

Kinetika i mehanizam reakcije katehina i DPPH

Dropulja, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:834793>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Dropulja

Kinetika i mehanizam reakcije katehina i DPPH

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Fizikalna kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom docentice Cvijete Jakobušić Brala.

Zahvaljujem se mentorici, docentici Cvijeti Jakobušić Brala na ukazanoj pomoći i susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada.

SADRŽAJ

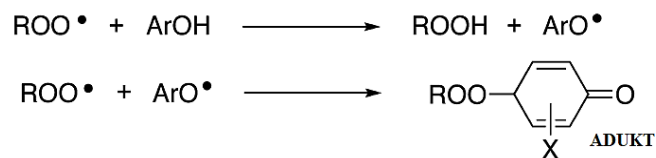
| | |
|---|----|
| 1. UVOD | |
| 1.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti..... | 1 |
| 1.1.1. DPPH metoda..... | 6 |
| 1.2. Katehin..... | 8 |
| 1.2.1 Mehanizam reakcije katehina i DPPH•..... | 10 |
| 1.3. Kemijska kinetika..... | 11 |
| 1.3.1. Brzina kemijske reakcije..... | 11 |
| 1.3.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije..... | 12 |
| 1.3.3. Ovisnost brzine reakcije o temperaturi..... | 14 |
| 1.3.4. Kinetički izotopni efekt..... | 16 |
| 1.4. UV-Vis spektrofotometrija..... | 17 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME..... | 18 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 19 |
| 3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor..... | 19 |
| 3.2. Mjerenje konstante brzine reakcije katehina s DPPH•..... | 20 |
| 3.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta reakcije katehina i DPPH•..... | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 24 |
| 4.1. Reakcija katehina i DPPH•..... | 24 |
| 4.2. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH•..... | 25 |
| 4.2.1. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)..... | 26 |
| 4.2.2. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu..... | 28 |
| 4.3. Aktivacijski parametri reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)..... | 30 |
| 4.4. Kinetički izotopni efekt reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)..... | 35 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 37 |
| 6. LITERATURA..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 7. SAŽETAK/SUMMARY..... | 41 |
| 7.1. Sažetak..... | 41 |
| 7.2. Summary..... | 42 |
| 8. PRILOZI..... | 43 |
| 8.1. KRATICE..... | 43 |
| 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.. | 45 |

1. UVOD

1.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti

Antioksidansi su tvari čija je uloga sprječavanje oksidativnih oštećenja biološkog sustava bez utjecaja na fiziološke funkcije. Predstavljaju molekule prisutne u niskim koncentracijama koje su sposobne spriječiti ili usporiti oksidaciju drugih molekula u prisutnosti slobodnih radikala (Gupta, 2015). Slobodne radikale možemo ugrubo podijeliti u dvije skupine: reaktivne kisikove spojeve (ROS, kao što su superoksidni anion $O_2^{\bullet-}$, hidroksilni radikal OH^{\bullet} , peroksilni radikal ROO^{\bullet} , alkoksilni radikal RO^{\bullet}) i reaktivne dušikove spojeve (RNS, kao što su NO^{\bullet} i NO_2^{\bullet}). Slobodni radikali izazivaju oštećenja makromolekula u stanici (DNA, proteina, lipida, ugljikohidrata), promjenu signalnih puteva u stanici, promjenu ekspresije gena te promjenu staničnog ciklusa stanice. Antioksidanse ugrubo dijelimo prema mehanizmu djelovanja na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni antioksidansi prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala (inicijaciju, propagaciju ili terminaciju) na način da doniraju elektron ili atom vodika pri čemu nastaju manje reaktivni radikali koji neće pokrenuti sljedeći stupanj lančane reakcije te stvoriti nove slobodne radikale.



Slika 1.1.1. Reakcijom fenolnog antioksidansa ($ArOH$) i peroksilnog radikala (ROO^{\bullet}) dolazi do gašenja peroksilnog radikala te nastaje fenoksilni radikal (ArO^{\bullet}) koji gasi još jedan peroksilni radikal, pri čemu nastaje nereaktivni adukt (Ingold i Pratt, 2014).

Sekundarni antioksidansi sprječavaju ili usporavaju oksidaciju na način da djeluju na promotore oksidacije kao što su ioni prijelaznih metala, singlet kisika, prooksidativni enzimi i drugi oksidansi (Shahidi i Zhong, 2015). Antioksidanse možemo podijeliti i prema njihovom podrijetlu na endogene i egzogene antioksidanse. Endogene antioksidanse čine molekule uobičajeno prisutne u našem organizmu: enzimi i proteini kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, feritin, transferin, albumin, laktoferin itd., te male molekule kao što su glutathion, ubikinon, vitamin E, vitamin C, tioredoksin, bilirubin i drugi. Kada endogeni antioksidansi nisu dovoljni kako bi osigurali zaštitu organizmu protiv štetnih radikala, povećava se potreba za egzogenim antioksidansima. Egzogeni antioksidansi podrijetlom mogu biti iz prirodnih izvora (vitamini, flavonoidi, karotenoidi, antocijanini itd.) ili mogu biti sintetski

spojevi kao što su BHT (butilhidroksitoluen), BHA (butilhidroksianisol), PG (propil galat) i TBHQ (*tert*-butilhidrokinon).

Učinkovitost antioksidansa ovisi o mnogim faktorima, kao što su njihove strukturne karakteristike, koncentracija, temperatura te prisutnost pro-oksidansa. Kemijska struktura antioksidansa određuje njegovu intrinzičnu antioksidativnu aktivnost (Shahidi i Zhong, 2015).

Antioksidativna se aktivnost može mjeriti različitim metodama temeljenim na reakcijama koje se razlikuju po reakcijskom mehanizmu, oksidansima, reakcijskim uvjetima, tehnikama detekcije i načinom izražavanja rezultata. Reakcijski mehanizmi na kojima se zasnivaju ove metode uključuju: prijenos atoma vodika (HAT – *hydrogen atom transfer*), prijenos elektrona (ET – *electron transfer*), keliranje metala i drugo.

Dvije glavne skupine metoda temelje se na reakcijama prijenosa atoma vodika (HAT) ili elektrona (ET) s antioksidansa na slobodni radikal u jednostavnom „bezlipidnom“ sustavu (HAT- ili ET-temeljene metode). Antioksidativna aktivnost određena ovim metodama temelji se na njihovoj sposobnosti hvatanja radikala, pri čemu su neki od korištenih radikala biološki irelevantni. Iz tog je razloga kritika ovih metoda da ne odražavaju stvarnu situaciju u *in vivo* sustavima. Ipak, ove metode pokazuju antioksidativni potencijal antioksidansa. Ove metode ne zahtijevaju lipidni supstrat te sustav većinom sadrži: oksidans (slobodni radikal ili neki drugi ROS), oksidirajuću probu (molekula koju oksidira radikal – antioksidans inhibira tu oksidaciju; nije potrebna za sva određivanja) i antioksidans koji se ispituje (Shahidi i Zhong, 2015).

HAT-temeljene metode mjere sposobnost gašenja slobodnih radikala (većinom peroksilnih) na način da antioksidans donira atom vodika. Kako u nekim od HAT-temeljenih metoda antioksidans i fluorescentna proba reagiraju s ROO•, antioksidativna se aktivnost određuje iz kompeticijske kinetike mjereći pad ovisnosti intenziteta fluorescencije o vremenu u odsutnosti/prisutnosti antioksidansa, te se integrira površina ispod krivulje. Primjeri takvih metoda su ORAC (*oxygen radical absorption capacity*) i TRAP (*total peroxy radical trapping antioxidant parameter*) metoda.

ET-temeljene metode temelje se na doniranju elektrona, te se izvode u različitim otapalima i pri različitim pH vrijednostima. Spektrofotometrijske ET-metode mjere kapacitet antioksidansa da reducira određenu molekulu, pri čemu reakcijska otopina mijenja boju. Promjena boje (povećanje/smanjenje apsorbancije na danoj valnoj duljini) povezana je s koncentracijom antioksidansa u uzorku. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metode temelje se na gubitku boje otopine, dok se CUPRAC (*cupric reducing antioxidant power*) i FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) metode temelje na mjerenju porasta apsorbancije na određenoj valnoj duljini (Gupta, 2015).

HAT i ET mehanizmi odvijaju se paralelno u većini sustava iako dominantni mehanizam ovisi o strukturi i reakcijskim uvjetima. Ove metode određivanja su jednostavne, brze, većinom automatizirane te široko upotrebljavane metode za početno određivanje i procjenu antioksidativne aktivnosti.

Elektrokemijske metode za procjenu antioksidativne aktivnosti najnovije su metode od kojih je ciklička voltometrija privukla pažnju kao alternativa kemijskim metodama. Ciklička voltometrija je jednostavna i brza metoda koja mjeri redoks potencijal (redukcijsku moć – sposobnost doniranja elektrona) antioksidansa (Shahidi i Zhong, 2015).

Kromatografske se metode često upotrebljavaju kako bi razdvojili i detektirali antioksidanse, te prije upotrebe spektrofotometrijskih ili elektrokemijskih metoda određivanja antioksidativne aktivnosti.

Tablica 1.1.1. Pregled metoda mjerenja antioksidativne aktivnosti (Negulescu i Pisoschi, 2011)

| Metoda | Princip metode | Određivanje završne točke |
|--|---|---|
| SPEKTROMETRIJSKE METODE | | |
| ABTS (2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6- sulfonska kiselina)) | Reakcija antioksidansa s organskim radikalom ABTS ^{•+} (nastao iz ABTS u prisutnosti oksidansa, K ₂ S ₂ O ₈). | Smanjenje apsorbancije na 734 nm (obezbojenje otopine plavo-zelene boje). |
| CUPRAC (<i>cupric reducing antioxidant power</i>) | Antioksidans reducira Cu(II)-neokuproin kompleks u Cu(I)-neokuproin kompleks pri pH 7. | Porast apsorbancije na 450 nm. |
| DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) | Reakcija antioksidansa s DPPH [•] radikalom. | Smanjenje apsorbancije na 520 nm (gubitak tamnoljubičaste boje). |
| FRAP (<i>ferric reducing antioxidant power</i>) | Antioksidans reducira Fe(III)- kompleks u intenzivno plavo obojeni Fe(II)-kompleks u kiselom mediju (pH 3,6) pri 37°C. | Porast apsorbancije na 593 nm. |

| | | |
|--|---|---|
| HORAC (<i>hydroxyl radical averting capacity</i>) | Antioksidans gasi OH radikale nastale iz Co(II) Fentonianskog sustava. | Smanjenje gubitka fluorescencije fluoresceina u prisustvu antioksidansa. |
| ORAC (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>) | Antioksidans gasi peroksilni radikal nastao iz AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) koji reagira s fluoresceinom pri čemu dolazi do gubitka fluorescencije. | Smanjenje gubitka fluorescencije fluoresceina u prisustvu antioksidansa. |
| PFRAP (<i>potassium ferricyanide reducing power</i>) | Antioksidans reducira Fe ³⁺ (kalijev ferocijanid) u Fe ²⁺ (kalijev ferocijanid). Kalijev ferocijanid potom reagira s FeCl ₃ pri čemu nastaje intenzivno plavo obojeni kompleks Prusko plavo. | Porast apsorbancije na 700 nm. |
| TRAP (<i>total peroxy radical trapping antioxidant parameter</i>) | Antioksidans reagira s H ₂ O ₂ pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta emitiranog zračenja povezano za reakciju luminola i H ₂ O ₂ . | Gašenje kemiluminiscenije. Kompeticija između antioksidansa i luminola za H ₂ O ₂ . |

ELEKTROKEMIJSKE METODE

| | | |
|-----------------------|--|--|
| Ciklička voltimetrija | Potencijal radne elektrode linearno se mijenja od početne do krajnje vrijednosti i nazad, te se mjeri intenzitet struje. | Iz voltamograma (prikaza ovisnosti struje o potencijalu) dobivamo parametre: <i>I_a</i> (jakost anodne struje) koji odražava koncentraciju antioksidansa; <i>E_{pa}</i> (oksidacijski potencijal) koji pokazuje redoks potencijal antioksidansa, te <i>Q</i> (površina ispod krivulje anodne struje) kao pokazatelj ukupne antioksidativne aktivnosti. |
|-----------------------|--|--|

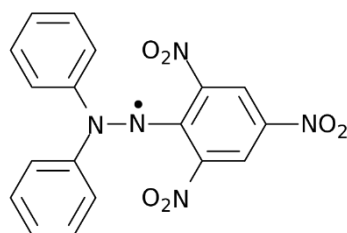
| | | |
|-----------------|---|--|
| Amperometrija | Potencijal radne elektrode je stalne vrijednosti u odnosu na referentnu elektrodu. | Mjerenje jakosti struje povezano za oksidaciju/redukciju elektroaktivnog analita (DPPH•). |
| Biamperometrija | Antioksidans reducira oksidirani oblik redoks-para (DPPH•/DDPH). Jakost struje proporcionalna je preostaloj koncentraciji DPPH•, tj. koncentraciji antioksidansa. | Mjerenje jakosti struje u članku s dvije identične radne elektrode, pri malom naponu, u otopini koja sadrži analit i redoks-par. |

KROMATOGRAFSKE METODE

| | | |
|---|--|--|
| GC (plinska kromatografija) | Razdvajanje sastavnica u smjesi temelji se na razdiobi između tekuće nepokretne faze i plinovite pokretne faze. | Detektor toplinske vodljivosti; Plameni ionizacijski detektor (FID). |
| HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) | Razdvajanje sastavnica u smjesi temelji se na razdiobi između čvrste nepokretne faze i tekuće pokretne faze različitih polarnosti. | UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska detekcija. |

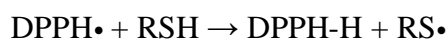
1.1.1. DPPH metoda

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M_r = 394.33$) je stabilni radikal obzirom na delokalizaciju elektrona na aromatskim prstenovima. Reagira s drugim radikalima te pritom ne dimerizira. Delokalizacija elektrona na DPPH• molekuli određuje ljubičastu boju otopine, s jakom apsorpcijskom vrpcom na 515-520 nm (Negulescu i Pisoschi, 2011; Gupta, 2015). Otopina reduciranog oblika DPPH je svijetlo žute boje. Uslijed reakcije s antioksidansom dolazi do smanjenja apsorbanacije pri 520 nm, što je linearno proporcionalno koncentraciji antioksidansa.

