

Razvoj elektroanalitičke metode cikličke voltametrije za karakterizaciju kafeina u uzorcima dodatka prehrani

Radman, Ivana

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:109:767775>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Radman

**Razvoj elektroanalitičke metode cikličke voltametrije za
karakterizaciju kafeina u uzorcima dodatka prehrani**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2020.

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.

Razvoj elektroanalitičke metode cikličke voltametrije za karakterizaciju kafeina u uzorcima dodatka prehrani

Ivana Radman, 0113140294

Sažetak: Ciklička voltametrija je elektroanalitički postupak kod kojeg se mjerenje provodi u elektrokemijskoj ćeliji. Elektrokemijska ćelija sastoji se od radne, pomoćne i referentne elektrode spojene na voltametrijski uređaj. Signal pobude kod ovog postupka je linearno rastući potencijal, a signal odziva struja. Potencijal radne elektrode se mijenja tijekom polarizacije određenom brzinom i u određenom području potencijala pri čemu se na površini radne elektrode odvija redoks reakcija. Ova metoda primjenjuje se za istraživanje mehanizama reverzibilnih, ireverzibilnih i kvazireverzibilnih elektrokemijskih procesa te za kvalitativnu i kvantitativnu analizu u različitim sustavima. Stoga je zadatak ovog diplomskog rada razviti elektroanalitički postupak cikličke voltametrije, ispitati elektrokemijsko ponašanje otopine kafeine pri različitim pH vrijednostima inertnog pufera, promjeni koncentracije otopine kafeina, promjeni brzine polarizacije i utjecaja višestruke uzastopne polarizacije te primijeniti na identifikaciju i kvantifikaciju u realnom sustavu kao što je dodatak prehrani.

Ključne riječi: kafein, dodatak prehrani, ciklička voltametrija

Rad sadrži: 35 stranice
14 slika
1 tablica
23 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: 30. 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

Development of Cyclic Voltammetry to the Characterization of Caffeine from Dietary Supplement Sample

Ivana Radman, 0113140294

Summary: Cyclic voltammetry is an electroanalytical procedure in which the measurement is performed in an electrochemical cell. The electrochemical cell consists of a working, auxiliary and reference electrode connected to a voltammetry device. The excitation signal by this procedure is a linearly increasing potential, and the response signal is a current. The potential of the working electrode changes during polarization at a certain speed and in a certain range of potential, where a redox reaction takes place on the surface of the working electrode. This method is used to investigate the mechanisms of reversible, irreversible and quasi – reversible electrochemical processes and for qualitative and quantitative analysis in different systems. Therefore, the task of this thesis is to develop an electroanalytical procedure of cyclic voltammetry, examine the electrochemical behaviour of caffeine solution at different pH values of inert buffer, change of concentration of caffeine solution, change of the polarization rate, and the effect of multiple consecutive polarization and apply to identification and quantification in a real system such as a dietary supplement.

Key words: caffeine, dietary supplement, cyclic voltammetry

Thesis contains: 35 pages
14 figures
1 table
23 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Maja Molnar, PhD, associate prof.
2. Ivana Tomac, PhD
3. Lidija Jakobek Barron, PhD, prof.
4. Antun Jozinović, PhD, assistant prof.

chair person
supervisor
member
stand-in

Defense date: September 30, 2020

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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kafein	4
2.1.1. Struktura i svojstva	4
2.1.2. Prirodni izvori kafeina	5
2.1.3. Utjecaj na zdravlje	5
2.2. Dodaci prehrani	6
2.3. Metode određivanja	7
2.3.1. HPLC metoda	7
2.3.2. Spektroskopija	7
2.3.3. Elektrokemijske metode	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Zadatak rada	12
3.2. Materijali i metode	12
3.2.1. Priprema otopina	12
3.2.2. Ciklička voltametrija	12
4. REZULTATI	14
4.1. Elektrokemijsko ponašanje kafeina	15
5. RASPRAVA	22
5.1. Elektrokemijsko ponašanje standardne otopine kafeina	23
5.2. Elektrokemijska karakterizacija uzorka dodatka prehrani	25
6. ZAKLJUČCI	27
7. LITERATURA	29

1. UVOD

Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$) je kristalni prah bez mirisa, gorkog okusa. Teofilin, teobromin, paraksantin i kafein ubrajaju se u metilirane oblike ksantina. Za dokazivanje kafeina primjenjuje se mureksid reakcija. Kava, čaj, guarana, kakao i kola predstavljaju najvažnije izvore kafeina, a preporučena dnevna doza iznosi 200 mg/dan.

Prema Pravilniku o hrani za posebne prehrambene potrebe (NN 81/04) dodatak prehrani definira se kao hranjiva tvar odnosno kao koncentrirani izvori hranjivih sastojaka ili drugih tvari sa prehrambenim ili fiziološkim funkcijama, same ili u kombinacijama, u doziranom obliku, sa svrhom da dodatno obogate unos hranjivih sastojaka u uobičajenoj prehrani. Kafein kao dodatak prehrani koristi se najčešće u prehrani rekreativaca ili sportaša.

Za određivanje sadržaja kafeina primjenjuju se različite metode kao što su kromatografija, spektroskopija, elektrokemijske metode i slično. Ciklička voltametrija je elektrokemijska tehnika kod koje je signal pobude linearno rastući potencijal, a signal odziva struja. Ciklička voltametrija se primjenjuje za istraživanje mehanizma elektrokemijske reakcije, identifikaciju i kvantifikaciju elektroaktivnih specija iz područja prehrambene, farmaceutske, biotehnološke industrije.

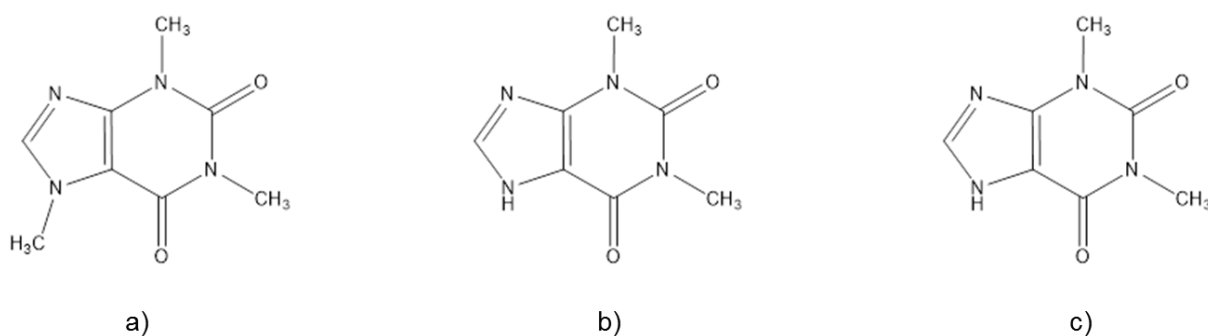
Stoga je zadatak ovog diplomskog rada razviti elektroanalitički postupak cikličke voltametrije, ispitati elektrokemijsko ponašanje otopine kafeine pri različitim pH vrijednostima inertnog pufera, promjeni koncentracije otopine kafeina, promjeni brzine polarizacije i utjecaja višestruke uzastopne polarizacije te primijeniti na identifikaciju i kvantifikaciju u realnom sustavu kao što je dodatak prehrani.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kafein

