

Exploratory Research Project (PCE)

**Novel Innovative Chemical, Electrochemical and Optical
Sensor Platforms for Reliable and Sustainable Real-Time
Implementation in Automated Data-Intensive Process
Systems**

**Contract Nr. 45/2017: Noi platforme inovatoare bazate pe
senzori chimici, electrochimici si optici pentru
implementarea fiabila si durabila in timp real in sisteme de
proces intensive de date automate**

PN-III-P4-ID-PCE-2016-0050

**PL's Project Leader (PL): Prof. Dr. CS1 Jacobus (Koos)
Frederick van Staden**

**PL's Project Laboratory: PATLAB, Bucharest of INCDEMC,
Timisoara**

**Host Institution for the project: National Institute of Research
and Development for Electrochemistry and Condensed
Matter (INCDEMC), Timisoara**

Project duration in months: 30 months (July 2017-2019)

Project budget: 850.000RON

Project Summary

The purpose of this extended scientific research and development project is to enhance the design, preparation, characterization and development of micro-/nanotech-based multi-parameter sensors further to a higher dimension with new novel innovative high-based technology with implementation as fast-responding highly sensitive and cost-effective interactive chemical, electrochemical and optical sensors platforms for reliable and sustainable real-time integrated implementation in automated data-intensive process systems. Due to latest new

developments in fields of modern microsystems technology in nano-structured/-porous materials) with UV/Vis, fluorescence, chemiluminescence (quantum dots), NIR, Raman, AFM, main idea is to move research of technical chemical process (micro/nano) systems engineering further with optical devices into photonics subdomain. Main targets are an innovative modern strategic approach of basic knowledge research, design and evaluation of various possible new analytical techniques and methodologies with downscaling to very small miniature sensor detection devices to be able to perform the real-time automated data-intensive processing on-site. Overall strategic research scenarios will include the identification and efficient quantification of analytes, substances, groupings (processes) from toxic (e.g. pesticides, toxic metals, organic and inorganic substances in food, beverages, water, soil) to healthy substances (e.g. vitamins, mineral, antioxidants in food, pharmaceutical) tailored to selected specific dedicated number, most needed within ability/feasibility of SPRADIPS. Objective is to go well ahead of current state-of-art with the design/ development of fast responding, smart intelligent interactive sensors (arrays), to achieve sustainable assessment, monitoring and control of target substances with a vision of exploitation in industrial production and environmental technology integrated with data base adaptive resource management systems.

Team Members

Name	Role in the project
Jacobus Frederick van Staden, DSc, Prof., CSI	Director of Project
Raluca-Ioana van Staden, PhD, CSI	Principal Researcher
Dr Ionela-Raluca Stancu	Postdoc Researcher
Dr Georgiana Luiza Arnold-Tatu	Postdoc Researcher
Dr Catalina Negut	Postdoc Researcher
Dr Roxana Luisa Popescu	Postdoc Researcher
Luciana Gherghina	Doctorand
Alexandrina Lungu-Moscalu	Doctorand
Roxana Nuta	Masterand

Vacant	

Objectives

The main objective of this extended scientific research and development project is to enhance the design, preparation, characterization and development of micro-/nanotech-based multi-parameter sensors further to a higher dimension with new novel innovative high-based technology with implementation as fast-responding highly sensitive and cost-effective interactive chemical, electrochemical and optical sensors platforms for reliable and sustainable real-time integrated implementation in automated data-intensive process systems. Due to latest new developments in fields of modern microsystems technology in nano-structured/-porous materials) with UV/Vis, fluorescence, chemiluminescence (quantum dots), NIR, Raman, AFM, main idea is to move research of technical chemical process (micro/nano) systems engineering further with optical devices into photonics subdomain. Main targets are an innovative modern strategic approach of basic knowledge research, design and evaluation of various possible new analytical techniques and methodologies with downscaling to very small miniature sensor detection devices to be able to perform the real-time automated data-intensive processing on-site. Overall strategic research scenarios will include the identification and efficient quantification of analytes, substances, groupings (processes) from toxic (e.g. pesticides, toxic metals, organic and inorganic substances in food, beverages, water, soil) to healthy substances (e.g. vitamins, mineral, antioxidants in food, pharmaceutical) tailored to selected specific dedicated number, most needed within ability/feasibility of SPRADIPS. Objective is to go well ahead of current state-of-art with the design/ development of fast responding, smart intelligent interactive sensors (arrays), to achieve sustainable assessment, monitoring and control of target substances with a vision of exploitation in industrial production and environmental technology integrated with data base adaptive resource management systems.

Specific objectives are:

1. O1-Applicable system specifications for reliable sustainable resource, environmental and industrial production management;
2. O2-Further development with extensive characterization of fast responding smart intelligent interactive sensors systems with special attention to optical (photonic systems) devices;

3. **O3-Integration into platforms for reliable and sustainable real-time implementation for monitoring and control with innovative decision-making tools;**
4. **O4-Real-time data base adaptive resources management information systems in Romania and Europe (Worldwide) for risk analysis and for interpretative inter-operative technical solutions and services;**
5. **O5-Progress evaluation and assessment and dissemination of results.**

Methodology

The following intermediate milestones (MS) are proposed:

MS1. Applicable Systems Specifications

MS2. Materials Selection, Sensor technology design, validation and evaluation of different individual sensors, Laboratory trials.

MS3. Cost-effective, portable interactive sensor platform systems

MS4. New toolkit named Real-time Quality Data Management System (RQDMS).

MS5. Management (Throughout)

MS6. Dissemination (Throughout)

The scientific work and technological development are structured distributed into SIX (6) core workpackages (WP's):

WP1: Applicable Systems Specifications coupled to objective O1 and to intermediate milestone 1.

WP2: Materials Selection, Development of sensor technology. Laboratory trials. coupled to objective O2 and to intermediate milestone 2.

WP3: Integration into platforms for reliable and sustainable real-time implementation for monitoring and control with innovative decision-making tools coupled to objective O3 and to intermediate milestone 3.

WP4: Real-time data base adaptive resources management information systems coupled to objective O4 and to intermediate milestone 4.

WP5 will be used as management and risk assessment of the project.

WP6 will form the dissemination and exploitation of results as well as integration of knowledge with training/education of students/young researchers.

The workpackages (WP's) are divided into the following tasks(activities):

WP1:

1.1 Setup of applicable system specifications with strategic planning for research studies needed to obtain reliable and sustainable sensors/probes/devices.

1.2 Preliminary investigation of various innovative pathways in terms of selection of proper sensor materials and detection devices for each of the sensors/probes/devices.

WP2:

2.1 The research activities will concentrate on finding and selecting the most promising (nano) materials for modified electrochemical, optical or spectroelectrochemical sensors for the selected target substances for efficient implementation. This will be done in step-by-step tasks and activities for synthesis, functionalization, build-up and testing for proper incorporation into the individual sensors on the laboratory scale.

2.2 The objective of this task is to realize the development of basic new innovative individual sensor technology architectures and to design, develop, characterize, optimize, validate and evaluate each individual sensor for individual single selected analyte/selected groups of analytes from selected target substances. Limits of detection (LOD) in the pg mL^{-1} range will be achieved.

2.3 This task (activity) is to test the stability of the final individual sensors and to find the most appropriate sensors for further work.

2.4 The task is to integrate the individual sensors into portable, fast responding smart and interactive sensor arrays with laboratory trials, making use of modern nano-/microsystems technology.

WP3:

3.1 This task activity) will focus on integrating the individual sensors (sensor arrays) for the different target substances into portable platform systems.

3.2 The main idea of this activity is to couple the portable platform system with an interactive mobile phone into a fast responding highly sensitive and cost-effective, interactive sensor platforms with RFID PID control coupled with mobile wireless networks with miniaturized integrated process data treatment systems (for dynamic info, spatial resolved info, and data management) for fast monitoring and control.

3.3 The system will be tested and validated for reliable on-site real-time control with the innovative decision-making tools at suitable sources of data-intensive process systems.

WP4:

4.1 Inclusion of the new portable/handheld sensing platform system in specific procedures within the new proposed decision-making management systems

along chosen distribution networks with integration into interactive mobile phone wireless sensor networks with RFID PID control.

4.2 Real-time data supplied via transfer from the real-time integrated monitoring will be continuously supplied to data base adaptive water resource management information systems in Europe (-and Worldwide-) for risk analysis and for interpretative inter-operative technical solutions and services.

4.3 Achievement of a new toolkit named Real-time Quality Data Management System (RQDMS) with piloting activity concerning the implementing and functioning on a specific chosen distribution network.

WP5:

5.1 Continuous progress evaluation and assessment of the project.

5.2 Continuous proper coordination and project management.

WP6:

6.1 Dissemination with a website, flyers and of results through patents, published papers in ISI peer-reviewed journals, presentations at workshops, conferences, seminars

6.2 Integration of knowledge with training/education of students/young researchers.

Dissemination

Doua review-uri se pregatesc pentru a fi trimise la reviste ISI.

Raportari:

**UNITATEA EXECUTIVĂ PENTRU
FINANȚAREA ÎNVĂȚAMÂNTULUI
SUPERIOR, CERCETĂRII,
DEZVOLTĂRII ȘI INOVĂRII**

**PROGRAM PN-III
PN-III-P4-ID-PCE-2016-0050**

**CONTRACTOR
Institutul Național de Cercetare
Dezvoltare pentru Electrochimie și
Materie Condensată**

Nr. Contract 45PCE/2017

**Noi platforme inovatoare bazate pe senzori chimici,
electrochimici și optici pentru implementarea fiabilă și
durabilă în timp real în sisteme de proces intensive de date
automate
SPRADIPS**

Raport științific în extenso

Etapa 1 - Identificarea specificațiilor sistemului inovativ - 2017

Director de proiect

CSI, Prof. Dr. JACOBUS FREDERICK VAN STADEN

Pentru atingerea obiectivelor din cadrul fazei 1 a proiectului de cercetare 45PCE/2017, in anul 2017 s-au realizat urmatoarele activitati de cercetare:

- A fost realizat un studiu de literatura cu privire la determinarea poluantilor din diferite probe de apa prelevate.
- Au fost prelevate mai multe probe de apa din diferite surse (apa potabila, apa uzata, apa de suprafata, apa geotermala, etc.).
- Pentru probele prelevate au fost urmariti indicatori de calitate fizico-chimici, cum ar fi: azotati, azotiti, fosfor total, fosfati, cupru, nichel, cadmiu, plumb si mercur si substante organice cum ar fi bisfenoli, melatonina, aminoacizi, vitamine.
- Probele prelevate au fost initial analizate prin metodele standarde utilizate in laboratoarele de mediu, iar ulterior au fost stabiliti parametrii pentru analizele prin metode electrochimice si optice.
- Cateva din rezultatele obtinute prin metode standard de analiza sunt prezentate in Tabelul 1.

Tabelul 1. Rezultatele analizelor fizico-chimice obtinute prin metode standard analizate

Nr.crt.	Incerari executate proba de apa	U.M.	Simbol proba/ Valori determinate											Metoda de incercare
			449RV	450RV	451RV	452RV	419RV	410RV	409RV	373RV	374RV	377RV	385RV	
Tipul probei			Apa subterana	Apa subterana	Apa subterana	Apa subterana	Apa uzata	Apa uzata	Apa uzata	Apa uzata	Apa uzata	Apa uzata	Apa uzata	
1	pH	Unit. pH	7.74	7.48	7.83	7.73	-	-	-	-	-	-	7.35	SR EN ISO 10523:2012
2	Azotati	mg/l	10.27	1.32	9.39	9.79	-	-	-	-	-	-	0.945	SR ISO 7890-3:2000
3	Azotiti	mg/l	0.13	0.20	0.52	0.082	-	-	-	-	-	-	0.068	SR EN 26777:2002 SR EN 6777:2002/C91:2006
4	Fosfati	mg/l	0.30	0.30	0.26	0.33	-	-	-	-	-	-	-	SR EN ISO 6878:2005
5	Fosfor total	mg/l	16,87	1,23	20,14	19,12	1,54	12,78	0,406	0,46	4,91	2,98	1,26	SR EN ISO 6878:2005, pct.8

Nr.crt.	Incerari executate proba de apa	U.M.	Simbol proba/ Valori determinate													Metoda de incercare
			280RV	281RV	282RV	284RV	285RV	383RV	384RV	497RV	498RV	499RV	500RV	501RV	502RV	
Tipul probei			Apa uzata gospodarska	Apa suprafaata (Rauil OLT)	Apa uzata menajera	Apa uzata menajera	Apa suprafaata (Rauil OLT)	Apa uzata gospodarska	Apa uzata menajera	Apa potabila din labor	Apa potabila din labor	Apa potabila din labor	Apa potabila din labor	Apa potabila din labor	Apa potabila din labor	
1	pH	Unit. pH	7.33	6.96	7.50	7.53	7.11	6.95	7.43	6.91	6.89	7.14	6.48	7.53	7.39	SR EN ISO 10523:2012
2	Azotati	mg/l	3.55	0.171	0.134	4.34	6.16	2.43	0.313	28.12	16.82	20.23	44.16	12.11	40.48	SR ISO 7890-3:2000
3	Azotiti	mg/l	0.431	0.09	0.186	0.04	0.101	3.95	0.11	0.003	0.010	0.062	0.003	0.014	0.003	SR EN 26777:2002 SR EN 6777:2002/C91:2006
4	Fosfati	mg/l	-	-	-	-	-	-	-	0.53	0.43	1.59	0.97	0.15	0.62	SR EN ISO 6878:2005
5	Fosfor total	mg/l	0.07	0.041	0.67	0.73	0.039	0.45	1.40	0.685	0.43	0.52	0.49	0.29	1.64	SR EN ISO 6878:2005, pct. 8