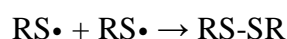


Slika 1.1.1.1. Struktura DPPH• radikala

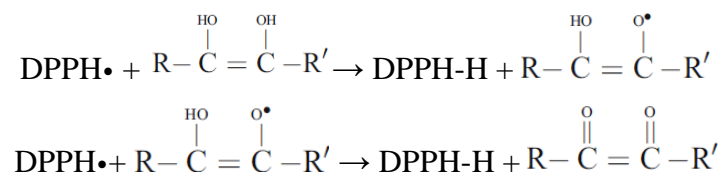
DPPH metodu razvio je Marsden Blois (1958.) s ciljem određivanja antioksidativne aktivnosti korištenjem stabilnog slobodnog radikala DPPH•. Korišten je cistein kao modelni antioksidans (Kedare i Singh, 2011). Početna reakcija je:



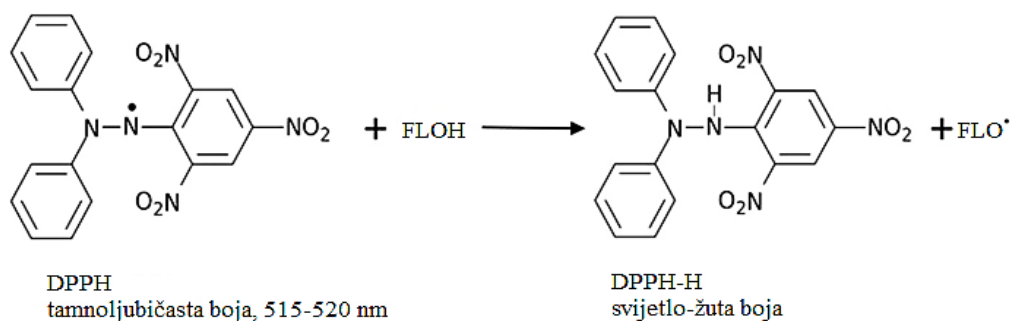
Slobodni radikal $\text{RS}\cdot$ reagira s drugom molekulom $\text{RS}\cdot$:



Reakcija DPPH• i cisteina odvija se u stehiometrijskom omjeru 1:1. Međutim, ako molekula ima dva mjesta na kojima može donirati atom vodika (npr. askorbinska kiselina, glutation, aromatski amini, α -tokoferol i polihidroksi aromati), stehiometrijski odnos je 2:1 :



Za interpretaciju rezultata dobivenih ovom metodom, uveden je pojam efikasna koncentracija (EC_{50}) (Brand-Williams i sur., 1995; Bondet i sur., 1997). EC_{50} se definira kao koncentracija antioksidansa koja dovodi do smanjenja apsorbanacije za 50%. Rezultati mjerenja prikazuju se kao μmol ekvivalenti Troloxa, μmol ekvivalenti galne kiseline i slično (Kedare i Singh, 2011).



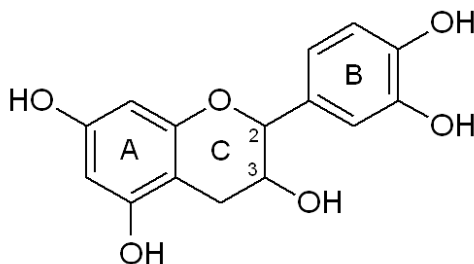
Slika 1.1.1.2. Reakcija DPPH• i flavonoida (FLOH). Doniranjem atoma vodika DPPH• se reducira te otopina gubi tamnoljubičastu boju.

Ova metoda je brza, jednostavna, jeftina i široko upotrebljiva metoda na temelju koje se procjenjuje antioksidativna aktivnost. Može se koristiti za kvantifikaciju antioksidansa u složenim biološkim sustavima, za tekuće i krute uzorke. Koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti antioksidansa u prirodnim izvorima (biljnim ekstraktima, prehrambenim proizvodima: žitaricama, voću, povrću, biljkama, jestivim uljima sjemenaka, brašnu). DPPH metoda može se koristiti u polarnim i nepolarnim organskim otapalima, kao što su etanol, aceton, metanol te se mogu ispitivati hidrofilni i lipofilni antioksidansi. DPPH• radikal je stabilan i ne mora se generirati neposredno prije korištenja (Kedare i Singh, 2011). Nedostatci ove metode su: reakcija DPPH• radikala s drugim radikalima, osjetljivost DPPH• na neke Lewis baze i otapala, osjetljivost na kisik te interferencije apsorbancije sastavnica uzorka. Također se apsorbancija DPPH• u metanolu i acetonu smanjuje pod utjecajem svjetla (Kedare i Singh, 2011).

1.2. Katehin

Katehin ((+)-Cijanidanol, D-katehin; empirijske formule $C_{15}H_{14}O_6$; $M_r = 290,27$) je flavonoid koji spada u skupinu flavan-3-ola. Prisutan je u biljkama kao zaseban spoj te u kombinaciji s galnom kiselinom u obliku trjeslovina. Nalazi se u čaju (zeleni čaj) i crnom vinu, te u obliku kondenziranih taninskih polimera prisutnih u voću (kruška, jabuka, marelica), leguminozama, i žitaricama (Pietta, 2000).

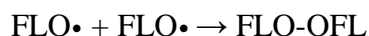
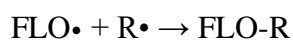
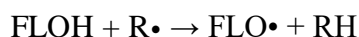
Strukturu katehina čine dva benzenska prstena (A- i B-) i dihidropiranski heterociklički prsten (C) s hidroksilnom skupinom na 3 C-atomu. Na molekuli postoje dva kiralna centra na 2C- i 3C-atomu, stoga katehin postoji u obliku 4 diastereoizomera, u dvije *cis* (epikatehin) i dvije *trans* (katehin) konfiguracije. Smjesa izomera označava se kao (+)-katehin. Esterifikacijom hidroksilne skupine na 3 C-atomu s galnom skupinom nastaje epikatehin galat (ECG). Kondenzacijom (polimerizacijom) molekula katehina nastaju procijanidini (Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018).



Slika 1.2.1. Struktura (+)-katehina

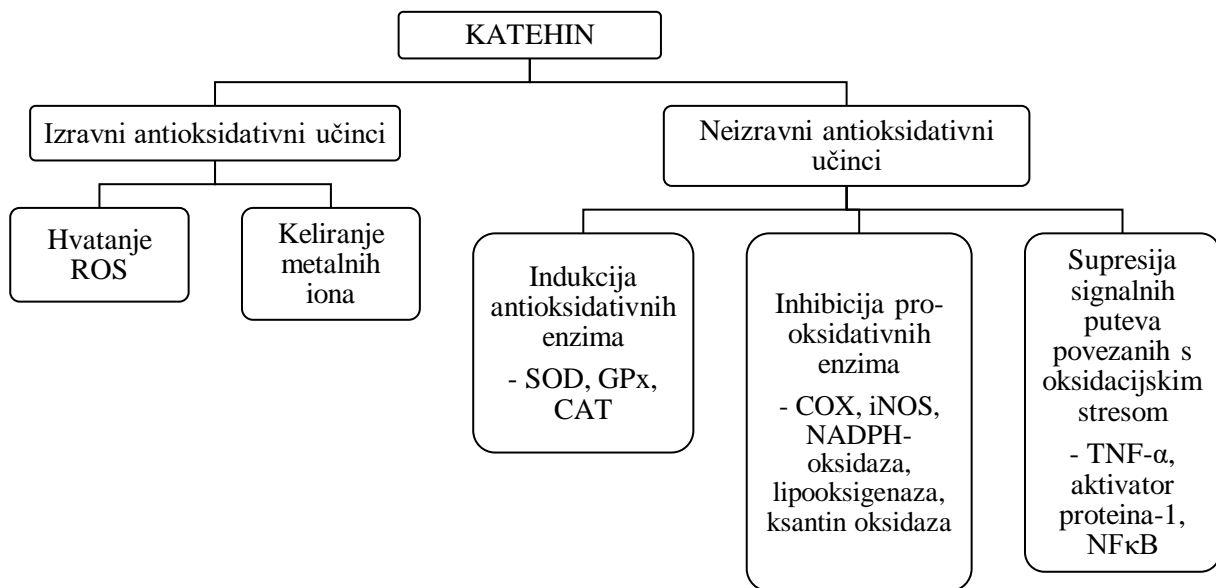
Antioksidativni učinak katehina očituje se kroz 1) direktne mehanizme – sposobnost hvatanja ROS, keliranje metalnih iona uključenih u proces nastanka slobodnih radikala i 2) indirektno mehanizme – induciranje antioksidativnih enzima, inhibicija pro-oksidativnih enzima, utjecaja na signalne puteve (Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018).

Katehin kao i ostali flavonoidi imaju nizak redoks potencijal (0,23-0,75 V) te su sposobni reducirati visoko oksidirajuće radikale s redoks potencijalima 2,13-1,0 V, kao što su superoksidni, peroksilni, alkoksi, hidroksilni radikal tako da doniraju atom vodika (Gupta, 2015). "Hvatanje" slobodnih radikala možemo prikazati pojednostavljenim jednadžbama:



Flavonoidi mogu reducirati slobodne radikale te kelirati metale. Katehin i njegovi diastereoizomeri imaju karakterističnu fenolnu skupinu koja je odgovorna za antioksidativni učinak. Najveći doprinos keliranju metala pridonose kateholne skupine (Gupta, 2015).

Katehini kao neizravni antioksidansi reguliraju sintezu proteina i signalne puteve preko 1. inhibicije redoks-osjetljivih transkripcijskih faktora, NF κ B i aktivatora proteina-1; 2. inhibicije pro-oksidativnih enzima kao što su NO sintaza, lipooksigenaza, ciklooksigenaza i ksantin oksidaza; te 3. indukcije enzima glutation-S-transferaze, superoksid dismutaze i katalaze (Frei i Higdon, 2003).



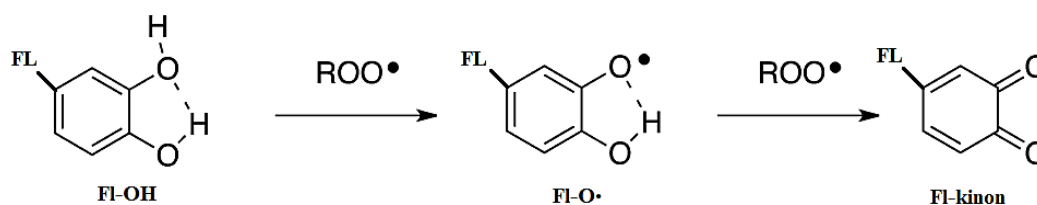
Slika 1.2.2. Antioksidativna svojstva katehina. ROS – reaktivne kisikove vrste, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GPx – glutation peroksidaza, COX – ciklooksigenaza, iNOS – inducibilna dušik (II) oksid sintaza, TNF- α – tumor nekrozni faktor alfa, NF κ B – nuklearni faktor kapa B.

