

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Andrea Jovović

**Spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije
kiselinsko-baznih indikatora – mogućnost primjene
ekološki prihvatljivih indikatora**

MASTER RAD

Podgorica, 2025. godine

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Andrea Jovović

**Spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije
kiselinsko-baznih indikatora – mogućnost primjene
ekološki prihvatljivih indikatora**

MASTER RAD

Podgorica, 2025. godine

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Andrea Jovović

Datum i mjesto rođenja: 01.12.2000. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Hemijska tehnologija, 2022. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije kiselinsko-baznih indikatora – mogućnost primjene ekološki prihvatljivih indikatora

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 27.03.2025. godine

Datum prihvatanja teme: 19.05.2025. godine

Mentor: Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, Podgorica, predsjednik

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, Podgorica, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, Podgorica, član

Komsija za odbranu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, Podgorica, predsjednik

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, Podgorica, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, Podgorica, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 2025. godine

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Andrea Jovović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom “Spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije kiselinsko-baznih indikatora – mogućnost primjene ekološki prihvatljivih indikatora“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nijesam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta:

Zahvalnica

Zahvalna sam svim profesorima tokom osnovnih i master studija koji su svojim znanjem, podrškom i razumijevanjem oblikovali moj akademski put i doprinijeli mom stručnom razvoju. Svaki savjet i podstrek bili su mi dragocjeni na ovom putu.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Vesni Vukašinović Pešić, čija je podrška, strpljenje i stručnost bila ključna u realizaciji ovog master rada. Takođe, želim izraziti zahvalnost prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Biljani Damjanović Vratnici na stručnoj pomoći i podršci tokom ovog procesa. Hvala što ste me vodili, motivisali i vjerovali u moj uspjeh.

Mojoj porodici dugujem neizmjernu zahvalnost za ljubav, razumijevanje i snagu koju su mi pružali tokom svih godina studija. Bez njihove podrške, ovaj uspjeh ne bi bio moguć.

Ovaj master rad je rezultat zajedničkog truda i podrške svih vas. Hvala vam što ste bili uz mene na putu ka ostvarenju mojih ciljeva.

Andrea Jovović

IZVOD

Cilj ovog istraživanja bio je spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije (pKa) prirodnih i sintetičkih kiselinsko-baznih indikatora, kao i ispitivanje mogućnosti primjene ekološki prihvatljivih indikatora. Od sintetičkih indikatora korišćeni su metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo i fenolftalein, dok su kao prirodni indikatori pripremljeni vodeni ekstrakt crvenog kupusa i sok od borovnice.

Pripremljene su serije rastvora indikatora koje pokrivaju širi pH opseg (od kiselih do baznih sredina), nakon čega su snimljeni njihovi UV-Vis spektri. pKa vrijednosti određene su grafičkim i računskim metodama. Dobijene pKa vrijednosti za sintetičke indikatore se slažu sa vrijednostima pKa koje su navedene u literaturi, pri čemu su pouzdaniji rezultati dobijeni računskim metodama u odnosu na grafičke metode. Takođe, izračunate pKa vrijednosti za prirodne indikatore koji su dobijeni iz crvenog kupusa i borovnice, su pokazale da se ovi indikatori mogu koristiti u sličnim pH opsezima kao i odgovarajući sintetički indikatori.

Mogućnost upotrebe prirodnih indikatora ispitivana je izvođenjem kiselinsko-baznih titracija za tri različita para kiselina i baza ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH}$, $\text{NaOH} + \text{HCl}$ i $\text{NH}_4\text{OH} + \text{HCl}$), a dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim korišćenjem sintetičkih indikatora. Utvrđeno je da se prirodni indikatori, ekstrakt crvenog kupusa i sok borovnice, ponašaju slično kao sintetički indikatori, pokazujući promjene boje pri sličnim zapreminama dodatog titranta.

Primjena prirodnih indikatora ne samo da pruža funkcionalnu alternativu sintetičkim jedinjenjima, već može značajno doprinijeti smanjenju negativnog uticaja hemijskih reagensa na životnu sredinu, čime se podržavaju principi zelene hemije i razvoj održivih analitičkih metoda. Međutim, identifikovani su i određeni izazovi, poput složenosti biljnih ekstrakata i varijabilnost njihove stabilnosti, što zahtijeva dalja istraživanja i primjenu naprednih tehnika za izolaciju i karakterizaciju aktivnih komponenti.

Ključne riječi: pH, pKa vrijednost, UV-Vis spektrofotometrija, kiselinsko-bazne titracije, sintetički indikatori, prirodni indikatori, biljni ekstrakti, zelena hemija

ABSTRACT

The aim of this study was the spectrophotometric determination of dissociation constants (pKa) of natural and synthetic acid-base indicators, as well as the examination of the potential application of environmentally friendly indicators. Among the synthetic indicators used were methyl orange, methyl red, bromothymol blue, and phenolphthalein, while natural indicators were prepared as aqueous extracts of red cabbage and blueberry juice.

Series of indicator solutions were prepared to cover a wide pH range (from acidic to basic media), after which their UV-Vis spectra were recorded. The pKa values were determined using both graphical and computational methods. The obtained pKa values for synthetic indicators were consistent with literature data, with more reliable results obtained through computational methods compared to graphical ones. Furthermore, the calculated pKa values for natural indicators derived from red cabbage and blueberry demonstrated that these indicators can be used within similar pH ranges as the corresponding synthetic indicators.

The applicability of natural indicators was tested by performing acid-base titrations for three different acid-base pairs ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH}$, $\text{NaOH} + \text{HCl}$, and $\text{NH}_4\text{OH} + \text{HCl}$), and the results were compared with those obtained using synthetic indicators. It was found that the natural indicators, red cabbage extract and blueberry juice, behave similarly to synthetic indicators, showing color changes at comparable volumes of titrant added.

The use of natural indicators not only offers a functional alternative to synthetic compounds but can also significantly contribute to reducing the negative environmental impact of chemical reagents, thus supporting the principles of green chemistry and the development of sustainable analytical methods. However, certain challenges have been identified, such as the complexity of plant extracts and the variability of their stability, which require further research and the application of advanced techniques for the isolation and characterization of active components.

Keywords: pH, pKa value, UV-Vis spectrophotometry, acid-base titrations, synthetic indicators, natural indicators, plant extracts, green chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD	10
2. TEORIJSKI DIO	12
2.1. Kiselinsko-bazni indikatori	12
2.2. Sintetički indikatori	12
2.2.1. Metil oranž	13
2.2.2. Metil crveno	14
2.2.3. Bromtimol plavo	14
2.2.4. Fenolftalein	15
2.2.5. Negativni aspekti primjene sintetičkih indikatora	15
2.3. Primjena i prednosti prirodnih u odnosu na sintetičke indikatore	16
2.3.1. Primjeri prirodnih indikatora	16
2.3.1.1. Crveni kupus	18
2.3.1.2. Borovnica	19
2.4. pKa vrijednost	19
2.4.1. Metode za određivanje pKa vrijednosti	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Instrumenti i oprema	26
3.1.1. Analitička vaga	26
3.1.2. pH metar	26
3.1.3. Magnetna miješalica	27
3.1.4. Spektrofotometar	27
3.2. Reagensi i hemikalije	28
3.3. Metode rada	29
3.3.1. Priprema rastvora indikatora	29
3.3.2. Priprema pufer rastvora	30
3.3.3. Priprema rastvora indikatora za spektrofotometrijsku analizu	30
3.3.4. Spektrofotometrijska analiza	31
3.3.5. Volumetrijske titracije	32
4. REZULTATI I DISKUSIJA	33
4.1. Grafičke metode određivanja konstante disocijacije (pKa)	40
4.1.1. Prva grafička metoda	40
4.1.1.1. Prva grafička metoda za indikator metil oranž	40
4.1.1.2. Prva grafička metoda za indikator metil crveno	41
4.1.1.3. Prva grafička metoda za indikator bromtimol plavo	42
4.1.1.4. Prva grafička metoda za indikator fenolftalein	43
4.1.1.5. Prva grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus	44
4.1.1.6. Prva grafička metoda za prirodni indikator borovnicu	45

4.1.2. Druga grafička metoda	46
4.1.2.1. Druga grafička metoda za indikator metil oranž	47
4.1.2.2. Druga grafička metoda za indikator metil crveno	48
4.1.2.3. Druga grafička metoda za indikator bromtimol plavo	49
4.1.2.4. Druga grafička metoda za indikator fenolftalein	51
4.1.2.5. Druga grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus	52
4.1.2.6. Druga grafička metoda za prirodni indikator borovnicu	53
4.1.3. Treća grafička metoda	55
4.1.3.1. Treća grafička metoda za indikator metil oranž	55
4.1.3.2. Treća grafička metoda za indikator metil crveno	56
4.1.3.3. Treća grafička metoda za indikator bromtimol plavo	57
4.1.3.4. Treća grafička metoda za indikator fenolftalein	57
4.1.3.5. Treća grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus	58
4.1.3.6. Treća grafička metoda za prirodni indikator borovnicu	58
4.2. Računske metode određivanja konstante disocijacije (pKa)	59
4.2.1. Prva računska metoda	59
4.2.1.1. Prva računska metoda za indikator metil oranž	60
4.2.1.2. Prva računska metoda za indikator metil crveno	60
4.2.1.3. Prva računska metoda za indikator bromtimol plavo	60
4.2.1.4. Prva računska metoda za indikator fenolftalein	61
4.2.1.5. Prva računska metoda za prirodni indikator crveni kupus	61
4.2.1.6. Prva računska metoda za prirodni indikator borovnicu	62
4.2.2. Druga računska metoda	62
4.2.2.1. Druga računska metoda za indikator metil oranž	62
4.2.2.2. Druga računska metoda za indikator metil crveno	63
4.2.2.3. Druga računska metoda za indikator bromtimol plavo	63
4.2.2.4. Druga računska metoda za indikator fenolftalein	64
4.2.2.5. Druga računska metoda za prirodni indikator crveni kupus	64
4.2.2.6. Druga računska metoda za prirodni indikator borovnicu	64
4.3. Analiza rezultata spektrofotometrijskog određivanja pKa vrijednosti indikatora	65
4.4. Analiza rezultata dobijenih kiselinsko-baznim titracijama	67
5. ZAKLJUČAK	69
6. LITERATURA	71

1. UVOD

Analitička hemija ima centralnu ulogu u svim granama hemije i u životu uopšte. Analitička hemija zauzima značajno mjesto u osiguranju kvaliteta hemijskih proizvoda, jer omogućava kvantifikaciju i verifikaciju njihove čistoće primjenom različitih hemijskih metoda. Kvalitativna i kvantitativna analiza proizvoda zasniva se na fundamentalnim zakonitostima hemije i drugih povezanih naučnih disciplina. Titracije neutralizacije, koje su česte u procjeni kvaliteta industrijskih hemikalija, posebno su relevantne s obzirom na to da su mnogi industrijski proizvodi kiselog ili baznog karaktera. Preciznost rezultata titracija, koja se temelji na identifikaciji tačaka ekvivalencije, zavisi od korišćenja odgovarajućih indikatora koji omogućavaju tačnu detekciju promjena pH vrijednosti (Sajin i sar., 2020).

Organske sintetičke supstance koje pokazuju promjenu boje u razblaženim rastvorima, kada koncentracija hidroksidnih jona dostigne određenu vrijednost i koje se najčešće koriste za identifikaciju ekvivalentne tačke titracije, nazivaju se kiselinsko-baznim indikatorima (Sajin i sar., 2020). Uobičajeno korišćeni sintetički indikatori imaju određene nedostatke, uključujući toksičnost, ekološku štetnost i visoke troškove.

Ekološki problemi postali su predmet intenzivne pažnje u posljednjim godinama, a sintetička jedinjenja, koja imaju visok potencijal za zagađenje, predstavljaju značajnu opasnost i često su ekonomski nepristupačna. U tom kontekstu, istraživači sve više usmjeravaju pažnju na prirodne proizvode, koji se odlikuju manjom toksičnošću, nižim troškovima, lakoćom dostupnosti i ekološkom prihvatljivošću. Mnogi istraživači su razvili odgovarajuće metode za izolaciju bioaktivnih jedinjenja iz cvjetova pod različitim uslovima, koristeći ih kao prirodne boje. Cvijeće, biljke, minerali itd., kroz svoje specifične boje i strukture, pokazuju jedinstvene karakteristike. Za prirodne boje cvjetova odgovorna su različita organska i neorganska jedinjenja, među kojima su antocijanidini i flavoni ključni (Khan i Farooqui, 2011).

Antocijanini su pigmenti koji prikazuju različite boje u zavisnosti od pH vrijednosti, zbog čega se mogu koristiti kao prirodni indikatori. Ovi hidrosolubilni pigmenti, koji se nalaze u vakuolama, mogu biti crveni, plavi ili ljubičasti u zavisnosti od pH sredine. Prisutni su u svim tkivima viših biljaka, uključujući stabljike, korijen, listove, plodove i cvjetove (Musale i Wagh, 2019).

Svako jedinjenje koje se koristi kao indikator ima specifičnu pKa vrijednost, koja predstavlja ključnu karakteristiku za razumijevanje njegove kiselinsko-bazne ravnoteže (Kapilraj i sar., 2019). Vrijednost

pKa predstavlja pH vrijednost pri kojoj jedinjenje postoji u jednakim koncentracijama u kiselom i baznom obliku, što je značajno za određivanje uslova u kojima će indikator pravilno reagovati (Thangavel i sar., 2022). Interval pH u kom kiselinsko-bazni indikator mijenja boju naziva se intervalom promjene boje i jednak je $pK_a \pm 1$ (Kapilraj i sar., 2019).

Različite metode koje se primjenjuju za određivanje konstante disocijacije imaju specifične prednosti i ograničenja. Stoga je odabir odgovarajuće metode od presudne važnosti i zahtijeva temeljno razumijevanje različitih tehnika koje su relevantne za precizno određivanje ove konstante (Pathare i sar., 2014). Spektrofotometrija je i dalje ključna tehnika u analitičkoj hemiji zbog svoje tačnosti, ponovljivosti i niskih troškova održavanja a korisna je jer ne zahtijeva poznavanje ravnotežne koncentracije reagensa i omogućava precizna mjerenja sa minimalnim količinama uzorka (Han i Priefer, 2023).

Glavni ciljevi istraživanja u ovom master radu bili su:

- Određivanje pKa vrijednosti kiselobaznih indikatora: korišćenjem UV-Vis spektrofotometrije snimljeni su apsorpcioni spektri rastvora indikatora različitih pH vrijednosti i ovi podaci su korišćeni za izračunavanje pKa vrijednosti primjenom grafičkih i računskih metoda. Kao sintetički indikatori upotrijebljeni su neki od najčešće korišćenih indikatora u kiselinsko-baznim titracijama (metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo, fenolftalein), a kao prirodni indikatori korišćeni su ekstrakti biljaka koje su bogate prirodnim pigmentima (aronija, borovnica, malina, višnja, šipurak, crveni kupus, cvekla, kurkuma, itd.).
- Provjera pouzdanosti primjene prirodnih indikatora: kroz titracije kiselina i baza (jaka kiselina sa jakom bazom, slaba kiselina sa jakom bazom i slaba baza sa jakom kiselinom), testirana je efikasnost prirodnih indikatora u identifikaciji ekvivalentne tačke i tačnosti ovakvog određivanja u poređenju sa istim titracijama uz korišćenje sintetičkih indikatora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kiselinsko-bazni indikatori

Indikatori su supstance koje, kroz specifične promjene boje, omogućavaju detekciju stepena kiselosti ili baznosti rastvora. Idealno je da indikatori posjeduju intenzivnu boju, što omogućava upotrebu vrlo malih količina, čime se smanjuje mogućnost uticaja samog indikatora na pH vrijednost rastvora (Sidana i sar., 2011).

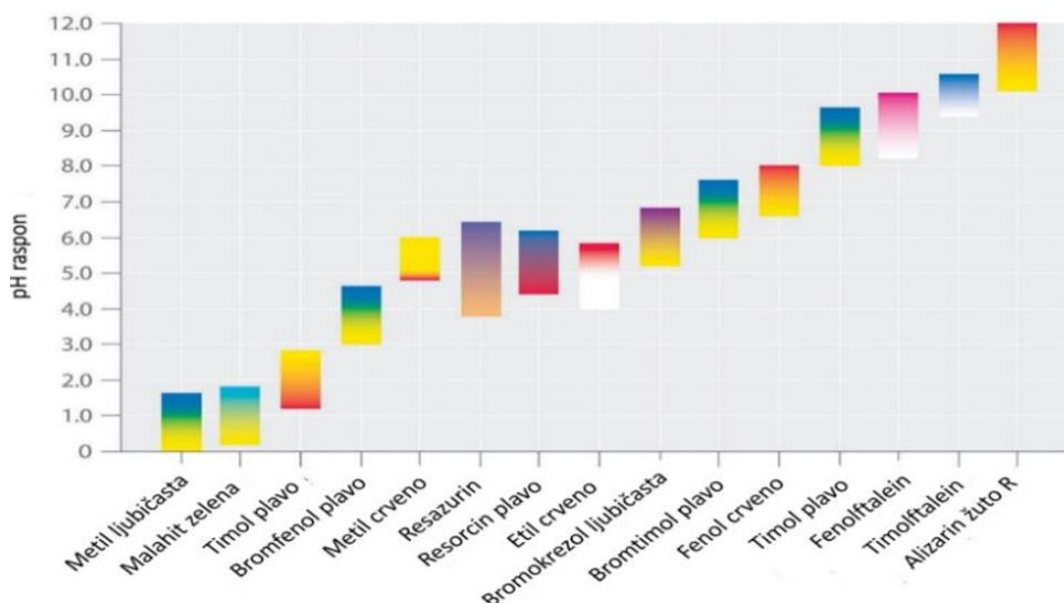
Kiselinsko-bazni indikatori su organske supstance koje se pojavljuju u različitim bojama u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora. Ove supstance postoje u dvije međusobno povezane forme: kiseloj (HIn) i baznoj (In^-), pri čemu svaka forma ima specifičnu boju koja odražava karakterističnu pH vrijednost (Hemdan i sar., 2020).

Kiselinsko-bazna titracija predstavlja metodu za određivanje koncentracije kiseline ili baze kroz njihovo precizno neutralisanje pomoću kiseline ili baze sa poznatom koncentracijom. Ovaj postupak omogućava kvantitativnu analizu koncentracije nepoznatog rastvora kiseline ili baze. Kiselinsko-bazni indikatori se koriste za uočavanje tačke ekvivalencije, tj. kraja titracije (Sidana i sar., 2011). Kiselinsko-bazni indikatori koriste se i za određivanje pH vrijednosti rastvora. Oni mijenjaju boju u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora, odnosno da li se nalaze u kiselom, neutralnom ili baznom okruženju. U savremenoj analitičkoj praksi, najčešće se kao kiselinsko-bazni indikatori primjenjuju slabe kiseline, dok se u određenim slučajevima mogu koristiti i slabe baze (Duković, 2022).

Vrlo je jednostavno odabrati odgovarajući kiselinsko-bazni indikator za vodene rastvore. Bira se onaj indikator koji ima najintenzivniju promjenu boje u završnoj tački titracije. S druge strane, primjena indikatora u mnogim organskim rastvaračima je komplikovanija, jer u tim rastvaračima promjena boje često nije brza niti jasno izražena, kao što je slučaj u vodenim rastvorima (Prebeg, 2023).

2.2. Sintetički indikatori

Dobijeni su sintetički kiselinsko-bazni indikatori koji pokrivaju čitav pH opseg. Na slici 1 je prikazan približan pH opseg u kojem neki uobičajeni indikatori mijenjaju boju, kao i specifične promjene boje koje nastaju.

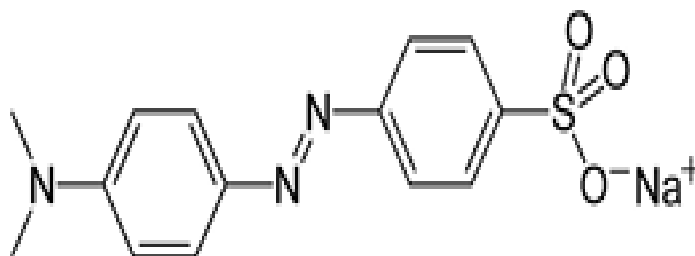


Slika 1. Promjene boje pojedinih sintetičkih indikatora u zavisnosti od pH vrijednosti (Gajić, 2023)

Postoje indikatori, koji pri razdvojenim pH vrijednostima dva puta mijenjaju boju. Takvi su poliprotionski kiseli ili bazni indikatori (npr. timol-plavo). Kako koncentracija indikatora opada, a koncentracija deprotonovanog oblika indikatora raste, boja rastvora postepeno prelazi od karakteristične boje indikatora ka boji deprotonovanog oblika (Gajić, 2023).

2.2.1. Metil oranž

Metil oranž (slika 2) je azo boja i mijenja boju iz žute u crvenu zavisno od pH sredine, pa se često koristi u kiselinsko-baznim titracijama (Prebeg, 2023). Azo boje predstavljaju značajnu klasu jedinjenja zbog njihove široke primjene u različitim tehnološkim oblastima. Njihova upotreba kao boja, metalohromnih reagenasa, fotoosjetljivih materijala, u nelinearnoj optici, kao senzora i analitičkih reagensa privukla je veliku pažnju u oblasti hemije (Mabrouk i sar., 2016).

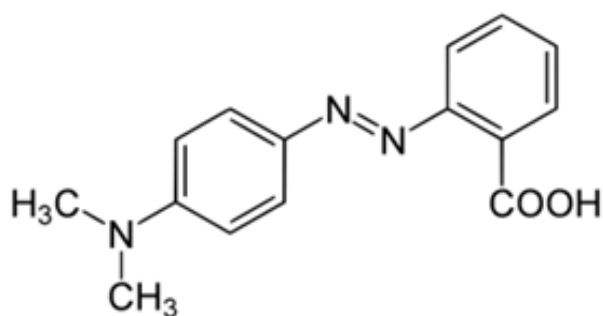


Slika 2. Metil oranž (Sajin i sar., 2020)

Rijetko se koristi u industriji bojenja tekstila, a široku primjenu nalazi u drugim oblastima, kao što su mastila za štampače. Međutim, istraživanja su pokazala da ovo jedinjenje sadrži supstance koje mogu izazvati trajne ili privremene promjene u strukturi ljudske DNK, što može dovesti do pojave kancera (Prebeg, 2023).