Nr.crt.	Incerari executate proba de apa	U.M.	Simbol proba/ Valori determinate										Metoda de incercare
			Apa potabila 614RV	Apa subterana 615RV	Apa retea 617RV	Apa retea 618RV	Apa potabila 619RV	Apa upotabila 620RV	Apa uzata 621RV	Apa uzata 646RV	Apa potabila 662RV		
1	Azotati	mg/l	0,21	1,66	0,405	0,12	0,49	2,70	1,67	1,88	1,66	SR ISO 7890-3:2000	
2	Azotiti	mg/l	0,003	0,006	0,019	0,011	0,0042	0,28	15,8	0,034	0,004	SR EN 26777:2002 SR EN 6777:2002/C91:2006	

Nr.crt.	Incerari executate proba de apa	U.M.	Simbol proba/ Valori determinate							Metoda de incercare		
			Apa potabila GEO-I -1	Apa subterana GEO -I -2	Apa retea GEO-I-3	Apa retea SE -II-1	Apa potabila SE -II-2	Apa upotabila SE -II-3	Apa uzata		Apa uzata	Apa potabila
1	Azotati	mg/l	1,47	0,36	21,22	0,26	0,41	15,09				SR ISO 7890-3:2000
2	Azotiti	mg/l	0,078	0,182	0,042	0,089	0,102	0,14				SR EN 26777:2002 SR EN 6777:2002/C91:2006

1. Fosfati. Forme in care se regasesc si metode de analiza.

Fosforul este un element chimic cu simbolul P și numărul atomic 15. Acesta a fost descoperit de alchimistul german Hennig Brand din Hamburg [1]. Ca element, fosforul există în două forme majore: fosforul alb și fosforul roșu, dar deoarece este foarte reactiv, fosforul nu este niciodată găsit ca un element liber pe Pământ. La 0,099%, fosforul este cel mai abundent pnictogen [2] din scoarța Pământului. Denumirea de "fosfor" provine de la termenul de origine greacă "phosphorus", ce înseamnă "purtător de lumină". Termenul de "fosforescență", adică strălucirea după iluminare, derivă inițial din această proprietate a fosforului, deși acest cuvânt a fost folosit de atunci pentru un proces fizic diferit care produce o strălucire. Strălucirea fosforului provine din oxidarea fosforului alb, un proces numit acum chemiluminescența.

Dupa calciu, fosforul este cel mai abundent element mineral din organism, aflandu-se in orice tesut, astfel ca fosforul reprezinta 1% din greutatea corpului, ceea ce inseamna ca in organismul unui adult se gasesc cca. 600-700 g P sub forma de diversi fosfati anorganici si

organici. Din aceasta cantitate, 85% intra in constitutia scheletului, 6% in muschi, iar 9% in nervi si sange. Aproximativ 70% din fosforul din sange este prezent in forma organica, in principal fosfolipide, restul fiind fosfor anorganic, sub forma de ortofosfati (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), care rezulta din ionizarea secventiala a acidului fosforic [3]. In celula, fosforul este in principal implicat sub forma de fosfor organic in metabolismul glucidic si lipidic sau este legat de proteine si doar o mica parte este prezenta ca ion fosfat [3]. Fosforul intra in compozitia oaselor si a dintilor, fiind unul dintre constituentii acizilor nucleici, nucleoproteinelor, fosfolipidelor din membranele celulare. De asemenea este implicat in mentinerea echilibrului acido-bazic, in stocarea si transferul de energie [4], in procese enzimatice, stimuleaza contractia musculara si este necesar pentru mentinerea activitatii neuronale [5].

Desi fosforul este un macronutrient vital necesar tuturor celulelor vii, elementul fosfor este foarte puternic reactiv, exploziv, ce nu apare in mod normal in natura sub forma lui neoxidata, ci tot timpul ca fosfat, unde atomul de fosfor este inconjurat de patru atomi de oxigen (PO_4); astfel ca fosfatul este transmis mai departe nealterat in diverse transformari prin care trece fosforul, fie anorganic, mineralizat, fie organic, inclus in molecule organice gigant.

Fosfatii organici sunt esentiali: ei formeaza o parte din ADN si ARN; fosfatul este folosit in fotosinteza si in sange; iar fosfolipidele sunt componente majore ale membranei celulare. Fosfatul de asemenea participa in fiecare celula vie, prin ATP (adenozin-trifosfat), molecula energetica de baza in organismele vii [6].

Analiza cantitativă a acizilor nucleici a devenit din ce în ce mai importantă în domeniile biologiei moleculare, diagnosticării medicale și asupra mediului. Au fost studiate metode analitice pentru analiza cantitativă a acidului dezoxiribonucleic (ADN): spectrofotometria [7,8], spectrofluorometria [9,10], împrăștierea luminii de rezonanță (RLS) [11-13], chemiluminescența (CL) [14,15] și electrochimia [16-18]. Metoda spectrofotometrică [7,8] are avantajul reacției ADN-ului cu diferiți coloranți organici pentru a forma derivați colorați, iar metodele spectrofluorometrice și RLS se bazează în general pe efectul de amplificare sau stingere a probelor cum ar fi coloranții [9,10], complex metalic [11] și chiar nanoparticule [12,13]. Metoda CL [14,15] măsoară emisia de lumină care apare în procesele chimice, având astfel o sensibilitate excelentă, o limită de detecție scăzută și un domeniu liniar larg. Metoda electrochimică este adesea folosită pentru studierea interacțiunii moleculelor mici, cum ar fi metalele [16], medicamentele [17] și coloranții organici [18] cu ADN, iar determinarea cantitativă poate fi

realizată prin interacțiunile specifice. Spectroscopia cu infraroșu apropiat (NIR) a fost dovedită o tehnică convenabilă, rapidă și nedistructivă pentru analiza complexă a eșantioanelor și a fost adoptată pe larg în diverse domenii [19,20]. Absorbția în combinație cu spectroscopia de reflexie difuză (NIRDRS) a fost utilizată pentru determinarea componentelor cu conținut scăzut în soluții sau a probelor reale cu matrice complexă [21].

Organofosfatul sau ester fosfatul este denumirea generală a esterilor acidului fosforic. Organofosfații sunt baza multor insecticide, erbicide și agenți neurotoxici. Agenția Statelor Unite pentru Protecția Mediului enumeră organofosfații ca fiind extrem de toxici pentru albine, animale sălbatice și oameni [22].

Exemple de organofosfați:

- Insecticide - Malation, paration, diazinon, fention, diclorvos, clorprifos, etion
- Gaze neurotoxice –soman, sarin, tabun, VX
- Agenți oftalmici - Ecotiofat, izofluorofat
- Antihelmintice – Triclorfon
- Erbicide - Tribufos (DEF), merfos
- Plastifianți - Tricresil fosfat

Semnele și simptomele otrăvirii cu organofosfați pot fi împărțite în trei mari categorii: (1) efectele muscarinice, (2) efectele nicotinic și (3) efectele sistemului nervos central (SNC).

Toxicitatea organofosfaților este un diagnostic clinic. Confirmarea otrăvirii cu organofosfați se bazează pe măsurarea activității colinesterazei; dar de obicei, aceste rezultate nu sunt ușor disponibile. Tratamentul începe cu decontaminarea. Principalele componente ale terapiei farmacologice includ atropină, pralidoximă (2-PAM) și benzodiazepine (de exemplu, diazepam) [23].

Studii recente sugerează o posibilă legătură dintre efectele adverse ale dezvoltării neuro-comportamentale a feteșilor și a copiilor, chiar și la niveluri foarte scăzute de expunere. Organofosfații sunt utilizați pe scară largă ca solvenți, plastifianți și aditivi.

Organofosfații sunt utilizați pe scară largă atât în aplicații naturale, cât și în cele sintetice, din cauza ușurinței cu care grupurile organice pot fi legate între ele.

Polifosfații formează de asemenea esteri; un exemplu important al unui ester al unui polifosfat este ATP, care este monoesterul acidului trifosforic ($H_5P_3O_{10}$). Cuvântul "organofosfați", care apare în comunicări (de exemplu, din presă sau din partea guvernului), în

domeniului precum agricultura, mediul și sănătatea umană și animală, se referă foarte des la un grup de insecticide (pesticide) care acționează asupra enzimei acetilcolinesterazei. Astăzi, organofosfații reprezintă aproximativ 50% din agenții de ucidere din pesticidele chimice [24].

Pesticidele organofosfatice, ca și unii agenți neurotoxici, inhibă enzima neuromusculară, care este în mare măsură esențială pentru funcționarea normală a insectelor, dar și pentru oameni și multe alte animale[25].

Parationul, unul dintre primele pesticide organofosfatice comercializate, este mai bun decât malationul, un insecticid folosit în combaterea insectelor de fructe mediteraneene și a țânțarilor care transmit virusul West Nile [26]. Expunerea oamenilor și a animalelor la acestea poate fi prin ingerarea alimentelor care le conțin sau prin absorbția prin piele sau plămâni [25].

Pesticidele organofosfatice se degradează rapid prin hidroliză prin expunerea la lumina soarelui, aerului și solului, deși cantități mici pot fi detectate în alimente și apă potabilă. Abilitatea lor de a se degrada sunt o alternativă atrăgătoare în fața pesticidelor organoclorurice, cum ar fi DDT, aldrin și dieldrin. Cu toate că organofosfații se degradează mai repede decât organoclorurile, creșterea toxicității acute a pesticidelor organofosfatice are ca rezultat riscul crescut asociat acestei clase de compuși.

Multi "organofosfați" sunt agenți puternici ai nervilor, care funcționează prin inhibarea acțiunii acetilcolinesterazei în celulele nervoase. Acestea sunt una dintre cele mai frecvente cauze ale otrăvirii la nivel mondial și sunt frecvent utilizate în mod intenționat în sinucideri în zonele agricole. Pesticidele organofosfatice pot fi absorbite prin toate căile, inclusiv prin inhalare, ingestie și absorbție dermică. Efectele lor inhibitoare asupra enzimei acetilcolinesterazice conduc la un exces patologic de acetilcolină din organism. Toxicitatea lor nu se limitează la faza acută, totuși, și efectele cronice au fost de mult observate. Neurotransmițătorii, cum ar fi acetilcolina (care este afectată de pesticidele organofosfatice) sunt profund importante în dezvoltarea creierului, iar multi organofosfați au efecte neurotoxice asupra organismelor în curs de dezvoltare, chiar și datorită nivelurilor scăzute de expunere. Alți organofosfați nu sunt toxici, dar principalii lor metaboliți, precum oxonii lor, sunt. Tratamentul include atât un liant de pralidoximă cât și un anticolinergic, cum ar fi atropina.

Chiar și la nivele relativ scăzute, organofosfații pot fi periculoși pentru sănătatea umană. Pesticidele acționează asupra acetilcolinesterazei [27], o enzimă găsită în substanțele chimice din creier strâns legate de cele implicate în ADHD [28]. Acestea pot fi absorbite prin plămâni, piele

sau prin consumul de hrană. Potrivit unui raport din 2008 al Departamentului Agriculturii al SUA, au fost găsite urme detectabile de organofosfati într-un eșantion reprezentativ de produse testate de agenție, 28% din afinele congelate, 20% telina, 27% boabe verzi, 17% de piersici, 8% din brocoli și 25% din căpșuni [29].

O dietă ecologică este o modalitate eficientă de a reduce expunerea la pesticidele organofosforice utilizate în mod obișnuit în producția agricolă. Nivelele metaboliților organofosfatici scad rapid, iar pentru anumiți metaboliți, devin nedetectabili în urina copiilor atunci când se consumă o dietă organică [30]. Acest lucru este o speculație bazată pe un scurt studiu pe 23 de copii, în care doar câțiva compuși organofosfatici au fost potențial reduși, niciun efect nu a fost demonstrat pentru majoritatea celor care au fost găsite în eșantioane.

Agenția Internațională pentru Cercetare în domeniul Cancerului (IARC) a constatat că unii organofosfați pot crește riscul de cancer [31]. Tetraclorvinfosul și parationul au fost clasificați drept "eventual carcinogeni", în timp ce malationul și diazinonul au fost clasificați ca fiind probabil carcinogeni pentru oameni[32].

Conform EPA, utilizarea organofosfatului în 2004 reprezenta 40% din totalul produselor insecticide utilizate în Statele Unite³³. Motivele de îngrijorare privind potențialele pericole ale expunerii organofosfatului la dezvoltarea copilului, EPA a început să elimine treptat formele de organofosfați utilizați în interior în 2001[33]. Deși este utilizat în silvicultură, pulverizarea în mediul urban și public (programe de reducere a țânțarilor etc.), populația generală a fost observată ca având o expunere scăzută[34].

