
Jovan Baljak

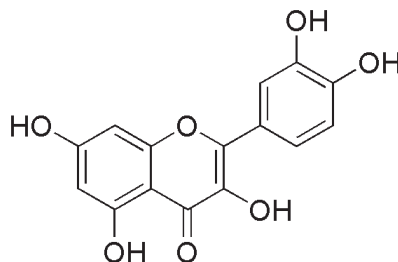
Voltometrijska metoda za određivanje kvercetina pomoću elektrode modifikovane provodljivim PANI polimerom

Cilj ovog istraživanja je razvijanje analitičke metode za određivanje koncentracije kvercetina. U ovu svrhu, kao radna elektroda, iskorišćena je platinska disk elektroda modifikovana provodljivim polimerom čime je povećana selektivnost prema kvercetinu. Sintetisan je provodljivi polimer polianilin (PANI) koji formira tanak sloj polimera na platinskoj disk elektrodi procesom ciklične voltametrije u rastvoru monomera anilina i dopanta. Polianilin (PANI) je dopiran sumpornom kiselinom (H_2SO_4). Tehnikom ciklične voltametrije dobijeni su kvalitativni podaci o elektrodama. Elektroda modifikovana polimerom ($PANI/H_2SO_4$) pokazuje veći voltametrijski odziv u rastvorima kvercetina nego u pozadinskom elektrolitu, dok nemođifikovana elektroda pokazuje isti voltametrijski odziv u rastvorima kvercetina u odnosu na pozadinski elektrolit. Stoga je elektroda modifikovana polimerom ($PANI/H_2SO_4$) pogodna za određivanje kvercetina u uzorcima, što je eksperimentalno potvrđeno u rasponu koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-5} M. Metodom kalibracione prave određena je koncentracija kvercetina u ekstraktu kantariona (*Hypericum perforatum*) u metanolu.

Uvod

Kvercetin se smatra pretečom i predstavnikom svih bioflavonoida. Hemijska struktura kvercetina je osnova i „skelet” većine drugih bioflavonoida, uključujući rutin, hesperidin i dr. Brojne lekovite biljke svoju aktivnost duguju

upravo kvercetinu. Kvercetin je dobar protivupalni agens jer direktno blokira nekoliko početnih nivoa upalnog procesa. Kvercetin blokira sintezu i oslobađanje histamina i drugih medijatora upale. Osim toga, dokazano je jak antioksidant i štiti LDL-holesterol od oksidacije, smanjujući na taj način opasnost od njegovog nakupljanja. Kvercetin sprečava zgrušavanje krvi, a time i stvaranje krvnih ugrušaka (Agarwal i Verma 2011.)



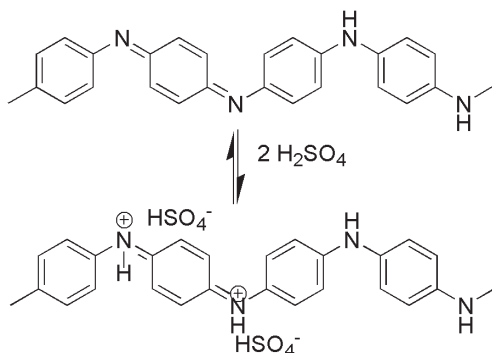
Slika 1. Kvercetin

Figure 1. Quercetin

Provodljivi polimeri su po svojoj strukturi dopirani polimeri s konjugovanim dvostrukim vezama. Mogućnost provodljivosti u ovim materijala potiče od konjugovanih dvostrukih veza koje se prostiru kroz čitavu strukturu polimernog lanca. Da bi se neutralni konjugovani polimeri preveli u provodljivo stanje potrebno je uvođenje slobodnih nosilaca naelektrisanja, tj. oksidacija ili redukcija polimera. Ovaj proces se naziva dopiranje polimera (Duić 1992).

