

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46230

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION AMPEROMETRIC  
METHOD USING TRIOXIDE ION AS REAGENT FOR  
ESTIMATION OF ANTIHEDANT ACTIVITY

PUTEAPORN KLAYPRASERT

MASTER OF SCIENCE  
IN CHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
FEBRUARY 2012

600256359

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46230

**DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION AMPEROMETRIC  
METHOD USING TRIIODIDE ION AS REAGENT FOR  
ESTIMATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY**



**PUTTAPORN KLAYPRASERT**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
IN CHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
FEBRUARY 2012**

**DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION AMPEROMETRIC  
METHOD USING TRIIODIDE ION AS REAGENT FOR  
ESTIMATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY**

PUTTAPORN KLAYPRASERT

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN CHEMISTRY

**EXAMINING COMMITTEE**

*Y. Vaneesorn*  
..... CHAIRPERSON  
Asst. Prof. Dr. Yuthsak Vaneesorn

*Jaroon Jakmunee*  
..... MEMBER  
Assoc. Prof. Dr. Jaroon Jakmunee

*J. Kritsana*  
..... MEMBER  
Dr. Kritsana Jitmanee

**THESIS ADVISOR**

*Jaroon Jakmunee*  
.....  
Assoc. Prof. Dr. Jaroon Jakmunee

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratitude and is greatly indebted to her thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Jaron Jakmune, for his kind supervision, invaluable guidance, comments, suggestions and consistent motivation and constant encouragement throughout the study.

The author is truly grateful to Asst. Prof. Dr. Yuthsak Vaneesorn and Dr. Kritsana Jitmanee for their valuable comments, suggestions and discussion.

The author gratefully acknowledges The Research Professional Development Science Project under the Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for granting the scholarship throughout her study. The Graduate School and Department of Chemistry are also acknowledged for partial support. She would like to thank her friends at the Flow Based Analysis Research group (FBA) and the Unit of Instrumentation and Electrochemistry (UIE) for their encouragements and friendship.

The author expresses her greatest gratitude to her parents, and everyone whom may concern to her success for their endless love and continual encouragement even in a difficult time. Finally, she would like to thank those whose names are not listed here, who have one way or another contributed to the success of this work.

Puttaporn Klayprasert

<b>Thesis Title</b>	Development of Flow Injection Amperometric Method Using Triiodide Ion as Reagent for Estimation of Antioxidant Activity
<b>Author</b>	Miss Puttaporn Klayprasert
<b>Degree</b>	Master of Science (Chemistry)
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Jaroon Jakmunee

### ABSTRACT

**E46230**

Flow injection amperometric method was developed for fast estimation of antioxidant activity. This method was based on the reducing property of antioxidants, which they can reduce iodine to iodide. The excess iodine in the form of triiodide is then monitored amperometrically, while it undergoes electrochemical reduction on a glassy carbon working electrode at 200 mV versus a Ag/AgCl reference electrode. Sample or standard solution was injected into the flow injection system to merge on-line with the triiodide reagent. Antioxidant reacted with triiodide leading to a decrease in electrical current which could be recorded as a FIA peak. Peak height obtained was used for examination of total antioxidant content, expressed as ascorbic acid equivalent. Under the optimum condition, the calibration graph obtained was linear in the range of 8-100 ppm ( $r^2 = 0.9990$ ). Sample throughput of 45 h<sup>-1</sup> was achieved. The developed method was applied for tea samples. The results obtained by the proposed method are in good correlation with those from a FI-ferrous tartrate method (reported as tannin equivalent) and a FI – colorimetric method based on FRAP reaction (reported as ascorbic acid equivalent). Colored and colloidal substances present in sample did not interfere in this method. Moreover, the proposed method is fast and consumes small amounts of low cost chemical reagent.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีที่ใช้ไอออนไครโอไอโอดีเป็นรีเอเจนต์สำหรับการประมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผู้เขียน	นางสาวพุทธพร คล้ายประเสริฐ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.จรรยา จักร์มณี