Potrivit organizației nonguvernamentale Pesticide Action Network, parationul este unul dintre cele mai periculoase pesticide[35]. Numai în SUA, peste 650 de lucrători agricoli au fost otrăviți din 1966, dintre care 100 au decedat.

În afară de utilizarea agricolă, diazinonul organofosfat a fost interzis în SUA. Mai mult de un milion de lire sterline au fost folosite în California pentru combaterea dăunătorilor din agricultură în anul 2000. Zonele și culturile pe care diazinonul se aplică cel mai puternic sunt controlul structurii dăunătorilor, salata verde, salata verde și prune uscate[36].

În mai 2006, Agenția pentru Protecția Mediului (EPA) a revizuit utilizarea diclorvosului și a propus vânzarea în continuare, în ciuda preocupărilor legate de siguranța sa și a dovezilor considerabile care sugerează că este cancerigenă și dăunătoare creierului și sistemului nervos, în special la copii[37].

O metoda de determinare a fosfatului este electroforeza capilara echipată cu un detector de fluorescență indusă de laser

Cea mai mare parte a fosfatului organic se găsește în fracția de amilopectină [38]. La nivelul unității de glucoză, fosforilarea are loc la poziția C6 sau C3 și au fost raportate și urme de D-glucoză-2-fosfat (Glc-2-P) în amidonul din cartof [39,40]. Conținutul de fosfați din amidon variază remarcabil în funcție de originea botanică. Dintre amidonurile obișnuite, amidonul din cartofi prezintă unul dintre cele mai ridicate conținuturi de fosfat (adică până la 0,09%), al doilea după amidonul din șoarece (Curcumazedoaria) care conține 0,18% fosfat organic [41].

Electroforeza capilară echipată cu un detector de fluorescență indusă de laser a fost utilizată pentru determinarea fosfatului în amidon. Metoda este simplă și oferă avantaje majore, inclusiv cost-eficiență, sensibilitate ridicată și este adecvată pentru o determinare a performanței ridicate a fosfoesterilor C3 și C6 [42].

2. Nitriți. Forme în care se regasesc si metode de analiza.

Azotul este considerat a fi descoperit de Daniel Rutherford în 1772, care l-a numit *aer fix*.

Azotul este cea mai mare componentă a atmosferei Pământului (78,084% după volum, 75,5% după greutate) și este obținut pentru scopuri industriale prin distilarea fracțională a aerului lichefiat sau prin mijloace mecanice (de exemplu, prin membrană de osmoză inversată prin presiune) [43].

Formele sub care apar compușii de azot sunt: formele organice (aminele, amidele, aminoacizii) și formele anorganice (nitriți, nitrați). [44] Nitritii sunt utlizati in industria alimentara, sol.

Nitriții în cantități mari produc boli pentru om, aceștia combinându-se cu pigmentii din sânge formând meta-hemoglobina în care oxigenul nu mai este disponibil pentru tesuturi. Se poate combina, de asemenea, în stomac cu amine și amide pentru a produce compuși N-nitrozaminici foarte carcinogeni. [45]

Nitriții sunt conservanți importanți în unele produse din carne, aceasta inhibă creșterea a mai multor bacterii nedorite, cum ar fi Clostridium Perfringens și Clostridium botulinum. Cu toate acestea, utilizarea de nitriți

pot prezenta unele riscuri pentru sănătate cauzând formarea nitrozaminele carcinogene din alimente. [46]

Alte surse de poluare cu nitriți sunt industriile textile, metalice, petroliere și farmaceutice. În ceea ce privește nitrații, cea mai importantă sursă de poluare provine din utilizarea intensivă a îngrășămintelor în activitățile agricole și în condiții anaerobe care se pot transforma cu ușurință în nitriți. [47]

Concentrația maximă admisă de nitriți în România este de 0,5 mg/L, iar în cazul WHO (World Health Organization) concentrația este de 1 mg/L. Nivelul maxim de concentrație al nitriților în apă (MCL), conform EPA (Agenția Națională de Protecția Mediului) este 1mg/L. [48]

Concentrațiile de nitriți din apă se determină prin metode spectrofotometrice (reacția Griess), [49,50], electrochimice [51,52], cromatografice [53,54], electroforeza capilară [55,56], chemiluminescență [57,58], spectrofluorimetrice.

Prin metode electrochimice se determina NO_2 cu ajutorul electrodului de carbon vitros (GC) modificat cu: carbon nano-onions bearing electroactive moieties [59]; modified with composite films made from gold nanoparticles (AuNPs) and a carbosilane-dendrimer possessing peripheral electronically communicated ferrocenyl units (Dend), cu o limită de detecție de $2 \times 10^{-7} \text{M}$ din proba de apă [60]; tionina a fost electro-polimerizată pe suprafața carbonului sticlos modificat din nanotuburi de carbon (CNT) (GC) pentru fabricarea electrodului politionină (PTH) /CNT/GC având limita de detecție de $1.4 \times 10^{-6} \text{M}$ [61]; alternated layers of iron (III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-Porphyrin (FeT4MPyP) and copper tetrasulfonated phthalocyanine (CuTSPc) din probe de mâncare cu o limită de detecție de $0.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ [62]; acerium dioxide reduced graphene oxide din proba de apă cu limită de detecție $1.4 \mu\text{M}$ [63]; paladiu (Pd/Grp) pe suport de grafit (Pd/Grp) cu o limită de detecție de $0.071 \mu\text{M}$ [64]; palladium nanoparticles (PdNPs) decorated functionalized multiwalled carbon nanotubes (f-MWCNT) [65]; high surface area nanoporous Cu film (NPCF) has been successfully synthesized using a hydrogen bubble dynamic template on the graphene nanosheets (GNs) în probe de apă de râu/robinet cu limită de detecție $8.8 \times 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$ [66]; study between cerium, titanium and selenium dioxide doped reduced graphene oxide cu o limită de detecție 1.4 din proba de apă de la robinet. [67]

În cazul electrodului pasta de carbon modificat cu: two different Toluidine Blue (TBO) în probă de apă cu limită de detecție 1.6 μM [68]; an aminophenol-formaldehyde polymer/phosphomolybdic acid nanocomposite are limită de detecție 9.8 μM [69]; CuII-(N, N'-bis (2,5-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminoethane) (CuII-DHB) aș a new synthesized copper Schiff base complex cu limită de detecție 1.5nM [70]; cu complexe de cupru (II) formate cu acizi humici comerciali (PFHA) și algerieni (YHA) și compuși modificați cu etilendiamină (EDA) sau trietilentetramină (TETA) cu limită de detecție 1.46 μmolL^{-1} din proba de apă [71]; cu polivinilimidazol (PVI) cu limită de detecție $9 \cdot 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ din proba de carne [72]; Ru (III) utilizând electrodul CPE/Ru (III) -BSAP-PLA având limita de detecție $1.39 \cdot 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ [73]; cu magnetite nanospheres as nanostructured materials and a newly synthesized cobalt (II)-Schiff base complex cu limită de detecție de $1.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{molL}^{-1}$ în probe de apă [74].

3. Determinarea melatoninei și a bisfenolului A prin metode optice

3.1. Introducere

Din punct de vedere chimic melatonina este o N-[2-(5-metoxi-1H-indol-3-il)etil] acetamida utilizată clinic în tratamentul cancerului, tulburării imune, bolilor cardiovasculare, depresiei și disfuncției sexuale. Melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) este un hormon natural secretat în principal de glanda pineală în timpul fazei întunecate a ciclului lumină-întuneric. Odată eliberată, melatonina poate acționa asupra diferitor organe prin receptorii specifici și direct pe hipotalamus, influențând ritmurile "circadiane". Din acest motiv, melatonina este considerată a fi potențial utilă în tratarea diferitelor forme de insomnie și tulburări de somn. Melatonina acționează ca un puternic antioxidant și ca agent de captare a radicalilor liberi de hidroxil, radicali peroxil și anioni de superoxid [75].

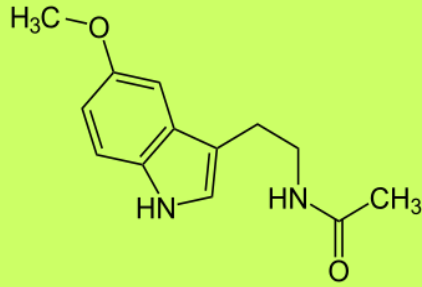


Fig 1: Structura chimică a melatoninei.

Rata de biosinteză a melatoninei la plantele superioare, similar mamiferelor, urmărește o fluctuație ritmică zilnică și sezonieră, cu un maxim nocturn, fiind implicată în semnalizarea și înflorirea fotoperiodică. Activitatea sa antioxidantă protejează diferite țesuturi vegetale și organe, țesuturi reproductive în special, fructe și țesuturile embrionare ale semințelor, de stres oxidativ din cauza tensiunilor abiotice și de mediu, cum ar fi seceta, caldura, frigul, lumina ultravioletă și ozonul. Alte funcții biologice ale melatoninei în plante includ activitatea antiapoptotică [76].

Deoarece melatonina este, de asemenea, ingerată în alimente cum ar fi legumele, fructele, orezul, grâul și medicamentele pe bază de plante, din punct de vedere nutrițional, melatonina poate fi, de asemenea, clasificată ca o vitamină. Inițial melatonina a evoluat ca un antioxidant, devenind o vitamină în lanțul alimentar, iar în organismele multicelulare, unde a fost produsă, a obținut proprietăți autocoide, paracoide și hormonale [77].

Bisfenolul A (2,2-bis (4-hidroxifenil) propan, BPA) este o substanță chimică industrială importantă datorită utilizării sale largi ca intermediar în fabricarea materialelor plastice din policarbonat, rășinilor epoxidice, substanțelor ignifuge, rășinilor poliesterice nesaturate, poliacrilat, și rășinilor polisulfonice. BPA poate fi eliberat în mediul înconjurător dintr-o mare varietate de materiale care intră în contact cu alimentele, cum ar fi sticle, ambalaje, locuri amenajate pentru depozitarea deșeurilor, hârtie și plante artificiale. BPA implică, în principal, riscul potențial de sănătate umană datorat activităților sale estrogenice, care pot interfera cu activitățile hormonale și, prin urmare, a fost identificat ca fiind un compus important care distruge sistemul endocrin. S-a constatat că BPA poate provoca diverse tipuri de cancer, acțiuni pleiotropice în creier și în sistemul cardiovascular [78].

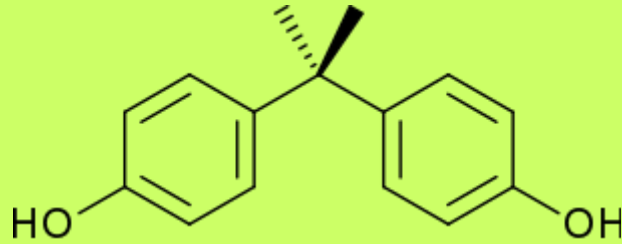


Fig 2: Structura chimică a Bisfenolului A (BPA)

Studiile efectuate asupra bisfenolului A au arătat potențialele efecte negative asupra funcției de reproducere a animalelor sălbatice și a omului prin afectarea funcției endocrine și poate împiedica creșterea și dezvoltarea prin interferarea cu producerea, eliberarea, transportul, metabolismul, legarea și reglarea proceselor de dezvoltare [79].

Conform studiilor de laborator BPA este un compus care distruge sistemul endocrin, datorită faptului că se leagă de receptorii estrogeni. Deși s-a descoperit că BPA are o afinitate mai scăzută față de receptorii estrogenici nucleari în raport cu beta estradiolul (E2), influența sa estrogenică este egală cu E2 pentru răspunsurile mediate de receptorii estrogeni fără nucleu. BPA poate acționa ca un antiestrogen, blocând răspunsul estrogen prin competiție cu acțiunea endogenă a beta estradiolului (E2). BPA este detectabil în urina majorității adulților și copiilor testați, precum și în serul femeilor însărcinate, laptele matern, lichidul folicular și amniotic, sângele din cordonul ombilical și țesutul placentar și ficatul uman, ceea ce indică faptul că expunerea la BPA este prevalentă în uter la dezvoltarea fetoșilor. Din cauza acestei expuneri pe scară largă și zilnică, este esențial să se determine dacă BPA provoacă efecte negative asupra sănătății omului [80].

3.2. Metode optice

3.2.1. Metode de determinare a melatoninei

Melatonina în probele biologice poate fi detectată prin mai multe metode, cum ar fi HPLC, UV, fluorimetrie și RIA. Au fost utilizate câteva metode de chemiluminiscentă pentru determinarea melatoninei și a derivaților acesteia, cum ar fi HPLC UV, fluorimetrie și RIA. Unele metode chemiluminescente au fost utilizate pentru determinarea melatoninei și a derivaților săi. Comportamentul chemiluminiscent al melatoninei și a derivaților săi în mediu

acid permanganat-formaldehidic a fost investigat în detaliu și relația dintre caracteristicile structurale ale acestor compuși și comportamentul lor chemiluminescent a fost de asemenea investigată prin spectrometrie UV, FL și CL [81].