Učinci katehina i ostalih flavonoida iz katehinske skupine ispitani su u mnogim istraživanjima na životinjskim modelima. Pokazano je da imaju protuupalni, antioksidativni, antialergijski, hepatoprotektivni, neuroprotektivni, antitrombotski, antiviralni i antikarcinogeni učinak (Dias i sur., 2013; Shay i sur., 2015; Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018).

1.2.1 Mehanizam reakcije katehina i DPPH•

Mehanizam reakcije katehina i DPPH• nije detaljno utvrđen. Smatra se da je prisutnost kateholnih hidroksilnih skupina na B prstenu flavonoida najznačajnija za hvatanje slobodnih radikalnih vrsta (Procházková i sur., 2001; Musialik i sur., 2009). Jedan od mogućih mehanizama je reakcija (+)-katehina s DPPH• na način da B prsten (+)-katehina prelazi u σ -kinonsku strukturu (Sawai i Moon, 2000).

Općenita reakcija flavonoida s radikalima može se prikazati kao na Slici 1.2.3. Flavonoid (FL-OH) reagira s radikalom (ROO•) pri čemu dolazi do gašenja radikala te stvaranja stabilnog flavonoidnog radikala (FL-O•). Stabilnost flavonoidnog radikala (FL-O•) proizlazi iz stvaranja vodikovih veza između hidroksilne skupine i kisika s nesparenim elektronom (Musialik i sur., 2009). Flavonoidni radikal (FL-O•) može reagirati s drugim radikalom (ROO•), pri čemu nastaje stabilna kinonska struktura (Procházková i sur., 2001; Ingold i Pratt, 2014).



Slika 1.2.3. Općenita reakcija flavonoida (FL-OH) sa slobodnim radikalima (ROO•)

1.3. Kemijska kinetika

1.3.1. Brzina kemijske reakcije

Brzina reakcije (v) označava promjenu koncentracije (c) sudionika reakcije u vremenu (t), odnosno brzinu prirasta doseg reakcije (ξ) (Atkins i de Paula, 2006).

Imamo reakciju oblika $A + 2B \rightarrow 3C + D$, gdje je u nekom trenutku molarna koncentracija sudionika reakcije J [J] te je volumen sustava konstantan. Brzina smanjenja jednog od reaktanata u nekom trenutku (t) je $-d[R]/dt$, gdje je $R = A$ ili B , a vrijednost brzine je pozitivna vrijednost. Brzina stvaranja jednog od produkata P (C ili D) je $d[P]/dt$, gdje je vrijednost brzine također pozitivna. Slijedeći stehiometriju reakcije $A + B \rightarrow 3C + D$, izraz za brzinu reakcije je:

$$d[D]/dt = 1/3 \cdot d[C]/dt = -1/2 \cdot d[B]/dt = -d[A]/dt$$

Brzina reakcije povezana je s brzinama promjena koncentracije produkata i reaktanata na različite načine. Kako bismo izbjegli izražavanje brzine reakciju na više različitih načina, uvodi se veličina doseg reakcije ξ (ksi):

$$\xi = (n_i - n_{i,0})/\nu_i$$

gdje je ν_i stehiometrijski koeficijent sudionika reakcije i , a n_i i $n_{i,0}$ količine tvari u određenom trenutku, odnosno na početku reakcije.

Brzina kemijske reakcije (v) definirana je kao brzina promjene doseg reakcije (Atkins i de Paula, 2010):

$$v = 1/V \cdot d\xi/dt$$

gdje je V volumen homogenog sustava. Iz toga slijedi:

$$v = 1/\nu_i \cdot 1/V \cdot dn_i/dt$$

ν_i je negativan za reaktante i pozitivan za produkte. Za homogeni sustav sa stalnim volumenom vrijedi da je $[J] = n_i/V$, pa dobivamo krajnju jednadžbu:

$$v = 1/\nu_i \cdot d[J]/dt$$

Molarne koncentracije su izražene u mol dm^{-3} , te vrijeme u sekundama, stoga je mjerna jedinica za brzinu reakcije homogenih sustava $\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

1.3.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije

Brzina reakcije često je proporcionalna koncentracijama reaktanata dignutih na određenu potenciju. Ako je brzina reakcije proporcionalna molarnoj koncentraciji reaktanata A i B, tada pišemo (Atkins i de Paula, 2010):

$$v = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b$$

Koeficijent (k) nazivamo konstanta brzine reakcije, koja je neovisna o koncentracijama reaktanata, ali ovisi o temperaturi.

Eksperimentalno određena jednadžba ovog tipa zove se zakon za brzinu reakcije, odnosno zakon za brzinu reakcije je jednadžba koja opisuje brzinu reakcije kao funkciju koncentracije sudionika reakcije u nekom trenutku tijekom reakcije. Zakon za brzinu reakcije određuje se eksperimentalno i ne može se izvesti općenito iz jednadžbe kemijske reakcije. Ako poznajemo zakon za brzinu reakcije i konstantu brzine reakcije, možemo predvidjeti brzinu reakcije iz sastava reakcijske smjese. Potencija na koju se diže koncentracija reaktanata u zakonu za brzinu reakcije zove se red reakcije u odnosu na taj reaktant. Ukupni red reakcije predstavlja zbroj pojedinačnih redova u odnosu na svaki reaktant.

Neke reakcije slijede zakon za brzinu reakcije nultog reda, te im brzina reakcija ne ovisi o koncentracijama reaktanata;

$$v = k$$

Zakon za brzinu reakcije prvog reda je:

$$d[A]/dt = -k \cdot [A]$$

Pošto su zakoni za brzinu reakcije diferencijalne jednadžbe, moramo ih integrirati kako bi dobili ovisnost koncentracije sudionika reakcije o vremenu. Integrirani oblik zakona za brzinu reakcije prvog reda je:

$$\ln([A]/[A]_0) = -k \cdot t \quad [A] = [A]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

gdje je $[A]_0$ koncentracija tvari pri $t = 0$.

Koristan pokazatelj brzine kemijske reakcije je vrijeme polureakcije ($t_{1/2}$), koje predstavlja vrijeme potrebno da se koncentracije određenog sudionika reakcije smanji na polovicu svoje početne vrijednosti.

Za reakciju prvog reda, poluvrijeme reakcije ne ovisi o početnoj koncentraciji određenog reaktanta:

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Zakon za brzinu reakcije drugog reda za reakciju tipa $2A \rightarrow P$ je:

$$d[A]/dt = -k \cdot [A]^2$$

Integrirani zakon za brzinu reakcije drugog reda je:

$$[A]^{-1} - [A]_0^{-1} = k \cdot t \quad [A] = [A]_0 / (1 + k \cdot t \cdot [A]_0)$$

Vrijeme polureakcije za reakciju drugog reda ovisi o početnoj reakciji reaktanta:

$$t_{1/2} = 1/(k \cdot [A]_0)$$

Druga vrsta reakcije drugog reda je $A + B \rightarrow P$, čiji je zakon za brzinu reakcije:

$$d[P]/dt = -d[A]/dt = -d[B]/dt = -k \cdot [A] \cdot [B]$$

Integrirani zakon za brzinu reakcije drugog reda ovog tipa je:

$$k \cdot t = ([B]_0 - [A]_0)^{-1} \cdot \ln([B]/[B]_0 / [A]/[A]_0)$$

Ako su koncentracije svih reaktanata osim jednog u velikom suvišku (20 ili više puta), možemo reći da im je koncentracija konstantna tijekom reakcije. Iako je stvarni zakon za brzinu reakcije $v = k \cdot [A] \cdot [B]$, možemo pisati $[B]$ kao $[B]_0$, te iz toga slijedi:

$$v = k' \cdot [A] \quad k' = k \cdot [B]_0$$

Pošto je stvarni zakon za brzinu reakcije sveden u onaj prvog reda, nazivamo ga zakonom za brzinu reakcije pseudo-prvog reda. Iz toga slijedi da je integrirani zakon za brzinu reakcije pseudo-prvog reda:

$$-d[A]/dt = k' \cdot [A]$$

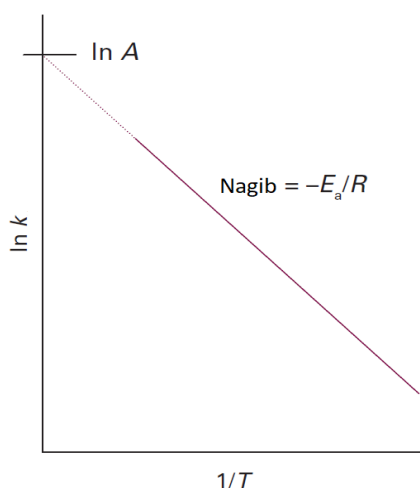
1.3.3. Ovisnost brzine reakcije o temperaturi

Konstanta brzine većine reakcije raste s porastom temperature. Eksperimentalno je utvrđeno da je ovisnost $\ln k$ o $1/T$ linearna te se ta ovisnost opisuje Arrheniusovom jednačbom (Atkins i de Paula, 2010):

$$\ln k = \ln A - E_a/(R \cdot T) \quad \text{ili} \quad k = A \cdot e^{-E_a/R \cdot T}$$

gdje R predstavlja opću plinsku konstantu ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), a T temperaturu.

Parametar E_a naziva se energija aktivacije koja se određuje iz nagiba pravca ($-E_a/R$). (Slika 1.3.3.1.). Energija aktivacije predstavlja minimalnu kinetičku energiju reaktanata potrebnu za nastanak produkata reakcije. Parametar A naziva se predeksponencijalni faktor, a predstavlja odsječak pravca pri $1/T = 0$ (Atkins i de Paula, 2010). Predeksponencijalni faktor je povezan s brojem sudara molekula reaktanata u jedinici vremena.



Slika 1.3.3.1. Graf ovisnost $\ln k$ o $1/T$ je pravac ako reakcija slijedi ponašanje opisano Arrheniusovom jednačbom. Nagib pravca daje $-E_a/R$, a odsječak pravca na $1/T = 0$ daje $\ln A$ (Atkins i de Paula, 2010)

Iz nagiba pravca ($-E_a/R$) vidimo da je ovisnost konstante brzine reakcije o temperaturi veća, što je veća energija aktivacije (strmiji nagib pravca).

Temperaturna ovisnost nekih reakcija ne slijedi Arrheniusovu jednačbu, odnosno ovisnost $\ln k$ o $1/T$ nije linearna. U tom slučaju, energiju aktivacije na određenoj temperaturi moguće je odrediti prema općoj definiciji:

$$E_a = R \cdot T^2 \cdot (d \ln k / dT)$$

Osim Arrheniusove jednadžbe, ovisnost konstante brzine o temperaturi opisuje i Eyringova jednadžba (Espenson, 1981):

$$k = [(k_B \cdot T)/h] \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/(R \cdot T)}$$

ili

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/R \cdot 1/T$$

gdje su k_B , h i R konstante (Boltzmannova ($1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), Planckova ($6,62608 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) i opća plinska konstanta ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)), k predstavlja konstantu brzine reakcije i T temperaturu.

Termodinamički aktivacijski parametri, koje je moguće odrediti na temelju Eyringove jednadžbe su: Gibbsova aktivacijska energija (ΔG^\ddagger), aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) te aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger). Pomoću aktivacijske entropije i entalpije možemo izračunati Gibbsovu aktivacijsku energiju (ΔG^\ddagger), prema jednadžbi:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$$

1.3.4. Kinetički izotopni efekt

Kinetički izotopni efekt (KIE) je promjena brzine kemijske reakcije uslijed zamjene jednog od atoma u molekuli reaktanta njegovim izotopom. Koristi se kod istraživanja mehanizama kemijskih reakcija. Na temelju kinetičkog izotopnog efekta moguće je dobiti pobliže informacije o koraku koji određuje brzinu reakcije. Zamjena jednog izotopa drugim na/u blizini veze koja puca ili mijenja hibridizaciju obično dovodi do promjene u brzini reakcije. Ako veza koja puca ili mijenja hibridizaciju uključuje atom vodika, učinak zamjene vodika (H) s deuterijem (D) je često relativno velik i može se jednostavno izmjeriti. Proučavani su izotopni efekti s drugim atomima osim atoma vodika, ali su učinci većinom mali te ih je teško izmjeriti (Anslyn i Dougherty, 2006).