2.2.2. Metil crveno

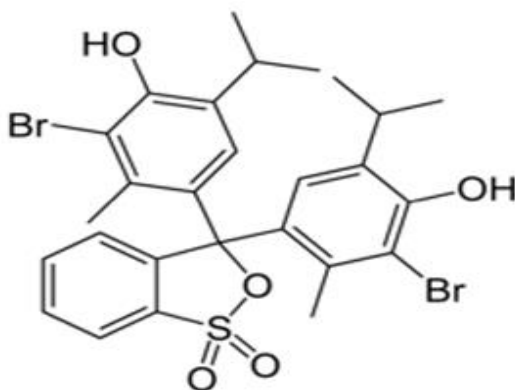
Metil crveno, kao indikator za kiseline i baze, postaje crven u kiselim rastvorima pri pH vrijednosti od oko 4,4 i niže, dok prelazi u žutu boju kada pH dostigne 6,2. U opsegu pH vrijednosti od 4,4 do 6,2, pojavljuje se u narandžastoj boja. Metil crveno (slika 3) se koristi kao indikator kiselosti i baznosti u laboratorijskim uslovima, a takođe pripada grupi azo boja (Kozlowski, 2022).



Slika 3. Metil crveno (Sajin i sar., 2020)

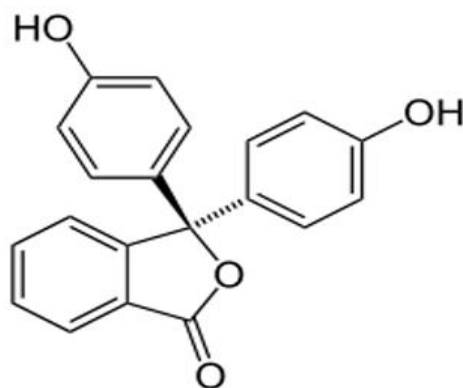
2.2.3. Bromtimol plavo

Bromtimol plavo sadrži tri benzenova prstena u svojoj strukturi (slika 4). U kiselim uslovima, bromtimol plavo je žute boje, dok prelazi u plavu u baznim uslovima, a u neutralnim poprima zelenu boju. Osim što se koristi kao indikator, bromtimol plavo nalazi primjenu i u industriji pigmenata i boja (Prebeg, 2023).



2.2.4. Fenolftalein

Fenolftalein (slika 5) je slaba kiselina koja može da postoji u dvije različite strukture, u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora. U baznim rastvorima, fenolftalein se pojavljuje u ružičastoj boji, dok u kiselim rastvorima ostaje bezbojan. Bazni rastvor apsorbuje svjetlost u vidljivom dijelu spektra, pri čemu ljudsko oko uočava promjenu boje u ružičastu pri pH vrijednosti od 8,2, koja prelazi u intenzivniju ljubičasto-ružičastu boju pri pH vrijednosti od 10 i višim pH vrijednostima (Kozłowski, 2022).



Slika 5. *Fenolftalein* (Sajin i sar., 2020)

2.2.5. Negativni aspekti primjene sintetičkih indikatora

Postoje brojne vrste kiselinsko-baznih indikatora koji se mogu proizvoditi od različitih sintetičkih boja, kao što su: bromotimol plavo, bromokrezol zeleno, krezol crveno, hlorofenol, metil crveno itd. Međutim, sintetičke boje predstavljaju ekološki rizik zbog svoje toksičnosti, slabe biorazgradivosti i kancerogenosti (Szadkowski i sar., 2022). Sintetički indikatori mogu izazvati štetne efekte kao što su: dijareja, plućni edem, hipoglikemija, pankreatitis, kožni osip, eritem i epidermalna nekroza (Nag i sar., 2023). Upravo iz ovih razloga, upotreba sintetičkih indikatora u prehrambenoj industriji se u velikoj mjeri izbjegava ili svodi na minimum (Shirisha i sar., 2025).

Ovi indikatori imaju i dodatne nedostatke, kao što su visoki troškovi i ograničena dostupnost (Okoduwa i sar., 2015). Većina komercijalno dostupnih standardnih sintetičkih indikatora je skupa, a uz to su jako toksični i zapaljivi, što ukazuje na potrebu za pronalaskom prirodnih i manje štetnih alternativa (Shirisha i sar., 2025). Zbog toga su prirodni indikatori, dobijeni iz različitih dijelova biljaka poput cvjetova, plodova i listova, bolji izbor (Okoduwa i sar., 2015).

Principi zelene hemije podstiču razvoj inovativnih tehnoloških rješenja kroz korišćenje proizvoda koji su istovremeno ekološki prihvatljivi i ekonomski održivi. Upotreba toksičnih sintetičkih kiselinsko-

baznih indikatora može biti uspješno zamijenjena prirodnim alternativama koje obezbjeđuju uporediv nivo analitičke tačnosti (Lavanya i sar., 2019).

2.3. Primjena i prednosti prirodnih u odnosu na sintetičke indikatore

Primjena prirodnih boja kao kiselinsko-baznih indikatora prvi put je dokumentovana od strane Sir Roberta Boylea u njegovom djelu *Experimental History of Colors* iz 1664. godine. Mnoge boje mogu se ekstrahovati iz različitih prirodnih izvora. Prirodne boje se dobijaju iz resursa prirodnog porijekla i u zavisnosti od izvora, obično se klasifikuju u četiri glavne kategorije: biljne, životinjske, mineralne i mikrobiološke boje, pri čemu biljke čine dominantni izvor. Na primjer, u Nigeriji su istraživači uspješno izolovali brojne boje iz lokalnih biljnih vrsta. U posljednjim decenijama, identifikovano je mnogo prirodnih kiselinsko-baznih indikatora koji se mogu izdvojiti iz širokog spektra biljnih izvora (Bahadori i Maroufi, 2016).

Prirodni indikatori postaju sve zastupljeniji kao zamjena za sintetičke varijante koje se koriste u laboratorijama i istraživačkim centrima, prije svega zbog svoje netoksičnosti, dostupnosti, jednostavne pripreme i zadovoljavajuće tačnosti u analitičkim postupcima. Osim što se koriste u svakodnevnom laboratorijskim analizama, značajnu ulogu imaju i u nadgledanju ekoloških promjena. Za razliku od sintetičkih indikatora, biljni indikatori su biorazgradivi, netoksični i bezbjedni po zdravlje, što ih čini pogodnijim za rad u okruženjima koja zahtijevaju ekološku odgovornost. Njihova proizvodnja ne zahtijeva velike troškove jer se sirovine lako pronalaze u prirodi, a budući da potiču iz obnovljivih izvora, njihova dugoročna dostupnost nije upitna. Još jedna značajna prednost jeste njihova sposobnost da pokriju širok opseg pH vrijednosti, što omogućava njihovu primjenu u različitim vrstama hemijskih analiza (Shirisha i sar., 2025).

2.3.1. Primjeri prirodnih indikatora

Biljke sadrže obilje sekundarnih metabolita koji reaguju na promjene pH vrijednosti. Među njima, betalaini, flavonoidi i antocijanini predstavljaju biljne metabolite koji su u literaturi prepoznati kao osjetljivi na varijacije pH vrijednosti (Chalosse i sar., 2023).

Brojni fitokonstituenti, uključujući antocijane, glikozilovane i acilovane antocijane, hinone, antrahinoide, naftohinone, flavonoide, acilovane flavonoide, flavanole, imine, indigoide, polimetine, diarilmetane, dihidropirane i karotene, odgovorni su za boje koje različite biljke pokazuju (Raju i sar., 2024). Antocijanini su prisutni u crvenom kupusu, plavom patlidžanu i hibiskusu. Ekstrakti listova moringe imaju karakterističnu zelenu boju usljed prisustva hlorofila, koji je odgovoran za njihove

biološke i hemijske osobine. Ekstrakti bugenvilije (tropska biljka porijeklom iz Južne Amerike) sadrže betalain, dok su karotenoidi odgovorni za boju čili paprike (Reyes i sar., 2022).

Takođe, primijećeno je da neki biljni ekstrakti pokazuju različite boje pri različitim pH vrednostima. Sok od trešnje može biti crven (pH= 2,5), narandžast (pH= 4,5), smeđ (pH= 7) ili zelen (pH= 10). Pokožica rotkve, šljive, jagode, trešnje, crnog grožđa, cvekle, latice ljubičice, latice tulipana, timijan, kurkuma, ljubičasti božuri i borovnice predstavljaju samo neke od biljaka koje pokazuju različite boje u kiselim i baznim rastvorima. Gotovo svaka intenzivno obojena biljka ima potencijal da se koristi kao indikator pH vrijednosti (Khan i Farooqui, 2011).

Kurkuma (*Curcuma longa* L.) predstavlja izuzetnu alternativu za zamjenu sintetičkih indikatora. Aktivni sastojak kurkume, kurkumin, žuti je pigment koji u kiselim uslovima pokazuje žutu boju, dok u baznim uslovima boja rastvora prelazi u crvenu. Cvekla (*Beta vulgaris* L.) sadrži betalain, pigment koji može obezbijediti boje u rasponu od crvene do ljubičaste u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora. Šipurak, plod divlje ruže (*Rosa canina* L.), bogat je vitaminima i u kiselim uslovima daje crvenu boju. Umjerena promjena pH vrijednosti dovodi do postepenog gubitka boje, dok pri pH = 11 postaje siva, pri pH = 13 zelena, a pri pH = 14 žuta (Prebeg, 2023).

Takođe, sok od grožđa, plavih ili crnih sorti, mijenja boju zavisno od pH vrijednosti. U kiselom rastvoru, dodavanjem soka od grožđa boja prelazi u crvenu, u blago baznom rastvoru postaje plava, dok u jako baznom rastvoru boja postaje tamno zelena. Dodatno, neki cvjetovi mogu biti pokazatelji pH vrijednosti pa mogu pokazati da li je zemljište kiselo ili bazno, a primjer je hortenzija (*Hydrangea macrophylla*). Ovu ukrasnu biljku odlikuje prisustvo 13 antocijanina, a njen cvijet mijenja boju u zavisnosti od pH zemljišta kao što je prikazano na slici 6 (Gajić, 2023).



Slika 6. Boje cvjetova hortenzije u zavisnosti od pH zemljišta (Gajić, 2023)

Prirodne boje se smatraju ekološki prihvatljivim alternativama zbog svoje obnovljivosti i biorazgradivosti (Bahadori i Maroufi, 2016). Pored toga, ove biljne alternative su ekonomičnije, lako dostupne, jednostavne za ekstrakciju, te manje toksične za korisnike (Okoduwa i sar., 2015).

2.3.1.1. Crveni kupus

Zbog problema sa bezbjednošću sintetičkih boja, povećane svijesti potrošača i lakše dostupnosti prirodnih boja, potražnja za upotrebom biljnih ekstrakata značajno raste (Ghareaghajlou i sar., 2021).

Crveni kupus se uzgaja širom svijeta već hiljadama godina unazad zbog svog kratkog vegetativnog ciklusa, velike prilagodljivosti i visoke produktivnosti. U Kini se crveni kupus uzgaja u mnogim provincijama sa visokim prinosima i obiljem resursa (Tan i sar., 2023).



Slika 7. Boje ekstrakta crvenog kupusa u različitim uslovima (Duković, 2022)

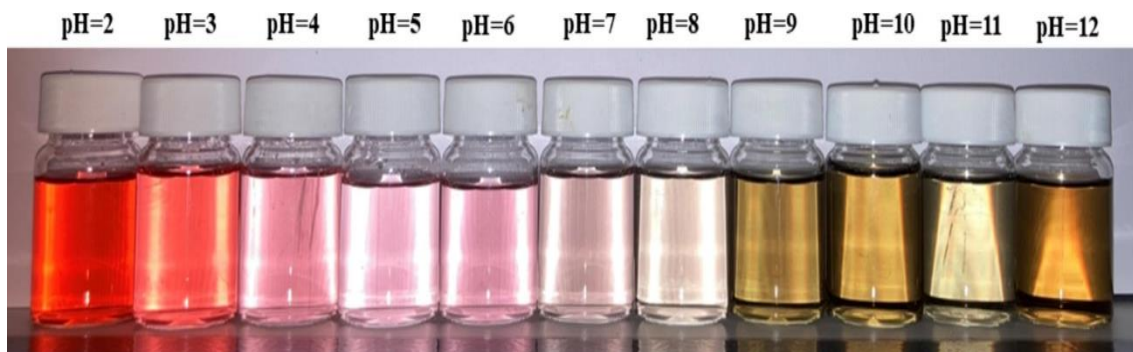
Antocijani iz crvenog kupusa izazivaju veliki interes kao prirodne boje u prehrambenoj industriji zbog svoje sposobnosti da pokrivaju širok opseg pH vrijednosti, što ih izdvaja u odnosu na antocijane drugih prirodnih izvora. Ove fenolne supstance pokazuju reverzibilne promjene boje u zavisnosti od pH vrijednosti (slika 7). U vodenim rastvorima, antocijani se nalaze u ravnoteži između četiri različita oblika: flavilijum-katjona (crveni oblik), kinonoidnog oblika (ljubičastog do plavog), kao i dva bezbojna oblika — karbinol-pseudobaze i halkona. Promjena boje rastvora je rezultat promjena u konfiguraciji antocijana, izazvanih promjenama pH vrijednosti sredine. Crveni kupus sadrži veće količine antocijana u poređenju sa drugim prehrambenim izvorima. Ova biljka je bogat izvor mikronutrijenata, kao što su vitamini C i K, β -karoten, minerali, vlakna, ukupni polifenoli i glukozinolati. Takođe, crveni kupus predstavlja značajan izvor prirodnih pigmenata sa visokim koncentracijama antocijana (≥ 10 g/kg suve materije), a ekstrakt crvenog kupusa sadrži više od 30 različitih antocijanskih pigmenata (Ghareaghajlou i sar., 2021).

2.3.1.2. Borovnica

Sitni plodovi, kao što su borovnice, brusnice, jagode i maline, bogati su bioaktivnim fenolnim jedinjenjima, uključujući flavonoide, antocijanine i fenolne kiseline, koji im daju izražena antioksidativna svojstva. Zbog svog hemijskog sastava i biološke aktivnosti, ova grupa voća sve češće se svrstava u kategoriju tzv. funkcionalnih namirnica. Brojne studije su ukazale na njihove potencijalne koristi u prevenciji raznih bolesti, čime se opravdava njihova sve češća upotreba (Yan i sar., 2023).

Borovnica (*Vaccinium spp.*) je voće porijeklom iz Evrope, gdje se široko gaji i komercijalizuje. Kako je potrošnja uvezenih zamrznutih borovnica porasla za potrebe prerade sokova i pekarskih proizvoda, gajenje borovnica je takođe poraslo i u drugim djelovima svijeta. Borovnice su poznate po mnogim nutritivnim zdravstvenim koristima. Bogate su vitaminima C, E i mineralima. Atraktivna boja, koja potiče od prisustva antocijanina, jedna je od ključnih organoleptičkih osobina ovog voća, ali i drugih bobica (Song i sar., 2018). Intenzivna tamnoplavo-ljubičasta nijansa na pokožici ploda borovnice rezultat je dominacije određenih antocijanina, pretežno glikozidnih oblika; delfinidina, petunidina i malvidina. Njihova koncentracija značajno je povezana sa izraženošću plave boje koja se razvija u toku procesa sazrijevanja ploda (Yan i sar., 2023).

Varijacija boja rastvora u koje je dodat ekstrakt borovnice prikazana je na slici 8. Svijetlo crvena boja se pojavljuje pri pH = 2–3, zatim svijetlo roza pri pH = 4–7. Sa porastom pH boja prelazi u sivkasto-ružičastu, sve dok ne dostigne žutu boju (Viscusi i Gorrasi, 2024).



Slika 8. Varijacija boja ekstrakta borovnice pri različitim pH vrijednostima (Viscusi i Gorrasi, 2024)

2.4. pKa vrijednost

Konstante disocijacije kiselina ključne su za razumijevanje mnogih osnovnih hemijskih reakcija, jer pokazuju stepen deprotonacije molekula u datom rastvaraču (Alongi i Shields, 2010).

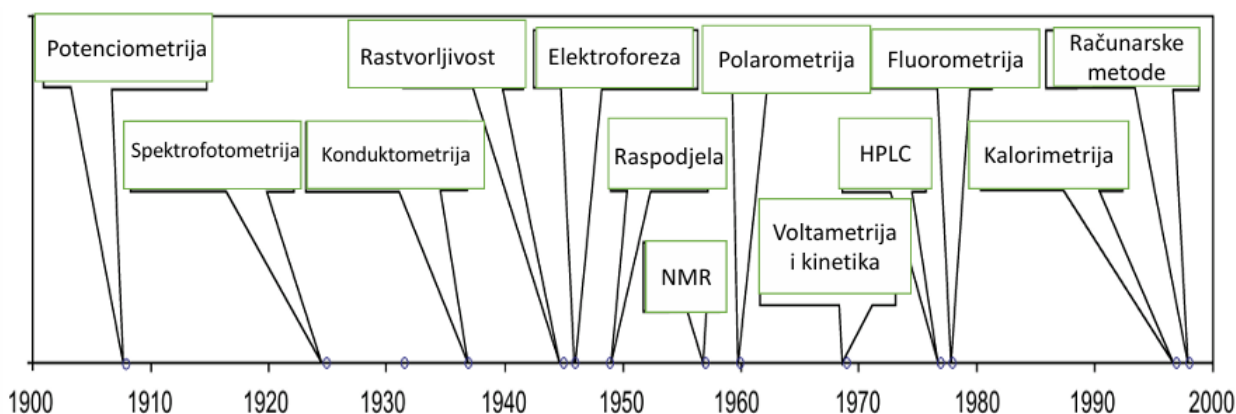
Mnoge hemijske, fizičke i biološke osobine prirodnih i sintetičkih jedinjenja određene su interakcijama kiselih i baznih grupa. Kod takvih jedinjenja, pKa vrijednost kontroliše mnoge aspekte metabolizma, pa čak i transport kroz membrane. Zbog toga je njeno proučavanje od velikog značaja u biologiji, farmaciji, medicini i brojnim srodnim naučnim oblastima (Vidal Salgado i Vargas-Hernández, 2014).

Pored drugih fizičko-hemijskih parametara, kao što su tačke ključanja i mržnjenja, gustina i rastvorljivost, pKa vrijednost funkcionalnih grupa u molekulu predstavlja jednu od ključnih karakteristika. pKa vrijednost odgovara vrijednosti pH pri kojoj se kiselna funkcionalna grupa nalazi u ravnoteži između protonovanog i deprotonovanog oblika, pri konstantnim uslovima pritiska i temperature. Ove vrijednosti imaju širok spektar primjena koje prevazilaze samo određivanje jačine kiseline. Razumijevanje pKa vrijednosti je od suštinskog značaja prilikom izbora odgovarajućeg pufera za sisteme koji zahtijevaju stabilnu pH vrijednost, uključujući farmaceutske formulacije, kozmetičke i prehrambene proizvode (Han i Priefer, 2023).

2.4.1. Metode za određivanje pKa vrijednosti

Trenutno postoji veliki broj metoda za određivanje ovog fizičko-hemijskog parametra (slika 9). One uključuju spektrofotometriju, fluorometriju, nuklearnu magnetnu rezonancu (NMR), tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC), konduktometriju, kapilarnu elektroforezu, voltometriju, rastvorljivost, raspodjelu, kalorimetriju, polarimetriju, računarske metode i površinski napon (Han i Priefer, 2023).

Postoje dvije metode koje se najčešće koriste za određivanje pKa vrijednosti jedinjenja, a to su potenciometrijska titracija i spektrofotometrijska metoda. Potenciometrijska titracija zahtijeva poznavanje ravnotežnih koncentracija reagensa, dok kod spektrofotometrijske titracije to nije neophodno, jer se odnos koncentracija baznog i kiselog oblika određuje na osnovu rezultata apsorpcije (Vidal Salgado i Vargas-Hernández, 2014).



Slika 9. Vremenska linija prvih pojava različitih tehnika za određivanje pK_a (Reijenga i sar., 2013)

Potenciometrijska titracija

U potenciometrijskim titracijama, uzorak se titrira kiselinom ili bazom, dok se promjene pH vrijednosti prate pomoću elektroda – referentne i indikatorske, ili kombinovane pH elektrode koja objedinjuje obje funkcije. Na osnovu promjene pH tokom titracije moguće je odrediti pK_a vrijednost ispitivane supstance. Ta vrijednost se najčešće izračunava na osnovu jednakosti $pH = pK_a$ u tački kada je supstanca poluneutralisana, analizom oblika titracione krive i njenim poređenjem sa krivom dobijenom iz kontrolnog uzorka (Cepanec, 2022).

Među glavnim prednostima potenciometrijske titracije izdvajaju se jednostavnost primjene, pogodnost za ispitivanje rastvora različitih boja, dostupnost i niska cijena potrebne opreme, kao i visoka tačnost i pouzdanost metode. Ipak, jedan od nedostataka ove tehnike jeste potreba za većom količinom uzorka (Cepanec, 2022). To je čini manje pogodnom u poređenju sa separacionim tehnikama poput HPLC-metode ili kapilarne elektroforeze, koje zahtijevaju minimalne količine materijala (Zaračko, 2015).

Dodatni izazov u određivanju pK_a vrijednosti ovom metodom može predstavljati ograničena rastvorljivost analita u vodi. Ovaj problem se djelimično može prevazići korišćenjem smješa različitih rastvarača, međutim, takav pristup može dovesti do odstupanja dobijenih rezultata u odnosu na vrijednosti koje bi se očekivale u čistom vodenom rastvoru (Cepanec, 2022).

Konduktometrija

Konduktometrija je metoda koja se koristi za određivanje tačke ekvivalencije mjerenjem promjena u električnoj provodljivosti rastvora. Provodljivost elektrolita zavisi od njegove prirode i broja jona koji

prenose električnu struju, pa se stoga mijenja u zavisnosti od koncentracije elektrolita. Osnovna pretpostavka ove metode je da su jaki elektroliti potpuno disosovani bez obzira na koncentraciju, dok će slabi elektroliti biti potpuno disosovani tek pri beskonačnom razblaženju. Konstanta disocijacije može se direktno odrediti primjenom Ostwaldovog zakona (jednačina 1), koji pokazuje da za njeno određivanje nije potrebna prethodna analiza pH vrijednosti, što čini ovu metodu korisnom u sistemima gdje je mjerenje pH nepraktično.

$$K' = \frac{\lambda^2 \cdot c}{(\lambda^\circ \cdot (\lambda^\circ - \lambda))} \quad (1)$$

U jednačini (1), K' predstavlja prividnu konstantu disocijacije, dok λ označava ekvivalentnu provodljivost, koja zavisi od broja jona prisutnih u rastvoru i dostiže svoju graničnu vrijednost λ° pri beskonačnom razblaženju, kada su, po definiciji, koeficijenti aktivnosti jednaki jedan. Simbol c odnosi se na analitičku koncentraciju (Reijenga i sar., 2013).