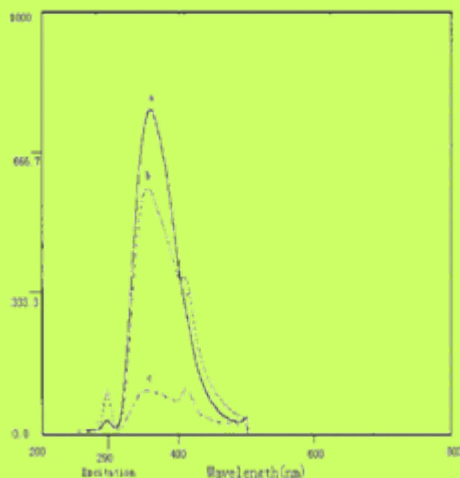


Fig. 3 Spectrul fluorescent al melatoninei.
a [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, H₂SO₄=1 mol l⁻¹;
b [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, H₂SO₄=1 mol l⁻¹, 30% formaldehidă, [KMnO₄]= 6×10^{-4} mol l⁻¹;
c [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, H₂SO₄=mol l⁻¹, 30% formaldehidă, [KMnO₄]= 1.2×10^{-3} mol l⁻¹

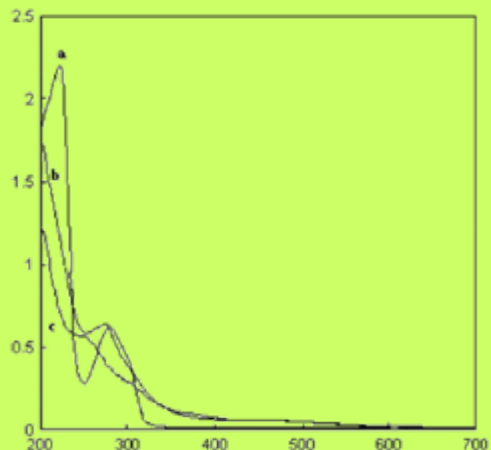


Fig. 4 Spectrul UV al melatoninei. *a* [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, *a* 1 mol l⁻¹ H₂SO₄; *b* [KMnO₄]= 6×10^{-4} mol l⁻¹, 30% formaldehidă, [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, 1 mol l⁻¹ H₂SO₄; *c* [KMnO₄]= 1.2×10^{-3} mol l⁻¹, 30% formaldehidă, [MT]= 1.0×10^{-4} mol l⁻¹, 1 mol l⁻¹H₂SO₄

Tabelul 2 Spectrul fluorescent și UV al melatoninei în KMnO₄-MT și formaldehidă, MT-H₂SO₄.

Substanță	Fluorescent Spectrum	UV spectrum
Melatonin		225-281 nm
KMnO ₄ -MT Formaldehyde	640 nm	305 nm
MT-H ₂ SO ₄	345 nm	
KMnO ₄ -MT Formaldehyde	410 nm	

3.2.2. Determinarea bisfenolului A

Tehnicile analitice clasice sunt utilizate în prezent pentru a determina BPA, inclusiv fluorescență, cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS), cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă de masă (GC-MS), teste de imunoabsorbție legată de enzime (ELISA) și senzori electrochimici. Chemiluminiscenta (CL) ar trebui să fie o tehnică promițătoare, cu avantajul fiabilității, răspunsului rapid, instrumentului ieftin, costului redus, operării simple și a sensibilității ridicate. Este raportat faptul că bicarbonatul poate reacționa cu peroxidul de hidrogen (H_2O_2) pentru a forma peroximonocarbonat instabil (HCO_4^-) și a fost observat un semnal chemiluminiscent foarte slab în timpul descompunerii (HCO_4^-). Semnalele chemiluminiscente generate de HCO_4^- sunt prea slabe pentru a fi detectate prin tehnicile directe de chemiluminiscentă. Prin urmare, este necesară utilizarea unor reactivi sau catalizatori de amplificare a semnalului chemiluminiscent, cum ar fi clorura de aur ($AuCl_4^-$), pentru a spori considerabil emisia chemiluminiscentă generată prin descompunerea HCO_4^- , iar BPA poate inhiba foarte mult intensitatea semnalului chemiluminiscent a sistemului $AuCl_4^- - HCO_4^-$.

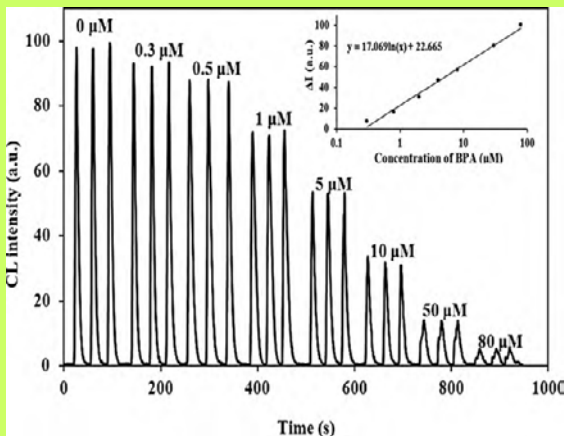


Fig 6: Inhibiția chemiluminiscentă a sistemului $AuCl_4^- - HCO_4^-$ prin adăugarea diferitor concentrații de BPA. Curba de calibrare pentru detectarea de BPA $Y = 17.069 \ln(X) + 22.665$ ($R = 0.9958$), unde Y este intensitatea CL relativă ($\Delta I = I_0 - I$) și X este concentrația de BPA (Fig. 6). Limita de detecție ($S/N = 3$) a fost $0.08 \mu M$ BPA. Deviația standard relativă pentru 12 măsurători repetate de $1.0 \mu M$ BPA a fost 2.9%.

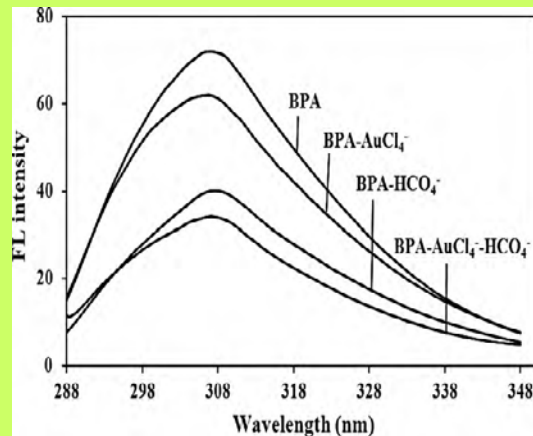


Fig. 7. Spectrul de emisie al BPA, BPA- $HAuCl_4$, BPA- HCO_4^- , BPA- $AuCl_4^- - HCO_4^-$, respectiv, racordat la $\lambda_{ex} = 278$ nm. Condiții: $5 \mu M$ BPA, $80 \mu M$ $HAuCl_4$, $0.008 M$ H_2O_2 și $0.3 M$ $NaHCO_3$.

Spectrele de fluorescență soluției BPA au fost prezentate în Fig. 7. Prin adăugarea HAuCl_4 , HCO_4^- sau $\text{AuCl}_4-\text{HCO}_4^-$, intensitatea fluorescenței la 307 nm a scăzut. Este de remarcat faptul că, scăderea intensității fluorescenței în prezența HCO_4^- era aproape aceeași ca și în cazul sistemului $\text{AuCl}_4-\text{HCO}_4^-$. Aceste rezultate au demonstrat că descompunerea intermediarului ($\text{CO}_3 \bullet$ și $\text{HO} \bullet$) de HCO_4^- au contribuit în principal la degradarea BPA [78].

3.3. Concluzii

O serie de studii controlate au implicat melatonina în diverse funcții fiziologice variind de la îmbătrânire la agresiune, acțiunea sa neutralizantă asupra radicalilor liberi, somnului, stresului, și chiar la mai multe tulburări fiziopatologice precum imunodepresie și cancer. Studiile cu privire la diferite populații umane au arătat în mod clar că abilitatea endogenă a biosintezei melatoninei scade treptat odată cu înaintarea în vârstă, și care oferă o explicație pentru sensibilitatea crescută la boli la persoanele vârstnice.

Evident, luând în considerare multiplele sale acțiuni în organism, melatonina pare a fi o moleculă cronobiotică puternică în îngrijirea sănătății umane și vindecarea mai multor boli. Eficacitatea și siguranța acesteia pot conduce în cele din urmă la utilizarea sa în aplicații clinice universale eficiente, fiind o terapie auxiliară în tratamentul ulterior al diferitelor boli reprezentând o moleculă de susținere care să acționeze împreună cu alte medicamente [82].

A fost înregistrată o creștere rapidă a numărului de studii evaluate de experți care au corelat în ultimii câțiva ani expunerea BPA la 16 efecte negative asupra sănătății. Potrivit studiilor, expunerea la BPA poate avea implicații semnificative asupra sănătății umane și a fertilității, în special în perioada sensibilă a populației. Autoritățile de reglementare din guvern au început să ia măsuri de precauție - Administrația pentru Alimentație și Medicamente a numit BPA un "produs chimic de importanță", iar recent în (iulie 2012) au interzis utilizarea acestuia în sticle pentru bebeluși și câni cu cioc(sippy), cu toate acestea, marja de siguranță nu a fost redusă sub $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{zi}$. Literatura actuală indică faptul că BPA în mediul înconjurător poate reprezenta un risc pentru sănătatea oamenilor. În plus, s-a recomandat ca regulamentul BPA să fie revizuit pentru a proteja sănătatea umană [80].

4. Aminoacizi. Caracterizare si metode de determinare.

Aminoacizii (SAA) sunt blocuri esențiale ale moleculelor biologice și joacă un rol cheie în multe mecanisme de răspuns neurochimice, cum ar fi memoria, controlul apetitului. Determinarea exactă a aminoacizilor poate îmbunătăți înțelegerea rolului său biologic și de a facilita tratarea bolilor cauzate de perturbarea acestuia [83]. Aminoacizii, care sunt unitățile de bază ale peptidelor și proteinelor sunt constituenți vitale ale biosintezei proteinelor în organism. Pe baza producției acestor substanțe în corpul nostru, aminoacizii pot fi împărțiți în: esențiali, nu au fost produși în corpul nostru și neesențiali produși în corpul nostru [84]. Aminoacizii joacă un rol esențial ca intermediari în metabolismul organismului, astfel dezvoltarea unor noi metode eficiente pentru determinarea lor cantitativă sensibilă este de mare interes și importanță. Ele sunt, de asemenea, cunoscute sub numele de surse de energie, cum ar fi grăsimi și carbohidrați. Cu toate acestea, aminoacizii conțin în structură azot (N), în timp ce carbohidrați și grăsimile nu. Astfel, aminoacizii sunt singurele specii care intră în compoziția țesuturilor, mușchilor, organelor, părului și pielii.

În eucariote, există doar 21 de aminoacizi proteinogenici, cei 20 din codul genetic standard, plus selenocisteina. Oamenii pot sintetiza 12 dintre acestea. Celelalte nouă trebuie să fie consumate (de obicei, ca și derivații lor de proteine) și astfel ei sunt numiți aminoacizi esențiali. Aminoacizii esențiali sunt histidină, izoleucină, leucină, lizină, metionină, fenilalanină, treonină, triptofan și valină. Există mai mult de 200 de aminoacizi diferiți, cei mai cunoscuți sunt așa numiți aminoacizi proteinogenici, dintre care am ales arginina (semiesențial), alanina (neesențial) și cisteina (semiesențial) [85,86]. În 1806 Vauquelin și Robiquet a izolat primul aminoacid ca o substanță din *Asparagus sativus*, care au numit asparagina. Câțiva ani mai târziu Braconnot a descoperit glicinadintr-un hidrolizat de acid din gelatină. Treonina a fost descrisă de Rose și colab. ca ingredient esențial alimentar în 1935 și selenocisteine și pirolizina, ultimele două din cele 22 de aminoacizi proteinogenici, au fost raportate în 1986 și respectiv 2002, acidul aspartanic, acidul glutamic, selenocisteina sunt aminoacizi neesențiali, și glutamina, prolina, serina, tirozina, asparagina, sunt aminoacizi semiesențiali. Pirolizina este considerată „a 22-aminoacid“, nu este utilizat de oameni [87,88].

Tirozina (Tir), un constituent esențial al proteinelor este indispensabilă în nutriția umană pentru stabilirea și menținerea unui echilibru pozitiv de azot. Tirozina este precursorul dopaminei și epinefrina și este obținut în principal din fenilalanina. hormoni vitale, cum ar fi

tiroida, noradrenalina, epinefrina și dopamina sunt convertite din L-dopa, care este derivat din tirozina. Absența Tir ar putea provoca hipocondria, depresie și alte boli psihice [89]. O deficiență de Tir poate conduce la boli, cum ar fi albinism, ipohondria, sau depresia. Cu toate acestea, o concentrație mare de Tir de multe ori poate induce hipertiroidism. Prin urmare, este substanțială pentru a detecta concentrația Tir, în diferite fluide biologice. Tir este abia prezent în legume, prin urmare, de multe ori este adăugat în produsele dietetice și alimentare de asemenea în formulările farmaceutice. Epuizarea la nivel Tir ar putea duce la albinism, alkaptonuria, precum depresia și alte tulburări psihologice, în timp ce excesul de Tir promovează boala Parkinson și crește șansele de schimburi de cromatide surori. Astfel, este evident că Tir este de mare importanță în domeniul farmacologiei, subliniind astfel necesitatea de a monitoriza pentru a asigura un stil de viață sănătos și de boală [90, 91].