Jovan Baljak (1999), Zvornik, Braće Obradovića 5, učenik 4. razreda JU SŠC „Petar Kočić” u Zvorniku

MENTOR: Nikola Obradović, dipl. hemičar



Slika 2. Jednačina reakcije oksidacije i redukcije PANI u PANI-H₂SO₄ sa imobilizacijom SO₄²⁻

Figure 2. Equation ox-red PANI in PANI-H₂SO₄ with immobilization SO₄²⁻

Polianilin (PANI) je provodljivi polimer u obliku emeraldin soli. Prednosti PANI u odnosu na ostale provodljive polimere su znatno niža cena, jednostavan način sinteze, stabilnost u atmosferskim uslovima, visoka električna provodljivost. Elektrohemijskom sintezom PANI polimera u toku redukcije privlači pozitivne jone M⁺ da bi izjednačio negativno naelektrisanje dopantnog jona SO₄²⁻. U toku oksidacije PANI će odbijati pozitivne jone M⁺, a dopantni jon SO₄²⁻ će ostati imobilisan. Polimer je dopiran sa H₂SO₄. (slika 2) (Cassagnol *et al.* 1998)

Različite analitičke metode, poput HPLC i spektrofotometrijskih metoda, mogu biti korišćene u određivanju niskih koncentracija različitih analita, ali ove metode zahtevaju skupe instrumente i ne mogu se koristiti za in situ merenja. S druge strane, voltametrijom pravougaonih talasa (eng. square wave voltammetry, u daljem tekstu SWV) je pogodna metoda za određivanje zbog niske cene, visoke osetljivosti i jednostavnog rada. Ciklična voltometrija se koristi za kvalitativno ispitivanje elektroda modifikovane provodljivim polimerima.

Cilj ovog istraživanja je razvijanje analitičke metode za određivanje koncentracije kvercetina. U ovu svrhu, kao radna elektroda, iskorišćena je platinska disk elektroda modifikovana provodljivim polimerima čime je povećana selektivnost prema kvercetinu.

Materijal i metode

Elektrohemijska sinteza polimera. Sintetisan je provodljivi polimer PANI koji se formira kao tanak sloj polimera na elektrodi. Tako modifikovana elektroda se koristi za ispitivanje elektrohemijskog odziva prema kvercetinu. U elektrohemijsku ćeliju uređaja za cikličnu volta-

metriju (DY2000 Series Multichannel Potentiostat) preneto je 25 mL smeše za elektrohemijsku sintezu pripremljena u normalnim sudovima od 25.00 mL, pri moljskim odnosima anilina (Zorka Pharma) i sumporne kiseline (Fluka) 1 : 1 u 0.1 M rastvoru hlorovodonične kiseline (Zorka Pharma). Koncentracije sastojaka smeše su iznosile: 0.1 M anilina i 0.1 M sumporne kiseline. Kao radna elektroda je korišćena platinska disk elektroda (Pt). Pre upotrebe, elektroda je polirana sa dijamantskim pastama (Shuangxin) sukcesivno manje veličine (14 μm, 10 μm, 2.5 μm, 1 μm, 0.5 μm). Posle svakog koraka elektroda je isprana dejonizovanom vodom i obrisana vlažnom tkaninom. Odvojena je tkanina za svaku veličinu čestica. Za uklanjanje preostalih tragova materijala za poliranje elektrode su stavljene u ultrazvučno kupatilo 5 min. Na kraju elektrode su elektrohemijski očišćene u rastvoru sumporne kiseline (c = 0.5 M) na potencijalu +2.0 V 2 min. Zatim, snimljen je ciklični voltamogram 10 ciklusa na potencijalu od -0.23 V do 1.10 V pri brzini skeniranja 100 mV/s. Referentna elektroda koja je korišćena je Ag/AgCl (3M KCl). Kao pomoćna elektroda je korišćena platinska žica. PANI film je elektrohemijski sintetisan pomoću ciklične voltametrije, sa promenom potencijala od -0.2 V do 1.1 V u toku 15 ciklusa pri brzini skeniranja 50 mV/s. Nakon sinteze elektrode su čuvane u rastvoru 0.1M HCl (Wang i Levon 2012).

Ispitivanje elektrode modifikovane polimerom. Elektrode modifikovane PANI polimerom su korišćene za ispitivanje odziva prema kvercetinu. Snimljeni su ciklični voltamogrami i SW voltamogrami u rastvorima kvercetina (50% EtOH fosfatni pufer pH = 6.8) (Acros) različitih koncentracija (tabela 1) u koje je dodato 500 μL kalijum-heksacijanoferata K₃[Fe(CN)₆] (50 mM) (Alkaloid) kao medijator (Lei *et al.* 2005). Ciklični voltamogrami snimljeni su pri brzini ske-

niranja od 100 mV/s sa promenom potencijala od -1.00 do +1.00 V. Pre svakog snimanja rastvor u elektrohemijskoj ćeliji je deaerisan argonom 5 min. Kao radne elektrode su korišćene elektroda modifikovana PANI polimerom i nemodifikovana elektroda. Snimljeni su SW voltamogrami i konstruisana je kalibraciona prava.

Tabela 1. Koncentracija standardnih rastvora kvercetina

Broj rastvora	Koncentracija (mol/dm ³)
QV 1	1.0×10^{-3}
QV 2	5.0×10^{-4}
QV 3	2.5×10^{-4}
QV 4	1.0×10^{-4}
QV 5	5.0×10^{-5}
QV 6	2.5×10^{-5}
QV 7	1.0×10^{-5}

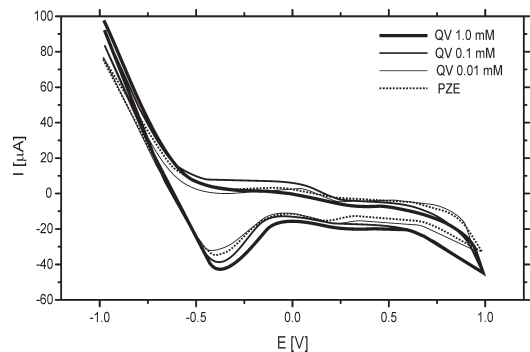
Određivanje kvercetina u uzorku. Kao uzorak je korišćena osušena biljka kantariona (*Hypericum perforatum*). Odmereno je 40 mg osušene i iseckane biljke. U uzorak je sipano 40 mL metanola (J. T. Baker) i sonifikovano je pola sata u ultrazvučnom kupatilu. Uzorak je profiltriran, a filtrat je uparen do suva i rastvoren u pozadinskom elektrolitu (50% EtOH fosfatni pufer pH = 6.8). Snimljen je SW voltamogram i izmerena jačina struje na potencijulu +0.55 V. Metodom kalibracione prave je određena koncentracija kvercetina u uzorku.

Rezultati i diskusija

Elektrohemijska sinteza polimera. Ciklični voltamogrami platinske elektrode uronjene u rastvor anilina/ H₂SO₄ se menjaju tokom svakog uzastopnog koraka (ciklusa) u sintezi. Razlika između prvog i drugog, zatim drugog i trećeg ciklusa, posledica je brzog nastanka dimera i trimera anilina. Mala razlika između susednih ciklusa je posledica završetka sinteze filma. U sintezi polianilina dopiranog H₂SO₄ oksidacioni pik velikog inteziteta na potencijalu 0.80 V odgovara oksidaciji monomerne jedinice – anilina. Nastanak redoks aktivnih polimera na elektrodi je praćen pojavom dva redoks para: prvi (0.27V/0.11V) koji odgovara transformaciji leukoemeraldina u emeraldin so i drugi par

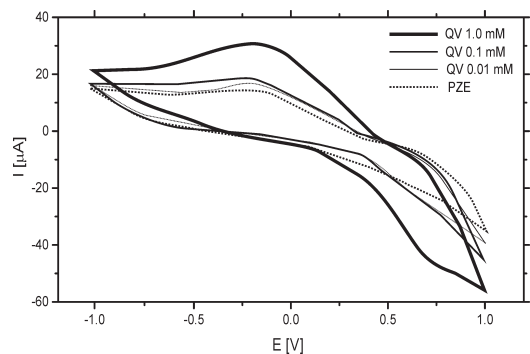
(0.56V/0.47V) koji odgovara transformaciji emeraldin soli u oksidovanu formu. Film je svetložute boje.

