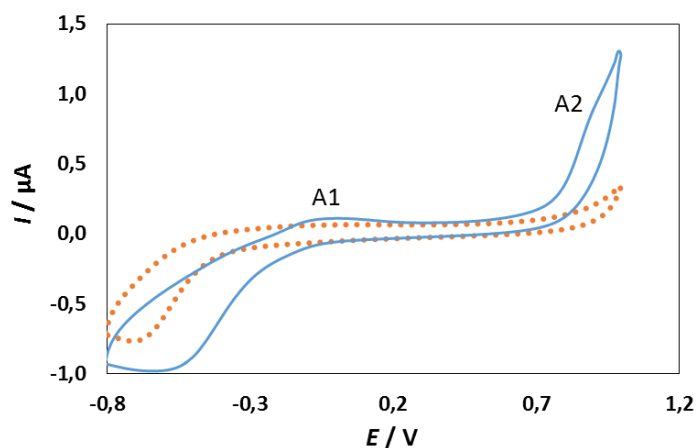
4.2.1.3. L-karnozin

Na slici 4.16. prikazan je ciklički voltamogram otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) koja je priređena u puferu pH = 10. Voltamogram je snimljen na elektrodi od staklastog ugljika pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} . Ciklički voltamogram otopine L-karnozina pokazuje da dipeptid nije elektroaktivan jer nema oksidacijskih ni redukcijskih strujnih vrhova.



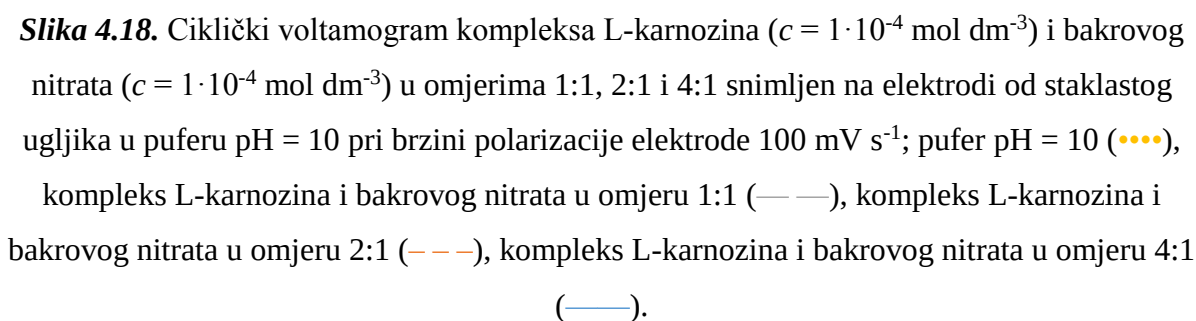
Slika 4.16. Ciklički voltamogram L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-karnozina (—).

Slika 4.17. prikazuje ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) omjera 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} . Na voltamogramu su vidljiva dva anodna strujna vrha. Prvi strujni vrh (A1) posljedica je oksidacije metalnog centra u kompleksu. Drugi strujni vrh (A2) pojavio se zbog oksidacije imidazolnog prstena karnozina. Oksidacijski strujni vrhovi nalaze se na potencijalima $E_{pA1} = -0,015 \text{ V}$ (A1) i $E_{pA2} = 0,86 \text{ V}$ (A2) u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. L-karnozin tvori kompleks s Cu^{2+} u puferu pH = 10 u omjeru 1:1.

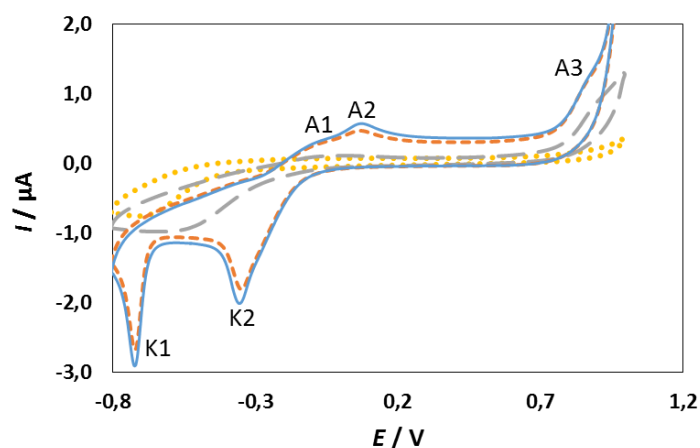


Slika 4.17. Ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (—).

Slika 4.18. Ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjerima 1:1, 2:1 i 4:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika. Na voltamogramu se jasno vide anodni strujni vrhovi A1 i A2 koji su posljedica oksidacije metalnog centra kompleksa, odnosno oksidacija imidazolnog prstena. Dodavanjem L-karnozina u suvišku ne dolazi do značajnih promjena. Visine anodnih strujnih vrhova su podjednake.