Konduktometrijska metoda pruža brzu i pouzdanu tehniku za određivanje pK, uz visok nivo preciznosti. Međutim, negativna strana ove metode je nespecifičnost konduktometrijskih mjerenja, jer električna provodljivost može biti pod uticajem drugih faktora osim same disocijacije, što može otežati interpretaciju rezultata u složenijim sistemima (Zaračko, 2015).

UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometrija predstavlja jednu od najzastupljenijih metoda za određivanje pKa jedinjenja koja se i dalje široko koristi zbog svoje dostupnosti, tačnosti, jednostavnosti i ponovljivosti. Za primjenu ove metode u određivanju pKa, neophodno je da hromofor bude prisutan u blizini mjesta ionizacije jedinjenja. Ukoliko je ovaj uslov ispunjen, moguće je primijetiti razliku u spektru disosovane i nedisosovane forme molekula. Apsorbancija se zatim prikazuje grafički u odnosu na pH, pri čemu se dobija sigmoidalna kriva, a pKa se procjenjuje na osnovu tačke infleksije (Berkhout i Ram, 2019).

UV-Vis spektrofotometrija je efikasna metoda za proučavanje jedinjenja male rastvorljivosti u vodi, kao i jedinjenja veoma niskih koncentracija. Aromatska jedinjenja, zahvaljujući svojoj karakterističnoj strukturi, lako se analiziraju pomoću spektrofotometra, jer posjeduju specifične apsorpcione pikove u UV i vidljivom dijelu spektra (Cepanec, 2022).

Kada se smješa rastvora analita i indikatora analizira spektrofotometrijski, analit apsorbuje u UV području (250–380 nm), dok indikator u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora, apsorbuje u vidljivom

dijelu spektra (380–700 nm). pKa vrijednost se može odrediti iz spektrofotometrijskih podataka primjenom različitih metodoloških pristupa (Vidal Salgado i Vargas-Hernández, 2014).

Podaci dobijeni za određenu talasnu dužinu analizom uzoraka puferskih rastvora poznatih pH vrijednosti mogu se koristiti za određivanje pKa vrijednosti. Takođe, konstanta disocijacije kiseline može se odrediti korišćenjem razvijenih spektrofotometrijskih pristupa na više talasnih dužina (Cepanec, 2022).

Fluorometrija

Fluorometrija je specifičan tip spektrofotometrije. Ova metoda se koristi za određivanje pKa vrijednosti analizom razlike u fluorescenciji između slobodne kiseline ili baze i njihovih konjugovanih oblika. Takođe, pH zavisnost fluorometrijskih mjerenja često nema povezanost sa rezultatima dobijenim konvencionalnom spektrofotometrijom, jer zavisi od razmjene protona u pobuđenom stanju, što može dovesti do razlika u pKa vrijednostima između osnovnog i pobuđenog stanja. Ipak, uspješno određivanje pKa vrijednosti osnovnog stanja slabo rastvorljivih N-heterocikličnih baza postignuto je pažljivim odabirom talasne dužine ekscitacije, čime je omogućeno mjerenje isključivo konjugovane kiseline (Reijenga i sar., 2013).

Fluorometrija je relativno brza i precizna metoda za određivanje konstanti disocijacije slabo rastvorljivih arilamina i hidroksiaromatskih jedinjenja. Često je značajno osjetljivija od mnogih drugih analitičkih metoda i koristi se u situacijama kada jonizujuća grupa aromatične kiseline ili baze izaziva promjenu u fluorescentnom spektru, što je čini metodom izbora za određivanje pKa vrijednosti. Međutim, ova metoda se primjenjuje isključivo na jonizujuće grupe koje daju fluorescentni spektar (Pathare i sar., 2014).

Elektroforeza

Elektroforeza kao metoda za određivanje pK pruža nekoliko prednosti u odnosu na druge tehnike. Za analizu je potrebna mala količina uzorka, a granica detekcije je na nivou 10^{-6} M, što omogućava efikasnu obradu slabo rastvorljivih supstanci. S obzirom na to da elektroforeza predstavlja separacionu tehniku, pK vrijednosti mogu se odrediti ne samo za čiste supstance, već i za komponente u složenim uzorcima. Ipak, potencijalni izazov ove metode leži u potrebi za pažljivim odabirom puferskih rastvora za svaku mjerenu pH vrijednost, kako bi se izbjegle moguće interakcije između pufera i analiziranih supstanci (Reijenga i sar., 2013).

Princip ove metode temelji se na vezi između elektroforetske mobilnosti jonizabilnog jedinjenja i pH vrijednosti pozadinskog elektrolita. Tačka infleksije krive mobilnosti u funkciji pH vrijednosti odgovara pKa vrijednosti jedinjenja. Da bi se dobile tačne pKa vrijednosti, mjerenja mobilnosti treba sprovesti u nekoliko pufera sa odgovarajućom i stabilnom jonskom silom, kao i precizno kontrolisanim pH vrijednostima (Albishri i sar., 2022).

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

HPLC (tečna hromatografija visokih performansi) je ključna tehnika u analitičkoj hemiji koja omogućava efikasnu separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih komponenti u kompleksnim smjesama. Veliki uspjeh HPLC-a može se pripisati njenim brojnim prednostima, uključujući visok stepen ponovljivosti, jednostavnost manipulacije, selektivnost i visok stepen osjetljivost. Najistaknutija karakteristika ove metode je izuzetna rezolucija, koja omogućava preciznu analizu i separaciju čak i veoma sličnih molekula, kao i molekula sa značajnim strukturnim razlikama, pri širokom spektru uslova (Ghanjaoui, 2020).

Kalorimetrija

Sve kalorimetrijske metode temelje se na mjerenju količine toplote koja se oslobađa tokom fizičkih ili hemijskih procesa. Jedna od tih metoda koja se koristi za određivanje pK vrijednosti je izotermička titraciona kalorimetrija, ITC. Ova metoda omogućava izvođenje kiselinsko-bazne titracije u kalorimetru, pri čemu se mjeri energija potrebna za održavanje konstantne temperature tokom titracije (Zaračko, 2015).

U posljednje vrijeme, ITC metoda postaje sve češće korišćena za određivanje konstanti disocijacije peptida, kao i za istraživanje efekta vezivanja na specifične jonizujuće grupe. Ova tehnika omogućava indirektno određivanje pKa vrijednosti analizom promjena entalpije (ΔH). Grafičkim prikazivanjem minimalnih ili maksimalnih vrijednosti u funkciji pH, generiše se sigmoidna kriva, iz koje se pKa vrijednost precizno određuje na osnovu infleksione tačke (Pathare i sar., 2014).

Volumetrijska titracija

Titracija je osnovna laboratorijska tehnika koja se koristi za kvantitativnu analizu supstanci čije koncentracije nijesu poznate, uz pomoć standardnih rastvora poznatih koncentracija. Supstanca sa nepoznatom koncentracijom naziva se analit, a standardni rastvor naziva se titrant (Jeiyendira Pradeep i Dave, 2013).

Tokom titracija, titrant iz kalibrisane birete polako se dodaje poznatoj zapremini analiziranog uzorka, u kom se nalazi odgovarajući indikator. Indikatori služe kao signali krajnje tačke titracije, signalizujući kada je reakcija postigla ekvivalentnu tačku. U trenutku kada dođe do promjene boje rastvora analiziranog uzorka zbog reakcije indikatora, titracija je završena. Utrošena zapremina titranta se zabilježi, nakon čega se računa nepoznata koncentracija analiziranog uzorka.

Najčešći tipovi titracija uključuju kiselinsko-bazne titracije, kompleksometrijske i redoks titracije. U kontekstu kiselinsko-baznih titracija, kada pH vrijednost dostigne pK_a vrijednosti indikatora, oba oblika, $HInd$ i Ind^- , prisutna su u ravnoteži u odnosu 1:1. Ako je pH iznad pK_a vrijednosti, koncentracija konjugovane baze prevazilazi koncentraciju kiseline, pa boja ovog oblika postaje dominantna. Suprotno, ako je pH ispod pK_a vrijednosti, dolazi do dominacije boje koja je karakteristična za kiselinsku formu indikatora. Ovaj princip predstavlja osnovu promjene boje indikatora tokom kiselinsko-baznih titracija (Jeiyendira Pradeep i Dave, 2013).

Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)

Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) je spektrofotometrijska tehnika koja se koristi za određivanje molekulskih struktura organskih i neorganskih jedinjenja. Ova tehnika temelji se na stvaranju magnetnog polja. Pomoću NMR-a, vrijednost pK može se odrediti analizom hemijskog pomaka (δ) komponenti u zavisnosti od pH. Ovaj pristup daje sigmoidalnu krivu, čija tačka infleksije odgovara pK_a vrijednosti (Zaračko, 2015).

Glavna prednost NMR metode je mogućnost rada sa smjesama. Kada se proučava hemijski pomak pojedine funkcionalne grupe, nijedna druga funkcionalna grupa ne utiče na rezultat, a to doprinosi preciznom određivanju pK_a vrijednosti bez preklapanja hemijskih pomaka (Zaračko, 2015).

Nedostaci povezani s mjerenjem pK_a vrijednosti NMR metodom nijesu vezani za samu tehniku izvođenja NMR-a, već uglavnom za uslove pod kojima se mjerenje vrši. Naime, promjena temperature tokom eksperimenta može uzrokovati vibracione promjene unutar molekula, koje ukoliko se ne uzmu u obzir pri računanju, mogu dovesti do netačnih vrijednosti pK_a . Takođe, pošto su aparat a često i sam eksperiment skupi, ova tehnika je isplativa samo za neke analize složenijih molekula (Cepanec, 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Instrumenti

U ovom radu od instrumenata korišćeni su analitička vaga (VWR), pH metar (Jenway), magnetna miješalica (Velp Scientifica) i spektrofotometar (Shimadzu UV-1601).

3.1.1. Analitička vaga

Mjerenje pomoću elektronskih analitičkih vaga smatra se najpreciznijom mjernom operacijom u analitičkoj laboratoriji, međutim, određivanje nesigurnosti mjerenja i dalje izaziva određena neslaganja. Specifikacije koje pružaju proizvođači često se ne podudaraju sa mjerenjima tokom rutinskih analiza, zbog čega je neophodno izvršiti validaciju mjernih metoda kako bi se tačno odredio stvarni nivo nesigurnosti (Andersen, 2018).

Analitička vaga nudi brojne prednosti, uključujući izuzetno visok nivo tačnosti, jednostavnost korišćenja i efikasnost u određivanju mase. Sistem samokalibracije omogućava automatsko podešavanje mase, čime se obezbjeđuje pravilna kalibracija i postizanje najpreciznijih i najosjetljivijih rezultata. Ove vage su sposobne da detektuju i najmanje promjene u težini. Takođe, pomažu laboratorijama da održavaju i unaprijede dobre laboratorijske prakse, osiguravajući ujednačenost, dosljednost, pouzdanost, kvalitet, ponovljivost i integritet rezultata (Karki, 2022).

3.1.2. pH metar

pH predstavlja negativni logaritam koncentracije vodonikovih jona. Korišćenjem digitalnog pH metra mogu se dobiti precizne numeričke vrijednosti pH, što je znatno tačnije u odnosu na tradicionalne metode koje samo ukazuju da li je rastvor kiseo ili bazan. Ovi uređaji omogućavaju visoku preciznost, sa tačnošću do 0,01% (Gangurde i sar., 2016).

pH metar je elektronski uređaj koji se koristi za precizno mjerenje pH vrijednosti rastvora. Obično se koristi kombinovana pH elektroda, koja integriše sve potrebne komponente u jedan uređaj. U vodenim rastvorima skala pH vrijednosti se kreće od 0 do 14, gdje vrijednost 7 označava neutralan rastvor. Vrijednosti manje od 7 ukazuju na to da je rastvor kiseo, dok vrijednosti veće od 7 označavaju da je rastvor bazan (alkalan) (Gangurde i sar., 2016).

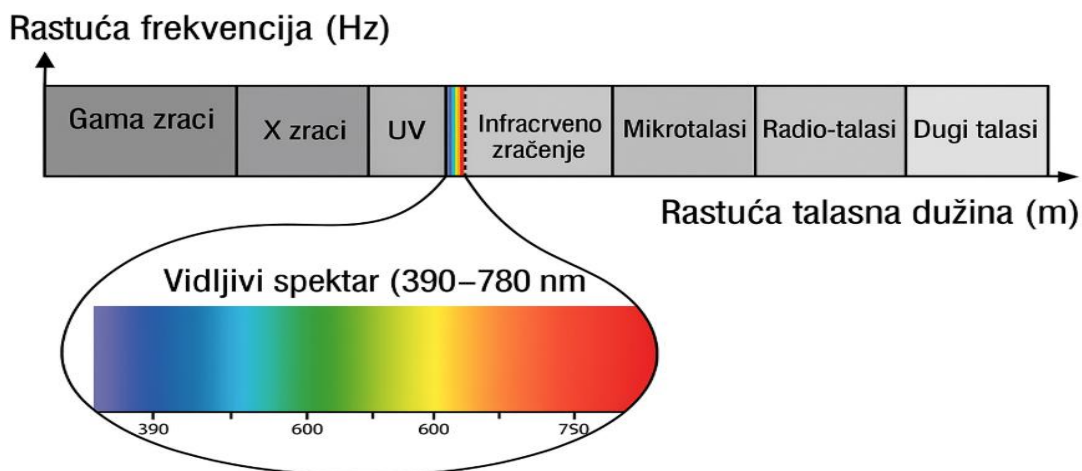
3.1.3. Magnetna miješalica

Analiza određenih tečnih uzoraka često zahtijeva dodatne supstance, rastvore ili uređaje koji mogu unaprijediti proces analize. Da bi smjesa analitičkih uzoraka bila homogena, neophodna je upotreba miješalice koja će obezbijediti jednolično miješanje. Ručno miješanje često dovodi do nereprezentativnih uzoraka, jer je za svaki uzorak različito i vrijeme i brzina miješanja. Magnetna miješalica je laboratorijski uređaj koji se koristi za miješanje rastvora s ciljem dobijanja homogene smješe (Nugraha i sar., 2021).

3.1.4. Spektrofotometar

Svaka boja ima specifičnu talasnu dužinu. Različite komponente svjetlosti karakterišu se specifičnim talasnim dužinama. Suma svih komponenti, tj. svih talasnih dužina, naziva se spektar. Preciznije, spektar predstavlja raspodjelu energije elektromagnetnog zračenja. Na primjer, elektromagnetni spektar vidljive svjetlosti prostire se od otprilike 390 nm do otprilike 780 nm (De Caro i Claudia, 2025).

Energija elektromagnetnih talasa povezana je sa njihovim talasnim dužinama (što je talasna dužina kraća, to je energija veća (slika 10)). Tako na primjer, ljubičasta svjetlost ima kraću talasnu dužinu od crvene svjetlosti, pa samim tim ima viši nivo energije (De Caro i Claudia, 2025).



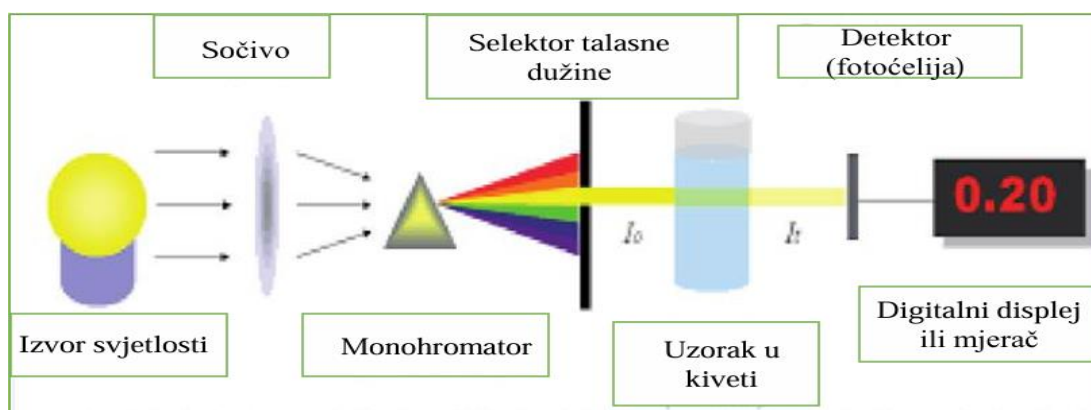
Slika 10. Vidljivi spektar predstavlja mali dio cjelokupnog elektromagnetnog spektra (De Caro i Claudia, 2025)

UV-Vis spektrofotometar mjeri intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz rastvor uzorka u kiveti, upoređujući ga sa intenzitetom svjetlosti prije nego što je prošla kroz uzorak. Na taj način, uređaj omogućava određivanje apsorpcije svjetlosti, što je ključno za kvantifikaciju koncentracije

komponenti u rastvoru na osnovu njihove sposobnosti da apsorbiraju svjetlost na određenim talasnim dužinama (De Caro i Claudia, 2025).

UV-Vis spektrofotometar se sastoji od izvora svjetlosti, držača uzorka, monohromatora i detektora, kao što je prikazano na slici 11 (Dadi i Yasir, 2022):

- Izvor svjetlosti: Hidrogenske i deuterijumske lampe za UV svjetlost, tungsten-filamentna lampa za vidljivu svjetlost.
- Monohromatori: Iz polihromatske svjetlosti monohromatorom se biraju određene talasne dužine.
- Držači uzoraka i kivete: Kivete od kvarca za UV opseg spektra i staklene kivete za vidljivi opseg spektra, sa standardnom dužinom puta od 1 cm.
- Detektori: Najčešće korišćeni detektori u UV i vidljivom opsegu spektra su fotoćelije, fototube i fotomultiplikatori.



Slika 11. Osnovni dijelovi spektrofotometra (Dadi i Yasir, 2022)

3.2. Reagensi i hemikalije

U ovom radu korišćeni su:

- Metil oranž
- Metil crveno
- Bromtimol plavo
- Fenolftalein
- Kalijum – dihidrogenfosfat

- Dinatrijum – hidrogenfosfat
- Natrijum – hidroksid
- Hlorovodonična kiselina
- Sirćetna kiselina
- Amonijum – hidroksid.

Sve upotrebljene hemikalije su bile p.a. (pro analysi) čistoće, a realni uzorci (crveni kupus, borovnica, kurkuma, višnja, šipurak, cvekla, malina, kopriva) su nabavljeni u lokalnim prodavnicama.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema rastvora indikatora

Eksperimentalni dio ovog istraživanja obuhvatio je pripremu rastvora kako sintetičkih, tako i prirodnih indikatora. Od sintetičkih indikatora korišćeni su: metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo i fenolftalein. Prva faza eksperimentalnog rada podrazumijevala je njihovu pripremu.

Rastvori sintetičkih indikatora pripremljeni su vaganjem tačno određenih masa čvrstih supstanci pomoću analitičke vage. Odvagane mase prenesene su u normalne sudove, nakon čega su indikatori rastvoreni u odgovarajućem rastvaraču (destilovana voda ili rastvor etanola) i zatim dopunjeni do oznake.

Rastvor metil oranža pripremljen je rastvaranjem oko 0,05 g indikatora u 50 mL destilovane vode. Metil crveno (iste mase) je rastvoreno u 50 mL 66% etanola. Rastvor bromtimol plavog pripremljen je na isti način, s tim da je kao rastvarač korišćen 20% etanol. Fenolftalein je korišćen u obliku rastvora koncentracije 0,10 M, u 96% etanolu kao rastvaraču. Svi pripremljeni rastvori sintetičkih indikatora profiltrirani su prije upotrebe i čuvani na sobnoj temperaturi.

Nakon sprovođenja analiza uz primjenu navedenih indikatora, pripremljeni su rastvori prirodnih indikatora – ekstrakti i sokovi od različitih biljaka (crveni kupus, borovnica, kurkuma, višnja, šipurak, cvekla, malina, kopriva). Za dalja ispitivanja korišćeni su ekstrakt crvenog kupusa i sok od borovnice. Rastvor borovnice dobijen je razblaživanjem 5 mL soka dobijenog cijedenjem ploda borovnice destilovanom vodom u mjernoj posudi do ukupne zapremine od 25 mL. Ekstrakt crvenog kupusa pripremljen je tako što su listovi kupusa dodati u ključalu vodu, nakon čega je sud poklopljen i

ostavljen da odstoji 10 do 15 minuta, omogućavajući tako ekstrakciju pigmenta. Oba rastvora su prije upotrebe profiltrirana kako bi se uklonile eventualne nečistoće.

3.3.2. Priprema pufer rastvora

Za realizaciju eksperimentalnog dijela rada, pored rastvora indikatora, bilo je neophodno pripremiti i pufer rastvore čije pH-vrijednosti obuhvataju širi pH-opseg. Priprema pufera izvršena je prema uputstvima navedenim u relevantnoj literaturi (Orešković, 2021; Chalosse i sar., 2023; Kapilraj i sar., 2019).

Acetatni pufer (pH= 3,56) je pripremljen miješanjem 46,3 mL rastvora sirćetne kiseline, koncentracije 0,2 M i 3,7 mL rastvora natrijum acetata iste koncentracije u mjernom balonu od 100 mL koji je zatim dopunjen destilovanom vodom do crte.

Pored acetatnog, pripremljen je i fosfatni pufer. U tu svrhu pripremljen je rastvor natrijum dihidrogenfosfata (NaH_2PO_4) koncentracije 0,10 M, kojem je dodatkom natrijum-hidroksida (NaOH) podešavana pH vrijednost (pH= 7,25), čime je uspostavljen pufer sistem baziran na ravnoteži između H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} jona.

Radi postizanja šire pokrivenosti pH opsega, pripremljen je boratni pufer (pH= 9,25). U tu svrhu su napravljeni odvojeni rastvori borne kiseline i kalijum-hlorida, oba koncentracije 0,20 M. Nakon potpunog rastvaranja u destilovanoj vodi, odmjerene su jednake zapremine oba rastvora (po 100 mL), koje su zatim sjedinjene i homogenizovane uz pomoć magnetne miješalice.

Ova tri pufer rastvora korišćena su u spektrofotometrijskoj analizi indikatora metil oranža, metil crvenog i fenolftaleina. Njihovom upotrebom obezbijeđeno je pokrivanje šireg pH-opsega, što je bilo od značaja za tačnost dobijenih rezultata.