## บทคัดย่อ

E46230

ระบบโพลีอินเจกชันแอมแปโรเมตรีถูกพัฒนาขึ้นเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้อาศัยสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถรีดิวซ์ไอโอดีซึ่งอยู่ในรูปไครโอไอโอดีเป็นไอโอดี โดยไครโอไอโอดีที่เหลือจะเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีที่ขั้วไฟฟ้าทำงานแกลวานอสตัททอน ที่ศักย์ไฟฟ้า 200 มิลลิโวลต์ เทียบกับขั้วอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐานจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบเข้าไปผสมกับไครโอไอโอดีซึ่งเป็นรีเอเจนต์ สารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกฉีดเข้าไป จะไปลดปริมาณไครโอไอโอดี ทำให้สัญญาณกระแสไฟฟ้าลดลงซึ่งสามารถบันทึกออกมาเป็นพีค ความสูงของพีคจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะใช้กรดแอสคอร์บิก เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถสร้างกราฟมาตรฐานเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 8-100 พีพีเอ็ม ที่มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9990 โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 45 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ได้ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นในวิเคราะห์ตัวอย่างชา พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลสอดคล้องกับวิธีโพลีอินเจกชันเฟอร์สทาร์เทรต (บ่งบอกปริมาณในรูป tannin equivalent) และวิธีโพลีอินเจกชันคัลเลอรีเมตรีซึ่งอาศัยปฏิกิริยาเฟอร์รีคิวซิงแอนไดออกซิแดนท์พาวเวอร์ (บ่งบอกปริมาณในรูป ascorbic acid equivalent) วิธีที่พัฒนาขึ้นไม่มีผลการรบกวนจากสีและความขุ่นของสารละลาย โดยสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยัง ใช้สารเคมีน้อย และเป็นสารเคมีราคาถูก

**TABLE OF CONTENTS**

	<b>Page</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT (THAI)</b>	<b>v</b>
<b>TABLE OF CONTENTS</b>	<b>vi</b>
<b>LIST OF TABLES</b>	<b>x</b>
<b>LIST OF FIGURES</b>	<b>xii</b>
<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>xiii</b>
<b>CHAPTER 1 INTRODUCTION</b>	
1.1 Overview	1
1.2 Antioxidant and its important	2
1.3 Method for estimation of antioxidant	
1.3.1 Chromatographic methods	4
1.3.2 Methods based on the neutralization of free radical	8
1.3.3 Spectrophotometric methods	11
1.3.4 Electroanalytical methods	15
1.3.5 Flow analysis methods	18
1.4 Research objectives	23

**CHAPTER 2 EXPERIMENTAL**

2.1 Chemicals	24
2.2 Materials and instruments	25
2.3 Software	25
2.4 Preparation of standard solution and reagents	
2.4.1 Working standard solution of ascorbic acid	25
2.4.2 Reagents solution	
2.4.2.1 Potassium iodate solution in hydrochloric acid solution	26
2.4.2.2 Potassium iodide solution	26
2.5 Preparation of electrode	26
2.6 Manifold of flow injection amperometric method	26
using triiodide as a reagent for estimation of antioxidant activity	
2.7 Optimization of flow injection amperometric method	
using triiodide as a reagent	
2.7.1 Concentration of iodate	28
2.7.2 Concentration of potassium iodide	28
2.7.3 Concentration of hydrochloric acid	29
2.7.4 Total flow rate	30
2.8 Analytical characteristics of the procedure	
2.8.1 Calibration curves and limit of quantitative	30
2.8.2 Precision study	31
2.8.3 Recovery study	31
2.8.4 Interferences study	32

2.9 Sample analysis	
2.9.1 Preparation of sample	32
2.9.2 Precision study of sample extraction method	32
2.9.3 Comparison with FI – ferrous tartrate method	32
2.9.4 Comparison with FI – colorimetric method based on FRAP reaction method	33
2.9.5 Application of the method to real samples	33

