Priprema i primjena tankog hidrogelnog filma u optičkim senzorima

Petrić, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:691173

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Robert Petrić

Priprema i primjena tankog hidrogelnog filma u optičkim senzorima

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Pavo Živković

Osijek, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Priprema i primjena tankog hidrogelnog filma u optičkim senzorima

Robert Petrić

Rad je izrađen na: Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Pavo Živković

Sažetak: Otapanjem kitozana u otopini octene kiseline te umrežavanjem pomoću 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline dobiva se hidrogel koji na svakom mjestu umreženja posjeduje bidentantni N-donorni ligand koji ima sposobnost kompleksiranja Fe iona. Dodatkom Fe(II) soli u vodenoj otopini dolazi do kompleksiranja željeza unutar hidrogela. Dodatkom pomoćnog liganda, kao što je TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine), hidrogelu koji unutar svoje mreže posjeduje kompleksirano željezo dolazi do nastajanja plavo obojenog hidrogel-(2,2'-bipiridin-Fe(II)-TPTZ) kompleksa. Djelovanjem oksidansa, kao što je H_2O_2, na takav hidrogel dolazi do njegovog obezbojenja, a redukcijskim djelovanjem antioksidanasa ponovno nastaje plavo obojenje. Ova reakcija oksidacije-redukcije unutar dobivenog hidrogela je reverzibilna.

Diplomski rad obuhvaća: 48 stranica, 31 slika, 2 tablice, 30 literaturih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidans/hidrogel/kitozan/totalni antioksidativni kapacitet (TAC)

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjedinca
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, mentor i član
3. doc. dr. sc. Anamarija Stanković, članica
4. izv. prof. dr. sc. Berislav Marković, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD Diploma Thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study Chemistry; Research Study

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Preparation and application of thin hydrogel film in optical sensors

Robert Petrić

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Abstract: By dissolving chitosan within acetic acid solution followed by crosslinking via 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid a hydrogel containing a bidentate nitrogen ligand at each crosslink site is formed which has the ability to bind Fe ions. Addition of Fe(II) salts in aqueous solution creates an iron complex within the hydrogel. An additional ligand such as TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) has the ability to bind to iron which is already bound within the hydrogel forming a blue colored hydrogel-(2,2'-bipyridine-Fe(II)-TPTZ) complex. Oxidation said complex via oxidizing agent such as hydrogen peroxide induces loss of color after which it is possible to again reduce the colorless Fe(III)-TPTZ complex via an antioxidative agent that results in return of the blue color. The Aforementioned oxidation-reduction reaction has been proven to be reversible.

Thesis includes: 48 pages, 31 pictures, 2 tables, 30 references

Original in: Croatian

Keywords: antioxidants/hydrogel/chitosan/total antioxidant capacity (TAC)

Thesis accepted:

Reviewers:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjedinca
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, mentor i član
3. doc. dr. sc. Anamarija Stanković, članica
4. izv. prof. dr. sc. Berislav Marković, zamjena člana

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Kuhačeva 20, Osijek

Kratice:

TAC- totalni antioksidativni kapacitet

FRAP- ferric reducing/antioxidant power

DD- stupanj deacetilizacije

CDA- hitin deacetilaza

ROS- Reaktivne kisikove jedinke

TPTZ-2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine

DMF- dimetilformamid

DMSO-dimetilsulfoksid

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Literaturni pregled 2
2.1. Kemijski optički senzori 2
2.1.1. Tanki slojevi kod optičkih senzora 2
2.2. Hidrogelovi 3
2.3. Hitin i Kitozan 4
2.4. Izolacija Hitina 5
2.5. Priprema kitozana 6
2.6. Kemijsko deacetiliranje hitina 6
2.7. Biokonverzija hitina u kitozan 7
2.8. Hidrogel na bazi kitozana 7
2.9. Totalni antioksidativni kapacitet 8
3. Eksperimentalni dio 9
3.1. Pribor i kemikalije: 9
3.2. Priprema gelova 9
3.2.1. Priprema gelova P1 i P2 9
3.2.2. Priprema gela P3 11
3.2.3. Priprema gela P4 12
3.2.4. Priprema gela P5 14
3.2.5. Priprema gela P6 16
3.2.6. Priprema gela P7 17
3.2.7. Priprema gela P8 18
3.2.8. Priprema gela P9 19
3.2.9. Priprema gela P10 20
3.3. Kompleksiranje iona željeza u hidrogelu 21
3.4. Korištenje pomoćnih liganada 22
3.5. Priprema tankih filmova 25
3.6. Priprema suspenzije u HCl-u 25
3.7. Karakterizacija hidrogela 26
3.7.1. Konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije 26
3.7.2. Konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije kitozana 27

3.7.3. Konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije hidrogela 28
3.7.4. Spektrofotometrijska analiza 29
4. Rezultati i rasprava 34
4.1. Rezultati priprave hidrogela 34
4.1.1. Hidrogelovi P1 i P2 34
4.1.2. Hidrogel P3 35
4.1.3. Hidrogel P4 i P5 35
4.1.4. Hidrogel P5 35
4.1.5. Hidrogel P6 36
4.1.6. Hidrogel P7 36
4.1.7. Hidrogel P8 36
4.1.8. Hidrogel P9 37
4.1.9. Hidrogel P10 37
4.2. Korištenje pomoćnih liganada 38
4.2.1. Hidrogel P8 38
4.2.2. Hidrogel P10 38
4.3. Priprema tankog filma 38
4.4. Priprema suspenzije u HCl-u 39
4.5. Rezultati konduktometrijskog određivanja stupnja deacetilacije 39
4.6. Rezultati spektrofotometrijske analize 39
5. Zaključak 40
6. Literatura 41

1. Uvod

Hidrogelovi su sačinjeni od polimerne mreže koja je dispergirana u vodenom mediju pri čemu se sama ne otapa u njoj. Polimerna mreža može biti sintetska ili prirodnog podrijetla te njihovim umrežavanjem i funkcionalizacijom se mogu dobiti takozvani pametni gelovi koji su osjetljivi na vanjske podražaje kao što je promjena temperature ili pH, ili mogu specifično reagirati s određenim ciljanim spojevima što je zatim popraćeno bubrenjem ili kaliranjem hidrogela, promjenom boje ili slično. Deacetilacijom prirodnog polimera hitina dobiva se kitozan koji posjeduje slobodne amino skupine zbog kojih je moguće umrežavanje dikarboksilnim kiselinama. Cilj ovog rada je sinteza funkcionalnog kitozan hidrogela kojim bi se mogao određivati totalni antioksidativni kapacitet (engl. *total antioxidant capacity,* TAC) realnih uzoraka. Umrežavanjem kitozana bi se istovremeno vršila i funkcionalizacija gela 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilnom kiselinom koja posjeduje 2 piridinska prstena koji mogu kompleksirati ione željeza čime unutar hidrogela nastaje obojeni kompleks koji promjenom oksidacijskog stanja kompleksiranog željeza mijenja boju. Dodavanjem pomoćnog liganda 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) na željezo kompleksirano unutar hidrogela te njegovom redukcijom bi se određivao TAC realnog uzorka na principu FRAP metode (engl. *ferric reducing/antioxidant power*) koja se zasniva na redukciji Fe(III)-$TPTZ_2$ kompleksa u plavo obojeni Fe(II)-$TPTZ_2$ kompleks gdje se spektrofotometrijski prati promjena apsorbancije djelovanjem antikosidansa.

2. Literaturni pregled

2.1. Kemijski optički senzori

Općenito, optički senzori se temelje na praćenju promjene intenziteta svjetlosti jednog ili više snopova svjetlosti nakon njihove interakcije s promatranim fizičkim sustavom [1]. Nadalje optički se senzori mogu koristiti u razne svrhe te se mogu klasificirati po njihovoj upotrebi. Kemijski optički senzori koriste fluorescencijske ili apsorpcijske spektroskopske tehnike dok se u svrhe mjerenja električnih i magnetskih polja mogu koristiti hibridni senzori kod kojih je optička komponenta (npr. optičko vlakno) direktno spojeno na neki drugi materijal koji je osjetljiv na promjenu električnog ili magnetskog polja kao što su piezoelektrični i piezomagnetični materijali [1]. Optičko se mjerenje uglavnom sastoji od analize intenziteta, faze, valne duljine i polarizacije svjetlosti koja prolazi kroz promatrani uzorak [2]. Neovisno o predmetu proučavanja, osnovna struktura optičkog senzora ostaje ista: Izvor svjetlosti, senzorski sloj, fotodetektor i ostali optički elementi (leće, zrcala, prizme, optički filteri, itd.)[3].

2.1.1. Tanki slojevi kod optičkih senzora

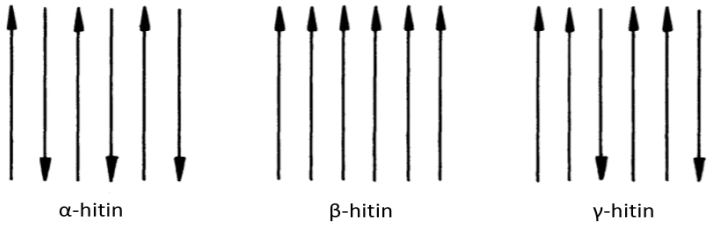
Polimerne mreže hidrogela mogu posjedovati razne funkcijske skupine kao što su hidroksilna, karboskilne i amino skupine koje mogu biti sastavni dio samog polimera ili se mogu nadograditi na polimerni lanac [4]. Modifikacijom polimernih lanaca hidrogela nanesenog na podlogu ili na optičko vlakno mogu se pripremiti optički senzori koji, ovisno o tipu modifikacije, mogu reagirati na promjenu pH, temperature ili na određeni analit [4, 5]. Interakcija analita s nanesenim hidrogelom najčešće je popraćena bubrenjem ili kaliranjem gela, promjenom boje ili oboje što rezultira promjenom indeksa loma ili smanjenjem intenziteta svjetlosti unutar optičkog vlakna [5]. U ovom radu modifikacijom kitozana pokušati će se dobiti hidrogel koji u reakciji s antioksidansima mijenja svoja optička svojstva.

2.2. Hidrogelovi

Gelovi se u pravilu definiraju kao viskoelastične tvari koje imaju svojstva krutina, ali u isto se vrijeme mogu povratno deformirati. Najčešće se sastoje se od polimerne mreže i medija u kojem je ona raspršena [4]. Nadalje, klasifikacija gelova se primarno odnosi na mediji u kojem je mreža raspršena te se prema tome gelovi dijele na *aerogelove, xerogelove* i *lyogelove* pri čemu je medij kod aero- i xerogelova plin, a kod lyogelova tekućina [4]. Hidrogelovi su u pravilu definirani kao umreženi (engl. *crosslinked*) polimeri koji u vodi bubre te nastaju kao rezultat jednostavnih reakcija između jednog ili više vrsta monomera [6]. Posjeduju mnoga svojstva koja ih čine vrlo svestranim materijalima. Osnovno svojstvo hidrogelova je apsorpcija vode unutar svoje trodimenzionalne strukture što uzrokuje njegovo bubrenje. Nadalje, apsorpcijom vode ili nekog biološkog fluida postaju mekani i elastični odnosno slični živom tkivu čime su idealni za primjenu u biološke i medicinske svrhe [7]. Klasifikacija hidrogelnih sustava je vrlo široka te se dijeli na više segmenata. Klasifikacija na temelju podrijetla gdje polimer može biti prirodnog ili sintetskog podrijetla. Prirodni polimeri su često i biokompatibilni te se iz tog razloga mogu koristiti u svrhu inženjeringa tkiva i općenito u svrhe obnove tkiva (reparativna medicina) [8], ali i u biosenzorske svrhe. Česti prirodni materijali proteinskog podrijetla koji se koriste za pripravu hidrogelova su kolagen i želatina koja je derivat kolagena. S druge strane polisaharidi kao što su kitozan, hijaluronska kiselina i alginat također se mogu koristiti za pripravu prirodnih hidrogelova [8]. Daljnja klasifikacija se odnosi na sastav polimera to jest sastoji li se hidrogel od jedne vrste monomera (homopolimerni hidrogelovi), dvije ili više vrsta monomera koji su međusobno povezani nasumičnim, izmjenjujućim ili blok redoslijedom (kopolimerni hidrogelovi) ili su izgrađeni od dvije vrste monomera koji su umreženi neovisno jedan o drugome (multipolimeri) [7]. Nadalje, mogu se dijeliti po konfiguraciji strukture na amorfne, polukristalne i kristalne. Također, bitna je i podjela po tipu ili metodi umrežavanja. Umrežavanje može biti kemijsko gdje uglavnom nastaju nove, čvrste, kovalentne veze ili fizičko gdje se umrežavanje vrši nastajanjem interakcija kao što su ionske interakcije ili nastajanje vodikovih veza [9].

2.3. Hitin i Kitozan

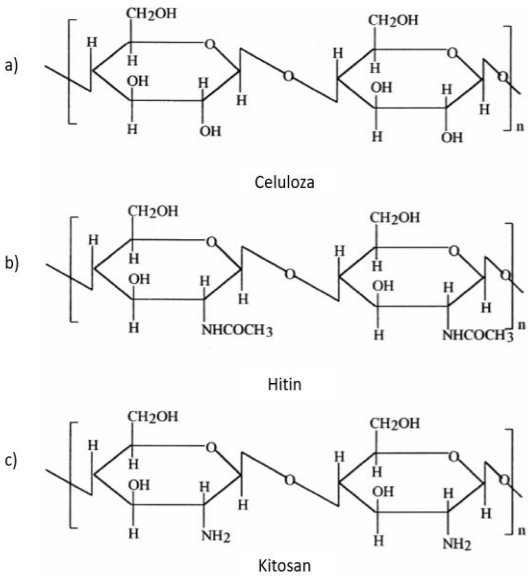
Hitin, kao i celuloza, je prirodni polimer čija je uloga primarno zaštitna i strukturna. Može ga se pronaći u ljušturama rakova i kukaca i u miceliju gljiva te je iz tog razloga lako dostupan u velikim količinama. Hitin je bijeli, tvrdi, neelastični polisaharid koji sadrži dušik i glavni je izvor površinskog onečišćenja u obalnim područjima [9]. Strukturno je sličan celulozi koja je izgrađena od β-1→4 D-glukopiranoze pri čemu je hidroksilna skupina na C-2 atomu zamijenjena acetamidnom skupinom, tako je hitin izgrađen od 2-actamido-2-deoksi-β-D-glukoze. Hitin se pojavljuje u tri polimorfne oblika α-hitin, β- hitin i γ-hitin. U α-hitinu lanci su poslagani antiparalelno, u β- hitinu su paralelni, a kod γ-hitina za svaki lanac koji je usmjeren prema „dolje“ dva su usmjerene prema „gore“ [10] (Slika 1.). Kitozan je N-deacetilirani derivat hitina pri čemu N-deacetiliranje nije potpuno. Posebno je zanimljiv zbog postotka sadržanog dušika (6.89%) za razliku od sintetički supstituirane celuloze (1,25%) [11]. Deacitiliranje hitina pri sintezi kitozana nije potpuno te sama razlika u nomenklaturi između kitozana i hitina nije u potpunosti definirana. Kitozan je polimer velike molekulske mase, biorazgradiv je i netoksičan. Struktura celuloze (a), hitina (b) i kitozana (c) vidljive su na slici 2. gdje su uočljive sličnosti u strukturi i njihove razlike na C-2 atomu.



