

# Kinetički izotopni efekt u reakciji dopamina i DPPH radikala u kiselom mediju

---

Košir, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:759582>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

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



Luka Košir

**Kinetički izotopni efekt u reakciji dopamina i  
DPPH radikala u kiselom mediju**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ane Karković Marković.

## Zahvala

*Mentorici, docentici Ani Karković Marković, na prenesenom znanju, ukazanoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Mojim roditeljima, bratu, bakama i djedu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom studiranja, slušanju o količini gradiva i proživljavanju svakog ispita sa mnom te svim riječima ohrabrenja.*

*Kolegama i prijateljima na druženjima, kavama, proslavama položenih ispita, motivaciji tijekom ispitnih rokova i svim lijepim uspomnama. Hvala što ste mi uljepšali studentske dane!*

*Hrvatskoj školskoj zakladi i obitelji Avdalović na ukazanom povjerenju i financijskoj potpori tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. DOPAMIN .....	1
1.1.1. Kemijska struktura.....	1
1.1.2. Metabolizam .....	2
1.1.3. Dopaminski receptori .....	3
1.1.4. Dopaminski sustav i funkcija .....	4
1.1.5. Poremećaji dopaminskog sustava.....	4
1.2. SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST .....	5
1.2.1. DPPH test .....	7
1.3. MEHANIZMI REAKCIJE RADIKALA I ANTIOKSIDANSA .....	8
1.4. KEMIJSKA KINETIKA .....	10
1.4.1. Brzina kemijske reakcije .....	10
1.4.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije.....	11
1.4.2.1. <i>Reakcije nultog reda</i> .....	12
1.4.2.2. <i>Reakcije prvog reda</i> .....	13
1.4.2.3. <i>Reakcije drugog reda</i> .....	13
1.4.3. Kinetički izotopni efekt .....	14
1.5. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA, BEER-LAMBERTOV ZAKON .....	18
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
3.1. MATERIJALI .....	21
3.1.1. Kemikalije .....	21
3.1.2. Instrumenti i laboratorijski pribor .....	21
3.2. METODE .....	22
3.2.1. Određivanje UV-VIS spektara dopamina u vodi pri različitim pH.....	22
3.2.2. Određivanje UV-VIS spektra DPPH <sup>•</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan i H <sub>2</sub> O .....	22
3.2.3. Određivanje konstante brzine reakcije DPPH <sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan i H <sub>2</sub> O .....	23
3.2.4. Određivanje konstante brzine reakcije DPPH <sup>•</sup> u smjesi 1,4-dioksan i D <sub>2</sub> O u svrhu određivanja KIE.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	25
4.1. REAKCIJA DOPAMINA I DPPH <sup>•</sup> RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-H <sub>2</sub> O (0,95-0,05 v/v) I 1,4-DIOKSAN-D <sub>2</sub> O (0,95-0,05 v/v) .....	29

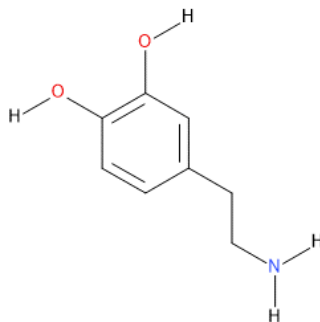
4.2. REAKCIJA DOPAMINA I DPPH• RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-H <sub>2</sub> O (0,75:0,25 v/v) I 1,4-DIOKSAN-D <sub>2</sub> O (0,75-0,25 v/v).....	32
4.3. KINETIČKI IZOTOPNI EFEKT U REAKCIJI DOPAMINA I DPPH• RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-VODA (0,75-0,25 v/v) .....	38
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	40
<b>6. POPIS OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	42
<b>7. LITERATURA</b> .....	44
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	51
8.1. SAŽETAK.....	51
8.2. SUMMARY .....	52

# 1. UVOD

## 1.1. DOPAMIN

### 1.1.1. Kemijska struktura

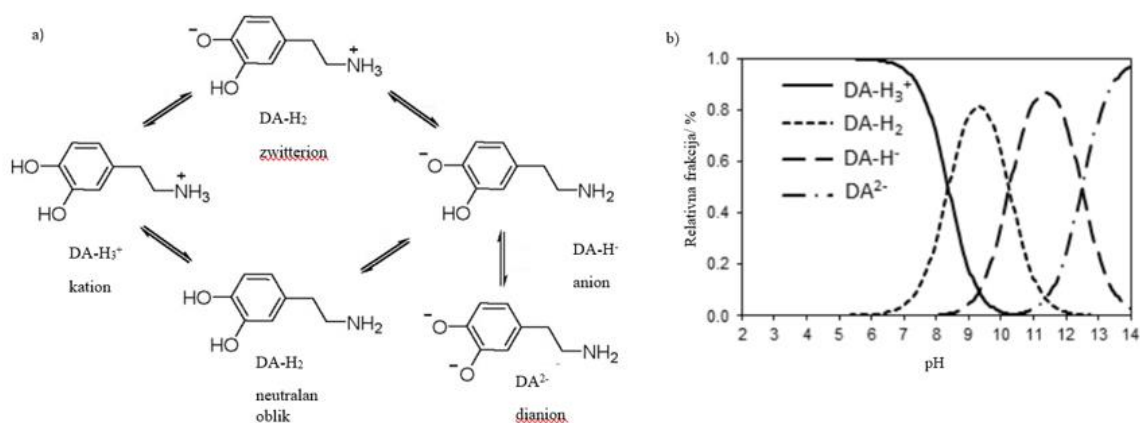
Dopamin, uz adrenalin i noradrenalin, pripada kateholaminima – aromatskim aminima građenim od benzenskog prstena supstituiranog s dvije hidroksilne skupine na položaju 1 i 2 te etilnim lancem na položaju 4 na kojeg je, na  $\beta$ -C atomu, vezana amino-skupina. Strukture se međusobno razlikuju prema supstuentima na etilnom lancu – adrenalin i noradrenalin sadrže dodatnu hidroksilnu skupinu na  $\alpha$ -C atomu etilnog lanca, a razlikuju se po supstuentu na amino-skupini (adrenalin sadrži metilnu skupinu, noradrenalin vodik). Dopamin nema hidroksilne skupine na  $\alpha$ -C atomu etilnog lanca te nema supstituiranu amino-skupinu metilnom (Čvorišćec i sur., 2009.).



**Slika 1.1.1.** Struktura dopamina

Budući da u svojoj strukturi sadrži amino-skupinu i dvije hidroksilne skupine, dopamin je amfoterna molekula. Amfoterne molekule mogu postojati u 4 osnovne forme: kationskoj, anionskoj ili u oblicima s neto nabojem 0 (neutralnom obliku ili zwitterionu) (Nagy i Takacs-Novak, 1997.). Jodko-Piorecka i sur. (2022.) eksperimentalno su odredili konstante disocijacije kiseline koje za dopamin u uvjetima metanol-voda (1:1 v/v) iznose  $pK_{a1} = 8,37$ ,  $pK_{a2} = 10,25$  i  $pK_{a3} = 12,49$ . Na temelju usporedbe s modelnim spojevima, kateholima i aminima,  $pK_{a1}$  i  $pK_{a3}$  pripisali su deprotonaciji fenolnih skupina, dok su  $pK_{a2}$  pripisali deprotonaciji alkilamonijevog kationa. Na temelju ove pretpostavke dopamin disocijacijom fenolne skupine prelazi iz kationskog oblika ( $DA-H_3^+$ ) u zwitterion ( $DA-H_2$ ), a zatim deprotonacijom amino i fenolne skupine u anionski ( $DA-H^-$ ) i dianionski oblik ( $DA^{2-}$ ) (Slika 1.1.2.). Ipak,  $pK_a$  vrijednosti kateholne skupine i amino-skupine preblizu su kako bi se donio točan zaključak o redosljedu disocijacije te postoje istraživanja koja predlažu alternativnu hipotezu u kojoj je alkilamonijev

kation kiseline i stoga prvi disocira (Rajan i sur., 1971.). Na temelju ove pretpostavke dopamin iz kationskog oblika ( $\text{DA-H}_3^+$ ) prelazi u neutralan oblik ( $\text{DA-H}_2$ ), a zatim deprotonacijom fenolnih skupina postaje anion ( $\text{DA-H}^-$ ), odnosno dianion ( $\text{DA}^{2-}$ ) (Slika 1.1.2.). Kiss i Gergely (1979.) predložili su da  $\text{p}K_{a1}$  i  $\text{p}K_{a2}$  ne mogu biti pripisane isključivo deprotonaciji fenolne ili amino skupine nego predstavljaju superpoziciju ta dva procesa – dolazi do parcijalnog preklapanja deprotonacije na te dvije skupine te se odvijaju oba procesa. Ukupni naboj dopamina ima veliku ulogu u interakciji s dopaminskim receptorima (Berfield i sur., 1999.). U kinetičkim studijama, najvažnija je ionizacija kateholne skupine, koja ima ključnu ulogu u redoks svojstvima kateholamina i mehanizmu kojim će se odvijati reakcija s  $\text{DPPH}^\bullet$  radikalom (HAT ili ET mehanizam) (Jodko-Piorecka i sur, 2022.).



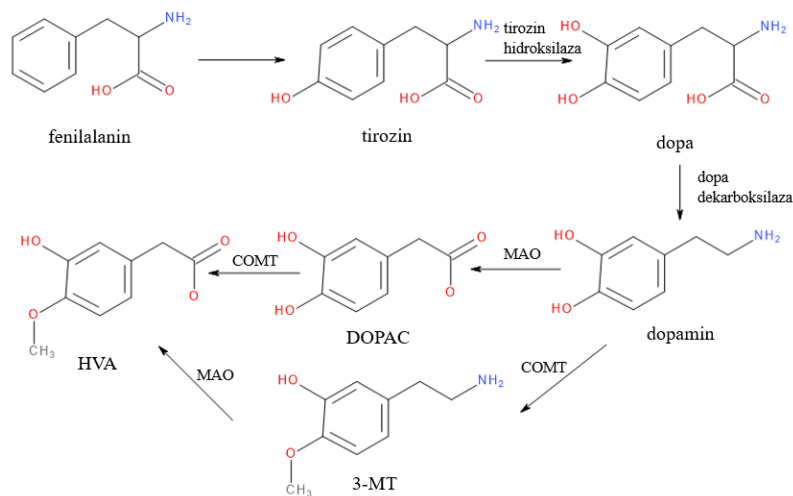
**Slika 1.1.2.** Reakcija deprotonacije dopamina (a) i disocijacijski dijagram dopamina pod pretpostavkom da  $\text{p}K_{a1}$  odgovara deprotonaciji fenolne skupine (kako su pretpostavili Jodko-Piorecka i sur., 2022.) (b). Preuzeto i prilagođeno prema (Jodko-Piorecka i sur., 2022.).

### 1.1.2. Metabolizam

Sinteza dopamina može početi od fenilalanina iz kojeg hidroksilacijom nastaje tirozin. Daljnjom hidroksilacijom tirozina uz enzim tirozin hidroksilazu nastaje 3,4-dihidroksifenilalanin (dopa). Na dopu dalje djeluje dekarboksilaza aromatskih kiselina (ili dopa dekarboksilaza) koja katalizira pretvorbu dope u dopamin (Bach-Rojecky, 1998.). Dopamin, kao takav, ne može prijeći krvno-moždanu barijeru te sav dopamin u središnjem živčanom sustavu (SŽS) potječe iz dopaminergičkih neurona koji ga sintetiziraju iz tirozina unesenog iz krvotoka visoko- i nisko-afinitetnim transporterima aminokiselina (Mladinov, 2016.; Elsworth i Roth, 1997.).

Nakon sinteze u dopaminergičkim neuronima, dopamin se iz citoplazme prenosi u specijalizirane skladišne vezikule vezikularnim monoaminskim transporterom (VMAT). Djelovanjem akcijskog potencijala na stanicu dolazi do promjene konformacije membranskih proteina, ulaska kalcijevih iona u stanicu, fuzije vezikula s membranom neurona i otpuštanja dopamina u sinapsu (Elsworth i Roth, 1997.). Dopamin se inaktivira uklonjenjem iz sinaptičke pukotine preko presinaptičkog dopaminskog transportera te se ponovno skladišti u vezikule ili se razgrađuje enzimima (German i sur., 2015.; Nirenberg i sur., 1996.).

Dopamin se razgrađuje katechol-O-metiltransferazom (COMT) i monoaminoooksidazom (MAO). Zastupljenost i aktivnost enzima ovisi o vrsti stanice ili lokaciji u organizmu što određuje koncentraciju pojedinog metabolita (Elsworth i Roth, 1997.). Djelovanjem COMT na dopamin nastaje 3-metoksitiramin (3-MT). Dalje, djelovanjem MAO na 3-MT nastaje krajnji produkt metabolizma dopamina – homovanilinska kiselina (HVA). Ako najprije djeluje MAO, iz dopamina nastaje 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina (DOPAC), a daljnjim djelovanjem COMT krajnji produkt metabolizma dopamina je također HVA (Čvorišćec i sur., 2009.).



**Slika 1.1.3.** Biosinteza i metabolizam dopamina

### 1.1.3. Dopaminski receptori

Fiziološki učinci dopamina posredovani su specifičnim receptorima. Dopamin djeluje preko svojih pet tipova receptora – D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub>. Dopaminski receptori pripadaju skupini receptora spregnutih s G-proteinom (GPCR, engl. *G Protein Coupled Receptors*). Prema podudarnosti i učinku tih 5 tipova receptora, dijele se u dvije podskupine. Prvoj podskupini D<sub>1</sub> pripadaju tipovi D<sub>1</sub> i D<sub>5</sub> koji su pretežno ekscitatorni i nalaze se na postsinapsi, a podskupini D<sub>2</sub> pripadaju tipovi D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>4</sub> koji su pretežno inhibitorni te su smješteni i na presinapsi i postsinapsi (German i sur., 2015.).



#### 1.1.4. Dopaminski sustav i funkcija

Dopaminski sustav čine dopamin zajedno sa svojim prekursorskim molekulama, enzimima koji sudjeluju u njegovoj sintezi i metabolizmu, membranskim prenositeljima i specifičnim receptorima. Taj se sustav, anatomski i funkcionalno, dijeli na dopaminski sustav unutar SŽS i dopaminski sustav u perifernom dijelu organizma (Ćuk i sur., 2004.).

U mozgu dopamin koji potječe iz nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona ima značajnu ulogu u kontroli motorne funkcije i učenju novih motornih vještina. Dopamin iz mezolimbickog sustava odgovoran je za ponašanje temeljeno na emocijama, uključujući motivaciju i nagradu, oslobađa se tijekom ugodnih situacija i potiče čovjeka na traženje aktivnosti koja stvara ugodu. Dopamin iz mezokortikalnog sustava ima ulogu u poboljšanju memorije i pažnje. U hipotalamusu su prisutne tuberoinfundibularne dopaminergičke neurosekrecijske stanice koje izlučuju dopamin u portalnu cirkulaciju koji ima neurohormonsku funkciju - koči lučenje prolaktina i stimulira lučenje hormona rasta (Ayano, 2016.; Bach-Rojecky, 1998.).

Dopamin može djelovati i kao hormon u perifernim tkivima – bubregu, gušterači, plućima i krvnim žilama (Drozak i Bryla, 2005.). Periferni učinci dopamina objasnit će se na primjeru bubrega. Dopamin se u bubregu sintetizira u epitelnim stanicama proksimalnih tubula te djeluje na svoje receptore u bubrežnom tkivu. Bubrežni dopamin sudjeluje u održavanju homeostaze soli i krvnog tlaka regulirajući izlučivanje soli i vode. Dopamin djeluje kao natrijuretski hormon tako da koči aktivnost natrijskih prenositelja u nefronu ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -izmjenjivač). Također, djelovanjem na  $\text{D}_1$  i  $\text{D}_5$  receptore na glatkim mišićnim stanicama bubrežnih arterija i arteriola, dopamin potiče njihovu vazodilataciju i time se povećava bubrežni protok krvi, minutna glomerularna filtracija i stvaranje mokraće. Na taj način dopamin djeluje kao protektivni čimbenik u patogenezi hipertenzije (Ćuk i sur., 2004.).

#### 1.1.5. Poremećaji dopaminskog sustava

Poremećaji dopaminskog sustava imaju ulogu u patofiziologiji raznih bolesti: Parkinsonove bolesti, shizofrenije, razvoju ovisnosti, poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje u djece (ADHD, engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*), Gilles de la Touretteovom sindromu, sindromu nemirnih nogu... Poremećaj u perifernom dopaminergičkom sustavu povezan je s nastankom esencijalne hipertenzije, jednog od vodećih uzroka smrti (Bach-Rojecky, 1998.).

