Karakterizacija kafeina u uzorcima dodatka prehrani primjenom pravokutnovalne voltametrije

Bilandžija, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:223166

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Tena Bilandžija

KARAKTERIZACIJA KAFEINA U UZORCIMA DODATKA PREHRANI PRIMJENOM PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Fizikalna kemija
Tema rada: je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 20. srpnja 2020.
Mentor: dr. sc. *Ivana Tomac, znan. sur.*

Karakterizacija kafeina u uzorcima dodatka prehrani primjenom pravokutnovalne voltametrije

Tena Bilandžija, 0113141265

Sažetak: Kafein je alkaloid iz skupine ksantina. Bijeli je kristalni prah, gorkog okusa i bez mirisa. Pravokutnovalna voltametrija je elektroanalitički postupak kod kojeg se mjerenje provodi u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji koja se sastoji od radne, pomoćne i referentne elektrode. Pravokutnovalna voltametrija je brza i jednostavna metoda, a može se primijeniti za istraživanje elektrokemijske oksidacije odnosno redukcije te za kvalitativnu i kvantitativnu analizu u različitim sustavima. Odziv na signal pobude (struja), mjeri se na kraju oksidacijskog odnosno redukcijskog strujnog odziva. Struja se mjeri dvaput tijekom svakog ciklusa. Stoga je zadatak ovog diplomskog rada razviti elektroanalitički postupak pravokutnovalne voltametrije, ispitati elektrokemijsko ponašanje otopine kafeina pri različitim pH vrijednostima inertnog pufera, promjeni koncentracije otopine kafeina, promjeni frekvencije pobudnog signala i utjecaja višestruke uzastopne polarizacije te primijeniti na identifikaciju i kvantifikaciju dodatka prehrani.

Ključne riječi: kafein, dodatak prehrani, pravokutnovalna voltametrija

Rad sadrži: 33 stranice
22 slike
1 tablicu
35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1.	izv. prof. dr. sc. Maja Molnar	predsjednik
2.	dr. sc. Ivana Tomac, znan. sur.	član-mentor
3.	prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron	član
4.	doc. dr. sc. Antun Jozinović	zamjena člana

Datum obrane: 29. rujan 2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Physical Chemistry
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 9 held on July 20, 2020
Mentor: *Ivana Tomac*, PhD

Characterization of Caffeine from Dietary Supplement Sample Using Square-Wave Voltammetry

Tena Bilandžija, 0113141265

Summary: Caffeine is an alkaloid from the xanthine group. It is a white crystalline powder, bitter in taste and odourless. Square-wave voltammetry is an electroanalytical technique where the measurement is performed in a three-electrode electrochemical cell consisting of a working, auxiliary and reference electrode. Square-wave voltammetry is a quick and simple method, and can be applied to the study of electrochemical oxidation or reduction and for qualitative and quantitative analysis in various systems. The response to the excitation signal (current) is measured at the end of the oxidation or reduction current response. Current is measured twice during each cycle. Therefore, the aim of this work is to develop an electroanalytical procedure of square-wave voltammetry, examine the electrochemical behaviour of caffeine solution at different pH values of inert buffer, change of caffeine solution concentration, change of the frequency of the excitation signal and the influence of multiple consecutive polarization and to apply on the identification and quantification of dietary supplement.

Key words: caffeine, dietary supplement, square-wave voltammetry

Thesis contains: 33 pages
22 figures
1 table
35 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Maja Molnar, PhD, associate prof. — chair person
2. Ivana Tomac, PhD — supervisor
3. Lidija Jakobek Barron, PhD, prof. — member
4. Antun Jozinović, PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: September 29, 2020

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

Posebno hvala mojim roditeljima Zrinki i Marku, bratu Tomislavu koji su me podržavali i usmjeravali ka ostvarenju ciljeva i bez čije potpore i ljubavi ne bih bila tu gdje jesam.
Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr. sc. Ivani Tomac, na strpljenju, prenesenom znanju i vještinama. Bez nje cijelo ovo akademsko iskustvo ne bi bilo isto i na čijoj sam nesebičnoj pomoći neizmjerno zahvalna.
Hvala svim mojim prijateljima što su vjerovali u mene i uljepšali mi ove godine studiranja.
Također, hvala svim zaposlenicima Prehrambeno – tehnološkog fakulteta na pomoći i prenesenom znanju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Kafein i njegova fizikalna svojstva 4

2.2. Kemijska svojstva i struktura kafeina 4

2.3. Prirodni izvori kafeina 5

2.4. Metode određivanja kafeina 9

2.4.1. Elektroanalitičke ili elektrokemijske metode 9

2.4.2. Ostale metode 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO 12

3.1. Zadatak rada 13

3.2. Materijali i metode rada 13

3.2.1. Priprema uzorka 13

3.2.2. Priprema otopina 13

4. REZULTATI 15

5. RASPRAVA 22

5.1. Elektrokemijsko ponašanje standarda kafeina 23

5.2. Elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani 24

6. ZAKLJUČAK 27

7. LITERATURA 30

1. UVOD

Kafein je prirodni alkaloid. Osnova strukture molekule metilksantina je jezgra purina koja je heterociklički aromatski spoj, a prema broju i poziciji metilne grupe se dijele na kafein, teofilin, teobromin i paraksantin. Kafein je bijele boje i bez mirisa, a zastupljen je u velikom broju biljaka (listovima čaja, kakao zrna, guarani, kavi).

Konzumacija kafeina najvećim dijelom se odnosi na unos različitih napitaka, najčešće kave. Kafein je najpoznatiji ksantin koji utječe na mentalno zdravlje. Nakon unosa, kafein se relativno brzo apsorbira u gastrointestinalnom traktu te preko krvi dolazi do živčanog sustava (Preedy, 2012). Dodaci prehrani na bazi kafeina imaju široku primjenu zbog svog djelovanja. Najčešće ih koriste sportaši prije natjecanja u obliku tableta te rekreativci prije treninga u obliku energetskih napitaka. Dodaci prehrani u obliku tableta najčešće se konzumiraju periodično, u hitnim slučajevima. Na tržištu se mogu pronaći u različitim dozama (Weinberg i Bealer, 2002).

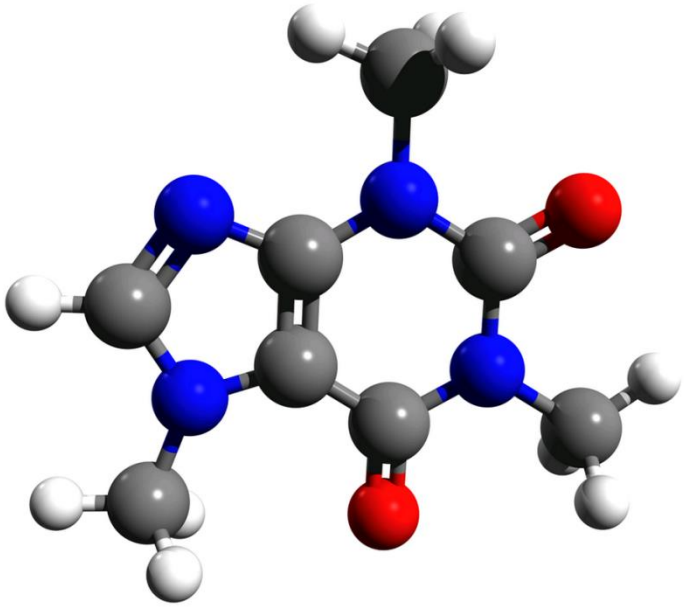
Do danas su razvijene mnoge metode analize kafeina, a najpoznatije su kromatografske (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.), spektrofotometrijske i elektrokemijske (voltametrija). Pravokutnovalna voltametrija je metoda kod koje se mjeri struja na kraju polaznog signala i na kraju signala suprotnog smjera. Ova tehnika je brza, osjetljiva i precizna.

