

Ispitivanje mogućnosti korišćenja antrahinonske boje Acid green 25 kao medijatora u degradaciji drugih sintetskih boja slobodnom i imobilizovanom lakazom

Lakaza spada u oksidoreduktaze kojima je za degradaciju sintetskih boja najčešće neophodno prisustvo medijatora, zbog čega je ispitano da li antrahinonska boja Acid green 25 može posredovati u ovakvim reakcijama. Degradirane su četiri boje (indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno) na prethodno određenoj optimalnoj pH, a reakcije praćene bez medijatora i uz ABTS ili boju acid green kao medijator. Enzim je inkapsuliran kalcijum-alginatom radi poređenja reakcija degradacije boje acid green slobodnom i imobilizovanom lakazom na 18 različitih pH vrednosti u opsegu 2–10.5. Ispitano je da li je inkapsulirani enzim manje osetljiv na promene pH vrednosti i može li imobilizat biti korišćen za degradaciju boje nakon završenog prvog ciklusa degradacije. Pokazano je da antrahinonska boja može biti medijator u degradaciji dve boje (indigo karmin i brom-fenol plavo), sa uspešnošću degradacije od 64 i 18 procenata, respektivno. Variranjem uslova inkapsulacije lakaze kalcijum-alginatom određeno je da odnos enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida treba da bude 1 : 2 : 12, a koncentracija natrijum alginata 4%, kako bi dobijeni imobilizat zadržao najveći deo aktivnosti enzima. Imobilizat lakaze u alginatu pokazuje isti trend aktivnosti u zavisnosti od pH kao i sam ekstrakt i sa manjom efikasnošću može biti korišćen za ponovnu degradaciju.

Uvod

Sintetske boje, koje su našle široku primenu u brojnim granama industrije, kao što su tekstilna industrija, industrija kože, proizvodnja papira i hrane, predstavljaju glavni industrijski izvor zagađenosti vode. Otpadne vode iz tekstilne industrije karakteriše visoka koncentracija boja, njihovih biološki aktivnih metabolita, veliki sadržaj mineralnih materija, visoka temperatura i različita pH vrednost. Značajna količina boja, posebno pri upotrebi rastvornih boja, gubi se tokom industrijskih procesa i preko otpadnih voda dospeva u prirodne vodotokove i stajaće vode. Prisustvo tek-

Milica Perić (1996),
Valjevo, Naselje
Oslobodioci Valjeva
85/14, učenica 4.
razreda Medicinske
škole „Dr Miša
Pantić”

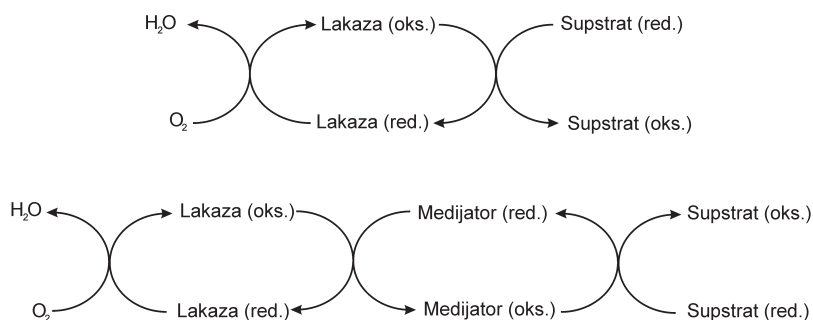
MENTOR: Jelica
Milošević, student
doktorskih studija na
Hemijskom fakultetu
Univerziteta u
Beogradu

stilnih boja u prirodnim vodama deluje štetno na vodeni ekosistem zbog apsorpcije i rasejavanja Sunčevih zraka, što bitno otežava proces fotosinteze. Takođe, poznato je da mnoge rastvorene tekstilne boje pod dejstvom Sunčevog zračenja i mikroorganizama podležu degradaciji uz nastajanje toksičnih proizvoda od primarnih molekula. Stoga je neophodno ukloniti sintetske boje iz industrijskih otpadnih voda pre njihovog ispuštanja u prirodne recipijente.

Po svojoj hemijskoj strukturi sintetske boje su veoma raznolike, a neke od najviše korišćenih grupa u industriji su azo, antrahinonske, akridinske, ksantanske, indigoidne, tiazinske, tiazolne i druge boje (Murugesan 2007).

Za uklanjanje sintetskih boja razvijene su razne fizičko-hemijske metode: jonska izmena, reverzna osmoza i druge (Abid 2012). Primenljivost ovih metoda ograničava to što su uglavnom skupe, boja kao otpad se zadržava, a kasnije se mora degradirati i odložiti. Enzimska oksidacija sintetskih boja oksidoreduktazama, kao što su lakaze, sve se više proučava zbog svoje efikasnosti.

Lakaze su bakar-zavisne polifenoloksidaze, kod kojih je bakar(II) vezan u okviru aktivnog centra enzima. Mogu biti izolovane iz raznih izvora: biljaka, gljiva, prokariota, insekata (Claus 2004). Vrlo su dobri biokatalizatori zbog toga što kao kosupstrat koriste kiseonik, kao proizvod reakcija nastaje voda, a imaju i veoma nisku specifičnost prema supstratima, koji mogu biti i sintetske boje (Wong 1999). Mehanizam oksidoredukcione reakcije između lakaze i supstrata prikazan je na slici 1.



Slika 1.
Šematski prikaz oksidacije supstrata lakazom, bez prisustva i u prisustvu medijatora (prema Riva 2006)

Figure 1.
Schematic representation of substrate oxidation by laccase, with and without presence of mediator (Riva 2006)

Boje koje su derivati antrahinona su direktni supstrati za lakazu, pa se zato reakcija odvija bez prisustva medijatora. I pored niske specifičnosti ovog enzima prema supstratima, ranija istraživanja su pokazala da nisu sve klase sintetskih boja direktni supstrati za lakazu. Za oksidaciju nekih boja neophodno je prisustvo medijatora koji će posredovati između enzima i supstrata. ABTS, (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina), direktan je supstrat za peroksidaze uz vodonik-peroksid i bakar-zavisne oksidaze, u koje spada lakaza. Kao takav, može se ponašati i kao medijator

u oksidoredukcionim reakcijama sa jedinjenjima koja nisu direktni supstrati za odgovarajuće enzime.

Pored prednosti koje pruža enzimska degradacija sintetskih boja, postoje i problemi koji još uvek nisu u potpunosti prevaziđeni: enzimi su aktivni u relativno uskom opsegu za njih karakterističnih pH vrednosti. Takođe, za obezbojavanje stotina litara otpadnih industrijskih voda, potrebne su i velike količine enzima. Rešenje oba ova problema pruža imobilizacija enzima na pogodan način.

Imobilizacija je skup tehnika kojima se ograničava kretanje i olakšava rukovanje enzimom, pri čemu enzimski aktivnost ostaje očuvana. Imobilizovani enzim se jednostavno može ukloniti iz sistema odvajanjem imobilizata od ostatka smeše i potencijalno ponovo koristiti. Jedna od metoda imobilizacije je inkapsulacija enzima, koja podrazumeva formiranje selektivno propustljive polimerne kapsule oko molekula enzima (Nahakpam *et al.* 2008). Inkapsulacija enzima formiranjem gel kapsula kalcijum-alginata je jedna od najjeftinijih i najjednostavnijih, pa stoga i najviše korišćenih metoda inkapsulacije (Williamson *et al.* 2013).

Cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti korišćenja antrahinonske boje Acid green 25 kao medijatora pri oksidaciji sintetskih boja koje nisu direktan supstrat za lakazu, radi potencijalne upotrebe pri degradaciji smese ovih boja. U okviru toga ispitano je i da li je inkapsulirani enzim manje osetljiv na promene pH vrednosti, kao i da li inkapsulirani enzim nakon degradacije boja može biti ponovo korišćen.

Materijal i metode

Za reakcije degradacije korišćen je sirov ekstrakt lakaze produkovan iz gljive *Trametes versicolor* (ćuranov rep). Ekstrakt je čuvan na temperaturi -20°C .

Određivanje koncentracije lakaze. Koncentracija proteina u ekstraktu određena je Bredfordovom metodom, koja se zasniva na vezivanju boje Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) za protein, pri čemu se apsorpcioni maksimum boje pomera sa 465 nm na 595 nm (kompleks protein-boja). Meri se porast apsorbanca na 595 nm. Radi konstruisanja kalibracione prave, napravljen je rastvor goveđeg seruma albumina (BSA) u vodi, koncentracije 1 mg/mL. Slepu probu su činili Bredfordov reagens i voda, dok je u ostale dodavana različita zapremina rastvora BSA čime je napravljeno šest rastvora različitih koncentracija u opsegu od 0.2 do 1.0 mg/mL (Vujčić 2002). Reakcionu smešu činilo je 50 μL ekstrakta lakaze i 2.5 mL Bredfordovog reagensa. Apsorbancija je snimana nakon pola sata, koliko je vreme potrebno za razvijanje kompleksa protein-boja. Koncentracija enzima očitana je sa kalibracione prave.

Određivanje aktivnosti lakaze. Enzimski aktivnost određena je pripremanjem esejja sa ABTS-om (koncentracija 50 mmol/L) na 18 različitih pH vrednosti, od 2 do 10.5 u intervalima od 0.5 pH jedinica. Merena je apsorbanca rastvora na talasnoj dužini od 420 nm, na kojoj je

apsorpcioni maksimum oksidovanog oblika ABTS-a. Apsorbancija je snimana svakih 10 sekundi tokom dva minuta i izračunata enzimska aktivnost izražena je u internacionalnim jedinicama. Jedna jedinica (U) definisana je kao količina enzima koja transformiše 1 μmol supstrata po minuti na 25°C.

Reakciona smeša sadržala je 100 μL ekstrakta enzima, 400 μL ABTS-a i 1.1 mL pufera (acetatnog za pH od 2 do 5.5 i fosfatnog za pH vrednosti od 6 do 10.5). Koncentracija svih pufera bila je 0.1 M.

Ispitivanje medijatora. Reakcije degradacije ispitivane su sa sledećim bojama: Acid green 25 (Sigma Aldrich), indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B, malahitno zeleno (Kemika). Korišćeni su rastvori koncentracija 10 g/L, koji su potom razblaživani 150 puta acetatnim puferom. Ispitano je da li su navedene boje direktni supstrati za lakazu praćenjem reakcija čije su reakcione smeše sadržale 200 μL ekstrakta enzima i 3.8 mL rastvora razblažene boje u puferu (pH = 4.5). Spektri su snimani nakon jednog sata i nakon 8 sati od dodavanja enzima.

Nakon toga, praćene su reakcije degradacije u prisustvu ABTS-a kao medijatora i antrahinonske boje Acid green 25, kao potencijalnog medijatora, dodavanjem 800 μL ABTS-a koncentracije 50 mmol/L (boje acid green koncentracije 10 g/L) u reakcionu smešu, na račun pufera.

Inkapsulacija lakaze. Enzim je inkapsuliran u kalcijum-alginat tako što je u rastvor natrijum-alginata (masenih udela 2.5, 3.0 i 4.0%) dodat ekstrakt lakaze. Nakon pola sata homogenizovanja smeša ekstrakta i alginata ukapavana je u rastvor kalcijum-hlorida ($c = 0.1 \text{ mol/L}$). Odnos masa ekstrakta enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida bio je redom 1 : 5 : 10 u prvom i 1 : 2 : 12 u drugom slučaju. Alginatne kuglice u kojima je enzim inkapsuliran su nakon toga isprane prvo vodom pa acetatnim puferom i potopljene u puferu pH vrednosti 4.5 i čuvane na 4°C.

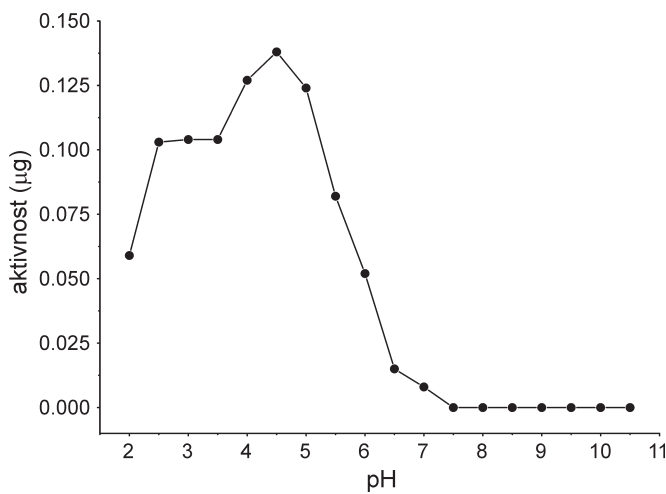
Radi ispitivanja uspešnosti inkapsulacije, merena je aktivnost rastvora CaCl_2 u kome su kuglice formirane (vrednost 1). Pošto je poznat i broj jedinica aktivnosti u zapremini korišćenog ekstrakta (vrednost 2), izračunat je procenat inkapsuliranog enzima, oduzimanjem vrednosti 1 od vrednosti 2. Time je utvrđeno koja koncentracija alginata i u kojim odnosima sa enzimom i kalcijum-hloridom doprinosi formiranju najaktivnijih kuglica. Rađene su reakcije degradacije boje Acid green 25 sa tako pripremljenim najaktivnijim kuglicama na svih 18 pH vrednosti i sa ekstraktom lakaze na istim pH vrednostima. Reakcione smeše su sadržale po 20 alginatnih kuglica ($m = 0.26 \text{ g}$), odnosno 200 μL ekstrakta enzima i po 3 mL rastvora boje u puferima. Dakle, u cilju poređenja efikasnosti, za svaku pH vrednost praćena je degradacija i sa 20 kuglica i sa 200 μL enzima.

Da bi se ustanovilo da li imobilizat nakon prvog ciklusa obezbojavanja može biti korišćen za ponovnu degradaciju, nakon 24 h reakcije boje acid green sa imobilizatom, degradirana boja je uklonjena iz reakcionih smeša i kuglicama je dodata nova količina puferisanih rastvora boja.

Rezultati i diskusija

Izmerena koncentracija lakaze u ekstraktu iznosi 1.31 mg/mL.

Zavisnost aktivnosti lakaze od pH vrednosti prikazana je na slici 2. Vidi se da je lakaza najaktivnija na pH = 4.5 (aktivnost 0.1388 U/mL), ali je veoma aktivna i na pH vrednostima 4 i 5 dok na pH 7 ne pokazuje aktivnost. Na pH = 4.5 praćene su reakcije degradacije.



Slika 2. Zavisnost aktivnosti lakaze od pH vrednosti

Figure 2. Laccase activity – pH dependence

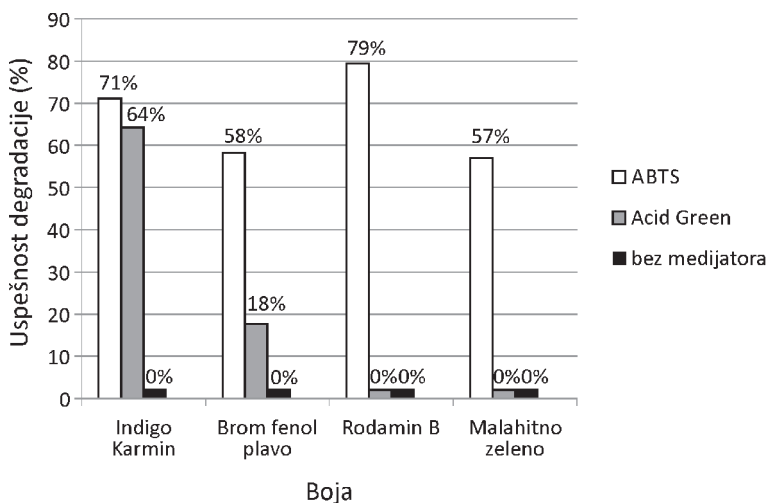
Radi utvrđivanja koja od boja je direktan supstrat za lakazu, poređene su početne apsorbancije i apsorbancije nakon 8 sati od početka degradacije. Procenat degradacije boje enzimom računat je prema jednačini:

$$D = 100 (A_i - A_f) / A_i$$

pri čemu A_i predstavlja apsorbanciju određene boje pre početka degradacije, a A_f završnu apsorbanciju, izmerenu nakon 8 časova.

Na ovaj način izračunato je da je nakon 8 časova degradirano 94% boje Acid green 25 i to bez prisutva ABTS-a kao medijatora, što ukazuje da ova boja jeste direktan supstrat za lakazu. Degradacija ostalih boja bez prisutva medijatora bila je manje uspešna, najviše je degradirano boje brom-fenol plavo, i to 4.8%.

Na slici 3 su prikazani rezultati degradacije svake od boja, bez prisustva i u prisustvu oba medijatora. Može se zaključiti da je ABTS uspešniji medijator od boje acid green. ABTS je bio najmanje uspešan pri degradaciji malahitno zelenog (57%). Takođe, vidi se i da se acid green može koristiti kao medijator pri degradaciji boje indigo karmin, sa uspešnošću od čak 64%, što je neznatno manje u odnosu na procenat obezbojenja sa ABTS-om kao medijatorom. Acid green boja pokazala se kao medijator i pri degradaciji brom-fenol plavog, doduše sa znatno manjim prinosom degradacije (18%). Rodamin B i malahitno zeleno ne mogu biti degradirane uz acid green kao medijator, dok se njihova degradacija u prisistvu ABTS-a pokazala kao uspešna (79, odnosno 57 procenata).

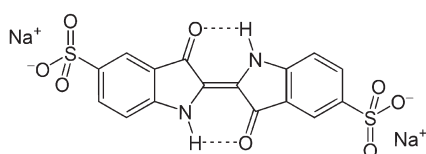


Slika 3.
Uspešnost medijatora pri degradaciji

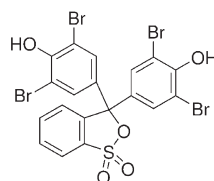
Figure 3.
Performance of mediators in degradation reactions (black is no mediator)

S obzirom na to da mehanizmi degradacije ovih boja lakazom još nisu poznati, može se pretpostaviti da su ovakvi rezultati povezani sa strukturnom sličnošću između dve boje koje mogu biti degradirane uz acid green. I indigo karmin i brom-fenol plavo u svojoj strukturi imaju najmanje po jednu sulfonsku grupu, dok one kod rodamina B i malahitno zelenog nisu prisutne (slika 4). Međutim, treba biti svestan da je uzorak od četiri boje korišćene u ovom istraživanju (indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno), premali za ovakvu generalizaciju.

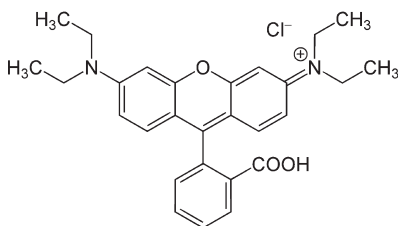
Optimalan odnos enzima, natrijum-alginata i kalcijum-hlorida je 1 : 2 : 12, a maseni udeo natrijum-alginata 4%. Koncentrovaniji rastvor alginata ima veći broj funkcionalnih grupa, pa će enzim biti jače, odnosno za više mesta vezan unutar polimerne kapsule. Kuglice napravljene na ovaj način inkapsulirale su 67% jedinica aktivnosti enzima u odnosu na prvo-



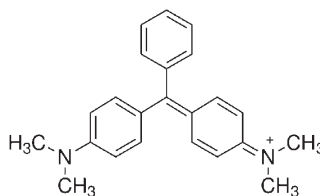
1. Indigo karmin



2. Bromfenol plavo



3. Rodamin B



4. Malahitno zeleno

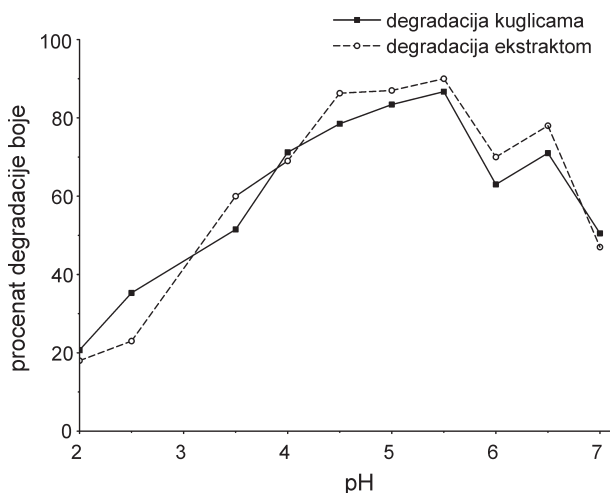
Slika 4.
Strukturne formule degradiranih boja

Figure 4.
Structures of degraded dyes

- 1 – Indigo carmine
- 2 – Bromphenol blue
- 3 – Rhodamine B
- 4 – Malachite green

bitan ekstrakt lakaze korišćen za inkapsulaciju. Takve kuglice su korišćene u daljim reakcijama degradacije.

Uspešnost degradacije boje acid green alginatnim kuglicama na različitim pH nakon 24 h upoređena je sa degradacijom boje ekstraktom enzima, što je prikazano na slici 5.



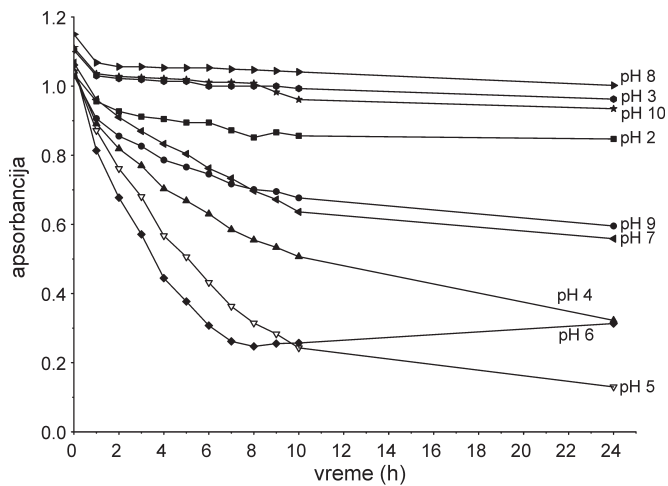
Slika 5. Poređenje reakcije degradacije boje ekstraktom i imobilizatom nakon 24 h

Figure 5. Dye degradation by extract (dotted line) and immobilizer, comparison after 24 h

Ekstrakt i imobilizat sa približno jednakom efikasnošću degradiraju boju na različitim pH vrednostima, iz čega se može zaključiti da imobilizat lakaze u alginatu pokazuje istu aktivnost u zavisnosti od pH vrednosti kao i sam ekstrakt. Pošto mehanizam degradacije sintetskih boja lakazom nije poznat, ne može se dati pouzdano objašnjenje zašto i ekstrakt i imobilizat pokazuju istu zavisnost od pH. Međutim, može se pretpostaviti da zato što su na različitim pH vrednostima kiselinski i bazni centri boja u manjoj ili većoj meri protonovani, odnosno deprotonovani, enzim sa različitom uspešnošću može da ostvari interakcije sa supstratom i oksiduje ga.

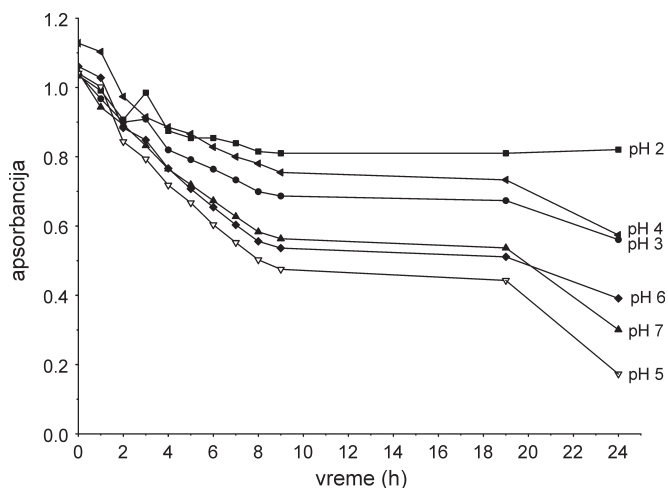
Na slikama 6 i 7 prikazane su reakcije degradacije boje ekstraktom i kuglicama tokom vremena, u zavisnosti od pH vrednosti. Poređenjem završnih tačaka svake od reakcija može se zaključiti da je nakon 24 h reakcije i sa ekstraktom i sa imobilizatom najviše boje degradirano na vrednosti pH = 5 i na onim njoj najbližim (pH = 4 i pH = 6), na kojima je apsorbancija po završetku reakcije približno istih vrednosti. Što se tiče reakcija sa ekstraktom, najmanja količina boje degradirana je na pH vrednostima 8, 9 i 10 a zatim na pH = 2. U reakciji boje sa imobilizatom, najmanje boje degradirano je na pH = 2 (pri čemu degradacije u baznim sredinama nisu mogle biti praćene zbog mehaničke nestabilnosti imobilizata).

Na slici 8 su prikazane reakcije degradacije ekstraktom (puna linija) sa reakcijama sa imobilizatom (isprekidana linija) na nekoliko najupečatljivijih pH vrednosti. Razlika između završnih apsorbancija reakcija sa ekstraktom i imobilizatom je u okviru greške instrumenta, tako da se mogu smatrati gotovo istim.



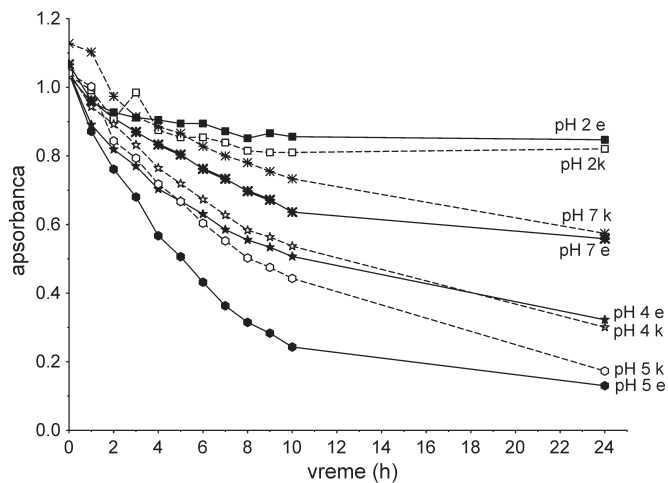
Slika 6. Reakcije degradacije ekstraktom na različitim pH vrednostima, tokom vremena

Figure 6. Extract degradation at different pH values – time dependence



Slika 7. Reakcije degradacije imobilizatom na različitim pH vrednostima, tokom vremena

Figure 7. Immobilizer degradation at different pH values – time dependence



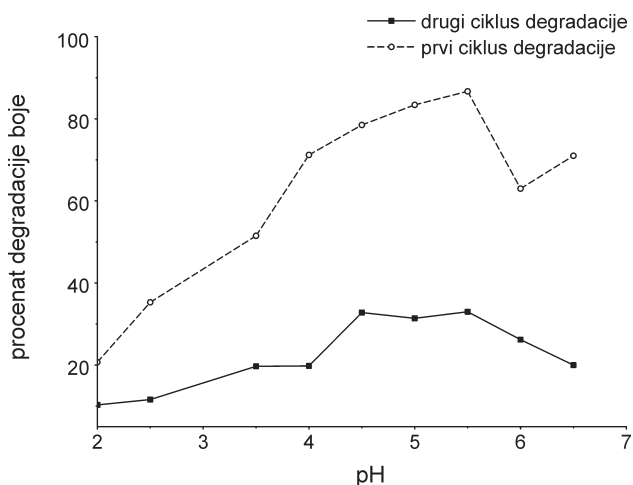
Slika 8. Reakcije degradacije ekstraktom i imobilizatom na različitim pH vrednostima, kroz vreme

e – ekstrakt
k – imobilizat

Figure 8. Extract and immobilizer degradation at different pH values – time dependence

e – extract
k – immobilizer

Uspešnost degradacije imobilizatom nakon prvog i drugog ciklusa degradacije na pH vrednostima od 2 do 6.5, nakon 24 h, data je na slici 9. Uočava se da je ponovno korišćenje alginatnih kuglica za degradaciju boje moguće, samo sa приметно manjom brzinom i efikasnošću (približno tri puta), što se može objasniti time što je boja degradirana tokom prvog ciklusa ušla u pore alginatne kapsule i na taj način delimično onemogućila interakciju između enzima i boje degradirane u drugom ciklusu. Još jedno moguće objašnjenje je i to da je imobilizat koji je degradirao boju u drugom ciklusu duže bio izložen pH vrednostima koje se razlikuju od one na kojoj enzim pokazuje optimalnu stabilnost.



Slika 9. Efikasnost imobilizata u ponovnom ciklusu obezbojavanja

Figure 9. Efficiency of immobilizer in first (dotted line) and second degradation cycle

Praćenje degradacije imobilizatom na višim pH vrednostima nije bilo moguće zbog mehaničke nestabilnosti imobilizata u baznim sredinama. Objasnjenje ove pojave je sledeće: kako je korišćen pufer sadržao jone natrijuma, došlo do izmene jona kalcijuma iz kalcijum-alginata jonima natrijuma, čime je polimer povratio svoju hidrosolubilnu strukturu natrijum-alginata, što je dovelo do raspadanja kuglica.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da od ispitivanih boja (Acid green 25, indigo karmin, brom-fenol plavo, rodamin B i malahitno zeleno) jedino Acid green 25 može biti direktan supstrat za lakazu, kao i da brom-fenol plavo može biti degradirana bez prisustva medijatora, ali u zanemarljivim količinama. Potvrđeno je da je ABTS univerzalni medijator, s tim što je pri korišćenim uslovima najmanja bila degradacija boje malahitno zeleno (57%), a najveća rodamina B (79%). Takođe, pokazano je i da se acid green može koristiti kao medijator za lakazu u degradaciji sintetskih boja, ali samo pri degradaciji boja indigo karmin i brom-fenol plavo, koje su sulfonske boje, i to sa uspešnošću degradacije od 64% kod indigo karmina i 18% kod boje bromfenol plavo. Rodamin B i malahitno zeleno ne mogu biti degradirane bez prisutva ABTS-a.

Utvrdeno je da je lakaza najaktivnija u opsegu pH vrednosti od 4 do 5, da aktivnost gubi sa sniženjem pH vrednosti i to za oko 60% na pH = 2, a da je u baznim sredinama potpuno neaktivna.

Inkapsulacijom kalcijum-alginatnim kuglicama aktivnost lakaze se ne može očuvati, ali kuglice degradiraju boju sa približno istom uspešnošću kao i sam ekstrakt. Inkapsulacija je sa druge strane omogućila ponovnu upotrebu enzima, čime se mogu uštedeti količine enzima potrebnog za degradaciju, jer inkapsuliran enzim može biti odvojen iz sistema nakon degradacije i biti ponovno korišćen.

U daljim istraživanjima mogla bi biti varirana količina korišćenih boja, ABTS-a i enzima, radi određivanja optimalnog odnosa koji bi rezultirao maksimalnom količinom degradirane boje. Trebalo bi i na većem broju boja proveriti da li prisustvo sulfonskih grupa u strukturi sintetskih boja utiče na to da li one mogu biti degradirane uz acid green kao medijator.

Zahvalnost. Zahvaljujem se dr Aleksandri Margetić, naučnom saradniku na IHTM-u, koja je obezbedila enzim ispitivan u ovom projektu, kao i Jelici Milošević, studentu doktorskih studija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja i organizovanju rezultata merenja.

Literatura

- Abid M. F., Zablouk M. A., Abid-Alameer A. M. 2012. Experimental study of dye removal from industrial wastewater by membrane technologies of reverse osmosis and nanofiltration. *Iranian journal of environmental health science and engineering*, **9**: 17.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, **35**: 93.
- Murugesan K., Nam I-H., Kim Y-M., Chang Y-S. 2004. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 1662.
- Nahakpam S., Singh P., Shah K. 2008. Effect of calcium on immobilization of rice (*Oryza sativa* L.) Peroxidase for bioassays in sodium alginate and agarose gel. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **13**: 632.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzyme for green chemistry. *Trends in biochemistry*, **24**: 5.
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija: Praktikum*. Beograd: Rantek
- Wong Y., Yu J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water research*, **33**: 3512.

Williamson C., Gonzalez J., Ascencio A., Osma J. 2013. Laccase Alginate Encapsulation: Comparison between Assisted and Non-assisted Extrusion for Large-scale Production. *Revista de Integria*, **39**: 24.

Milica Perić

Potential Use of Antraquinone Dye Acid Green 25 as a Mediator in the Degradation of Synthetic Dyes by Free and Immobilized Laccase

Laccases are a group of oxidative enzymes that are able to degrade synthetic dyes in the presence of a mediator. Therefore, in this research it was examined whether the dye Acid green 25 could mediate the interaction between the enzyme and the other dyes. Degradations of four dyes (Indigo carmine, Bromphenol blue, Rhodamin B and Malachite green), non-mediated and mediated by ABTS and Acid green, were examined at an optimal pH value which had been previously determined. In order to determine if the immobilized laccase could retain the activity in a wide range of pH values (2–10.5) and after the first cycle of degradation, the immobilization of laccase was performed by calcium-alginate encapsulation. The efficiencies of degradation by free and immobilized laccase were compared. Acid green was able to mediate degradation of two dyes (Indigo carmine and Bromphenol blue) with an efficiency of 64.2 and 17.7%. Laccase was encapsulated under different conditions and it was determined that the optimal ratio of enzyme, sodium alginate and calcium chloride was 1 : 2 : 12, with a 4% concentration of sodium alginate. Immobilized laccase showed the same trend of activity as free laccase and it can be reused in the second cycle of degradation, nevertheless with longer degradation time needed.



Izolovanje i inhibicija monoamin oksidaze (MAO) derivatima 8-(3-arilpropoksi)kofeina

Inhibitori monoamin oksidaze (MAO) produžavaju aktivnost dopamina u mozgu, što ih čini pogodnim izborom bilo kao monoterapija u ranim fazama Parkinsonove bolesti ili kao dodatna terapija kod bolesnika koji se već leče levodopom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da se 8-alkiloksi derivati kofeina ponašaju kao veoma dobri inibitori ljudske monoamin oksidaze. U cilju pronalaženja novih inhibitora, sintetisana su dva nova jedinjenja ovog tipa: 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (jedinjenje 4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (jedinjenje 4b). Delimično je prečišćena goveđa monoamin oksidaza iz goveđe jetre i određena je njena ukupna i specifična enzimaska aktivnost i Mikaelisova konstanta za benzilamin kao supstrat. Ispitivan je mehanizam inhibicije ovog enzima i određene su konstante inhibicije za kofein, jedinjenje 4a i jedinjenje 4b i njihove vrednosti redom iznose 0.197, 0.027 i 0.092 M. Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, sa oko 7 puta boljom inhibicijom u poređenju sa kofeinom.

Uvod

Monoamin oksidaza (MAO) je enzim koji kao kofaktor sadrži flavinadenin dinukleotid (FAD), kovalentno vezan za enzim, i katalizuje oksidativnu deaminaciju biogenih amina. Nalazi se vezan za spoljašnju membranu mitohondrija u ćelijama nervnog i perifernog tkiva (placenta, jetra, trombociti, srce i pluća). Javlja se u obliku dva izoenzima, MAO A i MAO B, koji imaju 70% homologije sekvenci i različitu selektivnost za supstrate i inhibitore. MAO A uglavnom deluje na serotonin, melatonin, norepinefrin i epinefrin. MAO B uglavnom deluje na fenetilamine i benzilamine. Oba enzima skoro podjednako deluju na dopamin, tiramin i triptamin (Anderson 1997).

Jedna od najvažnijih vrsta antidepresiva su inhibitori monoamin oksidaze (MAOI). Međutim, zbog mogućih neželjenih efekata, ireverzibilni inhibitori monoamin oksidaze su ranije bili rezervisani kao poslednja linija

*Pavle Kravljanac,
Beograd, Dečanska 2,
učenik 3. razreda Prve
beogradske gimnazije*

MENTORI:

*Jelica Milošević,
Hemijski fakultet
Univerziteta u
Beogradu*

*Filip Opinčal,
Hemijski fakultet
Univerziteta u
Beogradu*

tretmana i korišćeni su samo kada drugi antidepressivi nisu bili uspešni (Nowakowska i Chodera 1997). Svi lekovi koji su umešani u regulaciju serotonina mogu izazvati „serotoninski sindrom” (višak serotonina koji izaziva uznemirenost, emocionalnu labilnost, nesаницe i konfuziju). Ako se MAOI uzimaju zajedno sa hranom koja sadrži visok nivo tiramina (sir, razne vrste mesa, čokolada itd.), može se izazvati hipertenzivna kriza, a u manjim dozama jaka glavobolja zbog povišenog krvnog pritiska (Volz *et al.* 1996). Kao odgovor na ove neželjene efekte razvijeni su selektivni MAO A inhibitori koji smanjuju razlaganje serotonina, norepinefrina i dopamina, istovremeno dopuštajući da tiramin bude metabolizovan od strane MAO B (Nowakowska i Chodera 1997). Prvi MAOI, razvijeni 50-ih godina 20. veka, bili su ireverzibilni, tj. kovalentno su se vezivali za enzim i trajno blokirali njegovu aktivnost. Reverzibilni inhibitori monoamin oksidaze A (RIMA) razvijeni su tek 1990-ih godina (Volz *et al.* 1996) i koriste se kao prva linija tretmana antidepressivima (Swinkels i De Jonghe 1995).

Parkinsonova bolest je degenerativni poremećaj centralnog nervnog sistema. Motorni simptomi Parkinsonove bolesti posledica su odumiranja ćelija srednjeg mozga koje stvaraju dopamin. Levodopa je lek koji se najšire upotrebljava u lečenju simptoma Parkinsonove bolesti već više od 30 godina (Parkinson's 2006). Levodopa u organizmu prelazi u dopamin pomoću DOPA dekarboksilaze. Međutim, samo 5-10% levodope prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, a ostatak se metabolizuje na drugom mestu u organizmu izazivajući mnoge neželjene efekte (mučnina, diskinezija itd.). Početak tretmana levodopom može biti odložen korišćenjem selektivnih MAO B inhibitora i na taj način mogu se izbegnuti neželjeni efekti korišćenja Levodope u ranoj fazi bolesti. Takođe se inhibitori MAO B mogu uzimati zajedno sa levodopom i tako omogućiti zadržavanje, tj. veći nivo levodope u mozgu (Swinkels i De Jonghe 1995).

Kofein se pokazao kao slab inhibitor ljudske MAO B, ali uvođenjem različitih supstituenata na poziciji C8 u prstenu, dobijaju se jedinjenja sa značajno boljom inhibitornom aktivnošću (Petzer *et al.* 2003; Van der Walt *et al.* 2009; Pretorius *et al.* 2008). Sintetisana je serija analoga 8-aril- i alkiloksikofeina koji se ponašaju kao efikasni MAO A i MAO B inhibitori (Strydom *et al.* 2010; Strydom *et al.* 2011).

Na osnovu datih rezultata dosadašnjih istraživanja, a u cilju pronalazjenja novih inhibitora, u ovom radu predložena je sinteza dva nova derivata kofeina (slika 1): 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein i 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein.

Kako je MAO B iz mozga teško izolovati zbog heterogenosti tkiva i visokog sadržaja lipida, većina procedura koristi bubreg ili jetru pacova, svinje ili goveda kao polazni material (Erwin i Hellerman 1967; Hollunger i Orelan 1970; Youdim i Sourkes 1966; Kearney *et al.* 1971). Prema istraživanju Salach-a (1979) utvrđeno je da se monoamin oksidaza mitohondrija goveđe jetre nalazi isključivo kao B-izoforna. U ovom radu sintetisana su ova dva jedinjenja, izolovana je goveđa MAO B iz goveđe jetre i određena je konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa (konstanta inhibicije, K_i) za goveđu MAO B.

Materijali i metode

Monoamin oksidaza je izolovana iz sveže dobijene teleće jetre po modifikovanim procedurama iz literature (Schneider i Hogeboom 1950; McCauley i Racker 1973; Pearce i Roth 1984). Ukupna koncentracija proteina određivana je Bredford-ovim esejem (Vujčić 2002). Enzimska aktivnost praćena je spektrofotometrijski. MAO B inhibitori sintetisani su prema reakcionoj šemi (slika 1) iz 8-bromkofeina koji je dobijen bromovanjem kofeina i 3-aril-1-propanola (3), dobijenog redukcijom odgovarajuće supstituisane cimetine kiseline (2) litijum aluminijum hidridom. Supstituisana cimetna kiselina (2) dobijena je iz odgovarajućeg aldehida (1) Debnerovom modifikacijom Knevenagelove kondenzacije. Određene su konstante inhibicije za kofein, jedinjenje 4a i 4b i ispitan je mehanizam inhibicije jedinjenja 4a.

Enzimska aktivnost određena je spektrofotometrijski sa benzilaminom kao supstratom. U kvarcnoj kiveri od 1 mL pomešano je 100 μ L fosfatnog pufera (1.0 M, pH 7.27; fin. konc. 100 mM), 100 μ L rastvora benzilamina (50 mM; fin. konc. 5 mM), 100 μ L uzorka i 700 μ L vode. Promena apsorbance benzaldehida (250 nm) praćena je 30 min na 25°C. Mikaelisova konstanta K_m , odnosno mera afiniteta enzima prema supstratu, određena je iz Mikaelis-Mentenine jednačine ($v = v_{\max} [S] / (K_m + [S])$). Vrednosti inhibitorskih konstanti (K_i) dobijene su iz eksperimentalno određenih IC₅₀ vrednosti pomoću Čeng-Prusof jednačine ($K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [S] / K_m)$); Yung-Chi i Prusoff 1973). Mehanizam inhibicije određivan je primenom Direct linear plot tehnike (Eisenthal i Cornish-Bowden 1974).

Sve supstance korišćene u sintezama su p. a. čistoće. Za potrebe enzimskog esejja korišćen je Thermo Scientific Evolution 60S UV-Vis spektrofotometar. Infracrveni spektri su snimljeni Thermo Scientific Nicolet iS10 spektrometrom Diamond ATR tehnikom sa 32 snimanja u opsegu 500–4000 cm^{-1} , rezolucije 4 cm^{-1} .

Sinteza 8-bromkofeina. 8-bromkofein sintetisan je po modifikovanoj proceduri (Soltani Rad *et al.* 2012). U CH_2Cl_2 (300 mL) dodat je kofein (10.0 g, 0.05 mol) i N-bromsukcinimid (NBS; 25.0 g, 0.14 mol). Kada su se supstance rastvorile, dodata je voda (100 mL) i takva smeša je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi jedan i po dan. Reakcija je praćena tankoslojnom hromatografijom, a kao eluent korišćen je toluen/acetone 7:3. Nakon što je ustanovljeno da je početno jedinjenje u potpunosti reagovalo, reakciona smeša je prebaćena u levak za odvajanje. Odbačen je vodeni sloj, a brom iz organskog sloja je ekstrahovan više puta 2 M rastvorom NaOH do obezbojavanja smeše. Organska faza je odvojena, isprana zasićenim rastvorom NaCl (100 mL), osušena iznad Na_2SO_4 , filtrirana i uparena do suva. Dobijeno je 5.62 g (40%) 8-bromkofeina u obliku svetloroze praha. Tačka topljenja 209°C. IR 2980, 1700, 1652, 1340, 1034, 745 cm^{-1} .

Sinteza para-supstituisane cimetine kiseline. Supstituisana cimetna kiselina sintetisana (2) je iz odgovarajućeg aldehida (1) (slika 1) po sledećoj proceduri (Ferjančić i Bihelović 2012). U balon opremljen magnetnom mešalicom i povratnim kondenzatorom odmereni su aldehid (1) (0.10 mol),

malonska kiselina (17.3 g, 0.16 mol), piperidin (1.3 mL) i piridin (32 mL). Reakciona smeša je mešana i refluktovana na uljanom kupatilu tokom 2h, a zatim ohlađena do sobne temperature i izlivena u smešu koncentrovane hlorovodonične kiseline (100 g) i leda (100 g). Izdvojeni kristali su procedeni, isprani hladnom vodom i sušeni na vazduhu. Sirova kiselina je prekrystalisana iz vodenog etanola (v/v = 1 : 1).

4-metoksicimetna kiselina (2a). Prinos: 78%. T.t: 171°C. IR 2980, 1671, 1315, 1172, 1027 cm^{-1} . EI-MS 178 (M^+), 161, 147, 133, 132, 77 m/z.

4-metilcimetna kiselina (2b). Prinos: 82%. T.t: 250°C. IR 2980, 1671, 1311, 1177, 808 cm^{-1} . EI-MS 162 (M^+), 147, 117, 115, 91 m/z.

Sinteza para-supstituisanih 3-fenilpropil alkohola. Alkoholi (3) su sintetisani po modifikovanoj proceduri iz literature (Duarte *et al.* 2004). Korišćen je sveže destilovani THF, osušen iznad natrijuma. U suspenziju LiAlH_4 (0.228 g, 6 mmol) u THF-u (20 mL), na ledenom kupatilu, pod inertnom atmosferom, ukapavan je rastvor odgovarajuće kiseline (2 mmol) u THF-u (20 mL). Dobijena smeša je mešana dok nije dostigla sobnu temperaturu, a zatim je refluktovana 4h. Nakon završetka reakcije i hlađenja do sobne temperature, u reakcionu smešu je dodato redom 300 μL vode, 300 μL 20% NaOH i 900 μL vode. Smeša je filtrirana, osušena iznad Na_2SO_4 i uparena do suva. Dobijeni sirovi proizvod je prečišćen korišćenjem gravitacione hromatografije sa silika-gelom kao stacionarnom fazom koristeći petroletar: etil-acetat 7 : 3 kao eluent.

3-(4-metoksifenil)propan-1-ol (3a). Dobijeno je 134.3 mg u vidu žute tečnosti. Prinos: 40%. EI-MS 166 (M^+), 147, 121, 91, 77 m/z.

3-(4-metilfenil)propan-1-ol (3b). Dobijeno je 41,6 mg u vidu žute tečnosti. Prinos: 14 %. EI-MS 150 (M^+), 132, 117, 115, 105, 91 m/z.

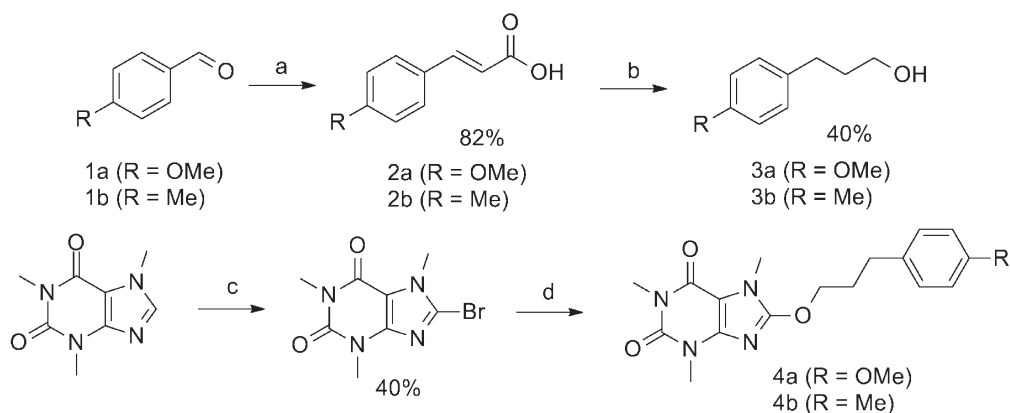
Za karakterizaciju sintetisanih jedinjenja korišćen je Agilent Technologies 7890A gasni hromatograf sa 240 Ion Trap masenim spektrometrom (EI jonizacija, sa energijom elektrona od 70 eV, u opsegu 40-1000 m/z). Korišćena je VF5MS kolona (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm) i helijum kao noseći gas pri protoku od 1 mL/min. Početna temperatura iznosila je 40°C, a zatim je povećana na 310°C brzinom od 7°C/min i na toj temperaturi je zadržana 10 min.

Korišćen je Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC sistem sa binarnom pumpom i DAD (na talasnim dužinama 254, 220, 280 i 272 nm, kao i snimanje spektra u opsegu 190-400 nm, sa korakom od 2 nm). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni (4.6 \times 50 mm, 1.8 μm) na temperaturi od 25°C, pri protoku od 0.4 mL/min. Kao mobilna faza korišćeni su voda (A) i acetonitril (B) uz gradijentno eluiranje: 0 min, 10% B; 2 min, 50% B; 7 min, 100% B; 9 min, 100% B; 11 min, 10% B.

Izolovanje enzima i sinteza inhibitora

Sinteza 8-(3-arilpropoksi)kofeina

Predloženi derivati kofeina – 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (4b) sintetisani su prema reakci-



Slika 1. Reakciona šema za sintezu derivata kofeina. Uslovi: a) malonska kis. (1.6 ekv.), piridin, piperidin, refluks, 2h; b) LiAlH_4 (3 ekv.), THF, refluks, 4 h; c) NBS (3 ekv.), CH_2Cl_2 , r.t., 1.5 d; d) Na, (3), toluen, refluks, 24 h.

Figure 1. Reaction scheme for synthesis of caffeine derivatives. Conditions: a) malonic acid (1.6 eq), pyridine, piperidine, reflux, 2 h; b) LiAlH_4 (3 eq), THF, reflux, 4 h; c) NBS (3 eq), CH_2Cl_2 , r.t., 1.5 d; d) Na, (3), toluene, reflux, 24 h.

onoj šemi datoj na slici 1. U hladnu suspenziju (0°C) natrijuma (4 ekv) u toluenu dodat je uz mešanje sav alkohol (3) (1 ekv) dobijen iz prethodne reakcije). Mešanje je nastavljeno dok sav natrijum nije reagovao. Dobijeni rastvor je zatim ukapavan u rastvor 8-bromkofeina (2.67 ekv) u toluenu. Reakciona smeša je refluksirana 24 h, a zatim filtrirana i, nakon uparavanja rastvarača, svetlo žuti ostatak je rastvoren u CHCl_3 , ispran zasićenim rastvorom Na_2CO_3 i uparen do suva. Tankoslojnom hromatografijom utvrđeno je nastajanje proizvoda koji je prečišćen pomoću HPLC-a i dobijeno je dovoljno supstance da bi se izvršila dalja ispitivanja.

Izolovanje MAO B

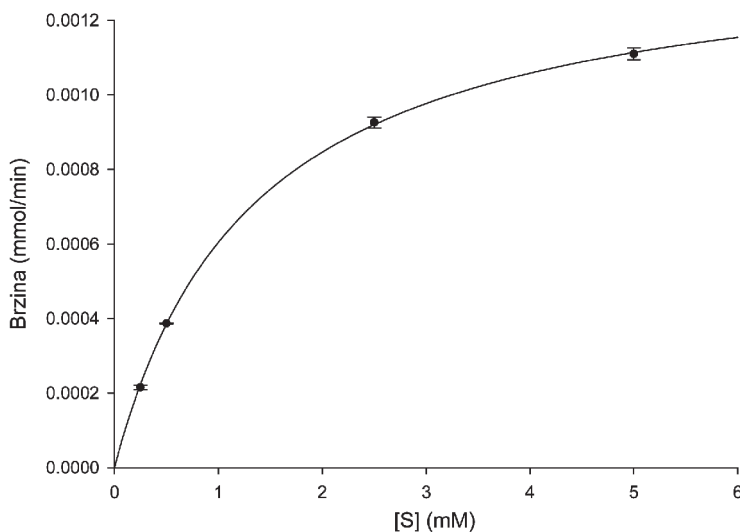
Svi postupci izvođeni su na temperaturi $0\text{--}4^\circ\text{C}$, ukoliko drugačije nije naglašeno. Oko 400 g jetre je usitnjeno i ispirano izotoničnim 0.25 M rastvorom saharoze, a zatim homogenizovano u blenderu i suspendovano u oko 0.5 dm^3 0.25 M rastvora saharoze. Homogenat je centrifugiran (700 g, 10 min) da bi se istaložila jedra i nelizirane ćelije. Talog je resuspendovan u 0.25 M rastvoru saharoze i ponovo centrifugiran na istoj brzini. Supernatanti su spojeni i centrifugirani dva puta na 4000 g i jednom na 5000 g po 10 minuta kako bi se istaložile mitohondrije. Spojeni talozi su isprani resuspendovanjem u 0.25 M rastvoru saharoze i centrifugiranjem 10 min na 24000 g. Talog je resuspendovan u istom rastvoru i zaostale nečistoće su staložene centrifugiranjem na 850 g 10 min, a zatim je supernatant centrifugiran 10 min na 24000 g da bi se istaložile mitohondrije.

Staložene mitohondrije su resuspendovane u 35 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.4). Esejem je potvrđena aktivnost enzima u resuspendovanom talogu. U dobijenu smešu dodat je 10% (w/v) rastvor Triton X-100 do koncentracije 0.5% (w/v) i smeša je ostavljena da se meša oko 30 min na 4°C, nakon čega je centrifugirana (40000 g, 10 min). Talog je resuspendovan u istom puferu i u njega je dodat 10% (w/v) rastvor Triton X-100 do koncentracije 1.5% (w/v). Smeša je ostavljena da se meša 45 min na 4°C, nakon čega je centrifugirana 10 min na 40000 g. Supernatanti su spojeni i njihova zapremina iznosila je 49 mL (20 mL posle prvog i 29 mL posle drugog centrifugiranja)

U dobijeni ekstrakt je, uz mešanje u toku 45 min, dodato 14.26 g fino spraćenog amonijum-sulfata. Nakon što je smeša centrifugirana (10000 g, 20 min), izdvojila su se tri sloja: plutajući žuti sloj, supernatant i talog. Samo je u talogu zadržana enzimska aktivnost i on je resuspendovan u 10 mM fosfatnom puferu (pH 8.0).

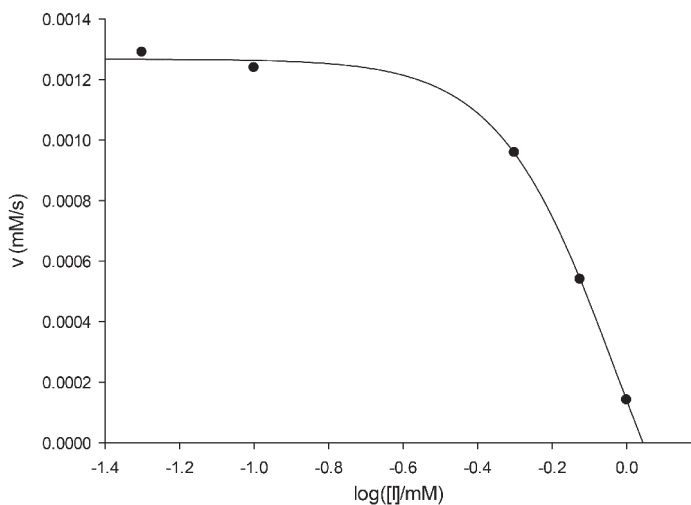
Tako dobijeni rastvor nanet je na Sephadex G25 kolonu (prethodno ekvilibrisanu 10 mM fosfatnim puferom pH 8.0). Sakupljene su tri frakcije koje su se razlikovale po intenzitetu boje, od kojih su samo dve pokazivale enzimsku aktivnost i one su sjedinjene. Njihova zapremina iznosila je 38 mL. One su čuvane u 0.25% Triton X-100 i 10% glicerolu u frižideru preko noći, a kasnije i zamrznute na nekoliko meseci.

Bradford-ovim esejem određena ukupna koncentracija proteina iznosila je 5.6 mg/mL. Enzimska aktivnost izražena u enzimskim jedinicama ($[U] = [\mu\text{mol}/\text{min}]$) iznosila je 1.45 U, a specifična aktivnost iznosila je 2.59 U/mg.



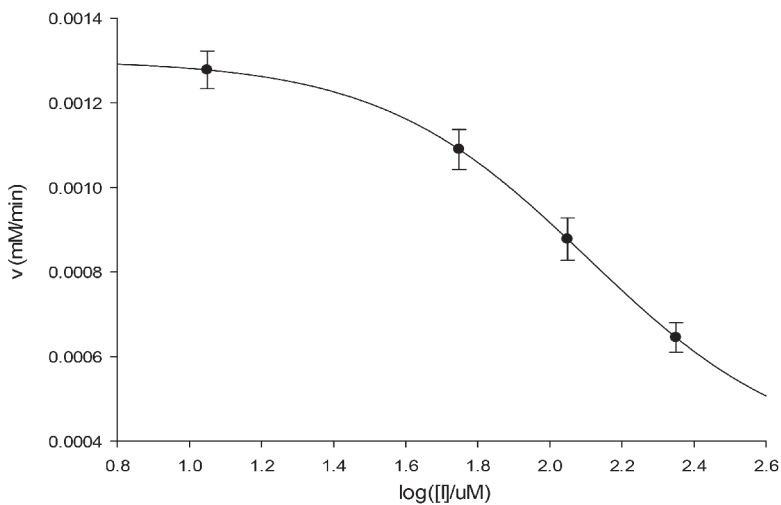
Slika 2. Mikaelis-Menten kriva zasićenja. Merenja su izvršena u triplikatima.

Figure 2. Michaelis-Menten curve of saturation. Measurements were done in triplicates.



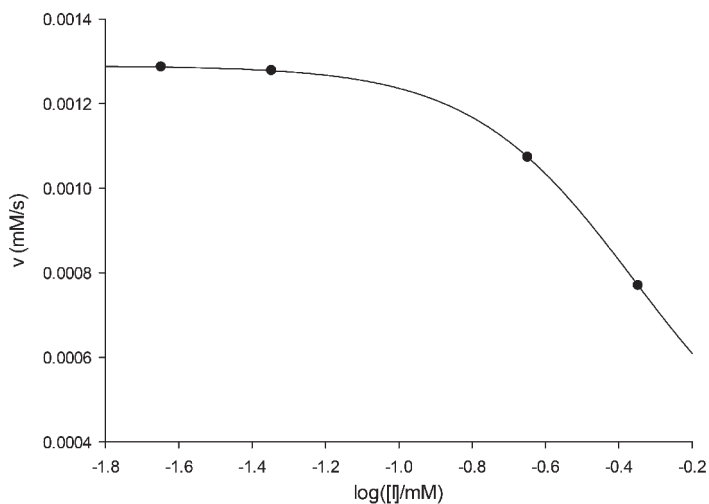
Slika 3.
Kriva dozno-zavisnog odgovora za kofein. Koncentracija supstrata bila je 5 mM.

Figure 3.
Dose-response curve for caffeine. The concentration of substrate used was 5 mM.



Slika 4.
Kriva dozno-zavisnog odgovora za jedinjenje 4a. Koncentracija supstrata bila je 5 mM. Merenja su rađena u duplikatu.

Figure 4.
Dose-response curve for compound 4a. The concentration of substrate used was 5 mM. Measurements were done in duplicates.



Slika 5.
Kriva dozno-zavisnog odgovora za jedinjenje 4b. Koncentracija supstrata bila je 5 mM.

Figure 5.
Dose-response curve for compound 4b. The concentration of substrate used was 5 mM.

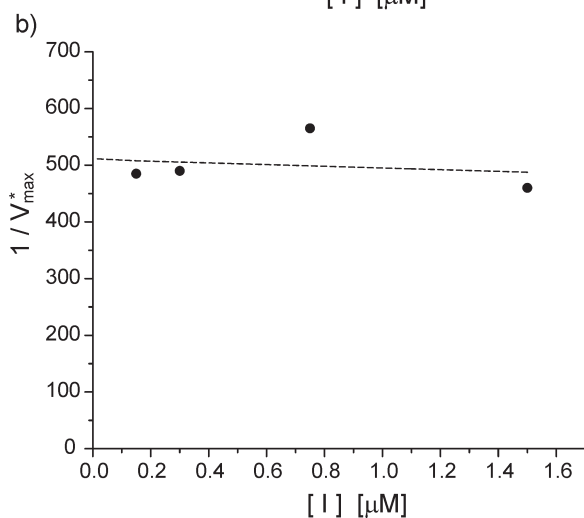
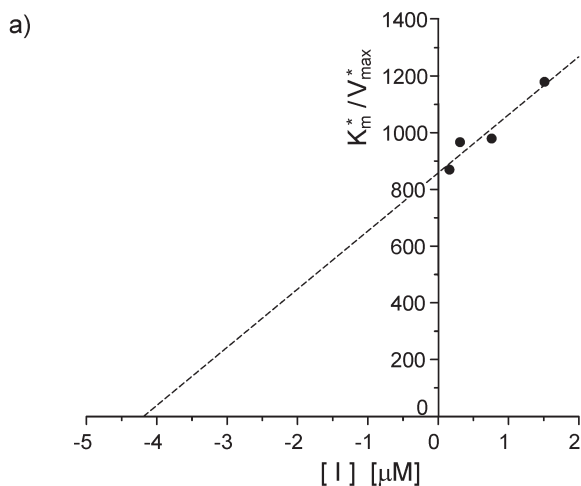
Ispitivanje inhibicije

Kriva zasićenja (slika 2) prikazuje zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije supstrata. Iz Mikaelis-Menten jednačine dobijeni su parametri $K_m = (1.33 \pm 0.06)$ mM i $v_{max} = (1.41 \pm 0.02)$ $\mu\text{M/s}$.

Sigmoidalna kriva dozno-zavisnog odgovora konstruisana je iz zavisnosti brzine oksidacije benzilamina (5 mM) od logaritma koncentracije ispitivanog inhibitora (slike 3-5).

Tabela 1. Vrednosti $\log IC_{50}$ i K_i za svaki ispitivani inhibitor

Jedinjenje	$\log IC_{50}$	K_i (mM)
Kofein	-0.03 ± 0.13	0.20 ± 0.06
4a	2.1 ± 0.3	0.027 ± 0.016
4b	-0.36 ± 0.00	0.092 ± 0.003



Slika 6.

- a) Zavisnost odnosa prividnih vrednosti K_m/v_{max} od koncentracije inhibitora;
 b) Zavisnost recipročne prividne vrednosti v_{max} od koncentracije inhibitora.

Figure 6.

- a) Relationship between apparent K_m/v_{max} ratio and inhibitor concentration;
 b) Relationship between reciprocal apparent v_{max} and inhibitor concentration.

Vrednosti parametara $\log IC_{50}$, dobijenih iz krivih sa grafika (slike 3-5), kao i vrednosti konstanti inhibicije (K_i), izračunatih korišćenjem Čeng-Prusof jednačine, prikazane su u tabeli za svaki ispitivani inhibitor (tabela 1). Iz tabele 1 se vidi da je najbolji inhibitor 4a. Na slici 6 su prikazani rezultati ispitivanja mehanizma inhibicije za 4a. Na koordinatnim osama K_m^* i v_{max}^* predstavljaju prividnu Mikaelisovu konstantu i prividnu maksimalnu brzinu reakcije, tj. K_m i v_{max} za različite koncentracije prisutnog inhibitora. Veličina $1/v_{max}^*$ ostaje relativno nepromenjena sa promenom koncentracije inhibitora (slika 6b), a odnos K_m^*/v_{max}^* se linearno povećava sa povećanjem koncentracije inhibitora (slika 6a). Drugim rečima, sa povećanjem koncentracije inhibitora K_m^* i v_{max}^* rastu sa istom proporcijom, što znači da ovom inhibitoru najbolje odgovara kompetitivni mod inhibicije (Eisenthal i Cornish-Bowden 1974).

Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, odnosno 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein, sa oko 7 puta boljom inhibicijom od kofeina. Poredeći K_i vrednosti kofeina i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofeina i 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofeina, može se videti da se inhibicija značajno poboljšava uvođenjem supstituenata na C8 atomu u prstenu kofeina.

Interesanto je da se uvođenjem metoksi umesto metil grupe na benzenovom prstenu vezivanje inhibitora za enzim pojačava, što nije slučaj i sa analognim 8-ariloksikofeinima, gde metil derivat ima bolju inhibiciju od metoksi derivata za ljudsku i majmunsku monoamin oksidazu. Zanimljivo je primetiti i to da je kofein mnogo bolji inhibitor goveđe MAO B ($K_i = 0.197$ mM) u poređenju sa ljudskom ($K_i = 3.6$ mM, Petzer *et al.* 2003).

Zaključak

Sintetisana su dva nova jedinjenja: 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (4b). Brzo i efikasno je delimično prečišćena goveđa monoamin oksidaza B i određena je njena ukupna i specifična enzimaska aktivnost i Mikaelisova konstanta za benzilamin kao supstrat. Ispitivan je mehanizam inhibicije ovog enzima i određene su konstante inhibicije za kofein, 4a i 4b. Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, sa oko 7 puta boljom inhibicijom u poređenju sa kofeinom i kompetitivnim mehanizmom inhibicije.

Literatura

- Anderson J. 1997. Color Atlas of Muscle Pathology. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(4): 557.
- Duarte C., Verli H., Araújo-Júnior J., Medeiros I., Barreiro E., Fraga C. 2004. New optimized piperamide analogues with potent *in vivo* hypotensive properties. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23 (4-5): 363.

- Eisenthal R., Cornish-Bowden A. 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochemical journal*, **139** (3): 715.
- Erwin V., Hellerman L. 1967. Mitochondrial Monoamine Oxidase: I. Purification and characterization of the bovine kidney enzyme. *Journal of biological chemistry*, **242**: 4230.
- Ferjančić Z., Bihelović F. 2012. *Preparativna organska hemija*. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- Hollunger G., Orelund L. 1970. Preparation of soluble monoamine oxidase from pig liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, **139** (2): 320.
- Kearney E., Salach J., Walker W., Seng R., Kenney W., Zeszotek E., Singer T. 1971. The Covalently-Bound Flavin of Hepatic Monoamine Oxidase. 1. Isolation and Sequence of a Flavin Peptide and Evidence for Binding at the 8 α Position. *European journal of biochemistry*, **24** (2): 321.
- McCaughey R., Racker E. 1973. Separation of two monoamine oxidases from bovine brain. *Molecular and cellular biochemistry*, **1** (1): 73.
- Nagatsu T., Sawada M. 2006. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *Journal of neural transmission supplementa*, **71** (71): 53.
- Nowakowska E., Chodera A. 1997. Inhibitory monoamine oxidases of the new generation. *Polski merkurusz lekarski*, **3** (13): 1.
- Parkinson's 2006. The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, ur. "Symptomatic pharmacological therapy in Parkinson's disease", Parkinson's Disease, London: Royal College of Physicians
- Pearce L., Roth J. 1984. Monoamine oxidase: separation of the type A and B activities. *Biochemical pharmacology*, **33** (11): 1809.
- Petzer J., Steyn S., Castagnoli K., Chen J., Schwarzschild M., Van der Schyf C., Castagnoli N. (2003). Inhibition of monoamine oxidase B by selective adenosine A2A receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **11** (7): 1299.
- Pretorius J., Malan S., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2008. Dual inhibition of monoamine oxidase B and antagonism of the adenosine A2A receptor by (E,E)-8-(4-phenylbutadien-1-yl)caffeine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **16** (18): 8676.
- Salach J. 1979. Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: Simplified isolation procedure, properties, and determination of its cysteinyl flavin content. *Archives of biochemistry and biophysics*, **192** (1): 128.
- Sathyanarayana R., Yeregani V. 2009. Hypertensive crises and cheese. *Indian journal of psychiatry*, **51** (1): 65.

- Schneider W., Hogeboom G. 1950. Intracellular distribution of enzymes: V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *Journal of biological chemistry*, **183**: 123.
- Soltani Rad M., Behrouz S., Nekoei A. 2012. 8-Bromocaffeine (8-BC): A New Versatile Reagent for Conversion of Aldoximes into Nitriles. *Synlett*, **23** (08): 1191.
- Strydom B., Bergh J., Petzer J. 2011. 8-Aryl- and alkyloxycaffeine analogues as inhibitors of monoamine oxidase. *European journal of medicinal chemistry*, **46** (8): 3474.
- Strydom B., Malan S., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2010. Inhibition of monoamine oxidase by 8-benzyloxycaffeine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **18** (3): 1018.
- Swinkels J., De Jonghe F. 1995. Safety of antidepressants. *International clinical psychopharmacology*, **9**: 19.
- Van der Walt E., Milczek E., Malan S., Edmondson D., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2009. Inhibition of monoamine oxidase by (E)-styrylisatin analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **19** (9): 2509.
- Volz H., Gleiter C., Möller H. 1996. Monoamine oxidase inhibitors in psychiatry. Status of current knowledge. *Nervenarzt*, **67** (5): 339.
- Vujčić Z. 2002. *Ekperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec
- Youdim M., Sourkes T. 1966. Properties of purified, soluble monoamine oxidase. *Canad. journal of biochemistry*, **44**: 1397.
- Yung-Chi C., Prusoff W. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*, **22** (23): 3099.

Pavle Kravljanac

Isolation and inhibition of Monoamine Oxidase (MAO) by Derivatives of 8-(3-Arylpropoxy)Caffeine

Inhibitors of monoamine oxidase (MAO) prolong the activity of dopamine in the brain, making them an option either as monotherapy in early Parkinson's disease or as adjunctive therapy in patients already treated with levodopa. Previous studies have shown that 8-alkyloxy derivatives of caffeine act as good inhibitors of human monoamine oxidase. In an attempt to discover new inhibitors, two new compounds were synthesized: 8-(3-(4-methoxyphenyl)propoxy)caffeine and 8-(3-(4-methylphenyl)propoxy)caffeine. Bovine monoamine oxidase was partially purified from bovine liver and its specific activity and Michaelis constant for benzylamine as a substrate were determined. Mechanism of inhibition of this enzyme were studied and enzyme-inhibitor dissociation constants (K_i) were measured for caffeine, and were found to be 0.197 M, 0.027 M and 0.092 M respectively. It was shown that the best inhibitor was the first compound, with about 7 fold better inhibition in comparison with caffeine and a competitive inhibition mechanism.



Kinetička metoda za određivanje dazometa zasnovana na njegovom katalitičkom dejstvu na jod-azidnu reakciju

Razvijena je kinetička metoda za određivanje mikrokoličina pesticida dazometa zasnovana na katalitičkom dejstvu dazometa na jod-azidnu reakciju. Reakcija je praćena spektrofotometrijski, a brzina je određena metodom tangensa. Optimalna pH vrednost za određivanje dazometa iznosi 3. Operativna koncentracija natrijum-azida iznosi 8 mM, joda 0.150 mM, a kalijum-jodida 0.833 mM. Dazomet je određivan u opsegu koncentracija od 50 ng/mL do 1.2 µg/mL sa maksimalnim odstupanjem od 3.1%. Pokazano je da je reakcija prvog reda u odnosu na dazomet i natrijum-azid, dok u odnosu na jod i kalijum-jodid parcijalni red reakcije iznosi 0.69 i 0.67.

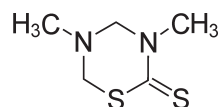
Uvod

Dazomet pripada grupi pesticida i sadrži dvovalentni sumpor (slika 1). U poljoprivredi se koristi kao fungicid, herbicid i nematocid za tretiranje voća i povrća, široko se primenjuje u industriji pri proizvodnji papira, specijalnih metalnih proizvoda, motora, aviona, a koristi se i u vulkanizaciji guma (Sismanoglu *et al.* 2003).

Dazomet pripada ditiokarbamatima (Crnogorac i Schwack 2009). Ditiokarbamati i njihovi metaboliti su toksični i sumnja se da su kancerogeni i mutageni; stoga su razvijene brojne metode za njihovo određivanje u životnim namirnicama i spoljašnjoj sredini (Kazos *et al.* 2007). Često korišćene hromatografske metode su jonoizmenjivačka hromatografija, HPLC, GC

metode sa različitim vrstom detektora (Szolar 2007). Kod ovih metoda, međutim, priprema uzoraka traje dugo i skupe su.

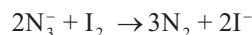
Kinetičke metode pripadaju analitičkim metodama koje se odlikuju velikom selektivnošću i preciznošću. Zasnivaju se na praćenju brzine reakcije i faktora koji na nju utiču. Najveći broj kinetičkih metoda se bazira na katalizovanim reakcijama. Katalitičkim kinetičkim metodama mogu se odrediti niske koncentracije katalizatora, koji imaju katalitički uticaj na brzinu reakcije (Skoog *et al.* 1988).



Slika 1. Hemijska struktura dazometa

Figure 1. Dazomet structure

Jod-azidna reakcija predstavlja reakciju oksidacije azida jodom. Ova reakcija, katalizovana jedinjenjima koja sadrže sumpor, često se koristi za određivanje neorganskih anjona, tiolamino kiselina, ditiokarbamata, tiosulfata, tiouree, tiofosfornih jedinjenja. U kvantitativne svrhe reakcija se prati fotometrijskim merenjem promene koncentracije joda (Lunar *et al.* 1993):



Kada se doda mala količina bilo kog jedinjenja koje sadrži dvovalentni sumpor u rastvor koji sadrži elementarni jod i azid, dolazi do redukcije joda do jodida i oslobađanja azota (Strickland *et al.* 1960).

Katarina Postolović (1997), *Svilajnac, Hilendarska 2/9, učenica 3. godine Poljoprivredno-veterinarske škole sa domom učenika „Svilajnac”*

MENTOR: Mihajlo Novaković, student IV godine Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

Razvijene su brojne kinetičke metode za određivanje katalizatora koji sadrži dvovalentni sumpor praćenjem brzine jod-azidne reakcije. Jod sa jodidom gradi I_3^- , kompleks žute boje, zbog čega se reakcija može pratiti spektrofotometrijski. Spektrofotometrija je brza i jeftina metoda, koja se odlikuje velikom preciznošću i selektivnošću. Stoga ima smisla pretpostavka da se kinetička metoda koja se zasniva na merenju brzine jod-azidne reakcije, koju dazomet katalizuje, može koristiti za određivanje mikrokoličina dazometa kao modela pesticida sa dvovalentnim sumporom.

Cilj ovog rada je razvijanje kinetičke metode za određivanje koncentracije dazometa praćenjem brzine jod-azidne reakcije, koju dazomet katalizuje, i ispitivanje uticaja različitih pH vrednosti, koncentracije azida, joda i kalijum-jodida na brzinu reakcije. Određen je parcijalni red reakcije u odnosu na sve reaktante radi određivanja mehanizma reakcije.

Materijal i metode

Kako je cilj ovog rada razvijanje kinetičke metode praćenjem brzine jod-azidne reakcije, brzina reakcije je merena spektrofotometrijski jer je praćeno obezbojavanje kompleksa trijodida. Najpre je snimanjem elektronskog spektra trijodidnog anjona (kompleksa joda i kalijum-jodida) utvrđen položaj apsorpcionog maksimuma (288 nm), koji je korišćen u daljem radu. Mereno je opadanje apsorbanije na svakih 13 sekundi tokom 15 minuta pri konstantnoj temperaturi (24 ± 1)°C na 288 nm. Reakciona smeša je, pri merenju brzine katalizovane reakcije, sadržala 1.5 mL fosfatne kiseline, 0.5 mL azida, 0.5 mL joda i 0.5 mL dazometa. U nekatalizovanoj reakciji dodavana je jednaka zapremina vode umesto dazometa. Pošto je posmatrano obezbojavanje joda, slepa proba je sadržala vodu umesto rastvora joda.

Ispitan je uticaj različitih pH vrednosti, koncentracija natrijum-azida, joda i kalijum-jodida sa ciljem određivanja optimalnih uslova. Određena je optimalna pH vrednost, pri kojoj je razlika između brzina katalizovane i nekatalizovane (mera aktivnosti katalizatora) reakcije najveća. Za postizanje različitih pH vrednosti korišćena je fosfatna kiselina. Koncentracija joda je iznosila

$1.5 \cdot 10^{-4}$ M, azida 0.006 M i dazometa 900 ng/mL. Pri ispitivanju uticaja koncentracija reaktanata određene su operativne koncentracije, pri kojima je brzina reakcije bila moguća za spektrofotometrijsko praćenje.

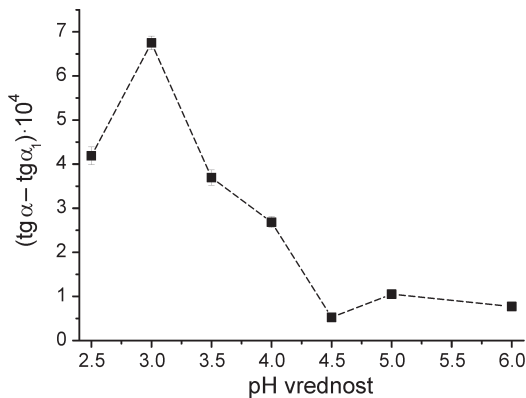
Za obradu podataka dobijenih spektrofotometrijskim praćenjem kinetike reakcije korišćena je metoda početnih brzina, tj. metoda tangensa. Posmatrana je promena apsorbancije u funkciji vremena i određena je brzina reakcije koja predstavlja promenu koncentracije reaktanta ili produkata s vremenom. Određen je i parcijalni red reakcije (zavisnosti logaritma brzine reakcije od logaritma koncentracije reaktanta) u odnosu na svaki reaktant (jod, kalijum-jodid, natrijum-azid i dazomet). Red reakcije određen je kao suma svih parcijalnih redova.

U eksperimentu su korišćeni rastvori dazometa (Basamid Granulat, 97%), natrijum-azida (Kemika), joda (Kemika), skroba (Merck alkaloid), kalijum-jodida (Centrohem), fosfatne kiseline i natrijum-tiosulfata. Rastvor joda je pripremljen sa kalijum-jodidom zbog održavanja koncentracije jodida konstantnom i sprečavanja sublimacije joda. Rastvori joda su standardizovani natrijum-tiosulfatom uz skrob kao indikator. Za merenje je korišćen spektrofotometar Thermo Scientific Evolution 60 s. Korišćene su kvarcne kivete optičkog puta 10 mm.

Rezultati i diskusija

Određivanje optimalne pH vrednosti. Pri ispitivanju zavisnosti brzine reakcije od pH vrednosti reakcione smeše, pH vrednost je varirana na sledeći način: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 i 6.0. Na slici 2 prikazana je zavisnost promene brzine katalizovane reakcije u odnosu na brzinu nekatalizovane od pH vrednosti.

Kao što se vidi na slici 2, aktivnost, tj. razlika u brzini katalizovane ($tg\alpha$) i nekatalizovane reakcije ($tg\alpha_1$), najveća je pri pH vrednosti 3.0. Jedno od mogućih objašnjenja za dobijeni rezultat je da brzina nastajanja kompleksa trijodida, koji obrazuju jod i kalijum-jodid, raste sa povećanjem kiselosti. Sa smanjenjem pH vrednosti ispod 3.0 ($pH = 2.5$) dolazi do smanjenja aktivnosti, što se može objasniti nastajanjem nestabilne hidrazinske kiseline (HN_3), usled čega dolazi do smanjenja koncentracije azidnog anjona i sma-



Slika 2. Zavisnost razlike brzine katalizovane ($tg\alpha$) i nekatalizovane ($tg\alpha_1$) reakcije od pH vrednosti

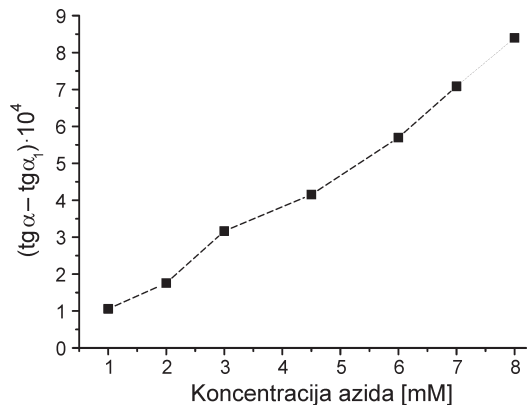
Figure 2. Difference between slopes of catalyzed ($tg\alpha$) and uncatalyzed reaction ($tg\alpha_1$) dependence vs. pH value

njenja brzine reakcije (Dahl *et al.* 1965). Druga mogućnost je da se dazomet na $pH = 3$ razlaže na produkte koji dodatno povećavaju katalizu. Proizvod razgradnje dazometa je metil-izotiocijanat (Primo *et al.* 2003), a sporedni proizvod je ugljen-disulfid (Ullah 2011). Kako oba proizvoda u svojoj strukturi sadrže dvovalentni sumpor, moguće je da oni dodatno pospešuju katalizu. U daljem radu je korišćena pH vrednost 3.0.

Optimalne koncentracije natrijum-azida.

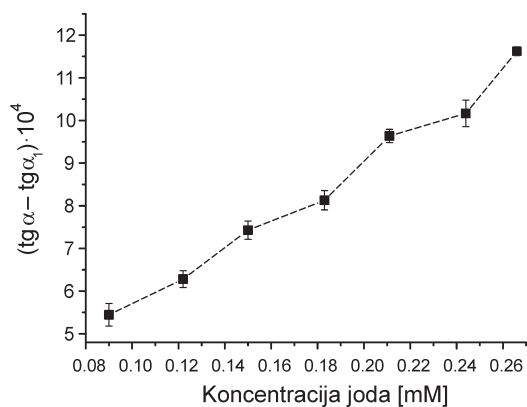
Koncentracije azida koje su ispitivane su 1.0, 2.0, 3.0, 4.5, 6.0, 7.0 i 8.0 mM. Brzinu reakcije pri koncentraciji azida iznad 8.0 mM nije bilo moguće meriti spektrofotometrijski, jer je reakcija imala veliku brzinu za uslove merenja. Na slici 3 prikazana je zavisnost razlike brzine katalizovane i nekatalizovane reakcije od koncentracije azida. Uočljiv je linearni trend zavisnosti brzine od koncentracije azida. Kako se ne uočava nagla promena u brzini, u daljem radu je korišćena koncentracija od 8.0 mM azida, uz koju se brzina na odgovarajući način može pratiti tokom 15 minuta.

Određivanje koncentracije joda. Ispitane su sledeće koncentracije joda: 0.090, 0.122, 0.150, 0.183, 0.211, 0.244 i 0.266 mM. I kod određivanja optimalne koncentracije joda uo-



Slika 3. Zavisnost razlike brzine katalizovane ($tg\alpha$) i nekatalizovane ($tg\alpha_1$) reakcije od koncentracije azida

Figure 3. Difference between slopes of catalyzed ($tg\alpha$) and uncatalyzed reaction ($tg\alpha_1$) vs. sodium-azide concentration



Slika 4. Zavisnost razlike brzine katalizovane ($tg\alpha$) i nekatalizovane ($tg\alpha_1$) reakcije od koncentracije joda

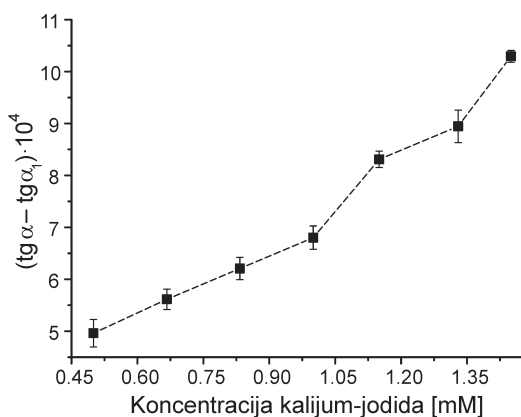
Figure 4. Difference between slopes of catalyzed ($tg\alpha$) and uncatalyzed reaction ($tg\alpha_1$) vs. iodine concentration

čava se da je zavisnost brzine od koncentracije linearna. Pri nižim koncentracijama joda od 0.090 mM reakcija ima malu promenu u apsorbciji, dok je pri koncentracijama većim od 0.266 mM reakcija brza i apsorbcija visoka, pa se ne može precizno pratiti spektrofotometrijski.

Na slici 4 prikazana je zavisnost razlike brzine katalizovane i nekatalizovane reakcije u odnosu na koncentraciju joda. Kao optimalna koncentracija joda odabrana je 0.150 mM, koja je i korišćena u daljem radu, zato što je pri toj koncentraciji apsorbancija bila u opsegu od 0.2 do 0.8, dok je pri većim koncentracijama izlazila iz tog opsega i uzrokovala grešku instrumenta. Takođe, pri ovoj koncentraciji pad apsorbancije je bio među najvećima, u povoljnom opsegu, a brzina reakcije je bila odgovarajuća za spektrofotometrijsko merenje u vremenskom intervalu od 15 minuta.

Uticao koncentracija kalijum-jodida. Pri variranju koncentracija joda istovremeno je varirana i koncentracija kalijum-jodida jer je rastvor joda bio napravljen zajedno sa kalijum-jodidom. Ispitane su sledeće koncentracije kalijum-jodida: 0.500, 0.667, 0.833, 1.000, 1.150, 1.330 i 1.450 mM. Na slici 5 je prikazana zavisnost aktivnosti reakcije od koncentracije kalijum-jodida. U daljem radu korišćena je koncentracija kalijum-jodida od 0.833 mM, a odnos joda i kalijum-jodida nije variran.

Pri variranju koncentracija reaktanata nisu dobijene optimalne koncentracije. Ispitan je različit odnos koncentracija azida, joda i dazometa kako bi se dobila zadovoljavajuća pro-

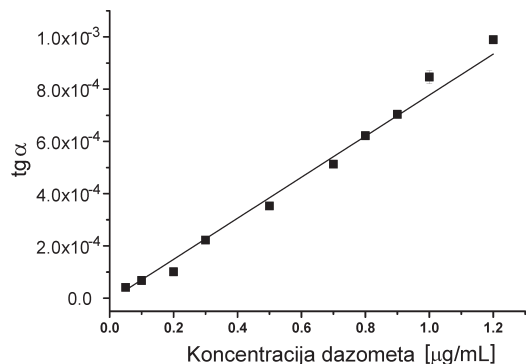


Slika 5. Zavisnost razlike brzine katalizovane ($\text{tg } \alpha$) i nekatalizovane ($\text{tg } \alpha_1$) reakcije od koncentracije kalijum-jodida

Figure 5. Difference between slopes of catalyzed ($\text{tg } \alpha$) and uncatalyzed reaction ($\text{tg } \alpha_1$) vs. potassium-iodide concentration

mena apsorbancije i kako bi se apsorbancija nalazila u opsegu 0.2–0.8. Pri ispitivanjima sa visokim koncentracijama azida i jako niskim koncentracijama dazometa promena apsorbancije nije bila zadovoljavajuća. Kako se pratilo obezbojavanje kompleksa trijodida, koncentracija joda nije mogla biti visoka jer je apsorbancija izlazila iz potrebnog opsega. Bilo je moguće smanjiti apsorbanciju dodatkom veće koncentracije dazometa, ali bi tada brzina reakcije bila velika i nemoguća za praćenje tokom 15 minuta. Kako je cilj bio određivanje niskih koncentracija dazometa, a da bi se pri visokim koncentracijama joda koristile veće koncentracije dazometa, radilo se sa nižim koncentracijama joda. Iz svega navedenog se može pretpostaviti da sama postavka eksperimenta nije bila dobra. Prikazani su samo odnosi koncentracija reaktanata pri kojima su ispunjena oba kriterijuma (promena apsorbancije i opseg apsorbancije). Zato se ova kinetička metoda može koristiti samo u ovim opsezima koncentracija reaktanata.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije dazometa. Za ispitivanje su korišćeni rastvori dazometa različitih koncentracija u opsegu 50 ng/mL–1.2 $\mu\text{g/mL}$. Napravljena je serija rastvora sledećih koncentracija: 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.70, 0.80, 0.90, 1.00 i 1.20 $\mu\text{g/mL}$. Korišćene su operativne koncentracije reaktanata i optimalna pH vrednost, pri uslovima koji su prethodno određeni. Na slici 6 prikazana je kalibraciona prava koja pokazuje zavisnost razlike brzine katalizovane i nekatalizovane re-



Slika 6. Kalibraciona prava

Figure 6. Calibration curve

akcije od koncentracije dazometa. Koeficijent korelacije ove kalibracione prave iznosi 0.994. Jednačina dobijene kalibracione prave iznosi

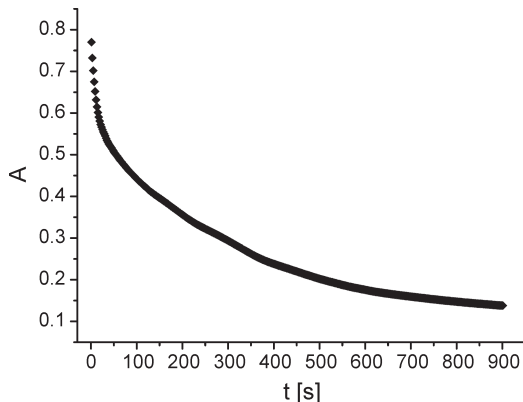
$$y = (7.85 \cdot 10^{-4} \pm 1.9 \cdot 10^{-5})x - (8.4 \pm 8.6) \cdot 10^{-6}.$$

Najniža određena koncentracija je 50 ng/mL sa odstupanjem od 2.5%, a najviša 1.20 µg/mL sa odstupanjem od 1.4%. Najveće odstupanje zabeleženo je pri određivanju koncentracije 0.10 µg/mL i iznosi 3.1%.

Red reakcije. Na osnovu dobijenih podataka o brzini reakcije izračunati su parcijalni redovi reakcije u odnosu na natrijum-azid, jod i dazomet. Dobijeni rezultati pokazuju da je reakcija prvog reda u odnosu na dazomet ($k = 1.03 \pm 0.05$) i natrijum-azid ($k = 0.99 \pm 0.04$). U odnosu na jod i kalijum-jodid parcijalni red iznosi 0.69 ± 0.04 , odnosno 0.67 ± 0.07 . Parcijalni red reakcije je dobijen iz zavisnosti logaritma $\text{tg}\alpha$ od logaritma koncentracije reaktanata. Koeficijent pravca prave koja pokazuje ovu zavisnost predstavlja parcijalni red reakcije u odnosu na reaktante.

Mehanizam reakcije. Na osnovu dobijenih operativnih koncentracija reaktanata, uzimajući pritom u obzir nagli pad apsorbancije, moguće je pretpostaviti mehanizam reakcije. Naime, u toku svih merenja zapaža se veći pad apsorbancije u toku prvih 50 sekundi, kao što se vidi na slici 7. Pri merenju sa ove slike korišćeni su isti uslovi kao pri variranju dazometa, a koncentracija dazometa je bila 900 ng/mL. Ova koncentracija je odabrana zato što je odstupanje pri njenom određivanju bilo najmanje. Promena apsorbancije je praćena na svake 2 sekunde.

Tokom eksperimenta apsorbancija je praćena na svakih 13 sekundi i prvi nagli pad apsorbancije nije mogao biti korišćen za određivanje brzine reakcije. Brzina reakcije je određivana na osnovu drugog pada. Prvi nagli pad apsorbancije se može povezati i sa dobijanjem operativnih koncentracija reaktanata. Na slikama 3, 4 i 5 može se videti da brzina linearno raste sa porastom koncentracija reaktanata, pa je moguće da bi apsorbancija bila sve veća sa još većim porastom koncentracija. Na osnovu slike 7 može se primetiti da je apsorbancija visoka na samom početku reakcije i da brzo opada. Zato se može pretpostaviti da je i ovakav pad apsorbancije uzrok za dobijanje operativnih koncentracija reaktanata i linearne zavisnosti brzine od koncen-

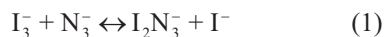


Slika 7. Zavisnost apsorbancije od vremena pri koncentraciji dazometa 900 ng/mL

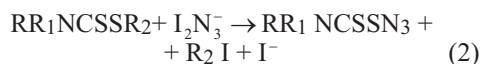
Figure 7. Absorbance dependence vs. time (dazomet concentration 900 ng/mL)

tracije reaktanata prilikom određivanja optimalnih koncentracija reaktanata. U tu svrhu bilo bi potrebno uraditi dodatno istraživanje da bi se ispratio nagli pad apsorbancije na početku reakcije i utvrdilo da li je on povezan sa uticajem koncentracija reaktanata na brzinu reakcije.

Jedna mogućnost za nagli pad apsorbancije u prvih 50 sekundi je da se odvijaju dve reakcije, od kojih je prva značajno brža (Lunar *et al.* 1993). U prvoj reakciji stvara se kompleks trijodida i azida (1), a potom sumpor indukuje drugu, jod-azidnu reakciju. Trijodid je prethodno formiran između joda i kalijum-jodida i na osnovu apsorpcionog maksimuma spektra dobijenog kompleksa praćena je reakcija. Kako u toj reakciji nastaje kompleks između trijodida i azida, pretpostavka je da se smanjuje intenzitet boje trijodida i da upravo ta pojava uzrokuje veliki pad apsorbancije u toku 50 sekundi.



Kako dobijeni rezultati pokazuju da je reakcija prvog reda u odnosu na dazomet i azid, i da brzina zavisi od koncentracije joda i jodida, može se pretpostaviti da se u ovom slučaju gradi međusobni kompleks između dazometa i trijodida i azida (2):



Druga mogućnost za nagli pad apsorbancije je da se u prvoj reakciji sumpor iz dazomet oksiduje u neko više oksidaciono stanje i da potom oksidovani sumpor indukuje reakciju. Takođe, postoji mogućnost razgradnje dazomet. U ovom slučaju bilo bi potrebno ispitati uticaj metil-izotiocijanata i ugljen-disulfida na reakciju kako bi se utvrdila mogućnost razlaganja dazomet na ove proizvode, koji dodatno poboljšavaju katalizu i ubrzavaju reakciju.

Ukoliko ima smisla ova mogućnost (da se dazomet razlaže na metil-izotiocijanat (Primo *et al.* 2003) i ugljen-disulfid (Ullah 2011)), pretpostavka je da se takođe gradi i kompleks između tiocijanata i ugljen-disulfida sa trijodidom i azidom. U ranijim istraživanjima je pokazano da ugljen-disulfid gradi najpre kompleks sa azidnim anjonom, a potom dobijeni intermedijer gradi kompleks sa jodom (Hofman-Bang *et al.* 1949). Pošto je u našem slučaju reakcija prvog reda u odnosu na azid i dazomet (koji se delom razlaže na ugljen-disulfid), a red reakcije u odnosu na jod iznosi 0.69, moguće je da najpre dolazi do formiranja kompleksa između ugljen-disulfida i azida, a nakon toga dolazi do obrazovanja kompleksa sa jodom.

Zaključak

Određeni su optimalni uslovi za razvijanje nove kinetičke metode za određivanje dazomet koja se zasniva na njegovom katalitičkom dejstvu na jod-azidnu reakciju. Najpovoljnija pH vrednost za određivanje dazomet je 3 jer je pri toj pH vrednosti zabeležen najveći rast brzine katalizovane reakcije u odnosu na nekatalizovanu. Određene su operativne koncentracije joda i natrijum-azida kao reaktanata i one iznose 0.15 mM za jod i 8.00 mM za azid. Koncentracija kalijum-jodida koja je korišćena iznosi 0.833 mM. Uz optimalnu pH vrednost i operativne koncentracije reaktanata moguće je određivanje dazomet u opsegu 50 ng/mL–1.2 µg/mL i kalibraciona prava je konstruisana u ovom opsegu koncentracija. Određen je i parcijalni red reakcije u odnosu na sve reaktante i iznosi 0.99 za azid, 0.69 za jod, 0.67 za kalijum-jodid i 1.03 za dazomet. Na osnovu dobijenih rezultata predloženo je mogući mehanizam reakcije, koji se zasniva na datim rezultatima, pri čemu se pretpo-

stavlja da se odvijaju dve reakcije, od kojih je jedna brža.

Predlozi za dalje istraživanje su: optimizacija metode upotrebom različitih aktivatora, ispitivanje različitih odnosa koncentracija joda i kalijum-jodida, određivanje selektivnosti ove metode praćenjem uticaja različitih pesticida koji u sebi i sadrže i ne sadrže sumpor, pri različitim odnosima drugih pesticida i dazomet, utvrđivanje ispravnosti predloženih mehanizama reakcije.

Zahvalnost. Zahvaljujem se mentoru Mihajlu Novakoviću na ideji za projekat, svim savetima, sugestijama i predlozima, saradnicima Iliji Bobincu i Stefanu Simiću na pomoći oko realizacije eksperimentalnog dela projekta, kao i Ivanu Terziću i Danici Despotović na velikoj pomoći oko pisanja rada i tumačenja rezultata.

Literatura

Crnogorac G., Schwack W. 2009. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*, **28** (1): 40.

Dahl W., Pardue H. 1965. Kinetics of Cystine Catalysis on the Iodine-Azide Reaction. *Analytical Chemistry*, **37**: 1382.

Hofman-Bang N., Szybalski W. 1949. The Iodine-Azide Reaction. The Catalytic Effect of Carbon Disulphide. *Acta Chemica Scandinavica*, **3**: 1418.

Kazos A. E., Stalikas D. C., Nanos G. C., Konidari N. C. 2007. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **68**: 2104.

Lunar M. L., Rubio S., Pérez-Benedito D. 1993. Hexadecylpyridinium chloride micelles for the kinetic determination of sulphur-containing compounds by their induction of the iodine-azide reaction. *Analytica Chimica Acta*, **286**: 233.

Primo P., Gamliel A., Austerweil M., Steiner B., Beniches M., Peretz-Alon I., Katan J. 2003. Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and

consequences for pathogen control. *Crop Protection*, **22**: 635.

Sismanoglu T., Ercag A., Pura S., Ercag E. 2003. Kinetics and isotherms of dazomet adsorption on natural adsorbents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15** (5): 669.

Skoog D., West D., Holler J., Crouch S. 1988. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Belmont: Brooks/Cole


Strickland R. D., Mack P. A., Childs W. A. 1960. Determination of Cystine by Its Catalytic Effect on the Iodine-Azide Reaction. *Analytical Chemistry*, **32**: 430.

Szolar O. H. J. 2007. Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates. *Analytica Chimica Acta*, **582**: 191.

Ullah S. 2011. Biocides in papermaking chemistry. Master's thesis. University of Jyväskylä, Department of Chemistry, Surfontie 9B, FI-40500 Jyväskylä, Finland

Katarina Postolović

A Kinetic Method for the Determination of Dazomet by its Catalytic Effect on the Iodine-Azide Reaction

In this study a sensitive kinetic method for the determination of the pesticide dazomet is developed. This method is based on the catalytic effect of dazomet on the reaction of oxidation of azide by iodine, known as the iodine-azide reaction. The optimal pH value in the reaction was determined. It was found that the optimal pH is at pH 3 (Figure 2). Subsequently, the influence of the concentration of the reactants on the reaction rate was examined. The reaction was monitored using a spectrophotometer, by measuring the decrease in the absorbance of consumed iodine on 288 nm. The initial-rate method was applied for data analysis. The effects of different concentrations of sodium-azide, iodine and potassium-iodide on the reaction rate were examined in order to optimize reaction conditions. It was concluded, based on Figures 3, 4 and 5, that the operative concentration of sodium-azide is 8 mM, iodine 0.15 mM and potassium iodide 0.833 mM. A calibration curve was constructed at the optimal pH value and operative concentrations of sodium-azide, iodine and potassium-iodide. Dazomet is determined in a concentration range from 50 ng/mL to 1.2 µg/mL, with a standard deviation 2.51% and 1.45%, respectively (Figure 6). In addition, orders of reaction were calculated with respect to all reactants. The reaction was a first order reaction with respect to dazomet (Figure 10) and sodium-azide (Figure 7). The orders of reaction with respect to iodine and to potassium-iodide were calculated and they were 0.69 and 0.67 (Figures 8 and 9). The possible mechanism of reaction is suggested. 

Elektrohemijska degradacija boje metilensko plavo

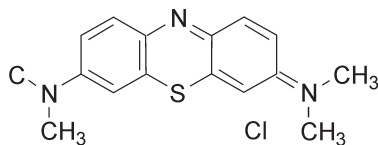
U ovom radu ispitani su optimalni uslovi za elektrohemijsku degradaciju boje metilensko plavo, što podrazumeva optimalan elektroodni materijal, optimalnu pH sredinu u kojoj se degradacija vrši i optimalnu jačinu upotrebijene struje. Kao anoda korišćena je platinska elektroda, dok su za katodu ispitane gvozdene, cinkova, paladijumska i grafitna elektroda. Ispitivanje je obavljeno na nativnom pH, u kiseljoj i baznoj sredini, sa jačinama struje od 50 mA, 100 mA i 150 mA. Rezultati su pokazali da se gvozdene i cinkova elektroda ne mogu koristiti za elektrohemijsku degradaciju boje metilensko plavo, jer dolazi do rastvaranja velike količine ovih elektroda. Najbolje rezultate grafitna elektroda pokazala je u baznoj sredini uz jačinu struje 150 mA, gde je degradirano 87.4% boje, dok je paladijumska elektroda najbolje rezultate pokazala u kiseljoj sredini, gde je uz jačinu struje od 150 mA degradirano 92.6% boje. U oba slučaja povećanjem jačine struje stepen degradacije boje se povećava.

Uvod

Boja metilensko plavo je tiazinska boja, heterociklično aromatično jedinjenje molekulske formule $C_{16}H_{18}N_3SCl$. Boja ovog jedinjenja potiče od njene strukture, u kojoj se nalazi azo grupa ($R_1-N=N-R_2$) i aromatični prstenovi (slika 1). Koristi se u hemiji kao redoks indikator za dokazivanje sulfida, u biologiji kao marker za razna bojenja tkiva (Steffen *et al.* 2014), a u medicini za terapiju kancera (Devis *et al.* 2013),

malariae (Meissner *et al.* 2006), methemglobinemije (Skold *et al.* 2011), kod trovanja cijanidima i ugljenik(II)-oksidom (Brooks 1933). Pretpostavlja se da primenom ovakvih boja u prirodne vodene tokove odlazi 1-10% ove supstance, što u kombinaciji sa ostalim supstancama može da izazove značajno zagađenje.

Male količine ove boje mogu da preboje znatnu količinu vode i time smanje transparentnost vode u rekama i jezerima, čime su ugroženi mnogi živi organizmi, zbog toga što Sunčeva svetlost ne dopire do njih, tj. sprečen je proces fotosinteze. Dodatni problem je što ni mikroorganizmi ne mogu da razlože ovu boju jer deluje bakteriocidno (Tabbara *et al.* 2012).



Slika 1. Struktura azo boje metilensko plavo

Figure 1. Azo colour methylene blue's chemical structure

Za uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda razvijene su različite fizičko-hemijske metode: elektroliza, fotodegradacija, jonska izmena, reverzna osmoza.

Boja se može oksidovati direktnom oksidacijom na anodi ili hemijskom reakcijom sa adsorbovanim kiseonikom iz vode na anodi (OH^*). Na osnovu reakcije sa *OH radikalom supstance se mogu razgraditi na dva načina: prvi je elektrohemijska konverzija, gde se organske boje hemi-

Biljana Anđelković (1997), Beograd Milana Rakića 12, učenica 3. razreda Farmaceutsko-fizioterapeutske škole

MENTOR: dr Dalibor Stanković, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

sorbovanim „aktivnim kiseonikom” selektivno oksiduju u neka biorazgradiva jedinjenja, najčešće u karboksilne kiseline, a drugi – elektrohemijsko sagorevanje, gde se boja fizisorbovanim •OH oksiduje do ugljenik(IV)- oksida i neorganskih jona (Guivarch *et al.* 2003). Optimalna pH vrednost varira u zavisnosti od toga koji elektrodni materijal se koristi, jer u zavisnosti od pH mogu se formirati jedinjenja koja onemogućavaju dalju elektrolizu boje (Deneshvar *et al.* 2007).

Cilj ovog rada je pronalaženje optimalnih uslova za degradaciju boje metilensko plavo, što podrazumeva optimalnu pH vrednost, jačinu struje i optimalni elektrodni materijal.

Materijal i metode

Za degradaciju boje metilensko plavo kao anoda korišćena je platinska elektroda, a kao katode ispitivane su elektrode od gvožđa, cinka, ugljenika, paladijuma. Korišćen je izvor jednosmerne struje Peaktech DC Power Supply 6080. Za svaku elektrodu je ispitana optimalna pH vrednost i jačina struje. Izabrane su tri pH vrednosti koje su ispitivane: nativni pH, tj. pH koji se dobija rastvaranjem boje metilensko plavo (pH 6.2), kisela sredina (pH 3.0) i bazna sredina (pH 9.0). Na pH vrednosti koja se pokazala kao najoptimalnija ispitana je jačina struje (50 mA, 100 mA i 150 mA) (Spadaro *et al.* 1994). Elektrohemijska degradacija je trajala 2 h, a alikvoti su uzimani na svakih 5 minuta prvih sat vremena, a kasnije na svakih 15 minuta radi praćenja stepena degradacije odnosno smanjenja koncentracije boje. Stepenn degradacije praćen je spektrofotometrijski. Apsorbancija je merena na spektrofotometru Thermo scientific 60S UV-Visible. Snimanjem celog spektra određeno je da je maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 665 nm.

Početna koncentracija boje je bila 5 mg/L, u 0.1 M rastvoru Na₂SO₄, jer se natrijum-sulfat nalazi i u otpadnim vodama raznih industrija koje koriste ovu boju (Chatzisyseon *et al.* 2006). U toku elektrolize uzimani su alikvoti zapremine 3 mL i njihova apsorbcija je merena na 665 nm (maksimum apsorpcije boje metilensko plavo). Stepenn degradacije računat je po formuli:

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

gde je A_0 apsorbancija početnog uzorka boje, a A apsorbancija uzorka nakon elektrolize. Pre i posle elektrolize merene su mase elektrode da bi se utvrdilo da li dolazi do njihovog rastvaranja.

Rezultati i diskusija

Praćenjem promene apsorbcije na 665 nm bilo je moguće pratiti samo obezbojavanje, a ne i potpunu oksidaciju boje u ugljenik(IV)-oksid.

Ispitane su četiri katode: gvozdna, cinkova, grafitna, paladijumska.

Tokom elektrolize gvozdenom katodom, na sve tri pH je dolazilo do zamućenja, koje nije dozvolilo da se degradacija prati spektrofotometrijski. Zamućenje potiče od rastvaranja gvozdene katode, što znači da bi se njenim korišćenjem ispuštalo gvožđe u vodene tokove.

Korišćenjem katode od cinka takođe se stvara zamućenje, koje verovatno potiče od cink-hidroksida. Kao ni gvožđe, ni cink se ne sme nalaziti u velikoj količini u otpadnim vodama. Za razliku od gvožđa, kod cinka je bilo moguće izmeriti apsorbciju, jer talog nakon nekog vremena padne na dno epruvete, pa se može koristiti supernatant. Rezultati degradacije sa cinkom kao katodom su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Stepenn degradacije boje nakon 2 h u zavisnosti od pH vrednosti za cinkovu elektrodu pri jačini struje od 50 mA

pH	Stepenn degradacije (%)
pH 3.0	13.7
nativni pH (6.2)	10.6
pH 9.0	23.4

Iako je primećeno da dolazi do degradacije boje, ova katoda ne bi mogla da se koristi, jer se cinkova elektroda zbog potencijala elektroda rastvara, a time ne bi došlo do zagađenja vode teškim metalima, u koje spada cink, umesto bojom metilensko plavo. Iz ovog razloga nije rađena optimizacija jačine struje, jer bi se prilikom povećanja jačine struje povećavala količina cinka u rastvoru.

Veći stepen degradacije u odnosu na gvozdeni i cinkovu elektrodu postignut je korišćenjem grafitne katode na istim pH vrednostima sa jačinom struje od 50 mA. Rezultati su predstavljeni u tabeli 2. Inače, korišćenjem grafitne elektrode ne dolazi do ekološkog zagađenja vodenih tokova iako se nakon dužeg korišćenja elektroda troši i mrvi.

Tabela 2. Stepen degradacije boje nakon 2 h u zavisnosti od pH vrednosti za grafitnu elektrodu pri jačini struje od 50 mA

pH	Stepen degradacije (%)
pH 3.0	29.5
nativni pH (6.2)	30.4
pH 9.0	35.2

Najveći stepen degradacije, 35.2%, u poslednjem alikvotu postignut je u baznoj sredini (pH 9), zatim na nativnom pH (6.2), 30.4%, a najmanje u kiselj sredini (pH 3), 29.5%, što potvrđuje da pH ima uticaja na elektrohemijisku degradaciju boje i što se može videti u ranije objavljenim radovima na ovu temu (npr. Awad *et al.* 2005).

Sa povećanjem jačine struje raste i stepen degradacije (tabela 3): to se dešava usled povećanog stvaranja kiseoničnih radikala, a veća količina kiseoničnih radikala dovodi do brže i potpunije degradacije (Kariyajjanavar *et al.* 2010). Pošto je u baznoj sredini najveći stepen degradacije nakon 2 h, prilikom korišćenja grafitne elektrode, na ovoj pH vrednosti je optimizovana jačina struje. Ispitivane jačine struje su bile 100 mA i 150 mA.

Tabela 3. Stepen degradacije nakon 2 h u zavisnosti od jačine struje za grafitnu elektrodu u baznoj sredini pH = 9

Jačina struje (mA)	Stepen degradacije (%)
50	35.2
100	76.1
150	87.4

Sa paladijumom kao katodom, najveći stepen degradacije je u kiselj sredini, 42.8% (tabela 4),

za razliku od stepena degradacije sa ugljenikom i cinkom kao katodama, koji su najveći u baznoj sredini.

Zbog toga što se boja najviše degradirala u kiselj sredini (pH = 3), na toj pH vrednosti je ispitivana jačina struje. Kao i u prethodnim slučajevima, potvrđeno je da porastom jačine struje raste i stepen degradacije (tabela 5).

Tabela 4. Stepen degradacije nakon 2 h u zavisnosti od pH vrednosti za paladijumsku elektrodu na jačini struje od 50 mA

pH	Stepen degradacije (%)
pH 3.0	42.8
nativni pH (6.2)	20.4
pH 9.0	36.1

Tabela 5. Stepen degradacije nakon 2 h u zavisnosti od jačine struje za paladijumsku elektrodu u kiselj sredini pH = 3

Jačina struje (mA)	Stepen degradacije (%)
50	42.8
100	87.2
150	92.6

Iz table 5 se vidi da je pri jačini struje od 150 mA degradiralo preko 90% boje nakon 2 sata. Paladijumaska elektroda se u toku elektrolize najmanje rastvarala, odnosno njenim korišćenjem bi najmanja količina metala bila ispuštena u prirodne vodene tokove.

Zaključak

Rezultati istraživanja pokazuju da se elektroliza može koristiti za uklanjanje metilenskog plavog iz otpadnih voda. Povećanjem jačine struje u opsegu od 50 mA do 150 mA raste stepen degradacije boje. Korišćenjem gvozdene i cinkane elektrode kao katode stvara se talog koji onemogućava primenu ovih katoda u prečišćavanju otpadnih voda od sintetičke boje metilensko plavo. Primenom paladijuma i ugljenika kao katode razgradi se značajan procenat boje. Korišćenjem

paladijuma kao katode i platine kao anode u kiseloj sredini za 2 h postiže se 93% degradacije pri jačini struje od 150 mA. Sličan procenat degradacije dobija se primenom ugljenika kao katode (87%), ali u baznoj sredini pri jačini struje od 150 mA. Elektrohemijaska degradacija pokazala se efikasnom za uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda za kratko vreme.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svom mentoru Daliboru Stankoviću na ideji za projekat, svim savetima, sugestijama i predlozima, kao i saradnicima Iliji Bobincu i Stefanu Simiću na pomoći oko eksperimentalnog dela projekta i velikoj pomoći oko pisanja rada.

Literatura

Awad H. S., Abo Galwa N. 2005. Electrochemical degradation of Acid Blue and Basic Brown dyes on Pb/PbO₂ electrode in the presence of different conductive electrolyte and effect of various operating factors. *Chemosphere*, **61**: 1327.

Brooks M. M. 1933. Methylene blue as antidote for cyanide and carbon monoxide poisoning. *Journal of the American Medical Association*, **100**: 59.

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**: 185.

Daneshvar N., Khataee A. R., Amani Ghadim A. R., Rasoulifard M. H. 2007. Decolorization of C. I. Acid Yellow 23 solution by electrocoagulation process: Investigation of operational parameters and evaluation of specific electrical energy consumption (SEEC). *Journal of Hazardous Materials*, **148**: 566.

Guivarch E., Trevin S., Lahitte C., Oturan M. A. 2003. Degradation of azo dyes in water by Electro-Fenton process. *Environmental Chemistry Letters*, **1**: 38.

Chatzisyneon E., Xekoukoulotakis N. P., Kalogerakis A., Coz N., Mantzavinos D. 2006. Electrochemical treatment of textile dyes and dyehouse effluents. *Journal of Hazardous Materials*, **137**: 998.

Meissner E. P., Mandi G., Coulibaly B., Witte S., Tapsoba T., Mansmamm U., et al. 2006. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malaria Journal*, **5**: 84.

Spadaro J. T., Lome I., Renganathan V. 1994. Hydroxyl Radical Mediated Degradation of Azo Dyes: *Environmental Science Technology*, **28**: 1389.

Kariyajanavar P., Narayana J., Nayaka Y. A., Umanai M. 2010. Studies on degradation of reactive textile dyes solution by electrochemical method. *Portugaliae Electrochimica Acta*, **190**: 952.

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.

Skold A., Cosco D., Klein R. 2011. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *Southern medical journal*, **104**: 757.


Tabbara M. A., Jamal E. M. M. 2012. A kinetic study of the discoloration of methylene blue by Na₂SO₃, comparison with NaOH. *Journal of University of Chemical Technology and Metallurgy*, **43**: 275.

Biljana Anđelković

Electrochemical Degradation of Methylene Blue Color

This study investigated the optimal conditions for the electrochemical degradation of methylene blue dye, that include optimal electrochemical material, pH of medium and current. A platinum electrode was used as the anode, and

carbon, palladium, zinc and iron electrodes were investigated as the cathode. Native, acid and basic pH values were investigated. Three values were chosen for the current: 50, 100 and 150 mA. Degradation lasted for 2 hours and Na_2SO_4 was used as the supporting electrolyte.

Results show that iron and zinc could not be used for degradation of methylene blue, because these electrodes dissolve during electrolysis. Palladium and carbon electrodes could be used. The carbon electrode shows the best results in the basic medium and the palladium electrode shows the best results in the acidic medium. With higher current intensity, in both cases the degradation rate is greater. 

Kinetička metoda za određivanje srebra(I) na bazi njegovog katalitičkog dejstva na reakciju oksidacije tartrazina

Ispitivana je mogućnost razvijanja nove kinetičke metode za kvantitativno određivanje srebra(I). Metoda se zasniva na reakciji oksidacije tartrazina amonijum-persulfatom u prisustvu srebra(I) kao katalizatora u acetatnom puferu na temperaturi od $24.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$. Brzina reakcije praćena je spektrofotometrijski, pri čemu je brzina određivana metodom tangensa. Optimalna pH vrednost acetatnog pufera iznosi 4.0, optimalna koncentracija amonijum-persulfata iznosi $9 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$, optimalna koncentracija tartrazina $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Granica osetljivosti metode iznosi 0.535 ppm srebra(I). Ispitana je i selektivnost reakcije, pri čemu je određen uticaj Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , VO_3^+ , WO_4^{2-} i Zn^{2+} jona na reakciju.

Uvod

Kinetičke metode su analitičke metode zasnovane na praćenju brzine hemijske reakcije i faktora koji na nju utiču. Na brzinu reakcije utiču mnogi faktori, kao što je temperatura i pritisak reakcione smeše, koncentracija reaktanata, priroda rastvarača, jonska sila rastvora, prisustvo katalizatora, aktivatora ili inhibitora u reakcionoj smeši. Katalitičkim metodama se kvantitativno određuju tragovi metala koji imaju katalitički uticaj na brzinu reakcije (Perez-Bendito i Silva 1988).

Katalitičke kinetičke metode su najčešće bazirane na najmanje tri reaktanta, i to indikator re-

akcije (ponso 4R, rezorcinol, mangan, hidrohion), izazivač reakcije (vodonik-peroksid, kalijum-bromat, kalijum-persulfat, kalijum-hlorat) i katalizator (bakar(II), vanadijum(V), srebro(I), vanadijum(V)) koji određujemo (Grahovac *et al.* 2002, Pešić i Drakulović 2005, Ilić i Salim 2009, Novaković 2012).

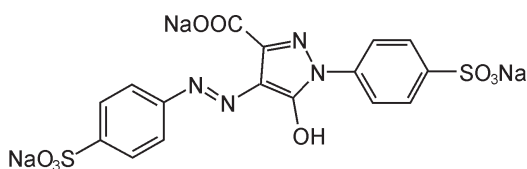
Za određivanje brzine korišćena je metoda tangensa. Praćena je promena apsorbance reakcione smeše sa vremenom. Grafik promene apsorbance reakcione smeše u zavisnosti od vremena u jednom svom delu sadrži prav segment, čiji koeficijent pravca ($\text{tg}\alpha$) predstavlja brzinu reakcije. Dobijeni koeficijenti pravca koriste se za određivanje optimalnih uslova reakcije i za konstrukciju kalibracione prave (Perez-Bendito i Silva 1988).

Postoji veliki broj metoda za kvantitativno određivanje srebra(I), ali one mogu biti neprecizne i neosetljive (titracije) ili skupe (fluorimetrija i polarimetrija). Spektrofotometrija je jeftina i brza metoda koja se odlikuje velikom selektivnošću i preciznošću.

U ovom radu je praćena reakcija oksidacije tartrazina amonijum-persulfatom uz srebro(I) kao katalizator. Prilikom reakcije oksidacije tartrazina, on se degradira, pa obojenost rastvora opada, što omogućava praćenje reakcije spektrofotometrijski. Srebro(I) ubrzava ovu reakciju, a različite koncentracije srebra(I) omogućavaju različitu brzinu reakcije. Optimalni uslovi su određeni variranjem parametara reakcije: koncentracije tartrazina, koncentracije oksidacionog sredstva, pH vrednosti. Za dalju analizu korišćene su one vrednosti parametara pri kojima je brzina reakcije najveća, što je omogućilo katalizu pri nižim koncentracijama srebra(I). Ispitana je mogućnost primene ove reakcije u novoj kinetičkoj metodi za određivanje srebra, kao i njena

Ognjen Stamenković (1998), Leskovac, Đure Salaja 33/18, učenik 2. razreda Gimnazije Leskovac

MENTOR: Miloš Pešić, Istraživačka stanica Petnica



Slika 1. Strukturna formula tartrazina

Figure 1. Structural formula of tartrazine

selektivnost. Selektivnost je predstavljena kao greška metode u prisustvu stranih jona (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , VO_3^+ , WO_4^{2-} i Zn^{2+}).

Eksperiment

U eksperimentu su korišćeni vodeni rastvori tartrazina (Etol Celje, slika 1), AgNO_3 (Zorka Šabac), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Centrohém).

Za pufer su korišćeni CH_3COONa (Zorka Šabac), CH_3COOH (Zorka Pharma). Za podešavanje pH vrednosti korišćena je HNO_3 (Centrohém).

Za selektivnost su korišćeni vodeni rastvori $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Kemika), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Šabac), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Kemika), NH_4VO_3 (Kemika), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Šabac), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Kemika), $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH), PbNO_3 (Hizip), $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Šabac).

Reakcije su praćene spektrofotometrijski (Thermo Scientific Evolution 60S UV-Vis Spektrofotometer) na temperaturi od $24.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$. Brzina reakcije praćena je na talasnoj dužini od 426 nm, na kojoj rastvor tartrazina ima maksimalnu apsorpciju. Apsorbanca je merena u vremenskim intervalima od 10 s u staklenim kivetama optičkog puta od 10 mm. Optimalne koncentracije i kalibraciona kriva su određene preko zavisnosti brzine reakcije od koncentracije odgovarajućih reagenasa. Brzina reakcije je određivana metodom tangensa.

Određivanje optimalne koncentracije tartrazina. Testirane koncentracije su $6 \cdot 10^{-5}$,

$7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $8.5 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, $9.5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Dok je varirana koncentracija tartrazina, merenja su vršena u 0.01 mol/dm³ acetatnom puferu na pH 4.95, u prisustvu $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ koncentracije 1×10^{-2} mol/dm³ i AgNO_3 koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³.

Određivanje optimalne koncentracije oksidacionog sredstva. Testirane koncentracije su $6 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $8 \cdot 10^{-3}$, $8.5 \cdot 10^{-3}$, $9 \cdot 10^{-3}$ i $9.5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ varirana je pri optimalnoj koncentraciji tartrazina u 0.01 mol/dm³ acetatnom puferu na pH 4.95 i pri AgNO_3 koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³.

Određivanje optimalne pH vrednosti. Napravljena je serija od pet 0.01 mol/dm³ acetatnih pufera sa pH vrednostima od 3.50, 3.75, 4.00, 4.50 i 5.00. Vrednosti pH su podešavane 0.1 mol/dm³ azotnom kiselinom. Vrednost pH je varirana pri optimalnoj koncentraciji tartrazina, sa optimalnom koncentracijom $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ i sa AgNO_3 koncentracije $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.

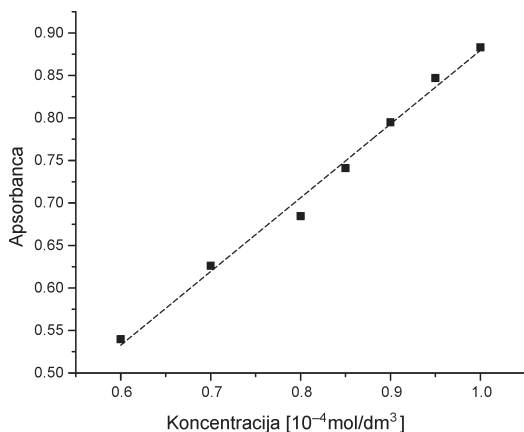
Kalibraciona prava je konstruisana kao zavisnost brzine reakcije od koncentracije srebra. Opseg koncentracije srebra za kalibracionu krivu je bio od 0.535 do 5.35 ppm. Merenja su vršena pod optimalnim uslovima.

Određivanje selektivnosti je vršeno pod optimalnim uslovima (optimalne koncentracije reaktanata i optimalna pH vrednost) i sa koncentracijom srebra 2×10^{-5} mol/dm³. Ispitivane su promene u brzini i tačnost metode u srebro : metal odnosima 1 : 1 i 1 : 10.

Rezultati i diskusija

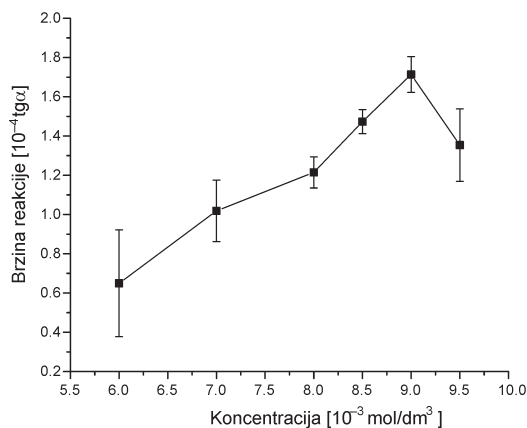
Određivanje optimalne koncentracije tartrazina. Tokom ispitivanja zavisnosti brzine od koncentracije tartrazina, primećeno je da koncentracija tartrazina nije imala znatan uticaj na brzinu reakcije i da su reakcije sa nižim koncentracijama znatno brže stizale do ravnotežnog stanja. Za optimalnu vrednost tartrazina uzeta je ona koncentracija koja je davala vrednost početne apsorbanca u opsegu od 0 do 1 kako bi se lakše određivala brzina reakcije i bila dovoljno visoka da bi promena apsorbanca bila što linearnija tokom 20 minuta trajanja reakcije.

Na grafiku zavisnosti apsorbanca od koncentracije tartrazina nakon 45 sekundi (slika 2) može se videti da je pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³



Slika 2. Zavisnost apsorbance od koncentracije tartrazina nakon 45 s od početka reakcije

Figure 2. Absorbance dependence vs. tartrazine concentration 45 s after the start of the reaction



Slika 3. Zavisnost brzine reakcije ($tg\alpha$) od koncentracije oksidacionog sredstva

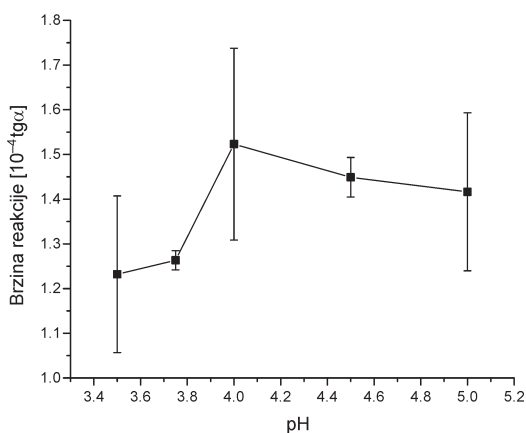
Figure 3. Reaction rate ($tg\alpha$) dependence vs. oxidizing agent concentrations

tartrazina očitavana najveća apsorbanca. Ova koncentracija je odabrana za optimalnu i korišćena u daljem radu.

Određivanje optimalne koncentracije oksidacionog sredstva. Optimalna koncentracija amonijum-persulfata je utvrđena na osnovu zavi-

snosti brzine reakcije od koncentracije tog oksidacionog sredstva.

Sa slike 3 može se uočiti da je brzina reakcije najveća pri koncentraciji amonijum-persulfata od $9.00 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, pa je ova koncentracija odabrana za optimalnu i korišćena u daljem toku rada.



Slika 4. Zavisnost brzine reakcije ($tg\alpha$) od pH vrednosti

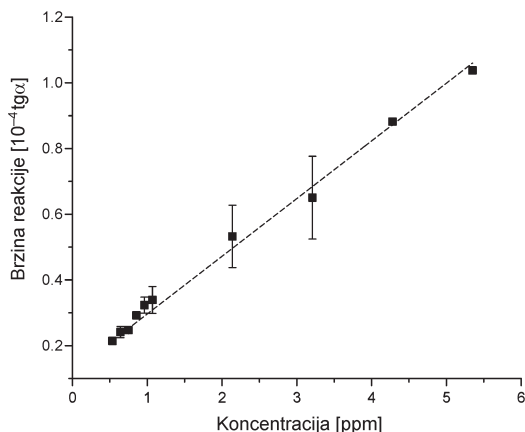
Figure 4. Reaction rate ($tg\alpha$) dependence vs. pH values

Određivanje optimalne pH vrednosti. Sa slike 4 može se uočiti da je brzina reakcije najveća pri pH vrednosti 4.00, pa je ova pH uzeta za optimalnu i korišćena u daljem radu.

Konstrukcija kalibracione prave. Ispitivanjem zavisnosti brzine reakcije od koncentracije srebra(I) dobijena je kalibraciona prava. Za konstrukciju kalibracione prave korišćena je metoda tangensa. Sve tačke sa grafikom (slika 5) predstavljaju srednju vrednost rezultata dobijenih iz 3-4 merenja. Koeficijent korelacije linearnog fita iznosi 0.994. Koncentracija srebra(I) se računa po formuli:

$$C(\text{ppm}) = (5.92 \pm 0.15) \cdot 10^4 \cdot tg\alpha - (0.84 \pm 0.02).$$

Selektivnost. Selektivnost metode ispitivana je praćenjem uticaja prisustva različitih metala na brzinu reakcije. Odstupanja su predstavljena



Slika 5. Kalibraciona prava – zavisnost brzine reakcije ($\text{tg}\alpha$) od koncentracije srebra(I)

Figure 5. The Calibration curve – reaction rate ($\text{tg}\alpha$) dependence vs. Ag(I) concentrations

kao odnos brzine reakcije uz prisustvo stranog jona i brzine reakcije bez prisustva stranog jona (tabela 1, odstupanja u procentima sa predznakom minus predstavljaju povećanje brzine reakcije u odnosu na onu bez prisustva stranog jona, dok pozitivna odstupanja predstavljaju smanjenje brzine).

Tabela 1. Selektivnost metode

Jon	Odstupanje u procentima za $c(\text{Ag})/c(\text{strani jon})$	
	1 : 1	10 : 1
Cr^{3+}	27.53	8.44
Cu^{2+}	19.78	-3.02
Fe^{2+}	-107.94	0.55
La^{3+}	-18.73	-0.27
Mo^{6+}	-35.12	4.88
Pb^{2+}	63.22	1.41
VO_3^+	30.62	10.34
WO_4^{2-}	2.04	-
Zn^{2+}	15.94	10.37
Mn^{2+}	53.12	-53.56
Ni^{2+}	-52.25	44.36

Dobijeni rezultati pokazuju da prisustvo ispitanih stranih jona ne utiče značajno na tačnost

metode pri koncentracijama do deset puta manjim od koncentracije srebra. Ovo nije slučaj sa WO_4^{2-} jonom, koji ne utiče na tačnost pri jednakim koncentracijama kao srebro. Ispitivanje je pokazalo da prisustvo Mn^{2+} i Ni^{2+} jona znatno utiče na tačnost metode (pri svim testiranim odnosima).

Zaključak

Prema dobijenim rezultatima reakcija oksidacije tartrazina amonijum-persulfatom u acetatnom puferu sa srebrom(I) kao katalizatorom može se primeniti u kinetičkoj metodi za kvantitativno određivanje srebra(I). Dobijenim optimalnim vrednostima za koncentraciju tartrazina od $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, koncentraciju oksidacionog sredstva od $9.00 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ i pH vrednosti 4 može se odrediti koncentracija srebra(I) u opsegu od 0.535 do 5.35 ppm, gde prva vrednost predstavlja donju granicu osetljivosti metode. Metoda je pokazala zadovoljavajuću selektivnost u slučaju kada je strani jon (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , VO_3^+ , Zn^{2+}) u deset puta manjoj koncentraciji od srebra, osim u slučaju kada je strani jon WO_4^{2-} , kada je metoda pokazala dobru selektivnost pri jednakim koncentracijama srebra(I) i stranog jona. U slučaju kada su strani joni bili Mn^{2+} ili Ni^{2+} , metoda nije bila selektivna ni u jednom proveravanom odnosu, te se srebro(I) ne može određivati u prisustvu ovih jona.

Literatura

Grahovac Z. M., Mitić S. S., Pecev E. T. 2002. Kinetic determination of ultramicro amounts of Cu(II) ion in solution. Original scientific paper. University of Niš, Višegradska 33, 18000 Niš

Ilić S., Salim A. 2009. Kinetička metoda za određivanje vanadijuma. *Petničke sveske*, 62: 299.


Novaković M. 2012. Kinetička metoda za određivanje srebra(I). *Petničke sveske*, 70: 304.

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

Pešić M., Drakulović M. 2005. Oksidacija hidrohinona kalijum-hloratom kao nova kinetička metoda za određivanje mikrokoličina vanadijuma. *Petničke sveske*, 58: 181.

Ognjen Stamenković

Kinetic Method for Silver(I) Ion Determination based on its Catalytic Effect on Tartrazine Oxidation

The possibility of the development of a new kinetic method for quantitative determination of Ag(I) was examined throughout this research. This method is based on a reaction of oxidation of tartrazine by ammonium persulphate using silver(I) as a catalyst in an acetic buffer at a temperature of $24.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$. The reaction rate of this reaction was monitored spectrophotometrically and the tangent method was used for optimal condition and calibration curve determination. The optimal conditions for the reaction to occur were determined so that the reaction rate was the fastest. The results show that the optimal pH for the acetic buffer is 4.00, the optimal concentration of ammonium persulphate is $9 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ and the optimal concentration for tartrazine is $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Using these optimal conditions, the calibration curve was obtained, showing the reaction rate dependence vs. Ag(I) concentrations. The range of the calibration in terms of the concentration of Ag(I) curve is from 0.535 to 5.35 ppm. The selectivity of the method was examined, and the effect of most of the foreign ions was negligible up to the ratio of 1:10 in favor of the Ag(I) ion, but in presence of Mn^{2+} or Ni^{2+} ions the method showed high inaccuracy. 

Ispitivanje inhibitornog efekta ekstrakta biljke *Camellia Sinensis* na koroziju gvožđa

Ispitivan je inhibitorni efekat ekstrakta biljke zelenog čaja (Camellia Sinensis), kao i polifenolnih komponenti i kofeina dobijenih iz čajnog ekstrakta, na koroziju gvožđa u 0.2 M rastvorima sumporne i hlorovodonične kiseline. Metodom gubitka mase izmereno je da ekstrakt polifenola u HCl pruža najveći stepen inhibicije za koroziju gvožđa, koji iznosi 98%.

Uvod

Korozija je posledica oksidoredukcionih reakcija metala sa različitim supstancama iz spoljašnje sredine, pri čemu metali prelaze u okside, koji su termodinamički stabilniji. Može biti hemijska i elektrohemijska: hemijska se odvija u gasovima, parama, tečnostima organskog porekla ili neelektrolitima, dok se elektrohemijska odvija u elektrolitima. Elektrohemijska korozija je najrasprostranjeniji oblik korozije jer se dešava u prirodnim uslovima – u vodi, tlu i atmosferi, kao i u industriji prilikom tretiranja metala elektrolitima.

Elektrohemijska korozija se može se podeliti u dva procesa:

1. Anodni proces: prelazak jona metala u rastvor



2. Katodni proces: redukcija jona rastvora, u kiselim sredinama vodonikovih jona, a ako je pH vrednost veća od 2, i rastvorom kiseonika (McCafferty 2010).

Smanjenje aktivnosti korozije postiže se otklanjanjem agenasa korozije ili inhibitorima korozije. Inhibitori korozije mogu da se oksiduju umesto metala, da reaguju sa potencijalnim korozivnim komponentama ili da se adsorbuju na površinu metala/legure i obrazuju zaštitni film.

Hemisorpcija inhibitora na površinu metala je najznačajniji metod inhibicije u kiselim sredinama. Ovakvi inhibitori najčešće sadrže atome sumpora, azota ili kiseonika, koji daju elektrone adsorbensu (McCafferty 2010). Takođe, inhibitori mogu biti aromatična jedinjenja ili jedinjenja sa konjugovanim dvostrukim vezama (Chauhan *et al.* 2007).

Toksičnost određenih sintetičkih inhibitora dovela je do korišćenja biljnih ekstrakata kao inhibitora korozije (Raja i Sethuraman 2008).

U ovom radu ispitan je inhibitorni efekat ekstrakta biljke *Camellia sinensis* na koroziju gvožđa u kiseloj sredini. Upoređen je inhibitorni efekat sirovog ekstrakta sa inhibitornim efektom polifenola i kofeina iz ekstrakta.

Materijal i metode

Priprema ekstrakata. Čajni ekstrakt je dobio iz 20 g suvog lišća zelenog čaja ekstrakcijom u 400 mL 50% vodenog rastvora acetonitrila tokom 2 h na temperaturi od 79°C uz konstantno mešanje (Perva-Uzunalić *et al.* 2006). Ekstrakt je uparen do suva na temperaturi 40–50°C. Masa 1.0427 g ekstrakta rastvorena je u 0.2 M H₂SO₄, a masa 1.1522 g u 0.2 M HCl. Masa 1.3040 g ekstrakta rastvorena je u 50 mL vode i ekstrahovana heksanom (2×20 mL) i hloroformom (2×20 mL) da bi se uklonili hlorofil i kofein. Vodena faza ekstrahovana je etil-acetatom (2×20 mL) (Ho *et al.* 1992). U organskoj fazi dobio je ekstrakt polifenola. Uzorak je sušen iznad natrijum sulfata, nakon čega je ekstrakt uparen do suva. Suvi ekstrakt mase 0.1504 g rastvoren je u

Mila Redžić (1998), Beograd, Bulevar Zorana Đinđića 123, učenica 3. razreda Devete gimnazije „Mihailo Petrović Alas”

0.2 M HCl, odnosno H₂SO₄. Kofein je ekstrahovan metilen-hloridom iz kiselog rastvora čajnog ekstrakta. Rastvor u metilen-hloridu je osušen nad natrijum-sulfatom i uparen do suva. Suvi ekstrakt ($m = 0.2392$ g) rastvoren je u 0.2 M HCl, odnosno H₂SO₄.

Metoda gubitka mase. Gvozdene pločice potopljene su u 0.2 M HCl, odnosno H₂SO₄, sa i bez dodatka inhibitora. Prvobitno su izmerene njihove dimenzije i masa, koja je merena i nakon 24 i 48 časova.

Brzina korozije B određena je pomoću formule:

$$B = \frac{G_0 - G_1}{S_0 \cdot t}$$

gde je G_0 – masa metala pre korozije, G_1 – masa metala posle korozije, S_0 – dodirna površina metala sa elektrolitom, tj. površina pločice, t – vreme korozije.

Inhibitorna delotvornost Z može se odrediti kao:

$$Z = \frac{B - B_{inh}}{B} \cdot 100$$

gde je B – brzina korozije u rastvoru bez inhibitora, B_{inh} – brzina korozije u rastvoru sa inhibitorom (Jeremić i Slijepčević 2007).

HPLC analiza uzorka kofeina. Masa kofeina u dobijenom ekstraktu određena je HPLC Agilent 1260 Infinity hromatografom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 × 50 mm. Kao rastvarači su korišćeni voda i acetonitril. Na početku je procenat vode bio 90%, nakon 2 minuta 50%; nakon 7 minuta procenat acetonitrile bio je 100% i taj odnos je ostao konstantan naredna 2 minuta, a zatim je tokom narednog minuta vraćen na početni odnos (9 : 1). Post run time bilo je 2 minuta.

Protok kroz kolonu iznosio je 0.4 mL/min, detekcija je vršena pomoću DAD i apsorpcija je praćena na talasnoj dužini od 254 nm. Injektovana zapremina bila je 20 µL.

Nakon analize uzorka rastvoren je čist kofein u 0.2 M HCl i H₂SO₄, tako da njegova koncentracija bude jednaka koncentraciji kofeina iz ekstrakta. Zatim je rastvor čistog kofeina korišćen kao inhibitor korozije, čime je provereno da li je u fazi metilen-hlorida ekstrahovana još neka komponenta koja pospešuje ili inhibira koroziju.

Ukupan sadržaj polifenola. Ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu određivan je Folin-Ciocalteu-ovim reagensom pre i posle njegovog korišćenja kao inhibitora. Koncentracije galne kiseline za standardnu seriju bile su 12.5, 50, 100, 200 i 400 µg/mL. Uzorci za spektrofotometar su pravljani na sledeći način: 0.5 mL uzorka + 7.5 mL vode + 0.5 mL Folin Ciocalteu-ovog reagensa (razblaženog 1:2) + 1.5 mL 20% rastvora natrijum-karbonata. Uzorci su pre snimanja stajali 60 min. na sobnoj temperaturi i zatim su snimani na Thermo Scientific Evolution 60 s spektrofotometru na talasnoj dužini od 765 nm.

Hemikalije. Sve korišćene hemikalije su pro analysis čistoće. Korišćeni su: acetonitril (Centrohlem), etil-acetat (Betahem), hloroform (Zorka Pharm), petrol-etar (Betahem), galna kiselina, natrijum-karbonat monohidrat (Kemika), Folin-Ciocalteu-ov reagens (Sigma Aldrich), kofein (Jugolek Beograd), sumporna kiselina (Centrohlem), hlorovodonična kiselina (Centrohlem), metilen-hlorid (Betahem), metanol (J. T. Baker), natrijum-sulfat (MP Hemija).

Rezultati i diskusija

Promene mase gvođenih pločica tokom korozije u sumpornoj i hlorovodoničnoj kiselini prikazane su u tabelama 1 i 2. Pokazano je da je brzina korozija veća u HCl nego u H₂SO₄ (tabela 3). Delotvornost inhibicije različitih čajnih ekstrakata predstavljena je u tabeli 3. Najveće inhibitorno dejstvo (97.9%) ima polifenolni ekstrakt u HCl, dok je njegov stepen inhibicije u H₂SO₄ 74.4% (tabela 3). U HCl veći stepen inhibicije pružaju i ekstrakt kofeina iz čaja i čist kofein. Kako su ovi ekstrakti dobijeni ekstrakcijom iz čajnog ekstrakta, pretpostavlja se da je smanjenje inhibitornog dejstva u H₂SO₄ posledica toga što su njihove koncentracije bile isuviše male da bi inhibirale koroziju. Inhibitorno dejstvo ekstrakta čaja je veće u H₂SO₄ (93.7%) nego u HCl (87.0%), što je rezultat za koji nije nađeno objašnjenje (tabela 3).

HPLC analiza ekstrakta kofeina. Na osnovu površina ispod pikova hromatograma izračunato je da je udeo kofeina u ekstraktu 41.94%. Retenciono vreme za standard bilo je 6.6 min, a za uzorak 6.3 min.

Tabela 1. Promena mase gvozdениh pločica koje su korodirale u H₂SO₄

Vreme korozije (h)	Masa pločice (g)				
	Bez inhibitora	Čajni ekstrakt	Ekstrakt polifenola	Ekstrakt kofeina	Čist kofein
0	0.9012	0.8992	0.8996	0.8581	0.9002
24	0.8057	0.8941	0.8834	0.8250	0.8527
48	0.6931	0.8861	0.8482	0.7749	0.8201

Tabela 2. Promena mase gvozdениh pločica koje su korodirale u HCl

Vreme korozije (h)	Masa pločice (g)				
	Bez inhibitora	Čajni ekstrakt	Ekstrakt polifenola	Ekstrakt kofeina	Čist kofein
0	0.9000	0.8998	0.8992	0.9040	0.8601
24	0.8930	0.8979	0.8986	0.9032	0.8586
48	0.8648	0.8954	0.8981	0.9016	0.8559

Tabela 3. Brzina korozije i delotvornost inhibicije

Inhibitor	Brzina korozije (mg m ⁻² s ⁻¹)		Delotvornost inhibicije (%)	
	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄	HCl
Bez inhibitora	5.35	0.92	–	–
Čajni ekstrakt	0.34	0.12	93.66	87.04
Ekstrakt polifenola	1.37	0.03	74.37	97.88
Ekstrakt kofeina	2.18	0.07	59.17	93.25
Čist kofein	2.07	0.11	61.20	87.58

Ukupna količina polifenola. U tabeli 4 prikazane su koncentracija polifenola u rastvorima pre i nakon što su korišćeni kao inhibitori. Koncentracije su izračunate na osnovu kalibracionih pravih.

Tabela 4. Koncentracije polifenola u rastvorima pre i nakon što su korišćeni kao inhibitori

Rastvor	Koncentracija (μg/L)	
	pre	posle
HCl	41.4	24.7
H ₂ SO ₄	26.1	36.1

Koncentracija polifenola u rastvoru hlorovodonične kiseline se smanjila za 16.7 μg/mL, što je i očekivan rezultat ako se pretpostavi da su se polifenoli oksidovali i tako sprečili koroziju gvožđa. Koncentracija u rastvoru sumporne kiseline se povećala za 10.0 μg/mL. To može biti posledica greške u pravljenju standardnih rastvora za kalibracionu pravu, ali se pretpostavlja da je posledica toga što se neko drugo jedinjenje koje se nalazilo u istom ekstraktu redukovalo primivši elektrone od gvožđa koje korodira, a zatim je, kao i polifenoli, oksidovano Folinovim reagensom i tako uticalo na prividno povećanje ukupne količine polifenola.

Zaključak

Merenjem gubitka mase pokazano je da sva tri ekstrakta (ekstrakti polifenola i kofeina iz zelenog čaja, kao i sirov biljni ekstrakt) imaju izuzetno veliko inhibitorno dejstvo na koroziju gvožđa u kiseloj sredini. Brzina korozije gvožđa manja je u hlorovodoničnoj kiselini, pa je to verovatno i razlog što su u takvim rastvorima sva tri ekstrakta pokazala inhibitornu delotvornost od preko 87%. Najveću inhibitorna delotvornost (98%) ima polifenolni ekstrakt u hlorovodoničnoj kiselini. Poređenjem inhibitorne delotvornosti čistog kofeina i ekstrakta kofeina iz čaja može se zaključiti da u nepolarnoj fazi metien-florida nije ekstrahovana nijedna druga supstanca koja bi pospešila ili umanjila koroziju.

Literatura

Chauhan L. R., Gunasekaran G. 2007. Corrosion inhibition of mild steel by plant extract in dilute HCl medium. *Corrosion Science*, **49** (3): 1143.

Ho C., Chen Q., Shi H., Zhang K. Q., Rosen R. T. 1992. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Preventive Medicine*, **21**: 520.

Jeremić R, Sljepčević I. 2007. Ispitivanje inhibitornog efekta formaldehida na koroziju gvožđa. *Petničke sveske*, 66: 233.

McCafferty E. 2010. *Introduction to Corrosion Science*. Springer

Perva-Uzunalić A., Škergeta M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., Grüner S. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, **96**: 597.

Raja P. B., Sethuraman M. G. 2008. Natural products as corrosive inhibitors for metals in corrosive media – a review. *Material Letters*, **62** (1): 113.

Mila Redžić

Investigation of the Inhibition Effect of *Camellia Sinensis* Extract on the Corrosion of Iron

The effect of green tea (*Camellia Sinensis*) extract as an inhibitor on the corrosion of iron in 0.2 M sulfuric and hydrochloric acid was studied. Polyphenolic and caffeine extracts obtained from the tea extract were also studied in order to compare their inhibitory effects. Weight loss method showed that the highest inhibitory effect on the corrosion of iron was given by polyphenolic extract in HCl (98%). 