U Parkinsonovoj bolesti dolazi do smanjenja koncentracije dopamina zbog odumiranja dopaminergičkih neurona čija se tijela nalaze u substanciji nigri, a zahvaćeni su i

dopaminergički neuroni u limbičkim strukturama i u korteksu. Tipični simptomi su ukočenost, izrazito drhtanje ruku i nestabilnost u hodanju i stajanju, poremećaj budnosti... (Bach-Rojecky, 1998.).

Schulz i sur. (2000.) navode da oksidativni stres i nakupljanje slobodnih radikala u dopaminergičkim neuronima može biti glavni uzročnik Parkinsonove bolesti. Stvaranje slobodnih radikala povezano je s metabolizmom dopamina - katabolizmom dopamina stvara se vodikov peroksid koji ulazi u Fentonovu reakciju u kojoj reagira sa željezovim(II) ionom i stvara reaktivni hidroksilni radikal. U sintezi dopamina hidroksilacijom tirozina i stvaranjem dople potrebna je reduktivna moć, stoga i proizvodnja dopamina može dovesti do oksidativnog stresa. Kako bi se smanjila sinteza novih molekula dopamina, postoje specifični mehanizmi koji omogućuju ponovni unos i korištenje već sintetiziranog dopamina. Nadalje, dopamin, pri određenim uvjetima, može biti spontano oksidiran molekulskim kisikom te nastaju kinoni i slobodni radikali. Oksidacija dopamina može poremetiti mitohondrijsku funkciju i uzrokovati autofagiju dopaminergičkih neurona (Franco i sur., 2021.; Munoz i sur., 2012.).

Shizofrenija je kronični teži duševni poremećaj karakteriziran specifičnim psihičkim i ponašajnim simptomima. Simptomi se dijele na pozitivne i negativne. Pozitivni simptomi javljaju se zbog pojačane neuralne aktivnosti, dok su negativni povezani s odumiranjem neurona kao posljedice prekomjerne ekscitatorne neurotransmisije (Ostojić, 2012.). Pozitivni simptomi mogu uključivati poremećaje mišljenja, vjerovanja, nenormalna iskustva, halucinacije, poremećaje raspoloženja i motorike, a negativni povlačenje iz socijalnog kontakta, nezainteresiranost za okolinu, apatiju i dezorijentaciju (Waddington, 1993.). Uzroci nastanka bolesti još nisu dovoljno razjašnjeni, a spoznaje ukazuju da su u razvoju bolesti uključeni genetski i okolišni čimbenici koji utječu na rani abnormalni razvoj mozga, no poremećaj se najčešće ne može detektirati prije adolescencije ili rane odrasle dobi (Ostojić, 2012.). Iako nije primarni uzročnik shizofrenije, oksidativni stres povezan je s pogoršanjem i lošijim ishodom bolesti (Murray i sur., 2021.).

## 1.2. SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim valentnim elektronom koji su visoko nestabilni i vrlo reaktivni s drugim molekulama (Carocho i Ferreira, 2013.). Najveći broj radikala u organizmu su reaktivni spojevi kisika ili reaktivni spojevi dušika. Pojam reaktivni spojevi kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) obuhvaća radikale kisika i njegove reaktivne neradikalne vrste: superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), perhidroksilni radikal ( $HOO^{\bullet}$ ),

hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hipokloritnu kiselinu ( $\text{HClO}$ ) i druge. U reaktivne spojeve dušika (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) se ubrajaju dušikov (II) oksid ( $\cdot\text{NO}$ ), dušikov (IV) oksid ( $\cdot\text{NO}_2$ ) i peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Parčetić-Kostelac i sur., 2016.; Galano i sur., 2016.). Velika kemijska reaktivnost slobodnih radikala potječe iz potrebe za postizanjem elektronske stabilnosti reagirajući s okolnim molekulama. Tako susjedne molekule postaju nestabilne i dalje ulaze u reakcije s drugim molekulama iz okruženja što rezultira oštećenjem staničnih komponenti (Parčetić-Kostelac i sur., 2016.).

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica poremećaja ravnoteže prooksidacijskog i antioksidacijskog sustava u korist prooksidacijskog sustava (Sies, 1997.) Do pomaka ravnoteže dolazi ukoliko je smanjena antioksidacijska obrana organizma ili ako je povećano stvaranje slobodnih radikala (Wiernsperger, 2003.). U stanjima oksidativnog stresa dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida stanične membrane. Slobodni radikali modificiraju strukturu proteina tako što kidaju peptide, oksidativno modificiraju specifičnu aminokiselinu ili dovode do stvaranja kovalentne veze s produktima lipidne peroksidacije (Lobo i sur., 2010.). Slobodni radikali na deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA, engl. *Deoxyribonucleic Acid*) uzrokuju lomove lanaca, delecije, modifikacije baza, stvaranje kovalentnih veza između DNA i proteina i promjene u kromosomima (Valko, 2004.). Lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su produkti aldehidi, ketoni, ugljikovodici, epoksidi ili reaktivni radikali čije nakupljanje ima toksične učinke na stanice (Štefan i sur., 2007.).

Antioksidansi su sve tvari koje u maloj količini u kratkome vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa. Djeluju na nekoliko načina: onemogućuju stvaranje novih radikala u organizmu, uništavaju u organizmu stvorene radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala (Parčetić-Kostelac i sur., 2016.; Bradamante, 2002.). Ljudski antioksidativni sustav podijeljen je u dvije glavne skupine: enzimski i neenzimski antioksidansi. Enzimski antioksidansi mogu se podijeliti na primarnu i sekundarnu enzimsku obranu. Primarna se sastoji od enzima koji izravno djeluju na slobodne radikale: superoksid dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza. Sekundarna enzimatska obrana uključuje glutation reduktazu i glukoza-6-fosfat dehidrogenazu. Ovi enzimi ne neutraliziraju izravno slobodne radikale, nego imaju potpornu ulogu za ostale endogene antioksidanse (Carocho i Ferreira, 2013.). Neenzimske antioksidanse čine brojne molekule koje pretvaraju aktivne molekule slobodnih radikala u inaktivne oblike, neki predstavnici skupine vežu potencijalno opasne metalne ione i onemogućavaju njihovo sudjelovanje u produkciji slobodnih radikala, a mogu sudjelovati i u regeneraciji drugih antioksidansa ili kao neophodni dio mnogih enzima koji bez

njih nemaju učinak. Neki od predstavnika ove skupine antioksidansa su vitamin A, vitamin C, vitamin E, beta karoten, bilirubin, mokraćna kiselina, glutation, koenzim Q10, bakar, cink, selen, mangan i dr. (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

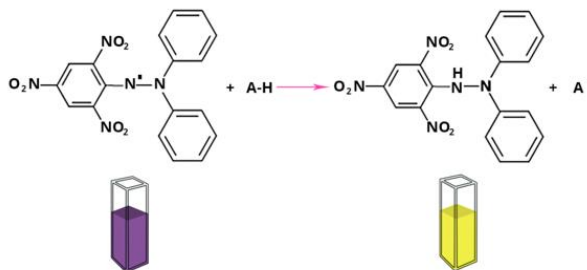
### 1.2.1. DPPH test

DPPH test se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti tvari korištenjem stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>) (Blois, 1958.).

DPPH<sup>•</sup> sadrži nespareni elektron na dušikovom atomu koji se reducira primanjem vodikovog atoma iz antioksidansa (Contreras-Guzman i Strong, 1982.). Stabilan je slobodni radikal zbog steričkih smetnji oko dušikovog atoma s nesparenim elektronom (Munteanu i Apetrei, 2021.) i delokalizacije nesparenog elektrona preko cijele molekule. Delokalizacija elektrona DPPH<sup>•</sup> daje ljubičastu boju te u otopinama etanola pokazuje maksimum apsorpcije oko 520 nm (Kedare i Singh, 2011.). DPPH<sup>•</sup> ne dimerizira i postoji kao monomer u alkoholnim otapalima (Nenadis i Tsimidou, 2002.). Upravo zbog svoje stabilnosti i intenzivnog obojenja u širokoj je primjeni (Foti, 2015.).

Zbog steričkih smetnji oko dušikovog atoma koje mu smanjuju reaktivnost, DPPH<sup>•</sup> s fenolima u pravilu reagira za 3 reda veličine sporije nego peroksil radikali (Foti i sur., 2008., Foti i Daquino, 2006.).

Kada otopina DPPH<sup>•</sup> reagira s tvari koja može donirati vodikov atom (antioksidansom), dolazi do redukcije DPPH<sup>•</sup> i gubi se ljubičasta boja koja prelazi u svijetlo žutu. Promjena intenziteta obojenja može se mjeriti UV-VIS spektrofotometrijom budući da se otopine u određenom rasponu koncentracija podvrgavaju Beer-Lambertovom zakonu (Slika 1.2.1.) (Blois, 1958.).



**Slika 1.2.1.** Reakcija DPPH<sup>•</sup> sa antioksidansom. Preuzeto sa web-stranice : [chimactiv.agroparistech.fr](http://chimactiv.agroparistech.fr)

DPPH test je brza, jednostavna, jeftina i reproducibilna metoda (Koleva i sur., 2002.) koja je u širokoj upotrebi za određivanje antioksidativnog kapaciteta čistih antioksidativnih molekula, posebno biljnih ekstrakata ili fenolnih spojeva (Foti i sur., 2004.).

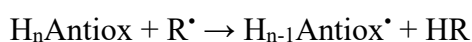
DPPH<sup>•</sup> je topljiv u organskim otapalima, ali slabo u vodi. Otapala koja se najčešće koriste i u kojima se dobro otapa su metanol i etanol ili njihove vodene smjese do određenog udjela vode. Staško i sur. (2007.) istraživali su kako povećanje udjela vode utječe na topljivost DPPH<sup>•</sup> u smjesi etanol-voda. Pri udjelima vode manjim od 60% DPPH<sup>•</sup> se dobro otapa, dok je pri većim udjelima vode, zbog smanjene topljivosti, prisutan i u čvrstoj formi i takav nije lako dostupan za reakcije s antioksidansima. Foti (2015.) je određivao reakcijski mehanizam kvercetina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala metanol-voda (0,80-0,20 v/v), dok su Jodko-Piorecka i sur. (2022.) određivali mehanizam reakcije kateholamina s DPPH<sup>•</sup> u uvjetima metanol-voda (1:1 v/v).

Ipak postoje i neki nedostaci metode. Na primjer, organska otapala mogu biti interferencija zbog apsorpcije prilikom kvantitativnih analiza (Arnao, 2000.). U prisutnosti svjetla DPPH<sup>•</sup> se fotokemijski razgrađuje. Također, molekularni kisik u prisutnosti svjetla sporo reagira s DPPH<sup>•</sup> te se njegova apsorpcija smanjuje zbog razgradnje (Ozcelik i sur., 2003.).

### 1.3. MEHANIZMI REAKCIJE RADIKALA I ANTIOKSIDANSA

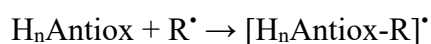
Postoji nekoliko mehanizama kojima antioksidansi mogu reagirati sa slobodnim radikalima:

**HAT** (reakcija prijelaza atoma vodika, engl. *Hydrogen Atom Transfer*) je mehanizam u kojem dolazi do zajedničkog prijenosa protona i elektrona (vodikovog atoma) u jednom koraku s molekule na radikal pri čemu proton i elektron dolaze s istog atoma, veze ili orbitale (Dimić i sur. 2017.; Galano i sur., 2016.):

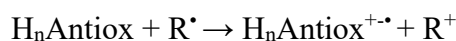
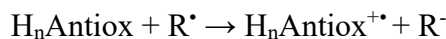


**PCET** (reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona, engl. *Proton Coupled Electron Transfer*) je mehanizam u kojem dolazi do prijelaza protona i elektrona u jednom koraku, ali oni prelaze kao dvije odvojene čestice, s različitih atoma, veze ili orbitale (Galano i sur., 2016.).

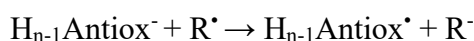
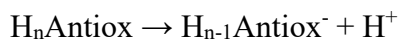
**RAF** (stvaranje adukta radikala, engl. *Radical Adduct Formation*) je mehanizam u kojem dolazi do stvaranja adukta radikala i molekule antioksidansa. Glavna strukturna značajka antioksidansa je prisutnost nezasićenih veza, elektrofilni radikali vjerojatnije su uključeni u RAF u usporedbi s neelektrofilnim radikalima (Galano i sur., 2016.):



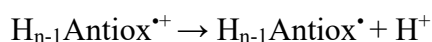
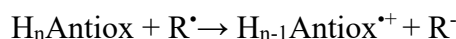
**SET** (reakcija prijenosa elektrona, engl. *Single Electron Transfer*) je mehanizam koji se može odvijati na dva načina: u prvom, prikazanom gornjom jednadžbom kemijske reakcije, dolazi do prijenosa elektrona s antioksidansa na radikal, dok se u drugom, koji je prikazan donjom jednadžbom, elektron prenosi s radikala na antioksidans (Galano i sur., 2016.; Sueishi i sur., 2011.):



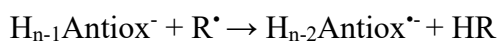
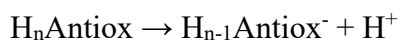
**SPLET** (reakcija stupnjevitog prijelaza protona i elektrona, engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*) je mehanizam u dva koraka: u prvom dolazi do deprotoniranja antioksidansa i nastajanja aniona, a u drugom koraku dolazi do brzog prijenosa elektrona s nastalog aniona na elektron deficijentni radikal (Galano i sur., 2016.; Musialik i sur., 2009.):



**SEPT** (reakcija stupnjevitog prijenosa elektrona i protona, engl. *Single Electron Transfer Followed by Proton Transfer*) je mehanizam u dva koraka koji uključuje prijelaz elektrona i prijelaz protona, ali u obrnutom redoslijedu u odnosu na SPLET (Galano i sur., 2016.):



**SPLHAT** (reakcija stupnjevitog prijelaza protona i prijelaza atoma vodika, engl. *Sequential Proton-Loss Hydrogen-Atom Transfer*) uključuje deprotonaciju antioksidansa, nakon koje slijedi reakcija prijenosa vodika (Galano i sur., 2016.):



Općenito, molekule koje sadrže kateholnu skupinu dobri su antioksidansi. Kateholi imaju visoku antioksidativnu aktivnost jer lako daju proton iz hidroksilne skupine, kao i zbog dodatne stabilizacije nastalih radikala intramolekulskim vodikovim vezama. Molekule koje sadrže jednu hidroksilnu skupinu vezanu na aromatski prsten imaju slabiju antioksidativnu aktivnost (Dimić i sur., 2016.).

Također, neurotransmiteri poput dopamina imaju važnu ulogu u obrani SŽS protiv slobodnih radikala. Razlozi tomu su što krvno-moždana barijera ne dozvoljava prijelaz mnogim antioksidansima (Gilgun-Sherki i sur., 2001.). Nadalje, mozak koristi više od 20% udahnutog kisika, stoga su neurotransmiteri izloženi velikim količinama ROS (Lee i sur., 2020.). U mozgu je prisutna i značajna količina nezasićenih masnih kiselina koje su visoko osjetljive na oksidaciju (Dimić i sur., 2016.).

Jodko-Piorecka i sur (2022.) istraživali su antioksidativnu aktivnost kateholamina DPPH testom u uvjetima metanol-voda (1:1 v/v) pri pH 5,5 – 7,4 za kateholamine (L-DOPA, dopamin, noradrenalin i adrenalin) te su utvrdili da dopamin ima najveću aktivnost među kateholaminima. Također, utvrdili su da HAT mehanizam prevladava u nepolarnim otapalima (npr. benzen). U polarnim otapalima koje podržavaju ionizaciju (npr. voda i kratkolančani alkoholi) i u bifazičnim voda/lipid sustavima, javljaju se kompleksniji mehanizmi, npr. SPLET.

## 1.4. KEMIJSKA KINETIKA

Kemijska kinetika je područje fizikalne kemije koje se bavi proučavanjem brzina kemijskih reakcija i mehanizama kojima se te reakcije odvijaju. Brzina reakcije opisuje napredovanje kemijske reakcije s vremenom, a mehanizam reakcije predstavlja slijed događaja na molekularnoj razini kojima reaktanti prelaze u produkte reakcije (Cvitaš, 20XX.).