Zadatak ovog diplomskog rada je bio razviti elektroanalitički postupak pravokutnovalne voltametrije, ispitati elektrokemijsko ponašanje otopine kafeina pri različitim pH vrijednostima inertnog pufera, promjeni koncentracije otopine kafeina, promjeni frekvencije pobudnog signala i utjecaja višestruke uzastopne polarizacije te primijeniti na identifikaciju i kvantifikaciju dodatka prehrani.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kafein i njegova fizikalna svojstva

Kafein je alkaloid (dušikov spoj) molekulske formule 1,3,7-trimetilksantin (Belitz i sur., 2009), čija je gustoća 1,23 g cm^{-3} i molekulska masa 194,194 g mol^{-1}. Pri sobnoj temperaturi je bijeli prah bez mirisa i malo gorkog okusa. Kafein sublimira pri 180° C. Topljiv je u kipućoj vodi, ali pri sobnoj temperaturi kloroform je jedan od najboljih otapala, a teško je topljiv u etanolu (Spiller, 1998). Vrelište je pri 178 °C, a talište 237 °C. Polimerizacija kafeina nije moguća (Preedy, 2012). Spektar ultraljubičastog zračenja kafeina iznosi 250-280 nm (Spiller, 1998), a maksimalnu apsorbanciju postiže pri 237 nm (Preedy, 2012).

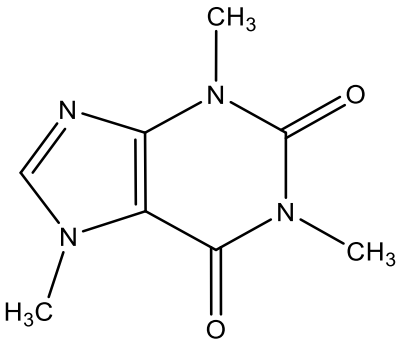


Slika 1 3D Struktura kafeina (WEB 1)

2.2. Kemijska svojstva i struktura kafeina

Kafein ($C_8H_{10}H_4O_2$) je organska molekula koja je sastavljena od ugljika (49,48 %), vodika (5,19 %), dušika (28,85 %) i kisika (16,48 %). Različiti sistematski nazivi se upotrebljavaju za kafein kao što su 1,3,7-trimetil-2,6-diokskipurin, 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purin-2,6-dion (IUPAC). Kafein potječe iz grupe purinskih alkaloida odnosno metilksantina. Temelj strukture molekule metilksantina je jezgra purina koja je heterociklički aromatski spoj, a prema broju i

poziciji metilne grupe se dijele na kafein, teofilin, teobromin i paraksantin. Analizirana su dva polimorfna oblika kafeina – alfa i beta. Alfa oblik, s obzirom na vlažnost i temperaturu prelazi u beta oblik. Prilikom kristalizacije kafeina iz vodenih otopina nastaju monohidrati, a monohidarati na sobnoj temperaturi kvantitativno prelaze u anhidride beta oblika (Preedy, 2012).



Slika 2 Kemijska struktura kafeina

2.3. Prirodni izvori kafeina

Prije dvije stotine godina, Nijemac Friedlieb Ferdinand Runge izolirao je kemijsku tvar iz zrna kave. Nedugo zatim, francuski znanstvenici također su dobili istu tvar, kafein. Njegovim otkrićem razjasnila su se mnoga, do tada, neobjašnjena ponašanja unutar populacije. Kasnije je kafein pronađen u mnogim biljkama i njihovim dijelovima od kojih su najrasprostranjeniji listovi čaja, kakao zrna, guarana, kava. Otkako se provode istraživanja, pokazuju da sve više ljudi uključuje kafein u svoj život kao prirodni stimulator u svojim aktivnostima (Burke i sur., 2013).

Kava je zimzeleni grm koji potječe iz Afrike te pripada porodici *Rubiaceae*. Uzgaja se u tropskim područjima gdje je godišnja prosječna temperatura 15-25 °C. Grm može narasti 3-12 m (Belitz i sur., 2009).



Slika 3 Grm kave (WEB 2)

Čaj je proizvod sušenog lišća biljke *Camellia sinensis* koja je porijeklom iz Kine i Indije. *Camelia sinensis* sadrži više kafeina od kave, ali tijekom pripreme se gubi trećina/četvrtina ukupnog kafeina. S obzirom na postupak proizvodnje, razlikujemo: bijeli, zeleni, oolong i crni čaj. Najviše kafeina sadrži crni čaj (Belitz i sur., 2009).



Slika 4 Biljka *Camellia sinensis* (WEB 3)

2.5. Dodaci prehrani

U dodatke prehrani ubrajaju se proizvodi koji nadopunjuju prehranu, a nisu zamjena za hranu. Potrošači su zainteresirani za njih zbog pozitivnog djelovanja na zdravlje u reguliranim količinama. Mnoga istraživanja pokazala su da unošenje dodataka prehrani ima niz prednosti na zdravlje. Upravo zbog toga sve su zastupljeniji na tržištu gdje se pojavljuju u različitim oblicima i različitog sastava. Prisutni su u obliku tableta, kapsula, praha te tekućih preparata. Svaka država Europske Unije ima stroge odredbe i direktive propisane za dodatke prehrani (Webb, 2006).

2.5.1. Dodaci prehrani na bazi kafeina

Zrna zelene kave predstavljaju zrna kave koja nisu pržena te su bogata fenolima. Ekstrakt zrna zelene kave popularan je dodatak prehani koji pospješuje mršavljenje. Uzrok tomu je što sadrži klorogensku kiselinu koja može sniziti količinu glukoze u krvi što zauzvrat omogućava manju pretvorbu glukoze u masti. Ovakvi dodaci nalaze se u obliku kapsula koje se konzumiraju pola sata prije svakog obroka. Ne preporučuje se trudnicama i maloj djeci (Pepper, 2013).



Slika 5 Ekstrakt zrna zelene kave u obliku kapsula (WEB 4)

Zeleni čaj predstavlja sastavni dio japanske kulture gdje se konzumira u prosjeku 3 puta na dan. Proizvodi se isparavanjem i sušenjem lista biljke *Camellie sinensis* čime se osigurava očuvanje polifenola. Jedna šalica zelenog čaja opskrbljuje organizam sa 100-200 mg polifenola koji uključuju epigalokatehin galat (EGCG), epikatehin (EC) i epikatehin galat (ECG). Osim polifenola, sadrži kafein, minerale te slobodne masne kiseline. Znanost je pokazala da umjerenom konzumacijom ekstrakta zelenog čaja neće doći do zdravstvenih problema. Sigurna dnevna doza je tri puta po 1g m^{-2} ekstrakta zelenog čaja. Provedena istraživanja dokazala su da ovaj dodatak prehrani regulira potrošnju energije u mirovanju te stoga kontrolira težinu (Sarubin-Fragakis, 2007).



Slika 6 Ekstrakt zelenog čaja u kapsulama (WEB 5)

Guarana je biljka koja potječe iz Brazila, sadrži veliku količinu kafeina i kao takva se dodaje u energetska pića. Poznata je po mentalnoj, fizičkoj i seksualnoj stimulaciji, no danas najviše se upotrebljava kao dodatak za povećanje količine energije tijekom aktivnosti te kao pomagač u gubljenju kilograma. Najzastupljeniji sastojak je upravo kafein dok su ostali važni sastojci (polifenoli, saponini) još u procesu istraživanja. Dodaci prehrani najčešće se pojavljuju u obliku tableta s guaranom koje sadrže ekstrakt sjemenki guarane. Preporučena dnevna doza iznosi 200-2000 mg. Osobe koje su osjetljive na kafein, kao i trudnice i mala djeca, mogu imati negativne posljedice po zdravlje, kao što su nesanica, povišenje krvnog tlaka, umor (Talbott i Hughes, 2007).