Ispitivanje elektrode modifikovane polimerom. Za kvalitativno ispitivanje elektroda snimljeni su ciklični voltamogrami pozadinskog elektrolita (50% EtOH fosfatni pufer pH = 6.8) i rastvora kvercetina 1, 4 i 7 (tabela 1) sa nemodifikovanom radnom elektrodom i sa elektrodom modifikovanom polimerom (PANI/H₂SO₄) pri brzini skeniranja 100 mV/s (slike 3 i 4).



Slika 3. Ciklični voltamogram pozadinskog elektrolita i rastvora kvercetina sa nemodifikovanom elektrodom

Figure 3. Cyclic voltammograms supporting electrolytes and quercetin scan with bare electrode



Slika 4. Ciklični voltamogram pozadinskog elektrolita i rastvora kvercetina sa Pt/PANI/H₂SO₄ elektrodom

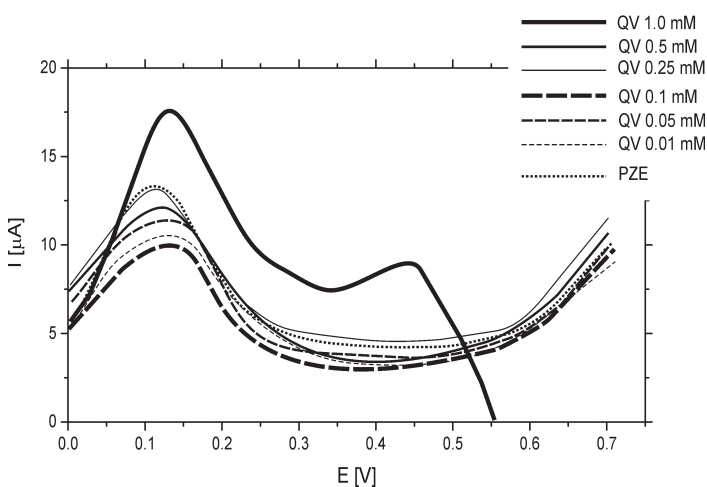
Figure 4. Cyclic voltammograms supporting electrolytes and quercetin scan with Pt/PANI/H₂SO₄ electrode

Na osnovu cikličnih voltamograma može se zaključiti da nemodifikovana elektroda pokazuje isti voltametrijski odziv za rastvore kvercetina i pozadinskog elektrolita, dok elektroda modifikovana polimerom (PANI/H₂SO₄) za koncentracije kvercetina od 1×10⁻³ M do 1×10⁻⁷ M pokazuje veći voltametrijski odziv u rastvorima kvercetina u odnosu na pozadinski elektrolit na potencijalima +0.55 V i -0.30 V na kojima dolazi do oksidacije i redukcije kvercetina. Koncentracija kvercetina je srazmerna voltametrijskom odzivu elektrode, tj. intezitet struje opada sa smanjenjem koncentracije rastvora.

Za kvantitativno određivanje kvercetina snimljeni su SW voltamogrami u pozadinskom elektrolitu i rastvorima kvercetina (tabela 1), na potencijalu od 0.7 V do -1.1 V, pri koraku po-

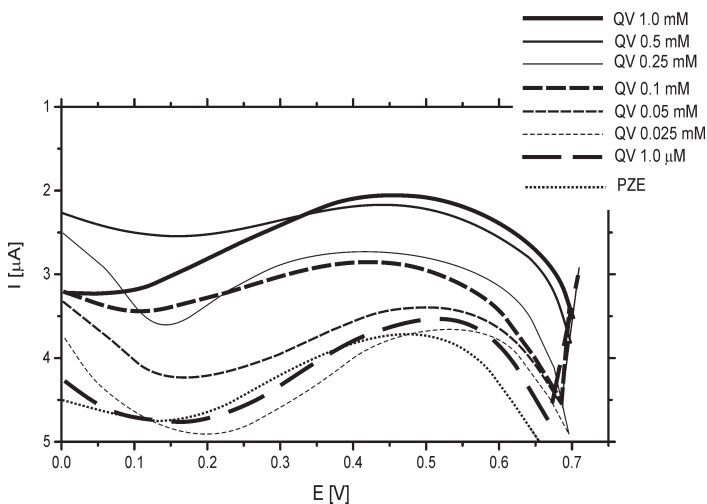
tencijala 0.007 V, pulsnoj amplitudi 0.120 V i frekvenciji 5 Hz sa nemodifikovanom elektrodom i elektrodom modifikovanom polimerom (PANI/H₂SO₄). SW voltamogrami su prikazani u oblasti potencijala od 0 V do 0.7 V (slike 5 i 6).

Na osnovu SW voltamograma može se zaključiti da nemodifikovana elektroda pokazuje iste voltametrijske odzive u rastvorima kvercetina koncentracije manje od 1×10⁻³ M i u pozadinskom elektrolitu. Elektroda modifikovana polimerom (PANI/H₂SO₄) pokazuje voltametrijske odzive srazmerne koncentraciji rastvora kvercetina na potencijalu +0.55 V, tj. intezitet struje opada sa smanjenjem koncentracije rastvora kvercetina. Na osnovu voltamograma konstruisana je kalibraciona prava. Kalibraciona prava je dobijena tako što je merena vrednost



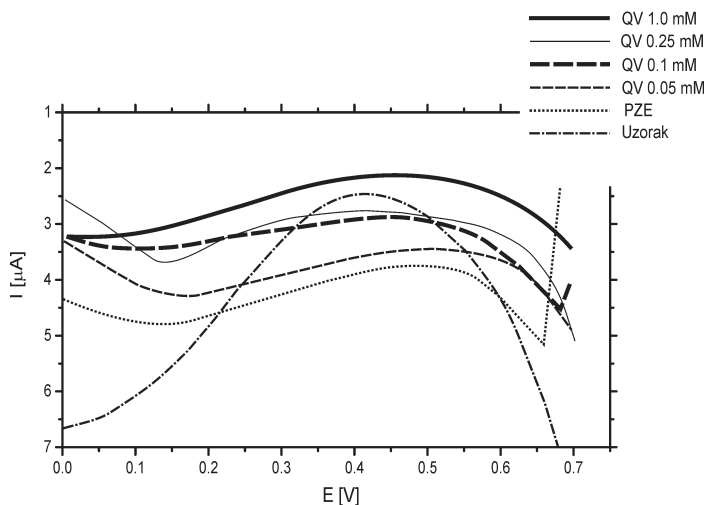
Slika 5. Voltamogrami pravouglanih talasa pozadinskog elektrolita i rastvora kvercetina sa nemodifikovanom elektrodom

Figure 5. Square wave voltammograms supporting electrolyte and quercetin scan with bare electrode



Slika 6. Voltamogrami pravouglanih talasa pozadinskog elektrolita i rastvora kvercetina sa Pt/PANI/H₂SO₄ elektrodom

Figure 6. Square wave voltammograms supporting electrolyte and quercetin scan with Pt/PANI/H₂SO₄ electrode



Slika 7. Voltamogram pravouglanih talasa uzorka snimljen sa Pt/PANI/H₂SO₄ elektrodom

Figure 7. Square wave voltammograms sample scan with Pt/PANI/H₂SO₄ electrode

inteziteta struje na potencijalu +0.55 V za svaki rastvor kvercetina i oduzeta vrednost inteziteta struje pozadinskog elektrolita, pa je napravljena zavisnost razlike struje od koncentracije. Kalibraciona prava je linearna u rasponu koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-5} M. U rastvorima kvercetina koncentracija većih od 1×10^{-4} M dolazi do prezasićenja na elektrodi, a rastvori koncentracija manjih od 1×10^{-5} M pokazuju isti odziv kao pozadinski elektrolit (slika 6). Dobijena je jednačina prave:

$$y = (8920 \pm 540) x - (0.110 \pm 0.031)$$

i koeficijent determinacije iznosi $R^2 = 0.988$. Elektroda koja je modifikovana polimerom (PANI/H₂SO₄) pokazuje veći voltametrijski odziv od nemodifikovane elektrode i pogodna je za određivanje kvercetina u uzorcima u rasponu koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-5} M.