### 1.4.1. Brzina kemijske reakcije

Brzina kemijske reakcije ( $v$ ) definirana je kao brzina prirasta dosega reakcije  $\xi$ , odnosno promjena koncentracije nekog od sudionika reakcije u vremenu (Pilepić, 2007.).

Doseg reakcije ( $\xi$ ) definira se jednadžbom:

$$\xi = \frac{n_J - n_{J,0}}{\nu_J}$$

U ovoj jednadžbi  $\nu_J$  je stehiometrijski koeficijent sudionika reakcije J ( $\nu_J$  je negativan za reaktante, a pozitivan za produkte),  $n_J$  je količina tvari u određenom trenutku, a  $n_{J,0}$  količina tvari na početku reakcije. Doseg se izražava kao i množina molekula jedinicom mol.

Brzina kemijske reakcije,  $v$ , je prirast dosega reakcije u vremenu:

$$v = \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_J} \frac{dn_J}{dt}$$

Brzina kemijske reakcije ekstenzivna je veličina – prirast broja ili množine pretvorbi bit će to veći što je reakcijski sustav veći. Dobro je zato definirati intenzivnu veličinu koja bi opisivala samu reakciju, a ne reakcijski sustav. To bi se moglo učiniti tako da se brzina prirasta dosega reakcije podijeli s nekom drugom ekstenzivnom veličinom reakcijskog sustava (množinom, brojem jedinki, masom ili volumenom). Za sustav volumena  $V$  vrijedi:

$$v = \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{\nu_J} \frac{dn_J}{dt}$$

Većina kemijskih reakcija proučava se u otopinama ili u plinskim reaktorima stalnog volumena  $V$ , tako da se prati množinska koncentracija sudionika reakcije  $[J]=n_J/V$ , odnosno njena promjena, te je za takve sustave jednadžba za brzinu reakcije:

$$v = \frac{1}{\nu_J} \frac{d[J]}{dt}$$

Brzina reakcija iskazuje se u molovima po kubnom decimetru u sekundi ( $\text{mol dm}^{-3}\text{s}^{-1}$ ). Brzina trošenja reaktanata ima negativan predznak, dok brzina nastajanja produkta ima pozitivan predznak (Cvitaš, 20XX.; Atkins i sur., 2006.).

#### 1.4.2. Zakoni za brzinu kemijske reakcije

Brzina reakcije često je proporcionalna koncentraciji reaktanata podignutih na potenciju. Na primjer, brzina reakcije može biti proporcionalna molarnoj koncentraciji dvaju reaktanata A i B te se može zapisati u obliku:

$$v = k[A][B]$$

Koeficijent  $k$  naziva se konstanta brzine za reakciju. Konstanta brzine neovisna je o koncentracijama, ali ovisi o temperaturi.

Zakon brzine je jednadžba koja prikazuje brzinu reakcije kao funkciju koncentracija svih vrsta prisutnih u reakciji u nekom vremenu:

$$v = f([A],[B],\dots)$$

Zakon za brzinu kemijske reakcije određen je eksperimentalno i ne može se izvesti iz jednadžbe kemijske reakcije. Ako je poznat zakon za brzinu kemijske reakcije i vrijednost konstante brzine, može se predvidjeti brzina reakcije iz sastava smjese, sastav smjese u kasnijoj fazi reakcije i mehanizam reakcije.



Eksperimentalno je utvrđeno da se zakon za brzinu kemijske reakcije može pisati u obliku:

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

Potencija na koju je dignuta koncentracija vrste (produkta ili reaktanta) u zakonu za brzinu reakcije je red reakcije u odnosu na tu vrstu. Ukupni red reakcije jednak je zbroju pojedinih redova reakcije u odnosu na svaku vrstu. Red reakcije ne mora odgovarati stehiometrijskim koeficijentima i ne mora biti cijeli broj.

Vrijeme polureakcije  $t_{1/2}$  je vrijeme potrebno da se koncentracija reaktanta smanji na polovicu početne koncentracije tog reaktanta.

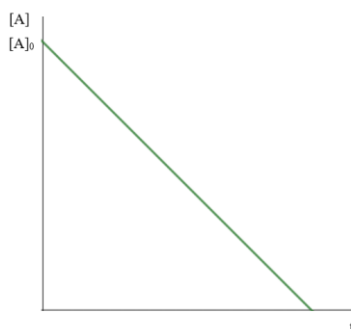
Zakon za brzinu reakcije određuje se metodom izolacije ili metodom početnih brzina. U metodi izolacije koncentracije svih reaktanata osim jednog drže se u velikom suvišku. Tako se reakcija svede na pseudo-prvi red i moguće je odrediti red reakcije obzirom na taj manjinski reaktant. Postupak se ponovi za svaki od reaktanata. U metodi početnih brzina mjeri se početna brzina pri različitim koncentracijama jednog reaktanta (Atkins i sur., 2006.).

#### 1.4.2.1. Reakcije nultog reda

U reakcijama nultog reda, brzina reakcije nultog reda je konstantna i neovisna je o koncentracijama reaktanta. Za reakciju nultog reda vrijedi:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]_0 = k$$

Integriranjem se dobije:  $[A] = [A]_0 - kt$  gdje je  $[A]$  trenutna koncentracija reaktanta, a  $[A]_0$  početna koncentracija reaktanta.



**Slika 1.4.1.** Ovisnost koncentracije reaktanta o vremenu za reakciju nultog reda.

Reakcije nultog reda javljaju u brojnim enzimatskim reakcijama kada je velik suvišak supstrata koji se veže na enzim (Tomišić i sur., 2011.; Atkins i sur., 2006.).

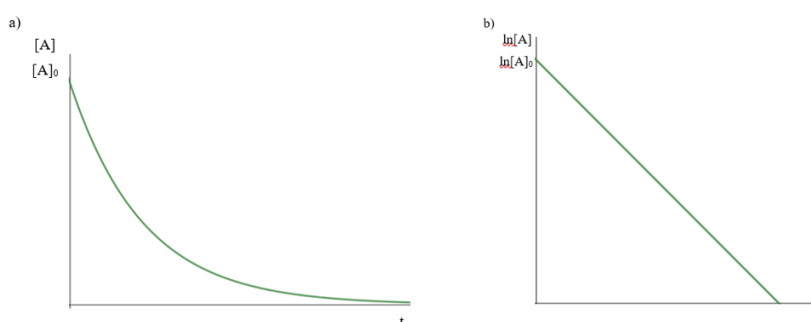
### 1.4.2.2. Reakcije prvog reda

Za reakciju prvog reda s obzirom na praćeni reaktant, brzina reakcije razmjerna je koncentraciji reaktanta na prvu potenciju:

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k[A]$$

Integriranjem se dobije  $\ln([A]/[A]_0) = -kt$  ili  $[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt}$

Vrijeme polureakcije u reakcijama prvog reda računa se prema jednadžbi  $t_{1/2} = \ln 2/k$ . Vrijeme polureakcije reaktanta neovisno je o njegovoj početnoj koncentraciji.



**Slika 1.4.2.** Ovisnost koncentracije reaktanta (a) i logaritma koncentracije reaktanta (b) o vremenu za reakciju prvog reda.

Slika 1.4.2.a. prikazuje da se u reakcijama prvog reda koncentracija reaktanta eksponencijalno smanjuje s vremenom brzinom određenom s konstantom brzine ( $k$ ). Slika 1.4.2.b. prikazuje da je ovisnost  $\ln([A]/[A]_0)$  o vremenu za reakcije prvog reda pravac s nagibom  $-k$  (Tomišić i sur., 2011.; Atkins i sur., 2006.; Cvitaš, 20XX.).

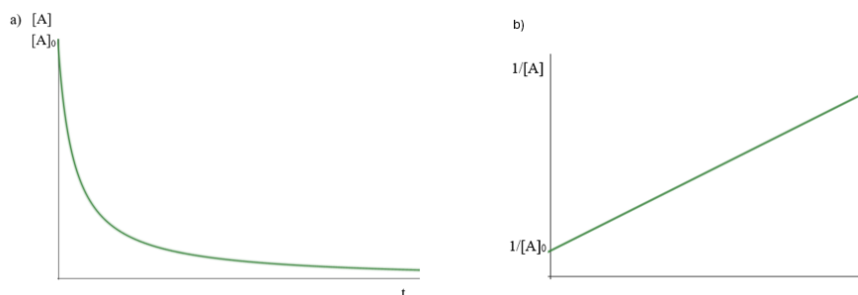
### 1.4.2.3. Reakcije drugog reda

Zakon brzine reakcije drugog reda oblika  $2A \rightarrow P$  je:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^2$$

Integriranjem se dobije:  $\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt$  ili  $[A] = \frac{[A]_0}{1+kt[A]_0}$

Vrijeme polureakcije za reakcije drugog reda računa se prema jednadžbi  $t_{1/2} = 1/k[A]_0$ . Vrijeme polureakcije u reakcijama drugog reda ovisi o početnoj koncentraciji reaktanta.



**Slika 1.4.3.** Ovisnost koncentracije (a) i recipročne koncentracije reaktanta (b) o vremenu za reakciju drugog reda

Graf ovisnosti recipročne koncentracije  $1/[A]$  o vremenu je pravac s nagibom  $k$  (Slika 1.4.3. b.). Koncentracija reaktanta  $[A]/[A]_0$  sporije se približava nuli u odnosu na reakciju prvog reda s istom početnom brzinom (Slika 1.4.3.a.) (Atkins i sur., 2006.; Cvitaš, 20XX).

Za reakciju  $A + B \rightarrow P$  vrijedi:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A][B]$$

Integriranjem se dobije:  $\ln\left(\frac{[B]}{[A]}\right) = ([B]_0 - [A]_0)kt$

Graf ovisnosti  $\ln\left(\frac{[B]}{[A]}\right)$  o vremenu je pravac (Atkins i sur., 2006.).

Ako je koncentracija jednog reaktanta u reakcijama drugog reda približno stalna tijekom reakcije, što se postiže velikim suviškom tog reaktanta u odnosu na drugi, reakcija je svedena na prvi red u odnosu na manjinski reaktant i naziva se reakcija pseudo-prvog reda (Tomišić i sur., 2011.; Atkins i sur., 2006.).

### 1.4.3. Kinetički izotopni efekt

Kinetički izotopni efekt (KIE) označava promjenu brzine kemijske reakcije nakon zamjene jednog atoma u molekuli reaktanta svojim lakšim ili težim izotopom. Koristi se u istraživanju mehanizama kemijskih i biokemijskih reakcija (Tandarić, 2017.).

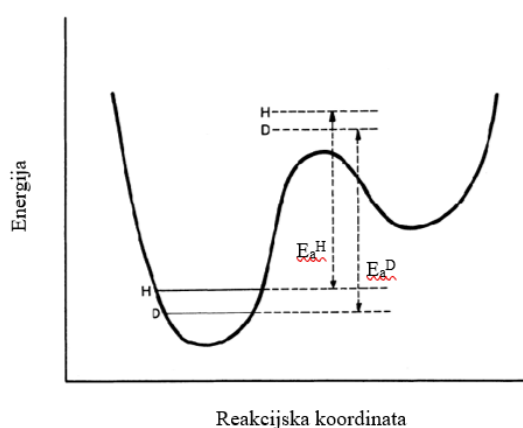
KIE se izražava kao omjer konstanta brzina reakcija u kojoj je brojnik konstanta brzine reakcije s izotopom koji je zastupljeniji u prirodi, dok je u nazivniku konstanta brzine s promijenjenim, u prirodi manje zastupljenim izotopom. Na primjeru atoma vodika, lakši izotop se označava s H, a teži (deuterij) s D, pa se konstante brzine mogu označiti s  $k_H$  i  $k_D$ , te se KIE računa prema izrazu (Anslyn i sur., 2006):

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

Primarni KIE opaža se kada se u koraku koji određuje brzinu reakcije cijepa ili stvara veza koja uključuje izotop. Sekundarni KIE manji je od primarnog te označava promjenu brzine reakcije kada dolazi do kidanja veze koja je u neposrednoj blizini veze koja uključuje izotop (Atkins i sur., 2006.; Anslyn i sur., 2006).

Ovisno o tome je li KIE veći ili manji od jedan, razlikuje se normalni ( $>1$ ) ili inverzni ( $<1$ ) izotopni efekt. Zamjena lakšeg izotopa težim uzrokuje usporavanje reakcije (normalni KIE), u suprotnom dolazi do ubrzavanja reakcije (inverzni KIE). Ako je KIE jednak 1, može se zaključiti da se veza sa supstituiranim izotopom ne mijenja u koraku koji određuje brzinu reakcije (Tandarić, 2017.; Anslyn i sur., 2006.).

KIE je posljedica promjene vibracijskih modova molekula reaktanta i prijelaznog stanja uslijed izotopne zamjene. Naime, molekule vibriraju određenom vibracijskom energijom koja je kvantizirana za svaki mod vibriranja. Kada su svi normalni modovi u osnovnom stanju, molekula ima vibracijsku energiju nulte točke (ZPE, engl. *Zero-Point Energy*). Promjena mase jednog atoma mijenja reduciranu masu normalnog moda vibriranja i time ZPE reaktanta i prijelaznog stanja. Zamjena lakšeg izotopa težim više će smanjiti ZPE molekule reaktanta nego prijelaznog stanja. Posljedično dolazi do povećanja energije aktivacije, odnosno doći će do usporavanja reakcije u kojoj ta veza puca (Slika 1.4.4.) (Tandarić, 2017., Atkins i sur., 2006.; Bell, 1980.).

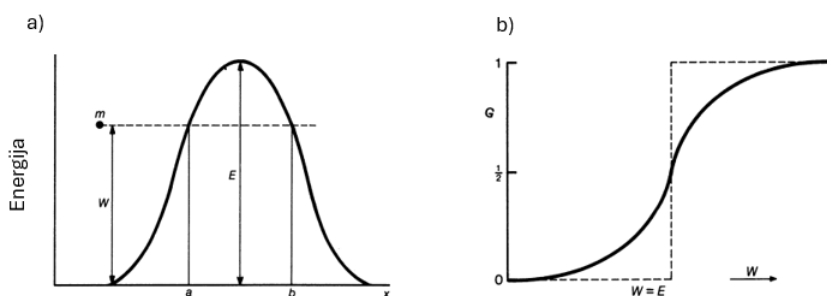


**Slika 1.4.4.** Prilikom zamjene vodika sa deuterijem, ZPE reaktanta više se smanjuje nego ZPE prijelaznog stanja te je energija aktivacije veća za cijepanje veze C-D nego za cijepanje veze C-H. Preuzeto i prilagođeno iz (Bell, 1980.)

Izotopni efekt otapala označava promjenu brzine kemijske reakcije, koja se događa u otopini, prilikom zamjene otapala njegovim izotopologom. Ovdje je otapalo uključeno u zamjenu izotopa između otapala i reaktanta, pri čemu nastaje reaktant koji sadrži izotop (Anslyn i sur., 2006.).

Izrazito veliki kinetički izotopni efekti mogu se objasniti tuneliranjem. Tuneliranje je kvantno-mehanički fenomen koji uključuje prodiranje valne funkcije čestice kroz energetska barijeru umjesto preko nje (Anslyn i sur., 2006.).

Značenje fenomena tuneliranja prikazano je na slici 1.4.5. Slika 1.4.5.a prikazuje česticu mase  $m$  i energije  $W$  koja se približava lijevom rubu potencijalne energetske barijere visine  $E$ . Kvantno-mehanički slučaj opisuje propusnost barijere iako je  $W < E$ . Ovo bi opisivalo nemoguću situaciju u klasičnoj mehanici, budući da ako bi čestica postojala između točaka  $a$  i  $b$ , njezina ukupna energija bila bi manja od potencijalne energije, a kinetička energija bi joj bila negativna. Slika 1.4.5.b prikazuje kako se  $G$ , tj. vjerojatnost da se čestica pojavi na desnoj strani barijere (tj. da se reakcija dogodi), mijenja s energijom čestice ( $W$ ). Isprekidana linija predstavlja predviđanja klasične mehanike na makrosokopskim objektima. Vjerojatnost je 0 sve dok je  $W < E$ , naglo raste do 1 kada je  $W = E$  i ostaje 1 za sve vrijednosti  $W > E$ . Ovaj rezultat ne ovisi o širini ili obliku barijere, kao ni o masi čestice. Puna krivulja prikazuje ponašanje na razini kvantne mehanike. Vjerojatnost prelaska barijere ( $G$ ) i dalje teži 0 za male vrijednosti  $W$ , ali nagla promjena prilikom prelaska iz  $W < E$  u  $W > E$  (kako je opisano klasičnom mehanikom) zamjenjuje se blažim povećanjem  $G$  što govori da određeni broj čestica može prelaziti barijeru čak i kada je  $W < E$ . Oblik pune krivulje ne ovisi samo o visini barijere, već i o njezinoj širini, obliku i masi čestice (Bell, 1980.).