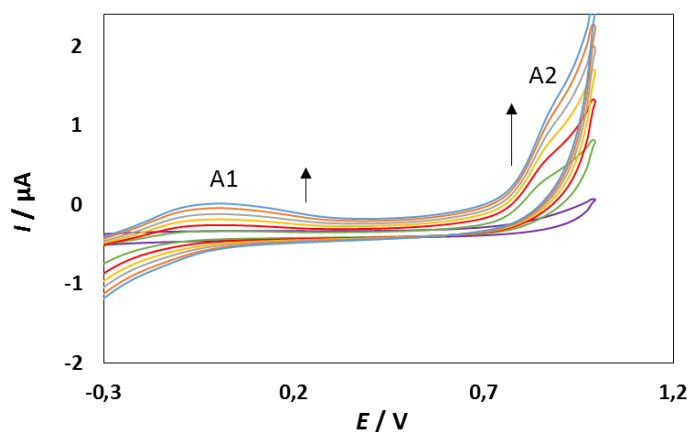


60



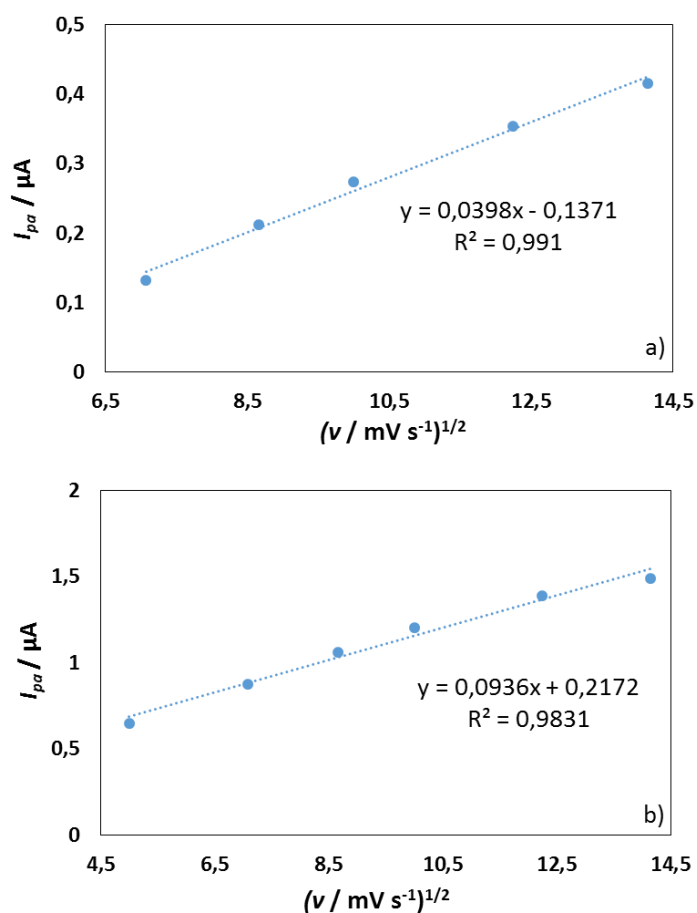
Slika 4.19. Ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjerima 1:1, 1:2 i 1:4 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 100 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 2:1 (— — —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 4:1 (—).

Slika 4.20. prikazuje voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 pri različitim brzinama polarizacije elektrode koje su išle od 50 mV s^{-1} do 300 mV s^{-1} . Pratio se trend oba anodna strujna vrha. Povećanjem brzine polarizacije elektrode, dolazi do povećanja anodnih strujnih vrhova.



Slika 4.20. Ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri različitim brzinama polarizacije elektrode; pufer pH = 10 (—), 50 mV s^{-1} (—), 100 mV s^{-1} (—), 150 mV s^{-1} (—), 200 mV s^{-1} (—), 250 mV s^{-1} (—), 300 mV s^{-1} (—).

Ciklički voltamogram kompleksa L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 pokazuje dva oksidacijska strujna vrha ($E_{pA1} = -0,015 \text{ V}$ i $E_{pA2} = 0,86 \text{ V}$). Prvi oksidacijski strujni vrh odnosi se na metalni centar kompleksa, a drugi na imidazolni prsten dipeptida. Na elektrodi se odvija oksidacijski proces koji je kontroliran difuzijom, jer je struja anodnih strujnih vrhova linearno ovisna o drugom korijenu promjene brzine potencijala (*slika 4.21.*).



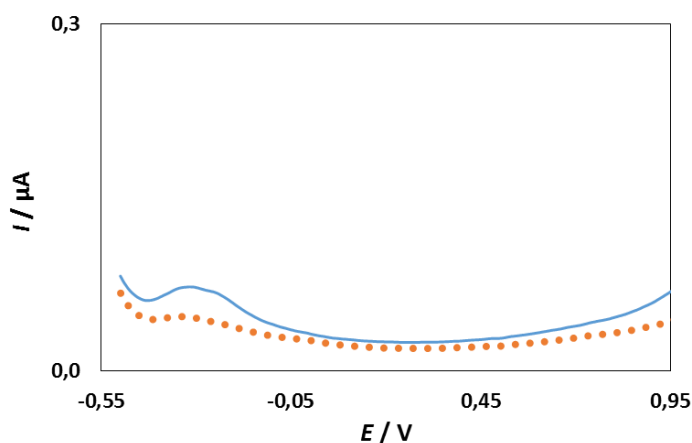
Slika 4.21. Ovisnost vrijednosti struje anodnog strujnog vrha, I_{pa} , o drugom korijenu brzine promjene potencijala, $v^{1/2}$, za elektrodu od staklastog ugljika u puferskoj otopini pH = 10 za kompleks L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1; anodni strujni vrh A1 (a), anodni strujni vrh A2 (b).

4.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Osim cikličke voltametrije, za ispitivanje elektrokemijskih svojstava β -alanina, L-histidina, L-karnozina i njihovih kompleksa s Cu^{2+} ionom koristila se diferencijalna pulsna voltametrija. Ova metoda je osjetljivija i pomoću nje se može pratiti adsorpcija oksidiranog produkta na radnu elektrodu.