Pufer rastvori koji su korišćeni za analizu indikatora bromtimol plavog, kao i dva prirodna indikatora, pripremljeni su prema zasebnom postupku. Bilo je potrebno napraviti 500 mL 0,10 M rastvora Na_2HPO_4 , 500 mL 0,10 M KH_2PO_4 , kao i 50 mL 4 M rastvora natrijum-hidroksida. Miješanjem rastvora indikatora sa ovim pripremljenim rastvorima u određenim odnosima zapremine, dobijeni su rastvori različitih pH vrijednosti, koji pokrivaju širi pH opseg.

3.3.3. Priprema rastvora indikatora za spektrofotometrijsku analizu

Rastvori indikatora metil oranža, metil crvenog i fenolftaleina različitih pH-vrijednosti za spektrofotometrijsku analizu pripremljeni su na način da je u 15 čašica odmjereno po 15 mL pufer

rastvora (3 pufer rastvora, po 5 čašica i tako za svaki indikator ponovljeno) i svakom tom odmjerenom rastvoru dodato je po 3 kapi rastvora indikatora. Na taj način bilo je moguće za svaki indikator pratiti promjenu koncentracije disosovanog i nedisosovanog oblika. Nakon dokapavanja indikatora u puferske rastvore, dobijeni rastvori dobro su promiješani na magentnoj miješalici uz dokapavanje 1 M rastvora NaOH ili 1 M rastvora HCl, kako bi se homogenizovali i dobili širi opseg pH čije su tačne vrijednosti izmjerene i zapisane, a nakon toga su rastvori bili spremni za spektrofometrijsku analizu.

Kada je u pitanju priprema rastvora bromtimol plavog, ekstrakta crvenog kupusa i borovnice za spektrofotometrijsku analizu, postupak je nešto drugačiji. U početnoj fazi, pripremljeno je deset pufer rastvora (u tabeli 1 označeni rednim brojevima 2-11) odmjera vanjem različitih zapremina 0,1 M Na_2HPO_4 i 0,1 M KH_2PO_4 u normalnim sudovima zapremine 25 mL. Zatim je u svaki sud dodato po 0,8 mL rastvora indikatora i dopunjeno destilovanom vodom do oznake.

Dodatni rastvori koji ne sadrže navedene soli, označeni su kao (1) i (12) u tabeli 1. Rastvor (1) je sadržao 0,8 mL indikatorskog rastvora, 5 mL destilovane vode i 4 kapi koncentrovane HCl, nakon čega je dopunjen vodom do 25 mL. Rastvor označen kao (12) pripremljen je tako što je u 0,8 mL indikatora dodat rastvor NaOH (12 kapi, koncentracije 4 M), pa razblažen do oznake na normalnom sudu.

Tabela 1. Zapremine 0,1 M Na_2HPO_4 i 0,1 M KH_2PO_4

Redni broj uzorka	V (KH_2PO_4), mL	V (Na_2HPO_4), mL
1	0	0
2	5	0
3	10	0,5
4	5	1
5	10	5
6	5	5
7	5	10
8	1	5
9	1	10
10	0,5	10
11	0	5
12	0	0

Svim pripremljenim rastvorima je izmjerena tačna pH vrijednost.

3.3.4. Spektrofotometrijska analiza

Pripremljeni rastvori analizirani su pomoću UV–Vis spektrofotometra, sa ciljem određivanja apsorbancije u određenom opsegu talasnih dužina. Za svaki od analiziranih indikatora snimani su

apsorpcioni spektri u intervalu talasnih dužina od 350 nm do 650 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetnog spektra. Kao referentni (blank) uzorak korišćena je destilovana voda.

Na osnovu dobijenih spektara, određene su talasne dužine pri kojima dolazi do maksimalne apsorpcije zračenja. Budući da su svi ovi ispitivani indikatori bili prisutni u rastvorima različitih pH-vrijednosti, pri čemu su disosovani i nedisosovani oblici indikatora prisutni u varijabilnim odnosima, a talasne dužine maksimalne apsorpcije određene su za svaki oblik indikatora posebno.

3.3.5. Volumetrijske titracije

U okviru eksperimentalnog dijela ispitivanja provedene su tri vrste kiselinsko-baznih titracija, pri čemu su korišćeni rastvori koncentracije 0,1 M: hlorovodonična kiselina (HCl), natrijum-hidroksid (NaOH), sirćetna kiselina (CH₃COOH) i amonijum-hidroksid (NH₄OH). Realizovane su sljedeće titracije: (1) titracija slabe kiseline jakom bazom (sirćetna kiselina titrisana natrijum-hidroksidom), (2) titracija jake baze jakom kiselinom (natrijum-hidroksid titrisan hlorovodoničnom kiselinom) i (3) titracija slabe baze jakom kiselinom (amonijum-hidroksid titrisan hlorovodoničnom kiselinom). Za svaku vrstu titracije vršena su po tri ponavljanja sa svakim od odabranih indikatora.

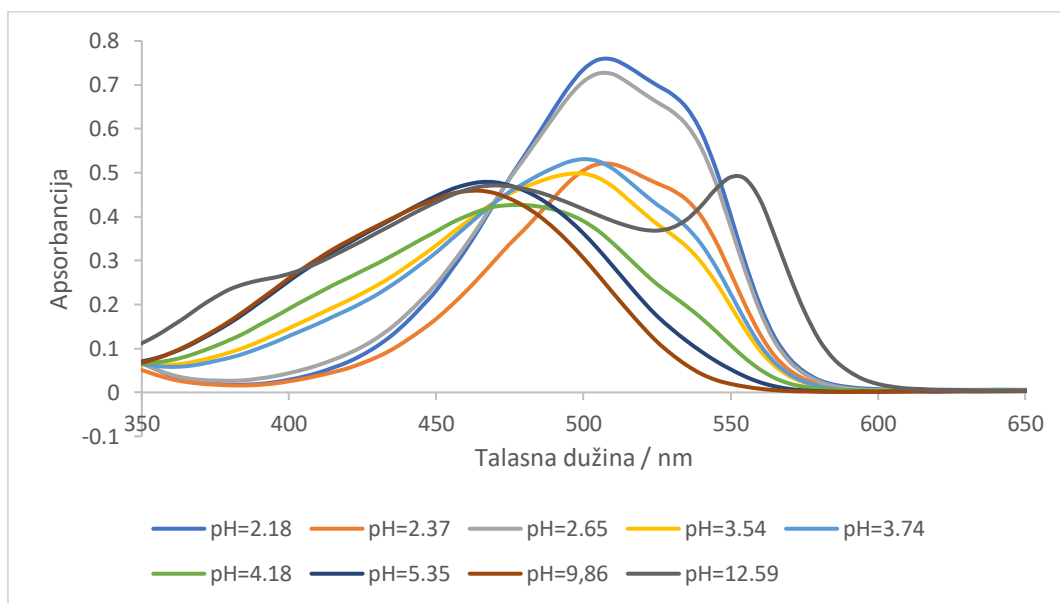
Za eksperimentalni postupak odmjereno je 10 mL odgovarajućeg analita (sirćetna kiselina, amonijum-hidroksid ili natrijum-hidroksid), koji je potom razblažen destilovanom vodom do ukupne zapremine od 100 mL. U svaki rastvor dodat je indikator (u kapima), nakon čega je sprovedena titracija odgovarajućim titrantom do tačke promjene boje. Svi eksperimenti su izvedeni uz miješanje na magnetnoj miješalici, pri laboratorijskoj temperature. Zapremine utrošenog titranta su zabilježene i korišćene za uporednu analizu rezultata različitih titracija.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

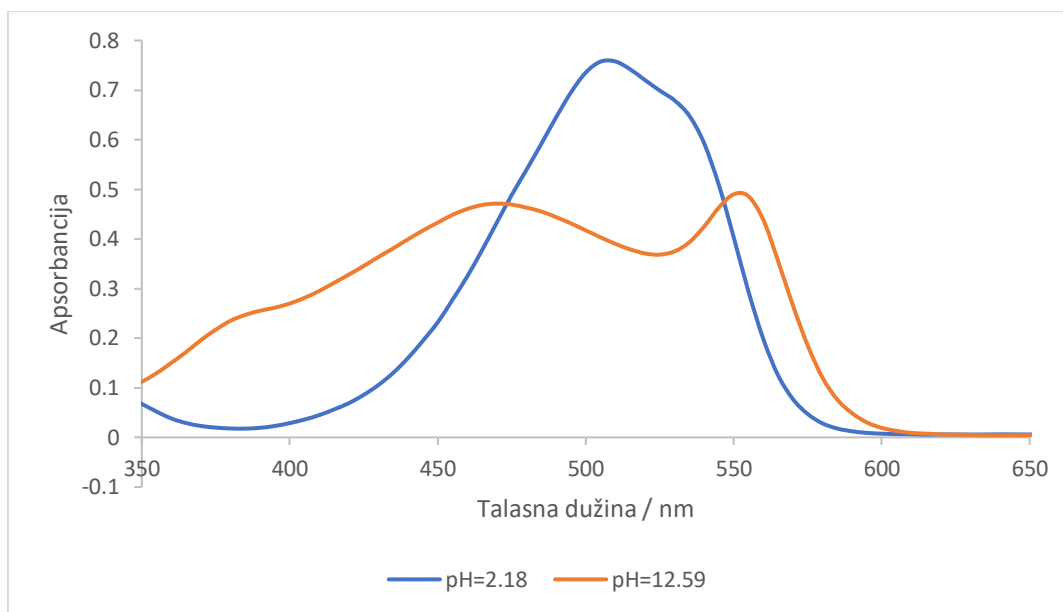
U okviru ovog istraživanja sprovedeno je spektrofotometrijsko određivanje konstanti disocijacije odabranih sintetičkih i prirodnih indikatora, uključujući metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo, fenolftalein, kao i ekstrakt crvenog kupusa i sok borovnice. Spektrofotometrijska mjerenja realizovana su u rastvorima različitih pH-vrijednosti, s ciljem praćenja promjena apsorbancije indikatora u kiselom, neutralnom i baznom području.

U svrhu identifikacije talasnih dužina maksimalne apsorpcije za disosovane i nedisosovane forme svakog indikatora, snimljeni su apsorpcioni spektri u prisustvu odgovarajućih pufer rastvora.

Na slikama 12 i 13 su dati apsorpcioni spektri rastvora indikatora metil oranža pri različitim pH vrijednostima.



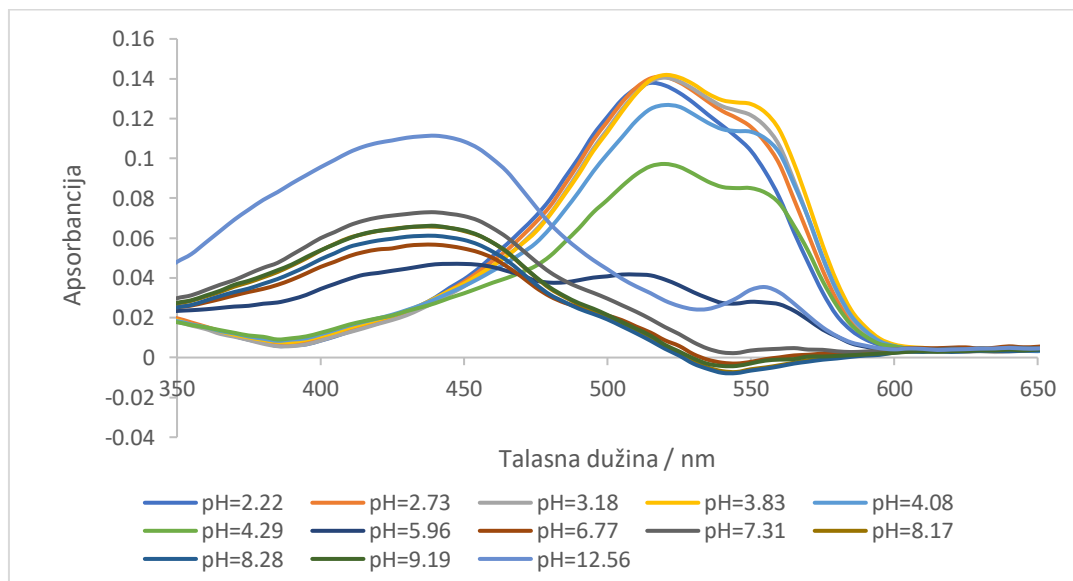
Slika 12. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora metil oranž*



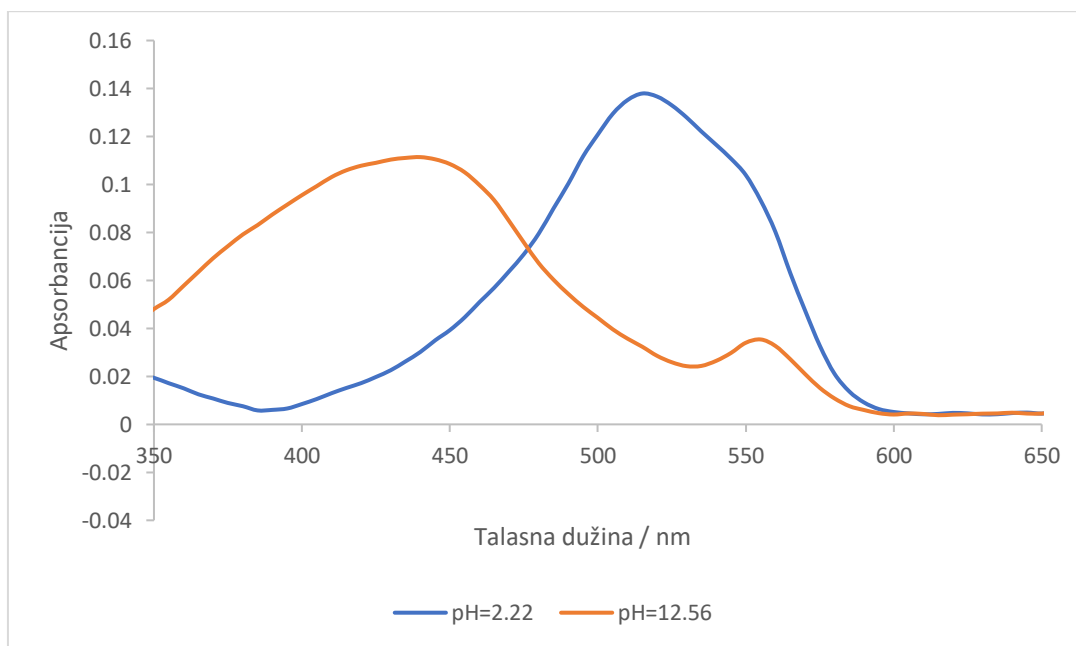
Slika 13. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora metil oranža*

Analizom apsorpcionih spektara eksperimentalno su određene talasne dužine maksimalne apsorpcije za indikator metil oranž, a dobijene vrijednosti iznose 459 nm i 520 nm. Ove vrijednosti su u skladu sa literaturnim podacima, gdje su zabilježene maksimalne apsorpcije na 464 nm i 508 nm (Shalaby i Mohamed, 2020).

Na slikama 14 i 15 su dati apsorpcioni spektri rastvora indikatora metil crvenog pri različitim pH vrijednostima.



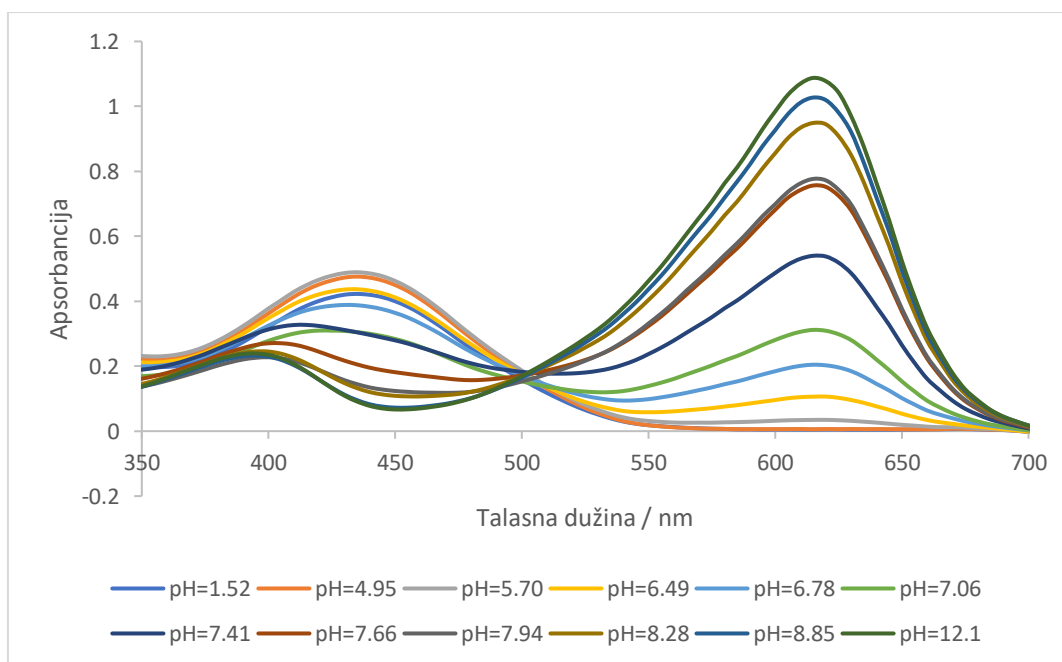
Slika 14. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora metil crvenog*



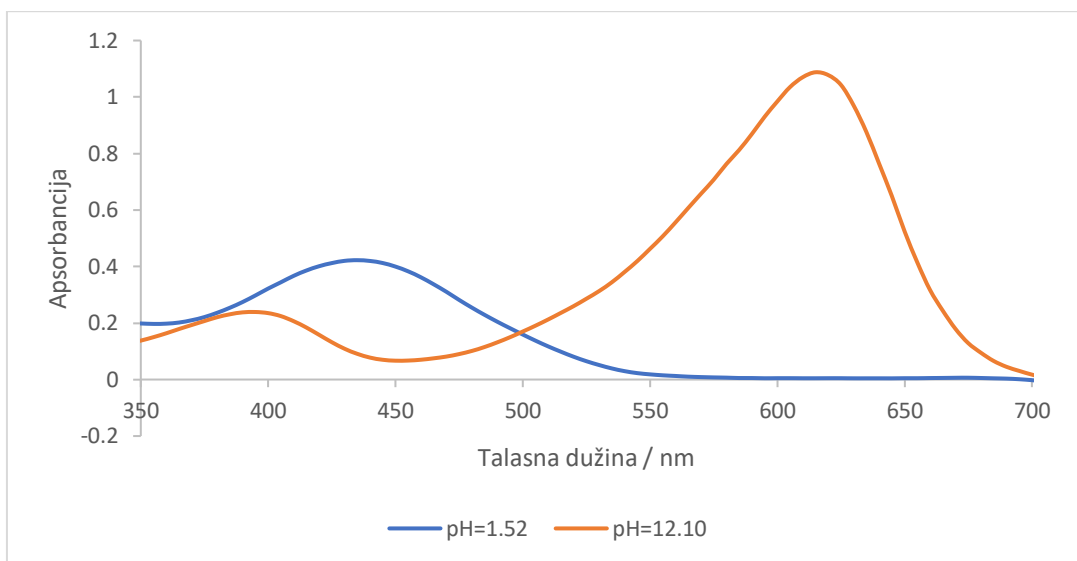
Slika 15. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora metil crvenog*

Analizom apsorpcijskih spektara eksperimentalno su određene talasne dužine maksimalne apsorpcije za ovaj indikator, a dobijene vrijednosti iznose 420 nm i 515 nm.

Na slikama 16 i 17 su dati apsorpcijski spektri rastvora indikatora bromtimol plavog pri različitim pH vrijednostima.



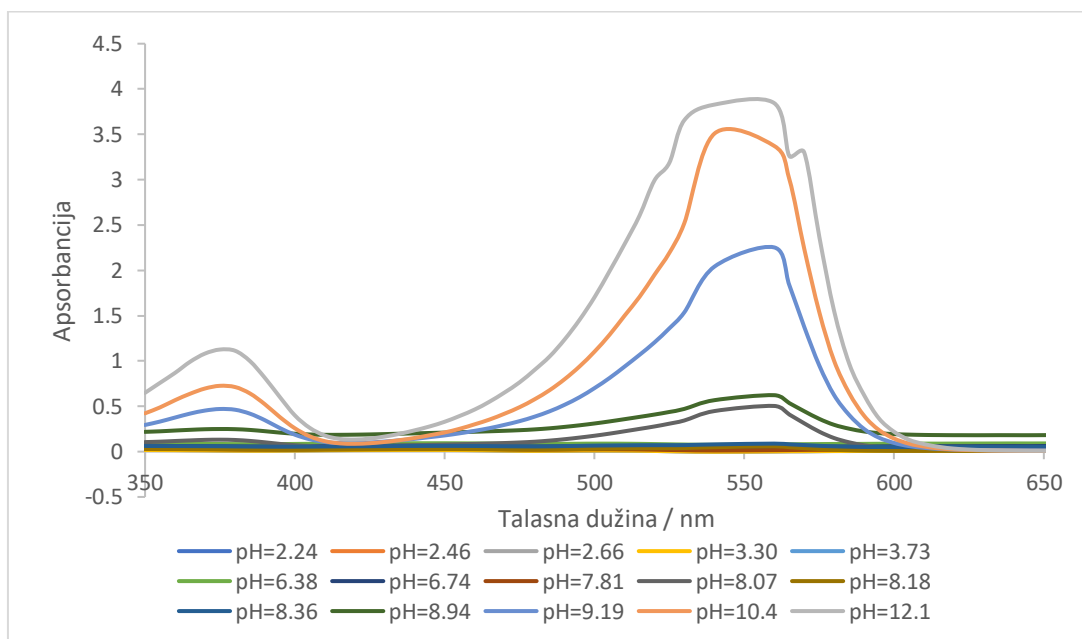
Slika 16. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora bromtimol plavog*



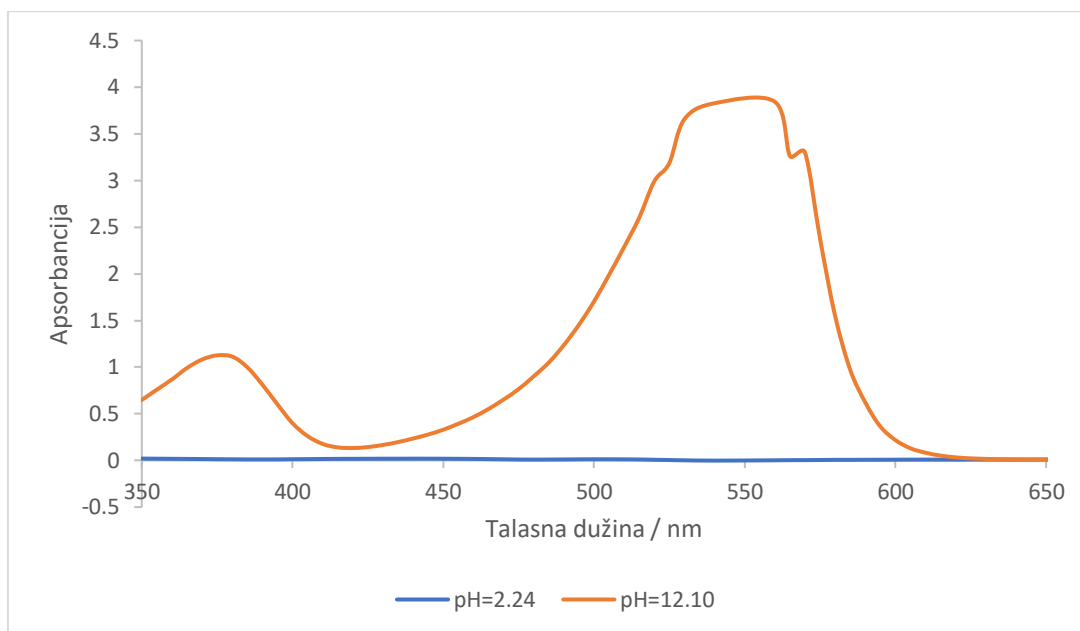
Slika 17. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora bromtimol plavog*

Analizom apsorpcionih spektara eksperimentalno su određene talasne dužine maksimalne apsorpcije za ovaj indikator, a dobijene vrijednosti iznose 440 nm i 620 nm. Ove vrijednosti su u skladu sa literaturnim vrijednostima, gdje su zabilježene maksimalne apsorpcije na 431 nm i 615 nm (Orešković, 2021) i 433 nm i 617 nm (Shalaby i Mohamed, 2020).