Određivanje kvercetina u uzorcima. Nakon ekstrakcije, filtriranja i uparavanja metanola masa suvog ostatka uzorka je iznosila 0.0145 g. Suvi ostatak je rastvoren u pozadinskom elektrolitu (50% EtOH fosfatni pufer pH = 6.8) i snimljen je SW voltamogram sa elektrodom modifikovanom polimerom (PANI/H₂SO₄). SW voltamogrami su prikazani u oblasti potencijala od 0 V do 0.75V (slika 7).

Na osnovu SW voltamograma uzorka izmerena je vrednost jačine struje na potencijalu +0.55 V i iz razlike inteziteta struje u rastvoru uzorka i pozadinskom elektrolitu izražena je koncentracija kvercetina u uzorku metodom kalibracione prave za kvercetin. Koncentracija kvercetina u uzorku iznosi 1×10^{-4} M. U jednom gramu biljke kantariona (*Hypericum perforatum*) nalazi se 30.2 mg kvercetina.

bracione prave za kvercetin. Koncentracija kvercetina u uzorku iznosi 1×10^{-4} M. U jednom gramu biljke kantariona (*Hypericum perforatum*) nalazi se 30.2 mg kvercetina.

Zaključak

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da nemodifikovana elektroda pokazuje isti voltametrijski odziv u rastvorima kvercetina i pozadinskom elektrolitu dok elektroda modifikovana polimerom (PANI/H₂SO₄) pokazuje veći voltametrijski odziv u rastvorima kvercetina nego u pozadinskom elektrolitu. Elektroda modifikovana polimerom PANI/H₂SO₄ je pogodna za određivanje kvercetina u uzorcima u rasponu koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-5} M. Određena je koncentracija kvercetina u 40 mg uzorka biljke kantariona lat. *Hypericum perforatum* i iznosi 1×10^{-4} M. 1 g biljke sadrži 30.2 mg kvercetina. Predlog za dalje istraživanje je optimizacija elektrohemijske sinteze polimera, tj. promena koncentracije monomera i vrste dopanta, brzine skeniranja i broja ciklusa tokom ciklične voltametrije kao i polimerizacija u prisustvu kvercetina radi dobijanja molekulske obeležene provodljivog polimera.

Zahvalnost. Želeo bih da izrazim zahvalnost svom mentoru Nikoli Obradoviću, studentu master studija, na pomoći pri izboru teme, strpljenju, a takođe zbog pomoći pri radu i obradi rezultata.

Literatura

- Agarwal J., Verma D. L. 2011. Antioxidative Activity and Flavonoid Composition from *Lepidium sativum*. *Academia Arena*, **3** (3), 25.
- Cassagnol C., Olivier P., Ricard A. 1998. Influence of the dopant on the polyaniline moisture content effects on conductivity and thermal stability. *Applied Polymer Science*, **70**: 1567.
- Duić Lj. 1992. Vodjivi polimeri. *Polimeri*, **13**: 20.
- Lei C-X., Huc S-Q., Na Gao, Shena G-L., Yua G-L. 2004. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer supported by sol-gel derived carbon ceramic electrode. *Bioelectrochemistry*, **65** (1): 33.
- Wang W., Levon K. 2012. Influence of Dopant on Electroactivity of Polyaniline. *Macromolecular Symposia*, **317-318** (1): 240.

Jovan Baljak

Voltammetric Method for Determination of Quercetin using PANI Conducting Polymer Modified Electrode

The aim of this study is the determination of quercetin in *Hypericum perforatum* by square-wave voltammetry, using a conducting polymer modified platinum disk electrode as the working electrode. The advantage of electrochemical methods lies in their simplicity, short time of analysis, and the fact they are less prone to matrix effects. Qualitative data about modified and bare electrodes was obtained via cyclic voltammetric experiments under the same experimental conditions, thus enabling comparison. The electrodes modified with the PANI/H₂SO₄ polymer showed a higher response in quercetin solutions than in the supporting electrolyte. Bare electrodes showed the same response in both quercetin solutions and the supporting electrolyte. The platinum disk electrode modified with PANI/H₂SO₄ polymer is suitable for the determination of quercetin in the concentration range of 1×10⁻⁴ M to 1×10⁻⁵ M. The quercetin concentrations were determined in *Hypericum perforatum*. 