

Inkapsulacija peroksidaze cvekle (*Beta vulgaris* L.) kao model zaštite enzima od inhibitornog uticaja teških metala

Grupa enzima (EC 1.11.1.X) koja uključuje peroksidazu (EC 1.11.1.7) detoksikuje žive organizme katalizujući razlaganje vodonik-peroksida. Peroksidaza katalizuje istu reakciju u industrijskim uslovima, pri prečišćavanju otpadnih voda. U ova-kvoj sredini joni teških metala, snažni inhibitori enzimske aktivnosti, značajno smanjuju prinos procesa. U ovom radu ispitana je mogućnost primene imobilizacije radi zaštite enzima od inhibitornog uticaja teških metala. Imobilizacija je skup tehnika kojima se ograničava kretanje enzima uz očuvanje njegove aktivnosti. Peroksidaza korena cvekle izolovana je homogenizacijom i amonijum-sulfatnim taloženjem. Aktivnost enzima merena je standardnim ABTS esejom i u dijalizatu iznosi (10.9±0.6) U/mL. Uticaj teških metala na aktivnost enzima ispitana je nakon dvanaestčasovne inkubacije enzima sa solima srebra(I), olova(II) i gvožđa(III). Najbolji inhibitorni efekat pokazalo je srebro(I), dok su olovo(II) i gvožđe(III) slične inhibitorne moći. IC₅₀ vrednosti za navedene metale iznose (16.8±0.7), (20.5±0.9) i (20.5±0.9) mmol/L, redom. Imobilizacija je izvedena inkapsulacijom enzima kalcijum-alginatom. IC₅₀ vrednosti za inkapsuliran enzim iznose (20.8±0.9), (27±1) i (32±2) mmol/L za inhibiciju srebrom(I), olovom(II) i gvožđem(III), redom. Za sve sisteme je zajedničko da je IC₅₀ vrednost povećana. Alginatna kapsula pruža zaštitu od teških metala, te se preporučuje dalje ispitivanje u cilju optimizacije osobina kapsule za uslove industrijske primene.

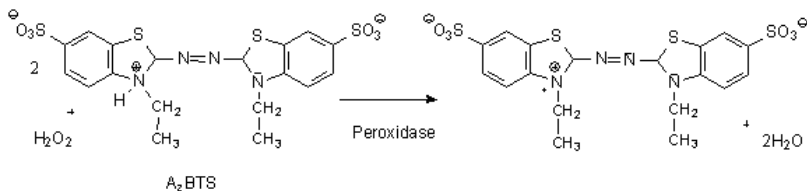
Uvod

Delimično redukovani oblici kiseonika osnovni su toksični metabolički produkti živih organizama. Ovakve supstance, među kojima je vodonik-peroksid, veoma su reaktivne i brzo stupaju u reakcije slobodno-radikalnog mehanizma. Tada dolazi do oštećenja biomolekula, što može uzrokovati prevremenu smrt ćelije, promene u međućelijskoj tečnosti i nastanak različitih bolesti. Ove pojave su bitni faktori koji utiču na starenje i smrt organizma (Harman 1991). Najčešći molekuli sa delimično redukovanim atomom kiseonika u živim sistemima su superoksidni (O²⁻) i

Igor Asanović (1992), Ruma, Franje Kluza 21, učenik 4. razreda Srednje medicinske škole „Draginja Nikšić” u Sremskoj Mitrovici

peroksidni (O_2^{2-}) jon, hidroksil-radikal ($\bullet OH$) i vodonik-peroksid (H_2O_2) (Tzika *et al.* 2001).

Poznato je šesnaest enzima zaduženih za redukciju vodonik-peroksida koji čine grupu peroksidaza (EC 1.11.1.X). Najčešći predstavnici peroksidaza su katalaza – CAT (EC 1.11.1.6), peroksidaza – POD (EC 1.11.1.7) i glutation-peroksidaza – GSH-Px (EC 1.11.1.9). POD je katjon-zavisan protein, čiji se mehanizam dejstva zasniva na cikličnoj redukciji gvožđe(III)-jona pogodnim supstratom i oksidaciji nastalog gvožđe(II)-jona vodonik-peroksidom (Kadnikova i Kostić 2002). Reakcija vodonik-peroksida katalizovana peroksidazom sa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselinom) – ABTS kao oksidujućim supstratom prikazana je jednačinom:



Peroksidaza (POD) je najviše zastupljena u renu (*Armoracia rusticana* L.). Kako primena ovog enzima raste, ispituje se njegov sadržaj u drugim biljnim vrstama slične morfologije korena (ren, rotkva, repa, peršun). Između ostalog, u korenu cvekle (*Beta vulgaris* L.) je detektovan značajan sadržaj ovog enzima (Rudrappa *et al.* 2005).

Osim što imaju značajnu ulogu u zaštiti i razvojnim procesima organizama, peroksidaze su našle primenu u različitim granama privrede. Najznačajnija industrijska upotreba POD je prečišćavanje otpadnih voda od peroksida, fenola, indola, amina, alkohola, formaldehida itd. (Tzika *et al.* 2008). Pored toga, koristi se u analitičke svrhe, u kliničkoj dijagnostici i prehrambenoj industriji: radi otklanjanja peroksida iz hrane i njenog konzervisanja (Rudrappa *et al.* 2005).

Primenu peroksidaze u industriji značajno ometaju inhibitori enzimske aktivnosti. Jedni od najčešće prisutnih inhibitora u otpadnim vodama jesu teški metali (Güngör 2008). Oni u malim koncentracijama inhibiraju enzim, što rezultuje smanjenjem brzine reakcije i prinosa procesa. (MacFarlane 2001).

Imobilizacija je skup tehnika kojima se, ma kojim mehanizmom, postiže ograničenje kretanja enzima, pri čemu enzimska aktivnost ostaje očuvana. Jedna od metoda imobilizacije je inkapsulacija enzima. Odgovarajućim podešavanjem uslova oko molekula enzima se formira selektivno propustljiva polimerna kapsula. Kretanje enzima se ograničava i rukovanje njime olakšava. Imobilizovan enzim se jednostavno odstranjuje iz sistema i ponovo upotrebljava (Nahakpam *et al.* 2008).

Kroz gel kapsule, zajedno sa molekulima supstrata lako difunduju joni teških metala, čestice sličnih ili manjih dimenzija (Kadnikova i Kostić 2002). Međutim, s obzirom na suprotno naelektrisanje gela i jona metala može se pretpostaviti da bi se jedan deo tih jona zadržao na gelu. Jednovalentni katjoni bi relativno lako difundovali do enzima i inhibirali njegovu aktivnost. Dvo- i trovalentni joni bi se snažnije i većim brojem veza vezivali za negativno naelektrisanu alginatnu mrežu, kao što to čine joni kalcijuma(II). Tako bi inhibitorni uticaj ovih jona na enzimsku aktivnost mogao biti smanjen.

U skladu sa tim, ima smisla pretpostaviti da bi, u slučaju peroksidaze, imobilizacija mogla da olakša njenu upotrebu za prečišćavanje otpadnih voda sa rastvorenim solima teških metala.

U ovom radu je ispitan uticaj prirode (veliĉine i naelektrisanja) i koncentracije jona teških metala na aktivnost neimobilizovane i kalcijum-alginatom imobilizovane peroksidaze cvekle. Na osnovu rezultata, moglo bi se utvrditi može li se, i eventualno u kojim slučajevima, imobilizacija koristiti za zaštitu enzima od inhibitornog uticaja teških metala u cilju olakšavanja njegove primene pri prečišćavanju otpadnih voda.

Materijal i metode

Peroksidaza je ekstrahovana iz korena crvene cvekle. Droga je homogenizovana u prisustvu fosfatnog pufera i polivinilpirolidona, a enzim izolovan taloženjem amonijum-sulfatom zasićenja 80%, centrifugiranjem i dijalizom naspram česemske vode. Enzim je inkubiran mešanjem odgovarajućih zapremina acetatnog pufera, rastvora nitrata teških metala i sto puta razblaženog rastvora enzima. Rastvor za esej pripremljen mešanjem inkubiranog enzima sa rasvorima ABTS i vodonik-peroksida. Merena je apsorbancija rastvora svakih deset sekundi tokom dva minuta i izračunate enzimске aktivnosti izražene u internacionalnim jedinicama. Jedna jedinica definisana je kao koliĉina enzima koja transformiše 1 μmol supstrata po minuti na 25°C pri gore navedenim uslovima. Slepa proba je pripremljena istim postupkom, samo što je umesto rastvora enzima dodavan pufer. Na osnovu dobijenih podataka izračunata je IC_{50} vrednost za svaki teški metal pojedinaĉno. POD je imobilizovana ukapavanjem smeše ekstrakta enzima i natrijum-alginata u rastvor kalcijum-hlorida. Eseji imobilizovanog enzima su identični esejima neimobilizovanog, osim što je umesto razblaženog rastvora enzima korišćena odgovarajuća masa imobilizata. Masena koncentracija proteina u svim uzorcima određena je Bredfordovom metodom sa Coomasie Brilliant Blue G-250 kao bojom i albuminom goveđeg seruma kao standardom. Sve brojĉane vrednosti i potrebne formule date su u daljem tekstu u okviru ovog odeljka.

Ekstrakcija peroksidaze. Peroksidaza je ekstrahovana iz korena crvene cvekle (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, convar *vulgaris*, var. *vulgaris*). Biljke starosti četiri meseca gajene bez tretiranja pesticidnim agensima, izvađene su i nakon odstranjivanja nadzemnog dela čuvane su pet dana na temperaturi 4°C. Neoljušten, opran i grubo isečen koren cvekle mase 180 g potopljen je u 800 mL fosfatnog pufera (pH 7) koncentracije 50 mmol/L u kom je rastvoren polivinilpirolidon – PVP (maseni udeo 2%). Koren cvekle je homogenizovan u blenderu maksimalnom brzinom šest puta po 15 s uzastopno. Dobijeni homogenat proceđen je kroz dvosloj gaze i nakon sat vremena inkubacije na 4°C centrifugiran tokom 90 minuta (centrifugalno ubrzanje 1600 g, HARRIER 15/80). Talog je odstranjen i deo supernatanta uzorkovan radi ispitivanja sirovog ekstrakta. U tečnu fazu ravnomerno je, tokom trideset minuta, dodavan fino usitnjen amonijum-sulfat do 40% zasićenja uz stalno mešanje i nakon jednog sata rastvor centrifugiran tokom 40 minuta (1600 g). Talog je odbačen i supernatant inkubiran sat vremena na 4°C. Nova količina amonijum-sulfata dodata je do 80% zasićenja i smeša mešana jedan sat na magnetnoj mešalici. Talog dobijen centrifugiranjem tokom 40 minuta (1900 g) rastvoren je u minimalnoj zapremini acetatnog pufera (pH 5) koncentracije 50 mmol/L i dijalizovan preko noći na 4°C (Vujčić 2002).

Eseji neimobilizovanog enzima. Rastvori enzima za inkubaciju zapremine 2.000 mL (preciznost reda mikrolitra, automatska pipeta EPPENDORF) pripremljeni su mešanjem odgovarajućih zapremina acetatnog pufera (pH 5, koncentracija 0.050 mol/L), rastvora nitrata teških metala (koncentracija 0.400 mol/L) i 0.250 mL 100 puta razblaženog rastvora enzima. Inkubacija je trajala dvanaest časova na temperaturi 4°C. Radi određivanja aktivnosti peroksidaze dodato je 0.100 mL rastvora ABTS (koncentracija 10.0 mmol/L) i 0.100 mL rastvora vodonik-peroksida (koncentracija 0.033 mol/L) u 0.800 mL inkubiranog rastvora. Merena je apsorbanca rastvora na 419 nm (spektrofotometar, ISKRA), svakih deset sekundi tokom dva minuta. Izračunate su enzimske aktivnosti izražene u internacionalnim jedinicama (formula data dalje u tekstu). Boja potiče od nastalog zelenog oksidovanog oblika ABTS. Jedna jedinica (U) definisana je kao količina enzima koja transformiše 1 μ mol supstrata po minuti na 25°C pri gore navedenim uslovima (Vujčić 2002). Slepa proba je pripremnjena istim postupkom, samo što je umesto rastvora enzima dodavan pufer.

Ispitana je aktivnost POD cvekle u prisustvu sledećih jona teških metala: Ag⁺, Pb²⁺ i Fe³⁺. Teški metali u rastvorima za enzimski esej su se nalazili u sedam koncentracija: 0, 3, 6, 8, 13, 20 i 30 mmol/L. Izračunata je IC₅₀ vrednost, koja predstavlja koncentraciju teškog metala koja smanjuje aktivnost enzima na jednu polovinu maksimalne. Za izračuna-

vanje je korišćen zakon opadajuće eksponencijalne zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije inhibitora:

$$c_{1/2} = c_0 \cdot \exp(-k \cdot IC_{50}),$$

gde je $c_{1/2}$ polovina maksimalne koncentracije enzimske aktivnosti, c_0 maksimalna koncentracija enzimske aktivnosti (bez prisustva teških metala), a k konstanta karakteristična za dati reakcioni sistem određena pomoću krive zavisnosti (Güngör 2008).

Sva ispitivanja rađena su spektrofotometrijski (CECIL CE2021) u klimatizovanoj prostoriji na 25°C nakon jednočasovnog stajanja svih rastvora na navedenoj temperaturi.

Određivanje masene koncentracije proteina. Određena je masena koncentracija proteina u ekstraktu Bredfordovom metodom. Kao boja u reagensu korišćen je Coomassie Brilliant Blue – CBB G-250. Standardnu seriju čine rastvori albumina govedeg seruma – BSA (boven serum albumine). Apsorbanca rastvora je merena na 595 nm nakon dodavanja 0.100 cm³ rastvora analize/standarda u 5.00 mL reagensa.

Imobilizacija peroksidaze. Pripremljen je 1.000 mL rastvora za imobilizaciju mešanjem 0.500 mL sto puta razblaženog ekstrakta enzima i iste zapremine rastvora natrijum-alginata masenog udela 4%. Potom je ovaj rastvor insulinskim špicem ukapavan u 15 mL rastvora kalcijum-hlorida koncentracije 1 mol/L brzinom 0.2 kapi po sekundi uz mešanje mehaničkom mešalicom. Time su dobijene polimerne kapsule sa imobilizovanim enzimom. Smeša je ostavljena dvanaest časova na temperaturi 4°C. Potom je rastvor odliven i kapsule dva puta isprane acetatnim puferom (pH 5) koncentracije 50 mmol/L i ostavljene u minimalnoj zapremini istog pufera na temperaturi 4°C. Rastvor kalcijum-hlorida i ispirci puferom sačuvani su radi određivanja masene koncentracije proteina i prinosa imobilizacije. Ceo postupak imobilizacije izveden je šest puta u odvojenim sudovima, a imobilizati sjedinjeni. Tako dobijene kapsule čuvane su na 4°C i korišćene za eseje imobilizovanog enzima.

Eseji imobilizovanog enzima. Eseji imobilizovanog enzima su identični esejima neimobilizovanog, osim što je umesto 0.100 mL razblaženog rastvora enzima korišćena odgovarajuća masa imobilizata (0.091 g).

Rezultati i diskusija

Ekstrakcija peroksidaze

Nakon blendiranja u fosfatnom puferu i filtriranja kroz gazu dobijen je homogenat. Rastvor je veoma viskoznan, svetlo ljubičast i sadrži znatnu masu vlaknastih balastnih supstanci. Centrifugiranjem su ove supstance otklonjene a antocijanski pigmenti zadržani, tako da je rastvor postao

tamniji, bistriji i manje viskozan. Primarnim taloženjem amonijum-sulfatom otklonjeni su nepoželjni proteini i njihovi derivati. Sekundarnim taloženjem u talog je prešla proteinska frakcija koja sadrži peroksidazu, izvesnu količinu sličnih enzima i većinu antocijana. Supernatant je odliven i talog rastvoren u minimalnoj zapremini acetatnog pufera. Potom je ostavljen da dijalizuje preko noći naspram česmenske vode. Veći molekuli antocijana su ostali koncentrovani u dijalizatu, tako da je on tamno mrk i gotovo neprovidan. Konačna zapremina dijalizovanog ekstrakta iznosila je 18 mL.

Eseji neimobilizovanog enzima

Standardnim ABTS enzimskim esejom određena je aktivnost POD sirovog ekstrakta, POD dijalizata i POD inkubirane sa teškim metalima. U svim esejima korišćeni su sto puta razblaženi ekstrakti.

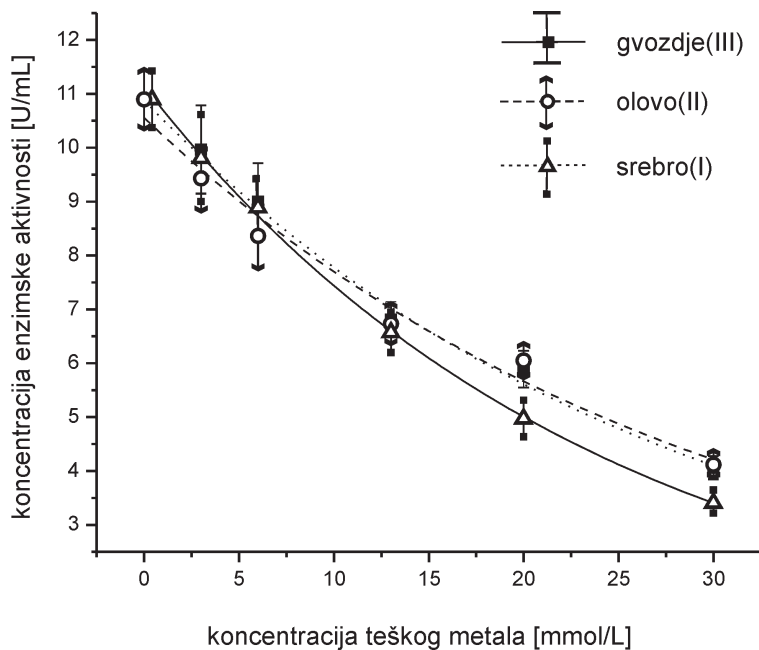
Aktivnost enzima u sirovom ekstraktu data je u tabeli 1. U istoj tabeli uočava se da masena koncentracija proteina ima visoku vrednost, a uticaj teških metala u ovom stadijumu nije ispitivan.

Masa proteina i njihova aktivnost u dijalizatu prikazani su u tabeli 1. Povećanje aktivnosti posledica je dve pojave. Prva je otklanjanje supstanci koje mogu da ometaju aktivnost enzima, a druga smanjenje viskoznosti koje omogućava veću brzinu reakcije. Antocijani koji se nalaze u homogenatu i dijalizatu ne ometaju merenje enzimske aktivnosti i pored koagulacije u golim okom vidljive čestice u ekstraktu. Stostrukim razblaživanjem ekstrakta ove čestice se rastvaraju.

Uticaj teških metala na peroksidazu prikazan je na slici 1.

Uočljivo je da joni srebra(I) najbolje inhibiraju enzim. IC_{50} vrednost izračunata na osnovu podataka dobijenih iz krive na slici 1. iznosi (16.8 ± 0.7) mmol/L. Neposredno po dodatku rastvora srebro-nitrata u rastvor enzima i pufera nije došlo do uočljivih promena. Međutim, u toku inkubacije se kod koncentracija preko 15 mmol/L pojavila mala količina žućkastog taloga koja je otklonjena centrifugiranjem u minifugi (3500 g, EPPENDORF). Pretpostavljen mehanizam inhibicije jeste da se peroksidaza delom denaturiša reakcijom jona srebra(I) sa slobodnim karboksilnim grupama enzima, i da potom dolazi do koagulacije denaturisanog proteina. Bledo žuta boja verovatno potiče od zaostalih fosfata adsorbovanih na enzimsku površinu, koji sa srebrom(I) grade žuto zamućenje.

Olovo(II) i gvožđe(III) pokazali su veliku podudarnost u inhibiranju aktivnosti peroksidaze. IC_{50} vrednost za gvožđe(III) iznosi (19.2 ± 0.8) mmol/L, a za olovo(II) (20.5 ± 0.9) mmol/L. Razlika je u nivou greške merenja, tako da se može smatrati da ova dva metala imaju jednaku potenciju inhibicije peroksidaze. Pored toga, pretpostavljeni su različiti mehanizmi inhibicije. Kod gvožđa(III), pri mešanju enzima sa rastvorom metala do-



Slika 1.
 Uticaj koncentracije
 gvožđa(III), olova(II) i
 srebra(I) na aktivnost
 peroksidaze cvekle

Figure 1.
 Influence of iron (III),
 lead (II) and silver (I)
 concentration on red
 beet peroxidase
 activity

lazi do pomeranja boje rastvora iz narandžaste u crvenu. To je verovatno posledica dejstva ligandnog polja atoma azota aminokiselina enzima koji koordinišu višak gvožđa(III). Kao rezultat ovog vezivanja dolazi do promene oblika proteina i smanjenja aktivnosti. Pretpostavlja se da kod olova(II) dolazi i do kompeticije sa jonom gvožđa(III) u porfirinskom prstenu hema. Pri dodatku ovog metala nije došlo do vizuelno uočljivih promena u rastvoru, tako da je potrebno dodatno ispitivanje kako bi se izveo pouzdaniji zaključak o mehanizmu inhibicije.

Imobilizacija peroksidaze

Ukupna masa imobilizata iznosi 2.72 g, a ukupan broj kapsula 240. Kapsule su mrke usled prisustva antocijana, tako da su lako uočljive i mogu se odlivanjem pouzdano odvojiti od rastvora. U tabeli 1 prikazane su mase proteina u kalcijum-hloridnom rastvoru i prvom i drugom ispirku. Merenjima mase proteina i aktivnosti enzima potvrđeno je da najveći deo neinkapsuliranih proteina ostaje adsorbovan na površinu kapsule i ispira se tek zakišeljavanjem puferom. Izračunat prinos imobilizacije iznosi $(90.0 \pm 0.8)\%$.

Eseji imobilizovanog enzima

Merenjem aktivnosti imobilizovane peroksidaze utvrđeno je da je najveći deo imobilizovanog enzima ostao aktivan i nakon ovog postupka. Rad korišćenog spektrofotometra nije ometalo prisustvo alginatnih kapsula

Tabela 1. Pregled karakteristika različitih stepena prečišćenosti peroksidaze cvekle i njenog imobilizata

	koncentracija enzimске aktivnosti (U/mL)	enzimska aktivnost (U)	zapremina (mL)	masena koncentracija proteina (g/L)	masa proteina (μg)	aktivnost enzima po jedinici mase proteina (U/mg)	stepen prečišćenosti**
homogenat	0.75(4)	0.23(2)	300	0.48(3)	131(8)	1.6(2)	1
dijalizat	10.9(6)	0.20(1)	18.0	0.81(2)	16(2)	14(1)	9
imobilizat	9.3(6)	0.028(2)	3.000*	0.37(2)	2.2(2)	13.4(8)	8.4
kalcijum-hloridni rastvor	–	–	900	0.129±0.(9)	116(8)	–	–
prvi ispirak	–	–	12.0	0.102(8)	1.22(7)	–	–
drugi ispirak	–	–	15.0	(1.5±0.1) ×10 ⁻³	2.2(4)	–	–

* ukupna zapremina ekstrakta dispergovanog u imobilizatu
** odnos aktivnosti enzima po jedinici mase proteina u uzorku i homogenatu

na dnu kivete. Time je omogućeno kontinuirano snimanje. Za eseje je korišćena jedna tridesetina (0.091 g) ukupne mase imobilizata koju čini u proseku osam alginatnih kapsula.