Triptofan (TRP) este unul dintre aminoacizii care are o structură de bază pentru proteine. Aceasta se numește aminoacid „esențial“, deși; organismul nu îl poate produce și trebuie să fie obținut din surse externă. Triptofanul pot fi găsit în multe proteine vegetale și animale. Este necesar pentru creșterea normală la sugari și pentru echilibrul de azot la adulți. Organismul folosește triptofan pentru a-l ajuta să producă niacină și serotonină. Serotonina produce somnul sănătos și o stare de spirit stabilă. L-triptofan este utilizat pentru insomnie, apnee de somn, depresie, anxietate, durere facială, o formă severă de sindrom premenstrual numit tulburare dysphonic premenstruală (PMDD) [92].

L-metionina (2-amino-4- (metil) butanoic) este un aminoacid esențial ce conține sulf furnizat cu produsele alimentare. Consumul intensiv de metionină este urmat de o creștere lineară a concentrației de metionină în plasmă. Aminoacidul L-metionină este ușor oxidat la sulfoxid de metionină, iar reducerea acesteia este catalizată de o familie de enzime numite reductaze metionină sulfoxid (MSRS). Ciclul de oxidare-reducere a MSRS a fost postulat de a acționa ca un sistem antioxidant catalitic, protejează celulele de la daune oxidative. Sistemul MSRA ar putea avea succes în prevenirea sau întârzierea bolii Parkinson. Datorită importanței clinice a L-metioninei, a fost determinată folosind o varietate de metode analitice cantitative [93].

Fenilalanina (Phe) este un aminoacid nepolar esențial și prezintă caracteristici hidrofobe datorită grupărilor sale aromatice. Este, de asemenea, precursor metabolic al aminoacizilor neesențiali, tirozina și derivații. Acesta este utilizat în industria farmaceutică, pentru a fabrica unele antibiotice, cum ar fi bacitracină, gramicin, tirocidin și în industria alimentară utilizat ca

îndulcitor, aspartam. Acesta este convertit la tirozină (Tir) în prezența enzimei hidroxilaza fenilalanina (HAP).

Tirozina este precursorul neurotransmițătorilor monoaminici, cum ar fi dopamina, epinefrina și norepinefrina, care sunt asociate cu depresia și lipsa de motivație. De aceea Phe este important să se mențină nivelului adecvat de neurotransmițători monoaminici în creier. Când L-fenilalanină traversează în creier, în prezența HAP, acesta este convertit la L-tirozină și apoi la L-dopa, care este convertit mai departe în cele trei neurotransmițătorii menționați mai sus. Adrenalina și noradrenalina sunt sintetizate de dopamină, care este ea însăși făcută din aminoacidul fenilalanina via tirozina. Este bine cunoscut faptul că Phe are un rol semnificativ în starea de spirit, depresie și anxietate. Deci, în cazul în care medicamentele care blochează descompunerea acestor neurotransmițători ridică starea de spirit, memoria și apoi ar putea lucra mări concentrația aminoacidului fenilalanina sau tirozină [94].

Arginina este unul dintre aminoacizii indispensabili pentru corpul în stare de stres. Funcțional, aceasta afectează metabolismul proteinelor și a fost implicat în sinteza proteinelor [85].

Alanina joacă un rol semnificativ în ciclul de glucoză-alanină în țesuturi și ficat. Ciclul de glucoză-alanină elimină piruvatul și glutamatul din mușchi la ficat [85].

Există multe rapoarte pentru determinarea individuală și simultană a TRP în literatură, folosind diferite metode analitice cum ar fi spectrofotometria, spectrometrie de masa, fluorometria, electroforeză capilară, chemiluminiscență, cromatografia și senzori electrochimici [95-108].

Dintre aceste metode, metode electroanalitice au atras mai multă atenție, deoarece acestea sunt simple, sensibile, precise și instrumentele au un cost redus. Prezența unor concentrații relativ scăzute de aminoacizi în probele de micro-dializă necesită o metodă analitică sensibilă pentru determinarea lor. Micro dializa este o tehnică puternică care permite determinarea concentrației extracelulare a neurotransmițătorilor de aminoacizi în timpul diferitelor manipulări farmacologice sau fiziologice. Detectorul amperometric combinat cu FIA prezintă multe avantaje, cum ar fi o sensibilitate ridicată, răspuns rapid și simplitate în procedura de operare, și o mare atenție a fost acordată dezvoltării de detecție electrochimică a aminoacizilor. Cu toate acestea, mulți aminoacizi sunt non electroactivi cu electrozii de carbon convenționali. Electrozii cu metal nobile prezintă un grad mai mare de activitate față de oxidarea aminoacizi, dar suprafeța

lor se murdărește rapide. Metoda alternativă este utilizarea de metal de tranziție ne-nobil, cum ar fi nichel și cupru, electrozi modificați chimic pot mediaza transferul de electroni rapid între aminoacizi și substructul electrodului și poate reduce murdărirea suprafeței. Aceste matrice cu nanoparticule de cupru nemodificate și oxid de zinc nanorod, aliaj de cupru-mangan, $\text{Cu}_2\text{V}_2\text{O}_7$, aliaj de nichel-cupru, nanoflakes hidroxid de nichel, cupru microparticulei, Cu_2O , cobalt și cadmiu dopat hidroxid de nichel, andnickel-curcumina complex. În plus, nanotuburile de carbon (CNT) au proprietăți electrocatalitice bune. Fierul este, de asemenea, un element de tranziție, ar trebui să aibă proprietăți similare cu nichel și cupru. Nanoparticulele de fier sunt centre complexe, cum ar fi Cu NPs AA, în timp ce MWCNTs pot dispersa nanoparticule de fier pentru a evita reunirea transferului electronilor de la electrodul AA. Stratul depus pe suprafața electrodului pentru detectare este convenabil pentru repetabilitatea electrodului. Astfel, Fe NPS și MWCNTs au fost utilizate pentru a fabrica un sensor pentru detecția AAs. Comportamentul electrochimic al Fe NPs / electrod MWCNTs și oxidarea complexului AA cu Fe NPs au fost investigate prin metode electrochimie. Mai mult, electrodul combinat cu metoda și separarea tehnologiei FIA a fost propusă pentru determinarea cu un răspuns rapid AA, stabilitate bună și sensibilitate [83]. Electrozii, cum ar fi platină și aur sunt utilizați în general în detecția electrochimică. Cu toate acestea, acești electrozi pot fi solubilizați cu faza mobilă și își pierd activitatea catalitică datorită speciilor de adsorbție de pe suprafață. În mod alternativ, electrozii modificați chimic (CEM-uri) au apărut pentru a depăși aceste neajunsuri. În general CME, au o suprafață mai mare, sensibilitate, selectivitate ridicate și cel mai important de stabilitate în comparație cu electrozii metalici convenționali, atunci când este vorba de analiza aminoacizilor HPAEC în mediu alcalin. Metalele tranziționale nenobile și oxizii lor, cum ar fi cobalt, fier, cupru și nichel au atras un interes considerabil ca materiale modificatoare, ca urmare a proprietăților lor electrocatalitice în mediu alcalin în raport cu aminoacizii oxidării acizilor. Dintre diversele materiale utilizate în modificarea electrozilor, grafenele a dus la o atenție mai largă datorită proprietăților sale optice, chimice și electronice, în plus față de o gamă largă de aplicații în nanomateriale, nanotehnologie și senzori electrochimici. Grafena este în esență un monostrat bidimensional de atomi de carbon într-un fagure atent ambalate. Este dotat cu multe avantaje, inclusiv proprietăți excepționale termice și mecanice, conductivitate electrică excelent, rapid capacitatea de transport de electroni și o suprafață mare, care permite imobilizarea unor cantități mari de substanțe și nanoparticule. Mai mult decât atât, nanoparticule metalice și oxizii

acestora au fost studiate dat proprietăți fizice, cum ar fi transportul de masă mai bun, cataliză, suprafață mare și controlul efectiv al micromediului electrodului comparativ cu electrozi metalici în vrac lor chimice. În virtutea proprietăților lor unice, grafenele și nanoparticulele de metale tranziționale nenobile au fost considerat noi materiale atractive pentru dezvoltarea unor senzori electrochimici cu scopul de detecție de aminoacizi. Până în prezent, mai multe tipuri de materiale funcționale, cum ar fi nanoparticulele de cobalt (CoNPs), CoNPs în oxid de grafen (GO) și nanoparticulele de fier pe GO au fost aplicate pentru determinarea aminoacizilor, nanoparticulele de nichel combinate cu electrozi modificați cu oxid de grafenă redusă poate spori detectarea aminoacizilor în timp ce contribuie la îmbunătățirea cunoștințelor noastre despre acest subiect în domeniul senzorilor și detectori [108].

Pentru a determina aminoacizi sunt folosite probele de urină, sânge uman, probă de ser, fluid microdializă din porcușor de guineea, hipotalamus, albuș de ou, pui, trestia de zahăr vinasă obținut dintr-un zahăr și etanol, lapte, probe farmaceutice.

5. Vitamine. Caracterizare și metode de determinare.

Analiza alimentelor reprezintă un domeniu important de cercetare în chimie, în principal datorită apariției continue de noi alimente, suplimente, etc. Unele dintre principalele componente benefice pe care consumatorii le caută în produse alimentare sunt vitaminele și antioxidanți. [109].

Vitaminele sunt una dintre cele mai importante micronutrienți cu roluri critice în timpul mai multor procese biologice, inclusiv angiogeneza, în multe reacții biochimice în interiorul celulelor și care afectează diferite funcții celulare [110] și joacă un rol semnificativ în funcțiile de bază ale corpului uman, cum ar fi imunitatea, metabolismul și digestia [111]. Vitamina este un nutrient care nu furnizează energie organismului, dar este un nutrient esențial. Este necesară pentru creșterea organismului și, de asemenea, este asociată cu funcția enzimatică în organism [112].

Produsele farmaceutice care conțin vitaminele solubile în apă sunt utilizate în mod normal ca un supliment alimentar pentru a compensa deficiența. Concentrațiile de vitamine în corpul uman pot fi identificate prin analizele de rutină/regulate ale probelor de sânge [113].

Vitaminele se împart în două categorii: vitamine liposolubile și vitamine solubile în apă. Vitamine liposolubile - vitaminele A, D, E și K - se dizolvă în grăsimi înainte ca acestea să fie absorbite în fluxul sanguin pentru a-și îndeplini funcțiile lor. Excesele acestor vitamine sunt stocate în ficat, și nu sunt necesare în fiecare zi, în dietă [114]. Vitamine solubile în apă, B2, B6 și C sunt esențiale pentru organismul uman pentru sănătate, nutriție și creștere normală. Deoarece aceste molecule active biochimice nu pot fi sintetizate de către organismul uman, sunt necesare în dietă cantități mici. În contrast, vitaminele solubile în apă, se dizolvă în apă și nu sunt stocate de către organism. Din moment ce acestea sunt eliminate prin urină, avem nevoie de o aprovizionare continuă, zilnică, în dieta noastră. Vitaminele solubile în apă sunt ușor distruse sau se pierd: prin spălare, în timpul depozitării alimentelor sau în urma procesului de preparare. Depozitarea corespunzătoare și prepararea hranei poate minimiza pierderea vitaminelor [115-116].

Unul dintre cele patru vitamine liposolubile, **vitamina A** sau retinol aparține unui grup numit retinoizi. Există diferite forme de vitamina A, cum ar fi retinol, acid retinoic și a- și b-carotene. Vitamin A (retinol) este un nutrient esențial necesar în cantități mici, pentru funcționarea normală a sistemului vizual; creștere și dezvoltare și menținerea integrității celulare epiteliale, funcția imunitară și reproducere. Aceste nevoi dietetice pentru vitamina A sunt prevăzute în mod normal pentru preformața retinolului (în principal, ca ester retinil) și carotenoide provitamina A. Aproximativ 90% din vitamina A este absorbită din produsele care conțin o conțin, în timp ce eficiența de absorbție a provitamina A carotenoizi variază foarte mult, în funcție de tipul de sursă vegetală și conținutul de grăsime. Acolo unde este posibil, un aport crescut de grăsimi alimentare este de natură să îmbunătățească absorbția vitaminei A în organism. Preformața vitaminei A se găsește aproape exclusiv în produsele de origine animală, cum ar fi laptele uman, ficat și uleiurile din ficat de pește (în special), gălbenuș de ou, lapte integral și alte produse lactate. Vitamina A este, de asemenea, utilizată pentru a fortifica produsele alimentare prelucrate, care pot include zahăr, cereale, condimente, grăsimi și uleiuri. carotenoide provitamina A se găsește în legumele cu frunze verzi (de exemplu, spanac, amarant, și frunzele tinere din diverse surse), legume galbene (de exemplu, dovleci suc de fructe și morcovi), și fructe galben și portocaliu (de exemplu, mango, caise, și papaia). Uleiul de palmier Red produs în mai multe țări din întreaga lume este deosebit de bogat în provitamina A [110, 117].

Opt dintre vitaminele solubile în apă sunt cunoscute ca grupul complex de **vitamina B**: tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), vitamina B6 (piridoxină), acid folic (acid folic), vitamina B12, biotină și acid pantotenic. Vitaminele B se regăsesc în produsele alimentare, iar influența lor se face simțită în multe părți ale corpului. Acestea funcționează ca coenzime care ajuta organismul să obțină energie din alimente. Vitaminele B sunt de asemenea importante pentru pofta de mâncare normală, o vedere bună și o piele sanatoasă, pentru sistemul nervos și formarea de celule roșii din sânge [114].

Vitamina C este utilizată pentru a preveni niveluri scăzute de vitamina C, în corpul uman, care nu primesc suficiente vitamine din dieta lor. Cei mai mulți oameni care mănâncă un regim alimentar normal nu au nevoie de suplimentare de vitamina C. Nivelurile scăzute de aceasta poate duce la o afecțiune numită scorbut. Scorbutul poate provoca simptome, cum ar fi slăbiciune musculară, erupții cutanate, dureri articulare, oboseală sau pierderea dinților. Vitamina C este un important antioxidant, împreună cu vitamina E, beta-caroten și multe alte elemente nutritive pe bază de plante. Antioxidanții blochează o parte din daunele cauzate de radicalii liberi, substanțe care distrug ADN-ul. Consumând alimente bogate în vitamine C este cea mai bună metodă pentru a asigura un aport adecvat de această vitamină. În timp ce multe alimente contin vitamina C, cele mai bune surse sunt fructele citrice. De exemplu, o portocală, un fruct de kiwi, 6 oz sau suc de grapefruit sau 1/3 cană de ardei roșu tocat furnizează organismului doză recomandată de vitamina C, timp de o zi. Doza zilnică recomandată (DZR) pentru vitamina C este de 90 mg / zi pentru bărbați adulți și 75 mg / zi pentru femei adulte. Pentru cei care fumează, DZR-ul, pentru vitamina C crește cu 35 mg / zi, pentru a contracara efectele oxidative ale nicotinei. Deși rare în Statele Unite, deficit sever de vitamina C poate duce la boala cunoscuta sub numele de scorbut, provocând o pierdere de putere de colagen pe tot corpul. Pierderea de colagen este o consecință datorită pierderii dinților, sângerării și gingiile umflate și vindecarea necorespunzătoare a rănilor. Mai frecvent, deficitul de vitamina C, se prezintă ca o deficiență secundară la alcoolici, persoanele în vârstă, și la fumători. În ciuda faptului că este o vitamină solubilă în apă care corpul excretă excesul de vitamină, supradozele de vitamina C s-au dovedit a provoca pietre la rinichi, guta, diaree și scorbut [114, 118].

Vitamina D se prezintă sub două forme: vitamina D2 și vitamina D3, ambele sunt rareori găsite în produsele alimentare. Ele provin din diferite surse; vit. D2 (ergocalciferol) este sintetizată din ergosterol de drojdie, în timp ce vit. D3 (colecalciferol) este produs din 7-

dehidrocolesterolului (7-DHC) din lanolină. Vitamina D, identificată ca un hormon pentru a menține homeostazia calciului din sânge și de a promova mineralizarea scheletului, a demonstrat că exercită funcții suplimentare, inclusiv anti-proliferativ, pro-diferențiere, pro-apoptotică, anti-angiogeneza și caracteristicile anti-invasive în celula canceroasă pe parcursul ultimelor două decenii. Aceste activități antitumorale au condus la mai multe studii clinice. Datele epidemiologice au indicat că scăderile concentrațiilor de vitamina D au fost asociate cu un risc crescut de diferite tipuri de cancer ca colorectal, de sân și cancerul de prostată. S-a sugerat că nivelurile scăzute de vitamina D poate fi un factor de risc pentru carcinomul hepatocelular [119-121].

Vitamina E este principalul antioxidant liposolubil în sistemul antioxidant celular de apărare și este obținută exclusiv din dietă. Termenul „vitamina E” se referă la o familie de opt omologi în mod natural care sunt sintetizate de către plante din acid homogentisic. Absorbția vitaminei E din intestin depinde de funcția pancreatică, secreția biliară. Condițiile de absorbție sunt ca cele pentru lipidelor dietetice, adică, emulsificare eficientă, solubilizări mixte în cadrul sărurilor biliare ce formează micellele, absorbția de enterocite și secreția în circulație prin intermediul sistemului limfatic. Problemele musculare și neurologice sunt, de asemenea, o consecință a deficitului de vitamina E, din corpul uman. Deficiențele vitaminei E pentru oameni este dată de semnele clinice foarte rar apărute, deoarece acestea se dezvoltă de obicei numai la sugari și adulți cu sindromuri de grăsime-malabsorbție sau boli hepatice, la persoanele cu anomalii genetice în transportul sau legarea de proteine și, eventual, la copiii prematuri. Acest lucru sugerează că dietele conțin suficientă vitamină E pentru a satisface nevoile nutriționale. Analiza bilanțurile alimentare FAO a țărilor indică faptul că aproximativ jumătate din α -tocoferol într-o dietă tipică nord europeană, cum ar fi în Regatul Unit, este derivat din uleiuri vegetale. Grăsimi animale, legume și carne contribuie fiecare la aproximativ 10% din DZR și fructele, nucile, cerealele și produsele lactate contribuie, fiecare, cu aproximativ 4% din DZR. Ouăle, peștele și legumele uscate contribuie cu mai puțin de 2% fiecare din DZR [117].

Vitamina K (VK) este o vitamină liposolubilă care reglează producția de factor de coagulare, acționând ca coenzimă pentru un carboxilază-dependent VK care catalizează carboxilarea resturilor de acid glutamic în acid γ -carboxiglutamic. VK pot fi împărțite în 2 grupe: 1) produsă în mod natural VK1 (fitonadiona) și VK2 (menachinonă) și 2) sintetizată chimic VK3 (menadiona). VK3 și derivații săi demonstrează efecte anti-proliferative împotriva liniilor

celulare tumorale in vitro. Vitamina K acționează ca o coenzimă în sinteza formei active biologice a unui număr de proteine care sunt implicate în coagularea sângelui și metabolismul osos. Rolul biologic al vitaminei K este de a acționa ca un cofactor pentru o reacție specifică carboxilării care transformă reziduurile de glutamat selectiv (Glu) la resturile g-carboxiglutamat (Gla). Vitamina K este metabolizat în ficat și excretat în urină și bilă. Sindromul deficienței este cunoscut în mod tradițional ca boala hemoragică a nou-născutului. Mai recent, pentru a oferi o mai bună definiție a cauzei, a fost numit sângerare datorită deficitului de vitamina K (VKDB- vitamin K deficiency bleeding). În general, valorile relative în legumele confirmă asocierea cunoscută a filochinona cu țesuturile fotosintetice, cu cele mai mari valori (în mod normal, în intervalul 400-700mg / 100g) regăsiindu-se în legume cu frunze verzi. Cele mai bune surse sunt anumite uleiuri vegetale (de exemplu, soia, rapiță și de măsline), care conțin 50-200mg / 100g; alte uleiuri vegetale, cum ar fi arahide, porumb, floarea-soarelui și de șofran, conțin cantități mult mai mici de filochinona (1-10mg / 100g) [117, 119].

Unele vitamine (vitamina C, riboflavină, vitamina B1 și vitamina B2) pot fi analizate direct prin detecție fluorometrică folosind HPLC. Metodele directe sunt robuste, precise și permite determinarea vitaminei specifice. Numeroase metode HPLC au fost dezvoltate pentru determinarea vitaminelor în probe biologice (urina, plasmă, sânge), produse alimentare, [109, 122-125]. Recent, multe metode au fost utilizate pentru a detecta în mod individual vitamina B2, vitamina C și vitamina B9, cum ar fi spectroscopie de fluorescență, spectrofotometrie, metode electrochimice și chemoluminescență din probe farmaceutice, tesuturi animale, produse alimentare sau sucuri [126-132].

Comparativ cu alte tehnici, metoda electrochimică are avantajele simplității, ușurința de miniaturizare [126]. Dintre aceste metode, metoda electrochimică a primit tot mai mare atenție datorită costului redus și datorită analizei și fezabilității. Utilizarea electrozilor modificați chimic asigură un instrument pentru îmbunătățirea performanței electrozilor solizi. Tot mai multe materiale funcționale sunt folosite pentru fabricarea electrozilor modificați, o metodă electrochimică pentru detecția vitaminele B2, B6 și C bazată pe pretratata electrochimică a electrodului de carbon vitros. O altă metodă de determinare a vitaminelor se bazează pe un senzor nou folosind un electrod modificat cu filme de tipul: tris ruteniu (2,2') bipiridil (Ru (bpy) 33+ sau 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol (p -AMTa) [115, 132-134]. Pentru determinarea unor vitamine sunt folosiți electrozii serigrafiați de argint / carbon nemodificați sau CdO / NPs / ILS /

CPE (NADH folosind un electrod pastă de carbon modificat cu nanoparticulă CdO / lichid ionic), sau grafenele oxidice reduce cu nanocompozite bimetalice PdAu. Probele pentru determinarea unor vitamine sunt plasmă, tablete farmaceutice, suc de fructe, fructe, legume, etc [111, 112, 135].

6. Evaluarea si planificarea conditiilor de lucru

S-au identificat noi materiale (matrici si modificatori) senzori stocastici, amperometrici care pot fi utilizati pentru determinarea compusilor sus amintiti. Astfel, pentru matrice s-au identificat materiale bazate pe diamant, grafene si grafit, iar pentru modificatori ftalicianine, porfirine si oleamide. Microsenzori cu diametrele partii active cuprinse intre 100 si 380 μ m au fost construiti pentru a fi testati in Etapa a 2a.

De asemenea s-a achizitionat pentru senzorii optici sisteme moderne de detectie, sisteme rapide si fiabile de scanare.

Conditiiile optime de lucru si toxicitatea acestor compusilor selectati pentru a fi determinati este evidentiata in paragrafele 1-5 si in Tabelul 1.

Referinte

[1] <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphorus>

[2] Connelly, NG; Damhus, T, eds. (2005). "section IR-3.5: Elements in the periodic table". Nomenclature of Inorganic Chemistry: IUPAC Recommendations 2005 (PDF). Cambridge, United Kingdom: RSC Publishing. p. 51. ISBN 0-85404-438-8

[3] Lothar Thomas. Bone and Mineral Metabolism. In Clinical Laboratory Diagnostics-Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main, Germany, 1 Ed., 1998, 241-244.

[4] Frances Fischbach. Pulmonary Function, ANGs and Electrolyte Studies. In A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 2009, 999-1001.

[5] Iulian Mincu, Aurora Popescu, C. Ionescu Tirgoviste. Elemente de biochimie si fiziologie a nutritiei, 1985.

[6] <http://www.acvariu.ro/forum/posts/list/24047.page>

- [7] C.Z. Huang, K.A. Li, S.Y. Tong, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 235–342.
- [8] H. Wang, W.R. Li, Y. Lu, N.N. Fu, H.S. Zhang, *Spectrochim. Acta, Part A* 61 (2005) 2103–2107.
- [9] Y.L. Zhou, S.N. Mao, Y.Z. Li, W.B. Chang, *Microchim. Acta* 144 (2004) 191–197.
- [10] H.R. Charlton, J.M. Relton, N.K.H. Slater, *Biotechnol. Tech.* 13 (1999) 681–688.
- [11] J. Li, J. Kang, J. Lu, X.Z. Li, J.L. Tang, H.Q. Zhang, Y.H. Zhang, *J. Lumin.* 129 (2009) 906–911.
- [12] Q.C. Zou, Q.J. Yan, G.W. Song, S.L. Zhang, L.M. Wu, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1461–1465.
- [13] Y.Q. Cheng, Z.P. Li, Y.Q. Su, Y.S. Fan, *Talanta* 71 (2007) 1757–1761.
- [14] A.V. Yegorova, Y.V. Scripinets, A. Duerkop, A.A. Karasyov, V.P. Antonovich, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 260–267.
- [15] S.W. Bae, J.-W. Oh, I.-S. Shin, M.S. Cho, Y.-R. Kim, H. Kim, J.-I. Hong, *Analyst* 135 (2010) 603–607.
- [16] T. Selvaraju, J. Das, K. Jo, K. Kwon, C. Huh, T.K. Kim, H. Yang, *Langmuir* 24 (2008) 9883–9888.
- [17] J.H. Chen, J. Zhang, Q. Zhuang, J. Chen, X.H. Lin, *Electroanalysis* 19 (2007) 1765–1772.
- [18] Y.Q. Li, Y.J. Guo, X.F. Li, J.H. Pan, *Talanta* 71 (2007) 123–128.
- [19] M. Blanco, I. Villarroya, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 240–250.
- [20] J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *TrAC, Trends Anal. Chem* 29 (2010) 578–591.
- [21] Y. Yang, J. Tu, W. Cai, X. Shao, *Talanta* 99 (2012) 871–874.
- [22] "Basic Information" Clothianidin – Registration Status and Related Information. U.S. EPA. 27 July 2012.
- [23] <https://emedicine.medscape.com/article/167726-overview>
- [24] Organophosphates: Background, Pathophysiology, Epidemiology". 2016-11-29.
- [25] B. Goodman, "Pesticide Exposure in Womb Linked to Lower IQ". *Health & Pregnancy*. 21 Apr 2011.
- [26] "Malathion". Environmental Protection Agency.
- [27] "Organophosphates FAQs". Centers for Disease Control and Prevention. DHHS Department of Health and Human Services. Retrieved 6 February 2016.

- [28] Jurewicz, J.; Hanke, W. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. Versita, Warsaw. **21** (2): 121–132. doi:10.2478/v10001-008-0014-z. ISSN 1896-494X. PMID 18614459 (9 Jul 2008)
- [29] Study: ADHD linked to pesticide exposure. CNN. 17 May 2010.
- [30] Lu, Chensheng; Toepel, K.; Irish, R.; Fenske, R. A.; Barr, D.B.; Bravo, R., *Environmental Health Perspectives*. (2006). **114** (2), 260–3. doi:10.1289/ehp.8418. PMC 1367841.
- [31] "IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides" World Health Organization.
- [32] <https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>
- [33] *Environmental Health Perspectives – Population-Based Biomonitoring of Exposure to Organophosphate and Pyrethroid Pesticides in New York City*". ehp.niehs.nih.gov. Retrieved 2017-04-24.
- [34] IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides.
- [35] S. Kegley; B. Hill; S. Orme. "Parathion - Identification, toxicity, use, water pollution potential, ecological toxicity and regulatory information". Pesticide Action Network.
- [36] Diazinon, Agrochemicals. Great Vista Chemicals.
- [37] Raeburn, P. "Slow-Acting". *Scientific American*., 14 Aug 2006.
- [38] Abe, J.I., Takeda, Y., & Hizukuri, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology*, (1982), 703(1), 26–33.
- [39] Hizukuri, S., Tabata, S., Kagoshima, & Nikuni, Z. (1970), 22(10), 338–343.
- [40] Tabata, S., & Hizukuri, S. (1971) 23(8), 267–272.
- [41] BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (2009). *Starch: chemistry and technology*. ElsevierScience.
- [42] J. Verbeke, C. Penverne, C. D'Hulst, C.n Rolando, N. Szydlowski, *Carbohydrate Polymers* 152 (2016) 784–791.
- [43] <https://ro.wikipedia.org/wiki/Azot>
- [44] STUDY REGARDING THE EFFICIENCY OF CERTAIN PROCEEDINGS OF REMOVING THE NITROGEN FROM THE WASTE MUNICIPAL WATERS .

- [45] Wilney J.R. Santos, Phabyanno R. Lima, Auro A. Tanaka, Sônia M.C.N. Tanaka , Lauro T. Kubota, Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode, *Ed. Food Chemistry* 113 (2009) 1206–1211;
- [46] Gulcemel Yildiz , Nevin Oztekin, Ayca Orbay, Filiz Senkal, Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode, *Food Chemistry* 152 (2014) 245–250.
- [47] Maria-Alexandra Cimpeana, Izabella Craciunescu, Delia Gligora*, Amperometric sensor based on HEMA hydrogels modified with Toluidine Blue for nitrite detection in water samples, *Materials Chemistry and Physics*-200- 2017-233-240;
- [48] The Water Quality Association publishes this Technical Application Bulletin
- [49] A.T. Mubarak, A.A. Mohamed, K.F. Fawy, A.S. Al-Shihry, A novel kinetic determination nitrite based on the perphenazine-bromate redox reaction, *Microchimica Acta*, 157 (2007) 99-105;
- [50] T. TOMIYASU, Y. KONAGAYOSHI, K. ANAZAWA, H. SAKAMOTO, A kinetic method for the determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of chlorpromazine with nitric acid, *Analytical sciences*, 17 (2001) 1437-1440;
- [51] B.R. Kozub, N.V. Rees, R.G. Compton, Electrochemical determination of nitrite at a bare glassy carbon electrode; why chemically modify electrodes?, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143 (2010) 539-546.
- [52] Y. Cui, C. Yang, W. Zeng, M. Oyama, W. Pu, J. Zhang, Electrochemical determination of nitrite using a gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode prepared by the seed-mediated growth technique, *Analytical Sciences*, 23 (2007) 1421-1425.
- [53] M.I. Helaleh, T. Korenaga, Ion chromatographic method for simultaneous determination of nitrate and nitrite in human saliva, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 744 (2000) 433-437.
- [54] S.B. Butt, M. Riaz, M.Z. Iqbal, Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography, *Talanta*, 55 (2001) 789-797;
- [55] N. Öztekin, M.S. Nutku, F.B. Erim, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis, *Food chemistry*, 76 (2002) 103-106.
- [56] Y. Tanaka, N. Naruishi, H. Fukuya, J. Sakata, K. Saito, S.-i. Wakida, Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone

electrophoresis and its application to the study of daily variations, *Journal of Chromatography A*, 1051 (2004) 193-197;

[57] D. He, Z. Zhang, Y. Huang, Y. Hu, Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food, *Food Chemistry*, 101 (2007) 667-672;

[58] Y. Kanda, M. Taira, Flow-injection analysis method for the determination of nitrite and nitrate in natural water samples using a chemiluminescence NO_x monitor, *Analytical sciences*, 19 (2003) 695-699.

[59] Electrochemical detection of nitrite and ascorbic acid at glassy carbon electrodes modified with carbon nano-onions bearing electroactive moieties, *Inorganica Chimica Acta*-468-2017-223-231;

[60] José Losada ^a, M. Pilar García Armada ^{a,*}, Esther García ^a, Carmen M. Casado ^b, Beatriz Alonso ^b, Electrochemical preparation of gold nanoparticles on ferrocenyl-dendrimer film modified electrodes and their application for the electrocatalytic oxidation and amperometric detection of nitrite, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 788 (2017) 14–22

[61] Chunyan Deng ^{a,b}, Jinzhuo Chen ^a, Zhou Nie ^c, Minghui Yang ^{a,*}, Shihui Si ^a, Electrochemical detection of nitrite based on the polythionine/carbon nanotube modified electrode, *Thin Solid Films* 520 (2012) 7026–7029;

[62] Wilney J.R. Santos ^a, Phabyanno R. Lima ^a, Auro A. Tanaka ^b, Sônia M.C.N. Tanaka ^b, Lauro T. Kubota ^{a,*} Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode, *Food Chemistry* 113 (2009) 1206–1211;

[63] Dalibor M. Stankovi´c^{a,*}, Eda Mehmeti^b, Janez Zavařnik^c, Kurt Kalcher^b ,Determination Of nitrite in tapwater: A comparative study between cerium,titanium and selenium dioxide doped reduced grapheme oxide modified glassy carbon electrodes, *Sensors and Actuators B* 236 (2016) 311–317;

[64] Jing-He Yang*, Haitang Yang, Shanhu Liu*, Liqun Mao Microwave-assisted synthesis graphite-supported Pd nanoparticles for detection of nitrite, *Sensors and Actuators B Chemical*-220-2015-652-658;

[65] Balamurugan Thirumalraj, Selvakumar Palanisamy, Shen-Ming Chen*, Duo-Han Zhao, An amperometric detection of nitrite in water samples using palladium nanoparticles decorated functionalized multiwalled carbon nanotubes modified electrode, *Journal of Colloid and Interface Science*- 478- 2016-413-420;

- [66] Mir Reza Majidi, Seyran Ghaderi ,Hydrogen bubble dynamic template fabrication of nanoporous Cu film supported by graphene nanaosheets: A highly sensitive sensor for detection of nitrite,Talanta-175-2017-21-29;
- [67] Dalibor M. Stankovi´c^{a,*}, Eda Mehmetib, Janez Zavařnik^c, Kurt Kalcher^b , Determination of nitrite in tap water:A comparative study between cerium,titanium and selenium dioxide doped reduced graphene oxide modified glassy carbon electrodes, Sensors and Actuators B Chemical-236- 2016-311-317;
- [68] Maria-Alexandra Cimpeana, Izabella Craciunescub, Delia Gligora , Amperometric sensor based on HEMA hydrogels modified with Toluidine Blue for nitrite detection in water samples, Materials Chemistry and Physics-200- 2017-233-240;
- [69] Gilani Muhammad Rehan Hasan Shah^{1,2,3}, ZHAO Jian-Ming^{1,2}, LOU Bao-Hua¹, ZHANG Wei¹,Azizur Rehman^{3,*}, XU Guo-Bao^{1,*} , Electrochemical Sensing of Nitrite at Aminophenol-Formaldehyde Polymer/Phosphomolybdic Acid Nanocomposite Modified Electrode, Chinese Journal of Analytical Chemistry- 45-4-2017-1709-e1712;
- [70] Ali Ouraria, Bouzid Kefia, Seif Islam Rabie Malhaa, Aziz Amineb , Electrocatalytic Reduction of Nitrite and Bromated and Their highly sensitive determination on carbon paste electrode modified with new copper Schiff base complex, Journal of Electroanalytical Chemistry-797-2017-31-36;
- [71] Chafia Ait Ramdane-Terbouche, Achour Terbouche, Safia Djebbar, Didier Hauchard,Electrochemical sensors using modified electrodes based on copper complexes formed with Algerian humic acid modified with ethylenediamine or triethylenetetramie for determination of nitrite in water, Talanta-119-014-214-225;
- [72] Gulcemal Yildiz ^{*}, Nevin Oztekin, Ayca Orbay, Filiz Senkal,Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode, Food Chemistry-152- 2014- 245-250;
- [73] Achour Terbouche, Siham Lameche, Chafia Ait-Ramdane-Terbouche, Djamila Guerniche, Djahida Lerari, Khaldoun Bachari, Didier Hauchard ,A new electrochemical sensor based on carbon paste electrode/Ru(III) complex for determination of nitrite: Electrochemical impedance and cyclic voltammetry measurements , Measurement-92- 2016- 524-533;
- [74] Mozhgan Parsaei^a, Zahra Asadi^{a,*}, Saeid Khodadoust^b., A sensitive electrochemical sensor for rapid and selective determination of nitrite ion in water samples using modified carbon paste

electrode with a newly synthesized cobalt(II)-Schiff base complex and magnetite nanospheres, *Sensors and Actuators B Chemical*- 220-2015- 1131-1138

[75] Veerendra C. Yeligar*, Ravindra G. Gaikwad, Kavita D. Patil, Sanjay S. Patil and Shitalkumar S. Patil, Development of spectrophotometric method and validation for melatonin in tablet, *world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, Volume 5, Issue 6, 1440-1451(2016).

[76] Marcello Iriti,¹ Mara Rossoni² and Franco Faoro^{3*}, Melatonin content in grape: myth or panacea? *J Sci Food Agric* 86:1432–1438 (2006).

[77] Dun-Xian Tan^{1,2}, Lucien C. Manchester¹, Rüdiger Hardeland², Silvia Lopez-Burillo¹, Juan C. Mayo¹, Rosa M. Sainz¹ and Russel J. Reiter¹, Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin, *J. Pineal Res.* 2003; 34:75–78.

[78] Chao Lua*, Jinge Li a, Yi Yanga, Jin-Ming Linb, Determination of bisphenol A based on chemiluminescence from gold(III)–peroxymonocarbonate, *Talanta* 82 (2010) 1576–1580.

[79] Xu Wang, Hulie Zeng, Yanlin Wei, Jin-Ming Lin *, A reversible fluorescence sensor based on insoluble β -cyclodextrin polymer for direct determination of bisphenol A (BPA), *Sensors and Actuators B* 114 (2006) 565–572.

[80] Rochester JR, Bisphenol A and Human Health: A review of the literature., *Reproductive Toxicology* (2013).

[81] Guo Nan Chen, Fu Xin Huang, Xiao Ping Wu, Zheng Feng Zhao, Jian Ping Duan, Chemiluminescence determination of melatonin and some of its derivatives using potassium permanganate and formaldehyde system, *Anal Bioanal Chem* (2003) 376 : 873–878.

[82] Saumen Kumar Maitra* and Kazi Nurul Hasan, Melatonin in the Care and Control of Human Health, *JOJ nursing& Health Care*, Volume 4 Issue 3- September 2017.

[83]. Jing Wang, Xueying Liu, Yiting Wang, Lei Yu, Hui Peng, Jian-Zhong Zhu, Fe NPs and MWCNTs based electrode as FIA detector for determination of amino acids in hypothalamus microdialysis fluids, *Sensors and Actuators B*, 238, 2017, 834–841.

[84]. Sadegh Karimi, Maryam Heydari, Voltammetric mixture analysis of Tyrosine and tryptophan using carbon paste electrode modified by newly synthesized mesoporous silica nanoparticles and clustering of variable-partial least square: Efficient strategy for template extraction in mesoporous silica nanoparticle synthesis, *Sensors and Actuators B*, article in press, accepted, 2017, doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.014.

- [85]. Sara Hooshmand, Zarrin Es'haghi, Simultaneous quantification of arginine, alanine, methionine and cysteine amino acids in supplements using a novel bioelectro-nanosensor based on CdSe quantum dot/modified carbon nanotube hollow fiber pencil graphite electrode via Taguchi method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 2017, pp. 226-235.
- [86]. https://en.wikipedia.org/wiki/Proteinogenic_amino_acid
- [87]. Rainer Bischoff, Hartmut Schlüter, Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications, *Journal of proteomics*, 75, 2012, pp. 2275 – 2296.
- [88]. https://en.wikipedia.org/wiki/Non-essential_amino_acid
- [89]. Ponnusamy Kanchana, Mani Navaneethan, Chinnathambi Sekar, Fabrication of Ce doped hydroxyapatite nanoparticles based non-enzymatic electrochemical sensor for the simultaneous determination of norepinephrine, uric acid and Tyrosine, *Materials Science & Engineering B*, 226, 2017, pp. 132–140.
- [90]. Sayed Mehdi Ghoreishi, Mehdi Malekian, Curve resolution on overlapped voltammograms for simultaneous determination of tryptophan and Tyrosine at carbon paste electrode modified with ZnFe₂O₄ nanoparticles, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 805, 2017, pp. 1-17.
- [91]. Siddharth Shrestha, Ronald J. Mascarenhas, Ozma J. D'Souza, Ashis K. Satpati, Zineb Mekhalif, Dhason A., Praveen Martis, Amperometric sensor based on multi-walled carbon nanotube and poly (Bromocresol purple) modified carbon paste electrode for the sensitive determination of L-Tyrosine in food and biological samples, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 778, 2016, pp. 32–40.
- [92]. S. Bahmanzadeh, M. Noroozifar, Fabrication of modified carbon paste electrodes with Ni-doped Lewatit FO36 nano ion exchange resin for simultaneous determination of epinephrine, paracetamol and tryptophan, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, article in press, accepted, 2017, doi:10.1016/j.jelechem.2017.11.073.
- [93]. Elahe Molaakbari Ali Mostafavi Hadi Beitollahi, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine, *Sensors and Actuators B*, 208, 2015, pp. 195-203.
- [12]. Nihal Ermiş, Lokman Uzun, Adil Denizli, Preparation of molecularly imprinted electrochemical sensor for l-phenylalanine detection and its application, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 807, 2017, pp. 244-252.

- [94]. H.Zeinali, H.Bagheri, Z.M.Khoshhesab, H.Khoshsafar, A.Hajian, Nanomolar imultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO₂-Co₃O₄@rGO nanocomposite Materials, Mater. Sci. Eng. C., 71, 2017, pp. 386–394.
- [95]. J. Ren, M.Zhao, J. Wang, C. Cui ,B. Yang, Spectrophotometric Method for Determination of Tryptophan in Protein Hydrolysates, Food Technol. Biotechnol., 45(4), 2007, pp. 360–366.
- [96] M. Utrera, M.Estévez, Analysis of tryptophan oxidation by fluorecence spectroscopy: Effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds, Food Chem., 135, 2012, pp. 88–93.
- [97]. [12] B.Williamson ,L. Benson , A.Tomlinson , A. Mayeno , G. Gleich , S. Naylor, On-line HPLC-tandem mass spectrometry analysis of contaminants of L-tryptophan associated with the onset of the eosinophilia-myalgia syndrome, Toxicol Lett., 92, 1997, pp. 139-48.
- [98]. M. K. Gaitonde, A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues, Biochem., 139, 1974, pp. 625-631.
- [99]. J. Zhao, H. Chen, P. Ni, B. Xu, X. Luo, Simultaneous determination of urinary tryptophan, tryptophan-related metabolites and creatinine by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection ,J.Chromatogr. B, 879, 2011, pp. 2720–2725.
- [100]. B. J. de Kort , G.J. de Jong, G.W. Somsen, Native fluorecence detection of biomolecular and pharmaceutical compounds in capillary electrophoresis: Detector designs, performance and applications: A review ,Anal. Chim. Acta, 766, 2013, pp. 13–33.
- [101]. N.Nuchtavorn, W.Suntornsuk, Recent applications of microchip electrophoresis to biomedical analysis, J. of Pharma. Biomed. Anal., 113, 2015, pp. 72–96.
- [102]. M. F. Dario, T. B.Freire, C. A. S. de Oliveira Pinto, M. S. A. Prado, A. R. Baby, M. V. R. Velasco, Tryptophan and kynurenine determination in human hair by liquid chromatography, J. Chromatogr. B., 1065, 2017, pp. 59–62.
- [103]. J. Zhao,P. Gao, Optimization of Zn²⁺-containing mobile phase for simultaneous determination of kynurenine, kynurenic acid and tryptophan in human plasma by high performance liquid chromatography, J. Chromatogr.B, 878 (2010) 603–608.
- [104] C. Wong , C. Strachan-Mills, S. Burman, Facile method of quantification for oxidized tryptophan degradants of monoclonal antibody by mixed mode ultra performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 1270, 2012, pp. 153–161.

- [105] V. P. Hanko, J. S. Rohrer, Direct determination of tryptophan using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *Anal. Biochem.*, 308, 2002, pp. 204–209.
- [106]. M. Noroozifar, M. Khorasani-Motlagh, R. Akbari, M. Bemanadi-Parizi, Simultaneous and sensitive determination of a quaternary mixture of AA, DA, UA and Trp using a modified GCE by iron ion-doped natrolite zeolite-multiwall carbon nanotube, *Biosens. Bioelectron.*, 28, 2011, pp. 56–63.
- [107]. M. Noroozifar, M. Khorasani –Motlagh, A. Taheri, Preparation of silver hexacyanoferrate nanoparticles and its application for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *Talanta* 80, 2010, pp. 1657–1664.
- [108]. José Luiz da Silva, Maísa Azevedo Beluomini, Graziela Cristina Sedenho, Nelson Ramos Stradiotto, Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode, *Microchemical Journal*, 134, 2017, pp. 374-382.
- [109]. Vítor Spínola, Eulogio J. Llorent-Martínez, Paula C. Castilho, Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation, *Journal of Chromatography A*, 1369, 2014, pp. 2-17.
- [110]. Mohammad Ali Saghiri, Armen Asatourian, Soroush Ershadifar, Mona Momeni Moghadam, Nader Sheibani, Vitamins and regulation of angiogenesis: [A, B1, B2, B3, B6, B9, B12, C, D, E, K], *Journal of Functional Foods*, Vol. 38, 2017, pp. 180–196.
- [111]. Vahid Arabali, Mahmoud Ebrahimi, Maryam Abbasghorbani, Vinod Kumar Gupta, Mohammad Farsi, M.R. Ganjali, Fatemeh Karimi, Electrochemical determination of vitamin C in the presence of NADH using a CdO nanoparticle/ionic liquid modified carbon paste electrode as a sensor, *Journal of Molecular Liquids*, 213, 2016, pp. 312-316.
- [112]. Jaymin K. Jadav, Valentina V. Umrana, Khyati J. Rathod, Baljibhai A. Golakiya, Development of silver/carbon screen-printed electrode for rapid determination of vitamin C from fruit juices, *LWT - Food Science and Technology*, 88, 2018, pp. 152-158.
- [113]. Piyush Kumar Sonkar, Vellaichamy Ganesan, Susanta K. Sen Gupta, Dharmendra Kumar Yadav, Rupali Gupta, Mamta Yadav, Highly dispersed multiwalled carbon nanotubes coupled manganese salen nanostructure for simultaneous electrochemical sensing of vitamin B2 and B6, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 807, 2017, pp. 235–243.

- [114]. L. Bellows specialist and assistant professor and R. Moore graduate student, Food and nutrition series- Water-Soluble Vitamins: B-Complex and Vitamin C, Fact Sheet No. 9.312 Colorado State University 11/2012.
- [115]. Tao Nie, Jing-Kun Xu, Li-Min Lu, Kai-Xin Zhang, Ling Bai, Yang-Ping Wen, Electroactive species-doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films: Enhanced sensitivity for electrochemical simultaneous determination of vitamins B₂, B₆ and C, *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 2013, pp. 244–250.
- [116]. Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J., Scrimgeour, K., *Principles of Biochemistry*, second ed. Prentice-Hall, New Jersey, 1996.
- [117]. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21–30 September 1998.
- [118]. Fatemeh Khaleghi, Zahra Arabb, Vinod Kumar Gupta, M.R. Ganjali, Parviz Norouzi, Necip Atar, Mehmet L. Yola, Fabrication of novel electrochemical sensor for determination of vitamin C in the presence of vitamin B₉ in food and pharmaceutical samples, *Journal of Molecular Liquids*, 221, 2016, pp. 666–672.
- [119]. Manal L. Louka, Ahmed M. Fawzy, Abdelrahman M. Naiem, Mustafa F. Elseknedey, Ahmed E. Abdelhalim, Mohamed A. Abdelghany, Vitamin D and K signaling pathways in hepatocellular carcinoma, *Gene*, 629, 2017, pp. 108-116.
- [120]. Edward Giovannucci, Vitamin D and Cancer Incidence in the Harvard Cohorts, *Ann Epidemiol*, 19 (2), 2009, pp. 84-89.
- [121]. Elizabeth R. Bertone-Johnson, Wendy Y. Chen, Michael F. Holick, Bruce W. Hollis, Graham A. Colditz, Walter C. Willett, Susan E. Hankinson, Plasma 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D and Risk of Breast Cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (8), 2005, pp. 1991-1997.
- [122]. Brian J. Petteys, Elizabeth L. Frank, Rapid determination of vitamin B₂ (riboflavin) in plasma by HPLC, *Clinica Chimica Acta*, 412, 2011, pp. 38–43.
- [123]. Lopez-Anaya A, Mayersohn M., Quantification of riboflavin, riboflavin 5'- phosphate and flavin adenine dinucleotide in plasma and urine by highperformance liquid chromatography, *J. Chromatogr*, 423, 1987, pp. 105–113.
- [124]. Zempleni J., Determination of riboflavin and flavocoenzymes in human blood plasma by high-performance liquid chromatography, *Ann Nutr Metab*, 39, 1995, pp. 224–226.

- [125]. Iha Bama, Emo Dworschik, Determination of thiamine (vitamin B1) and riboflavin (vitamin B2) in meat and liver by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 668, 1994, 359-363.
- [126]. Nasrin Shadjou, Mohammad Hasanzadeh, Ali Omari, Electrochemical quantification of some water soluble vitamins in commercial multi-vitamin using poly-amino acid capped by graphene quantum dots nanocomposite as dual signal amplification elements, *Analytical Biochemistry*, 539, 2017, pp. 70-80.
- [127]. S.L. Bahattar, G.B. Kolekar, S.R. Patil, Fluorescence resonance energy transfer between perylene and riboflavin in micellar solution and analytical application on determination of vitamin B2, *Journal of Luminescence*, 128, 2008, pp. 306–310.
- [128]. Yolanda Andreu, Susana de Marcos, Juan R. Castillo, Javier Galban, Sensor film for Vitamin C determination based on absorption properties of polyaniline, *Talanta*, 65, 2005, pp. 1045–1051.
- [129]. L.G. Shaidarova, L.N. Davletshina, G.K. Budnikov, Flow-Injection Determination of Water-Soluble Vitamins B1, B2, and B6 from the Electrocatalytic Response of a Graphite Electrode Modified with a Ruthenium(III) Hexacyanoruthenate(II) Film, *Analyt. Chem.* 61, 2006, pp. 502-509.
- [130]. P. Moreno, V. Salvado', Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 870, 2000, 207–215.
- [131]. Tomás Pérez-Ruiz, Carmen Martínez-Lozano, Antonio Sanz, Virginia Tomás, Photokinetic determination of riboflavin and riboflavin 5'-phosphate using flow injection analysis and chemiluminescence detection, *Analyst*, 8, 1994, pp. 1825–1828.
- [132]. S. Brillians Revin, S. Abraham John, Simultaneous determination of vitamins B2, B9 and C using a heterocyclic conducting polymer modified electrode, *Electrochimica Acta*, 75, 2012, pp. 35–41.
- [133]. Jing Wu, Cunxi Leia, Haifeng Yang, Xumei Wu, Guoli Shen, Ruqin Yu, Ruthenium tris(2,2) bipyridyl-modified oxidized boron-doped diamond electrode for the determination of Vitamin B6 in the presence of Vitamins B1 and B2, *Sensors and Actuators B*, 107, 2005, pp. 509–515.

[134]. Hai-Ying Gu , Ai-Min Yu, Hong-Yuan Chen, Electrochemical behavior and simultaneous determination of vitamin B₂, B₆, AND C at electrochemically pretreated glassy carbon electrode, *Analytical Letters*, 34 (13), 2001, pp. 2361–2374.

[135]. Cui'e Zou, Jiatai Zhong, Shumin Li, Huiwen Wang, Jin Wang, Bo Yan, Yukou Du, Fabrication of reduced graphene oxide-bimetallic PdAu nanocomposites for the electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and rutin, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 805, 2017, pp. 110–119.