

---

Miloš Selaković

# Ispitivanje uticaja olova(II) na primarni i sekundarni metabolizam kukuruza primenom HPLC/MS i GC/MS metode

---

*Ispitivan je uticaj olova(II) na primarni i sekundarni metabolizam kukuruza (Zea Mays) primenom HPLC/MS i GC/MS metode. Ispitivanje je rađeno tako što su sadnice kukuruza tretirane rastvorima olovo(II)-nitrata koncentracija u opsegu 5-50 mg/L tokom 30 dana i praćen je sadržaj fenolnih jedinjenja i drugih biomolekula u biljnim ekstraktima nakon tretiranja. Uočeno je da se koncentracija fenolnih jedinjenja i aminokiselina povećava prilikom tretiranja biljaka rastvorom olova(II) koncentracije 5 mg/L u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe koncentracija ove dve klase jedinjenja postepeno se smanjuje sa povećanjem koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su biljke tretirane.*

---

## Uvod

Jone teških metala, sa kojima dođe u kontakt, biljka najviše apsorbuje korenom, zajedno sa vodom, dok manji deo apsorbuje listovima kroz pore. Apсорbovani, ovi joni izazivaju štetne efekte po biljku, poput smanjene reprodukcije i smanjene sinteze hranljivih materija. Štetna dejstva teških metala mogu se podeliti na: (1) stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, (2) supstituciju esencijalnih metalnih jona jonima teških metala i (3) vezivanje za funkcionalne grupe biomolekula kao što su proteini i nukleinske kiseline, čime se narušava njihova struktura i smanjuje ili u potpunosti zaustavlja njihiva aktivnost.

Objašnjeno je nekoliko mehanizama kojima se biljka brani od stresa izazvanog jonima teških metala. Na primer, povećana sinteza fenolnih jedinjenja u ćelijskom zidu ćelija korena čime se smanjuje apsorpcija teških metala zajedno sa vodom; zatim kompleksacija teških metala u ćeliji (npr. pomoću cisteina, raznih fenolnih jedinjenja) ili biosinteza enzima i antioksidanasa koji smanjuju broj reaktivnih kiseoničnih vrsta (Michalak 2006).

---

*Miloš Selaković  
(1996), Užice, Dr  
Veselina  
Marinkovića 4,  
učenik 2. razreda  
Užičke gimnazije*

*MENTOR: Gordana  
Krstić, master  
hemičar,  
istraživač-pripravnik  
IHTM*

U ovom radu su ispitivani odbrambeni mehanizmi kukuruza (*Zea Mays*) na prisustvo povećane koncentracije olova(II) u zemljištu. Biljke kukuruza tretirane su rastvorom olovo(II)-nitrata, a potom je praćena koncentracija fenolnih jedinjenja i drugih biomolekula u biljkama. Promena koncentracije fenolnih jedinjenja praćena je Folin-Ciocalteu-ovom metodom, dok je promena koncentracije ostalih metabolita praćena primenom HPLC/MS i GC/MS tehnika. Takođe, u biljnom materijalu je određen i sadržaj olova atomskom apsorpcionom spektrometrijom.

## Materijal i metode

Semena kukuruza postavljena su na vlažnu vatu u Petrijevim šoljama i tokom 72 h puštena da klijaju u mraku. Iskljajala semena preneti su u 18 posuda za gajenje sa zemljom, tako da se u svakoj posudi nalazilo po sedam semena. Biljke su zalivane svakog trećeg dana od dana presađivanja (ukupno šest puta) sa po 200 mL Hoagland-ovog rastvora (Hoagland *et al.* 1950). Na ovaj način biljkama su obezbeđeni svi potrebni nutritienti kako bi se eliminisao poremećaj metabolizma usled nedostatka nekog osnovnog nutritienta.

Počev od desetog do tridesetog dana od dana presađivanja, sadnice su zalivane svakog trećeg dana sa po 200 mL rastvora olovo(II)-nitrata određene koncentracije, odnosno destilovanom vodom kod kontrolne probe. Jednu probu (uzorak) činilo je 7 sadnica biljaka koje su se nalazile u istoj posudi za gajenje. Uzorci su tretirani sa ukupno 5 različitih koncentracija rastvora olova(II) i to: 5, 10, 20, 30 i 50 mg/L. Nakon tridesetog dana od dana presađivanja nadzemni deo biljnog materijala je uzorkovan i sušen na vazduhu 14 dana. Potom je osušeni biljni materijal samleven.

Za određivanje sadržaja olova(II) odmereno je 0.1 g suvog biljnog uzorka za mokru digestiju. Mokro spaljivanje je vršeno na sledeći način: odmerenoj masi biljnog materijala dodato je 12 mL smeše koncentrovane  $\text{HNO}_3$  i 71%  $\text{HClO}_4$  (u odnosu 2 : 1). Dobijena smeša je zagrevana na temperaturi ne većoj od 210°C. Nakon zaostajanja belog peskovitog taloga, uzorci su ohlađeni i profiltrirani. Filtrat je prenet u normalni sud od 50 mL i sud je dopunjen do crte destilovanom vodom (Allan 1971). Na ovaj način pripremljeni su uzorci u kojima je određivana koncentracija olova pomoću atomskog apsorpcionog spektrometra Thermo Electron corporation S Series AA Spectrometar.

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola, kao i analizu ostalih metabolita odmereno je 0.1 g suvog biljnog materijala i iz njega su ekstrahovana jedinjenja rastvorna u vodi i etanolu. Ekstrakcija je raćena 30%-nim vodenim rastvorom etanola (15 mL) uz refluktovanje od sat vremena. Dobijeni ekstrakt je proceđen, a rastvarać uparen na rotacionom vakuum uparivaću.

Deo suvog ekstrakta uzoraka rastvoren je u odgovarajućoj zapremini metanola tako da je koncentracija dobijenih rastvora bila 10 g/L. Dobijeni rastvori razdvajani su na HPLC-u (Agilent Technologies 1260 Infinity). Korišćeni su detektori DAD (tok hromatografisanja je praćen na talasnim dužinama od 210, 240, 254, 280 i 340 nm), kao i maseni spektrometar (Agilent Technologies 6130 Quadrupole). Kao mobilna faza korišćena je

smeša 0.2% rastvora sirćetne kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B) po sledećoj metodi: 0-5 min 90-70% A, 5-12 min 70-10% A, 12-14 min 10-0% A, 14-15 min 0-90% A (post time 5 min). Temperatura kolone je 30°C, a protok 1 mL/min. Razdvajanje je rađeno na koloni Zorbax Eclipse XDB C18 (50 × 4.6 mm, 1.8 µm).

Deo suvog ekstrakta uzorka koji su tretirani rastvorima olova(II) koncentracije 5, 10, 20, 30 i 50 mg/L i kontrolne probe, rastvoren je u odgovarajućoj zapremini dihlormetana tako da je koncentracija rastvora iznosila 10 g/L. Dobijeni rastvori su procedeni kroz filtere (RC 0.45 µm, Agilent). U 100 µL dobijenog filtrata dodato je 50 µL smeše za silanizovanje – BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroetanamid) i 0.1% TMCS (Trimetilsililhlorid). Rastvor je potom termostatiran 30 minuta na 60°C. Uzorak je ohlađen do sobne temperature i analiziran gasnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom. Razdvajanje je rađeno na uređaju Agilent Technologies 7890A GC system: inicijalna temperatura pećnice bila je 60°C, zatim se temperatura povećavala brzinom od 3°C/min do 315°C, i na toj temperaturi je zadržana 10 min. Ukupno vreme analize iznosilo je 100 min. Razdvajanje je urađeno na HP-5 koloni (dužina kolone 30 m, prečnik kolone 0.20 mm, debljina filma 0.10 µm). Maseni spektri razdvojenih jedinjenja snimani su pomoću uređaja Agilent Technologies 7890A GC system 7890A GC/240 MS ION TRAP system.

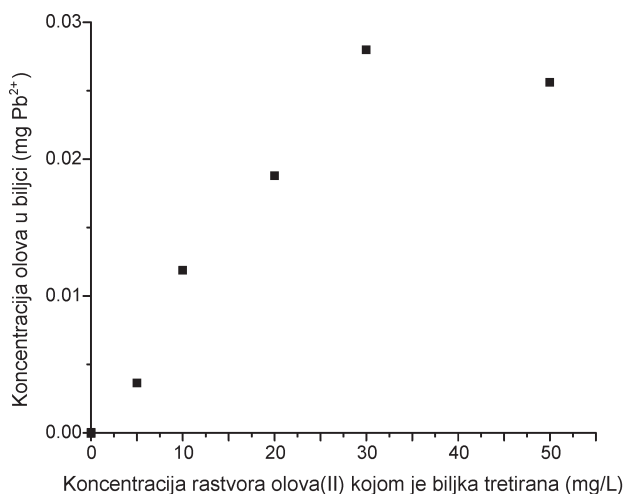
Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima određivan je u uzorcima rastvorenim u etanolu po proceduri Folin-Ciocalteu-a. Po 0.1 mL ekstrakta ili standarda galne kiseline (koncentracije 50-500 µg/mL) dodato je 7.9 mL destilovane vode. Slepa proba umesto ekstrakta sadržala je ukupno 8 mL destilovane vode. U rastvor uzorka dodat je Folin-Ciocalteu-ov reagens za fenole (0.5mL), a zatim nakon 5 minuta i 1.5 mL 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Gorunović 1995). Smeša se energično meša i nakon inkubacije (120 minuta) na sobnoj temperaturi izmerena je absorbanca na 750 nm pomoću spektrofotometra Iskra AM5923. Korišćena je staklena kiveta optičkog puta 1 cm. Ukupni fenoli se izražavaju kao ekvivalent galne kiseline (GKE) po masi suvog ekstrakta.

Za pripremu Hoagland-ovog rastvora korišćeni su kalcijum-nitrat, kalijum-nitrat, kalijum-dihidrogenfosfat, magnezijum-sulfat, borna kiselina, mangan(II)-hlorid tetrahidrat, cink-sulfat heptahidrat, bakar(II)-sulfat pentahidrat, natrijum-molibdat, natrijum-EDTA, gvožđe(II)-sulfat. Za tretiranje biljaka korišćen je rastvor olovo(II)-nitrata. Takođe u eksperimentalnom radu korišćene su i sledeće hemikalije i reagensi: Folin-Ciocalteu-ov reagens, galna kiselina, natrijum-karbonat, etanol, azotna kiselina, perhlorna kiselina, dihlormetan, reagens za silanizaciju (BSTFA + 0.1% TMCS, GC čistoće), metanol (HPLC čistoće), acetonitril (HPLC čistoće) i voda (HPLC čistoće). Sve navedene hemikalije su p.a. čistoće, sa izuzetkom reagenasa za HPLC i GC analize.

## Rezultati i diskusija

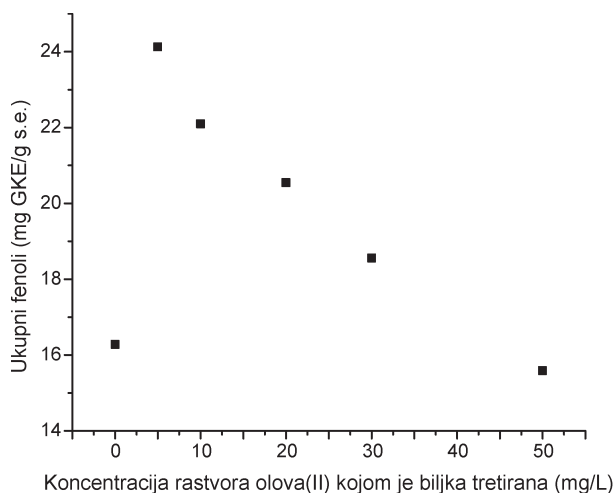
Dobijeni rezultati za koncentracije olova u biljkama i za koncentraciju ukupnih fenola predstavljaju prosečnu vrednost uzoraka tretiranih na isti način. Vrednosti koncentracija olova u biljkama prikazane su na slici 1.

Iz dobijenih rezultata može se videti da se koncentracija olova u biljka linearno povećava sa povećanjem koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim je biljka tretirana do koncentracije rastvora od 30 mg/L. Nakon ove vrednosti, zbog malog broja tačaka, ne može se pratiti trend promene koncentracije olova u biljkama u zavisnosti od koncentracije prisutnog olova u zemljištu. Ako se koncentracija usvojenog olova ustalila pri tretiranju biljaka rastvorima većih koncentracija to bi se moglo objasniti oštećenjem sprovodnih sudova koji transportuju jone iz korena u nadzemne delove.



Slika 1. Zavisnost koncentracije olova(II) u biljkama od koncentracije rastvora olova(II) kojom su biljke tretirane

Figure 1. Concentration of lead(II) in plants dependence on concentration of solutions of lead(II) which was used for plants' treatments



Slika 2. Zavisnost koncentracija fenolnih jedinjenja u biljkama od koncentracije rastvora olova(II) kojima su biljke tretirane

Figure 2. Concentration of phenolic compounds in plants dependence on concentration of solutions of lead(II) which was used for plants' treatments

Ukupni fenoli u uzorcima računati su kao ekvivalent galne kiseline prema sledećoj jednačini:

$$A_{750} = 0.00093 \cdot c(\text{GK}) - 0.02055$$

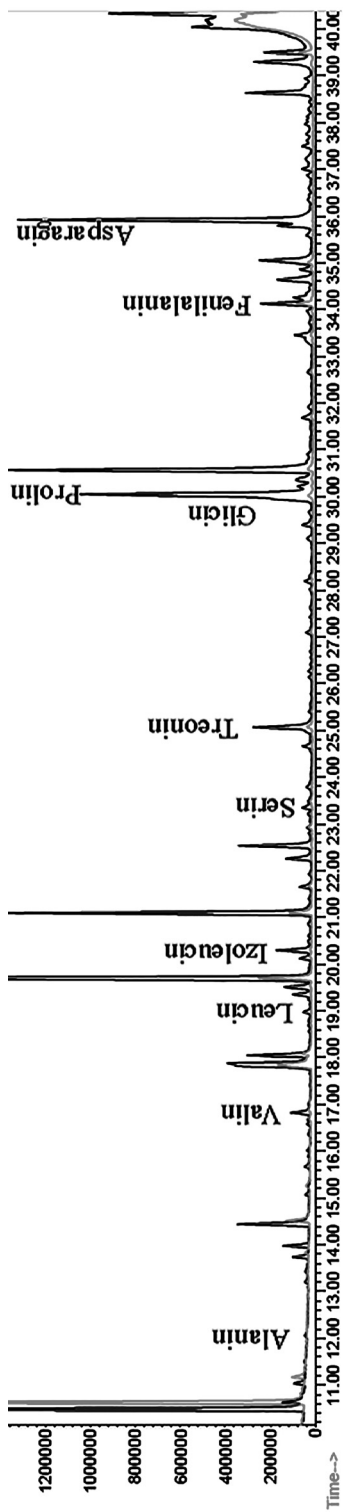
Data jednačina dobijena je na osnovu kalibracione krive za galnu kiselinu kao standarda za fenolna jedinjenja. Vrednosti ukupnih fenola u biljkama prikazani su na slici 2.

Dobijeni rezultati pokazuju da se koncentracija fenolnih jedinjenja u biljkama povećala u odnosu na kontrolnu grupu pri tretiranju biljaka sa početnom koncentracijom rastvora olovo(II)-nitrata. Međutim ako se koncentracija rastvora olova(II) kojim su biljke tretirane poveća iznad 5 mg/L, dolazi do pada koncentracije fenolnih jedinjenja u biljkama. Ovo se može objasniti time što pri većim koncentracija dostupnog olova(II) u biljne ćelije dolazi do degradacije ili blokiranja enzima koje katalizuju sintezu fenolnih jedinjenja. Takođe, smanjenje fenolnih komponenti može značiti i to da ova jedinjenja reaguju sa nusproizvodima (kao što su slobodni radikali i sl.) koji nastaju prilikom dejstva olova(II) pa se koncentracija fenolnih jedinjenja smanjuje.

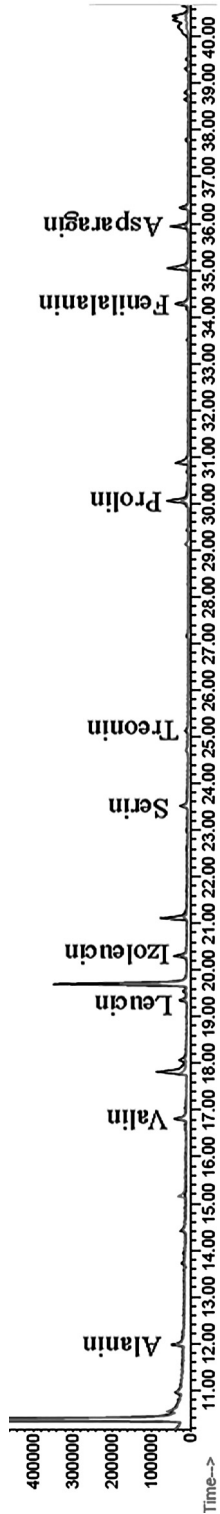
Za poređenje profila ekstrahovanih jedinjenja rastvornih u vodenom rastvoru etanola korišćena je HPLC tehnika. Na osnovu izgleda hromatograma dobijenog sa DAD detektora proizilazi da su uzorci tretirani najmanjom koncentracijom rastvora olovo(II)-nitrata (kao i kontrolne grupe), veoma složene smeše sa velikim brojem različitih klasa organskih jedinjenja, a da se pri povećanju koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su uzorci tretirani broj komponenta i različitih klasa jedinjenja smanjuje.

Na osnovu gasnih hromatograma identifikovan je veliki broj metabolita ekstrahovanih iz biljnog materijala. Preklapanjem hromatograma za različite uzorke može se uočiti promena koncentracije metabolita u ekstraktu. Na slici 3 prikazani su delovi hromatograma (od 10. do 40. min) za uzorke tretirane koncentracijama 5 i 50 mg/L (slika 3a), uzorke tretirane koncentracijama 10 i 20 mg/L (slika 3b) i uzorke tretirane koncentracijama 20 i 30 mg/L (slika 3c).

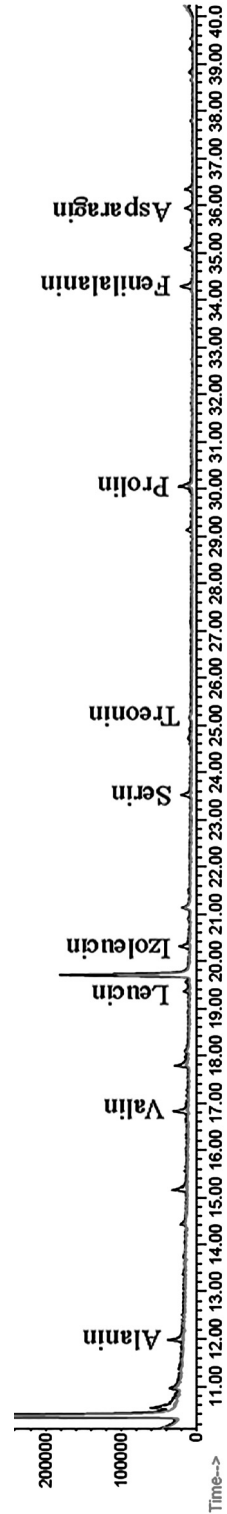
Na osnovu dobijenih hromatograma može se uočiti da se koncentracija svih ekstrahovanih aminokiselina povećala u uzorku tretiranog sa najmanjom koncentracijom rastvora olova(II) (5 mg/L) u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo se može objasniti činjenicom da su za sintezu enzima i proteina potrebne aminokiseline, i da se neki od enzima koriste za sintezu fenolnih jedinjenja koji su potrebni biljci za vezivanje nusprodukata nastalih dejstvom jona olova u ćeliji. Takođe možemo primetiti i da se koncentracija aminokiselina postepeno smanjuju pri povećanju koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su biljke tretirane. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je uzrok smanjenja koncentracije aminokiselina povećana sinteza potrebnih enzima za sintezu fenolnih jedinjenja ili blokiranje određenih enzima koji su potrebni za sintezu aminokiselina.



a



b



c

Slika 3 (naspramna strana). Deo hromatograma za uzorke kukuruza tretiranih rastvorima olova(II) koncentracija: a) 5 mg/L (crna linija) i 50 mg/L (siva linija); b) 10 mg/L (crna linija) i 20 mg/L (siva linija); c) 20 mg/L (crna linija) i 30 mg/L (siva linija)

Figure 3 (opposite page). Part of chromatograms of corns' samples which was treated with solution of lead(II) of concentration: a) 5 mg/L (black) and 50 mg/L (gray); b) 10 mg/L (black) and 20 mg/L (gray); c) 20 mg/L (black) and 30 mg/L (gray)

## Zaključak

Na osnovu dobijenih odnosa fenolnih komponenti i aminokiselina može se zaključiti da se biljna vrsta *Zea Mays* pri manjim koncentracijama olova koje apsorbuje brani povećanom sintezom fenolnih jedinjenja ili aminokiselina. Pri koncentracijama rastvora olova(II) većim od 5 mg/L biljka nije sposobna da se odbrani od štetnog dejstva olova, jer joni olova(II) najverovatnije denaturišu ili blokiraju enzime koji su potrebni za sintezu fenolnih jedinjenja i aminokiselina zamenom njihovog esencijalnog metalnog jona jonom olova(II) ili vezivanjem SH-grupa.

Praćenje promena koncentracija biljnih metabolita uzrokovanih dejstvom zagađivača primenom HPLC/MS i GC/MS metoda pokazalo se kao vrlo praktičano, jer se za relativno kratko vreme dobijaju koncentracije velikog broja jedinjenja prisutnih u biljnom materijalu. Klasične i spektrofotometrijske u poređenju sa HPLC/MS i GC/MS metodama ne daju dovoljno selektivne rezultate i ne mogu se koristiti za određivanje veoma malih koncentracija jedinjenja u uzorku.

## Literatura

- Allan J. E. 1971. *The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy*. Hamilton: Varion Techton
- Folin O., Ciocalteu V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of biological chemistry*, **73**: 627.
- Gorunović M. 1995. *Praktikum iz farmakognozije (hemijsko ispitivanje droga)*. Beograd: Jugohemija
- Hoagland D. R., Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular*, **347**: 1.
- Michalak A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, **15** (4): 523.
- Wojdy A., Oszmianski J., Czemyers R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**: 940.

---

*Miloš Selaković*

## Study of Influence Lead(II) on Primary and Secondary Metabolism of *Zea Mays* Using HPLC/MS and GC/MS Method

In this research corn's defense mechanisms of presence of increase concentration of lead(II) in soil was studied. The research was carried out the plant treated with solutions of different concentration of lead(II)-nitrate and after that followed by absorption lead using method of atomic absorption spectroscopy; concentration of all phenolic compounds by Fonic-Ciocalte method and concentration of other biomolecules in plant by HPLC/MS and GC/MS method.

Research has shown that plant species *Zea Mays* defend of lead's harmful action increasing the synthesis of phenolic compounds and amino acids. Phenolic compounds are probably used to eliminate by-products like reactive oxygen species which was generated by lead(II). Amino acids are probably used to synthesis of enzymes which catalyze synthesis of phenolic compounds. Also it should be noted that modern methods like HPLC and GC allow monitoring of changes in very small concentration of compounds which is included in primary and secondary metabolism, therefore there are very selective.



---

Milorad Anđelković

## Optimizacija uslova za biosorpciju bakar(II) jona iz otpadnih voda biomasom šišarice crnog bora (*Pinus nigra* L.)

---

*U ovom istraživanju određivani su optimalni uslovi za biosorpciju Cu(II) jona iz vodenog rastvora biomasom šišarica crnog bora (*Pinus nigra* L.). Efikasnost biosorpcije ispitivana je u zavisnosti od vremena kontakta, pH vrednosti rastvora, temperature i koncentracije biosorbenta. Neadsorbovana koncentracija jona bakra određivana je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Dobijeno je da adsorpcija Cu(II) jona raste s vremenom pri povećanju pH vrednosti rastvora, kao i da temperatura ne utiče značajno na efikasnost biosorpcije pa se biosorbent može koristiti u širem opsegu temperatura sa približno istom efikasnošću. Maksimum adsorpcije primećen je na temperaturi 70°C i pri pH 7.2, dok je najefikasnija regeneracija biosorbenta ostvarena na pH 3.0. Rezultati su pokazali da je biomasa šišarice crnog bora pogodan i efikasan biosorbent, sa visokim adsorpcionim kapacitetom (2.48 mg/g) za uklanjanje Cu(II) jona iz otpadnih voda. Rezultati takođe pokazuju da je najbolje poklapanje sa Langmirovim adsorpcionim modelom izoterme.*

---

### Uvod

Zagađenje voda jonima teških metala predstavlja problem globalnih razmera, a široka upotreba materijala od bakra predstavlja rizik od zagađenja (Ngah *et al.* 2002). Zbog toga se posebna pažnja posvećuje metodama za prečišćavanje otpadnih voda. Neki od procesa uklanjanja

metala iz otpadnih voda su: hemijska precipitacija, koagulacija, flotacija, reverzna osmoza, elektrodijaliza i jonska izmena. Međutim, mnogi od ovih procesa imaju značajne nedostatke: nepotpuno uklanjanje jona metala, skupa oprema, velika količina otpada, pa je od suštinskog značaja pronalažanje adekvatnijih metoda za prečišćavanje otpadnih voda.

Pod biosorpcijom se podrazumeva proces akumuliranja zagađivača biološkim materijalima (biosorbentima) metaboličkim ili fizičko-hemijskim putem. Biosorpcija je reverzibilni hemijski proces koji se javlja kao posledica različitih afiniteta koji joni imaju prema sorbentu, pa joni sa većim afinitetom zamenjuju one jone sa manjim afinitetom. U poslednje vreme biosorpcija postaje komercijalna alternativa postojećim metodama za prečišćavanje otpadnih voda (Stanković *et al.* 2009). Pri prečišćavanju voda biosorpcija ima značajne prednosti: tretirana voda je dovoljno čista da se može reciklirati i ponovo koristiti, a biosorbent može da se regeneriše (McKay 1995). Neki od bioloških materijala koji su ispitivani kao potencijalni biosorbenti jona metala su: piljevina, kora drveta, čekinje, šišarice (Nuhoglu i Oguz 2003).

Ljuspe šišarica pretežno su izgrađene od celuloze, hemiceluloze, smole, lignina i tanina (Robbins *et al.* 1957; Sakagami *et al.* 1992). Ove komponente sadrže veliki broj funkcionalnih grupa (karboksilnu, karbonilnu, hidroksilnu, fenolnu) od kojih se većina u zavisnosti od pH vrednosti rastvora, temperature, koncentracije sorbenta, može u većoj ili manjoj meri deprotonovati. Deprotonovanjem ovih grupa nastaju aktivni centri za koje se mogu vezati joni metala i na taj način eliminisati iz vodenog rastvora.

---

Milorad Anđelković (1996), Surdulica, Kapetana Radiše Lukića 62, učenik 2. razreda Gimnazije „Svetozar Marković” u Surdulici

MENTOR: Dragana Marković, diplomirani hemičar, Laboratorija za hemijsku dinamiku i permanentno obrazovanje, Institut za nuklearne nauke „Vinča”

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja temperature, pH vrednosti rastvora i koncentracije sorbenta, kao i trajanja biosorpcije na efikasnost adsorpcije  $\text{Cu}^{2+}$  iz vodenog rastvora biomasom šišarica crnog bora, kao i određivanje optimalne pH za regeneraciju biosorbenta. Takođe je ispitivana i veza između kapaciteta biosorbenta i ravnotežne koncentracije  $\text{Cu(II)}$  jona u rastvoru kroz dva teorijska modela – Langmirov i Frojndlihov.

## Materijal i metode

Ispitivan je uticaj pH vrednosti rastvora, temperature i koncentracije biosorbenta na adsorpciju jonskih vrsta iz vodenog rastvora; preostala koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  u rastvoru (koja potiče od neadsorbovanih bakar(II) jona određivana je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Ispitivane koncentracije biosorbenta su 400, 800, 1600 i 4000 ppm; temperature 25, 40, 50 i 70 °C, dok su ispitivane pH vrednosti iznosile 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 i 8.0. Pored toga, određena je optimalna pH za najefikasniju regeneraciju biosorbenta.

**Pripremanje biosorbenta.** Opale šišarice crnog bora sakupljene su početkom avgusta 2013. godine na Vlasini. Šišarice su isprane destilovanom vodom, a potom sušene nedelju dana pri sobnoj temperaturi (25±1)°C. Ljuspe su potom odvojene od osovine šišarica, usitnjene, samlevene i prosejane kroz sito veličine pora 125 µm.

### Sorpcija bakar(II) jona

Izvor  $\text{Cu}^{2+}$  jona predstavljao je standardni vodeni rastvor bakar(II)-sulfata (Fluka, Copper Standard for AAS 1001±4 mg/L), od kog je razblaživanjem dobijen rastvor koncentracije 10 mg/L, koji je dalje korišćen u eksperimentu. Preostala koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  u rastvoru (koja potiče od neadsorbovanih bakar(II) jona) određivana je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (Thermo S-Series AA spektrometer).

U čašu sa 500 mL rastvora  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracije  $c_0 = 10$  mg/L uronjena je elektroda pH metra (Corning-Schott instruments) i elisa mehaničke mešalice (Heidolph laborota 4001). Mešalica je podešena na 400 obrtaja u minuti, a zatim je uka-

pavan rastvor hlorovodonične kiseline koncentracije 0.1 mol/L (Zorka Pharma Šabac), odnosno 0.1 mol/L NaOH (Centrohem), kako bi se podesila pH vrednost. Potom je dodata izmehena masa praha biosorbenta. Alikvoti od 15 mL uzimani na: 0, 2, 6, 10, 20, 30, 60, 80 minuta od početka sorpcije su filtrirani (Filtrak Sorte 288) kako bi se rastvor odvojio od biosorbenta (uzetog pri uzimanju alikvota). Pri ispitivanju uticaja temperature na efikasnost biosorpcije, postupak je ponovljen, s tim što je sud u kome je rađena biosorpcija postavljen u vodeno kupatilo (Gesellschaft für Labortechnik mbH D-30938) i termostatiran.

Regeneracija je rađena tako što je sorbent, već korišćen za biosorpciju, izložen rastvorima različitih pH vrednosti. Alikvoti rastvora kome je biosorbent bio izložen uzimani su na 10, 30 i 60 minuta, a potom je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom određena koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$ .

Za procenu efikasnosti biosorpcije korišćene su efikasnost biosorpcije i kapacitet biosorbenta. Efikasnost biosorpcije definiše se kao udeo adsorbovanih bakar(II) jona u odnosu na početnu koncentraciju:

$$\frac{c_0 - c_t}{c_0} \cdot 100\%$$

gde je  $c_0$  koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  pre početka biosorpcije, a  $c_t$  koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  u trenutku  $t$ . Kapacitet biosorbenta definisan je kao masa adsorbovanih bakar(II) jona po gramu sorbenta i računa se po formuli:

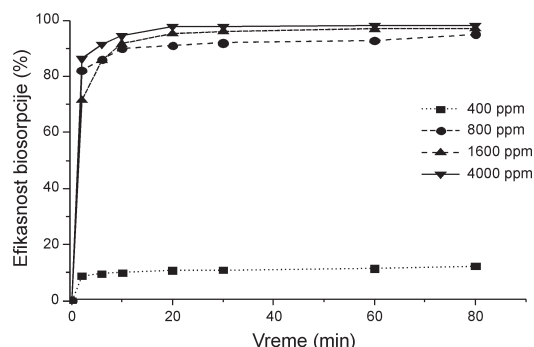
$$q_t = \frac{c_0 - c_t}{m} \cdot V$$

gde je  $V$  zapremina rastvora  $\text{Cu}^{2+}$ , a  $m$  masa biosorbenta.

## Rezultati i diskusija

### Zavisnost od vremena kontakta

Uticaj vremena na adsorpciju  $\text{Cu}^{2+}$  prikazan je na slici 1. Na grafiku se mogu uočiti dva dela: prvi, u trajanju 2 minuta, tokom kojeg se adsorbuje najveća količina bakra, i drugi, koji prethodi uspostavljanju ravnoteže, koji traje do 80 minuta. Daljim uzorkovanjem (duže vreme kontakta bi-



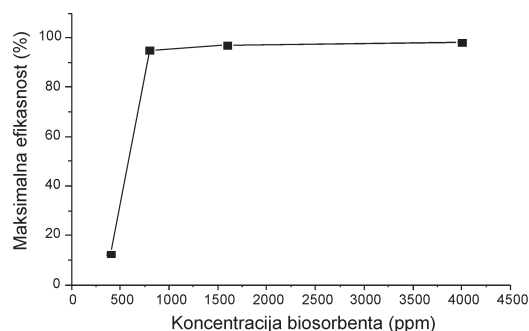
Slika 1. Uticaj različitih koncentracija biosorbenta na efikasnost biosorpcije ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ ,  $\text{pH} = 7.2$ , brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 1. Effect of different biosorbent concentrations on biosorption efficiency ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ ,  $\text{pH} = 7.2$ , agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )

osorbenta sa bakar(II) jonima) nije pokazano da dolazi do nastavka biosorpcije.

### Uticaj koncentracije biosorbenta

Uticaj koncentracije biosorbenta na efikasnost adsorpcije bakar(II) jona prikazan je na slici 2. Pokazalo se da je za adsorpciju  $5 \text{ mg Cu}^{2+}$  jona iz  $500 \text{ mL}$  rastvora, minimalna dovoljna koncentracija biosorbenta  $800 \text{ ppm}$ . Ravnotežna koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  jona smanjuje kako se koncentracija biosorbenta povećava. Povećanjem koncentracije biosorbenta obezbeđuje se veća površina za adsorpciju. Pri koncentraciji biosorbenta od  $400 \text{ ppm}$ , adsorpciona površina (broj aktivnih centara) je ograničena, pa stoga znatna količina ostaje neadsorbovana. Već pri koncentraciji od  $800 \text{ ppm}$  obezbeđuje se dovoljna adsorpciona površina, što za posledicu ima veliku razliku u maksimalnoj efikasnosti biosorpcije pri koncentracijama biosorbenta od  $400$  i  $800 \text{ ppm}$ . Bez obzira na veći broj aktivnih centara i na veću adsorpcionu površinu pri koncentraciji biosorbenta iznad  $800 \text{ ppm}$ , maksimalna efikasnost biosorpcije se znatno ne menja, zbog ograničene koncentracije pre početka biosorpcije. Posledica ovoga je neznatna razlika u maksimalnoj efikasnosti biosorpcije pri koncentracijama biosorbenta od  $800$ ,  $1600$ ,  $4000 \text{ ppm}$  (slika 2).



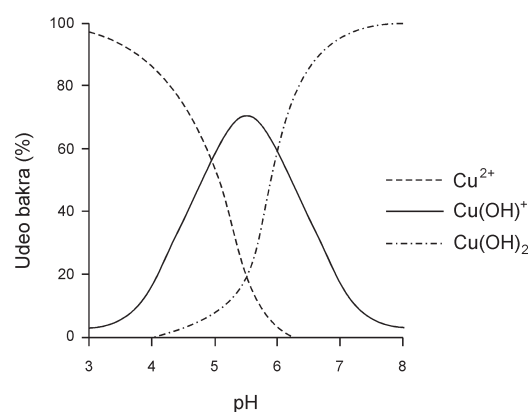
Slika 2. Uticaj različitih koncentracija biosorbenta na maksimalnu efikasnost biosorpcije ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $80 \text{ min}$ ,  $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ ,  $\text{pH} = 7.2$ , brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 2. Effect of different biosorbent concentrations on maximum biosorption efficiency ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $80 \text{ min}$ ,  $c_0 = 10 \text{ mg/L}$ ,  $\text{pH} = 7.2$ , agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Kapacitet biosorbenta na  $\text{pH} = 7.2$ , temperaturi  $70^{\circ}\text{C}$  i brzini mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ , iznosio je  $2.48 \text{ mg/g}$ .

### Uticaj pH vrednosti rastvora

Poznato je da pri pH vrednostima od  $3.0$  do  $8.0$  u rastvoru bakar(II)-sulfata figurišu tri vrste

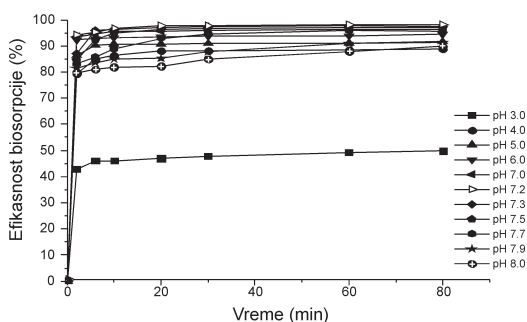


Slika 3. Udeo vrsta koje sadrže bakar(II) u zavisnosti od pH vrednosti rastvora (adaptirano prema Astimal *et al.* 1998)

Figure 3. Specifications of copper (II) as a function of pH (Adapted from Astimal *et al.* 1998)

koje se adsorbuju na površini biosorbenta:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CuOH}^+$  i  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Zastupljenost ovih vrsta u rastvoru u zavisnosti od pH vrednosti prikazana je na slici 3 (Astimal *et al.* 1998). Pri biosorpciji na nižim pH vrednostima, hidronijum joni iz vodenog rastvora pokretljiviji su od katjona bakra, lakše dolaze do funkcionalnih grupa i sprečavaju njihovo deprotonovanje, što za posledicu ima smanjenu adsorpciju  $\text{Cu}^{2+}$ . Kako pH rastvora raste, površina biosorbenta postaje sve negativnija, zbog čega je adsorpcija pozitivno naelektrisanih čestica  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{CuOH}^+$  favorizovana.

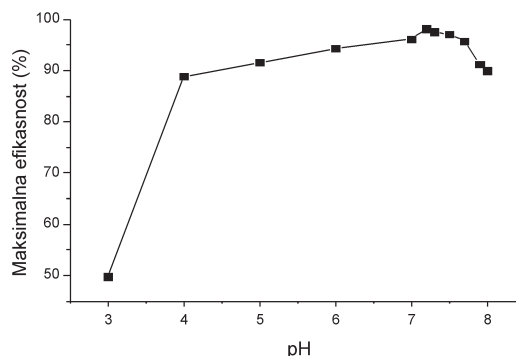
Uticaj pH vrednosti rastvora na efikasnost biosorpcije  $\text{Cu}^{2+}$  u našem istraživanju prikazan je na slici 4. Efikasnost uklanjanja  $\text{Cu}^{2+}$  biomasom šišarice crnog bora povećava se sa povećanjem pH od 3.0 do 8.0; najveća efikasnost biosorpcije bakar(II) jona primećena je na pH 7.2 (slika 5). Rezultati ukazuju da se sa promenom pH od 5 do 8 efikasnost biosorpcije nalazi u opsegu 80-99.4%.



Slika 4. Uticaj pH vrednosti rastvora na efikasnost biosorpcije ( $T = 25^\circ\text{C}$ , koncentracija biosorbenta 4000 ppm,  $c_0 = 10$  ppm, brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 4. Effect of pH on biosorption efficiency ( $T = 25^\circ\text{C}$ , biosorbent concentration 4000 ppm,  $c_0 = 10$  ppm, agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Uticaj pH vrednosti rastvora na efikasnost biosorpcije objašnjava se da se sa porastom pH vrednosti favorizuje deprotonovanje funkcionalnih grupa, što direktno znači više jonizovanih grupa za vezivanje  $\text{Cu}^{2+}$ . Ipak, sa slike 3 jasno se vidi da je preko pH 7.2 bakar u rastvoru uglavnom u obliku bakar(II)-hidroksida, a budući da je stabilnost  $\text{Cu}^{2+}$  u hidroksidu je veća nego u kom-



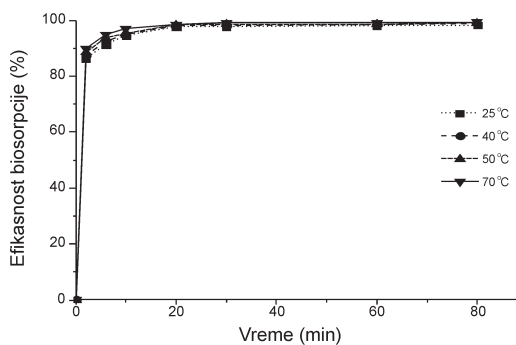
Slika 5. Uticaj pH vrednosti rastvora na maksimalnu efikasnost biosorpcije ( $T = 25^\circ\text{C}$ , koncentracija biosorbenta 4000 ppm, 80 min,  $c_0$  10 ppm, brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 5. Effect of pH on maximum biosorption efficiency ( $T = 25^\circ\text{C}$ , biosorbent concentration 4000 ppm, 80 min,  $c_0$  10 ppm, agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )

pleksu sa biosorbentom, to za posledicu ima nižu efikasnost adsorpcije bakra na pH višim od 7.2 (slika 5).

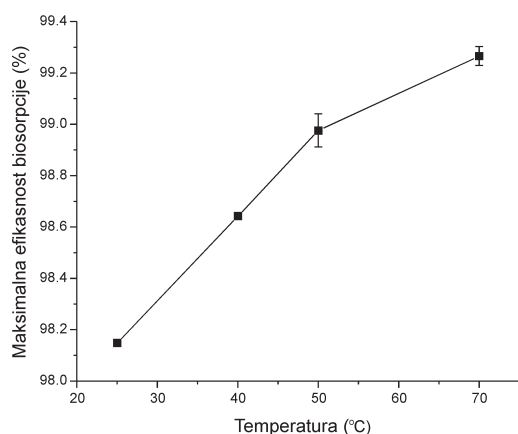
## Uticaj temperature

Uticaj temperature na efikasnost biosorpcije  $\text{Cu}^{2+}$  predstavljen je na slikama 6 i 7. Sa slike 7 može se videti da povećanje temperature nema veliki uticaj na maksimalnu efikasnost biosor-



Slika 6. Uticaj temperature na efikasnost biosorpcije (pH 7.2,  $c_0$  10 ppm, brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 6. Effect of temperature on biosorption efficiency (pH 7.2,  $c_0$  10 ppm, agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )



Slika 7. Uticaj temperature na maksimalnu efikasnost biosorpcije (pH 7.2, 80 min,  $c_0$  10 ppm, brzina mešanja  $400 \text{ min}^{-1}$ )

Figure 7. Effect of temperature on maximum biosorption efficiency (pH 7.2, 80 min,  $c_0$  10 ppm, agitation speed  $400 \text{ min}^{-1}$ )

pcije, odnosno da se dodatnim zagrevanjem rastvora maksimalna efikasnost biosorpcije neznatno povećava. Sa promenom temperature od  $25^\circ\text{C}$  do  $70^\circ\text{C}$  efikasnost biosorpcije nalazi u opsegu 98-99.3%. Ovo se objašnjava činjenicom da se energija bakar(II) jona povećava se sa povećanjem temperature rastvora, što za posledicu ima veću učestalost sudara između čestica biosorbenta i bakar(II) jona, pa će biti veća mogućnost za efikasnije vezivanje bakar(II) jona. Neznatan uticaj temperature na efikasnost biosorpcije u ispitivanom sistemu ima velike prednosti jer se biosorbent može koristiti u širem rasponu temperatura sa približno istom efikasnošću.

## Regeneracija biosorbenta

Pod regeneracijom se podrazumeva obnavljanje biosorbenta, protonovanje funkcionalnih grupa i desorpcija bakra. U tabeli 1 prikazani su rezultati efikasnosti regeneracije biosorbenta u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Iz tabele se vidi da su kiseliji uslovi efikasniji za regeneraciju od baznih. Pri nižim pH vrednostima,  $\text{H}^+$  joni iz rastvora protonuju grupe koje su adsorbovale bakar(II) jone, a oni prelaze u rastvor.

## Adsorpcione izoterme

Adsorpcione izoterme dobijene su variranjem pH od 3.0 do 8.0 na konstantnoj temperaturi. U cilju ispitivanja veze između kapaciteta biosorbenta ( $q_e$ ) i ravnotežne koncentracije Cu (II) jona ( $C_e$ ) u rastvoru korišćeni su Langmirov i Frojndlihov model.

Langmirov model izoterme idealizuje da se vezivanje metalnih jona dešava na homogenoj površini jednoslojnom adsorpcijom, bez interakcije između adsorbovanih jona (Langmuir 1918). Langmirovi parametri određeni su zavisnošću  $C_e/q_e$  od  $C_e$ :

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max}} \cdot C_e$$

gde je  $C_e$  ravnotežna koncentracija Cu (II) jona u rastvoru,  $q_e$  količina vezanih metalnih jona adsorbovanih jediničnom masom sorbenta celom monoslojnom površinom,  $q_{\max}$  je Langmirova ravnotežna konstanta koja se odnosi na maksimalni adsorpcioni kapacitet (afinitet aktivnih centara) i  $K_L$  je Langmirova konstanta koja se odnosi na entalpiju adsorpcije (mg/L). Iako je najčešće korišćen model izoterme Langmirova izoterma ne nudi mehaničke aspekte u biosorpcije.

Sa druge strane, Frojndlihov model izoterme idealizuje da se vezivanje metalnih jona dešava na heterogenoj površini višeslojnom adsorp-

Tabela 1. Efikasnost regeneracije biosorbenta u zavisnosti od pH vrednosti sredine

Efikasnost (%)	pH=3.0	pH=4.0	pH=6.0	pH=7.0
Posle 10 min	95.790±0.002	0.00	0.61±0.65	0.00
Posle 30 min	95.940±0.002	0.35±1.14	2.09±0.19	9.85±0.04
Posle 60 min	99.990±0.002	3.65±0.11	3.10±0.13	24.00±0.01

cijom, pri čemu se prvo ostvaruju jače veze, obavezujuća snaga opada kako stepen okupiranosti deprotonovanih centara raste, zbog toga je bliži fizičkom objašnjenju adsorpcije. Frojndlihova empirijska adsorpciona izoterma predstavlja se logaritamski, po jednačini:

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

gde je  $C_e$  ravnotežne koncentracije Cu(II) jona u rastvoru,  $q_e$  količina vezanih metalnih jona adsorbovanih jediničnom masom sorbenta,  $K_F$  se računa iz odsečka, a  $n$  iz nagiba prave (Freundlich 1906).

Kako rezultati, prikazani u tabeli 2, pokazuju da je najbolje poklapanje sa Langmirovim adsorpcionim modelom izoterme ( $r = 0.999$ ), sledi da se radi o tipičnoj hemijskoj monoslojnoj adsorpciji na homogenoj površini čestica biosorbenta, bez interakcija između adsorbovanih jona i bez striktnog redosleda vezivanja.

Tabela 2. Langmirovi i Frojndlihovi parametri adsorpcionih izoterma

Izoterma	Parametar	Vrednost	$r$
Langmir	$q_{\max}$	2.185(4)	0.999
	$K_L$	-32.275(3)	
Frojndlih	$n$	-17.902(5)	0.942
	$K_F$	2.261(4)	

## Zaključak

Rezultati ispitivanja biosorpcije bakar(II) jona pokazali su da je biomasa šišarice crnog bora efikasan biosorbent za uklanjanje  $\text{Cu}^{2+}$  iz otpadnih voda sa velikim adsorpcionim kapacitetom (2.48 mg/g). Najveća efikasnost biosorpcije od 99.3%, za adsorpciju 5 mg  $\text{Cu}^{2+}$  iz 500 mL rastvora, primećena je na pH 7.2, pri teperaturi od  $T = 70^\circ\text{C}$  i pri koncentraciji biosorbenta od 4 000 ppm. Pokazalo se da temperatura ne utiče značajno na efikasnost biosorpcije, odnosno da se sa promenom temperature od  $25^\circ\text{C}$  do  $70^\circ\text{C}$  efikasnost biosorpcije nalazi u opsegu 98-99.3%, pa se biosorbent može koristiti u ši-

rokom rasponu temperatura sa približno istom efikasnošću. Maksimum adsorpcije dostignut je u 80 minuta, ali je oko 90% bakra adsorbovano do drugog minuta. Rezultati istraživanja pokazali da su kiseli uslovi pogodniji za regeneraciju biosorbenta od baznih. Najbolje poklapanje pokazalo se sa Langmirovim adsorpcionim modelom izoterme.

U ovom radu biosorpcija je ispitivana na model-sistemu, stoga se ostavlja mesta za dalja ispitivanja efikasnosti biosorbenta na realnom uzorku.

**Zahvalnost.** Iskreno se zahvaljujem svom mentoru, dipl. hemičaru Dragani Marković (Institut za nuklearne nauke „Vinča”) na nesebičnoj pomoći, sugestijama, strpljenju i podršci. Želim da se zahvalim i Ljubici Perić, rukovodiocu programa hemije, na požrtvovanosti oko obrade rezultata. Posebnu zahvalnost dugujem ocu, Miodragu Anđelkoviću, na velikoj pomoći pri pripremi biosorbenta.

## Literatura

- Astimal M., Khan Ah., Ahmad S., Ahmad A. 1998. Cole of sawdust in the removal of copper (II) from industrial wastes. *Water Research*, **32** (10): 3085.
- Freundlich H. 1906. Über die adsorption in lösungen. *Journal of Physical Chemistry*, **57** (98): 385.
- Langmuir I. 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, **40** (9): 1361.
- McKay G. 1995. *Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters*. Boca Raton: CRC Press
- Ngah W. W., Endud C. S., Mayanar R. 2002. Removal of copper(II) from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. *Reactive and Functional Polymers*, **9** (50): 181.
- Nuhoglu Y., Oguz E. 2003. Removal of copper(II) from aqueous solutions by biosorption on the cone biomass of *Thuja orientalis*. *Process Biochemistry*, **5** (38): 1627.

Robbins W. W., Weier T. E., Stocking C. R. 1957. *Botany – an introduction to plant science*. Wiley

Stanković V., Božić D., Gorgievski M., Bogdanović G. 2009. Heavy metal ions adsorption from mine waters by sawdust. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, **15** (4): 237.

Sakagami H., Takeda M., Kawazoe Y., Nagata K., Ishihama A., Ueda M., Yamazaki S. 1992. Anti-influenza virus activity of alignin fraction from cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *In Vivo*, **6** (5): 491.

---

Milorad Anđelković

### Optimization of Biosorption of Copper (II) Ions from Wastewaters on the Cone Biomass of Black Pine (*Pinus Nigra* L.)

Biosorption is a physiochemical process that occurs naturally in certain biomass (biosorbent) which allows it to bind contaminants, in this case metal ions from salt dissolved in water. It is a reversible chemical process which is the result of varied affinity of ions for deprotonated biosorbent. The advantage of biosorption is that a biosorbent can often be regenerated. The subject of this experimental study is the optimization of adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solutions on the

cone biomass of *Pinus Nigra* L. (black pine) and regeneration of biosorbent. Sieved powder of ground mature scales of cones black pine (particles size  $\leq 125 \mu\text{m}$ ) was used as biosorbent. The biosorption equilibrium level was determined as a function of contact time, pH, temperature and biosorbent concentrations. The amount of  $\text{Cu}^{2+}$  ions adsorbend by biosorbent was defined as difference in concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  in solution before and during biosorption. The remaining (nonadsorbed) concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  was determined by using atomic adsorption spectroscopy.

The entire set of measurements that have been performed showed that the adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solutions increased as pH and temperature of the solution were increased. The maximum copper biosorption of 99.27% occurred at 70°C (Figure 7) and pH 7.2 (Figure 5). However, results also indicated that temperature does not significantly affect biosorption efficiency, so biosorbent can be used in wide temperature range with approximately the same efficiency. Biosorption equilibrium was reached in 80 minutes, but nearly 90% of copper was adsorbed within 2 minutes (Figure 2). The minimum concentration of biosorbent for adsorption of 10 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  from 0.5 L solution was 800 ppm (Figure 2). Results showed that compared to basic solutions acid conditions proved to be better for the regeneration of biosorbent. It turned out that the results best fit with the Langmuir adsorption isotherm model. The results indicated that the cone biomass of black pine is a suitable biosorbent for the removal of  $\text{Cu}^{2+}$  from wastewaters with high adsorption capacity (2.48 mg/g).

---

Olivera Živojinović i Dragana Sretenović

## Optimizacija sinteze i karakterizacija polianilina dopiranog poli(4-stirensulfonskom kiselinom) i njegova primena u određivanju jona olova

---

*Polianilin dopiran poli(4-stirensulfonskom kiselinom), PANI-PSSA, sintetisan je pri različitim uslovima hemijskim i elektrohemijskim putem. U svrhu dokazivanja prisustva poli(4-stirensulfonske kiseline) (PSSA) u matrici polianilina (PANI) izvršena je karakterizacija proizvoda hemijskih i elektrohemijskih polimerizacija. Cikličnom voltametrijom, merenjem provodljivosti, Raman-, infracrvenom, ultraljubičastom i vidljivom spektroskopijom, kao i skenirajućom elektronskom mikroskopijom ispitana su elektrohemijska svojstva, morfologija i hemijska struktura polimera. Elektrohemijskim putem sintetisan je tanak sloj polimera na elektrodi od staklastog ugljenika. Tako modifikovana elektroda upotrebljena je za detekciju jona olova pri čemu je izmerena donja granica detekcije od  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L  $Pb^{2+}$ . Proizvod hemijske polimerizacije upotrebljen je za dobijanje više podataka o hemijskim i elektrohemijskim svojstvima PANI-PSSA. Izvršena je optimizacija uslova hemijske sinteze da bi se dobio polimer veće elektroprovodljivosti. Najviša izmerena provodljivost iznosi 0.064 S/cm.*

---

### Uvod

Polianilin (PANI) pokazuje osobine provodnika u obliku emeraldin soli koja predstavlja poluoksidovani, protonovani (dopirani) oblik formule  $(B-NH^{*+}-B-NH^-)_n(A^-)_n$ , gde  $A^-$  označava dopant anjon, a B – benzenov prsten.

Prednosti polianilina u odnosu na ostale provodne polimere su znatno niža cena, jednostavan način sinteze, stabilnost u atmosferskim uslovima, visoka električna provodljivost (koja dostiže vrednosti u rangu metala,  $10^3$  S/cm), redoks-aktivnost i elektrohromizam (Ćirić-Marjanović 2013). Pored toga, mogućnost pretvaranja polianilina iz jednog oblika u drugi i kombinovanje različitih osobina tih oblika još je jedna od prednosti ovog polimera (Rakić *et al.* 2011).

Najčešće korišćena metoda sinteze PANI je hemijska oksidaciona polimerizacija (slika 1). Anilin se korišćenjem amonijum-peroksidisulfata (APS) oksiduje u kiseloj sredini pri čemu se kao talog formira PANI. Plavo obojeni pernigranilinski oblik u krajnjoj fazi reakcije prelazi u zelenu emeraldin so. Reakcija je egzotermna i pored nastalog PANI nastaje i sumporna kiselina kao sporedni proizvod.

U našem istraživanju PANI je dopiran poli(4-stirensulfonskom kiselinom), PSSA (slika 2), tako što je polimerizacija anilina vršena u prisustvu ove polimerne kiseline. Osobine dopant anjona utiču na stabilnost i elektroprovodljivost PANI (Vivekanandan *et al.* 2011). U nedavnim istraživanjima primećeno je stvaranje nanočestica polianilina, npr. nanocevi, u prisustvu organskih sulfonskih kiselina (Yang *et al.* 2007). Disocijacijom PSSA nastaje polistirensulfonatni anjon ( $PSS^-$ ), koji tokom sinteze biva upleten među lance PANI i time imobilisan u njegovoj matrici. Pozitivno naelektrisanje PANI lanca u formi emeraldin soli kompenzovano je negativnim naelektrisanjem  $PSS^-$  anjona (slika 3).

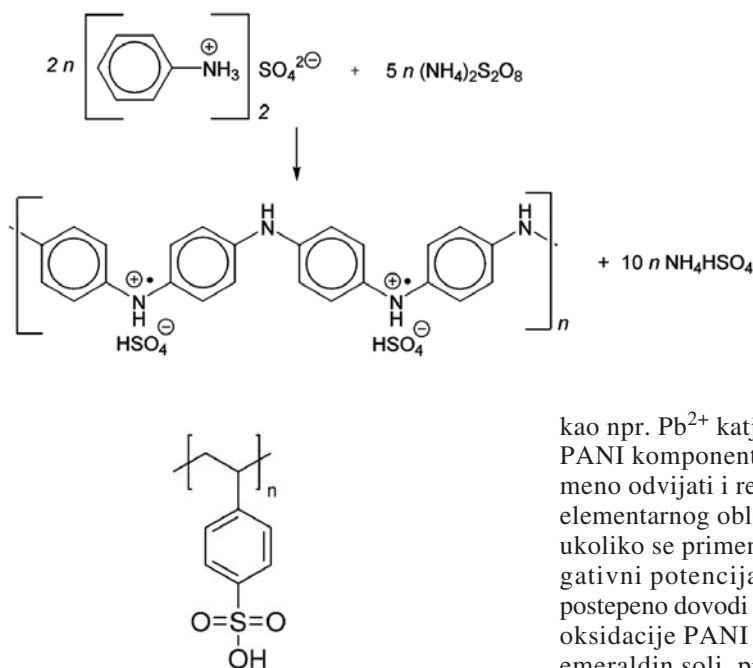
---

*Olivera Živojinović (1995), Velika Ivanča, Majdanska 4, učenica 3. razreda Gimnazije u Mladenovcu*

*Dragana Sretenović (1995), Lučani, Ive Andrića 5, učenica 3. razreda Gimnazije „Sveti Sava” u Požegi*

*MENTOR: dr Gordana Ćirić-Marjanović, vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu*





Slika 2. Struktura poli(4-stirensulfonske kiseline), PSSA

Figure 2. Structure of poly(4-styrenesulfonic acid), PSSA

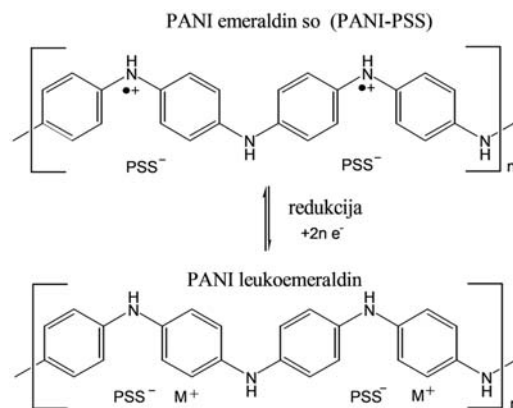
Elektrohemijski sintetisan oksidovani oblik PANI-PSSA tokom procesa redukcije na elektrodi (prelaz PANI u leukoemeraldinski oblik) privlačiće pozitivno naelektrisane jone  $M^+$  iz rastvora da bi se kompenzovalo negativno naelektrisanje  $PSS^-$  anjona koji, zbog svojih dimenzija, međusobne upletenosti sa PANI i međumolekulskih interakcija između njih, neće moći da se udaljavaju od PANI lanaca. U obrnutom procesu oksidacije nastaje PANI emeraldin so, polikatjonski oblik, odbijaće katjone  $M^+$ , usled čega će oni odlaziti u rastvor.  $PSS^-$  anjoni ostaju imobilisani i u toku procesa oksidacije iz istih razloga kao i tokom redukcije.

Princip detekcije jona metala elektrohemijском metodom anodne stripping voltametrije (ASV) pomoću PANI-PSSA je sledeći. Tokom redukcije, u PANI-PSSA film mogu ulaziti različiti katjoni iz rastvora u koji je polimer uronjen,

Slika 1. Jednačina hemijske polimerizacije anilinium-sulfata sa APS kao oksidacionim sredstvom i dobijanje PANI u obliku emeraldin soli

Figure 1. Equation of chemical polymerization of anilinium sulfate with APS as an oxidant and PANI emeraldine salt formation

kao npr.  $Pb^{2+}$  katjoni. Paralelno sa redukcijom PANI komponente polimera, može se istovremeno odvijati i redukcija prisutnog katjona do elementarnog oblika, metala ( $Pb^{2+} + 2e^- \rightarrow Pb$ ), ukoliko se primeni odgovarajući, dovoljno negativni potencijal. Kada se potom elektroda postepeno dovodi na pozitivniji napon, dolazi do oksidacije PANI i njegovog prelaska u formu emeraldin soli, pri čemu se dešava oksidacija metala do katjona koji napušta elektrodu. Otpu-



Slika 3. Jednačina reakcije redukcije/oksidacije PANI u PANI-PSSA praćena ulaskom/izlaskom katjona ( $M^+$ ) u/iz polimera. Anjoni  $PSS^-$  ostaju imobilisani u matrici PANI

Figure 3. Equation of reduction/oxidation of PANI in PANI-PSSA followed by entrance/release of cations ( $M^+$ ) into/from the polymer.  $PSS^-$  anions remain immobilized in PANI matrix

šteni  $Pb^{2+}$  katjoni mogu se detektovati anodnom striping voltametrijom.

**Cilj ovog rada** je: potvrda ugradnje PSSA u polianilin, ispitivanje elektrohemijskih svojstava i detekcija jona olova elektrohemijski sintetisanim PANI-PSSA, i sinteza PANI-PSSA sa što većom elektroprovodljivošću.

## Eksperiment

### Skica eksperimenta

PANI-PSSA je sintetisan dvema metodama: hemijskom i elektrohemijskom. Elektrohemijskim putem sintetisan je tanak sloj polimera na elektrodi. Tako modifikovana elektroda je upotrebljena za detekciju jona olova. Pored toga, izvršena je karakterizacija tankih filmova raman-skom spektroskopijom, cikličnom voltametrijom i elektronskom mikroskopijom s ciljem određivanja njihovih elektrohemijskih svojstava. Proizvod hemijske polimerizacije upotrebljen je za dobijanje više podataka o hemijskim i elektrohemijskim svojstvima PANI-PSSA, pre svega o elektroprovodljivosti. Karakterizacije metode kojima je ovaj proizvod podvrgnut su: FTIR i UV-Vis spektroskopije, skenirajuća elektronska mikroskopija, kao i ispitivanje električne provodljivosti.

### Elektrohemijska sinteza PANI-PSSA

Za elektrohemijsku sintezu 25.0 mL reakcione smeše pripremljeno je tako da je molski odnos anilina i monomernih jedinica PSSA iznosio 1:1. Koncentracije sastojaka smeše su iznosile: 0.08 mol/L anilina, 0.08 mol/L PSSA monomernih jedinica i 0.1 mol/L HCl.

U elektrohemijsku ćeliju uređaja za cikličnu voltametriju Princeton Applied Research Potentiostat/Galvanostat Model 273 preneto je 10 mL reakcionog rastvora. Kao radne elektrode za sintezu PANI-PSSA filma korišćene su platinska pločica i elektroda od staklastog ugljenika (GC). Elektroda od platine ( $15 \times 9 \text{ mm}^2$ ) pre upotrebe žarena je do crvenog usijanja i ohlađena na sobnu temperaturu. Elektrode od staklastog ugljenika ( $15 \times 3 \text{ mm}^2$ ) pre upotrebe su polirane šmirgl papirom finoće P1000A. Ostatak površine elektrode koja nije potrebna za sintezu prekriven je slojem bezbojnog laka za nokte, da bi bilo sprečeno neželjeno stvaranje filma PANI na stranicama koje nisu okrenute direktno ka pomoćnoj i referentnoj elektrodi. Pomoćna elektroda bila je platinska pločica, a kao referentna korišćena je zasićena kalomelska elektroda (SCE).

Elektrohemijska sinteza izvedena je primenom ciklične voltametrije, sa promenom potencijala u opsegu od 0 do 1 volta. Nakon sinteze, PANI-PSSA filmovi su čuvani u rastvoru HCl koncentracije 0.1 mol/L. Sintetisano je pet tankih filmova, jedan na platinskoj i četiri na GC elektrodi, prema uslovima datim u tabeli 1.

### Karakterizacija elektrohemijski sintetisanog PANI-PSSA

Tabela 1. Uslovi elektrohemijske sinteze PANI-PSSA filmova na GC i Pt elektrodama

Naziv elektrode modifikovane PANI-PSSA filmom:	Dimenzije ( $\text{mm}^2$ )	broj ciklusa	brzina promene potencijala (mV/s)	priprema elektrode
Pt1	$15 \times 9$	15	50	Žarena
GC2	$15 \times 3$	30	50	Polirana
GC3	$15 \times 3$	15	50	Polirana
GC4	$15 \times 3$	15	50	Nova, nepolirana
GC5	$15 \times 3$	15	100	Polirana

Cikličnom voltametrijom ispitana su redoks svojstva sintetisanog filma PANI-PSSA u rastvoru HCl 0.1 mol/L, u opsegu potencijala 0-1 V, pri brzini promene potencijala 50 mV/s.

DXR Raman spektrometrom (Thermo Scientific, USA) snimljeni su ramanski spektri osušanih elektroda Pt1, GC2 i GC3 u opsegu talasnih brojeva 1800 do 400  $\text{cm}^{-1}$ , na po tri različite tačke površine. Korišćen je monohromatski laser ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ , snage 0.3 mW).

Površina elektrode sa slojem PANI-PSSA snimljena je skenirajućim elektronskim mikroskopom (JEOL JSM-6610LV) pri uvećanju do 50 hiljada puta i naponu 30 kV.

## Detekcija jona olova elektrodama modifikovanim PANI-PSSA slojem

Film PANI-PSSA deponovan na elektrodi od staklastog ugljenika (GC) korišćen je kao radna elektroda troelektrodnog voltametrijskog sistema (Metrohm 797 VA Computrace) za određivanje  $\text{Pb}^{2+}$  jona u rastvoru. Korišćena je tehnika anodne striping voltametrije, sa konstantnim vremenom depozicije od 300 s, depozicionim potencijalom od  $-0.95 \text{ V}$  i merenjem jačine struje u elektrolitu pri vrednostima napona u opsegu od  $-0.7$  do  $-0.2 \text{ V}$ . Kao elektrolit korišćen je acetatni pufer, pH 4.5. Koncentracije olovo-acetata u probama iznosile su:  $1 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $9 \times 10^{-6}$  i  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ . Merenja su za svaku od sedam proba vršena po tri puta.

## Hemijska sinteza PANI-PSSA

Kod hemijske oksidativne polimerizacije anilina potreban je inicijator reakcije, koji omogućava stvaranje elektrofilnog nitrenijum-katjona u inicijalnoj fazi reakcije (Ćirić-Marjanović *et al.* 2008). Kao inicijator reakcije korišćen je amonijum-peroksidisulfat, APS. Optimalan molski odnos APS i monomera (anilina) za dobijanje emeraldin soli iznosi 1.25:1 (Rakić *et al.* 2011). Molski odnos anilina i monomernih jedinica PSSA iznosio je 1:1. Na osnovu toga, u prvi odmerni sud od 25.0 mL odmereno je 5.56 g 18% rastvora PSSA i 0.49 mL anilina. Sud je dopunjen do odgovarajuće oznake rastvorom HCl koncentracije 0.1 mol/L. U drugom odmernom sudu (25.0 mL) rastvoreno je 1.54 g APS u 0.1

mol/L HCl. U čaši od 100 mL pomešani su sadržaji iz prvog i drugog normalnog suda. Rastvor je mešan na 1000 obrtaja po minutu. Nakon isticanja potrebnog vremenskog intervala odvijanja reakcije smeša je procedena, kako bi se reakcija zaustavila stvaranjem taloga. Talog je ispiran vodom i 96% etanolom. Uzorci su sušeni na vazduhu, a zatim u sušnici 3 h na  $40^\circ\text{C}$ . Sintetisani polimeri sprášeni su u avanu i čuvani u eksikatoru. Pre merenja električne provodljivosti i pripreme kalijum-bromidnih tableta za snimanje IR spektara, uzorci su sušeni 3 h na  $60^\circ\text{C}$  u sušnici pod sniženim pritiskom.

Uslovi odvijanja hemijske reakcije su varirani. Menjani su trajanje polimerizacije, temperatura i pH vrednost reakcione smeše. U tabeli 2 navedeni su podaci o eksperimentalnim uslovima sinteza.

Tabela 2. Eksperimentalni uslovi hemijske sinteze uzoraka PANI-PSSA

Sinteza	Trajanje (min)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Koncentracija dodate HCl (mol/L)
1	30	25	0.1
2	30	25	0.1
3	30	4	0.1
4	30	4	0.1
5	30	4	0.1
6	120	3	0.0
7	180	5	1.0
8	180	26	1.0
10	180	-10	1.0
11	180	-10	0.1
12	180	25	1.0

## Karakterizacija PANI-PSSA dobijenog hemijskom polimerizacijom

Na spektrofotometru Thermo Scientific Evolution 60 S UV-Vis snimljeni su spektri PANI-PSSA u različitim rastvaračima. Spektar protonovane forme polianilina snimljen je u disperziji PANI-PSSA u destilovanoj vodi. Deprotonovana forma polianilina, emeraldin

baza, dobijena je rastvaranjem sprasjenog uzorka u zasićenom vodenom rastvoru natrijum-hidroksida, pri čemu je koncentracija podešena tako da se apsorbcija rastvora na talasnoj dužini 530 nm kretala između 0.5 i 1. Bazni rastvor PANI-PSSA pripremljen je 24 h pre snimanja UV-Vis spektara. Zbog male rastvorljivosti u vodi, kao rastvarač upotrebljen je i N-metil-2-pirolidon, u kome se rastvara deprotonovana forma PANI, pri čemu se provodna, emeraldin so, samo delimično rastvara. S obzirom da polianilin u PANI-PSSA ima dopant-surfaktant sa  $-\text{SO}_3\text{H}$  grupama, rastvorljivost polimera u N-metil-2-pirolidonu biva poboljšana.

Električna provodljivost PANI-PSSA uzoraka merena je mostom naizmenične struje (Wayne Kerr B224), pri konstantnoj frekvenciji struje 1 kHz, na sobnoj temperaturi. Uzorci su pripremani u vidu tablete, koja se koristi kao grana mosta nepoznate otpornosti. Za sve vreme merenja elektroprovodljivosti održavan je pritisak na tabletu uzorka od ~125 MPa, postignut korišćenjem hidraulične prese. Uzorci (svaki mase 120 mg) presovani između klipova od nerđajućeg čelika, u cilindričnom kalupu izolovanom sa unutrašnje strane tvrdom plastikom. Specifična provodljivost  $k$  izračunata je pomoću izraza:

$$k = \frac{l}{RS} \quad [\text{S/cm}]$$

gde je  $l$  – debljina tablete,  $S$  – površina poprečnog preseka tablete, a  $R$  – otpor koji je izmeren.

Površina uzoraka snimljena je skenirajućim elektronskim mikroskopom (JEOL JSM-6610LV) pri uvećanju do 50 000 puta i naponu 30 kV. Praškasti uzorci nanoseni su na aluminijumski nosač prečnika 1 cm preko koga je zalepljena dvostruko lepljiva traka od ugljenika kao provodni materijal. Uzorcima je pre snimanja prekrivena površina tankim slojem zlata debljine 15 do 25 nm.

IR spektri polimernih uzoraka PANI-PSSA snimani su pomoću FTIR spektrometra Nicolet 6700 (Termo Scientific, USA), sa 64 skeniranja po spektru i rezolucijom  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Svi spektri su snimljeni tehnikom kalijum-bromidne tablete u oblasti  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ . Tableta je pripremljena mešanjem 149.8 mg KBr i 0.2 mg uzorka u avanu. Dobijena smeša je stavljena u poseban kalup

od nerđajućeg čelika, između optički poliranih površina i presovana pomoću hidraulične prese pod pritiskom od nekoliko tona po  $\text{cm}^2$ . Da bi se izbegla inkluzija vazduha, tableta je presovana u vakuumu. KBr se pod ovim uslovima sinteruje, a uzorak ostaje fino dispergovan u pastili.

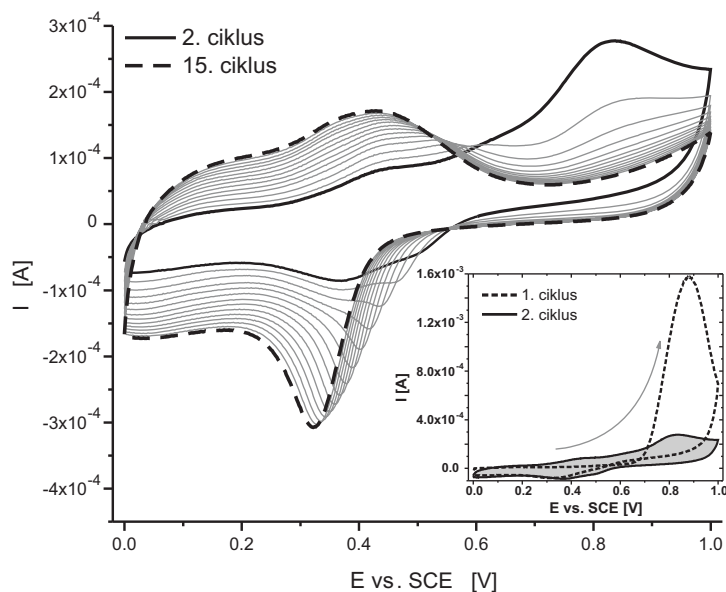
## Rezultati i diskusija

### Tok elektrohemijske sinteze

Ciklovoltamogram radne GC elektrode uronjene u rastvor anilina i PSSA menja se svakim narednim ciklusom sinteze (slika 4). Najveća je razlika između prvog i drugog, kao i drugog i trećeg potenciodinamičkog odgovora, što je posledica brzog nastanka dimera, trimera i oligomera anilina. Sa povećanjem broja ciklusa, razlika između susednih ciklusa postaje sve manja, što govori o praktičnom zaustavljanju sinteze filma PANI-PSSA. U toku prvog ciklusa zapaža se oksidacioni pik velikog intenziteta na potencijalu ~0.85 V koji odgovara oksidaciji monomera anilina (slika 4a). Ovaj pik je znatno slabiji u drugom ciklusu i postepeno se smanjuje u svakom sledećem usled potrošnje monomera i nastanka produkata (oligomera i kasnije PANI) u vidu filma na elektrodi. Nastanak redoks-aktivnih oligomera/polimera na elektrodi trebalo bi da bude praćen pojavom dva nova redoks para: prvi par (0.35 V/0.45 V) odgovara transformaciji leukoemeraldina u emeraldin so, a drugi (0.50 V/ 0.60V) transformaciji emeraldin soli u potpuno oksidovanu pernigranilin formu (da Silva *et al.* 2000). Ova dva redoks para u našem eksperimentu slabo su uočljiva, a kod kasnijih ciklusa postepeno se spajaju u jedan sa oksidacionim pikom na potencijalu 0.44 V i redukcionim pikom na 0.32 V u 15. ciklusu (isprekidana kriva, slika 4). Spajanje dva redoks para u jedan posledica je inkorporiranja PSSA lanaca u PANI film koji nastaje na elektrodi.

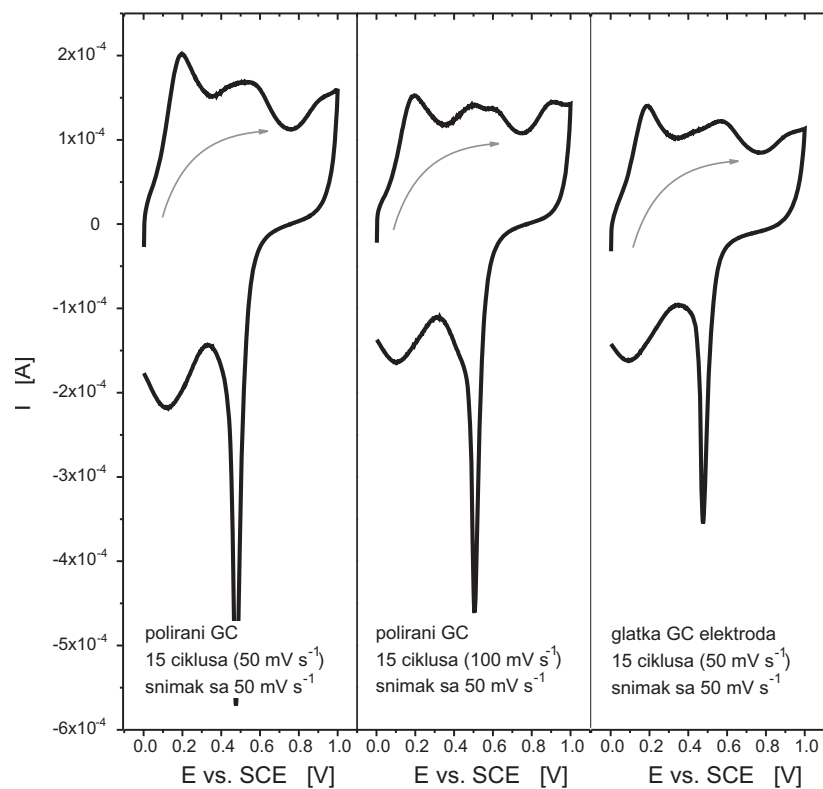
### Ciklična voltametrija – GC/PANI-PSSA

Na slici 5 prikazan je potenciodinamički odgovor PANI-PSSA filma u 0.1 M HCl elektrolitu, bez anilina i PSSA u rastvoru. Na ispitanoj intervalu potencijala primećena je promena boje filma na elektrodi od svetlo zelene



Slika 4. Tok elektrohemijske sinteze PANI-PSSA na GC elektrodi, I-E krive: GC3

Figure 4. Course of electrochemical synthesis of PANI-PSSA on GC electrodes, I-E curves: GC3



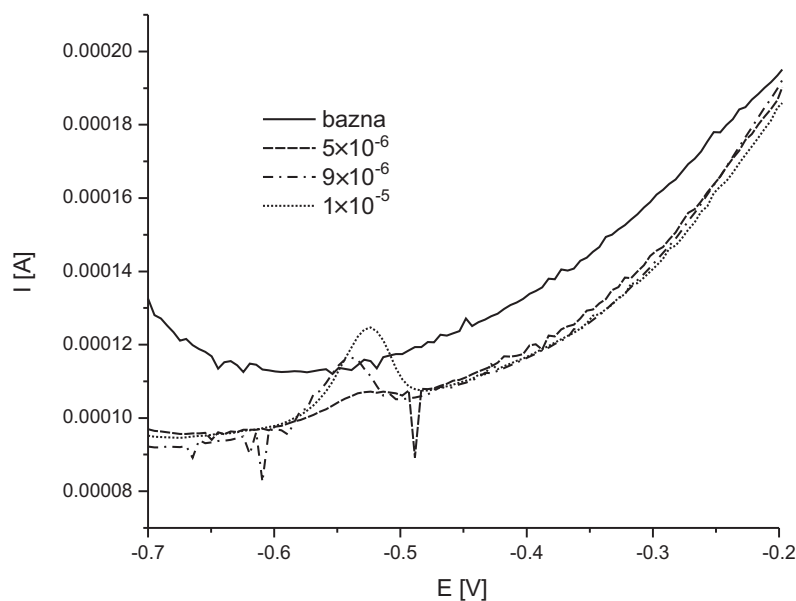
Slika 5. Potenciodinamički odgovor PANI-PSSA filma u 0.1 mol/L HCl: a) GC3, b) GC4, c) GC5

Figure 5. Potentiodynamic response of PANI-PSSA film in 0.1 mol/L HCl, a) GC3, b) GC4, c) GC5

na oko 0 V do tamno plave na oko 1 V. Proces oksidacije i redukcije filma je reverzibilan, sa relativno brzom promenom boje. Mogu se uočiti tri oksidaciona strujna maksimuma na 0.19, 0.57 i 0.90 V. Jedan jasno izražen redukциони pik na 0.46 V, koji nije karakterističan za ciklovoltamogram polianilina, pokazuje međudejstvo lanaca dvaju različitih polimera, PANI i PSSA.

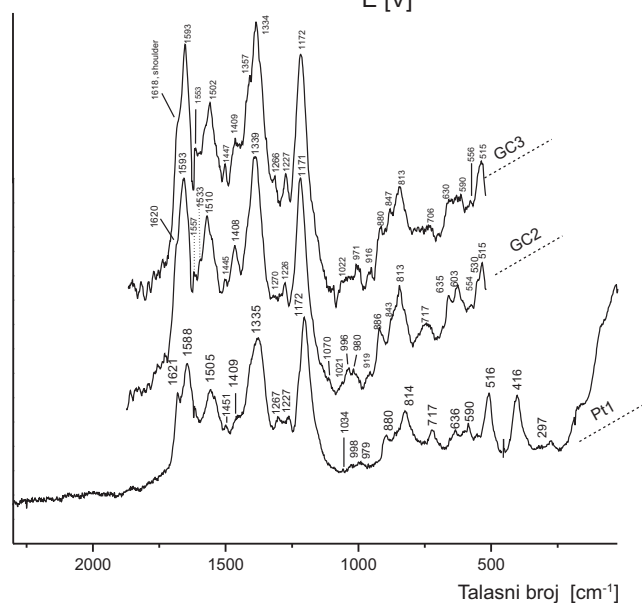
## Detekcija olova pomoću elektroda modifikovanih sa PANI-PSSA

Najniža koncentracija olova detektovana GC3 elektrodom metodom anodne stripping voltametrije iznosi  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L. Oksidacija olova dešava se na  $-0.54$  V pri skeniranju od negativnijeg ka pozitivnijem potencijalu (slika 6). Kriva bazne linije ima na čitavom intervalu potencijala veće vrednosti struje, što, pod pretpo-



Slika 6. Detekcija olova pomoću GC3 elektrode: voltamogrami za detekciju olova koncentracije:  $5 \times 10^{-6}$  mol/L,  $9 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L

Figure 6. Detection of lead ions via GC3 electrode: voltammograms for detection of lead ions in concentrations:  $5 \times 10^{-6}$  mol/L,  $9 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L



Slika 7. Raman spektri PANI-PSSA filmova (modifikovane elektrode Pt1, GC2 i GC3)

Figure 7. Raman spectra of PANI-PSSA films (modified electrodes Pt1, GC2 and GC3)

stavkom da nije u pitanju greška prilikom merenja, može da bude posledica jednog od sledeća dva procesa: ili prisustvo jona olova ima značajan uticaj na promenu elektrohemijskih svojstava polimera, ili je kvalitet filma opao pod uticajem električne struje nakon prvog snimanja (snimanja bazne linije), pa se ne može višekratno upotrebljavati. Zavisnost jačine struje od koncentracije olova nije linearna, ali ostaje mogućnost za poboljšanje kvaliteta elektrode u svrhu preciznijeg merenja.

## Raman spektroskopija

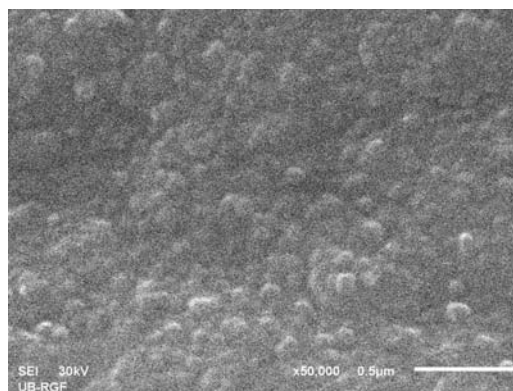
Ramanski spektri elektrohemijski sintetisanih PANI-PSSA filmova na GC elektrodi sadrže karakteristične jake trake polianilina u oblasti  $1600-1100\text{ cm}^{-1}$  koje prekrivaju trake PSSA (slika 7). Međutim, neke trake karakteristične za PSSA mogu se uočiti na talasnim brojevima  $\sim 635\text{ cm}^{-1}$ , kao i  $1070$ ,  $1034$  i  $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$  i uglavnom predstavljaju istezanje  $-\text{SO}_3^-$  i  $-\text{SO}_3\text{H}$  sulfonatnih grupa PSSA (Edwards *et al.* 2001). Jaka traka na  $1172\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od C-H deformacije semihinoidnog prstena PANI, tj. polaronske strukturne jedinice, ukazuje na visoku električnu provodljivost filmova.

## Skenirajuća elektronska mikroskopija GC/PANI-PSSA

PANI-PSSA film sintetisan elektrohemijski na GC elektrodi je kompaktni i granularne morfologije (slika 8). Ova činjenica se može smatrati indirektnim dokazom inkorporiranja PSSA, s obzirom da PSSA izaziva stvaranje nanostrukture polianilina (Yang *et al.* 2007).

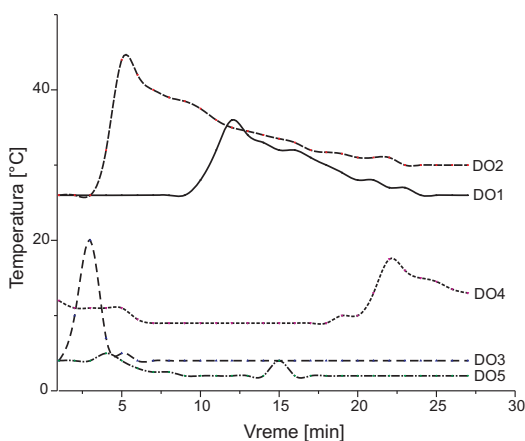
## Tok hemijske sinteze PANI-PSSA

Vremenski intervali od početka reakcije do naglog temperaturnog skoka (indukcioni period) su različitog trajanja, čak i kod sinteza izvedenih pri jednakim uslovima, pa tako za sinteze 3, 4 i 5 oni redom iznose 3, 22 i 15 minuta (slika 9). Energije aktivacije ove tri reakcije se prema tome očigledno razlikuju. Pretpostavlja se da je zbog različite brzine dodavanja iste količine inicijatora reakcije svaka reakcija pokretana na drugačiji način, stvaranjem različite količine nitrenijum katjona anilina.



Slika 8. SEM fotografija: GC3 elektroda (uvećanje: 50 000)

Figure 8. SEM micrograph of GC3 electrode (magnification: 50 000)



Slika 9. Temperature reakcionih smeša tokom sinteze uzoraka 3, 4 i 5

Figure 9. Temperatures of reaction mixture of samples 3, 4 i 5

Proizvodi sinteze nakon sušenja su u obliku ljuспи veličine oko 1 cm, glatke i sjajne površine, intenzivne tamnozelenе boje. Teško se sprаšuju jer su izuzetno tvrdi, što bi bilo povoljno za neke od primena provodnih polimera za koje su bitna mehanička svojstva.

Tabela 3. Provodljivosti uzoraka sintetisanih hemijskom oksidativnom polimerizacijom pri različitim uslovima

Uzorak	Trajanje sinteze (min)	Temperatura (°C)	Koncentracija dodate HCl (mol/L)	Provodljivost (S/cm)
2	30	25	0.1	0.045
5	30	4	0.1	0.028
7	180	5	1.0	0.056
10	180	-10	1.0	0.058
11	180	-10	0.1	0.049
12	180	25	1.0	0.064

### Električna provodljivost

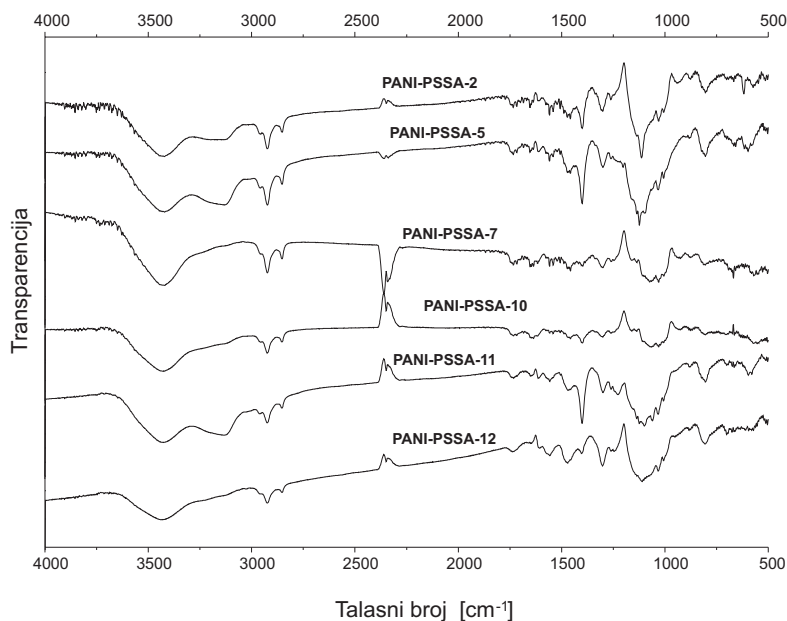
Prema podacima datim u tabeli 3, provodljivost svih ispitivanih uzoraka je istog reda veličine, ali je maksimalna vrednost provodljivosti, uzorka 12 preko 2 puta veća od provodljivosti uzorka 5, i iznosi 0.064 S/cm. S obzirom na uslove sinteze svakog uzorka, može se zaključiti da značajan uticaj na provodljivost imaju trajanje sinteze i pH vrednost reakcione smeše.

Uticaj pH vrednosti reakcione smeše je bitan, s obzirom da su tri uzorka najveće provodljivosti sintetisana u 1 mol/L rastvoru HCl. Niža pH vrednost tokom polimerizacije uslovljava veći

stepen protonovanja polianilina, što je preduslov za visoku elektroprovodljivost.

Uzorci 2 i 5, sintetisani tokom 30 min, imaju najmanju provodljivost. Pretpostavlja se da su, zbog kraćeg vremena sinteze PANI lanci kraći, usled čega je i njihova električna provodljivost manja. U toku sinteze uzorka 5 nije uočen veći temperaturni skok, pa je moguća da je reakcija zaustavljena pre nego što su formirani duži lanci PANI. Upravo je provodljivost ovog uzorka najmanja među ispitanimima.

Pored toga, razlika u provodljivosti polimera sintetisanih na različitim temperaturama je mala. Na primer, temperaturna razlika između sinteza



Slika 10. IR spektri navedenih uzoraka sintetisanih hemijskom oksidativnom polimerizacijom.

Figure 10. IR spectra of samples synthesized by chemical oxidative polymerization



broj 2 i 11 je 35°C, a razlika u provodljivosti je minimalna, iako je sinteza 11 trajala šest puta duže. Sintaza polianilina na nižoj temperaturi dovodi do povećane stope linearnosti molekula polimera i geometrijske uređenosti kristala polianilina, dok viša temperatura najverovatnije dovodi do višeg stepena dopovanja, bilo da je u pitanju bolje „usađivanje” PSSA lanaca u PANI matricu ili dopovanje malim, pokretnim jonima poput  $\text{Cl}^-$  i  $\text{SO}_4^{2-}$ .

### Infracrvena spektroskopija

U opsegu talasnih brojeva  $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  pojavljuje se apsorpciona traka koja je posledica istežanja N-H veza. Trake na  $1580$  i  $1480\text{ cm}^{-1}$  su karakteristične trake PANI koje redom potiču od C–C istežućih vibracija hinonoidnih i benzenovih prstenova. Isto tako, izražena oštra traka na  $1402\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje fenazinskim strukturama, uočena je kod manje provodljivih uzoraka 2, 5 i 11 (slika 10).

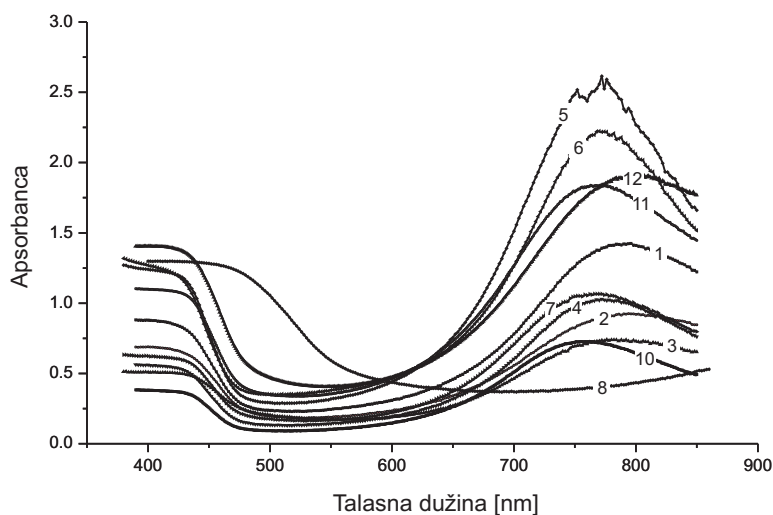
Trake na  $2920\text{ cm}^{-1}$  i  $2830\text{ cm}^{-1}$  potiču redom od asimetrične i simetrične C–H vibracije  $\text{CH}_2$  grupe iz  $\text{PSS}^-$  anjona. Traka na oko  $1640\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$  najverovatnije predstavlja C=C istežanje prstena fenazinskog tipa. Traka na  $1130\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$  pokazuje prisustvo sulfonske grupe iz  $\text{PSS}^-$  anjona (asimetrično istežanje S=O veze u  $\text{SO}_3^-$  grupi) (Socrates 2001). Apsorbanca na tom talasnom broju direktno je proporcio-

nalna koncentraciji PSSA dopanta u polianilinu (Neetika et al 2012). Traka na oko  $1300\text{ cm}^{-1}$  potiče od C–N $^+$  istežanja u polaronskim segmentima i C–N istežanja sekundarnog aromatičnog amina u PANI lancima.

### UV-Vis spektroskopija

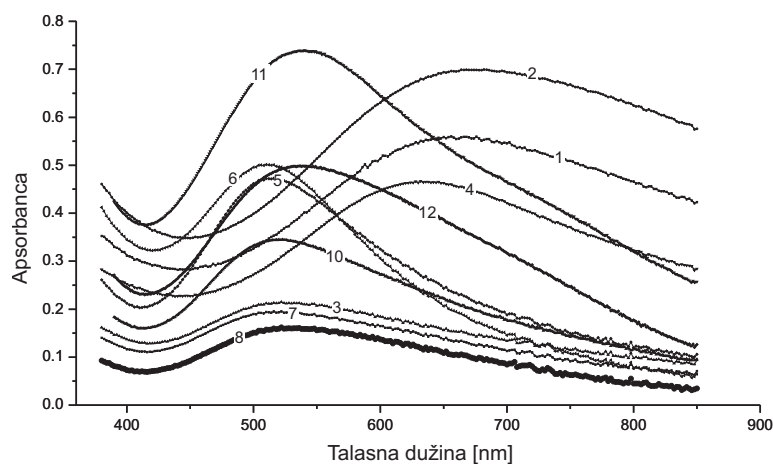
Spektri protonovanog oblika uzoraka PANI-PSSA (emeraldin soli) na slici 11 pokazuju apsorpcioni pik na 780 nm, isto kao i spektar polianilina koji nije dopiran PSSA (Pruneanu et al. 1999). To ukazuje da dopant-jon ovog kompleksa ne utiče na elektronsku strukturu emeraldin soli.

Kod vodenih rastvora većine PANI-PSSA uzoraka apsorpcioni maksimumi su u istom delu spektra, 750-800 nm (slika 11), dok kod deprotonovanih formi (slika 12) to nije uvek slučaj. Kod većina deprotonovanih uzoraka maksimum apsorpcije nalazi se na ~530 nm, što ukazuje na njihovu deprotonaciju i kraću dužinu i/ili konjugaciju PANI lanaca. Međutim, kod uzoraka 1, 2 i 4 maksimum se nalazi na 660 nm, najverovatnije zbog preklapanja polianilinskog pika provodljive (standardna emeraldin so ima apsorpcioni maksimum na oko 750 nm) i neprovodljive (bazne) forme (standardna emeraldin baza ima traku na oko 630 nm), odnosno zbog delimične deprotonacije/otpora prema deprotonaciji PANI u ovim uzorcima usled prisustva lanaca PSSA.



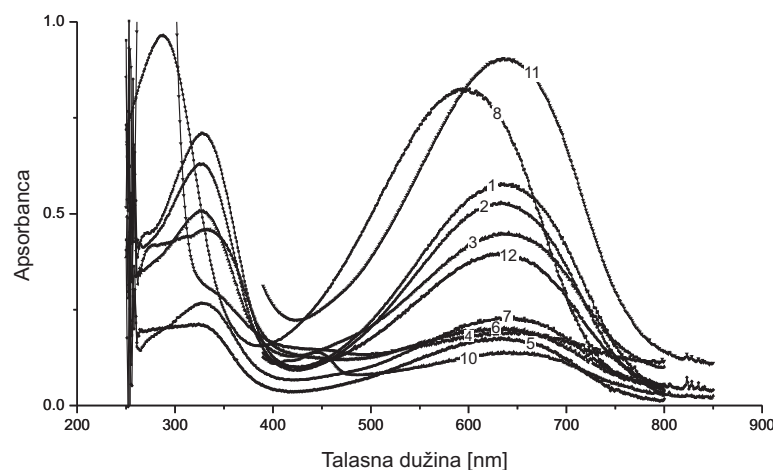
Slika 11. Vis Spektri PANI-PSSA uzoraka – vodena disperzija

Figure 11. Vis spectra of PANI-PSSA samples – aqueous dispersion



Slika 12. Vis spektri deprotonovanih formi PANI-PSSA u zasićenom vodenom rastvoru NaOH

Figure 12. Vis spectra of PANI-PSSA deprotonated forms in aqueous saturated solution of NaOH



Slika 13. UV-Vis spektri PANI-PSSA u N-metil-2-pirolidonu

Figure 13. UV-Vis spectra of PANI-PSSA in N-methyl-2-pyrrolidone

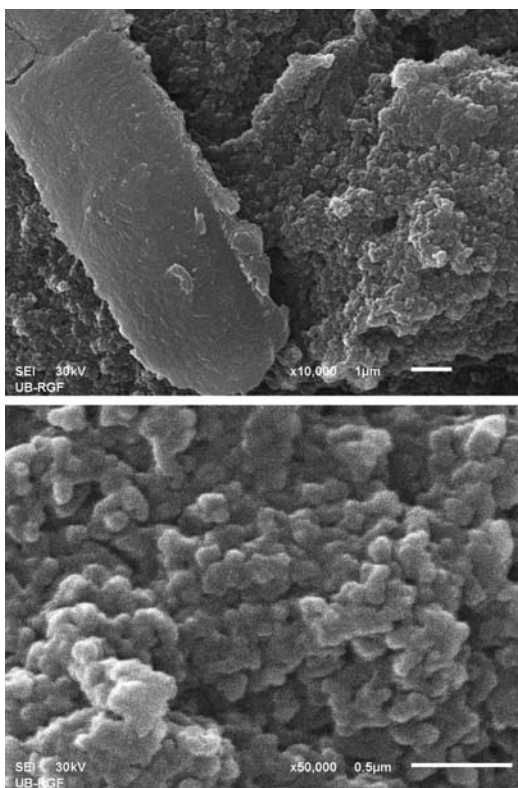
Deprotonacija PANI podrazumeva i istovremeni odlazak anjona (kontra-jona), ali pošto su polianjoni  $PSS^-$  upleteni u matrici PANI, deprotonacija PANI može biti otežana.

U N-metil-2-pirolidonu, apsorpcijski maksimumi PANI-PSSA nalaze se na 340 i 630 nm (slika 13). Maksimumi se nalaze na manjim talasnim dužinama nego u spektru vodene disperzije PANI-PSSA i na sličnim su pozicijama kao maksimumi deprotonovanih proizvoda 1, 2 i 4 u zasićenom vodenom rastvoru NaOH. Pretpostavlja se da je u N-metil-2-pirolidonu došlo do deprotonovanja PANI-PSSA, na šta je ukazivala i plava boja rastvora PANI-PSSA. Traka na ~340 nm nastaje usled  $\pi \rightarrow \pi^*$  elektronskog pre-

laza u okviru benzenovog prstena. Traka na ~630 nm se pripisuje intramolekulskom transferu naelektrisanja sa najviše popunjene orbitale (HOMO) na benzenovom prstenu na najnižu nepopunjenu orbitalu (LUMO) na hinonoidnom prstenu ( $B \rightarrow Q$  exciton traka) i karakteristična je za emeraldin bazu PANI.

### Morfologija PANI-PSSA uzoraka

SEM fotografije uzoraka pokazuju njihovu iregularnu i globularnu površinsku strukturu (slika 14), što se takođe može smatrati indirektnim dokazom inkorporiranja PSSA, pošto PSSA izaziva stvaranje nanostrukture polianilina (Yang *et al.* 2007).



Slika 14. SEM fotografije PANI-PSSA uzorka br. 12 sa odgovarajućim uveličanjem: gore 10 000, dole 50 000

Figure 14. SEM micrographs of the PANI-PSSA-12 (with appropriate magnification): above 10 000, below 50 000

## Zaključak

Sintetisan je i okarakterisan proizvod oksidativne elektrohemijske i hemijske polimerizacije anilina u prisustvu poli(4-stirensulfonske kiseline), PSSA. Rezultati karakterizacije ukazuju na postojanje PSSA lanaca ugrađenih u matricu polianilina. IR, Raman i UV/Vis spektri potvrđuju visoku elektroprovodljivost, koja iznosi 0.028 do 0.064 S/cm. Pored provodljivosti, ovi spektri, kao i ciklovoltamogrami, potvrđuju prisustvo PSSA u matrici PANI, sa приметnim

uticajem na elektrohemijska svojstva polianilina. SEM fotografije PANI-PSSA u obliku praha i filma na elektrodi pokazuju iregularno-globularnu strukturu. PANI-PSSA kompleks sintetisan elektrohemijskim putem, deponovan na GC elektrodi, upotrebljen je za detekciju jona olova u vodenom rastvoru, pri čemu je izmerena donja granica detekcije od  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L.

## Zahvalnost

Ovo istraživanje delom je realizovano zahvaljujući pomoći Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, kao i katedre za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujemo dr Gordani Ćirić-Marjanović, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, na pomoći u teorijskom delu rada i na laboratorijskim uslovima koje nam je obezbedila za ovo istraživanje.

Zahvaljujemo se i:

dr Daliboru Stankoviću, asistentu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći pri detekciji jona olova elektrodama modifikovanim PANI-PSSA slojem i obezbeđenim laboratorijskim uslovima;

dr Aleksandri Janošević, asistentu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na izmerenoj električnoj provodljivosti i FTIR spektrima uzoraka PANI-PSSA;

dr Danici Bajuk-Bogdanović, istraživaču-saradniku Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, na snimanju FTIR spektara uzoraka;

dr Igoru Paštiju, docentu Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, na snimanju ciklovoltamograma elektroda modifikovanih PANI-PSSA slojem;

Nikoli Vukoviću, istraživaču-pripravniku Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na snimanju uzoraka skenirajućim elektronskim mikroskopom;

dr Draganu Manojloviću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim savetima.

Takođe, zahvalnost dugujemo firmi Centrohem, Stara Pazova, na doniranim hemikalijama potrebnim za ovo istraživanje.

## Literatura

- Ćirić-Marjanović G., Konyushenko E. N., Trchová M., and Stejskal J. 2008. Chemical Oxidative Polymerization of Anilinium Sulfate versus Aniline: Theory and Experiment. *Synthetic Metals*, **158**: 200.
- Ćirić-Marjanović G., Trchová M., Stejskal J. 2008. The chemical oxidative polymerization of aniline in water: Raman Spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, **39**: 1375.
- Ćirić-Marjanović G. 2013. Recent advances in polyaniline research: Polymerisation mechanisms, structural aspects, properties and applications. *Synthetic Metals*, **177**: 1.
- Da Silva J. E. P., de Torresi S. I. C., Temperini M. L. A. 2000. Redox behaviour of crosslinked polyaniline films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **11**: 91.
- Edwards H. G. M., Brown D. R., Dale J. R. 2001. Raman spectroscopic studies of acid dissociation in sulfonated polystyrene resins. *Journal of molecular structure*, **595**: 111.
- Pruneanu S., Veress E., Marian I., Oniciu L. 1999. Characterization of polyaniline by cyclic voltammetry and UV-Vis spectroscopy. *Journal of materials science*, **34**: 2733.
- Rakić A., Bajuk-Bogdanović D., Mojović M., Ćirić-Marjanović G., Milojević M., Mentus S., Marjanović B., Trchová M., Stejskal J. 2011. Oxidation of aniline in dopant-free template-free dilute reaction media. *Materials Chemistry and Physics*, **127**: 501.
- Socrates G. 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. Wiley
- Trchová M., Šedekova I., Konyushenko E. N., Stejskal J., Holler P., Ćirić-Marjanović G. 2006. Evolution of Polyaniline Nanotubes: The Oxidation of Aniline in Water. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**: 9461.
- Vivekanandan J., V., Mahudswaran A., Vijayanand P. S. 2011. Synthesis, characterization and conductivity study of polyaniline prepared by chemical oxidative and electrochemical methods. *Archives of Applied Science Research*, **3** (6): 147.
- Yang J., Ding Y., Chen G., Li C. 2007. Synthesis of conducting polyaniline using novel anionic Gemini surfactant as micellar stabilizer. *European polymer journal*, **43** (8): 3337.

---

Olivera Živojinović and Dragana Sretenović

## Optimization of Synthesis of Poly(4-styrenesulfonic acid) Doped Polyaniline and its use for Lead Ions Determination

In order to synthesize polymers with various properties, PANI-PSSA was synthesized in different conditions. The two main synthetic directions were electrochemical polymerization and chemical oxidative polymerization.

The presence of PSSA in synthesized polymers was proven by FTIR and Raman spectroscopy. Cyclovoltamograms of GC/PANI-PSSA show modified redox activity of polyaniline. SEM micrographs of PANI-PSSA powders and films on electrodes show their irregularly-globular morphology.

Electrochemically synthesized PANI-PSSA on glassy carbon electrodes was tested for the determination of concentration of lead ions,  $Pb^{2+}$ , and the lowest concentration detected by anodic stripping voltammetry on GC/PANI-PSSA electrode was  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L.

Different conditions of chemical oxidative aniline polymerization in the presence of poly(4-styrenesulfonic) acid were examined in order to obtain the product with the maximum electrical conductivity. The highest values of conductivity for PANI-PSSA amounted to 0.064 S/cm.

---

Milica Puđa

## Elektrohemijska i bio-degradacija boje metilensko plavo

---

Procesima elektrohemije i hemijske razgradnje moguće je ukloniti boju metilensko plavo iz otpadnih voda iz tekstilne industrije. Ova boja, kada dospe u životnu sredinu, inhibira proces fotosinteze i dovodi do smrti bakterija. U ovom radu ispitan je tok elektrohemije i bio-degradacije ove boje. Za elektrohemijsku degradaciju kao anodni materijal korišćen je Pb/PbO<sub>2</sub>, a kao katodni gvozdена pločica. Početna koncentracija boje održavana je konstantnom i iznosila je 100 mg/L. Varirani parametri bili su gustina električne struje (25 i 35 mA/cm<sup>2</sup>) i pH vrednost rastvora boje (2.5, 5.0 i 6.9). Za biodegradaciju je korišćen bakterijski soj *Pseudomonas sp. C2*. Procesi biodegradacije odvijani su u minimalnom medijumu (medijum bez izvora ugljenika). Varirani su početna koncentracija boje (5, 10 i 20 mg/L) i pH vrednost rastvora boje (5.0, 7.0 i 8.0). Koncentracija boje zaostale nakon degradacije određivana je spektrofotometrijski. Najviši stepen elektrohemijske degradacije (98.7%) postignut je pri pH vrednosti 5.0 i gustini električne struje od 35 mA/cm<sup>2</sup>, dok je najviši stepen biodegradacije boje postignut pri pH vrednosti 7.0 (91.0 %) i početnoj koncentraciji boje 20 mg/L.

---

### Uvod

Metilensko plavo, tiazinska boja, je heterociklično aromatično jedinjenje molekulske formule C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>SCl (slika 1). Na sobnoj temperaturi se javlja u obliku čvrstog, tamno-zelenog praha bez mirisa, koji se rastvara u vodi. Metilensko plavo se koristi u hemiji kao indika-

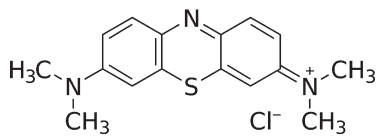
tor, za dokazivanje sulfida, u biologiji kao marker za različite postupke bojenja tkiva (Steffen *et al.* 2014), a u medicini se koristi u terapiji kancera (Davis *et al.* 2013), malarije (Meissner *et al.* 2006), methemoglobinemije (Skold *et al.* 2011), kod trovanja cijanidima i ugljenik(II)-oksidom (Brooks 1933). Toksičnost afektuje inhibiciju procesa fotosinteze i dovodi do smrti bakterija, jer ima baktericidno dejstvo (Tabbaral i Jamal 2012). Procesima elektrohemijske i biodegradacije moguće je ukloniti ovu boju iz otpadnih voda (Cibulić *et al.* 2013).

Elektroliza je proces razlaganja supstanci pod dejstvom jednosmerne struje. Elektrohemijska ćelija je sistem koji pretvara hemijsku energiju redoks reakcije u električnu energiju. Elektrohemijska ćelija ima dve elektrode, anodu i katodu koje mogu biti metalne, staklene, grafitne ili druge. Elektrodne reakcije su oksidacione reakcije na faznim granicama između elektrodnog materijala i elektrolita. Zbog proticanja struje kroz elektrolit, anjoni se kreću ka pozitivnoj elektrodi (anodi), a katjoni se kreću ka negativno naelektrisanjoj elektrodi (katodi). Na elektrodama se joni izdvajaju u obliku atoma ili molekula. Pri tome, anjoni predaju anodi višak elektrona (oksidacija), dok istovremeno na katodi katjoni primaju jednaku količinu elektrona (redukcija). Na ovaj način se kretanjem jona naelektrisanje prenosi sa jedne elektrode na drugu, čime se zatvara strujno kolo. Dimenziono stabilne anode (DSA) su elektrode kod kojih se

---

Milica Puđa (1996), Beograd,  
Borisavljevićeva 1, učenica 3. razreda  
Farmaceutsko-fizioterapeutske škole u  
Beogradu

MENTOR: Miljan Ćorović, student I godine  
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Slika 1. Strukturna formula boje metilensko plavo

Figure 1. Methylene blue structure

matriks, koji se najčešće sastoji od grafita, titana, cirkonijuma ili talijuma, termički oblaže tankim slojem plemenitog metala, kao što je rutenijum, ili oksidom metala kao što je olovo(IV)-oksid, kalaj(IV)-oksid, titanijum(IV)-oksid ili iridijum(IV)-oksid (Sujitha *et al.* 2009). Korišćenjem ovih anoda postižu se visoki procenti degradacije supstanci iz otpadnih voda uz manju vrednost gustine električne struje (20–40 mA/cm<sup>2</sup>) (Chen i Huang 2012).

*Pseudomonas* je rod Gram-negativnih aerobnih bakterija. Neke bakterije iz roda *Pseudomonas* imaju sposobnost konzumacije aromatičnih jedinjenja kao jedinog izvora ugljenika i energije. One se koriste za biodegradaciju organskih supstanci rastvorenih u otpadnim vodama, kao i za bioremedijaciju zagađenog zemljišta (Chen *et al.* 2007). U ovom radu su korišćene bakterije *Pseudomonas* sp. C2.

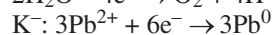
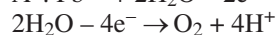
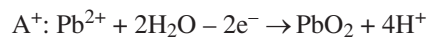
Biodegradacija boje predstavlja hemijsku razgradnju supstanci bakterijama ili drugim biološkim materijalima. Ovom metodom je moguće izvršiti razgradnju početne komponente do jednostavnijih, kao što su CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> ili drugih mineralnih supstanci. Bakterije koje mogu vršiti biodegradaciju su sposobne da koriste ispitivanu boju kao osnovni izvor ugljenika. To su bakterije iz rodova *Bacillus* sp (Zhang *et al.* 2013), *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp (Wang *et al.* 2007), *Achromobacter* sp. Ovi mikroorganizmi su osetljivi na povišene koncentracije boja, u čijem prisustvu dolazi do inhibicije porasta mikroorganizama (Chen *et al.* 2007). Enzim azo-reduktaza, koji sintetišu bakterije, je odgovoran za bio-degradaciju boja. Ovaj enzim katalizuje kidanje azo-veze prisutne u strukturi mnogih tekstilnih boja. Njegova aktivnost zavisi od pH vrednosti sredine, on je najaktivniji u slabo baznoj i neutralnoj sredini (pH 7–8) (Jadhav *et al.* 2013).

Cilj ovog rada je utvrđivanje efikasnosti i međusobno poređenje elektrohemijske i bio-degradacije boje metilensko plavo u različitim uslovima sredine i koncentracijama boje korišćenjem električne struje različite gustine.

## Materijal i metode

U radu su za elektrohemisjku degradaciju boje metilensko plavo korišćene, kao anoda DSA Pb/PbO<sub>2</sub> elektroda, a kao katoda gvozdена pločica. Ispitivan je uticaj vrednosti gustine električne struje (25 i 35 mA/cm<sup>2</sup>) i pH vrednosti sredine (2.5, 5.0 i 6.9). Za bio-degradaciju boje korišćen je soj bakterija *Pseudomonas* sp. C2. Biodegradacija je odvijana u minimalnom medijumu. Ispitivan je uticaj pH vrednosti sredine (5.0, 7.0 i 8.0) i početne koncentracije boje (5, 10 i 20 mg/L). Tokovi elektrohemijske i bio-degradacije su praćeni spektrofotometrijski, na 662 nm ( $\lambda_{max}$  metilenskog plavog). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, izračunati su standardna devijacija i koeficijenti varijacije.

**Priprema Pb/PbO<sub>2</sub> elektrode.** Elektrodepozicijom (postupak taloženja čvrstog materijala na elektrodnu površinu procesom elektrolize) je izvršeno taloženje sloja PbO<sub>2</sub> na olovnoj pločici. Pločica je mehanički očišćena abrazivnim papirom od sukcesivnih neravnina i onda isprana u dva petnaestominutna koraka u ultrazvučnom kupatilu acetonom i destilovanom vodom. Zatim je isprana rastvorom sumporne kiseline (25%) u cilju otklanjanja površinskih nečistoća. Elektrodepozicioni eksperimenti su sprovedeni pomoću dve elektrode, gde je Pb pločica korišćena kao anoda a gvozdена pločica kao katoda. Razmak između katode i anode je podešen na 2 cm. Kao elektrolit korišćen je rastvor Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (16.7 g u 1 L rastvora 0.1 mol/L HNO<sub>3</sub>). Elektrodepozicija sloja PbO<sub>2</sub> se odvijala po reakcijama:



Sloj PbO<sub>2</sub> je generisan nakon 2 h, pri 20 mA/cm<sup>2</sup>, na 25°C, uz konstantno mešanje magnetnom mešalicom.

**Elektroliza boje metilensko plavo.** Elektroliza boje metilensko plavo, koncentracije

100 mg/L, odvijana je u 30 mL rastvora Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> koncentracije 0.1 mg/L. Temperatura i početna koncentracija boje su održavane konstantnim i to 25°C, odnosno 100 mg/L. Elektrohemijska degradacija je trajala 2 sata. Uzimani su alikvoti elektrolitičkog rastvora zapremine 100 µL u prvih 30 minuta na svakih 5 minuta, a kasnije na svakih 15 minuta, radi praćenja stepena degradacije, odnosno smanjenja koncentracije boje. Promena apsorbanca boje je praćena spektrofotometrijski. Uzorci su pre analize razblaženi do 1 mL rastvorom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> koncentracije 0.1 mol/L. Procenat degradacije boje, odnosno efikasnost elektrolize računat je po formuli:

$$\text{Efikasnost obezbojavanja (\%)} = \frac{100(A_0 - A)}{A_0}$$

**Spektrofotometrijska analiza.** Apsorbanca je merena na spektrofotometru ISKRA AM 5923, osim snimanja celog spektra koji je snimljen na spektrofotometru Thermo Scientific 60 S UV-Visible. Snimanjem spektra boje metilensko plavo određen je maksimum apsorbcije na talasnoj dužini 662 nm.

**Biodegradacija boje metilensko plavo.** Biodegradacija boje metilensko plavo vršena je tako što je suspenzija bakterija zapremine 1 mL u Lysogeny broth (LB) medijumu centrifugirana i resuspendovana u minimalnom medijumu. U minimalnom medijumu, varirana je koncentracija rastvorene boje (5, 10 i 20 mg/L). 1 L minimalnog medijuma sadrži 4.36 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.45 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.00 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.91 g MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O. pH ovog rastvora je podešen na 7.0 pomoću rastvora NaOH koncentracije 2 mol/L. U litar ovog medijuma je dodat 1 mL bazalnog rastvora soli. Količina od 100 mL bazalnog rastvora soli sadrži: 4.77 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.37 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.37 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.02 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Biodegradacija je praćena na pH vrednostima 3.0, 7.0 i 8.0 koje su podešavane pomoću rastvora HCl i NaOH koncentracija 0.1 mol/L. U procesu biodegradacije za kultivisanje bakterija korišćen je minimalni medijum da bi molekuli boje bili jedini izvor ugljenika za bakterijsku ćeliju. Biodegradacija je praćena 8 časova, tako što je na svakih sat vremena alikvotirana zapremina od 1 mL.

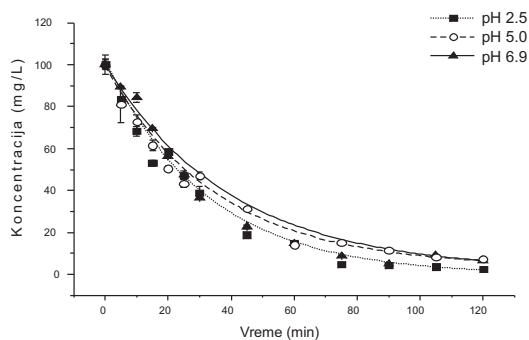
## Rezultati i diskusija

Procesom elektrodepozicije generisan je sloj PbO<sub>2</sub>.

Rezultati elektrohemijske degradacije boje pri gustini struje od 25 mA/cm<sup>2</sup> i različitim pH vrednostima prikazani su na slici 2, a stepen degradacije boje za poslednji alikvot, izražen u procentima, u tabeli 1.

Tabela 1. Stepen elektrohemijske degradacije boje pri različitim pH vrednostima i gustini struje od 25 mA/cm<sup>2</sup>

pH vrednost elektrolitičkog rastvora	Stepen degradacije boje (%)
2.5	97.4
5.0	92.2
6.9	93.4



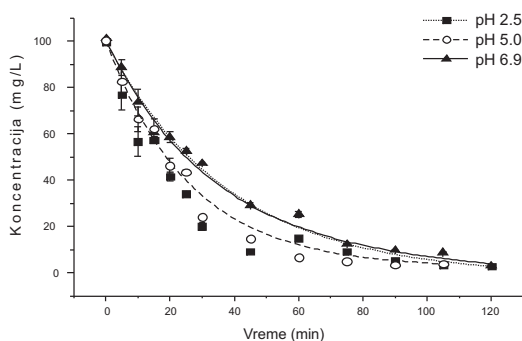
Slika 2. Elektrohemijska degradacija boje pri gustini struje od 25 mA/cm<sup>2</sup>

Figure 2. Electrochemical degradation of dye at current intensity of 25 mA/cm<sup>2</sup>

Stepen degradacije boje na sve tri pH vrednosti, pri gustini struje od 25 mA/cm<sup>2</sup> je preko 90%. Najviši stepen degradacije se javlja pri elektrolizi u veoma kiseljoj sredini, pH 2.5 (97.4%), zatim pri elektrolizi na pH 6.9 (93.4%), dok najniži stepen degradacije boje se javlja pri elektrolizi na pH 5.0 (92.2%). Razlika između procenata degradacije iz poslednjih alikvota na sve tri pH

vrednosti je minimalna, iz čega sledi da variranje pH vrednosti nema veliki uticaj na elektrohemijsku degradaciju boje, što nije u skladu sa dosadašnjim ispitivanjima. Sa slike 2 se može primetiti da se brzina elektrohemijske degradacije boje menja u zavisnosti od vremena. Degradacija je najbrža u prvih 30 minuta, i u tom periodu se koncentracija boje smanjila sa 100 na 40 mg/L što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima iz ove oblasti (Awad i Galwa 2005).

Rezultati elektrohemijske degradacije boje pri različitim pH vrednostima i gustini struje od 35 mA/cm<sup>2</sup> prikazani su na slici 3, a stepen degradacije boje za poslednji alikvot u tabeli 2.



Slika 3. Elektrohemijska degradacija boje pri gustini struje od 35 mA/cm<sup>2</sup>

Figure 3. Electrochemical degradation of dye at current intensity of 35 mA/cm<sup>2</sup>

Tabela 2. Stepen degradacije boje pri različitim pH vrednostima i jačini struje od 35 mA/cm<sup>2</sup>

pH vrednost elektrolitičkog rastvora	Stepen degradacije (%)
2.5	97.2
5.0	98.7
6.9	96.6

Stepen degradacije boje na sve tri pH vrednosti, pri jačini struje od 35 mA/cm<sup>2</sup> je, takođe veoma visok, preko 90%. Najviši stepen degradacije se javlja pri elektrolizi u umereno kiseloj

sredini, pH 5.0 (98.7%), zatim pri elektrolizi na pH 2.5 (97.2 %), dok se najniži stepen degradacije boje javlja pri elektrolizi na pH 6.9 (96.9%). Razlika između procenata degradacije iz poslednjih alikvota na sve tri pH vrednosti je minimalna, iz čega ponovo proizilazi da variranje pH vrednosti nema veliki uticaj na stepen degradacije boje. Obezbojavanje rastvora, odnosno degradacija boje, najbrža je u prvih 20 minuta od početka elektrolize, kada se koncentracija boje smanjila sa 100 na 30 mg/L. Stepen degradacije boje je viši pri višoj gustini električne struje, jer se sa povećanjem gustine struje povećava i produkcija kiseoničnih radikala. Usled povećane produkcije kiseoničnih radikala dolazi do brže i potpunije degradacije boje.

Vrednosti koeficijenata varijacije rezultata elektroliza pri različitim pH vrednostima i gustinama električne struje prikazane su u tabeli 3.

Tabela 3. Srednje vrednosti koeficijenata varijacije rezultata elektrohemijske degradacije boje pri različitim pH vrednostima i jačinama električne struje

Gustina električne struje (mA/cm <sup>2</sup> )	pH=2.5	pH=5.0	pH=6.9
25	7.29	5.40	4.82
35	6.12	6.66	8.34

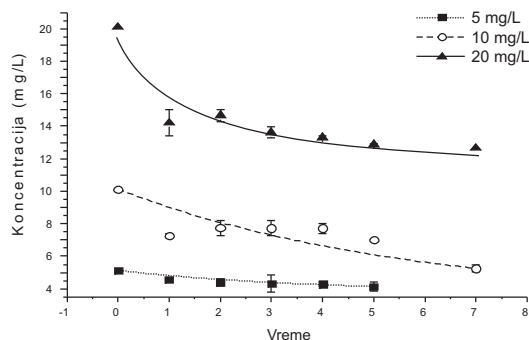
Rezultati biodegradacije boje različitih koncentracija pri pH 5.0 prikazani su na slici 4, a stepen degradacije boje za poslednji alikvot u tabeli 4.

Tabela 4. Stepeni degradacije boje pri pH 5

Koncentracija boje (mg/L)	Stepen degradacije (%)
5	21.5
10	54.8
20	37.1

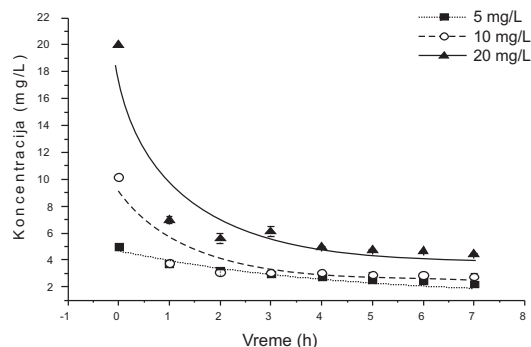
Rezultati biodegradacije različitih koncentracija boje pri pH 7.0 prikazani su na slici 5, a stepen degradacije boje za poslednji alikvot u tabeli 5.





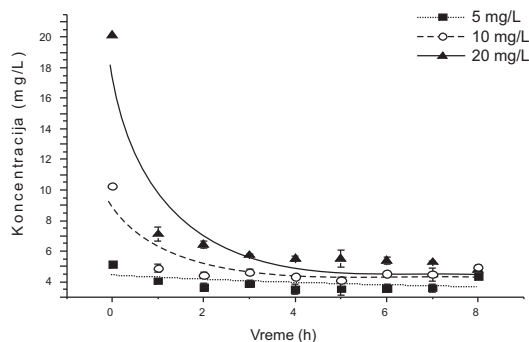
Slika 4. Biodegradacija boje pri pH 5.0

Figure 4. Biodegradation of dye at pH 5.0



Slika 6. Biodegradacija boje pri pH 8.0

Figure 6. Biodegradation of dye at pH 8.0



Slika 5. Biodegradacija boje pri pH 7.0

Figure 5. Biodegradation of dye at pH 7.0

Tabela 5. Stepeni degradacije boje pri pH 7.0

Koncentracija boje (mg/L)	Stepen degradacije (%)
5	21.4
10	57.8
20	91.0

Rezultati biodegradacije različitih koncentracija boje pri pH 8.0 prikazani su na slici 6, a stepen degradacije boje za poslednji alikvot u tabeli 6.

Tabela 6. Stepeni degradacije boje pri pH 8.0

Koncentracija boje (mg/L)	Stepen degradacije (%)
5	58.8
10	75.0
20	78.0

Bio-degradacija boje metilensko plavo pomoću bakterijskog soja *Pseudomonas* sp. je najefikasnija pri pH 7.0, pri koncentraciji boje od 20 mg/L (91.0%). Pri neutralnoj pH vrednosti efikasnost enzima azo-reduktaze je veća u odnosu na kiselu i baznu sredinu, pa je i stepen degradacije boje viši. Pri pH vrednostima 5.0 i 8.0 stepen degradacije boje je niži pri svim koncentracijama boje, jer dolazi do inhibicije kapaciteta bio-degradacije metilenskog plavog u kiseljoj i baznoj sredini. Razlog inhibicije kapaciteta bio-degradacije jeste smanjena efikasnost enzima azo-reduktaze u kiseljoj (pH 5.0) i baznoj sredini (pH 8.0). Takođe, pri pH vrednostima 7.0 i 8.0, u prvih sat vremena degradacije dolazi do najintenzivnijeg obezbojavanja rastvora pri višim početnim koncentracijama boje. Tako je pri pH 7.0 od 10, odnosno 20 mg/L degradiralo 58 %, odnosno 64.5 % boje, dok je pri pH 8.0 od 10, odnosno 20 mg/L degradiralo 62 %, odnosno 65 % boje.

Tako pri pH 7.0 ostaje 4.2 od 10 mg/L, odnosno 7.1 od 20 mg/L, dok pri pH 8.0 ostaje 3.8 od 10 mg/L, odnosno 7.0 od 20 mg/L.

Vrednosti koeficijenta varijacije rezultata biodegradacija pri različitim pH vrednostima i koncentracijama boje za poslednji alikvot prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7. Srednje vrednosti koeficijenta varijacije pri različitim pH vrednostima i koncentracijama boje

Koncentracija boje (mg/L)	pH=5.0	pH=7.0	pH=8.0
5	4.85	6.30	3.37
10	3.48	4.09	4.27
20	2.08	3.99	2.87

## Zaključak

Postupci elektrohemijske i bio-degradacije mogu se uspešno primenjivati za snižavanje koncentracije metilenskog plavog u otpadnim vodama koje potiču iz tekstilne i drugih industrija.

Rezultati istraživanja pokazuju da pH vrednost ne utiče značajno na tok elektrohemijske degradacije, što ukazuje da se ovaj vid razgradnje boje može primeniti u tretmanu otpadnih voda, nezavisno od njihove pH vrednosti u kiselj sredini. Primenom većih gustina električne struje ( $35 \text{ mA/cm}^2$ ) došlo je do potpunije elektrohemijske degradacije (98.7%), u poređenju sa gustinom struje od  $25 \text{ mA/cm}^2$  (92.2 %). Brzina degradacije boje u početnoj fazi se povećava sa porastom gustine struje sa 25 na  $35 \text{ mA/cm}^2$  sa 60 mg/L razgrađene boje u 30 minuta na 70 mg/L u toku 20 minuta.

Ustanovljeno je da pH vrednost sredine voma utiče na stepen bio-degradacije boje. Pri visokoj početnoj koncentraciji boje (20 mg/L) najveći stepen degradacije javlja pri pH 7.0 (91.0%), dok je pri niskoj početnoj koncentraciji boje (5 mg/L) najveće obezbojavanje rastvora ustanovljeno pri pH 8.0 (58.8%). Niska pH vrednost (5.0) nepovoljno utiče na tok bio-degradacije i rezultira degradiranjem 21 do 55% boje pri

variranju početne koncentracije boje od 5 do 20 mg/L. Brzina degradacije boje u prvih sat vremena procesa je najveća pri pH 8.0 gde je od 10, odnosno 20 mg/L degradiralo 62%, odnosno 65% boje.

Kada govorimo o ekonomičnosti metoda degradacije boje iz otpadnih voda, metoda izbora je elektrohemisjka metoda, jer kraće traje i stepen degradacije boje je viši. S druge, ekološke strane, metoda izbora je bio-degradacija boje, prvenstveno zato što se vrši pomoću bakterijskog soja koji se može izolovati iz prirode, kao i mogućnosti primene ove metode u radu sa realnim uzorcima u prirodi.

**Zahvalnost.** Ovom prilikom želim da se zahvalim svom mentoru Miljanu Čoroviću, stručnim saradnicima Ivanu Mrkiću i Aleksandri Margetić, studentima saradnicima Stevanu Vlajinu, Marinu Kuntiću, Zlatku Jončevu i Filipu Iliću na pomoći oko eksperimentalnog rada i profesorki Veri Raičević i saradniku Daliboru Stankoviću koji su obezbedili potreban material za realizaciju eksperimenata.

## Literatura

- Awad H. S., Galwa A. N. 2005. Electrochemical degradation of acid blue and basic brown dyes on Pb/PbO<sub>2</sub> electrode in the presence of different conductive electrolyte and effect of various operating factors. *Chemosphere*, **61** (9): 1327.
- Brooks M. M. 1933. Methylene blue as antidote for cyanide and carbon monoxide poisoning. *Journal of the American Medical Association*, **100** (1): 59.
- Cibulić V. V., Stamenković J. L., Veljković D. N., Staletović M. N. 2013. Dynamics of the process of colour adsorption from waste waters after dyeing textile fibres on natural zeolites. *Chemical Industry*, **67** (1): 41.
- Chen C. C., Liao H. J., Cheng C. Y., Yen C. Y., Chung Y. C. 2007. Biodegradation of crystal violet by *Pseudoonasputida*. *Biotechnology Letters*, **29**: 391.

- Chen T. S., Huang K. L. 2012. Electrochemical detection and degradation of acetaminophen in aqueous solution. *International Journal of Electrochemical Science*, **7**: 6877.
- Davis A. L., Cabello C. M., Qiao S., Wondrak A., Wondrak G. T. 2013. Phenotypic Identification of the redox dye methylene blue as an antagonist of heat shock response gene expression in metastatic melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **14** (2), 185.
- Jadhav S. B., Surwase S. N., Phugare S. S., Jadhav J. P. 2013. Response surface methodology mediated optimization of Remazol Orange decolorization in plain distilled water by *Pseudomonas aeruginosa* BCH. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **10** (1): 181.
- Meissner E. P., Mandi G., Coulibaly B., Witte S., Tapsoba T., Mansmamm U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Walter-Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K. D., Schirmer H., Kouyate B., Muller O. 2006. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malaria Journal*, **5** (1): 84.
- Skold A., Cosco D., Klein R. 2011. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *Southern medical journal*, **104** (11): 757.
- Steffen J., Rice J., Lecuona K., Carrara H. 2014. Identification of ocular surface squamous neoplasia by in vivo staining with methylene blue. *British Journal of Ophthalmology*, **98**: 13.
- Sujitha S., Jeevitha R. R., Palanivelu K. 2009. A Study on the degradation of 2,4-dichlorophenol by electrochemical oxidation using TiO<sub>2</sub> modified graphite electrode. *Science of Advances Materials*, **1** (2): 186.
- Tabbaral M. A., Jamal E. M. M. 2012. A kinetic study of the discoloration of methylene blue by Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, comparison with NaOH. *Journal of University of Chemical Technology and Metallurgy*, **43** (7): 275.
- Wang Y., Tian Y., Han B., Zhao H., Bi J., Cai B. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Science*, **19** (2): 222.
- Zhang Y., Lu D., Ju T., Wang L., Lin S., Zhao Y., Wang C., He H., Dui Y. 2013. Biodegradation of phenol using *Bacillus cereus* WJ1 and evaluation of degradation efficiency based on a graphene-modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, **8** (1): 504.

---

*Milica Puđa*

## Electrochemical and Bio-Degradation of the Dye Methylene Blue

Methylene blue, thiazine dye, is a heterocyclic aromatic compound with the molecular formula C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>SCl. It is toxic for living organisms. It prevents photosynthesis and leads to the death of bacterial cells. By application of electrochemical and bio-degradation this dye can be removed from waste water originating from textile industry. For electrochemical degradation, a Pb/PbO<sub>2</sub> plate was used as an anode, while an iron plate was used as a cathode. The initial dye concentration was 100 mg/L, the variation of the electric current intensity was (25 and 35 mA/cm<sup>2</sup>) and the pH of the dye electrolyte solution was (2.5, 5.0 and 6.9). For bio-degradation, the bacterial strain *Pseudomonas* sp. C2 was used. Each biodegradation process was performed in a minimal medium. The initial dye concentration was varied over 5, 10 and 20 mg/L, while the pH value of the dye solutions for biodegradation was varied over 5.0, 7.0 and 8.0. All samples were analyzed spectrophotometrically at 662 nm ( $\lambda_{\max}$  methylene blue) and the concentration of residual color after degradation was determined using the calibration curve. The highest level of electrochemical degradation (98.74%) was found at pH 5.0 and the intensity of electric current of 35 mA/cm<sup>2</sup>, while the highest degree of biodegradation of color achieved at pH 7.0 (91.00%) and the initial dye concentration of 20 mg/L.

---

Ana Urošević

## Određivanje najpovoljnijeg sastava niozoma kao transportnog sistema za flurbiprofen

---

*Vezikule koje sadrže nejonske surfaktante predstavljaju savremeni transportni sistem za lekove (niozomi), kao nosači kako hidrofилnih tako i lipofilnih medikamenata. U ovom radu određivan je najpovoljniji sastav niozoma u cilju dizajniranja što efikasnijeg transportnog sistema za flurbiprofen. Niozomi su sintetisani modifikovanim metodama hidratacije tankog filma i ubrizgavanja etra. Metoda hidratacije tankog filma se pokazala kao efikasnija u odnosu na metodu ubrizgavanja etra. Ispitivan je i uticaj ultrazvuka na veličinu, oblik i efikasnost inkapsulacije niozoma. Veličina i oblik niozoma određivani su optičkom mikroskopijom. Najveću efikasnost inkapsulacije leka (53%) pokazali su niozomi dobijeni mešanjem surfaktanta i holesterola u odnosu Span 40 : holesterol 1 : 1. Pokazan je negativan uticaj ultrazvuka na veličinu niozoma i efikasnost inkapsulacije.*

---

### Uvod

Niozomi su vezikule mikroskopskih dimenzija koji predstavljaju savremene sisteme za transport medikamenata ili drugih malih molekula. Niozomi su unilamelarne ili multilamelarne vezikule kod kojih jedna lamela predstavlja jedan lipidni dvosloj. Sastoje se od nejonskog surfaktanta i mogu biti stabilizovani holesterolom ili anjonskim surfaktantom, kao što je dicetil fosfat. Hidratacijom u vodi surfaktant obrazuje lipidni dvosloj, pa se u niozomima mogu prenositi kako hidrosolubilni, u vodenom delu

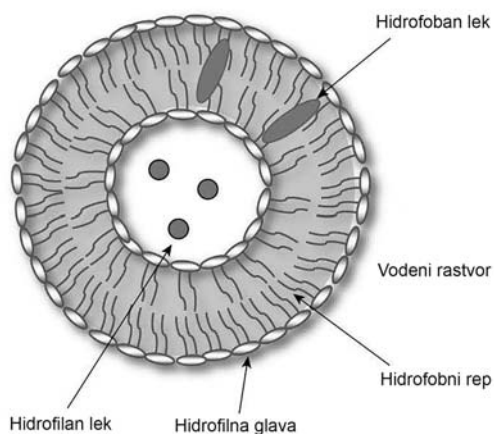
unutar vezikule okruženom membranom, tako i liposolubilni lekovi, inkapsulirani u samu membranu (Akhilesh *et al.* 2012). Prečnici vezikula kreću se od 20 nm do 50 μm (Kumar *et al.* 2011), i u zavisnosti od veličine pokazuju veći, odnosno manji udeo inkapsulacije leka. Osnovna prednost ovakvog sistema u odnosu na uobičajen unos medikamenta je kontrolisano i ciljano oslobađanje medikamenta, povećanje biodostupnosti i konkretno za transdermalni unos medikamenta, dublje prodiranje leka kroz kožu. Niozomi mogu prolongirati dejstvo leka što smanjuje učestalost unošenja leka u organizam. U poređenju sa lipozomima niozomi imaju određene prednosti koje se ogledaju u većoj stabilnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti i većoj dostupnosti kada se koriste za komercijalne svrhe (Madhav i Saini 2011).

Flurbiprofen, odnosno 2-(3-fluoro-4-fenil-fenil) propionska kiselina (slika 2) je nesteroidni antiinflamatorni lek (NSAIL) koji se koristi protiv bolova i zapaljenja kao i oboljenja poput reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Ima analgetsko, antipiretičko i antiinflamatorno dejstvo. Flurbiprofen inhibira enzim ciklooksigenazu koji katalizuje sintezu prostaglandina i tromboksana. Ima kratko poluvreme eliminacije pa se stoga daje u češćim intervalima. Flurbiprofen nema veliku transdermalnu propustljivost pa je zbog toga smanjena i biodostupnost leka. Pokazuje neželjena dejstva kao što su ulceracije i krvarenje u želucu. Svođenje rizika od neželjenih dejstava na minimum, povećana propustljivost kroz kožu i biodostupnost mogu se postići formulacijom odgovarajućeg prenosnog sistema za medikament – niozoma (Prajapati *et al.* 2012).

---

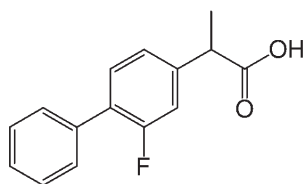
Ana Urošević (1995), Valjevo, Dr Pantića 124/1, učenica 3. razreda Valjevske gimnazije

MENTOR: dr Nenad Milosavić, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za biohemiju



Slika 1. Struktura niozoma (Lembo 2010)

Figure 1. Structure of niosome (Lembo 2010)



Slika 2. 2-(3-fluoro-4-fenil-fenil) propionska kiselina

Figure 2. 2-(3-fluoro-4-phenylphenyl)propanoic acid

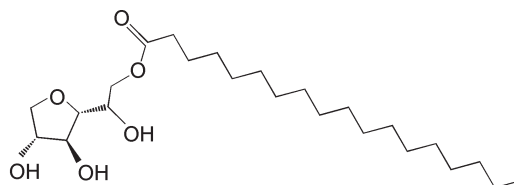
Cilj ovog rada je optimizacija sastava niozoma kako bi se sintetisao najpovoljniji transportni sistem za flurbiprofen, pogodan za transdermalni unos, kao i ispitivanje uticaja ultrazvuka na veličinu i efikasnost inkapsulacije niozoma.

## Materijali i metode

Upoređene su dve modifikovane metode sa sintezu niozoma, metoda hidratacije tankog filma i metoda ubrizgavanja etra. Pri poređenju je korišćen isti odnos surfaktanta (Span 60) i holesterola. Metoda koja je pokazala veću efikasnost inkapsulacije korišćena je za sintezu niozoma u daljem istraživanju, pri čemu su od-

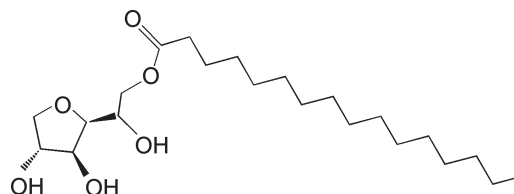
nosi surfaktanta (Span 60 i Span 40) i holesterola u sastavu niozoma varirani, a količina flurbiprofena bila nepromenjena. Veličina i efikasnost inkapsulacije određivani su i pre i nakon izlaganja suspenzija niozoma ultrazvuku. Oblik i veličina vezikula ispitivani su optičkom mikroskopijom, a veličina određivana merenjem prečnika tri puta i uzimanjem srednje vrednosti za veličinu vezikule.

Span 60 (slika 3) i Span 40 (slika 4) su bili donacija Crode GmbH (Nemačka). Flurbiprofen je bio donacija Galenike a. d. (Beograd, Srbija).



Slika 3. Span 60, sorbitan monostearat

Figure 3. Span 60, sorbitan monostearate



Slika 4. Span 40, sorbitan monopalmitat

Figure 4. Span 40, sorbitan monopalmitate

Kalibraciona kriva za flurbiprofen u PBS-u

Za pripremu pufera (pH 7.4) (Jugoslovenska farmakopeja (2000)) 2.38 g dinatrijum-hidrogen fosfata, 0.19 g kalijum-hidrogen fosfata i 8 g natrijum hlorida su rastvoreni u 1 L vode. Za određivanje apsorpcionog maksimuma spektar rastvora flurbiprofena u PBS-u koncentracije 10 µg/mL je sniman na talasnim dužinama od 200

do 400 nm. Iz početnog rastvora flurbiprofena u PBS-u (100 µg/mL) napravljena su razblaženja od 1, 2, 5, 10, 15 i 20 µg/mL i snimana su na 248 nm, sa PBS-om kao slepom probom na osnovu čega je dobijena kalibraciona kriva

$$y = 0.07563x + 0.02726 \quad (R^2 = 0.99861).$$

Kalibraciona kriva za flurbiprofen u izopropanolu

Iz početnog rastvora flurbiprofena u izopropanolu (100 µg/mL) napravljena su razblaženja od 1-10 µg/mL i snimana su na talasnoj dužini 210 nm sa izopropanolom kao slepom probom. Dobijena je kalibraciona kriva

$$y = 0.06965x + 0.0598, \quad R^2 = 0.97367.$$

Sinteza niozoma

U cilju biranja najpovoljnije metode upoređene su metode ubrizgavanja etra i hidratacije tankog filma kao dve od najčešće korišćenih metoda za sintezu niozoma:

**Ubrizgavanje etra.** Niozomi su sintetisani putem izmenjene Ether Injection metode. Surfaktant, holesterol (Merck) i flurbiprofen su rastvoreni u 8 mL dietil etra i metanola (2 : 1). Rastvor je ubrizgavan mikrošpicem u 5 mL PBS-a na temperaturi od 60°C. Brzo isparavanje etra dovodi do stvaranja niozoma. Fosfatni pufer 7.4 (PBS; phosphate buffer saline) je napravljen prema Jugoslovenskoj farmakopeji (2000).

**Hidratacija tankog filma.** Surfaktant i holesterol su rastvoreni u 10 mL hloroforma i metanola (4:1) u balonu od 100 mL. Rastvor je uparavan na vakuum uparivaču (IKA RV 10 control) na 100 rpm, i postepeno smanjivanom pritisku od 650 mbar do 450 mbar na temperaturi od 25 od 40°C do pojave tankog providnog filma (Singh 2011). Film je hidratisan na vodenom kupatilu (IKA HB 10 control) jedan sat na 60°C bez vakuuma sa 10 mL rastvora flurbiprofena u PBS-u (100 µg/mL). Šest uzoraka je stavljeno na ultrazvučno kupatilo na 2 minuta. Svi uzorci su stavljeni u frižider preko noći da se dalje hidratišu i čuvani su u frižideru za dalju analizu.

Određivanje zarobljenog flurbiprofena u niozmima

Alikvoti od svih proba su centrifugirani na 14 000 rpm 30 min. Supernatant je odvojen i nio-

zomi su isprani 2 puta PBS-om i recentrifugirani. Da bi se odredio procenat leka u niozmima vezikule su razbijane izopropanolom i koncentracija leka je određivana spektrofotometrijski (Thermo Scientific Evolution 605) u UV-Vis oblasti na 210 nm.

Efikasnost inkapsulacije je određivana po formuli:

$$\text{efikasnost inkapsulacije} = \frac{C_Z}{C_U} \cdot 100\%$$

gde je  $C_Z$  – koncentracija zarobljenog leka, a  $C_U$  – ukupna koncentracija leka

Izabrana je metoda hidratacije tankog filma zato što je pokazala veću efikasnost u odnosu na metodu ubrizgavanja etra za 12% (poređene su probe Span 60 : Holesterol – 1.5 : 1 za obe metode) i ona je korišćena u daljem radu.

Određivanje veličine i oblika niozoma

Veličina i oblik niozoma određivani su putem optičke mikroskopije (Zeiss Axio Lab.A1) Fotomikrografije su analizirane u ImageJ-u. Prečnici pojedinačnih vezikula mereni su tri puta. Ukupno je izmereno 100 niozoma za svaku probu (tabela 1).

Tabela 1. Formula, količina leka i sastav niozoma (surfaktant i holesterol 150 µmol)

Surfaktant	Kod formule	Flurbiprofen [µg/mL]	Surfaktant : Holesterol
Span 60	H1	100	1 : 1
	H2	100	1.5 : 1
	H3	100	3 : 1
Span 40	H4	100	1 : 1
	H5	100	1.5 : 1
	H6	100	3 : 1
Span 60	H1 u*	100	1 : 1
	H2 u	100	1.5 : 1
	H3 u	100	3 : 1
Span 40	H4 u	100	1 : 1
	H5 u	100	1.5 : 1
	H6 u	100	3 : 1

\*suspenzije niozoma izložene ultrazvuku

## Rezultati i diskusija

Efikasnost inkapsulacije pokazuje da je Span 40 efikasniji u odnosu na Span 60 (slika 5). Efikasnost inkapsulacije niozoma koji u sastavu imaju Span 40 pokazuje zavisnost od količine holesterola tako da je ona srazmerna količini holesterola. Ova zavisnost kod niozoma koji u sastavu imaju Span 60 nije pokazana. U oba slučaja pokazan je negativan uticaj ultrazvuka na efikasnost inkapsulacije i veličinu niozoma. Vezikule sa odnosom holesterol : surfaktant 1 : 1 u sastavu poseduju najveću efikasnost inkapsulacije. Metodom hidratacije tankog filma dobijene su multilamelarne vezikule sa širokom distribucijom veličina. Vezikule izložene ultrazvuku su bile unilamelarne.

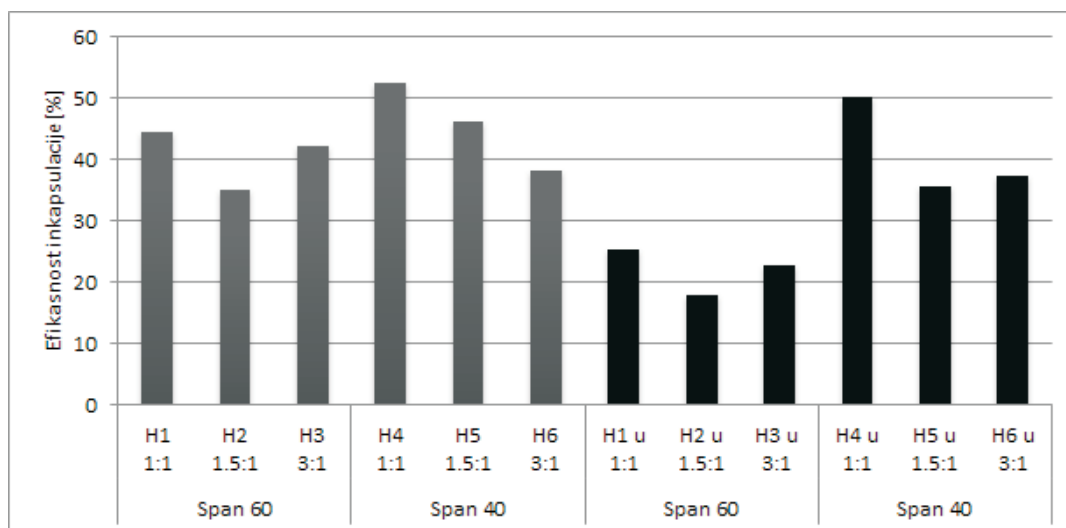
Uticaj surfaktanta na formiranje niozoma

Moguće je da je Span 60 efikasniji od Span-a 40 zbog temperature na kojoj surfaktanti menjaju fazu. Span 60 ima višu temperaturu topljenja (50 - 60°C) u odnosu na Span 40 (44 - 51°C). Visoka temperatura topljenja prouzrokuje brzo ispu-

štanje leka iz vezikula (Srnivas *et al.* 2010). Veličina niozoma se povećeva sa smanjenjem HLB vrednosti (vrednost koja pokazuje koliko je surfaktant liposolubiln odnosno hidrosolubiln). Pretpostavlja se da je veličina niozoma određena dužinom lanca surfaktanta. Span 60 (C16) ima veći alkil lanac u odnosu na Span 40 (C14), pa su i prečnici niozoma sa Span-om 60 veći (Singh 2011) (tabela 3).

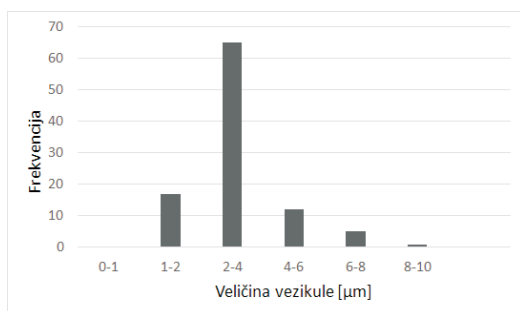
Uticaj holesterola na formiranje niozoma

Efikasnost inkapsulacije flurbiprofena u niozomima dobijenim korišćenjem Span-a 60 i holesterola nije pokazala zavisnost od sastava niozoma, ali je u ovom slučaju pokazan negativan uticaj ultrazvuka, pa je procenat efikasnosti leka sa oko 40% pao na oko 23%. Rezultati dobijeni korišćenjem Span-a 40 i holesterola za dobijanje niozoma pokazali su da efikasnost inkapsulacije raste sa povećanjem udela holesterola u vezikulama. Takođe je pokazano da veća koncentracija lipida obezbeđuje veću efikasnost inkapsulacije, kao što se navodi i u literaturi (Jadon *et al.* 2009), kao i da holesterol povećava stabilnost niozoma i



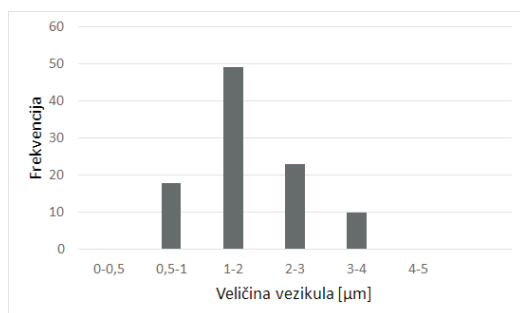
Slika 5. Efikasnost inkapsulacije niozoma sintetisanih putem metoda hidratacije tankog filma (slovom u su označene vezikule izlagane ultrazvuku)

Figure 5. Entrapment efficiency of niosomes prepared by Thin Film Hydration Method (the letter u denotes sonicated vesicles)



Slika 6a. Raspodela veličina Span 40 niozoma u molarnom odnosu 1 : 1 pre izlaganja ultrazvuku

Figure 6a. Size distribution of Span 40 niosomes in molar ratio 1 : 1 pre sonication



Slika 6b. Raspodela veličina Span 40 niozoma u molarnom odnosu 1 : 1 nakon izlaganja ultrazvuku

Figure 6b. Size distribution of Span 40 niosomes in molar ratio 1 : 1 after sonication

omogućava veći procenat inkapsulacije sprečavajući gubitak leka iz niozoma, što takođe odgovara podatku iz literature (Akhilesh *et al.* 2012). U ovom istraživanju pokazano je da odnos holesterol : surfaktant 1:1 poseduje najveću efikasnost inkapsulacije, koja je pokazana i u literaturi (Jadon *et al.* 2009) (slika 5). Niozomi sa najvećom efikasnošću (53%) inkapsulacije flurbiprofena bili su oni dobijeni mešanjem Span-a 40 i holesterola u odnosu 1 : 1.

#### Veličina i oblik niozoma

Metodom hidratacije tankog filma dobijeni su sferni niozomi sa širokom distribucijom veli-

čina (tabela 3). Ovi niozomi imaju multilamelarnu strukturu. Niozomi podvrgnuti ultrazvuku su unilamelarni, uniformniji i manji od niozoma koji nisu tretirani ultrazvukom, što se navodi i u literaturi (Nasir *et al.* 2012), kako je prikazano na slici 7 (b) i (d). Najveći broj vezikula pre izlaganja ultrazvuku imao je prečnike između 2 i 4 μm, a nakon izlaganja ultrazvuku duplo manje (slike 6 a i b). Shodno tome imaju i manju efikasnost inkapsulacije (slika 5).

Tabela 3. Veličina vezikula

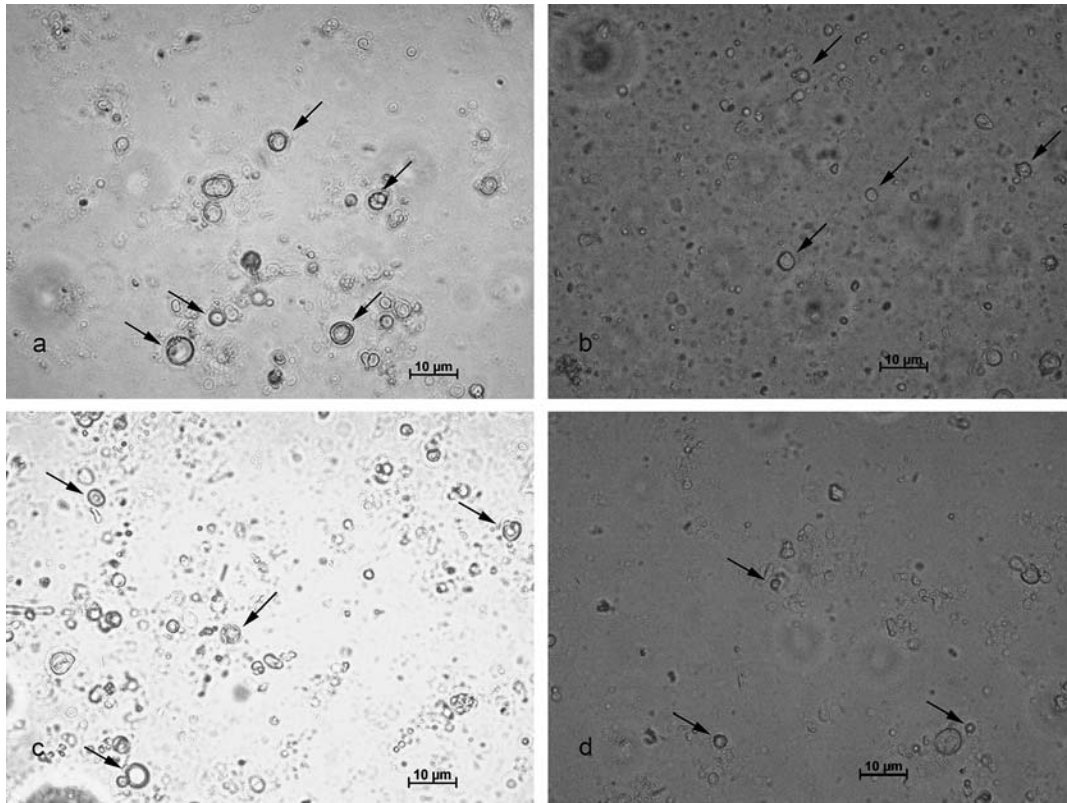
Surfaktant	Kôd formule	Veličina vezikule (M±SD)* [μm]
Span 60	H1	6±2
	H2	7±4
	H3	3.4±1.6
Span 40	H4	3.2±1.4
	H5	2.7±1.5
	H6	2.3±1.4
Span 60	H1 u	5.1±1.7
	H2 u	1.4±0.6
	H3 u	1.9±0.9
Span 40	H4 u	1.8±0.8
	H5 u	1.7±0.7
	H6 u	2±1

\* Srednja vrednost ± standardna devijacija

## Zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da je modifikovana metoda hidratacije tankog filma pogodna za sintetisanje sfernih niozoma sa velikom distribucijom veličina. Razbijanjem multilamelarnih do unilamelarnih vezikula na ultrazvučnom kupatilu smanjuje se veličina niozoma i dobijaju se uniformne vezikule približne veličine. Najveći procenat inkapsulacije (53%) postignut je sa niozomima sintetisanim sa Span-om 40 (Span 40 : Holesterol 1 : 1). Veća količina lipida povećava efikasnost inkapsulacije, a holesterol povećava lipofilnost niozoma i samim tim povećava i





Slika 7.

- (a) H3 (Span 60: Holesterol 3 : 1);
- (b) H3 u (Span 60: Holesterol 3 : 1);
- (c) H4 (Span 40: Holesterol 1 : 1);
- (d) H4 u (Span 40 : Holesterol 1 : 1).

Strelice ukazuju na neke od vezikula. Na slikama (a) i (c) su niozomi koji nisu izloženi ultrazvuku, a na (b) i (d) se nalaze niozomi nakon izlaganja ultrazvuku. Prečnici niozoma su manji nakon izlaganja ultrazvuku.

Figure 7.

- (a) H3 (Span 60: Cholesterol 3 : 1);
- (b) H3 u (Span 60: Cholesterol 3 : 1);
- (c) H4 (Span 40: Cholesterol 1 : 1);
- (d) H4 u (Span 40 : Cholesterol 1 : 1).

Arrows indicate some of the vesicles. Pictures (a) and (c) show niosomes which were not sonicated whereas pictures (b) and (d) show sonicated niosomes. Vesicle diameters are smaller after sonication.

efikasnost inkapsulacije sprečavajući gubitak leka iz niozoma. Imajući u vidu dobijene rezultate otvaraju se mogućnosti za dalje istraživanje koje se tiče karakterizacije niozoma, njihove stabilnosti i *in vitro* oslobađanja leka iz niozoma.

**Zahvalnost.** Posebnu zahvalnost dugujem mom mentoru dr Nenadu Milosaviću na nesebičnoj pomoći i podršci. Takođe se zahvaljujem Ivanu Mrkiću, doktorantu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći u izvođenju eksperimenta.

## Literatura

- Akhilesh D., Bini K. B., Kamath J. V. 2012. Review on Span-60 Based Non-Ionic Surfactant vesicles (Niosomes) as Novel Drug Delivery System. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **3** (1): 7.
- Das M. K., Palei N. N. 2011. Sorbitan Esters niosomes for topical niosomal delivery of rofecoxib. *Indian Journal of Experimental Biology*, **49**: 438.
- Jadon P. S., Gajbhiye V., Jadon R. S., Gajbhiye K. R., Ganesh N. 2009. Enhanced Oral Bioavailability of Griseofulvin via Niosomes. *AAPS PharmSciTech*, **10** (4): 1186.
- Jigar V., Puja V., Krutika S. 2011. Formulation and evaluation of topical niosomal gel of erythromycin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3** (1): 123.
- Kumar A., Pal J. L., Jaiswal A., Singh V. 2011. Review on niosomes as novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy*, **2** (5): 61.
- Leombo D. I., Cavalli R. 2010. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs, Review. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **21**: 53.
- Lingan M. A., Sathali A. H., Kumar V. M. R., Gokila A. 2011. Formulation and evaluation of topical drug delivery containing clobetasol propionate niosomes. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, **1** (1): 7.
- Madhav N., Saini A. 2013. Niosomes, A novel drug delivery system. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, **1**: 498.
- Nasir A., Harikumar S. L., Amanpreet K. 2012. Niosomes: An Excellent tool for drug delivery. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, **2** (2): 479-487
- Prajapati S. K., Kumar S., Sahu V. K., Prakash G. 2012. Proniosomal gel of flurbiprofen: formulation and evaluation. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **2** (1): 105
- Singh C. H., Jain C. P., Kumar B. N. 2011. Formulation, characterization, stability and invitro evaluation of nimesulide niosomes. *Pharmacophore*, **2** (3): 168.
- Srnivas S., Anand Kumar Y., Hemanth A., Anitha M. 2010. Preparation and evaluation of niosomes containing Aceclofenac. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **5** (1): 249.
- Yasin M. N., Hussain S., Malik F., Hameed A., Sultan T., Qureshi F., Riaz H., Parveen G., Wajid A. 2012. Preparation and characterization of chloramphenicol niosomes and comparison with chloramphenicol eye drops (0.5% w/v) in experimental conjunctivitis in albino rabbits. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **25** (1): 117.

---

Ana Urošević

## Determination of the Most Suitable Formula of Niosomes as a Drug Delivery System for Flurbiprofen

Niosomes are non-ionic surfactant vesicles that are microscopic in size. They can have either unilamellar or multilamellar structure. Non-ionic surfactant vesicles represent a novel drug delivery system as carriers for both hydrophilic and lipophilic drugs. The objective of this study was to optimize the niosomal formula as a carrier for the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) Flurbiprofen. Niosomes were prepared by the modified Thin Film Hydration method in terms of temperature and pressure. Different molar ratios of non-ionic surfactants (Span 40 and Span 60) and cholesterol were used in niosomal preparation. The effect of sonication on vesicle size, shape and entrapment efficiency was also studied. Vesicle shape and size were determined by means of optical microscopy. Furthermore, Entrapment Efficiency was investigated for different niosomal formulations. The highest entrapment efficiency (52.58%) was obtained with Span 40 niosomes (molar ratio of surfactant : cholesterol – 1 : 1). Sonication reduces the size of vesicles thus lowering the entrapment efficiency.

---

Vojislav Gligorovski

## Poređenje analitičkih metoda za određivanje vitamina C u farmaceutskim preparatima

---

Razvijena je kinetička metoda za određivanje vitamina C čija je tačnost i preciznost upoređena sa pet analitičkih metoda, određivanjem količina vitamina C u realnim uzorcima. Metoda se zasniva na praćenju inhibirane reakcije metilenskog plavog sa vitaminom C. Procenjeni optimalni uslovi su sledeći: pH = 3.0, koncentracija metilenskog plavog: 9.6 mg/L, koncentracija jona vanadata: 21.2 mg/L. Vitamin C se ovom metodom može odrediti i u prisustvu vitamina B1 i B9, glukoze, fruktoze, saharoze i rastvorljivog skroba. Metoda je upoređena sa jodimetrijom, dve kiselinsko-bazne titracije, spektrofotometrijom i HPLC-MS metodom. Svih šest metoda ispitane su na tri tipa uzorka: tablete vitamina C Galenika i Ekofarm i prašak za razmućivanje Cedevita. Poređenjem deklariranih i određenih vrednosti mase zaključuje se da je HPLC-MS metoda najpogodnija za određivanje vitamina C u sva tri uzorka. Pored HPLC-MS metode za određivanje veće količine vitamina C (prva dva uzorka) pogodna je i jodimetrija dok su za manje količine (uzorak Cedevite) pogodnije kinetička metoda i spektrofotometrija.

---

### Uvod

Vitamin C je naziv za L-askorbinsku kiselinu i njene soli. Spada u grupu hidrosolubilnih vitamina i predstavlja jak antioksidant koji redukuje slobodne radikale nastale pri metaboličkim procesima. Askorbinska kiselina je prisutna u voću i

povrću, gde se nalazi u svim zelenim delovima biljke (Brody 1994). Preporučena dnevna doza za odrasle ljude je 90 mg na dan, a ne savetuje se uzimanje dnevne doze veće od 2000 mg jer u tim količinama vitamin C oštećuje bubrege (US Recommended Dietary Allowance, RDA). Najčešće se ishranom postiže dovoljan unos ovog vitamina. U slučajevima hipovitaminoze (uglavnom izazvane stresom) vitamin C se uzima u vidu tableta za oralnu upotrebu. Bolest koja nastaje kao posledica dugotrajnog nedostatka vitamina C u organizmu se naziva skorbut. Karakteristični simptomi skorbuta su promene na koži i vezivnom tkivu usled poremećaja u sintezi kolagena.

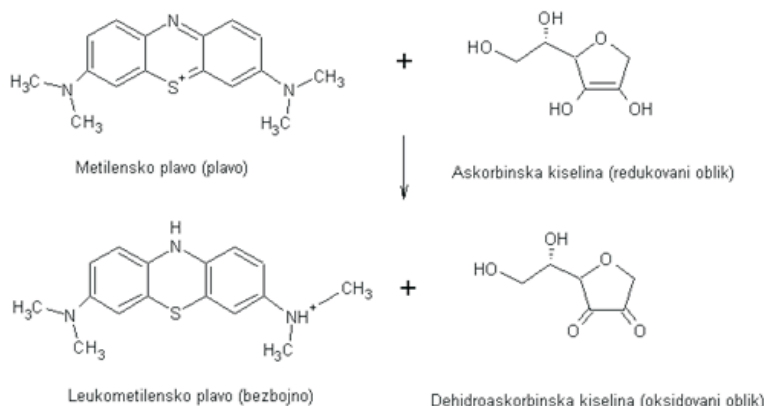
Usled apsorpcije u ultraljubičastoj (UV) oblasti i kiselih i redukcionih svojstava, brojni su načini njegove kvantifikacije: jodimetrijski, acidimetrijski, hromatografski, spektrofotometrijski i elektrohemijski (Cvetković *et al.* 2012). Zbog nestabilnosti vitamina C na vazduhu i svetlosti potrebna je njegova česta kontrola u farmaceutskim preparatima metodom koja je brza i primenljiva na takvu vrstu uzoraka, ali koja ima i opravdanje sa komercijalnog stanovišta (Milutinović i Vulović 2002).

Spektrofotometrijske metode se zasnivaju na praćenju količine svetlosti koju apsorbuje rastvor određene supstance date koncentracije. Posebna vrsta spektrofotometrijskih metoda su kinetičke metode kod kojih se koncentracija ispitivanog analita određuje merenjem brzine reakcije u kojoj on učestvuje (Perez-Bendito i Silva 1988).

U ovom radu ispitivane su dve spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije vitamina C. Jedna je spektrofotometrijsko određivanje vitamina C merenjem apsorbanse u UV delu spektra koja se javlja usled prisustva askorbinske kiseline (Selimović *et al.* 2011). Druga

---

Vojislav Gligorovski (1995), Beograd, Skadarska 17, učenik 3. razreda Matematičke gimnazije u Beogradu



Slika 1. Jednačina reakcije metilenskog plavog sa askorbinskom kiselinom

Figure 1. Equation of reaction of methylene blue with ascorbic acid

pripada kinetičkim metodama i zasnovana je na praćenju zavisnosti brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom od koncentracije askorbinske kiseline. Na brzinu ove reakcije utiče prisustvo jona prelaznih metala kao što su bakar(II), vanadijum(V), gvožđe(III) i mangan(II) (Khan i Sarwar 2001). Reakcija između askorbinske kiseline i metilenskog plavog data je na slici 1.

Hromatografske metode podrazumevaju razdvajanje komponenti smeše koja se ispituje pre kvalitativne ili kvantitativne analize njenih sastojaka. Za kvantitativno određivanje vitamina C od hromatografskih metoda najčešće se koristi kuplovana HPLC-MS tehnika (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

Pet najkorišćenijih metoda za određivanje askorbinske kiseline su spektrofotometrija, titracija uz bromtimol-plavo kao indikator, titracija uz fenolftalein kao indikator, jodimetrija, HPLC-MS. Ni za jednu od njih se ne može reći da je najpogodnija jer one preciznije zahtevaju skupe aparate ili reagense dok one jeftinije imaju manju preciznost ili su potpuno neprimenljive na realne uzorke vitamina C. Uprkos dostupnosti i efikasnosti kinetičkih metoda, postoji relativno mali broj koje se koriste za određivanje vitamina C.

Cilj ovog rada je razvijanje nove kinetičke metode za određivanje askorbinske kiseline i njeno poređenje sa do sada korišćenim metodama za određivanje vitamina C uz ispitivanje primenljivosti na realnim uzorcima.

## Materijal i metode

Eksperiment se sastojao od šest etapa tokom kojih je pri svakoj korišćena druga metoda za određivanje vitamina C. Prvi korak se razlikovao od ostalih po tome što je u njemu razvijena nova metoda za kvantifikaciju vitamina C, dok su tokom ostalih pet korišćene do sada poznate metode: spektrofotometrija, dve kiselinsko-bazne titracije, jodimetrijska titracija i HPLC-MS. Kinetička metoda je zahtevala dodatan rad u odnosu na ostale korišćene metode jer za nju nisu bili poznati optimalni uslovi, te su tako određene optimalne koncentracije reaktanata i ispitivanja njena selektivnost prema supstancama koje se najčešće nalaze zajedno sa vitaminom C u komercijalno dostupnim proizvodima.

### Kinetička metoda

Kinetička metoda je razvijena praćenjem brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom (Ascorbic acid, AA) pri talasnoj dužini na kojoj se javlja maksimum apsorpcije boje metilensko plavo (Methylene Blue, MB), koja iznosi 665 nm. Izraz za brzinu te reakcije je (Khan i Sarwar 2001):

$$v = k \cdot [\text{MB}] \cdot [\text{AA}] \cdot [\text{H}^+]$$

Apsorbance pripremljenih rastvora merene su uređajem Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer u kvarcnim kivetama optičkog puta  $a = 1.0$  cm, pri temperaturi okoline  $t = (25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ . Kao slepa proba korišćen je rastvor u kome su koncentracije pufera,

vode i vitamina C jednake kao i u ispitivanoj smeši. Merenja apsorbanca su započinjana 12 s nakon dodavanja poslednjeg reaktanta. pH vrednost smeše je iznosila ( $3.0 \pm 0.2$ ), merena je pH-metrom i održavana je konstantom pomoću pufera koji se sastojao od limunske kiseline koncentracije 0.1000 mol/L i natrijum-hidrogenfosfata koncentracije 0.2000 mol/L. Ispitivana smeša je pripremana dodavanjem rastvora reaktanata u kivetu, sledećim redosledom: 0.5 mL pufera, 0.5 mL rastvora metilenskog plavog, 0.5 mL destilovane vode, 0.5 mL rastvora amonijum-vanadata i na kraju 0.5 mL rastvora askorbinske kiseline.

Svako određivanje brzine reakcije askorbinske kiseline sa MB je ponavljano tri puta, pripremanjem tri rastvora istih koncentracija reaktanata. Vrednost brzine koja je unošena na kalibracionu krivu je medijana te tri vrednosti, vrednost apsolutne greške vrednosti brzine na kalibracionoj krivi računata je kao polovina razlike maksimalne i minimalne određene brzine u okviru tri merenja.

U cilju konstruisanja kalibracione krive pogodne za precizno određivanje što većeg opsega koncentracija askorbinske kiseline ispitane su i određene optimalne koncentracije jona vanadijuma(V) i MB.

**Određivanje optimalne koncentracije amonijum-vanadata.** U ovom eksperimentu je korišćen amonijum-vanadat i ispitan je njegov uticaj na brzinu oksidacije MB. Korišćeni rastvori amonijum-vanadata su prethodno standardizovani kompleksometrijski. Najpre su joni vanadata redukovani pomoću sumpor(IV)-oksida (dobijenog u reakciji 32.0 mg kalijum-metabisulfita i 2.0 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline) do vanadil-jona koji se vezuju za etilendiamintetrasirćetnu kiselinu (EDTA). EDTA je dodavana u rastvor vanadil-jona u višku i višak EDTA retitrovan standardnim rastvorom cink(II)-hlorida koncentracije 0.0109 mol/L (pripremljenog rastvaranjem 0.7134 g granula cinka u koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini). Za konstruisanje grafika zavisnosti brzine reakcije od koncentracije jona vanadata su korišćeni rastvori amonijum-vanadata u sledećim koncentracijama 1.0, 2.1, 3.7, 5.2, 6.5, 9.4 mg/L.

**Određivanje optimalne koncentracije metilenskog plavog.** Za konstruisanje zavisnosti

brzine reakcije od koncentracije metilenskog plavog su korišćeni rastvori metilenskog-plavog u koncentracijama od 0.8, 1.6, 3.4, 6.4, 9.6 i 12.8 mg/mL.

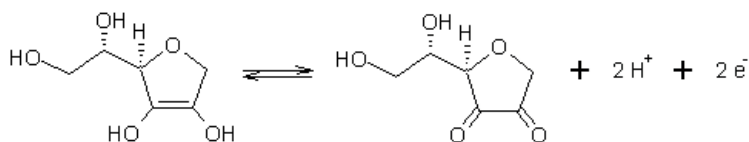
Konstruisana je kalibraciona kriva koja predstavlja zavisnost brzine reakcije askorbinske kiseline sa MB od koncentracije askorbinske kiseline. Brzina reakcije je određivana kao koeficijent pravca linearnog dela grafika zavisnosti apsorbanca rastvora od vremena na talasnoj dužini od 665 nm. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su rastvori askorbinske kiseline u sledećim koncentracijama: 2.6, 3.9, 5.9, 8.9, 13.3, 17.3, 20.8 i 25.0 g/L.

Pri određivanju koncentracija askorbinske kiseline u tabletama proizvođača Ekofarm i Galenika ovom metodom, suspenzija tablete je filtrirana. Filtriranje je rađeno kako bi se eliminisala potencijalna greška merenja apsorbanca koja bi nastala usled zamućenja koje potiče od punioca (mikrokristalna celuloza, natrijum-kroskarmeloza, magnezijum-stearat, laktoza, kukuruzni skrob).

Za ispitivanje selektivnosti kinetičke metode korišćena su jedinjenja koja se najčešće nalaze zajedno sa askorbinskom kiselinom u komercijalno dostupnim proizvodima i koja bi potencijalno mogla da ometaju određivanje vitamin C menjajući brzinu reakcije sa metilenskim plavim: fruktoza, glukoza, saharoza, tiamin (vitamin B1), folna kiselina (vitamin B9) i rastvorljivi skrob. Koncentracija vitamina C u smešama korišćenim za ispitivanje selektivnosti iznosila je 13.3 g/L. Rastvori korišćeni za ispitivanje selektivnosti dobijeni su rastvaranjem sledećih masi supstanci u po 25 mL vode: 0.0633 g tiamin-dihlorida, 0.0832 g folne kiseline, 0.3398 g fruktoze, 0.3398 g glukoze, 0.6468 g saharoze i 0.0332 g skroba. Kao slepa proba pri ispitivanju selektivnosti korišćen je rastvor u kome su koncentracije pufera, vode, vitamina C i ispitivanog interferirajućeg agensa iste kao i u ispitivanoj smeši.

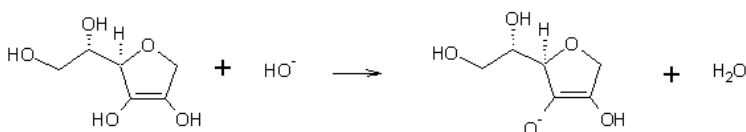
## Ostale metode

**Spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline.** UV spektri askorbinske kiseline različitih koncentracija su snimani u opsegu talasnih dužina od 250 nm do 350 nm. Za konstrukciju kalibracione krive odnosno zavisnosti



Slika 2. Jednačina polureakcije oksidacije L-askorbinske kiseline do L-dehidroaskorbinske kiseline

Figure 2. Equation of oxidation of L-ascorbic acid to L-dehydroascorbic acid



Slika 3. Jednačina neutralizacije askorbinske kiseline

Figure 3. Equation of ascorbic acid neutralisation

apsorbance od koncentracije korišćeni su rastvori vitamina C sledećih masenih koncentracija: 4.2, 7.0, 9.8, 14.1, 18.3, 21.1, 23.9, 28.1 g/L.

**Volumetrijske metode.** U ovom radu koncentracija askorbinske kiseline određivana je i pomoću tri volumetrijske metode: jodimetrijska titracija uz škrob kao indikator, kiselinsko-bazna titracija uz bromtimol-plavo (Bromthymol blue, BTB) kao indikator i kiselinsko-bazna titracija uz fenolftalein (Phenolphthalein, PHPH) kao indikator.

**Jodimetrijska metoda** zasniva se oksidoredukciji askorbinske kiseline (slika 2).

Askorbinska kiselina je određena uz pomoć standardnog rastvora joda. U smeši joda i vode se nalazio i kalijum-jodid koji reaguje sa jodom i gradi stabilan trijodidni kompleks i time poboljšava rastvaranje joda u vodi (Jeffery *et al.* 1989). Indikator koji je korišćen za ovu titraciju je škrob koji sa jodom gradi inkluziono jedinjenje intenzivno plave boje. Koloidni rastvor joda je pripremljen rastvaranjem 1 g škroba sa 3 g kalijum-jodida u 100 mL vode. Rastvor joda je prethodno standardizovan rastvorom natrijum-tiosulfata koncentracije 0.1000 mol/L. Probe za titraciju su se sastojale od jedne tablete vitamina C sa deklarisanom masom od 500 mg koja je rastvorena u vodi i titrovana, dok su probe praška Cedevite pripremljene rastvaranjem 1.0000 g praha u vodi i titrovane. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana po pet puta.

#### **Kiselinsko-bazna titracija uz bromtimol-plavo kao indikator.**

Rastvor askorbinske kiseline je titrovano standardnim rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0.1000 M. Završna tačka titracije je detektovana promenom boje rastvora iz žuto-narandžaste u plavu. Uzorci za ovu titraciju su pripremljeni kao i pri jodimetrijskoj titraciji. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana po pet puta. Jednačina neutralizacije askorbinske kiseline data je na slici 3.

#### **Kiselinsko-bazna titracija uz fenolftalein kao indikator.**

Rastvor askorbinske kiseline je titrovano standardnim rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0.1000 M i završna tačka titracije je detektovana promenom boje rastvora iz bezbojne u roze. Uzorci za ovu titraciju su pripremljeni kao i pri jodimetrijskoj titraciji. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana pet puta.

**Određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS.** Za hromatografsko razdvajanje i merenja apsorbance korišćen je aparat tipa Agilent Technologies 12000 Infinity Series. Za razdvajanje je korišćena kolona tipa ZORBAX Eclipse XDB-C18 dimenzija 4.6 × 50 mm pomoću mobilne faze koja se sastojala od smeše 2% vodenog rastvora sirćetne kiseline i acetonitrila. Uzorci propušteni kroz kolonu su dobijeni pomoću rastvora askorbinske kiseline u vodi HPLC čistoće koncentracije 30.8 g/L. Kalibraciona kriva je konstruisana u opsegu kon-

centracija od 1.54 g/L do 30.8 g/L i predstavlja zavisnost površine ispod pika na hromatogramu od koncentracije askorbinske kiseline.

U eksperimentu su korišćene sledeće supstance: L-askorbinska kiselina (Centrohem, p. a.), metilensko plavo (sintetisano u IS Petnica), amonijum-vanadat (Kemika, p. a.), hlorovodonična kiselina (Lachner, 35%), cink u granulama (Zorka Šabac, p. a.), natrijum-tiosulfat (Kemika, p. a.), limunska kiselina (Kemika, p. a.), natrijum-hidrogenfosfat (Kemika, p. a.), kalijum-metabisulfat (Kemika, p. a.),  $\alpha$ -tokoferol (Sigma Aldrich, p. a.), D-fruktoza (Kemika, p. a.), D-glukoza (Zorka Šabac, p. a.), saharoza (Sunoko), tiamin-dihlorid (Merck, p. a.), folna kiselina (sintetisano u IS Petnica), kalijum-jodid (Centrohem, p. a.), jod (Centrohem, p. a.) i skrob (Kemika, p. a.). Realni uzorci korišćeni za poređenje metoda su: tablete vitamina C proizvođača Galenika i Ekofarm sa deklariranih 500 mg vitamina C i prašak za razmućivanje Cedevita sa deklariranih 3.10 mg vitamina C po 1 g praha.

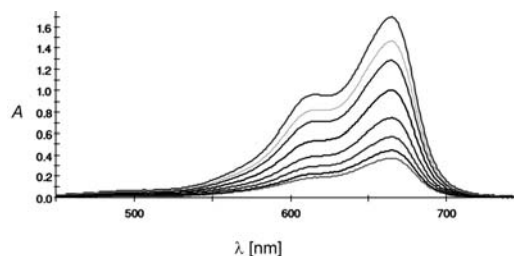
## Rezultati

### Kinetička metoda

Za optimalnu koncentraciju vanadijuma je uzeta najviša ispitana koncentracija koja iznosi 21.2 mg/L (9.4 mg/L preračunato na koncentraciju jona vanadijuma) jer se pri tim uslovima reakcija odvija najsporije pa je zato tada opseg linearne zavisnosti apsorbance od vremena najširi. Ova koncentracija vanadatnog jona je korišćena pri ispitivanju uticaja koncentracije MB na brzinu reakcije i pri konstruisanju kalibracione krive.

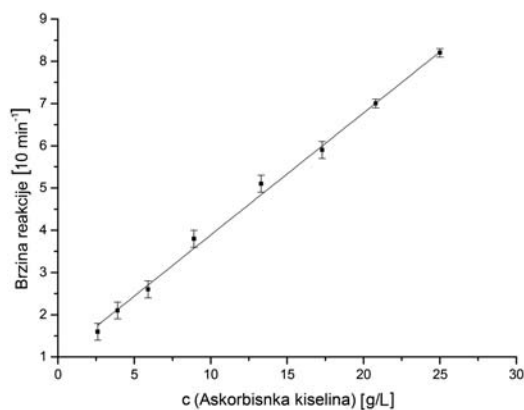
Za optimalnu koncentraciju metilenskog plavog je odabrana koncentracija od 9.6  $\mu\text{g/mL}$ . Pri višim koncentracijama od ove početna apsorbance je veća od 2.0, a pri tako visokim vrednostima apsorbance se merenje smatra nepouzdanim. Pri nižim koncentracijama metilenskog plavog od optimalne manja je promena apsorbance tokom vremena čime se povećava relativna greška određivanja brzine reakcije. Ova koncentracija MB je korišćena pri konstruisanju kalibracione krive.

Promena koncentracije metilenskog plavog uočava se kroz promene spektra metilenskog



Slika 4. Vis-spektri metilenskog plavog nakon određenog vremena od početka reakcije (odozgo naniže, spektri nakon 0, 10s, 20, 30, 45, 65, 85 i 100 sekundi)

Figure 4. Vis-Spectra of methylene blue recorded after specific time intervals from the beginning of the reaction (from above to below, spectra after: 0, 10,



Slika 5. Zavisnost promene apsorbance u vremenu od koncentracije AA-Kalibraciona kriva za kinetičku metodu

Figure 5. Dependence of change of absorbance during time on conc. of AA-Calibration curve for kinetic method

plavog tokom vremena (slika 4). Masene koncentracije reaktanata korišćene za snimanje ovih spektara su  $\gamma(\text{MB}) = 15 \text{ mg/L}$ ,  $\gamma(\text{AA}) = 25 \text{ g/L}$ ,  $\gamma(\text{VO}_3^-) = 21.2 \text{ mg/L}$ .

Kako je brzina reakcije prvog reda i u odnosu na metilensko-plavo i u odnosu na askorbinsku kiselinu, ista je brzina promene koncentracije metilenskog-plavog i vitamina C. Zahvaljujući tome, moguće je konstruisati kalibracionu krivu za

vitamin C praćenjem promene koncentracije metilenskog-plavog (slika 5).

Konstruisana kalibraciona kriva ima nagib  $k = (29.5 \pm 0.6) \times L/(g \times \text{min})$ .

Selektivnost metode predstavljena je kao procenat odstupanja brzine reakcije u prisustvu ometajuće supstance od brzine reakcije kada ometajuća supstanca nije prisutna.

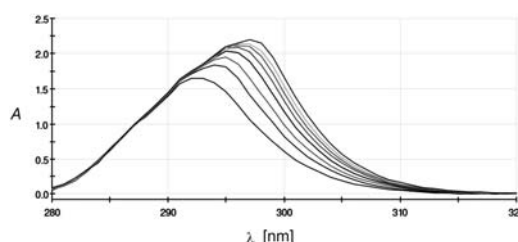
Tabela 1. Selektivnost kinetičke metode

Ometajuća supstanca	Odstupanje brzine (%)	Odnos količinskih koncentracija ometajuće supstance i askorbinske kiseline
Fruktoza	0.3	1 : 1
Glukoza	0.1	1 : 1
Saharoza	1.9	1 : 1
Tiamin	0.1	1 : 10
Folna kiselina	0.3	1 : 100
Rastvorljivi skrob	1.4	1 : 10 (maseni odnos)

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode su prikazani u tabeli 1, i iz njih se može zaključiti da nijedna od ispitivanih supstanci ne ometa određivanje askorbinske kiseline ovom metodom.

Tabela 2. Mase askorbinske kiseline [mg] u ispitivanim uzorcima

Metoda	Uzorak		
	Tablete Ekofarm	Tablete Galenika	Cedevita 1000 mg
Kinetička	508±10	511±11	3.13±0.06
Spektrofotometrijska	522±12	534±12	2.02±0.05
Jodimetrijska titracija	496±5	498±4	25.8±0.5
Kiselinsko-bazna titracija uz btp kao ind.	500±2	502±2	223±2
Kiselinsko-bazna titracija uz fenolft. kao ind.	508±9	510±11	228±5
HPLC-MS	498±6	498±6	2.04±0.03



Slika 6. UV-Vis spektri vodenih rastvora vitamina C različitih koncentracija

Figure 6. UV-Vis spectra of aqueous vitamin C solutions with different concentrations

Mase vitamina C u uzorcima određene svim metodama – kinetičkom metodom, spektrofotometrijski, jodimetrijskom titracijom, kiselinsko-baznom titracijom uz bromtimol-plavo kao indikator, kiselinsko-baznom titracijom uz fenolftalein kao indikator i određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS-a, prikazane su u tabeli 2.

**Spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline.** Na slici 6 uočava se batohromno pomeranje maksimuma apsorpcije rastvora od 294 nm do 299 nm sa povećanjem koncentracije vitamina C.

U ovoj metodi kalibraciona kriva je konstruisana snimanjem apsorbanca pri talasnoj dužini od 299 nm jer se na toj vrednosti najbolje uočava razlika između dva susedna spektra. Koeficijent



nagiba kalibracione krive je  $k = (4.6 \pm 0.1) \times 10^{-2}$  L/g.

**Jodimetrijska titracija askorbinske kiseline.** Koncentracija rastvora joda je određena titracijom standardnog rastvora natrijum-tiosulfata koncentracije 0.1000 mol/L. Određena koncentracija rastvora joda iznosila je 0.1024 mol/L. Ovako standardizovan rastvor joda korišćen je za jodimetrijske titracije.

**Određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS-a.** Konstruisana kalibraciona kriva ima nagib  $k = (318 \pm 4) \times 10^{-2}$  L/mg.

## Diskusija

Primećeno je da je vrednost mase vitamina C u svakom uzorku veća kada je određivana kiselinsko-baznom titracijom u kojoj je korišćen fenolftalein kao indikator u odnosu na kiselinsko-baznu titraciju u kojoj je korišćen bromtimol-plavo indikator. To se može objasniti činjenicom da je fenolftalein jednobojni indikator dok je bromtimol-plavo dvobojni, što znači da pri titraciji uz fenolftalein uočavanje završne tačke titracije zavisi od koncentracije indikatora, dok kod bromtimol-plavog to nije slučaj. Poređenjem sa deklarisanim masama možemo zaključiti da je bromtimol-plavo pogodniji indikator za izvođenje kiselinsko-baznih titracija askorbinske kiseline.

Najveće variranje određene mase u zavisnosti od metode se zapaža kod uzorka Cedevite. Velike količine vitamina C određene u Cedeviti jodimetrijom i kiselinsko-baznim titracijama se mogu objasniti neselektivnošću titracija. U Cedeviti postoje i druga redukciona sredstva, pored askorbinske kiseline koje mogu redukovati jod. Pri jodimetrijskoj titraciji, sve one reaguju sa jodom i ometaju određivanje vitamina C. Analogno tome, svaka supstanca koja ima kiselina svojstva, a potiče iz ispitivanih uzoraka Cedevite reaguje sa natrijum-hidroksidom koji se koristi pri kiselinsko-baznim titracijama. Usled toga, dobijaju se i po nekoliko desetina puta veće vrednosti za mase vitamina C u uzorcima Cedeviti u odnosu na deklarisanu vrednost.

Takođe se uočava da je jodimetrija pogodna metoda za određivanje vitamina C u uzorcima u kojima nema supstanci sa sličnim hemijskim karakteristikama vitaminu C koje bi redukovale

jod. Masa vitamina C u uzorcima određena spektrofotometrijski je veća u odnosu na masu određenu HPLC-MS-om što se može objasniti pomeranjem maksimuma apsorpcije batohromno usled povećanja koncentracije.

Metode su upoređene po preciznosti. Uočava se da je najpreciznija volumetrijska titracija uz bromtimol-plavo kao indikator (tabela 3). Ukoliko za referentnu metodu uzmemo HPLC-MS, rezultate možemo predstaviti i kao odstupanja mase određene svakom od metoda u odnosu na masu određenu HPLC-MS-om (tabela 4).

Na osnovu podataka iz tabele 4 se uočava da je pored metode HPLC-MS za određivanje veće količine vitamina C (uzorci sa deklariranih 500 mg vitamina C) pogodna i jodimetrija dok je za manje količine (uzorak Cedevite sa deklariranih 3.10 mg vitamina C po 1 g praha) odgovarajuća spektrofotometrija kao jedna od najselektivnijih metoda.

## Zaključak

Kinetička metoda razvijena u ovom radu je upoređena sa pet stadarnih metoda za određivanje vitamin C po tačnosti, preciznosti i selektivnosti. Metoda se zasniva na praćenju brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom u prisustvu jona vanadijuma(V) kao inhibitora u kiseljoj sredini. Optimalni uslovi za određivanje vitamina C kinetičkom metodom su: pH = 3.0, koncentracija metilenskog plavog 9.6 mg/L i koncentracija vanadatnog jona 21.2 mg/L. Razvijena kinetička metoda je selektivna prema skrobu, glukozi, fruktozi, saharozi, tiaminu i folnoj kiselini. Utvrđeno je da determinisana masa vitamina C može značajno varirati u zavisnosti od korišćene metode usled postojanja ostalih komponenti u smeši koje imaju hemijska svojstva slična vitaminu C. Tablete vitamina C mogu se precizno odrediti svim metodama uz granice relativne greške od oko 2%, dok su najpreciznije HPLC-MS i jodimetrija. Vitamin C u Cedeviti se može odrediti HPLC-MS metodom, kinetičkom metodom i spektrofotometrijom uz relativne greške ne veće od 2.2%, dok se pri jodimetriji i kiselinsko-baznim titracijama dobijaju nekoliko stotina puta veće količine vitamina C usled osobina titranta.

Tabela 3. Preciznost metoda (%)

Spektrofotometrija	Kinetička metoda	Titracija uz HPH	HPLC-MS	Jodimetrija	Titracija uz BTB
2.2	2.0	2.0	1.3	1.0	0.4

Tabela 4. Relativna odstupanja rezultata dobijenih navedenim metodama u odnosu na HPLC-MS

Uzorak	Metoda				
	Kinetička metoda	Spektrofotometrija	Jodimetrija	Titracija uz BTB	Titracija uz PHPH
Tablete Ekofarm	2.1%	4.7%	0.3%	0.5%	2.1%
Tablete Galenika	2.6%	6.8%	<0.1%	0.8%	2.4%
Cedevita	34.8%	1.0%	93.5%	>100%	>100%

Ispitivanjem reakcija u kojima učestvuje vitamin C kao katalizator ili inhibitor koje imaju pogodnu kinetiku za spektrofotometrijsko praćenje može se pronaći nova kinetička metoda kojom se mogu dobiti pouzdaniji rezultati u odnosu na druge ispitivane metode, izuzev HPLC-MS.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se diplomiranom hemičaru Milošu Pešiću na konstruktivnim predlozima, masteru hemije Gordani Krstić na pomoći pri izradi eksperimentalnog dela rada, kao i saradnicima Stefanu Kociću, Mihajlu Novakoviću, Marinu Kuntiću i Edvinu Faku na sugestijama pri osmišljavanju i realizaciji teme. Veliku zahvalnost dugujem i studentima Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Vuku Vukoviću i Igoru Asanoviću na pomoći pri pisanju rada.

## Literatura

Brody T. 1994. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press

Cvetković B., Malbaša V., Lončar E., Nježić Z., Šimurina O., Filipčev B., Tepić A. 2012. Poređenje tehnika i metoda određivanja L-askorbinske kiseline u voću. *Hemijska industrija*, **66** (4): 553.

Jeffery G., Bassett J., Mendham J., Denney R. 1989. *Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis*, Fifth edition. Avon: Bath press

Khan M., Sarwar A. 2001. The Influence of Transition Metal Ions on the Kinetic of Ascorbic Acid Oxidation by Methylene Blue in Strongly Acidic Media. *Turkish Journal of Chemistry*, **25**: 433.

Milutinović M., Vulović B. 2002. Poređenje kiselinsko-bazne titracije sa jodometrijskim metodama za određivanje vitamina C. *Petničke sveske*, **54**: 199.

Perez-Bendito D, Silva M. 1988. *Kinetic methods in analytical chemistry*. Ellis Horwood Limited

Selimović A., Salkić M., Selimović A. 2011. Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical preparations using sodium oxalate as a stabilizer. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, **11** (02): 106.

Watada A. 1982. A High-performance Liquid Chromatography Method for Determining Ascorbic Acid Content of Fresh Fruits and Vegetables Horticultural Crops. *HortScience*, **17** (3): 334.

---

*Vojislav Gligorovski*

## Comparison of Analytical methods for Vitamin C Determination in Pharmaceutical Dosages

Due to the relatively fast oxidation of vitamin C with oxygen to L-dehydroascorbic acid it is often necessary to control its quantity in pharmaceutical dosages via fast and efficient methods. For that purpose, the kinetic method is developed for the determination of vitamin C and its accuracy is compared with five standardized analytical methods through the determination of vitamin C in product samples. The kinetic method is based on the monitoring of the rate of inhibited reaction of methylene-blue with ascorbic acid. Optimal conditions for vitamin C determination are: pH = 3.0,  $\gamma(\text{Methylene Blue}) = 9.6 \text{ mg/L}$ ,  $\gamma(\text{VO}_3^-) = 21.2 \text{ mg/L}$ . Ascorbic acid can be determined using the kinetic method in the presence of vitamin B1, vitamin B9, glucose, fructose, sucrose and soluble starch. All six methods are tested on three different samples: vitamin C pills 500 mg, manufacturer Galenika, vitamin C pills 500 mg, manufacturer Ekofarm and powder Cedevita. Results show that the most suitable method for determination of vitamin C in all three samples is the HPLC-MS method. In addition to the HPLC-MS method, for determination of large amounts of vitamin C iodimetric titration is suitable, while for smaller amounts (Cedevita samples) the appropriate methods are the kinetic method and spectrophotometry.

---

*Isidora Banjac*

### Ispitivanje uticaja provodljivosti početnog rastvora i koncentracije katalizatora na sintezu silika nanočestica sol-gel metodom

Ispitan je uticaj katalizatora, njegove koncentracije kao i promene provodljivosti početnog rastvora na karakteristike silika nanočestica sintetisanih modifikovanom sol-gel metodom. Nanočestice su okarakterisane praćenjem promene raspodele pomoću Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, posmatranjem raspodele optičkom mikroskopijom i snimanjem IC spektara sintetisanih uzoraka. Rezultati su pokazali da je NaOH bolji katalizator u poređenju sa NH<sub>3</sub> kao i da povećanje koncentracije katalizatora i provodljivosti početnog rastvora imaju povoljan uticaj i snižavaju srednji prečnik nanočestica. Čestice najpovoljnijih karakteristika, najmanjeg najzastupljenijeg prosečnog prečnika 50.7 nm sintetisane su u 1 M rastvoru NaOH uz 0.97 M NaBr. Ovakve čestice u 0.2% suspenziji u hloroformu pokazale su indeks polidispersnosti od 0.236. Snimljeni su SEM uzoraka sintetisanih pri različitim koncentracijama NaOH koji su pokazali da su dobijene nanočestice sfernog oblika.

### Influence of Conductivity of the Initial Solution and Catalyzer Concentration on the Synthesis of Silica Nanoparticles by sol-gel

The influence of concentration and type of the catalyzer, as well as the changes in conductivity of the initial solution on the characteristics of nanoparticles synthesized by modified sol-gel method have been tested. Nanoparticles have been characterized by following the changes in distribution by Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, observing the distribution under an optical microscope and recording the IR spectrum of the synthesized samples. The results showed that NaOH is a better catalyzer than NH<sub>3</sub> and that the higher concentration of the catalyzer and the higher conductivity both have favorable influence on synthesis of nanoparticles of a smaller diameter. Nanoparticles of the smallest diameter 50.7 nm, have been synthesized in 1 M solution of NaOH with 0.97M NaBr. These particles have the index of polidispersity of 0.236 in 0.2% (mass fraction) suspension in chloroform. The SEM images of the sample synthesized in different concentrations of NaOH showed that the particles are spherical in shape.

---

*Isidora Banjac (1994), Beograd, Gandijeva 156/7, učenica 4. razreda XIII beogradske gimnazije*

*MENTOR: Srđan Tadić, profesor u Hemijsko-medicinskoj školi u Vršcu*