Kinetički izotopni efekt izražavamo kao omjer konstanti brzina, gdje je brojnik konstanta brzine za reakciju s izotopom koji je najzastupljeniji u prirodi, a nazivnik je konstanta brzine reakcije sa zamijenjenim izotopom. Ako mjerimo izotopni efekt za reakcije u kojima se atom H zamjenjuje s D, izrazit ćemo ga kao:

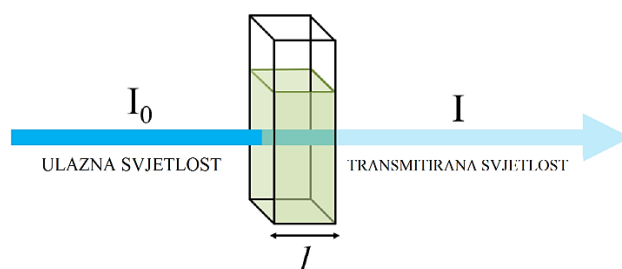
$$\text{KIE} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$$

Kako bismo izračunali kinetički izotopni efekt potrebno je odrediti konstante brzine k_{H} i k_{D} . k_{H} se određuje za reakciju s molekulom (X-H) koja ima prirodni izotopni omjer, tj. prirodni udio deuterija (^2H) i tricija (^3H) je toliko nizak da im je doprinos u (X-H) molekuli beznačajan. k_{D} se mjeri na način da se koristi sintetski promijenjen oblik molekule ili uvodi otapalo s deuterijem pri čemu se deuterij uvodi umjesto atoma vodika u molekuli.

Vrijednost kinetičkog izotopnog efekta daje nam informacije o reakcijskom mehanizmu. Ako je omjer $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 1$, zaključak bi bio da se veza na kojoj je izvršena supstitucija atoma vodika nije promijenila tijekom reakcije. Ako je omjer $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 1$, tada govorimo o „normalnom“ kinetičkom izotopnom efektu, te ako je $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} < 1$, o „inverznom“. Ukoliko u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do pucanja X-H / X-D, riječ je o primarnom kinetičkom izotopnom efektu. Kada se efekt pripisuje promjeni hibridizacije ili proizlazi iz izotopne zamjene dalje od veze koja stupa u reakciju, tada se naziva sekundarnim kinetičkim izotopnim efektom.

1.4. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometrija je metoda koja mjeri intenzitet apsorpcije elektromagnetnog zračenja. Spektrometrom se mjeri intenzitet izlaznog zračenja nakon prolaska kroz otopinu uzorka, unutar ultraljubičastog (200-350 nm), odnosno vidljivog (350-850 nm) spektralnog područja (Atkins i de Paula, 2006).



Slika 1.4.1. Prolazak svjetlosti kroz ispitivanu otopinu u spektroskopskim mjerenjima

Omjer transmitiranog intenziteta svjetlosti (I) i ulazne svjetlosti (I_0) na određenoj frekvenciji naziva se transmitancija (T):

$$T = I/I_0$$

Empirijski je utvrđeno da se intenzitet elektromagnetnog zračenja koje prolazi kroz uzorak na određenoj valnoj duljini smanjuje eksponencijalno s debljinom uzorka, tj. s duljinom puta prolaska svjetlosti (l) i molarnom koncentracijom uzorka (c) prema Beer-Lambertovom zakonu (Atkins i de Paula, 2006):

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot [J] \cdot l}$$

Gdje je ε molarni apsorpcijski koeficijent koji ovisi o frekvenciji ulaznog zračenja i karakterističan je za tvar otoplenu u određenom otapalu.

Za pojednostavljenje prethodne jednadžbe, uvodi se pojam apsorbancija (A):

$$A = \log(I_0/I) = -\log(I/I_0) = -\log T$$

Tada Beer-Lambertov zakon izražavamo kao:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Poznavajući molarni apsorpcijski koeficijent (ε), duljinu puta prolaska svjetlosti (l) i mjereći apsorbanciju, iz Beer-Lambertovog zakona možemo izračunati koncentraciju otopine uzorka.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antioksidansi su spojevi koji sprječavaju ili usporavaju oksidaciju bioloških molekula koja se događa u prisutnosti slobodnih radikala, te na taj način štite organizam od štetnih utjecaja oksidativnog stresa. Jedan takav spoj koji se ističe po antioksidativnom učinku te je široko zastupljen u prirodi, posebno u zelenom čaju, je flavonoid katehin. Antioksidativni učinak katehina povezan je za direktne mehanizme – hvatanje slobodnih radikala, keliranje metalnih iona uključenih u proces nastajanja slobodnih radikala i indirektno mehanizme – induciranje antioksidativnih enzima, inhibicija pro-oksidativnih enzima, utjecaja na signalne puteve.

Iako postoji veliki broj uvida o reakciji katehina i slobodnih radikala, mehanizam reakcije još uvijek nije detaljno ispitan. Kod proučavanja ovih reakcija često se kao modelni spoj koristi DPPH• radikal.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati kinetiku i mehanizam reakcije katehina i DPPH• radikala. Određena je konstanta brzine reakcije u otapalima dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te u acetonitrilu. Dodatno su određeni aktivacijski parametri za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v): energija aktivacije (E_a), predeksponencijalni faktor (A), aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger), aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) i Gibbsova aktivacijska energija (ΔG^\ddagger). Određen je kinetički izotopni efekt (KIE) mjerenjem konstante brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v). Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju mehanizma reakcije katehina i DPPH• radikala, te općenito reakcije katehina i štetnih radikala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

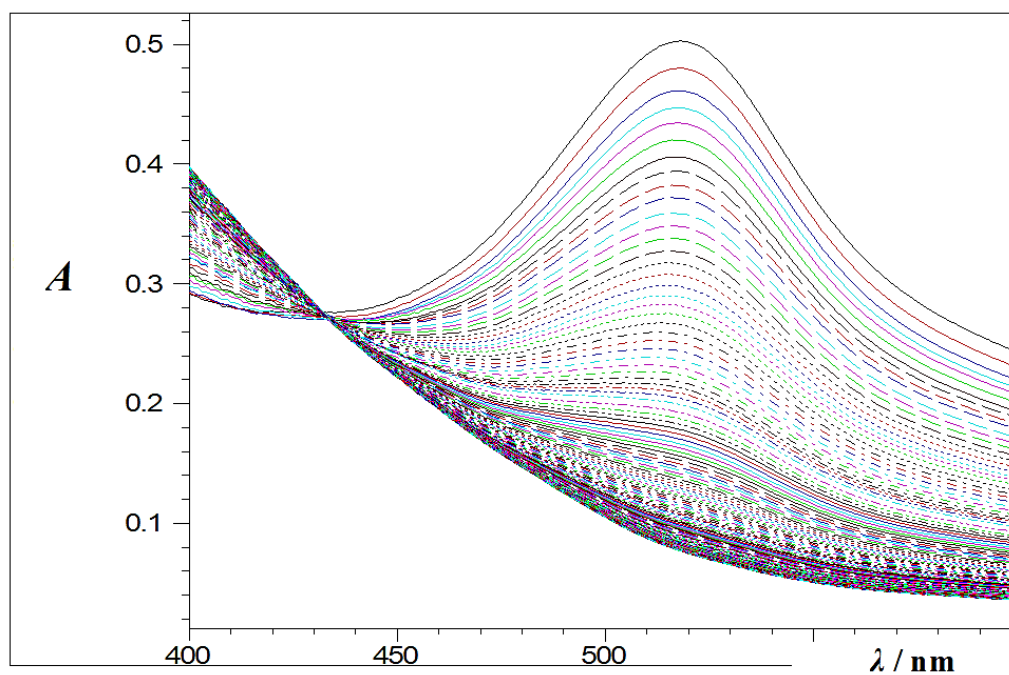
- (+)-katehin hidrat ($\geq 96,0$ %, Sigma-Aldrich)
- DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), slobodni radikal, 95% (Sigma-Aldrich)
- 1,4-dioksan (max. 0,005% H₂O, Merck)
- acetonitril ($\geq 99,9$ %, Merck)
- dušik 5.0 (99.999% N₂, Messer Croatia plin d.o.o.)
- redestilirana voda
- teška voda, D₂O (99.9% D, Sigma-Aldrich)

Korišteni su sljedeći instrumenti i laboratorijski pribor:

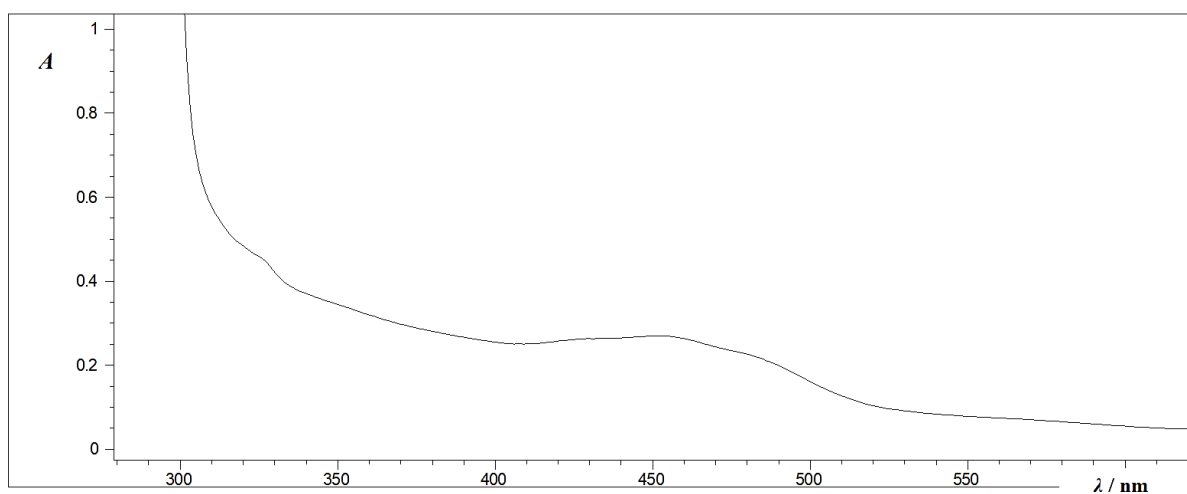
- vaga Mettler H2OT ($P_{\max} = 160$ g, $d = 0,01$ mg)
- HP G1103A 8453 UV-Vis spektrofotometar, Agilent Technologies
- termostatirani nosač za kivete Q-pod, Quantum Northwest TC 125 Temperature Control ($\pm T < 0,1^{\circ}\text{C}$)
- Eppendorf automatske pipete od 200 i 1000 μL uz odgovarajuće plastične Eppendorf nastavke
- plastične tube Eppendorf (1,5 mL)
- staklene odmjerne tikvice (5,0 i 25,0 mL)
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma

3.2. Mjerenje konstante brzine reakcije katehina i DPPH•

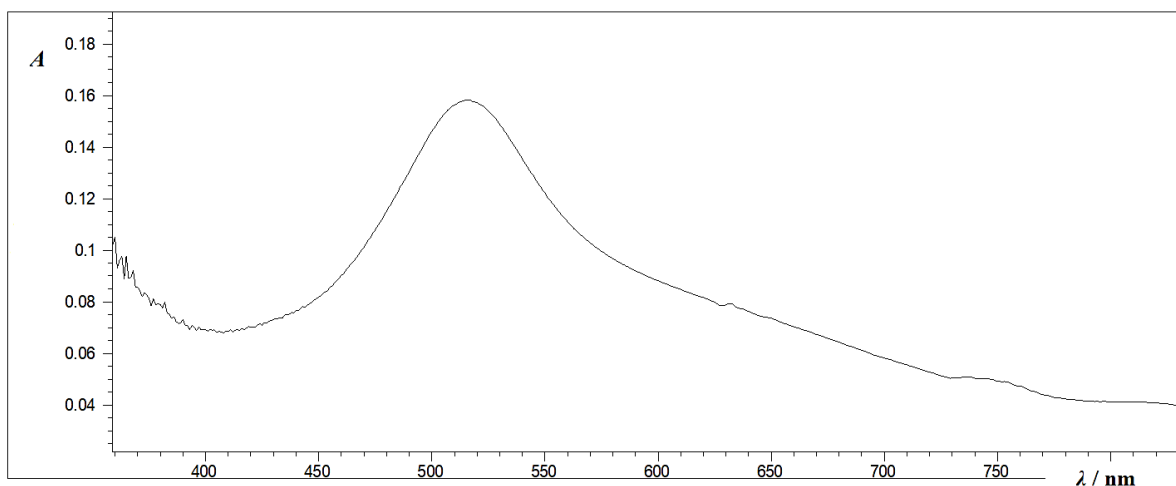
Konstante brzine reakcije (k_{obs}) određene su mjerenjem smanjenja apsorbancije DPPH• u reakcijskoj smjesi na valnoj duljini 525 nm tijekom reakcije. Mjerenja su izvedena u uvjetima pseudo-prvog reda, prema kojem se katehin nalazi u najmanje 30 puta većoj koncentraciji od DPPH• u reakcijskoj smjesi.



Slika 3.2.1. Spektalni profil reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)



Slika 3.2.2. Spektar 0,001 M otopine katehina u dioksanu



Slika 3.2.3. Spektar $2,5 \cdot 10^{-5}$ M otopine DPPH• u dioksanu

Konstanta brzine reakcije (k_2) određuje se iz izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije katehina u reakcijskoj otopini prema jednadžbi:

$$k_2 = k_{\text{obs}} / [\text{Katehin}];$$

pri čemu je koncentracija katehina $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$.

U kivetu se pripremi smjesa otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) dodatkom određenog volumena prethodno dušikom propuhanog 1,4-dioksana visoke čistoće te neposredno prije pripremljene redestilirane vode nakon čega se smjesa termostatira 15 minuta na temperaturi mjerenja. Nakon termostatiranja smjese otapala, u kivetu se dodaje određeni volumen prethodno pripremljene otopine katehina u dioksanu kako bismo dobili konačnu koncentraciju katehina u reakcijskoj otopini, te se otopina promiješa. Reakciju pokrećemo dodatkom određenog volumena prethodno termostatirane otopine DPPH• u dioksanu kako bismo dobili konačnu koncentraciju DPPH• u reakcijskoj otopini te se kiveta nakon brzog miješanja stavlja u spektrofotometar na mjerenje. Mjerenja se provode se u rasponu valnih duljina 400-600 nm, pri čemu je apsorpcijski maksimum (A_{max}) DPPH• na 525 nm.

Mjerenje konstante brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) u ovisnosti o koncentraciji katehina, pri 25°C

Tablica 3.2.1. Sastav reakcijske otopine u kiveti

| Ukupni volumen reakcijske otopine u kiveti = 1800μL | | | | |
|---|--------|-----------------------------------|-------------|----------------------|
| c (katehina) / mol dm ⁻³ | | c (DPPH) / mol dm ⁻³ | Dioksan / % | H ₂ O / % |
| 1. | 0,0015 | 0,00005 | 95 | 5 |
| 2. | 0,003 | | | |
| 3. | 0,006 | | | |
| 4. | 0,01 | | | |
| 5. | 0,015 | | | |

Mjerenje konstante brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) u ovisnosti o temperaturi

Mjere se konstante brzine reakcije na različitim temperaturama, i to redom na: 9, 15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C.

Tablica 3.2.2. Sastav reakcijske otopine u kiveti

| Ukupni volumen reakcijske otopine = 1800μL | | | |
|--|-----------------------------------|-------------|----------|
| c (katehina) / mol dm ⁻³ | c (DPPH) / mol dm ⁻³ | Dioksan / % | Voda / % |
| 0,003 | 0,00005 | 95 | 5 |

Mjerenje konstante brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu, pri 25°C

U kivetu se doda određeni volumen prethodno dušikom propuhanog acetonitrila nakon čega se smjesa termostatira 15 minuta na 25°C. Nakon termostatiranja u kivetu se dodaje određeni volumen prethodno pripremljene otopine katehina u acetonitrilu kako bismo dobili koncentraciju katehina 0,003 mol dm⁻³ te se otopina promiješa. Reakciju pokrećemo dodatkom određenog volumena prethodno termostatirane otopine DPPH• u acetonitrilu kako bismo dobili koncentraciju DPPH• 0,00005 mol dm⁻³ te se kiveta nakon brzog miješanja stavlja u spektrofotometar na mjerenje. Mjerenja se provode se u rasponu valnih duljina 400-600 nm, pri čemu je apsorpcijski maksimum (A_{\max}) DPPH• na 525 nm.

Tablica 3.2.3. Sastav reakcijske otopine u kiveti

| Ukupni volumen reakcijske otopine = 1800μL | | |
|--|--------------------------------------|-----------------|
| c (katehina) / mol dm ⁻³ | c (DPPH) / mol dm ⁻³ | Acetonitril / % |
| 0,003 | 0,00005 | 100 |

3.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta reakcije katehina i DPPH•, pri 25°C.

Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v) (k_D), pri temperaturi 25°C, određuje se na jednak način kao i konstanta brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) (k_H) pri čemu je voda zamijenjena teškom vodom. Iz izmjerenih vrijednosti konstanti brzina reakcije k_H i k_D izračuna se kinetički izotopni efekt (KIE) prema jednadžbi:

$$\text{KIE} = k_H/k_D$$

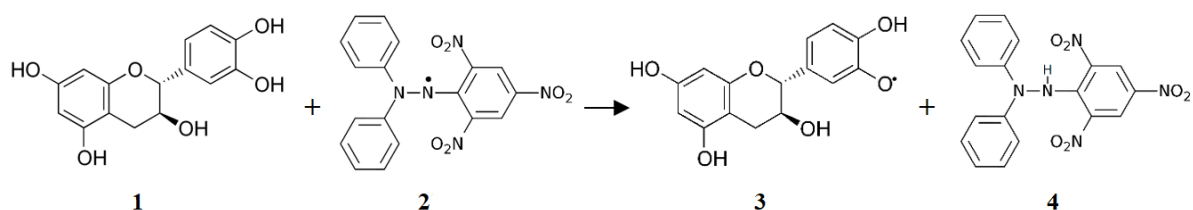
Tablica 3.3.1. Sastav reakcijske otopine u kiveti

| Ukupni volumen reakcijske otopine = 1800μL | | | |
|--|--------------------------------------|-------------|----------------------|
| c (katehina) / mol dm ⁻³ | c (DPPH) / mol dm ⁻³ | Dioksan / % | D ₂ O / % |
| 0,003 | 0,00005 | 95 | 5 |

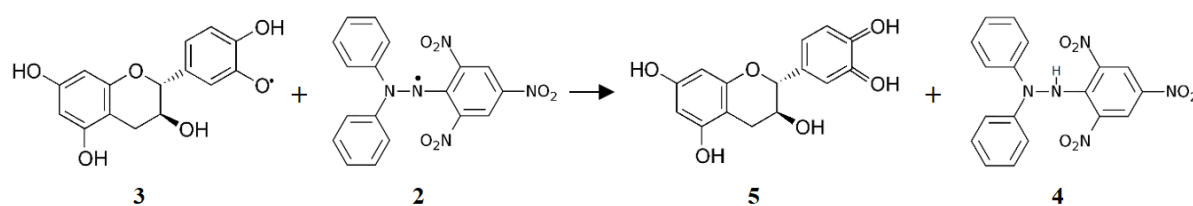
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Reakcija katehina i DPPH•

Reakcija katehina i DPPH• radikala odvija se prema kemijskoj jednadžbi:



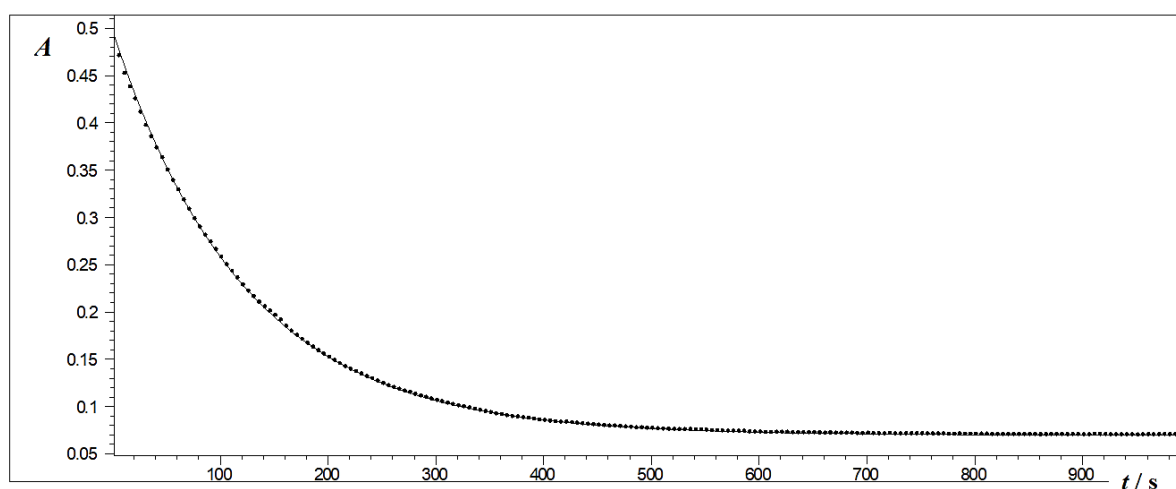
gdje dolazi do prijelaza elektrona i protona s katehina (1) na DPPH• (2), pri čemu nastaje odgovarajući fenoksi radikal (3) i reducirani DPPH (4). Mehanizam prijelaza elektrona i protona zasad nije pobliže ispitan.



Nastali fenoksi radikal (3) može reagirati s još jednom molekulom DPPH• (2) pri čemu nastaje stabilna kinonska struktura katehina (5) i reducirani DPPH (4) (Procházková i sur., 2001; Ingold i Pratt, 2014).

4.2. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH•

Izmjerene su konstante brzine reakcije katehina i DPPH• radikala u uvjetima pseudo-prvog reda, tako što je koncentracija katehina bila u dovoljno velikom suvišku, te se može opravdano pretpostaviti da je koncentracija katehina približno konstantna tijekom reakcije. Dobivena ovisnost koncentracije DPPH• o vremenu slijedi zakon za brzinu reakcije prvog reda. Na temelju izmjerene ovisnosti određene su konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) kod određene koncentracije katehina.



Slika 4.2.1. Ovisnost apsorbancije (A) DPPH• pri 525 nm o vremenu (t) za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), pri koncentraciji DPPH• $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$ te pri temperaturi 25°C .

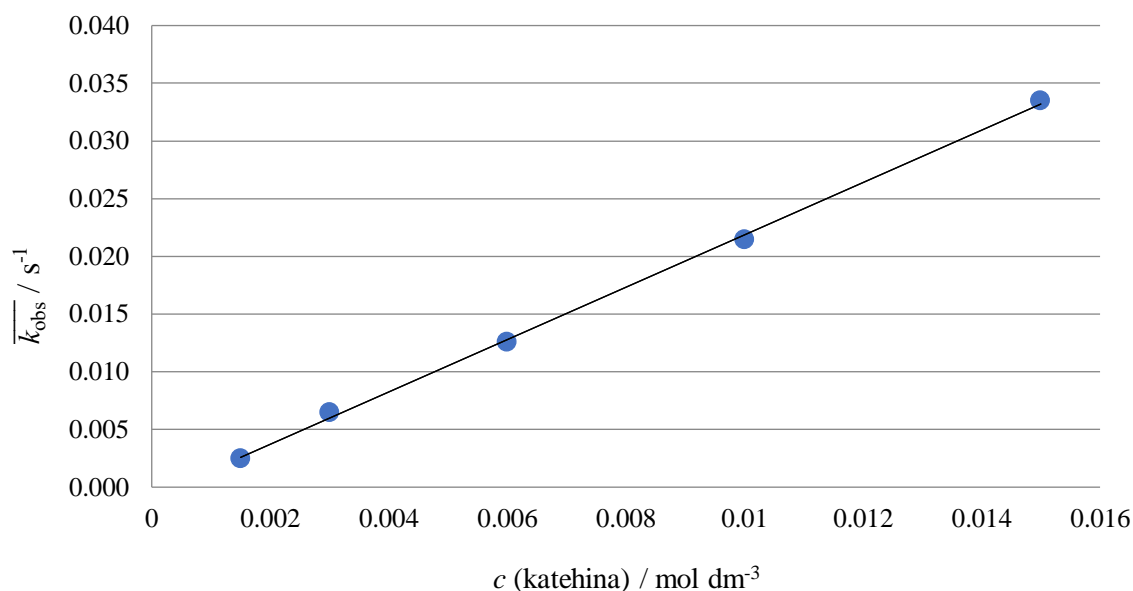
4.2.1. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)

U smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) izmjerene su konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) u rasponu koncentracija katehina od (0,0015 – 0,015) mol dm⁻³, pri temperaturi 25°C. Podatci su prikazani u Tablici 4.2.1.1.

Tablica 4.2.1.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri različitim koncentracijama katehina i koncentraciji DPPH• 0,00005 mol dm⁻³, pri temperaturi 25°C.

| c (katehina) / mol dm ⁻³ | $k_{\text{obs}} \cdot 10^{-3} / \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^{-3} / \text{s}^{-1}$ | SD $\cdot 10^{-4} / \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|---------------------------------------|--|---|------------------------------------|---------|
| 0,0015 | 2,54 | 2,48 | 1,9 | 7,7 |
| | 2,27 | | | |
| | 2,64 | | | |
| 0,003 | 6,55 | 6,46 | 1,2 | 1,9 |
| | 6,51 | | | |
| | 6,32 | | | |
| 0,006 | 12,0 | 12,5 | 5,6 | 4,5 |
| | 12,5 | | | |
| | 13,1 | | | |
| 0,01 | 22,2 | 21,4 | 7,3 | 3,4 |
| | 21,3 | | | |
| | 20,8 | | | |
| 0,015 | 35,0 | 33,5 | 1,5 | 4,4 |
| | 32,1 | | | |
| | 33,4 | | | |

Prikazana je ovisnost izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda (k_{obs}) za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) o koncentraciji katehina (Slika 4.2.1.1). Dobivena je vrlo dobra linearna ovisnost, opisana s jednadžbom pravca $y = 2,2678x - 0,0008$. $R^2 = 0,9991$.



Slika 4.2.1.1. Prikaz ovisnosti izmjerene konstante brzine ($\overline{k_{\text{obs}}}$) reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) o koncentraciji katehina. Koncentracija DPPH• iznosi 0,00005 mol dm⁻³, pri temperaturi 25°C. $R^2 = 0,9991$. Podatci iz Tablice 4.2.1.1.

Dobivena linearna ovisnost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji katehina u skladu je sa zakonom za brzinu reakcije:

$$v = -d [\text{DPPH}] / dt = k_2 \cdot [\text{DPPH}] \cdot [\text{Katehin}]$$

U uvjetima pseudo-prvog reda:

$$[\text{Katehin}] \gg [\text{DPPH}]$$

slijedi

$$-d [\text{DPPH}] / dt = k_{\text{obs}} \cdot [\text{DPPH}]$$

pri čemu je $k_{\text{obs}} = k_2 \cdot [\text{Katehin}]_0$.

Utvrđeni zakon za brzinu reakcije u skladu je sa zakonom za brzinu koji su eksperimentalno utvrdili Musialik i sur. (2008.) za reakcije 10 flavonoida (galangina, kvercetina, naringenina, morina, 6-hidroksiflavona i dr.) i DPPH• radikala u metanolu, etanolu, metanolu i etanolu u kiselom, etil-acetatu i dioksanu:

$$k_{\text{exp}} = \text{konst.} + k_2 \cdot [\text{Flavonoid-OH}]$$

Na temelju dobivene jednadžbe pravca ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) i koncentracije katehina, iz nagiba pravca, određena je konstanta brzine reakcije (k_2) za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), pri temperaturi 25 °C: **$k_2 = 2,27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.**

4.2.2. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu

Izmjerene su konstante brzine reakcije katehina i DPPH• radikala u acetonitrilu u uvjetima pseudo-prvog reda, analogno slučaju smjese otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Dobivena ovisnost koncentracije DPPH• o vremenu slijedi zakon za brzinu reakcije prvog reda te su iz nje određene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k_{obs}) pri koncentraciji katehina 0,003 mol dm⁻³, koncentraciji DPPH• 0,00005 mol dm⁻³ te pri temperaturi 25 °C. Izračunate su konstante brzine (k_2) prema jednadžbi: $k_2 = k_{\text{obs}} / c(\text{katehina})$. Podatci su prikazani u Tablici 4.2.2.1.

Tablica 4.2.2.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) te izračunate konstante brzine (k_2) za reakciju katehina i DPPH• u acetonitrilu, pri temperaturi 25°C.

| $c(\text{katehina}) / \text{mol dm}^{-3}$ | $k_{\text{obs}}^{(a)} \cdot 10^{-2} / \text{s}^{-1}$ | $k_2^{(b)} / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $\bar{k}_2 / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | RSD / % |
|---|--|---|---|--|---------|
| 0,003 | 3,93 | 13,1 | 12,8 | 0,6 | 4,9 |
| | 3,99 | 13,3 | | | |
| | 3,64 | 12,1 | | | |

^a Reakcijska se smjesa sastoji od 0,003 mol dm⁻³ katehina i 0,00005 mol dm⁻³ DPPH• u acetonitrilu

^b Konstanta brzine izračunata je iz jednadžbe: $k_2 = k_{\text{obs}} / c(\text{katehin})$

Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu pri 25°C iznosi 12,8 mol⁻¹ dm³ s⁻¹. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri temperaturi 25°C iznosi 2,27 mol⁻¹ dm³ s⁻¹. Iz toga proizlazi da je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu 5,96 puta (≈ 6 puta) veća od konstante brzine reakcije u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v).

Veća konstanta brzine reakcije u acetonitrilu u skladu je s prethodnim istraživanjima utjecaja otapala na reakciju flavonoida (kvercetina, galangina, naringenina, morina, 6-hidroksiflavona i dr.) s DPPH• radikalom (Musialik i sur., 2009), gdje se pokazalo da su reakcije flavonoida i DPPH• brže u polarnim otapalima kao što su metanol i etanol od reakcija u nepolarnim otapalima kao što je dioksan. U polarnim otapalima dolazi do deprotonizacije fenola koju slijedi brzi prijenos elektrona od fenolatnog aniona na radikal (peroksilni radikal ili DPPH•), tj. dolazi do SPLET mehanizma (*Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*). Otapala koja imaju veću dielektričnu konstantu (polarnija otapala kao što su metanol, etanol i acetonitril) potiču deprotonizaciju, posljedično podupiru SPLET mehanizam. Pokazalo se da se u nepolarnim otapalima (kao što je dioksan) te u onima koji ne potiču deprotonizaciju reakcija odvija prema HAT mehanizmu. U navedenom istraživanju je konstanta brzine reakcije u metanolu bila 1000 puta veća od one u nepolarnom otapalu dioksanu, gdje se odvijao samo HAT mehanizam.

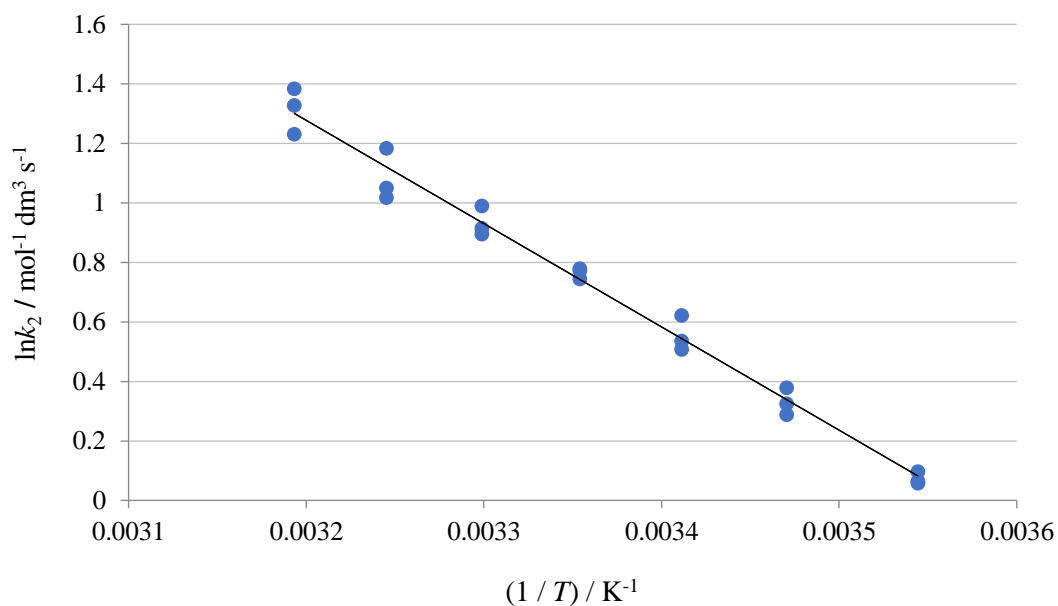
4.3. Aktivacijski parametri reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)

Tablica 4.3.1. Izmjerene konstante brzine (k_{obs}) te izračunate konstante brzine (k_2) za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), pri različitim temperaturama.

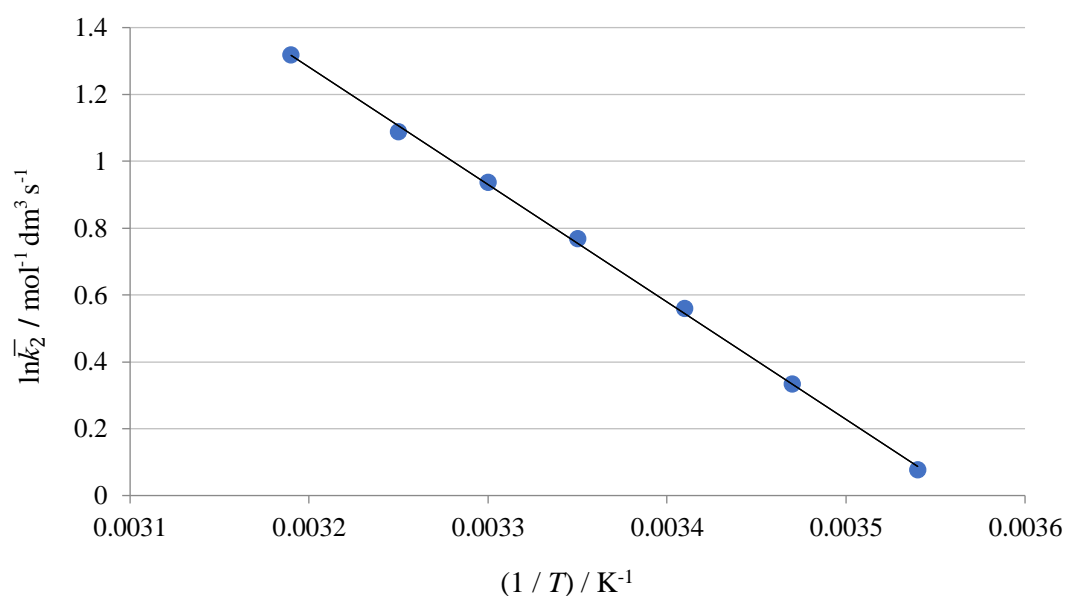
| $t / ^\circ\text{C}$ | $k_{\text{obs}}^{(a)} \cdot 10^{-3} / \text{s}^{-1}$ | $k_2^{(b)} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\bar{k}_2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|----------------------|--|---|---|--|---------|
| 9,0 | 3,18 | 1,06 | 1,08 | 0,02 | 2,1 |
| | 3,31 | 1,10 | | | |
| | 3,20 | 1,07 | | | |
| 15,0 | 4,01 | 1,34 | 1,39 | 0,06 | 4,6 |
| | 4,16 | 1,39 | | | |
| | 4,39 | 1,46 | | | |
| 20,0 | 5,14 | 1,71 | 1,75 | 0,10 | 6,0 |
| | 5,59 | 1,86 | | | |
| | 4,99 | 1,66 | | | |
| 25,0 | 6,55 | 2,17 | 2,15 | 0,04 | 1,9 |
| | 6,51 | 2,11 | | | |
| | 6,32 | 2,18 | | | |
| 30,0 | 8,08 | 2,69 | 2,55 | 0,13 | 5,0 |
| | 7,35 | 2,45 | | | |
| | 7,50 | 2,50 | | | |
| 35,0 | 9,80 | 3,27 | 2,97 | 0,26 | 8,9 |
| | 8,59 | 2,86 | | | |
| | 8,30 | 2,77 | | | |
| 40,0 | 12,0 | 3,99 | 3,73 | 0,29 | 7,7 |
| | 10,3 | 3,43 | | | |
| | 11,3 | 3,77 | | | |

^(a) Reakcijska se smjesa sastoji od $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$ katehina i $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$ DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)

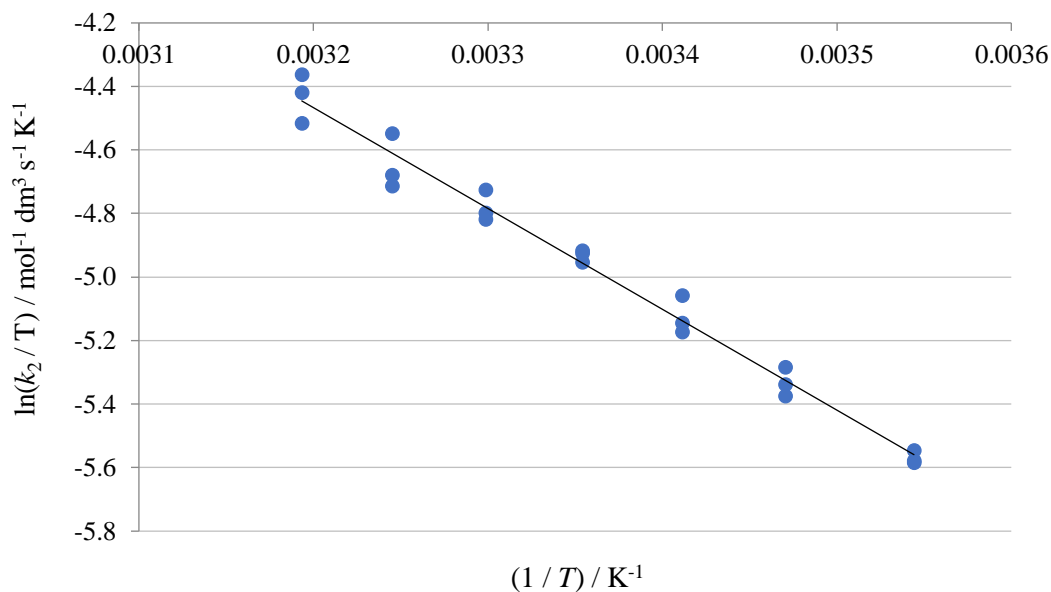
^(b) Konstanta brzine izračunata je iz jednadžbe: $k_2 = k_{\text{obs}} / c(\text{katehin})$



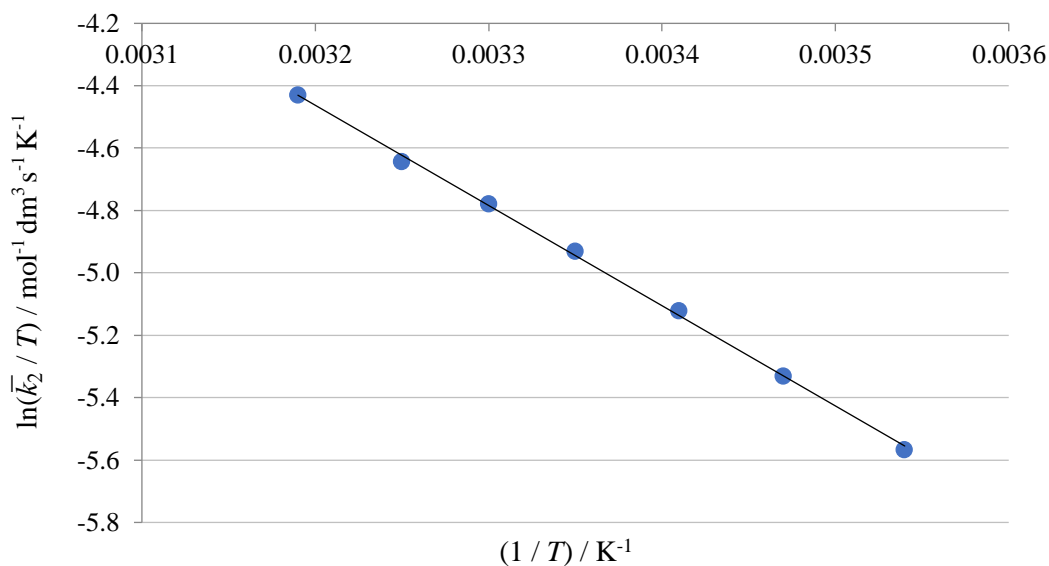
Slika 4.3.1. Arrheniusov prikaz ovisnosti $\ln k_2$ o $1/T$ za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Reakcijska se smjesa sastoji od $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$ katehina, $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$ DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). $R^2 = 0,9849$. Podatci iz Tablice 4.3.1.



Slika 4.3.2. Arrheniusov prikaz ovisnosti $\ln \bar{k}_2$ o $1/T$ za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Reakcijska se smjesa sastoji od $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$ katehina, $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$ DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). $R^2 = 0,9992$. Podatci iz Tablice 4.3.1.



Slika 4.3.3. Eyringov prikaz ovisnosti $\ln(k_2 / T)$ o $1 / T$ za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Reakcijska se smjesa sastoji od 0,003 mol dm^{-3} katehina, 0,00005 mol dm^{-3} DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). $R^2 = 0,9819$. Podatci iz Tablice 4.3.1.



Slika 4.3.4. Eyringov prikaz ovisnosti $\ln(\bar{k}_2 / T)$ o $1 / T$ za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Reakcijska se smjesa sastoji od 0,003 mol dm^{-3} katehina, 0,00005 mol dm^{-3} DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). $R^2 = 0,9989$. Podatci iz Tablice 4.3.1.

Tablica 4.3.2. Arrheniusovi aktivacijski parametri za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), dobiveni iz ovisnosti sa Slike 4.3.1.

| $a / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ K}$ | $b / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $A / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $E_a / \text{kJ mol}^{-1}$ |
|---|---|---|----------------------------|
| -3471,3 | 12,39 | $2,39 \cdot 10^5$ | 28,9 |

Oznaka a predstavlja nagib, b predstavlja odsječak pravca ovisnosti $\ln k_2$ o $1/T$.

Tablica 4.3.3. Eyringovi aktivacijski parametri za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), dobiveni iz ovisnosti sa Slike 4.3.3.

| $a / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ | $b / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-1}$ | $\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$ | $\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ | $\Delta G^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$ |
|---|--|--|--|--|
| -3174,1 | 5,69 | 26,39 | -150,2 | 71,18 |

Oznaka a predstavlja nagib, b predstavlja odsječak pravca ovisnosti $\ln(k_2/T)$ o $1/T$.

Ispitana je ovisnost konstante brzine reakcije katehina i DPPH• o temperaturi u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Mjerenja konstanti brzine reakcije (k_{obs}) provedena su u rasponu temperatura od 9 do 40 °C (9, 15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C) pri koncentraciji katehina $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$ te koncentraciji DPPH• $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$. Konstante brzine reakcije (k_2) pri određenoj temperaturi određene su prema jednadžbi: $k_2 = k_{\text{obs}} / c(\text{katehin})$. Koristeći izmjerene konstante brzine (k_2) prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi. Iz nagiba i odsječka pravca određeni su aktivacijski parametri za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v).

Na temelju Arrheniusove jednadžbe: $\ln k = \ln A - E_a / (R \cdot T)$ određeni su Arrheniusovi aktivacijski parametri. Energija aktivacije (E_a) određena je iz nagiba pravca prema jednadžbi: $E_a = -a \cdot R$ (iz $a = -E_a / R$) te predeksponencijalni faktor (A) iz odsječka $b = \ln A$ te iznose redom $28,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $2,39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Dobivene vrijednosti u skladu su s prethodnim

istraživanjima reakcija fenola s DPPH•, gdje su vrijednosti A za fenole (27 fenola s različitim supstituentima) iznosile $1,3 - 19 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, te su vrijednosti E_a iznosile $8,368 - 41,84 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Foti i sur., 2008). Niske vrijednosti predeksponencijalnog faktora (A) pripisane su steričkim učincima orto-H atoma na fenolnim prstenovima i orto-NO₂ skupina pikrilnog prstena koji sterički štite atom dušika u DPPH•, čime se smanjuje reaktivnost radikala (uobičajene vrijednosti predeksponencijalnog faktora (A) za reakcije prijelaza atoma vodika (HAT reakcije) iznose oko $10^{8,5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) (Foti i sur., 2008).

Iz Eyringove jednadžbe: $\ln(k / T) = \ln(k_B / h) + \Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / R \cdot 1 / T$ određeni su Eyringovi aktivacijski parametri. Aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger), aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) određeni su iz nagiba pravca $a = -\Delta H^\ddagger / R$ i odsječka pravca $b = \ln(k_B / h) + \Delta S^\ddagger / R$, te iznose redom $26,39 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $-150,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Gibbsova aktivacijska energija (ΔG^\ddagger) određena je prema jednadžbi: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ te iznosi $71,18 \text{ kJ mol}^{-1}$.

4.4. Kinetički izotopni efekt reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v)

Tablica 4.4.1. Izmjerene konstante brzine ($k_{\text{obs(D)}}$) i izračunate konstante brzine (k_{D}) za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v), pri temperaturi 25°C.

| $k_{\text{obs(D)}}^{(a)} \cdot 10^{-3} / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{D}}^{(b)} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | SD / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | RSD / % |
|---|--|---|--|---------|
| 1,90 | 0,635 | 0,587 | 0,05 | 8,0 |
| 1,62 | 0,541 | | | |
| 1,76 | 0,586 | | | |

^(a) Reakcijska se smjesa sastoji od 0,003 mol dm⁻³ katehina, 0,00005 mol dm⁻³ DPPH• u smjesi otapala dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v)

^(b) Konstanta brzine izračunata je iz jednadžbe: $k_{\text{D}} = k_{\text{obs(D)}} / c(\text{katehin})$

Tablica 4.4.2. Konstante brzine (k_{H} i k_{D}) i kinetički izotopni efekt reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v), pri temperaturi 25°C.

| DIOKSAN-H ₂ O | | DIOKSAN-D ₂ O | | KIE |
|--|---|--|---|------|
| $k_{\text{H}}^{(a)} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{H}}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{D}}^{(b)} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | $\overline{k_{\text{D}}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ | |
| 2,18 | 2,15 (0,04) | 0,635 | 0,587 (0,05) | 3,67 |
| 2,17 | | 0,541 | | |
| 2,11 | | 0,586 | | |

^a Podatci iz Tablice 4.3.1., $k_{\text{H}} = k_2$ pri temperaturi 25°C

^b Podatci iz Tablice 4.4.1.

Izmjerene su konstante brzine reakcije $k_{\text{obs(H)}}$ i $k_{\text{obs(D)}}$ za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) i dioksan-teška voda (0,95:0,05 v/v) pri koncentraciji katehina $0,003 \text{ mol dm}^{-3}$, koncentraciji DPPH• $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$, te pri temperaturi 25°C . Izračunate su konstante brzine reakcije k_{H} i k_{D} prema jednadžbi: $k = k_{\text{obs}} / c(\text{katehin})$. Na temelju dobivenih rezultata izračunat je kinetički izotopni efekt (KIE) prema jednadžbi $\text{KIE} = k_{\text{H}} / k_{\text{D}}$, koji iznosi 3,67. Dobivena vrijednost kinetičkog izotopnog efekta ne odstupa mnogo od prethodnih istraživanja, gdje vrijednost KIE za reakcije fenolnih spojeva (6 fenola s različitim supstituentima) u cikloheksanu iznosi 1.3 – 3.3 (Foti i sur., 2008). Istraživanje je pokazalo da tijekom reakcije fenola i DPPH• nastaje produktu-slično prijelazno stanje (PCET mehanizam), gdje se stvara vodikova veza između OH skupine fenola i slobodnog para na DPPH• radikalu.

Izmjereni KIE upućuje na reakcijski mehanizam u kojemu u sporomu reakcijskom stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza protona te na reakcijski mehanizam u kojemu u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijelaza vjerojatno i elektrona i protona, što odgovara reakcijskom mehanizmu HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*).

5. ZAKLJUČAK

U ovom je diplomskom radu provedeno i prikazano istraživanje kinetike i mehanizma reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te u acetonitrilu. Određeni su Arrheniusovi aktivacijski parametri (energija aktivacije (E_a) i predeksponencijalni faktor (A)) te Eyringovi aktivacijski parametri (Gibbsova aktivacijska energija (ΔG^\ddagger), aktivacijska entropija (ΔS^\ddagger) te aktivacijska entalpija (ΔH^\ddagger)) u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v). Određen je i kinetički izotopni efekt u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri temperaturi 25°C.

- Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) koja iznosi $2,27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, pri temperaturi 25°C.
- Određena je konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu koja iznosi $12,8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, pri temperaturi 25°C. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u acetonitrilu veća je 6 puta od konstante brzine u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v).
- Izmjerene su konstante brzine za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) na različitim temperaturama od 9 – 40°C. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi iz kojih su određeni aktivacijski parametri. Utvrđene vrijednosti Arrheniusovih aktivacijskih parametara su: $A = 2,39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $E_a = 28,9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Utvrđene vrijednosti Eyringovih aktivacijskih parametara su: $\Delta H^\ddagger = 26,39 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = 150,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 71,18 \text{ kJ mol}^{-1}$.
- Određen je kinetički izotopni efekt u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri temperaturi 25°C, koji iznosi 3,67. Izmjereni KIE upućuje na reakcijski mehanizam HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*).