2.1.1. Struktura i svojstva

Kafein je glavni sastojak zrna kave (Marković i sur., 2003). Molekulska formula kafeina je $C_8H_{10}N_4O_2$; sistematskog naziva trimetilksantin. Ubraja se u skupinu prirodnih alkaloida jakog fiziološkog djelovanja sa vrlo gorkim okusom. Čisti kafein je kristalni prah bez mirisa. Točka taljenja kafeina iznosi $236\text{ }^{\circ}\text{C}$, a sublimacije $178\text{ }^{\circ}\text{C}$. Molekularne mase $194,19\text{ g}$ (Patil, 2012). Metilirani oblici ksantina mogu biti kafein, teofilin, teobromin i paraksantin. Navedeni metilirani oblici derivata ksantina razlikuju se samo po prisutnosti CH_3 grupe (**Slika 1.**). Kafein se lakše otapa u kipućoj vodi, kloroformu i u razblaženim mineralnim kiselinama, a teže u vodi i etanolu. Za dokazivanje purinskih alkaloida (kofein, teofilin, teobromin) primjenjuje se mureksid reakcija. Mureksid nastaje kada kafein djeluje s bromnom vodom ili koncentriranim vodikovim peroksidom u prisustvu klorovodične kiseline. Nakon uparavanja nastaje žuti ostatak koji u prisustvu amonijaka rezultira ljubičastom bojom odnosno nastankom mureksida. Kafein tijekom 24 sata pri standardnim laboratorijskim uvjetima trebao bi biti stabilan u vodi, 95% etanolu, acetonu ili DMSO (dimetil sulfoksid) te može reagirati s jakim oksidacijskim sredstvima (Taletović i sur., 2014).



Slika 1. Strukturni prikaz a) kafeina, b) teofilina i c) teobromina



Slika 2. Bijeli prah kafeina (WEB 1)

2.1.2. Prirodni izvori kafeina

Prirodni alkaloidi među koje se ubraja i kafein, mogu se pronaći u najmanje 63 biljne vrste (Bhawani i sur., 2015). Biljke upotrebljavaju kafein kao prirodni pesticid za zaštitu od insekata (Taletović i sur., 2014). Pojavljuje se u kavi, lišću čaja i sjemenkama kakaa (Patil, 2012). Njegova količina ovisi o vrsti i podrijetlu biljaka budući da pripada obitelji snažnih ksantina koji su prirodno prisutni i najstariji stimulansi. Povremeno se koristi kao sastojak u raznim napitcima poput bezalkoholnih i energetske pića te u kombinaciji s raznim lijekovima. Najvažniji izvori kafeina su: kava, čaj, guarana, kakao i kola. Prisutnost kafeina u navedenim proizvodima varira, a najveće količine su prisutne u guarani koja sadrži 4-7%, zrnu kave 1.1-2.2%, kolu 1.5%, kakao zrnu 0.03% i lišću čaja 3.5% (Patil, 2012). Kafeinu slični spojevi su atropin, nikotin, kinin, kokain i drugi. Vrsta kave određuje njegovu koncentraciju u zrnu pa tako u 150 ml kavinog napitka nalazi se 40-80 mg kafeina dok tablete sadrže i do 200 mg kafeina, a dozvoljena maksimalna dnevna doza iznosi 1g (Marković i sur., 2003). Zbog antropogenog podrijetla kafein je pokazatelj onečišćenja vode u kućanstvima, a može se naći i u otpadnim i površinskim vodama u vrlo malim količinama (Patil, 2012).

2.1.3. Utjecaj na zdravlje

Prosječno 90% odraslih putem kave, čaja i bezalkoholnih pića svakodnevno unosi kafein. U vrlo kratkom vremenu brzo se izlučuje iz probavnog trakta i raspoređuje tijelom. Iz organizma se ne uklanja sve dok se ne metabolizira u paratoksin, teofilin, teobromin, a potom u derivat mokraćne kiseline i diaminouracil. Poluživot kafeina u plazmi kod čovjeka, odnosno vrijeme

potrebno da se njegova razina smanji za 50% je 5-6 sati (Patil, 2012). Iz organizma se mokraćom izlučuje 75% kofeina (Marković i sur., 2003). Kao glavni stimulans u pićima djeluje na središnji živčani sustav, srce i povećava aktivnost mozga (Bhawani i sur., 2015). Smanjuje umor, pruža energiju, povećava koncentraciju, doprinosi bržem i jasnijem toku misli (Corciova i Ivanescu, 2016). Umjerena izloženost kafeinu doprinosi smanjenju rizika od hepatocelularnog i endometrijskog raka, dijabetesa tipa 2, poboljšava tjelesne sposobnosti, ima diuretski učinak na bubrege i slično (Corciova i Ivanescu, 2016). Preporučena dnevna doza kafeina je 200 mg/dan. Visoke doze kafeina mogu dovesti do suženja krvnih žila, povišenja krvnog tlaka, aritmije. Pretjerana konzumacija dovodi do povišenja razine slobodnih masnih kiselina u plazmi koji remete predmenstrualne simptome. Konzumacija kafeina u količinama većim od 250 mg dnevno dovodi do nervoze, nesanice, glavobolje i razdražljivosti. Takvo stanje naziva se kafenizmom. Farmakološka svojstva kafeina omogućuju njegovu primjenu u različitim farmaceutskim proizvodima. Primjerice, u kombinaciji s aspirinom primjenjuje se za liječenje glavobolje ili s paracetamolom za ublažavanje boli (Corciova i Ivanescu, 2016).

2.2. Dodaci prehrani

Prema Pravilniku o hrani za posebne prehrambene potrebe (NN 81/04) dodatak prehrani definira se kao hranjiva tvar odnosno kao koncentrirani izvori hranjivih sastojaka ili drugih tvari sa prehrambenim ili fiziološkim funkcijama, same ili u kombinacijama, u doziranom obliku, sa svrhom da dodatno obogate unos hranjivih sastojaka u uobičajenoj prehrani. Trend konzumacije različitih napitaka i namirnica na bazi kafeina je u porastu (Ivančić, 2017). Konzumacija energetskih napitaka smanjuje umor, povećava budnost i osjećaj „energije“ organizma jer pored kafeina sadrže i mineralne tvari, glukozu, vitamine B skupine, neke aminokiseline i drugo (Ivančić, 2017). Kafein je prisutan u mnogim proizvodima kao što su čokolade, lijekovima protiv bolova i proizvodima za kontroliranje tjelesne težine (Jašić i sur., 2009). Koncentracija kafeina je različita u mnogim proizvodima, stoga njegovu koncentraciju trebaju ograničiti osobe osjetljive na kafein, trudnice i djeca. Također, raste tendencija konzumacije energetskih napitaka među vojnicima i sportašima (Ivančić, 2017). Sportske organizacije tumače kafein kao jedan od zabranjenih stimulansa živčanog sustava, međutim koncentracija od 12 µg/l u urinu je dopuštena normalna dnevna razina (Patil, 2012). Koncentracije iznad navedene definiraju se kao doping (Ivančić, 2017).

2.3. Metode određivanja

Za određivanje sadržaja kafeina u hrani, biološkim uzorcima, farmaceutskim proizvodima primjenjuje se nekoliko metoda kao što su UV/Vis spektroskopija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), nuklearna magnetska rezonancija (NMR), kapilarna elektroforeza, tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija, elektrokemijske tehnike i slično (Tadesse i sur., 2013).

2.3.1. HPLC metoda

HPLC podrazumijeva kromatografiju koja omogućuje identifikaciju, razdvajanje i kvantitativno određivanje vrlo kompleksnih smjesa. Temelji se na različitoj raspodjeli supstance između dvije faze (mobilne i stacionarne). Mobilna faza je polarna, a stacionarna nepolarna. Najčešće primjenjivane vodeno-organske smjese za mobilnu fazu su metanol, acetonitril ili kombinacija navedenog. Od ostalih metoda razlikuje se zbog izloženosti mobilne faze djelovanju visokog tlaka. Njime se postiže kontinuirani protok mobilne faze i razvija dinamička ravnoteža sa stacionarnom fazom što osigurava dobru raspodjelu komponenti u analiziranom uzorku. HPLC sistem sastoji se od pumpe, kolone, detektora (najčešće UV/Vis detektor) (Banković, 2016). Metoda je vrlo pouzdana i precizna. Skupa oprema i složenost samog instrumenta onemogućava njegovu primjenu u manjim industrijskim laboratorijima (Patil, 2012).

2.3.2. Spektroskopija

Spektroskopija je jedna od najčešće primjenjivanih tehnika za analizu tvari. Upotrebljavaju se za analizu različitih spojeva u jednostavnim i složenim uzorcima (Bhawani i sur., 2015). Spektroskopijom se dobivaju informacije o uzoraka na osnovi djelovanja elektromagnetskog zračenja analiziranog uzorka. Razlikuje se infracrvena, ultrazvučna, fluorescentna spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija. Osim što spektroskopske metode analiziraju valove, razlikuje se i spektrometrija mase koja proučava čestice (Butorac i sur., 2013). Postupak je brz, jeftin, jednostavan i osigurava visoku točnost rezultata (Bhawani i sur., 2015).

2.3.3. Elektrokemijske metode

Elektrokemijska metoda je analitička tehnika koja se primjenjuje u različitoj industriji. Prednost su joj osjetljivost, točnost, preciznost i selektivnost. Analiza je brza, a instrumenti relativno

jeftini. Pojedine elektrokemijske metode baziraju se na principu kontinuirane promjene primijenjenih potencijala u okolini elektroda-otopina i izmjerene struje (Farghaly i sur., 2014).

Ciklička voltametrij

Ciklička voltametrij (CV) često se primjenjuje za proučavanje redoks reakcija i dobivanje informacija o kemijskim reakcijama. Temelji se na brzom pronalasku napona čiji smjer pronalaska je obrnut, a rezultirajuća struja bilježi primijenjeni potencijal radne elektrode. (Farghaly i sur., 2014). Kod cikličke voltametrije signal pobude je linearno rastući potencijal. Signal odziva daje specifičan oblik s anodnim i katodnim vrhom. Grafički prikaz odziva naziva se ciklički voltamogram. Visina strujnog odziva ovisi o broju razmijenjenih elektroda po čestici (z), koncentraciji elektoreduktanta u otopini (c_0), o površini radne elektrode (A) i čimbenicima koji određuju brzinu difuzije.

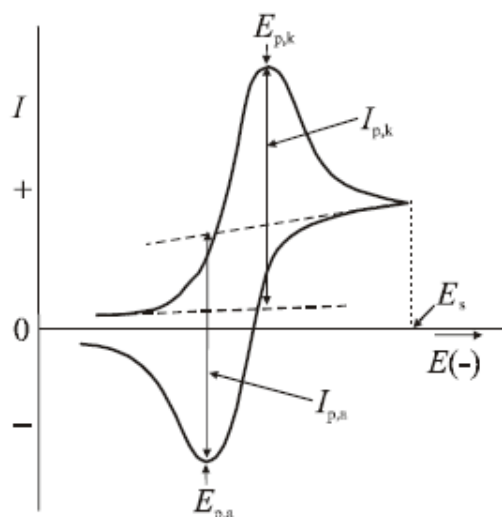
U povratnom posmiku dolazi do razvoja oksidacije produkta elektrodne reakcije redukcije. U signalu odziva oblikuje se anodni vrh. Ciklički voltagram karakterizira omjer visine polaznog i povratnog vala te razlika potencijala vrhova katodnog i anodnog vala. Za reverzibilni elektrodni proces razlika potencijala vrha katodnog ($E_{p,k}$) i anodnog ($E_{p,a}$) vala prikazan je **Jednadžbom 1**:

$$E_{p,k} - E_{p,a} = \frac{57}{z} [mV] \quad (1)$$

Omjer struje vrha vala prikazano je **Jednadžbom 2**:

$$\frac{I_{p,k}}{I_{p,a}} = 1 \quad (2)$$

Na **Slici 3.** prikazan je način obrade cikličkog voltamograma i mjerenje visine katodnog i anodnog vala. Omjer struje vala katodnog i anodnog vala nije ovisan o brzini promjene potencijala (v). Odstupanje od jedinice ukazuje da proces nije reverzibilan (Piljac, 2010).



Slika 3. Grafički prikaz cikličkog voltamograma (Piljac,2010)

Navedeni parametri koriste se kao kriteriji reverzibilnosti elektrodnog procesa (redukcije i oksidacije):

- $E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ ne ovisi o brzini promjene potencijala (v),
- $E_{p,k} - E_{p,a}$ je $57/z$ mV, pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne ovisi o v ,
- $I_{p,k} / I_{p,a}$ je 1, ne ovisi o v ,
- $I_p / v^{1/2}$ ne ovisi o v (Piljac, 2010).

Osjetljivost metode može se odrediti pomoću linearnosti, granice detekcije i granice kvantifikacije. Granica detekcije je najmanja količina analita koja se može ustanoviti u uzorku, a prikazana je **Jednadžbom 3**:

$$LOD = \frac{k S}{b} \quad (3)$$

gdje su: $k - 3$

S – signal slijepe probe

b – nagib pravca (Jakobek Barron, 2017).

Granica kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću točnost i preciznost a prikazana je **Jednadžbom 4**:

$$LOD = \frac{k S}{b} \quad (4)$$

gdje su: $k = 10$

S – signal slijepe probe

b – nagib pravca (Jakobek Barron, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak ovog diplomskog rada bio je:

- ispitati utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, brzine polarizacije, promjene pH osnovnog elektrolita i koncentracije na elektrokemijska svojstva kafeina,
- primijeniti elektrokemijsku tehniku cikličke voltametrije na karakterizaciju kafeina u uzorku dodatka prehrani.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Priprema otopina

Otopina 0.1 mol L^{-1} acetatnog pufera (AcB) pri pH 4 upotrijebila se kao osnovni elektrolit za provođenje cikličke voltametrije.

Standardna otopina kafeina u koncentraciji $1,04 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pripravljena je u ultračistoj vodi. Otopina je čuvana u hladnjaku pri 4°C .

Kafein (My Protein, UK) kao uzorak dodatka prehrani otopljen je u 200 ml ultračiste vode.

3.2.2. Ciklička voltametrija

Kompjuterski kontrolirani sustav potencijostat μ Autolab (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemska) koristio se za mjerenje primjenom cikličke voltametrije (**Slika 4**). Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi. Za elektrokemijsko mjerenje koristila se komercijalna "screen printed" ugljikova elektroda na koju je nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica (engl. *Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes*, SWCNT elektroda), od tvrtke DropSens, Španjolska. Elektroda predstavlja tro-elektrodni sustav u kojem je radna elektroda SWCNT-COOH/ugljik, pomoćna sloj ugljika i referenta elektroda sloj srebra.

Osjetljivost metode izrazila se pomoću linearnosti, granice detekcije i granice kvantifikacije.



Slika 4. Potencijostat za mjerenje voltametrijskim tehnikama

Eksperimentalni uvjeti primijenjeni na analizu cikličkom voltametrijom prikazani su **Tablicom 1.**

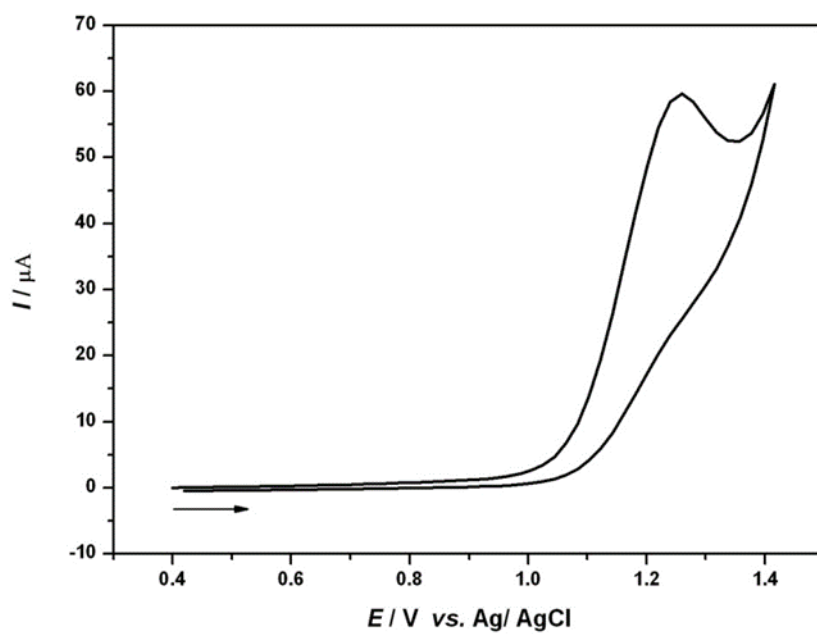
Tablica 1. Eksperimentalni parametri za cikličku voltametriju

Parametar	Iznos
Početni potencijal (mV)	-0,4
Konačni potencijal (mV)	1,4
Brzina polarizacije (mV/s)	5

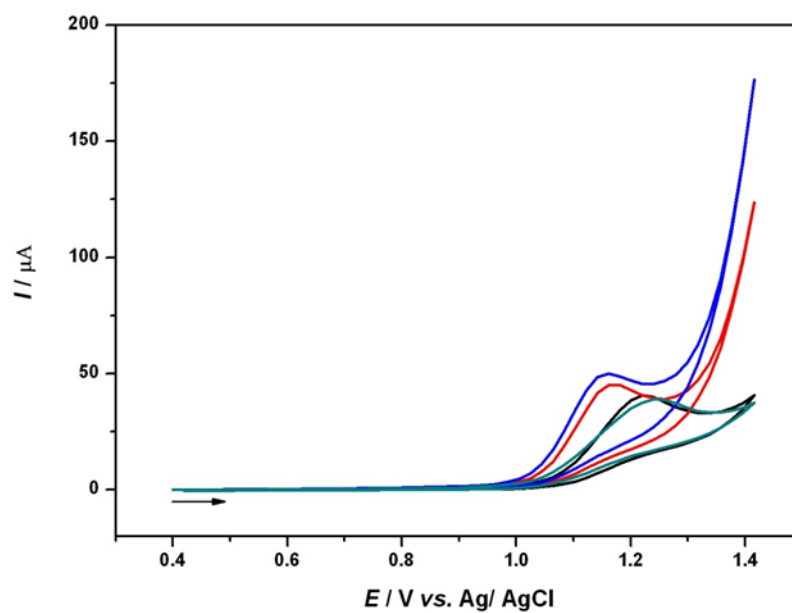
Sadržaj kafeina u uzorku dodatka prehrani dobiven je na osnovi kalibracijske krivulje i izražen je kao miligrami po tableti (mg / tableta) na temelju 3 provedena mjerenja.