4.2.2.1. β -alanin

Na slici 4.22. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} . Na voltamogramu nema strujnih vrhova. Porast struje koji se pojavljuje na potencijalu od -0,29 V, pojavljuje se i u puferu pH = 10.



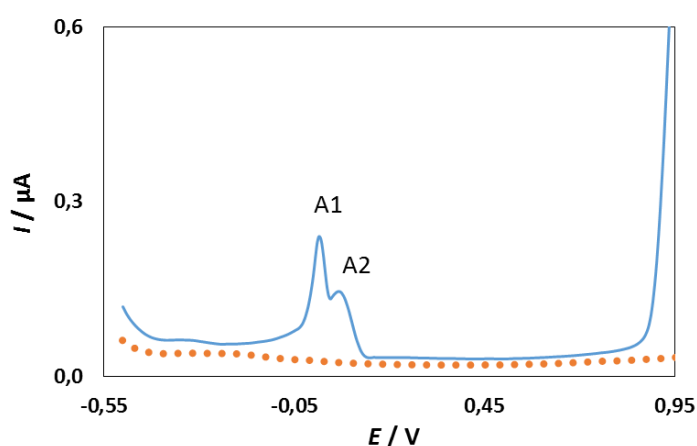
Slika 4.22. Diferencijalni pulsni voltamogram β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina β -alanina (—).

Slika 4.23. prikazuje diferencijalni pulsni voltamogram bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10. Na voltamogramu su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha koji su posljedica oksidacije bakra:

Oksidacija 1 (A1): $\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^+ + \text{e}^-$

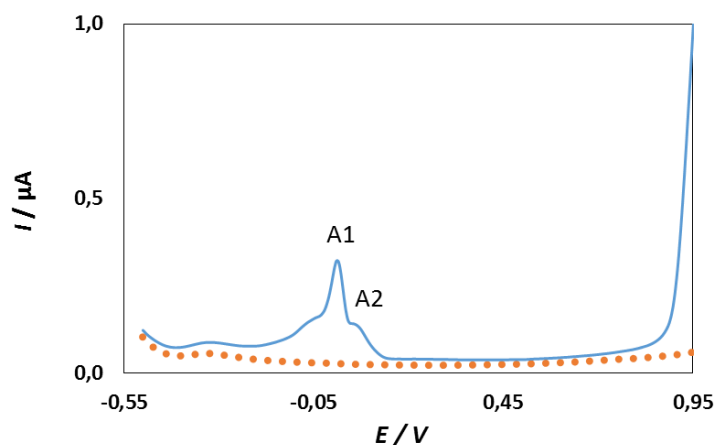
Oksidacija 2 (A2): $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{e}^-$

Potencijal prvog oksidacijskog strujnog vrha (A1) iznosi $E_{\text{pA1}} = 0,025 \text{ V}$, a potencijal drugog strujnog vrha (A2) iznosi $E_{\text{pA2}} = 0,075 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Visina oba oksidacijska strujna vrha raste ponovljenim snimanjem, čime se zaključuje da ne dolazi do adsorpcije oksidacijski produkata bakra na površinu radne elektrode.



Slika 4.23. Diferencijalni pulsni voltamogram bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina bakrovog nitrata (—).

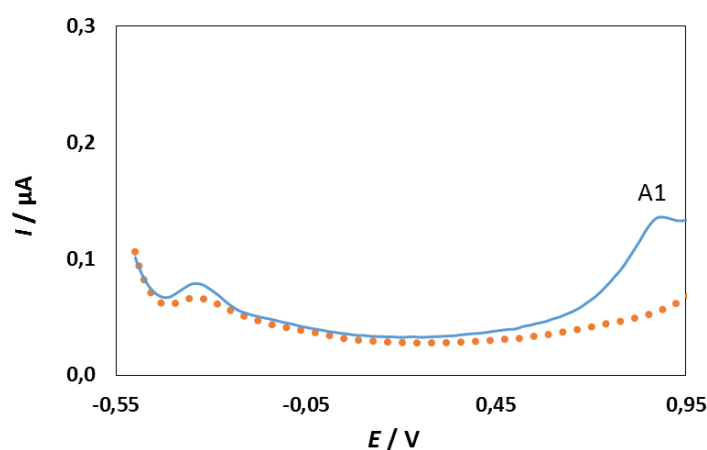
Na slici 4.24. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram kojim se ispitivao nastanak kompleksa između otopine β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1. Brzina polarizacije elektrode iznosila je 5 mV s^{-1} . Na voltamogramu su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha na potencijalu $E_{\text{pA1}} = 0,02 \text{ V}$ (A1) i $E_{\text{pA2}} = 0,07 \text{ V}$ (A2) u odnosu na Ag/AgCl. Iz iznosa potencijala na kojima se javljaju strujni vrhovi, jasno je da ne dolazi do stvaranja kompleksa između β -alanina i slobodnog Cu^{2+} iona ako ih se usporedi s potencijalima otopine bakrova nitrata.



Slika 4.24. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine β -alanina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina β -alanina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (—).