6. LITERATURA

- Anslyn EV, Dougherty DA. Experiments Related to Thermodynamics and Kinetics. U: Modern Physical Organic Chemistry. Anslyn EV, Dougherty DA, urednici, Sausalito, California, University Science Books, 2006, str. 421-424.
- Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry. 8. izdanje. Oxford, Oxford University Press, 2006, str. 431-433.
- Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry. 9. izdanje. Oxford, Oxford University Press, 2010, str. 782-795; 799-802.
- Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 2018, 23(4):965, 1-11.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *Lebensm Wiss Technol – J Food Sci Technol*, 1997, 30, 609-615.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss Technol – J Food Sci Technol*, 1995, 28, 25-30.
- Dias TR, Tomás G, Teixeira NF, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. White Tea (*Camellia sinensis* (L.)): Antioxidant Properties and Beneficial Health Effects. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 2013, 2(2), 19-26.
- Espenson, JH. Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms. New York, McGraw-Hill, 1981, str. 116-120.
- Eyring equation, Peter Keusch, University of Regensburg, 2020., http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Ecuacion_Eyring_7482.pdf, pristupljeno 07.07.2021.

- Foti MC, Daquino C, Mackie ID, DiLabio GA, Ingold KU. Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism. *J Org Chem*, 2008, 73(23), 9270-9282.
- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *J Nutr*, 2003, 133(10), 3275S–3284S.
- Gupta D. Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review. *Int J Pharm Sci Res*, 2015, 6, 546-566.
- Ingold KU, Pratt DA. Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry in the 21st Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective. *Chem Rev*, 2014, 114(18), 9022-9046.
- Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(4), 412-422.
- Musialik M, Kuzmicz R, Pawłowski TS, Litwinienko G. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem*, 2009, 74(7), 2699-2709.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, 63(7), 1035-1042.
- Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem Anal Biochem*, 2011, 1, 1-10.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 2011, 82(4), 513-523.
- Sawai Y, Moon JH. NMR Analytical Approach to Clarify the Molecular Mechanisms of the Antioxidative and Radical-Scavenging Activities of Antioxidants in Tea Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(12), 6247-6253.

- Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 2015, 18, 757-781.
- Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015, 1-13.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Katehin je flavonoid najviše prisutan u zelenom čaju koji se ističe po antioksidativnom učinku te štiti organizam od štetnih utjecaja oksidativnog stresa. Neki od mehanizama antioksidativnih učinaka katehina su: hvatanje slobodnih radikala, keliranje metalnih iona uključenih u proces nastajanja slobodnih radikala, induciranje antioksidativnih enzima, inhibicija pro-oksidativnih enzima, utjecaj na signalne puteve. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika i mehanizam reakcije katehina i DPPH• radikala radi boljeg razumijevanja reakcijskog mehanizma te općenito reakcija katehina i štetnih radikala. Istraživanje kinetike i mehanizma reakcije katehina i DPPH• provedeno je u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te u acetonitrilu. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) iznosi $2,27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te je konstanta brzine reakcije u acetonitrilu 6 puta veća od konstante brzine u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) i iznosi $12,8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, pri temperaturi 25°C . Izmjerene su konstante brzine za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) na različitim temperaturama od $9 - 40^\circ\text{C}$. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi iz kojih su određeni aktivacijski parametri. Utvrđene vrijednosti Arrheniusovih aktivacijskih parametara – predeksponencijalnog faktora (A) i energije aktivacije (E_a) su: $A = 2,39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $E_a = 28,9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Utvrđene vrijednosti Eyringovih aktivacijskih parametara – aktivacijske entalpije (ΔH^\ddagger), aktivacijske entropije (ΔS^\ddagger) i Gibbsove aktivacijske energije (ΔG^\ddagger) su: $\Delta H^\ddagger = 26,39 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = 150,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 71,18 \text{ kJ mol}^{-1}$. Određen je kinetički izotopni efekt (KIE) u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri temperaturi 25°C , koji iznosi 3,67. Izmjereni KIE upućuje na reakcijski mehanizam HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*).

7.2. Summary

Catechin is the flavonoid most present in green tea, which stands out for its antioxidant effect and protects the body from the harmful effects of oxidative stress. Some of the mechanisms of antioxidant effects of catechin include: capturing free radicals, chelation of metal ions involved in the process of free radical formation, induction of antioxidant enzymes, inhibition of pro-oxidative enzymes, influence on signaling pathways. In this thesis, the kinetics and mechanism of catechin and DPPH• radical reaction are examined in order to better understand the reaction mechanism and the reactions of catechin and harmful radicals in general. Research of the kinetics and mechanism of catechin and DPPH• reaction was performed in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) and in acetonitrile. The determined rate constant for the catechin and DPPH• reaction in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) is $2.27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ and the reaction rate constant in acetonitrile is 6 times higher than the rate constant in the solvent mixture dioxane-water (0.95:0.05 v/v), which is $12.8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, at a temperature of 25°C . Rate constants for the catechin and DPPH• reaction in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) at different temperatures ranging from 9 to 40°C were measured. Based on the obtained results, the Arrhenius and Eyring plots of the rate constants against temperatures are presented, from which the activation parameters were determined. The determined values of Arrhenius activation parameters – pre-exponential factor (A) and activation energy (E_a) are: $A = 2.39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 28.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. The determined values of Eyring activation parameters – enthalpy of activation (ΔH^\ddagger), entropy of activation (ΔS^\ddagger) i Gibbs energy of activation (ΔG^\ddagger) are: $\Delta H^\ddagger = 26.39 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = 150.2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $\Delta G^\ddagger = 71.18 \text{ kJ mol}^{-1}$. The kinetic isotope effect (KIE) was determined in a mixture of solvent dioxane-water (0.95:0.05 v/v) at a temperature of 25°C , which is 3.67. The measured KIE refers to the reaction mechanism HAT (hydrogen atom transfer) or PCET (proton electron transfer).

8. PRILOZI

8.1. KRATICE

AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid, engl. *2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), engl. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)*

BHA – butilhidroksianisol, engl. *Butylhydroxyanisole*

BHT – butilhidroksitoluen, engl. *Butylhydroxytoluene*

CAT – katalaza, engl. *Catalase*

COX – ciklooksigenaza, engl. *Cyclooxygenase*

CUPRAC – antioksidativna moć redukcije bakra, engl. *Cupric reducing antioxidant power*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *Deoxyribonucleic acid*

DPPH – 1,1-difenil-2 pikril-hidrazil, engl. *2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

ET – prijenos elektrona, engl. *Electron transfer*

FRAP – antioksidativna moć redukcije željeza, engl. *Ferric reducing antioxidant power*

GC – plinska kromatografija, engl. *Gas chromatography*

GPx – glutation peroksidaza, engl. *Glutathione peroxidase*

HAT – prijenos atoma vodika, engl. *Hydrogen atom transfer*

HORAC – sposobnost hvatanja hidroksilnog radikala, engl. *Hydroxyl radical averting capacity*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High Performance Liquid Chromatography*

iNOS – inducibilna dušik (II) oksid sintaza, engl. *Inducible nitric oxide synthase*

KIE – kinetički izotopni efekt, engl. *Kinetic isotope effect*

NFκB – nuklearni faktor kappa B, engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

ORAC – sposobnost hvatanja radikala kisika, engl. *Oxygen radical absorption capacity*

PCET – protonom spregnuti prijelaz elektrona, engl. *Proton-coupled electron transfer*

PFRAP – moć reduciranja kalijevog fericijanida, engl. *Potassium ferricyanide reducing power*

PG – propil galat, engl. *Propyl gallate*

RNS – reaktivne dušikove vrste, engl. *Reactive nitrogen species*

ROS – reaktivne kisikove vrste, engl. *Reactive oxygen species*

SOD – superoksid dismutaza, engl. *Superoxide dismutase*

SPLET – uzastopni prijenos protona i elektrona, engl. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*

TBHQ – tert-butilhidrokinon, engl. *Tert-Butylhydroquinone*

TNF – tumor nekrozni faktor alfa, engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*

TRAP – antioksidativni parametar ukupnog hvatanja peroksilnog radikala, engl. *Total peroxy radical trapping antioxidant parameter*

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC
DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za fizikalnu kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KINETIKA I MEHANIZAM REAKCIJE KATEHINA I DPPH

Ivana Dropulja

SAŽETAK

Katehin je flavonoid najviše prisutan u zelenom čaju koji se ističe po antioksidativnom učinku te štiti organizam od štetnih utjecaja oksidativnog stresa. Neki od mehanizama antioksidativnih učinaka katehina su: hvatanje slobodnih radikala, keliranje metalnih iona uključenih u proces nastajanja slobodnih radikala, induciranje antioksidativnih enzima, inhibicija pro-oksidativnih enzima, utjecaj na signalne puteve. U ovom je diplomskom radu ispitana kinetika i mehanizam reakcije katehina i DPPH• radikala radi boljeg razumijevanja reakcijskog mehanizma te općenito reakcija katehina i štetnih radikala. Istraživanje kinetike i mehanizma reakcije katehina i DPPH• provedeno je u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te u acetonitrilu. Konstanta brzine reakcije katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) iznosi $2,27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ te je konstanta brzine reakcije u acetonitrilu 6 puta veća od konstante brzine u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) te iznosi $12,8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, pri temperaturi 25°C . Izmjerene su konstante brzine za reakciju katehina i DPPH• u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) na različitim temperaturama od $9 - 40^\circ\text{C}$. Na temelju dobivenih rezultata prikazane su Arrheniusove i Eyringove ovisnosti konstante brzine o temperaturi iz kojih su određeni aktivacijski parametri. Utvrđene vrijednosti Arrheniusovih aktivacijskih parametara – predeksponencijalnog faktora (A) i energije aktivacije (E_a) su: $A = 2,39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $E_a = 28,9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Utvrđene vrijednosti Eyringovih aktivacijskih parametara – aktivacijske entalpije (ΔH^\ddagger), aktivacijske entropije (ΔS^\ddagger) i Gibbsove aktivacijske energije (ΔG^\ddagger) su: $\Delta H^\ddagger = 26,39 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = 150,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger = 71,18 \text{ kJ mol}^{-1}$. Određen je kinetički izotopni efekt (KIE) u smjesi otapala dioksan-voda (0,95:0,05 v/v) pri temperaturi 25°C , koji iznosi 3,67. Izmjereni KIE upućuje na reakcijski mehanizam HAT (*hydrogen atom transfer*) ili PCET (*proton-coupled electron transfer*).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

- Rad sadrži: 47 stranica, 17 grafičkih prikaza, 12 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: Antioksidans, antioksidativna aktivnost, DPPH, katehin, konstanta brzine reakcije, Arrheniusovi i Eyringovi aktivacijski parametri, kinetički izotopni efekt
- Mentor: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Viktor Pilepić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Miranda Sertić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Physical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Kinetics and mechanism of catechin and DPPH reaction

Ivana Dropulja

SUMMARY

Catechin is the flavonoid most present in green tea, which stands out for its antioxidant effect and protects the body from the harmful effects of oxidative stress. Some of the mechanisms of antioxidant effects of catechin include: capturing free radicals, chelation of metal ions involved in the process of free radical formation, induction of antioxidant enzymes, inhibition of pro-oxidative enzymes, influence on signaling pathways. In this thesis, the kinetics and mechanism of catechin and DPPH• radical reaction are examined in order to better understand the reaction mechanism and the reactions of catechin and harmful radicals in general. Research of the kinetics and mechanism of catechin and DPPH• reaction was performed in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) and in acetonitrile. The determined rate constant for the catechin and DPPH• reaction in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) is $2.27 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ and the reaction rate constant in acetonitrile is 6 times higher than the rate constant in the solvent mixture dioxane-water (0.95:0.05 v/v), which is $12.8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, at a temperature of 25°C. Rate constants for the catechin and DPPH• reaction in a solvent mixture of dioxane-water (0.95:0.05 v/v) at different temperatures ranging from 9 to 40 °C were measured. Based on the obtained results, the Arrhenius and Eyring plots of the rate constants against temperatures are presented, from which the activation parameters were determined. The determined values of Arrhenius activation parameters – pre-exponential factor (A) and activation energy (E_a) are: $A = 2.39 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 28.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. The determined values of Eyring activation parameters – enthalpy of activation (ΔH^\ddagger), entropy of activation (ΔS^\ddagger) i Gibbs energy of activation (ΔG^\ddagger) are: $\Delta H^\ddagger = 26.39 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = 150.2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $\Delta G^\ddagger = 71.18 \text{ kJ mol}^{-1}$. The kinetic isotope effect (KIE) was determined in a mixture of solvent dioxane-water (0.95:0.05 v/v) at a temperature of 25°C, which is 3.67. The measured KIE refers to the reaction mechanism HAT (hydrogen atom transfer) or PCET (proton electron transfer).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 47 pages, 17 figures, 12 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Antioxidant, antioxidant activity, DPPH, catechin, rate constant, activation parameters, kinetic isotope effect

Mentor: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Viktor Pilepić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021.