

Ispitivanje stabilnosti kompleksa cink(II) i bakar(II) sa feofitinom *a* u zavisnosti od pH vrednosti

Ispitivana je i upoređivana stabilnost kompleksa bakra(II) i cinka(II) sa feofitinom a u vodenim rastvorima različitih pH vrednosti. Ispitivanje je vršeno u cilju određivanja uticaja pH vrednosti na degradaciju ovih kompleksa, što dovodi do oslobađanja Cu^{2+} i Zn^{2+} jona koji u određenim koncentracijama mogu imati negativne efekte na organizam. Stabilnost kompleksa je ispitivana praćenjem promena u UV-Vis spektrima ovih jedinjenja u rastvorima različitih pH vrednosti. U jako kiseljoj sredini (pH 1 i 2) oba kompleksa se degradiraju posle nekoliko sati, dok se u slabo kiseljoj sredini (pH 3) degradira samo kompleks cinka što pokazuje da je kompleks bakra stabilniji na ovoj pH vrednosti. Nije primećena razgradnja kompleksa u baznoj sredini (pH 8.5).

Uvod

Biljni pigmenti su hemijske supstance koje daju boju biljnim ćelijama, što je rezultat selektivne apsorpcije svetlosti različitih talasnih dužina. Uloga i funkcija svakog biljnog pigmenta je različita. Zeleni pigmenti, hlorofili, zajedno sa karotenoidima, učestvuju u fotosintezi kao sakupljači svetlosti. Fotosinteza je proces kojim se obezbeđuje energija i hranljive materije neophodne za život biljke. Pigmenti grupe flavonoida značajno povećavaju uspešnost reprodukcije, tako što svojim bojama privlače oprašivače koji raznose polen. Pigmenti se dele u grupe na osnovu hemijske strukture i funkcije, a najveće grupe biljnih pigmentata su karotenoidi (beta-karoten,

likopen), porfirini (hlorofil *a* i *b*, feofitin *a* i *b*), flavonoidi (flavonoli i flavanoni) i fikobilini.

Feofitin *a* (Pheo) je tamno zeleni pigment koji pripada grupi porfirina i zajedno sa hlorofilima i karotenoidima učestvuje u procesu fotosinteze. Iako feofitin *a* nije jedan od najzastupljenijih biljnih pigmentata u svežim biljkama, količina ovog pigmenta znatno se povećava termičkom obradom biljaka, jer nastaje kao jedan od produkata degradacije najzastupljenijeg biljnog pigmenta, hlorofila *a* (slika 1). Feofitin *a* (slika 2) sastoji se iz porfirinskog prstena, nezasićene makrociklične hemijske strukture koja sadrži četiri pirolova prstena povezana atomima ugljenika, esterifikovanog alkoholima fitolom i metanolom. Feofitin *a* je slične strukture kao i hlorofil *a*, s razlikom da feofitin *a* ne sadrži Mg^{2+} kao centralni metalni jon, već sadrži dva atoma vodonika.

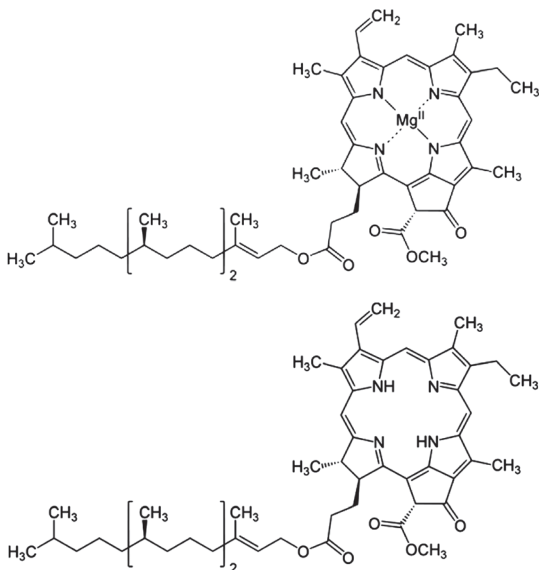
Zbog četiri atoma azota s unutrašnje strane porfirinskog prstena, feofitin *a* gradi kovalentno koordinovane veze gde se ponaša kao tetradentatni ligand.