4. REZULTATI

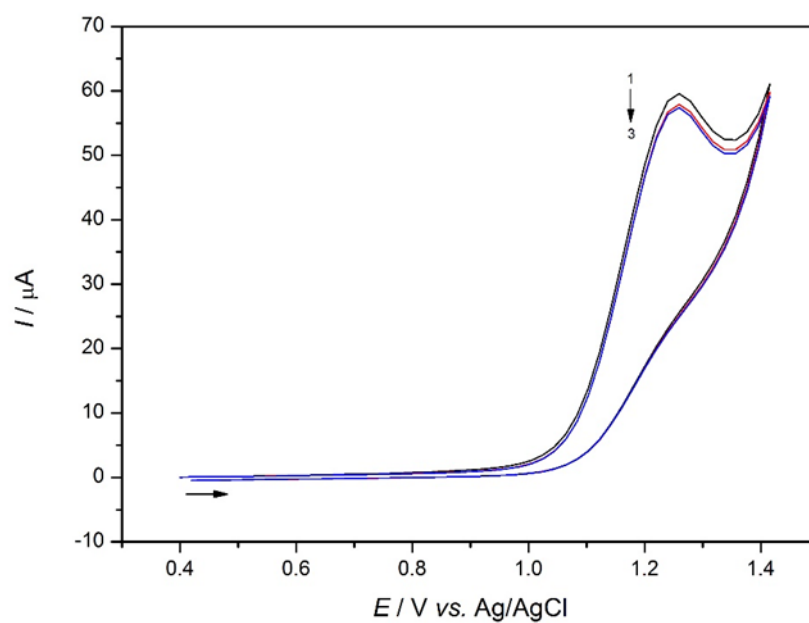
4.1. Elektrokemijsko ponašanje kafeina



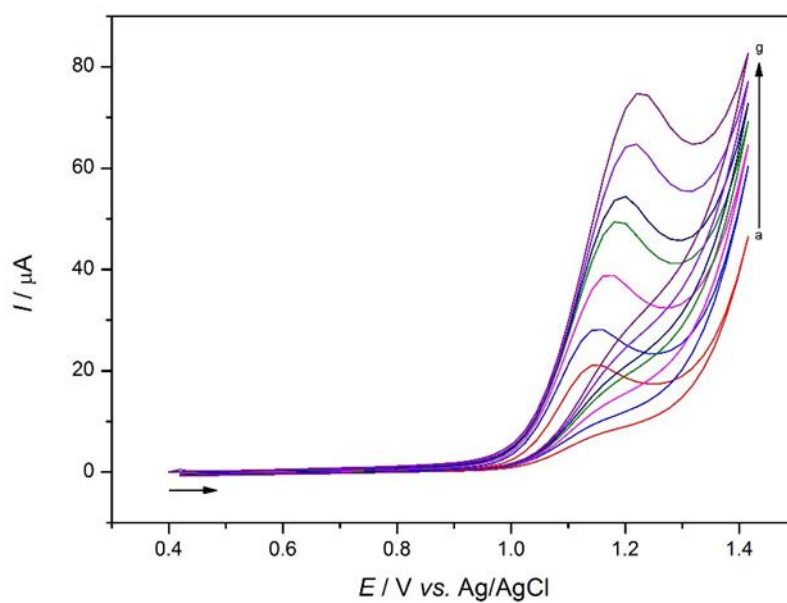
Slika 5. Ciklički voltamogram standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



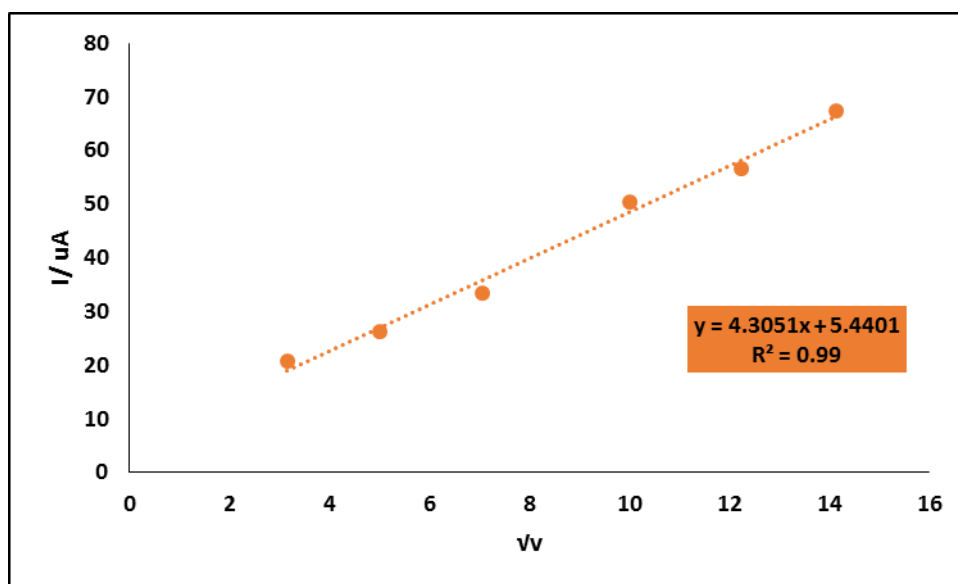
Slika 6. Utjecaj promjene pH vrijednosti elektrolita na cikličke voltamograme standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 (crno), pH 5 (crveno), pH 6 (plavo), pH 3 (zeleno) snimljene pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



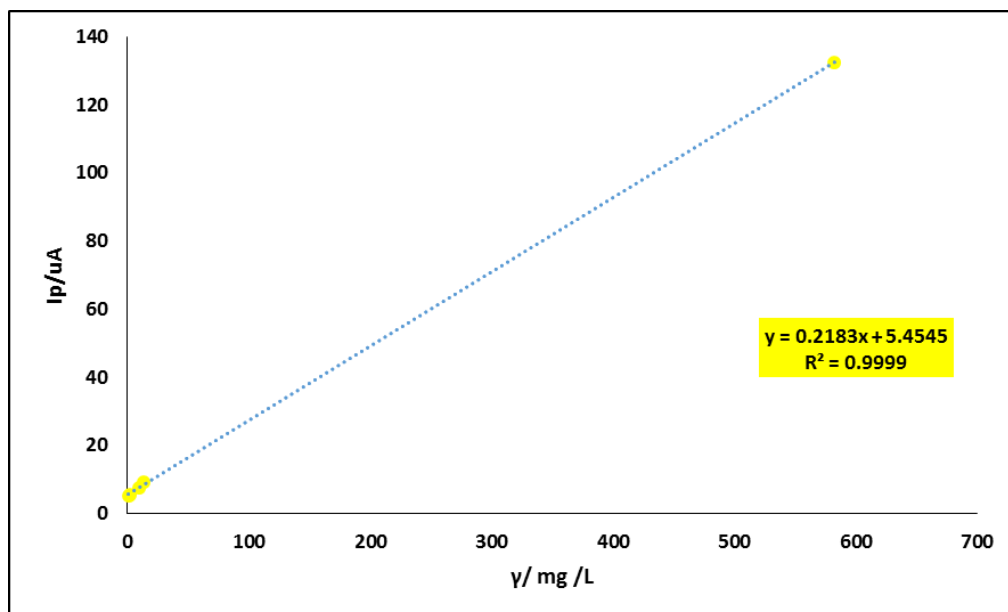
Slika 7. Utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na ciklički voltamogram standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



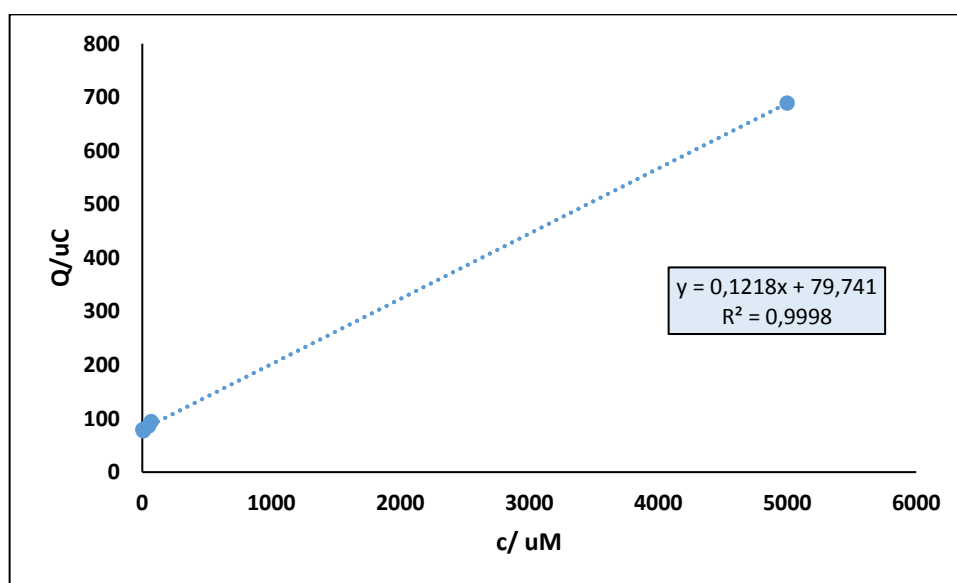
Slika 8. Utjecaj brzine polarizacije na na ciklički voltamogram standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



Slika 9. Ovisnost strujnog odziva o brzini polarizacije

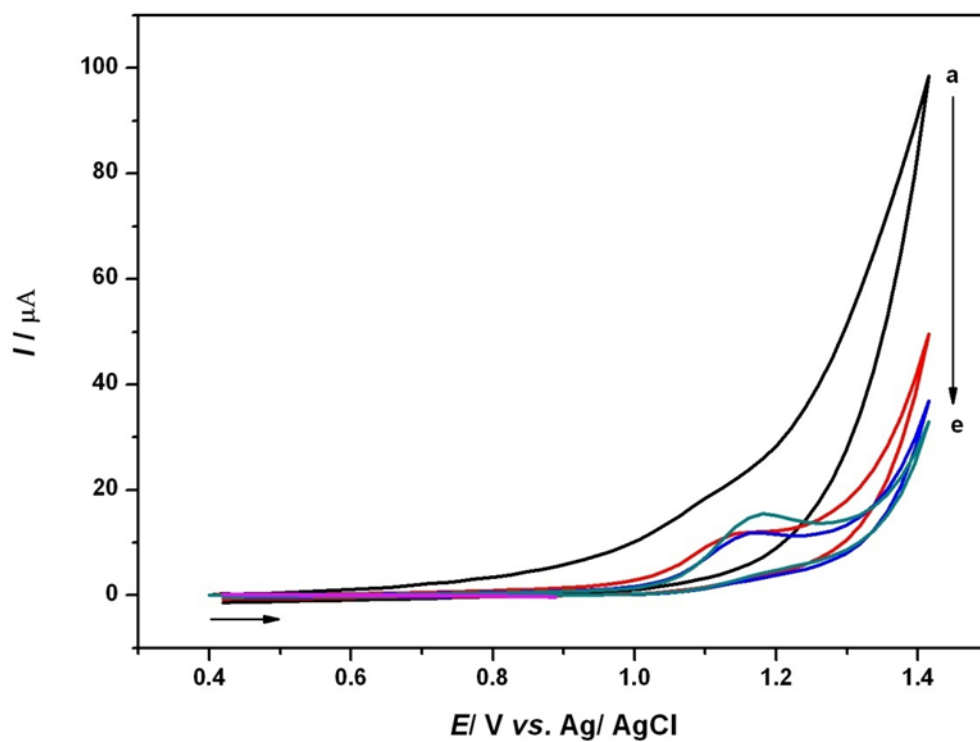


Slika 10. Kalibracijska krivulja otopine kafeina

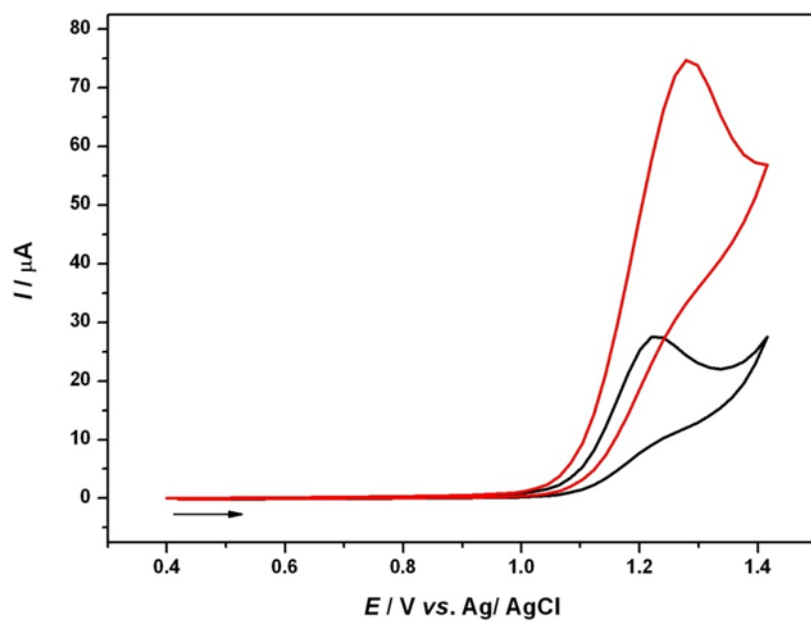


Slika 11. Ovisnost naboja, Q o promjeni koncentracije otopine kafeina

4.2. Elektrokemijsko ponašanje uzorka dodatka prehrani



Slika 12. Ciklički voltamogrami uzorka dodatka prehrani (a-DF 100, b-DF 50, c-DF 25, d-10, e-DF 5) snimljeni pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**



Slika 13. Ciklički voltamogrami obogaćivanja uzorka dodatka prehrani (DF 10) (crno bez dodatka kafeina, crveno s dodatkom kafeina) snimljen pri eksperimentalnim uvjetima kao u **Tablici 1**

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istraženo je elektrokemijsko ponašanje otopine kafeina primjenom cikličke voltametrije. Ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije, utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita, utjecaj brzine polarizacije i utjecaj promjene koncentracije otopine kafeina. Nadalje, razvijena elektrokemijska tehnika primijenjena je na identifikaciju i kvantifikaciju kafeina u uzorku dodatka prehrani.

5.1. Elektrokemijsko ponašanje standardne otopine kafeina

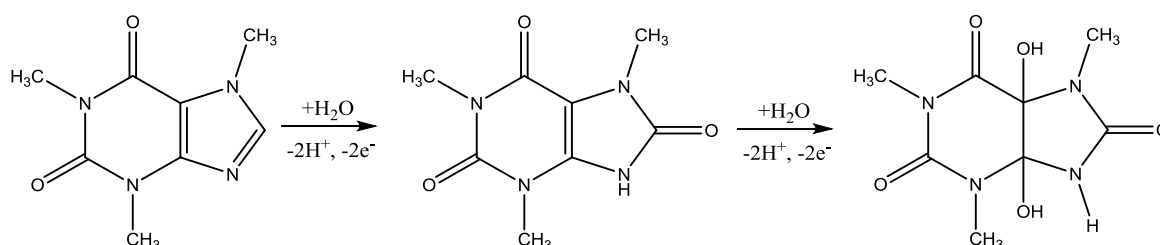
Na **Slici 5** prikazan je ciklički voltamogram standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 te se uočava jedan jasno izraženi anodni strujni odziv na potencijalu od $1,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl i odsustvo katodnog strujnog pika što govori o mogućem ireverzibilnom procesu na površini radne elektrode.

Nadalje, ispitan je utjecaj pH vrijednosti osnovnog elektrolita na cikličke voltamograme standardnu otopinu kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH vrijednosti od 3 do 6 (**Slici 6**). Uočava se jedan jasno izraženi anodni strujni pik i odsustvo katodnog strujnog pika pri svim ispitanim pH vrijednostima. Najviši strujni odziv uočava se pri pH 6, a najniži pri pH 3 te je za istraživanje elektrokemijskog ponašanja u ovom radu odabrana vrijednost pH 4. Ova pH vrijednost je izabrana zbog lakše usporedbe rezultata s literaturnim referencama jer su drugi autori u svojim istraživanjima koristili pH 4 i pH 5 (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.). Ciklički voltamogrami standardne otopine kafeina u različitim pH vrijednostima pokazuju porast strujnog odziva s povećanjem pH vrijednosti (od 3 do 6) (Hansen i Dryhurst, 1971; Spataru i sur., 2002.; Campean i sur., 2011.; Tadesse i sur., 2013.).

Zatim je ispitan utjecaj brzine polarizacije prikazan na **Slici 8** i **Slici 9**. Utjecaj brzine polarizacije ispituje se s ciljem istraživanja kinetike kemijske reakcije na površini radne elektrode. Iz cikličkih voltamograma (**Slika 8**) uočava se da porastom brzine polarizacije (od 10 do 200 mV s^{-1}) raste anodni strujni odziv i neznatno se mijenja potencijal prema pozitivnijim vrijednostima (oko $2\text{--}3 \text{ mV}$) što govori o ireverzibilnosti procesa na površini radne elektrode. Također, ovisnost struje pika i korijena brzine polarizacije (**Slika 9**) daje vrijednost koeficijenta korelacije (R^2) $0,99$ što govori da se na površini radne elektrode odvija proces oksidacije

otopine kafeina i da je proces difuzijski kontroliran, što su isto primijetili autori Amare i Aklog (2017).

Mehanizam oksidacije otopine kafeina su ispitali i autori Hansen i Dryhurst (1971.) te su zaključili da se proces oksidacije odvija pri izmjeni četiri protona i četiri elektrona ($4\text{ H}^+ - 4\text{ e}^-$). Također, grupa autora Tedessi i suradnici (2013.) su predložili mehanizam oksidacije otopine kafeina koji se odvija u dva koraka. U prvom koraku se odvija 2H^+ , 2e^- oksidacija veze s C-8 na N-9 dajući supstituiranu mokraćnu kiselinu te se u drugom koraku odvija 2H^+ , 2e^- oksidacija na 4,5-diol analogu mokraćne kiseline koja se vrlo brzo raspada (**Slikom 14**).



Slika 14. Mehanizam elektrokemijske reakcije otopine kafeina na površini radne elektrode (Tedesse i sur., 2013)

Ispitan je utjecaj višestruke uzastopne polarizacije na cikličke voltamograme standardne otopine kafeina (**Slici 7**). Iz prikaza cikličkih voltamograma standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4 uočava se opadanje strujnog odziva pri drugoj i trećoj polarizaciji te pomak elektrodnog potencijala prema većim vrijednostima elektrodnog potencijala kao i odsustvo katodnog strujnog odziva. Smanjenje iznosa anodnog strujnog odziva povezano je s mogućim nastankom oksidacijskih produkata na površini radne elektrode te je difuzija molekula iz otopine kafeina otežana prema površini radne elektrode (Spataru i sur., 2002; Campean i sur., 2011; Tadesse i sur., 2013; Amare i Aklog, 2017).

Da bi se mogao odrediti sadržaj kafeina u realnim uzorcima ispitan je utjecaj koncentracije na cikličke voltamograme standardne otopine kafeina te je kreirana kalibracijska krivulja (**Slika 10 i 11**). Kalibracijska krivulja standardne otopine kafeina kreirana je na osnovi ovisnosti masene koncentracije o anodnom strujnom odzivu u rasponu koncentracija od 0,9 do 583 mg

L⁻¹ te se uočava linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita (**Jednadžba 2**):

$$I_p (\mu A) = 0,2183 \gamma (mg L^{-1}) + 5,4545 \quad (2)$$

i koeficijent korelacije 0,9999. Osjetljivost primijenjene elektrokemijske tehnike izražena je preko granice detekcije koja iznosi 4,4 mg L⁻¹ i granice kvantifikacije koja iznosi 14,8 mg L⁻¹. Također, kreirana je i kalibracijska krivulja na osnovi ovisnosti elektrodnog naboja o promjeni koncentracije standardne otopine kafeina (**Slika 11, Jednadžba 3**).

$$Q (\mu C) = 0,1218 c (\mu mol L^{-1}) + 79,741 \quad (3)$$

Koeficijent korelacije iznosi 0,9998, granica detekcije 52,18 μmol L⁻¹ i granica kvantifikacije 173,9 μmol L⁻¹.

5.2. Elektrokemijska karakterizacija uzorka dodatka prehrani

Elektrokemijska metoda, ciklička voltametrija primijenjena je na istraživanje elektrokemijskog ponašanja realnog uzorka koji sadrži kafein. Uzorak dodatka prehrani pripremljen je za elektrokemijsku karakterizaciju prema opisu u poglavlju **3.2.2 Priprema otopina** te su primijenjeni eksperimentalni uvjeti iz **Tablice 1**.

Ispitan je utjecaj različitog razrjeđenja (DF) koji je iznosio 100, 50, 25, 10 i 5 (**Slika 12**) na cikličke voltamograme uzorka dodatka prehrani na komercijalnoj „screen printed“ elektrodi u 0.1 mol L⁻¹ acetatnom puferu pH 4. Ciklički voltamogrami ispitanog uzorka pokazuju opadanje anodnog strujnog odziva i odsustvo katodnog strujnog odziva povećanjem razrjeđenja ispitane otopine odnosno najniži strujni odziv prisutan je pri DF 5, a najviši pri DF 100 te je stoga izabran za daljnju analizu DF 10. Na **Slici 13** prikazan je ciklički voltamogram uzorka dodatka prehrani (DF 10) te se uočava jedan jasno izraženi anodni pik pri potencijalu 1,2 V i odsustvo katodnog strujnog odziva kao što se uočava kod standardne otopine kafeina (**Slika 5**).

Nadalje, provela se identifikacija kafeina i potvrdila njegova prisutnost u uzorku obogaćivanjem realnog uzorka s poznatom koncentracijom standarda kafeina ($c = 1,92 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Na **Slici 13** prikazani su ciklički voltamogrami realnog uzorka prije i nakon dodatka standarda kafeina te se jasno uočava značajni porast anodnog strujnog odziva realnog uzorka nakon dodatka

standarda kafeina, dok se potencijal pika (1,2 V) vrlo malo pomakao prema pozitivnim vrijednostima (oko 2-3 mV) te se u oba ciklička voltamograma uočava odsustvo katodnog strujnog odziva. Pomak potencijala oksidacije vjerojatno je posljedica adsorpcije oksidacijskih produkata na površini radne elektrode. Iz cikličkih voltamograma prikazanih na **Slici 13** nedvojbeno se može zaključiti da se anodni strujni odziv odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog u uzorku dodatka prehrani.

Određivanje sadržaja kafeina u realnom uzorku provelo se na osnovi kalibracijskih krivulja i jednadžbi pravaca te sadržaj kafeina u realnom uzorku iznosi $210,45 \pm 10$ mg / tableti. Deklarirani sadržaj kafeina u ispitanom uzorku dodatka prehrani iznosi 200 mg. Dobiveni sadržaj kafeina u dodatku prehrani u skladu je s deklariranim sadržajem te se ciklička voltametrijom pokazala primjenjivom za karakterizaciju elektrokemijskog ponašanja kafeina, istraživanje elektrokemijske oksidacije te za identifikaciju i kvantifikaciju u realnom uzorku.

6. ZAKLJUČCI

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

- Ciklički voltamogram standardne otopine kafeina otopinu kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na komercijalnoj "screen printed" elektrodi u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu daje prikaz anodnog strujnog pika.
- Pri svim ispitivanim pH vrijednostima (od 3 do 6) osnovnog elektrolita; ciklički voltamogrami standardne otopine kafeina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) daju jasan prikaz anodnog strujnog pika te pokazuju porast strujnog odziva kako raste pH vrijednost.
- Istraživanje elektrokemijskog ponašanja provodilo se pri vrijednosti pH 4 radi lakše usporedbe s literaturnim rezultatima.
- Utjecaj brzine polarizacije daje prikaz cikličkih voltamograma na kojima se uočava ireverzibilnost procesa na površini radne elektrode (strujni odziv opada pri drugoj i trećoj polarizaciji).
- Također, na površini radne elektrode odvija se proces oksidacije otopine kafeina što su uočili i autori u prethodno navedenoj raspravi.
- Ispitivanjem utjecaja koncentracije dobiveni su ciklički voltamogrami standardne otopine kafeina te je pomoću njih napravljena kalibracijska krivulja koja pokazuje linearni porast anodnog strujnog odziva povećanjem koncentracije analita.
- Provedbom različitih razrjeđenja (DF) na cikličke voltamograme uzoraka dodataka prehrani mogu se jasno uočiti najniži i najviši strujni odzivi te je za daljnju analizu izabran DF 10.
- Kod cikličkih voltamograma realnog uzorka prije i nakon dodatka standarda primjećuje se odsustvo katodnog strujnog odziva te se uočava značajni porast anodnog strujnog odziva realnog uzorka koji se odnosi na oksidaciju kafeina prisutnog uzorku dodatka prehrani.
- Ciklička voltimetrija pokazala se primjenjivom na identifikaciji i kvantifikaciji kafeina u uzorku dodatka prehrani jer je u skladu s deklariranim sadržajem

7. LITERATURA

- Amare M, Aklog S: Electrochemical Determination of Caffeine Content in Ethiopian Coffee Samles Using Lignin Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of analytical Methods in Chemistry* 2017:3979068, 2017. (<https://doi.org/10.1155/2017/3979608>)
- Banković J: Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje polifenolnih jedinjenja u odabranim biljnim čajevima. Diplomski rad. Prirodno-matematički fakultet, Niš, 2016.
- Bhawani SA, Fong SS, Mohamed NI: Spectrometric Analysis of Caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry* 2015: 7, 2015.
- Butorac A, Marić M, Badnjak Sablović M, Hruškan M, Rimac Brnčić S, Družina Bačun V: Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 8 : 90-101, 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.
- Corciova A, Ivanescu B: Determination of caffeine content from different pharmaceutical and natural products. *Europen chemical Bulletin* 5: 138-141, 2016.
- Farghaly OA, Hameed RSA, Abu-Nawwas AAH: Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. *International Journal of Electrochemical Science* 9: 3287-3318, 2014.
- 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.
- Ivančić AL: Analiza udjela kofeina u energetske napitcima i učestalost konzumiranja istih od strane rekreativaca. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.
- Jakobek Barron L: Predavanja – Instrumentalne metode II, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Jašić M, Begić L, Mujagić Z, Grujić S: Derivati ksantina u hrani. Tehnologija hrane, 2009. <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/derivati-ksantina-hrani> (4.9.2020.)
- Marković T, Radaković S, Pavlica M: Uticaj pijenja kafe na kardiovaskularni sistem. Vojnomedicinska akademija, ZPM – Institut za higijenu, Beograd, Srbija i Crna Gora, 2003.
- Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilnik o hrani za posebne prehrambene potrebe*. Narodne novine 81/04, 2004.

- Patil NP,: caffeine in various samples and their analysis with HPLC – A Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16, 2012, 76-83.
- Piljac I: Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Media Print, Zagreb, 2010.
- 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.
- 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.
- 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, Tadesse A, Saini R.C., Pal R: Cyclic Voltammetric Investigation of Caffeine at Anthraquinone ModifiednCarbon Paste Electrode. *International Journal of Electrochemistry* 2013:7, 2013.
- Taletović A, Banjanin B, Poljaković M, Srabović M, Vuković S: Optimizacija izolacije, identifikacije i karakterizacija kofeina iz različitih supstrata. *Vox Scientiae PHARM-HEALTH* 2:1,2014.
- 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.
- WEB 1:<https://siol.net/digisvet/nasveti/vse-o-belem-prahu-ki-nas-lahko-naredi-pametnejse-hitrejse-lazje-452103> 31.08.2020
- 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.