Slika 7 Ekstrakt sjemenki guarane u obliku tableta (WEB 6)

2.4. Metode određivanja kafeina

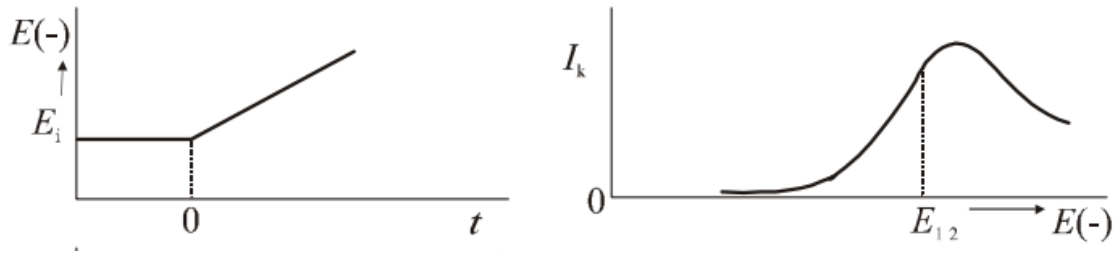
2.4.1. Elektroanalitičke ili elektrokemijske metode

Elektroanalitičke metode bave se proučavanjem ionskih sustava, procesa unutar njih te kemijskih reakcija koje se događaju uz utrošak električne energije ili koje su izvor električne energije. Elektrokemija se bavi istraživanjem uzajamnog djelovanja elektriciteta i tvari u užem smislu i njihovim posljedicama. Elektrokemijski sustav sastoji se od elektrokemijske ćelije. Katoda i anoda čine elektronske vodiče koji su razdvojeni ionima (najčešće otopina elektrolita) (Metikoš i Huković, 2020). Ove metode dijele se s obzirom na to teče li električna struja ili ne. Kod onih metoda gdje nema protoka električne struje, dolazi do elektrokemijskih reakcija na elektrodama gdje spontano nastaje električni napon pri čemu se uspostavlja ravnotežni elektrodni potencijal. S druge strane, kod metoda gdje postoji tok električne struje, ali i vanjski električni krug zbog primjenjenog napona iz vanjskog izvora, dolazi do reakcija oksidacije i redukcije (Bockris i sur., 2000). Električni napon je signal pobude, a električna struja signal odziva koji je rezultirajuća fizikalna veličina (Piljac, 2010).

Voltametrija

Voltametrija je grupa elektroanalitičkih metoda kod kojih je signal pobude električni napon. Oblik i vremenska ovisnost amplitude signala pobude je različit (Piljac, 2010). U takvim

mjerenjima elektrokemijska ćelija sadrži 3 elektrode. Radna elektroda kod koje se potencijal mijenja s vremenom zbog odvijanja temeljne elektrokemijske reakcije na njezinoj površini, elektroda stalnog potencijala koju nazivamo referentna elektroda te pomoćna elektroda koja ima ulogu vođenja elektrona od izvora signala do radne elektrode preko otopine. Uzorak sadrži elektroaktivne tvari u otopini koje putuju do radne elektrode te dolazi do redoks reakcija polučlanka. Kako bi se zatvorio tok elektrona, redoks reakcija drugog polučlanka odvija se na pomoćnoj elektrodi (Saito i Kikuchi, 2013).



Slika 8 Signal pobude i odziva voltametrije (Piljac, 2010)

Pravokutnovalna voltametrija

Pravokutnovalna voltametrija je metoda u kojoj je valni oblik sastavljen od simetričnog kvadratnog vala (Piljac, 2010). Tijekom svakog ciklusa kvadratnog oblika struja se mjeri dva puta. Jednom na kraju polaznog pulsa i na kraju pulsa suprotnog smjera (Wang, 2000). Pobudni signal prikazuje se kao rastući stepeničasti pravokutni val. Vrijeme trajanja impulsa iskazuje se frekvencijom te iznosi 1-500 Hz (Piljac, 2010). Rezultati se prikazuju u voltamogramu koji može biti gotov za nekoliko sekundi jer je najveća prednost ove metode njezina brzina i zbog toga ima veliku primjenu (Wang, 2000).

2.4.2. Ostale metode

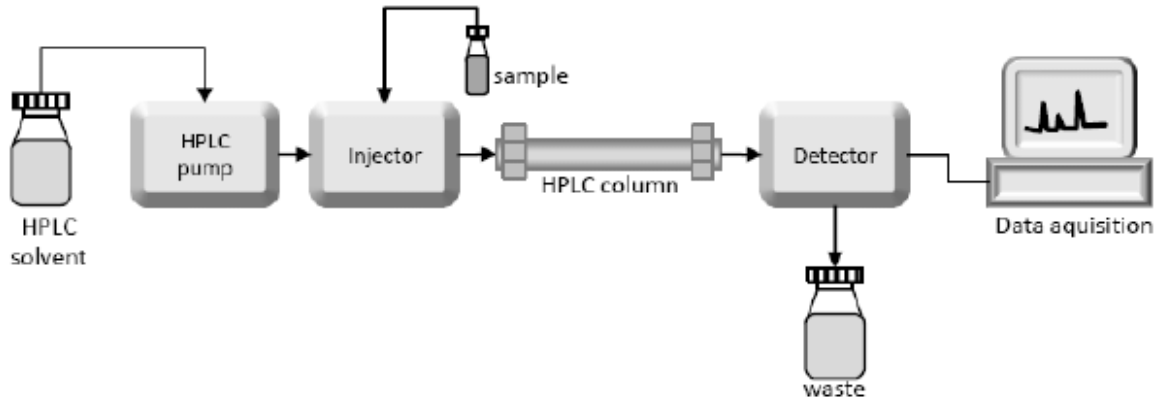
Spektroskopske metode

Spektroskopske metode temelje se na prepoznavanju spektara. Uređaj s kojim se mjeri naziva se spektrometar. Spektar nastaje bilježenjem intenziteta apsorpcije različite valne duljine elektromagnetskog zračenja ili frekvencije unutar elektromagnetskog polja. Kod elementarnih

čestica dolazi do njihovog međudjelovanja s česticama energije elektromagnetskog zračenja (fotonima) ili drugim česticama (Skrabal, 2012) pri čemu se odvija prijelaz elektrona iz osnovnog u pobuđeno energijsko stanje, tj. prijelaz s niže na višu energijsku razinu. Svaki element emitira karakterističan spektar zračenja. Metode se provode za kvantitativnu i kvalitativnu analizu (Jakobek Barron, 2017; Vitha, 2019; Skoog, 1999).

Kromatografske metode

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je metoda u kojoj se smjese razdvajaju temeljem njihove polarnosti u dvije faze, stacionarne i mobilne. Mobilna faza je tekućina pod visokim tlakom (čisto otapalo) kojom se ispire kolona u kojoj se nalazi analizirana tvar (stacionarna faza). Rad pri visokom tlaku povećava brzinu odvajanja i smanjuje vrijeme zadržavanja komponenata. Najčešće otapalo je voda, zatim metanol te druga organska otapala. Na kraju kolone nalazi se detektor koji reagira na analiziranu komponentu i signal prikazuje nizom pikova u kromatogramu (Jakobek Barron, 2017).



Slika 9 Postupak provođenja HPLC metode (WEB 7)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak ovog diplomskog rada je:

- ispitati utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, pH vrijednosti osnovnog elektrolita, frekvencije pobudnog signala i koncentracije na elektrokemijsko ponašanje kafeina pomoću pravokutnovalne voltametrije i
- primijeniti pravokutnovalnu voltametriju na elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani.

3.2. Materijali i metode rada

3.2.1. Priprema uzorka

Uzorak dodatka prehrane, kafein (My Protein, UK) pripremljen je otapanjem u 200 mL ultračiste vode. Neposredno prije analize, uzorak je filtriran preko filter papira.

3.2.2. Priprema otopina

Standard kafeina

Pripremila se otopina standarda kafeina koncentracije, c = 1,14·10^{-2} mol L^{-1} u ultračistoj vodi. Radne koncentracije pripremile su se razrjeđivanjem u odgovarajućoj pH vrijednosti elektrolita. Standardna otopina kafeina čuvana je zaštićena od svjetla u hladnjaku na 4 °C.