## **CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION**

3.1 Optimization of flow injection amperometric method using triiodide as a reagent	
3.1.1 Concentration of iodate	36
3.1.2 Concentration of potassium iodide	37
3.1.3 Concentration of hydrochloric acid	37
3.1.4 Total flow rate	38
3.1.5 Summary of the selected conditions	39
3.2 Analytical characteristics of the procedure	
3.2.1 Calibration curves and limit of quantitative	40
3.2.2 Precision study	41
3.2.3 Recovery study	43
3.2.4 Interferences study	45
3.3 Sample analysis and comparison to other methods	48

<b>CHAPTER 4 CONCLUSION</b>	<b>55</b>
-----------------------------	-----------

<b>REFERENCES</b>	57
<b>APPENDICES</b>	62
Appendix A Flow injection analysis	63
Appendix B Amperometric method	65
Appendix C FI-ferrous tartrate method	68
Appendix D FI – colorimetric method based on FRAP reaction	70
Appendix E Structure of some antioxidant compounds	71
<b>THE RELEVANCY OF THE RESEARCH WORK TO THAILAND</b>	75
<b>CURRICULUM VITAE</b>	76

**LIST OF TABLES**

Table		Page
1.1	Summary of some chromatographic methods for the determination of antioxidant	5
1.2	Summary of some methods based on the neutralization of free radical	10
1.3	The summary of some spectrophotometric methods for the estimation of antioxidant activity	13
1.4	The summary of some electrochemical methods for the estimation of antioxidant activity	16
1.5	Some analytical methods based on with the flow injection system for estimation of antioxidant	19
2.1	The conditions for the study of effect of potassium iodate concentration	28
2.2	The conditions for the study of effect of potassium iodide concentration	29
2.3	The conditions for the study of effect of hydrochloric concentration	29
2.4	The conditions for the study of effect of total flow rate	30
3.1	The optimum condition of FI-amperometric method for estimation of antioxidant activity	39
3.2	The precision of the system at two concentration of ascorbic acid	42
3.3	The precision study of the sample preparation method	43

3.4	The recovery percentages obtained by spiking ascorbic acid at 10-40 ppm into sample	44
3.5	Comparisons content of antioxidant between calculated from standard addition graph and calibration graph	45
3.6	Summary of the percentage of recovery at various ratio of interference to ascorbic acid	46
3.7	Antioxidant content in some tea infusion samples	49
3.8	Antioxidant content in some tea infusion samples	52

**LIST OF FIGURES**

Figure		Page
1.1	DPPH and ABTS structure	9
2.1	Manifold for the Estimation of Antioxidant Activity	27
3.1	Effect of potassium iodate concentration on sensitivity of the method	36
3.2	Effect of potassium iodide concentration on sensitivity of the method	37
3.3	Effect of hydrochloric acid concentration on sensitivity of the method	38
3.4	Effect of total flow rate on sensitivity of the method	39
3.5	FI-Agram for the estimation of antioxidant activity by FI-amperometric method.	40
3.6	Calibration graph for the estimation of antioxidant activity by FI-amperometric method	41
3.7	Correlation graph of antioxidant contents obtained by the proposed method and FI-ferrous tartrate method	51
3.8	Correlation graph of antioxidant contents by the proposed method and FI – colorimetric method based on FRAP reaction	54

**ABBREVIATIONS AND SYMBOLS**

AA	ascorbic acid
cm	centimeter
FC	electrochemical flow cell
FIA, FI	flow injection analysis
g	gram
GC	gas chromatography
GCE	glassy carbon working electrode
h <sup>-1</sup>	per hour
HPLC	high performance liquid chromatography
L	liter
LC	liquid chromatography
μM	micro molarity
mL	milliliter
mL.min <sup>-1</sup>	milliliter per minute
M	Molarity
MS	mass spectrometry

ppm	part per million
PC	personal computer
RE	reference electrode
RSD	relative standard deviation
%RSD	percentage relative standard deviation
SD	standard deviation
V	voltage
WE	working electrode