

Sistem de senzori
pe bază de **mină de creion** pentru
analiza compușilor de tip naringenin din băuturi
(PENSENAR)

PN-III-P2-2.1-PED-2016-0477

PROIECT Nr. 179PED / 2017

Sursa de Finantare:

UNITATEA EXECUTIVA pentru FINANTAREA
INVATAMANTULUI SUPERIOR, a CERCETARII,
DEZVOLTARII si INOVARII (UEFISCDI)

ECHIPA DE CERCETARE



COORDONATOR (CO)

Universitatea din București

DAVID Gabriela Iulia - *Director de proiect*

PARTENER (P1)

**Institutul Național de
Cercetare Dezvoltare pentru
Științe Biologice**

**LIȚESCU-FILIPESCU Simona Carmen -
*Responsabil***

VALOAREA CONTRACTULUI

ANUL	Sursa 1 (lei)	Sursa 1 Angajament (lei)	Sursa 2 Cofinantare (lei)	TOTAL (lei)
2017	117.647,00	58.823,00	0,00	176.470,00
2018	298.530,00	0,00	0,00	298.530,00
TOTAL	416.177,00	58.823,00	0,00	475.000,00

OBIECTIVE

Obiectivul general al proiectului îl constituie **dezvoltarea, optimizarea și validarea completă a unui nou sistem dual de senzori** pentru evaluarea conținutului și a eficienței **naringeninului (NG) și a derivaților de tip naringenin ca antioxidanți**. Sistemul dezvoltat va avea la bază senzori voltametrici pe bază de grafit mină de creion (PGE), care sunt ieftini, disponibili comercial pe scară largă și au proprietăți bune ca materiale de electrod. Dispozitivul obținut va fi un sistem analitic eficient și fiabil pentru furnizarea rapidă de răspunsuri utile pentru luarea deciziilor de tip da/nu în controlul de proces.

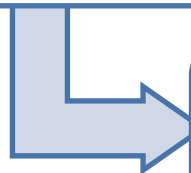
Obiectivele specifice ale proiectului sunt: (i) Optimizarea și pre - validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de măsurare pentru evaluarea sensibilă și fiabilă a conținutului de naringenin (NG) și a derivaților de tip NG; (ii) Optimizarea și pre - validarea dispozitivului pe baza de PGE și a metodei electrochimice de evaluare a capacității antiradicalice a derivaților de tip NG; (iii) Optimizarea și validarea răspunsului dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru compușii fenolici de tip NG; (iv) Demonstrarea aplicabilității dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pe probe reale (băuturi).

ETAPA 1– 2017

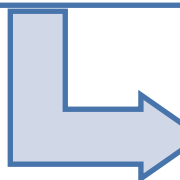
Optimizarea și pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE (electrod de grafit mină de creion) și a metodei electrochimice de măsurare pentru evaluarea sensibilă și fiabilă a conținutului de naringenin (NG) și a derivaților de tip NG. Optimizarea și pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de evaluare a capacității antiradicalice a derivaților de tip NG.

ACTIVITĂȚI

Act 1.1 - Optimizarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei DPV de măsurare pentru compuși de tip NG

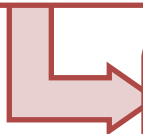


Act 1.2 - Dezvoltarea unei metode alternative de măsurare-metoda cronoamperometrica (CA).

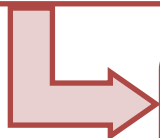


Act 1.3 - Pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de măsurare (DPV sau CA) pentru compuși de tip NG.

Act 1.4 - Optimizarea dispozitivului pe baza de PGE și a metodei DPV pentru evaluarea capacității antiradicalice a NG și a compușilor de tip NG.



Act 1.5 - Dezvoltarea unei metode alternative de măsurare-metoda cronoamperometrică (CA).



Act 1.6 - Pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de măsurare pentru evaluarea proprietăților antiradicalice ale compușilor fenolici de tip NG.

INSTRUMENTAȚIE

Sistem electrochimic **Autolab PGSTAT 12** conectat la PC cu software GPES4.9.

Celulă voltametrică cu trei electrozi: electrod de lucru; electrod de referință Ag/AgCl, KCl (3M) și contraelectrod de Pt.

Electrozii de lucru testați :

- electrod de Pt –aria suprafeței active: 3,14 mm²;
- electrodul de cărbune sticlos (GCE) -aria suprafeței active: 7 mm²;
- **electrodul de grafit mina de creion (PGE** = pencil-graphite electrode) (Fig.a 1) - aria suprafeței active: 15,86 mm² (Fig. 2).



Figura 1. PGE

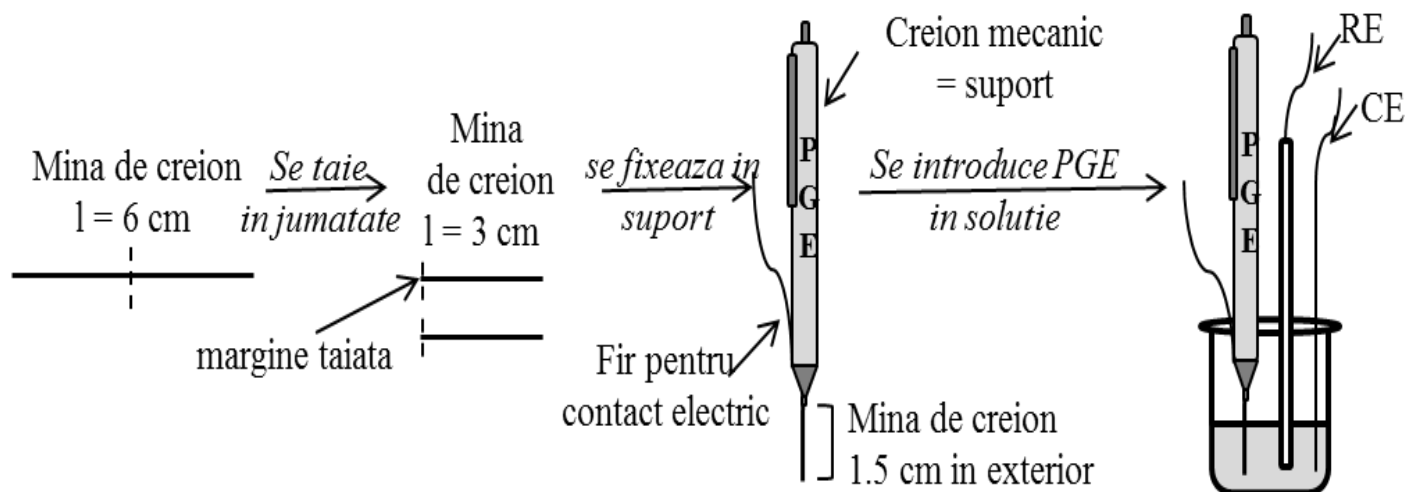


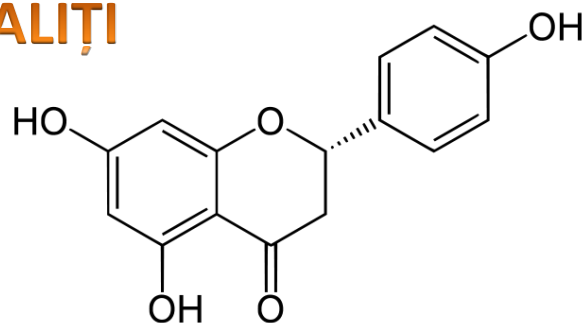
Figura 2. Etapele obținerii PGE. ¹

¹ David I.G., Florea M.A., Cracea O.G., Popa D.E., Buleandră M., Iorgulescu E.E., David V., Badea I.A., Ciucu A.A., Voltammetric determination of B₁ and B₆ vitamins using a pencil graphite electrode, Chem. Pap., 69 (2015) 901:910.

