



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Saša Mićin

**VOLTAMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA GLAVNIH
POLIFENOLA U VINU POMOĆU ELEKTRODE OD
UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANE NANOČESTICAMA
 TiO_2**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Saša Mićin

**VOLTAMETRIC CHARACTERIZATION OF MAIN
POLYPHENOLS IN WINE USING MODIFIED CARBON
PASTE ELECTRODES WITH TiO₂ NANOPARTICLES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SAŠA MIĆIN

**VOLTAMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA GLAVNIH
POLIFENOLA U VINU POMOĆU ELEKTRODE OD
UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANE NANOČESTICAMA
 TiO_2**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis

Prof. dr. sc. Sanja Martinez

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

SAŠA MIĆIN

**VOLTAMETRIC CHARACTERIZATION OF MAIN
POLYPHENOLS IN WINE USING MODIFIED CARBON
PASTE ELECTRODES WITH TiO₂ NANOPARTICLES**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Dr. Nadica Ivošević DeNardis, Ph.D.

Prof. Sanja Martinez, Ph.D.

Zagreb, 2025.

Bibliografski podaci

- ❖ UDK:
 - ❖ Znanstveno područje: Prirodne znanosti
 - ❖ Znanstveno polje: Kemija
 - ❖ Znanstvena grana: Primjenjena kemija
 - ❖ Institucija: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za elektrokemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
 - ❖ Voditelj rada: Prof. dr. sc. Sanja Martinez, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; dr.sc. Nadica Ivošević DeNardis, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
 - ❖ Broj stranica: 172
 - ❖ Broj slika: 58
 - ❖ Broj tablica: 22
 - ❖ Broj priloga: 64
 - ❖ Broj literaturnih referenci: 231
 - ❖ Datum obrane:
 - ❖ Sastav povjerenstva za obranu:
-
- ❖ Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 23. ožujka 2020., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana 26. svibnja 2020.

Stranica s informacijama o mentorima

SAŽETAK

Ciljevi ovog doktorskog rada su razvoj ugljikove elektrode modificirane s TiO_2 nanočesticama (engl. *modified carbon paste electrode, MCPE*) za definiranje elektrokemijskih karakteristika glavnih polifenolnih spojeva prisutnih u vinima te razvoj algoritma za matematičku obradu podataka kao temelja elektrokemijskog senzora za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnog sastava vina. U prvom dijelu doktorskog rada ispitan je utjecaj vrste i količine veziva i modifikatora na fizičko-kemijske i elektrokemijske karakteristike elektrodnog materijala. Elektrodni materijal pripremljen je od grafitnog praha te modificiran nanočesticama TiO_2 uz dodatak tekućih ugljikovodika kao vezivnog sredstva. Primjenom bulk i površinskih tehnika provedena je karakterizacija MCPE. Rezultati su pokazali da elektrodni materijal postaje kompaktniji povećanjem udjela vezivnog sredstva, te da nema značajnijih morfoloških promjena s povećanjem udjela nanočestica TiO_2 , koje su gotovo homogeno raspoređene u grafitnom površinskom materijalu. Modificirana ugljikova pasta s 40 vol.% parafinsko ulje i 6-8 tež.% nanočestica TiO_2 odlikuje se najnižom vrijednošću specifične otpornosti, najmanjom hrapavosti površine, te je dobiven najizraženiji stupanj reverzibilnosti u odnosu na standardni reverzibilni redoks sustav $[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-/4-}$.

U drugom dijelu doktorskog rada ispitane su elektrokemijske karakteristike odabranih modelnih polifenolnih spojeva (galna kiselina, kofeinske kiselina, katehina, kvercetina resveratrola) primjenom voltametrijskih metoda na MCPE (sastava: 40 vol.% parafinskog ulja i 8 tež.% nanočestica TiO_2). Analizom voltametrijskog odziva ispitivanih analita, određeni su kinetičkih parametri oksidacije analita na elektrodi, linearni raspon detekcije analita, granica detekcije i granica kvantifikacije analita, ispitana je stabilnost, ponovljivosti i selektivnosti primijenjene elektrode u odnosu na odabrani analit. U cilju poboljšanja obrade voltamograma, procjena standardnog potencijala oksidacije odabranog analita provedena je matematičkom obradom cikličkih voltamograma. Rezultati su pokazali da primjenom MCPE dobiven je izraženiji strujni odziv, niska vrijednost pozadinske struje, selektivnost i mogućnost detekcije vrlo niskih koncentracija analita uz stabilnost, reproducibilnost mjerenja. Vrijednosti procijenjenog potencijala oksidacije pojedinih modelnih otopina polifenolnih spojeva kreću se u rasponu od 0.39 V do 0.48 V, dok je proces kontroliran adsorpcijom. Elektrooksidaciju modelnih otopina galne kiseline, katehina, kvercetina i resveratrola karakterizira ireverzibilnost za razliku od kofeinske kiseline koja pokazuje reverzibilnost procesa.

U trećem dijelu doktorskog rada provedena je elektrokemijska karakterizacija sedam odabranih prirodnih uzoraka vina (sorte bijelih, roze i crnih) te je predložen algoritam za matematičku obradu podataka. Voltamogrami prirodnih uzoraka vina ukazuju na ireverzibilnost elektrooksidacije polifenolnih spojeva u vinu, s procijenjenim potencijalom u rasponu od 0.40 V do 0.82 V.

Elektrokemijska karakterizacija uzoraka bijelih vina pokazala je nižu koncentraciju polifenolnih spojeva u odnosu na crne i roze sorte, gdje dolazi do pomaka potencijala elektrooksidacije prema pozitivnijim vrijednostima zbog kompleksnosti smjese. Rezultati su pokazali da MCPE pruža poboljšani i ponovljivi voltametrijski odgovor galne kiseline u uzorcima vina i što čini dobru osnovu za daljnji razvoj integriranog sustava senzora/podataka s mogućnošću šire primjene u vinarstvu u smislu određivanja galne kiseline kao važnog parametra za aromu vina.

Ključne riječi: AFM, amperometrijski senzor, analiza vina, ciklička voltametrija, modificirana ugljikova elektroda, nanočestice TiO₂, polifenoli, SEM-EDS

ABSTRACT

The aims of this doctoral thesis are to develop a modified carbon paste electrode with TiO₂ nanoparticles (MCPE) to determine the electrochemical characteristics of the most important polyphenolic compounds in wines and to develop an algorithm for mathematical data processing as the basis for an electrochemical sensor to identify and quantify the polyphenolic composition of wine. In the first part of the doctoral thesis, the influence of the type and content of binders and modifiers on the physico-chemical and electrochemical characteristics of the electrode material was investigated. The electrode material was prepared from graphite powder modified with TiO₂ nanoparticles with the addition of liquid hydrocarbons as binder material. The MCPE was characterized using both bulk and surface techniques. Results showed that the electrode material becomes more compact with increasing amount of binder material and that there are no significant morphological changes with increasing amount of TiO₂ nanoparticles, which are almost homogeneously distributed in the surface material of the graphite. The results show that the modified carbon paste with 40 vol.% paraffin oil and 6-8 wt.% TiO₂ nanoparticles has the lowest resistivity value, the lowest surface roughness, and the most pronounced degree of reversibility compared to the standard reversible redox system ($[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-/4-}$) in the electrode material.

In the second part of the doctoral thesis, the electrochemical characteristics of selected model polyphenolic compounds (gallic acid, caffeic acid, catechin, quercetin, resveratrol) were tested on MCPE (composition: 40 vol.% paraffin oil and 8 wt.% TiO₂ nanoparticles) using voltammetric methods. By analyzing the voltammetric response of the analytes, the kinetic parameters of the oxidation of the analyte at the electrode, the linear range of analyte detection, the detection limit and the limit of quantification of the analyte were determined and the stability, reproducibility and selectivity of the electrode used in relation to the selected analyte were tested. To improve the processing of the voltammograms, the evaluation of the standard oxidation potential of the selected analyte was carried out by mathematical processing of the cyclic voltammograms. The results showed that MCPE is characterized by a more pronounced current response, stability, reproducibility, low background current, selectivity and the ability to detect very low concentrations of the analytes. The values of the estimated oxidation potential of individual model solutions of polyphenolic compounds are in the range of 0.39 V to 0.48 V, while the process is controlled by adsorption. The electrooxidation of model solutions of gallic acid, catechin, quercetin and resveratrol is characterized by irreversibility, unlike caffeic acid, which is reversible process.

In the third part of the thesis, the electrochemical characterization of seven selected commercial wine samples (white, rosé and red wine) was performed and an algorithm for mathematical data processing

was proposed. The voltammograms of the commercial wine samples indicate the irreversibility of electrooxidation of polyphenolic compounds in wine, with an estimated potential in the range of 0.40 V to 0.82 V. The electrochemical characterization of the white wine samples showed a lower concentration of polyphenolic compounds compared to the red and rosé varieties, where the electrooxidation potential shifted towards more positive values due to the complexity of the mixture. The results showed that MCPE provides an improved and reproducible voltammetric response of gallic acid in wine samples and provides a good basis for the further development of an integrated sensor/data system. Such a system facilitates broader applications in winemaking in terms of determining gallic acid, as an important parameter for wine aroma.

Key words: AFM, amperometric sensor, analysis of wine, cyclic voltammetry, modified carbon electrodes, nanoparticles of TiO₂, polyphenols, SEM-EDS

SADRŽAJ

1. UVOD.....	13
2. PREGLED LITERATURE.....	16
2.1. Kemijski sastav vina.....	16
2.1.1. Fenolni spojevi.....	21
2.2. Elektrokemijske metode.....	25
2.2.1. Elektrode na bazi ugljika.....	26
2.2.2. Nanočestice TiO ₂	29
2.2.3. Ugljikove elektrode modificirane nanočesticama TiO ₂	29
2.3. Analiza polifenola.....	31
3. MATERIJALI I METODE.....	35
3.1. Kemikalije i prirodni uzorci vina.....	35
3.2. Priprema ugljikove elektrode.....	35
3.3. Instrumenti i analitički postupci.....	37
3.3.1. Postupci fizičko-kemijske karakterizacije elektrode.....	37
3.3.2. Elektrokemijska karakterizacija materijala elektrode.....	39
3.3.3. Elektrokemijska karakterizacija polifenolnih spojeva.....	40
3.3.4. Elektrokemijska karakterizacija prirodnih uzoraka vina.....	42
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	43
4.1. Fizičko-kemijske karakteristike elektrodnog materijala.....	43
4.1.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	43
4.1.2. Energetska disperzivna analiza (EDS)	47
4.1.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM)	53
4.1.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).....	59
4.1.5. Specifični električni otpor elektrodnog materijala.....	61
4.2. Elektrokemijske karakteristike modificirane ugljikove elektrode.....	62
4.2.1. Ciklička voltametrija.....	62
4.3. Elektrokemijska karakterizacija modelnih polifenolnih spojeva.....	67
4.3.1. Galna kiselina.....	67
4.3.2. Kofeinska kiselina.....	74
4.3.3. Katehin	78

4.3.4. Kvercetin	84
4.3.5. Resveratrol	90
4.4. Elektrokemijska karakterizacija prirodnih uzoraka vina.....	95
5. ZAKLJUČAK.....	105
6. POPIS LITERATURE.....	106
7. PRILOZI.....	125
8. ŽIVOTOPIS.....	172

1. UVOD

Jedna od najstarijih namirnica koja se koristi u ljudskoj prehrani je vino, s poviješću dugom 8000 godina. Vino je alkoholno piće složenog kemijskog sastava nastalo fermentacijom grožđa iz vinove loze (lat. *Vitis Vinifera*). Vino sadrži organske kiseline, alkohole i druge hlapljive spojeve, ugljikohidrate, suhu tvar, minerale, komponente dušika, polifenolne spojeve i sortne arome. Brojna istraživanja pokazala su pozitivan utjecaj konzumacije vina u odgovarajućim količinama na ljudsko zdravlje. Polifenolni spojevi prisutni u vinima pomažu aktivaciji antioksidativnih i protuupalnih mehanizama, odnosno posjeduju antiradikalno i antioksidativno djelovanje. Također inhibiraju agregaciju trombocita, smanjuju rizik od srčanih bolesti i moždanog udara te sudjeluju u sintezi estrogena. Osim toga, utječu na staničnu aktivnost u krvnim žilama, uglavnom u endotelu, i smanjuju proliferaciju stanica [1-3].

Potreba za kontrolom procesa proizvodnje i kvalitete vina, kao i spoznaja o utjecaju na ljudsko zdravlje, doveli su do razvoja i primjene različitih analitičkih metoda za određivanje kemijskog sastava te antioksidativnih i antiradikalnih svojstava polifenolnih spojeva u vinima. Standardne metode ispitivanja polifenolnih spojeva uključuju kolorimetrijske, gravimetrijske, sedimentacijske i kromatografske metode [4]. U novije vrijeme sve se više koriste tehnike vibracijske spektroskopije, elektrokemijske metode, spektrometrija masa, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije i površinska plazmonska rezonancija [5-8]. Prednosti primjene elektrokemijskih metoda u odnosu na druge metode ogledaju se u jednostavnosti postupka koji ne zahtijeva složenu predobradu uzorka, brzom vremenu odziva, niskoj cijeni te visokoj osjetljivosti i selektivnosti. Unatoč tome, ove metode nisu razvijene do razine koja bi omogućila širu primjenu u proizvodnji vina.

Početak razvoja elektrokemijskih senzora temeljenih na ugljikovim materijalima započeo je pedesetih godina prošlog stoljeća. U usporedbi s drugim vrstama elektrodnih materijala, elektrokemijske senzore izrađene od ugljikove paste karakterizira mogućnost primjene u širokom rasponu potencijala, niska vrijednost rezidualne struje, specifične površinske karakteristike, niski troškovi proizvodnje, jednostavnost pripreme, minimalna razina toksičnosti i široke mogućnosti kemijskih i bioloških modifikacija. U cilju poboljšanja prijenosa mase ili smanjenja ograničenja prijenosa elektrona na površini elektrode istražene su modifikacije ugljikove paste s različitim dodacima modifikatora, stabilizatora, katalizatora, medijatora kako bi se postigla specifična uloga [9]. Prednost modificiranih ugljikovih elektroda u odnosu na makroelektrode ogleda se u znatno većoj specifičnoj površini, izraženom adsorpcijskom kapacitetu, kemijskoj inertnosti, toplinskoj stabilnosti, netoksičnosti, dobroj biokompatibilnosti, povećanom transportu mase te mogućnosti kvalitetne interpretacije mehanizma prijenosa elektrona i elektrokatalize. Elektrokemijski senzori modificirani

nanočesticama raznih metala, metalnih oksida i nanomaterijala na bazi ugljika pokazali su poboljšane elektrokemijske karakteristike u usporedbi s nemodificiranim ugljikovim elektrodama [10].

S obzirom na specifična svojstva, nanočestice TiO_2 predstavljaju vrlo atraktivan modifikator. Imaju kemijsku, fotokemijsku i netoksičnu stabilnost, visoku inertnost, biokompatibilnost, nisku cijenu, visoku vodljivost, veliku specifičnu površinu i optičku prozirnost.

Ugljikove elektrode modificirane nanočesticama TiO_2 našle su vrlo široku primjenu u elektroanalitičkim metodama za određivanje raznih anorganskih, organskih i bioloških tvari [11,12]. Do sada je nedovoljno istražena primjena ugljikove elektrode modificirane nanočesticama TiO_2 kao elektrokemijskog senzora za određivanje polifenolnih spojeva prisutnih u vinu.

Ciljevi ovog doktorskog rada su razvoj ugljikove elektrode modificirane s TiO_2 nanočesticama za definiranje elektrokemijskih karakteristika glavnih polifenolnih spojeva prisutnih u vinima te razvoj algoritma za matematičku obradu podataka kao temelja elektrokemijskog senzora za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnog sastava vina. Na temelju literaturnog pregleda dosadašnjih istraživanja i definiranja ciljeva doktorskog rada postavljene su hipoteze istraživanja:

- Ugljikova elektroda modificirana nanočesticama TiO_2 , koja će biti rezultat predloženog ispitivanja, pokazat će bolja elektrokemijska svojstva u odnosu na dosad ispitivane elektrode.
- Poboljšane elektrodne karakteristike ogledat će se u izraženijem odzivu struje, stabilnosti, obnovljivosti, niskom intenzitetu pozadinske struje, selektivnosti i mogućnosti detekcije vrlo niskih koncentracija analiziranih analita, što će omogućiti bolju analizu antioksidativnog kapaciteta vina od onih koje osiguravaju trenutne elektrokemijske metode.
- Detaljna usporedba odziva antioksidativnih standarda i prirodnih polifenola s odzivom uzoraka vina biti će omogućena ne samo naprednim karakteristikama razvijene elektrode već i primjenom matematičke obrade cikličkih voltamograma algoritmom posebno pogodnim za objektivnu ocjenu rezultata kod ireverzibilnih sustava kao što je vino.
- Novorazvijena elektroda i algoritam za obradu podataka činit će cjelinu koja predstavlja osnovu za senzor polifenola u vinu.

U prvom dijelu doktorskog rada proveden je razvoj i karakterizacija modificiranih ugljikovih elektroda u smislu njenih fizičko-kemijskih, i elektrokemijskih karakteristika ovisno o izboru vezivnog sredstva i poluvodičkih svojstava nanočestica TiO_2 u cilju kvalitativnog i kvantitativnog određivanja polifenolnih spojeva. U drugom dijelu doktorskog rada provedeno je ispitivanje elektrokemijskih karakteristika odabranih modelnih polifenolnih spojeva (galne kiseline, kofeinske kiselina, katehina, kvercetina, resveratrola) primjenom voltametrijskih metoda na modificiranoj ugljikovoj elektrodi odabranih karakteristika. Ispitivanje elektrokemijskih karakteristika modelnih polifenolnih otopina na modificiranoj ugljikovoj elektrodi uključivalo je analizu voltametrijskog

odgovora analita, određivanje kinetičkih parametara reakcije analita na elektrodi, određivanje linearnog raspona detekcije analita, određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije analita, ispitivanje stabilnosti, ponovljivosti i selektivnosti primijenjene elektrode u odnosu na analizirani analit. Procjena standardnog potencijala modelnih polifenolnih spojeva provedeno je matematičkom obradom cikličkih voltamograma za pojedine ispitivane tvari. Treći dio istraživanja uključivao je detaljnu analizu i usporedbu elektrokemijskog odgovora komercijalno dostupnih uzoraka vina i modelnih otopina polifenola, te prijedlog algoritma za matematičku obradu podataka.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Kemijski sastav vina

Vino je fermentirano piće koje se dobiva od grožđa, a njegov složeni sastav ovisi o raznim faktorima poput vrste grožđa, tla, klime, metodi fermentacije i procesu starenja. Ova raznolikost rezultira različitim aromama, okusima i teksturama, a sve to proizlazi iz kompleksnih kemijskih interakcija između organskih i anorganskih spojeva. Vino posjeduje specifične fizičko-kemijske karakteristike koje dodatno oblikuju njegovu jedinstvenost a koja je podložna promjenama u vremenu. Osnovne tehnološke faze procesa proizvodnje vina uključuju pripremu vinskog mošta (soka), alkoholno vrenje vinskog mošta i odležavanje (čuvanje) vina. Uobičajeno, vino sadrži oko 86 % vode, 12 % etanola, 1.0 % glicerola i polisaharida ili drugih elemenata u tragovima, 0.5 % raznih kiselina i 0.5 % hlapljivih komponenti. Glavni kemijski spojevi u vinu su organske kiseline, alkoholi, ugljikohidrati, minerali, hlapljive tvari, dušikovi spojevi, sortne arome i fenolne komponente čiji sastav i omjer se mijenja tokom procesa proizvodnje vina [2]. U nastavku je naveden kemijski sastav vina detaljnije.

Organske kiseline prisutne u vinima imaju značajan utjecaj na sastav i organoleptička svojstva vina. Također utječu na mikrobiološku i fizikalnu kemijsku stabilnost vina. Prema podrijetlu organske kiseline prisutne u vinima dijele se na organske kiseline porijeklom iz grožđa i organske kiseline koje nastaju tijekom procesa fermentacije. Vinska, jabučna, limunska, glukonska, galaktarna, kumarinska, kofeinska i kumaril vinska kiselina ubrajaju se u skupinu glavnih organskih kiselina podrijetlom iz grožđa. Drugu skupinu glavnih organskih kiselina prisutnih u vinu, koje nastaju tijekom procesa fermentacije, čine pirogroždana, mliječna, jantarna, octena, fumarna, oksalno octena i citramalna kiselina. Većina glavnih organskih kiselina prisutnih u vinu, bez obzira na podrijetlom, imaju polifunkcionalnu molekularnu strukturu i mogu se klasificirati kao hidroksi kiseline. Ova kemijska struktura uvjetuje polarne i hidrofilne karakteristike, što rezultira dobrom topljivošću u vodi kao i dobrom kemijskom reaktivnošću. S obzirom na kemijsku strukturu, karakterizira ih prisutnost jednog ili više asimetričnih ugljikovih atoma, što je karakteristika biološki važnih molekula [2]. Koncentracija organskih kiselina u vinu ovisi o nekoliko čimbenika kao što su vrsta grožđa, način pripreme mošta, korišteni kvasci, proces fermentacije i način na koji vino odležava [13]. S obzirom na složenost čimbenika koji utječu na količinu organskih kiselina prisutnih u vinu, raspon koncentracija organskih kiselina prisutnih u vinu iznosi od 0.01-4.5 gL⁻¹ [14].

Alkoholi prisutni u vinu su etil alkohol, metil alkohol, alkoholi višeg vrenja, ostali alkoholi i poliolli. Najzastupljeniji alkoholni sastojak vina je etilni alkohol koji je nastao u procesu alkoholnog

vrenja šećera u vinskom moštu. Količina etilnog alkohola u vinu općenito je oko 100 gL^{-1} (12.6 vol. %). U nekim slučajevima koncentracija etilnog alkohola kreće se i do 136 gL^{-1} (16 vol. %). Metilni alkohol je prisutan u vrlo malim količinama i ne utječe na organoleptička svojstva vina. Prisutni metilni alkohol nastaje isključivo na temelju enzimske hidrolize metoksilne skupine pektina tijekom fermentacije. Izobutilni (metil-2-propanol-1) i amilni alkoholi (mješavina metil-2-butanol-1 i metil-3-butanol-1) predstavljaju najzastupljenije alkohole u vinu. Karakterizira ih intenzivan miris koji utječe na aromu. Od ostalih alkohola identificiranih u vinu značajniju ulogu imaju heksanoli i heksenoli. Poliolli predstavljaju specifičnu skupinu šećernih alkohola nastalih katalitičkom hidrogenacijom ugljikohidrata. Iz ove skupine alkohola identificirani su glicerol, butandiol-2,3, eritritol, arabitol, manitol, sorbitol i mezo inozitol [2]. Na prisutnost i koncentraciju alkoholnih spojeva uveliko utječu vrsta i kvaliteta polazne sirovine, primijenjeni proizvodni proces te način i vrijeme skladištenja. Koncentracija alkoholnih spojeva u vinu iznosi od 0.2 do 100 gL^{-1} [15].

Hlapljive spojeve predstavljaju masne kiseline, esteri i razni drugi spojevi. Identificiran je veliki broj različitih masnih kiselina, od kojih je octena kiselina najvažnija. One pokazuju značajan utjecaj na proces vrenja tijekom procesa proizvodnje vina, a zbog sadržaja većeg broja različitih alkohola i kiselina u vinu je prisutan i veći broj različitih esterskih spojeva. Esteri u vinu nastaju procesima enzimske reakcije tijekom procesa fermentacije i kemijske esterifikacije tijekom konzerviranja i skladištenja. S obzirom na izraženu koncentraciju etanola i octene kiseline, ester koji je najčešće prisutan u vinu je etil acetat koji je nastao djelovanjem aerobnih octenih bakterija tijekom starenja vina. Osim etil acetata u vinu prisutni su i drugi esteri etanola i masnih kiselina, uglavnom etil kaproat i etil kaprilat koji nastaju pod utjecajem kvasca tijekom alkoholnog vrenja. Octeni esteri viših alkohola kao što su izoamil acetat i feniletal acetat prisutni su u umjerenim količinama. Imaju značajan utjecaj na organoleptička i senzorna svojstva vina [16]. Tijekom procesa starenja, odnosno "odležavanja" vina, odvijaju se procesi kemijske esterifikacije zbog prisutnosti raznih kiselina i veće koncentracije etanola. Ovisno o sastavu i starosti samog vina ovisi i ukupna koncentracija estera (nastalih kemijskim ili enzimskim reakcijama) u vinu [2]. Od ostalih hlapljivih komponenti koje nastaju u procesu proizvodnje vina su aldehidi, ketoni, acetali i laktoni. U ovu skupinu spojeva mogu se svrstati i hlapljivi fenolni spojevi, derivati sumpora i terpeni. Zbog značajnog utjecaja na senzorska svojstva vina, fenoli su posebno obrađeni u poglavlju 2.2. Derivati sumpora odgovorni su za aromatske karakteristike, dok prisutni terpeni doprinose sortnim aromama karakterističnim za različite sorte grožđa. U vinima je prisutan veliki broj aldehydskih i ketonskih spojeva, od kojih najvažniju ulogu ima etanal (acetaldehyd). Etanal pokazuje značajan utjecaj na organoleptička i senzorna svojstva vina. Prisutnost etanala zbog reakcije oksidacije etanola usko je povezana s redoks procesima [2]. Od aromatskih aldehyda prisutni su vanilin, heksenal i heksenol. Identificirano je i

nekoliko spojeva s ketonskom strukturom (acetilmetil karbinol, diacetil, merkaptopentanon). Pronađeno je nekoliko različitih spojeva s aldehidnim i ketonskim funkcionalnim skupinama, poput glioksala, metil glioksala i hidroksipropandijala. Reakcije između aldehida i alkohola prisutnih u vinu dovode do stvaranja acetala. Sama reakcija acetalizacije je reverzibilna i sa stajališta kinetike odvija se sporo. Vodikovi ioni djeluju katalitički na reakciju acetalizacije. Prisutni acetali utječu na aromatičnost vina. Laktoni su ciklički esteri koji se mogu smatrati produktom kondenzacije alkoholne skupine i karboksilne kiseline u istoj molekuli [17]. Laktoni nastali tijekom fermentacije utječu na aromatske karakteristike vina. Najizraženija je prisutnost γ -butirolaktona u koncentracijama mgL^{-1} . Mogu potjecati i od grožđa gdje utječu na aromu sorte. U vinima su prisutni i drugi laktoni čije su ukupne koncentracije reda veličine nekoliko desetaka mgL^{-1} , što je značajno više od granice detekcije [2].

Proces fotosinteze dovodi do stvaranja disaharida (uglavnom saharoze) koji tijekom sazrijevanja grožđa procesom hidrolize proizvode monosaharide (uglavnom glukozu i fruktozu). Proces fermentacije pretvara monosaharide u alkohol (etanol) i ugljikov dioksid. Kada je proces vrenja spor i pri kraju, preostale količine glukoze i fruktoze u vinu su vrlo male ($\approx 1.0 \text{ gL}^{-1}$). Pretežno je zastupljena fruktoza jer je glukoza podložnija procesu fermentacije. Procesom intramolekularne hemiacetalizacije (reakcija aldehidnih i alkoholnih funkcionalnih skupina) monosaharida nastaju različiti optički aktivni oblici piranoze također prisutni u vinu. Osim uloge u proizvodnji alkohola, šećeri su prekursori organskih kiselina, fenola i aromatskih aminokiselina. Svi šećeri prisutni u moštu nisu sposobni za fermentaciju. Određene pentoze (arabinoza, ramnoza, ksiloza) prisutne su u vinu i nakon procesa fermentacije [18]. Kvalitativni i kvantitativni sastav šećera prisutnih u vinu ovisi o više različitih čimbenika, koji uključuju vrstu grožđa, odnosno polazne sirovine, način pripreme mošta (groždanog soka), provođenje procesa fermentacije i odležavanja, odnosno skladištenja. Sadržaj pentoza u vinu kreće se u rijetkim slučajevima od 0.3 do 2.0 gL^{-1} . Najzastupljenije pentoze su L-arabinoza, D-ksiloza (u količinama od nekoliko tisuća mgL^{-1}), D-riboza, L-ramnoza i metilirane pentoze (u koncentracijama od oko 100 mgL^{-1}). Također su identificirani različiti disaharidi u niskim koncentracijama (melibioza, maltoza, laktoza, rafinoza, trehaloza, saharoza). Koncentracija prisutnih polisaharida kreće se od nekoliko stotina miligrama do nekoliko grama po litri.

Ukupni suhi ekstrakt ili suha tvar predstavlja nehlapljivu frakciju koja je prisutna kao prava ili koloidna otopina u fizičkim uvjetima u kojima se priroda tih tvari ne mijenja. Suhi ekstrakt u vinu sastoji se od nehlapljivih organskih tvari i mineralnih spojeva [2]. Mineralne tvari uglavnom se nalaze u krutim dijelovima zrna grožđa i u peteljicama, dok su u vinu prisutne u obliku soli anorganskih i organskih kiselina (vinske, jabučne, mliječne) [19]. Anorganski anioni prisutni u vinu su kloridi s koncentracijom $<50 \text{ mgL}^{-1}$ izraženi u natrijevom kloridu, sulfati s koncentracijom $100\text{--}400 \text{ mgL}^{-1}$

izraženi u kalijevom sulfatu i fosfati čiji je sadržaj veći u crnim vinima u odnosu na bijela vina (u bijelim vinima 70-500 mgL⁻¹ fosfata, u crnim vinima 150-1000 mgL⁻¹). Ostale anorganske tvari prisutne u tragovima uključuju bromide, jodide i fluoride, kao i silicijevu i bornu kiselinu. Anorganski kationi u vinu su kalij (0.5-2.0 gL⁻¹), kalcij (80-140 mgL⁻¹ za bijela vina), magnezij (60-150 mgL⁻¹) i mangan (1.0-3.0 mgL⁻¹), dok su željezo i bakar prisutni u malim količinama [2].

Dušikovi spojevi prisutni u vinu uključuju razne anorganske i organske spojeve. Dušikovi anorganski spojevi u obliku amonijačnih soli najzastupljeniji su u grožđu u fazi vegetativnog rasta. Zbog biokemijskih procesa tijekom zrenja grožđa i fermentacije soka od grožđa, prisutne soli amonijaka prelaze u složenije oblike organskih dušikovih spojeva. Prisutnost anorganskih spojeva dušika u vinu može se očitovati kao sadržaj u sedimentu nakon procesa starenja vina. Organske spojeve dušika čine aminokiseline, oligopeptidi, polipeptidi, proteini, amidni dušik (dušikovi amidi), bioamini, nukleinski dušik, aminošećeri i pirazini. U vinima su identificirane 32 aminokiseline čija je molekulska masa <200 daltona. Karakteriziraju ih antioksidativna, antimikrobna, površinski aktivna i emulgirajuća svojstva. Ukupno koncentracija slobodnih aminokiselina je u rasponu od 1.0-4.0 gL⁻¹ [2]. Vezivanjem aminokiselina peptidnom vezom nastaju oligopeptidi i polipeptidi, a sadrže najviše četiri aminokiseline i molekulska masa je manja od 10000 daltona, te su važni za senzorna svojstva vina. Povezivanjem velikog broja aminokiselina nastaju makromolekularne strukture proteina molekulske mase 30000-150000 Da. Osim peptidne veze, karakteriziraju ih i druge veze s frakcijama ugljikohidrata (manoprotein kvasca, izolektin). Iz skupine primarnih amida [20-22] u manjim količinama prisutni su asparagin i glutamin, dok se u ovoj skupini spojeva nalaze i urea i etil karbamat. Istraživanja su pokazala da je prosječna koncentracija uree i etil karbamata u vinu 1.0 mgL⁻¹, odnosno 7.7 µgL⁻¹ [23].

Biogeni amini (bioamini) predstavljaju jednu od klasa biogenih tvari nastalih kao posljedica uticaja klimatskih i bioloških procesa koji se odigravaju u okolišu [24]. Klasa bioamina (R – NH₂) uključuje organske baze s alifatskom, aromatskom ili heterocikličkom strukturom koje su prisutne u mnogim fermentiranim namirnicama. Nastaju procesom dekarboksilacije aminokiselina ili aminacijom i transaminacijom aldehida i ketona. Ova skupina spojeva uključuje histamin, serotonin, tiramin, feniletilamin, triptamin kao i alifatske poliamine [25]. Ovisno o vrsti mikroorganizama i aminokiselina prisutnih u vinskom moštu tijekom procesa fermentacije nastaju različiti bioamini. Koncentracija bioamina u vinu je reda veličine nekoliko desetaka mgL⁻¹. S obzirom da imaju štetno djelovanje na ljudsko zdravlje, dopuštena koncentracija bioamina, zakonski je regulirana.

Nukleinski dušik su spojevi prisutni u vinu koji u svojoj strukturi imaju dušik, a sastoje se od purinskih, pirimidinskih baza, nukleozida, nukleotida i nukleinske kiseline [2]. Procesom fosforilacije nukleozidi se pretvaraju u nukleotide. Istraživanja su identificirala i kvantificirala različite nukleotide

i nukleozide prisutne u vinima. Koncentracija ukupnih nukleotida je do 3.0 mgL^{-1} [26,27]. Dušikovi spojevi prisutni u vinu pripadaju dušičnim šećerima, postoji manja količina glukozamina i galaktozamina, a prisutni derivati pirazina koji imaju značajan utjecaj na aromu sorte vina.

Aromatična svojstva vina jedan su od najvažnijih čimbenika kvalitete vina. Aroma vina sastoji se od stotina različitih organskih spojeva prisutnih u koncentracijama od nekoliko miligrama do nekoliko nanograma. Na kompleksnost arome vina utječu različiti čimbenici kao što su vrsta vina, sorta grožđa, tlo na kojem se vinova loza uzgaja, kvasci koji se koriste za vrenje, proces vrenja, odležavanja i punjenje u boce. Općenito, mogu se razlikovati sortne arome, arome fermentacije i arome nastale tijekom procesa starenja vina.

Najizraženiji doprinos aromi vina daju tzv. fermentacijske arome proizvedene ili otpuštene tijekom procesa fermentacije. Ova skupina spojeva uključuje različite više alkohole, estere i hlapljive masne kiseline prisutne u vinu.

Arome koje nastaju u procesu odležavanja rezultat su samog procesa odležavanja (oksidacije), kontakta sa sedimentom i utjecaja materijala od kojeg su izrađene posude u kojima se odležava, dok u isto vrijeme dolazi do gubitka sortnih i fermentacijskih aroma te stvaranja novih aroma [28, 29].

Sortne arome uključuju terpenoide (izoprenoide), metokspirazine i tiole koji potječu od prekursora prisutnih u grožđu i moštu, koji djelovanjem mikroorganizama prelaze u arome i nazivaju se aromatičnim sortnim spojevima jer potječu iz vinove loze. Terpenoidi predstavljaju klasu prirodnih organskih spojeva i procjenjuje se da postoji od 25000 do 55000 izoprenoida [30]. Najvažniji izoprenoidi za aromu vina su monoterpenoidi, seskviterpenoidi, norisoprenoidi. U vinu je prisutno oko 50 različitih monoterpenoida [31] od kojih su najvažniji linalol, (E)-hotrienol, citronelol, terpineol, geraniol, nerol i rose oksid.

Osim hlapljivih monoterpenoida, potvrđena je prisutnost nehlapljivih frakcija monoterpenoida u obliku glikozida uključujući glukozu, arabinozu, ramnozu i apiozu u vinu [28]. Sljedeća važna skupina terpenoida prisutnih u vinu i karakterističnog utjecaja na aromu vina predstavljaju norisoprenoidi. Oksidativna razgradnja karotenoida prisutnih u grožđu uzrokuje različite produkte kao što su izoforon, safranal, dihidroaktinidiolid i inorizoprenoide [32] od kojih norisoprenoidi imaju izražene karakteristike mirisa. Zasebnu skupinu norisoprenoida predstavljaju ne megastigmatični spojevi koji imaju različite strukturne karakteristike [33]. Pojedine vrste vina karakteriziraju tzv. herbalne (vegetativne) arome koje značajno utječu na senzorne karakteristike vina. Glavni izvori ovih aroma su metokspirazini koji su prisutni u niskim koncentracijama ($1.0\text{-}2.0 \text{ ngL}^{-1}$). S obzirom na kemijsku strukturu, metokspirazini su heterociklički spojevi s atomima dušika u cikličkom prstenu, nastali metabolizmom aminokiselina [34].

Na organoleptička svojstva vina značajno utječu spojevi koji sadrže sulfhidrilnu (tiolnu, -SH) skupinu vezanu na ugljikov atom. Hlapljive spojeve s tiolnom funkcionalnom skupinom dijelimo na vrlo hlapljive spojeve koji negativno utječu na aromu i slabo hlapljive koji pozitivno utječu na aromu vina. Nisko hlapljivi spojevi uključuju tzv. voćni (sortni) hlapljivi tioli. Koncentracije sortnih tiola pronađenih u vinima su reda veličine nanograma po litri [28].

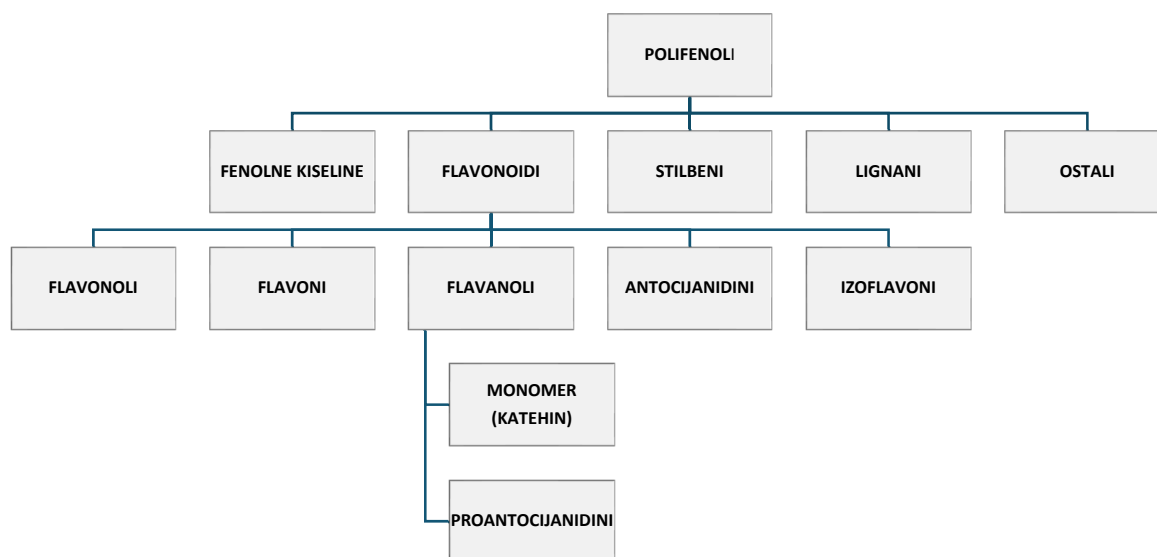
2.1.1. Fenolni spojevi

Različiti fenolni spojevi koji su prisutni u vinima utječu značajno na fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva vina. Harborn i Simond predložili su klasifikaciju fenolnih spojeva na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli (Slika S1) [35].

Spojevi s velikim brojem fenolnih strukturnih jedinica, prirodnog, sintetskog ili polusintetskog podrijetla, nazivaju se polifenolima. Prema Bate-Smithu i Swainu, polifenoli su u vodi topivi fenolni spojevi s molekularnom težinom između 500 i 3000 Da. Pokazuju uobičajene fenolne reakcije i imaju sposobnost taloženja alkaloida, želatine i drugih proteina iz otopine [36]. Haslam je proširio definiciju Bate-Smitha i Swaina navodeći da su polifenoli spojevi topljivi u vodi koji imaju molekularnu težinu u rasponu od 500 do 3-4000 Da i da na svakih 1000 Da posjeduju 12 do 16 hidroksi fenolnih skupina na 5 do 7 aromatskih prstenova te pokazuju mogućnost taloženja nekih alkaloida, želatine i drugih proteina iz otopine [37]. S obzirom da gornja definicija ne uključuje kompleksiranje polifenola s drugim biomolekulama, Quido navodi da polifenoli podrazumijevaju sekundarne metabolite biljaka koji potječu isključivo iz fenilpropanoida a koji potječu iz shikimatnih i/ili poliketidnih prekursora, sadrže više od jednog fenolnog prstena i lišeni su bilo koje funkcionalne skupine koja se temelji na dušiku u svojim najosnovnijim strukturnim izrazima [38]. Klasifikacija polifenola temelji se na mjestu nastanka, rasprostranjenosti u prirodi, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Predloženo je nekoliko različitih klasifikacija na temelju kemijske strukture (slika 1).

Polifenoli prisutni u vinu pripadaju skupini prirodnih (biljnih) polifenola. Pokazuju biološku aktivnost uključujući pozitivne učinke na ljudsko zdravlje i značajno pridonose kvaliteti vina. Oni također utječu na senzorne karakteristike kao što su izgled, boja, trpkost, gorčina, okus i stabilnost tijekom kasnijih oksidativnih procesa. Klase polifenolnih spojeva prisutnih u vinu mogu se podijeliti na neflavonoidne i flavonoidne tvari. U skupinu neflavonoida spadaju fenolne kiseline, derivati fenolnih kiselina i stilbenoidi [2,39,40]. Uobičajena podjela fenolnih kiselina prisutnih u vinu je na benzojeve kiseline prema C6-C1 strukturi i cimetne kiseline sa C6-C3 strukturom. Ovi spojevi se pretežno nalaze u obliku hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline [41]. Hidroksicimetne

kiseline su u slobodnom obliku prisutne u malim količinama. Uglavnom se esterificiraju vinskom kiselinom.



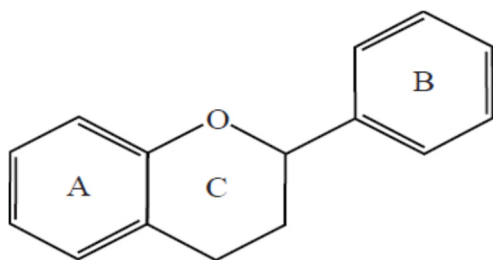
Slika 1. Klasifikacija polifenolnih spojeva na temelju kemijske strukture [42].

Pod utjecajem mikroorganizama i načina skladištenja vina, fenolne kiseline mogu biti prekursori za stvaranje različitih hlapljivih spojeva čija je prisutnost utvrđena u vinu. Prosječna koncentracija fenolnih kiselina i derivata fenolnih kiselina prisutnih u vinu je 100-200 mgL⁻¹ za crna vina i 10-20 mgL⁻¹ za bijela vina [2].

Stilbeni su klasa polifenolnih spojeva čija kemijska struktura sadrži dva aromatska prstena povezana etenskim ili možda etilenskim mostom. Identificirani su u lišću vinove loze i kožici grožđa, a tijekom prerade prelaze u vino. Najčešće identificirani stilben je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) čija je sinteza odgovor na biotičke i abiotičke agense. U vinima su identificirani resveratroli različitih strukturnih oblika. Ukupna koncentracija svih oblika resveratrola kretala se od 6.9 do 13.8 mgL⁻¹, a karakterizira ih širok raspon kemopreventivnih učinaka na različite bolesti kao i potencijalnih terapijskih svojstava [43].

Drugu skupinu velikog broja različitih polifenolnih spojeva prisutnih u vinu čine tzv. flavonoidne tvari. Ovu skupinu spojeva čine flavonoidi i tanini [2,41]. Flavonoidi predstavljaju klasu polifenolnih spojeva, prirodnog podrijetla, koje karakterizira osnovna kemijska struktura s 15 ugljikovih atoma. Sastoji se od dva aromatska prstena povezana lancem od 3 ugljikova atoma (C6-C3-C6) (Slika 2), koji u nekim spojevima može biti i dio trećeg aromatskog prstena. Klasifikacija flavonoida temelji se na molekularnoj strukturi, stupnju oksidacije i stupnju nezasićenosti. Klase

flavonoida prisutnih u vinu uključuju flavonole, flavone, flavanonole, flavanone, flavanole i antocijane [2,41,44].



Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida

Glavni flavonoli prisutni u vinu su miricetin, kvercetin, kemferol, izorhamnetin i siringetin. Kvercetin se pretežno nalazi u glikozidnom obliku (kvercetin 3-o-glukozid). Oni utječu na boju vina i imaju važnu ulogu u stabilizaciji mladih vina kroz kopigmentaciju s antocijanima. Također imaju važnu ulogu u senzornim karakteristikama kao što su trpkost i gorčina. Količina flavonola prisutna u vinu je prosječno 60 mgL^{-1} [41,45-47]. Takođe, u vinima su identificirani izomeri flavonola (izoflavonoli), u obliku glukozida, glukuronida, galaktozida i diglikozida [48].

Najizraženiji predstavnici flavona koji se nalaze u vinu su apigenin i luteolin. Identificirane ukupne količine flavona u crvenim vinima kreću se od 1.7 do 8.7 mg ekvivalenata galne kiseline po kg (mg/GAE/kg) [45].

U glavne predstavnike flavanonola svrstavaju se, dihidrokvercetin (taksifolin) i dihidromiricetin, često u obliku ramnoze (dihidrokvercetin 3-ramnoza) [45]. Prema literaturnim podacima količina dihidrokvercetin ramnoze u vinu kreće se od 0.7 do 13 mgL^{-1} , dok je prosječna koncentracija 3.0 mgL^{-1} [49].

U vinima su identificirani spojevi koja se svrstavaju u skupinu flavanona i veći broj derivata ove podskupine flavonoida. Glavni predstavnici flavanona prisutnih u vinu su naringenin čija koncentracija u vinu doseže do 25 mg kg^{-1} i hespertin [45].

Dva glavna flavanola prisutna u crvenim vinima su (+) katehin i (-) epikatehin. Katehini se uglavnom nalaze u obliku aglikona ili su esterificirani galnom kiselinom, pri čemu mogu tvoriti polimere (proantocijanidine). Pokazuju izražen utjecaj na senzorne karakteristike (trpkost, gorčina) vina. Koncentracija flavanola u bijelim vinima kreće se od 15 do 25 mgL^{-1} , dok u crnim vinima iznosi od 4.0 do 120 mgL^{-1} [48,50].

Antocijanini (antocijani) su tvari odgovorne za crvenu boju grožđa i crnih vina, koja se u vinu mijenja ovisno o pH, koncentraciji sumpor dioksida i kopigmentima. Sastoje se od dvije komponente, aglikonske (antocijanidin) i šećerne komponente, pri čemu su u obliku antocijanskih glikozida

(antocijanini) znatno stabilniji u odnosu na oblik aglikona (antocijanidin). U vinima je identificirano pet antocijanidina: delfinin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin. Koncentracija antocijana kreće se od 90 do 400 mgL⁻¹ i do više od 700 mgL⁻¹ u crnim vinima duljeg vremena odležavanja [2,51].

Tanini su polifenolni sekundarni metaboliti viših biljaka u obliku galoil estera i njihovih derivata u kojima su galoil dijelovi ili njihovi derivati vezani za mnoge jezgre poliola, katehina i triterpenoida (galotanini, elagitanini, kompleksni tanini), ili su oligomerni i polimerni proantocijanidini koji mogu imati različite interflavanilne veze i supstitucijske obrasce (kondenzirani tanini) [52]. Tanini prisutni u vinu općenito se klasificiraju u dvije skupine: hidrolizabilni tanini (topivi tanini) i kondenzirani tanini.

Topivi tanini uglavnom potječu iz hrastovog drveta koji se koristi za skladištenje vina, dok kondenzirani tanini (polimeri flavanola) dolaze iz grožđa. U skupinu tanina koji se mogu hidrolizirati spadaju galotanini i elagitanini koji oslobađaju galnu i elaginsku kiselinu. Glavni predstavnici elagitanina (podrijetlom iz hrasta) su veskalgin, kastalagin, grandinin i roburin [3]. Sadržaj topivih tanina u vinu kreće se od 0.4 do 50 mgL⁻¹ [53].

Kondenzirani tanini su polimeri flavanola u kojima su osnovne strukturne jedinice katehini i epikatehini. Ovi spojevi također su poznati kao procijanidini. Osnovne strukturne jedinice ne mogu se smatrati taninima zbog njihove niske molekularne težine i vrlo ograničenih karakteristika u usporedbi s proteinima. Stabilno vezanje na proteine moguće je kada su osnovne jedinice u obliku dimera, trimera, oligomera i kondenziranih procijanidina. Dimerni procijanidi A2 i B1 – B3 te nekoliko trimernih procijanidina identificirani su u vinu [2,54] pri čemu su najčešće prisutni kondenzirani procijanidini i katehini. Prirodni kondenzirani tanini mogu se naći u vinima u koncentracijama od 1.2 do 3.3 gL⁻¹ [53].

Polifenolni spojevi prisutni u vinu značajno utječu na organoleptička i senzorna svojstva vina. Osim toga, polifenoli imaju pozitivan učinak na bolesti povezane s oksidativnim stresom, kao što su kardiovaskularne bolesti, tumori, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, osteoporoza i alergijske bolesti. Također, polifenoli inhibiraju agregaciju trombocita, smanjuju rizik od srčanih bolesti i moždanog udara te sudjeluju u sintezi estrogena. Takođe, utječu na staničnu aktivnost u krvnim žilama, uglavnom u endotelu, i smanjuju proliferaciju stanica [55]. Veza konzumacija vina sa smanjenjem rizika od određenih bolesti (Francuski paradoks) objašnjava se prisutnošću polifenolnih spojeva u vinu, kojima se pripisuje širok raspon bioloških aktivnosti [56] i niski stupanj bioraspoloživosti. Pozitivan učinak polifenola na ljudsko zdravlje temelji se na antiradikalnom ili antioksidativnom djelovanju (inhibiraju oksidaciju lipida) [57]. Međutim, novija istraživanja ukazuju na kontradiktorne rezultate ispitivanja između in vitro istraživanja pojedinih polifenolnih spojeva ili smjesa i in vitro istraživanja provedenih s produktima metabolizma polifenolnih tvari koje nastaju u

ljudskom tijelu [58]. Pretpostavka je da polifenolne tvari imaju nisku razinu izravnog antioksidativnog učinka u ljudskom organizmu, a da metaboliti koji nastaju konzumiranjem hrane bogate polifenolima imaju značajnu pozitivnu ulogu. Također je utvrđen pozitivan utjecaj ukupne frakcije polifenolnih spojeva na ljudsko zdravlje [59, 60].

2.2. Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode spadaju u elektroanalitičke metode koje omogućuju kvantitativnu i kvalitativnu karakterizaciju kemijske tvari u uzorku. Prednosti primjene elektrokemijskih metoda u odnosu na druge metode ogleda se u jednostavnosti postupka koji ne zahtijeva složenu predobradu uzorka, brzom vremenu odziva, niskoj cijeni te visokoj osjetljivosti i selektivnosti [6].

Jedna od važnijih elektrokemijskih metoda je voltametrijska metoda u kojima je pobuda električni napon na radnu elektrodu (živina elektroda, elektroda od plemenitih metala, elektrode od ugljika ili ugljikove paste), dok je odziv, električna struja. S obzirom na oblik i vremensku ovisnost pobudnog signala, razlikujemo voltametriju s linearnom promjenom potencijala, cikličku voltametriju, pulsnu voltametriju, diferencijalnu pulsnu voltametriju, voltametriju s pravokutnim izmjeničnim pobudnim signalom (eng. square wave voltammetry) i voltametriju mikročestica (eng. *voltammetry of microparticles*, *VMPs*) [61].

Ciklička voltametrija jedna je od najčešće korištenih elektrokemijskih tehnika u istraživanju elektrokemijskih procesa, za kvantitativnu i kvalitativnu analizu i određivanje kinetičkih parametara procesa. Specifično, kod cikličke voltametrija primjenom linearno promjenjivog potencijala na elektrokemijski sustav mjeri se rezultirajuća struje. Potencijal se mijenja na ciklički način, uzrokujući da analit prolazi kroz redoks reakcije na radnoj elektrodi. Dobiveni odziv u odnosu na primijenjeni potencijal, tvori ciklički voltamogram s karakterističnim vrhovima kod određenih potencijala što se pripisuje procesima oksidacije i redukcije analita na elektrodi. Iz analize cikličkog voltamograma u smislu potencijala vrha strujnog vala, odnosno potencijal na polovici visine vala i vrijednost strujnog vala voltamograma dobivaju se informacije o koncentraciji reduciranog analita u otopini elektrolita, broju izmijenjenih elektrona po čestici, površini radne elektrode i faktorima koji određuju brzinu difuzije (gradijent koncentracije uz površinu elektrode) [61]. Teorijski temelji voltametrije temelje se na formalizmima Butler-Volmer i Marcus-Hush, koji sadrže osnovne mehaničke principe vezane uz međufazne fenomene [62]. Espinoza i sur. [63] predložili su primjenu prve i druge derivacije cikličkih voltamograma kao metode matematičke analize koja omogućuje preciznije određivanje minimuma, maksimuma i točaka infleksije složenih odziva ireverzibilnih sustava te fizikalnu interpretaciju koja uzima u obzir utjecaj površine elektrode i medija na elektronska svojstva analita.

2.2.1. Elektrode na bazi ugljika

Elektrode na bazi ugljikove paste (engl: carbon paste electrode, CPE) pripremljene su kao binarna mješavina ugljikovih materijala s vezivnim sredstvima. Ugljični materijali zastupljeni su u raznim oblicima kao što su grafitni prah, acetilenska čađa, koloidni grafit, dijamant, aktivni ugljen, prirodni ugljen, stakleni ugljik, fuleren C-60, ugljikove nanocijevi, ugljikovi nanorogovi (eng. *carbon nanohorns*), porozna ugljikova pjena, porozne ugljikove mikrosfere, mezoporozni ugljik, ugljikove nanočestice, ugljikova nanovlakna i grafen. Zbog različitih strukturnih karakteristika, kemijske stabilnosti, površinske aktivnosti i jakih veza unutar kemijske strukture, elektrodni materijali na bazi ugljika pokazuje različita fizikalna i kemijska svojstva [9].

Najčešće korišten materijal za izradu ugljikove elektrode je grafit (grafitni prah). Grafit ima dobru vodljivost električne struje i topline. Komercijalno dostupan grafitni prah odlikuje se veličinom čestica od 100 nm do nekoliko desetaka mikrometara, ujednačenošću raspodjele veličine čestica, niskim afinitetom adsorpcije prema kisiku i visokim stupnjem čistoće [64].

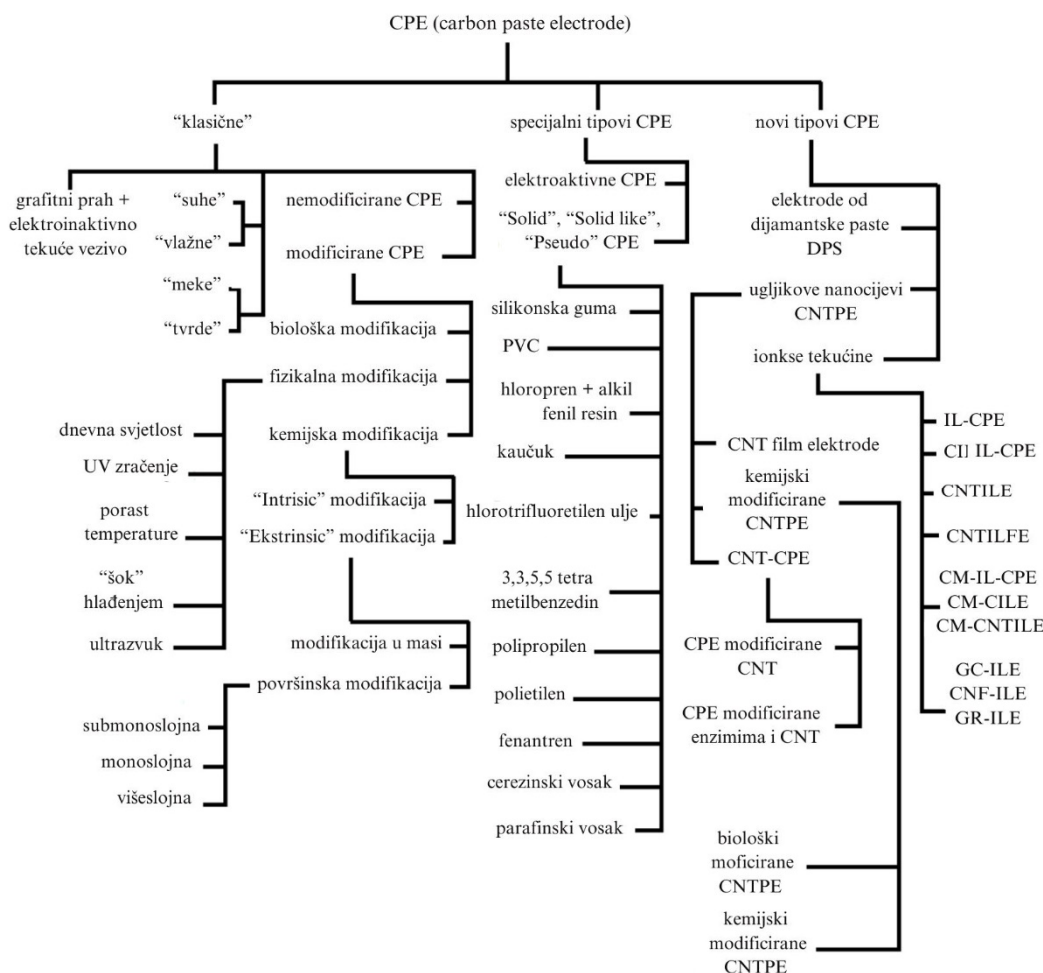
Za veziva se koriste parafinsko ulje (mješavina tekućih alifatskih ugljikovodika), alifatski i aromatski ugljikovodici, silikonsko ulje, silikonska mast, halogenirani ugljikovodici, tri-krezil fosfat, dioktil ftalat, di-izo- nonil ftalat, difenil eter, glicerol, ricinusovo ulje, vazelin, ionske tekućine i ugljikovo ionske tekućine. Tražene karakteristike veziva su netopljivost u analiziranoj otopini, nizak tlak pare i elektrokemijska inertnost u ispitivanom potencijalnom intervalu [9, 64].

Najčešće korišteno vezivno sredstvo u elektrokemijskim senzorima na bazi ugljikovih materijala je mješavina tekućih alifatskih ugljikovodika (parafinsko ulje) [65]. Karakterizira ga visoka kemijska stabilnost, elektronska neaktivnost, a međudjelovanje s elektroaktivnim tvarima prisutnim u elektrolitu na elektrokemijski aktivnoj površini elektrode i u masi elektrode pretežno je fizičke prirode. Zbog električne nevodljivosti veziva, kinetika prijenosa elektrona je usporena i javljaju se pozadinske struje zbog prisutnosti kisika adsorbiranog u ugljičnoj pasti ili otopljenog u elektrolitu [66].

Reakcijska smjesa 3-metilfenil bis(4-metilfenil) fosfata, bis(3-metilfenil) 4-metilfenil fosfata i tris(3-metilfenil) fosfata (trikrezol fosfata) tipičan je predstavnik elektroaktivnih veziva. Pokazuje sposobnost protoniranja organofosfatnih molekula u kiselim sredinama, što rezultira kationima s izraženim lipofilnim karakteristikama. U tom obliku sudjeluje u procesima ionske izmjene ili sparivanja iona i tvori relativno stabilne elektroaktivne ionske parove [66, 67].

Prednosti ugljikovih elektroda ogledaju se u njihovoj primjeni u širokom rasponu potencijala, niskoj pozadinskoj struji, jednostavnosti izrade, malom električnom otporu te mogućnosti raznih kemijskih modifikacija [68]. Interakcija odabranog analita na ugljikovoj elektrodi temelji se na

Faradejskim procesima prijenosa mase i elektrona. Elektrode na bazi ugljika (slika 3) s obzirom na fizikalno-kemijske karakteristike ugljikovih materijala i veziva, konzistencija dijelimo ih na nemodificirane i modificirane ugljikove elektrode.

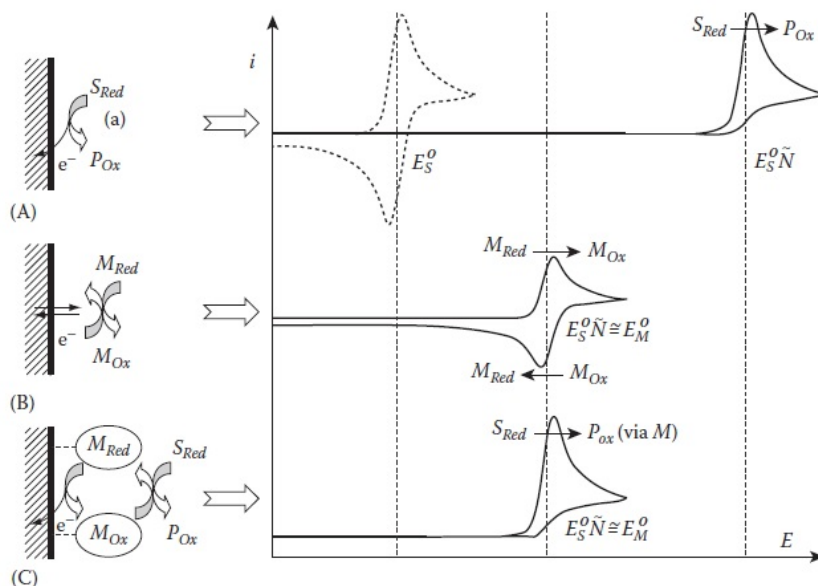


Slika 3. Klasifikacija ugljikovih elektroda [9]

Ovisno o svojstvima modifikatora, modificirane ugljikove elektrode dijele se na kemijski modificirane, biološki modificirane i modifikacije temeljene na fizikalnim procesima [9]. Poboľšanja modificiranih elektroda u usporedbi s nemodificiranim elektrodama temelje se na mogućnosti primjene u širokom rasponu potencijala, visokoj elektrokatalitičkoj aktivnosti, stabilnosti [69], povećanju brzine prijenosa elektrona i smanjenju prenapona elektrokemijskog procesa [70]. S obzirom na veliki izbor modifikatora, podjela kemijski modificiranih elektroda temelji se na njihovim fizikalnim i kemijskim karakteristikama te mogu biti anorganski, organski i organometalni materijali. Svaka od osnovnih kategorija sadrži nekoliko potkategorija [9]. U dosadašnjim istraživanjima u literaturi ispitana je primjena modificiranih ugljikovih elektroda u elektroanalitičkim metodama [71],

u raznim područjima kao što su elektrokataliza [72], istraživanje kinetike mehanizma prijenosa elektrona [73], membranskih barijere [74], elektroorganske sinteze, te za određivanje bioloških komponenti [70].

Ugljikove elektrode modificirane nanočesticama svrstavaju se u skupinu kemijski modificiranih elektroda s često primjenjivanim modifikatorima, podskupinu elektroda modificiranih nanomaterijalima. Elektrode od ugljikove paste modificiranim nanomaterijalima pronašli su vrlo široku primjenu u elektroanalitičkim metodama analize različitih tvari biološkog podrijetla, farmaceutskih spojeva i zagađivala okoliša [75]. Prednost elektroda modificiranih nanočesticama u odnosu na makroelektrode ogleda se u znatno većoj specifičnoj površini, izraženoj adsorpcijskoj sposobnosti, kemijskoj inertnosti, toplinskoj stabilnosti, netoksičnosti, dobroj biokompatibilnosti, utjecaju na povećanje transporta mase, utjecaju na mehanizam prijenosa elektrona i elektrokatalizu [76]. Prisutnost modifikatora omogućuje interakciju između modifikatora i supstrata (ugljikove paste), što utječe na imobilizaciju i predkoncentraciju (akumulaciju) analita na površini elektrode, te elektrokatalizu elektrokemijske reakcije tj. ubrzanje prijenosa elektrona. Imobilizacija reaktanata omogućuje generiranje elektrokemijski aktivnih produkata, zaštitu i stabilizaciju površine elektrode i odgovarajuće promjene fizičkih i kemijskih karakteristika površine ugljikove elektrode.



Slika 4. Shematski prikaz elektrokatalize s modifikatorima A) izravna oksidacija reduciranog supstrata u produkt oksidacije B) elektrokemijski redoks proces modifikatora karakteriziran brzom kinetikom prijenosa elektrona C) elektrokatalitička transformacija reduciranog supstrata u produkt oksidacije, gdje je modifikator imobiliziran na površini elektrode [9].

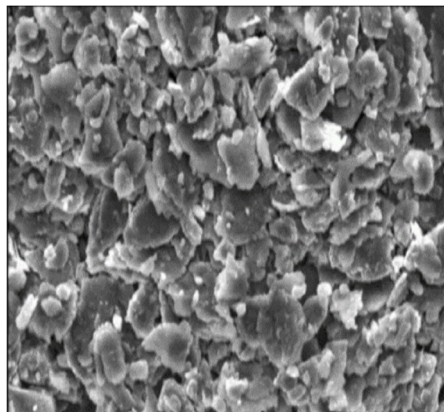
Elektrokatalitički aktivna površina elektrode utječe na poboljšanje prijenosa elektrona prema analitu, što se može očitovati u obliku generiranja elektroaktivnosti supstrata na primijenjenom potencijalu, poboljšanja elektrokemijskog signala, odvajanja preklapanja signala i eliminacija smetnji, te povećanje linearnih dinamičkih raspona i granica detekcije. Slika 4. shematski prikazuje glavne mehanizme elektrokatalize pomoću modifikatora.

2.2.2. Nanočestice TiO_2

Nanočestice TiO_2 smatraju se dobrim modifikatorom s obzirom na njihova specifična svojstva. Imaju kemijsku, fotokemijsku i netoksičnu stabilnost, visoku inertnost, biokompatibilnost, nisku cijenu, visoku vodljivost, veliku specifičnu površinu i optičku prozirnost. S obzirom na električna svojstva, TiO_2 je n-tip poluvodiča koji pokazuje dobru optičku propusnost u području infracrvenog zračenja. Ima jednostavnu elektroničku strukturu s ispunjenom valentnom zonom i praznom zonom provođenja [77]. U posljednje vrijeme posebnu pozornost privlače neporozne nanočestice TiO_2 za pripremu elektroda. Osim prirodnih kristalnih oblika poznat je i niz sintetiziranih kristalnih struktura TiO_2 . S gledišta morfoloških karakteristika, dobiveni su različiti nanostrukturni oblici TiO_2 u obliku sfernih nanočestica, poliedarskih nanočestica, nanožica, nanovlakana, nanoploča i nanocijevi [78]. Kao modifikator najčešće se koriste nanočestice TiO_2 koje imaju anatazni oblik tetragonalne kristalne forme. Često korišten, komercijalno dostupan referentni materijal za proučavanje mehanizama, procesa i materijala su nanočestice TiO_2 pod nazivom Evonik Aeroxid P25 (ranije Degusa P25), koje predstavljaju nanočestice TiO_2 , višefaznog sastava u omjeru, 77 % anataza, 16 % rutila i 7 % amorfno TiO_2 [79].

2.2.3. Ugljikove elektrode modificirane nanočesticama TiO_2

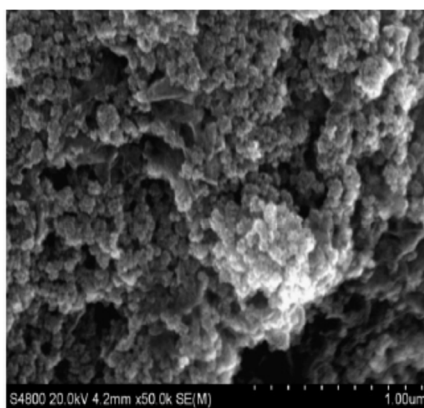
Trenutna primjena ugljikovih elektroda modificiranih nanočesticama TiO_2 u elektroanalitičkim tehnikama ogleda se u korištenju elektrodnog materijala za izradu radne elektrode i elektrokemijsku karakterizaciju različitih anorganskih, organskih i bioloških tvari [80]. Elektrokemijske senzore na bazi ugljikove paste modificirane nanočesticama TiO_2 koji se koriste za kvantitativnu i kvalitativnu analizu biološki aktivnih tvari karakterizira dobra osjetljivost, selektivnost ispitivanih tvari, reproducibilnost i ponovljivost uz nisku granicu detekcije [81,82].



Slika 5. SEM slika ugljične elektrode modificirane nanočesticama TiO₂ [83].

Amperometrijski senzori na bazi ugljikove paste i nanočestica TiO₂ pokazuju visoku razinu biokompatibilnosti i stabilnosti. Zahvaljujući svojim specifičnim fizikalnim, kemijskim, optičkim, elektronskim i fotokatalitičkim svojstvima, našli su široku primjenu u određivanju kemijskih tvari u vodenim otopinama. Aktivni elektrodni materijal može biti izrađen od različitih oblika ugljikovog materijala te s dodatkom različitih vrsta veziva te nanočesticama TiO₂ u ulozi modifikatora [84-87]. Mogućnost praktične primjene modificirane ugljikove elektrode s nanočesticama TiO₂ za elektroanalitičke svrhe u značajnoj mjeri ovisi o fizikalno-kemijskim i elektrokemijskim karakteristikama elektrodne paste. S obzirom na heterogeni sastav ugljikove paste, karakteristike materijala elektrode ovise o vrsti i veličini čestica ugljičnog materijala [88-91], vrsti veziva [92], modifikatoru, načinu pripreme [93] kao i omjeru ugljični materijal/vezivo/modifikator [94]. Rezultati istraživanja pokazali su da nanočestice TiO₂ u ulozi modifikatora utječu na morfološka svojstva površine elektrode [95] kao i na povećanje broja adsorpcijskih mjesta na elektroaktivnoj površini [96]. Također, značajan utjecaj na karakteristike signala voltametrijskog odziva pokazuje omjer ugljikov materijal/vezivo/np TiO₂ [96]. Pokazalo se da udio veziva i nanočestica TiO₂ u materijalu elektrode dovodi do promjena u električnim karakteristikama elektrode [97]. Zima i suradnici uočili su da vezivno sredstvo, osim svoje vezivne uloge, također ima utjecaj na elektrokemijske procese koji se odvijaju na površini elektrode [98]. Istraživanja elektrokemijskog ponašanja ugljikovih elektroda modificiranih nanočesticama TiO₂ pokazala su da pokazuju bolje elektrokemijske karakteristike u usporedbi s nemodificiranim ugljičnim elektrodama [99]. Nanočestice TiO₂ koje imaju mezoporoznu strukturu od posebne su važnosti zbog svojih morfoloških karakteristika [100]. Ugljikove elektrode modificirane mezoporoznim TiO₂ nanočesticama pokazuju bolje elektrokemijske karakteristike zbog znatno veće aktivne površine mezoporoznih TiO₂ nanočestica u odnosu na TiO₂ nanočestice koje nemaju mezoporoznu strukturu [101] te izražene adsorpcijske karakteristike [102]. Provedena istraživanja ugljikovih elektroda na bazi mješavine grafitnog praha i

ionskih tekućina s nanočesticama TiO_2 ukazuju na prisutnost elektrokatalitičkog učinka tijekom elektrooksidacije analita [103]. Ispitivanja su također provedena na modificiranim ugljikovim elektrodama gdje se osnovna matrica elektrode sastojala od grafitnog praha i različitih oblika nanočestica ugljika i TiO_2 [104]. Kompoziti nanočestica TiO_2 i ugljikovih nanocijevi (Slika 6) posjeduju specifična svojstva kao što su velika specifična površina i elektrokatalitički karakter, što ih čini pogodnima za imobilizaciju biomolekula pa se može smatrati kao biosenzor [105] te kao katalizator za heterogenu katalizu [106]. Ispitivanja kompozita grafena i nanočestica TiO_2 ukazuju na povećanje brzine fotokatalitičke reakcije [107].



Slika 6. SEM slika nanokompozita nanočestica TiO_2 i grafena [108].

Još uvijek nisu definirane općeprihvaćene metode za karakterizaciju nemodificiranih i modificiranih ugljikovih elektroda te određivanja njihovog optimalnog sastava. Švancara i Schachl predložili su postupak za karakterizaciju elektroda od nemodificiranog ugljičnog materijala. Postupak karakterizacije osniva se na određivanju fizičko-kemijskih i elektrokemijskih karakteristika i specifičnih karakteristika (interakcije s ugljikovom pastom, promjena površinskih karakteristika) ugljikove elektrode. Također predloženi su modelni sistem za karakterizaciju ugljikove elektrode pomoću voltametrije [109]. Mikysek i suradnici predložili da se određivanje omskog otpora i kvalitativnog indeksa ugljikove paste može koristiti za optimizaciju postupka pripreme elektrode [110].

2.3. Analiza polifenola

Do sada je u literaturi istražena karakterizacija polifenola u smislu identifikacije, kvantifikacije, određivanje antioksidativnih i antiradikalnih karakteristika te ispitivanje kinetike i mehanizma elektrooksidacije polifenola primjenom standardnih [111] i novijih metoda [112]. Kao standardne metode ispitivanja polifenolnih spojeva korištene su kolorimetrijske, gravimetrijske,

precipitacijske i kromatografske metode. Primjenom tekućinske kromatografije visoke preciznosti (HPLC) za separaciju polifenolnih spojeva u bijelim vinima u kombinaciji s UV i VIS spektrometrijom, Larauri i suradnici pokazali su mogućnost detekcije veoma niskih koncentracija različitih polifenolnih spojeva prisutnih u vinima [113]. Novije metode uključuju tehnike vibracijske spektroskopije, elektrokemijske metode, tehnike masene spektrometrije, spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije i površinsku plazmonske rezonancije. Palma i suradnici koristili su infracrvenu spektroskopiju s Furievom transformacijom za određivanje antioksidativnog kapaciteta komercijalno dostupnih tanina. Rezultati su pokazali slaganje primjenom drugih tehnika [114]. Istraživanja mehanizma i određivanje kinetičkih parametara elektrooksidacije katehina provedena su pomoću cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije [115]. Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija visoke rezolucije (^1H -NMR) pokazala se kao veoma brza tehnika s dobrom reproducibilnosti za određivanje sastava raznih sorta vina i geografskog porijekla [116]. Također su korištene kombinacije različite separacijske i spektrometrijske tehnike, kao što su kromatografija, elektroforeza, masena spektrometrija, nuklearna magnetska rezonancija [8,117-119]. Viera i suradnici koristili su tekućinsku kromatografiju u kombinaciji s masenom spektrometrijom za kvantitativnu i kvalitativnu analizu antocijanidnih i ne antocijanidnih polifenolnih spojeva u uzorcima palme jukara. Kombinacija primjenjenih metoda pokazala je visoku osjetljivost, preciznost i ponovljivost [120].

Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajan potencijal voltametrijskih tehnika (ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim pobudnim signalom, amperometrija) za analizu polifenolnih spojeva prisutnih u vinu [121]. Elektroaktivnost glavnih komponenti vina i osjetljivost na redoks reakcije (oksidacija fenola, sulfita, askorbinske kiseline, glutaciona, etanola, redukcija kisika, vodika, kinona, metalnih iona) korištena je za njihovu kvantifikaciju i identifikaciju, pri čemu izbor elektrodnog materijala ima vrlo važnu ulogu.

Nemodificirane elektrode na bazi ugljikovih materijala pokazale su se vrlo prikladnima za reverzibilnu oksidaciju fenolnih spojeva s orto-difenilnom (kateholnom) skupinom [122]. Karakterizira ih niska razina pozadinske struje koja nastaje oksidacijom etanola [123], kao i ovisnost oksidacijskog potencijala o pH vrijednosti elektrolita. Rezultati ispitivanja elektrokemijskih karakteristika strukturno različitih flavonoida pokazuju da se produkti elektrokemijske oksidacije polifenola adsorbiraju na površini elektrode [124]. Analiza ukupnih polifenola prisutnih u prirodnim uzorcima vina dobivenim cikličkom voltametrijom na nemodificiranoj ugljikovoj elektrodi pokazalo je dobro slaganje s analizom pomoću tekućinske kromatografije visoke preciznosti i diferencijalnom pulsnom voltametrijom [125-128]. Nemodificirane ugljične elektrode korištene su za elektrokemijsku karakterizaciju fenolnih kiselina i flavonoida [129], frakcija uzoraka vina dobivenih

semipreparativnom visokopreciznom tekućinskom kromatografijom [130], sadržaja polifenola u stvarnim uzorcima i polifenolnih spojeva tijekom procesa fermentacije mošta [131]. Pokazano je da vrijednosti vršnog potencijala anodne struje i Trolox ekvivalentnog antioksidativnog kapaciteta (TEAC) imaju dobro slaganje s polifenolima karakteriziranim dvostupanjskom reakcijom s kationskim radikalom ABTS [132]. Utvrđen je utjecaj kemijske strukture ispitivanih polifenolnih spojeva na oksidacijski potencijal [133] kao i odnos između antioksidativnog i prooksidativnog djelovanja i oksidacijskog potencijala [134]. Elektrokemijska karakterizacija flavonoida i kumarina pokazala su da oblik voltamograma izravno ovisi o relativnom položaju hidroksilnih skupina u molekuli [135]. Rezultati istraživanja ukazuju da se različitim skupinama polifenolnih spojeva mogu pripisati dobro definirani voltametrijski maksimumi koji omogućuju kvantitativnu analizu pojedinih polifenolnih skupina spojeva kao i ukupnih polifenola [136]. Osjetljivi i dobro definirani voltametrijski odgovori na oksidaciju polifenola u vinima dobiveni su pomoću diferencijalne pulsne voltametrije [137] i voltametrije s pravokutnim izmjeničnim pobudnim signalom [138]. Određeni polifenolni spojevi pokazali su tendenciju adsorpcije na površini radne elektrode, što otežava samu analizu [139].

Radi poboljšanja osjetljivosti i selektivnosti, polifenolni spojevi u vinu testirani su na modificiranim ugljikovim elektrodama s različitim organskim, anorganskim tvarima i nanočesticama. Pomoću voltametrijskih tehnika kao što su ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutno izmjeničnim pobudnim signalom i diferencijalna pulsna voltametrija, procijenjen je antioksidativnog potencijal vina [140] i te je provedena karakterizacija pojedinih polifenola [141-143]. Rezultati analize sadržaja ukupnih polifenola [144-146] imaju visok stupanj korelacije s rezultatima mjerenja spektrofotometrijskim metodama [147]. Oksidacijska struja višestruko je izraženija u usporedbi s strujnim odzivom nemodificiranih ugljičnih elektroda [148]. Korištenje vodljivog polimera poli-3,4-etilendioksitiofena (PEDOT) kao modifikatora pokazalo je povećanu razinu osjetljivosti kao i mogućnost detekcija niskih koncentracija katehina [149]. Ugljikove elektrode modificirane kompozitnim nanomaterijalima ukazuju na poboljšana svojstva materijala elektrode, koja se ogledaju u niskoj granici detekcije, širem linearnom rasponu, niskoj adsorpciji analita i niskom intenzitetu pozadinske struje [150]. Elektrode izrađene od ugljikove paste modificirane nanočesticama cerija [151], bizmuta [152] i željeznog oksida [153] korištene su kao senzor za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta i karakterizaciju određenih polifenolnih spojeva (galne kiseline, sinapinske kiseline, siringinske kiseline, rutina, kofeinske kiseline, kvercetina). Rezultati istraživanja ukazuju na poboljšana svojstva elektrode u usporedbi na nemodificirane elektrodama od ugljikove paste, kao što su osjetljivost, selektivnost, ponovljivost, reproducibilnost, širok linearni dinamički raspon. Provedena su određivanja sadržaja ukupnih polifenola, resveratrola i galne kiseline

korištenjem elektrode od ugljikove paste modificirane biološki aktivnim tvarima. Takve modificirane elektrode pokazale su dobar analitički odgovor, nizak limit detekcije i identifikacije kao i visok stupanj reproducibilnosti [154-156].

Prema dostupnim literaturnim podacima, kvalitativna, i kvantitativna karakterizacija polifenolnih spojeva u prirodnih uzorcima vina pomoću elektrode od ugljikove paste modificirane nanočesticama TiO_2 do sada nije dovoljno istražena. Taškurian i suradnici koristili su modificiranu elektrodu od ugljikove paste s nanočesticama TiO_2 za elektrokemijsku karakterizaciju galne kiseline korištenjem cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. Ispitivanja su pokazala manji otpor u prijenosu elektrona i značajno izraženiju vršnu struju oksidacije. Visoka analitička učinkovitost pripisana je dobroj biokompatibilnosti i visokoj vodljivosti nanočestica TiO_2 . Širina područja linearnog voltametrijskog odgovora i granica detekcije ukazuju na dobru osjetljivost elektrode [83].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i prirodni uzorci vina

Za pripremu radne elektrode korištene su komercijalno dostupne kemikalije: grafitni prah ekstra čistoće, veličina čestica $<50\text{ }\mu\text{m}$, CAS broj 7782-42-5, Merck, Njemačka; parafinsko ulje, CAS broj 8042-47-5, Merck, Njemačka; reakcijska smjesa 3-metilfenil bis(4-metilfenil) fosfata, bis(3-metilfenil) 4-metilfenil fosfata i tris(3-metilfenil) fosfata (trikrezol fosfata), CAS broj 1330-78-5, Merck; dietil eter, p.a., Lachner, Češka Republika; nanočestice TiO_2 (np TiO_2), komercijalni naziv AEROXIDE®TiO2P, Evonik Industries AG, Njemačka. Veličina nanočestica bila je u rasponu od 15 nm do 25 nm [79].

Elektrokemijska mjerenja provedena su u otopini elektrolita kalijevog heksacijanoferata(II) p.a., Kemika, Hrvatska; kalijev klorid, p.a., Kemika, Hrvatska.

Za karakterizaciju polifenolnih spojeva korištene su otopine: etil alkohol, 99.8 %, pa. LACH:NER, Češka Republika; vinska kiselina Sigma-Aldrich, Njemačka; natrijev hidroksid, LACH:NER, Češka Republika; (+)-katehin, CAS broj 154-23-4, Roth, Njemačka; kofeinska kiselina ($\geq 98\%$), CAS broj 331-39-5, Sigma-Aldrich, Njemačka; trans-resveratrol ($\geq 98\%$), CAS broj 501-36-0, Kajmanska kemikalija, SAD; kvercetin ($\geq 98\%$), CAS broj 117-39-5, Molekula grupa, Velika Britanija; galna kiselina (98 %), CAS broj 149-91-7, Acros organics, Belgija.

Za karakterizaciju prirodnih uzoraka vina korištene su 3 komercijalno dostupne vrste crnog vina (Cabernet Sauvignon, Rubin, Srbija, pH=3.41, konc. alkohola 13.5 vol. %; Merlot, 13. srpnja, Crna Gora, pH=3.19, koncentracija alkohola 13.5 vol. %, Vranac Vilarov, vinarija Stobi, Sjeverna Makedonija, pH=3.19, koncentracija alkohola 11.5 vol. %), 3 vrste bijelih vina (Temjanika, Tikveš, Sjeverna Makedonija, pH=3.14, koncentracija alkohola 11.5 vol. %, Graševina, Tikveš, Sjeverna Makedonija, pH=2.92, koncentracija alkohola 10.5 vol. %, Chardonnay, 13. srpnja, Crna Gora pH=3.07, konc. alkohola 12.5 vol. %) i 1 vrsta rose vina (Belrose Mediteranee Rose, Societe Fermiere des Grands crus de France, Francuska pH=3.1, konc. alkohola 12.5 vol. %).

Za pripremu mjernih otopina korištena je destilirana voda vodljivosti $4\text{ }\mu\text{S m}^{-1}$.

3.2. Priprema ugljikove elektrode

Pripremljeno je nekoliko vrsta modifikacija ugljikovih elektroda dispergiranjem smjese grafitnog praha i nanočestica TiO_2 u 50 mL dietil etera uz kontinuirano miješanje i zagrijavanje na temperaturi od 40°C . Nakon uparavanja dietil etera, dodano je tekuće vezivno sredstvo i) parafinsko ulje (PO), ii) tri-krezil fosfat (TCP) i iii) smjesa parafinsko ulje i tri-krezil fosfat (POTCP) (volumni

omjer PO : TCP, 1:1). Gustoće pojedinih komponenata za pripremu modificiranih ugljikovih elektroda prikazane su u tablici 1. Homogenizacija materijala provedena je ručnim miješanjem grafitnog praha i tekućeg veziva s keramičkim tučkom u keramičkoj zdjelici u trajanju od 2-3 minuta, uz tvz. „stiskanje materijala“ a zatim „struganje“ sa stijenki. Postupak se ponavlja tri puta uzastopno [9]. Pripremljene modificirane ugljikove paste pohranjene su u zatvorenoj plastičnoj kutiji na sobnoj temperaturi i korištene 24 sata nakon pripreme [93].

Tablica 1. Gustoća pojedinih komponenti korištenih za izradu modificirane ugljikove paste

Komponenta	Gustoća gcm ⁻³	Literaturni izvor
Grafitni prah	2.2	[157]
Parafinsko ulje	0.86	[158]
Trikrezol fosfat	1.14	[159]
nanočestice TiO ₂ (atanase forma)	3.894	[79]
nanočestice TiO ₂ (rutil forma)	4.25	[79]
nanočestice TiO ₂ *	3.96	

* izračunata gustoća na osnovu morfološkog sastava praha nanočestica TiO₂ (80 % anatase forma, 20 % rutil forma)

U cilju optimizacije postupka pripreme ugljikove elektrode, pripremljene su modificirane ugljikove elektrode različitog sastava i udjela veziva i udjela modifikatora tj. TiO₂ nanočestica.

Tablica 2. Ispitani sastavi modificiranih ugljikovih elektroda s obzirom na udio nanočestica TiO₂, i veziva PO i TCP.

nanočestice TiO ₂ [mas. %]	PO [vol. %]	TCP [vol. %]
	40	
4, 6, 8, 10, 12	10	
4, 6, 8, 10, 12	20	
4, 6, 8, 10, 12	30	
4, 6, 8, 10, 12	40	
4, 6, 8, 10, 12	50	
4, 6, 8, 10, 12	60	
		40
4, 6, 8, 10, 12		10

4, 6, 8, 10, 12		20
4, 6, 8, 10, 12		30
4, 6, 8, 10, 12		40
4, 6, 8, 10, 12		50
4, 6, 8, 10, 12		60
	20	20
4, 6, 8, 10, 12	5	5
4, 6, 8, 10, 12	10	10
4, 6, 8, 10, 12	15	15
4, 6, 8, 10, 12	20	20
4, 6, 8, 10, 12	25	25
4, 6, 8, 10, 12	30	30

Pripremljena modificirana ugljikova pasta utiskivana je u tijelo elektrode pri čemu je površina elektrode iznosila 4.52 mm². Aktivna površina elektrode polirana je pomoću filter papira kako bi se dobila glatka površina elektrode. Postupak utiskivanja nove količine paste i poliranja površine elektrode provodio se neposredno prije svakog mjerenja.

3.3. Instrumenti i analitički postupci

3.3.1. Postupci fizičko-kemijske karakterizacije elektrode

U cilju određivanja optimalnog sastava ugljikove elektrode s vezivnim sredstvom i nanočesticama TiO₂ kao modifikatorom, provedena je fizičko-kemijska karakterizacija elektrodnog materijala multimetodološkim pristupom primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije s energetske disperzivnom spektroskopijom X-zraka (SEM-EDS), mikroskopijom atomskih sila (AFM), određivanjem omskog otpora, infracrvenom spektroskopijom Fourierove transformacije (FTIR) i cikličkom voltametrijom (CV). Za površinsku karakterizaciju elektrode korištene su pretražna elektronska mikroskopija (SEM-EDS, engl. *scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy*) i mikroskopija atomskih sila (AFM, engl. *atomic force microscopy*). Ukratko, SEM koristi fokusirani snop visokoenergetskih elektrona za skeniranje površine uzorka, generirajući detaljne slike otkrivanjem sekundarnih ili povratno raspršenih elektrona. Energetska disperzivna rentgenska spektroskopija (EDS) obično se kombinira sa SEM-om za analizu elementarnog sastava uzorka mjerenjem karakterističnih X-zraka emitiranih kada su atomi uzorka pobuđeni snopom elektrona. SEM pruža topografske i morfološke podatke, dok EDS nudi kemijske

podatke, te stoga zajedno omogućuju uvid na mikro i nanoskali. Za karakterizaciju je korišten SEM uređaj (Quanta 250 FEG, FEI, SAD) s niskovakuumskim detektorom sekundarnih elektrona (LFD) i detektorom povratno raspršenih elektrona (BSED). Kemijska analiza i mapiranje kemijskih elemenata prisutnih na površini ispitivanih materijala provedeno je SEM/EDS, Pentafet detektor, Oxford). Veličina pojedine ispitivane točke iznosila je 5 nm na uzorku površine 3.7 mm x 3.2 mm. Pri korištenju LFD načina rada korištena su povećanje od 100×, 200×, 400× i 800×. Slike u BSED načinu rada snimljene su pri povećanjima od 100×, 200×, 400×, 800×, 1600× i 3000×. Priprema uzorka provedena je na način da je manja količina uzorka u tankom sloju nanešena na nosač uzorka i postavljena u položaj za snimanje.

Mikroskopija atomskih sila omogućava nedestruktivno pretraživanje površine uzorka mjereći interakciju između atoma oštrog šiljka pričvršćenog za savitljivu polugu i atoma površine uzorka. Mikroskopija atomskih sila ima dva načina rada, ovisno o vrsti samog uzorka. U oslikavajućem načinu rada stvara se topografski trodimenzionalni prikaz površine u ambijentalnim uvjetima, na zraku ili u tekućini uz vertikalno razlučivanje od 1 Å i lateralno razlučivanje od 1 nm. U oslikavajućem načinu rada razlikuje se kontakti režim rada (engl. contact mode) i tapkajući režim rada (engl. tapping mode). Kontakti režim rada temelji se na konstantnoj interakciji između atoma šiljka i uzorka. Tapkajući režim rada temelji se na skeniranju površine uzorka oscilirajućom polugom. Poluga efektivno oscilira dok putuje preko uzorka i povremeno ga dodiruje, a približavanjem šiljka površini uzorka dolazi do smanjenja amplitude osciliranja poluge. To omogućuje stvaranje topografske slike mjerenjem promjene amplitude poluge. Tapkajući režim rada se koristi kada se zahtjeva velika preciznost te kada su uzorci previše mekani za kontakti režim rada. U neoslikavajućem načinu rada određuju se mehanička svojstva, sile koje djeluju među molekulama, te magnetna i električna svojstva. Osnovni princip rada temelji se da oštar šiljak koji se nalazi na slobodnom kraju fleksibilne poluge skenira površinu uzorka pri čemu osjeća interakcijske sile između šiljka i uzorka. Uslijed interakcije između šiljka i uzorka dolazi do otklona poluge koji je proporcionalan sili interakcije prema Hookovom zakonu (1):

$$F = -K \times \Delta d \quad (1)$$

gdje je F sila interakcije, K konstanta poluge, a d udaljenost između šiljka i uzorka.

Uzorak se stavlja na piezoelektrično pretraživalo koje omogućuje trodimenzionalno pozicioniranje sa subnanometarskom točnošću. Uslijed otklona poluge dolazi do otklona reflektirane laserske zrake do fotodetektora što uzrokuje promjenu napona na fotodiodi, te se preko povratne sprege mijenja visina piezoelektričnog pretraživala, kako bi se održavala stalna udaljenost između

pretražne probe i uzorka. Registrirane vrijednosti otklona poluge elektronički se konvertiraju u topografsku trodimenzionalnu sliku uzorka [160,161].

Mjerenja su provedena na uređaju MultiMode Scanning Probe Microscope s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom (Bruker, Billerica USA) i piezoelektričnim pretraživalom s vertikalnom spregom („JV“ pretraživalo, lateralni raspon $125\text{ }\mu\text{m} \times 125\text{ }\mu\text{m}$, vertikalni raspon $5\text{ }\mu\text{m}$). Topografske slike snimljene su u kontaktnom režimu rada pomoću pretražnih probi načinjenih od silicijevog nitrida (DNP, Bruker, nominalna frekvencija 18 kHz , nominalna konstanta opruge 0.06 Nm^{-1}). Mjerenja su provedena na zraku, pri sobnoj temperaturi i pri 50-60 % relativne vlažnosti zraka. Tijekom oslikavanja, primijenjena sila držana je na najnižoj mogućoj vrijednosti kako bi se izbjegla moguća oštećenja uzorka. Brzina oslikavanja optimizirana je između $1\text{ i }2\text{ Hz}$ po liniji, a rezolucija slika bila je $512\text{ točaka} \times 512\text{ točaka}$. Sve slike predstavljaju izvorne podatke (eng. raw data), osim što je korištena opcija dvodimenzionalnog poravnjanja prve linije zbog histereze piezoelektričnog pretraživala. Slike su obrađene i analizirane programskim paketom NanoScope™ (Digital Instruments, verzija V614r1), a na njima je određivana i hrapavost uzoraka. Hrapavost je aritmetička sredina apsolutnih vrijednosti odstupanja visine površine izmjerenih u odnosu na središnji položaj ravnine. Hrapavost je određena na homogenom dijelu površine na području $2\text{ }\mu\text{m} \times 2\text{ }\mu\text{m}$. Na topografskim snimkama u off-line načinu rada napravljene su i analize vertikalnih presjeka i trodimenzionalni prikazi slike. Uzorak za AFM oslikavanje pripremljen je homogeniziranjem ugljikove paste u keramičkoj posudi prije snimanja. Uzorak je postavljen izravno na dvostrano ljepljivu traku pričvršćenu na metalni disk površine 1.76 cm^2 . S jedne strane ljepljiva traka zalijepljena je na metalni disk, dok je s druge strane metalnom špatulom nanescena ugljikova pasta. Višak paste uklonjen je špatulom dok se nije dobila tanka površina paste pogodna za snimanje.

Fizičko-kemijska karakterizacija elektrodnog materijala provedena je mjerenjem omskog otpora i primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR). Omski otpor mjeren je digitalnim multimetrom (DÜWI 07976, Njemačka). Pripremljena ugljikova pasta određenog sastava utisnuta je u horizontalno učvršćenu plastičnu cijev (promjera 5 mm , duljine 10 mm) postavljenu između učvršćenih spojnih žica. Korištenjem izraza:

$$R_{CP} = \frac{R_{CP,exp} \times A_{CPE}}{L_{CP}} \quad (2)$$

izračunata je vrijednost specifičnog otpora (R_{CP} , Ωm^{-1}); $R_{CP,exp}$ - eksperimentalno izmjerena vrijednost omskog otpora (Ω); A_{CPE} - površina poprečnog presjeka materijala elektrode (m^2); L_{CP} - duljina nosača materijala elektrode. Sva eksperimentalna mjerenja ponovljena su tri puta.

Ukratko, princip rada infracrvene (FTIR) spektroskopije osniva se na propuštanju širokog spektra infracrvene (IR) svjetlosti kroz uzorak. Molekule u uzorku apsorbiraju specifične frekvencije IR svjetlosti koje odgovaraju njihovim vibracijskim stanjima, stvarajući jedinstveni apsorpcijski spektar. Interferometar u FTIR sustavu mjeri svjetlost apsorbiranu na različitim valnim duljinama, a matematička Fourierova transformacija pretvara te podatke u IR spektar. Ovaj spektar otkriva molekularnu strukturu i sastav uzorka na temelju karakterističnih apsorpcijskih traka. Analiza sastava ispitivanih elektrodnih pasta provedena je s FTIR-om pomoću infracrvenog spektrofotometra s Fourierovom transformacijom (IR Spirit T s ATR komponentom, Shimadzu, Japan) pri valnim duljinama od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} . Rezultati FTIR-a analizirani su pomoću aplikacijskog softvera SpectraGryph 1.2., te su uspoređeni FTIR spektri snimljeni na nemodificiranim i modificiranim ugljikovim pastama. Priprema uzorka provedena je na način da su uzorci ispitivanih ugljikovih pasti otopljeni dodavanjem kloroforma te je uzorak pomoću kapalice stavljen na pločicu od NaCl. Pločica je prekrivena s dodatnom pločicom kako bi nastao tanki film. Pripremljeni uzorak postavljen je u držač uzorka u samom uređaju.

3.3.2. Elektrokemijska karakterizacija materijala elektrode

Elektrokemijska karakterizacija nemodificiranog i modificiranog materijala ugljikove elektrode provedena je cikličkom voltametrijom. Mjerenja su provedena korištenjem potenciostata/galvanostata (PAR 273A, Princeton Applied Research, SAD), s elektrokemijskom ćelijom, volumena 50 mL, te troelektrodnim sustavom: radna elektroda (modificirana ugljikova elektroda), referentna elektroda (Ag/ AgCl/ 3.5 M KCl) i protuelektroda (platinasta pločica, površine 2.4 cm^2). Tijelo radne elektrode izrađeno je od komercijalno dostupnog teflona u obliku cijevi, duljine 200 mm, promjera 20 mm) sa šupljinom na kraj tijela elektrode (duljina 10 mm, promjer 2.4 mm, površina 0.045 cm^2). Električni kontakt ostvaren je pomoću Cu žice (promjera 1 mm) učvršćene u tijelo elektrode. Tri uzstopna mjerenja provedena su bez miješanja na sobnoj temperaturi $23\pm 1^\circ\text{C}$. Ciklički voltamogrami analizirani su pomoću softvera Powersuite 2.40. Svi potencijali iskazani su u odnosu na referentnu elektrodu. Za elektrokemijsku karakterizaciju modificirane ugljikove elektrode korištena je otopina elektrolita 0.01 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (koji ima reverzibilnu jednoelektronsku reakciju). Za pomoćni elektrolit korišten je 0.1 M KCl. Mjerenja su provedena u području potencijala od 0.0 V do 1.0 V, s brzinom promjene potencijala 50 mVs^{-1} .

Analizirana je razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha (χ faktor) [110] i omjer anodnog i katodnog vrha struje voltametrijskog vala [60]. Vrijednosti kvalitativnog indeksa modificirane karbonske paste (χ -faktor) izračunate su prema izrazu:

$$\chi = \frac{\Delta E_p[Fe(CN)_6]^{3-/4-}}{\Delta E_{p,teor}} \quad (3)$$

što odgovara stupnju reverzibilnosti istraživanog elektrokemijskog sustava. Teorijska vrijednost razlike potencijala za redoks sustav ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) iznosi 59 mV [110]. Za reverzibilne elektrokemijske sustave, vrhovi anodne i katodne struje voltametrijskog vala pokazuju iste vrijednosti jakosti struje ($I_{p,a} / I_{p,k} = 1$). Elektrokemijski aktivna površina elektrode određena je na temelju Randles-Sevchikovog izraza [60]:

$$I_{p,a}(A) = 2,69 \times 10^5 \times z^{1/2} \times A \times D_0^{1/2} \times v^{1/2} \times c_0 \quad (4)$$

D_0 - koeficijent difuzije, v (V/s) - brzina promjene potencijala, c_0 (mol cm⁻³ - koncentracija elektroaktivnih vrsta, z - broj izmijenjenih elektrona, A (cm²) – elektroaktivna površina.

3.3.3. Elektrokemijska karakterizacija polifenolnih spojeva

Primjenom cikličke voltametrije provedena je elektrokemijska karakterizacija glavnih polifenolnih spojeva prisutnih u vinu (galna kiselina, katehin, kvercetin, kofeinska kiselina, resveratrol) čije su koncentracije u dosadašnjim istraživanjima pokazale najviše vrijednosti [162]. Korištena laboratorijska oprema, radna elektroda i uvjeti za izvođenje mjerenja identični su onima korištenim tijekom elektrokemijske karakterizacije materijala elektrode opisanima u poglavlju 3.3.2.

Radni elektrolit koncentracije 0.3 mM otopina polifenolnog spoja u modelnoj otopini vina sastava: vinska kiselina 0.033 M, 12 % v/v etanol, pH vrijednosti 3.6. Korišteni radni elektrolit pripreman je za svaki pojedini polifenolni spoj. Priprava radnog elektrolita uključuje miješanje određenih volumena 3 mM otopine polifenolnog spoja u etanolu i 0.033 M vodene otopine vinske kiseline, te korekcijom pH vrijednosti 3.6 za radni elektrolit s galnom kiselinom, katehinom, resveratrolom i kavenom kiselinom. Provedena je korekcija pH vrijednosti radnog elektrolita kvercetinom na pH vrijednosti 2.6 zbog otežanog otapanja pri višim pH vrijednostima. Korekcija je napravljena dodatkom NaOH kontroliranog pH metrom CONSORT C861.

Ciklički voltamogrami snimani su u području potencijala od -100 mV do 1500 mV s brzinama promjene potencijala od 50, 100, 150, 200, 250, 300 mV s⁻¹ na nemodificiranoj i modificiranoj ugljikovoj elektrodi. Osjetljivost elektrode na detekciju elektroaktivnih vrsta polifenolnog spoja analizirani su na temelju pojavnosti i intenziteta vrhova anodnih struja kod karakterističnog potencijala. Na temelju snimljenih cikličkih voltamograma određeni su karakteristični elektrokemijski parametri ($I_{p,a}$ – jakost vrha anodne struje, $I_{p,k}$ – jakost vrha katodne struje, $E_{p,a}$ –

potencijal vrha anodne struje, $E_{p,k}$ – potencijal vrha katodne struje). Procjena reverzibilnosti procesa elektrokemijske oksidacije polifenolnih spojeva provedena je na temelju oblika cikličkog voltamograma i kriterija za ocjenu reverzibilnosti [60].

Procjena dominantnog utjecaja (difuzija, adsorpcija) na kinetičke značajke procesa oksidacije provedena je snimanjem voltamograma s različitim brzinama promjene potencijala i određivanjem funkcije:

$$I_{p,a} = f(v) \quad (5)$$

Analitička svojstva korištenog elektrodnog materijala u odnosu na ispitivane polifenolne spojeve prisutne u radnom elektrolitu može se prikazati kao funkcionalna ovisnost:

$$I_{p,a} = f(c_{analita}) \quad (6)$$

Granica detekcije (LOD) izračunata iz omjera signala i šuma ($S/N = 3$). Granica kvantifikacije određena je na temelju izraza $S/N = 10$ [163].

Ispitivanje ponovljivosti provedeno je snimanjem pet cikličkih voltamograma s identičnim mjernim parametrima pomoću pet zasebno pripremljenih modificiranih ugljičnih elektroda. Ponovljivost je ocijenjena izračunavanjem relativne standardne devijacije (RSD) prema izrazu:

$$RSD = (standardna\ devijacija / srednja\ vrijednost) \times 100 \quad (7)$$

Procjena formalnog elektrooksidacijskog potencijala polifenolnih spojeva provedena je na temelju točke infleksije koja je određena preko prve derivacije cikličkog voltamograma. Potencijali za koje je vrijednost funkcije prve derivacije jednaka nuli (sjecište funkcije prve derivacije s x osi) odgovaraju vrijednostima potencijala vrha anodne struje, dok potencijali maksimuma funkcija prve derivacije u skladu je s točkom infleksije [110]. Za određivanje točke infleksije korišten je aplikacijski softver EXCEL 2016 i MATH 10 za obradu cikličkih voltamograma.

3.3.4. Elektrokemijska karakterizacija prirodnih uzoraka vina

Elektrokemijska karakterizacija prirodnih uzoraka vina provedena je direktno, te razrjeđivanjem prirodnog uzorka vina modelnom otopinom vina i snimanjem cikličkih voltamograma. Ciklički voltamogrami snimljeni su u području potencijala od -100 mV do 1500 mV s brzinama promjene potencijala od 200 mVs⁻¹. Procjena formalnog potencijala i pika anodne struje elektrooksidacije uzoraka vina provedena je na temelju prve derivacije cikličkog voltamograma. Za

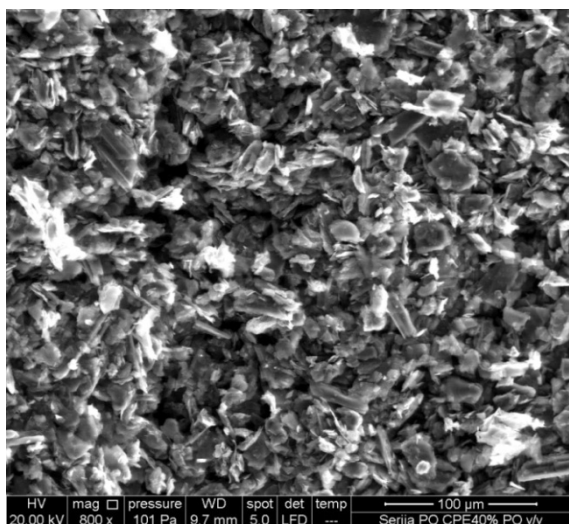
obradu cikličkih voltamograma korišten je aplikacijski softver EXCEL 2016 i MATH 10. Napravljena je detaljna usporedba elektrokemijskih odgovora prirodnih uzoraka vina s odabranim polifenolnim standardima u modelnim otopinama vina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

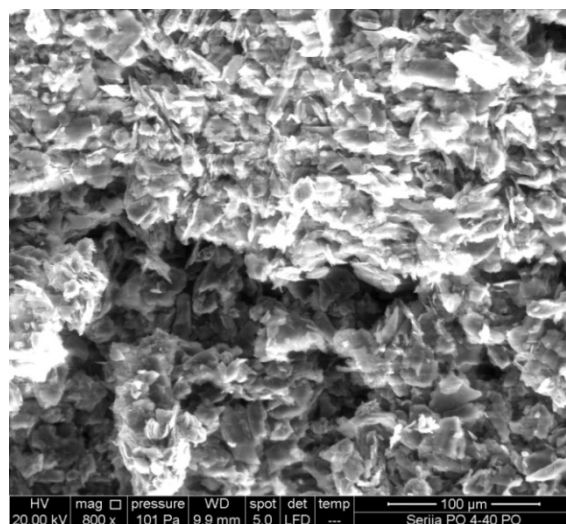
4.1. Fizičko-kemijske karakteristike elektrodnog materijala

4.1.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

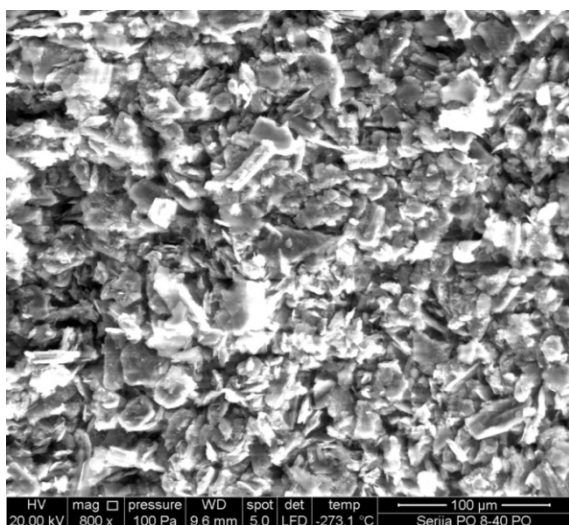
Utjecaj količine modifikatora te količine i vrste vezivnog sredstva na morfološka površinska svojstva modificiranih ugljičnih elektroda analizirana je na temelju SEM slika. Na slici 7 prikazane su reprezentativne SEM slike površine nemodificirane (a) i modificirane ugljikove paste (b-d).



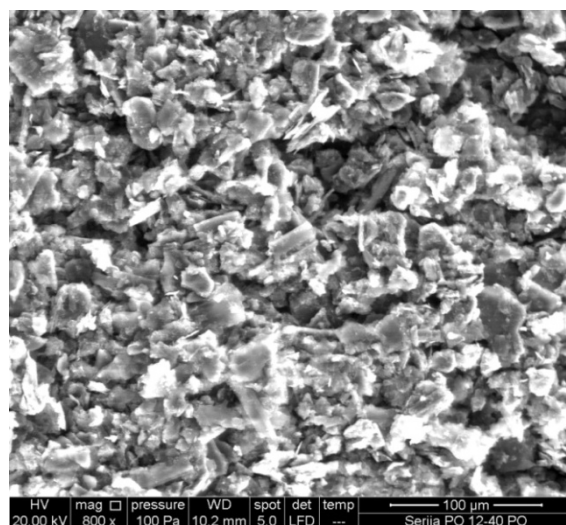
A



b



C

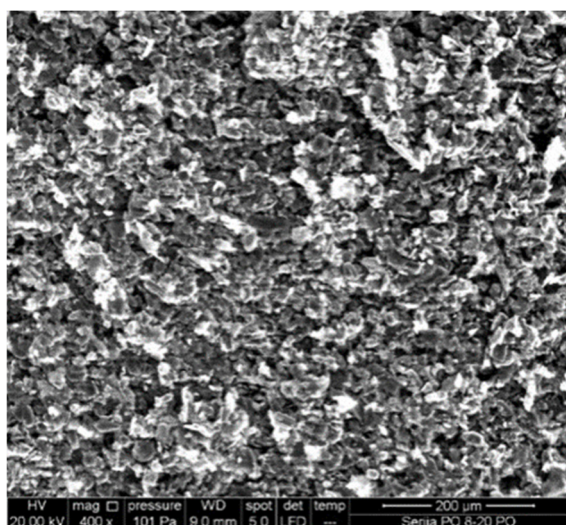


d

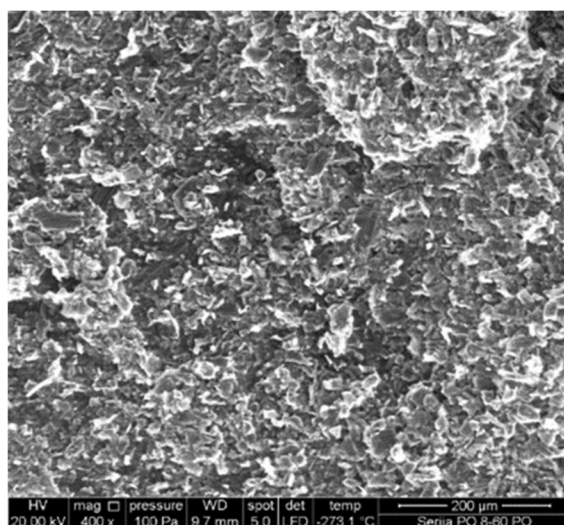
Slika 7. SEM slike površine modificirane ugljikove paste s udjelom veziva 40 % (v/v) PO i a) 0 % (m/m) TiO_2 , b) 4 % (m/m) TiO_2 , c) 8 % (m/m) TiO_2 , d) 12 % (m/m) TiO_2 . Slike su snimljene u LFD modu, povećanje 800 $\times$.

Dodatne SEM slike modificiranih ugljikove paste s PO nalaze se u Prilogu (Slika S2-S5). Usporedbom slika nemodificirane i modificirane ugljikove paste, rezultati pokazuju da nanočestice TiO_2 ispunjavaju prostor između pojedinačnih čestica grafitnog praha. Povećanjem udjela nanočestica TiO_2 u elektrodoj pasti dolazi do povećanja stupnja popunjenosti međuprostora. Sličan učinak dodavanja nanočestica TiO_2 elektrodnom materijalu također je primijećen tijekom izrade modificiranih ugljičnih pasta s TCP i POTCP (Prilozi, Slika S6-S13). Istraživanja morfoloških karakteristika nemodificiranog elektrodnog materijala izrađenog od 0.17 g grafitnog praha i 35 % (m/m) PO, koje su proveli Hassaninejad-Darzi i suradnici, pokazuju da površinsku strukturu karakterizira slojevita specifična forma karakteristična za kristalna struktura čestica grafita koje su međusobno izolirane. Dodane nanočestice TiO_2 ispunjavaju slobodni prostor između čestica grafitnog praha [82]. Istraživanja Tashkhouriana i suradnika pokazala su da je površina nemodificiranog ugljikovog elektrodnog materijala karakterizirana manje izraženom kristalnom strukturom, dok je površina modificirane ugljikove elektrode pokazala viši stupanj ujednačenosti. Takvi rezultati pronađeni su za modificiranu ugljikovu elektrodu koja se sastoji od 500 mg grafitnog praha, 80 mg veziva PO i 20 mg nanočestica TiO_2 [83].

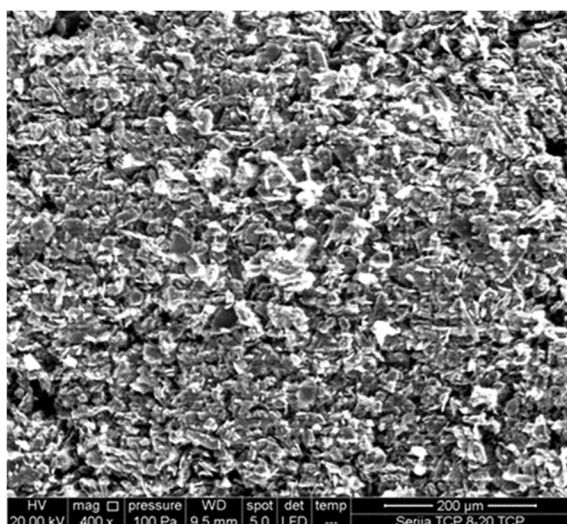
Utjecaj količine i vrste vezivnog sredstva na morfološke karakteristike površine modificirane ugljikove elektrode prikazan je na slici 8.



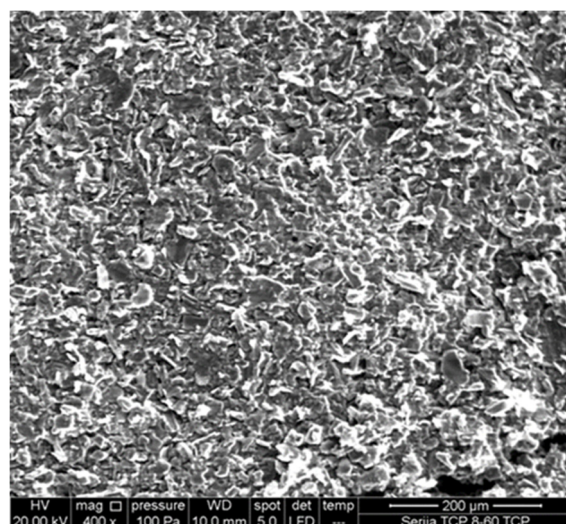
a



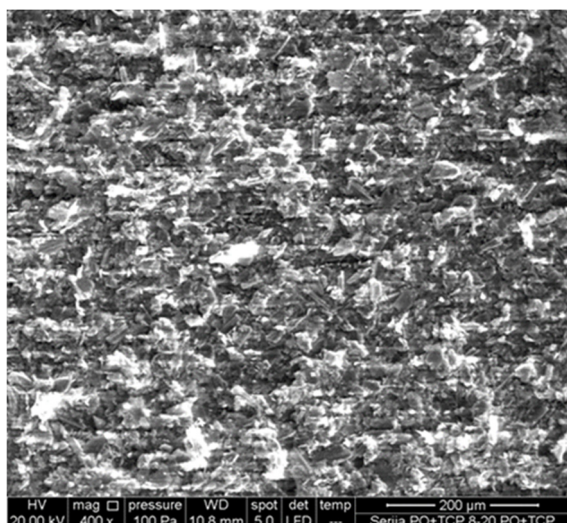
b



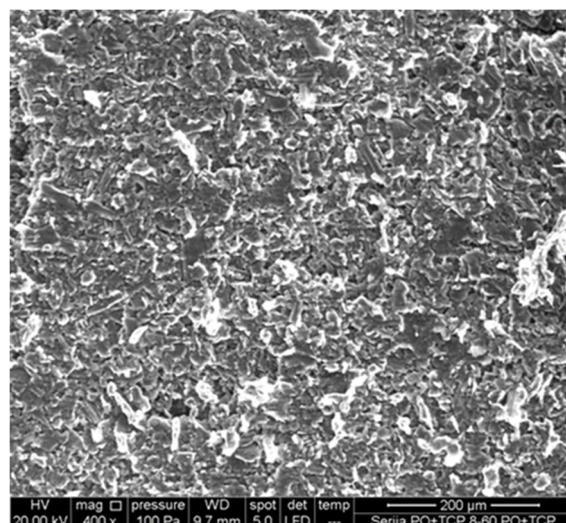
c



d



e

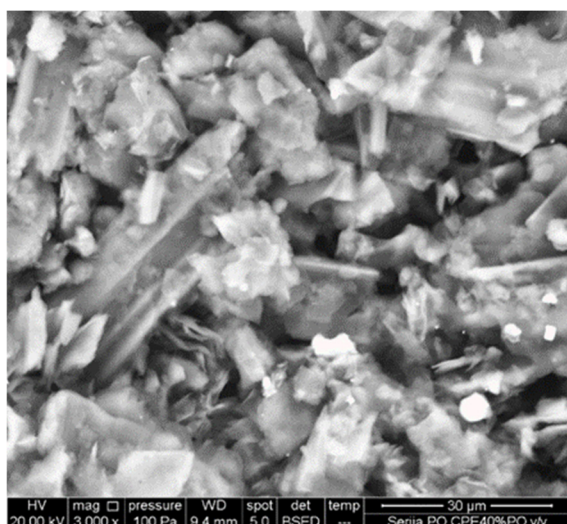


f

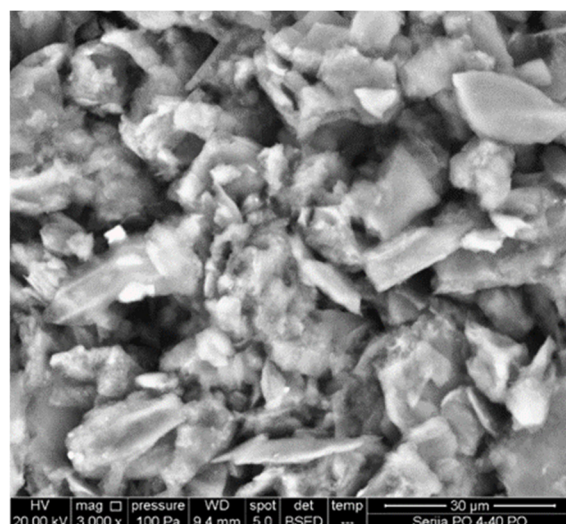
Slika 8. Reprezentativne SEM slike površina modificiranih ugljikovih elektroda koja sadrži 8 % (m/m) nanočestica TiO_2 i a) 20 % (v/v) PO, b) 60 % (v/v) PO, c) 20 % (v/v) TCP, d) 60 % (v/v) TCP, e) 20 % (v/v) POTCP, f) 60 % (v/v) POTCP. Snimljeno u LFD modu, povećanje 400 $\times$.

Vidljivo je da s povećanjem udjela vezivnog sredstva, površina modificirane ugljikove elektrode poprima homogeniji izgled s manje izraženim geometrijskim oblikom čestica grafita i boljom popunjenosti prostora između grafitnih struktura. Bez obzira na količinu vezivnog sredstva u elektrodi, promjena količine nanočestica TiO_2 i vrste vezivnog sredstva nije značajno utjecala na morfološke karakteristike površine ugljikove elektrode. Svi ispitani uzorci pokazuju slične morfološke karakteristike (Prilog, Slika S14-S19).

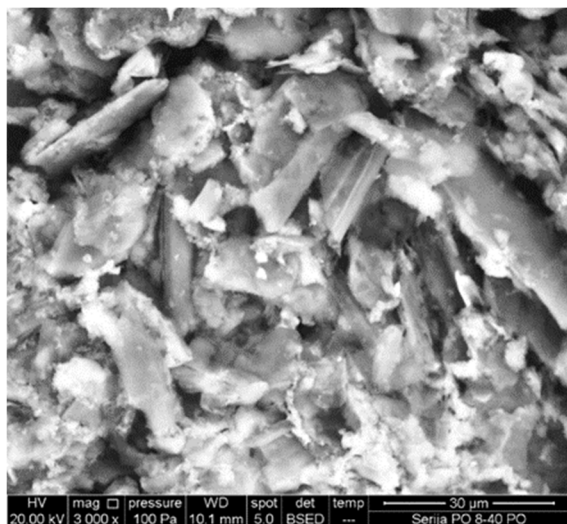
Raspodjela nanočestica TiO_2 u masi materijala elektrode analizirana je na temelju reprezentativnih SEM slika snimljenih u BSED modu (Slika 9).



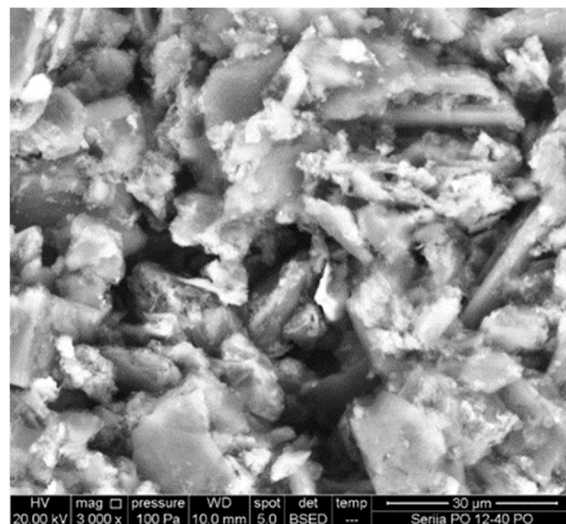
a



b



c



d

Slika 9. Reprezentativne SEM slike površina modificiranih ugljikovih pasti s udjelom vezivnog sredstva PO od 40 % (v/v) i a) 0 % (m/m) TiO_2 , b) 4 % (m/m) TiO_2 , c) 8 % (m/m) TiO_2 , d) 12 % (m/m) TiO_2 . Snimljeno u BSED modu, povećanje 3000 $\times$.

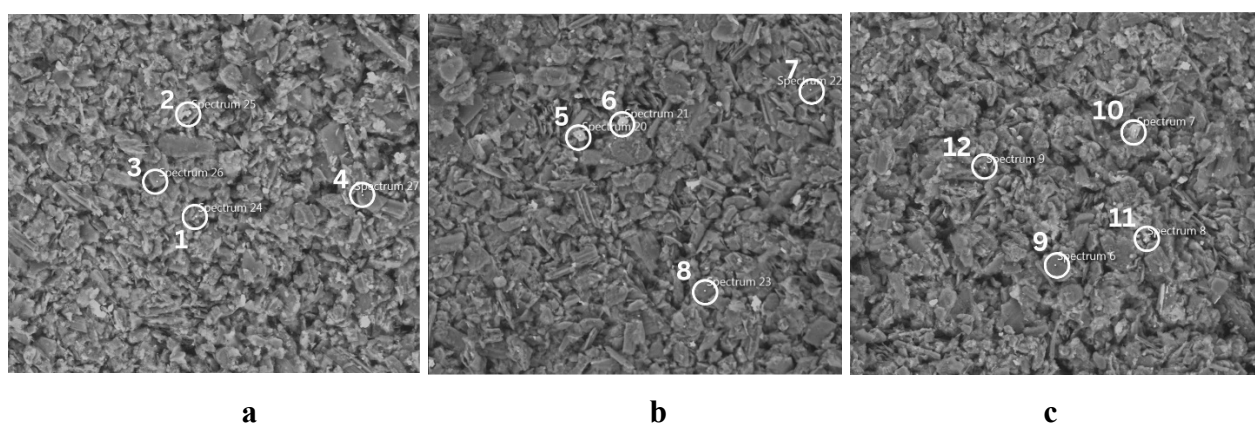
Nanočestice se mogu identificirati kao oblici s izraženom svjetlijom nijansom na SEM slici. Uočljiva je prisutnost aglomerata nanočestica TiO_2 na površinama zrnaca grafitnog praha. Pojava agregacije čestica modifikatora može se pripisati s jedne strane utjecaju načina pripreme materijala elektrode, odnosno stupnju disperzije nanočestica TiO_2 u grafitnom prahu, a s druge strane povoljnom utjecaju vezivnog sredstva na interakciju nanočestica. Također može se pretpostaviti da raspodjela vezivnog sredstva u ugljikovoj smjesi utječe na veličinu aglomerata. Povećanjem udjela nanočestica TiO_2 u pastama, od 4 % (m/m) na 12 % (m/m), uočava se intenzivnija prisutnost čestica modifikatora na površini zrna grafita, dok površina ugljikove paste poprima homogeniji izgled [164]. Nije uočen

značajan utjecaj vrste vezivnog sredstva na stupanj raspodjele nanočestica TiO_2 unutar površine modificiranog materijala elektrode (Prilog, Slika S20-S37).

García i suradnici uočili su tendenciju homogene adsorpcije nanočestica TiO_2 na ugljikove površine, za razliku od nanočestica PdO , koje su imale veći udio u pasti u odnosu na nanočestice TiO_2 i niži stupanj homogenosti, što je uzrokovalo promjene nanostrukturne modifikacije površine elektrode [95]. Fargali i suradnici promatrali su odvojene i međusobno izolirane slojeve grafita u nemodificiranim ugljikovim elektrodama. Dodatkom modifikatora, nanočestica TiO_2 , uočen je veći stupanj agregacije nanočestica TiO_2 [165].

4.1.2. Energetska disperzivna analiza (EDS)

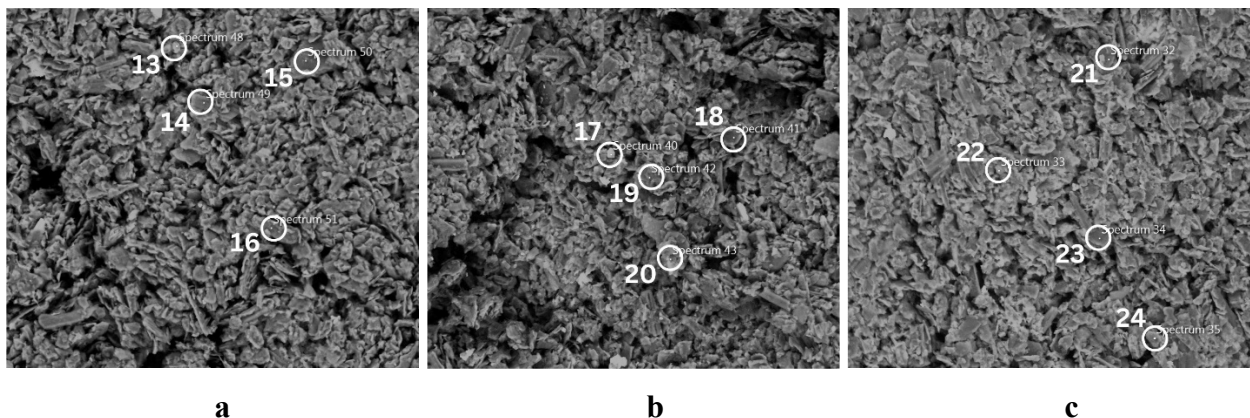
Imajući u vidu da elektrodni materijal predstavlja kompleksnu smjesu ugljikovog materijala, vezivnog sredstva i nanočestica TiO_2 , primjenom SEM/EDS analize ispitana je homogenost površina različitog sastava mapiranjem kemijskih elemenata (Prilog, Slika S38-S43). Analiza udjela kemijskih elemenata provedena je na četiri različite točke. Rezultati analiza odabranih modificiranih ugljikovih elektroda s nanočesticama TiO_2 prikazani su na Slikama 10-12 i u Tablicama 3-5.



Slika 10. SEM slika površina elektrodnog materijala s označenim položajem analiziranih točaka (grafitni prah, 40 % (v/v) vezivnog sredstva PO i a) 4 % (m/m) nanočestice TiO_2 ; b) 8 % (m/m) nanočestice TiO_2 ; c) 12 % (m/m) nanočestice TiO_2 .

Tablica 3. EDS analiza kemijskih elemenata na modificiranim ugljikovim elektrodama sastava, 40 % (v/v) PO i 4, 8, 12 % (m/m) nanočestica TiO₂ u odabranim točkama.

Sadržaj np TiO ₂ % (mas.)	element	Sadržaj % (mas.)			
		točka 1	točka 2	točka 3	točka 4
4	C	79.69	49.77	97.92	97.53
	Ti	20.31	50.23	2.08	2.47
		točka 5	točka 6	točka 7	točka 8
8	C	62.72	58.01	96.53	97.75
	Ti	34.58	41.99	3.47	2.25
		točka 9	točka 10	točka 11	točka 12
12	C	97.37	62.96	56.65	94.11
	Ti	2.63	37.04	43.35	5.89

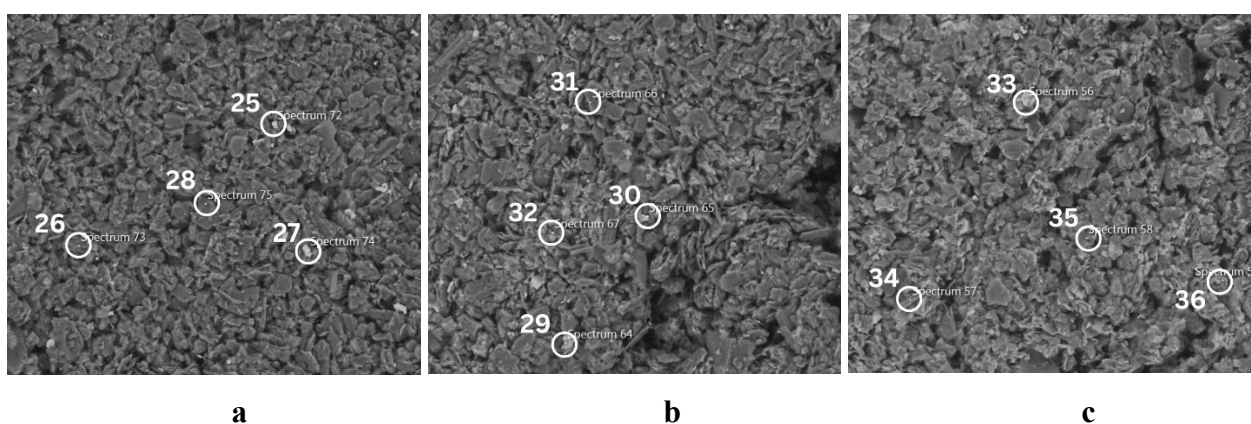


Slika 11. SEM slika površina elektrodnog materijala s označenim položajem analiziranih točaka (grafitni prah, 40 % (v/v) vezivnog sredstva TCP i a) 4 % (m/m) nanočestice TiO₂; b) 8 % (m/m) nanočestice TiO₂; c) 12 % (m/m) nanočestice TiO₂.

Tablica 4. EDS analiza kemijskih elemenata na modificiranim ugljikovim elektrodama sastava 40 % (v/v) TCP i 4, 8, 12 % (m/m) nanočestica TiO₂ u odabranim točkama

Sadržaj np TiO ₂ % (mas.)	element	Sadržaj % (mas.)			
		točka 13	točka 14	točka 15	točka 16
4	C	96.35	97.18	95.66	97.02
	Ti	2.30	1.27	2.80	1.36
	P	1.35	1.55	1.54	1.62

		točka 17	točka 18	točka 19	točka 20
8	C	34.30	96.77	93.56	85.56
	Ti	37.02	2.02	2.41	11.22
	P	0.93	1.21	4.03	3.22
		točka 21	točka 22	točka 23	točka 24
12	C	91.28	92.92	96.92	93.28
	Ti	6.92	5.15	1.93	4.77
	P	1.81	1.93	1.15	1.95



Slika 12. SEM slika površina elektrodnog materijala s označenim položajem analiziranih točaka (grafitni prah, 40 % (v/v) vezivnog sredstva POTCP i a) 4 % (m/m) nanočestice TiO₂; b) 8 % (m/m) nanočestice TiO₂; c) 12 % (m/m) nanočestice TiO₂.

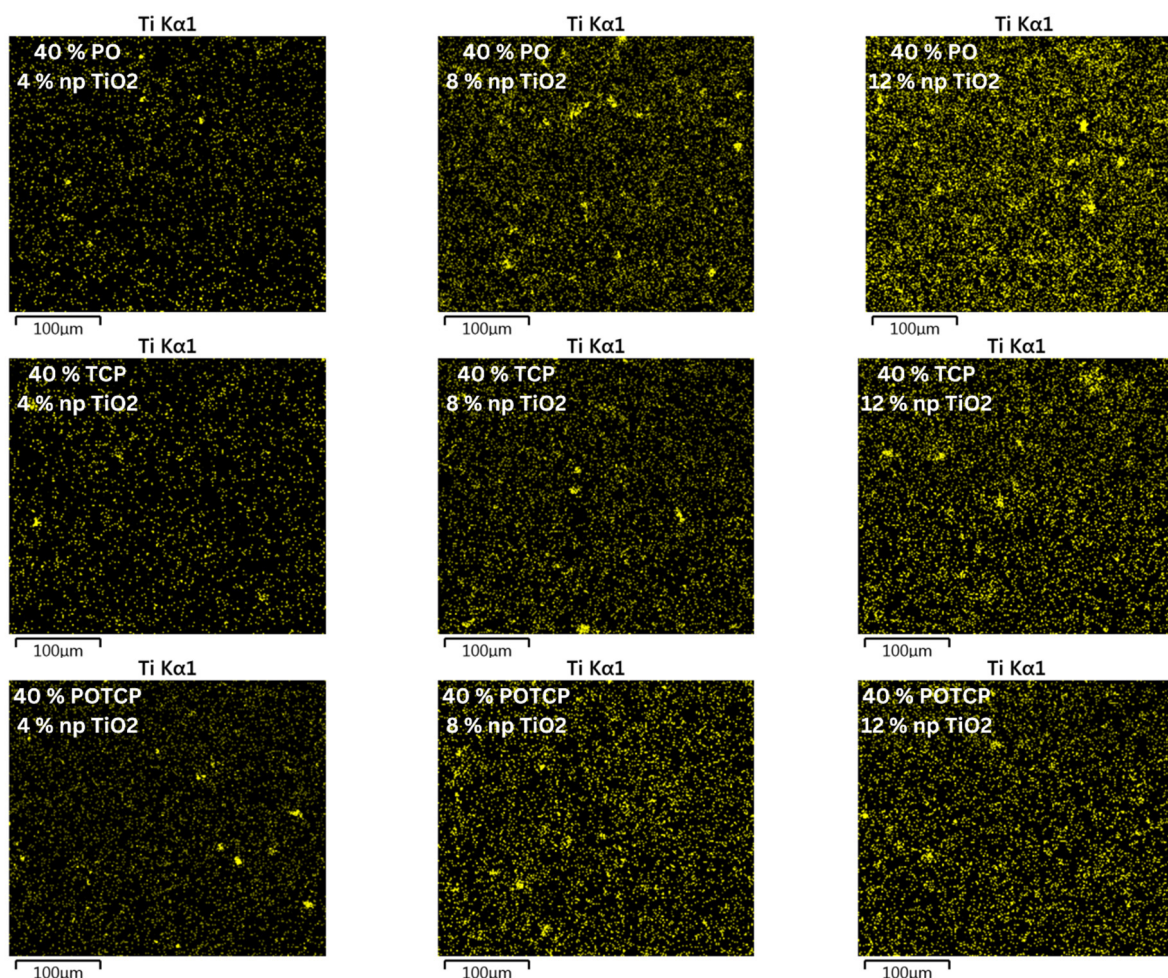
Tablica 5. EDS analiza kemijskih elemenata na modificiranim ugljikovim elektrodama sastava 40 % (v/v) POTCP i 4, 8, 12 % (m/m) nanočestica TiO₂ u odabranim točkama

Sadržaj np TiO ₂ % (mas.)	element	Sadržaj % (mas.)			
		točka 25	točka 26	tačka 27	tačka 28
4	C	44.31	97.84	66.75	97.96
	Ti	19.23	1.17	32.84	1.18
	P	0.46	0.98	0.41	0.86
		točka 29	točka 30	točka 31	točka 32
8	C	82.93	57.10	96.09	95.44
	Ti	0.26	42.44	2.72	3.88
	P	0.10	0.45	1.19	0.69

		točka 33	točka 34	točka 35	točka 36
12	C	83.05	95.62	94.06	91.96
	Ti	15.79	0.26	4.81	6.40
	P	1.16	0.12	1.13	1.64

Rezultati pokazuju da je površina elektrodne paste nehomogena, odnosno da je udio ugljika titana, te drugih pojedinih elemenata (željeza ili fosfora ili kalcija) neujednačen, bez obzira na količinu modifikatora te vrsti i količini vezivnog sredstva. Uzrok neujednačenog kemijskog sastava površine elektrodnog materijala rezultat je načina pripreme elektrodnog materijala. Prisutnost drugih kemijskih elemenata (kalcij, željezo, kisik) predstavlja moguće tragove nečistoća u pojedinim komponentama.

Mapiranjem kemijskih elemenata na površini elektrodnog materijala analizirana je prostorna raspodjela modifikatora ovisno o količini dodanih nanočestica, te o količini i vrsti vezivnog sredstva.

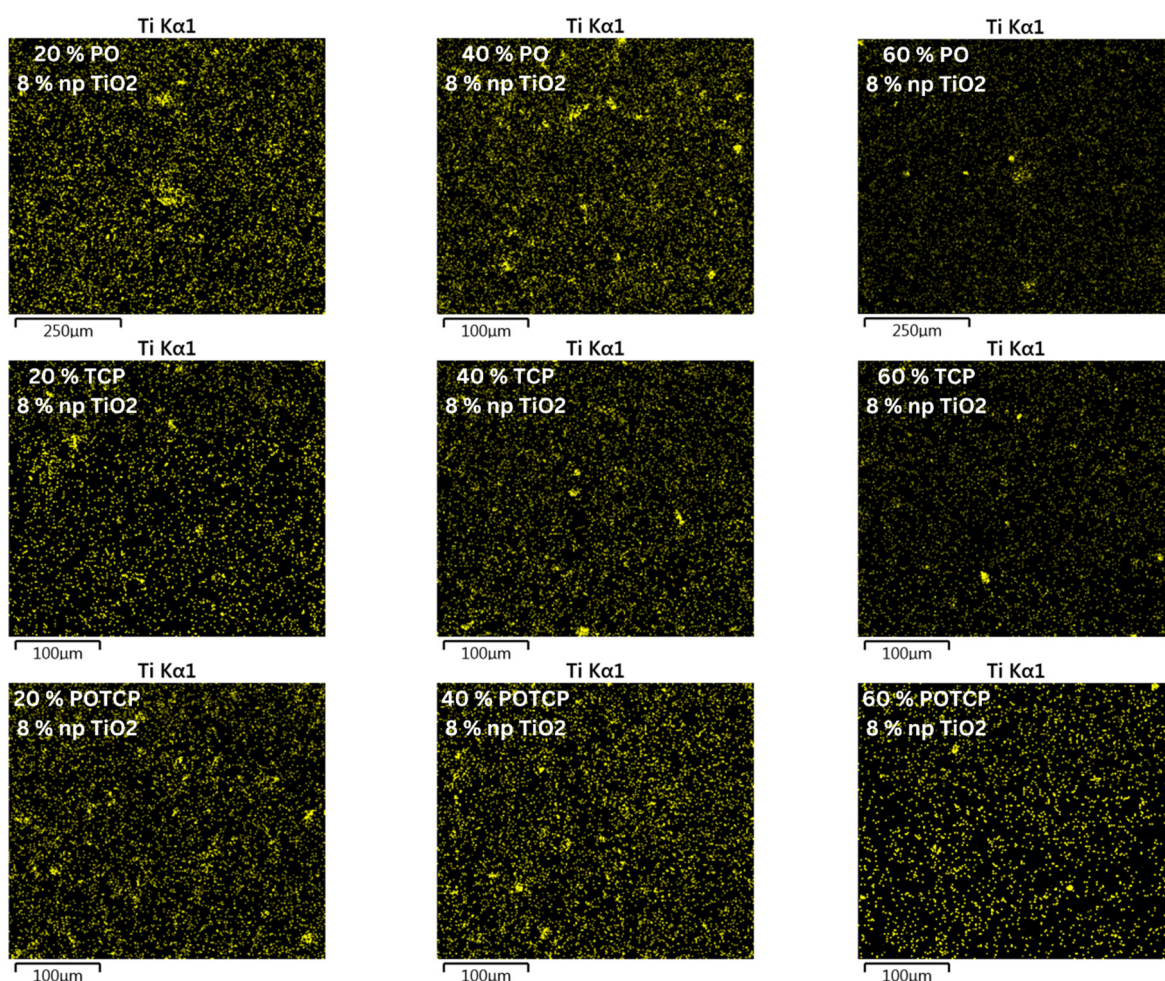


Slika 13. Mape prostorne raspodjele nanočestica TiO_2 na površini modificirane ugljikove paste s udjelom veziva PO, TCP, POTCP (1:1) (v/v) i različitog udjela nanočestica TiO_2 (w/w).

Nanočestice TiO_2 označene su žutom bojom.

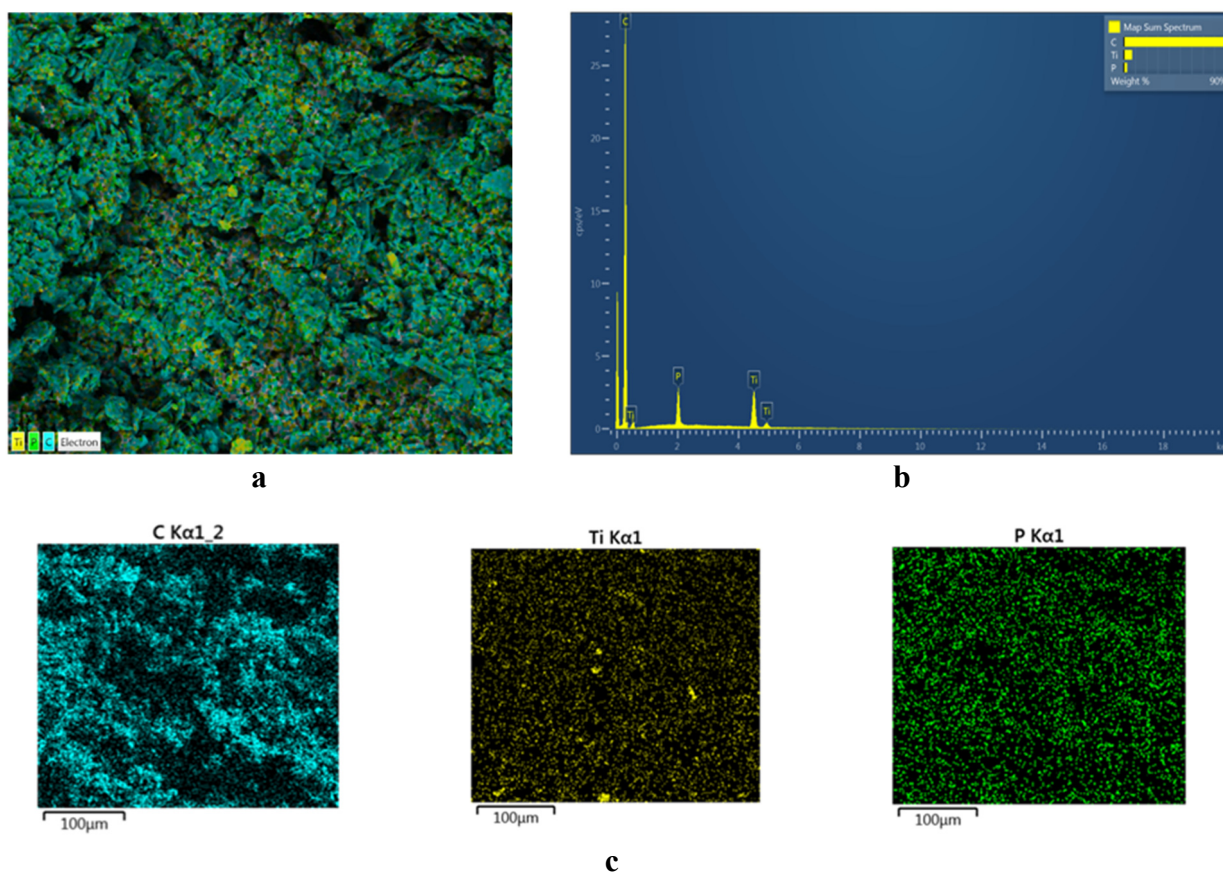
Slika 13 prikazuje prostornu raspodjelu nanočestica TiO_2 na površini materijala elektrode kod različitog udjela nanočestica. Uočeno je da s povećanjem udjela nanočestica TiO_2 , dolazi do povećanja brojnosti nanočestica na površini ispitivanih elektroda, međutim postoje dijelovi površine elektrode gdje je brojnosti čestica manja (Tablice 3-5). Također se uočava prisutnost aglomeracija nanočestica TiO_2 nepravilnog geometrijskog oblika u rasponu veličine od 5 μm do 15 μm . Uzrok neravnomjernosti prostorne raspodjele nanočestica rezultat je postupka pripreme elektrodnog materijala.

Utjecaj udjela vezivnog sredstva na prostornu raspodjelu nanočestica TiO_2 analiziran je mapiranjem nanočestica na površini elektrode (Slika 14).



Slika 14. Mape prostorne raspodjele nanočestica TiO_2 na površini modificiranih ugljikovih pasta s odabranim udjelima veziva PO, TCP, POTCP (1:1) (v/v) i nanočestica TiO_2 (w/w). Nanočestice TiO_2 označene su žutom bojom.

Kod ugljikovih pasta s vezivnim sredstvima PO i TCP s povećanjem njihovog udjela dolazi do smanjenja intenziteta prisutnih nanočestica modifikatora. Uočava se stvaranje aglomerata nanočestica TiO_2 i smanjenja prostorne raspodjele modifikatora na površini materijala elektrode u odnosu na niži udio vezivnog sredstva. Povećanje količine vezivnog sredstva u pastama s POTCP karakterizira pojava većeg broja ujednačenih aglomerata sličnog oblika, veličine od $2.5\ \mu\text{m}$ do $12.5\ \mu\text{m}$ s približno ravnomjernim površinskim rasporedom. Može se pretpostaviti da broj i veličina aglomerata ovisi o intenzitetu interakcije čestica TiO_2 i grafita s vezivim sredstvom te o fizičko-kemijskim karakteristikama vezivnog sredstva. Također, stvaranje aglomeriranih čestica dovodi do smanjenja aktivne površine prisutnog modifikatora. Radoman i suradnici pokazali su da povećanje udjela nanočestica TiO_2 dispergiranih u alkidnoj smoli dovodi do aglomeracije nanočestica zbog povećanja specifične površine modifikatora, te interakcija između čestica [166]. Mapiranje ostalih detektiranih kemijskih elemenata na površini elektrode prikazano je na slici 15.



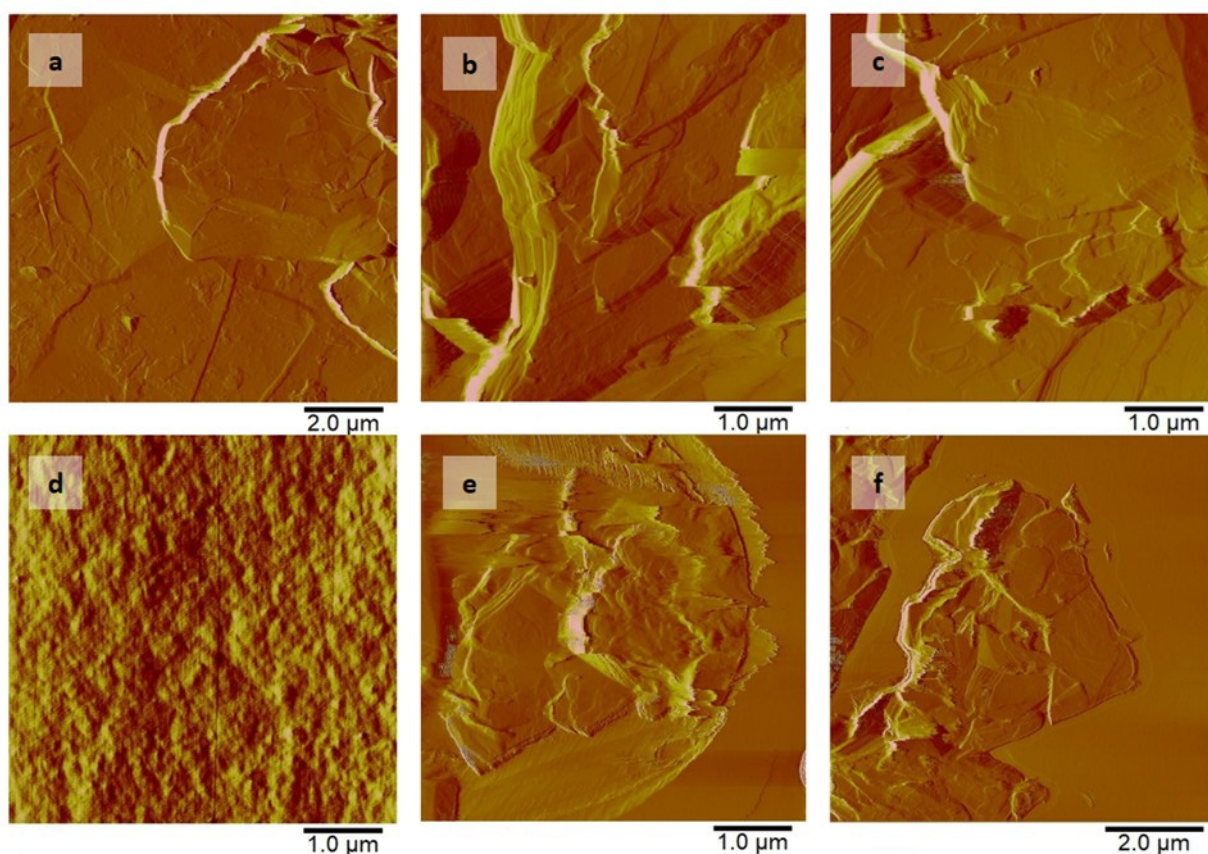
Slika 15. EDS mapiranje površine elektrodne paste EDS metodom (grafitni prah, 8 % (m/m) nanočestice TiO_2 , 40 % (v/v) TCP; a) SEM slika površine elektrodne paste; b) detektirani kemijski elementi; c) prostorna raspodjela pojedinačnih kemijskih elemenata (ugljik, titan, fosfor).

Na slici je prikazana prostorna raspodjela elementa ugljika koji potječe iz grafitnog praha, fosfora koji se nalazi u strukturi vezivnog sredstva i titana u sastavu nanočestica TiO_2 . U prilogu su prikazani dobiveni rezultati mapiranja pojedinačnih kemijskih elemenata prisutnih na površini modificiranog ugljikovog materijala u nekoliko točaka (Prilog, Slika S44-S57).

4.1.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Ispitivanje morfoloških karakteristika ugljikove paste provedeno je mikroskopijom atomskih sila (AFM) oslikavanjem područja od $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ do $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, za razliku od SEM oslikavanja na području od $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ do $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$.

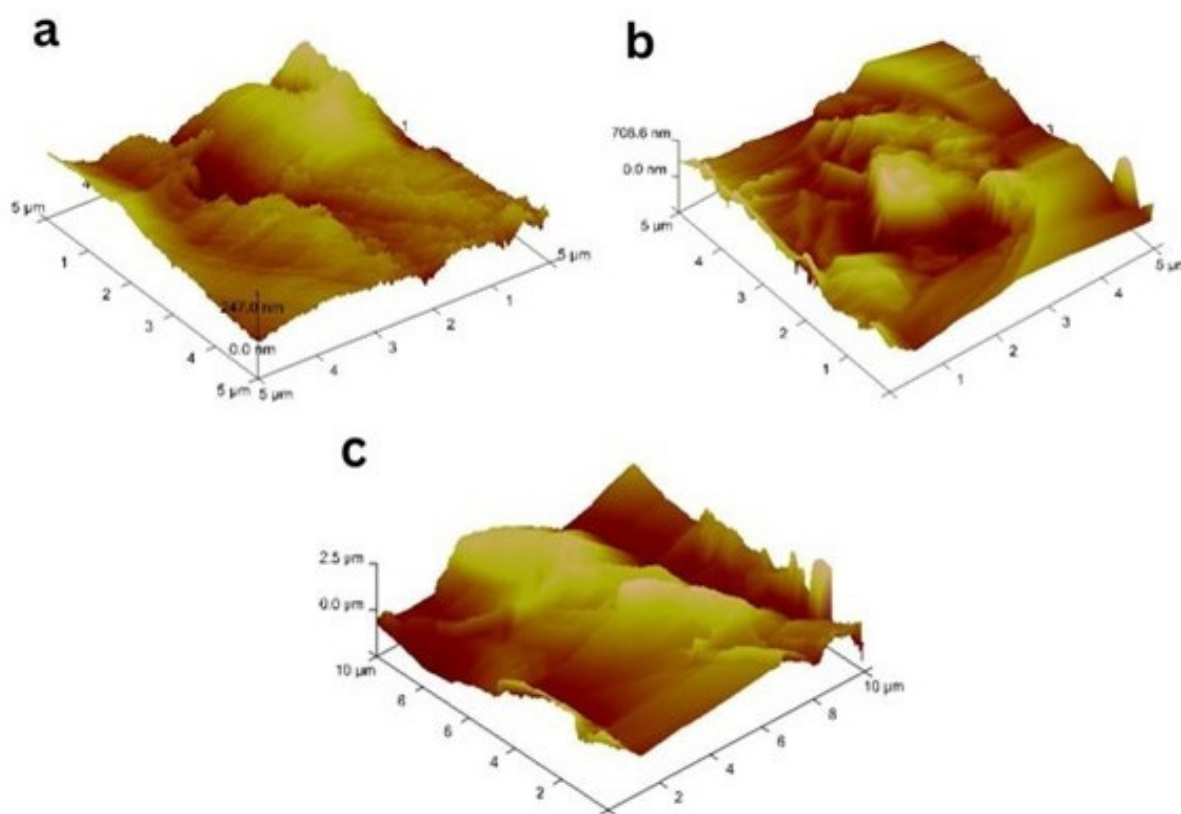
Topografske karakteristike nemodificirane ugljikove paste s pojedinim vezivnim sredstvima PO, TCP i POTCP i modificirane ugljikove paste nakon dodatka nanočestica TiO_2 , oslikane su AFM-om i prikazane su na slici 16.



Slika 16. AFM slike otklona nemodificirane ugljikove paste s (a) 40 vol.% PO, (b) 40 vol.% TCP, (c) 40 vol.% POTCP kao vezivim sredstvima i modificirane ugljikove paste s 8 tež.% nanočestica TiO_2 i (d) 40 vol.% PO, (e) 40 vol.% TCP i (f) 40 vol.% POTCP.

AFM slike otklona na modificiranoj ugljikovoj pasti s PO vezivnim sredstvom i nanočesticama TiO_2 pokazuju umjereno granularnu strukturu na površini (Slika 16d) u usporedbi s nemodificiranom ugljikovom pastom koja sadrži samo PO vezivno sredstvo (Slika 16a). Na osnovu vertikalnog presjeka na topografskom prikazu (nije prikazano ovdje) oslikani su utori dubine 10 – 40 nm, tako da se površina može smatrati gotovo ravnom. Hrapavost površine određena je iz topografskih prikaza na modificiranoj ugljikovoj pasti s PO vezivom te iznosi 38 nm, dok za TCP vezivo, hrapavost površine iznosi 130 nm, a za POTCP vezivo, hrapavost površine iznosi 116 nm. Za vezivna sredstva TCP i POTCP (slike 16e i 16f), oslikana površinska struktura nije ravna, već se sastoji od velikih čestica grafita ili aglomerata.

Površina modificirane ugljikove paste s nanočesticama TiO_2 i vezivnim sredstvom TCP pokazuje slojevitú strukturu. Čestice grafita karakteriziraju oštri rubovi, relativno duboki utori (cca. 700 nm) i slojevita struktura (slika 17b).

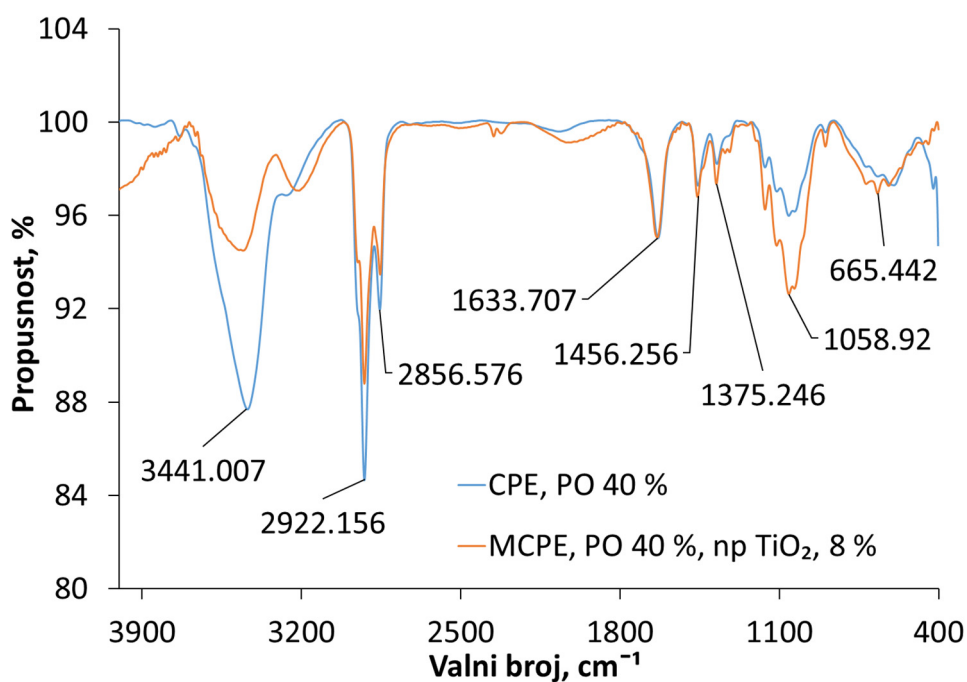


Slika 17. Trodimenzionalni prikaz površine ugljikove paste modificirane s 8 tež.% np TiO_2 i (a) 40 vol.% PO (veličina područja snimanja $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, vertikalna skala 247 nm); (b) 40 vol.% TCP (veličina područja snimanja $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, vertikalna skala 708.6 nm) i (c) 40 vol.% POTCP (1:1) (veličina područja snimanja $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$, vertikalna skala 2.5 μm).

Odgovarajuće površinske strukture imaju visinu manju od 1 μm . Modificirana ugljikova pasta s nanočesticama TiO_2 i vezivnim sredstvom POTCP pokazuje slične karakteristike kao ugljikova pasta modificirana s TCP vezivnim sredstvom. AFM-om oslikane površinske strukture čestica grafita (Slika 17) imaju usporedivu strukturu kao na SEM slikama modificiranih ugljikovih pasta istog sastava (Prilog, Slika S4c).

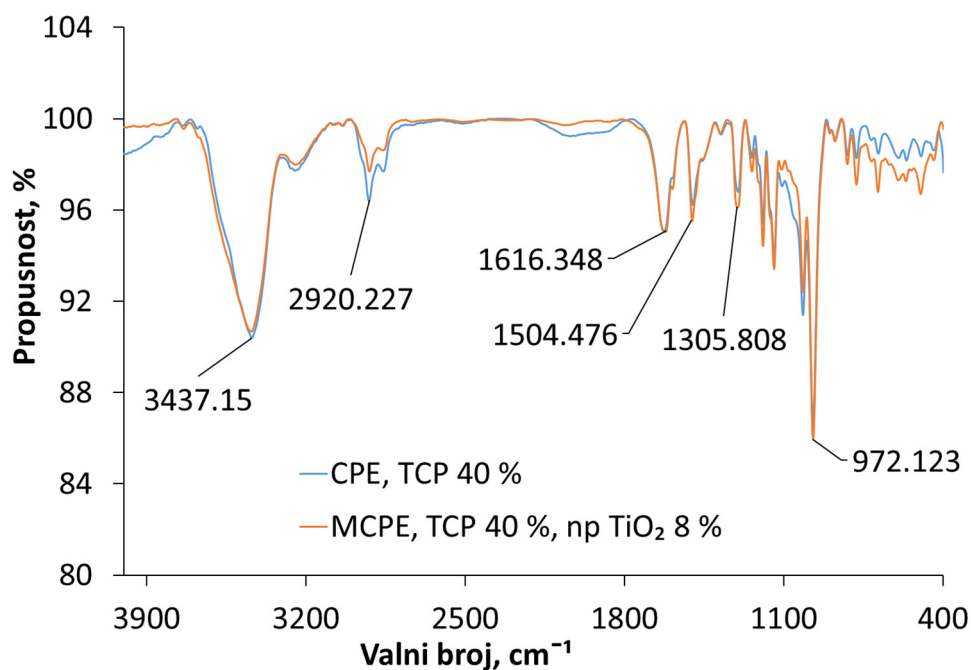
4.1.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Slika 18. prikazuje FTIR spektre nemodificirane ugljikove paste (40 % v/v PO) i modificirane ugljikove paste s nanočesticama TiO_2 (40 % v/v PO, 12 % m/m nanočestice TiO_2). Na FTIR spektru mogu se uočiti tri karakteristične C-H vrpce u području $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Dvije karakteristične vrpce na 1375 i 1456 cm^{-1} također se mogu pripisati C-H vezi [165]. Vrpce koje se pojavljuju iznad 3000 cm^{-1} i oko 1630 cm^{-1} ukazuju na prisutnost vode.

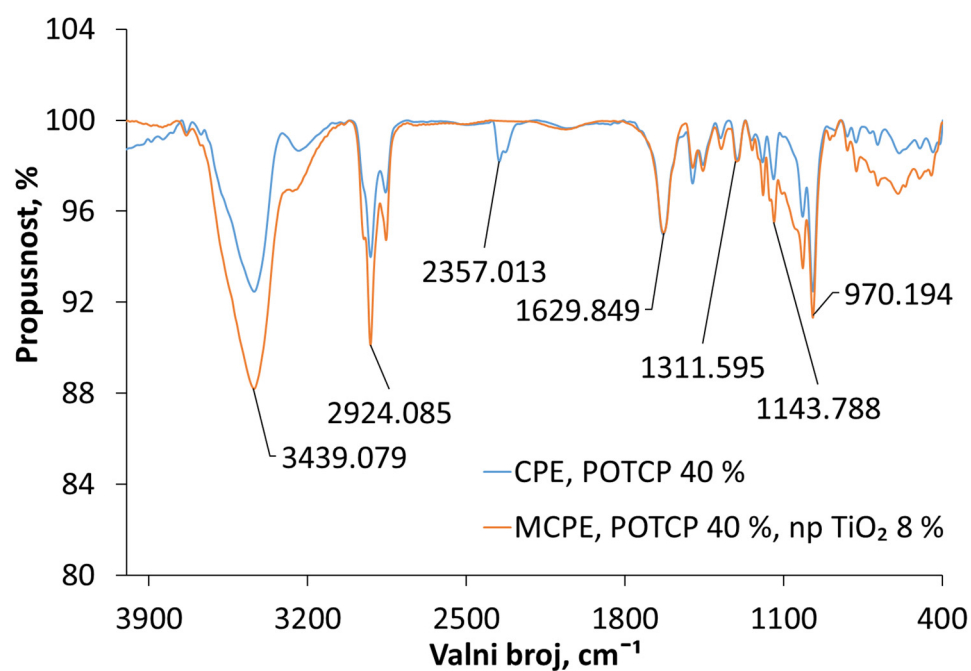


Slika 18. FTIR spektri nemodificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v PO) i modificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v PO, 12 % m/m nanočestice TiO_2).

FTIR spektri nemodificirane (40 % v/v TCP) i modificirane ugljikove elektrode sastava 40 % v/v TCP i 12 % m/m nanočestica TiO_2 (Slika 28) pokazuju karakteristične nizove vrpce za TCP u području od 920 cm^{-1} do 1020 cm^{-1} [167].



Slika 19. FTIR spektri nemodificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v TCP) i modificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v TCP, 12 % m/m nanočestica TiO_2).



Slika 20. FTIR spektri nemodificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v POTCP 1:1) i modificirane ugljikove paste (grafit, 40 % v/v POTCP 1:1, 12 % m/m nanočestice TiO_2).

Slika 20 prikazuje FTIR spektre nemodificiranog i modificiranog materijala elektrode s POTCP (40 % v/v POTCP 1:1, 12 % m/m nanoočestica TiO_2 ,) te utjecaj TCP-a, i C-H veze PO u rasponu od 2800-3000 cm^{-1} .

Na slikama FTIR spektara modificiranih ugljikovih pasti s vezivnim sredstvima TCP i POTCP, također se može uočiti široki vrh u području od 400-800 cm^{-1} , što se može pripisati načinu savijanja Ti-O-Ti [168]. Također, na FTIR spektrima za sve ispitivane elektrodne materijale nisu uočeni dodatni pikovi koji bi upućivali na stvaranje kemijskih veza između pojedinih komponenti materijala elektrode. Dodatni FTIR spektri snimljeni na ugljikovim pastama s različitim vezivnim sredstvima: PO, TCP i POTCP, prikazani su u Prilogu (Slika S58, S59).

4.1.5. Specifični električni otpor elektrodnog materijala

Određivanje specifičnog otpora elektrodnog materijala korišteno je za procjenu električne otpornosti modificiranog materijala ugljične elektrode [9]. Ispitan je utjecaj vrste, udjela vezivnog sredstva i udjela nanoočestica TiO_2 na specifični otpor ispitivanih materijala. Vrijednosti omskog otpora i specifičnog otpora elektroda različitog sastava veziva i modifikatora prikazane su u Prilogu (Tablica P1).

Slika 21. Ovisnost specifičnog otpora (R_{CP}) modificiranog materijala elektrode o a) količini vezivnog sredstva kod konstantnog udjela nanoočestica TiO_2 od 8 %, te b) količini nanoočestica TiO_2 kod konstantnog udjela vezivnog sredstva od 40 %

Ispitivani elektrodni materijali pokazuju tendenciju smanjenja specifičnog otpora s povećanjem količine vezivnog sredstva do 40 % (v/v). Daljnjim povećanjem udjela vezivnog sredstva