Na slikama 18 i 19 su dati apsorpcioni spektri rastvora indikatora fenolftaleina pri različitim pH vrijednostima.



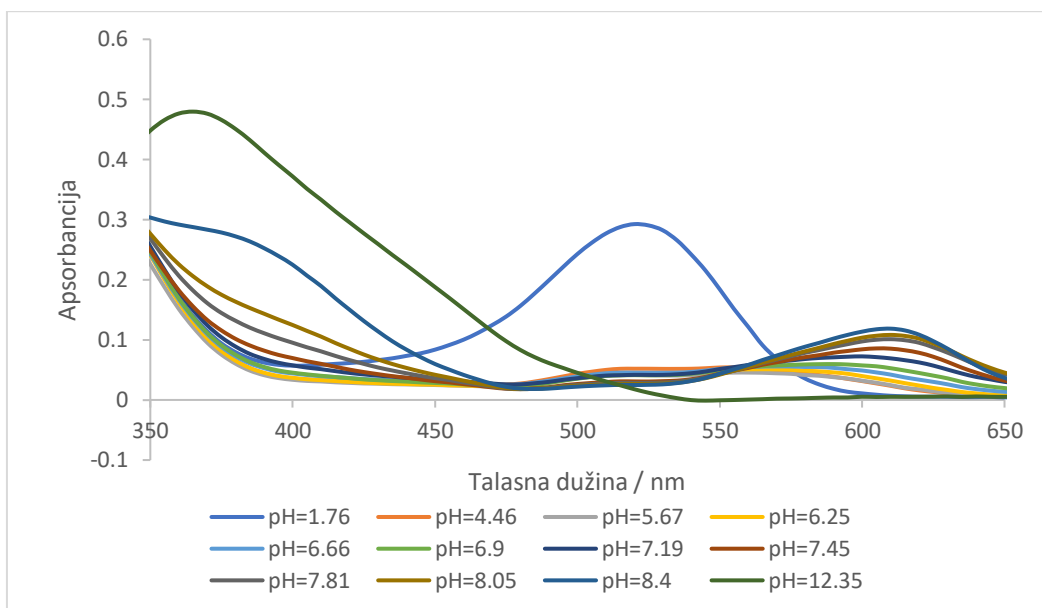
Slika 18. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora fenolftaleina*



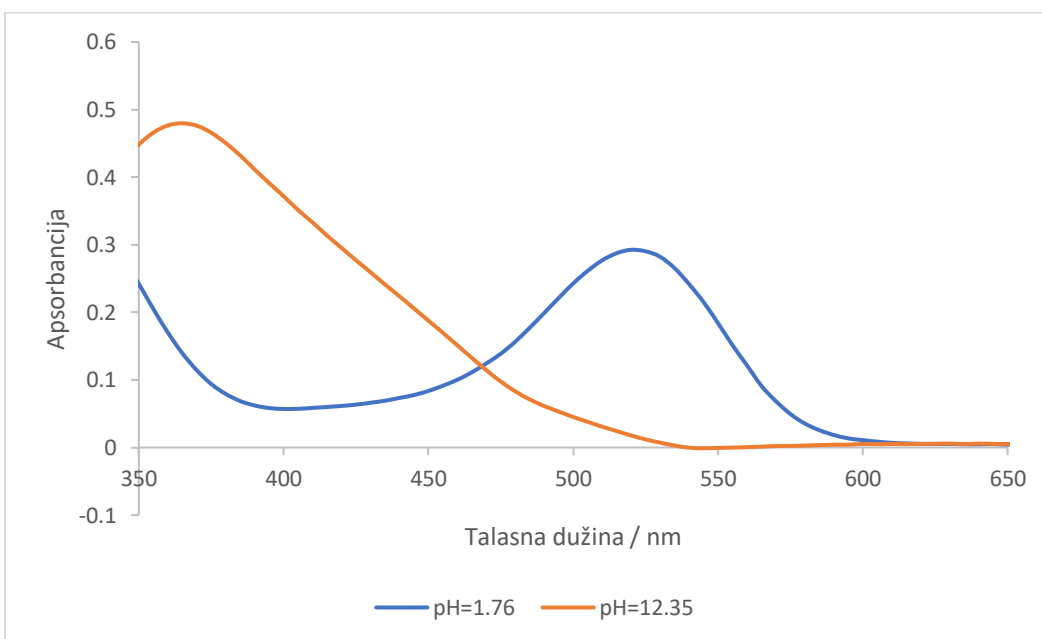
Slika 19. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora fenolftaleina*

Analizom apsorpcionih spektara eksperimentalno su određene talasne dužine maksimalne apsorpcije za ovaj indikator, pri čemu su dobijene vrijednosti 380 nm i 559 nm. Vrijednost od 380 nm dobro se poklapa sa rezultatima iz rada Orešković (2021), gdje je zabilježeno 375 nm, dok druga vrijednost odstupa u odnosu na njihovu izmjerenu vrijednost od 522 nm, što može biti posljedica razlika u eksperimentalnim uslovima.

Na slikama 20 i 21 su dati apsorpcioni spektri rastvora indikatora crvenog kupusa pri različitim pH vrijednostima.



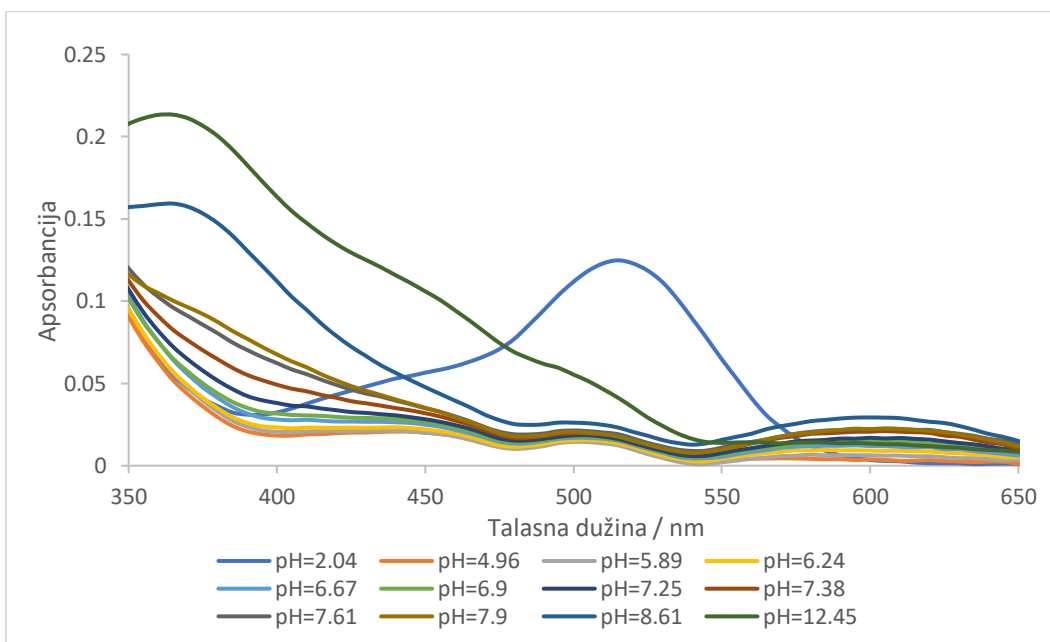
Slika 20. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora crvenog kupusa*



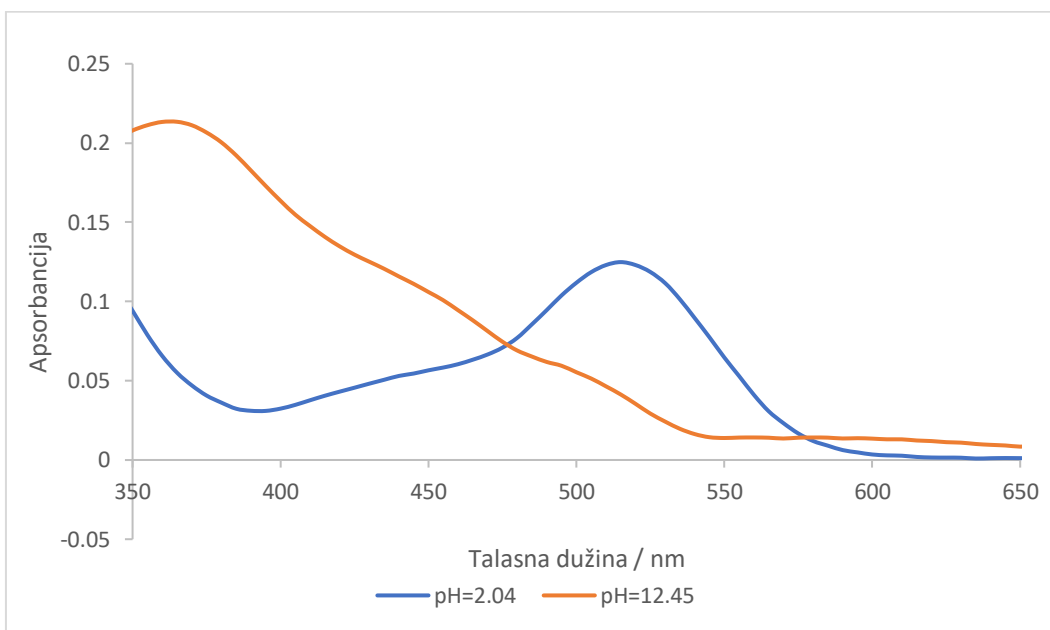
Slika 21. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora crvenog kupusa*

U slučaju ovog prirodnog indikatora, identifikovane talasne dužine maksimuma apsorpcije bile su 370 nm i 524 nm.

Na slikama 22 i 23 su dati apsorpcioni spektri rastvora indikatora borovnice pri različitim pH vrijednostima.



Slika 22. *Apsorpcioni spektar rastvora indikatora borovnice*



Slika 23. *Apsorpcioni spektar najkiselijeg i najbaznijeg rastvora borovnice*

Identifikovane talasne dužine maksimuma apsorpcije za sok borovnice bile su 375 nm i 509 nm.

Na osnovu izmjerenih talasnih dužina može se zaključiti da se svi registrovani maksimumi apsorpcije nalaze unutar vidljivog dijela elektromagnetnog spektra, što ukazuje na sposobnost ovih indikatora da apsorbuju zračenje u području vidljive svjetlosti. Za spektrofotometrijsko određivanje konstanti

disocijacije (pK_a) primijenjeno je pet metoda: dvije grafičke metode i tri numeričko-računske metode, čime je obezbijedena pouzdana evaluacija kiselinsko-baznih svojstava ispitivanih jedinjenja.

4.1. Grafičke metode određivanja konstante disocijacije (pK_a)

Za spektrofotometrijsko određivanje konstante disocijacije grafičkim putem, u ovom istraživanju primijenjene su tri različite metode, koje su zasebno analizirane. Metode se zasnivaju na mjerenju apsorbancije indikatora u njegovim potpuno disosovanim i nedisosovanim oblicima, kao i na određivanju apsorbancije u rastvorima različitih pH-vrijednosti, unutar raspona u kojem dolazi do značajne promjene relativnog udjela disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora (Orešković, 2021; Vidal Salgado i Vargas- Hernández, 2014).

4.1.1. Prva grafička metoda

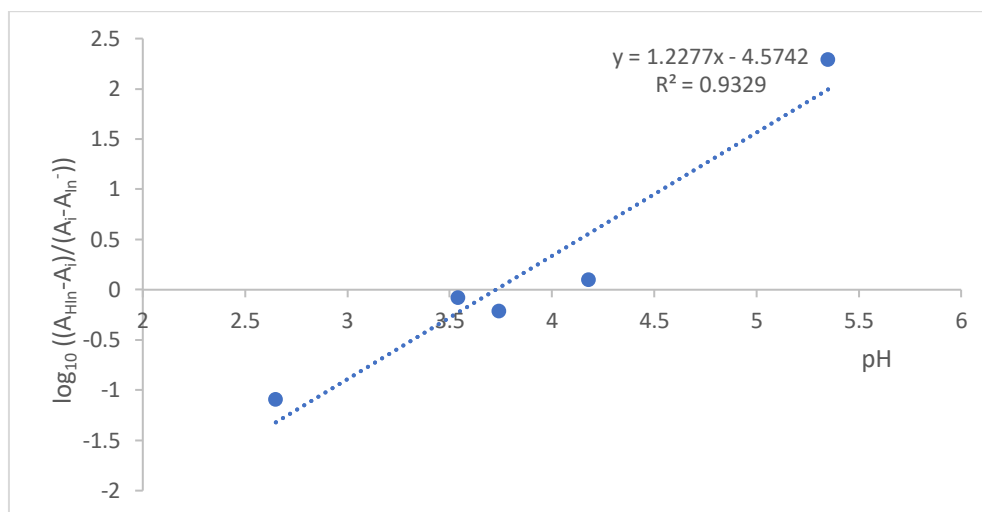
Prva grafička metoda temelji se na primjeni Henderson-Hasselbalchove jednačine, pri čemu se uspostavlja linearna korelacija između vrijednosti izraza (2) i pH vrijednosti rastvora,

$$\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} \quad (2)$$

gdje A_i predstavlja izmjerenu apsorbanciju pri određenom pH, dok su A_{HIn} i A_{In-} apsorbancije odgovarajućih potpuno nedisosovanih i disosovanih oblika indikatora. Pravac dobijen linearnom regresijom presijeca apscisu u tački u kojoj vrijedi $pH = pK_a$, što implicira da navedena vrijednost odgovara eksperimentalno određenoj konstanti disocijacije (pK_a) analiziranog indikatora.

4.1.1.1. Prva grafička metoda za indikator metil oranž

Na slici 24 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za metil oranž.



Slika 24. Grafički prikaz prve grafičke metode za metil oranž

Iz jednačine pravca:

$$y = 1,2277 \cdot x - 4,5742$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

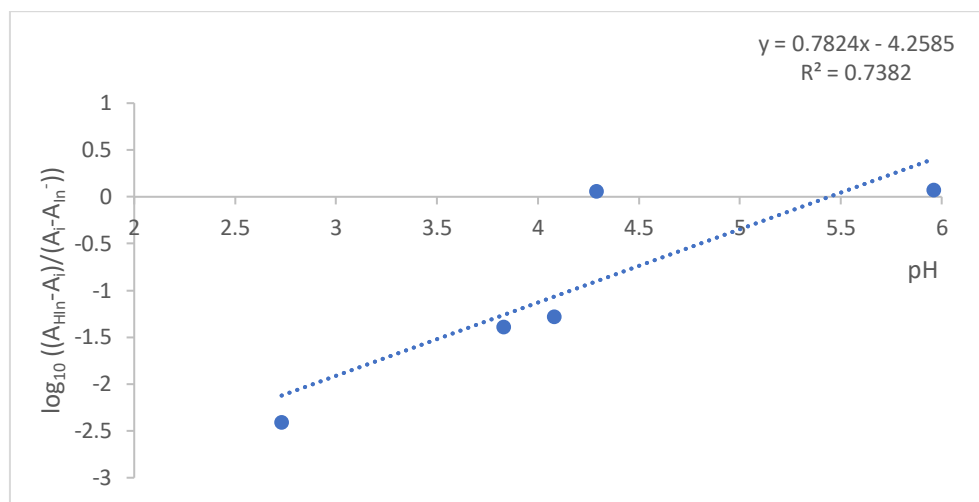
$$0 = 1,2277 \cdot \text{pH} - 4,5742$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 3,72$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za indikator metil oranž koja iznosi 3,72.

4.1.1.2. Prva grafička metoda za indikator metil crveno

Na slici 25 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za metil crveno.



Slika 25. Grafički prikaz prve grafičke metode za metil crveno

Iz jednačine pravca:

$$y = 0,7824 \cdot x - 4,2585$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

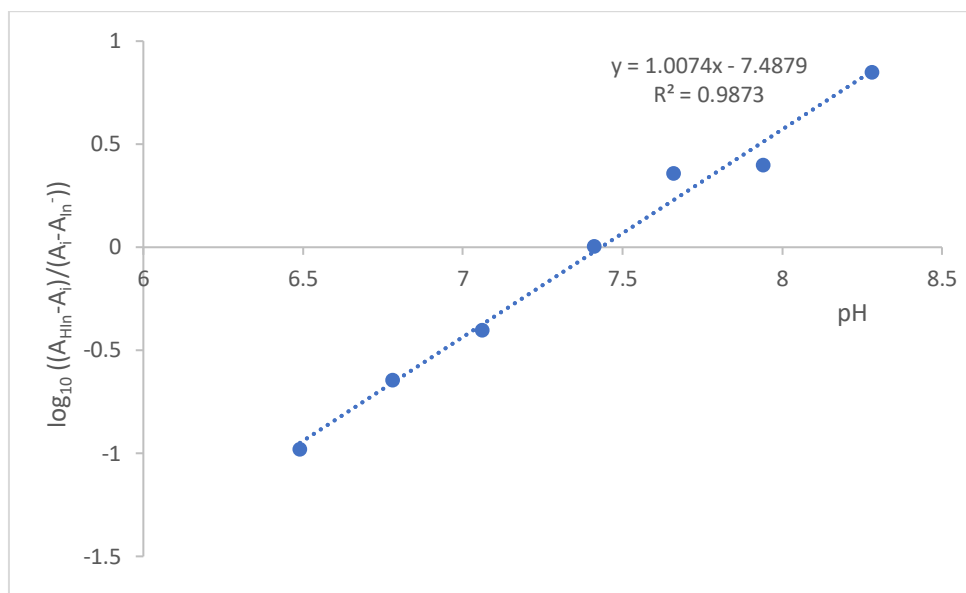
$$0 = 0,7824 \cdot \text{pH} - 4,2585$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 5,44$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za indikator metil crveno koja iznosi 5,44.

4.1.1.3. Prva grafička metoda za indikator bromtimol plavo

Na slici 26 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za bromtimol plavo.



Slika 26. Grafički prikaz prve grafičke metode za bromtimol plavo

Iz jednačine pravca:

$$y = 1,0074 \cdot x - 7,4879$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

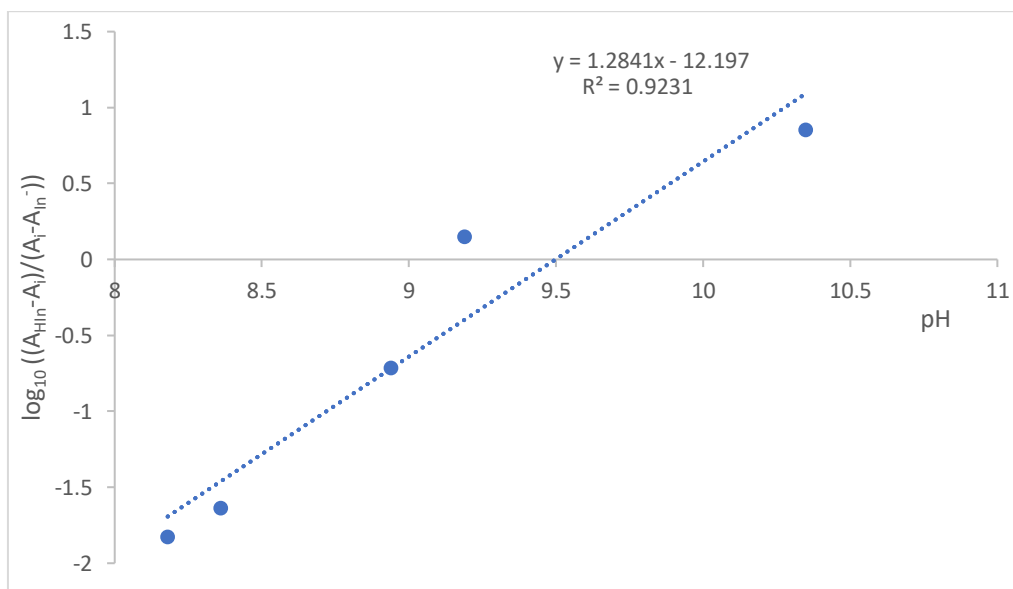
$$0 = 1,0074 \cdot \text{pH} - 7,4879$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 7,43$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za indikator bromtimol plavo koja iznosi 7,43.

4.1.1.4. Prva grafička metoda za indikator fenolftalein

Na slici 27 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za fenolftalein.



Slika 27. Grafički prikaz prve grafičke metode za fenolftalein

Iz jednačine pravca:

$$y = 1,2841 \cdot x - 12,197$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

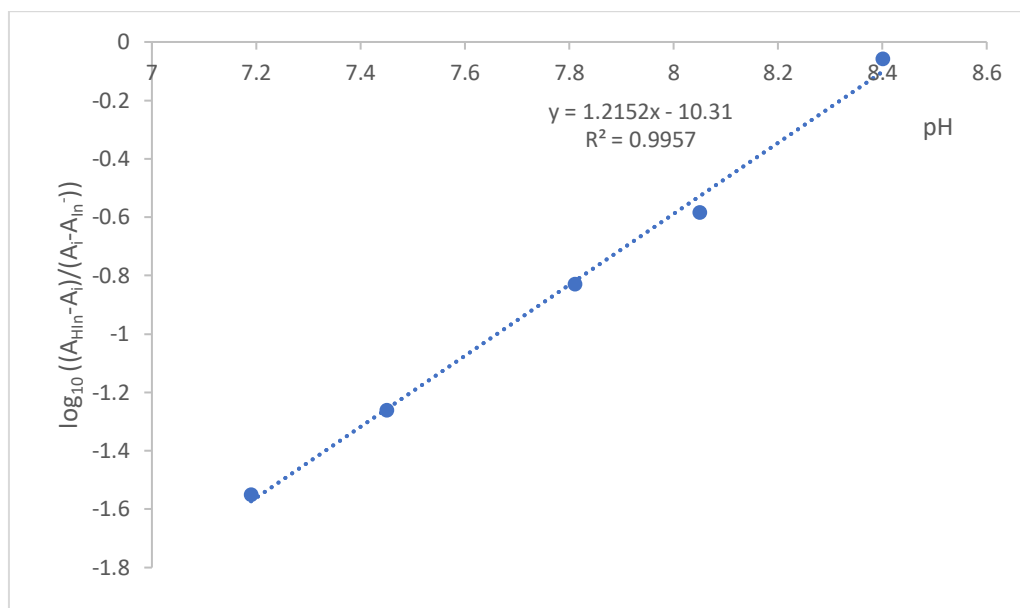
$$0 = 1,2841 \cdot \text{pH} - 12,197$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 9,49$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za indikator fenolftalein koja iznosi 9,49.

4.1.1.5. Prva grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus

Na slici 28 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za crveni kupus.



Slika 28. Grafički prikaz prve grafičke metode za crveni kupus

Iz jednačine pravca:

$$y = 1,2152 \cdot x - 10,31$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

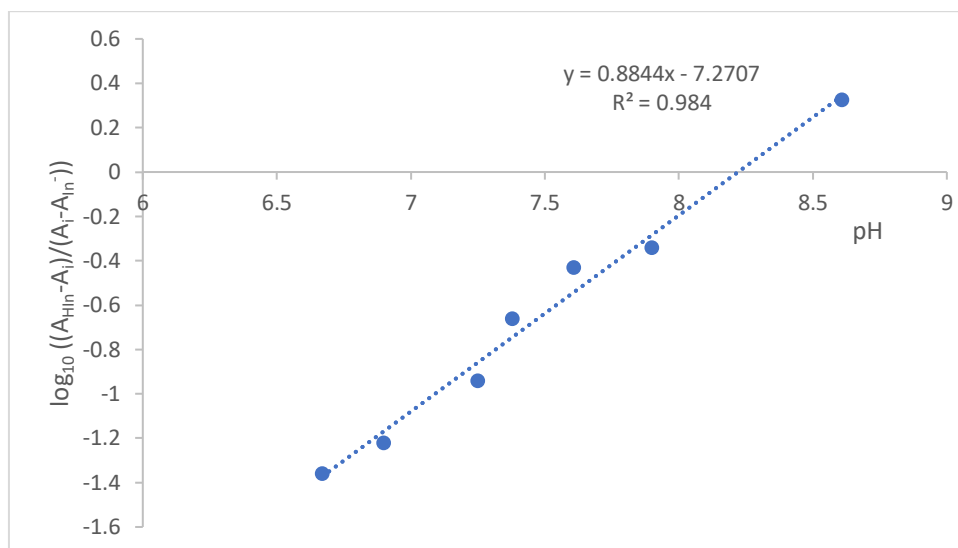
$$0 = 1,2152 \cdot \text{pH} - 10,31$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 8,48$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za prirodni indikator crveni kupus koja iznosi 8,48.

4.1.1.6. Prva grafička metoda za prirodni indikator borovnicu

Na slici 29 je dat grafički prikaz zavisnosti $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})}$ od pH za borovnicu.



Slika 29. Grafički prikaz prve grafičke metode za borovnicu

Iz jednačine pravca:

$$y = 0,8844 \cdot x - 7,2707$$

za vrijednost $\log_{10} \frac{(A_{HIn} - A_i)}{(A_i - A_{In-})} = 0$ slijedi:

$$0 = 0,8844 \cdot \text{pH} - 7,2707$$

Iz čega slijedi da je $\text{pH} = 8,22$.

Grafičkom metodom je određena pK_a vrijednost za prirodni indikator borovnicu koja iznosi 8,22.

4.1.2. Druga grafička metoda

Druga grafička metoda zasniva se na mjerenju apsorbancije indikatora na dvije talasne dužine, koje odgovaraju maksimalnoj apsorpciji disosovanog i nedisosovanog oblika. Grafičkim prikazom zavisnosti apsorbancije od pH vrijednosti za obje talasne dužine dobijaju se dva skupa podataka. Primjenom linearne regresije određuju se prave kroz tačke najbliže presjeku dobijenih krivih, a njihovo ukrštanje daje pH vrijednost za koju važi $\text{pH} = \text{pK}_a$. Na osnovu te vrijednosti određuje se konstanta disocijacije indikatora.

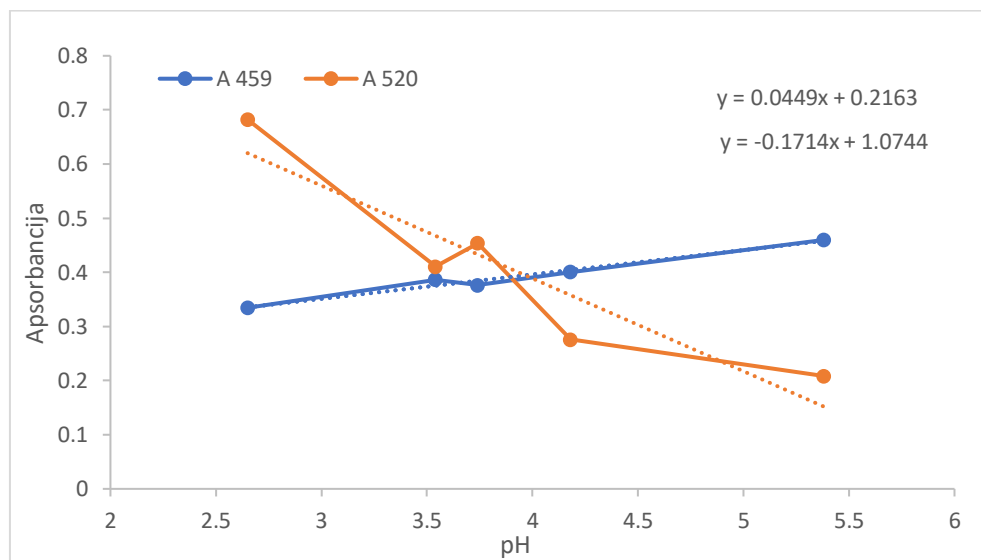
4.1.2.1. Druga grafička metoda za indikator metil oranž

U tabeli 2 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora indikatora metil oranža pri različitim pH vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tabela 2. Apsorbancije metil oranža na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH vrijednostima

pH	A (459 nm)	A (520 nm)
2,65	0,3345	0,6822
3,54	0,3863	0,4107
3,74	0,3762	0,4539
4,18	0,4005	0,2756
5,38	0,4598	0,2085

Na slici 30 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za indikator metil oranž.



Slika 30. Grafički prikaz druge grafičke metode za metil oranž

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{459} = A_{520}$$

iz čega slijedi:

$$0,0449 \cdot \text{pH} + 0,2163 = -0,1714 \cdot \text{pH} + 1,0744$$

$$\text{pH} = 3,96$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za indikator metil oranž:

$$\text{pK}_a = 3,96$$

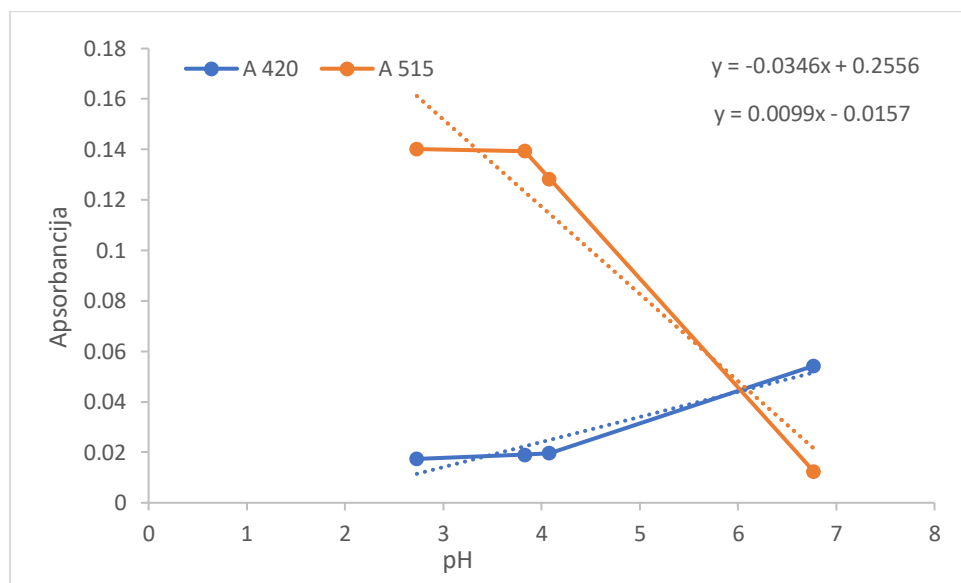
4.1.2.2. Druga grafička metoda za indikator metil crveno

U tabeli 3 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora indikatora metil crveno pri različitim pH-vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tabela 3. Apsorbancije metil crvenog na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH-vrijednostima

pH	A (420 nm)	A (515 nm)
2,73	0,01738	0,14017
3,83	0,01901	0,1394
4,08	0,01967	0,1284
6,77	0,05427	0,0125

Na slici 31 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za indikator metil crveno.



Slika 31. Grafički prikaz druge grafičke metode za metil crveno

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{420} = A_{515}$$

iz čega slijedi:

$$-0,0346 \cdot \text{pH} + 0,2556 = 0,0099 \cdot \text{pH} - 0,0157$$

$$\text{pH} = 6,09$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za indikator metil crveno:

$$\text{pK}_a = 6,09$$

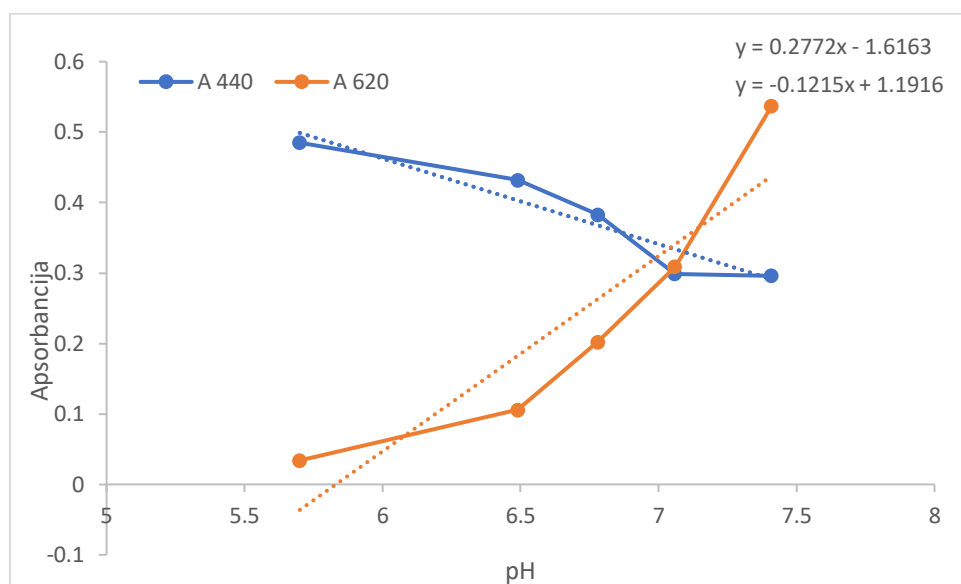
4.1.2.3. Druga grafička metoda za indikator bromtimol plavo

U tabeli 4 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora indikatora bromtimol plavo pri različitim pH-vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tabela 4. Apsorbancije brotimol plavog na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH-vrijednostima

pH	A (440 nm)	A (620 nm)
5,7	0,485	0,034
6,49	0,432	0,106
6,78	0,383	0,202
7,06	0,299	0,309
7,41	0,296	0,537

Na slici 32 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za indikator brotimol plavo.



Slika 32. Grafički prikaz druge grafičke metode za brotimol plavo

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{440} = A_{620}$$

iz čega slijedi:

$$0,2772 \cdot \text{pH} - 1,6163 = -0,1215 \cdot \text{pH} + 1,1916$$

$$\text{pH} = 7,04$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za indikator bromtimol plavo:

$$\text{pK}_a = 7,04$$

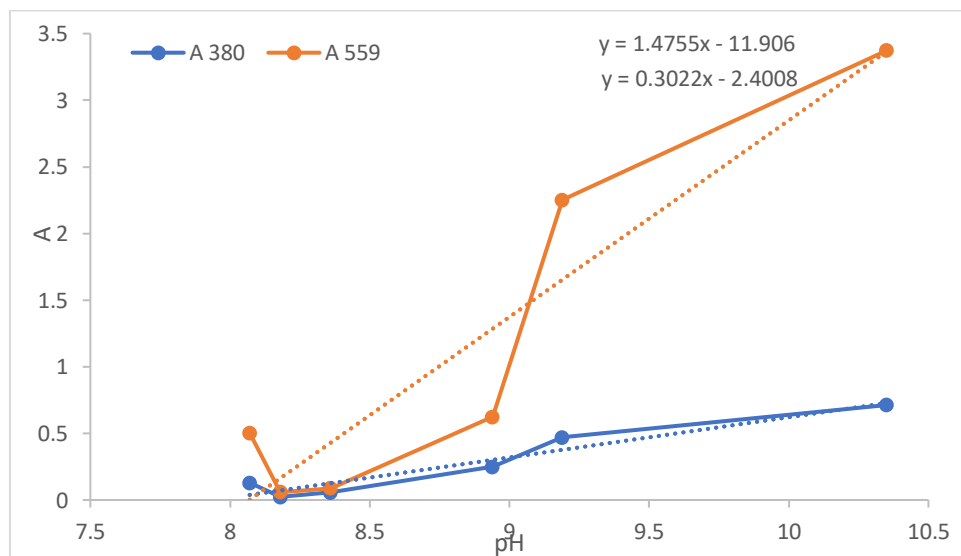
4.1.2.4. Druga grafička metoda za indikator fenolftalein

U tabeli 5 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora indikatora fenolftaleina pri različitim pH-vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tabela 5. Apsorbancije fenolftaleina na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH-vrijednostima

pH	A (380 nm)	A (559 nm)
8,07	0,128286	0,50361
8,18	0,023576	0,058394
8,36	0,057315	0,088432
8,94	0,247526	0,622454
9,19	0,470117	2,252754
10,35	0,712342	3,372404

Na slici 33 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za indikator fenolftalein.



Slika 33. Grafički prikaz druge grafičke metode za fenolftalein

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{380} = A_{559}$$

iz čega slijedi:

$$1,4755 \cdot \text{pH} - 11,906 = 0,3022 \cdot \text{pH} - 2,4008$$

$$\text{pH} = 8,10$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za indikator fenolftalein:

$$\text{pK}_a = 8,10$$

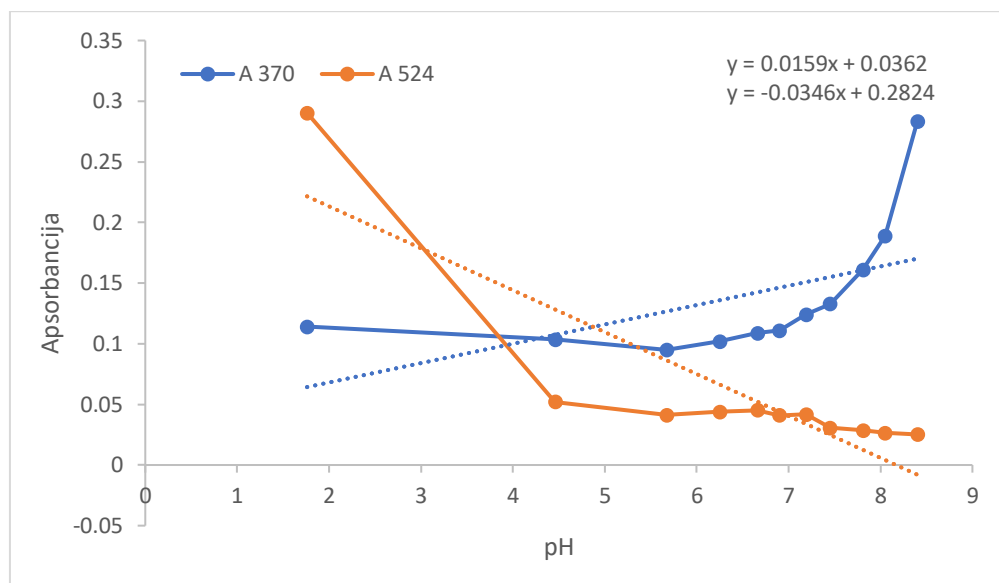
4.1.2.5. Druga grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus

U tabeli 6 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora prirodnog indikatora crvenog kupusa pri različitim pH-vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tabela 6. Apsorbancije crvenog kupusa na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH-vrijednostima

pH	A (370 nm)	A (524 nm)
1,76	0,114077	0,290369
4,46	0,103408	0,051917
5,67	0,094924	0,041208
6,25	0,101962	0,043756
6,66	0,108837	0,045249
6,9	0,110993	0,040959
7,19	0,123979	0,041683
7,45	0,132658	0,030691
7,81	0,160881	0,028475
8,05	0,188876	0,026552
8,4	0,283176	0,025195

Na slici 34 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za prirodni indikator crveni kupus.



Slika 34. Grafički prikaz druge grafičke metode za crveni kupus

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{370} = A_{524}$$

iz čega slijedi:

$$0,0159 \cdot \text{pH} + 0,0362 = -0,0346 \cdot \text{pH} + 0,2824$$

$$\text{pH} = 4,87$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za prirodni indikator crveni kupus:

$$\text{pK}_a = 4,87$$

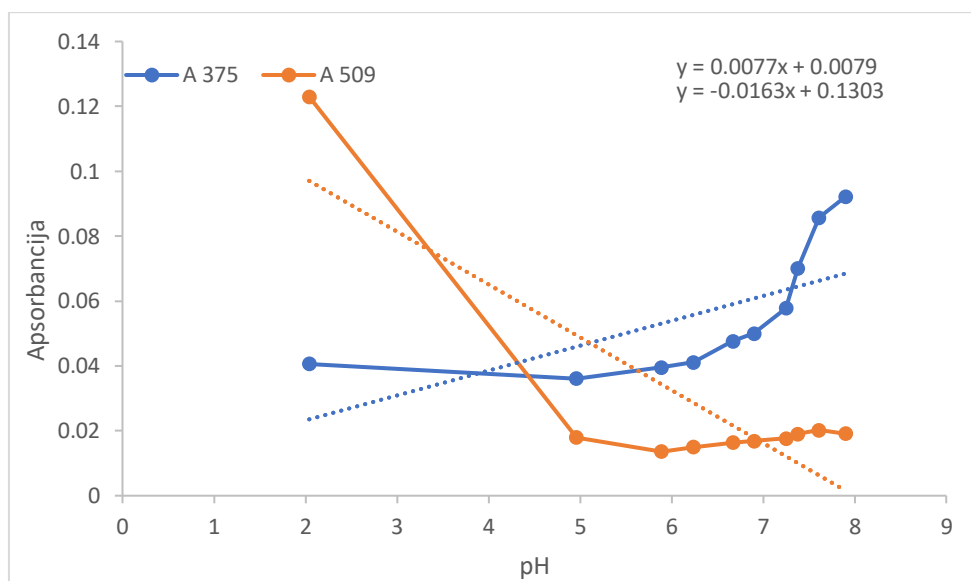
4.1.2.6. Druga grafička metoda za prirodni indikator borovnicu

U tabeli 7 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora prirodnog indikatora borovnice pri različitim pH-vrijednostima i pri talasnim dužinama maksimuma apsorpcije disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora.

Tablela 7. Apsorbancije borovnice na maksimalnim talasnim dužinama disosovanog i nedisosovanog oblika pri različitim pH-vrijednostima

pH	A (375 nm)	A (509 nm)
2,04	0,04067	0,122985
4,96	0,036055	0,017933
5,89	0,039541	0,013564
6,24	0,041151	0,015035
6,67	0,04759	0,016402
6,9	0,050041	0,016879
7,25	0,057785	0,017658
7,38	0,070155	0,019039
7,61	0,085679	0,020225
7,9	0,092182	0,019158

Na slici 35 je dat grafički prikaz zavisnosti apsorbancije pri različitim talasnim dužinama od pH vrijednosti za prirodni indikator borovnicu.