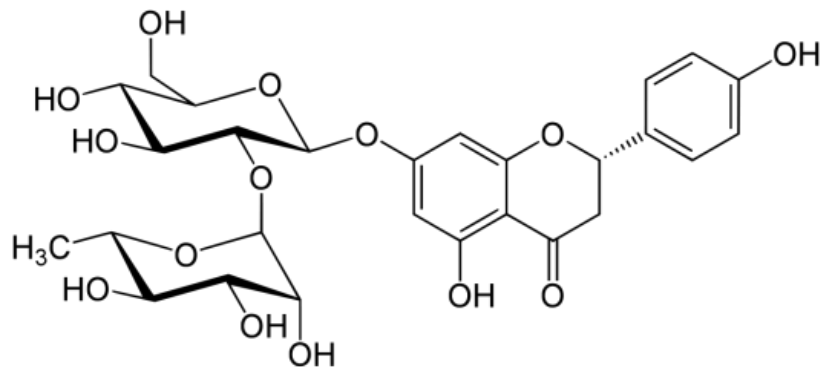
TEHNICI VOLTAMETRICE

- Voltametrie ciclică (CV)
- Voltametrie diferențială cu pulsuri de potențial (DPV)
- Cronoamperometrie (CA)

ANALIȚI



Naringenin (NGN)

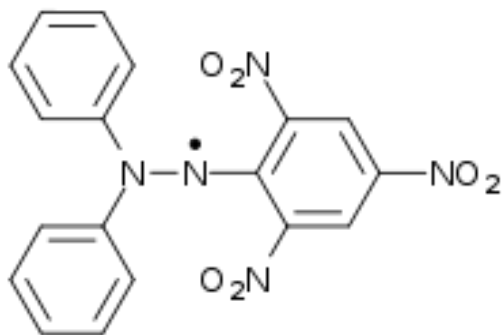


Naringin (NG)

REACTIVI

Soluțiile stoc de NG, NGN și DPPH s-au preparat în etanol.

Soluțiile de lucru de NGN și NG s-au preparat din soluția stoc prin diluare cu electrolitul suport corespunzător și aducere la semn la balon cotat de 10 mL.



DPPH

Electroliti suport:

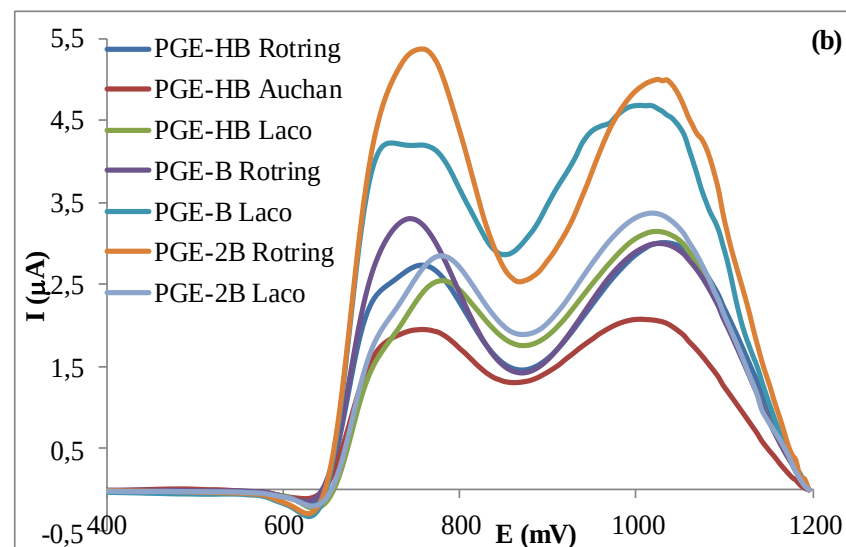
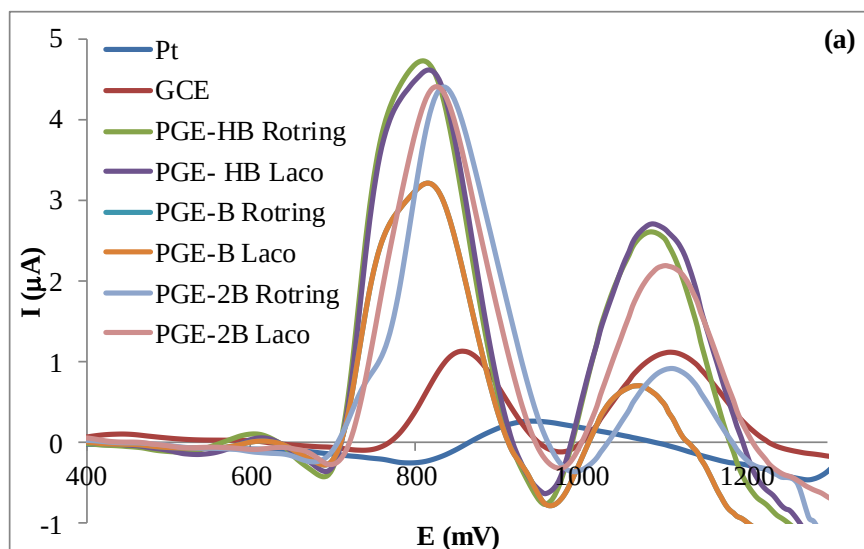
- soluții tampon acetat (ABS) pH = (3,80; 4,00; 4,60; 5,20)
- soluție tampon fosfat (PBS) pH = 7,00
- soluții tampon Britton Robinson (BRB) cu pH-uri cuprinse în domeniul 1,81 11,20.
- soluție 0,05 M ftalat acid de potasiu pH=4,04.

Act 1.1 - Optimizarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei DPV de măsurare pentru compuși de tip NG

Stabilitatea soluției

Semnalul voltametric înregistrat pe soluții de 1 zi scade cu ~14%
→ soluțiile stoc/de lucru trebuie preparate în ziua efectuării determinărilor

Influența materialului de electrod



DPV înregistrate pe diferite materiale de electrod pentru o soluție (a) $4,2 \cdot 10^{-4} M$ NG în ABS pH=4,00 și (b) $10^{-4} M$ NGN în 0,05 M ftalat acid de potasiu pH=4,04.

Material de electrod optim:

NG: - HB Rotring

NGN: - 2B Rotring

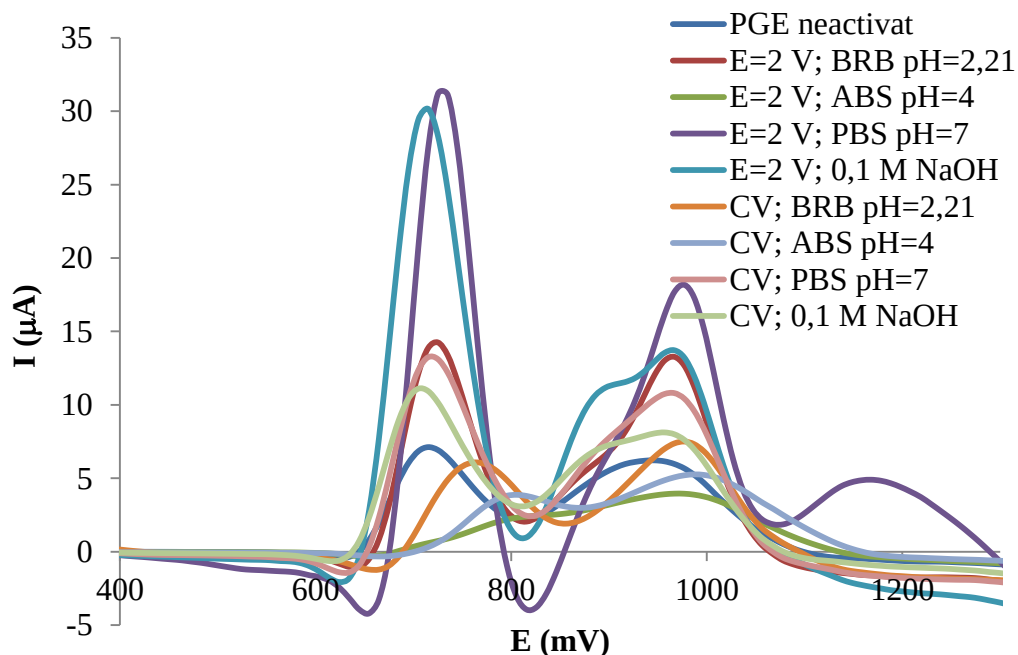
Influența pretratării electrochimice a suprafeței electrodului

S-a testat activarea :

- potențiodinamică (de la -0,5 la -2 V; $v = 500$ mV/s; $n=10$) cât și
- potențiostatică (2 V; 60 s)

în diferiți electroliți suport cu diferite valori de pH și anume: BRB pH = 2,21; ABS pH = 4,00 ; PBS pH = 7,00 și 0,2 N NaOH

Pentru studiile ulterioare s-a ales utilizarea **minelor de creion din grafit (2B pentru NGN și HB pentru NG)** activate potențiostatic în PBS pH=7,00

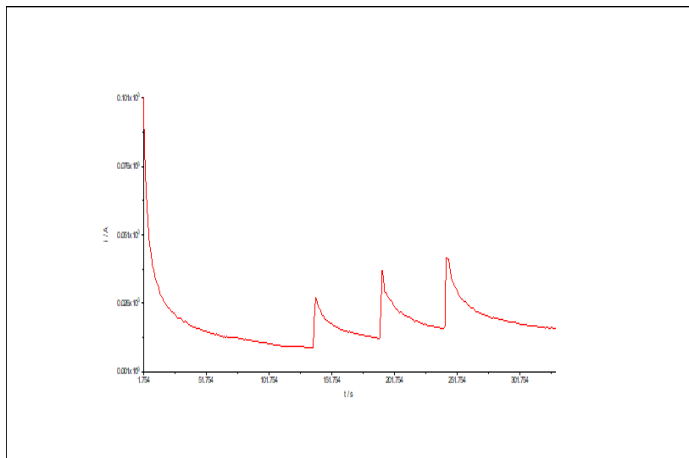


DPV înregistrate pe mine 2B activate în diferite moduri pentru o soluție $5 \cdot 10^{-5}$ M NGN în ftalat acid de K pH=4,04. Treapta de potențial: 0,01 V; amplitudinea de modulare: 0,15 V.

Influența pH-ului și a naturii electrolitului suport

- ✓ S-a studiat atât influența pH-ului (domeniul 1,81- 11,20) cât și natura electrolitului suport (BRB, ABS, ftalat acid de potasiu) asupra răspunsului voltametric (CV, DPV) al NGN și al NG pe PGE pre-tratat potențiostatic.
- ✓ Atât curentul (I_p) cât și potențialul (E_p) picurilor de oxidare ale NGN și NG au variat cu pH-ul soluției de analizat → în procesul de electrod sunt implicați și protoni.
- ✓ Din pantele ecuațiilor dreptelor $E_p = f(\text{pH}) \rightarrow$ numărul de electroni este egal cu numărul protonilor implicați în procesul de electrod
- ✓ În BRB, cele mai intense picuri de oxidare înregistrate pe PGE electroactivat pentru NGN și NG s-au obținut la pH 4,56
- ✓ Cele mai intense picuri DPV de oxidare ale NGN și NG s-au obținut folosind ca electrolit suport o soluție **0,05 M ftalat acid de potasiu pH = 4,04**, pentru studiile ulterioare acesta se va folosi ca electrolit suport.

Act 1.2 - Dezvoltarea unei metode alternative de măsurare-metoda cronoamperometrica (CA).



Cronoamperograma pentru determinarea în prezență a NG și NG-G

Caracteristici de performanță ale metodei cronoamperometrice de determinare a naringeninului si naringinului utilizând electrozi de lucru PGE HB Rotring activat

Compus	Ecuția curbei de răspuns	Domeniul de liniaritate (M)	Limita de detectie (M)	RSD (%)
Naringenin (NG)	$I \text{ (A)} = 3 \times 10^7 C + 27,09$	$4,62 \times 10^{-6} - 2,68 \times 10^{-4};$ $R = 0,9742$	$1,86 \times 10^{-6}$	9,20
	$I \text{ (A)} = 5 \times 10^8 C - 6,96$	$1,62 \times 10^{-7} - 4,68 \times 10^{-6}; R =$ $0,9987$	$5,57 \times 10^{-8}$	10,32
Naringin (NG-G)	$I \text{ (A)} = 1 \times 10^6 C - 1,24$	$9,62 \times 10^{-6} - 2,68 \times 10^{-4}$ $R = 0,9942$	$4,49 \times 10^{-6}$	11,22

Act 1.3 - Pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de măsurare (DPV sau CA) pentru compuși de tip NG.

Influența concentrației

Domeniul de concentrații investigat:

NGN: $8 \cdot 10^{-9}$ - $3,34 \cdot 10^{-4}$ M

NG: $2 \cdot 10^{-7}$ - $3,11 \cdot 10^{-4}$ M

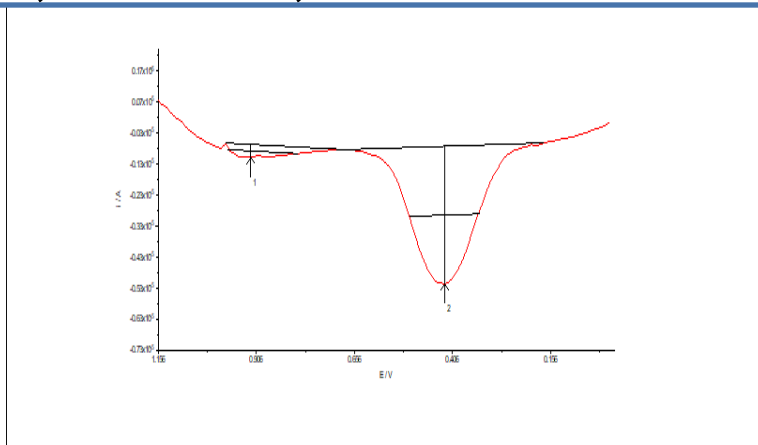
Domeniul de liniaritate:

NGN: $7,86 \cdot 10^{-8}$ - $1,82 \cdot 10^{-4}$ M

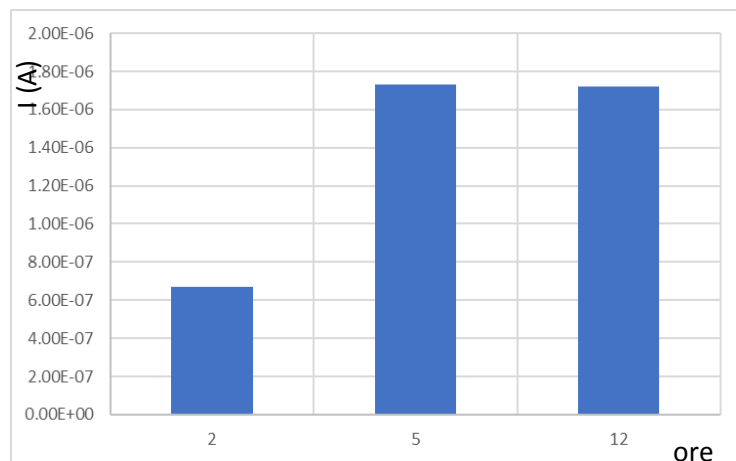
NG: $1,4 \cdot 10^{-6}$ - $1,41 \cdot 10^{-4}$ M

Picul	Domeniul de liniaritate (M)	Ecuția de regresie a dreptei de etalonare	R ²
NGN (PGE 2 B activat)			
1	$7,86 \cdot 10^{-8}$ la $7,62 \cdot 10^{-7}$	$I_{p1a} = 3262638 C_{NGN} + 0,80186$	0,9828
	$4 \cdot 10^{-6}$ la $1,82 \cdot 10^{-4}$	$I_{p1b} = 349613,3 C_{NGN} + 3,0974$	0,9964
2	$7,86 \cdot 10^{-8}$ la $7,62 \cdot 10^{-7}$	$I_{p2a} = 3553119,7288 C_{NGN} + 0,7894$	0,9951
	$4 \cdot 10^{-6}$ la $1,82 \cdot 10^{-4}$	$I_{p2b} = 340922 C_{NGN} + 3,0974$	0,9964
NG (PGE HB activat)			
	$1,39 \cdot 10^{-6}$ la $1,37 \cdot 10^{-5}$	$I_{p1a} = 374170 C_{NG} - 0,0616$	0,9984
	$1,37 \cdot 10^{-5}$ la $1,41 \cdot 10^{-4}$	$I_{p1b} = 71394 C_{NG} + 4,2376$	0,9981

Act 1.4 - Optimizarea dispozitivului pe baza de PGE și a metodei DPV pentru evaluarea capacității antiradicalice a NG și a compușilor de tip NG.

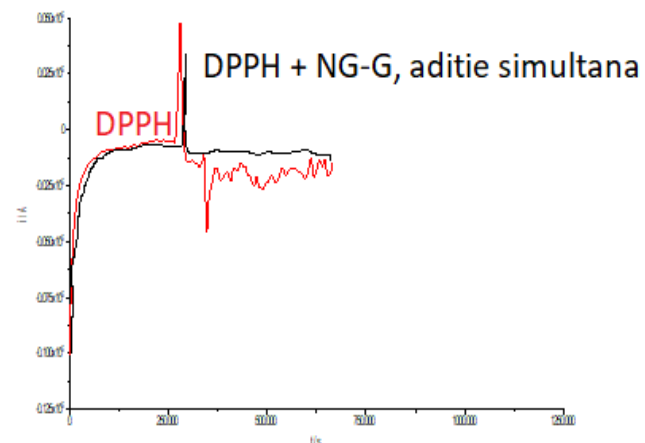


DPV pentru electro-reducerea DPPH-ului pe electrod de lucru PGE HB Rotring activat



Variația intensității curentului de pic al electro-reducerii DPPH-ului cu timpul de imobilizare

Act 1.5 - Dezvoltarea unei metode alternative de măsurare-metoda cronoamperometrică (CA)



CA suprapuse, obținute pe un electrod PGE HB Rotring activat, pentru o adiție de DPPH respectiv adiție simultană de DPPH și NG-G, concentrații echimolare.

Act 1.6 - Pre-validarea dispozitivului pe bază de PGE și a metodei electrochimice de măsurare pentru evaluarea proprietăților antiradicalice ale compuşilor fenolici de tip NG.

Valorile repetabilităților unor parametri ai reacției de eliminare a radicalului liber DPPH monitorizată electrochimic

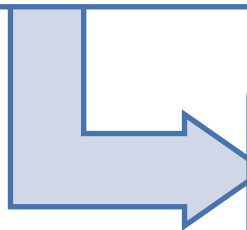
Parametru	Valoare medie	RSD %
$E_{\text{pic DPPH}}$	405 mV	8,87
$I_{\text{pic DPPH}}, [\text{DPPH}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$4,81 \times 10^{-6} \text{ A}$	2,09
$I_{\text{pic DPPH}}, [\text{DPPH}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1,01 \times 10^{-6} \text{ A}$	9,04
ΔI_{pic} solutii echimolare $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,20 \times 10^{-6} \text{ A}$	4,97
ΔI_{pic} solutii echimolare $5 \times 10^{-6} \text{ M}$	$3,06 \times 10^{-7} \text{ A}$	6,98

ETAPA 2- 2018

Optimizarea și validarea răspunsului dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru compușii fenolici de tip NG. Demonstrarea aplicabilității dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pe probe reale (băuturi)

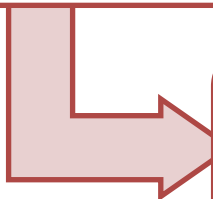
ACTIVITĂȚI

Act. 2.1. - Dezvoltarea dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru evaluarea atât a conținutului cât și al capacității A_{ox}



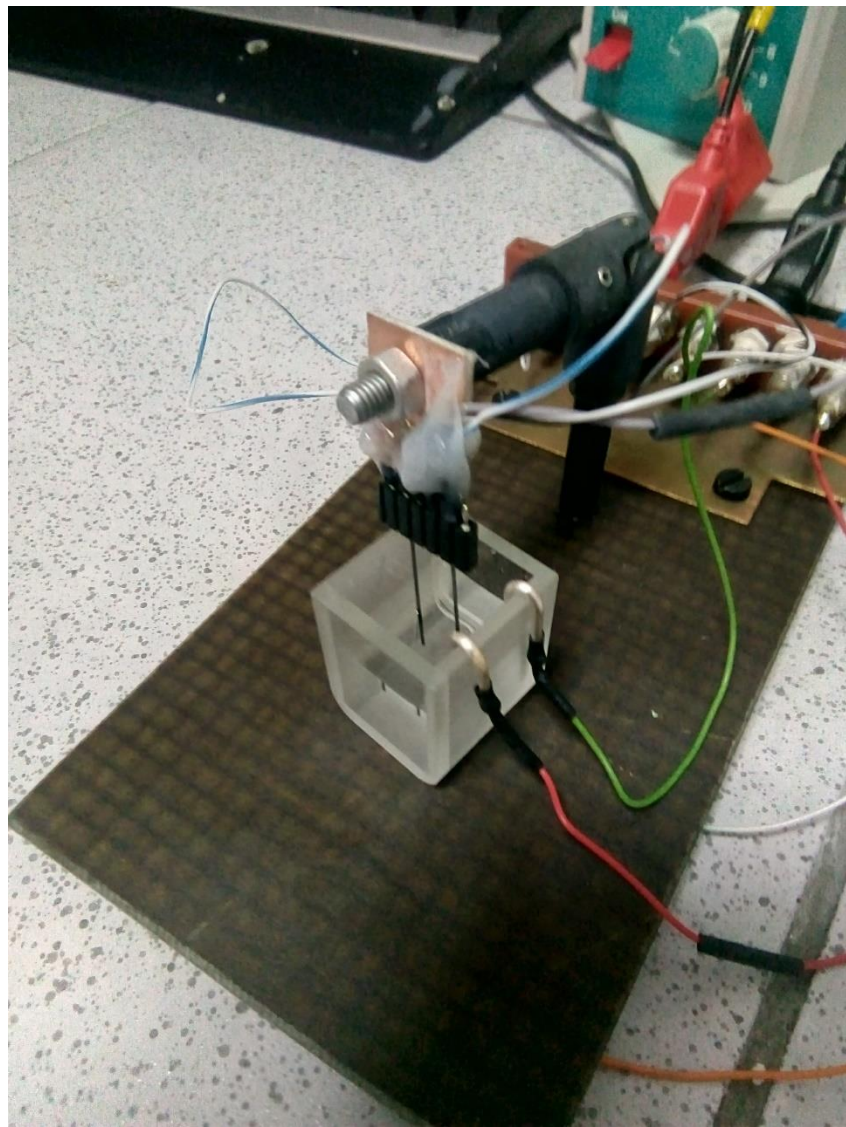
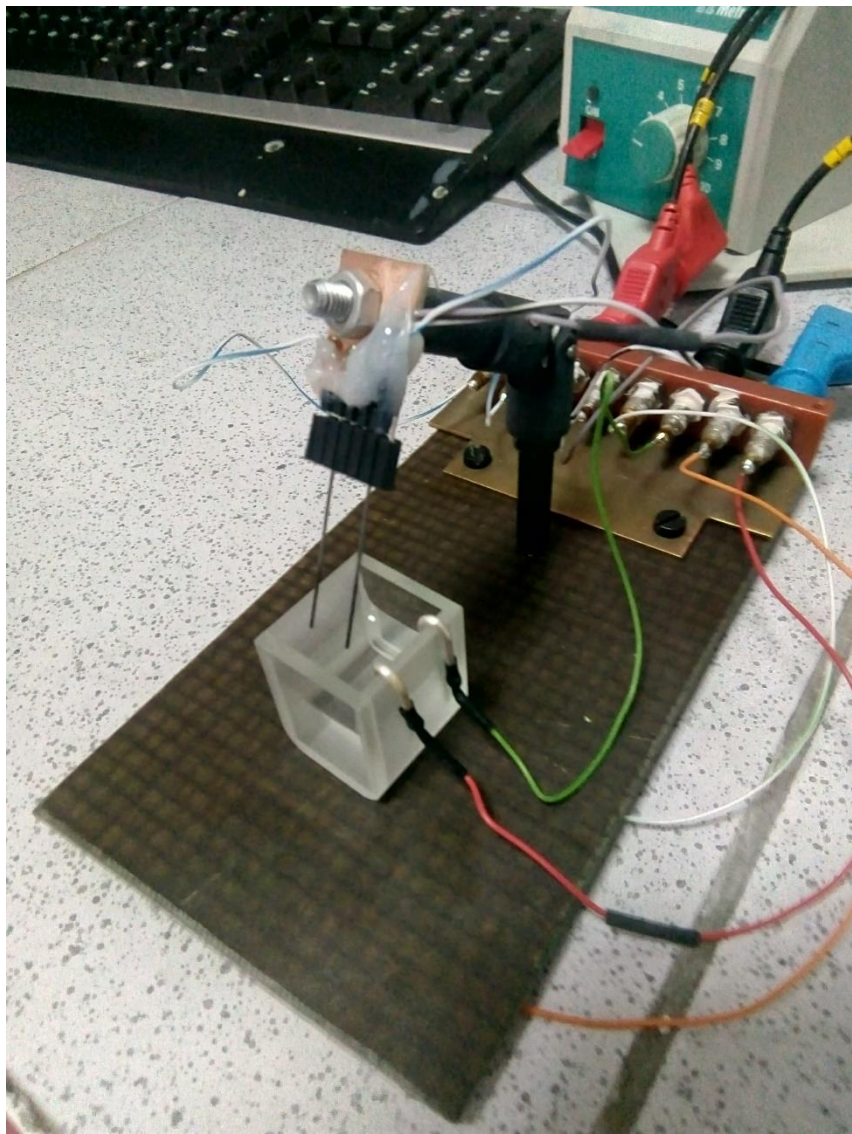
Act. 2.2 - Validarea răspunsului dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru NG și a derivaților de tip NG;

Act 2.3 - Demonstrarea aplicabilității dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pe probe reale (băuturi);



Act 2.4 - Diseminarea rezultatelor.

Act. 2.1. - Dezvoltarea dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru evaluarea atât a conținutului cât și al capacității A_{ox}



Act. 2.2 - Validarea răspunsului dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pentru NG și a derivaților de tip NG;

Stabilitatea senzorilor

electrozii activați pot fi folosiți cu rezultate bune la determinarea conținutului de NG și derivați de tip NG doar aproximativ 24-30 h după activare.

Reproductibilitatea și precizia intermediară a sistemului dual de senzori

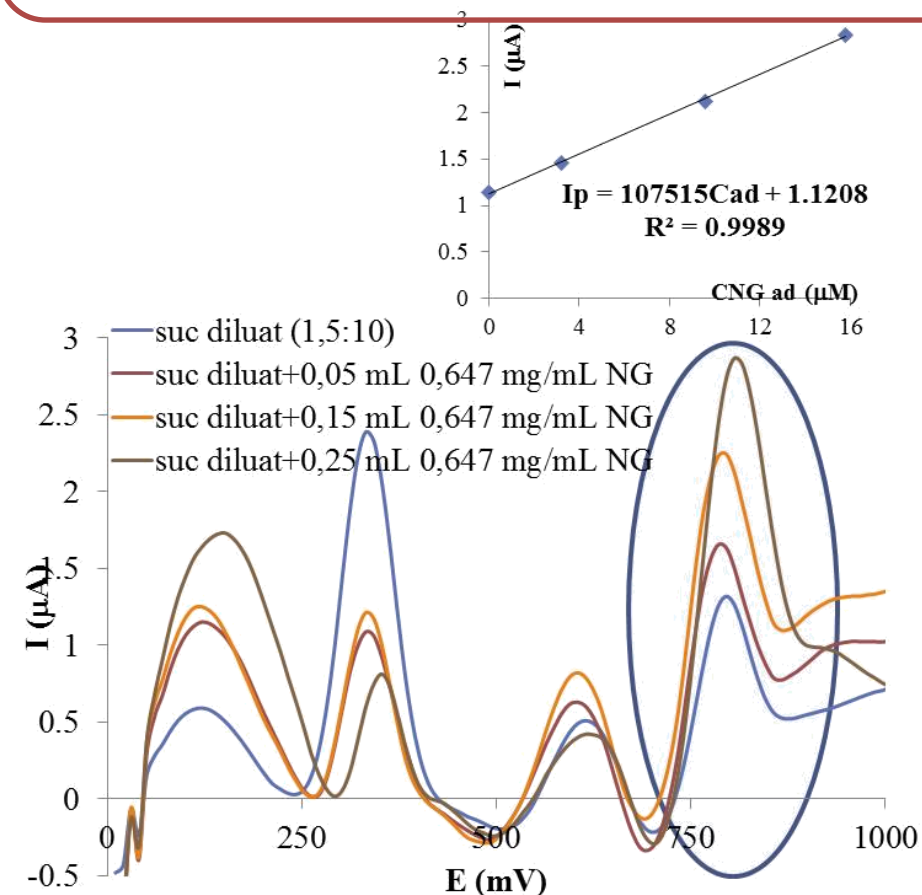
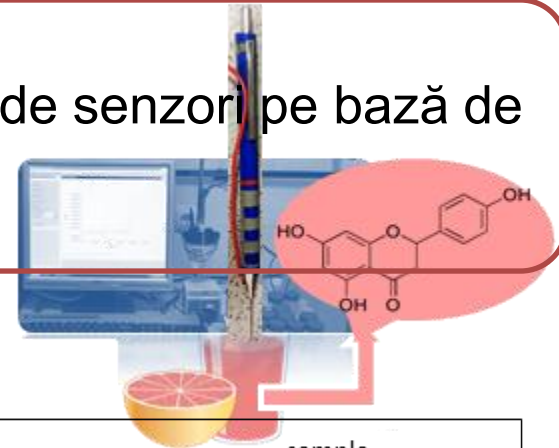
Valorile reproductibilității sistemului dual de senzori obținute prin DPV pe PGE pentru determinarea conținutului de derivați de tip NG

Analit	NG (PGE 2 B activat)	NG-G (PGE HB activat)
Reproductibilitate RSD%	4,53	6,11
Repetabilitate RSD%	3,15	5,83

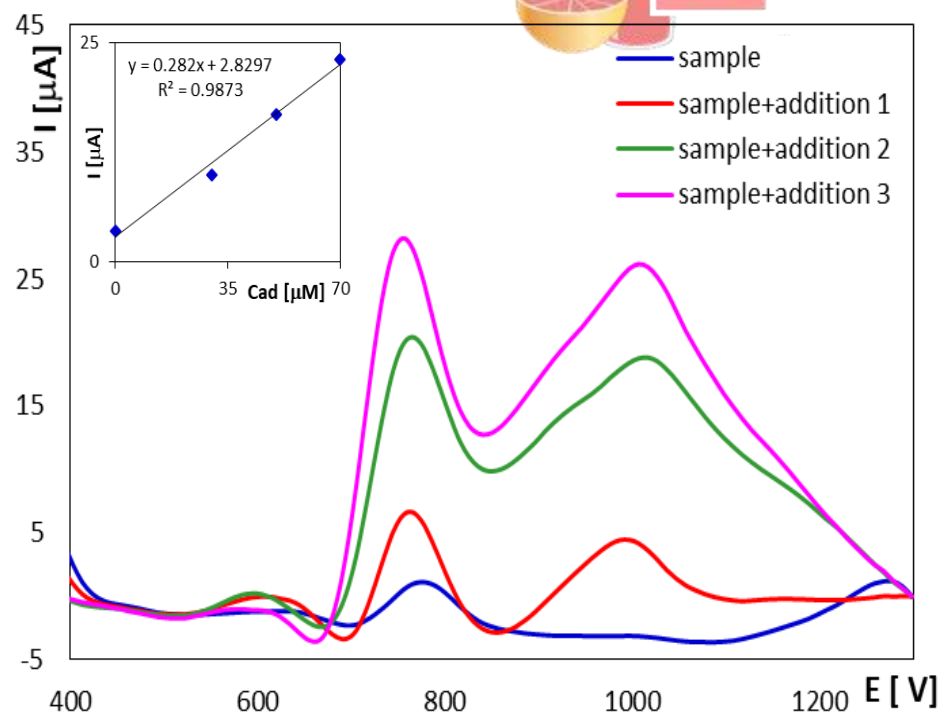
Valorile repetabilităților unor parametri ai reacției de eliminare a radicalului liber DPPH monitorizată electrochimic

Parametru	Valoare medie	RSD %
E _{pic} DPPH	408 ± 3,5 mV	10,87
I _{pic} DPPH, [DPPH] = 1,00 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	321 × 10 ⁻⁹ A	8,09
Δ I _{pic} solutii echimolare NG 1,00 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	200 × 10 ⁻⁹ A	6,99
Δ I _{pic} solutii echimolare NGG 1,00 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	10,6 × 10 ⁻⁹ A	4,93

Act 2.3 - Demonstrarea aplicabilității dispozitivului dual de senzori pe bază de PGE pe probe reale (băuturi);



DPV pe PGE activat pentru o probă de suc Cappy diluată în 0.05 M ftalat acid de K pH=4,00 fără și cu adiții de NG și dependența curentului de pic de concentrația de NG adăugată



DPV pe PGE activat pentru o probă de suc proaspăt stors de grapefruit roz diluat în 0.05 M ftalat acid de K pH=4,00 fără și cu adiții de NGN și dependența curentului de pic de concentrația de NG adăugată

Act 2.4 - Diseminarea rezultatelor.

Rezultatele obținute în urma activității experimentale desfășurate în cadrul proiectului au fost diseminate prin:

- **O prezentare la Sesiunea de Comunicări Științifice a Studenților**, Facultatea de Chimie, Universitatea din București - VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF NARINGIN ON A PENCIL GRAPHITE ELECTRODE, Raluca Radu, Iulia Gabriela David
- **Lucrare de disertație** la Universitatea din București, Facultatea de Chimie, Master: Chimia Medicamentelor și a Produselor Cosmetice - STUDIUL VOLTAMETRIC AL NARINGINULUI PE ELECTROD GRAFIT MINĂ DE CREION, Raluca Radu
- **O comunicare orală și 6 postere** prezentate la 4 conferințe (3 internaționale și una națională cu participare internațională) din România
- **Un articol acceptat spre publicare în revistă indexată ISI**
I. G. David, S. C. Litescu, D. E. Popa, M. Buleandra, L. Iordache, C. Albu, A. Alecu, R. L. Penu, Voltammetric analysis of naringenin at a disposable pencil graphite electrode - application to polyphenol content determination in citrus juice, *Analytical Methods*, 2018, DOI: DOI: 10.1039/C8AY02281J

Conferința Internațională CHIMIA 2018 "NEW TRENDS IN APPLIED CHEMISTRY", - 24-26.05.2018, Constanța, Romania

VOLTAMMETRIC APPLICATIONS OF PENCIL GRAPHITE LEADS, I. G. David, M. Buleandră, D.-E. Popa – prezentare orală

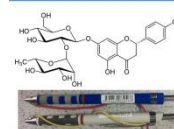


VOLTAMMETRIC INVESTIGATION OF NARINGIN, I. G. David, M. Buleandră, D.-E. Popa, L. Iordache, M.-C. Cheregi, R. Radu – poster



VOLTAMMETRIC INVESTIGATION OF NARINGIN

I.G. David, M. Buleandră*, D.E. Popa, L. Iordache, M.C. Cheregi, R. Radu
University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Panduri 90-92 Av., 050663, Bucharest 5, Romania, *mihaela.buleandra@yahoo.com



Introduction

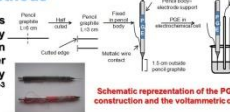
Naringin (NG) is a flavanone glycoside present in citrus fruits, especially grapefruit, being responsible for their bitter taste. NG has antioxidant activity and some other beneficial effects on health [1]. Due to the presence of the HO-groups polyphenols are electroactive and thus their redox behavior can be investigated by electrochemical methods.

The present work describes the cyclic voltammetric (CV) behavior of NG on a disposable pencil graphite electrode (PGE) and the development of a differential pulse voltammetric method (DPV) for its quantitative determination.

Materials and methods

NG working solutions were obtained by successive dilution in Britton-Robinson buffer (BRB) of the freshly prepared ethanolic $5 \cdot 10^{-3}$ M NG stock solution.

Autolab PGSTAT12 system, equipped with a 3 electrodes measurement cell (PGE as working electrode) [2] and a PC running GPES4.9 software, was used for the analytical studies. In order to increase the electrode active surface, PGE was potentiostatic pre-treated at 2 V for 60 s in phosphate buffer solution (PBS) pH 7.00.



Results and Discussions

> The investigated parameters were: electrode material type, electrode surface pretreatment, pH, supporting electrolyte, scan rate, NG solution stability and analyte concentration.

> The best signals were obtained on pretreated HB Rotring pencil leads in 0.05 M KHP (potassium hydrogen phthalate) pH 4.00.

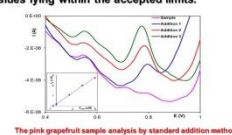
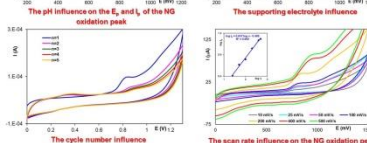
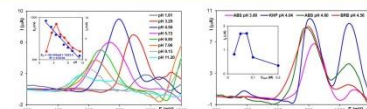
> NG presents two CV irreversible oxidation waves, only that appearing at potentials of about 700-800 mV having analytical significance.

> The NG oxidation was pH-dependent, controlled by a mixed diffusion-adsorption process and implied $1e^-$ and $1H^+$.

> The peak current decrease for repetitive CV suggests a radical mechanism involved in an electro-polymerization process.

> NG was quantitatively determined between 2 and 141 μ M by DPV in 0.05 M KHP pH 4.00, two linear concentration ranges being emphasized.

> The repeatability of the method was evaluated at three NG concentration levels, all the RSD% values lying within the accepted limits.



Conclusions

The developed DPV method for the NG quantification using a cheap, easily available and disposable pre-treated PGE in 0.05 M KHP pH 4.00 is simple, rapid and reliable.

The optimized method was applied with good results for the NG determination in grapefruit samples.

The repeatability of the DPV method

NG concentration (μ M)	RSD %
2	7.62
8	5.47
50	2.13

The performance characteristics of DPV method for the NG quantitative determination on PGE

Linear concentration range (μ M)	Calibration curve equation	R^2	LoD (μ M)	LoQ (μ M)
2 ± 14	$I_p (\mu A) = 0.3742 C_{NG} (\mu M) - 0.0616$	0.9984	0.785	2.29
14 ± 141	$I_p (\mu A) = 0.0714 C_{NG} (\mu M) + 4.2378$	0.9981		

References

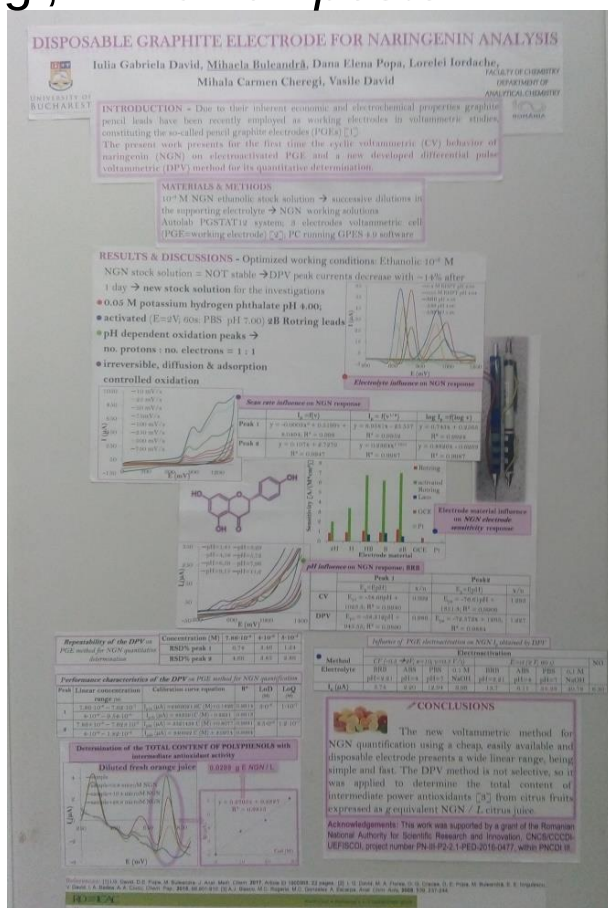
- [1] T. Feng, Y. Wang, Y. Ma, W. Su, Y. Bai, P. Zhao, A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2005) 454-459.
- [2] I. G. David, M.A. Pires, D. E. Popa, M. Buleandră, E. Iordache, V. David, I.A. Balas, A.A. Cinc, Voltammetric determination of B, and B, citra using a pencil graphite electrode. *Chemical Papers* 69 (2018) 901-910.

Acknowledgements. This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation, CNCS-UECCDI-UEFISCDI, project number PN-III-P2-1-PID-2016-0477, within PN3ID III.

4th International Conference on Analytical Chemistry, Bucharest, Romania, 1-3 September 2018

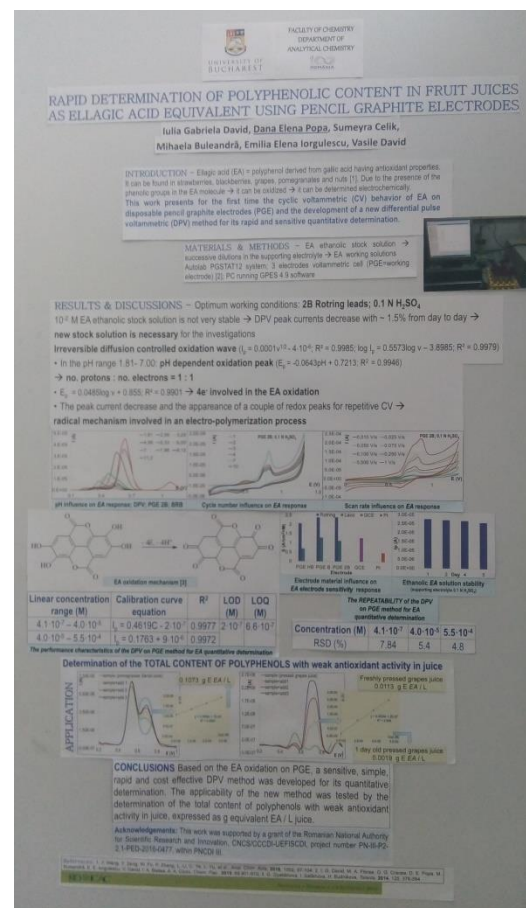
DISPOSABLE GRAPHITE ELECTRODE FOR NARINGENIN

ANALYSIS, I. G. David, M. Buleandră,
D. E. Popa, L. Iordache, M. C.
Cheregi, V. David— poster



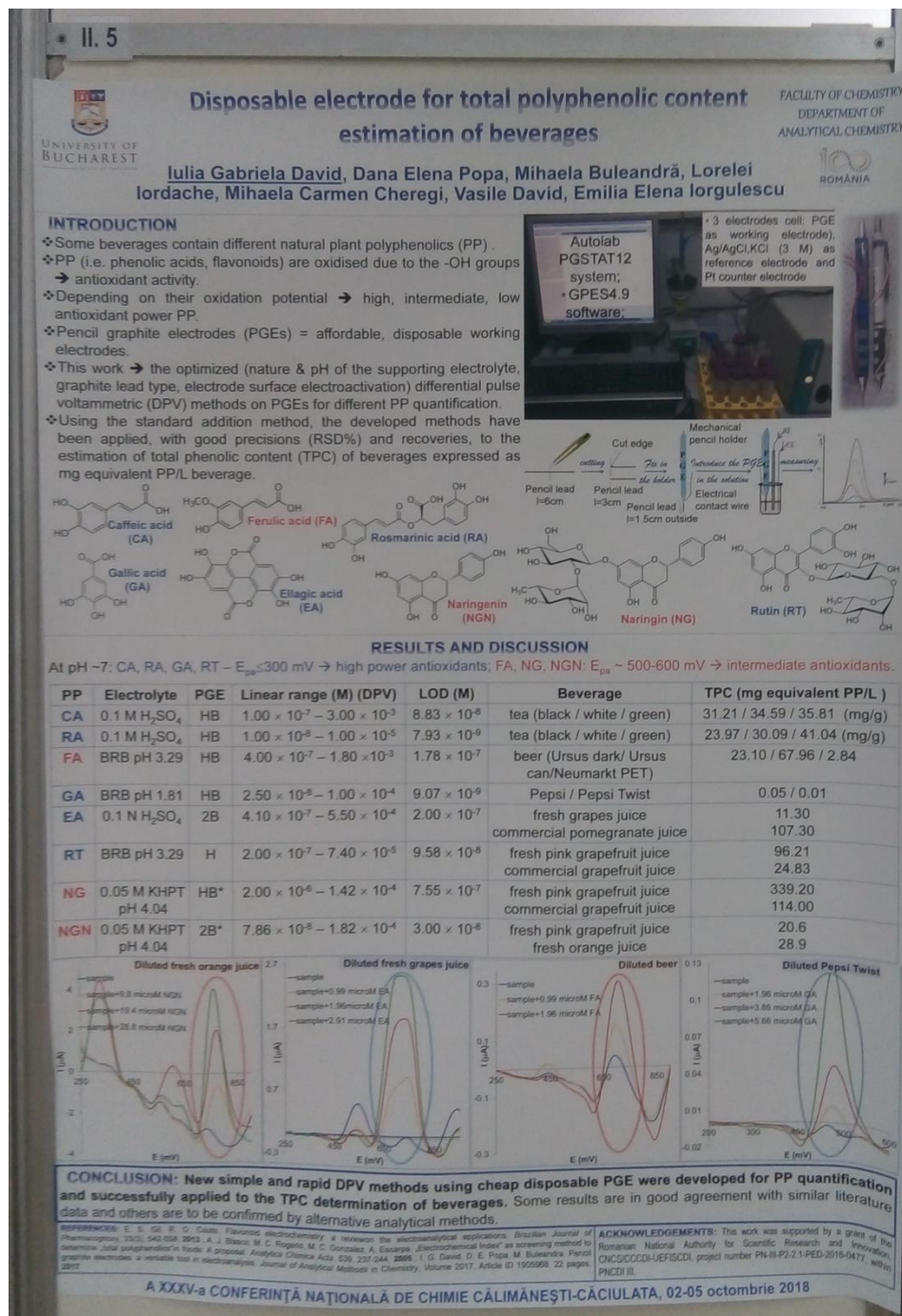
RAPID DETERMINATION OF POLYPHENOLIC CONTENT IN FRUIT JUICES AS ELLAGIC ACID EQUIVALENT USING PENCIL GRAPHITE ELECTRODES,

I. G. David,
D. E. Popa,
S. Celik,
M. Buleandră,
E. E. Iorgulescu,
V. David— poster



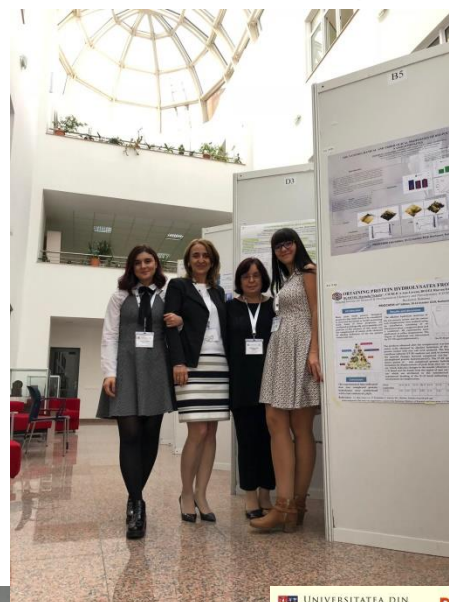
a XXXV-a Conferinta Nationala de Chimie, Călimănești, 2-5 Octombrie 2018

DISPOSABLE ELECTRODE FOR TOTAL POLYPHENOLIC CONTENT ESTIMATION OF BEVERAGES, I. G. David, D. E. Popa, M. Buleandră, L. Iordache, M. C. Cheregi, V. David, E. E. Iorgulescu -poster



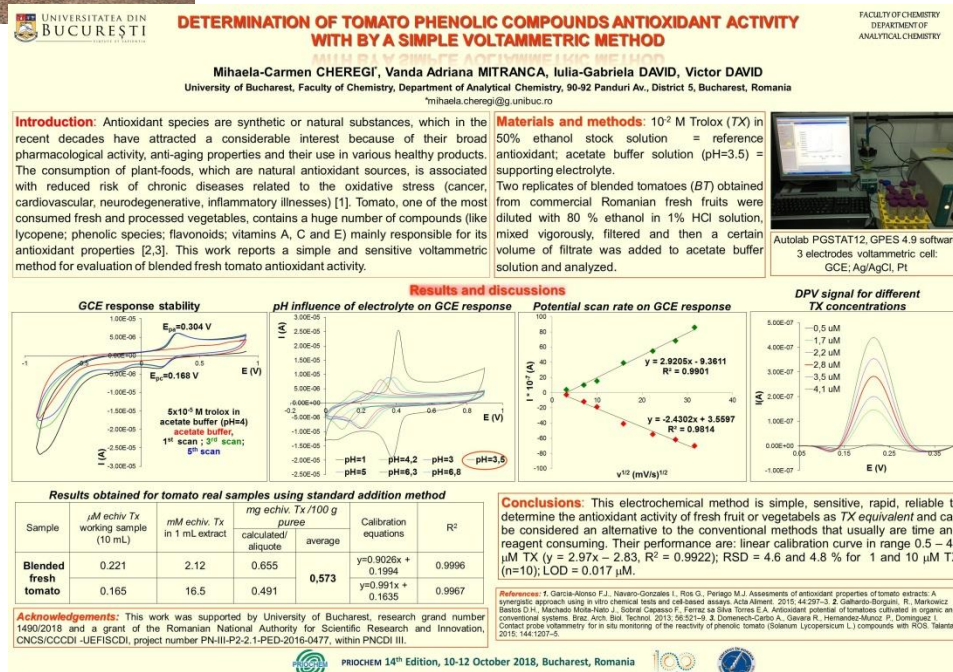
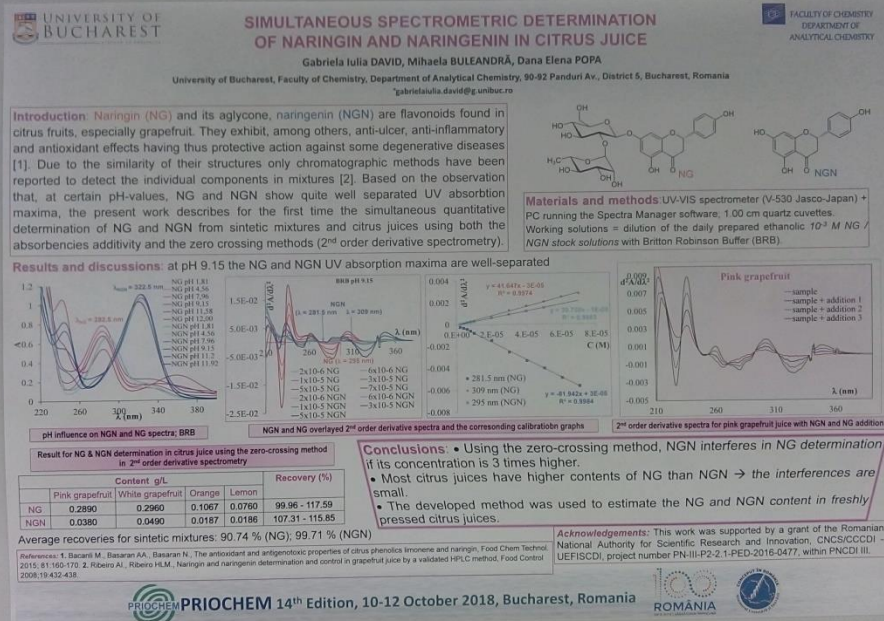
Prioritatile Chimiei pentru o Dezvoltare Durabila - PRIOCHEM - editia XIV, 10-12.10.2018, Bucuresti, Romania

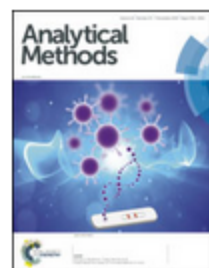
SIMULTANEOUS SPECTROMETRIC DETERMINATION OF NARINGIN AND NARINGENIN IN CITRUS JUICE, G. I. David, M. Buleandră, D. E. Popa – poster



DETERMINATION OF TOMATO PHENOLIC COMPOUNDS ANTIOXIDANT ACTIVITY WITH A SIMPLE VOLTAMMETRIC METHOD, M. C. Cheregi, V. A. Mitrancă, I.-G. David, V. David – poster

52 • P 13





From the journal:

Analytical Methods

Voltammetric analysis of naringenin at a disposable pencil graphite electrode - application to polyphenol content determination in orange juice

[Iulia Gabriela David](#), [Simona Litescu](#), [Dana Elena Popa](#), [Mihaela Buleandra](#), [Lorelei Iordache](#), [Camelia Liliana Penu](#)

Abstract

The electrochemical behaviour of the flavonoid naringenin (NGN) was investigated for the