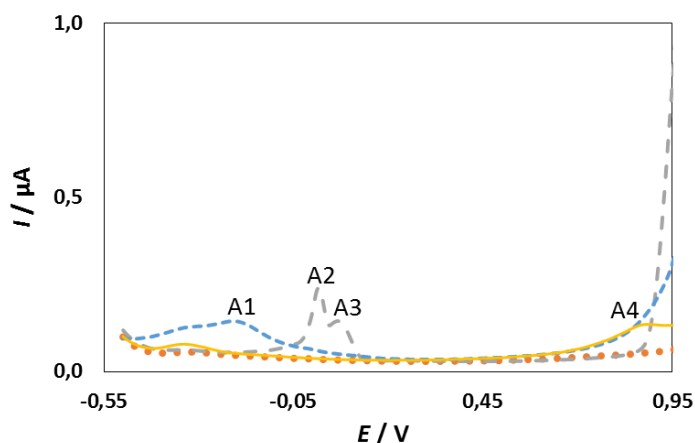
4.2.2.2. L-histidin

Na slici 4.25. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} . Na voltamogramu je vidljiv strujni vrh koji je označen s A1. Taj strujni vrh javlja se na potencijalu $E_{pA1} = 0,87 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Porast struje koji se pojavljuje na potencijalu od $-0,29 \text{ V}$, pojavljuje se i u puferu pH = 10. Iako su rezultati cikličke voltametrije pokazali da aminokisleina L-histidin nije elektroaktivna, diferencijalno pulsni voltamogram govori suprotno. A1 strujni vrh posljedica je oksidacije imidazolnog prstena. Ponavljanjem mjerenja nije došlo do adsorpcije oksidiranog produkta na površinu elektrode.



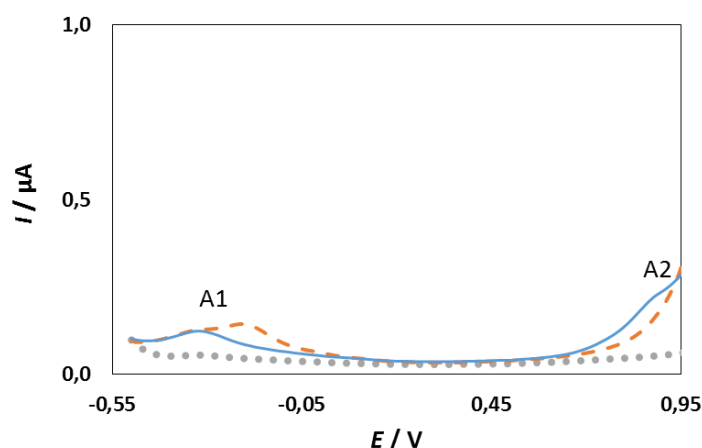
Slika 4.25. Diferencijalni pulsni voltamogram L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-histidina (—).

Slika 4.26. prikazuje diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1. Žutom punom linijom označen je voltamogram otopine L-histidina s njegovim pripadajućim strujnim vrhom (A4) na $E_{pA4} = 0.87 \text{ V}$ u odnosu na referentnu elektrodu. Sivom iscrtkanom krivuljom označen je voltamogram otopine bakrovog nitrata koji sadrži dva oksidacijska strujna vrha, A2 i A3. A2 se nalazi na potencijalu $E_{pA2} = 0,02 \text{ V}$, a A3 na potencijalu $E_{pA3} = 0,075 \text{ V}$. Plavom iscrtkanom krivuljom označen je voltamogram otopine L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1. Na voltamogramu se pojavljuje oksidacijski strujni vrh kojeg nema na voltamogramu otopine L-histidina, ali ni na voltamogramu otopine bakrovog nitrata. Taj strujni vrh označen s A1 pojavljuje se zbog oksidacije metalnog centra u kompleksu i nalazi se na potencijalu $E_{pA1} = -0,2 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl. Na diferencijalno pulsnom voltamogramu kompleksa gubi se oksidacijski strujni vrh karakterističan za imidazolni prsten koji je vidljiv na voltamogramu otopine L-histidina.



Slika 4.26. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-histidina (—), otopina bakrovog nitrata (— —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— — —).

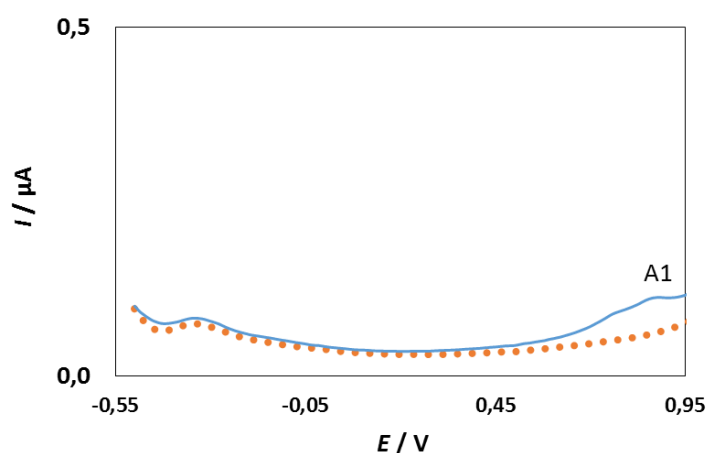
Na slici 4.27. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 i 2:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} . Za razliku od diferencijalno pulsnog voltamograma kompleksa L-histidina i Cu^{2+} omjera 1:1, na voltamogramu omjera 2:1 pojavljuje se i strujni vrh karakterističan za imidazolni prsten. On se pojavljuje na potencijalu $E_{\text{pA2}} = 0,87 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Također se strujni vrh A1 voltamograma omjera 2:1 negativira, odnosno pomiče u lijevo na potencijal od $-0,31 \text{ V}$.



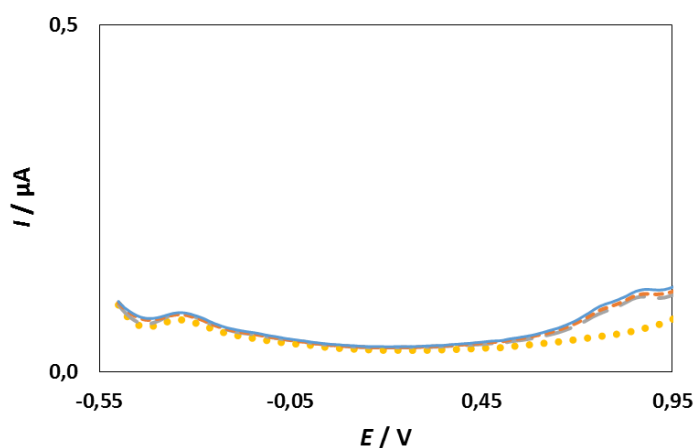
Slika 4.27. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-histidina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 i 2:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— — —), kompleks L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 2:1 (— — —).

4.2.2.3. L-karnozin

Cilj diferencijalne pulsne voltametrije bio je dokazati nastajanje kompleksa L-karnozina i Cu^{2+} iona te ispitati adsorpciju produkta oksidacije na površinu radne elektrode od staklastog ugljika. Slika 4.28. prikazuje diferencijalni pulsni voltamogram L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} . Na voltamogramu se javlja strujni vrh A1 na potencijalu $E_{pA1} = 0,85 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Pojava strujnog vrha A1 posljedica je oksidacije imidazolnog prstena histidina u dipeptidu. Adsorpcija oksidiranog oblika L-karnozina ispitana je uzastopnim snimanjem voltamograma. Odrađena su 3 mjerenja, a rezultati su prikazani na slici 4.29. Na diferencijalnom pulsnom voltamogramu može se vidjeti da jakost struje blago raste za svako sljedeće mjerenje. Time je pokazano da ne dolazi do adsorpcije oksidacijskog produkta na površinu radne elektrode.



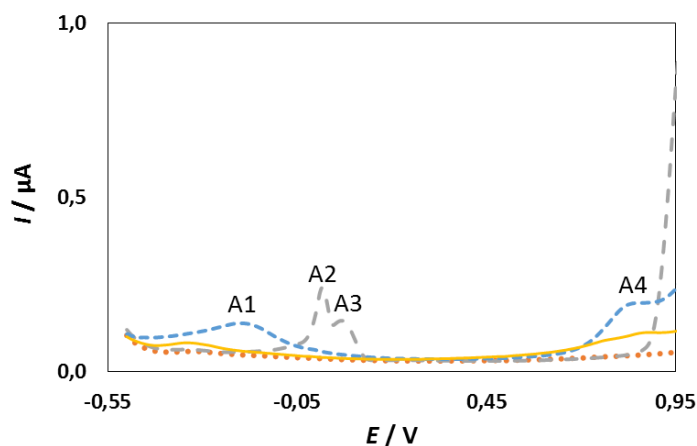
Slika 4.28. Diferencijalni pulsni voltamogram L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-karnozina (—).



Slika 4.29. Diferencijalni pulsni voltamogram L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina L-karnozina: 1. scan (—•—), 2. scan (—•—), 3. scan (—).

Slika 4.30. prikazuje diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1. Žutom punom linijom označen je voltamogram otopine L-karnozina s njegovim pripadajućim strujnim vrhom (A4) na $E_{pA4} = 0,85 \text{ V}$ u odnosu na referentnu elektrodu. Sivom

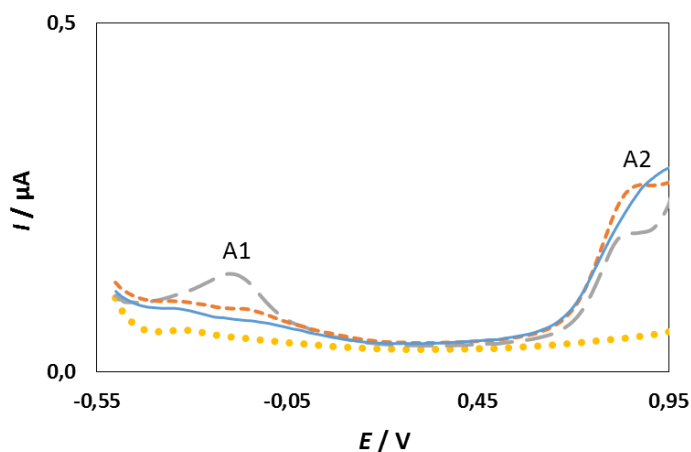
iscrtnanom krivuljom označen je voltamogram otopine bakrovog nitrata koji sadrži dva oksidacijska strujna vrha, A2 i A3. A2 se nalazi na potencijalu $E_{pA2} = 0,025 \text{ V}$, a A3 na potencijalu $E_{pA3} = 0,08 \text{ V}$. Plavom iscrtnanom krivuljom označen je voltamogram otopine L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1. Na voltamogramu se pojavljuje oksidacijski strujni vrh kojeg nema na voltamogramu otopine L-karnozina, ali ni na voltamogramu otopine bakrovog nitrata. Taj strujni vrh označen s A1 pojavljuje se zbog oksidacije metalnog centra u kompleksu i nalazi se na potencijalu $E_{pA1} = -0,18 \text{ V}$ u odnosu na Ag/AgCl elektrodu. Za razliku od kompleksa s L-histidinom, kompleks L-karnozina s bakrom ima oksidacijski strujni vrh karakterističan za imidazolni prsten koji se nalazi na potencijalu $E_{pA4} = 0,82 \text{ V}$. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom također je potvrđeno da nastaje kompleks između L-karnozina i Cu^{2+} iona u puferu $\text{pH} = 10$.