Pored toga što se hlorofil *a* raspada tokom termičke obrade, feofitin *a* nastaje i prilikom degradacije hlorofila *a* u sredinama niske pH vrednosti. Sa porastom koncentracije H_3O^+ jona u rastvoru hlorofila *a*, stabilnost kompleksa opada, zato što hidronijum joni teže da protonuju atome azota u porfirinskom prstenu. Pošto jon magnezijuma gradi slabe koordinovane veze sa ligandima dolazi do raskidanja veze (Zvezdanović *et al.* 2012), a Mg^{2+} jon se kvantitativno zamenjuje jonima vodonika, čime nastaje feofitin *a*.

Neki od jona metala koji se mogu kompleksirati feofitinom *a* su Cu^{2+} i Zn^{2+} . Kompleksi feofitina *a* i Cu^{2+} , čija je veličina slična veličini Mg^{2+} jona koji se prirodno nalazi u hlorofilu, koriste se kao polusintetske zelene boje za hranu, odobrene od strane Evropske Unije, i u njima se nalazi do 8% bakar-feofitina *a* (www.fao.org). Derivati hlorofila *a* koji su rastvoreni u vodi se oralno upotrebljavaju kao antimutagena sredstva, jer imaju sposobnost vezivanja kancerogenih sup-

Aleksa Mijatović (2000), Kotraž, učenik 2. razreda Srednje škole „Dragačevo” u Guči

MENTOR: Filip Đurković, student Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Slika 1.
Struktura hlorofila *a*

Figure 1.
Structure of chlorophyll *a*

Slika 2.
Struktura feofitina *a*

Figure 2.
Structure of pheophytin *a*

stanci, kao što su policiklični aromatični ugljovodoni, čime smanjuju njihove toksične efekte na organizam (Linus Pauling Institute). Proces poboljšanja zelene boje konzerviranog povrća bazira se na formiranju kompleksa cink(II) i feofitina *a*. Povrće konzervirano na ovaj način prvi put predstavljeno je u SAD 1990 godine (Fenne-ma 1996).

Da bi kompleksi dospeli u organizam oralnim putem, oni moraju proći kroz želudac, koji luči digestivnu tečnost čija je pH vrednost u opsegu od 1.5 do 3.5. Ova pH vrednost je verovatno dovoljno niska da bi destabilizovala komplekse feofitina *a* sa jonima bakra i cinka i pri tom oslobodila ove jone, koji u određenim koncentracijama imaju toksične efekte na organizam. Preporučena dnevna doza cinka je 11 mg kod muškaraca, odnosno 8 mg kod žena, a preporučena dnevna doza bakra i kod muškaraca i kod žena je 900 µg. Toksične doze cinka su od 150 do 500 mg dnevno, dok je toksična doza bakra preko 12 mg dnevno. Povećana koncentracija jona Zn^{2+} nepovoljno utiče na memoriju i ubrzava razvoj Alchajmerove bolesti, dok povećana koncentracija Cu^{2+} jona dovodi do kognitivnih oštećenja i mentalnih disfunkcija, takođe povezanih s Alchajmerovom bolešću (Rani i Yadav 2015).

Kako se ovi kompleksi degradiraju u želucu, potrebno je odrediti dnevne količine boja koje se

mogu uneti u organizam, a da ne dođe do trovanja. Takođe, potrebno je odrediti pH vrednost hrane prilikom čije proizvodnje se koriste ove boje da ne bi došlo do degradacije kompleksa i gubitka boje pre nego što dospe u naš organizam.

Cilj ovog rada je određivanje pH vrednosti na kojima se kompleksi Zn^{2+} i Cu^{2+} sa feofitinom *a* degradiraju i poređenje stabilnosti ovih kompleksa.

Materijal i metode

Ekstrakcija feofitina *a*. Zaleđeni spanać mase 800 g stavljen je u vodu i smeša je zagrevana uz povremeno mešanje dok nije proključala. Smeša je dekantovana, a dobijeni materijal je prebačen u avan gde je dodat pesak, radi finijeg usitnjavanja, a potom i smeša 1000 mL metanola i 110 mL dietiletra. Sadržaj avana je prebačen u erlenmajer od 3 L, u koji je dodato i 280 mL 1M HCl, da bi se dobio feofitin *a*, što je uočeno potamnjenjem boje. Pigmenti su ekstrahovani sa po 200 mL petroletra, sve dok organski sloj postaje intenzivno maslinasto zelen prilikom ekstrakcije. Ekstrakti su spojeni u balon u koji je dodata dovoljnja količina bezvodnog natrijum-sulfata radi sušenja. Potom je ekstrakt profiltriran i uparen do suva na vakuum uparivaču. Ekstrakt je čuvan u frižideru.