Slika 1. Polimorfni oblici hitina

Značajna svojstva hitina koja utječu na njegovu svestranost su netoksičnost, sposobnost formiranja filma i vlakana, adsorpcija metalnih iona, koagulacija suspenzija i otopina te biološka aktivnost [12]. U odnosu na celulozu, hitin i kitozan zbog acetamidne skupina imaju puno veći potencijal za kemijske modifikacije, a time i veću potencijalnu raznovrsnost u praktičnoj primjeni. Za razliku od biljnih vlakana, kitozan posjeduje mogućnost formiranja filma te optička svojstva. Također,

posjeduje pozitivni ionski naboj zbog kojeg se može vezati na negativno nabijene masti, lipide i žučne kiseline [13].



Slika 2. Struktura a) celuloze; b) hitina i c) kitozana

2.4. Izolacija Hitina

Hitin se na industrijskoj razini najviše izolira iz otpada prehrambene industrije, primarno iz odbačenih ljuštura rakova. Kod rakova je hitin usko vezan za proteine, anorganske spojeve, lipide i pigmente. Svi ti spojevi moraju se odstraniti kako bi se postigla visoka čistoća hitina potrebna za biomedicinsku i farmaceutsku upotrebu [14]. Prvi korak izolacije čistog hitina iz prirodnog materijala je demineralizacija razrijeđenom kiselinom kao što je razrijeđena klorovodična kiselina popraćeno tretiranjem jakim lužinama koje se koriste za uklanjanje proteina. Potrebno je voditi računa pri izolaciji hitina, naročito pri uklanjanju proteina i deacetiliranju zbog mogućnosti degradacije strukture hitina. Kako nije poznata točna molekulska masa hitina, molekulsku masu prije i nakon demineralizacije i uklanjanja proteina iz prirodnog uzorka, koja govori o stupnju degradacije, teško je odrediti. Najviši stupanj degradacije hitina primijećen je pri deacetiliranju to jest pri sintezi kitozana. β-hitin podložniji je degradaciji od α-hitina zbog slabih intermolekularnih sila, nadalje stupanj degradacije uvelike je ovisan o stupnju deacetiliranja. Parcijalno deacitilirani β-hitin je posebno zanimljiv jer se lako pripravlja, biorazgradivi je materijal niske toksičnosti čija se razgradivost može fino regulirati [15].

2.5. Priprema kitozana

Izolacija hitina iz prirodnog uzorka se uglavnom sastoji od tri glavna koraka: Demineralizacija, deproteinizacija i depigmentacija (dekoloracija) [16]. Kemikalije te sam postupak varira ovisno o samom prirodnom uzorku. Nakon izolacije hitina deacetiliranje se vrši pomoću koncentriranije otopine natrijeva hidroksida pri čemu je bitno uzeti u obzir da sami proces deacetiliranja utječe na depolimerizaciju hitina/kitozana što se očituje promjenom to jest smanjenjem molarne mase polimera [17]. Priprema kitozana iz hitina može se vršiti enzimatski ili kemijskim reaktantima. Ovisno o pripremi, konačni produkt može uvelike varirati u strukturi i svojstvima. Utjecaj na konačni produkt također imaju početna sirovina, to jest izvor hitina, bilo to iz gljiva ili najčešće iz glavonožaca i rakova te postupak izolacije hitina.

2.6. Kemijsko deacetiliranje hitina

Kemijsko transformacija hitina u kitozan vrši se pomoću koncentrirane NaOH (40%-50) uz povišenu temperaturu. Temperatura u pravilu mora biti 100°C ili više te se postupak deacetiliranja vrši nekoliko sati [18]. Deacetiliranje je moguće vršiti jakom kiselinom ili bazom ali bitno je voditi računa o tome da se N-acetilne skupine ne mogu odstraniti pomoću kiselina, a da pri tome ne dođe do hidrolize polisaharida [16]. Deacetiliranje se može odvijati heterogeno ili homogeno. Heterogeno deacetiliranje podrazumijeva tretiranje hitina vrućom NaOH nekoliko sati dok se homogeno deacetiliranje odvija disperzijom hitina u koncentriranoj NaOH (30g NaOH/ 45g H_20/ 3g hitina) pri temperaturi od 25°C nekoliko sati [17]. Metoda deacetiliranja utječe na konačni produkt u pogledu, između ostalog, topivosti, stupnju deacetilizacije (engl. *degree of N-deacetylation*, DD), distribuciji acetilnih grupa duž lanca i na konačnu molekulsku masu. Pri homogenom deacetiliranju dobiva se kitozan sa DD od 55% nakon tretiranja hitina s NaOH 77 sati [19]. Isti rad pokazuje da je topivost produkta pri DD od oko 50% najveća. Visoka topivost u tako uskom spektru DD-a može biti posljedica ravnoteže između stupnja kristaličnosti i protoniranja produkta, što u isto vrijeme objašnjava netopivost kitozana višeg DD kod kojeg protoniranje utječe na njegovu hidrofilnost dok stupanj kristaličnosti utječe na smanjene topivosti [20]. Nadalje, na brzinu deacetiliranja najveći utjecaj imaju koncentracija NaOH i temperatura reakcije, ali i sam uzorak hitina, to jest izvor hitina, odnosno vrsta iz koje je izoliran. Također, postupak izolacije

ima velik utjecaj na brzinu i krajnji stupanj deacetiliranja [21]. Glavni nedostatak kemijskog deacetiliranja je dugotrajnost postupka te dugotrajno izlaganje visokim temperaturama, to jest visoka energijska neefikasnost te korištenje velikih količina bazičnih spojeva što utječe za zagađenje. Nedostatke kemijskog deacetiliranja pokušava se nadoknaditi korištenjem enzima to jest biokonverzijom u kitozan.

2.7. Biokonverzija hitina u kitozan

Kitozan se prirodno može pronaći u staničnim stijenkama gljiva *Phycomyces blakesleeanus i Mucor rouxii*. Pretpostavlja se da se N-deacetilirani oblici polimera formiraju nakon formiranja polisaharidnih polimera kao što je hitin [22]. Enzim koji vrši konverziju hitina u kitozan, hidrolizom acetamidnih skupina hitina, naziva se hitin deacetilaza (engl. *Chitin deacetylase*; CDA) te se može izolirati iz pojedinih gljiva. Upotreba CDA za pripremu kitozana predstavlja mogućnost razvoja metode enzimskog procesa koji bi potencijalno mogao savladati nedostatke kemijskog procesa pripreme kitozana [22]. Naravno kako je CDA enzim, potrebno je odrediti optimalne uvijete enzimske reakcije kao što su temperatura i pH, utjecaj pufera i slično kako bi se taj proces mogao primijeniti na industrijskoj razini. CDA iz *M. rouxii* se nije pokazao efektivnim u deacetiliranju netopivog oblika hitina te je potrebno prethodno tretiranje kristaličnog hitina prije dodavanja enzima kako bi se poboljšala pristupačnost enzima acetilnim grupama te se na taj način poveća prinos i brzina reakcije deacetiliranja [23]. U tu svrhu se koristi prethodno parcijalno deacetilirani hitin to jest kitozan topiv u vodi. Korištenjem prethodno parcijalno deacetiliranog supstrata te naknadno enzimatsko djelovanje CDA rezultira kitozanom koji je deacetiliran i do 97% [17].

2.8. Hidrogel na bazi kitozana

Za sintezu hidrogela na bazi kitozana najbolje su se pokazale metode kemijskog umrežavanja. Velika prednost kitozana kao kostura hidrogela je postojanje amino skupina zbog čega je moguće umrežavanje pri blagim uvjetima u odnosu na polimere koji posjeduju hidroksilne skupine kod kojih su najčešće potrebni ekstremni uvjeti kao što su niski pH i visoka temperatura [24]. U

posljednje vrijeme su se ekstenzivno počeli proučavati biokompatabilni i biorazgradivi polimeri. Spojevi koji se koriste za umrežavanje (engl. *crosslink*) su najčešće aldehidi i anhidridi kao što su formaldehid, acetaldehid, glutaraldehid i anhidrid octene kiseline i dikarboksilne kiseline kao što je jabučna kiselina. Ovi se spojevi najčešće koriste za umrežavanje jer su uglavnom jeftini i lako dostupni [24]. U ovom će se radu kao *crosslinker* koristiti dikarboksilna kiselina 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilna kiselina pri čemu karboksilni krajevi dikarboksilne kiseline tvore amidnu vezu sa slobodnim amino skupinama kitozana dok će bipiridinski dio služiti kao bidentantni N-donor za kompleksiranje željeznih iona.

2.9. Totalni antioksidativni kapacitet

Reaktivne kisikove jedinke (engl. *reactive oxygen species*; ROS) je pojam koji obuhvaća radikale kisika kao što su superoksidni ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($HO^{\bullet-}$) i peroksil ($RO_2^{\bullet-}$), to jest radikali koji posjeduju nespareni elektron i pojedini kisikovi spojevi kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i ozon (O_3) koji nisu radikali [26]. ROS između ostalog nastaje unutar organizma kao nusprodukt metabolizma oksidativne fosforilacije unutar mitohondija [27]. S jedne strane dokazano je da ROS u niskim koncentracijama sudjeluju u posredovanju stimulaciji proliferacije stanica i ekspresije gena, no pri većim koncentracijama njihovo djelovanje se najčešće povezuje s odumiranjem stanica putem apoptoze ili nekroze [26]. Tako pri većim koncentracijama ROS sudjeluju u lančanim reakcijama koje neselektivno djeluju na proteine, lipide, polisaharide i DNA [28]. U normalnim okolnostima količina unutar staničnih ROS jedinki je regulirana od strana antioksidacijskih enzima kao što je superoksid dismutaza, katalaza, peroksiredoksini i dr. te ne-enzimatskih antioksidacijskih molekula kao što su glutation, flavonoidi i vitamini A, C i E [27]. Antioksidansi se općenito mogu definirati kao bilo koja tvar koja u niskim koncentracijama, u odnosu na oksidacijski supstrat, značajno usporavaju ili sprječavaju njegovo oksidacijsko djelovanje [29]. Totalni antioksidativni kapacitet (total antioxidative capacity; TAC) podrazumijeva određivanje antioksidativne moći nekog prirodnog uzorka kao što je hrana, piće, plazma ili druge tjelesne tekućine [30]. Ova je metoda potrebna jer prirodni uzorci uglavnom posjeduju više od jedne komponente koja posjeduje antioksidativna svojstva te je izolacija i određivanje pojedinog elementa vrlo nepraktična, a uz to pri određivanju TAC-a bitno je i međudjelovanje pojedinih komponenti samog uzorka [30]. FRAP (engl. *ferric*

reducing/antioxidant power) metoda određivanja totalnog antioksidativnog kapaciteta je metoda koja se temelji na redukciji Fe(III)-$TPTZ_2$ kompleksa u plavo obojeni Fe(II)-$TPTZ_2$ pomoću nekog antioksidativnog biološkog uzorka pri čemu se prati promjena apsorbancija pri 593 nm u odnosu na standard [31].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Pribor i kemikalije:

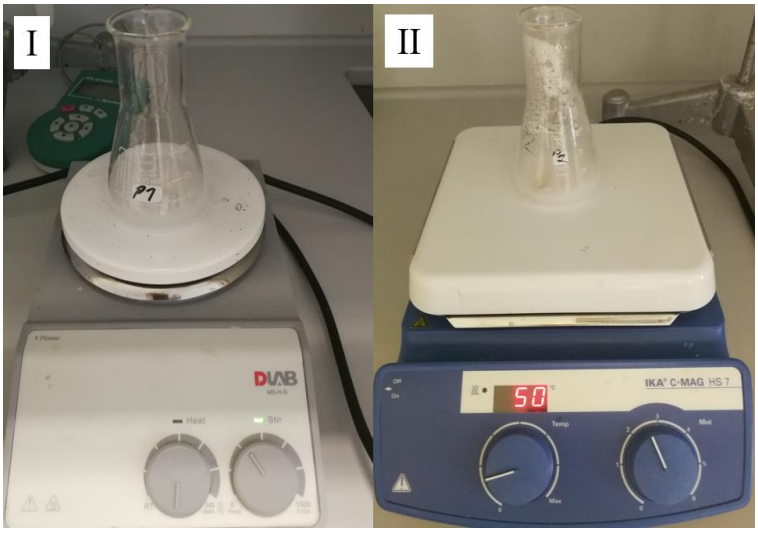
2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilna kiselina, ledena octena kiselina (99-100%), kitozan Mr= 300 000-100 000, DD≈80%, Dimetilformamid (DMF), Dimetilsulfoksid (DMSO), NaOH, $Fe(NO_3)_3x9H_2O$, $Fe(SO_4)x7H_2O$, $FeCl_3x6H_2O$ Metanol, Etanol, 2,2-bipiridin, 4,4-bipiridin, 2,2-bipiridilamin, Glutaraldehid 25%, Askorbinska kiselina, Urična (mokraćna) kiselina, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), HCl, H_2O_2, Galna kiselina, Trolox ((R)-(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Realni uzorak (Šumeća tableta vitamina C)

Magnetska miješalica sa grijačem, Centrifuga, IR, ultrazvučna kupelj, UV-VIS spektrofotometar, rotirajući evaporator

3.2. Priprema gelova

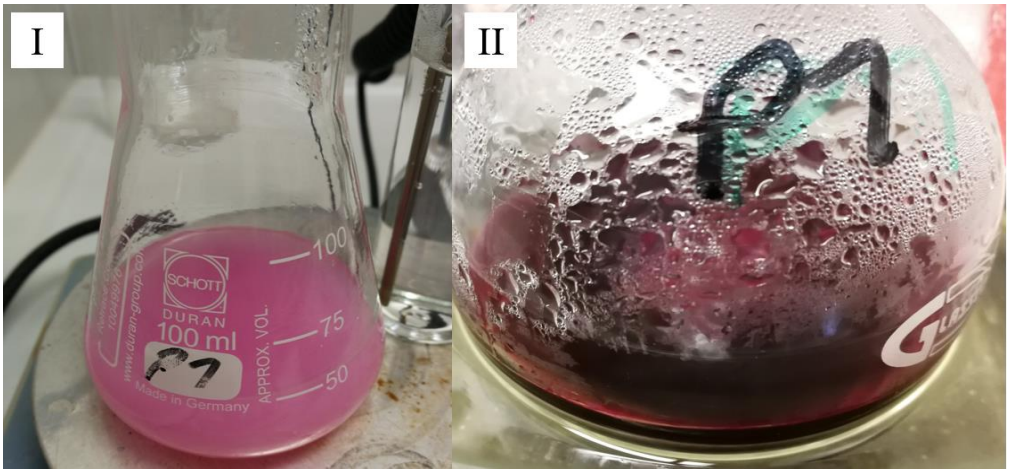
3.2.1. Priprema gelova P1 i P2

Za pripremu P1 i P2 gelova pripremljene dvije otopine kitozana otapanjem 200 mg kitozana (CS) u 20 mL 5%-tne otopine octene kiseline (HAc) te u istu tu otopinu je dodano 20 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline. Obje reakcijske smjese stavljene su na magnetsku miješalicu. Jedna je stavljena na miješanje pri sobnoj temperaturi (P1), a druga na povišenu temperaturu od 50°C te su se miješale 3 sata. Tokom miješanja nije došlo do potpunog otapanja 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilna kiselina što je rezultiralo bijelim zamućenjem (Slika 3.).



Slika 3. Otopine P1 (I) i P2 (II)

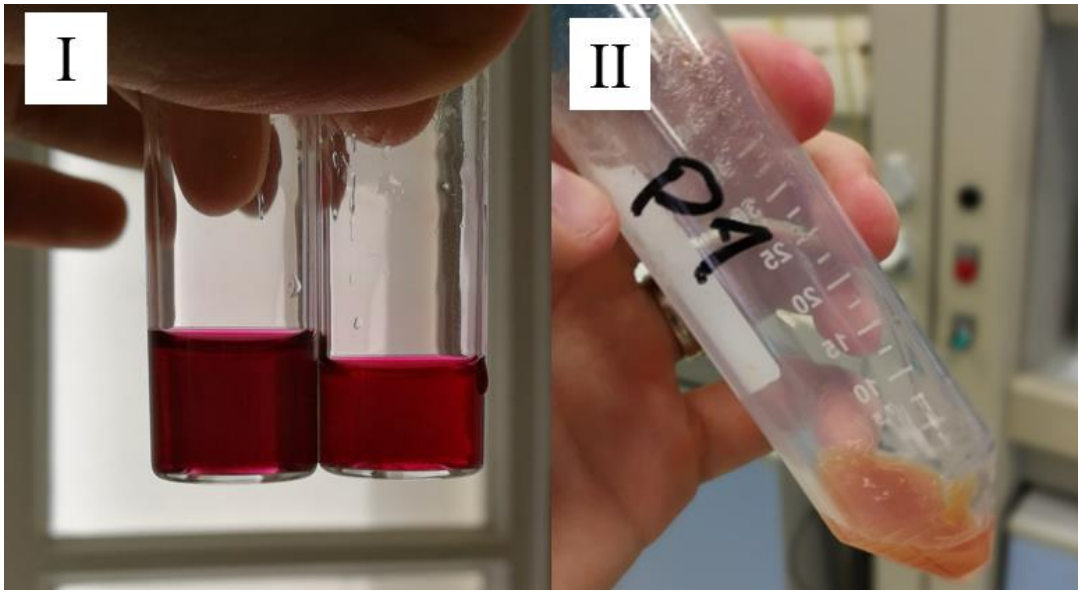
U otopinu kitozana gdje je 200 mg CS otopljeno u 20 mL 5%-tne HAc uz dodatak 20 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline te je miješano pri sobnoj temperaturi (P1) naknadno je dodano 30 mL metanola te je smjesa stavljena na miješanje uz povišenu temperaturu. Gotovo trenutno je došlo do pojave ružičaste boje. U otopinu P1 (ružičasta boja) dodano je Fe(II) ($FeSO_{4(aq)}$) soli u omjeru n (1:1) u odnosu na početnu količinu dodane 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline pri čemu nije došlo do vidljive promjene boje. Takva smjesa stavljena je na refluks te već pri slabom zagrijavanju postala je vidljiva promjena boje dok je nakon 2 sata refluksa otopina postala tamno ljubičasta (crno vino) (Slika 4.).



Slika 4. Smjesa P1 (lijevo); boja smjese P1 nakon 2 sata refluksiranja

Nakon refluksiranja odmjerena su dva alikvota po 1 mL koji su razrijeđeni sa 2 mL vode. U jednu je dodana čista askorbinska kiselina (na vrh špatule) pri čemu je došlo do blage promjene boje, to jest zatamnjenje što je vidljivo na slici 5.

Neutralizacijom P1 otopine pomoću 1M NaOH do pH≈9 i te centrifugiranjem i ispiranjem ultra čistom vodom nastaje gel narančaste boje koja se ne gubi dodatnim ispiranjem vodom. Dodatkom askorbinske kiseline u otopinu P1 gela nije došlo do promjene boje.



Slika 5. usporedba P1 otopine prije (I desno) i nakon dodatka askorbinske kiseline (I lijevo); gel nakon neutralizacije i ispiranja (II)

3.2.2. Priprema gela P3

Sljedeća otopina kitozana (P3) pripremljena je na način da se u 20 mL 5%-tne otopine HAc otopilo 300 mg CS pri temperaturi od 50°C do potpunog otapanja što je trajalo oko 30-45 min. U dodatnih 10 mL 5%-tne otopine HAc odvagano je 30 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline te zagrijavano uz miješanje i naknadno stavljano u ultrazvučnu kupelj, ali nije dolazilo do otapanja.

Iz ovih proba zaključeno je kako je 2,2'- bipiridin-4,4'-dikarboksilna kiselina netopiva u vodi i vodenoj otopini octene kiseline te je njegova topivost ispitana u etanolu, DMF, i DMSO pri čemu se pokazalo da je najbolje topiv u DMF-u.

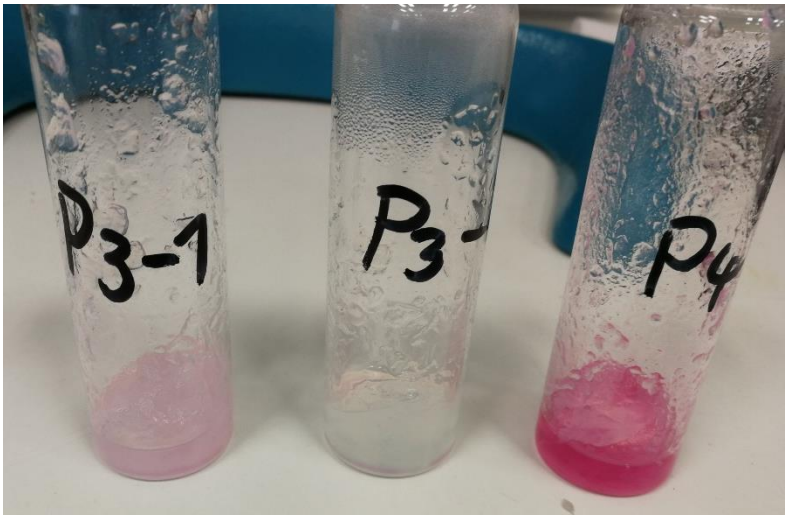
3.2.3. Priprema gela P4

Sljedeća otopina kitozana (P4) pripremljena je otapanjem 300 mg CS u 30 mL 5%-tne HAc. Pripremljena je otopina od 10 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u 10 mL DMF-a. Nakon potpunog otapanja kitozana u alikvot od 10 mL dodavana je otopina 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline kap po kap. Gotovo trenutno je nastalo ružičasto obojenje otopine (Slika 6.). Istovremeno su odmjerena dva alikvota otopine P3 te je u jedan dodana otopina 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u DMF-u (P3-1), a u drugu otopina u DMSO (P3-2) pri čemu su obje bile nepoznate koncentracije i koristile se samo za probu.



Slika 6. otopina P4 nakon dodavanja 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u DMF-u

Nakon 18 sati miješanja uz zagrijavanje odmjereni su alikvoti otopine od 15 mL (P3-1 i P3-2) i 20 mL (P4). Isto je napravljeno i nakon 24 sata miješanja (P3-1*, P3-2* i P4*). Otopine P3-1, P3-1*, P3-2, P3-2* i P4 i P4* neutralizirane su pomoću vodene otopine NaOH (10 mol/L). Ciljani pH nakon neutralizacije bio je između 8 i 9, ali zbog visoke koncentracije NaOH pH nakon neutralizacije iznosio je oko 12. Dodatkom NaOH dolazilo je do vidljivog nastajanja gela (koagulacije) i postupnog obezbojenja otopine (Slika 7.) koje je ovisno o količini dodane lužine.



Slika 7. otopine P3-1 (lijevo), P3-2 (sredina) i P4 (desno) nakon dodatka NaOH.

Svi uzorci presipani su u kivete za centrifugu te centrifugirani na 10 000 rpm 5 minuta pri čemu je došlo do taloženja gela. Supernatant je dekantiran te su uzorci isprani na način da je u njih dodano po 5 mL ultra čiste vode, promiješano na vortex-u i centrifugirano pri 10 000 rpm 10 minuta. Postupak je ponovljen tri puta pri čemu je došlo do postupnog ispiranja roze boje, a nakon trećeg ciklusa ispiranja i do potpunog obezbojenja sva tri uzorka. Svih šest uzoraka stavljeno je u sušionik na 24 sata pri temperaturi od 60°C.

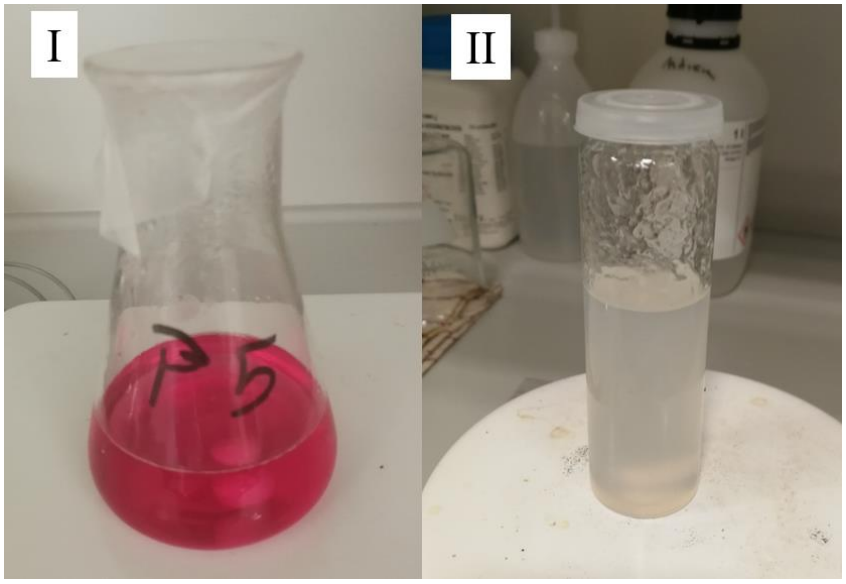
Pripremljena suspenzija P4* gela podijeljena je na dva jednaka dijela te je u jedan dio dodana vodena otopina $Fe(NO_3)_3$ x$9H_2O$, a u drugi vodena otopina $FeSO_4$ x$7H_2O$ tako da omjer Fe(II) i Fe(III) iona budu jednaki broju molova 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline. Množina dikarboksilne kiseline je izračunata s pretpostavkom da je iskorištenje reakcije vezanja dikarboksilne kiseline za kitozan 100%. Dodatkom otopina Fe(II) i Fe(III) soli u suspenziju hidrogela došlo je do gotovo neprimjetnog obojenja (Slika 8.).



Slika 8. Suspenzije hidrogela nakon dodatka Fe(II) i Fe(III) soli.

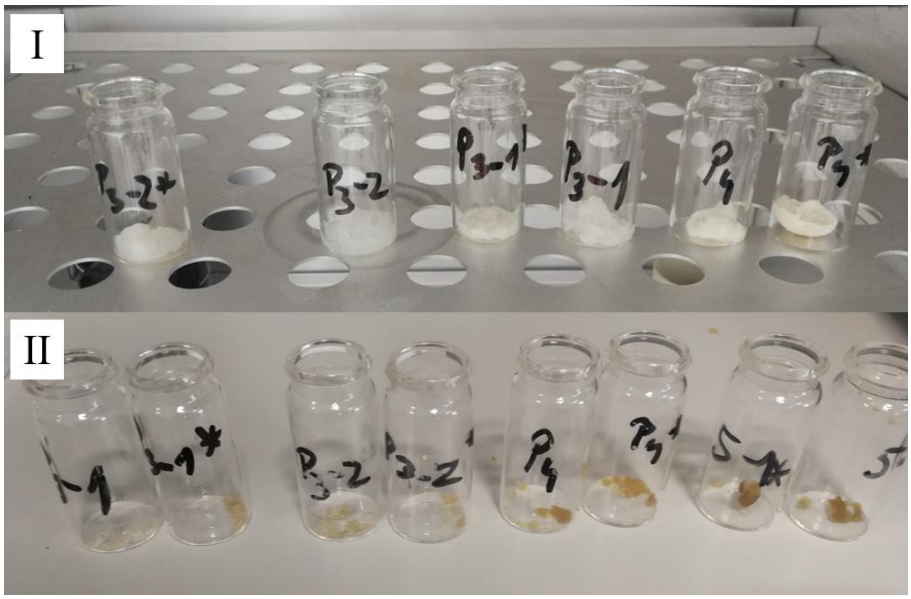
3.2.4. Priprema gela P5

Pripremljena je otopina kitozana P5 otapanjem 300 mg CS u 30 mL 5%-tne HAc. Istovremeno je otopljeno 20 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u DMF-u pri čemu je početni volumen DMF-a bio 10 mL te je postupno dodavano po 5 mL do potpunog otapanja dikarboksilne kiseline. Nakon potpunog otapanja ukupni volumen otopine dikarboksilne kiseline je bio 30 mL te je otopina dodana u prethodno priređenu otopinu kitozana. Nastalo je ružičasto obojena otopina koja je bila u potpunosti transparentna (Slika 9.). Otopina je ostavljena na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje preko noći. Nakon 18 sati miješanja odmjeren je alikvot od 30 mL otopine P5 te neutraliziran pomoću NaOH (c= 10 mol/L) do pH približno 8 (P5). Isto je napravljeno i nakon 24 sata (P5*) te su obje otopine odmah nakon neutralizacije stavljene na centrifugu kako bi se odvojio supernatant od taloga (hidrogela) te su oba uzorka pročišćena ultra čistom vodom uz centrifugiranje, postupak je ponovljen 3 puta.



Slika 9. otopina kitozana P5 prije (I) i nakon neutralizacije (II)

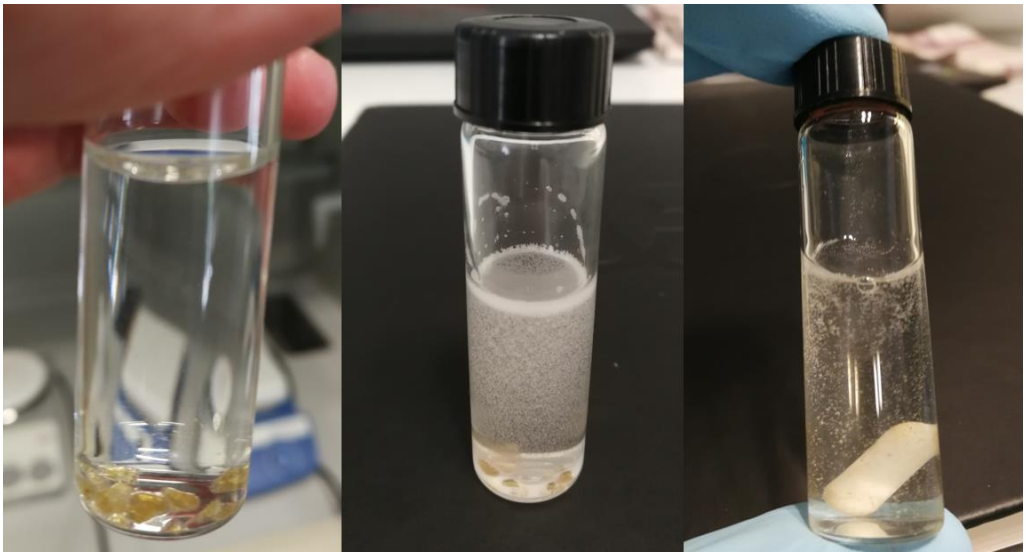
Nakon ispiranja uzorci su stavljeni na sušenje u sušionik na 24 sata pri temperaturu od 60°C. Prije sušenja svi uzorci hidrogela bili su bezbojni (bijeli) dok su sušenjem postali blago žuto-smeđe obojeni (Slika 10.).



Slika 10. Uzorci hidrogelova prije (I) i nakon sušenja (II)

Nakon sušenja svi uzorci su naizgled bili jednaki osim P3-2 koji je jedini zadržao određenu količinu vode te je i na dodir bio djelomično elastičan.

Suspenzija hidrogela pripremljena je na način da se u vijalicu od 8 mL odvagalo 50 mg P4* gela te je dodano 5 mL otopine HAc kojoj je pH iznosio oko 3,5. Suspenzija je miješana pomoću magnetske miješalice i vortex-a te je suspendiranje suhog gela trajalo oko 30 min. Potpunom suspenzijom gela došlo je do vidljivog povećanja viskoznosti (Slika 11.).



Slika 11. Otapanje P4 gela u HAc

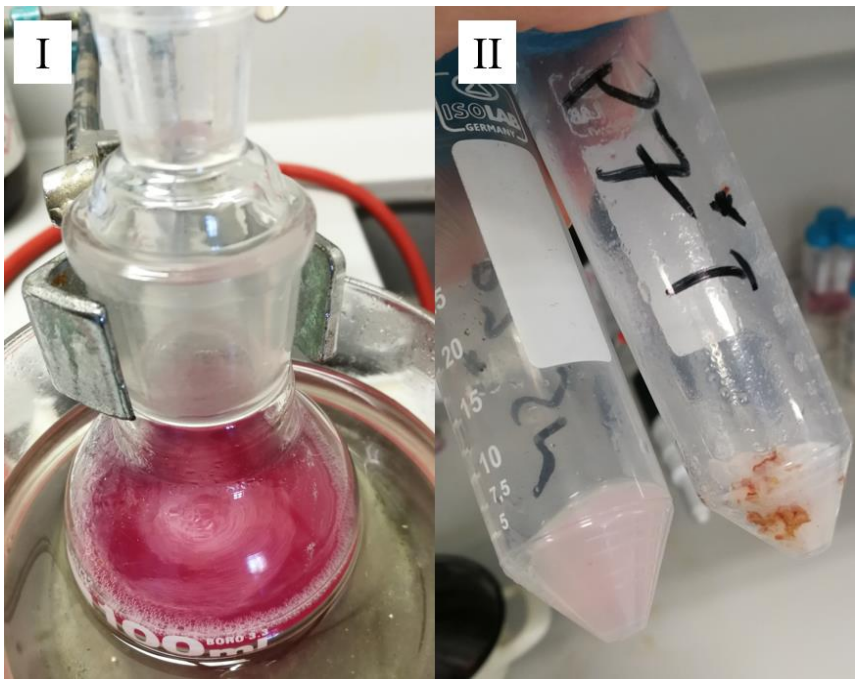
3.2.5. Priprema gela P6

Otopina kitozana P6 pripremljena je u otopini od 0,5 mL ledene octene kiseline, 2 mL vode i 47,5 mL metanola gdje je odvagano 500 mg CS. Smjesa je stavljena na magnetsku miješalicu uz zagrijavanje no nakon više od 2 sata nije došlo do otapanja kitozana te je dodavano je po 0,5 mL ledene HAc i 2 mL vode. Dodatak vode i HAc ponovljen je još jednom te je tek nakon drugog dodatka došlo do potpunog otapanja kitozana. Nakon potpunog otapanja dodano je 5 mL vodene otopine $FeSO_4$ x7H_2O (c=0,01 mol/L) te nakon dodataka soli dodana je suspenzija 10 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u 10 ml metanola. Za razliku od priprave prijašnjih gelova kod P6 prvo je dodavala Fe(II) sol, a tek nakon toga se gel umrežavao pomoću dikarboksilne kiseline. Dodatkom dikarboksilne kiseline nije došlo do nastajanja kompleksa. Ovakva otopina stavljena je na refluks pri čemu je došlo do nastajanja ljubičastog obojenja. Uz obojenje otopine došlo je i do nastajanja vrlo tvrdih i intenzivno ljubičasto obojenih komadića gela. Nakon toga smjesa je neutralizirana pomoću 1M NaoH do pH≈8. Nakon neutralizacije smjesa je centrifugirana

10 min na 10000 rpm pri čemu je došlo do razdvajanja na tri faze: talog (vrlo čvrsti gel), meki gel i supernatant. Ispiranjem taloga ultra čistom vodom po prvi puta nije došlo do obezbojenja gela.

3.2.6. Priprema gela P7

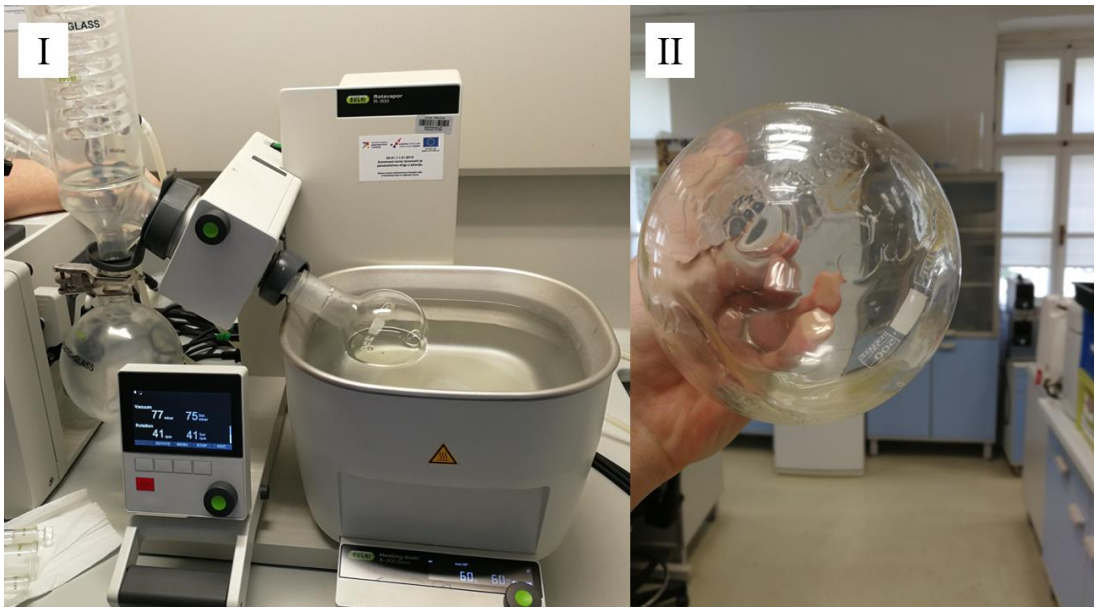
Otopina P7 pripremljena je otapanjem 500 mg CS u 50 mL 5%-tne HAc te nakon potpunog otapanja dodana je suspenzija od 10 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u 10 mL metanola. Pripremljena P7 smjesa stavljena je na refluks (Slika 12 I.). Nakon 18 sati odmjereno je 25 mL smjese te je neutralizirano pomoću NaOH (c=1 mol/L). Korištena je manje koncentrirana otopina NaOH u odnosu na prijašnje neutralizacije jer se neutralizacija pomoću 10M NaOH do pH≈8 pokazala gotovo nemogućom. Neutralizacijom pomoću 1M NaOH uspješno je dobiven pH≈8 te je uzorak nakon neutralizacije centrifugiran pri 10000 rpm 10 min. Nakon dekantiranja uzorak je ispiran ultra čistom vodom tri puta. Nakon 36 sati refluksiranja ostatak otopine je također neutraliziran i ispran ultra čistom vodom uz centrifugiranje. Zaostali hidrogel je većinom bio bezbojan ali dijelovi su bili narančasto-smeđe boje (Slika 12. II). Nakon ispiranja P7 gela odvagano je 60 mg još neosušenog gela koji je otopljen u 2 mL 2,5%-tne HAc. U priređene suspenzije gela dodane su vodene otopine Fe(II) i Fe(III) soli pri čemu nije došlo do nastajanja kompleksa.



Slika 12. priprema otopine P7 na refluksu (I); obojeni talog nakon neutralizacije i ispiranja (II)

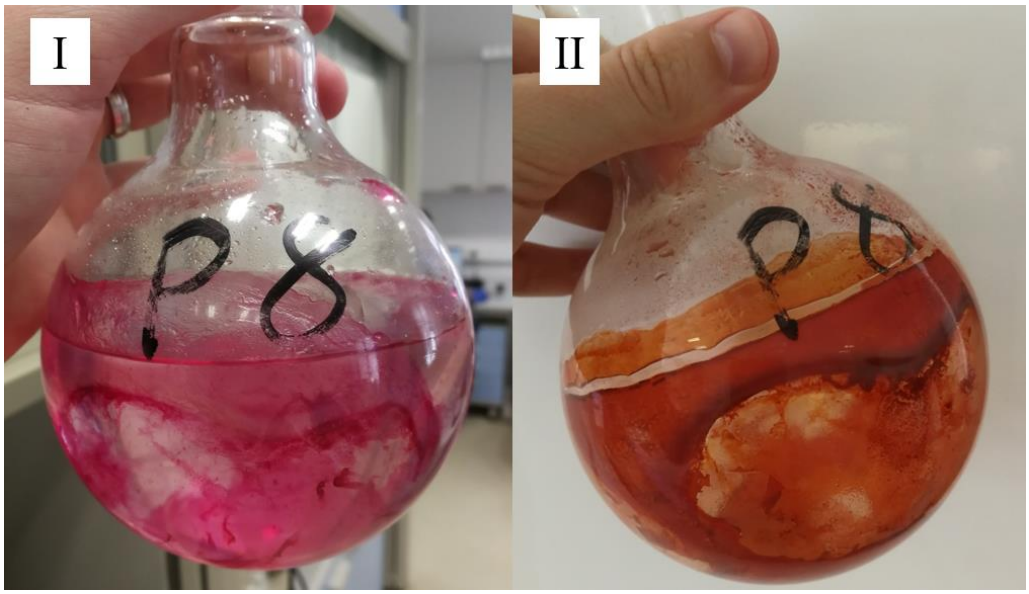
3.2.7. Priprema gela P8

P8 gel pripremljen je otapanjem 500 mg CS u 50 mL 1%-tne HAc te nakon potpunog otapanja kitozana otopina je presipana u okruglu tikvicu od 500 mL te je otopina stavljena na rotirajući evaporator (Slika 13. I) kako bi došlo do otparivanja većine octene kiseline uz nastajanje tankog filma gela po stijenkama tikvice (Slika 13. II). Nakon otparivanja uzorak je ostavljen preko noći kako bi došlo do dodatnog sušenja gela nakon čega je gel ispiran 96% etanolom tri puta po 5 mL te je isto napravljeno s vodom.



Slika 13. uparavanje P8 uzorka na rotirajućem evaporatoru (I); Film kitozana nakon ispiranja etanolom i vodom (II)

Nakon ispiranja filma kitozana u tikvicu je dodano 10 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u 300 mL metanola. Koristio se velik volumen otapala kako bi se pokrilo što više filma. Nakon dodavanja dikarboksilne kiseline u metanolu cijela smjesa stavljena je na refluks 6 sati. Tokom refluksiranja došlo je do obojenja gela u ružičasto (Slika 14. I) pri čemu je otapalo (MeOH) ostalo bezbojno. Nakon refluksiranja P8 gela u metanolu, metanol je dekantiran te je hidrogel tri puta ispran metanolom u obrocima od 5 ml nakon čega je isto ponovljeno i s vodom. U tikvicu je zatim dodana vodena otopina Fe(II) soli (1,138 g $FeSO_4$ x7H_2O u 300 mL H_2O) te je cijela smjesa stavljena na refluks preko noći pri čemu je došlo do obojenja gela u tamno narančastu (Slika 14. II).



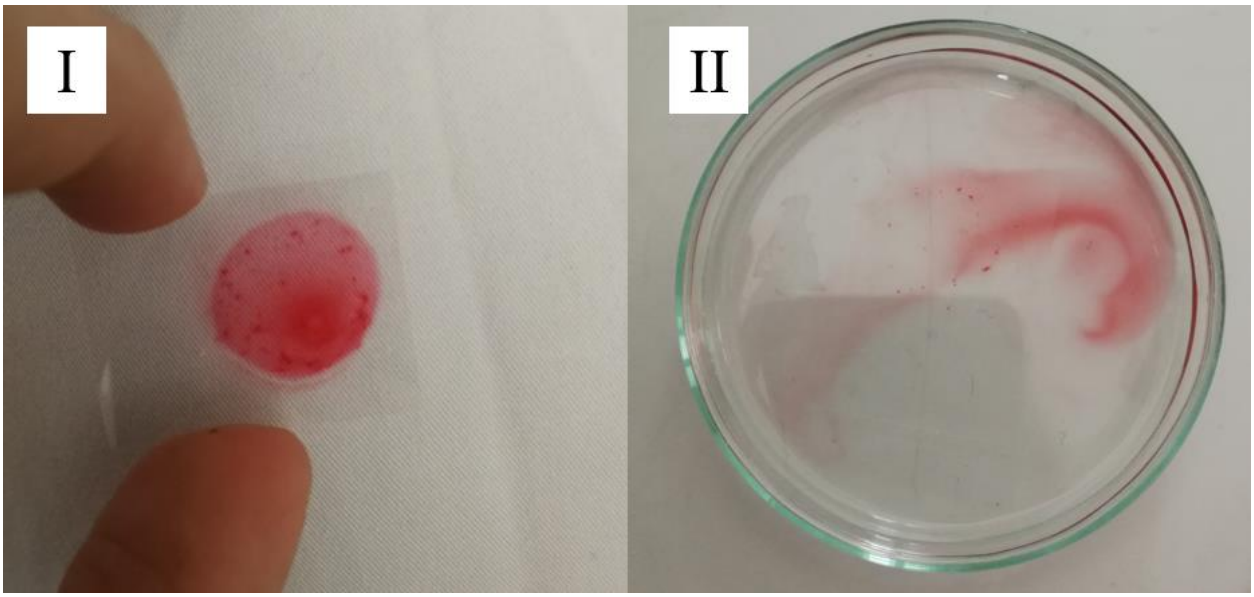
Slika 14. I- tanki film kitozana nakon refluksiranja 6h uz 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilnu kiselinu u metanolu; II- tanki film umreženog gela nakon refluksiranja u vodenoj otopini $FeSO_4$

Otapanjem 20 mg kompleksiranog gela u 5 mL 5%-tne HAc te dodatkom Askorbinske i urične kiseline ne dolazi do promjene boje. Dodatkom TPTZ-a koji služi kao pomoćni ligand za vezano željezo dolazi do trenutnog nastajanja ljubičaste boje, ali dolazi i do razdvajanja faza. Nakon što se sav P8 gel u potpunosti osušio sastrugan je sa stjenki tikvice i prebačen u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL. U okruglu tikvicu gdje se nalazio P8 hidrogel dodano je 200 mL 1%-tne HAc kako bi se što više gela otopilo nakon čega je ta smjesa presipana u Erlenmeyerovu tikvicu u kojoj se nalazi ostatak P8 hidrogela. Sva količina stavljena je na magnetsku miješalicu na sobnoj temperaturi 5 dana, no nije došlo do potpunog otapanja gela. Nakon tog vremena neotopljeni gel je odvojen od ostatka otopine.

3.2.8. Priprema gela P9

P9 otopina kitozana pripremljena je otapanjem 50 mg CS u 5 mL HAc (pH≈5). Nakon potpunog otapanja u pola P9 otopine dodana je prethodno priređena otopina 2,2- bipiridina i Fe(II) soli ($FeSO_4$) u metanolu. Od čistog P9 i od dodatno kompleksiranog P9 gela napravljeni su tanki filmovi na predmetnim stakalcima. Svi filmovi stavljeni su na sušenje 2 sata pri 60°C. Jedan suhi,

kompleksirani P9 gel (Slika 15. I) uronjen je u vodu te je gotovo trenutno došlo do difuzije kompleksa u vodu (Slika 15. II).



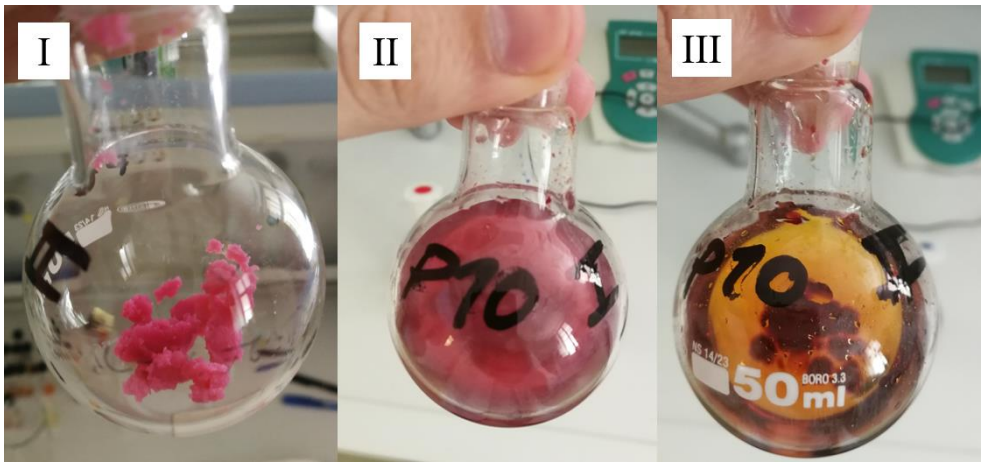
Slika 15. suhi P9 gel (+ 2,2-bipiridin) (I); gel nakon uranjanja u vodu (II) pri čemu se uzorak nalazi na dnu satnog stakalca te je vrlo slabo vidljiv dok se kompleks isprao iz gela te se otopio u vodi (II-crveno)

Zatim su priređene tri otopine glutaraldehida različitih koncentracija: 25%, 15% i 10%; razrijeđenje se radilo 96% etanolom. U svaku otopinu glutaraldehida je uronjen jedan film na stakalcu kako bi došlo do dodatnog umrežavanja gela pri čemu bi se 2,2-bipiridinski kompleks zarobio u gelu. Nakon 30 minuta su gelovi izvađeni iz otopina glutaraldehida te su isprani 96% etanolom i sušeni na zraku. Nakon toga prvi je uronjen u vodu prilikom čega nije došlo do ispiranja kompleksa. Na preostala dva gela nakapane su otopine askorbinske kiseline i H_2O_2, ali niti u jednom slučaju nije došlo do promjene boje.

3.2.9. Priprema gela P10

P10 otopina kitozana pripremljena je otapanjem 500 mg CS u 50 mL 2,5%-tne HAc uz stalno miješanje pri temperaturi od otprilike 50°C. Nakon potpunog otapanja kitozana i hlađenja do sobne temperature otopina je neutraliziran do pH≈8-9 pomoću NaOH (c= 2 mol/L). Dobiveni gel je centrifugiran kako bi se odvojio talog od supernatanta te je talog (gel) ispiran ultra čistom vodom uz miješanje na vortex-u nakon svakog dodatka vode te centrifugiran 10 min na 10000 rpm pri

čemu se dobio čisti gel. Dobiveni gel stavljen je u tikvicu od 100 mL uz dodatak 30 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline suspendirane u 30 mL metanola. Sve zajedno stavljeno je na refluks preko noći. Refluks je trajao oko 20 sati pri čemu je došlo do obojenja gela u ružičasto (Slika 16. I) dok je metanol ostao bezbojan. Dobiveni umreženi hidrogel ispiran je metanolom i vodom dva puta po 5 mL uz centrifugiranje. Hidrogel je odvagan i podijeljen na 2 jednaka dijela u okrugle tikvice od 50 mL. U jednu tikvicu dodano je $6{,}14 \times 10^{-3}$ mol $FeSO_4$ (P10-I), a u drugu $6{,}14 \times 10^{-3}$ mol $FeCl_3$ (P10-II) otopljenih u 30 mL vode. Obje tikvice su prvo stavljene 15 min u ultrazvučnu kupelj pri čemu je u P10-I došlo do ljubičastog obojenja otopine i gela (Slika 16. II), a kod P10-II obojenja gela u smeđe-narančastu boju (Slika 16. III).



Slika 16. P10 gel nakon ispiranja vodom (I), nakon dodatka Fe(II) soli (II) i nakon dodatka Fe(III) soli (III)

Zatim su obje smjese stavljene na refluks preko noći. Nakon 20 sati oba uzorka su skinuta s refluksa te nakon hlađenja na sobnu temperaturu su centrifugirani kako bi se odvojio dobiveni kompleksirani hidrogel od supernatanta. Nakon dekantiranja supernatanta oba gela su ispirana s etanolom uz centrifugiranje nakon čega su dobiveni čisti hidrogelovi koji sadrže kompleksirane Fe(II) (P10-I) i Fe(III) (P10-II) ione.

3.3. Kompleksiranje iona željeza u hidrogelu

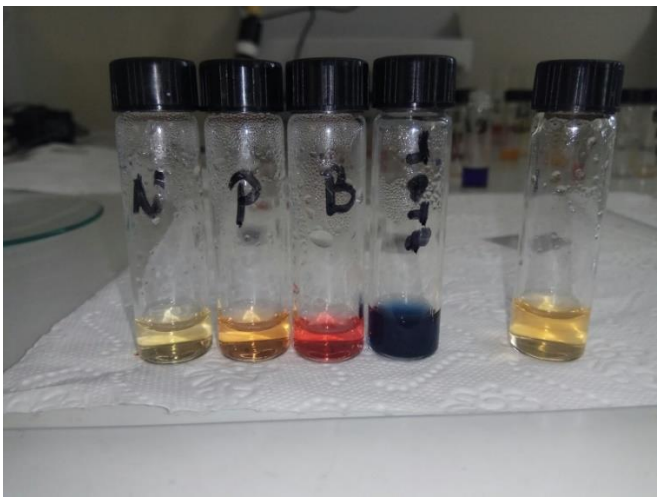
Kako bi se potvrdilo kopleksiranje željeza pomoću 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u dvije odvojene posudice pripremljene su smjese dikarboksilne kiseline u 96% etanolu uz dodatak 5%-tne HAc. U jednu posudicu dodana je vodena otopina Fe(II) soli, a u drugu Fe(III) soli.

Trenutno nije došlo do obojenja niti jedne otopine, ali je zagrijavanjem dolazilo do postupnog kompleksiranja željeza, a time i nastanka intenzivne ljubičaste boje.

Ispitivanjem osjetljivosti gelova na djelovanje antioksidanasa kao što su askorbinska i urična kiselina pokazalo se kako uglavnom nema promjene boje. Kako bi se dobila željena osjetljivost na antioksidanse u otopine gelova dodavani su pomoćni ligandi koji bi trebali dodatno kompleksirati željezo koje je već vezano za 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilnu kiselinu unutar hidrogela. U ovu svrhu koristili su se 2,2-bipiridin (B) i 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), 1,10-fenantrolin (P) i 4,7-difenil-1,10-fenantroline (N) (Slika 17.)

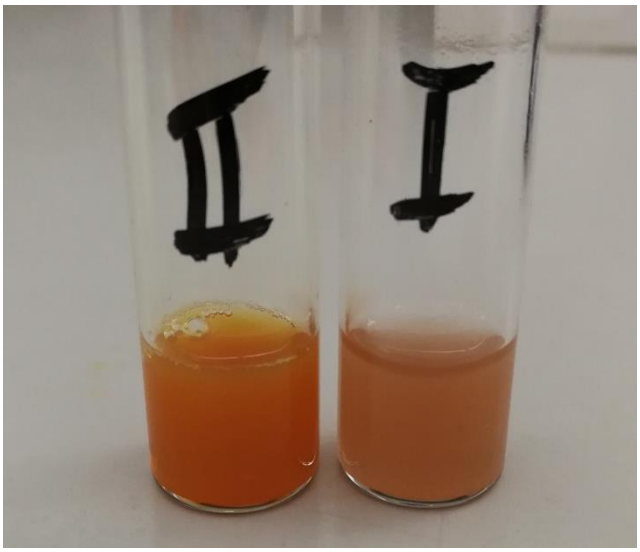
3.4. Korištenje pomoćnih liganada

Pripremljena je suspenzija P8 hidrogela u 1 mol/L otopini HCl-a koja je podijeljena na pet dijelova. Jedan dio suspenzije je ostavljen bez dodatka pomoćnog liganda (Slika 17. neoznačena vijalica). U slijedeće 4 je redom dodano 4,7-difenil-1,10-fenantroline (Slika 17. oznaka „N“), 1,10-fenantrolin (Slika 17. oznaka „P“), 2,2-bipiridin (Slika 17. oznaka „B“) i TPTZ (Slika 17. oznaka „TPTZ“). P8 hidrogel nije odvagan jer je ova proba služila kao „proof of concept“ nastajanja kompleksa.



Slika 17. P8 hidrogel suspendiran u 1M HCl-u (bez oznake) uz dodatak pomoćnih liganada 4,7-difenil-1,10-fenantroline (N), 1,10-fenantrolin (P), 2,2-bipiridin (B) i TPTZ

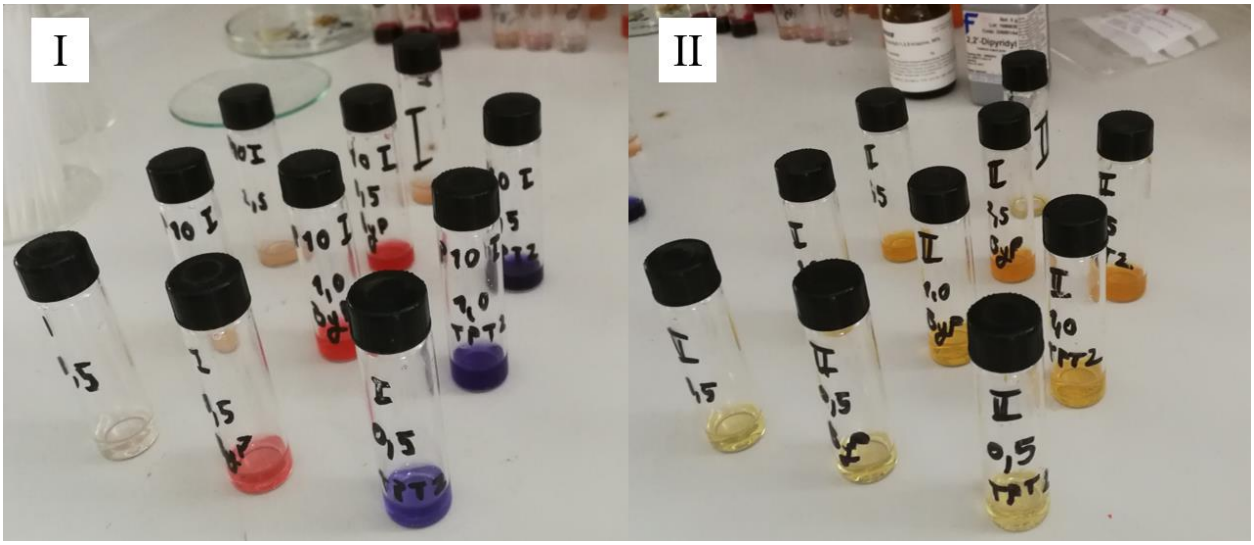
Odvagano je po 20 mg P10-I i P10-II gela i suspendirati u 4 mL 2,5%-tne HAc u vijalicama od 8 mL. Oba uzorka staviti 20 min u ultrazvučnu kupelj. Disperzijom gela u otopini HAc nastaju narančaste otopine (Slika 18.).



Slika 18. pripremljene suspenzije P10-I (desno) i P10-II (lijevo) u 2,5% HAc

Priređena P10-I otopina podijeljena je na tri jednaka dijela, u jedan je dodan 2,2-bipiridin nakon čega je došlo do prijelaza boje iz narančaste u crvenu. U drugi dio dodan je TPTZ-a čime je nastalo plavo-ljubičasto obojenje. U treći dio nije dodavan pomoćni ligand kako bi postojala referenca za usporedbu boje. Od sve tri priređene otopine napravljene su još dva dodatna razrjeđenja (2,5 mg/mL; 1,0 mg/mL i 0,5 mg/mL) (Slika 19.I).

Priređena P10-II otopina je također podijeljena na tri jednaka dijela, u jedan je dodan 2,2-bipiridin, a u drugi dio dodan je TPTZ-a. Dodatkom liganada niti u jednom slučaju nije došlo do promjene boje. U treći dio nije dodavan pomoćni ligand kako bi postojala referenca za usporedbu boje. Kao i kod P10-I sve tri priređene otopine napravljene su još dva dodatna razrjeđenja (2,5 mg/mL; 1,0 mg/mL i 0,5 mg/mL) (Slika 19. II).



Slika 19. Priređene otopine P10-I hidrogela (lijevo), uz dodatak 2,2-bipiridina (sredina) i TPTZ (desno) pri različitim razrjeđenjima (I); Priređene otopine P10-II hidrogela (lijevo), uz dodatak 2,2-bipiridina (sredina) i TPTZ (desno) pri različitim razrjeđenjima (II)

Priređena je otopina askorbinske kiseline ($c=5x10^{-4}$) te je dodavano po 0,5 mL u vijalice koje sadrže P10-II i pomoćne ligande. Dodatkom askorbinske kiseline u gel koji ne sadrži pomoćne ligande nije došlo do promjene boje dok je dodatkom kiseline u gel gdje je dodan 2,2-bipiridn gotovo trenutno nastalo crveno obojenje, a dodatkom kiseline u gel gdje je dodan TPTZ došlo do nastajanja ljubičasto-smeđeg obojenja (Slika 20.).



Slika 20. Priređene otopine P10-II hidrogela (lijevo), uz dodatak 2,2-bipiridina (sredina) i TPTZ (desno) pri različitim razrjeđenjima (II) nakon dodatka askorbinske kiseline.

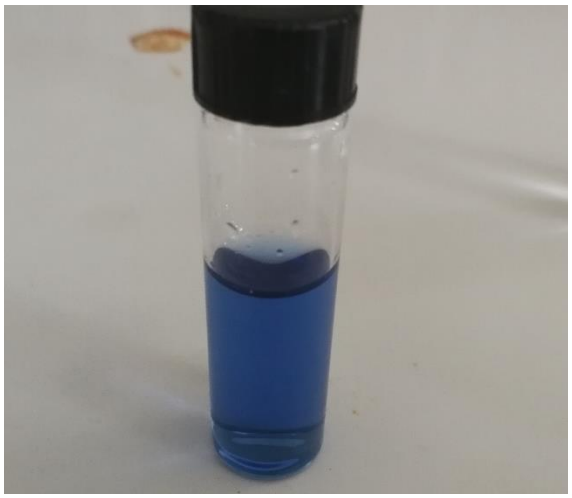
3.5. Priprema tankih filmova

U vijalicu je odvagano 19 mL P10-II hidrogela i dispergirano u 2 mL 2,5%-tne HAc uz pomoć ultrazvučne kupelji nakon čega je uzorak podijeljen na dva jednaka dijela. U jedan je dodan 2,2-bipiridin, a u drugi TPTZ na vrh špatule te su oba uzorka stavljena na ultrazvučnu kupelj. Nakon 15 minuta po 0,1 mL svakog uzorka nanesen je na predmetno stakalce i stavljen na sušenje u sušionik pri 50°C dok se nisu u potpunosti osušili. Na ovaj način pripremljeno je po 3 tanka filma svakog uzorka.

Nakon što su se uzorci osušili jedan film koji sadrži TPTZ uronjen je u otopinu askorbinske kiseline ($c=5x10^{-4}$) pri čemu je došlo do trenutne promjene boje (iz narančaste u plavu), ali je istovremeno došlo do ispiranja kompleksa iz gela u otopinu. Umrežavanjem u glutaraldehidu dolazi do iste pojave ispiranja kompleksa.

3.6. Priprema suspenzije u HCl-u

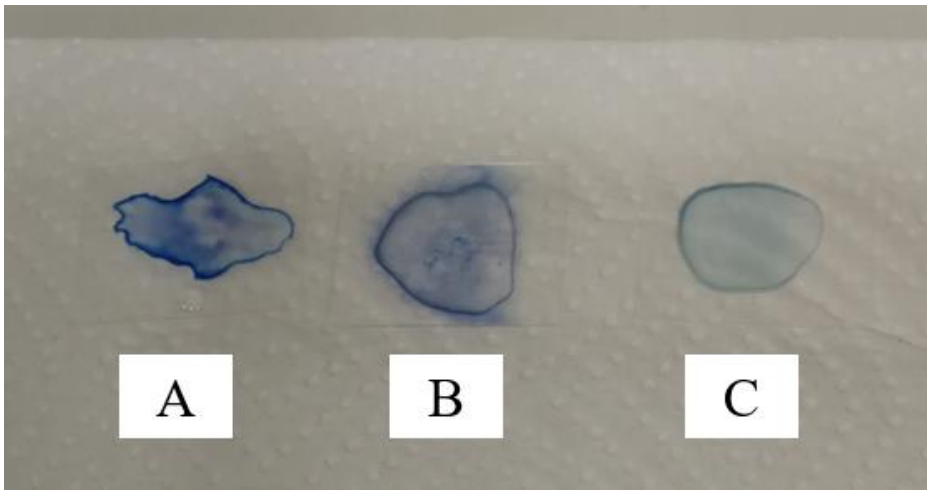
500 mg P8 hidrogela, koji se nije uspio otopiti u 5%-tnoj HAc, je odvagano i dispergirano u 50 mL HCl (c=1 mol/L). Odvagano je 40 mg TPTZ-a u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL te je u nju odmjereno 10 mL priređene suspenzije P8 hidrogela u HCl-u i zatim je dodano još 10 mL vode (Slika 21).



Slika 21. pripremljeni P8* hidrogel u 1M HCl-u uz dodatak TPTZ-a

Po 0,1 mL P8* gela koji je prethodno oksidiran 0,01% vodikovim peroksidom je naneseno na predmetna stakalca te su stavljeni u sušionik na 50°C. Nakon potpunog sušenja dobiveni su tanki

filmovi hidrogela. Dodatkom vodene otopine askorbinske i uričnе kiseline na film gela dolazi do trenutne pojave tamno plave boje pri čemu ne dolazi do razdvajanja faza to jest ispiranja kompleksa (Slika 22.).



Slika 22. tanki film oksidiranog P8* hidrogela (C). tanki film oksidiranog P8* hidrogela nakon dodatka uričnе kiseline (A) i askorbinske kiseline (B)

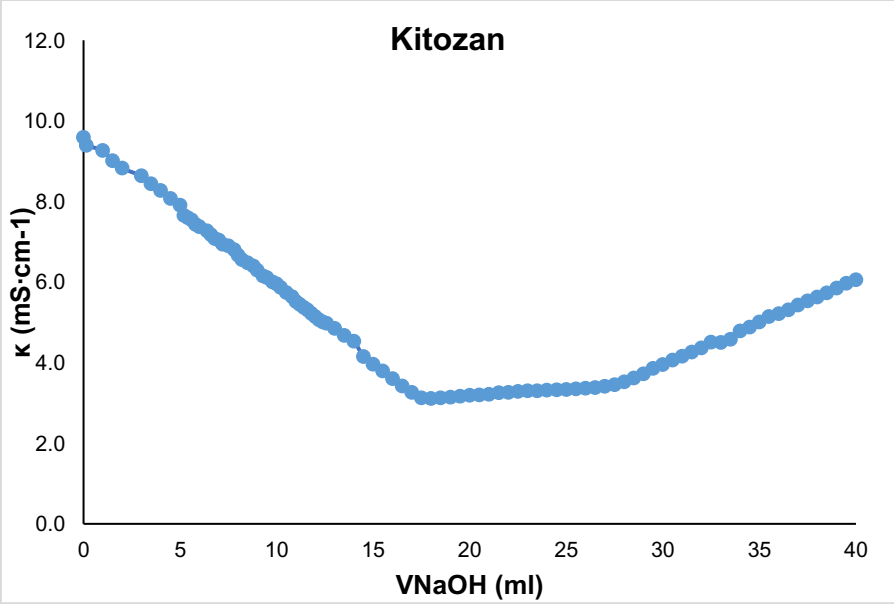
3.7. Karakterizacija hidrogela

3.7.1. Konduktometrijsko određivanje stupnja Deacetilacijom

Konduktometrijskom titracijom kitozana otopljenog u HCl-u vodenom otopinom NaOH dobije se tipična krivulja vidljiva na slici 23. Ovakva krivulja može se podijeliti na tri glavna dijela: Prvi dio predstavlja neutralizaciju slobodnog HCl-a unutar otopine kitozana pri čemu dolazi do smanjenja električne provodnosti dodatkom NaOH (Na^+ ioni su veći od H^+ iona). Drugi dio predstavlja neutralizaciju protoniranih amino skupina kitozana pri čemu provodnost raste (Na^+ ioni su pokretniji u odnosu na protonirani kitozan). Treći dio predstavlja dodatak suviška Na^+ i OH^- iona u otopinu pri čemu provodnost raste zbog povećanog broja samih iona u otopini.

3.7.2. Konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije kitozana

Odvagano je 50 mg čistog CS te je otopljen u 2,5 ml 2%-tne octene kiseline uz konstantno miješanje na sobnoj temperaturi 24 sata. Slijedeće je u otopinu kitozana dodavana 5%-tnom otopinom NaOH do prestanka taloženja kitozana. Kitozan je odvojen od supernatanta i ispiran vodom do neutralnog pH nakon čega je sušen pri 40°C pri atmosferskom tlaku, a zatim u vakuumu. 0,2 g osušenog kitozana je odvagano i otopljeno u 40 ml 0,05 mol/L HCl uz miješanje. Nakon 18 h dodano je još 100 ml vode te je provedena konduktometrijska titracija s 0,1 mol/L NaOH. Slika 23 predstavlja dobivenu konduktometrijsku krivulju titracije kitozana.



Slika 23. konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije čistog kitozana

$$X_D = 100M_A \cdot \frac{\Delta V \cdot C_{NaOH}}{\Delta V \cdot C_{NaOH} \cdot \Delta M + W_{CHIT} \cdot m_s} \quad (1)$$

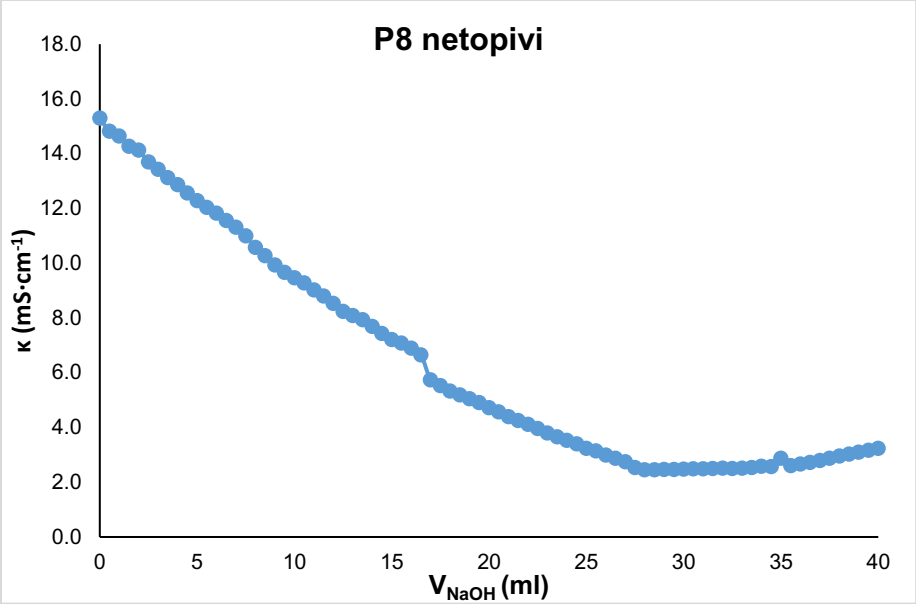
Tablica 1.Parametri povezani s kemijskom strukturom kitozana

Parametri	Vrijednost
Molarna masa ugljika	12.0107 g mol^{-1}
Molarna masa vodika	1.00794 g mol^{-1}
Molarna masa kisika	15.9994 g mol^{-1}
Molarna masa dušika	14.0067 g mol^{-1}
Molarna masa deacetilirane jedinice ($C_6H_{11}O_4N$), MD	161.1558 g mol^{-1}
Molarna masa acetilirane jedinice ($C_8H_{13}O_5N$), MA	203.1925 g mol^{-1}
ΔM	42.0367 g mol^{-1}
Broj C atoma po deacetiliranoj jedinici, nC,D	6
Broj C atoma po acetiliranoj jedinici, nC,A	8

Stupanj deacetilacije određen je pomoću jednadžbe 1. uz korištenje tabličnih vrijednosti kitozana iz tablice 1. pri čemu je dobivena vrijednost od X_D=80,77% za čisti kitozan.

3.7.3. Konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije hidrogela

Prethodno umreženi P8 hidrogel osušen je prvo u sušioniku, a zatim i u vakuumu pri 40°C. Nakon sušenja odvagano je 51 mg uzorka hidrogela te je dispergiran u 10 mL 0.01 mol/L HCL-a nakon čega je dodano 100 mL vode te je provedena konduktometrijska titracija s 0,025 mol/L NaOH. Slika 24 predstavlja dobivenu konduktometrijsku krivulju titracije hidrogela.



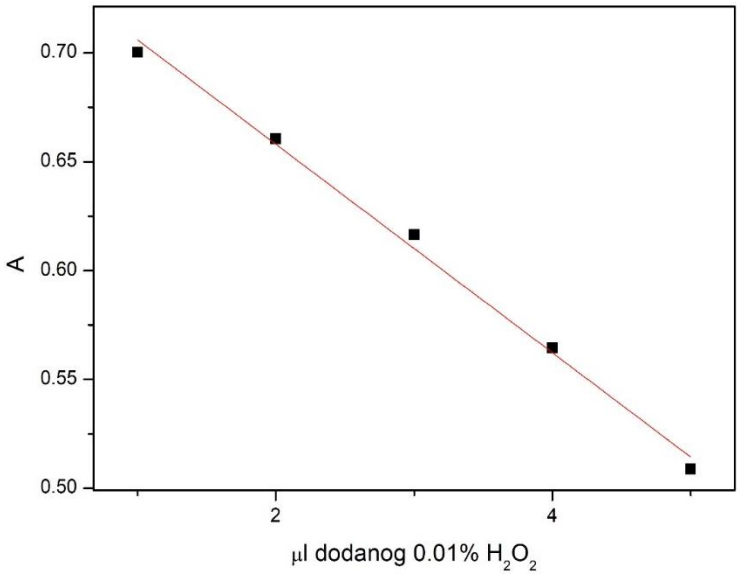
Slika 24. konduktometrijsko određivanje stupnja deacetilacije P8 hidrogela

3.7.4. Spektrofotometrijska analiza

dispergirano je 500 mg P8 hidrogela u 50 ml 1 mol/L HCl-a te je dodano 40 mg TPTZ-a a nakon potpunog otapanja je kompletni uzorak razrijeđen s još 10ml vode. U vijalice od 8 mL priređene su suspenzije P8 hidrogela po tablici 2. Spektrofotometrijska analiza odrađena je 30 min nakon dodatka H_2O_2. Pri analizi je mjeren maksimum apsorbancije pri 620 nm što odgovara A_{max} hidrogel-2,2'-bipiridin-Fe(II)-TPTZ kompleksa (Slika 25).

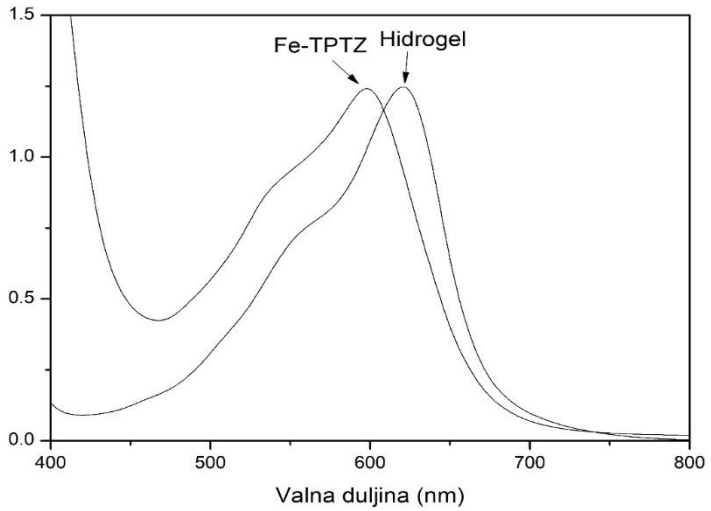
Tablica 2. Priprema P8 hidrogela za spektrofotometrijsku analizu uz dodatak 0,01% H_2O_2

Uzorak	P8*/µL	H_2O/µL	H_2O_2/µL
1	1000	495	5
2	1000	490	10
3	1000	485	15
4	1000	480	20
5	1000	475	25

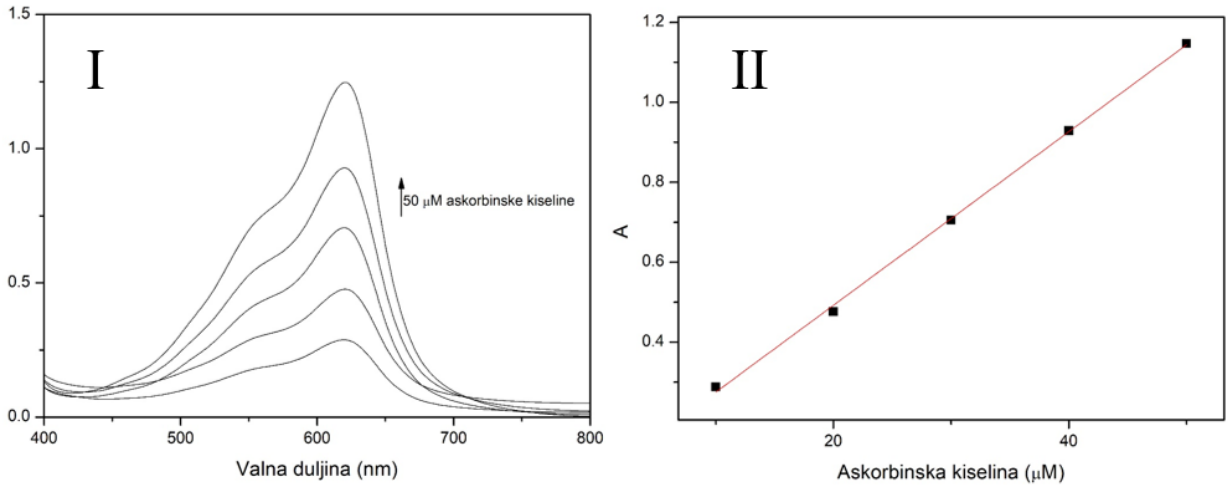


Slika 25. spektrofotometrijska analiza oksidacije suspenzije P8* hidrogela na 620 nm

U 5 mL P8* hidrogela dodano je 15 μL 1%-tnog H_2O_2 te je ostavljen preko noći. Tako oksidirani P8* hidrogel korišten je za spektrofotometrijsku analizu redukcije hidrogela askorbinskom kiselinom ($c=5x10^{-3}$ mol/L). U 1,5 mL oksidiranog gela dodavana je askorbinska kiselina u obrocima od 5 μL Dodano je ukupno 10 μL, 15 μL, 20 μL i 25 μL. Spektar je sniman odmah nakon dodatka askorbinske kiseline. Apsorbancija je snimana od 800 do 300 nm pri čemu je A_{max}=620 nm što odgovara apsorbancijskom maksimumu hidrogel-2,2'-bipiridin-Fe(II)-TPTZ kompleksa dok je apsorbancijski maksimum čistog Fe(II)-$TPTZ_2$ kompleksa pri nešto nižim valnim duljinama ($A_{max}\approx$ 589 nm) (Slika 26). Snimljeni spektar pokazuje rast apsorbancije pri 620 nm dodatkom askorbinske kiseline (Slika 27. I). Ovisnost apsorbancije o količini dodane askorbinske kiseline je linearan (Slika 27. II)

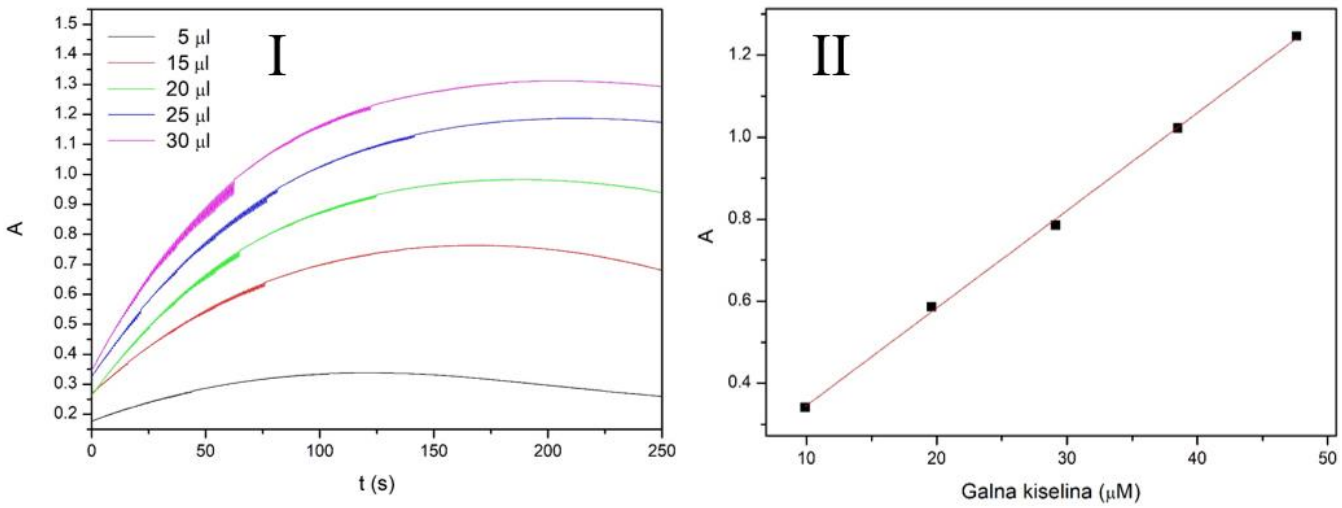


Slika 26. usporedba Fe-TPTZ u otopini i u hidrogelu



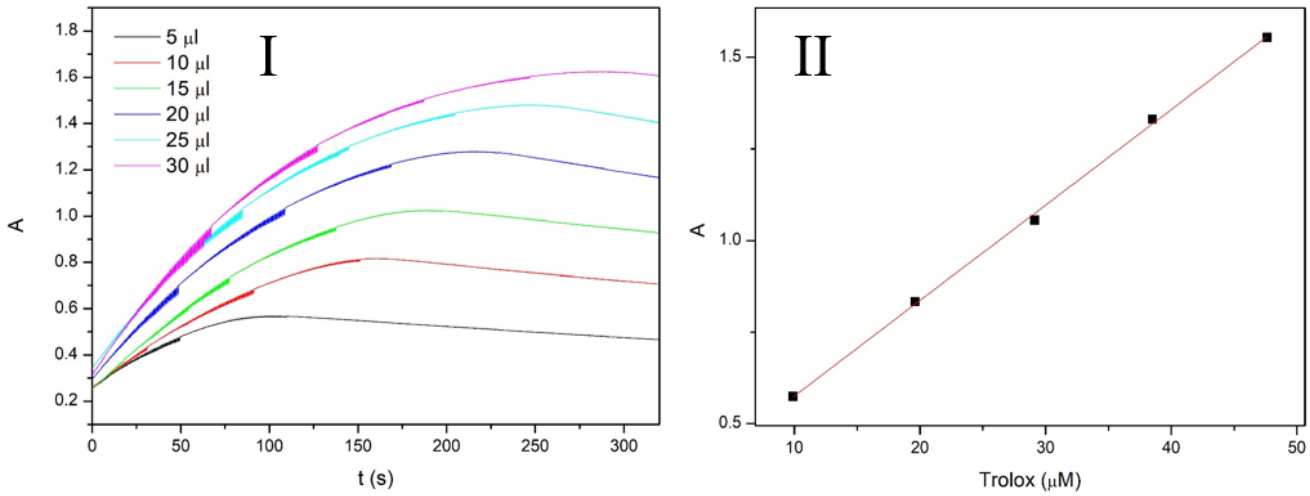
Slika 27. I- spektar redukcije hidrogela koji sadrži Fe(III)-TPTZ kompleks askorbinskom kiselinom; II- Ovisnost apsorbancije o količini dodane askorbinske kiseline iz I

U vijalice od 8 mL pripremljeno je 5 uzoraka po 0,5 mL prethodno oksidiranog hidrogel-2,2'-bipiridin-Fe(II)-TPTZ komplexa.. Priređena je otopina galne kiseline ($c=1x10^{-3}$). u svaku vijalicu je neposredno prije mjerenja dodan određen volumen galne kiseline, uzorak je dobro promućkan i presipan u kivetu te je praćena vremenska ovisnost apsorbancije pri 620 nm. Dobiveni spektar (Slika 28. I) prikazuje postepeni porast apsorbancije koji traje oko 150 sekundi nakon čega dolazi do ponovne oksidacije hidrogela i ponovnog smanjenja apsorbancije. Ovisnost apsorbancije o količini dodane galne kiseline također je linearna (Slika 28. II).



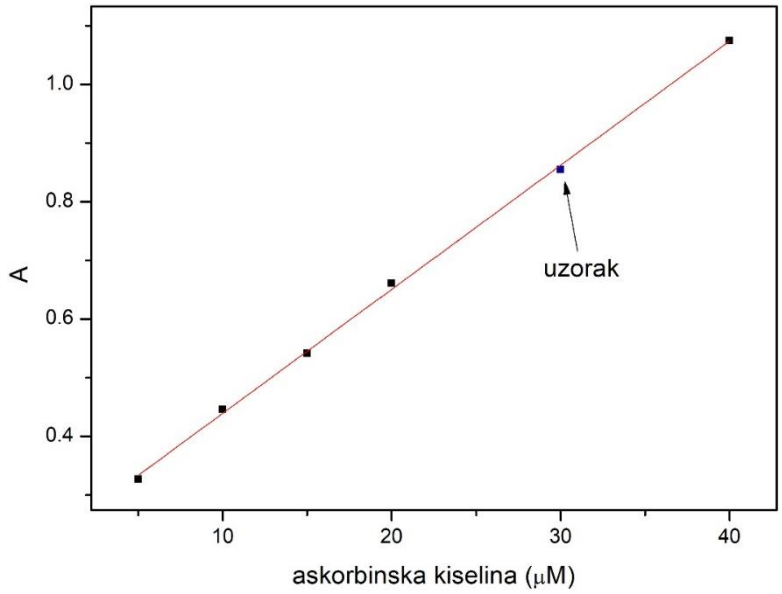
Slika 28. I-Vremenski ovisna promjena apsorbancije hidrogela nakon dodatka različite koncentracije galne kiseline; II- Ovisnost apsorbancije o količini dodane galne kiseline y=0,0238+0,10742 R2=0,9989

U vijalice od 8 mL pripremljeno je 5 uzoraka po 0,5 mL prethodno oksidiranog P8* hidrogela.. Priređena je otopina trolox-a u 96%-tnom etanolu ($c=1x10^{-3}$). u svaku vijalicu je neposredno prije mjerenja dodan određen volumen otopine trolox-a, uzorak je dobro promućkan i presipan u kivetu te je praćena vremenska ovisnost apsorbancije pri 620 nm. Dobiveni spektar (Slika 29. I) prikazuje postepeni porast apsorbancije koji je ovisan o količini dodanog trolox-a nakon čega dolazi do ponovne oksidacije hidrogela i ponovnog smanjenja apsorbancije. Ovisnost apsorbancije o količini dodanog trolox-a također je linearna (Slika 29. II).



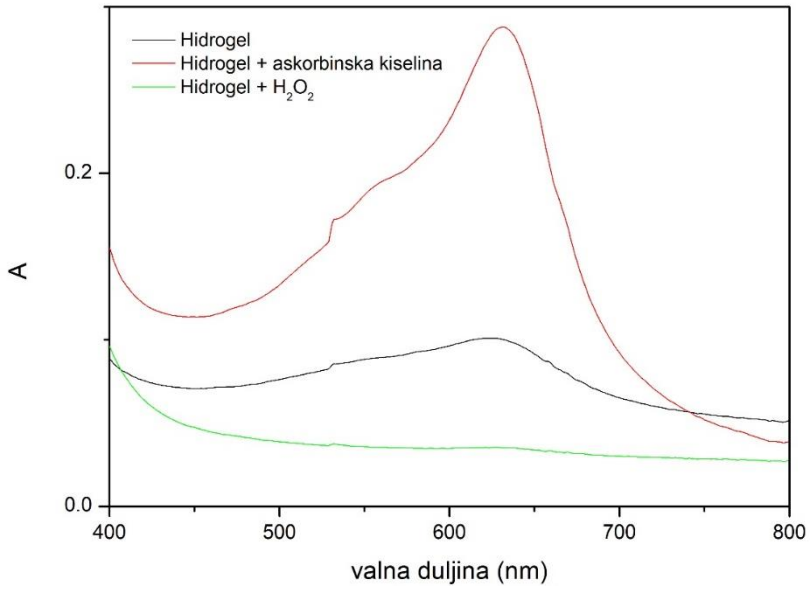
Slika 29. I-Vremenski ovisna promjena apsorbancije hidrogela nakon dodatka različite koncentracije trolox-a; II- Ovisnost apsorbancije o količini dodanog troloxa y=0,02607X+0,31467 R2=0,9988

Mjerenje realnog uzorka vršeno je na način da je šumeća tableta vitamina C usitnjena u tarioniku te je odvagano 0,8812 g te je otopljeno u 100 mL vode. U kivetu u kojoj se nalazi prethodno oksidirani P8* hidrogel dodano je 20 µL priređene otopine realnog uzorka te mu je izmjerena A_{max} pri 620 nm. A_{max} uzorka uspoređen je s pripremljenom baždarnom krivuljom redukcije P8* hidrogela askorbinskom kiselinom (Slika 30).



Slika 30. Određivanje koncentracije realnog uzorka, Y=0,02115x+0,22777 A_{max} uzorka pri 620 nm= 0,855

Spektrofotometrijska analiza P8* hidrogela u tankom sloju odrađena je na način da su gelovi koji su bili prethodno oksidirani vodikovim peroksidom, pa zatim reducirani askorbinskom kiselinom nakon sušenja snimani u spektrofotometru od 800 do 300nm (Slika 31).



Slika 31. Spektrofotometrijska analiza tankog filma hidrogela P8*

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati priprave hidrogela

4.1.1. Hidrogelovi P1 i P2

Kitozan je uspješno otopljen u 5%-tnoj HAc, ali nije došlo do otapanja 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u istoj otopini pri sobnoj (P1),a ni pri povišenoj temperaturi (P2) što je rezultiralo bijelim zamućenjem. Nije došlo do umrežavanja kitozana dikarboksilnom kiselinom što je najvjerojatnije rezultat niskog pH reakcijske smjese. Dodatkom metanola u smjesu P1 uz miješanje pri povišenoj temperaturi je došlo do nastanka ružičaste boje što je najvjerojatnije posljedica djelomičnog umreženja kitozana. Dodatkom vodene otopine $FeSO_4$ reakcijskoj smjesi te refluksiranjem je došlo do tamno ljubičastog obojenja. Dodatkom askorbinske kiseline u pripremljenu otopinu je došlo do vrlo blage promjene, to jest gubitka boje. Nakon neutralizacije reakcijske smjese 1 mol/L vodenom otopinom NaOH te ispiranjem dobiven je narančasti hidrogel.

Suspenzijom tog hidrogela u 5%-tnoj HAc te dodatkom askorbinske kiseline nije došlo do promjene boje.

4.1.2. Hidrogel P3

Posebno je pripremljena otopina kitozana, a u odvojenoj tikvici je odvagano 30 mg 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u 10 ml 5%-tne HAc pri čemu otapanje dikarboksilne kiseline nije bilo moguće ni zagrijavanjem ni u ultrazvučnoj kupelji. Nakon čega su napuštene suspenzije dikarboksilne kiseline u vodenoj otopini HAc. Pripremljene su otopine dikarboksilne kiseline u DMF-u i DMSO gdje je u oba slučaja topivost bila vrlo slaba. Dodatkom pripremljenih otopina dikarboksilne kiseline u DMF (uzorak P3-1) i u DMSO (uzorak P3-2) došlo je do nastajanja ružičastog obojenja. Neutralizacijom 10 mol/L vodenom otopinom NaOH dolazi do obezbojenja uzorka. Pročišćavanjem ultra čistom vodom uz centrifugu dolazi do daljnjeg obezbojenja oba gela što je najvjerojatnije dokaz da nije došlo do umreženja kitozan.

4.1.3. Hidrogel P4 i P5

Dodatkom dikarboksilne kiseline otopljene u DMF-u u prethodno pripremljenu otopinu kitozana u 5%-tnoj HAc došlo je do trenutnog nastajanja ružičastog obojenja. Kao u kod P3 hidrogelova neutralizacijom je došlo do djelomičnog obezbojenja smjese uz nastajanje taloga. Ispiranjem ultra čistom vodom i centrifugiranjem dolazi do potpunog obezbojenja uzorka. Također nije došlo do umrežavanja kitozana. Dodatkom vodenih otopina $Fe(NO_3)_3$ i $FeSO_4$ uzorak dispergiran u 5%-tnoj HAc dolazi do obojenja suspenzije u samu boju željezovih soli te zagrijavanjem nema promjene boje. Ovo je daljnji dokaz kako nije došlo do umreženja kitozana, a samim time nije bilo moguće kompleksiranje željeza unutar hidrogela.

4.1.4. Hidrogel P5

Dodatkom dikarboksilne kiseline otopljene u DMF-u u prethodno pripremljenu otopinu kitozana u 5%-tnoj HAc došlo je do trenutnog nastajanja ružičastog obojenja. Neutralizacijom je došlo do djelomičnog obezbojenja smjese uz nastajanje taloga to jest precipitacije kitozana. Ispiranjem ultra

čistom vodom i centrifugiranjem dolazi do potpunog obezbojenja. Također nije došlo do umrežavanja kitozana.

4.1.5. Hidrogel P6

Otapanjem kitozana u otopini metanola vode i ledene octene kiseline te dodatkom vodene otopine $FeSO_4$ popraćeno dodatkom dikarboksilne kiseline suspendirane u metanolu ne dolazi do nastajanja kompleksa. Refluksiranjem ove otopine dolazi do ružičastog obojenja i nastajanja ljubičastog, vrlo tvrdog gela. Neutralizacijom i ispiranjem ne dolazi do ispiranja boje hidrogela što je znak da je umreženje bilo uspješno. Dobiveni pročišćeni hidrogel u potpunosti je netopiv u vodi i vodenoj otopini octene kiseline to jest nije ga moguće suspendirati što je najvjerojatnije rezultat vrlo visokog stupnja umreženja. Komadić gela uspješno je suspendiran u 1 mol/L HCl. Dodatkom pomoćnog liganda TPTZ-a dolazi do nastajanja intenzivno plavog obojenja suspenzije što je znak da u gelu ima kompleksiranog željeza. Dodatkom peroksida dolazi do obezbojenja, a dodatkom askorbinske kiseline do povratka boje suspenzije.

4.1.6. Hidrogel P7

U kitozan prethodno otopljen u HAc dodana je suspenzija 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilne kiseline u metanolu te je cijela reakcijska smjesa stavljena na refluks. Nakon 18 i 36 sati je dio smjese neutraliziran 1 mol/L NaOH do približno neutralnog pH te su uzorci ispirani ultra čistom vodom uz centrifugiranje gdje je došlo do gotovo potpunog obezbojenja uzorka. Dodatkom vodenih otopina $Fe(NO_3)_3$ i $FeSO_4$ nije došlo do nastajanja kompleksa.

4.1.7. Hidrogel P8

Otapanjem kitozana u HAc te uparivanjem na rotirajućem evaporatoru dobiven je tanki sloj kitozana. Nakon ispiranja 96%-tnom etanolom i vodom dodana je suspenzija dikarboksilne kiseline u metanolu te je kompletni uzorak stavljen na refluks pri čemu je došlo do ružičastog obojenja gela dok je metanol ostao bezbojan pri čemu je na granici otapala na mjestima gdje sav

gel nije bio prekriven otapalom došlo do višeg stupnja umreženja. Nakon refluksa metanol je dekantiran, a gel je ispran čistim metanolom i vodom. Dodatkom vodene otopine $FeSO_4$ te refluksiranjem došlo je do obojenja gela u narančasto. Suspenzijom osušenog gela u HAc i dodatkom askorbinske ili uričnе kiseline nije došlo do promjene boje. U sljedeću suspenziju hidrogela dodan je pomoćni ligand TPTZ te je trenutno nastalo plavo-ljubičasto obojenje koje je rezultat nastajanja Fe(II)-TPTZ kompleksa, ali u istom uzorku je također došlo do razdvajanja faza. Pri sintezi P8 hidrogela po prvi put je u potpunosti uspješno provedeno umreženje kitozana gdje je reakcija umrežavanja provedena u neutralnom pH.

4.1.8. Hidrogel P9

U kitozan otopljen u HAc dodana je prethodno priređena otopina $FeSO_4$ i 2,2'-bipiridina u metanolu gdje je došlo do pojave ružičasto-crvene boje. *Drop casting* metodom pripremljeni su tanki filmovi uzorka na predmetnom stakalcu koji su osušeni u sušioniku. Uranjanjem osušenog uzorka u vodu dolazi do trenutne difuzije kompleksa van filma što je najvjerojatnije dokaz kako nije došlo do kompleksiranja željeza unutar gela. Uranjanjem filma u otopine glutaraldehida raznih koncentracija, ispiranjem i sušenjem te uranjanjem u vodu nije došlo do ispiranja kompleksa. Dodatkom askorbinske kiseline i vodikovog peroksida na umrežene hidrogelove ne dolazi do promjene boje. Ovo može bit znak previsokog stupnja umreženja gela pri čemu ne dolazi do apsorpcije vode i vodenih otopina ili na samom početku nije dobiven dobar kompleks.

4.1.9. Hidrogel P10

Nakon otapanja kitozana u HAc uzorak je neutraliziran natrijevom lužinom te ispiran uz centrifugiranje. U čisti kitozan dodana je suspenzija dikarboksilne kiseline u metanolu te je smjesa refluksirana pri čemu je došlo do obojenja to jest umrežavanja gela. Dobiveni hidrogel je nakon ispiranja podijeljen na dva jednaka dijela pri čemu je u jedan dodana vodena otopina $FeSO_4$ (P10 I), a u drugi $FeCl_3$ (P10 II) nakon čega su oba uzorka stavljena na refluks. Refluksiranjem je došlo do promjene boje oba uzorka što je rezultat kompleksiranja željeza unutar gela.

4.2. Korištenje pomoćnih liganada

4.2.1. Hidrogel P8

Dodatkom pomoćnih liganada 4,7-difenil-1,10-fenantroline (Slika 17. oznaka „N“), 1,10-fenantrolin (Slika 17. oznaka „P“), 2,2-bipiridin (Slika 17. oznaka „B“) i TPTZ u P8 hidrogel dispergiran u 1 mol/L HCl-u nastao je kompleks sa svakim pomoćnim ligandom. Reverzibilnu oksidaciju Fe(II) pomoću otopine H_2O_2 i redukcije Fe(III) pomoću standardnih antioksidansa kao što su askorbinska, galna i urična kiseline postigli smo samo ako smo kao pomoćni ligand koristili TPTZ.

4.2.2. Hidrogel P10

Priređene su suspenzije P10 I o P10 II hidrogela u HAc. Svaka suspenzija podijeljena je na dva jednaka dijela te je u jedan dodan pomoćni ligand 2,2-bipiridin, a u drugi TPTZ. U slučaju P10 I hidrogela dodatkom 2,2- bipiridina nastaje blago crveno obojenje, a dodatkom TPTZ-a nastaje intenzivno plavo-ljubičasto obojenje. Dodatkom vodikovog peroksida u dolazi do potpunog gubitka boje u slučaja, a dodatkom askorbinske kiseline se vraća prvotno obojenje.

U slučaju P10 II hidrogela dodatkom 2,2- bipiridina i TPTZ-a ne nastaje obojenje. Dodatkom askorbinske kiseline dolazi do nastajanja blago crvenog obojenja u slučaju 2,2-bipiridin, a kod TPTZ-a do nastanka ljubičastog obojenja. Oksidacijom vodikovim peroksidom dolazi do obezbojenja otopina i razdvajanja faza što je dokaz da željezo nije dovoljno dobro kompleksirano unutar hidrogela.

4.3. Priprema tankog filma

U priređenu suspenziju P10 II hidrogela u HAc je dodan pomoćni ligand TPTZ. Nakon sušenja je film uronjen u vodenu otopinu askorbinske kiseline pri čemu je došlo do pojave plave boje koja je

rezultat redukcije željeza iz Fe(III) u Fe(II) pri čemu nastaje plavo obojeni Fe(II)-TPTZ kompleks, no u isto vrijeme se kompleks ispire iz hidrogela što je također dokaz da željezo nije dovoljno dobro kompleksirano unutar hidrogela.

4.4. Priprema suspenzije u HCl-u

Umreženi i kompleksirani P8 hidrogel suspendiran je u 1 mol/L HCl. Dodatkom TPTZ-a u suspenziju dolazi do nastajanja plavo obojenog Fe(II)-TPTZ kompleksa. Oksidacijom hidrogela vodikovim peroksidom dolazi do gotovo potpunog obezbojenja hidrogela. Dodatkom askorbinske kiseline u suspenziju dolazi do povratka plave boje

Pripremljeni su tanki filmovi oksidiranog gela te su osušeni u sušioniku. Dodatkom askorbinske kiseline dolazi do plavog obojenja gela pri čemu se kompleks ne ispire i ne dolazi do razdvajanja faza te je reakcija oksidacije i redukcije reverzibilna. Ovo je dokaz da se TPTZ i željezo ne ispiru dodatkom vodenih otopina, a time i da je željezo čvrsto kompleksirano unutar hidrogela i da je hidrogel-Fe-TPTZ kompleks stabilan.

4.5. Rezultati konduktometrijskog određivanja stupnja deacetilacije

Dobivena vrijednost pri konduktometrijskoj titraciji čistog kitozana: $\Delta V(NaOH)=10,5$ mL, $c(NaOH)=0,1$ mol/L. Uvrštavanjem ovih vrijednosti i tabličnih vrijednosti iz tablice 1. u jednadžbu 1. dobije se da je stupanj deacetilacije kitozana $X_D=80,77\%$

Dobivene vrijednosti konduktometrijske titracije umreženog hidrogela: $\Delta V(NaOH)=6,5$ mL, $c(NaOH)=0,025$ mol/L te je dobivena vrijednost stupnja deacetilacije hidrogela $X_D=57,094\%$.

Razlika ova dva rezultata je 23,676% što predstavlja postotak umreženja hidrogela to jest postotak slobodnih amino skupina na koje je uspješno vezana 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilna kiselina.

4.6. Rezultati spektrofotometrijske analize

Mjerenjem spektra hidrogela koji sadrži Fe(II)-TPTZ kompleks vidljiv je pomak maksimuma apsorbancije u odnosu na čisti Fe(II)-TPTZ kompleks što je rezultat i dokaz nastajanja kompleksa

sa željezom kompleksiranim unutar hidrogela. Mjerenjem apsorbancije u suspenziji dodatkom askorbinske ili galne kiseline ili trolox-a vidljiva je linearna ovisnost apsorbancije o količini dodanog antioksidansa. Mjerenjem apsorbancije nakon dodatka vodene otopine realnog uzorka izračunata je količina vitamina c od 2,0009 g/100 g tablete dok je po deklaraciji 2 g/ 100 grama tablete.

5. Zaključak

Umrežavanje kitozana 2,2'-bipiridin-4,4'-dikarboksilnom kiselinom optimalno pri neutralnom pH uz dodatak dikarboksilne kiseline prethodno suspendirane u metanolu te refluksiranjem duži vremenski period (oko 20 sati). Ispiranjem metanolom i ultračistom vodom dolazi do ispiranja ostataka nevezane dikarboksilne kiseline pri čemu ostaje čisti umreženi hidrogel koji sadrži 2,2'-bipiridinske skupine koji mogu kompleksirati ione željeza. Dodatkom vodene otopine iona željeza te refluksiranjem dolazi do kompleksiranja iona željeza unutar hidrogela što je karakterizirano pojavom narančaste boje. Suspendiranjem osušenog hidrogela u 1M klorovodičnoj kiselini te dodatkom TPTZ-a kao pomoćnog liganda dolazi do dodatnog kompleksiranja željeza unutar gela što rezultira pojavom plave boje. Oksidacijom kompleksiranog željeza iz Fe(II) u Fe(III) vodikovim peroksidom dolazi do gubitka plave boje to jest obezbojenja hidrogela. Dodatkom antioksidansa (trolox, askorbinska ili galna kiselina) dolazi do postupnog povratka plave boje. Stajanjem suspenzije nakon dodatka antioksidansa dolazi do ponovnog postupnog gubitka boje i smanjenja apsorbancije što je znak da je reakcija redukcije i oksidacije kompleksiranog željeza unutar hidrogela reverzibilna. Pripremom tankog filma hidrogela na predmetno stakalce vršila se nanošenjem prethodno oksidiranog hidrogela „drop casting“ metodom te sušenjem filma pri 60°C. Dodatkom vodene otopine askorbinske kiseline dolazi do trenutne vidljive promjene boje gela što se odrazilo i na snimanom spektru. Pripremljeni hidrogel se pokazao kao vrlo precizno senzorski tanki sloj za određivanje antioksidansa unutar realnog uzorka (šumeće tablete) koji sadrži askorbinsku kiselinu.

6. Literatura

1. V. K. Rai, Applied Physics B, 88(2) (2007), 297–303.
2. J. L. Santos, F. Farahi, Handbook of Optical Sensors, CRC Press, Boca Raton, 2014
3. J. Haus, Optical sensors Basics and Applications, Wiley-VCH, Wincheim, 2010
4. A. Mateescu,, Y. Wang, J. Dostalek, i U. Jonas, Membranes, 2(1) (2012), 40–69.
5. A. K. Yetisen,, H. Butt,, L.R. Volpatti,Pavlichenko i dr. Advances, 34(3) (2016), 250–271.
6. E.M. Ahmed, Journal of Advanced Research, 6(2) (2015), 105–121.
7. F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Materials Science and Engineering: C, 57 (2015), 414–433.
8. W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liu, J. Fu, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 88(3) (2012), 327–339.
9. W. E. Hennink i C.F. van Nostrum Advanced Drug Delivery Reviews, 64 (2012), 223–236.
10. K.C. Gupta, M. N. V. Ravi, Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 76(5) (2000), 672-683.žG. A. F. Roberts, Chitin Chemistry, Macmillan, London, 1992
11. M.N. Ravi Kumar, Reactive and Functional Polymers 46 (2000), 1-27-
12. K. Kurita. Marine Biotechnology 8 (2006), 203-226
13. F. Nessa, S.M. Masum, M. Asaduzzaman, S. Roy, M. Hossain, M. Jahan, Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 45(4). (2011), 323-330.

14. I. Younes, S. Hajji, M. Rinaudo, M. Chaabouni, K. Jellouli M. Nasri, International Journal of Biological Macromolecules, 84 (2016), 246–253.

15. K. Kurita, Y. Kaji, T. Mori, Y. Nishiyama, Carbohydrate Polymers, 42(1) (2000), 19–21.

16. H.K. No, S.P. Meyers, K.S.Lee, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(3) (1989), 575–579.

17. I. Younes, M. Rinaudo, Marine Drugs, 13(3) (2015), 1133–1174.

18. H.K. No, S.P. Meyers, Journal of Aquatic Food Product Technology, 4(2) (1995), 27–52.

19. T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura, Die Makromolekulare Chemie, 177(12) (1976), 3589–3600.

20. I.A. Sogias, V.V. Khutoryanskiy, A.C. Williams, Macromolecular Chemistry and Physics, 211(4) (2010), 426–433.

21. K.L.B. Chang, G. Tsai, J. Lee, W.R. Fu (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. Carbohydrate Research 303 (3) (1997), 327-332.

22. Y. Araki, E. Ito, European Journal of Biochemistry, 55(1) (1975), 71–78.

23. I. Tsigos, V. Bouriotis, Journal of Biological Chemistry, 270(44) (1995), 26286–26291.

24. A. Singh, S.S. Narvi, P.K. Dutta, N.D. Pandey, Bulletin of Materials Science, 29(3) (2006), 233–238.

25. C. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi, C. Cervellati, Current Pharmaceutical Design, 10(14) (2004), 1611–1626.

26. G.Y. Liou, P. Storz, Free Radical Research, 44(5) (2010), 479–496.

27. H. Bayr, Reactive oxygen species. Critical Care Medicine, 33 (2005), 498–501.

28. G. Bartosz, Advances in Clinical Chemistry, 37 (2003), 219–292.

29. C.G. Fraga, P.I. Oteiza, M. Galleano, General Subjects, 1840(2) (2014), 931–934.

30. S.P. Griffin i R. Bhagooli, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 302(2) (2004), 201–211.