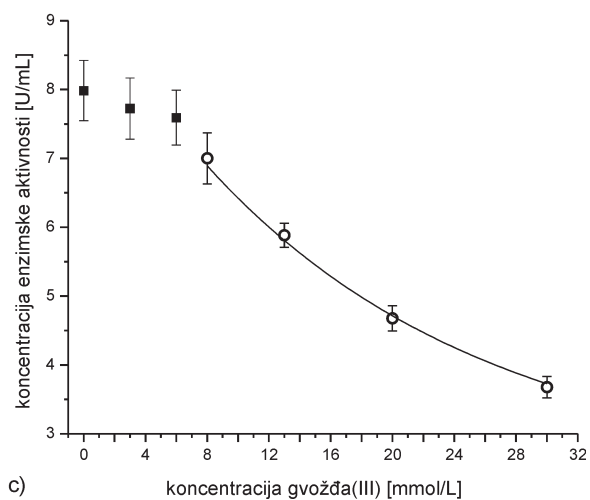
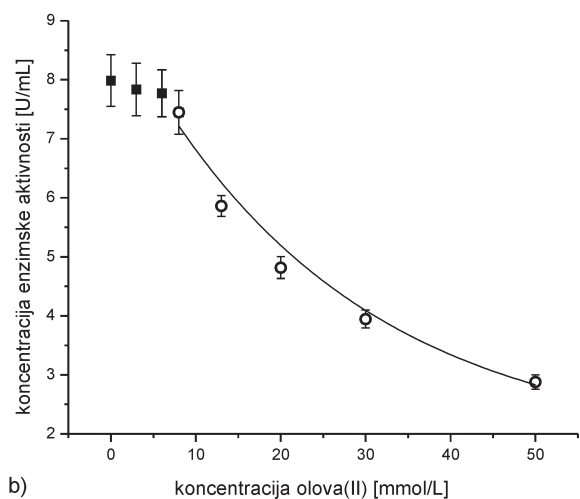
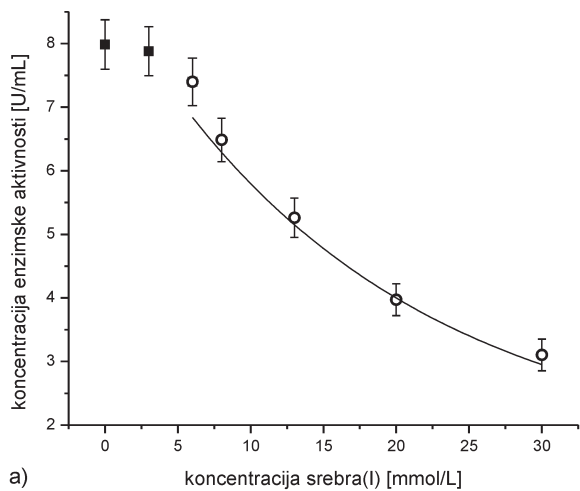
Aktivnost imobilizovanog enzima prikazana je u tabeli 1, a preračunata na jedinicu mase imobilizata iznosi (4.2±0.3) U/g. Kada se prva navedena vrednost uporedi sa neimobilizovanim enzimom i u obzir uzme gubitak proteina usled imobilizacije, rezultat je smanjenje aktivnosti enzima usled inkapsulacije od približno 14.8%. To je blisko očekivanoj vrednosti za inkapsulaciju kalcijum-alginatom (Nahapkam 2008).

U tabeli 1 prikazane su osnovne karakteristike homogenata (svežeg ekstrakta), amonijum-sulfatnog dijalizata i imobilizata.

Zavisnost aktivnosti imobilizovane POD cvekle od koncentracije teških metala (srebra(I), olova(II) i gvožđa(III), redom) prikazana je na slici 2.

Kod imobilizovanih enzima uočljiva su dva različita dela grafika. Prvih tri do pet tačaka (crni kvadrati na graficima) grade plato koji linearno pada ka x-osi, i nakon određene granične vrednosti koncentracije počinje eksponencijalni pad (beli kružići na slikama). Ova pojava može se tumačiti zadržavanjem jona teških metala na površini kapsule do određene koncentracije, nakon čega dolazi do intenzivnijeg prodiranja jona u unutrašnjost kapsule i inhibicije enzima.

Nakon preliivanja kapsula rastvorom srebro-nitrata uočava se bela sluz, i to u rastvorima svih ispitivanih koncentracija većih od 3 mmol/L.



Slika 2.
Zavisnost aktivnosti imobilizovane POD cvekle od koncentracije srebra(I) (a), olova(II) (b) i gvožđa(III) (c). Delovi krive označeni crnim kvadratima (linearan pad) i belim kružićima (eksponencijalan pad) označavaju oblast koncentracija sa zadržavanjem jona na kapsuli, odnosno oblast njihovog prodiranja u kapsulu.

Figure 2.
Dependence of immobilized peroxidase activity of silver(I) concentration (a), lead(II) concentration (b) and iron(III) concentration (c). Parts of the curve marked by black squares (linear fall) and white dots (exponential fall) signify concentration zone with ion retention on the capsule and zone of their penetration into the capsule, respectively.

Pored toga javlja se i svetlo mrko obojenje rastvora kod koncentracija 20 i 30 mmol/L. Pretpostavlja se da sa malobrojnim jonizovanim karboksilnim grupama alginata srebro(I) reaguje stvarajući sluzavu strukturu. Mrko obojenje rastvora pri višim koncentracijama može biti uzrokovano značajnijom promenom strukture alginatne mreže. Tada se stvaraju pore dovoljno velike da propuste molekule antocijana koji napuštaju kapsulu. IC_{50} vrednost imobilizovanog enzima inhibiranog srebrom(I) iznosi (20.8 ± 0.9) mmol/L, što je za 26% veće od IC_{50} vrednosti neimobilizovanog enzima.

Alginatna kapsula smanjuje sličnost inhibicije olovom(II) i gvoždem(III). Kod gvožđa(III) uočava se gotovo linearna kriva, sa blagim eksponencijalnim padom nakon koncentracije 8 mmol/L. Kod olova(II) uočava se jasnija razlika između ova dva dela. Granična vrednost je takođe 8 mmol/L. Može se zaključiti da se olovo(II) u nižim koncentracijama zadržava na kapsuli bolje od gvožđa(III) i pored toga što je manje naelektrisano. Ovo se može tumačiti poređenjem poluprečnika jona gvožđa(III) (69 nm u niskospinskom stanju) i olova(II) (133 nm) sa prečnikom jona kalcijuma(II) (114 nm) koji se najbolje uklapa među karboksilne grupe u porama polimerne mreže (Nahakpam 2008). Pored toga, deo olova(II) se zadržava na površini usled građenja olovo(II)-hlorida sa zaostalim hloridnim jonima na kapsulama. Tvrdnja da kapsula bolje štiti od olova(II) ogleda se i u IC_{50} vrednosti: za olovo(II) iznosi (31 ± 2) mmol/L (relativno povećanje 43% u odnosu na neinkapsuliran enzim), a za gvožđe(III) (27 ± 1) mmol/L (relativno povećanje 39%). Poređenje sa zaštitom od srebra(I) potvrđuje da su oligovalentni joni bolje zadržani od monovalentnih usled stvaranja više veza sa alginatom.

Zaključak

Peroksidaza je izolovana iz korena cvekle homogenizacijom i amonijum-sulfatnim taloženjem. Karakteristično za ekstrakt je mrko obojenje koje potiče od zaostalih antocijana i preporučuje se optimizacija postupka ekstrakcije u cilju njihovog otklanjanja.

Teški metali inhibiraju enzim, pri čemu IC_{50} vrednosti iznose (16.8 ± 0.7) mmol/L za srebro(I), (19.2 ± 0.8) mmol/L za gvožđe(III) i (20.5 ± 0.9) mmol/L za olovo(II). Dakle, srebro(I) je bolji inhibitor od olova(II) i gvožđa(III), koji su slične inhibitorске moći. Imobilizacija kalcijum-alginatom inkapsulira enzim sa malim gubitkom aktivnosti. IC_{50} vrednosti imobilizovanog enzima su veće od onih za neimobilizovan i iznose (20.8 ± 0.9) , (27 ± 1) i (31 ± 2) mmol/L za srebro (I), gvožđe(III) i olovo(II), redom. Rezultati pokazuju da kapsula dobro zadržava jone teških metala u malim koncentracijama (do 8 mmol/L za Pb^{2+} i Fe^{3+} i 5 mmol/L za Ag^+) i da je za oligovalentne katjone slabije propusna nego za monovalentne.

Verovatno je da ovaj efekat zavisi od naelektrisanja, prečnika i hemijskih osobina jona.

Zajedničko za sve sisteme jeste da kapsula pruža zaštitu od teških metala i preporučuje se dalje istraživanje u cilju optimizacije osobina kapsule za primenu u industrijskim uslovima.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Vladimiru Prokopoviću i Ivanu Mrkiću, studentima Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći oko izvođenja ekperimentalnog dela istraživanja i organizovanja rezultata merenja. Takođe, zahvaljujem se Aleksandri Dimitrijević, diplomiranom biohemičaru, na pomoći oko nabavke za rad neophodnih supstanci i prezentaciji o inkapsulaciji enzima koja je pomogla u osmišljavanju eksperimenata u okviru projekta.

Literatura

- Güngör S. I. 2008. The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *African Journal of Biotechnology*, **7**: 2248.
- Harman D. 1991. The aging process: Major risk factor for disease and death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**: 5360.
- Kadnikova E. N., Kostić N. M. 2002. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, **18**: 39.
- MacFarlane G. R., Burchett M. D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(3): 233.
- Nahakpam S., Singh P., Shah K. 2008. Effect of Calcium on Immobilization of Rice (*Oryza sativa* L.) Peroxidase for Bioassays in Sodium Alginate and Agarose Gel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**: 632.
- Rudrappa T., Neelwarne B., Kumar V., Lakshmanan V., Venkataramareddy S. R., Aswathanarayana R. G. 2005. Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**: 185.
- Tzika E. D., Sotiorudis T. G., Papadimitriou V., Xenakis. A. 2008. Partial purification and characterization of peroxidase from olives. *European food research and technology*, **228**: 487.
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija: Praktikum*. Beograd: Rantek

Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Peroxidase Encapsulation as Model of Enzyme Protection from Inhibitory Effect of Heavy Metals

A Group of enzymes (EC 1.11.1.X) including peroxidase (EC 1.11.1.7) detoxifies living organisms catalyzing hydrogen-peroxide degradation. Nevertheless, it is being applied in industrial conditions, for example in waste water purification. In this medium are frequent ions of heavy metals, which are strong enzyme activity inhibitors. Immobilization is a technique which limits enzyme movement and facilitates operating with the same, but not destroying its activity. In this project, the possibility of using immobilization in order to protect enzyme from inhibitory effect of heavy metals was the purpose of research. Red beet peroxidase has been isolated by homogenization and ammonium-sulphate purification. Enzyme activity has been measured by standard ABTS enzyme assay, and is (10.9 ± 0.6) U/mL in dialysate. Influence of heavy metals has been determined after twelve hours incubation with silver(I), lead(II) and iron(III) salts. Silver(I) shows the best inhibitory effect, while lead(II) and iron(III) have similar peroxidase inhibitory potential. IC_{50} values, for these three metals respectively, are (16.8 ± 0.7) mmol/L, (20.5 ± 0.9) mmol/L and (20.5 ± 0.9) mmol/L. Immobilization has been performed by calcium-alginate encapsulation. After that, influence of heavy metals on immobilized enzyme has been determined. IC_{50} values for encapsulated enzyme are (20.8 ± 0.9) , (27 ± 1) and (32 ± 2) mmol/L for inhibition by silver(I), lead(II) and iron(III) respectively. It is common for all systems that IC_{50} values increase due to immobilization process and that alginate capsule provides effective protection from inhibitory effect of heavy metals, so further research to optimize capsule characteristics for use in industrial conditions is highly recommended.



Adsorpcija Cr(VI) iz vodenih rastvora na piljevini belog bora (*Pinus silvestris* L.) kao biosorbenta

Ispitivan je mehanizam adsorpcije, sorpciona ravnoteža, kao i uticaj mase sorbenta, kontaktnog vremena i početne koncentracije sorbata na adsorpciju Cr(VI) iz vodenih rastvora na piljevini belog bora (Pinus silvestris). Optimalno kontaktno vreme sorpcije, tj. vreme nakon kojeg se postiže sorpciona ravnoteža, iznosi 55 min. Optimalna masa sorbenta je 9 g/dm³. Početna koncentracija pri kojoj se vrši najefikasnija sorpcija je 6×10⁻⁴ mol/dm³. Mehanizam adsorpcije ispitivan je snimanjem IR spektara sorbenta pre i posle sorpcije. Zaključeno je da dolazi do akceptorske hemisorpcije. Sorpciona ravnoteža opisana je konstruisanjem Freundlich-ove izoterme, iz koje se uočava da je adsorpcija Cr(VI) favorizovan proces i da se vrši na neuniformnoj površini, podrazumevajući višeslojni kapacitet.

Uvod

Prisustvo jona metala u prirodnim ili industrijskim otpadnim vodama i njihov potencijalni uticaj na biološke sisteme predmet je ekoloških istraživanja već duže vreme. Joni metala, kao što su kadmijum, hrom, gvožđe, bakar, cink i sl. često se nalaze u otpadnim vodama (Argun i saradnici 2007). Visoka zastupljenost Cr(VI) u industrijskim procesima (hromiranje, metalurgija hroma, sagorevanje fosilnih goriva, impregniranje drveta i sl.) dovodi do zagađenja voda (Ristović 2010). Prečišćavanje otpadnih voda od Cr(VI) je važno zbog visoke toksičnosti Cr(VI) i veliki je broj studija od značaja za zaštitu životne sredine. Prema NTP (National Toxicology Program) postoji dovoljno dokaza o njegovom kancerogenom, mutagenom i genotoksičnom dejstvu (Ristović 2010). Adsorpcija jona metala pomoću biljnih sorbenata može biti jedno od rešenja za uklanjanje Cr(VI) i ostalih teških metala iz otpadnih voda.

Odgovor na pitanje zašto se određena hemijska vrsta adsorbuje na određenom sorbentu se dobija tek kada se ispituju aktivna mesta na površini sorbenta, kao i mehanizam sorpcije. Metode kojima se ispituju mehanizam sorpcije i priroda aktivnih centara na površini sorbenta su: IR, LEED, XPS, FEM i sl. (Hasan i saradnici 2008).

*Radoslav Pavlović
(1994), Kragujevac,
Lepenički bulevar
31/10, učenik 2.
razreda Medicinske
škole sa domom
učenika „Sestre
Ninković” u Kragujevcu*

*MENTOR:
Prof. dr Katarina
Karljiković-Rajić,
Farmaceutski fakultet,
Beograd Univerziteta u
Beogradu*

Adsorpcija može biti fizička i hemijska. Fizička adsorpcija je posledica vezivanja čestica međumolekulskim Van der Waals-ovim (disperzionim, indukcionim i orijentacionim) silama. Hemijska adsorpcija (hemisorpcija) podrazumeva uspostavljanje hemijske veze između adsorbata i adsorbenta (jonska, kovalentna i koordinativno kovalentna). Jonska hemisorpcija može biti donorska (katjonska) i akceptorska (anjonska).

Za opisivanje adsorpcione ravnoteže mogu se koristiti Langmuir-ova, Freundlich-ova, Temkin-ova, Gibbs-ova i ostale izoterme. Najčešće korišćene izoterme su Langmuir-ova i Freundlich-ova. Langmuir-ova izoterma idealizuje proces adsorpcije tako što pretpostavlja uniformnost površine, monoslojni kapacitet i zanemaruje međusobnu interakciju adsorbovanih čestica (Hasan i saradnici 2008). Po Langmuir-u adsorpcija se sastoji od dva procesa: kondenzacije čestica na čvrstoj površini i otparavanja sa iste, pri čemu u određenom trenutku dolazi do uspostavljanja dinamičke ravnoteže (Hasan i saradnici 2008). Freundlich-ova izoterma za adsorpciju iz rastvora zadržava osnovne pretpostavke o upostavljanju dinamičke ravnoteže. Razlika između Langmuir-ove i Freundlich-ove izoterme se ogleda u tome što Freundlich-ova izoterma pretpostavlja nejednorodnost površine i višeslojni kapacitet. Linearan oblik Freundlich-ove sorpcione izoterme može se predstaviti na sledeći način:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \cdot \log C_e$$

gde je C_e ravnotežna koncentracija sorbata u rastvoru (mg/L), K_F – Freundlich-ova konstanta koja pokazuje relativni sorpcioni kapacitet sorbenta (mg/g), n – Freundlich-ova konstanta koja pokazuje intezitet sorpcije, a q_e – količina sorbata sorbovana po jedinici mase sorbenta u ravnoteži (mg/g).

Grafik zavisnosti $\log q_e$ od $\log C_e$ je Freundlich-ova sorpciona izoterma i iz njega se mogu dobiti vrednosti n i K_F . Konstante n i K_F zavise od prirode adsorbata, prirode adsorbenta i temperature. Parametri kao što su masa sorbenta, kontaktno vreme, temperatura i početna koncentracija sorbata utiču na efikasnost sorpcije. Uticaj ovih parametara se ispituje serijskim sorpcionim eksperimentima (batch sorption experiments).

Cilj ovog istraživanja je da se ispita mehanizam sorpcije, sorpciona ravnoteža, kao i uticaj mase sorbenta, kontaktnog vremena i početne koncentracije sorbata na sorpciju Cr(VI) iz vodenih rastvora na hemijski obrađenoj piljevini belog bora (*Pinus silvestris* L.).

Materijal i metode

U toku eksperimenta korišćene su koncentrovana hlorovodonična kiselina (Centrohem), natrijum-hidroksid (Fluka) i kalijum-dihromat (Merck). Sve korišćene supstance su čistoće p. a.

Hrom(VI) je određivan direktnom spektrofotometrijom, na talasnoj dužini od 350 nm. Radna talasna dužina utvrđena je prethodnim snimanjem elektronskog apsorpcionog spektra. U radu je korišćen spektrofotometar CECIL CE 2021.

Pri fizičko-hemijskoj karakterizaciji hemijski obrađenog sorbenta snimljen je IR spektar sorbenta pre sorpcije. Infracrveni spektri su rađeni na Perkin-Elmer-ovom FTIR spektrometru Model Scan one. Supstance su analizirane u obliku kalijum-bromidnih pilula.

Priprema rastvora

Pripremljeni su rastvori 1 mol/dm^3 HCl, 0.1 mol/dm^3 HCl, 1 mol/dm^3 NaOH, kao i rastvori $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ u oblasti koncentracija od $2 \cdot 10^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ za konstrukciju kalibracione krive.

Da bi se pripremio primarni standardni rastvor kalijum-dihromata koncentracije $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, neophodno je prvo osušiti kalijum dihromat na 130°C u sušnici, do konstantne mase. Za pripremu rastvora kalijum-dihromata kao rastvarač korišćen je rastvor HCl koncentracije 0.1 mol/dm^3 zbog pH vrednosti pri kojoj se hrom(VI) najbolje sorbuje (Ristović 2010).

Priprema sorbenta

Sorbent biljnog porekla koji je korišćen u radu je piljevina belog bora. Piljevina je mehanički obrađena i bilo je potrebno izvršiti samo hemijsku obradu.

Sorbent je pripremljen na taj način što se odmeri 5 g piljevine u staklenoj čaši, zatim doda oko 20 cm^3 1 mol/dm^3 HCl i prenese na guč JENNAH G4 prečnika pora 5-15 μm , prethodno povezanog sa vakuum pumpom. Kroz sorbent, koji se filtrirao na vakuumu, je propuštan ostatak do ukupne zapremine od 50 cm^3 1 mol/dm^3 HCl. Potom je propušteno 50 cm^3 1 mol/dm^3 NaOH. Sorbent je ispiran destilovanom vodom do neutralne pH vrednosti.

Sorbent je prenet u porculansku šolju i sušen u sušnici na 120°C 6 h. Nakon toga je usitnjen u tarioniku i sušen još 2 h. Kada je sušenje završeno, sorbent je usitnjen, prenet u vegoglas i čuvan u eksikatoru (Ristović 2010).

Eksperiment

Aparatura koja je korišćena u ispitivanjima uticaja mase sorbenta, kontaktnog vremena i koncentracije sorbata sastojala se od tri uklemljene široke epruvete opremljene magnetnom mešalicom. Broj obrtaja u svim eksperimentima bio je 300 min^{-1} . Supernatant u kome je spektrofotome-

trijski određivana koncentracija Cr(VI) izdvojen je centrifugiranjem na 2000 rpm tokom 2 minuta.

Uticaj mase sorbenta ispitan je na sobnoj temperaturi variranjem mase sorbenta u intervalu od 1 do 16 g/dm³.

Tokom ispitivanja uticaja kontaktnog vremena na sorpciju Cr(VI) varirano je kontaktno vreme u intervalu od 5 do 90 min, na sobnoj temperaturi.

U eksperimentu u kom je određivan uticaj početne koncentracije sorbata na sorpciju Cr(VI) varirane su koncentracije sorbata u opsegu od $2 \cdot 10^{-4}$ do $8 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, na sobnoj temperaturi.

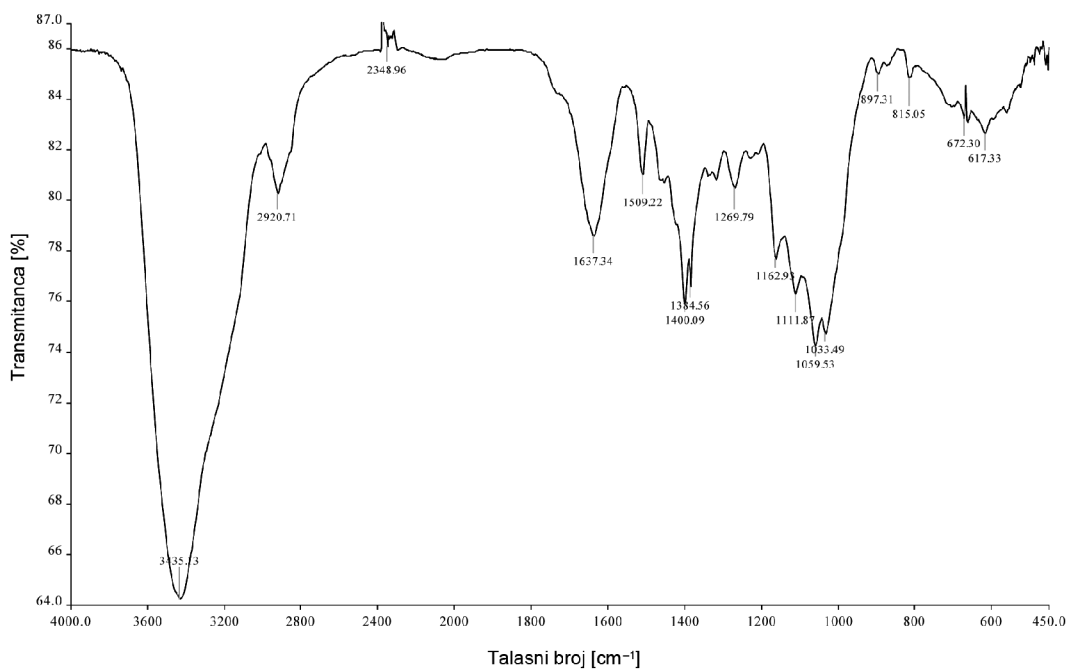
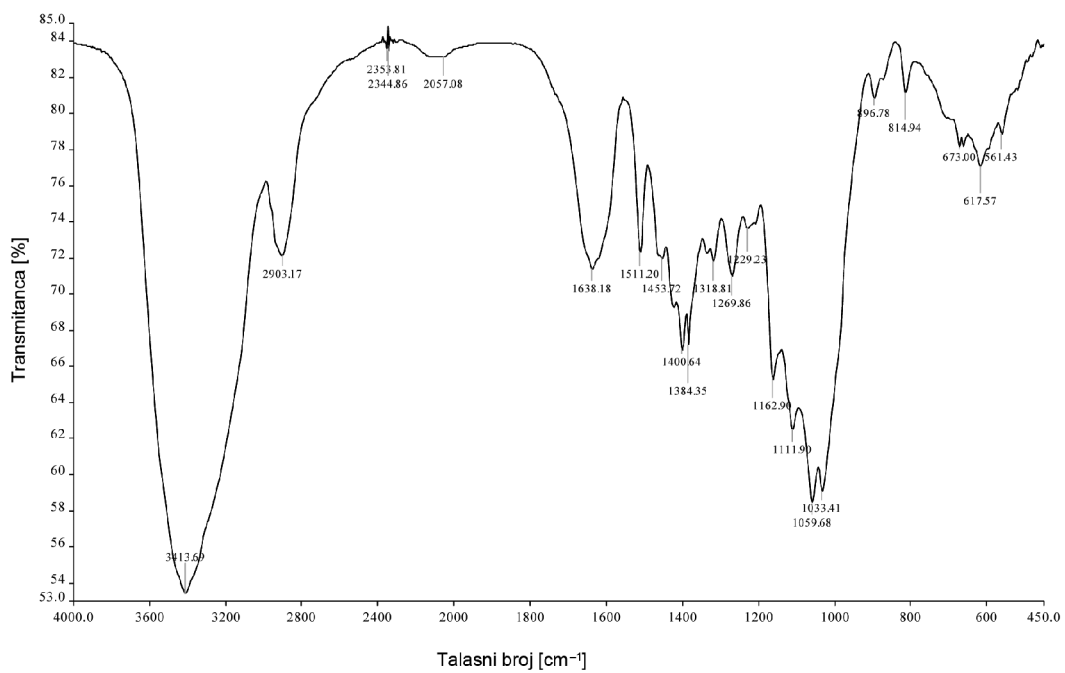
U cilju dobijanja neophodnih podataka o sorpciji za konstruisanje Freundlichove izoterme pripremljeno je 7 rastvora sorbata različite koncentracije, u opsegu od $2 \cdot 10^{-5}$ do $8 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³. Sorpcija je ispitivana u erlenmajerima od 100 cm³ sa 0.125 g piljevine u koji su dodati rastvori sorbata (po 25 cm³). Suspenzije su promešane i ostavljene 1 h na temperaturi od 20±1°C, nakon čega su centrifugirane 2 min na 2000 rpm. U supernatantu je određivana koncentracija neadsorbovanog Cr(VI).

Rezultati i diskusija

Radi pretpostavljanja mehanizma adsorpcije Cr(VI) na piljevini belog bora, snimljeni su IR spektri pre i posle sorpcije, koji su prikazani na slici 1. IR spektar sorbenta pre adsorpcije je sličan spektru snimljenom nakon sorpcije, što govori o tome da se hemisorpcija ne odigrava kovalentnim ili koordinativno-kovalentnim mehanizmom već jonskim. Da je u pitanju bio kovalentni mehanizam pojavile bi se nove trake u IR spektru, a u slučaju koordinativno kovalentnog mehanizma trake u IR spektru posle adsorpcije bi morale biti pomerene za 15-30 cm⁻¹.

Jaka i razvučena traka na 3414 cm⁻¹ je posledica valencionih vibracija OH grupe koja može da potiče iz alkohola i/ili fenola. Oblik i intezitet ove trake je posledica intra- i intermolekulskih vodoničnih veza. Može se uočiti traka na 2903 cm⁻¹ koja potiče od valencionih CH vibracija iz alifatičnih grupa. Traka na 1638 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija za karbonilnu grupu iz polipeptida. U oblasti dvostrukih veza je dosta traka preklapljeno, pa se jedino može reći da trake na 1400 i 1385 cm⁻¹ potiču od C-N valencionih vibracija za amide.

Pošto su iz IR spektara detektovane određene funkcionalne grupe, može se pretpostaviti da prvenstveno dolazi do hemisorpcije zato što postoji mogućnost elektrostatičkih interakcija između hidrogenhromatnog anjona sa nekim grupama iz piljevine (kao što su protonovane aminske, amidne i iminske). Tačnije, mehanizam kojim se odvija sorpcija Cr(VI) na piljevini belog bora jeste akceptorski (anjonski).

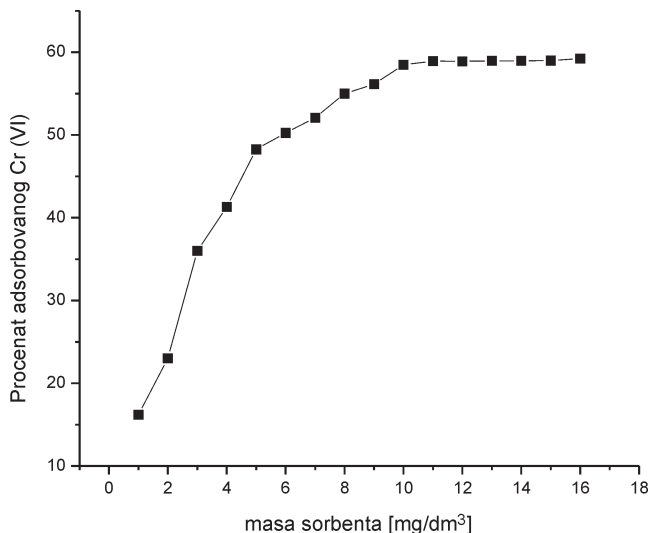


Slika 1. IR spektri sorbenta pre (gore) i posle sorpcije Cr(VI) (dole)

Figure 1. IR spectrum of sorbent before (above) and after sorption of Cr(VI) (below)

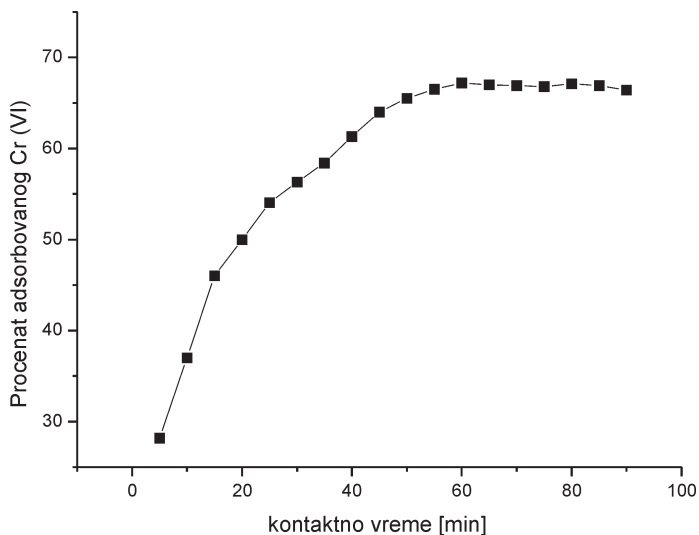
Uticaj mase sorbenta na sorpciju je grafički prikazan na slici 2. Sorpcija Cr(VI) je rađena iz vodenih rastvora čija je pH = 1. Ova pH vrednost bila je ista u svim eksperimentima zato što je najefikasnija sorpcija Cr(VI) upravo na ovoj vrednosti (Ristović 2010). Na grafiku se uočava da sa porastom mase sorbenta raste i efikasnost sorpcije, do jednog trenutka gde dolazi do stvaranja platoa, odnosno masa sorbenta više ne utiče na efikasnost sorpcije, što se objašnjava sorpciopnom ravnotežom koja se uspostavlja između čvrste i tečne faze.

Grafički prikaz uticaja kontaktnog vremena na efikasnost sorpcije je prikazan na slici 3. Kontaktno vreme utiče na sorpciju tako da sa pove-



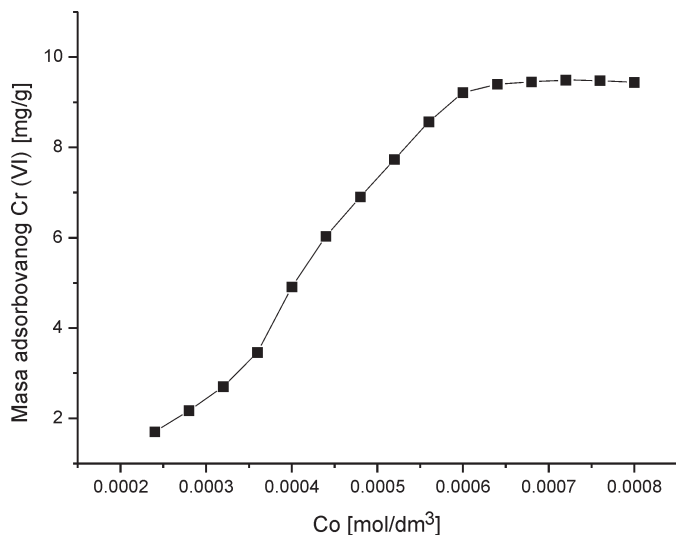
Slika 2.
Grafik efikasnosti sorpcije u zavisnosti od mase sorbenta

Figure 2.
Efficiency graph of sorption depending on the mass of sorbent



Slika 3.
Grafik efikasnosti sorpcije Cr(VI) od kontaktnog vremena

Figure 3.
Efficiency graph of sorption depending on the contact time

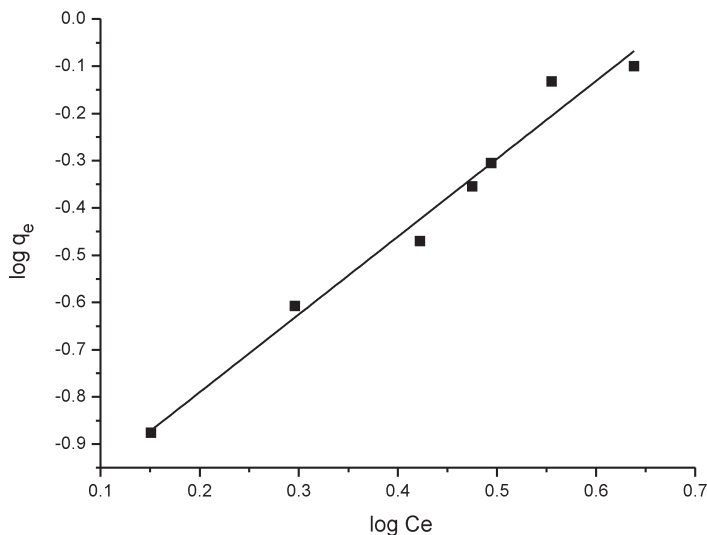


Slika 4.
Grafik zavisnosti
početne koncentracije
sorbata od efikasnosti
sorpcije

Figure 4.
Efficiency graph of
sorption depending on
the start concentration
of sorbate

ćanjem kontaktnog vremena raste i efikasnost sorpcije, ali u jednom trenutku dolazi do zasićenja čvrste faze, odnosno adsorpcione površine, i uspostavlja se sorpciona ravnoteža, koja je u grafiku predstavljena platom od 55 do 100 min.

Slika 4. predstavlja grafički prikaz uticaja početne koncentracije na efikasnost sorpcije i iz nje se može uočiti da se sa povećanjem koncentracije sorbata povećava i efikasnost sorpcije. U jednom trenutku dolazi do uspostavljanja ravnoteže između čvrste i tečne faze i tada se na grafiku formira plato.



Slika 5.
Freundlich-ova
izoterma

Figure 5.
Freundlich isotherm

Za ispitivanje sorpcione ravnoteže konstruisana je Freundlich-ova izoterma (slika 5). U tabeli 1 prikazane su vrednosti Freundlich-ovih konstanti, koje se odnose na kapacitivnost piljevine.

Tabela 1. Vrednosti Freundlich-ovih konstanti

K_F	n	R^2
0.076	0.606	0.95

Iz ove izoterme se zaključuje da se Cr(VI) sorbuje na piljevini bora. Konstante K_F i n ukazuju na to da je sorpcija Cr(VI) favorizovan proces. Visok korelacioni koeficijent pokazuje da se sorpcija odvija na neuniformnoj površini, nepodrazumevajući monoslojni kapacitet, što se i poklapa sa Freundlichovim pretpostavkama (Argun 2007; Hasan 2008; Alibadi 2006; Rafati 2010).

Zaključak

Piljevina belog bora (*Pinus Silvestris*), uspešno sorbuje Cr(VI) iz vodenih rastvora. Optimalna pH vrednost sorpcije je pH 1 (Ristović 2010). Optimalna masa sorbenta je 9 g/dm³. Optimalno kontaktno vreme sorpcije je 55 min.

IR spektroskopijom došlo se do zaključka da je mehanizam sorpcije akceptorski. Akceptorski mehanizam je u saglasnosti sa optimalnom pH vrednošću sorpcije, pri kojoj su određene grupe iz sorbenta protonovane i mogu ostvariti elektrostatičke interakcije sa hidrogenhromatnim anjonom.

Sorpciona ravnoteža opisana je konstruisanjem Freundlich-ove sorpcione izoterme. Sorpciona ravnoteža je pomerena u smeru adsorpcije Cr(VI) iz vodenih rastvora, što znači da se na površini adsorbenta povećava koncentracija sorbata, dok u rastvoru ona opada. Visok korelacioni koeficijent govori o tome da se sorpcija vrši na nejednorodnoj površini i nepodrazumevajući kapacitet monosloja.

Iz dobijenih rezultata se može izvesti zaključak da se biosorbent, piljevina belog bora, može koristiti za sorpciju Cr(VI) iz vodenih rastvora.

Literatura

- Alibadi M., Morshedzadeh K., Soheyli H. 2006. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by lignocellulosic. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **3**: 321.
- Argun M. E., Dursun S., Ozdenir C., Karatas M. 2007. Heavy metal adsorption by modified oak sawdust: Thermodynamics and Kinetic. *Journal of Hazardous Materials*, **141**: 77.

- Hasan S. H., Singh K. K., Prakash O., Talat M., Ho Y. S. 2008. Removal of Cr (VI) from aqueous solutions using agricultural waste "maize bran". *Journal of Hazardous Materials*, **152**: 356.
- Rafati L., Mahvi A. H., Asgari A. R., Hosseini S. S. 2010, Removal of chromium (VI) from aqueous solutions using Lewatit FO36 nano ion exchange resin. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **7**: 147.
- Ristović D. D. 2010. Primena ekstrakcije čvrstom fazom za specijacionu analizu hroma-značaj u farmaceutskim analizama. Diplomski rad, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd.

Radoslav Pavlović

Adsorption of Cr(VI) from aqueous Solution on Sawdust of Scots Pine (*Pinus silvestris* L.) as Biosorbent

In this research mechanism of sorption, sorption equilibrium and effect of different parameters on sorption of Cr(VI) on sawdust of Scots Pine (*Pinus silvestris* L.) are determined. The effect of different parameters, such as adsorbent mass, contact time and sorbate concentration, are tested by batch sorption experiments, at room temperature and pH = 1. Optimal contact time for sorption is 55 min. Optimal adsorbent mass for sorption is 9 g/dm³. The most effective sorption was when sorbate concentration was 6·10⁻⁴ mol/dm³.

The mechanism of sorption is determined using IR spectroscopy. The mechanism of adsorption Cr(VI) on sawdust of Scots Pine is anionic hemisorption. Sorption equilibrium is described using Freundlich isotherm, which show that sorption is a favourable process, and sorption happens on uniform surface and without monolayer capacity.



In vitro ispitivanje mogućnosti primene fenol crvenog, L-askorbinske kiseline, L-cisteina i galne kiseline za produženje života solarnih ćelija na bazi antocijana i hlorofila

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja zaštitnih pigmentata (fenol crveno) i antioksidanasa (askorbinske kiseline, cisteina i galne kiseline) na usporavanje razlaganja biljnih pigmentata hlorofila i antocijana u *in vitro* uslovima, a time i na mogućnost primene zaštitnih boja i antioksidanasa za produženje života DSS (solarne ćelije na bazi organskih boja) ćelija na bazi hlorofila i antocijana. Ispitivan je stresni uticaj svetlosti u sistemima koji najpribližnije simuliraju unutrašnjost DSS ćelije. Spektrofotometrijski su merene koncentracije hlorofila i antocijana posle određenog vremena izlaganja stresnom faktoru. Za interpretaciju rezultata korišćeni su eksperimentalno dobijeni podaci o kinetici razlaganja biljnih pigmentata u različitim ispitivanim sistemima. Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da fenol crveno i L-cistein imaju potencijal da produže vreme poluraspada biljnih pigmentata u DSS ćelijama pri ispitivanim uslovima, dok L-askorbinska kiselina i galna kiselina ne pokazuju zaštitnu aktivnost. Zaštitnu aktivnost pokazuje i kombinovani sistem od četiri zaštitne supstance. Relativno produženje života biljnih pigmentata u ovom sistemu je od oko 60% do 110% u zavisnost od pigmenta i osvetljenosti kojom se delovalo na sistem. Pretpostavlja se da bi fenol crveno i L-cistein, kao i njihova kombinacija mogli biti uspešno korišćeni za produženje života DSS ćelija.

Uvod

Solarne ćelije na bazi organskih boja (Dye Sensitized Solar Cells, DSS ćelije) grupa su jeftinih solarnih ćelija. Ispitivanjima u poslednjih 15 godina teži se da se konstruišu DSS ćelije sposobne da zamene skupe silicijumske poluprovodničke ćelije koje su sada u upotrebi (Grätzel i Smestad 1998).

Svaka DSS ćelija sastoji se od fotosenzitivne anode, elektrolitnog rastvora i katode sa katalizatorom (*ibid.*). Anoda DSS ćelije izrađuje se od dve komponente – od jednostrano provodnog stakla ili plastike (često indijum-dopovano kalaj-dioksidno staklo – ITO staklo) 1984) i tankog sloja

Milan Kornjača
(1993), Hrtkovci, 27.
Oktobra 1a, učenik 3.
razreda Mitrovačke
gimnazije u Sremskoj
Mitrovici

MENTOR:
Dr Igor Pašti,
Fakultet za fizičku
hemiju Univerziteta u
Beogradu

titanijum-dioksida na koji je kovalentno adsorbovana boja. Boje koje se koriste kod najvećeg broja DSS ćelija su organski kompleksi rutenijuma, ali moguće je korišćenje bilo kog molekula koji se može oksidovati pri izlaganju svetlosti (vidljivoj ili UV) (Grätzel i Smestad 1998). Elektrolit se sastoji od nekog reverzibilnog redoks sistema (najčešće trijodid/jodid) rastvorenog u polarnom organskom rastvaraču (koriste se nitrili, etilen-glikol i dr) (Grätzel 1998). Katoda se sastoji od jednostranoprovodnog stakla ili plastike (najčešće ITO staklo) i tankog sloja katalizatora. Najviše se ispituju ćelije sa finim slojem platine kao katalizatorom, ali kao katalizator može poslužiti i sloj grafita ili aktivnog uglja (Grätzel i Smestad 1998).

Jedna od grupa DSS solarnih ćelija su ćelije na bazi prirodnih pigmentata, antocijana i hlorofila. Velika prednost ovih ćelija jeste dostupnost i niska cena organske boje (naspram, daleko skupljih i težih za dobijanje, rutenijumovih kompleksa). Osnovni nedostatak DSS ćelije na bazi pigmentata jeste nepostojanost ovih pigmentata. Pri dužem izlaganju svetlosti, naročito UV, te pri dejstvu atmosferskog kiseonika, dolazi do trajne oksidacije pigmentata, a time i do smanjenja efikasnosti, i na kraju, do neupotrebljivosti ćelije. To je osnovni razlog što nije razmatrana primena ovog tipa DSS ćelija (Grätzel 2003)

Zbog prirode faktora koji utiču na skraćanje života DSS ćelije (svetlost i oksidativni stres), pretpostavlja se da je moguće produžiti život DSS ćelija korišćenjem antioksidanasa koji usporavaju oksidaciju pigmenta. Skora ispitivanja vršena za organski sintetisane pigmente su dala pozitivne rezultate (Grätzel 2003).

U biljkama, kao i u DSS ćelijama dolazi do problema zaštite fotosintetskih pigmentata. Biljke ovaj problem rešavaju stvaranjem sistema antioksidativne zaštite i stvaranjem zaštitnih pigmentata (Halliwell 1987). Kako DSS ćelije funkcionišu po istom principu kao i fotosinteza, moglo bi se imitacijom biljnih mehanizama zaštite uticati i na zaštitu pigmentata u foto ćelijama.

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja zaštitnih pigmentata (fenol crveno) i antioksidanasa (askorbinske kiseline, cisteina i galne kiseline) na usporavanje razlaganja biljnih pigmentata hlorofila i antocijana u *in vitro* uslovima, a time i na mogućnost primene zaštitnih boja i antioksidanasa za produženje života DSS ćelija na bazi hlorofila i antocijana.

Materijali i metode

Reakcioni sistemi. Vršena su ispitivanja za dve grupe biljnih pigmentata (antocijane i hlorofile), sa četiri zaštitne supstance (kombinacije date u tabeli 1) i uz vidljivu svetlost dva različita intenziteta kao stresni faktor (sijalice snage 60 i 100 W).

Tabela 1. Sistemi i zaštitne supstance (+)

Ispitivani biljni pigment	Zaštitne supstance				Oznaka sistema
	Fenol-crveno	L-askorbinska kiselina	L-cistein	Galna kiselina	
hlorofili	-	-	-	-	H0 (kontrolni)
	+	-	-	-	H1
	-	+	-	-	H2
	-	-	+	-	H3
	-	-	-	+	H4
	+	+	+	+	H5
antocijani	-	-	-	-	A0 (kontrolni)
	+	-	-	-	A1
	-	+	-	-	A2
	-	-	+	-	A3
	-	-	-	+	A4
	+	+	+	+	A5

Sistemi u kojima se vrši ispitivanje uticaja svetlosti konstantnog intenziteta imali su zapreminu od 20 mL i postavljani su u Petrijeve šolje. Konstantan intenzitet i osvetljenost reakcionih sistema obezbeđen je postavljanjem Petrijevih šolja radijalno u odnosu na normalnu projekciju sijalice na podlogu i fiksiranje sijalice na visinu od 25 cm. Eliminisanje uticaja dnevne svetlosti i temperature omogućeno je postavljanjem šolja u mračnu i klimatizovanu komoru (temperatura konstantno održavana na 25°C). Maksimalna refleksija svetlosti od podloge (time i maksimalna osvetljenost reakcionih sistema) postignuta je postavljanjem belog papira ispod šolja. Da se ne bi značajno menjala debljina sloja u šolji, zapremina alikvota je bila 100 µL.

Rastvori reakcionih sistema. Rastvori u Petrijevim šoljama su određeni tako da najpribližnije simuliraju unutrašnjost DSS ćelije (debljina sloja 4 mm, organski polarni rastvarač, dodatak joda i kalijum-jodida (tabela 2))

Priprema acetonskog ekstrakta hlorofila. Acetonski ekstrakt hlorofila je pripreman od sveže ubranog lišća crnog duda (*Morus nigra*). Svi listovi su bili brani sa istog stabla, sa istog sprata (radi izbegavanja variranja odnosa raličitih hlorofila usled različite izloženosti pojedinih spratova drveta Suncu). Ekstrakcija je bila vršena prelivanjem prethodno usitnjenih listova zapreminom acetona dovoljnom da ih potpuno prekrije, a zatim ostavljanjem na mračnom i hladnom mestu 12 časova (Gräztel

Tabela 2. Sastav rastvora reakcionih sistema

Vrsta biljnog pigmenta u reakcionom sistemu	Ekstakt	Zaštitne supstance	od/kalijum jodid	Dopuna
Antocijani	5 mL prethodno pripremljenog acetonskog ekstrakta antocijana	5 mL prethodno pripremljenog acetonskog ekstrakta hlorofila	0.5 mL etanolnog rastvora joda i kalijum jodida, obe supstance koncentracije 0.1 mol/L	potrebna količine etanola da bi ukupna zapremina rastvora u šolji bila 20 mL
Hlorofili	5 mL prethodno pripremljenog acetonskog ekstrakta hlorofila			

2003). Dobijeni ekstrakt je odlivan, pa filtriran, a filtrat je centrifugiran 45 minuta na 2000 obrtaja (centrifuga Harrier 15/80).

Priprema acetonskog ekstrakta antocijana. Acetonski ekstrakt antocijana je pripreman od svežih zrelih plodova crnog duda (*Morus nigra*). U isitnjene plodove bila je dodavana desetostruka zapremina acetona. Ekstrakcija je trajala 12 časova (Grätzel 2003). Dobijeni ekstrakt je odlivan, zatim filtriran, a filtrat je centrifugiran 45 minuta na 2000 obrtaja (centrifuga Harrier 15/80).

Zaštitne supstance. U radu su ispitivane zaštitne supstance izabrane sledećim kriterijumima:

1. Funkcija u biljnim sistemima zaštite pigmenta i antioksidativne zaštite uopšte, i to:
 - fenol crveno kao organska boja slična karotenoidima (zaštitni pigmenti u biljkama) (Demming-Adams *et al.* 1995), zbog bliskih oblasti maksimalne apsorpcije u neutralnoj i kiseljoj sredini koje su postojale u rastvorima u Petrijevim šoljama (apsorpcioni maksimum beta-karotena 430nm (Dere *et al.* 1997), a fenol crvenog 454nm u uslovima koji su postojali u eksperimentu (Bigger 2004)
 - L-askorbinska kiselina kao dostupan i značajan antioksidans u biljkama (glutation-askorbatni ciklus) (Streb *et al.* 1997)
 - L-cistein kao jedinjenje sa tiolnom grupom, jedna od aminokiselina koje grade glutation (značajan antioksidans u biljkama) (Streb *et al.* 1997)
 - galna kiselina kao dostupan i čest u biljkama antioksidans iz grupe polifenola (Streb *et al.* 1997)
2. Rastvorljivost u etanolu – izabrane supstance rastvorljive granicama potrebnim za istraživanje

U tabeli 3 date su koncentracije ispitivanih zaštitnih supstanci. Za svaki sistem iz tabele 1, osim kontrolnog, ispitivane su po 3 koncentracije zaštitnih supstanci. Koncentracije su birane tako da budu usklađene sa

redom veličine koncentracije biljnog pigmenta (antocijana i hlorofila (Dere *et al.* 1998)) za antioksidativne zaštitne supstance, dok su koncentracije fenol-crvenog za red veličine manje (analogija sa karotenoidima u biljkama (Dere *et al.* 1998)). Svaki sistem je pripremljen na identičan način u dve Petrijeve šolje, od kojih je jedna osvetljavana sijalicom snage 60 W, a druga sijalicom snage 100 W.

Tabela 3. Koncentracije zaštitnih supstanci

Zaštitna supstanca	Koncentracija (mg/mL)	Sistemi u kojima će se koristiti
Fenol crveno	5	H1a, H5a, A1a, A5a
	10	H1b, H5b, A1b, A5b
	15	H1c, H5c, A1c, A5c
Askorbinska kiselina	25	H2a, H5a, A2a, A5a
	50	H2b, H5b, A2b, A5b
	75	H2c, H5c, A2c, A5c
L-cistein	25	H3a, H5a, A3a, A5a
	50	H3b, H5b, A3b, A5b
	75	H3c, H5c, A3c, A5c
Galna kiselina	25	H4a, H5a, A4a, A5a
	50	H4b, H5b, A4b, A5b
	75	H4c, H5c, A4c, A5c

Određivanje koncentracije pigmenta. Koncentracije hlorofila, odnosno antocijana u reakcionim sistemima su određivane spektrofotometrijski neposredno pre početka izlaganja stresnom faktoru, zatim na 3, 6, 10, 24 i 30 časova.

Ukupni hlorofili. Ukupni hlorofili su određivani spektrofotometrijski na 662 i 645 nm (UV-VIS spektrofotometar Cecil G-2000). Uziman je alikvot od 100 μ L rastvora i razblaživan etanolom do 2.5 mL. Kontrola je bila smeša acetona i etanola u odnosu 1:3. U zelenim višim biljkama, nalaze se samo hlorofil a i b, pa se koncentracija ukupnih hlorofila dobija sabiranjem njihovih koncentracija. Formula korišćena za određivanje koncentracije ukupnih hlorofila u etanolnom rastvoru na osnovu očitanih apsorbanci je (Lichtenthaler i Welbum 1989):

$$c_{an} = 25 \cdot (17.76A_{645} + 7.34A_{662}) \text{ mg/mL}$$

Ukupni antocijani. Ukupni antocijani su određivani pH diferencnom metodom po čengu i Brinu. Po jedan alikvot od 50 μ L je rastvaran u 2.45

mL HCl/KCl pufera (pH 1), i u 2.45 mL acetatnog pufera (pH 4.5). Merene su apsorbance na 510 i 700 nm za oba pufera (UV-VIS spektrofotometar Cecil CE2021). Kontrolu su činili HCl/KCl pufer i acetatni pufer. Koncentracija ukupnih antocijana u etanolnom ekstraktu je bila određivana po formuli (Cheng i Breen 1991):

$$c_{\text{an}} = 25 \cdot 29.6 \cdot [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}] \text{ mg/mL}$$

Interpretacija rezultata. Rezultati merenja predstavljeni su graficima zavisnosti koncentracije biljnih pigmenata (hlorofila i antocijana) od vremena. Na osnovu grafika, analizom kinetičkih parametara upoređivani su različiti sistemi sa kontrolnom grupom, kao i sistemi međusobno. Kako je reakcija raspadanja biljnih pigmenata reakcija prvog reda (brzina raspadanja pigmenata zavisi od njihove koncentracije u rastvoru), dobijene zavisnosti su eksponencijalne, tj važi. (Zvezdanović i Marković 2008):

$$c = c_0 e^{-kt}$$

Logaritamskom transformacijom i uvrštavanjem $c = \frac{1}{2} c_0$, $t = t_{1/2}$, te rešavanjem po $t_{1/2}$, dobija se $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$, tj, vreme poluraspada, parametar koji je određivan za sve sisteme. Upoređivanjem vremena poluraspada nekog sistema sa zaštitnim supstancama i kontrolnog sistema dobija se kvantitativna mera efikasnosti usporavanja razgradnje biljnog pigmenta izazvane svetlošću (w). Vrednost w zapravo predstavlja relativno produženje vremena poluraspada biljnog pigmenta:

$$w = \frac{t_{1/2\{HXy\}}}{t_{1/2\{H0\}}} - 1.$$

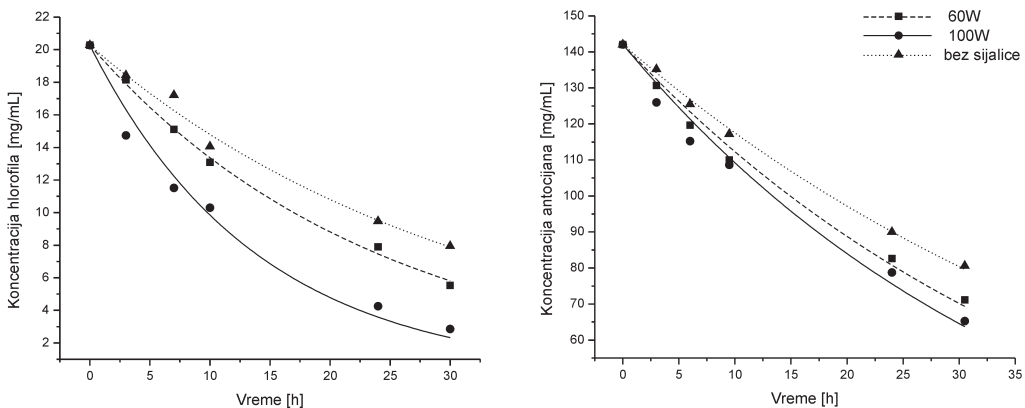
Rezultati i diskusija

Kontrolni sistemi

Vremena poluraspada pigmenata za kontrolne sisteme data su tabeli 4, a pad njihove koncentracije sa vremenom na slici 1.

Tabela 4. Vrednosti vremena poluraspada pigmenata za kontrolne sisteme (H – hlorofili, A – antocijani)

sistem	$t_{1/2}$ (h)	sistem	$t_{1/2}$ (h)
H0 – 100 W	9.8±0.8	A0 – 100 W	26.0±1.4
H0 – 60 W	16.6±0.4	A0 – 60 W	29.5±1.1
H0 – bez sijalice	22.0±1.0	A0 – bez sijalice	36.5±1.3



Slika 1. Kontrolni sistem za hlorofile (a) i antocijane (b) pod sijalicom od 60 W, pod sijalicom od 100 W i u mraku

Figure 1. Control system with chlorophyll pigment (a) and anthocyanin pigment (b) under the light of a 60 W bulb, 100 W and in the dark chamber

Sa slike 1 i iz tabele 4 se vidi da je najveća brzina raspada hlorofila i antocijana pod sijalicom snage 100 W, zatim pod sijalicom snage 60W, dok je najmanja u kontrolnom sistemu koji nije bio pod sijalicom, što je u skladu sa očekivanjima.

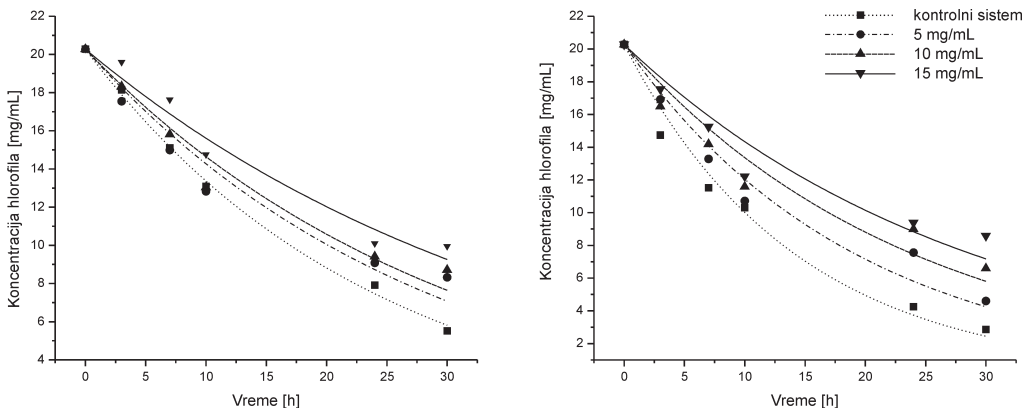
Vremena poluraspada antocijana značajno su veća od vremena poluraspada hlorofila, što je očekivano, budući da su antocijani manje osetljivi na svetlosni stres od hlorofila (Halliwell 1987).

Sistemi sa fenol crvenim kao zaštitnom supstancom

Promena koncentracija pigmenata sa vremenom data je na slikama 2 i 3, a vremena poluraspada i relativno produženje poluraspada u odnosu na kontrolne sisteme u tabeli 5.

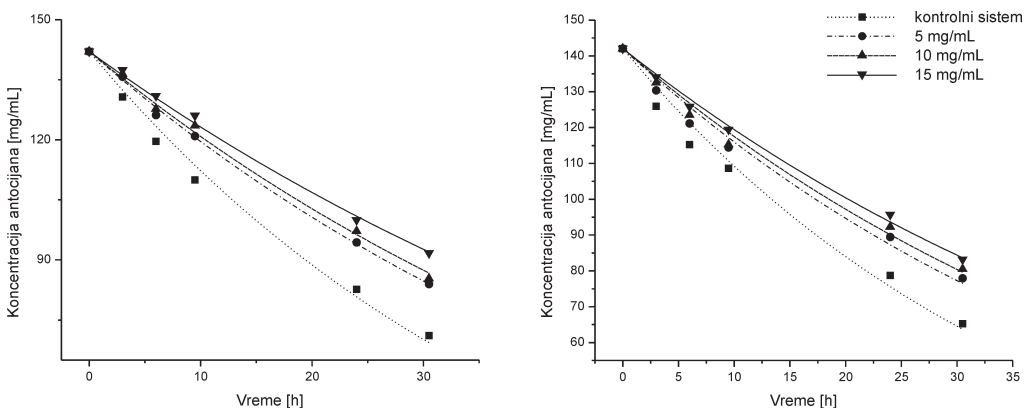
Tabela 5. Vremena poluraspada antocijana (A) i hlorofila (H) sa fenil crvenim kao zaštitnom supstancom i relativno produženje poluraspada

sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)	sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)
H0 60W	16.6±0.4	kontrolni	A0 60W	29.5±1.1	kontrolni
H1a 60W	19.8±1.7	19±2	A1a 60W	40.3±0.6	37±2
H1b 60W	21.3±1.6	28±3	A1b 60W	42.8±1.0	45±3
H1c 60W	26.6±1.2	59±6	A1c 60W	48.7±1.0	65±4
H0 100W	9.8±0.8	kontrolni	A0 100W	26.0±1.4	kontrolni
H1a 100W	13.3±1.5	35±7	A1a 100W	34.2±1.5	30±3
H1b 100W	16.6±1.8	69±13	A1b 100W	36.5±1.4	39±4
H1c 100W	20±2	104±19	A1c 100W	40.0±1.0	52±4



Slika 2. Hlorofil sistemi sa fenol crvenim kao zaštitnom supstancom pod sijalicom snage 60W (a) i 100 W (b)

Figure 2. Chlorophyll systems with phenol red as a protective substance under the light of a 60 W bulb (a) and a 100 W bulb (b)



Slika 3. Antocijanski sistemi sa fenol crvenim kao zaštitnom supstancom pod sijalicom snage 60 W (a) i 100 W (b).

Figure 3. Anthocyanin system with phenol red as protective substance under light of a 60 W bulb (a) and a 100 W bulb (b)

Sa slika 2 i 3 i iz tabele 5 može se zaključiti da fenol crveno ima značajan zaštitni efekat kako za sisteme sa hlorofilima, tako i za sisteme sa antocijanima. Relativno produženje poluraspada iznosi od 20% do 100% što ga čini pogodnim za zaštitu biljnih pigmentata u DSS ćelijama.

Značajno produženje vremena poluraspada biljnih pigmentata u sistemima sa fenol crvenim kao zaštitnim reagensom može se objasniti njegovom sličnošću sa karotenoidima, zaštitnim pigmentima u biljkama. Kako se oblasti maksimalne apsorpcije karotenoida i fenol crvenog u kiseloj i

neutralnoj sredini, kakva je postojala u eksperimentu, preklapaju, pretpostavlja se da je došlo do zaštite hlorofila i antocijana od onih talasnih dužina (područje plave i ultraljubičaste svetlosti, 300-500 nm) od kojih ih u biljkama štite karotenodi.

Može se primetiti i da se sa povećanjem koncentracija fenol crvenog u sistemu povećava i relativno vreme poluraspada biljnog pigmenta, što se objašnjava većom apsorpcijom svetlosti talasnih dužina 300-500 nm pri većim koncentracijama fenol crvenog.

Sistemi sa L-askorbinskom kiselinom

Vremena poluraspada antocijana i hlorofila sa L-askorbinskom kiselinom kao zaštitnom supstancom data su u tabeli 6.

Tabela 6. Vremena poluraspada antocijana i hlorofila sa L-askorbinskom kiselinom kao zaštitnom supstancom

sistem	$t_{1/2}$ (h)	sistem	$t_{1/2}$ (h)
H0 60W (kontrola)	16.6±0.4	A0 60W (kontrola)	29.5±1.1
H2a 60 W	17.3±0.3	A2a 60 W	29.3±1.1
H2b 60 W	17.3±0.7	A2b 60 W	29.9±1.1
H2c 60 W	17.5±0.8	A2c 60 W	29.9±1.0
H0 100 W (kontrola)	9.8±0.8	A0 100 W (kontrola)	26.3±1.4
H2a 100 W	10.3±0.6	A2a 100 W	26.3±1.4
H2b 100 W	9.6±0.6	A2b 100 W	26.4±1.2
H2c 100 W	10.3±0.5	A2c 100 W	26.3±1.2

U sistemima sa L-askorbinskom kiselinom kao zaštitnom supstancom nije došlo do povećanja vremena poluraspada biljnih pigmenata, što je prikazano u tabeli 6. Moguća objašnjenja za ovakve rezultate:

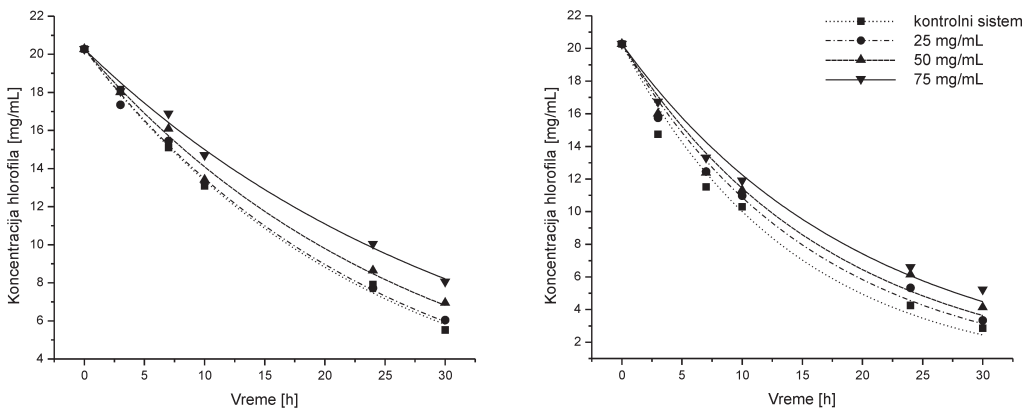
- brza oksidacija L-askorbinske kiseline jodidima
- oksidacija L-askorbinske kiseline u prisustvu atmosferskog kiseonika
- nepostojanje mehanizama za iskorišćavanje antioksidativnog kapaciteta L-askorbinske kiseline u *in vitro* sistemu za redukciju biljnih pigmenata
- zanemarljiv oksidativni stres atmosferskog kiseonika u odnosu na oksidativni stres pri osvetljavanju
- kombinacija prethodnih faktora

Pretpostavlja se da je prvi faktor najznačajniji za nemogućnost zaštite L-askorbinskom kiselinom (Anesini *et al.* 2008).

Sistemi sa L-cisteinom kao zaštitnom supstancom

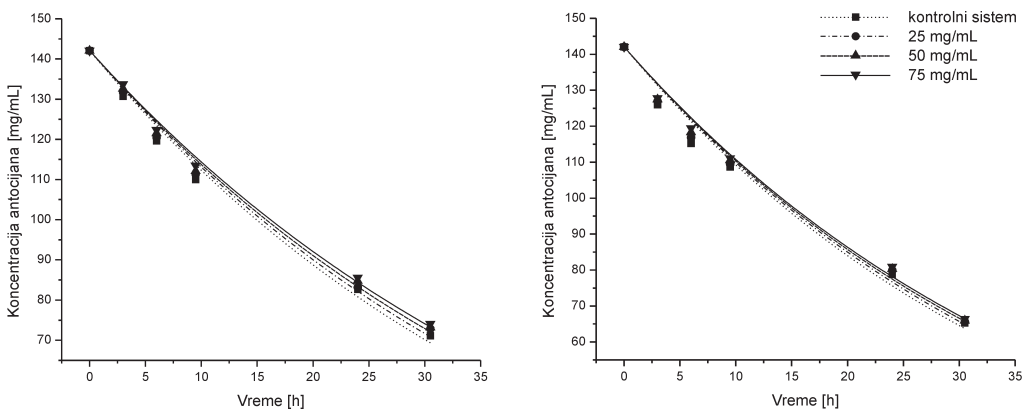
Sa slika 4 i 5 i iz tabele 7. može se zaključiti da L-cistein ima zaštitno dejstvo za hlorofile i antocijane, ali i da je to dejstvo znatno slabije nego kod fenol crvenog. Produženje vremena poluraspada pigmentata je od nekoliko procenta do najviše 40% za hlorofile, odnosno do najviše 9% za antocijane.

Moguće objašnjenje zaštitnog efekta L-cisteina jeste kombinacija dva faktora. Prvi, slabiji, jeste redukcija atmosferskog kiseonika L-cisteinom,



Slika 4. Hlorofilni sistemi sa L-cisteinom kao zaštitnom supstancom pod sijalicom snage 60 W (a) i 100 W (b).

Figure 4. Chlorophyll system with L-cysteine as a protective substance under the light of a 60 W bulb (a) and a 100 W bulb (b)



Slika 5. Antocijanski sistemi sa L-cisteinom kao zaštitnom supstancom pod sijalicom snage 60 W (a) i 100 W (b).

Figure 5. Anthocyanin system with L-cysteine as a protective substance under the light of a 60 W bulb (a) and a 100 W bulb (b)

što smanjuje oksidativni stres atmosferskim kiseonikom na biljne pigmente. Drugi, značajniji faktor, je učešće L-cisteina u redukciji samih biljnih pigmenata. Razlika u odnosu na L-askorbinsku kiselinu i galnu kiselinu može se tumačiti time što je L-cistein stabilniji na oksidaciju od L-askorbinske, a –SH grupa ima negativniji redukcionni potencijal od fenolnih i enolnih grupa galne i L-askorbinske kiseline. Tako u *in vitro* uslovima L-cistein može da redukuje biljne pigmente, dok L-askorbinska kiselina i galna kiselina to ne mogu (Halliwell 1987).

Tabela 7. Vremena poluraspada antocijana i hlorofila sa L-cisteinom kao zaštitnom supstancom i relativno produženje poluraspada u odnosu na kontrolu

Sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)	Sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)
H0 60W	16.6±0.4	kontrolni	A0 60W	29.5±1.1	kontrolni
H3a 60W	17.0±0.4	gg	A3a 60W	30.1±0.8	gg
H3b 60W	19.1±0.6	14.6±0.9	A3b 60W	31.2±0.9	5.9±0.4
H3c 60W	23.0±0.7	38.3±2.2	A3c 60W	32.0±0.8	8.5±0.6
H0 100W	9.8±0.8	kontrolni	A0 100W	26.3±1.4	kontrolni
H3a 100W	11.2±0.6	13.4±1.8	A3a 100W	27.0±1.2	gg
H3b 100W	12.1±0.8	23.2±3.4	A3b 100W	27.4±1.0	gg
H3c 100W	13.8±0.8	40.1±5.3	A3c 100W	27.9±1.0	5.8±0.6

gg – vrednost u granicama greške

Slabija zaštitna aktivnost u odnosu na fenol crveno tumači se razlikama u mehanizmu na koji L-cistein i fenol crveno štite antocijane i hlorofile. Dok fenol crveno apsorbuje deo svetlosnog zračenja (i to zračenje više energije, talasne dužine 300-500 nm) i tako sprečava oksidaciju biljnih pigmenata, glavna aktivnost L-cisteina je sadržana u redukciji već oksidovanih pigmenata.

Povećanje zaštitne aktivnosti sa povećanjem koncentracije L-cisteina može se objasniti pretpostavljenim mehanizmom zaštite. Što je koncentracija L-cisteina u rastvoru u reakcionim sistemima, to je veći kapacitet za redukciju biljnih pigmenata i atmosferskog kiseonika.

Sistemi sa galnom kiselinom kao zaštitnom supstancom

U sistemima sa galnom kiselinom kao zaštitnom supstancom nije došlo do povećanja vremena poluraspada biljnih pigmenata, što je predstavljeno u tabeli 8. Moguća objašnjenja za neuspešnost zaštite su:

- nepostojanje mehanizama za iskorišćavanje antioksidativnog kapaciteta galne kiseline u *in vitro* sistemu za redukciju biljnih pigmenata

- zanemarljiv oksidativni stres atmosferskog kiseonika u odnosu na oksidativni stres pri osvetljavanju
- kombinacija prethodnih faktora

Tabela 8. Vremena poluraspada antocijana i hlorofila sa galnom kiselinom kao zaštitnom supstancom

Sistem	$t_{1/2}$ (h)	Sistem	$t_{1/2}$ (h)
H0 60W (kontrolni)	16.6±0.4	A0 60W (kontrolni)	29.5±1.2
H4a 60W	16.8±0.3	A4a 60W	29.1±1.2
H4b 60W	17.2±0.4	A4b 60W	29.7±0.9
H4c 60W	17.3±0.6	A4c 60W	29.6±1.2
H0 100W (kontrolni)	9.8±0.8	A0 100W (kontrolni)	26.3±1.4
H4a 100W	9.8±0.8	A4a 100W	26.5±1.4
H4b 100W	9.9±0.8	A4b 100W	26.3±1.3
H4c 100W	10.1±0.8	A4c 100W	26.5±1.4

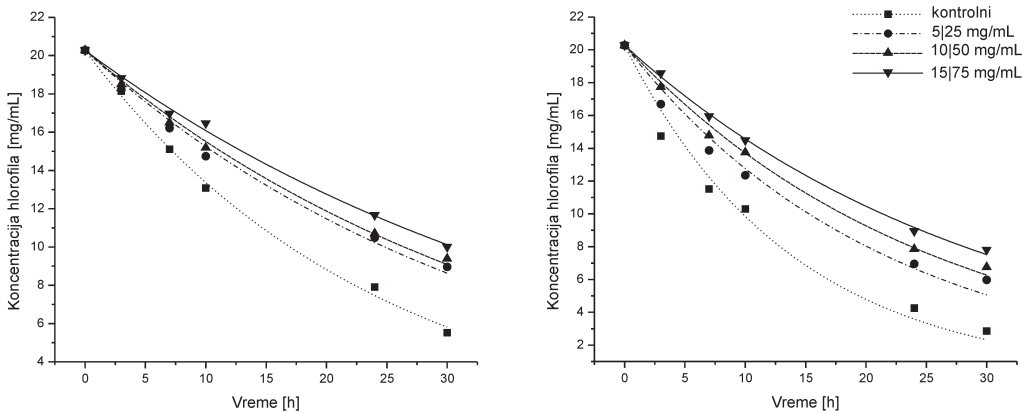
Kako je galna kiselina pri uslovima iz eksperimenta stabilna i na oksidaciju jodidima i na oksidaciju atmosferskim kiseonikom, može se pretpostaviti da je faktor nedostatka mehanizma za redukciju biljnih pigmenata *in vitro* presudan za neuspješnost zaštite galnom kiselinom.

Sistemi sa četiri zaštitne supstance

Četiri zaštitne supstance u jednom sistemu pokazuju znatnu zaštitnu aktivnost (slike 6 i 7, tabela 9). Relativno produženje poluraspada u ovim sistemima se kreće od oko 20% do preko 110%.

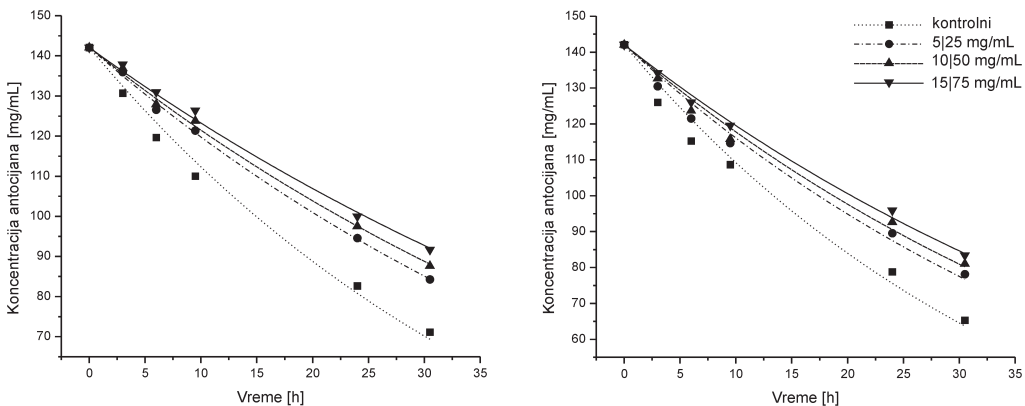
Tabela 9. Vremena poluraspada antocijana i hlorofila sa četiri zaštitne supstance i relativno produženje poluraspada u odnosu na kontrolne sisteme

Sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)	Sistem	$t_{1/2}$ (h)	w (%)
H0 60W	16.3±0.4	kontrolni	A0 60W	29.5±1.2	kontrolni
H5a 60W	24.3±0.8	46±3	A5a 60W	40.6±0.6	38±2
H5b 60W	25.9±0.6	56±38	A5b 60W	44.2±0.8	50±3
H5c 60W	29.9±0.6	80±4	A5c 60W	48.7±1.2	65±4
H0 100W	9.8±0.8	kontrolni	A0 100W	26.3±1.4	kontrolni
H5a 100W	15.0±0.9	52±7	A5a 100W	34.3±1.5	30±3
H5b 100W	17.7±0.6	80±9	A5b 100W	36.9±1.3	40±4
H5c 100W	20.9±0.4	112±11	A5c 100W	40.1±0.9	52±4



Slika 6. Hlorofilni sistemi sa četiri zaštitne supstance pod sijalicom snage 60 W (a) i 100 W (b)

Figure 6. Chlorophyll system with four protective substances under the light of a 60 W bulb (a) and a 100 W bulb (b)



Slika 7. Antocijanski sistemi sa četiri zaštitne supstance pod sijalicom snage 60 W (a) i 100 W (b)

Figure 7. Anthocyanin system with four protective substances under the light of a 60W bulb (a) and a 100 W bulb (b)

Kako na osnovu rezultata na sistemima možemo pretpostaviti da galna i L-askorbinska kiselina ne utiču na zaštitnu aktivnost sistema zaštitnih supstanci, možemo pretpostaviti da zaštitna aktivnost u sistemu sa četiri zaštitne susptance predstavlja kombinaciju zaštitnih uticaja fenol crvenog i L-cisteina.

Iz tabela 5, 7 i 9 primećuje se da je zaštitni uticaj sistema sa četiri supstance veći od zaštitnih uticaja i fenol crvenog i L-cisteina u sistemima sa jednom zaštitnom supstancom. U zavisnosti od koncentracija fenol crvenog i L-cisteina dešava se da je njihovo zajedničko dejstvo jače ili slabije od zbira odvojenih dejstava (aditivnog dejstva). Pod pretpostavkama mehanizama za zaštitu fenol crvenim i L-cisteinom, moguće je objasniti i variranje jačine njihovog zajedničkog dejstva. Dva osnovna faktora koja određuju snagu zajedničkog dejstva su:

- sinergijski faktor koji nastaje kao posledica različitih mehanizama zaštite fenol crvenog (sprečavanje oksidacije apsorpcijom svetlosti) i L-cisteina (redukcija biljnih pigmenata i atmosferskog kiseonika), koji međusobno nisu konkurentni, već se dopunjavaju
- faktor inhibicije redukcije biljnih pigmenata L-cisteinom usled smanjene koncentracije oksidovanog oblika pigmenta koja nastaje kao posledica zaštitnog efekta fenol crvenog.

Fenol crveno i L-cistein deluju zajedno, u zavisnosti od koncentracija, sinergistički i delimično inhibitorno, kao posledica različitosti i specifičnosti pretpostavljenih mehanizama zaštite.

Zaključak

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da fenol crveno i L-cistein imaju potencijal da produže vreme poluraspada biljnih pigmenata u DSS ćelijama pri ispitivanim uslovima, dok L-askorbinska kiselina i glna kiselina ne pokazuju zaštitnu aktivnost. Zaštitnu aktivnost pokazuje i kombinovani sistem od četiri zaštitne supstance. Relativno produženje života biljnih pigmenata u ovom sistemu je od oko 60% do 110% u zavisnost od pigmenta i osvetljenosti kojom se delovalo na sistem.

Pretpostavlja se da bi fenol crveno i L-cistein, kao i njihova kombinacija mogli biti uspešno korišćeni za produženje života DSS ćelija.

Literatura

- Grätzel M., Smestad Greg P. 1998. A Natural Dye-Sensitized Nanocrystalline Energy Converter. *Journal of Chemical Education*, **75**: 6.
- Grätzel M., 2003. Dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **4**: 145.
- Steven L., Suib S., Tanaka J. 1984. Surface Conductive Glass. *Journal of Chemical Education*, **61**: 12.
- Halliwell B. 1987. Oxidative Damage, Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection in Chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44**: 327.
- Veron L.P. 1960. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts. *Analytical Chemistry*, **32**: 9.

- Pantelidis G.E., Vasilakakis M., Manganaris G.A., Diamantidis G. 2005. Antioxidant Capacity, Phenol, Anthocyanin and Ascorbic Acid Contents in Raspberries, Blackberries, Red Currants, Gooseberries and Cornelian Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **102**: 777.
- Streb P., Tel-Or E., Feierabend J. 1997. Light Stress Effects and Antioxidative Protection in Two Desert Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 9225.
- Barbara Demming-Adams, Adams W. W. 1995. The Role of Xanthophyll Cycle Carotenoids in the Protection of Photosynthesis. *Planta*, **1**: 1.
- Dere S., Günes T., Sivaci R. 1998. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll – A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Turkish Journal of Botany*, **22**: 17.
- Anesini C., Ferraro G. E., Filip R. 2008. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 9225.
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, **11**: 591.
- Porra R. J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, **73**: 149.
- Sims D. A., Gamon J. A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, **81**: 337.
- Cheng G.W., Breen P. J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116**: 865.
- Zvezdanović J., Marković D. 2008. Obezbojavanje hlorofila UV zračenjem in vitro – efekti na organizaciju hlorofila u acetonu i heksanu. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **73**: 3.

Milan Kornjača

In Vitro Study of Potential Application of Phenol Red, L-ascorbic Acid, L-cysteine and Gallic Acid for Life Extension of Anthocyanin and Chlorophyll Based Solar Cells

The subject of this research has been *in vitro* studying of influence of protective pigments (phenol red) and antioxidants (ascorbic acid, cysteine and gallic acid) on life extension of chlorophyll and anthocyanin, and through this, estimation of potential application of these substances for dye sensitized solar (DSS) cell life extension.

The studied factor was stress under exposure of systems, which simulate the interior of a DSS cell, to visible light. Concentrations of chlorophyll and anthocyanin pigments after exposure to light were determined by standard spectrophotometric methods. The data obtained from analysing kinetics of pigment degradation in various examined systems were used for discussion of the results.

Based on experimental results, it may be concluded that phenol red and L-cysteine have a potential for prolonging half-life of herbal pigments in DSS cells under studied conditions, while L-ascorbic acid and gallic acid have shown no protective activity. The system with all protective substances studied has shown protective activity. Relative half-life prolonging in this system has ranged from 60% to 110%, depending on stress intensity and herbal pigment studied.

It has been assumed that phenol red and L-cysteine, as well as their combination, might be successfully used for life extension of herbal pigment based DSS cells.



Ispitivanje uticaja aktivatora na kinetičku metodu za određivanje vanadijuma(V)

Ispitivan je uticaj vinske kiseline, sulfosalicilne kiseline, limunske kiseline, fenantrolina, bipiridila i askorbinske kiseline kao aktivatora, na kinetičku metodu za određivanje mikrokoličina vanadijuma(V) u cilju povećanja osetljivosti i selektivnosti metode. Ispitivana metoda zasnovana je na katalitičkom dejstvu vanadijuma(V) na reakciju oksidacije rezorcinola kalijum-bromatom, pri temperaturi $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$. Brzina hemijske reakcije je praćena spektrofotometrijski. Kao najpogodniji aktivator pokazala se askorbinska kiselina koncentracije $0.08 \mu\text{g/mL}$, koja je korišćena u daljem ispitivanju. Kalibracione krive za određivanje vanadijuma konstruisane su na dva načina: metodom tangensa i metodom fiksne koncentracije. Metodom tangensa dobijena je kalibraciona kriva koja predstavlja zavisnost brzine oksidacije od koncentracije vanadijuma(V), dok je metodom fiksne koncentracije konstruisana zavisnost recipročne vrednosti vremena od koncentracije vanadijuma u reakcionoj smeši. Vanadijum je određivan u opsegu koncentracija od 15 ng/mL do $1.66 \mu\text{g/mL}$, pri čemu donja vrednost određuje i donju granicu primene metode. U cilju određivanja selektivnosti metode ispitan je uticaj različitih metalnih jona na reakciju. Dobijeni rezultati su pokazali da dodatak askorbinske kiseline kao aktivatora znatno povećava osetljivost, ali smanjuje selektivnost metode. Selektivnost ove metode se povećava dodavanjem EDTA u reakcionu smešu.

Uvod

Svaka hemijska reakcija teče konačnom brzinom i teži stanju ravnoteže i zbog toga se sastoji iz dva stadijuma: kinetičkog i ravnotežnog. Kinetičke metode se zasnivaju na praćenju kinetičkog stadijuma

reakcije, to jest praćenju brzine reakcije. Faktori koji utiču na brzinu reakcije su: temperatura i pritisak reakcione smeše, koncentracija reaktanata, prirodna rastvarača, jonska sila rastvora, kao i prisustvo katalizatora, aktivatora ili inhibitora u reakcionoj smeši (Rančić 2005). Promenom svakog od ovih faktora mogu se poboljšati osobine metode kao što su njena osetljivost i selektivnost. Praćenjem brzine reakcije oksidacije rezorcinola kalijum-bromatom, koju vanadijum katališe, može se odrediti njegova koncentracija.

Najčešći način da se poboljšaju analitičke karakteristike kinetičkih metoda je upotreba katalizatora i aktivatora. Katalizatori su supstance koje ubrzavaju hemijsku reakciju, snižavajući slobodnu energiju aktivacije, a pritom ne menjaju položaj njene ravnoteže. Aktivator se definiše kao supstanca koja ne katališe reakciju, ali povećava njenu brzinu u prisustvu katalizatora (Meyers 2008).

Optimalni aktivator je onaj kod koga je razlika u brzini aktivirane i neaktivirane reakcije najveća. Optimalna koncentracija aktivatora je ona koncentracija pri kojoj je brzina reakcije najveća.

Kinetička metoda za određivanje vanadijuma (V) zasniva se na praćenju reakcije oksidacije rezorcinola kalijum-bromatom, koju on katališe. Upotreba aktivatora bi ubrzala reakciju i time poboljšala njenu osetljivost. Aktivatori bi trebalo da favorizuju vanadijum time poboljšaju selektivnost (Perez-Bendito 1988).

Vanadijum je element 5. grupe periodnog sistema elemenata. Danas se najviše koristi u svrhe legiranja čelika i kao katalizator u organskoj industriji. Takođe se može naći i u fosilnim gorivima, bojama i lakovima. Smatra se da toksičnost vanadijuma raste sa povećanjem oksidacionog broja u njegovim jedi-

Mihajlo Novaković (1993), Leskovac, Đuke Dinić 41, učenik 3. razreda Gimnazije Leskovac

Marin Kuntić (1993), Beograd, Por. Spasića i Mašare, učenik 3. razreda XIII beogradske gimnazije

MENTOR:

Miloš Pešić, student IV godine Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

njenjima. U živim organizmima prisutan je u tragovima i neophodan je za normalan rast ćelija, ali je toksičan u većim koncentracijama. Ima značajnu fiziološku ulogu u održavanju nivoa šećera u krvi i učestvuje u raznim enzimskim sistemima. Svojstvo vanadijuma da katalizuje mnoge reakcije u organskoj hemiji može se iskoristiti za nalaženje novih metoda za njegovo određivanje (Filipović i Lipanović 1987).

Rezorcinol (1,3-dihidroksibenzen) pripada grupi fenola. Fenoli su jedinjenja koja lako podležu oksidaciji, a najčešća oksidaciona sredstva korišćena u ovim reakcijama su vodonik-peroksid, kalijum-hlorat i kalijum-peroksodisulfat. Proizvodi oksidacije fenola su hinoni, intenzivno obojena jedinjenja, što čini reakcije oksidacije fenola izuzetno povoljnim za spektrofotometrijsko praćenje (Pešić i Drakulović 2005).

Cilj ovog rada bio je unapređivanje osetljivosti i selektivnosti kinetičke metode za određivanje mikrokoličina vanadijuma traženjem najpogodnijeg aktivatora i njegove optimalne koncentracije. Ispitivano je dejstvo sledećih aktivatora: vinske kiseline, sulfosalicilne kiseline, limunske kiseline, fenantrolina, bipiridila i askorbinske kiseline.

Materijal i metode

U cilju određivanja optimalnog aktivatora praćene su brzine reakcija za više različitih aktivatora kao i brzina reakcije bez aktivatora. Ispitani su sledeći rastvori aktivatora: vinske kiseline, sulfosalicilne kiseline, limunske kiseline, fenantrolina, bipiridila i askorbinske kiseline iste koncentracije. Za snimanja je korišćen rastvor vanadijuma koncentracije 4.04 $\mu\text{g/mL}$. Optimalna koncentracija aktivatora je koncentracija koja najviše ubrzava reakciju za datu koncentraciju vanadijuma. Brzina reakcije izražena je kao tangens ugla koji prava zavisnosti apsorbancije od vremena gradi sa x osom.

Odabranom aktivatoru je određena optimalna koncentracija. Postupak se sastojao u praćenju brzine reakcije za različite koncentracije aktivatora. Optimalna je ona koncentracija pri kojoj je brzina reakcije najveća.

Pri konstruisanju kalibracione krive korišćen je odabrani aktivator u optimalnoj koncentraciji, a varirana je koncentracija vanadijuma u reakcionoj smeši. Kalibraciona kriva vanadijuma je konstruisana korišćenjem dve metode. Prva metoda je metoda tangensa. Za ovu metodu praćene su promene apsorbancije u zavisnosti od vremena za svaku od koncentracija

vanadijuma. Nagib linearnog dela ovog grafika predstavlja brzinu reakcije. Kalibraciona kriva predstavlja zavisnost brzine reakcije od koncentracije vanadijuma. Druga metoda je metoda fiksne koncentracije. Meri se vreme za koje će apsorbancija reakcije doći određenu vrednost za različite koncentracije vanadijuma. Kalibraciona kriva se konstruiše kao zavisnosti recipročne vrednosti vremena od koncentracije vanadijuma. Svaka od tačaka kalibracione krive je srednja vrednost 4 do 5 merenja.

Ispitivan je i uticaj prisustva drugih jona metala na promenu brzine reakcije. Korišćeni su sledeći joni: Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , WO_4^{2-} . Joni korišćenih metala su odabrani zbog svojstva da katalizuju ispitivanu reakciju i zbog svoje zastupljenosti u prirodi. Ispitivana su tri različita odnosa koncentracija i to tako da koncentracija stranog jona u reakcionom sistemu bude deset puta veća od koncentracije vanadijuma, jednaka koncentraciji vanadijuma i deset puta manja. Takođe je ispitan uticaj EDTA kako bi se povećala selektivnost metode.

Sva spektrofotometrijska merenja izvršena su na instrumentu tipa Iskra AM 9523 UV-Vis sa kvarcnim kivetama dužine optičkog puta 1 cm, na talasnoj dužini od 455 nm i temperaturi od $26 \pm 1^\circ\text{C}$ u toku 15 minuta. Apsorbancija je očitavana sa spektrofotometra na svakih 10 sekundi.

Pri određivanju optimalnog aktivatora i njegove koncentracije, reakciona smeša se sastojala od 1.5 mL fosforne kiseline, 0.5 mL kalijum-bromata, 0.5 mL rezorcinola, 0.5 mL aktivatora i 0.5 mL vanadijuma. Reakciona smeša korišćena za konstruisanje kalibracione krive i određivanja selektivnosti metode sastojala se od 1.5 mL fosforne kiseline, 0.5 mL kalijum-bromata, 0.5 mL rezarcinola, 0.25 mL aktivatora i 0.25 mL amonijum-vanadata za aktiviranu reakciju, a za neaktiviranu reakciju od 1.5 mL fosforne kiseline, 0.5 mL kalijum-bromata, 0.5 mL rezorcinola, 0.25 mL amonijum-vanadata i 0.25 mL destilovane vode. Slepa proba sadržala je 1.5 mL fosforne kiseline, 0.5 mL kalijum-bromata, 0.5 mL rezorcinola i 0.5 mL destilovane vode. Sva snimanja započinjana su 30 sekundi nakon dodatka amonijum-vanadata.

Za standardizaciju rastvora amonijum-vanadata korišćena je kompleksometrijska titracija. Postupak se sastoji u redukciji vanadijuma(V) do vanadijuma(IV) uvođenjem sumpor(IV)-oksida (SO_2) u rastvor amonijum-vanadata, dodavanju viška kompleks-

rajućeg sredstva etilendiamin-tetraacetata (EDTA) i njegovoj titraciji rastvorom cink-hlorida ($ZnCl_2$). Za ovaj postupak korišćeni su standardni rastvori EDTA (Kemika, p. a.) koncentracije 0.0099 M i cink-hlorida (Zorka Šabac p. a.) koncentracije 0.0104 M.

Za standardizaciju askorbinske kiseline korišćena je jodimetrijska titracija (Ph. Eur. V). Korišćeni jod je prethodno bio standardizovan titracijom rastvorom natrijum-tiosulfata ($Na_2S_2O_3$). Koncentracija korišćenog natrijum-tiosulfata određena je jodometrijskom titracijom (Vogel *et al.* 1989).

U eksperimentu korišćeni su vodeni rastvori kalijum-bromata ($KBrO_3$ Merck-Alkaloid, p. a.) koncentracije 0.15 M, rezorcinola ($C_6H_6O_2$ SuperLab p. a.) koncentracije 0.21 M, fosforne kiseline (H_3PO_4 ZorkaPharm p. a.) koncentracije 1 M, amonijum-vanadata (NH_4VO_3 Merk p. a.) koncentracije 200 $\mu g/mL$. Korišćeni su i rastvori ispitivanih aktivatora, limunske kiseline ($C_6H_8O_7$ Kemika p. a.), vinske kiseline ($C_4H_6O_6$ Merck p. a.), sulfo-salicilne kiseline ($C_7H_8O_6S$ Reanal p. a.), askorbinske kiseline ($C_6H_8O_6$ Centrohemp p. a.), 1,10-fenantrolina ($C_{12}H_8N_2$) i α -bipiridila ($C_{10}H_8N_2$ Merck-Alkaloid p. a.).

Za određivanje selektivnosti metode korišćeni su vodeni rastvori $AlCl_3$ (Merck p.a.), $CuSO_4 \times 6H_2O$ (Kemika p. a.), $ZnSO_4 \times 7H_2O$ (Zorka Šabac p. a.), $Fe_2(SO_4)_3$ (Zorka p. a.), $CrCl_3 \times 6H_2O$ (Merck p. a.), $CoCl_2 \times 6H_2O$ (Kemika p. a.), $MnSO_4 \times H_2O$ (Kemika, p. a.), $NiCl_2$ (Kemika p. a.), $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ (Merck p. a.). Pripremljeni su i rastvori soli svih metala njihovim rastvaranjem u rastvoru EDTA koncentracije 0.01 M. Za ispitivanje selektivnosti u kivetu je umesto 0.25 mL amonijum-vanadata dodavano po 0.125 mL soli ispitivanog metala i amonijum-vanadata.

Pri određivanju optimalne koncentracije askorbinske kiseline korišćeni su rastvori više različitih koncentracija (0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.50 i 1.00 $\mu g/mL$). Koncentracija vanadijuma korišćena pri određivanju je iznosila 4.04 $\mu g/mL$.

Određivanje koncentracije vanadijuma. Za standardizaciju vanadijuma odmeravane su minimalno tri probe amonijum-vanadata u opsegu zapremine od 20 do 150 mL u zavisnosti od koncentracije. Rastvor je zatim redukovao do vanadil-jona (VO^{2+}) sumpor(IV)-oksidom. U rastvor vanadil-jona je dodavano 10 mL EDTA koncentracije 0.0099 M, a zatim je višak EDTA titrovao rastvorom cink-hlorida konce-

ntracije 0.0104 M uz eriohrom crno T kao indikator. Iz utrošene zapremine cink-hlorida izračunat je višak EDTA. Razlika dodatog EDTA i određenog viška ekvivalentna je količini vanadil-jona (reaguju u odnosu 1 : 1). Količina vanadil-jona jednaka je količini vanadijuma.

Određivanje koncentracije askorbinske kiseline. Koncentracija askorbinske kiseline je određena tako što je odmereno 10 mL pripremljenog rastvora i u njega je dodat 1 mL 1 M rastvora sumporne kiseline (H_2SO_4) i 0.5 mL skroba kao indikatora. Dobijeni rastvor je titrovao rastvorom joda (I_2) koncentracija od 0.0097 M do 0.0100 M (u zavisnosti od dana kad je standardizovan). Jod i askorbinska kiselina reaguju u odnosu 1 : 1, tako da je utrošena količina joda ekvivalentna količini askorbinske kiseline.

Određivanje koncentracije joda. Rastvor joda je pripremljen tako što je u 40 mL vode rastvoreno 8.5 g kalijum-jodida i 0.6354 g resublimovanog joda i dopunjeno do 250 mL u cilindru za mućkanje. U 25 mL pripremljenog rastvora dodavan je natrijum-tiosulfat do promene boje u bledo žutu. Zatim je dodato 0.5 mL rastvora skroba i titracija nastavljena do obezbojavanja rastvora. Količina joda u rastvoru duplo je manja od količine utrošenog natrijum-tiosulfata.

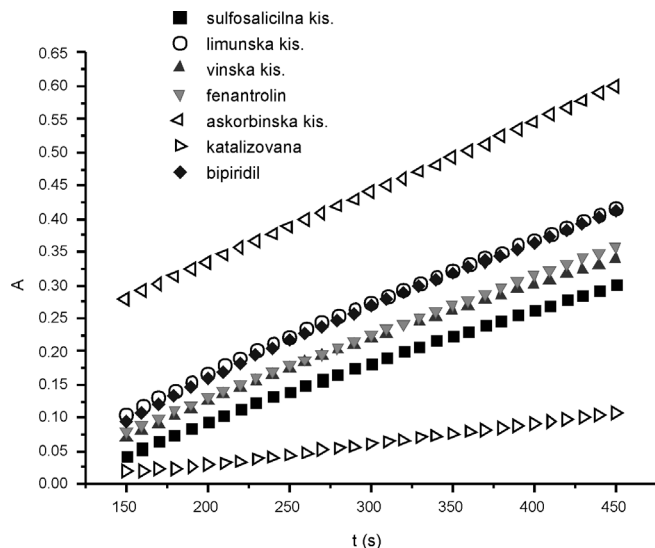
Određivanje koncentracije natrijum-tiosulfata. Rastvor je pripremljen rastvaranjem 5 g natrijum-tiosulfata u ključaloj destilovanoj vodi i dopunjavanjem do 1 L u normalnom sudu. Titrovani rastvor je pripremljen rastvaranjem 0.0313 g kalijum-jodata i 0.5068 g kalijum-jodida u 25 mL destilovane vode. Dodat je 1 mL sumporne kiseline, nakon čega se osloboda odgovarajuća količina joda koja je ekvivalentna količini KIO_3 . U rastvor je dodavan natrijum-tiosulfat do promene boje u bledo žutu boju, zatim je dodato je 0.5 mL rastvora skroba i titracija nastavljena do obezbojavanja rastvora. Količina natrijum-tiosulfata šest puta je veća od utrošene količine kalijum-jodata.

Rezultati i diskusija

Određivanje optimalnog aktivatora

Optimalni aktivator je određen upoređivanjem brzina reakcija u prisustvu različitih aktivatora sa brzinom neaktivirane reakcije.

U prisustvu svih ispitivanih aktivatora brzina reakcije bila je približno ista (sulfosalicilna kiselina 8.51×10^{-4} , limunska kiselina 1.02×10^{-3} , vinska kise-



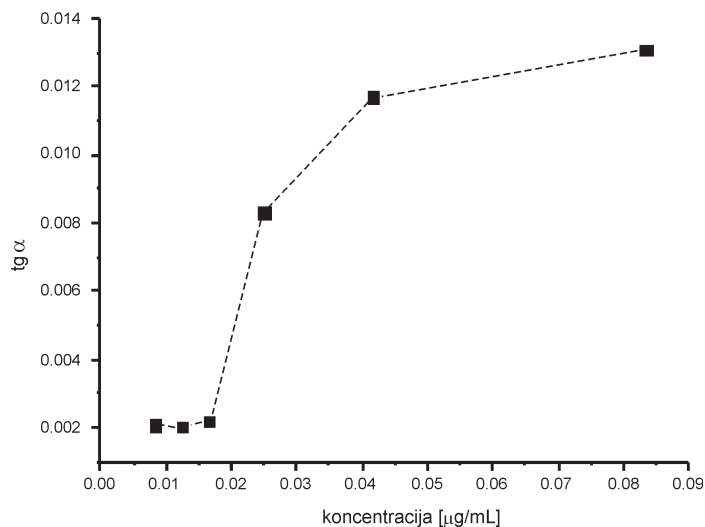
Slika 1.
Zavisnost apsorbancije od vremena za korišćene aktivatore

Figure 1.
Absorbance dependence vs. time for used activators

lina 8.89×10^{-4} , fenantrolin 9.23×10^{-4} , askorbinska kiselina 1.06×10^{-3} , bipiridil 1.04×10^{-3} , i znatno niža u odsustvu aktivatora 3.07×10^{-4} (samo katalizovana reakcija). Kod askorbinske kiseline primećena je najveća apsorbancija u odnosu na neaktiviranu reakciju. Ona je izabrana kao optimalni aktivator zbog mogućnosti detekcije nižih koncentracija vanadijuma.

Određivanje optimalne koncentracije askorbinske kiseline

Optimalna koncentracija askorbinske kiseline je utvrđena na osnovu zavisnosti brzine reakcije od koncentracije kiseline.



Slika 2.
Zavisnost brzine reakcije ($\text{tg } \alpha$) od koncentracije askorbinske kiseline

Figure 2.
Effect of ascorbic acid concentration on the reaction speed ($\text{tg } \alpha$)

Na slici 2 se može videti da pri nižim koncentracijama askorbinske kiseline ne dolazi do značajnog povećanja brzine reakcije, ali se pri većim koncentracijama (0.02 do 0.05 $\mu\text{g/mL}$) brzina znatno povećava u odnosu na brzinu neaktivirane reakcije. Pretpostavlja se da brzina prestaje dalje značajnije da raste na koncentracijama većim od 0.08 $\mu\text{g/mL}$, pa je iz tog razloga ova koncentracija odabrana kao optimalna i korišćena je u daljem radu.

Konstruisanje kalibracione krive

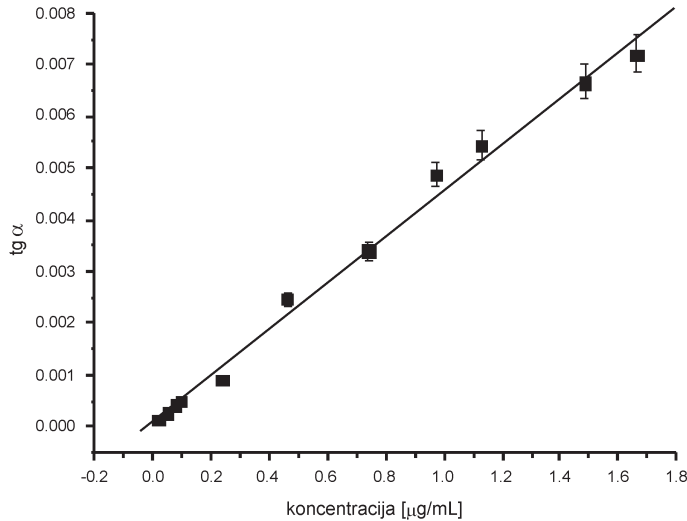
Kalibraciona kriva vanadijuma konstruisana je na osnovu podatka da brzina aktivirane reakcije oksidacije vanadijuma zavisi od koncentracije askorbinske kiseline.

dacije rezorcinola kalijum-bromatom raste sa povećanjem koncentracije vanadijuma. Kalibraciona kriva je konstruisana na dva različita načina, metodom tangensa i metodom fiksne koncentracije.

Na slici 3 prikazana je kalibraciona kriva konstruisana metodom tangensa, odnosno predstavljena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije vanadijuma. Pri konstrukciji grafika tačke su prethodno otežinjene, budući da predstavljaju usrednjene vrednosti dobijene na osnovu više ponavljanja. Koficijent korelacije linearnog fita sa empirijskim vrednostima iznosi 0.9915.

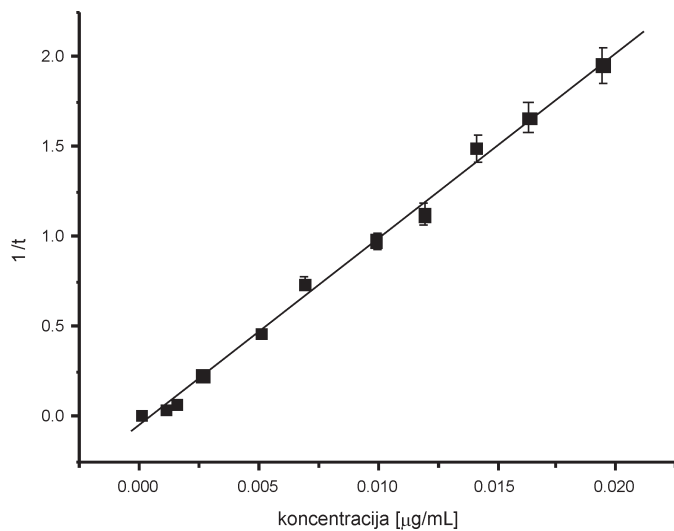
Za metodu fiksne koncentracije (slika 4) odabrana je apsorbancija od 0.1000. Mereno je vreme potrebno da reakcione smeše sa različitim koncentracijama vanadijuma dostignu tu apsorbanciju. Dobijena kalibraciona kriva predstavlja zavisnost recipročne vrednosti vremena od koncentracije vanadijuma i , u našem slučaju, stepen korelacije sa empirijskim vrednostima iznosi 0.9923.

Obe kalibracione krive su konstruisane u opsegu koncentracija od 15 ng/mL do 1.66 $\mu\text{g/mL}$. Prva vrednost se može uzeti za donju granicu osetljivosti metode.



Slika 3.
Zavisnost brzine reakcije (tg α) od koncentracije vanadijuma

Figure 3.
Slope (tg α) dependence vs. vanadium concentrations



Slika 4.
Zavisnost vremena od koncentracije vanadijuma

Figure 4.
Time dependence vs. vanadium concentrations

Tabela 1. Selektivnost

Ispitivani jon	Odstupanje u procentima		
	Konc. vanadijuma/konc. ispitivanog jona 1 : 1	Konc. vanadijuma/konc. ispitivanog jona 1 : 10	Konc. vanadijuma/konc. ispitivanog jona 10 : 1
Al ³⁺	9.0	-9.5	27.7
Cu ²⁺	16.8	-14.5	2.5
Zn ²⁺	8.0	34.8	9.4
Fe ³⁺	12.7	45.8	29.2
Cr ³⁺	10.4	9.0	11.7
Co ²⁺	9.0	16.8	10.0
Mn ²⁺	12.2	31.6	34.3
Ni ²⁺	-4.8	15.4	6.7
WO ₄ ²⁻	18.6	45.4	34.8

Selektivnost metode

Selektivnost metode je ispitivana praćenjem uticaja prisustva različitih metala na brzinu reakcije. Odstupanje je predstavljeno kao odnos brzina reakcija sa dodatkom stranog jona i brzine reakcije bez prisustva stranog jona (tabela 1).

Dobijeni podaci pokazuju da joni svih metala osim jona Ni²⁺, u koncentracijama jednakim koncentraciji vanadijuma, imaju znatan uticaj na brzinu reakcije. Odstupanja pri koncentracijama ispitivanih jona deset puta većim od koncentracije vanadijuma su znatno veća. Pri deset puta nižim koncentracijama metala odstupanja takođe nisu zanemarljiva, i u nekim slučajevima su veća od odstupanja pri višim koncentracijama. Kod jona Cr³⁺ primećeno je da odstupanje raste sa smanjenjem koncentracije u odnosu na koncentraciju vanadijuma. Takođe, kod jona Mn²⁺ i jona Al³⁺ odstupanje je veće pri deset puta nižim koncentracijama, nego pri deset puta višim koncentracijama u odnosu na koncentraciju vanadijuma. Najveće odstupanje se može primetiti u prisustvu jona Fe³⁺ i WO₄²⁻.

U cilju poboljšanja selektivnosti metode ispitan je uticaj EDTA na izabrane jone metala. Rastvori ispitivanih jona u EDTA imali su koncentraciju jednaku koncentraciji vanadijuma. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 2.

U prisustvu EDTA odstupanja za sve jone su znatno smanjena. Joni Al³⁺, Cu²⁺ i Cr³⁺ nemaju veliki uticaj na promenu brzine reakcije. Uticaj Fe³⁺ i WO₄²⁻ jona je znatno smanjen, ali su i dalje zadržali

veliki uticaj na brzinu reakcije. Odstupanje za većinu jona se smanjilo, osim za jone Co²⁺, Zn²⁺ i Ni²⁺ kod kojih se odstupanje povećalo.

Tabela 2. Selektivnost u prisustvu EDTA

Ispitivani jon	Odstupanje u procentima
Al ³⁺	-0.2
Cu ²⁺	-0.7
Zn ²⁺	14.5
Fe ³⁺	9.0
Cr ³⁺	4.8
Co ²⁺	12.6
Mn ²⁺	9.0
Ni ²⁺	9.4
WO ₄ ²⁻	14.5

Zaključak

Od ispitivanih aktivatora (vinska kiselina, sulfosalicilna kiselina, limunska kiselina, fenantrolin, bipiridil i askorbinska kiselina), askorbinska kiselina je pokazala najpovoljniji uticaj na reakciju. Reakcija sa askorbinskom kiselinom je imala sličnu brzinu kao i reakcije sa ostalim aktivatorima, ali je zbog osobine da gradi kompleks sa vanadijumom(V) (apsorpcioni maksimum kompleksa je na $\lambda = 425$ nm) davala najvišu apsorpciju. Određena je njena optimalna koncentracija od 0.08 $\mu\text{g/mL}$. Poboljšanje metode dodavanjem aktivatora omogućilo je određivanje

koncentracija vanadijuma u opsegu od 15 ng/mL do 1.66 $\mu\text{g/mL}$, pri čemu prva vrednost predstavlja donju granicu osetljivosti metode. Metoda nije pokazala dobru selektivnost, kako u odnosu ispitivanih jona i vanadijuma 1 : 1, tako ni u bilo kom drugom ispitivanom odnosu. Selektivnost se znatno poboljšala dodavanjem EDTA u reakcionu smešu, zbog njegove osobine da kompleksira ispitivane jone metala i onemogućujući njihov uticaj na reakciju. Dodavanjem EDTA vanadijum se može određivati u prisustvu jona Al^{3+} , Cu^{2+} i Cr^{3+} bez većih odstupanja. Kod ostalih ispitivanih jona (Zn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} i WO_4^{2-}) nije dobijena uočljiva pravilnost njihovog uticaja na povećanje brzine reakcije.

Literatura


2004. European Pharmacopoeia, 5th Edition.
- Filipović I., Lipanović S. 1987. *Opća i anorganska kemija*. Zagreb: Školska knjiga
- Ilić S., Salim A. 2009. Kinetička metoda za određivanje vanadijuma. *Petničke sveske*, 62: 299.
- Meyers R. A. 2008. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New York: Wiley
- Perez-Bendito D., Silva M. 1988. *Kinetic methods in analytical chemistry*. New York: Wiley
- Pešić M., Drakulović M. 2005. Oksidacija hidrohinona kalijum-hloratom kao nova kinetička metoda za određivanje mikrokoličina vanadijuma. *Petničke sveske*, 58: 181.
- Rančić S. 2005. Optimizacija kinetičkih spektrofotometrijskih metoda za određivanje toksičnih elemenata. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd

Savić J., Savić M. 1990. *Osnovi analitičke hemije – klasične metode*. Sarajevo: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva

Vogel A. I, Tatchell A. R, Furnis B. S, Hannaford A. J, Smith P. W. G. 1989. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition. Longman

Mihajlo Novaković and Marin Kuntić

Study of the Activators Effect on the Kinetic Method for the Determination of Vanadium

In this paper the influence of activators on the kinetic method for determination of microquantities of Vanadium was investigated. This method is based on the catalytic effect of Vanadium(V) on the chemical reaction of oxidation of resorcinol by potassium bromate, on a temperature of $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$. The rate of reaction is monitored spectrophotometrically by measuring the increase in absorbance of oxidation products at 455 nm during 15 minutes. Several activators were examined and it was determined that ascorbic acid is the optimal activator (Figure 1). It is also found (Figure 2) that its optimal concentration is 0.08 $\mu\text{g/mL}$. For data analysis two different methods were applied. The first one is initial-rate method and the second one is fixed-concentration method. Vanadium is determined in concentration range from 15 ng/mL to 1.66 $\mu\text{g/mL}$. The effect of different metal ions on the reaction was also investigated. The results show that the addition of a certain activator significantly increases the sensitivity of the method but decreases its selectivity. The selectivity is significantly increased by adding EDTA in the reaction mixture. 

Ispitivanje katalitičkog dejstva ZnO, SnO₂ i njihovih kompozitnih smeša na fotokatalitičku degradaciju boje oranž II

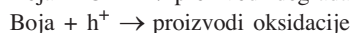
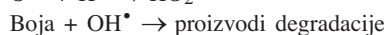
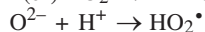
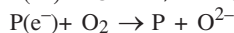
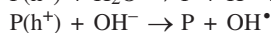
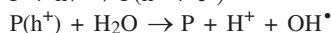
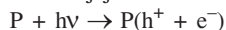
U ovom istraživanju ispitan je uticaj katalizatora i vrste zračenja na fotokatalitičku degradaciju boje Oranž II. Kao katalizatori, korišćeni su ZnO, SnO₂ i njihove kompozitne smeše različitih masenih odnosa oksida. Ispitan je uticaj mase i vrste katalizatora. Suspenzije (rastvor boje + katalizator) su ozračivane na sunčevom i UV zračenju. Pokazano je da je ZnO najefikasniji katalizator za ovaj tip reakcije pri oba vida zračenja, a najmanja katalitička aktivnost pokazana je kod SnO₂.

Uvod

Azo-boje nastaju dejstvom diazonijum soli na aromatične amine i fenole. U svojoj strukturi sadrže hromofornu grupu -N=N-. Da bi supstanca mogla da se koristi kao boja, potrebno je da pored hromoforne sadrži bar još jednu auksofornu grupu koja će pojačati dejstvo hromofora i pomoći vezivanje za odgovarajuće vlakno ili podlogu (Arsenijević 2005). Ovakve boje se koriste u mnogim granama industrije, kao što su tekstilna industrija, industrija kože, proizvodnja papira, hrane i sl. Pretpostavlja se da primenom obojenih proizvoda u prirodne vodene tokove odlazi oko 1-10% ove supstance, što u kombinaciji sa ostalim supstancama u vodi može izazvati značajno zagađenje. Za uklanjanje sintetskih boja razvijene su različite fizičko-hemijske metode: jonska izmena, reverzna osmoza, fotodegradacija otpada.

Fotodegradacija je zasnovana na principu fotokatalitičke oksidacije (Mijin *et al.* 2006). Kod fotokatalitičke oksidacije utvrđeno je da se provodni

elektroni (e⁻) i valentne šupljine (h⁺) stvaraju kada se vodena suspenzija poluprovodnika zrači svetlosnom energijom većom od energetskog razmaka traka. Slobodni elektroni mogu izazvati redukciju boje ili reagovati sa akceptorima elektrona. Kiseonik koji je adsorbovan na površini katalizatora ili rastvoren u vodi, biva redukovano do superoksidnog radikal-anjona O²⁻. Fotogenerisane šupljine mogu oksidovati organske molekule i nagraditi R⁺ katjone ili reagovati sa OH⁻ ili H₂O prevodeći ih u OH[•] radikale. Reakcije se odvijaju na sledeći način:



(P = poluprovodnik, hv = ultravioletno zračenje)

Nastali OH[•] radikal je jako oksidaciono sredstvo, tako da može oksidovati većinu diazo boja do krajnjih proizvoda razgradnje kao što su CO₂, H₂O, NH₄⁺ ili SO₄²⁻ (Noller 1972; Vollhardt 1996).

U eksperimentima koji su izvođeni pri sunčevoj i veštačkoj svetlosti, oksidi cinka, kalaja i titana pokazali su dobru katalitičku sposobnost. Stoga u ovom radu ispitujeemo katalitičku aktivnost dva poluprovodnika, ZnO i SnO₂, kao i tri kompozitne smeše na bazi ova dva poluprovodnika u različitim masenim odnosima. Korišćena je boja oranž II (natrijum-4[(2-hidroksi-1-naftil)azo]benzensulfonat), narandžasta boja koja se upotrebljava u tekstilnoj industriji.

Cilj ovog rada bilo je ispitivanje fotokatalitičke aktivnosti ZnO, SnO₂ i sinergičkog/antagonističkog efekta kompozitnih smeša ZnO : SnO₂ pri UV i sunčevom zračenju na degradaciju boje oranž II.

Miljan Ćorović (1993), Žarka Zrenjanina 42, učenik 3. razreda Gimnazije „Žarko Zrenjanin” u Vrbasu

MENTOR:
dr Igor Pašti, Fakultet za fizičku hemiju,
Univerzitet u Beogradu

Materijal i metode

Na početku istraživanja pripremljen je matični vodeni rastvor ispitivane boje koncentracije 6×10^{-4} mol/L. Iz ovog rastvora uzimani su alikvoti od 20 mL koji su razblaživani deset puta. Iz dobijenih rastvora koncentracije 6×10^{-5} mol/L, uzeti su alikvoti zapremine 20 mL u koje je dodat katalizator. Tako dobijeni sistemi su ozračivani, a fotodegradacija je praćena sprektrofotometrijski (CECIL CE 2021). Kao izvor svetlosti korišćena je UV lampa (Philips TUV 30W/G30 T8 UV-c Hg). Reakcije fotokatalitičke degradacije su se odvijale u PYREX erlenmajerima zapremine 25 mL, jer sudovi pravljani od PYREX stakla, propuštaju ultravioletno zračenje.

Određivanje uticaja ZnO na fotodegradaciju boje oranž II. Pripremljeno je pet serija od po četiri suspenzije ZnO i boje oranž II u PYREX erlenmajerima. U svakoj od serija nalazila se različita masa ZnO i to: 10.0 mg, 30.0 mg, 100.0 mg, 300.0 mg i 900.0 mg ZnO i ista količina boje (20 mL rastvora boje koncentracije 6×10^{-5} mol/L). Sve serije ozračivane su 2 h. Na svakih pola sata jedna suspenzija je centrifugirana 3 min na 2000 obrtaja/min na aparatu Harrier 15/80, da bi se katalizator istaložio i supernatantu izmerila apsorbanacija.

Sinteza i određivanje uticaja SnO₂ na fotodegradaciju boje oranž II. SnO₂ je sintetisan iz SnCl₄ × 5H₂O. Kalaj(IV)-hlorid rastvoren je u minimalnoj količini destilovane vode i nakon toga je u dobijeni rastvor sipan rastvor NaOH koncentracije 4 mol/L u kapima do pH vrednosti 9 (nakon svakih par kapi hidroksida, suspenzija je mućkana na vorteksu). Dobijeni kalaj(IV)-hidroksid istaložen je centrifugiranjem suspenzije 5 min na 2000 obrtaja/min, nakon čega je prenet u porculansku šolju. Talog je sušen 2 h na 120°C, a zatim prenet u tigl i žaren 6 h na 600°C, pri čemu je dobijen kalaj(IV)-oksid (Wang *et al.* 2002). Uticaj SnO₂ na fotokatalitičku degradaciju boje oranž II, ispitan je na isti način kao i uticaj cink oksida.

Sinteza i određivanje uticaja kompozitnih smeša ZnO : SnO₂ na fotodegradaciju boje oranž II. Kompozitne smeše su pripremljene na isti način kao i SnO₂. Masa kompozitnih smeša koje su korišćene je bila konstantna (0.1 g). Početne supstance za sintezu bile su ZnSO₄ × 5H₂O i SnCl₄ × 5H₂O. Kompozitne smeše sadržale su: 66.6 mg ZnO i 33.3 mg SnO₂, 50.0 mg ZnO i 50.0 mg SnO₂, 33.3 mg ZnO i 66.6 mg SnO₂. Za svaku od tri kompozitne smeše pripremljena je serija od 4 suspenzije sa bojom oranž

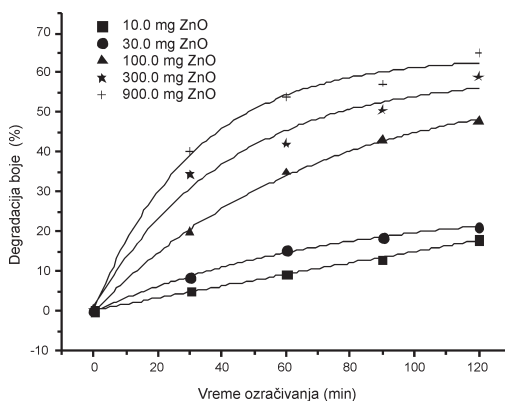
II. Sve serije ozračivane su 2 h na UV lampi. Na svakih pola sata jedna suspenzija je centrifugirana, nakon čega je izmerena apsorbanacija supernatanta.

Određivanje uticaja sunčeve svetlosti na fotodegradaciju boje oranž II. Po jedna suspenzija iz svake serije koja je pripremana, ozračivana je 2 h (od 11:00–13:00) na sunčevoj svetlosti. Nakon ozračivanja, suspenzije su izcentrifugirane 3 min na 2000 obrtaja/min i spektrofotometrijski je merena apsorbanacija degradirane boje.

Rezultati i diskusija

Zavisnost procenta degradacije boje oranž II od vremena ozračenja suspenzija u kojima je kao katalizator korišćen ZnO, prikazana je na slici 1. Sa porastom mase katalizatora, fotodegradacija boje je efikasnija. Bez katalizatora ne dolazi do degradacije boje. Zavisnost fotodegradacije od vremena ozračenja suspenzija u kojima je katalizator bio SnO₂, prikazana je na slici 2.

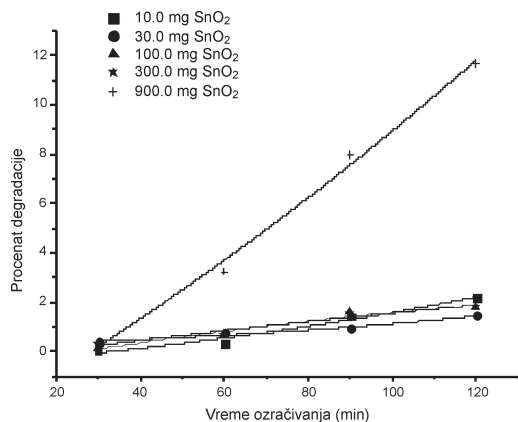
Sa slike 3, koja prikazuje zavisnost fotodegradacije od vremena ozračenja, prilikom korišćenja kompozitnih smeša ZnO i SnO₂ kao katalizatora može se zaključiti da je kompozitna smeša koja sadrži 66.6 mg ZnO i 33.3 mg SnO₂ fotokatalitički aktivnija od ostalih smeša. Pretpostavlja se da je smeša sa većim procentom ZnO fotokatalitički efikasnija jer je ZnO



Slika 1.

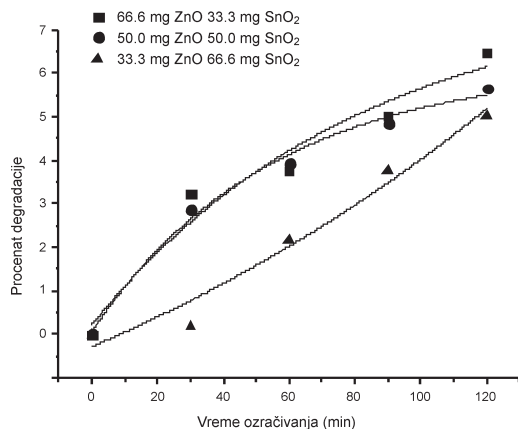
Zavisnost procenta degradacije boje katalizovane ZnO od vremena ozračenja

Figure 1. Degradation percentage catalyzed by ZnO depending on irradiation time



Slika 2. Zavisnost procenta degradacije boje katalizovane SnO₂ od vremena ozračenja

Figure 2. Degradation percentage catalyzed by SnO₂ depending on irradiation time



Slika 3. Zavisnost procenta degradacije boje katalizovane kompozitnim smešama od vremena ozračenja

Figure 3. Degradation percentage catalyzed by composites depending on irradiation time

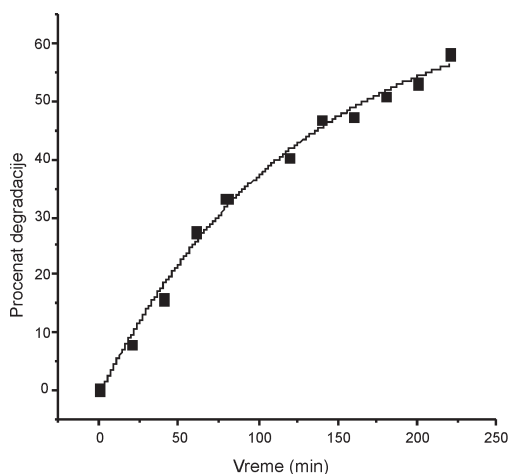
parcijalno efikasniji katalizator. Rezultati su pokazali antagonistički efekat između ZnO i SnO₂ jer je ZnO iste mase zasebno fotokatalitički aktivniji od ZnO iste mase u smeši. U tabeli 1 prikazana je zavisnost degradacije boje od mase ispitivanih katalizatora pri sunčevom zračenju. Nakon 2 h ozračivanja, u suspenzijama koje su sadržale ZnO, degradirano je oko

99% boje. To znači da je ZnO najpogodniji katalizator za reakciju fotokatalitičke oksidacije boje oranž II. Apsorbancija rastvora nije se promenila ni nakon 2 časa ozračivanja kada je kao katalizator korišćen SnO₂.

Tabela 1. Zavisnost degradacije boje od vrste i mase katalizatora

Katalizator	Degradacija (%)
10.0 mg ZnO	98.20
30.0 mg ZnO	99.97
100.0 mg ZnO	99.99
300.0 mg ZnO	99.99
900.0 mg ZnO	99.99
66.6 mg ZnO + 33.3 mg SnO ₂	21.94
50.0 mg ZnO + 50.0 mg SnO ₂	12.89
33.3 mg ZnO + 66.6 mg SnO ₂	5.12
10.0 mg SnO ₂	0.11
30.0 mg SnO ₂	0.38
100.0 mg SnO ₂	0.94
300.0 mg SnO ₂	2.64
900.0 mg SnO ₂	5.43

Na slici 4 prikazana je eksponencijalna zavisnost fotodegradacije boje oranž II, sa ZnO mase 100.0 mg pri UV zračenju.



Slika 4. Eksponencijalna zavisnost fotodegradacije boje oranž II

Figure 4. Exponential function of orange II degradation

Zaključak

Ispitanjem fotokatalitičke aktivnosti ZnO i SnO₂ u reakciji fotodegradacije boje oranž II, dobijeno je da je ZnO, za razliku od SnO₂, efikasan katalizator za ovaj tip reakcije. Nakon 2 h ozračivanja UV lampom, u reakciji koja je katalizovana sa 900.0 mg ZnO degradirano je 65% boje, dok je u reakciji koja je katalizovana sa 900.0 mg SnO₂ degradirano 11.7% boje. Nakon 2 h ozračivanja na sunčevoj svetlosti sve suspenzije boje koje su sadržale ZnO kao katalizator, degradirane su potpuno, bez obzira na masu katalizatora. Suspenzije sa većim masama katalizatora degradirane su u kraćem vremenskom periodu. Pokazano je da sunčeva svetlost nema uticaja na degradaciju boje katalizovanu pomoću SnO₂. Takođe je pokazano da je reakcija fotodegradacije boje oranž II eksponencijalno zavisna od vremena.

Utvrđen je i antagonistički efekat ZnO i SnO₂ u smešama. Kompozitne smeše su fotokatalitički aktivnije od SnO₂, ali su manje aktivne od ZnO. Smeša koja je sadržala 66.6 mg ZnO i 33.3 mg SnO₂ fotokatalitički je aktivnija od smeša sa manjim udelom ZnO. Kada je reakcija degradacije boje oranž II katalizovana ovom smešom, nakon 2 h ozračivanja na UV lampi razgrađeno je 6.5% boje. Pretpostavlja se da SnO₂ ometa ZnO kada se nalaze u kompozitnoj smeši, pa je fotokatalitička aktivnost smeša manja od parcijalne aktivnosti ZnO iste mase.

Literatura

- Arsenijević S. R. 1965. *Neorganska hemija*. Beograd: Naučna knjiga
- Arsenijević S. R. 2005. *Organska hemija*. Beograd: Partenon
- Filipović I., Lipanović S. 1973. *Opća i anorganska kemija*. Zagreb: Školska knjiga
- Noller R. C. 1972. *Kemija organskih spojeva*. Zagreb: Tehnička knjiga
- Mijin D., Jugurđžija M., Jovančić P. 2006. Photocatalytic degradation of synthetic dye under sunlight. *Hemijska industrija*, **61**: 7.
- Shifu C., Yunzhang L. 2006. Study on the photocatalytic degradation of glyphosate by TiO₂ photocatalyst. *Chemosphere*, **67**: 1010.

Vollhardt K. P. C., Schore N. 1996. *Organska hemija*. Beograd: Hajdigrad

Wang C., Zhao I., Wang X., Mai B., Sheng G., Peng P., Fu J. 2002. Preparation, characterization and photocatalytic activity of nano-sized ZnO/SnO₂ coupled photocatalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, **39**: 269.

Miljan Ćorović

Determination of the Influence of ZnO, SnO₂ and Composites ZnO : SnO₂ on Photocatalytic Degradation of Dye Orange II

Dye pollutants from the textile industry are an important source of environmental contamination. The majority of these dyes are toxic and mostly, non-biodegradable. Among new oxidation method or "advanced oxidation processes", heterogeneous photocatalysis appears as an emerging destructive technology leading to total mineralization of organic pollutants. In this research, the influence of ZnO, SnO₂ and ZnO : SnO₂ composites was determined. Composites were synthesized by forced-hydrolysis method. Three composites of ZnO : SnO₂ were prepared: composite 1 (66.6% ZnO i 33.3% SnO₂), composite 2 (50% ZnO i 50% SnO₂) and composite 3 (33.3% ZnO i 66.6% SnO₂). Suspensions (dye + catalyst) were irradiated under UV and sun light. The most effective catalyst for this reaction was ZnO, then composites 1, 2, 3 and SnO₂, respectively. When the reaction was catalyzed by ZnO, under sunlight, after an irradiation time of 2 hours, the total mineralization of dye solution has been shown. Sunlight does not have influence on degradation catalyzed by SnO₂. Composite 1 is photocatalytically more active, because it contains more ZnO, than other composites. The method of photocatalytic degradation can be applied on any organic pollutants, so it was useful to determine influence of different catalyst on this reaction. ☺

Određivanje osobina i antioksidativne aktivnosti ekstrakata lista leske

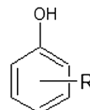
Ispitivan je sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal metanolnog, etanolnog, acetonskog i etil-acetatnog ekstrakta lista leske (*Avellana Corylus*), kao i upotrebljivost ovih rastvarača kao ekstragenata. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida kao i antioksidativna aktivnost ispitani su primenom spektrofotometrijskih metoda. Antioksidativna aktivnost određena je ispitivanjem redukcione moći i sposobnosti zaustavljanja procesa lipidne peroksidacije na modelu β -karotena. Rezultati su pokazali da je list leske bogat izvor fenolnih jedinjenja, pa stoga i njegovi ekstrakti poseduju visok antioksidativni potencijal. Takođe, ispitivanje je pokazalo da acetonski ekstrakt sadrži najviše kako flavonoida, tako i ostalih fenola, da etanolni ekstrakt ispoljava najveću redukcionu moć, a metanolni najveću sposobnost zaustavljanja lipidne peroksidacije, dok se pokazalo da je etil-acetatni ekstrakt najsiromašniji flavonoidima i ostalim fenolnim jedinjenjima, pa stoga skoro i da ne ispoljava redukcionu moć i u značajno manjoj meri zaustavlja proces lipidne peroksidacije u odnosu na sve ostale ispitivane ekstrakte.

Uvod

Pri metaboličkim procesima koji se svakodnevno odvijaju u organizmu dolazi do stvaranja slobodnih radikala, čestica koje imaju nesporene elektrone, zbog čega su izuzetno hemijski nestabilni, pa vrlo lako stupaju u hemijske reakcije kako bi „pridobili” nedostajući elektron. Međutim, molekul koji je u ulozi elektron-donora i sam postaje slobodni radikal.

Najčešće su molekuli kojima slobodni radikali oduzimaju elektron važni molekuli za funkcionisanje ćelije, te na ovaj način postojanje slobodnih radikala dovodi do gubitka funkcije ovih molekula i ubrjava proces starenja ćelija. Stoga se danas sve više traga za supstancama koje će predati svoj elektron slobodnim radikalima, a da im se pri tome stabilnost ne naruši. Takva jedinjenja nazivaju se antioksidansi. Među najaktivnije antioksidanse ubrajaju se fenoli i flavonoidi.

Fenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti u biljkama. Šematski se njihova opšta struktura može prikazati na sledeći način (slika 1):



Slika 1. Opšta strukturalna formula fenola

Figure 1. General structural formula of phenol

U svojoj strukturi fenolna jedinjenja sadrže aromatični prsten sa jednom ili više fenolnih grupa. Upravo je postojanje fenolne grupe ono što olakšava fenolima da posle doniranja elektrona ne postanu slobodni radikali. Naime, atom kiseonika iz fenolne grupe zbog velike elektronegativnosti privlači delokalizovane π -elektrone iz benzenovog prstena, pri čemu se stvara centar negativnog naelektrisanja, što olakšava ovim jedinjenjima da otpuste jedan elektron, a da se njihova stabilnost pri tome ne naruši.

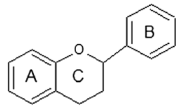
Flavonoidi su prisutni u svim organima biljaka, najčešće kao pigmenti. Osnovni strukturalni skelet flavonoida čini 15 atoma ugljenika u osnovnoj strukturi

Nataša Diklić (1994), *Apatin, Prigrevačka 5, učenica 2. razreda Gimnazije „Nikola Tesla” u Apatinu*

Natalija Arsić, (1994), *Beograd, Dr Ivana Ribara 162/32, učenica 2. razreda Prve beogradske gimnazije*

MENTOR:
dipl. inž. Marija Radojković, istraživač saradnik, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

(C6-C3-C6) od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenov prsten A, kondenzovan sa piranskim prstenom C). Ostalih šest C-atoma čine benzenov prsten (B) povezan sa benzopiranskim prstenom na ugljenikovom atomu C2 (flavoni, dihidroflavoni, flavonoli, katehini, flavani i antocijanidini), C3 (izoflavonoidi) i C4 (4-fenil-kumarini). Sistem koji čine A i C prsten naziva se benzo-1-piran-4-hinon (slika 2).



Slika 2. Osnovni strukturni skelet flavonoida

Figure 2. General structural skeleton of flavonoids

Zbog svoje široke rasprostranjenosti, flavonoidi su najbolje ispitani sekundarni metaboliti biljaka. Ispoljavaju brojna povoljna dejstva, kao što su anti-inflamatorno, antialergijsko, analgetičko, antibakterijsko, antivirusno i antimikotičko (Havsteen 2002).

Ranije su se radi upotrebe u komercijalne svrhe farmaceutske ili kozmetičke industrije najviše koristili sintetički antioksidansi. Međutim, dokazano je da su neki od njih štetni po zdravlje ljudi. Zbog toga se počelo tragati za prirodnim antioksidansima koji će u što većoj meri uspešno zameniti veštačke. Pošto biljke predstavljaju izvor prirodnih antioksidanasa, u poslednjih nekoliko godina sve se više ispituju antioksidativne osobine raznovrsnih biljaka.