Hromatografsko razdvajanje biljnih pigmenta. Pigmenti su razdvojeni hromatogra-

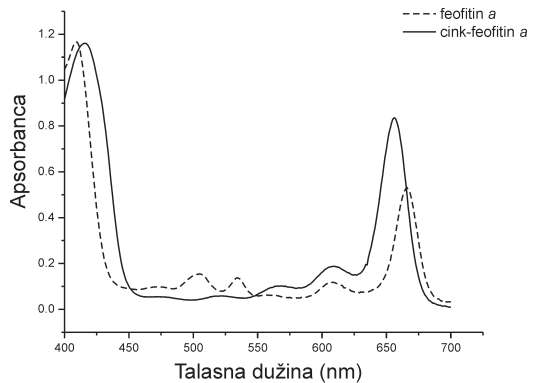
fijom na koloni na stubu silika-gela mase 40 g. Ekstrakt je rastvoren u malo eluenta (petroleter / aceton 4/1) i nanet na kolonu. Nakon hromatografskog razdvajanja ekstrakta, TLC analizom utvrđeno je u kojim se frakcijama nalazi feofitin *a*. Kako je TLC analiza pokazala da se ni u jednoj frakciji nije nalazio čist feofitin *a*, hromatografija je ponovljena, ali samo za frakcije koje sadrže feofitin *a*. Te frakcije su sipane u jedan balon i koncentrovane na vakuum uparivaču.

Kao eluent korišćena je smeša petroletra i etil-acetata. Izvršena je TLC analiza da bi se utvrdilo koji je odnos rastvarača najpogodniji za razdvajanje i njom je utvrđeno da je najbolji odnos petroletra i etil-acetata 8/2. Pigmenti iz smeše su razdvojeni hromatografijom na koloni na stubu silika-gela mase 20 g. Tamnozeleno frakcije spojene su u jedan ekstrakt i uparene do suva na vakuum uparivaču. Deo ekstrakta rastvoren je u acetonu i snimljen je UV-vis spektar ovog rastvora. Poređenjem UV-vis spektra ekstrakta sa već poznatim spektrom čistog feofitina *a* u acetonu, potpunim poklapanjem dokazano je da je dobijena supstanca feofitin *a*. Masa dobijenog feofitina *a* iznosila je 228.8 mg.

Sinteza cink-feofitina *a* (ZnPheo). U trogri balon je dodato 59.7 mg Pheo, 2.2 mL acetatnog pufera (pH = 5), 17.7 mg cink-acetata dihidrata i 22 mL metanola. Sinteza se odigrala u atmosferi argona na temperaturi od 40°C tokom 1 h (Nurhayati i Suendo 2015), a po završetku sinteze reakciona smeša je uparena do suva na vakuum uparivaču. Poređenjem UV-Vis spektara feofitina *a* i reakcione smeše pokazano je da je Zn^{2+} jon uspešno kompleksiran feofitinom *a*. Kao rastvarač i kao slepa proba korišćen je metanol. Dobijeno je ukupno 43.7 mg Zn-feofitina *a*.

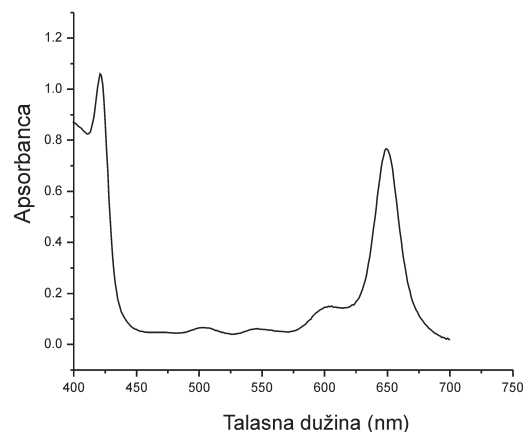
Sinteza bakar-feofitina *a* (CuPheo). U trogri balon dodaje se 40 mL etanola, 0.0655 g feofitina *a*, 0.01879 g bakar(II)-sulfata pentahidrata, 2 mL vode i reakcija se održava na 40°C. Nakon reakcije vrši se ekstrakcija CuPheo petroleptom, 5 puta sa po 30 mL uz dodatak dovoljne količine anhidrovanog natrijum-sulfata radi sušenja. Potom se ovaj rastvor uparava. Poređenjem UV-vis spektra dobijenog jedinjenja u dietil-etu sa već poznatim spektrom CuPheo utvrđeno je da je dobijena supstanca bakar-feofitin *a*. Ukupno je dobijeno 70.6 mg CuPheo.

pH degradacija ZnPheo i CuPheo. Određivanje stabilnosti kompleksa CuPheo i ZnPheo u vodenim rastvorima različitih pH vrednosti izvedeno je spektrofotometrijski, praćenjem promena spektara kompleksa u rastvorima pH vrednosti 1, 2, 3, 4.75 i 8.5. Spektri su snimani u vremenskim intervalima od 10, 20, 30, 60, 120 i 240 minuta nakon mešanja rastvora odgovarajuće pH vrednosti i rastvora kompleksa.



Slika 3. UV-vis spektri feofitina *a* i cink-feofitina *a* u acetonu

Figure 3. UV-vis spectrums of pheophytin *a* and zinc-pheophytin *a* in acetone



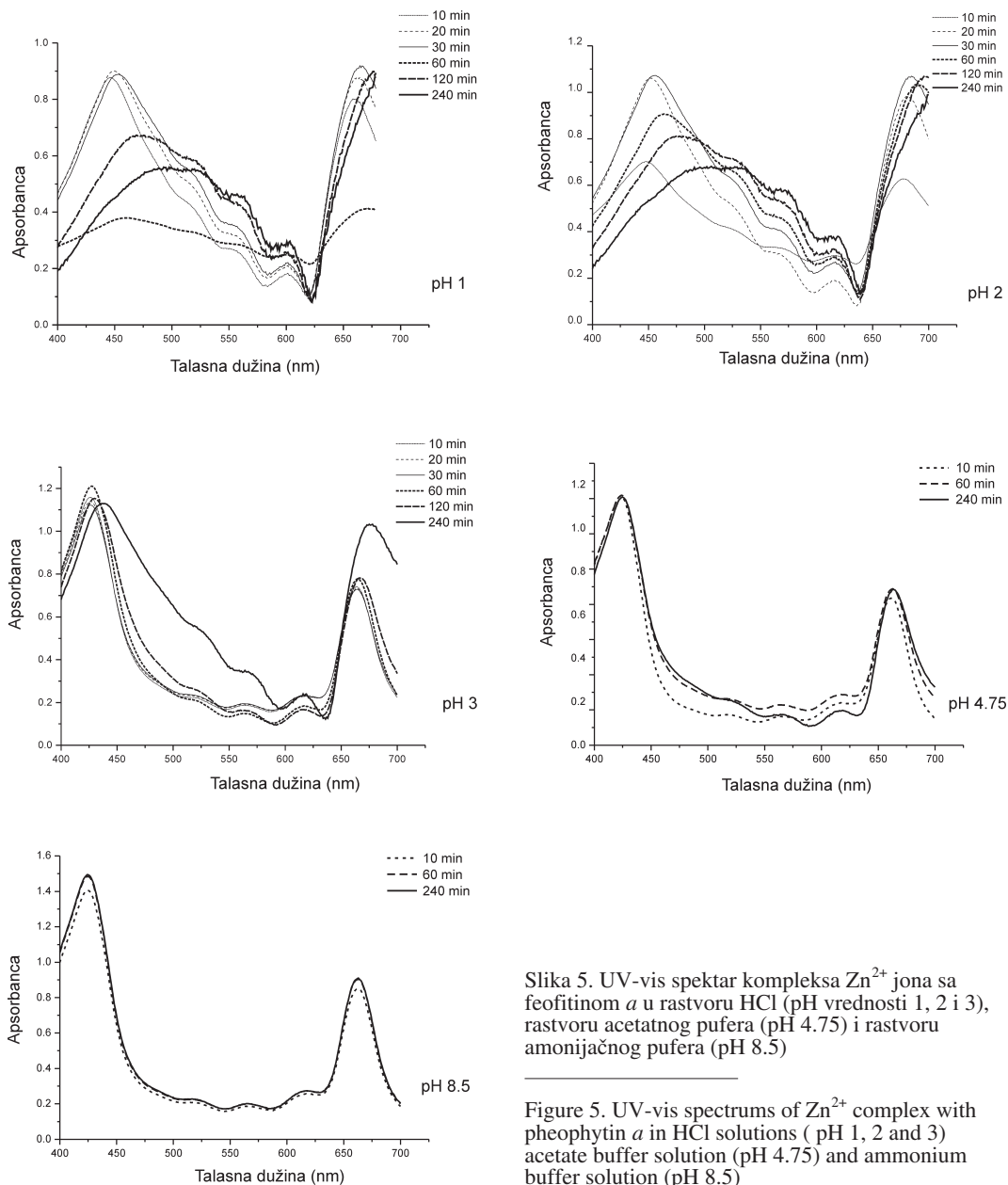
Slika 4. UV-vis spektar CuPheo u dietil etru

Figure 4. UV-vis spectrum of copper-pheophytin *a* in diethyl-ether

Napravljeni su rastvori HCl pH vrednosti 1, 2 i 3, acetatni pufer pH vrednosti 4.75 i amonijačni pufer pH vrednosti 8.5. Snimani su UV-vis spektri od 400 do 700 nm, a zatim upoređeni, da bi se videlo kada se kompleksi degradiraju. Sva spektrofotometrijska merenja vršena su na spektrofotometru Thermo Scientific Evolution 60 s.

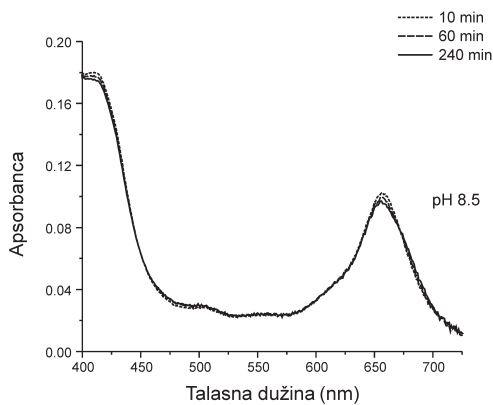
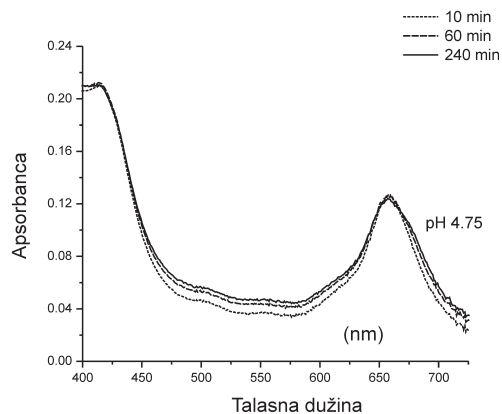
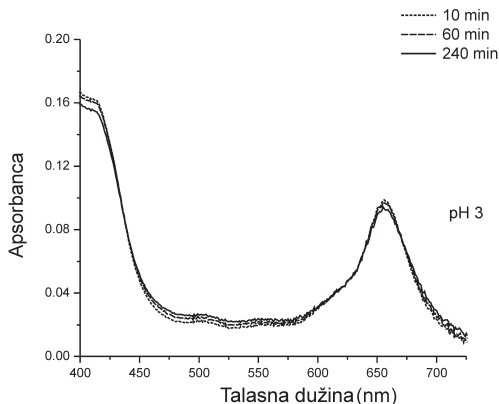
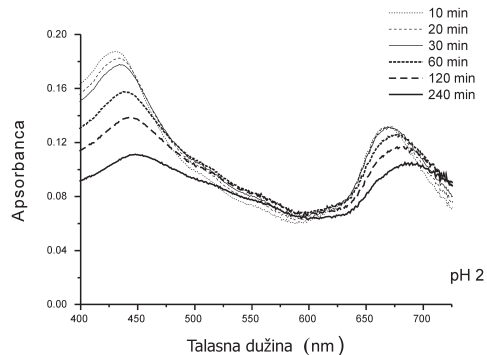
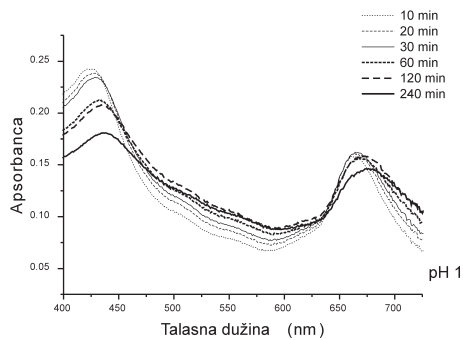
Rezultati

Spektar feofitina *a* u acetonu sniman je na talasnim dužinama od 400 do 700 nm, i njegovim poklapanjem sa spektrom iz literature dokazano je da je dobijena supstanca upravo feofitin *a*. Spektri ZnPheo i feofitina *a* u acetonu (slika 3) su



Slika 5. UV-vis spektar kompleksa Zn²⁺ jona sa feofitinom *a* u rastvoru HCl (pH vrednosti 1, 2 i 3), rastvoru acetatnog pufera (pH 4.75) i rastvoru amonijačnog pufera (pH 8.5)

Figure 5. UV-vis spectrums of Zn²⁺ complex with pheophytin *a* in HCl solutions (pH 1, 2 and 3) acetate buffer solution (pH 4.75) and ammonium buffer solution (pH 8.5)



Slika 6. UV-vis spektar kompleksa feofitina *a* sa Cu^{2+} jonom u rastvoru HCl (pH vrednosti 1, 2 i 3), rastvoru acetatnog pufera (pH 4.75) i rastvoru amonijačnog pufera (pH 8.5)

Figure 6. UV-vis spectrums of Cu^{2+} complex with pheophytin *a* in HCl solutions (pH 1, 2 and 3) acetate buffer solution (pH 4.75) and ammonium buffer solution (pH 8.5)

upoređeni, čime je dokazano da je dobijena supstanca cink-feofitin *a*.

Spektar CuPheo u dietil etru (slika 4) poklapa se sa spektrom bakar-feofitina *a* iz literature, što je dokaz da je kompleks bakra sintetisan.

pH degradacija cink-feofitina *a* prikazana je na slici 5, a pH degradacija bakar-feofitina *a* na slici 6.

Zaključak

Ispitana je stabilnost kompleksa cinka(II) i bakra(II) sa feofitinom *a* na pH vrednostima 1, 2, 3, 4.75 i 8.5. Na osnovu promene u spektrima zaključeno je da sa smanjenjem pH vrednosti opada stabilnost oba kompleksa, odnosno da

dolazi do degradacije kompleksa na pH vrednostima 1 i 2, dok se na pH vrednosti 3 samo kompleks cink-feofitina *a* potpuno degradira nakon 240 minuta. Iz toga sledi da je kompleks bakar-feofitina *a* manje osetljiv na kiselu sredinu od cink-feofitina *a*. Kompleks bakra(II) sa feofitinom *a* se potencijalno može upotrebljavati u proizvodnji hrane, pošto je pokazao dovoljnu stabilnost na pH vrednostima iznad 3.

Literatura

Fennema O. R. 1996. *Food chemistry*. New York: Marcel Dekker

Linus Pauling Institute. Chlorophyll and chlorophyllin. Dostupno na: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/chlorophylls/>

Nurhayati N., Suendo V. 2015. Isolation of chlorophyll *a* from spinach leaves and modification of center ion with Zn^{2+} : Study on its optical stability. *Jurnal Matematika & Sains*, **16** (2): 65.

Rani V., Yadav U. 2015. *Free radicals in human health and disease*. Springer

www.fao.org. Chlorophylls, copper complexes: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/additive-129-m1.pdf>

Zvezdanović J. B., Marković D. Z., Milenković S. M. 2012. Zinc(II) and copper(II) complexes with pheophytin and mesoporphyrin and their stability to UV-B irradiation: Vis spectroscopy studies. *Journal of Serbian Chemical Society*, **77** (2): 187.

Aleksa Mijatović

Determination of Stability of Copper(II) and Zinc(II) Complexes with Pheophytin *a* Depending on pH Value

Pheophytin *a* was extracted from frozen spinach. The procedure of synthesis of copper and zinc complexes with Pheophytin *a* is described. The stability of copper and zinc complexes with Pheophytin *a* in solutions of different pH value was observed and compared. The purpose of the observation was to discover how pH value affects the degradation of complexes and the release of Cu^{2+} and Zn^{2+} ions which may be harmful in certain concentrations. The stability of complexes was determined by observation of changes in absorption graphs of water solutions of complexes at certain pH value. The very acidic medium (pH 1 and pH 2) degraded both complexes, but the weakly acidic one (pH 3) degraded only the zinc complex, which shows that the copper complex is more stable. Alkaline solutions (pH 8.5) did not degrade any of these complexes. 