**Slika 1.4.5.** Prijelaz čestice preko barijere u klasičnoj i kvantnoj mehanici. Preuzeto i prilagođeno iz (Bell, 1980.)

Ova pojava može se objasniti valnim svojstvima čestica. De Broglie je ustanovio da elektroni imaju ne samo korpuskularna već i valna svojstva te da za elektron mase  $m$  i brzine  $v$  vrijedi

jednadžba koja opisuje duljinu vala elektrona  $\lambda = h/mv$  ( $h$  je Planckova konstanta koja iznosi  $6,626 \cdot 10^{-34}$  J s). De Broglieova jednadžba vrijedi za sve vrste čestice (Filipović i sur, 1995.; Bell, 1980.). Sve dok je De Broglieova valna duljina vrlo mala u usporedbi s dimenzijama veličina od interesa, gibanje čestice se može opisati na temelju klasične mehanike. S druge strane, na molekularnoj razini masa čestice i srodne veličine tako su male da De Broglieova valna duljina može postati istog reda veličine kao udaljenosti između molekula koje reagiraju, dolazi do devijacije od klasičnog ponašanja te postoji značajna vjerojatnost tuneliranja (Bell, 1980). Dakle, vodik ima dobru sposobnost tuneliranja jer mu mala masa daje de Broglieovu valnu duljinu koja je tipična za udaljenosti između molekula (Sen i Kohen, 2010.; Anslyn i sur. 2006.).

Vjerojatnost tuneliranja smanjuje se eksponencijalno s debljinom barijere i korijenom mase čestice. Prema tome, lakše čestice sposobnije su tunelirati kroz barijeru nego one teže. Zato je tuneliranje često povezano s prijenosom protona ili elektrona. Deuterij, budući da je dvostruko teži od vodika, ima manju sposobnost tuneliranja te su reakcije s deuteriranim supstratima sporije i mogu proizvesti velike izotopne efekte. U nekim slučajevima mogu tunelirati i čestice teže od izotopa vodika, ako je barijera dosta uska (Atkins i sur., 2006; Anslyn i sur., 2006.).

Bell (1980.) navodi maksimalni dopušteni izotopni efekt za vodik prema semi-klasičnoj teoriji koja govori da je primarni KIE određen razlikama u ZPE u početnom i prijelaznom stanju. Fenomen tuneliranja povećava KIE iznad maksimalnih vrijednosti predviđenih semi-klasičnom teorijom. Dakle, ako eksperimentalno određene vrijednosti KIE u nekoj reakciji premaše maksimalne dobivene semi-klasičnom teorijom, može se pretpostaviti da u reakciji dolazi do tuneliranja. Maksimalno dopuštena vrijednost KIE za normalne modove vibriranja (istezanje veza) u semi-klasičnom sustavu za O-H vezu pri 25°C je 7,9, a ako dolazi i do savijanja veze ta vrijednost iznosi 13,39.

Kvantno-mehaničko tuneliranje može biti dominantan proces u reakcijama prijenosa atoma vodika ili protona na niskim temperaturama pri kojima vrlo malo molekula može prijeći energetska barijeru i time daje velike, o temperaturi neovisne KIE. Na Arrheniusovom grafu to se prikazuje kao odstupanje od linearne ovisnosti  $\ln(k)$  o  $1/T$  pri niskim temperaturama (Sen i Kohen, 2010.; Atkins i sur., 2006.).

## 1.5. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA, BEER-LAMBERTOV ZAKON

UV (od engl. *Ultraviolet*) područje jest područje elektromagnetskog zračenja frekvencije između x-zraka i vidljivog područja spektra te se nalazi u rasponu valnih duljina 200-400 nm, dok je VIS (od engl. *Visible*) područje u rasponu valnih duljina 400-800 nm. Energije u UV-VIS području odgovaraju elektronskim prijelazima, tj. energijama potrebnim da bi se elektron pobudio iz jedne u drugu molekulsku orbitalu (Wade, 2017.).

Kako bi se dobio apsorpcijski spektar uzorka, potrebno je odrediti intenzitet apsorbiranog elektromagnetskog zračenja u ovisnosti o valnoj duljini zračenja. Za to se upotrebljava uređaj koji se naziva spektrofotometar. Polikromatska svjetlost koja izlazi iz izvora prolazi najprije kroz monokromator koji je programiran da mu se valna duljina propuštenog zračenja linearno mijenja s vremenom. Propušteno zračenje zatim prolazi kroz kivetu s uzorkom te dolazi do detektora koji svjetlosni signal pretvara u električni. Kada se spektrofotometar koristi za određivanje koncentracije otopljene tvari, monokromator se podesi na valnu duljinu koju molekule u otopini najviše apsorbiraju. Spektrofotometar mjeri apsorbanciju uzorka pa se koncentracija otopine tvari može izračunati primjenom jednadžbe Beer-Lambertova zakona (Herak, 2008.).

Transmitancija predstavlja omjer intenziteta transmitiranog zračenja ( $I$ ) i ulaznog zračenja ( $I_0$ ) pri određenoj frekvenciji:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Pokazano je da intenzitet transmitiranog zračenja ( $I$ ) ovisi o debljini uzorka ( $l$ ) i molarnoj koncentraciji tvari koja apsorbira [ $J$ ] u skladu s Beer-Lambertovim zakonom.

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

Veličina  $\epsilon$  naziva se molarni apsorpcijski koeficijent te ovisi o frekvenciji ulaznog zračenja i najveći je na onoj frekvenciji u kojem je apsorpcija najveća. Izražava se kao  $l/[J]l$  [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

Apsorbancija predstavlja logaritam omjera intenziteta ulaznog zračenja i intenziteta transmitiranog zračenja

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \text{ ili } A = -\log T$$

te Beer Lambertov zakon poprima oblik (Atkins i sur., 2006.):

$$A = \epsilon[J]l$$

UV-VIS spektrofotometrija ima široku primjenu u raznim područjima. Na primjer, u farmaceutskoj industriji koristi se u analizi čistoće, koncentracije i identiteta farmaceutskih proizvoda kao i u praćenju stabilnosti farmaceutskih proizvoda tijekom vremena. U medicinsko-biokemijskom laboratoriju koristi se, između ostaloga, u određivanju brojnih analita u biološkim uzorcima ili u određivanju koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina. U prehrambenoj industriji UV-VIS spektrofotometrijom utvrđuje se kvaliteta i sastav hrane i pića, a u kemijskoj industriji koristi se u određivanju kemijskih svojstava i procjeni kvalitete proizvoda, u studijama sastava polimera, kvalifikaciji otpadnih voda, određivanju ostataka pesticida u tlu... ([www.mt.com](http://www.mt.com))



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dopamin djeluje kao neurotransmiter u SŽS i kao hormon izvan SŽS. Već mali poremećaj u njegovoj funkciji može dovesti do raznih patoloških stanja, npr. Parkinsonove bolesti, ADHD, shizofrenije... Općenito, progresija brojnih neurodegenerativnih bolesti povezana je s oksidativnim stresom i brojni su pokušaji da se razvije relevantna antioksidativna terapija temeljena na molekulama koje su izvorno prisutne u SŽS ili koje mogu difuzijom proći krvno-moždanu barijeru nakon sistemskog unosa.

Kao i mnogi sintetski i prirodni antioksidansi, dopamin ima kateholnu skupinu u svojoj strukturi. Upravo je kateholna skupina zaslužna za antioksidativnu aktivnost mnogih prirodnih spojeva. Reakcija kateholne skupine i radikala odvija se putem nekoliko mehanizama, a koji mehanizam će biti preferiran ovisi o reaktivnosti vrsta i uvjetima reakcije. Istraživanja provedena *in vitro* na staničnim linijama neurona i perifernim krvnim stanicama ukazuju da dopamin u mikromolarnim koncentracijama može djelovati kao endogeni antioksidans, jer štiti stanice smanjujući koncentraciju intracelularnih reaktivnih spojeva kisika (Cosentino i sur., 2004; Troadec i sur., 2001.).

Za istraživanje antioksidativne aktivnosti različitih spojeva često se koristi DPPH test kao brza, jednostavna i jeftina metoda koja je u širokoj upotrebi za određivanje antioksidativnog kapaciteta biljnih ekstrakata ili fenolnih spojeva. Reakcija dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala u ovom je radu korištena kao model reaktivnosti dopamina prema slobodnim radikalima.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati kinetiku reakcije dopamina s DPPH<sup>•</sup> te odrediti konstante brzine u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) 0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v i kinetički izotopni efekt koji može biti pokazatelj tuneliranja vodika u navedenoj reakciji te doprinijeti razumijevanju mehanizma reakcije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI:

##### 3.1.1. Kemikalije:

- Dopamin hidroklorid (> 97.5 %, Sigma Aldrich)
- DPPH<sup>\*</sup> slobodni radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (95%, Aldrich)
- Redestilirana voda
- 1 M HCl (Merck)
- 1 M NaOH (Merck)
- standardne puferne otopine pH 4 i pH 7 (Merck)
- 1,4 – dioksan (99,8%, Sigma-Aldrich)
- Teška voda, D<sub>2</sub>O (99,9 % D, Aldrich)
- DCI 35% (99% D, Aldrich)
- Konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ HNO<sub>3</sub> (*p.a.* Kemika)
- Metanol (>99,9 % Honeywell Riedel-de Haen)
- Dušik 5,0 (99,999% N<sub>2</sub>, Messer Croatia plin d.o.o.)

##### 3.1.2. Instrumenti i laboratorijski pribor:

- Plastične tube Eppendorf (1,5 mL)
- Staklene odmjerne tikvice s ubrušenim čepom od 5 i 10 mL
- Vaga Mettler H54AR ( $P_{\max} = 160$  g,  $d=0,01$  mg)
- Eppendorf automatske pipete od 50, 100, 200 i 1000  $\mu$ L i odgovarajući plastični Eppendorf nastavci
- Kvarcne kivete QS 10,0 mm, Helma
- Termostatirani nosač za kivete Quantum northwest TC 125 Temperature Control ( $\pm t < 0,1$  °C)
- UV-VIS spektrofotometar HP 8453 G1103A, Agilent Technologies
- Spektrofotometar Avantes AvaSpec – 2048L Starline i pripadajući softver Avantes Software AvaSoft 8
- Deuterijska-halogenna lampa Ocean Optics DH-2000
- pH-metar Mettler Toledo MP 230

- kombinirana pH-elektroda (Mettler Toledo, InLab Semi-Micro)
- boca štrcaljka, staklena Erlenmeyerova tikvica s ubrušenim čepom, kapaljka, male čaše, Petrijeva zdjelica, metalna špatula, parafilm
- Aparatura za redestilaciju vode

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje UV-VIS spektara dopamina u vodi pri različitim pH

Iz matičnih otopina  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH i  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl pripremaju se  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  otopine NaOH i HCl. U odmjernu tikvicu od 10 mL dodaje se 0,1 mL  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl te se tikvica napuni do oznake redestiliranom vodom. Isti postupak je i za pripremu  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH. Otopine HCl i NaOH koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  pripremile su se na početku eksperimentalnog dijela rada te su se iste koristile tokom cijelog rada. Iz praška dopamin hidroklorida priprema se matična otopina dopamin hidroklorida koncentracije oko  $0,035 \text{ mol dm}^{-3}$ . Matična otopina priprema se na način da se izvagalo 0,0333 g praška dopamin hidroklorida te se odmjerna tikvica od 5 mL nadopunila do oznake redestiliranom vodom.

Otopine dopamina kojima se određuju spektri pripremaju se uz dodatak  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,0001 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl, u čistoj vodi i uz dodatak  $0,0001 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH, na način da je konačna koncentracija dopamina  $0,0002 \text{ mol dm}^{-3}$ . Priređenim otopinama dopamina izmjeren je točan pH koji je redom iznosio 2,0, 3,0, 4,0, 6,1, 7,8, 9,3 i 9,9. Mjerenje pH provodilo se na pH metru Mettler Toledo MP 230 koji je prethodno kalibriran standardnim puferskim otopinama pH 4 i pH 7. Potom su otopine dopamina prenesene u spektrofotometrijsku kivetu i stavljene u nosač kiveta spektrofotometra HP 8453 G1103A te je snimljen UV-VIS spektar u području valnih duljina 200 – 800 nm. Prije snimanja spektara otopina dopamina snimljen je spektar slijepe probe (kiveta + otapalo, bez dopamina) te je postavljen kao bazna linija ( $A = 0$  na svim valnim duljinama).

### 3.2.2. Određivanje UV-VIS spektra DPPH<sup>•</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan i H<sub>2</sub>O

Matična otopina DPPH<sup>•</sup> priprema se vaganjem oko 0,0109 g DPPH<sup>•</sup> i dodavanjem sadržaja u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se zatim napuni 1,4-dioksanom do oznake kako bi se dobila otopina konačne koncentracije približno  $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Otopina DPPH<sup>•</sup> kojoj se određuje UV-VIS spektar priprema se u kiveti uz dodatak 1,4-dioksana, redestilirane vode, HCl i matične otopine DPPH<sup>•</sup> na način da konačni omjer 1,4-dioksana i vode

bude 0,95:0,05 v/v, a konačna koncentracija DPPH•  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (detaljnije o pripremi reakcijskih otopina u poglavlju 3.2.3.). Kao i prethodno, kiveta se stavlja u nosač kiveta spektrofotometra HP 8453 G1103A i snima se UV-VIS spektar DPPH• u području valnih duljina 200-800 nm. Prije snimanja spektra otopine DPPH• snima se spektar slijepe probe koja ne sadrži DPPH• (kiveta + smjesa otapala + HCl) te se postavlja kao bazna linija.

### 3.2.3. Određivanje konstante brzine reakcije DPPH• u smjesi otapala 1,4-dioksan i H<sub>2</sub>O

Prije početka mjerenja, potrebno je pripremiti matične otopine DPPH• u 1,4-dioksanu i dopamin hidroklorida u redestiliranoj vodi. Matična otopina DPPH• priprema se kako je opisano u prethodnom odlomku. Matična otopina dopamin hidroklorida od 0,1 mol dm<sup>-3</sup> priprema se vaganjem oko 0,0190 g dopamin hidroklorida te se izračuna točan volumen redestilirane vode koji je potrebno dodati u plastičnu tubu kako bi se dobila konačna koncentracija otopine od 0,1 mol dm<sup>-3</sup>. Matične otopine dopamin hidroklorida radile su se svakog radnog dana prije početka mjerenja, dok se matična otopina DPPH• radila svakih nekoliko dana. Koristi se prethodno pripremljena 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. U uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) u kinetikama s većim koncentracijama dopamina (0,01 i 0,016 mol dm<sup>-3</sup>) i HCl (0,01 mol dm<sup>-3</sup>) pripremale su se koncentriranije matične otopine dopamina (0,8 mol dm<sup>-3</sup>) i HCl (1 mol dm<sup>-3</sup>) kako bi smjesa otapala 1,4-dioksana i vode ostala u točnom omjeru.

U kivetama se pripremaju reakcijske smjese zadanih koncentracija ovisno o uvjetima reakcije (različit omjer 1,4-dioksana i vode, različita koncentracija HCl, različite koncentracije dopamina). Prije punjenja kivete potrebno je izračunati volumene matičnih otopina dopamin hidroklorida i DPPH• koje je potrebno dodati u kivetu kako bi se postigla njihova konačna koncentracija u kiveti. Konačna koncentracija dopamina varira ovisno o uvjetima reakcije, dok je koncentracija DPPH• jednaka u svim uvjetima i iznosi  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Konačne koncentracije dopamina 10-100 puta su veće od koncentracija DPPH•, čime je reakcija svedena na pseudo-prvi red. Također, računa se i volumen 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine HCl (po potrebi i veće koncentracije) koju je potrebno dodati u kivetu, ovisno o uvjetima reakcije. Kivetu je potrebno nadopuniti 1,4-dioksanom i redestiliranom vodom poštujući njihov omjer. Na primjer, za reakciju u 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) reakcijska se smjesa priprema na način da se prvo u kivetu stavi određeni volumen 1,4-dioksana. Volumen 1,4-dioksana koji je potreban dobije se množenjem ukupnog volumena reakcijske smjese koji je uvijek iznosio 1800 μL u kiveti, s odgovarajućim postotkom 1,4-dioksana u konačnoj smjesi:  $1800 \mu\text{L} \cdot 0,95 = 1710 \mu\text{L}$  te oduzimanjem volumena matične otopine DPPH• koja se mora dodati u kivetu. Zatim se dodaje

određeni volumen redestilirane vode. Volumen redestilirane vode koju je potrebno dodati računa se prema istom principu kao i volumen 1,4-dioksana. Dakle, od 90  $\mu\text{L}$  oduzima se volumen matične otopine dopamina i HCl koje se moraju dodati u kivetu kako bi se postigla konačna koncentracija. Tim se postupkom postiže konačni omjer 1,4-dioksana i vode 0,95:0,05. Nakon dodatka izračunatih volumena 1,4-dioksana i redestilirane vode, dalje se redom dodaju određeni volumeni 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopine HCl i 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopine dopamin hidroklorida u vodi. U kivetu se dodaje i magnetni mješač. Potom se kiveta stavi u nosač za kivete opremljen magnetnom miješalicom i blokom za termostatanje, te se snimi bazna linija reakcijske smjese prije dodatka DPPH'. Reakcija se započinje dodatkom određenog volumena otopine DPPH' u kivetu te pokretanjem programa Avantes kojim se pratila promjena apsorbancije DPPH' radikala na valnoj duljini 518 nm u vremenu, pri konstantnoj temperaturi od 25°C. Reakcija se prati tijekom 5 vremena polureakcije te se određuje konstanta brzine reakcije u svakoj kinetici primjenom algoritma za nelinearnu regresiju. Mjerenja se izvode u duplikatu ili triplikatu. Dobiveni podaci unosili su se u tablice programa Microsoft Excel te su pomoću njega napravljeni grafovi.

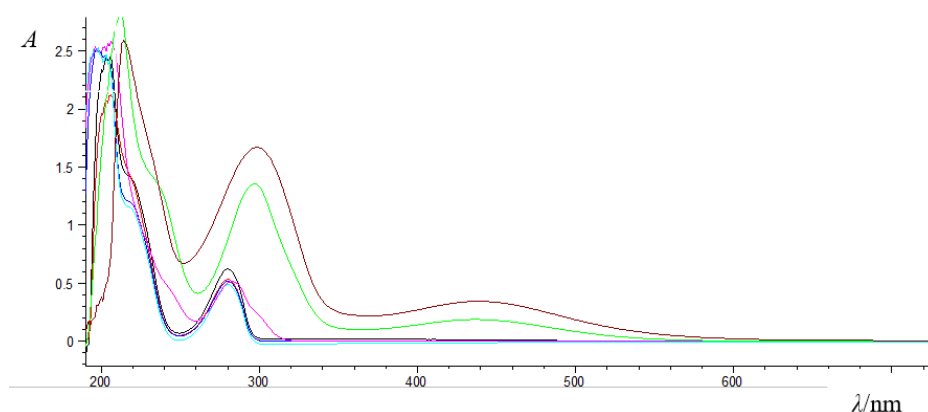
Kivete i pripadajuće čepove je nakon reakcije potrebno isprati vodovodnom vodom i redestiliranom vodom te ostaviti neko vrijeme (minimalno 30 minuta) u koncentriranoj  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  kako bi se oksidirala onečišćenja. Potom je kivete potrebno dobro isprati od ostataka kiseline, dodatno otkiseliti namakanjem u redestiliranoj vodi (minimalno 1 sat), te temeljito oprati i osušiti.

#### 3.2.4. Određivanje konstante brzine reakcije DPPH' u smjesi 1,4-dioksan i $\text{D}_2\text{O}$ u svrhu određivanja KIE

Za mjerenje KIE, princip pripreme matičnih otopina je jednak, jedino se u svim procesima umjesto redestilirane vode koristi teška voda (priprema matične otopine dopamin hidroklorida u  $\text{D}_2\text{O}$ , priprema 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  DCl). Također, i princip pripreme reakcijskih smjesa je jednak, s tim da se koristi DCl i otopine dopamin hidroklorida u  $\text{D}_2\text{O}$ . Mjerenje konstante brzine reakcije se vrši na isti način kako je opisano u poglavlju 3.2.3., s tim da se reakcija prati tijekom samo 2 vremena polureakcije zbog duljine trajanja reakcije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Izmjereni su UV-VIS spektri  $0,0002 \text{ mol dm}^{-3}$  vodene otopine dopamina uz dodatak različitih koncentracija kiseline HCl odnosno lužine NaOH ( $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,0001 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te u čistoj vodi kako bi se utvrdilo ponašanje dopamina u različitim pH područjima. Spektri su određeni redom pri pH vrijednostima otopina 2,0, 3,0, 4,0, 6,1, 7,8, 9,3 i 9,9. Izmjereni UV-VIS spektri prikazani su na slici 4.1. Naime, dopamin zbog svojih hidroksilnih skupina i amino-skupine može u vodenoj otopini biti prisutan kao kation, zwitterion ili anion, ovisno o pH i polarosti medija, što utječe na njegovu reaktivnost.



**Slika 4.1.** UV-VIS spektri  $0,0002 \text{ mol dm}^{-3}$  dopamina pri različitim pH

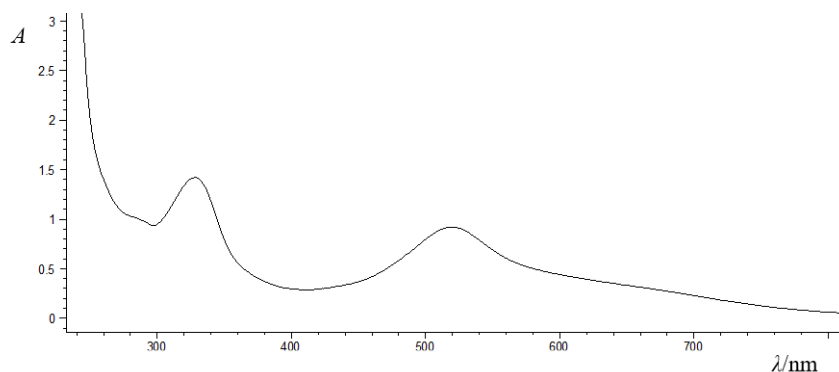
UV-VIS spektri dopamina u kiselom i neutralnom pH imaju maksimum apsorpcije na 280 nm. U mediju s pH 7,8 na spektralnoj krivulji javlja se blago proširenje u području oko 280 nm i pomak pika prema većim valnim duljinama (roza krivulja). UV-VIS spektri pri pH 9,3 (zeleno krivulja) i pH 9,9 (smeđa krivulja) značajno odstupaju od ostalih – maksimum apsorpcije se pomiče na oko 300 nm, a javlja se i novi, manji pik s maksimumom u području 430-450 nm. Različiti UV-VIS spektri dopamina pri različitim pH ukazuju na prisutnost različitih ionizacijskih oblika dopamina, ali i nastanak autooksidacijskih produkata (semikinona i kinona) koji su također podložni ciklizaciji (Falamas i sur., 2022.; Salomaki i sur., 2018.).

Falamas i sur. (2022.) su snimali UV-VIS spektre vodenih otopina dopamina u području pH 5-12. Uočili su da spektralne krivulje pri pH 5 i 7,8 imaju maksimum apsorpcije na 280 nm što odgovara protoniranom dopaminu. Pri pH 8,5 i 9 dolazi do pojave ramena na spektru u području 250-300 nm i pomaka maksimuma apsorpcije prema većim valnim duljinama što objašnjavaju pojavom prisutnosti zwitteriona. Pri pH 10,5 i 12 javljaju se izraženije spektralne promjene (novi pik na 430-450 nm) koje upućuju na promjenu molekulske strukture dopamina. Ova strukturna promjena može biti znak kompletne deprotonacije oba kisika dopamina (pojava *o*-

kinona) ili zatvaranja  $\text{NH}_2$  fragmenta u peteročlani prsten i nastanka 2,3-dihidro-indolo-5,6-kinona. Pri niskom pH dominantan je protonirani oblik dopamina, dok se iznad pH 8 počinju javljati neutralne i zwitterionske forme. Pri pH većem od 9, prisutna je deprotonirana forma na jednom kisiku hidroksilne skupine, a daljnjim povećanjem pH deprotonira se i drugi kisik. S obzirom na malu razliku u vrijednostima  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  dopamina ( $\Delta pK_a < 3$ ) nije moguće točno utvrditi redoslijed disocijacije protona te bi osim makroskopskih konstanti disocijacije koje odgovaraju stehiometriji ionizacije molekule trebalo poznavati i mikroskopske konstante disocijacije koje odgovaraju ionizaciji pojedinih formi dopamina (Pagliara i sur., 1997.). Također, redoslijed disocijacije može biti promijenjen pod utjecajem nepolarnog otapala.

Nagy i Takacs-Novak (1997.) istraživali su ravnotežu zwitterionske i neutralne forme nikotinske i izonikotinske kiseline u smjesama vode s organskim otapalima metanolom, tetrahidrofuranom i 1,4-dioksanom. Zwitterionska forma prevladava u smjesama s najmanje 60% vode. Neutralna forma je prisutna gotovo u potpunosti (100%) u čistim organskim otapalima. S obzirom da je dopamin, kao i (izo)nikotinska kiselina, amfoterna molekula, u smjesi može postojati u dvije ili više ionizacijske vrste koje se preklapaju upravo zbog bliskih  $pK_a$  vrijednosti što komplicira predviđanje raspodjele između polarnog i nepolarnog medija.

Na slici 4.2. prikazan je spektar DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-voda (0,95-0,05 v/v). Iz UV-VIS spektra  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  DPPH<sup>\*</sup> u smjesi 1,4-dioksan-voda (0,95-0,05 v/v) i kiselom pH određena su dva apsorpcijska maksimuma na valnim duljinama oko 330 nm i 520 nm. Rekarska i sur. (2013.) snimali su UV-VIS spektre otopine DPPH<sup>\*</sup> u čistom etanolu koncentracije  $8,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Uočili su dva maksimuma apsorpcije na valnoj duljini od 325 nm i 516 nm.



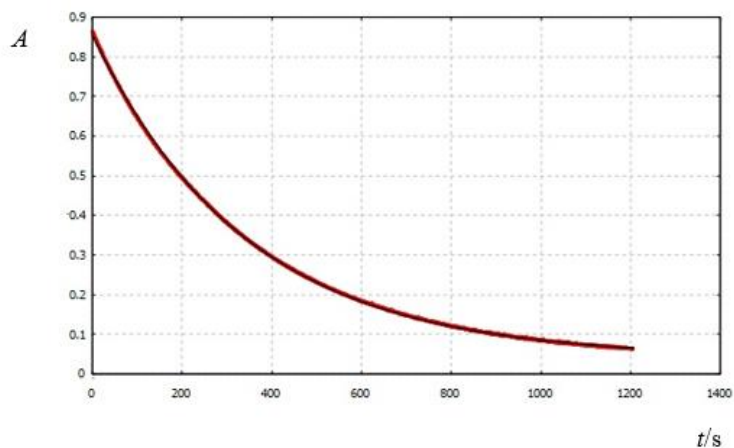
**Slika 4.2.** UV-VIS spektar  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi 1,4-dioksan-voda (0,95-0,05 v/v) u kiselom mediju.

Kako bi ispitali utjecaj polarnosti smjese na ponašanje spektra, snimali su spektre DPPH<sup>•</sup> u čistom etanolu i smjesi etanol-voda (2:1,5 v/v). Uočili su da povećanje polarnosti smjese uzrokuje pomak apsorpcije prema višim valnim duljinama (525 nm) te dolazi do smanjenja vrijednosti u maksimumu apsorpcije na otprilike polovicu. Ispitali su i kako na spektre utječe promjena pH dodatkom vodene otopine HCl otopini DPPH<sup>•</sup> u čistom etanolu – pri nižim pH također dolazi do smanjenja apsorpcije i pomaka maksimuma na 525 nm. Spektri DPPH<sup>•</sup> mjereni u ovom istraživanju u skladu su s navedenom literaturom.

Određivanje konstante brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> provedeno je u uvjetima pseudo-prvog reda s dopaminom u velikom suvišku i zasniva se na praćenju smanjenja apsorpcije DPPH<sup>•</sup> radikala na 518 nm u reakcijskoj smjesi tijekom reakcije. Reakcija se pratila tijekom pet vremena polureakcije ( $t_{1/2}$ ) u smjesama 1,4-dioksana s H<sub>2</sub>O, dok se u smjesama 1,4-dioksana s D<sub>2</sub>O pratila reakcija u trajanju dva vremena polureakcije zbog vremenske zahtjevnosti ( $t_{1/2} > 1$  h). Vrijeme polureakcije se odredilo praćenjem smanjenja apsorpcije na 50% od početne vrijednosti. Konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) izračunate su pomoću algoritma za nelinearnu regresiju. Koncentracija DPPH<sup>•</sup> u svim mjerenjima je ista i iznosi  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Sva mjerenja izvedena su na temperaturi od 25°C. Za konstante izmjerene u određenim uvjetima provedena je statistička analiza – određena je srednja vrijednost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda za svaku koncentraciju dopamina i HCl (DCl), standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV).

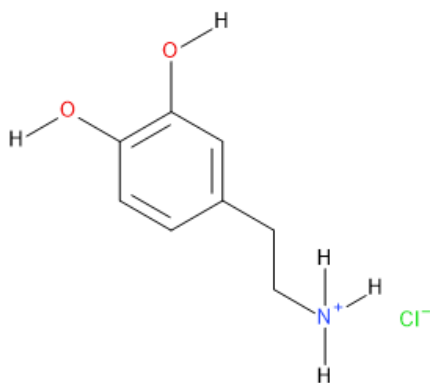
Slika 4.3. pokazuje da se apsorpcija DPPH<sup>•</sup> eksponencijalno smanjuje s vremenom što je karakteristično za kinetiku prvog reda. Reakcija dopamina i DPPH<sup>•</sup> ponaša se prema zakonu za brzine reakcija prvog reda odnosno u ovom slučaju pseudo-prvog reda budući da je dopamin reaktant koji je u suvišku u odnosu na DPPH<sup>•</sup> radikal.





**Slika 4.3.** Ovisnost apsorbancije  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  DPPH $\cdot$  o vremenu u reakciji dopamina i DPPH $\cdot$  pri koncentraciji dopamina  $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ , HCl  $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$  u smjesi 1,4-dioksan-H $_2$ O (0,75-0,25 v/v).

Mjerenja su se radila u pretežno nepolarnom mediju uz dodatak kiseline kako bi reakcija išla iz kationskog oblika dopamina. Naime, u nepolarnom mediju preferirani oblik dopamina je neutralni (nenabijeni) uz vjerojatno mali udio zwitteriona. Kako bi bilo sigurno da reakcija ide iz kationa, u reakcijski medij se dodala HCl. Takav kationski oblik uza sebe ima kloridne ione koji neutraliziraju naboj koji je nepoželjan u nepolarnom otapalu, stoga kation dopamina i kloridni ion tvore ionski par (Slika 4.4.).



**Slika 4.4.** Ionski par kationa dopamina i kloridnog aniona

#### 4.1. REAKCIJA DOPAMINA I DPPH<sup>\*</sup> RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) I 1,4-DIOKSAN-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v)

Konstante brzina reakcija pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) dopamina i DPPH<sup>\*</sup> u uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) određivale su se pri različitim koncentracijama dopamina i klorovodične kiseline (HCl) te su prikazane u Tablici 4.1.1.

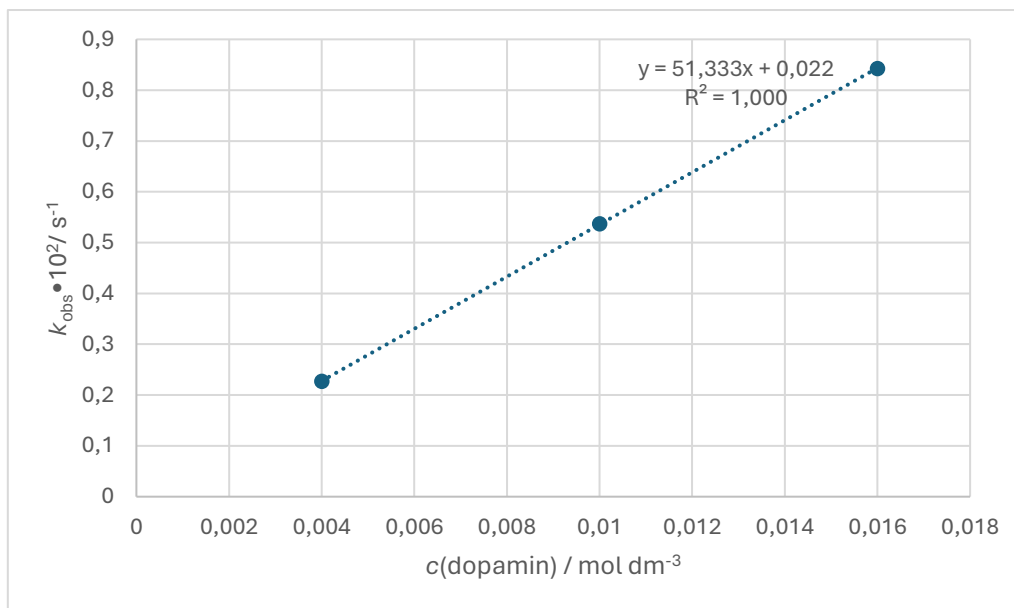
**Tablica 4.1.1.** Izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) i konstante brzine drugog reda ( $k$ ) za reakciju dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) pri različitim koncentracijama HCl i dopamina. Vrijednosti konstante brzine drugog reda dobivene su računski:  $k = \overline{k_{obs}} / c(\text{dopamin})$ . ( $t = 25^\circ\text{C}$ )

$c(\text{HCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$SD \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV / %	$k / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	
0,001	0,004	0,224	0,227	0,004	1,92	0,568	
		0,232					
		0,225					
	0,01	0,01	0,534	0,537	0,004	0,70	0,537
			0,535				
			0,541				
	0,016	0,016	0,842	0,843	0,002	0,27	0,527
			0,846				
			0,842				
0,01	0,01	0,609	0,609	0,000	0,00	0,609	
	0,016	0,947	0,952	0,003	0,33	0,595	
		0,952					
		0,953					
		0,954					

\* $c(\text{DPPH}^*) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Konstante brzine reakcija pseudo-prvog reda imaju mali koeficijent varijacije (0,27-1,92%) što ukazuje na dobru reproducibilnost provedenih mjerenja.

Grafički je prikazana ovisnost srednje vrijednosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda dopamina i DPPH<sup>\*</sup> o koncentraciji dopamina u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) pri  $c(\text{HCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  (Slika 4.1.1.).



**Slika 4.1.1.** Graf ovisnosti srednje vrijednosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) o koncentraciji dopamina uz  $c(\text{HCl}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  u smjesi otapala 1,4-dioksan- $\text{H}_2\text{O}$  (0,95-0,05 v/v). Koncentracija DPPH<sup>\*</sup> radikala iznosi  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a mjerenja su rađena na temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . Podaci su uzeti iz tablice 4.1.1.

Ovisnost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji dopamina pri 518 nm je linearna. Pravac pokazuje dobru linearnu ovisnost, izraženu koeficijentom determinacije  $R^2$  ( $R^2 = 1,000$ ).

Konstanta brzine drugog reda za reakciju dopamina i DPPH<sup>\*</sup> određena je kao nagib pravca iz eksperimentalno određene konstante brzine pseudo-prvog reda i koncentracije dopamina prema jednadžbi (Jodko-Piorecka i sur., 2022.):

$$k_{\text{obs}} = k \cdot c(\text{dopamin}) + \text{konstanta}$$

Iz nagiba pravca prikazanih grafom na slici 4.1.1. dobivena je konstanta brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$  i koncentraciji HCl  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ :

$$k = 0,513 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$$

Konstanta brzine reakcije drugog reda ( $k$ ) može se odrediti i računski iz izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) i koncentracije dopamina u reakcijskoj smjesi prema jednadžbi:  $k = k_{\text{obs}} / c(\text{dopamin})$ .

Računski određena konstanta brzine reakcije  $k = (0,602 \pm 0,009) \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ s}^{-1}$  pri koncentraciji HCl  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  usporedive je vrijednosti s onom određenom pri  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl što

upućuje na neovisnost vrijednosti konstante brzine o koncentraciji kiseline u reakcijskom mediju.

U smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v), također su izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) pri različitim koncentracijama dopamina i DCl. Podaci su prikazani u Tablici 4.1.2.

**Tablica 4.1.2.** Izmjerene konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) i konstante brzine drugog reda ( $k$ ) za reakciju dopamina i DPPH• radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) pri različitim koncentracijama DCl i dopamina. Vrijednosti konstante brzine drugog reda dobivene su računski:  $k = \overline{k_{obs}} / c(\text{dopamin})$ . ( $t=25^\circ\text{C}$ )

$c(\text{DCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{obs} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$SD \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV/%	$k / \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$
0,001	0,016	0,072	0,072	0,000	0,00	0,045
0,0014	0,016	0,083	0,083	0,000	0,00	0,052
0,003	0,016	0,114	0,114	0,000	0,00	0,071
0,01	0,004	0,089	0,089	0,000	0,00	0,197
	0,01	0,185	0,186	0,001	0,76	
		0,187				
	0,016	0,299	0,291	0,011	3,89	
0,283						

\* $c(\text{DPPH}\cdot) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Iz mjerenja provedenih u smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) utvrđena je ovisnost izmjerene konstante brzine reakcije dopamina i DPPH• o koncentraciji DCl i to na način da se u rasponu koncentracija 0,001 – 0,01 mol dm<sup>-3</sup> konstanta brzine povećala 4,4 puta. Ovakav utjecaj DCl nije očekivan budući da je početna pretpostavka bila da DCl nije reaktant u reakciji. S obzirom da utjecaj DCl na reakciju dopamina i DPPH• nije do kraja istražen u ovim reakcijskim uvjetima, konstante brzine reakcije dopamina i DPPH• u izmjerene u mediju 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) ne mogu se uzeti kao relevantan pokazatelj brzine ove reakcije niti interpretirati u tom smislu.

#### 4.2. REAKCIJA DOPAMINA I DPPH• RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-H<sub>2</sub>O (0,75:0,25 v/v) I 1,4-DIOKSAN-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v)

Istraživanje reakcije dopamina i DPPH• nastavljeno je u nešto polarnijoj reakcijskoj smjesi 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) te se u prvoj fazi ispitao utjecaj različitih koncentracija HCl i DCl na konstantu brzine reakcije.

Kako bi se dobila ovisnost brzine reakcije o koncentraciji kiseline mjere se konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) pri stalnoj koncentraciji dopamina (0,005 mol dm<sup>-3</sup>), dok se koncentracija HCl (DCl) mijenja.

U tablicama 4.2.1. i 4.2.2. i na Slici 4.2.1. prikazane su konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda u uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri stalnoj koncentraciji dopamina i koncentracijama HCl (DCl) u rasponu 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> – 0,015 mol dm<sup>-3</sup>.

**Tablica 4.2.1.** Izmjerene konstante brzine pseudo prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) reakcije dopamina i DPPH• radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri istoj  $c(\text{dopamina})=0,005$  mol dm<sup>-3</sup> i pri različitim koncentracijama HCl. ( $t=25^{\circ}\text{C}$ )

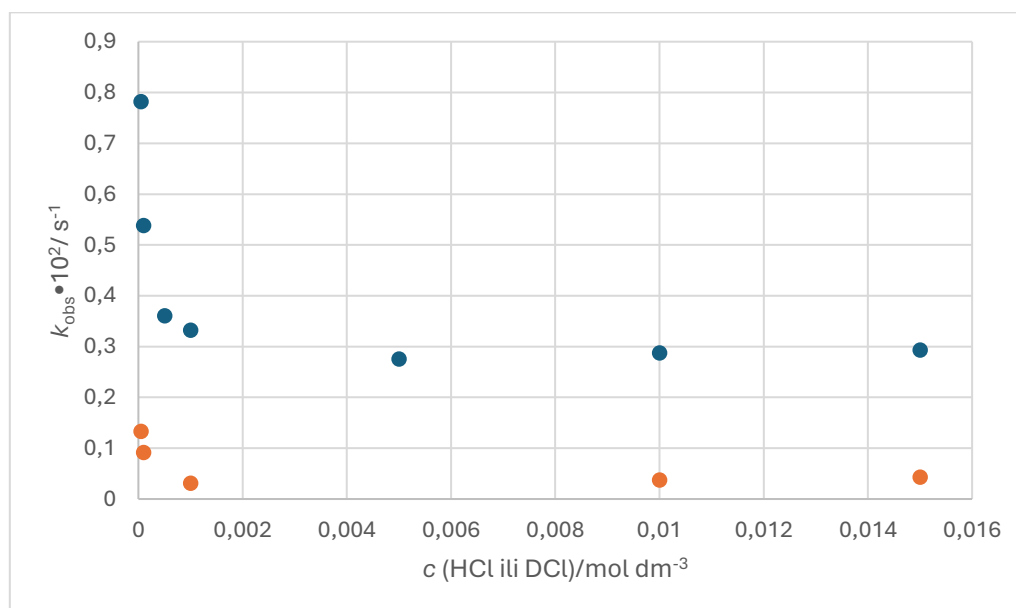
$c(\text{HCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\text{SD} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV / %
0,00005	0,005	0,768	0,782	0,020	2,58
		0,796			
0,0001		0,566	0,538	0,040	7,39
		0,510			
0,0005		0,358	0,360	0,003	0,81
		0,362			
0,001		0,333	0,332	0,001	0,16
		0,332			
0,005		0,274	0,275	0,001	0,26
		0,275			
0,01		0,287	0,287	0,001	0,25
		0,286			
0,015		0,292	0,293	0,002	0,63
		0,295			

\* $c(\text{DPPH}\cdot) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

**Tablica 4.2.2.** Izmjerene konstante brzine pseudo prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri istoj  $c(\text{dopamina})=0,005 \text{ mol dm}^{-3}$  i različitim koncentracijama DCl. ( $t=25^\circ\text{C}$ )

$c(\text{DCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\text{SD} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV / %
0,00005	0,005	0,125	0,133	0,010	7,87
		0,140			
0,0001		0,093	0,091	0,003	2,84
		0,089			
0,001		0,030	0,031	0,001	3,58
		0,032			
0,01		0,039	0,037	0,002	4,18
		0,036			
0,015	0,043	0,043	0,000	0,00	

\* $c(\text{DPPH}^*) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$



**Slika 4.2.1.** Graf ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) o koncentraciji HCl (DCl) u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) (plave točke) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) (crvene točke). Koncentracija DPPH<sup>\*</sup> radikala iznosi  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a mjerenje se izvodilo pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . Podaci su uzeti iz tablice 4.2.1. i 4.2.2.

Iz grafa ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji HCl (DCl) (Slika 4.2.1.), uočava se da je najveća brzina reakcije pri koncentraciji HCl od  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  te se brzina smanjuje s porastom koncentracije HCl. Brzina reakcije najviše se smanjuje u rasponu

koncentracije HCl od  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  i to za faktor 2,7. S obzirom da je s porastom koncentracije kiseline očekivan potpuni prelazak dopamina u oblik kationa, ovo smanjenje brzine reakcije najvjerojatnije je posljedica tog procesa jer čak i mali udjeli molekula u obliku zwitteriona (ionizirana OH skupina) mogu osjetno povećati konstantu brzine. U rasponu koncentracija HCl od  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$  brzina se značajno ne mijenja što također govori u prilog potpunog prelaska dopamina u kationski oblik. U teškoj vodi konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda očekivano su bitno manje, no uočeno je isto ponašanje konstante brzina u odnosu na koncentraciju kiseline, te se u rasponu koncentracija DCl od  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  konstanta brzine smanjila za faktor 3,1.

Daljnijim mjerenjima određene su konstante brzina reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v), uz  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  kiseline te je određen KIE za oba slučaja.

Kako bi se dobila konstanta brzina reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup>, mjerila se konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) pri različitim koncentracijama dopamina uz dodatak  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl (DCl). Izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) prikazane su u tablici 4.2.3., a u tablici 4.2.4. prikazane su konstante brzine reakcije u smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v).

**Tablica 4.2.3.** Izmjerene konstante brzine pseudo prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri različitim koncentracijama HCl. ( $t=25^{\circ}\text{C}$ )

$c(\text{HCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\text{SD} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV / %
0,00005	0,003	0,472	0,504	0,028	5,55
		0,524			
		0,517			
	0,005	0,768	0,782	0,020	2,58
		0,796			
	0,01	0,01	1,50	1,58	0,13
1,73					
1,52					
0,01	0,0025	0,166	0,165	0,001	0,86
		0,164			
	0,005	0,287	0,287	0,001	0,25
		0,286			
	0,01	0,521	0,521	0,000	0,00

\* $c(\text{DPPH}^*) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Konstante brzine reakcija imaju nešto veći koeficijent varijacije (0,25-7,98%) nego u uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v). Ovisnost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji dopamina je linearna u oba slučaja (0,00005 i 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl) što je izraženo koeficijentom determinacije R<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9991 i 0,9999) (Slika 4.2.2. i 4.2.3.).

**Tablica 4.2.4.** Izmjerene konstante brzine pseudo prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u smjesi otapala dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri različitim koncentracijama DCl. ( $t=25^{\circ}\text{C}$ )

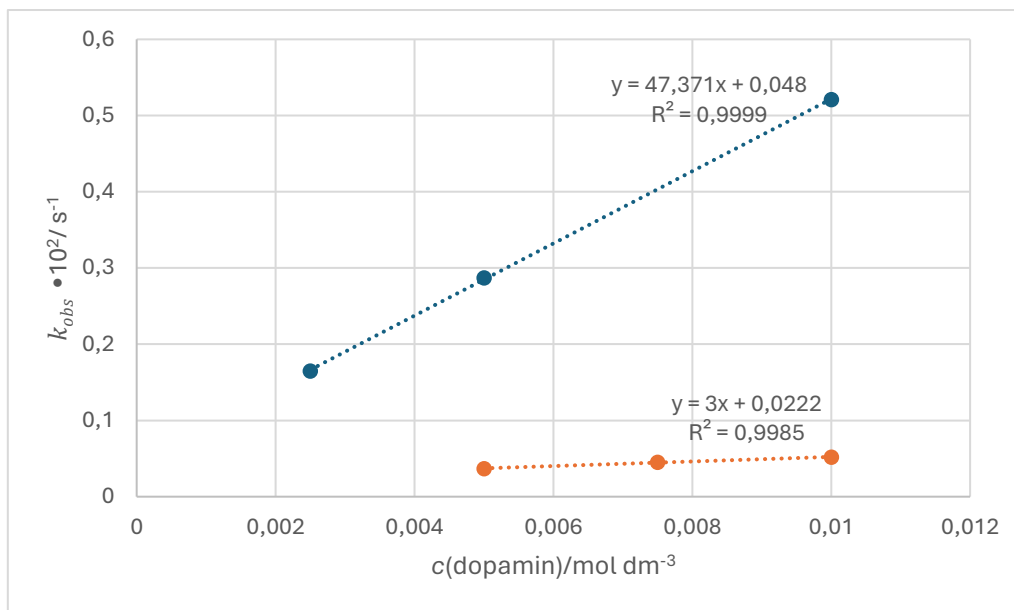
$c(\text{DCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{dopamin}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	$\text{SD} \cdot 10^2 / \text{s}^{-1}$	CV/ %
0,00005	0,003	0,081	0,086	0,007	7,77
		0,090			
	0,005	0,125	0,133	0,010	7,87
		0,140			
	0,01	0,221	0,220	0,001	0,51
		0,219			
0,01	0,005	0,039	0,037	0,002	4,18
		0,036			
	0,0075	0,047	0,045	0,002	5,32
		0,044			
	0,01	0,053	0,052	0,001	1,00
		0,052			

\* $c(\text{DPPH}^*) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

U smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v), konstante brzine reakcija imaju nešto veći koeficijent varijacije (1,00-7,87%) nego u uvjetima 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v). Ovisnost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) o koncentraciji dopamina također je linearna u oba slučaja (0,00005 i 0,01 mol dm<sup>-3</sup> DCl) što je izraženo koeficijentom determinacije R<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9985 i 0,9948) (Slika 4.2.2. i 4.2.3.).

Graf na Slici 4.2.2. prikazuje ovisnost izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda za reakciju dopamina i DPPH<sup>\*</sup> o koncentraciji dopamina pri koncentraciji HCl (DCl) 0,01 mol dm<sup>-3</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v).





**Slika 4.2.2.** Graf ovisnosti srednje vrijednosti konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) o koncentraciji dopamina uz koncentraciju HCl (DCl)  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  u smjesi otapala 1,4-dioksan- $\text{H}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) (plave točke) i 1,4-dioksan- $\text{D}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) (crvene točke). Koncentracija DPPH<sup>\*</sup> radikala iznosi  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a mjereno je pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . Podaci su uzeti iz tablice 4.2.3. i 4.2.4.

Konstante brzine drugog reda u smjesi 1,4-dioksan- $\text{H}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan- $\text{D}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) pri koncentraciji HCl (DCl)  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ , određene su kao nagib pravca grafa ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji dopamina (Slika 4.2.2.) i iznose:

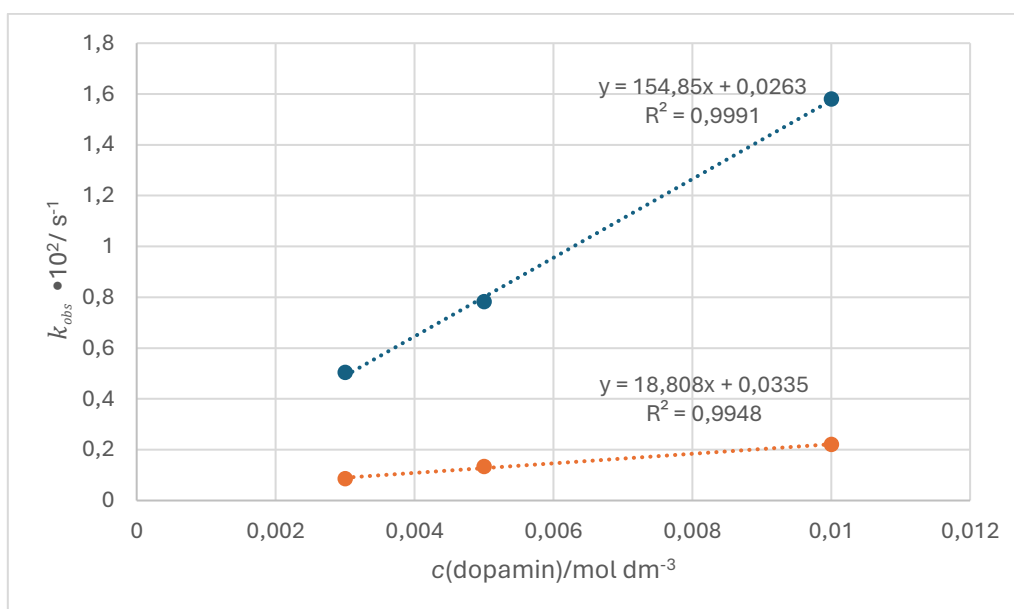
$$1,4\text{-dioksan-}\text{H}_2\text{O} (0,75\text{-}0,25 \text{ v/v}): k_H = 0,474 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

$$1,4\text{-dioksan-}\text{D}_2\text{O} (0,75\text{-}0,25 \text{ v/v}): k_D = 0,030 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Dodatnim mjerenjima utvrđeno je da pri  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl (DCl) u smjesi otapala 1,4-dioksan- $\text{H}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan- $\text{D}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) dolazi do usporedne reakcije između HCl (DCl) i DPPH<sup>\*</sup> u kojoj sama kiselina djeluje kao donor vodika te na taj način reducira DPPH<sup>\*</sup> ometajući pritom reakciju dopamina i DPPH<sup>\*</sup>. Izmjerena konstanta brzine pseudo-prvog reda za ovu reakciju u oba slučaja iznosi  $k_{obs} \approx 0,0002 \text{ s}^{-1}$  (rezultat iz laboratorija) što je usporedivo s vrijednostima konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda dopamina i DPPH<sup>\*</sup>, posebno u slučaju reakcije u 1,4-dioksan- $\text{D}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v). Određivanjem konstante brzine drugog reda reakcije dopamina i DPPH<sup>\*</sup> iz nagiba pravca ovisnosti  $k_{obs}$  o koncentraciji dopamina zanemaruje se doprinos reakcije HCl (DCl) i DPPH<sup>\*</sup>, pri čemu je konstanta brzine ove sporedne reakcije vidljiva iz odsječka pravca. Pri manjim koncentracijama HCl (DCl) doprinos ove reakcije ukupnoj konstanti brzine postaje zanemariv.

Usporedbom konstante brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) uz 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl koja iznosi  $k_H=0,474 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  s onom u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) 0,001 mol dm<sup>-3</sup>  $k_H=0,513 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  može se pretpostaviti da se u oba slučaja reakcija odvija istim mehanizmom, najvjerojatnije iz ionskog para kojeg čine kationski oblik dopamina i Cl<sup>-</sup> ion. U tom slučaju obje su fenolne skupine na dopaminu protonirane i reakcija se događa prijenosom vodika s jedne fenolne skupine dopamina na N atom DPPH<sup>•</sup> radikala.

Graf na Slici 4.2.3. prikazuje ovisnost izmjerene konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda za reakciju dopamina i DPPH<sup>•</sup> o koncentraciji dopamina pri koncentraciji HCl (DCl) 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v).



**Slika 4.2.3.** Graf ovisnosti srednje vrijednosti konstante brzine pseudo-prvog reda ( $k_{obs}$ ) o koncentraciji dopamina uz koncentraciju HCl (DCl) 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) (plave točke) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) (crvene točke) Koncentracija DPPH<sup>•</sup> iznosi  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>, a mjereno je pri temperaturi od 25°C. Podaci su uzeti iz tablice 4.2.3. i 4.2.4.

Iz nagiba pravaca prikazanih na grafu (Slika 4.2.3.) dobivene su konstante brzine drugog reda reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> pri koncentraciji HCl (DCl) 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> u uvjetima:

$$1,4\text{-dioksan-H}_2\text{O (0,75-0,25 v/v): } k_H=1,549 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

$$1,4\text{-dioksan-D}_2\text{O (0,75-0,25 v/v): } k_D=0,188 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

U slučaju reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) uz 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> HCl konstanta brzine iznosi  $k_H=1,549 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  što je ~ 3 puta brže u

odnosu na konstantu uz  $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$ , no ako se uzme u obzir da je konstanta u neutralnom mediju (bez dodatka kiseline) gdje je sigurno dominantno prisutan fenolatni anion (zwitter ion dopamina) oko dva reda veličine brža ( $k_H \sim 100 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ , rezultat iz laboratorija), onda se i u ovom slučaju može zaključiti da reakcija većinski ide iz kationskog oblika dopamina (u slobodnom obliku ili u ionskom paru) uz manje zastupljeni neutralni ili zwitterionski oblik molekule.

Povećanje brzine reakcije između dopamina i DPPH<sup>•</sup> prelaskom u manje kiseli reakcijski medij u skladu je s literaturom. Jodko-Piorecka i sur. (2022.) proučavali su kinetiku kateholamina i DPPH<sup>•</sup> u uvjetima metanol-voda (1-1 v/v) te su primijetili da se povećanjem pH s 5,5 na 7,4 konstanta brzine reakcije kateholamina i DPPH radikala povećava za dva reda veličine, konkretno za dopamin s  $k_{pH 5,5} = (1200 \pm 200) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  na  $k_{pH 7,4} = (170000 \pm 10000) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Takav porast konstante brzine kemijske reakcije objašnjavaju povećanjem udjela koncentracije fenolatnih aniona i brzom prijenosu elektrona s dopamin-aniona na DPPH<sup>•</sup> te je potvrđeno da se reakcija odvija SPLET mehanizmom. Konstante brzine iz navedenog istraživanja koje su čak 5 redova veličine od konstanti izmjerenih u ovom radu također upućuju na značajne razlike mehanizma reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> koje su posljedica različitih pH i polarnosti medija.

#### 4.3. KINETIČKI IZOTOPNI EFEKT U REAKCIJI DOPAMINA I DPPH<sup>•</sup> RADIKALA U SMJESI OTAPALA 1,4-DIOKSAN-VODA (0,75-0,25 v/v)

Iz dobivenih konstanti brzina reakcije  $k_H$  i  $k_D$  izračunat je kinetički izotopni efekt (KIE) pri koncentraciji HCl (DCl)  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti KIE prikazane su u tablici 4.3.1. Kinetički izotopni efekt računa se prema formuli  $KIE = k_H / k_D$  pri čemu je  $k_H$  konstanta brzine reakcije DPPH<sup>•</sup> i dopamina u otapalu 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v), a  $k_D$  je konstanta brzine reakcije DPPH<sup>•</sup> i dopamina kojem su svi lako izmjenjivi protoni (na hidroksilnim skupinama i na amino skupini) zamijenjeni težim izotopom deuterijem (D), u otapalu 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v).

**Tablica 4.3.1.** Konstante brzine drugog reda ( $k_H$  i  $k_D$ ) i KIE reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O, odnosno 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75:0,25 v/v) pri koncentraciji HCl (DCl)  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  pri temperaturi od 25°C.

$c(\text{HCl})$ ili $c(\text{DCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	$k_H / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$k_D / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	KIE
$0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$	1,549	0,188	<b>8,2</b>
$0,01 \text{ mol dm}^{-3}$	0,474	0,030	<b>15,8</b>

S obzirom na vrijednost KIE koji je određen u smjesi otapala 1,4-dioksan-voda (0,75-0,25 v/v) uz 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl(DCl) te iznosi **15,8** i veći je od semiklasično predviđene vrijednosti KIE za OH vezu (Bell, 1980.), može se zaključiti da je prijenos vodika ključan korak u mehanizmu ove reakcije. Vrijednost KIE veća od semiklasično predviđene vrijednosti KIE za OH vezu upućuje na prisutnost kvantno-mehaničkog tuneliranja vodika u ovoj reakciji. KIE određen u uvjetima 1,4-dioksan-voda (0,75-0,25 v/v) uz 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> HCl(DCl) od **8,2** govori u prilog tome da je tuneliranje vodika prisutno u reakciji i u manje kiselim uvjetima. Niža vrijednost KIE u odnosu na onu u reakcijskom mediju s 0,01 mol dm<sup>-3</sup> HCl(DCl) može biti posljedica razlika u ionizacijskim oblicima dopamina u H<sub>2</sub>O u odnosu na D<sub>2</sub>O u manje kiselim uvjetima koji u ovom istraživanju nisu određivani. Mehanizam prijenosa vodika (HAT, PCET ili stupnjeviti PT/ET) u reakciji dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala na temelju ovdje prikazanih eksperimentalnih rezultata ne može se točno utvrditi bez poznavanja termodinamičkih aktivacijskih parametara ove reakcije. U sličnim reakcijama između DPPH<sup>•</sup> radikala i prirodnih fenolnih spojeva s kateholnom skupinom u istom reakcijskom mediju isključen je stupnjeviti PT/ET na temelju određenih aktivacijskih parametara, a potvrđen je PCET mehanizam na temelju računalne analize koja je pokazala da elektron i proton prelaze iz različitih orbitala fenolnog spoja na različite atome DPPH<sup>•</sup> radikala (Torić i sur. 2024). S obzirom da se radi o strukturama sličnim dopaminu i usporedivim vrijednostima konstanti brzine i KIE, može se pretpostaviti da je i u slučaju reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> najvjerojatnije posrijedi sličan PCET mehanizam.

Koliko je poznato, nijedna studija dosad nije određivala KIE za reakciju dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala te se ovdje prikazani rezultati mogu smatrati značajnim doprinosom u razumijevanju mehanizma reakcije dopamina i slobodnih radikala u nepolarnom mediju. Kompleksna reaktivnost dopamina i njegovi antioksidativni učinci nastavit će se istraživati zbog iznimne važnosti ovog neurotransmitera u mnogim biokemijskim reakcijama.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu određene su konstante brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) u kiselom mediju u kojem je dominantno prisutan kationski oblik molekule dopamina te kinetički izotopni efekti (KIE) u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) (0,75-0,25 v/v) uz 0,01 mol dm<sup>-3</sup> i 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> HCl (DCl).

- UV-VIS spektri dopamina snimljeni u vodenoj otopini, u kiselom i neutralnom pH imaju maksimum apsorpcije na 280 nm, dok se u bazičnom pH maksimum apsorpcije pomiče prema većim valnim duljinama (300 nm) te se javlja novi pik na 430-450 nm što ukazuje na prisutnost različitih ionizacijskih oblika dopamina, ali i nastanak autooksidacijskih produkata.
- Određena je konstanta brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) pri različitim koncentracijama HCl. Konstanta brzine drugog reda reakcije dopamina i DPPH pri koncentraciji HCl od 0,001 mol dm<sup>-3</sup> iznosi  **$k=0,513 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** , a pri koncentraciji HCl od 0,01 mol dm<sup>-3</sup> iznosi  **$k=0,602 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** . Dobivene konstante brzine usporedive su, stoga ne ovise o koncentraciji HCl. Za razliku od toga, konstante brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> određivane u smjesi otapala 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v) u rasponu koncentracija DCl 0,001 – 0,01 mol dm<sup>-3</sup>, promijenile su se za 4,4 puta - konstanta brzine reakcije ovisi o koncentraciji DCl, što može biti objašnjeno reakcijom između DPPH<sup>•</sup> radikala i same kiseline.
- Određene su konstante brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri koncentracijama HCl (DCl) od 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> do 0,015 mol dm<sup>-3</sup>. Uočeno je da je najveća brzina reakcije pri koncentraciji HCl od 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> te da se brzina smanjuje kako raste koncentracija HCl i to tako da najviše pada u rasponu HCl 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> do 0,001 mol dm<sup>-3</sup>, dok se u rasponu koncentracija HCl od 0,001 mol dm<sup>-3</sup> do 0,015 mol dm<sup>-3</sup> brzina značajno ne mijenja. U teškoj vodi uočen je isti trend smanjenja brzine reakcije porastom koncentracije DCl. Određena je konstanta brzine reakcije dopamina i DPPH<sup>•</sup> u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,75-0,25 v/v) pri koncentraciji HCl (DCl) 0,01 mol dm<sup>-3</sup>. Konstanta brzine drugog reda u smjesi 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O iznosi  **$k_H=0,474 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** , a u smjesi 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O iznosi  **$k_D=0,030 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** .
- Pri koncentraciji HCl (DCl) 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> konstanta brzine drugog reda u smjesi 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O iznosi  **$k_H=1,549 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$** , a u smjesi 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O iznosi  **$k_D=0,188$**

$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ . Iako je ova konstante brzine  $\sim 3$  puta veća u odnosu na onu uz  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ , zaključeno je da u oba slučaja reakcija ide dominantno iz kationskog oblika dopamina, tj. najvjerojatnije iz ionskog para kationa dopamina i kloridnog iona.

- KIE izmjeren u smjesi otapala 1,4-dioksan- $\text{H}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan- $\text{D}_2\text{O}$  (0,75-0,25 v/v) pri koncentraciji HCl (DCl) od  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  iznosi **15,8**, dok pri koncentraciji HCl (DCl)  $0,00005 \text{ mol dm}^{-3}$  iznosi **8,2**. Vrijednosti KIE odstupaju od semiklasično predviđenih za OH vezu što upućuje da je ključni korak u mehanizmu reakcije prijenos vodika (najvjerojatnije PCET mehanizam). Također, ove vrijednosti KIE upućuju i na prisutnost fenomena tuneliranja. Za detaljnije razumijevanje mehanizma ove reakcije kao i za potvrdu tuneliranja vodika potrebno je odrediti termodinamičke aktivacijske parametre u reakciji dopamina i DPPH $\cdot$ .

## 6. POPIS OZNAKA I SIMBOLA

3-MT – 3-metoksitiramin

ADHD – poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (engl. *Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*)

COMT – katehol-O-metiltransferaza

CV – koeficijent varijacije (engl. *Coefficient of Variation*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

DOPAC – 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina (engl. *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*)

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ET – prijenos elektrona (engl. *Electron Transfer*)

GPCR – receptori spregnuti s G-proteinom (engl. *G Protein Coupled Receptors*)

HAT – reakcija prijelaza atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*)

HVA – homovanilinska kiselina(engl. *Homovanillic acid*)

KIE – kinetički izotopni efekt

MAO – monoaminooksidaza

PCET – reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona (engl. *Proton Coupled Electron Transfer*)

RAF - stvaranje adukta radikala (engl. *Radical Adduct Formation*)

RNS – reaktivni spojevi dušika (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROS – reaktivni spojevi kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SD – standardna devijacija

SEPT - reakcija stupnjevitog prijenosa elektrona i protona (engl. *Single Electron Transfer Followed by Proton Transfer*)

SET - reakcija prijenosa elektrona (engl. *Single Electron Transfer*)

SPLET - reakcija stupnjevitog prijelaza protona i elektrona (engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*)

SPLHAT - reakcija stupnjevitog prijelaza protona i prijelaza atoma vodika (engl. *Sequential Proton-Loss Hydrogen-Atom Transfer*)

SŽS – središnji živčani sustav

UV – ultraljubičasta svjetlost (engl. *Ultraviolet*)

VIS – vidljiva svjetlost (engl. *Visible*)

VMAT – vezikularni monoaminski transporter

ZPE – energija nulte točke (engl. *Zero-Point Energy*)



## 7. LITERATURA

Anslyn EV, Dougherty DA. Modern Physical Organic Chemistry. Sausalito CA, University Science Books, 2006, str. 421-438.

Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practice case. *Tr Food Sc Tehnol*, 2000, 11(11), 419–421.

Atkins P, de Paula J. Atkins Physical Chemistry. 8. izdanje. New York, WH Freeman and Company, 2006, str. 432-433, 794-804, 808-809, 816.

Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat*, 2016, 2(2).

Bach-Rojecky L. Dopamin i dopaminergički lijekovi. *Farm Glas*, 1998, 54, 243-258.

Bell RP. The Tunnel Effect in Chemistry. New York, Springer New York, 1980, str. 1-5, 77-84.

Berfield JL, Wang LC, Reith MEA. Which form of dopamine is the substrate for the human dopamine transporter: The cationic or the uncharged species?. *J Biol Chem*, 1999, 274, 4876–4882.

Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 1958, 181(4617), 1199-1200.

Bradamante V. Mjesto i uloga vitamina u životu suvremenog čovjeka. *Medicus*, 2002, 11, 101-111.

Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51, 15-25.

Contreras-Guzmán ES, Strong FC. Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. *J Assoc Off Anal Chem*, 1982, 65(5), 1215-1221.

Cosentino M, Rasini E, Colombo C, Marino F, Blandini F, Ferrari M, Samuele A, Lecchini S, Nappi G, Frigo G. Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radical Biol Med*, 2004, 36(10), 1233–1240.

Cvitaš T. Fizikalna kemija - rukopis knjige u pripremi. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 20xx.

Ćuk M, Ćuk Đ, Dvornik Š, Mamula O, Matanić Manestar M. Novije spoznaje o fiziološkim svojstvima i učincima bubrežnog dopamina. *Liječ Vjesn*, 2004, 126, 147-155.

Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH assay, n.d.,  
<https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>, pristupljeno 24.5.2024.

Dimić D, Milenković D, Marković JD, Marković Z. Antiradical activity of catecholamines and metabolites of dopamine: theoretical and experimental study. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(20), 12970-12980.

Drozak J, Bryła J. Dopamina--nie tylko neuroprzeakaźnik [Dopamine: not just a neurotransmitter]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2005, 59, 405-420.

Elsworth JD, Roth RH. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 1997, 144(1), 4-9.

Falamaş A, Petran A, Hada AM, Bende A. Dopamine Photochemical Behaviour under UV Irradiation. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10), 5483.

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 145-148.

Foti MC, Daquino C, Geraci C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. *J Org Chem*, 2004, 69(7), 2309-2314.

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.

Foti MC, Daquino C. Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the dpph radical. *Chem Commun*, 2006, 30, 3252-3254.

Foti MC. Use and Abuse of the DPPH Radical. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40), 8765-8776.

Franco R, Reyes-Resina I, Navarro G. Dopamine in Health and Disease: Much More Than a Neurotransmitter. *Biomedicines*, 2021, 9(2), 109.

Galano A, Mazzone G, Alvarez-Diduk R, Marino T, Alvarez-Idaboy JR, Russo N. Food Antioxidants: Chemical insights at the molecular level. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016, 7(1), 335-352.

German CL, Baladi MG, McFadden LM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev*, 2015, 67(4), 1005-1024.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 2001, 40(8), 959-975.

Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008, str. 308-310.

Jodko-Piórecka K, Sikora B, Kluzek M, Przybylski P, Litwinienko G. Antiradical Activity of Dopamine, L-DOPA, Adrenaline, and Noradrenaline in Water/Methanol and in Liposomal Systems. *J Org Chem*, 2022, 87(3), 1791-1804.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(4), 412-422.

Kiss T, Gergely A. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives, III. Equilibrium study of parent and some mixed ligand complexes of dopamine, alanine and pyrocatechol with nickel(II), copper(II) and zinc(II) ions. *Inorg Chim Acta*, 1979, 36, 31-36.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1), 8-17.

Lee KH, Cha M, Lee BH. Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19), 7152.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4(8), 118-126.

Mladinov M. Raspodjela i izraženost dopaminskih D2 receptora u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša (Disertacija). Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.

Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine oxidation and autophagy. *J Parkinson's Dis*, 2012, 2012:920953.

Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in Determining antioxidant Activity: a review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7).

Murray AJ, Rogers JC, Katsu MZUH, Liddle PF, Upthegrove R. Oxidative stress and the pathophysiology and symptom profile of schizophrenia spectrum disorders. *Front Psychiatry*, 2021, 12.

Musialik M, Kuzmich 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.

Nagy PI, Takács-Novák K. Theoretical and Experimental Studies of the Zwitterion  $\rightleftharpoons$  Neutral Form Equilibrium of Ampholytes in Pure Solvents and Mixtures. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(21), 4999–5006.

Nenadis N, Tsimidou M. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) tests. *J Amer Oil Chem Soc*, 2002, 79, 1191–1195.

Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 1996, 16(2), 436-447.

Ostojić D. PRVA EPIZODA SHIZOFRENIJE – VAŽNOST RANOG OTKRIVANJA BOLESTI: ŠTO O TOME TREBAJU ZNATI SOCIJALNI RADNICI? *Ljetopis socijalnog rada*, 2012, 19 (1), 53-72.

Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci*, 2003, 68(2), 487-490.

Pagliara A, Carrupt PA, Caron G, Gaillard P, Testa B. Lipophilicity profiles of ampholytes. *Chem Rev*, 1997, 97(8), 3385-3400.

Parčetić-Kostelac I, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T, Jozinović A. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016, 70(2), 71-92.

Pilepić V. Upute za vježbe praktikuma iz Fizikalne kemije II – Interna skripta za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.

Rajan KS, Davis JM, Colburn RW. METAL CHELATES IN THE STORAGE AND TRANSPORT OF NEUROTRANSMITTERS: INTERACTIONS OF METAL IONS WITH BIOGENIC AMINES1. *J Neurochem*, 1971, 18(3), 345-364.

Rekarska B, Hristov G, Stanimirov S, Velkov Z, Mandjukov P, Radoev B. Preliminary study of the kinetics of the reaction between antioxidants and test radical – DPPH. FMNS2013, Blagoevgrad, 2013, 59-64.

Salomäki M, Marttila L, Kivelä H, Ouvinen T, Lukkari J. Effects of pH and oxidants on the first steps of polydopamine formation: a thermodynamic approach. *J Phys Chem*, 2018, 122(24), 6314-6327.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichganz J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, 2000, 267(16), 4904–4911.

Sen A, Kohen A. Enzymatic tunneling and kinetic isotope effects: chemistry at the crossroads. *J Phys Org Chem*, 2010, 23(7), 613-619.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 1997, 82(2), 291-295.

Staško A, Brezová V, Biskupič S, Mišić V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Res*, 2007, 41(4), 379-390.

Sueishi Y, Hori M, Kita M, Kotake Y. Nitric oxide (NO) scavenging capacity of natural antioxidants. *Food Chem*, 2011, 129 (3), 866-870.

Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. LIPIDNA PEROKSIDACIJA - UZROCI I POSLJEDICE. *Medicina Fluminensis*, 2007, 43(2), 84-93.

Štraus B, Plavšić V. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišće D, Čepelak I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, 360-361.

Tandarić T. Kinetički izotopni efekt – računalni pristup (Kemijski seminar). Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Tomišić V, Preočanin T, Kallay N. Osnove fizikalne kemije (Predavanja). Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011, str. 75-78.

Torić J, Karković Marković A, Mustać S, Pulitika A, Jakobušić Brala C, Pilepić V. Proton-coupled electron transfer and hydrogen tunneling in olive oil phenol reactions. *Int J Mol Sci*, 2024, rukopis predan za objavljivanje.

Troadec JD, Marien M, Darios F, Hartmann A, Ruberg M, Colpaert F, Michel PP. Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochem*, 2001, 79, 200-210.

UV Vis spektroskopija: Osnove mjerenja, n.d.,  
[https://www.mt.com/hr/hr/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/hr/hr/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html), pristupljeno 21.5.2024.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266(1-2), 37-56.

Waddington JL. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. *Lancet*, 1993, 341(8844), 531-532.

Wade, LG. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 693-700.

Wiernsperger N. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*, 2003, 29(6), 579-585.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. SAŽETAK

Dopamin, kao pripadnik skupine kateholamina, djeluje kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (SŽS) i hormon izvan SŽS. Poremećaji dopaminskog sustava mogu dovesti do raznih bolesti, na primjer Parkinsonove bolesti, shizofrenije, esencijalne hipertenzije. Važnu ulogu u patogenezi tih bolesti ima oksidativni stres. Molekule koje sadrže kateholnu skupinu dobri su antioksidansi, a budući da je kateholna skupina sastavni dio kateholamina, oni imaju važnu ulogu u obrani SŽS protiv slobodnih radikala. Reakcija dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala u ovom je radu korištena kao model reaktivnosti dopamina prema slobodnim radikalima. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati kinetiku reakcije dopamina s DPPH<sup>•</sup> te odrediti konstante brzine i kinetički izotopni efekt (KIE) u svrhu boljeg razumijevanja mehanizma reakcije. Odredile su se konstante brzine reakcije u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) u kiselom mediju u kojem je dominantno prisutan kationski oblik molekule dopamina. Iz dobivenih konstanti brzina reakcije određen je KIE u uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) (0,75-0,25 v/v) koji pri koncentraciji HCl (DCl) od 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> iznosi 8,2, dok pri koncentraciji HCl (DCl) od 0,01 mol dm<sup>-3</sup> iznosi 15,8. Vrijednosti izmjerenog KIE odstupaju od semiklasično predviđenih vrijednosti za OH vezu što upućuje da je ključni korak u mehanizmu reakcije u ovim uvjetima prijenos vodika s kateholne skupine dopamina na N atom DPPH<sup>•</sup> radikala. Također, ove vrijednosti KIE upućuju na prisutnost fenomena tuneliranja vodika u reakciji dopamina i DPPH<sup>•</sup> radikala u pretežno nepolarnom reakcijskom mediju.



## 8.2. SUMMARY

Dopamine, as catecholamine, acts as a neurotransmitter in the central nervous system (CNS) and as a hormone outside the CNS. Disorders of the dopamine system can lead to various diseases such as Parkinson's disease, schizophrenia and essential hypertension. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of these diseases. Molecules containing a catechol group are good antioxidants, and since the catechol group is an integral part of catecholamines, they play an important role in defending the CNS against free radicals. The reaction of dopamine and DPPH<sup>•</sup> radical in this study was used as a model for dopamine's reactivity towards free radicals. The aim of this thesis is to examine the kinetics of the reaction of dopamine with DPPH<sup>•</sup> and to determine the rate constants and the kinetic isotope effect (KIE) to better understand the reaction mechanism. The rate constants of the reaction were determined in solvent mixtures of 1,4-dioxane-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v and 0,75-0,25 v/v) and 1,4-dioxane-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v and 0,75-0,25 v/v) in an acidic medium where the cationic form of the dopamine molecule is predominantly present. From the obtained rate constants of the reaction, the KIE was determined under the conditions of 1,4-dioxane-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) (0,75-0,25 v/v). KIE at an HCl (DCl) concentration of 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> is 8,2, while at an HCl(DCl) concentration of 0,01 mol dm<sup>-3</sup> it amounts 15,8. The measured KIE values deviate from the semiclassical predicted values for the OH bond, indicating that the key step in the reaction mechanism under these conditions is hydrogen transfer from the catechol group of dopamine to the N atom of the DPPH<sup>•</sup> radical. Additionally, these KIE values suggest the presence of the hydrogen tunneling in the reaction between dopamine and the DPPH<sup>•</sup> radical in a predominantly nonpolar reaction medium.

## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Kinetički izotopni efekt u reakciji dopamina i DPPH radikala u kiselom mediju

Luka Košir

### SAŽETAK

Dopamin, kao pripadnik skupine kateholamina, djeluje kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (SŽS) i hormon izvan SŽS. Poremećaji dopaminskog sustava mogu dovesti do raznih bolesti, na primjer Parkinsonove bolesti, shizofrenije, esencijalne hipertenzije. Važnu ulogu u patogenezi tih bolesti ima oksidativni stres. Molekule koje sadrže kateholnu skupinu dobri su antioksidansi, a budući da je kateholna skupina sastavni dio kateholamina, oni imaju važnu ulogu u obrani SŽS protiv slobodnih radikala. Reakcija dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u ovom je radu korištena kao model reaktivnosti dopamina prema slobodnim radikalima. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati kinetiku reakcije dopamina s DPPH<sup>\*</sup> te odrediti konstante brzine i kinetički izotopni efekt (KIE) u svrhu boljeg razumijevanja mehanizma reakcije. Odredile su se konstante brzine reakcije u smjesi otapala 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) i 1,4-dioksan-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v i 0,75-0,25 v/v) u kiselom mediju u kojem je dominantno prisutan kationski oblik molekule dopamina. Iz dobivenih konstanti brzina reakcije određen je KIE u uvjetima 1,4-dioksan-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) (0,75-0,25 v/v) koji pri koncentraciji HCl (DCl) od 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> iznosi 8,2, dok pri koncentraciji HCl (DCl) od 0,01 mol dm<sup>-3</sup> iznosi 15,8. Vrijednosti izmjerenog KIE odstupaju od semiklasično predviđenih vrijednosti za OH vezu što upućuje da je ključni korak u mehanizmu reakcije u ovim uvjetima prijenos vodika s kateholne skupine dopamina na N atom DPPH<sup>\*</sup> radikala. Također, ove vrijednosti KIE upućuju na prisutnost fenomena tuneliranja vodika u reakciji dopamina i DPPH<sup>\*</sup> radikala u pretežno nepolarnom reakcijskom mediju.

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

Rad sadrži: 52 stranica, 17 grafičkih prikaza, 7 tablica i 67 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: dopamin, DPPH, konstanta brzine reakcije, kinetički izotopni efekt, tuneliranje vodika

Mentor: **Dr. sc. Ana Karković Marković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Karković Marković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Monika Barbarić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Cvijeta Jakobić Brala**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Kinetic isotope effect in the reaction of dopamine and DPPH radical in an acidic medium

Luka Košir

#### SUMMARY

Dopamine, as catecholamine, acts as a neurotransmitter in the central nervous system (CNS) and as a hormone outside the CNS. Disorders of the dopamine system can lead to various diseases such as Parkinson's disease, schizophrenia and essential hypertension. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of these diseases. Molecules containing a catechol group are good antioxidants, and since the catechol group is an integral part of catecholamines, they play an important role in defending the CNS against free radicals. The reaction of dopamine and DPPH<sup>•</sup> radical in this study was used as a model for dopamine's reactivity towards free radicals. The aim of this thesis is to examine the kinetics of the reaction of dopamine with DPPH<sup>•</sup> and to determine the rate constants and the kinetic isotope effect (KIE) to better understand the reaction mechanism. The rate constants of the reaction were determined in solvent mixtures of 1,4-dioxane-H<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v and 0,75-0,25 v/v) and 1,4-dioxane-D<sub>2</sub>O (0,95-0,05 v/v and 0,75-0,25 v/v) in an acidic medium where the cationic form of the dopamine molecule is predominantly present. From the obtained rate constants of the reaction, the KIE was determined under the conditions of 1,4-dioxane-H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) (0,75-0,25 v/v). KIE at an HCl (DCI) concentration of 0,00005 mol dm<sup>-3</sup> is 8,2, while at an HCl(DCl) concentration of 0,01 mol dm<sup>-3</sup> it amounts 15,8. The measured KIE values deviate from the semiclassical predicted values for the OH bond, indicating that the key step in the reaction mechanism under these conditions is hydrogen transfer from the catechol group of dopamine to the N atom of the DPPH<sup>•</sup> radical. Additionally, these KIE values suggest the presence of the hydrogen tunneling in the reaction between dopamine and the DPPH<sup>•</sup> radical in a predominantly nonpolar reaction medium.

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

Thesis includes: 52 pages, 17 figures, 7 tables and 67 references. Original is in Croatian language.

Keywords: dopamine, DPPH, rate constant, kinetic isotope effect, hydrogen tunneling

Mentor: **Ana Karković Marković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Karković Marković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Monika Barbarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2024.