Leska (*Avellana Corylus*) je višegodišnja biljka iz porodice Corylaceae. Delovi leske koji se najviše koriste u komercijalne svrhe su sam plod, njegov perikarp i kožica, i seme. Dokazano je da su svi delovi lešnika i seme bogati izvori kako fenola, tako i brojnih proteina, minerala (kalijuma, kalcijuma, magnezijuma, selen) i vitamina (Alasalvar i sar. 2003; Kornsteiner i sar. 2006), te da su potencijalno pogodni za upotrebu u izradi dijetetskih ili kozmetičkih proizvoda. Ranija istraživanja samog lišća leske vršena su u cilju određivanja organohlornih pesticida (Barriada-Pereira i sar. 2004), sadržaja hormona (Andres i sar. 2002), policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Howsam i sar. 2000), slobodnih poliamina (Rey i sar. 2005), fenolnog sastava (Amaral i sar. 2005), kao i određivanja antioksidativnih osobina njihovog vodenog ekstrakta (Oliveira i sar. 2007), ali

do sada nisu vršene analize antioksidativnih karakteristika metanolnog, etanolnog i acetonskog ekstrakta.

Cilj ovog rada jeste određivanje osobina i antioksidativne aktivnosti ekstrakata lista leske, kao i određivanje zavisnosti antioksidativne aktivnosti od primenjenog ekstrakta.

Materijal i metode

U radu su korišćene supstance čistoće p. a. Biljni materijal potiče iz Velikog sela u okolini Loznice, osušen je prirodnim putem, isitnjen laboratorijskim mlinom i prosejan kroz sito veličine otvora 1.5 mm. Spektrofotometrijska merenja rađena su na spektrofotometru CECIL CE 2021, Great Britain.

Priprema ekstrakata

Osušeni i isitnjeni biljni materijal maceriran je svakim od četiri ekstrakta (smešama metanol/voda, etanol/voda i aceton/voda (70/30, v/v) i čistim etil-acetatom) u odnosu 1:15 (m/v), tokom 24 h. Radi što efikasnije ekstrakcije aktivnih materija iz biljnog materijala primenjena je trostuka maceracija.

Ispitivanje hemijskog sastava

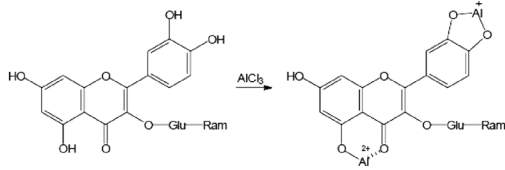
Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima (Metoda po Folin-Ciocalteu). Metod po Folin-Ciocalteu zasniva se na merenju redukcione sposobnosti fenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon koji redukuje Folin-Ciocalteu-ov reagens (FCR) do plavo obojenog jona (fenol-MoW₁₁O₄₀)⁴⁻. Intenzitet obojenosti srazmeran je koncentraciji fenolnih jedinjenja (Mitrović 2008).

Reakcioni sistem je dobijen mešanjem 0.1 mL ekstrakta, 7.9 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu) i 1.5 mL 20% (m/m) rastvora natrijum-karbonata (Merk-Alkaloid). Slepa proba pripremljena je mešanjem 8 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR i 1.5 mL 20% natrijum-karbonata. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h izmerena je apsorbancija na 750 nm. Kao standard korišćena je galna kiselina (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu).

Na osnovu izmerenih apsorbanci ispitivanih rastvora ekstrakata izračunavana je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja za svaki uzorak, odnosno sadržaj ukupnih fenola sračunatih na galnu kiselinu (izražena preko miligramama galne kiseline kao ekvi-

valenta (GA) po jednom gramu čistog biljnog materijala (D)).

Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima (Metoda po Markam-u). Ova spektrofotometrijska metoda zasniva se na kompleksiranju flavonoida sa aluminijum(III)-jonima (slika 3).



Slika 3. Struktura rutina i njegovog kompleksa sa aluminijumom

Figure 3. Structure of rutin and its complex with aluminium

Dobijeni ekstrakti su upareni na vakuum uparivaču i rastvoreni u rastvoru za ekstrakciju (metanol : voda : sirćetna kiselina (Zorka Šabac); 14 : 5 : 1 v/v/v) u odnosu 1 : 1 (v/v). U 5 mL ekstrakta dodato je 1 mL destilovane vode i 2,5 mL reagensa AlCl_3 (dobijenog mešanjem 133 mg $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Merk) i 400 mg CH_3COONa (Euro Hemija)). Slepa proba pripremljena je mešanjem 6 mL rastvora za ekstrakciju i 2,5 mL AlCl_3 reagensa. Apsorbanca je merena nakon pripremanja reakcione smeše na talasnoj dužini od 430 nm. Kao standard korišćen je rutin (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu).

Na osnovu kalibracione krive rutina, kao standarda, izračuna se ukupni sadržaj flavonoida, izražen preko miligrama rutina kao ekvivalenta (R) u gramu droge (D).

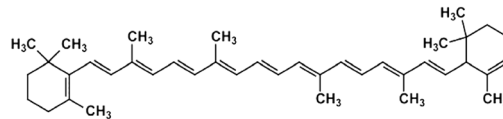
Određivanje antioksidativnih karakteristika

Određivanje redukcionne moći (Metod po Oy-aizu). U 1 mL rastvora ekstrakata različitih koncentracija dodato je 1 mL 0.2 M natrijum-fosfatnog (Fluka A. G.) pufera (pH = 6.6) i 1 mL 1% kalijum-heksacijanoferata(III) (Merk). Smeša je inkubirana na 50°C 20 min. Nakon dodatka 1 mL 10% (m/m) trihlorsirćetne kiseline (Centrohema), smeša je centrifugirana na 2000 obrtaja 10 minuta. Jedan mililitar ove smeše je pomešan sa 1 mL destilovane vode i 0.2 mL 0.1% (m/m) gvožđe(III)-hlorida (Zorka Šabac).

Nakon 10 minuta izmerena je apsorbanca na 700 nm. Kao standard upotrebljen je vitamin C (Centrohema).

Koncentracija ekstrakta koja ima apsorbancu od 0.5 (EC_{50}) i redukuje 50% prisutnih Fe^{3+} jona u Fe^{2+} jone izračuna se sa grafika apsorbance u zavisnosti od koncentracije ekstrakta i izražava se kao masena koncentracija biljnog materijala.

Određivanje sposobnosti zaustavljanja lipidne peroksidacije. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ispitivana je na modelu β -karotena. Ova metoda je jedna od *in vitro* metoda koja je najbliža *in vivo* uslovima zbog čega se vrlo često koristi za određivanje sposobnosti zaustavljanja lipidne peroksidacije. Do oksidacije β -karotena dolazi zbog raskidanja dvostruke veze, što dovodi do gubitka hromofore. Dodatkom antioksidansa u sistem sprečava se apstrakcija vodonika iz dialilnih metilenskih grupa linolne kiseline, čime se direktno sprečava oksidacija β -karotena (slika 4) (Kennedy i Liebler 1991; Tsuchihashi i sar. 1995).



Slika 4. Strukturna formula β -karotena

Figure 4. Structural formula of β -carotene

Rastvor β -karotena pripremljen je rastvaranjem 2 mg β -karotena (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu) u 10 mL hloroforma (Lahner). Dva mililitra rastvora β -karotena ispipetirano je u balon od 100 mL. Nakon što je hloroform otparen na 40°C na vakuum uparivaču, u balon je dodato 40 mg linolne kiseline (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu), 400 mg emulgatora Tween-a 80 (Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu). Zatim je uz mešanje balon dopunjen vodom do crte. Alikvoti (5 mL) ove emulzije su dodati u epruvete koje sadrže po 0.2 mL ekstrakata lista leske različitih koncentracija. Izmerena je početna apsorbanca uzorka na 470 nm. Uzorak je inkubiran na 50°C u vodenom kupatilu. Apsorbanca je očitana i nakon 2 sata. Kontrola sadrži 0.2 mL vode i 5 mL emulzije β -karotena i linolne kiseline. Slepa proba pripremljena je

mešanjem 40 mg linolne kiseline i 400 mg Tween-a 80 u balonu od 100 mL, koji je dopunjen destilovanom vodom do crte. Kao standard korišćen je butil-hidroksitoluen (BHT) (Centohem).

Brzina degradacije β -karotena u uzorku izračuna se prema jednačini:

$$V = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{A_0}{A_k}$$

gde je A_0 apsorbanca na početku analize, A_k apsorbanca nakon dva sata, a $t = 120$ min.

Na osnovu dobijene brzine degradacije β -karotena izračunat je procenat antioksidativne aktivnosti (AOA) prema sledećoj formuli:

$$AOA(\%) = \frac{V_k - V_u}{V_k} \times 100\%$$

gde je V_k brzina degradacije u kontroli, a V_u brzina degradacije β -karotena u uzorku.

Koncentracija ekstrakta potrebna da inhibira degradaciju β -karotena 50% u odnosu na kontrolu (EC_{50}) izračunata je sa grafika procenta antioksidativne aktivnosti u odnosu na koncentraciju ekstrakta i izražena je preko masene koncentracije droge.

Rezultati i diskusija

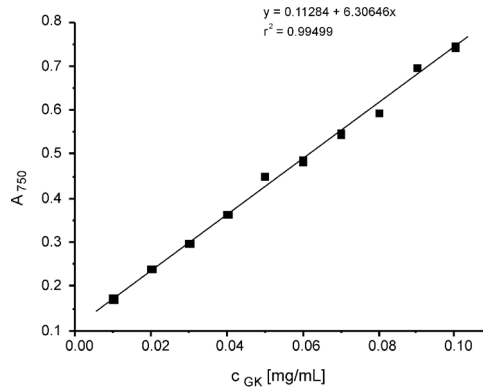
Ispitivanje hemijskog sastava

Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima. Na osnovu podataka koji su prikazani na slici 5. izračunate su koncentracije fenola izražene preko galne kiseline kao ekvivalenta prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima

Vrsta ekstrakta	Koncentracija fenola [mg GK /g D]
Etanolni ekstrakt	17 ± 3
Metanolni ekstrakt	18 ± 2
Acetonski ekstrakt	25 ± 4
Etil-acetatni ekstrakt	–

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima različitih rastvarača zavisi od prirode rastvarača, ali i prirode ekstrahovanih materija. Ovi rezultati pokazuju da je primenom acetona kao ekstragensa



Slika 5. Zavisnost apsorbance uzoraka od koncentracije galne kiseline

Figure 5. Absorbance of samples as a function of gallic acid concentration

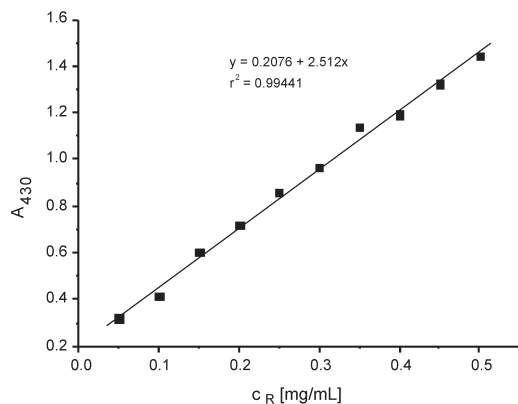
ekstrahovana najveća količina fenola iz droge, dok koncentracija fenola u etil-acetatnom ekstraktu nije određena zbog prisustva izuzetno male količine ekstrahovanih fenolnih jedinjenja, što je i očekivano, s obzirom na polarnost rastvarača.

Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima. Na osnovu kalibracione krive rutina kao standarda, prikazane na slici 6, izračunate su koncentracije flavonoida u već pripremljenim ekstraktima i te vrednosti date su u tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima

Vrsta ekstrakta	Koncentracija flavonoida [mg R /g D]
Etanolni ekstrakt	9.9 ± 0.2
Metanolni ekstrakt	3.057 ± 0.009
Acetonski ekstrakt	11.2 ± 0.1
Etil-acetatni ekstrakt	2.84 ± 0.17

Na osnovu vrednosti koje su prikazane u tabeli 1. i 2. uočava se razlika u ekstrahovanoj količini fenola i flavonoida iz lista leske. Najviše flavonoida sadrži acetonski ekstrakt, a najmanje etil-acetatni, što je u skladu sa već dobijenim rezultatima sadržaja ukupnih fenola. Velika efikasnost ekstrakcije flavonoida acetona, osim njihove slične polarnosti, pretpostavlja se da potiče i od moguće reakcije među njima – flavonoida kao nukleofila i acetona kao elektrofila. Sa



Slika 6. Grafik zavisnosti apsorbance uzorka od koncentracije rutina

Figure 6. Absorbance of samples as a function of rutin concentration

druge strane, pokazano je da je prisutna značajno veća količina flavonoida u etanolnom nego u metanolnom ekstraktu, što nije u skladu sa rezultatima sadržaja ukupnih fenola u ova dva ekstrakta. Međutim, ako se u obzir uzme polarnost, moguće je objasniti zašto se pokazalo da je etanol podesniji rastvarač flavonoida od metanola.

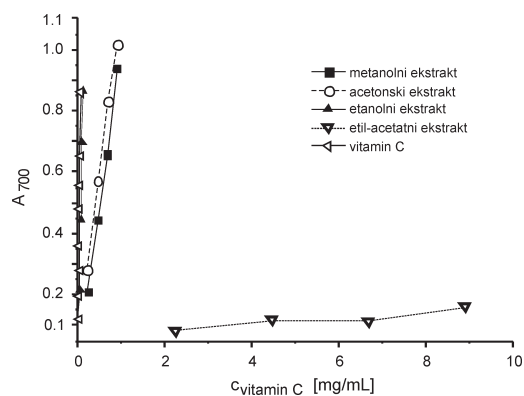
Odnos ukupne količine ekstrahovanih materija i udeo flavonoida je prikazan u tabeli 3. i pokazuje da fenolni sastav ekstrakata obuhvata i neflavonoidne grupe jedinjenja.

Tabela 3. Udeo flavonoida u fenolnim jedinjenjima

Vrsta ekstrakta	Udeo flavonoida (%)
Etanolni ekstrakt	58.8
Metanolni ekstrakt	17.2
Acetonski ekstrakt	45.8
Etil-acetatni ekstrakt	–

Određivanje antioksidativnih karakteristika

Određivanje redukcionog moći. EC_{50} vrednosti za uzorke i standard prikazane su u tabeli 4 i određene su na osnovu grafika apsorbance u zavisnosti od koncentracije droge, odnosno vitamina C kao standarda (slika 7).



Slika 7. Grafik zavisnosti apsorbance uzoraka i standarda od koncentracije droge i vitamina C

Figure 7. Absorbance of samples and standard as a function of drug and vitamin C concentration

Pokazano je da redukciona moć uzoraka raste sa porastom koncentracije ekstrakta i standarda u njima. Svi uzorci su pokazali manju redukcionu moć od vitamina C. Etanolni ekstrakt je pokazao najjaču redukcionu moć, najbližnju vitaminu C, iako je EC_{50} vrednost uzorka sa etanolnim ekstraktom značajno veća od EC_{50} vrednosti standarda.

Tabela 4. EC_{50} vrednosti za uzorke i standard

Uzorak	EC_{50} (mg/mL)
Etanolni ekstrakt	0.072
Metanolni ekstrakt	0.497
Acetonski ekstrakt	0.398
Etil-acetatni ekstrakt	–
Standard (Vitamin C)	0.031

Određivanje sposobnosti zaustavljanja lipidne peroksidacije. Step en inhibicije lipidne peroksidacije određen je za sve vrste ekstrakta osim za etil-acetatni ekstrakt, zbog nemešanja etil-acetatnog sloja sa emulzijom β -karotena i linolne kiseline sa Tween-om 80.

Dobijene EC_{50} vrednosti za ispitane uzorke prikazane su u tabeli 6. i njihovim poređenjem uočava se neznatna razlika među uzorcima, što može upućivati na činjenicu da su jedinjenja iz različitih frakcija, koja su odgovorna za inhibiranje oksidacije lipida, slične strukture. Ovim ispitivanjem utvrđeno

Tabela 5. Procenat antioksidativne aktivnosti uzoraka u lipidnom model-sistemu

Vrsta ekstrakta	Koncentracija ekstrakta		
	0.0555 mg/mL	0.111 mg/mL	2.222 mg/mL
Metanolni ekstrakt	27.631	39.757	53.234
Etanolni ekstrakt	21.405	46.270	60.144
Acetonski ekstrakt	14.499	40.694	57.288
Etil-acetatni ekstrakt	–	–	–

je da aktivne komponente iz svih ispitivanih ekstrakata imaju manju sposobnost zaustavljanja lipidne peroksidacije (EC_{50} uzorka $\gg EC_{50}$ standarda) od upotrebljenog standarda BHT.

Tabela 6. EC_{50} vrednosti za uzorke i standard

Vrsta ekstrakta	EC_{50} (mg/mL)
Metanolni ekstrakt	1.593
Etanolni ekstrakt	1.637
Acetonski ekstrakt	1.814
Etil-acetatni ekstrakt	–
Standard (BHT)	0.050

Upoređujući dobijene rezultate sa rezultatima istraživanja antioksidativnih karakteristika vodenih ekstrakata ploda leske (Oliveira i sar. 2008), može se zaključiti da je list bogatiji fenolnim jedinjenjima, kao i da ima veću redukcionu moć i sposobnost zaustavljanja lipidne peroksidacije. U poređenju sa antioksidativnim osobinama vodenog ekstrakta lista tri različite vrste leske (Oliveira i sar. 2007), može se zaključiti da etanolni ekstrakt ispoljava značajnije veću redukcionu moć od sve tri vrste, što nije slučaj sa metanolnim i acetonskim, kao i da i metanolni i etanolni i acetonski ekstrakt poseduju veću moć zaustavljanja procesa lipidne peroksidacije na modelu β -karotena u odnosu na dve od tri ispitivane vrste leske, što nam pokazuje da se lišće leske može uspešno iskoristiti kao izvor prirodnih antioksidanasa.

Zaključak

Dobijeni podaci pokazuju da količina ekstrahovane materije zavisi kako od droge, tako i od upotrebljenog ekstragensa. Rezultati su pokazali da je upotreba smeše aceton/voda najpogodnija za ekstra-

hovanje kako flavonoida, tako i većine ostalih fenolnih jedinjenja, etanol/voda ekstragens čiji ekstrakt ispoljava najveću redukcionu moć, dok smeša metanol/voda daje ekstrakt čija je sposobnost zaustavljanja lipidne peroksidacije najveća. Očekivano, pokazano je i da je ekstrakt dobijen ekstrakcijom biljnog materijala čistim etil-acetatom najsiromašniji i flavonoidima i ostalim fenolima, da skoro i ne pokazuje redukcionu moć, kao i to da u najmanjoj meri zaustavlja proces lipidne peroksidacije. U nameri da se u što većoj meri sintetički antioksidansi zamene prirodnim, svi ekstrakti korišćeni u ovom ispitivanju, osim etil-acetatnog, mogu se iskoristiti za dalja ispitivanja radi potencijalne upotrebe u komercijalne svrhe farmaceutske ili kozmetičke industrije.


Literatura

- Alasalvar C., Shahidi F., Liyanapathirana C. M., Ohshima T. 2003. Turkish tumbul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1 Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3790.
- Amaral J.S., Andrade P.B., Ferreres F., Pinheiro C., Santos A., Valentao P. 2005. Phenolic of hazel (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars grown in Portugal. *Natural Product Research*, **19**: 157.
- Andres H., Fernandez B., Rodriguez A., Rodriguez R. 2002. Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **70**: 173.
- Barriada-Pereira M., Fernandez-Fernandez E., Gonzalez-Castro M. J., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D. 2004. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, **1061**: 133.

- Contini M., Baccelloni S., Massantini R., Anelli G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, **110**: 659.
- Havsteen B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96**: 67-202.
- Howsam M., Ineson P., Jones K. C. 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I – Concentrations and profiles. *Environmental Pollution*, **108**: 413.
- Kornsteiner M., Wagner K.H., Elmadfa I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, **98**: 381.
- Kennedy T. A., Liebler D. C. 1991. Peroxy radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides. *Chemical Research in Toxicology*, **4**: 290.
- Mitrović B. 2008. Ekstrakcija i analiza različitih vrsta suvih pečuraka. Diplomski rad. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
- Oliveira I., Sousa A., Morais S. J., Ferreira C. F. R. I., Bento A., Estevinho L., Pereira A. 2008. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 1801.
- Oliveira I., Sousa A., Valentao P., Andrade B. P., Ferreira C. F. R. I., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L., Pereira J. A. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*, **105**: 1018.
- Rey M., Diaz-Sala C., Rodriguez R. 1998. Free polyamine content in leaves and buds of hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Negret) trees subjected to repeated severe pruning. *Scientia Horticulturae*, **76**: 115.
- Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki, E. 1995. Action of beta-carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, **323** (1): 137.

Nataša Diklić and Natalija Arsić

Determination of Characteristics and Antioxidant Activity of the Extracts From Hazel Leaf (*Avellana Corylus* L.)

The aim of this study was to determine the content of polyphenolic compounds and antioxidant potential of methanol, ethanol, acetone and ethyl acetate extract of hazel leaf, as well as the determination of their dependence on the applied solvent. The total content of phenols and flavonoids and antioxidant activity were examined using spectrophotometric methods. Antioxidant activity was determined by examining the reducing power and the ability to inhibit process of lipid peroxidation using the β -carotene linoleate model system. The results showed that the hazel leaf is a rich source of polyphenolic compounds, and hence its extracts have high antioxidant potential. Also, the testing showed that acetone extract contains the most flavonoids and other polyphenols, that ethanol extract exhibits the highest reducing power and methanol the greatest ability to inhibit process of lipid peroxidation, while it was shown that ethyl acetate extract is the poorest in flavonoids and other phenolic compounds, and therefore almost not demonstrating reducing power and significantly less inhibits the process of lipid peroxidation in relation to all other extracts tested. 

Ispitivanje uticaja temperature sušenja elektroda na kapacitet punjivih litijum-jonskih baterija

U ovom radu eksperimentalno je ispitan uticaj temperature sušenja elektroda od modifikovanog V_2O_5 na kapacitet dopunjivih litijum-jonskih baterija. Optimalna temperatura sušenja gela je bitna za poboljšanje karakteristika baterija ovog tipa. Gelovi sušeni na različitim temperaturama su pokazali različite osobine, stabilnost inicijalnog napona i kapacitet.

The Effects of Drying Temperature of Electrodes on the Capacity of Rechargeable Lithium-Ion Batteries

In this experimental study the effects of the electrode drying temperature (which were made of V_2O_5) on the capacity of rechargeable lithium-ion batteries were examined. The optimal gel drying temperature is important for the improvement of the characteristics of this type of batteries. The gels dried at different temperature have shown different electrochemical attributes like initial voltage stability and capacity.

Marko Kostić (1992), Obrenovac, Miloša Obrenovića 150, učenik 4. razreda Poljoprivredno-hemijske škole u Obrenovcu

Edvin Fako (1992), Vršac, Crnog Jovana 46, učenik 4. razreda Hemijsko-medicinske škole u Vršcu

MENTOR: dr Igor Pašti, Fakultet za Fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu