

58. državno srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024



II. GIMNAZIJA MARIBOR

II. gimnazija Maribor
Trg Miloša Zidanška 1, Maribor



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Smetanova ulica 17, Maribor

INTERAKCIJE METIL GALATA Z Fe(II) IN Al(III) IONI

Raziskovalno področje: KEMIJA ALI KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: Matic Mohorko

Mentorica: Anita Mustač, prof. kem.

Somentor: red. prof. dr. Urban Bren, univ. dipl. kem.

Somentor: doc. dr. Gregor Hostnik, univ. dipl. kem.

Maribor, 2024

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
ZAHVALA.....	VIII
UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE	IX
1 UVOD	1
1.1 Opredelitev problema	1
1.2 Namen, hipoteze in cilji.....	2
2 TEORETIČNI DEL	5
2.1 Tanini.....	5
2.1.1 Splošno o taninih.....	5
2.1.2 Delitev taninov	5
2.1.3 Uporaba taninov	6
2.1.3.1 Splošna uporaba	6
2.1.3.2 Vloga koordinacijskih spojin taninov in železa	7
2.1.3.3 Vloga koordinacijskih spojin taninov in aluminija	7
2.2 Metil galat.....	8
2.3 Koordinacijske spojine	10
2.3.1 Koordinacijske spojine taninov	11
2.4 Železo	13
2.4.1 Koordinacijske spojine železa.....	14
2.5 Aluminij.....	17
2.5.1 Koordinacijske spojine aluminija.....	17
3 METODE DELO	19
3.1 UV-Vis spektroskopija	19
3.2 Jobova metoda	21
4 EKSPERIMENTALNI DEL.....	24
4.1 Načrt dela.....	24
4.2 Kemikalije in laboratorijska oprema	25
4.2.1 Kemikalije	25
4.2.2 Laboratorijska oprema.....	25
4.3 Priprava raztopin in pufrov.....	27
4.4 UV-Vis spektroskopija in priprava vzorcev metil galata ter kovinskih ionov	28
4.4.1 Interakcije metil galata z Fe(II) ioni.....	29
4.4.2 Interakcije metil galata z Al(III) ioni	31
4.5 UV-Vis spektri metil galata in koordinacijskih spojin metil galata s kovinskimi ioni.....	32
4.6 Jobov diagram.....	33
4.7 Ujemanje modelne funkcije in Jobovega diagrama.....	33
4.7.1 Model	33

5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
5.1	Koordinacijske spojine metil galata s kovinskimi ioni.....	39
5.1.1	Koordinacijske spojine metil galata z Fe(II) ioni.....	39
5.1.2	Koordinacijske spojine metil galata z Al(III) ioni	43
5.2	Jobov diagram koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) ionov.....	46
5.2.1	Jobov diagram	46
5.2.2	Sprememba valovne dolžine absorpcijskega maksimuma v odvisnosti od sestave vzorca.....	47
5.2.3	Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) ionov	48
5.3	Jobov diagram koordinacijskih spojin metil galata in Al(III) ionov	51
5.3.1	Jobov diagram	51
5.3.2	Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Al(III) ionov	52
5.4	Primerjava koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) in Al(III) ioni	54
5.5	Ujemanje modelne funkcije in Jobovega diagrama.....	55
6	DRUŽBENA ODGOVORNOST	58
7	ZAKLJUČEK	59
8	VIRI IN LITERATURA	61
8.1	Bibliografija.....	61
8.2	Viri slik.....	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek petčlenskega obroča po deprotonaciji dveh hidroksilnih skupin in vezavi kovinskega iona (lasten vir)	3
Slika 2: Vpliv pH-ja na stehiometrijo koordinacijskih spojin derivatov katehola in Fe(III) ionov (Geng, 2022, str. 17, prevedeno).....	4
Slika 3: Delitev taninov (lasten vir, povzeto po [1]).....	6
Slika 4: Proces kondenzacije galne kisline z metanolom, ki vodi do nastanka metil galata (lasten vir, povzeto po [30]).....	8
Slika 5: Kemijska struktura metil galata (Wikipedia, 2023).....	9
Slika 6: Heksaaminkobaltov(II) ion (Housecroft, 2005, str. 179).....	10
Slika 7: Reakcija deprotonacije kvercetina in nastanka petčlenskega obroča (lasten vir, povzeto po [12])	12
Slika 8: Poenostavljen prikaz odseka hemoglobina, na katerega je preko železa vezan molekularni kisik (LibreTexts Chemistry, 2019).....	13
Slika 9: Galoilna enota (lasten vir, povzeto po [14])	14
Slika 10: Eden izmed mehanizmov tvorbe KS med Fe(III) ionom in galoilnimi enotami (Perron, 2016, str. 79).....	15
Slika 11: Oksidacija Fe(II) ionov v Fe(III) ione pri tvorbi koordinacijske spojine s polifenoli ob prisotnosti kisika v raztopini (Fermišek, 2021, str. 4).....	15
Slika 12: Redukcija Fe(III) ionov do Fe(II) ionov po tvorbi koordinacijskih spojin s polifenoli do semikinonske in kinonske spojine (Fermišek, 2021, str. 4)	16
Slika 13: Koordinacijski spojini aluminija z oktaedrično oz. tetraedrično razporeditvijo ligandov (Housecroft, 2005, str. 173)	17
Slika 14: Možne kemijske strukture KS Al(III) ionov in galoilne enote (Zhang, 2019, str. 71).....	18
Slika 15: Poenostavljen princip delovanja UV-Vis spektrofotometra (lasten vir, povzeto po [53]).....	19
Slika 16: Primeri Jobovih krivulj koordinacijskih spojin, ki se nanašajo na različne stehiometrije (Frešer, 2022, str. 20)	22
Slika 17: Shema poteka eksperimentalnega dela (lasten vir).....	24

Slika 18: Instrumenti, uporabljeni pri izdelavi raziskovalne naloge: a) pH meter, b) analitska tehnica, c) vortex stresalnik, d) ultrazvočna kopel, e) UV-Vis spektrofotometer (lasten vir).....	26
Slika 19: Reakcijska shema modela, pri kateri zvrst H_2MeG^- , ki je v ravnotežju s preostalimi zvrstmi, reagira z Fe(II) oz. Al(III) ioni, pri čemer nastane koordinacijska spojina $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$ (lasten vir)	34
Slika 20: Obarvanost raztopine MeG in Fe(II) ionov brez dodatka Fe(II) ionov (levi vzorec) in po vzpostavitvi ravnotežja (desni vzorec) (lasten vir)	41

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava UV-Vis absorpcijskih spektrov raztopine MeG v prosti obliki ter raztopine z ekvimolarno množino MeG in Fe(II) pri pH-ju 5,5 ($c_{\text{MeG}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).....	40
Graf 2: Časovni potek nastajanja koordinacijske spojine pri reakciji MeG z Fe(II) ioni ($x_{\text{MeG}} = 0,40$; pH = 4,5) s spremljanjem odvisnosti absorbance pri valovni dolžini 570 nm... 42	42
Graf 3: Primerjava UV-Vis absorpcijskih spektrov raztopine z ekvimolarno množino MeG in Al(III) ionov ter raztopine z identično sestavo brez dodatka Al(III) ionov pri pH-ju 5,5 ($c_{\text{MeG}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	44
Graf 4: Jobov diagram koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov	46
Graf 5: Spreminjanje valovne dolžine absorpcijskega maksimuma koordinacijske spojine MeG in Fe(II) ionov v odvisnosti od sestave vzorca pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5	47
Graf 6: Ekstrapolacija Jobovih krivulj tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5; c) pH = 3,5	48
Graf 7: Jobov diagram koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov	51
Graf 8: Ekstrapolacija Jobovih krivulj tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5; c) pH = 3,5	52
Graf 9: Primerjava Jobovih diagramov koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) oz. Al(III) ioni (pH = 4,5).....	54
Graf 10: Ujemanje modelnih vrednosti (modelne funkcije) z eksperimentalnimi vrednostmi Jobovih diagramov: a) MeG + Fe(II), b) MeG + Al(III) (pH = 5,5).....	55

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestava posameznih acetatnih pufrov	28
Tabela 2: Sestava vzorcev MeG in Fe(II) ionov	30
Tabela 3: Sestava vzorcev MeG in Al(III) ionov	31
Tabela 4: Vrednosti presečišč ekstrapoliranih Jobovih krivulj za reakcije MeG in Fe(II) ionov	49
Tabela 5: Vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov	49
Tabela 6: Vrednosti presečišč ekstrapoliranih Jobovih krivulj za reakcije MeG in Al(III) ionov	53
Tabela 7: Vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov	53
Tabela 8: Konstanti tvorbe in molarne absorpcijskega koeficienta za tvorbo koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$ (M = Fe(II) oz. Al(III)) pri pH-ju 5,5; ki so izračunani z uporabo modela ...	56

POVZETEK

V okviru raziskovalne naloge smo proučevali interakcije metil galata – monomera hidrolizirajočih taninov, tj. spojin, ki se že od prazgodovine uporabljajo za strojenje usnja in izdelavo barvil. Danes jih uporabljamo tudi za nadzor in zaviranje rasti bakterij, vplivajo pa tudi na biološko dostopnost kovinskih ionov. Za razumevanje njihove aktivnosti in uporabnosti so ključnega pomena študije interakcij taninov s kovinskimi ioni. V okviru raziskovalnega dela smo z uporabo UV-Vis spektroskopije izmerili absorbance raztopin metil galata in Fe(II) oz. Al(III) ionov ter z eksperimentalno pridobljenimi podatki konstruirali Jobove diagrame. Z ekstrapolacijo skrajnih točk na Jobovih diagramih smo določili stehiometrijo tvorjenih koordinacijskih spojin in pokazali, kako pH-medija vpliva na njihovo stehiometrijo in količino. Eksperimentalno določenim točkam Jobovega diagrama smo prilegali modelno funkcijo, pri izpeljavi katere smo predpostavili, da s posameznimi kovinskimi ioni reagira reakcijska zvrst enkrat deprotoniranega metil galata (H_2MeG^-). Z modelom smo izračunali vrednosti konstant tvorbe koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) oz. Al(III) ionov ter modelne molarne absorpcijske koeficiente in pokazali, po kakšnem reakcijskem mehanizmu pride do tvorbe tovrstnih spojin.

Ključne besede: metil galat, železovi(II) ioni, aluminijeви(III) ioni, koordinacijske spojine, UV-Vis spektroskopija, Jobova metoda, modelna funkcija

ABSTRACT

In this research, the interactions of methyl gallate, a monomer of hydrolysable tannins – compounds that have been used since prehistoric times for tanning leather and the production of dyes – were studied. Today, these compounds are used to control and inhibit bacterial growth and they affect the bioavailability of metal ions, as well. Studies on the interactions of tannins with metal ions are crucial for understanding their activity and utility. In our research, the absorbances of solutions of methyl gallate and Fe(II) or Al(III) ions were measured using UV-Vis spectroscopy, and Job diagrams were plotted using the experimentally obtained data. By extrapolating the extreme points on the Job diagrams, the stoichiometry of the coordination compounds formed was determined. It was shown how the pH of the media affects the stoichiometry and the amount of coordination compounds that are formed. A model function was fitted to the experimentally determined points of the Job diagram, which was derived by assuming that the reaction species of the once deprotonated methyl gallate (H_2MeG^-) reacts with the individual metal ions. The model was used to calculate the values of the formation constants of the coordination compounds of methyl gallate and Fe(II) or Al(III) ions, and the model molar absorption coefficients and to show by which reaction mechanism the formation of such compounds occurs.

Key words: methyl gallate, iron(II) ions, aluminium(III) ions, coordination compounds, UV-Vis spectroscopy, Job's method, model function

ZAHVALA

Ko želim izreči zahvalo vsem, ki so pripomogli pri ustvarjanju raziskovalne naloge, se mi beseda »hvala« zdi preskromna, da bi lahko vanjo vlil vse svoje misli in občutke.

Posebno zahvalo namenjam svojim zunanjim mentorjema red. prof. dr. Urbanu Brenu in doc. dr. Gregorju Hostniku za strokovno pomoč ter veliko spodbudo pri izvedbi raziskovalnega dela.

Hvala asist. Franju Frešerju za vodenje, usmerjanje, koristne nasvete in potrpežljivost pri izvedbi in analizi meritev. Za pomoč pri pisanju naloge se zahvaljujem tudi svoji šolski mentorici prof. Aniti Mustač.

Hvala Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru, ki mi je omogočila izvedbo eksperimentalnega dela.

Iskrena hvala tudi prof. Tini Mojzer za jezikovni pregled dela, prof. Poloni Vehovar za angleški prevod povzetka, staršem za razumevanje ter podporo med pisanjem naloge in vsem, ki so na kakršenkoli način pripomogli k uresničitvi zastavljenih ciljev.

UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE**Simboli**

A	absorbanca [/]
b	dolžina optične poti kivete [cm]
c	vsota množinskih koncentracij ligandov (L) in kovinskih ionov (K) [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
c_K	analitska množinska koncentracija kovinskih ionov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
c_L	analitska množinska koncentracija ligandov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
k	konstanta [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
K_a	konstanta disociacije kisline [/]
K_r	konstanta ravnotežja za tvorbo koordinacijske spojine [/]
m	masa [g]
M	molska masa [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
P	jakost transmitiranega, prepuščenega svetlobnega toka [W]
P_0	jakost vstopnega svetlobnega toka [W]
pH	pH [/]
$T_{\text{UV-Vis}}$	transmitanca [/]
U	navidezna konstanta ravnotežja za tvorbo koordinacijske spojine [/]
$V_{\text{Al(III)}}$	prostornina raztopine aluminijevih(III) ionov v posameznem vzorcu [mL]
$V_{\text{Fe(II)}}$	prostornina raztopine železovih(II) ionov v posameznem vzorcu [mL]
V_{MeG}	prostornina raztopine metil galata [mL]
x_{MeG}	množinski delež metil galata [/]
z	konstanta za posamezen pH [/]

Grški simboli

ϵ	molarni absorpcijski koeficient [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
λ	valovna dolžina [nm]
σ	električna prevodnost [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]

Kratice

H_3MeG	nevtralna zvrst metil galata
H_2MeG^-	enkrat deprotonirana zvrst metil galata
HMeG^{2-}	dvakrat deprotonirana zvrst metil galata
MeG^{3-}	trikrat deprotonirana zvrst metil galata
H_3O^+	oksonijev ion
KS	koordinacijska spojina (angl. <i>coordination compound</i>)
MCV	metoda zveznih variacij (angl. <i>method of continuous variations</i>)
MeG	metil galat (angl. <i>methyl gallate</i>)
M^{n+}	kovinski ion
UV	ultravijolična svetloba (angl. <i>ultraviolet radiation</i>)
Vis	vidna svetloba (angl. <i>visible radiation</i>)

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Tanini (čreslovine) so skupina sekundarnih metabolitov, ki jih rastline tvorijo kot odziv na okoljski stres. Gre za polifenolne spojine, ki jih delimo na kondenzirane in hidrolizirajoče tanine [1,2]. Zgodovina njihove uporabe sega že v čase pred našim štetjem, ko so njihove ekstrakte uporabljali za strojenje usnja, skozi stoletja pa smo razvili še številne druge načine njihove uporabe, mdr. so se več stoletij uporabljali v železo-taninskih črnilih, saj tanini s številnimi kovinskimi ioni tvorijo različno obarvane spojine [3]. Danes največ pozornosti posvečamo njihovemu antioksidativnemu, protivnetnemu, antikancerogenemu, protivirusnemu in zlasti protibakterijskemu delovanju [1,4]. V sodobnem svetu namreč čedalje večji problem predstavlja odpornost bakterij na antibiotike, zaradi česar je njihova uporaba vedno bolj omejena. Eden od pristopov pri zamenjavi antibiotikov v krmi živali je prav dodajanje taninskih ekstraktov [5–7]. Študije njihove aktivnosti namreč kažejo, da tanini z različnimi mehanizmi zavirajo rast bakterij in vplivajo na biološko dostopnost kovinskih ionov [8].

Raziskave interakcij taninov s kovinskimi ioni so zato nujne za razumevanje njihovih lastnosti. Pri tem se za proučevanje reakcij uporabljajo taninski monomeri z veliko hidroksilnimi skupinami, ki se lahko deprotonirajo, kelirajo različne kovinske ione, zlasti ione prehodnih kovin, in z njimi tvorijo koordinacijske spojine [9]. Med tovrstne monomere uvrščamo tudi metil galat, spojino, ki je predmet našega raziskovanja. Z razumevanjem njegovih interakcij lahko namreč sklepamo, kako s tovrstnimi ioni reagirajo taninske makromolekule, kar dolgoročno prispeva k poznavanju reakcijskih mehanizmov taninov.

1.2 Namen, hipoteze in cilji

V okviru raziskovanja smo si zastavili naslednji raziskovalni vprašanji:

- Kakšna je stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata (osnovnega gradnika hidrolizirajočih taninov) in kovinskih ionov Fe(II) ter Al(III)?
- Kako pH-raztopin vpliva na stehiometrijo in koncentracijo tvorjenih koordinacijskih spojin?

Namen raziskovalnega dela je z uporabo UV-Vis spektroskopije in Jobove metode eksperimentalno določiti stehiometrijo koordinacijskih spojin, ki se tvorijo pri reakciji železovih(II) in aluminijevih(III) ionov z metil galatom in proučiti, kako se stehiometrija in količina tvorjenih koordinacijskih spojin spreminjata s pH-vrednostjo raztopine, mehanizem tvorbe, pripadajoče ravnotežne konstante in molarne absorpcijske koeficiente pa določiti s prileganjem modelne funkcije eksperimentalnim podatkom.

Pred začetkom dela smo si tako zastavili naslednje cilje:

- pregledati literaturo na področju taninov in njihovih interakcij s kovinskimi ioni,
- na podlagi literature izbrati modelno spojino oz. monomer taninov, interakcije katerih še niso dodobra raziskane, kovinske ione, s katerimi bo modelna spojina reagirala, in pogoje (pH), pri katerih lahko pride do tovrstnih interakcij,
- pripraviti ustrezne raztopine in reagente,
- izmeriti absorbance v ultravijoličnem in vidnem delu spektra svetlobe za raztopine z različnimi razmerji med koncentracijo modelne spojine in kovinskih ionov (Jobova metoda),
- analizirati pridobljene podatke in iz njih določiti stehiometrijo tvorjenih kompleksov ter vpliv pH-ja na stehiometrijo in količino tvorjenih koordinacijskih spojin,
- določiti eksperimentalne molarne absorpcijske koeficiente (ϵ) tvorjenih koordinacijskih spojin pri različnih pH-jih,
- eksperimentalno pridobljenim podatkom prilegati modelno funkcijo in s tem določiti konstanto tvorbe koordinacijskih spojin, modelne molarne absorpcijske koeficiente in mehanizem tvorbe,
- ovrednotiti dobljene rezultate in postavljene hipoteze ter
- predlagati možne izboljšave oz. nadgradnje raziskovalnega dela.

Na podlagi pregledane literature smo postavili naslednje hipoteze:

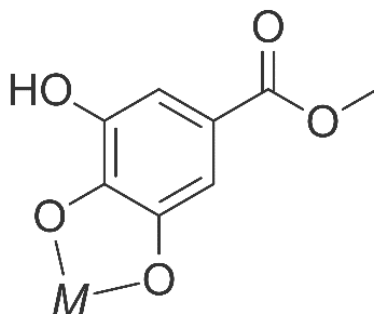
Hipoteza 1: Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) ionov bo 1:1.

Argumentacija hipoteze: Metil galat velja za sorazmerno majhno molekulo, ki je s strukturnega vidika zelo podobna molekuli galne kisline. Študija tvorbe koordinacijskih spojin galne kisline in železovih(II) ionov, ki so jo izvedli Frešer, F. in sodelavci, je pokazala, da se omenjena reaktanta vežeta v stehiometričnem razmerju 1:1 [10]. Zaradi podobnosti struktur molekul predpostavljamo, da bo metil galat z istovrstnimi ioni reagiral po podobnem mehanizmu kot galna kislina.

Hipoteza 2: Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Al(III) ionov bo 1:1.

Argumentacija hipoteze: Študije interakcij galotaninskih monomerov z Al(III) ioni kažejo, da imajo lahko tvorjene koordinacijske spojine različne stehiometrije, npr. 1:1, 1:2 in 3:1 [11]. Sami bomo tovrstne reakcije proučevali v območju nižjih vrednosti pH-jev (5,5–3,5), v katerem lahko kovinske ione kelira manj hidroksilnih skupin, zato sklepamo, da se bo v tem območju na kovinski ion koordiniralo manjše število enot metil galata.

Literatura nakazuje tudi na to, da galotaninski monomeri, kot sta galna kislina in metil galat, kovinske ione kelirajo preko dveh sosednjih deprotoniranih hidroksilnih skupin, pri čemer pride do nastanka stabilnega petčlenskega obroča, kot prikazuje Slika 1 (na njej M označuje kovinski ion) [12]. V sklopu hipotez 1 in 2 tako predvidevamo, da bo prišlo do nastanka tovrstnih struktur.



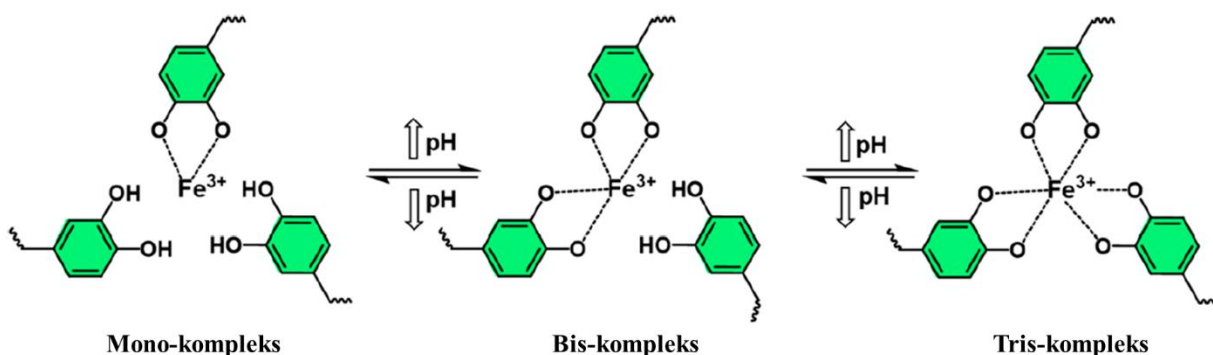
Slika 1: Nastanek petčlenskega obroča po deprotonaciji dveh hidroksilnih skupin in vezavi kovinskega iona (lasten vir)

Hipoteza 3: pH bo vplival na količino tvorjenih koordinacijskih spojin.

Argumentacija hipoteze: Literatura navaja, da pri višjih vrednostih pH-ja hitreje pride do deprotonacije hidroksilnih skupin, ki pomakne kemijsko ravnotežje v desno – večje število deprotoniranih hidroksilnih skupin v večji meri kelira kovinske ione [10,13]. Na podlagi tega predvidevamo, da se bo pri višjih pH-jih tvorila večja količina koordinacijskih spojin metil galata in kovinskih ionov, kar bo razvidno iz večjih vrednosti UV-Vis absorbanc.

Hipoteza 4: pH ne bo vplival na stehiometrijo tvorjenih koordinacijskih spojin.

Argumentacija hipoteze: Geng, H. in sodelavci so v eni izmed svojih študij mdr. proučevali vpliv pH-ja na zmožnost derivatov katehola, da kelirajo Fe(III) ione [13]. Ugotovili so, da lahko z višanjem pH-ja kovinske ione kelira več deprotoniranih hidroksilnih skupin, s čimer se na centralni ion koordinira več enot katehola (Slika 2).



Slika 2: Vpliv pH-ja na stehiometrijo koordinacijskih spojin derivatov katehola in Fe(III) ionov (Geng, 2022, str. 17, prevedeno)

V okviru našega proučevanja tvorbe koordinacijskih spojin metil galata smo se omejili na območje pH-jev med 3,5 in 5,5. Predvidevamo, da se znotraj njega protolitsko ravnotežje metil galata ne bo bistveno spremenilo, zato bo stehiometrija tvorjenih koordinacijskih spojin skozi celotno območje približno enaka.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Tanini

2.1.1 Splošno o taninih

Tanini ali čreslovine so skupina sekundarnih metabolitov, ki skupaj z lignini tvorijo najbolj razširjeno in obsežno skupino polifenolov v rastlinah [1,2]. Pri delovanju rastlin imajo pomembno vlogo, te jih namreč tvorijo kot odgovor na okoljski stres – ščitijo jih pred insekti, rastlinojedimi živalmi (so trpkega okusa in značilnega vonja), okužbami in elektromagnetnim valovanjem [1,14]. V naravi jih najdemo v veliki večini višjih rastlin, npr. v njihovem lesu, listih, koreninah in semenih [1]. Glavni viri taninov v hrani pa so predvsem različni sadeži, vključno s kakijem, brusnicami, robidami, granatnim jabolkom in grozdem [4]. V trdni obliki so tanini praški bele ali svetlorumene barve [14]. Veljajo za fenolne spojine, ki so zmožne tvoriti vezi s proteini in z nekaterimi makromolekulami, predvsem z ogljikovimi hidrati [15].

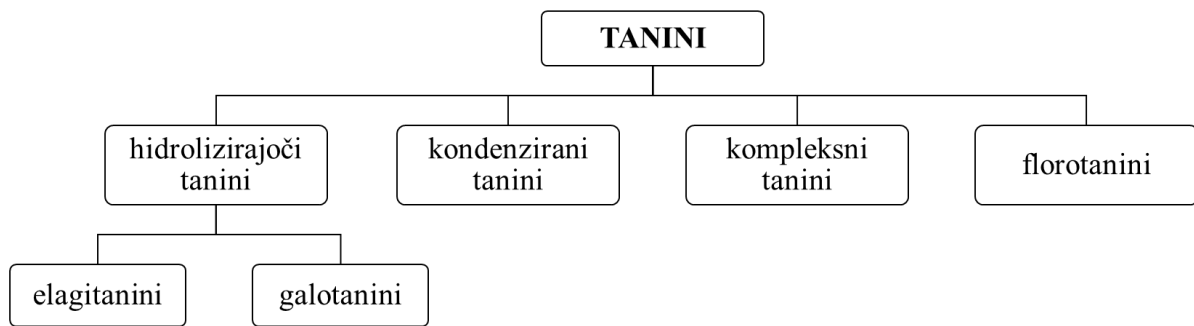
2.1.2 Delitev taninov

Tanine delimo na več razredov spojin, vsem pa sta skupna velika molekulska masa (od 300 pa vse do 30 000 Da) in večje število funkcionalnih skupin, preko katerih lahko tvorijo koordinacijske spojine z ogljikovimi hidrati, proteini, ki jih obarjajo [14,16], in kovinskimi ioni [17].

Tanine najpogosteje delimo na dve veliki skupini, in sicer na:

- kondenzirane tanine (proantocianidine) in
- hidrolizirajoče tanine [1].

Hidrolizirajoče tanine nadaljnjo delimo na elagitanine, ki hidrolizirajo do elagične kisline, in galotanine, ki hidrolizirajo do galne kisline [1]. Glede na strukturo monomernih enot lahko tanine, ob kondenziranih in hidrolizirajočih, delimo še na kompleksne tanine in florotanine, kot prikazuje Slika 3 [1,14].



Slika 3: Delitev taninov (lasten vir, povzeto po [1])

2.1.3 Uporaba taninov

2.1.3.1 Splošna uporaba

Tanini imajo bogato zgodovino uporabe. Njihovo ime izhaja iz 18. stol., ko so s tanini, (njihovimi rastlinskimi ekstrakti) v veliki meri strojili usnje (fr. *tanner* – strojenje) [18]. Pri tem so živalske kože potopili v raztopino vode in taninskih ekstraktov ter jih tako ustrojili [15,19]. Za strojenje so se uporabljali že pred več tisočletji, danes pa se uporabljajo tudi na področju medicine in prehranske industrije [15]. V medicini so njihovi ekstrakti uporabljeni proti diareji in bolečinam v želodcu, pa tudi kot protivnetno in antiseptično sredstvo. Ker so zmožni obarjati težke kovine in alkaloidne, jih pogosto uporabljajo pri zastrupitvah z omenjenimi snovmi [1].

Taninom pripisujejo tudi antioksidativno delovanje, saj imajo sposobnost odstranjevanja prostih radikalov, kako uspešni so pri tem, pa je odvisno od strukture in stopnje polimerizacije taninov. Višja, kot je stopnja polimerizacije, več prostih radikalov bo lahko nevtralizirala vsaka molekula. Prav zato lahko tanini predstavljajo tudi potencialne antikancerogene in antimutagene učinkovine [15]. Tanine so zgodovinsko uporabljali tudi za pripravo črnila, saj s številnimi kovinskimi ioni tvorijo različno obarvane spojine. V živilski industriji pa se uporabljajo za bistrenje vina, piva in sadnih sokov [1].

Tanini so predmet raziskav na številnih področjih. Eno izmed njih je farmacija, saj se zaradi številnih pozitivnih učinkov taninov (antioksidativnost, protivnetnost, antikancerogenost, protibakterijska in protivirusna aktivnost), raziskujejo novi potencialni farmacevtski izdelki [15].

2.1.3.2 Vloga koordinacijskih spojin taninov in železa

Pomembna lastnost taninov so njihove protibakterijske lastnosti, zaradi katerih se jih v veliki meri uporablja za nadzor in zaviranje rasti bakterij, istočasno pa vplivajo še na biološko dostopnost kovinskih ionov [8,20]. Tanini kot makromolekularni polifenoli vsebujejo veliko hidroksilnih skupin, vezanih na benzenov obroč, kar je eden izmed glavnih razlogov za njihovo močno protibakterijsko delovanje. Omenjene skupine se namreč zlahka deprotonirajo in tvorijo koordinacijske spojine z ioni (zlasti prehodnih) kovin [4,9].¹

Dosedanje študije nakazujejo, da naj bi tanini na bakterijsko rast v prvi vrsti delovali po naslednjih mehanizmih:

- z inhibicijo bakterijskih encimov,
- s tvorbo koordinacijskih spojin s proteini rastline [2],
- z delovanjem na metabolizem mikroorganizmov (inhibirajo proces oksidativne fosforilacije, kar prekine elektronsko transportno verigo) [15],
- z interakcijami z bakterijsko celično steno in membrano [22] ter
- s kelacijo esencialnih kovinskih ionov in tvorbo koordinacijskih spojin z njimi [9].²

Na zadnji mehanizem se navezuje tudi naša študija, saj lahko nastanek koordinacijskih spojin med tanini in železovimi(II) ioni povzroči njihovo pomanjkanje v mediju. Železo je namreč ključnega pomena za mnoge bakterijske celične procese, zato lahko tanini s tem mehanizmom občutno zavirajo rast bakterij.

2.1.3.3 Vloga koordinacijskih spojin taninov in aluminija

Aluminij je prisoten v mnogih kamninah, ki se v kisli prsti počasi raztapljajo, pri čemer se sproščajo Al(III) ioni. Slednji so za dele rastlin, zlasti korenine, toksični. Aluminijevi(III) ioni zavirajo njihovo rast, rastline zaradi pomanjkanja hranilnih snovi odmirajo, posledično pa se zmanjšuje količina pridelka.

¹ **Deprotonacija** – odstranitev protona iz molekule (vodikovega protona (H^+) iz hidroksilne ($-OH$) skupine) [21].

² **Kelacija** – nastanek dveh ali več koordinacijskih vezi med večveznim ligandom in enim centralnim atomom oz. ionom. Tovrstne ligande pogosto imenujemo kelatorji, nastale komplekse pa kelati [23,24].

Prav zato toksičnost aluminija v kisljih tleh predstavlja pomembno omejitev za pridelavo poljščin po vsem svetu. Zmanjšanje pridelka najbolj občutijo v državah v razvoju, zlasti na območju tropskega in subtropskega sveta, kjer je kar 60 % tal kisljih [25–27].

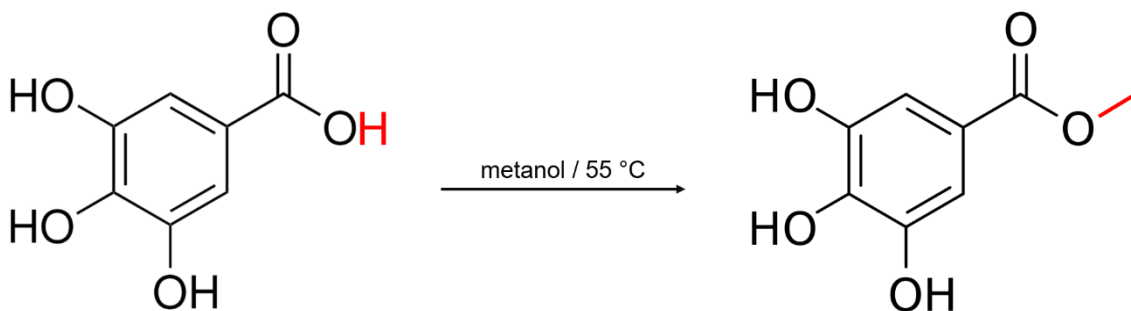
Da bi zmanjšale kopičenje aluminija in z njim povezane poškodbe, so rastline razvile različne fiziološke mehanizme, s katerimi se spopadajo s toksičnostjo prostih Al(III) ionov v prsti. Predmet največ raziskav sta predvsem naslednja mehanizma:

- izražanje genov za odpornost proti Al(III) ionom (regulacija proteinov),
- izločanje snovi, ki kelirajo Al(III) ione in z njimi tvorijo nereaktivne komplekse [26,27].

Pri slednjem mehanizmu rastline izločajo sekundarne metabolite (različne organske kisline, fenolne spojine idr.), med katere uvrščamo tudi tanine, ki so zmožni kelirati Al(III) ione v prsti. Tvorjene koordinacijske spojine za rastline niso toksične, istočasno pa se zmanjša koncentracija Al(III) ionov v prsti. Zato rečemo, da tanini s svojo zmožnostjo vezave aluminijevih ionov občutno vplivajo na njihovo biološko dostopnost v prsti in imajo pomembno vlogo pri obrambnih mehanizmih rastlin [28].

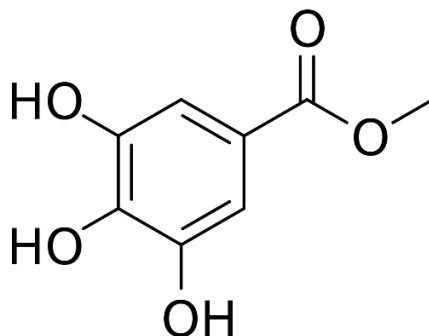
2.2 Metil galat

Metil galat (MeG) je metilni ester galne kisline. Gre za preprost in biološko aktiven polifenol, ki ga je mogoče sintetizirati s procesom kondenzacije galne kisline z metanolom [29]. Omenjen proces prikazuje Slika 4.



Slika 4: Proces kondenzacije galne kisline z metanolom, ki vodi do nastanka metil galata (lasten vir, povzeto po [30])

Najdemo ga tudi v naravi, saj je kot antioksidant prisoten v raznem sadju in zelenjavi, npr. v vzhodnoindijskem mandlju (*Terminalia myriocarpa*), breskvah in granatnem jabolku [29]. Metil galat ($C_8H_8O_5$) je tetrasubstituirani derivat benzena, pri katerem so na centralni benzenov obroč vezane tri hidroksilne ($-OH$) skupine in metil ester ($-COO-CH_3$). Njegovo poimenovanje po IUPAC-nomenklaturi je *metil 3,4,5-trihidroksibenzoat* [29]. Strukturno formulo metil galata prikazuje Slika 5.



Slika 5: Kemijska struktura metil galata (Wikipedia, 2023)

Ker je metil galat derivat galne kisline, se, kot slednja, v študijah obravnava kot monomer hidrolizirajočih taninov (natančneje galotaninov) oz. kot modelna spojina za proučevanje interakcij omenjenih spojin [31].

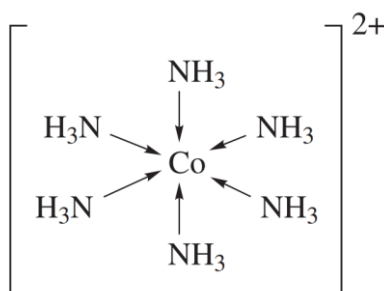
Študije metil galatu, podobno kot hidrolizirajočim taninom, pripisujejo veliko biološko aktivnost oz. številne farmakološke učinke – mdr. deluje antiseptično, antimikrobno, antialergijsko in protivnetno, prav tako pa mu pripisujejo močno antioksidativno delovanje oz. zmožnost lovljenja prostih radikalov [32–35]. Raziskave rastline *Acacia hydastica*, v kateri je izmed biološko aktivnih sestavin prisoten tudi metil galat, prav tako kažejo na obetavno antikancerogeno oz. protirakavo delovanje, saj inducirajo apoptozo rakavih celic [36]. Omeniti velja še študijo, v kateri se je pokazalo, da metil galat zavira razmnoževanje virusa HIV-1, zato je mu pripisujejo tudi protivirusno delovanje [37]. Zaradi protivnetnega učinka pri zdravljenju artritisa ga najdemo v različnih farmacevtskih izdelkih, uporablja pa se tudi v kozmetični in prehrambeni industriji, kjer se dodaja za preprečevanje oksidacije živilskih izdelkov in za podaljšanje njihovega roka uporabnosti [33,38].

2.3 Koordinacijske spojine

V splošnem s pojmom koordinacijske spojine (KS) opredeljujemo spojine, pri katerih so na centralni delec vezane oz. koordinirane nevtralne molekule ali anioni, imenovani ligandi [23,39]. Poleg izraza koordinacijska spojina sta za tovrstne spojine v rabi tudi termina kompleksne spojine oz. (koordinacijski) kompleksi [40].

Ligandi morajo imeti vsaj en nevezni elektronski par, ki ga pri vzpostavitvi koordinacijskih vezi donirajo centralnemu delcu, ki je najpogosteje atom ali ion prehodnih kovin. Ti so idealni kandidati za akceptorje elektronskih parov, saj imajo delno zasedene *d*-orbitale. Njihovo vlogo pa lahko prevzamejo tudi drugi delci, npr. ioni elementov *p*-bloka, kot je Al(III) ion. Tako v koordinacijskih spojinah prevladujejo interakcije med *s* in *p* molekulkimi orbitalami ligandov ter *d*-orbitalami kovinskih atomov oz. ionov [23,24,39].

Primer preprostega koordinacijskega iona prikazuje Slika 6. V tem primeru imajo molekule amonijaka vlogo ligandov, pri katerih dušikov atom donira nevezni elektronski par centralnemu kobaltovemu(II) ionu. Vzpostavljene koordinacijske vezi so prikazane s puščicami.



Slika 6: Heksaaminkobaltov(II) ion (Housecroft, 2005, str. 179)

Različne razporeditve ligandov okrog centralnega delca povezujemo s koordinacijskimi števili. Koordinacijsko število centralnega iona/atoma je število vseh vezi, s katerimi se ligandi vežejo nanj. Večina struktur je takšnih, da je centralni atom v središču nekega poliedra, ligandi pa so v njegovih ogliščih [23]. Ena izmed lastnosti mnogih koordinacijskih spojin je tudi njihova obarvanost, ki je posledica absorpcije vidne svetlobe oz. prehoda elektronov med energijskimi nivoji [23,39].

Tvorbo koordinacijskih spojin lahko proučujemo z različnimi metodami:

- meritvijo magnetnega momenta KS (za določitev števila samskih elektronov v spojini),
- rentgensko kristalografijo ali jedrsko magnetno resonanco (NMR, angl. *nuclear magnetic resonance*) (za določitev strukture KS) in
- UV-Vis-spektroskopijo, potenciometrijo ali voltometrijo za študije ravnotežja (z njimi lahko spremljamo koncentracijo KS v ravnotežnem stanju) [2,40,41].

V zadnjih desetletjih se obsežno raziskuje pomen koordinacijskih spojin v biokemijskih procesih, odkrivajo pa se tudi nove možnosti njihove uporabe v medicinske namene [42].

2.3.1 Koordinacijske spojine taninov

Kot omenjeno, je eden izmed mehanizmov, s katerimi tanini vplivajo na rast bakterij, kelacija esencialnih kovinskih ionov in tvorba koordinacijskih spojin z njimi. Pri nastanku koordinacijskih spojin taninov in kovinskih ionov najprej pride do deprotonacije hidroksilnih skupin. Preostali kisikov atom deprotonirane oblike fenolne skupine liganda v nadaljevanju predstavlja dobro vezavno mesto kovinskih ionov, npr. Fe(II), Fe(III), Zn(II), Al(III) in Cu(II), kar vodi do kelacije ionov in tvorbe koordinacijskih spojin [9].

Številne študije so pokazale, da morajo biti funkcionalne skupine na ligandu primerno orientirane za tvorbo kompleksov med tanini in kovinskimi ioni. Kadar imajo fenolne komponente na svojem obroču zgolj eno OH-skupino, se kovinski ioni namreč ne vežejo in posledično ne pride do tvorbe koordinacijskih spojin. Pokazalo se je, da morajo ustrezati dvema pogojema:

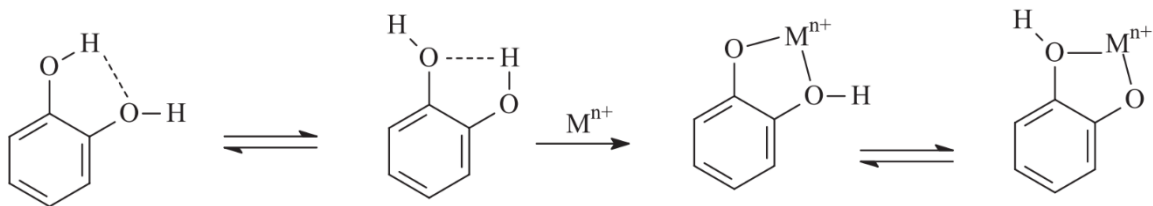
- vsebovati morajo vsaj dve hidroksilni skupini,
- hidroksilni skupini morata biti na sosednjih mestih, saj jim to omogoča tvorbo stabilnih KS [43].

Lastnost tvorbe koordinacijskih spojin danes s pridom izkoriščajo v mnogih študijah, kjer preiskujejo vpliv njihove tvorbe na rast in razvoj bakterij [5,44,45]. Tvorjene koordinacijske spojine pa ne vplivajo zgolj na protibakterijsko aktivnost taninov, temveč prispevajo tudi k njihovi antioksidativni aktivnosti [12].

Ligandi lahko s kovinskimi ioni tvorijo koordinacijske spojine v različnih stehiometričnih razmerjih (najpogosteje 1:1, 2:1 ali 3:1), kar je odvisno od:

- koncentracij liganda in kovinskih ionov ter
- pH-ja raztopine [9].

Reakcija deprotonacije fenolne skupine je prikazana na Sliki 7. Pri tem M^{n+} predstavlja kovinski kation.

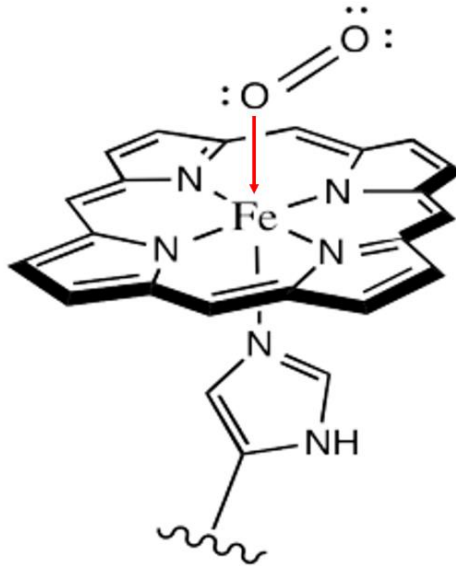


Slika 7: Reakcija deprotonacije kvercetina in nastanka petčlenskega obroča
(lasten vir, povzeto po [12])

2.4 Železo

Železo (Fe) je element 8. skupine periodnega sistema, ki ga zaradi delne zapoljenosti *d*-orbital uvrščamo med prehodne kovine. V naravi je vezan v številnih mineralih in je druga najbolj razširjena kovina v zemeljski skorji, takoj za aluminijem. Je tehnično najpomembnejša kovina, zgodovina njene uporabe pa sega že v čase pred našim štetjem. V človeškem telesu predstavlja pribl. 0,004 %, večina pa ga je vezana v hemoglobinu, beljakovini, ki prenaša kisik iz pljuč v telesna tkiva. Pri tem pride prav do tvorbe kompleksov železa z molekularnim kisikom.

Železovi ioni se uvrščajo med bolj reaktivne, saj težijo k pritegnitvi ali oddaji elektrona in vzpostavitvi elektronskega para [46,47]. Poenostavljen prikaz nastale koordinacijske spojine železa prikazuje Slika 8. Pri tem rdeča puščica predstavlja vzpostavljeno koordinacijsko vez.



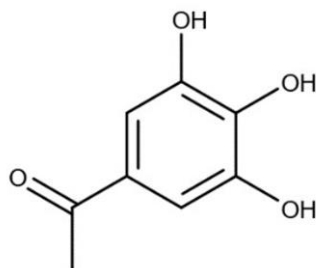
Slika 8: Poenostavljen prikaz odseka hemoglobina, na katerega je preko železa vezan molekularni kisik (LibreTexts Chemistry, 2019)

2.4.1 Koordinacijske spojine železa

Elektronska konfiguracija železovega atoma je $[\text{Ar}]3d^64s^2$. V spojinah se najpogosteje pojavlja v enem izmed dveh oksidacijskih stanjih, +2 in +3. Ligandi, ki najpogosteje sodelujejo pri nastanku koordinacijskih spojin z Fe(II) ioni, pa vsebujejo kisik z dvema prostima elektronskima paroma (npr. CO_2 , O_2 in NO) [39,40].

Pogost vir Fe(II) ionov je železov(II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ki ima obliko granul modrozeleno barve. Kot večina vodnih soli Fe(II) ionov se omenjeni sulfat v vodi raztaplja do heksaakvaželezovih(II) ionov $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Pri nadaljnjem nastanku koordinacijskih spojin pride do zamenjave ligandov vode. Nastale KS imajo najpogosteje koordinacijsko število 6 in oktaedrično razporeditev ligandov (npr. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ in $[\text{Fe}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$). Redkejša pa so koordinacijske spojine Fe(II) ionov, ki imajo koordinacijsko število 4 in tetraedrično razporeditev ligandov (npr. $[\text{FeCl}_4]^{2-}$) [39,40].

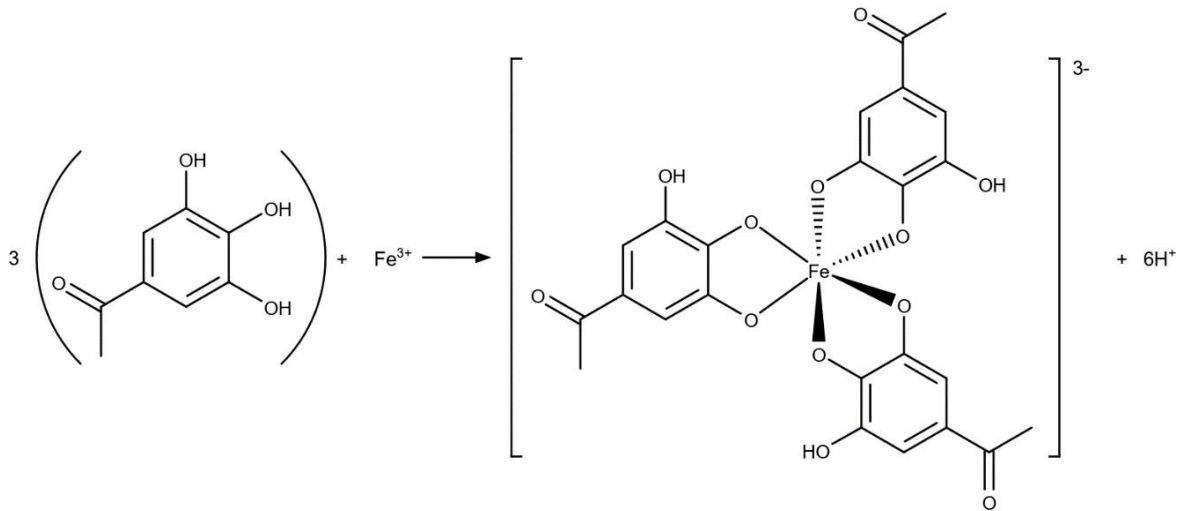
Kot omenjeno, je za Fe(II) in Fe(III) ione značilna oktaedrična razporeditev ligandov, pri čemer se lahko na en železov ion vežejo do trije bidentatni ligandi.³ V primeru taninov so to običajno deprotonirane galoilne enote (Slika 9) [48].



Slika 9: Galoilna enota (lasten vir, povzeto po [14])

Enega izmed mehanizmov tvorbe koordinacijskih kompleksov med galoilnimi enotami in Fe(III) ionom prikazuje Slika 10. Pri tem do kelacije železovega iona pride preko kisikovih atomov po deprotonaciji hidroksilnih skupin galoilnih enot. V konkretnem primeru se na en ion vežejo trije bidentatni ligandi, KS ima oktaedrično razporeditev ligandov, stehiometrično razmerje med ligandi in centralnim ionom pa je 3:1.

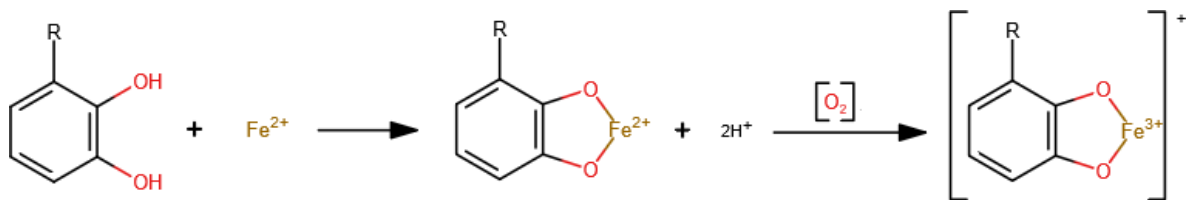
³ **Bidentaten** ali dvovezen ligand – ligand, ki centralnemu delcu donira dva nevezna elektronska para [48].



Slika 10: Eden izmed mehanizmov tvorbe KS med Fe(III) ionom in galoilnimi enotami (Perron, 2016, str. 79)

Poudariti je treba, da stehiometrija polifenolov in železovih ionov vedno ni 3:1. Odvisna je namreč od strukture specifičnih polifenolov (le-te so izredno raznolike) in pH-ja medija [48].

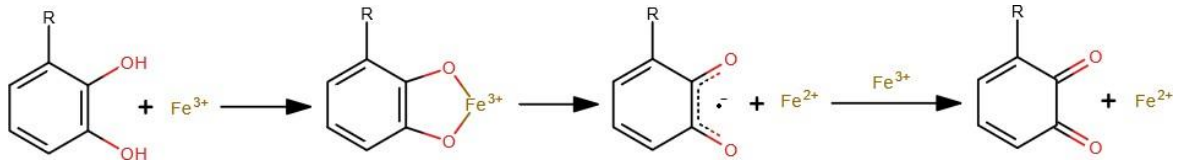
Za KS železovih ionov in polifenolov so značilne tudi redoks reakcije. Železovi(II) ioni namreč v tvorjeni KS s polifenoli ob prisotnosti v raztopini raztopljenega kisika oksidirajo do železovih(III) ionov (nastanejo torej kompleksi Fe(III)–polifenol). Polifenolni ligandi oksidacijo še pospešijo tako, da znižajo redukcijski potencial Fe(II) ionov, saj Fe(III) ione stabilizirajo močnejše kot Fe(II).⁴ Interakcije z Fe(III) ioni so stabilnejše od tistih z Fe(II) ioni [48]. Omenjen proces, imenovan tudi avtooksidacija Fe(II) do Fe(III) ionov, prikazuje Slika 11.



Slika 11: Oksidacija Fe(II) ionov v Fe(III) ione pri tvorbi koordinacijske spojine s polifenoli ob prisotnosti kisika v raztopini (Fermišek, 2021, str. 4)

⁴ **Redukcijski potencial** – merilo za sposobnost spojine oz. njena težnja, da se reducira s sprejemanjem elektrona [49].

Zanimivo je, da lahko, kot prikazuje Slika 12, po vezavi ligandov na Fe(III) ion pride do redukcije le-teh do Fe(II) ionov. Pri tem se polifenolni ligandi oksidirajo do (semi)kinonskih spojin.



Slika 12: Redukcija Fe(III) ionov do Fe(II) ionov po tvorbi koordinacijskih spojin s polifenoli do semikinonske in kinonske spojine (Fermišek, 2021, str. 4)

Koordinacijske spojine, ki jih tvorijo hidrolizirajoči tanini z npr. Fe(III) ioni, se obarvajo modro-vijolično. To lastnost so v preteklosti s pridom izkoriščali pri proizvodnji železo-taninskih črnih [50].

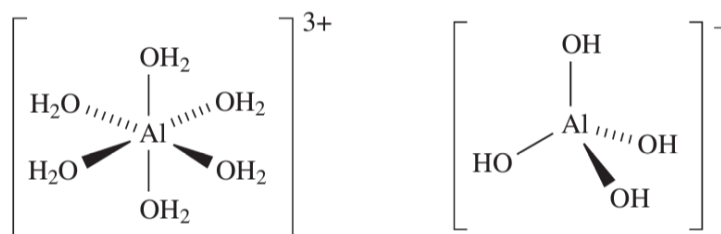
2.5 Aluminij

Aluminij (Al) je element 13. skupine periodnega sistema in najbolj razširjena kovina v zemeljski skorji. V naravi ga ne najdemo v elementarnem stanju, je pa vezan v številnih mineralih, ki gradijo zlasti magmatske kamnine. Prisoten je tudi v glini, zato so ga posredno uporabljale že prve civilizacije. Velja za mehko, lahko in reaktivno kovino. Istočasno je tudi odporen na korozijo, saj se na zraku s procesom pasivacije prevleče s tanko oksidirano plastjo Al_2O_3 [51].

2.5.1 Koordinacijske spojine aluminija

Aluminij je v koordinacijski kemiji zastopan v manjši meri kot železovi ioni. Ni prehodna kovina, vendar je vseeno zmožen tvorbe koordinacijskih spojin.

Elektronska konfiguracija aluminijevega atoma je $[\text{Ne}]3s^23p^1$. V spojinah se najpogosteje pojavlja v oksidacijskem stanju +3, v katerem je najstabilnejši. Večina koordinacijskih aluminijevih(III) spojin ima oktaedrično, npr. $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, ali pa tetraedrično koordinacijo, npr. $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$. Omenjeni spojini prikazuje Slika 13.

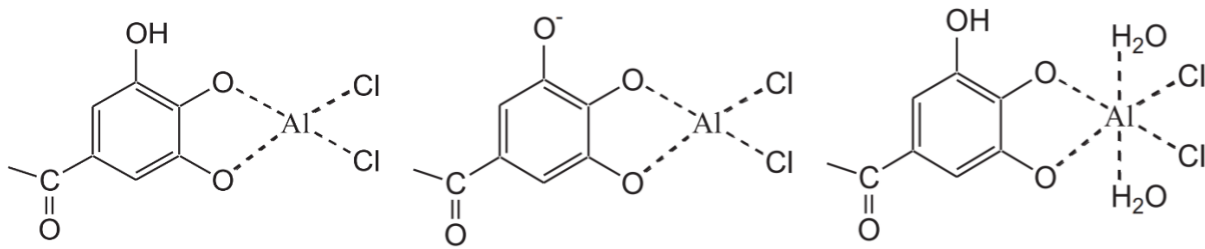


Slika 13: Koordinacijski spojini aluminija z oktaedrično oz. tetraedrično razporeditvijo ligandov (Housecroft, 2005, str. 173)

Kot centralni delec je Al(III) ion prisoten tudi v drugih koordinacijskih spojinah, kot so $[\text{AlF}_6]^{3-}$, $\text{Li}[\text{AlH}_4]$, $[\text{Al}(\text{NO}_3)_4]^-$ idr. Tudi v njih je njegovo koordinacijsko število bodisi 6 bodisi 4.

V naravi Al(III) ioni sodelujejo v različnih reakcijah, tudi s polifenoli. Pri tem pa so študije pokazale, da v primerjavi z Fe(II) ioni aluminijevi ioni sodelujejo v bistveno manj tovrstnih interakcijah, saj niso zmožni tvorbe tako močnih, stabilnih koordinacijskih vezi. Je pa obojim skupno, da do njune kelacije pride preko kisikovih atomov deprotoniranih hidroksilnih skupin [52].

Pri proučevanju interakcij Al(III) ionov in galoilnih enot so bile predlagane različne strukture KS, ki bi potencialno lahko bile tvorjene. Nekatere izmed njih so prikazane na Sliki 14.



Slika 14: Možne kemijske strukture KS Al(III) ionov in galoilne enote (Zhang, 2019, str. 71)

3 METODE DELA

3.1 UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija temelji na merjenju absorpcije elektromagnetnega valovanja (svetlobe) pri prehodu skozi raztopino [53]. Znotraj spektra elektromagnetnega valovanja ločimo različna območja, od mikrovalov, IR (angl. *infrared radiation*), UV (angl. *ultraviolet radiation*) in Vis (angl. *visible radiation*), pa vse do rentgenskega in gama sevanja. V vsakem območju svetloba povzroči različne atomske in molekularne prehode, ki so posledica interakcij elektromagnetnega valovanja s snovjo. V IR-območju npr. pride do nihanj atomov v molekuli, v UV in vidnem območju pa do prehoda elektronov med elektronskimi nivoji. Ko ultravijolična ali vidna svetloba potuje skozi analizirani vzorec, se del svetlobe namreč absorbira, pri čimer elektroni analita preidejo na višji energijski nivo [53,54].⁵

UV-Vis spektroskopijo uporabljamo za kvantitativno določevanje anorganskih, organskih, biološko aktivnih in koordinacijskih spojin, ki absorbirajo svetlobo v področju valovnih dolžin med 190 in 800 nm (ultravijolično in vidno področje) [54]. UV-Vis spektrofotometer je v splošnem sestavljen iz vira svetlobe (devterijeve in volframove žarnice), ki mu sledita monokromator in filter, ki zagotavljata, da vzorec presvetli svetloba točno določene valovne dolžine. Svetloba nato potuje skozi kiveto z vzorcem, kjer se je del absorbira, del odbije, del pa prepusti. Transmitirano oziroma prepuščeno svetlobo zazna detektor, ki svetlobni tok pretvori v električni signal in ga posreduje računalniku. Rezultat meritev je tako spekter odvisnosti transmittance ali absorbance od valovne dolžine [53,54].

Poenostavljen koncept delovanja UV-Vis spektrofotometra prikazuje Slika 15.



Slika 15: Poenostavljen princip delovanja UV-Vis spektrofotometra

(lasten vir, povzeto po [53])

⁵ **Analit** – snov, spojina oz. komponenta, ki jo določamo [55].

Pri merjenju transmittance spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino (slepi vzorec) in skozi merjeni vzorec. Vrednost transmittance (T_{UV-Vis}) je enaka kvocientu med jakostjo svetlobnega toka, ki preide skozi merjeni vzorec (P), in jakostjo svetlobnega toka, ki preide skozi slepi vzorec (P_0). Povezavo med transmittanco, absorbanco in koncentracijo analita opisuje Beer-Lambertov zakon, ki je definiran z enačbo 3.1 [53].

$$A = -\log T_{UV-Vis} = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

kjer je:

A absorbanca [/],

T_{UV-Vis} transmittanca [/],

P_0 jakost vstopnega svetlobnega toka [W],

P jakost transmitiranega, prepuščenega svetlobnega toka [W],

ε molarni absorpcijski koeficient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$],

b dolžina optične poti kivete [cm],

c koncentracija raztopine [$mol \cdot L^{-1}$].

Iz Beer-Lambertovega zakona je razvidno, da je absorbanca analita odvisna od molarne absorpcijskega koeficienta, dolžine optične poti in koncentracije preiskovane snovi. Molarni absorpcijski koeficient (ε) je konstanta, odvisna od vrste preiskovane snovi (njene kemijske strukture) in od valovne dolžine svetlobe [56].

Absorbanca, izmerjena v UV-Vis področju, spada med fizikalne količine, ki so najpogosteje uporabljene za konstrukcijo Jobovega diagrama [57].

3.2 Jobova metoda

Nastanek koordinacijskih spojin je temelj številnih kemijskih, fizikalnih in bioloških procesov. Za obravnavo in njihovo razumevanje je ključnega pomena določitev stehiometrije tvorjenih koordinacijskih spojin [58].

Določimo jo lahko z različnimi metodami. Najpogosteje so v uporabi:

- metoda molskih razmerij,
- metoda naklonskih razmerij in
- metoda zveznih variacij ali Jobova metoda
(angl. *Job's method* ali MCV, angl. *method of continuous variations*) [58,59].

V okviru raziskovalnega dela smo za študijo koordinacijskih spojin uporabili slednjo. Jobova metoda velja za eksperimentalno metodo, s katero lahko na podlagi opazovanja ene izmed lastnosti koordinacijske spojine določimo njeno obstojnost, molarni absorpcijski koeficient in stehiometrijo. Uporablja se predvsem v organokovinski kemiji [57]. Pri tej metodi pripravimo niz binarnih vzorcev, ki vsebujejo raztopino liganda in kovinskih ionov. Skupna množinska koncentracija reaktantov mora biti v vseh vzorcih konstantna (enačba 3.2), posameznim vzorcem pa postopoma spreminjamo množinsko razmerje med ligandi in kovinskimi ioni [60].

$$c = c_K + c_L = k \quad (3.2)$$

kjer je:

c vsota množinskih koncentracij ligandov (L) in kovinskih ionov (K) [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],

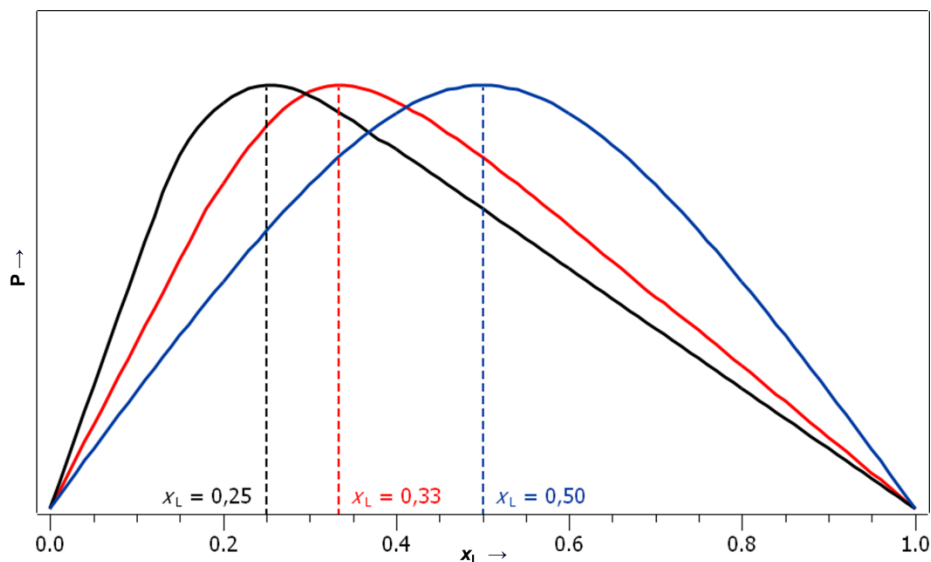
c_K analitska množinska koncentracija kovinskih ionov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],

c_L analitska množinska koncentracija ligandov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],

k konstanta [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

Odvisno količino, v našem primeru absorbanco, merimo, ko se v posamezni raztopini vzpostavi ravnotežje [57]. Pridobljene vrednosti uporabimo za konstrukcijo Jobovega diagrama. Ta prikazuje odvisnost vrednosti fizikalne količine (P) od sestave raztopin (najpogosteje množinskega deleža liganda oz. x_L).

Dobljen Jobov diagram oz. krivulja ima pri določeni sestavi (x_L) maksimum ali minimum. Le-ti nam omogočijo določitev stehiometričnega razmerja med kovinskimi ioni in ligandi oz. stehiometrijo tvorjene koordinacijske spojine [57]. Idealni primeri treh Jobovih krivulj so prikazani na Sliki 16.



Slika 16: Primeri Jobovih krivulj koordinacijskih spojin, ki se nanašajo na različne stehiometrije (Frešer, 2022, str. 20)

Prikazane krivulje imajo maksimume pri vrednostih množinskih deležih ligandov 0,25; 0,33 in 0,50. Vrh pri množinskem deležu 0,25 npr. kaže na to, da je stehiometrija tvorjene koordinacijske spojine 1:3 (en kovinski ion veže tri molekule liganda). Pri množinskih deležih 0,33 in 0,50 pa iz vrhov razberemo, da kovinski ion in ligand reagirata v razmerju 1:2 oz. 1:1 [57,59]

Za uspešno uporabo metode morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- linearna odvisnost merjene (odvisne) količine od koncentracije nastale KS,
- prevladovanje ene KS pri danih pogojih,
- konstantna skupna koncentracija liganda in kovinskega iona v raztopinah ter
- konstantni drugi parametri, npr. pH [60].

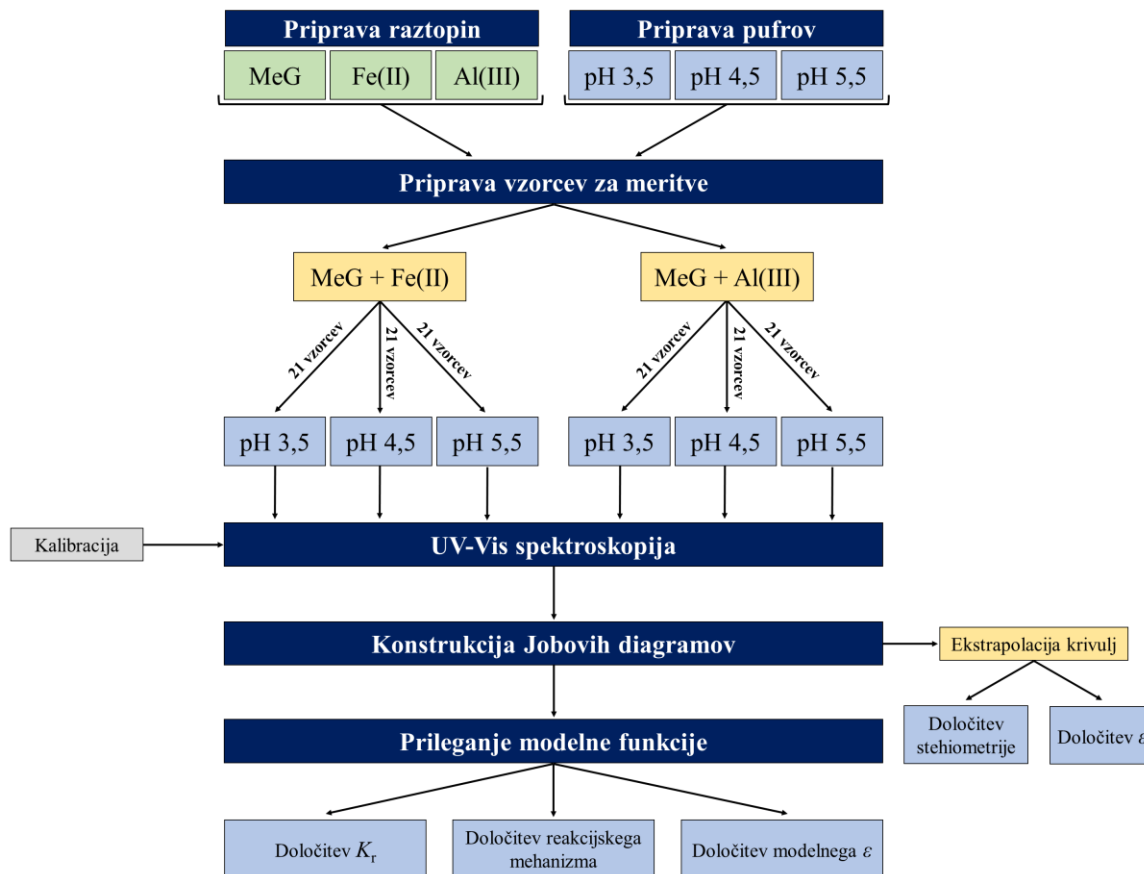
Jobova metoda ima kljub uporabni vrednosti nekaj pomanjkljivosti:

- ne moremo je uporabiti v primeru prisotnosti drugih kemijskih ravnotežnih reakcij – te namreč lahko vplivajo na tvorbo prvotnega kompleksa in onemogočijo pravilno določitev stehiometrije KS,
- v okviru nje ne moremo meriti fizikalne količine, ki ni linearno odvisna od koncentracije nastalega kompleksa,
- v kolikor je v vzorcu prisotna zvrst, ki ne reagira, lahko le-ta povzroči merilno napako [59].

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Načrt dela

Eksperimentalni del naloge smo izvedli v Laboratoriju za fizikalno kemijo in kemijsko termodinamiko na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru. Shemo poteka eksperimentalnega dela prikazuje organigram na Sliki 17.



Slika 17: Shema poteka eksperimentalnega dela (lasten vir)

4.2 Kemikalije in laboratorijska oprema

4.2.1 Kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednje kemikalije:

- $C_8H_8O_5$, metil galat (Fluorochem, Hadfield, Velika Britanija, $M = 184,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- $FeSO_4\cdot 7H_2O$, železov(II) sulfat heptahidrat (Emsure, Darmstadt, Nemčija, vsebnost 99,5–102,0 %, $M = 278,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- $AlCl_3$, aluminijev klorid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemčija, $M = 133,34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- H_2O , voda tipa I (Adrona, Riga, Latvija, $\sigma = 0,055 \text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, vsebnost organskega ogljika $\leq 2 \text{ ppb}$),
- CH_3COONa , natrijev acetat (Emsure, Darmstadt, Nemčija, vsebnost 99,0 %, $M = 82,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- CH_3COOH , etanojska kislina (Emsure, Darmstadt, Nemčija, 100,0 %-raztopina, $M = 60,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),
- standardna raztopina pufra s pH-jem 7 (Honeywell Fluka, Nemčija),
- standardna raztopina pufra s pH-jem 4 (Fluka Analytical, Nemčija).

4.2.2 Laboratorijska oprema

Eksperimentalni del smo izvedli z uporabo naslednjih instrumentov in inventarja:

- analitska tehtnica MS205DU/M (Mettler Toledo, ZDA), s katero smo izmerili mase kemikalij na $1\cdot 10^{-5} \text{ g}$ natančno,
- žlička,
- lopatica za tehtanje,
- kapalke in
- merilne bučke ($V = 100 \text{ mL}$, 50 mL in 25 mL), ki smo jih uporabili pri pripravi raztopin;
- ultrazvočna kopel Ultrasonic cleaner PRO 30 (ASonic, Ljubljana, Slovenija), s katero smo pospešili raztapljanje metil galata, železovega sulfata heptahidrata in aluminijevega klorida;
- centrifugirke ($V = 50 \text{ mL}$), v katere smo shranili založno raztopino Al(III) ionov,
- avtomatske pipete različnih kapacitet ($2\text{--}20 \text{ }\mu\text{L}$, $20\text{--}200 \text{ }\mu\text{L}$, $100\text{--}1000 \text{ }\mu\text{L}$) (Transferpette in LLG-Labware), s katerimi smo odmerili volumne raztopin,

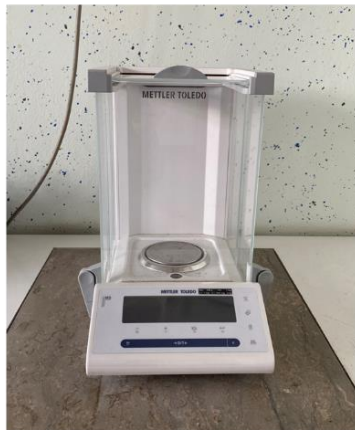
- vortex stresalnik Vortex Wizard (Starlab, Milton Keynes, Velika Britanija), s katerim smo pripravljene vzorce pred izvedbo meritev pretresli,
- pH meter 780 pH meter (Metrohm, Švica), s katerim smo odčitali pH-vrednosti raztopin,
- kombinirana steklena elektroda (Metrohm, Švica), ki smo jo uporabili na pH metru za merjenje pH-ja pufrov,
- magnetno mešalo 801 Stirrer (Metrohm, Švica), ki smo ga uporabili pri pripravi pufrov na pH metru,
- spektrofotometer Cary 4000 UV-Vis Spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, USA), s katerim smo spremljali tvorbo koordinacijskih spojin,
- kivete iz kremenčevega (kvarčnega) stekla z dolžino optične poti 1 cm (Hellma Analytics, Müllheim, Nemčija), ki smo jih uporabili za merjenje absorbance v spektrofotometru.

Instrumente, ki smo jih uporabili pri izvedbi eksperimentalnega dela, prikazuje Slika 18.

a)



b)



c)



d)



e)



Slika 18: Instrumenti, uporabljeni pri izdelavi raziskovalne naloge: a) pH meter, b) analitska tehtnica, c) vortex stresalnik, d) ultrazvočna kopel, e) UV-Vis spektrofotometer (lasten vir)

4.3 Priprava raztopin in pufrov

Pred izvedbo meritev smo si pripravili naslednje raztopine:

- **založna raztopina metil galata s koncentracijo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$**

V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 0,0185 g metil galata, do oznake dolili vodo in bučko postavili v ultrazvočno kopel, da se je topljenec v celoti raztopil. Pripravljeno raztopino s koncentracijo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ smo shranili v zamrzovalniku v mikrocentrifugirkah.

- **raztopina Fe(II) ionov s koncentracijo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$**

V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 0,2782 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, do oznake dolili vodo in bučko postavili v ultrazvočno kopel. V nadaljevanju smo iz prvotne bučke v 25 mL merilno bučko odpipetirali 2,5 mL raztopine in razredčili do oznake. Omeniti velja, da smo morali vsak dan zaradi oksidacije Fe(II) ionov do Fe(III) ionov pripraviti svežo raztopino Fe(II) ionov.

- **založna raztopina Al(III) ionov s koncentracijo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$**

V 100 mL merilno bučko smo zatehtali 0,2667 g AlCl_3 , do oznake dolili vodo in bučko postavili v ultrazvočno kopel. V nadaljevanju smo iz prvotne bučke v 25 mL merilno bučko odpipetirali 2,5 mL raztopine in razredčili do oznake. Te raztopine ni bilo potrebno dnevno sveže pripraviti, saj aluminij ne oksidira v višja oksidacijska stanja.

- **acetatni pufri s pH-ji 3,5; 4,5 in 5,5**

Acetatne pufre smo pripravili z raztapljanjem natrijevega acetata v vodi in potrebnim dodatkom etanojske kisline. Pri tem smo v 500 mL čašo zatehtali določeno maso natrijevega acetata in dolili vodo, da se je topljenec v celoti raztopil. Zatehtane mase natrijevega acetata so prikazane v Tabeli 1.

Tabela 1: Sestava posameznih acetatnih pufrov

pH-pufra	3,5	4,5	5,5
sestava			
$m(\text{CH}_3\text{COONa})$ [g]	0,1246	1,1630	2,3170

V nadaljevanju smo uporabili pH meter s kombinirano stekleno elektrodo, ki smo jo pred merjenjem kalibrirali s standardnima raztopinama pufrov (s pH-vrednostma 4,00 in 7,00). Po umeritvi smo pričeli z merjenjem pH-ja posameznega acetatnega pufra. Pri tem smo v raztopino z avtomatsko pipeto postopoma dodajali koncentrirano etanojsko kislino. Ko je bila pH-vrednost ustrezna, smo dobljene pufre shranili za nadaljnjo uporabo. Njihove množinske koncentracije so bile $6,3 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.4 UV-Vis spektroskopija in priprava vzorcev metil galata ter kovinskih ionov

Po pripravi osnovnih raztopin in pufrov smo proučevali reakcije metil galata z Fe(II) in Al(III) ioni. Vrednosti absorbanc vzorcev smo izmerili z UV-Vis spektrofotometrom v kivetah iz kremenčevega (kvarčnega) stekla z dolžino optične poti 1 cm. Vse meritve smo izvedli pri temperaturi 25 °C. Sestave posameznih vzorcev, območja valovnih dolžin svetlobe in dolžina izvajanja meritev so se razlikovale glede na kovinske ione, ki so reagirali z metil galatom. Vsem merjenim vzorcem pa sta bila skupna volumen (1,5 mL) in prisotnost acetatnega pufra, s katerim smo zagotovili konstanten pH, kar je eden izmed pogojev za izvedbo Jobove metode. Prav tako smo pred vsakim nizom meritev za t. i. bazno linijo pomerili slepi vzorec. Ta je vedno vseboval 1,2 mL pufra z ustrežno vrednostjo pH-ja in 0,3 mL vode.

4.4.1 Interakcije metil galata z Fe(II) ioni

a) Sestava vzorcev:

Vzorci so se med seboj razlikovali po množinskih deležih MeG (x_{MeG}) in Fe(II) ionov. Posamezen vzorec smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko z volumnom 1,5 mL dodali 1,2 mL ustreznega acetatnega pufra in 0,3 mL skupne prostornine raztopin MeG in Fe(II) ionov. Njuno skupno množinsko koncentracijo definira enačba 4.2. Pri prikazovanju sestave vzorca, nadaljnjih izračunih in konstrukciji diagramov pa smo uporabili množinski delež metil galata, ki je definiran z enačbo 4.1. V obeh enačbah K predstavlja Fe(II) ione.

$$x_{\text{MeG}} = \frac{n_{\text{MeG}}}{n_{\text{MeG}} + n_{\text{K}}} = \frac{c_{\text{MeG}}}{c} \quad (4.1)$$

$$c = c_{\text{MeG}} + c_{\text{K}} \quad (4.2)$$

kjer je:

x_{MeG} množinski delež metil galata [/],

n_{MeG} množina metil galata [mol],

n_{K} množina kovinskih ionov [mol],

c_{MeG} množinska koncentracija metil galata [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],

c_{K} množinska koncentracija kovinskih ionov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],

c skupna množinska koncentracija metil galata in kovinskih ionov [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

Sestavo posameznih raztopin oz. skupne prostornine metil galata in Fe(II) ionov prikazuje Tabela 2. V njej V_{MeG} predstavlja prostornino raztopine metil galata, $V_{\text{Fe(II)}}$ pa prostornino raztopine železovih(II) ionov v posameznem vzorcu.

Tabela 2: Sestava vzorcev MeG in Fe(II) ionov

št. vzorca	x_{MeG}	V_{MeG} [μL]	$V_{\text{Fe(II)}}$ [μL]
0	0,00	0	300
1	0,05	15	285
2	0,10	30	270
3	0,15	45	255
4	0,20	60	240
5	0,25	75	225
6	0,30	90	210
7	0,35	105	195
8	0,40	120	180
9	0,45	135	165
10	0,50	150	150
11	0,55	165	135
12	0,60	180	120
13	0,65	195	105
14	0,70	210	90
15	0,75	225	75
16	0,80	240	60
17	0,85	255	45
18	0,90	270	30
19	0,95	285	15
20	1,00	300	0

b) Območje valovnih dolžin

Tvorbo KS metil galata in Fe(II) ionov smo opazovali v območju valovnih dolžin med 450 in 650 nm. Korak meritve je bil 1 nm, meritev pri posamezni valovni dolžini pa je trajala 0,2 sekunde.

c) Dolžina opazovanja

Vzorcem pri pH-ju 5,5 smo absorbanco izmerili eno uro po njihovi pripravi, vzorcem pri nižjih pH-jih pa smo absorbanco merili 10 (pH 4,5) oz. 20 ur (pH 3,5).

4.4.2 Interakcije metil galata z Al(III) ioni

a) Sestava vzorcev:

Posamezen vzorec smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko z volumnom 1,5 mL dodali 1,2 mL ustreznega acetatnega pufra, 150 μL vode in 150 μL skupne prostornine raztopin MeG in Al(III) ionov. Njuno skupno množinsko koncentracijo definira enačba 4.2. Pri prikazovanju sestave vzorca, nadaljnjih izračunih in konstrukciji diagramov pa smo uporabili množinski delež metil galata, ki je definiran z enačbo 4.1. V obeh enačbah K predstavlja Al(III) ione.

Sestavo posameznih raztopin oz. skupne prostornine metil galata in Al(III) ionov prikazuje Tabela 3. V njej V_{MeG} predstavlja prostornino raztopine metil galata, $V_{\text{Al(III)}}$ pa prostornino raztopine aluminijevih(III) ionov v posameznem vzorcu.

Tabela 3: Sestava vzorcev MeG in Al(III) ionov

št. vzorca	x_{MeG}	V_{MeG} [μL]	$V_{\text{Al(III)}}$ [μL]
0	0,00	0,0	150,0
1	0,05	7,5	142,5
2	0,10	15,0	135,0
3	0,15	22,5	127,5
4	0,20	30,0	120,0
5	0,25	37,5	112,5
6	0,30	45,0	105,0
7	0,35	52,5	97,5
8	0,40	60,0	90,0
9	0,45	67,5	82,5
10	0,50	75,0	75,0
11	0,55	82,5	67,5
12	0,60	90,0	60,0
13	0,65	97,5	52,5
14	0,70	105,0	45,0
15	0,75	112,5	37,5
16	0,80	120,0	30,0
17	0,85	127,5	22,5
18	0,90	135,0	15,0
19	0,95	142,5	7,5
20	1,00	150,0	0,0

b) Območje valovnih dolžin

Tvorbo KS metil galata in Al(III) ionov smo opazovali v območju valovnih dolžin med 200 in 500 nm. Korak meritve je bil 1 nm, meritev pri posamezni valovni dolžini pa je trajala 0,2 sekunde.

c) Dolžina opazovanja

Vsem vzorcem smo absorbanco izmerili neposredno po pripravi vzorcev.

4.5 UV-Vis spektri metil galata in koordinacijskih spojin metil galata s kovinskimi ioni

Proučevanje reakcij med MeG in Fe(II) ioni smo začeli tako, da smo pri vseh treh pH-jih pomerili UV-Vis spektre metil galata v prosti obliki, tj. brez dodatka Fe(II) ionov ($x_{\text{MeG}} = 1,00$), in UV-Vis spektre raztopin, v katerih sta bila množinska deleža MeG in Fe(II) ionov enaka ($x_{\text{MeG}} = 0,50$). Tako smo lahko spremljali spremembe UV-Vis spektra metil galata pri tvorbi koordinacijske spojine z železovimi(II) ioni.

UV-Vis spekter izbranih vzorcev smo pomerili vsakih pet minut in opazovali, po kolikšnem času se pri določenem pH-ju vzpostavi kemijsko ravnotežje (tj. kdaj se vrednosti absorbance v okviru eksperimentalne napake več bistveno ne spreminjajo). Na podlagi tega smo določili dolžino opazovanja oz. merjenja absorbanc nizov vzorcev (vseh raztopin MeG in Fe(II) ionov). Pred meritvami vsakega niza smo spektrofotometer umerili s slepim vzorcem, čigar absorbance smo pri kasnejši obdelavi podatkov odšteli od absorbanc posameznih vzorcev. Iz sprememb spektra smo določili tudi območje valovnih dolžin, kjer sta se spektra najbolj razlikovala. To območje smo v nadaljevanju uporabili za proučevanje KS, tvorjenih med MeG in Fe(II).

Dolžino opazovanja in opazovano območje valovnih dolžin smo predhodno določili tudi za raztopine, v katerih je prišlo do tvorbe KS med MeG in Al(III) ioni. Pri tem smo pri vsakem pH-ju primerjali UV-Vis spekter raztopine z ekvimolarnim množinskim deležem MeG in Al(III) ionov ($x_{\text{MeG}} = 0,50$) s spektrom identične raztopine brez dodanih Al(III) ionov – vsi merjeni vzorci (pri različnih pH-jih) so tako vsebovali enako množino MeG. Ob razlikah v spektrih absorbanc smo, tako kot pri Fe(II) ionih, opazovali tudi, koliko časa je potrebno za vzpostavitev ravnotežja pri posameznem pH-ju.

4.6 Jobov diagram

Za koordinacijske spojine, ki so nastale pri reakcijah metil galata z Fe(II) oz. Al(III) ioni, smo iz pridobljenih vrednosti absorbanc konstruirali Jobov diagram. Za vsak diagram smo, kot omenjeno, pripravili niz 21 vzorcev (Tabeli 2 in 3) z različnimi množinskimi deleži MeG pri treh različnih pH-jih: 3,5; 4,5 in 5,5.

Z Jobovo metodo smo pokazali, kako se absorbanca raztopin spreminja v odvisnosti od njihove sestave in pH-ja. V nadaljevanju smo dobljene Jobove krivulje ekstrapolirali s prileganjem trendnih črt, na podlagi njunih presečišč razbrali, pri kolikšnem množinskem deležu MeG ima krivulja maksimum, ter iz njega določili stehiometrije tvorjenih koordinacijskih spojin in njihove molarne absorpcijske koeficiente v omenjenem pH-območju.

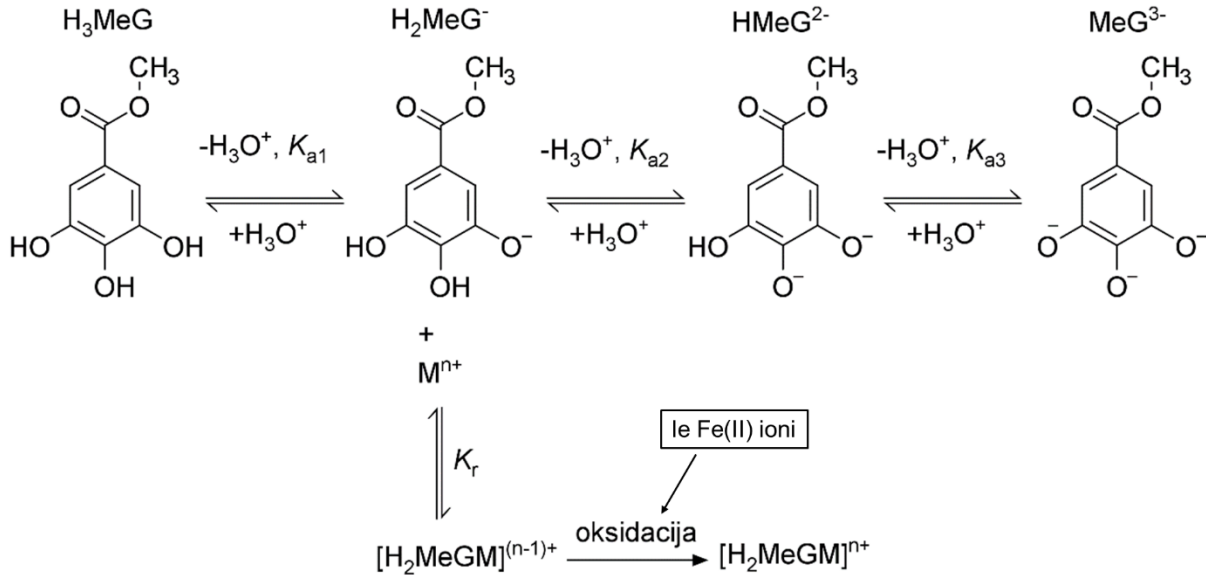
4.7 Ujemanje modelne funkcije in Jobovega diagrama

Reakcijo med metil galatom in železovimi(II) oz. aluminijevimi(III) ioni smo poskušali opisati z uporabo modelne funkcije. Z njo smo z vključitvijo različnih spremenljivk opisali eksperimentalno določene točke Jobovega diagrama in izračunali konstanto ravnotežja za tvorbo koordinacijske spojine (K_r) ter pripadajoči modelni molarni absorpcijski koeficient (ϵ). S pomočjo modela smo določili še, katera zvrst metil galata preferenčno reagira z Fe(II) in Al(III) ioni v opazovanem pH-območju.

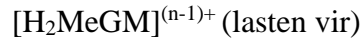
4.7.1 Model

Pri modelu smo predpostavili, da z Fe(II) oz. Al(III) ioni reagira le ena zvrst (H_2MeG^-), ki je v ravnotežju s preostalimi zvrstmi metil galata. S tem smo v modelno funkcijo vključili tudi opaženo odvisnost absorbance od pH-ja. Predpostavili smo reakcijsko shemo, ki je prikazana na Sliki 19. Preizkusili smo tudi preostale možne modele, pri katerih s posameznimi kovinskimi ioni posamično reagirajo druge zvrsti MeG, a se je izkazalo, da model, ki je izpeljan za zvrst H_2MeG^- , najboljše opiše dano reakcijo oz. da je pri njem največje ujemanje teoretično izračunanih in eksperimentalno določenih vrednosti absorbanc.

Na reakcijski shemi črka M predstavlja posamezen kovinski ion. Omeniti pa velja, da je lahko metil galat pri zvrsteh H_2MeG^- in HMeG^{2-} deprotoniran tudi na drugih mestih, kot je prikazano na sliki, ter da do nadaljnje oksidacije tvorjene KS pride le v primeru, ko MeG reagira z Fe(II) ioni.



Slika 19: Reakcijska shema modela, pri kateri zvrst H_2MeG^- , ki je v ravnotežju s preostalimi zvrstmi, reagira z Fe(II) oz. Al(III) ioni, pri čemer nastane koordinacijska spojina



Iz reakcijske sheme na Sliki 19 smo izpeljali modelno funkcijo (enačba 4.14) za ravnotežno reakcijo zvrsti H_2MeG^- s kovinskimi ioni, pri kateri pride do tvorbe koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$. Modelne funkcije, kjer je bilo predpostavljeno, da s kovinskimi ioni reagirajo druge zvrsti metil galata, so bile izpeljane na analogen način. Matematičen zapis ravnotežja za reakcijo zvrsti H_2MeG^- s posameznimi kovinskimi ioni prikazuje enačba 4.3.

$$K_r = \frac{[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}}{[\text{H}_2\text{MeG}^-] \cdot [\text{M}^{n+}]} \quad (4.3)$$

kjer je:

$[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$ ravnotežna koncentracija koordinacijske spojine enkrat deprotoniranega metil galata in kovinskih ionov $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{H}_2\text{MeG}^-]$ ravnotežna koncentracija enkrat deprotoniranega metil galata $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{M}^{n+}]$ ravnotežna koncentracija posameznih kovinskih ionov $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$.

Iz reakcij disociacij MeG, ki so prikazane na Sliki 19, sledijo enačbe 4.4 – 4.6, pri katerih smo vrednosti $\text{p}K_a$ metil galata pridobili s programom MarvinSketch (ChemAxon, Madžarska).

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}_2\text{MeG}^-] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{MeG}]} = 7,762 \cdot 10^{-9} \quad (4.4)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{HMeG}^{2-}] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_2\text{MeG}^-]} = 5,248 \cdot 10^{-12} \quad (4.5)$$

$$K_{a3} = \frac{[\text{MeG}^{3-}] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HMeG}^{2-}]} = 1,698 \cdot 10^{-14} \quad (4.6)$$

kjer so:

K_{a1} , K_{a2} , K_{a3} konstante disociacij posameznih ravnotežnih zvrsti metil galata [/],

$[\text{H}_3\text{MeG}]$ ravnotežna koncentracija nevtralnega metil galata $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{H}_2\text{MeG}^-]$ ravnotežna koncentracija enkrat deprotoniranega metil galata $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{HMeG}^{2-}]$ ravnotežna koncentracija dvakrat deprotoniranega metil galata $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{MeG}^{3-}]$ ravnotežna koncentracija trikrat deprotoniranega metil galata $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$,

$[\text{H}_3\text{O}^+]$ ravnotežna koncentracija oksonijevih ionov $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$.

Skupno koncentracijo metil galata lahko zapišemo kot vsoto koncentracij posameznih ravnotežnih zvrsti, kot prikazuje enačba 4.7, oz. kot vsoto ravnotežnih koncentracij nevtralne oblike metil galata (nezreagirani preostanek), možnih deprotoniranih zvrsti metil galata in tvorjene koordinacijske spojine (oz. metil galata, vezanega vanjo).

$$c_{\text{MeG}} = [\text{H}_3\text{MeG}] + [\text{H}_2\text{MeG}^-] + [\text{HMeG}^{2-}] + [\text{MeG}^{3-}] + [\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+} \quad (4.7)$$

Koncentracijo posameznih zvrsti smo izrazili iz enačb 4.4 – 4.6 in jih vstavili v enačbo 4.7. V njej smo izpostavili člen $[\text{H}_3\text{MeG}]$ ter dobljen izraz v oklepaju v enačbi 4.8 iz praktičnih razlogov zamenjali s spremenljivko z , ki je funkcija koncentracije oksonijevih ionov (torej pH-ja) in konstant disociacij metil galata. Tako smo dobili enačbo 4.9, ki prikazuje skupno koncentracijo metil galata v posameznem vzorcu.

$$c_{\text{MeG}} = [\text{H}_3\text{MeG}] \cdot \left(1 + \frac{K_{a1}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^3} \right) + [\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+} \quad (4.8)$$

$$c_{\text{MeG}} = [\text{H}_3\text{MeG}] \cdot z + [\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+} \quad (4.9)$$

Iz enačb 4.4 in 4.9 smo izrazili koncentracijo zvrsti H_2MeG^- , ki je prikazana z enačbo 4.10.

$$[\text{H}_2\text{MeG}^-] = \frac{\left(c_{\text{MeG}} - [\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+} \right) \cdot K_{a1}}{z \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]} \quad (4.10)$$

Z enačbo 4.11 smo zapisali masno bilanco posameznih kovinskih ionov, ki opisuje, da je ravnotežna koncentracija le-teh v posameznem vzorcu enaka razliki koncentracije dodanih ionov in koncentracije tvorjene KS (oz. keliranih kovinskih ionov). Nato smo vpeljali novo spremenljivko U , ki smo jo definirali z enačbo 4.12 in jo poimenovali navidezna konstanta ravnotežja.

Preostale predpostavke so enake tistim, ki smo jih definirali z enačbama 4.1 in 4.2. Z vstavitvijo enačb 4.2 in 4.9 – 4.12 v enačbo 4.3 smo prišli do končnega izraza, ki je podan s kvadratno enačbo 4.13. Le-to se pogosto uporablja za opis reakcij, pri katerih nastane KS s stehiometrijo 1:1 [57].

$$[M^{n+}] = c_{M^{n+}} - [H_2MeGM]^{(n-1)+} \quad (4.11)$$

$$U_{[H_2MeGM]^{(n-1)+}} = \frac{K_r \cdot K_{al}}{Z \cdot [H_3O^+]} \quad (4.12)$$

$$U \cdot [H_2MeGM]^2 - (U \cdot c + 1) \cdot [H_2MeGM] + U \cdot c \cdot c_{MeG} - U \cdot c_{MeG}^2 = 0 \quad (4.13)$$

Z upoštevanjem rešitve kvadratne enačbe (fizikalno smiselno rešitev namreč dobimo le, če pred kvadratnim korenem upoštevamo negativen predznak – le takrat bo koncentracija tvorjene koordinacijske spojine pozitivna), Beer-Lambertovega zakona (enačba 3.1) in enačbe 4.1 smo dobili modelno funkcijo, ki je prikazana z enačbo 4.14. Pri tem smo rešitev kvadratne enačbe, torej koncentracijo tvorjene KS, vstavili v Beer-Lambertov zakon in po njem izračunali teoretične (modelne) vrednosti absorbanc vzorcev, ki smo jih primerjali oz. prilegali eksperimentalno pridobljenim vrednostim.

$$A_{\text{model}} = [H_2MeGM]^{(n-1)+} \cdot \varepsilon \cdot b = \frac{1 + U \cdot c - \sqrt{1 + 2 \cdot U \cdot c + [U \cdot c \cdot (1 - 2 \cdot x_{MeG})]^2}}{2 \cdot U} \cdot \varepsilon \cdot b \quad (4.14)$$

Izpeljava modelnih funkcij, pri katerih je bilo predpostavljeno, da s kovinskimi ioni reagirajo druge posamezne zvrsti metil galata, je analogna izpeljavi za zvrst H_2MeG^- . Končne funkcije so enake oblike kot enačba 4.14, med seboj pa se razlikujejo le v navidezni ravnotežni konstanti U . Enačbe 4.15 – 4.17 tako prikazujejo zapis navidezne konstante ravnotežja U za različne možne tvorjene koordinacijske spojine.

$$U_{[\text{H}_3\text{MeGM}]^{n+}} = \frac{K_r}{z} \quad (4.15)$$

$$U_{[\text{HMeGM}]^{(n-2)+}} = \frac{K_r \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{z \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^2} \quad (4.16)$$

$$U_{[\text{MeGM}]^{(n-3)+}} = \frac{K_r \cdot K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{z \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^3} \quad (4.17)$$

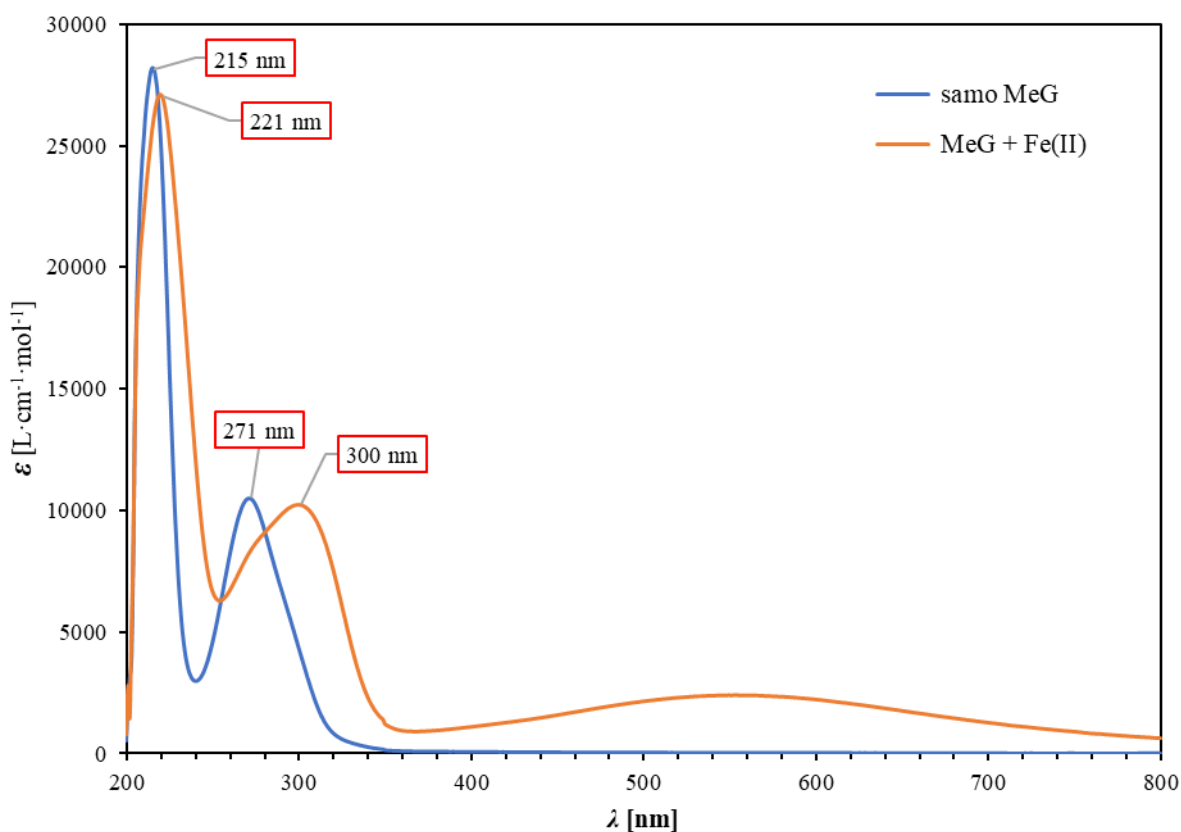
Modelne vrednosti absorbanc, podane z enačbo 4.14, smo v nadaljevanju primerjali z izmerjenimi vrednostmi. Prileganje modelne funkcije smo izvedli tako, da smo kot prilagodljiva parametra vzeli ε in K_r . Najustreznejši vrednosti teh dveh spremenljivk pa smo določili z metodo najmanjših kvadratov, pri čemer smo uporabili prileganje, s katerim smo določili vrednosti prilagodljivih parametrov, pri katerih so razlike med modelnimi in eksperimentalnimi vrednostmi absorbanc najmanjše.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Koordinacijske spojine metil galata s kovinskimi ioni

5.1.1 Koordinacijske spojine metil galata z Fe(II) ioni

Primerjava UV-Vis absorpcijskega spektra raztopine z ekvimolarno množino metil galata in železovih(II) ionov ($x_{\text{MeG}} = 0,50$) s spektrom raztopine metil galata v prosti obliki je pri vseh treh vrednostih pH-ja pokazala, da v območju valovnih dolžin med 500 in 600 nm pride do pojava širokega absorpcijskega vrha. Ta je posledica tvorbe koordinacijske spojine, saj metil galat v tem območju svetlobe ne absorbira. Omenjeno spektralno območje smo nekoliko razširili (med 450 in 650 nm) in ga v nadaljevanju uporabili pri merjenju absorbanc nizov vzorcev raztopin MeG in Fe(II) ionov. Drugih večjih sprememb spektra ni bilo, pri tvorbi KS je prišlo le do rdečega premika (angl. *red shift*) značilnih absorpcijskih vrhov metil galata v desno, tj. proti daljšim valovnim dolžinam. Prvi vrh se je premaknil za 6 nm, drugi pa za 29 nm. Absorpcijski spekter raztopine metil galata v prosti obliki ter raztopine z ekvimolarno množino MeG in Fe(II) ionov pri pH-ju 5,5 prikazuje Graf 1. Za prikaz obeh spektrov smo izmerjene absorbance pretvorili v molarne absorpcijske koeficiente (ε), pri čemer smo v obeh primerih upoštevali koncentracijo MeG, ki je znašala $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



Graf 1: Primerjava UV-Vis absorpcijskih spektrov raztopine MeG v prosti obliki ter raztopine z ekvimolarno množino MeG in Fe(II) pri pH-ju 5,5 ($c_{\text{MeG}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Primerjava izmerjenih spektrov z izsledki drugih je pokazala, da so enak absorpcijski spekter raztopine MeG v prosti obliki izmerili tudi Prakashkumar, N. in sodelavci v svoji študiji nevroproteksijskega potenciala metil galata [61]. O nastanku absorpcijskega vrha v omenjenem območju valovnih dolžin pri tvorbi KS galne kisline z Fe(II) ioni pa so poročali tudi Lu, L. in sodelavci [62].

Posledica absorpcijskega vrha v omenjenem spektralnem območju je bila obarvanost raztopin. Z nastankom koordinacijskih vezi med ligandi (MeG) in kovinskimi (Fe(II)) ioni se elektronski energijski nivoji slednjih namreč tako spremenijo, da oksidirajo v višje oksidacijsko stanje oz. do stabilnejših Fe(III) ionov. Nastanek teh ionov pa zaznamo kot modro-vijolično obarvanost raztopin. Podobno so opazili Frešer, F. in sodelavci v študiji tvorbe koordinacijskih spojin galne kisline in Fe(II) ionov [10].

Vzporedno z nastankom Fe(III) ionov se je po določenem času ustalila tudi absorbanca raztopin, testne vzorce pa smo opazovali dalje, da bi ugotovili, ali se bo po določenem času nastala koordinacijska spojina začela obarjati. Do nastanka oborine ni prišlo pri nobenem vzorcu.

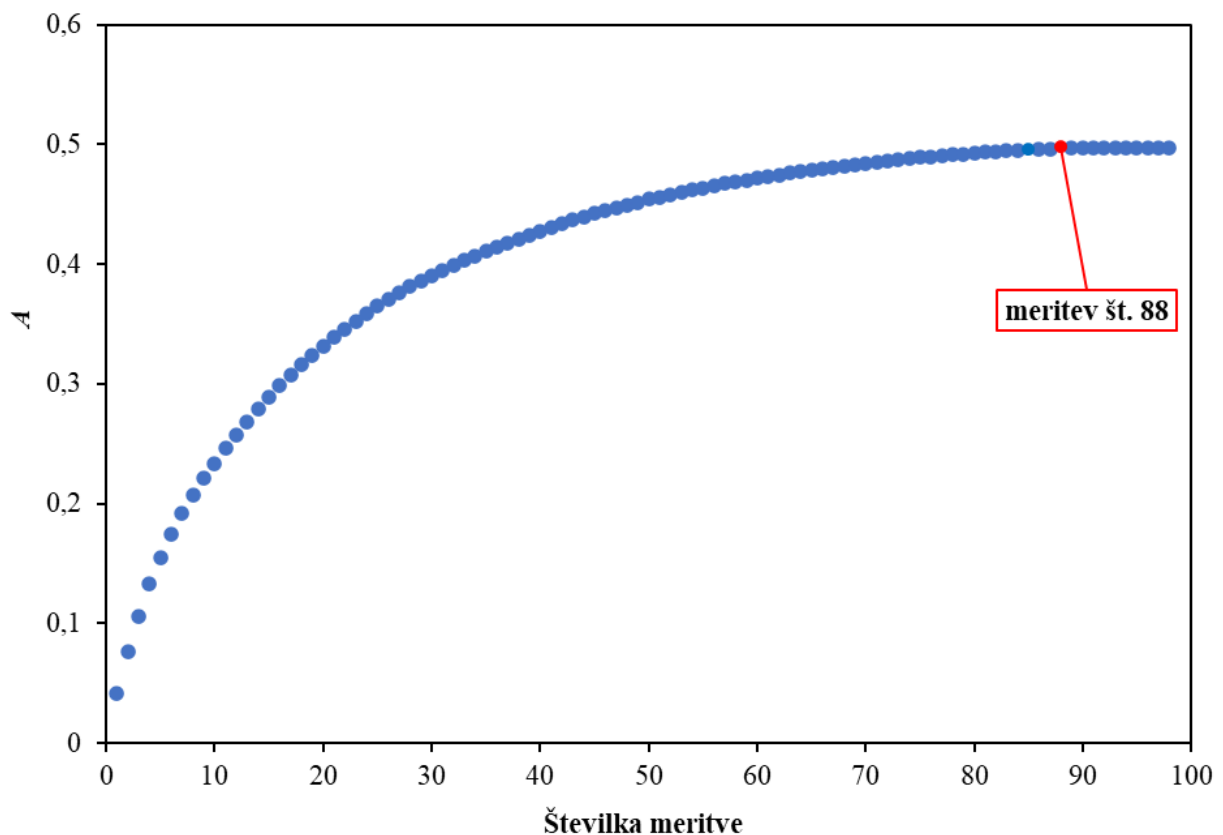
Na podlagi ugotovljene časovne odvisnosti absorbance testnih raztopin z ekvimolarno množino reagentov pri posameznem pH-ju smo sklepali, koliko časa je potrebno, da se v raztopinah MeG in Fe(II) ionov vzpostavi kemijsko ravnotežje, ko se absorbanca bistveno več ne spreminja. Tako smo pri nadaljnjih meritvah absorbanc nizov vzorcev raztopin MeG in Fe(II) ionov upoštevali, da raztopine pri pH-ju 5,5 ravnotežno stanje dosežejo v eni uri po njihovi pripravi, medtem ko je pri nižjih pH-jih potrebno počakati približno 10 (pH 4,5) oz. 20 ur (pH 3,5). Na tej točki velja poudariti, da pri tem ne moremo govoriti o hitrosti vezave, temveč o hitrosti oksidacije Fe(II) ionov.

Obarvanost raztopine MeG in Fe(II) ionov prikazuje Slika 20, na kateri je vidna razlika v obarvanosti levega (stanje brez dodatka Fe(II) ionov) in desnega vzorca (stanje po vzpostavitvi ravnotežja oz. po nastanku koordinacijskih spojin).



Slika 20: Obarvanost raztopine MeG in Fe(II) ionov brez dodatka Fe(II) ionov (levi vzorec) in po vzpostavitvi ravnotežja (desni vzorec) (lasten vir)

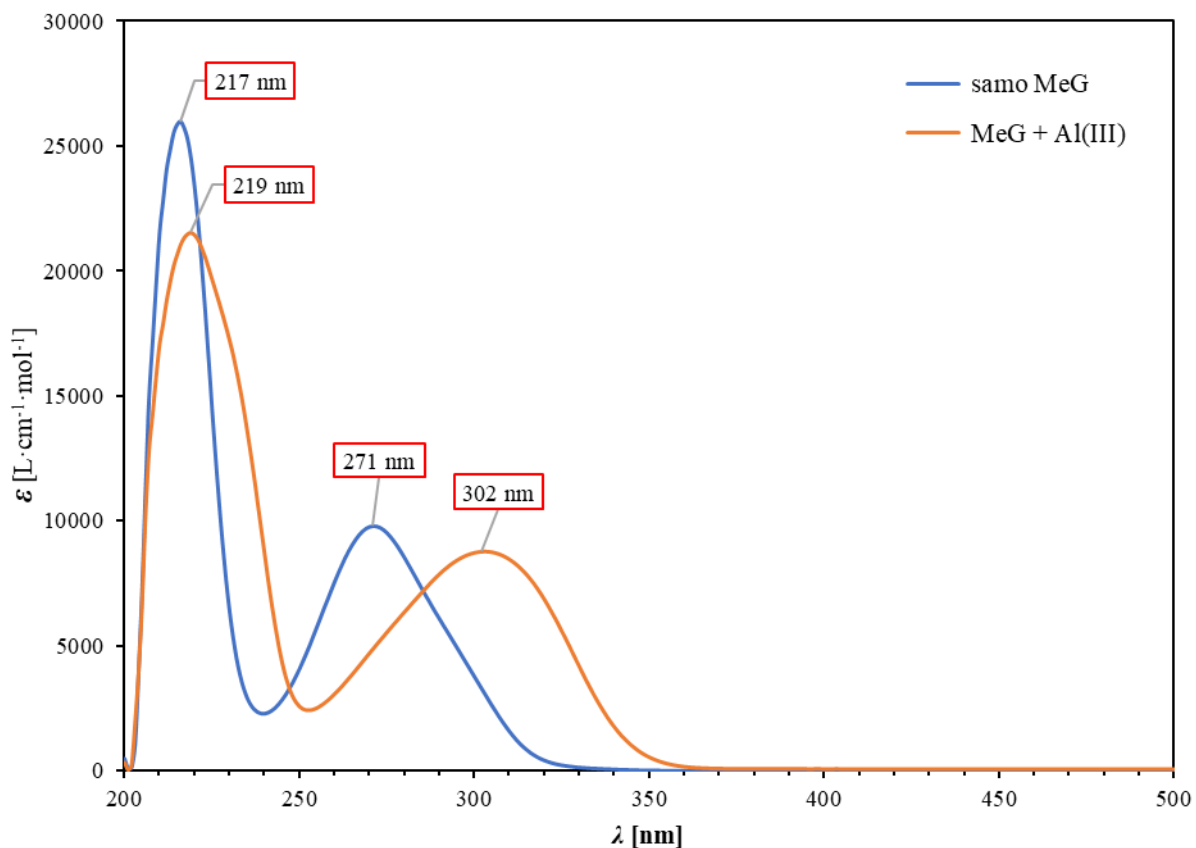
Pri posameznih vzorcih se je pri istem pH-ju zaradi drugačne sestave raztopin (x_{MeG}) ravnotežje vzpostavilo tudi prej. Meritev, pri kateri je prišlo do tega, smo zato za vsak vzorec pri pH-jih 4,5 in 3,5 razbrali z grafa časovne odvisnosti absorbance posamezne raztopine – izbrali smo točko (številko zaporedne meritve), ki je nakazovala ustalitev oz. izravnavo krivulje absorbance. Ker je obstajal dovolj dolg interval, ko se je vrednost absorbance ustalila, smo predpostavili, da je to maksimalna koncentracija nastale KS. Pri konstrukciji Jobovega diagrama smo v nadaljevanju uporabili vrednosti absorbanc pri tej meritvi. Konkreten primer (vzorec MeG in Fe(II) ionov pri pH-ju 4,5 z $x_{\text{MeG}} = 0,40$) prikazuje Graf 2, na katerem je z rdečo barvo označena izbrana točka.



Graf 2: Časovni potek nastajanja koordinacijske spojine pri reakciji MeG z Fe(II) ioni ($x_{\text{MeG}} = 0,40$; pH = 4,5) s spremljanjem odvisnosti absorbance pri valovni dolžini 570 nm

5.1.2 Koordinacijske spojine metil galata z Al(III) ioni

Primerjava UV-Vis absorpcijskega spektra raztopine z ekvimolarno množino metil galata in aluminijevih(III) ionov ($x_{\text{MeG}} = 0,50$) s spektrom identične raztopine brez dodanih Al(III) ionov je pri vseh treh pH-jih pokazala, da v območju valovnih dolžin med 250 in 450 nm pride do pojava absorpcijskega vrha, ki se delno prekriva z vrhom MeG. Nastali vrh je posledica tvorbe koordinacijske spojine. Omenjeno spektralno območje smo tudi tukaj nekoliko razširili (med 200 in 500 nm) in ga v nadaljevanju uporabili pri merjenju absorbanc nizov vzorcev raztopin MeG in Al(III) ionov. Drugih večjih sprememb spektra ni bilo, podobno kot pri KS MeG in Fe(II) ionov sta se oba značilna absorpcijska vrhova MeG nekoliko pomaknila proti daljšim valovnim dolžinam (rdeči premik). Prvi vrh se je pri tem premaknil za 2 nm, drugi pa za 31 nm. Hkrati lahko opazimo, da ima prvi vrh z absorpcijskim maksimumom pri 219 nm pod seboj še en vrh – gre za ramo pri valovni dolžini pribl. 230 nm. Primerjavo spektrov testnih raztopin pri pH-ju 5,5 prikazuje Graf 3. Za prikaz obeh spektrov smo izmerjene absorbance po Beer-Lambertovem zakonu pretvorili v molarne absorpcijske koeficiente (ε), pri čemer smo v obeh primerih upoštevali koncentracijo MeG, ki je znašala $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.



Graf 3: Primerjava UV-Vis absorpcijskih spektrov raztopine z ekvimolarno množino MeG in Al(III) ionov ter raztopine z identično sestavo brez dodatka Al(III) ionov pri pH-ju 5,5 ($C_{\text{MeG}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

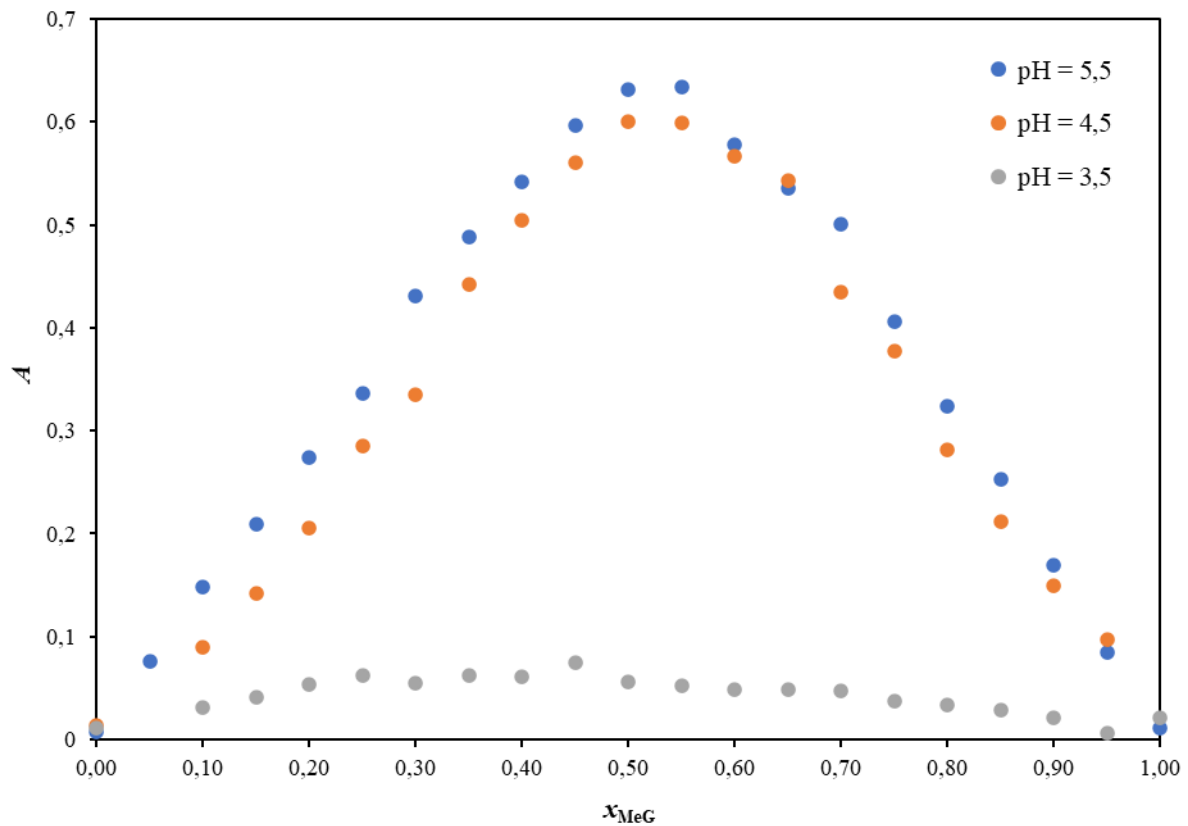
Kot pri KS MeG in Fe(II) ionov smo dobljena spektra primerjali, da bi izbrali območje valovnih dolžin, kjer bomo opazovali absorbanco nizov raztopin. Slednjo navadno opazujemo v ekstremih (v maksimumih oz. minimumih), saj je tako eksperimentalna napaka najmanjša. Da bi se v primeru koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov znebili absorpcijskega prispevka MeG, smo izbrali valovno dolžino, kjer so bile motnje absorbance s strani MeG najmanjše. Tvorbo KS med MeG in Al(III) smo zato opazovali pri valovni dolžini 320 nm, torej pri valovni dolžini, kjer največji del svetlobe absorbirajo tvorjene koordinacijske spojine (pri tej valovni dolžini je namreč, kot je razvidno z grafa, absorbanca MeG praktično ničelna). Kasnejša primerjava rezultatov z izsledki drugih pa je pokazala, da so tudi v sorodnih študijah, npr. od Zhang, L. in sodelavcev, za meritve absorbanc KS galotaninskih monomerov in Al(III) ionov izbrali to valovno dolžino [63].

Pri tvorbi KS MeG z Al(III) ioni do obarvanja raztopin, za razliko od KS z Fe(II) ioni, ni prišlo. Meritve časovne odvisnosti absorbance testnih vzorcev MeG in Al(III) pa so pokazale, da pri njih do tvorbe koordinacijskih spojin oz. vzpostavitve ravnotežja v raztopinah pri vseh treh pH-jih pride v zelo kratkem času, praktično takoj po dodatku Al(III) ionov. Tako smo v nadaljevanju meritve absorbanc nizov vzorcev raztopin MeG in Al(III) ionov izvedli neposredno po njihovi pripravi. Sklepamo, da do hitre vzpostavitve ravnotežja pride, ker pri reakcijah MeG in Al(III) potekata le deprotonacija fenolnih hidroksilnih skupin in nadaljnja kelacija Al(III) ionov, torej nastanek MeG–Al(III) kompleksov, medtem ko nadaljnja oksidacija Al(III) ionov ne poteka – ti ioni namreč ne morejo oksidirati v višja oksidacijska stanja.

5.2 Jobov diagram koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) ionov

5.2.1 Jobov diagram

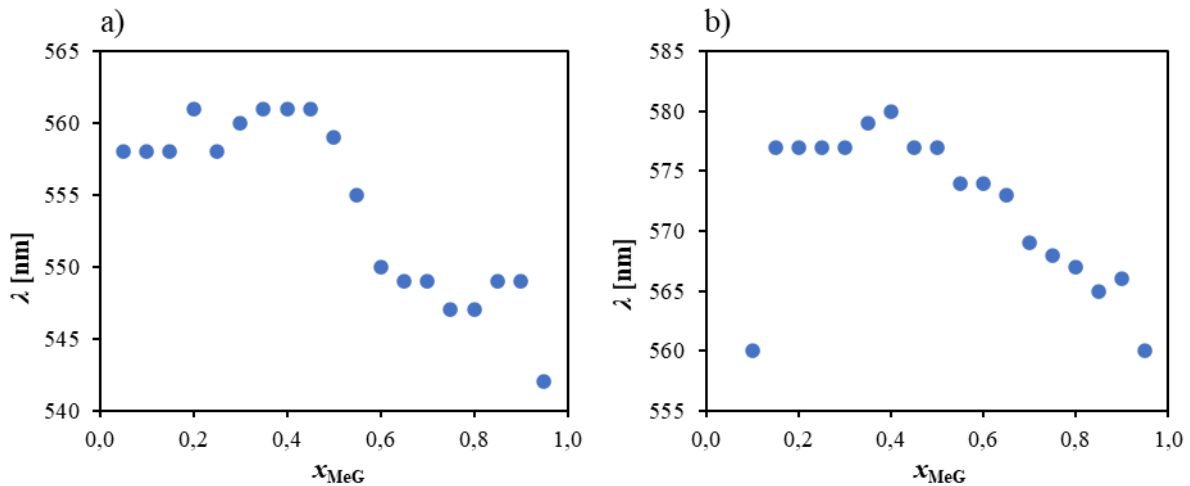
Iz pridobljenih meritev absorbance nizov vzorcev raztopin MeG in Fe(II) ionov z različnimi sestavami smo pri vsakem pH-ju konstruirali Jobov diagram, ki prikazuje odvisnost najvišje izmerjene absorbance vzorca od njegove sestave (x_{MeG}). Združene Jobove diagrame pri vseh pH-jih prikazuje Graf 4. Z grafa je razvidno, da absorbanca narašča z višanjem pH-vrednosti medija, vrhi posameznih krivulj pa so v območju x_{MeG} od 0,45 do 0,55. Opazimo lahko, da so razlike vrednosti absorbance za niza s pH-jema 5,5 in 4,5 majhne, medtem ko so absorbance za niza s pH-jem 3,5 znatno nižje. Iz razlike med absorbancami vzorcev z enakimi sestavami pri posameznih pH-jih zato sklepamo, da se pri nižjih vrednostih pH-ja tvori manj koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov. To se kaže tudi s položnostjo krivulje pri pH-ju 3,5.



Graf 4: Jobov diagram koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov

5.2.2 Sprememba valovne dolžine absorpcijskega maksimuma v odvisnosti od sestave vzorca

Položaj absorpcijskega maksimuma koordinacijske spojine je odvisen od sestave vzorca. Tako Graf 5 prikazuje spreminjanje oz. odvisnost valovne dolžine maksimuma absorbance koordinacijske spojine MeG in Fe(II) ionov od sestave raztopin pri pH-ju 5,5 in 4,5. Pri vseh raztopinah se je absorpcijski vrh nahajal v merjenem območju valovnih dolžin med 450 in 650 nm. Pri konstrukciji grafov nismo upoštevali vrednosti za vzorce s sestavo $x_{\text{MeG}} = 0,00$ in $x_{\text{MeG}} = 1,00$; saj pri njih ni prišlo do tvorbe koordinacijskih spojin (v njih ni bilo enega izmed reaktantov). Tovrstnega grafa nismo konstruirali za raztopine pri pH-ju 3,5; saj so bili absorpcijski vrhovi koordinacijskih spojin pri tem pH-ju široki in hkrati tudi nizki (absorbance so bile pod 0,1), zato smo njihovo vrednost opazovali pri valovni dolžini 570 nm.



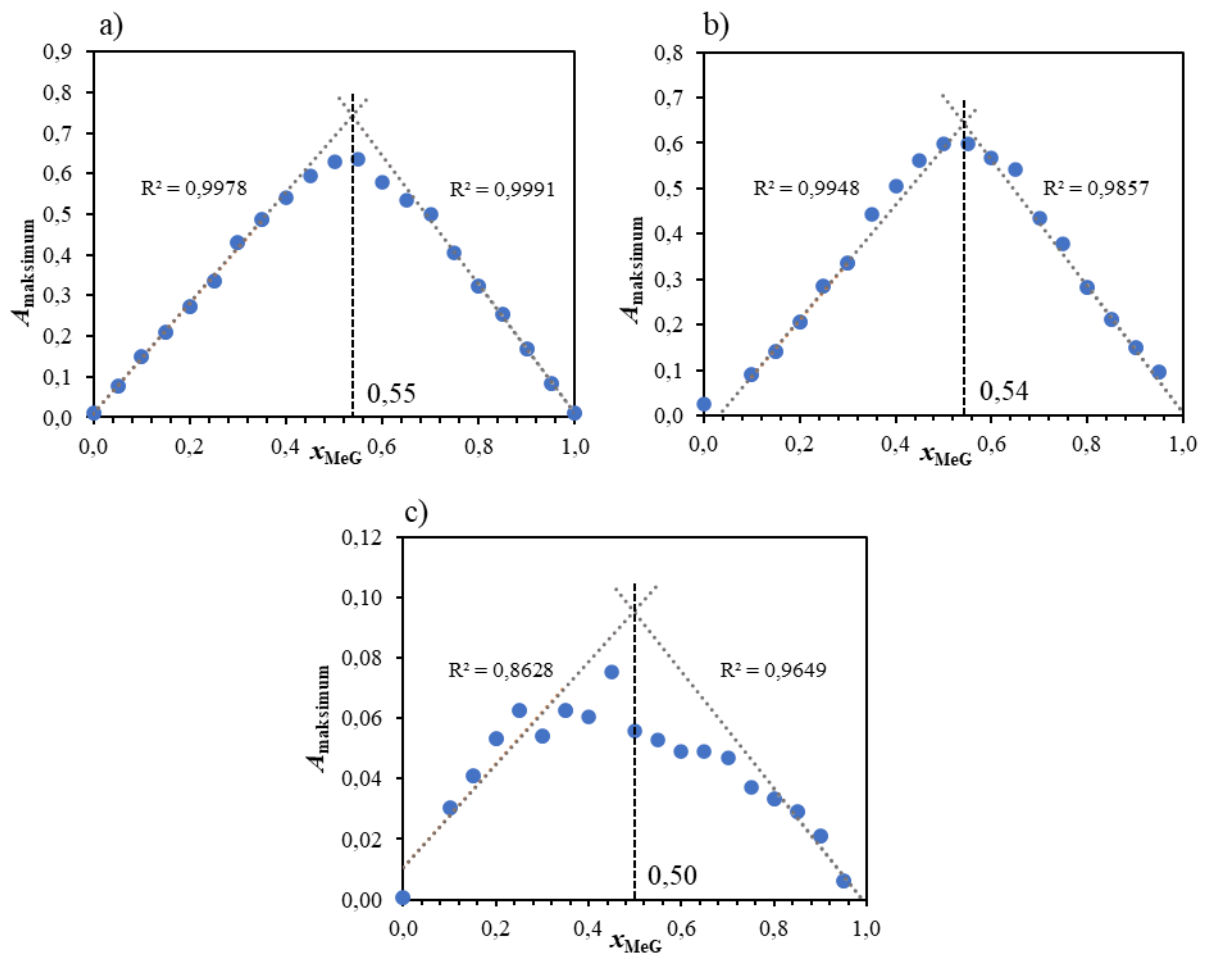
Graf 5: Spreminjanje valovne dolžine absorpcijskega maksimuma koordinacijske spojine MeG in Fe(II) ionov v odvisnosti od sestave vzorca pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5

Z grafa je razvidno, da se položaj absorpcijskega maksimuma v prvi polovici grafa (tj. pri vzorcih, kjer je x_{MeG} manjši od 0,50 oz. so v presežku Fe(II) ioni) skoraj ne spreminja. Dobljene krivulje, kot pri Jobovem diagramu, vrh dosežejo v območju x_{MeG} od 0,45 do 0,55. V drugi polovici grafa (tj. pri vzorcih, kjer je x_{MeG} večji od 0,50 – takrat je v presežku metil galat) pa je razvidno, da se absorpcijski maksimum pri obeh pH-jih z višanjem množinskega deleža metil galata pomika proti krajšim valovnim dolžinam. Povedano drugače, valovna dolžina absorpcijskega maksimuma se manjša s presežkom MeG.

5.2.3 Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Fe(II) ionov

Jobove krivulje, konstruirane v podpoglavju 5.2.1, smo v nadaljevanju ekstrapolirali. Z ekstrapolacijo smo določili stehiometrije in molarne absorpcijske koeficiente tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov. Stehiometrijo smo določili na podlagi presečišča premic, določenih z ekstrapolacijo posameznega dela Jobove krivulje (oz. z enačenjem enačb premic, tj. trendnih črt levega in desnega dela diagrama).

Graf 6 prikazuje ekstrapolacije Jobovih krivulj koordinacijskih spojin, ki se tvorijo pri reakcijah MeG z Fe(II) ioni pri posameznih pH-jih. Za posamezne premice so navedeni tudi koeficienti determinacije R^2 .



Graf 6: Ekstrapolacija Jobovih krivulj tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5; c) pH = 3,5

Z grafov lahko razberemo, da so vrednosti presečišč premic oz. trendnih črt pri vseh treh pH-jih zelo podobne. Zbrane so v Tabeli 4.

Tabela 4: Vrednosti presečišč ekstrapoliranih Jobovih krivulj za reakcije MeG in Fe(II) ionov

pH	x_{MeG}
5,5	0,55
4,5	0,54
3,5	0,50
	\bar{x}_{MeG}
	0,53

Na podlagi rezultatov (povprečne vrednosti presečišč) sklepamo, da je stehiometrija koordinacijske spojine, ki se tvori pri reakciji MeG z Fe(II) ioni v pH-območju 5,5–3,5 enaka 1:1 (ena molekula MeG kelira en Fe(II) ion). Tako lahko **potrdimo hipotezo 1**.

V Tabeli 5 so zbrane vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov pri posameznem pH-ju, ki smo jih na podlagi pridobljenih vrednosti presečišč izračunali po Beer-Lambertovem zakonu. Z njimi smo izračunali povprečno vrednost molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov v pH-območju 5,5–4,5. Zaradi merilne negotovosti oz. slabše kakovosti podatkov pri pH-ju 3,5 vrednosti koeficienta za to pH-vrednost nismo navedli.

Tabela 5: Vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Fe(II) ionov

pH	$\epsilon_{\text{ekstrapoliran}} \left[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]$
5,5	3452
4,5	3000
	$\bar{\epsilon} \left[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]$
	3226

Frešer, F. in sodelavci so v študiji tvorbe koordinacijskih spojin galne kisline z Fe(II) ioni v pH-območju 5,5–4,0 za povprečno vrednost molarne absorpcijskega koeficienta določili vrednost $3369,3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [10]. Če le-to primerjamo z vrednostjo našega koeficienta, opazimo, da sta njuni vrednosti zelo podobni. Sklepamo, da je to posledica dejstva, da sta si strukturi galne kisline in metil galata zelo podobni – njuna kromofora sta namreč popolnoma enaka.⁶ Razlog za nekoliko odstopanje pa bi lahko bil ta, da se naši študiji razlikujeta v pH-območju meritev.

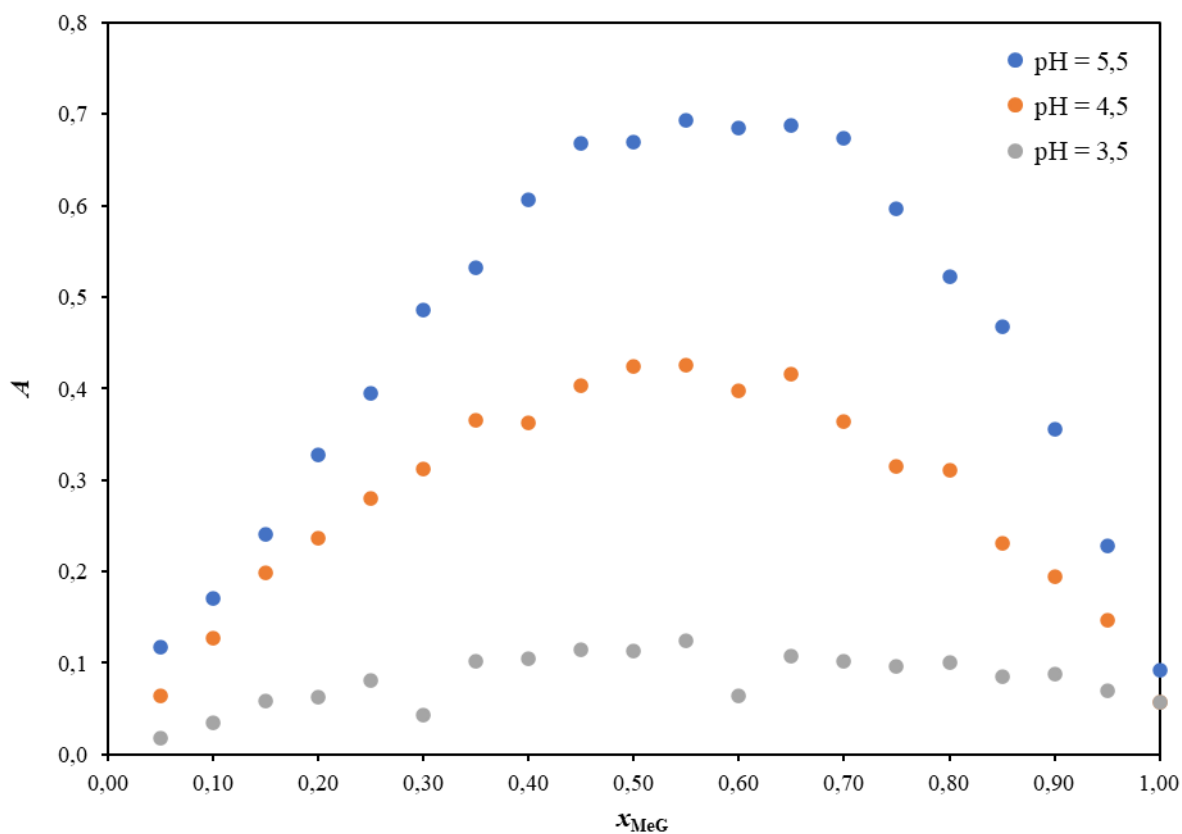
⁶ **Kromofor** – del molekule, ki absorbira svetlobo [64].

5.3 Jobov diagram koordinacijskih spojin metil galata in Al(III) ionov

5.3.1 Jobov diagram

Iz pridobljenih meritev absorbance nizov vzorcev raztopin MeG in Al(III) ionov z različnimi sestavami smo pri vsakem pH-ju konstruirali Jobov diagram. Združene Jobove diagrame pri vseh pH-jih prikazuje Graf 7. Na njem je razvidno, da absorbanca vzorcev narašča z višanjem pH-vrednosti medija, pH torej vpliva na količino tvorjenih koordinacijskih spojin. Ker smo enak pojav opazili tudi pri tvorbi KS MeG z Fe(II) ioni, lahko **potrdimo hipotezo 3**.

Vrhi posameznih Jobovih krivulj na spodnjem grafu se nahajajo v območju x_{MeG} od 0,55 do 0,65.



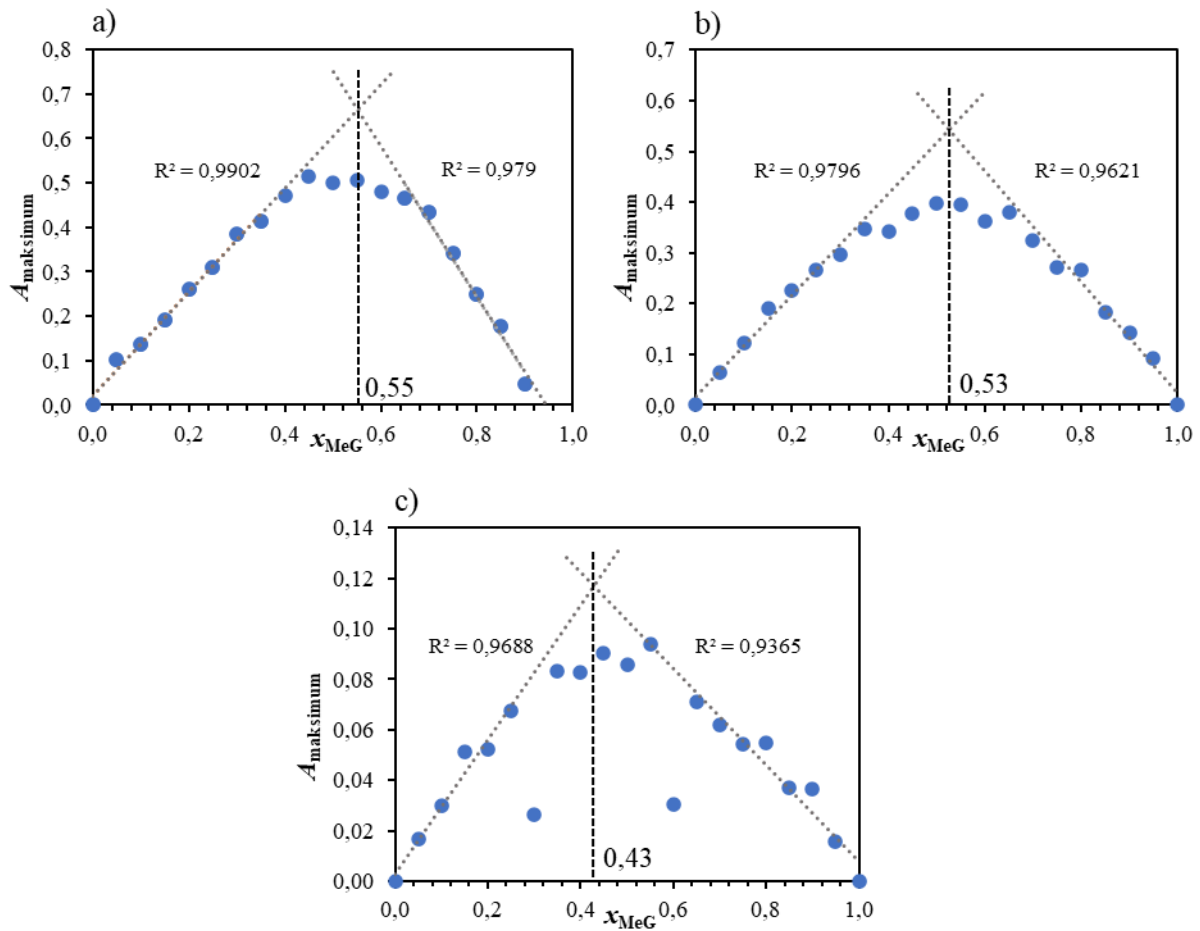
Graf 7: Jobov diagram koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov

Ker smo, kot omenjeno v podpoglavju 5.1.2, tvorbo koordinacijskih spojin vzorcev MeG in Al(III) ionov opazovali pri valovni dolžini 320 nm, se, za razliko od KS z Fe(II) ioni, tukaj valovna dolžina absorpcijskega maksimuma v odvisnosti od sestave vzorca ni spreminjala oz. je bila konstantna.

5.3.2 Stehiometrija koordinacijskih spojin metil galata in Al(III) ionov

Jobove krivulje, konstruirane v podpoglavju 5.3.1, smo v nadaljevanju ekstrapolirali in tako določili stehiometrije ter molarne absorpcijske koeficiente tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov.

Graf 8 prikazuje ekstrapolacije Jobovih krivulj koordinacijskih spojin, ki se tvorijo pri reakcijah MeG z Al(III) ioni pri posameznih pH-jih. Za posamezne premice so navedeni tudi koeficienti determinacije R^2 .



Graf 8: Ekstrapolacija Jobovih krivulj tvorjenih koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov pri: a) pH = 5,5; b) pH = 4,5; c) pH = 3,5

Vrednosti presečišč so zbrane v Tabeli 6.

Tabela 6: Vrednosti presečišč ekstrapoliranih Jobovih krivulj za reakcije MeG in Al(III) ionov

pH	x_{MeG}
5,5	0,55
4,5	0,53
3,5	0,43
	\bar{x}_{MeG}
	0,50

Na podlagi rezultatov (povprečne vrednosti presečišč) sklepamo, da je stehiometrija koordinacijske spojine, ki se tvori pri reakciji MeG z Al(III) ioni v pH-območju 5,5–3,5 enaka 1:1 (ena molekula MeG kelira en Al(III) ion). Tako lahko **potrdimo** hipotezo 2.

Stehiometrije nastalih koordinacijskih spojin MeG tako z Fe(II) kot tudi z Al(III) ioni so bile pri proučevanih pH-jih enake. pH-raztopin tako ni vplival na stehiometrijo KS, zato lahko **potrdimo** tudi hipotezo 4.

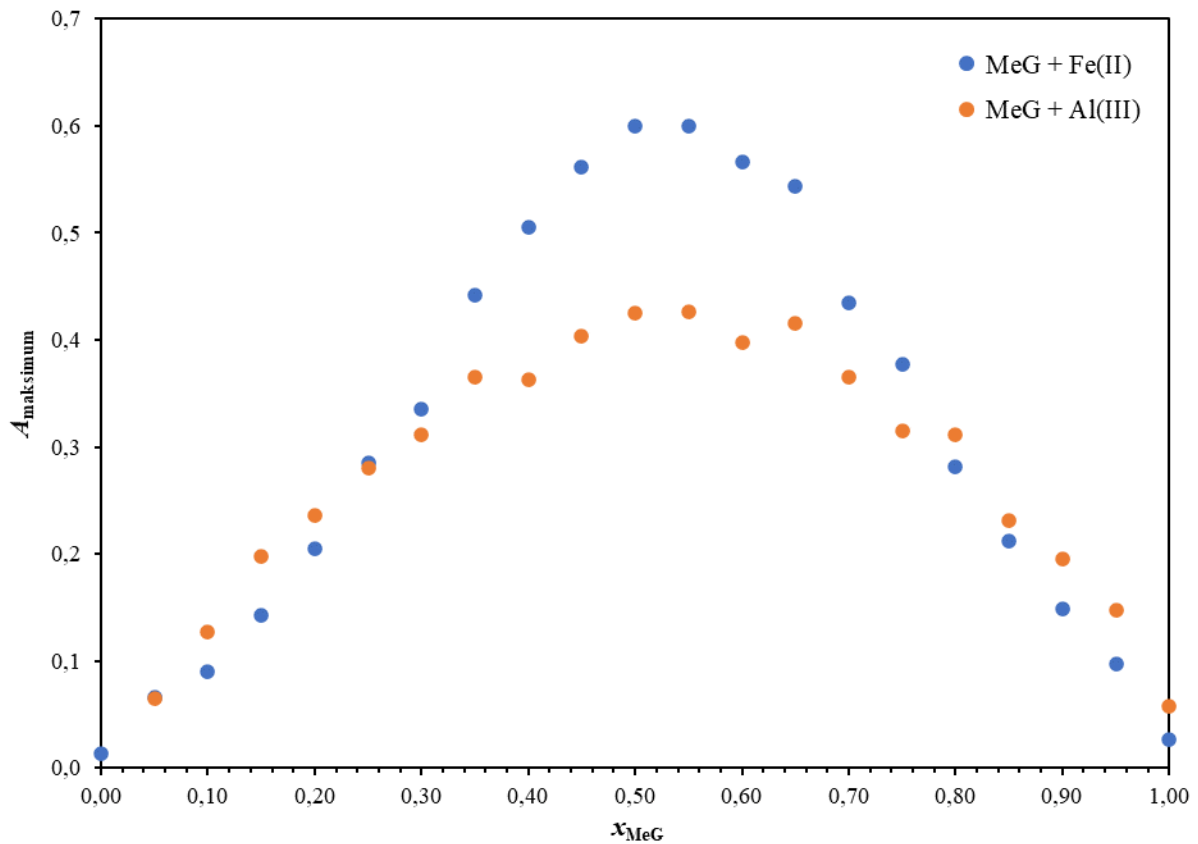
V Tabeli 7 so zbrane vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov pri posameznem pH-ju. Z njimi smo izračunali povprečno vrednost molarne absorpcijskega koeficienta KS MeG in Al(III) ionov v pH-območju 5,5–4,5. Zaradi merilne negotovosti oz. slabše kakovosti podatkov pri pH-ju 3,5 vrednosti koeficienta za to pH-vrednost, kot pri KS MeG in Fe(II) ionov, nismo navedli.

Tabela 7: Vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta koordinacijskih spojin MeG in Al(III) ionov

pH	$\epsilon_{\text{ekstrapoliran}} \left[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]$
5,5	6008
4,5	5150
	$\bar{\epsilon} \left[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]$
	2790

5.4 Primerjava koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) in Al(III) ioni

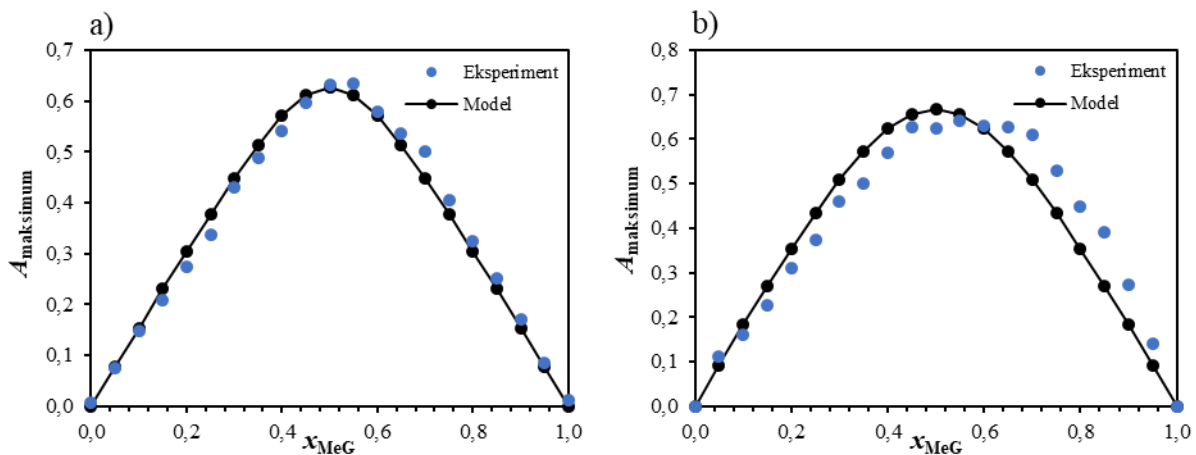
Graf 9 prikazuje primerjavo Jobovih diagramov koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) oz. Al(III) ioni ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pri pH-ju 4,5. Z grafa je razvidna razlika v obliki Jobovih krivulj – pri krivulji KS MeG in Al(III) je vrh znatno položnejši in širši. Sklepamo, da do tovrstne oblike diagrama pride, ker imajo koordinacijske spojine MeG in Al(III) ionov manjšo konstanto tvorbe v primerjavi s KS MeG in Fe(II) ionov oz. manjšo zmožnost vezave z ligandi.



Graf 9: Primerjava Jobovih diagramov koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) oz. Al(III) ioni (pH = 4,5)

5.5 Ujemanje modelne funkcije in Jobovega diagrama

Ujemanje modelne funkcije, podane z enačbo 4.14, z eksperimentalno dobljenimi podatki za niza vzorcev MeG in Fe(II) oz. Al(III) ionov pri pH-ju 5,5 prikazuje Graf 10. Na njem vidimo, da je ujemanje modela, torej teoretično izračunanih vrednosti absorbanc, in eksperimentalnih podatkov, torej izmerjenih vrednosti absorbanc, za model, ki je predpostavil, da s posameznimi kovinskimi ioni reagira enkrat deprotonirana zvrst metil galata (H_2MeG^-), pri čemer pride do tvorbe koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$, dobro.



Graf 10: Ujemanje modelnih vrednosti (modelne funkcije) z eksperimentalnimi vrednostmi Jobovih diagramov: a) MeG + Fe(II), b) MeG + Al(III) (pH = 5,5)

Na enak način smo prilegali tudi druge modele, pri katerih smo predpostavili, da je reaktivna zvrst bodisi nevtralna (H_3MeG) bodisi dvakrat (HMeG^{2-}) oz. trikrat (MeG^{3-}) deprotonirana oblika metil galata. Ugotovili smo, da je bilo pri vseh naštetih ujemanje z eksperimentalno določenimi točkami Jobovega diagrama bistveno slabše, v primeru, ko je predpostavljena reaktivna zvrst H_3MeG , pa z modelom nismo mogli niti razložiti eksperimentalno opaženih trendov. Prileganje modela s predpostavko, da je reaktivna zvrst enkrat deprotonirana zvrst metil galata (H_2MeG^-), je tako bilo najboljše.

Uporaba modelne funkcije, ki je predpostavila reaktivno zvrst H_2MeG^- , nam je za nize raztopin s skupno koncentracijo $c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ za vzorce z Fe(II) ioni in $c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ za vzorce z Al(III) ioni omogočila izračun ravnotežnih koncentracij posameznih zvrsti v raztopinah. Izračunana vsota koncentracij zvrsti metil galata in koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$ je bila pri tem enaka skupni koncentraciji metil galata, ki smo ga dali v raztopino, kar smo tudi predpostavili pri izpeljavi modela (enačba 4.7).

Če povzamemo, iz rezultatov prileganja modelne funkcije k Jobovim diagramom sklepamo, da v pH-območju med 3,5 in 5,5 z Fe(II) in Al(III) ioni preferenčno reagira zvrst H_2MeG^- , pri čemer pride do tvorbe koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$, v kateri črka M predstavlja posamezen kovinski ion.

Za omenjen model sta v Tabeli 8 prikazani modelno izračunani vrednosti konstant tvorbe koordinacijske spojine MeG z Fe(II) oz. Al(III) ioni pri pH-ju 5,5 in pripadajoča modelna molarna absorpcijska koeficienta.

Tabela 8: Konstanti tvorbe in molarna absorpcijska koeficienta za tvorbo koordinacijske spojine $[\text{H}_2\text{MeGM}]^{(n-1)+}$ (M = Fe(II) oz. Al(III)) pri pH-ju 5,5; ki so izračunani z uporabo modela

ioni	K_r	$\epsilon_{\text{model}} [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$
Fe(II)	$3,42 \cdot 10^7$	4003
Al(III)	$2,36 \cdot 10^7$	10102

V podpoglavju 5.4 smo na podlagi razlik v oblikah Jobovih diagramov sklepali, da imajo KS MeG in Al(III) ionov manjšo konstanto tvorbe v primerjavi s KS MeG in Fe(II) ionov. Z uporabo predpostavljenega modela smo izračunali njihovi natančni vrednosti in s tem potrdili naše sklepanje.

Če primerjamo še velikosti modelnih in eksperimentalno določenih vrednosti molarnih absorpcijskih koeficientov KS pri pH-ju 5,5 (podpoglavji 5.2.3 in 5.3.2), opazimo, da so njihove vrednosti zelo podobne. Pri tem sta najbližje vrednosti za KS MeG z Fe(II) ioni.

Frešer, F. in sodelavci so v študiji tvorbe KS galne kisline in Fe(II) ionov za le-te v pH-območju med 3,52 in 5,50 določili vrednost konstante tvorbe $K_r = 4,34 \cdot 10^7$ in molarni absorpcijski koeficient $\varepsilon = 3553 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [10]. Primerjava le-teh z vrednostmi naše konstante in koeficienta za KS MeG in Fe(II) ionov kaže, da so si omenjene vrednosti blizu. Podobno kot pri njihovih eksperimentalnih vrednostih sklepamo, da je le-to posledica podobnega kromofora molekul galne kisline in metil galata (s strukturnega vidika se razlikujeta na drugem, neabsorbirajočem delu molekule, kar znatno ne vpliva na mehanizem tvorbe KS), do nekolišnega odstopanja pa pride zaradi različnih pH-območij meritev in koncentracij merjenih vzorcev. Istočasno pa smo opazili, da je pH-odvisnost KS galne kisline in Fe(II) ionov večja – na pripadajočih Jobovih diagramih so razlike v vrednostih absorbanc pri pH-ju 5,5 in 4,5 namreč bistveno večje v primerjavi z majhnimi razlikami med našimi vrednostmi absorbanc KS MeG in Fe(II) ionov pri istih pH-jih [10]. Sklepamo, da je le-to posledica različne strukture molekul ligandov – galna kislina v primerjavi z metil galatom v kemijski strukturi vsebuje karboksilno (–COOH) skupino, ki ima precej nižjo vrednost pK_a ($pK_a = 4,32$) kot hidroksilne (–OH) skupine, ki so vezane na centralni benzenov obroč obeh molekul [65].

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Izsledki naše raziskave predstavljajo korak bližje k razumevanju reakcijskih mehanizmov taninov. Z oblikovanjem reakcijske sheme in modela reakcije, ki smo ga preverili s prileganjem modelne funkcije eksperimentalno dobljenim podatkom, smo pokazali, kako galotaninski monomer metil galat reagira s posameznimi kovinskimi ioni. Poznavanje interakcij monomernih enot pa nam omogoča lažje razumevanje interakcij taninskih makromolekul in odkrivanje novih načinov njihove uporabe.

V sodobnem svetu tanini zanimanje vzbujajo predvsem zaradi svoje tvorbe koordinacijskih spojin z železovimi(II) ioni. Ker je železo ključnega pomena za mnoge bakterijske celične procese, lahko tanini s tem mehanizmom občutno zavirajo rast bakterij [2]. Naša študija tako predstavlja tudi doprinos k rešitvi enega izmed aktualnejših svetovnih problemov, tj. vedno večje odpornosti bakterij na antibiotike.

Istočasno pri tvorjenju omenjenih kompleksov z Fe(II) ioni pride do obarvanja raztopin, kar so skozi zgodovino s pridom izkoriščali za pripravo železo-taninskih črnih. Proučevanje sestave in nastanka črnih pa prispeva tudi h kulturni dediščini. Analiza črnih namreč lahko razkrije informacije o njihovem izvoru in naravi, kar je pomembno pri odkrivanju ponaredkov in proučevanju zgodovinskih rokopisov, kakor tudi njihovi uspešni restavraciji [3].

Težavo današnje družbe predstavlja tudi zmanjšanje pridelka poljščin na območju s kisljo prstjo. V njej se namreč sproščajo aluminijevi(III) ioni, ki zavirajo rast rastlin in so za njih toksični. Rastline zato pri tem v obrambo izločajo sekundarne metabolite, med drugim tudi tanine. Le-ti zaradi svoje zmožnosti kelacije Al(III) ionov občutno vplivajo na njihovo biološko dostopnost v prsti. Naša raziskava, izvedena prav v pH-območju kisljih prsti, je tako pripomogla tudi k razumevanju tovrstnih obrambnih mehanizmov rastlin.

7 ZAKLJUČEK

Študije interakcij taninskih monomerov s kovinskimi ioni so zaradi tvorbe koordinacijskih spojin nujne za razumevanje njihove aktivnosti in uporabnosti. Ker taninom pripisujemo številne pozitivne učinke, predstavljajo obetavne kandidate za rešitev aktualnih svetovnih problemov – npr. odpornosti bakterij na antibiotike in toksičnosti Al(III) ionov.

V raziskovalnem delu smo proučevali interakcije metil galata, tj. monomera hidrolizirajočih taninov, z železovimi(II) in aluminijevimi(III) ioni. Z uporabo UV-Vis spektroskopije smo raztopinam metil galata in omenjenih kovinskih ionov pri treh različnih vrednostih pH-ja (3,5; 4,5 in 5,5) izmerili absorbance. Z eksperimentalno pridobljenimi podatki smo konstruirali Jobove diagrame in z njihovo ekstrapolacijo določili stehiometrijo tvorjenih koordinacijskih spojin. Ta je pri koordinacijskih spojinah metil galata z Fe(II) in Al(III) ioni v omenjenem pH-območju pri obeh kovinskih ionih znašala 1:1. V nadaljevanju smo raziskali vpliv pH-ja medija na količino tvorjenih koordinacijskih spojin in na njihovo stehiometrijo. Ugotovili smo, da absorbanca vzorcev narašča z višanjem pH-vrednosti medija, pH torej vpliva na količino tvorjenih koordinacijskih spojin. Ker so bile stehiometrije nastalih koordinacijskih spojin MeG tako z Fe(II) kot tudi z Al(III) ioni pri vseh pH-jih enake, smo sklepali, da pH-raztopin ni vplival nanje. Iz ekstrapoliranih Jobovih krivulj smo izračunali tudi molarne absorpcijske koeficiente raztopin metil galata z Fe(II) oz. Al(III) ioni pri posameznih vrednostih pH-ja. Prav tako smo primerjali Jobove krivulje koordinacijskih spojin metil galata z Fe(II) in z Al(III) ioni.

Na podlagi pridobljenih podatkov smo razvili model, ki predvideva nastanek koordinacijske spojine iz metil galata in posameznih kovinskih ionov. V njem smo upoštevali protolitsko ravnotežje MeG, s čimer smo v modelno funkcijo vključili tudi odvisnost absorbance od pH-ja. S prileganjem modelne funkcije eksperimentalnim podatkom smo določili konstanti tvorbe KS MeG in Fe(II) oz. Al(III) ionov ter pripadajoče molarne absorpcijske koeficiente. Izkazalo se je, da model, ki predpostavlja reakcijo kovinskih ionov in enkrat deprotonirane ravnotežne zvrsti metil galata (H_2MeG^-), najboljše opiše eksperimentalno spreminjanje vrednosti absorbanc, s čimer naloga prispeva k razumevanju reakcijskih mehanizmov taninskih monomernih enot.

Prileganje modela bi nam lahko dodatno zapletla morebitna oksidacija Fe(II) do Fe(III) ionov. Posledično bi lahko nalogo nadgradili tako, da bi raztopine MeG in Fe(II) ionov pripravili ob popolni odsotnosti kisika, s čimer bi dodatno potrdili model, saj bi v vzorcih imeli le Fe(II) ione.

Pred izvedbo eksperimentalnega dela smo postavili štiri hipoteze, v katerih smo predpostavili stehiometrijo KS MeG z Fe(II) oz. Al(III) ioni ter vpliv pH-ja medija nanjo in na količino tvorjene KS. Z dobljenimi rezultati smo vse hipoteze potrdili. Prav tako smo uspešno realizirali vse zastavljene cilje.

»V znanosti je lepota v odkrivanju, razumevanju in razlaganju narave.«

– Marie Curie

8 VIRI IN LITERATURA

8.1 Bibliografija

- [1] K. Khanbabaee, T. van Ree, Tannins: classification and definition, *Nat Prod Rep* 18 (2001) 641–649. <https://doi.org/10.1039/b101061l>.
- [2] A. Scalbert, I. Mila, D. Expert, F. Marmolle, A.M. Albrecht, R. Hurrell, J.F. Huneau, D. Tomé, Polyphenols, metal ion complexation and biological consequences, *Basic Life Sci* 66 (1999) 545–554. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4139-4_30.
- [3] A. Espina, M.V. Cañamares, Z. Jurašková, S. Sanchez-Cortes, Analysis of Iron Complexes of Tannic Acid and Other Related Polyphenols as Revealed by Spectroscopic Techniques: Implications in the Identification and Characterization of Iron Gall Inks in Historical Manuscripts, *ACS Omega* 7 (2022) 27937–27949. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01679>.
- [4] A.K. Farha, Q.-Q. Yang, G. Kim, H.-B. Li, F. Zhu, H.-Y. Liu, R.-Y. Gan, H. Corke, Tannins as an alternative to antibiotics, *Food Bioscience* 38 (2020) 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>.
- [5] Q. Huang, X. Liu, G. Zhao, T. Hu, Y. Wang, Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production, *Animal Nutrition* 4 (2018) 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>.
- [6] L.M. Redondo, P.A. Chacana, J.E. Dominguez, M.E. Fernandez Miyakawa, Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry, *Front Microbiol* 5 (2014) 118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00118>.
- [7] A.R. Jolazadeh, M. Dehghan-banadaky, K. Rezayazdi, Effects of soybean meal treated with tannins extracted from pistachio hulls on performance, ruminal fermentation, blood metabolites and nutrient digestion of Holstein bulls, *Animal Feed Science and Technology* 203 (2015) 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.02.005>.
- [8] H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, K. Iwatsuki, Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*, *J Antimicrob Chemother* 48 (2001) 487–491. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>.
- [9] R.C. Hider, Z.D. Liu, H.H. Khodr, Metal chelation of polyphenols, in: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2001: pp. 190–203. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35243-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35243-6).
- [10] F. Frešer, G. Hostnik, J. Tošović, U. Bren, Dependence of the Fe(II)-Gallic Acid Coordination Compound Formation Constant on the pH, *Foods* 10 (2021) 2689. <https://doi.org/10.3390/foods10112689>.
- [11] H. Zhang, L. Zhang, L. Tang, X. Hu, M. Xu, Effects of Metal Ions on the Precipitation of Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose by Protein, *J Agric Food Chem* 69 (2021) 5059–5066. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01185>.

- [12] R. de Souza, E. Sussuchi, W. Giovani, Synthesis, Electrochemical, Spectral, and Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with Metal Ions, *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry - SYN REACTIV INORG METAL-ORG C 33* (2003) 1125–1144. <https://doi.org/10.1081/SIM-120023482>.
- [13] H. Geng, Q.-Z. Zhong, J. Li, Z. Lin, J. Cui, F. Caruso, J. Hao, Metal Ion-Directed Functional Metal-Phenolic Materials, *Chem Rev* 122 (2022) 11432–11473. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01042>.
- [14] M. Fraga-Corral, P. García-Oliveira, A.G. Pereira, C. Lourenço-Lopes, C. Jimenez-Lopez, M.A. Prieto, J. Simal-Gandara, Technological Application of Tannin-Based Extracts, *Molecules* 25 (2020) 614. <https://doi.org/10.3390/molecules25030614>.
- [15] J. Serrano, R. Puupponen-Pimiä, A. Dauer, A.-M. Aura, F. Saura-Calixto, Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects, *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 2 (2009) S310-329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>.
- [16] M. Bule, F. Khan, K. Niaz, Phenolics, in: *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 2020: pp. 42–56.
- [17] T. Okuda, H. Ito, Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins, *Molecules* 16 (2011) 2191–2217. <https://doi.org/10.3390/molecules16032191>.
- [18] G. Hostnik, Čreslovine – večnamenska skrivnost dreves, *Alternator* (2020). <https://www.alternator.science/sl/daljse/creslovine-vecnamenska-skrivnost-dreves/> (accessed October 17, 2023).
- [19] CAPPEQ, Tannin in the leather tanning industry, *Tannins.Org* (2023). <https://www.tannins.org/leather-tanning/>.
- [20] A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30 (1991) 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
- [21] Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Deprotonacija | Kemijski slovar, *Kemijski Slovar | FKKT UM* (n.d.). <https://www.fkkt.um.si/kslovar/index.php?page=94> (accessed November 14, 2023).
- [22] R.C. Anderson, M. Vodovnik, B.R. Min, W.E. Pinchak, N.A. Krueger, R.B. Harvey, D.J. Nisbet, Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* in vitro, *Folia Microbiol (Praha)* 57 (2012) 253–258. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0119-4>.
- [23] G. Neuss, *Coordination Compounds*, in: *Chemistry: course companion*, 2. izdaja, Oxford University Press, Oxford, 2012: pp. 63, 64.
- [24] Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Kelacija | Kemijski slovar, *Kemijski Slovar | FKKT UM* (n.d.). <https://www.fkkt.um.si/kslovar/index.php?page=14> (accessed November 13, 2023).
- [25] R.G. Piña, C. Cervantes, Microbial interactions with aluminium, *Biomaterials* 9 (1996) 311–316. <https://doi.org/10.1007/BF00817932>.

- [26] J. Liu, M.A. Piñeros, L.V. Kochian, The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance, *J Integr Plant Biol* 56 (2014) 221–230. <https://doi.org/10.1111/jipb.12162>.
- [27] L. Yan, M. Riaz, J. Liu, M. Yu, C. Jiang, The aluminum tolerance and detoxification mechanisms in plants; recent advances and prospects, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 52 (2021) 1–37. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1859306>.
- [28] M. O’Coinceanainn, M.J. Hynes, The kinetics and mechanisms of the reactions of aluminium(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and adrenaline, *J Inorg Biochem* 84 (2001) 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00232-4](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00232-4).
- [29] National Library of Medicine, Methyl gallate, PubChem - National Library of Medicine (2023). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7428> (accessed February 3, 2024).
- [30] S. Sharma, S.S. Kanwar, P. Dogra, G.S. Chauhan, Gallic acid-based alkyl esters synthesis in a water-free system by celite-bound lipase of *Bacillus licheniformis* SCD11501, *Biotechnol Prog* 31 (2015) 717. <https://doi.org/10.1002/btpr.2072>.
- [31] L. Zhang, Y. Liu, Y. Wang, Deprotonation Mechanism of Methyl Gallate: UV Spectroscopic and Computational Studies, *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018) 3111. <https://doi.org/10.3390/ijms19103111>.
- [32] H. Liang, Q. Huang, L. Zou, P. Wei, J. Lu, Y. Zhang, Methyl gallate: Review of pharmacological activity, *Pharmacological Research* 194 (2023) 106849. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106849>.
- [33] E.C. Rosas, L.B. Correa, M. das Graças Henriques, Antiinflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and Its Use in Arthritic Conditions, in: R.R. Watson, V.R. Preedy (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (Second Edition), Academic Press, 2019: pp. 489–505. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00028-3>.
- [34] A.A. Shahat, M.S. Marzouk, Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa, in: V. Kuete (Ed.), *Medicinal Plant Research in Africa*, Elsevier, Oxford, 2013: pp. 479–555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00013-8>.
- [35] M. Asnaashari, R. Farhoosh, A. Sharif, Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion, *Food Chem* 159 (2014) 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.038>.
- [36] S.U. Khan, A.U. Khan, M.A. Kamal, T.T. Htar, Computer-aided drug designing illuminate polypharmacology of natural products against multiple estrogen receptor, in: R.K. Gautam, M.A. Kamal, P. Mittal (Eds.), *Computational Approaches in Drug Discovery, Development and Systems Pharmacology*, Academic Press, 2023: pp. 281–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99137-7.00005-8>.
- [37] T.B. Ng, J.H. Wong, C. Tam, F. Liu, C.F. Cheung, C.C.W. Ng, R. Tse, T.F. Tse, H. Chan, Chapter 14 - Methyl Gallate as an Antioxidant and Anti-HIV Agent, in: V.R. Preedy, R.R. Watson (Eds.), *HIV/AIDS*, Academic Press, 2018: pp. 161–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809853-0.00014-6>.

- [38] Qingdao Fengchen Technology and Trade Co., Methyl Gallate, Fengchen Group (n.d.). <https://www.fengchengroup.com/chemicals/featured-chemicals/methyl-gallate-bp-ep-usp-cas-99-24-1.html> (accessed February 3, 2024).
- [39] C.E. Housecroft, A.G. Sharpe, Coordination Complexes, Complex Ions in aqueous solution, d-Block Metal Chemistry, in: Inorganic Chemistry, 2. izdaja, Pearson Education Limited, Harlow, 2005: pp. 178, 179, 187, 287, 291, 617, 622–624.
- [40] F. Lazarini, J. Brenčič, Koordinacijske spojine, in: Splošna in Anorganska Kemija, 3. izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2014: pp. 240-246,251,254.
- [41] A.E. Fazary, M. Taha, Y.-H. Ju, Iron Complexation Studies of Gallic Acid, J. Chem. Eng. Data 54 (2009) 35–42. <https://doi.org/10.1021/je800441u>.
- [42] H.S. Mohammed, V.D. Tripathi, Medicinal Applications of Coordination Complexes, J. Phys.: Conf. Ser. 1664 (2020) 012070. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1664/1/012070>.
- [43] M. Karamać, Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts, Int J Mol Sci 10 (2009) 5485–5497. <https://doi.org/10.3390/ijms10125485>.
- [44] A.J. Jansman, Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals, Nutr Res Rev 6 (1993) 209–236. <https://doi.org/10.1079/NRR19930013>.
- [45] J. Choi, W.K. Kim, Dietary Application of Tannins as a Potential Mitigation Strategy for Current Challenges in Poultry Production: A Review, Animals 10 (2020) 2389. <https://doi.org/10.3390/ani10122389>.
- [46] Iron | Element, Occurrence, Uses, Properties, & Compounds | Britannica, Encyclopædia Britannica (2023). <https://www.britannica.com/science/iron-chemical-element> (accessed November 10, 2023).
- [47] Hemoglobin | Definition, Structure, & Function | Britannica, Encyclopædia Britannica (2023). <https://www.britannica.com/science/hemoglobin> (accessed November 10, 2023).
- [48] N.R. Perron, J.L. Brumaghim, A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, Cell Biochem Biophys 53 (2009) 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>.
- [49] Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Redukcijski potencial | Kemijski slovar, Kemijski Slovar | FKKT UM (n.d.). <https://www.fkkt.um.si/kslovar/index.php?page=422> (accessed November 17, 2023).
- [50] M.V. Limaye, C. Schütz, K. Kriechbaum, J. Wohlert, Z. Bacsik, M. Wohlert, W. Xia, M. Pléa, C. Dembele, G. Salazar-Alvarez, L. Bergström, Functionalization and patterning of nanocellulose films by surface-bound nanoparticles of hydrolyzable tannins and multivalent metal ions, Nanoscale 11 (2019) 19278–19284. <https://doi.org/10.1039/C9NR04142G>.
- [51] Aluminum | Uses, Properties, & Compounds | Britannica, Encyclopædia Britannica (2023). <https://www.britannica.com/science/aluminum> (accessed November 16, 2023).

- [52] B.P. Lee, A. Narkar, R. Wilharm, Effect of metal ion type on the movement of hydrogel actuator based on catechol-metal ion coordination chemistry, *Sensors and Actuators B: Chemical* 227 (2016) 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.038>.
- [53] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of analytical chemistry*, 7., Saunders College Pub., Fort Worth, 1996. <http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy1514/95067683-b.html> (accessed February 3, 2023).
- [54] F. Melone, R. Saladino, C. Crestini, Tannin Structural Elucidation and Quantitative ^{31}P NMR Analysis. 1. Model Compounds, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 9307–9315. <https://doi.org/10.1021/jf401477c>.
- [55] ZRC SAZU, Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša, Analit | Farmacevtski terminološki slovar, Farmacevtski Terminološki Slovar | ZRC SAZU (n.d.). <https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/iskalnik?iztocnica=anal%C3%ADt> (accessed November 21, 2023).
- [56] M. Islamčević Razboršek, M. Kolar, Spektrofotometrična določitev železa, in: *Analizna kemija II in industrijska analiza: navodila za vaje*, Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba, Maribor, 2023: p. 38. <https://doi.org/10.18690/um.fkkt.4.2023>.
- [57] J.S. Renny, L.L. Tomasevich, E.H. Tallmadge, D.B. Collum, Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry, *Angewandte Chemie International Edition* 52 (2013) 11998–12013. <https://doi.org/10.1002/anie.201304157>.
- [58] X. Li, Y. Zhang, Y. Xu, Modified asynchronous orthogonal sample design scheme @ Job's method to determine the stoichiometric ratio in the molecular association system, *Journal of Molecular Structure* 1206 (2020) 127757. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127757>.
- [59] V.M.S. Gil, N.C. Oliveira, On the use of the method of continuous variations, *J. Chem. Educ.* 67 (1990) 473. <https://doi.org/10.1021/ed067p473>.
- [60] Z.D. Hill, P. Macarthy, Novel Approach to Job's Method, *Journal of Chemical Education* 63 (1986) 162–67.
- [61] N. Prakashkumar, B.S. Sivamaruthi, C. Chaiyasut, N. Suganthy, Decoding the Neuroprotective Potential of Methyl Gallate-Loaded Starch Nanoparticles against Beta Amyloid-Induced Oxidative Stress-Mediated Apoptosis: An In Vitro Study, *Pharmaceutics* 13 (2021) 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030299>.
- [62] L.-L. Lu, Y. Li, X. Lu, Kinetic study of the complexation of gallic acid with Fe(II), *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 74 (2009) 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.08.025>.
- [63] L. Zhang, Y. Liu, X. Hu, Y. Wang, M. Xu, Metal ion interactions with methyl gallate characterized by UV spectroscopic and computational methods, *Food Chemistry* 293 (2019) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.083>.

- [64] Amebis, d. o. o., Kromofor | Mikrobiološki slovar, Termania | Mikrobiološki Slovar (n.d.). <https://www.termania.net/slovarji/mikrobioloski-slovar/6745649/kromofor> (accessed January 10, 2024).
- [65] T. Marino, A. Galano, N. Russo, Radical Scavenging Ability of Gallic Acid toward OH and OOH Radicals. Reaction Mechanism and Rate Constants from the Density Functional Theory, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 10380–10389. <https://doi.org/10.1021/jp505589b>.

8.2 Viri slik

Slika 1: Nastanek petčlenskega obroča po deprotonaciji dveh hidroksilnih skupin in vezavi kovinskega iona (osebni arhiv avtorja)

Slika 2: Vpliv pH-ja na stehiometrijo koordinacijskih spojin derivatov katehola in Fe(III) ionov (Huimin Geng, 2022, str. 17, dostopno na https://www.researchgate.net/publication/360508277_Metal_Ion-Directed_Functional_Metal-Phenolic_Materials, datum dostopa: 28. 10. 2023)

Slika 3: Delitev taninov (osebni arhiv avtorja, povzeto po [1])

Slika 4: Proces kondenzacije galne kisline z metanolom, ki vodi do nastanka metil galata (osebni arhiv avtorja, povzeto po [30])

Slika 5: Kemijska struktura metil galata (Wikipedia, dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_gallate, datum dostopa: 18. 10. 2023)

Slika 6: Heksaaminkobaltov(II) ion (C. E. Housecroft, A.G. Sharpe, *Inorganic Chemistry*, 2. izdaja, Pearson Education Limited, Harlow, 2005, str. 179)

Slika 7: Reakcija deprotonacije kvercetina in nastanka petčlenskega obroča (osebni arhiv avtorja, povzeto po [12])

Slika 8: Poenostavljen prikaz odseka hemoglobina, na katerega je preko železa vezan molekularni kisik (LibreTexts Chemistry, dostopno na: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_\(Schaller\)/V%3A_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/04%3A_Oxygen_Binding_and_Reduction/4.0%3A_Oxygen_Binding](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_(Schaller)/V%3A_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/04%3A_Oxygen_Binding_and_Reduction/4.0%3A_Oxygen_Binding), datum dostopa: 22. 10. 2023)

Slika 9: Galoilna enota (osebni arhiv avtorja, povzeto po [14])

Slika 10: Eden izmed mehanizmov tvorbe KS med Fe(II) in galoilnimi enotami (Perron Nathan, 2009, dostopno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12013-009-9043-x>, datum dostopa: 25. 10. 2023)

Slika 11: Oksidacija Fe(II) ionov v Fe(III) ione pri tvorbi koordinacijske spojine s polifenoli ob prisotnosti kisika v raztopini (Fermišek Miha, 2021, str. 4, dostopno na: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=80054&lang=slv>, datum dostopa: 25. 10. 2023)

Slika 12: Redukcija Fe(III) ionov do Fe(II) ionov po tvorbi koordinacijskih spojin s polifenoli do semikinonske in kinonske spojine (Fermišek Miha, 2021, str. 4, dostopno na: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=80054&lang=slv>, datum dostopa: 25. 10. 2023)

Slika 13: Koordinacijski spojinini aluminija z oktaedrično oz. tetraedrično razporeditvijo ligandov (C. E. Housecroft, A.G. Sharpe, Inorganic Chemistry, 2. izdaja, Pearson Education Limited, Harlow, 2005, str. 173)

Slika 14: Možne kemijske strukture KS Al(III) ionov in galoilne enote (Zhang Liangliang, 2019, str. 71, dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31151650/>, datum dostopa: 26. 10. 2023)

Slika 15: Poenostavljen princip delovanja UV-Vis spektrofotometra (osebni arhiv avtorja, povzeto po [53])

Slika 16: Primeri Jobovih krivulj koordinacijskih spojin, ki se nanašajo na različne stehiometrije (Frešer Franjo, 2022, str. 20, dostopno na: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=82474&lang=slv>, datum dostopa: 30. 10. 2023)

Slika 17: Shema poteka eksperimentalnega dela (osebni arhiv avtorja)

Slika 18: Instrumenti, uporabljeni pri izdelavi raziskovalne naloge: a) pH meter, b) analitska tehnica, c) vortex stresalnik, d) ultrazvočna kopel, e) UV-Vis spektrofotometer (osebni arhiv avtorja)

Slika 19: Obarvanost raztopine MeG in Fe(II) ionov brez dodatka Fe(II) ionov (levi vzorec) in po vzpostavitvi ravnotežja (desni vzorec) (osebni arhiv avtorja)