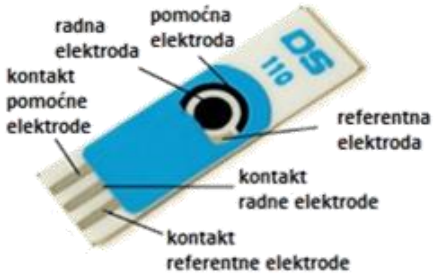
Osnovni elektrolit za mjerenje primjenom pravokutnovalne voltametrije

Otopina acetatnog pufera (AcB) predstavlja otopinu osnovnog elektrolita za elektrokemijsko mjerenje. Pripremljena je u koncentraciji od 0,1 mol L^{-1} pri pH vrijednostima 3, 4, 5, 6. Za pripremu otopine AcB. Za pripremu osnovnog elektrolita koristila se ultračista voda vodljivosti manje od 0,1 µS cm^{-1}.

Pravokutnovalna voltametrija

Istraživanje primjenom pravokutnovalne voltametrije na elektrokemijsku oksidaciju kafeina i uzoraka provedeno je na elektrokemijskom sustavu µAutolab koji je kontroliran kompjuterski (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemska) pri sobnoj temperaturi. Mjerenje se odvijalo u staklenoj stacionarnoj elektrodnoj ćeliji. Stacionarna elektrokemijska ćelija sastojala se od tro-elektrodnog sustava komercijalne ''s*creen printed*'' ugljikove elektrode modificirane karboksiliranim jednostjenčanim ugljikovim nanočesticama (engl. *Carboxylated Single-Walled*

Carbon Nanotubes, SWCNT elektroda), od tvrtke DropSens, Španjolska. Tro-elektrodni sustav predstavlja SWCNT-COOH/ugljik radna elektroda, sloj ugljika pomoćna i sloj srebra kao referenta elektroda i električni kontakt za sve tri elektrode (**Slika 10**).



Slika 10 Komercijalna ''*screen printed*'' ugljikova elektroda

Mjerenja standarda kafeina i uzoraka ponavljana su tri puta, a pravokutnovalni voltamogrami snimljeni su prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 1**.

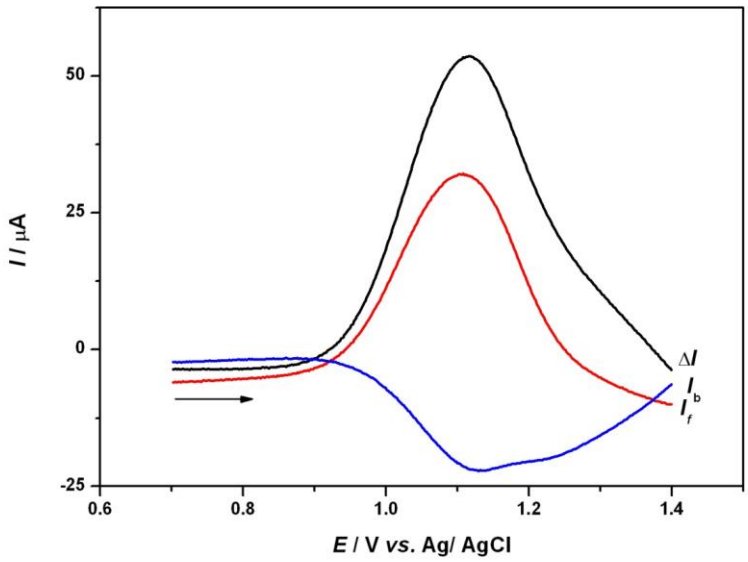
Tablica 1 Eksperimentalni uvjeti diferencijalne pulsne voltametrije

Parametar	Iznos
Početni potencijal (mV)	-0,4
Konačni potencijal (mV)	1,4
Korak potencijala (mV)	2
Amplituda pulsa (mV)	50
Frekvencija, *f* (Hz)	50

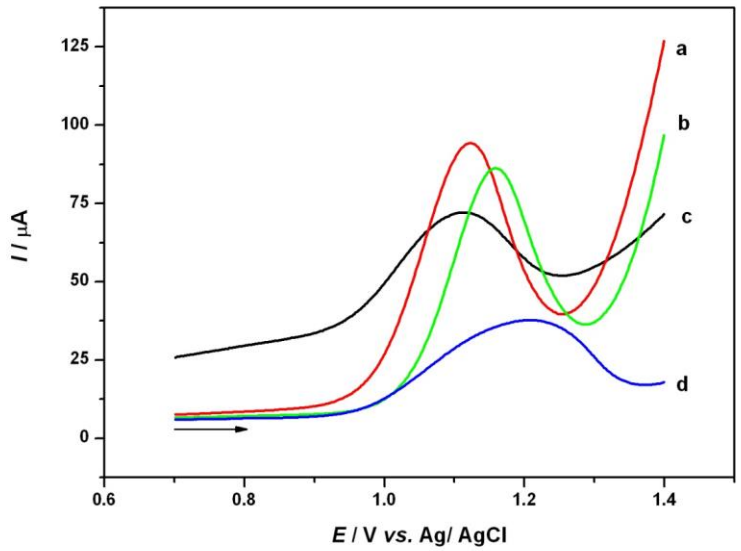
Sadržaj kafeina u uzorcima dodatka prehrani izraženi su u miligramima po tableti (mg / tableta) kao srednja vrijednost tri mjerenja.

4. REZULTATI

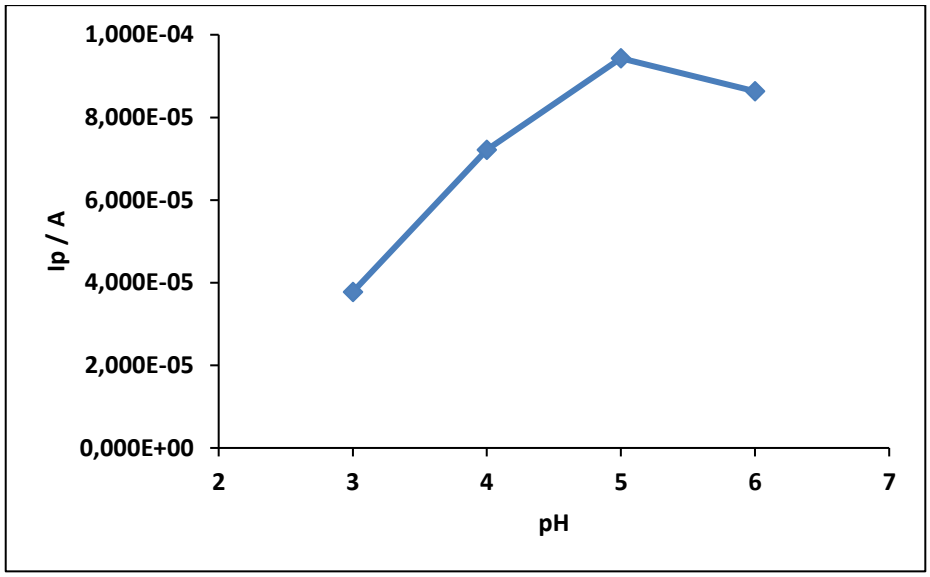
4.1. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE KAFEINA



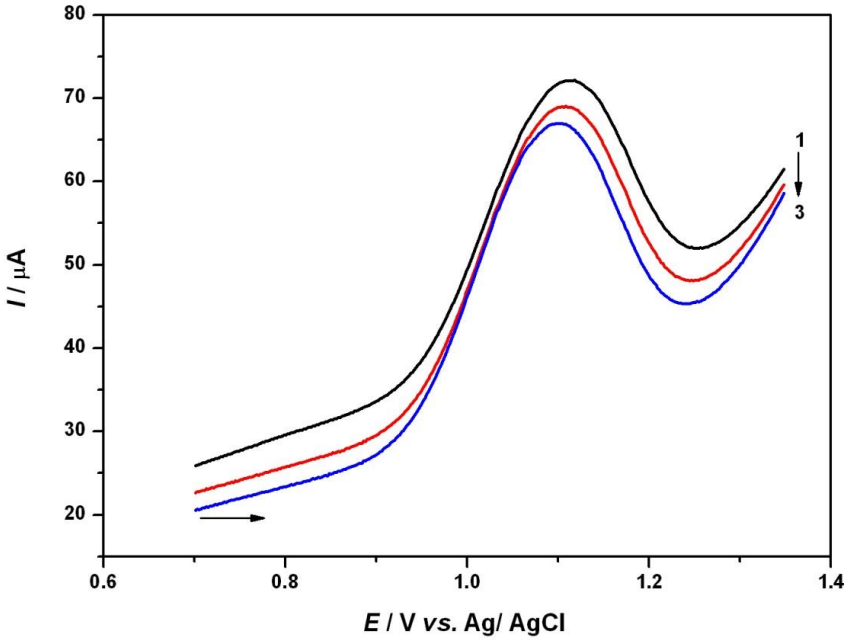
Slika 11 Pravokutnovalni voltamogram standarda kafeina (c = 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1}) kafeina u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



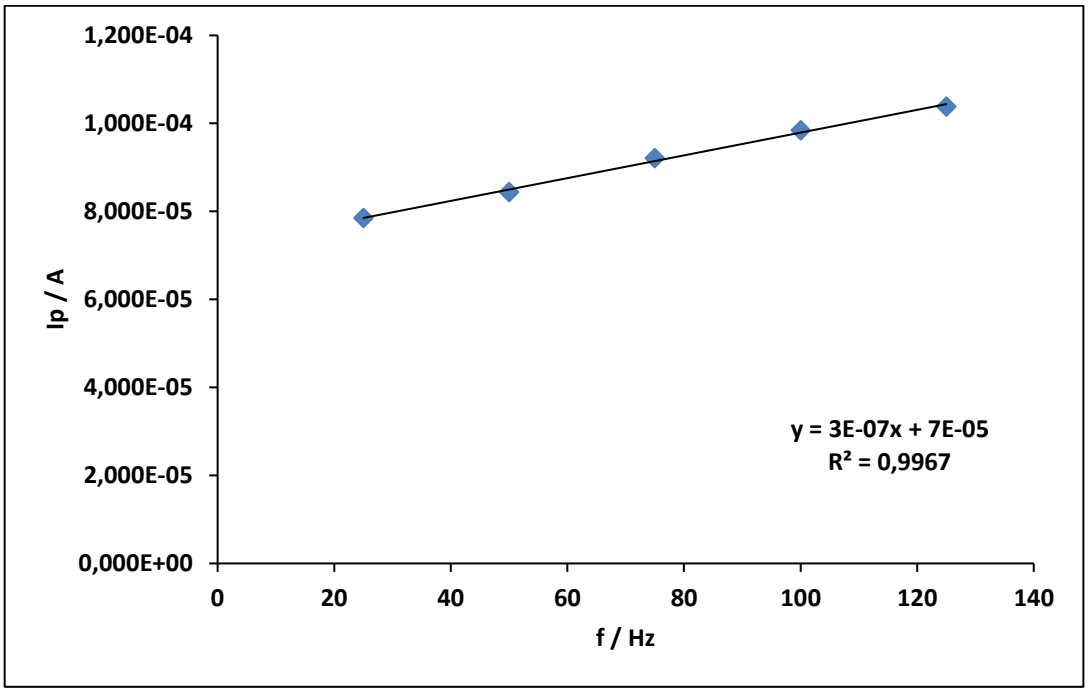
Slika 12 Pravokutnovalni voltamogram utjecaja promjene pH elektrolita na elektrokemijska svojstva kafeina koncentracije, c = 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 3 (c), pH 4 (a), pH 5 (d) i pH 6 (b) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



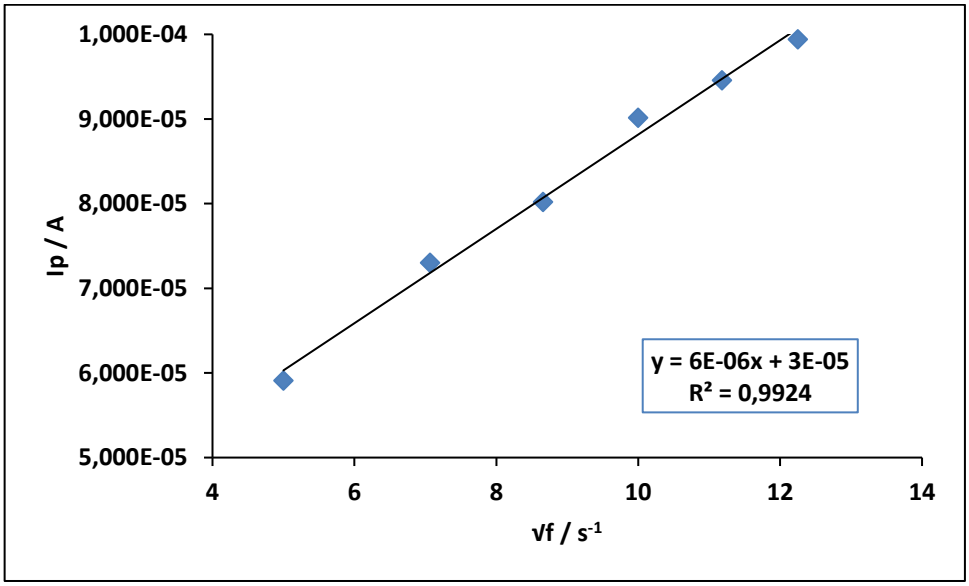
Slika 13 Ovisnost struje pika o promjeni pH vrijednosti



Slika 14 Pravokutnovalni voltamogram utjecaja višestruke uzastopne polarizacije na elektrokemijska svojstva kafeina koncentracije $1{,}14 \cdot 10^{-2}$ mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**