Slika 4.30. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu $\text{pH} = 10$ pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer $\text{pH} = 10$ (••••), otopina L-karnozina (—), otopina bakrovog nitrata (— —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— — —).

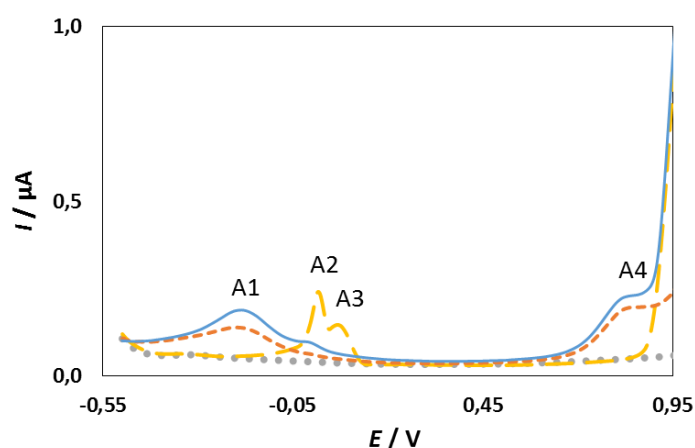
Na slici 4.31. prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1, 2:1 i 4:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu $\text{pH} = 10$. Za razliku od diferencijalno pulsni voltamograma kompleksa L-karnozina i Cu^{2+} omjera 1:1 (siva iscrtkana krivulja), na voltamogramu omjera 2:1 i 4:1 (narančasta i plava krivulja) smanjuje se strujni vrh (A1)

karakterističan za oksidaciju metalnog centra kompleksa. Dok se prvi strujni vrh smanjuje, drugi strujni vrh (A2) raste povećanjem koncentracije karnozina.



Slika 4.31. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1, 2:1 i 4:1 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 2:1 (— — —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 4:1 (—).

Na slici 4.32. nalazi se diferencijalni pulsni voltamogram otopine bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) te otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 i 1:2. Diferencijalno pulsni voltamogram otopine bakrovog nitrata pokazuje dva oksidacijska strujna vrha (A2 i A3). Ako se priredi otopina L-karnozina i bakrovog nitrata jednakih omjera, nema strujnih vrhova A2 i A3, već se javljaju strujni vrhovi A1 i A4. Ako se priredi otopina omjera 1:2 za Cu^{2+} , pojavljuje se naznaka strujnog vrha A2, ali svakako se može zaključiti da je jedan dipeptid karnozina sposoban vezati dva Cu^{2+} iona.

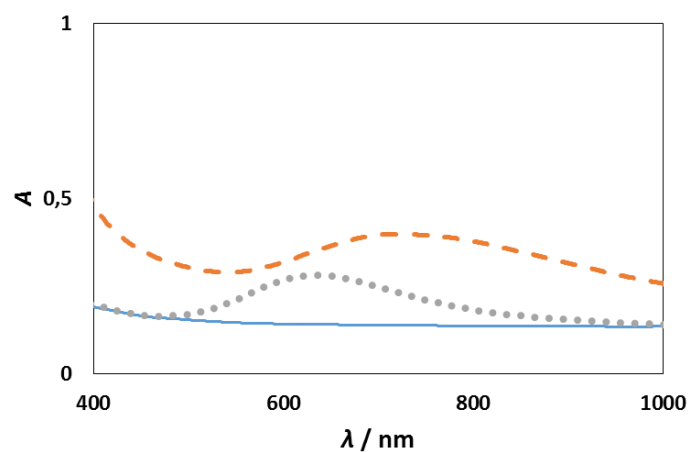


Slika 4.32. Diferencijalni pulsni voltamogram otopine bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i otopine L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i bakrovog nitrata ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 i 1:2 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 10 pri brzini polarizacije elektrode 5 mV s^{-1} ; pufer pH = 10 (••••), otopina bakrovog nitrata (— — —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (— — —), kompleks L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:2 (— — —).

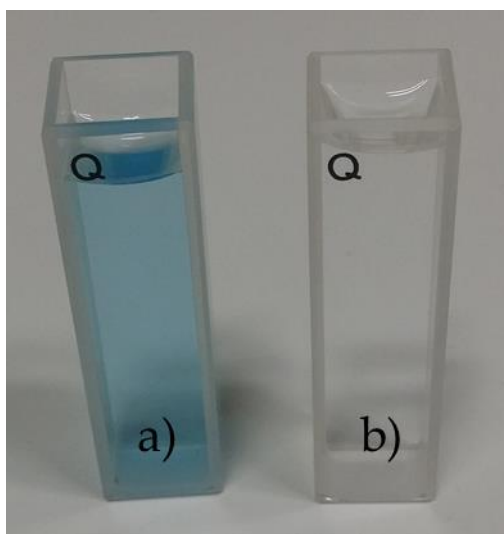
4.3. UV/VIS mjerenja

UV/VIS mjerenja služe za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ovom metodom htjelo se potvrditi nastajanje kompleksa, ali i pokazati da nastaju različiti kompleksi.

Slika 4.33. uspoređuje spektar otopine L-histidina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1. Spektar L-histidina nema pik u vidljivom području. Spektar bakrovog nitrata ima pik čiji se maksimum apsorbancije postiže na valnoj duljini $\lambda = 723 \text{ nm}$. Spektar kompleksa L-histidina i Cu^{2+} također ima pik s najvećom apsorbancijom na $\lambda = 632 \text{ nm}$. Na *slici 4.34.* prikazane su otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 i otopina L-histidina koje se nalaze u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 .



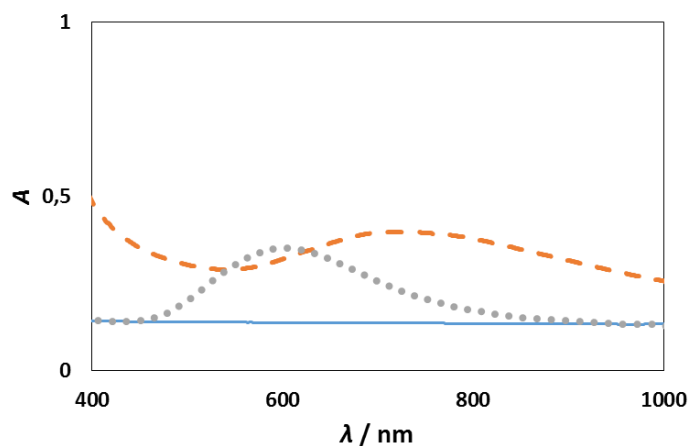
Slika 4.33. Apsorpcijske krivulje L-histidina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10, bakrovog nitrata ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 i kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1; otopina L-histidina (—), otopina bakrovog nitrata (---), otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (....).



Slika 4.34. Otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (a), otopina L-histidina (b).

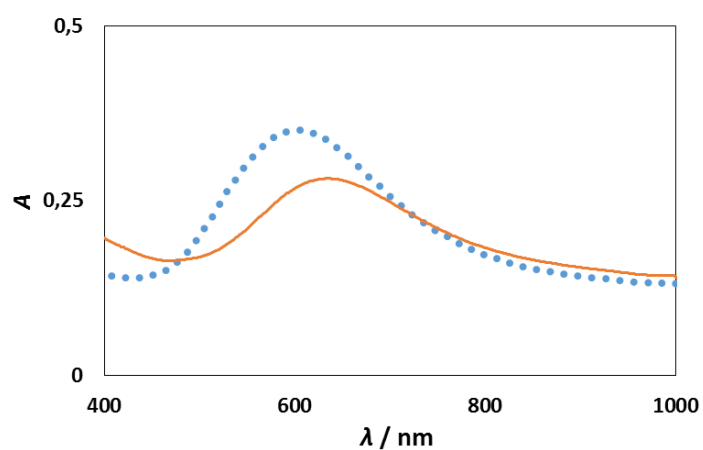
Na slici 4.35. prikazan je spektar L-karnozina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), bakrovog nitrata ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 u puferu pH =

10. Otopina L- karnozina ima spektar u UV području na 266 nm [38]. Otopina kompleksa L- karnozina i bakrovog nitrata omjera 1:1 ima maksimum apsorbancije na 603 nm.

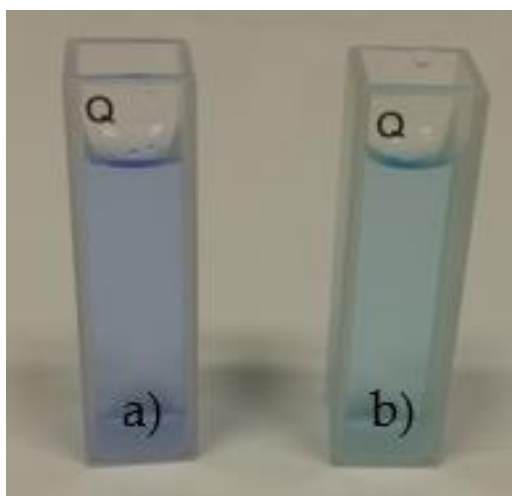


Slika 4.35. Apsorpcijske krivulje L-karnozina ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10, bakrovog nitrata ($c = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu pH = 10 i kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1; otopina L-karnozina (—), otopina bakrovog nitrata (---), otopina kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (....).

Na slici 4.35. uspoređeni su spektar otopine kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata omjera 1:1 te otopine kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata omjera 1:1. Kompleks s histidinom ima maksimum apsorbancije na $\lambda = 632 \text{ nm}$, a kompleks s karnozinom na $\lambda = 603 \text{ nm}$. Osim instrumentalnom detekcijom, lako se mogu i vizualno uočiti razlike nastalih kompleksa. Slika 4.36. prikazuje kvarcne kivete u kojima se nalaze uzorci za UV/VIS mjerenje. Otopine kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata omjera 1:1 tamnija je od otopine kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata omjeru 1:1.



Slika 4.35. Apsorpcijske krivulje L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 te L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1; otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (—), otopina kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (....).



Slika 4.36. Otopina kompleksa L-karnozina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (a); otopina kompleksa L-histidina i bakrovog nitrata u omjeru 1:1 (b).

5. ZAKLJUČAK

Aminokiseline β -alanin i L-histidin te dipeptid L-karnozin spojevi su od velike važnosti u ljudskom organizmu. L-karnozin između ostalog sudjeluje i u keliranju Cu^{2+} iona. Pomoću elektrokemijskih i UV/VIS mjerenja ispitano je stvaranje kompleksa β -alanina, L-histidina i L-karnozina s bakrom u puferu $\text{pH} = 10$.

Potenciometrijske titracije pokazale su nastajanje kompleksa L-histidina i L-karnozina s bakrom u puferu $\text{pH} = 10$. Prema utrošenom volumenu titranta, nastaju kompleksi u omjeru 1:1.

Prema rezultatima dobivenim cikličkom voltametrijom, β -alanin, L-histidin i L-karnozin nisu elektroaktivne vrste. U puferu $\text{pH} = 10$ nastaju kompleksi L-histidina i L-karnozina s Cu^{2+} ionom u omjeru 1:1.

Diferencijalna pulsna voltometrija je osjetljivija metoda kojom se ustanovilo da su L-histidin i L-karnozin elektroaktivni. Također se potvrdilo da nastaju kompleksi L-histidina i L-karnozina s bakrom u omjeru 1:1 u puferu $\text{pH} = 10$.

UV/VIS mjerenja su također potvrdila nastajanje različitih kompleksa L-histidina i L-karnozina s bakrom.

L-karnozin, kao i L-histidin, kompleksiraju s Cu^{2+} ionom preko imidazolnog prstena, dok β -alanin ne stvara komplekse s bakrom pri $\text{pH} = 10$.

6. POPIS LITERATURE

- [1] J. M. Berg, J. T. Tymoczko, L. Strayer, *Biochemistry*, Fifth Edition, W. H. Freeman, 2002.
- [2] W. Derave, I. Everaert, S. Beeckam, A. Baguet, *Sports Medicine* 40 (2010) 247-263
- [3] A. Abbaspour, M. A. Kamyabi, *Analytica chemica Acta* 512 (2004) 257-269
- [4] J. Bai, Nannan-Yu, H. Mu, L. Dong, X. Zhang, *Jurnal of Cellular Biochemistry* (2017)
- [5] P. Deschamps, P. P. Kulkarni, M. Gautam-Basak, B. Sarkar, *Coordination Chemistry Reviews* 249 (2005) 895 – 909
- [6] <http://www.rsc.org/periodic-table/element/29/copper> (29.10.2017.)
- [7] M. M. Antonijevic, S. C. Alagic, M. B. Petrovic, M. B. Radovanovic, A. T. Stamenkovic, *International Journal of Electrochemical Science* 4 (2009) 516-524
- [8] M. Lee Branham, P. Singh, K. Bisetty, M. Sabela and T. Govender, *Molecules* 16 (2011) 10269-10291
- [9] I. Chevalot, E. Arab-Tehrany, E. Husson and C. Gerardin, *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments and Antioxidants*, First Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.
- [10] G. R. Lenz, A. E. Martell, *Biochemistry*, 3 (1964) 750-753
- [11] V. P. Skulachev, *Biochemistry Moscow* 65 (7) (2000) 749-750
- [12] EFSA Journal 9 (4) (2011) 2038
- [13] A. A. Boldyrev, G. Aldini and W. Derave, *Physical Review* 93 (2013), 1803-1845
- [14] E. J. Baran, *Biochemistry (Moscow)* 65 (2000) 789-797
- [15] D. Mizuno, M. Kawahara, *Journal of Vascular Medicine & Surgery*, 2 (2014)
- [16] L. L. S. Canabady-Rochelle, C. Harscoat-Schiavo, V. Kessler, A. Aymes, F. Fournier, J. M. Girardet, *Food Chemistry* (2015)
- [17] Y. Tsuruta, K. Maruyama, H. Inoue, K. Kosha, Y. Date, N. Okamura, S. Eto, E. Kojima, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 327-332

- [18] M. Jozanović, M. Medvidović-Kosanović, M. Sak-Bosnar, *International Journal of Electrochemical Science*, 10 (2015) 6548-6557
- [19] Y. Huang, J. Duan, H. Chen, M. Chen, G. Chen, *Electrophoresis*, 26 (2005) 593-599
- [20] S. Zhao, Y. Huang, M. Shi, J. Huang, Y.-M. Liu, *Analytical Biochemistry*, 393 (2009) 105-110
- [21] M. Mati, L. Staruch, M. Šoral, *Chemical Papers*, 69 (2015) 1319-1324
- [22] A. Torreggiani, S. Bonora, G. Fini, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 57 (2000) 352-364
- [23] M. Jozanović, N. Sakač, D. Jakobović, M. Sak-Bosnar, *International Journal of Electrochemical Science*, 10 (2015) 5787-5799
- [24] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Second Edition, John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [25] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [26] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Zagreb, 2010.
- [27] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw-Hill Companies, USA, 1976.
- [28] M Bralić, E. Generalić, *Potenciometrijski senzori*, Periodni sustav elemenata, KTF Split; web: https://www.periodni.com/enig/potenciometrijski_senzori.html (1.11.2017.)
- [29] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, prvo izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [30] M. Medvidović-Kosanović, *Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola*, Doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 2011.
- [31] <https://www.thinglink.com/scene/368761992913092608> (1.11.2017.)
- [32] N. Bhattatai, S. Khanal, P. R. Pudasaini, S. Pahl, D. Romero-Urbina, *International Journal of Nanotechnology and Molecular Computation*, 3 (2011) 15-28
- [33] <https://www.metrohm.com/en/products/%7B3559288E-3CE8-4070-B6FB-D7A9AE22BB63%7D> (3.11.2017.)

- [34] <https://www.metrohm.com/en/products/%7B6330FC85-E253-429C-81A3-3BC9F64B5746%7D> (3.11.2017.)
- [35] <https://www.als-japan.com/1406.html> (3.11.2017.)
- [36] <https://www.als-japan.com/1388.html> (3.11.2017.)
- [37] http://www.electrochemistry.co.kr/mall1/m_mall_detail.php?ps_goid=258 (3.11.2017.)
- [38] M. Khosravi, R. Rahimi, E. Safavi, Synthesis of L-carnosine and its Application in Biomedical Fields, 2014.