Slika 35. Grafički prikaz druge grafičke metode za borovnicu

U tački presjeka pravaca važi:

$$A_{375} = A_{509}$$

iz čega slijedi:

$$0,0077 \cdot \text{pH} + 0,0079 = -0,0163 \cdot \text{pH} + 0,1303$$

$$\text{pH} = 5,1$$

Kako u tački presjeka pravaca važi da je $\text{pH} = \text{pK}_a$, slijedi da je vrijednost konstante disocijacije (pK_a) za prirodni indikator borovnicu:

$$\text{pK}_a = 5,1$$

4.1.3. Treća grafička metoda

Za svaki indikator eksperimentalno se određuju talasne dužine na kojima HIn oblik pokazuje maksimalnu apsorpciju, dok In^- oblik u istom spektralnom opsegu pokazuje minimalnu apsorpciju, i obrnuto. Na osnovu spektralnih podataka i izraza (3), za svaki rastvor se računski određuje logaritamski odnos koncentracija indikatorskih oblika:

$$\frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} = \frac{A_{\lambda 2} \cdot A_{\lambda 1, \text{kisela}}}{A_{\lambda 2, \text{bazna}} \cdot A_{\lambda 1}} \quad (3)$$

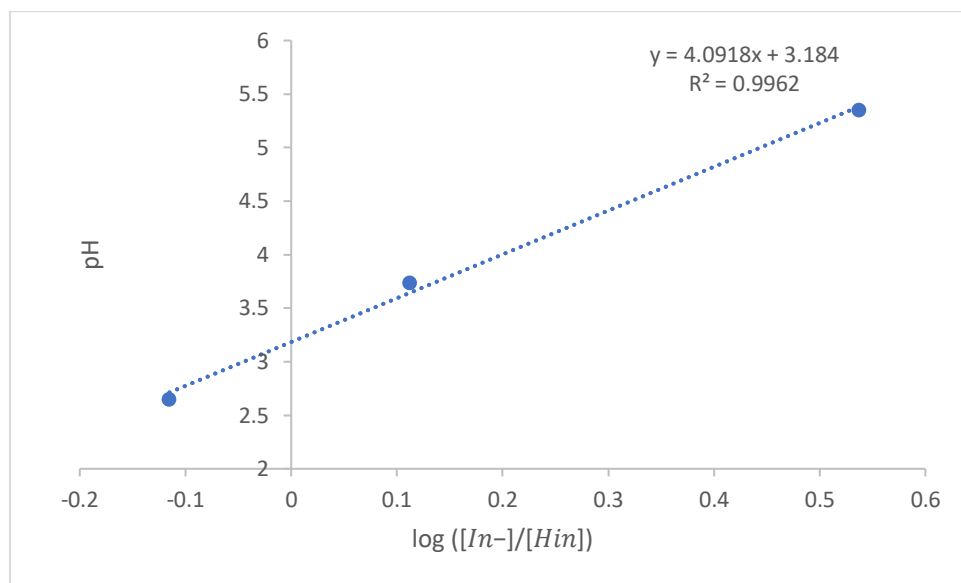
gdje su:

- $A_{\lambda 1, \text{kisela}}$ i $A_{\lambda 2, \text{bazna}}$ - apsorbancije čistih kiselih i baznih oblika indikatora na odgovarajućim talasnim dužinama maksimuma apsorpcije,
- $A_{\lambda 2}$ i $A_{\lambda 1}$ - apsorbancije ispitivanog rastvora na tim talasnim dužinama.

Na osnovu izračunatih vrijednosti $\log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$ konstruiše se dijagram zavisnosti pH od logaritamskog odnosa oblika indikatora. Presjek dobijene linearne zavisnosti sa y-osom odgovara eksperimentalno određenoj vrijednosti pK_a indikatora (Verbić i sar., 2018).

4.1.3.1. Treća grafička metoda za indikator metil oranž

Na slici 36 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$ za metil oranž.

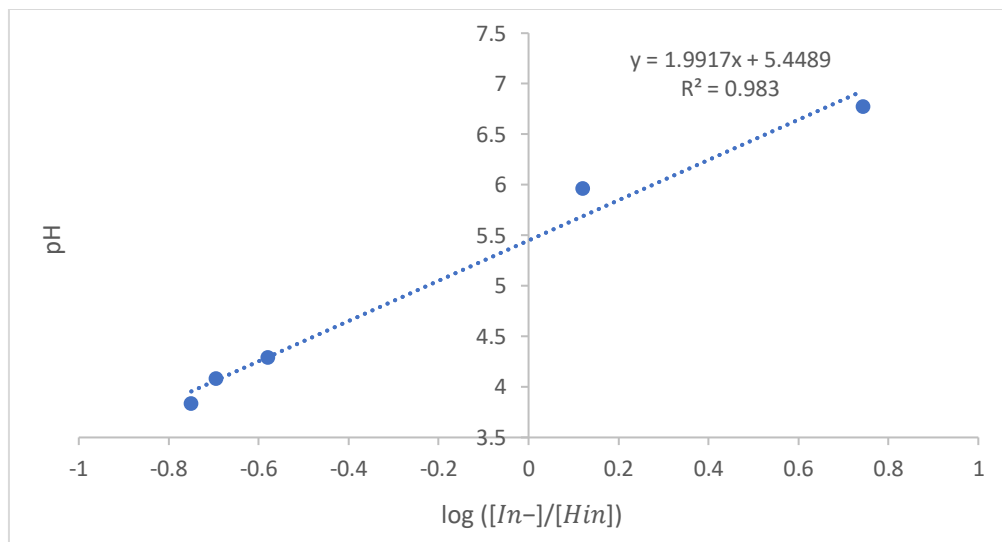


Slika 36. Grafički prikaz treće grafičke metode za metil oranž

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za indikator metil oranž iznosi $pK_a = 3,18$.

4.1.3.2. Treća grafička metoda za indikator metil crveno

Na slici 37 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[In^-]}{[Hin]}$ za metil crveno.

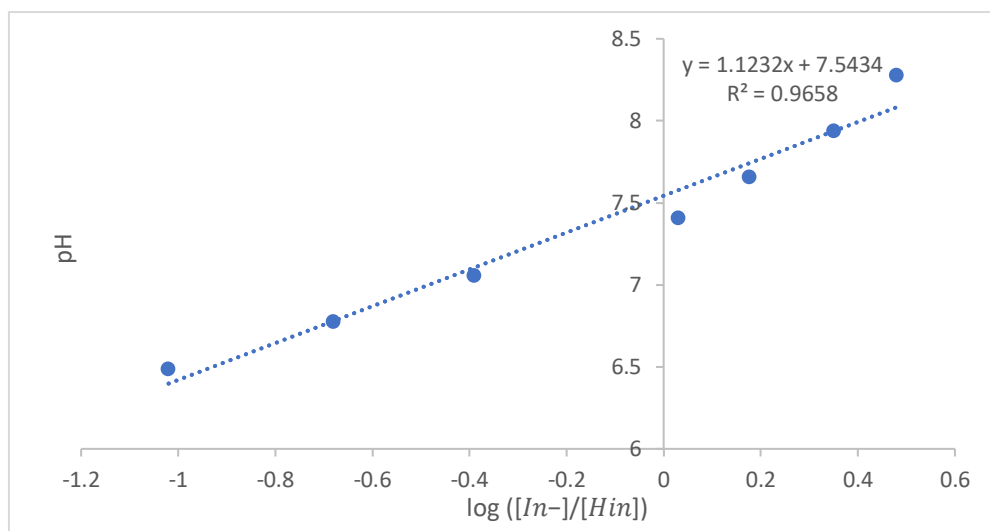


Slika 37. Grafički prikaz treće grafičke metode za metil crveno

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za indikator metil crveno iznosi $pK_a = 5,45$.

4.1.3.3. Treća grafička metoda za indikator bromtimol plavo

Na slici 38 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[In-]}{[Hin]}$ za bromtimol plavo.

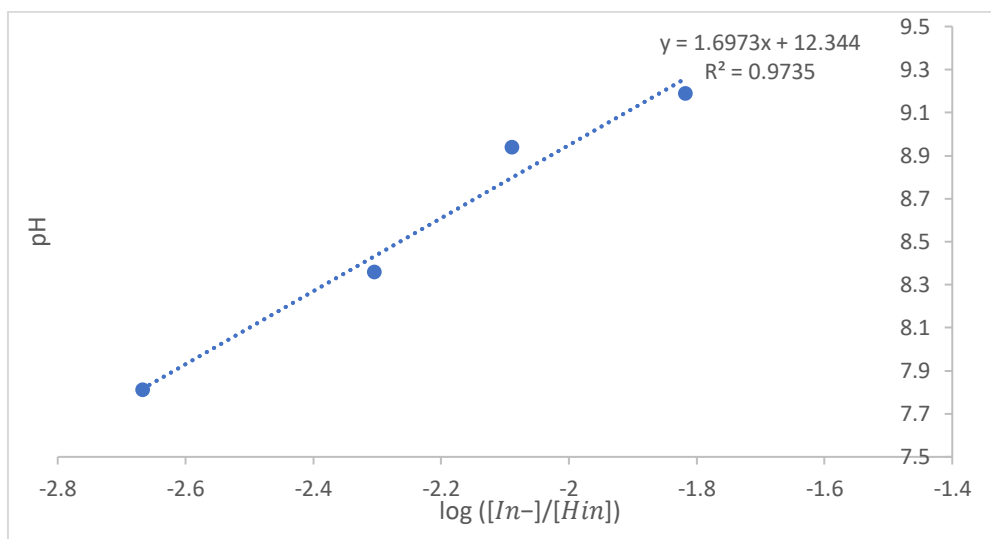


Slika 38. Grafički prikaz treće grafičke metode za bromtimol plavo

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za indikator bromtimol plavo iznosi $pK_a = 7,54$.

4.1.3.4. Treća grafička metoda za indikator fenolftalein

Na slici 39 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[In-]}{[Hin]}$ za fenolftalein.

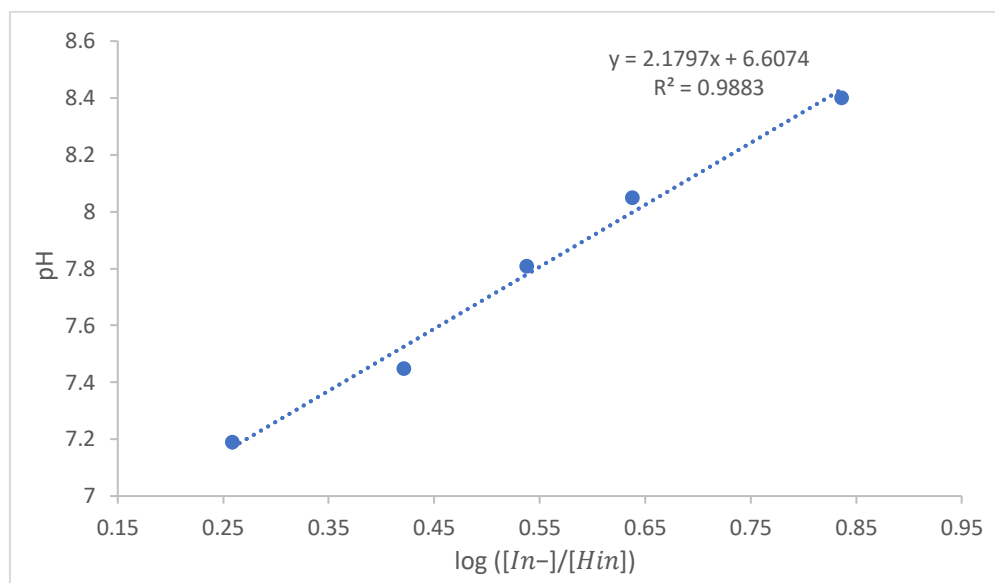


Slika 39. Grafički prikaz treće grafičke metode za fenolftalein

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za indikator fenolftalein iznosi $pK_a = 12,34$.

4.1.3.5. Treća grafička metoda za prirodni indikator crveni kupus

Na slici 40 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[In-]}{[Hin]}$ za crveni kupus.

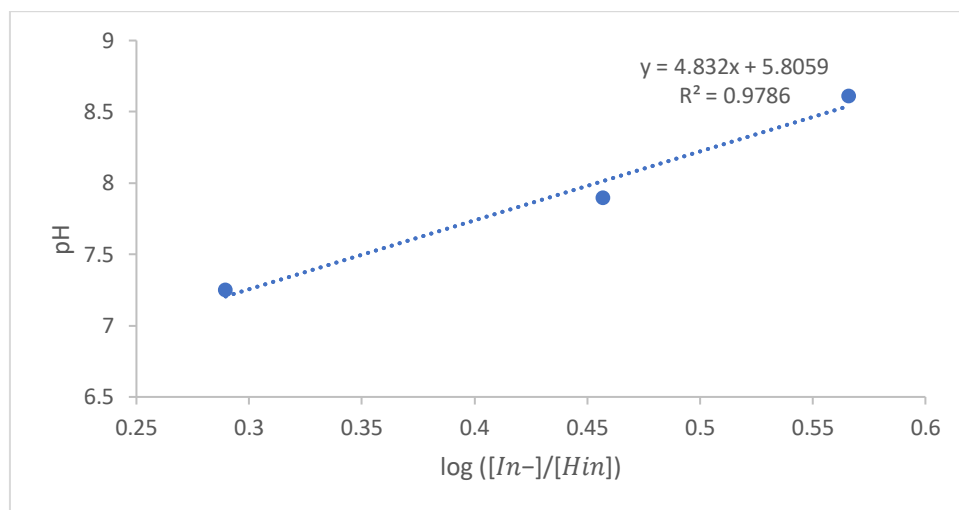


Slika 40. Grafički prikaz treće grafičke metode za crveni kupus

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za prirodni indikator crveni kupus iznosi $pK_a = 6,61$.

4.1.3.6. Treća grafička metoda za prirodni indikator borovnicu

Na slici 41 je dat grafički prikaz zavisnosti pH od $\log \frac{[In-]}{[Hin]}$ za borovnicu.



Slika 41. Grafički prikaz treće grafičke metode za borovnicu

Iz jednačine pravca slijedi da vrijednost konstante disocijacije za prirodni borovnicu iznosi $pK_a = 5,81$.

4.2. Računske metode određivanja konstante disocijacije (pK_a)

U ovom radu, za spektrofotometrijsko određivanje konstante disocijacije indikatora, primijenjene su dvije računske metode koje se zasnivaju se na mjerenju apsorbance rastvora indikatora pri različitim pH vrijednostima koje obuhvataju oblast promjene odnosa koncentracija disosovanog i nedisosovanog oblika indikatora (Orešković, 2021).

4.2.1. Prva računaska metoda

Prva računarska metoda zasniva se na primjeni Henderson-Hasselbalchove jednačine (4). Za svaku eksperimentalno određenu pH vrijednost, konstanta disocijacije (pK_a) izračunava se prema jednačini (5), dok se konačna vrijednost konstante disocijacije određuje kao aritmetička sredina pojedinačno dobijenih rezultata.

$$pH = pKa - \frac{[HA]}{[A-]} \quad (4)$$

$$\log 10 \frac{(A_i - A_{In-})}{(A_{HIn} - A_i)} = pKa - pH \quad (5)$$

Na osnovu mjerenja apsorbance uzorka pri različitim pH vrijednostima, kao i poznavanja graničnih apsorbanci za potpuno disosovani (bazni) i potpuno nedisosovani (kisel) oblik indikatora, moguće je

uz pomoć Henderson-Hasselbalchove relacije precizno odrediti pK_a vrijednost indikatora (Orešković, 2021).

4.2.1.1. Prva računska metoda za indikator metil oranž

U tabeli 8 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora metil oranža pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{HIn} = 0,3243$ i $A_{In^-} = 0,46049$.

Tabela 8. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za indikator metil oranž

pH	2,65	3,54	3,74	4,18	5,35
A_i	0,3345	0,3863	0,3762	0,4005	0,4598
$pK_{a,i}$	3,74	3,61	3,95	4,07	3,06

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije metil oranža iznosi $pK_a = 3,68$.

4.2.1.2. Prva računska metoda za indikator metil crveno

U tabeli 9 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora metil crvenog pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{HIn} = 0,017208$ i $A_{In^-} = 0,063639$.

Tabela 9. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za indikator metil crveno

pH	2,73	3,83	4,08	4,29	5,96
A_i	0,01738	0,01901	0,01967	0,01975	0,04248
$pK_{a,i}$	5,15	5,22	5,33	5,52	5,88

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije metil crvenog iznosi $pK_a = 5,42$.

4.2.1.3. Prva računska metoda za indikator bromtimol plavo

U tabeli 10 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora bromtimol plavog pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{HIn} = 0,00474$ i $A_{In^-} = 1,042823$.

Tabela 10. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za indikator bromtimol plavo

pH	6,49	6,78	7,06	7,41	7,66	7,94	8,28
A_i	0,106	0,202	0,309	0,537	0,752	0,772	0,944
$pK_{a,i}$	7,46	7,41	7,44	7,39	7,25	7,49	7,30

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije bromtimol plavog iznosi $pK_a = 7,39$.

4.2.1.4. Prva računska metoda za indikator fenolftalein

U tabeli 11 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora fenolftaleina pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{Hln} = 0,001749$ i $A_{ln^-} = 3,84471$.

Tabela 11. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za indikator fenolftalein

pH	8,18	8,36	8,94	9,19	10,35
A_i	0,058394	0,088432	0,622454	2,252754	3,372404
$pK_{a,i}$	10,01	10,00	9,65	9,04	9,50

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije fenolftaleina iznosi $pK_a = 9,64$.

4.2.1.5. Prva računska metoda za prirodni indikator crveni kupus

U tabeli 12 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora crvenog kupusa pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{Hln} = 0,114077$ i $A_{ln^-} = 0,476137$.

Tabela 12. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za prirodni indikator crveni kupus

pH	7,19	7,45	7,81	8,05	8,40
A_i	0,123979	0,132658	0,160881	0,188876	0,283176
$pK_{a,i}$	8,74	8,71	8,64	8,63	8,45

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije ekstrakta crvenog kupusa iznosi $pK_a = 8,63$.

4.2.1.6. Prva računska metoda za prirodni indikator borovnicu

U tabeli 13 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije rastvora borovnice pri različitim pH vrijednostima i vrijednosti konstante disocijacije izračunate pri svakoj pH vrijednosti. Vrijednosti konstante disocijacije izračunate su prema jednačini (5) uz $A_{HIn} = 0,04067$ i $A_{In^-} = 0,206626$.

Tabela 13. Apsorbancija i pK_a vrijednosti pri različitim pH vrijednostima za prirodni indikator borovnicu

pH	6,67	6,9	7,25	7,38	7,61	7,9	8,61
Ai	0,04759	0,050041	0,057785	0,070155	0,085679	0,092182	0,15334
$pK_{a,i}$	8,03	8,12	8,19	8,04	8,04	8,24	8,28

Srednja vrijednost svih $pK_{a,i}$, odnosno konstanta disocijacije ekstrakta borovnice iznosi $pK_a = 8,13$.

4.2.2. Druga računska metoda

Vrijednost konstante disocijacije (pK_a) određuje se primjenom izraza datog jednačinom (6):

$$pKa = I - \log \frac{(10^b - 10^a)A_1 + (1 - 10^b)A_2 + (10^a - 1)A_3}{(10^a - 10^b)A_1 + (10^{a+b} - 10^a)A_2 + (10^b - 10^{a+b})A_3} \quad (6)$$

gdje je: I - najmanja pH vrijednost; a - razlika srednje i najmanje pH vrijednosti; b - razlika najveće i najmanje pH vrijednosti; A_1 - apsorbancija pri niskoj pH vrijednosti; A_2 - apsorbancija pri srednjoj pH vrijednosti; A_3 - apsorbancija pri visokoj pH vrijednosti; A_1 , A_2 i A_3 mjere se pri istoj talasnoj dužini (Orešković, 2021).

4.2.2.1. Druga računska metoda za indikator metil oranž

Vrijednosti izmjerenih parametara su sljedeći:

$$I = 2,65$$

$$a = 3,74 - 2,65 = 1,09 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$b = 5,35 - 2,65 = 2,7 \text{ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$A_1 = 0,334503$$

$$A_2 = 0,376197$$

$$A_3 = 0,4598$$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 459 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za metil oranž iznosi $pK_a = 4,02$.

4.2.2.2. Druga računska metoda za indikator metil crveno

Vrijednosti izmjerenih parametara su sljedeći:

$$I = 2,73$$

$$a = 4,08 - 2,73 = 1,35 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$b = 5,96 - 2,73 = 3,23 \text{ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$A_1 = 0,01738$$

$$A_2 = 0,01967$$

$$A_3 = 0,042477$$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 420 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za metil crveno iznosi $pK_a = 5,12$.

4.2.2.3. Druga računska metoda za indikator bromtimol plavo

Vrijednosti potrebnih parametara su sljedeći:

$$I = 6,49$$

$$a = 7,41 - 6,49 = 0,92 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$b = 8,28 - 6,49 = 1,79 \text{ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$A_1 = 0,106$$

$$A_2 = 0,537$$

$$A_3 = 0,944$$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 620 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za bromtimol plavo iznosi $pK_a = 7,41$.

4.2.2.4. Druga računska metoda za indikator fenolftalein

Vrijednosti izmjerenih parametara su sljedeći:

$$I = 8,18$$

$$a = 8,94 - 8,18 = 0,76 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$b = 10,35 - 8,18 = 2,17 \text{ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$A_1 = 0,058394$$

$$A_2 = 0,622454$$

$$A_3 = 3,372404$$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 559 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za fenolftalein iznosi $pK_a = 9,66$.

4.2.2.5. Druga računska metoda za prirodni indikator crveni kupus

Vrijednosti potrebnih parametara su sljedeći:

$$I = 7,19$$

$$a = 7,81 - 7,19 = 0,62 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$b = 8,40 - 7,19 = 1,21 \text{ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)}$$

$$A_1 = 0,123979$$

$$A_2 = 0,160881$$

$$A_3 = 0,283176$$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 370 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za crveni kupus iznosi $pK_a = 9,17$.

4.2.2.6. Druga računska metoda za prirodni indikator borovnicu

Vrijednosti izmjerenih parametara su sljedeći:

$$I = 6,67$$

$$a = 7,38 - 6,67 = 0,71 \text{ (razlika srednje i najmanje pH vrijednosti)}$$

$b = 8,61 - 6,67 = 1,94$ (razlika najveće i najmanje pH vrijednosti)

$A_1 = 0,04759$

$A_2 = 0,070155$

$A_3 = 0,15334$

A_1 , A_2 i A_3 su mjerene na 375 nm.

Primjenom jednačine (6) izračunata je vrijednost pK_a i dobijeno je da konstanta disocijacije za borovnicu iznosi $pK_a = 8,26$.

4.3. Analiza rezultata spektrofotometrijskog određivanja pK_a vrijednosti indikatora

U tabeli 14 prikazane su dobijene pK_a vrijednosti za indikatore dobijene primjenom tri grafičke i dvije računaska metode, kao i literaturne vrijednosti pK_a za sintetičke indikatore.