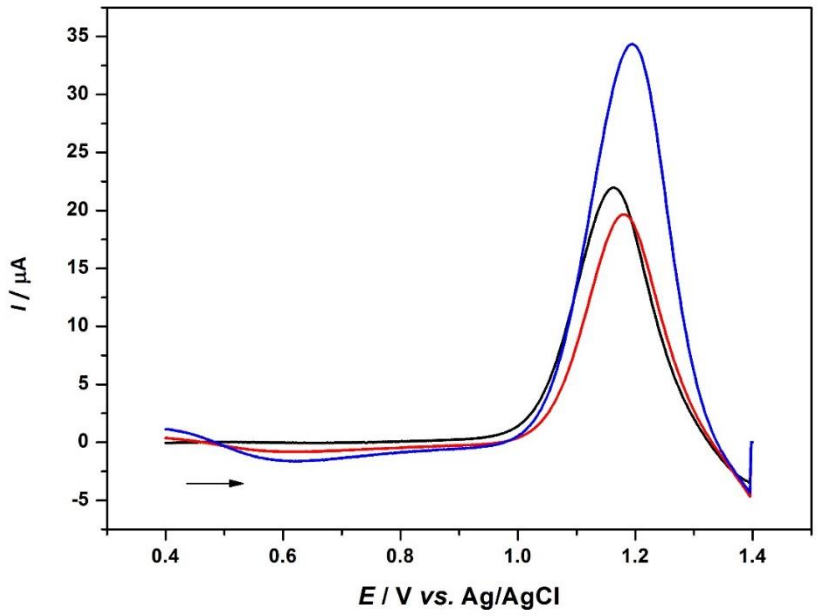


Slika 15 Ovisnost struje pika o promjeni frekvencije pobudnog signala

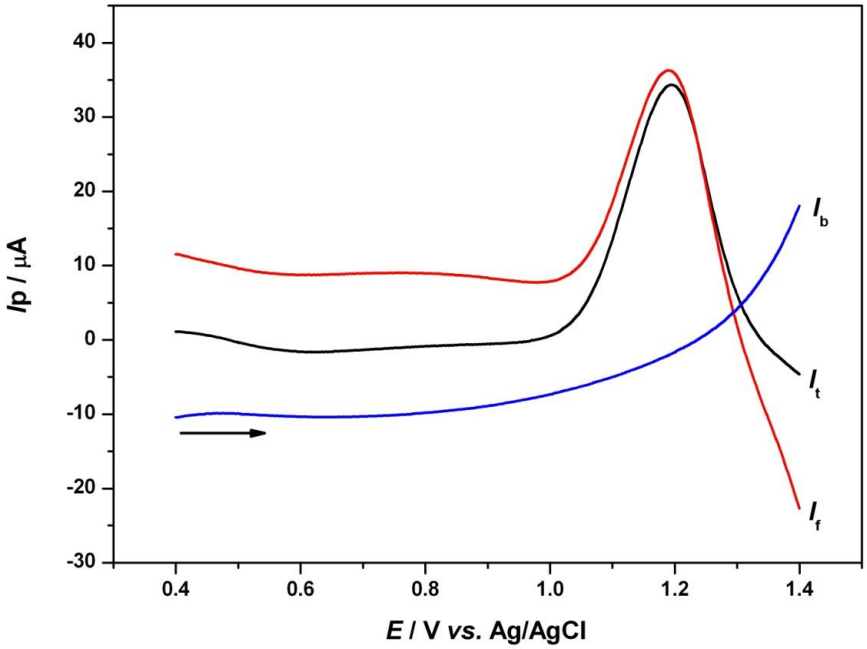


Slika 16 Ovisnost struje pika kafeina o korijenu frekvencije pobudnog signala

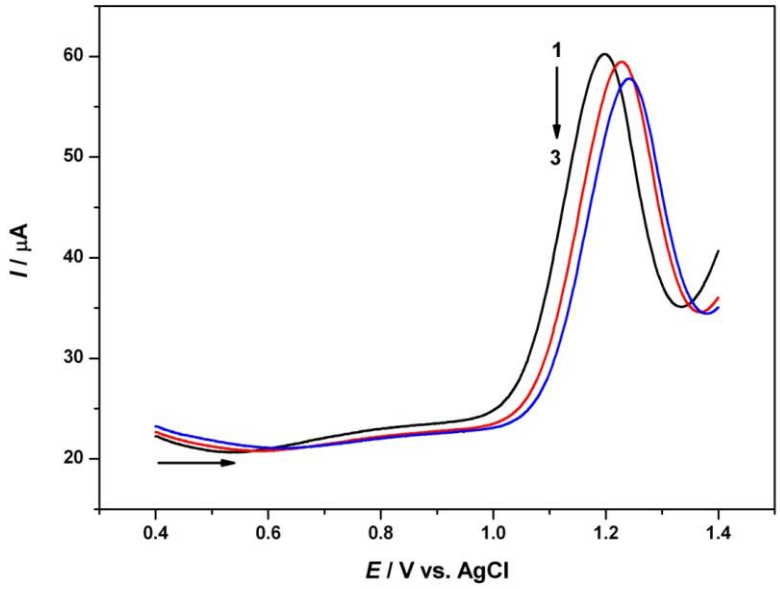
4.2. ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE UZORKA DODATKA PREHRANI



Slika 17 Pravokutnovalni voltamogrami uzorka dodatka prehrani (crno DF 50, crveno DF 25, plavo DF 10) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**

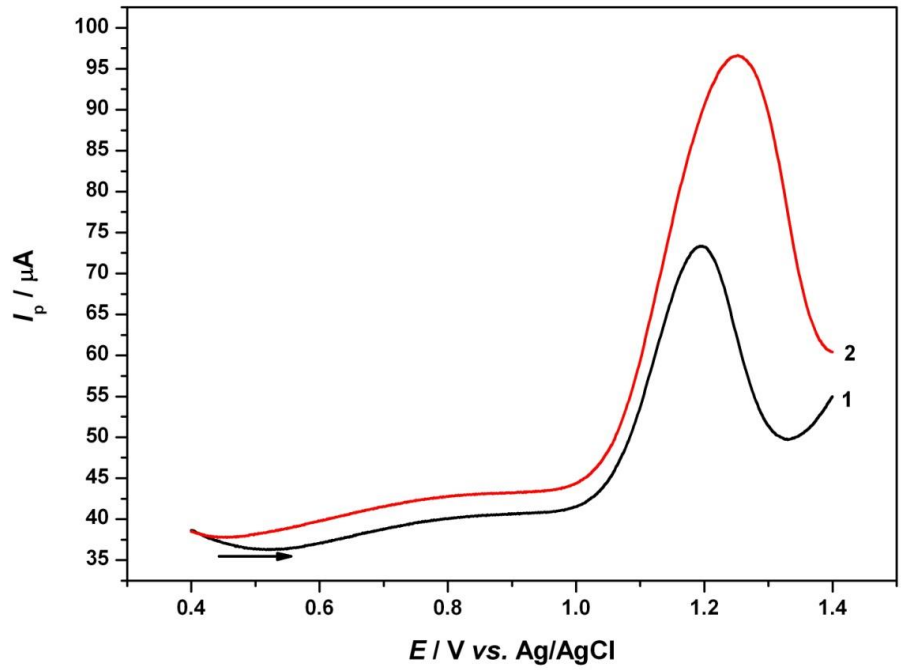


Slika 18 Pravokutnovalni voltamogram uzorka dodatka prehrani (DF 10) u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**

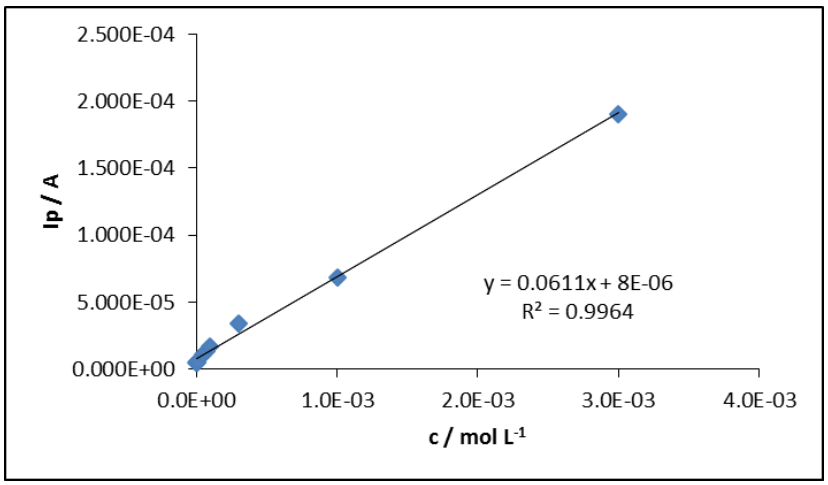


Slika 18 Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na pravokutnovalne voltamograme uzorka dodatka prehrani (DF 10) u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**

4.2.1. Kvantifikacija sadržaja kafeina u uzorku dodatka prehrani



Slika 20 Pravokutnovalni voltamogram obogaćivanja uzorka dodatka prehrani (DF 10) (crno bez dodatka kafeina, crveno s dodatkom kafeina) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



Slika 21 Ovisnost struje pika o promjeni koncentracije standarda kafeina

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitano je elektrokemijsko ponašanje kafeina primjenom pravokutnovalne voltametrije. Ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita, utjecaj frekvencije pobudnog signala i utjecaj koncentracije na pravokutnovalne voltamograme kafeina. Nadalje, ispitan je utjecaj parametara pravokutnovalne voltametrije na elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani koji sadrži kafein.

5.1. Elektrokemijsko ponašanje standarda kafeina

Na **Slici 11** prikazan je pravokutnovalni voltamogram standarda kafeina koncentracije 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 na komercijalnoj ''*screen printed*'' elektrodi. Iz pravokutnovalnog voltamograma uočava se jedan jasno izraženi oksidacijski strujni odziv na potencijalu 1,1 V te prisustvo anodnog strujnog odziva i odsustvo katodnog strujnog odziva govori da se na površini radne elektrode vjerojatno odvija ireverzibilna elektrokemijska redoks reakcija (Mirčeski i sur., 2007; Campean i sur., 2011).

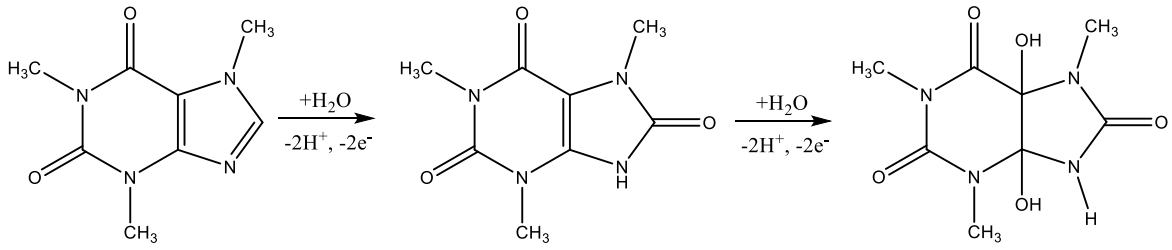
Ispitan je utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita na pravokutnovalne voltamograme standarda kafeina koncentracije 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1} (**Slike 12** i **13**). Ispitan je utjecaj 0,1 mol L^{-1} acetatnog pufera od pH 3 do pH 6. Iz **Slika 12** i **13** uočava se da je najviši strujni odziv pri pH 4 te se pri ostalim ispitanim pH vrijednostima strujni odziv smanjuje te je pH 4 izabran za ispitivanje eksperimentalnih uvjeta na elektrokemijsku oksidaciju standarda kafeina što je u skladu s literaturnim referencama (Hansen i Dryhurst, 1971; Sontag i Kral, 1979; Zen i sur., 1998; Spataru i sur., 2002; Campean i sur., 2011; Tadesse i sur., 2013; Švorc, 2013; Torres i sur., 2014; Redivo i sur., 2018).

Nadalje, ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije otopine standarda kafeina koncentracije 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 na komercijalnoj ''*screen printed*'' elektrodi na pravokutnovalne voltamograme te se uočava opadanje strujnog odziva pri drugoj i trećoj polarizaciji i pomak potencijala (2-3 mV) što govori da se vjerojatno na površini radne elektrode odvija nastanak oksidacijskih produkata koji otežavaju difuziju elektroaktivne specije iz otopine prema površini radne elektrode (Campean i sur., 2011; Wang i sur., 2014).

Utjecaj frekvencije pobudnog signala na pravokutnovalne voltamograme otopine standarda kafeina koncentracije 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1} u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4 na komercijalnoj

''*screen printed*'' elektrodi prikazan je na **Slikama 15** i **16** te se uočava linearni porast strujnog odziva povećanjem frekvencije i korijena frekvencije u rasponu od 25 do 150 Hz, a u skladu je s literaturnim podacima autora Campean i suradnika (2011) i Wang i suradnika (2014).

Autori Hansen i Dryhurst (1971) u svom istraživanju elektrokemijskog ponašanja otopine kafeina zaključili su da se proces oksidacije odvija pri izmjeni četiri protona i četiri elektrona (4 H+ - 4 e-), a grupa autora Tedessi i suradnici (2013) predložili su mehanizam oksidacije otopine kafeina prikazane **Slikom 22**.



Slika 22 Mehanizam elektrokemijske oksidacije otopine kafeina (Tedesse i sur., 2013)

Mehanizam elektrokemijske oksidacije otopine kafeina odvija se u dva koraka ($2H^+$, $2e^-$ oksidacija veze s C-8 na N-9 te 2H+, 2e- oksidacija na 4,5-diol analogu mokraćne kiseline).

5.2. Elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani

Ispitan je utjecaj primjene eksperimentalnih uvjeta (višestruka uzastopna polarizacija, frekvencija pobudnog signala, koncentracija) pravokutnovalne voltametrije na elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani koji sadrži kafein.

Uzorak dodatka prehrani koji sadrži kafein pripremljen je za analizu kao što je objašnjeno u poglavlju **3.2. Priprema otopina i uzorka** te su primijenjeni eksperimentalni uvjeti iz **Tablice 1**.

Ispitan je utjecaj različitog razrjeđenja (DF) uzorka dodatka prehrani u rasponu od 50, 25 do 10 na pravokutnovalne voltamograme na komercijalnoj „*screen printed*“ elektrodi u 0,1 mol L^{-1} acetatnom puferu pH 4. Iz prikaza pravokutnovalnih voltamograma realnog uzorka uočava se opadanje anodnog strujnog odziva povećanjem razrjeđenja ispitane otopine odnosno najniži strujni odziv prisutan je pri DF 50, a najviši pri DF 10 te je stoga izabran za daljnju analizu elektrokemijskog ponašanja dodatka prehrani DF 10 (**Slika 17**).

Na **Slici 18** prikazan je pravokutnovalni voltamogram uzorka dodatka prehrani te se uočava jedan jasno izraženi anodni pik pri potencijalu 1,1 V i odsustvo katodnog strujnog pika

jednako kao što je uočeno kod pravokutnovalnog voltamograma otopine standarda kafeina (**Slika 11**).

Nadalje, ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na pravokutnovalne voltamograme uzorka dodatka prehrani te se uočava jednaka pojava kao i kod pravokutnovalnog voltamograma otopine standarda kafeina (**Slika 14**) odnosno u drugoj i trećoj polarizaciji primjećuje se opadanje strujnog odziva i pomak elektrodnog potencijala prema nižim vrijednostima što vjerojatno upućuje na nastanak oksidacijskih produkata na površini radne elektrode i otežanu difuziju molekula iz ispitivane otopine prema površini elektrode.

Zatim, da bi se provela identifikacija kafeina i potvrdila njegova prisutnost u uzorku provedeno je obogaćivanje realnog uzorka s poznatom koncentracijom standarda kafeina (c = 1,14 · 10^{-2} mol L^{-1}). Na **Slici 20** prikazani su pravokutnovalni voltamogrami realnog uzorka prije i nakon dodatka standarda kafeina te se jasno uočava značajni porast oksidacijskog strujnog odziva realnog uzorka nakon dodatka standarda kafeina, dok se potencijal pika (1,1 V) vrlo malo pomakao prema pozitivnim vrijednostima (oko 2-3 mV). Pomak potencijala oksidacije vjerojatno je posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata na površini radne elektrode. Iz pravokutnovalnih voltamograma prikazanih na **Slici 20** može se zaključiti da se oksidacijski strujni odziv nedvojbeno odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog u uzorku dodatka prehrani.

Kalibracijska krivulja i jednadžba pravca kreirani su s ciljem ispitivanja utjecaja koncentracije na pravokutnovalne voltamograme otopine standarda kafeina i s ciljem ispitivanja sadržaja kafeina u realnim uzorcima (**Slika 21**). Kalibracijska krivulja otopine kafeina kreirana je na temelju ovisnosti množinske koncentracije o ukupnom oksidacijskom strujnom odzivu u rasponu koncentracija od 5 do 500 µmol L^{-1} te se uočava linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita. Dobila se **Jednadžba 1**:

$$I_p\ (A) = 0{,}0611\ c\ (mol\ L^{-1}) + 0{,}000008 \qquad (\mathbf{1})$$

i koeficijent korelacije 0,9964. Osjetljivost primijenjene elektrokemijske tehnike izražena je preko granice detekcije koja iznosi 7,22 · 10^{-5} mol L^{-1} i granice kvantifikacije koja iznosi 2,40 · 10^{-4} mol L^{-1}. Deklarirani sadržaj kafeina u ispitanom uzorku dodatka prehrani iznosi 200 mg. Primjenom pravokutnovalne voltametrije dobiveni sadržaj ispitanog uzorka iznosi 276±24 mg po tableti dodatka prehrani te je dobiveni sadržaj kafeina u dodatku prehrani u skladu s

deklariranim sadržajem. Pravokutnovalna voltametrija pokazala se primjenjiva za karakterizaciju elektrokemijskog ponašanja kafeina, istraživanje mehanizma elektrokemijske oksidacije kafeina i identifikacije i kvantifikacije kafeina u realnom uzorku.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja u ovom diplomskom radu može se zaključiti:

- Primjenom pravokutnovalne voltametrije, ispitana elektrokemijska svojstva kafeina pokazala su kako kemijska struktura, pH vrijednost osnovnog elektrolita, višestruka uzastopna polarizacija i različite frekvencije pobudnog signala utječu na elektrokemijsko ponašanje kafeina.
- Pravokutnovalni voltamogram standarda kafeina koncentracije pokazuje jedan jasno izraženi oksidacijski strujni odziv na potencijalu 1,1 V te prisustvo anodnog strujnog odziva i odsustvo katodnog strujnog odziva govori da se na površini radne elektrode vjerojatno odvija ireverzibilna elektrokemijska redoks reakcija.
- Utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita na pravokutnovalne voltamograme standarda kafeina pokazao je najviši strujni odziv pri pH 4 te se pri ostalim ispitanim pH vrijednostima strujni odziv smanjuje.
- Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije otopine standarda pokazao je opadanje strujnog odziva pri drugoj i trećoj polarizaciji i pomak potencijala što govori da se vjerojatno na površini radne elektrode odvija nastanak oksidacijskih produkata koji otežavaju difuziju elektroaktivne specije iz otopine prema površini radne elektrode
- Utjecaj frekvencije pobudnog signala na pravokutnovalne voltamograme otopine standarda kafeina pokazuje linearni porast strujnog odziva povećanjem frekvencije i korijena frekvencije u rasponu od 25 do 150 Hz.
- Elektrokemijsko ponašanja otopine kafeina je proces oksidacije koji se odvija pri izmjeni četiri protona i četiri elektrona ($4\ H^+ - 4\ e^-$).
- Prisutno je opadanje anodnog strujnog odziva povećanjem razrjeđenja odnosno najniži strujni odziv prisutan je pri DF 50, a najviši pri DF 10 te je stoga izabran za daljnju analizu elektrokemijskog ponašanja dodatka prehrani DF 10.
- Pravokutnovalni voltamogram uzorka dodatka prehrani pokazuje jedan jasno izraženi anodni pik pri potencijalu 1,1 V i odsustvo katodnog strujnog pika jednako kao što je uočeno kod pravokutnovalnog voltamograma otopine standarda kafeina.
- Prisutan je jednak utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na pravokutnovalne voltamograme uzorka dodatka prehrani kao i kod pravokutnovalnog voltamograma otopine standarda kafeina (u drugoj i trećoj polarizaciji primjećuje se opadanje strujnog odziva i pomak elektrodnog potencijala prema nižim vrijednostima).

- Identifikacija kafeina i prisutnost u uzorku provedeno je obogaćivanje realnog uzorka s poznatom koncentracijom standarda kafeina te se jasno uočava značajni porast oksidacijskog strujnog odziva realnog uzorka nakon dodatka standarda kafeina što se nedvojbeno odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog u uzorku dodatka prehrani.
- Kalibracijska krivulja otopine kafeina pokazala je linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita u rasponu koncentracija od 5 do 500 μmol L^{-1}, koeficijent korelacije 0,9964, granice detekcije $7,22 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} i granice kvantifikacije $2,40 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}.
- Primjenom pravokutnovalne voltametrije dobiveni sadržaj ispitanog uzorka iznosi 276±24 mg po tableti dodatka prehrani te je dobiveni sadržaj kafeina u dodatku prehrani u skladu s deklariranim sadržajem (200 mg).
- Pravokutnovalna voltametrija pokazala se primjenjiva za karakterizaciju elektrokemijskog ponašanja kafeina i identifikaciju i kvantifikaciju u realnom uzorku.

7. LITERATURA

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P: *Food Chemistry (4th revised and extended)*. Springer, Berlin, 2009.

Bockris JOM, Reddy AKN, Gamboa-Aldeco M: Modern Electrochemist 2A, Fundamentals of Electrodics (2nd edition). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.

Burke L, Desbrow B, Spriet L: *Caffeine for sports performance*. Human Kinetics, SAD, 2013.

Campean A, Tertis M, Sandulescu R: Voltammetric determination of some alkaloids and other compounds in pharmaceuticals and urine using an electrochemically activated glassy carbon electrode. *Central European Journal of Chemistry* 9:688-700, 2011.

Hansen BH, Dryhurst G: Electrochemical oxidation of theobromine and caffeine at the pyrolytic graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 30:406-416, 1971.

Jakobek Barron L: *Nastavni materijali iz kolegija Instrumentane metode II.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

Metikoš-Huković M: *Elektrokemija*. Interni udžbenik, FKIT, Zagreb, 2000.

Mirčeski V, Komorsky-Lovrić Š, Lovrić M: *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*. Springer-Verlag, Berlin, 2007.

Pepper L: The Green Coffee Bean Quick Weight Loss Diet: Turbo Charge Your Weight Loss Diet. St. Martin's Publishing Group, New York, 2013.

Piljac I: *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*. Media print, Zagreb, 2010.

Preedy VR: *Caffeine: Chemistry, analysis, function and effects*. RSC Publishing, Cambridge, 2012.

Redivo L, Stredanský M, De Angelis E, Navarini L, Resmini M, Švorc L: Bare carbon electrodes as simple and efficient sensors for the quantification of caffeine in commercial beverages. *Royal Society Open Science* 5: 172146, 2018.

Saito Y, Kikuchi T: *Voltammetry: Theory, Types and Applications*. Nova, NY, 2013.

Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije.* Školska knjiga, Zagreb, 1999.

Skrabal PM: *Spectroscopy: An interdisciplinary integral description of spectroscopy from UV to NMR*. Vdf, Zurich, 2012.

Sontag G, Kral K: Differential-Pulsvoltammetrie und cyklische Voltammetrie von Phenolsäuren. *Microchimica Acta* 72:317-336, 1979.

Spataru N, Sarada BV, Tryk DA, Fujishima A: Anodic Voltammetry of Xanthine, Theophylline, Theobromine and Caffeine at Conductive Diamond Electrodes and Its Analytical Application. *Electroanalysis* 14:721-728, 2002.

Spiller GA: *Caffeine,* CRC Press, Boca Raton, 1998.

Švorc L, Rievaj M, Bustin D: Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods. *International Journal of Electrochemical Sciences* 8:5755-5773, 2013.

Tadesse Y, Tadese A, Saini RC, Pal R: Cyclic Voltammetric Investigation of Caffeine at Anthraquinone Modified Carbon Paste Electrode. *International Journal of Electrochemistry* 2013:1-7, 2013.

Talbott SM, Hughes K: *The Health Professional's Guide to Dietary Supplements.* Lippincott Williams & Wilkins, SAD, 2007.

Torres C, Barsan MM, Brett CMA: Simple electrochemical sensor for caffeine based on carbon and Nafion-modified carbon electrodes. *Food Chemistry* 149:215-220, 2014.

Vith MF: *Spectroscopy: Principles and Instrumentation.* Wiley, New York, 2019.

Wang J: *Analytical electrochemistry (second edition)*. Wiley-VCH, New York, 2000.

Wang Y, Wei W, Wang F, Li M: Sensitive voltammetric detection of caffeine in tea and beverage based on DNA-functionalized single-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Analytical Methods* 6:7525-7531, 2014.

Weinberg BA, Bealer BK: *The Caffeine Advantage: How to Sharpen You Mind, Improve Your Physical performance, and achieve your goals- the healthy way*. The free press, New York, 2002.

Zen JM, Jou JJ, Ilangovan G: Selective voltammetric method for uric acid detection using preanodized Nafion-coated glassy carbon electrodes. *Analyst* 123:1345-1350, 1998.

WEB1:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Caffeine_3d_structure.png (21.9.2020.)

WEB2:https://www.skolskiportal.hr/media/kavovakavova-500xxxxx.jpg (30.4.2020.)

WEB3:https://biljoteka.ba/wp-content/uploads/2018/06/header-zeleni-caj-camellia-sinensis-folium.jpg (30.4.2020.)

WEB4:https://www.tvornicazdravehrane.com/upload/catalog/product/187/zelena-kava-i-lcarnitin_5a2ea39404557.jpg (1.9.2020.)

WEB5:https://www.futunatura.hr/image/cache/data/ALLNUTRITION/Zeleni-caj-90-kapula-AllNutrition-500x500.jpg (1.9.2020.)

WEB6:https://www.futunatura.hr/image/cache/data/Bioforma/Guarana-60-kapsula-500x500.jpg (1.9.2020.)

WEB7:https://www.researchgate.net/profile/Sylwester_Czaplicki/publication/236146377/figure/fig2/AS:299417216274435@1448398035117/Schematic-diagram-of-the-High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC-system.png (30.4.2020.)

WEB8:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine (30.4.2020.)