Tabela 14. pK_a vrijednosti indikatora dobijene primjenom grafičkih i računskih metoda

Indikator/Metoda	I grafička metoda	II grafička metoda	III grafička metoda	I računska metoda	II računska metoda	Literaturne vrijednosti*
Metil oranž	3,72	3,96	3,18	3,68	4,02	3,46; 3,8
Metil crveno	5,44	6,09	5,45	5,42	5,12	5,0; 5,1
Bromtimol plavo	7,43	7,04	7,54	7,39	7,41	7,3
Fenolftalein	9,49	8,10	12,34	9,64	9,66	9,5
Crveni kupus	8,48	4,87	6,61	8,63	9,17	/
Borovnica	8,22	5,1	5,81	8,13	8,26	/

*Kaye i Laby, 2003; Amador-Hernández i sar., 2014

Apsolutne i relativne greške za sve primijenjene metode prikazane su u tabeli 15. Proračuni su izvedeni prema formulama (7) i (8):

$$\text{Apsolutna greška} = |pK_a - pK_{a,T}| \quad (7)$$

$$\text{Relativna greška (\%)} = (\text{Apsolutna greška} / pK_{a,T}) \cdot 100 \quad (8)$$

gdje su:

- pK_a – eksperimentalno određena vrijednost
- $pK_{a,T}$ – teorijska (literaturna) vrijednost.

Tabela 15. Vrijednosti apsolutne greške (**A**) i relativne greške (**R, %**) u određivanju pKa vrijednosti sintetičkih indikatora primjenom različitih grafičkih i računskih metoda

Indikator/Metoda	I grafička metoda		II grafička metoda		III grafička metoda		I računska metoda		II računska metoda	
	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R
Metil oranž	0,26	7,51	0,50	14,45	0,28	8,09	0,22	6,36	0,56	16,18
	0,08	2,11	0,16	4,21	0,62	16,32	0,12	3,16	0,22	5,79
Metil crveno	0,44	8,80	1,09	21,80	0,45	9,00	0,42	8,40	0,12	2,40
	0,34	6,66	0,99	19,41	0,35	6,86	0,32	6,27	0,02	0,39
Bromtimol plavo	0,13	1,78	0,26	3,56	0,24	3,28	0,09	1,23	0,11	1,51
Fenolftalein	0,01	0,11	1,40	14,74	2,84	29,89	0,14	1,47	0,16	1,68

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja pKa vrijednosti indikatora, primjenom različitih metoda, pokazuju određena odstupanja u odnosu na literaturne vrijednosti. Analizom svih dobijenih pKa vrijednosti u poređenju sa literaturnim, može se uočiti da druga i treća grafička metoda pokazuju najveća ukupna odstupanja. Ova odstupanja mogu ukazivati na potrebu optimizacije eksperimentalnog pristupa, prije svega kroz povećanje broja mjernih tačaka u neposrednoj blizini očekivane pKa vrijednosti, čime bi se omogućila preciznija primjena linearne regresije.

Odnosno, prva grafička metoda daje rezultate koji su u najvećoj mjeri u skladu s vrijednostima dobijenim računskim metodama, što ukazuje na veću pouzdanost ove metode. Ovo je naročito uočljivo kod indikatora poput metil oranža, bromtimol plavog i fenolftaleina, kod kojih su eksperimentalne pKa vrijednosti prve grafičke metode vrlo bliske rezultatima dobijenim računskom analizom.

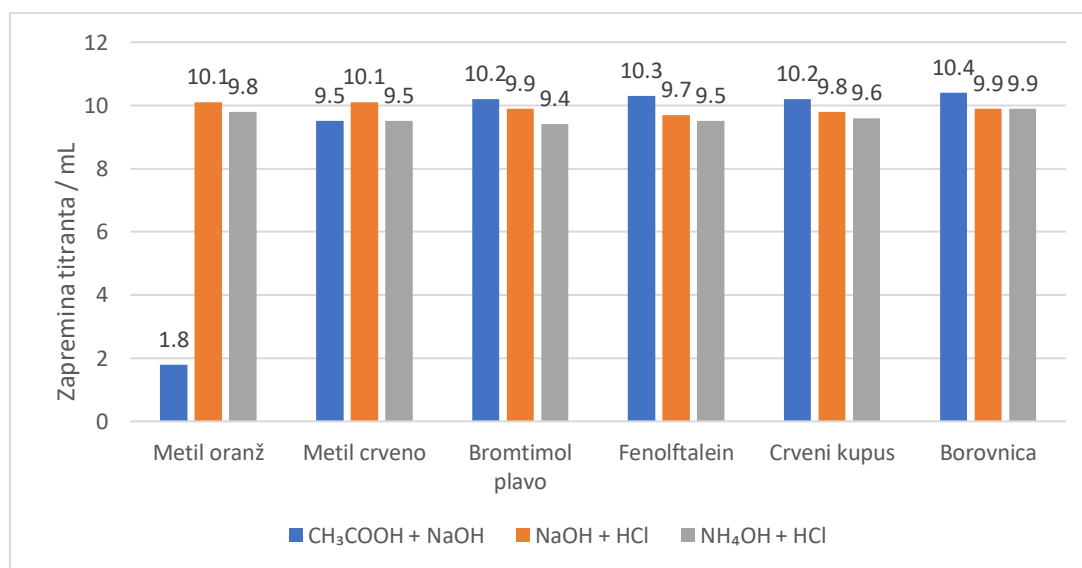
Računske metode, kako prva tako i druga, generalno daju vrijednosti koje su u dobroj saglasnosti s literaturnim podacima. Budući da se oslanjaju na matematičku obradu eksperimentalnih rezultata, a ne na grafičku interpretaciju, smanjen je uticaj subjektivnih faktora, što doprinosi tačnosti dobijenih rezultata. Kod svih analiziranih indikatora, računске metode pružile su konzistentne i međusobno usklađene vrijednosti pKa.

Uočena odstupanja u rezultatima, kako kod grafičkih tako i kod računskih metoda, mogu se djelimično pripisati eksperimentalnim uslovima, uključujući odstupanja od standardne temperature (25 °C) ali i moguća instrumentalna odstupanja, što sve može uticati na tačnost određivanja konstante disocijacije.

4.4. Analiza rezultata dobijenih kiselinsko-baznim titracijama

U ovom dijelu eksperimentalnog rada primijenjena je klasična kiselinsko-bazna titracija s ciljem ispitivanja tačnosti i preciznosti određivanja pomoću prirodnih indikatora. Eksperimentalno su izvedene tri vrste titracija: titracija slabe kiseline jakom bazom, titracija jake baze jakom kiselinom, te titracija slabe baze jakom kiselinom i dat je grafički prikaz poređenja rezultata dobijenih za prirodne i sintetičke indikatore na slici 42.

Tokom svake titracije paralelno su korišćeni prirodni indikatori (crveni kupus, borovnica) i sintetički indikatori (metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo, fenolftalein), kako bi se uporedili rezultati dobijeni sa različitim indikatorima. Na osnovu dobijenih podataka izvršena je analiza potencijalne primjenjivosti prirodnih indikatora u odnosu na konvencionalne sintetičke u kontekstu njihove efikasnosti i pouzdanosti.



Slika 42. Poređenje utrošene zapremine titranta pri različitim titracijama i uz različite indikatore

Grafik (slika 42) prikazuje zapremine titranta utrošene u tri vrste kiselinsko-baznih titracija (CH₃COOH + NaOH, NaOH + HCl, NH₄OH + HCl) korišćenjem različitih indikatora – četiri sintetička (metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo, fenolftalein) i dva prirodna (crveni kupus i

borovnica). Rezultati pokazuju da prirodni indikatori u najvećem broju slučajeva daju zapremine vrlo slične onima dobijenim sintetičkim indikatorima, uz minimalna odstupanja.

Izuzetak je metil oranž, koji u titraciji slabe kiseline sa jakim bazom ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH}$) pokazuje značajno nižu zapreminu (1,8 mL), što ukazuje na neodgovarajuću pH zonu prelaza za ovu titraciju. Nasuprot tome, i crveni kupus i borovnica pokazuju rezultate koji su najbliži onima dobijenim za fenolftalein i bromtimol plavo. Kod oba indikatora uočene su ujednačene zapremine titranata kroz različite vrste titracija, što ukazuje na stabilno i konzistentno ponašanje u širem pH opsegu.

Ovi rezultati potvrđuju da prirodni indikatori, posebno crveni kupus i borovnica, mogu predstavljati pouzdanu i ekološki prihvatljivu alternativu sintetičkim indikatorima u osnovnim kiselinsko-baznim titracijama.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu spektrofotometrijski su određene konstante disocijacije (pK_a vrijednosti) za četiri sintetička indikatora (metil oranž, metil crveno, bromtimol plavo i fenolftalein) i dva prirodna indikatora (ekstrakti crvenog kupusa i borovnice), korišćenjem tri grafičke i dvije računске metode. Cilj istraživanja bio je da se ispita mogućnost zamjene sintetičkih indikatora prirodnim, u skladu sa principima zelene hemije.

Spektrofotometrijska mjerenja su sprovedena u pufer rastvorima poznatih pH vrijednosti, pri čemu su određene talasne dužine maksimalne apsorpcije za svaki indikator, kao i apsorbcije u zavisnosti od pH. Dobijene pK_a vrijednosti za sintetičke indikatore se slažu sa vrijednostima pK_a koje su navedene u literaturi. Rezultati dobijeni računskim metodama generalno su pokazali veću pouzdanost u odnosu na grafičke metode. Takođe, izračunate pK_a vrijednosti za prirodne indikatore koji su dobijeni iz crvenog kupusa i borovnice, su pokazale da se mogu koristiti u sličnim pH opsezima kao i odgovarajući sintetički indikatori.

Izvođenjem kiselinsko-baznih titracija za tri različita para kiselina i baza ($CH_3COOH + NaOH$, $NaOH + HCl$ i $NH_4OH + HCl$) utvrđeno je da se prirodni indikatori ponašaju slično kao sintetički, pokazujući promjene boje pri sličnim zapreminama dodatog titranta. Kod titracionih metoda, vrijednosti koje su dobijene korišćenjem prirodnih indikatora, ekstrakt crvenog kupusa, kao i sok borovnice pokazuju podudaranje s vrijednostima koje su dobijene uz indikatore fenolftalein i bromtimol plavo. Ovo potvrđuje da bi prirodni indikatori mogli predstavljati održivu alternativu u određenim analitičkim postupcima. Upotrebom prirodnih indikatora umanjuje se negativan uticaj sintetičkih reagenasa na životnu sredinu i otvaraju se mogućnosti za razvoj održivijih i ekološki prihvatljivih analitičkih tehnika.

Ovo istraživanje ukazuje na mogućnost razvoja jednostavnih, ekonomičnih i „zelenih“ metoda analize uz korišćenje lako dostupnih biljnih resursa. Ipak, korišćenje biljnih ekstrakata nosi određena ograničenja, prije svega zbog njihove kompleksnosti – brojne komponente koje apsorbuju u UV-Vis području otežavaju precizno određivanje pK_a vrijednosti, što je pokazalo i ovo istraživanje (ispitivani su ekstrakti i sokovi kurkume, višnje, šipurka, cvekle, maline, koprive a za koje se analizom apsorpcionih spektara pokazalo da se ne može odrediti pK_a vrijednost). Rješenje za ovaj izazov može se tražiti u izolaciji i karakterizaciji pojedinačnih hromofora, primjenom različitih rastvarača i

ekstrakcionih tehnika. Takav pristup bi omogućio veću selektivnost i preciznost, ali bi istovremeno zahtijevao duži eksperimentalni postupak i primjenu sofisticirane instrumentalne opreme, poput hromatografskih sistema.

Dodatni izazov predstavlja i stabilnost prirodnih indikatora, koja može varirati u zavisnosti od vrste rastvarača, uslova skladištenja i vremena između pripreme i upotrebe. Stoga je neophodno dalje ispitivanje stabilnosti i reproduktivnosti ovih indikatora, kako bi se omogućila njihova pouzdanija i šira primjena u analitičkoj praksi.

U skladu sa dobijenim rezultatima, zaključuje se da prirodni indikatori, posebno uz odgovarajuću karakterizaciju, mogu imati praktičnu primjenu kao zamjena za sintetičke indikatore u kiselinsko-baznim titracijama i drugim spektrofotometrijskim analizama.

6. LITERATURA

1. Albishri, A., Cabot, J. M., Fuguet, E., & Rosés, M. (2022). Determination of the aqueous pKa of very insoluble drugs by capillary electrophoresis: Internal standards for methanol-water extrapolation. *Journal of Chromatography A*, 1665, 462795. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462795>
2. Alongi, K. S., & Shields, G. C. (2010). Theoretical calculations of acid dissociation constants: A review article. In *Annual Reports in Computational Chemistry*, 6, 113–138. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(10\)06008-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(10)06008-1)
3. Andersen, J. E. T. (2018). Understanding uncertainty to weighing by electronic-analytical balances. *Journal of AOAC International*, 101(6), 1977–1984. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0428>
4. Amador-Hernández, J., Rojas-Hernández, A., Colunga-Urbina, E. M., De La Garza-Rodríguez, I. M., Velázquez-Manzanares, M., & Medina-Vallejo, L. F. (2014). New chemometric strategies in the spectrophotometric determination of pKa. *European Journal of Chemistry*, 5(1), 1–5. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.5.1.1-5.901>
5. Bahadori, A., & Maroufi, N. G. (2016). Volumetric acid-base titration by using natural indicators and effects of solvent and temperature. *Austin Chromatography*, 3(1), 1041.
6. Berkhout, J. H., & Ram, A. H. (2019). Recent advancements in spectrophotometric pKa determinations: A review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(4 Suppl), 32–39. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.4s.141>
7. Cepanec, M. (2022). *Određivanje pKa vrijednosti morina* (Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju).
8. Chalosse, J. R., Muchave, G. J., Neuana, N. F., Macalia, C. M. A., Santana Junior, M. B., Macuvele, D. L. P., & Aly, T. A. (2023). Euclea natalensis root extract as a green acid-base indicator: pKa determination and application in acid-base titration. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02384-1>
9. Dadi, M., & Yasir, M. (2022). Spectroscopy and spectrophotometry: Principles and applications for colorimetric and related other analysis. In *Colorimetry* (pp. 1–22). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101106>
10. De Caro, C. A., & Claudia, H. (2025). *UV/Vis spectrophotometry – Fundamentals and applications*. Mettler-Toledo Publication No. ME-30256131.
11. Duković, I. (2022). *Ispitivanje utjecaja otapala na primjenu plodova vinobojke, Phytolacca sp. L., kao kiselo-baznog indikatora* (Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju).
12. Gajić, T. (2023). *Ispitivanje primjene ploda šumske tise, Taxus baccata L., kao kiselo-baznog indikatora* (Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju).
13. Gangurde, A. V., Pagar, S. S., Kadam, A. V., & Ghodke, R. S. (2016). Micro controller based pH meter using magnetic stirrer. *IOSR Journal of Computer Engineering (IOSR-JCE)*, 18(2), 45–49.
14. Ghanjaoui, M. (2020). High performance liquid chromatography quality control. *International Journal of Advanced Chemistry*, 6, 160–169.
15. Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S., & Ghasempour, Z. (2021). Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. *Food Chemistry*, 365, 130482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130482>
16. Han, G. E., & Priefer, R. (2023). A systematic review of various pKa determination techniques. *International Journal of Pharmaceutics*, 635, 122783.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122783>
17. Hemdan, S. S., Al Jebaly, A. M., & Ali, F. K. (2020). The behavior and properties of some acid-base indicators: A review. *Journal of Science and Humanities* (66).
<https://doi.org/10.37376/jsh.vi66.5615>
 18. Jeiyendira Pradeep, D., & Dave, K. (2013). A novel, inexpensive and less hazardous acid-base indicator. *Journal of Laboratory Chemical Education*, 1(2), 34–38.
<https://doi.org/10.5923/j.jlce.20130102.04>
 19. Kapilraj, N., Keerthanan, S., & Sithambaresan, M. (2019). Natural plant extracts as acid-base indicator and determination of their pKa value. *Journal of Chemistry*, 2019, 6 pages.
<https://doi.org/10.1155/2019/2031342>
 20. Karki, P. (2022). Analytical balance – Definition, principle, parts, types, examples. *Microbe Notes*.
 21. Khan, P. M. A., & Farooqui, M. (2011). Analytical applications of plant extract as natural pH indicator: A review. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2(4), 20–27.
 22. Kozłowski, R. (2022). Common acid-base indicators. *Sciencing*.
<https://www.sciencing.com/common-acid-base-indicators-8375206/>
 23. Kaye, G. W. C., & Laby, T. H. (2003). *Tablice fizičkih i hemijskih konstanti* (D. S. Pešić, Ur., str. 330–333). Beograd: VELARTA.
 24. Lavanya, D., Guna Shekhar, G., Purushothom, A., & Pallavi, A. (2019). Green chemistry: A study on acid-base indicator property of various flower pigments. *Advanced Biomedicine*, 1(1).
<https://doi.org/10.54730/abm.2019.010102>
 25. Mabrouk, E. M., Felaly, R. N., & El-Mossalamy, E. H. (2016). Distinctive routes: Electrochemical and spectrophotometric studies and dissociation constants determination of some aminopyridine azo-dye derivatives in aqueous media. *International Journal of Electrochemical Science*, 11, 4892–4908. <https://doi.org/10.20964/2016.06.49>
 26. Musale, A. Y., & Wagh, P. S. (2019). Review on anthocyanins as herbal pH indicators. *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology*, 6(1), 73–76.
 27. Nag, M., Paul, R. K., Biswas, S., Dasgupta, D., Roy, D., Bhattacharjee, P., Chattopadhyay, S., & Mallick, A. (2023). A review on application of natural indicators in acid-base titration. *Pharmacognosy Reviews*, 17(34), 308–319.
 28. Nugraha, I. M. A., Mahardiananta, I. M. A., Putra, P. A. M., & Adnyana, I. G. S. (2021). Magnetic stirrer with speed advisor and timer based on microcontroller. *Journal of Robotics and Control (JRC)*, 3(1), 18–25. <https://doi.org/10.18196/jrc.v3i1.11279>
 29. Okoduwa, S. I. R., Mbora, L. O., Adu, M. E., & Adeyi, A. A. (2015). Comparative analysis of the properties of acid-base indicator of rose (*Rosa setigera*), allamanda (*Allamanda cathartica*), and hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis*) flowers. *Biochemistry Research International*, 2015, 381721. <https://doi.org/10.1155/2015/381721>
 30. Orešković, P. (2021). *Spektrofotometrijsko određivanje konstante disocijacije* (Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije).
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:264173>
 31. Pathare, B., Tambe, V., & Patil, V. (2014). A review on various analytical methods used in determination of dissociation constant. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), 26–34.
 32. Prebeg, P. (2023). *Ispitivanje primjene odabranih agruma kao kiselo-baznog indikatora* (Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju).

33. Raju, D. S., Yaswanth, L., Gayathri, B., & Rao, C. B. P. (2024). An overview of the use of natural indicators in acid-base titrations. *UPI Journal of Pharmaceutical, Medical, and Health Sciences*, 7(1), 29–35. <https://doi.org/10.37022/jpmhs.v4i2.103>
34. Reyes, D., Santos, M. R., Cruz, J. B., & Ascaño, F. G. (2022). Utilization of plant material extracts as natural acid-base indicators: An example of at-home lab experiment in the new normal learning set-up. *The QUEST Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 1(2). <https://doi.org/10.60008/thequest.v1i2.14>
35. Reijenga, J., van Hoof, A., van Loon, A., & Teunissen, B. (2013). Development of methods for the determination of pKa values. *Analytical Chemistry Insights*, 8, 53–71. <https://doi.org/10.4137/ACI.S12304>
36. Sajin, K. A., Anoobkumar, K. I., & Rasa, O. K. (2020). pH indicators: A valuable gift for analytical chemistry. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 393–400. <https://doi.org/10.36348/sjimps.2020.v06i05.001>
37. Shalaby, A. A., & Mohamed, A. A. (2020). Determination of acid dissociation constants of Alizarin Red S, Methyl Orange, Bromothymol Blue and Bromophenol Blue using a digital camera. *RSC Advances*, 10(18), 11311–11317. <https://doi.org/10.1039/C9RA10568A>
38. Shirisha, K., Srilikitha, K., Vaishnavi, K., Abhinaya, K., & Sathish, K. (2025). A review on herbal indicators. *International Journal of Pharmaceuticals and Health Care Research*, 13(1), 1–4. <https://doi.org/10.61096/ijphr.v13.iss1.2025.1-4>
39. Sidana, J., Arora, K., Nain, P., & Deswal, G. (2011). Herbal indicators as an upcoming trend in titrimetric analysis. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(4), 177–179. <http://www.irjponline.com>
40. Song, H. N., Ji, S. A., Park, H. R., Kim, H. H., & Hogstrand, C. (2018). Impact of various factors on color stability of fresh blueberry juice during storage. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(1), 46–51. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.1.46>
41. Szadkowski, B., Rogowski, J., Maniukiewicz, W., Beyou, E., & Marzec, A. (2022). New natural organic–inorganic pH indicators: Synthesis and characterization of pro-ecological hybrid pigments based on anthraquinone dyes and mineral supports. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 105, 446–462. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.10.004>
42. Tan, S., Lan, X., Chen, S., Zhong, X., & Li, W. (2023). Physical character, total polyphenols, anthocyanin profile and antioxidant activity of red cabbage as affected by five processing methods. *Food Research International*, 169, 112929. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112929>
43. Thangavel, N., Al Bratty, M., Al Hazmi, H., Najmi, A., & Sivadasan, D. (2022). Structural attributes of organic compounds for UV-spectrophotometric determination of dissociation constant: A systematic review. *Oriental Journal of Chemistry*, 38(1), 85–93. <https://doi.org/10.13005/ojc/380110>
44. Verbić, T., Pešić, M., Obradović, N., & Cvijetić, I. (2018). *Praktikum sa zbirkom zadataka iz instrumentalne analitičke hemije: Optičke i elektroanalitičke metode*. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet.
45. Vidal Salgado, L. E., & Vargas-Hernández, C. (2014). Spectrophotometric determination of the pKa, isosbestic point and equation of absorbance vs. pH for a universal pH indicator. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5, 1290–1301. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.517135>
46. Viscusi, G., & Gorrasi, G. (2024). Blueberry extract loaded into rice milk/alginate-based hydrogels as pH-sensitive systems to monitor the freshness of minced chicken. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282 (Part 4), 137210. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137210>

47. Yan, Y., Pico, J., Gerbrandt, E. M., Dossett, M., & Castellarin, S. D. (2023). Comprehensive anthocyanin and flavonol profiling and fruit surface color of 20 blueberry genotypes during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 199, 112274.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112274>
48. Zračko, M. (2015). *Određivanje konstante disocijacije površinski samoformiranih kratkolančanih alkilnih tiola cikličkom voltametrijom* (Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije).